细胞外囊泡活体成像技术的研究进展

陶巧玉[1,2,3]，许波华[2]，李嫚琪[4]，张　鹏[2,3,5]，常　艳[4*]

（1. 安徽中医药大学药学院，安徽合肥 230012；2. 益诺思生物技术南通有限公司，江苏南通 226000；3. 长三角药物高等研究院，江苏南通 226133；4. 中国医药工业研究总院，上海益诺思生物技术有限公司，上海 201203；5. 江西中医药大学，江西南昌 330000）

摘要：细胞外囊泡（extracellular vesicles，EVs）是一种由细胞自然分泌的囊泡，包括人体肿瘤细胞在内的几乎所有类型的细胞在生理和病理条件下均可分泌。近年来，EVs因其固有的生物相容性、高稳定性、低免疫原性以及在病理过程中的细胞间通信中发挥的重要作用而引起了广泛关注，被认为是有潜力的药物递送载体，还可能具有治疗恶性肿瘤和其他疾病的潜在价值。实现对体内EVs的准确检测是开发EVs疗法的首要关键步骤，目前已开发出不同的标记、成像方法，如光学成像及放射性同位素成像等，使无创体内示踪成为可能，可直接原位研究其生物分布、迁移和靶向特性。该综述简单介绍了EVs的生物学功能，主要论述了可用于EVs体内示踪的不同成像技术，以期促进EVs的体内生物学过程研究，推进基于EVs的纳米医学应用。

关键词：细胞外囊泡；分子成像；体内示踪；放射性标记；细胞间通信

中图分类号：Q334　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)01-0039-09

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.01.004

Advances in *in vivo* Imaging Technology of Extracellular Vesicles

TAO Qiaoyu[1,2,3], XU Bohua[2], LI Manqi[4], ZHANG Peng[2,3,5], CHANG Yan[4*]

(*1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. InnoStar Biotechnology Nantong Co., Ltd., Nantong 226000; 3. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong 226133; 4. Shanghai InnorStar Biotech Co., Ltd., China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 5. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000*)

ABSTRACT: Extracellular vesicles (EVs) are naturally secreted by almost all types of cells, including human cancer cells, under physiological and pathological conditions. In recent years, due to their inherent biocompatibility, high stability, low immunogenicity, and essential role in intercellular communication in the pathological process, they have attracted wide attention and are considered as promising drug delivery vectors. In addition, they could have potential of treating cancer and other diseases. Accurate detection of EVs *in vivo* is the first critical step in developing EVs therapy. Different markers and imaging methods have been developed to enable non-invasive tracers *in vivo*, such as optical imaging and radioisotope imaging, which can be used to investigate the biological distribution, migration, and targeting characteristics *in vivo* of EVs. In this paper, the biological functions of EVs are briefly introduced, and the different imaging techniques available for *in vivo* tracers are discussed to promote the study of the biological process of EVs *in vivo* and the application of EVs-based nanomedicines.

Key Words: extracellular vesicle; molecular imaging; *in vivo* tracking; radio-labeling; intercellular communication

细胞外囊泡（extracellular vesicles，EVs）是几乎所有类型的细胞均可分泌的天然异质性脂质双分子层封闭囊泡的集合，在细胞间通信中发挥关键作用[1]，在纳米医学领域具有应用潜力。EVs的有效应用取决于其生物分布谱、循环动力学、靶向能力

收稿日期：2022-04-14

基金项目：江苏省新药一站式高效非临床评价公共服务平台建设（BM2021002）

作者简介：陶巧玉（1996—），女，硕士，从事药物代谢动力学研究。

通信作者：常　艳（1974—），女，博士生导师，从事药物毒理学研究。

E-mail：ychang@ncdser.com

和摄取途径等[2—3]，由于目前对 EVs 的活体生物学行为了解有限，其应用有一定的局限性。

分子成像技术是体内成像技术和分子生物学的结合，旨在通过非侵入性的方法在细胞和分子水平上识别或描述实时生物过程。利用分子成像技术可为外源性 EVs 在体内的生物学行为研究提供直接信息[4—6]。其中，基于放射性同位素的活体成像技术凭借其高灵敏性和巨大的临床转化潜力脱颖而出，成为研究 EVs 体内生物过程的有力手段。本研究从 EVs 的生物学功能出发，介绍了目前常用于 EVs 体内示踪的成像技术，聚焦于基于放射性同位素的活体成像技术，以期为 EVs 的体内生物过程研究提供文献支持，推进其在纳米医学领域的应用。

1　EVs 的基本概况

根据 EVs 的生物学来源、大小、形态以及收集方式等，可将其分为不同的亚型[7]：外泌体、微囊泡和凋亡小体（如表 1 所示）。外泌体是被研究较多的亚型，粒径为 50 ～ 150 nm，是由含腔内小泡（intraluminal vesicles，ILVs）的多泡体（multivesicular bodies，MVBs）的膜内陷形成的，在 MVBs 与质膜融合时释放到细胞外空间[7—9]。微囊泡是直接由质膜向外出芽和分裂，被释放到细胞外环境中的，粒径为 100 ～ 1 000 nm，粒度分布不均匀，具有异质性[10—11]。凋亡小体只在细胞程序性死亡过程中形成，通常尺寸较大，且囊泡内存在细胞器，可以将包含的凋亡细胞残余物运送到健康的受体细胞[12]，在此过程中也会释放出较小的囊泡（50 ～ 500 nm）。动植物来源的 EVs 性质也有区别，因此其应用范围也有所不同（如表 2 所示）。

分离 EVs 有多种方法（如表 3 所示），其中超速离心法使用较广泛，被认为是“金标准”。超速离心法即通过不同的离心力将密度不同的颗粒分离，操作简单，但存在运行时间较长、设备昂贵且样本量要求大等诸多不足；此外，为提高纯度需多次离心，可能会破坏 EVs 结构，阻碍下游分析[14—15]。基于共沉淀法开发的快速、简单、易于使用的商业试剂盒（如 Exo Quick^{TM}）可将 EVs 从生物液体中分离出来，不需要长时间超速离心，但因处理量相对较低和化学品污染而应用受限[15—16]。尺寸排阻色谱（size-exclusion chromatography，SEC）可通过多孔固定相过滤不同尺寸的颗粒，分离人体体液中的 EVs，是一种低分辨率的色谱技术[17—19]，产物中可能包含其他类似大小的颗粒和低水平的血浆蛋白复合物。免疫亲和捕获法多用于从复杂生物材料中分

表 1　EVs 的分类

Tab.1　The Classification of EVs

EVs亚型	起源	粒径/nm	密度/(g·ml^{-1})	相对离心力/×g	标志物
外泌体	多泡体与质膜融合	50～150	1.13～1.19	100 000	四跨膜蛋白(CD63/CD9)、肿瘤易感基因101(tumor susceptibility gene 101，TSG101)、凋亡诱导因子6相互作用蛋白(ALIX)
微囊泡	从质膜直接向外出芽或起泡	100～1 000	1.25～1.30	10 000	二磷酸腺苷核糖基化因子6(ADP-ribosylation factor 6，ARF6)、VCAMP3
凋亡小体	细胞凋亡过程中的碎片	1 000～5 000	1.16～1.28	2 000	血小板应答蛋白(thrombospondin，TSP)、C3b

表 2　不同来源 EVs 的对比[13]

Tab.2　Comparison of EVs from Different Sources[13]

项目	粒径	脂质	蛋白	RNA	应用
植物来源	不同植物来源的EVs粒径大小各有差异，多为100～1 000 nm	主要为磷脂酰乙醇胺、磷脂酸和磷脂酰胆碱等，无胆固醇	包括肌动蛋白和蛋白水解酶在内的胞质蛋白、水通道和氯通道相关的膜蛋白等	主要为微小RNA(miRNA)	可用于治疗恶性肿瘤、酒精性肝病、肠炎等，并能调节免疫，作为药物载体
动物来源	根据亚细胞来源可分为微泡和外泌体两类，微泡粒径为100～1 000 nm，外泌体粒径为30～150 nm	主要为胆固醇、神经酰胺等，磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酸等较少	主要有靶向融合蛋白、热休克蛋白家族、膜转运蛋白、参与多囊泡内体形成的蛋白ALIX和TSG101、CD63/CD9、细胞骨架蛋白、信号传递蛋白等	包含丰富的mRNAs、miRNAs和长非编码RNA(long non-coding RNA，lncRNAs)	治疗恶性肿瘤、神经退行性疾病、炎症、感染等，调节免疫、组织再生功能，可作为药物载体

离 EVs，通过特异性抗体修饰的磁珠或微通道表面来分离外泌体，不适合分离较大样本量[20—23]。

2 EVs 的应用

2.1 生物标志物

EVs 是重要的细胞间信号传递媒介，可以传递特定的生物信息，包括 DNA、RNA、蛋白质等，通过与细胞相互作用而引发生物反应[24—26]。EVs 装载的生物大分子反映了供体细胞的来源和状态，肿瘤细胞来源的 EVs 具有作为疾病诊断、监测的候选生物标志物的潜力。YOSHIOKA 等[27]建立了一种高敏感度、快速的分析技术——ExoScreen，可分析来自患者血液 EVs 中的表面蛋白，例如 ExoScreen 能够在结直肠癌患者的血清中检出 CD147 和 CD9 双阳性 EVs。此外，有研究[28]表明前列腺特异性抗原（prostate specific antigen，PSA）和 CD81 双阳性 EVs 可用于前列腺癌诊断；EVs 携带的 lncRNA LINC00152 可作为胃癌的潜在生物标志物[29]；miR-196a 和 miR-1246 可作为胰腺癌的标志物[30]；血浆外泌体中 miR-192 水平的升高可能预示急性心肌梗死后患者的心力衰竭等[31]。

2.2 治疗手段

EVs 参与多种病理和生理学过程，某些 EVs 本身就具有治疗潜力，可将所携带的供体细胞中的各种可溶性蛋白、mRNA、miRNAs 等生物活性物质传递到受体细胞，从而影响其生物学功能。

间充质干细胞来源的 EVs 能将其供体细胞中的各种促生长因子、抗炎因子和抗凋亡因子等传递到受体细胞，改善损伤部位的微环境，作为治疗药物用于组织修复和再生[32]。免疫细胞分泌的 EVs 可通过转移和呈递其供体细胞表面的特异性抗原来调节下游细胞的免疫反应[9]。EVs 已成为一种关键的无细胞治疗策略，用于治疗一系列疾病，包括恶性肿瘤、心肌梗死和炎症性疾病等[33—35]。

2.3 药物载体

EVs 可在细胞外液中安全转运、跨越生物屏障、穿透致密结构组织，高特异性和高效率地将内源性物质运送到目标细胞[24]，具有作为药物载体的潜力。

SUN 等[36]报道了将外泌体作为载体递送抗炎药物（如姜黄素）的技术，该技术能靶向炎性细胞。试验证明，通过外泌体递送的姜黄素在体内更稳定、在血液中的浓度更高。研究[37]表明，携带过氧化氢酶的外泌体可通过血脑屏障，减轻帕金森病的症状，避免了由于血脑屏障致使疗效降低的情况，提高了药物的疗效。外泌体介导的药物递送可增强多柔比星的抗肿瘤活性，与游离多柔比星相比，外泌体包裹的多柔比星对心脏的毒性降低，且未观察到肝肾功能损伤[38—39]。与其他纳米颗粒相比，外泌体具有较高的物理化学稳定性、天然的生物相容性、低免疫原性以及通过信号转导和膜融合与细胞相互作用的内在靶向给药能力等优点，近年来被高度重视[40—43]。

3 EVs 的常见成像方式

EVs 的无创体内示踪技术是发展优化其诊断和治疗作用的重要工具。然而，追踪生物体内的 EVs 是一项挑战[44]，除需要可靠的技术操作外，还须确保经外源性探针标记后 EVs 的膜完整性和生物活性[45]。目前有几种分子成像方法可用于活体中 EVs 的无创追踪[46]，如光学成像［包括荧光成像（fluorescence imaging，FLI）和生物发光成像（bioluminescence imaging，BLI）］、磁共振成像（magnetic resonance imaging，MRI）、正电子发射断层显像（positron emission tomography，PET）和单光子发射计算机断层显像（single-photon emission

表 3 EVs 的不同分离技术

Tab.3 Different Separation Techniques of EVs

分离技术	原理	优点	缺点
超速离心	密度、离心力	金标准、简单	耗时长、成本高、回收率低
共沉淀	表面蛋白	简单、快速	特异性差、产量低
尺寸排阻色谱	尺寸、相对分子质量	快速、方便、高收益	特异性差、需专用设备
免疫亲和捕获	免疫亲和性	高纯度	成本高、产量低

computed tomography，SPECT），表 4 总结了各种方法的优势与局限性 [47—49]。

3.1 光学成像

光学成像技术依赖于对光的监测，以高通量效率和低成本的优势，在分子和细胞生物学领域得到广泛应用。

3.1.1 FLI

FLI 是一种直接、高效、相对低成本的标记和成像技术，需使用能在外部光源激发下发光的内源性或外源性荧光分子 [50—51]。例如绿色荧光蛋白（GFP）和红色荧光蛋白（RFP）等荧光蛋白，主要通过间接标记，阐明生物发生、分泌和通信机制，已被广泛用于标记活细胞和活体组织。亲脂性荧光染料可通过长脂肪链锚定在 EVs 膜的磷脂双分子层或某些特定蛋白上，也可用于 EVs 在体内的示踪。

WIKLANDER 等 [52] 使用荧光亲脂性示踪剂近红外荧光染料花青素（DiR）标记人胚胎肾细胞（HEK293T 细胞）来源的 EVs，将 DiR-EVs 尾静脉注射给予小鼠，在注射后 24 h 使用图像可视化与红外光谱（image visualization and infrared spectroscopy，IVIS）分析 DiR-EVs 的生物分布。为进一步证实试验结果，将 CD63-EGFP 质粒［可表达增强绿色荧光蛋白（EGFP）］转染到 HEK293T 细胞中，收集 CD63-EGFP-EVs，采用纳米颗粒跟踪分析（nanoparticle tracking analysis，NTA），结果显示约 20％的 EVs 为 EGFP 阳性。将静脉注射给药 24 h 后收集到的小鼠器官快速冷冻切片，并用 4',6-二脒基 -2- 苯基吲哚（4',6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）染色，结果显示肝脏和脾脏中可检测到 EGFP 阳性的 EVs，但肺脏和肾脏中未检出，与 DiR-EVs 生物分布结果一致。

然而，FLI 也存在一些局限性，例如穿透深度和空间分辨率较低，存在自荧光伪影（因为某些染料的发射峰会与生物组织的自发荧光发射峰重叠）[45]，也可能影响膜蛋白的流动性，且由于脂质染料的半衰期远超过 EVs，EVs 降解后，荧光染料可能会被再循环和重新分配，成为假信号。

3.1.2 BLI

BLI 不需激发光，而是以特异性荧光素酶为底物与 ATP 和 Mg^{2+} 反应或单独与氧反应而产生生物发光信号。通过构建表达荧光素酶与 EVs 高表达蛋白的融合质粒并转染到母细胞中，可得到荧光素酶标记的 EVs，然后利用超灵敏的摄像机检测荧光素酶的生物荧光信号来示踪其在体内的分布。

TAKAHASHI 等 [53] 首次报道利用 BLI 对 EVs 进行可视化研究，设计了一种由 Gaussia 荧光素酶（gLuc）和乳糖黏附蛋白（LA，一种已知位于外泌体表面的蛋白）组成的融合蛋白，并构建了表达该融合蛋白的质粒，转染到小鼠黑色素瘤细胞（B16-BL6 细胞）后，通过超速离心收集细胞释放的外泌体。将收集的外泌体静脉注射到小鼠体内并评估其组织分布，连续的体内成像结果显示，信号首先分布到肝脏，然后到肺部。此外，药动学分析结果显示，标记的外泌体会快速从体内清除，注射后 4 h 的血

表 4　用于 EVs 可视化的常见体内成像技术

Tab.4　Common *in vivo* Imaging Techniques for the Visualization of EVs

成像技术	发射源	检测探针	空间分辨率/mm	时间分辨率
FLI/BLI	可见光和近红外	荧光蛋白报告基因、亲脂染料/荧光素酶	0.002～0.005	秒至分钟级
MRI	无线电波	超顺磁氧化铁纳米粒子(superparamagnetic iron oxide nanoparticles，SPION)	0.025～0.100	分钟至小时级
PET	高能γ-射线	放射性同位素	2～4	秒至分钟级
SPECT	低能γ-射线	放射性同位素	4～6	分钟级
成像技术	穿透深度	灵敏度/(mol·L^{-1})	优势	缺点
FLI/BLI	1～2 cm	10^{-9}～10^{-12}	低成本、易操作、高灵敏度、可检测活细胞和死细胞中的荧光形态和实现功能成像、无穿透限制、高空间分辨率	穿透有限、低空间分辨率、自发荧光干扰
MRI	无限制	10^{-3}～10^{-5}		灵敏度低、高成本、扫描处理费时
PET	无限制	10^{-11}～10^{-12}	高灵敏度、可定量、无穿透限制	高成本、低空间分辨率、辐射风险
SPECT	无限制	10^{-10}～10^{-11}		

清中只检测到很少的荧光素酶信号。

BLI 的优点是安全性较好、不需要激发光源、灵敏度高，以及信噪比较高，但其穿透深度较浅和空间分辨率较低，不适于临床应用[51,54]。

3.2 MRI

MRI 是强大的分子成像工具之一，主要用于临床诊断，如包括大脑在内的主要器官的成像、评估心脏和肾脏等器官的功能，以及肿瘤检测。

SPION 和超小超顺磁氧化铁纳米粒子（ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticles，USPION）由于体积小、生物相容性好，是标记 EVs 用于 MRI 体内追踪的良好探针。HU 等[55]报道采用一种电穿孔方法可将 5 nm 的 SPION 标记于小鼠皮肤黑色素瘤细胞（B16-F10 细胞）来源的外泌体上，给药 48 h 后通过 MRI 成像进行体内跟踪，揭示了外泌体从足垫到淋巴结的迁移过程。BUSATO 等[56]报道了一种 USPION 标记外泌体的方法：将脂肪干细胞与 USPION（4 ～ 6 nm）共孵育 72 h，通过胞饮作用可以 100%标记细胞，且这种标记细胞的活力与未标记的细胞相当。该方法通过间接方式获得了 USPION 标记的 EVs，避免了电穿孔可能造成的 EVs 膜结构破坏。

与光学成像或 SPECT/PET 相比，MRI 具有高分辨率、无限的穿透深度和良好的软组织对比度，在安全性方面优于放射性同位素标记法，所开发的核磁共振标记方法可用于临床应用，还可与解剖评估、功能评估和组织表征相结合，但与其他分子成像方式相比，MRI 的检测灵敏度相对较低[56—58]。

3.3 基于放射性同位素的活体成像

基于放射性同位素的活体成像包括 SPECT 和 PET，使用放射性核素作为成像探针，灵敏度较高。由于其灵敏度高、组织穿透能力强和定量准确，使深部结构和器官的可视化成为可能，并且该法允许探头在微米至纳米级范围内进行检测[59]，适用于 EVs 的活体无创追踪。

SPECT 成像是基于对能量在 30 ～ 300 keV 且半衰期（$t_{1/2}$）从小时到天不等的 γ- 辐射核素发射的单光子［如 ^{99m}Tc（$t_{1/2}$=6 h）、^{111}In（$t_{1/2}$=2.8 d）和 ^{123}I（$t_{1/2}$=13.2 h）[60]］的探测。PET 则是基于放射性同位素的衰变，它释放一个正电子并与受检组织中附近的一个电子湮灭，产生 2 个方向相反、能量相同（511 keV）的 γ 光子对，以提供高分辨率的图像，灵敏度比 SPECT 高 2 ～ 3 倍[61]。PET 常用的同位素包括 ^{18}F（$t_{1/2}$=110 min）、^{68}Ga（$t_{1/2}$=68 min）、^{64}Cu（$t_{1/2}$=12.7 h）和 ^{89}Zr（$t_{1/2}$=3.3 d）等。通常可使用 SPECT 或 PET 获得三维图像，并与 CT 或 MRI 等结合，以提供分子和解剖细节，提高定位能力。目前大多数放射性核素已应用于临床。

ROYO 等[62]通过用亲电芳香基团取代嵌入在 EVs 表面蛋白质中的酪氨酸残基来实现［^{124}I］NaI 的放射性标记，可以在给药后数小时到数天内对标记的 EVs 进行体内追踪。结果显示，放射化学产率为（17±2）%，标记前后蛋白含量损失 <5%。稳定性研究表明，在生理盐水中孵育 72 h 后游离放射性碘含量 <10%，放射化学纯度保持相对稳定，可在小鼠体内实现更长时间的活体追踪。

HWANG 等[63]开发了一种用 ^{99m}Tc- 六甲基丙烯胺肟（^{99m}Tc-HMPAO）放射性标记巨噬细胞来源的拟外泌体纳米囊（exosome-mimetic nanovesicles，ENVs）的方法，并使用 SPECT/CT 监测 ^{99m}Tc-HMPAO-ENVs 在小鼠体内的生物分布。^{99m}Tc-HMPAO 是一种不带电的低分子、高亲脂性的放射性示踪剂，广泛用于细胞标记。HMPAO 首先与 ^{99m}Tc 混合形成亲脂性的 ^{99m}Tc-HMPAO，然后在温和的条件下与 ENVs 孵育，使 ^{99m}Tc-HMPAO 在脂质双分子层中扩散并与 ENVs 内的谷胱甘肽巯基发生反应，转化为亲水形式，不可逆地滞留在 ENVs 内。^{99m}Tc-HMPAO-ENVs 的放射化学纯度高于 90%，且外泌体特异性蛋白（CD63）的表达未发生变化，NTA 结果显示其平均尺寸分布没有显著变化，小鼠的 SPECT/CT 图像显示肝脏高摄取，其次为脾、肾，脑中无摄取。

SMYTH 等[64]使用放射性同位素 ^{111}In（$t_{1/2}$=2.8 d）实现了外泌体的放射性标记，^{111}In 与 8- 羟基喹啉（oxine）可形成一种不带电的伪八面体复合物，该复合物通过外泌体的脂质双分子层自由扩散进入外

泌体腔内后，^{111}In 与 8- 羟基喹啉分离，并与腔内的蛋白质和核酸形成稳定的复合物，缺点是由于 ^{111}In 的高能 γ- 辐射，^{111}In-8- 羟基喹啉对关键器官和整个身体的辐射暴露量大大高于 ^{99m}Tc-HMPAO。

FARUQU 等 [65] 提出使用环庚三烯酚酮（tropolone）代替 8- 羟基喹啉。环庚三烯酚酮是一种疏水小分子，也可与 ^{111}In 形成复合物并通过外泌体膜扩散进入腔内。由于 ^{111}In 与环庚三烯酚酮之间的相互作用不是特别强，^{111}In 可从该复合物中分离出来，与外泌体腔内的蛋白质和核酸发生交换，而游离的环庚三烯酚酮分子离开外泌体，从而形成放射性标记的外泌体。SPECT/CT 图像分析证实了 ^{111}In 标记外泌体在体内的稳定性，且 ^{111}In 标记不影响外泌体的生物学特性，包括 CD9 和 CD63 外泌体表面标志物的表达。

SHI 等 [66] 提出了另一种利用双官能团螯合剂 2-*S*-（4- 异硫氰基苄基）-1,4,7- 三氮杂环壬烷 -1,4,7- 三乙酸（*p*-SCN-Bn-NOTA）与外泌体表面蛋白结合并聚乙二醇化后用于 ^{64}Cu 标记的方法。该方法的新颖之处在于，通过亲核攻击，用 *N*- 羟基琥珀酰亚胺功能化的聚乙二醇（$mPEG_{5k}$-NHS）将外泌体表面聚乙二醇化，以改善其药动学性质和肿瘤内积累。温和条件下，聚乙二醇化外泌体能与 $^{64}CuCl_2$ 快速复合，标记率高。与没有表面涂层的天然外泌体相比，这种方法增强了肿瘤摄取和成像能力，降低了外泌体的肝脏清除率。

JUNG 等 [67] 描述了一种用于标记 4T1 乳腺癌源性外泌体的方法，使用 *p*-SCN-Bn-NOTA 作为放射性同位素 ^{64}Cu 和 ^{68}Ga 的双官能团螯合剂。此外，用近红外荧光染料 Cy7 也可标记外泌体。光学图像显示 Cy7 信号仅在臂淋巴结和注射部位检测到，而 PET 图像则能更清晰地显示标记物在腋窝和臂淋巴结处的定位，灵敏度更高。

4　总结

近年来，EVs 的基本生物学研究取得了很大进展，具有较大的临床应用潜力。本研究简单介绍了 EVs 的基本概况及相关生物学功能，总结了 EVs 可用的体内示踪成像技术，并描述了它们各自的优点和局限性。在不断发展的纳米技术领域，分子成像有助于指导 EVs 在医学诊断和治疗方面应用的发展，对于 EVs 的体内示踪能够帮助人们更好地理解生理和病理过程，促进基于 EVs 的药物递送系统的临床开发，对于开发可靠的治疗和诊断工具至关重要。但目前使用的光学成像、MRI 和放射性核素成像均是在成熟细胞示踪的基础上通过调整参数来试图实现对 EVs 的向下兼容，尚缺乏 EVs 动态示踪的专用平台，因此有必要提倡开发具有综合优势的多模态成像平台 [68]。

参考文献：

[1] TAI Y L, CHEN K C, HSIEH J T, *et al*. Exosomes in cancer development and clinical applications [J]. *Cancer Sci*, 2018, **109**(8): 2364-2374.

[2] ROCCO G D, BALDARI S, TOIETTA G. Towards therapeutic delivery of extracellular vesicles: strategies for *in vivo* tracking and biodistribution analysis [J]. *Stem Cells Int*, 2016, **2016**: 5029619.

[3] MORISHITA M, TAKAHASHI Y, NISHIKAWA M, *et al*. Pharmacokinetics of exosomes-an important factor for elucidating the biological roles of exosomes and for the development of exosome-based therapeutics [J]. *J Pharm Sci*, 2017, **106**(9): 2265-2269.

[4] WU M, SHU J. Multimodal molecular imaging: current status and future directions [J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2018, **2018**: 1382183.

[5] KIM D H, KOTHANDAN V K, KIM H W, *et al*. Noninvasive assessment of exosome pharmacokinetics *in vivo*: a review [J]. *Pharmaceutics*, 2019, **11**(12): 649.

[6] CHUO S T Y, CHIEN J C Y, LAI C P K. Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods [J]. *J Biomed Sci*, 2018, **25**(1): 91.

[7] JABALEE J, TOWLE R, GARNIS C. The role of extracellular vesicles in cancer: cargo, function, and therapeutic implications [J]. *Cells*, 2018, **7**(8): 93.

[8] THÉRY C, ZITVOGEL L, AMIGORENA S. Exosomes: composition, biogenesis and function [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, **2**(8): 569-579.

[9] ROBBINS P D, MORELLI A E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, **14**(3): 195-208.

[10] MAAS S L N, BREAKEFIELD X O, WEAVER A M.

Extracellular vesicle: unique intercellular delivery vehicles [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, **27**(3): 172-188.

[11] BEBELMAN M P, SMIT M J, PEGTEL D M, *et al*. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, **188**: 1-11.

[12] AKERS J C, GONDA D, KIM R, *et al*. Biogenesis of extracellular vesicles(EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies [J]. *J Neurooncol*, 2013, **113**(1): 1-11.

[13] 王 前, 郑 磊. 细胞外囊泡: 基础研究与临床应用[M]. 北京: 科学出版社, 2019: 296.

[14] MOMEN-HERAVI F, BALAJ L, ALIAN S, *et al*. Current methods for the isolation of extracellular vesicles [J]. *Biol Chem*, 2013, **394**(10): 1253-1262.

[15] BU H C, HE D G, HE X X, *et al*. Exosomes: isolation, analysis, and applications in cancer detection and therapy [J]. *Chembiochem*, 2019, **20**(4): 451-461.

[16] TAYLOR D D, ZACHARIAS W, GERCEL-TAYLOR C. Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, **728**: 235-246.

[17] KREIMER S, IVANOV A R. Rapid isolation of extracellular vesicles from blood plasma with size-exclusion chromatography followed by mass spectrometry-based proteomic profiling [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, **1660**: 295-302.

[18] BÖING A N, VAN DER POL E, GROOTEMAAT A E, *et al*. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography [J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, **3**(1): 1-11.

[19] NAVAJAS R, CORRALES F J, PARADELA A. Serum exosome isolation by size-exclusion chromatography for the discovery and validation of preeclampsia-associated biomarkers [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, **1959**: 39-50.

[20] GARDINER C, DI VIZIO D, SAHOO S, *et al*. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey [J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, **5**: 32945.

[21] KANG Y T, KIM Y J, BU J, *et al*. High-purity capture and release of circulating exosomes using an exosome-specific dual-patterned immunofiltration(Exo DIF) device [J]. *Nanoscale*, 2017, **9**(36): 13495-13505.

[22] HONG C S, MULLER L, BOYIADZIS M, *et al*. Isolation and characterization of $CD34^+$ blast-derived exosomes in acute myeloid leukemia [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(8): e103310.

[23] TAURO B J, GREENING D W, MATHIAS R A, *et al*. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes [J]. *Methods*, 2012, **56**(2): 293-304.

[24] MURPHY D E, DE JONG O G, BROUWER M, *et al*. Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking [J]. *Exp Mol Med*, 2019, **51**(444): 1-12.

[25] SIMEONE P, BOLOGNA G, LANUTI P, *et al*. Extracellular vesicles as signaling mediators and disease biomarkers across biological barriers [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(7): 2514.

[26] JURJ A, ZANOAGA O, BRAICU C, *et al*. A comprehensive picture of extracellular vesicles and their contents molecular transfer to cancer cells [J]. *Cancers* (Basel), 2020, **12**(2): 298.

[27] YOSHIOKA Y, KOSAKA N, KONISHI Y, *et al*. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen [J]. *Nat Commun*, 2014, **5**: 3591.

[28] LOGOZZI M, ANGELINI D F, IESSI E, *et al*. Increased PSA expression on prostate cancer exosomes in *in vitro* condition and in cancer patients [J]. *Cancer Lett*, 2017, **403**: 318-329.

[29] LI Q, SHAO Y F, ZHANG X J, *et al*. Plasma long noncoding RNA protected by exosomes as a potential stable biomarker for gastric cancer [J]. *Tumor Biol*, 2015, **36**(3): 2007-2012.

[30] XU Y F, HANNAFON B N, ZHAO Y D, *et al*. Plasma exosome miR-196a and miR-1246 are potential indicators of localized pancreatic cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, **8**(44): 77028-77040.

[31] MATSUMOTO S, SAKATA Y, SUNA S, *et al*. Circulating p53-responsive microRNAs are predictive indicators of heart failure after acute myocardial infarction short communication [J]. *Circ Res*, 2013, **113**(3): 322-326.

[32] GANGADARAN P, RAJENDRAN R L, LEE H W, *et al*. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells activates VEGF receptors and accelerates recovery of hindlimb ischemia [J]. *J Control Release*, 2017, **264**: 112-126.

[33] YANG B W, CHEN Y, SHI J L. Exosome biochemistry and advanced nanotechnology for next-generation theranostic platforms [J]. *Adv Mater*, 2019, **31**(2): e1802896.

[34] LANE R E, KORBIE D, HILL M M, *et al*. Extracellular vesicles as circulating cancer biomarkers: opportunities and challenges [J]. *Clin Transl Med*, 2018, **7**(1): 14.

[35] ARMSTRONG J P K, HOLME M N, STEVENS M M. Re-engineering extracellular vesicles as smart nanoscale

therapeutics [J]. *Acs Nano*, 2017, **11**(1): 69-83.

[36] SUN D M, ZHUANG X Y, XIANG X Y, *et al*. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes [J]. *Mol Ther*, 2010, **18**(9): 1606-1614.

[37] HANEY M J, KLYACHKO N L, ZHAO Y, *et al*. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy [J]. *J Control Release*, 2015, **207**: 18-30.

[38] DE JONG B, BARROS E R, HOENDEROP J G J, *et al*. Recent advances in extracellular vesicles as drug delivery systems and their potential in precision medicine [J]. *Pharmaceutics*, 2020, **12**(11): 1006.

[39] TOFFOLI G, HADLA M, CORONA G, *et al*. Exosomal doxorubicin reduces the cardiac toxicity of doxorubicin [J]. *Nanomedicine* (Lond), 2015, **10**(19): 2963-2971.

[40] SHEN L M, QUAN L L, LIU J. Tracking exosomes *in vitro* and *in vivo* to elucidate their physiological functions: implications for diagnostic and therapeutic nanocarriers [J]. *Acs Appl Nano Mater*, 2018, **1**(6): 2438-2448.

[41] LORENC T, CHRZANOWSKI J, OLEJARZ W. Current perspectives on clinical use of exosomes as a personalized contrast media and theranostics [J]. *Cancers*, 2020, **12**(11): 3386.

[42] LUAN X, SANSANAPHONGPRICHA K, MYERS I, *et al*. Engineering exosomes as refined biological nanoplatforms for drug delivery [J]. *Acta PharmacolSin*, 2017, **38**(6): 754-763.

[43] ZHENG Y Z, HASAN A, BABADAEI M M N, *et al*. Exosomes: multiple-targeted multifunctional biological nanoparticles in the diagnosis, drug delivery, and imaging of cancer cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, **129**: 110442.

[44] BETZER O, BARNOY E, SADAN T, *et al*. Advances in imaging strategies for *in vivo* tracking of exosomes [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2020, **12**(2): e1594.

[45] KOUREMBANAS S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy [J]. *Annu Rev Physiol*, 2015, **77**: 13-27.

[46] GANGADARAN P, HONG C M, AHN B C. Current perspectives on *in vivo* noninvasive tracking of extracellular vesicles with molecular imaging [J]. *Biomed Res Int*, 2017, **2017**: 9158319.

[47] MAHMOUDI M, SERPOOSHAN V, LAURENT S. Engineered nanoparticles for biomolecular imaging [J]. *Nanoscale*, 2011, **3**(8): 3007-3026.

[48] YOUN H, HONG K J. *In vivo* non invasive molecular imaging for immune cell tracking in small animals [J]. *Immune Netw*, 2012, **12**(6): 223-229.

[49] YI Y W, LEE J H, KIM S Y, *et al*. Advances in analysis of biodistribution of exosomes by molecular imaging [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(2): 665.

[50] JUNG E K, SENTHILKUMAR K, BYEONG-CHEOL A. *In vivo* cell tracking with bioluminescence imaging [J]. *Nucl Med Mol Imaging*, 2015, **49**(1): 3-10.

[51] LI Y J, WU J Y, WANG J M, *et al*. Emerging strategies for labeling and tracking of extracellular vesicles [J]. *J Control Release*, 2020, **328**: 141-159.

[52] WIKLANDER O P B, NORDIN J Z, O'LOUGHLIN A, *et al*. Extracellular vesicle *in vivo* biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, **4**(1): 1-8.

[53] TAKAHASHI Y, NISHIKAWA M, SHINOTSUKA H, *et al*. Visualization and *in vivo* tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection [J]. *J Biotechnol*, 2013, **165**(2): 77-84.

[54] GANGADARAN P, HONG C M, AHN B C. An update on *in vivo* imaging of extracellular vesicles as drug delivery vehicles [J]. *Front Pharmacol*, 2018, **9**: 169.

[55] HU L S, WICKLINE S A, HOOD J L. Magnetic resonance imaging of melanoma exosomes in lymph nodes [J]. *Magn Reson Med*, 2015, **74**(1): 266-271.

[56] BUSATO A, BONAFEDE R, BONTEMPI P, *et al*. Magnetic resonance imaging of ultrasmall superparamagnetic iron oxide-labeled exosomes from stem cells: a new method to obtain labeled exosomes [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, **11**: 2481-2490.

[57] TADA Y, YANG P C. Iron oxide labeling and tracking of extracellular vesicles [J]. *Magnetochemistry*, 2019, **5**(4): 60.

[58] CASSIDY P J, RADDA G K. Molecular imaging perspectives [J]. *J R Soc Interface*, 2005, **2**(3): 133-144.

[59] GAMBHIR S S. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, **2**(9): 683-693.

[60] GOMES C M, ABRUNHOSA A J, RAMOS P, *et al*. Molecular imaging with SPECT as a tool for drug development [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, **63**(7): 547-554.

[61] CHERRY S R. Fundamentals of positron emission tomography and applications in preclinical drug development [J]. *J Clin Pharmacol*, 2001, **41**(5): 482-491.

[62] ROYO F, COSSÍO U, DE ANGULO A R, *et al*. Modification of the glycosylation of extracellular vesicles alters their biodistribution in mice [J]. *Nanoscale*, 2019, **11**(4): 1531-1537.

[63] HWANG D W, CHOI H, JANG S C, *et al*. Noninvasive imaging of radiolabeled exosome-mimetic nanovesicle using ^{99m}Tc-HMPAO [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 15636.

[64] SMYTH T, KULLBERG M, MALIK N, *et al*. Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes [J]. *J Control Release*, 2015, **199**: 145-155.

[65] FARUQU F N, WANG J T W, XU L Z, *et al*. Membrane radiolabelling of exosomes for comparative biodistribution analysis in immunocompetent and immunodeficient mice—a novel and universal approach [J]. *Theranostics*, 2019, **9**(6): 1666-1682.

[66] SHI S X, LI T T, WEN X F, *et al*. Copper-64 labeled PEGylated exosomes for *in vivo* positron emission tomography and enhanced tumor retention [J]. *Bioconjug Chem*, 2019, **30**(10): 2675-2683.

[67] JUNG K O, KIM Y H, CHUNG S J, *et al*. Identification of lymphatic and hematogenous routes of rapidly labeled radioactive and fluorescent exosomes through highly sensitive multimodal imaging [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(21): 7850.

[68] MA N, WU C F, MENG Z H. *In vivo* imaging and tracking of exosomes for theranostics [J]. *J Innovative Opt Health Sci*, 2021, **14**(6): 2130005.

