

核素分子显像监测胚胎干细胞及诱导性多潜能干细胞移植的研究进展

吕靖 张一帆

【摘要】 胚胎干细胞(ESCs)具有分化成多种细胞的能力, 而由转录因子转染体细胞获得的诱导性多潜能干细胞(iPSCs)具有与 ESCs 相似的生物学特性, 且不涉及伦理学相关问题, 在干细胞治疗领域得到广泛的应用。近年来, 干细胞移植治疗的分子影像学监测得到了快速发展, 并取得了显著的成果。该文仅就核素分子显像监测 ESCs 及 iPSCs 移植的研究进展进行综述。

【关键词】 干细胞移植; 多潜能干细胞; 放射性核素显像; 分子影像学

Advances in radionuclide imaging of monitoring embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells transplantation *Lyu Jing, Zhang Yifan. Department of Nuclear Medicine, Ruijin Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China*

Corresponding author: Zhang Yifan, Email: zhang_yifan@126.com

【Abstract】 Embryonic stem cells (ESCs) possess the ability to differentiate into various cell types. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are a type of pluripotent stem cell genetically reprogrammed from somatic cells, which have similar biological features of natural pluripotent stem cells, such as ESCs. iPSCs have been widely used in stem cell therapy without any drawbacks of ethical issues. In recent years, there is a growing body of studies concerning molecular imaging of monitoring stem cells transplantation and made significant achievements. This review will be focused on the updated application of radionuclide imaging in monitoring of ESCs and iPSCs transplantation.

【Key words】 Stem cell transplantation; Pluripotent stem cells; Radionuclide imaging; Molecular imaging

干细胞是一类具有自我复制能力的多潜能细胞, 在一定条件下可分化为多种功能的细胞。根据干细胞的不同发育潜能可将其分为3类: 全能干细胞、多潜能干细胞和单能干细胞, 而胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)通常被认为是多潜能干细胞, 几乎可被诱导分化为机体所有的细胞类型, 因此在干细胞治疗、再生医学等领域有着广阔的应用前景^[1-3]。

由于 ESCs 的应用涉及到损毁胚胎的相关伦理学问题^[4], 近年来通过体外转录因子转染体细胞而获得的诱导性多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs), 因其具有与 ESCs 相似的生物

学特性, 为干细胞治疗在医学中的应用掀开了新的篇章。

ESCs 和 iPSCs 在诸多疾病的细胞治疗中得到应用, 但如何在活体条件下监测移植细胞的移行、存活及分布等生物学行为仍是目前干细胞治疗所面临的重要课题。分子影像学可在活体条件下无创性地进行干细胞移植的监测, 本文仅就核素分子显像监测 ESCs 及 iPSCs 移植的研究进展进行综述。

1 ESCs 及 iPSCs

ESCs 是一类在特定条件下能自我更新、无限增殖和多向分化的干细胞, 具有发育的全能性, 可以从早期胚胎的内细胞团经体外分离培养而获得^[5]。近年来, ESCs 治疗已用于心肌梗死^[6]、帕金森病^[7]、糖尿病^[8]、脊髓损伤^[9]等疾病的临床及实验研究, 并展示出了良好的应用前景。但由于 ESCs 的建系十分困难, 且存在异体移植免疫排斥^[10]以及伦理学

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2014.02.009

基金项目: 国家自然科学基金(81171367, 30570525); 上海市教委科研创新项目(12YZ041)

作者单位: 200025, 上海交通大学医学院附属瑞金医院核医学科

通信作者: 张一帆(Email: zhang_yifan@126.com)

等问题^[4], 因此限制了其进一步的临床应用。

2006年 Takahashi 和 Yamanaka^[11]将 4 种转录因子 Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4 导入小鼠成纤维细胞, 获得了与小鼠 ESCs 功能相似的细胞, 即 iPSCs。2007年 Takahashi 等^[12]利用 Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4 等 4 个转录因子、Yu 等^[13]利用 Oct4、Sox2、Nanog、Lin28 等 4 个转录因子先后将人的体细胞重编程为 iPSCs。由于 iPSCs 不涉及伦理方面的限制, 因此在细胞治疗、再生医学等领域得到了广泛的研究和应用, 充分展示了其潜在的临床应用价值。

2 核素分子显像类型

分子显像包括光学显像、核磁共振显像、放射性核素显像以及超声显像等^[14]。其中放射性核素显像是通过放射性示踪剂或放射性示踪剂标记细胞, 将其引入体内后通过核医学显像仪器进行靶目标显像。相比其他分子显像技术, 放射性核素显像具有皮摩尔级的灵敏度和良好的组织穿透性^[15]。一般用于活体内移植细胞的放射性核素显像方法主要有 2 种, 直接标记细胞显像和间接标记细胞显像。

2.1 直接标记干细胞显像

直接标记细胞显像是通过放射性示踪剂与细胞结合后植入体内进行细胞示踪的方法。如将 ¹⁸F-FDG 与干细胞体外培养后植入小鼠体内, 使用小动物 PET 显像仪进行干细胞移植后的生物分布监测^[16]。虽然直接标记显像的方法简单, 成本较低, 但是标记显像的信号会随着细胞的分裂或代谢有所降低, 不能长时间监测, 且标记细胞死亡后仍可检测到其释放出的信号^[17-18]。

2.2 间接标记干细胞显像

间接标记干细胞显像也称为干细胞报告基因显像, 是将含有报告基因的载体转染干细胞, 然后植入体内, 通过转染细胞表达的报告蛋白介导放射性探针进行细胞示踪的显像。

报告基因显像是在细胞和分子水平对生物过程进行定量和定性的无创显像方法。目前用于显像的报告基因有多种, 如以受体为基础的多巴胺 D2 受体报告基因和生长抑素受体亚型 2 报告基因、以转运体为基础的钠碘同向转运体报告基因、以酶为基础的 1 型单纯疱疹病毒胸苷激酶 (herpes simplex virus type 1 thymidine kinase, HSV1-tk) 报告基因和

突变型 HSV1-tk 报告基因 (HSV1-sr39tk) 等^[19]。

3 放射性核素显像仪器

目前用于放射性核素显像的仪器主要有 PET 和 SPECT。用于临床前研究的主要是小动物 PET 或小动物 SPECT。PET 显像有较高的灵敏度, 使用的放射性核素主要为 ¹⁸F, 其半衰期约为 110 min, 由回旋加速器生产, 成本较高。而 SPECT 为核医学常用显像仪器, 尽管灵敏度不如 PET, 但其常用显像剂为 ^{99m}Tc、¹³¹I 等放射性核素, 其来源方便, 价格低廉。

4 ESCs 及 iPSCs 治疗的核素显像监测

干细胞治疗作为一种人类多种退行性疾病新的治疗手段, 仍存在着很多亟待解决的问题。特别是在活体条件下, 通过无创、灵敏的方法示踪干细胞在靶器官的命运, 这对理解干细胞的生物学特性、干细胞植入的最优化以及干细胞治疗效益的最大化等是十分重要的。

4.1 ESCs 治疗的核素显像监测

ESCs 具有多向分化的潜能, 已用于多种疾病的治疗, 因此核素分子显像监测在该领域也得到广泛应用。Tarantal 等^[20]使用 ⁶⁴Cu-丙酮醛双 N4-2 甲基缩氨基硫脲直接标记表达荧光素酶的人 ESCs, 在超声引导下将其移植到孕中期的猴胎儿肾脏内, 通过 PET 成功进行了移植细胞向肾源性细胞系分化的显像监测。

实际上, 干细胞治疗的核素显像方法多采用间接显像方法, 即报告基因显像方法。Qiao 等^[21]用 HSV1-tk 的突变型报告基因及超顺磁性氧化铁颗粒 (super paramagnetic iron oxide, SPIO) 转染和标记鼠 ESCs 后, 将标记物注射到无胸腺鼠的心肌梗死部位, 研究显示, PET 可有效地进行移植部位 ESCs 存活和增殖的监测。MRI 具有良好的空间分辨率, 但 SPIO 标记的干细胞死亡后, 被吞噬细胞吞噬后其体内仍含有 SPIO, 因此, MRI 难于区分存活与死亡的细胞; 而 PET 显像尽管空间分辨率差, 但灵敏度高, 可以检测移植的活性细胞。因此, 在细胞治疗监测方面两种模式各有所长, 可以取长补短。

由于慢病毒载体可将报告基因整合到细胞基因组中, 因此可以长时间进行干细胞移植治疗的监测。Lee 和 Wu^[22]通过重组单体红色荧光蛋白 (red

fluorescent protein, RFP)、萤火虫荧光素酶(firefly luciferase, Fluc)以及 HSV-tk 3 种报告基因的慢病毒转染 ESCs, 通过生物发光显像和小动物 PET 显像成功地进行了 ESCs 移植后长时间的示踪监测。

4.2 iPSCs 治疗的核素显像监测

近年来, iPSCs 用于干细胞治疗, 特别在心、脑血管病的治疗方面得到越来越多地应用, 因此, 针对 iPSCs 移植后的核素显像报道也逐渐增多。Wang 等^[23]将 iPSCs 和 ESCs 植入大鼠的脑缺血模型中, 通过 ¹⁸F-FDG 小动物 PET 显像观察移植后大鼠脑功能的状况。结果表明, 植入 iPSCs 和 ESCs 的大鼠脑缺血部位的 FDG 代谢恢复, 并认为 iPSCs 移植治疗可能优于 ESCs, 展示出更大的应用价值。

在报告基因核素显像方面, Templin 等^[24]将稳定表达荧光和钠碘同向转运体的人 iPSCs 植入猪的心肌梗死模型中, 通过 ¹²⁵I 进行了移植后细胞的存活和分布的 SPECT 显像监测, 并通过 ^{99m}Tc^m-tetrafosmin 进行了心肌灌注显像以了解梗死心肌的血供。该研究首次进行了大型动物人 iPSCs 移植后的分布、存活等的长时间监测的研究, 并证实植入猪心肌梗死部位的人 iPSCs 能够分化形成血管。此外, Lee 等^[25]通过在慢病毒载体构建 3 种报告基因(Fluc-RFP-HSV-tk)进行 ESCs 分子显像监测的基础上, 又结合 SPIO, 对狗心肌缺血梗死模型中 iPSCs 移植后的命运进行了 PET/CT 和 MRI 多模式显像, 证实其对 iPSCs 移植监测具有潜在临床应用价值。

5 畸胎瘤形成的分子影像学监测

人 ESCs 或 iPSCs 具有无限增殖和多项分化的潜能, 这些特性使其成为生物医学研究和移植治疗的理想细胞来源。然而, 细胞植入体内异位位置易形成畸胎瘤, 严重影响其在细胞治疗及再生医学中的应用。因此, 如何在活体条件下无创地监测或降低畸胎瘤的形成, 是目前细胞移植治疗中所面临的重要课题。

血管形成是肿瘤的一个重要的生物学特性, 其中 $\alpha v\beta 3$ 整合素在肿瘤血管形成和转移中起着重要作用^[26-27]。Cao 等^[28]利用 ⁶⁴Cu 标记 $\alpha v\beta 3$ 配基的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(arginine-glycine-aspartate, RGD)四聚体(⁶⁴Cu-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N',N'-tetraacetic acid-RGD₄, ⁶⁴Cu-DOTA-RGD₄)进行了 ESCs 植入后畸胎瘤形成的 PET 显像监测,

研究结果显示, 畸胎瘤高表达 $\alpha v\beta 3$, 通过 ⁶⁴Cu-DOTA-RGD₄ 可明显和特异性地进行畸胎瘤显像, 明显优于 ¹⁸F-FDG 和 ¹⁸F-胸腺嘧啶脱氧核苷进行的畸胎瘤显像。鉴于 ⁶⁴Cu 为加速器生产的非常用正电子核素, 来源不便, Li 等^[29]通过 ^{99m}Tc^m 标记 RGD 制备的 ^{99m}Tc^m-3PRGD2 (其中, P 为聚乙二醇)显像剂, 进行了 iPSCs 移植后畸胎瘤形成的 SPECT 显像监测, 结果显示, 其可有效进行 iPSCs 移植后畸胎瘤形成的监测, 具有良好的应用前景。

除了通过放射性药物进行畸胎瘤形成的监测外, Pomper 等^[30]也观察到转染基因的人 ESCs 也可形成畸胎瘤, 并通过 SPECT 显像对重组 HSV1-tk-绿荧光蛋白慢病毒转染的人 ESCs 移植后的存活和分布进行了荧光和 PET 显像的长时间监测, 并获得了较好的效果。

6 小结

核素分子显像在活体条件下无创地进行 ESCs 及 iPSCs 移植治疗监测方面取得了长足的进展, 同时在 ESCs 及 iPSCs 的畸胎瘤的形成监测方面也取得了良好效果, 对推动 ESCs 及 iPSCs 治疗的应用和发展起着重要作用。但 ESCs 及 iPSCs 的研究和临床应用还有许多有待解决的问题, 因此, 进一步开发新的核素显像剂以及采用多模态的显像方法进行 ESCs 及 iPSCs 移植治疗监测, 仍是未来分子影像学发展的重要方向。

参 考 文 献

- [1] Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, et al. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2008, 2(4): 169-183.
- [2] Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine[J]. Respiration, 2013, 85(1): 3-10.
- [3] Kadota S, Aiba K, Nakatsuji N. Embryonic stem cell research[J]. Nihon Rinsho, 2011, 69(12): 2109-2113.
- [4] Luong MX, Smith KP, Stein GS. Human embryonic stem cell registries: value, challenges and opportunities[J]. J Cell Biochem, 2008, 105(3): 625-632.
- [5] Chen X. Stem cells: what can we learn from flies?[J]. Fly(Austin), 2008, 2(1): 19-28.
- [6] Simpson DL, Boyd NL, Kaushal S, et al. Use of human embryonic stem cell derived-mesenchymal cells for cardiac repair[J]. Biotechnol Bioeng, 2012, 109(1): 274-283.
- [7] Muramatsu S, Okuno T, Suzuki Y, et al. Multitracer assessment of dopamine function after transplantation of embryonic stem cell-

- derived neural stem cells in a primate model of Parkinson's disease [J]. *Synapse*, 2009, 63(7): 541-548.
- [8] Rezanian A, Bruin JE, Riedel MJ, et al. Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice[J]. *Diabetes*, 2012, 61(8): 2016-2029.
- [9] Bottai D, Cigognini D, Madaschi L, et al. Embryonic stem cells promote motor recovery and affect inflammatory cell infiltration in spinal cord injured mice[J]. *Exp Neurol*, 2010, 223(2): 452-463.
- [10] Moller MS. Human embryonic stem cell research, justice, and the problem of unequal biological access[J]. *Philos Ethics Humanit Med*, 2008, 3: 22.
- [11] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [12] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [13] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [14] Kuchmiy AA, Efimov GA, Nedospasov SA. Methods for in vivo molecular imaging[J]. *Biochemistry(Mosc)*, 2012, 77(12): 1339-1353.
- [15] Welling MM, Duijvestein M, Signore A, et al. In vivo biodistribution of stem cells using molecular nuclear medicine imaging[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(6): 1444-1452.
- [16] Wolfs E, Struys T, Notelaers T, et al. ¹⁸F-FDG labeling of mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells for PET imaging: effects on ultrastructure and differentiation capacity[J]. *J Nucl Med*, 2013, 54(3): 447-454.
- [17] Cai W, Zhang Y, Kamp TJ. Imaging of induced pluripotent stem cells: from cellular reprogramming to transplantation[J]. *Am J Nucl Med Mol Imaging*, 2011, 1(1): 18-28.
- [18] Gu E, Chen WY, Gu J, et al. Molecular imaging of stem cells: tracking survival, biodistribution, tumorigenicity, and immunogenicity[J]. *Theranostics*, 2012, 2(4): 335-345.
- [19] Jiang H, Cheng Z, Tian M, et al. In vivo imaging of embryonic stem cell therapy[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2011, 38(4): 774-784.
- [20] Tarantal AF, Lee CC, Batchelder CA, et al. Radiolabeling and in vivo imaging of transplanted renal lineages differentiated from human embryonic stem cells in fetal rhesus monkeys[J]. *Mol Imaging Biol*, 2012, 14(2): 197-204.
- [21] Qiao H, Zhang H, Zheng Y, et al. Embryonic stem cell grafting in normal and infarcted myocardium: serial assessment with MR imaging and PET dual detection[J]. *Radiology*, 2009, 250(3): 821-829.
- [22] Lee AS, Wu JC. Imaging of embryonic stem cell migration in vivo [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 750: 101-114.
- [23] Wang J, Chao F, Han F, et al. PET demonstrates functional recovery after transplantation of induced pluripotent stem cells in a rat model of cerebral ischemic injury[J]. *J Nucl Med*, 2013, 54(5): 785-792.
- [24] Templin C, Zweigerdt R, Schwanke K, et al. Transplantation and tracking of human-induced pluripotent stem cells in a pig model of myocardial infarction: assessment of cell survival, engraftment, and distribution by hybrid single photon emission computed tomography/computed tomography of sodium iodide symporter transgene expression[J]. *Circulation*, 2012, 126(4): 430-439.
- [25] Lee AS, Xu D, Plews JR, et al. Preclinical derivation and imaging of autologously transplanted canine induced pluripotent stem cells[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(37): 32697-32704.
- [26] Cai W, Niu G, Chen X. Imaging of integrins as biomarkers for tumor angiogenesis[J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(28): 2943-2973.
- [27] Liu Z, Wang F, Chen X. Integrin $\alpha_3\beta_3$ -targeted cancer therapy[J]. *Drug Dev Res*, 2008, 69(6): 329-339.
- [28] Cao F, Li Z, Lee A, et al. Noninvasive de novo imaging of human embryonic stem cell-derived teratoma formation[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(7): 2709-2713.
- [29] Li Y, Liu Z, Dong C, et al. Noninvasive detection of human-induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived teratoma with an integrin-targeting agent ^{99m}Tc-3PRGD2[J]. *Mol Imaging Biol*, 2013, 15(1): 58-67.
- [30] Pomper MG, Hammond H, Yu X, et al. Serial imaging of human embryonic stem-cell engraftment and teratoma formation in live mouse models[J]. *Cell Res*, 2009, 19(3): 370-379.

(收稿日期: 2013-08-02)