

体内可见光成像技术用于干细胞研究

王俊¹, 张怡², 赵春林¹

¹龙脉得生物技术有限公司,²中国协和医学院,
北京清华大学, 学研大厦 A304. 邮编:100084

导言

干细胞在肿瘤治疗、组织工程和细胞治疗等方面拥有巨大的潜力。如果在活体动物体内, 在各种组织和器官都保持完整的情况下能够观察干细胞的行为和生物学特性, 则会大力促进基于干细胞的各种疾病治疗方法的研究工作。目前已对多种干细胞进行了大量的研究, 动物模型研究方法也很多, 但典型的方法还是在移植后的几星期或几个月, 通过解剖实验动物以了解干细胞的功能。但采用这种研究方式, 就无法得到移植后一些关键性的实验数据, 例如, 移植后的前几个小时到几天时间造血干细胞在脾和骨髓的定位和增值情况; 移植后造血干细胞在动物体内的迁移情况等。体内可见光成像技术, 主要是生物发光成像 (*in vivo* bioluminescence Imaging, BLI) 技术作为一种新型成像技术, 在最近几年已被广泛应用于在多种动物模型中示踪肿瘤细胞、造血干细胞, 淋巴细胞, 病原菌和病毒。本节简要介绍体内可见光成像技术成像原理, 成像系统使用方法和在干细胞研究方面的应用。

一, 体内可见光成像技术成像原理

体内可见光成像技术是采用荧光素酶 (luciferase) 基因 (*Luc*) 标记细胞和基因, 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。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, 体内可见光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, 所得的数据也更加真实可信。另外, 这一技术由于不涉及放射性物质, 具有操作简单, 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。

1. 细胞标记

1995年, Contag 首次在小动物体内检测到带有 *lux* 操纵子的病原菌发出的可见光。他是通过 CCD 相机捕捉到这个被感染动物的生物发光现象的。在 1997 年, 他又首次观察到表达荧光素酶的转基因小鼠在注入荧光素酶底物后的生物发光现象[1]。自此, 细菌及萤火虫荧光素酶被广泛应用于小动物体内可见光成像技术。

哺乳动物生物发光, 是将 *Luc* 基因整合到细胞染色体 DNA 上以表达荧光素酶, 当来源 (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, 氧存在的条件下, 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, 并且发光光强度与标记细胞的数目线性相关。对于细菌, *lux* 操纵

<http://www.longmed.com>

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（见图1）。

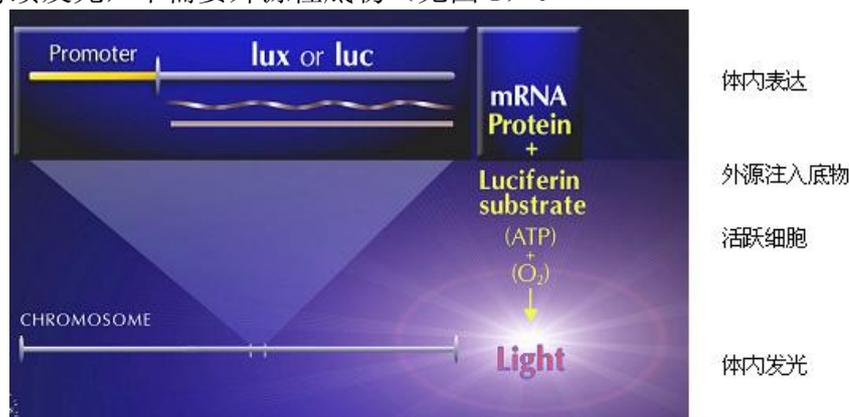


图1 可见光成像原理。将荧光素酶基因连接于启动子下游，稳定整合到细胞染色体体内，使荧光素酶得到持续表达。在体内，荧光素酶在ATP、氧气存在的条件下，与外源注入的特异底物反应产生发光现象。因此仅在活细胞内才会出现荧光，且发光强度与标记细胞数目线性相关。

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体内，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，常用的肿瘤细胞株基本上都已标记好，市场上已有销售。而对于非永生系细胞，如干细胞和淋巴细胞，可采用病毒转染或者利用转基因动物方式获得标记细胞。将标记好的细胞接种到实验动物体内后，观测前需要注射荧光素酶的底物—荧光素。荧光素是280道尔顿的小分子，其脂溶性非常好，能很容易地透过血脑屏障。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，精诺真公司（Xenogen Corp.）生产的IVIS成像系统，应用一个高度灵敏的制冷CCD（Charge Coupled Device）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（见图2）。

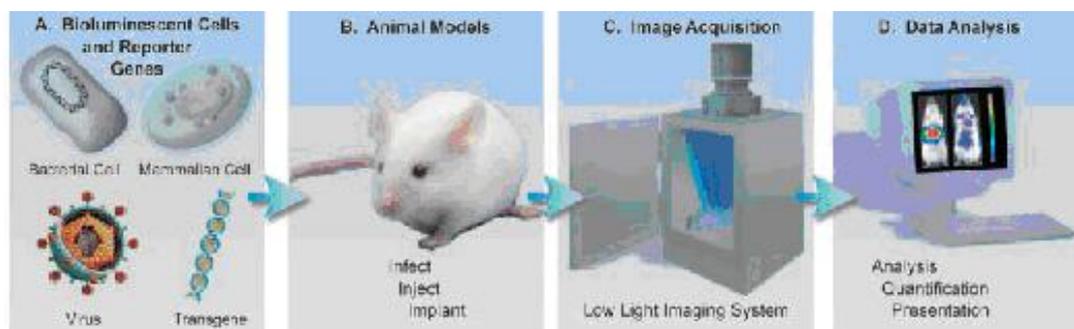


图2 体内可见光成像系统组成。A. 细胞、病原体及病毒均可被荧光素酶标记。B. 小鼠携带标记的细胞及基因。C. 在暗箱中由CCD相机记录生物发光。D. 由成像软件定量、分析所得数据。

2. 不同波长可见光穿透动物组织能力不同

<http://www.longmed.com>

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。血红蛋白（hemoglobin）是造成体内可见光被吸收的主要因素，其吸收可见光中蓝绿光波段的大部分。但是在可见光大于600纳米的红光波段，血红蛋白的吸收作用却很小。因此，在偏红光区域，大量的光可以穿过组织和皮肤而被检测到，如图3所示。利用精诺真公司的IVIS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，在不同情况下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。体内可见光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。

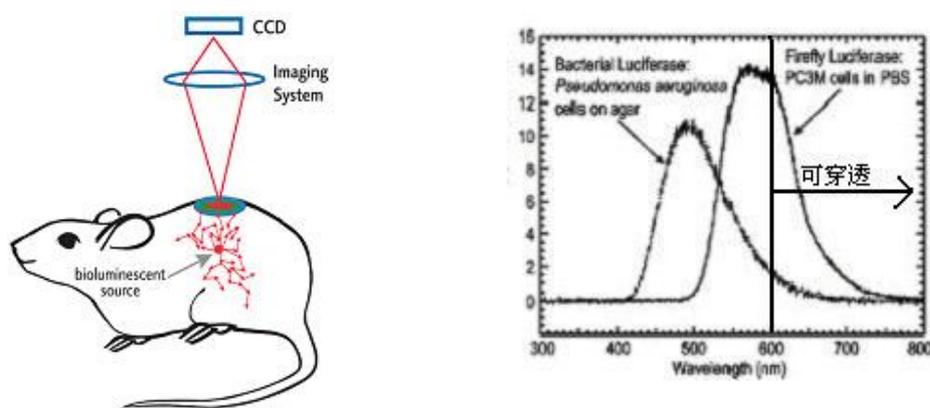


图3 在波长大于 600nm 时，由老鼠体内发出的光是可以穿透皮肤被检测到。

3. 技术特性

相比较于目前的活体生物成像技术，如超声（Ultrasound）、计算机断层摄影（Computed Tomography, CT）、核磁共振（Magnetic Resonance Imaging, MRI）、正电子衍射成像（Positron-Emission Tomography, PET）、单光子衍射(Single-Photon-Emission Computed Tomography, SPECT)等技术，体内可见光成像技术(Optical Imaging)包括生物发光（Bioluminescence）与荧光（Fluorescence）具有许多独特的优点：操作简便，测量快速（短于 5 分钟），同时可检测多个动物，费用低廉等。

1) 与荧光成像技术的比较[2]

荧光发光需要激发光使得荧光团达到较高的能量水平，然后发射出较长波长的发射光。两种常见的荧光蛋白：绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）和红色荧光蛋白（Discosoma red fluorescent protein, DsRed）的发射光局限于可见光 400-650nm 范围。生物体内很多物质在受到激发光激发后，也会发出荧光，产生的非特异性荧光会影响到检测灵敏度。特别是当发光细胞深藏于组织内部，则需要较高能量的激发光源，也就会产生很强的背景噪音。

<http://www.longmed.com>

生物发光成像相对于荧光成像，其灵敏度高。作为体内报告源，生物发光较之荧光的优点之一为不需要激发光的激发，它是以酶和底物的特异作用而发光，且动物体自身不会发光，这样生物发光就具有极低的背景。虽然荧光信号强度远远超过生物发光，但极低的自发光水平使得生物发光的信噪比远高于荧光。另外，生物发光信号可以方便计量，即使标记细胞在动物体内有复杂的定位，亦可从动物体表的信号水平直接得出发光细胞的数量

(图4)。而对于荧光，信号水平取决于发光细胞的数量及激发光的强度，而光线穿过的组织对其有强烈的吸收，这使得荧光强度很难计量。荧光素酶在表达后快速合成并具有较短的寿命(荧光素酶在体内的半衰期为3小时)，作为报告基因可实时反应细胞数量或启动子起始转录过程效率的变化。可根据两者所具有的特点以及实验要求如组织的光学条件(报告源的深度、体积及组织吸光度等)，选择所适合的发光探针。

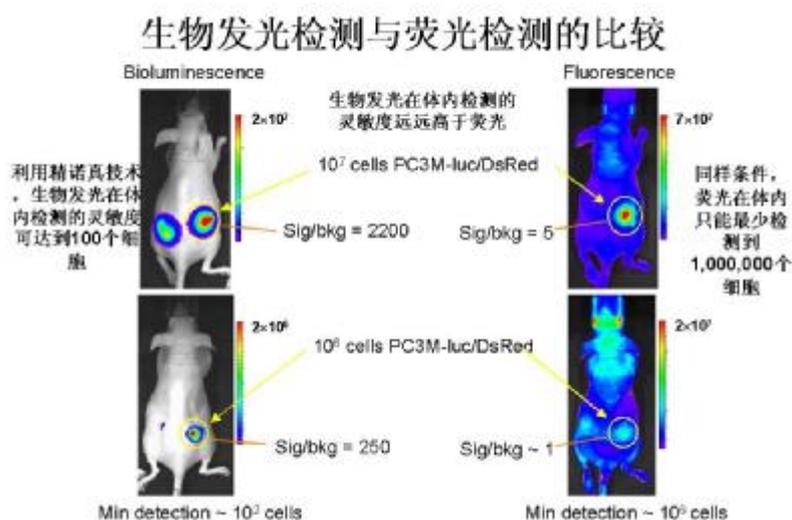


图4 生物发光检测和荧光检测的比较

2) 功能成像与结构成像

MRI/CT 系统通常仅提供结构信息，无法区分细胞的不同生理状态(如细胞是存活还是死亡)，而体内可见光成像不仅可以定位信号，更可得出有代谢活性细胞的数量。对于不能应用MRI/CT检测的软组织及细菌被检物，采用可见光成像技术均可灵敏检测。而且，将组织特异性基因启动子连接于生物发光或荧光报告基因，可以检测该基因的表达及功能，开启了以发光转基因动物为模型的新研究领域。

二. 仪器结构及参数

以精诺真公司的 IVIS 100 系统（图 5）为例, 体内可见光成像系统主要由三部分组成:

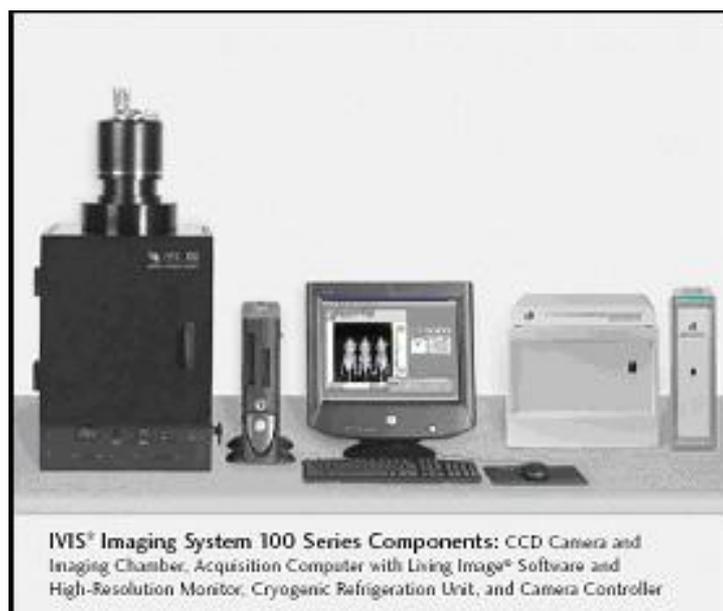


图 5 IVIS 100 成像系统包括: CCD 数码相机及成像暗仓, 配备活体成像软件及高清晰度监视器的计算机, 低温制冷系统, 以及相机控制器。

1) CCD 镜头

选择适当的 CCD 镜头, 对于体内可见光成像是非常重要的。选用的 CCD 镜头对于波长大于 600nm 的光必须具有非常高的灵敏度和量子效率, 而且由于需要探测的光源在皮下几厘米处, 其噪声信号要尽可能的小。应用于体内可见光检测的主要是电子记数加强型 CCD 镜头, 它可以在噪音很低的情况下精确记数到单个光子。但大部分此类型 CCD 的量子效率在 450nm 时仅有 10%-15%, 在 650nm 时迅速减小到低于 1%。例如 Hamamatsu 公司的 C2400-30 系列。有些 CCD 例如 iMultialkali 的 S20 在大于 600nm 时虽然有更高的量子效率但其噪音很大并且其需要的冷却温度很低, 实际上难以实现。怎样减少电子记数型 CCD 的噪音和获得更高的量子效率是仪器研发者特别关注的技术难点, 解决这个问题需要开发出新型的光圈和滤光镜。

更为合适的 CCD 是制冷型的背照射 CCD。暗电流是 CCD 的噪音, 在冷却到 -105℃ 的条件下, 暗电流降低到一个可以忽略不计的程度。以前的技术要达到 -105℃ 的低温需要液氮冷却, 现在有更好的低温设备可以方便的达到此温度。制冷型背照射 CCD 的信噪比可以达到成像技术要求, 例如信噪比为 10 时, 读数噪音和暗电流达到可以忽略不计的程度, 并且量子效率也有非常好的表现。

2) 成像暗箱

由精诺真公司研制的体内可见光成像系统 (IVIS) 如图 6 所示。

<http://www.longmed.com>



图6 成像暗箱结构

成像暗箱屏蔽宇宙射线及一切光源，可以使暗箱内部保持完全黑暗，CCD所检测的光线完全由被检动物体内发出，避免外界环境的光污染。CCD镜头位于暗箱的顶部，光线通过光圈后被CCD收集。镜头下部是滤光镜安装环，可以根据应用需要安装不同的滤光镜，扩展其光学成像能力。暗箱里的平台是由软件控制升降，通过升降可以获得不同的10厘米到25厘米视野（Field of View, FOV），并且带有加热装置，可以保持观察试验动物的体温。

3) 软件系统

软件系统负责仪器控制和图像分析。软件控制镜头的焦距，曝光时间，滤光镜的更换，照明灯的开启，平台的升降，具有非常友好的用户界面，操作简便。如图7所示。

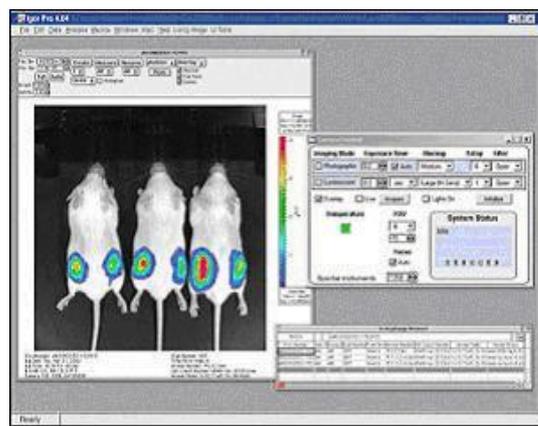


图7 软件操作界面

4) 其它可选装置:

<http://www.longmed.com>

I) 荧光附件:

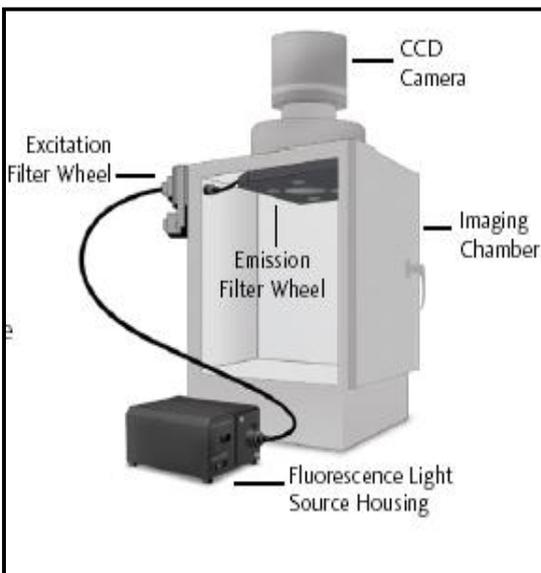


图8 精诺真XFO荧光附件连接于IVIS系统成像暗仓, 扩展了IVIS成像系统的功能, 在生物发光成像之外, 亦可用于荧光成像。

精诺真荧光附件(图8)可连接于精诺

真公司IVIS100或IVIS50成像系统, 使系统在用于生物发光成像之外, 还可用于体内荧光成像。精诺真XFO荧光附件拥有一个12位置激发光滤镜轮和一个6位置发射光滤镜轮。激发光滤镜轮用于选择合适激发波长照射于观察样本上, 发射光滤镜轮用于选择从样品发射出的较长波长的荧光波段。各种滤镜的选择由诺真活体成像软件控制(图9)。采用这套滤镜系统可有效地消除非特异性荧光的干扰。荧光附件采用150瓦石英卤素灯作为光源, 激发光通过光学纤维传递到激发光滤镜后到达光分配盘, 光分配盘可将激发光均匀的分布到整个成像暗仓。整套系统采用极低自发荧光材料, 尽量避免对实验动物荧光成像的干扰。

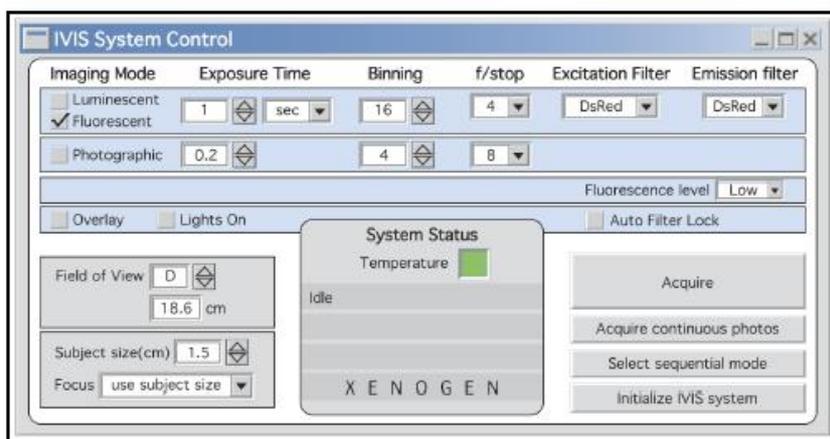


图9 可见光成像软件控制相机与成像参数。成像软件为用户提供荧光和生物发光成像之间相互转换的便捷操作模式。

II) 麻醉系统:

<http://www.longmed.com>

为了对实验动物进行可见光成像，需要将实验动物进行麻醉，以获得期望的观察角度及稳定的数据。精诺真公司的小动物 XGI-气体麻醉系统与 IVIS 成像系统配套使用（见图 10），为 IVIS 成像系统输送麻醉气体，并保证在成像过程中有尽可能少的麻醉气体渗漏。在成像前，将大鼠或小鼠置入系统成像暗仓并被麻醉，然后放入成像暗仓进行观察。输入成像暗仓的麻醉气体可分成五通道或二通道进行操作。

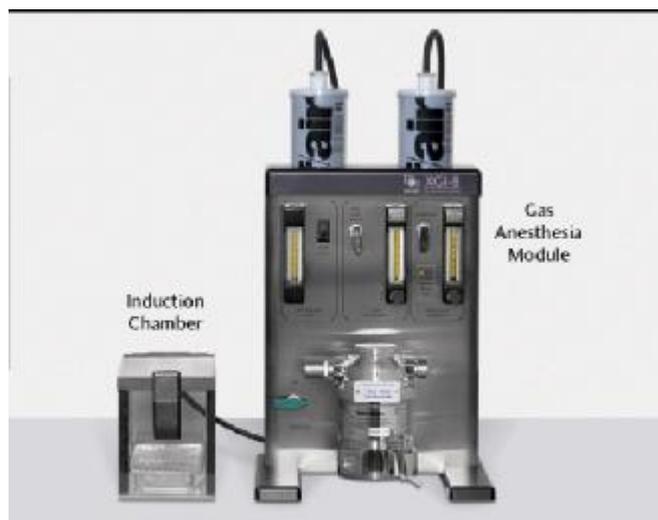


图 10 精诺真小动物 XGI-8 气体麻醉系统是 IVIS 成像系统的有机组成部分

系统组成包括：气体麻醉模块、异氟烷吸收过滤器、麻醉仓、小鼠或大鼠 5 通道麻醉多支管及大鼠 2 通道麻醉多支管。

气体麻醉模块能够在高效地输送气体异氟烷（isoflurane）到麻醉仓或麻醉多支管。该装置可同时安全地麻醉 5 只成年小鼠或 2 只大鼠。该装置亦包括废气清除途径以防止气体进入周围工作环境。开启麻醉仓盖的同时系统会自动打开真空系统以使废气远离研究人员并进入免洗的异氟烷收过滤器，将废气排出系统及房间。该装置允许研究者独立控制并监测异氟烷在麻醉仓的作用，以及控制成像暗仓中动物的生理状态，并使得全程的麻醉气体剂量保持在最适值。



图 11 小鼠或大鼠 5 通道麻醉多支管包括光栅及透明的鼻部圆锥吸入器。大鼠也可应用 2 通道麻醉多支管装置。

<http://www.longmed.com>

麻醉仓：可同时麻醉 5 只成年小鼠或 2 只大鼠，仓盖开启时，渗漏气体通风装置自动开启，麻醉过程中提升仓内地板保持动物清洁。

5 通道及 2 通道麻醉多支管装置（图 11）：在 IVIS 成像暗仓中使用；5 通道形式输送气体至 5 只成年小鼠或 2 只大鼠，2 通道只适用于 2 只大鼠；采用不光滑黑色、不发光结构保证成像数据不受多支管影响；透明鼻式圆锥状吸入装置确保动物合适的位置并保证在成像过程中麻醉气体的输送；光栅可保证每只动物的光信号数据完整。

三、体内可见光成像技术在干细胞研究方面应用

采用体内可见光成像系统，可以观测到实验动物体内肿瘤的发展进程以及药物治疗所产生的反应[3]，示踪干细胞和淋巴细胞[4-7]，并广泛用于细菌和病毒学研究[8,9]、利用转基因动物进行基因表达研究[10,11]、siRNA 研究[12]、细胞凋亡研究[13]、蛋白质相互作用研究[14]等领域。以下简单介绍其在干细胞研究方面的应用：

1. 人造血干细胞重建小鼠造血系统[4]

研究造血干细胞移植的试验性骨髓模型的标准方法为在受体动物死后检测骨髓中供体细胞数量。采用这种方法，每一只实验动物只能提供一个时间点的数据。体内可见光成像技术可用来长期和动态地显示人造血干细胞的异种移植情况。利用表达荧光素酶的慢病毒载体（lentiviral vector），可明显地区分人 CD34+ 和 CD34+ CD38- 细胞群在受体 NOD/SCID 小鼠骨髓中的增殖能力。成像数据显示，CD34+ 细胞在植入后的早期（13 天）出现一个峰值，随后信号很快减弱。而对于更原始的 CD34+ CD38- 细胞，植入后出现较长时间的潜伏期，但在 36 天时，供体细胞的数量已大大超过相应地植入 CD34+ 细胞群的情况。

（图 12）

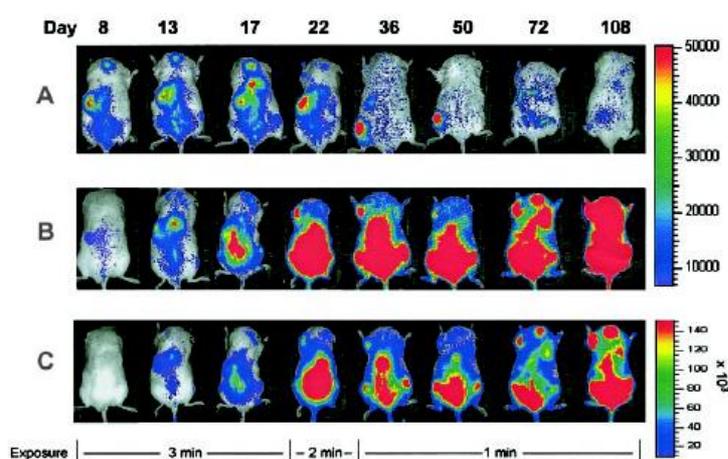


图 12 荧光素酶标记的不同分化程度的人 HSC 植入受体小鼠后，植入细胞群随时间变化情况。A，植入 CD34+；B，植入 CD34+CD38-；C，与 B 为同一只小鼠，通过成像软件改变标尺以便更加清晰地分辨发光部位。

2) 小鼠造血干细胞重建同源受体小鼠造血系统[5]

从表达荧光素酶的转基因小鼠分离出的造血干细胞可用于小鼠同种移植研究。Cao 等利用分离出的表达荧光素酶的造血干细胞来研究植入经辐射处理受体鼠的早期事件和增殖动力学。在移植后的早期，造血干细胞产生离散的聚集点，分别分布在脾和骨髓部位。早期可检测到的聚集点随后会扩大，形成新的聚集点或以不同的速度消失。这些研究结果揭示了高度纯化的 HSC 动态的和不

同的增殖模式，并证明单个的 HSC 对重建造血系统的最终贡献程度与早期的定位和增殖无关（图 13）。

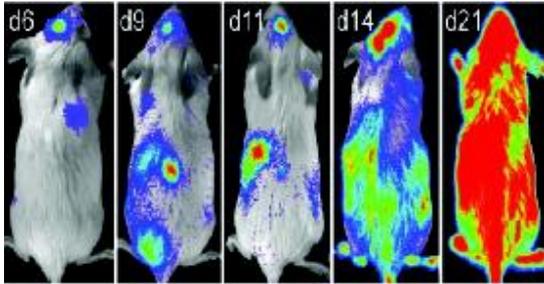
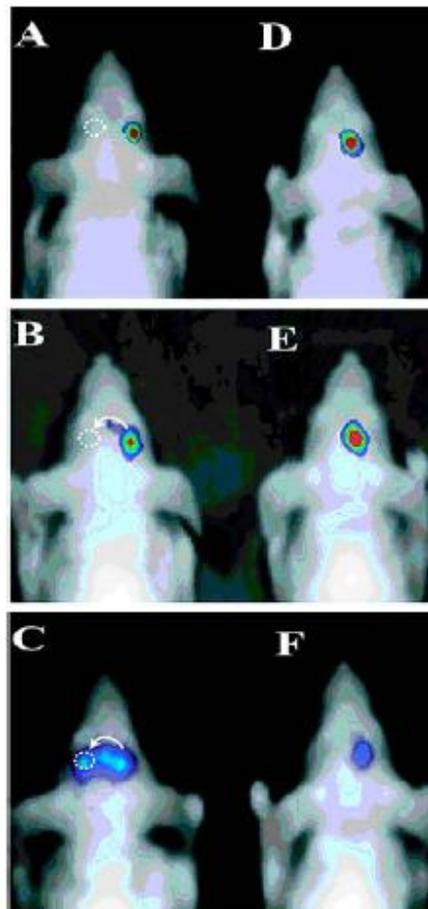


图13 一只受体小鼠植入250个荧光素酶标记的造血干细胞后供体细胞群随时间变化的情况。第6天时，出现两个发光点，第9天，出现了新的发光点，随后这些新出现的发光点的发光强度减弱或消失（11天），而在脾部的信号强度稳定增加，到21天时整只受体小鼠体内分布有大量的供体细胞。

3) 神经祖细胞用于胶质瘤的治疗[6]

能够非侵入性的跟踪神经祖细胞（neural progenitor cell, NPC）的迁移，植入和增殖具有重要的临床和研究价值。Tang等利用体内可见光成像技术研究了NPC植入受体裸鼠后向受体鼠脑部胶质瘤部位移动的情况。用荧光素酶基因稳定转染C17.2 NPC后，注射到胶质瘤的对侧脑实质，采用体内可见光成像技术，可观察到NPC跨过胼胝体移动到肿瘤部位（图14）。

图 14 标记荧光素酶基因的 NPC 细胞植入到长有 Gli36 胶质瘤（用点状圈表示）小鼠（A-C）或对照小鼠（D-E）的右侧脑半球。A, D 显示植入部位，B, E 和 C, F 分别为第一周和第二周时的情况。



详细信息, 请参考 www.longmed.com

参考文献:

1. Contag P *et al.* Bioluminescent indicators in living mammals. *Nature Medicine* 1998, 4(2): 245-247.

<http://www.longmed.com>

2. Troy T *et al.* Quantitative Comparison of the Sensitivity of Detection of Fluorescent and Bioluminescent Reporters in Animal Models. *Molecular Imaging* 2004, 3(1): 9-23.
3. Jenkins DE *et al.* Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. *Clinical & experimental Metastasis*, 2003, 20: 733-744.
4. Wang XL *et al.* Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using in vivo bioluminescence imaging. *Blood*. 2003, 102(10):3478-82.
5. Cao YA *et al.* Shifting foci of hematopoiesis during reconstitution from single stem cells. *PNAS*, 2004, 101(1): 221-226.
6. Tang Y *et al.* In vivo tracking of neural progenitor cell migration to glioblastomas. *Human Gene Therapy*. 2003, 14(13):1247-1254.
7. Edinger M *et al.* Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging. *Blood*. 2003, 101(2):640-648.
8. Hardy J *et al.* Extracellular replication of *Listeria monocytogenes* in the murine gall bladder. *Science*. 2004, 303(5659):851-853.
9. Luker GD *et al.* Bioluminescence Imaging Reveals Systemic Dissemination of Herpes Simplex Virus Type 1 in the Absence of Interferon Receptors. *Journal of virology*, 2003, 77(20): 11082-11093.
10. Zhang W *et al.* A transgenic mouse model with a luciferase reporter for studying *in vivo* transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene. *Drug metabolism and disposition*, 2003, 31(8): 1054-1064.
11. Zhang N *et al.* An Inducible Nitric Oxide Synthase-Luciferase Reporter System for In Vivo Testing of Anti-inflammatory Compounds in Transgenic Mice. *The Journal of Immunology*, 2003, 170: 6307-6319.
12. McCaffrey AP *et al.* RNA interference in adult mice. *Nature*, 2002, 408: 38-39.
13. Laxman B *et al.* Noninvasive real-time imaging of apoptosis. *PNAS*, 2002, 99(26): 16551-16555.
14. Paulmurugan R *et al.* Noninvasive imaging of protein-protein interactions in living subjects by using reporter protein complementation and reconstitution strategies. *PNAS*, 2002, 99(24): 15608-15613.

2005-1-14

<http://www.longmed.com>