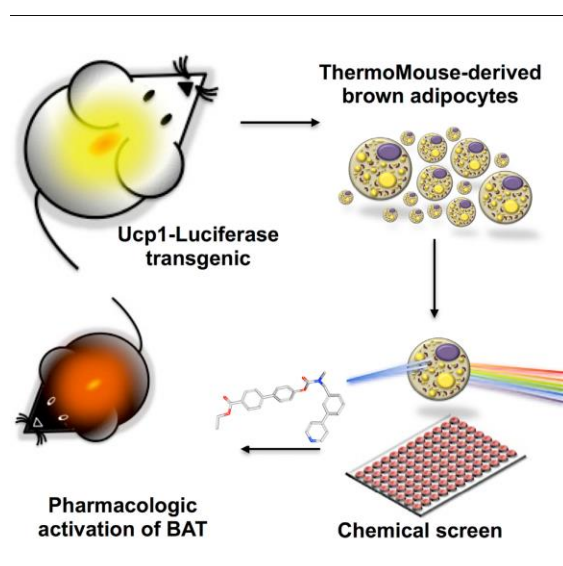


小动物活体光学成像技术在脂肪代谢研究中的应用

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。其中脂肪代谢研究是一个新兴的热点领域。将活体光学成像技术应用于脂肪代谢研究的主要方向是研究某个基因与脂肪代谢的关系及建立相关转基因动物模型筛选参与脂肪代谢的化合物，实现方式包括：1、在小鼠体内将荧光素酶的基因重组到感兴趣的脂肪代谢相关的基因启动子的下游，构建转基因小鼠，利用该模型可完成多种脂肪代谢相关信号通路、化合物作用等研究；2、在体外载体中将荧光素酶的基因重组到感兴趣的脂肪代谢相关的基因启动子的下游，然后利用水动力学的方式注射到小鼠体内，载体特异性地在肝脏表达；利用此模型同样可进行多种肝脏脂肪代谢相关研究；3、利用生物发光探针进行脂肪吸收的检测；下面结合一些具体实例进行阐述：

一.棕色脂肪研究

ThermoMouse 是一种新的转基因报告小鼠，可允许研究人员实时地研究活体动物中的棕色脂肪活性。相关研究结果发表在最近一期的《Cell Reports》杂志。棕色脂肪燃烧能量的这种能力，其关键是解偶联蛋白 1 (UCP1)，在该小鼠模型中当 UCP1 表达时，荧光素酶随之表达。因此通过生物发光检测荧光素酶的表达，则可实时检测 UCP1 的表达，因此该模型可鉴定药物对肥胖的治疗效果。



实验思路示意图

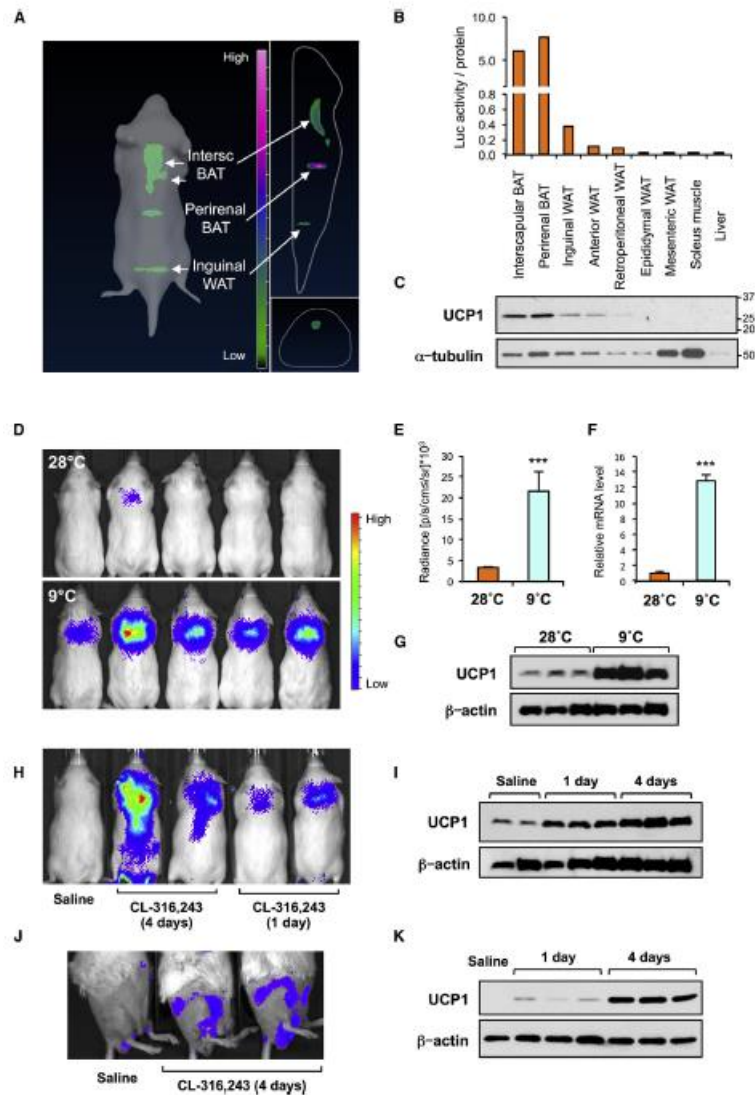


图 1: 左, 利用 IVIS 系统生物发光成像检测 ThermoMouse 转基因小鼠 UCP1 表达; (A) ThermoMouse 报告鼠中生物发光 3D 重构信号, 特定荧光素酶信号已经表明体脂类型; (B)室温下荧光素酶定量结果:脂肪、骨骼肌、肝脏、脂肪定量结果已经用蛋白含量进行校准; (C) B 中小鼠不同组织 UCP1 蛋白表达分; (D) 28°C 饲养条件下小鼠发光成像, 随后 9°C 饲养 24 小时后进行生物发光成像; (E) D 中小鼠定量结果(n=9); (F) D 中小鼠 Ucp1 mRNA 表达分析; (G)F 中 UCP1 肩胛间棕色脂肪表达分析; (H) 生理盐水或化合物 CL-316, 243 处理 1 天 (急性) 或者 4 天 (慢性)后生物发光成像; (I) H 小鼠中 UCP1 在棕色脂肪中的表达分析.(J) 生理盐水或化合物 CL-316, 243 处理四天后, 腹股沟白色脂肪成像; (K)小鼠腹股沟白色脂肪中 UCP1 蛋白表达。Galmozzi et al., 2014, Cell Reports 9, 1584–1593

二.实时检测脂肪酸在体内的吸收

在一些生理或者病理条件下, 脂肪比如游离脂肪酸的吸收程度会发生改变, 这种现象反映了重要的代谢过程, 比如饥饿、寒冷以及心脏缺氧、肠道吸收障碍等一些病理状

态会激活棕色脂肪。同样，FFAs（游离脂肪酸）的过多吸收与骨骼肌胰岛素耐受性、心肌疾病、脂肪肝以及心脏、肝脏的脂肪毒性有关。此外，FFA/脂质流量可以被药物干预，例如在格列酮类抗糖尿病治疗中，会增加 FFA 的吸收和在脂肪细胞的滞留。改变脂肪酸的吸收和利用也可能是某些药物带来的副作用，比如抗癌药物阿霉素，就会导致心脏代谢的改变。因此对脂肪酸吸收的变化进行定量定位的研究不仅对生物功能学研究有重要意义，对于疾病的诊断、治疗方法评价以及药物开发同样意义重大。因此在此研究中利用生物发光技术来实时检测脂肪酸的脂质流量。研究表明，其设计的生物发光探针 FFA-SS-luc 结合荧光素酶转基因小鼠，能够很好的评价脂肪酸的吸收，同样建立肝脏生物发光转基因小鼠能够更好的评价肝脏脂肪的代谢情况。

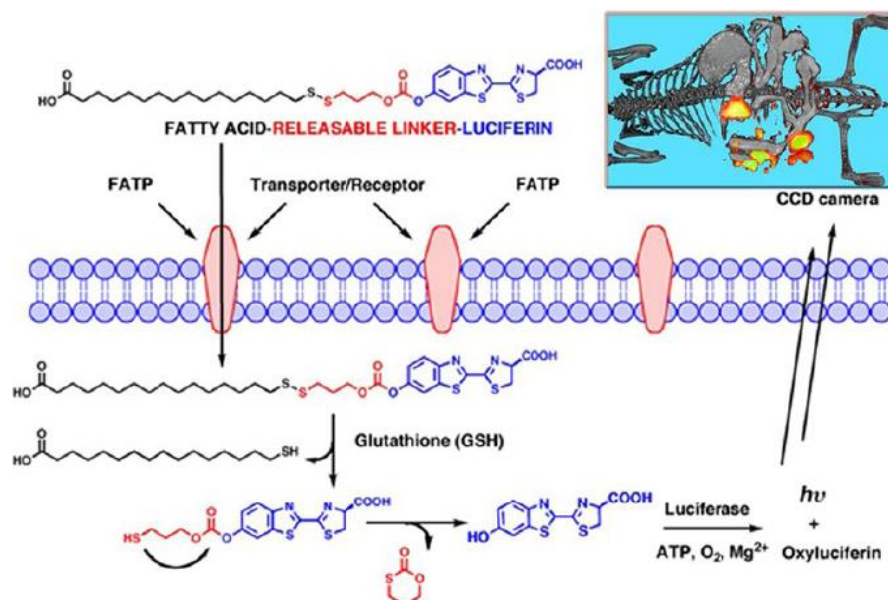


图1.在体内生物发光检测脂肪酸吸收的原理：首先小鼠为荧光素酶转基因小鼠(FVB-luc+小鼠，荧光素酶在actin 启动子下表达)，FFA-SS-luc即游离脂肪酸和底物荧光素以二硫键相连，此生物发光探针注射小鼠体内后，荧光素会随着脂肪酸的吸收被转运到细胞内部，在细胞内GSH的作用下，FFA与luc分离，随后荧光素与荧光素酶发生酶促反应，产生光子，产生的光子穿透动物体表后被高灵敏度的IVIS光学成像系统采集到，生成小鼠生物发光的图像。

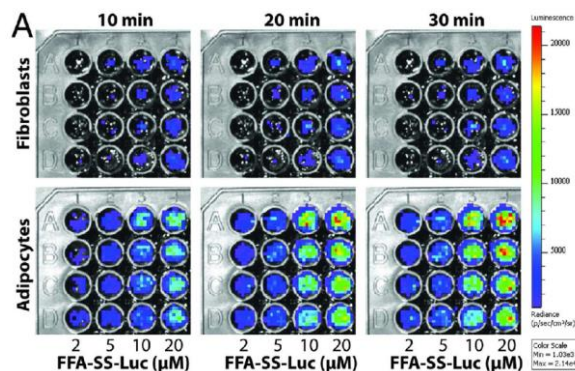


图2.在体外确定FFA-SS-luc生物发光探针的效果，游离脂肪酸在3T3-luc 脂肪细胞 和成纤维细胞的吸收。

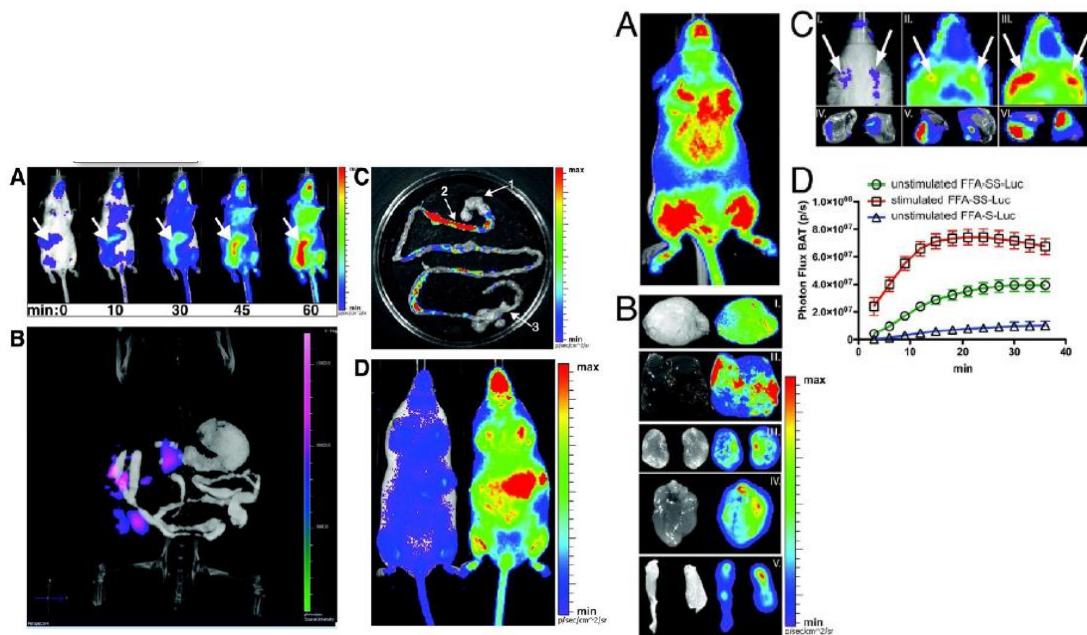


图3. FFA-SS-luc在小鼠体内肠道、肝脏、脂肪组织、肾脏、心脏、骨骼肌的吸收成像。
 左侧：口服给药方式，FFA-SS-luc在FVB-luc+小鼠小肠内的吸收(A)注射100 μ L FFA-SS-luc (20 μ M) 探针后不同时间小鼠腹侧成像；(b) 生物发光和 μ CT 叠加成像，注射50 μ L of FFA-SS-luc (300 μ M) 1 h后；(c)离体肠道进行成像，1、2、3分别是胃部、十二指肠和结肠；(d) FFA-SS-luc(right) 和对照1 FFA-S-luc (left)注射 20 min 后腹部生物发光成像。
 右侧：尾静脉注射方式，(a)注射 FFA-SS-luc 5min后成像；(b) 离体脏器成像(I) 白色脂肪(WAT), (II)肝脏(III) 肾脏, (IV) 心脏 (V)骨骼肌；(c)腹腔注射FFA-S-luc 溶液((I/IV)、FFA-SS-luc (II/V)、FFA-SS-luc 与1 mg/kg 的 β -肾上腺素拮抗剂 CL316243 (III/VI)；(d)棕色脂肪对C中不同探针吸收的动力学曲线。

三.脂肪含量研究

减肥后脂肪量恢复的细胞过程具有普遍性，瘦素的 mRNA 水平与脂肪量有着密切关系，因此瘦素的表达可以代表脂肪含量的改变。瘦素 (Leptin, LP) 是一种由脂肪组织分泌的激素，人们之前普遍认为它进入血液循环后会参与糖、脂肪及能量代谢的调节，促使机体减少摄食，增加能量释放，抑制脂肪细胞的合成，进而使体重减轻。为了进一步研究在不同条件下脂肪含量的变化，在此研究中建立了一种转基因小鼠，在该小鼠体内重组的荧光素酶基因的表达受瘦素表达调节序列的调控，因此可以利用生物发光来非侵入实时监控瘦素的表达，从而衡量脂肪含量的变化。研究表明，1、该转基因小鼠瘦素的表达水平与荧光素酶活性高度一致，可以通过活体成像检测荧光素酶的表达来真实反映瘦素的表达量；2、在禁食时瘦素的表达含量降低，而喂食后升高，另外在肥胖小鼠中，瘦素的表达异常高；3、在禁食后，重新给予喂食 6h 后，瘦素表达增加，但是此时脂肪并未合成，因此提示脂-殆尽的脂肪细胞在脂肪组织的滞留，在瘦素治疗实验中同样验证了这一论点。

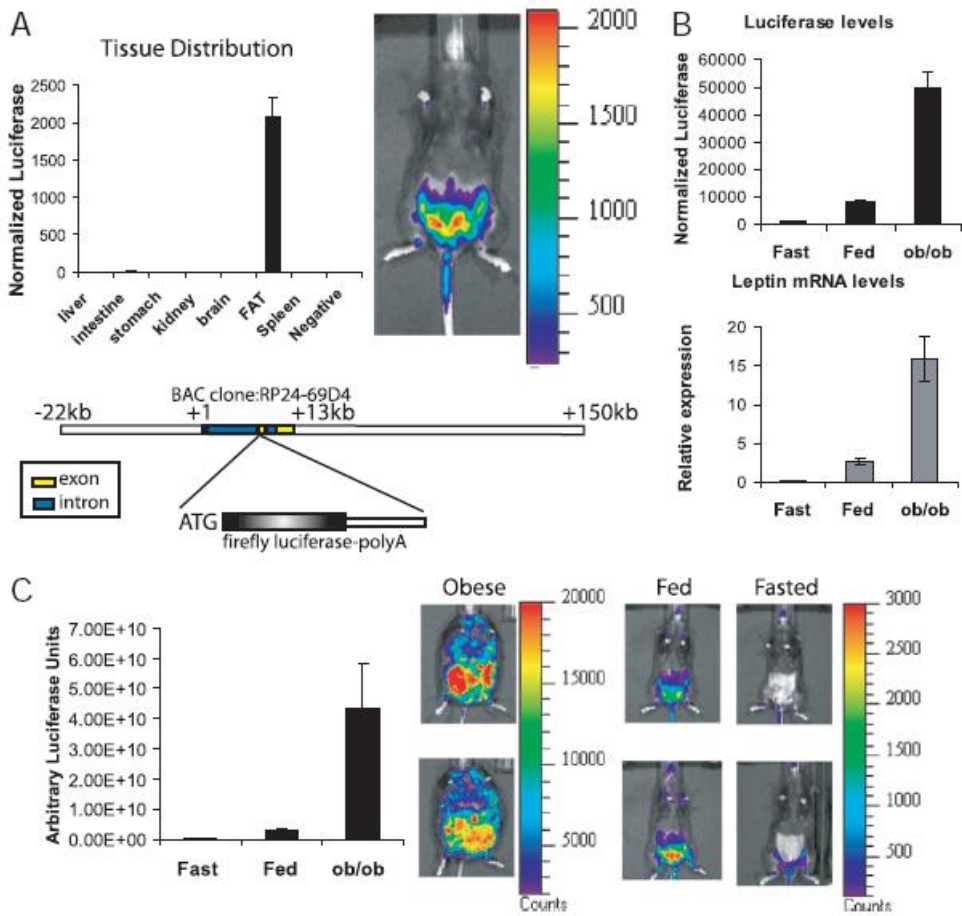


图1. (A) leptin-luciferase转基因小鼠中荧光素酶在各组织中表达特性，荧光素酶活性由组织裂解后蛋白量进行标准化处理；下方是荧光素酶在转基因小鼠体内插入的位点示意图；(B)在禁食、喂食、ob/ob小鼠中荧光素酶和瘦素的相对表达，上排位荧光素酶活性，下排为瘦素的表达采用实时定量PCR的方法检测；(C)检测禁食、喂食情况下leptin-luciferase转基因小鼠以及ob/ob肥胖转基因小鼠进行生物发光成像。

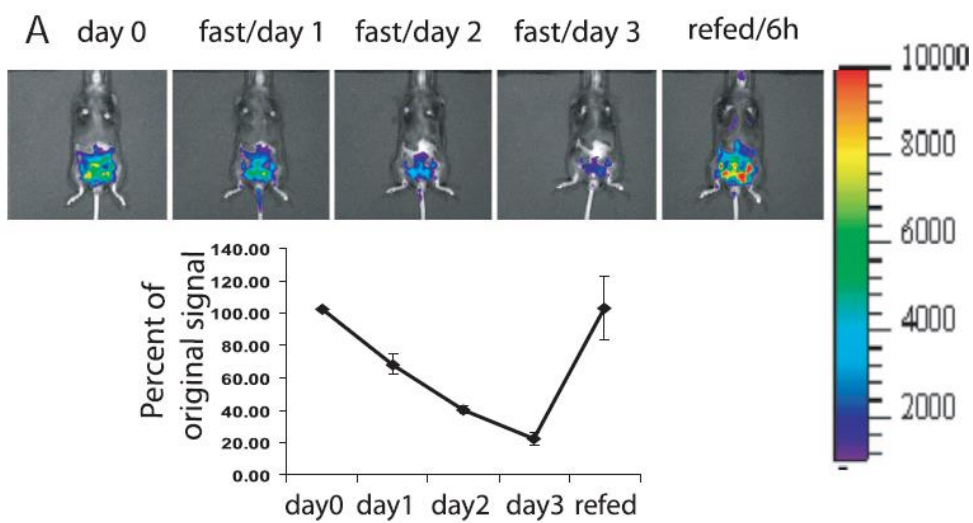


图2. 禁食对脂肪组织和荧光素酶表达的影响

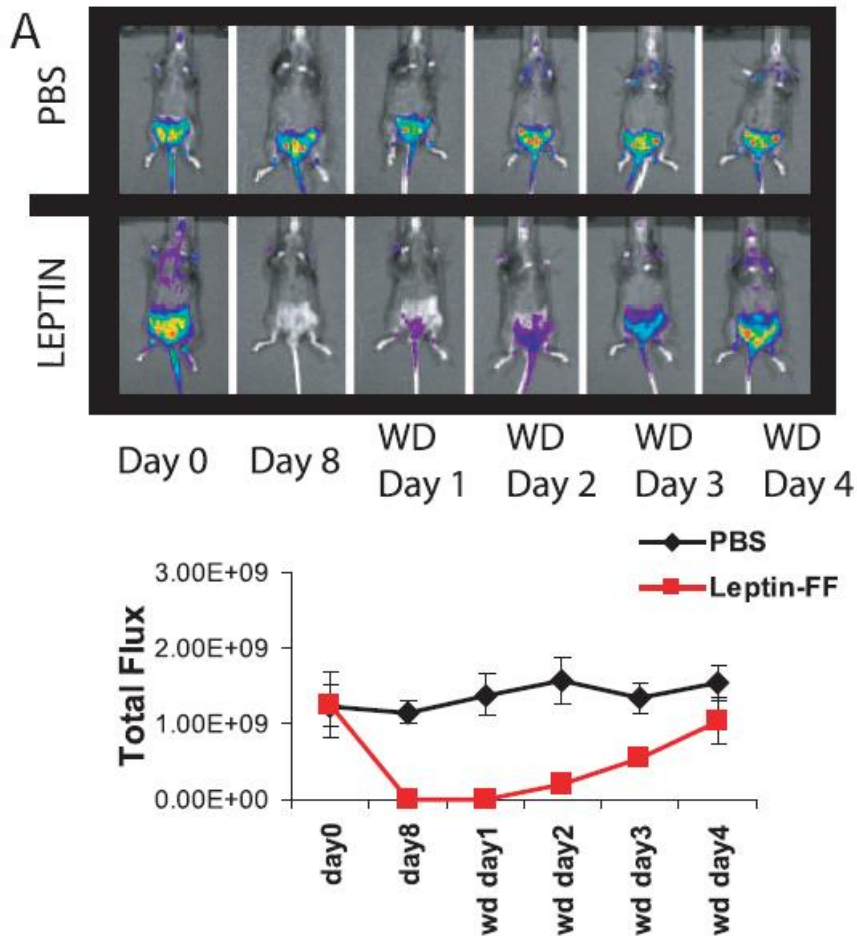
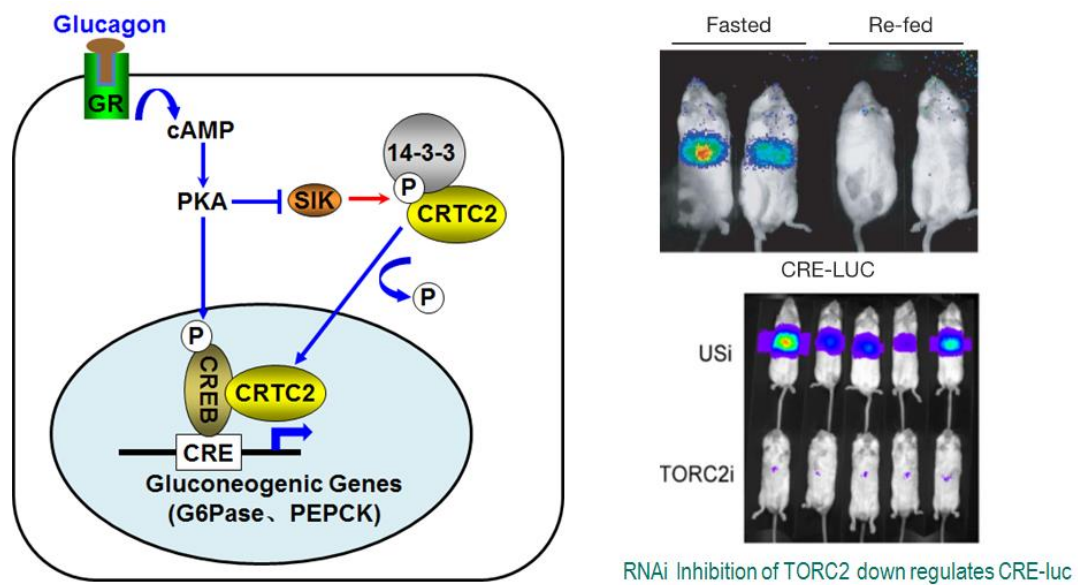


图2. 瘦素治疗对脂肪组织和荧光素酶表达的影响

四.载体水动力学注射后在肝脏表达的应用

利用水动力学注射方法，能让表达载体稳定存留在肝脏一段时间并进行表达，例如 Dentin 等发表于 2007 年 Nature 的一篇文献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，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。水动力注射是非常成熟的方法，在 IVIS 光学成像系统国内用户中，军事医学科学院詹林盛研究员就利用水动力学模型开展了一系列围绕肝脏疾病的研究，例如丙型肝炎、肝脏毒物代谢等，已经成功建立了多种小鼠肝脏荧光素酶调控模型，在此类研究中有者丰

富的经验。



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光学成像系统在脂肪代谢研究中代表文献

1. Kivanc Birsoy, Alexander Soukas, Javier Torrens, Giovanni Ceccarini, Jason Montez, Margherita Maffei, Paul Cohen, Gulnorakhon Fayzikhodjaev, Agnes Viale, Nicholas D. Socci, and Jeffrey M. Friedman. Cellular program controlling the recovery of adipose tissue mass: An in vivo imaging approach. *PNAS*, 2008, 105(35)12985–12990;
2. Andrea Galmozzi, Si B. Sonne, Svetlana Altshuler-Keylin, Yutaka Hasegawa, 1 Kosaku Shinoda, Ineke H.N. Luijten, Jae Won Chang, Louis Z. Sharp, Benjamin F. Cravatt, 2 Enrique Saez, and Shingo Kajimura. ThermoMouse: An In Vivo Model to Identify Modulators of UCP1 Expression in Brown Adipose Tissue. *Cell Reports* 9, 1584–1593;
3. Amy H. Henkin, Allison S. Cohen, Elena A. Dubikovskaya, Hyo Min Park, Gennady F. Nikitin, Mathieu G. Auzias, Melissa Kazantzis, Carolyn R. Bertozzi, Real-Time Noninvasive Imaging of Fatty Acid Uptake in Vivo. *Real-Time Noninvasive Imaging of Fatty Acid Uptake in Vivo; ACS Chem. Biol.*, 2012, 7 (11), pp 1884–1891;
4. Renaud Dentin¹, Yi Liu¹, Seung-Hoi Koo², Susan Hedrick, Thomas Vargas, Jose Heredia¹, John Yates III³ Marc Montminy, Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature*. 2007 Sep 20;449(7160):366-9;