

骨髓基质细胞移植治疗脑缺血的 MRI 活体示踪研究进展

江峰 马杰

【关键词】 骨髓基质细胞; 活体示踪; 磁共振成像; 超顺磁性氧化铁; 脑缺血

【中图分类号】 R743.3 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-8925(2009)08-0859-03

Recent progress in magnetic resonance imaging for *in vivo* tracking of transplanted bone marrow stromal cells for treatment of brain ischemia

JIANG Feng, MA Jie. Department of

Neurosurgery, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University College of Medicine, Shanghai 200092, China

【Key words】 Bone marrow stromal cells; *In vivo* tracking; Magnetic resonance imaging; Superparamagnetic iron oxide; Brain ischemia

骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)是成年哺乳动物骨髓中存在的一类特殊的非造血组织干细胞,其数量不到髓内细胞总数的 0.05%,属于间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)范畴。它不表达造血干细胞的标志,如 CD34, 曾被称为“成纤维集落形成单位(CFU-fibroblast)”^[1],具有多向分化潜能和高度自我复制能力,能够在特定条件下分化为多种起源组织^[2],包括神经元和胶质细胞等。由于 BMSCs 来源广泛,取材方便,具有神经分化的潜能,而且在临床应用中自身骨髓的取材不受伦理学和供体组织来源的限制,因此在神经系统疾病的细胞基因工程治疗方面有广阔的应用前景。

一、BMSCs 移植治疗脑缺血的进展

近期研究证实, BMSCs 移植能明显促进脑卒中后神经功能的恢复。Shen 等^[3]对大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型的 BMSCs 移植治疗可改善卒中后功能恢复,这提示细胞替代治疗能提高损伤脑组织的内在恢复机制,并支持血管再生、神经发生和神经再造。研究者在长达 1 年的随访中发现植入的 BMSCs 大部分能存活,并转化为神经元和胶质细胞^[4]。采用转基因技术将 *HGH* 以及 *FGF-2* 基因转入 BMSCs 并移植入中风大鼠的脑内来增强营养因子的分泌,这些营养因子可促进缺血边缘区的血管生成^[5,6]。BMSCs 还可降低卒中病灶胶质瘢痕的厚度,从而减少轴突再生时的屏障^[7]。2003 年 Mezey 等^[8]将来源于男性的骨髓细胞(包括 MSCs 和造血干细胞)通过静脉注入患急性淋巴细胞性白血病或遗传性免疫缺陷病的 4 位女性患者体内,患者死后的尸检发现,注入的骨髓细胞可迁移至脑内,在海马和皮质可见转化为神经元的骨髓细胞。由此推断,成人骨髓细胞也可以迁移进入脑内并转化为神经元。因此,对脑缺血性损伤部位施行干细胞替代或

转基因治疗是一种极有前景的神经系统疾病治疗策略。

二、细胞标记示踪技术的进展

虽然对 BMSCs 的研究取得了令人瞩目的成果,但目前大部分仍停留在动物实验阶段,真正进入临床应用还存在很多困难需要克服。开展干细胞治疗的挑战之一就是 BMSCs 移植后如何从宿主中辨别移植细胞,并观察其在体内的生存和转归情况。目前移植干细胞的示踪研究大都采用移植前体外预先标记培养的干细胞,包括直接或间接荧光染料标记(标记细胞核或细胞膜)、核素标记方法、Y 染色体标记及报告基因转染等,移植后在特定时间点切取组织,检测特异性标记鉴别移植来源的干细胞。目前国际上比较认可的 Y 染色体标记细胞追踪移植细胞技术是选用雄性供体和雌性宿主,利用 Y 染色体作为标志物,其最大的优点就是标记技术简单且标记效率很高,利用荧光原位杂交(FISH)技术进行追踪,其荧光标记的细胞能清楚地观察到,适合长期体内试验定量分析^[9]。但这类侵袭性的方法不能动态观察移植细胞在活体宿主体内的生长分化情况,难以客观评价细胞移植术的疗效,这显然难以满足 BMSCs 移植已进入临床应用的现状。

分子成像技术的兴起为无创动态地监测活体内移植细胞提供了新的路径,采用体内神经影像学方法追踪细胞无疑是最理想的手段。随着分子影像学 and 细胞标记技术的发展,目前活体影像追踪移植干细胞成为可能,目前在干细胞示踪研究中应用较多的主要是磁标记细胞 MRI 示踪成像技术^[10]。

三、MRI 活体示踪技术

MRI 活体示踪移植干细胞的前提是需用 MR 对比剂磁化标记细胞,以使其能与宿主细胞相区分。目前标记干细胞的 MR 对比剂主要有两类:一类是主要产生 T1 正性对比效应的 Gd-DTPA,另一类是主要产生 T2 负性对比效应的超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)纳米材料。

Gd-DTPA 是二乙三胺五乙酸(DTPA)与 Gd³⁺ 的配合物,是临床常规的 MRI 造影剂。Shyu 等^[11]使用它来标记人的

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.08.028

基金项目:国家自然科学基金(30770731)

作者单位:200092 上海,上海交通大学医学院附属新华医院神经外科

BMSCs 并立体定向移植到脑缺血 SD 大鼠的脑内不同部位, 用 3T 的 MRI 跟踪到干细胞迁移到脑缺血皮层, 时间大于 4 周, 并经免疫组化证实 BMSCs 向神经元方向转化, 但该方法缺点在于对 MRI 场强要求高(必须大于 3T), 很多研究机构并不具备这一条件, 故目前应用较少。

SPIO 是右旋糖酐超顺磁性氧化铁磁共振对比剂, 其颗粒平均直径为 80 nm, 核心氧化铁直径为 20 nm, 外周为葡萄糖包裹, 理化性质稳定。其晶体核心决定物质的磁性特征及弛豫效应, 而葡萄糖衣则影响物质的生物学行为^[12]。特殊的化学结构使其具有对外加磁场的高敏感性, 在较弱的磁场中, 磁化中心即按外加磁场排列, 获得巨大的磁矩, 撤除外加磁场后无净剩磁, 此即超顺磁性。磁标记细胞 MR 成像原理为具有超顺磁性的 Fe_3O_4 晶体低浓度即能显著地造成局部磁场的均匀, 使邻近氢质子在弛豫中很快产生相散, 加速了质子去相位过程, 缩短了组织的 T2 值, 在梯度回波和自旋回波序列 MRI 中, 使组织信号降低, 从而产生较强的 T2 负性对比效应, 常规 1.5T MR 成像就能显示被标记的干细胞, 但 SPIO 对 T1 弛豫的加快作用较弱。SPIO 在体内可生物降解被细胞代谢, 示踪细胞至少可达 3 个月, 假阳性低^[13]。因此, MRI 示踪磁标记细胞是活体内最理想的细胞示踪方法。

四、SPIO 标记和活体示踪技术

SPIO 作为磁标记探针, 可用于各种细胞的标记。单独 SPIO 粒子标记活细胞有效率低, 需经带正电荷的转染剂修饰后才能提高细胞的有效磁标记率。目前发展起来的转染剂包括多聚赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)及硫酸鱼精蛋白等, 可标记不同物种和不同来源细胞。PLL 是一种多聚阳离子, 多用来转染基因进入靶细胞内部网。其与 SPIO 形成复合体后, 通过静电作用与细胞表面的配体结合, 经内吞作用使 SPIO 进入细胞内部。Arbab 等^[14, 15]研究证实不同的转染剂中, 高分子量 PLL 的标记效率是最高的。他们用 SPIO 和 PLL 成功标记了人 MSCs, 与对照组相比其活力、增殖率、凋亡指数未受摄入的 SPIO 影响, 证明 SPIO-PLL 复合物未对其产生短期和长期的毒性效应。

五、SPIO 标记的 BMSCs 移植治疗脑缺血的活体示踪

近年来, 干细胞磁标记后 MR 示踪已成功应用于中枢神经系统、心脏等器官方面的多种动物模型干细胞探索性治疗的研究中等。为利用 MRI 技术无创性地追踪监测移植的 BMSCs 在活体内的存活、迁移及演变规律等奠定基础。Rice 等^[16]用 SPIO-PLL 标记干细胞, 用立体定向方法移植到 2 周后小鼠 MCAO 模型脑内梗死区边缘, 并成功地定位示踪了移植的干细胞。Stuckey 等^[17]采用 SPIO 标记 GFP 转染的公鼠 BMSCs 并注射移植到母鼠心梗区边缘, 用 MRI 追踪达 16 周以上。Sykova 和 Jendelova^[18]在报道在一侧脑缺血损伤的大鼠模型上, 将 SPIO 和多聚阳离子的复合物标记的 BMSCs 定向移植到损伤对侧的大脑皮层, 在 MRI 上可以观测到植入的细胞逐渐向对侧损伤处迁移并聚集, 磁标记细胞可被观测持续 30 d 以上, 同时较对照组有明显的神经功能改善。Cicchetti 等^[19]用 MRI 和 PET 来追踪和检测 SPIO 标记的干

细胞在脑内迁移和代谢的过程, 可以观测到 7 周的过程。Magnitsky^[20]用不同的注射方式将 SPIO 标记的干细胞移植到小鼠脑内的不同部位, 用 MRI 检测发现不同的细胞迁移方式, 在海马区的细胞很少迁移。

Ukai 等^[21]分别将骨髓和外周血获得的 MSCs, 在 6 h 后经尾静脉注入移植到 SD 大鼠的 MCAO 模型, 用高场强 MRI(7T)检测脑灌注加权(PWI)和局部脑血流(rCBF), 2 组结果近似, 均较对照组有明显改善, 提示 MRI 对于移植后梗死面积和脑血流甚至脑功能成像评估也大有作为。

综上所述, 有关 BMSCs 标记和活体示踪方面的研究目前取得了重要进展, 其中 MRI 活体示踪磁标记干细胞技术为无创动态监测活体内移植细胞提供了新的路径, 显示了其广阔的应用前景。目前公认磁标记对细胞的活性、增殖、分化无影响^[22-24], 且无致癌作用^[25]。然而磁标记会随着细胞分裂而稀释, 并有可能在细胞死亡后被巨噬细胞系统吞噬而出现假阳性^[26], 而且不同的宿主和不同的供体细胞需采取不同的标记和注射方式^[27], 另外磁标记的时效性也存在争议, 还需要进一步的研究来阐述。而针对磁标记技术的长期研究, 则需要一种长期稳定有效的标记技术来作为参照, 如结合 Y 染色体的标记, 在干细胞移植实验过程中选用雄性供体和雌性宿主, 再对供体细胞进行 SPIO 标记, 利用 FISH 技术来检验 SPIO 标记的准确性, 就能够在动物实验中长时间地定位检测移植细胞在宿主体内的分布和分化, 能够长期地对磁标记技术进行研究。

参 考 文 献

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
- [2] Woodbury D, Reynolds k, Black IB. Adult bonemarrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endoderma, and mesodermal genes prior to neurogenesis[J]. J Neurosci Res, 2002, 69(6): 908-917.
- [3] Shen LH, Li Y, Chen J, Zacharek A, et al. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(1): 6-13.
- [4] Li HS, Yi L, Chen JL, et al. One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke[J]. Stroke, 2007, 38(7): 2150-2156.
- [5] Zhao MZ, Nonoguchi N, Ikeda N, et al. Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and ex vivo HGF gene transfer with HSV-1 vector [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(9): 1176-1188.
- [6] Ikeda N, Nonoguchi N, Zhao MZ, et al. Bone marrow stromal cells that enhanced fibroblast growth factor-2 secretion by herpes simplex virus vector improve neurological outcome after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. Stroke, 2005, 36(12): 2725-2730.
- [7] Li Y, Chen JL, Zhang CL, et al. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells[J]. Glia, 2005, 49(3): 407-417.
- [8] Mezey E, Key S, Vogelsang G, et al. Transplanted bone marrow

- generates new neurons in human brains [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(3): 1364-1369.
- [9] Li Y, McIntosh K, Chen J, et al. Allogeneic bone marrow stromal cells promote glial-axonal remodeling without immunologic sensitization after stroke in rats [J]. Exp Neurol, 2006, 198 (2): 313-325.
- [10] Corot C, Robert P, Idee JM, et al. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2006, 58(14): 1471-1504.
- [11] Shyu WC, Chen CP, Lin SZ, et al. Efficient tracking of non-iron-labeled mesenchymal stem cells with serial MRI in chronic stroke rats[J]. Stroke, 2007, 38(2): 367-374.
- [12] 刘世霆, 晏媛, 陈志良, 等. 超顺磁性葡聚糖氧化铁纳米颗粒的研制及表征[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(3): 331-334.
- [13] Hinds KA, Hill JM, Shapiro EM, et al. Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells[J]. Blood, 2003, 102(3): 867-872.
- [14] Arbab AS, Yocum GT, Wilson LB, et al. Comparison of transfection agents in forming complexes with ferumoxides, cell labeling efficiency, and cellular viability[J]. Mol Imaging, 2004, 3 (1): 24-32.
- [15] Arbab AS, Yocum GT, Rad AM, et al. Labeling of cells with ferumoxides-protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells[J]. NMR Biomed, 2005, 18(8): 553-559.
- [16] Rice HE, Hsu EW, Sheng H, et al. Superparamagnetic iron oxide labeling and transplantation of adipose-derived stem cells in middle cerebral artery occlusion-injured mice [J]. AJR Am J Roentgenol, 2007, 188(4): 1101-1108.
- [17] Stuckey DJ, Carr CA, Martin-Rendon E, et al. Iron particles for noninvasive monitoring of bone marrow stromal cell engraftment into, and isolation of viable engrafted donor cells from, the heart[J]. Stem Cells, 2006, 24(8): 1968-1975.
- [18] Sykova E, Jendelova P. In vivo tracking of stem cells in brain and spinal cord injury[J]. Prog Brain Res, 2007, 161: 367-383.
- [19] Cicchetti F, Gross RE, Bulte JW, et al. Dual-modality in vivo monitoring of subventricular zone stem cell migration and metabolism[J]. Contrast Media Mol Imaging, 2007, 2(3): 130-138.
- [20] Magnitsky S. In vivo and ex vivo MRI detection of localized and disseminated neural stem cell grafts in the mouse brain [J]. Neuroimage, 2005, 26(3): 744-754.
- [21] Ukai R, Honmou O, Harada K, et al. Mesenchymal stem cells derived from peripheral blood protects against ischemia [J]. J Neurotrauma, 2007, 24(3): 508-520.
- [22] 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[J]. Radiology, 2003, 229(3): 838-846.
- [23] Miyoshi S. Transfection of neuroprogenitor cells with iron nanoparticles for magnetic resonance imaging tracking: cell viability, differentiation, and intracellular localization [J]. Mol Imaging Biol, 2005, 7(4): 286-295.
- [24] Yocum GT, Wilson LB, Ashari P, et al. Effect of human stem cells labeled with ferumoxides-poly-L-lysine on hematologic and biochemical measurements in rats[J]. Radiology, 2005, 235 (2): 547-552.
- [25] Jiang X, Xu R, Yang Z, et al. Experimental study on trace marking and oncogenicity of neural stem cells derived from bone marrow[J]. Cell Mol Neurobiol, 2008, 28(5): 689-711.
- [26] Mowat P, Franconi F, Chapon C, et al. Evaluating SPIO-labelled cell MR efficiency by three-dimensional quantitative T2* MRI [J]. NMR Biomed, 2007, 20(1): 21-27.
- [27] Miyoshi S, Flexman JA, Cross DJ, et al. Transfection of neuroprogenitor cells with iron nanoparticles for magnetic resonance imaging tracking: cell viability, differentiation, and intracellular localization [J]. Mol Imaging Biol, 2005, 7 (4): 286-295.

(收稿日期:2009-01-01)

(本文编辑:卢丽玉)

(上接 858 页)

能完全代替外科操作,但这种辅助作用又不能忽视。事实证明, Arista™ 可以提高手术效率,节省手术时间,防止术后创面渗血,为术者降低了手术的难度和风险,在临床中具有较好的推广价值。

参 考 文 献

- [1] Ereth M, Schrader L, Dong Y, et al. Efficacy of microporous polysaccharide hemispheres on liver punch biopsies in porcine model [J]. Presented at NATA 4th Annual Symposium, London, United Kingdom, 2003.
- [2] Murat F, Ereth M, Dong Y, et al. Evaluation of microporous polysaccharide hemispheres as a novel hemostatic agent in open partial nephrectomy: favorable experimental results in the porcine model[J]. J Urol, 2004, 172(3): 1119-1122
- [3] Goodnough L, Brecher M, Kanter M, et al. Transfusion medicine. First of two parts-blood transfusion[J]. N Engl J Med, 1999, 340(6): 438-447.
- [4] Tan S, Tope W. Effectiveness of microporous polysaccharide hemispheres for achieving hemostasis in mohs micrographic surgery[J]. Dermatol Surg, 2004, 30(6): 908-914.
- [5] Hamdi G, Ponchel G. Enzymatic degradation of epichlorohydrin crosslinked starch microspheres by alpha-amylase [J]. Pharm Res, 1999, 16(6): 867-875.
- [6] Ereth M, Dong Y, Henderson N, et al. Do microporous polysaccharide hemispheres(MPH) enhance surgical site infection in a rat model[J]. Anesth Analg, 2004, 98: 132-134.

(收稿日期:2009-05-05)

(本文编辑:刘凯)