

细胞磁共振成像技术在体示踪免疫细胞的研究进展

王静 姚振威

【摘要】 肿瘤免疫治疗是继手术、放疗和化疗后出现的一种新的治疗方法。在体示踪免疫细胞有助于指导肿瘤的免疫治疗并预测和评估其治疗效果。细胞磁共振成像技术运用特殊的对比剂,能够无创、实时、可重复地监测体内细胞的活动。近年来,研究者对应用细胞磁共振成像技术在体示踪免疫细胞进行了大量的研究并取得了一定的进展,该文将就这一研究进展作一综述。

【关键词】 磁共振成像;免疫细胞;示踪;对比剂;在体

Advances in tracking immunocytes using cellular magnetic resonance imaging in vivo Wang Jing, Yao Zhenwei. Department of Radiology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China
Corresponding author: Yao Zhenwei, Email: aocnhnr@126.com

【Abstract】 Tumor immunotherapy is a new treatment modality following surgical resection, chemotherapy and radiotherapy. In vivo tracking immunocyte helps to direct immunotherapy, as well as predict and assess the treatment effect. Cellular magnetic resonance imaging, applying specific contrast agents, is a non-invasive imaging modality capable of monitoring the real-time migration of cells in vivo repeatedly. These years, a lot of related studies have been conducted and certain research progress has been achieved. This article reviews the advances in the study of immunocytes tracking using cellular magnetic resonance image in vivo.

【Key words】 Magnetic resonance imaging; Immunocytes; Tracking; Contrast agents; In vivo

肿瘤免疫治疗是继手术、放疗和化疗后出现的一种新的治疗方法,能够克服放化疗杀伤正常细胞的缺点。免疫细胞在肿瘤的免疫治疗中居于核心地位,细胞的成熟状态、引入途径、迁移和归巢能力都将影响免疫治疗的效果,阐明免疫细胞在体内的迁移途径及迁移特性有助于人们更深入地理解免疫系统与肿瘤的作用机制。因此,我们需要一种无创的、可重复的并且能够实时监测体内细胞活动的成像方法。在体运用成像技术示踪免疫细胞虽然困难重重,但近些年来仍然取得了一定的进展。

分子和细胞影像技术将生物技术和成像方法有机地结合起来,监测生理和病理状态下体内分子和细胞的变化情况。该技术是对活体内分子和细胞以及体内生物学变化和细胞过程进行的一种无创的、可重复的成像技术^[1],主要涉及以下两个方面^[2]:一是对比剂、示踪剂和报告探针相关技术,二是成

像技术。目前,研究较为广泛的分子和细胞影像技术主要有 PET、SPECT、荧光显像和 MRI。PET 和 SPECT 具有较高的灵敏度,但空间分辨率差。荧光成像是细胞水平研究的重要工具,灵敏度高、价格便宜、操作简单,但是其空间分辨率差,活体成像效果受组织穿透深度的限制,目前仍无商用的基于荧光成像的临床诊断仪器。MRI 克服了荧光显像、PET 与 SPECT 的缺点,具有优异的空间分辨率,显像不受组织深度的限制。随着高场强 MRI 和新型对比剂的出现, MRI 灵敏度不佳的缺点也随之克服。利用 MRI 监测体内标记细胞的迁移途径不仅作为一种研究方法,而且作为一种潜在的临床诊断工具,受到越来越广泛的关注。

目前,研究最多的细胞 MRI 对比剂是超顺磁性对比剂,主要包括超顺磁性氧化铁纳米颗粒(superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPION)^[3]、超小超顺磁性氧化铁纳米颗粒(ultrasmall superparamagnetic iron oxide nano-particles, USPIO)^[4]和微小氧化铁颗粒(micron-sized iron oxide particles, MPIO)^[5]

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2014.05.014

作者单位: 200040 上海, 复旦大学附属华山医院放射科

通信作者: 姚振威(Email: aocnhnr@126.com)

等。另外,还有单晶氧化铁颗粒(monocrystalline iron oxide particles, MION)^[4]和交叉结合氧化铁(cross-linked iron oxides, CLIO)^[4]等。不同对比剂MRI信号特征各不相同,如氧化铁纳米颗粒在T2加权呈低信号,钆离子螯合物T1加权上呈高信号,从而根据不同的信号特征监测免疫细胞的生物学分布以及它们在靶器官的定位。

细胞标记技术可以分为两大类:直接标记和间接标记。直接标记是示踪某种特定细胞最常用的方法。在直接标记中,免疫细胞直接内化标记物。免疫细胞在体外用标记探针,如荧光物质、放射性示踪剂或顺磁性纳米颗粒进行标记后回输体内,分别用荧光显像、PET/SPECT或MRI进行体内示踪。直接标记的优势在于操作简单,标记探针能够与特异的靶细胞结合或者能够容易地穿透细胞膜。直接标记的缺陷:①标记水平取决于细胞的标记物摄取能力。②只能用来在体示踪终末分化细胞,如树突状细胞(dendritic cells, DCs)和巨噬细胞,而不能长时间监测体内细胞的活性和增殖能力。③可能会影响细胞的迁移、活性、功能、增殖以及分化能力。利用转染介质(transfection agents)(如多聚L-赖氨酸、鱼精蛋白硫酸盐等)^[6]、电穿孔技术(electroporation)^[7]、HIV-1反式作用因子肽(HIV-1 transactivator peptides, HIV-1-TAT)^[8]修饰颗粒表面可以更有效地进行细胞标记。另外,细胞标记效率还与细胞类型有关,如吞噬细胞容易内化纳米颗粒,而非吞噬细胞则需要多聚L-赖氨酸或鱼精蛋白硫酸盐等带正电载体辅助纳米颗粒的内化。间接标记需要进行基因修饰,表达可被探测到的报告蛋白或产生酶促反应,目前应用较少。本文重点介绍直接标记法细胞MRI在体示踪DCs、T淋巴细胞、巨噬细胞和自然杀伤(natural killer, NK)细胞。

1 细胞MRI在体示踪DCs

DCs是体内最强的抗原递呈细胞,能够在周围淋巴器官中直接激活初始型T淋巴细胞^[9]。肿瘤抗原负载的DCs疫苗已经开始应用于临床,对人体无不良反应,并产生了预期的免疫反应和临床治疗效果^[9]。de Vries等^[10]将SPIO或¹¹¹In-8羟基喹啉(¹¹¹In-oxine)标记的自体DCs,在超声引导下同时注射至黑色素瘤患者的淋巴结内,联合运用MRI和闪烁扫描成像对其进行示踪,其结果表明,MRI在体

示踪磁性标记细胞以监测少量DCs在体内的位置是切实可行的,并且与闪烁扫描成像相比,MRI可以更精确地评估DCs在淋巴结间及淋巴结内的转移方式。Aspord等^[12]在免疫缺陷小鼠体内分别静脉和腹膜下注射荧光钆氧化物纳米颗粒(Gd-fluorescent gadolinium-based nanoparticles, Gd-FITC-HNP)标记的人类浆细胞树突状细胞(human plasmacytoid dendritic cells, HuPDC),并用7.0T MRI对其进行示踪,结果显示,Gd-FITC-HNP可以高效地标记HuPDC,并且不影响细胞的存活率、功能和归巢能力。Gd纳米颗粒是MRI的一种阳性对比剂,提高了标记细胞的检出数目和敏感性。Rohani等^[13]报道,MRI体内示踪荧光MPIO标记的DCs同样能够获得理想的效果。

2 细胞MRI在体示踪T淋巴细胞

T淋巴细胞是人体最主要的淋巴细胞之一,占外周血淋巴细胞的60%左右,在人体的免疫过程中起着举足轻重的作用。T淋巴细胞介导的免疫治疗,其治疗效果主要依据T细胞在肿瘤组织中的分布以及原始T细胞分化为效应T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞和细胞毒性T细胞的情况进行评价。与B淋巴细胞通过产生抗体可以远距离发挥作用不同的是,效应T细胞作用的发挥必须与靶细胞直接接触。运用MRI无创性体内示踪T淋巴细胞能够使我们更加深入地认识多种病理生理过程,如艾滋病、肿瘤、糖尿病、移植排斥反应等。Liu等^[14]应用一种新型SPION——PEG包裹的氨基氧化铁纳米颗粒(iron-oxide particle coated with NH₂, IOPC-NH₂)标记T淋巴细胞,该颗粒有着较高的横向弛豫,不影响T细胞的功能特性。IOPC-NH₂颗粒是首个报道的能够以超过90%的有效率标记大鼠和人T淋巴细胞的细胞MRI对比剂,而无需使用转染介质、HIV-1-TAT或者电穿孔。在体试验证明,MRI能够在体示踪IOPC-NH₂标记的T淋巴细胞,并证明了NH₂基团能够促进T淋巴细胞的内吞作用,PEG包裹同样能够促进T淋巴细胞摄取IOPC-NH₂颗粒。Shapiro等^[15]利用生物素酰化抗CD5抗体介导的链霉抗生物素蛋白包裹的MPIOs标记T淋巴细胞,虽然电子显微镜下显示标记后大部分MPIO位于细胞外,但仍然存在细胞内的摄取,且细胞内铁离子的浓度高达60 pg/细胞,是

USPIO 标记后细胞内铁浓度的 30 倍,能明显提高 MRI 示踪 T 淋巴细胞的检出率。

3 细胞 MRI 在体示踪巨噬细胞

巨噬细胞在抗病原体 and 抗肿瘤的免疫反应中起着重要的作用。活化的巨噬细胞与其他免疫活性细胞一样,在决定免疫原性和产生恰当的免疫应答方面起着重要的作用。巨噬细胞吞噬颗粒和化合物以及向炎性病灶的迁移能力是体内标记和监测巨噬细胞的基础。Petry 等^[16]将 SPIO 或 USPIO 静脉注射至大鼠多发性硬化、缺血性脑卒中和脑胶质瘤患者体内,首次实现在人体利用 MRI 监测脑内巨噬细胞。该临床试验揭示了以上这些中枢神经系统疾病巨噬细胞在时间和空间上的分布情况,从而使人们能够更加深入地了解这些中枢神经系统疾病的免疫反应,有助于中枢神经系统疾病的诊断和治疗。Valable 等^[15]利用绿色荧光微小氧化铁颗粒(green-fluorescent MPIO)体外标记单核/巨噬细胞(monocytes/macrophages, Mo/Ma)并静脉注射至大鼠 C6 脑胶质瘤模型体内,并用 MRI T2* 序列监测到标记的 Mo/Ma 对脑胶质瘤具有靶向作用。Figueiredo 等^[17]利用钆负载的葡聚糖颗粒[Gd(III)-loaded glucan particles, Gd-GPs]作为 MRI 阳性对比剂标记和示踪吞噬细胞,并且在鼠肝炎模型中用 MRI 观察到病灶区域 Gd-GPs 标记的巨噬细胞的浸润。

4 细胞 MRI 在体示踪 NK 细胞

NK 细胞是机体天然免疫的主要承担者,来源于骨髓,主要存在于血液和淋巴样组织。NK 细胞作为天然免疫细胞首先参与抗肿瘤反应,并通过调节 DCs 的功能调节获得性免疫反应的方向和强度^[18]。NK 细胞是实体肿瘤和血源性恶性疾病强有力的免疫治疗细胞,通过识别靶细胞表面抑制性受体和活化受体杀伤靶细胞,无需预先致敏^[19]。NK 细胞识别靶细胞时释放包含穿孔素和颗粒酶的颗粒物质或者死亡配体如肿瘤坏死因子引起靶细胞的凋亡^[20]。Mallett 等^[21]用 MRI 在鼠前列腺癌模型体内示踪 USPIO 标记的 KHYG-1 NK 细胞(NK 细胞系的一种),并发现 MRI 只能监测到皮下注射(肿瘤周围标记细胞分布集中)的 NK 标记细胞,而不能监测到静脉内和腹膜下(标记细胞稀疏分布在肿瘤病灶中心)注射的 NK 细胞。Meier 等^[22]将 SPIO 标记的

NK 细胞静脉注射至皮下异基因移植的前列腺癌大鼠模型体内,证明 MRI 技术在体示踪 SPIO 标记的 NK 细胞是切实可行的。

综上所述,在体示踪免疫细胞有助于人们更深入地了解机体各种病理生理过程的免疫反应,这对于疾病免疫治疗方案的制定、效果的评价有着重要的指导作用。由于荧光示踪技术穿透深度较低,难以运用于人体示踪免疫细胞。MRI 技术无辐射且空间分辨率高,是一种无创、可重复并且能够实时监测体内细胞的成像方法,近年来被越来越多地运用于免疫细胞的在体示踪。MRI 设备以及细胞 MRI 对比剂为 MRI 在体示踪细胞提供了基本技术支持,近年来,各种新型 MRI 对比剂的出现大大促进了细胞 MRI 的研究进展。然而,这些新型对比剂在投入临床使用之前,仍需要进一步进行毒理学、体内稳定性和生物学分布的研究。另外, MRI 能否追踪到免疫细胞以及所能观察到的靶器官的归巢量,还与 MRI 对比剂的选取及不同 MRI 成像技术有关。目前,还没有文献具体报道细胞 MRI 技术示踪免疫细胞的归巢,仍需要进一步研究。随着 MRI 设备的不断改进和安全性更高的新型细胞 MRI 对比剂的出现,利用 MRI 在体示踪细胞将成为强大的临床疾病诊断工具,并为疾病的治疗提供不可忽视的指导。

参 考 文 献

- [1] Bulte JW, Krait chm an DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging[J]. NMR Biomed, 2004, 17(7): 484-499.
- [2] Lucignani G, Ottobriani L, Martelli C, et al. Molecular imaging of cell-mediated cancer immunotherapy[J]. Trends Biotechnol, 2006, 24(9): 410-418.
- [3] Li L, Jiang W, Luo K, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents for non-invasive stem cell labeling and tracking[J]. Theranostics, 2013, 3(8): 595-615.
- [4] Li M, Kim HS, Tian L, et al. Comparison of two ultrasmall superparamagnetic iron oxides on cytotoxicity and MR imaging of tumors [J]. Theranostics, 2012, 2(1): 76-85.
- [5] Valable S, Barbier EL, Bernaudin M, et al. In vivo MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma[J]. Neuroimage, 2008, 40(2): 973-983.
- [6] Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, et al. Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI[J]. Blood, 2004, 104(4): 1217-1223.
- [7] Wang L, Wang Z, Frank TG, et al. Rapid and efficient cell labeling

- with a MRI contrast agent by electroporation in the presence of protamine sulfate[J]. *Nanomedicine(Lond)*, 2009, 4(3): 305-315.
- [8] Lewin M, Carlesso N, Tung CH, et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(4): 410-414.
- [9] Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, et al. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells[J]. *Nat Immunol*, 2000, 1(4): 311-316.
- [10] Figdor CG, de Vries IJ, Leaterhuis WJ, et al. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way[J]. *Nat Med*, 2004, 10(5): 475-480.
- [11] de Vries IJ, Leaterhuis WJ, Barentsz JO, et al. Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(11): 1407-1413.
- [12] Asford C, Laurin D, Janier MF, et al. Paramagnetic nanoparticles to track and quantify in vivo immune human therapeutic cells[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(23): 11409-11415.
- [13] Rohani R, de Chickera SN, Willert C, et al. In vivo cellular MRI of dendritic cell migration using micrometer-sized iron oxide(MPIO) particles[J]. *Mol Imaging Biol*, 2011, 13(4): 679-694.
- [14] Liu L, Ye Q, Wu Y, et al. Tracking T-cells in vivo with a new nano-sized MRI contrast agent[J]. *Nanomedicine*, 2012, 8(8): 1345-1354.
- [15] Shapiro EM, Medford-Davis LN, Fahmy TM, et al. Antibody-mediated cell labeling of peripheral T cells with micron-sized iron oxide particles (MPIOs) allows single cell detection by MRI[J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2007, 2(3): 147-153.
- [16] Petry KG, Boiziau C, Dousset V, et al. Magnetic resonance imaging of human brain macrophage infiltration[J]. *Neurotherapeutics*, 2007, 4(3): 434-442.
- [17] Figueiredo S, Cutrin JC, Rizzitelli S, et al. MRI tracking of macrophages labeled with glucan particles entrapping a water insoluble paramagnetic Gd-based agent[J]. *Mol Imaging Biol*, 2013, 15(3): 307-315.
- [18] Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, et al. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to the altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection[J]. *J Immunol*, 2004, 173(10): 6072-6081.
- [19] Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology[J]. *Blood Rev*, 2006, 20(3): 123-137.
- [20] Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, et al. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity[J]. *Trends Immunol*, 2003, 24(11): 603-609.
- [21] Mallett CL, McFadden C, Chen Y, et al. Migration of iron-labeled KHYG-1 natural killer cells to subcutaneous tumors in nude mice, as detected by magnetic resonance imaging[J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(6): 743-751.
- [22] Meier R, Golovko D, Tavri S, et al. Depicting adoptive immunotherapy for prostate cancer in an animal model with magnetic resonance imaging[J]. *Magn Reson Med*, 2011, 65(3): 756-763.

(收稿日期: 2013-11-12)

·读者·作者·编者·

更正

发表在《国际放射医学核医学杂志》2011年第35卷第1期的题目为“ ^{125}I 粒子持续低剂量率杀伤肿瘤细胞体外实验研究进展”的文章,其基金项目为甘肃省自然科学基金项目(1107RJZA097)。由于作者的疏忽,当时没有标注基金项目,给读者与杂志带来了不便,特此致歉并更正。

作者 柳江燕