

## 细胞示踪影像学技术的发展

张华 姚振威

**【摘要】** 随着细胞治疗的不断深入, 采取有效的活体细胞示踪技术评价细胞治疗后的疗效并监测移植细胞的分化增殖、迁移及生存状况, 对细胞治疗后脏器功能改善机制的深入研究及指导未来细胞治疗的临床应用显得尤为重要, 因此活体细胞示踪成像技术成为细胞治疗由基础研究到临床应用推广的关键技术之一。笔者主要就当前细胞示踪影像技术(主要是MRI及光学成像)的发展及其可行性作一综述。

**【关键词】** 磁共振成像; 放射性示踪剂; 荧光蛋白质示踪; 光学成像

**The development of cell tracking technology** Zhang Hua, Yao Zhenwei. Department of Radiology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200030, China.

Corresponding author: Yao Zhenwei, Email: aocnhnr@126.com

**【Abstract】** As the cell therapy moves forward, adopting effective cell tracking techniques in living cells plays an important role in evaluating curative effects after cell therapy and monitoring differentiation and proliferation, migration and survival status of transplanted cells, which hold promise and potential to address many unmet clinical needs. So cell tracking technique in vivo is one of crucial techniques to transform cell therapy from basic research to clinical promoted application. This article is mainly to overview recent development and feasibility of cell tracking with optical and MR imaging.

**【Key words】** Magnetic resonance imaging; Radioactive tracers; Fluorescent antibody technique; Optical imaging

传统离体组织病理学细胞示踪的方法是在不同的时间点杀死多只动物, 取其离体靶组织进行标记染色, 从而简要了解细胞在生物体内迁徙等的基本情况, 传统的细胞示踪无法实现无创、实时、动态观察同一动物体内标记细胞的迁徙过程, 离体状态下所取得的结论与活体状态下难免有一定的偏差, 这在一定程度上制约了细胞治疗疗效及机制的研究探讨。

Weissleder 和 Mahmood<sup>[1]</sup>于 2001 年提出分子影像学的概念, 即在活体状态下, 在细胞和分子水平上实时定性及定量检测活体细胞内某些生物学特征, 可观察到疾病早期的细胞分子水平的异常变化, 而不是对最终的形态学变化成像, 达到对疾病早期检测的目的, 这也是分子影像学相对于传统影像学最大的优势所在。Weissleder<sup>[2]</sup>同时指出活体示踪比传统的示踪检测更具挑战性, 因为它同时需要 4 个方面的努力研究探索: ①活体内合适的亲和配

体即分子探针; ②高效的器官靶向定位; ③目标区域灵敏的信号放大系统; ④高分辨率和高敏感度的成像系统。至此, 分子影像学的发展使得活体细胞示踪技术进入新阶段。

目前活体细胞示踪成像技术主要有光学成像(optical imaging, OI)、MRI 和核医学分子成像, 每种示踪技术均有各自特殊的优势与劣势, 而细胞示踪技术的选择主要取决于特定的研究目的和所要证明的假设。

### 1 磁共振细胞示踪成像技术

MRI 技术是指通过 MRI 连续监测活体细胞内作为成像依据的特殊分子, 将活体内的生物学行为转化为特异性分子影像, 从而实现活体状态下定性定量研究生物组织结构及功能变化的生理过程。MRI 探针标记物的基本要求为: 高特异性及高亲和力; 半衰期长, 有充足的时间成像; 对标记细胞安全可靠; 检测单元可达单细胞或多细胞水平等<sup>[3]</sup>。目前 MRI 细胞标记物主要有 3 类: 顺磁性钆对比剂( $Gd^{3+}$ )、超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.02.017

作者单位: 200030 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)

oxide, SPIO)纳米材料对比剂和磁共振报告基因(前两种为直接标记),但其均不能达到上述的理想要求。

顺磁性钆对比剂属于细胞外液阳性对比剂,其细胞标记效率低,需较高浓度才能产生正性 T1 对比效应,有一定的技术难度。钆对比剂对靶细胞的潜在毒性以及对干细胞的多向分化潜能的影响尚未研究明确,因此目前钆对比剂标记干细胞进行分子成像的研究报道比较少见<sup>[4]</sup>。当然,也有少数以钆为基础的对比剂标记细胞并取得成功的研究,如 Modo 等<sup>[5]</sup>首先用右旋糖酐聚合物连接的 Gd-DTPA 与 nlodalline 颗粒体外标记神经干细胞,然后将标记后的细胞移植到卒中患者体内行 MRI/OI 示踪移植后的神经干细胞,可以特异性地显示神经干细胞在患者体内的迁徙分化过程。

SPIO 多由葡聚糖生物高分子包裹修饰而成,是一种磁共振阴性对比剂<sup>[6]</sup>,主要包括普通型 SPIO 和超微型 SPIO,可以通过直接胞吞、转染试剂介导胞吞及电穿孔法等措施标记组织细胞,方法简单,安全有效。分布于组织中的 SPIO 会导致局部磁场不均匀,质子去相位纵向弛豫时间缩短,产生负性 T2 对比效应,而对 T1 弛豫影响较小,所以观察 SPIO 标记细胞在体内的生物过程应选择 T2 加权成像。Anderson 等<sup>[7]</sup>将 SPIO 标记的内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 静脉注入脑胶质瘤模型鼠体内,然后应用 MRI T2 加权像对移植后 EPCs 活体示踪发现其进入了肿瘤血液循环当中,并进一步分化为肿瘤血管内皮细胞。

SPIO 对外加磁场的高灵敏度使其在相对较低的浓度即可达到所需的标记效果。研究显示,采用 SPIO 标记干细胞的最佳终浓度为 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ <sup>[8]</sup>。Neri 等<sup>[9]</sup>和 Frank 等<sup>[10]</sup>对磁性标记的骨髓间充质干细胞、神经前体细胞等研究显示,适当提高 SPIO 浓度可使标记率达到 100%,而此时生物特性未明显受到损害。SPIO 的生物降解特性及低浓度 SPIO 标记可以消弱对靶细胞生物特性的潜在影响,以上特性使 SPIO 成为目前较理想的磁共振示踪剂。

磁标细胞的代谢、分裂等对 SPIO 的稀释作用会导致 T2 弛豫逐渐延长,不能长期示踪细胞,在一定程度上,我们可以根据 MRI 上随时间改变的信号强度的下降来评价标记细胞分裂速度。

磁共振报告基因成像是通过特定程序重新整合靶细胞的基因,使其稳定过度表达导致 MRI 信号

改变的物质,如某些受体、酶类等,它无需使用外源性对比剂,是间接标记成像。Moriel<sup>[11]</sup>提出目前主要的报告基因为酶相关报告基因,主要包括肌酸激酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和酪氨酸酶等报告基因;受体相关报告基因主要包括转铁蛋白受体等报告基因、化学交换饱和转移相关报告基因及一些其他类型的报告基因。Naumova 等<sup>[12]</sup>在 2010 年最早将此技术运用于移植干细胞治疗心肌梗死后的细胞示踪,通过使鼠成骨骼肌细胞铁蛋白基因超量表达, MRI T2 加权像中的细胞移植区呈低信号区,从而达到示踪移植干细胞迁徙状况的目的。

磁共振报告基因成像是磁共振在基因水平上对靶细胞的示踪,相对于直接标记成像而言,其技术复杂且要求更加严格,基因再改造在一定程度上会影响标记细胞的生物学特性,同时标记细胞内报告基因产物的蓄积等局限使其尚处于基础研究阶段,未推广于临床应用中。

此外,也有相关研究报道了全氟化碳纳米乳剂作为 MRI 细胞示踪剂的可行性<sup>[13]</sup>。

MRI 技术无创、信号不受组织深度的限制,可同时提供移植细胞周围的生理及组织结构信息等特点使得其在细胞示踪中得到广泛的应用,特别是在磁共振引导下提供精确的细胞注射移植信息,但其仍面临许多突出的问题,首先在选择对比剂时要考虑到标记细胞的快速分裂对对比剂所产生的稀释作用,特别是移植干细胞的不均等分裂<sup>[14]</sup>;一定浓度的探针标志物对标记细胞所产生的潜在毒性;标记细胞的存活状态尚不能为磁共振所辨别,影响标记细胞的 MRI 特异性显示等问题,而这些问题的解决需要对新型磁共振标记物作进一步研究。其次,在应用磁共振时要考虑在存在外在磁场条件下,活体内金属移植植物对细胞示踪及活体本身的影响。最后 MRI 技术本身也需要提高,更高的空间分辨率及检测灵敏度等会使细胞示踪的结果更真实。

## 2 光学细胞示踪成像技术

OI 为一种无创性成像技术,主要依赖于应用光的波长,最佳检测的波长范围为近红外线波谱即 700~1000 nm<sup>[15]</sup>。目前用于 OI 的探针主要有内源性生物分子、有机染料、荧光螯合物等<sup>[16]</sup>,这些对比剂都有光致漂白效应并受生物化学代谢所产生的稀释作用等局限。而近几年活跃的光学纳米粒子<sup>[17]</sup>

的发展使这些问题的解决成为可能,特别是半导体纳米晶体及量子点成为近来光学探针的研究热点。OI 主要分为两类,即生物发光成像和荧光成像(两者皆为内源性标记成像)。

生物发光成像是利用高灵敏度的电荷耦合器件相机检测标记细胞内荧光素酶催化底物荧光素(需外源性注射)所产生的特定波长的荧光,产生直观的光学图像。可检测的荧光最大组织穿刺深度为3 cm<sup>[15]</sup>。由于生物发光过程存在生化反应,信号强度可以反应标记细胞的功能状态,信号的强度与发光细胞数目成线性关系,可用于定量定性分析,在胰岛细胞、淋巴细胞及干细胞等示踪中应用广泛。Shah<sup>[18]</sup>经慢病毒载体途径用萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶标记细胞,利用生物发光成像成功示踪胶质瘤小鼠模型中干细胞的存活情况及迁徙状况。但外源性荧光素所产生的免疫源性限制了其在人体中的应用。

当标记细胞内的荧光蛋白被高能量激发光激发时会产生特定波长的光,荧光成像技术就是通过探测这种特定波长的光而产生光学图像。目前常见的荧光蛋白及染料为绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白及近红外荧光染料等,其最大的优势在于同一个体的不同亚单位可被不同的荧光蛋白标记以实现多通道细胞成像<sup>[9]</sup>,还可以观察到不同标记细胞之间的相互生物过程。荧光成像由于自发荧光信号的干扰而产生背景噪声,信噪比远低于生物发光,但随着时域荧光成像的出现,克服自发荧光的干扰成为可能<sup>[20]</sup>。此外还有外源性标记成像包括荧光染料成像及量子点成像等,其不涉及基因水平,比较容易标记。Ezzat 等<sup>[21]</sup>将近红外荧光染料 DiR 标记的干细胞移植到小鼠体内,可以清楚地示踪到干细胞从脾脏移行到肝脏的过程。

总之 OI 技术相对于其他分子影像技术有其独特的优势:单细胞高敏感性;价格较低;成像时间短,多为数秒。光谱学衍生而来的分子印迹有待用于检测移植干细胞的生存及分化情况等,但是由于光学信号穿透深度有限以及光学探针对人体安全潜在的影响等限制了其在人体的应用,目前 OI 更多用于小动物实验成像,临床应用于人体的报道少见。

### 3 多模态细胞示踪成像技术

由于磁共振、光学或者核医学等单一影像技术细胞示踪的局限性,以期实现各种成像技术优势互

补的多模态示踪成像技术应运而生,同时也带动了多模态分子探针的研发。基于不同模态分子探针的有机结合已经形成 MRI/OI、PET/OI、PET/MRI 等多模态分子探针,多模态分子探针的研发势必推动细胞示踪成像技术的显著进步。

基于 OI 与 MRI 相结合的分子探针是目前多模态示踪成像技术中较为成熟的领域。目前已有基于 MRI-荧光染料/量子点/纳米金等双模态分子探针而达到有效示踪细胞的目的, Li 等<sup>[22]</sup>将设计的一种铁蛋白包裹以绿色荧光蛋白及 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 为核心的牢笼式的分子探针引入到实验动物中,特异性示踪表达整联蛋白  $\alpha v \beta 3$  的肿瘤细胞,实现了光学的高灵敏度和磁共振技术的高分辨率的结合。Detante 等<sup>[23]</sup>用荧光修饰的 SPIO 微粒标记人骨髓间充质干细胞并移植到卒中小鼠模型中,4 周后, MRI 与光学显微镜可同时示踪到标记的人骨髓间充质干细胞,目前其主要用于动物细胞治疗后的影像学示踪研究。

关于 PET/OI,美国斯坦福大学 Lee 等<sup>[24]</sup>研究出基于 <sup>64</sup>Cu-量子点的 PET/OI 双模态分子探针,引入到动物模型体内可特异性及有效地示踪表达整联蛋白  $\alpha v \beta 3$  的肿瘤细胞。此外还有基于 <sup>125</sup>I-纳米材料双模态探针的 PET/MRI 在动物实验细胞示踪中获得成功的相关报道,提高了示踪的靶向性及灵敏度,如 <sup>125</sup>I-Hb-MnMEIO 双模态分子探针标记淋巴瘤动物模型后细胞示踪获得成功<sup>[25]</sup>等。

基于各种成像类型相结合的双模态分子探针的研究开发势必为细胞示踪技术开辟新的领域,同时多模态分子探针与治疗药物相结合实现示踪与治疗于一体的治疗诊断学也是非常值得探索的领域。Benyettou 等<sup>[26]</sup>则成功研制了 RhB- $\gamma$ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-alendronate (MRI/OI 双模态分子探针与抗肿瘤药物结合)示踪与治疗相结合的多功能纳米体系,并证实了其对动物胸腺肿瘤细胞靶向示踪及治疗的有效性。

### 4 小结

综上所述,现有的细胞示踪技术为细胞治疗的评价提供了一定的依据和可能,但是还没有任何单一影像技术达到理想要求,从而限制了细胞示踪技术在临床上的推广应用。对活体细胞示踪成像技术的研究仍有待于进一步发展和完善,特别是跨学科交叉研究的多模态分子成像技术将会成为接下来的研究热点。相信在不久的将来,细胞示踪影像技术

的研究会有新的突破。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Weissleder R, Mahmood U. Molecular imaging[J]. *Radiology*, 2001, 219(2): 316–333.
- [ 2 ] Weissleder R. Molecular imaging: exploring the next frontier[J]. *Radiology*, 1999, 212(3): 609–614.
- [ 3 ] Frangioni JV, Hajjar RJ. In vivo tracking of stem cells for clinical trials in cardiovascular disease[J]. *Circulation*, 2004, 110(21): 3378–3383.
- [ 4 ] Politi LS. MR-based imaging of neural stem cells[J]. *Neuroradiology*, 2007, 49(6): 523–534.
- [ 5 ] Modo M, Mollodew K, Cash D, et al. Mapping transplanted stem cell migration after a stroke: a serial, in vivo magnetic resonance imaging study[J]. *NeuroImage*, 2004, 21(1): 311–317.
- [ 6 ] Ahrens ET, Bulte JW. Tracking immune cells in vivo using magnetic resonance imaging[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(10): 755–763.
- [ 7 ] Anderson SA, Glod J, Arbab AS, et al. Noninvasive Mr imaging of magnetically labeled stem cells to directly identify neovasculature in a glioma model[J]. *Blood*, 2005, 105(1): 420–425.
- [ 8 ] 林冰影, 张景峰, 张敏鸣. 不同粒径和浓度超顺磁性氧化铁 MR 信号特征的实验研究[J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2010, 39(2): 125–129.
- [ 9 ] Neri M, Maderna C, Cavazzin C, et al. Efficient in vitro labeling of human neural precursor cells with superparamagnetic Iron oxide particles: relevance for in vivo cell tracking[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(2): 505–516.
- [ 10 ] Frank JA, Miller BR, Arbab AS, et al. Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic Iron oxides and transfection agents[J]. *Radiology*, 2003, 228(2): 480–487.
- [ 11 ] Vandsburger M. Cardiac cell tracking with MRI reporter genes: welcoming a new field[J]. *Curr Cardiovasc Imaging Rep*, 2014, 7(2): 9250.
- [ 12 ] Naumova AV, Reinecke H, Yarnykh V, et al. Ferritin overexpression for noninvasive magnetic resonance Imaging-Based tracking of stem cells transplanted into the heart[J]. *Mol Imaging*, 2010, 9(4): 201–210.
- [ 13 ] Janjic JM, Ahrens ET. Fluorine-containing nanoemulsions for MRI cell tracking[J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2010, 1(5): 492–501.
- [ 14 ] Waleczak P, Kedziorek DA, Gilad AA, et al. Applicability and limitations of MR tracking of neural stem cells with asymmetric cell division and rapid turnover: the case of the shiverer dysmyelinated mouse brain[J]. *Magn Reson Med*, 2007, 58(2): 261–269.
- [ 15 ] Elizabeth J, Sutton Tobias D, Henning Bernd J, et al. Cell tracking with optical imaging[J]. *Eur Radiol*, 2008, 18(10): 2021–2032.
- [ 16 ] Dhawan AP, D'Alessandro B, Fu X. Optical imaging modalities for biomedical applications[J]. *IEEE Rev Biomed Eng*, 2010, 3: 69–92.
- [ 17 ] Gao Y, Cui Y, Chan JK, et al. Stem cell tracking with optically active nanoparticles[J]. *Am J Nucl Med Mol Imaging*, 2013, 3(3): 232–246.
- [ 18 ] Shah K. Imaging neural stem cell fate in mouse model of glioma[J]. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2009[2014–09–26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19306259>
- [ 19 ] Hong H, Yang Y, Zhang Y, et al. Non-invasive cell tracking in cancer and cancer therapy[J]. *Curr Top Med Chem*, 2010, 10(12): 1237–1248.
- [ 20 ] Baba S, Cho SY, Ye Z, et al. How reproducible is bioluminescent imaging of tumor cell growth? Single time point versus the dynamic measurement approach[J]. *Mol Imaging*, 2007, 6(5): 315–322.
- [ 21 ] Ezzat T, Dhar DK, Malago M, et al. Dynamic tracking of stem cells in an acute liver failure model[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(6): 507–516.
- [ 22 ] Li K, Zhang ZP, Luo M, et al. Multifunctional ferritin cage nanostructures for fluorescence and Mr imaging of tumor cells [J]. *Nanoscale*, 2012, 4(1): 188–193.
- [ 23 ] Detante O, Valable S, De Fraipont F, et al. Magnetic resonance imaging and fluorescence labeling of clinical-grade mesenchymal stem cells without impacting their phenotype: study in a rat model of stroke[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(4): 333–341.
- [ 24 ] Lee HY, Li ZB, Chen K, et al. PET/MRI dual-modality tumor imaging using arginine-glycine-aspartic (RGD)- Conjugated radiolabeled Iron oxide nanoparticles[J]. *J Nucl Med*, 2008, 49(8): 1371–1379.
- [ 25 ] Choi JS, Park JC, Nah H, et al. A hybrid nanoparticle probe for dual-modality positron emission tomography and magnetic resonance imaging[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47(33): 6259–6262.
- [ 26 ] Benyettou F, Lalatonne Y, Chebbi I, et al. A multimodal magnetic resonance imaging nanoplatfrom for cancer theranostics[J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2011, 13(21): 10020–10027.

(收稿日期: 2014–09–29)