

differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res*, 2000, 60(22): 6248-6252.

14 Rogulski KR, Wing MS, Paielli DL, et al. Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent -lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization.

*Hum Gene Ther*, 2000, 11(1): 67-76.

15 郭善禹, 顾琴龙, 刘炳亚, 等. CD 基因联合mIL-2/mGM-CSF 基因治疗胃癌的研究, *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2000, 7(3): 191-194.

(收稿日期: 2006-04-11)

·临床放射医学·

## 干细胞移植的磁性标记及磁共振成像活体示踪

周翠屏 沈君 梁碧玲

**【摘要】** 干细胞移植的临床应用需要解决植入活体内干细胞在体内存活、迁移及分化的监测问题。通过对干细胞进行顺磁性标记, 磁共振成像(MRI)能够在活体上显示标记的干细胞, 并进行特异性地追踪及定位, 是目前干细胞活体示踪极具前景的方法。干细胞进行磁性标记主要利用铁类或钆类对比剂, 两者各有优缺点。利用铁类或钆类对比剂标记干细胞并进行 MRI 活体监测取得了成功。并在心脑血管缺血损伤的疾病模型中得到应用, 但在干细胞磁性标记的载体选用及其标记率、标记的持久性、标记对细胞活力及遗传性状方面尚存在一定的问题。

**【关键词】** 造血干细胞移植; 磁共振成像; 磁性标记; 示踪; 活体内

**【中图分类号】** R445.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2006)04-0253-04

### Magnetic labelling of transplanted stem cells and in vivo tracking with magnetic resonance imaging

ZHOU Cui-ping, SHEN Jun, LIANG Bi-ling

(Department of Radiology, Zhongshan University of the Second Affiliated Hospital, Guangzhou 510120, China)

**【Abstract】** How to monitor and track the survival, migration and differentiation of grafted stem cell in vivo is necessary for the widespread clinically application of stem cell transplantation. Magnetic resonance imaging(MRI), which can display and specifically track and localize labelled stem cell by paramagnetically labelling of the stem cell, is an extremely prospective method to monitor stem cell in vivo. The ferrum and gadolinium derviative contrast agents were mainly used to paramagnetically label the stem cell, and each had its own advantages and disadvantages. Currently, on the basis of paramagnetically labelling of the stem cell with ferrum and gadolinium derviative contrast agents, MRI had been successfully used to monitor the stem cell in vivo and had been applied into animal model of the heart and brain stroke, but these are still some problems exist such as the selection of vehicle transferring the contrast agents into stem cells, the labeling efficiency, the duration of labelling and the viability and heredity changes of the stem cell after labelling.

**【Key words】** Hematopoietic stem cell transplantation; Magnetic resonance imaging; Magnetic labeling; Tracking; In vivo

干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞, 根据来源可分为胚胎干细胞和成体干细胞。大

量的动物实验研究表明, 干细胞移植在神经系统的损伤和中枢神经系统退行性变疾病、心肌梗死、血液病等方面的治疗取得了可喜的效果, 显示了不可估量的应用前景。但是, 干细胞广泛应用于临床尚需解决较多问题, 其中关键的是如何监测移植的干细胞在体内存活、迁移及分化情况。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30400115); 广东省自然科学基金博士启动项目(04300241)

作者单位: 510120 广州, 中山大学第二附属医院放射科

通讯作者: 沈君(E-mail: vencentsj@tom.com)

目前,对于干细胞移植后的监测多采用细胞体外标记示踪剂后再移植体内的方法,如:①遗传性地改变细胞的基因,使其表达特异性的标志物,如绿色荧光蛋白、 $\beta$ 半乳糖苷酶等;②选用雄性供体和雌性宿主,利用Y染色体作为标志物;③利用染料标记细胞;④移植前用5-溴-2-脱氧尿苷或脱氧胸苷来监测正在分裂的细胞。以上方法的缺点是如监测干细胞体内的迁移必须在离体状态下进行组织切片分析,为创伤性、毁灭性方法,临床上难以应用于人体。MRI具有亚细胞水平分辨率、良好的软组织分辨率的成像方法,且为无创伤性、无电离辐射,十分适合于对标记的干细胞在活体上进行识别、特异性地追踪及定位,给干细胞移植治疗的临床应用带来新的应用前景。

## 1 MRI 标记物的种类

### 1.1 以单晶体或多晶体氧化铁为基础的对比剂

主要产生较强的T2负性对比效应。其特点是颗粒直径小,穿透力强,且具有生物可降解性,能被细胞代谢后进入正常血浆铁池,与血红蛋白结合或用于其他代谢过程。其基本结构是以葡聚糖包裹氧化铁颗粒而获得,根据直径的大小分为超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)、超小超顺磁性氧化铁(ultrasmall superparamagnetic iron oxide, USPIO)、单晶氧化铁纳米复合物(monocrystalline iron oxide nanocompound, MION),其都能够被干细胞吞噬,因此可被用于追踪监测微量的干细胞。普通SPIO直径大于50 nm,USPIO直径小于或等于50 nm,MION直径为(2.8±9)nm。

2001年Bulte等<sup>[1]</sup>发明了一种高度非特异性的细胞内磁性探针MD-100,这是一种构建于细胞转染试剂Dendrimer基础上的SPIO。MD-100呈高度顺磁性,它不依赖于膜受体的结合,可以被广泛用于哺乳类动物细胞的标记,包括胚胎干细胞、间充质干细胞(mesendrymal stem cell, MSC)和神经干细胞等,研究发现,MD-100标记细胞是一个不可逆的过程,MD-100至少在细胞内存在1周以上,MD-100对细胞的增殖、分化和活力等几乎没有影响。目前MD-100没有商品化,也未进入临床研究阶段。用三氧化二铁( $Fe_2O_3$ )标记细胞已有很多成功报道,如Charlotte等<sup>[2]</sup>用 $Fe_2O_3$ 毫微型颗粒标记鼠平滑肌细胞,细胞的标记率很高,且对细胞活力、分

化能力、凋亡没有影响。

MION-46L是USPIO颗粒与葡聚糖交联(cross-linking dextran, CLIO)及与短的人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)反式激活蛋白(trans-activator, Tat)结合形成MION-Tat或CLIO-Tat, MION-46L可以与膜受体特异性结合并内化进入细胞内,但Tat对细胞核有亲和力,在CLIO-Tat颗粒的生物降解过程中,并可能会暂时释放,激活的铁将通过魏斯反应(Weiss reaction)催化羟基,引起脂类过氧化,形成脂过氧化氢结合物,这些结合物能破坏膜的结构和功能,细胞核内的蛋白质与DNA同样受到破坏。Mathias等<sup>[3]</sup>将USPIO磁性粒子与FuGENE(一种非脂质体型转染试剂)在无血清的Dulbecco极限必需培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)中共同孵育30 min,使FuGENE包裹在USPIO磁性粒子表面,这种复合粒子更容易使磁性粒子通过融合进入细胞内,而不需要抗体、受体的参与,并用这种复合粒子来标记鼠神经干细胞,将神经干细胞移植入脑缺血模型的大鼠健侧半球,在MRI上观察到了移植细胞向缺血部位移行的路线。MION经处理被一层低分子右旋糖酐包被,与人转铁蛋白(transferrin, Tf)共价结合形成Tf-MION颗粒,以基因工程修饰过的转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)基因为报告基因,使靶细胞高度表达TfR,细胞结合并内吞Tf的量增加,与之相连的MION结合进入细胞的量也相应增加。目前MION尚处于实验开发阶段。

### 1.2 Gd类对比剂

主要产生T1正性对比效应,对T2加权影响小。Modo等<sup>[4]</sup>应用右旋糖酐聚合物连接的Gd-DTPA与罗丹明复合物(gadoliniumrhodaminedextran, GRID),可同时提供MR和荧光组织显像,将之标记永生化小鼠神经干细胞MHP36细胞后,移植至脑缺血大鼠的海马后进行4.7T MR离体成像,证实MR能可靠分辨移植细胞以及示踪细胞迁移。最近Vuu等<sup>[5]</sup>成功地应用一种新的双重标记的毫微型颗粒标记肿瘤细胞并进行活体示踪,这种Gd-罗丹明毫微型颗粒由脂质体与丁二炔结合并进行声波降解及光分解而形成聚合体,这种聚合体可以高效标记细胞,所标记的细胞可被MRI及视像监测,还有进行活组织检查时可以经荧光显微镜观察到所标记细胞;并且可以改变荧光基团和靶因子而用于研究不同的细

胞, 如干细胞、免疫细胞等。

Fe类及Gd类对比剂作为细胞内磁性标记物各有优缺点。对比研究表明, 铁颗粒主要位于溶酶体内, 铁标记细胞的优势在于所需的培养液铁浓度只需25 mg/L, 细胞内铁可高达20 pg/细胞, 即可达到T2加权上明显负性增强效应, 其缺点是必须用转染因子作为载体(当前能运用于人类细胞的载体仅为Tf与脂质体<sup>[7]</sup>, 在实验室严格的合成<sup>[8]</sup>); 且Fe标记的干细胞由于其内的氧化铁不断降解, 随着时间推延T2\*加权负性增强效应逐渐减弱; 而Fe标记细胞还需进行普鲁士蓝染色或X-半乳糖染色或电子显微镜来观察证实细胞的体内存活情况。目前以Gd<sup>3+</sup>为基础的对比剂在干细胞标记中的应用报道不多, 因为在目前应用的1.5T MR磁场强下, 对比剂颗粒中的Gd<sup>3+</sup>的量要达到相当程度才能够被探测到, 而这在技术上有一定的难度。另外, Gd<sup>3+</sup>潜在的毒性也限制了其应用, 但Gd与DTPA或DOTA螯合后其毒性明显降低, 1987年美国FDA批准Gd-DTPA应用于临床。用作细胞内磁性标记物时, Gd主要游离于细胞质或高尔基体附近, 在细胞内不能降解, 其T1加权正性增强作用能持续保持<sup>[7]</sup>。Modo等<sup>[9]</sup>直接利用GRID, 既可因Gd的顺磁性效应而为MRI所检测, 也可因罗丹明能在荧光显微镜下观察到标记的细胞而从组织学上直接显示标记细胞, 无需借助免疫组化方法来证实。

## 2 磁性标记中存在的问题

### 2.1 各种顺磁性物质的标记载体及其标记率

用于标记的顺磁性的Fe和Gd在自然状态并不能有效地被哺乳动物细胞(如T细胞和吞噬细胞本身具有吞噬作用以外的其他大多数细胞)摄取, 因此为达到磁性标记细胞的目的, 必须通过载体, 通过吞噬作用、液相胞饮作用、受体介导的吞噬作用和转染作用促进细胞对它们的摄取。目前载体有: ①镶嵌于细胞膜的单克隆抗体, 它广泛应用于运输靶向药物经细胞膜进入细胞, 也可用于运输造影剂。这种方法的缺点是种族特异性, 优点是能在混杂的细胞群中辨认特定的细胞亚群。②镶嵌于细胞膜的肽链代替单克隆抗体, 例如人免疫缺陷病毒反式激活蛋白(human immunodeficiency virus trans-activator, HIV Tat), 它含有膜性转移标记, 可有效地把氧化铁颗粒转入细胞内, 进一步的转入

可以到达细胞核而非内涵体。这种方法的缺点是可用的肽链较少。③用带有正电荷分子携带带有负电荷的DNA穿梭细胞膜性结构, 这一模式也可应用于细胞对造影剂颗粒的摄取。Frank等<sup>[9]</sup>的方法是采用多种带正电荷的转染剂(transfection agents, TA), 例如多聚赖氨酸(poly-L-Lysine, PLL)<sup>[7]</sup>、硫酸鱼精蛋白(protamine, PRO)<sup>[8]</sup>等, 通过静电相互作用包裹多种氧化铁颗粒, 使带负电荷的细胞通过非特异性膜表面吸收, 促进标记物摄入细胞内, 而细胞本身保持原来的生物特性, 且一样在体内迁徙。这种标记方法相对简单易行而且高效, 如Frank等<sup>[9]</sup>用Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-TA或MION-46L-TA标记细胞, 标记率接近100%。Arbab等<sup>[9]</sup>用PRO与Fe的复合物标记MSC, 标记率约100%。这种方法所用制剂如PLL、PRO在美国都是FDA已获准使用的, 标记后的细胞只要数千个就能在MR成像并示踪这些细胞的迁徙。此种方法为非特异性, 可广泛应用于各种哺乳动物(小鼠、大鼠、人)细胞的标记, 且大多采用1.5T临床应用型MR机即可进行显像。最近Vuu等<sup>[9]</sup>成功地应用由脂质体与丁二炔结合并进行声波降解及光分解而形成Gd-罗丹明毫微型颗粒, 可以高效标记细胞, 并且可以改变荧光基团和靶因子而用于研究不同的细胞。④Wilhelm等<sup>[10]</sup>研究组研制成一种表面带阴离子的氧化铁磁性纳米颗粒, 认为对多种细胞有很强的亲和力, 但尚未见其对细胞标记后活力、代谢、增殖等影响的系列报道。

### 2.2 标记细胞的活力

大部分资料表明, 磁性标记干细胞后, 标记物对细胞活力无明显影响。居胜红等<sup>[12]</sup>应用磁性氧化铁纳米粒子和PLL的耦联物Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>体外标记人脐血MSC, 结果, 不同浓度Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PLL复合物对细胞的活力无明显不同, 标记MSC、未标记MSC者晚期凋亡及坏死细胞分别为5.43%、2.95%, 早期凋亡细胞分别为9.93%、10.14%。Rudelius等<sup>[10]</sup>把改良的标准转染方案包括脂质转染法和磷酸钙化合物转染法用于干细胞对Gd-DTPA的摄取, 所观察的胚胎干细胞与神经干细胞的增殖和分化能力未受影响。

### 2.3 标记后的干细胞遗传特性

标记后干细胞遗传特性是否改变, 需要进行长期的观察和基因分析, 目前尚缺乏这方面的研究。

### 2.4 标记的持久性

目前所标记的细胞大都能被MRI监测到, 对

比剂在细胞内存在的时间长短与细胞的分裂速度及对比剂的种类有关。Fe 标记的细胞, 由于 Fe 能参与到细胞本身的代谢循环内, 随着细胞的分裂, 细胞内的 Fe 浓度逐渐下降, 影响 MRI 对移植细胞的识别。Gd 因为其生物代谢的特点, 在细胞内不能降解, 其 T1 加权正性增强作用能持续保持。Daldrup-Link 等<sup>[7]</sup>随访结果表明, 用马根维显(Gd 类)标记的细胞在 MRI T1 加权上持续正性增强, 而 Fe 类标记的细胞在标记后 7 d 其负性增强信号逐渐减弱。

### 3 疾病模型中干细胞标记及示踪

利用 Fe 或 Gd 标记干细胞, 在中枢神经系统的中风、缺血模型中均发现标记的神经干细胞沿胼胝体向侧脑室壁迁移, 大量聚集在缺血损伤区周围<sup>[5,13]</sup>。Zhang 等<sup>[14]</sup>在缺血模型小鼠的脑池内注入 Fe 标记的神经干细胞, 发现干细胞以(65±14.6)mm/h 的速度向脑缺血区迁移, 移植后神经功能得到明显改善。随后, 在猪的心肌梗死模型上, 也成功地运用 MRI 监测到注入梗死心肌内 Fe 标记的 MSC 存活情况<sup>[15,16]</sup>。无论是体外还是动物活体实验, 细胞标记率较高, 标记的干细胞活性及增殖能力并不受影响, 能够正常分化, 且顺磁性对比剂亦不会发生细胞外漏<sup>[4,17]</sup>, 反映了干细胞磁性标记的安全性与可靠性, 是干细胞移植临床应用的疗效监测的新方法。然而, 这些研究均局限于心脑血管急性缺血损伤的动物模型中, 而且还未见有细胞磁性标记后远期影响的追踪报道, 目前虽然有些报道在 1.5T 磁场下可以观测到标记的干细胞, 但大多数仍是在高磁场下监测的, 对人体的应用尚需进一步研究。

### 参 考 文 献

- Bulte JW, Douglas T, Witwer B, et al. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labelling and in vivo tracking of stem cells. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(12): 1141-1147.
- Charlotte R, Frank PB, Florence G, et al. Iron oxide nanoparticle labeled rat smooth muscle cells: Cardiac MR imaging for cell graft monitoring and quantitation. *Radiology*, 2005, 235(3): 959-967.
- Mathias H, Ekkehard KS, James B, et al. Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: A highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (25): 162-167.
- Modo M, Mellodew K, Cash D, et al. Mapping transplanted stem cell migration after a stroke: a serial, in vivo magnetic resonance imaging study. *Neuroimage*, 2004, 21(1): 311-317.
- Modo M, Cash D, Mellodew K, et al. Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent enhanced, magnetic resonance imaging. *Neuroimage*, 2002, 17(2): 803-811.
- Vuu K, Xie J, McDonald MA, et al. Gadolinium-rhodamine nanoparticles for cell labeling and tracking via magnetic resonance and optical imaging. *Bioconjug Chem*, 2005, 16(4): 995-999.
- Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RA, et al. Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. *Radiology*, 2003, 228(3): 760-767.
- Frank JA, Miller BR, Arbab AS, et al. Clinically applicable labelling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology*, 2003, 228(2): 480-487.
- Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, et al. Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood*, 2004, 104(4): 1217-1223.
- Rudelius M, Dald-Link HE, Heinzmann U, et al. Highly efficient paramagnetic labelling of embryonic and neuronal stem cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2003, 30(7): 1038-1044.
- Wilhelm C, Billotey C, Roger J, et al. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*, 2003, 24(6): 1001-1011.
- 居胜红, 滕皋军, 毛曦. 脐血间充质干细胞磁探针标记和 MR 成像研究. *中华放射学杂志*, 2005, 1(39): 101-106.
- Hoehn M, Kustermann E, Blunk J, et al. Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(25): 16267-16272.
- Zhang ZG, Jiang Q, Zhang R, et al. Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat. *Ann Neurol*, 2003, 53(2): 259-263.
- Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, et al. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation*, 2003, 107(18): 2290-2293.
- Hill JM, Dick AJ, Raman VK, et al. Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cell. *Circulation*, 2003, 108(8): 1009-1014.
- Oehn M, Kustermann E, Blunk J, et al. Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(25): 16267-16272.

(收稿日期: 2005-12-27)