

# 活体生物荧光成像技术新进展

宿华威, 崔云甫, 吴德全, 韩德恩

## ■背景资料

活体生物荧光成像技术(*in vivo* bioluminescence imaging)是近年来发展起来的一项崭新的分子、基因表达的分析检测系统。近5 a来随着荧光成像设备的进一步完善以及转基因动物的构建开发,在欧美等发达国家活体生物荧光成像技术已被广泛地应用于感染、肿瘤免疫及治疗、自身免疫性疾病、器官移植、基因治疗、药物开发等实验领域并取得了许多成果。

宿华威, 崔云甫, 吴德全, 韩德恩, 哈尔滨医科大学附属第二医院肝胆胰器官移植外科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
通讯作者: 宿华威, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院肝胆胰器官移植外科。  
huawei97@msn.com  
电话: 0451-88671108  
收稿日期: 2006-05-23 接受日期: 2006-06-30

## 摘要

活体生物荧光成像技术(*in vivo* bioluminescence imaging)是近年来发展起来的一项崭新的分子、基因表达的分析检测系统。与传统的检测方法相比具有巨大的优越性,堪称是分子基因检测领域的革命性技术。随着荧光成像设备的进一步完善以及转基因动物的构建开发,在欧美等发达国家活体生物荧光成像技术已被广泛地应用于感染、肿瘤免疫及治疗、自身免疫性疾病、器官移植、基因治疗、药物开发等实验领域。本文就活体生物荧光成像技术的发展和应用作如下综述。

**关键词:** 活体生物荧光成像; 萤光素; 萤光素酶

宿华威, 崔云甫, 吴德全, 韩德恩. 活体生物荧光成像技术新进展. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2440-2443  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2440.asp>

## 0 引言

活体生物荧光成像技术(*in vivo* bioluminescence imaging)是近年来发展起来的一项崭新的分子、基因表达的分析检测系统。他由敏感的萤光照相机(charge coupled device camera, CCD camera)及其分析软件和作为报告子的萤光素酶(luciferase)和萤光素(luciferin)组成。与传统的检测方法相比具有巨大的优越性,堪称是分子基因检测领域的革命性技术<sup>[1-2]</sup>。近5 a来随着荧光成像设备的进一步完善以及转基因动物的构建开发,在欧美等发达国家活体生物荧光成像技术已被广泛地应用于感染、肿瘤免疫及治疗、自身免疫性疾病、器官移植、基因治疗、药物开发等实验领域,并取得了许多成果。

活体生物荧光成像技术是指在小的哺乳动物体内利用报告基因-萤光素酶基因表达所产生

的萤光素酶蛋白与其小分子底物萤光素在氧、 $Mg^{2+}$ 离子存在的条件下消耗ATP发生氧化反应,将部分化学能转变为可见光能释放。然后在体外利用敏感的CCD camera设备定量检测体内所发射的光子数量并将之转换成图像。萤光素酶基因可以被插入多种基因的启动子(promoter)之后,这样就成了此种基因表达的报告基因,通过监测报告基因从而实现目标基因表达的监测<sup>[3-4]</sup>。

多种生物包括细菌、藻类、腔肠动物、珊瑚、萤火虫等体内存在萤光素酶基因,其中以北美萤火虫(North America firefly)的萤光素酶基因应用的最为广泛。此种基因可编码产生550个氨基酸的萤光素酶蛋白。生物萤光实质是一种化学萤光,北美萤火虫萤光素酶在氧化其特有底物萤光素的过程中可以释放波长广泛的可见光光子,其平均波长为560 nm(460-630 nm),这其中包括重要的波长超过600 nm的红光成分。在哺乳动物体内血红蛋白是吸收可见光的主要成分,能吸收中蓝绿光波段的大部分可见光;水和脂质主要吸收红外线,但其均对波长为590-800 nm的红光至近红外线吸收能力较差,因此波长超过600 nm的红光虽然有部分散射消耗但大部分可以穿透哺乳动物组织被敏感的CCD camera检测到。除了北美萤火虫萤光素酶之外,其他种类的萤光素酶在氧化萤光素过程中所产生的可见光成分主要为波长较短的蓝绿光(平均波长480 nm),大多数被组织所吸收。这也是北美萤火虫萤光素酶基因被广泛应用的主要原因<sup>[5-7]</sup>。

北美萤火虫萤光素酶的底物-萤光素是一种水溶性小分子[D-(-)-2-(6'-hydroxy-2'-benzothiazdyl)thiazone-4-carboxylic acid],经ip或iv后可以迅速渗透通过细胞膜并广泛地分布于哺乳动物体内,而且可以顺利通过血脑屏障和胎盘屏障。目前研究尚未发现其具有毒副作用。

## 1 活体生物荧光成像技术的优势

活体生物荧光成像技术具有以下几个常规检测手段所不具备的优点: (1)无创伤性; (2)可多次重复在不同时间点检测; (3)快速扫描成像(时

间少于5 min); (4)可以使实验动物整体成像. 活体生物荧光成像技术与转基因动物相结合可以实时示踪许多重要细胞和分子, 特别是肿瘤细胞、免疫相关细胞和介质, 从而洞悉其在疾病发生发展过程中所扮演的角色, 为揭示多种疾病病理过程提供了线索<sup>[8-9]</sup>. 活体生物荧光成像技术的无创检测报告基因表达这一能力与传统的将实验动物处死后再进行组织染色、酶活性分析的方法相比有巨大优势. 活体生物荧光成像技术在实验中可在同一实验动物体内获得全部时间点的整体数据, 可以用极少的实验动物而迅速获得更全面的数据, 这样就大大地节省了实验动物、时间以及实验经费. 由于能够对同一动物进行连续检测这样就最大程度减少了不同实验动物之间的个体差异以及传统检测方法误差所造成的对实验结果的影响. 更重要的是活体生物荧光成像技术的敏感性极高, Edinger *et al*<sup>[10]</sup>报道活体生物荧光成像技术检测肿瘤细胞的敏感性甚至超过了流式细胞仪体外检测的敏感性. 与其他用于检测细胞游走增殖的标记技术如荧光染料、放射性探针等相比活体生物荧光成像技术对靶细胞无毒副作用, 并且也不会因靶细胞增殖分裂, 信号稀释而丧失标记作用.

## 2 活体生物荧光成像技术的发展及应用

**2.1 在肿瘤方面的应用** 借助活体生物荧光成像技术实时监测肿瘤发生发展的病理过程是当前在欧美医学发达国家一个非常重要、发展迅速的前沿研究领域. 他可以快速的测量各种癌症模型中肿瘤的生长, 并可对癌症治疗中癌细胞的变化进行实时观测评估; 可以无创伤地定量检测小鼠整体的原位瘤、转移瘤及自发瘤. Contag *et al*<sup>[11]</sup>研究使用荧光素酶和GFP作为报告子活体成像肿瘤细胞, 并探讨了使用这些报告基因在细胞分子水平研究肿瘤的前景. 同时发现活体生物荧光成像技术的敏感性是超前的, 在追踪肿瘤的生长过程方面具有很大的优越性. Rehemtulla *et al*<sup>[12]</sup>使用荧光素酶基因稳定地转染qL大鼠的胶质肉瘤细胞(qLluc)建立了原位脑肿瘤模型. 此后荧光素酶转染其他 肿瘤细胞系不断出现, 经过ip, sc或iv进入实验动物体内, 研究肿瘤生长的动力性改变以及对治疗的反应. 令人感到兴奋的是使用活体生物荧光成像技术获得的实验结果与MRI成像的结果达到了91%的一致性, 这进一步证明活体生物荧光成像技术在活体分析肿

瘤的时间空间分布方面是一个极其优秀的工具. MRI测出的肿瘤体积与活体生物荧光成像测得的肿瘤组织所产生的光子数呈线性相关. 由于MRI测得的体积还包括肿瘤周边的水肿、浸润的细胞、死亡细胞的残骸, 而活体生物荧光成像测得的却只有具有代谢活力的肿瘤细胞因此更具研究价值. Alvarnas *et al*<sup>[13]</sup>报道将细胞活素诱导产生的杀伤细胞(主要成分是CD3<sup>+</sup>和CD56<sup>+</sup>细胞)注入已存在荧光素酶标记的肿瘤细胞的小鼠体内, 无论在活体内还是在体外CD3<sup>+</sup>和CD56<sup>+</sup>细胞均显示出抗多种肿瘤细胞的活性. Scheffold *et al*<sup>[14]</sup>用荧光素酶基因标记表达HER2的人类卵巢癌细胞, 并建立异种移植的小鼠模型. 在输注CD8<sup>+</sup>NK-T细胞后使用活体生物荧光成像证实其对卵巢癌细胞具有杀灭作用. Edinger *et al*<sup>[10]</sup>将BALB/C来源的淋巴瘤细胞用荧光素酶基因标记, 然后利用活体生物荧光成像在小鼠体内示踪淋巴瘤细胞的增殖、游走、器官浸润, 并定量分析全身的肿瘤细胞负荷. Jenkins *et al*<sup>[15]</sup>将靶了荧光素酶基因的人类前列腺癌细胞PC-3M-luc-C6输注到小鼠体内, 并利用活体生物荧光成像活体监测前列腺癌细胞化疗后的复发和转移情况. Hollingshead *et al*<sup>[16]</sup>利用人类胶质瘤细胞系U251构建U251-HRE细胞, 其中的荧光素酶基因表达受可诱导启动子的操控, 低氧状态为其诱导条件, 因此在细胞处于低氧状态下荧光素酶基因开始表达. 将此肿瘤细胞sc于裸鼠体内, 肿瘤增殖早期并无明显荧光素酶表达, 当肿瘤达到了300-500 mg时, 局部组织出现低氧状态, 此时可监测到荧光素酶显著表达. 这种方法不仅仅监测肿瘤本身, 更重要的是可以监测肿瘤细胞所处的微环境.

**2.2 在监测感染和炎症方面的应用** 利用活体生物荧光成像技术可以检测到荧光素酶基因标记的病毒和细菌, 并能连续观察其对机体的侵袭过程以及抗病毒药物和抗生素对其病理过程的影响. Contag *et al*<sup>[17]</sup>用细菌荧光素酶标靶沙门菌, 并用活体生物荧光成像追踪细菌感染. Francis *et al*<sup>[18]</sup>luxABCDE标靶葡萄球菌, 并将此种葡萄球菌im于小鼠体内. 然后利用活体生物荧光成像技术对小鼠进行全身成像可以定位葡萄球菌侵袭的组织并能区分不同的感染来源、感染发生的进程以及抗生素的疗效. Sadikot *et al*<sup>[19]</sup>利用NF-kappaB-luc转基因小鼠研究肝脏冷冻消融术所引起的多系统损害. 通过活体生物荧光成像证实35%的肝脏冷冻消融术后会发生剩余肝

### ■同行评价

本文综述的活体生物荧光成像技术是目前国际上刚刚兴起的一种实验技术, 在国内尚未开展, 因此具有新意. 文章立意新颖, 为国内首次, 对国内医学实验研究具有重要指导意义.



脏以及多个远位脏器的NF-kappaB转录因子的激活,继而在肝脏的直接损伤后引发多个系统损伤. Gray *et al*<sup>[20]</sup>将活体生物荧光成像技术应用到急性胰腺炎的研究中. 他们构建了由依赖转录因子NF-kappaB的启动子操控photinus萤光素酶表达的转基因小鼠. NF-kappaB在胰腺、肝脏、肺脏中的活性可通过萤光素酶表达程度反映. 在造成急性胰腺炎模型后证实肝脏和肺脏中NF-kappaB活性均明显升高,根据所得数据推断肝脏在调节胰腺炎诱导的SIRS中发挥了重要作用. Nguyen *et al*<sup>[21]</sup>将活体生物荧光成像技术应用于对环加氧酶-2(COX-2)的研究. 将转染鼠COX-2启动子和萤光素酶基因的嵌合体的肿瘤细胞进行异种移植,在注射脂多糖(LPS)或内毒素后可观察到萤光素酶表达,从而实现对COX-2表达的监测. Zhang *et al*<sup>[22]</sup>利用iNOS-luc转基因小鼠观察炎症过程中可诱导一氧化氮合成酶(iNOS)的表达. 在小鼠的败血症模型中观察到iNOS在肝脏中的表达,并提出此种转基因诱导是时间、剂量依赖的,所产生的光子数量与肝脏中的iNOS mRNA的水平是相关的. 同年作者评估了此种转基因小鼠在关节炎中的应用,在膝关节中注射酵母聚糖(zymosan)后利用活体生物荧光成像可观测到其诱导的iNOS-luc表达. 因此, iNOS-luc转基因小鼠模型为今后研究诱导iNOS表达的各种病理过程和研究各种抗炎因子提供了一个有价值的工具. Hardy *et al*<sup>[23]</sup>利用活体生物荧光成像发现可以引起致命感染的单核细胞增多利斯特菌增殖侵袭、定位于小鼠的胆囊内,并由此推测人类此病菌的感染灶很可能也位于此处.

**2.3 活体生物荧光成像技术和细胞示踪** 活体生物荧光成像技术除了已广泛用于多种肿瘤细胞和病原体的体内示踪,最近开始应用到免疫细胞、干细胞、细胞凋亡等研究领域. Costa *et al*<sup>[24]</sup>在小鼠模型上实现了直接对转染了萤光素酶基因的CD4<sup>+</sup>T细胞的活体成像. 在一个模拟多发性硬化病的小鼠模型上,实验性地诱导自身免疫性脑脊髓炎. T淋巴细胞通过PGC逆转录载体转导表达萤光素酶,通过活体生物荧光成像可以追踪到T淋巴细胞聚集于中枢神经系统. Wang *et al*<sup>[25]</sup>将萤光素酶基因稳定地转导于人类造血干细胞(HSC)中,利用活体生物荧光成像揭示了HSC及其前体细胞在受体小鼠骨髓腔中植活、增殖的动态信息. Kim *et al*<sup>[26]</sup>将萤光素酶基因转染于神经前体细胞(NPC),然后注射于使用夹闭大脑中

动脉方法造成的小鼠脑梗模型中,利用活体生物荧光成像显示神经前体细胞迅速游走聚集至梗塞病灶处. 同年Lu *et al*<sup>[27]</sup>将萤光素酶基因利用慢病毒载体成功转导于胰岛细胞,并将此胰岛细胞移植于用链脲霉素处理过的NOD-scid小鼠. 利用活体生物荧光成像观察移植后的胰岛细胞及排斥反应,证明移植后胰岛细胞的功能并没有受到病毒转导、萤光素酶基因表达的影响. 这为胰岛移植后监测胰岛细胞的存活提供了一个全新的和更为直接的手段.

### 3 活体生物荧光成像技术与放射性活体成像技术的比较

活体生物荧光成像技术与放射性活体成像技术如PET, SPECT相比敏感性更高而且易操作,在应用方面,因为可以同时成像多个动物,并且图像采集时间短少于5 min,因此效率更高;不需要回旋加速器,无放射性损害;成像设备价格相对较低,单次成像成本低廉;底物萤光素相对便宜,稳定易保存,而放射性核素标靶的探针合成既昂贵又费时. 活体生物荧光成像其主要缺点在于成像深度较浅暂时不能应用于临床和较大的实验动物,而且目前不具备断层成像功能. 活体生物荧光成像这一新兴的技术由于具有巨大的优势,因此在生物医学方面的应用领域目前仍在不断地扩大. 他的出现已打破了以往许多研究禁区堪称一项革命性的技术. 目前活体生物荧光成像为二维图像,在不远的将来将会发展为三维断层成像,并且与PET和MRI相结合取长补短进一步扩大应用领域,突破更多的研究瓶颈,及早应用于临床造福人类.

### 4 参考文献

- 1 Contag CH, Bachmann MH. Advances in *in vivo* bioluminescence imaging of gene expression. *Annu Rev Biomed Eng* 2002; 4: 235-260
- 2 McCaffrey A, Kay MA, Contag CH. Advancing molecular therapies through *in vivo* bioluminescent imaging. *Mol Imaging* 2003; 2: 75-86
- 3 Caitlin E, O'Connell-Rodwell, Stacy M, Burns, Michael H, Bachmann, Christopher H, Contag. Bioluminescent indicators for *in vivo* measurements of gene expression. *Trends in Biotechnology* 2002; 20: 19-23
- 4 Weissleder R, Mahmood U. Molecular imaging. *Radiology* 2001; 219: 316-333
- 5 Contag PR. Whole-animal cellular and molecular imaging to accelerate drug development. *Drug Discov Today* 2002; 7: 555-562
- 6 Contag PR, Olomu IN, Stevenson DK, Contag CH. Bioluminescent indicators in living mammals. *Nat*

- Med 1998; 4: 245-247
- 7 Greer LF, Szalay AA. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* 2002; 17: 43-74
  - 8 Hardy J, Edinger M, Bachmann MH, Negrin RS, Fathman CG, Contag CH. Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking *in vivo*. *Exp Hematol* 2001; 29: 1353-1360
  - 9 Weissleder R, Ntziachristos V. Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med* 2003; 9: 123-128
  - 10 Edinger M, Cao YA, Verneris MR, Bachmann MH, Contag CH, Negrin RS. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using *in vivo* bioluminescence imaging. *Blood* 2003; 101: 640-648
  - 11 Contag CH, Jenkins D, Contag PR, Negrin RS. Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease *in vivo*. *Neoplasia* 2000; 2: 41-52
  - 12 Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, Gupta S, Hall DE, Contag CH, Ross BD. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using *in vivo* bioluminescence imaging. *Neoplasia* 2000; 2: 491-495
  - 13 Alvarnas JC, Linn YC, Hope EG, Negrin RS. Expansion of cytotoxic CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> cells from peripheral blood progenitor cells of patients undergoing autologous hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 216-222
  - 14 Scheffold C, Kornacker M, Scheffold YC, Contag CH, Negrin RS. Visualization of effective tumor targeting by CD8<sup>+</sup> natural killer T cells redirected with bispecific antibody F(ab')(2)HER2xCD3. *Cancer Res* 2002; 62: 5785-5791
  - 15 Jenkins DE, Yu SF, Hornig YS, Purchio T, Contag PR. *In vivo* monitoring of tumor relapse and metastasis using bioluminescent PC-3M-luc-C6 cells in murine models of human prostate cancer. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 745-756
  - 16 Hollingshead MG, Bonomi CA, Borgel SD, Carter JP, Shoemaker R, Melillo G, Sausville EA. A potential role for imaging technology in anticancer efficacy evaluations. *Eur J Cancer* 2004; 40: 890-898
  - 17 Contag CH, Contag PR, Mullins JL, Spilman SD, Stevenson DK, Benaron DA. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol Microbiol* 1995; 18: 593-603
  - 18 Francis KP, Joh D, Bellinger-Kawahara C, Hawkinson MJ, Purchio TF, Contag PR. Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in living mice using a novel luxABCDE construct. *Infect Immun* 2000; 68: 3594-3600
  - 19 Sadikot RT, Wudel LJ, Jansen DE, Debelak JP, Yull FE, Christman JW, Blackwell TS, Chapman WC. Hepatic cryoablation-induced multisystem injury: bioluminescent detection of NF-kappaB activation in a transgenic mouse model. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 264-270
  - 20 Gray KD, Simovic MO, Chapman WC, Blackwell TS, Christman JW, Washington MK, Yull FE, Jaffal N, Jansen ED, Gautman S, Stain SC. Systemic nf-kappaB activation in a transgenic mouse model of acute pancreatitis. *J Surg Res* 2003; 110: 310-314
  - 21 Nguyen JT, Machado H, Herschman HR. Repetitive, noninvasive imaging of cyclooxygenase-2 gene expression in living mice. *Mol Imaging Biol* 2003; 5: 248-256
  - 22 Zhang N, Weber A, Li B, Lyons R, Contag PR, Purchio AF, West DB. An inducible nitric oxide synthase-luciferase reporter system for *in vivo* testing of anti-inflammatory compounds in transgenic mice. *J Immunol* 2003; 170: 6307-6319
  - 23 Hardy J, Francis KP, DeBoer M, Chu P, Gibbs K, Contag CH. Extracellular replication of *Listeria monocytogenes* in the murine gall bladder. *Science* 2004; 303: 851-853
  - 24 Costa GL, Sandora MR, Nakajima A, Nguyen EV, Taylor-Edwards C, Slavin AJ, Contag CH, Fathman CG, Benson JM. Adoptive immunotherapy of experimental autoimmune encephalomyelitis via T cell delivery of the IL-12 p40 subunit. *J Immunol* 2001; 167: 2379-2387
  - 25 Wang X, Rosol M, Ge S, Peterson D, McNamara G, Pollack H, Kohn DB, Nelson MD, Crooks GM. Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using *in vivo* bioluminescence imaging. *Blood* 2003; 102: 3478-3482
  - 26 Kim DE, Schellingerhout D, Ishii K, Shah K, Weissleder R. Imaging of stem cell recruitment to ischemic infarcts in a murine model. *Stroke* 2004; 35: 952-957
  - 27 Lu Y, Dang H, Middleton B, Zhang Z, Washburn L, Campbell-Thompson M, Atkinson MA, Gambhir SS, Tian J, Kaufman DL. Bioluminescent monitoring of islet graft survival after transplantation. *Mol Ther* 2004; 9: 428-435

电编 李琪 编辑 潘伯荣