

活体肿瘤成像技术的研究进展

邵文, 袁永兵, 郑礼胜, 陈常青*

天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 成像技术在肿瘤生物学研究和临床诊断治疗中是不可或缺的工具之一, 活体动物成像实验平台的主要优点是无创伤、低成本、实时检测, 而分子探针与活体荧光成像技术相结合对肿瘤的早期诊断具有重要意义。肿瘤的近红外荧光 (NIRF) 成像技术依赖于稳定、高特异性和敏感性的分子探针。综述活体肿瘤成像技术的研究进展以及该项技术与新的分子探针、显像剂、报告分子的协同作用, 为进一步应用于临床肿瘤诊断和治疗打下基础。

关键词: 活体肿瘤成像; 近红外荧光 (NIRF); 分子探针; 肿瘤诊断; 荧光成像

中图分类号: R730.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)01-0031-05

Advances in studies on *in vivo* imaging of cancer

TAI Wen, YUAN Yong-bing, ZHENG Li-sheng, CHEN Chang-qing

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Imaging technology is one of the indispensable tools in oncobiological research and clinical diagnosis and therapy. The imaging experimental platform of *in vivo* animals has several advantages such as non-invasion, low cost, and real-time detection, and the combination of molecular probe and *in vivo* fluorescence imaging technique plays an important role in the early diagnosis of tumor. Near-infrared fluorescence (NIRF) imaging of tumor depends on the molecular probes with stability, high-specificity, and sensitivity. In the present paper, the research advance of *in vivo* tumor imaging and its synergism with novel molecular probes, imaging reagents, and reporters are summarized so as to lay a foundation on applying it in clinical diagnosis and therapy of tumor.

Key words: *in vivo* tumor imaging; near-infrared fluorescence (NIRF); molecular probe; tumor diagnosis; fluorescence imaging

近年来, 成像技术已经成为肿瘤研究和临床治疗不可或缺的工具之一, 不同成像技术的数量飞速增长, 并应用于不同领域^[1]。宏观成像系统主要提供解剖学和生理学信息, 如今已经广泛应用于临床及临床前研究, 如计算机断层扫描技术 (CT)、核磁共振 (MRI) 等; 而分子成像系统既可应用于临床也可应用于实验室研究, 如荧光反射成像、生物发光、激光共聚焦显微技术等。小动物活体成像是一种无创伤、低成本的实时监测实验平台, 对新药研发的主要环节, 如转基因动物的高通量表型, 新型疾病模型的药理药动力学分析, 以及安全性检测和药效评价等, 都具有重要意义^[2-3]。在肿瘤的早期诊断和定位中, 需要一种无创伤的成像方法, 既能够显示肿瘤所在位置和解剖学结构, 同时也可以反映出肿瘤的代谢和生化特征。目前已有多种非荧光体内成像技术, 如 MRI、正电子发射型计算机断层显像 (PET)、X 光、放射摄影术等应用于临床, 这

些方法的最大问题在于特异性和敏感性不足, 同时价格昂贵^[4]。可见光成像技术具有肿瘤检测高分辨率, 其信号能提供生物学组织的分子信息并显示重要生理参数的变化。在光学成像中, 荧光成像可同时使用几种分子探针, 具有高分辨率, 用于肿瘤早期诊断^[4]。该技术常用发射波长在 650~900 nm 的近红外荧光 (NIRF) 谱探针, 最常见的体内 NIRF 探针为聚甲炔 (如 Cy5.5 和 Cy7)^[5]。本文综述了活体成像技术的研究进展及其在肿瘤诊断和治疗中的常见应用, 为其进一步应用于临床提供理论依据。

1 微计算机断层扫描技术 (micro-CT)

典型的 micro-CT 设备包括 X 光管和二维 X 光检测器, X 线光束可以是扇形或锥形 (cone beam), 其中扇形 X 线源提供连续的螺旋状循环 X 光, 适用于较大的被检测对象, 而锥形 X 线源单次扫描较小的被检测对象, 不仅能够获得真正各向同性的容积图像, 提高空间分辨率, 提高射线利用率, 并且在

收稿日期: 2011-10-18

*通讯作者 陈常青, 研究员。E-mail: chencq@tjipr.com

采集相同 3D 图像时速度远快于扇形 X 线束, 常用于啮齿类动物的心脏和胸廓成像^[3]。Micro-CT 图像检测设备为电荷耦合元件 (CCD) 图像传感器, 与 GdO_2SO_4 或 CSI 制成的闪烁屏幕相连接^[6]。目前 micro-CT 系统中最普遍应用的图形重构方法是滤波反投影算法^[7]。

在肿瘤生物学研究中, micro-CT 结合数字减影血管造影 (DSA) 可以对肿瘤骨转移灶进行检测定量^[8-9], 肿瘤供给血管的检测限为 $50\ \mu\text{m}$, 另外还可以利用基于锥形束 CT 平台的 DSA 技术对血管生成网络进行评价^[3,10]。micro-CT 是一种相对稳定的对实体肿瘤进行检测、形态学分析和对血管发生进行定量评分的实验方法^[11-12], 也可用于鼠类结肠癌模型。在活体动物清肠和空气吸入之后运用微计算断层结肠镜检查能够检测到极小的结肠肿瘤, 并进行肿瘤生长的容积分析^[13]。

2 微核磁共振图像技术 (micro-MRI)

现代 micro-MRI 系统能对小动物进行无创伤全身成像, 空间分辨率高, 啮齿类动物检测限度为 $100\ \mu\text{m}$, 临床 1.5~3 T MRI 扫描也可用于中型动物 (如兔等) 初生实体肿瘤的血管生成和表型特性的分子成像^[14]。现已开发出多种能够提取丰富信息 (包括解剖结构、形态、功能、代谢等) 的 MRI 程序, 临床前 MRI 的优势在于实现组织灌注、扩散和血流动力学的动态可视化, 从而进一步应用于高敏感性的肿瘤血管生成研究。

核磁共振光谱 (MRS) 包括对不同原子核光谱的识别, 如氢、碳、磷、氟等, 可以提供许多生物学过程的功能和生化信息, 其敏感性不及 PET 和 SPECT, 但可以应用于中枢神经系统和心脏等内源性代谢物和介质的定位和检测^[15]。该技术能鉴别离体单细胞代谢指纹 (metabolomic fingerprint), 并进一步应用于发现疾病的新生物标记^[16]。由于敏感性不佳, MRS 对临床前研究的作用局限于药效学而非药动学, 药动学主要研究药物的吸收、分布、代谢、排泄, 而药效研究则集中于药物的生理作用和机制及其与人体器官的相互作用。应用 MRS 的一个重要领域为异种移植肿瘤细胞特异性代谢物水平的识别^[17], 在小鼠肿瘤模型中, 用 MRS 来评价血管破坏剂治疗肿瘤的疗效, 将总胆碱水平作为后续抗血管生成疗法的生物标记, 对其进行测定^[18]。

3 正电子发射断层扫描技术 (PET)

PET 成像能够追踪源于系统管理示踪剂 (如

^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{13}N 等) 衰变的正电子。大量癌症相关代谢底物、药物以及抗体等可被标记^[19-20]。目前临床使用的成功示踪剂有氟脱氧葡萄糖 (^{18}FDG), ^{18}FDG PET-CT 是一种快速发展的对癌症复发进行分期和评估的重要临床工具^[21], 因其能够反映出肿瘤对治疗干预的早期反应而得到广泛关注。与普通分化细胞依赖线粒体氧化磷酸化产生能量供给细胞活动不同, 多数肿瘤细胞通过有氧糖酵解来获取能量, 因此代谢需求增长, 从而摄入 ^{18}FDG 。已知的癌基因和肿瘤抑制基因信号通路能直接控制细胞增殖的代谢途径, 并且科研人员在研究中发现糖酵解、氧化磷酸化、磷酸戊糖途径以及氨基酸代谢等过程在增殖细胞中互联^[22]。 ^{18}FDG -PET 能够检测由于小分子破坏 PI3K 信号通路而降低的肿瘤葡萄糖摄入, 而对肿瘤摄入 ^{18}FDG 的抑制能力与肿瘤消退有关。 ^{18}FDG PET-CT 成像在乳腺癌中基本应用于癌症分期以及监视临床试验的治疗反应^[21,23-24]。

4 生物发光成像 (BLI)

BLI 是一种实用的小动物成像实验技术, 其图像信号强弱依赖于荧光素酶的表达水平以及信号产生位置的深度, 在外源性底物、ATP 以及氧气存在的条件下, 荧光素酶与底物作用发出可见光信号从而被检测器捕捉成像。多种荧光素酶/底物配对已应用于体内成像, 如 firefly/luciferin、luciferase/coelenterazine 等。在实验中, 对实验动物腹腔注射荧光素 ($>100\ \text{mg/kg}$), 随后进行数据获取。与荧光技术不同, 生物发光技术没有固定背景, 因此具有较高的敏感性, 但目前为止还不能进行靶信号的绝对定量。BLI 基本应用于同一动物在一定条件下 (位置不变) 的追踪成像, 以提供半定量生物学数据, 在乳腺癌实验研究中用于基因表达成像从而评价疗效^[25-27], 或进行体内过氧化物酶活性检测成像^[28]。生物发光显微术是新研发出的成像技术, 因其在低光照下的良好细胞成像能力获得了细胞生物学研究人员的关注, 降低了对荧光分子的需求。

5 近红外荧光成像技术 (NIRF)

由于新型探针和光学成像设备的发展, 肿瘤的体内近红外荧光 (NIRF) 分子成像近年来得到了快速发展。传统的有机荧光基团具有一些显著的局限性: 绝大多数的近红外荧光染料都难溶于水, 且不稳定, 很难与生物分子共价结合; 生物分子或其他肿瘤靶配体与荧光基团结合时, 每个配体通常只有少数荧光基团存在, 因此敏感性相对较低; 传统荧

光染料受快速光漂白作用的影响,不适用于长期分子成像;荧光染料的体内毒性尚未知,目前仅有一种荧光染料吲哚花青绿(ICG)已被FDA批准用于临床^[29]。

近年来纳米科技的发展也对生物制药起到了积极作用,其中最重要的有基于纳米颗粒的荧光探针,用于体内肿瘤分子成像。这样的探针能够通过肿瘤微脉管系统的高通透性和滞留效应(EPR效应)靶向肿瘤,或者通过肿瘤细胞受体与生物分子修饰纳米颗粒的特异性结合来进行靶向。使用纳米粒成像探针能将肿瘤受体的被动富集和主动靶向都纳入医学成像的范围内,从而对早期癌症进行检测。现已有针对不同肿瘤成像(声光成像、MRI、拉曼成像、NIRF成像等^[30-32])所使用的纳米粒,包括NIR染料纳米粒、无机荧光半导体纳米晶体、上转换发光纳米粒(UCN)、金团簇、银团簇等。为提高纳米粒的靶向作用,通常要对其进行表面修饰,目前开发较为完善的用于肿瘤体内分子成像的NIRF纳米探针主要有NIR染料纳米粒、NIRF量子粒(QD)、以及UCN。

6 手术中成像

目前手术切除仍为肿瘤治疗中最有效的方法之一,然而由于无法完全可见并与宿主组织区分,恶性肿瘤细胞群在手术中常常无法清除完全。随着显微技术和探针的发展,临床上已经利用其来进行细胞水平的手术中成像。肿瘤边缘可用不同荧光方法观察,如肿瘤细胞靶向^[33]、外周细胞蛋白水解或吞噬作用^[34]等。有研究表明多色荧光手术中活体显微术(color-FILM)已将现代实验显微技术应用于临床肿瘤外科治疗。

7 显像剂、报告分子和标记物

正常细胞和肿瘤细胞很难通过体内成像直接区分,因此需要对感兴趣的分子和细胞进行标记使其可见,从而成像。主要有3种途径:(1)编码报告分子(如发光蛋白或其他PET、MRI可检测的报告分子);(2)放射性示踪元素、荧光染料或磁标记亲和分子(如标记抗体或小分子);(3)双正交报告分子法。

具有分子靶向特异性的可注射显像剂能够用于鼠类和人类,但目前对肿瘤靶向性<5%,主要由于体内显像剂相比体外试剂具有更严格的设计标准,其中最根本的难点在于设计的显像剂应在体内具有高的靶本底比值。理想的显像剂应具有较小的本底

信号(如非特异性组织渗出、巨噬细胞的内化作用、肝肾对隐藏周围器官的消除作用、体内传递屏障等),以及在预期的分子靶点上具有较高浓度。因此目前的体内显影剂设计通常采用化学药品或生物学方法来达到放大信号的目的。所有的可注射显影剂都基于可检测的报告分子(如荧光染料、放射性同位素、磁性标记物等),超极化技术应用于MRI以提高信噪比,且能加强对多种疾病的生物标记物和代谢变化的实时鉴别。

使用荧光或光转换荧光蛋白、生物发光蛋白或其他融合蛋白标记物遗传报告分子在小鼠肿瘤模型中具有很大的局限性,但在基础科学研究中依然被广泛使用。光学报告基因被克隆到启动子/增强子区域,或表达为融合蛋白,从而进行生物学过程的纵向研究。遗传工程小鼠模型能够暂时性和组织特异性控制癌基因和/或肿瘤抑制基因,由于这些报告分子可被用于致癌性转化研究,以及药物功能、耐药性、毒性等研究^[35],因此具有特殊价值。近年来有大量具有高亮度和红移波长的新型荧光蛋白作为理想探针用于MPM和FMT成像^[36]。

8 结语和展望

MRI、PET、SPECT、CT等在临床治疗中常用来检测药物疗效,这些方法具有较高的空间分辨率,可用于实验小鼠模型以及新型转基因成像探针相结合。这些方法具有各自的优势,但单独使用也有局限性,因此正在对PET-CT、FMT-CT、PET-MRI等杂交成像平台进行开发,有利于数据构建和显影。诊断学已经逐渐与疾病治疗相结合,形成一种名为治疗诊断剂(theragnostics)的新方法,是生物科学的一种创新范式转变。生物信息学多模式平台整合了图像和生物学数据,如横断面解剖功能影像、可见光成像、基因和蛋白表达、药动力学和药物基因组学研究等,能够处理来源于多种图像的复杂生物医药信息。目前临床前成像技术也已经由肿瘤学和放射性药物研究扩展到新的领域,作为一种新的有价值的分子药物研究工具获得更加广泛的关注。

参考文献

- [1] 赵静,马骥,庞其昌,等.黄柏饮片光谱成像指纹图谱的研究[J].中草药,2010,41(3):384-387.
- [2] Beckmann N, Kneuer R, Gremlich H U, et al. In vivo mouse imaging and spectroscopy in drug discovery [J]. NMR Biomed, 2007, 20(3): 154-185.
- [3] Schambach S J, Bag S, Schilling L, et al. Application of

- micro-CT in small animal imaging [J]. *Methods*, 2010, 50(1): 2-13.
- [4] Ballou B, Ernst L A, Waggoner A S. Fluorescence imaging of tumors *in vivo* [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12(7): 795-805.
- [5] Sima P D, Kanofsky J R. Cyanine dyes as protectors of K562 cells from photosensitized cell damage [J]. *Photochem Photobiol*, 2000, 71(4): 413-421.
- [6] Badea C T, Drangova M, Holdsworth D W, *et al.* *In vivo* small-animal imaging using micro-CT and digital subtraction angiography [J]. *Phys Med Biol*, 2008, 53(19), R319-R350.
- [7] Pan X, Sidky E Y, Vannier M. Why do commercial CT scanners still employ traditional, filtered back-projection for image reconstruction? [J]. *Inverse Probl*, 2009, 25(12): 123009.
- [8] Mouchess M L, Sohara Y, Nelson M D, *et al.* Multimodal imaging analysis of tumor progression and bone resorption in a murine cancer model [J]. *J Comput Assist Tomogr*, 2006, 30(5): 525-534.
- [9] Li X F, Zanzonico P, Ling C C, *et al.* Visualization of experimental lung and bone metastases in live nude mice by X-ray microcomputed tomography [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2006, 5(2): 147-155.
- [10] Schambach S J, Bag S, Groden C, *et al.* Vascular imaging in small rodents using micro-CT [J]. *Methods*, 2010, 50(1): 26-35.
- [11] Dobrucki L W, Dione D P, Kalinowski L, *et al.* Serial noninvasive targeted imaging of peripheral angiogenesis: Validation and application of a semiautomated quantitative approach [J]. *J Nucl Med*, 2009, 50(8): 1356-1363.
- [12] Gössl M, Herrmann J, Tang H, *et al.* Prevention of vasa vasorum neovascularization attenuates early neointima formation in experimental hypercholesterolemia [J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104(6): 695-706.
- [13] Durkee B Y, Weichert J P, Halberg R B. Small animal micro-CT colonography [J]. *Methods*, 2010, 50(1): 36-41.
- [14] Winter P M, Caruthers S D, Kassner A, *et al.* Molecular imaging of angiogenesis in nascent Vx-2 rabbit tumors using a novel alpha(nu)beta3-targeted nanoparticle and 1.5 Tesla magnetic resonance imaging [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(18): 5838-5843.
- [15] Heerschap A, Sommers M G, in't Zandt H J, *et al.* Nuclear magnetic resonance in laboratory animals [J]. *Methods*, 2004, 385: 41-63.
- [16] Viant M R. Revealing the metabolome of animal tissues using ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 358: 229-246.
- [17] Al-Saffar N M, Troy H, Ramirez de Molina A, *et al.* Non-invasive magnetic resonance spectroscopic pharmacodynamic markers of the choline kinase inhibitor MN58b in human carcinoma models [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(1): 427-434.
- [18] McPhail L D, Chung Y L, Madhu B, *et al.* Tumor dose response to the vascular disrupting agent, 5,6-dimethyl-xanthenone-4-acetic acid, using *in vivo* magnetic resonance spectroscopy [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(10): 3705-3713.
- [19] Kumar R, Dhanpathi H, Basu S, *et al.* Oncologic PET tracers beyond [(18) F] FDG and the novel quantitative approaches in PET imaging [J]. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2008, 52(1): 50-65.
- [20] Dunphy M, Lewis J. Radiopharmaceuticals in preclinical and clinical development for monitoring of therapy with PET [J]. *J Nucl Med*, 2009, 50 (Suppl. 1): 106S-121S.
- [21] Ben-Haim S, Ell P. ^{18}F -FDG PET and PET/CT in the evaluation of cancer treatment response [J]. *J Nucl Med*, 2009, 50(1): 88-99.
- [22] Vander Heiden M, Cantley L, Thompson C. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation [J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029- 1033.
- [23] Foster J A, Abdolrasulnia M, Doroodchi H, *et al.* Practice patterns and guideline adherence of medical oncologists in managing patients with early breast cancer [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2009, 7(7): 697-706.
- [24] Ellis M J, Gao F, Dehdashti F, *et al.* Lower-dose vs high-dose oral estradiol therapy of hormone receptor-positive, aromatase inhibitor-resistant advanced breast cancer: A phase 2 randomized study [J]. *JAMA*, 2009, 302(7): 774-780.
- [25] Kalra J, Warburton C, Fang K, *et al.* QLT0267, a small molecule inhibitor targeting integrin-linked kinase (ILK), and docetaxel can combine to produce synergistic interactions linked to enhanced cytotoxicity, reductions in P-AKT levels, altered F-actin architecture and improved treatment outcomes in an orthotopic breast cancer model [J]. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(3): R25.
- [26] Szafran A A, Folks K, Warram J, *et al.* Death receptor 5 agonist TRA8 in combination with the bisphosphonate zoledronic acid attenuated the growth of breast cancer metastasis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(12): 110-1116.
- [27] Wang H, Cao F, De A, *et al.* Trafficking mesenchymal stem cell engraftment and differentiation in tumor-bearing mice by bioluminescence imaging [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(7): 1548-1558.
- [28] Gross S, Gammon S T, Moss B L, *et al.* Bioluminescence

- imaging of myeloperoxidase activity *in vivo* [J]. *Nat Med*, 2009, 15(4): 455-461.
- [29] Ballou B, Ernst L A, Waggoner A S. Fluorescence imaging of tumors *in vivo* [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12(7): 795-805.
- [30] Yang X M, Stein E W, Ashkenazi S, *et al.* Nanoparticles for photoacoustic imaging [J]. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 2009, 1(4): 360-368.
- [31] Keren S, Zavaleta C, Cheng Z, *et al.* Noninvasive molecular imaging of small living subjects using Raman spectroscopy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 5844-5849.
- [32] Bentolila L A, Ebenstein Y, Weiss S. Quantum dots for *in vivo* small-animal imaging [J]. *J Nucl Med*, 2009, 50(4): 493-496.
- [33] Koyama Y, Hama Y, Urano Y, *et al.* Spectral fluorescence molecular imaging of lung metastases targeting HER2/neu [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 2936-2945.
- [34] Kirsch D G, Dinulescu D M, Miller J B, *et al.* A spatially and temporally restricted mouse model of soft tissue sarcoma [J]. *Nat Med*, 2007, 13: 992-997.
- [35] Ventura A, Kirsch D G, McLaughlin M E, *et al.* Restoration of p53 function leads to tumour regression *in vivo* [J]. *Nature*, 2007, 445: 661-665.
- [36] Drobizhev M, Tillo S, Makarov N S, *et al.* Absolute two-photon absorption spectra and two-photon brightness of orange and red fluorescent proteins [J]. *J Phys Chem B*, 2009, 113(4): 855-859.

• 信 息 •

FDA 药品安全信息通告：白血病治疗药达沙替尼或存在肺动脉高压风险

美国食品药品监督管理局（FDA）2011年10月11日向公众发布白血病治疗药达沙替尼（dasatinib，商品名 Sprycel）安全性信息。该药存在发生罕见且严重的肺动脉高压（pulmonary arterial hypertension, PAH）的风险，该病可致肺动脉内的血压异常升高。相关风险信息已添加到达沙替尼药品说明书的警告与注意事项部分。

达沙替尼最早于2006年6月在美国获批，制造商百时美施贵宝公司（Bristol-Myers Squibb）。自获批以来，从制造商百时美施贵宝全球药物警戒数据库中识别出多例肺动脉高压病例。但尚无该疾病致死的报告。在我国2011年该药已获准进口。

制造商药物警戒数据库中收集的12名PAH病例经右心导管插入术获得证实，已收集到的病例中，出现PAH的患者均是使用达沙替尼治疗后发生。患者接受达沙替尼治疗后出现PAH的时间各异，有的在一年以上。在达沙替尼治疗期间被确诊为PAH的患者，常常同时服用其他药物或患有其他相关的疾病。其他病症也可引起与PAH相似的症状。因此，对具有症状的患者，如果其他原因已被排除，可考虑确诊PAH与达沙替尼的相关性的。如果患者停用达沙替尼，PAH可能会出现逆转，在部分病例显示停用达沙替尼之后观察到血液动力学和临床参数有所改善。

专业医护人员应在患者开始达沙替尼治疗之前和治疗期间，评估潜在心肺疾病迹象和症状的风险。一旦确诊是PAH，应不再使用达沙替尼。

患者在服用达沙替尼期间，如出现PAH症状应及时通知开具处方的专业医护人员。

（本刊讯）