

磁性对比剂标记的细胞移植研究进展

朱文珍, 项红兵, 漆剑频, 夏黎明, 王承缘

【中图分类号】R445.2 【文献标识码】A 【文章编号】1000-0313(2005)10-0931-02

细胞移植研究是一门新兴的学科, 移植细胞的生物学研究与应用不仅在细胞治疗、器官移植、基因治疗上具有重要作用, 还将在新基因发掘与基因功能分析、新药开发、组织工程等领域发挥重大的影响。追踪细胞的活体移植, 可为研究者提供基因工程细胞治疗的最优化信息。因此, 将需要移植的细胞进行磁性对比剂标记, 通过磁共振成像(MRI)技术对其进行可视化追踪, 就能得知移植细胞在体内的运动信息以及未来命运。

磁性对比剂概述

有关标记细胞的磁性对比剂的出现, 得益于 10 多年来磁性纳米微粒超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)作为肝脏磁共振对比剂的研究。Ferumoxides(Fe)是美国食品和药品管理局批准的一种葡聚糖包被 SPIO 纳米微粒, 有较高的 T_2 弛豫活性, 其弛豫率 R_2/R_1 比值为 4 : 1, 它被广泛用作肝脏的磁共振成像(MRI)的对比剂^[1], 目前在肝脏肿瘤和肝弥漫性疾病的诊断、肝脏磁共振血管成像等方面的临床应用已渐趋成熟。研究表明, 静脉注射后, 大多数 SPIO 纳米微粒聚集在肝脏的 Kupffer 细胞和脾脏的网状内皮细胞, 这些巨噬细胞吞噬 SPIO 后使 T_2 WI 相应区域信号降低, 而不含正常吞噬细胞的组织保持信号不变, 故它被称为肝脏特异性对比剂。Fe 是双降解, 即既被网状内皮系统吞噬又可被细胞代谢, 降解的铁加入体内铁库, 静脉注射后的第 1 天血清铁短暂增加, 第 7 天血清铁蛋白增加, 注射后 30~40d SPIO 纳米微粒中的铁参与组成血红蛋白或其它代谢过程。

磁性对比剂标记细胞方法

SPIO 不能单独有效地标记非巨噬细胞, 因此必须采取特异方法才能有效标记需要移植的细胞。近年来, 随着分子影像学的发展, 采用磁性对比剂标记细胞的方法有:

用抗原特异性单克隆抗体连接葡聚糖包被, 离体细胞在保持其活性的条件下能被磁性标记^[2]。也可将 SPIO 微粒与特定受体结合, 通过细胞表面相应的受体使其与细胞结合并进入细胞内, 从而使细胞得以标记。

通过交联葡聚糖(CLIO)和连接人免疫缺陷病毒反式作用物蛋白(MION-Tat 或 CLIO-Tat)来制备超小型 SPIO 微粒(如一种实验用对比剂 MION-46L), 使之易于标记细胞, 例如, Dodd 等^[3]将 CLIO-Tat 标记来源于 C57BL/6 型小鼠的 T 细

胞, 该细胞被从静脉输注后进入其归巢组织脾脏, 其细胞活性不受影响, 3d 内使用 MRI 技术证实活体脾组织中聚集着标记细胞。

利用 SPIO 微粒表面电荷的作用。繁枝体(Dendrimer)包被的 SPIO, 称为磁性繁枝体(MD-100), 当 MD-100 用于标记干细胞, 繁枝体充当转染物(TA)的作用, 它能以非特异方式将 SPIO 微粒摄入需要移植的细胞内。带负荷的 SPIO 微粒与表面带阳离子的繁枝体-多聚赖氨酸复合物(TA-PLL)通过静电作用能有效标记细胞^[1]。Frank 等^[4]将 3 种转染物(TA)以不同比例分别与 Terumoxides、MION-46L 混合, 然后置于大鼠少突胶质前体 CG-4 细胞、人间充质干细胞中孵育 2~48h, 结果表明使用复合物 Ferumoxides-TA、MION-46L-TA 时, 借助普鲁士蓝染色在所有孵育的细胞胞浆中均发现有标记物; 而仅仅将 Ferumoxides、MION-46L 加入的孵育细胞则摄入有限的标记物或不摄入。可见上述复合物更容易使 SPIO 微粒通过融合进入细胞内。

磁性对比剂标记细胞移植及 MRI 示踪

移植磁性对比剂标记的细胞, 可达到替代病变细胞而具有治疗目的的潜力, 同时可解决移植细胞在活体内被 MRI 示踪的一个难题。分子影像学是目前可以在活体状态下在细胞和分子水平对生物过程进行定性和定量研究的唯一手段, 它在移植细胞的功能研究中发挥独特的作用, 目前有关这方面的研究还仅处于初级动物试验阶段。

磁性对比剂标记细胞移植的研究大体上经历了 3 个阶段。第 1 个阶段是萌芽期, 把结合的 SPIO 的某种组织直接移植给动物的相应部位以观察组织学变化。1992 年 Norman 等^[5]报道, 将与麦胚凝集素结合的 SPIO 与大鼠胎脑组织共同培养, 然后将其移植到成年大鼠的纹状体, 术后 6d 和 3 周在 MRI T_2 加权像可以清楚地看到移植区呈对比明显的低信号, 组织学检查表明铁粒子大部分限于移植区域内, 并且不影响细胞的形态, 由此作者认为 SPIO 能作为 MRI 对比剂来标记被移植的细胞。

第 2 阶段: 在体外用 SPIO 对细胞进行磁性标记, 这种标记物可以标记哺乳动物细胞, 包括少突胶质前体细胞、人类的神经干细胞和间质干细胞。磁性 SPIO 微粒通过非特异性膜表面吸收过程进入细胞内, 标记细胞的增值、分化能力不受影响。所应用的 SPIO 微粒具有超顺磁性, 每毫升组织培养基中至少有 $1\mu\text{g}$ 铁即可以引起足够强度的 MRI 信号的改变。当细胞内铁浓度达 $9\sim 4\text{pg/ml}$ 时, 被标记的细胞体外核磁共振弛豫率($1/T_2$)高达 $24\sim 39\text{s}^{-1}/\text{mM}$ 。1999 年 Franklin 等^[6]报道, 用多发性硬化的动物模型进行细胞标记及移植实验, 由于少突胶质前体细胞能增加髓鞘再生, 故他们先使用葡聚糖包被的磁性粒

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院放射科(朱文珍、漆剑频、夏黎明、王承缘); 510120 广州, 广东省中医院麻醉科(项红兵)

作者简介: 朱文珍(1969—), 女, 湖北孝感人, 博士, 副教授, 主要从事中枢神经系统及分子影像学研究。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300093)

子来标记少突胶质前体细胞(CG-4),然后将磁性标记细胞植入成年大鼠脑内,术后第1~7天内借助于MRI可观察到在移植部位有明显的1个信号降低区,同时透射电镜观察到脑组织标本标记物仍存在于移植细胞内。Bulte等^[7,8]已设计合成了一种含SPIO的多功能磁性微粒,然后将其标记人神经干细胞和间质干细胞,并将标记的细胞移植到脱髓鞘动物模型的中枢神经系统内。组织化学染色表明被标记的神经干细胞在体内可以正常分化为神经元,标记后至少6周仍可以在体内检测到移植的细胞。

转铁蛋白受体在许多神经系统细胞内有很高的表达,而转铁蛋白受体的抗体OX-26已被证明能很有效地将其携不定期的药物通过完整的血脑屏障转入细胞。Bulte等^[2]将葡聚糖包被的 Fe_3O_4 粒子连接到OX-26上,通过少突胶质前体细胞表面的转铁蛋白受体结合后,被细胞吞入胞内。磁性标记后细胞移植入脱髓鞘动物模型的脊髓后,MRI可以发现标记的细胞从移植区域向周围组织迁徙,组织化学检查表明移植的前体细胞分化为成熟的少突胶质细胞,而铁粒子只存在于移植细胞内,只是由于细胞的分裂,其内的铁浓度逐渐降低。

Hoehn等^[9]将含USPIO微粒的MR对比剂SINEREM($2\sim 14\text{mg/ml} = 400\sim 2800\mu\text{g Fe/ml}$)与脂质体FuGENE($1\mu\text{g/ml}$)在无血清的DMEM培养基中共同孵育30min,使FuGENE包裹在SINEREM表面,这种复合物SINEREM-FuGENE更容易使USPIO微粒通过融合进入细胞内,而不需要抗体、受体的参与。Hoehn用这种复合物来标记鼠胚胎干细胞,将胚胎干细胞植入脑缺血2周模型的大鼠健侧半球,3周内MRI上观察到了移植细胞向对侧半球的缺血部位进行靶向移行,这一非侵入性技术适用于观察移植细胞的植入部位、迁徙和动态分化过程,为临床上中枢神经系统移植研究提供了新视野。

第3阶段:对干细胞进行基因修饰后,把基因工程细胞进行磁性标记,并将标记的转基因细胞移植到中枢神经系统内。2001年Bulte等^[7]将SPIO标记了转LacZ基因少突胶质前体细胞,发现磁共振示踪结果与 $\beta\text{-gal}$ 表达有密切相关性。

前景展望

目前磁性对比剂标记细胞的移植研究已经取得了较大的进展,通过分子影像学手段,如用特异性的分子探针与特定的

干细胞结合,用光学成像、正电子发射计算机体层摄影术(PEI)、MRI等手段能显示标记细胞移植以后的分化、转归等过程。随着分子影像学技术的不断发展,其在细胞移植的研究与应用中会发挥越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] Arbab AS, Bshaw LA, Miler BR, et al. Intracytoplasmic Tagging of Cells with Ferumoxides and Transfection Agent for Cellular Magnetic Resonance Imaging after Cell Transplantation: Methods and Techniques[J]. Transplantation, 2003, 76(7): 1123-1230.
- [2] Bulte JW, Zhang S, van Gelderen P, et al. Neurotransplantation of Magnetically Labeled Oligodendrocyte Progenitors: Magnetic Resonance Tracking of Cell Migration and Myelination[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(26): 15256-15261.
- [3] Dodd CH, Hsu HC, Chu WJ, et al. Normal T-Cell Response and in Vivo Magnetic Resonance Imaging of T Cells Loaded with HIV Transactivator-Peptide-Derived Superparamagnetic Nanoparticles[J]. J Immunol Methods, 2001, 256(1-2): 89-105.
- [4] 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.
- [5] Norman AB, Thomas SR, Pratt RG, et al. Magnetic Resonance Imaging of Neural Transplants in Rat Brain Using a Superparamagnetic Contrast Agent[J]. Brain Res, 1992, 594(2): 279-283.
- [6] Franklin RJ, Blaschuk KL, Bearechell MC, et al. Magnetic Resonance Imaging of Transplanted Oligodendrocyte Precursors in the Rat Brain[J]. Neuroreport, 1999, 10(18): 3961-3965.
- [7] Bulte JW, Douglas T, Witwer B, et al. Magnetodendrimers Allow Endosomal Magnetic Labeling and in Vivo Tracking of Stem Cells[J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(21): 1141-1147.
- [8] Bulte JW, Duncan ID, Frank JA. In Vivo Magnetic Resonance Tracking of Magnetically Labeled Cells after Transplantation[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(8): 899-907.
- [9] Hoehn M, Kustermann E, Blunk J, et al. Monitoring of Implanted Stem Cell Migration in Vivo: a Highly Resolved in Vivo Magnetic Resonance Imaging Investigation of Experimental Stroke in Rat[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(25): 16267-16272.

(收稿日期:2004-07-27)