

报告基因显像监测干细胞治疗的研究进展

裴之俊 张永学

【摘要】 干细胞移植治疗各种组织损伤或退行性疾病是目前国内外研究热点, 而对于干细胞移植后的活体归巢、分化及功能表达等动态变化却所知甚少, 影响了干细胞治疗的进一步发展。报告基因显像是分子影像技术的重要组成部分, 通过间接监测转染报告基因的表达, 可以动态监测移植干细胞活体内变化过程。该文简述报告基因显像活体监测移植干细胞治疗的最新研究进展和未来发展趋势。

【关键词】 基因, 报告; 分子诊断技术; 干细胞移植

Advances of reporter gene imaging monitoring stem cell therapy

PEI Zhi-jun, ZHANG Yong-xue.

(Department of Nuclear Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Key Laboratory of Molecular Imaging of Hubei Province, Wuhan 430022, China)

【Abstract】 Stem cell transplantation in the treatment of various tissue damage or degenerative diseases are research hotspots both at home and abroad. However, ignorance of the homing, differentiation and functional expression of the stem cell in vivo influence the further development of stem cell therapy. As an important component of molecular imaging technology, reporter gene imaging dynamically monitors the change of stem cell in vivo via monitoring the expression of transfected reporter gene. This paper briefly describes the latest research progress and the future development trend of the monitoring of reporter gene imaging in stem cell therapy in vivo.

【Key words】 Gene, reporter; Molecular diagnostic techniques; Stem cells transplantation

干细胞移植治疗各种组织损伤或退行性疾病是目前生命科学领域中的前沿和热点问题^[1], 其应用前景广阔。监测移植干细胞的增殖、分布、迁移的方法虽然有多种, 但传统方法主要是在体外进行组织学分析, 耗力、耗时、具侵袭性, 如何在活体内监测移植干细胞及其发展, 是关系到这一治疗方法成败的至关重要的医学问题。1999年美国哈佛大学 Weissleder 等^[2]首先提出了分子影像学后, 移植干细胞治疗的监测进入了崭新的阶段, 人类开始在细胞分子水平评价活体组织细胞的生物学过程。目前, 无创性监测体内移植细胞的分子影像学技术主要是通过转染报告基因间接显像。

1 报告基因

报告基因是一种编码可被检测的蛋白质或酶的

基因, 也就是说, 是一种表达产物非常容易被鉴定的基因。把它的编码序列和基因表达调节序列相融合形成嵌合基因, 或与其他目的基因相融合, 在调控序列控制下进行表达, 从而利用其表达产物来标定目的基因的表达调控。作为报告基因, 在遗传选择和筛选检测方面必须具有以下3个条件: ①已被克隆且全序列已测定; ②其表达产物能进行定量测定; ③表达产物在受体细胞中本不存在, 即无背景, 在被转染的细胞中无相似的内源性表达产物。报告基因显像(reporter gene imaging, RGI)则是将报告基因转染给靶细胞后, 通过标记的报告探针与报告基因的特异性结合而显影。通过探针的聚集显示报告基因产物的活性水平, 从而间接提供报告基因表达水平及驱动报告基因表达的内源性信号或转录因子水平的信息, 了解体内特异性基因或蛋白质表达的部位、水平、迁徙及持续时间。RGI可以无创性研究活体移植细胞的定位、存活、分布及分化过程, 指导临床干细胞治疗的顺利进行。因此, RGI成为活体监测移植干细胞治疗的最佳手段之一。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2010.02.002

基金项目: 国家自然科学基金(30830041, 30571816, 30772208, 30970853)

作者单位: 430002 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院核医学科

通信作者: 张永学 (E-mail: zhyx1229@163.com)

RGI 目前已有很大发展, 根据报告基因的编码产物不同, 可分为以酶为基础的报告基因和以受体或转运子为基础的报告基因, 已经形成了包括放射性核素显像、MRI 和光学成像的完整体系^[3] (表 1)。

表 1 报告基因在分子影像技术中的应用

显像技术	报告基因
光学成像	荧光蛋白(红、绿)基因、荧光素酶(萤火虫、甲虫、海肾、长腹水蚤)基因
放射性核素成像	单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶基因、人类线粒体胸苷激酶基因、多巴胺 2 型受体基因、去甲肾上腺素转运体基因、钠碘同向转运体基因、雌激素受体、生长抑素受体 2 基因
MRI	转铁蛋白受体基因、 β -半乳糖苷酶基因、酪氨酸酶基因、铁蛋白基因

2 RGI

根据报告基因的表达产物不同, RGI 活体示踪移植干细胞动态变化的方法主要包括放射性核素显像、MRI 和光学成像, 这三类技术各有优势和不足, 其中最具有发展前途的是放射性核素 RGI 系统。

2.1 放射性核素显像

放射性核素显像主要包括 SPECT 及 PET。基于核医学技术监测体内移植干细胞的 RGI 主要包括 2 类: 一类是基于酶基因作为报告基因, 如单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶 (herpes simplex virus type 1-thymidine kinase, HSV1-tk) 基因及其突变体 HSV1-sr39tk 基因^[4-6]; 另一类是基于跨膜受体基因作为报告基因, 如多巴胺 2 型受体基因、生长抑素受体 2 基因以及钠碘同向转运体基因^[7]。其中, 目前在活体示踪移植干细胞方面研究最多的是 HSV1-tk, 该基因编码的胸苷激酶可以选择性地磷酸化多种核苷衍生物, 磷酸化后的产物不能穿过细胞膜而聚集于细胞内, 利用放射性核素对 HSV1-tk 特异性底物进行标记, 通过显像可以示踪报告基因的表达。HSV1-tk 的探针主要有 2 类: ① 无环鸟苷类衍生物, 如 ^{18}F -8- ^3H -丙氧鸟苷、 ^{18}F -9-(1-氟-3-羟基-2-丙氧基甲基)鸟嘌呤、 ^{18}F -9-[4-氟-3-(羟甲基)-丁基]鸟嘌呤和 ^{18}F -阿昔洛韦; ② 嘧啶核苷衍生物, 如 ^{131}I 、 ^{125}I 和 ^{14}C 标记的 2'-脱氧-2'-氟-1- β -D-阿拉伯呋喃糖-5-脲嘧啶。 ^{18}F -9-(1-氟-3-羟基-2-丙氧基甲基)鸟嘌呤、2'-脱氧-2'-氟-1- β -D-阿拉伯呋喃糖-5-脲嘧啶具

有本底信号低、从血液中清除快、稳定性好、安全等特性, 是目前最成熟的 HSV-tk RGI 的分子探针, 可分别用于 SPECT 和 PET。放射性核素显像具有较高的灵敏度, 但 SPECT、PET 的空间分辨率和解剖定位能力仍然相对较差, 而 PET-CT(MRI) 和 SPECT-CT 的应用有效地弥补了这些不足, 实现了高灵敏度和高分辨率的结合。

2.2 光学成像

活体动物体内光学成像主要采用荧光与生物发光两种技术。常用的报告基因是萤火虫荧光素酶基因和绿荧光蛋白基因。光学成像的主要优点是无辐射, 可进行实时、连续监测, 灵敏度较高, 且花费相对较低, 但由于光的穿透能力有限(仅为数毫米到数厘米)以及散射的原因, 光学成像的空间分辨能力有限, 解剖定位能力较差, 因此, 目前该技术多用于体表病变的观察和小动物成像研究。

2.3 MRI

MRI 的报告基因主要有 β -半乳糖苷酶基因、转铁蛋白受体基因与酪氨酸酶基因。以 β -半乳糖苷酶作为报告基因的研究应用了一种叫 "EgadMa" 的分子探针, 它由钆的不配对电子组成, 周围由 1 个化学箍环封闭以阻止其与水分子反应, 使得 β -半乳糖苷酶有活性的区域 MR 信号明显增强。酪氨酸酶在黑色素合成代谢中催化两个主要反应, 是黑色素合成的限速酶, 黑色素有较高结合铁的能力。酪氨酸酶基因的过度表达可导致黑色素合成代谢增加, 其结合铁的能力相应增加, 从而导致 MR 信号增强。Luoie 等^[10] 采用这种探针对蟾蜍胚胎干细胞编码 β -半乳糖苷酶的 LacZ 基因的表达进行 MRI, 结果获得了 LacZ 基因在蟾蜍胚胎干细胞表达的 MR 影像。由于 MRI 具有很高的空间和时间分辨率, 因此 MRI 活体示踪移植干细胞也是一种非常有前景的技术, 国内外学者做了不少这方面研究^[11-17]。但 MRI 的缺点主要是灵敏度较差, 其对比剂信号很难检测, 对比剂不能随着干细胞的分裂而自我复制, 因此仅能示踪干细胞进入活体后的早期过程, 对示踪后续的增殖和分化存在着一定的局限。

3 目前存在的问题

由于 RGI 能够无创性通过评价报告基因的表达, 可间接评价移植干细胞治疗的部位、存活及持续时间等信息, 且可多次重复监测, 无疑在人类干

细胞治疗效果的监控及评价中有明显优势,但在目前研究中仍存在一些问题:①报告基因转导或转染是否成功?②转导或转染的基因是否以足够高的水平定位于器官或组织?③转导或转染的基因是否分布到靶器官或靶组织,其分布是否最佳?④基因的免疫源性和基因突变带来的问题?⑤在移植干细胞治疗过程中,报告基因表达的最佳时机是何时?⑥报告基因表达在靶组织或器官内可持续多长时间?这一系列问题,也需要新的方法来解决。

除报告基因本身的一些问题外,还存在报告基因进入干细胞的载体选择问题,报告基因进入干细胞内必需有合适的基因载体,目前常用的载体有非病毒载体和病毒载体两大类。非病毒载体最常用的是脂质体,通过阳离子脂质体介导转染,其缺点是大多数质粒载体无法进入干细胞,转染效率极低,而且大多是瞬时表达;病毒载体主要有非逆转录病毒载体和逆转录病毒载体,前者的代表是腺病毒载体,其优点是容纳碱基数较大,但由于也是瞬时表达,只能对移植干细胞进行早期示踪;后者的代表是慢病毒载体,此载体是一种理想的载体,其携带的基因可以整合到宿主细胞中,建立稳定表达细胞系,但由于其容纳碱基数较少,出毒量较低,也限制了其发展。

4 报告基因的发展

4.1 多模式 RGI

目前,单一报告基因很难解决 RGI 存在的问题,但可基于不同的目的开发多系统的报告基因,利用不同的成像系统同时对活体监控多种报告基因的表达。Zinn 等^[18]和 Chaudhuri 等^[19]采用腺病毒载体将 HSV1-tk 和人生长抑素受体 2、绿色荧光蛋白和人生长抑素受体 2 基因转染后,进行双 RGI,用于监测皮下肿瘤。近年来,国外还有一些学者采用复合模式的 RGI 在小动物研究中获得成功,这种利用不同的成像系统同时监测活体内多种报告基因表达的技术,在干细胞治疗的研究和临床应用中具有广阔的前景^[20-22]。

4.2 二步转录放大系统

在弱的启动子启动基因表达时,往往因启动子的转录活性弱而使基因表达显像受影响,通过嵌合抗体和转录后增强基因产物及标志物活性,可增加标志物的水平。Lyer 等^[23]在进行荧光素酶基因和

HSV1-tk 基因的表达研究时发现,前列腺特异抗原增强子可促进酵母转录激活蛋白转录因子的表达,该转录因子能与微小启动子上的酵母转录激活蛋白基因反应元件结合,促使报告基因的转录,研究证实荧光素酶基因和 HSV1-tk 基因的表达增加了 50 倍和 12 倍。

5 展望

近年来,干细胞的研究在生命科学领域取得了突破性进展,人们已经开始尝试用干细胞技术治疗某些疾病,如:干细胞移植治疗心肌梗死是目前公认的具有较好前景的治疗技术。尽管报告基因示踪干细胞的技术在近几年取得了较大进步,然而目前绝大多数 RGI 还处于临床前研究阶段,距离临床应用仍有一段距离,未来研究的着眼点不仅在于加大、加深小动物 RGI 研究的深度与力度,还需要多学科共同努力,将 RGI 从实验室方法转变为临床实用的显像手段。

参 考 文 献

- [1] Shanthly N, Aruva MR, Zhang K, et al. Stem cells: a regenerative pharmaceutical. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2006, 50(3): 205-216.
- [2] Weissleder R. Molecular imaging: exploring the next frontier. *Radiology*, 1999, 212(3): 609-614.
- [3] Kang JH, Chung JK. Molecular-genetic imaging based on reporter gene expression. *J Nucl Med*, 2008, 49 (suppl 2): S164-S179.
- [4] Sun N, Lee A, Wu JC. Long term non-invasive imaging of embryonic stem cells using reporter genes. *Nat Protoc*, 2009, 4(8): 1192-1201.
- [5] Willmann JK, Paulmurugan R, Rodriguez-Porcel M, et al. Imaging gene expression in human mesenchymal stem cells: from small to large animals. *Radiology*, 2009, 252(1): 117-127.
- [6] Love Z, Wang F, Dennis J, et al. Imaging of mesenchymal stem cell transplant by bioluminescence and PET. *J Nucl Med*, 2007, 48(12): 2011-2020.
- [7] Roelants V, Labar D, de Meester C, et al. Comparison between adenoviral and retroviral vectors for the transduction of the thymidine kinase PET reporter gene in rat mesenchymal stem cells. *J Nucl Med*, 2008, 49(11): 1836-1844.
- [8] Terrovitis J, Kwok KF, Lautam ki R, et al. Ectopic expression of the sodium-iodide symporter enables imaging of transplanted cardiac stem cells in vivo by single-photon emission computed tomography or positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52(20): 1652-1660.
- [9] Hofmann M, Woller KC, Meyer GP, et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*, 2005, 111(17): 2198-2202.

增生容易判断,对于双侧增生要特别注意,凡在2 h延迟相上甲状腺影减退不明显或增强,结合临床应考虑 SHPT。

除此以外,血清 PTH 测定可以作为甲状旁腺切除的重要指征,也是 PHPT 手术切除亢进的甲状旁腺腺瘤的重要指标,而在 SHPT 患者中,当其 PTH 升高明显(或达到 1000 pg/ml 左右),有顽固的骨痛等甲状旁腺功能亢进的表现也可考虑手术。血清 PTH 测定也是手术成功与否的重要标志^[3]。因 PTH 半衰期短(3~5 min),当异常甲状旁腺切除 10 min 后,PTH 水平比切除前下降 $\geq 50\%$,预示着亢进的腺体组织切除成功。因此血清 PTH 的测定在指导手术治疗方面有着重要的临床价值。

参 考 文 献

- [1] 韩恩昆,刘自宽,高硕,等.影像学检查在原发性甲状旁腺功能亢进术前定位中的作用.中华普通外科杂志,2004,19(4):219-221.
- [2] Taillefer R, Boucher Y, Pochvin C, et al. Detection and localization of parathyroid adenomas in patients with hyperparathyroidism using a single radionuclide imaging procedure with technetium-99m-sestamibi (double-phase study). J Nucl Med, 1992,33(10):1801-1807.
- [3] 刘新杰,周冬仙.甲状旁腺激素测定在继发性甲状旁腺功能亢进手术中应用的进展.中国普通外科杂志,2008,17(11):1124-1126.

(收稿日期:2009-11-25)

(上接第 75 页)

- [10] Louie AY, Hüber MM, Ahrens ET, et al. In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. Nat Biotechnol, 2000, 18(3): 321-325.
- [11] Amsalem Y, Mardor Y, Feinberg MS, et al. Iron-oxide labeling and outcome of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium. Circulation, 2007, 116(11 Suppl): 138-145.
- [12] Kirchin MA, Runge VM. Contrast agents for magnetic resonance imaging: safety update. Top Magn Reson Imaging, 2003, 14(5): 426-435.
- [13] Kostura L, Kraitchman DL, Mackay AM, et al. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. NMR Biomed, 2004, 17(7): 513-517.
- [14] Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RA, et al. Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. Radiology, 2003, 228(3): 760-767.
- [15] Hill JM, Dick AJ, Raman VK, et al. Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells. Circulation, 2003, 108(8): 1009-1014.
- [16] Gao J, Dennis JE, Muzic RF, et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. Cells Tissues Organs, 2001, 169(1): 12-20.
- [17] Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. Circulation, 2005;111(17): 2198-2202.
- [18] Zinn KR, Chaudhuri TR. The type 2 human somatostatin receptor as a platform for reporter gene imaging. Eur J Nucl Med Imaging, 2002, 29(3): 388-399.
- [19] Chaudhuri TR, Rogers BE, Zinn KR, et al. Noninvasive dual modality imaging of ovarian cancer in mice. Eur J Nucl Med, 2001, 28: 1179.
- [20] Ray P, De A, Min JJ, et al. Imaging tri-fusion multimodality reporter gene expression in living subjects. Cancer Res, 2004, 64(4): 1323-1330.
- [21] Ponomarev V, Doubrovin M, Serganova L, et al. A novel triple-modality reporter gene for whole-body fluorescent, bioluminescent, and nuclear noninvasive imaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2004, 31(5): 740-751.
- [22] Kim YJ, Dubey P, Ray P, et al. Multimodality imaging of lymphocytic migration using lentiviral-based transduction of a tri-fusion reporter gene. Mol Imaging Biol, 2004, 6(5): 331-340.
- [23] Lyer M, Wu L, Carey M, et al. Two-step transcriptional amplification as a method for imaging reporter gene expression using weak promoters. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(25): 14595-14600.

(收稿日期:2009-10-05)