

- 13 Fenchel M, Martirosian P, Langanke J, et al. Perfusion MR imaging with FAIR True FISP spin labeling in patients with and without renal artery stenosis. *Radiology*, 2006, 238(3): 1013-1021.
- 14 Rusinek H, Lee VS, Johnson G. Optimal dose of Gd-DTPA in dynamic MR studies. *Magn Reson Med*, 2001, 46(2): 312-316.
- 15 Gandy SJ, Sudarshan TA, Sheppard DG, et al. Dynamic MRI contrast enhancement of renal cortex: a functional assessment of renovascular disease in patients with renal artery stenosis. *J Magn Reson Imaging*, 2003, 18(4): 461-466.
- 16 Michaely HJ, Schoenberg SO, Oesingmann N, et al. Renal artery stenosis: functional assessment with dynamic MR perfusion measurements-feasibility study. *Radiology*, 2006, 238(2): 586-596.
- 17 Vallee JP, Lazeyras F, Khan HG, et al. Absolute renal blood flow quantification by dynamic MRI and Gd-DTPA. *Eur Radiol*, 2000, 10(8): 1245-1252.
- 18 Aumann S, Schoenberg SO, Just A, et al. Quantification of renal perfusion using an intravascular contrast agent (part 1): results in a canine model. *Magn Reson Med*, 2003, 49(2): 276-287.
- 19 Lenhard SC, Nemrkar SS, Schaeffer TR, et al. p38 MAPK inhibitors ameliorate target organ damage in hypertension: Part 2. Improved renal function as assessed by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307(3): 939-946.
- 20 Niendorf ER, Grist TM, Lee FT Jr, et al. Rapid in vivo measurement of single-kidney extraction fraction and glomerular filtration rate with MR imaging. *Radiology*, 1998, 206(3): 791-798.
- 21 Lee VS, Rusinek H, Noz ME, et al. Dynamic three-dimensional MR renography for the measurement of single kidney function: initial experience. *Radiology*, 2003, 227(1): 289-294.

(收稿日期: 2007-01-31)

## 骨髓间充质干细胞的活体标记示踪技术及其研究进展

董庆玉 陈丽

**【摘要】** 骨髓基质干细胞因具有不断自我更新和向多种细胞分化的能力而备受关注。通过干细胞移植并诱导其向各种受损组织细胞分化, 可促进受损组织的再生和修复, 为疾病的治疗开辟了新途径。为更深入认识移植细胞实现其修复功能的机制, 需要有效的标记方法追踪移植细胞在受者体内的分布、迁移、增殖和分化情况。

**【关键词】** 骨髓; 间充质干细胞; 生物学标记; 超顺磁性氧化铁

**【中图分类号】** R445.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2007)05-0314-04

### Living labeling techniques of mesenchymal stem cells

DONG Qing-yu, CHEN Li

(Department of Endocrinology and Metabolism, The Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

**【Abstract】** Mesenchymal stem cells (MSCs) are well known for their self-renew and multi-differentiation potentiality. With the transplantation of the MSCs which can promote the regeneration and repair of the injured tissue, a new route for the treatment of diseases is hopeful to be effective. To trace the distribution, migration, proliferation and differentiation of the implanted MSCs, there need effective labeling techniques, especially living labeling techniques.

**【Key words】** Bone marrow; Stem cell transplantation; Biological markers; Superparamagnetic iron oxide

骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是来源于骨髓的具有不断自我更新和多向分化能力的干细胞。目前, 干细胞移植的治疗作用已在动物模型和部分临床试验中得到证实<sup>[1,2]</sup>。由于骨髓间充质干细胞具有来源丰富、取材容易、可自体移植等其他干细胞不可比拟的优点, 故目前通过

移植骨髓间充质干细胞治疗疾病的研究成为热点。为更深入认识移植细胞实现其修复功能的机制, 需要对移植细胞在体内的存活、分布、迁移及增殖、分化进行监测。所以, 为区别供体及受体细胞, 需要有效的标记方法对这些细胞进行标记示踪。

### 1 MSCs 常用标记示踪技术及研究现状

近年来, 常用的干细胞标记技术包括抗原标

记、荧光染料标记、荧光蛋白标记、核素标记、Y染色体标记等方法<sup>[3,4]</sup>。其中抗原标记法是通过免疫组化方法,利用抗体对细胞上的抗原进行检测,从而对移植细胞进行观察;荧光染料标记方法的原理是使用某些能够结合到细胞膜或细胞内不同部位上的荧光染料进行观察;荧光蛋白标记中所用的荧光蛋白为可自发产生荧光的蛋白质,如绿色荧光蛋白,其标记细胞的方法通常是建立转基因动物或通过基因工程转染技术;核素标记的原理是利用核素标记脱氧嘧啶核苷酸作为DNA合成前体,从而在细胞DNA合成期较特异地掺入细胞核内;Y染色体标记方法是将来源于雄性供体含Y染色体的细胞移植入雌性动物体内,因为Y染色体长臂末端带有一段特异的重复序列,针对此序列进行荧光原位杂交,即可对移植细胞进行示踪。

以上多种方法各有其优缺点,但在检测时是侵袭性的,需用实验动物制备组织切片,因此体外检测不适于人体。随着分子影像学的发展,使得活体示踪干细胞成为可能。日前认为,已广泛应用于临床的MRI以及处于快速发展中的核医学分子影像技术是能够克服以上不足而用于活体示踪的成像技术。

## 2 MRI技术在干细胞活体标记示踪中的应用及发展

由于MR具有较高的时间和空间分辨率,加之近年来MR对比剂研究的不断进展,利用MR敏感的对剂作为分子探针标记干细胞并进行移植后的MRI活体示踪是可能的<sup>[5]</sup>。其中,超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)微粒由于具有粒径小及弛豫率强等优点,成为日前应用最广泛的标记物。SPIO最初被应用于标记白细胞、淋巴细胞及单核细胞等血液细胞,主要用于免疫追踪研究<sup>[6]</sup>。近年来,随着干细胞研究的不断进展,磁标记技术开始用于干细胞<sup>[7,8]</sup>。

### 2.1 SPIO标记技术原理

应用SPIO对干细胞直接进行标记,其标记率往往较低,因此多采用抗体(如抗转铁蛋白受体单克隆抗体)、转染剂(如脂质体等)等介导,以提高细胞的磁标记率<sup>[7,8]</sup>。最近,Arbab等<sup>[9]</sup>开发了更为有效而简便的干细胞磁标记法,即应用多聚赖氨酸(polylysine, PLL)介导干细胞磁标记。PLL是一种表面带大量正电荷的转染剂,通过静电作用可与表面带负电荷的氧化铁微粒有效结合,从而增加

SPIO与细胞的亲和性,提高干细胞的磁标记率。干细胞磁标记后其MR信号发生改变是MR活体示踪的基础,而MR信号的改变受对比剂种类、标记效率和细胞数量等因素的影响。

### 2.2 SPIO标记的安全性

磁标记对干细胞的安全性是磁标记干细胞体内应用的前提。SPIO标记干细胞的安全性取决于标记所用的对比剂和标记方法。研究表明,用FDA(美国食品与药物管理局)批准的SPIO进行标记,SPIO存在于胞质中,对所标记的干细胞并无短期或长期毒性作用;与未标记细胞相比,标记细胞的生存能力、分化能力以及凋亡率都没有随着时间的推移而发生改变。另外,因这些对比剂由可生物降解的铁组成,所以理论上这些铁可在体内再循环,即可在正常铁代谢通路中被重新使用。对用于肝脏的SPIO标记显示,这些铁被肝脏Kupffer细胞代谢且随之被再利用,进入正常的铁血池及红细胞内<sup>[6]</sup>。

### 2.3 SPIO标记的敏感性

SPIO由于其特殊的化学结构,即使在较弱的磁场中也可产生较大的磁性,外磁场撤销后磁性也迅速消失,即所谓超顺磁性。以往多采用高磁场MR对磁标记干细胞进行显微成像,但仅限于动物实验,离临床应用尚有一定距离。随着标记方法的不断改进和标记效率的明显提高,近期有研究表明,1.5T MR也可成功显示磁标记干细胞<sup>[10]</sup>。所以,既可在专用的高场强MR设备中对磁标细胞成像,也可采用1.5T临床型MR成像。由于MR具有较高的分辨率及整体成像等特点,已成为干细胞成像的最佳选择之一。

### 2.4 SPIO标记的准确性

MR增强检查所显示的结果与用常规病理染色标记铁所形成的结果存在很好的吻合,目前的结果表明,MR追踪细胞可用于指导移植过程和活体观察移植效果。

### 2.5 SPIO标记细胞的有效时限

磁化标记的消失主要由于细胞内铁含量的下降。SPIO在体内不会随着细胞的分裂而分配,分裂细胞内SPIO的下降主要由于细胞分裂引起的稀释作用,不分裂细胞SPIO的下降主要由于外排和代谢作用。磁化标记的消失与干细胞的分裂速度有关,细胞分裂越快,稀释越快,SPIO下降越快,直至SPIO无法示踪,故无法用于移植干细胞的长

期追踪观察。SPIO 在细胞中能保存最长的时间,在细胞分裂过程中 SPIO 是否均匀分配以及是否以全或无形式分配等有待于进一步的研究,不同的细胞类型在这些方面存在不同。

总之,用 SPIO-PLL 微粒可较为简单有效地标记干细胞,而且对细胞无毒副作用,这样,MR 可以对干细胞的生物学分布和迁移情况进行活体示踪。虽然 SPIO 在细胞标记方面的研究已取得了一定进展,但仍有许多问题有待于进一步研究。在基础科学研究方面,加深对 SPIO 造影剂生物分布特性和毒性的了解研究是必要的;标记干细胞在体内死亡、裂解,释放出的增强剂粒子将造成假阳性显像;氧化铁类造影增强剂不能够跟随细胞的分裂而自体复制,所以仅能标记移植的细胞或部分分化的细胞,在监测移植后干细胞的增殖和分化方存在一定不足。以上诸多问题都有待进一步探索。

### 3 核医学分子影像技术在干细胞活体标记示踪中的应用前景

众所周知,核医学影像技术因具有较高的灵敏性(利用核素示踪可以检测到体内低至  $10^{-12}$  mol/L 的分子表达),可进行定量分析,能够对细胞的代谢状态进行判断而具有优势。设想能否通过放射性核素标记移植前细胞,利用核医学影像技术对细胞的迁移、增殖和分化进行监测。日前,应用核素标记 MSCs 并观察其移植后在受者体内的迁移和分布已有报道<sup>[11,12]</sup>,但如何应用核医学独特的分子成像技术对移植细胞在体内的增殖和分化进行监测成为人们关注的焦点。核医学显像技术包括代谢显像、抗体显像、受体显像等,代谢显像是指作为探针的分子是组织和细胞的代谢底物或类似物。代谢显像剂可以显示干细胞在体内的增殖,但迄今为止,尚未发现干细胞有任何特异的代谢底物,同时干细胞在体内增殖、代谢远低于肿瘤细胞,现有设备的灵敏性还不能达到区分移植干细胞和体内原有组织细胞的代谢差异,故目前代谢显像在干细胞示踪方面尚难以有所作为。抗体显像原理是将特异抗体作为探针,利用抗原抗体结合检测组织细胞表面抗原的存在。干细胞在其增殖和多向分化的过程中可出现表面抗原表达差异,从而为利用抗体显像示踪干细胞提供了潜在的可能性。另外,在干细胞有关研究过程中,发

现了很多种相对特异的受体。例如:干细胞生长所需的生长因子受体(表皮生长因子受体等)<sup>[13]</sup>,一些神经系统来源的干细胞和食道角质层干细胞表达的神经营养受体 p75 等<sup>[14]</sup>,这些细胞在移植到相应受体低表达区后,可以应用受体显像检测其存活和增殖。因此,受体显像有可能首先进入干细胞活体示踪的领域。Bai 等<sup>[15]</sup>即利用这一原理对移植的 MSCs 进行活体示踪。但受体显像也存在一些缺点:受体表达受多种体内因素外影响,即稳定性较差;不同的干细胞/前体细胞受体表达不一致,而且,已知的受体在正常组织细胞中也有不同程度表达,同一种细胞移植在不同部位须采用不同显像剂,导致其应用的局限性。

虽然核素显像的方法有多种,但目前尚不能彻底地解决干细胞活体示踪,除了各自技术的不完善外,缺少明确、特异的干细胞标志物是主要的障碍,如何解决这些问题尚需进一步研究。

### 4 展望

随着骨髓间充质干细胞研究及临床应用的发展,干细胞移植的标记示踪研究显得越来越重要。干细胞移植的示踪研究有助于了解移植后干细胞的分布、迁徙、分化及转归等生物学行为,评估干细胞移植的效果,以及提供干细胞移植疗法的最优化信息。相信随着干细胞的深入研究,尤其是细胞活体示踪技术的发展,骨髓基质干细胞移植的应用前景将更加广阔。

### 参 考 文 献

- 1 Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, 123(6): 1132-1140.
- 2 Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*, 2003, 361(9351): 45-46.
- 3 Li P, Tessler A, Han SS, et al. Fate of immortalized human neuronal progenitor cells transplanted in rat spinal cord. *Arch Neurol*, 2005, 62(2): 223-229.
- 4 Lee-Pullen TF, Bennett AL, Beilharz MW, et al. Superior survival and proliferation after transplantation of myoblasts obtained from adult mice compared with neonatal mice. *Transplantation*, 2004, 78(8): 1172-1176.
- 5 Halavaara J, Tervahartiala P, Isoniemi H, et al. Efficacy of sequential use of superparamagnetic iron oxide and gadolinium in

- liver MR imaging. *Acta Radiol*, 2002, 43(2): 180-185.
- 6 Dodd CH, Hsu HC, Chu WJ, et al. Normal T2cell response and in vivo magnetic resonance imaging of T cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles. *J Immunol Methods*, 2001, 256(122): 89-105.
  - 7 Bulte JW, Arbab AS, Douglas T, et al. Preparation of magnetically labeled cells for cell tracking by magnetic resonance imaging. *Methods Enzymol*, 2004, 386: 275-299.
  - 8 Frank JA, Miller BR, Arbab AS, et al. Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology*, 2003, 228(2): 480-487.
  - 9 Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, et al. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology*, 2003, 229(3): 838-846.
  - 10 Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, et al. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation*, 2003, 107(108): 2290-2293.
  - 11 Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD, et al. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation*, 2005, 112(10): 1451-1461.
  - 12 Stodilka RZ, Blackwood KJ, Prato FS. Tracking transplanted cells using dual-radionuclide SPECT. *Phys Med Biol*, 2006, 51(10): 2619-2632.
  - 13 Reitners D, Lopez-Toledano MA, Mason I, et al. Developmental expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors in neural stem cell progeny. Modulation of neuronal and glial lineages by basic FGF treatment. *Neuro Res*, 2001, 23(6): 612-621.
  - 14 Okumura T, Shimada Y, Imamura M, et al. Neurotrophin receptor p75 (NTR) characterizes human esophageal keratinocyte stem cells in vitro. *Oncogene*, 2003, 22(26): 4017-4026.
  - 15 Bai J, Ding W, Yu M, et al. Radionuclide imaging of mesenchymal stem cell transplanted into spinal cord. *Neuroreport*, 2004, 15(7): 1117-1120.

(收稿日期: 2007-03-02)

(上接第 291 页)

- 7 Yasuda S, Ide M, Fujii H, et al. Application of positron emission tomography imaging to cancer screening. *Br J Cancer*, 2000, 83(12): 1607-1611.
- 8 Hustinx R, Benard F, Alavi A. Whole-body PET imaging in the management of patients with cancer. *Semin Nucl Med*, 2002, 32(1): 35-46.
- 9 Rohren EM, Turkington TG, Coleman RE. Clinical applications of PET in oncology. *Radiology*, 2004, 231(2): 305-332.
- 10 Chen YK, Ding HJ, Chen KT, et al. Prevalence and risk of cancer of focal thyroid incidentaloma identified by <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for cancer screening in healthy subjects. *Anticancer Res*, 2005, 25(2B): 1421-1426.
- 11 Fischer BM, Mortensen J. The future in diagnosis and staging of lung cancer. *Respiration*, 2006, 73(3): 267-276.
- 12 Borrego Dorado I, Vazquez Albertino R. A proposal for the rational use of the PET in oncology. *Rev Esp Med Nucl*, 2002, 21(3): 163-173.
- 13 Chen YK, Kao CH, Liao AC, et al. Colorectal cancer screening in asymptomatic adults. *Anticancer Res*, 2003, 23(5b): 4357-4361.
- 14 Byrne AM, Hill AD, Skehan SJ, et al. Positron emission tomography in the staging and management of breast cancer. *Br J Surg*, 2004, 91(11): 1398-1409.
- 15 Higashi T, Saga T, Nakamoto Y, et al. Diagnosis of pancreatic cancer using fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG PET) usefulness and limitations in "clinical reality". *Ann Nucl Med*, 2003, 17(4): 261-279.
- 16 Meignan M, Haioun C, Iti E, et al. Value of [<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography in managing patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma*, 2006, 6(4): 306-313.
- 17 Tamara I, Velez I, Tamara C. Positron emission tomography: a promising diagnostic modality for head and neck pathology. *J Oral Maxillofac Surg*, 2006, 64(8): 1272-1277.
- 18 于长海, 汪涛, 孙玉鸢, 等. 肺部良性结节性病变 <sup>18</sup>F-脱氧葡萄糖正电子发射断层摄影术检查. *中华外科杂志*, 2006, 44(2): 90-92.
- 19 汪涛, 初向阳, 孙玉鸢, 等. <sup>18</sup>F-脱氧葡萄糖正电子发射断层显像检查在肺结核患者中的应用. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2006, 13(2): 73-76.
- 20 Chang JM, Lee HJ, Goo JM, et al. False positive and false negative FDG-PET scans in various thoracic diseases. *Korean J Radiol*, 2006, 7(1): 57-69.
- 21 Kalvin B, Fekeshazy A, Lengyel Z, et al. Cost-effective PET investigations in oncology. *Magy Onkol*, 2002, 46(3): 203-223.
- 22 Sloka JS, Hollett PD, Mathews, M. Cost effectiveness of positron emission tomography in Canada. *Med Sci Monit*, 2005, 7(5): 351-360.
- 23 Gugliatti A, Grimaldi A, Rossetti C. Economic analyses on the use of positron emission tomography for the work-up of solitary pulmonary nodules and for staging patients with non-small-cell-lung-cancer in Italy. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2004, 48(1): 49-61.
- 24 顾爱春, 黄钢. PET在肿瘤方面应用的成本效益分析. *国际放射医学核医学杂志*, 2006, 30(2): 65-68.
- 25 李彪, 廖日强. FDG-PET在非小细胞肺癌分期中的成本效益分析. *循证医学*, 2005, 5(3): 140-142.
- 26 Weckesser M, Schober O. Is whole-body FDG-PET valuable for health screening?. *Against Eur J Nucl Mol Imaging*, 2005, 32(3): 342-343.

(收稿日期: 2007-03-11)