

# 肿瘤干细胞活体示踪的分子影像学研究进展

王 芮, 姜立新

(上海交通大学附属第六人民医院超声医学科, 上海 200233)

**摘要:** 肿瘤干细胞(Cancer Stem Cell, CSCs)是肿瘤细胞中具有自我更新和多向分化能力的细胞, 与肿瘤的发生、增殖、转移和耐药等生物学行为关系密切, CSCs 的活体示踪对于实时监测 CSCs 在体内的生物学行为具有重要意义。目前常见 CSCs 活体示踪的分子影像学方法包括: 超声成像、核磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)、光学成像、核医学成像(Positron Emission Tomography -Computed Tomography, PET-CT)、光声成像、多模态成像。这些成像方法的发展对于 CSCs 的研究具有重大意义, 对于 CSCs 的研究有助于临床诊断及治疗, 有利于诊疗一体化进程的发展。文章就 CSCs 活体示踪的分子影像学研究进展进行了综述。

**关键词:** 肿瘤干细胞; 活体示踪; 超声; 分子影像学

中图分类号: R445.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3630(2017)-03-0257-05

DOI 编码: 10.16300/j.cnki.1000-3630.2017.03.011

## Research progress in the molecular imaging tracking of cancer stem cells in vivo

WANG Rui, JIANG Li-xin

(Department of Ultrasound, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

**Abstract:** Cancer stem cells (CSCs) have distinct characteristics including cell renewal capability, differentiation into multiple lineages, endless proliferation potential, and have intimate relationship with tumor initiation, proliferation, metastasis and drug resistance. In vivo, tracking of CSCs is of great significance in monitoring the biological behavior of CSCs. The study about CSCs is beneficial to clinical diagnosis and therapy. The current common in vivo tracking of CSCs molecular imaging include: ultrasonic imaging, MRI imaging, optical imaging, PET - CT imaging, photoacoustic imaging, multimodal imaging. These imaging methods is of great significance for CSCs research is helpful to clinical diagnosis and treatment, is conducive to the development of diagnosis and integration. This review will briefly discuss the recent findings on molecular imaging of CSCs behavior as reported in vivo imaging studies.

**Key words:** cancer stem cells; tracking in vivo; ultrasonography; molecular imaging

## 0 引言

近年来关于肿瘤干细胞(Cancer Stem Cell, CSCs)的研究认为, CSCs 是肿瘤起始、增殖、转移和放疗化疗无效的主要原因。肿瘤干细胞是肿瘤细胞中极少量的一群细胞,其发现对于研究肿瘤的起始、增殖、转移等生物学行为具有重要意义,对于 CSCs 的研究也有助于临床诊断和选择正确的治疗方法。如何有效地对 CSCs 进行示踪,从而实时监控 CSCs 在体内外的生物学行为,是 CSCs 研究中十分重要的部分。

## 1 肿瘤干细胞的发现及其特点

1997 年, Bonnet<sup>[1]</sup>等人发现在人急性髓系白血病细胞中只有 0.2%~1%的细胞具有持续克隆增殖能力,将分离出的 CD34+CD38-白血病细胞移植入裸鼠体内后,发现其形成的肿瘤与母代生物学特性相似,而将 CD34-CD38-白血病细胞移植入裸鼠体内后无肿瘤形成,可见 CD34+CD38-白血病细胞成瘤能力显著强于 CD34-CD38-白血病细胞。美国癌症研究学会定义 CSCs 是肿瘤中具有自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞的细胞<sup>[2]</sup>。而后 CSCs 相继在脑肿瘤、前列腺癌、胰腺癌等不同肿瘤中得到了证实<sup>[3-5]</sup>。

### 1.1 CSCs 与普通干细胞的关系

CSCs 与普通干细胞的共同点是: CSCs 表面的一些特异性标志如分化抗原(Clusters of Differentia-

收稿日期: 2017-02-12; 修回日期: 2017-05-22

基金项目: 国家自然科学基金(81371574)、上海市人才发展基金(201452)、上海交通大学医工交叉基金(YG2014MS53)资助。

作者简介: 王芮(1991-),女,安徽蚌埠人,硕士研究生,研究方向胰腺癌干细胞的活体示踪。

通讯作者: 姜立新, E-mail: jinger\_28@sina.com

tion, CD)等也存在于 CSCs 所在器官的正常干细胞表面<sup>[2]</sup>。Crowel<sup>[3]</sup>等人研究发现普通干细胞在无限增殖的过程中,有机会发生突变转化为 CSCs,但是 CSCs 的形态、数量及其功能与普通干细胞存在显著差异<sup>[4]</sup>。CSCs 与普通干细胞的区分是:(1) CSCs 无分化为成熟细胞的能力,这与有正常分化程序的干细胞有着本质的区别。(2)普通干细胞经过某些信号通路的改变可转化为 CSCs,目前较为认可的信号通路为 Wnt 通路、Hedgehog 通路、Notch 通路、TGF- $\beta$  通路<sup>[5-7]</sup>等。

### 1.2 CSCs 与普通肿瘤细胞的区别

CSCs 与普通肿瘤细胞区分的标志是其细胞表面具有特殊标记物,这些标记物的存在与其增殖能力密切相关,CSCs 在肿瘤细胞中所占比例不到 5%<sup>[8]</sup>。CSCs 的致瘤可能性是普通肿瘤细胞的 100 倍。CSCs 的侵袭性极强,极少量的 CSCs 从肿瘤原发灶部位脱离,侵袭血管或淋巴管,最后到达其他组织器官形成转移灶。普通肿瘤细胞则不具备这一特性<sup>[9]</sup>。

## 2 CSCs 的表面标记物

肿瘤干细胞的分离是利用其细胞表面标志物,使用流式分选法或磁珠分选法,分离和鉴定 CSCs。Li<sup>[10]</sup>等在研究胰腺癌时,在同一只裸鼠上腹部对称部位分别皮下注射 500 个 CD44-CD24-ESA-细胞和 500 个 CD44+CD24+ESA+细胞,发现 CD44+CD24+ESA+细胞处理组正常成瘤,CD44-CD24-ESA-细胞处理组肿瘤后 20 周末成瘤,表明 CD44+CD24+ESA+细胞的成瘤能力明显强于 CD44-CD24-ESA-细胞。认为 CD44CD24ESA 分子是胰腺癌干细胞的标志。CD44 是一种常见的 CSCs 表面标志物,CD44 与胞外基质中的透明质酸相结合,活化酪氨酸蛋白激酶受体如 EGFR(表皮生长因子受体)和 ERBB 2(人类表皮生长因子受体 II),通过 MAPK 和 P13/AKT 信号通路增强细胞的增殖能力<sup>[11]</sup>。CD44 可以促进肿瘤细胞通过血行转移的方式进行肿瘤转移<sup>[12]</sup>。Olempska<sup>[11]</sup>等研究 5 种胰腺癌细胞系时发现,CD133+ABCG+胰腺癌细胞是胰腺癌干细胞,其致瘤率和侵袭能力显著高于 CD133-ABCG-胰腺癌细胞,CD133 可保持胞质膜拓扑结构的稳定性,稳定胞质膜的磷脂结构<sup>[13]</sup>,CD133 使得 CSCs 细胞在增殖分化过程中保持其干细胞的稳定性。后续的研究发现 CD44CD24 是乳腺癌 CSCs 标记物<sup>[14]</sup>,CD133+人脑胶质瘤细胞具有干细胞特性<sup>[15]</sup>,CD44/integrin

$\alpha 2\beta 1$ high/CD133 是前列腺癌 CSCs 的标记物<sup>[16]</sup>。目前 CSCs 表面的特异性标记物常作为活体成像中靶向性示踪剂与 CSCs 特异性结合的靶点。

## 3 CSCs 的活体成像方法

CSCs 活体示踪是在活体动物体内 CSCs 上标记示踪剂(如微泡、荧光素、量子点、核素等),应用特定的影像学方法(如超声、小动物活体成像、PET-CT 等)对 CSCs 进行示踪,从而观察 CSCs 在体内的生物学行为。目前常用的活体示踪方法包括超声成像、MRI 成像、光学成像、核素成像和多模态成像。

### 3.1 超 声

超声分子影像学成像采用靶向性造影剂对血管或细胞进行超声显像。随着超声造影剂的研发,超声的分子影像学水平研究逐渐由血管内成像拓展到血管外成像。Fan<sup>[17]</sup>等采用生物素-亲和素法合成了靶向前列腺癌 CSCs 细胞表面特异性抗原 PSMA 的脂质体,粒径为(487.60 $\pm$ 33.55) nm,对 LNCaP 前列腺癌细胞(PSMA 的表达水平高)、C4-2 前列腺癌细胞(PSMA 的表达水平低)、MKN45 胃癌细胞(不表达 PSMA)的皮下移植瘤进行超声成像,评价该脂质体对于细胞膜上 PSMA 的靶向性。LNCaP 组注射脂质体后超声信号强度显著强于空白对照组。C4-2 组注射脂质体后超声信号强度稍强于空白对照组。MKN45 组注射脂质体和空白对照组图像无显著性差异。LNCaP 组注射脂质体后峰值时刻超声信号强度明显高于 C4-2 组和 MKN45 组。LNCaP 组脂质体超声显像的始增时间、达峰时间、峰值强度与其他两组有显著性差异,增强时间没有显著性差异。靶向性脂质体较早对肿瘤实现超声增强作用,超声强度较早达到峰值,超声信号显著增强。靶向性脂质体对 CSCs 的超声成像具有特异性作用。超声的优点是实时成像,可反映组织、器官的血流情况,并且超声没有电离辐射,可反复进行超声检查。其缺点是对肿瘤或脏器成像,成像范围小,可观察范围小。

### 3.2 MRI

MRI 的分子影像学研究采用靶向性的磁珠与 CSCs 特异性标志物结合,实现体内的主动靶向作用,进行肿瘤的活体示踪<sup>[18-20]</sup>。CD44 是乳腺癌 CSCs 细胞表面的特异性标记物,在肿瘤的增殖、侵犯、血管生成方面发挥重要作用。CD44 是细胞表面最重要的透明质酸(Hyaluronic Acid, HA)受体,

是与 HA 结合的主要部位。Lim<sup>[21]</sup>等合成了 HA 修饰含有铁和锰的磁性纳米晶体(Hyaluronan- Modified Magnetic Nanoclusters, HA-MNCs), 研究乳腺癌时发现 HA-MNCs 注射 1 小时后, 注射前后的 T2 加权相信号差达到最大。在另一组提前 4 小时腹腔注射 CD44 抗体(Anti-CD44 Ab+HA-MNC 组), 相同时间 T2 加权相信号差小于 HA-MNCs 组。采用电感耦合等离子体原子发射光谱法(Inductively Coupled Plasma, ICP-AES), 测量肿瘤、肝脑、脾、肾中的铁和锰含量, 发现 HA-MNCs 组 HA-MNCs 主要聚集在肿瘤中, 而 Anti-CD44 Ab+HA-MNC 组 HA-MNCs 主要聚集在肝脏中。HA-MNCs 组肿瘤普鲁士蓝染色表明铁在肿瘤部位的大量积聚, 材料在肿瘤内聚集。该实验表明 HA-MNCs 可主动靶向 CD44 阳性的乳腺癌 CSCs。

在前列腺癌 MRI 研究方面, CSCs 细胞特异性抗原 PSMA 与超小顺磁氧化铁(Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide, USPIO)的结合物, 作为前列腺癌特异性的纳米显像剂, 对 CSCs 进行活体示踪<sup>[22]</sup>。MRI 是一种无创的影像学检查方法, 可以了解活体组织的解剖结构、功能、代谢情况等, 无电离辐射。MRI 成像以超小顺磁性氧化铁(USPIO)和超顺磁性氧化铁(SPIO)为造影剂时, 凋亡或裂解细胞释放出的铁被周围的巨噬细胞吞噬, 产生的信号与 CSCs 产生的信号难以区分, 可以通过更换造影剂避免 MRI 伪像。

### 3.3 光学成像

#### 3.3.1 生物发光成像

生物发光成像是利用荧光素酶催化荧光素反应后产生特定的光子, 采用高灵敏度相机采集光子信号进行成像。目前常用的荧光素酶包括细菌荧光素酶(Bacterial Luciferase, BL)<sup>[23]</sup>和萤火虫荧光素酶(Firefly Luciferase, FL)<sup>[24]</sup>。Contaq<sup>[25]</sup>等人研究 HIV 病毒时发现转基因小鼠体内的荧光素酶基因在荧光素存在的条件下, 产生生物发光现象。Rehemtulla<sup>[26]</sup>等人研究神经胶质肉瘤时发现, 荧光素所发出的光子量与肿瘤体积有关, 通过活体观察转染了荧光素酶基因的神经胶质肉瘤细胞所发出光学信号的强弱, 可对药物作用后的肿瘤生长情况进行评估。Liu<sup>[27]</sup>等人研究乳腺癌转移机制时, 在 CD44+乳腺癌 CSCs 上标记荧光素酶, 通过小动物活体成像实时监测了 CSCs 由原位灶转移至肺和淋巴结的动态过程。该实验表明 CSCs 主动靶向性成像有利于 CSCs 的定位和监测肿瘤的转移过程。生物发光成像, 可在不处死动物的情况下, 对同一动物体进行

连续观察, 减少了动物个体差异的影响, 不需要外源性激发光即可成像。荧光素酶活体示踪的优点是实时、非放射性、应用范围广, 缺点是必须要有外源性荧光素的存在。荧光素酶催化荧光素的反应必须要在有氧和 ATP 存在的条件下进行, 在活细胞中进行。

#### 3.3.2 荧光成像

荧光活体成像技术是将标记了荧光染料的 CSCs 注射入动物体内, 或将靶向性荧光材料注入带瘤动物体内, 激发一定波长的荧光探针, 采用高灵敏度的摄像机对发射的质子进行捕获, 从而成像。带有活性基团的荧光染料通过活性基团与生物大分子上的羟基、羧基或巯基结合, 形成高分子材料。Gener<sup>[28]</sup>等人在研究乳腺癌时, 构建了 FITC 标记的纳米粒, 该纳米粒上载有 CD44 抗体(针对乳腺癌 CSCs)和紫杉醇, 即 PLGA-co-PEG-CD44-FITC 纳米粒, 共聚焦显微镜发现纳米粒位于溶酶体内, 表明受体可介导细胞对材料的胞吞作用, 通过观察细胞的凋亡发现紫杉醇在 CSCs 内的定位释放可对肿瘤起到治疗作用。该研究表明携带药物的靶向性抗体可对 CSCs 进行定位, 对肿瘤进行治疗。Beck<sup>[29]</sup>等人构建了荧光素与 NESTIN 单克隆抗体结合的聚合物(NESTIN 蛋白是胶质瘤 CSCs 细胞表面特异性标志物)。聚合物注入带胶质瘤裸鼠体内 4 天后, 观察到裸鼠皮下移植瘤部位的荧光强度显著高于裸鼠身体其他部位, 将解剖得到的皮下移植瘤、原位脑肿瘤和主要脏器进行荧光成像, 观察到皮下移植瘤和原位脑肿瘤的荧光强度显著高于各脏器。主动靶向脑胶质瘤 CSCs 的聚合物在定位 CSCs 方面发挥作用, 为后续的治疗奠定了基础。Tsurumi<sup>[30]</sup>等人研究脑胶质瘤时, 合成了 CyDye Cy5.5 标记的 CD133 抗体, 抗体注入带瘤鼠体内 7 天后, 靶向组肿瘤部位荧光强度是对照组的 3 倍。注射入带瘤鼠体内九天后, 将肿瘤取下进行体外成像, 发现靶向组肿瘤的荧光强度强于对照组。该研究表明靶向材料可对肿瘤血管外的 CSCs 进行显像。荧光成像的优点是可应用含活性基团的荧光探针对荧光材料进行成像, 对材料在体内的代谢过程进行实时检测。荧光成像的缺点是受动物皮肤、脏器等自发荧光的干扰。

### 3.4 PET-CT 成像

PET-CT 成像技术是将靶向性抗体与放射性核素结合, 采用微型 PET-CT 成像系统对 CSCs 进行显像<sup>[31]</sup>。2B3 抗体的受体是前列腺癌 CSCs 细胞表面的 PSMA 分子, Leyton<sup>[32]</sup>等人设计了碘 124 标记

的 2B3 抗体作为 PET-CT 成像的显像剂, 对体内前列腺癌中 PSCA+细胞进行了长达 21 小时的示踪。Yang<sup>[33]</sup>等人在研究脑胶质瘤时, 构建了 <sup>64</sup>Cu 标记的 YY146 核素, 可主动靶向 CD146+胶质瘤 CSCs, PET-CT 上核素在原位肿瘤部位异常浓聚, 显像 2 mm 以下的肿瘤。免疫组化表明核素的摄取量与 CSCs 表面的 CD146 表达量呈正相关。在进一步的研究中, 作者发现该靶向性核素也可主动靶向其他肿瘤(人胃癌、卵巢癌、肝癌、肺癌)CSCs 的 CD146 蛋白。靶向性核素的应用提高了 PET-CT 的灵敏度, 在显像微小肿瘤方面具有优势。PET-CT 成像的缺点是部分放射性核素半衰期短, 无法进行长时间动态观察。

### 3.5 光声成像

光声成像是用光辐照某种媒质时, 光能通过分子振动和热弹性膨胀转化为热能, 引起媒质内结构和体积变化, 形成波源, 被组织表面的超声传感器探测到, 转换为一系列时间序列的电信号<sup>[34]</sup>。Liang<sup>[35]</sup>等人采用特异性靶向 CD44+胃癌 CSCs 的金纳米探针研究胃癌 CSCs 进行研究, 发现靶向组注射 4 小时后, 裸鼠胃癌皮下移植瘤的光声信号强度是注射前的 4.7 倍。靶向组注射 4 小时后, 裸鼠胃癌皮下移植瘤的光声信号强度是非靶向组的 2.5 倍。等离子体质谱分析发现靶向组肿瘤注射 4 小时后, 肿瘤中的金含量明显高于非靶向组。实验表明该材料具有较高的光声转化效率, 对 CSCs 具有主动靶向性。光声成像集合了光学成像对比度高和超声成像穿透深度深的优点。光声成像的缺点是受到光的穿透深度限制, 对于深部组织的显像具有局限性。

### 3.6 多模态成像

以上各种成像方法均各有利弊, 多模态成像可综合各种成像方法的优点。多模态成像是同一研究对象采取不同的影像学方法, 结合他们的优势, 将设备与数据分析软件相连接, 将图像融合后获得更多的信息, 提高肿瘤诊断的灵敏度和特异度。目前较为成熟的多模态成像方法包括 MRI 与荧光成像结合, PET 与荧光成像结合, PET 和生物发光成像结合, 以及三模态成像系统: (PET 与荧光成像、生物发光成像共结合)。Zhou<sup>[36]</sup>等人在研究肺癌时, 采用层层自组装方法合成了一种含有 Cy5.5 和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 的纳米复合材料, 可主动靶向 HCBP-1 阳性肺癌干细胞, 对肿瘤既可进行荧光成像, 也可进行 MRI 成像。该纳米复合材料粒径为(138.4±2.99) nm, 材料注射入裸鼠体内一小时后发现靶向组肿瘤部位荧光逐渐增强, 7 小时荧光达到最强。非靶向组在

观察的 7 小时内肿瘤部位未见荧光。在材料注射 7 小时后对裸鼠进行 MRI 成像, 发现靶向组肿瘤部位 T2 加权相出现显著则高信号, 非靶向组和 PBS 组实验全程未见高信号。该实验表明将荧光成像和 MRI 成像相结合的多模态成像方法可有效提高 CSCs 的发现率, 提高肿瘤的诊断率。多模态成像既可监测肿瘤大小等器质性改变, 也可发现肿瘤转移等功能性变化。

## 4 结 论

携带药物的示踪剂可对 CSCs 进行精确定位, 提高肿瘤治疗效果, 改善患者预后, 这种示踪剂是目前的研究难点, 同时也是研究热点。相信随着 CSCs 活体示踪分子影像学研究的开展, 可以为肿瘤的精确定位提供更好的方法, 促进肿瘤诊疗一体化平台的发展。

### 参 考 文 献

- [1] Bonnet D, Dick J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [J]. *Nat Med*, 1997, 3(7): 730-737.
- [2] Shipitsin M, Polyak K. The cancer stem cell hypothesis in search of definition, markers and relevance[J]. *Lab Invest*, 2008, 88(8): 459-263.
- [3] Crowe D L, Parsa B, Sinha U K. Relationships between stem cells and cancer stem cells[J]. *Histol Histopathol*, 2004, 19(2): 505-509.
- [4] Wicha M S, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(4): 1883-1890.
- [5] Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer[J]. *Nature*, 2005, 434(7035): 843-850.
- [6] Matsui W H. Cancer stem cell signaling pathways[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(1 Suppl 1): S8-S19.
- [7] Farnie G, Clarke R B. Mammary stem cells and breast cancer--role of Notch signalling[J]. *Stem Cell Rev*, 2007, 3(2): 169-175.
- [8] Bagheri V, Razavi M S, Momtazi A A, et al. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: a review[J]. *J. Cell Physiol*, 2016.
- [9] Visvader J E, Lindeman G J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(10): 755-768.
- [10] Li C, Lee C J, Simeone D M. Identification of human pancreatic cancer stem cells[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 568: 161-173.
- [11] Ghatak S, Misra S, Toole B P. Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(10): 8875-8883.
- [12] Lang D, Mascarenhas J B, Shea C R. Melanocytes, melanocyte stem cells, and melanoma stem cells[J]. *Clin Dermatol*, 2013, 31(2): 166-178.
- [13] Mizrak D, Brittan M, Alison M. CD133: molecule of the moment[J]. *J Pathol*, 2008, 214(1): 3-9.
- [14] Alhaji M, Wicha M S, Benito Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

- 2003, **100**(7): 3983-3988.
- [15] Singh S K, Clarke I D, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumor[J]. *Cancer research*, 2003, **63**(18): 5821-5828.
- [16] Collins A T, Berry P A, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells[J]. *Cancer research*, 2005, **65**(23): 10946-10951.
- [17] Fan X, Wang L, Guo Y. Ultrasonic nanobubbles carrying anti-psma nanobody: construction and application in prostate cancer-targeted imaging[J]. *PLoS One*, 2015, **10**(6): e0127419.
- [18] Zhu H, Zhang L, Liu Y, et al. Aptamer-PEG-modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Mn as a novel T1- and T2- dual-model MRI contrast agent targeting hypoxia-induced cancer stem cells[J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 39245
- [19] Addington C P, Cusick A, Shankar R V, et al. Siloxane nanoprobes for labeling and dual modality functional imaging of neural stem cells[J]. *Ann Biomed Eng*, 2016, **44**(3): 816-827.
- [20] Ray P. Multimodality molecular imaging of disease progression in living subjects[J]. *J Biosci*, 2011, **36**(3): 499-504.
- [21] Lim E K, Kim H O, Jang E, et al. Hyaluronan-modified magnetic nanoclusters for detection of CD44-overexpressing breast cancer by MR imaging[J]. *Biomaterials*, 2011, **32**(32): 7941-7950.
- [22] Wang A Z, Bagalkot V, Vasilliou C C, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-aptamer bioconjugates for combined prostate cancer imaging and therapy[J]. *ChemMedChem*, 2008, **3**(9): 1311-1315.
- [23] Mc E W, Green A A. Enzymatic properties of bacterial luciferase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1955, **56**(1): 240-255.
- [24] Green A A, McElroy W D. Crystalline firefly luciferase[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1956, **20**(1): 170-176.
- [25] Contag C H, Ehrnst A, Duda J, et al. Mother-to-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 involving five envelope sequence subtypes[J]. *J Virol* 1997, **71**(2): 1292-1300.
- [26] Rehemtulla A, Stegman L D, Cardozo S J, et al. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging[J]. *Neoplasia*, 2000, **2**(6): 491-495.
- [27] Liu H, Patel M R, Prescher J A, et al. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, **107**(42): 18115-18120.
- [28] Gener P, Gouveia L P, Sabat G R, et al. Fluorescent CSC models evidence that targeted nanomedicines improve treatment sensitivity of breast and colon cancer stem cells[J]. *Nanomedicine*, 2015, **11**(8): 1883-1892.
- [29] Beck S, Jin X, Yin J, et al. Identification of a peptide that interacts with Nestin protein expressed in brain cancer stem cells[J]. *Biomaterials*, 2011, **32**(33): 8518-8528.
- [30] Tsurumi C, Esser N, Firat E, et al. Non-invasive in vivo imaging of tumor-associated CD133/prominin[J]. *PLoS One*, 2010, **5**(12): e15605.
- [31] Gao X, Cui Y, Levenson R M, et al. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, **22**(8): 969-976.
- [32] Leyton J V, Olafsen T, Lepin E J, et al. Humanized radioiodinated minibody for imaging of prostate stem cell antigen-expressing tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**(22): 7488-7496.
- [33] Yang Y, Hernandez R, Rao J, et al. Targeting CD146 with a <sup>64</sup>Cu-labeled antibody enables in vivo immunoPET imaging of high-grade gliomas[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, **112**(47): E6525-6534.
- [34] van den Berg P J, Daoudi K, Steenbergen W. Review of photoacoustic flow imaging: its current state and its promises[J]. *Photoacoustics*, 2015, **3**(3): 89-99.
- [35] Liang S, Li C, Zhang C, et al. CD44v6 monoclonal antibody-conjugated gold nanostars for targeted photoacoustic imaging and plasmonic photothermal therapy of gastric cancer stem-like cells[J]. *Theranostics*, 2015, **5**(9): 970-984.
- [36] Zhou X, Chen L, Wang A, et al. Multifunctional fluorescent magnetic nanoparticles for lung cancer stem cells research[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, **134**: 431-439.