

光学分子影像技术在疾病诊疗和药物研究中的应用

董 雪, 顾月清*

(中国药科大学生命科学与技术学院生物医学工程教研室, 南京 210009)

摘要 光学分子影像技术是发展迅速的生物医学影像技术之一, 利用各种光学分子探针及成像技术、纳米技术等, 对体内外细胞、组织、生物体等进行无创、实时、定位监测分子过程, 以实现定性或定量动态研究。该技术灵敏度高、特异性强, 尤其适用于小动物活体检测, 为疾病诊断、新药临床前研究和新药开发提供有力的体内实时监测技术。本文综述了光学分子影像学的发展现状及荧光探针和纳米材料等在疾病诊断治疗、药物作用机制、肿瘤生物学等研究中的应用。

关键词 光学分子影像技术; 疾病诊疗; 作用机制; 肿瘤生物学; 新药开发

中图分类号 R96 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2014)02-0145-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20140203

Application of optical molecular imaging technology in the diagnosis and treatment of diseases

DONG Xue, GU Yueqing*

Department of Biomedical Engineering, School of Life Science&Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Optical molecular imaging (OMI) is one of the rapidly developing biomedical imaging technique employing different technologies, such as optical molecular probing, imaging and nanotechnology to monitor a local real-time non-invasive qualitative or quantitative dynamic studies both *in vivo* and *in vitro*. OMT's advantages, i. e. high sensitivity and specificity, especially *in vivo* studies, make it suitable for diagnosis, drug tracking in pre-clinical research and development of new drugs. Thus, it is regarded as a powerful real-time *in vivo* monitor. This paper discusses the latest advances in the use of fluorescent probes and nanomaterials in optical molecular imaging and its application in the diagnosis and treatment of diseases and in the studies of pharmacology and tumor biology.

Key words optical molecular imaging technology; diagnosis and treatment; mechanism; tumor biology; new drug research & development

This study was supported by the Major International (Regional) Joint Research Project, National Natural Science Foundation (No. 81220108012)

分子影像学(molecular imaging)是以分子生物学为基础,借助现代医学影像技术,对人体内部生理或病理过程在分子水平上的无创、微创实时成像,为疾病的早期发现和治疗提供手段,已经成为疾病临床诊断和治疗的重要支柱^[1]。分子成像技术包括X线计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)、核医学成像(PET、SPECT)、超声成像、光

学成像(OCT)等医学影像技术,可在分子水平上对体内生理或病理过程进行无损伤实时监测。X-CT通过不同组织对X线的吸收程度不同,可反映机体的结构。MRI分子成像的优势在于具有良好的软组织分辨力,多方位任意切层,可精确确定病灶,对比分辨率高。核医学成像通过注射放射性核素标记直接显像,显示代谢异常的组织器官,具有灵

* 收稿日期 2013-12-28 * 通信作者 Tel:025-83271268 E-mail:cpuyueqing@163.com

基金项目 国家自然科学基金重大国际(地区)合作研究资助项目(No. 81220108012)

敏度高、特异性强、可进行疾病早期诊断等特点。与MRI、PET等设备昂贵、检测费高的技术相比,光学成像具有高通量、高灵敏度,低辐射、低价格、快速测量等优点^[5]。光学成像包括弥散光学成像、多光子成像、活体显微镜成像、近红外荧光成像、激光共聚焦成像等^[1-4],在生命科学的研究中发挥着越来越重要的作用。近十余年,光学分子影像学快速发展,与生命科学领域内的其他学科相比,光学分子影像学具有独特的优势,它将复杂的生物学过程转换成直观的图像,在药物研究中发挥着重要作用。通过生物标记可在细胞水平检测血管生成转移及细胞移植治疗中移植干细胞在活体内的迁移、分化情况;在分子水平通过标记与靶组织特异性识别并能与之结合的分子,动态观察疾病的发生、发展过程,同时检测多个生物信号,并对其进行时间和空间上的研究;在基因水平应用报告基因成像可间接反映目的基因的表达情况,成功实现了对基因治疗过程的活体监测,并应用于肿瘤生长,转移机制研究。同时,光学分子影像技术将实现特定分子、细胞、生物过程的表达和代谢活动可视化,尤其是肿瘤细胞的行为过程(早期诊断、检测、个体化治疗)和其他相应的治疗药物的动力学过程。

光学分子探针是光学分子成像的基本要素之一。新型的荧光基团的产生和光学标记技术的发展为光学分子成像提供了特异性的高效对比度,极大地提高了活体成像的检测灵敏度和特异性。目前,光学标记技术已经从传统的小分子有机染料发展到多功能的纳米材料探针,在生物成像和疾病诊断研究中展现出无穷魅力。新型材料的荧光探针在增强生物体内信号的对比度起到了重要的作用,其本质是将有机荧光染料或无机荧光纳米粒与靶分子进行偶联得到对病灶部位具有特异性识别功能的靶信号分子。通过荧光标记的分子探针与靶分子相互结合发出信号,借助光学影像设备检测信号,计算机处理成像,最终显示出活体组织分子的图像,因此这种技术被广泛用于疾病的早期诊断和药物研究中。本文将概述各种新颖的光学分子探针以及在药物研究中的作用。

1 荧光分子探针

荧光探针一般由荧光团(fluorophore)、识别基团(receptor)和连接臂(spacer)构成,荧光团可将

分子识别信息转换为荧光信号,具备灵敏度高、反应时间迅速以及能够实现原位检测等优点。荧光团和识别基团之间的响应通过一些机制来控制,包括光诱导电子转移、分子内电荷转移、荧光共振能量转移、激发态分子内质子转移等。目前,荧光探针主要分为有机荧光探针和无机纳米材料探针。

1.1 有机荧光染料探针

有机荧光染料是一种荧光指示剂,主要包括异硫氰酸酯荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、花青类(cyanine)、罗丹明类(rhodamine B)、氟化硼络合二吡咯甲川(BODIPY)类、1,8-萘酰亚胺类(4-氨基-1,8-萘酰亚胺)、香豆素衍生物、喹啉类(8-羟基喹啉)等,具有检测快、重复性好、用样量少等优点。目前,有机小分子荧光探针主要用于检测生物体系中的阳离子(Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等)、阴离子(磷酸根等)、自由基(活性氧 H_2O_2 、超氧阴离子、单线态氧、羟基自由基等)、糖(葡萄糖、壳聚糖等)、核酸(DNA、RNA)、酶(胰蛋白酶、病毒蛋白酶、NO合成酶)等物质的细胞内荧光识别与成像^[6]。

近红外荧光物质的激发及发射波长在700~1000 nm内,避开了生物体内大量的水、血红蛋白等的强吸收区,具有较深的组织穿透能力(10 cm)。且该范围内生物分子自身荧光较弱,可避免背景干扰,因此广泛用于小动物活体荧光成像中。吲哚菁绿(ICG)是目前唯一被美国FDA批准的近红外有机菁染料,不良反应小,可用于临床的血管造影剂。目前许多研究者合成各种ICG衍生物用于实时在位监测生物体内的分子过程。Nishimura等^[7]开发了9种不同结构的吲哚类衍生物,其中ZMB741荧光染料与血清白蛋白有极强的亲和力,并且在血清白蛋白存在的情况下,发射很强的荧光,该化合物通过浸泡方式感染斑马鱼或静脉注射到小鼠体内,观察血-脑脊液屏障阻断情况,结果证实ZMB741是一种方便、多用途的体内阻断多种动物模型血-脑脊液屏障的荧光指示剂。

本实验室也设计合成了两种ICG衍生物,利用近红外荧光成像系统,实时在位监测药物体内过程、肿瘤成像等。Cao等^[8]针对 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体设计一种近红外荧光探针c(RGDyK)-ICG-Der-02可用于体内肿瘤快速诊断。借助近红外小动物成像系统观察到该探针可在肿瘤部位聚集,具有很强

的荧光信号,迅速靶向至乳腺癌、脑胶质瘤等,并在肿瘤部位长时间聚集,实现肿瘤的早期快速诊断。Guo等^[9]合成的两种近红外荧光染料(ICG-Der-02和Cypate),用于体内肿瘤快速诊断。结果说明水溶性的ICG-Der-02染料比脂溶性的Cypate通过肾途径能较快清除。

1.2 无机荧光探针

有机荧光探针可以高选择性、高灵敏度的检测某些离子,但仍存在缺点,有机染料激发光谱比较窄,荧光寿命和光稳定性较差,这很大程度上限制了有机染料在生物分子、活体细胞成像中的应用。针对这些问题,人们开发了许多种类的新型无机纳米材料,荧光强度显著高于有机染料,良好的光稳定性,主要包括量子点、上转换纳米粒、纳米金颗粒等,广泛用于生物标记、纳米载药等生物医学领域,并取得了一系列突破性进展。

1.2.1 量子点

量子点(QDs)是一种新型的光学分子成像试剂,Alivisatos等于1998年首次将荧光半导体量子点引入光学分子影像学领域,它有显著的光学成像优势。激发光波长范围宽且连续分布,而发射波长的范围窄且呈对称分布,并可通过调整量子点尺寸大小来得到不同颜色的荧光,充分利用量子点本身优越的荧光特性和偶联生物分子的特异性开发具有灵敏性高、特异性强、光稳定性好的荧光诊断试剂,为疾病的早期诊断提供重要的科学方法。

基于量子点标记的光学分子探针,可在光学成像系统下,利用材料的荧光特性,实现光学成像。与传统荧光蛋白介导的肿瘤成像相比,量子点介导下的肿瘤检测灵敏度明显提高。Ag等^[10]将抗人表皮生长因子(anti-HER2)抗体共价连接在修饰巯基乙酸的量子点(TGA-QDs)上,用于靶向过度表达的HER2受体的A549肺癌细胞,低表达的NIH-3T3细胞作为阴性对照组。荧光显微成像显示与对照组相比,TGA-QDs/anti-HER2检测到较强的荧光信号,说明巯基乙酸修饰的量子点能通过受体介导的内吞作用被特异性摄取到细胞质的囊泡结构中,借助于荧光成像实现对活细胞的标记。

Nurunnabi等^[11]设计一种水溶性功能化的近红外量子点转载胶束用于肿瘤细胞成像和实体瘤靶向治疗。发光的量子点被包封在PEG-pentacosadiynoic acid(PEG-PCDA)和PCDA-曲妥珠单抗(herceptin)混合区域内,进一步稳定与胶束间的交

联聚合作用。这种量子点装载胶束对乳腺癌有显著的抗肿瘤作用,经过21 d治疗,实验组小鼠的肿瘤体积由原来285 mm³缩小到137.5 mm³,而未经过治疗的对照组肿瘤体积迅速增长到603.6 mm³,抑制率达77.3%,还充分说明其精确的靶向识别能力。激光共聚焦荧光显微镜可视化监测量子点装载胶束对乳腺癌SK-BR3活细胞表面HER-2抗原的识别,通过抗原抗体特异性免疫反应,实现量子点对肿瘤细胞的早期诊断和治疗作用。Elsa等^[12]设计一种基于量子点的近红外荧光探针,该探针可用于深层组织成像,包括淋巴结定位,血管成像,肿瘤定位,细胞跟踪等。Dong等^[13]用谷胱甘肽处理的CdTe量子点结合上人IgG抗原,与特异性多功能抗体孵育后能产生广泛的凝集反应,利用量子点标记的免疫分子识别特异性抗体或抗原可应用于免疫化学研究。

1.2.2 上转换纳米粒

稀土元素上转换发光粒子(UCNPs)是一种在近红外光激发下能发出可见光的发光材料,由于稀土元素独特的电子层结构决定了它具有特殊的发光特性,即可通过多光子机制把长波辐射转换成短波辐射,所以称之为“上转换”(upconversion)。上转换发光材料的最大特点是材料所吸收的光子能量低于发射的光子能量。与传统的荧光标记物(如有机染料、量子点)不同,由于上转换纳米材料能在近红外光下激发,增加了光子在组织中的穿透能力,且对生物样品造成光损伤较小,在体内深层组织成像中得到广泛应用。Liu等^[14]基于上转换发光原理设计一种七甲川花青染料(hCy7)修饰的纳米系统用于体内监测甲基汞。甲基汞(methyl mercury)由于在动物器官积累,造成产前神经系统和内脏损伤。修饰后功能化的上转换纳米粒可用光学滴定法监测甲基汞、活细胞发光成像,这种纳米系统检测限最低能达到0.18 ng,检测限远低于血液水平(5.8 ng),具有高敏感性。He等^[15]设计一种多层双重聚合物包裹的上转换纳米粒可用于多通道成像和基因传递。上转换纳米粒首先被聚乙二醇修饰,然后包裹二层PEI聚合物(UCNP-PEG@2×PEI),以装载基因。实验结果显示,在空白培养基中,单独PEI对基因转染十分有效,逐渐增加血清的量,抑制效果加强。一方面可能在纳米粒子表面形成一个动态的纳米颗粒-蛋白质环;另一方面,由于受体介导的内吞作用促进

细胞对纳米粒子的摄取,对基因有较高的转染效率。因此,这种具有发光和磁共振对比能力的上转换纳米粒可作为“可追踪”基因载体,在诊断治疗中有广泛的应用前景。

1.2.3 纳米金颗粒 纳米金颗粒(GNP)具有形态及尺寸可控,颗粒呈球形、壳装、棒状、笼状等,温和的表面化学及生物相容性好等特点,加上其独特的等离子表面吸收和光散射等物理特性,可作为分子影像探针,在疾病监测方面广泛应用。金纳米簇(cluster)粒径一般在 2 nm 以下,介于原子和纳米粒之间,有双光子横截面使得其在双光子成像领域有很大潜力。树枝状包埋的金纳米粒子能够有效延长血液停留时间,不但延长了显像时间,并降低了肾毒性,可作为血池造影剂用于肿瘤诊断,实现动物活体成像^[16]。此外,金纳米棒在近红外区具有强表面等离子共振特性,可将吸收的光转化成热,而细胞或组织在周围热量达到一定程度后容易被破坏,因此也是红外肿瘤热疗的理想光敏材料。Larson 等^[17]联合热休克蛋白靶向载药的 HPMA 共聚物和金纳米棒用于增强肿瘤热疗。金纳米棒有较大的比表面积,在近红外区有等离子体峰,在激光照射下,加强肿瘤周围血液流动和血管通透性,从而可以控制药物的释放并具有光热治疗作用。

分子信标是一种新型荧光标记的寡核苷酸探针,纳米金可作为分子信标中的荧光猝灭团,相比传统使用 DABCYL 的荧光猝灭效率高,成功地引入金纳米分子信标技术检测肿瘤细胞中信号通路蛋白的表达情况。细胞中 mRNA 的转录水平与其表达蛋白量之间存在着正比关系,因此可以借助金纳米分子信标检测肿瘤细胞中的 mRNA 表达量间接衡量其蛋白的表达效果,从而为寻找药物的治疗靶点提供参考。本课题组针对 JAK-STAT 信号转导通路中 STAT 蛋白家族中的 STAT5b 的 mRNA 进行检测^[18],研究发现在人源乳腺癌 MCF-7 中 STAT5b 属于高表达,而在鼠源神经胶质瘤细胞 C6 中几乎不表达。与 RT-PCR 进行比较,发现金纳米分子信标检测结果与其保持一致,实验证明金纳米分子信标检测准确性。

1.3 荧光蛋白/荧光素酶

荧光蛋白(fluorescent protein)作为一种生物发光分子,能在多种生物如细菌、酵母、植物和哺乳动物中表达并产生荧光。利用灵敏的光子成像检测

生物体内部光源,监测活体生物体内成像。研究者通过定点突变技术获得了荧光强度和光稳定性大大增强的绿色荧光蛋白(GFP)的突变体,红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白等。改进后的 GFP 突变体在荧光光谱、量子产率、对温度和 PH 的敏感性等方面有所提高,从而扩大了荧光蛋白的应用范围。因此,荧光蛋白成为广泛运用的荧光标记分子。

Wang 等^[19]选择性标记 nisI 构建一个乳酸球菌新的表达载体,GFP 做报告基因探究乳酸球菌体内存在特征,最后带有标记 GFP 的接合株注入小鼠体内跟踪。高表达的标记荧光蛋白的乳酸球菌首先分布在胃肠道,此现象说明了通过检测 GFP 基因表达水平可以准确地描述宿主细菌在体内的代谢过程。而在脾或肝脏内没有发现带有荧光的细菌,可能由于乳酸球菌不能穿过肠上皮屏障进入动物的内部组织。Aboubaker 等^[20]用 GFP 标记弧菌 *Vibrio aestuarianu* 菌株,分析在牡蛎中细菌感染动力学分布,实验结果能辨别牡蛎组织的细菌感染路线。通过标记某一带荧光的基因,对同一组实验对象不同时间点跟踪,观察他们的移动变化情况,这样在最大程度上减少不同实验动物之间的个体差异,更重要的是活体生物成像灵敏度极高。

荧光素酶(luciferase)是生物体内催化荧光素氧化发光的一类酶总称。荧光素酶可以标记基因、细胞和动物,通过生物成像系统监控生物体内的细胞活动和基因行为,利用荧光素酶基因标记特定目的基因,可以建立非放射性的外源基因检测体系,也可以构建表达荧光素酶基因的真核表达载体,将其转入到肿瘤细胞,再用活体成像技术评价其稳定发光能力,能够直接快速地测量肿瘤细胞的生长和转移情况,并可对治疗中肿瘤细胞的变化进行实时观测和评估。Wang 等^[21]将带有双融合报告基因 Luc 和 GFP 的肝癌细胞注入到小鼠中,建立原位肝肿瘤模型。针对 CD144 抗体介导的脂质体纳米粒传递系统,加载阿霉素或疱疹病毒(HSV-ttk)阻断胸苷激酶 Luc 和 GFP 的融合基因,特异性地靶向肝癌小鼠。通过光学生物发光成像和靶向脂质体纳米粒子跟踪监测 Flu 成像,进而观察肿瘤的生长情况。

2 光学分子成像在药物研究中的应用

2.1 肿瘤特异性标志物的识别

光学分子影像学在肿瘤研究中扮演重要的角

色,肿瘤标志物是肿瘤细胞本身存在或分泌的特异性物质,是肿瘤诊断的普遍工具,为肿瘤的筛查和早期诊断带来了新的发展机遇。肿瘤标志物主要分为4大类,癌胚蛋白(carcino-embryonic proteins),如甲胎蛋白是原发性肝癌最特异性标志物,癌胚抗原(CEA)是广谱肿瘤标志物,存在于胃癌、乳腺癌、肺癌及胰腺癌等肿瘤患者血清中;肿瘤相关抗原(tumor-associated antigens),如CA125、CA19-9;酶类,如乳酸脱氢酶和前列腺酸性磷酸酶;激素类如降钙素、促肾上腺皮质激素等,此外,原癌基因、抑癌基因及其产物也被越来越广泛作为肿瘤标志物^[22]。目前,纳米技术与肿瘤标志物相结合是纳米医学中新兴的重要领域,新合成的生物亲和性多功能纳米荧光材料具有独特的光学性质,能在活体内或活细胞生理条件下对多种活细胞进行生物标记。通过制备能与肿瘤表面特殊分子结构和基团(-COOH、-OH、-NH₂等)结合的生物纳米材料,利用其专一性的结合和荧光特性,研究各种肿瘤灶检测,识别肿瘤位点,描绘病变区特征,可以作为一种高效稳定的新型荧光标记物应用于肿瘤的检测和诊断。

各种生物标志物与纳米粒作为良好的光学对比剂被广泛应用,为光学分子影像学肿瘤诊断助一臂之力。Li等^[23]基于量子点及电化学发光原理检测一种肿瘤特异性标志物癌胚抗原。在纳米多孔金膜修饰电极上,将量子点CdS标记到双抗夹心免疫复合物上,目标抗原与量子点一一对应关系,通过免疫反应形成的复合物对量子点膜的电化学发光信号产生不同程度的猝灭作用,从而实现癌胚抗原的定量分析检测,提高检测灵敏度。Wang等^[24]设计一种基于金属-有机酶复合纳米材料标记的电致化学发光(ECL)免疫传感器,使用夹心免疫分析模式,实现对人体血清中CA125肿瘤标志物的测定。该方法将金属与有机酶的协同催化作用,应用到ECL信号放大中,提高了免疫分析,为临床检测肿瘤标志物提供有效方法。Singh等^[25]通过热分散胶体方法合成了可控的多功能磁性镍掺杂的近红外量子点(MNIR-QDs)应用于研究肺癌细胞的靶向性,叶酸做特异性配体,聚乙二醇修饰量子点(FA-PEG-MNIR-QDs)成功地证明荧光量子点实现借助肿瘤表面受体相关标志物对单一肿瘤细胞准确的量化。

2.2 纳米药物活体靶向传递示踪及体内动力学分布特征

纳米靶向载体是一类有高分子材料制成的粒径为纳米级的载体,其表面经过功能化修饰后具有靶向作用。纳米药物靶向示踪是将药物连接到纳米载体系统后运送到组织或特异细胞内或者将药物包埋到纳米粒子中被动地到达靶器官,如通过肿瘤组织透过性增强及滞留(ERP)效应被动到达肿瘤组织,借助体外光学成像系统,实时在体监测体内分布的动态过程,对同一组实验对象在不同时间点进行记录,还可获得深层组织器官(心、肝、脾、肺、肾、膀胱等)的高分辨率图像。此外,某些纳米颗粒不仅可以作为靶向药物的载体材料,在光学生物治疗方面也有应用。光动力学治疗(PDT)是一种新兴的治疗肿瘤的方法,利用肿瘤组织对光敏剂药物的选择性摄入,在光照作用下引起肿瘤细胞内包括蛋白质、酶和核酸等生物大分子的变性进而选择性的杀死肿瘤细胞。PDT通过高能量光激发光敏剂释放出细胞毒素活性氧(ROS)杀死肿瘤细胞,980 nm光能有较高的穿透深度,激发的上转换纳米粒子被应用在深层组织中肿瘤细胞的光动力治疗。光动力学治疗还可以与其他治疗手段相结合,以彻底消灭残留的肿瘤细胞,减少复发机会,提高存活率,这些研究对实现肿瘤的早期诊断和治疗都具有极大的推动作用。

Chien等^[26]首次利用近红外光控的上转换纳米笼研究体内外靶向性,生物成像和化学治疗。将被光照的药物分子释放到笼子里,用二氧化硅包裹NaYF₄:Yb,Tm笼状上转换纳米粒作为近红外触发靶点和药物传递系统,PEG和抗肿瘤药物多柔比星DOX共价连接在纳米表面,成功地应用于体内外近红外光靶向性,细胞成像,对于化疗作用,多柔比星的巯基与纳米粒子连接,形成的二硫键可以被细胞里的溶酶体酶裂解,进而药物释放出来,这种上转换纳米粒子笼可以提高药物的靶向性,减少化疗中的不良反应。Liu研究小组^[27]利用AEP包裹NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺上转换纳米粒子,通过共价偶联的方法将光敏剂玫瑰红(RB)、叶酸以及PEG修饰到纳米粒子表面,得到功能化的纳米粒子,同时具有肿瘤靶向和标记功能。用近红外光激发,在540 nm用于光动力学治疗,650 nm下用于光学诊断,然后用JAR细胞系对这种多功能上转换复合

纳米平台的靶向标记,光动力学细胞杀伤作用进行研究。

本课题组利用一种聚合物分子 FASOC 将光敏剂分子锌酞青 (ZnPc) 装载到 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 上转换纳米粒子表面,叶酸作为配体,实现对肿瘤细胞的标记,上转换的 650 nm 发射光用来实现光动力治疗,而 540 nm 发射光可以实现成像,上转换产生的活性氧自由基与单线态氧都具有很高的细胞毒作用,能够诱导肿瘤细胞凋亡或坏死,对肿瘤抑制率达到 50% 以上,而可见光激发的光动力学治疗肿瘤抑制率达到 18%,因此也是一种集诊断和治疗一体化的纳米平台^[28]。上转换纳米粒子已经被应用在发光检测和靶向肿瘤成像等方面,如 DNA 杂化检测,免疫检测,生物亲和性检测等。

Cao 等^[7]设计合成一种近红外探针 ICG-Der-02-cRGDyK 靶向乳腺癌和脑胶质瘤,验证探针的靶向肿瘤能力,通过近红外小动物成像仪 0~24 h 内实时活体观察该分子探针在裸鼠体内主要器官的动态分布情况,进一步考察探针的体内代谢途径。实验结果表明在近红外系统监测显像图和器官动态分布图中发现,水溶性的分子探针主要通过肝肠和肾膀胱两种途径代谢,肝肠和肾膀胱区域有明显的荧光信号,为进一步确定结论,对主要器官进行解剖,肝肠和肾膀胱荧光信号进行 ROI 分析也验证此结论。Shan 等^[29]采用化学修饰法共价偶联腺病毒衣壳蛋白的活性位点,成功制备双重靶向叶酸-腺病毒-近红外探针 (FA-Ad-ICG02),叶酸-腺病毒-丁二酸酐-紫杉醇 (FA-Ad-Suc-PTX),此方法彻底解决紫杉醇水溶性差和无靶向问题,在近红外活体成像系统下实时在位监测 FA-Ad-ICG02 探针在体内动态分布,体内和体外实验证明化学法修饰腺病毒衣壳蛋白虽不能改变其在体内的代谢途径,但能改变腺病毒在机体中代谢动力学,减少在肝部聚集的时间,此方法对研究药物在体内代谢途径及靶向性治疗提供一个重要的补充。

2.3 肿瘤生物学研究

2.3.1 细胞凋亡

应用生物发光的荧光素酶基因可用于观察活体动物体内细胞凋亡现象。细胞色素 C 作为一种信号物质在细胞凋亡中发挥重要的作用。Mahani 等^[30]应用荧光素酶生物发光成像借助 Apaf-1 分子和凋亡体形成的复合物检测细胞早期阶段凋亡。荧光素酶的 N 端片段和 C 端片段与

Apaf-1 的 N 末端融合,然后将其和多柔比星共同转染到 HEK 细胞中诱导细胞凋亡。24 h 观测生物发光活动进而监测细胞死亡情况。实验结果显示与对照组相比,4 h 后出现明显的荧光信号,可证明细胞开始出现程序性死亡。

Caspase 3 在凋亡的早期阶段被激活,常被用作早期细胞凋亡的指标。Boeneman 等^[31]用荧光蛋白修饰的量子点荧光探针监测 caspase 3 蛋白水解活动。用来表达 N 末端 caspase 3 分解位点的 mCherry 红色荧光蛋白自组装修饰在量子点表面,caspase 3 酶可以特异性地分解量子点-复合物 (QD-mCherry) 上的 mCherry 连接序列,改变与量子点的能量转移关系,进而定量地监测蛋白酶水解活动。

2.3.2 血管生成

肿瘤生长依赖于血管生成,因此,光学分子影像学在分子与基因水平研究各种肿瘤生物学性状及抗肿瘤治疗成为热点。使用特异性荧光探针直接或间接标记对肿瘤血管生成起调控作用的一系列分子,可实时可视化监测肿瘤血管生成情况。Li 等^[32]利用 Ag_2S 量子点,延长体内循环时间,具有高稳定性,设计一种新型荧光探针 (NIR-II, 1 000~1 350 nm) 可实时可视化监测体内的淋巴结成像和肿瘤血管生成。此外,该荧光探针具有超高的空间分辨率(约 40 μm),可用来通过介导体内微小肿瘤来跟踪血管生成。研究结果表明 Ag_2S 量子点荧光探针在外科手术治疗,如淋巴结解剖、评价组织器官血流供应和抗血管生成药物筛选等方面有广阔前景。Terada 等^[33]将量子点注入小鼠肾和脾脏内,可视化观察微血管的血流量。在 2 s 后,量子点主要分布在肾小球毛细血管,5 s 时可扩散到毛细血管周围。还有研究者利用多功能纳米级造影剂用于干细胞成像,监测追踪新生血管的生成过程^[34],这些借助量子点荧光探针的成像技术具有更高的灵敏度和识别精度。

2.3.3 肿瘤转移

恶性肿瘤的转移是大多数肿瘤患者治疗失败和死亡的主要原因之一。通过建立人类肿瘤模型,可在体研究肿瘤的转移机制,光学分子影像学技术已成为动物模型活体成像最有效的方法。研究人员基于 GFP 在体荧光成像可揭示肿瘤发生发展的细胞和分子机制,非侵入性在体评价抗肿瘤药物疗效。GFP 及其衍生物也可用来标记目的基因的表达情况,从而对目的基因和肿瘤生长、侵袭

和转移能力之间的关系进行动态和可视化观察。

Hillen 等^[34]建立了标记有 GFP 的 Tie2 转基因 (Tie2-GFP) 移植裸鼠模型研究血管生物学性质,特别应用于肿瘤血管成像及抗肿瘤药物的研究。不同于血管内皮细胞,由于肿瘤细胞的可塑性,有助于形成肿瘤的循环系统,该研究可以用活体显微鉴定血液存在的结构,这些标记 Tie2-GFP 肉瘤小鼠中,在普通血管和非荧光标记的肿瘤细胞血管通道可观测血管动力学影响,这些结果显示 GFP 作为荧光标记分子靶向标记物。Suetsugu 等^[35]利用乳腺癌裸鼠模型,观察了 GFP 标记 CD63 抗体成像,研究异物从细胞转移到新的基质上的转移过程,进一步证明利用 GFP 荧光成像可以研究肿瘤的转移机制。

3 结语与展望

过去的十年中,光学分子影像学取得了巨大进展,许多新技术、造影剂、报告分子已成功地应用于肿瘤研究和临床试验。这些技术的发展依赖于生物、化学、物理和工程学等多交叉学科的发展,此外,纳米技术和计算机也推动了分子影像技术的革新。新成像系统和成像探针的商业化及实用性也有助于新技术的推广。分子影像学技术应用于药物研究中,已经成为一种强大而有效的工具,但目前仍存在一定的不足:①不同探针的光波长范围有限,不能满足所有的检测要求,且由于光吸收和散射的影响,光学分子影像设备并不能分辨活体内任何深度的细胞活动;②光学分子探针缺乏特异性,探针与特异性配体、蛋白等通过化学方法结合而成,需要能够与细胞表面特异靶点特异性结合;③荧光探针的开发,研发高度灵敏性和特异性的多重荧光探针,进行多通道荧光成像是未来检测趋势。解决好上述这些问题,能够促进非放射性的影像技术在临床中的应用以及在药物研发领域有更广泛的应用前景。

参考文献

[1] Rudin M, Weissleder R. Molecular imaging in drug discovery and development[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003(2): 123 - 131.
 [2] Weissleder R, Pittet M J. Imaging in the era of molecular oncology[J]. *Nature*, 2008, **452**(7 187): 580 - 589.
 [3] Weissleder R. Molecular imaging in cancer[J]. *Science*, 2006, **312**(3): 1 168 - 1 171.

[4] Achilefu S. Introduction to concepts and strategies for molecular imaging[J]. *Chem Rev*, 2010, **110**(5): 2 575 - 2 578.
 [5] Beuthan J, Mahnke C, Netz U, et al. Optical molecular imaging: overview and technological aspects[J]. *Laser Appl Med*, 2002, **17**(1): 25 - 30.
 [6] Fei XN, Gu YC. Progress in modifications and applications of fluorescent dye probe[J]. *Prog Nat Sci*, 2009, **19**(1): 1 - 7.
 [7] Nishimura Y, Yata K, Nomoto T, et al. Identification of a novel indoline derivative for *in vivo* fluorescent imaging of blood-brain barrier disruption in animal models[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2013, **4**(8): 1 183 - 1 193.
 [8] Cao J, Wan SN, Tian JM, et al. Fast clearing RGD-based near-infrared fluorescent probes for *in vivo* tumor diagnosis[J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2012, **7**(4): 390 - 402.
 [9] Guo J, Du CL, Shan LL, et al. Comparison of near-infrared fluorescent deoxyglucose probes with different dyes for tumor diagnosis *in vivo*[J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2012, **7**(3): 289 - 301.
 [10] Ag D, Bongartz R, Dogan LE, et al. Biofunctional quantum dots as fluorescence probe for cell-specific targeting[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, **114**: 96 - 103.
 [11] Nurunnabi M, Cho KJ, Choi JS, et al. Targeted near-IR QDs-loaded micelles for cancer therapy and imaging[J]. *Biomaterials*, 2010, **31**(20): 5 436 - 5 444.
 [12] Cassette E, Helle M, Bezdetnaya L, et al. Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, **65**(5): 719 - 731.
 [13] Dong W, Guo L, Wang M, et al. CdTe QDs-based prostate-specific antigen probe for human prostate cancer cell imaging[J]. *J Lumin*, 2009, **129**(9): 926 - 930.
 [14] Liu Y, Chen M, Cao TY, et al. A cyanine-modified nanosystem for *in vivo* upconversion luminescence bioimaging of methylmercury[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(26): 9 869 - 9 876.
 [15] He L, Feng LZ, Cheng L, et al. Multilayer dual-polymer-coated upconversion nanoparticles for multimodal imaging and serum-enhanced gene delivery[J]. *ACS App Mater Interfaces*, 2013, **5**(9): 10 381 - 10 388.
 [16] Peng C, Zheng LF, Chen Q, et al. PEGylated dendrimer-entrapped gold nanoparticles for *in vivo* blood pool and tumor imaging by computed tomography[J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(4): 1 107 - 1 119.
 [17] Larson N, Gormley A, Frazier N, et al. Synergistic enhancement of cancer therapy using a combination of heat shock protein targeted HPMA copolymer-drug conjugates and gold nanorod induced hyperthermia[J]. *J Controlled Release*, 2013, **170**(1): 41 - 50.
 [18] Xue JP, Shan LL, Chen HY, et al. Visual detection of STAT5B gene expression in living cell using the hairpin DNA modified gold[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, **41**(3): 71 - 77.
 [19] Wang YP, Wang JR, Dai WL. Use of GFP to trace the colonization of *Lactococcus lactis* WH-C1 in the gastrointestinal tract of mice[J]. *J Microbiol Methods*, 2011, **86**(3): 390 - 392.

- [20] Aboubaker MH, Sabrie J, Huet M, *et al.* Establishment of stable GFP-tagged *Vibrio aestuarianus* strains for the analysis of bacteria infection dynamics in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Vet Microbiol*, 2013, **164**(3/4):392-398.
- [21] Wang LN, Su WJ, Liu Z, *et al.* CD44 antibody-targeted liposomal nanoparticles for molecular imaging and therapy of hepatocellular carcinoma[J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(20):5107-5114.
- [22] Sturgeon C. Practice guidelines for tumor marker use in the clinic [J]. *Clin Chem*, 2002, **48**(8):1151-1159.
- [23] Li XY, Wang RY, Zhang XL. Electrochemiluminescence immunoassay at nanoporous gold leaf electrode and using CdTe quantum dots as labels[J]. *Microchim Acta*, 2011, **172**(2):285-290.
- [24] Wang GJ, Qing Y, Shan JL, *et al.* Cation-exchange antibody labeling for simultaneous electrochemical detection of tumor markers CA15-3 and CA19-9[J]. *Microchim Acta*, 2013, **180**(4):651-657.
- [25] Singh N, Charan S, Sanjiv K, *et al.* Synthesis of tunable and multi-functional Ni-doped near-infrared QDs for cancer cell targeting and cellular sortin. [J]. *Bioconjug Chem*, 2012, **23**(3):421-430.
- [26] Chien YH, Chou YL, Wang SW, *et al.* Near-infrared light photocontrolled targeting, bioimaging and chemotherapy with caged upconversion nanoparticles *in vitro* and *in vivo*[J]. *ACS Nano*, 2013, **7**(10):8516-8528.
- [27] Liu K, Liu XM, Zeng QH, *et al.* Covalently assembled NIR nano-platform for simultaneous fluorescence imaging and photodynamic therapy of cancer cell [J]. *ACS Nano*, 2012, **6**(5):4054-4062.
- [28] Cui SS, Yin DY, Chen YQ, *et al.* *In vivo* targeted deep-tissue photodynamic therapy based on near-infrared light triggered upconversion nanoconstruct[J]. *ACS Nano*, 2013, **7**(1):676-688.
- [29] Shan LL, Xue JP, Guo J, *et al.* Improved targeting of ligand-modified adenovirus as a new near infrared fluorescence tumor imaging probe[J]. *Bioconjug Chem*, 2011, **22**(4):567-581.
- [30] Torkzadeh-Mahani M, Ataei F, Nikkiah M, *et al.* Design and development of a whole cell luminescent biosensor for detection of early-stage apoptosis[J]. *Bios Bioelectron*, 2012, **38**(1):362-368.
- [31] Boeneman K, Mei BC, Dennis AM, *et al.* Sensing caspase-3 activity with quantum dot-fluorescent protein assemblies[J]. *J Am Chem Soc*, 2009, **131**(11):3828-3829.
- [32] Li CY, Zhang YJ, Wang M, *et al.* *In vivo* real-time visualization of tissue blood flow and angiogenesis using Ag₂S quantum dots in the NIR-II window[J]. *Biomaterials*, 2014, **35**(1):393-400.
- [33] Terada N, Saitoh Y, Saitoh S, *et al.* Visualization of microvascular blood flow in mouse kidney and spleen by quantum dot injection with "in vivo cryotechnique" [J]. *Microvasc Res*, 2010, **80**(3):491-498.
- [34] Femke H, Eric LK, Karolien C, *et al.* A transgenic Tie2-GFP Mathymic mouse model; a tool for vascular biology in xenograft tumors[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **368**(2):364-367.
- [35] Suetsugu A, Honma K, Saji S, *et al.* Imaging exosome transfer from breast cancer cells to stroma at metastatic sites in orthotopic nude-mouse models[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, **65**(3):383-390.

· 校园信息 ·

中国药科大学两项科技成果喜获教育部科技奖励

日前,教育部发布《关于2013年度高等学校科学研究优秀成果奖(科学技术)奖励的决定》(教技发〔2014〕1号),中国药科大学主持的两项科技成果分别荣获一等奖和二等奖。其中,由李萍教授主持的"中药有效成分群发现与质量评价研究"喜获教育部自然科学一等奖;由张陆勇教授主持的"新药筛选核心技术规范化平台建设及其科学应用"荣获教育部科技进步二等奖。

高等学校科学研究优秀成果奖(科学技术)是教育部为调动高校教师和科技工作者进行科技创新、自主创新和推动科技进步的积极性,加速我国教育和科学技术事业发展,根据《国家科学技术奖励条例》,结合高等学校实际情况设立的。该奖项分为高等学校自然科学奖、高等学校技术发明奖、高等学校科学技术进步奖和高等学校专利奖四个类别。2013年,共奖励一等奖117项,其中自然科学奖42项、技术发明奖28项、科技进步奖47项。

(孙立冰)