

生物冷光活體影像 研究生殖保存

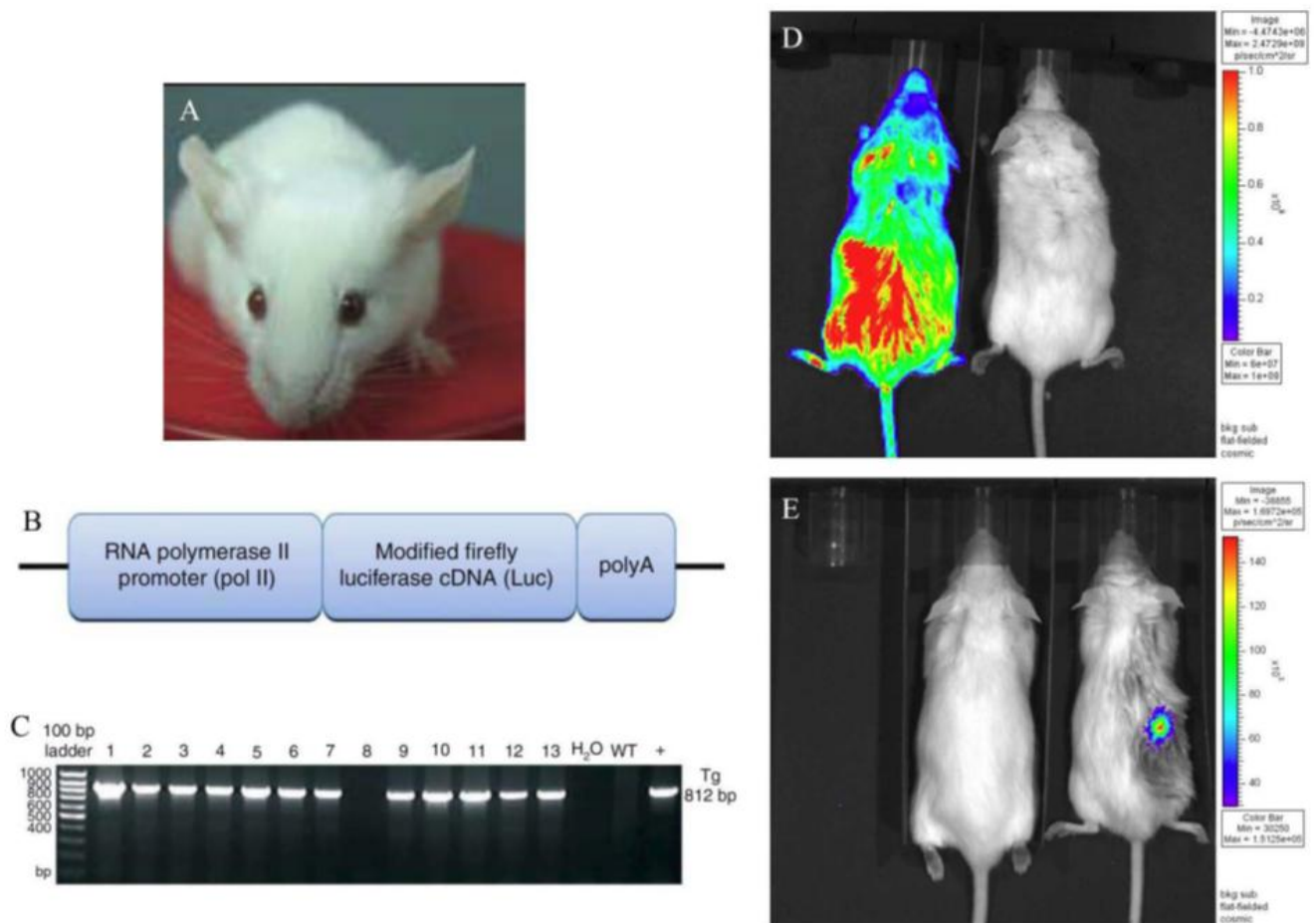
陳啟煌副教授 台北醫學大學醫學系

人眼看不穿表皮，更看不見體內的器官，或是更小的細胞及分子。過去都是透過解剖，才有辦法認識與了解各種組織器官的樣貌、或是透過病理切片觀察得以明白細胞組織的病變。因此，為了能非破壞性地了解及顯現體內的結構及病變，往往需要仰賴能透視生物體的工具。「非侵入式影像」的問世對研究的重要性，已為世人所公認。從事人工生殖的臨床工作時，有感於體內及體外乃至活產一切都是活體觀察，因此從事轉譯醫學的動物實驗更有賴活體的觀察以增加研究的張立及可性度，因此癌症病患接受化療及放射線治療的生殖保存系列研究長年以來有賴生物冷光表達基因(**reporter gene**)用於活體觀察性腺異種艱移植、冷凍保存移植，及精原細胞及組織工程的成效結合跨領域的研究有日漸增加趨勢，基因轉殖動物對於研究帶來即時與觀測的便利性。因此在執行九十七年度國科會計劃「以基因轉殖鼠冷光表現活體追蹤生殖保存與延續的動物模式」期間引進帶有冷光基因片段之基因轉殖鼠建立生物冷光(**bioluminescence**)實驗模式。

此類非侵入式觀察的特點有：(Figure 1-5)

- 1.針對同一隻實驗動物在時間上做連續性的觀察，可降低動物之間個體差異所造成的誤差
- 2.可同時定性及定量化
- 3.減少實驗動物的使用量 (3R)
- 4.觀察動物整體的變化
- 5.即時 (**real-time**)並可提早發現細胞或分子層次的變化 (例如癌細胞增生或是基因的異常表現)
更能真實反應生物體內的作用，因為如此讓活體影像系統逐漸受到重視並漸漸成為未來的實驗主流。

Figure 1.



FVB基因轉殖動物研究卵巢組織移植與排斥模式。

(A) 帶有(PolII-luc) Ltc的FVB/N-Tg基因轉殖鼠。

(B) 含有小鼠RNA聚合酶II (PolII) 啟動子和螢火蟲螢光素酶 cDNA(PromegapGL-2)的812-bp轉基因構建體示意圖。

(C) 用PCR篩選基因轉殖鼠。

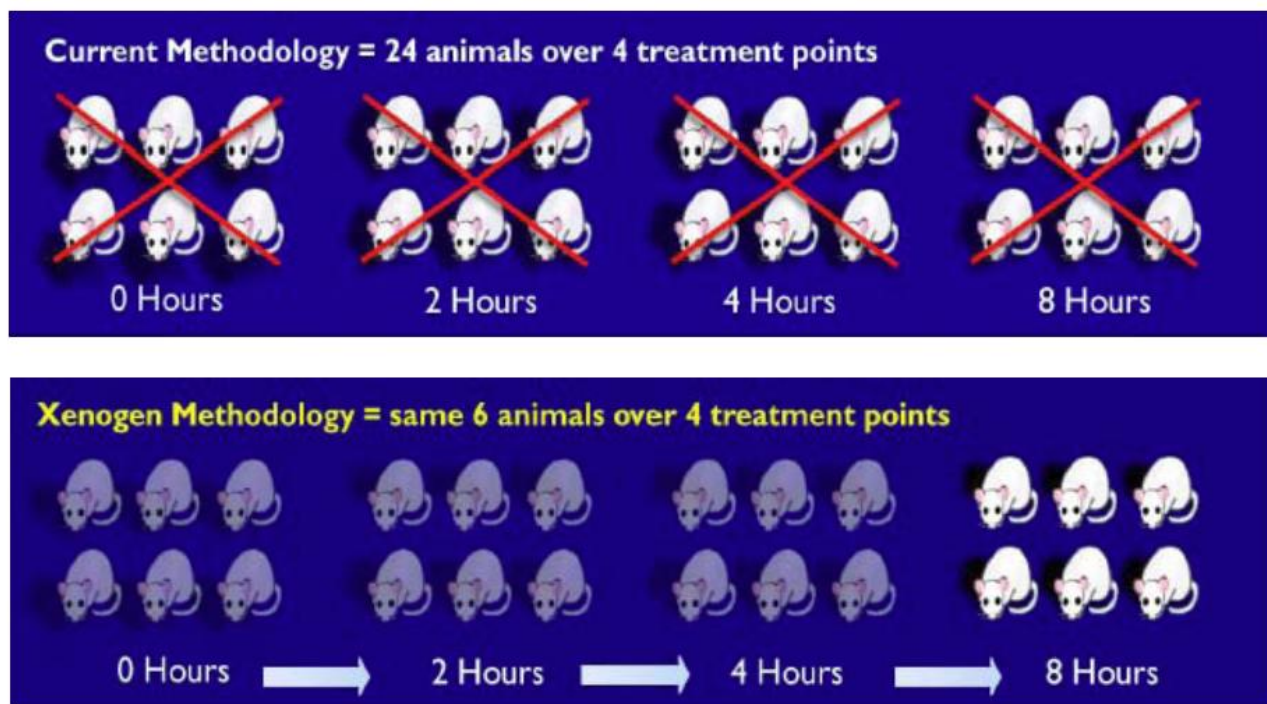
(D) 用IVIS成像系統檢測基因轉殖反應產生的光，未注射螢光素(右)注射螢光素(左)。螢光素酶會表現基因轉殖鼠所有的器官中。

(E) 小鼠經由腹腔注射螢光素後，即可量化量子生物發光成像數據。以 FVB/N-Tg(PolII-Luc)Ltc做為捐助者，野生型FVB/N做為受贈者(右)觀察卵巢移植後的生長情況。

(Chen et al., Reproduction 2010)

或許有人會問怎麼不使用生物螢光來做觀察？沒錯，它可以在顯微鏡下操作是很方便。一旦移植到體內時就會產生諸多限制；例如：生物體的厚度是會影響被偵測光的強度，所以若所在位置越深，被偵測的強度也就相對降低。若波長偏藍光區域 (例如 EGFP)，越容易被體內所吸收，所以如果強度不夠也不容易被偵測。特別是生物螢光是需要激發光的，因此光的行徑路線會受到體內構造阻礙而有折射及散射的情況發生，所以激發光的能量很難完全被吸收利用。更何況因為生物體本身以及飼料也會有自體螢光的表現，特別是皮毛的影響更劇，所以如果螢光不夠強或是在身體深處，都難以偵測，這樣的系統通常建議使用裸鼠與特殊飼料做實驗。

Figure 2^{۱۰}

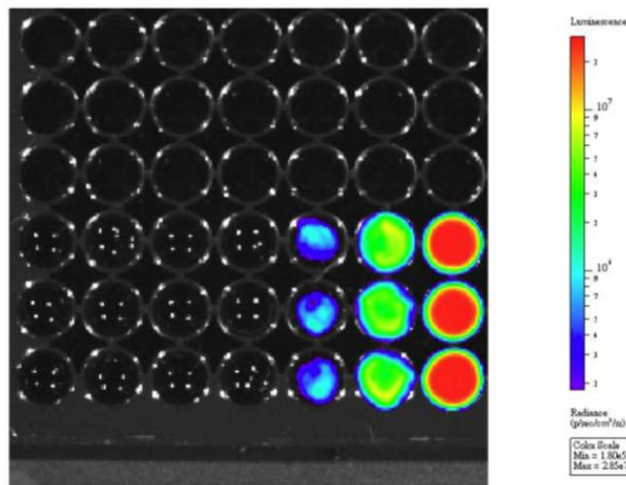
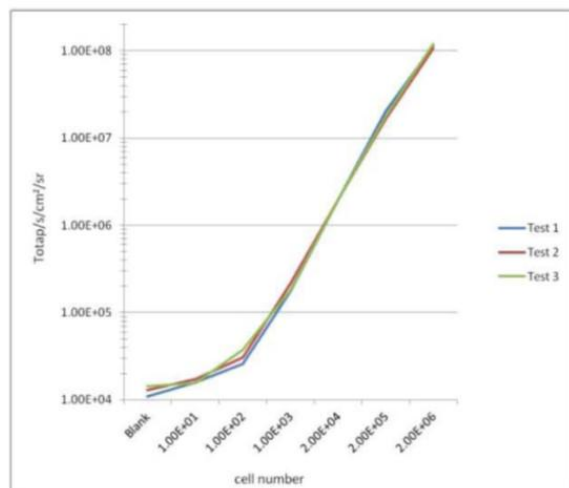


在每個時間點使用同一組動物，比目前的模式使用更少的動物 (3R)^{۱۰}

因此我們使用螢火蟲的生物冷光系統做為我們的實驗模式。冷光酵素luciferase 是利用酵素與受質的專一性反應，反應後發出的冷光可作量化的偵測，目前已廣泛的應用在in vitro及細胞培養實驗當中。同時生物冷光其波長的範圍較廣 (480~620nm)，受到身體穿透力的影響較低。僅需於偵測時再施打受質進行反應，並非隨時進行反應。跟其他的螢光蛋白比較，沒有生物自體螢光的問題。所以這套系統早已應用於功能性基因、感染性疾病、癌症、幹細胞、藥物開發、毒性測試等研究領域之中，而我們更進一步利用生物冷光追蹤讓異體器官移植進入這領域。

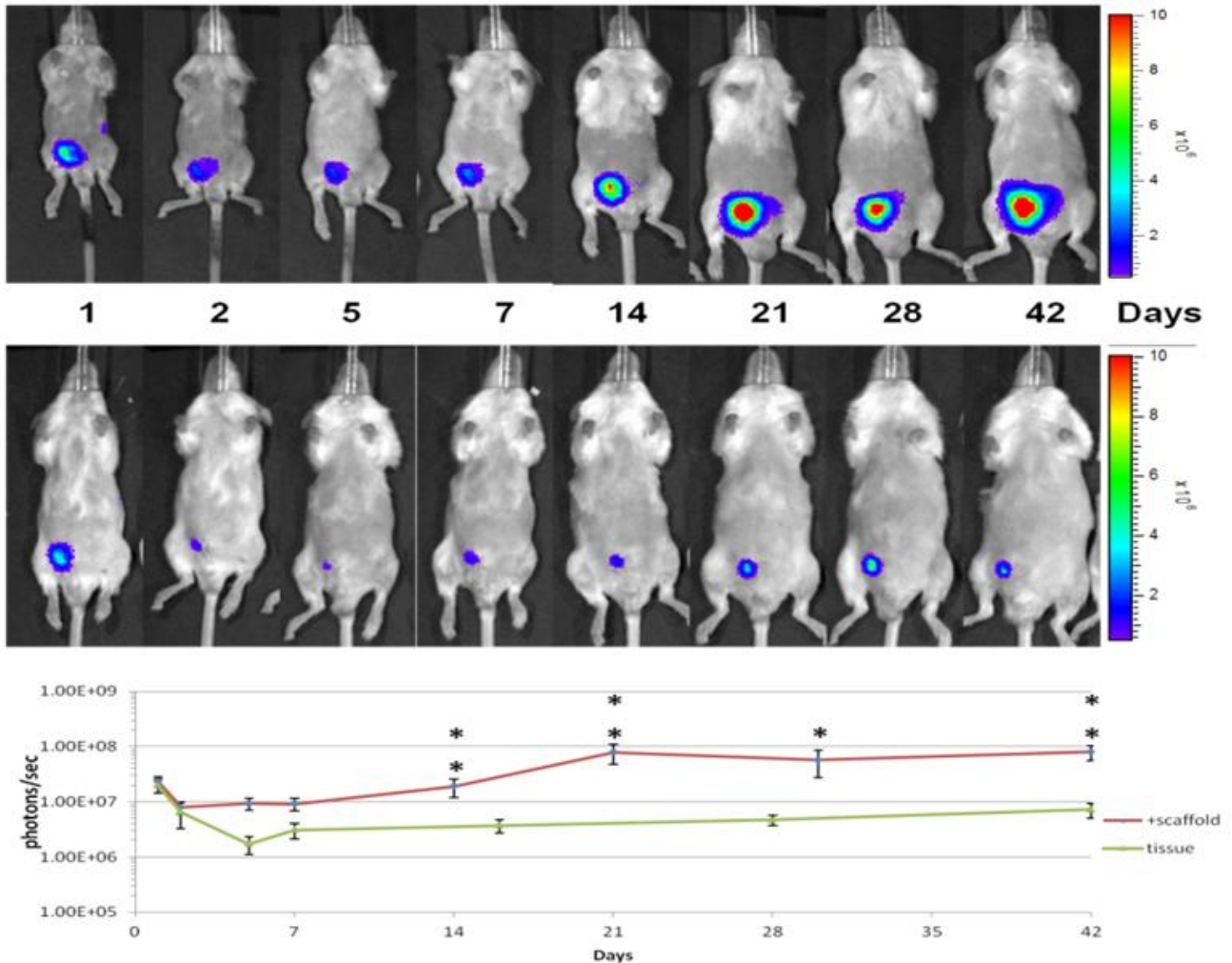
我們利用生物冷光的特點：亮度與細胞數量成高度正相關、在每個時間點使用同一組同一隻動物進行連續性觀察，以減少誤差與動物使用量。來進行異體器官移植，讓我們能長時間追蹤評估生長情況與效率。使以往難以呈現的生長型態能加以捕捉。

Figure 3.



亮度與細胞數量成高度正相關 (Chen et al., Fertil Steril 2012).

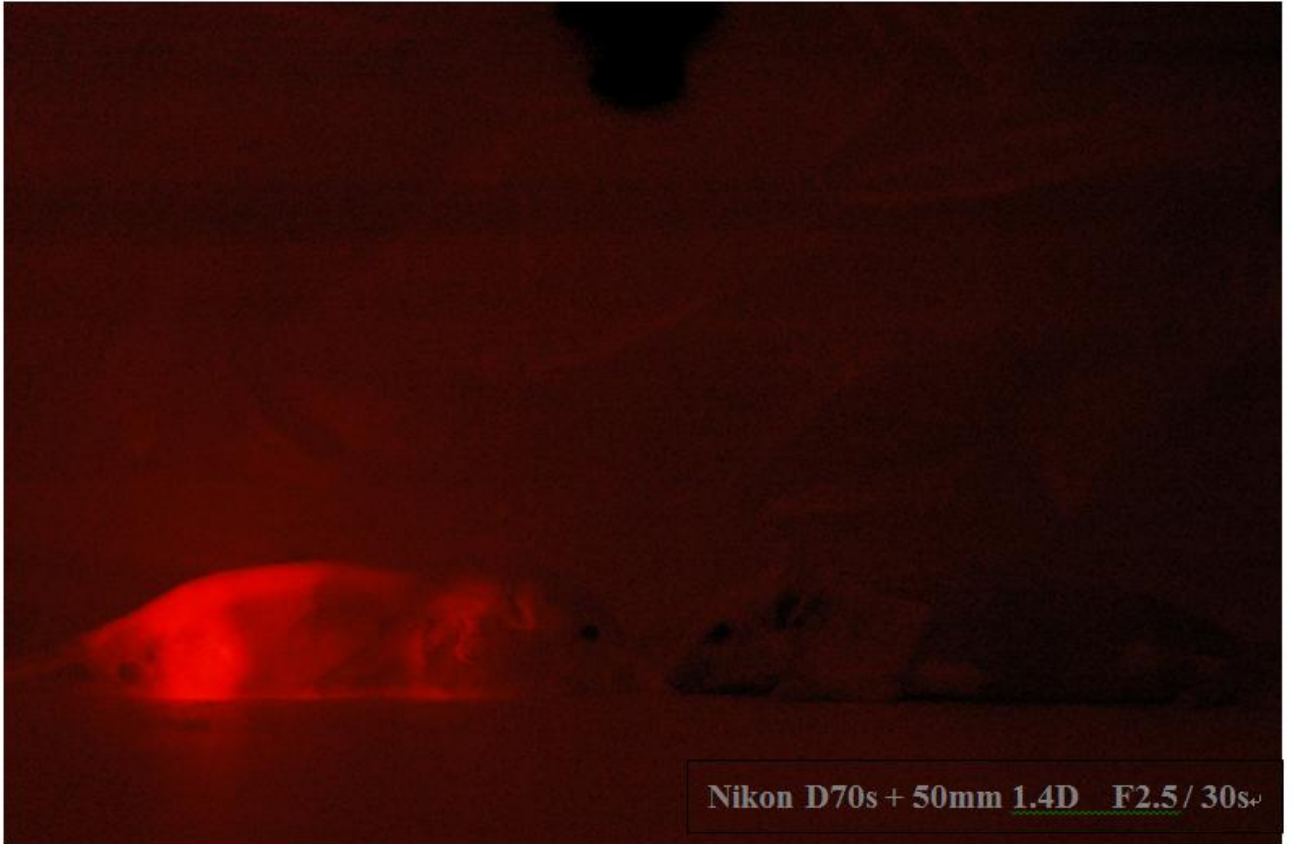
Figure 4



使用同一隻動物進行活體連續觀察性未成熟睪丸組織工程至成熟，以即時了解移植物的變化及成效。

The first place prize poster of ASRM in Boston 2013 (preliminary data from 陳啟煌醫師)

Figure 5



用DSLR拍攝基因轉殖反應產生的光，
未注射螢光素(右)注射螢光素(左)。

目前國內罹癌人口呈現逐漸年輕化趨勢，許多年輕患者在接受治療時，可能忽略了為自己保留生育的機會！年輕癌患的治療計畫應包含生育規劃，透過生殖能力的保存，癌症病患也可擁有生育的夢想！過去人類對抗癌症只能追求其存活率，然而隨著現代科技的進步，醫病都應有足夠的認知，在進行治療前，提供癌症病人適當的轉介及諮詢，維護其生育權利，而這也是目前國際癌症生殖醫學〈**Oncofertility**〉領域所倡導的新趨勢。不論是男性的精原細胞或是女性卵子都相當脆弱，治療癌症使用的化療或電療都可能對其生育能力造成永久性傷害！在生殖保存的領域裡,子宮及子宮內膜受到放射治療的傷害值得重視與研究(Wallace 2011), 非持續性輻射劑量對子宮產生損傷的閾值是未知的。對於女性以及罹患惡性腫瘤，卵巢冷凍保存與自體移植提供一個有希望的選項。在移植過程中，新血管再生完成需要時間，因此如何減低再灌注缺血所引起之損傷是一個急需解決的問題。在於性未成熟的男性幼童無論精原細胞的植入或組織工程應用於睪丸組織的研究，定性及定量的份子影像即時活體觀察可快速改良實驗設計及增強實驗的強度可信度。隨著不同的 **promoter** 設計應用在其他領域如藥物開發，腫瘤學，免疫學，細菌病毒學,移植,幹細胞及組織工程均具有可觀而**powerful**的研究潛能與價值。