

# 报告基因在超声成像中的应用进展

李登峰 刘旋 刘刚

**摘 要** 报告基因是超声成像基础研究中的一种重要工具,具有便捷、可靠、敏感性高等优点,可对多种不同生物学和分子遗传学过程进行显像。本文就多种报告基因在超声成像中的应用进展进行综述,为该技术进一步拓展生物学应用提供新的方法和思路。

**关键词** 报告基因;超声成像;基因编码产物;伪空胞

[中图分类号]R445.1

[文献标识码]A

## Application progress of reporter genes in ultrasound imaging

LI Dengfeng, LIU Xuan, LIU Gang

Center for Molecular Image and Translational Medicine, Xiamen University, Fujian 361102, China

**ABSTRACT** Reporter genes are important tools for ultrasound imaging research with the advantages of convenience, reliability and high sensitivity, which can image various biological and genetical processes at the molecular level. This paper summarizes the application progress of multiple reporter genes in ultrasound imaging, providing new methods and ideas for the further application in expansion of biomedical engineering.

**KEY WORDS** Reporter genes; Ultrasound Imaging; Genes encoding products; Gas vesicles

目前,医学影像技术已成功实现在组织、细胞及分子水平对活体状态下的生物学过程进行无创监测与实时分析,分子影像探针的应用极大地提高了其在生物体内检测的广度和深度,为疾病的早期筛查、疗效监测及预后评估提供依据<sup>[1-2]</sup>。报告基因是一种编码易被检测的蛋白质或酶的基因<sup>[3]</sup>,作为新兴分子影像探针,将报告基因转入生物体后,通过影像技术检测其表达产物释放的信号,能获得基因表达水平和细胞定位等生物学信息。目前已有光学报告基因应用于研究基因表达的时空性与特异性,但因其表达产物受光散射和组织自发荧光干扰较大,难以获得高分辨率的深层组织图像。超声成像是一种非侵入性的医学影像技术,通过接收、分析、显示反射及散射的超声波信号,获得体内器官的功能和解剖信息<sup>[4]</sup>。与光子仅能穿透毫米级的软体组织不同,超声波的方向性好,组织穿透能力强,并易于获得较集中的声能。因此,将报告基因编码产物作为分子影像探针引入超声成像研究,在分子水平实现深层组织的可视化和动态监测,具有良好的生物医学应用前景。本文就多种报告基因在超声成像中的应用进展进行综述。

### 一、微气泡超声分子探针

微气泡超声分子探针能有效提高超声成像的敏感性和准确性,已广泛应用于血管成像、炎症检测及肿瘤检查,为实现细胞和分子水平深层组织可视化和动态监测提供了可能<sup>[5]</sup>。有文献<sup>[6]</sup>报道注射盐水后的主动脉根部在M型超声下的结构显影明显增强,首次提出超声对比造影的概念。此后,多种微气泡造影剂被研发成功并应用于临床。靶向微泡分子探针为第三代声振含气微泡,目前临床应用较少,多处于实验和临床转化阶段,有较好的体内稳定性,可穿过血管壁进入组织间隙进行组织成像。微气泡超声造影需要靶区周围或靶区内存在足够数量的超声微泡<sup>[7]</sup>,具有靶向性的第三代微气泡虽可以特异性地集中在靶区,但配体与受体间的亲和力不尽相同,微泡的靶向富集能力亦随之改变,很难应对超声造影监控基因表达水平的复杂生理学环境。因此,需根据应用领域的不同综合考虑粒径、靶向及穿透能力等多方面因素,利用合成生物学的研究成果进一步开发生物来源的超声分子影像探针及适用于超声检测的报告基因系统。

### 二、用于超声成像的报告基因及其编码产物种类

将报告基因成功转入目的细胞或生物体中是其应用于分

基金项目:国家自然科学基金项目(81925019、81422023、51273165、U1705281);国家重点研发计划课题(2017YFA0205201);教育部新世纪优秀人才支持计划(ncet-13-0502)

作者单位:361102 福建省厦门市,厦门大学公共卫生学院分子影像暨转化医学研究中心

通讯作者:刘刚,Email:gangliu.cmim@xmu.edu.cn

子影像技术的前提。分子生物学研究中应用的表达载体均可作为传送报告基因的中介物质。报告基因与载体的整合方法包括基因融合法、双顺反子法及共载体法等。整合后的报告基因在特异启动子或增强子元件控制下启动转录并翻译成为相应产物,提供影像学信息。理想化的超声报告基因应具有以下条件:①报告基因编码产物的过程不应过于复杂,检测方式也应简便、准确、灵敏、重现性良好;②编码产物不应具有免疫原性,在体内的稳定性较好;③成像信号与编码产物间应具有良好的相关性。

1. 伪空泡:1895 年德国微生物学家 Klebahn 利用光学显微镜观察到蓝藻细胞内存在含有气体略带红色的气囊。随后,有学者<sup>[8-9]</sup>陆续在古细菌(嗜盐菌和产甲烷菌)和革兰氏阴性菌中发现了类似的气囊结构,并将其命名为伪空泡或伪空泡(GVs)。与水中气泡的简单结构不同,GVs 具有以下特征:①大部分呈圆柱形或纺锤形;②GVs 的两亲性外壳厚约 2 nm,在与周围介质进行气体交换时可阻止水分渗入;③GVs 内部气体压力小于同等大小的水中气泡,可以承受高达 1.3 MPa 的压力,这种抗压能力一方面来源于韧性外壳,另一方面可能与内部存在的包膜结构有关<sup>[10-11]</sup>。Shapiro 等<sup>[12]</sup>提出将 GV 作为超声造影剂,提取了来自水华鱼腥藻和盐生杆菌 NRC-1 的 GV,体外实验显示 3.5 μg/ml 的 GV 在超声介导下产生了声信号,其浓度和声信号强度在一定范围内呈现良好的线性关系;体内实验显示通过静脉注射的 GV 富集于严重联合免疫缺陷小鼠的肝脏组织中,增强了组织在超声图像中的对比度。另有研究<sup>[9]</sup>报道了一种基于空胞蛋白(Gvp)C 蛋白的重组 GV 构建方案,通过 6-M 尿素处理纯化后的水华鱼腥藻 GV,可以较简便地除去外层的 GvpC 蛋白,处理后的 GV 与大肠杆菌重组表达的另一 GvpC 共同孵育,二者通过分子间作用力重新组合,除去游离组分后即得到了重组 GV。相比于重组蛋白组分,这种构建方式不仅能够改变其蛋白成分,还可以对外部的结构蛋白进行功能化改造,在用以制备 GV 分子探针的同时体现了 *gvpA* 和 *gvpC* 作为超声成像报告基因的潜力。

2. 生物素连接酶(BirA)及其受体肽: BirA 是一种存在于大部分微生物体内的生物素连接酶,能够在体内催化生物素对蛋白质进行标记,包含 3 个结构域: N 端结构域、C 端结构域及中心催化结构域<sup>[13-14]</sup>。BirA 的中心催化结构域可催化生物素和三磷酸腺苷(ATP)反应形成 5'-AMP-biotin 活化中间产物,靶蛋白中赖氨酸残基的 ε 氨基随后与中间产物结合,并将生物素以酰胺键结合形式转移至靶蛋白质上。当融合生物素受体肽(BAP)的蛋白和 BirA 共表达时,BAP 序列可以被有效生物素化,生物素化的蛋白质可被亲和素标记<sup>[15]</sup>。Tannous 等<sup>[16]</sup>设计了一种重组报告蛋白,其 N 端信号序列和跨膜结构域之间包含 BAP 序列,将该重组蛋白序列转染进入 BHK-12 细胞后,BAP 序列可被细胞中内源性的生物素连接酶生物素化,最终将生物素展示在细胞表面;体内实验显示,转染有报告基因的 Gli36 神经胶质瘤细胞被用于构建小鼠皮下瘤模型,向小鼠体内注射亲和素偶联的荧光分子探针后,可对皮下肿瘤的生长情况进行实时

监测。与光学成像中荧光素酶报告基因系统相似,基于 BirA 及其受体肽的报告系统需要亲和素偶联的分子探针作为“底物”,二者共同作用产生影像学信号。但该报告系统更加灵活,成像模式可依据分子探针的不同而改变。随着第三代微气泡制备技术的成熟与完善,以偶联亲和素的微气泡作为分子探针,基于 BirA 及其受体肽的报告基因有望对其他深层组织中的生物学过程进行研究。

### 三、报告基因在体内外超声成像中的应用

1. 声学报告基因(ARGs)和哺乳动物声学报告基因(mARGs): Bourdeau 等<sup>[17]</sup>报道了一种重组 *gvp* 基因作为 ARGs,命名为 ARG1。由于单独将水华鱼腥藻和盐生杆菌 NRC-1 的 *gvp* 基因转入大肠杆菌工程菌中并不会产生 GV,而巨大芽孢杆菌 *gvp* 基因转入后虽然能产生 GV,但无明显超声造影效果。因此,Bourdeau 等<sup>[17]</sup>选择将水华鱼腥藻 GV 的结构蛋白基因与巨大芽孢杆菌 GV 进行基因重组,并导入大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌中,于透射电镜下观察到菌体内存在大量气泡状结构,有较强的超声对比度。随后,重组有 ARG1 和 *luxABCDE* (Lux)的大肠杆菌 EcN 被用于声学和光学报告基因对正常小鼠结肠组织成像能力的对比,相较于光学报告基因仅能显示组织的大致范围,ARGs 能更清晰地通过大肠杆菌 EcN 显示结肠组织的结构,检测深度 >10 cm,分辨率 <100 μm。肿瘤内部的缺氧环境可为鼠伤寒沙门氏菌等厌氧菌的定殖提供条件,目前已有利用该类细菌诊断和治疗癌症的研究<sup>[18]</sup>,但由于成像深度的限制,光学成像无法对细菌疗法的效果进行全面评估。因此,重组携 ARG1 的鼠伤寒沙门氏菌被进一步用于对荷瘤小鼠肿瘤组织的超声成像,结果显示 ARG1 作为声学报告基因提供了高分辨率的超声图像,证实了其深部无创成像性能。

真核生物的基因调控方式与原核生物不同,将 ARGs 作为报告基因转入真核细胞中表达的调控过程更为复杂。Farhadi 等<sup>[19]</sup>报道了基于 ARGs 的 mARGs,mARGs 是由多质粒组成的共转染系统,包括 *gvpB* 重组质粒、病毒 P2A 序列连接的多个巨大芽孢杆菌 *gvp* 重组质粒及增强质粒,并在其中设计了由强力霉素控制的基因表达开关。多质粒共转染 HEK-293T 人体肾脏细胞,经纯化分离后电镜下可见中空蛋白结构。体内实验显示,向免疫缺陷小鼠左右腿分别注射具有致瘤性的 mARG-HEK 和 mCherry-HEK 细胞,构建了一种双侧荷瘤模型。由于肿瘤外侧的新生血管多,外部血供较内部丰富,强力霉素诱导剂更多地富集在肿瘤组织外侧,产生了较强的声学报告基因诱导作用。超声成像下,报告基因的信号可以清晰并动态地勾勒出肿瘤组织的轮廓,而另一侧肿瘤组织中的光学报告基因虽持续表达,但仅能显示出斑点状的肿瘤轮廓。

2. Biotag-BirA 报告系统: Bartelle 等<sup>[10]</sup>构建了一种基于 BirA 及其受体肽的 Biotag 基因报告系统,主要基因元件包括 Tie2 血管启动子、BAP 融合蛋白序列及 BirA 序列。该基因报告系统转入细胞后可在细胞表面展示生物素。同时,Tie2 血管启动子的存在使生物素的表达量随血管生长发育状态改变<sup>[20]</sup>。在超声作用下,与细胞表面生物素结合的亲和素功能化微气泡分子探

针能够产生穿透深度较深、与生物素表达量呈线性关系的超声信号。Bartelle等<sup>[10]</sup>先向 HEK-293 细胞内转染内质网靶向 BirA 和 BAP 融合蛋白重组质粒,将生物素蛋白展示在细胞表面,并在体外实验中验证了报告系统表达的可行性。体内实验中,用 Biotag 报告系统构建了 Ts-Biotag 转基因小鼠作为动物模型,随着转基因小鼠的血管发育,Tie2 血管启动子控制着血管内皮细胞表面生物素的表达,向转基因小鼠体内注射微气泡分子探针后,探针结合于血管内皮细胞表面,根据超声信号的强弱可监测小鼠血管生长发育的动态超声图像。因此,BirA 及其受体肽作为一种间接的超声成像报告基因系统为研究血管系统发育过程提供了新方式,并有望实现对其他深层组织中生物学过程的研究。

#### 四、结论与展望

报告基因显像使在分子水平动态无创观察细胞动态活动成为可能。超声波是一种广泛使用的生物医学技术,可实现具有高时空分辨率的无创成像。目前,多数超声成像报告基因系统均与微气泡有关,由空心胞衍生出的 ARGs 和 mARGs 实现了动物模型的结肠组织和肿瘤组织的高分辨超声成像。基因编码产生的生物源性微气泡在尺寸、稳定性及抗压性等方面均显示出优越性。BirA 及其受体肽作为间接的超声成像报告基因系统,以偶联亲和素的第三代微气泡作为分子探针,被用于动物模型炎症部位和血管发育的监测与分析,具有良好的应用前景。此外,虽然过氧化氢酶等气体产生酶生成的气泡在物理性质上不够稳定,仅能维持数分钟,但也可进行短时间的超声成像,有望被开发为新型超声成像报告基因<sup>[21]</sup>。

已开发的超声成像报告基因也存在不足:①已开发的超声成像报告基因数量不多,其是否能在体内复杂多变的微环境中应用尚有待探索;②报告基因往往作为一种外源性基因导入,生物安全性需进一步验证;③报告基因编码产物的定量方法尚不成熟,标准化研究亟待探索。随着超声分子影像学的发展,报告基因种类的增多,相信超声报告基因将进一步推动超声分子影像领域发展并焕发新的活力。

#### 参考文献

- [1] Ye J, Fu G, Yan X, et al. Noninvasive magnetic resonance / photoacoustic imaging for photothermal therapy response monitoring [J]. *Nanoscale*, 2018, 10(13): 5864-5868.
- [2] 高海燕, 任恩, 刘刚. 分子影像技术在抗肿瘤药物研发中的应用进展[J]. *中国药房*, 2017, 28(24): 3448-3453.
- [3] Yang C, Tian R, Liu T, et al. MRI reporter genes for noninvasive molecular imaging[J]. *Molecules*, 2016, 21(5): 580.
- [4] Paefgen V, Doleschel D, Kiessling F. Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery[J]. *Front Pharmacol*, 2015, 15(9): 197.
- [5] Cao WJ, Matkar PN, Chen HH, et al. Microbubbles and ultrasound: therapeutic applications in diabetic nephropathy [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 880(1): 309-330.
- [6] Kotopoulis S, Dimceviski G, Gilja OH, et al. Treatment of human pancreatic cancer using combined ultrasound, microbubbles, and gemcitabine: a clinical case study [J]. *Med Phys*, 2013, 40(7): 072902.
- [7] Tanter M, Fink M. Ultrafast imaging in biomedical ultrasound [J]. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2014, 61(1): 102-119.
- [8] Pfeifer F. Distribution, formation and regulation of gas vesicles [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10(10): 705-715.
- [9] Lakshmanan A, Farhadi A, Nety SP, et al. Molecular engineering of acoustic protein nanostructures [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(8): 7314-7322.
- [10] Bartelle BB, Berrios-otero CA, Rodriguez JJ, et al. Novel genetic approach for in vivo vascular imaging in mice [J]. *Circ Res*, 2012, 110(7): 938-947.
- [11] Ezzeldin HM, Klauda JB, Solares SD. Modeling of the major gas vesicle protein, GvpA: from protein sequence to vesicle wall structure [J]. *J struct Biol*, 2012, 179(1): 18-28.
- [12] Shapiro MG, Goodwill PW, Neogy A, et al. Biogenic gas nanostructures as ultrasonic molecular reporters [J]. *Nat Nanotechnol*, 2014, 9(4): 311-316.
- [13] Kim DI, Roux KJ. Filling the void: proximity-based labeling of proteins in living cells [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(11): 804-817.
- [14] Zeng Y, Zhu J, Wang J, et al. Functional probes for cardiovascular molecular imaging [J]. *Quant Imaging Med Surg*, 2018, 8(8): 838-852.
- [15] Li P, Li J, Wang L, et al. Proximity labeling of interacting proteins: application of BioID as a discovery tool [J]. *Proteomics*, 2017, 17(20).doi: 10.1002/pmic.201700002.
- [16] Tannous BA, Grimm J, Perry KF, et al. Metabolic biotinylation of cell surface receptors for in vivo imaging [J]. *Nat Methods*, 2006, 3(5): 391-396.
- [17] Bourdeau RW, Lee-gosselin A, Lakshmanan A, et al. Acoustic reporter genes for noninvasive imaging of microorganisms in mammalian hosts [J]. *Nature*, 2018, 553(7686): 86-90.
- [18] Chen F, Zang Z, Chen Z, et al. Nanophotosensitizer-engineered salmonella bacteria with hypoxia targeting and photothermal-assisted mutual bioaccumulation for solid tumor therapy [J]. *Biomaterials*, 2019, 214(9): 119226.
- [19] Farhadi A, Ho GH, Sawyer DP, et al. Ultrasound imaging of gene expression in mammalian cells [J]. *Science*, 2019, 365(6460): 1469.
- [20] 陆俊佳, 袁志刚, 许淑茹. 小鼠 TIE2 基因启动子的克隆及转录活性分析 [J]. *生物技术通报*, 2012, 11(1): 90-94.
- [21] Olson ES, Orozco J, Wu Z, et al. Toward in vivo detection of hydrogen peroxide with ultrasound molecular imaging [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(35): 8918-8924.

(收稿日期: 2020-03-28)