

间充质干细胞活体示踪：如何实现分布和存活的同时示踪

<https://doi.org/10.12307/2021.146>

李 晔^{1,2}, 杨育坤^{1,2}, 朱向情¹, 何 洁^{1,2}, 王金祥¹, 王严影¹, 田 川¹, 庞荣清¹, 潘兴华¹

投稿日期: 2020-06-15

送审日期: 2020-06-19

采用日期: 2020-07-31

在线日期: 2021-01-06

中图分类号:

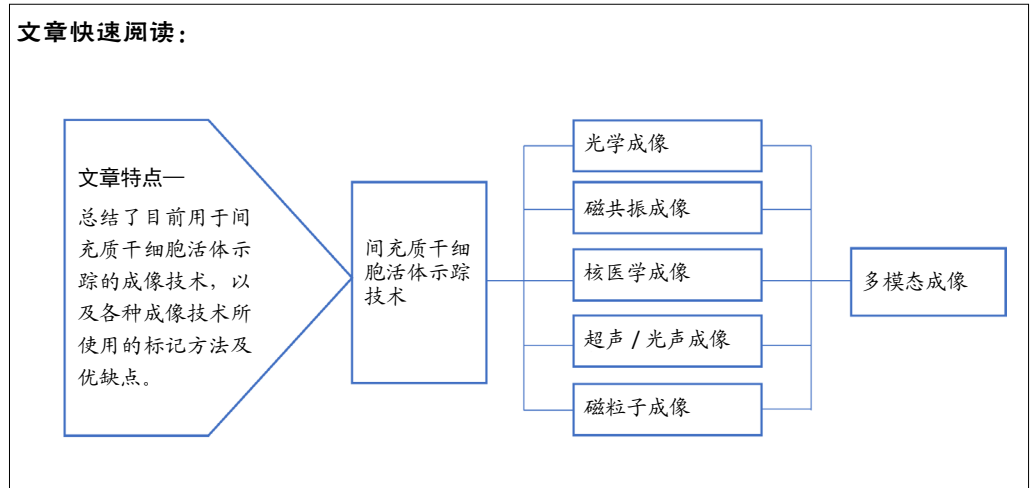
R459.9; R394.2; R318

文章编号:

2095-4344(2021)31-05025-09

文献标识码: A

文章快速阅读:



文题释义:

活体示踪技术: 是一种借助适当的细胞标记方法, 通过影像学成像在一定时间内无创地在活体内动态监测移植细胞的迁移、分布、定植和存活情况的一类技术, 可为干细胞在体内的转归及其治疗的潜在作用机制提供一些线索, 使用适当的一种或多种成像方式可以帮助评估干细胞的疗效和安全性, 动态监测干细胞是否出现了恶性转化、畸胎瘤形成等不良事件。

光声成像: 是一种借助光声效应将光学成像的对比度和特异性与超声的高时间分辨率结合在一起, 机体吸收的激光能量引起组织的快速热弹性膨胀, 从而产生超声波, 用换能器检测超声波, 该换能器将机械声波转换为电信号, 所捕获的信号被处理后形成图像的一种成像技术。

摘要

背景: 干细胞疗法对开发许多疑难疾病的新治疗策略有广阔的应用前景。尽管在过去的几年里, 干细胞疗法的临床试验数量有所增加, 但由于干细胞的低免疫原性和高增殖能力, 在体内可能会存在恶性转化的潜在风险, 通过影像学成像可以确定细胞治疗的安全性和有效性。

目的: 需要详细的体内研究来监测移植细胞的命运, 包括它们的分布、分化和寿命。实时追踪移植细胞的非侵入性细胞成像技术的进展, 为确定干细胞治疗的有效性提供了一个强有力的工具。在这篇综述中, 总结了最近10年干细胞标记和示踪使用的不同成像技术及其利弊。

方法: 检索 PubMed 数据库、CNKI 数据库中2010年1月至2020年3月关于间充质干细胞非侵入性示踪技术的文章, 英文检索词为“mesenchymal stem cell*; transplantation; cell track*; molecular imaging”, 中文检索词为“间充质干细胞, 移植, 示踪”, 检索文献类型不限, 排除陈旧性和无关研究, 最后选择92篇文章进行综述。

结果与结论: 目前可用于活体干细胞示踪的分子影像技术主要包括光学成像、磁共振、核医学、超声/光声、磁粒子成像、多模态成像示踪等。间充质干细胞移植后的存活率和长期命运仍处于探索阶段, 直接与间接标记成像相结合的新型多模态对比剂的出现, 使得对移植细胞的分布和存活进行同时示踪成为可能。

关键词: 干细胞; 间充质干细胞; 细胞疗法; 干细胞移植; 回输; 活体示踪; 分子影像学; 多模态; 纳米颗粒

In vivo track technique for mesenchymal stem cells: how to realize simultaneous tracing of distribution and survival

Li Ye^{1,2}, Yang Yukun^{1,2}, Zhu Xiangqing¹, He Jie^{1,2}, Wang Jinxiang¹, Wang Yanying¹, Tian Chuan¹, Pang Rongqing¹, Pan Xinghua¹

¹Cell Biological Therapy Center of 920th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese PLA, The Transfer Medicine Key Laboratory of Cell Therapy Technology of Yunnan Province, The Integrated Engineering Laboratory of Cell Biological Medicine of State and Regions, Kunming 650032, Yunnan Province, China; ²Kunming Medical University, Kunming 650504, Yunnan Province, China

¹解放军联勤保障部队第九二〇医院细胞生物治疗中心, 云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室, 干细胞与免疫细胞生物医药技术国家地方联合工程实验室, 云南省昆明市 650032; ²昆明医科大学, 云南省昆明市 650504

第一作者: 李晔, 女, 1995年生, 云南省昆明市人, 汉族, 昆明医科大学在读博士, 主要从事间充质干细胞与再生医学研究。

通讯作者: 潘兴华, 博士, 主任医师, 教授, 解放军联勤保障部队第九二〇医院细胞生物治疗中心, 云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室, 干细胞与免疫细胞生物医药技术国家地方联合工程实验室, 云南省昆明市 650032

<https://orcid.org/0000-0002-3147-6824> (李晔)

基金资助: 云南省重大科技专项计划(2018ZF007), 项目负责人: 潘兴华; 国家自然科学基金项目(31970515), 项目负责人: 庞荣清

引用本文: 李晔, 杨育坤, 朱向情, 何洁, 王金祥, 王严影, 田川, 庞荣清, 潘兴华. 间充质干细胞活体示踪: 如何实现分布和存活的同时示踪 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(31):5025-5033.



Review

Li Ye, Doctoral candidate, Cell Biological Therapy Center of 920th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese PLA, The Transfer Medicine Key Laboratory of Cell Therapy Technology of Yunnan Province, The Integrated Engineering Laboratory of Cell Biological Medicine of State and Regions, Kunming 650032, Yunnan Province, China; Kunming Medical University, Kunming 650504, Yunnan Province, China

Corresponding author: Pan Xinghua, MD, Chief physician, Professor, Cell Biological Therapy Center of 920th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese PLA, The Transfer Medicine Key Laboratory of Cell Therapy Technology of Yunnan Province, The Integrated Engineering Laboratory of Cell Biological Medicine of State and Regions, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Stem cell therapy has a broad application prospect for the development of new treatment strategies for many difficult diseases. Although the number of clinical trials of stem cell therapy has increased in the past few years, due to the low immunogenicity and high proliferation ability of stem cells, there may be a potential risk of malignant transformation *in vivo*. The safety and effectiveness of cell therapy can be determined by imaging.

OBJECTIVE: Detailed *in vivo* studies are needed to monitor the fate of transplanted cells, including their distribution, differentiation and lifespan. The development of non-invasive cell imaging techniques for real-time tracking of transplanted cells provides a powerful tool for determining the effectiveness of stem cell therapy. In this review, we summarize the advantages and disadvantages of different imaging techniques used for stem cell labeling and tracing in the last 10 years.

METHODS: Articles about non-invasive tracer technology of mesenchymal stem cells in PubMed database and CNKI database from January 2010 to March 2020 were searched with the English key words of “mesenchymal stem cell*, cell track*, molecular imaging” and the Chinese key words of “mesenchymal stem cells, transplantation, tracer”. The search literature types were not limited; obsolete and irrelevant studies were excluded. Finally, 92 articles were selected for review.

RESULTS AND CONCLUSION: At present, the molecular imaging techniques that can be used to trace stem cells *in vivo* mainly include optical imaging, magnetic resonance, nuclear medicine, ultrasound/photoacoustics, magnetic particle imaging, multimodal imaging and so on. The survival rate and long-term fate of mesenchymal stem cell transplantation are still in the exploratory stage. The emergence of a variety of new multimodal contrast agents which are directly combined with indirect labeled imaging makes it possible to trace the distribution and survival of transplanted cells at the same time.

Key words: stem cells; mesenchymal stem cells; cell therapy; stem cell transplantation; transfusion; *in vivo* track; molecular imaging; multimodal; nanoparticles

Funding: the Major Science and Technology Special Plan of Yunnan Province, No. 2018ZF007 (to PXH); the National Natural Science Foundation of China, No. 31970515 (to PRQ)

How to cite this article: LI Y, YANG YK, ZHU XQ, HE J, WANG JX, WANG YY, TIAN C, PANG RQ, PAN XH. *In vivo* track technique for mesenchymal stem cells: how to realize simultaneous tracing of distribution and survival. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(31):5025-5033.

0 引言 Introduction

衰老是人类面对的重大健康问题，随着年龄的增长，人体各种器官、组织的实质细胞数、反应敏感性及功能均逐步下降，各项功能开始衰退，患病风险逐渐增加。近年来，生物医学和转化研究的重点是探索再生医学疗法治疗多种疾病的潜力，干细胞疗法因其具有可塑性、自我更新和迁移等生物学特性，在再生医学中具有广阔的应用前景。间充质干细胞最早被发现存在于骨髓中，后来证明其分布于机体全身多个组织，具有良好的免疫调节、自分泌多种因子促进内源性组织细胞增殖生长、促进损伤组织结构与功能修复的特点^[1]，是当前研究较多的一种成体干细胞。当前基于间充质干细胞移植的细胞疗法，可对心血管疾病^[2]、内分泌系统疾病^[3]、自身免疫性疾病^[4]、创伤等引起的组织器官损伤进行修复、移植和替代治疗^[5-6]，甚至对改善老年退变性组织器官的结构与功能和提高亚健康人群的生活质量也有巨大潜力^[7]。

目前，对于干细胞移植后在体内的迁移、增殖及分化过程仍不清楚，干细胞的治疗过程和有效性难以界定，因此，使用非侵入性干细胞活体示踪成像技术来监测评估移植干细胞在体内的存活时长、迁移、转归，是确定细胞治疗安全性和有效性的关键一步^[8]。理想的示踪技术应具备一定的条件，如高敏感性、非侵入性及无害性，并且在长时间内都能被检测到，以便在体内长期示踪移植的间充质干细胞。当今影像学的发展正为干细胞的活体示踪开辟全新途径，该文章将对目前用于移植间充质干细胞活体示踪的主要技术予以综述和展望。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者在2020年3月检索2010年1月

至2020年3月被PubMed数据库、CNKI数据库收录的文章，英文检索词为“mesenchymal stem cell*; transplantation; cell track*; molecular imaging”，中文检索词为“间充质干细胞，移植，示踪”，检索文献类型不限，并参考专著《脐带间充质干细胞转化医学》。

1.2 纳入标准 ①文章内容与检索主题之间相关性高；②所述观点新颖，结论真实可信的文章。

1.3 排除标准 ①研究内容与主题不相符的文章；②证据充分、陈旧性、重复性文献。

1.4 质量评估 通过检索共得到593篇文献，根据纳入和排除标准，阅读摘要以及标题，最后保留92篇文献并结合专著《脐带间充质干细胞转化医学》进行综述。文献筛选流程见图1。

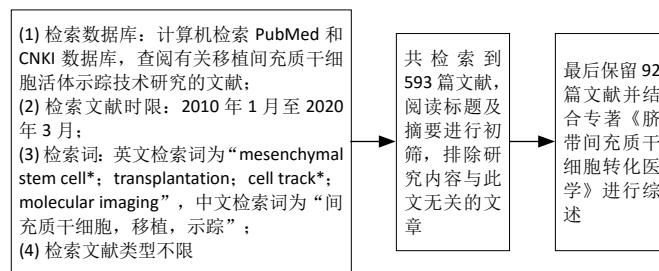


图1 | 文献筛选流程图

2 结果 Results

2.1 干细胞示踪技术 近年来，活体细胞成像技术的发展显著提高了对移植细胞的非侵入性实时跟踪能力，这主要得益于纳米技术的高灵敏、高时空分辨成像技术及新影像设备的快速发展。目前可用于活体干细胞示踪的分子影像技术主要包括光学成像示踪、磁共振示踪、核医学示踪、超声/光声示踪、

磁粒子成像示踪等, 以及为了解决单一显像模式不足使用两种及以上显像模式融合, 优势互补的多模态成像技术^[9]。

细胞标记是跟踪移植细胞迁移和分化的必要手段, 可以用直接或间接的方法标记。直接方法简单, 不涉及细胞的遗传修饰, 但细胞中的标记物会随着干细胞的分裂而逐渐减少或消失, 从而影响移植细胞的示踪。间接标记需要在干细胞移植前通过携带报告基因的质粒、反转录病毒、腺病毒或慢病毒等转染细胞, 使得细胞表达特异性的酶、受体或荧光蛋白等。因为报告基因能与细胞基因组一起复制, 这种标记方式信号不会随着细胞分裂而丢失, 并且信号强度与细胞数量相关, 还可以对细胞数量进行量化^[10], 但这种方法具有潜在的生物风险性, 在临床干细胞标记成像中应用会受到一定限制, 另外报告基因在经过几次细胞分裂后会表达沉默^[11]。

2.2 干细胞光学成像示踪技术

2.2.1 直接标记法 基于外源标记的光学成像在干细胞示踪方面一直具有重要地位。通过简单的共孵育将荧光探针标记到细胞内, 细胞移植后荧光探针被特定波长的光激发, 发射的光子被高灵敏度电荷耦合器件 (CCD) 摄像机记录下来, 从而实现对于干细胞的示踪。有机近红外荧光染料价格低廉、结构易调、生物安全性好, 吖啶菁绿是唯一获得美国 FDA 批准的近红外染料, 不足之处是其光学性能较差。MAZZA 等^[12]将吖啶菁绿与脂质体组成的生物相容性纳米探针来标记人间充质干细胞, 细胞能发出强烈的近红外信号, 使用 IVIS 成像系统可追踪移植入裸鼠皮下信号 2 周, 但颅内仅能观察 1 周。由于有机荧光染料容易发生光漂白, 只适合短期示踪, 目前也多在小动物活体成像中应用。

另一种标记试剂是半导体发光的无机纳米粒子, 也称为量子点 (quantum dots, QDs), 与传统荧光染料不同, 量子点具有更高的光稳定性、高量子产量、高摩尔吸收系数、宽激发光谱和窄发射光谱的特点, 比有机荧光染料更适合用于细胞的标记^[13]。近些年发现近红外二区 (NIR- II, 1 000–1 700 nm) 的体内荧光成像显示出较低的光子散射和组织自发荧光, 具有高穿透深度、高成像信噪比等优点, 超过了 NIR- I 荧光成像的性能^[14]。Ag₂S 量子点 (荧光峰 1 200 nm) NIR- II 荧光成像可以对人骨髓间充质干细胞实现 100 ms 时间分辨的实时荧光监测^[15], 在体内可检测到低至 1 000 个 Ag₂S 量子点标记的骨髓间充质干细胞, 荧光强度可维持 30 d, 可动态监测到细胞在肝功能衰竭小鼠肺和肝脏中原位移位和分布达 14 d。YANG 等^[16]制备的 PbS 量子点标记间充质干细胞后, 通过 NIR- II 荧光成像提供了关节内注射治疗小鼠网上肌腱撕裂的生物分布和清除过程的信息。CHETTY 等^[17]新开发的高近红外荧光纳米生物共轭物 (CIZS-NBCs) 在 2 h 内无需任何转染剂或电穿孔过程可快速标记脐带间充质干细胞 (MSCs-CIZS-NBCs), 体内荧光跟踪分析显示标记的脐带间充质干细胞最初在肺中被捕获并在 2 h 内逐渐迁移到对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤小鼠肝脏中。新的 NIR- II 成像提供了以高时空分辨率跟踪活体动物体内干细胞的可能性。

量子点的主要限制是重金属毒性, 其通常由 II–VI 或 III–V 元素基团组成。与无机量子点相比, 有机分子的种类更丰富, 与活细胞的相容性更强。聚集诱导发射的光稳定性荧光有机量子点 (AIE 量子点) 具有高发射效率、高光量子产量、出色的生物相容性和强大的抗光漂白性, 在小鼠腹侧面皮下注射 1×10⁶ 个标记后的 C6 胶质瘤细胞, 随着细胞分裂, 该部位在 21 d 后还能发出明显的荧光信号^[18]。YANG 等^[19]合成的具有聚集诱导发射特性的高近红外发光有机纳米点可在体内观察脂肪干细胞治疗辐射诱发皮肤损伤小鼠 18 d, 30 d 后在组织水平上仍能显示出单细胞分辨率, 其所制备的 AIE 量子点在水介质中具有较高的量子产率 (33%), 在脂肪干细胞分化和增殖过程中具有良好的生物相容性。碳量子点是一种碳基零维半导体纳米晶体, 具备特殊的尺寸和界面效应, 表现出独特的光学性质, 与其他的有机、无机的半导体量子点相比, 其荧光稳定性强、细胞毒性低、分辨率更高^[20], 碳量子点逐渐成为一种新兴的高效干细胞标记剂^[21]。YAN 等^[22]通过改变柠檬酸二铵和亚精胺的质量比, 合成了一系列具有不同表面电荷的碳量子点, 发现相对较弱的表面正电荷使碳量子点在人脐带间充质干细胞的生物相容性和标记效率之间取得了良好的平衡, 对人脐带间充质干细胞增殖、自我更新和分化能力的影响最小, 50 mg/L 是碳量子点对人骨髓间充质干细胞毒性的阈值剂量^[23]。

2.2.2 间接标记法 利用报告基因的光学成像技术可以分为 2 种类型: 荧光成像和生物发光成像。基于荧光蛋白的报告基因技术, 如绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白是最为常用的荧光成像技术。然而, 荧光蛋白的激发和发射波长在组织中的穿透性有限, 而且较低的信噪比限制了荧光素在体内深层组织中的使用, 它们目前仅限于小动物研究。

与荧光成像不同, 生物发光成像是基于荧光素酶催化反应中光子的发射, 在氧气和 ATP 的存在下, 荧光素酶催化分子内氧化荧光素, 使其分子处于激发态, 在激发态发射后, 分子还原回到荧光素底物状态。生物发光不需要外光照射, 成像过程中避免了背景荧光和生物自发荧光信号的干扰。OH 等^[24]将带有萤火虫荧光素酶基因的间充质干细胞通过尾静脉注射到小鼠皮肤烧伤模型中, 生物发光成像信号在细胞注射后出现在烧伤病灶中, 4 d 后逐渐下降。遗憾的是生物发光成像需要高灵敏度的 CCD 镜头, 生物发光会受到信号衰减的影响, 光穿透能力有限, 因此目前也仅适用于小动物活体成像。此外, 由于其信号弱、检测时间长、需重复注射荧光素而成本高昂, 以及转基因标记的风险, 成为阻碍其研究进展的主要问题。

近年来通过设计新的底物、提高荧光素酶的发光效率、开发红移特性的新酶等措施, 生物发光成像的灵敏度、空间分辨率及穿透深度等有了明显提升。YEH 等^[25]将 NanoLuc 萤光素酶与基于生物发光共振能量 (BRET) 报告基因的荧光蛋白融合在一起产生了 2 个红移最大的变体——Antares 和 ReNL, 通过在 Antares 中用 teLuc 取代 NanoLuc, 得到了一个

基于生物发光共振能量的 Antares 2 报告基因, 它在 600 nm 以上发射的光子是 Antares 的 3.8 倍, 是 Fluc-D 荧光素的 65 倍, 可以提供来自深层组织的更好信号。IWANO 等^[26]对萤火虫荧光素酶进行定向进化, 使用红移且高度可传递的荧光素酶类似物设计了一种全工程化的生物发光成像系统 (AkaBLI), 与传统技术相比, 该系统产生的体内发射信号亮度要高 100-1 000 倍, 可以无创地观察到在小鼠肺血管中的单个致瘤细胞。他们还在 1 年多的时间里记录了 1 只猕猴纹状体 (大脑深层区域) 神经元发出的视频率生物发光信号。

2.3 干细胞磁共振成像示踪技术

2.3.1 直接标记法

MRI 作为最早监测体内移植干细胞的非侵入性成像手段之一, 具有很高的时空分辨率, 可用于追踪干细胞的存活、迁移和归巢、分化等生理活动。细胞用 MRI 对比剂标记后, 改变了附近组织水质子的弛豫速度, 可将标记的细胞与其周围组织区别开来。目前常用于细胞标记示踪的 MRI 对比剂主要有以锰、钆螯合物为基础的顺磁剂、超顺磁性氧化铁纳米粒子 (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs) 等超顺磁剂, 以及含有氢以外的核对比剂。

钆 (III) 是镧系金属, 属于稀土元素, Gd-DTPA 标记骨髓间充质干细胞后在 T1 加权扫描上通过增强“正”对比来增加信号, 但 Gd-DTPA 和细胞膜表面均带负电荷, 转染效率较低, 且未螯合的钆具有高毒性。为减少钆信号的丢失和毒性, CAI 等^[27]合成约 7 nm 的黑色素钆 (Gd³⁺) 螯合纳米颗粒 (MnP-Gd³⁺), 与 Gd-DTPA 相比, MnP-Gd³⁺ 更稳定灵敏, T1 弛豫时间更短, 细胞标记效率更高, 通过内吞作用摄取到细胞质中, 3T MRI 在 4 周后也能检测到植入 SD 大鼠左侧大腿肌肉的骨髓间充质干细胞。MOHSENI 等^[28]将天然可生物降解的壳聚糖-海藻酸钠纳米颗粒与 Gd³⁺ 结合, 在活体成像中观察到了比 Gd-DTPA 更强的信号。但是, 钆对比剂仍存在毒性问题, 如在脑和骨的积聚和肾脏毒性^[29]。

锰 (Mn) 是继 Gd 之后, 研究较多的 T1 对比剂。黑色素具有良好的金属离子螯合能力, 螯合于黑色素的锰离子纳米颗粒 [MnP-Mn(II)] 与骨髓间充质干细胞在 37 °C 共温育 4 h 即可成功标记^[30], 高质量浓度 (1 600 mg/L) 标记下也没有细胞毒性, 注射到 SD 大鼠右腿肌肉内, 高信号持续了至少 28 d, 但随着时间的推移, 相对信号强度逐渐降低。锰卟啉对比剂是一种用于细胞标记和跟踪的新型 T1 对比剂。HAEDICKE 等^[31]将制备的第 3 代锰卟啉对比剂 MnEtP 用于人胚胎干细胞磁共振成像。MnEtP 具有高生物相容性和细胞摄取率, 可显著缩短 T1 弛豫时间, 增强体内信号, 对细胞存活、增殖和分化能力也没有负面影响。向大鼠体内移植后, MRI 成像显示了 MnEtP 对干细胞无创追踪的出色敏感性和特异性。但该新型对比剂在 24 h 后的信号就开始降低, 仅适用于移植后的最初几个小时内急性细胞分布成像。另外以碳钆纳米管 (GNTs) 为代表的新型纳米对比剂已用于体外标记猪骨髓间充质干细胞成像^[32], 这种新型对比剂具有极短的 T1 弛豫时间, 具有良

好的图像对比度, 效果优于含钆对比剂。

超顺磁性氧化铁纳米粒子在过去的 20 年里已被广泛用于 MRI T2 加权成像下的干细胞标记和示踪, 它属于阴性对比剂, 是以 Fe₃O₄ 或 γ-Fe₂O₃ 为晶体核心的纳米颗粒, 直径 10-100 nm, 可以显著缩短 T2 弛豫时间, 在 T2 加权 MRI 中产生对比度为负的暗信号^[33]。WANG 等^[33]将 2×10⁶ 个超顺磁性氧化铁纳米粒子标记的骨髓间充质干细胞注入肾缺血再灌注损伤大鼠肾动脉, 第 1, 7, 14, 21 天对肾脏成功进行 MRI 示踪, 在 T2*WI 序列观察更佳。JIANG 等^[34]分析了超顺磁性氧化铁纳米粒子标记的骨髓间充质干细胞治疗小鼠肺纤维化模型过程中的分布, 发现骨髓间充质干细胞在体内通过靶向内皮间质转化 (EndoMT) 来逆转肺纤维化, 并且在肺部可靠地追踪了干细胞 14 d。然而, 超顺磁性氧化铁纳米粒子单独标记干细胞摄取效率较差, 为了促进其在细胞内的内化, 最直接和有效的方法是在氧化铁芯上进行表面涂层。目前用于干细胞标记和跟踪的超顺磁性氧化铁纳米粒子表面改性材料有多聚赖氨酸^[35-36]、聚乙烯亚胺^[37]、葡聚糖^[38]、乙二醇^[39]、柠檬酸等^[40]。多聚赖氨酸是一种转染剂, 为阳离子化合物, 通过与超顺磁性氧化铁纳米粒子形成带正电荷的络合物来发挥作用, 以促进与带负电荷的细胞膜的静电吸引^[41], 从而诱导转染试剂偶联的超顺磁性氧化铁纳米粒子内吞。这类转染剂还包括硫酸鱼精蛋白和脂质体^[42], 在增强超顺磁性氧化铁纳米粒子摄取到 MRI 跟踪应用的可检测水平方面发挥了关键作用^[43]。尽管吸收效率有显著提高, 但这些化合物与剂量依赖性毒性效应有关^[44]。为了进一步提高涂层剂的安全性和改善生物相容性, GU 等^[45]设计的一种自组装两亲性肽 (PA) 与超顺磁性氧化铁纳米粒子表面结合, 提高了间充质干细胞的内化率, 且对间充质干细胞无毒。SHELAT 等^[46]用生物相容性氨基酸、精氨酸和组氨酸对磁性 Fe₃O₄ 纳米流体进行表面修饰得到了 AA@MNFs (Arg@MNFs 和 His@MNFs), 大小为 15-25 nm, 不需任何转染剂即可成功标记干细胞, 对 AA@MNFs 及标记的干细胞进行体外细胞毒性分析表明其毒性很小。另外, 有学者利用一种新的细胞穿透肽 P21-8R 和一种称为糖胺聚糖结合增强转导 (GET) 的技术成功增强了绵羊间充质干细胞对超顺磁性氧化铁纳米粒子的吸收效率^[47], 该方法不会影响细胞的增殖和活力。但是, 超顺磁性氧化铁纳米粒子作为示踪剂也存在不足, 其浓度会随着细胞分裂而逐渐稀释, 标记细胞死亡后释放的超顺磁性氧化铁纳米粒子被巨噬细胞等其他细胞摄取可能导致图像假阳性^[48]。另外, 细胞标记效率与超顺磁性氧化铁纳米粒子浓度呈正相关, 其浓度越高, 细胞标记效率越高, 但过高的浓度会导致细胞内铁含量过多, 影响细胞生物学活性及增殖能力。超顺磁性氧化铁纳米粒子标记细胞的有效安全浓度为 20-50 mg/L, 以适量浓度标记干细胞, 不会对其生物学活性、增殖能力及多向分化能力产生明显影响^[49]。

除 ¹H 核, ¹⁹F 也表现出磁共振现象。人体内源性氟背景缺失, 因此所获得的信号是特定于标记细胞的, ¹⁹F MRI 提

供了一种高度特异、明确和定量的标记间充质干细胞追踪方法^[50]，但¹⁹F MRI没有提供解剖信息，与同时采集的¹H磁共振解剖图像叠加在一起可以提供更完整的图像。目前，被用于¹⁹F MRI细胞追踪成像的对比剂大多数是基于全氟化碳化合物^[51]，由于其不溶于水，需将全氟化碳化合物配制成生物相容的纳米乳液。全氟辛基溴化物(PFOB)已被FDA批准用于临床，制备时包埋到可生物降解的聚乳酸-乙醇酸中，然而，聚乳酸-乙醇酸带负电荷，与细胞膜相斥，为了克服这一障碍，2015年时，VU-QUANG等^[52]用阳离子聚合物壳聚糖包覆聚乳酸-乙醇酸提高了其水溶性，但标记效率仍不高，它还降低了细胞活力，改变了细胞形态；2017年时，改用聚苯乙烯磺酸盐(PSS)包封聚乳酸-乙醇酸得到的PSS-NPs不仅增加了亲脂性，不影响细胞的增殖和分化，而且还促进了NPs通过微囊蛋白1(CAV-1)介导的胞吞作用进入间充质干细胞内^[53]。MOONSHI等^[54]合成了一种新的与荧光染料偶联的小尺寸高氟含量的部分氟化聚合物纳米粒子，用于双模式成像。胎盘间充质干细胞对其具有较高的摄取和良好的耐受性，生存力大于90%，¹⁹F MRI的最低检测灵敏度约为 7.4×10^3 个细胞/像素。这种双重MRI/荧光显像剂在9.4T的场强下可以在短时间内(12 min)获得高分辨率图像，细胞标记后注射到NOD-SCID小鼠皮下，7 d后还可产生明显的信号。

2.3.2 间接标记法 目前常用于间充质干细胞示踪的MRI报告基因主要为铁蛋白报告基因^[55]。铁蛋白是一种450 kD的球状蛋白，由多种重、轻蛋白亚基组成，重链升高，或与轻链结合，可使细胞内铁储备增加。HUANG等^[56]将含有铁蛋白重链1(Fth1)基因穿梭质粒(pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP)的慢病毒转染骨髓间充质干细胞，以及超顺磁性氧化铁纳米粒子标记骨髓间充质干细胞，二者分别植入脑缺血再灌注损伤SD大鼠，观察到超顺磁性氧化铁纳米粒子标记骨髓间充质干细胞的MRI信号强度随时间逐渐减弱，Fth1标记的细胞在10-60 d内表现出相同的信号强度，Fth1标记比起顺磁性氧化铁纳米粒子标记更稳定、更适合长期跟踪，SWI比T2W1序列更敏感，然而，与利用外源铁颗粒的技术相比，该技术的灵敏度，尤其是在活体环境中的灵敏度有限，产生的对比度也较低。此外，有数据表明，Fth1过度表达的干细胞在形态和增殖速度上有明显的变化，但培养基中补充足够的铁可防止细胞表型变化^[57]，铁蛋白表达增加与神经退行性疾病之间也有关联^[58]。因此，铁蛋白作为报告基因的慢性过度表达可能具有细胞毒性作用。

在一些淡水磁螺属趋磁细菌(MTB)中发现了线性排列的亚细胞磁性细胞器链(称为磁小体)，磁小体起源于MTB细胞质膜，含有磁铁矿(Fe_3O_4)、黑云母(Fe_3S_4)或磁铁矿($\gamma-Fe_2O_3$)晶体，具有类似于超顺磁性氧化铁纳米粒子纳米颗粒的性质，也可作为MRI报告基因。磁螺菌中的magA基因(一种假定的铁转运体)可以编码合成细胞内生物磁铁矿颗粒(Fe_3O_4)，T2*加权MRI显示magA阳性细胞信号明显下降^[59]。然而，有学者研究发现，磁螺菌magA基因的组成性表达可

被人胚肾(HEK)细胞耐受^[60]，但对小鼠间充质细胞和肾源性干细胞有较强的毒性作用。来自磁螺菌AMB-1的mms6和mmsF基因中的任何1个或2个也能合成单畴晶体^[61]，整合入磁小体中进而磁化人间充质干细胞，转染21 d后测量结果证实了mms6/mmsF共转染的间充质干细胞表现出比mmsF单独转染更强的磁性，对间充质干细胞的增殖、迁移和分化也无不良影响。研究表明，趋磁细菌基因可以在哺乳动物细胞中表达，可以产生胞内磁纳米颗粒，但这种方法对体内间充质干细胞功能的长期影响需要时间来检验。

2.4 干细胞核医学(Nuclear imaging)示踪技术

2.4.1 直接标记法 核医学示踪技术是采用正电子发射断层显像(PET)和单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)，通过检测放射性示踪剂在活体中显示被标记细胞的分布及状态的细胞追踪技术。目前应用较多的核素示踪剂包括具有短半衰期的正电子发射同位素(例如¹⁸F-FDG，¹²⁴I，⁶⁸Ga)和发射 γ 的同位素(例如¹¹¹In，¹³¹I，⁹⁹Tc^m)，其中¹⁸F-FDG^[62]、⁹⁹Tc^m^[63]、¹¹¹In已在干细胞示踪领域广泛应用^[64]。PET(-1 cm/s to min)相对于SPECT(1.0-2.0 cm/min)具有更好的时空分辨率，但又远低于MRI^[65]。放射性核素的半衰期短(例如¹⁸F-FDG为110 min，⁹⁹Tc^m为6 h)是长期追踪的主要障碍，只能对移植细胞进行即时成像分析。⁸⁹Zr因其高空间分辨率和78.4 h半衰期而成为一种新的PET放射性核素^[66]，可用于监测两周内的移植细胞，静脉注射7 d后无胸腺裸鼠体内⁸⁹Zr标记的人间充质干细胞大部分分布在肺中(50±27)%，其余在肝脏和骨骼中，第7天时急性心肌缺血再灌注损伤的无胸腺小鼠心脏发现了⁸⁹Zr标记的人间充质干细胞(20±7)%。然而，由于放射性示踪剂可能会从标记的细胞中排出，因此游离的放射性同位素可能会产生假阳性信号，导致数据不准确，并且时间依赖性的细胞毒作用和对靶细胞的电离辐射损伤仍是一大障碍，需要谨慎使用。因此，该显像技术不利于细胞的长期示踪，若长期监测还需要借助于其他分子影像示踪技术。此外，该技术分辨率低的缺点也在一定程度上限制了应用。

2.4.2 间接标记法 目前常用于核素显像的报告基因有1型单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV1-TK)或其突变株sr39TK^[67]、多巴胺D2受体^[68]、人钠碘转运体等^[69]。HSV1-TK是目前应用最广泛的PET报告基因之一，能特异地磷酸化放射性同位素FHBG、FIAU、FEAU等，在细胞中可作为HSV1-TK的显像底物^[11]。PEI等^[70]将HSV1-TK置于心肌细胞特异性 α -肌球蛋白重链(α -MHC)启动子的控制下开发了一个报告基因，通过慢病毒转导骨髓间充质干细胞产生了稳定表达 α -MHC-HSV1-tk的细胞系，采用¹⁸F-FHBG动态监测心肌梗死大鼠模型中的骨髓间充质干细胞变化，在这个系统中，HSV1-tk只在骨髓间充质干细胞直接分化为心肌细胞时表达，因此可以在体内监测干细胞分化。同时，¹⁸F-FHBG-PET成像可以对细胞进行跟踪。另外， α -MHC还促进了骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化。

2.5 干细胞超声(Ultrasound, US)与光声(Photoacoustic imaging, PAI)示踪技术 超声示踪成像不像其他方法那样普

遍使用,但作为指导干细胞递送的实时高分辨率成像技术,它具有巨大潜力,可以提高干细胞递送的准确性^[71]。在细胞成像中,超声成像仅限于对比度差。为了解决这个问题,目前已经开发了几种类型的对比剂,包括微泡、二氧化硅和金纳米颗粒。磷酸盐玻璃是一种新的超声对比剂^[72],具有可控的降解速率和体内易代谢的降解成分,1 h即可成功标记间充质干细胞,超声成像显示细胞数量与超声后向散射之间存在线性关系,可对未知细胞数量进行量化。

光声成像可以增加传统超声的对比度,提供更深的组织穿透力。光声成像对比剂包括碳纳米管^[73]、金纳米棒等^[74]。普鲁士蓝纳米颗粒(PBNPs)是一种新兴的光声对比剂^[75],在近红外区域具有很强的光吸收。涂覆有多聚赖氨酸的普鲁士蓝纳米颗粒可有效标记人间充质干细胞,在体外和体内均表现出强烈的光声对比,体内的检测限为 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 。光声信号随细胞浓度的增加而增加,可以在细胞移植期间和之后定量标记细胞的数量。在超声/光声混合成像中,可以实时引导进行脑实质内注射,并在14 d的时间内监测和检测到小鼠脑内的 5×10^4 个间充质干细胞。DHADA等^[76]使用惰性涂覆有活性氧(ROS)敏感的近红外染料(IR775c)金纳米棒(AuNRs)作为光声成像示踪剂,进行超声/光声成像联合成像跟踪移植到小鼠下肢的间充质干细胞。该纳米粒子系统体内示踪具有高时空分辨率,允许纵向追踪间充质干细胞的存活情况,这是其他成像方式目前无法实现的。细胞死亡后,间充质干细胞产生活性氧降解细胞。因此,可以通过IR775c(795 nm)与AuNRs(920 nm)的光声信号比来监测间充质干细胞的存活率,因为后者对活性氧不敏感,这种活性氧敏感的光声示踪剂可以更快地优化临床前研究中的治疗条件,包括细胞移植时机、移植的干细胞数量以及给药后的干细胞存活率。LAF-FEY等^[77]评估了金纳米球标记的人脂肪间充质干细胞在冷冻储存1周、1个月及2个月后的存活率、多能性和光声活性,与未标记的间充质干细胞比较,存活率无明显变化,纳米标记干细胞的功能和成像特性在冷冻储存后依然可以维持,可简化与临床方案的整合,提高干细胞监测技术的转化率。

2.6 干细胞磁粒子成像(magnetic particle imaging, MPI)示踪技术 磁粒子成像是20世纪初发展起来的一种新的层析成像技术。与传统的成像方法如X射线片、CT成像和MRI、超声成像相比,磁粒子成像不是一种结构成像技术。相反,它是一种类似于生物发光成像、荧光成像、PET和SPECT的示踪成像技术。磁粒子成像可以跟踪和量化示踪剂,特别是磁性纳米颗粒,如超顺磁性氧化铁纳米粒子。该技术特别适用于细胞成像,因为它提供了接近理想的图像对比度、无周围组织背景干扰、高灵敏度以及良好的时空分辨率,对于干细胞输入后细胞分布较少的器官也可以检测到,从而更准确地监测细胞的迁移分布^[78]。ZHENG等^[79]使用磁粒子成像技术动态地监测和定量了静脉注射的超顺磁性氧化铁纳米粒子标记的人间充质干细胞在小鼠体内的生物分布,尾静脉注射1 h后,标记的人间充质干细胞大量存在于肺组织中,1 d之内

逐渐迁移到了肝脏;在12 d内,约在第4.6天磁粒子成像信号开始在肝脏逐渐衰减。为了进一步提高磁粒子成像性能,SONG等^[80]合成了一种封装在荧光半导体聚合物Janus纳米颗粒中的氧化铁示踪剂,能发出强烈的磁粒子成像信号,这些颗粒的荧光性质使它们能够通过磁粒子成像、MRI以及荧光成像用于细胞追踪和小鼠活体成像。在相同铁浓度下,该粒子提供的信号比标准磁粒子成像对比剂VivoTrax发出的信号大3倍,比Feraheme(一种可用于磁粒子成像的商业MRI纳米粒子)大7倍。最近,WANG等^[81]研制了一种边长为22 nm的立方氧化铁纳米颗粒(CIONs-22)的专用磁粒子成像示踪剂。体外磁粒子成像可检测到极低浓度($3 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$)的CIONs-22标记骨髓间充质干细胞,还可实时长期监测移植干细胞在后肢缺血小鼠体内的时空轨迹,最低能监测到约2 500个细胞。

2.7 干细胞多模态成像示踪技术 多模态成像可以结合每种模态的优点进行全面检测。对急性肝损伤大鼠模型植入标记了荧光素酶和超顺磁性氧化铁纳米粒子的间充质干细胞,利用生物发光成像和MRI可实时、无创示踪间充质干细胞的分布^[82]。KUBELICK等^[83]基于普鲁士蓝纳米颗粒开发了一种US/PAI/MRI联合成像方法,可在术中实时指导干细胞注射至脊髓损伤大鼠脊髓中,并在术后监测干细胞的治疗效果。非放射性 ^{57}Fe 离子磁共振成像与体外激光消融-电感耦合等离子体质谱(LA-ICP-MS)成像相结合,可区别小鼠体内内源性铁(^{56}Fe)和外源性铁,即使在铁被代谢之后,也可以从对比剂中追踪细胞的长期命运^[84]。此外,间接标记的报告基因已被证明可用于多模态成像。例如,酪氨酸酶多功能报告基因标记的大鼠骨髓间充质干细胞可在PAI、MRI和PET中被检测到^[85]。

3 讨论 Discussion

干细胞具有独特的生物学特性,包括自我更新、多向分化潜能、“归巢”特性、可分泌多种因子以及免疫调节作用等,具有缓解甚至治愈一系列急性、慢性和年龄相关性疾病的巨大潜力^[86],以干细胞为基础的治疗方法有望成为一种新的疾病治疗模式,目前已有多项干细胞临床试验在进行中^[6, 87-88]。但是,必须确保这些疗法既安全又有效,要知道和减少与使用这些疗法的相关风险,长期连续的体内细胞示踪可以提供关于细胞生物学行为和生物医学疗法的有价值的详细信息^[89],如监测干细胞移植后的组织再生,以及干细胞在体内是否致癌等,有临床报告向鞘内注射间充质干细胞、胚胎干细胞和胎儿神经干细胞,1例患者的胸脊髓和鞘囊中发现了主要由非宿主细胞组成的原始肿瘤^[90],强调了临床前安全性测试的重要性。

使用生物相容性对比剂连续或实时跟踪干细胞一定时间内的生物学过程,对于精确诊治及评估基于干细胞疗法的风险至关重要,非侵入性成像技术是干细胞研究临床转化的一个重要推动力^[91]。目前正在设计开发各种方法来改进细胞成

像技术, 分子探针的生物相容性、时间分辨率、检测阈值、实时图像引导注射的需要以及成本效益是选择合适的细胞成像技术的几个重要标准。光学成像技术在小动物成像方面显示出明显的优势, 但鉴于组织穿透性差和信号的空间分辨率低, 无法在较大的动物和人类中使用。MRI 和 PET/SPECT 在分辨率和灵敏度上都优于光学成像, 可用于大动物和人类成像, 但成像速度较慢。多模态成像技术结合了每种示踪技术的优点, 在将来临床使用更具优势, 这些技术各有利弊, 各种成像示踪技术的特点见表 1。

干细胞移植后在生物体内的存活率与死亡或清除时间也是影响治疗效果的主要因素之一, 而报告基因的表达往往与细胞的活性直接相关。近年来, 基于纳米颗粒的细胞示踪探针在各种成像技术中的开发和应用, 以及高时空分辨成像技术及新影像设备的快速发展, 对于小动物活体成像, 采用 NIR- II 荧光成像结合生物发光成像技术可以同时提供细胞分布及存活情况的信息, 对于大动物和人类成像, 采用多模态成像技术可以满足不同需求, 超声/光声与 MRI 结合可以实时引导干细胞注射, 同时对移植后的细胞分布进行追踪; 基于报告基因的 PET 成像技术与 MRI 结合成像可以提供细胞存活与否和体内分布的信息, 目前已生产了联合这两种技术的成像设备。目前对于干细胞移植后的体内长期高灵敏度监测仍是一大难点, 并且区分细胞的存活状态、分化与否也至关重要, 干细胞途径特异性报告基因有望解决这一问题^[92]。因此, 对于现代甚至未来的疾病治疗, 特别是干细胞治疗和免疫治疗, 结合多模式技术和集成智能探针的活体细胞示踪将具有巨大的潜力。

作者贡献: 第一作者负责综述构思设计、文献收集、分析总结、成文, 潘兴华、朱向情负责审核。

经费支持: 该文章接受了“云南省重大科技专项计划(2018ZF007)”及“国家自然科学基金资助项目(31970515)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] MOLL G, HOOGDIJN MJ, ANKRUM JA. Editorial: Safety, Efficacy and Mechanisms of Action of Mesenchymal Stem Cell Therapies. *Front Immunol.* 2020;11:243.
- [2] VADIVEL S, VINCENT P, SEKARAN S, et al. Inflammation in myocardial injury- Stem cells as potential immunomodulators for myocardial regeneration and restoration. *Life Sci.* 2020;250:117582.
- [3] WANG W, WU RD, CHEN P, et al. Liraglutide combined with human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation inhibits beta-cell apoptosis via mediating the ASK1/JNK/BAX pathway in rats with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2020;36(2):e3212.
- [4] CHEN Y, YU Q, HU Y, et al. Current Research and Use of Mesenchymal Stem Cells in the Therapy of Autoimmune Diseases. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2019;14(7):579-582.
- [5] MAYILSAMY K, MARKOUTSA E, DAS M, et al. Treatment with shCCL20-CCR6 nanodendriplexes and human mesenchymal stem cell therapy improves pathology in mice with repeated traumatic brain injury. *Nanomedicine.* 2020;29:102247.
- [6] BYDON M, DIETZ AB, GONCALVES S, et al. CELLTOP Clinical Trial: First Report From a Phase 1 Trial of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Paralysis Due to Traumatic Spinal Cord Injury. *Mayo Clin Proc.* 2020;95(2):406-414.
- [7] 单莎瑞, 黄国志. 干细胞抗衰老的理论研究与进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(23):4347-4354.
- [8] PATEL S, LEE KB. Probing stem cell behavior using nanoparticle-based approaches. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2015;7(6):759-778.
- [9] VU H, ZHOU J, HUANG Y, et al. Development of a dual-wavelength fluorescent nanoprobe for in vivo and in vitro cell tracking consecutively. *Bioorg Med Chem.* 2019;27(9):1855-1862.
- [10] KIRCHER MF, GAMBHIR SS, GRIMM J. Noninvasive cell-tracking methods. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(11):677-688.

表 1 | 各种成像示踪技术的特点

示踪技术	成像特点								
	组织穿透深度及分辨率	适用动物类型	成像速度	示踪时间	成像准确性	细胞定量	操作过程	成本	
光学成像	传统光学探针差, NIR- II、改进后的荧光素酶探针相对较好	小动物成像及大动物表面结构成像	几秒至几分钟	数周	有来自生物自发荧光的干扰, 生物发光成像可避免	无法定量	简便	低	
磁共振成像	接近理想的穿透深度, 高空间分辨率 (10-100 μm)	大、小动物及人类均可	几分钟至几小时	数周至数月	非干细胞会吞噬对比剂造成假阳性	可以定量	复杂	高	
核医学成像	组织穿透深度高, 低空间分辨率 (1.0-2.0 mm)	大、小动物及人类均可	几分钟至几小时, 低于 MRI	数周, 取决于核素半衰期	非干细胞会吞噬对比剂造成假阳性	无法定量	复杂	高	
超声与光声成像	检测深度较浅 (cm), 与光学成像相比成像分辨率有限	大、小动物及人类均可	几秒至几分钟	数天至数周	实时细胞注射成像准确性高	可以定量	简便	低	
磁粒子成像	任意方向的层析成像, 理想的图像对比度, 亚毫米空间分辨率	目前只有用于小动物的 MPI 设备	几秒至几分钟	数周至数月	对比剂的磁信号受其局域环境的影响很大, 导致成像伪影增多	线性定量	复杂	高	
多模态成像	结合多种模式, 取长补短	大、小动物及人类均可	几秒至几小时	数周至数月	结合多种模式, 取长补短	可以定量	复杂	高	

- [11] WANG J, JOKERST JV. Stem Cell Imaging: Tools to Improve Cell Delivery and Viability. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9240652.
- [12] MAZZA M, LOZANO N, VIEIRA DB, et al. Liposome-Indocyanine Green Nanoprobes for Optical Labeling and Tracking of Human Mesenchymal Stem Cells Post-Transplantation In Vivo. *Adv Healthc Mater.* 2017;6(21):1700374.
- [13] 温清, 刘人恺, 王志勇. 两亲性聚乙烯亚胺修饰量子点构建功能性光学探针用于干细胞治疗的示踪研究 [J]. *华中科技大学学报 (医学版)*, 2015, 44(1):28-31.
- [14] CAO J, ZHU B, ZHENG K, et al. Recent Progress in NIR-II Contrast Agent for Biological Imaging. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;7:487.
- [15] CHEN G, TIAN F, ZHANG Y, et al. Tracking of Transplanted Human Mesenchymal Stem Cells in Living Mice using Near-Infrared Ag2S Quantum Dots. *Advanced Functional Materials.* 2014;24(17):2481-2488.
- [16] YANG Y, CHEN J, SHANG X, et al. Visualizing the Fate of Intra-Articular Injected Mesenchymal Stem Cells In Vivo in the Second Near-Infrared Window for the Effective Treatment of Supraspinatus Tendon Tears. *Adv Sci (Weinh).* 2019;6(19):1901018.
- [17] CHETTY SS, PRANEETHA S, GOVARTHANAN K, et al. Noninvasive Tracking and Regenerative Capabilities of Transplanted Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Labeled with I-III-IV Semiconducting Nanocrystals in Liver-Injured Living Mice. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019;11(9):8763-8778.
- [18] LI K, QIN W, DING D, et al. Photostable fluorescent organic dots with aggregation-induced emission (AIE dots) for noninvasive long-term cell tracing. *Sci Rep.* 2013;3:1150.
- [19] YANG C, NI X, MAO D, et al. Seeing the fate and mechanism of stem cells in treatment of ionizing radiation-induced injury using highly near-infrared emissive AIE dots. *Biomaterials.* 2019;188:107-117.
- [20] 杨磊, 杨志, 连锋. 碳量子点作为生物相容性发光材料在再生医学方面的应用 [J]. *材料导报*, 2019, 33(S2):1-9.
- [21] VENERANDO A, MAGRO M, BARATELLA D, et al. Biotechnological applications of nanostructured hybrids of polyamine carbon quantum dots and iron oxide nanoparticles. *Amino Acids.* 2020;52(2):301-311.
- [22] YAN J, HOU S, YU Y, et al. The effect of surface charge on the cytotoxicity and uptake of carbon quantum dots in human umbilical cord derived mesenchymal stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2018;171:241-249.
- [23] QIU J, LI D, MOU X, et al. Effects of Graphene Quantum Dots on the Self-Renewal and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Adv Healthc Mater.* 2016;5(6):702-710.
- [24] OH EJ, LEE HW, KALIMUTHU S, et al. In vivo migration of mesenchymal stem cells to burn injury sites and their therapeutic effects in a living mouse model. *J Control Release.* 2018;279:79-88.
- [25] YEH HW, KARMACH O, JI A, et al. Red-shifted luciferase-luciferin pairs for enhanced bioluminescence imaging. *Nat Methods.* 2017;14(10):971-974.
- [26] IWANO S, SUGIYAMA M, HAMA H, et al. Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. *Science.* 2018;359(6378):935-939.
- [27] CAI WW, WANG LJ, LI SJ, et al. Effective tracking of bone mesenchymal stem cells in vivo by magnetic resonance imaging using melanin-based gadolinium³⁺ nanoparticles. *J Biomed Mater Res A.* 2017;105(1):131-137.
- [28] MOHSENI M, SHOJAEI S, MEHRAVI B, et al. Natural polymeric nanoparticles as a non-invasive probe for mesenchymal stem cell labelling. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2020;48(1):770-776.
- [29] ROGOSNITZKY M, BRANCH S. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *Biometals.* 2016;29(3):365-376.
- [30] LIU SJ, WANG LJ, QIAO Y, et al. A promising magnetic resonance stem cell tracer based on natural biomaterials in a biological system: manganese(II) chelated to melanin nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:1749-1759.
- [31] HAEDICKE IE, LOAI S, CHENG HM. An Efficient T 1 Contrast Agent for Labeling and Tracking Human Embryonic Stem Cells on MRI. *Contrast Media Mol Imaging.* 2019;2019:3475786.
- [32] MOGHADDAM SE, HERNÁNDEZ-RIVERA M, ZAIBAQ NG, et al. A New High-Performance Gadonanotube-Polymer Hybrid Material for Stem Cell Labeling and Tracking by MRI. *Contrast Media Mol Imaging.* 2018;2018:2853736.
- [33] WANG LJ, YAN CP, CHEN D, et al. Efficacy Evaluation and Tracking of Bone Marrow Stromal Stem Cells in a Rat Model of Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Biomed Res Int.* 2019;2019:9105768.
- [34] JIANG R, LIAO Y, YANG F, et al. SPIO nanoparticle-labeled bone marrow mesenchymal stem cells inhibit pulmonary EndoMT induced by SiO₂. *Exp Cell Res.* 2019;383(1):111492.
- [35] DEMIN AM, MEKHAEV AV, KANDARAKOV OF, et al. L-Lysine-modified Fe₃O₄ nanoparticles for magnetic cell labeling. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2020;190:110879.
- [36] MISHRA SK, KHUSHU S, SINGH AK, et al. Homing and Tracking of Iron Oxide Labelled Mesenchymal Stem Cells After Infusion in Traumatic Brain Injury Mice: a Longitudinal In Vivo MRI Study. *Stem Cell Rev Rep.* 2018;14(6):888-900.
- [37] DUAN X, LU L, WANG Y, et al. The long-term fate of mesenchymal stem cells labeled with magnetic resonance imaging-visible polymersomes in cerebral ischemia. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:6705-6719.
- [38] ZARE S, MEHRABANI D, JALLI R, et al. MRI-Tracking of Dental Pulp Stem Cells In Vitro and In Vivo Using Dextran-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *J Clin Med.* 2019;8(9):1418.
- [39] HSU FT, WEI ZH, HSUAN YC, et al. MRI tracking of polyethylene glycol-coated superparamagnetic iron oxide-labelled placenta-derived mesenchymal stem cells toward glioblastoma stem-like cells in a mouse model. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(sup3):S448-S459.
- [40] ANDREAS K, GEORGIEVA R, LADWIG M, et al. Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking. *Biomaterials.* 2012;33(18):4515-4525.
- [41] LI L, JIANG W, LUO K, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents for non-invasive stem cell labeling and tracking. *Theranostics.* 2013;3(8):595-615.
- [42] AZEVEDO-PEREIRA RL, RANGEL B, TOVAR-MOLL F, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a tool to track mouse neural stem cells in vivo. *Mol Biol Rep.* 2019;46(1):191-198.
- [43] 马思雨, 王鹏, 杨玉志, 等. 磁性纳米颗粒标记间充质干细胞及其功能的调控 [J]. *中国材料进展*, 2019, 38(6):559-566.
- [44] CORES J, CARANASOS TG, CHENG K. Magnetically Targeted Stem Cell Delivery for Regenerative Medicine. *J Funct Biomater.* 2015;6(3):526-546.
- [45] GU L, LI X, JIANG J, et al. Stem cell tracking using effective self-assembled peptide-modified superparamagnetic nanoparticles. *Nanoscale.* 2018;10(34):15967-15979.
- [46] SHELAT R, BHATT LK, KHANNA A, et al. A comprehensive toxicity evaluation of novel amino acid-modified magnetic ferrofluids for magnetic resonance imaging. *Amino Acids.* 2019;51(6):929-943.
- [47] MARKIDES H, NEWELL KJ, RUDORF H, et al. Ex vivo MRI cell tracking of autologous mesenchymal stromal cells in an ovine osteochondral defect model. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):25.
- [48] MUHAMMAD G, JABLONSKA A, ROSE L, et al. Effect of MRI tags: SPIO nanoparticles and 19F nanoemulsion on various populations of mouse mesenchymal stem cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2015;75(2):144-159.
- [49] HU S, ZHOU Y, ZHAO Y, et al. Enhanced bone regeneration and visual monitoring via superparamagnetic iron oxide nanoparticle scaffold in rats. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(4):e2085-e2098.
- [50] HEQUET E, HENOUMONT C, MULLER RN, et al. Fluorinated MRI contrast agents and their versatile applications in the biomedical field. *Future Med Chem.* 2019;11(10):1157-1175.

- [51] RIZZO S, PETRELLA F, ZUCCA I, et al. In vitro labelling and detection of mesenchymal stromal cells: a comparison between magnetic resonance imaging of iron-labelled cells and magnetic resonance spectroscopy of fluorine-labelled cells. *Eur Radiol Exp.* 2017;1(1):6.
- [52] VU-QUANG H, VINDING MS, XIA D, et al. Chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic acid) perfluorooctyl bromide nanoparticles for cell labeling in (19)F magnetic resonance imaging. *Carbohydr Polym.* 2016;136:936-944.
- [53] 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(10):2657-2671.
- [54] MOONSHI SS, ZHANG C, PENG H, et al. A unique 19F MRI agent for the tracking of non phagocytic cells in vivo. *Nanoscale.* 2018;10(17):8226-8239.
- [55] CAO M, MAO J, DUAN X, et al. In vivo tracking of the tropism of mesenchymal stem cells to malignant gliomas using reporter gene-based MR imaging. *Int J Cancer.* 2018;142(5):1033-1046.
- [56] HUANG X, XUE Y, WU J, et al. MRI Tracking of SPIO- and Fth1-Labeled Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell Transplantation for Treatment of Stroke. *Contrast Media Mol Imaging.* 2019;2019:5184105.
- [57] PEREIRA SM, MOSS D, WILLIAMS SR, et al. Overexpression of the MRI Reporter Genes Ferritin and Transferrin Receptor Affect Iron Homeostasis and Produce Limited Contrast in Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2015;16(7):15481-15496.
- [58] SRIVASTAVA AK, BULTE JW. Seeing stem cells at work in vivo. *Stem Cell Rev Rep.* 2014;10(1):127-144.
- [59] CHO IK, MORAN SP, PAUDYAL R, et al. Longitudinal monitoring of stem cell grafts in vivo using magnetic resonance imaging with inducible magA as a genetic reporter. *Theranostics.* 2014;4(10):972-989.
- [60] PEREIRA SM, WILLIAMS SR, MURRAY P, et al. MS-1 magA: Revisiting Its Efficacy as a Reporter Gene for MRI. *Mol Imaging.* 2016;15:1536012116641533.
- [61] KERANS FFA, LUNGARO L, AZFER A, et al. The Potential of Intrinsically Magnetic Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):3159.
- [62] SOOD V, MITTAL BR, BHANSALI A, et al. Biodistribution of 18F-FDG-Labeled Autologous Bone Marrow-Derived Stem Cells in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: Exploring Targeted and Intravenous Routes of Delivery. *Clin Nucl Med.* 2015;40(9):697-700.
- [63] DUDHIA J, BECERRA P, VALDÉS MA, et al. In Vivo Imaging and Tracking of Technetium-99m Labeled Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Equine Tendinopathy. *J Vis Exp.* 2015;(106):e52748.
- [64] PARK BN, LIM TS, YOON JK, et al. In vivo tracking of intravenously injected mesenchymal stem cells in an Alzheimer's animal model. *Cell Transplant.* 2018;27(8):1203-1209.
- [65] CEN P, CHEN J, HU C, et al. Noninvasive in-vivo tracing and imaging of transplanted stem cells for liver regeneration. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):143.
- [66] BANSAL A, PANDEY MK, DEMIRHAN YE, et al. Novel (89)Zr cell labeling approach for PET-based cell trafficking studies. *EJNMMI Res.* 2015;5:19.
- [67] MUÑOZ-ÁLVAREZ KA, ALTOMONTE J, LAITINEN I, et al. PET imaging of oncolytic VSV expressing the mutant HSV-1 thymidine kinase transgene in a preclinical HCC rat model. *Mol Ther.* 2015;23(4):728-736.
- [68] SCHÖNITZER V, HAASTERS F, KÄSBAUER S, et al. In vivo mesenchymal stem cell tracking with PET using the dopamine type 2 receptor and 18F-fallypride. *J Nucl Med.* 2014;55(8):1342-1347.
- [69] 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. *PLoS One.* 2014;9(4):e94833.
- [70] PEI Z, ZENG J, SONG Y, et al. In vivo imaging to monitor differentiation and therapeutic effects of transplanted mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Sci Rep.* 2017;7(1):6296.
- [71] CHEN F, JOKERST JV. Stem Cell Tracking with Nanoparticle-Based Ultrasound Contrast Agents. *Methods Mol Biol.* 2020;2126:141-153.
- [72] FOROUTAN F, JOKERST JV, GAMBHIR SS, et al. Sol-gel synthesis and electrospraying of biodegradable (P2O5)55-(CaO)30-(Na2O)15 glass nanospheres as a transient contrast agent for ultrasound stem cell imaging. *ACS Nano.* 2015;9(2):1868-1877.
- [73] BHATTACHARYA K, SACCHETTI C, EL-SAYED R, et al. Enzymatic 'stripping' and degradation of PEGylated carbon nanotubes. *Nanoscale.* 2014;6(24):14686-14690.
- [74] BOUCHÉ M, HSU JC, DONG YC, et al. Recent Advances in Molecular Imaging with Gold Nanoparticles. *Bioconjug Chem.* 2020;31(2):303-314.
- [75] KIM T, LEMASTER JE, CHEN F, et al. Photoacoustic Imaging of Human Mesenchymal Stem Cells Labeled with Prussian Blue-Poly(l-lysine) Nanocomplexes. *ACS Nano.* 2017;11(9):9022-9032.
- [76] DHADA KS, HERNANDEZ DS, SUGGS LJ. In Vivo Photoacoustic Tracking of Mesenchymal Stem Cell Viability. *ACS Nano.* 2019;13(7):7791-7799.
- [77] 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):1-10.
- [78] PAYSEN H, LOEWA N, STACH A, et al. Cellular uptake of magnetic nanoparticles imaged and quantified by magnetic particle imaging. *Sci Rep.* 2020;10(1):1922.
- [79] ZHENG B, VON SEE MP, YU E, et al. Quantitative Magnetic Particle Imaging Monitors the Transplantation, Biodistribution, and Clearance of Stem Cells In Vivo. *Theranostics.* 2016;6(3):291-301.
- [80] SONG G, CHEN M, ZHANG Y, et al. Janus Iron Oxides @ Semiconducting Polymer Nanoparticle Tracer for Cell Tracking by Magnetic Particle Imaging. *Nano Lett.* 2018;18(1):182-189.
- [81] WANG Q, MA X, LIAO H, et al. Artificially Engineered Cubic Iron Oxide Nanoparticle as a High-Performance Magnetic Particle Imaging Tracer for Stem Cell Tracking. *ACS Nano.* 2020;14(2):2053-2062.
- [82] 胡越, 彭焘, 黄明声, 等. 多模态成像对间充质干细胞移植后活体示踪的应用研究 [J]. *中国医学影像技术*, 2019,35(11):1622-1626.
- [83] 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.
- [84] MASTHOFF M, BUCHHOLZ R, BEUKER A, et al. Introducing Specificity to Iron Oxide Nanoparticle Imaging by Combining 57Fe-Based MRI and Mass Spectrometry. *Nano Lett.* 2019;19(11):7908-7917.
- [85] LIU M, WANG Y, LI M, et al. Using tyrosinase as a tri-modality reporter gene to monitor transplanted stem cells in acute myocardial infarction. *Exp Mol Med.* 2018;50(4):54.
- [86] NOMBELA-ARRIETA C, RITZ J, SILBERSTEIN LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(2):126-131.
- [87] GU J, HUANG L, ZHANG C, et al. Therapeutic evidence of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transplantation for cerebral palsy: a randomized, controlled trial. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):43.
- [88] MATHIASSEN AB, QAYYUM AA, JØRGENSEN E, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with ischaemic heart failure: final 4-year follow-up of the MSC-HF trial. *Eur J Heart Fail.* 2020;22(5):884-892.
- [89] EDMUNDSON M, THANH NT, SONG B. Nanoparticles based stem cell tracking in regenerative medicine. *Theranostics.* 2013;3(8):573-582.
- [90] BERKOWITZ AL, MILLER MB, MIR SA, et al. Glioproliferative Lesion of the Spinal Cord as a Complication of "Stem-Cell Tourism". *N Engl J Med.* 2016;375(2):196-198.
- [91] WANG Y, XU C, OW H. Commercial nanoparticles for stem cell labeling and tracking. *Theranostics.* 2013;3(8):544-560.
- [92] PETERSON KM, FRANCHI F, OLTHOFF M, et al. Pathway-specific reporter genes to study stem cell biology. *Stem Cells.* 2020;38(6):808-814.

(责任编辑: MZH, ZN, JY)