

应用生物发光活体成像技术进行抗肿瘤研究进展

刘晓霓¹,王爽¹,杨庆²,王娅杰²,陈德喜¹,朱晓新²

(1.首都医科大学附属北京佑安医院,北京市肝病研究所,北京 100069;

2.中国中医科学院中药研究所,北京 100070)

摘要:生物发光活体成像技术是基于荧光素酶报告系统进行小动物组织、细胞和分子体内行为研究的新兴生命科学技术,在抗肿瘤研究领域应用极为广泛。全文概述生物发光活体成像技术的原理、综述了生物发光活体成像在抗肿瘤研究方面应用的最新进展以及发展趋势,为应用该技术进行抗肿瘤领域研究提供参考。

关键词:生物发光活体成像;荧光素酶;抗肿瘤;裸鼠

中图分类号:R730.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-0242(2015)10-0844-05

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2015.10.A010

Research Progress in The Technique of Bioluminescence Molecular Imaging for Anti-tumor

LIU Xiao-ni¹,WANG Shuang¹,YANG Qing²,et al.

(1. Beijing Institute of Hepatology and Beijing Youan Hospital,Capital Medical University,Beijing 100069,China;2. Institute of Chinese Materia Medica,China Academy of Chinese Medical Sciences,Beijing 100700,China)

Abstract:Technique of bioluminescence molecular imaging is a new biological scientific technique based on luciferase reporter to research the behavior of tissue,cell and molecule in vivo and is widely applied in anti-tumor research field. This paper summarizes the principle of bioluminescence molecular imaging,overviews the latest advance and developing trend of this technique application in anti-tumor research,which will provide references in anti-tumor with this technique.

Key words:bioluminescence molecular imaging;luciferase;anti-tumor;nude mice

小动物活体成像技术(in vivo imaging technology)是在小动物活体内进行组织、细胞和分子水平的定性、定量生物学行为研究的一类技术,是近年来发展最快的生命科学研究方法,是最直接观察细胞和分子在体内行为的新兴技术,已广泛应用于生命科学研究的各个领域^[1]。

自1986年Marlene等第一个成功地获得表达萤火虫荧光素酶(luciferase)基因—*luc*基因以来,荧光素酶的应用和发展进入了一个崭新的时代^[2]。尤

其以*luc*基因标记细胞或DNA,利用其产生的蛋白酶与相应底物—荧光素(luciferin)发生生化反应,产生生物体内的探针光信号进行细胞和分子体内行为研究的生物发光活体成像(bioluminescence molecular imaging,BLI)技术,在抗肿瘤研究领域应用极为广泛。

本文主要针对近几年生物发光活体成像技术在抗肿瘤研究方面的研究进展进行分析。

1 生物发光活体成像概述

1.1 荧光素酶分类

按照来源生物种类的不同,荧光素酶可以分为

收稿日期:2014-12-20;修回日期:2015-01-14

基金项目:国家科技重大专项-重大新药创制专项(2013ZX09301307001004);北京市肝病研究所基金

通讯作者:朱晓新,E-mail:zhuxx59@163.com

细菌荧光素酶(bacterial luciferase,BL)、萤火虫荧光素酶(firefly luciferase,FL)、海肾荧光素酶(renilla luciferase,RL)、海萤荧光素酶(cypridina luciferase,CL)和肠腔素荧光素酶(gaussia luciferase,GL)等,来自萤火虫的荧光素酶是最经典的荧光素酶^[3]。

1.2 荧光素酶报告基因系统原理

经典的萤火虫荧光素酶报告基因系统是以荧光素为底物来检测荧光素酶活性的一种报告系统。荧光素酶在ATP和氧存在的情况下,可以催化氧化荧光素,在荧光素氧化的过程中,会发出生物荧光。这种无需激发光就可发出偏红色的生物荧光,组织穿透能力强,灵敏度高,由于没有激发光的非特异性干扰,信噪比也比较高^[4]。

1.3 生物发光活体成像技术

生物发光活体成像技术是利用高灵敏度的暗视野电荷偶联设备(charge-coupled device,CCD)相机系统,捕捉荧光素酶分解荧光素过程中部分转化的可见光。该技术能有效地对报告基因标记的实验对象进行实时、空间位置的观测,可在完整的体内环境中快速获得实时和空间的信息^[5],在肿瘤研究领域应用最广泛,也最为成熟。

2 应用生物发光活体成像技术进行抗肿瘤研究

2.1 标记肿瘤相关基因的研究

荧光素酶基因可以插入到目标基因的启动子,成为某种基因的报告基因,通过监测报告基因从而实现对目标基因的监测。

视黄酸受体 $\beta 2$ (RARbeta2)表达缺陷在某些上皮肿瘤发展中起重要作用,主要原因是视黄酸受体靶基因激活受损所致。Qian等^[6]选择RARbeta2阴性的前列腺癌细胞PC3,将其用荧光素酶转染并受控于RARbeta2启动子之下,建立pGL2-RARbeta2-PC3细胞,采用活体成像系统可以实时观察RARbeta2的表达,应用组蛋白去乙酰化抑制剂MS-275和13-顺式维甲酸处理细胞,观察RARbeta2的再激活和药物的抗肿瘤作用。结果显示MS-275和13-顺式维甲酸处理细胞可以在转录水平激活RARbeta2的再表达和乙酰化,两者联合应用可以恢复视黄酸的敏感性,对肿瘤生长具有明显的抑制作用。这种

RARbeta2实时再激活模型可以用于组蛋白去乙酰化抑制剂和视黄酸联合治疗的评价。Lu等^[7]将胸腺嘧啶核苷激酶(TK)——荧光素酶报告基因置于小鼠AFP启动子的转录控制之下,给予肝致癌物质DEN诱导肝癌发生,基于Luc生物发光和TK的正电子发射断层扫描(PET)双重成像。目的是利用肝癌的AFP基因再表达建立肝癌形成报告基因(hepatocarcinogenesis reporter,HCR)双模式小鼠模型,体内纵向观察肝癌的发生和发展,为肝癌化学预防和治疗提供了一个有力的工具。Cyclin A2可以促进哺乳动物细胞进入S期,在G₁期其表达水平低,但在S期开始增加。Chen等^[8]开发了一种Cyclin A2荧光素酶(cycA Luc)融合蛋白报告系统,用于监测细胞周期的S期,为筛选抗癌药物提供了重要工具。IL-15是公认一个有希望肿瘤免疫治疗的候选因子,IL-15在被I型人类T淋巴细胞白血病逆转录病毒(HTLV-I)转化的细胞中发现,HTLV-I携带Tax肿瘤基因,是成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATL)的致病因子。Rauch等^[9]建立了Tax-luc ATL小鼠模型,该模型表达Tax,诱导恶变和luciferase表达,可以实时观察肿瘤的形成。为了证实IL-15在自发淋巴瘤形成过程的作用,研究者又建立了IL-15(-/-)Tax-luc瘤株,发现IL-15缺陷导致肿瘤恶性生长,增加死亡率,显示IL-15在Tax介导的淋巴瘤中不是必要因子,但在抗肿瘤免疫中发挥着重要作用,可能是淋巴瘤治疗的重要靶点。

上述研究显示将荧光素酶基因插入到肿瘤细胞的相关基因的启动子之下,将该肿瘤细胞转入动物体内形成所需的肿瘤模型,可以观察靶基因在体内的实时表达和对候选药物的准确反应;也可以应用基因敲入技术将荧光素酶基因插入到小鼠肿瘤相关基因启动子之下,观察该基因在小鼠肿瘤发生发展中表达变化,为肿瘤治疗提供直接可视的研究方法。

2.2 标记肿瘤细胞的研究

2.2.1 构建各种肿瘤模型

荧光素酶基因插入到肿瘤细胞的染色质的随机位点,再将该肿瘤细胞转入动物体内可以建立各种肿瘤模型,用于实时观察体内肿瘤细胞的增殖、生长、转移情况。

Wang等^[10]采用慢病毒载体携带eGFP、Luc2和新的融合基因转导进入MDA-MB-231三阴性乳腺

癌(triple-negative breast cancer, TNBC)细胞,进而构建了双报告基因的肿瘤模型,研究显示 eGFP 和 Luc2 组合优于单一报告基因标记细胞,这种可视化细胞为研究 TNBC 转移机制和抗肿瘤新药的研发提供了方便、敏感、可视化的研究平台。Sonabend 等^[11]通过向小鼠脑皮质下白质注射血小板衍生因子 PDGF-IRES-Cre 逆转录病毒敲入肿瘤抑制基因 (*Pten* 和 *p53*)建立 *Pdgf(+)**Pten(-/-)* *p53(-/-)**luciferase(+)*,建立了胶质母细胞瘤肿瘤模型,结果显示颅内注射 *Pdgf(+)**Pten(-/-)**p53(-/-)* *luciferase(+)*胶质瘤细胞可以建立一种新的、高度可重复的模型,具有人神经母细胞瘤的关键特征,可用于评估肿瘤的生长和对治疗的反应。

与传统的肿瘤模型技术相比,采用这种标记技术灵敏度更高,可以进行定量研究,可以方便地观察肿瘤生长、转移与复发的情况,避免由于动物模型差异而造成的组间差异,可以节省动物的成本。

2.2.2 抗肿瘤治疗评价

用荧光素酶标记肿瘤细胞,建立各种可视肿瘤模型,实时评价各种治疗手段的治疗效果,可以动态观察肿瘤细胞治疗后的变化、肿瘤细胞是否死亡、肿瘤体积是否变小,这是生物发光活体成像技术的最重要的应用领域。

2.2.2.1 评价各种抗肿瘤药物的药效

目前有很多研究者应用生物发光活体成像技术进行靶向、免疫、激素、抗血管、化学抗癌新药或新剂型等的疗效评价。由于该技术实时、动态、灵敏的特点,是新药研发的理想的评价和筛选工具。

Rubin 等^[12]采用活体成像技术观察 CXCR4 拮抗剂 AMD 3100 对 U87 和 Daoy 神经胶质细胞移植瘤的抑制作用,结果显示 AMD 3100 可明显抑制肿瘤细胞的生长。Graeser 等^[13]比较吉西他滨脂质体和吉西他滨对 AsPC1-luc 前列腺癌移植瘤的影响,结果显示吉西他滨脂质体可以明显抑制肿瘤的生长,而吉西他滨抑制作用不明显。Zhang 等^[14]采用 *Luciferase* 和 GFP 双标记的人肝癌细胞,建立皮下和原位肝癌肿瘤模型,评价 Endostar 抗血管和抗肿瘤的药效,结果显示肿瘤细胞接种 14~18d 后,静脉注射 Endostar (每天 5mg/kg)8d 即可以观察到 Endostar 抑制肿瘤的作用;研究者同时比较 BLI、计算机断层扫描血管造影 (computer tomography angiography,

CTA)以及荧光分子成像 (fluorescence molecular tomography, FMT) 三种成像技术评价 Endostar 的抗血管和抗肿瘤的效果,结果显示三种技术综合应用,更能得到可靠的非侵入性活体成像技术对肝癌的抗肿瘤药物的疗效评价^[14]。F10 是新型的抗肿瘤药物,在体外对胶质母细胞瘤 (GBM) 有很好的抑制作用。Gmeiner 等^[15]采用荷 G48a-luc GBM 裸鼠观察 F10 的药效,显示 F10 体内可以明显抑制 GBM,是潜在的治疗 GBM 的候选药物。Fryer 等^[16]将 *Luciferase* 标记的骨髓瘤细胞注射到 NOD/SCID 小鼠体内建立骨髓瘤模型,用于进行抗骨髓瘤药物的临床前评价,采用这种模型已经评价了 Bortezomib、Melphalan 两种新的抗骨髓瘤药物。探讨力达霉素 (LDM) 与氨甲喋呤 (MTX) 及其组合对裸鼠荧光素酶转染 HT-1080 肺转移纤维肉瘤的影响,结果表明 LDM 单独应用有很强的抗肿瘤转移作用,联合 MTX 对 HT-1080 肉瘤抑制作用增强^[17]。Feng 等^[18]建立了稳定的 NCI-H226-luc-GFP 双标恶性间皮瘤细胞系 (LMB-H226-GL),用该细胞系可以建立小鼠腹腔实体瘤,对 SS1P (一种重组免疫毒素,正在进行临床 II 期试验)有良好的反应,该模型可以用来评价其他抗间质瘤药物^[18]。Tai 等^[19]采用 luc-MDA-MB-231 移植瘤模型评价紫杉醇混合胶囊的药效,这种技术可以实时、准确、方便地观察肿瘤的生长大小,与常规方法结果一致。传统上依靠形态学的变化检测体内抗癌药物开发的治疗效果评价,新的靶向治疗的出现,可能导致这一评价方法发生变化。Hoff 等^[20]采用多模式的分子成像技术 (包括 BLI 观察肿瘤凋亡和荧光探针观察 Osteosense 800 和 CatK 680-FAST 肿瘤标志物)探讨了 Docetaxel 和 Zoledronic acid (ZA)对 MDA-MB-231 乳腺癌骨转移小鼠模型的反应,显示多模态成像提供了新的药物疗效评价和筛选更全面的工具。应用 Hep3B-luc 人类肝细胞癌荷瘤小鼠模型评价 3-磷酸甘油醛脱氢酶拮抗剂 (3-溴丙酮酸) 经皮消融的作用,结果显示 3-溴丙酮酸经皮注射入肿瘤可以缩小 Luc-hep3b 生物发光成像信号和活力,可以靶向抑制 GAPDH,诱导肿瘤细胞凋亡, GAPDH 拮抗剂经皮注射诱导细胞凋亡和阻滞细胞肿瘤的进展,这表明靶向抑制肝癌 GAPDH 具有一定的治疗潜力^[21]。前列腺癌早期常常使用雄激素来控制,但雄激素消融治疗常常使雄激素非依赖性前列腺癌恶化,3 β -雌二醇

不具有雄激素活性,且不能转变为雄激素,Dondi 等^[22]发现 3β -雌二醇体内外可以明显抑制 PC3-Luc 的增殖和转移,具有潜在的发展成抗前列腺癌药物的能力。

2.2.2.2 评价抗肿瘤生物治疗效果

近年来,生物免疫抗肿瘤治疗研究迅猛发展,生物发光活体成像技术也为评价抗肿瘤生物治疗效果提供了全新的研究方法。

Lin 等^[23]观察联合 GM-CSF 的分泌肿瘤细胞免疫和阿糖胞苷对荷 C1498-luc 小鼠的影响,结果显示联合治疗比单独使用阿糖胞苷的中位生存时间明显提高。Geller 等^[24]建立荧光素酶标记卵巢癌肿瘤细胞移植瘤模型,腹腔注射 NK 细胞,评价这种 NK 细胞传输形式是否影响其对肿瘤细胞的杀伤作用。结果显示腹腔注射人 NK 细胞后,NK 细胞在循环中保持高水平,并能有效清除肿瘤细胞,NK 细胞能在腹腔内保持 54d,并且保持成熟,存活的 NK 细胞杀伤肿瘤细胞作用和输注前相似,提示腹腔输注 NK 细胞方式是稳定的植入方式,抗卵巢癌作用明显。

3 生物发光活体成像在抗肿瘤研究领域应用的发展趋势

3.1 多模式成像技术

虽然生物发光活体成像技术具有特异性强、高灵敏度、精确定量的优点,非放射性、非损伤性、实时动态的观测的优越性,但是对于肿瘤立体定位,分析肿瘤内部微环境结构(血管、药物分布等)没有优势。因此近年来生物发光活体成像技术常常与正电子发射断层扫描(PET)、计算机断层扫描血管造影(CTA)、荧光分子成像(FMT)、核磁、超声等其他成像系统联合应用,在肿瘤分子影像研究中已经成为一种趋势^[7,14,20]。

3.2 新的荧光素酶报告系统的应用

萤火虫荧光素酶报告系统是最经典的报告系统,但随着新的荧光素酶的发现,研究者也开始趋向新的报告系统的应用。Han 等^[25]应用肠腔素荧光素酶标记 EC1 脂质体靶向给药系统,监测 ErbB2 过度表达的转移性卵巢癌的治疗。Lee 等^[26]采用海肾荧光素酶报告系统体内观察了 NK 细胞免疫治疗对 D54-CR 肿瘤细胞凋亡的影响。这些新的荧光素酶

报告系统在肿瘤研究领域已经显示一定的优势。

3.3 在机制/信号途径方面的研究

在肿瘤研究领域,应用荧光素酶报告系统活体观察肿瘤生长、转移、药物疗效所占的比例最多。但现在研究者开始关注应用生物发光技术研究肿瘤信号途径,如受体酪氨酸激酶的活化、缺氧的信号转导、细胞凋亡、DNA 双链断裂、TGF-信号途径等,使得在活体状态下可视研究肿瘤发生机制和药物作用机制成为可能^[27,28]。

参考文献:

- [1] Ntziachristos V. Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology[J]. *Nature Methods*,2010,7(8):603-614.
- [2] Deluca M. Transient and stable Expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants[J]. *Science*,1986,234(4778): 856-859.
- [3] Michelini E,Cevenini L,Mezzanotte L,et al. Luminescent probes and visualization of bioluminescence [J].*Methods Mol Biol*,2009,574:1-13.
- [3] Navizet I,Liu YJ,Ferré N,et al. The chemistry of bioluminescence:an analysis of chemical functionalities [J]. *Chemphyschem*,2011,12(17):3064-3076.
- [4] Fraga H,Fernandes D,Novotny J,et al. Firefly luciferase produces hydrogen peroxide as a coproduct in dehydroluciferyl-adenylate formation[J]. *Chembiochem*,2006,7(6): 929-935.
- [5] Lyons SK,Meuwissen R,Krimpenfort P,et al. The generation of a conditional reporter that enables bioluminescence imaging of Cre/loxP-dependent tumorigenesis in mice[J]. *Cancer Res*,2003,63(21): 7042-7046.
- [6] Qian DZ,Ren M,Wei Y,et al. In vivo imaging of retinoic acid receptor beta2 transcriptional activation by the histone deacetylase inhibitor MS-275 in retinoid-resistant prostate cancer cells[J].*Prostate*,2005,64(1):20-28.
- [7] Lu X,Guo H,Molter J,et al. Alpha-fetoprotein-thymidine kinase-luciferase knockin mice: a novel model for dual modality longitudinal imaging of tumorigenesis in liver[J]. *J Hepatol*,2011,55(1):96-102.
- [8] Chen ZH,Zhao RJ,Li RH,et al. Bioluminescence imaging of DNA synthetic phase of cell cycle in living animals[J]. *PLoS One*,2013,8(1):e53291.
- [9] Rauch DA,Harding JC,Ratner L. IL-15 deficient tax mice reveal a role for IL-1 α in tumor immunity [J]. *PLoS One*,2014,9(1):e85028.

- [10] Wang K,Xie S,Ren Y,et al. Establishment of a bioluminescent MDA-MB-231 cell line for human triple-negative-breast cancer research[J]. *Oncol Rep*,2012,27(6):1981-1989.
- [11] Sonabend AM,Yun J,Lei L,et al. Murine cell line model of proneuralglioma for evaluation of anti-tumor therapie [J]. *J Neurooncol*,2013,112(3):375-382.
- [12] Rubin JB,Kung AL,Klein RS,et al. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2003,100(23):13513-13518.
- [13] Graeser R,Bornmann C,Esser N,et al. Antimetastatic effects of liposomal gemcitabine and empty liposomes in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer[J]. *Pancreas*,2009,38(3):330-337.
- [14] Zhang Q,Du Y,Xue Z,et al. Comprehensive evaluation of the anti-angiogenic and anti-neoplastic effects of Endostar on liver cancer through optical molecular imaging[J]. *PLoS One*,2014,9(1):e85559.
- [15] Gmeiner WH,Lema-Tome C,Gibo D,et al. Selective anti-tumor activity of the novel fluoropyrimidine polymer F10 towards G48a orthotopic GBM tumors[J]. *J Neurooncol*,2014,116(3):447-454.
- [16] Fryer RA,Graham TJ,Smith EM,et al. Characterization of a novel mouse model of multiple myeloma and its use in preclinical therapeutic assessment [J]. *PLoS One*,2013,8(2): e57641.
- [17] Zhang SH,Zhong GS,He HW,et al. Bioluminescence imaging evaluation of the inhibitory effect of lidamycin on lung metastasis of human fibrosarcoma in athymic mice[J]. *Yao Xue Xue Bao*,2011,46(1):45-49.
- [18] Feng M,Zhang J,Anver M,et al. In vivo imaging of human malignant mesothelioma grown orthotopically in the peritoneal cavity of nude mice[J]. *J Cancer*,2011,2:123-131.
- [19] Tai W,Sun MM,Liu N,et al. Study on the anti-tumor effect of paclitaxel mixed micelle by using in vivo optical imaging technique[J]. *Yao Xue Xue Bao*,2010,45(4):530-534.
- [20] Hoff BA,Chughtai K,Jeon YH,et al. Multimodality imaging of tumor and bone response in a mouse model of bony metastasis[J]. *Transl Oncol*,2012,5(6):415-421.
- [21] Ganapathy-Kanniappan S,Kunjithapatham R,Torbenson MS,et al. Human hepatocellular carcinoma in a mouse model: assessment of tumor response to percutaneous ablation by using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antagonists[J]. *Radiology*,2012,262(3): 834-845.
- [22] Dondi D,Piccolella M,Biserni A,et al. Estrogen receptor beta and the progression of prostate cancer: role of 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol [J]. *Endocr Relat Cancer*,2010,17(3):731-742.
- [23] Lin JM,Li B,Rimmer E,et al. Enhancement of the anti-tumor efficacy of a GM-CSF-secreting tumor cellimmunotherapy in preclinical models by cytosine arabinoside[J]. *Exp Hematol*,2008,36(3):319-328.
- [24] Geller MA,Knorr DA,Hermanson DA,et al.Intraperitoneal delivery of human natural killer cells for treatment of ovariancancer in a mouse xenograft model[J].*Cytotherapy*,2013,15(10):1297-1306.
- [25] Han XJ,Wei YF,Wan YY,et al. Development of a novel liposomal nanodelivery system for bioluminescence imaging and targeted drug delivery in ErbB2-overexpressing metastatic ovarian carcinoma[J]. *Int J Mol Med*,2014,34(5):1225-1232.
- [26] Lee HW,Singh TD,Lee SW,et al. Evaluation of therapeutic effects of natural killer (NK) cell-based immunotherapy in mice using in vivo apoptosis bioimaging with a caspase-3 sensor[J]. *FASEB J*,2014,28(7):2932-2941.
- [27] Brogan J,Li F,Li W,et al. Imaging molecular pathways: reporter genes [J]. *Radiat Res*,2012,177(4):508-513.
- [28] Imamura T,Hanyu A.TGF-beta signaling during bone metastasis of reast cancer and in-vivo imaging [J]. *Clin Calcium*,2008,18(4):460-465.