科学通报 2016 年 第 61 卷 第 10 期: 1075 ~ 1085
进 展
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

移植干细胞死活活体示踪技术研究进展

林素颖[①②], 陈光村[②*], 黄德华[①②], 孟春[①], 王强斌[②*]

① 福州大学生物科学与工程学院, 福州 350116;
② 中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所, 纳米生物医学部/国际实验室, 中国科学院纳米-生物界面重点实验室, 苏州 215123
* 联系人, E-mail: gcchen2011@sinano.ac.cn; qbwang2008@sinano.ac.cn

2015-12-18 收稿, 2016-01-28 修回, 2016-01-30 接受, 2016-03-22 网络版发表
中国科学院战略性科技先导专项(XDA01030200)和国家自然科学基金(21303249, 21425103, 81401464, 21501192)资助

摘要 近年来, 干细胞再生医学作为未来治愈人类重大疾病最具潜力的方法之一, 吸引了科学工作者的广泛关注. 清晰了解移植干细胞在活体中的存活、迁移和分化行为是指导干细胞有效治疗的重要前提, 其中移植干细胞在体内的存活率更是决定干细胞疗法成败的关键因素. 因此, 发展有效示踪干细胞死活的影像技术以有效评估干细胞在活体的存活, 已成为当今的一大研究热点. 本文就目前干细胞死活示踪活体影像技术的研究进展予以综述和展望.

关键词 移植干细胞, 存活, 活体示踪, 影像技术

干细胞是一类具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞, 是组织和器官再生不可或缺的, 也是再生医学的基础[1,2]. 目前, 基于干细胞的细胞疗法已经成为治愈人类重大疑难疾病(如帕金森病、糖尿病、缺血性心脏病和退行性关节病)最具前景的方法之一. 然而, 大量动物及临床前实验表明移植干细胞在宿主中的低存活率和功能丧失是干细胞疗法在临床上成功应用的最主要限制因素之一[3]. 而目前对于移植干细胞在体内的死亡、迁移以及增殖和分化过程仍不清楚, 难以界定干细胞的治疗过程和效果, 这也成为干细胞治疗方法的开发和临床应用的一个主要障碍. 因此, 发展一种非损伤的干细胞死活示踪成像技术, 以了解移植干细胞在活体内的死亡和存活情况及其决定因素将对有效干细胞疗法的开发及其临床转化都具有重大意义. 而当今影像学的发展正为干细胞的死活示踪开辟全新途径, 也使得人们开始了解移植干细胞在宿主中存活和死亡过程以及决定其存活的关键性因素. 本文将归纳目前用于干细胞死活活体示踪的主要技术, 比较了各种成像技术的优缺点, 并对目前影像技术存在的挑战和未来的发展方向进行了讨论.

1 干细胞活体影像技术的发展

得益于纳米技术、分子生物学技术及新影像设备的发展, 近20年来干细胞活体示踪影像技术也得到了飞速发展. 干细胞活体影像技术的发展经历了从离体成像检测到活体原位成像技术的建立, 基于纳米技术的高灵敏、高时空分辨成像技术的建立, 干细胞死活及功能的原位成像的实现, 以及可对干细胞进行多功能成像示踪的多模态成像技术建立等几个阶段(图1). 这些活体影像技术的发展已经为人们了解移植干细胞在动物模型甚至人类体内的迁移、分布、存活和功能提供了有效的研究手段. 其中移植干细胞在体内的存活率是决定干细胞疗法成败的关键因素, 因此发展有效示踪干细胞死活的影像技术以评估移植干细胞在宿主中的存活情况是目前影像技

引用格式: 林素颖, 陈光村, 黄德华, 等. 移植干细胞死活活体示踪技术研究进展. 科学通报, 2016, 61: 1075–1085
Lin S Y, Chen G C, Huang D H, et al. Progress of tracking the viability of transplanted stem cells *in vivo* (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 1075–1085, doi: 10.1360/N972015-01404

© 2016《中国科学》杂志社

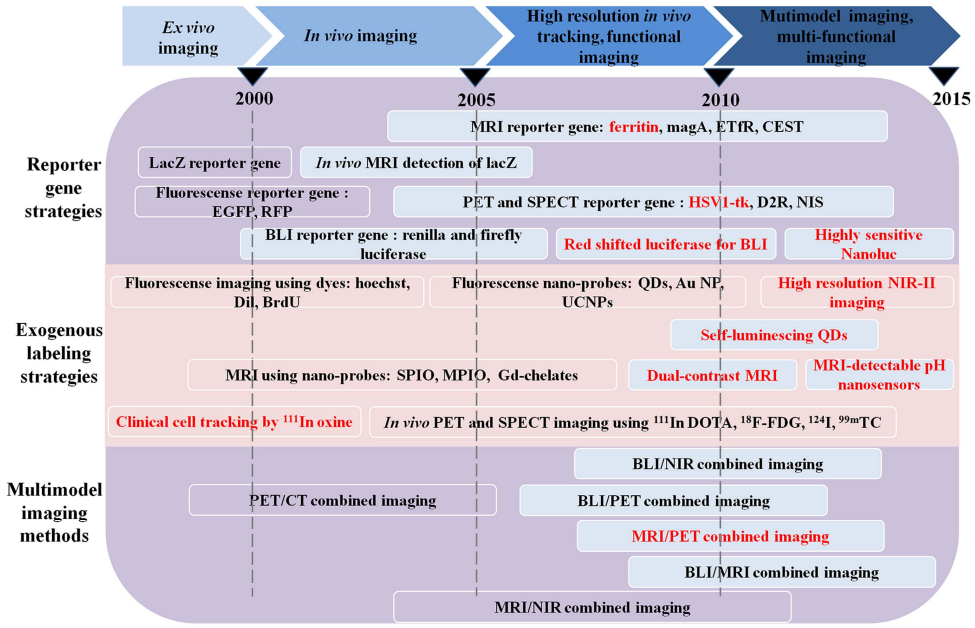


图 1 干细胞活体示踪影像技术研究进展的时序示意图. 近 20 年来可用于干细胞活体示踪的报告基因成像技术、外源标记成像技术以及多模态联合标记成像技术的发展历程. 蓝色背景框指示该影像技术已经成功应用于活体示踪干细胞死活状况. 红字指示具有重要意义和应用前景的干细胞活体示踪技术

Figure 1 The recent progress in the development of tracking the viability of *in vivo* stem cell tracking methodologies, including reporter-gene based methods, exogenous contrast label-based methods and multimodel imaging methods. Blue background indicates methods that are capable to track cell viability *in vivo*. Red letters indicate key methods for *in vivo* cell tracking

术的一个主要发展方向. 目前可用于活体示踪干细胞存活的影像技术主要可分为基于报告基因的成像示踪技术、基于外源标记的成像示踪技术以及联合多种成像优势的多模态成像技术, 以下将分这3部分对目前的干细胞死活活体示踪技术的原理、优缺点、主要应用及未来发展等进行详细介绍.

2 干细胞存活示踪的报告基因技术

报告基因成像是现代生物医学研究中最为重要的成像工具之一. 基于报告基因的成像技术需要干细胞在移植前通过携带报告基因的质粒、逆转录病毒、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(图2). 这些报告基因的表达往往与细胞的活性直接相关, 且报告基因能够在细胞分裂过程传递给子代细胞, 因此尤其适合于对细胞存活和功能的示踪研究[4]. 以下将从光学成像、磁共振成像以及放射性核素成像等3个方面介绍报告基因技术在干细胞死活示踪中的应用.

2.1 基于报告基因的光学成像技术

基于报告基因的光学成像技术主要包括荧光成像技术和生物发光成像技术. 基于荧光蛋白的报告基因技术, 如绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)和红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)等是最为常用的荧光成像技术. 然而, 这些荧光蛋白的激发光和发射光波长均在可见光区域(400~760 nm), 而活体组织对该波段荧光的强吸收和散射, 导致这种方法在活体成像中具有低穿透深度、低空间分辨和低检测灵敏度的缺陷, 这大大限制了其在活体成像中的应用.

生物发光成像是目前最为常用和有效的干细胞存活和功能示踪技术[5]. 干细胞通过基因转染稳定表达荧光素酶, 并移植到活体, 在活体成像时注射荧光素底物, 荧光素酶催化荧光素的氧化反应发出光子, 并利用高灵敏的CCD对光信号进行检测以实现对干细胞的活体示踪成像. 相比于荧光成像, 生物发光成像(bioluminescence imaging, BLI)是利用荧光素酶氧化底物从而得到光信号. 因此, 这种生物发光成像模式没有背景信号干扰, 大大提高光学成像灵敏度, 可在活体中实现对少于10个细胞的检测[6]. 在活体中常用的荧光素酶报告系统主要有萤火虫和海肾荧光素酶报告系统, 它们分别特异利用发光底物荧光素(*D*-

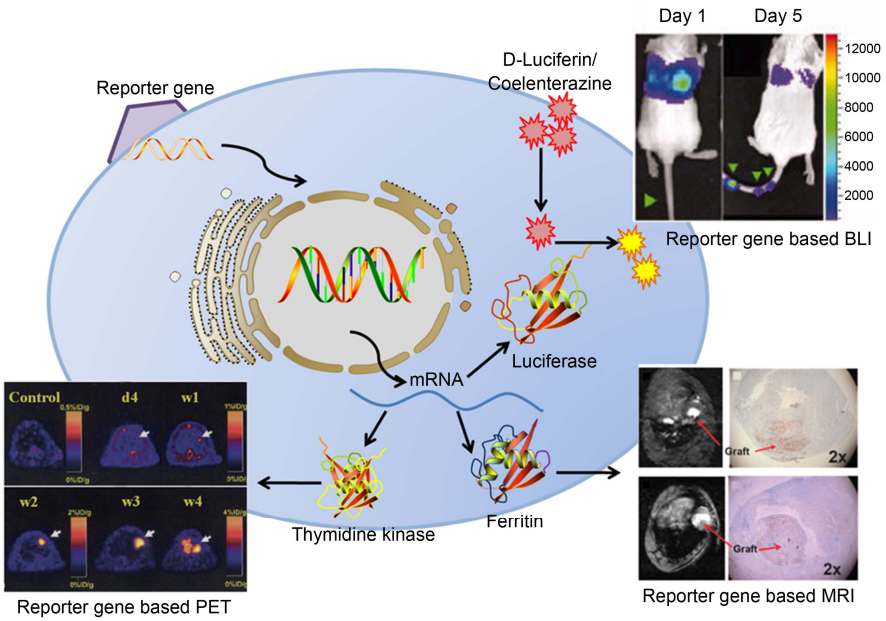


图 2 基于报告基因的干细胞存活示踪技术. 基于荧光素酶报告基因的BLI[7]、基于铁蛋白的MRI[13]和基于胸苷激酶的PET[23]是目前示踪干细胞存活最为常用的报告基因成像技术

Figure 2 Reporter gene-based methods for *in vivo* imaging cell viability. Luciferase-based bioluminescence imaging[7], ferritin-based magnetic resonance imaging (MRI)[13], and thymidine kinase-based positron emission computed tomography[23] are the most widely used imaging methods for *in vivo* cell viability tracking

luciferin)和腔肠素(coelenterazine)产生酶促反应，发出光子进行成像. 如Kidd等人[7]运用萤火虫荧光素酶报告基因技术观察到尾静脉移植干细胞先累积在肺部，再迁移到肝脏和脾脏，也能在炎症损伤部位富集. 由于荧光素和腔肠素不产生交叉反应，这两种荧光素酶也能够通过组合进行双报告基因检测. Vilata等人[8]为了探究干细胞在活体的增殖和分化，用海肾荧光素酶(renilla luciferase, RLuc)和II型骨胶原启动子控制的萤火虫荧光素酶(firefly luciferase, FLuc)构建双报告基因系统，通过该报告系统发现移植到活体的干细胞能够利用前驱细胞或支架共同进行组织修复. 虽然生物发光成像是一种在活体有效示踪干细胞死活、命运的成像方法，但也存在成像空间分辨率低、光穿透能力有限等缺陷，因此目前也仅适用于小动物活体成像[6,9]. 近年来通过改进荧光素酶的发光效率、设计新的底物、开发红移特性的新酶等措施，生物发光成像的分辨率、穿透深度和灵敏度等都有明显地改进和提升. 如Loening等人[10]设计了红色海肾荧光素酶使得海肾荧光素酶发光从480 nm红移到521 nm，而目前红色萤火虫荧光素酶的发光可以达到620 nm[9]. Mofford等人[11]开发了氨基荧光素使红色萤火虫荧光素酶的发光光谱延伸到近红外光谱区，这种底物的特异性也优于传统的荧光素. Promega公司开发了新的19 kd NanoLuc荧光素酶和底物furimazine，其发光效率可达到传统海肾荧光素酶和红色荧光素酶的150倍[12]. 随着不同特性荧光素酶报告基因和底物的不断开发，以及发光效率和成像分辨率的不断提高，生物发光成像在活体影像学上的应用也将越来越广阔.

2.2 MRI报告基因

磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)是另一类非侵袭性软组织检测的基本方法，MRI报告基因成像的出现使活体深层组织评估细胞存活、迁移和分化成为可能[13]. 干细胞通过转基因，在细胞内表达可以被磁共振检测的信号蛋白(如铁蛋白等)，或者在细胞内表达与外源MRI探针进行反应的蛋白，以增加MRI信号，从而实现对干细胞的活体示踪. 相比于光学成像，MRI具有很高的组织穿透深度和分辨率，同时又可以获得解剖和生理信息. 常见的MRI报告基因主要有以下3种：(1) 过表达细胞内铁调控因子，如转铁蛋白受体和铁蛋白. 增加胞内铁含量，从而缩短T_2驰豫时间，使得在T_2加权成像中能检测该报告基因的表达情况[14]. Naumova等人[15]通过MRI技术

探测过表达铁蛋白的干细胞发现铁蛋白的过表达能够缩短25%的T_2弛豫时间; (2) 通过转基因细胞表达*LacZ*基因, 并通过β-gal基质类似物激活反应产生MRI可检测到的对比图像[16]; (3) 利用化学交换饱和转移过程的(chemical exchange saturation transfer, CEST)报告基因, CEST是在可交换质子共振频率中利用饱和脉冲射频(radiofrequency, RF)使饱和质子磁化, 从而创造一种化学物质交换, 选择性的产生CEST对比图像. Gilad等人[17]设计了富含赖氨酸蛋白(lysine rich-protein, LRP)受体, 这种基因工程设计的内生造影剂通过化学分子与水分子交换质子产生磁共振信号. 然而, MRI报告基因成像也存在一些缺陷, 比如不确定在细胞死亡后铁蛋白复合物的降解速度和MRI信号的持续时间, 同时活体检测的灵敏度也较低. 所以, 在评估细胞死活的过程中仍存在一定的不确定性.

2.3 放射性核素报告基因

另一种常用的报告基因成像技术是放射性核素显像, 包括正电子发射断层成像术(positron emission tomography, PET)与单光子发射计算机断层成像术(single photon emission-computed tomography, SPECT). 由于该技术具有高灵敏度、高穿透深度和可定量等优点, 而被广泛应用于大动物以及临床干细胞示踪研究. Kraitchman等人[18]利用SPECT对^{111}In oxine标记的间充质干细胞在狗心肌梗塞部位的迁移和累积过程进行了高分辨示踪. Kang等人[19]则利用PET对^{18}F-FDG标记的造血干细胞在心肌梗塞病人体内的迁移进行了临床示踪研究. 而放射性核素报告基因成像的原理是将细胞通过基因工程改造表达放射性探针的受体或转运体, 以促进靶细胞对放射性探针的摄取与聚集, 可以利用PET或SPECT探测具有生物发射光子活性的示踪剂(^{18}F等), 从而实现对细胞的活体监测[20~23]. 常用的PET/SPECT报告基因又可以归纳为以下3种: (1) 基于受体的报告基因成像系统, 如靶向多巴胺受体(dopamine receptor, hD2R)能够和^{18}F标记的受体探针结合, 可用于干细胞在脑部的示踪[21]; (2) 基于酶的报告基因成像系统, 如最常用的单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase type 1, HSV1-tk)等. 胸苷激酶(thymidine kinase, TK)通过磷酸化放射性核素基质使细胞表面带上负电荷, 防止放射性标记物脱离细胞. 利用这种原理HSV1-tk已经被用于示踪肿瘤特异性的淋巴细胞、活化的T细胞、骨髓间充质干细胞和人胚胎干细胞等[4,22,23]; (3) 基于转运体的报告基因成像系统, 有些转运蛋白能够表达在细胞膜上, 并能特异性结合放射性探针, 如钠/碘转运体(NIS)能够与放射性碘化物^{124}I结合, 因此, 使用PET成像可以观察到钠/碘转运体报告基因(sodium-iodine symporter, NIS)的表达情况. Higuchi等人[20]利用NIS报告基因对心肌内注射移植的人内皮祖细胞(human endothelial progenitor cells, HEPCs)进行PET成像, 通过^{124}I-PET观察到活性HEPCs信号逐渐下降直到移植后第7天完全消失. 放射性核素报告基因成像技术也存在一些缺陷. 首先, 连续注射放射性核素到生物体, 会对生物体产生潜在的放射性损害. 此外, 当前大多数能用的放射性示踪剂的半衰期较短, 限制了该成像方法只能作为短期急性生物分布成像, 在干细胞长期的死活示踪上仍有一定的局限.

3 干细胞存活示踪的外源标记技术

虽然报告基因成像能够将标记信息传递给子代细胞, 能够较好地示踪干细胞在体内的存活、增殖和分化. 但是报告基因成像无法指示细胞的死亡, 且都存在一定的转基因风险, 无法在临床上使用. 相比于报告基因成像, 外源标记方法操作更加简单, 只需要在细胞移植前用探针标记. 而得益于近年来纳米技术的迅速发展, 大量新型的干细胞活体示踪外源标记探针被开发出来, 大大提高了活体示踪的灵敏度和时空分辨率, 且有部分已进入临床前研究[3,24,25]. 然而大多数的外源标记探针在细胞死亡后其信号仍然持续存在, 因此无法区分细胞的生存状态. 近年来, 根据细胞活性和死亡状态的不同特性进行巧妙设计, 发展出了可以指示细胞死亡或活性的非报告基因示踪技术. 下面系统介绍目前可用于干细胞死活示踪的外源标记示踪策略.

3.1 pH响应的干细胞存活MRI成像技术

由于细胞死亡后会引起局部微环境pH下降, 因此建立响应pH变化的成像技术就可以间接指示移植细胞的死亡情况. Chan等人[26]将精氨酸脂质体、细胞以及藻酸盐混合, 通过微型注射泵获得单层带电荷的藻酸盐微球, 建立一个微环境pH响应的细胞活性示踪平台(图3(a)). 微球中的细胞死亡会引起微球中微环境pH下降, 引起微球中的L-精氨酸的质子交换

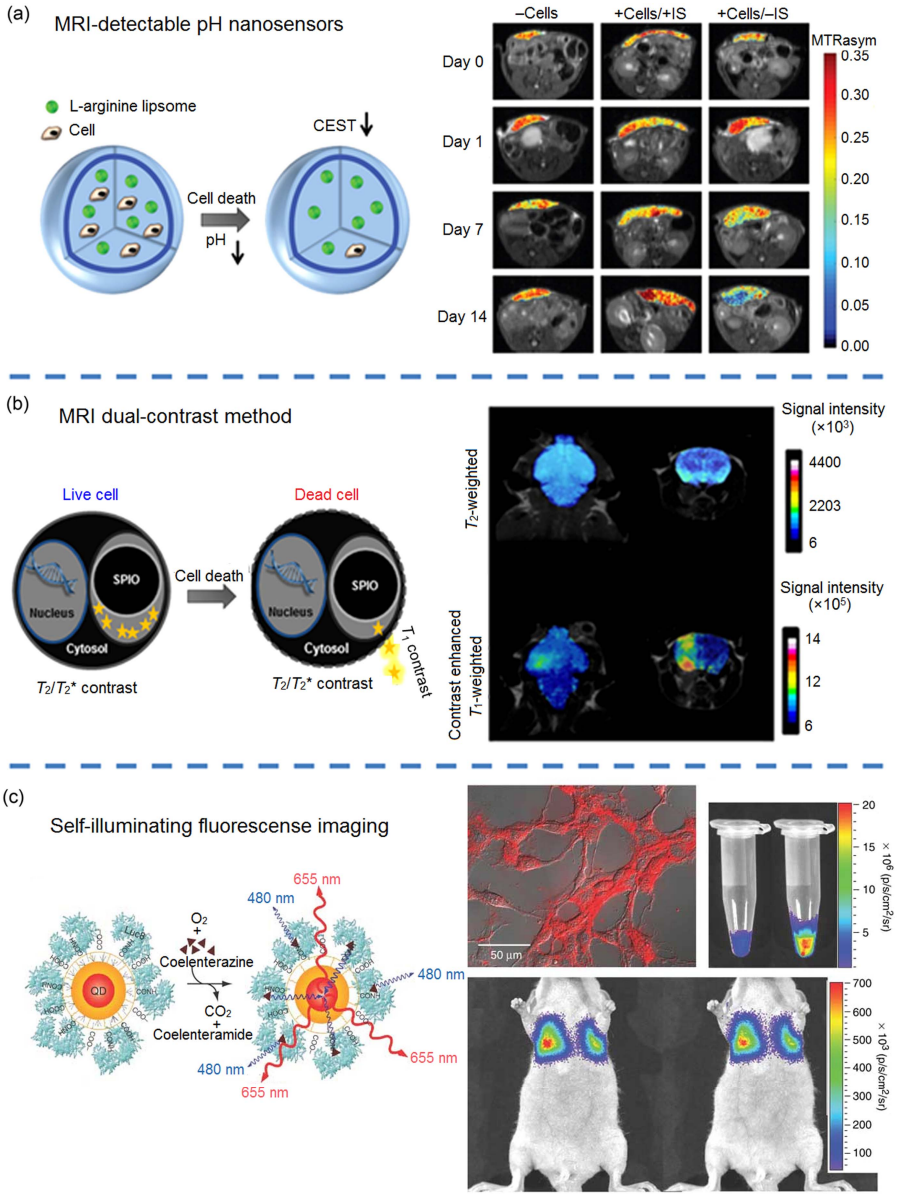


图 3 干细胞存活示踪的外源标记策略. (a) pH响应的干细胞存活MRI成像示踪技术[26]; (b) 双造影剂标记示踪干细胞死活的MRI成像技术[27]; (c) 示踪干细胞死活的荧光成像方法[30]

Figure 3 Exogenous labeling strategies for tracking cell viability. (a) MRI-detectable pH nanosensors for *in vivo* tracking cell viability[26]; (b) MRI dual-contrast method for *in vivo* tracking cell viability[27]; (c) fluorescense imaging method for *in vivo* tracking cell viability[30]

率下降, 减少化学交换转移(CEST)对比度, 从而可以利用MRI成像系统实现对移植细胞的活性检测. 这种纳米传感器的优势在于能够将移植细胞的生存信号与高分辨解剖学成像信息结合起来, 同时该纳米传感器所用材料均通过临床使用认证, 具有良好的临床转化潜能. 然而, 这种pH响应的MRI成像平台只能指示移植后细胞的死亡, 并不能很好地表征移植后细胞的存活以及增殖过程. 同时在活体使用时很多不确定因素也可能引起*L*-精氨酸的质子交换率下降, 因此可能存在一定的假信号.

3.2 双造影剂标记示踪干细胞死活的MRI成像技术

另一种外源标记示踪干细胞死活的策略是通过T_2型的超顺磁氧化铁纳米粒子(superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs)造影剂和T_1型的钆

喷酸葡胺(gadolinium-based chelates, GdDTPA)造影剂双标记干细胞, 并通过MRI成像来监测干细胞的迁移和存活[27]. 其成像原理是依据活细胞内同时存在2种探针会产生更为明显的阴性MRI对比信息(T_2/T_2*), 这个信号可以用于追踪细胞在活体的分布和迁移. 而细胞死亡后GdDTPA造影剂会快速扩散, 因此会在死细胞附近产生一个扩散的阳性T_1 MRI对比信号, 这个信号就可以用来表征细胞死亡情况(图3(b)). 因此, 利用这种方法就可以在活体中监测干细胞的死活状态. 但是这种方法的使用也存在一些弊端: 首先, GdDTPA会在细胞死亡后迅速被释放降解, 因此准确的成像时间点才有助于捕获到精确的信息; 其次, 这种方法更适合于探测急性细胞死亡过程; 最后, 这种方法不能很好区分细胞凋亡和细胞坏死也无法指示细胞后续的存活和增殖情况.

3.3 干细胞死活示踪的光学成像技术

基于外源标记的光学成像技术一直是活体干细胞示踪的最佳方法之一. 其标记成像原理是通过简单的共孵育实现光学荧光探针对干细胞的标记, 将标记细胞移植到活体后经过一定波长的激发光激发并且由高灵敏度的CCD捕获发射光子, 从而实现对干细胞的示踪. 目前常用的光学探针有荧光量子点和上转换纳米探针等[28,29]. 然而, 由于此类荧光探针需要外源激发光的刺激, 同时也不能响应干细胞在活体的死活状态. 因此, 如何利用非转基因方法建立可对干细胞活性进行响应的光学影像示踪技术是目前的一大难点. 目前, 有研究者将外源表达纯化的荧光素酶与荧光探针进行偶联, 利用生物发光的自发冷光作为激发光, 通过生物发光共振能量转移(bioluminescence resonance energy transfer, BRET)方式使得荧光探针发射光信号. 这种成像技术既可以利用荧光素酶特异指示细胞活性的特性和高检测灵敏度, 又能利用特殊荧光探针的优异光学性质克服荧光素酶光信号的缺点, 因此是一种有效指示细胞活性的光学成像技术. So等人[30]将荧光素酶与不同发射波长的荧光量子点进行偶合制备了一系列发射光从红光到近红外光的自发光量子点. Xiong等人[31]将荧光素酶与富载有NIR775荧光探针的多聚物纳米颗粒进行耦合, 成功制备了一种自发光荧光纳米探针. 为进一步提高自发光量子点的发射波长以提高成像的穿透深度和空间分辨率, Ma等人[32]以荧光素酶为模板通过生物矿化合成Luc8-PbS近红外量子点, 得到了发射波长在800~1050 nm的自发光近红外量子点. 将这类探针通过电穿孔或显微注射的方法标记细胞, 移植活体后, 注射荧光素底物, 并利用荧光素酶氧化底物产生的光激发量子点, 发射具有更高组织穿透能力的近红外荧光, 就能用生物发光成像系统对干细胞进行活体示踪. 这种成像技术无需对细胞进行基因改造, 仅利用外源探针标记就可以实现对细胞活性的成像示踪, 目前已成功应用于C6胶质瘤细胞的标记和活体示踪[30](图3(c)). 这种成像方式虽然兼具生物发光成像和荧光量子点成像的优点, 但也存在一些缺陷. 如需要进一步提高这种复合探针的荧光量子产率以获得更高的检测灵敏度. 此外, 目前这种复合探针大多采用只需要氧气和底物参与发光的海肾荧光素酶, 若能采用需要ATP参与的萤火虫荧光素酶将更能精确指示细胞的生存状态.

4 干细胞存活示踪的多模态成像技术

干细胞死活示踪的目的在于了解干细胞进入体内后的存活情况以指导提高干细胞存活率的干细胞移植技术的开发. 因此, 干细胞死活示踪技术不仅要了解移植干细胞在何时何地存活和增殖, 也需要了解干细胞何时何地死亡, 从而帮助人们了解决定移植干细胞存活的关键因素. 基于报告基因的成像技术往往只能提供干细胞活性和增殖等信息, 而外源标记方法只能提供细胞分布或死亡信息. 因此, 结合报告基因成像技术和外源标记成像技术的优势, 发展多模态成像技术就可能对移植干细胞的存活和死亡过程进行同时示踪. 目前用于联合示踪干细胞死活的策略主要包括利用基于报告基因的生物发光成像或放射性核素成像技术联合基于外源标记的近红外荧光成像、MRI成像或放射性核素成像等[3~5,21](图4).

4.1 PET结合MRI

基于报告基因的PET成像技术具有高灵敏和细胞活性定量分析特性, 而以超顺磁纳米粒子为造影剂的MRI技术具有高分辨成像特性同时还能提供组织结构信息. 因此, 结合2种成像技术, 可以利用PET成像对移植细胞的活性和功能进行定量分析, 同时利用MRI成像对移植的所有细胞进行精确定位, 就能对移植细胞的死活情况进行同时分析. Higuchi等人[20]对人内皮祖细胞进行碘钠转运体基因和氧化

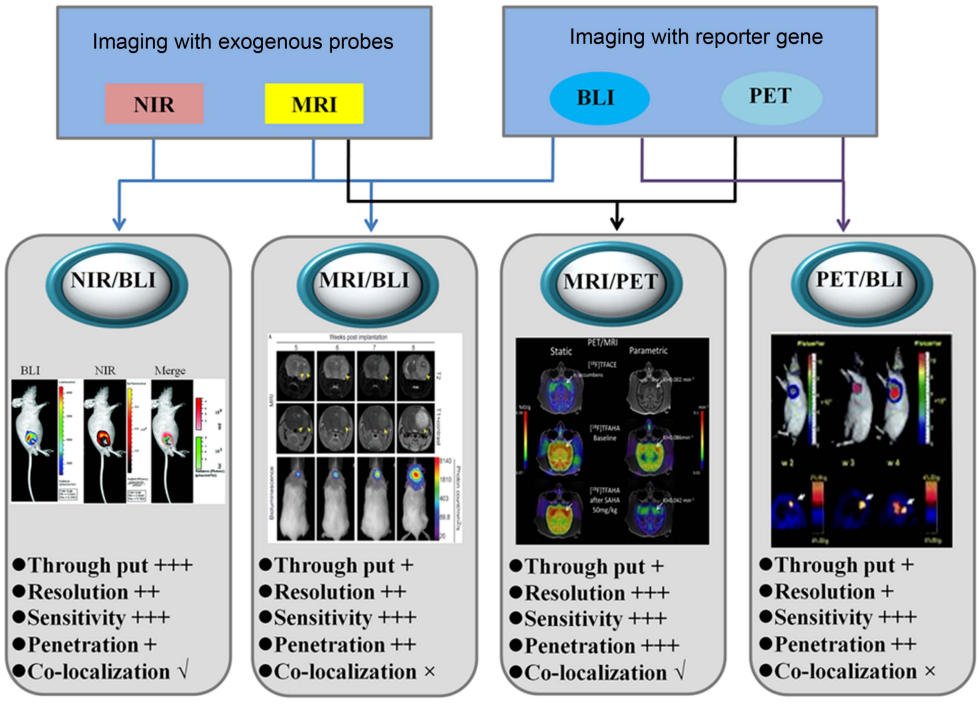


图 4 干细胞存活示踪的多模态成像技术. 多模态成像技术可以结合报告基因成像技术和外源标记成像技术的优势. 当前较为成熟的多模态技术包括：PET结合BLI[23]、NIR结合BLI[44]、MRI结合BLI[45]和MRI结合PET[34]

Figure 4 Multimodel imaging methods for cell viability tracking. Multimodel imaging methods that combine the advangtages of the reporter-gene-based techniques and exogenous labeling methods have been developed, such as the combined PET/BLI[23], NIR/BLI[44], MRI/BLI[45] and MRI/PET methods[34]

铁纳米探针标记, 并运用PET和MRI对植入大鼠心脏的细胞进行了定位和存活分析. 目前, 通过2种成像设备的整合和合理的计算分析已经能够对PET和MRI成像图进行共定位分析, 这也使得该成像方法更为精确[33,34]. 而得益于PET和MRI联合成像技术的优异性能, 相应的商业化PET/MRI小动物成像设备和临床成像设备也相继问世, 并被认为是目前早期疾病诊断的最佳成像平台之一. 然而, PET/MRI设备价格昂贵难以普及, 同时如何将PET定量分析数据与MRI定量数据进行比较分析以同时获得细胞的存活和死亡定量化信息也还有待发展, 这些因素也在一定程度上限制了这种方法的普及应用.

4.2 BLI结合MRI成像技术

相对于基于报告基因的PET成像技术, 更加方便快捷的BLI成像技术的应用更加普及. 因此结合BLI和MRI的联合示踪技术也是活体中常用细胞存活检测方法. 在该方法中生物发光成像通过荧光素酶基因的表达提供定量的细胞存活信息, 而高组织穿透深度和高分辨的MRI成像则提供精确的细胞定位和组织结构信息. Wu等人[35]运用磁性纳米颗粒和荧光素酶报告基因共同标记间充质干细胞(MSCs), 示踪尾静脉移植干细胞在急性肝损伤小鼠中的迁移和存活情况. Li等人[36]用萤火虫荧光素酶和超顺磁氧化铁共同标记人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)和人胚胎干细胞衍生的内皮细胞(human embryonic stem cell-derived endothelial cells, hESC-ECs), 发现移植小鼠后肢的2种细胞的MRI信号都能够持续4周, 而分化的细胞在4周内生物荧光信号会不断减少, 未分化的细胞却出现信号增强的现象. 这些研究表明BLI和MRI的联合成像可以在活体中对移植干细胞进行定位和死活分析. 但是这种联合示踪方法也存在一些缺陷, 比如由于BLI和MRI成像原理和成像设备的巨大差异, 无法同PET/MRI成像方法一样进行精确共定位分析, 使得其无法对死细胞和活细胞进行精确的区分成像.

4.3 PET结合BLI技术

BLI结合PET成像技术也是目前常用的联合示踪干细胞存活的方法. 这种成像方法目前主要运用BLI

报告基因和PET报告基因对干细胞的联合标记来实现. Cao等人[23]用慢病毒载体构建三标记的报告基因系统使ES细胞稳定表达红色荧光蛋白(RFP)、荧光素酶(fluc)和胸苷激酶(tk), 并用于心脏移植干细胞迁移、存活分析. 在该成像系统中荧光素酶报告基因可以提供细胞在小动物全身迁移、存活和增殖情况, 而PET报告基因*tk*则可以提供细胞在深部组织的存活和增殖信息并与BLI信号进行相互验证. Wolfs等人[37]利用碘钠转运体和萤火虫荧光素酶作为PET和BLI成像的报告基因对尾静脉移植和皮下移植的间充质干细胞的迁移和存活进行示踪. 这个成像系统不仅可以进行PET和BLI成像, 同时也能利用放射性核素进行切伦科夫光学成像(Cerenkov luminescence imaging, CLI). PET和BLI技术的联合示踪优势在于能够整合PET成像的层析信息和生物发光成像的高灵敏和高通量特性. 然而, 类似于BLI/MRI成像, 由于成像原理的巨大差异, PET/BLI成像也无法对2种成像图进行共定位分析.

4.4 近红外NIR结合BLI技术

目前能够与BLI成像进行共定位分析的是荧光成像技术. 生物发光成像和荧光成像采用相似的图像采集和定量方法, 可在目前主流的小动物成像设备和软件上同时实现. 因此, 生物发光成像结合荧光成像是较为理想的联合成像方法[38,39]. 然而, 目前的荧光成像的荧光波长大多集中在可见光到近红外一区波段(400~950 nm). 活体组织对该波段的光具有很强的吸收和散射, 再加上生物组织的自发荧光, 使得目前的荧光成像技术的组织穿透深度, 成像灵敏度和空间分辨率都较低. 这也大大限制了生物发光和荧光联合成像的应用. 最近的研究表明, 活体组织对近红外二区荧光(NIR-II, 1.0~1.4 μm)的吸收和散射都很低, 能大大提高荧光成像的组织穿透深度和空间分辨率[40]. 因此, 本课题组[40,41]率先发展了一种发射波长在900~1300 nm可调的近红外二区Ag_2S量子点, 并以其为探针建立了一种高组织穿透深度(>1.1 cm)和高时空分辨(50 ms和25 μm)的近红外二区荧光成像平台. 本课题组[42,43]利用该成像平台发展了一种高组织穿透深度、高时空分辨的干细胞活体示踪技术, 实现了对干细胞移植治疗小鼠急性肝损伤和皮肤再生过程的高分辨成像示踪. 这种高分辨的近红外二区荧光成像方法若能与以红色荧光素酶为报告基因的生物发光成像联合使用, 将有望为干细胞死活示踪提供一种全新的高时空分辨、方便快捷和高通量的成像平台. 目前这种成像平台的主要限制在于没有成熟的近红外二区荧光和生物发光联合成像设备. 此外, 由于光学成像自身特性的限制, 这种成像平台将更适合于小动物活体成像.

5 总结与展望

理想的干细胞死活示踪技术有助于研究者更好地制定最佳的干细胞移植策略, 提高细胞的存活和迁移效率, 并且更好地评估干细胞疗法的有效性和安全性[3,24,28,29]. 当前的干细胞死活示踪研究已经建立了多种成像技术可以让人们在活体水平上监测移植干细胞的死亡和存活过程. 各种成像技术均有各自的优缺点, 研究者可以依据不同活体影像技术的检测灵敏度、成像的时空分辨率、成像深度、安全性、标记方法以及研究目的和对象等因素选择合适的成像技术. 如生物发光成像和荧光成像等方便快捷的光学成像方法是小动物活体研究的理想工具. 而针对猴子等大动物的研究, 具有高组织穿透深度和三维成像功能的MRI和PET是理想的选择, 同时他们也是脑部等深层组织成像的理想方法. 此外, 若需要对干细胞在活体的功能进行精细分析, 报告基因的方法是目前最为理想的工具. 而若想在临床上进行研究, 安全的外源标记方法是目前的唯一选择. 因此, 针对目前各种成像技术的不足和缺陷, 也需要进一步改进现有的技术以及发展新的成像技术, 以满足对不同干细胞死活示踪研究的需求. 如建立一种方便快捷、高通量及可定量的干细胞死活示踪技术以满足在小动物上快速、高通量筛选有效的干细胞移植策略是目前的迫切需求之一, 其中发展更高组织穿透深度和空间分辨率的NIR-II/BLI联合成像技术及定量方法将是目前解决该问题的一个有效途径. 此外, 建立一种非报告基因的安全方法, 可在临床上监测移植干细胞的存活并评价干细胞疗效的方法是目前更为迫切的需求, 同时也更具挑战性. 构建对细胞死亡和活性进行响应的MRI和PET探针, 并结合高灵敏和高组织穿透深度的PET/MRI联合成像技术是目前最有潜力解决该问题的方法. 因此, 更为理想的干细胞死活示踪技术的发展, 必定能帮助人们更全面了解移植干细胞在活体内的迁移、存活和功能, 进而加速干细胞疗法的临床转化应用.

参考文献

1 Bianco P, Robey P G. Stem cells in tissue engineering. Nature, 2001, 414: 118–121
2 Frenette P S, Pinho S, Lucas D, et al. Mesenchymal stem cell: Keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. Annu Rev Immunol, 2013, 31: 285–316
3 Naumova A V, Modo M, Moore A, et al. Clinical imaging in regenerative medicine. Nat Biotechnol, 2014, 32: 804–818
4 Srivastava A K, Bulte J W M. Seeing stem cells at work i*n vivo*. Stem Cell Rev, 2013, 10: 127–144
5 Hwang do W, Lee D S. Optical imaging for stem cell differentiation to neuronal lineage. Nucl Med Mol Imaging, 2012, 46: 1–9
6 Rabinovich B A, Ye Y, Etto T, et al. Visualizing fewer than 10 mouse T cells with an enhanced firefly luciferase in immunocompetent mouse models of cancer. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 14342–14346
7 Kidd S, Spaeth E, Dembinski J L, et al. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using *in vivo* bioluminescent imaging. Stem Cells, 2009, 27: 2614–2623
8 Vilalta M, Jorgensen C, Degano I R, et al. Dual luciferase labelling for non-invasive bioluminescence imaging of mesenchymal stromal cell chondrogenic differentiation in demineralized bone matrix scaffolds. Biomaterials, 2009, 30: 4986–4995
9 Liang Y, Walczak P, Bulte J W. Comparison of red-shifted firefly luciferase Ppy RE9 and conventional Luc2 as bioluminescence imaging reporter genes for *in vivo* imaging of stem cells. J Biomed Opt, 2012, 17: 016004
10 Loening A M, Dragulescu-Andrasi A, Gambhir S S. A red-shifted Renilla luciferase for transient reporter-gene expression. Nat Methods, 2010, 7: 5–6
11 Mofford D M, Reddy G R, Miller S C. Aminoluciferins extend firefly luciferase bioluminescence into the near-infrared and can be preferred substrates over D-luciferin. J Am Chem Soc, 2014, 136: 13277–13282
12 Hall M P, Unch J, Binkowski B F, et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. ACS Chem Biol, 2012, 7: 1848–1857
13 Vandsburger M H, Radoul M, Cohen B, et al. MRI reporter genes: Applications for imaging of cell survival, proliferation, migration and differentiation. NMR Biomed, 2013, 26: 872–884
14 Cohen B, Dafni H, Meir G, et al. Ferritin as an endogenous MRI reporter for noninvasive imaging of gene expression in C6 glioma tumors. Neoplasia, 2005, 7: 109–117
15 Naumova A V, Reinecke H, Yarnykh V, et al. Ferritin overexpression for noninvasive magnetic resonance imaging-based tracking of stem cells transplanted into the heart. Mol Imaging, 2010, 9: 201–210
16 Louie A Y, Hüber M M, Ahrens E T, et al. *In vivo* visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. Nat Biotechnol, 2000, 18: 321–325
17 Gilad A A, Mcmahon M T, Walczak P, et al. Artificial reporter gene providing MRI contrast based on proton exchange. Nat Biotechnol, 2007, 25: 217–219
18 Kraitchman D L, Tatsumi M, Gilson W D, et al. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. Circulation, 2005, 112: 1451–1461
19 Kang W J, Kang H J, Kim H S, et al. Tissue distribution of ^{18}F-FDG-Labeled peripheral hematopoietic stem cells. J Nucl Med, 2006, 47: 1295–1301
20 Higuchi T, Anton M, Dumler K, et al. Combined reporter gene PET and iron oxide MRI for monitoring survival and localization of transplanted cells in the rat heart. J Nucl Med, 2009, 50: 1088–1094
21 Jiang H, Cheng Z, Tian M, et al. *In vivo* imaging of embryonic stem cell therapy. Eur J Nucl Med Mol I, 2011, 38: 774–784
22 Herrlinger U, Jacobs A, Aghi M, et al. HSV-1 vectors for gene therapy of experimental CNS tumors. Methods Mol Med, 2000, 35: 287–312
23 Cao F, Lin S, Xie X, et al. *In vivo* visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. Circulation, 2006, 113: 1005–1014
24 Nguyen P K, Lan F, Wu J C, et al. Imaging: Guiding the clinical translation of cardiac stem cell therapy. Circ Res, 2011, 109: 962–979
25 Berthiaume F, Maguire T J, Yarmush M L. Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. Annu Rev Chem Biomol Eng, 2011, 2: 403–430
26 Chan K W, Liu G, Arifin D R, et al. MRI-detectable pH nanosensors incorporated into hydrogels for *in vivo* sensing of transplanted-cell viability. Nat Mater, 2013, 12: 268–275
27 Ngen E J, Wang L, Kato Y, et al. Imaging transplanted stem cells in real time using an MRI dual-contrast method. Sci Rep, 2015, 5: 13628

28 Liang C, Wang C, Liu Z. Stem cell labeling and tracking with nanoparticles. Part Part Syst Charact, 2013, 30: 1006–1017

29 Wang Y, Xu C, Ow H. Commercial nanoparticles for stem cell labeling and tracking. Theranostics, 2013, 3: 544–560

30 So M K, Xu C, Rao J, et al. Self-illuminating quantum dot conjugates for *in vivo* imaging. Nat Biotechnol, 2006, 4: 339–343

31 Xiong L, Shuhendler A J, Rao J. Self-luminescing BRET-FRET near-infrared dots for *in vivo* lymph-node mapping and tumour imaging. Nat Commun, 2012, 3: 1193

32 Ma N, Marshall A F, Rao J. Near-infrared light emitting luciferase via biomineralization. J Am Chem Soc, 2010, 132: 6884–6885

33 Pichler B J, Kolb A, Schlemmer H P, et al. PET/MRI: Paving the way for the next generation of clinical multimodality imaging applications. J Nucl Med, 2010, 51: 333–336

34 Yeh H H, Tian M, Hinz R, et al. Imaging epigenetic regulation by histone deacetylases in the brain using PET/MRI with ^{18}F-FAHA. Neuroimage, 2013, 64: 630–639

35 Wu C, Li J, Li D, et al. Polymeric vector-mediated gene transfection of MSCs for dual bioluminescent and MRI tracking *in vivo*. Biomaterials, 2014, 35: 8249–8260

36 Li Z, Suzuki Y, Connolly A J, et al. Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects. Stem Cells, 2008, 26: 864–873

37 Wolfs E, Holvoet B, Struys T, 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: e94833

38 Sato K, Nagaya T, Kobayashi H, et al. Near infrared photoimmunotherapy for lung metastases. Cancer Lett, 2015, 365: 112–121

39 Edwards W B, Akers W J, Xu B, et al. Multimodal imaging of integrin receptor-positive tumors by bioluminescence, fluorescence, gamma scintigraphy, and single-photon emission computed tomography using a cyclic RGD peptide labeled with a near-infrared fluorescent dye and a radionuclide. Mol Imaging, 2009, 8: 101–110

40 Li C, Zhang Y, Wang M, et al. *In vivo* real-time visualization of tissue blood flow and angiogenesis using Ag_2S quantum dots in the NIR-II window. Biomaterials, 2014, 35: 393–400

41 Du Y, Xu B, Fu T, et al. Near-infrared photoluminescent Ag_2S quantum dots from a single source precursor. J Am Chem Soc, 2010, 132: 1470–1471

42 Chen G, Tian F, Wang Q, et al. Tracking of transplanted human mesenchymal stem cells in living mice using near-infrared Ag_2S quantum dots. Adv Funct Mater, 2014, 24: 2481–2488

43 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. Biomaterials, 2015, 53: 265–273

44 Yuan C, Wang L, An Y, et al. Luciferase gene-loaded CS-Qdots as self-illuminating probes for specific hepatoma imaging. RSC Adv, 2015, 5: 29048–29057

45 Jarzabek M A, Huszthy P C, Skaftnesmo K O, et al. *In vivo* bioluminescence imaging validation of a human biopsy-derived orthotopic mouse model of glioblastoma multiforme. Mol Imaging, 2013, 12: 161–172

Progress of tracking the viability of transplanted stem cells *in vivo*

LIN SuYing[1,2], CHEN GuangCun[2], HUANG DeHua[1,2], MENG Chun[1] & WANG QiangBin[2]

[1] *College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350116, China;*
[2] *Key Laboratory of Nano-Bio Interface, Division of Nanobiomedicine and i–Lab, Suzhou Institute of Nano-Tech and Nano-Bionics, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215123, China*

In the last decades, stem cell-based regenerative medicine has attracted intense attention and extraordinary expectation due to its potentials in the treatment of numerous major diseases, such as hepatic, cardiac, pulmonary, renal and neurological diseases. Clearly knowing the viability, distribution and differentiation of the transplanted stem cells *in vivo* is a prerequisite for better understanding the role of stem cells playing in the therapeutic process, in which the survival report of the transplanted stem cells *in vivo* is particularly crucial in determining the success of stem cell-based regenerative medicine. Therefore, the development of non-invasive imaging methods that can *in situ* monitor the viability of the transplanted stem cells is urgently needed.

In this review, we summarize the recent progress in tracking the viability of the transplanted stem cells *in vivo*, including reporter-gene based methods, exogenous contrast label-based methods and multimodel imaging methods. The reporter-gene based methods rely on functional proteins that produce only in live cells, thus the imaging signals are specifically coresponding to the viability of cells. Reporter gene-based imagings, including the luciferase-based bioluminescence imaging (BLI), ferritin-based magnetic resonance imaging (MRI) and thymidine kinase-based positron emission computed tomography (PET) have been the most robust technique for short- and long-term monitoring cell viability *in vivo*. Herein, we explain basic principles of these reporter gene-based methods, and describe current examples and future prospects of these methods. In contrast to reporter-gene based methods, methods using exogenous contrast labels such as quantum dots and superparamgnetic iron oxides give a strong signal in cell tracking, but they cannot assess cell survival or death for the agents continue to display signals when the transplanted stem cells are dying. More recently, new nanotechnologies using exogenous contrast labels were developed to monitor cell viability *in vivo*, such as the pH-nanosensor-based MRI method, the dual-contrast MRI method and the fluorescence imaging method using self-illuminating nano-probes. In this review, the imaging principles underlying these techniques are explained, and the recent examples of exogenous contrast label-based methods are described. Multimodel imaging that combines the reporter-gene-based technique and exogenous labeling method, such as the combined MRI/PET method, PET/BLI method, MRI/BLI method, or fluorescence imaging/BLI method, has been proposed to *in vivo* monitor both cell death and cell viability.

This review summarizes the recent development of multimodel imaging methods, emphasizes the promise of the combined NIR-II fluorescence imaging/BLI method and MRI/PET method for *in vivo* tracking cell viability, and discusses the current challenges of multimodel imaging. In conclusion, this review provides an overview of the current imaging methodologies for cell viability tracking, and discusses the current challenges and further prospects of cell viability imaging methods.

transplanted stem cell, stem cell viability, *in vivo* tracking, imaging methods

doi: 10.1360/N972015-01404