

## 外泌体成像技术的研究进展

金陆飞, 汪建华\*

(宁波大学医学院, 宁波 315000)

**摘要:** 外泌体与其母细胞具有同质性, 基于此特性, 其在肿瘤成像及载药治疗中均能发挥靶向优势。通过外泌体与多种成像技术的联合应用, 不仅可有效探索外泌体的体内生物分布规律, 也能有效发挥成像材料及治疗药物的诊疗作用。但不同成像方式在外泌体中应用的潜力仍有待探究。本文就外泌体的不同成像技术研究进展作一综述, 希望为外泌体成像载药技术发展提供新思路。

**关键词:** 外泌体; 成像; 治疗

## Advances in exosome imaging techniques

JIN Lufei, WANG Jianhua\*

(School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315000, China)

**Abstract:** Exosomes have homogeneity with their metrocyte. Based on this feature, they can play a targeted advantage in tumor imaging and drug-loaded therapy. The combined application of exosomes and multiple imaging technologies, can not only effectively explore the biological distribution of exosomes in the body, but also play the role of imaging materials and therapeutic drugs in diagnosis and treatment. But the application of different imaging methods in exosomes remains to be explored. This paper reviews the research progress of different imaging technologies for exosomes, hoping to provide new ideas for the development of drug-carrying technologies for imaging of exosomes.

**Key Words:** exosome; imaging; threapy

外泌体是一种外膜由脂质双分子层组成、呈“碟状”结构、直径为30 nm~150 nm的囊泡, 它是细胞外囊泡的亚型之一<sup>[1]</sup>。研究表明, 几乎所有类型的细胞都可分泌外泌体, 其在血浆、尿液、精液、唾液、支气管液、脑脊液, 母乳、血清、羊水、突触液、眼泪、淋巴、胆汁和胃酸中亦广泛存在<sup>[2]</sup>。外泌体可携带核酸、蛋白质、脂质和其他生物活性物质<sup>[3]</sup>, 这些成分因其来源和细胞类型不同而不同<sup>[4]</sup>, 而该特性赋予了外泌体独特的迁移、定向和选择性内化到特定细胞的能力<sup>[5]</sup>。因此, 外泌体可作为分子信息的载体或新型示踪剂

载体, 将大量的生物活性分子或特殊标记物传递给特定的受体细胞, 用于细胞间的通讯交流及靶向诊疗<sup>[6]</sup>。随着对外泌体研究的不断深入, 对外泌体进行电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)成像、磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI), 甚至核成像有望成为影像诊疗的新思路和手段。但目前对外泌体的认知尚不全面, 特别是其在体内与受体细胞相互作用诱导的变化差异很大, 故将其作为载体应用于成像诊疗仍存在盲区。追踪外泌体在体内的分布、迁移能力、毒性、生物学作用、通讯能力及作用机制可

收稿日期: 2021-12-10

基金项目: 宁波市自然科学基金项目(2021J254)

第一作者: E-mail: 957230576@qq.com

\*通信作者: E-mail: woxingw@sina.com

为其应用提供依据<sup>[5]</sup>。因此,开发高效、灵敏和生物兼容的外泌体标记和成像诊疗技术成为可能。本文就外泌体成像、诊疗的研究进展作一简要综述。

## 1 外泌体的荧光成像

### 1.1 亲脂性荧光染料成像

最初,大多数研究主要依靠亲脂性染料标记细胞膜对细胞进行显像。如亲脂性近红外染料DiR与膜结合后,会在细胞质膜中逐步扩散并将整个细胞染色,实时荧光成像系统可对其染色的细胞进行成像以及跟踪<sup>[7]</sup>。因此,相当一部分研究也以此来探究细胞迁移等生物学行为<sup>[8]</sup>。此后,亲脂性染料成功应用于标记外泌体脂质双分子层,成为最简单有效的外泌体标记方法。该研究领域常用的亲脂性荧光染料有PKH26、PKH67、DiI、DiR<sup>[9-11]</sup>。然而,这些染料具有荧光强度低和组织穿透深度有限的缺点,使其对囊泡的成像会有部分信号丢失,因此很少应用于外泌体的实时跟踪<sup>[12]</sup>。其次,亲脂性染料具有高度稳定性和抗降解性<sup>[13]</sup>,具有较长的半衰期,染料易进入不反映囊泡生物分布的其他细胞膜中,从而影响囊泡生物分布研究的准确性<sup>[14,15]</sup>。此外,亲脂性荧光染料与囊泡表面脂质结合后,囊泡表面性质会发生变化,导致囊泡在某些器官中的生物分布有所改变<sup>[16]</sup>。综上所述,亲脂性荧光染料作为外源性标记,在外泌体体内成像中应用比较局限。但不可否认的是,该成像技术为探索外泌体在体内的分布奠定了一定的基础。同时,该类染料标记外泌体是量化指标实现的重要工具,我们可通过探索不同受体细胞对外泌体胞吞内化的情况,了解外泌体被受体细胞摄取的特点以及两者之间的关系。

### 1.2 荧光蛋白成像

基于荧光蛋白的成像主要使用分子生物学方法将荧光蛋白与外泌体膜上的标记蛋白融合表达,通过监测膜蛋白的荧光来研究外泌体释放、吸收、内容物递送等过程。Verweij等<sup>[17]</sup>通过在斑马鱼胚胎中表达CD63-pHluorin基因,对细胞分泌的外泌体示踪成像,首次揭示了体内外泌体的分泌、扩散和被摄取,以及这些过程中的关键分子

介质。本文着重综述基于荧光蛋白的成像流式细胞术以及激光共聚焦成像技术。

高灵敏度、高通量的成像流式细胞术不仅可对外泌体进行定量分析,还可研究外泌体与肿瘤细胞之间的作用关系以及外泌体的功能。同样,基于荧光蛋白的激光共聚焦成像亦是研究外泌体生物过程的重要手段。Lai等<sup>[18]</sup>使用棕榈酰化序列的荧光蛋白标记肿瘤细胞膜,利用激光共聚焦显微镜研究肿瘤细胞分泌的外泌体在细胞间交换的生物过程。需要提出的是,荧光蛋白一般只能标记外泌体表面一些特定物质,目前外泌体表面仍有许多尚未发现的特异性蛋白标志物,因此,两种成像在研究外泌体生物过程中仍受到一定限制。此外,相较于脂质荧光标记半衰期长的特点,荧光蛋白标记截然相反,相对较短的半衰期导致其标记效率较低,给后期体成像带来了一定挑战<sup>[19]</sup>。何文慧<sup>[20]</sup>利用吡啶酮类荧光探针与带负电的外泌体结合,在斑马鱼体内实现了头、腹、尾部均显示绿色荧光的体成像。然而,当前对其他模式动物中的体成像尚未有更进一步的研究。由此看来,基于荧光蛋白的成像技术在未来探究外泌体生物过程以及体内分布仍有较大进展空间。值得一提的是,荧光蛋白特异性缀合到外泌体上,一定程度上避免了假阳性信号,在研究外泌体的调控和功能上具有一定的优势。

### 1.3 生物荧光成像

生物荧光成像(bioluminescence imaging, BLI)也是外泌体活体成像技术之一。BLI需要以蛋白质——荧光素酶标记为基础,当细胞转染荧光素酶基因后,分泌表面带有荧光素酶的外泌体,荧光素酶与相应底物结合后,可利用酶-底物反应产生生物发光<sup>[21]</sup>。目前,高斯荧光素酶、海肾荧光素酶、纳米荧光素酶等已经陆续应用于外泌体成像中<sup>[22-24]</sup>。与脂质荧光标记不同的是,生物荧光标记作为内源性标记,不需要光源激发出波长更长的光<sup>[25]</sup>,并且相较于脂质荧光标记具有更高的灵敏度和更高的信噪比<sup>[12]</sup>。Gupta等<sup>[16]</sup>不仅证明了纳米荧光素酶具有出色的亮度和稳定性,还发现CD63-Thermo荧光素酶具有较高的发射波长,更易穿透组织,能够清晰地显示囊泡在体内的生物分布。相较于外源性标记,我们发现BLI所应用的内源性

标记在体内实时示踪外泌体更具优势。特别是在活体条件下, BLI对动物体成像可达到连续观察的目的, 是后续研究外泌体的有效工具。当然, BLI也受到一些客观条件的约束。首先, 荧光素酶的发光需要底物触发<sup>[26]</sup>, 它自身并不能发出荧光; 其次, 荧光素酶需通过质粒转染或慢病毒转导入原代细胞中表达, 后者分泌表达有荧光素酶的囊泡, 实现对囊泡的成像<sup>[12]</sup>。然而, 该技术的实施往往需要构建复杂的转基因细胞株, 这对原代细胞具有一定的挑战性。最后, 我们不难发现, 生理液体来源的外泌体可能无法找到原代细胞, 荧光素酶也就不能在相应原代细胞中表达, 从而无法实现外泌体成像<sup>[27]</sup>。综上, 外泌体通过BLI成像虽然受到一些自身客观因素的限制, 但其成像优势仍是一大亮点, 特别是实时成像为研究外泌体在体内生物分布及迁移带来巨大优势。

## 2 外泌体的光声成像及其应用治疗

荧光成像虽然已广泛应用于科学研究中, 但这些传统的荧光成像只是对外泌体进行标记追踪, 在疾病的成像、治疗上并未获得突破性进展。外泌体的光声成像(photoacoustic imaging, PAI)是近几年发展起来的一种新型结构和功能成像技术, 结合了光学成像和超声成像的优点, 具有高分辨率和高组织对比度, 突破了光学成像的深度限制。当前, PAI的成像材料有光敏剂、光热剂等, 这些成像材料通过近红外光激发产生光声信号, 光声成像系统可探测到产生的光声信号并重建光吸收分布图像。同时, 成像材料本身可显现出相应的治疗效果, 使PAI在肿瘤诊疗上开始崭露头角。首先, 光敏剂是一种能吸收辐射能的药物, 其在特定波长激光照射下, 吸收光子能量发光成像, 并进一步释放电子或能量, 将环境氧分子转换为活性氧, 释放的活性氧可使细胞内部发生氧化应激, 导致细胞受损, 甚至死亡<sup>[28-30]</sup>。一般来讲, 依靠光敏剂的治疗方式被称为非侵入性触发式治疗——光动力治疗。而在众多光敏剂中, 二氢卟吩e6(chlorine6, Ce6)已成为新一代光动力治疗癌症药物中的明星分子, 其具有化学结构明确、光动力反应能力强、暗毒性小和体内代谢快等诸多优点<sup>[31]</sup>。然而, Ce6疏水性强、具有非选择

性细胞毒性及难以富集到病灶部位的缺点<sup>[32]</sup>, 进入人体后, 在循环过程中易被细胞吸收, 滞留在各个脏器, 对脏器造成一定损伤, 故其生物医学应用受到限制。因此, Jang等<sup>[33]</sup>将外泌体进行重组使其具有靶向性, 并将Ce6载入重组外泌体内, 最终使载有Ce6的重组外泌体靶向进入胰腺癌肿瘤组织, 实现肿瘤精准PAI可视化以及杀伤肿瘤的目的。此外, Pan等<sup>[34]</sup>将光敏剂Ce6结合至超小的金纳米粒子, 使其转变成亲水性物质, 并将其包裹至外泌体内, 利用外泌体本身具有一定的细胞靶向特异性功能, 精准到达肿瘤部位, 实现了肿瘤精准荧光成像与治疗。后者虽未进行PAI成像, 但我们不难发现光敏剂自身发挥的杀伤肿瘤作用具有相当大的前景。值得一提的是, 外泌体具有的靶向性能优势弥补了光敏剂药物的缺陷, 为肿瘤疾病精准诊疗带来新的研究方向。而在光热材料上, 有学者利用光热材料金纳米星提升了外泌体靶向至肿瘤的性能。Zhu等<sup>[35]</sup>利用金纳米星高效靶向肿瘤以及促进肿瘤细胞外泌体胞吐的特性, 将肿瘤细胞与金纳米星共同孵育, 使肿瘤细胞分泌大量包裹金纳米星的外泌体, 而载有金纳米星的外泌体可靶向富集于肿瘤, 最终通过光声成像系统对肿瘤进行PAI成像, 同时, 金纳米星对肿瘤起热放疗杀伤作用。由此可见, PAI的优势不仅在于外泌体或肿瘤的显像, 其成像材料带来的抗肿瘤作用亦是一大突破, 特别是外泌体可作为体内的靶向“探针”, 两者相互结合, 在肿瘤的精准诊疗方面具有一定的应用潜力。但外泌体在体内具有一定程度的非靶向分布, PAI成像材料通过外泌体仍会对脏器有所损伤, 其结合应用的副作用亦不可忽视。

## 3 外泌体的CT成像

CT成像是当今医院在综合考虑可用性、效率和成本后, 选择的最优成像、诊断工具之一。但CT在检测亚厘米病变时灵敏度较低<sup>[36]</sup>, 其对大脑深层结构的成像能力更是有限, 特别是在神经系统领域<sup>[37,38]</sup>。此外, 血脑屏障一直是中枢神经系统(central nervous system, CNS)疾病诊疗手段发展的主要障碍, 是多数可能改善CNS疾病的造影剂及药物无法跨越血脑屏障<sup>[39]</sup>。研究表明, 外泌体不仅



能有效载荷遗传信息及蛋白质传递给细胞,还可穿透血脑屏障,将荧光标记物和化疗药物阿霉素传递到斑马鱼的大脑内<sup>[40]</sup>。因此,外泌体在CNS疾病的诊疗上存在巨大潜力,也在一定程度上为CNS疾病诊治指明了方向。此后,Betzer等<sup>[37]</sup>通过葡萄糖包覆金纳米颗粒,标记脑内来源的骨髓间充质干细胞外泌体,利用CT进行非侵入性体内神经成像追踪外泌体,结果表明,该标记技术可以作为脑部疾病的有效诊断工具,有利于发展基于外泌体的神经恢复治疗。而Perets等<sup>[41]</sup>利用纳米金标记骨髓间充质干细胞外泌体,并进行CT成像,阐述了其在不同的脑部疾病(中风、自闭症、帕金森病和阿尔茨海默病)中的迁移和归巢模式。结果表明,骨髓间充质干细胞外泌体在病理区域可被神经元细胞选择性摄取并积累,而在正常组别中只有弥漫性迁移并在24 h内清除。在未来,载有显像剂的外泌体突破血脑屏障并对CNS疾病病灶精准定位成为可能,这将大大提升后期诊疗手段的特异性和有效性;同时,在一定程度上填补CT对CNS疾病成像定位的空白。

#### 4 外泌体的MRI成像及其应用治疗

MRI成像没有X线辐射,对人体无任何放射性损伤<sup>[42]</sup>,与CT相比,MRI具有更高的组织分辨力,在脊柱、椎间盘、脊髓病变、盆腔病变上具有更好的诊断优势<sup>[43]</sup>。因此,基于外泌体的MRI成像研究也颇有进展。特别是随着纳米技术的发展,超顺磁性氧化铁纳米粒子(superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs)——大小在5 nm~50 nm之间的小结晶磁铁矿结构,已被应用于标记外泌体<sup>[44,45]</sup>。Hu等<sup>[45]</sup>用电穿孔技术将SPIONs载入黑色素瘤外泌体内,最终实现了黑色素瘤外泌体体外MRI成像;同时,发现外泌体可在体内淋巴结积聚,有望对其进行示踪成像。由此看来,常规MRI成像在体内示踪外泌体为其成像的发展打开了新的大门。然而,尽管MRI成像分辨率较高,但敏感度较低,需大量外泌体才可成像,在技术上存在很大的挑战。随后,Busato等<sup>[46]</sup>为了阐明脂肪干细胞及其外泌体发挥治疗作用的部位,利用超小的超顺磁氧化铁纳米颗粒(ultrasmall superparamagnetic iron oxides, USPIO, 直径4 nm~6 nm)标记该细

胞,USPIO可保留在外泌体内,最终实现MRI对外泌体的体内外显像。值得一提的是,少量USPIO标记即可实现外泌体的体内外MRI监测,这为外泌体的高敏、高分辨率示踪提供了新方法。国内学者在神经系统疾病的MRI成像也进行了一些探索研究。张帆<sup>[47]</sup>构建了基于狂犬病毒糖蛋白修饰外泌体的靶向磁共振分子探针,并在体内成像,证实了该探针具有高效的神经靶向成像能力,为神经系统疾病的精准诊断与治疗提供了新的思路和途径。Jia等<sup>[48]</sup>将SPIONs加载至偶联神经髓鞘素-1靶向肽的外泌体中,同时将姜黄素加载至外泌体中,最终实现了对脑胶质瘤靶向MRI成像以及治疗的目的。这也意味着外泌体载药成像进入了新阶段,特别是基于SPIONs的成像材料可被机体铁代谢途径自然消除,具有良好的生物相容性,相较于PAI成像所用的成像材料具有更大的优势。在未来,外泌体的无创MRI成像在诊治疾病上有待进一步的发展。

#### 5 外泌体的核成像——单光子发射计算机断层扫描、正电子发射断层扫描

精准示踪外泌体,了解其在体内的分布和行为至关重要。放射性示踪剂在体核成像适用于其体内分布评价,一方面由于外泌体降解后,其标记物的放射性仍可被检测到<sup>[49]</sup>,另一方面放射性核素组织穿透深度也优于荧光标记物<sup>[21]</sup>。早期,Morishita等<sup>[49]</sup>用<sup>125</sup>I标记B16BL6细胞来源的外泌体,验证了<sup>125</sup>I可定量评估外泌体在体内脏器的分布。Hwang等<sup>[50]</sup>将亲脂性较强的<sup>99m</sup>Tc-HMPAO标记于巨噬细胞衍生的外泌体模拟纳米囊泡,通过单光子发射计算机断层扫描(single photon emission computed tomography, SPECT)观察其在生物体内的分布情况,最终证明,<sup>99m</sup>Tc-HMPAO标记的外泌体模拟纳米囊泡可提供灵敏、定量和可重复的成像,并提出此方法对于探究天然外泌体在体内的分布是可行的。但该技术在实际应用中仍具有一定的挑战性,因为大量细胞中提取的外泌体产量低,而低浓度外泌体会导致放射性标记效率不太理想。此后,Varga等<sup>[51]</sup>用比活度高的<sup>99m</sup>Tc-三羧基放射性同位素标记红细胞来源的囊泡,阐明了此放射性示踪剂对低浓度囊泡有良好的标记效率,

同时也具有良好的生物稳定性, 为进一步利用核成像技术研究外泌体的体内分布特性奠定了基础。

正电子发射断层扫描(positron emission tomography, PET)成像作为核成像方法之一, 已广泛应用于肿瘤学等领域, 成为肿瘤诊断必不可少的工具<sup>[52,53]</sup>。该方法相较于SPECT成像, 具有更强的灵敏度、空间分辨率和可量化性<sup>[54]</sup>。Shi等<sup>[55]</sup>研究表明, 外泌体聚乙二醇化不仅可使外泌体在肿瘤组织中大量蓄积, 还可增强其体内药代动力学, 减少肝脏的清除作用。此外, 对经放射性核素<sup>64</sup>Cu标记的外泌体进行PET示踪成像, 不仅实现了外泌体的体内生物分布探索, 还使体内肿瘤显像得到显著强化。Jung等<sup>[56]</sup>利用放射性同位素<sup>64</sup>Cu/<sup>68</sup>Ga标记乳腺癌细胞来源的外泌体, 经静脉注射给药后, PET图像可以清楚地观察到外泌体在体内脏器以及淋巴结的积累, 并发现外泌体积聚部位与已知的乳腺癌常见转移位点一致。此外, PET图像还显示外泌体积聚在肺部和肝脏, 这是荧光成像没有检测到的。

总的来说, 放射性示踪剂标记的外泌体核成像是一种更加高敏的成像技术。相较于其他外泌体标记显像技术, 核成像是监测外泌体生物分布、迁移更可靠的方式, 或许在未来能通过核成像进一步揭示外泌体在体内的迁移机制。尤其是核成像中的PET成像, 它不仅能显示外泌体及肿瘤, 对转移也有一定的提示作用, 使其在临床癌症诊疗中更具应用优势。

## 6 外泌体的其他成像

外泌体除了上述的标记成像外, 在细胞外的无标记成像也有很多, 这些成像更多注重于外泌体的形貌、结构以及粒径。例如: 扫描电子显微镜是显示外泌体形态和大小最简便的工具。而透射电子显微镜和原子力显微镜特有的高分辨率优势, 使两者成为观察外泌体立体结构的得力工具。特别是原子力显微镜不仅能观察到外泌体大小、结构等特征, 还能展示外泌体黏度、硬度等方面的异质性特点<sup>[57]</sup>。此外, 动态光散射技术可测量外泌体的尺寸, 但测得的粒径与实际分布存在较大偏差。而与动态光散射技术相比, 纳米粒

子追踪分析通过激光散射显微成像技术能够更精确地检测溶液中外泌体的粒径。以上所述的成像工具虽然只是对外泌体物理性质的探究, 但能够为研究外泌体生物过程以及体内作用机制提供技术支撑。

## 7 展望

外泌体的成像方式多种多样, 荧光、PAI、CT、MRI、SPECT以及PET均可对外泌体进行标记成像, 追踪并探究其在体内的分布情况。在这些成像中, 外泌体PET成像通过放射性示踪剂成像, 尽管对人体有一定的辐射危害, 但它的病灶显像优势是普通成像无法比拟的。特别是在识别肿瘤转移病灶方面, 外泌体PET成像更易发现细微的变化, 且识别更精准, 可为临床治疗提供动态信息。与此同时, 外泌体MRI成像也颇具应用潜力, 一方面MRI对人体没有辐射伤害, 另一方面成像材料SPIONs自身具有可负载药物的优势, 借助外泌体靶向特性, 在未来可达到诊疗一体化的效果。因此, 外泌体MRI及PET成像在病灶定位和诊治上更具优势和应用潜力, 两者均有望通过进一步探索为肿瘤诊疗提供新的突破。

## 参考文献

- [1] Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, et al. Extracellular vesicles: composition, biological relevance, and methods of study. *Bioscience*, 2015, 65(8): 783-797
- [2] Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*, 2019, 8(7): 727
- [3] Zhang Y, Bi J, Huang J, et al. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 6917-6934
- [4] Yang XX, Sun C, Wang L, et al. New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes. *J Control Release*, 2019, 308: 119-129
- [5] Betzer O, Barnoy E, Sadan T, et al. Advances in imaging strategies for *in vivo* tracking of exosomes. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2020, 12(2): e1594
- [6] Syn NL, Wang L, Chow EKH, et al. Exosomes in cancer nanomedicine and immunotherapy: prospects and challenges. *Trends Biotechnol*, 2017, 35(7): 665-676

- [7] Basel MT. Lipophilic near-infrared dyes for *in vivo* fluorescent cell tracking. *Methods Mol Biol*, 2020, 2126: 33-43
- [8] Kaiser JP, Bruinink A. Investigating cell-material interactions by monitoring and analysing cell migration. *J Mater Sci Mater Med*, 2004, 15(4): 429-435
- [9] Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res*, 2011, 71(11): 3792-3801
- [10] Hong BS, Cho JH, Kim H, et al. Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics*, 2009, 10(1): 556
- [11] Skog J, Würdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(12): 1470-1476
- [12] Salunkhe S, Dheeraj S, Basak M, et al. Surface functionalization of exosomes for target-specific delivery and *in vivo* imaging & tracking: strategies and significance. *J Control Release*, 2020, 326: 599-614
- [13] Simonsen JB. Pitfalls associated with lipophilic fluorophore staining of extracellular vesicles for uptake studies. *J Extracell Vesicles*, 2019, 8(1): 1582237
- [14] Lehmann TP, Juzwa W, Filipiak K, et al. Quantification of the asymmetric migration of the lipophilic dyes, DiO and DiD, in homotypic co-cultures of chondrosarcoma SW-1353 cells. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5): 4529-4536
- [15] Progatzy F, Dallman MJ, Lo Celso C. From seeing to believing: labelling strategies for *in vivo* cell-tracking experiments. *Interface Focus*, 2013, 3(3): 20130001
- [16] Gupta D, Liang X, Pavlova S, et al. Quantification of extracellular vesicles *in vitro* and *in vivo* using sensitive bioluminescence imaging. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1800222
- [17] Verweij FJ, Revenu C, Arras G, et al. Live tracking of inter-organ communication by endogenous exosomes *in vivo*. *Dev Cell*, 2019, 48(4): 573-589.e4
- [18] Lai CP, Kim EY, Badr CE, et al. Visualization and tracking of tumour extracellular vesicle delivery and RNA translation using multiplexed reporters. *Nat Commun*, 2015, 6(1): 7029
- [19] Russell AE, Sneider A, Witwer KW, et al. Biological membranes in EV biogenesis, stability, uptake, and cargo transfer: an ISEV position paper arising from the ISEV membranes and EVs workshop. *J Extracell Vesicles*, 2019, 8(1): 1684862
- [20] 何文慧. 一种吡啶酮类荧光探针的合成及其在体内外成像中的应用[D]. 福建: 福建医科大学, 2018: 74
- [21] Chuo STY, Chien JCY, Lai CPK. Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1): 91
- [22] Lai CP, Tannous BA, Breakefield XO. Noninvasive *in vivo* monitoring of extracellular vesicles. *Methods Mol Biol*, 2014, 1098: 249-258
- [23] Gangadaran P, Li XJ, Lee HW, et al. A new bioluminescent reporter system to study the biodistribution of systematically injected tumor-derived bioluminescent extracellular vesicles in mice. *Oncotarget*, 2017, 8(66): 109894-109914
- [24] Hikita T, Miyata M, Watanabe R, et al. Sensitive and rapid quantification of exosomes by fusing luciferase to exosome marker proteins. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14035
- [25] Badr CE, Tannous BA. Bioluminescence imaging: progress and applications. *Trends Biotechnol*, 2011, 29(12): 624-633
- [26] Zambito G, Chawda C, Mezzanotte L. Emerging tools for bioluminescence imaging. *Curr Opin Chem Biol*, 2021, 63: 86-94
- [27] Lassailly F, Griessinger E, Bonnet D. "Microenvironmental contaminations" induced by fluorescent lipophilic dyes used for noninvasive *in vitro* and *in vivo* cell tracking. *Blood*, 2010, 115(26): 5347-5354
- [28] Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol*, 2004, 5(8): 497-508
- [29] Ghosh S, Carter KA, Lovell JF. Liposomal formulations of photosensitizers. *Biomaterials*, 2019, 218: 119341
- [30] Kessel D, Oleinick NL. Cell death pathways associated with photodynamic therapy: an update. *Photochem Photobiol*, 2018, 94(2): 213-218
- [31] Juzeniene A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2009, 6(2): 94-96
- [32] Ding YF, Li S, Liang L, et al. Highly biocompatible chlorin e6-Loaded chitosan nanoparticles for improved photodynamic cancer therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(12): 9980-9987
- [33] Jang Y, Kim H, Yoon S, et al. Exosome-based photoacoustic imaging guided photodynamic and immunotherapy for the treatment of pancreatic cancer. *J Control Release*, 2021, 330: 293-304
- [34] Pan S, Pei L, Zhang A, et al. Passion fruit-like exosome-PMA/Au-BSA@Ce6 nanovehicles for real-time fluorescence imaging and enhanced targeted photodynamic therapy with deep penetration and superior retention behavior in tumor. *Biomaterials*, 2020, 230: 119606
- [35] Zhu D, Lyu M, Huang Q, et al. Stellate plasmonic exosomes for penetrative targeting tumor NIR-II thermoradiotherapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(33): 30000-30010

- 36928-36937
- [36] Branstetter Iv BF, Blodgett TM, Zimmer LA, et al. Head and neck malignancy: is PET/CT more accurate than PET or CT alone? *Radiology*, 2005, 235(2): 580-586
- [37] Betzer O, Perets N, Angel A, et al. *In vivo* neuroimaging of exosomes using gold nanoparticles. *ACS Nano*, 2017, 11(11): 10883-10893
- [38] Pasternak O, Kubicki M, Shenton ME. *In vivo* imaging of neuroinflammation in schizophrenia. *Schizophr Res*, 2016, 173(3): 200-212
- [39] Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32(11): 1959-1972
- [40] Yang T, Martin P, Fogarty B, et al. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in danio rerio. *Pharm Res*, 2015, 32(6): 2003-2014
- [41] Perets N, Betzer O, Shapira R, et al. Golden exosomes selectively target brain pathologies in neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. *Nano Lett*, 2019, 19(6): 3422-3431
- [42] Summers P, Saia G, Colombo A, et al. Whole-body magnetic resonance imaging: technique, guidelines and key applications. *Ecancermedicalscience*, 2021, 15: 1164
- [43] Hendee WR, Morgan CJ. Magnetic resonance imaging. part II—clinical applications. *West J Med*, 1984, 141(5): 638-648
- [44] Zhuo Z, Wang J, Luo Y, et al. Targeted extracellular vesicle delivery systems employing superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Acta Biomater*, 2021, 134: 13-31
- [45] Hu L, Wickline SA, Hood JL. Magnetic resonance imaging of melanoma exosomes in lymph nodes. *Magn Reson Med*, 2015, 74(1): 266-271
- [46] 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. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 2481-2490
- [47] 张帆. 基于外泌体构建神经靶向MR分子探针RVG-Exo-SPION的实验研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2020: 55
- [48] Jia G, Han Y, An Y, et al. NRP-1 targeted and cargo-loaded exosomes facilitate simultaneous imaging and therapy of glioma *in vitro* and *in vivo*. *Biomaterials*, 2018, 178: 302-316
- [49] Morishita M, Takahashi Y, Nishikawa M, et al. Quantitative analysis of tissue distribution of the B16BL6-derived exosomes using a streptavidin-lactadherin fusion protein and iodine-125-labeled biotin derivative after intravenous injection in mice. *J Pharm Sci*, 2015, 104(2): 705-713
- [50] Hwang DW, Choi H, Jang SC, et al. Noninvasive imaging of radiolabeled exosome-mimetic nanovesicle using (99m) Tc-HMPAO. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 15636
- [51] Varga Z, Gyurkó I, Pálóczi K, et al. Radiolabeling of extracellular vesicles with (99m) Tc for quantitative *in vivo* imaging studies. *Cancer Biother Radiopharm*, 2016, 31(5): 168-173
- [52] Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(9): 683-693
- [53] Shi S, Hong H, Orbay H, et al. ImmunoPET of tissue factor expression in triple-negative breast cancer with a radiolabeled antibody Fab fragment. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2015, 42(8): 1295-1303
- [54] Rahmim A, Zaidi H. PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges. *Nucl Med Commun*, 2008, 29(3): 193-207
- [55] Shi S, Li T, Wen X, et al. Copper-64 labeled PEGylated exosomes for *in vivo* positron emission tomography and enhanced tumor retention. *Bioconjug Chem*, 2019, 30(10): 2675-2683
- [56] Jung KO, Kim YH, Chung SJ, et al. Identification of lymphatic and hematogenous routes of rapidly labeled radioactive and fluorescent exosomes through highly sensitive multimodal imaging. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 7850
- [57] Kim SY, Khanal D, Kalionis B, et al. High-fidelity probing of the structure and heterogeneity of extracellular vesicles by resonance-enhanced atomic force microscopy infrared spectroscopy. *Nat Protoc*, 2019, 14(2): 576-593