活细胞药物体内可视化研究进展

魏奶杰,王广基*,张经纬**

(中国药科大学江苏省药物代谢动力学重点实验室,南京 210009)

摘 要 活细胞药物的研发以及治疗的成功实施均需要充分阐明移植后的细胞命运,这对活细胞药物的有效性和安全性至关重要。为了解决这一问题,细胞成像技术进入人们视线,利用可视化技术对活细胞药物进行无创示踪,可以了解活细胞药物在体内的分布、归巢、活性等,有助于确定最佳的移植细胞数量、优化给药方案、提高移植效率、增强作用的靶向性、降低潜在的靶外积累风险。本文从放射性核素成像技术、磁共振成像技术、磁颗粒成像技术、计算机断层扫描成像技术、荧光成像技术以及多模态成像技术综述了活细胞药物体内无创可视化示踪的研究进展,旨在指导应用合适的造影剂和示踪技术,获得活细胞药物在体内的生物学行为,为活细胞药物研发及其移植治疗提供更加合理的科学依据。

关键词 活细胞药物;体内成像;CAR-T细胞;间充质干细胞;进展

中图分类号 R91 **文献标志码** A **文章编号** 1000 –5048(2022)02 –0156 –08

doi:10. 11665/j. issn. 1000 –5048. 20220204

引用本文 魏奶杰,王广基,张经纬.活细胞药物体内可视化研究进展[J].中国药科大学学报,2022,53(2):156 – 163.

Cite this article as: WEI Naijie,WANG Guangji,ZHANG Jingwei. Advances in research on visualization of living cell drugs *in vivo*[J].*J China Pharm Univ*,2022,53(2):156 – 163.

Advances in research on visualization of living cell drugs *in vivo*

WEI Naijie, WANG Guangji*, ZHANG Jingwei**

Key Labratory Jiangsu Provincial of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The development of living cell drugs and their successful application in clinical treatments require full clarification of the fate of cells after transplantation, which is critical to the safety and efficacy of living cell drugs. In order to solve this problem, cell imaging technology has come into our sight, and the use of visualization technology for non-invasive tracing of living cell drugs could reveal the distribution, homing and activity of living cell drugs in the body, which helps to determine the best number of transplanted cells, optimize the administration scheme, improve the transplantation efficiency, enhance the targeting of transplanted cells, and reduce the potential off-target accumulation risk. This paper summarizes the research advances of non-invasive visual tracing *in vivo* for living cell drugs from the perspectives of radionuclide imaging, magnetic resonance imaging, magnetic particle imaging, computed tomography imaging, fluorescence imaging and multimodal imaging. The aim is to obtain the biological behavior of living cell drugs *in vivo* with the application of appropriate contrast agent and tracing technology, and provide a more reasonable scientific basis for the research and development of living cell drugs and their transplantation therapy.

Key words living cell drug; *in vivo* imaging; CAR-T cell; mesenchymal stem cells; advances

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82173887, 82073928)

收稿日期 2021-12-03 **通信作者** *Tel:025-83271128 E-mail:guangjiwang@hotmail. com
**Tel:025-83271176 E-mail:zhangjw_cnnj@sina. com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 82173887,No. 82073928)

面对重大疾病精准治疗的临床紧迫需求，生物医药行业正在从传统的小分子化学药物时代进入精准靶向生物药/细胞治疗药物的个性化治疗时代。其中，基于活细胞药物的先进细胞疗法被认为是医药治疗领域的新支柱[1]。根据文献报道，截至2021年4月16日，全球共计有2 073种在研的活细胞治疗药物[2]。作为活细胞药物治疗的成功案例之一，靶向CD19的嵌合抗原受体（CAR）工程化T细胞（CAR-T细胞）的临床使用获批及其展现出的令人激动的临床疗效，为肿瘤免疫治疗开启了一个"活细胞药物"的全新时代[3]。而更多的修饰改造的干细胞、免疫细胞、血细胞药物以及活体微生物药物等，正在成为未来的新兴热点。例如，间充质干细胞（mesenchymal stem cell，MSCs）由于能够自我更新、可分化为各种特化细胞类型、具有免疫调节以及向受损组织分泌营养因子和迁移的能力[4]，在治疗脑损伤[5-6]、心肌梗死[7]、肺纤维化[8-9]、系统性红斑狼疮[10-11]、肝纤维化[12]等疾病上具有广阔的应用前景，目前全球范围内已有多个MSCs的临床研究结果发布，并且证实了基于MSCs的细胞疗法具有可行性和有效性。活细胞药物的研发以及治疗的成功实施均需要建立在充分阐明移植后细胞体内动态过程的基础上。然而，移植的活细胞药物在体内的动态过程，如细胞的生物分布、活性、增殖、归巢等，因研究技术和策略发展的羁绊，仍然不清楚。传统的药物吸收、分布、代谢和排泄的研究思路和方法并不完全适用于活细胞药物的药代动力学研究。为了更好的了解活细胞药物在体内的动态过程，无创可视化成像技术进入人们的视线，并且成为一种重要手段。通过对细胞进行探针标记，借助各种成像设备，可视化地监测移植细胞在体内的时间和空间分布，有助于确定最佳的移植细胞数量、优化给药方案、提高移植效率、增强作用的靶向性、降低潜在的靶外积累风险。

理想的活细胞药物体内无创可视化示踪应该具备以下特点：（1）对活细胞药物进行标记并不影响其活性、分化能力、治疗功能等；（2）能够示踪活细胞药物在体内的多个生物学行为，包括活性、迁移、分布、分化等；（3）具备足够长时间的无创可视化监测能力。上述成像要求对医学影像技术提出了挑战。近年来，放射性核素成像（radionuclide imaging，RI）、磁共振成像（magnetic resonance imaging，MRI）、磁颗粒成像（magnetic particle imaging，MPI）、计算机断层扫描成像（computed tomography，CT）、荧光成像（fluorescence imaging，FI）、光声成像（photoacoustic imaging，PAI）等成像技术已经被大量应用于示踪移植的活细胞药物，并成功用于活细胞药物的体内动态过程研究。本文对当前研究中的主要细胞成像示踪技术进行综述，旨在进一步提高活细胞药物体内成像能力，从而为活细胞药物的研发及其移植治疗提供更加科学的理论依据。

1　放射性核素成像技术（RI）

RI技术主要有单光子发射断层成像技术（single photon emission computed tomography，SPECT）和正电子发射断层成像技术（positron emission tomography，PET）[13]。RI技术具有较强的临床相关性、良好的敏感性及可定量性。标记细胞用的^{111}In，^{89}Zr，^{68}Ga等作为FDA批准使用的放射性核素成像造影剂，具有优良的生物相容性和非免疫原性，并且兼具价格低廉、使用方便等优点。利用这些造影剂可在体外直接对活细胞药物进行标记，并通过放射性核素成像示踪其在体内归巢和分布的动态信息[14-16]。Gholamrezanezhad等[17]利用PET成像技术研究了MSCs在肝硬化患者体内的分布变化情况。首先利用^{111}In在体外对MSCs进行标记，然后通过肘正中静脉进行移植，PET成像结果表明，静脉输注后放射性信号首先在肺部显示，然后逐渐转移到肝和脾。但是直接标记的放射性示踪剂的量会随着细胞的增殖而稀释，因此不适用于长期监测活细胞药物。解决这一问题较好的方法是使活细胞药物稳定表达PET/SPECT成像所需的报告基因，活细胞移植后进一步在体连续输入特定的探针，利用报告基因导入的受体与特定探针的相互作用对活细胞药物进行即时成像。Minn等[18]构建了表达前列腺特异性膜抗原（PSMA）的CD19-tPSMA$^{(N9del)}$ T细胞，并使用特异性造影剂[^{18}F]DCFPyL进行在体PET成像研究。利用该成像技术发现外周血和骨髓中的CD19-tPSMA$^{(N9del)}$ CAR-T细胞数量与肿瘤中的数量之间存在明显差异，这一发现提示了临床上进行无创、可重复监测CAR-T细胞分布的必要性。Emami-Shahri等[19]则构建了表达人钠/碘转运体

(hNIS)的CAR-T细胞,在荷瘤鼠中使用$^{99}mTcO4^{-}$放射示踪剂进行放射性核素成像,该研究为CAR-T细胞在体内的高分辨率连续成像提供了无创且快速的方法。虽然采用报告基因-特异性探针这一策略可以有效地避免示踪剂的稀释,但存在改变细胞功能和增加免疫原性的风险。因此,利用内源性抗原与抗体反应的免疫PET技术迅速发展起来,该技术兼具了单抗的高特异性和PET显像的高灵敏度[20]。Simonetta等[21]针对CD19特异性CAR-T细胞的共刺激因子设计了免疫PET成像方法,可以对CD19特异性CAR-T细胞在B细胞淋巴瘤小鼠模型中的激活、扩增和靶向肿瘤浸润进行监测。尽管如此,在核素成像实验中研究人员也发现,单一的核素成像技术无法提供解剖信息,必须与其他解剖成像方法相结合[22],如PET/CT[23]、PET/MRI[24]等。

2 磁共振成像技术(MRI)

MRI技术适用于活细胞药物体内无创纵向监测,它表现出优越的空间分辨率,良好的组织穿透和对比度,并能获取病理生理和解剖信息。近年来,以氧化铁纳米颗粒作为造影剂的MRI在活细胞药物体内可视化领域得到广泛关注。Mathiasen等[25]首次在慢性缺血性心脏病患者中证明,在体使用MRI示踪心肌内注射的氧化铁纳米颗粒标记的MSCs是安全可行的,并且在移植两周后,依然能够在心肌部位检测到MSCs的磁共振信号。类似的,Xie等[26]用氧化铁纳米颗粒标记CAR-T细胞,在不影响细胞生物学特性和杀伤效率情况下,用MRI技术示踪CAR-T细胞在胶质母细胞瘤中的动态浸润和滞留时间,同时证明了CAR-T细胞用于治疗胶质母细胞瘤的早期效果。由于MRI检测细胞的前提是对细胞进行磁共振探针标记,因此在不影响细胞活性的情况下,更高的标记效率和更长的探针驻留时间,可使MRI达到更好的成像效果。Egawa等[27]利用DNA双链杂交原理,将两个短单链DNA oligo $[dT]_{20}$和oligo $[dA]_{20}$分别与神经干细胞(neural stem cells, NSCs)和氧化铁纳米颗粒偶联。修饰后的氧化铁纳米颗粒具有更好的细胞摄取率、更高的标记效率和更强的体内MRI信号,移植到大鼠脑纹状体中的NSCs可以通过MRI进行长达30 d的扫描检测。除了氧化铁纳米粒,(^{19}F)[28-29]、钆[30]、石墨烯氧化物[31]等也可以作为MRI造影剂,用于活细胞药物示踪。Hingorani等[32]在全氟化碳(perfluorocarbon, PFC)纳米乳剂中加入TAT细胞穿透肽,CAR-T对PFC的摄取量增加7倍多,同时提高了^{19}F MRI用于体内成像的灵敏度。但是MRI技术时间分辨率低,无法在短时间内进行连续成像,造成了其使用的局限性。

3 磁颗粒成像技术(MPI)

MPI技术由荷兰飞利浦研究所(Philips Research)于2005年推出,是基于功能和断层影像技术检测磁性纳米颗粒空间分布的示踪方法,MPI信号仅由氧化铁纳米颗粒提供,而不从周围组织中获取,可直接对氧化铁的强磁化进行成像[33]。MPI具有无辐射、高信噪比、零信号衰减以及高灵敏度的特点,因此MPI可成为体内细胞追踪的理想平台。Zheng等[34]使用MPI在12 d的时间内监测了氧化铁纳米颗粒标记的MSCs在大鼠体内的动态分布,标记的MSCs注射后立即截留在肺组织中,随后在1 d内转移到肝脏,其在肝脏中的清除半衰期为4.6 d。动物处死后进一步通过MPI确定了肺、肝、脾和心脏中MSCs的生物分布,验证了MPI可量化MSCs生物分布的能力。同时,Nejadnik等[35]也证明MPI技术可用于氧化铁纳米颗粒标记的MSCs体内示踪。研究发现,MPI提供的信号能够确认移植部位的细胞在第1天和第14天之间存在显著性差异,而MRI技术提供的信号无法区分第1天和第14天的差别,提示MPI定量的灵敏度和准确度显著高于MRI。示踪剂的性质决定MPI的图像质量,球形的氧化铁纳米颗粒是目前最主要的MPI造影剂,但是其标记的细胞在体内的示踪效果远远不能令人满意。因此,开发适用于MPI的高性能磁示踪剂对于提高MPI的灵敏度和分辨率至关重要。Wang等[36]通过将球形氧化铁纳米粒改成立方体氧化铁纳米粒,提高了氧化铁纳米粒的磁成像能力。这种立方氧化铁纳米粒标记的干细胞在体外成像时,通过MPI能够检测到极低浓度的细胞(每微升30个细胞)。即便是在复杂的体内环境下,不论组织深度如何(肺、肝),通过MPI能检测到至少2 500个细胞。此外,由于基于立方体氧化铁纳米颗粒的MPI具有较高的敏感性,因此可以实时揭示MSCs在后肢缺血小

鼠模型中的迁移和分布规律。由此可见,在现有的分子成像模式中,MPI显示出独特的高灵敏度、定量准确性和纵向监测的能力。但值得注意的是,MPI并不能提供解剖学信息。

4　计算机断层扫描成像技术(CT)

CT技术是临床应用最广泛的成像技术之一,具有成本效益高、空间分辨率高、扫描时间短、成像过程简单等优点,这使得CT成为一种用于细胞示踪的重要成像方式。目前研究发现金(Au)纳米粒具有固有的高X射线吸收系数,高生物相容性和无毒性,这些特点使Au纳米粒成为一种具有良好发展前景的CT造影剂[37-38]。Betzer等[39]发现使用Au纳米标记间充质干细胞不仅几乎不影响细胞活性和功能,还能利用CT成像技术对移植进入大脑内的细胞进行长期示踪和成像。Yu等[40]成功开发了一种pH敏感纳米示踪剂CPP-PSD@Au,用于增强体内标记和长期CT成像示踪间充质干细胞。使用该探针,实现了移植MSCs在肺纤维化模型小鼠中的位置、分布和迁移长达35 d的原位可视化。此外,为了解决传统CT技术中造影剂的图像可能被骨组织的高强度所掩盖、难以准确提取双组份成像图像的问题,最新的双能计算机断层扫描DECT技术通过两种不同能量的X射线的照射,可以消除质量密度对图像信号的影响,准确地区分来自各种组织或物质的图像信号。Wan等[41]利用这一技术,实现了干细胞在骨再生过程中长达14 d的示踪。然而,CT图像的对比度取决于组织对X射线衰减的差异,而许多软组织在X射线衰减上的差异极其细微,导致无法区分相邻组织,造成CT成像的敏感性低、软组织图像对比度有限[42]。

5　荧光成像技术(FI)

FI技术最常见的标记方式是直接标记,将荧光材料与活细胞药物进行直接孵育,从而对细胞进行标记示踪。Chen等[43]利用硫化银量子点(Ag_2S QDs)对MSCs进行标记,首次通过FI技术在体动态监测MSCs在趋化因子SDF-1α作用下向皮肤伤口迁移和分布的动态过程。Yang等[44]利用硫化铅量子点(PbS QD,λ_{ex} = 1 300 nm)作为造影剂,不影响MSC增殖、自我更新和分化能力。在冈上肌腱撕裂模型小鼠关节内注射3种不同密度MSCs,并利用FI进行纵向监测。成像结果发现3组MSCs的迁移方向相似,但迁移起始时间、停留时间和细胞在足迹周围的滞留率差异很大。其中,中等密度组在修复阶段停留时间最长,足迹周围细胞滞留率最高,有利于愈合。

与无机量子点相比,基于有机荧光染料的纳米颗粒具有出色的生物相容性和荧光稳定性,从而成为干细胞标记示踪的潜在替代品。吲哚菁绿是一种获得FDA批准的近红外染料,Mazza等[45]利用脂质体将其包载制成高生物相容性、高近红外荧光信号的纳米探针来标记MSCs,并使用IVIS成像系统可对移植入皮下的细胞示踪两周,对移植进入颅内的细胞示踪一周。在近年来发展起来的荧光材料中,聚集诱导发光(aggregation-induced emission,AIE)的特性引起了生物医学领域的广泛关注。Yang等[46]设计了具有33%的较高量子产率的AIE量子点,并在脂肪间充质干细胞(adipose mesenchymal stem cells,ADSCs)中表现出显着的保留能力,在传代72 h后的单个细胞中仍能明显检测到荧光信号。体内研究表明,AIE量子点能够作为一种有效荧光成像造影剂,用于精确示踪移植的ADSCs在辐射诱导的皮肤损伤小鼠中的行为。此外,利用荧光素酶及其底物催化反应而产生天然光源的生物荧光成像(bioluminescence imagining,BLI),其不需要外界光照射的特点有助于避免成像过程中背景荧光和生物自身荧光信号的干扰,可用于活细胞药物示踪中长时间的非侵入性成像,并能提供移植后细胞存活率的信息。Rabinovich等[47]开发了一种增强版的萤火虫荧光素酶报告基因,它可以转导到原代小鼠T细胞中,并且可以提供足够的灵敏度来示踪小鼠体内小于1万个T细胞。而Santos等[48]则开发了一种使用膜锚定形式的高斯荧光素酶(extGLuc)进行生物发光T细胞成像,该酶可在小鼠和人原代T细胞中稳定表达,$extGLuc^+$细胞在体内外均能发出更强的生物发光信号。这种成像方法能够显示体内CAR-T细胞在肿瘤中的累积、驻留,还能与肿瘤细胞伴随成像。

6　光声成像技术(PAI)

PAI技术是近年来发展起来的一种非入侵式

和非电离式的新型生物医学成像方法,具有对比度高、空间分辨率高、对组织功能特征敏感等独特的优点,在生物医学和临床领域有着巨大的应用潜力。目前,Yin等[49]报道了一种基于高分子半导体的纳米探针(OSPNs+),并用PAI技术示踪移植进入活体小鼠的MSCs。结果显示,与未标记的细胞相比,皮下成像和脑成像的光声信号增强幅度分别为40.6倍和21.7倍。Kim等[50]开发了一种更加简单有效的方法,用光声成像对普鲁士蓝纳米颗粒(PBNPs)标记的MSCs进行示踪,标记的MSCs在移植入裸鼠皮下后表现出强烈的光声对比,检出限可维持在每微升200个细胞的较低水平。并且标记粒子的高敏感性和持久的光声对比使得移植的5×10^4个MSCs在裸鼠皮下能够进行持续14 d的可视化监测。

PAI不仅用于活细胞药物给药后的示踪,还使活细胞药物的精确靶向移植、体内纵向示踪成为了可能,为进一步对活细胞移植后的活性监测提供了基础。Donnelly等[51]使用金纳米球成功标记了MSCs,并利用超声和光声成像实时指导MSCs注射的针头放置,实现精准递送,改善治疗效果。Dhada等[52]使用惰性金纳米棒(Au NRs)包覆活性氧(ROS)敏感的荧光染料(IR775c)作为PAI成像造影剂。当MSCs死亡时,胞内ROS含量增加,IR775c的光声信号增强,而Au NRs的光声信号对ROS不敏感,因此MSCs的生存情况可以通过IR775c与Au NRs光声信号的比值来监测。利用该技术进行体内研究发现,移植进入小鼠下肢肌肉的MSCs在24 h内显著死亡,10 d后大约只剩下5%的活力。

7 多模态成像技术

每一种成像方式都有其自身的优缺点,单独采用一种成像方式难以满足活细胞药物体内示踪要求。因此,结合两种或两种以上的多模态成像方式可以相互补充,更具应用前景。

Bao等[53]开发了一种结合Au纳米颗粒和萤火虫荧光素酶(RfLuc)的双重标记策略,在肺纤维化小鼠模型中对移植的MSCs进行CT/BLI双模态成像示踪。BLI可以监测MSCs在体外和体内的生存情况,灵敏度高。但是在体内的示踪过程会受到低穿透深度和低空间分辨率的限制,因此配合CT成像技术,同时记录移植后MSCs的存活、位置和分布的准确信息。为了实现更灵敏的成像,Harmsen等[54]设计了一种非基因组标记的,基于FI/PET多模态成像的标记策略。利用FI/PET活性纳米探针标记细胞,以提供基于PET的高灵敏度、全身成像,并同时实现广域和高分辨率荧光成像,可以成功对移植后的CAR-T细胞全身示踪长达一周。Hua等[55]构建了荧光/生物发光/拉曼散射(FI/BLI/SERS)三模态成像,用于示踪MSCs治疗心肌梗死的体内行为。近红外二区荧光成像和生物发光成像技术能够动态地评估标记MSCs在体内的分布和代谢。另一方面,SERS能够在心脏组织中精确定位标记的MSCs,揭示MSCs分布和迁移模式的细节。传统的多模态成像探针多采用直接标记的方法,该方法基于将成像探针主动/被动递送到细胞内,存在标记效率低、影响细胞活性等缺点。为了解决这些问题,Lim等[56]利用生物正交标记策略,对MSCs进行精确标记,利用FI/MRI双模态成像,对MSCs在卒中模型鼠大脑中的迁移和分布开展长达14 d的精确监测。除了上述介绍的技术外,在当前的研究中还有CT/FI[57]、CT/MRI[58]、FI-MRI[59]、PAI-FI[60]等技术,故多模态成像是克服单一成像方法不足最高效、实用的策略。

8 结 语

本文总结了各种成像技术用于活细胞药物示踪的研究进展,各种成像技术的优缺点如表1所示。然而单一成像技术的应用往往存在许多的局限性,不能全面地了解活细胞在体内的动态过程。在今后的研究中,应该更加注重多种成像技术相结合,从更多的维度去研究活细胞药物的体内过程。在各种成像技术中,探针不可或缺,但是当前所选用的探针普遍存在伴随细胞增殖后稀释、在细胞的生理活动过程中可能被排出、被其它细胞非特异性吞噬等问题,导致不能准确提供移植细胞的体内示踪信息。因此,结合多模态检测的发展趋势,克服探针现有的弊端,开发新型探针及其标记技术,将提高活细胞药物体内示踪的准确性和特异性,促进活细胞药物的体内动态过程研究,为活细胞药物的研发和临床应用提供科学依据。

表1　各种活细胞药物体内成像技术的比较

成像方法	常用造影剂	优　点	缺　点
SPECT/PET	^{18}F-法鲁必利,^{18}F-胸苷类似物,^{18}F-脱氧葡萄糖,^{111}In,^{99m}Tc	成像深度高,临床相关性强,灵敏度高,时间分辨率高,可定量分析	成本高,操作难,辐射伤害,半衰期短,不能得到解剖学信息,空间分辨率低
MRI	氧化铁纳米粒,钆,^{19}F,石墨烯氧化物	成像深度高,临床相关性强,空间分辨率高,可获取解剖学信息,可定量分析	成本高,操作难,灵敏性低,时间分辨率低
MPI	氧化铁纳米颗粒	成像深度高,灵敏度高,时间分辨率高,可定量分析	成本高,操作难,缺乏高性能造影剂,临床相关性差,不能得到解剖学信息
CT	Au纳米粒	成像深度高,空间分辨率高,临床相关性强,可获取解剖学信息	成本高,操作难,灵敏度低,时间分辨率低
FI	近红外一区荧光染料,近红外二区荧光染料,无机量子点,AIE荧光染料	成本低,易操作,时间分辨率高,可定量分析	成像深度低,临床相关性差,空间分辨率低,不能得到解剖学信息
PAI	普鲁士蓝纳米颗粒,金纳米棒,高分子半导体	成本低,易操作,时间分辨率高,可定量分析	空间分辨率低,临床相关性差,不能得到解剖学信息

MRI: 磁共振成像技术; MPI: 磁颗粒成像技术; CT: 计算机断层扫描成像技术; FI: 荧光成像技术; PAI: 光声成像技术

References

[1] The Committee for Advanced Therapies (CAT).Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them [J]. *Nat Rev Drug Discov*,2010,**9**(3):195-201.

[2] Upadhaya S,Yu JX,Shah M,*et al*. The clinical pipeline for cancer cell therapies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, **20**(7): 503-504.

[3] Garfall AL, Maus MV, Hwang WT, *et al*. Chimeric antigen receptor T cells against CD19 for multiple myeloma[J]. *N Engl J Med*,2015,**373**(11):1040-1047.

[4] Jiang YH,Jahagirdar BN,Reinhardt RL,*et al*. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002,**418**(6893):41-49.

[5] Zhao YH,Gibb SL,Zhao J,*et al*. Wnt3a, a protein secreted by mesenchymal stem cells is neuroprotective and promotes neurocognitive recovery following traumatic brain injury [J]. *Stem Cells*,2016,**34**(5):1263-1272.

[6] Lindvall O,Kokaia Z,Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work [J]. *Nat Med*,2004,10 Suppl:S42-S50.

[7] Nguyen PK, Rhee JW, Wu JC. Adult stem cell therapy and heart failure,2000 to 2016:a systematic review[J]. *JAMA Cardiol*,2016,**1**(7):831-841.

[8] Ortiz LA,Gambelli F,McBride C,*et al*. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2003,**100**(14):8407-8411.

[9] Zhu YG,Feng XM,Abbott J,*et al*. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of *Escherichia coli* endotoxin-induced acute lung injury in mice[J]. *Stem Cells*,2014,**32**(1): 116-125.

[10] Yuan XR, Qin XD, Wang DD, *et al*. Mesenchymal stem cell therapy induces FLT3L and CD1c$^+$ dendritic cells in systemic lupus erythematosus patients[J]. *Nat Commun*,2019,**10**(1): 2498.

[11] Liang J,Zhang H,Hua B,*et al*. Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study[J]. *Ann Rheum Dis*,2010,**69**(8): 1423-1429.

[12] He YL,Guo XR,Lan TY,*et al*. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improve the function of liver in rats with acute-on-chronic liver failure via downregulating Notch and Stat1/Stat3 signaling [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, **12**(1):396.

[13] Wang LT,Wang JL,Liu HW,*et al*. Process in targeted contrast agents for cancer imaging[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报),2017,**48**(6):635-645.

[14] Parente-Pereira AC, Burnet J, Ellison D, *et al*. Trafficking of CAR-engineered human T cells following regional or systemic adoptive transfer in SCID beige mice [J]. *J Clin Immunol*, 2011,**31**(4):710-718.

[15] Charoenphun P, Meszaros LK, Chuamsaamarkkee K, *et al*. [(89)zr]oxinate4 for long-term *in vivo* cell tracking by positron emission tomography[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*,2015, **42**(2):278-287.

[16] Pittet MJ,Grimm J,Berger CR,*et al*. *In vivo* imaging of T cell delivery to tumors after adoptive transfer therapy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2007,**104**(30):12457-12461.

[17] Gholamrezanezhad A,Mirpour S,Bagheri M,*et al*. *In vivo* tracking of ^{111}In-oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis[J]. *Nucl Med Biol*, 2011,**38**(7):961-967.

[18] Minn I,Huss DJ,Ahn HH,*et al*. Imaging CAR T cell therapy with PSMA-targeted positron emission tomography[J]. *Sci Adv*, 2019,**5**(7):eaaw5096.

[19] Emami-Shahri N, Foster J, Kashani R, *et al*. Clinically compliant spatial and temporal imaging of chimeric antigen receptor T-cells[J]. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 1081.

[20] Wei WJ, Rosenkrans ZT, Liu JJ, *et al*. ImmunoPET: concept, design, and applications[J]. *Chem Rev*, 2020, **120**(8): 3787-3851.

[21] Simonetta F, Alam IS, Lohmeyer JK, *et al*. Molecular imaging of chimeric antigen receptor T cells by ICOS-ImmunoPET[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, **27**(4): 1058-1068.

[22] Jurgielewicz P, Harmsen S, Wei E, *et al*. New imaging probes to track cell fate: reporter genes in stem cell research[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, **74**(24): 4455-4469.

[23] Jing BP, Qian RJ, Jiang DW, *et al*. Extracellular vesicles-based pre-targeting strategy enables multi-modal imaging of orthotopic colon cancer and image-guided surgery[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, **19**(1): 151.

[24] Nejadnik H, Jung KO, Theruvath AJ, *et al*. Instant labeling of therapeutic cells for multimodality imaging[J]. *Theranostics*, 2020, **10**(13): 6024-6034.

[25] Mathiasen AB, Qayyum AA, Jørgensen E, *et al*. *In vivo* MRI tracking of mesenchymal stromal cells labeled with ultrasmall paramagnetic iron oxide particles after intramyocardial transplantation in patients with chronic ischemic heart disease[J]. *Stem Cells Int*, 2019, **2019**: 2754927.

[26] Xie T, Chen X, Fang JQ, *et al*. Non-invasive monitoring of the kinetic infiltration and therapeutic efficacy of nanoparticle-labeled chimeric antigen receptor T cells in glioblastoma via 7.0-Tesla magnetic resonance imaging[J]. *Cytotherapy*, 2021, **23**(3): 211-222.

[27] Egawa EY, Kitamura N, Nakai R, *et al*. A DNA hybridization system for labeling of neural stem cells with *SPIO* nanoparticles for MRI monitoring post-transplantation[J]. *Biomaterials*, 2015, **54**: 158-167.

[28] Senders ML, Meerwaldt AE, van Leent MMT, *et al*. Probing myeloid cell dynamics in ischaemic heart disease by nanotracer hot-spot imaging[J]. *Nat Nanotechnol*, 2020, **15**(5): 398-405.

[29] Koshkina O, Lajoinie G, Bombelli FB, *et al*. Multicore 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.

[30] Li H, Luo D, Yuan CN, *et al*. Magnetic resonance imaging of PSMA-positive prostate cancer by a targeted and activatable Gd(III) MR contrast agent[J]. *J Am Chem Soc*, 2021, **143**(41): 17097-17108.

[31] Zhang MX, Liu XY, Huang J, *et al*. Ultrasmall graphene oxide based T 1 MRI contrast agent for *in vitro* and *in vivo* labeling of human mesenchymal stem cells[J]. *Nanomedicine*, 2018, **14**(7): 2475-2483.

[32] Hingorani DV, Chapelin F, Stares E, *et al*. Cell penetrating peptide functionalized perfluorocarbon nanoemulsions for targeted cell labeling and enhanced fluorine-19 MRI detection[J]. *Magn Reson Med*, 2020, **83**(3): 974-987.

[33] Zheng B, Vazin T, Goodwill PW, *et al*. Magnetic particle imaging tracks the long-term fate of *in vivo* neural cell implants with high image contrast[J]. *Scientific reports*, 2015, **5**: 14055.

[34] Zheng B, See MPV, Yu E, *et al*. Quantitative magnetic particle imaging monitors the transplantation, biodistribution, and clearance of stem cells *in vivo*[J]. *Theranostics*, 2016, **6**(3): 291-301.

[35] Nejadnik H, Pandit P, Lenkov O, *et al*. Ferumoxytol can be used for quantitative magnetic particle imaging of transplanted stem cells[J]. *Mol Imaging Biol*, 2019, **21**(3): 465-472.

[36] Wang QY, Ma XB, Liao HW, *et al*. Artificially engineered cubic iron oxide nanoparticle as a high-performance magnetic particle imaging tracer for stem cell tracking[J]. *ACS Nano*, 2020, **14**(2): 2053-2062.

[37] Liu YL, Yang M, Zhang JP, *et al*. Human induced pluripotent stem cells for tumor targeted delivery of gold nanorods and enhanced photothermal therapy[J]. *ACS Nano*, 2016, **10**(2): 2375-2385.

[38] Betzer O, Shwartz A, Motiei M, *et al*. Nanoparticle-based CT imaging technique for longitudinal and quantitative stem cell tracking within the brain: application in neuropsychiatric disorders[J]. *ACS Nano*, 2014, **8**(9): 9274-9285.

[39] Betzer O, Meir R, Dreifuss T, *et al*. *In-vitro* optimization of nanoparticle-cell labeling protocols for *in-vivo* cell tracking applications[J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 15400.

[40] 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[J]. *Small*, 2021, **17**(33): e2101861.

[41] Wan DQ, Chen DX, Li KC, *et al*. Gold nanoparticles as a potential cellular probe for tracking of stem cells in bone regeneration using dual-energy computed tomography[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, **8**(47): 32241-32249.

[42] Meir R, Popovtzer R. Cell tracking using gold nanoparticles and computed tomography imaging[J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2018, **10**(2): e1480.

[43] Chen GC, Tian F, Zhang Y, *et al*. Tracking of transplanted human mesenchymal stem cells in living mice using near-infrared Ag_2S quantum dots[J]. *Adv Funct Mater*, 2014, **24**(17): 2481-2488.

[44] Yang YM, Chen J, Shang XL, *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[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, **6**(19): 1901018.

[45] 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*[J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, **6**(21): 1700374.

［46］ Yang CH, 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［J］. *Biomaterials*, 2019, **188**: 107-117.

［47］ Rabinovich BA, Ye Y, Etto T, *et al*. Visualizing fewer than 10 mouse T cells with an enhanced firefly luciferase in immunocompetent mouse models of cancer［J］. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(38): 14342-14346.

［48］ Santos EB, Yeh R, Lee J, *et al*. Sensitive *in vivo* imaging of T cells using a membrane-bound *Gaussia princeps* luciferase［J］. *Nat Med*, 2009, **15**(3): 338-344.

［49］ Yin C, Wen GH, Liu C, *et al*. Organic semiconducting polymer nanoparticles for photoacoustic labeling and tracking of stem cells in the second near-infrared window［J］. *ACS Nano*, 2018, **12**(12): 12201-12211.

［50］ Kim T, Lemaster JE, Chen F, *et al*. Photoacoustic imaging of human mesenchymal stem cells labeled with Prussian blue-poly (L-lysine) nanocomplexes［J］. *ACS Nano*, 2017, **11**(9): 9022-9032.

［51］ Donnelly EM, Kubelick KP, Dumani DS, *et al*. Photoacoustic image-guided delivery of plasmonic-nanoparticle-labeled mesenchymal stem cells to the spinal cord［J］. *Nano Lett*, 2018, **18**(10): 6625-6632.

［52］ Dhada KS, Hernandez DS, Suggs LJ. *In vivo* photoacoustic tracking of mesenchymal stem cell viability［J］. *ACS Nano*, 2019, **13**(7): 7791-7799.

［53］ Bao HY, Xia YY, Yu CG, *et al*. CT/bioluminescence dual-modal imaging tracking of mesenchymal stem cells in pulmonary fibrosis［J］. *Small*, 2019, **15**(46): e1904314.

［54］ Harmsen S, Medine EI, Moroz M, *et al*. A dual-modal PET/near infrared fluorescent nanotag for long-term immune cell tracking［J］. *Biomaterials*, 2021, **269**: 120630.

［55］ Hua SY, Zhong SH, Arami H, *et al*. Simultaneous deep tracking of stem cells by surface enhanced Raman imaging combined with single-cell tracking by NIR-II imaging in myocardial infarction［J］. *Adv Funct Mater*, 2021, **31**(24): 2100468.

［56］ Lim S, Yoon HY, Jang HJ, *et al*. Dual-modal imaging-guided precise tracking of bioorthogonally labeled mesenchymal stem cells in mouse brain stroke［J］. *ACS Nano*, 2019, **13**(10): 10991-11007.

［57］ 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］. *J Mater Chem B*, 2020, **8**(8): 1713-1727.

［58］ Lee SM, Yoon HI, Na JH, *et al*. *In vivo* stem cell tracking with imageable nanoparticles that bind bioorthogonal chemical receptors on the stem cell surface［J］. *Biomaterials*, 2017, **139**: 12-29.

［59］ Cao J, Li X, Chang N, *et al*. Dual-modular molecular imaging to trace transplanted bone mesenchymal stromal cells in an acute myocardial infarction model［J］. *Cytotherapy*, 2015, **17**(10): 1365-1373.

［60］ Filippi M, Garello F, Pasquino C, *et al*. Indocyanine green labeling for optical and photoacoustic imaging of mesenchymal stem cells after *in vivo* transplantation［J］. *J Biophotonics*, 2019, **12**(5): e201800035.