



# 小动物活体成像技术的应用

朱淼鑫, 姚 明

(上海市肿瘤研究所实验病理研究室, 上海 200032)

**【摘要】** 小动物活体成像技术在国内外得到越来越多的普及应用, 极大地促进了生命科学特别是肿瘤研究的发展。本文就小动物活体成像技术的原理、标记方法和实际应用做简单介绍。

**【关键词】** 荧光蛋白; 荧光素酶; 活体成像; 模型, 动物

**【中图分类号】** R-33 R332 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1671-7856(2011)03-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.03.001

## In Vivo Imaging Technology in Small Animal

ZHU Miao-xin, YAO Ming

(Department of Experimental Pathology, Shanghai Cancer Institute, Shanghai 200032, China)

**【Abstract】** Small animal in vivo imaging technology at home and abroad is more and more popular, which greatly promoted the life sciences, especially cancer research. This article describes the in vivo small animal imaging principles, methods and practical applications.

**【Key words】** Fluorescent protein; Luciferase; In vivo imaging; Model, Animal

活体动物体内光学成像主要采用生物发光与荧光两种技术。生物发光是用荧光素酶基因(Luciferase)标记细胞或DNA,而荧光技术则采用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)、红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)等荧光报告基因和FITC、Cy5、Cy7等荧光素及量子点(quantum dot, QD)进行标记。小动物活体成像技术是采用高灵敏度制冷CCD配合特制的成像暗箱和图像处理软件,使得可以直接监控活体生物体内的细胞活动和基因行为。实验者借此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。由于具有更高量子效率CCD的问世,使活体动物体内光学成像技术具有越来越高的灵敏度,对肿瘤微小转移灶的检测灵敏度极高;另外,该技术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、实验成本低等特点,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<sup>[1-3]</sup>。

### 1 小动物活体成像概述

#### 1.1 荧光发光成像

荧光成像的标记对象较为广泛,可以是动物、细胞、微生物、基因,也可以是抗体、药物、纳米材料等。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<sup>[4]</sup>。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效率高,近红外荧光为成像观察的最佳选择。

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

本文由高诚教授推荐。

研究活体动物体内成像。但是,荧光成像有其方便、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。例如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。

荧光发光是通过激发光激发荧光基因到达高能状态,而后产生发射光。考虑到不同荧光物质的发射光谱 EX (excitation spectrum) 和激发光谱 EM (emission spectrum) 的不同,要选择对应的激发和发射滤片。常用荧光蛋白和荧光染料的激发和发射波长见表 1。

表 1 常用荧光蛋白和荧光染料的激发和发射波长  
Tab. 1 Common fluorescent protein and fluorescence dyes excitation and emission wavelength

	EX (nm)	EM (nm)
GFP	480	520
dsRed/RFP	530	600
Cy5	630	680
Cy5.5	630	700
Cy7	700	780

## 1.2 生物发光成像

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-荧光素酶基因表达所产生的荧光素酶蛋白与其小分子底物荧光素在氧、 $Mg^{2+}$  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 设备形成图像。荧光素酶基因可以被插入多种基因的启动子,成为某种基因的报告基因,通过监测报告基因从而实现目标基因的监测<sup>[5]</sup>。

生物荧光实质是一种化学荧光,萤火虫荧光素酶在氧化其特有底物荧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高灵敏的 CCD 检

测到。

生物发光成像的优点可以非侵入性,实时连续动态监测体内的各种生物学过程,从而可以减少实验动物数量,及降低个体间差异的影响;由于背景噪声低,所以具有较高的敏感性;不需要外源性激发光,避免对体内正常细胞造成损伤,有利于长期观察;此外还有无放射性等其他优点。然而生物发光也有自身的不足之处:例如波长依赖性的组织穿透能力,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,而且不同类型的细胞和组织吸收光子的特性也不尽相同,其中血红蛋白是吸收光子的主要物质;由于是在体外检测体内发出的信号,因而受到体内发光源位置及深度影响;另外还需要外源性提供各种荧光素酶的底物,且底物在体内的分布与药动力学也会影响信号的产生;由于荧光素酶催化的生化反应需要氧气、镁离子及 ATP 等物质的参与,受到体内环境状态的影响。

## 2 细胞转染方法

以移植性小鼠肿瘤模型活体成像为例,一个完整的成像过程包括构建报告基因、细胞转染和筛选、建立稳定表达的细胞、再将此细胞在体内建立相应的动物模型,进而通过小动物活体成像系统检测动物体内特定部位所发出的光子信号,最后通过计算机图像处理软件获得量化数据和实验图像。也就是说,选择合适的报告基因与转染方法至关重要。

荧光蛋白表达质粒可以自己实验室构建,也可以来源于其它实验室惠赠或市售。本文采用的真核表达质粒 eGFP-2A-CBGr99 由德国癌症研究中心 Haemmerling 教授惠赠,全长 5929 bp,属氨苄青霉素抗性选择系统,带有细菌的氨苄青霉素抗性基因 Amp,在 CMV 启动子驱动下可在真核细胞中表达,产物为 GFP 与 Luciferase 双表达<sup>[6]</sup>。细胞转染方法包括 DEAE-葡聚糖法,磷酸钙法,阳离子脂质体法,阳离子聚合物法,病毒介导法,Biolistic 颗粒传递法(基因枪粒子轰击法),显微注射法,电穿孔法等,本文介绍比较常用的阳离子脂质体法和病毒介导法。

### 2.1 阳离子脂质体法

2.1.1 细胞准备:转染前 1 d 将待转染细胞铺 24 孔板,每孔大约  $1 \times 10^5$  个细胞,预计转染时细胞达 50% ~ 80% 融合。

2.1.2 脂质体/质粒复合物的制备:1  $\mu\text{g}$  质粒稀释于 100  $\mu\text{L}$  不含血清及抗菌素的 DMEM 培养液中,轻轻混匀;10  $\mu\text{L}$  的脂质体转染试剂稀释于 100  $\mu\text{L}$  DMEM 中,轻轻混匀;将 100  $\mu\text{L}$  脂质体转染试剂稀释液滴加到质粒稀释液中,一边滴加一边混匀;室温孵育 30 min;将 200  $\mu\text{L}$  脂质体/质粒复合物添加到每孔中并轻轻摇动使之混合;放置在 37 $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  孵育箱孵育 36 h 后,在荧光显微镜下观察转染效率。转染后一般隔天换液,培养液为含有 G418 的 DMEM 培养基,以筛选抗性克隆,所含 G418 浓度从 400 mg/L 开始。视情况每次换液时 G418 浓度增加(200~400) mg/L,到最高达 2000 mg/L,2~3 周后荧光显微镜下挑选最亮克隆,将细胞克隆扩增,可得 GFP 表达纯度约为 50%~60% 的细胞株,取少量细胞进一步在 6 孔板中培养,每孔约 10 个细胞,待长成克隆后再挑选单个表达 GFP 的细胞生成的克隆即可得到高纯度的 GFP 阳性细胞株。

## 2.2 慢病毒感染法

### 2.2.1 质粒制备

2.2.1.1 质粒准备:收到溶解于滤纸上的质粒 eGFP-2A-CBG<sub>r</sub>99 后,用剪刀剪下含有质粒的滤纸部分,放入一个 1.5 mL Eppendorf 管中,然后加入 50  $\mu\text{L}$  灭菌去离子水至此管中,充分溶解后,12000 r/min,离心 5 min,转移上清液至另一个 Eppendorf 管,-20 $^{\circ}\text{C}$  保存。

2.2.1.2 质粒转化:取 1.5  $\mu\text{L}$  上述质粒加入到 50  $\mu\text{L}$  Top10 感受态细菌中;放入冰中 30 min;42 $^{\circ}\text{C}$  热休克 90 s;快速的将 Eppendorf 管移到冰中,冷却 1~2 min;加入 1 mL 新鲜 LB 培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ ,摇床 < 50 r/min,振荡 45 min,主要使 Amp 基因表达;4000 r/min,离心 5 min,超净台中将 Eppendorf 管中的上清液吸去一部分,并反复吹打,使感受态细胞悬浮;将悬浮液用涂布棒均匀的涂布到含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Amp 的 1.5% 的琼脂板上。平板倒置,37 $^{\circ}\text{C}$  培养过夜(12~16 h);以无菌牙签挑取含氨苄青霉素琼脂平板上的单菌落,接种到 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$  220 r/min 振荡培养过夜;取 1 mL 过夜培养液加入 1.5 mL Eppendorf 管中,10000 r/min 离心 2 min,弃 0.3 mL 上清液,并加入 0.3 mL 甘油到此含有细菌的离心管中,混匀后放入 -70 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

2.2.1.3 质粒抽提:将含质粒 eGFP-2A-CBG<sub>r</sub>99 的甘油菌以 1:1000 接种到 5 mL 含氨苄青霉素的 LB

培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ ,220 r/min 振荡培养过夜。采用质粒小量抽提试剂盒进行小量抽提质粒,具体方法如下:取 1.5 mL 细菌培养物加入到 1.5 mL Eppendorf 管中,12000 r/min 离心 2 min;弃掉上清液后,加入 100  $\mu\text{L}$  Solution I,反复吹打至菌体充分悬浮,室温下静置 1 min;加入 200  $\mu\text{L}$  Solution II,轻轻颠倒 5 次,室温下静置 1 min;加入 350  $\mu\text{L}$  Solution III,轻轻颠倒 5 次,室温下静置 1 min;12000 r/min 离心 5 min;转移上清液至层析柱中,10000 r/min 离心 2 min;弃掉收集液,加入 500  $\mu\text{L}$  Wash Solution,10000 r/min 离心 2 min;弃掉收集液,再加入 500  $\mu\text{L}$  Wash Solution,10000 r/min 离心 2 min;弃掉收集液,10000 r/min 离心 1 min;弃掉残留的收集液,转移层析柱到另一个 1.5 mL Eppendorf 管中,加入 50  $\mu\text{L}$  Elution Buffer 至层析柱中央区域,室温孵育 2 min,10000 r/min 离心 2 min,保留收集液,分别取出一部分质粒溶液进行后续分析(包括电泳、浓度及纯度、酶切鉴定等),剩下的质粒溶液 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存。

2.2.1.4 质粒浓度测定及酶切电泳分析:取 5  $\mu\text{L}$  抽提的质粒进行 1% agarose 胶电泳,检测质粒大小,应为 5929 bp;取 2  $\mu\text{L}$  抽提的质粒加入到 78  $\mu\text{L}$  去离子水中,1:20 稀释后应用核酸定量仪测定其 A260 及 A280,以检测质粒浓度及纯度;用两种内切酶 Hind III 及 Xho I 进行双酶切鉴定,若为正确的克隆,则可被切出一个 2731 bp 及一个 3198 bp 片段。

### 2.2.2 慢病毒载体构建

2.2.2.1 pWPXL-eGFP-2A-CBG<sub>r</sub>99 质粒的构建:将质粒 eGFP-2A-CBG<sub>r</sub>99 与 pWPXL 载体质粒分别经 BamH I 和 Xba I 双酶切,37 $^{\circ}\text{C}$  酶切 3 h。1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收目的 DNA 片段和酶切后的 pWPXL 载体片段;将回收的目的 DNA 片段和 pWPXL 载体片段,用 T4 连接酶进行连接,16 $^{\circ}\text{C}$  水浴过夜;连接产物转化 Top10 感受态细菌,挑选阳性克隆扩增培养。离心收集细菌并抽提重组质粒。所提取的质粒用 BamH I 和 Xba I 进行酶切鉴定;将酶切鉴定正确的重组质粒进行扩增培养,并制备少量质粒送 Invitrogen 公司测序。测序正确后,命名为 pWPXL-eGFP-2A-CBG<sub>r</sub>99;大量提取质粒 pWPXL-eGFP-2A-CBG<sub>r</sub>99。同时大量提取质粒 pA2 和 pMDG2,准备转染细胞之用;

2.2.2.2 慢病毒载体的包装:应用 Lipofectamine 2000 介导的细胞转染方法将三个质粒(重组质粒 pWPXL-eGFP-2A-CBG<sub>r</sub>99,包装质粒 pA2 和包膜质

粒 pMDG2) 共同转染 293T 细胞。第 1 天: 接种  $2.5 \times 10^6$  293T 细胞至 1 个 10 cm 培养皿中; 第 2 天: 转染前半小时, 将培养皿中的培养液换成无血清无抗生素 DMEM。将 12  $\mu\text{g}$  重组质粒载体 pWPXL-eGFP-2A-CBG $\gamma$ 99, 9  $\mu\text{g}$  包装质粒 pA2 及 3.6  $\mu\text{g}$  包膜质粒 pMDG2 加入 DMEM 至 1.5 mL, 混匀; 将 60  $\mu\text{L}$  Lipofectamine 2000 加入 DMEM 至 1.5 mL, 混匀; 静置 5 min 后, 将两者混匀, 室温放置 20 ~ 25 min, 滴加入培养皿中。6 ~ 8 h 后, 更换培养基, 加入新鲜培养基 9 mL, 继续培养; 第 3 天: 荧光显微镜观察转染效率; 第 4 天: 收集培养基, 3000 r/min 室温离心 5 min, 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜抽滤。病毒可直接用于感染或  $-70^\circ\text{C}$  保存。

2.2.2.3 慢病毒滴度测定(用 293T 细胞测定): 第 1 天:  $2.0 \times 10^5$  293T 细胞铺在 6 孔板内, 加入完全培养基进行培养; 第 2 天: 换液, 每孔加入新鲜完全培养基。消化其中一个孔中的细胞并进行计数。其余各孔每孔均加入多聚赖氨酸(Sigma), 使其终浓度为 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。30 min 后, 加入病毒(病毒量按梯度加入, 如 10  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$  四个梯度); 第 3 天: 用完全培养基换液; 第 4 天: 荧光镜下观察表达 GFP 细胞。消化细胞, 加入 2 mL PBS, 1000 r/min 离心 5 min; 用 0.5 mL PBS 重悬细胞, 把细胞置于冰上或冰箱中准备分析。用流式细胞仪检测 GFP<sup>+</sup> 细胞数目, 根据下列公式计算病毒滴度: 滴度 = [% GFP<sup>+</sup> Cells] [day 2 cell count (cells/mL)] / volume of virus added (mL)

### 2.2.3 慢病毒感染

2.2.3.1 铺板: 消化细胞: 将 1 个 10 cm 培养皿细胞胰酶消化后, 转移一部分细胞悬液至 1 个 5 mL 离心管中, 1500 r/min, 离心 4 min, 去除上清液, 并用 1 mL 完全培养液重悬; 计数并调整细胞悬液浓度: 分别取 50  $\mu\text{L}$  上述准备的细胞悬液加入到 450  $\mu\text{L}$  无血清培养液中, 10 倍稀释后进行计数, 并根据计数结果用完全培养液调整细胞悬液浓度; 上述准备的细胞悬液加入到 1 块 6 孔板中的 1 个孔中, 并用完全培养液补足体积至 0.6 mL, 混匀后, 放入  $37^\circ\text{C}$  培养箱中继续培养。

2.2.3.2 慢病毒感染: 第 2 天: 昨日铺板的 1 块 6 孔板, 弃掉各孔中旧培养基, 加入新鲜完全培养基, 各孔中再加入多聚赖氨酸(终浓度为 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 放入培养箱中继续培养。30 min 后,  $6.0 \times 10^6$  单位病毒加入到各个孔中; 第 3 天, 弃掉各孔中的含病毒的

培养基, 加入新鲜完全培养基, 继续培养; 第 4 天, 在荧光显微镜下观察转染的各孔中细胞表达 GFP 情况。

### 2.2.4 流式细胞分选稳定表达 GFP 细胞

2.2.4.1 消化细胞: 上述经过慢病毒感染后的细胞 1 个 10 cm 培养皿, 经胰酶消化, 1% FBS DMEM 吹打分散后, 全部转移至 1 个 5 mL 离心管中, 1500 r/min, 离心 4 min, 去除上清液, 并用 2% FBS DMEM 培养液重悬, 并转移至流式分选样品管中,  $4^\circ\text{C}$  放置, 备用。准备 2 个 15 mL 离心管, 分别加入 7 mL 10% FBS DMEM, 准备收集细胞之用。

2.2.4.2 细胞分选: 应用流式细胞仪的分选模式分选并收集 GFP 阳性表达细胞;

2.2.4.3 细胞扩增: 分选结束后, 将上述 15 mL 离心管 2000 r/min, 离心 4 min; 弃掉上清液后, 加入 1 mL 完全培养基重悬, 分别转移至 1 个 10 cm 培养皿中, 继续扩增培养。

## 3 小动物活体成像

### 3.1 制作动物模型

可根据实验需要通过尾静脉注射、皮下移植、原位移植等方法接种已标记的细胞或组织。在建模时应认真考虑实验目的和选择荧光标记, 如标记荧光波长短, 则穿透效率不高, 建模时不直接种深部脏器和观察体内转移, 但可以观察皮下瘤和解剖后脏器直接成像。深部脏器和体内转移的观察大多选用荧光素酶标记<sup>[7]</sup>。

### 3.2 活体成像

小鼠经过常规麻醉(气麻、针麻皆可)后放入成像暗箱平台, 软件控制平台的升降到一个合适的视野, 自动开启照明灯(明场)拍摄第一次背景图。下一步, 自动关闭照明灯, 在没有外界光源的条件下(暗场)拍摄由小鼠体内发出的特异光子。明场与暗场的背景图叠加后可以直观的显示动物体内特异光子的部位和强度, 完成成像操作。值得注意的是荧光成像应选择合适的激发和发射滤片, 生物发光则需要成像前体内注射底物激发发光。

### 3.3 数据处理

小动物活体成像图像处理软件除了提供含有光子强度标尺的成像图片外, 还能计算分析发光面积、总光子数、光子强度的相关参数供实验者参考。

### 3.4 实验影响因素

原则上, 如预实验时拍摄出图片非特异性杂点

多,需降低曝光时间;反之,如信号过弱可适当延长曝光时间。但曝光时间的延长,不仅增加了目的信号,对于背景噪音也存在一个放大效应。同一批实验应保持一致的曝光时间,同时还应保持标本相对位置和形态的一致,从而减少实验误差。

进行荧光成像时,实验者可选择背景荧光低不容易反光的黑纸放在动物标本身下,减少金属载物台的反射干扰。动物体内很多物质在受到激发光激发后,会发出荧光,产生的非特异性荧光会影响到检测灵敏度。背景荧光主要是来源于皮毛和血液的自发荧光,皮毛中的黑色素是皮毛中主要的自发荧光源,其发光光线波长峰值在 500 ~ 520 nm 左右,在利用绿色荧光作为成像对象时,影响最为严重,产生的非特异性荧光会影响到检测灵敏度和特异性。动物尿液或其他杂质如没有及时清除,成像中也会出现非特异性信号。

由于各厂商的图像分析软件不同,实验数据分析方法也有区别。活体成像系统使用时,实验者考虑到非特异性杂信号,以及成像图片美观等方面,可能会调节信号的阈值,因此在分析信号光子数或信号面积时,应考虑阈值的改变对实验结果的影响。正确选择 ROI 区域,可提高分析实验数据的准确性。

#### 4 展望

小动物活体成像技术具有灵敏度高、直观、操作简单、能同时观测多个实验标本,相比 PET、SPECT 无放射损害等优点,但也有其自身的缺陷,例如动物组织对光子吸收、空间分辨率较低等问题,因而仍需不断地完善和改进。小动物活体成像

按成像性质属于功能成像,如何能更好地与结构成像技术(microCT、超声等)相结合,使实验结果不但能够定量,而且还能精确定位,这是活体成像技术今后的发展方向之一<sup>[8]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung [J]. *Nature*, 2005, 436 (7050): 518 - 524.
- [2] Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2008, 451 (7175): 147 - 152.
- [3] Hardy J, Francis KP, DeBoer M, et al. Extracellular replication of *Listeria monocytogenes* in the Murine gall bladder [J]. *Science*, 2004, 303: 851 - 853.
- [4] 闫明霞,刘蕾,英德水,等. 人肺癌裸小鼠模型活体成像的动态观察 [J]. *肿瘤*, 2008, 28 (10): 204 - 208.
- [5] Jenkins DE, Hornig YS, Oei Y, et al. Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *breast [J]*. *Breast Cancer Res*, 2005, 7: R444 - R454.
- [6] 王晓敏,闫明霞,梁琳慧,等. GFP 和 Luc 双标技术在小鼠肿瘤模型建立中的应用 [J]. *实验动物与比较医学*, 2010, 30 (1): 2 - 7.
- [7] Kelly P, Moeller BJ, Juneja J, et al. The G12 family of heterotrimeric G proteins promotes breast cancer invasion and metastasis [J]. *PNAS* 2006, 103 (21): 8173 - 8178.
- [8] Ray P, Tsien R, Gambhir SS. Construction and validation of improved triple fusion reporter gene vectors for molecular imaging of living subjects [J]. *Cancer Res* 2007, 67 (7): 3085 - 3093.

修回日期)2010-05-10