

# 间充质干细胞的细胞成像技术比较与应用

凌海乾 谢沛根\*

(中山大学附属第三医院脊柱外科, 广州 510600)

**摘要** 间充质干细胞是一类具有强大增殖、多向分化潜能和免疫调节能力的多功能细胞, 研究显示间充质干细胞移植可能治疗多种难治性疾病, 例如帕金森病、脊髓损伤以及肿瘤等。但是, 人们对移植后的细胞在宿主内的存活、分布、增殖、分化、免疫排斥反应以及成瘤特性等问题尚不清楚, 所以许多疾病经过细胞移植治疗后的进展及转归情况仍难以获得确切的科学证据。而细胞成像技术(包括放射性核素成像、超声成像、磁共振成像以及光学成像)可以在体外或者体内实现对间充质干细胞实时、无创的示踪, 在以间充质干细胞为研究基础的细胞移植治疗和细胞组织再生的医学领域里有着巨大的应用潜力。该文综述近十年来细胞成像技术应用于示踪间充质干细胞移植疗法的研究进展, 旨在比较当下多种热门细胞成像技术的优劣, 进而找寻更合适的干细胞示踪策略, 为干细胞移植治疗的基础和临床研究提供进一步的理论证据支持和研究思路。

**关键词** 间充质干细胞; 细胞成像; 移植治疗; 示踪

## Comparison and Application of Cell Imaging Technology of Mesenchymal Stem Cells

LING Haiqian, XIE Peigen\*

(Department of Spinal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510600, China)

**Abstract** Mesenchymal stem cells are a class of cells with strong proliferative capacity, multidirectional differentiation potential and immunomodulatory ability. Studies have shown that stem cell transplantation may treat a variety of refractory diseases, such as Parkinson's disease, spinal cord injury and tumors. However, the survival, distribution, proliferation, differentiation, immune rejection response and tumorigenicity of transplanted cells in the host are still unknown, so it is difficult to obtain exact and strong scientific evidence of disease progression and outcome after cell transplantation. Cell imaging technology (including radionuclide imaging, ultrasound imaging, magnetic resonance imaging and optical imaging) can realize real-time and non-invasive tracing of mesenchymal stem cells, so it has great application potential in the field of cell transplantation therapy and cell tissue regeneration medicine based on the research of mesenchymal stem cells. This paper focuses on the basic characteristics of mesenchymal stem cell imaging and its latest applications in medical research in order to provide more powerful support for further research on stem cell transplantation.

**Keywords** mesenchymal stem cells; cell imaging; transplantation therapy; tracer

收稿日期: 2020-11-16 接受日期: 2020-12-25

广东省科技计划项目(批准号: 2017A020215162)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13826005536, E-mail: xiepgen@mali.sysu.edu.cn

Received: November 16, 2020 Accepted: December 25, 2020

This work was supported by the Guangdong Science and Technology Project (Grant No.2017A020215162)

\*Corresponding author. Tel: +86-13826005536, E-mail: xiepgen@mali.sysu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5491>

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类具有强大增殖能力、多向分化潜能和免疫调节能力的细胞<sup>[1]</sup>,在组织严重缺血或损伤的情况下,它们可以被吸引到病变部位,并且可通过自身调控或基因工程调控的方式分泌生物活性分子,也可以作为运送治疗剂的载体<sup>[2-3]</sup>。人们希望应用干细胞的多向潜能治疗各种难治性疾病,例如帕金森病、脊髓损伤、心脏病、I型糖尿病以及肿瘤等。当前干细胞治疗的方式一般是将干细胞直接注入病灶或者间接从动静脉注入宿主体内。但是,人们对移植后的干细胞在宿主内的存活、迁移、分布、增殖、分化、免疫反应以及成瘤特性等问题尚未足够清楚。相比传统将死后的动物器官组织切片进行免疫组织化学或者免疫荧光检测的观察方法,对移植后的MSCs能够实现实时、无创示踪的细胞成像技术[包括放射性核素成像、核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)、超声成像(ultrasonic imaging, USI)以及光学成像]具有更大的优势。因为这些技术可以非侵入性地实时监测细胞在靶器官组织或身体其他部位的分布、数量和活力,也可以用于评估细胞的迁移特性<sup>[4]</sup>。无论是在基础研究、移植疗法的临床前评估以及临床试验设计,还是在最终的临床治疗监测当中,针对干细胞移植后的细胞示踪策略始终有着重大的研究价值。本文综述近十年来多种细胞成像技术的基本特征以及它们在MSCs移植治疗医学研究中的最新应用,旨在比较当下多种热门细胞成像技术的优劣,进而找寻更合适的干细胞示踪策略,为干细胞移植治疗的基础和临床研究提供进一步的理论证据支持和研究思路。

## 1 放射性核素成像

### 1.1 正电子发射断层成像(positron emission tomography, PET)

PET成像原理是利用其环形探测器对一对具有511 keV但方向相反飞出的 $\gamma$ 光子进行信号捕捉、数据处理、图像重建,其常用的探针包括<sup>18</sup>F-FDG、<sup>18</sup>F-FHBG、<sup>18</sup>F-HFB、<sup>64</sup>Cu-PTSM、<sup>64</sup>Cu-PEI和<sup>89</sup>Zr-DBN。通常来说,PET成像正是根据探针集聚情况提供测量细胞和生物变化的方法,例如发育代谢、迁移定位或肿瘤负荷<sup>[5]</sup>。研究显示,PET成像可以将肿瘤间质中表达的*hsv1-tk*基因作为“示踪剂”,为MSCs体内运输、肿瘤靶向定植和增殖的无创全身监测

提供了手段,可促进以干细胞为基础的抗癌基因疗法的临床转化<sup>[6]</sup>。LUO等<sup>[7]</sup>将人骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的分泌因子包装成聚乳酸-糖醛酸微球并涂覆于BMSCs膜上,并命名此治疗颗粒为合成间充质干细胞(synthetic mesenchymal stem cells, synMSCs)。通过<sup>18</sup>F-FDG PET/CT在第1和第14天进行追踪,结果显示,synMSCs一定程度上促进血管生成,减轻了左心室重构,强调PET利用葡萄糖示踪剂模拟物<sup>18</sup>F-FDG可检测到不同代谢活性的细胞。YANG等<sup>[8]</sup>使用PET连续21天跟踪移植的<sup>89</sup>Zr标记的MSCs,<sup>89</sup>Zr标记干细胞的一系列PET图像证实了MSCs在外膜可以长时间保留。

在临床研究应用上,HOFMANN等<sup>[9]</sup>率先测定了首次ST段抬高型心肌梗死患者经梗死相关动脉支架植入术后的BMSCs生物分布。用100 mbq <sup>18</sup>F-FDG进行放射标记BMSCs,<sup>18</sup>F-FDG标记的细胞经冠状动脉内转移后,在梗死心肌中检测到14%~39%的存活细胞,而静脉转移后未检测到任何细胞。因此,在临床环境中,细胞追踪很可能因标记策略的不同而不同,<sup>18</sup>F-FDG干细胞标记策略的可行性也被证实适用于其他类型的细胞。最新研究发现,鞘内注射自体BMSCs疗法在阿尔茨海默病治疗中有积极作用<sup>[10]</sup>,在每次细胞治疗后,使用<sup>18</sup>F-FDG-PET可测量到大脑葡萄糖代谢整体增加,提示鞘内注射自体BMSCs可能是一种治疗阿尔茨海默病的新策略。

### 1.2 单光子发射计算机断层成像(single photon emission computed tomography, SPECT)

SPECT成像与传统的伽马照相机的成像原理相似,即直接捕捉放射性探针发射的 $\gamma$ 光子,最终能够经过数字化技术提供3D信息。其常用的探针主要有<sup>99m</sup>Tc-HMPAO和<sup>111</sup>In-oxine,它们也用作干细胞体外标记的SPECT示踪剂,其中<sup>111</sup>In-oxine被动地扩散到细胞内,半衰期为2.8天,可长期追踪长达14天;<sup>99m</sup>Tc-HMPAO也被被动地通过细胞膜扩散,半衰期为6小时,可以连续监测3天以上<sup>[11]</sup>。

<sup>99m</sup>Tc-HMPAO作为一种亲脂性复合物,被细胞捕获之后通过谷胱甘肽依赖性机制被还原成亲水性复合物,并且和细胞内蛋白结合。OLMO等<sup>[12]</sup>通过对<sup>99m</sup>Tc-HMPAO标记的MSCs静脉注射和膝关节内给药后的生物分布进行比较研究发现,静脉给药后,MSCs在肺实质有大量的放射性,而关节内给药的

SPECT图像显示其主要在注射腔内活动, 在肺床内完全没有摄取, 说明 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO在细胞内可以较为稳定存在。动脉内和静脉内区域肢体灌注(regional limb perfusion, RLP)技术, 常常被用于研究马远端肢体相关疾病的MSCs灌注治疗。在全身麻醉下, 通过使用 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO标记的MSCs通过前肢正中动脉和对侧肢体头静脉进行RLP, 研究发现, 此方法存在RLP术后动脉血栓形成和RLP术后MSCs在足部静脉内分布不良的局限性<sup>[13-14]</sup>。故TRELA等<sup>[15]</sup>研究经马正中动脉注射和经掌侧加压静脉注射 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO标记的MSCs后发现, 动脉内RLP能够实现更好的病灶分布, 这是首选的, 但在移植技术上依旧具挑战性。而TORRENT等<sup>[16]</sup>通过研究马胫骨头动脉注射的可行性, 评价 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO标记的MSCs在超声引导下注射后的分布和持久性情况。结果显示, 18例实验动物均接受超声引导下动脉注射, 四肢动脉周围轻度局部注射, SPECT图像显示弥漫性MSCs分布从跗骨区到足部。虽然成像的持久性随着时间的推移而下降, 但在24小时之内信号仍然存在, 进一步说明 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO标记的MSCs可实现稳定持续的示踪效应。在一项多中心临床试验研究中, 116例急性ST段抬高心肌梗死患者在再灌注治疗成功后5~7天开始移植MSCs治疗, 从治疗开始到18个月结束使用 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO SPECT进行测量, 结果显示, 冠状动脉内灌注MSCs对急性心肌梗死患者是安全有效的, 能在有效的时间窗内提供临床相关的治疗信息<sup>[17]</sup>。

$^{111}\text{In}$ -oxine是俄歇电子发射体, 能够非特异性内化到正常细胞和恶性细胞中<sup>[18]</sup>。最初的动物研究结果表明, 利用联合SPECT/CT扫描仪的高灵敏度特性, 动态测定了与 $^{111}\text{In}$ -oxine示踪剂和MRI造影剂共培养的异基因MSCs在急性心肌梗死时的体内迁移<sup>[19]</sup>。在SPECT/CT图像中已经可以看到梗死心肌中局灶性和弥漫性的MSCs摄取, 并持续到注射后7天, 且通过组织放射性计数进行了验证。最近研究显示, 他达拉非预处理 $^{111}\text{In}$ -oxine标记的MSCs后, 通过静脉注射进入急性心肌梗死小鼠体内, 然后用CT/SPECT成像定位标记激活的MSCs。与对照组相比, 他达拉非处理的急性心肌梗死动物的心脏功能、移植细胞存活率、MSCs的动员和归巢能力均有改善<sup>[20]</sup>。虽然目前鲜有使用 $^{111}\text{In}$ -oxine标记MSCs用于临床示踪的相关研究报道, 但对于其他细胞的临床试验研究早已经有所报道, 如用 $^{111}\text{In}$ -oxine标记

CD133(+)细胞移植治疗长期心肌梗死(纳入前病程大于12个月)和左冠状动脉可达的患者<sup>[21]</sup>; 也有以放射性 $^{111}\text{In}$ -oxine标记外周血中分离培养3天的促循环血管生成祖细胞<sup>[22]</sup>, 发现心肌梗死患者冠状动脉内灌注使用 $^{111}\text{In}$ -oxine标记的促血管新生祖细胞后, 可在心脏内连续几天检测到大量的放射性物质。这些也都说明了,  $^{111}\text{In}$ -oxine作为示踪探针具有其独特的优势, 使用 $^{111}\text{In}$ -oxine标记的MSCs应用于临床对特定疾病治疗的示踪是一个值得关注的研究方向。

## 2 核磁共振成像(MRI)

### 2.1 MRI成像技术的基本特征

MRI成像技术利用原子核在强磁场内发生共振产生的信号进行图像重建, 可以直接拍摄出横断面、矢状面、冠状面和各种斜面的体层图像, 既无电离辐射风险, 对机体也没有不良的影响<sup>[23]</sup>。由于其高敏感性、非放射性和无细胞损伤的特性<sup>[24]</sup>, MRI在过去几年里成为药物传递和细胞追踪相关研究的重要辅助工具。在现有的基于图像的细胞追踪工具中, MRI更因其具有非侵袭、深度穿透和高度空间分辨率的特性而具有优势。MRI的细胞追踪涉及检测表现出差异信号的细胞, 可以通过4种方式控制MRI信号, 包括(1) 主要影响T1的含有顺磁性金属的正对比剂, 是临床最广泛使用的MRI对比剂之一。其中钆(III)螯合物例如钆喷酸二葡甲胺, 也正是由于它们存在不成对的电子而成为有效的对比剂<sup>[25]</sup>; (2) 主要通过其氧化铁晶体影响T2的超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)负对比剂。SPIO颗粒具有很高的灵敏度, 因此在MRI的细胞追踪领域占主导地位<sup>[26]</sup>; (3) 主要通过分子探针诱导的化学交换饱和转移(chemical exchange saturation transfer, CEST), 当饱和的不稳定非水质子与水质子交换位置时, 将导致CEST图像上标记细胞的MRI信号丢失<sup>[27]</sup>; (4) 主要通过将不同于金属离子的磁共振对比剂- $^{19}\text{F}$ 探针直接作为示踪剂起作用,  $^{19}\text{F}$ 探针具有灵敏度高、天然丰度大、极其广泛的化学位移和非天然存在于生物组织中等优点, 对背景信号没有太大干扰, 可以高精度实现细胞示踪作用<sup>[28]</sup>。

### 2.2 干细胞MRI成像技术的应用

在可用的基于成像的细胞跟踪工具中, 正如上述, MRI的优势在于其无创性、深度穿透和高空间分辨率。顺磁性金属的正对比剂是经过内化的MRI



对比剂(如氧化铁纳米颗粒IO-NP), 在临床前模型中追踪细胞是一种广泛使用的方法, 但IO-NP的每个颗粒铁含量低, 对于非吞噬细胞类型(例如MSCs), 较弱的阴性对比和细胞增殖以及胞吐作用将导致MRI信号降低。在MSCs中负载含有IO-NP(10 nm)的可生物降解聚乳酸微粒(IO/PLGA-MP)能够一定程度上增强MR参数, 例如使得 $T_2$ 弛豫性提升5倍, 与单独的IO-NP相比, 在细胞内的停留时间增长3倍。XU等<sup>[29]</sup>通过体外和体内实验表明, IO/PLGA-MP在MSCs中的内化不会损害细胞的生存、增殖、迁移及其对炎症部位的适应能力等固有特性。同样GUO等<sup>[30]</sup>设计了包含铁蛋白重亚基和转铁蛋白受体的双MRI报告基因能提供足够的MRI顺磁性正对比, 在T1下能清晰地检测到DTX-1基因修饰的人类MSCs在体内的分布和迁移。

在中枢神经系统, 由于血脑屏障的存在, 大多数治疗性药物在常规给药条件下难以到达病灶, 故对于神经系统相关疾病的治疗仍旧是世界性难题, 而当前干细胞移植疗法的发展为解决此难题带来了许多启发。在一项研究中, BMSCs被NF-200蛋白启动子和脂质体激活的含钆的纳米颗粒(Gd-DTPA-FA)标记, 双标记的BMSCs原位植入大鼠脊髓损伤模型, 利用MRI可以追踪标记的BMSCs的迁移和分布, 得到直接将移植细胞作为脊髓功能改善来源的可视证据<sup>[31]</sup>。对于神经退行性疾病或心血管疾病的治疗, 利用MRI在SPIO纳米颗粒标记的干细胞的疗法进行跟踪和定量化方面引入了最新进展<sup>[32]</sup>, 他们提出通过MRI定量标记细胞只是一种间接的方法, 因为MRI信号的改变通常是由SPIO纳米颗粒的浓度引起的, 而不是由细胞数量引起的, 故用SPIO对比剂标记细胞不具有用来检测移植干细胞的生存、功能或分化成所需表型的能力, 此为SPIO对比剂在细胞成像中不可忽视的重要缺陷。

而<sup>19</sup>F探针作为一种新兴的体内MRI成像技术, 因为它可以在无内源性背景信号的情况下无创地显示<sup>19</sup>F核。早在2016年, 研究报道取自心肌梗死后的心外膜来源MSCs可在体内外特异地吞噬纳米粒子<sup>[33]</sup>。这种新特性允许此种细胞在体内以含氟碳化合物或若丹明偶联的纳米粒子为靶点, 通过<sup>19</sup>F-MRI和荧光显微镜跟踪心外膜来源MSCs的迁移和命运, 实现干细胞在体内外实时与稳定的追踪效果。由此可见, <sup>19</sup>F探针在未来的细胞成像应用中有着十分可预见的发展前景。

### 3 超声成像(USI)

USI是利用超声声束扫描人体, 通过对反射信号的接收、处理, 以获得体内器官的图象。虽然超声是最常用的临床成像方式, 但是在需要细胞标记的示踪应用中, 超声造影剂的较大的粒子半径和较短的活性时限限制了其纵向使用。KOSHKINA等<sup>[34]</sup>描述了包含液态全氟化碳的半径为100 nm的可临床应用的聚合物纳米颗粒, 该纳米颗粒在至少48小时重复的USI过程中增强了超声对比度。纳米粒子被用于通过体内超声对治疗后的树突状细胞进行成像, 证明了其长期在体内多峰成像中的潜力。此外, 超声的一个重要限制是背景目标组织的低对比度。CHEN等<sup>[35]</sup>也描述了一种新型的杯状二氧化硅纳米颗粒, 通过标记MSCs用于再生医学成像, 此颗粒能够增强干细胞信号, 因为它的正电荷促进细胞摄取, 并在标记的浓度下特定地增加了回声, 但当体内检测<500个细胞, 没有可检测到的毒性时, 具有显著的超声阻抗失配现象。

由于USI技术容易受到气体和骨骼的影响, 传统超声不利于含气脏器如肺脏、消化道等和骨骼的成像, 对于体内实验的超声成像效果也一直存在较大的局限性。ZHANG等<sup>[36]</sup>构建8只犬膝关节骨性关节炎模型, 通过USI技术只能显示模型膝关节处无回声空间基本消失和滑车沟处持续线样低回声区增厚的图像。SUN等<sup>[37]</sup>通过超声靶向微泡破坏技术有效地诱导了一个良好的细胞移植微环境, 虽然改善了BMSCs的肝归巢, 但MSCs移植后在体内的观察和定量不能实现空间上精准分辨。

### 4 光学成像

#### 4.1 荧光成像(fluorescence imaging, FLI)

FLI由于荧光穿透深度较低, 因此多限于小动物或术中离体使用。该技术可与直接(荧光团标记、直接标记的分子材料)或间接(报告基因表达, 如EGFP)标记技术相结合, 而且间接标记可实现理论上的长期监测<sup>[38]</sup>。在不影响细胞增殖和潜能的情况下, LIU等<sup>[39]</sup>新开发的纳米探针系统, 其中噻吩-2-基-二酮吡咯(diketopyrrolo [3,4-c] pyrroles, DPP)在聚合己内酯(polymerized caprolactone, PCL)中间共价连接, 形成PCL-DPP-PCL聚合物纳米复合物。研究发现, PCL-DPP-PCL标记虽然不影响细胞活性, 但不利于MSCs的成骨分化, 却对成脂分化和软骨分化未见

影响。此外, PCL-DPP-PCL纳米粒在分化4周后仍保持较强的荧光强度, PCL-DPP-PCL纳米粒也可用于MSC向成脂和成软骨分化的长期细胞追踪, 却限制了成骨分化的示踪。此外, MENG等<sup>[40]</sup>展示了半导体聚合物在人类BMSCs体外和体内荧光标记和细胞跟踪中的应用, 其明亮的标记性、出色的示踪能力和良好的生物相容性, 意味着此半导体聚合物在干细胞生物学和再生医学领域有着重要的实践应用价值。

MSCs移植治疗已成为一种有前途的组织再生和修复治疗策略, 然而有效的靶向给药仍然是一个开放的挑战。LI等<sup>[41]</sup>在活体大鼠模型中非侵袭性监测了标记 $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ 聚多巴胺纳米颗粒( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PDA-NPs)的MSCs向激光烧伤部位的迁移, 并评估了标记的MSCs对损伤部位的影响: 注射后1天, 标记的MSCs在烧伤病灶处出现荧光信号, 然后逐渐增加至7天。证明了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PDA-NPs可用在基于MSCs促进烧伤愈合治疗策略的安全性、可行性和潜在疗效探究方面。ZHANG等<sup>[42]</sup>采用了一种与油酸(oleic acid, OA)和肿瘤靶向配体叶酸(folic acid, FA)结合的双亲性超支链化聚合物(AHP-OA-FA), AHP-OA-FA可自组装和注入BMSCs的细胞膜, 并将叶酸末端留在体外进行靶向。体外透射法和体外荧光图像证实, 与BMSCs和AHP-OA-FA-BMSCs相比, AHP-OA-FA增强了BMSCs的肿瘤趋向性成像效果。研究提示, 活的BMSCs与一种聚合物结合可能是一种有希望的靶向转移到癌细胞的载体, 因而干细胞的靶向示踪治疗可以提高肿瘤治疗领域诊断和治疗的准确性<sup>[43]</sup>。其中值得关注的是, 具有聚集诱导发光(aggregation-induced emission, AIE)特性的有机纳米粒子是具有生物相容性的纳米粒子, 被称为最有前途的治疗诊断学纳米粒子之一。利用近红外荧光成像技术理想的时空分辨率, 首次在体内动态显示了MSCs向创面的迁移<sup>[44]</sup>, 实现了实时、无创和空间立体化的靶向可视示踪效果, 是当前较为理想的细胞示踪策略。大部分基于FLI的技术虽然不一定会影响细胞活力或增殖, 但过高的量子点浓度容易导致炎性细胞因子水平升高<sup>[45]</sup>。随着高分子技术的进步, 细胞结合分子材料的荧光成像示踪将会是一个突破性的进步。

## 4.2 生物荧光成像(bioluminescence-based imaging, BLI)

BLI与FLI类似, 但需要荧光素酶的产生, 再将荧光素转化为氧化荧光素, 从而释放出可被检测到

的光子。这项技术既需要对目标干细胞进行基因工程编辑以产生荧光素酶, 也需要在受体体内注射荧光素。该技术的优势在于可区分活细胞和死细胞, 并排除转入非移植细胞的可能。YAO等<sup>[46]</sup>用30只小鼠建立开放性股骨骨折内固定模型, 再从具有荧光素酶的转基因小鼠分离得到Luc-MSCs, 在上述动物模型造模成功4天后, 将此分离所得的细胞注射入损伤部位, 并且规定所有动物均于骨折后5周终止给药。基于BLI揭示, 在局部注射后12~14天, 具有生物发光信号的Luc-MSCs在骨折部位可以被检测到, 在骨折后5周, MSCs注射组的愈伤组织中均出现了荧光素酶阳性的MSCs和成骨细胞; 而在Luc-MSC静脉注射组, Luc-MSCs最初滞留在肺内8~9天, 然后逐渐分配给骨折的部位。此实验通过荧光生物成像生动形象地对比了局部和全身药物应用的优劣。而在改善心肌梗死(myocardial infarction, MI)后心脏重塑方面, 由于缺血心肌细胞植入和存活不良限制了细胞治疗MI的成功率。YAO等<sup>[47]</sup>移植脂肪衍生MSCs与水凝胶共价结合的短肽半乳糖一氧化氮复合物, 构建重组表达绿色荧光蛋白和荧光素酶的转基因MI模型小鼠和VEGFR-2启动子控制下表达绿色荧光素酶的转基因MI模型小鼠。利用BLI和超声心动图证实细胞存活率提高, 心功能增强。说明短肽半乳糖一氧化氮复合物-水凝胶可通过增加细胞植入和血管生成旁分泌作用, 明显提高脂肪衍生MSCs治疗MI的疗效。由于荧光素酶是基因与蛋白重组构建的产物, 虽然在基础科学研究中, 生物荧光成像充分发挥了其在细胞蛋白显像及生物活体示踪中独特的效用, 但在与人体相关的临床研究中, 仍存在许多安全性以及伦理相关的争论。

## 4.3 薛伦科夫发光成像(cerenkov luminescence imaging, CLI)

CLI是一种利用薛伦科夫辐射检测光发射的新型成像方法。2014年, CLI首次被应用于MSCs的标记和检测<sup>[48]</sup>。该方法的最大优点是可以方便地应用于建立PET示踪剂的低水平背景噪点。作为一种混合成像方法, CLI包含了以上所述的光学成像方式和放射性示踪剂标记的所有优点和缺点。但由于此成像技术相关研究的局限性及技术操作的复杂性, 在当前细胞成像方法可选择性足够丰富的前提之下, CLI往往不是基础及临床上细胞示踪研究的最佳选择。

## 5 讨论及展望

一种绝对理想的成像方式在当前的研究仍然是不存在的, 一般情况下, 细胞追踪需要高灵敏度和高空间分辨率, 尤其是作为显微目标的干细胞。要使标记的目标干细胞可见, 可以选择不同的成像方法, 其中SPECT、PET、MRI、USI、BLI、FLI和CLI成像方法均能在不同程度上追踪移植细胞在体内外的情况, 但它们相互之间各有优势与不足(表1)。每个临

床试验设计的目的应该是在确定其特定的理想成像方式情况下, 兼顾良好生物相容性和低毒甚至无毒性。对于间充质干细胞的细胞成像选择, 我们最起码要遵守以下两个基本原则, (1) 放射性物质的使用应该保持在最低限度; (2) 如果涉及生物相关实验研究, 应避免侵入性操作和排除基因修饰。因此, “多模态成像”概念应运而生, 即利用光学和放射性核素成像提供的高探测灵敏度, 同时利用核磁共振成像

表1 几种重要细胞成像技术的信息汇总

Table 1 Summary of information on several important cell imaging technologies

细胞成像技术 Cell imaging technology	亚分类 Subgroup	主要探针 Main probe	优势 Superiority	不足 Inferiority
Radionuclide imaging	PET	$^{18}\text{F}$ -FDG, $^{18}\text{F}$ -FHBG, $^{18}\text{F}$ -HFB, $^4\text{Cu}$ -PTSM, $^{64}\text{Cu}$ -PEI, $^{89}\text{Zr}$ -DBN	Nuclear probes can stably and effectively label stem cells; having a variety of available and approved clinical probes; great potential for transformation from animal research to human clinical trials; the conversion cycle is relatively short	The necessary of using a relatively large dose of radiolabeled cells; having a relatively high risk of radiation exposure for cells
	SPECT	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO, $^{111}\text{In}$ -Oxine		
MRI		Positive contrast agents containing paramagnetic metals that affect T1; SPIO negative contrast agent that affects T2; molecular probe-induced CEST; $^{19}\text{F}$ probe of magnetic resonance contrast agent that binds metal ions	The imaging method is simple and has the advantages of high spatial resolution; the cell signal is excellent in distribution in the body	Magnetic reflective particles have not been clinically approved for cell labeling, and most of them are temporarily unavailable in clinical settings; magnetically labeled cells have limited sensitivity and cannot reach detectable signal strength
USI		No special probe, generate image by receiving and processing the reflected signal	The most commonly used clinical imaging method; safe and practical	Lacking of sensitivity to the function and molecular state of biological materials and tissues (such as chemical composition); the wavelength of the sound waves used to form the image is relatively long, and the spatial resolution is difficult to reach the single-cell level
Optical imaging	FLI	Combined with direct (fluorophore labeling, directly labelled molecular materials) or indirect (reporter gene expression, such as EGFP) labeling technology, indirect labeling can realize theoretical long-term monitoring	The imaging effect is excellent, the generated image is colorful, and the object image is displayed clearly; the basic research is mature, and the choice is large; the intersection of biomaterials and medical research has become the possibility of subverting traditional imaging technology in the future	The imaging equipment and environment have strict requirements; there are still many difficulties in clinical application transformation, including safety issues such as cytotoxicity and disputes related to humanitarian ethics
	BLI	Requiring the production of luciferase, and then converts luciferin into oxyluciferin, which releases photons that can be detected		
	CLI	Using cerenkov radiation to detect light emission		



提供的优越空间分辨率, 最终使得多种成像技术交互融合, 能够充分实现间充质干细胞移植治疗某特定疾病后的实时和可视化示踪。此外, 随着科学技术的发展进步, 特别是粒子物理学和生物化学的与日俱进, 正如上述在“荧光成像”部分提到的AIE纳米材料、纳米粒子的深入研究和转化应用将为间充质干细胞的体外和体内成像示踪探索提供无限可能。

### 参考文献 (References)

- [1] DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the international society for cellular therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-7.
- [2] URDZÍKOVÁ L J P, GLOGAROVÁ K, BURIAN M, 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]. *J Neurotrauma*, 2006, 23(9): 1379-91.
- [3] SYKOVA E, JENDELOVA P. Migration, fate and *in vivo* imaging of adult stem cells in the CNS [J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(7): 1336-42.
- [4] SCHITO L, REY S. Hypoxic pathobiology of breast cancer metastasis [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2017, 1868(1): 239-45.
- [5] XU M, HAN Y, LIU G, et al. Preclinical study of a fully human anti-PD-L1 antibody as a theranostic agent for cancer immunotherapy [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(10): 4426-33.
- [6] HUNG S C, DENG W P, YANG W K, et al. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive *in vivo* positron emission tomography imaging [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(21): 7749-56.
- [7] LUO L, TANG J, NISHI K, et al. Fabrication of synthetic mesenchymal stem cells for the treatment of acute myocardial infarction in mice [J]. *Circ Res*, 2017, 120(11): 1768-75.
- [8] YANG B X, BRAHMBHATT A, NIEVES TORRES E, et al. Tracking and therapeutic value of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation in reducing venous neointimal hyperplasia associated with arteriovenous fistula [J]. *Radiology*, 2016, 279(2): 513-22.
- [9] HOFMANN M, WOLLERT K C, MEYER G P, et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium [J]. *Circulation*, 2005, 111(17): 2198-202.
- [10] VAQUERO J, ZURITA M, MUCIENTES J, et al. Intrathecal cell therapy with autologous stromal cells increases cerebral glucose metabolism and can offer a new approach to the treatment of Alzheimer's type dementia [J]. *Cytotherapy*, 2019, 21(4): 428-32.
- [11] LI X, HACKER M. Molecular imaging in stem cell-based therapies of cardiac diseases [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 120: 71-88.
- [12] MESEGUER-OLMO L, MONTELLANO A J, MARTINEZ T, et al. Intraarticular and intravenous administration of (99M)Tc-HMPAO-labeled human mesenchymal stem cells ((99M)TC-AH-MSCS): *in vivo* imaging and biodistribution [J]. *Nucl Med Biol*, 2017, 46: 36-42.
- [13] SOLE A, SPRIET M, GALUPPO L D, et al. Scintigraphic evaluation of intra-arterial and intravenous regional limb perfusion of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the normal equine distal limb using (99m) Tc-HMPAO [J]. *Equine Vet J*, 2012, 44(5): 594-9.
- [14] SOLE A, SPRIET M, PADGETT K A, et al. Distribution and persistence of technetium-99 hexamethyl propylene amine oxime-labelled bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced tendon lesions after intratendinous injection and regional perfusion of the equine distal limb [J]. *Equine Vet J*, 2013, 45(6): 726-31.
- [15] TRELA J M, SPRIET M, PADGETT K A, et al. Scintigraphic comparison of intra-arterial injection and distal intravenous regional limb perfusion for administration of mesenchymal stem cells to the equine foot [J]. *Equine Vet J*, 2014, 46(4): 479-83.
- [16] TORRENT A, SPRIET M, ESPINOSA-MUR P, et al. Ultrasound-guided injection of the cranial tibial artery for stem cell administration in horses [J]. *Equine Vet J*, 2019, 51(5): 681-7.
- [17] GAO L R, CHEN Y, ZHANG N K, et al. Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial [J]. *BMC Med*, 2015, 13: 162.
- [18] ELGAZZAR A H, DANNOON S, SARIKAYA I, et al. Scintigraphic patterns of indium-111 oxine-labeled white blood cell imaging of gram-negative versus gram-positive vertebral osteomyelitis [J]. *Med Princ Pract*, 2017, 26(5): 415-20.
- [19] KRAITCHMAN D L, TATSUMI M, GILSON W D, et al. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2005, 112(10): 1451-61.
- [20] ELMADBOUH I, ASHRAF M. Tadalafil, a long acting phosphodiesterase inhibitor, promotes bone marrow stem cell survival and their homing into ischemic myocardium for cardiac repair [J]. *Physiol Rep*, 2017, 5(21): e13480.
- [21] SCHOTS R, DE KEULENAER G, SCHOORS D, et al. Evidence that intracoronary-injected CD133<sup>+</sup> peripheral blood progenitor cells home to the myocardium in chronic postinfarction heart failure [J]. *Exp Hematol*, 2007, 35(12): 1884-90.
- [22] SCHÄCHINGER V, AICHER A, DÖBERT N, et al. Pilot trial on determinants of progenitor cell recruitment to the infarcted human myocardium [J]. *Circulation*, 2008, 118(14): 1425-32.
- [23] SMITH-BINDMAN R, MIGLIORETTI D L, JOHNSON E, et al. Use of diagnostic imaging studies and associated radiation exposure for patients enrolled in large integrated health care systems, 1996-2010 [J]. *JAMA*, 2012, 307(22): 2400-9.
- [24] FERNANDEZ-FERNANDEZ A, MANCHANDA R, MCGORON A J. Theranostic applications of nanomaterials in cancer: drug delivery, image-guided therapy, and multifunctional platforms [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 165(7/8): 1628-51.
- [25] SHIN T H, CHOI Y, KIM S, et al. Recent advances in magnetic nanoparticle-based multi-modal imaging [J]. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(14): 4501-16.
- [26] YUAN Y, DING Z L, QIAN J C, et al. Casp3/7-instructed intracellular aggregation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles enhances T<sub>2</sub> MR imaging of tumor apoptosis [J]. *Nano Lett*, 2016, 16(4): 2686-91.
- [27] CAI K, SINGH A, POPTANI H, et al. CEST signal at 2ppm

- (CEST@2ppm) from Z-spectral fitting correlates with creatine distribution in brain tumor [J]. *NMR Biomed*, 2015, 28(1): 1-8.
- [28] WAICZIES S, ROSENBERG J T, KUEHNE A, et al. Fluorine-19 MRI at 21.1 T: enhanced spin-lattice relaxation of perfluoro-15-crown-5-ether and sensitivity as demonstrated in *ex vivo* murine neuroinflammation [J]. *MAGMA*, 2019, 32(1): 37-49.
- [29] XU C, MIRANDA-NIEVES D, ANKRUM J A, et al. Tracking mesenchymal stem cells with iron oxide nanoparticle loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles [J]. *Nano Letters*, 2012, 12(8): 4131-9.
- [30] GUO R, LI Q, YANG F, et al. *In vivo* MR imaging of dual MRI reporter genes and deltex-1 gene-modified human mesenchymal stem cells in the treatment of closed penile fracture [J]. *Mol Imaging Biol*, 2018, 20(3): 417-27.
- [31] ZHANG H W, WANG L Q, WEN S H, et al. Magnetic resonance imaging tracking and assessing repair function of the bone marrow mesenchymal stem cells transplantation in a rat model of spinal cord injury [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(35): 58985-99.
- [32] GOODFELLOW F, SIMCHICK G A, MORTENSEN L J, et al. Tracking and quantification of magnetically labeled stem cells using magnetic resonance imaging [J]. *Adv Funct Mater*, 2016, 26(22): 3899-915.
- [33] DING Z, TEMME S, QUAST C, et al. Epicardium-derived cells formed after myocardial injury display phagocytic activity permitting *in vivo* labeling and tracking [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(5): 639-50.
- [34] KOSHKINA O, LAJOINIE G, BOMBELLI F B, et al. Multi-core liquid perfluorocarbon-loaded multimodal nanoparticles for stable ultrasound and (19)F MRI applied to *in vivo* cell tracking [J]. *Adv Funct Mater*, 2019, 29(19): 1806485.
- [35] CHEN F, MA M, WANG J, et al. Exosome-like silica nanoparticles: a novel ultrasound contrast agent for stem cell imaging [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(1): 402-11.
- [36] ZHANG B Y, WANG B Y, LI S C, et al. Evaluation of the curative effect of umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for knee arthritis in dogs using imaging technology [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 1983025.
- [37] SUN T, GAO F, LI X, et al. A combination of ultrasound-targeted microbubble destruction with transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells promotes recovery of acute liver injury [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 356.
- [38] WELLING M M, DUIJVESTIEN M, SIGNORE A, et al. *In vivo* biodistribution of stem cells using molecular nuclear medicine imaging [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(6): 1444-52.
- [39] LIU S, TAY L M, ANGGARA R, et al. Long-term tracking mesenchymal stem cell differentiation with photostable fluorescent nanoparticles [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(19): 11925-33.
- [40] MENG Z, GUO L, LI Q. Peptide-coated semiconductor polymer dots for stem cells labeling and tracking [J]. *Chemistry*, 2017, 23(28): 6836-44.
- [41] LI X, WEI Z, LI B, et al. *In vivo* migration of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@polydopamine nanoparticle-labeled mesenchymal stem cells to burn injury sites and their therapeutic effects in a rat model [J]. *Biomater Sci*, 2019, 7(7): 2861-72.
- [42] ZHANG S, LIU Y, DERAKHSHANFAR S, et al. Polymer self-assembled BMSCs with cancer tropism and programmed homing [J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7(23): e1800118.
- [43] HSIAO W W, HUI Y Y, TSAI P C, et al. Fluorescent nanodiamond: a versatile tool for long-term cell tracking, super-resolution imaging, and nanoscale temperature sensing [J]. *Acc Chem Res*, 2016, 49(3): 400-7.
- [44] CHEN G, TIAN F, LI C, et al. *In vivo* real-time visualization of mesenchymal stem cells tropism for cutaneous regeneration using NIR-II fluorescence imaging [J]. *Biomaterials*, 2015, 53: 265-73.
- [45] RANJBARVAZIRI S, KIANI S, AKHLAGHI A, et al. Quantum dot labeling using positive charged peptides in human hematopoietic and mesenchymal stem cells [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(22): 5195-205.
- [46] HUANG S, XU L, SUN Y, et al. The fate of systemically administered allogeneic mesenchymal stem cells in mouse femoral fracture healing [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 206.
- [47] YAO X, LIU Y, GAO J, et al. Nitric oxide releasing hydrogel enhances the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells for myocardial infarction [J]. *Biomaterials*, 2015, 60: 130-40.
- [48] WOLFS E, HOLVOET B, GIJSBERS R, et al. Optimization of multimodal imaging of mesenchymal stem cells using the human sodium iodide symporter for PET and Cerenkov luminescence imaging [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94833.