

小动物活体成像技术在泌尿系统肿瘤中的应用进展^{*}

吴学武 张 杨 李雨峰 王培龙 王 伟 田俊强^{**}

(兰州大学第二医院泌尿外科/兰州大学第二医院泌尿外科研究所/甘肃省
泌尿系统疾病重点实验室/甘肃省泌尿系统疾病临床医学中心,兰州 730030)

摘 要:泌尿系统肿瘤异质性高,易复发和转移。小动物活体成像技术是生物及医学研究领域的一项新兴技术,近年来,其在肿瘤发生发展机制的基础研究中不断深入,这些研究对患者临床诊断、肿瘤转移、预后的判断、抗肿瘤药物研发以及个体化治疗指导具有深远意义。本文纵览近年来相关文献,总结了小动物活体成像技术及其在泌尿系统肿瘤动物模型研究中的应用进展,以期对泌尿系肿瘤的临床诊断、治疗、疗效判断及抗肿瘤药物研发提供新思路。

关键词:分子影像学;活体成像;泌尿系统肿瘤;膀胱癌;肾细胞癌;前列腺癌

中图分类号:R69 文献标识码:A doi:10.16507/j.issn.1006-6055.2015.06.030

Progress on Small Animal in Vivo Imaging Technique in Urologic Neoplasms^{*}

WU Xuewu ZHANG Yang LI Yufeng WANG Peilong WANG Wei TIAN Junqiang^{**}

(Department of Urology, Lanzhou University Second Hospital/Institute of Urology of
Lanzhou University Second Hospital/Key Laboratory for Urological Diseases of Gansu
Province/Gansu Nephro Urological Clinical Center, Lanzhou 730030)

Abstract: Urinary system tumors are characterized by high heterogeneity, inclination to relapse and metastasis. Small animal in vivo imaging technique is an emerging technique involving the biological and medical field of study. In recent years, small animal in vivo imaging technique in the basic research of tumor progress is deepening and has far-reaching significance on the judgement of the clinical diagnosis, tumor metastasis, prognosis, antitumor drug development and individual treatment. The recent literatures on progress of small animal in vivo imaging technique in urologic neoplasms in animal models are reviewed, to provide new ideas for the judgement of the clinical diagnosis, treatment and antitumor drug development of urologic neoplasms.

Key words: molecular imaging; vivo imaging; urologic neoplasms; bladder cancer; renal cell carcinoma; prostate cancer

1 引言

恶性肿瘤是全球范围内严重危害人类健康的疾病,世界人口死亡原因中,癌症致死率居第二位^[1]。癌症患者的死因主要是肿瘤细胞浸润或转移至重要器官引起相应的并发症^[2]。其中,泌尿系统肿瘤中的膀胱癌、肾癌、前列腺癌是泌尿外科中较常见的疾病,其发病率和死亡率呈明显增长趋势。因此,对泌尿系肿瘤发生、发展过程的研究刻不容缓。

1999 年,美国哈佛大学 Weissleder 等^[3]提出了分子影像学(molecular imaging)的概念,即应用分子

影像学的方法,对活体状态下的生物过程进行分子和细胞水平的定性和定量研究。分子影像技术是一种利用特异性的分子探针针对研究对象进行追踪并成像的技术。正是分子成像技术的迅猛发展,使得人类肿瘤小动物模型实时、非侵入活体成像成为可能。近年来,随着生物学及医学研究的飞速发展,为了能更直观、实时地监测活体生物体内的细胞活动,观测活体动物体内肿瘤的发生发展、基因的表达及反应等生物学过程,分子及细胞生物学技术已从传统的体外研究逐步延伸到活体动物体内。小动物活体成像技术(Small animal in vivo imaging technique)以其操作简单、结果直观、非侵入性、高度灵敏等特点被广泛应用到泌尿系肿瘤的诊断、治疗、疗效判断及抗肿瘤药物研发等许多与临床密切联系的研究中。

本文纵览近年来相关文献,总结了小动物活体成像技术及其在泌尿系统肿瘤动物模型研究中的应

2015-03-30 收稿,2015-06-26 接受

* 国家自然科学基金(81372732),甘肃省卫生行业科研计划项目(GWGL2013-30),自然科学类中央高校基本科研业务费项目(861508),甘肃省泌尿临床医学中心开放课题经费资助

** 通讯作者,E-mail: tj007263@sina.com

用进展,以期对泌尿系肿瘤的临床诊治、疗效评价及抗肿瘤药物研发提供依据。

2 小动物活体成像技术概述

目前,小动物活体成像技术主要包括 X 光成像、超声成像、核素成像、同位素成像及可见光成像等。其中可见光成像又包括生物发光成像 (Bioluminescence imaging, BLI) 与荧光成像 (Fluorescence imaging)。活体动物光学成像与传统活体成像技术相比,具有非电离低能量照射、高灵敏度、无需放射试剂以及成像系统费用低等独特优势。

2.1 传统的活体成像技术

传统活体成像技术主要是形态学成像,包括计算机断层扫描成像、磁共振成像和超声成像等。形态学成像技术有较高的空间分辨率,但敏感性较差,只有疾病引起相应的组织结构变化时才能检测到,而此时疾病多数已发展到中晚期,达不到早诊断、早治疗的临床目标。而生物发光成像、荧光成像等功能成像技术可在分子和细胞水平检测疾病,即在疾病尚未导致组织结构发生变化时就能检测到。因此,不同成像技术的联合应用将成为未来活体成像技术研究的一种必然趋势。

2.2 活体荧光成像技术

荧光成像是近年来发展较快的成像技术之一,在生物医学领域得到了广泛的应用^[4,5]。它主要采用荧光报告基因标记细胞或 DNA,通过先进的光学仪器检测,动态观察活体动物体内被标记肿瘤细胞的生长、转移、特定基因的表达等生物学行为,从而为肿瘤的诊断、基因治疗及抗肿瘤药物的研发提供依据^[6,7]。

目前,活体荧光成像技术主要有三种标记技术:1) 荧光蛋白标记:常用的有绿色荧光蛋白 (GFP)、红色荧光蛋白 (RFP) 等;2) 荧光染料标记:常用的有 FITC、Cy3、Cy5、Cy5.5 及 Cy7 等;3) 量子点 (Quantumdot, QD) 标记:作为一种新型的荧光标记物,量子点在长时间实时动态监测细胞活动方面有着独特的应用优势。通过使用不同光谱的 QDs,可实现一元激发多元发射,同时检测生物分子的多个组分。QDs 的发射光谱从可见光范围一直延续到红外,这一光谱范围避开了血液和水的吸收峰,因此可实现 QDs 活体标记,使用近红外或红外光子成像,提高了组织穿透性和成像灵敏性^[8]。

2.3 活体生物发光成像技术

生物发光成像是用荧光素酶 (luciferase, Luc) 基

因作为报告基因标记细胞或病毒,在适宜的条件下被荧光素酶标记的细胞或病毒能稳定地表达荧光素酶,再通过腹腔或静脉注射相应的底物荧光素 (luciferin),荧光素酶与相应底物荧光素发生氧化反应并产生光信号从而发光^[9,10]。在体外采用高灵敏度制冷 (-90℃) 电荷耦合元件 (Charge-Coupled device, CCD) 成像系统可以精确观测并记录这些生物发光信号及变化^[11],进而对活体动物体内肿瘤的生长及转移、免疫反应、特定基因的表达等诸多生物学过程进行实时直观的监测和研究。生物发光成像具有非侵入性、背景噪音低、灵敏度高、准确定位发光点、实时动态监测等优势。此外,生物发光成像是动物体内的自发发光,不需要外源性激发光,避免了对体内正常细胞的损伤,有利于进行长期观察。

3 小动物活体成像技术在泌尿系肿瘤动物模型研究中的应用

通过构建泌尿系肿瘤动物模型,可采用活体成像技术定量、无创地监测小动物整体的原位瘤、转移瘤及自发瘤的大小及转移情况,以及对肿瘤治疗过程中肿瘤细胞的变化进行实时、原位、活体的观测和评价,进而为研究泌尿系肿瘤的发生、发展机制、新的治疗方法及疗效评估提供实验基础,将泌尿系肿瘤治疗方面的临床问题转化为基于动物模型的实验问题,最终回归临床治疗。

3.1 膀胱癌

膀胱癌是泌尿系统中最为常见的恶性肿瘤,其恶性度高,具有易复发与复发后进展的特点,早期诊断及治疗是改善预后的关键^[12]。利用活体成像技术研究膀胱癌动物模型对临床治疗具有重要的指导意义。

杨彬等^[13]用红色荧光蛋白 (RFP) 作为报告基因,标记小鼠膀胱癌 (BT1739) 细胞,成功构建可视化的红色荧光小鼠膀胱癌皮下移植瘤模型,通过 MAESTRo 活体成像系统实现了对膀胱肿瘤生物学过程的在体、非侵入、实时动态的研究。但这种裸小鼠皮下接种属于异位移植,实验中移植瘤常表现出与人膀胱癌不同的生物学行为。为了克服异位移植这一缺点,谭万龙等^[14]以绿色荧光蛋白 (GFP) 作为标记基因,标记人膀胱移行细胞癌 T24 细胞株,再将能够稳定表达 GFP 的 T24/GFP 细胞移植于裸小鼠膀胱壁内,建立了人膀胱移行细胞癌可视化的小鼠

原位移植瘤模型,可在活体荧光整体成像系统下直接观察肿瘤的发生与发展。此外,Zhou JH 等^[15]将表达 GFP 的人浅表膀胱癌(KU7)细胞通过膀胱灌注法原位种植于裸小鼠,应用活体荧光成像系统动态观察肿瘤的变化情况。原位移植的肿瘤移植方法使肿瘤细胞获得与人体肿瘤相近的微环境,能够近似表现人体肿瘤本来的生物学特性,为研究人类恶性肿瘤侵袭及转移等恶性生物学行为提供了更为理想的动物模型^[16]。

活体成像技术在抗肿瘤药物的研发及疗效评估方面具有重要的理论和临床意义。付奎等^[17]将含香菇珊瑚红色荧光蛋白(Discosomasp. red fluorescent protein, DsRed)基因的质粒载体采用脂质体法转染至小鼠膀胱移行细胞癌(BTT)细胞,筛选并扩大培养后,将其皮下种植于615小鼠后肢大腿内侧,建立了肿瘤发射红色荧光的小鼠膀胱癌移植瘤模型,分别自右后肢肿瘤细胞种植后第6、13、20天,于小鼠右后肢肌肉注射Ag85A、Ag85B疫苗,应用活体成像技术摄取移植瘤的荧光影像学特征,从而动态、客观、可视化地评估Ag85A和Ag85BDNA疫苗对小鼠膀胱癌移植瘤的抑瘤效应,为肿瘤DNA疫苗的发展应用提供了直观、可靠的理论依据。

作为一种新型的荧光标记物,近红外量子点成像系统在指导肿瘤定位和外科手术切除方面具有重要意义。Knapp 等^[18]在人膀胱癌的狗和猪动物模型中利用近红外 QDs 对浸润性膀胱肿瘤的前哨淋巴结进行术中实时显像。Soltesz 等^[19]利用近红外 QDs 对前哨淋巴结显像并指导手术切除淋巴结。余伟民等^[20]采用 QDs 对前列腺干细胞抗原在膀胱移行细胞癌中的表达水平进行检测,发现 QDs 能分别显示不同表达强度的组织标本,并且荧光强度可稳定保持至少2周,非常适合长时间示踪研究。

3.2 前列腺癌

世界范围内,前列腺癌在男性恶性肿瘤中最为常见,病死率居各种癌症第2位^[21]。我国前列腺癌发病率明显低于西方国家,但近年来呈迅速上升趋势^[22]。前列腺癌因其解剖位置较深,早期常无明显症状,患者就诊时大多已发展为晚期,失去手术治疗的机会^[1]。早期诊断及治疗对提高前列腺癌预后具有重要意义。

生物发光前列腺癌细胞系(PC-3M-luc-C6)可表达荧光素酶,将其注射到小鼠前列腺或皮下构

建前列腺癌动物模型,可对原发性肿瘤进行评估,并可通过基于荧光素酶的前列腺癌动物模型特异性评估化疗后活体内肿瘤的复发和转移。Jenkins 等^[23]使用生物发光 PC-3M-luc-C6 细胞,构建人前列腺癌小鼠模型来监测肿瘤的复发和转移。Yang M^[24]等以 RFP 为报告基因构建人前列腺癌原位移植瘤动物模型,采用活体荧光成像系统进行实时动态观察。另有研究报道^[25]利用 GFP 和 RFP 双重荧光标记通过成像系统观察肿瘤的病理过程。Yang M^[26]等将 RFP 标记的前列腺癌细胞移植到 GFP 转基因小鼠上,荧光显微镜下观察肿瘤与间质的相互作用,实现了活体内动态观察肿瘤血管的发生和发展,同时观察到抗癌药物对肿瘤细胞及宿主自身细胞的作用效应。研究发现这种多报告基因标记的细胞较单报告基因标记的细胞在实际应用中更具优势。

QDs 在前列腺癌研究中也表现出显著的优势。Shi C 等^[27]应用 QDs 和免疫组化的方法对前列腺癌细胞中的前列腺特异性抗原和雄激素受体进行检测,发现 QDs 的检测方法明显优于免疫组化,并且 QDs 可对这两种生物分子同时进行标记。通过 QDs 标记,他们发现前列腺癌细胞受雄激素刺激后引起雄激素受体和前列腺特异性抗原的表达水平同时上调,并使雄激素受体的表达从胞液移向细胞核。在使用雄激素受体拮抗剂后,前列腺特异性抗原的表达受到抑制,并阻止雄激素受体向胞核移动。Xing Y 等^[28]采用4种不同光谱的 QDs 对人前列腺癌组织中的4种肿瘤标志物分别进行标记,在同一激发光下实现对这4种肿瘤标志物的同时检测。

利用近红外光发射的 QDs 与特异性肿瘤标志物结合,可对肾癌、膀胱癌、前列腺癌等的微小病灶进行活体检测,也可对区域淋巴结转移进行体外检测。Gao X 等^[29]首先报道采用一种新的多功能 QDs 对活体动物体内肿瘤进行示踪和成像,他们将 QDs 与抗前列腺特异性膜抗体相连,然后经鼠尾静脉注入到人前列腺癌模型小鼠体内,实现 QDs 对肿瘤部位的特异性标记。Shi C 等^[30]报道利用近红外光发射 QDs 连接抗前列腺特异性膜抗体后,可使小鼠骨头中前列腺癌微转移灶在体显像。对前列腺癌骨转移灶进行检测的动物实验表明,这一方法灵敏度极高,可检出小鼠胫骨中仅含 5×10^5 个肿瘤细胞的转移灶。应用近红外光发射 QDs 特异性活体标记肿瘤细胞,术中根据 QDs 荧光确定手术切除范围;同

时应用 QDs 荧光示踪转移的淋巴结,在肾癌、膀胱癌、前列腺癌等根治术中进行辅助淋巴结清扫,在泌尿系肿瘤治疗中的术前定位和术中指导手术切除范围方面有潜在的应用价值。此外 Shi C 等^[31]利用 QDs 连接寡核苷酸检测了前列腺癌中 Sonic Hedgehog mRNA 的表达,发现 QDs 连接寡核苷酸作为原位杂交探针较标准的原位杂交有很大优势,尤其适用于低水平表达的基因的示踪监测。

3.3 肾细胞癌

肾细胞癌(RCC)是泌尿系第三大恶性肿瘤,发病率每年上涨约 2%^[32],每年新发病患者超过 10 万人,其中 20% 初诊时已发生转移,20% ~ 40% 术后发生转移^[33]。因此构建肾癌动物模型的研究具有重要的意义。

裸鼠移植瘤常被用于肾癌的实验研究,但因小鼠体型小,抗干预能力差,不宜进行肿瘤介入研究。余军军等^[34]通过瘤块种植法构建兔 VX2 肾癌模型,利用螺旋 CT、MRI 及肾动脉造影(DSA)动态监测瘤灶变化,总结了不同时段移植瘤的生长特征,为研究肾癌的发生发展及转移和临床指导诊治提供了理论依据。目前将活体成像应用于肾癌动物模型的研究较少,有关肾癌移植瘤的功能成像和结构成像资料有待进一步完善。

4 结束语

小动物活体光学成像技术具有直观、灵敏度高、能同时检测多个实验标本、相比传统成像技术无放射损害等优点,近年来在泌尿系肿瘤动物模型研究中的应用越来越多,在直观、实时地监测活体动物体内膀胱癌、肾细胞癌及前列腺癌的细胞活动、肿瘤发生发展、基因的表达及反应等生物学过程方面表现出巨大的优越性。但其同时存在动物组织对光子的吸收、空间分辨率低、结构信息不足等缺陷,仍需不断地进行在体检测条件的优化和技术扩展。小动物活体光学成像按成像性质属于功能成像,如何更好地与结构成像(CT、超声等)相结合,使实验结果既能获得相应的功能信息,又能获得直观的解剖结构信息,将是今后小动物活体成像发展的必然趋势。随着对分子基础疾病的深入研究及显像技术的日益进步,成像技术的种类不断增多,小动物活体成像技术将在泌尿系肿瘤动物模型研究中的应用范围不断扩大,进而在膀胱癌、肾癌、前列腺癌的临床诊断、治

疗、疗效判断及抗肿瘤药物研发等方面发挥越来越重要的作用。

参考文献

[1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global Cancer Statistics [J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2011, 61(2): 69-90.

[2] JOOSSE S A, GORGES T M, PANTEL K. Biology, Detection, and Clinical Implications of Circulating Tumor Cells [J]. EMBO Molecular Medicine, 2015, 7(1): 1-11.

[3] WEISSELEDER R, TUNG C H, MAHMOOD U, et al. In Vivo Imaging of Tumors with Protease-Activated Near-Infrared Fluorescent Probes [J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(4): 375-378.

[4] SHIM S H, XIA C L, ZHONG G S, et al. Super-Resolution Fluorescence Imaging of Organelles in Live Cells with Photoswitchable Membrane Probes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(35): 13978-13983.

[5] LEVENSON R, BEECHEM J, MCNAMARA G. Spectral Imaging in Preclinical Research and Clinical Pathology [J]. Studies in Health Technology and Informatics, 2013, 185: 43-75.

[6] MORAN D E, HEFFEMAN E J. The Evolution of Whole-Body Imaging [J]. Seminars in Musculoskeletal Radiology, 2010, 14(1): 3-13.

[7] WEISSELEDER R, PITTET M J. Imaging in the Era of Molecular Oncology [J]. Nature, 2008, 452(7187): 580-589.

[8] HE Y, ZHONG Y, SU Y, et al. Water-Dispersed Near-Infrared-Emitting Quantum Dots of Ultrasmall Sizes for in Vitro and in Vivo Imaging [J]. Angewandte Chemie (International ed in English), 2011, 50(25): 5695-5698.

[9] CULVER J, AKERS W, ACHILEFU. Multimodality Molecular Imaging with Combined Optical and SPECT/PET Modalities [J]. Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine, 2008, 49(2): 169-172.

[10] NAHRENDORF M, KELIHER E, MARINELLI B, et al. Hybrid PET-Optical Imaging Using Targeted Probes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(17): 7910-7915.

[11] DOTHAGER R S, FLENTIE K, MOSS B, et al. Advances in Bioluminescence Imaging of Live Animal Models [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2009, 20(1): 45-53.

[12] AMIT D, HOCHBERG A. Development of Targeted Therapy for Bladder Cancer Mediated by a Double Promoter Plasmid Expressing Diphtheria Toxin under the Control of H19 and IGF2-P4 Regulatory Sequences [J]. Journal of Translational Medicine, 2010, 8: 134.

[13] 杨彬. 小鼠膀胱癌红色荧光移植瘤模型的建立及其荧光影像分析 [D]. 太原: 山西医科大学, 2010.

[14] 谭万龙, 吴元东, 陈彤, 等. 可视人膀胱肿瘤裸鼠原位移植模型的建立 [J]. 热带医学杂志, 2006, 6(6): 631-634.

[15] ZHOU J H, ROSSER C J, TANAKA M, et al. Visualizing Superficial Human Bladder Cancer Cell Growth in Vivo by Green Fluorescent