

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00439

• 综述 •

体内细胞示踪技术及其应用

金以超^{1,2}, 孙瑜¹, 夏照帆^{1*}

1. 第二军医大学长海医院烧伤科, 上海 200433

2. 云南省昆明医学院病理学教研室, 昆明 650000

[摘要] 随着科学技术的发展,越来越多的体内细胞示踪技术被运用于医学研究中。目前常用的体内示踪技术包括核素成像、磁共振成像、光学成像等技术,这些成像的方式在特异性、敏感性、操作方式等方面都各有特点。在运用这些技术的时候,研究者需要根据成像的要求、实验对象、成像目的等综合因素,并结合各种成像的特点来考虑。本文就现有的体内细胞示踪技术作一综述。

[关键词] 放射性示踪剂; 磁共振成像; 光学成像; 生物发光成像; 近红外荧光成像

[中图分类号] R 445 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)04-0439-04

In vivo cell tracking

JIN Yi-chao^{1,2}, SUN Yu¹, XIA Zhao-fan^{1*}

1. Department of Burns, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pathology, Kunming Medical College, Kunming 650000, Yunnan, China

[Abstract] Owing to the progression of science and technology, increasing techniques for *in vivo* cell tracking have been applied in medical research; they include radionuclide imaging, magnetic resonance imaging, optical imaging, etc. These imaging methods have their own characteristics in specificity, sensitivity and manipulation mode. Researchers should choose the appropriate method while taking the following into consideration: requirement of the image, object of the image, the aim of the image, and the characteristics of each imaging method. In this paper we summarize the techniques of cell tracking *in vivo*.

[Key words] radioactive tracers; magnetic resonance imaging; optical imaging; bioluminescence; near infrared fluorescence imaging

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(4): 439-442]

传统细胞示踪的方法通常是采用组织病理学技术,在不同的时间点将组织从活体中取出或者处死实验动物进行标记从而了解细胞在体内的情况。通过这种方法尽管可以得到动物处死时刻的信息,但是无法及时获得细胞在动物体内的定位、生存能力、迁移、功能状态(如活化、分化等的前后改变),而且这样的方法明显不利于对同一个体的动态观察,同时这种方法在大多数情况下也不适用于人体。为解决传统示踪的不足,研究者开发了不同的体内示踪细胞的方法,采用这些方法可对同一实验对象在不同时间点进行比较,跟踪同一观察目标(标记的细胞)在体内的移动及变化,所得的数据更加真实可信。这既减少了实验动物数量且符合动物伦理,同时又为临床治疗提供了指导。目前,示踪技术已被广泛应用于干细胞治疗、基因表达、新药开发、细菌感染、器官移植等多个领域。本文综述了体内细胞示踪技术方面的研究 and 应用。

1 核素成像技术

放射性核素标记细胞显像需要应用 γ 相机、单光子发射计算机断层显像(SPECT)和正电子发射断层显像(PET)等技术, PET 和 SPECT 都是观察体内细胞分布方面高灵敏度和高分辨率的仪器,这些仪器可以根据各组织器官的放射性比例,确定细胞在体内的分布和定量^[1]。

1.1 常用细胞标记物 核素可以通过两种方法成像,一是直接标记细胞,如¹⁸F核素直接标记^[2-3];二是报告基因标记细胞,即将能够表达可测表型蛋白(酶、受体、转运体等)的特定核苷酸序列(报告基因)导入靶细胞基因,表达的蛋白再与特定的发射光子的放射性核素标记的探针相结合,并通过PET/SPECT进行检测间接反映靶细胞的分布和定量。如胸苷激酶基因导入细胞基因^[4], PET 首选的放射性核素是¹⁸F、¹¹C、¹³N和¹⁵O,这些放射性核素的半衰期较短,如¹³N的半衰期约为10 min、¹⁸F的半衰期约为110 min,用葡萄糖、脂

[收稿日期] 2010-11-08

[接受日期] 2010-12-03

[基金项目] 国家自然科学基金(30730091)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30730091)。

[作者简介] 金以超, 博士生, 讲师。E-mail: shuke2004@126.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81873471, E-mail: xiazhaoan@hotmail.com

肪酸或抗体等把核素整合成复合物后,注入体内标记细胞。SPECT常用的放射性核素是 ^{99m}Tc 、 ^{123}I 、 ^{67}Ga 和 ^{111}In ,这些核素半衰期较长, ^{111}In 半衰期约为67 h, ^{99m}Tc 的半衰期约为6 h^[5-6]。在实验中需要根据示踪细胞的不同来选择不同的标记物,研究者需要注意标记物泄露,以及半衰期时间与所标记的细胞存活时间等问题。另外由于报告基因的表达产物所引起的机体发生免疫反应也是一个要考虑的问题。

1.2 应用现状 目前核素示踪技术主要应用于干细胞的治疗(尤其是心肌梗死后干细胞的治疗)、肿瘤细胞的标记及治疗、细胞免疫研究以及神经炎症等方面。Gyöngysi等^[4]把胸苷激酶报告基因导入心肌干细胞,然后再把细胞注入大动物的心肌梗死区,利用PET来示踪心肌干细胞在梗死区的分化及分布,从而了解干细胞治疗心肌梗死的疗效。Lyngbaek等^[7]通过 ^{111}In 标记的人间充质干细胞注入猪心肌梗死模型中,来研究干细胞治疗的排斥反应。Prince等^[8]通过 ^{18}F 标记树突状细胞后,用PET示踪树突状细胞体内分布的情况,从而研究树突状细胞对人多发性骨髓瘤的免疫治疗作用。

采用核素示踪细胞,是因为PET和SPECT在细胞的成像上都具有较高的敏感性和特异性,所以核素示踪细胞的敏感性高于MRI。但不足的方面是空间分辨率较低,同时还产生辐射,而且所涉及的放射化学和放射调控的问题也相当复杂,另外,其设备也比较昂贵^[9]。

2 磁共振成像技术

磁共振成像技术是利用人体组织中某种原子核的核磁共振现象,将所得射频信号经过电子计算机处理,重建出人体某一层面的图像的诊断技术。最常利用的原子核是氢原子核质子(^1H),因为它的信号最强,并且在人体组织内也广泛存在。MRI在分子和细胞成像领域具有独特的功能,可以提供高分辨率的体内成像。尤其是在基于细胞的治疗上,MRI能够无创获取细胞分辨率解剖定位的空间变化。由于注射敏感造影剂、构建MRI报告基因等新方法在MRI上的运用,使得MRI超越了仅对标记细胞在时间和空间信息的获取,进而开始了体内细胞功能变化的研究^[10]。

2.1 常用细胞标记物 从宿主细胞背景中使细胞显影,并且提高细胞的敏感性,以MRI为基础的细胞成像需要造影剂标记细胞。造影剂可分为如下几种:(1)氧化铁类的造影剂,根据其大小可分为超小超顺磁氧化铁颗粒(USPIO)、超顺磁性氧化铁(SPIOs)及微米级顺磁氧化铁颗粒(MPIO)^[11]。氧化铁颗粒通常被像右旋糖酐、聚乙烯、蛋白质、硅胶、聚苯乙烯等有机聚合物包被,以提高铁颗粒的稳定性和生物相容性,进一步使颗粒功能化^[12-14]。SPIO是目前最常用的干细胞标记物^[15]。(2)像 Mn^{2+} 离子和稀土螯合物这样的顺磁复合物,如钆(Gd)螯合物在临床运用较多。锰造影剂如 MnCl_2 或 MnO_2 纳米颗粒,因其有毒性而阻碍了它们在实验和临床研究领域更广泛的应用^[16]。(3)异核磁共振的造影剂主要是 ^{19}F , ^{19}F 磁共振成像的一个优势在于,如果能够达到一个足够的信噪比,则可以直接进行定量试验^[17]。(4)成像报告基因:即通过向靶细胞内导入某种基因使其表达某种物质,从而增强MR的信号。如将转铁蛋白基因导入

靶细胞,通过转铁蛋白的过度表达和随后经过一个活跃的穿梭整合过程致铁颗粒聚集,这导致了可检测的细胞内铁的堆积和相应的 T_2 和 T_2WI 低密度。目前运用于MRI的报告基因有lacZ、转铁蛋白基因、铁蛋白基因^[18-19]等。

2.2 应用现状 磁共振已经发展成在放射学和生物医学科学领域最有用的成像工具之一。由于分辨率高,MRI可用于同质背景下单个细胞的显影^[20]。目前主要用于肿瘤治疗、干细胞治疗、糖尿病细胞治疗等方面。Kea等^[21]用SPIO造影剂标记骨髓来源的猕猴神经干细胞,用MRI示踪这些被自体移植进猕猴大脑内纹条状的神经干细胞分化情况。为研究胰岛细胞移植治疗1型糖尿病的可行性,Leoni等^[22]采用锰等作为造影剂,通过MRI长期示踪胰岛B细胞在受体内定植、排斥的情况。Aung等^[23]运用电穿孔法在肿瘤细胞内导入红荧光和转铁蛋白双报告基因,通过MRI示踪肿瘤细胞,为肿瘤的基因治疗提供了一个研究平台。

3 光学成像

目前的光学成像仪器运用装配了离散窄频带通滤波器和电子可调滤波器,改进多谱分析的软件算法,发展了具有透视能力的高敏感的CCD相机^[24],使生物发光和荧光成像的敏感性和分辨率得到很大提高^[25]。体内光学成像是运用生物发光剂和内源性荧光报告基因或者是外源性探针检测分子和生化进程的一项无创性技术。

3.1 体内发光成像技术 体内发光成像技术包括生物发光成像(bioluminescence imaging)与荧光(fluorescence)两技术^[26-27]。生物发光成像是把荧光素酶基因(包括bacterial lux, firefly luc或Renilla Rluc)插入细胞的基因组,在细胞存活情况下,细胞内产出荧光素酶,通过底物荧光素与荧光素酶在氧和ATP存在的情况下发生的酶促反应而发光。发射光可以被高度敏感的CCD相机所检测。生物发光成像常被用于基因表达的显影,蛋白与蛋白的相互作用,在活体无创性示踪细胞^[25]。而荧光技术则采用荧光报告基因如EGFP进行标记,无需底物,但需要激发光才能使荧光基团达到较高的能量水平,然后发射出较长波长的发射光^[28]。

3.1.1 常用细胞标记物 细胞系可以被设计成稳定表达一种或多种可被识别和具有特征的荧光素酶和(或)荧光蛋白^[29]。生物发光剂,例如荧光素酶^[30],其光的发射(波长550~650 nm)是由于化学能量转变为光能的化学反应所致,此酶反应需要化学底物以产生光。体内生物发光成像的基本优势是可以检测较低水平的信号,很少有背景光源的发生,有较高的信噪比。另一类发光剂,如绿色荧光蛋白(EGFP)、红色荧光蛋白(RFP)和远红光蛋白,当分子吸收了波长为400~600 nm的光子就激发另一波长为450~650 nm的光子发射。荧光报告基因显影不需要底物的作用,可同时用于活体和固定的细胞和组织^[31]。荧光报告基因通常比生物发光报告基因更亮,然而其敏感性低,体内存在相对高的背景光是其局限。无论生物发光还是荧光发光体内成像都有其固有的局限性,即在可见光范围内由于光子被组织吸收和散射的缘故,组织每加深1 cm发射信号就衰减大约10倍^[32]。

3.1.2 应用现状 目前的光学成像运用越来越广泛,在细胞方面主要用在干细胞的治疗、肿瘤治疗、组织的重建等方面。Toyoshima等^[33]通过导入荧光蛋白基因进入子宫癌细胞后,把细胞注入小鼠腹腔进行肿瘤扩散的研究。Cao等^[34]在鼠胚胎干细胞中导入萤火虫荧光素酶、单体红荧光蛋白、胸苷激酶三联基因(fluc-mrfp-ttk)三联报告基因,用体外光学成像技术来示踪鼠胚胎干细胞注入心肌梗死区后细胞的分化及增殖,从而研究鼠胚胎干细胞对心肌梗死的治疗作用。Xu等^[35]用绿色荧光蛋白基因标记肌细胞后注入小鼠胫骨前肌观察肌细胞的再生情况。在许多模型中,光子发射和细胞数量的相关关系已经被证实,这使得在许多部位(如皮下、常位的、异位的)对疾病的进展进行定量监测成为可能^[36]。

3.2 近红外荧光成像技术(near infrared fluorescence imaging, NIRF) 近红外荧光成像的基本原理是以特定波谱范围的激发光源照射荧光分子(近红外荧光探针),此时荧光分子被激发出不同光谱特性的光子信号,此信号通过滤光片后由超敏CCD相机采集,然后通过数据处理技术将光子信号转换为图像^[32]。与可见光相比近红外荧光可穿透更深层的组织,近红外荧光最大可穿透12 cm的乳腺或肺组织,6 cm的肌肉组织,5 cm的成人脑组织^[37]。

3.2.1 常用细胞标记物 目前常用的标记物有吖啶花青染料Cy5.5、量子点(QD)、VivoTag 680 (VT680)等,随着新标记物的开发,越来越多的新产物如肽序列IQ-tag、DY-681、DY-676已用于细胞标记的近红外成像^[38-41]。

3.2.2 应用现状 NIRF成像主要运用于干细胞治疗和肿瘤治疗上。Ushiki等^[42]采用NIRF观察移植入小鼠体内的骨髓间充质干细胞的归巢情况。少数的实验报道NIRF成像用于神经炎症模型的研究中,如Berger等^[43]用Cy5.5体外标记T淋巴细胞,然后把标记好的细胞移植到鼠体内以制造实验性自身性脑脊髓炎(EAE)。Michel等^[44]用羧菁染料(DiR)标记巨噬细胞在裸鼠皮下建立肉芽肿模型,通过NIRF成像研究炎症细胞对肉芽肿形成的反应。

近红外荧光成像的光子量探测域值低,故检测灵敏度高;每一探针均为针对某个具体的分子靶而设计,故特异性强。与其他光学成像手段如生物发光成像相比,可不必转基因,因此操作相对简便。

总之,无创性光学成像具有高敏感性、无电离辐射、费用相对便宜、仪器简单而且具有高通量及量化光能的功能等优点,但光学技术也有局限性,如光学成像的空间分辨率相对低,光源在生物体内发生散射,随着荧光源的加深光子会衰减,有背景光的干扰等^[32]。

4 展望

各种体内示踪技术的发展给研究者提供了较多的研究方法,但是各种技术有其优势也有其劣势。研究者需要注意以下几点:(1)严格设立对照试验,最终成像结果必须用传统方法来证明,如通过免疫组化的方法进行体外的验证^[45];(2)针对不同的模型及研究目的,并且根据各种成像方法的特点同时采用不同方法^[46]。(3)要充分考虑示踪细胞的寿命和需

要示踪的周期,因为在细胞增殖过程中,造影剂浓度被稀释,将导致细胞可检测率的降低。因为细胞的死亡导致造影剂释放后被宿主细胞摄取可致结果的误判。(4)导入基因对细胞的影响,需要避免导入基因所表达的产物引起机体的免疫反应。

综上所述,理想的体内示踪技术应具备以下特点:(1)操作简单,费时少;(2)所需设备便宜;(3)无需造影剂或者造影剂容易得到而且无毒;(4)空间分辨率高;(5)有较高的特异性和敏感性;(6)不受背景的干扰或干扰较小;(7)导入基因不引起细胞本质的改变,所表达蛋白不产生免疫反应。

[参考文献]

- [1] Hamoudeh M, Kamleh M A, Diab R, Fessi H. Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60: 1329-1346.
- [2] Terrovitis J, Kwok K F, Lautamaki R, Engles J M, Barth A S, Kizana E, et al. Ectopic expression of the sodium-iodide symporter enables imaging of transplanted cardiac stem cells *in vivo* by single photon emission computed tomography or positron emission tomography[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 52: 1652-1660.
- [3] Yaghoubi S S, Jensen M C, Satyamurthy N. Noninvasive detection of therapeutic cytolytic T cells with ¹⁸F-FHBG PET in a patient with glioma[J]. Nat Clin Prac Oncol, 2009, 6: 53-58.
- [4] Gyöngysi M, Blanco J, Marian T, Trón L, Petneházy Ö, Petrasi Z, et al. Serial non-invasive *in vivo* positron emission tomographic (pet) tracking of percutaneously intramyocardially injected autologous porcine mesenchymal stem cells modified for transgene reporter gene expression[J]. Circ Cardiovasc Imaging, 2008, 1: 94-103.
- [5] Meerwaldt R, Slart R H, van Dam G M, Luijckx G J, Tio R A, Zeebregts C J. PET/SPECT imaging: From carotid vulnerability to brain viability[J]. Eur J Radiol, 2010, 74: 104-109.
- [6] Dietlein M, Pels H, Schulz H, Staak O, Borchmann P, Schomacker K, et al. Imaging of central nervous system lymphomas with iodine-123 labeled rituximab[J]. Eur J Haematol, 2005, 74: 348-352.
- [7] Lyngbaek S, Ripa R S, Haack-Sørensen M, Cortsen A, Kragh L, Andersen C B, et al. Serial *in vivo* imaging of the porcine heart after percutaneous, intramyocardially injected ¹¹¹In-labeled human mesenchymal stromal cells[J]. Int J Cardiovasc Imaging, 2010, 26: 273-284.
- [8] Prince H M, Wall D M, Ritchie D, Honemann D, Harrisson S, Quach H, et al. *In vivo* tracking of dendritic cells in patients with multiple myeloma[J]. J Immunother, 2008, 31: 166-179.
- [9] Wunder A, Klohs J, Dirnagl U. Non-invasive visualization of CNS inflammation with nuclear and optical imaging[J]. Neuroscience, 2009, 158: 1161-1173.
- [10] Himmelreich U, Dresselaers T. Cell labeling and tracking for experimental models using magnetic resonance imaging[J]. Methods, 2009, 48: 112-124.
- [11] Himmelreich U, Hoehn M. Stem cell labeling for magnetic resonance imaging[J]. Minim Invasive Ther Allied Technol, 2008, 17: 132-142.
- [12] Patel D, Kell A, Simard B, Deng J X, Xiang B, Lin H Y, et al. Cu²⁺-labeled, SPION loaded porous silica nanoparticles for cell labeling and multifunctional imaging probes[J]. Biomaterials, 2010, 31: 2866-2873.

- [13] Vreys R, Vande Velde G, Krylychkina O, Vellema M, Verhoye M, Timmermans J P, et al. MRI visualization of endogenous neural progenitor cell migration along the RMS in the adult mouse brain; validation of various MPIO labeling strategies [J]. *NeuroImage*, 2010, 49: 2094-2103.
- [14] Soenen S, Hoenius M, De Cuyper M. Magnetoliposomes: versatile innovative nanocolloids for use in biotechnology and biomedicine [J]. *Nanomedicine*, 2009, 4: 177-191.
- [15] Ju S, Teng G J, Lu H. *In vivo* MR tracking of mesenchymal stem cells in rat liver after intrasplenic transplantation [J]. *Radiology*, 2007, 245: 206-215.
- [16] Nagaraja T N, Karki K, Ewing J R, Divine G W, Fenstermacher J D, Patlak C S, et al. The MRI-measured arterial input function resulting from a bolus injection of Gd-DTPA in a rat model of stroke slightly underestimates that of Gd-[¹⁴C]DTPA and marginally overestimates the blood-to-brain influx rate constant determined by Patlak plots [J]. *Magn Reson Med*, 2010, 63: 1502-1509.
- [17] Srinivas M, Heerschap A, Ahrens E T, Figdor C G, Vries I J. ¹⁹F MRI for quantitative *in vivo* cell tracking [J]. *Trends Biotechnol*, 2010, 28: 363-370.
- [18] Bengtsson N E, Brown G, Scott E W, Walter G A. LacZ as a genetic reporter for real-time MRI [J]. *Magn Reson Med*, 2010, 63: 745-753.
- [19] Ziv K, Meir G, Harmelin A, Shimoni E, Klein E, Neeman M. Ferritin as a reporter gene for MRI; chronic liver over expression of H-ferritin during dietary iron supplementation and aging [J]. *NMR Biomed*, 2010, 23: 523-531.
- [20] Küstermann E, Himmelreich U, Kandal K, Geelen T, Ketkar A, Wiedermann D, et al. Magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells labeled with dual (MR and fluorescence) agents in rat spinal cord injury [J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2008, 3: 27-37.
- [21] Kea Y Q, Hua C C, Jiang X D, Yang Z J, Zhang H W, Ji H M, et al. *In vivo* magnetic resonance tracking of Feridex-labeled bone marrow-derived neural stem cells after autologous transplantation in rhesus monkey [J]. *J Neurosci Methods*, 2009, 179: 45-50.
- [22] Leoni L, Roman B B. MR imaging of pancreatic islets; tracking isolation, transplantation and function [J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16: 1582-1594.
- [23] Aung W, Hasegawa S, Koshikawa-Yano M, Obata T, Ikehira H, Furukawa T, et al. Visualization of *in vivo* electroporation-mediated transgene expression in experimental tumors by optical and magnetic resonance imaging *in vivo* imaging of EP-mediated transgene expression [J]. *Gene Ther*, 2009, 16: 830-839.
- [24] Meyer O, Burrell K H, Chavez J A, Kaplan D H, Chrystal C, Pablant N A, et al. Masking a CCD camera allows multichord charge exchange spectroscopy measurements at high speed on the DIII-D tokamak [J]. *Rev Sci Instrum*, 2011, 82: 023114.
- [25] Brindle K. New approaches for imaging tumor responses to treatment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 94-107.
- [26] Sadikot R T, Blackwell T S. Bioluminescence imaging [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2: 537-540.
- [27] Gratton E. Deeper tissue imaging with total detection [J]. *Science*, 2011, 25: 1016-1017.
- [28] Contag C. *In vivo* pathology; seeing with molecular specificity and cellular resolution in the living body [J]. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2007, 2: 277-305.
- [29] Shaner N C, Steinbach P A, Tsien R Y. A guide to choosing fluorescent proteins [J]. *Nat Methods*, 2005, 2: 905-909.
- [30] Caysa H, Jacob R, Müther N, Branchini B, Messerle M, Söling A. A redshifted codon-optimized firefly luciferase is a sensitive reporter for bioluminescence imaging [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2009, 8: 52-56.
- [31] Hsu C H, Chang W S, Chen C T, Lee T W, Chen C T, Lin K M. Human breast tumor cells express multimodal imaging reporter genes [J]. *Mol Imaging Biol*, 2008, 10: 253-263.
- [32] Shah K, Weissleder R. Molecular optical imaging: Applications leading to the development of present day therapeutics [J]. *NeuroRx*, 2005, 2: 215-225.
- [33] Toyoshima M, Tanaka Y, Matumoto M, Yamazaki M, Nagase S, Sugamura K, et al. Generation of a syngeneic mouse model to study the intraperitoneal dissemination of ovarian cancer with *in vivo* luciferase imaging [J]. *Luminescence*, 2009, 24: 324-331.
- [34] Cao F, Lin S, Xie X Y. *In vivo* visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery [J]. *Circulation*, 2006, 21: 1005-1014.
- [35] Xu X, Yang Z, Liu Q, Wang Y. *In vivo* fluorescence imaging of muscle cell regeneration by transplanted EGFP-labeled myoblasts [J]. *Mol Ther*, 2010, 18: 835-842.
- [36] Kaijzel E L, van der Pluijm G, Lowik C W. Whole-body optical imaging in animal models to assess cancer development and progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 3490-3497.
- [37] Klops J, Gräfe M, Graf K, Steinbrink J, Dietrich T, Stibenz D, et al. *In vivo* imaging of the inflammatory receptor CD40 after cerebral ischemia using a fluorescent antibody [J]. *Stroke*, 2008, 39: 2845-2852.
- [38] Laurent A, Bentolila, Ebenstein Y, Weiss S. Quantum dots for *in vivo* small-animal imaging [J]. *J Nucl Med*, 2009, 50: 493-496.
- [39] Nam T, Park S, Lee S Y, Park K, Choi K, Song I C, et al. Tumor targeting chitosan nanoparticles for dual-modality optical/MR cancer imaging [J]. *Bioconjug Chem*, 2010, 21: 578-582.
- [40] Sarah K, Petra K, Ali H, Amir S, Christian D, Margret R F, et al. Noninvasive imaging of liver repopulation following hepatocyte transplantation [J]. *Cell Transplant*, 2009, 18: 69-78.
- [41] Pauli J, Brehm R, Spieles M, Kaiser W A, Hilger I, Resch-Genger U. Novel fluorophores as building blocks for optical probes for *in vivo* near infrared fluorescence (NIRF) imaging [J]. *J Fluoresc*, 2010, 20: 681-693.
- [42] Ushiki T, Kizaka-Kondoh S, Ashihara E, Tanaka S, Masuko M, Hirai H, et al. Noninvasive tracking of donor cell homing by near-infrared fluorescence imaging shortly after bone marrow transplantation [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e11114.
- [43] Berger C, Gremlich H U, Schmidt P, Cannel C, Kneuer R, Hiestand P, et al. *In vivo* monitoring the fate of Cy5.5-Tat labeled T lymphocytes by quantitative near infrared fluorescence imaging during acute brain inflammation in a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Immunol Methods*, 2007, 323: 65-77.
- [44] Michel E, Jan E, Georg V, Cord S, Walter H, Johannes R, et al. *In vivo* optical imaging of cellular inflammatory response in granuloma formation using fluorescence-labeled macrophages [J]. *J Nucl Med*, 2009, 50: 1676-1682.
- [45] Hickson J. *In vivo* optical imaging: preclinical applications and considerations [J]. *Urol Oncol*, 2009, 27: 295-297.
- [46] Nam T, Park S, Lee S Y, Park K, Choi K, Song I C, et al. Tumor targeting chitosan nanoparticles for dual-modality optical/MR cancer imaging [J]. *Bioconjug Chem*, 2010, 21: 578-582.