

小动物活体成像技术

1、背景和原理

1999年,美国哈佛大学 Weissleder 等人提出了分子影像学(molecular imaging)的概念——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。

传统成像大多依赖于肉眼可见的身体、生理和代谢过程在疾病状态下的变化,而不是了解疾病的特异性分子事件。分子成像则是利用特异性分子探针追踪靶目标并成像。这种从非特异性成像到特异性成像的变化,为疾病生物学、疾病早期检测、定性、评估和治疗带来了重大的影响。

分子成像技术使活体动物体内成像成为可能,它的出现,归功于分子生物学和细胞生物学的发展、转基因动物模型的使用、新的成像药物的运用、高特异性的探针、小动物成像设备的发展等诸多因素。目前,分子成像技术可用于研究观测特异性细胞、基因和分子的表达或互作过程,同时检测多种分子事件,追踪靶细胞,药物和基因治疗最优化,从分子和细胞水平对药物疗效进行成像,从分子病理水平评估疾病发展过程,对同一个动物或病人进行时间、环境、发展和治疗影响跟踪。

2、分子成像的优点

分子成像和传统的体外成像或细胞培养相比有着显著优点。首先,分子成像能够反映细胞或基因表达的空间和时间分布,从而了解活体动物体内的相关生物学过程、特异性基因功能和相互作用。第二,由于可以对同一个研究个体进行长时间反复跟踪成像,既可以提高数据的可比性,避免个体差异对试验结果的可影响,又不需要杀死模式动物,节省了大笔科研费用。第三,尤其在药物开发方面,分子成像更是具有划时代的意义。根据目前的统计结果,由于进入临床研究的药物中大部分因为安全问题而终止,导致了在临床研究中大量的资金浪费,而分子成像技术的问世,为解决这一难题提供了广阔的空间,将使药物在临床前研究中通过利用分子成像的方法,获得更详细的分子或基因述水平的数据,这是用传统的方法无法了解的领域,所以分子成像将对新药研究的模式带来革命性变革。其次,在转基因动物、动物基因打靶或制药研究过程中,分子成像能对动物的性状进行跟踪检测,对表型进行直接观测和(定量)分析;

3、分类

分子成像技术主要分为光学成像、核素成像、磁共振成像和超声成像、CT 成像五大类。

(1) 光学成像

活体动物体内光学成像(Optical in vivo Imaging)主要采用生物发光(bioluminescence)与荧光(fluorescence)两种技术。生物发光是用荧光素

酶(Luciferase)基因标记细胞或 DNA，而荧光技术则采用荧光报告基因（GFP、RFP, Cyt 及 dyes 等）进行标记。利用一套非常灵敏的光学检测仪器，让研究人员能够直接监控活体生物体内的细胞活动和基因行为。通过这个系统，可以观测活体动物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。传统的动物实验方法需要在不同的时间点宰杀实验动物以获得数据，得到多个时间点的实验结果。相比之下，可见光体内成像通过对同一组实验对象在不同时间点进行记录，跟踪同一观察目标（标记细胞及基因）的移动及变化，所得的数据更加真实可信。另外，这一技术对肿瘤微小转移灶的检测灵敏度极高，不涉及放射性物质和方法，非常安全。因其操作极其简单、所得结果直观、灵敏度高等特点，在刚刚发展起来的几年时间内，已广泛应用于生命科学、医学研究及药物开发等方面。

乳动物生物发光，是将 **Fluc** 基因整合到细胞染色体 DNA 上以表达荧光素酶，当外源（腹腔或静脉注射）给予其底物荧光素(luciferin)，即可在几分钟内产生发光现象。这种酶在 **ATP** 及氧气的存在条件下，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线性相关。对于细菌，**lux** 操纵子由编码荧光素酶的基因和编码荧光素酶底物合成酶的基因组成，带有这种操纵子的细菌会持续发光，不需要外源性底物。

基因、细胞和活体动物都可被荧光素酶基因标记。标记细胞的方法基本上是通过分子生物学克隆技术，将荧光素酶的基因插到预期观察的细胞的染色体，通过单克隆细胞技术的筛选，培养出能稳定表达荧光素酶的细胞株。目前，常用的细胞株基本上都已标记好，市场上已有销售。将标记好的细胞注入小鼠体内后，观测前需要注射荧光素酶的底物—荧光素，为约 **280** 道尔顿的小分子。荧光素脂溶性非常好，很容易透过血脑屏障。注射一次荧光素能保持小鼠体内荧光素酶标记的细胞发光 **30-45** 分钟。每次荧光素酶催化反应只产生一个光子，这是肉眼无法观察到的，应用一个高度灵敏的制冷 **CCD** 相机及特别设计的成像暗箱和成像软件，可观测并记录到这些光子。

光在哺乳动物组织内传播时会被散射和吸收，光子遇到细胞膜和细胞质时会发生折射现象，而且不同类型的细胞和组织吸收光子的特性并不一样。在偏红光区域，大量的光可以穿过组织和皮肤而被检测到。利用灵敏的活体成像系统最少可以看到皮下的 **500** 个细胞，当然，由于发光源在老鼠体内深度的不同可看到的最少细胞数是不同的。在相同的深度情况下，检测到的发光强度和细胞的数量具有非常好的线性关系。可见光体内成像技术的基本原理在于光可以穿透实验动物的组织并且可由仪器量化检测到的光强度，同时反映出细胞的数量。

荧光发光是通过激发光激发荧光基团到达高能量状态，而后产生发射光。常用的有绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白 **DsRed** 及其它荧光报告基因，标记方法与体外荧光成像相似。荧光成像具有费用低廉和操作简单等优点。同生物发光在动物体内的穿透性相似，红光的穿透性在体内比蓝绿光的穿透性要好得多，近红外荧光为观测生理指标的最佳选择。

虽然荧光信号远远强于生物发光，但非特异性荧光产生的背景噪音使其信噪比远远低于生物发光。虽然许多公司采用不同的技术分离背景光，但是受到荧光特性

的限制，很难完全消除背景噪音。这些背景噪音造成荧光成像的灵敏度较低。目前大部分高水平的文章还是应用生物发光的方法来研究活体动物体内成像。但是，荧光成像有其方便，便宜，直观，标记靶点多样和易于被大多数研究人员接受的优点，在一些植物分子生物学研究和观察小分子体内代谢方面也得到应用。对于不同的研究，可根据两者的特点以及实验要求，选择合适的方法。最近许多文献报道的实验中，利用绿色荧光蛋白和荧光素酶对细胞或动物进行双重标记，用成熟的荧光成像技术进行体外检测，进行分子生物学和细胞生物学研究；然后利用生物发光技术进行动物体内检测，进行活体动物体内研究。

(2) 核素成像

核素成像技术用于发现易于为核素标记的既定靶目标底物的存在，或用于追踪少量标记基因药物和进行许多药物抵抗或病毒载体的传送。包括微 PET、微 SPECT。

微 PET（正电子发射断层扫描仪 Positron Emission Tomography）在目前的分子影像学研究中占据着极其重要的地位。最先开始的分子影像学研究就是用 PET 完成的，如今，用微 PET 进行的单纯疱疹病毒胸苷激酶的分子影像学技术已应用于临床试验中。微 PET 技术是将正电子同位素标记的化合物注入生物体内作为探针，当这些化合物参与生物体内的代谢过程时，PET 按照同位素放射性分布的绝对量进行连续性扫描，根据动力学原理和图像数据，对活体组织中的生理生化代谢过程作出定量分析，如血流量、能量代谢、蛋白质合成、脂肪酸代谢、神经递质合成速度、受体密度及其与配体结合的选择性和动力学等。PET 通常使用的探针是用 ^{11}C ， ^{14}N ， ^{15}O 及 ^{18}F 等生物组织中含最多元素的放射性核素标记的化合物，它们具有与体内分子类似（包括细胞代谢）的特点。

在药理学研究中，则可以用正电子同位素直接标记药物，观察其在活体中的分布和代谢，或测量生理性刺激及病理学过程中药物分布与代谢的变化，从而对药物剂量、作用部位、可能发生的毒副作用等做出前瞻性判断。还可以判断其代谢反应的类型及产物，观察药物与其他药物的相互作用、药物与营养物质的相互作用、药物与受体的作用、药物与酶的相互作用等。

(3) 磁共振成像

磁共振（MRI）分子影像学的优势在于它的高分辨率（已达到 μm 级），同时可获得解剖及生理信息。这些正是核医学、光学成像的弱点。但是 MRI 分子影像学也有其弱点，它的敏感性较低（微克分子水平），与核医学成像技术的纳克分子水平相比，低几个数量级。传统的 MRI 是以物理、生理特性作为成像对比的依据。分子水平的 MRI 成像是建立在上述传统成像技术基础上，以特殊分子作为成像依据，其根本宗旨是将非特异性物理成像转为特异性分子成像，因而其评价疾病的指标更完善，更具特异性。MRI 分子影像学成像，可在活体完整的微循环下研究病理机制，在基因治疗后表型改变前，评价基因治疗的早期效能，并可提供三维信息，较传统的组织学检查更立体、快速。概括起来，MRI 在分子影像学的应用主要包括基因表达与基因治疗成像、分子水平定量评价肿瘤血管生成、显微成像、活体细胞及分子水平评价功能性改变等方面。

(4) 超声成像

超声分子影像学是近几年超声医学在分子影像学方面的研究热点。它是利用超声微泡造影剂介导来发现疾病早期在细胞和分子水平的变化，有利于人们更早、更准确地诊断疾病。通过此种方式也可以在患病早期进行基因治疗、药物治疗等，以期在根本上治愈疾病。

(5) CT 成像

CT 成像是利用组织的密度不同造成对 X 射线透过率的不同而对人体成像的临床检测技术。近来，由于具有更高的分辨率与灵敏度的微 CT 的出现，使这项传统的技术也进入分子成像领域。主要是应用在肿瘤学，骨科方面的研究