

## MR 示踪技术在干细胞移植治疗软骨缺损中的研究进展

樊鹏 甄俊平 王峻

**【摘要】** 关节软骨缺损临床十分常见,但目前的治疗方法均存在修复不完全的缺陷。间充质干细胞移植治疗的发展为再生修复关节软骨缺损提供了新的治疗策略,但是作为组织修复执行者的干细胞移植后的在体迁徙分布、增殖及转归过程,目前尚无安全无创、实时动态的监测手段,因此难以明确外源性干细胞在关节软骨缺损再生修复中所扮演的角色。而 MR 在体示踪细胞技术为解决上述问题提供了新思路。MRI 具有无创、无电离辐射、时间空间分辨率高、对比度好等优点,协同 MRI 对比剂,既可无创提供关节软骨的详细解剖结构信息,还可动态评估移植干细胞的归宿。笔者就 MR 示踪技术在干细胞移植治疗软骨缺损中的最新研究进展进行综述,探讨其优势、局限性及未来前景。

**【关键词】** 关节软骨缺损;间充质干细胞;磁共振成像;示踪

**The progress of magnetic resonance cell tracing technique in stem cells transplantation treatment of cartilage defects** Fan Peng, Zhen Junping, Wang Jun. Department of Imaging, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Wang Jun, Email: cjr.wangjun@vip.163.com

**【Abstract】** Articular cartilage defects are common and caused by many reasons. However, treatments including conservative treatment, joint debridement, autologous or allogeneic bone cartilage transplantation and artificial joint replacement have obvious limitations such as incomplete repair. Mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation therapy is considered as a new and effective therapy proposal of articular cartilage defects in future. But it is difficult to know about the role MSCs played in repairing process because of the lack of methods regarding the efficient and noninvasive technique to monitor the in vivo behavior of delivered cells in host tissue. Recently, MRI in vivo tracking of labeled cells technology provides a new train of thought. MRI molecular imaging can not only noninvasively provide anatomical information of articular cartilage, but also evaluate the fate of transplanted stem cells. The novel progress of magnetic resonance cell tracing technique in stem cells transplantation treatment of cartilage defects was reviewed, and the strengths, limitations and prospect of MR tracing technique were explored in this review.

**【Key words】** Articular cartilage defects; Mesenchymal stem cells; Magnetic resonance imaging; Tracing

关节软骨属于透明软骨,其表面光滑,具有减小摩擦、保护软骨下骨、增加关节运动承载负荷的作用。由于关节软骨是一种无血管组织,主要依靠关节液营养,其自身修复、再生能力很低。当创伤、肿瘤、炎症等病因导致关节软骨缺损及损伤后,常引起关节疼痛、不稳和僵硬等症状,如果治疗不及时或治疗方法不恰当,后期常继发成为骨性

关节炎,最终患者不得不接受人工关节置换<sup>[1]</sup>。目前临床上常用的骨髓刺激技术、自体或异体骨软骨移植、骨膜软骨膜移植等治疗方法存在纤维化、退化或者二期骨化的问题,都难以取得理想的效果<sup>[2]</sup>。

以间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植治疗为基础的软骨组织工程是近年来研究的热点。目前认为 MSCs 取材方便、体外培养简单、增殖和成软骨能力强,是软骨组织工程首选的“种子”细胞<sup>[3-5]</sup>。将 MSCs 移植到软骨缺损区域诱导自体软骨的形成成为一种最有前景的治疗方法。

MSCs 移植后,为了评估其移植的效果,明确

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.06.013

基金项目:山西省回国留学人员科研资助项目(2014077)

作者单位:030001 太原,山西医科大学第二医院影像科

通信作者:王峻(Email: cjr.wangjun@vip.163.com)

外源性 MSCs 在软骨缺损再生修复中所扮演的角色, MSCs 移植的示踪研究是非常必要的。传统的细胞示踪方法如荧光染料标记法、同位素标记法等需要在离体状态下行组织学切片分析和鉴定,不利于在活体内连续动态的跟踪观察,更不适于临床,具有较大的局限性。

MRI 具有无创、无电离辐射、时间及空间分辨率高、软组织对比度好等优点,并能对监测对象进行三维重构,是广泛接受的无创评价关节软骨损伤修复的最佳检查方法<sup>[6-7]</sup>。协同 MRI 对比剂, MRI 可作为动态监测 MSCs 的移植和迁移情况的理想手段<sup>[8]</sup>,能同时提供关节软骨精确的解剖结构及生物化学特征。本文对近年来 MR 示踪技术在 MSCs 移植治疗软骨缺损中的应用作一综述。

## 1 MSCs 移植治疗软骨缺损

目前为止, MSCs 在软骨缺损的修复与重建中是最有应用潜力的“种子”细胞。Haleem 等<sup>[9]</sup>将 MSCs 负载在血小板纤维蛋白胶支架上治疗 5 例患者的关节软骨缺损, 12 个月后, 有 3 例患者的 MRI 检查提示缺损区软骨修复良好, 与周围自身软骨平面一致。Emadedin 等<sup>[10]</sup>对 6 例骨性关节炎患者单独注射骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs), 6 个月后患者疼痛减轻, 关节活动度均有了明显的好转。其中有 3 例患者的 MRI 显示缺损区有软骨生成, 软骨下骨的水肿也明显减少。

但 MSCs 移植治疗软骨缺损还面临着一些问题: ①移植到关节腔后 MSCs 的分布和转归情况还不清楚; ②MSCs 能否在关节腔环境下向损伤区域趋化; ③目前研究的 MSCs 有许多种, 何种 MSCs 修复软骨缺损更为有利。为了回答以上问题, 解决在临床试验中的困惑, 探索理想的“种子”细胞和移植方式, MR 在体示踪移植 MSCs 治疗软骨缺损成为新的研究热点。

## 2 MR 示踪相关的对比剂

MR 示踪 MSCs 的前提是需用 MR 对比剂标记靶细胞, 被标记的细胞移植到体内后根据其 T1 或 T2 弛豫时间与宿主细胞不同产生对比成像。在 MR 细胞示踪技术中, 标记细胞的常用对比剂主要有两类: 一类为外源性对比剂, 包括 T1、T2 对比剂

等; 另一类为内源性对比剂, 包括报告基因系统等。目前为止绝大部分的 MR 报告基因成像研究仅限于观察癌细胞的增殖, 监测软骨缺损后外源性移植 MSCs 的生物学行为的报道少见。

### 2.1 T1 对比剂

T1 对比剂主要包括以钆离子为基础的螯合物如钆喷酸葡胺(gadopentetate dimeglumine, Gd-DTPA)、钆贝葡胺(gadobenate dimeglumine, Gd-BOPTA)等, 以缩短 T1 弛豫时间为主, 产生的是正性对比效果。钆螯合物对比剂用于细胞示踪的有关报道不多, 主要是因为钆剂用于细胞或分子显像, 其弛豫率较低, 且很难被细胞吞噬。另外, 钆螯合物在溶酶体和内涵体内可迅速去螯合而游离出 Gd<sup>3+</sup>, 而 Gd<sup>3+</sup>可能会导致肾脏纤维化<sup>[11]</sup>。但也有少数成功的应用钆螯合物通过胞饮或胞吞作用进入细胞内的 MR 细胞显像研究。

Nejadnik 等<sup>[12]</sup>用胶粒型钆螯合物 GadofluorineM-CY 标记人 MSCs, 标记细胞与琼脂糖支架复合后移植至猪股骨髁的软骨缺损处, 行 3.0T MRI 离体成像, 结果表明, GadofluorineM-CY 与干细胞简单共培养即可高效标记干细胞, 在梯度回波 (gradient echo, GE) 序列 T2\* 加权成像上正常软骨呈高信号, 软骨缺损呈略低信号, 未标记细胞呈低信号, 而标记细胞呈显著低信号与相邻软骨对比明显。但是, GadofluorineM-CY 的生物安全性有待进一步研究。

### 2.2 T2 对比剂

T2 对比剂主要是超顺磁性铁氧化物纳米颗粒(superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIOs), 以 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 或 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 晶体为核心, 由葡聚糖等高分子化合物包裹, 以缩短 T2 弛豫时间为主, 主要产生较强的 T2 负性对比效应。根据它们的粒径大小可分为: ①超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO), 直径大于 50 nm, 如 Feridex 等; ②超微超顺磁性氧化铁(ultrasmall superparamagnetic iron oxide, USPIO), 其平均直径在 20~50 nm, 如 Combidex 等。还可根据来源不同将它们分为商用品和自制品, 国外相关研究中一般采用商用品(Feridex、Feraheme 等)。商用品使用方便, 药效稳定, 可用于临床, 更利于实验结论的推广。

由于 SPIOs 及干细胞表面均带负电荷, SPIOs 不易通过胞吞或胞饮作用进入干细胞内。为增加细

胞标记效率,目前最常用的方法是将 SPIOs 包被上多聚阳离子从而促使 SPIOs 与细胞膜结合,进而被细胞吞噬。常用的转染试剂有多聚赖氨酸(Poly-L-lysine)、硫酸鱼精蛋白(protamine sulfate)等,通过简单的孵育即可标记细胞。SPIOs 以囊泡的形式在细胞内不均匀分布,造成局部磁场不均匀,加速质子去相位,使组织的横向弛豫时间 T2 值明显缩短,从而产生较强的 T2 负性对比效应。

Nedopil 等<sup>[13]</sup>用 Feridex(SPIO)标记人 MSCs 后,通过琼脂糖支架将标记细胞移植入猪的髌软骨缺损处,离体状态下行 7.0T MRI。SE 序列 T2 加权成像上显示缺损区标记细胞呈显著低信号,与相邻正常软骨的高信号对比明显;而未标记细胞呈等或稍高信号,与周围软骨对比不明显。

与钆螯合物相比, SPIOs 具有以下优点:①粒径小、穿透力强,同样条件下弛豫率约为 Gd 的 7~10 倍,在很低浓度时即可在 MRI 上形成对比;②具有生物可降解性,能被细胞代谢后进入正常血浆铁池与红细胞血红蛋白结合或用于其他代谢过程;③纳米颗粒的磁特性可以通过控制核心大小和表面涂层材料而得到改变<sup>[14]</sup>;④生物相容性好,对干细胞的生理活性和功能无抑制,不影响 MSCs 的成软骨细胞分化<sup>[15]</sup>。

这些特点使 SPIOs 备受关注,是目前公认的较理想的 MSCs 示踪剂<sup>[16-18]</sup>。

### 3 MR 在体示踪 MSCs 移植治疗软骨缺损

MR 在体示踪技术可对移植到缺损区的标记干细胞进行动态示踪,监测干细胞在组织修复过程中的生物学行为。

Jing 等<sup>[19]</sup>将 Feridex(SPIO)标记的兔自体 BMSCs 与壳聚糖支架复合后注入软骨缺损模型的兔膝关节腔内,1.5T MRI 在体扫描。GE 序列 T2\* 加权成像上标记细胞的特征性低信号可持续存在 12 周,注射后 1 h 观察到标记 BMSCs 存在于关节液中,第 12 周观察到标记的 BMSCs 迁移到髌上囊滑液、腓窝和股骨的软骨下骨,而软骨修复区并没有检测到标记的 BMSCs。上述实验提示,在缺损软骨的修复过程中外源性干细胞并非始终位于缺损区,而是从缺损区到腓窝等周围区域逐渐进行动态迁移。Henning 等<sup>[17]</sup>将 Endorem(SPIO)标记的人 MSCs 构建成基质干细胞移植体(matrix associated stem cell

implants, MASIs)移植到鼠膝关节软骨缺损处,每隔一周行 7.0T MRI 扫描。第 12 周,SE 序列 T2 加权成像上股骨远端尚可清楚显示标记细胞的局灶性低信号。在整个观察周期,标记细胞的存活与凋亡可通过 MRI 上低信号区域面积的变化来间接判定,组织学检查显示软骨缺损完全修复,修复区可见软骨样细胞、含铁细胞和人 MSCs。Kamei 等<sup>[20]</sup>制作猪膝关节髌软骨缺损模型,关节镜直视下利用外磁场(1.5T)作用将 Ferucarbotran(USPIO)标记的 BMSCs 注入膝关节,可见被标记 BMSCs 在缺损区域聚集,维持外磁场 10 min,冲洗关节腔,细胞不会脱落,24 周后组织学检查证明施加外磁场组软骨缺损修复较未加磁场组明显改善。Khurana 等<sup>[21]</sup>在 SD 大鼠提取 BMSCs 前 48 h 静脉注射 Feraheme(USPIO),分离并培养的标记 BMSCs 随后被移植到软骨缺损大鼠的膝关节腔中,7.0T MRI 在体扫描示踪,结果表明,静脉注射 USPIO 可有效标记体内 BMSCs, MRI 可连续追踪移植干细胞至少 4 周,组织学检查证实标记的移植物和软骨修复区有铁颗粒的存在。这种经静脉注射 USPIO 体内标记法的优点是能消除体外标记程序中干细胞被污染和生物改建的相关风险,其缺陷在于进入体内的纳米铁颗粒不仅被 BMSCs 吞噬,还会被肝、脾等器官中的巨噬细胞吞噬进而可能影响 BMSCs 的标记效率<sup>[22]</sup>。

### 4 小结与展望

MSCs 移植治疗为关节软骨缺损的修复带来了希望,MR 细胞示踪技术能活体无创地监测移植后的标记 MSCs,为疗效诊断和预后评估提供参考。有关干细胞标记和 MRI 活体示踪方面的研究已经取得了重要进展,但尚有以下一些问题需要解决:①随着干细胞的分裂增殖,每个细胞内铁含量会逐渐减少,导致 MRI 信号强度低于可检测的阈值,而影响干细胞移植的长期观察(目前文献报道的最长示踪周期为 3 个月);②含铁血黄素等血液衍生物在 MRI 呈低信号, MRI 无法区分标记细胞、游离铁和含铁组织;③干细胞死亡崩解导致铁粒子的外漏,而后被巨噬细胞等内源细胞吞噬,引起“假阳性”。

综上所述,利用 MRI 协同 SPIOs 等对比剂实现了早期、无创、动态监测外源性 MSCs 在活体关节腔内的分布、迁移以及归巢情况。但是尚无法提

供 MSCs 存活、增殖、分化的直接证据及满足 MSCs 的长期示踪要求(软骨缺损修复的愈合时间为 12 个月左右)。

目前的商用 SPIOs 示踪剂都是葡聚糖包覆,有研究者在研究新型 SPIO,如更换包被材料,达到延长标记细胞示踪时间的目的,以满足软骨修复示踪的时间要求;或 SPIO 联合其他示踪剂同时标记细胞,以排除 MRI 检查假阳性的干扰。但这些新型 SPIO 目前还处于实验阶段。随着新型干细胞标记物的研发,MR 细胞示踪将为监测软骨组织工程 MSCs 的在体生物学行为提供一种实时、安全、无创、有效的新技术,为组织工程软骨相关产品的临床应用提供即时监测及疗效评定。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation--United States, 2010-2012[J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2013, 62(44): 869-873.
- [ 2 ] Bouwmeester PS, Kuijjer R, Homminga JN, et al. A retrospective analysis of two Independent prospective cartilage repair studies: autogenousperichondrial grafting versus subchondral drilling 10 year post-surgery[J]. *J Orthop Res*, 2002, 20(2): 267-273.
- [ 3 ] Gardner OF, Archer CW, Alini M, et al. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering[J]. *Histol Histopathol*, 2013, 28(1): 23-42.
- [ 4 ] Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, et al. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2010, 3(4): 248-269.
- [ 5 ] Gimble JM, Grayson W, Guilak F, et al. Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration[J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2011, 3: 69-81.
- [ 6 ] Roemer FW, Crema MD, Trattnig SA. Advances in imaging of osteoarthritis and cartilage[J]. *Radiology*, 2011, 260(2): 332-354.
- [ 7 ] 侯志超, 孙剑, 甄俊平, 等. 关节软骨损伤修复的 MRI 评价[J]. *国际医学放射学杂志*, 2011, 34(5): 456-460.
- [ 8 ] Cromer Berman SM, Walczak P, Bulte JW. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles[J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2011, 3(4): 343-355.
- [ 9 ] Haleem AM, El Singergy AA, Sabry D, et al. The clinical use of human Culture-Expanded autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplanted on Platelet-Rich fibrin glue in the treatment of articular cartilage defects: a pilot study and preliminary results [J]. *Cartilage*, 2010, 1(4): 253-261.
- [ 10 ] Emadedin M, Aghdami N, Taghiyar L, et al. Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis[J]. *Arch Iran Med*, 2012, 15(7): 422-428.
- [ 11 ] Bulte JW. In vivo MRI cell tracking: clinical studies[J]. *AJR Am J Roentgenology*, 2009, 193(2): 314-325.
- [ 12 ] Nejadnik H, Henning TD, Thuy D, et al. MR imaging features of Gadofluorine-Labeled Matrix-Associated stem cell implants in cartilage defects[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e49971[2015-03-01]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0049971>.
- [ 13 ] Nedopil A, Klenk C, Kim C, et al. MR signal characteristics of viable and apoptotic human mesenchymal stem cells in matrix-associated stem cell implants for treatment of osteoarthritis[J]. *Invest Radiol*, 2010, 45(10): 634-640.
- [ 14 ] 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/OL]. *Stem Cells Int*, 2013, 2013: 353105 [2015-03-01]. <http://www.hindawi.com/journals/sci/2013/353105/>.
- [ 15 ] Van Buul GM, Kotek G, Wielopolski PA, et al. Clinically translatable cell tracking and quantification by MRI in cartilage repair using superparamagnetic Iron oxides [J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e17001 [2015-03-01]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0017001>.
- [ 16 ] Nedopil AJ, Mandrussow LG, Daldrup-Link HE. Implantation of ferumoxides labeled human mesenchymal stem cells in cartilage defects[J/OL]. *J Vis Exp*, 2010, (38): 1793[2015-03-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2900275>.
- [ 17 ] Henning TD, Gawande R, Khurana A, et al. Magnetic resonance imaging of Ferumoxide-Labeled mesenchymal stem cells in cartilage defects: in vitro and in vivo investigations[J]. *Mol Imaging*, 2012, 11(3): 197-209.
- [ 18 ] Khurana A, Nejadnik H, Chapelin F, et al. Ferumoxytol: a new, clinically applicable label for stem cell tracking in arthritic joints with MRI[J]. *Nanomedicine*, 2013, 8(12): 1969-1983.
- [ 19 ] Jing XH, Yang L, Duan XJ, et al. In vivo Mr imaging tracking of magnetic Iron oxide nanoparticle labeled, engineered, autologous bone marrow mesenchymal stem cells following intra-articular injection[J]. *Joint Bone Spine*, 2008, 75(4): 432-438.
- [ 20 ] Kamei G, Kobayashi T, Ohkawa SA, et al. Articular cartilage repair with magnetic mesenchymal stem cells[J]. *Am J Sports Med*, 2013, 41(6): 1255-1264.
- [ 21 ] Khurana A, Chapelin F, Beck G, et al. Iron administration before stem cell harvest enables Mr imaging tracking after transplantation [J]. *Radiology*, 2013, 269(1): 186-197.
- [ 22 ] Bonnemain B. Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review[J]. *J Drug Target*, 1998, 6(3): 167-174.

(收稿日期: 2015-03-07)