

**硕士学位论文**



**A549-LUC2-GFP 移植瘤裸鼠的几种影像学瘤体边界分析研究**

**The** investigation of the indication value of several imaging technique on A549-LUC2-GFP mice tumor **boundary**

**专业名称：影像医学与核医学研究生：向湘**

**导** **师：强永刚**

**广州医科大学二O一五年四月**

**学位论文原创性声明**

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。文中依法引用他人的成果、对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。

本人如违反上述声明，愿意承担以下责任和后果： 1．交回学校授予的学位证书；

2．学校可在相关媒体上对作者本人的行为进行通报；

3．本人按照学校规定的方式，对因不当取得学位给学校造成的名誉损害，进行公开道歉。

4．本人负责因论文成果不实产生的法律纠纷。

论文作者签名： 日期： 年 月 日

**学位论文知识产权权属声明**

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属广州医科大学及附属单位。广州医科大学及附属单位享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为广州医科大学及附属单位。任何其他收存和保管本论文的单位和个人，未经本论文作者、导师授权，不得将本论文转借他人、复制、抄录或以其他任何方式传播，否则，引起有碍作者的著作权益问题，将会追究相应的法律责任。

论文作者签名： 日期： 年 月 日

导 师 签 名 ： 日期： 年 月 日

**关于学位论文使用授权的说明**

1、学校可以保留本学位论文的原件及复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复印手段保存、汇编学位论文； 2、本人授权学校向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。送交学位论文时间选择（请在下面相应栏内打“√” ）：

①答辩后即可送：是 否

②延迟一年后送：

③延迟二年后送：

④延迟三年后送：

论文作者签名： 日期： 年 月 日

导 师 签 名 ： 日期： 年 月 日

**目** 录

**A549-LUC2-GFP移植瘤裸鼠的几种影像学瘤体边界分析研究**

# 中文摘要

**研究目的：**

通过构建能稳定表达荧光素酶及绿色荧光蛋白的人肺癌A549-LUC2-GFP细胞株，建立了A549-LUC2-GFP人肺癌细胞裸鼠移植瘤模型，在该动物模型基础上分别进行裸鼠micro活体生物发光成像、micro 18F-FDG PET亲肿瘤显像、micro CT断层扫描、X线摄影和99mTc-MIBI放射性扫描，然后处死成像裸鼠，快速制成冰冻切片，对切片分别进行微距拍摄、绿色荧光和放射性扫描成像。利用图像处理软件，参照病理切片对各种获得图像及边界进行对比分析，为肺肿瘤放疗照射野的方案制定提供影像学实验依据。

**研究方法**

1、A549-LUC2-GFP细胞株的构建

将慢病毒载体PLenti-LUC2-GFP与辅助质粒共同转染293T细胞，制备好慢病毒，用此慢病毒感染人肺腺癌A549细胞，继续经嘌呤霉素筛选出持续表达较强荧光信号的细胞，冻存备用。

2、A549-LUC2-GFP移植瘤裸鼠模型的构建、成像及图像处理分析。

将A549-LUC2-GFP细胞按5×10 6个/只接种在裸鼠臀部皮下，4周后可成瘤。裸鼠动物模型注射适量的18F-FDG核素显像剂后对小鼠进行micro PET成像和micro CT断层扫描，二者的图像进行融合并三维重建，利用活体成像系统对该小鼠模型进行活体荧光成像和生物发光成像，并对小鼠模型进行X光拍摄。对不同影像设备拍摄的图像进行对比分析。

3、肿瘤组织切片扫描成像

同一动物模型麻醉后，尾静脉注射99mTc-MIBI显像剂，2h后取肿瘤组织，快速制成冰冻切片，微距拍摄后，利用荧光/化学发光及同位素影像分析仪分别对切片进行荧光成像和放射性扫描成像，分析几种图像。

4、病理组织学检查

1

将肿瘤块剥离后固定，制成石蜡组织切片，常规HE染色后在光镜下观察肿瘤的病理特点，参照病理图片对所有的图像进行分析。

**研究结果：**

1、成功构建了A549-LUC2-GFP细胞株，荧光信号较强，发光稳定，96孔板最低可检测到100个荧光细胞，荧光发光光子数与细胞数成正相关，相关系数R2为1.00。肿瘤生长过程中，荧光发光的强度与肿瘤生长的大小相一致，荧光发光光子数与肿瘤生长的天数成正相关，相关系数R2为0.93。

2、裸鼠A549-LUC2-GFP肿瘤模型显像，几种成像方法对同一肿瘤模型的显示不尽相同，X线和CT显示肿瘤部位呈低密度影，其边界不如PET和生物发光成像显示的肿瘤边界清晰，生物发光成像对肿瘤细胞有较精确的定位和定量，而PET能更准确的显示肿瘤的生长状态、进展情况和功能代谢。肿瘤生长第15天，PET所示肿瘤面积为121（像素点2），周长为35（像素点）；生物发光成像所示肿瘤面积为59（像素点2），周长为23（像素点）；肿瘤生长第55天，PET所示肿瘤的面积为1840（像素点2），周长为168（像素点）；生物发光所示肿瘤面积为3200（像素点2），周长为236（像素点）。3D图能展示肿瘤的区域、位置和形态。合成图对肿瘤的特性有更全面和准确的指示。肿瘤组织切片完整，能清楚的看到肿瘤组织及其边界、包膜，绿色荧光扫描成像和放射性扫描成像效果良好，分别对肿瘤图像进行了进一步的补充。利用图像软件对图像分析后得到，绿色荧光扫描成像肿瘤切片的面积为：4554.6±240.8，放射性扫描成像肿瘤切片的面积为：4344.0±294.6，两者的差异性无统计学意义，t=1.24，P=0.25；绿色荧光扫描肿瘤切片的周长为：304.0±53.0，放射性扫描肿瘤切片的周长为：291.4±64.6，两者的差异性无统计学意义，t=0.34，P=0.75。

结论：

1、慢病毒介导的A549-LUC2-GFP细胞荧光信号较强，发光稳定，构建裸鼠A549-LUC2-GFP

模型能有效动态的监测A549细胞的生长过程。

2、A549-LUC2-GFP细胞裸鼠移植瘤模型的影像对比分析，其中X光片和CT对肿瘤主要起定位作用。PET和生物发光成像能清晰的显示肿瘤的区域和边界，生物发光对肿瘤细胞的数量有较精确的定量，而PET在肿瘤早期诊断以及提示肿瘤细胞的生长状态和进展情况方面有其独特的优势。PET/CT结合的3D图像直观的显示了肿瘤的大小、部位和代谢旺盛区。PET/CT成像与生物发光成像结合更全面的描述了肿瘤的边界、生长情况和生理病理特性。

2

3、通过多种影像方法，从活体到切片分别展示了肿瘤的形态、大小和特点，不同的影像学方法联合应用，弥补了单一影像信息的缺失和不足，对临床诊断和治疗以及疗效监测和预后评定提供了一定的指导作用。

【关键词】A549-LUC2-GFP； 肺肿瘤裸鼠模型； 生物发光与核医学成像； 图像对比； 放疗照射野

3

**The investigation of the indication value of several imaging technique on A549-LUC2-GFP mice tumor boundary**

**Abstract**

**Objective:** Human lung cancer cells A549-LUC2-GFP lung transplantation tumor BALB/C-nunu nude mice models which can express luciferase and fluorescent were set up, micro PET imaging with 18F-FDG tail vein injection were applied for the mice, micro CT imaging and micro bioluminescent imaging, then to analyze the different images by fuse or reconstruction. Remove the tumor tissue after tail vein injection of 99mTc-MIBI, fast frozen sections were made, respectively macro photography, green fluorescence and autoradiography scanning imaging. The use of image processing software, refer to the pathological sections of various images were analyzed, and provide the experimental basis for the formulation of imaging diagnosis of lung tumors and the treatment plan.

**Methods:**

1. The construction of A549-LUC2-GFP cell lines.

With PLenti-LUC2-GFP and its auxiliary plasmid transfect 293 t cells, get the lentivirus, then use this lentivirus infection the human lung adenocarcinoma A549 cells, continue add puromycin screened expressed strong fluorescence signal cells, cryopreservation standby.

2. Construction, imaging and image processing and analysis of A549-LUC2-GFP models in nude mice. Human lung cancer cells A549-LUC2-GFP were inoculated subcutaneously in BALB/C-nunu nude mice, every mice were inoculated 5×10 6 cells, 4 weeks after, micro PET imaging with 18F-FDG tail vein injection were applied for the mice, micro CT imaging, X-ray imaging and micro bioluminescent imaging, fuse or reconstruction images, then analyze the different images.

3. Tumor slices scanning imaging.

Anaesthetizing animals, with 99mTc-MIBI tail vein injection were applied for the mice, then striping the tumor, making rapid frozen sections, Macro photo, Fluorescence scanning and autoradiography scanning, analysis of several images.

4

4. Histologic examination.

Making Paraffin section of tumor, HE dyeing, Observe the pathological changes of tumor by microscope.

**Results:**

1. A549-LUC2-GFP cell lines were set up successfully, Fluorescent signal is stronger, light stability, can detect 100 cells. The photon number is closely relative to the cell number. The correlation coefficient is 1.00. And the intensity of the fluorescent light is consistent with the size of the tumor growth, Fluorescent light photon number is closely relative to the number of days of the tumor growth. The correlation coefficient is 0.93.

2. The images are different, X-ray and CT showed the tumor site was the low density shadow, PET and fluorescence imaging showed the tumor area and boundary is clearer than X-ray and CT. Bioluminescent imaging has more accurate location and more accurate quantitative to tumor cells, and PET more accurately show tumor growth status, progress and metabolic function. The first 15 days of tumor growth, PET tumor area of 121 pixels as shown in points, a circumference of 35 pixels; bioluminescence imaging of tumor area shown as 59 pixels, 23 pixels circumference; the first 55 days of tumor growth, PET which showed that the tumor area of 1840 pixels, 168 pixels perimeter; luminous shown biological tumor area of 3200 pixels, 236 pixels perimeter. Stereo image vividly shows the tumor area, location and form. Synthetic image more comprehensively and accurately indicate the characteristics of the tumor. Tumor section is complete, the effect of green fluorescence scanning imaging and autoradiography scanning imaging are good, describe the characteristics of the tumor is effective. Using image software analysis the images, green fluorescence scanning imaging of tumor slice area: 4554.6±240.8, autoradiography scanning imaging of tumor slice area:

4344.0±294.6, it's no statistically significant differences between them, t=1.24, P=0.25. The

Perimeter of the green fluorescence scanning tumor slice is: 304.0±53.0, the perimeter of the autoradiography scanning tumor slice is: 291.4±64.6, it's no statistically significant differences between them, t=0.34, P=0.75.

**Conclusions:**

5

1. The A549-LUC2-GFP cells base on lentivirus have strong and stable fluorescence signal, setting nude mice A549 LUC2 - GFP model can effectively and dynamically monitor the growth process of A549 cells.

2. X-ray and CT main positioning of the tumor. PET and bioluminescent imaging can clearly show that the tumor area and the boundary, and PET have its unique advantage for early diagnosis and describing the growth status and progress of tumor cells. PET/CT and three-dimensional reconstruction image intuitively shows the tumor size, location and metabolism area. The combination of PET/CT imaging and bioluminescent imaging can provide more comprehensive information of tumor.

3. Several imaging methods, Studies both in vivo and in vitro, are more comprehensive indicators of the tumor morphology, boundary and pathophysiological characteristics, Combinations of different imaging techniques can reduce the defects and errors caused by single imaging method. So provide some guidance for clinical diagnosis and treatment.

**Keywords:** A549-LUC2-GFP; Lung tumor model in nude mice; Bioluminescence imaging and nuclear medicine imaging; Image contrast; Radiotherapy radiation field

6

# 中英文对照表

**英文全名 中文名称**

GFP Green Fluorescent Protein 绿色荧光蛋白 DMSO Dimethyl Sulfoxide 二甲基亚砜 PBS Phosghate Buffered Saline 磷酸盐缓冲盐液

CT Computed Tomography 计算机 X 射线断层扫描

MR Magnetic Resonance 磁共振

SPECT Single Photon Emission Computed 单光子发射计算机断层 PET positron emission tomography 正电子发射计算机断层扫描 SPF Specific Pathogen Free 无特定病原体

FBS Fetal Bovine Serum 胎牛血清

MIBI Methoxyisobutylisonitrile 甲氧基异丁基异腈

ROI Region of Interest 感兴趣区域

MDR Multidrug Resistance 多药耐药 PCR Polymerase Chain Reaction 聚合酶链反应 LUC Luciferase 荧光素酶 BLI Bioluminescence imaging 生物发光成像 FLUI Fluorescence imaging 荧光成像

FDG β-2-[ 18 F] -Fluoro-2-deoxy-D-glucose β-2-[F]氟-[2-脱氧-D-葡萄糖](http://www.baidu.com/s?wd=2-%E8%84%B1%E6%B0%A7-D-%E8%91%A1%E8%90%84%E7%B3%96&amp;hl_tag=textlink&amp;tn=SE_hldp01350_v6v6zkg6) MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide [噻唑蓝](http://baike.baidu.com/view/4025606.htm) BALB/c-nu/nu 无胸腺裸鼠

7

前 言

肺癌在我国发病率呈逐年上升趋势，也是全世界范围内最常见的恶性肿瘤之一，肺癌致死率高，大多数患者发病时已经为晚期，临床上多采用放射治疗为主的综合治疗，只有约15%-20%的Ⅰ期和Ⅱ期的非小细胞癌能够进行手术切除和化疗[1-3]。然而，在利用放射线对肺癌进行治疗时，射线常常也会损伤肿瘤周围的正常组织，并且放疗时间越长、放射线剂量越大，正常组织所受到的损伤也会越严重[4, 5]。因此，无论是手术还是放疗，获得较精确的肿瘤区域和边界及其浸润、进展情况是治疗成功的关键，目前临床上进行肿瘤放疗时，主要是在影像资料的指导下，往病灶外扩展2—3cm或计算机图像拟合程序确定放疗靶区，这种方法带有很大的主观性，不能保证在不损伤正常细胞的前提下精确的杀伤肿瘤细胞。

目前，依靠单一的影像学技术做出的诊断越来越少，病情的复杂多变决定了我们必须要依靠多重影像学诊断，通过不同图像之间的比较、分析，得到更为精确的诊断结果。而不同的检查技术存在不同的优缺点，如何使病灶在形态及功能代谢等多方面都更好的显示成为影像学科研究的热点。

核医学发射计算机断层扫描（PET和SPECT），其原理是放射性核素标记物参与体内器官或细胞的循环代谢，突破了单纯依赖“肿瘤形态学”的成像方法，由于核医学图像边界不够清晰，限制了该方法在临床肿瘤上的广泛应用，导致一些临床医师仅依赖CT和MR方法，然而

PET放射性核素发出的正电子与组织中的负电子结合产生湮灭辐射，可以从分子水平观察机体内的代谢情况和生理生化变化，还能获得病灶区及全身的断面图像和三维定量结果，是核医学分子影像技术的重要手段。

CT成像的原理是用X射线对检查部位进行扫描，扫描层面的厚度和结构密度不同，探测器接收到的射线也不相同，转变成可见光，光子信号再转换成电信号，经转换器转换成数字信号，通过计算机处理构成CT图像，CT的发明，极大的推动了医学的发展。CT与PET结合能同时进行病灶的解剖显像和功能显像，由于CT和PET都可以对全身断层扫描，所以能重建三维的图像，两者融合的三维图像对病灶的描述更具体和更准确。

近年来，分子影像学的另一项重要技术—可见光成像技术得到飞速发展，可见光成像技术主要包括荧光（fluorescence）与生物发光（bioluminescence）两种。荧光技术主要利用荧光报告基团如GFP、RFP及Cyt等标记细胞或DNA，通过一定波长的激发光源激发其发光。生物

8

发光成像技术则利用荧光素酶（Luciferase）基因标记，与底物荧光素（Luciferin）结合催化发光，两者通过灵敏度极高的光学检测仪器，可直接监测生物体内的细胞活动和基因行为，观测活体内肿瘤的生长及转移、感染性疾病发展过程以及特定基因的表达等生物学过程[6]。荧光的信号强，发光稳定，且研究成本低，容易操作，但受到活体内深度的限制，背景噪音也高。生物发光的灵敏度和特异性都远远大于荧光成像，但需经底物催化发光，很多研究者在实验中利用绿色荧光蛋白和荧光素酶对细胞或研究对象进行双重标记[7, 8]，荧光成像技术用于体外检测，观察细胞生物学状态，在活体动物体内则利用生物发光进行研究，具有很好的成效。

18F-FDG和99mTc-MIBI是目前临床上常用的两种肿瘤诊断的显像剂，两者对肿瘤显像的原理不同，18F-FDG能准确反映机体内的葡萄糖代谢水平，恶性肿瘤细胞的代谢旺盛，对葡萄糖的需求增加，注射18F-FDG后，肿瘤病灶对18F-FDG呈高摄取[9, 10]；99mTc-MIBI通过依赖细胞膜和线粒体膜的负电位而在肿瘤细胞浓聚[11]。

本实验基于上述原理，采用绿色荧光蛋白和荧光素酶对肺腺癌A549细胞进行双重标记，通过一系列实验在体外检测细胞的生长特性和标记率，然后将标记的稳定表达荧光蛋白和荧光素酶的A549细胞注射进裸鼠体内，构建成裸鼠A549-LUC2-GFP动物模型，不仅对模型进行常规的X光和CT拍摄，还通过PET和光学成像仪对其成像，对几种成像结果进行对比分析，并将不同的影像结果结合，再引入99mTc-MIBI显像剂，将肿瘤组织制成快速切片进行反射性扫描，从切片水平用两种扫描成像方法进一步对肿瘤的生长和肿瘤边界细胞分布状况作补充，旨在更全面的观察肿瘤的生长特性，为临床诊断、放疗靶区的勾画以及放疗方案的制定提供一定的实验依据。

9

目 录

[中文摘要](#_Toc686790170) 3

[结论：](#_Toc686790171) 3

**[Abstract](#_Toc686790172)** 4

[中英文对照表](#_Toc686790173) 5

[前 言](#_Toc686790174) 6

[第一部分 稳定表达荧光素酶的](#_Toc686790175)**[A549-LUC2-GFP](#_Toc686790175)**[人肺腺癌细胞肿瘤模型的建立](#_Toc686790175) 7

[实验材料](#_Toc686790176) 7

[实验方法与步骤](#_Toc686790177) 8

[实验结果](#_Toc686790178) 10

[讨论](#_Toc686790179) 11

[第二部分 裸鼠移植瘤模型四种图像采集及分析](#_Toc686790180) 11

[实验材料和仪器](#_Toc686790181) 11

[实验方法和步骤](#_Toc686790182) 12

[实验结果](#_Toc686790183) 12

[讨论](#_Toc686790184) 15

[第三部分 肿瘤切片扫描成像及病理观察](#_Toc686790185) 15

[实验材料](#_Toc686790186) 15

[实验结果](#_Toc686790187) 17

[讨论](#_Toc686790188) 19

[结论](#_Toc686790189) 19

[参考文献](#_Toc686790190) 20

[综述](#_Toc686790191) 22

[参考文献](#_Toc686790192) 23

# 第一部分 稳定表达荧光素酶的**A549-LUC2-GFP**人肺腺癌细胞肿瘤模型的建立

慢病毒系统可以将所携带的外源基因以转座的方式整合进入靶基因，基因组不会发生重排，因此外源基因不会改变[12]。脂质体转染的方法也可以实现基因整合，但需经长期筛选才能得到高效表达目的基因的细胞，另外，获得细胞的荧光值会随着传代代数增加而减弱。腺病毒载体以同源重组的方式进行基因整合，整合过程中使基因组发生了重排，外源基因的结构和性质有可能改变。而逆转录病毒载体只能转染有分裂能力的细胞[13]，所以本实验选择慢病毒载体介导，结合脂质体将LUC2基因整合进A549细胞，获得稳定发光的细胞，建立裸鼠移植瘤模型后通过荧光成像方法对瘤体边界进行观察和分析。

# 实验材料

## 1、 细胞株

A549细胞、293T细胞、慢病毒系统和表达载体pLenti-FLUC2-GFP由广州医科大学实验医学研究中心刘启才教授提供。

## 2、 实验动物

BALB/c-nu/nu裸鼠10只，雌性（SPF级4周龄，体重为10±2g）。购自广东省医学实验动物中心。合格证号：SCXK(粤) 2008-0002。

## 3、 实验试剂

1640培养基 美国GIBCO公司

胎牛血清美国GIBCO公司

链霉素、青霉素美国GIBCO公司

DMSO美国Sigma公司

10

嘌呤霉素美国Invitrogen公司

胰蛋白酶美国GIBCO公司

LipofectamineTM2000美国Invitrogen公司

戊巴比妥钠德国MERCK公司

D-Luciferin美国Promega公司

## 4、 仪器及耗材

SWC-J100型超净工作台苏州净化公司

Z2 Coulter Particle Count细胞计数器美国Beckman公司Forma-86C MLT Freezer超低温冰箱美国Thermo公司Forma 3111型CO2培养箱美国Thermo公司

光学显微镜美国Leica公司

Night OWLⅡLB983 NC100小动物活体德国Berthold公司成像系统

## 5、 试剂配制

### 5.1 细胞培养液：

|  |  |
| --- | --- |
| 1640 培养基 | 85-90% |
| FBS | 10-15% |
| 青霉素、链霉素 | 5% |

### 5.2 血清

胎牛血清分装至50ml离心管中，40ml每管，用封口膜密封好放在－20℃备用。需要使用时从－20℃拿出，放在4℃冰箱使其冻融。

5.3戊巴比妥钠溶液

戊巴比妥钠溶液终浓度为10mg/ml，用电子天平称取1g戊巴比妥钠干粉，加入100ml生理盐水，充分混匀使其融化，再用0.2um针孔滤器过滤后，保存在4℃冰箱。

5.4 PBS缓冲液

PBS粉剂1包，溶于2L双蒸水中，在磁力搅拌机上充分混匀（pH值为7.2～7.6），灭菌后备用。

11

# 实验方法与步骤

## **1**、 细胞培养

1.1细胞复苏

1.1.1从－80℃超低温冰箱中拿出装有细胞的冻存管，快速放入37℃水浴箱，左右振摇，使其快速解冻，然后将冻存管放进离心机内，配平后以1200rpm（r=8.4cm）离心10min，倒掉上清液。

1.1.2冻存管内加入1ml细胞培养液，用吸头充分吹打管底的白色细胞沉淀，使其形成悬液，移入25cm2的细胞培养瓶中，补加3ml培养液，继续吹打混匀，使细胞在瓶中均匀分布，置于

37℃的CO2培养箱中，每天观察细胞生长情况，2—3天更换一次培养基。

1.2细胞传代

1.2.1超净台使用前应打开紫外灯消毒至少15min。取出培养箱中的细胞培养瓶，倒掉培养液，加入PBS缓冲液（或D-Hanks液）充分冲洗2次，将死亡的细胞和杂质清除。

1.2.2将培养瓶中的液体吸干后加入0.25%的胰蛋白酶400μｌ，盖上盖子，将瓶身倾斜使消化液完全覆盖在细胞面上，放入培养箱中消化1—3分钟，拿出培养瓶在显微镜下观察，发现细胞质回缩，胞体变圆，细胞脱落浮动，此时即完成消化，立即加入培养液终止消化。

1.2.3加入1ml细胞培养液，用吸头吹打细胞生长面，将瓶壁上的细胞都吹打落入培养液中。

1.2.4将细胞悬液分装在培养瓶中（一般传成3瓶），所有瓶内补加培养液至4ml左右，盖上盖子，继续放进37℃的CO2培养箱中培养。

1.3细胞冻存

1.3.1选对数生长期的细胞冻存，从培养箱中拿出培养瓶，吸走培养基，加PBS缓冲液冲洗两遍后，加入胰酶消化1—3min，加1ml培养基终止，轻轻吹打细胞生长面，将细胞吹打脱离瓶壁，形成悬液，将细胞悬液移入15ml离心管中，培养瓶再加2—3mlPBS液洗净残余的细胞，同样移入15ml离心管的细胞悬液中，细胞计数后放入离心机以1200rpm离心10min。

1.3.2弃上清，按细胞个数加入培养基吹打混匀，重新成悬液，然后分装入无菌冻存管中，每管900μｌ，然后分别加入100μｌDMSO，轻轻吹打混匀，封闭冻存管，于4℃冰箱放置30min，移入－20℃冰箱放置30min，再移入－80℃超低温冰箱内过夜，最后移入到液氮容器内保存。

1.4细胞计数

1.4.1细胞消化后终止，吸入至15ml离心管中，补PBS液至10ml，吹打混匀。

1.4.2取200μｌ细胞悬液加入到装有20ml生理盐水的测量杯中，盖上杯盖，上下摇匀，摇匀

12

过程中尽量避免出现气泡。

1.4.3打开细胞分析计数仪，取下保护液，用双蒸水清洗测量管，执行命令为“function—start”。

1.4.4拿下双蒸水水杯，放上装有细胞的测量杯，待测液体没过测量管，开始计数，执行命令为“set up—start”。

1.4.5仪器上获得的读数乘以总体积即得到总细胞数。每个样本应至少测量三次，取平均值。

## **2**、 慢病毒制备

2.1 293T细胞常规培养，转染前1天将293T细胞种至六孔板，第2天细胞生长到90%，开始转染。

2.2以转染1孔为例。准备好PLenti-FLUC2表达质粒和另外3个包装质粒gag、rev、vsvg，按1μｇ表达质粒加相同量（摩尔）、总量为1μｇ的包装质粒来算。（表1）

表1 转染中各质粒的比例和算法

|  | Gag | Rev | vsvg |
| --- | --- | --- | --- |
| 大小 | 8889bp | 4180bp | 5821bp |
| 摩尔比 | 1 | 1 | 1 |
| 质量比 | 0.47 | 0.22 | 0.31 |
| 算法 | x(8889+4180+5821)=1（μ  ｇ） | |  |

2.3取1支灭菌EP管，加入250μｌOpti-MEM培养基（转染用的培养基是用灭活的血清配制），将上述1μｇ表达质粒和相同摩尔的、总量为1μｇ的三个包装质粒加入到EP管中，室温放置

5min。

2.4取1支灭菌EP管，加入250μｌOpti-MEM培养基，吸取10μｌLipofectamineTM2000加入到培养基中，混匀，室温放置5min。

2.5 5min后，将上述两支EP管混合，充分混匀后继续室温放置20min，此时DNA-Lipofectamine

复合物形成。

2.6胰酶消化293T细胞并计数，离心完后用含血清的培养液重悬293T细胞，调整细胞浓度为

1×10 6个/ml。

2.7取1块6孔板，1孔内加入1ml含血清的培养基，将准备好的DNA-Lipofectamine复合物

13

加入进去，混匀。

2.8将1ml重悬后的293T细胞（1×1 06个）加入到孔内，和DNA-Lipofectamine复合物混匀，

6孔板放进37℃，CO2培养箱过夜。

2.9第2天（12h后）更换成新的培养基，继续放在培养箱中转染。

2.10转染60h后，取出6孔板，收集细胞培养液（含病毒的上清），500rpm，4℃下离心15min，去除掉细胞碎片和杂质。取上清液用0.45um 的低蛋白结合能力的微孔滤膜过滤，继续经

8000rpm(r=8.4cm)，4℃离心12h，采用慢加速离心，离心完后，倒掉上清（注意：第1次离心收集上清，第2 次离心弃上清），加适量的培养基重悬病毒颗粒，置于4℃冰箱过夜，目的是使病毒颗粒充分溶解，然后保存在-80℃超低温冰箱。

## **3**、 建立稳定表达**LUC2**基因的**A549**细胞株

3.1 A549细胞常规培养，待细胞生长至40%融合度时，取出慢病毒，按感染复数200的比例用慢病毒感染A549细胞。

3.2感染3天后，加1μｇ/ml的嘌呤霉素对细胞进行筛选，将细胞置于荧光显微镜下观察，带有GFP基因的细胞在蓝光的激发下显示绿色荧光，维持嘌呤霉素筛选，常规进行传代，直到观察到所有的细胞表达绿色荧光蛋白能稳定表达，此时即为A549-LUC2-GFP细胞，可停止筛选，单光子仪检测细胞的发光光子数，并检测细胞的活性以及荧光值与细胞个数之间的相关性，将细胞冻存备用。

## **4**、 **MTT**法绘制细胞的生长曲线

4.1常规培养A549和A549-LUC2-GFP细胞，细胞消化、计数，分别将两种细胞种至96孔板，每孔种2×10 3个，两种细胞均设6个复孔。

4.2接种1天后，所有孔内加10μｌCCK8，继续放进37℃培养箱内孵育2h，将96孔板放在酶标仪上测量其在450nm处的吸光光度值，测量完后放回培养箱，连续测量6天，即可绘制出两种细胞的生长曲线。

## **5**、 建立裸鼠移植瘤模型

5.1 BALB/c-nu/nu裸鼠10只，雌性（SPF级4周龄，体重为10±2g），SPF级饲养。

5.2 A549-LUC2-GFP细胞常规培养，选取生长状态较好的细胞，消化后计数，将细胞浓度调整

14

为2.5×10 7个/ml。

5.3戴一次性无菌手套，选择裸鼠皮肤较厚的左侧臀部背侧进行皮下接种，接种前用酒精棉球对皮肤消毒，1ml的一次性无菌注射器抽取细胞悬液200μｌ，皮下注射，注意针头与皮肤平面呈5°，注射后在皮下形成皮丘，拔出针头，酒精棉球按压1min。

5.4所有裸鼠注射完毕，放回SPF级环境下继续饲养。

## **6**、 裸鼠移植瘤模型荧光成像

6.1裸鼠注射细胞后第5天，取出裸鼠，于活体成像系统上进行生物发光成像。

6.2打开Night OWLⅡLB983 NC100活体成像系统预冷30min，裸鼠称重，1ml的一次性无菌注射器抽取戊巴比妥钠，用酒精棉球局部消毒后，对裸鼠进行腹腔注射，麻醉剂量为50mg/kg。

6.3裸鼠麻醉完毕后，将其以俯卧位置于活体成像系统上，选择相应的拍照程序拍摄荧光。

6.4成像结束后将裸鼠放回SPF级环境继续饲养，每隔5天成像一次，一个月后，肿瘤生长到一定大小，可进行第二部分的实验。

# 实验结果

## 1、 A549-LUC2-GFP细胞生长状态良好，在荧光显微镜下可观察到细胞发出绿色荧光，细胞形态没有发生变化。（图1）



**图1 A5** **49-LUC2-GFP细胞在普通显微镜和荧光显微镜下的图像**

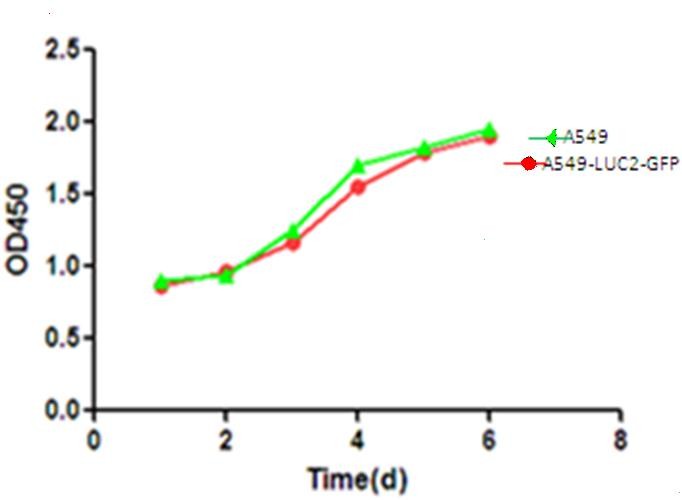
2、A549-LUC2-GFP细胞荧光值与细胞数量呈正相关，细胞数量越多，其荧光值越大，细胞个数为2.5×10 4，1.25×10 4, 6250，3125，1562，781，390，195，98, 0时对应的荧光值分别为：7.78×10 7、5.67×10 7、4.08×10 7、2.58×10 7、1.30×10 7、0.96×10 7、0.38×10 7、0.22×10 7、0.06×10 7、

15

0. 两者之间经Spearman秩相关与回归分析得到r＝1.00，R2＝1.00。



**图2 A5** **49-LUC2细胞体外生物成像结果**



zkq 20160118

3、MTT法绘制转染荧光基因后和未转染荧光基因的两种细胞生长曲线基本一致，细胞生长特性不受影响。（图3）

**图3** **两种细胞的生长曲线**

4、A549-LUC2-GFP细胞接种裸鼠的成功率为100%（n=10），活体荧光成像发光信号稳定，强度与肿瘤生长的大小相一致。（图4）裸鼠在生长至第2、5、10、15、20、25天时分别对应的荧光值为0.19×10 5、0.30×10 5、0.92×10 5、1.32×10 5、2.92×10 5和4.15×10 5。两者呈正相关，线性相

关分析得到r＝0.96，R2＝0.93。

16



**图4** **裸鼠肿瘤生长天数与荧光值变化图**

# 讨论

目前， ，基于细胞和分子水平的活体成像

Zkq 20160118

小动物的光学影像已经成为医学研究的重要工具

技术日趋成熟，已成为临床影像对比分析的重要手段。生物可见光成像主要采用分子荧光标记手段标记所研究的对象，通过自发荧光或外源性激发光激发产生荧光，从而对研究对象进行观测。目前普遍采用的荧光标记方法有：荧光蛋白、荧光素酶、荧光染料等。由于单一利用荧光蛋白观察肿瘤边界成像受背景光影响、噪声较高、检测深度受到限制的不足，本实验应用绿色荧光蛋白和荧光素酶标记肿瘤细胞，建立能稳定发光的裸鼠移植瘤模型，灵敏度好。用荧光素酶分子探针不存在背景光的影响，外界噪声也相对较少，更易于进行定量化的研究，但荧光素酶需要底物催化发光，在活体成像，不能适用于后期将模型制成连续切片后进行荧光扫描成像，因此将二者结合起来，可同时进行两种实验。

慢病毒系统可以将外源基因整合进入靶基因，靶基因能够在细胞中获得长期、稳定的表达，这为构建稳定发光的裸鼠移植瘤模型奠定了基础，此外，该模型易于构建，周期短，接种细胞后4周即可成瘤，能满足实验要求。

这一部分是构建模型的过程，通过慢病毒将荧光素酶和绿色荧光蛋白整合进A549细胞中，建立能稳定发荧光的裸鼠移植瘤模型，为后续的影像对比实验提供支撑。

17

# 第二部分 裸鼠移植瘤模型四种图像采集及分析

动物模型生长至15-60天内，将模型分别置于X光机、小动物PET/CT成像仪及小动物活体成像仪上进行四种影像拍摄和扫描，得到的图像用图像处理软件进行分析。

# 实验材料和仪器

裸鼠A549-LUC2-GFP模型

18F-FDG(370MBq)中ft大学分子影像中心实验室提供戊巴比妥钠德国MERCK公司

D-Luciferin美国Promega公司

Night OWLⅡLB983 NC100活体德国Berthold公司

成像系统

Zkq 20160118

Inveon小动物PET/CT成像仪 德国Siemense公司

IRW数据处理软件德国Siemense公司

Matlab R2011b软件美国Math Works公司

# 实验方法和步骤

## 1、 将裸鼠动物模型从SPF环境中取出麻醉后置于普通X光机上拍摄成像。

## 2、 打开Night OWLⅡLB983 NC100小动物活体成像系统预冷30min，同一裸鼠动物模型称重，

1ml的一次性无菌注射器抽取戊巴比妥钠，用酒精棉球局部消毒后，对裸鼠进行腹腔注射，麻醉剂量为50mg/kg。裸鼠麻醉完毕后，将其以俯卧位置于活体成像系统上，选择相应的拍照程序拍摄荧光。实验中分别选择荧光成像和生物发光成像两种模式对裸鼠进行拍摄。

## 3、 活体成像完成后三天内，再对该模型进行micro PET/CT成像。

3.1拍摄前动物禁食8h，同上以50mg/kg剂量的戊巴比妥对裸鼠进行腹腔注射麻醉。

3.2打开小动物PET/CT成像仪，设置好相关程序。

3.3动物麻醉后，操作人员穿防护服，取显像剂18F-FDG，用生理盐水配成约37KBq/μｌ（1uCi/

18

μｌ）浓度，裸鼠称重，取1ml 注射器抽取配好的显像剂对裸鼠进行尾静脉注射，裸鼠注射

18F-FDG剂量为3.7MBq，总体积不超过200μｌ。

3.4注射完后将小鼠以俯卧位用胶带固定在夹板上，等待40min，待显像剂在小鼠体内及肿瘤部位浓聚。

3.5 40min后，将放置小鼠的夹板固定在小动物PET/CT成像仪上，分别进行PET和CT两种断层扫描拍摄，图像保存在文件夹中。

3.6拍摄完毕后取出小鼠，采用IRW（Inveon Research Workplace）数据处理软件对采集到的

PET和CT图像进行处理。

3.6.1打开IRW软件，在左上角点击File→Manual Import，下拉菜单中选择datasets，进入数据库，按照日期和命名找到储存好的图片文件，打开文件夹，分别导入CT图像和PET图像。

3.6.2在导入的列表中按Ctrl键选中CT和PET图像，点击General Analysis按钮对图像进行常规分析。

3.6.3进入到数据处理页面，对CT和PET图像进行适当的调整，点击Registration对图像进行校准，进入Review页面，可以对校准后的图像进行窗宽、窗位的调整，可以选择两种图像的

颜色。

Zkq 20160118

3.6.4点击进入到ROI Quantification，画出所需要的感兴趣区，读取ID%/g值，即每克组织占

注射剂量的百分数。分别打开CT图像、PET图像及二者的融合图像，点击MIP按钮获得三种三维重建图。

3.7采用Matlab R2011b软件计算机平台对得到的图像进行二值化、去噪音、区域标记、抽取图像、获得参数等处理，对生物发光和PET图像进行对比，分别获得不同图像的周长和面积，单位用像素点值来表示，并对两种图像进行相对强度的扫描分析和细胞区域的移行细胞学分析。

19

# 实验结果

1、裸鼠A549-LUC2-GFP模型的X线成像，可以看到左侧臀部肿瘤呈低密度影，边界不很清晰。（图5）



**图5** **裸鼠模型的X线片图像**

2、分别取肿瘤生长期第15天和第55天zk的q裸2鼠0（16A0514198-LUC2-GFP）模型进行绿色荧光成像和生物发光成像，生物发光成像的灵敏度和特异性较高，显示肿瘤的区域远大于荧光成像的区域。

（图6）



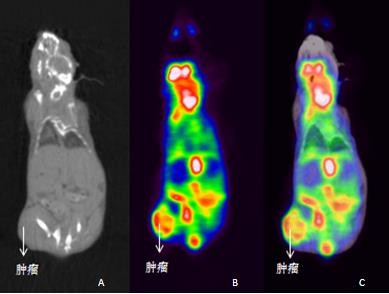
**图6** **同一裸鼠模型的两种可见光成像对比图**

A裸鼠A549-LUC2-GFP绿色荧光成像B裸鼠A549-LUC2-GFP生物发光成像

（左为肿瘤生长15天的裸鼠，右为肿瘤生长第55天的裸鼠）

20

3、18F-FDG在裸鼠体内心脏、胃肠道、肾脏及脑和眼球处均呈高摄取状态，左侧臀部肿瘤显像清晰，边界尚清楚。取冠状面肿瘤面积最大的图像，CT显示肿瘤呈中等密度软组织影，边界不清，与周围软组织几乎一致，横断面肿瘤较清晰。与PET图像融合能较准确的显示肿瘤的部位、形状和边界情况，三维重建后的图像见图7、图8。



**图** **7裸鼠A549-LUC2-GFP模型的CT、PET及两种图像融合**

A: CT图B: PET显像C: PET/CT融合图像D: CT扫描横断面



zkq 20160118

**图8** **两种图像及融合图像的三维重建**

A: CT图（A2图像受背景影响肿瘤部位不清，调整图像为A1可观察到左臀部肿瘤）B: PET显像C: PET/CT 融

合图像

## 4、 肿瘤生长第15天时，生物发光成像和PET成像均能较清晰的显示肿瘤，18F-FDG摄取率为

1.8%ID/g，采用Matlab软件得到生物发光所示肿瘤区域的面积为59（像素点2），周长为23（像素点）；PET显示肿瘤区域的面积为121（像素点2），周长为35（像素点）。PET显示的肿瘤

21

比生物发光显示的肿瘤区域大。而肿瘤生长第55天时，Matlab软件得到生物发光肿瘤面积为

3200（像素点2），周长为236（像素点）；PET成像肿瘤面积为1840（像素点2），周长为168

（像素点），18F-FDG摄取率为2.2%ID/g，此时PET所示的肿瘤区域小于生物发光所示的肿瘤区域。（图9、表2）



**图** **9裸鼠A549-LUC2-GFP肿瘤生长不同时期的生物发光和PET对比图**

A：生物发光图（第15天和第55天）B: PET显像（第15天和第55天）

表2 不同时期的两种图像肿瘤面积和周长

|  | | 15 天 |  |  | 55 天 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 生物发光 |  | PET | 生物发光 |  | PET |
| 2  面积（（像素点 ）） | 59 |  | 121 | 3200 |  | 1840 |
| 周长（（像素点）） | 23 |  | 35 | 236 |  | 168 |

两种图像面积比值0.49(59/121)

1.74(3200/1840)

两种图像周长比值0.66(23/35) 1.40(236/168)

## 5、 以肿瘤中央区为中心，分别从图示A→B→C方向进行扫描，得到两种肿瘤图像的相对强度变化趋势图（图10）。

22



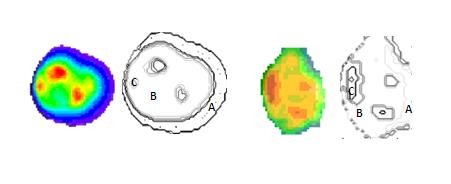


**图10** **两种方法成像肿瘤相对强度连续扫描**

注：箭头所指为扫描方向

## 6、 彩色图像基于红、绿、蓝三种颜色（RGB）构成，每种颜色有256个组别，可以有256（R）

×256（G）×256（B）＝1677万种颜色，应用Matlab软件计算机平台提取处理图像，两种图像方法（生物发光成像和PET成像）肿瘤区域细胞学移行分析，发现两者的细胞浓度分布基本一致。（图11）



**图11 两种图像（55天）的细胞学移行分析**

A：生物发光的外周蓝区和PET的外周绿区B：生物发光的周边绿区和PET的周边黄区C：生物发光的中央红区和PET的中央红区

23

5、PET/CT图像与生物发光活体成像的融合图像（55天）。（图12）



**图12** **PET/CT与生物发光融合图像**

注：红色为PET/CT边界，紫色为Luciferin荧光边界

# 讨论

X线拍摄和CT平扫主要用于观察对比度大的肺部、空腔脏器和密度高的骨性组织，对肿瘤显像效果欠佳，主要起到解剖定位作用，对肿瘤具体的形状、代谢进展情况和边界不能很好的显示。PET通过核素显像，将放射性核素标记在参与生命代谢的化合物上，将此化合物注射进入体内，可以从分子水平观察机体内的代谢情况和生理生化变化，具有早期诊断功能，PET没有定位功能，只能显示与该化合物相关的代谢旺盛区，属于功能显像，实验中发现，PET显像不仅能得到较清晰的肿瘤边界，还能显示肿瘤细胞的生长情况，不同时期的肿瘤细胞对核素的摄取浓度不同，高摄取区肿瘤细胞生长活跃，低摄取区肿瘤细胞可能出现坏死，由后期病理切片观察予以证实。因此将PET与CT图像结合在一起观察，可同时得到肿瘤的解剖和功能信息，已经为临床所采用。

18F-FDG（氟代脱氧葡萄糖）能准确反映机体内的葡萄糖代谢水平，恶性肿瘤细胞的代谢

旺盛，对葡萄糖的需求增加，注射18F-FDG后，肿瘤病灶对18F-FDG呈高摄取，18F-FDG是目前最主要的肿瘤显像剂。但是正常代谢旺盛的组织对18F-FDG的摄取也很高，有的甚至高过肿

24

瘤组织，若早期癌变病灶在代谢旺盛的正常组织区域，则不容易区分，有可能造成假阳性或假阴性显像。另外18F-FDG只在代谢比较旺盛的肿瘤组织处大量浓聚，对代谢率不高的良性肿瘤细胞、一些交界性肿瘤或者恶性肿瘤的坏死期，18F-FDG有可能不能很好的浓聚。

活体内的可见光成像技术主要包括荧光成像和生物发光两种，两种技术各有优缺点，发光原理不同，GFP发出的绿色荧光稳定性高，研究成本低，但受到活体内深度的限制，背景噪声也高。生物发光最低能检测到体内100个左右的细胞，低于100个细胞发光不易区别，但灵敏度和特异性都远远大于荧光成像[14]，实验中裸鼠A549-LUC2-GFP模型同时做了活体的荧光成像和生物发光拍摄，发现两者都能显出绿色荧光，但荧光成像所显示的肿瘤区域远远小于生物发光所显示的肿瘤区域，在非肿瘤区也发现有绿色荧光影响，因此在研究肿瘤边界时，选择能更精确指示肿瘤细胞的生物发光技术。

核医学PET/CT显像和生物发光显像这两种成像技术均为重要的分子影像技术，都是基于分子水平对病灶的病理生理、发病机制和进展情况进行描述，又能很好的指示病灶的区域和边界，从实验中可以看出，裸鼠A549-LUC2-GFP模型在两种设备显像下所示的肿瘤区域基本一致，并且都在肿瘤边缘呈深颜色的浓聚区，提示肿瘤细胞可能在边缘区数量较多或者活力较好，而在中心区数量少或者代谢低下。从两者的成像原理看，Luciferin生物发光指示的是活体内的肿瘤细胞，对细胞数量有很好的指示，而18F-FDG不仅指示活体内的肿瘤细胞，还着重在肿瘤细胞生长活跃、代谢高的区域显像清晰，在一些血供不足、代谢低下的坏死或即将坏死肿瘤细胞区域显像效果欠佳，实验中肿瘤生长的早期（15天），PET所示的肿瘤面积大于生物发光所示的肿瘤面积，而在晚期（55天）肿瘤其面积小于生物发光所示的肿瘤面积，因为早期肿瘤处于迅速增殖期，代谢活跃，18F-FDG摄取量也高，周边散在浸润的肿瘤细胞仍能显示18F-FDG高摄取状态，这可能也是核医学分子成像边界不够清晰的原因之一，而在生物发光图像上的指示不如18F-FDG明显。晚期肿瘤处于坏死期，代谢低下，18F-FDG摄取量开始下降，在实验中

PET呈现的肿瘤区域小于生物发光呈现的肿瘤区域。另外小鼠拍摄时的体位也有一定的影响。利用图像软件分析，发现两种图像显示的肿瘤细胞变化的相对光强度和浓度分布基本呈现一致。将生物发光图像和PET/CT图像结合起来观察，不仅能清楚的看到肿瘤的边界和区域，还能观测到肿瘤细胞生长活跃的区域和相对生长抑制的区域，这对于临床上放疗靶区的勾画和剂量的确定可能有一定的指导作用，从而做到能在杀伤肿瘤细胞的同时最大限度的保护正常组织，另外，在早期诊断以及放疗后对疗效监测和预后评定方面也可能具有相当的指导意义。

25

# 第三部分 肿瘤切片扫描成像及病理观察

上述实验从活体用四种影像设备对同一裸鼠A549-LUC2-GFP移植瘤模型进行了对比性显像，PET/CT显像剂采用18F-FDG，主要基于恶性肿瘤细胞代谢旺盛，对葡萄糖呈高摄取的原理，与生物发光成像结合观察肿瘤。这一部分再引入99mTc-MIBI显像剂，使其在肿瘤部位浓聚后取下肿瘤，快速冷冻切片扫描，结合肿瘤组织本身所带有的绿色荧光蛋白，切片克服荧光体内发光深度和难以定量的限制，对描述肿瘤的大小、状态和边界情况作进一步的补充。

# 实验材料

## 1、 实验试剂

OCT冰冻包埋剂美国SAKURA公司

乙醇国药集团

丙酮国药集团

HCL广州化学试剂厂

多聚甲醛广州化学试剂厂

苏木精武汉博士德生物公司

伊红武汉博士德生物公司

TO型生物制片透明剂武汉博士德生物公司

中性树脂武汉博士德生物公司

99mTc-MIBI（740MBq）广东希埃核医药公司

## 2、 仪器及耗材

半自动切片机美国Thermo公司

冰冻切片机美国Leica公司

光学显微镜（E400）日本Nikon公司

FLA-5100化学发光/生物发光日本FUJIFLIM公司

26

成像系统

Origin V8.5.1 SR2数据处理软件 美国OriginLab公司

**实验方法和步骤**

## **1**、 **A549-LUC2-GFP**移植瘤快速冰冻切片制作

1.1取1%戊巴比妥钠溶液，按50mg/kg剂量对裸鼠模型进行腹腔注射麻醉。

1.2裸鼠完全麻醉后，穿好辐射防护服，佩戴防护眼镜和双层乳胶手套，先用温水浸泡裸鼠的尾巴，以使尾静脉扩张提高注射的成功率，选取尾巴下1/3作为进针起点，每只裸鼠注射37MBq(1mCi) 99mTc-MIBI显像剂，注射后将裸鼠放置在防护屏后，文献报道[15]，约2小时左右99mTc-MIBI在肿瘤处达到最高浓聚。

1.3裸鼠放置2小时后，将裸鼠处死，迅速取下肿瘤，取肿瘤时连其周围包膜和软组织一起取下，用生理盐水稍微清洗干净血液，用滤纸滤干，冰冻包埋剂包埋后置于冰冻切片机上切片，此时不需要清楚的观察肿瘤组织病理结构，并需要足够多的肿瘤细胞进行荧光扫描与背景光区分开，切片可切最大厚度。

1.4将切片置于防脱载玻片上，放在冷丙酮中固定1min，液体用滤纸小心吸干，轻轻盖上盖玻片（此时不应使用中性树胶封片，因其自发荧光会对后续的荧光扫描造成过高的背景光），并在60℃恒温干燥箱中放置5min，待切片干燥后，采用数码照相机进行微距拍摄。

## **2**、 **A549-LUC2-GFP**移植瘤切片荧光扫描成像和放射性扫描成像

2.1切片进行微距拍摄的同时，打开FLA-5100化学发光/生物发光成像系统预热30min，为避免带有放射性核素的切片污染仪器，需要在样品台上铺上透明保鲜膜，将切片放置在荧光样品台上，将样品台推入，启动Image Reader软件后选择Fluorescent模式，设置参数CH1: 400V，

Laser1: 473nm，设置相应的扫描区域，开始读取，10min后完成绿色荧光扫描。虽然绿色荧光蛋白的稳定性极强，但是为了避免它在放射性压片后降解，造成图像误差，所以首先进行荧光扫描成像。

2.2在做放射性扫描之前，需要对IP（image plate）磷屏进行彻底的擦除，目的是擦除自然辐射形成的背景噪声。同样将曝光盒中铺一层保鲜膜避免污染，切片放入，样品片朝上，将彻底擦除的磷屏的曝光面对着样品放好，关闭曝光盒，压片48h。操作过程中需小心，避免样品移动。

2.3 48h后，再次打开FLA-5100化学发光/生物发光成像系统预热，打开曝光盒拿出磷屏，将

27

磷屏贴于样品台，读取面朝上，启动Image Reader软件后选择IPS模式，设置好参数和扫描区域，推入样品台，开始读取，10min后完成放射性扫描成像。

2.4将获得的三种图像进行对比分析，可以在Image Reader软件上选择Display Color将两种扫描图片设置成同一种颜色，观察肿瘤的大小和边界情况，采用Photoshop软件将同一切片的三种图像合成在一起比较，更直观的显示肿瘤组织。



（FLA-5100化学发光/生物发光成像系统）

## **3**、 **A549-LUC2-GFP**移植瘤常规病理切片制作与观察

3.1取材：取同一时期的另一只裸鼠移植瘤模型，处死后取材，连其周围包膜和软组织一起取下，用生理盐水洗干净血液和其他杂质，将肿瘤块放于4%的多聚甲醛溶液中固定2h。

3.2剪材：取出肿瘤块，仔细修剪成适当大小，修剪时留取肿瘤包膜和少量软组织。继续放于

4%的多聚甲醛中过夜。

3.3将肿瘤块移至75%的酒精中保存过夜。

3.4 脱水：80%酒精 2h

90%酒精40min

95%酒精 30min 100%酒精 1 15min

100%酒精2 15min

TO 1 20min

TO 2 20min

3.5 浸蜡： 软蜡 20min

硬蜡 20min

3.6包埋：包埋后放在4℃保存。

3.7切片：切片厚度为5um。

3.8裱片：在45℃的水浴箱中展开。

3.9切片晾干后，开始进行HE染色，将切片放在60℃烤箱中烤成泪珠状。

28

3.10脱蜡：切片在TO1、TO2、TO3中各放置6min。

3.11复水：100%酒精1、2、3中各3min。

90%酒精3min

80%酒精3min 75%酒精3min蒸馏水3min

3.12 染色：苏木素液 2-5min

自来水蓝化15-30min饱和碳酸锂分色5sec蒸馏水 3min

伊 红 3min

3.13 脱水：75%酒精 3min

80% 酒 精 3min

90% 酒 精 3min

95% 酒 精 3min

100%酒精 1 3min

100%酒精 2 3min

3.14透明：TO1、TO2、TO3中各5min。

3.15中性树胶封片、镜检。

# 实验结果

1、肿瘤组织快速切片的绿色荧光扫描图像和放射性扫描图像都能较准确的指示肿瘤的轮廓和边界，带有GFP的肿瘤组织发出高亮度的荧光，与正常组织的自发荧光以及背景光之间能明显区分开来（图13）。从微距拍摄照片来看，肿瘤中心可能出现了大片坏死，之后制作石蜡切片进行HE染色后观察，证实其为坏死区。放射性扫描图像显示显像剂在肿瘤切片的边缘呈高摄取，而在中心摄取量低，与肿瘤中心坏死区对核素摄取低的事实相符合，在绿色荧光蛋白扫描图像上看，这一点并不明显。将两种图像同时进行Display Color转换后，发现颜色深浅区域不完全一致（图14）。

29



**图13 A5** **49-LUC2-GFP肿瘤切片后的荧光扫描成像及对照**

A：正常组织有微弱的自发荧光B: OCT冰冻包埋剂扫描几乎不发荧光C：带有GFP的肿瘤切片



**图14 A5** **49-LUC2-GFP肿瘤GFP和99mTc-MIBI扫描成像**

A: 切片微距拍摄B: GFP扫描C: 99mTc-MIBI扫描D: GFP扫描经Display Color后E: 99mTc-MIBI扫描经Display Color

后

30

2、三种图像先用Gauss滤波器对图像进行平滑，仅对图像及边缘特征计算感兴趣区，一阶偏导有限差分计算梯度幅值和方向，最后实现图像空间映射融合，既能清晰的指示肿瘤边界，又能指示肿瘤细胞的活力。（图15）



**图15** **三种图像融合后图像**

注：黑色是微距拍摄的轮廓，蓝色是GFP扫描的轮廓，红色是99mTc-MIBI扫描轮廓

3、采用Matlab软件计算出两种方法扫描的肿瘤切片面积和周长（n=5），绿色荧光扫描成像肿瘤切片的面积为：4554.6±240.8，放射性扫描成像肿瘤切片的面积为：4344±294.6，两者的差异性无统计学意义，t=1.24，P=0.25；绿色荧光扫描肿瘤切片的周长为：304.0±53.0，放射性扫描肿瘤切片的周长为：291.4±64.6，两者的差异性无统计学意义，t=0.34，P=0.75。（表3）

表3 两种方法扫描肿瘤切片的面积和周长（n=5）

| 2  面积（像素点 ） |  | 周长（像素点） |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 荧光扫描 | 放射性扫描 | 荧光扫描 | 放射性扫描 |
| 4380  4387  4933  4658  4415 | 4125  4843  4255  4360  4139 | 253  267  388  316  296 | 210  311  261  290  285 |
| 4554.6±240.8 | 4344±294.6 | 304.0±53.0 | 291.4±64.6 |
| T=1.24, P=0.25 | | T=0.34, P=0.75 | |

31

## 4、 A549-LUC2-GFP肿瘤石蜡切片HE染色后，在光学显微镜下观察，呈肿瘤细胞生长特性，肿瘤细胞积聚在周边，包膜和软组织有少量浸润，中心区呈大片坏死状（图16）。



**图16 A5** **49-LUC2-GFP肿瘤石蜡切片病理学观察**

A：肿瘤细胞B：肿瘤坏死区C：包膜和软组织

# 讨论

这部分实验基于裸鼠移植瘤模型不仅能稳定表达荧光素酶基因，同时还带有GFP的条件，利用GFP在470nm左右的光源激发下能发出绿色荧光的原理，以及99mTc-MIBI亲肿瘤浓聚的原理，经尾静脉注射99mTc-MIBI显像剂后，将裸鼠A549-LUC2-GFP的肿瘤取下来快速制作成冰冻切片，通过荧光和放射性两种技术扫描切片，对二者的扫描图像进行对比。

GFP即绿色荧光蛋白，GFP包含238个氨基酸的序列，其中第65至67个氨基酸残基为丝氨酸—酪氨酸—甘氨酸，它们可以自发形成一种荧光发色团，[这种发光团不需要借助其他辅酶](http://baike.baidu.com/view/72850.htm)，自身就能发光，因此可以在分子水平上研究活细胞的动态过程[16, 17]。99mTc-MIBI（甲氧基异丁基乙腈）是一种肿瘤非特异性显像剂，临床广泛用于肿瘤的SPECT（单光子发射计算机断层扫描成像）显像[18]，99mTc-MIBI显像的原理主要是通过依赖细胞膜和线粒体膜的负电位而在肿瘤细胞浓聚，国内外已经大量用于恶性肿瘤的诊断和鉴别诊断[19, 20]。

从A549-LUC2-GFP肿瘤切片扫描图像来看，荧光成像和放射性扫描两种图像都很好的显示了肿瘤的形状、大小和轮廓，99mTc-MIBI在肿瘤切片的边缘摄取量高，在中心摄取量低，这可能与肿瘤中心处开始出现肿瘤细胞坏死，线粒体开始出现凋亡有关，而在瘤细胞边缘可能肿瘤细胞分裂快线粒体多，微距拍摄的切片中心也呈现了白色的疑似坏死区。将肿瘤进行病理切

32

片染色后观察，证实了肿瘤中心区已经出现大片坏死，细胞核消失，细胞轮廓不清，呈大片粉红色无结构的坏死灶。而在GFP所示的绿色荧光扫描图像上看，这一点并不明显，即使在肿瘤坏死区仍然有较高亮度的荧光表达，两种图像进行Display Color转换后的颜色也不完全一致，这可能与GFP极其稳定的性质相关，即使细胞出现坏死，只要GFP降解不多，仍然会发出较多的荧光。另外99mTc-MIBI所示的放射性扫描图像显示的肿瘤边界没有GFP绿色荧光清晰，这可能与边界的肿瘤细胞有向周边包膜浸润，线粒体多有关，还有可能是核素发出的射线干扰所致。将两种图像结合来看，不仅能清晰的指示出肿瘤的边界，还能提示瘤细胞的数量以及活力情况，这对于临床更准确的放疗有可能起到一个指导作用，在准确勾画靶区的条件下，还可以对瘤细胞数量多、活力高的区域用较大剂量，相反就减小剂量，从而达到精确放疗、保护正常组织的目的。

综上所述，裸鼠A549-LUC2-GFP模型的几种影像学成像均有良好的显像效果，肿瘤快速切片扫描的荧光成像和放射性自显影扫描成像的研究效果良好。将可见光成像技术与核医学成像以及常规定位的影像技术结合起来，对肿瘤早期的检出以及全面描述肿瘤的大小、形状、边界及代谢进展情况具有很好的指导作用[21]。

33

结**论**

1、慢病毒介导的A549-LUC2-GFP细胞荧光信号较强，发光稳定，构建裸鼠A549-LUC2-GFP

模型能有效动态的监测A549细胞的生长过程。

2、对A549-LUC2-GFP模型进行4种影像学方法成像，其中X光片和CT对肿瘤主要起定位作用。PET和生物发光成像能清晰的显示肿瘤的区域和边界，生物发光对肿瘤细胞的数量有较精确的定量，而PET在肿瘤早期诊断以及提示肿瘤细胞的生长状态和进展情况方面有其独特的优势。PET/CT结合并三维重建图像直观的显示了肿瘤的大小、部位和代谢旺盛区。PET/CT成像与生物发光成像结合更全面的描述了肿瘤的边界和生长情况。

3、A549-LUC2-GFP肿瘤切片的绿色荧光扫描成像和99mTc-MIBI放射性扫描成像效果良好，成像清晰，99mTc-MIBI对肿瘤细胞状态的指示优于GFP, GFP的分辨力更高。两者结合对肿瘤解剖和病理生理特性的描述作了进一步的补充。

综上所述，生物发光图像边缘细胞数量较少时（＜100 个细胞），不易形成可区别的肿瘤图像，而X线摄影和CT扫描的最小可探测限约在1—3mm范畴，由于X线摄影和CT依赖于

“形态学”成像，难于发现肿瘤边缘分散的未形成“团块”的肿瘤细胞变化，但核医学PET和SPECT图像边缘不清晰可能反映了肿瘤边缘细胞的移行行为的细胞学特征，提示核医学图像对肿瘤放疗“照射野”的勾画可能是一个重要补充，具有临床参考价值。

34

参考文献

[1] Prof. Dr. Md M G, Kavanagh A, Partridge M. Combining advanced radiotherapy technologies to maximize safety and tumor control probability in stage III non-small cell lung cancer[J]. Strahlentherapie und Onkologie, 2012, 188(10): 894-900.

[2] Wang F, Ning F, Liu C, et al. Comparison of Gefitinib Versus VMP in the Combination with Radiotherapy for Multiple Brain Metastases from Non-small Cell Lung Cancer[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2014.

[3] Garbey M, Bass B L, Berceli S, et al. Stereotactic Body Radiotherapy/Stereotactic Ablative Body Radiotherapy for Lung Cancer[M]. Computational Surgery and Dual Training, Garbey M, Bass B L, Berceli S, et al, Springer New York, 2014., 37-55.

[4] Qiang Y G, Liao Y H, Zhang X P, et al. Modulation of beta-adrenergic receptor in rat lung after gamma irradiation[J]. J Xray Sci Technol, 2014, 22(2): 165-173.

[5] Robbins M E, Brunso-Bechtold J K, Peiffer A M, et al. Imaging radiation-induced normal tissue injury[J]. Radiat Res, 2012, 177(4): 449-466.

[6] Poeschinger T, Renner A, Weber T, et al. Bioluminescence imaging correlates with tumor serum marker, organ weights, histology, and human DNA levels during treatment of orthotopic tumor xenografts with antibodies[J]. Mol Imaging Biol, 2013, 15(1): 28-39.

[7] Zhang C, Su F, Zhang J, et al. Luciferase and fluorescent protein as dual reporters analyzing the effect of n-dodecyltrimethylammonium bromide on the physiology of Pseudomonas putida[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(1): 393-400.

[8] 樊全荣, 史俊文, 贾俊双, 等. 携带Fluc和ZsGreen双报告基因小鼠iPS细胞系的建立[J]. 中国癌症杂志, 2013(1): 10-16.

[9] Koolen B B, Peeters M T F D, Aukema T S, et al. 18F-FDG PET/CT as a staging procedure in primary stage II and III breast cancer: comparison with conventional imaging techniques[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2012, 131(1): 117-126.

[10] Florczak A, Amico A D. The role of 18F-FDG PET/CT testing in the management of a papillary thyroid carcinoma[J]. Thyroid Research, 2013.

[11] Campenni A, Violi M A, Ruggeri R M, et al. Clinical usefulness of 99mTc-MIBI scintigraphy in the postsurgical evaluation ofpatients with differentiated thyroid cancer[J]. Nucl Med Commun, 2010, 31(4): 274-279.

[12] Padmanabhan R, Vasudevan S G, Mukherjee S, et al. Pseudo-infectious Reporter Virus Particles for Measuring Antibody-Mediated Neutralization and Enhancement of Dengue Virus Infection[Z]. Springer New York, 201475-97.

[13] 吕景礼, 李二毛, 李晓艳, 等. 慢病毒介导荧光素酶表达的人鼻咽癌细胞小鼠模型的建立[J]. 现代生物医学进展, 2013(36): 7005-7009.

[14] Henriques C, Castro D P, Gomes L H, et al. Bioluminescent imaging of Trypanosoma cruzi infection in Rhodnius prolixus[J]. Parasites & Vectors, 2012.

[15] 梁智欣, 强永刚, 廖永华. 透明质酸软骨链蛋白探针对肺肿瘤小鼠放疗靶区勾画的可行性分析[J]. 南方医科大学学报, 2012(03): 301-305.

[16] 王国建, 朱琦, 邓洪平, 等. 利用聚合物自组装实现绿色荧光蛋白生色团的荧光增强[J]. 高分子学报, 2013(05): 660-667.

[17] 李涛涛, 王湘达, 田少奇, 等. 重组增强型绿色荧光蛋白慢病毒载体示踪转染的脐血间充质干细胞移植

35

治疗兔股骨头缺血性坏死(英文)[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011(10):1897-1900.

[18] Tomura N, Watanabe O, Takahashi S, et al. Comparison of 201Tl-chloride SPECT with 99mTc-MIBI SPECT in the depiction of malignant head and neck tumors[J]. Annals of Nuclear Medicine, 2006, 20(2): 107-114.

[19] Treglia G, Caldarella C, Saggiorato E, et al. Diagnostic performance of 99mTc-MIBI scan in predicting the malignancy of thyroid nodules: a meta-analysis[J]. Endocrine, 2013, 44(1): 70-78.

[20] 文美玲, 梁庆模, 包铮, 等. 低剂量99mTc-MIBI乳腺断层双时相显像诊断乳腺癌的临床研究[J]. 中国肿瘤临床, 2013(01): 36-40.

[21] Liang Z X, Qiang Y G, Liao Y H, et al. In vivo mouse 99mTc SPECT scans with bioluminescence imaging validation[J]. J Xray Sci Technol, 2013, 21(1): 85-91.

36

# 综述

**几种影像联合在小鼠肺肿瘤模型的应用分析**

恶性肿瘤对人类的危害极大，肿瘤生长多样化、异质化，其发生发展机制也各不相同，复杂多变，使恶性肿瘤在早期诊断、个体化治疗以及疗效评价等方面存在困难。以肺癌为例，肺癌是全世界范围内最常见的恶性肿瘤之一，在我国肺癌的发病率也呈逐年上升趋势[1, 2]，大多数患者发病时已经为晚期，临床上多采用放射治疗为主的综合治疗，只有约15%-20%的Ⅰ期和Ⅱ期的非小细胞癌能够进行手术切除[3, 4]。无论是手术还是放疗，获得较精确的肿瘤区域和边界及其浸润、进展情况是治疗成功的关键。现代医学影像技术被应用于肿瘤诊疗的各个阶段，多种影像设备的出现，推动了人类医学的巨大进步，然而，不同的影像技术存在不同的优缺点，如何能更精确的描述肿瘤的病理生理特征、功能代谢以及大小、形态、定位等全面信息，成为影像学研究的热点。

在肺肿瘤的临床治疗中，手术、化疗和放射治疗是最主要的手段，大部分恶性肿瘤都需要在其手术治疗的某些阶段进行放疗，放射线可以杀伤肿瘤细胞，但周围正常组织也常常受到损害[5, 6]，并且放疗时间越长、放射线剂量越大，正常组织所受到的损伤也会越严重[7]，甚至出现纤维化趋势。如何在杀伤肿瘤细胞时又能保护周围健康组织是放射治疗成功的关键。常规外照射发展到立体定向、三维适形放疗阶段，应运而生的模拟定位系统、CT模拟和MRI模拟、

γ、χ刀等精确放疗技术对肿瘤精确照射起到了巨大的推动作用[8, 9]，然而这些技术正常发挥有赖于准确判断肿瘤照射靶区大小。

目前临床上进行肿瘤放疗时，主要是在影像资料的指导下，往病灶外扩展2-3cm确定放疗靶区，这种方法带有很大的主观性，不能保证在不损伤正常细胞的前提下精确的杀伤肿瘤细胞。

常规的影像学方法主要是观测肿瘤生长的大小和位置，属于解剖学显像，存在很大的局限性。包括普通超声、X线、CT、MRI等，它们主要提示肿瘤病灶的形态和结构信息，如肿瘤的体积、部位、表面是否光滑等，另外CT血管造影术、超声血管造影术等还能提供肿瘤的血管形态和血流动力情况[10]。其中，这几种影像学方法又各有不同，CT的优点是分辨率高，主要用于观察对比度大的肺部、空腔脏器和密度高的骨性组织，对软组织显像效果欠佳，不能很好的鉴别良恶性肿瘤组织；MRI 对软组织显像效果较好，但扫描速度慢，难以定量；超声成

37

像能够很好的提供软组织和血流动力信息，但是它的分辨力低，成像部位也有很大的局限性。近年来兴起的分子影像技术则是从细胞和分子水平评价肿瘤或其他病灶的生物学过程，这

种评价方法能够定性、定量的检测到肿瘤的生物学变化和特征[11-13]，目前分子影像技术主要包括三类，核医学分子影像技术、功能磁共振技术以及光学成像技术。其中核医学SPECT、PET和功能磁共振技术发展较成熟，已经大量应用于临床疾病的诊断和治疗。18F-FDG和99mTc-MIBI是目前临床上常用的两种肿瘤显像剂，分别用于PET和SPECT，两者对肿瘤显像的原理不同，18F-FDG能准确反映机体内的葡萄糖代谢水平，恶性肿瘤细胞的代谢旺盛，对葡萄糖的需求增加，注射18F-FDG后，肿瘤病灶对18F-FDG呈高摄取[14, 15]；99mTc-MIBI通过依赖细胞膜和线粒体膜的负电位而在肿瘤细胞浓聚[16]；功能磁共振成像主要用于神经和精神疾病，揭示大脑皮层功能改变和病理生理改变[17, 18]；目前光学分子成像的研究热点主要包括荧光（fluorescence）与生物发光（bioluminescence）两种。荧光技术主要利用荧光报告基团如GFP、RFP及Cyt等标记细胞或DNA，通过一定波长的激发光源激发其发光。生物发光成像技术则利用荧光素酶

（Luciferase）基因标记，与底物荧光素（Luciferin）结合催化发光，两者通过灵敏度极高的光学检测仪器，可直接监测生物体内的细胞活动和基因行为，观测活体内肿瘤的生长及转移、感染性疾病发展过程以及特定基因的表达等生物学过程[19]。

大量病例研究发现，在肿瘤早期、进展期或放射治疗后，用常规影像方法观察肿瘤大小无改变，但其局部代谢和病理变化早已出现，这就需要我们将常规的影像学方法和分子影像学方法结合起来，多种方法互相补充，以达到更精确描述肿瘤的解剖、功能以及生物学信息的目的，而各种分子影像学方法由于其各自的成像原理不同，也必然存在一定的局限性，要减少单一影像学方法造成的误差，更精确的描述病灶的全面特性，就必须采取几种影像联合的方式。

近年国内外的研究中，几种分子影像学联合成像主要包括两种形式，一种从显像设备着手，将基于解剖学显像的CT、MRI等和基于功能显像的SPECT、PET以及光学成像图像结合起来，利用同机或异机计算机软件将不同原理不同设备的图像融合，同时得到两种或更多的图像信息，有些已经初步应用于临床，临床医生根据融合后的图像可以将分离的、孤立的病灶信息结合起来，实现互补和交叉验证，从而更准确的指导诊疗过程；上个世纪末出现PET/CT，

SPECT/CT, MR/CT等，随着融合技术、三维重建技术的发展，多模态的融合也发展到三维图像的融合，彭[20]等人尝试用一种基于特征定位的三维图像配准方法，实现了正电子发射断层成像（PET）和计算机断层扫描（CT）异机三维图像的精准融合。Baek J[21]等使用3D超声和CT-3D图像融合对前列腺癌进行放疗。

38

另一种形式从显像剂着手，制备出一种具有多种显像功能的分子探针，将这种探针注入机体，可同时在不同的设备上显像。Hwang[22]等构建成功了一种多模态成像探针，这种探针由磁性荧光纳米粒子制成，其中包含了用于MRI显像的钴铁氧体、用于核医学显像的67Ga-柠檬酸以及用于荧光显像的罗丹明-异硫氰酸酯，将此多模态探针注射进小鼠肿瘤模型，在三种设备上均能成像，并能得到肿瘤的综合信息；Choi[23]等为了更准确的在早期观察肿瘤的转移灶，将氧化铁-锰纳米粒子和124I结合注射进大鼠体内，通过PET和MRI两种成像方法同时得到了肿瘤的代谢和解剖图像。

以上两种形式是相辅相成的，在现有的条件下，还不能做到所需几种影像设备的同机一体化，更多的影像联合方式是在异机获取图像，将采集的图像通过专门的计算机处理软件进行综合分析，以获得病灶的全面信息。

为了更好的应用影像学方法获得最准确、最全面的肿瘤信息和放疗靶区，研究者们通常用小鼠建立模型，通过给小鼠种植肿瘤或者化学药物致癌等方式，模拟出人类常见的或所要研究的目的肿瘤病灶，在此基础上进行影像资料拍摄和一些显像制剂的探索，从而对临床的诊断和治疗提供一些指导和依据。研究发现[24]，利用免疫缺陷的BALB/c-nu/nu裸小鼠，进行肺腺癌细胞的种植，成瘤时间短，成功率高，所需成本低，也容易操作，可进行肿瘤细胞生长状况的实时监测以及探索肿瘤边界和放疗靶区的研究。

如前所述，CT成像属于解剖学显像，对肿瘤病灶能够准确的定位，它的成像原理是发射

X射线对受检生物体进行断层扫描，由于生物组织的构成不同，各层面的密度不同，穿过的放射线也有差异，这些放射线信号被电光子探测器所接收，转换成数字，输入计算机，再通过计算机转化成图像，因此CT检查在一些密度差异大的组织器官或者密度变化大的病灶，显像图像清晰，分辨率也高。普通CT对于早期肺癌的检出率不高，而螺旋CT虽然能很好的鉴别一些非钙化性结节，却比较容易忽略掉大气道内的肿瘤，此时行CT检查不如诱导痰脱落细胞的检查。PET的引入使早期肺癌的检出率大大提高，PET与CT联合应用成为早期肺癌筛查的最好选择。

PET的全称是正电子发射计算机断层扫描，它主要采用带正电子发射体的核素，将这些能够发射正电子的核素标记在参与生物代谢的化合物上，制备成特殊的核素显像剂，当显像剂进入生物体中，所发出的正电子与生物组织的负电子相碰撞，立即被湮灭，湮灭辐射产生的光子被探测器接收，经过信息的处理和重建，计算机便可获得该正电子在生物体内的分布情况，从而能动态的、定量的观察到机体内的生理生化活动，PET在反映组织、细胞的新陈代谢、血流

39

情况以及受体功能变化等方面有其独有的优势，它能灵敏的探测机体内分子水平的变化，对微小病灶的检出率远远高于其他影像方法。PET显像作为功能显像的一种，在肿瘤病灶与周围组织的关系定位方面可能不如CT，另外，PET显像剂通常在正常的高代谢组织区域也有很高的摄取量，若早期癌变病灶在代谢旺盛的正常组织区域，则不容易区分，有可能造成假阳性或假阴性显像，由于PET是一种反映分子代谢的显像，它对一些代谢率不高的良性肿瘤细胞、交界性肿瘤或者恶性肿瘤的坏死期可能不能很好的显像。

目前，小动物的光学影像已经成为医学研究的重要工具，基于细胞和分子水平的活体成像技术日趋成熟，为进入临床应用提供了重要的基础。生物可见光成像主要采用荧光标记手段标记所研究的对象，通过自发荧光或外源性激发光激发产生荧光，从而对研究对象进行观测。其中，小动物光学成像的两种主要技术—生物发光技术和荧光成像技术，它们各有优缺点，采用荧光素酶标记的生物发光技术灵敏度和特异性高，对观测对象有较精确的定量，但荧光素酶与底物荧光素结合才能发光；而采用荧光蛋白标记的荧光成像技术发出的荧光信号强，发光稳定，且研究成本低，容易操作，但受到活体内深度的限制，背景噪音也高。很多研究者在实验中利用绿色荧光蛋白和荧光素酶对细胞或研究对象进行双重标记，荧光成像技术用于体外检测，观察细胞生物学状态，在活体动物体内则利用生物发光进行研究，具有很好的成效[25, 26]。

在进行荧光标记手段标记所研究对象的过程中，研究者们进行了大量的探索，标记方法也在不断的改进和革新中。研究发现[27]，利用脂质体转染法构建出来的细胞荧光发光并不稳定，随着传代代数的增加，荧光发光的强度会逐渐减弱，而逆转录病毒载体只能转染有分裂能力的细胞，不能转染无分裂能力的细胞，腺病毒载体转染细胞的方式是通过同源重组整合基因，在此过程中基因组发生了重排，有可能会导致基因结构或性质的改变。慢病毒载体不仅能转染有分裂能力的细胞，也能转染无分裂能力的细胞，并且慢病毒是以转座子的方式将外源基因整合进入靶基因，整合过程中基因组不会发生重排，因此并不影响外源基因的结构和功能。

基于以上原理，可以首先用慢病毒介导的方法对肺腺癌A549细胞进行荧光素酶和荧光蛋白的双重标记，将标记好的A549细胞注射进BALB/c-nu/nu裸小鼠体内，经过一段时期的生长，建立起能稳定表达荧光素酶和荧光蛋白基因的裸鼠肺肿瘤模型，然后对裸鼠肺肿瘤模型分别进行小动物CT拍摄、小动物PET成像，另外对裸鼠模型进行生物发光成像和荧光拍摄，将常规的解剖学成像方法和核医学分子影像技术、可见光成像技术联合起来，共同对肺肿瘤的位置、形态、区域大小、边界和代谢情况等生长特性进行探索，通过影像联合应用获得肺肿瘤的全面信息，从而为临床肺肿瘤的诊断、放疗靶区的勾画以及治疗后的监测提供一定的依据。此

40

外，在实验后期，还可以引入合适的核素显像剂，待其在肿瘤处达到最高浓聚后进行切片扫描，同时观察显像剂在肿瘤组织的浓集情况和荧光蛋白在肿瘤细胞中的荧光发光情况，对二者进行比较，观察两种成像方法的特点。

影像联合的方法弥补了单一影像信息的不足，提供了更全面的更精确的病灶信息，必然是今后影像医学发展的方向。分子影像技术参与的影像融合能够更全面揭示肿瘤的发病机制和靶点，能准确的描述肿瘤的形态学特征和生物学特性，大大提高了早期诊断的可能性，对临床上肿瘤放疗靶区的勾画，以及放疗剂量的选择，更是提供了更精确的信息，从而能够做到在杀伤肿瘤细胞的同时最大限度的保护正常组织。在制定放疗方案时，如果有准确的影像学资料和肿瘤的病理生理、功能代谢等多方面的信息作指导，就能勾画出最合理的靶区，个性化选择最合理的放疗剂量，使放疗过程达到既安全又高效的目的。当然，影像联合技术还存在很多的问题和困难亟待解决，例如各种成像设备所显示的图像格式和大小、方向不同，需要采用准确的图像配准方法对其融合，如何设计出最合理的分子探针，使其能多靶点多方位的显示肿瘤的生物学特性和病理特征，另外，有相当一部分的研究比如荧光成像技术和生物发光成像技术目前都还停留在动物实验阶段，如何将其安全的应用在人体等等，这些问题都需要进一步的探索。然而，随着医学技术的不断发展和所有研究者的共同努力，相信这些问题都能得到解决，分子影像联合技术必将为今后的临床做出重大的贡献[28]。

参考文献

[1] Liu Y, Bi Y, Lin J, et al. Tag SNPs of CFI contributed to the susceptibility for non-small cell lung cancer in Chinese population[J]. Tumour Biol, 2014.

[2] Zhang J H, Wen Q L, Yang C, et al. XRCC3 T241M polymorphism and lung cancer risk in the Han Chinese population: a meta-analysis[J]. Genet Mol Res, 2014, 13(4): 9505-9513.

[3] Prof. Dr. Md M G, Kavanagh A, Partridge M. Combining advanced radiotherapy technologies to maximize safety and tumor control probability in stage III non-small cell lung cancer[J]. Strahlentherapie und Onkologie, 2012, 188(10): 894-900.

[4] Wang F, Ning F, Liu C, et al. Comparison of Gefitinib Versus VMP in the Combination with Radiotherapy for Multiple Brain Metastases from Non-small Cell Lung Cancer[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2014.

[5] Robbins M E, Brunso-Bechtold J K, Peiffer A M, et al. Imaging radiation-induced normal tissue injury[J]. Radiat Res, 2012, 177(4): 449-466.

[6] Citrin D, Cotrim A P, Hyodo F, et al. Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury[J]. Oncologist, 2010, 15(4): 360-371.

[7] Qiang Y G, Liao Y H, Zhang X P, et al. Modulation of beta-adrenergic receptor in rat lung after gamma irradiation[J]. J Xray Sci Technol, 2014, 22(2): 165-173.

[8] Wang X, Xu F, Wei Y. [Advances of precise radiotherapy for lung cancer] [J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2011, 14(11): 894-899.

[9] Mackie T R, Kapatoes J, Ruchala K, et al. Image guidance for precise conformal radiotherapy[J]. Int J Radiat

41

Oncol Biol Phys,2003,56(1):89-105.

[10] Kawanisi Y, Kimura K, Lee K S, et al. [Comparison of digital subtraction angiography, CT angiography, and ultrasonic Doppler examination in the evaluation of penile arterial lesions] [J]. Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi, 2001, 92(7): 674-681.

[11] Chen Z Y, Wang Y X, Lin Y, et al. Advance of molecular imaging technology and targeted imaging agent in imaging and therapy[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 819324.

[12] Lindner J R. Molecular imaging of thrombus: technology in evolution[J]. Circulation, 2012, 125(25): 3057-3059.

[13] Iqbal U, Albaghdadi H, Nieh M P, et al. Small unilamellar vesicles: a platform technology for molecular imaging of braintumors[J]. Nanotechnology, 2011, 22(19): 195102.

[14] Koolen B B, Peeters M T F D, Aukema T S, et al. 18F-FDG PET/CT as a staging procedure in primary stage II and III breast cancer: comparison with conventional imaging techniques[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2012, 131(1): 117-126.

[15] Florczak A, Amico A D. The role of 18F-FDG PET/CT testing in the management of a papillary thyroid carcinoma[J]. Thyroid Research, 2013.

[16] Campenni A, Violi M A, Ruggeri R M, et al. Clinical usefulness of 99mTc-MIBI scintigraphy in the postsurgical evaluation ofpatients with differentiated thyroid cancer[J]. Nucl Med Commun, 2010, 31(4): 274-279.

[17] 廖大伟, 张体江. 癫的静息态功能磁共振成像研究进展[J]. 国际医学放射学杂志, 2012(4): 22-24.

[18] 姚成军, 吴劲松, 庄冬晓, 等. 术中磁共振多模态影像导航下脑内病变穿刺活检术的初步应用[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2012, 38(3): 182-185.

[19] Poeschinger T, Renner A, Weber T, et al. Bioluminescence imaging correlates with tumor serum marker, organ weights, histology, and human DNA levels during treatment of orthotopic tumor xenografts with antibodies[J]. Mol Imaging Biol, 2013, 15(1): 28-39.

[20] 彭鳒侨, 丘红英, 董伟强, 等. 正电子发射断层成像与计算机断层扫描的异机三维融合影像分析[J]. 中国医学影像学杂志, 2011, 19(10): 786-791.

[21] Baek J, Huh J, Kim M, et al. Accuracy of volume measurement using 3D ultrasound and development of CT-3D US image fusion algorithm for prostate cancer radiotherapy[J]. Med Phys, 2013, 40(2): 21704.

[22] Hwang D W, Ko H Y, Lee J H, et al. A nucleolin-targeted multimodal nanoparticle imaging probe for tracking cancer cells using an aptamer[J]. J Nucl Med, 2010, 51(1): 98-105.

[23] Choi J S, Park J C, Nah H, et al. A hybrid nanoparticle probe for dual-modality positron emission tomography and magnetic resonance imaging[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2008, 47(33): 6259-6262.

[24] Liang Z X, Qiang Y G, Liao Y H, et al. In vivo mouse 99mTc SPECT scans with bioluminescence imagingvalidation[J]. J Xray Sci Technol, 2013, 21(1): 85-91.

[25] Zhang C, Su F Y, Zhang J F, et al. Luciferase and fluorescent protein as dual reporters analyzing the effect of n-dodecyltrimethylammonium bromide on the physiology of Pseudomonas putida[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93(1): 393-400.

[26] 樊全荣, 史俊文, 贾俊双, 等. 携带Fluc和ZsGreen双报告基因小鼠iPS细胞系的建立[J]. 中国癌症杂志, 2013(1): 10-16.

[27] 吕景礼, 李二毛, 李晓艳, 等. 慢病毒介导荧光素酶表达的人鼻咽癌细胞小鼠模型的建立[J]. 现代生物医学进展, 2013(36): 7005-7009.

[28] Li Q, Wang Y, Liu H, et al. Leukocyte cells identification and quantitative morphometry based on molecular hyperspectral imaging technology[J]. Comput Med Imaging Graph, 2014, 38(3): 171-178.

42

**攻读学位期间取得的成果**

向湘，梁智欣，强永刚，等. [HA-CLP制备及三重影像对小鼠肿瘤边界指示价值研究](http://www.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=QLZL201415002&amp;dbname=CJFDLAST2014&amp;dbcode=CJFQ&amp;uid&amp;v=MTY4MjdhbXoxMVBIYmtxV0EwRnJDVVJMK2ZaT1ptRnk3bFVMM05OQ0hSWXJHNEg5WE5xbzlGWm9SK2ZuczR5Ulk%3D)[J]. 中华肿瘤防治杂志，2014, 21(15)：1134-1138.

43

致 **谢**

在本论文即将完成之际，谨此向我的导师强永刚教授致以衷心的感谢和崇高的敬意！本论文的工作是在强老师的悉心指导下完成的。在攻读硕士的这三年里，导师不仅为我创造了优越的科研和学习环境，使我得以较好的完成本专业基本理论知识和技能的学习，同时在思想上、人生态度和意志品质方面给予了谆谆教诲，这些宝贵的教育必将激励着我在今后的人生道路上奋勇向前。

真诚感谢教研室的廖永华老师和梁智欣师兄、安梦林师弟，他们不仅在学术上给我指引，而且在生活上予以帮助，从他们身上我学到很多知识。

特别感谢实验医学中心刘启才教授和生物医学工程教研室汪峰副教授，在本课题的研究中为我提供了特别多的帮助和指导。

非常感谢广医附三张金ft主任在我实习期间给我的指导。

谢谢我的同学李二毛、董文伟、冯丽等，正是有了他们帮我解决实验中遇到的各种问题，才能将此课题完成。

衷心的感谢我的父母和其他亲朋好友对我的关心、支持和理解，没有他们对我的关心、鼓励和支持，我无法完成现在的硕士学业。

最后，感谢曾经教育和帮助过我的所有老师。衷心地感谢为评阅本论文而付出宝贵时间和辛勤劳动的专家和教授们！

44