

## 超顺磁性氧化铁标记骨髓间充质干细胞在脊髓损伤中的应用进展

王春源, 冯世庆

(天津医科大学总医院骨科 300052 天津市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.04.16

中图分类号: R445.9, R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2009)-04-0331-03

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种高度致残的中枢神经系统损伤性疾病,对其治疗一直是医学界的难题。近年来骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)移植成为治疗 SCI 的热点<sup>[1]</sup>。由于 BMSCs 不仅可以表达脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factors, BDNF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)等,在损伤局部分化为特定神经细胞,促进 SCI 的功能恢复,同时还具有低免疫原性、取材方便、扩增迅速、可自体移植等优点,在 SCI 修复方面具有广阔的前景。但 BMSCs 移植后,如何无创性地在活体内动态监测移植细胞的存活、迁移、分化状况一直是困扰医学科研工作者的难题。随着纳米科技在医学领域的广泛应用,超顺磁性氧化铁纳米颗粒(superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPION)作为一种新型的磁性标记物成为研究的热点。目前 SPION 标记的 BMSCs 在治疗心、肝、肾及中枢神经系统疾病方面得到了快速应用,现对其在修复 SCI 中的应用做一综述。

## 1 SPION 的特性及标记作用

SPION 粒径小,穿透力及弛豫率强,对外加磁场具有高敏感性,在较弱的磁场中即可产生较大的磁性,撤除外加磁场后磁性也迅速消失,即所谓的超顺磁性<sup>[2]</sup>。总体来说 SPION 具有以下几点作用<sup>[3]</sup>:(1)磁性分离靶细胞和其他生物体;(2)作为 MRI 显像的对比增强剂;(3)具有靶向性呈递药物、基因和放射性核素的作用;(4)磁性纳米粒子还可以在外磁场作用下进行定位能量传递,在癌组织的局部产生过热使癌细胞失活,在肿瘤诊断与治疗方面发挥着一定的作用。

分子影像概念的提出使得活体示踪成为可能,由于 MRI 有效成像时间长,可观察细胞的动态迁移过程,且空间、时间分辨率高,对比度好,是用于活体细胞示踪的最佳选择之一<sup>[4]</sup>。应用 MRI 进行活体示踪需要体外标记示踪剂,SPION 是目前研究最多、最有前景的一种对比示踪剂。由于 SPION 的超顺磁性,引起局部磁场不均匀,可明显缩短 T2 值尤其是 T2WI 和 T2\*WI,使磁标记细胞周围组织信号降低<sup>[5]</sup>。目前国内外研究报道利用 SPION 标记干细

胞后移植到动物脑、心脏、肾脏等进行活体示踪,其最佳成像序列为 GRE T2\*WI 序列<sup>[5,6]</sup>。

SPION 同样可以作为一种分子探针标记 BMSCs 进行细胞示踪研究<sup>[7]</sup>。与其他细胞标记方法相比,其最突出的特点是能在活体状态下动态显示移植的 BMSCs。Frank 等<sup>[8]</sup>最先采用 SPION 分别标记 BMSCs、少突前体细胞等,发现单纯采用 SPION 标记干细胞的标记效率较低,原因是细胞膜和 SPION 表面都带有负电而相互排斥,致使 SPION 不能有效标记细胞。目前常采用多聚阳离子转染剂<sup>[9]</sup>、脂质体<sup>[10]</sup>等方法对 SPION 进行修饰,通过改变其表面电性,从而达到有效标记 BMSCs 的目的。将 SPION 与转染剂或脂质体混合后,通过静电相互作用,带负电荷的 SPION 与带正电荷的转染剂或脂质体结合形成复合物,这种复合物会刺激细胞膜内吞作用,从而将铁颗粒转运至细胞内<sup>[11,12]</sup>。实验表明其标记有效率高达 99%以上,适当浓度的铁纳米颗粒标记后对细胞的活力、增殖能力和分化能力不产生影响<sup>[13]</sup>,且足以产生显著的 MRI 对比显像效果,能长期、敏感地标记移植细胞。

## 2 SPION 标记的 BMSCs 在治疗脊髓损伤中的应用

SCI 后由于原发性损伤和继发性神经元凋亡,脊髓空洞、胶质瘢痕形成,以及存在的抑制轴突再生因素如轴突生长抑制因子、髓磷脂相关糖蛋白和少突胶质细胞-髓磷脂糖蛋白等,使得脊髓损伤局部微环境调节紊乱,阻碍了轴突再生及再髓鞘化。BMSCs 源于中胚层未分化的间质细胞,是位于成年动物或人骨髓中的非造血组织干细胞,具有自我更新和多向分化潜能两个特性,能在特定微环境的诱导下向多种中胚层和神经外胚层来源的组织细胞分化。近年来, BMSCs 向神经系统细胞(包括神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞)的分化研究受到了极大的关注。许多实验都显示 BMSCs 经各种途径诱导分化所得的神经元样细胞具备神经元的形态特征,并出现相对特异的神经元标志。Kang 等<sup>[14]</sup>利用雌激素调节神经营养因子基因的表达,从而促进 BMSCs 向神经细胞分化。Kan 等<sup>[15]</sup>的研究表明,同时增加培养基中二十二碳六烯酸和花生四烯酸的浓度可促进轴突形成,使神经分化标志增加。Tseng 等<sup>[16]</sup>也发现成年大鼠 BMSCs 经过长时间体外培养后,能自动分化成神经元前体细胞,其中相当一部分细胞 Nestin 表达阳性,仅极少数表达未成熟神经元标志  $\beta$ -tubulin。因此,

第一作者简介:男(1983-),医学硕士,研究方向:脊柱脊髓损伤  
电话:(022)60363936 E-mail:a1984081519830326@yahoo.com.cn  
通讯作者:冯世庆 E-mail:fengsq321@sina.com

有学者认为神经元标志物的出现并不表明其已向神经元分化,其本质仍应该是干细胞<sup>[17]</sup>。一些体内实验也显示 BMSCs 移植到脊髓损伤局部能迁移并分化为神经元或神经胶质细胞<sup>[18]</sup>。Cao 等<sup>[19]</sup>研究发现在 BMSCs 移植到大鼠脊髓损伤部位后, BMSCs 和宿主组织相互作用生成 2',3'环状腺苷酸 3'-磷酸二酯酶细胞(2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase cells, CNP),被认为是 BMSCs 的衍生细胞,类似于雪旺细胞,且发现移植的 BMSCs 和神经胶质细胞相互协调促进神经纤维通过受损部位。以上研究表明, BMSCs 在接触神经系统的微环境时,不仅可以分泌多种神经营养因子,自身还可以分化成神经元或神经胶质样细胞,补充了损伤凋亡的神经细胞,改善了脊髓局部微环境,能够有效促进 SCI 后神经功能的恢复。将 BMSCs 移植到动物脊髓损伤部位,移植细胞可在损伤局部迁移、分化、分泌细胞因子,促进了动物感觉运动功能的恢复<sup>[20]</sup>。Ankeny 等<sup>[21]</sup>、Satake 等<sup>[22]</sup>的研究也表明,移植于脊髓损伤局部的 BMSCs 能够促进轴突生长,提示 BMSCs 在 SCI 部位的轴突重建过程中发挥了重要作用。

将 SPION 标记的 BMSCs 移植到脊髓损伤部位,可以进行活体示踪,通过观察 BMSCs 在移植部位的存活、迁移、分化等情况,为进一步研究 BMSCs 修复脊髓损伤的机制提供有力手段。Jendelová 等<sup>[23]</sup>用 SPION(Endorem)、BrdU 同时标记了 BMSCs,移植入 SCI 大鼠体内,移植 4 周后用 MRI 观察移植细胞在损伤脊髓局部的情况,普鲁士蓝染色和 BrdU 单抗免疫组化染色同时显示移植细胞存在于损伤局部,从而证实 SPION 作为一种新的标记物可以对移植的干细胞进行长期非侵入的 MRI 活体示踪。Syková 等<sup>[24]</sup>将 SPION(Endorem)标记的大鼠 BMSCs 通过股静脉移植到大鼠脊髓压迫损伤模型的损伤局部, MRI 显示移植部位呈持续 T2 低信号,细胞移植后脊髓损伤大鼠的后肢感觉运动功能有所恢复,较对照组有明显差异;形态学观察显示损伤局部白质增加,脊髓空洞面积缩小。他们同时将 Endorem 标记的小鼠 BMSCs 和胚胎干细胞,将其移植到小鼠大脑皮质损伤区域对侧,通过 MRI 跟踪细胞在脑内的存活、迁移及分化情况。研究表明,在移植后的第一周,细胞向损伤区域迁移并且在损伤的边缘带进行增殖,发现其中小于 3% 的 BMSCs 分化为神经元,这种 MRI 上的低信号持续存在达 50 多天,同时通过组织化学染色进一步证实了这些被磁粒标记的细胞存在。在 Syková 等<sup>[25]</sup>的另一项研究中,将磁性纳米颗粒标记的 BMSCs 接种到可降解生物材料水凝胶聚合物(polymer hydrogels)中,然后移植到大鼠脊髓半切损伤模型的损伤局部,发现大鼠后肢感觉运动功能的恢复较对照组有差异,形态学比较显示实验组大鼠脊髓损伤部位白质增加,也同样运用 MRI 示踪了移植细胞的存活、迁移和分化情况。Urdžíková 等<sup>[26]</sup>比较了静脉途径移植 SPION 标记的 BMSCs、骨髓中的单核细胞成分以及通过皮下注射粒细胞集落刺激因子来动员自体骨髓细胞三种方法对大鼠脊髓损伤模型神经功能恢复的影响,

结果表明,与对照组相比,这三种方法都能促进 SCI 大鼠感觉运动功能的恢复,其中 BMSCs 移植组大鼠的后肢功能恢复更为显著。

经蛛网膜下腔移植 BMSCs 治疗 SCI 是一种创伤较小的手段,但是这种方法可能比直接局部注射的效率低<sup>[27]</sup>。大量研究表明, SPION 能够在外加磁场作用下主动到达目标组织,因而也使标记后的 BMSCs 具有了靶向作用。Nishida 等<sup>[28]</sup>确立了一种示踪磁场引导系统,通过这种外加磁场的引导,经 SPION 标记的 BMSCs 通过蛛网膜下腔注射,在外加磁场力的作用下可以较容易到达脊髓局部,移植的细胞主要聚集在脊髓组织的背侧。因此通过这种磁场引导系统可以更有效地辅助 BMSCs 移植治疗脊髓损伤。对于静脉移植途径治疗 SCI,血脊髓屏障的存在是 BMSCs 移植的最大障碍。有研究表明,包裹 SPION 的纳米载体经过一些生物活性分子如跨膜肽(transactivating-transduction protein, TAT)与多聚赖氨酸(polyethylene glycol, PEG)的功能化修饰后具有跨膜的特殊功能<sup>[29]</sup>。因此将功能化修饰的 SPION 与 BMSCs 相结合,以提高 BMSCs 的定向迁移及跨血-脊髓屏障能力,从而提高治疗脊髓损伤的疗效,可能是科研工作者致力研究的方向。

### 3 展望

BMSCs 的活体示踪技术有助于进一步研究移植的 BMSCs 在脊髓损伤部位存活、迁移及分化的情况,有助于从分子水平探讨 BMSCs 与周围细胞的相互作用,而 SPION 作为一种独特而有效的标记物有望成为研究这一机制的有力工具。但目前,通过 SPION 标记 BMSCs 来探讨脊髓损伤修复机制的研究还处于初级阶段,仍存在着诸多尚未解决的问题。例如,普鲁士蓝染色阳性可以作为 SPION 标记 BMSCs 在脊髓损伤局部组织聚集的病理学指标,但由于脊髓局部的出血致使吞噬细胞吞噬代谢死亡的红细胞,因而同时也存在着含铁血黄素颗粒的干扰;如何区分蓝染的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  颗粒与含铁血黄素颗粒是需要进一步研究解决的问题。另一方面,细胞内的 SPION 是否会对移植细胞及移植周围的细胞产生毒性作用,含有 SPION 的细胞移植后是否会增加脊髓损伤局部铁离子的浓度从而进一步加重自由基的破坏作用等;细胞增殖分裂会降低细胞的平均含铁量从而导致磁标记强度降低,进而使 MRI 的敏感性降低,死亡的标记细胞可释放出铁标记物将周围未标记的细胞标记从而产生假阳性;脊髓损伤局部的巨噬细胞可吞噬磁标记的移植细胞,也能使周围组织在 MRI 上呈假阳性;移植入脊髓内的标记细胞所引起的低信号与病理因素所引起的信号丢失如局部出血等区分困难等。这些问题都需要更多实验去深入研究。

### 4 参考文献

1. Carvalho KA, Vialle EN, Moreira GH, et al. Functional outcome of bone marrow stem cells(CD45+/CD34-) after cell therapy

- in chronic spinal cord injury in Wistar rats [J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(3):845-846.
2. Gerales CF, Laurent S. Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging [J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2009, 4(1):1-23.
3. Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine [J]. *Phys D: Appl Phys*, 2003, 36:167-181.
4. Islam T, Josephson L. Current state and future applications of active targeting in malignancies using superparamagnetic iron oxide nanoparticles [J]. *Cancer Biomark*, 2009, 5(2):99-107.
5. Bos C, Delmas Y, Desmouliere A, et al. In vivo MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver [J]. *Radiology*, 2004, 233(3):781-789.
6. Kustermann E, Roel WI, Breitbach M, et al. Stem cell implantation in ischemic mouse heart: a high resolution magnetic resonance imaging investigation [J]. *NMR Biomed*, 2005, 18(6):362-370.
7. Henning TD, Boddington S, Daldrup-Link HE, et al. Labeling hESCs and hMSCs with iron oxide nanoparticles for non-invasive in vivo tracking with MR imaging [J]. *Vis Exp*, 2008, 31(13):685-693.
8. Frank J A, 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.
9. Heike DE, Rudelius M, Piontek G, et al. Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: in vivo monitoring with 1.5-T MR imaging equipment [J]. *Radiology*, 2005, 234:197-205.
10. Matuszewski L, Persigehl T, Wall A, et al. Cell tagging with clinically approved iron oxides: feasibility and effect of lipofection, particle size, and surface coating on labeling efficiency [J]. *Radiology*, 2005, 235:155-162.
11. 魏俊吉, 王任直, 陆菁菁, 等. 超顺磁性氧化铁标记骨髓间充质干细胞治疗大鼠脑卒中的磁共振活体追踪 [J]. *中国医学科学院学报*, 2007, 29(1):73-77.
12. Janic B, Iskander AS, Rad AM, et al. Effects of ferumoxides-protamine sulfate labeling on immunomodulatory characteristics of macrophage-like THP-1 cells [J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(6):e2499.
13. 代广辉, 修俊刚, 周振军, 等. 超顺磁性氧化铁对大鼠神经干细胞生活活性的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2007, 27(1):49-55.
14. Kang JH, Lee CK, Kim JR, et al. Estrogen stimulates the neuronal differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (CD34-) [J]. *Neuroreport*, 2007, 18(1):35-38.
15. Kan I, Melamed E, Offen D, et al. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid are fundamental supplements for the induction of neuronal differentiation [J]. *Lipid Res*, 2007, 48(3):513-517.
16. Tseng PY, Chen CJ, Sheu CC, et al. Spontaneous differentiation of adult rat marrow stromal cells in a long-term culture [J]. *Vet Med Sci*, 2007, 69(2):95-102.
17. Tondreau T, Lagneaux L, Dejenef M, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation [J]. *Differentiation*, 2004, 72(7):319-26.
18. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney D. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(19):10711-10716.
19. Cao Q, Ding P, Lu J, et al. 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase cells derived from transplanted marrow stromal cells and host tissue contribute to perineurial compartment formation in injured rat spinal cord [J]. *Neurosci Res*, 2007, 85(1):116-130.
20. Shi E, Kazui T, Jiang X, et al. Therapeutic benefit of intrathecal injection of marrow stromal cells on ischemia-injured spinal cord [J]. *Ann Thorac Surg*, 2007, 83(4):1490-1497.
21. Ankeny DP, McTigue DM, Jakeman LB, et al. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axon after contusive spinal cord injury in rats [J]. *Exp Neurol*, 2004, 190(1):17-31.
22. Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injury spinal cord tissue [J]. *Spine*, 2004, 29(18):1971-1979.
23. Jendelová P, Herynek V, Urdzík L, et al. Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord [J]. *Neurosci Res*, 2004, 76(2):232-243.
24. Syková E, Jendelová P. Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord [J]. *Neurodegener Dis*, 2006, 3(1-2):62-67.
25. Syková E, Jendelová P, Urdzík L, et al. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels—two strategies for spinal cord injury repair [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2006, 26(7-8):1113-1129.
26. Urdzík L, Jendelová P, Glogarová K, et al. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats [J]. *Neurotrauma*, 2006, 23(9):1379-1391.
27. Ban DX, Kong XH, Feng SQ, et al. Intraspinal cord graft of autologous activated Schwann cells efficiently promotes axonal regeneration and functional recovery after rat's spinal cord injury [J]. *Brain Res*, 2009, 1256:149-161.
28. Nishida K, Tanaka N, Nakanishi K, et al. Magnetic targeting of bone marrow stromal cells into spinal cord: through cerebrospinal fluid [J]. *Neuroreport*, 2006, 17(12):1269-1272.
29. Rapoport M, Lorberboum-Galski H. TAT-based drug delivery system: new directions in protein delivery for new hopes [J]. *Drug Deliv*, 2009, 6(5):453-463.

(收稿日期: 2009-10-09 修回日期: 2009-11-09)

(本文编辑 卢庆霞)