

报告基因显像监测干细胞治疗的研究进展

周翔 尹红燕 张一帆

【摘要】 干细胞治疗的研究展示了广阔的应用前景,但干细胞治疗作为一种新的疾病治疗手段,仍存在着很多亟待解决的问题。报告基因显像是近年来发展迅速的一种无创、灵敏的监测干细胞的方法,特别是放射性核素报告基因显像具有灵敏度高和特异性强的优点,并可进行深部组织显像和重复显像,是在活体条件下示踪干细胞最具潜力的技术,展示了良好的应用前景。

【关键词】 基因;报告;干细胞;放射性核素显像;分子影像技术

Advances of reporter gene monitoring stem cell therapy

ZHOU Xiang, YIN Hong-yan, ZHANG Yi-fan.

(Department of Nuclear Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 Stem cell therapy research has made great progress, demonstrating a broad application prospects. However, stem cell therapy as a new disease treatment, there are still many problems to be solved. Reporter gene imaging is a rapid development in recent years, a non-invasive, sensitive method of monitoring of stem cells, in particular radionuclide reporter gene imaging has high sensitivity and specificity of the advantages of strong and can carry out imaging of deep tissue and repeat imaging, is a tracer in vivo conditions, the most promising stem cell transplantation technique, showing good prospects for development.

【Key words】 Gene, reporter; Stem cells; Radionuclide imaging; Molecular imaging technology

近年来,干细胞治疗的研究取得了很大的进展,展示了广阔的应用前景。但干细胞治疗作为人类多种退行性疾病新的治疗手段,仍存在着很多亟待解决的问题^[1],如干细胞移植后,如何在活体条件下通过无创的、灵敏的方法示踪干细胞在靶器官内的分布、移行以及存活等,并对其治疗疗效及安全性进行评估。这对理解干细胞生物学、干细胞植入的最优化以及干细胞治疗效益的最大化等十分重要。

近年来,干细胞标记显像发展迅速,可分为直接标记显像和间接标记显像。报告基因显像是一种间接标记显像,通过载体将报告基因转入干细胞内,表达的报告蛋白可以与放射性探针结合或介导放射性探针的摄取,通过 PET 或 SPECT 对干细胞进行示踪。其具有很高的敏感性和特异性,并可进行深部组织显像和重复显像,是活体示踪移植干细

胞最具潜力的技术。

1 放射性核素报告基因干细胞显像的条件

报告基因干细胞显像是在细胞和分子水平对干细胞生物过程进行定量和定性的、无创性的显像方法。报告基因干细胞显像通常应具备以下的条件:①报告基因产物无抗原性;②报告探针可以被特异性的摄取,并有效滞留一定时间,能被 SPECT 或者 PET 有效探测;③报告探针最终能被完全清除且无细胞毒性;④载体、报告基因产物和探针不影响干细胞的增殖和分化;⑤观察干细胞的分化时,需要报告基因能长期、稳定、安全地表达;⑥影像信号强,显像的灵敏度和分辨率高。

2 放射性核素报告基因干细胞显像

目前用于显像的报告基因有多种,如以受体为基础的多巴胺 2 受体(dopamine type 2 receptor, D₂R)和生长抑素受体亚型 2 报告基因,以转运体为基础的钠碘同向转运体 (sodium/iodine symporter, NIS)和去甲肾上腺素转运体报告基因,以及以酶为基础的单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶基因 (herpes simplex

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2010.05.002

基金项目:国家自然科学基金(30570525),上海市重点学科建设项目(S30203)

作者单位:200025,上海交通大学医学院附属瑞金医院核医学科

通信作者:张一帆(E-mail: zhangyifan1992@yahoo.com.cn)

virus type 1-thymidine kinase, HSV1-tk) 和 HSV1-sr39tk (HSV1-tk 的一种突变体) 报告基因等。常用于干细胞显像的报告基因有 NIS、HSV1-tk 及 D₂R。

2.1 NIS 报告基因显像

NIS 是位于甲状腺滤泡细胞膜上的一种跨膜糖蛋白, 可介导碘离子的主动转运, 使碘离子顺着电化学梯度从间质进入细胞。除甲状腺组织外, NIS 在唾液腺、胃黏膜、分泌期的乳腺等甲状腺外组织也有低水平表达^[2]。与其他报告基因相比较, NIS 具有许多潜在的优势: NIS 是一种生理性蛋白, 理论上无免疫原性; 介导的放射性核素碘或锝不需要复杂的化学合成; 可用于 SPECT 或 PET。近年来, NIS 在干细胞的示踪研究中积累了不少经验, 技术日趋成熟^[3]。

Kang 等^[4]构建了含 α -肌球蛋白重链组织特异表达启动子和 NIS 基因的质粒, 转导成肌细胞系 L6 和 H9C2 后的体外放射性碘摄取实验显示, 转导的 L6 和 H9C2 的细胞均表现出明显的 ¹²⁵I 摄取增高; 通过 γ 相机针孔准直器进行转 α -肌球蛋白重链-NIS 基因小鼠心肌显像显示, 实验鼠心肌快速而明显地摄取 ¹³¹I, 其相对摄取率是对照组的 3.8 倍, 且摄取的 ¹³¹I 滞留时间长; 同时他们又进行了 ¹²⁵I 的小动物 PET, 结果表明小鼠心肌的放射性摄取要高于胃和甲状腺组织。为了解干细胞心脏移植后细胞的植入和存活状况, Higuchi 等^[5]进行了 PET 结合 MRI 监测细胞移植和存活的可行性研究, 分别通过含有 NIS 报告基因的重组逆转录病毒以及氧化铁粒子转染和标记人内皮祖细胞, 然后在裸鼠心肌壁内注射, ¹²⁵I 小动物 PET 显示心肌移植部位放射性明显浓聚, 10 min 时达摄取高峰, 但随着天数的增加放射性逐渐降低; 而小动物 MRI 显示心肌移植部位信号没有改变, 研究表明, PET 报告基因显像可有效地监测存活细胞, 而 MRI 则由于死亡的细胞或被巨噬细胞吞噬后含有的氧化铁粒子不能有效检测。

重组报告基因载体可通过细胞分裂转移给子细胞, 但基因的表达有时会出现排斥或表达沉默。Kim 等^[6]构建了含人 NIS 基因的重组质粒, 启动子为巨细胞病毒(cytomegalovirus)启动子, 通过转导 F3 人神经干细胞后经筛选得到 F3-NIS 细胞系, 该细胞系经传代后人 NIS 基因表达逐渐沉默, 通过去甲基化试剂 5-氮杂胞苷(5-azacytidine)和组蛋白脱

乙酰酶抑制剂曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA) 处理第三代 F3-NIS 细胞系, 结果显示细胞对 ¹²⁵I 的摄取明显提高, 且两者具有协同作用。

由于 NIS 基因介导干细胞摄取的放射性碘不像甲状腺细胞那样有效地滞留, 而是排除较快, 这样会明显降低对干细胞的辐射不良反应; 同样, 由于 NIS 基因能够介导 ^{99m}Tc 的摄取, 因此对细胞也无辐射的不良反应。

2.2 HSV1-tk 报告基因显像

HSV1-tk 是目前小动物 PET 分子影像研究中最成熟的报告基因, 其编码产物是胸苷激酶, 放射性核素标记的该酶底物 2'-脱氧-2'-¹⁸F-1- β -D-阿糖呋喃基-5-碘尿嘧啶(2'-deoxy-2'-¹⁸F-fluoro-1- β -D-arabinofuranosyl-5-iodouracil, ¹⁸F-FIAU) 和 9-¹⁸F-4-氟-3-羟甲基丁基鸟嘌呤[(9-¹⁸F-(4-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine, ¹⁸F-FHBG)], 经主动转运进入转染的细胞后, 可被磷酸化, 磷酸化的底物不能穿出细胞膜而集聚在细胞内, 因而可通过 PET 或 SPECT 进行转染的干细胞显像。

Hung 等^[7]通过 HSV1-tk 成功转染了骨髓基质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC), 由荷瘤裸鼠尾静脉注射后, PET 可清晰显示 MSC 在小鼠体内移行及定位到肿瘤部位, 证实了干细胞可靶向到肿瘤并分化为肿瘤间质部分, 同时表明, HSV1-tk 的 PET 是体内示踪干细胞的有效工具。

研究发现, 使用重组胸苷激酶的腺病毒转染细胞, 其对 ¹⁸F-FHBG 的摄取比其他载体介导的胸苷激酶摄取更高, 这可能与腺病毒改变了细胞内脱氧嘧啶核苷酸的表达水平有关; 另外, 在 HSV1-tk 转染的间质干细胞中, ¹⁸F-FIAU 的摄取是 ¹⁸F-FHBG 的 5~8 倍, 然而某些肿瘤细胞中, 如胶质瘤细胞株 C6, ¹⁸F-FHBG 的摄取则高于 ¹⁸F-FIAU, 表明不同的细胞系对示踪剂的摄取也不同, 因此在体内细胞示踪研究中, 应根据不同的靶细胞选择不同的放射性探针^[8]。

HSV1-tk 报告基因能定位干细胞并反映治疗基因表达的程度, 但应用核苷酸衍生物进行显像时也具有其局限性: 由于 ¹⁸F-FHBG 主要通过消化道排泄, 对于腹部病灶的观察有一定的影响^[9]; ¹⁸F-FHBG 也不能透过血脑屏障, 因此不能用于中枢神经系统干细胞移植的显像; 另外, HSV1-tk 的免疫原性也是临床应用面临的重要问题。

近年来的研究显示,突变型的 HSV1-sr39tk 较野生型 HSV1-tk 免疫原性更低,可以更为有效地利用无环鸟苷底物 FHBG, HSV1-sr39tk 联合 ^{18}F -FHBG 探针是目前最为有效的 PET 报告基因显像系统^[10]。另外,为避免鼠报告蛋白对人的免疫反应,近来 Ponomarev 等^[11]进行了人线粒体胸苷激酶 2 的小动物 PET,探针为 ^{125}I -FIAU 和 ^{18}F -氟乙基- β -D-阿糖呋喃糖基尿嘧啶,显像效果良好。

2.3 D_2R 报告基因显像

D_2R 报告基因是少数能够进行脑内细胞示踪的报告基因系统之一,其相应的配体氟乙基螺哌隆 (fluoroethylspiperone, FESP) 可以通过血脑屏障与 D_2R 受体结合,具有很高的亲和力。定量分析显示, ^{18}F -FESP 的放射性浓聚与 D_2R 基因表达水平呈正相关,小动物 PET 可准确反映靶组织 D_2R 基因的表达水平^[12]。但 D_2R 的激活可以改变细胞内 cAMP 浓度,导致靶细胞或组织生理学的改变,第二代的 D_2R 报告基因 $\text{D}_2\text{R80A}$ 则避免了这个不足,它不会引起胞内 cAMP 浓度的改变,从而避免了相关生物学效应的产生^[13]。当然, D_2R 报告基因系统在体内使用也存在一些问题:在进行脑干细胞移植监测时,由于内源性脑组织 D_2R 的存在,难于对转基因干细胞进行清晰的定位和活力判断^[14];同样,心肌 D_2R 干细胞移植也存在着类似的问题。

除上述三类报告基因外,还有胞嘧啶脱氨酶、生长抑素受体、雌激素受体等放射性核素显像报告基因,这些报告基因都各有优缺点,但目前还很少应用于干细胞的研究。

3 其他模式报告基因显像

光学显像有很高的灵敏度,但由于荧光在体内穿透力有限,不易于进行大动物深部组织的活体显像。放射性核素基因显像的灵敏度不及光学显像,但可非侵袭性地观察深部组织的干细胞的移行、定位和存活,并可进行定量。MRI 基因显像的灵敏度相对不高,但用超顺磁性氧化铁等直接标记法进行 MRI,分辨率可以观察到细胞级水平^[15]。

因此,鉴于每种报告基因都有各自的优缺点,目前多数研究者开始进行多模式的报告基因显像来示踪干细胞。Ray 等^[16]设计了一种新的多模式报告基因系统可以表达 3 种融合蛋白,即红色荧光蛋白、荧光素酶及 HSV1-tk 进行小动物活体成像,分

别可进行荧光显微镜观察细胞、高灵敏的小动物活体显像以及 PET 并定量测定,能更全面地了解干细胞的移行、增殖和分化。

4 目前存在的问题

目前的报告基因显像技术也存在一定的缺陷。病毒是目前最常用的转基因载体,但病毒感染细胞后,病毒蛋白或报告蛋白有可能会诱导宿主免疫反应,导致报告基因表达的缺失^[17]。

另外,监视干细胞的增殖分化需要报告基因在转导细胞中长时间稳定表达,但多数载体如腺病毒载体介导的基因在干细胞中只是瞬时表达。因此,要想获得稳定的基因表达,需要用逆转录病毒或者慢病毒载体。但这些病毒由于随机插入基因组,有可能会诱导干细胞的基因突变。显像灵敏度的提高也是报告基因显像监测干细胞移植需要解决的一个重要问题。

5 报告基因显像的展望

报告基因显像可以进行移植干细胞的定位及分布监测,指导临床干细胞治疗。采用多模式报告基因显像和通过组织特异性启动子启动报告基因的表达是干细胞报告基因显像发展的趋势。但目前仅限于动物实验研究。为进一步扩大其临床应用,尚需进一步研究无免疫原性载体、报告蛋白以及探针,而提高载体的转染效率和报告基因表达、减少转染后对干细胞代谢的影响、增强启动子的转录活性及增大报告基因的表达等为今后研究的重要课题。

相信随着分子生物学和影像技术的进展,将会有更多新颖高效的载体、报告基因和标记探针涌现,并应用于干细胞示踪,这也必将进一步推动对干细胞的深入研究和临床应用。

参 考 文 献

- [1] Hu YC. Baculoviral vectors for gene delivery: a review. *Curr Gene Ther*, 2008, 8(1): 54-65.
- [2] Spitzweg C. Gene therapy in thyroid cancer. *Horm Metab Res*, 2009, 41(6): 500-509.
- [3] Terrovitis J, Kwok KF, Lautamaki R, et al. Ectopic expression of the sodium-iodide symporter enables imaging of transplanted cardiac stem cells in vivo by single-photon emission computed tomography or positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52(20):1652-1660.
- [5] Kang JH, Lee DS, Paeng JC, et al. Development of a sodium/iodide

- symporter (NIS)-transgenic mouse for imaging of cardiomyocyte-specific reporter gene expression. *J Nucl Med*, 2005, 46(3): 479-483.
- [6] Higuchi T, Anton M, Dumler K, et al. Combined reporter gene PET and iron oxide MRI for monitoring survival and localization of transplanted cells in the rat heart. *J Nucl Med*, 2009, 50(7): 1088-1094.
- [7] Kim YH, Lee DS, Kang JH, et al. Reversing the silencing of reporter sodium/iodide symporter transgene for stem cell tracking. *J Nucl Med*, 2005, 46(2): 305-311.
- [8] Hung SC, Deng WP, Yang WK, et al. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(21): 7749-7756.
- [9] Min JJ, Iyer M, Gambhir SS. Comparison of ^{18}F -FHBG and ^{14}C -FIAU for imaging of HSV1-tk reporter gene expression: adenoviral infection vs stable transfection. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2003, 30(11): 1547-1560.
- [10] Yaghoubi S, Barrio JR, Dahlbom M, et al. Human pharmacokinetic and dosimetry studies of ^{18}F -FHBG: a reporter probe for imaging herpes simplex virus type-1 thymidine kinase reporter gene expression. *J Nucl Med*, 2001, 42(8): 1225-1234.
- [11] Herschman HR. Noninvasive imaging of reporter gene expression in living subjects. *Adv Cancer Res*, 2004, 92: 29-80.
- [12] Ponomarev V, Doubrovin M, Shavrin A, et al. A human-derived reporter gene for noninvasive imaging in humans: mitochondrial thymidine kinase type 2. *J Nucl Med*, 2007, 48(5): 819-826.
- [13] Waerzeggers Y, Monfared P, Viel T, et al. Methods to monitor gene therapy with molecular imaging. *Methods*, 2009, 48(2): 146-160.
- [14] Liang Q, Satyamurthy N, Barrio JR, et al. Noninvasive, quantitative imaging in living animals of a mutant dopamine D2 receptor reporter gene in which ligand binding is uncoupled from signal transduction. *Gene Ther*, 2001, 8(19): 1490-1498.
- [15] Acton PD, Zhou R. Imaging reporter genes for cell tracking with PET and SPECT. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2005, 49(4): 349-360.
- [16] Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev*, 2003, 17(5): 545-580.
- [17] Ray P, De A, Min JJ, et al. Imaging tri-fusion multimodality reporter gene expression in living subjects. *Cancer Res*, 2004, 64(4): 1323-1330.
- [18] Bangari DS, Mittal SK. Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity. *Curr Gene Ther*, 2006, 6(2): 215-226.

(收稿日期: 2010-04-23)

中华医学会与北京万方数据股份有限公司续签“中华医学会系列杂志数据库”独家合作协议

中华医学会与北京万方数据股份有限公司(以下简称万方数据)达成的“中华医学会系列杂志数据库”独家战略合作已成功运行3年,新一轮的独家合作协议已于2010年6月底续签。中华医学会旗下遍布全国24个省、直辖市的123种医学期刊的数字化信息网络传播权继续独家授予万方数据,双方将继续践行“传承百年经典,铸就精品中华期刊群;再现世纪华章,打造医学信息新航母”的战略目标。

传媒产业数字化、信息化已经成为期刊业必须面对的重要问题。国家新闻出版总署对数字化出版的发展趋势高度关注,出台了一系列政策引导传统出版行业积极利用新兴技术、有效融入数字化出版潮流,推动产业转型及升级。2008年中华医学会与万方数据建立了“中华医学会系列杂志数据库”独家战略合作伙伴关系。作为国内信息资源提供方与信息服务商的首次独家合作,不仅在传统出版领域解决了数字信息版权保护问题,而且避免了在迅速发展的信息内容服务业中由于版权保护制度滞后产生的负面效应,给当时信息内容服务业者对数字信息版权保护的迷茫指明了发展方向。

在双方合作的3年中,万方数据开发完成了覆盖中西医全领域的信息内容产品体系,搭建了开放、和谐、创新的医学知识链接全开放平台——万方医学网。万方数据通过多渠道资源合作、互链等形式,整合文献数据、知识库资源和各类多媒体资源打造了包括在线产品、镜像产品、移动产品、分析报告和光盘等其他产品的综合产品线,促进了以万方医学网为媒介的传统媒体和新媒体的全媒体联动,从而为医护人员、医学科研人员、企事业单位以及普通大众提供了具有个性化的专业信息服务,同时开拓性地致力于公众的健康信息素养培育。

中华医学会与万方数据战略合作协议的续签,顺应了国家新闻出版总署倡导和引导的数字传播发展方向和趋势,推动了中华医学会系列杂志品牌化、集群化、数字化、国际化的发展进程。在未来的3年合作期中,我们不仅要巩固和发展已有的良好合作局面,而且将更加坚定地同心携手,共同探求医学出版的未来之道。双方将会按照国家有关期刊改革的要求,建立逐步开放和共享的医学专业信息平台,力争使我们的专业信息服务于更多的读者和作者,最终实现为医学科技创新体系建设、医学科研信息评价等方面提供全方位、多层次、个性化的服务。

中华医学会