

干细胞移植治疗急性心肌梗死 MRI 示踪的研究进展

薛 杨 赵江民

摘 要 心肌梗死干细胞移植疗法是一种新兴的治疗手段。通过干细胞的定向分化、旁分泌等机制促进坏死心肌组织修复和心肌细胞再生,改善心脏功能。磁共振成像不仅可以观察心脏解剖结构的改变,还能通过标记磁性对比剂或 MRI 报告基因的方法对干细胞移植后的定位、迁移、存活及增殖等情况进行示踪。本文就干细胞移植 MRI 示踪及其在急性心肌梗死治疗中的应用进行综述。

关键词 干细胞移植 急性心肌梗死 MRI 超顺磁性氧化铁 磁共振报告基因

中图分类号 R445.2 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.09.045

世界卫生组织报告显示,冠心病、心肌梗死等心血管疾病已成为人类死亡的最主要病因,严重威胁人类的健康。目前临床上通过稳定性药物、血管再通及冠脉旁路移植术等方法治疗急性心肌梗死,但这些方法只能改善未坏死的损伤心肌细胞的功能,而不能通过再生的方式修复心肌组织。干细胞移植疗法通过干细胞的自我更新及多向分化潜能,促进心肌细胞再生,并分泌多种生长因子,能够提高左心室射血分数、减少左心室收缩末期容积、缩小梗死面积,从而改善梗死后心功能^[1]。然而也有一些研究认为干细胞对心脏功能无明显改善^[2]。因此,对干细胞移植后如何归巢、能否存活、增殖等情况进行示踪和观察尤为重要。

随着分子影像学的发展,利用影像学对移植细胞进行示踪能够连续多次检查,更具有无创性、避免侵入性损伤的优点,成为干细胞示踪的重要手段。心脏磁共振成像(cardiac magnetic resonance imaging, CMR)具有良好的时间和空间分辨率,能够清楚显示心脏及周围大血管的解剖结构和功能,加之能够判断心肌活性等独特优势,使其成为诊断心脏疾病的金标准^[3]。磁共振细胞示踪目前主要有磁性对比剂示踪、报告基因示踪的方法。本文就干细胞移植 MRI 示踪及其在急性心肌梗死治疗中的应用进行综述。

一、磁性对比剂

常规 MRI 对比剂示踪细胞的原理是将磁性对比剂与细胞结合,通过胞吞作用进入胞质内,引起 T_1 或 T_2 弛豫时间的变化,从而产生 MRI 对比信号。目前常用的磁性对比剂包括顺磁性对比剂和超顺磁性纳米颗粒。顺磁性对比剂目前广泛应用于临床,以钆-二乙三胺五醋酸(Gd-DTPA)为代表,可显著缩短 T_1 和 T_2 弛豫时间,以 T_1 最为明显,是一种 T_1 阳性效应的阳性对比剂。可用来追踪特定细胞的迁移或募集情况,如标记卵巢肿瘤细胞中肌纤维母细胞的募集情况,也可追踪小鼠心肌梗死后心脏瘢痕形成中巨噬细胞的游走^[4]。

超顺磁性纳米颗粒以超顺磁性氧化铁颗粒(Superparamagnetic iron oxide, SPIO)为代表,常用于分子成像领域。超顺磁性氧化铁颗粒包括一个直径约4~10nm的氧化铁核心,内含上千个铁原子,周围包裹一层具有良好生物相容性的聚合物,为铁核心提供立体空间及稳定的静电场^[5]。在 MRI 上能够显著缩短 T_2 弛豫时间,是一种 T_2 负性效应的阴性对比剂。由于 SPIO 和细胞表面均带有负电荷而相互排斥,因此需要在转染剂的介导下消除表面电荷从而进入细胞,常用的转染剂有多聚赖氨酸、鱼精蛋白等。

近年来,在心血管疾病的动物实验研究中,大量利用了超顺磁性氧化铁标记细胞进行 MRI 示踪。被标记的干细胞通过颈内静脉、冠脉、心肌或者经皮心内膜等注射方式,将干细胞移植到梗死区域并进行 MRI 扫描,通过低信号强度、分布等判断干细胞存活、增殖及迁移情况。然而,目前最主要的争议有两点:①由于细胞分裂导致 SPIO 稀释, MRI 低信号不能正确反映标记细胞增殖后的数量;② SPIO 引起的低信

基金项目:上海市科委科技创新行动计划重点项目(10411953400);上海市卫生局基金资助项目(20124194);上海市宝山区科学技术委员会项目(14-E-4);上海交通大学医学院基金资助项目(12XJ30061)

作者单位:233000 蚌埠医学院(薛杨);201999 上海交通大学医学院附属第九人民医院影像科(赵江民)

通讯作者:赵江民,硕士生导师,电子信箱:johnmzhao@sjtu.edu.cn

号不能说明 SPIO 位于存活的干细胞内,标记干细胞被巨噬细胞吞噬或 SPIO 游离到细胞外同样能产生低信号。Huang 等^[6]观察到移植后大量的铁颗粒分布在移植细胞外,少数铁分布在巨噬细胞和其他细胞内,而 MRI 不能区分低信号来自干细胞内或外以及来自何种细胞。Winter 等^[7]也证实活细胞组和死细胞组移植后均能观察到低信号存在,且 6 周后低信号区的大小、强度以及位置都没有变化,并通过病理学证实活细胞组 SPIO 存在于胞内,而死细胞组细胞被巨噬细胞吞噬。因此,无论 SPIO 位于干细胞内、干细胞外还是其他种类的细胞内,均能显示 MRI 低信号,造成假阳性结果,那么低信号的长期存在将会使我们高估干细胞的存活能力。

然而,另一些研究认为移植后活的干细胞不会被巨噬细胞吞噬,而死亡干细胞会被吞噬后代谢清除。在一项研究中显示,SPIO 标记的干细胞被分别移植到急性心肌梗死和正常大鼠心脏,16 周后 MRI 仍可以检测到梗死组的低信号区,而正常组的低信号区只在 MRI 显示了 1 周^[8]。这说明干细胞在炎症区域才能存活,而在正常心肌组织内将会死亡并被清除,同时在移植后组织学证实大部分含有铁颗粒的细胞不表达巨噬细胞表面标志物 CD68,这说明大部分移植细胞并没有被巨噬细胞吞噬,因此可以认为 MRI 低信号代表了移植活细胞内的 SPIO。

早期研究发现,细胞内的自由铁会增强过氧化物的代谢,形成过多的自由基,导致细胞膜、蛋白质和 DNA 的损害^[9]。SPIO 进入细胞后,是否影响细胞生物学特性,与标记 SPIO 浓度有关。研究认为,较低浓度 SPIO 对细胞没有明显影响,而高浓度 SPIO 则会影响细胞的活力及增殖能力^[10,11]。研究发现 SPIO 对脑细胞的影响取决于粒子的类型、标记细胞的孵育时间、浓度,甚至应用于不同的生理系统也具有差异^[12]。在心血管系统中 SPIO 对移植干细胞毒性的机制尚有待于进一步研究。

二、磁共振报告基因

由于超顺磁性氧化铁标记无法区分细胞的存亡、示踪时间有限等限制,报告基因标记法应运而生,其原理就是将外源性基因转入细胞自身基因组,外源性基因表达的蛋白能够和磁性物质(如报告探针)结合成复合物,引起 MRI 上 T_1 、 T_2 弛豫时间的变化,从而被 MRI 检测出来。报告基因可以通过质粒 DNA、病毒载体等方式转染细胞。目前常见的 MRI 报告基因包括铁蛋白报告基因、化学交换饱和转移(chemical

exchange saturation transfer, CEST) 报告基因以及人工质膜肽报告基因等^[13-15]。这些方法在多被用于啮齿动物大脑肿瘤细胞存活和增殖的成像。目前报道的 MR 报告基因的研究中,应用于心脏移植细胞的示踪研究仍较少,主要为铁蛋白报告基因的应用^[16-19]。铁蛋白报告基因使细胞过表达铁蛋白,从胞外摄取更多的铁来增加细胞内的铁含量,从而缩短 T_2 弛豫时间,使得转基因细胞在 MRI 上能够被检测出来。

由于报告基因能够在宿主细胞基因组稳定表达,相对于磁性对比剂直接标记而言其具有以下两个优势:①报告基因能够遗传到子代细胞,不会随细胞分裂增殖而稀释或消失,从而避免了假阴性信号的产生;②报告基因通过在宿主细胞中转录翻译合成特定蛋白而产生信号,只能在活细胞中发挥作用,因此低信号便可以代表活细胞的存在,从而避免了假阳性信号的产生。因此,报告基因不仅能够进行长期示踪观察,而且能够较为准确地反映移植细胞的数量和分布情况,更为稳定地监测细胞移植后的命运。

1. 移植细胞存活和增殖的 MRI 示踪:急性心肌梗死后,干细胞能否在炎症区域存活及增殖,成为近来许多研究争论的焦点。近年来研究发现,移植细胞能够在梗死心肌中存活长达 12 个月^[20]。报告基因标记细胞成像则为细胞命运的追踪提供了长时间连续观察的可能性。Naumova 等^[18]第 1 次将铁蛋白报告基因用于干细胞移植治疗急性心肌梗死的研究,成功用 MRI 检测到了体外及体内移植 3 周后转基因标记的小鼠骨骼肌成肌细胞,证明了在小鼠骨骼肌成肌细胞中过表达铁蛋白报告基因的可行性,并证明移植细胞分布面积和组织学的一致性。Campan 等^[16]将检测时间延长到移植后 4 周,与移植后 1 周的低信号面积对比没有明显变化,并通过组织学证实了含铁细胞正是来源于移植细胞。因此,尽管报告基因产生的低信号强度较 SPIO 弱,但它能够真正代表活细胞的存在^[21]。这些研究均表明细胞能够在分裂增殖过程中持续过表达铁蛋白基因,并能连续产生低信号。此外,有研究者认为铁蛋白的过表达还能够保护细胞免受氧化损伤,从而提高了移植细胞生存力^[22]。因此,铁蛋白家族成员作为在体示踪细胞存活和增殖的 MRI 报告基因,具有很大的应用潜力。

2. 干细胞分化的 MRI 示踪:关于细胞再生疗法,无论是用于心血管系统、神经系统疾病,还是肿瘤细胞治疗,都是将未分化的多能或专能干细胞注射到特定器官内,以期在宿主器官微环境的诱导下分化为与

靶器官相同的细胞类型。相比于 MRI 对细胞存活和增殖的示踪,细胞分化的成像要求更高。研究发现,移植到心肌梗死区域的干细胞不仅通过旁分泌作用分泌生长因子(bFGF and IGF-1 等)修复受损心肌,还可以分化为心肌细胞和血管内皮细胞,但仅有 3.5% 的干细胞发生分化,因此,报告基因必须能够产生足够的对比度才能检测到细胞在低密度情况下的低水平分化^[23,24]。有早期研究报道在双转基因小鼠胚胎应用 MRI 检测血管内皮细胞的分化,而关于移植干细胞分化的 MRI 示踪目前仍未见报道,需要采用多种成像方式进一步研究^[25]。

3. 新型 MRI 对比剂靶向示踪:由于 SPIO 标记特异性低的弊端,有研究者设计出将 SPIO 靶向标记到特定种类的细胞中。Chung 等^[17]将胚胎干细胞改造后使细胞表面表达 HA 和 MYC 抗原,并将 SPIO 与 HA 和 MYC 单克隆抗体共价结合,体外和体内实验均证明 MRI 能够检测到 T₂ 信号的降低。靶向 SPIO 标记既提高了特异性,同时又克服了铁蛋白报告基因信号强度较弱的缺点。但需要注意的是移植细胞的致癌风险,以及外源性抗原的植入有可能触发宿主的免疫应答反应而破坏移植细胞。

随着研究的深入,研究者直接利用细胞自身表面抗原进行 SPIO 特异性标记,从而避免了外源性抗原的潜在风险。GD2 近来被报道是人 MSCs 表面特异性标志物。Pang 等合成了一种特异性的报告基因,能够和人骨髓间充质干细胞的表面抗原 GD2 特异结合并通过质粒 DNA 转染细胞,其末端携带的 SPIO 基团便可被 MRI 检测到。同时,该报告基因具有低毒性、良好的生物相容性,并在体外 MRI 成像 T₂/T₂* 上具有敏感的信号。

无论是顺磁性对比剂还是报告基因进行 MRI 成像,都各有其优缺点。SPIO 特异性不高,在细胞内停留时间短,但产生信号灵敏,易于被检测,适用于移植细胞早期的定位及数量的评估。而磁共振报告基因克服了特异性低的弊端,信号持续时间相对较长,更适用于移植细胞的存活、增殖及迁移的追踪,但信号敏感度比 SPIO 低,且安全性有待于进一步证实。应用磁性对比剂及报告基因对心血管疾病进行 MRI 示踪由于其良好的空间分辨率及无创连续随访等优势,具有广阔的临床应用前景,但研究尚处于初级阶段,在应用于临床之前,尚需对其安全性进行深入证实,如干细胞在体内的活性及分化能力是否受到影响,外来基因导致宿主自身基因突变以及致瘤性等问题。

此外,利用磁共振示踪手段对干细胞向不同谱系分化后的可视化成像值得进一步探索。综合运用各种标记方法成像,相信会对干细胞移植治疗急性心肌梗死的基础理论研究及未来临床应用提供重大帮助。

参考文献

- Roncalli J, Mouquet F, Piot C, *et al.* Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial [J]. *EurHeart J*, 2011, 32(14):1748-1757
- Lunde K, Solheim S, Aakhus S, *et al.* Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(12):1199-1209
- Pennell DJ. Cardiovascular magnetic resonance [J]. *Circulation*, 2010, 121(5):692-705
- Naresh NK, Xu Y, Klibanov AL, *et al.* Monocyte and/or macrophage infiltration of heart after myocardial infarction: MR imaging by using T1-shortening liposomes [J]. *Radiology*, 2012, 264(2):428-435
- Mathiasen AB, Kastrup J. Non-invasive in-vivo imaging of stem cells after transplantation in cardiovascular tissue [J]. *Theranostics*, 2013, 3(8):561-572
- Huang Z, Li C, Yang S, *et al.* Magnetic resonance hypointensive signal primarily originates from extracellular iron particles in the long-term tracking of mesenchymal stem cells transplanted in the infarcted myocardium [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10:1679-1690
- Winter EM, Hogers B, Van Der Graaf LM, *et al.* Cell tracking using iron oxide fails to distinguish dead from living transplanted cells in the infarcted heart [J]. *Magn Reson Med*, 2010, 63(3):817-821
- 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
- Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2001, 55(6):333-339
- Roeder E, Henrionnet C, Goebel JC, *et al.* Dose-response of superparamagnetic iron oxide labeling on mesenchymal stem cells chondrogenic differentiation: a multi-scale in vitro study [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e98451
- 赵江民, 刘佳, 林雁冰, 等. SPIO 标记浓度对 BMSCs 生物学特性的影响及体外 MRI 表现 [J]. *磁共振成像*, 2014, 5(2):138-143
- Neubert J, Wagner S, Kiwit J, *et al.* New findings about iron oxide nanoparticles and their different effects on murine primary brain cells [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10:2033-2049
- Vandsburger MH, Radoul M, Addadi Y, *et al.* Ovarian carcinoma: quantitative biexponential mr imaging relaxometry reveals the dynamic recruitment of ferritin-expressing fibroblasts to the angiogenic rim of tumors [J]. *Radiology*, 2013, 268(3):790-801
- Pumphrey A, Yang Z, Ye S, *et al.* Advanced cardiac chemical exchange saturation transfer (cardioCEST) MRI for in vivo cell tracking and metabolic imaging [J]. *NMR Biomed*, 2016, 29(1):74-83

(下转第 179 页)

- man pancreatic cancer cell proliferation by AGN194204, an RXR – selective retinoid[J]. *Carcinogenesis*,2004,25(8):1377 – 1385
- 16 Hu J, Ning RB, Lin XY, *et al.* Retinoid X receptor agonists inhibit hypertension – induced myocardial hypertrophy by modulating LKB1/AMPK/p70S6K signaling pathway [J]. *Am J Hypertens*, 2014, 27(8):1112 – 1124
 - 17 Singh AB, Guleria RS, Nizamutdinova IT, *et al.* High glucose – induced repression of RAR/RXR in cardiomyocytes is mediated through oxidative stress/JNK signaling[J]. *J Cell Physiol*,2012,227:2632 – 2644
 - 18 Lehman AM, Montford JR, Horita H, *et al.* Activation of the retinoid X receptor modulates angiotensin II – induced smooth muscle gene expression and inflammation in vascular smooth muscle cells[J]. *Mol Pharmacol*,2014,86(5):570 – 579
 - 19 Miyazaki S, Taniguchi H, Moritoh Y, *et al.* nuclear Hormone retinoid X Receptor (RXR) negatively regulates the glucose – stimulated insulin secretion of pancreatic β – Cells [J]. *Diabetes*, 2010, 59(11):2854 – 2861
 - 20 Zhang HT, Zhou R, Li L, *et al.* Danthron functions as a retinoic X receptor antagonist by stabilizing tetramers of the receptor[J]. *J Biol Chem*,2011,286(3):1868 – 1875
 - 21 Kawata K, Morishita K, Nakayama M, *et al.* RXR partial agonist produced by side chain repositioning of alkoxy RXR full agonist retains antitype 2 diabetes activity without the adverse effects[J]. *ACS Med Chem*,2015,58(2):912 – 926
 - 22 Ohsawa F, Yamada S, Yakushiji N, *et al.* Mechanism of retinoid X receptor partial agonistic action of 1 – (3,5,5,8,8 – pentamethyl – 5,6,7,8 – tetrahydro – 2 – naphthyl) – 1H – benzotriazole – 5 – carboxylic acid and structural development to increase potency[J]. *J Med Chem*,2013,56(5):1865 – 1877
 - 23 Zhao J, Fu Y, Liu CC, *et al.* Retinoic acid isomers facilitate apolipoprotein E production and lipidation in astrocytes through the retinoid X receptor/retinoic acid receptor pathway [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(16):11282 – 11292
 - 24 Kram A, Schmeidler J, Katsel P, *et al.* Increased expression of RXR α in dementia; an early harbinger for the cholesterol dyshomeostasis[J]. *JMol Neurodegener*,2010,5:36
 - 25 Tousi B. The emerging role of bexarotene in the treatment of Alzheimer’s disease; current evidence[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*,2015,11:311 – 315
 - 26 Balducci C, Paladini A, Micotti E, *et al.* The continuing failure of bexarotene in alzheimer’s disease mice [J]. *J Alzheimers Dis*,2015,46(2):471 – 482
 - 27 Takeuchi H, Yokota – Nakatsuma A, Ohoka Y, *et al.* Retinoic acid receptor activation differentiation with differential dependence Foxp3 + regulatory T cell and Th17 Cell[J]. *J Immunol*,2013,191(7):3725 – 3733
 - 28 Chen H, Ma F, Hu X, *et al.* Elevated COX₂ expression and PGE2 production by downregulation of RXR α in senescent macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2013,440(1):157 – 162
 - 29 Venteclef N, Jakobsson T, Steffensen KR, *et al.* Metabolic nuclear receptor signaling and the inflammatory acute phase response[J]. *Trends Endocrinol Metab*,2011,22(8):333 – 343
 - 30 Bubna AK. Alitretinoin in dermatology – an update[J]. *Indian J Dermatol*,2015,60(5):520

(收稿日期:2016 – 01 – 17)

(修回日期:2016 – 01 – 26)

(上接第 174 页)

- 15 Vandsburger MH, Radoul M, Cohen B, *et al.* Mri reporter genes: Applications for imaging of cell survival, proliferation, migration and differentiation [J]. *NMR Biomed*, 2013, 26(7):872 – 884
- 16 Campan M, Lionetti V, Aquaro GD, *et al.* Ferritin as a reporter gene for in vivo tracking of stem cells by 1.5 – t cardiac mri in a rat model of myocardial infarction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(6):H2238 – 2250
- 17 Chung J, Kee K, Barral JK, *et al.* In vivo molecular mri of cell survival and teratoma formation following embryonic stem cell transplantation into the injured murine myocardium [J]. *Magn Reson Med*, 2011, 66(5):1374 – 81
- 18 Naumova AV, Reinecke H, Yarnykh VL, *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
- 19 Naumova AV, Yarnykh VL, Balu N, *et al.* Quantification of mri signal of transgenic grafts overexpressing ferritin in murine myocardial infarcts [J]. *NMR Biomed*, 2012, 25(10):1187 – 1195
- 20 Wang J, Zhang S, Rabinovich B, *et al.* Human CD34⁺ cells in experimental myocardial infarction; long – term survival, sustained functional improvement, and mechanism of action [J]. *Circ Res*, 2010, 106(12):1904 – 1911
- 21 Naumova AV, Balu N, Yarnykh VL, *et al.* Magnetic resonance imaging tracking of graft survival in the infarcted heart; iron oxide particles versus ferritin overexpression approach [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2014, 19(4):358 – 367
- 22 Vandsburger MH, Radoul M, Cohen B, *et al.* MRI reporter genes: applications for imaging of cell survival, proliferation, migration and differentiation [J]. *NMR Biomed*, 2013, 26(7):872 – 884
- 23 Bai X, Yan Y, Coleman M, *et al.* Tracking longterm survival of intramyocardially delivered human adipose tissue – derived stem cells usingbioluminescence imaging [J]. *Mol Imaging Biol*, 2011,13(4):633 – 645
- 24 Penn MS, Dong F, Klein S, *et al.* Stem Cells for Myocardial Regeneration [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 90(4):499 – 501
- 25 Cohen B, Ziv K, Plaks V, *et al.* Mri detection of transcriptional regulation of gene expression in transgenic mice [J]. *Nat Med*, 2007, 13(4):498 – 503

(收稿日期:2016 – 03 – 06)

(修回日期:2016 – 03 – 13)