

DOI: 10.13376/j.cbls/2023030

文章编号: 1004-0374(2023)02-0233-08

· 技术与应用 ·

间充质干细胞活体无创示踪技术研究进展

高皓玥¹, 薛文婷¹, 吴世满^{2,3*}

(1 山西医科大学第一临床医学院, 太原 030001; 2 国家卫生健康委员会尘肺病重点实验室, 太原 030001; 3 山西医科大学第一医院呼吸与危重症医学科, 太原 030001)

摘要: 间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 作为一种具有自我更新和多向分化能力的细胞, 因其免疫规避、修复再生和免疫调节等特性而受到广泛关注。此外, MSCs 还被用作负载治疗药物的载体。近几年来有关 MSCs 的实验数量大幅增加, 但 MSCs 在体内的分布、迁移、归巢、分化、存活及安全性问题目前尚不明确, 仍限制着干细胞疗法的发展。随着成像技术的不断提升, 无创活体示踪方法逐渐成为应用主流, 能够对移植的外源性 MSCs 存活和迁移模式进行动态监测。本文对不同标记方法、成像方式及其优缺点进行了探讨, 并对示踪技术的未来进行了展望, 以期 MSCs 示踪研究提供新的思路。

关键词: 间充质干细胞; 分布; 示踪

中图分类号: Q2-33; R329.2 文献标志码: A

Research progress of noninvasive tracing technique for mesenchymal stem cells *in vivo*

GAO Hao-Yue¹, XUE Wen-Ting¹, WU Shi-Man^{2,3*}

(1 First Clinical Medical College of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2 National Health Commission Key Laboratory of Pneumoconiosis, Taiyuan 030001, China; 3 Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: Mesenchymal stem cells (MSCs), which have potentials of self-renewal and multidirectional differentiation, have drawn a wide range of attention due to their immune evasion, regenerative and immunomodulatory properties. Besides, MSCs have been used as carriers in loading therapies. In recent decades, researches on MSCs have increased dramatically. However, the distribution, migration, homing, differentiation, survival and safety of MSCs *in vivo* are still limiting the development of stem cell therapies. As the continuous improvement of cell tracing and imaging techniques, noninvasive tracing methods have become mainstream in stem cell tracing and imaging, enabling dynamic monitor of the survival and migration patterns of transplanted MSCs in the body. In this review, recent studies of transplanted stem cell fate *in vivo* are reviewed, the advantages and disadvantages of different labeling and imaging methods are discussed, and the future of the tracing technique is prospected, aiming to provide new ideas for tracing MSCs.

Key words: mesenchymal stem cells; distribution; tracing

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 有多向分化潜能、归巢能力和免疫调节等特性, 是疗法在许多疾病治疗中显示出极大的潜力, 因其具当前细胞疗法的研究热点。近年来在全球范围内获

收稿日期: 2022-07-28; 修回日期: 2022-09-26

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费(2020-PT320-005); 山西省应用基础计划项目(08414); 山西医科大学横向合作项目(2F022019043); 山西医科大学第一医院“136”兴医工程

*通信作者: E-mail: wushiman@163.com

批上市的 MSCs 药品层出不穷, 主要集中于移植物抗宿主病、克罗恩病和急性心肌梗死等疾病的治疗。此外, MSCs 在治疗新型冠状病毒肺炎的实验中同样显示出一定的作用^[1]。纵向跟踪外源性 MSCs 移植入体内后的分布、迁移、归巢、增殖及分化过程不仅有助于评估细胞治疗的功效, 而且有助于改进移植的时间、剂量和移植途径^[2]。之前由于技术限制, 研究人员多采用免疫细胞染色、PCR 等方法对 MSCs 进行示踪研究, 但这些有创观察方法既不能进行连续动态观察, 又不适用于临床研究, 阻碍了 MSCs 在体命运研究的发展。随着技术不断地发展进步, 目前无创连续示踪方法可随时对同一实验对

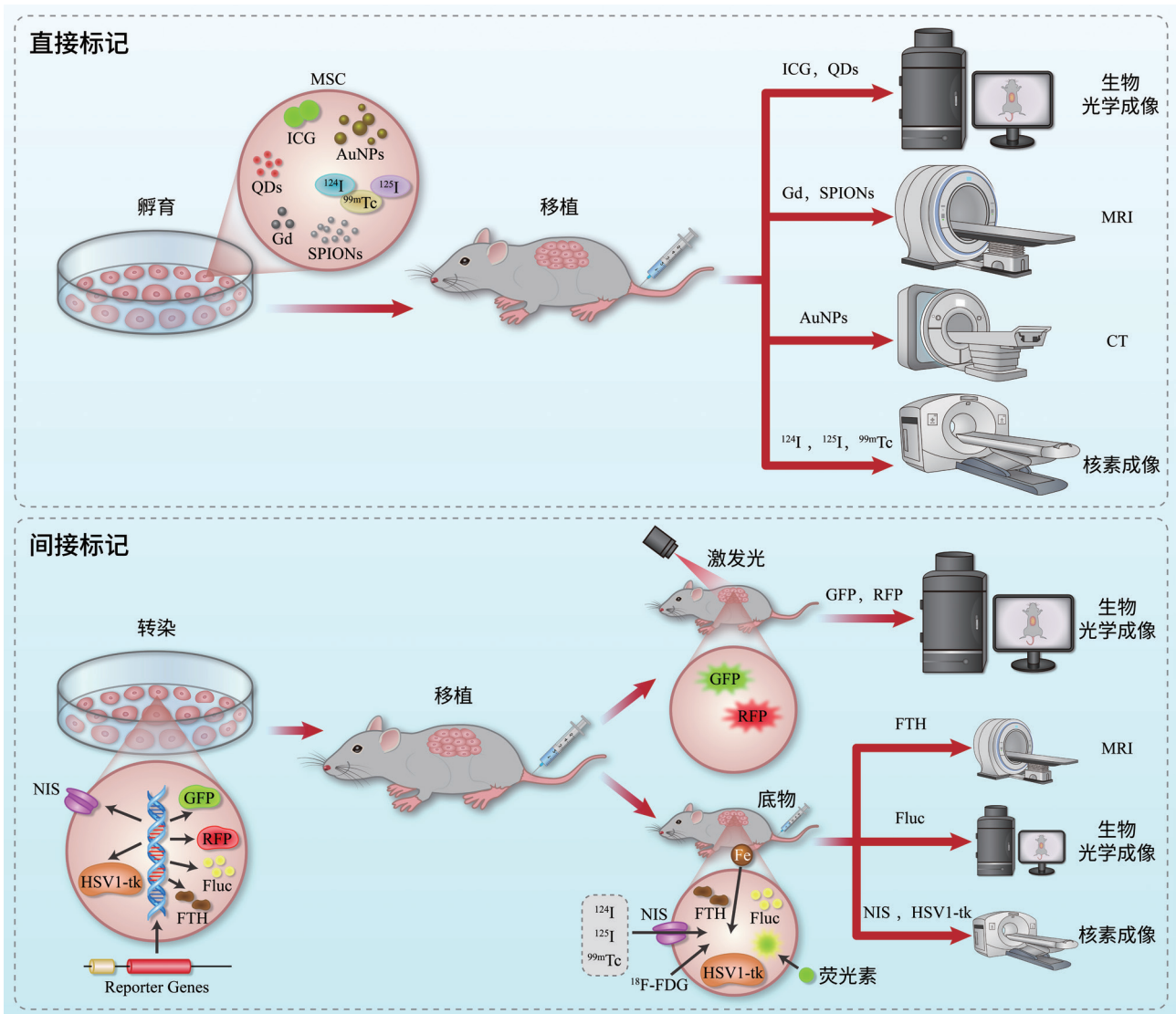
象进行检测, 极大地减小了误差。本文就 MSCs 标记方法及无创活体示踪方法进行系统分析, 并对其优缺点及应用进行论述。

1 无创活体示踪技术

在观察 MSCs 分布时, 由于植入的 MSCs 与周围软组织难以区分, 所以需要使用示踪剂对其进行标记。具体标记流程见图 1, 不同标记方法的优缺点及新进展汇总见表 1。

1.1 生物光学成像(optical imaging, OI)

OI 是当前应用最广泛的一种示踪方法, 能够高效特异性地在体内组织和器官中对所标记的



ICG: 吲哚菁绿; QDs: 量子点; Gd: 钆; SPIONs: 超顺磁性氧化铁纳米粒子; AuNPs: 金纳米颗粒; NIS: 钠碘同向转运体; HSV1-tk: 1型单纯疱疹病毒胸苷激酶; FTH: 铁重链蛋白; Fluc: 荧光素酶; RFP: 红色荧光蛋白; GFP: 绿色荧光蛋白; Reporter Genes: 报告基因。

图1 不同标记方法流程图

表1 不同标记方法的特点及进展

标记方法	示踪剂	优点	局限	新进展
直接标记	ICG、AuNPs、QDs、Gd、SPIONs、 ¹²⁴ I、 ¹²⁵ I、 ^{99m} Tc	1. 示踪剂种类广泛, 可进行表面修饰以提供不同作用; 2. 无需基因编辑, 避免对细胞造成不良损害。	1. 无法辨别细胞生存状态和活力; 2. 示踪剂随细胞分裂而浓度降低, 存在检测下限; 3. 示踪剂排出或被宿主细胞吸收可导致假阳性; 4. 时间依赖性, 不适宜长程示踪。	修饰后的AuNPs实现了对MSCs分化的实时检测 ^[3] 。
间接标记	NIS、HSV1-tk、FTH、Fluc、RFP、GFP	1. 仅对活细胞示踪; 2. 报告基因随细胞增殖而增殖, 可长程示踪。	1. 需进行基因编辑, 可能损伤细胞生物功能; 2. 操作复杂, 花费高。	将报告基因插入特殊位点可监测细胞分化情况 ^[4] 。

MSCs 进行显像, 具有成像速度快、成本低、高灵敏度和无辐射等优势。但由于光在组织中的吸收和散射致使其应用深度仅有几厘米, 并且空间分辨率较低, 不利于间充质干细胞在体内的解剖学定位, 所以这类成像方法常用于小动物或皮肤黏膜表面的实验研究^[5]。在可见光和近红外光范围内, 根据探测方式, OI 可分为以下五种。

生物发光成像 (bioluminescence imaging, BLI), 其基本原理是利用荧光素酶 (firefly luciferase, Fluc) 与荧光素结合后的发光现象进行示踪^[6]。由于这种现象的本质是荧光素的氧化反应, 所以只有在细胞存活时才能进行显像, 从而导致 BLI 特异性高、光源信号弱和实验成本高。经实验证实, 荧光素的发光强度与标记细胞数目呈线性相关^[7]。Xia 等^[8]将内源性 BLI 和外源性近红外成像相结合, 利用 MSCs 表达 Fluc 的能力, 将移植后存活的干细胞与死亡细胞进行区分, 并用近红外成像对移植的 MSCs 进行动态跟踪。

荧光成像 (fluorescence imaging, FI) 是对荧光物质经特定光源激发后产生的荧光信号进行探测成像。与 BLI 成像原理不同, 由于荧光激发过程是物理过程, 所以离体组织仍可进行荧光成像。此外, 非特异性荧光物质的背景信号总是对成像造成干扰, 因此 FI 成像灵敏度较低, 难以监测少量细胞。根据标记方法不同, FI 可分为荧光染料标记成像 (直接标记) 和自荧光蛋白成像 (间接标记)。吖啶菁绿 (indocyanine green, ICG) 作为常用荧光染料的一种, 因其使用简便以及高稳定性和安全性而广受欢迎^[9]。自荧光蛋白成像则是利用 MSCs 自身表达荧光蛋白, 可以分为红色荧光蛋白 (red fluorescent protein, RFP) 和绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 等。当前使用最为广泛的是增强绿色荧光蛋白 (enhanced

green fluorescent protein, EGFP), Khorolskaya 等^[10]的实验证实 EGFP 基因不会影响 MSCs 的分化能力及细胞表型。

近红外荧光成像 (near infrared fluorescence imaging, NIRF) 是指对荧光物质在特定光源激发后发出的近红外光波进行显像。NIRF 操作简单, 具有自发荧光、成像深度较深和光散射极小等优点, 并且可以对移植的 MSCs 功能进行监测。根据光波范围不同, NIRF 具有两个窗口, 即 NIR-I 和 NIR-II。NIR-II 荧光拥有更深的组织穿透度和更高的图像分辨率^[11]。NIRF 所使用的示踪剂主要有小分子荧光团、纳米粒子和靶向探针等^[12]。但是 NIR-II 示踪剂, 例如量子点 (quantum dots, QDs)^[13], 存在成像后的蓄积问题和潜在免疫原性问题, 限制了临床使用。Nucci 等^[14]使用磁性纳米颗粒 (magnetic nanoparticle, MNP) 标记可表达 Fluc 的 MSCs, 将其注入中风小鼠模型后观察颗粒内化情况。7 d 内, 用 BLI 和 NIRF 在受损部位检测 MSCs, 结果表明信号升高可能与卒中急性期损伤部位的细胞增殖有关。Cai 等^[15]用 NIR-II 荧光染料修饰的黑色素纳米颗粒 (melanin nanoparticles, MNP) 标记 MSCs, 通过 NIR-II 荧光/光声双模态成像实现了长达 21 d 的示踪。据图像显示, MSCs 能够移植到受伤的肝脏中修复受损组织, 并且可以观察到急性肝功能衰竭中基于 MSCs 的肝脏再生。

光学相干层析成像 (optical coherence tomography, OCT) 利用光电探测器探测不同深度组织对光反射、散射形成的信号, 从而得到生物组织图像。OCT 具有超高图像分辨率, 可以达到 1~15 μm ; 但是, 由于光散射导致 OCT 在大多数组织 (除眼睛等透明组织) 的成像深度仅有 2~3 mm^[16], 所以多用于眼部成像。Nguyen 等^[17]研发了一种光声显微镜联合

OCT 成像系统,并在视网膜色素上皮损伤的兔模型中追踪用金纳米颗粒 (gold nanoparticles, AuNPs) 标记的人视网膜色素上皮细胞。实验结果证实,在3个月的追踪期内,该成像系统可以提供准确的解剖信息来确定移植细胞所在的确切视网膜层。

光声成像 (photoacoustic imaging, PAI) 的原理是通过采集吸收光能后组织释放出的超声波,形成关于组织结构的图像。PAI 结合了超声和光学成像的优点,超声信号相较于光学信号散射大大降低,使 PAI 拥有较高的空间分辨率和深达 50 mm 的成像深度^[18]。Li 等^[19]开发了一种光声显微镜系统,利用近红外光穿透力强的特点,可监测深层器官血流中纳米粒子的分布。适用于 PAI 成像的造影剂十分丰富,主要为各类纳米粒子^[18]。Yang 等^[20]使用茈二亚胺衍生物纳米探针 (perylene diimide nanoprobes, PDI) 实现了对小鼠侧腹皮下注射的 MSCs 长达 11 d 的观察,并且经 BLI 验证了这些细胞在实验期间的存活状态。Kubelick 和 Emelianov^[21]开发了一种新的普鲁士蓝颗粒 (prussian blue particles, PBPs) 来标记 MSCs,并可使用超声/PAI/MRI 多模态联合成像。在体外实验中测得经 PAI 对 PBNC 标记的 MSCs 进行检测,检测下限为 100 cells/ μL ,而 MRI 的检测下限约为 1 000 cells/ μL ,证实 PAI 的灵敏度优于 MRI。Li 等^[22]将 PBPs 标记的 MSCs 注射入小鼠体内,并利用 PAI 观察创伤性脑损伤的修复情况;实验结果证明,标记的 MSCs 具有通过血脑屏障的能力,并且 PAI 可对小鼠头颅提供准确、清晰的示踪图像。除此之外,PAI 还可对 T 细胞进行动态观察^[23]。表 2 概述了最近用于光学成像的示踪剂。

1.2 磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)

在细胞示踪方面,MRI 展现出了高空间分辨率、长示踪时间、无限穿透深度和极佳的软组织对比度

等优点,广泛应用于中枢神经系统、心脏和关节等部位的成像。但因其成像时间长、低灵敏度的缺点,并不适用于全身成像^[18, 20, 24]。常用的 MRI 造影剂一般有金属离子型造影剂和 ^{19}F 两种。其中金属离子型造影可分为两种,一种是 T1 造影剂,主要是以锰 (Mn)、钆 (Gd) 螯合物为基础的顺磁剂;另一种是 T2 造影剂,以超顺磁性氧化铁纳米粒子 (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs) 等超顺磁剂为主。

由于钆离子 (Gd^{3+}) 存在严重的毒性,且 Gd^{3+} 螯合物在体内循环时间非常短,不适宜进行长期示踪,所以应用较为局限^[25]。SPIONs 因其无毒和可生物降解的性质而受到广泛关注,目前已有多种产品被批准临床使用。通常情况下,SPIONs 由外周环绕着的配体和氧化铁核心共同组成^[2],外周涂层包括聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)、多聚-L-赖氨酸 (poly-L-lysine, PLL)、聚乙烯胺 (polyethyleneimine, PEI) 和二氧化硅等,可防止颗粒聚集,并为内部磁芯提供亲水性和稳定性。有研究表明,使用 SPIONs 不会影响骨髓来源 MSCs 的活力、增殖、表面抗原及分化潜能,且能促进细胞迁移^[26];然而在标记脂肪来源 MSCs 时,发现对细胞施加不同类型的磁场会改变细胞成脂分化和成骨分化的倾向性^[27]。除具有与其他示踪剂相同的功能外,SPIONs 还可由外部磁场引导至特定位点,有助于提高 MSCs 或其外泌体靶向治疗效率^[28-29]。由于血脑屏障的制约,静脉注射的 MSCs 不能有效迁移到中枢神经系统发挥作用,Hour 等^[30]将 SPIONs 标记的 MSCs 静脉注入大鼠体内,然后利用磁场引导这些细胞转移到阿尔茨海默症大鼠大脑内的海马区域,并通过表达胆碱乙酰转移酶和乙酰胆碱酯酶改善海马细胞的功能,取得了与脑室内注射 MSCs 相

表2 生物光学成像示踪剂示例

示踪剂	作者	发表时间	表面修饰	孵育浓度	成像细胞量	示踪天数	成像方法	应用
LPLNP	Xia等 ^[8]	2020	LPLNP@PLL	75 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2×10^6 cells	30 d	BLI/NIRF	肺纤维化小鼠
MNP ¹	Nucci等 ^[14]	2022		50 μg Fe/ mL	1×10^6 cells	7 d	NIRF	缺血性中风大鼠
MNP ²	Cai等 ^[15]	2020	MNP-PEG-H2	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5×10^5 cells	21 d	NIR-II	肝衰竭小鼠
							FL/PAI	
CGNP	Nguyen等 ^[17]	2021	ICG@CGNP-RGD	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3×10^7 cells	90 d	PAI/OCT	视网膜损伤家兔
PDI	Yang等 ^[20]	2020		15 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$2.5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells	11 d	PAI	小鼠

注: LPLNP (long persistent luminescence nanoparticle): 长程持续性发光纳米颗粒; MNP¹ (magnetic nanoparticles): 磁性纳米颗粒; MNP² (melanin nanoparticles): 黑色素纳米颗粒; H2: 一种有机小分子染料; RGD (Arg-Gly-Asp peptides): 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列, 一种细胞黏附序列。

同的疗效。

上述造影剂是通过对比 ^1H 信号进行成像, 可能检测到假阳性细胞, 使用 ^{19}F MRI 即可避免这一问题。因为来自体内的氟信号极低, 可忽略不计, 所以 MRI 检测到的信号均来自于氟化物示踪剂, 且信号强度与示踪剂含量成正比^[31]。由于 ^{19}F MRI 无法提供解剖信息, 所以需要与 ^1H MRI 联合使用进行成像。目前用于 MSCs 示踪的氟化物普遍存在胞内浓度较低的问题。Quang 等^[32] 为增强细胞内氟浓度开发了一种新的氟化物纳米示踪剂。这种造影剂由全氟溴辛烷 (perfluorooctyl bromide, PFOB) 核心和其他物质形成的外壳共同组成, 并命名为 PSS-NPs。经多种方法证实, 该示踪剂在提供 MRI 信号的同时可保持 MSCs 成骨细胞分化的能力, 并可在免疫低下的小鼠体内进行长达 2 个月的示踪。

MRI 也可以利用间接标记法进行示踪, 例如铁蛋白重链 (ferritin heavy chain, FTH) 报告基因。Mao 等^[33] 在通过 MSCs 将 IFN β 递送到恶性胶质瘤的实验中使用了 FTH 报告基因进行标记, 发现 FTH 的过表达导致 IFN β -FTH-MSCs 中铁含量增加, 并可在 T2 加权像表现为低信号。

1.3 电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)

CT 成像空间分辨率高、扫描时间短、操作简单, 多用于胸腹部器官成像。理想的 CT 示踪剂首先要具备优秀的稳定性和安全性, 因此 AuNPs 被广泛应用。大量研究表明, AuNPs 的应用并不会影响 MSCs 的增殖或细胞特性^[34]。在实际应用中, MSCs 通常需要冻存或解冻。Laffey 等^[35] 证实, 使用 AuNPs 标记时, 经历冷冻、储存和解冻后的 MSCs 仍保留其细胞功能。

Li 等^[36] 使用经 PEI 和 PEG 修饰过的 AuNPs (Au@PEI@PEG), 在特发性肺纤维化小鼠模型中对 MSCs 进行了为期 12 d 的 CT 示踪。CT 是目前最适宜肺部成像的示踪技术, 由于利用 AuNPs 进行示踪的 CT 技术无法监测 MSCs 存活率, 他们通过 Fluc 报告基因使用 BLI 鉴定了肺中 MSCs 的存活情况。并且, CT 对 BLI 较差的穿透深度和低空间分辨率进行了弥补。近年的研究为了获取更理想的示踪图像, 往往对 AuNPs 进行表面修饰和改造。其中荧光染料是常用的修饰物之一, 通过 CT 与光学成像相结合的方式改善了 CT 成像灵敏度低的缺陷。Huang 等^[37] 开发了一种用于 CT/NIRF 双模态成像的纳米颗粒——Au@Albumin@ICG@PLL (AA@

ICG@PLL)。其中, ICG 用于 NIRF 成像, PLL 进行表面修饰促进细胞摄取纳米颗粒。在实验中, 将 AA@ICG@PLL 标记的 MSCs 通过气管内滴注的方式注入尘肺小鼠体内, 通过 CT/NIRF 成像进行 21 d 的 MSCs 示踪成像。实验过程中出现了 AA@ICG@PLL 信号减弱的现象, 作者认为可能与标记材料随细胞增殖分化被稀释或者排出有关。虽然 AuNPs 应用广泛, 但也存在细胞摄取率低和容易排出的困扰。AuNPs 进出细胞的能力主要取决于其体积大小和表面电荷^[38], 这些物理特征在合成过程中可人为干预, 制造出符合要求的定制化 AuNPs^[39]。为了减慢纳米颗粒从细胞内流出的速度, Yu 等^[34] 合成了一种新型 AuNPs。该示踪剂由 AuNPs 与磺胺基聚合物 (sulfonamide-based polymer, PSD) 和细胞穿透肽 (cell-penetrating peptide, CPP) 偶联而成, 被命名为 CPP-PSD@Au, 具有对 pH 敏感的特性。由于 MSCs 内外 pH 不同, 在进入细胞后 CPP-PSD@Au 可自动质子化并迅速聚集成团, 以达到延长追踪时间的目的, 并且在特发性肺纤维化小鼠模型中成功实现了长达 35 d 的 MSCs 示踪。当然, 延长示踪时间的策略并不止一种, Yu 等^[40] 还研发了一种温度反应性 AuNPs (temperature-responsive AuNPs, TRAuNPs), 通过表面亲水性的改变和增加尺寸可抑制其被 MSCs 排出的速度。TRAuNPs 在暴露于 39 °C 的环境中时疏水性增加, 外周聚合物链崩塌并且尺寸减小, 增加了纳米颗粒对细胞膜的黏附性和渗透性。在转运入细胞后, 环境温度降为 37 °C, 外周聚合物链恢复到原有的延伸构象, 减缓排出。基于 TRAuNPs 的 CT/BLI 成像能够对特发性肺纤维化小鼠模型中 MSCs 的分布、迁移和存活进行长达 10 d 的观察。

1.4 核素成像

核素成像常用的技术包括单光子发射计算机断层成像术 (single-photon emission computed tomography, SPECT) 和正电子发射断层成像术 (positron emission tomography, PET)。目前常用的报告基因有钠碘同向转运体 (sodium iodide symporter, NIS) 报告基因、1 型单纯疱疹病毒胸苷激酶 (herpes simplex virus-1 thymine kinase, HSV1-tk) 报告基因等。PET 一般使用半衰期较短的正电子发射同位素, 例如 ^{18}F -FDG、 ^{89}Zr 、 ^{124}I 等^[41-43]。SPECT 使用发射伽马光子的同位素进行标记, 这些同位素半衰期一般较长, 例如 ^{131}I 、 ^{125}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 等^[44-46]。

NIS 作为 NIS 报告基因的表达产物, 广泛存在

于甲状腺滤泡细胞、胃肠道及膀胱黏膜,可将血液中的碘离子主动转运至细胞内(这种转运作用可被高氯酸盐抑制),利用 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 等放射性核素进行SPECT或PET成像^[47]。由于NIS是一种生理蛋白,所以在理论上没有免疫原性,并且定位于细胞膜,更易获取放射性核素。Schug等^[48]通过基因转染使NIS报告基因在小鼠MSCs中稳定表达,在对胰腺癌小鼠进行 ^{124}I -PET成像后使用 ^{131}I 靶向治疗,发现该疗法可抑制肿瘤生长。Wang等^[49]也通过转染NIS报告基因观察到MSCs在下咽癌小鼠中的迁移。由于MSCs没有甲状腺滤泡细胞有机化碘离子的能力,所以在周围无碘的环境下会很快将碘离子排出。这种特性造成的结果可从不同角度看待:一方面,在追踪MSCs时有效避免了放射性核素破坏周围细胞和组织;另一方面,碘离子的快速外流制约了以MSCs为载体的 ^{131}I 靶向治疗的发展。研究人员就增加胞内碘离子滞留时间进行了多种尝试。Shi等^[50]发现不同的启动子可以影响摄碘效率,并在小鼠模型中通过实验证明在 ^{131}I 照射后,包含CArG元件的启动子可以促进NIS更高效地摄取 ^{125}I ,证实了在NIS基因靶向治疗卵巢癌的过程中, MSCs作为载体的可行性。

但是,多种器官组织内源性表达NIS限制了它在全身成像中的应用。在消除内源性NIS干扰的探索进程中,Concilio等^[51]发现来自小须鲸的NIS对高氯酸盐抑制作用具有部分抗性,随即他们在小鼠体内证实可以通过使用高氯酸盐来减少内源性NIS摄取放射性同位素,而耐高氯酸盐的小须鲸NIS不受影响,可以同时成像。表3对常见示踪方法的优缺点及应用进行了归纳总结。

2 小结与展望

当前示踪剂种类丰富,大量实验证实示踪剂不会影响MSCs增殖、分化及活性^[10, 34-35]。但是,研究人员为了提高示踪灵敏度、准确度,得到更为理想的示踪图像,往往对示踪剂和报告基因进行修饰改良。示踪剂中的纳米颗粒因易于改造的特性而被广泛关注;报告基因也随基因编辑技术的成熟可以进行多种修饰与改造,尽可能地满足实验需求。文中提及的各类成像方式虽然各具优点,但仍存在缺陷,如OI成像深度浅、FI无法识别细胞存活状态、MRI灵敏度低等。为避免这些缺陷,多模态联合成像逐渐成为研究热点。常用的联合方式有核素/BLI^[52]、CT/BLI^[36]、CT/NIRF^[37]、PAI/OCT/FI^[17]等。各种成像方法可以弥补相互间的不足,并且可对其中一种方法的示踪结果进行验证,如CT示踪AuNPs标记的MSCs时,BLI可以通过观察Fluc的表达情况从而鉴别细胞的存活。多模态联合成像为MSCs示踪研究提供了新的思考模式,启发科研工作者设计简便、安全、高效的示踪方式,并有望在揭示MSCs在体命运方面做出巨大贡献。

[参 考 文 献]

- [1] Leng ZK, Zhu RJ, Hou W, et al. Transplantation of ACE2⁺ mesenchymal stem cells improves the outcome of patients with COVID-19 pneumonia. *Aging Dis*, 2020, 11: 216-28
- [2] Mehta KJ. Iron oxide nanoparticles in mesenchymal stem cell detection and therapy. *Stem Cell Rev Rep*, 2022, 18: 463-7
- [3] Wu Q, Wang KP, Wang XC, et al. Delivering siRNA to control osteogenic differentiation and real-time detection of cell differentiation in human mesenchymal stem cells using multifunctional gold nanoparticles. *J Mater Chem B*, 2020, 8: 3016-27

表3 各种成像方式优缺点及应用

成像方式	常用示踪剂/报告基因	优点	缺点	适用
OI	ICG、CGNP、PBNC、Fluc 报告基因、GFP报告基因	成像速度快、成本低	成像深度浅、解剖定位差	小动物、皮肤黏膜表面
MRI	Gd ³⁺ 螯合物、SPIONs、 PFOB、FTH报告基因	空间分辨率高、示踪 时间较长、无成像 深度限制	成像时间长、灵敏度低、 部分示踪剂存在毒性	中枢神经系统、心脏、 关节等软组织部位
CT	AuNPs	空腔脏器空间分辨率 高、扫描时间短	电离辐射、灵敏度较低	肺部组织
核素成像	^{124}I 、 ^{89}Zr 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 NIS报告基因、HSV1-tk基因	无成像深度限制、敏 感性高	放射性辐射、空间分辨 率低	各器官
多模态联合成像	NIS/Fluc、AuNPs/Fluc、 AuNPs/ICG	可避免各示踪方式的 缺陷	过程复杂、成本高	依据选择的成像方式 决定

- [4] Okubo T, Hayashi R, Shibata S, et al. Generation and validation of a PITX2-EGFP reporter line of human induced pluripotent stem cells enables isolation of periocular mesenchymal cells. *J Biol Chem*, 2020, 295: 3456-65
- [5] Muller J, Wunder A, Licha K. Optical imaging. *Recent Results Cancer Res*, 2013, 187: 221-46
- [6] Wu JC, Sundaresan G, Iyer M, et al. Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Mol Ther*, 2001, 4: 297-306
- [7] Guo R, Wan F, Morimatsu M, et al. Cell sheet formation enhances the therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on myocardial infarction as a bioactive material. *Bioact Mater*, 2021, 6: 2999-3012
- [8] Xia YY, Bao HY, Huang JH, et al. Near-infrared-persistent luminescence/bioluminescence imaging tracking of transplanted mesenchymal stem cells in pulmonary fibrosis. *Biomater Sci*, 2020, 8: 3095-105
- [9] Khraishah H, Jaffer FA. Intravascular molecular imaging: near-infrared fluorescence as a new frontier. *Front Cardiovasc Med*, 2020, 7: 587100
- [10] Khorolskaya JI, Perepletchikova DA, Kachkin DV, et al. Derivation and characterization of EGRP-labeled rabbit limbal mesenchymal stem cells and their potential for research in regenerative ophthalmology. *Biomedicines*, 2021, 9: 1134
- [11] Zhu SJ, Yung BC, Chandra S, et al. Near-infrared-II (NIR-II) bioimaging off-peak NIR-I fluorescence emission. *Theranostics*, 2018, 8: 4141-51
- [12] Ji YY, Jones C, Baek Y, et al. Near-infrared fluorescence imaging in immunotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 167: 121-34
- [13] Li CY, Chen GC, Zhang YJ, et al. Advanced fluorescence imaging technology in the near-infrared-II window for biomedical applications. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 14789-804
- [14] Nucci MP, Oliveira FA, Ferreira JM, et al. Effect of cell therapy and exercise training in a stroke model, considering the cell track by molecular image and behavioral analysis. *Cells*, 2022, 11: 485
- [15] Cai WW, Sun JH, Sun Y, et al. NIR-II FL/PA dual-modal imaging long-term tracking of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells labeled with melanin nanoparticles and visible HUMSC-based liver regeneration for acute liver failure. *Biomater Sci*, 2020, 8: 6592-602
- [16] Fujimoto JG. Optical coherence tomography for ultrahigh resolution *in vivo* imaging. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 1361-7
- [17] Nguyen VP, Fan W, Zhu TY, et al. Long-term, noninvasive *in vivo* tracking of progenitor cells using multimodality photoacoustic, optical coherence tomography, and fluorescence imaging. *ACS Nano*, 2021, 15: 13289-306
- [18] James S, Neuhaus K, Murphy M, et al. Contrast agents for photoacoustic imaging: a review of stem cell tracking. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12: 1-19
- [19] Li WT, Sun XL, Wang Y, et al. *In vivo* quantitative photoacoustic microscopy of gold nanostar kinetics in mouse organs. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5: 2679-85
- [20] Yang YH, Fryer C, Sharkey J, et al. Perylene diimide nanoprobes for *in vivo* tracking of mesenchymal stromal cells using photoacoustic imaging. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 27930-9
- [21] Kubelick KP, Emelianov SY. Prussian blue nanocubes as a multimodal contrast agent for image-guided stem cell therapy of the spinal cord. *Photoacoustics*, 2020, 18: 100166
- [22] Li WT, Chen RH, Lv J, et al. *In vivo* photoacoustic imaging of brain injury and rehabilitation by high-efficient near-infrared dye labeled mesenchymal stem cells with enhanced brain barrier permeability. *Adv Sci (Weinh)*, 2018, 5: 1700277
- [23] Zheng S, Li HH, Lai KJ, et al. Noninvasive photoacoustic and fluorescent tracking of optical dye labeled T cellular activities of diseased sites at new depth. *J Biophotonics*, 2018, 11: e201800073
- [24] Ni DL, Bu WB, Ehlerding EB, et al. Engineering of inorganic nanoparticles as magnetic resonance imaging contrast agents. *Chem Soc Rev*, 2017, 46: 7438-68
- [25] Li H, Meade TJ. Molecular magnetic resonance imaging with Gd(III)-based contrast agents: challenges and key advances. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 17025-41
- [26] Yao D, Liu NN, Mo BW. Assessment of proliferation, migration and differentiation potentials of bone marrow mesenchymal stem cells labeling with silica-coated and amine-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Cytotechnology*, 2020, 72: 513-25
- [27] Labusca L, Herea DD, Dancaneanu CM, et al. The effect of magnetic field exposure on differentiation of magnetite nanoparticle-loaded adipose-derived stem cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 109: 110652
- [28] García-Belda P, Prima-García H, Aliena-Valero A, et al. Intravenous spion-labeled adipocyte-derived stem cells targeted to the brain by magnetic attraction in a rat stroke model: an ultrastructural insight into cell fate within the brain. *Nanomedicine*, 2022, 39: 102464
- [29] Li XY, Wang Y, Shi LY, et al. Magnetic targeting enhances the cutaneous wound healing effects of human mesenchymal stem cell-derived iron oxide exosomes. *J Nanobiotechnology*, 2020, 18: 113
- [30] Hour FQ, Moghadam AJ, Shakeri-Zadeh A, et al. Magnetic targeted delivery of the SPONs-labeled mesenchymal stem cells derived from human Wharton's jelly in Alzheimer's rat models. *J Control Release*, 2020, 321: 430-41
- [31] Janjic JM, Ahrens ET. Fluorine-containing nanoemulsions for MRI cell tracking. *Wiley Interdisciplinary Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2009, 1: 492-501
- [32] Quang HV, Chang CC, Song P, et al. Caveolae-mediated mesenchymal stem cell labelling by PSS-coated PLGA PFOB nano-contrast agent for MRI. *Theranostics*, 2018, 8: 2657-71
- [33] Mao JJ, Cao MH, Zhang F, et al. Peritumoral administration

- of IFN β upregulated mesenchymal stem cells inhibits tumor growth in an orthotopic, immunocompetent rat glioma model. *J Immunother Cancer*, 2020, 8: e000164
- [34] Yu CG, Chen ZJ, Li XD, et al. pH-triggered aggregation of gold nanoparticles for enhanced labeling and long-term CT imaging tracking of stem cells in pulmonary fibrosis treatment. *Small*, 2021, 17: e2101861
- [35] Laffey MK, Kubelick KP, Donnelly EM, et al. Effects of freezing on mesenchymal stem cells labeled with gold nanoparticles. *Tissue Eng Part C Methods*, 2020, 26: 1-10
- [36] Li XD, Yu CG, Bao HY, et al. CT/bioluminescence dual-modal imaging tracking of stem cells labeled with Au@PEI@PEG nanotracers and Rfluc in nintedanib-assisted pulmonary fibrosis therapy. *Nanomedicine*, 2022, 41: 102517
- [37] Huang J, Huang J, Ning XY, et al. CT/NIRF dual-modal imaging tracking and therapeutic efficacy of transplanted mesenchymal stem cells labeled with Au nanoparticles in silica-induced pulmonary fibrosis. *J Mater Chem B*, 2020, 8: 1713-27
- [38] Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, et al. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem Soc Rev*, 2017, 46: 4218-44
- [39] Liu XY, Wang JQ, Ashby CR Jr, et al. Gold nanoparticles: synthesis, physicochemical properties and therapeutic applications in cancer. *Drug Discov Today*, 2021, 26: 1284-92
- [40] Yu CG, Bao HY, Chen ZJ, et al. Enhanced and long-term CT imaging tracking of transplanted stem cells labeled with temperature-responsive gold nanoparticles. *J Mater Chem B*, 2021, 9: 2854-65
- [41] Nose N, Nogami S, Koshino K, et al. [^{18}F]FDG-labelled stem cell PET imaging in different route of administrations and multiple animal species. *Sci Rep*, 2021, 11: 10896
- [42] Berger A, Araujo-Filho I, Piffoux M, et al. Local administration of stem cell-derived extracellular vesicles in a thermoresponsive hydrogel promotes a pro-healing effect in a rat model of colo-cutaneous post-surgical fistula. *Nanoscale*, 2021, 13: 218-32
- [43] Knoop K, Schwenk N, Schmohl K, et al. Mesenchymal stem cell-mediated, tumor stroma-targeted radioiodine therapy of metastatic colon cancer using the sodium iodide symporter as theranostic gene. *J Nucl Med*, 2015, 56: 600-6
- [44] Kim JW, Kim JM, Choi ME, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells regenerate radioiodine-induced salivary gland damage in a murine model. *Sci Rep*, 2019, 9: 15752
- [45] Zhang L, Xi Y, Guo R, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-mediated radiosensitive promoter-combined sodium iodide symporter for the treatment of breast cancer. *Hum Gene Ther*, 2022, 33: 638-48
- [46] Yao MH, Shi XJ, Zuo CJ, et al. Engineering of SPECT/photoacoustic imaging/antioxidative stress triple-function nanoprobe for advanced mesenchymal stem cell therapy of cerebral ischemia. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 37885-95
- [47] Perron B, Rodriguez AM, Leblanc G, et al. Cloning of the mouse sodium iodide symporter and its expression in the mammary gland and other tissues. *J Endocrinology*, 2001, 170: 185-96
- [48] Schug C, Gupta A, Urnauer S, et al. A novel approach for image-guided ^{131}I therapy of pancreatic ductal adenocarcinoma using mesenchymal stem cell-mediated NIS gene delivery. *Mol Cancer Res*, 2019, 17: 310-20
- [49] Wang J, Kong DD, Zhu LY, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells modified hybrid baculovirus-adenovirus-associated viral vectors targeting ^{131}I therapy of hypopharyngeal carcinoma. *Hum Gene Ther*, 2020, 31: 1300-11
- [50] Shi S, Li F, Wu LC, et al. Feasibility of bone marrow mesenchymal stem cell-mediated synthetic radiosensitive promoter-combined sodium iodide symporter for radiogenetic ovarian cancer therapy. *Hum Gene Ther*, 2021, 32: 828-38
- [51] Concilio SC, Suksanpaisan L, Pham L, et al. Improved noninvasive *in vivo* tracking of AAV-9 gene therapy using the perchlorate-resistant sodium iodide symporter from minke whale. *Mol Ther*, 2021, 29: 236-43
- [52] Vandergaast R, Khongwichit S, Jiang HL, et al. Enhanced noninvasive imaging of oncology models using the NIS reporter gene and bioluminescence imaging. *Cancer Gene Ther*, 2020, 27: 179-88