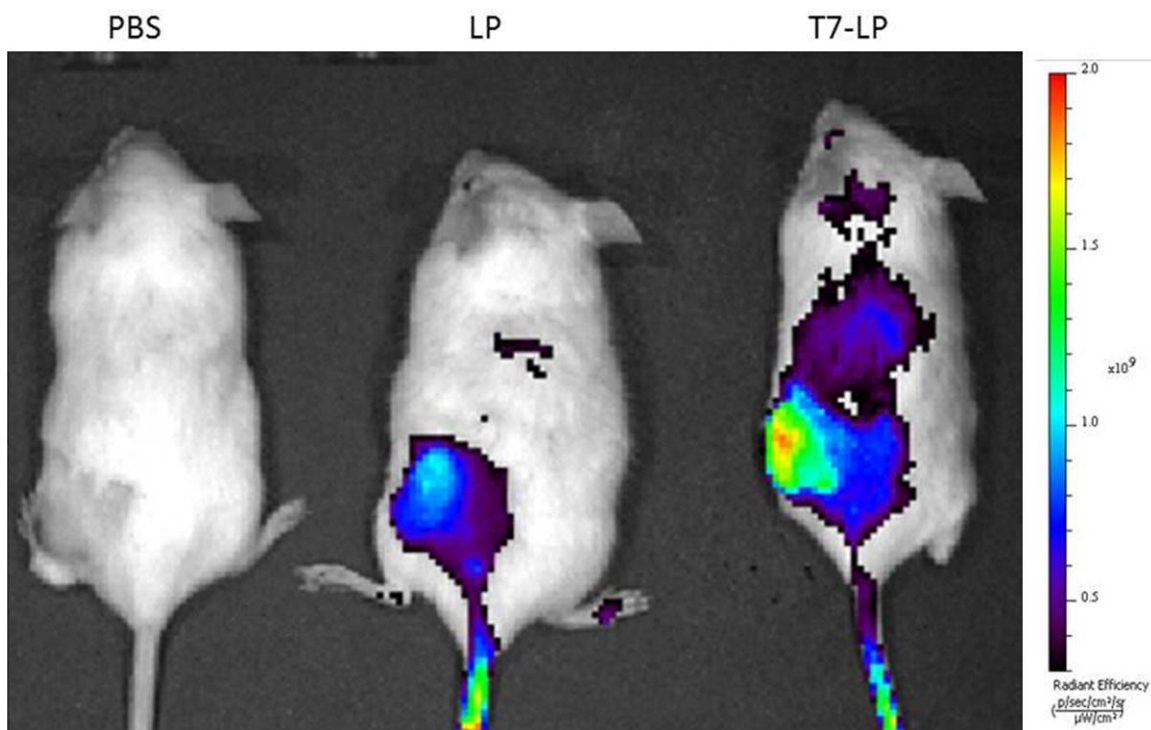


小动物活体光学成像技术在生殖科学中的应用

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了广泛应用，其中生殖科学研究是一个新兴的热点领域。将小动物活体光学成像技术应用于生殖科学研究的主要方向包括：（一）研究生殖相关的肿瘤，如卵巢癌、子宫肌瘤等发展、转移、内在分子生物学机制和药物治疗方法；（二）研究生殖相关的干细胞，如乳腺干细胞、精原干细胞等移植后的存活能力和在体示踪情况；（三）研究生殖相关的移植和排异：如卵巢组织异体移植和存活，或不同冷冻和复苏方法对卵巢组织移植存活的影响；（四）研究药物、材料、食物、环境等对怀孕母体和胎儿的影响以及相关的毒理学评价。下面结合一些实例对相关研究方向和具体方法进行阐述：

（一）生殖相关肿瘤研究

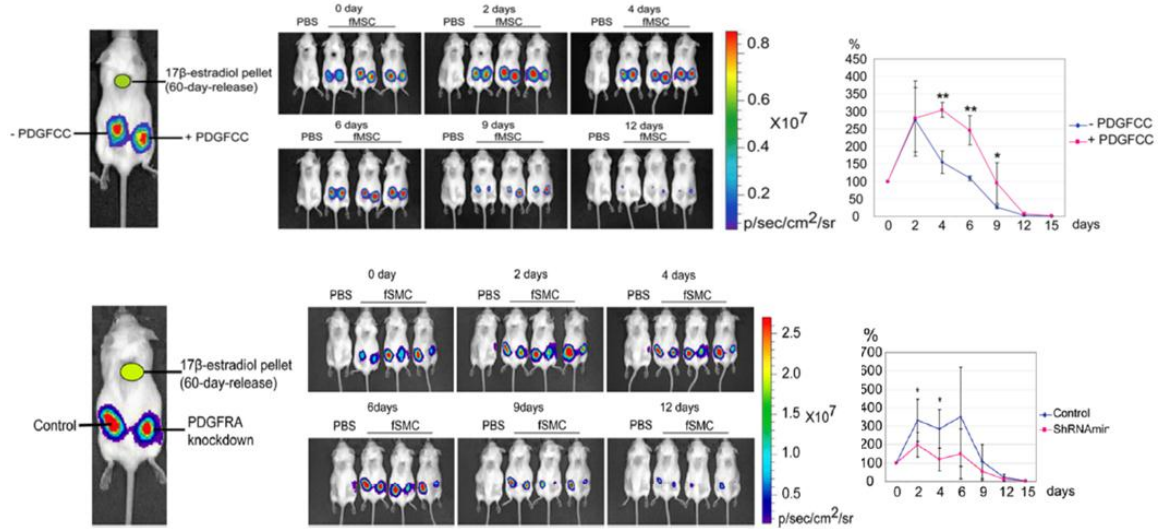
卵巢恶性肿瘤是女性生殖器官常见的恶性肿瘤之一，发病率仅次于宫颈癌和子宫体癌而列居第三位。但卵巢上皮癌死亡率却占各类妇科肿瘤的首位，对女性生命造成了严重威胁，例如 2011 年仅美国就有约 21,880 位女性被诊断出卵巢癌，因此，卵巢癌的早期检测和靶向药物研究意义重大。Wu 等利用小动物活体光学成像技术研究了功能性多肽引导的药物包裹脂质体（Liposome）对卵巢癌的靶向作用：卵巢癌细胞能高表达转铁蛋白（Transferrin receptor, TfR）受体，近年发现的一种新型靶向转铁蛋白受体的 T7 肽（HAIYPRH），对转铁蛋白受体的亲和性与转铁蛋白相当，且 T7 肽在转铁蛋白受体上的结合位点与转铁蛋白不同，不会与转铁蛋白竞争抑制且不影响转铁蛋白本身的生理功能，此外 T7 肽是小分子多肽，具有可化学合成、稳定性好的优点，作为靶头其空间位阻小，临床应用前景好；研究人员在包裹紫杉醇（PTX）的脂质体上锚定 T7 肽，再通过近红外荧光染料 DiR 标记脂质体，尾静脉注射上述脂质体到卵巢癌荷瘤模型小鼠内，未锚定 T7 肽的相应脂质体为对照注射组，通过 IVIS 系统的荧光成像功能，可以对脂质体在小鼠体内的分布和对肿瘤的靶向富集能力进行实时监测，结果显示：相对于对照组，锚定有 T7 肽靶头的脂质体在卵巢癌肿瘤部位能更显著地富集。



图：左：注射 PBS 的小鼠；中：注射 DiR 标记脂质体的小鼠；右：注射 DiR 标记 T7 肽靶头锚定脂质体的小鼠。尾静脉注射的 DiR 标记脂质体会在卵巢癌肿瘤部位富集，T7 肽靶头能显著提高脂质体对肿瘤的靶向和富集作用。

子宫肌瘤（Uterine Fibroids）是女性生殖器官中最常见的一种良性肿瘤，也是人体最常见的肿瘤之一，尽管子宫肌瘤很少恶化，但其往往伴随着各种并发症，在美国每年有超过 200,000 人因为子宫肌瘤而将子宫切除，子宫肌瘤主要是由子宫平滑肌细胞增生而成。血小板衍生生长因子（Platelet-Derived Growth Factor, PDGF）在细胞增殖，存活，迁移，血管生成，组织重构和器官发生中发挥着重要作用，研究显示子宫肌瘤处的血小板衍生生长因子 C（PDGFC）的表达量比周边正常的子宫肌层组织高约 80%，同时，纤维源子宫平滑肌细胞（fSMCs）中的 PDGFC 表达量也高于肌源子宫平滑肌细胞（mSMCs）。Suo 等利用小动物活体光学成像技术对 PDGFC 作用于 fSMCs 的效果进行了研究：研究人员通过慢病毒介导的方式将萤火虫荧光素酶报告基因（luc）导入 fSMCs 细胞内，将发光 fSMCs 细胞分别混入添加了重组型 PDGFCC 二聚体和未添加 PDGFCC 的基质胶（Matrigel plugs）中，上述细胞-基质胶混合物再分别植于免疫缺陷小鼠背部皮下的两侧，之后通过 IVIS 系统对 fSMCs 细胞在小鼠体内的增殖和存活进行长时程的连续观测，结果显示对于未添加 PDGFCC 的 fSMCs 细胞，发光信号在经过第一天信号增强后迅速下降，对于添加 PDGFCC 的 fSMCs 细胞，其发光信号在最初并未显著增强，但在随后 7 天内，发光信号下降的速度相对非常缓慢。此外，研究人员还对 fSMCs 的 PDGFRA (PDGFCC 的受体蛋白) 基因效用进行了研究：通过慢病毒构建发光 fSMCs 细胞后，利用 shRNA 对发光 fSMCs 细胞进行干扰，使得 PDGFRA 基因被 Knock-down，将正常发光 fSMCs 与 PDGFRA 基因 Knock-down 的发光 fSMCs 分别混于基质胶后植于免疫缺陷小鼠背部皮下的两侧，IVIS 系统成像结果显示 PDGFRA 基因 Knock-down 的 fSMCs 细胞增殖能力和存活能力弱于正常

fSMCs 细胞。综上，PDGFCC/PDGFRA 信号通路对纤维源子宫平滑肌细胞的增殖过程起着重要作用，利用 IVIS 小动物活体光学成像系统可以为子宫肌瘤的相关研究发挥积极的作用。



图（上）：PDGFCC 延长了 fSMCs 细胞在小鼠体内的存活时间；图（下）：PDGFRA 基因 Knock-down 的 fSMCs 细胞增殖能力和存活能力弱于正常 fSMCs 细胞。

（二）生殖相关干细胞研究

乳腺干细胞（Mammary stem cells, MaSCs）在乳腺发育尤其是孕期乳腺的发育过程中发挥重要作用，Tiede 等利用流式细胞仪从 FVB/N 生物发光转基因小鼠的乳腺组织中筛选出表达 luciferase 的乳腺干细胞（CD24⁺/CD29^{hi}/GFP⁺/强生物发光信号），将这些发光乳腺干细胞植入 3 周龄雌性小鼠乳腺（预先清除了乳腺内源上皮细胞）中，之后利用 IVIS 活体成像系统对乳腺干细胞在植入后、受孕后（乳腺干细胞植入后 2~3 周时刻人工诱导受孕）、幼崽出生后、哺乳期、断奶后的活跃度进行实时监测和定量比较；生物发光活体成像（*In vivo* BLI）的结果显示：乳腺干细胞的活跃度（生物发光强度）在小鼠怀孕后迅速提升了约 200 倍，在幼崽出生后活跃度又迅速下降，最终活跃度下降到一个与断奶期持平的基线水平；另外，乳腺干细胞的活跃度与母鼠是否哺乳幼崽直接相关，如果将刚出生的幼崽立即从母鼠身边取走，该不哺乳母鼠体内的乳腺干细胞活跃度将比哺乳母鼠更快地下降到一个更低水平。该研究将为研究乳腺的发育和预防乳腺癌发挥积极作用。

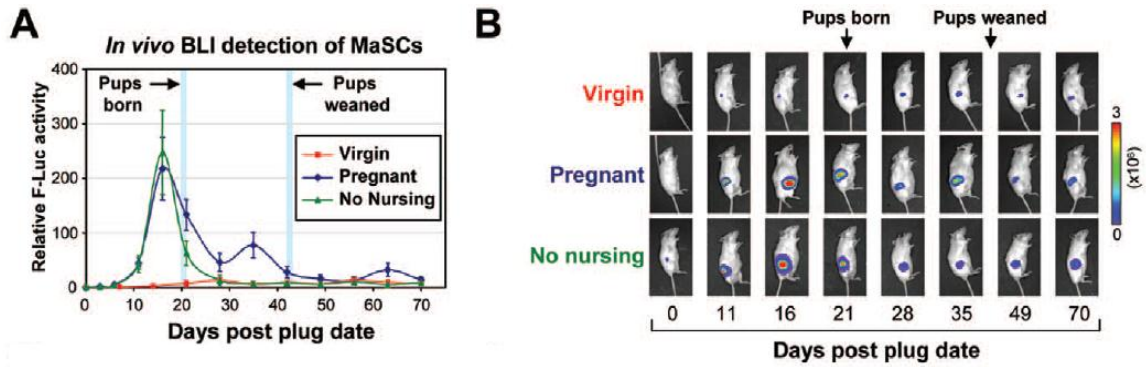
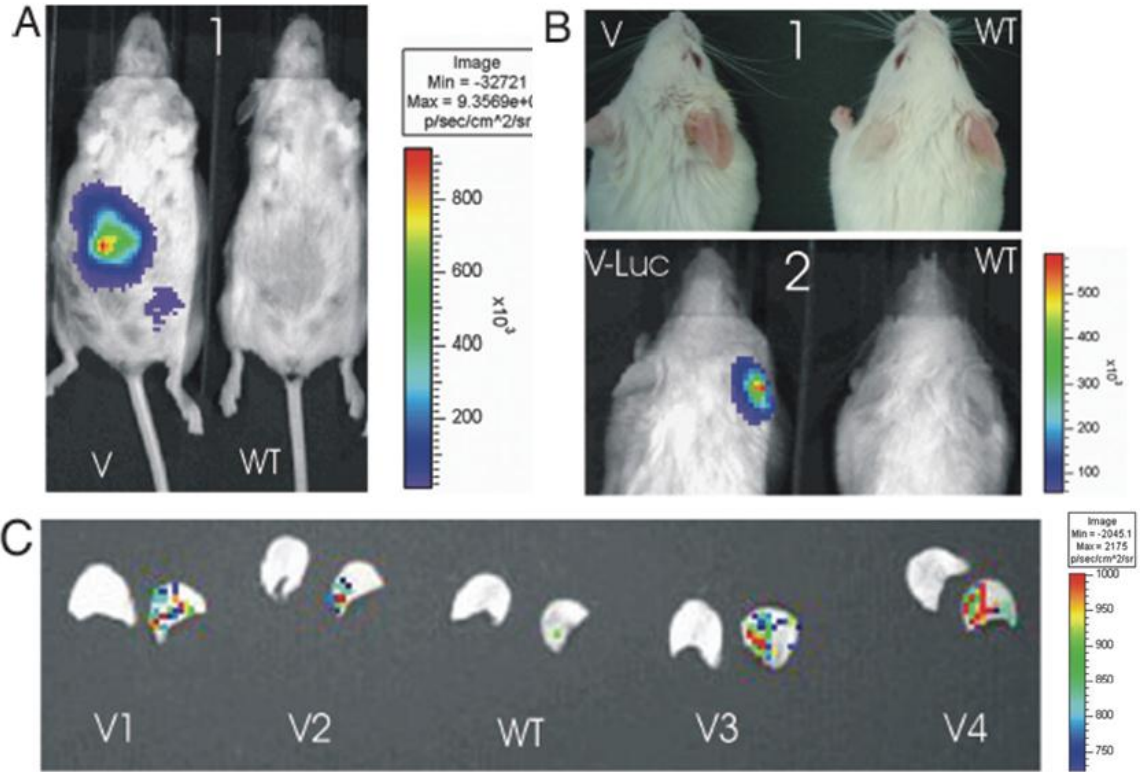


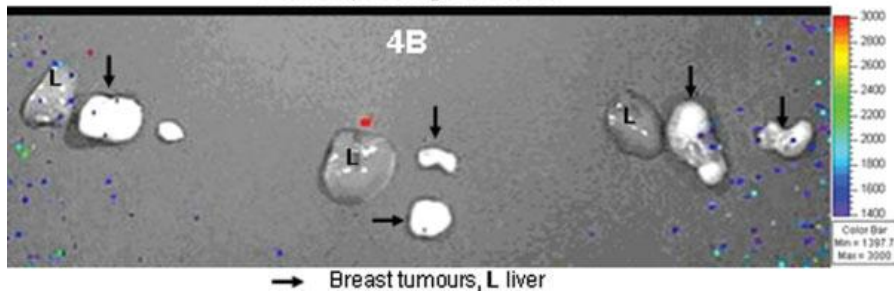
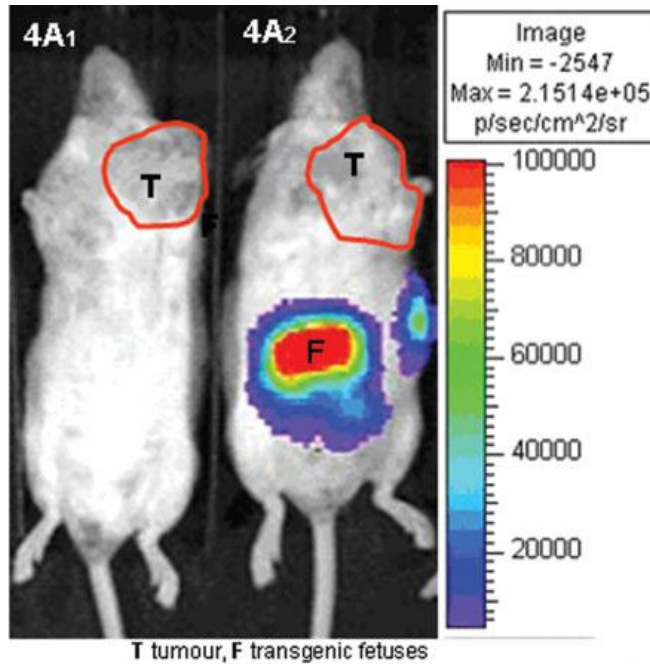
图 A (生物发光结果定量比较) 和图 B (生物发光图像)：乳腺干细胞的活跃度 (生物发光强度) 在小鼠怀孕后迅速提升，幼崽出生后活跃度又迅速下降；乳腺干细胞的活跃度与母鼠是否哺乳幼崽直接相关。

在哺乳动物妊娠期间，母体和胎儿之间会交换 DNA 和细胞，被交换的细胞在母体内仍可能会继续分裂并在母体血液和骨髓中驻留数十年，这种现象被称为胎儿微嵌合体 (Fetal microchimerism)，它对母体来说好坏参半，既有利于促进组织修复和改进免疫系统，但也会导致自体免疫反应。利用小动物活体光学成像技术，研究人员可以对进入母体的胎儿细胞在母体的炎症反应和肿瘤发展过程中发挥的作用进行实时、无损、长时程监测。Huu 等将 FVB/N 野生型雌性小鼠与 V-Luc 转基因雄性小鼠 (VEGFR2 基因与 Luciferase 基因串联表达，细胞发光信号受 VEGFR2 启动子控制) 进行配对受孕，成功受孕后的第三周，使用 IVIS 系统可以在雌鼠胎盘内检测到很强的胎鼠生物发光信号；利用恶唑酮 (Oxazolone) 在孕鼠的右耳诱发接触性超敏反应 (CHS)，CHS 反应后第二天在小鼠右耳病症部位检测到明显的发光信号，而正常左耳无发光信号，这表明胎鼠中表达 VEGFR2 的细胞已进入了母体内，并在相应炎症部位的血管新生过程中发挥作用；将小鼠耳朵取下进行离体生物发光成像观察，结论也与活体成像结果一致。



A: FVB/N-WT 雌性小鼠与 V-Luc 雄性小鼠交配后胎鼠显示强烈生物发光信号；B: 恶唑酮诱发接触性超敏反应后，胎鼠内皮源细胞在其血管新生过程中发挥作用；C: 离体鼠耳成像显示炎症病灶处有显著的发光信号。

基于同样原理，Dubernard 等研究了胎儿微嵌合体对母鼠孕期乳腺癌的作用：研究人员将一种通过怀孕可诱发乳腺癌的 MMTV-H-Ras 雌性小鼠与 V-Luc 转基因雄性小鼠（VEGFR2 基因与 Luciferase 基因串联表达，发光细胞为血管内皮细胞源，表达 VEGFR2 蛋白）进行配对受孕，成功受孕后的部分母鼠罹患乳腺癌，使用 IVIS 系统检测到受孕后第 13 天时刻，雌鼠子宫内的胎鼠表达出强烈的生物发光信号，但在乳腺癌肿瘤部位并没有检测到发光信号，为避免组织的光吸收干扰，研究人员将肿瘤和肝脏取出进行离体生物发光成像观察，同样显示肿瘤部位没有发光信号；但是，通过 FISH 实验和免疫组化实验，研究人员在肿瘤内发现了表达 Cytokeratin（角蛋白）的胎鼠细胞；以上结果显示：表达角蛋白的上皮细胞源胎鼠细胞在母鼠孕期乳腺癌肿瘤部位有所富集并发挥一定作用，而血管内皮细胞源的胎鼠细胞在相应母鼠肿瘤部位并不发挥作用。



图（上）：与左侧未受孕小鼠相比，右侧怀孕雌鼠子宫内的胎鼠表达出强烈的生物发光信号，肿瘤部位均无发光信号；图（下）：离体生物发光成像显示肿瘤和肝脏内均无发光信号。

（三）生殖相关移植研究

随着癌症发病低龄化现象的日益严重，越来越多年轻女性在没有生育前就必须接受各种放疗或化疗的抗肿瘤治疗，然而卵巢对放化疗药物相当敏感，在治疗肿瘤的同时卵巢可能发生不可逆损伤，甚至导致卵巢早衰，丧失生殖和内分泌功能。因此，对这些患者的卵巢组织进行冷冻保存，在适当时候（如肿瘤治愈后）再植回体内（自体或异体），可在一定程度上恢复其生殖及内分泌能力，改善其生活质量；目前，如何对卵巢组织移植后的活力、异体移植免疫排斥、不同冷冻方式的效果等进行评价成为研究热点，小动物活体光学成像技术由于其直观性、灵敏度高、无损、可连续长期监测等优势，已被广泛应用于该领域的相关研究中。Chen 等使用 IVIS 系统对卵巢组织在同系移植（Isograft，指遗传基因完全相同的异体间移植，例如同卵双生间移植和同种纯系动物间的移植）和同种移植（Allograft，又称同种异体移植，是指同种不同基因型个体之间的移植）后的活力进行了评价研究：研究人员从 FVB/N-Tg(PoIII-Luc)小鼠（RNA 聚合酶 II 基因与萤火虫荧光素酶基因串联表达的全身生物发光转基因小鼠）体内提取发光标记的卵巢组织，之后将卵巢组织分别移植入预先切除双侧卵巢组织的同系 FVB 小鼠（包括 CsA 处理组和非处理组；

CsA: Cyclosporin A / 环孢菌素 A，是一种常用的免疫抑制剂，可用于一些免疫性疾病的治疗）、同种（异系）BALB/c 小鼠（包括 CsA 处理组和非处理组）和免疫缺陷 NOD SCID 小鼠的单侧肾小囊内，然后使用 IVIS 系统对移植卵巢组织的发光强度进行长时间连续监测，通过发光强度的变化来评价移植后卵巢组织的活力；结果显示：同系 FVB 小鼠体内的卵巢组织活力要优于同种 BALB/c 小鼠体内的卵巢组织活力，NOD SCID 小鼠由于缺乏免疫力，其移植后的卵巢存活活力也与同系 FVB 小鼠相当，而 CsA 处理（治疗）对于同种移植过程中的急性免疫排斥无明显改善作用。

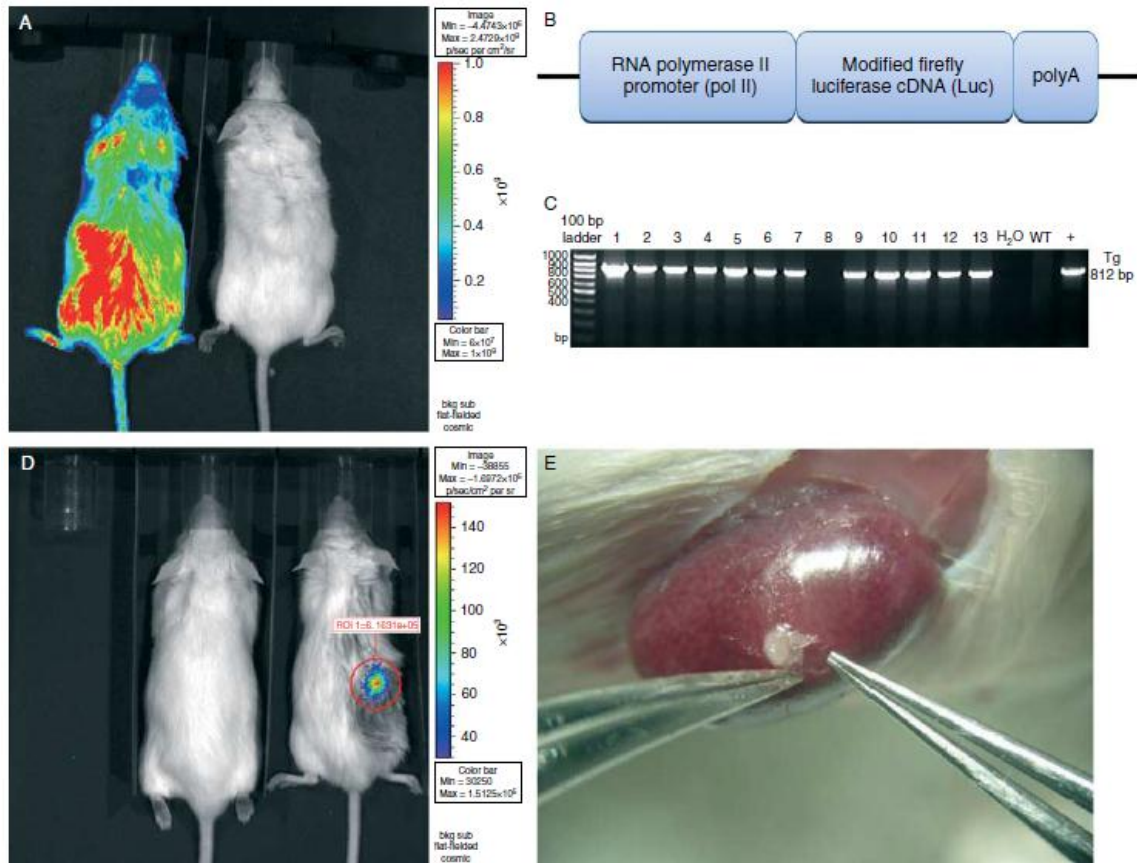


图 A: 左侧为 FVB/N-Tg(PolII-Luc)小鼠，右侧为 FVB/N 野生型小鼠；图 B 和 C: RNA 聚合酶 II 与萤火虫荧光素酶基因 (Luc) 串联表达，使用 PCR 对上述基因表达进行检测和验证；图 D: 右侧为肾小囊内移植了发光卵巢组织的小鼠，左侧为未移植卵巢组织小鼠；图 E: 向肾小囊内植入发光卵巢组织的手术过程。

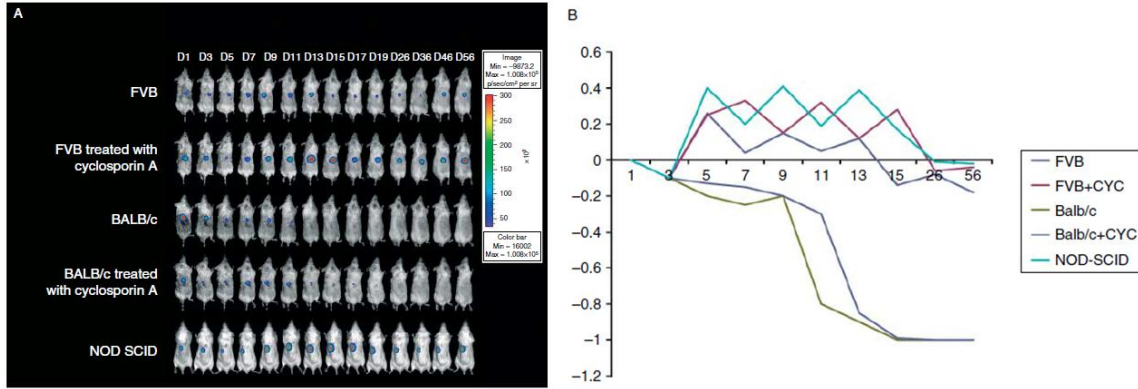


图 A: 使用 IVIS 系统对卵巢移植后卵巢组织活力进行监测和评价; 图 B: 定量结果显示同系 FVB 小鼠体内的卵巢组织活力要优于同种 BALB/c 小鼠体内的卵巢组织活力, NOD SCID 小鼠体内卵巢组织活力与同系 FVB 移植小鼠相当, CsA 治疗对于同种移植过程中的急性免疫排斥无明显改善作用。

Chen 等还在另一项研究中比较了新鲜卵巢组织和慢速冷冻复苏后卵巢组织在同系移植后活力的差别: 先从 FVB/N-Tg(PolIII-Luc)小鼠体内提取发光标记的卵巢组织, 之后将卵巢组织进行程序化慢速冷冻, 再次复苏后植入同系 FVB/N 野生型小鼠的背部肌肉下, 另一组 FVB/N 野生型对照小鼠背部肌肉下植入新鲜未被冻融的发光卵巢组织, 之后使用 IVIS 系统比较两组小鼠体内卵巢组织的发光强度, 结果显示: 经过慢速冷冻/复苏的卵巢组织的发光强度(活力)要显著低于新鲜卵巢组织, 即卵巢组织在慢速冷冻过程中的冷冻损伤和缺血会影响其移植后的活力。

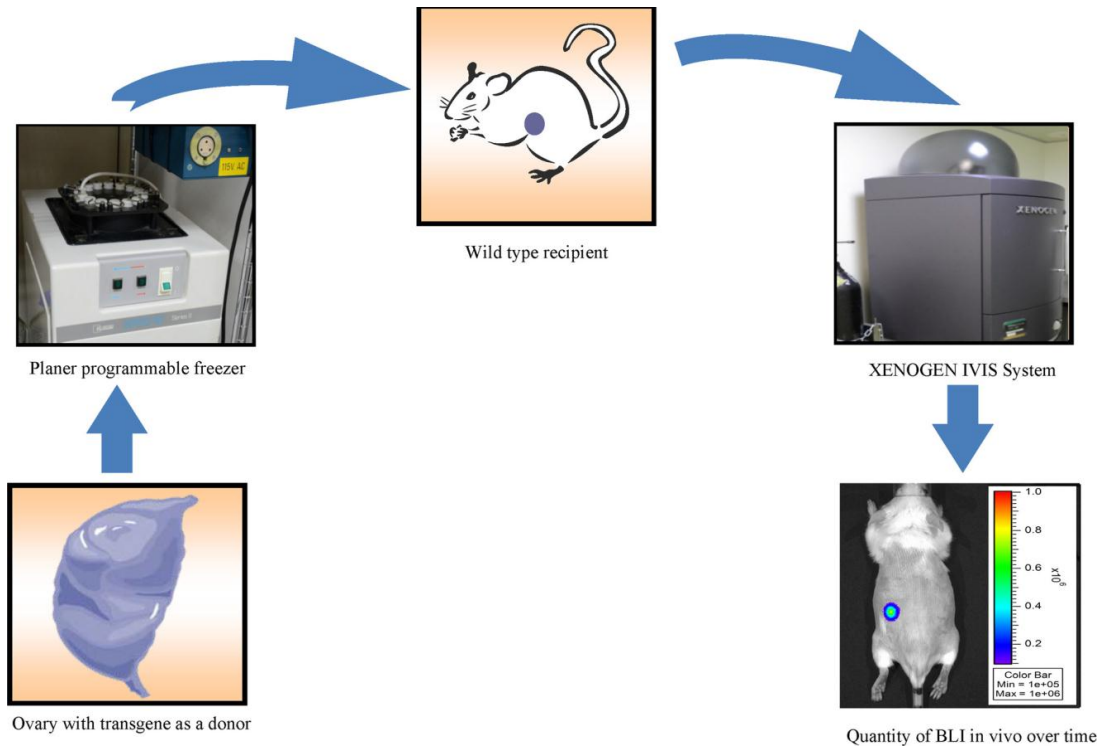
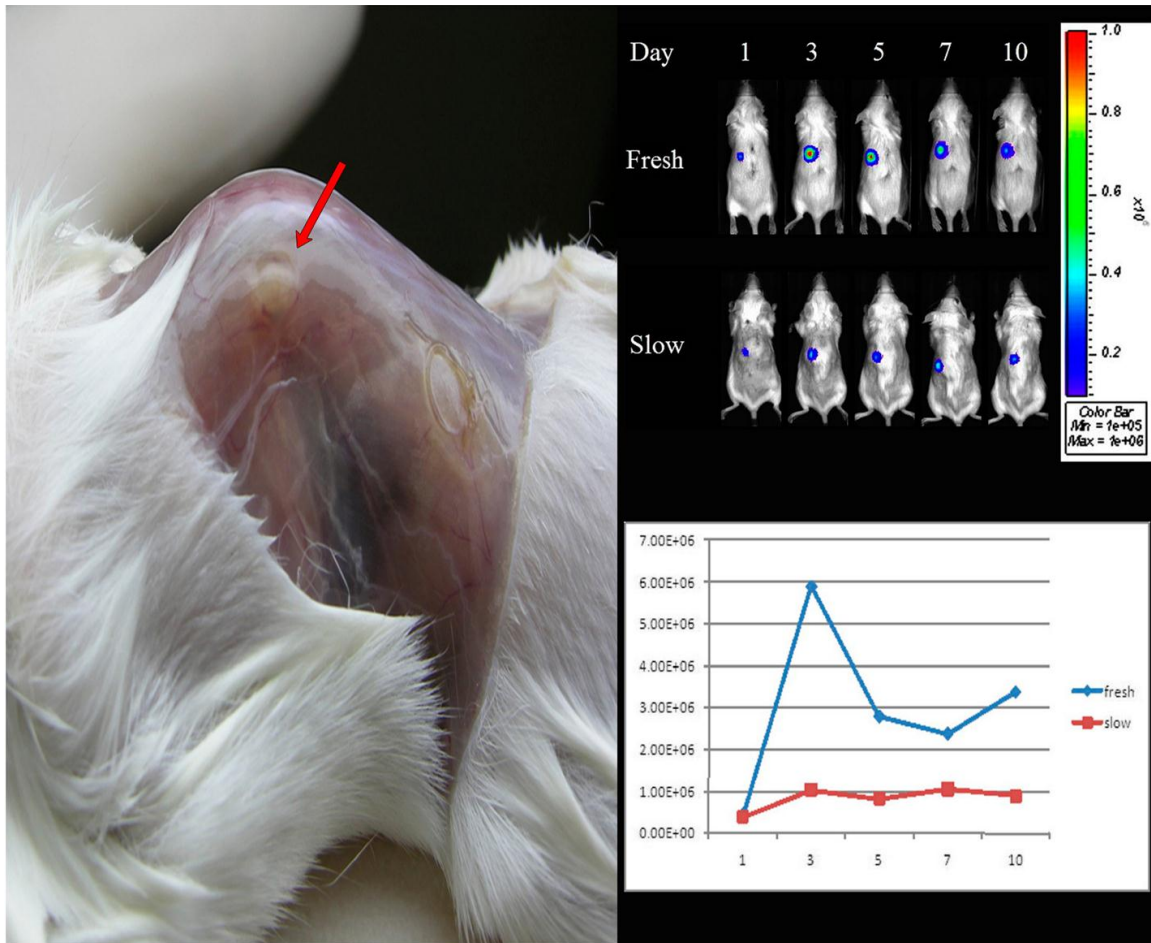


图: 实验流程: 提取发光卵巢组织—程序化慢速冷冻和复苏—同系异体移植—IVIS 系统成像—定量比较

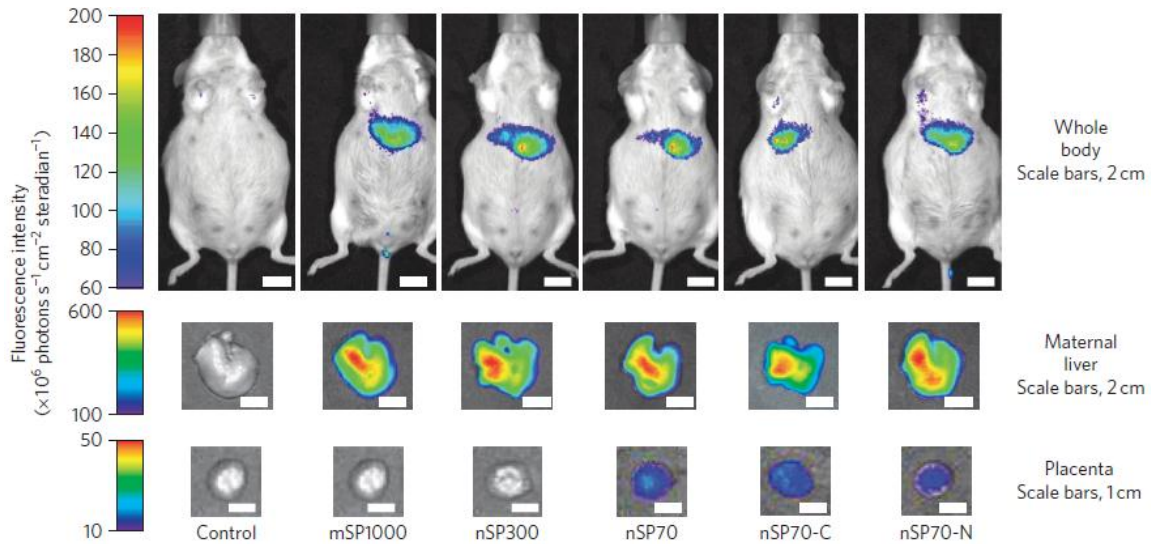


图左：将发光卵巢组织植入小鼠背部肌肉下；图右：使用 IVIS 系统比较新鲜卵巢组织和慢速冷冻复苏后卵巢组织在移植后的活力差别：卵巢组织慢速冷冻过程中的冷冻损伤和缺血会影响其移植后的活力。

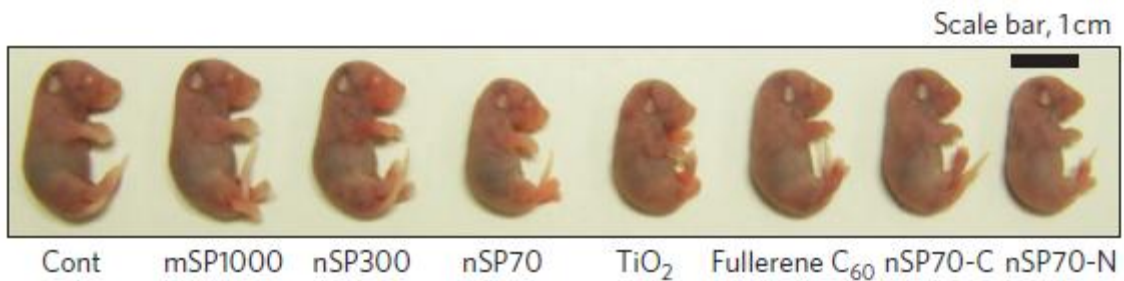
（四）生殖相关毒理学研究

纳米硅颗粒 (nSPs)，二氧化钛纳米颗粒 (nano-TiO₂) 和碳纳米管 (carbon nanotubes) 等纳米材料如今已经广泛应用于食品工业、化妆品制造和药物递呈研究中，尤其是 nSPs，由于其亲水性强，易合成并且表面容易修饰，常被用作化妆品和食物中的添加剂。但这些纳米材料也具有潜在的生物学毒性，例如碳纳米管可像石棉一样诱发小鼠体内间皮瘤样病变，nSPs 可诱发小鼠严重肝损伤和炎症反应。胎儿与成人相比，其对环境中的有毒物质更加敏感，来自空气、水体和食物中的化学有毒物质可诱发妊娠并发症，因此，研究这些常见纳米材料的母体/胎儿毒理学作用，对防治复发性流产、胎儿宫内生长异常等意义重大，小动物活体光学成像技术由于其无损、直观、可长时程连续观测等优势，在该领域的研究中发挥着越来越重要的作用。Yamashita 等使用 IVIS 系统研究了不同粒径大小的纳米材料对胎鼠的富集和毒理学作用。研究人员将不同粒径（直径 70 nm、300 nm、1000 nm）的 nSPs 用 DY-676 进行荧光标记，标记后的 nSPs 通过尾静脉注射入怀孕 16 天的孕鼠体内，注射后 24 h 时刻使用 IVIS 系统对 nSPs 在母鼠和胎鼠中的分布进行活体成像观察，结果显示：全部不同粒径大小的 nSPs 均在母鼠肝脏部位有富集，而只有 nSP70 在胎盘和胎鼠内

有富集，直径较大的 nSP300 和 nSP1000 的无法进入胎盘；将荧光标记的 nSPs 连续两天通过尾静脉注射入孕鼠体内（每天注射一次，每次注射剂量为 0.8 mg），结果显示注射了 nSP70 的母鼠体重很快开始下降，且胎鼠重量明显偏轻（比正常胎鼠的重量轻 10%），注射了直径较大 nSP300 和 nSP1000 的母鼠和胎鼠的体重均无影响，这说明 nSP70 对母鼠和胎鼠产生了明显的毒副作用；另外，研究人员还对 nSP70 表面用 COOH 和 NH₂ 基团进行了化学修饰（分别得到 nSP70-C 和 nSP70-N），活体成像实验显示 nSP70-C 和 nSP70-N 也可以进入胎盘和胎鼠内，但对母鼠和胎鼠的体重无影响，通过适当表面化学修饰的方法可以降低 nSPs 的毒性；研究人员还测试了 nano-TiO₂（35 nm 粒径）以及 Fullerene（富勒烯 / C60）的相关毒理作用，结果显示 nano-TiO₂ 和 nSP70 一样，会对母鼠和胎鼠产生明显毒性，而 Fullerene 则无明显毒性。



图：全部 nSPs 均可在母鼠肝部产生富集，但只有粒径较小的 nSP70 可以进入胎盘和胎鼠内



图：nSP70 和 TiO₂ 能产生明显毒副作用，导致胎鼠体重偏轻；较大粒径 nSPs、COOH/NH₂ 表面修饰的 nSPs、Fullerene 均无明显胎毒性

参考文献

- Tiede BJ, Owens LA, Li F, DeCoste C, Kang Y. A novel mouse model for non-invasive single marker tracking of mammary stem cells in vivo reveals stem cell dynamics throughout pregnancy. *PLoS One*. 2009; 4(11): e8035.
- Nguyen Huu S, Oster M, Uzan S, Chareyre F, Aractingi S, Khosrotehrani K. Maternal neoangiogenesis during pregnancy partly derives from fetal endothelial progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:1871-1876.
- Dubernard G, Oster M, Chareyre F, Antoine M, Rouzier R, Uzan S, Aractingi S, Khosrotehrani K. Increased fetal cell microchimerism in high grade breast carcinomas occurring during pregnancy. *Int J Cancer*. 2009; 124:1054-1059.
- Suo G, Jiang Y, Cowan B, Wang JY. Platelet-derived growth factor c is upregulated in human uterine fibroids and regulates uterine smooth muscle cell growth. *Biology of Reproduction*. 2009; 81:749-758.
- Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, Yoshida T, Ogura T, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Monobe Y, Imazawa T, Aoshima H, Shishido K, Kawai Y, Mayumi T, Tsunoda S, Itoh N, Yoshikawa T, Yanagihara I, Saito S, Tsutsumi Y. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nature nanotechnology*. 2011; 6:321-328.
- Chen CH, Yeh YC, Wu GJ, Huang YH, Lai WF, Liu JY, Tzeng CR. Tracking the rejection and survival of mouse ovarian iso- and allografts in vivo with bioluminescent imaging. *Reproduction*. 2010; 140:105-112.
- Chen C H, Tan S J, Tzeng C R. In vivo fate mapping of cryopreserved murine ovarian grafts. *Journal of ovarian research*, 2014; 7(1): 81.
- Hong Wu, Li Yao, Jiazhuan Mei, Feng Li. Development of synthetic of peptide-functionalized liposome for enhanced targeted ovarian carcinoma therapy. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7(12): 4809-4818.