

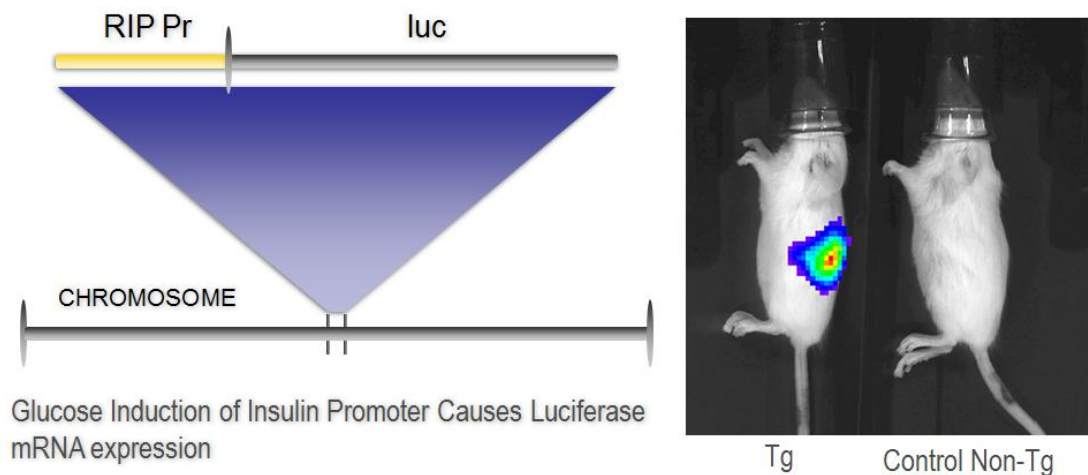
小动物活体光学成像技术在糖尿病研究中的应用

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，糖尿病相关研究是近几年又一兴起的应用热点之一。将活体光学成像技术应用于糖尿病研究的主要方向包括：1、从特异构建的发光转基因小鼠中获取具有发光特性的胰岛，进行胰岛移植相关研究；2、利用荧光素酶基因标记相关治疗用细胞，观测治疗用细胞在活体动物体内的分布、器官靶向及对糖尿病的治疗效果；3、通过构建荧光素酶基因表达载体或转基因动物，研究糖尿病相关基因表达及信号通路。下面结合一些具体实例进行阐述：

一.胰岛移植相关研究

I 型糖尿病，即胰岛素依赖性糖尿病，是由感染、毒物等因素诱发机体产生异常自身体液和细胞免疫应答，导致胰岛 β 细胞损伤，胰岛素分泌减少。胰岛移植的主要适应症为胰岛素依赖型糖尿病。众多实验研究证实，胰岛移植不仅可以纠正实验动物的糖尿病状态，而且可有效地防止糖尿病微血管病变的发生、发展，促进糖代谢内环境稳定，降低死亡率。

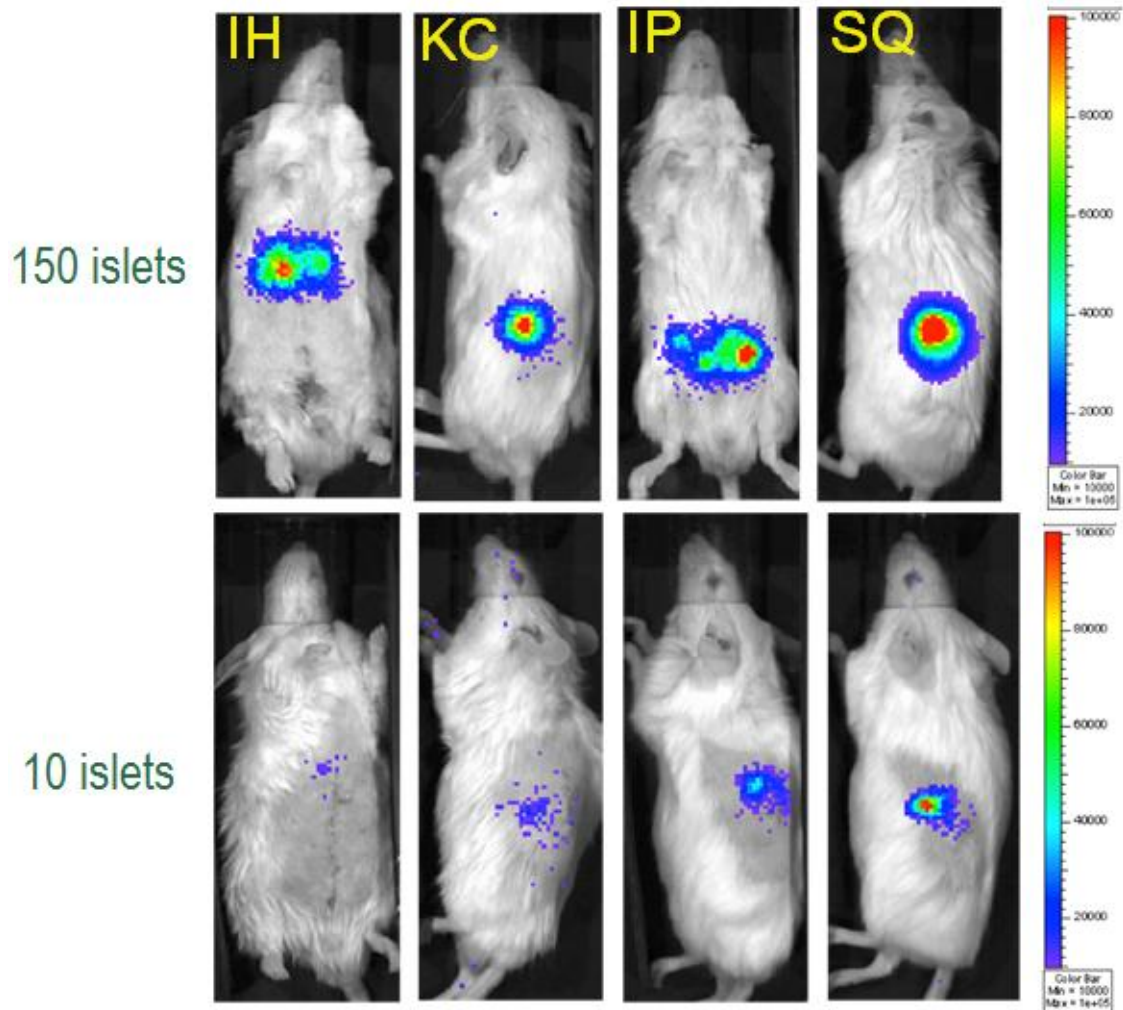
应用活体光学成像技术可以在活体动物水平长期监测胰岛移植的存活。为了实现这一应用，研究者首先需要对胰岛进行光学标记，通常采用的方法是利用荧光素酶基因标记胰岛素基因启动子，而构建胰腺特异性发光的转基因动物，从该转基因动物体内即可直接提取具备发光特性的胰岛。



上图：左，Tg(RIP-luc)转基因小鼠表达载体示意图；应用 IVIS 系统对发光转基因小鼠及对照的成像结果。

从转基因小鼠获取发光的胰岛之后，便可开展胰岛移植的相关观测实验。如观测不同数量或不同部位胰岛移植的存活情况。如下图所示，应用 IVIS 系统可以观测胰岛在不同部位的移植情况，并且基于 IVIS 系统的超高灵敏度，可以观测到少量胰岛移植后

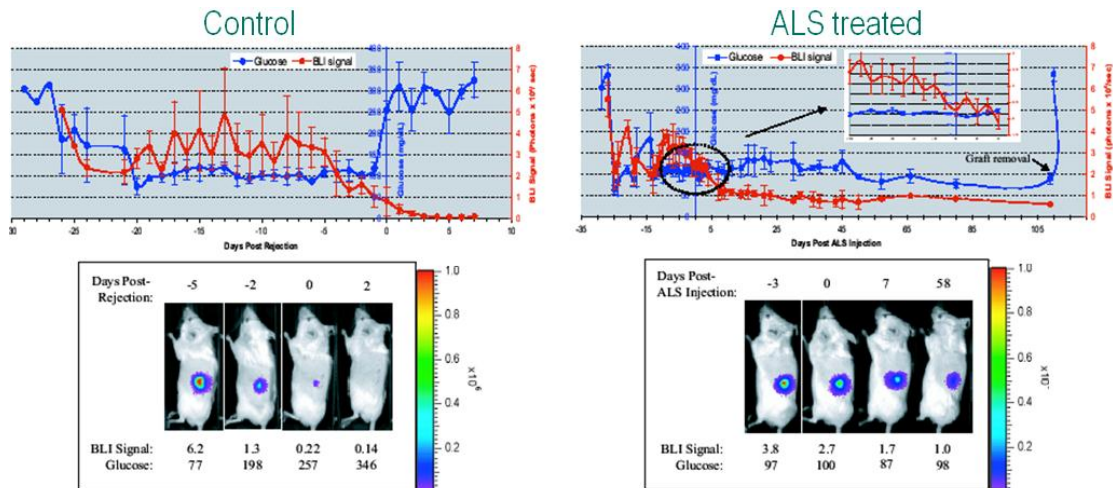
的发光情况。



上图：分别将 10 个或 150 个从 FVB-Tg(RIP-luc)转基因小鼠中取出的胰岛移植于同种小鼠的不同部位，应用 IVIS 系统进行观测。IH，肝部移植；KC，肾包膜移植；IP，腹腔移植；SQ，皮下移植。

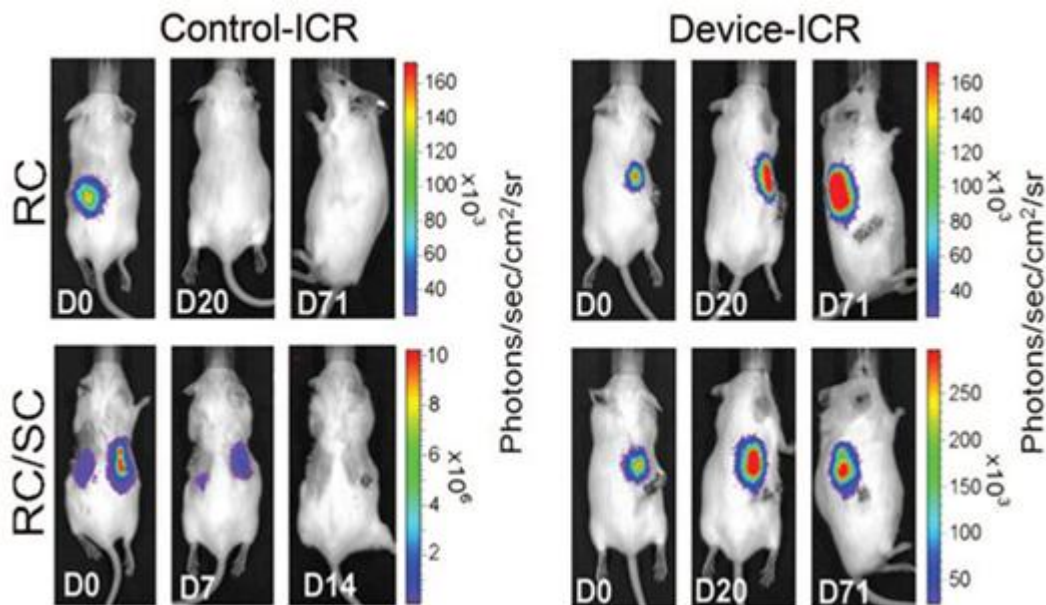
应用胰岛移植治疗糖尿病的一个限制因素是缺少足够的同种供体，解决供体来源的一个途径便是异种移植。而异种移植通常会引发受体体内的免疫排斥，造成移植失败。因此，研究如何通过有效方式抑制异种移植而产生的免疫排斥，也是胰岛移植研究的一个热点。应用活体光学成像技术可以在活体水平观测评价不同方式对于免疫排斥的抑制效果。

如 Chen 等通过利用抗淋巴细胞血清这种免疫抑制剂处理异种移植受体小鼠，有效抑制了免疫排斥，成功移植了从异种小鼠取出的胰岛。如下图所示，在没有经抗淋巴细胞血清（Antilymphocyte Serum，ALS）处理的 Balb/c 糖尿病小鼠肾包膜移植从 FVB-Tg(RIP-luc)转基因小鼠中取出的胰岛，在胰岛移植后十几天，由于免疫排斥作用，胰岛的发光信号逐渐减弱并消失，导致体内血糖浓度重新升高至高浓度水平；而若当移植的胰岛信号出现下降初期时，用 ALS 处理，则能够抑制免疫排斥，使异种胰岛移植获得成功，维持体内的正常血糖浓度。



上图：应用 IVIS 系统观测 ALS 对异种胰岛移植的作用

也有一些研究者利用免疫隔离装置提高胰岛移植的成功率。他们将胰岛置于一定形式的带有微孔的包囊内即可避免免疫活性细胞与移植入的胰岛细胞的直接接触，从而避免排斥反应，而胰岛细胞所分泌的小分子物质可以通过微孔弥散至包囊外进入血液循环，从而维持正常的血糖浓度。如 Lee 等应用免疫隔离装置将从 FVB-Tg(RIP-luc)转基因小鼠中取出的胰岛，成功移植入异种的 ICR 小鼠体内，并长期存活，如下：

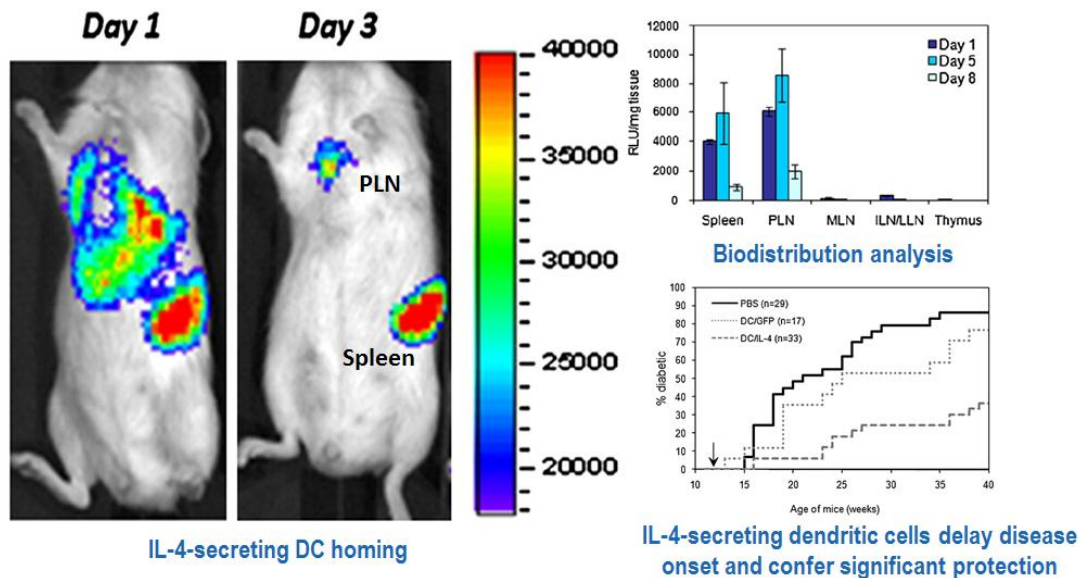


上图：应用 IVIS 系统观测免疫隔离装置对异种胰岛移植的作用

二. 针对糖尿病的细胞治疗研究

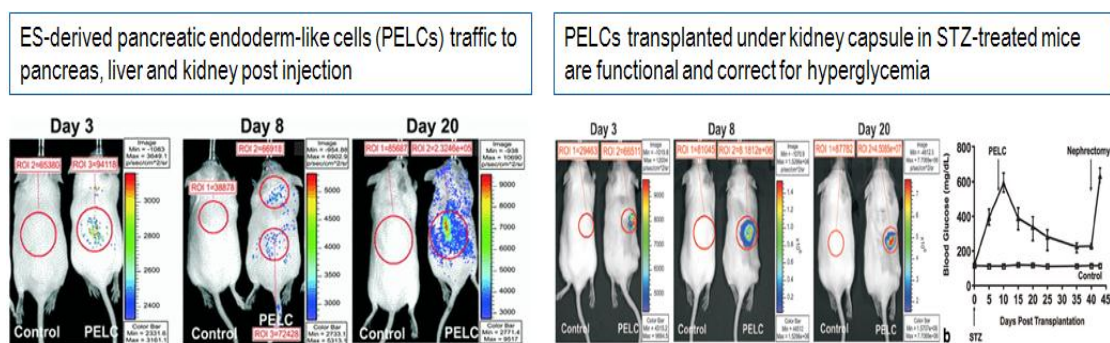
针对糖尿病的细胞治疗是近些年兴起的一个研究领域。应用活体光学成像技术，可以在活体动物水平，观测经光学标记的治疗用细胞在体内的分布、靶向及治疗效果。如 Creusot 等利用 IVIS 系统观测了表达 IL-4 的树突细胞 (dendritic cells, DC) 在糖尿病小鼠体内的分布、组织靶向及治疗效果。之前的研究结果显示，IL-4 表达的不足在糖尿病

病人或小鼠中均存在，而将 IL-4 注入小鼠体内能够防止 I 型糖尿病的发生，说明 IL-4 可能在 I 型糖尿病的发生发展中起调节作用。因此，研究者基于这一推测，将 IL-4 导入经荧光素酶基因标记的 DC 中而获得表达 IL-4 的发光 DC（基于 DC 能够迁移至各种组织或淋巴结而起免疫调节作用，因此是一种理想的细胞治疗载体），并将上述 DC 经尾静脉注入前期糖尿病的小鼠体内，利用 IVIS 系统观测 DC 在体内的分布、靶向及对糖尿病的治疗效果。结果显示，DC 主要靶向分布于脾及胰腺淋巴结，并能够延迟或阻止糖尿病的发生。



上图：利用 IVIS 系统观测表达 IL-4 的树突细胞在前期糖尿病小鼠体内的分布、组织靶向及治疗效果。

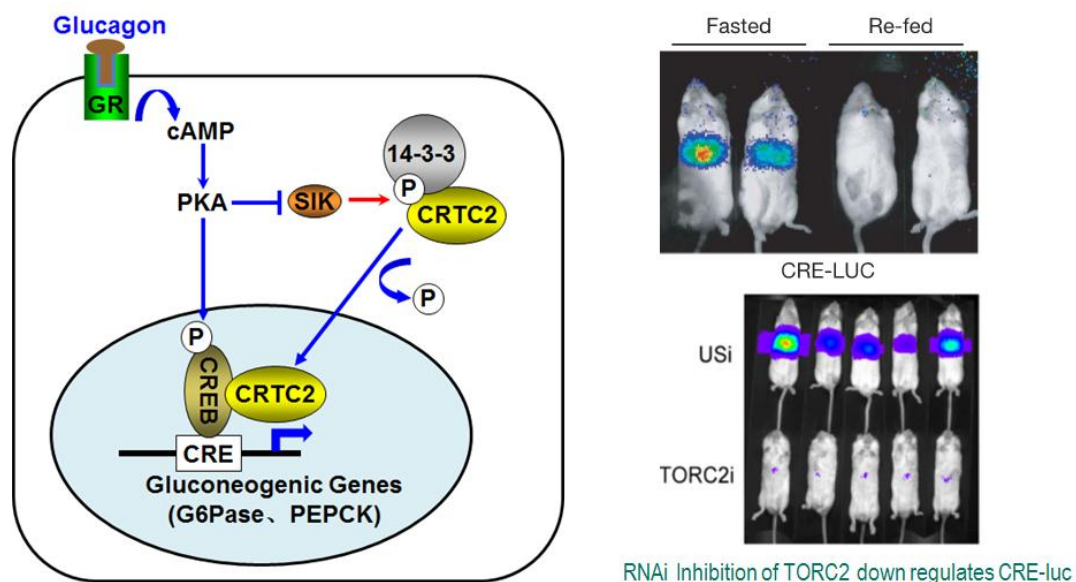
应用能够分化为胰岛细胞的干细胞，也是进行糖尿病治疗的一个有效途径。Raikwar 等从经荧光素酶基因标记的小鼠胚胎干细胞中诱导分化出胰腺内胚层类细胞 (pancreatic endoderm-like cells, PELC)，体外实验显示 PELC 能够进一步分化为胰岛素生产细胞 (insulin-producing cells, IPC)，随后，研究者将 PELC 移植入糖尿病小鼠肾包膜中，并用 IVIS 系统观测了 PELC 在小鼠体内的分布及对糖尿病的治疗情况。结果显示，PELC 会特异性靶向分布于胰腺、肝部及肾部，并能有效降低发病小鼠体内的血糖浓度，如下图所示：



上图：利用 IVIS 系统观测 PELC 在糖尿病小鼠体内的分布及治疗。

三.糖尿病相关信号通路研究

对于糖尿病相关基因表达及信号通路的研究，是了解糖尿病发病机理的基础。应用荧光素酶基因可以标记糖尿病特异性基因，构建出表达载体，并利用活体光学成像技术，在活体动物水平研究疾病相关的信号通路。如 Dentin 等发表于 2007 年 Nature 的一篇文章报道了通过应用荧光素酶基因标记的 cAMP 响应元件 (CRE-luc)，研究了控制糖异生相关基因表达的一个关键分子开关 TORC2/CRTC2 的作用。研究者通过水动力注射法将 CRE-luc 表达载体经尾静脉注入正常小鼠体内，由于采用水动力注射方法，因此，该表达载体将在一定时间内稳定存留于小鼠肝脏中，使得研究者能够借助该表达载体观测禁食及再进食小鼠肝脏中的糖异生情况。在禁食小鼠中，禁食会导致血糖浓度降低，从而激活胰高血糖素 (Glucagon) 所调控的糖异生信号通路，因此，在肝脏中能够观测到由于 CRE-luc 的表达激活而出现的光信号；而当小鼠再进食后，由于血糖浓度升高，而主要激活胰岛素调控的糖酵解通路，因此，肝脏中 CRE-luc 的表达被抑制，光信号消失；而当用 TORC2 siRNA 处理禁食小鼠后，本该大量表达的 CRE-luc 表达被抑制 (减弱的光信号)，说明 TORC2 在糖异生相关基因的表达调控中起重要作用。事实上，TORC2 是糖异生相关基因表达的关键共激活因子，它与 cAMP 响应元件结合蛋白 (CREB) 共同控制着糖异生相关基因的表达。当胰高血糖素激活 cAMP 信号通路后，TORC2 会被去磷酸化而进入细胞核，与 CREB 协同开启基因的表达；而当胰岛素激活糖酵解通路时，TORC2 会被磷酸化而排出细胞核，并在细胞质中被泛素化而降解。



上图：利用 IVIS 系统观测肝脏中糖异生信号通路的开启及闭合。

IVIS APPLICATIONS IN METABOLIC DISEASE RESEARCH

1. Balestrieri ML, Lu SJ, de Nigris F, Giovane A, Williams-Ignarro S, D'Armiento FP, Feng Q, Fiorito C, Testa G, Pastore L, Cacciatore F, Mancini FP, Servillo L, De Rosa G, Pagliarulo C, Rienzo M, Minucci PB, Farzati B, Salvatore F, Rengo F, Ignarro LJ, Giordano A, Baker A, Lanza R, Napoli C. Therapeutic angiogenesis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice using bone marrow cells, functional hemangioblasts and metabolic intervention. *Atherosclerosis*. Apr 2010;209(2):403-414.
2. Billingsley K, Balaconis MK, Dubach JM, Zhang N, Lim E, Francis KP, Clark HA. Fluorescent nano-optodes for glucose detection. *Analytical chemistry*. May 1 2010;82(9):3707-3713.
3. Birsoy K, Soukas A, Torrens J, Ceccarini G, Montez J, Maffei M, Cohen P, Fayzikhodjaeva G, Viale A, Succi ND, Friedman JM. Cellular program controlling the recovery of adipose tissue mass: An in vivo imaging approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Sep 2 2008;105(35):12985-12990.
4. Cao YA, Bachmann MH, Beilhack A, Yang Y, Tanaka M, Swijnenburg RJ, Reeves R, Taylor-Edwards C, Schulz S, Doyle TC, Fathman CG, Robbins RC, Herzenberg LA, Negrin RS, Contag CH. Molecular imaging using labeled donor tissues reveals patterns of engraftment, rejection, and survival in transplantation. *Transplantation*. Jul 15 2005;80(1):134-139.
5. Carlsen H, Haugen F, Zadelaar S, Kleemann R, Kooistra T, Drevon CA, Blomhoff R. Diet-induced obesity increases NF-kappaB signaling in reporter mice. *Genes & nutrition*. Sep 2009;4(3):215-222.
6. Chan KM, Raikwar SP, Zavazava N. Strategies for differentiating embryonic stem cells (ESC) into insulin-producing cells and development of non-invasive imaging techniques using bioluminescence. *Immunologic research*. 2007;39(1-3):261-270.
7. Chen X, Zhang X, Larson C, Chen F, Kissler H, Kaufman DB. The epididymal fat pad as a transplant site for minimal islet mass. *Transplantation*. Jul 15 2007;84(1):122-125.
8. Chen X, Zhang X, Larson C, Xia G, Kaufman DB. Prolonging islet allograft survival using in vivo bioluminescence imaging to guide timing of antilymphocyte serum treatment of rejection. *Transplantation*. May 15 2008;85(9):1246-1252.
9. Chen X, Zhang X, Larson CS, Baker MS, Kaufman DB. In Vivo Bioluminescence Imaging of Transplanted Islets and Early Detection of Graft Rejection. [Article]. 2006.
10. Creusot RJ, Yaghoubi SS, Kodama K, Dang DN, Dang VH, Breckpot K, Thielemans K, Gambhir SS, Fathman CG. Tissue-targeted therapy of autoimmune diabetes using dendritic cells transduced to express IL-4 in NOD mice. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. Mar 10 2008.
11. Dentin R, Hedrick S, Xie J, Yates J, 3rd, Montminy M. Hepatic glucose

- sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science (New York, N.Y.)*. Mar 7 2008;319(5868):1402-1405.
12. Dentin R, Liu Y, Koo SH, Hedrick S, Vargas T, Heredia J, Yates J, 3rd, Montminy M. Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature*. Sep 20 2007;449(7160):366-369.
 13. Fowler M, Virostko J, Chen Z, Poffenberger G, Radhika A, Brissova M, Shiota M, Nicholson WE, Shi Y, Hirshberg B, Harlan DM, Jansen ED, Powers AC. Assessment of pancreatic islet mass after islet transplantation using in vivo bioluminescence imaging. *Transplantation*. April 2005;79(7):768-776.
 14. Giannoukakis N, Phillips B, Trucco M. Toward a cure for type 1 diabetes mellitus: diabetes-suppressive dendritic cells and beyond. *Pediatric diabetes*. Jun 2008;9(3 Pt 2):4-13.
 15. Goudy KS, Wang B, Tisch R. Gene gun-mediated DNA vaccination enhances antigen-specific immunotherapy at a late preclinical stage of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*. Oct 2008;129(1):49-57.
 16. Grossman EJ, Lee DD, Tao J, Wilson RA, Park SY, Bell GI, Chong AS. Glycemic control promotes pancreatic beta-cell regeneration in streptozotocin-induced diabetic mice. *PloS one*. 2010;5(1):e8749.
 17. Hirota K, Sakamaki J, Ishida J, Shimamoto Y, Nishihara S, Kodama N, Ohta K, Yamamoto M, Tanimoto K, Fukamizu A. A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding. *The Journal of biological chemistry*. Nov 21 2008;283(47):32432-32441.
 18. Kodama M, Tsukamoto K, Yoshida K, Aoki K, Kanegasaki S, Quinn G. Embryonic stem cell transplantation correlates with endogenous neurogenin 3 expression and pancreas regeneration in streptozotocin-injured mice. *J Histochem Cytochem*. Dec 2009;57(12):1149-1158.
 19. Lee MH, Lee WH, Van Y, Contag CH, Liu CP. Image-guided analyses reveal that non-CD4 splenocytes contribute to CD4+ T cell-mediated inflammation leading to islet destruction by altering their local function and not systemic trafficking patterns. *Mol Imaging*. Nov-Dec 2007;6(6):369-383.
 20. Lee SH, Hao E, Savinov AY, Geron I, Strongin AY, Itkin-Ansari P. Human beta-cell precursors mature into functional insulin-producing cells in an immunisolation device: implications for diabetes cell therapies. *Transplantation*. Apr 15 2009;87(7):983-991.
 21. Liu Y, Dentin R, Chen D, Hedrick S, Ravnskjaer K, Schenk S, Milne J, Meyers DJ, Cole P, Yates J, 3rd, Olefsky J, Guarente L, Montminy M. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature*. Nov 13

- 2008;456(7219):269-273.
22. Lu Y, Dang H, Middleton B, Zhang Z, Washburn L, Campbell-Thompson M, Atkinson MA, Gambhir SS, Tian J, Kaufman DL. Bioluminescent monitoring of islet graft survival after transplantation. *Mol Ther*. March 2004;9(3):428-435.
 23. Park SY, Bell GI. Noninvasive monitoring of changes in pancreatic beta-cell mass by bioluminescent imaging in MIP-luc transgenic mice. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. Jan 2009;41(1):1-4.
 24. Park SY, Wang X, Chen Z, Powers AC, Magnuson MA, Head WS, Piston DW, Bell GI. Optical imaging of pancreatic beta cells in living mice expressing a mouse insulin I promoter-firefly luciferase transgene. *Genesis*. Oct 2005;43(2):80-86.
 25. Phillips B, Nylander K, Harnaha J, Machen J, Lakomy R, Styche A, Gillis K, Brown L, Lafreniere D, Gallo M, Knox J, Hogeland K, Trucco M, Giannoukakis N. A microsphere-based vaccine prevents and reverses new-onset autoimmune diabetes. *Diabetes*. Jun 2008;57(6):1544-1555.
 26. Roth DJ, Jansen ED, Powers AC, Wang TG. A Novel Method of Monitoring Response to Islet Transplantation: Bioluminescent Imaging of an NF-kB Transgenic Mouse Model. [Article]. *Transplantation*. 2006.
 27. Smith SJ, Zhang H, Clermont AO, Powers AC, Kaufman DB, Purchio AF, West DB. In vivo monitoring of pancreatic beta-cells in a transgenic mouse model. *Mol Imaging*. Apr-Jun 2006;5(2):65-75.
 28. Stendahl JC, Wang LJ, Chow LW, Kaufman DB, Stupp SI. Growth factor delivery from self-assembling nanofibers to facilitate islet transplantation. *Transplantation*. Aug 15 2008;86(3):478-481.
 29. Tarantal AF, Lee CC, Itkin-Ansari P. Real-time bioluminescence imaging of macroencapsulated fibroblasts reveals allograft protection in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Transplantation*. Jul 15 2009;88(1):38-41.
 30. Tarner IH, Slavin AJ, McBride J, Levicnik A, Smith R, Nolan GP, Contag CH, Fathman CG. Treatment of autoimmune disease by adoptive cellular gene therapy. *Ann N Y Acad Sci*. September 2003;998:512-519.
 31. Virostko J, Radhika A, Poffenberger G, Chen Z, Brissova M, Gilchrist J, Coleman B, Gannon M, Jansen ED, Powers AC. Bioluminescence Imaging in Mouse Models Quantifies beta Cell Mass in the Pancreas and After Islet Transplantation. *Mol Imaging Biol*. Jun 23 2009.
 32. Wang X, Jiang J, Warram J, Baumann G, Gan Y, Menon RK, Denson LA, Zinn KR, Frank SJ. Endotoxin-Induced Proteolytic Reduction in Hepatic Growth Hormone Receptor: A Novel Mechanism for GH Insensitivity. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. Mar 6 2008.
 33. Wang Y, Inoue H, Ravnskjaer K, Viste K, Miller N, Liu Y, Hedrick S, Vera L, Montminy M. Targeted disruption of the CREB coactivator *Crtc2* increases insulin sensitivity. *PNAS*, Feb 16 2010;107(7):3087-3092.