

## ·技术与方法·

## 生物发光成像的特点及应用

杨丽平 赵敬湘 裴雪涛

**【摘要】**生物发光成像(BLI)是通过荧光素酶基因标记细胞或DNA,在ATP及氧气存在条件下,催化荧光素的氧化反应而发光,从而能够直接监控活体内的细胞活动和基因行为。该文通过比较BLI与MRI、PET、放射成像的异同,以及BLI在肿瘤、干细胞和免疫细胞运输、细胞凋亡等方面的应用,为更好地推广BLI的应用提供依据。

**【关键词】**体层摄影术,光学;荧光素酶类;肿瘤;干细胞

**Bioluminescence imaging characteristics and application**YANG Li-ping<sup>1</sup>, ZHAO Jing-xiang<sup>2</sup>, PEI Xue-tao<sup>2</sup>

(1.Department of Neurology, No.263 Hospital, Beijing 101149, China; 2.Department of Stem Cell and Regenerative Medicine, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

**【Abstract】**Bioluminescence imaging (BLI) by luciferase gene marked cells or DNA, in the presence of ATP and oxygen, catalytic oxidation reaction of fluorescein luminescence. So that it can directly monitor in vivo cell activity and gene behavior. In this paper, by comparing the BLI and MRI, PET, radiography of the similarities and differences, as well as about their cancer, stem cells and immune cells transportation, apoptosis and other aspects of the application, in order to better provide the basis for promoting the application of BLI.

**【Key words】**Tomography, optical; Fluoresceins; Neoplasms; Stem cells

分子影像学是应用影像学方法,对活体状态下的生物过程进行细胞和分子水平的定性和定量研究,通过图像直接显示细胞或分子水平的生理和病理过程。目前常用的分子显像模式包括MRI、PET、SPECT、CT以及光学成像等<sup>[1-3]</sup>。光学成像主要包括生物发光成像(bioluminescence imaging, BLI)和荧光成像,而荧光成像由于其光谱范围位于可见光能量较低的绿光部分,组织穿透深度有限,其发射荧光需要外在光源激发,而且所获影像信噪比低等不足限制了应用。因此我们对BLI作为一种可视性显像模式的特点及应用做如下综述。

## 1 BLI概述

BLI是用荧光素酶基因标记细胞或DNA,而荧

光技术则采用荧光报告基因进行标记。由于哺乳动物的组织是相对不透光的,利用灵敏的光学检测仪将动物体内的组织所发出并穿透组织的生物光源收集成像,能够直接监控动物活体内的细胞活动和基因行为。通过BLI系统,可以观测动物活体内肿瘤的生长及转移、感染性疾病发展过程、特定基因的表达等生物学过程。

BLI的机制是酶促反应。荧光素酶在ATP及氧气存在条件下,催化荧光素的氧化反应才可以发光,因此只有在活细胞内才会产生发光现象,并且光的强度与标记细胞的数目呈线性相关。酶反应所发出的光具有非常广的光谱,并且多超过600 nm。该波长不仅光子组织穿透力强(可达数cm),而且该区域血红蛋白、水及脂肪对光子的吸收率最低,组织的自发荧光最小,所获影像信噪比最高。BLI是一种活体动物模型研究肿瘤和疾病进程敏感而且快速的方法。

## 2 BLI和其他成像方法的异同

### 2.1 MRI

MRI作为传统的临床成像方法,曾用来确认

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2009.04.018

基金项目:国家重点基础研究发展规划(973计划)项目(2005CB522702);国家高科技研究发展计划(863计划)项目(2006AA2A107)

作者单位:1.101149,北京军区总医院263临床部神经内科(杨丽萍);2.100850北京,中国人民解放军军事医学科学院输血研究所干细胞生物学研究室(赵敬湘,裴雪涛)

通信作者:裴雪涛(E-mail:peixt@nic.ac.cn)

并对比 BLI 的可行性。Rehemtulla 等<sup>[9]</sup> 对比观察了 MRI 和 BLI 检测大鼠 9L 胶质瘤细胞生长的动力学和对治疗的反应: 由于 9L 胶质瘤细胞稳定表达荧光素酶, 使 BLI 能够直接检测到大鼠脑胶质瘤发出的光; BLI 获得的信号和 MRI 测定的肿瘤体积具有极好的相关性 ( $r=0.91$ ), 能够对全身应用化疗药物 (1,3-双(氯乙基)-1-亚硝基脲) 治疗进行定量分析; 将 MRI 和 BLI 收集的数据进行处理后发现, 两种成像方法均具有独立价值, BLI 为实验治疗的评价和量化提供了更精确的方法。

## 2.2 小动物 PET

小动物 PET 已在啮齿类动物模型中得到应用。Wu 等<sup>[9]</sup> 应用腺病毒将标记的萤火虫荧光素酶基因转染到小鼠肌肉和肝组织, 用 BLI 和小动物 PET 同时检测标记基因的表达发现, 在肌肉中 BLI 比小动物 PET 敏感 100 至 1000 倍, 而在肝脏中敏感 10 倍。由此可见, 在小动物成像方面, 与核医学方法相比, BLI 应用简便, 更易被接受。

## 2.3 放射成像

放射成像由于其高穿透性, 在肿瘤的骨转移中得到广泛应用。虽然放射成像可以检测到大面积的融骨性转移, 但微转移病变很难检测到, 而这些微小的病变是介入治疗的理想靶目标。Wetterwald 等<sup>[6]</sup> 报道, 在骨转移的异种移植中, 极少的人乳腺癌细胞在免疫缺陷小鼠骨髓中就可被 BLI 检测到。在该研究中, 放射成像和 BLI 检测疾病不同阶段的同一组动物, 结果: 放射成像在疾病晚期可以观察到骨质破坏, 但不能检测到早期变化; BLI 不仅可以检测到放射成像发现的晚期病变, 而且在疾病的超早期即可发现病变。这一研究表明 BLI 在活体的微小病变中具有敏感性高的特点。BLI 发现的溶骨性病变也证明了整合到肿瘤细胞中的报告基因可以用来做长期观察<sup>[6-7]</sup>。

## 3 BLI 在肿瘤研究中的应用

肿瘤治疗方法应用于临床前最重要的步骤是在肿瘤动物模型中观察该治疗方法的有效性。多年来在活体动物观察疗效主要有两种方法: 一是观察浅表肿瘤的生长, 二是监测动物的生存期。而对于转移性或播散性疾病, 发病率和(或)病死率以及详细的病理学和组织学检查是肿瘤模型的重要观察指标, 虽然上述方法给我们提供了一些必要的数据,

但是不可能快速准确地检测到肿瘤发生的微转移, 而且由于很多动物需要处死、取材, 增加了动物的消耗等。BLI 可以无创性实时动态检测活体动物<sup>[4,8-9]</sup>, 快速测量各种癌症模型中肿瘤的生长和转移, 并可对癌症治疗中癌细胞的变化进行实时观测和评估, 即使微小的迁移也能被检测到(可以检测到体内  $10^2$  个细胞的微小转移灶)。

### 3.1 肿瘤基因治疗的检测

BLI 可以用来对肿瘤基因治疗过程中疗效的观察。Shah 等<sup>[10-11]</sup> 将肿瘤坏死因子相关凋亡配体基因转入携带有荧光素酶复制缺陷的单纯疱疹病毒中观察对小鼠胶质瘤的治疗效果, 发现未转染该基因而仅表达荧光素酶的小鼠胶质瘤呈持续生长, 而转染该基因的胶质瘤小鼠在 4 周后肿瘤体积缩小。Dickson 等<sup>[12]</sup> 将神经纤维母细胞瘤细胞移植到 SCID 小鼠, 接种 14 d 后肿瘤形成, 然后经静脉注射表达干扰素  $\beta$  的腺病毒, 通过 BLI 活体观察肿瘤的发生及生长, 结果发现接受干扰素  $\beta$  治疗的肿瘤生长速度明显减慢, 而未接受干扰素  $\beta$  治疗的对照组小鼠肝脏和肾脏监测到肿瘤的发生。

### 3.2 肿瘤微转移的监测

尽管肿瘤患者的生存期由于肿瘤治疗方法的改进已经得到很大改善, 多数肿瘤患者应用大剂量的化疗或放疗得到有效的治疗, 但是这些患者中仍有很大部分在将来复发。BLI 能够有效监测到微转移的肿瘤细胞, 不仅可以用来显示复发的分子基础, 而且为下一步的靶向治疗提供基础。BLI 使得检测极少量的恶性肿瘤细胞转移成为可能<sup>[6-7]</sup>。应用免疫缺陷小鼠移植人乳腺癌细胞后, 通过 BLI 可以检测到骨髓转移灶的存在和位置, 小于  $0.5 \text{ mm}^3$  的骨髓微转移(相当于  $2 \times 10^4$  细胞) 均可检测到, 而骨髓微转移用放射成像不易检测到<sup>[6]</sup>。可见, 动物肿瘤模型应用的进展将大大提高疾病超早期靶向治疗少量微转移细胞的能力。

## 4 BLI 在分子生物学研究中的应用

### 4.1 干细胞和免疫细胞的运输

将荧光素酶标记的干细胞移植入体内, 可用于实时观测活体动物体内移植的干细胞迁移过程及动力学变化。Tang 等<sup>[13]</sup> 报道, 将神经干细胞移植到脊髓损伤的小鼠, 通过 BLI 检测到移植的干细胞迁移到脊髓损伤部位, 修复损伤后, 脊髓的功能得到

恢复。Cao 等<sup>[14]</sup>报道,将胚胎干细胞移植入有心肌梗死的裸鼠体内,观察到移植的胚胎干细胞在体内扩增,修复受损的心肌组织后,心功能得到恢复。

应用 BLI 观察正常免疫细胞的运输模式是 BLI 的重要功能<sup>[15-16]</sup>。移植物抗宿主疾病是器官和细胞移植中常见的反应,将标记有荧光素酶的同种异体脾脏细胞移植到小鼠体内,通过 BLI 观察移植细胞的组织分布,结果发现供体的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>和 CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T 细胞扩增,随后向肠、肝脏和皮肤迁移,导致移植物抗宿主疾病,而移植的、不在淋巴器官扩增的 CD<sub>4</sub> 记忆 T 细胞却不会引起急性移植物抗宿主疾病<sup>[10]</sup>。

#### 4.2 细胞凋亡

当荧光素酶与抑制多肽以融合蛋白形式在哺乳动物细胞中表达,产生的融合蛋白无荧光素酶活性,细胞不能发光,而当细胞发生凋亡时,活化的 caspase-3 在特异识别位点切割抑制蛋白,恢复荧光素酶活性,产生发光现象,由此可用于观察动物活体内的细胞凋亡相关事件<sup>[17]</sup>。

#### 4.3 蛋白质相互作用

观察细胞中或动物活体内两种蛋白质的相互作用,是将荧光素酶基因分成两段,分别连接所研究的两种蛋白之一的编码 DNA,然后导入细胞或动物体内表达为融合蛋白。当两种蛋白有强相互作用时,表达的荧光素酶两部分相互靠近,形成有活性的荧光素酶,在有底物存在时出现生物发光,反映出所研究的两种蛋白存在相互作用。应用此原理亦可用于研究细胞信号转导途径<sup>[18]</sup>。

#### 4.4 RNA 干涉

通过对比生物发光的变化,用 BLI 可以验证成年小鼠体内注射双链 siRNA 后特异地阻遏的基因表达<sup>[19-20]</sup>。

### 5 BLI 的优点和发展前景

BLI 可将基因表达、生物信号传递等复杂的过程变成直观的图像,不仅提供了无创性活体观察分子和细胞事件、可以减少在实验中使用的动物数目,而且可以提高动物的利用效率。BLI 具有双基因报告系统,有萤火虫和海肾两种荧光素酶,二者的底物不一样,前者的底物是荧光素,后者的底物是海洋肠腔荧光素(coelenterazine),而且二者的发光颜色不一样,前者所发的光波长在 540~600 nm,后者所发的光波长在 460~540 nm。由于二者应用

不同的底物,可以同时观察同一个动物的两个生物过程,增加了 BLI 的应用性。BLI 技术作为一种在体探测方法,其优势在于可快速、远距离、无创性获得人体分子的三维图像。它可以揭示病变的早期分子生物学特征,从而为疾病的早期诊断和治疗提供可能性。

相对于其他非侵入性观察手段,如小动物 PET 等,BLI 技术以其极高的检测敏感性及低廉的实验费用,可以在极短的时间内应用尽可能少的动物而精确得到预期的实验结果,为研究者提供了广阔的应用空间,不仅用于基础科学研究领域,也将作为新技术用于临床实践。

### 参 考 文 献

- [1] Zhang WS, Purchio A, Chen K, et al. In vivo activation of the human CYP3A4 promoter in mouse liver and regulation by pregnane X receptors. *Biochem Pharmacol*, 2003, 65(11): 1889-1896.
- [2] Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, et al. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to streptococcus pneumoniae meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis*, 2002, 186(6): 798-806.
- [3] Lyer M, Berenji M, Templeton NS, et al. Noninvasive imaging of cationic lipid-mediated delivery of optical and PET reporter genes in living mice. *Mol Ther*, 2002, 6(4): 555-562.
- [4] Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, et al. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia*, 2000, 2(6): 491-495.
- [5] Wu JC, Sundaresan G, Lyer M, et al. Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Mol Ther*, 2001, 4(4): 297-306.
- [6] Wetterwald A, Van der Pluijm G, Que I, et al. Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease. *Am J Pathol*, 2002, 160(3): 1143-1153.
- [7] Sweeney TJ, Mail nder V, Tucker AA, et al. Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(21): 12044-12049.
- [8] Hollingshead MG, Bonomi CA, Borgel SD, et al. A potential role for imaging technology in anticancer efficacy evaluations. *Eur J Cancer*, 2004, 40(6): 890-898.
- [9] Vooijs M, Jonkers J, Lyons S, et al. Noninvasive imaging of spontaneous retinoblastoma pathway-dependent tumors in mice. *Cancer Res*, 2002, 62(6): 1862-1867.
- [10] Shah K, Tung CH, Breakefield XO, et al. In vivo imaging of S-TRAIL-mediated tumor regression and apoptosis. *Mol Ther*, 2005, 11(6): 926-931.
- [11] Shah K, Tang Y, Breakefield X, et al. Real-time imaging of TRAIL-

- induced apoptosis of glioma tumors in vivo. *Oncogene*, 2003, 22(44): 6865-6872.
- [12] Dickson PV, Hamner JB, Burger RA, et al. Intravascular administration of tumor tropic neural progenitor cells permits targeted delivery of interferon-beta and restricts tumor growth in a murine model of disseminated neuroblastoma. *J Pediatr Surg*, 2007, 42(1): 48-53.
- [13] Tang Y, ShaháK, Messerli SM, et al. In vivo tracking of neural progenitor cell migration to glioblastomas. *Hum Gene Ther*, 2003, 14(13): 1247-1254.
- [14] Cao F, Lin S, Xie X, et al. In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation*, 2006, 113(7): 1005-1014.
- [15] Baumjohann D, Lutz MB. Non-invasive imaging of dendritic cell migration in vivo. *Immunobiology*, 2006, 211(6-8): 587-597.
- [16] Beilhack A, Schulz S, Baker J, et al. In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood*, 2005, 106(3): 1113-1122.
- [17] Laxman B, Hall DE, Bhojani MS, et al. Noninvasive real-time imaging of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (26): 16551-16555.
- [18] Paulmurugan R, Umezawa Y, Gambhir SS. Noninvasive imaging of protein-protein interactions in living subjects by using reporter protein complementation and reconstitution strategies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(24): 15608-15613.
- [19] McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, et al. RNA interference in adult mice. *Nature*, 2002, 418(6893): 38-39.
- [20] Huang M, Chan DA, Jia F, et al. Short hairpin RNA interference therapy for ischemic heart disease. *Circulation*, 2008, 118(14 suppl): S226-S233.

(收稿日期: 2009-04-22)

## 生物学系统内检测自由基方法的研究进展及其意义

池翠萍

【摘要】活性氧等自由基与神经变性疾病、糖尿病、辐射损伤等多种病理过程的发展相关。检测自由基技术在辐射防护和辐射生物效应方面具有重要的实际意义。该文综述了建立在电子自旋共振(ESR)基础上的各种自由基检测技术,同时介绍了新近建立的利用免疫电子自旋捕捉技术检测DNA和蛋白质大分子自由基的方法。

【关键词】自由基;活性氧;辐射损伤;电子自旋共振谱学

### Progress in measurement of free radicals in biological systems

CHI Cui-ping

(Department of Radiation Medicine and Environmental Medicine, China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China)

【Abstract】Free radicals generation and oxidative stress are involved in many pathological processes including neuro-degenerated diseases, diabetes, tumorigenesis and radiation damage. Measurement of free radicals is of importance in the field of radiation protection and radiation damage. The electron spinning resonance(ESR) techniques for measurement of free radicals in biological systems are summarized according to the literature and the author's research work in this review. The recent emerging immuno-spin trapping method for analysis of protein radicals and DNA radicals is also introduced.

【Key words】Free radicals; Reactive oxygen species; Radiation damage; Electron spin resonance spectroscopy

### 1 检测自由基的意义

自由基生物学研究已经渗透到与生命科学相关

的多种领域,目前与自由基研究相关的一些主要领域包括以下几个方面:

(1)与疾病的发病机制和预后有关<sup>[1-3]</sup>。研究表明,神经变性疾病如帕金森病、老年性痴呆、肌萎缩侧索硬化症等的发病原因与长期过量的自由基对神经组织的作用,使得大脑中枢系统相应功能部