

磁共振成像在干细胞心肌移植中的应用

熊旭光 刘文卫 苏昌亮 敖启林

【摘要】 干细胞移植是针对心肌损伤性疾病的再生医学治疗方式。磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)能观察移植后心脏解剖结构、疤痕形态和心功能等的变化,而且对比剂标记干细胞成像、多模态成像和功能成像可对干细胞迁移、分布、分化等方面提供更多元化、更深入的视角。该文就 MRI 相关成像技术在干细胞心肌移植中的研究进展作一综述。

【关键词】 心肌梗死;干细胞移植;磁共振成像;多模态成像;弥散张量成像

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2015.02.004

目前临床上对心肌梗死除了血管再通、对症支持等治疗外,尚无有效逆转心肌坏死的方式。研究显示,部分干细胞能分化成表达心肌细胞特异性标志物及具有收缩功能的心肌样细胞。干细胞移植治疗心肌梗死可改善左室射血分数、减轻心脏扩张、减少心肌组织疤痕形成和增加梗死心肌周边的微血管,甚至可以重塑坏死心肌纤维^[1-3]。

通过影像学可对注入活体的干细胞进行无创性示踪,有助于探索干细胞移植后的转归,以更有效地指导细胞治疗。磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)具有良好的组织对比度且无辐射,可对干细胞移植后的患者进行无创、连续性观察。除了观察解剖结构, MRI 在干细胞示踪技术中扮演重要的角色,为干细胞研究提供了全新的视角。

1 解剖与功能评价

MRI 具有良好的空间分辨率,广泛用于观察心脏解剖结构和评估心功能。与 X 线不同, MRI 在引导介入性操作时可以避免射线损伤。通过将电解剖标测单极电压与三维心脏 MRI 相结合, Williams 等^[4]精确地在梗死心肌周边注入干细胞。通过测量心脏射血分数,对干细胞移植后的心脏收缩功能进行评估。此外, Yin 等^[5]对急性心肌梗死小型猪模

型的研究发现,延迟增强显像(delayed-enhanced magnetic resonance imaging, DE-MRI)可以精确描述梗死和疤痕, DE-MRI 值与病理切片检测的微球值相匹配;还可检测到心脏每搏输出量、射血分数和心输出量均下降。DE-MRI 有望成为评估急性心肌梗死干细胞移植效果的可行手段。

2 干细胞标记

依靠移植细胞产生的 MRI 信号并不能很好地区分干细胞与组织细胞,对干细胞进行合适的对比剂标记实现了在体长时间、精确的干细胞示踪,观察移植细胞在体内的再生能力、分布、迁移和在目标组织的停留(retention)率。常用的干细胞 MRI 对比剂主要包括两类:(1)以氧化铁为基础制成的超顺磁性横向弛豫时间加权对比剂,通过降低 MRI 信号产生负性对比,以超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)较常见;(2)以钆(Gd^{3+})为基础研发的顺磁性纵向弛豫时间加权对比剂,通过增加 MRI 信号产生明显的正性对比,以钆纳米管(gadonanotube, GNT)多见。

2.1 SPIO

20 世纪 80 年代中期氧化铁颗粒就被作为对比剂用于诊断成像,目前是 MRI 细胞示踪研究领域的代表性药物。它直径小、穿透力强,低浓度即可形成较好对比。SPIO 标记技术不仅可以有效示踪移植细胞在活体内的分布,且并不影响功效^[6-7]。研究发现,用 SPIO 标记间充质干细胞,对细胞活力、分化能力和分泌模式无负面影响,移植后可降低血管再狭窄发生率^[8]。

依据直径大小 SPIO 可以分为微米级 SPIO

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81270105)

作者单位:441800 湖北省老河口市第一医院心内科(熊旭光); 441021 湖北省襄阳市中心医院心内科(刘文卫); 430030 湖北, 华中科技大学同济医学院临床二系(苏昌亮); 430030 华中科技大学同济医学院病理学系, 附属同济医院病理研究所(敖启林)

通信作者:敖启林, Email: aoqilin@263.net

(micrometer-sized superparamagnetic iron oxide, MPIO) 颗粒和纳米级超小 SPIO (nanometer-sized ultrasmall superparamagnetic iron oxide, USPIO) 颗粒。研究发现, 将两种颗粒分别标记的间充质干细胞经冠状动脉注入心肌梗死猪模型, 经横向弛豫时间成像都检测到了低信号, 两者标记效率相近, 但 USPIO 标记后低信号更明显, MPIO 标记后有 2 例未检测到信号, USPIO 更适用于经冠状动脉注入。在标记剂量及培育方面, Mathiasen 等^[9]发现, 以 $10 \mu\text{g}$ USPIO/ 10^5 间充质干细胞的剂量培养 21 h, 移植后最少有 25 万个间充质干细胞可被 MRI 检测到, 而采用较低剂量或者较短时间, 要达到同样的检测效果则需标记的细胞数达数百万个。进行干细胞标记时, 恰当的标记时间非常重要。分化前用 SPIO 标记人胚胎干细胞可以产生显著的磁共振效果, 而分化后标记则无明显铁摄入或者 MRI 信号变化^[10]。然而, 也有研究指出 SPIO 应用有一定的局限性。Ruggiero 等^[11]发现, 对氧化铁颗粒标记的干细胞的体内研究结果与以往体外实验报道并不一致, 成像技术无助于区分死亡或存活的细胞, 干细胞增殖、迁移、死亡及细胞外 SPIO 的分散、聚集都具有不同的弛豫, 在活体内定量这些同时发生的现象非常复杂。

目前, 单一标记后示踪已经不能满足基础研究和临床实践的需要。胚胎干细胞中转导萤火虫荧光素酶报告基因后可表达 2 种特定抗原, 将抗原的特异性抗体与 SPIO 连接形成复合体, 经静脉注入小鼠梗死心肌附近后, 可观察到显著的低信号改变, 实现了对胚胎干细胞在活体内的活力、增殖和胚胎干细胞源性畸胎瘤的检测^[12]。尽管采用氧化铁颗粒可以进行干细胞活体内无创性示踪, 但关于这些颗粒对细胞超微结构的影响尚未可知。Hansen 等^[13]将葡聚糖包被的 USPIO 与转录反式激活因子转导序列结合, 用其标记间充质干细胞, 21 h 后并未发现细胞超微结构、活力、表型和增殖能力受到影响。膜联蛋白 V 是一种磷脂结合蛋白, 可与凋亡早期细胞结合, 灵敏反映细胞凋亡。Lam 等^[14]将膜联蛋白与 SPIO 结合, 对凋亡细胞进行成像及监测。

2.2 含 Gd^{3+} 颗粒

Gd^{3+} 具有高磁矩和对称电子基态, 是纵向弛豫时间对比剂的基础成分之一, 广泛用于临床 MRI 检查。此类对比剂有利于区别移植细胞与固有的低

信号组织、图像伪影。Agudelo 等^[15]研究发现, 含 Gd^{3+} 复合物 (Dex-DOTA- Gd^{3+}) 在内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPC) 中具有良好的稳定性, 且在相当长时间内无细胞毒性, 将标记的 EPC 注入大鼠缺血肢体后, 产生的信号足够对其进行示踪。纳米技术的出现推动了成像研究进展。在不用转染剂的情况下, 将 Gd^{3+} 装入碳纳米胶囊组装而成的 GNT 在微摩尔浓度水平可为每个骨髓间充质干细胞提供高达 10^9 个 Gd^{3+} , 且不影响细胞活力、分化潜能、扩散模式和表型, 10^7 个 GNT 标记的间充质干细胞在 1.5 特斯拉 MRI 扫描中弛豫时间比未标记的间充质干细胞减少一半^[16]。动物实验显示, GNT 标记的间充质干细胞进行心肌成形术是可行的, 且其在心肌组织的停留率较镱标记的细胞高出近 3 倍^[17]。

3 铁蛋白报告基因

铁蛋白普遍存在于生物体内, 被视为“内源性纳米颗粒”, 具有较大的应用价值及空间。将过表达铁蛋白重链的干细胞在体外培养成细胞球, 以未过表达铁蛋白的干细胞球作为对照组, 分别移植入心肌梗死小鼠的心脏中。与对照组相比, 过表达铁蛋白重链的干细胞球移植 4 周后心肌梗死面积未见明显扩大, 干细胞分化能力亦未受影响^[18]。Naumova 等^[19]研究发现, 可以采用铁蛋白作为内源性对比剂, 在干细胞心肌移植后对移植细胞的存活、增殖和迁移进行示踪。

4 多模态成像

不同成像方式具有不同的优势, 多模态成像将不同成像方式整合, 以更好地实现对移植干细胞的监测。新技术, 如放射性核素、磁介质、荧光蛋白等不同信号源成像的融合、干细胞多重标记、成像探针连接抗体形成复合标记物等拓展了成像的应用空间。各种成像方式在时间和空间上互补, 能提供局部甚至全体的生物信息。

X 线成像具有高时间分辨率, 操作简便。MRI 可以提供良好的软组织对比, 有助于区别心肌组织与心外膜血管, 提高经心包注入干细胞的安全性。Fu 等^[20]将 X 线成像与 MRI 融合, 在其引导下成功将干细胞微胶囊经心包注入猪的心脏, 与单用 X 线引导的对照组相比, 采用融合成像并未引起心包粘连、心包积液或心功能受损等不良反应。

Elhami 等^[21]用 SPIO 和 ^{18}F -脱氧葡萄糖双重标记脂肪源性干细胞, 通过不同方式注入心肌缺血的

动物体内,用全身正电子发射型计算机断层显像(positron emission computed tomography, PET)联合 MRI 确定干细胞在体内的分布。研究发现,干细胞在缺血心肌中的停留与注入方式相关,细胞停留率由低到高依次为尾静脉注射($1.2\% \pm 0.6\%$)、心室内注射($3.5\% \pm 0.9\%$)、梗死心肌内注射($14.0\% \pm 4.0\%$),心肌内直接注射为最有效的移植方式。PET 联合 MRI 的成像结果与组织化学检测结果具有较高的一致性。目前, PET 联合 MRI 成像一体机已经进入市场,其潜在的临床价值尚有待更多研究去开发。

干细胞移植治疗中,精确地将干细胞注入治疗部位会大大提高治疗效率,但在跳动的心脏中这一过程的实施存在较大挑战。整合多种成像方式实现精确注射的同时还可以避免发生心脏破裂的风险。Hatt 等^[22]将实时三维超声心动图、MRI、X 线、电子传感器示踪成功地融合在一起,通过导管成功地将细胞注入目标区域。此复合成像技术为干细胞注射提供了实时影像,且在一定程度上降低了对 X 线设备的依赖,减少了患者在治疗中接受的放射剂量,有较大的临床应用价值。

荧光素酶报告基因转导干细胞后可表达荧光素酶蛋白,其作用于荧光素后可将化学能转变为可见光能,利用体外设备实现生物荧光成像。生物荧光成像具有可重复成像、扫描时间快等优点,并可实现与 SPIO 双重标记。这种双重标记的干细胞在 MRI 成像中信号显著降低,信号强度在 4 周内无明显变化^[23],而生物荧光信号强度则在一定时段内逐渐增加^[24]。双重标记并不影响干细胞性能,移植 8 周后单光子发射计算机断层成像检测显示,梗死区域充盈缺损减少,心肌存活显著增加,心功能明显改善^[25]。双重标记并不影响干细胞活力,且用 MRI 检测单个细胞是可行的,但不同组织间检测到的细胞数存在差异,如脑组织检测到的信号数多于肾组织^[26]。

5 弥散张量成像(diffusion tensor imaging, DTI)

利用生物组织中的水分子弥散存在各向异性,磁共振 DTI 在弥散成像的基础上通过增加扫描梯度场方向,采用弥散张量相关系数体现水分子的弥散运动,能够更加精细地显示组织显微结构。Vallee 等^[3]将骨髓单核细胞移植入小鼠缺血心肌,用 DTI 示踪再生的心肌纤维,观察到移植后心肌细胞增殖加快,心肌纤维束沿着正确方向生成,并且

得到了组织学的证实。因此,DTI 可明确显示骨髓单核细胞生成肌纤维束的能力。此外,DTI 可显示干细胞移植后的显微结构改变,且不需要注射 MRI 对比增强剂或放射性示踪剂。

6 动脉自旋标记成像

常用的无创性心肌血流成像方法包括超声、PET 和 MRI,其中 MRI 灌注成像方法主要通过静脉注射外源性造影剂 Gd^{3+} 实现。随着成像技术的发展,基于内源性对比剂的动脉自旋标记(arterial spin labeling, ASL)成像被用于评价脏器的血流灌注,能反映微血管灌注信息。Zhang 等^[27]发现,给小鼠心肌梗死周边区域注射 EPC 可以促进血管形成,提高心肌血流灌注,注射后第 2 周 ASL 成像表明,细胞治疗组梗死部位的血流灌注和微血管密度较基质胶治疗组显著增高。ASL 可检测干细胞移植后局部组织灌注的改变,无创且无需注射造影剂。

7 小结

从单一成像到多模态成像融合,从大体解剖结构到分子影像提供的多参数信息,影像学的发展推动了干细胞心肌移植研究的进展,加深了对干细胞迁移、分布、分化和改善心功能等方面的理解。尽管成像方式能够从多角度、多方位实现对移植后干细胞的示踪与评价,但要全面了解干细胞治疗情况和机制,尚需在成像指导下进一步探索。

参 考 文 献

- [1] 陈 康,辛仰勋,顾 刚,等. 胚胎干细胞向心肌细胞分化中内皮细胞的作用[J]. 国际心血管病杂志, 2013, 40(4): 240-243.
- [2] Levit RD, Landazuri N, Phelps EA, et al. Cellular encapsulation enhances cardiac repair [J]. J Am Heart Assoc, 2013, 2(5): e000367.
- [3] Sosnovik DE, Mekkaoui C, Huang S, et al. Microstructural impact of ischemia and bone marrow-derived cell therapy revealed with diffusion tensor magnetic resonance imaging tractography of the heart in vivo[J]. Circulation, 2014, 129(17): 1731-1741.
- [4] Williams AR, Suncion VY, McCall F, et al. Durable scar size reduction due to allogeneic mesenchymal stem cell therapy regulates whole-chamber remodeling[J]. J Am Heart Assoc, 2013, 2(3): e000140.
- [5] 尹巧香,赵玉生,王 姮,等. 延迟增强核磁共振评估经皮球囊封堵冠状动脉法制备的小型猪心肌梗死模型[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(1): 34-39.
- [6] 陆敏杰,赵世华,宋 鹏,等. 磁共振成像对猪不同心脏状态下经冠状动脉干细胞移植后体内再分布的评价[J]. 中华心

- 血管病杂志, 2010, 38(11): 1014-1018.
- [7] Vallee JP, Hauwel M, Lepetit-Coiffe M, et al. Embryonic stem cell-based cardiopatches improve cardiac function in infarcted rats[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(3): 248-260.
- [8] Riegler J, Liew A, Hynes SO, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle targeting of mscs in vascular injury[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(8): 1987-1994.
- [9] Mathiasen AB, Hansen L, Friis T, et al. Optimal labeling dose, labeling time, and magnetic resonance imaging detection limits of ultrasmall superparamagnetic iron-oxide nanoparticle labeled mesenchymal stromal cells[J]. *Stem Cells Int*, 2013, 2013:353105.
- [10] Castaneda RT, Boddington S, Henning TD, et al. Labeling human embryonic stem-cell-derived cardiomyocytes for tracking with mr imaging[J]. *Pediatr Radiol*, 2011, 41(11): 1384-1392.
- [11] Ruggiero A, Guenoun J, Smit H, et al. In vivo mri mapping of iron oxide-labeled stem cells transplanted in the heart[J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2013, 8(6): 487-494.
- [12] 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): 1374-1381.
- [13] Hansen L, Hansen AB, Mathiasen AB, et al. Ultrastructural characterization of mesenchymal stromal cells labeled with ultrasmall superparamagnetic iron-oxide nanoparticles for clinical tracking studies[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2014, 74(5):437-446.
- [14] Lam J, Simpson PC, Yang PC, et al. Synthesis of an in vivo mri-detectable apoptosis probe [J]. *J Vis Exp*, 2012, (65):e3775.
- [15] Agudelo CA, Tachibana Y, Noboru T, et al. Long-term in vivo magnetic resonance imaging tracking of endothelial progenitor cells transplanted in rat ischemic limbs and their angiogenic potential[J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(15-16): 2079-2089.
- [16] Tran LA, Krishnamurthy R, Muthupillai R, et al. Gadonanotubes as magnetic nanolabels for stem cell detection [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(36): 9482-9491.
- [17] Tran LA, Hernandez-Rivera M, Berlin AN, et al. The use of gadolinium-carbon nanostructures to magnetically enhance stem cell retention for cellular cardiomyoplasty [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(2): 720-726.
- [18] 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-H2250.
- [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] Fu Y, Azene N, Ehtiati T, et al. Fused x-ray and mr imaging guidance of intrapericardial delivery of microencapsulated human mesenchymal stem cells in immunocompetent swine [J]. *Radiology*, 2014, 272(2): 427-437.
- [21] Elhami E, Dietz B, Xiang B, et al. Assessment of three techniques for delivering stem cells to the heart using pet and mr imaging[J]. *EJNMMI Res*, 2013, 3(1): 72.
- [22] Hatt CR, Jain AK, Parthasarathy V, et al. MRI-3D ultrasound-X-ray image fusion with electromagnetic tracking for transendocardial therapeutic injections; In-vitro validation and in-vivo feasibility [J]. *Comput Med Imaging Graph*, 2013, 37(2): 162-173.
- [23] 曹 剑, 王怡宁, 石新琳, 等. 双模态标记 F344 大鼠骨髓间充质干细胞移植入大鼠心脏后离体及在体影像示踪[J]. *中国医学科学院学报*, 2012, 34(5): 474-479.
- [24] Zhang H, Qiao H, Bakken A, et al. Utility of dual-modality bioluminescence and mri in monitoring stem cell survival and impact on post myocardial infarct remodeling [J]. *Acad Radiol*, 2011, 18(1): 3-12.
- [25] Peng C, Yang K, Xiang P, et al. Effect of transplantation with autologous bone marrow stem cells on acute myocardial infarction[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 162(3): 158-165.
- [26] Salamon J, Wicklein D, Didie M, et al. Magnetic resonance imaging of single co-labeled mesenchymal stromal cells after intracardial injection in mice [J]. *Rofo*, 2014, 186(4): 367-376.
- [27] Zhang H, Zhou R. Noninvasive imaging of myocardial blood flow recovery in response to stem cell intervention [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1052:89-99.

(收稿:2014-10-29 修回:2015-02-07)

(本文编辑:梁英超)