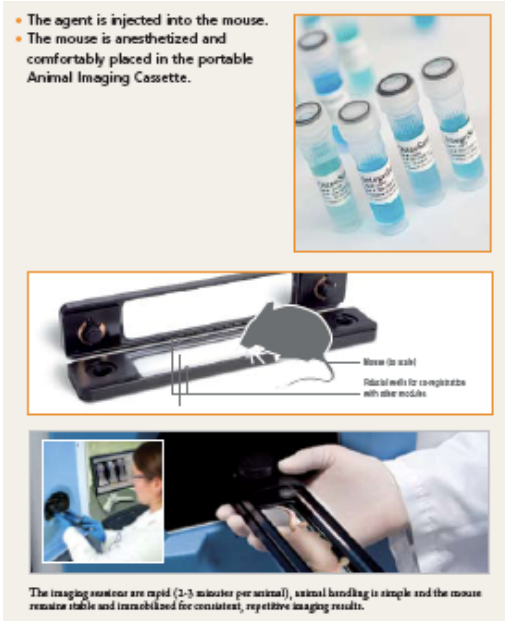
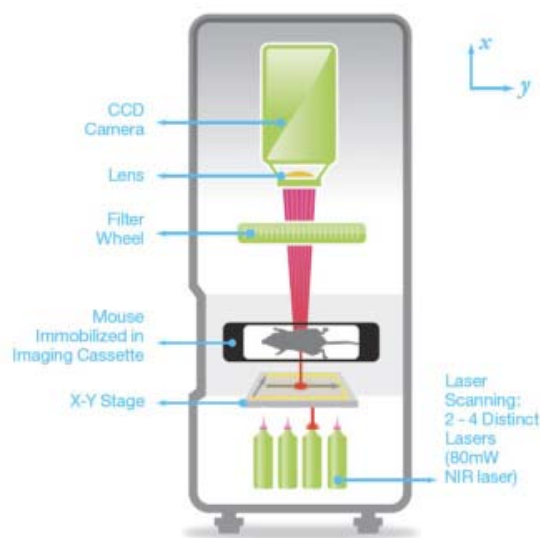


小動物活體螢光斷層影像系統

一. 系統介紹：

動物活體螢光影像在國內外應用越來越普及，有越來越多的科學家希望能長時間追蹤活體動物體內腫瘤細胞的生長及對藥物治療的反應，有的則希望能藉多螢光來標記抗體、小分子藥物以觀察在動物體內的分佈和代謝。有別於傳統方法，活體螢光影像技術不需犧牲動物就可對同一個動物體進行長時間反覆的影像追蹤，可有效提高數據的可信度，避免因為個體差異而影響了試驗結果；同時也免除了傳統方法的諸多缺點；甚至可不用標記動物體本身，即直接以螢光標記物來研究其變化，所得之觀察結果亦真實可靠。

FMT2500螢光斷層影像系統是全球唯一可對小動物體內螢光進行激光斷層掃描分析的系統，配合多種近紅外波長並與生物體相容的體內螢光試劑，進而對螢光強度進行精確的體內定量技術，並可與其他分子影像進行3D與斷層的融合，從而對螢光源所在位置進行精確的解剖影像定位。FMT 系統主要是藉由連續雷射激光進行光柵掃描，其可穿透整個小動物身體，最大可偵測達10萬成對光束，所得龐大的吸收和螢光散射訊號，再配合高階電腦經由獨特運算分析後，可得到不同深度的螢光訊號並精確的加以定量，如此，即可得到螢光斷層數據，並據此進行3D重建。



活體螢光斷層影像系統，在國外也有人稱這種技術為光學PET，主要是因為其保有PET可定量的功能優點，設備建立成本也相對經濟，更重要的是完全不會使用放射性物質。此技術經過5到7年的開發，現在已經可以完全量化，其空間辨識率亦達到了0.5mm，檢測深度則可達5-10cm。此系統最早是由美國VisEn Medical公司開發的定量活體螢光斷層影像系統，研發團隊專精於螢光影像系統及螢光試劑的開發，其技術背景雄厚，創始人之一是有“分子影像之父”之稱的哈佛醫學院/麻省總醫院分子影像中心主任Ralph Weissleder教授。因此該系統從2008年6月問世以來，很快就被眾多知名學校（如哈佛），及世界著名製藥公司（如輝瑞）所應用，目前已廣泛的應用在腫瘤學、心血管學、骨骼學、呼吸、神經生物學、炎症等多個研究領域。在NATURE，PNAS，CIRCULATION, NEUROIMAGE 等權威雜誌上也發表多篇論文。Perkin Elmer公司一直以來從分子開發平台到細胞相關研究的技術一直相當完整，2010年的8月他們正式宣佈將Visen 公司納入旗下，這也相對宣告世人，他們更加完備的產品線，將帶領著大家進入隨後的分子影像年代。



二. 系統主要優勢

1. 可以真正進行體內訊號的定量研究：

檢測體內螢光的強度，不會隨著深度加深而衰減。

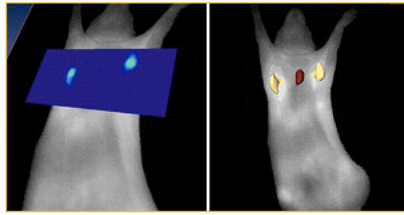


Image: Absolute quantification based on robust data even within deep tissue

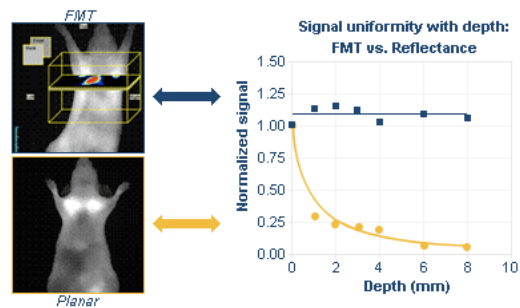


Image: Readouts from conventional optical imagers show erroneously decreasing signals, due to depth effects. FMT technology provides uniformly accurate measurement regardless of depth.

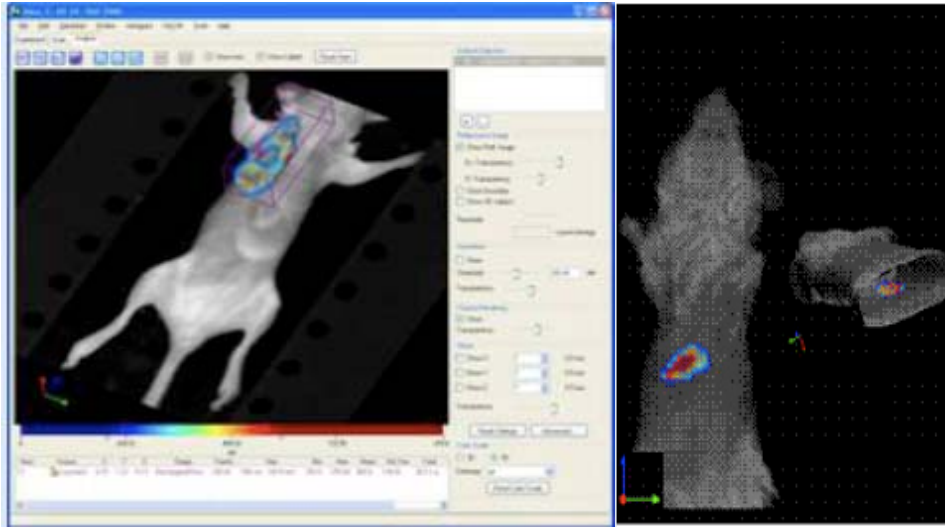
2. 可以進行斷層影像掃描：

測量各個斷層深度的螢光強度，反應螢光所處的深度位置訊息。



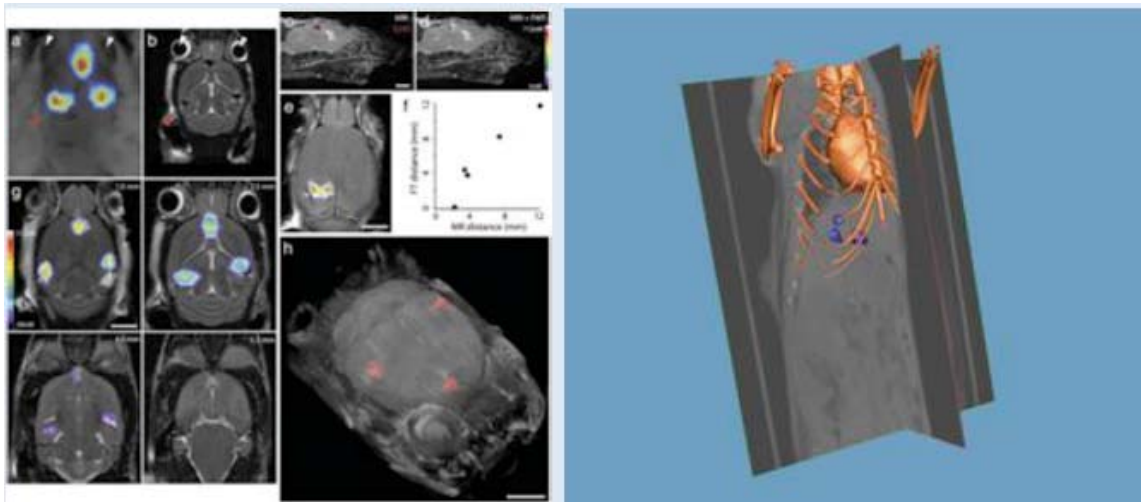
3. 可以進行3D重建:

將不同斷層深度的螢光訊號進行3D重建，從而得到目標螢光的形態、濃度、體積與解剖定位等。



4. 具有影像多樣性的特色:

可與MicroCT、MicroMRI、MicroPET、MicroSPECT影像進行3D及斷層融合。



二. 相關螢光試劑

由於用於活體成像的試劑必須具備較高的親和力和特異性，並且要克服一系列“生物屏障”的問題，比如快速排泄、非特異性標靶組織之非特異性蓄積、代謝、清除和藥物給藥屏障等。因此現今Perkin Elmer除了現有的螢光試劑外，也積極研製一系列具備不同機制的螢光試劑，包含多種疾病演變和治療反應的生物指標、生物標記與通路等，而除了評估動物模式之生物活性表現與治療反應外，螢光試劑本身的生物相容性與毒性作用也是相當重要的。

Perkin Elmer公司目前擁有的螢光試劑易用於各種標準動物模型，包含生物、生理、功能信息等，可對多分子作同步監測，亦可針對特殊需求訂制需要的螢光試劑，其試劑主要可分成以下幾類：

1. 蛋白酶探針：特別設計的分子探針，當被特定酶切割後發出螢光，從而反應出標的蛋白酶在體內的活性。
2. 分子標靶探針：以螢光標記特定分子來研究標的蛋白在體內表達之情形。
3. 血管研究用螢光試劑：以螢光染劑注入血管內進而研究微血管密度、灌注點、血管通透性等。
4. 螢光標籤：螢光粒子以-NH₂基團端與任何帶有-COOH基團的分子相連，研究者可自由標定分子，開發最適合自己的研究模式。

Application			Organ	
Angiogenesis	Hypertension	Vascular	Bone	Lungs
Apoptosis	Infectious		Brain	Stomach
Arthritis	Inflammation		CNS	
Atherosclerosis	Oncology		Heart & Carotids	
Bone Turnover	Pulmonary		Intestines	
Cardiovascular	Skeletal		Kidneys	
Gastro Intestinal	Neurological		Liver	

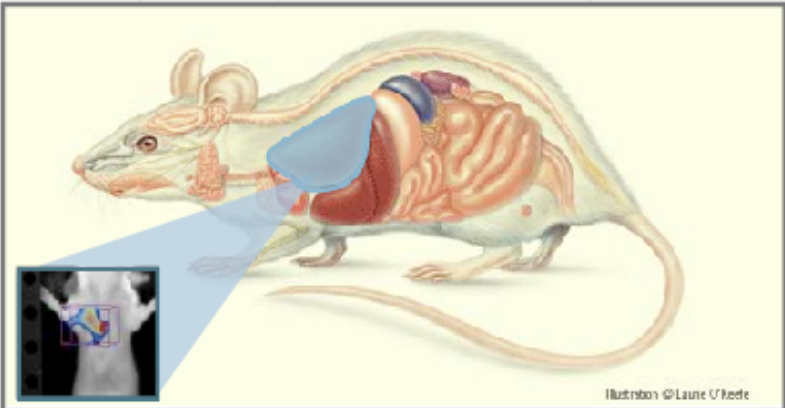


Illustration © Laurie Ufford

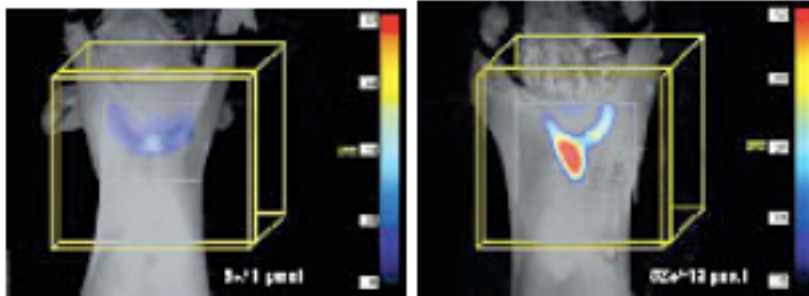
	Acute Inflammation	Angiogenesis	Apoptosis	Arthritis	Atherosclerosis	Bone Loss	Cardiovascular Disease	Hypertension	Oncology	Pulmonary	Vascular Disease
Activatable fluorescence agents enable specific imaging of biological processes that underlie disease											
Cat B 680 and 750 FAST™	•			•	•		•		•	•	•
Cat K 680 FAST						•					
MMP5ense® 680 and 750 FAST	•			•	•		•		•	•	•
Neutrophil Elastase 680 FAST	•									•	
ProSense 680, 750 and 750 FAST	•			•	•		•		•	•	•
ReninSense 680 FAST								•			
Targeted fluorescence agents enable specific areas of interest to be detected, monitored and measured <i>in vivo</i>											
Annexin-Vivo 750			•								
IntegriSense™ 680 and 750		•			•		•		•		•
OsteoSense® 680, 750 and 800				•	•	•	•		•		
Vascular fluorescence agents are distributed passively through blood vessels to enable imaging of vascularity, blood pooling in tumors and inflammation, and vascular leakage											
AngioSense® 680 and 750	•	•		•			•		•	•	•
AngioSPARK® 680 and 750	•			•	•		•	•	•		•
Superhance™ 680	•	•		•			•		•		•

三. 應用實例：

活體螢光斷層影像在腫瘤學中的應用

案例：深肺中央靜脈轉移：疾病及治療反應的檢測與測量(ProSense)

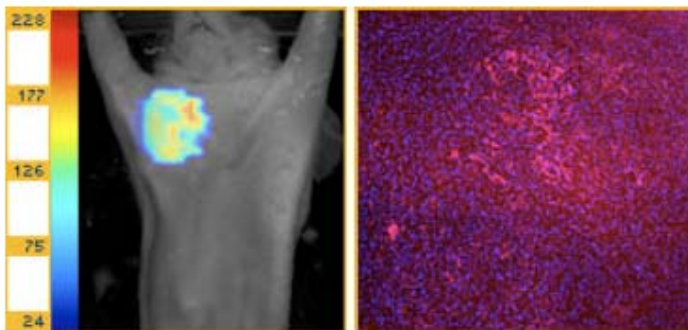
4-5週齡的雌性BALB/c小鼠在注射4T1細胞後一天開始接受強力黴素(15 mg/kg/d) 化療。 第13天時，注射ProSense 750並在24小時後使用FMT系統拍攝之影像。



結果：肺部冠狀位顯示，腫瘤治療效果明顯。

案例：與腫瘤相關的血量和血管之即時影像(AngioSense)

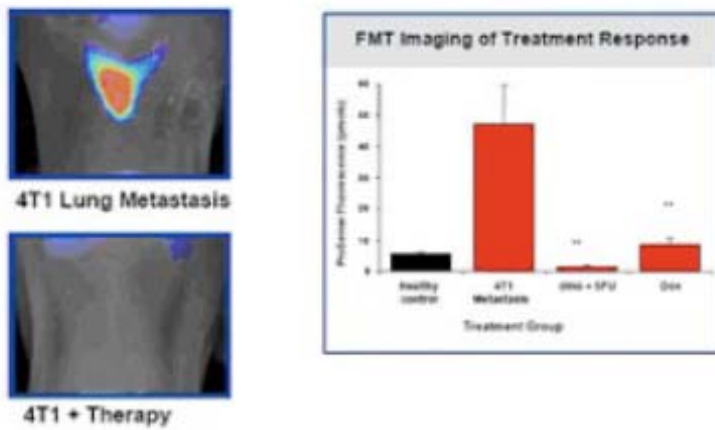
使用植入人前列腺癌細胞 (PC3)的裸鼠，15天後，對老鼠注射AngioSense(2nm)，24小時後使用FMT系統影像。 隨後切除腫瘤組織，冷凍切片(5 μ m)。



螢光顯微鏡下顯示之腫瘤細胞（吖啶，藍色）和AngioSense（紅色）的分佈（ 100X）

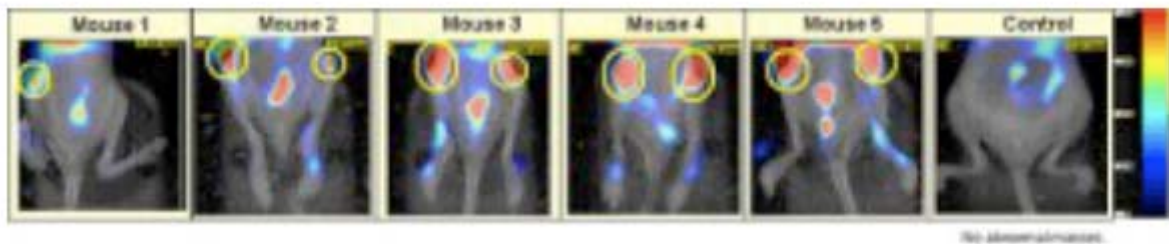
治療反應監測(ProSense)

4T1乳腺癌轉移肺中的蛋白酶活性

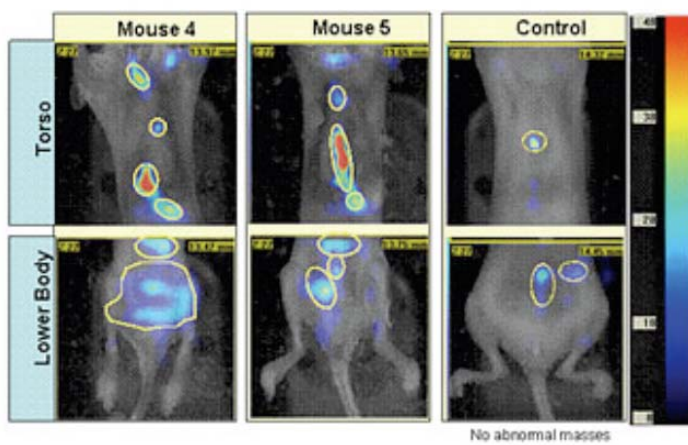


案例：彌散性轉移掃描結果和組織學一致 (ProSense)

使用ProSense 750試劑分析股骨和脊椎轉移



股部腫瘤轉移的態樣一致



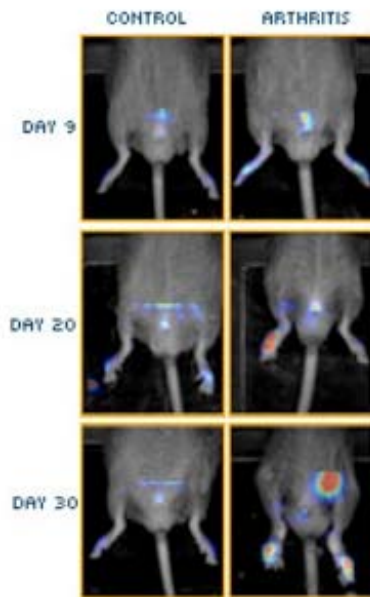
脊椎和盆骨區腫瘤轉移態樣一致

活體螢光斷層影像在炎症性疾病中的應用

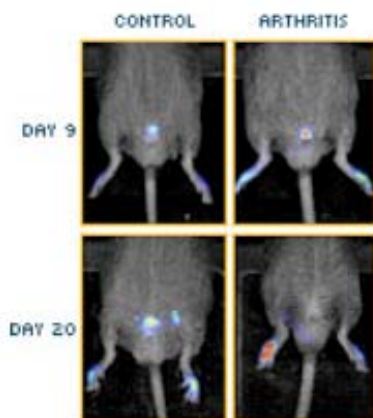
案例：膠原性關節炎模型中的多重影像

試劑及儀器：ProSense, MMPsense, Osteosense及FMT系統

活體內表現疾病進程和治療反應，全程有效定量檢測生物學改變
無需使用放射性同位素，即時監測骨重建活動中疾病相關酶的活性特徵，
和傳統方法具有良好的一致性，且更能區分正常和關節炎動物。



單核細胞浸潤/激活增加(ProSense)



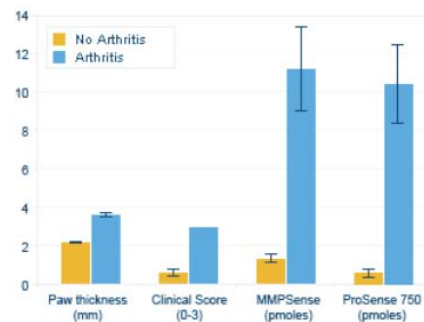
金屬蛋白酶活性增加(MMPsense)

背景：各種試劑注射24小時後進行斷層分析

在這項研究中，使用膠原性關節炎疾病為模型，觀察單核細胞浸潤和活化、金屬蛋白酶活性和骨重建等情形，週期為30天。在第1天和第21天時對DBA/1J小鼠注射螢光試劑。使用傳統方法（測量足蹠厚度和進行臨床評分）作為對照。在類風濕關節炎時，蛋白酶和基質金屬蛋白酶活性的變化參與炎症反應的發展與維持，同時發生骨骼變化。

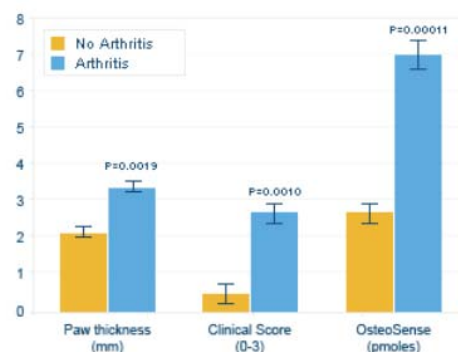
結果：比傳統方法有較良好的一致性，且更能區分正常與患有關節炎動物。

測量酶活性：ProSense和MMPsense為活性螢光試劑。ProSense主要通過體內組織蛋白酶B激活（部分為體外組織蛋白酶K、L、S，纖維蛋白溶酶、血漿激肽釋放酶、尿激酶和CD10激活），而MMPsense由基質金屬蛋白酶（MMPs）激活，包括MMP-2、3、9和13。



和傳統技術相比，OsteoSense(pmoles)試劑具有良好的一致性

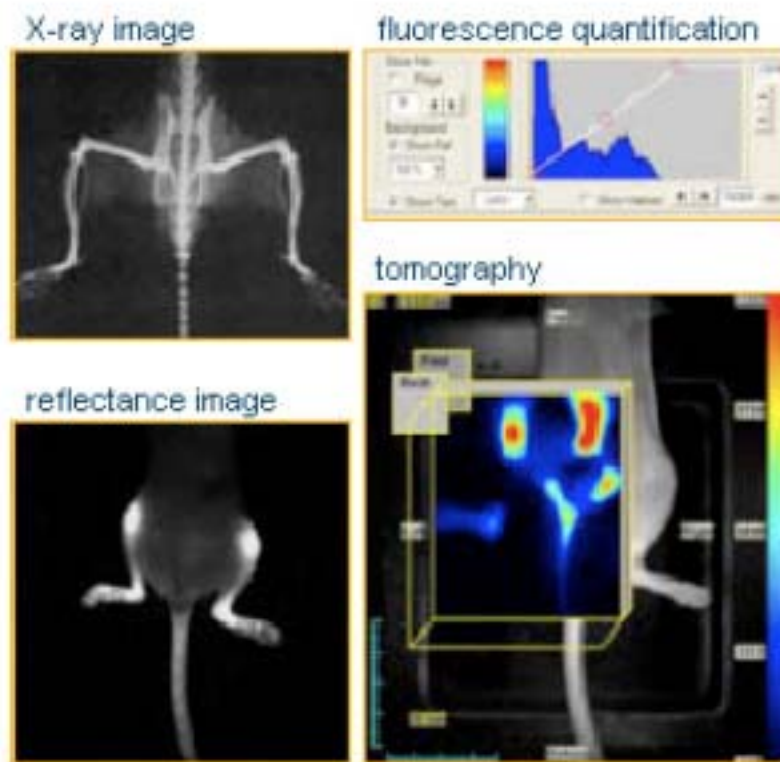
用於檢測骨轉換應用：螢光試劑OsteoSense能結合在骨轉換過程中暴露的羥基磷灰石，從而可監測活體動物骨生長或骨吸收等骨骼改變。



活體螢光斷層影像在骨病中的應用

案例: 骨生長活體影像

與X線影像或反射影像相比，定量技術能分析更深層的盆骨和脊椎結構。

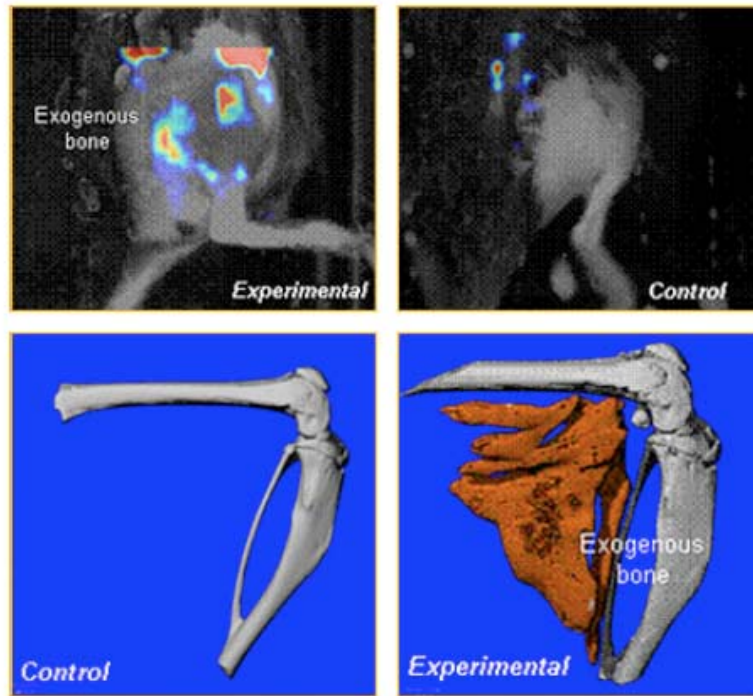


圖為同一隻老鼠使用傳統影像技術（左上為X線，左下為反射影像）和FMT三維螢光影像技術（右，注射螢光試劑OsteoSense 680後24小時）所得影像。

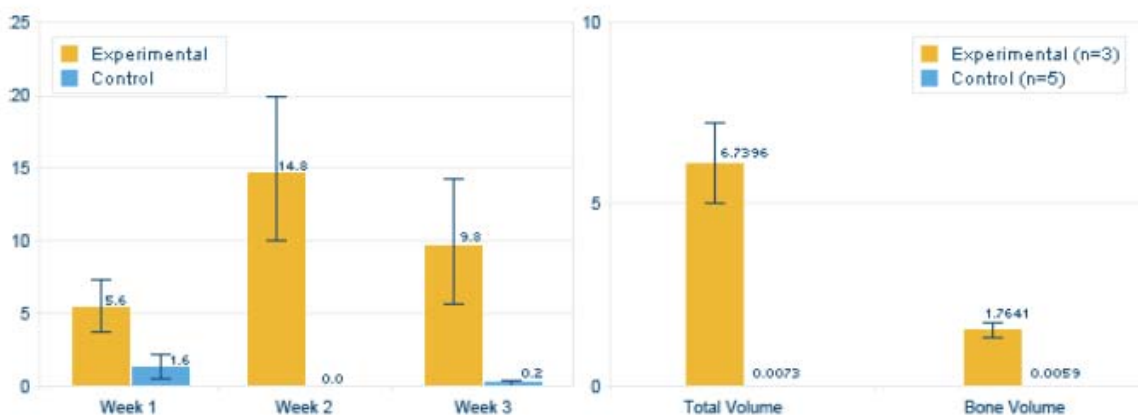
案例:異位骨形成與微型CT分析結果一致

新建的肌內骨形成。在這些研究中，使用骨形態發生蛋白-2（BMP-2）用於體內誘導骨形成。將可表達rhBMP-2（C9細胞）的小鼠骨髓基質乾細胞移植到C3H/HeN小鼠的右大腿肌肉內。

對移植部位進行斷層和微型CT分析顯示，在肌內有大量異位新骨組織形成。



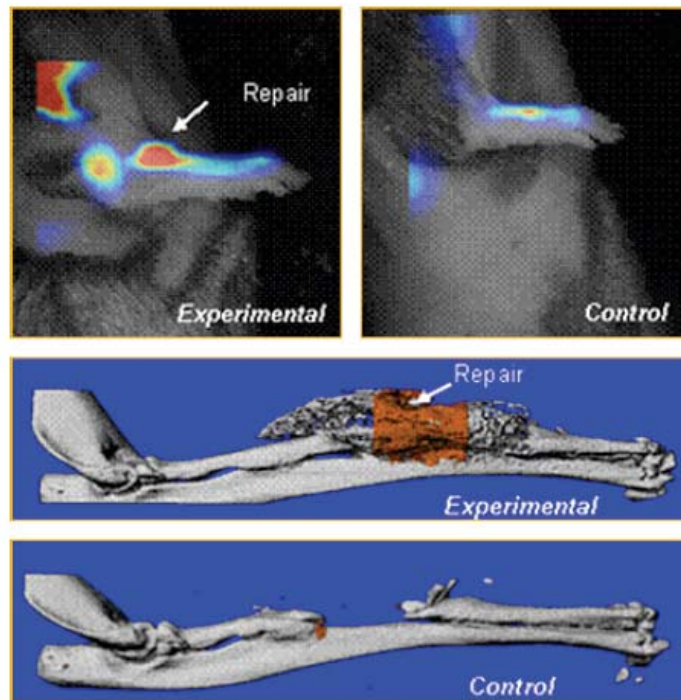
上圖為第2週時注射體內螢光試劑OsteoSense（2nmoles），24小時後使用FMT系統進行斷層影像。第3週時以微CT掃描對骨改變進行確認。



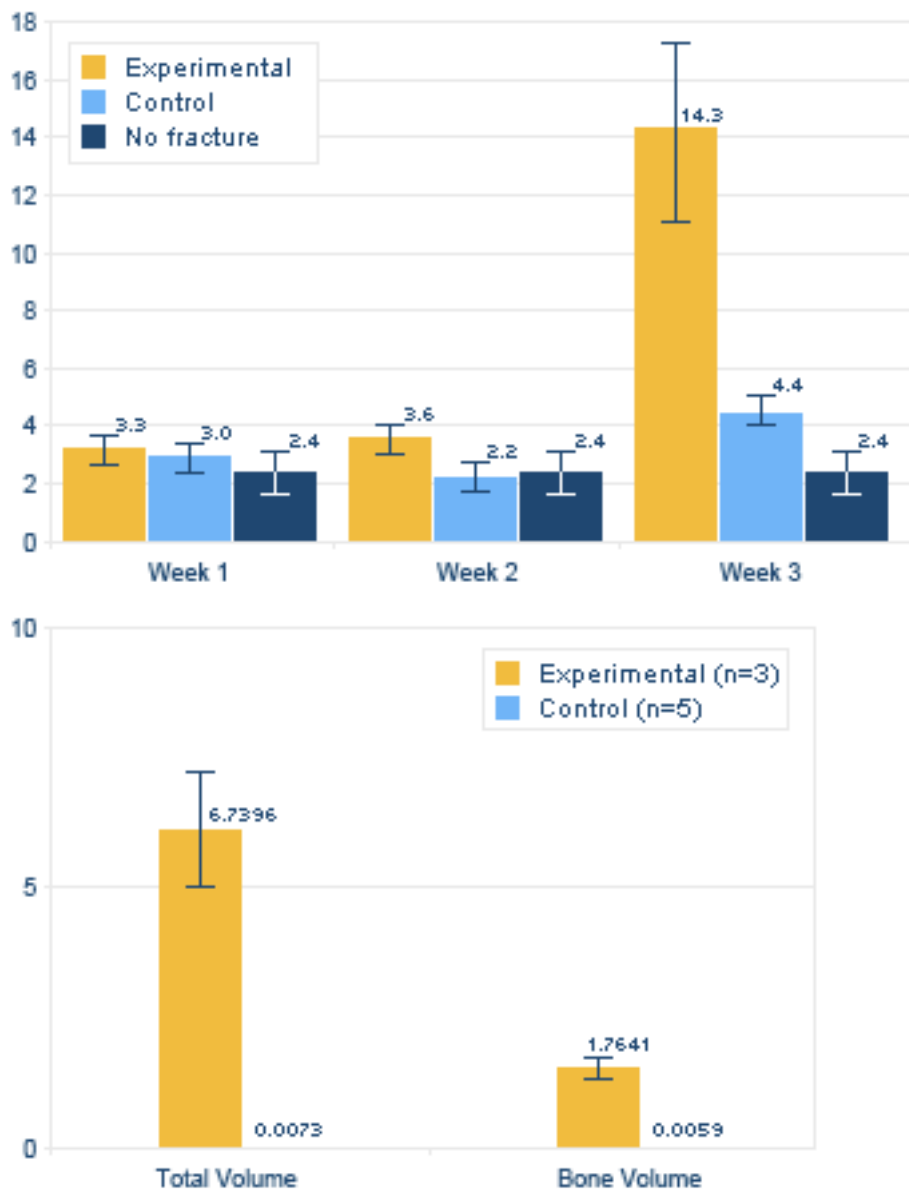
結果:定量螢光斷層分析顯示的螢光總量（pmoles，平均值± SEM；每組4-7隻小鼠）。異位骨組織的骨螢光量峰值出現在第2-3週。微型CT數據證實了異位骨生長的骨量增長。

案例: 橈骨修復之定量檢測:

在這些研究中，使用骨形態發生蛋白-2 (BMP-2) 用於體內誘導骨形成。將可表達rhBMP-2 (C9細胞) 的小鼠骨髓間質幹細胞移植到C3H/HeN小鼠右橈骨的2.5mm缺陷節段中，之後對移植部位進行斷層和微型CT分析顯示，在橈骨骨折不癒合部位顯示有新骨組織形成。



上圖為第2週時注射體內螢光試劑OsteoSense (2nmol)，24小時後使用FMT系統進行斷層影像。第3週時進行微CT掃描對骨改變進行確認。



結果:螢光斷層定量分析顯示之螢光總量 (pmoles, 平均值 $\pm$ SEM; 每組4-7隻小鼠)。修復部位骨組織的骨螢光量高峰值出現在第3週。微型CT數據證實了骨折修復的骨量增長。

活體螢光斷層影像在肺部疾病中的應用

案例:建立哮喘動物模式之非侵入性活體影像

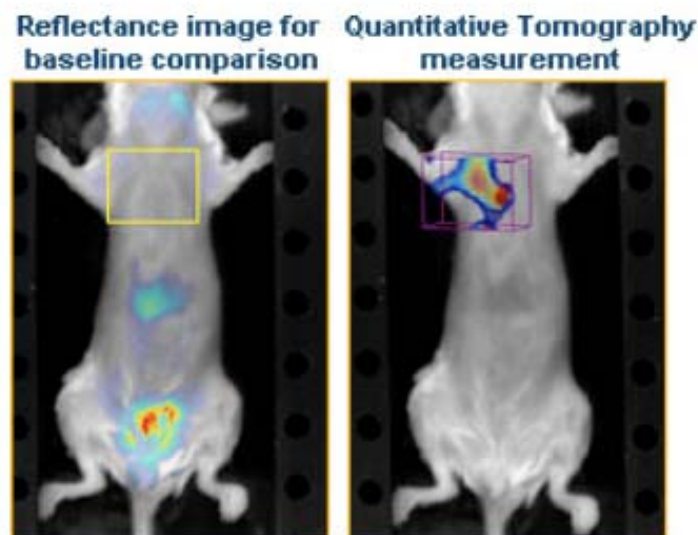
試劑及儀器：ProSense，FMT系統

背景介紹:蛋白酶活性檢測：ProSense主要透過體內組織蛋白酶B激活（部分為體外組織蛋白酶K、L、S，纖維蛋白溶酶、血漿激肽釋放酶、尿激酶和CD10激活）

哮喘動物模式：卵白蛋白（OVA）誘導的BALB/c小鼠哮喘動物模式用於模擬相關人類疾病，小鼠肺部大量出現炎症細胞，與人類哮喘極為相似。

活體定量測量疾病進展和治療反應：

嗜酸性粒細胞的蛋白酶對螢光試劑Prosense的特異性激活作用與傳統技術及體外測量技術結果一致。在卵白蛋白(OVA)誘導的BALB/c小鼠哮喘模型中以非侵入性之活體影像定量及檢測肺部炎症螢光，以三維方式鑑定與測量肺部的異質區域。

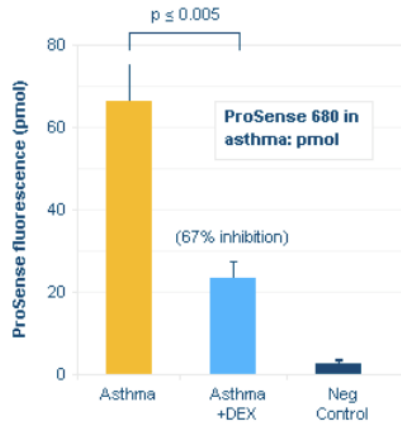


反射影像：哮喘模型中有廣泛的螢光（蛋白酶激活的ProSense）分佈，上胸部無明顯信號。

定量斷層影像(FMT2500)：透過螢光驗證、測量肺部的異質區域。

測量治療反應：

使用螢光斷層影像定量測量哮喘組、哮喘治療組和陰性對照組的肺部總螢光量（相當於激活的ProSense的pmoles數）和容積（相當於激活的ProSense的mm³數）。



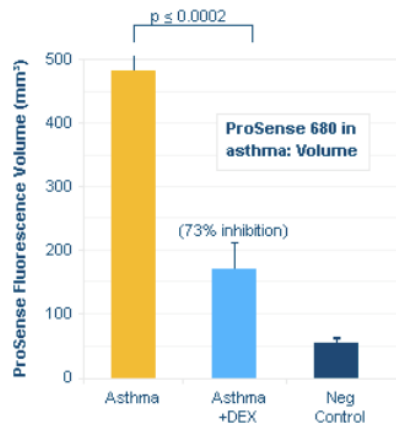
肺部總螢光量=蛋白酶活性(A)

哮喘組： >65 pmols

小動物活體螢光影像系統

類固醇治療組：肺部總螢光量減少67%

陰性對照組： <5 pmols



螢光容積大小反應肺組織相對大小(B)

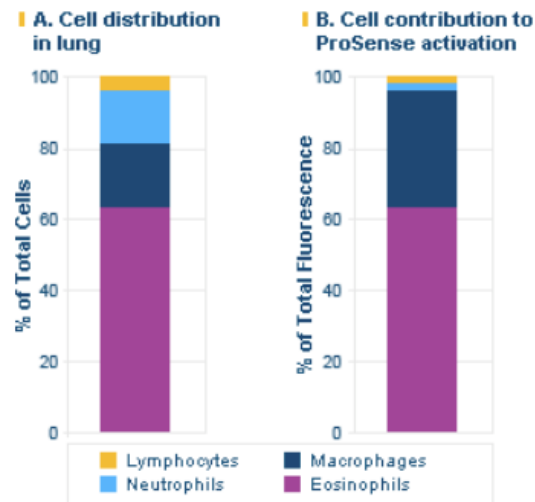
哮喘組： 500 mm³

類固醇治療組：較少73%

陰性對照組： 50 mm³

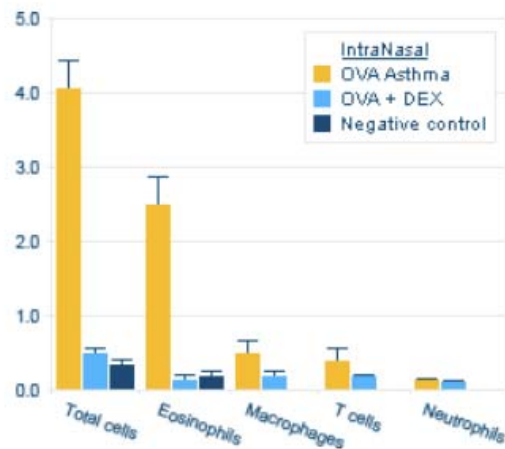
嗜酸性粒細胞和巨噬細胞體內特異性激活ProSense:

對哮喘小鼠進行支氣管肺泡細胞灌洗，使用流式細胞儀，標記嗜酸性粒細胞、巨噬細胞、中性粒細胞和淋巴細胞亞群，以驗證各自對螢光試劑ProSense的激活作用。正如預期，在用卵白蛋白免疫及鼻內誘發之後，肺部急劇出現大量炎症細胞，嗜酸性粒細胞和巨噬細胞同時為激活ProSense的主要細胞。

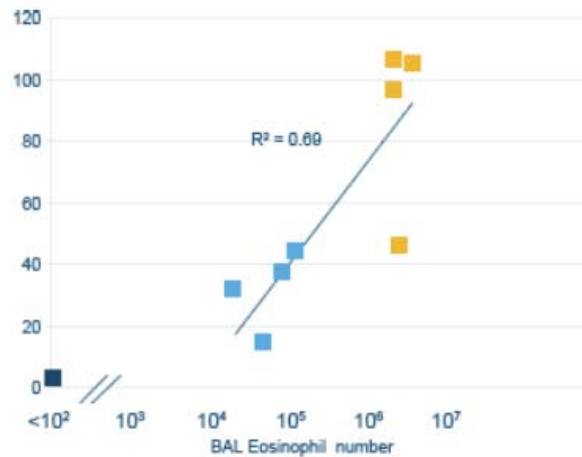


螢光定量斷層技術與傳統技術、侵入性技術具有良好的一致性。

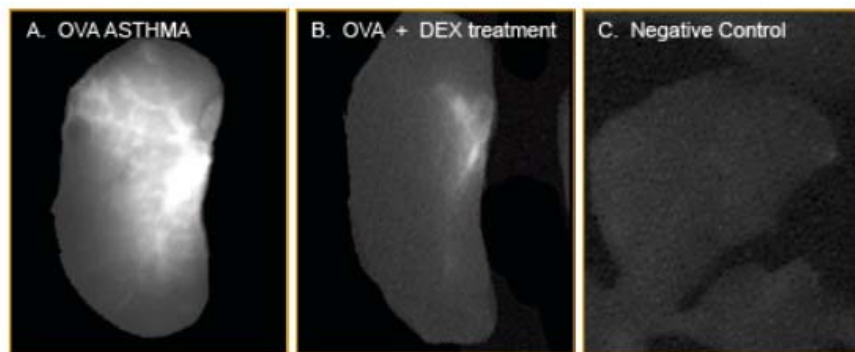
對哮喘組、哮喘治療組和對照組小鼠行支氣管肺泡灌洗，分離、計數肺部不同的細胞亞群。



哮喘小鼠中大量出現嗜酸性粒細胞，地塞米松治療之小鼠出現少量炎症細胞，以巨噬細胞為主。



上圖顯示螢光斷層技術(ProSense) 定量結果 和BAL嗜酸性粒細胞數量一致。



上圖為肺組織體外螢光反射影像。 從三組小鼠中切取肺組織，使用反射影像系統對各自的肺葉進行影像。

哮喘組：大小氣道具有大量螢光；治療組：螢光減少；對照組：無螢光。

蛋白酶活性能反映出肺部炎症反應。 傳統評估肺部炎症的動物模型大多為侵入性技術，以測量肺功能和肺部各細胞狀況。 非侵入性、可視性的即時定量測量方法對觀察疾病進展和治療反應具有重要意義。

活體螢光斷層影像在心血管疾病中的應用

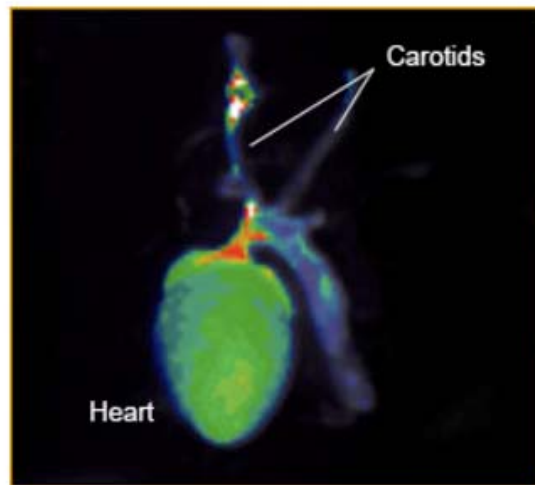
案例:動脈粥樣硬化老鼠模式的斷層研究

傳統的動脈粥樣硬化動物模式和血管損傷研究需要對疾病演變和治療反應進行組織學分析，此過程耗時費力。而定量斷層技術結合生物相容性螢光試劑，能為您提供：不依賴組織學、非侵入性的連續分析技術、活體特異性定量檢測與具有多種生物活性等優點。

非侵入性定量斷層顯示炎症信息(AngioSPARK)

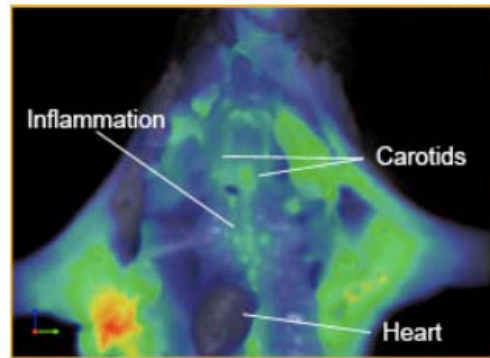


2D反射影像，FMT系統。 AngioSPARK顯示頸動脈炎區域。



3D 重建影像，FMT 系統。 AngioSPARK顯示心血管炎症區域。

以FRI和AngioSPARK清晰顯示炎症區域（需要侵入性手術）



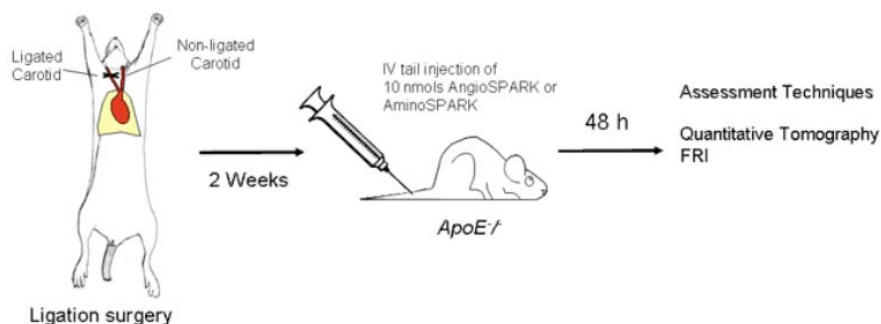
上圖為FRI影像. AngioSPARK 顯示炎症區域

實驗背景：動脈粥樣硬化頸動脈結紮小鼠模式通常是使用血流停止法（頸動脈結紮）誘導高脂飲食的ApoE⁺/⁻小鼠的形成斑塊，該模式廣泛應用於動脈粥樣硬化研究。

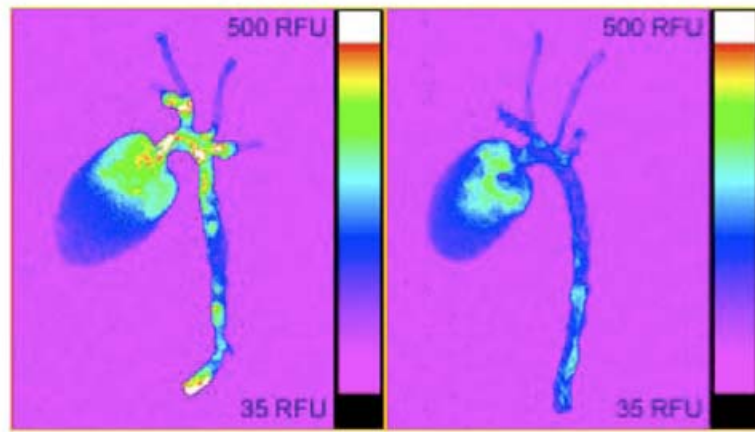


AminoSPARK和AngioSPARK為高亮螢光試劑，在血漿中的半衰期約為20小時，能夠長時間檢測血管狀況，用以觀察腫瘤血漏、炎症、血管生成等現象。這兩種試劑最後會被巨噬細胞吞噬。

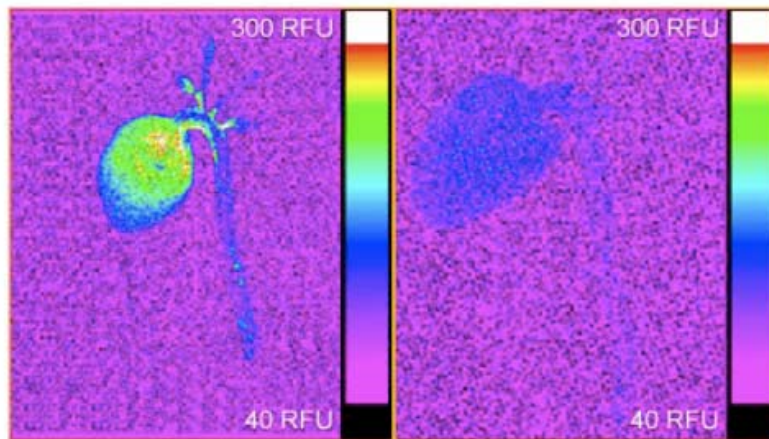
實驗步驟



檢測疾病相關的組織蛋白酶B活性及主動脈根部和主動脈弓的巨噬細胞（體外FRI，Prosense，AngioSPARK）



上圖為主動脈體外FRI影像。 ApoE KO老鼠（左）和BALB/c 老鼠對照(右)
 方法：7月齡的ApoE KO老鼠。 注射 ProSense（每隻老鼠4nmol)24小時後影像。 灌注、分離主動脈。



上圖為主動脈體外FRI成像。 ApoE KO老鼠（左）和BALB/c 老鼠對照(右)
 方法：7月齡的BALB/c老鼠。 注射AngioSPARK（每隻老鼠4nmol)24小時後成像。 灌注、分離主動脈。

背景介紹：

組織蛋白酶活性檢測：ProSense主要通過體內組織蛋白酶B激活（部分為體外組織蛋白酶K、L、S，纖維蛋白溶酶、血漿激肽釋放酶、尿激酶和CD10激活）



博克科技有限公司

www.jnhotech.com.tw

(02) 8791-2769

--專業服務・誠心以赴--