

小动物活体成像技术在肿瘤研究中的应用

杨丽华¹, 沈星凯¹, 符丹¹, 余玉春¹, 赵渊¹, 龚朝辉^{1,2*}

(1. 宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211; 2. 浙江省病理生理学技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 活体成像技术可以在近无创条件下对活体组织或小动物体内的生物学行为进行成像跟踪, 已被广泛应用于肿瘤研究中。它的优势在于非侵入性地连续动态检测活体内肿瘤的生长及转移和评价肿瘤治疗的疗效。与传统的检测方法相比, 大大减少了动物的用量, 符合“3R”原则。文中综述了小动物活体成像技术的成像模式、技术原理和路线及其在肿瘤生长、转移与治疗过程中的应用。

关键词: 活体成像; 生物发光; 荧光; 放射性同位素; X光; 肿瘤

中图分类号: Q95-331

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2013) 04-0115-04

活体成像一般是指生物体处于活体状态下, 在细胞和分子水平上应用多种成像模式对各种生物行为进行定性和定量分析研究的一种新技术。与传统的体外成像或切片相比, 活体成像有着诸多优点: (1)可以在同一个体反复多次获得一系列数据, 消除个体差异, 不需要杀死动物, 节省人力物力; (2)可以动态观察实验结果, 并得到直观的图像, 结果一目了然; (3)能够非侵入式地检测活体内特异的生物学行为, 最大限度地模拟人体内的生理病理状态。基于活体成像的诸多优点, 该技术的应用也十分广泛, 更是肿瘤学研究领域中有力的

研究工具。

1 动物活体成像模式及原理

目前小动物活体成像模式主要包括生物发光成像(Bioluminescence)、荧光成像(Fluorescence)、同位素成像(Isotopes)、X光成像(X-ray)等, 它们各自的优缺点和适用范围都有所不同(表1)。

1.1 生物发光成像

生物发光所需的激发能量来自生物体内由荧光素酶催化的反应, 这种酶与相应底物荧光素发生生化反应并产生光信号, 在体外通过成像系统

表1 不同成像模式比较

成像模式	优点	缺点	应用领域
生物发光成像	灵敏度高, 背景噪音低, 安全方便, 高通量	波长短穿透力差, 细胞构建耗时费力, 底物使用成本高	基因表达, 细胞、病毒和细菌示踪等
荧光成像	灵敏度高, 操作简单, 标记对象广泛	低空间分辨率, 较强的背景噪音, 性噪比低	基因表达, 蛋白和小分子、细胞、病毒和细菌示踪等
放射性同位素成像	极其灵敏, 不影响被标记物体内行为, 无背景噪音	相对低的空间分辨率, 放射损伤, 设备价格昂贵	抗体、肽等的体内成像, 药物体内代谢等
X光成像	穿透性强, 直接定位成像	波长很短, 易被吸收, 电离辐射损伤, 低空间分辨率	骨组织、血管相关研究, 肿瘤骨转移研究, 体内解剖学成像等

收稿日期: 2013-02-22.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.g.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省公益性技术应用研究计划(2012C37102); 宁波市自然科学基金(2012A610193); 宁波市科技创新团队(2011B82014); 宁波大学研究生优秀学位论文培育基金(PY2012010); 宁波大学SRIP项目; 宁波大学王宽诚教育基金。

第一作者: 杨丽华(1987-), 男, 江西上饶人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 肿瘤分子生物学。E-mail: huajj22@163.com

*通信作者: 龚朝辉(1978-), 男, 湖北蕲春人, 博士/副教授, 主要研究方向: 肿瘤分子生物学。E-mail: zhaohui@ncmi.org.cn

可直观检测到光信号的产生及变化,从而对小动物体内肿瘤的生长及转移、免疫反应、特定基因的表达等诸多生物过程进行实时直观的监测。成像信号强弱取决于荧光素酶的表达水平、酶底物(荧光素)存在状况以及 ATP、氧气含量和组织深度^[1]。与传统影像学成像技术相比,生物发光成像的背景噪音低,图像较清晰,灵敏度高,可以准确地定位发光位点;一旦购买或建立动物模型,成像实验较为简单;尤其适合于肿瘤细胞和其它类细胞的研究。但是,荧光素酶-荧光素反应会使荧光素酶高表达的肿瘤生长受到抑制,其原因可能与反应后 ATP 水平下降、副产物的形成以及缺氧有关^[2]。

1.2 荧光成像

荧光发光成像技术是采用特定的荧光蛋白(绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白等)或外源性荧光基团(如菁色素、量子点、镧系元素)进行标记^[3],在特定波长的光源照射下释放出光子,从而产生发光。区别于生物发光成像技术的是,荧光标记基团本身就是一个生物发光系统,其激发荧光是一个特异性的独立过程,无需协同因子、底物和其它基因产物的介导。但由于生物体内很多物质都会产生发光,如皮肤、毛发、鼠粮等,这就使得特定波长下荧光成像会出现一定的背景噪音,使信噪比低于生物发光成像。但随着当前活体成像技术的不断发展,可通过使用背景扣除、近红外波长染料、多光谱分析技术等方法去除或减弱这种背景噪音。

1.3 放射性同位素成像

同位素成像是利用放射性同位素作为示踪剂,对研究对象进行标记,并进行活体成像的一种微量分析方法,属功能显像。它包括正电子发射断层成像技术(Positron Emission Tomography, PET)和单光子发射断层成像技术(Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT)两种形式。PET 的灵敏度非常高($10^{-11} \sim 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),由于其使用的正电子同位素具有相当短的半衰期,所以同位素整合母体分子的化学反应以及后续母体分子导入活体的操作必须迅速进行,适合快速动态研究。在 SPECT 成像中,标记化合物的放射性同位素能发出一种或多种具有特征能量的 γ 射线。与 PET 成像不同的是,两种或两种以上被标记不同放射性同位素的化合物可在同一项研究中被区分,所以

SPECT 可以允许同时对多种事件进行分开检测^[4-5]。然而, PET 比 SPECT 提供更多的定量数据,特别是 PET 具有更高的敏感性,有可能被用于评估低水平的细胞活动^[6]。目前, PET 和 SPECT 在分子水平上提供了生理信息,非常适合监测许多重要的过程,如葡萄糖代谢,血流量和灌注,受体-配体结合率以及氧气的利用率。

1.4 X 光成像

X 光是一种高能量且穿透性很强的射线。它对不同物质的穿透性由射线强度、频率、阻挡物质与射线作用程度、阻挡物质比重及大小等因素共同决定。X 光成像在骨研究中有广泛的应用,由于骨骼含钙量高、比重高,其吸收的 X 射线量最多,成像时可与周围的组织和器官形成鲜明对比,能直接进行成像。对于其它大部分组织和器官, X 光的穿透率大体相同,与周围环境没有明显的对比度,不能直接进行 X 光成像。但可以通过造影剂靶向特定的器官和组织增加其对比度,从而形成活体成像,并最终确定特定器官的位置。因此, X 光成像可以清晰地展示实验动物的内部的解剖学成像。其主要的缺点是研究对象需持续暴露于电离辐射下,尤其在重复研究时,电离辐射可能会影响肿瘤的特性,从而影响实验结果^[7]。

2 小动物活体成像在肿瘤研究中的几个关键技术

2.1 动物模型制备

建立肿瘤模型首先必须解决宿主动物的免疫排斥反应,因此免疫缺陷动物是异种移植的最佳受体^[8]。根据实验研究内容不同,肿瘤的接种途径亦有所不同,常见的有尾静脉注射、皮下移植和原位移植等方法。除此之外,在建模时,要根据实验目的来选择合适的标记方式。如在荧光成像中,激发光波长短,穿透性弱,一般只能达深度 1~2 mm,适合皮下瘤和解剖后脏器肿瘤的直接成像;而深部脏器肿瘤的成像宜选择生物学发光成像。

2.2 活体成像

影响成像效果的因素较多,主要包括以下几个方面:(1)成像软件:利用高灵敏度的电荷耦合元件(Charge-Coupled device, CCD)探测器,使用离散的窄带带通滤波器或电调滤波器,改善多光谱分

析软件算法以及提高位于动物两侧的激发光源和探测器之间的透射能力,可使生物发光或荧光成像的灵敏度和分辨率增加^[9]; (2) 荧光发光标记: 荧光发光成像宜选择发射波长较长的探针。近些年报道的一种称为 Katushka 的新型荧光蛋白, 它拥有超过 620 nm 的发射波长, 且能对深部组织进行成像, 是目前成像效果最好的蛋白^[10]; (3) 自发荧光干扰: 动物的毛发、体内食物等产生的自发荧光会降低荧光的信噪比, 减弱成像的灵敏度, 从而影响了成像效果。因此, 可以采用无荧光素鼠粮饲养小鼠、剃去小鼠毛发等方法减少自发荧光, 也可以利用成像系统通过软件处理除去荧光信号。

3 小动物活体成像技术在肿瘤研究中的应用

在肿瘤研究中, 可采用活体成像技术无创地定量检测小动物整体的原位瘤、转移瘤及自发瘤的大小及转移情况, 以及对癌症治疗过程中癌细胞的变化进行实时、原位、活体的观测和评价。

3.1 肿瘤细胞成像

采用发光基团标记肿瘤细胞, 使之成为发光源, 然后接种活体就可实现肿瘤细胞活体成像。在一定范围内, 随细胞增多发光信号逐渐增强。利用荧光素酶标记的胃癌细胞, 通过观察 ApoG2 蛋白体外抑制胃癌细胞生长的效果, 发现随该蛋白量增加, 检测到胃癌细胞荧光素酶活性逐渐降低^[11]。通过探针标记乳腺癌细胞后, 甚至可以在单细胞水平动态观察药代动力学变化^[12]。通过观察在细胞内用荧光素酶标记 p16 蛋白从而建立细胞模型, 可以适时检测肿瘤生成和细胞衰老情况^[13]。因此, 活体成像技术是肿瘤形成研究强有力的工具。

3.2 肿瘤转移过程成像

小动物活体成像系统能通过对发光信号的检测而追踪肿瘤的转移过程, 包括观察癌细胞在血管中的停留、外渗和转移灶等一系列过程, 甚至能够检测到少于 100 个细胞的肿瘤微小转移病灶, 从而对发现肿瘤早期诊断与治疗提供帮助。生物发光成像可以确定两种转移性嗜铬细胞瘤的特征情况^[14]。利用近红外荧光探针标记, 可以简单、快速、无放射性地活体观察胶质母细胞瘤的转移情况^[15]。利用生物发光成像技术观测不同亚群癌细胞向肺部的转移情况和转移活性, 再检测基因在细胞内

的表达差异确认了一系列与乳腺癌肺转移有关的基因^[16], 给肿瘤转移机制的研究提供了巨大帮助。

3.3 肿瘤治疗过程的成像

在肿瘤药物研究中, 利用荧光染料或放射性同位素标记药物, 可直接在活体水平观察到药物对肿瘤的是否靶向肿瘤、最佳靶向时间及药物在动物其它器官组织的积累, 有利于研究人员在最佳的时间, 进行组织分析及其它下游分子水平研究。同时也帮助研究人员选择需要分析的器官组织, 以便进行药物作用机制等研究。整体成像不仅在手术过程中对肿瘤进行精确定位, 还可评价肿瘤手术切除后的发展状况。在免疫治疗的研究中, 利用膜锚定 Gaussia 荧光素酶的高强度信号对 T 淋巴细胞进行生物发光成像, 通过遗传修饰的肿瘤特异性嵌合抗原受体介导证明 T 淋巴细胞在肿瘤中聚集、停留以及与肿瘤细胞的相互作用^[17]。在基因治疗中, 光学成像技术可挖掘病毒特异性靶向肿瘤细胞的基因治疗潜能^[18]。也可探究微小 RNA (microRNA, miRNA) 对肿瘤增殖及转移的影响^[19]。还可以观察采用特定运送方法进入肿瘤细胞中的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 的传递及沉默过程, 提高了基因治疗的目的性^[20]。

4 展望

由于各种成像技术的原理、方法、优缺点等都各不同, 因此其研究对象和应用领域也各不相同。在活体成像研究中, 一定要结合具体的研究方向和实验目的选择合适的成像模式。同时, 也可以将两种或多种模式相结合, 优势互补, 使得实验结果更可靠更有说服力。例如, 肿瘤研究用生物发光标记肿瘤细胞, 用荧光或同位素标记肿瘤药物, 用 X 光成像作为解剖学背景, 三者相叠加, 既能准确定位肿瘤细胞在体内的位置, 又能看到肿瘤治疗的药物在体内的分布, 是否靶向到肿瘤, 直观明了。这种多模式组合的活体成像技术将使得活体成像研究提升到全新的水平, 为研究工作提供更充分详实的数据, 满足当今多种领域里研究的需要。

参考文献:

- [1] Weissleder R, Pittet M J. Imaging in the era of molecular oncology[J]. *Nature*, 2008, 452(7187):580-589.
- [2] Brutkiewicz S, Mendonca M, Stantz K, et al. The

- expression level of luciferase within tumour cells can alter tumour growth upon in vivo bioluminescence imaging[J]. *Luminescence*, 2007, 22(3):221-228.
- [3] Dufort S, Sancey L, Wenk C, et al. Optical small animal imaging in the drug discovery process[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, 1798(12):2266-2273.
- [4] Holland J P, Cumming P, Vasdev N. PET of signal transduction pathways in cancer[J]. *J Nucl Med*, 2012, 53(9):1333-1336.
- [5] Willmann J K, Bruggen N V, Dinkelborg L M, et al. Molecular imaging in drug development[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(7):591-607.
- [6] Park C W, Rhee Y S, Vogt F G. Advances in microscopy and complementary imaging techniques to assess the fate of drugs ex vivo in respiratory drug delivery[J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2012, 64(4):344-356.
- [7] Grassi R, Cavaliere C, Cozzolino S, et al. Small animal imaging facility: new perspectives for the radiologist[J]. *Radiol Med*, 2009, 114(4):152-167.
- [8] 卓莹, 吴一龙, 郭爱林等. 荷人肺癌小鼠皮下移植瘤模型的建立及其生物学特性初探[J]. *中国肺癌杂志*, 2010, 13(6):568-574.
- [9] Hickson J. In vivo optical imaging: preclinical applications and considerations[J]. *Urol Oncol*, 2009, 27(3):295-297.
- [10] Rice B W, Cable M D, Nelson M B. In vivo imaging of light-emitting probes[J]. *J Biomed Opt*, 2001, 6(4):432-440.
- [11] Xin J, Zhan Y, Liu M, et al. ApoG2 induces ER stress-dependent apoptosis in gastric cancer cells in vitro and its real-time evaluation by bioluminescence imaging in vivo[J]. *Cancer Lett*, 2013, 69(2):317-331.
- [12] Thurber G M, Yang K S, Reiner T, et al. Single-cell and subcellular pharmacokinetic imaging allows insight into drug action in vivo[J]. *Nat Commun*, 2013(4):1504-1506.
- [13] Burd C E, Sorrentino J A, Clark K S, et al. Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16(INK4a)-luciferase model[J]. *Cell*, 2013, 152(1/2):340-351.
- [14] Giubellino A, Woldemichael G M, Sourbier C, et al. Characterization of two mouse models of metastatic pheochromocytoma using bioluminescence imaging[J]. *Cancer Lett*, 2012, 316(1):46-52.
- [15] Huang R, Vider J, Kovar J L, et al. Integrin $\alpha\beta 3$ -targeted IRDye 800CW near-infrared imaging of glioblastoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(20):5731-5740.
- [16] Minn A J, Gupta G P, Siegel P M, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung[J]. *Nature*, 2005, 436(7050):518-524.
- [17] Santos E B, 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.
- [18] Tseng J C, Levin B, Hurtado A, et al. Systemic tumor targeting and killing by Sindbis viral vectors[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(1):70-77.
- [19] Tavazoie S F, Alarcón C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2008, 451(7175):147-152.
- [20] Medarova Z, Pham W, Farrar C, et al. In vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors[J]. *Nat Med*, 2007, 13(3):372-377.

In Vivo Imaging Technology of Small Animals Applied in Cancer Study

YANG LI-hua¹, SHEN Xing-kai¹, FU Dan¹, YU Yu-chun¹, ZHAO Yuan¹, GONG Zhao-hui^{1,2*}

(1. School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pathophysiology, Ningbo 315211, China)

Abstract: In vivo imaging technology has been used to take images of biological behavior in the living tissues or small animals under the noninvasive conditions, which has been widely applied in cancer research. It has great advantage of real-time in vivo detection of tumor growth, metastasis and evaluation of tumor therapy. Compared with the traditional detection methods, in vivo imaging greatly reduces the number of test animals, which is consistent with the principle of "3R". This paper reviews the imaging modes, technical principles and routes, and the applications of in vivo imaging technology in the field of tumor growth, metastasis and treatment process of small animals.

Key words: in vivo imaging; bioluminescence; fluorescence; radioisotope; X-Ray; tumor

(责任编辑 章践立)