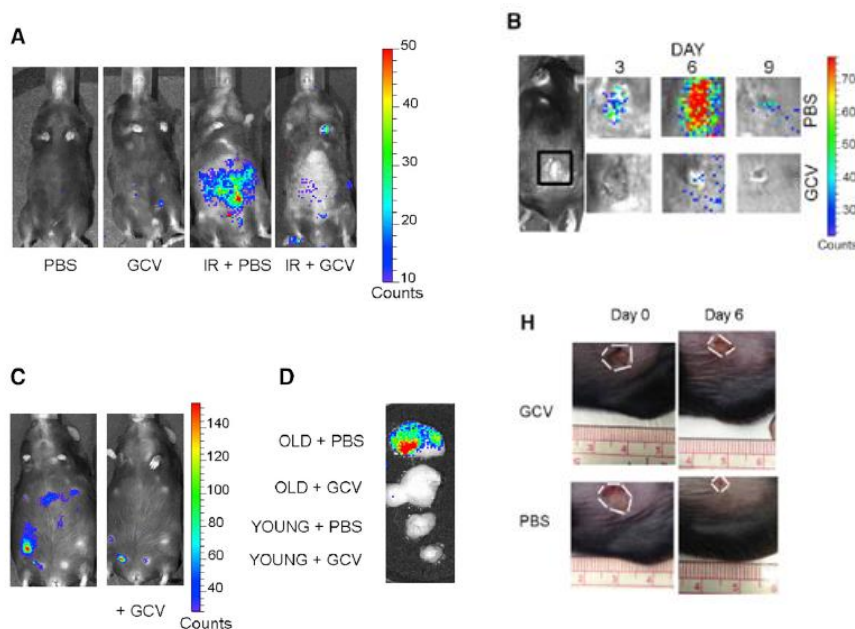


小动物活体光学成像技术在皮肤创伤研究中的应用

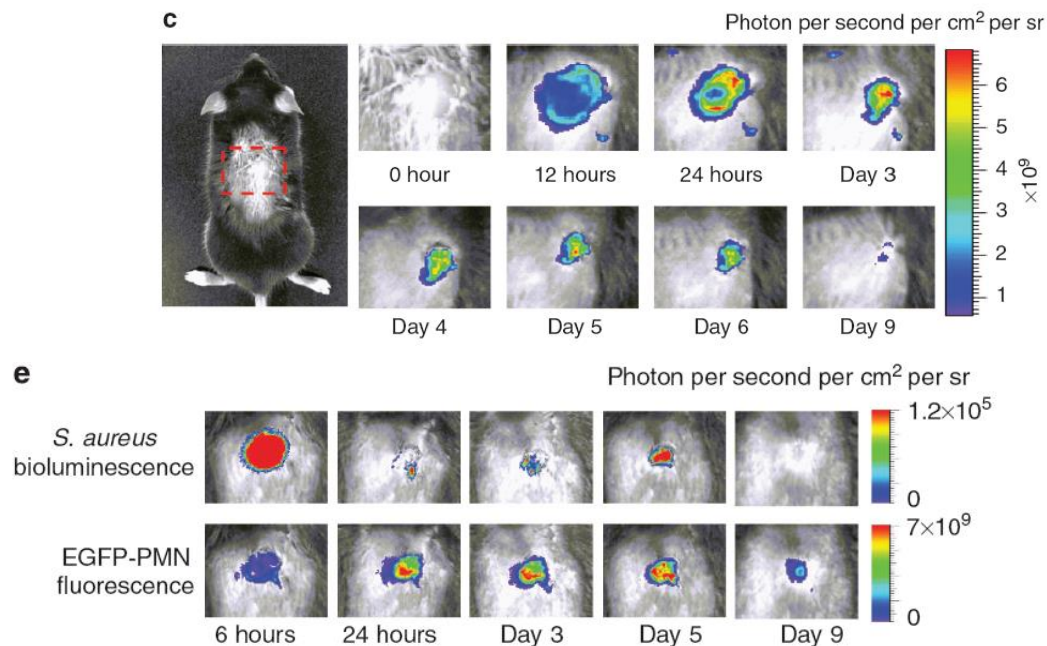
Revvity小动物活体光学成像技术已在生命科学基础研究、临床前医学研究及药物研发等领域得到广泛应用。在众多应用领域中，皮肤创伤是近年来活体光学成像技术的应用热点之一。小动物光学成像技术可对烧伤领域的研究起到重要的作用，促进该领域研究的进展。利用小动物光学成像技术可以研究 1、皮肤创伤发生后愈合的机制；2、创伤伴随的细菌感染的发生和进展及机体自身产生的免疫反应；4、治疗性的干细胞、药物等在体内的靶向、分布、代谢等。下面结合一些具体实例进行阐述：

在包括烧伤在内的皮肤创伤研究中首先通过光学成像系统可观察皮肤受到烧伤等创伤后疾病发展或愈合的机制。例如 Judith Campisi 和他的同事证明，在皮肤创伤中，衰老细胞起到积极的作用，通过分泌血小板衍生生长因子(PDGF-AA)来促进伤口的愈合。在研究中研究人员建立了一种转基因小鼠模型使得衰老细胞在体内可视化(The p16-3MR 小鼠模型，即将包含功海荧光素酶，单节显性 RFP，以及缩短的单纯疱疹病毒 (HSV-1) 胸腺激酶 (HSV-TK) 的 3MR 融合蛋白构建入小鼠 P16IKN4a 基因的启动子下，而 P16IKN4a 在大部分衰老的细胞表达，因此可显示衰老细胞)；利用该小鼠模型可观察皮肤创伤后衰老细胞在创伤部位汇集如下图所示，进而可研究衰老细胞参与皮肤愈合的机制。



上图.检测转基因小鼠的特点。A.对照或 X 射线照射 (IR) 的 p16-3MR 小鼠，连续 5 天腹腔注射 PBS 或 25 mg/kg of GCV，在注射底物腔肠素后进行成像，可以看到正常的 p16-3MR 小鼠未检测到发光的信号，而经 X 射线诱导衰老后，P16-3MR 开始表达，而 GCV (丙氧鸟苷) 对细胞有杀伤作用。B.小鼠皮肤创伤后，腹腔注射底物腔肠素进行成像和定量分析，提示在两天后检测到发光的信号，在第 6 天时达到峰值。H.P16-3MR 小鼠伤口的图像。Marco Demaria,*et al*.*Developmental Cell* 2014,31: 722–733.

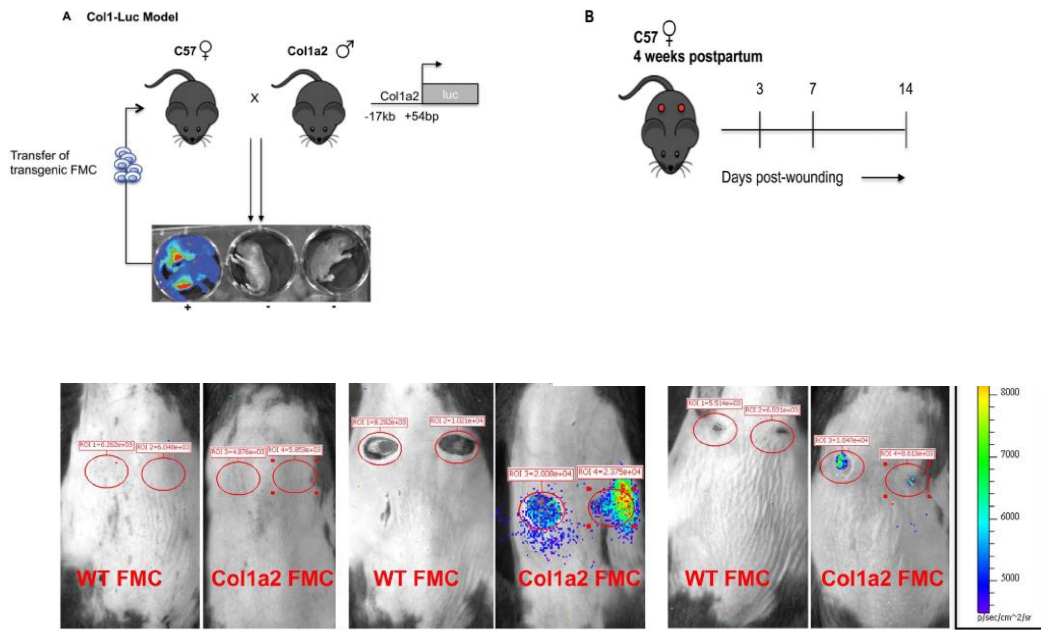
在大面积烧伤或其他皮肤创伤发生时，往往伴随感染，而感染也成为烧伤患者致死的重要原因。利用小动物光学成像系统，可无创的实时检测烧伤引起的感染程度，分析细菌在伤口的生长，对感染程度作出判断，同样也可以检测体内免疫系统对感染的反应，研究机体抵御感染的作用机制。例如 Min-Ho Kim 就利用小动物光学成像系统检测了小鼠皮肤创伤时嗜中性粒细胞在伤口的分布及金黄色葡萄球菌在创口的增殖情况。在研究中，Min-Ho Kim 利用增强型绿色荧光蛋白标记嗜中性粒细胞的转基因小鼠（lys-EGFP mice）和荧光素酶标记的金黄色葡萄球菌，分别利用荧光和生物发光成像即可检测在小鼠体内嗜中性粒细胞和金黄色葡萄球菌的时空分布。



上图.上：嗜中性粒细胞在伤口愈合过程中对伤口的浸润；下：粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和金黄色葡萄球菌注射后增加系统嗜中性粒细胞的量和在伤口的分布，但是并未增加伤口的愈合时间，图中生物发光显示金黄色葡萄球菌的分布，荧光成像显示嗜中性粒细胞的时空分布。

Min-Ho Kim, et al. Journal of Investigative Dermatology (2008), 128:1812-1822

同样利用小动物光学成像系统可以对烧伤等皮肤创伤的治疗方法进行评价，如评价治疗性干细胞或相关药物的分布靶向及代谢情况，从而对治疗机制和效果做出准确的判断。其中 Elke Seppanen 就利用 IVIS 光学成像技术观察了皮肤发生创伤时，分泌胶原蛋白的胎儿微嵌合体细胞（fetal microchimeric cells, FMC）在创伤部位的分布，并证明了在创伤发生后分泌胶原蛋白的细胞对创口的治疗作用，从而研究干细胞的治疗效果及存进伤口愈合的机制（如下图所示）。并且 Revvity 的 IVIS 成像技术在药物研发中应用已经非常成熟，全球各大制药企业均已采用活体光学成像技术开展多种新药的研发，其中已有 6 种药物获得 FDA 认证，另有 8 种药物处于临床测试阶段。另外，Revvity 的 IVIS 光学成像系统是唯一受 FDA 认可的系统。



上图.上排：小鼠I型胶原a2 (col1a2) 微嵌合模型的建立。(A)繁殖策略，野生型雌性小鼠与半合子col1a2 转基因雄性小鼠（该小鼠在表达col1a2细胞中表达荧光素酶）交配，此方式可得到50% 的后代和因怀孕获得的永久表达荧光素酶基因的胎儿微嵌合体细胞（FMC）即实验组；野生型雌性，即与野生型的雄性进行交配作为对照。(B) 创伤模型：在产后大出血的雌性小鼠身上建立背部切割创伤，在创伤后0到7天连续进行生物发光成像。下排：产生胶原的FMC在伤口起始的第一天就被招募到母体皮肤创口处。

此外在烧伤或其他皮肤创伤发生后，损伤组织立即发生变性、渗出等一系列反应，同时产生炎症反应和血管内皮细胞损害，烧伤后的炎症反应属于急性炎症反应。利用 Revvity 的荧光探针即可检测烧伤发生或愈合过程中，炎症的发生和发展。

Revvity除提供专业的成像设备外，还具备专业的生物学研发团队，在生物学模型建立及应用方面提供强大支持。生物发光方面，几十种稳定的生物发光肿瘤细胞株，生物发光细菌菌株，以及优质的生物发光底物荧光素；荧光成像方面，具有几十种功能性荧光试剂（包括酶激活类、特异靶向类、血管生理类），可满足癌症、炎症、心血管疾病、代谢疾病、传染病等多种领域的应用需求，方便研究者直接开展上述实验；另外，还提供多种有机荧光染料及纳米颗粒类荧光探针，用于细胞、蛋白、抗体等对象的标记成像。这些生物学产品可以很大程度的提高研究效率，加快发表高水平文章的进程。

IVIS光学成像系统在皮肤创伤研究中代表文献

1. Marco Demaria, Naoko Ohtani, Sameh A. Youssef, Francis Rodier, Wendy Toussaint, James R. Mitchell Remi-Martin Laberge, Jan Vijg, Harry Van Steeg, Martijn E.T. Dolle, Jan H.J. Hoeijmakers, Alain de Bruin, Eiji Hara, and Judith Campisi. An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell* (2014) 31, 722–733.
2. Alphonsus K.S. Chong, MD; Thomas Satterwhite, BS; Hung M. Pham, BS; Melinda A. Costa, MD Jian Luo, PhD; Michael T. Longaker, MD; Tony Wyss-Coray, PhD; James Chang, MD. Live imaging of Smad2/3 signaling in mouse skin wound healing. *Wound Rep Reg* (2007) 15 762–766.
3. Min-Ho Kim, Wei Liu, Dori L. Borjesson, Fitz-Roy E. Curry, Lloyd S. Miller, Ambrose L. Cheung, Fu-Tong Liu, R Rivkah Isseroff² and Scott I. Simon. Dynamics of Neutrophil Infiltration during Cutaneous Wound Healing and Infection Using Fluorescence Imaging. *Journal of Investigative Dermatology* (2008), 128: 1812–1820.
4. Min-Ho Kim, Wei Liu, Dori L. Borjesson, Fitz-Roy E. Curry, Lloyd S. Miller, Ambrose L. Cheung, Fu-Tong Liu², R Rivkah Isseroff² and Scott I. Simon. Dynamics of Neutrophil Infiltration during Cutaneous Wound Healing and Infection Using Fluorescence Imaging. *J Invest Dermatol*. 2008 Jul;128(7):1812-20
5. Yang Liu., Qin Zhou., Yunchuan Wang., Zhengcai Liu., Maolong Dong, Yaojun Wang, Xiao Li, Dahai Hu. Negative Pressure Wound Therapy Decreases Mortality in a Murine Model of Burn-Wound Sepsis Involving *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *PLOS ONE*. February 2014,9(2):90494
6. Nelly A. Kuklin, Gregory D. Pancari, Timothy W. Tobery, Leslie Cope, Jesse Jackson, Charles Gill, Karen Overbye, Kevin P. Francis, Jun Yu, Donna Montgomery, Annaliesa S. Anderson, William McClements, and Kathrin U. Jansen. Real-Time Monitoring of Bacterial Infection In Vivo: Development of Bioluminescent Staphylococcal Foreign-Body and Deep-Thigh-Wound Mouse Infection Models. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Sept. 2003, p2740–2748
7. Chan J, Kumar S, Fisk NM. First trimester embryo-fetosopic and ultrasound-guided fetal blood sampling for ex vivo viral transduction of cultured human fetal mesenchymal stem cells. *Human reproduction (Oxford, England)*. Nov 2008;23(11):2427-2437.
8. Chanda D, Isayeva T, Kumar S, Hensel JA, Sawant A, Ramaswamy G, Siegal GP, Beatty MS, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in prostate cancer bone metastasis. *Clin Cancer Res*. Dec 1 2009;15(23):7175-7185.
9. Chang EI, Bonillas RG, El-Ftesi S, Chang EI, Ceradini DJ, Vial IN, Chan DA, Michaels Jt, Gurtner GC. Tissue engineering using autologous microcirculatory beds as vascularized bioscaffolds. *Faseb J*. Nov 10 2008.
10. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, Houvenaeghel G, Extra JM, Bertucci F, Jacquemier J, Xerri L, Dontu G, Stassi G, Xiao Y, Barsky SH, Birnbaum D, Viens P, Wicha MS. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res*. Jan 1 2010;16(1):45-55.

11. Chen WH, Liu HY, Lo WC, Wu SC, Chi CH, Chang HY, Hsiao SH, Wu CH, Chiu WT, Chen BJ, Deng WP. Intervertebral disc regeneration in an ex vivo culture system using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials*. Oct 2009;30(29):5523-5533.
12. Cheng JC, Kinjo K, Judelson D, Chang J, Wu WS, Schmid I, Shankar DB, Kasahara N, Stripecke R, Bhatia R, Landaw EM, Sakamoto KM. CREB is a critical regulator of normal hematopoiesis and leukemogenesis. *Blood*. Nov 1 2007.
13. Chimenti I, Smith RR, Li TS, Gerstenblith G, Messina E, Giacomello A, Marban E. Relative Roles of Direct Regeneration Versus Paracrine Effects of Human Cardiosphere-Derived Cells Transplanted Into Infarcted Mice. *Circulation research*. Jan 28 2010.