

肝脏免疫的活体显微光学成像研究进展*

林巧雅^{1,2)} 黄松林^{1,2)} 骆清铭^{1,2)} 张智红^{1,2)**}

(¹⁾ 华中科技大学 - 武汉光电国家研究中心, Britton Chance 生物医学光子学研究中心, 武汉 430074;

(²⁾ 华中科技大学工程科学学院, 生物医学光子学教育部重点实验室, 生物医学工程协同创新中心, 武汉 430074)

摘要 光学分子成像技术是在活体复杂的组织区域环境内细胞形态、运动与功能研究的最佳手段之一, 极大地推进了免疫学的发展。肝脏是机体新陈代谢和解毒的重要器官, 也被视为一个免疫器官。解析肝脏免疫基本特性和功能, 对防治肝脏疾病以及全身性相关疾病具有重要意义。活体可视化研究肝脏区域生理或者病理状态下免疫应答, 提供关键事件的多细胞参与及其彼此交互的时空动态信息, 能极大地丰富对肝脏独特免疫反应的认知。本文将重点阐述目前活体肝脏成像的技术与方法以及光学显微成像技术, 例如多光子激发显微成像与转盘共聚焦成像在肝脏免疫中的应用, 并展望活体肝脏成像今后的发展方向和面临的机遇与挑战。

关键词 多光子激发显微成像, 转盘共聚焦成像, 活体腹窗, 肿瘤肝转移, 急性肝损伤, 局灶性肝损伤和炎症

学科分类号 O43, R392

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0390

近 10 年来, 光学分子成像技术飞速发展, 已经成为在活体研究复杂生物体内细胞形态、运动与功能的最佳手段之一^[1-2]。肝脏是机体最大的实质器官, 是机体新陈代谢和解毒的重要器官, 在胚胎期还具备造血功能。越来越多的研究表明, 肝脏中富含大量的免疫细胞, 也被视为一个免疫器官。解析肝脏及其免疫功能, 对防治肝脏疾病以及相关全身性疾病具有重要意义^[3-6]。光学分子成像技术与遗传学、传统免疫学和生物学研究手段相结合, 活体可视化研究肝脏区域生理或者病理状态下免疫应答, 观察特定组织区域内不同免疫细胞的形态、运动、迁移和相互接触等动态行为, 提供关键事件的多细胞参与及其彼此交互的时空动态信息, 能极大地丰富对肝脏独特的免疫反应的认知。但由于肝脏特定的组织解剖学特征, 相比浅表的皮肤或者淋巴结, 如何长时程、活体动态光学表征其免疫特性还面临着许多技术瓶颈。本文将重点阐述目前活体肝脏成像的技术与方法, 主要包括: 肝脏活体显微光学成像的结构基础以及技术难点, 适合于活体显微成像的技术, 肝脏的活体成像光学标记方法和成像窗口模型制备。再以肿瘤肝转移以及急性肝损伤等疾病模型为例介绍活体肝脏免疫的显微成像研究进

展。最后展望活体肝脏成像今后的发展方向, 以及面临的机遇与挑战。

1 肝脏成像的技术与方法

1.1 活体显微光学成像的结构基础以及技术难点

肝脏位于横膈膜之下的腹腔右上侧毗邻肠道, 是机体最大的实质器官, 成人肝脏约重 1 200 ~ 1 500 g。人体肝脏一般由镰状韧带分割成一个大的右叶和一个小的左叶再加上尾状叶和方叶组成。肝脏的血液供应十分丰富, 机体每分钟有 30% 的血液从肝脏流过, 其中 80% 的血液从肝门静脉流入, 剩下的 20% 从肝动脉流入^[3-5]。肝小叶 (hepatic lobule) 是肝脏的基本结构和功能单位 (图 1), 在 C57 小鼠体内肝小叶平均直径通常为 250 ~ 400 μm 。肝小叶中央有一条纵行血管, 即中央静脉 (central vein), 在 C57 小鼠中平均直径为 40 ~

* 国家自然科学基金重大研究计划(91542000, 91442201), 国家自然科学基金(81501593), 国家杰出青年科学基金(81625012)和中国博士后科学基金(2015M572148)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 027-87792033, E-mail: czyzzh@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2017-10-19, 接受日期: 2017-11-06

60 μm . 由肝细胞互相连接形成的单个细胞厚度的肝板, 以中央静脉为中心呈辐射状排列. 肝血窦(hepatic sinusoids)沿着肝板排列, 主要由带筛孔的肝血窦内皮细胞组成, 是肝脏的毛细血管网络. 在 C57 小鼠体内, 肝血窦平均直径大约 7~14 μm . 肝板和肝血窦之间的间隙称为狄氏腔(space of Disse)^[7-8]. 肝脏内富含免疫细胞, 包括肝内造血干细胞在肝内分化为髓系及淋巴系细胞, 以及从循环来源的免疫细胞, 广泛参与固有免疫和适应性免疫. 肝脏中含约 70%的肝实质细胞和约 30%的非实质细胞. 肝脏内的实质细胞主要是指肝细胞; 肝

脏内非实质细胞主要是由肝血窦内皮细胞(LESC, 约占 50%)、枯否细胞(KC, 位于肝血窦中, 约占 20%)和肝星状细胞(HSC, 位于狄氏腔内, 约 5%~8%)这三类组成, 淋巴细胞约占肝脏非实质细胞的 25%. 其中, 肝脏内 NK 以及 NKT 细胞, 约占淋巴细胞的 50%, T 细胞以及 B 细胞分别约占 30%和 10%^[5,9]. LSEC、KC、HSC、树突状细胞(DC)、淋巴细胞以及肝实质细胞之间通过直接接触或分泌细胞因子而相互作用, 构成复杂的免疫调控网络, 共同参与肝脏免疫耐受状态的维持和病理刺激诱导的免疫应答.

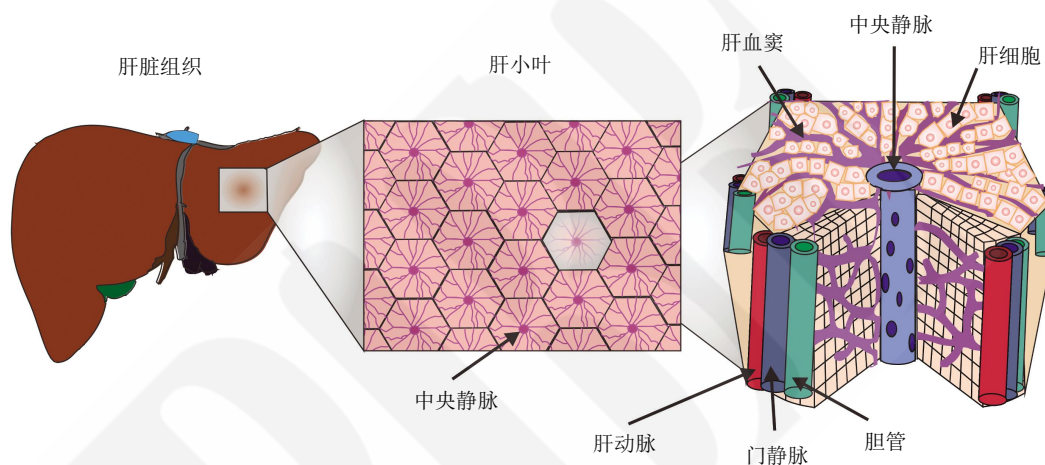


Fig. 1 The basic structure of liver tissue

图 1 肝脏组织的基本结构

肝脏独特的组织特性以及解剖学特征, 使得肝脏活体成像研究面临着众多的挑战. 首先, 肝脏毗邻肺、心脏使其更易受呼吸运动和心跳抖动的影响, 同时靠近肠道的部位还易受肠道蠕动的干扰, 因而要求成像仪器和固定装置能够最大程度地克服这些脏器带来的干扰. 其次, 肝脏的组织光学性质特殊: a. 肝脏组织呈红褐色, 血供非常丰富^[5,7], 富含血红蛋白有着强吸收特性, 在光学成像中不利于光子在组织中的传输; b. 肝脏组织自发荧光很强, 富含黄素(flavins)、脂褐素(lipofuscins)、胶原蛋白和弹性蛋白(collagen and elastin)以及网状纤维(reticular fibres)这些内源性的荧光物质, 在光学成像中常常会产生高背景荧光^[10]. 此外, 肝脏是机体最大的实质器官^[3-5], 相对于浅表皮肤、淋巴结等组织, 肝脏的深部成像将更具挑战, 需要结合光学成像窗口模型. 肝脏的这些特点对活体显微成像的

技术、光学标记方法以及建立动物模型均提出了更高要求.

1.2 适用于肝脏的活体显微光学成像技术

近 10 年来, 光学分子成像技术飞速发展, 在神经科学、肿瘤学、免疫学等多个领域已经应用广泛. 其中, 多光子激光扫描显微镜(MLSM: multiphoton laser scanning microscopy)以其多色和高分辨成像等优点在活体显微光学成像领域大放异彩^[2,11]. 1931 年, 物理学家 Maria Göppert-Mayer 首次描述了由荧光团同时吸收两个或更多光子的过程^[12]. 在双光子激发中, 电子通过同时吸收两个低能量的光子达到激发态, 继而发射荧光, 因此, 双光子吸收的概率是与光强度的平方成正比的. 而这一新的成像方法是于 1976 年被引入到实际应用中的^[13], 当时激发激光器被研发出来, 它提供了足够高的光子密度来获得双光子激发事件. 如今, 钛蓝

宝石激光器也已经商业化了, 它们通过产生非线性光效应使多光子显微成像技术得以实现^[14]. 这些激光器提供脉冲光子流, 其脉冲发放间隔与普通荧光分子的激发态持续时间相似(约 100 MHz). 这些使 MLSM 相对于激光共聚焦显微镜而言, 具有成像深度明显增加(从 50 μm 增加到 500 μm)、纵向分辨率提升、不受焦平面之外的背景荧光影响、降低对样品的光漂白和光损伤等优点. 自 2002 年首次在淋巴结内进行活体光学成像以来^[15], 该技术已经在多种组织器官(皮肤^[16-17]、肺^[18]、肝脏^[19-21]以及脑等^[22-24])的活体免疫成像研究中发挥了重要作用, 可视化特定组织区域内不同免疫细胞的形态、运动、迁移和相互接触等动态行为, 提供了免疫应答过程中关键事件的多细胞参与彼此交互的高分辨率时空动态信息, 极大地丰富了人们对免疫应答的认知. 但该技术也存在着一定的局限性: 一是仪器价格昂贵. 二是对于活体肝脏成像而言, 除了空间分辨率和成像深度的需求之外, 对成像速率提出了明确需求, 需要在呼吸运动和心跳抖动的间隙采集到足够的图像信息. MLSM 的高速视频成像是以降低空间分辨率和图像清晰度为代价的, 它更适合肝脏组织处于相对静止或运动位移极小情况下的成像(详细介绍见 1.3.2 节).

为适应生命科学对活细胞成像速度的需求, 转盘共聚焦显微镜(spun-disk confocal microscopy)应运而生^[25]. 该技术在获得高质量图像的同时, 显著提升了成像速度. 不同于常规单点共聚焦扫描成像技术, 转盘采用多点同步扫描方式. Nipkow 转盘是现代转盘共扫描显微镜的核心^[26], 由 Paul Nipkow 在 1884 年提出, 主旨是将图像分割成单一连续的信号. 在 1967 年由 Egger and Petráň 首次实现了串联扫描转盘显微镜(tandem scanning-disk confocal microscope)^[27]. 其后由不同的研究者(Kino、Xiao、Boyde、Lichtman^[25, 28]等)以及公司进一步完善. 目前商业化的成像系统, 其核心是增强型微透镜双转盘专利技术, 由日本 Yokogawa Electric 公司发明, 包括微透镜转盘与针孔转盘同步旋转速率达 1 800~5 000 r/min, 最大程度地保证了透光率并允许高速多点扫描. 结合高灵敏度 CCD 使用时, 显著提高了成像速度可达千帧每秒, 同时降低样本的光漂白和光毒性^[26, 29]. 因此, 转盘共聚焦显微镜是捕获活体内或活细胞内高度动态的细胞、亚细胞结构或分子信息的最佳手段之一. 然

而, 其多点扫描策略, 也有其内在限制性. 荧光从较远的焦平面产生发射加上从邻近针孔穿透的离焦散射, 会增加背景信号干扰从而模糊图片, 这种现象称为“针孔串扰(pinhole cross-talk)”. 因此, 该技术应用于厚组织样本成像时的背景噪声相对较高. 2012 年, Yuko Mimori-Kiyosue 小组^[30]采用增加中间针孔的距离方式结合双光子激发来降低“针孔串扰”最终提高了活体图像分辨率. 综上所述, 转盘共聚焦显微成像技术以高速扫描、低光漂白以及低光毒性等特性, 使其非常适于活体成像研究组织表面快速发生的细胞行为和分子事件, 例如血管中的白细胞运动与迁移等, 对于受呼吸运动和心跳抖动影响的脏器成像, 也极具应用价值.

1.3 肝脏活体光学标记方法和成像窗口模型制备

1.3.1 活体光学标记方法

肝脏的活体光学标记方法, 主要分为内源性标记和外源性标记两大类. 与活体成像技术一样, 也具有明显的组织特性.

a. 内源性标记

如前文 1.1 中所述, 肝脏是一个自发荧光很强的组织, 富含维生素衍生物, 如视黄醇、核黄素、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)以及黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD), 胶原蛋白和弹性蛋白以及网状纤维^[10, 31-32]. (1)在细胞层面, 正常 HSC 的脂滴中由于贮存了机体 70%~80%的维生素 A^[33-34], 富含视黄醇, 因此可以利用维生素衍生物的自发荧光对其进行成像^[35]. 在单光子共聚焦显微成像中可选择 405 nm 激光器激发, 450/50-nm 带宽滤光片接收. 在双光子成像中, 可选择 700~800 nm 波长激发, 在 500 nm 以内产生很强的荧光信号. 但是在特定疾病模型中, 激活的 HSC 会丢失贮存的维生素 A, 转变成胶原蛋白分泌的表型从而诱发肝纤维化^[36]. 因此, 只限于在机体正常的生理状态下可利用自发荧光对 HSC 进行成像. (2)在细胞外基质成像方面, 可采用二次谐波(SHG)对胶原蛋白 I、III、微管和肌凝蛋白进行成像^[2, 37]. 肝脏被膜内细胞外基质富含胶原蛋白, 因此可采用 SHG 对肝脏被膜进行结构定位成像. 在肝脏纤维化等特定疾病模型中, 也可用 SHG 对纤维化灶点进行定位和量化^[35]. (3)在代谢成像方面, 线粒体呼吸链中的 NADH 和 FAD 都有着很强的自发荧光, 其最大发射分别在 460 nm 和 535 nm. 在肝脏活体双光子成像中, 可选择 800 nm 波长激发, 分别采用 410~490 nm 以

及 510~560 nm 带宽滤光片进行成像^[31-32, 38-39].

b. 外源性标记

除了利用肝脏组织自身内源性荧光基团进行成像之外, 更多的还是需要引入外源性荧光物质对特定细胞进行标记. 目前主要有三种方法: (1)构建荧光蛋白标记的转基因小鼠^[40-46], 例如采用胚胎显微注射方式或者基因编辑技术示踪特定的肝内免疫细胞(具体信息如表 1 所示). 此种方法遗传稳定性好, 活体内示踪时程不受限, 但动物模型的构建周期长, 且动物的饲养与繁殖也很耗时. (2)利用抗体或者染料标记技术, 小鼠尾静脉注射不同荧光基团偶联的抗体^[47](通常为 4~8 μg 每只鼠, 尾静脉注射 10 min 后)对不同免疫细胞进行成像. 例如: 利用 HNF4 α ^[41](肝细胞核因子)标记肝细胞; 利用 PECAM/CD31^[48-49] 抗体 或者 FITC-dextran^[50]、Isolectin B4^[51]标记 LSEC 细胞; 利用抗 F4/80 抗体^[48]

或者荧光染料偶联的乳胶微粒^[52]标记 KC 细胞; 利用抗 Nkp46 或者 NK1.1 抗体^[44]标记 NK 细胞; 利用 phycoerythrin(藻红蛋白)偶联的 CD49b^[53]标记血小板等. 此种方法适用范围比较广, 在多色成像中可灵活选择不同染料偶联的抗体, 但活体内可示踪的时程相对较短(仅 1~3 天左右), 且抗体有可能会封阻相应受体而影响细胞的功能. (3)外源性回输成像, 主要有两种方式: 一种是从全基因组表达 GFP 或者 RFP 荧光蛋白^[54]的小鼠体内分离特定的免疫细胞再进行回输成像; 另一种是离体分离特定的免疫细胞, 然后用染料染色标记, 例如 CFSE^[55]等再进行外源性回输成像. 这种外源性回输的成像方式, 在免疫活体成像中已经应用非常广泛, 例如淋巴结或者肿瘤部位. 但在肝脏活体成像中, 一般只适用于循环于肝血窦中的淋巴细胞, 例如 NK 细胞和 T 细胞^[56-58]等, 不适用于其他肝脏内细胞.

Table 1 Hepatic cells of transgenic mice with fluorescent protein labelling
表 1 荧光蛋白标记的肝脏内细胞转基因小鼠

细胞或结构	标记方法与特点	参考文献
静息肝星状细胞 (quiescent-HSC)	glial fibrillary acidic protein (GFAP) GFAPCre-GFP 转基因小鼠能够标记 Q-HSC, 但也标记其他细胞, 例如胆管细胞、卵圆细胞	[40]
肝星状细胞(HSC)	lecithin-retinol acyltransferase(Lrat)LratCre-ZsGreen、-Tdtomato 以及 -mTom/mGFP 转基因小鼠能够特异性标记 99%的 HSC	[41]
枯否细胞(KC)	Clec4F-specific knock-in mouse B6-Clec4f ^{tm1} Ciphe 简称 KC-DTR-YFP 转基因小鼠能特异性标记 95.5%的 KC, 在 human diphtheria toxin(DT)作用下可特异性剔除 KC	[42]
NKT 细胞	CXCR6-EGFP 转基因鼠能够标记 75%~80%的 NKT 细胞	[43]
中性粒细胞	LysM-EGFP 转基因小鼠 但该转基因鼠也包含一些其他髓系细胞	[44]
中性粒细胞	C57BL/6-Ly6g(tm2621(Cre-tdTomato)Arte)简称 Catchup ^{TM-red} 转基因小鼠 能够特异性标记 98%的中性粒细胞	[45]
单核细胞	CCR2-RFP/CX3CR1-GFP 转基因小鼠 可标记 CCR2 ^{hi} CX3CR1 ^{low} 或者 CCR2 ^{low} CX3CR1 ^{hi} 不同表型的单核细胞	[46]
血小板	CAG-EGFP 转基因小鼠 无特异性, 需结合血小板形态特征来鉴别	[59]

1.3.2 实验动物模型制备

如前文 1.2 中所述, 肝脏以其独特的解剖学特征, 在活体成像应用中需要排除呼吸运动、心跳抖动或者肠道蠕动的干扰, 同时也需要引入成像窗口或者将其暴露. 在建立肝脏活体模型中, 可分为以下三种方式:

a. 直接暴露式肝脏窗口模型. 如图 2a、2b 中所示, 这类方法通常都是通过手术直接将肝脏暴露出来, 通过低温冷凝胶琼脂糖固定或者湿润的 kimwipes 纸巾覆盖保湿肝脏组织, 然后对其进行双光子或者转盘共聚焦显微成像(正置: 如图 2a;

倒置: 如图 2b). 这类成像方法手术相对简单, 准备时间短, 但由于对动物的损伤大, 故只适用于 6 h 以内的一次性短时程肝脏成像. 超过 6 h 后, 机体的正常生理状态将发生改变. 该动物模型的制备及其成像步骤可参考 Heymann 等在 *JOVE*^[60] 或者 Pedro E Marques 等在 *Nature Protocol*^[47] 以及 Liane Babes 等在 *Methods Mol Biol*^[61] 上发布的实验步骤.

b. 吸盘式成像窗口模型. 由日本三重大学 Koji Tanaka 团队^[59]设计的可匹配小鼠肝脏大小的环状吸盘, 通过可逆式胶水固定肝脏组织, 与此连接的机械臂夹住环状吸盘借此固定肝脏(图 2c). 该方

法比直接暴露式的使用次数要多,一般可反复使用3~4次。但因为可逆式胶水粘连处肝脏部位容易发炎,经过3~4次成像后窗口便会模糊不清。且这类模型只适用于正置显微镜,而不适合倒置型。

c. 荷包缝线式环状腹窗成像模型。2012年,荷兰皇家艺术与科学院Jacco van Rheenen团队^[19]利用“荷包缝线”结合钛合金环建立的腹窗成像模型,可用于长时程(5~6周)、低损伤地观察小鼠肝

脏。具体模型制备可参考Laila Ritsma等发表在2013年*Nature Protocol*上^[62]的实验步骤。在他们的研究中证实了该成像模型不会影响小鼠的正常生理状态以及免疫细胞的运动特征,是一种安全、可靠的成像窗口(图2d)。

然而,目前该方法在应用于正置显微镜时,小鼠肝脏的运动位移仍然明显。为此,我们课题组设计了一种可减少呼吸抖动并保持恒温的小动物活体



Fig. 2 The window model of liver imaging

图2 肝脏成像窗口模型

成像盒(已申请实用新型专利, 专利号 201720020039.9)。该成像盒综合考虑了正置和倒置显微镜的特点, 可很方便地适配正置和倒置显微镜, 为活体肝脏成像研究提供了一种集降低呼吸抖动影响、精准维持动物体温、无损伤固定麻醉小动物, 以及水平调节腹窗窗口平面等多功能于一体的实验方案。

2 活体显微成像在肝脏疾病基础研究中的应用

2.1 肿瘤肝转移的活体显微成像研究

肿瘤转移到二级器官(例如肝脏、肺或骨骼等)是导致肿瘤病人死亡的主要原因。日本三重大学 Tanaka 团队^[59]利用双光子激光扫描显微镜对吸盘式成像窗口模型(如图 2c 中所示, 日本专利申请号: P2007-129723)上的小鼠肝左叶进行活体成像, 他们将 2×10^6 个表达红色荧光蛋白的鼠源性或人源性的大肠癌细胞(SL4 或 HT29)经脾注射到表达绿色荧光蛋白(EGFP)的 C57BL/6 转基因小鼠 [TgN(β -act-EGFP)Osb] 体内形成肿瘤肝转移模型, 实现了肿瘤细胞转移到肝脏过程的高分辨率(细胞或亚细胞水平)动态监测。成像结果显示, 在肿瘤细胞注射后 1 h 内肝脏血管中不会出现肿瘤细胞, 2 h 后肝血窦中有肿瘤细胞停留, 在 24 h 后癌细胞从肝血窦中渗透到狄氏间隙, 并且发现呈阿米巴样形态的枯否细胞生成网状突起包围着单个癌细胞, 提示枯否细胞可能会吞噬肝血窦中的癌细胞。

肿瘤转移是一个多步骤过程: 包括原位肿瘤中的肿瘤细胞逃逸、在循环过程中的存活、进入二级器官并在新环境中的播种与生长。此外, 肿瘤新生血管需要待小转移灶生长成大转移灶(直径超过 $500 \mu\text{m}$)时才逐渐形成。为了研发有效靶向抑制肿瘤转移灶生长或血管生成的药物, 需要发展相应的动态成像技术。荷兰皇家艺术与科学院 Jacco van Rheenen 团队利用 Leica TCS SP5 AOBS 双光子激光扫描显微镜对进行荷包缝线式环状腹窗成像模型手术的小鼠进行活体成像, 他们将 7.5×10^4 个表达绿色荧光蛋白(Dendra2)或红色荧光蛋白(mCherry)的结肠癌细胞经脾注射到野生型雌性 C57BL/6 或 BALB/c 小鼠体内形成肿瘤肝转移, 不仅证明了转移灶是从单一的肿瘤种子细胞生长而来, 更重要的是观察到肝转移灶形成的 14 天中的每一个步骤: 单个肿瘤细胞渗出肝脏血管后数小时或数天内增殖形成“预微转移”, “预微转移”中相邻细胞之间

缺少紧密的接触, 可在生长克隆的有限区域内活动和迁移。此外, 他们利用磷脂酶 C 抑制剂 U73122 抑制“预微转移”中的细胞迁移并降低了肝脏肿瘤转移负荷。此研究表明, 靶向作用于“预微转移”中的肿瘤细胞迁移, 可能起到抑制转移灶形成的作用^[60]。

2.2 急性肝损伤的活体显微成像研究

对活体动物内肝脏微血管、肝脏细胞、分子和免疫反应进行可视化研究, 能够为药物诱导的肝损伤(DILI: Drug-induced liver injury)提供大量基础实验数据。Gustavo Batista Menezes 团队^[61]给小鼠口服 APAP($200 \sim 500 \text{ mg/kg}$)构建小鼠 DILI 模型, 小鼠在成像前 10 min 静脉注射荧光染料或抗体: Sytox Green 标记细胞外 DNA、碘化丙啶(PI)标记死细胞、PE 或 FITC 偶联的抗 Gr-1 抗体标记髓系细胞、用 LysM-EGFP 小鼠内源性标记中性粒细胞、PE 偶联的抗 F4/80 抗体标记 KC 细胞、Alexa Fluor-555 偶联的抗弹性蛋白酶抗体标记弹性蛋白。使用正置共聚焦显微镜对肝脏进行活体成像, 动态监测结果发现: 在给药 6 h 后肝脏血管就被内衬了一层 DNA; 在肝损伤进程($12 \sim 24 \text{ h}$)中, 肝脏坏死区域不断扩大, 并且释放大量的 DNA, 而中性粒细胞定向迁移到 DNA 富集区域, 表现出激活后的巡逻行为。此外, 通过尾静脉注射 1000U DNase I 消除肝脏血管中的 DNA 或者利用 TLR9 缺陷小鼠阻断 TLR9 对 DNA 的识别, 显著降低了系统性炎症、中性粒细胞招募以及肝损伤, 证明肝脏 DNA 聚积是 DILI 发病机制的一个新特征, 并且阻断先天免疫系统对 DNA 的识别可能成为一种有希望的治疗方法。

2.3 局灶性肝损伤和炎症

无菌损伤引起的无菌炎症, 其特征是红肿、发热、肿胀和疼痛。局灶性肝损伤是肝脏无菌损伤的常用模型, 其中热损伤诱导的肝脏无菌损伤炎症最为常见, 而且具有造模简单、成像质量清晰等优点。模型简单描述如下: 将麻醉小鼠的剑突下方剪开一个小口, 剪断镰状韧带暴露出肝脏, 在加热电烙装置上安装一个 30 G 的针头, 在肝脏表面造一个体积为 $(0.022 \pm 0.001) \text{ mm}^3$ 的损伤点。

中性粒细胞从血液中招募到无菌炎症位点, 有助于损伤修复, 但也可能引起组织损伤。Kubes 团队^[64]对中性粒细胞在此模型中的行为和作用进行了细致的研究。他们使用 LysM-EGFP 小鼠, 中性粒细胞高表达 EGFP(区别于 EGFP^{low} 的单核细胞和巨

噬细胞), 或者在其他小鼠品系中通过静脉注射(3 μ l Alexa-fluor 488 抗 Gr-1 抗体来表征中性粒细胞. 在小鼠肝脏表面滴加少量 PI 来表征坏死细胞, 通过静脉注射 Alexa-fluor 647 偶联的牛血清白蛋白显影肝脏血流. 采用直接暴露式肝脏窗口模型利用转盘倒置共聚焦显微镜观察到肝脏损伤 30~60 min 内, 中性粒细胞开始黏附到肝血窦内皮细胞上, 并且证明此过程是由整黏蛋白(MAC-1)与内皮配体细胞间黏附分子 1(ICAM-1, endothelial ligand intercellular adhesion molecule-1)之间的相互作用介导的; 此外, 从坏死细胞释放的 ATP 激活 Nlrp3 炎症体, 在肝脏中形成炎症微环境; 最后, 约 77.3%的黏附的中性粒细胞在 2~3 h 时间段定向趋化迁移到损伤位点, 并浸润到坏死细胞区域. 此研究系统性地描述了中性粒细胞募集到体内局灶性肝坏死部位的动力学和分子机制.

在最近的研究结果中, 该团队采用同样的暴露式窗口模型并结合光激活蛋白标记技术^[49], 发现在无菌型肝损伤修复过程中, 中性粒细胞也能穿透损伤部位, 执行拆除受损血管、并为血管新生创造通道的关键任务. 有意思的是, 完成这些任务后, 它们既没有被吞噬也没有死亡, 相反, 许多中性粒细胞逆向迁移重新进入血管系统, 有一个预先规划的旅程: 在肺部逗留并上调 CXCR4(C-X-C motif chemokine receptor 4)随后进入骨髓, 在那里中性粒细胞凋亡.

Kubes 团队也对肝脏无菌损伤早期炎症反应中单核细胞的招募过程进行了描绘^[46]. 现已知小鼠单核细胞至少有两种表型, 促炎型(CCR2^{hi}Cx3cr1^{low})和巡逻型(CCR2^{low}Cx3cr1^{hi}). 在同样的模型下, 使用 Alexa Fluor-488 或者 Alexa Fluor-647 偶联的抗 CD31 抗体标记肝血窦内皮细胞, LysM-EGFP 转基因小鼠内标记的中性粒细胞, CCR2^{RFP}/Cx3cr1^{GFP} 转基因小鼠内标记的单核细胞, 用 Sytox Green 或 Sytox Orange 或 PI 标记死细胞. 利用转盘倒置共聚焦显微镜观察到肝脏损伤 8 h 就有 CCR2^{hi}Cx3cr1^{low} 单核细胞被招募到损伤位点, 至少能持续到 24 h; 并且 48 h 之后这群细胞会在损伤位点从促炎型 CCR2^{hi}CX3CR1^{low} 表型转变为 CCR2^{low}CX3CR3^{hi} 巡逻型单核细胞, 同时也证明了这种转变对于肝脏损伤的修复是很重要的.

3 结语与展望

尽管目前已经有文献利用多光子激发显微成像

以及转盘共聚焦成像描述了特定疾病模型下免疫细胞的基本特性和功能, 但在肝脏高度动态、长时程、多细胞参与交互的免疫应答过程中, 研究者们对肝脏免疫的认知还只是冰山一角. 无论是从适合于活体显微成像的技术、活体光学标记方法, 亦或是动物模型上, 均有待我们去完善和改进.

在适用于肝脏活体显微成像的技术上, 无论是多光子激发显微成像还是转盘共聚焦显微成像都无法完全满足需求. 在成像深度上, 这两种技术都止步于 500 μ m 以内, 由于肝脏的强吸收和高背景荧光的特性, 双光子激发显微成像实际深度在 200 μ m 以内, 转盘共聚焦成像仅限于浅表 100 μ m 左右, 并且这两种技术的单次成像视野只有几百微米. 因此, 对于肝脏这种“大体积”的生物样本来说, 这样的成像深度和视野范围是远远不够的. 在未来, 光声成像技术以其多尺度可调的成像深度和大视野成像能力^[65-67], 极有可能在活体肝脏免疫成像研究中发挥重要的应用价值.

在肝脏活体光学标记方法上, 基因编辑技术日新月异, 选择多样, 未来利用 Cre/lox 重组系统、TALEN 或者 CRISPR/Cas 技术结合光转化蛋白, 可研发更多标记肝脏内特定免疫细胞亚群的转基因鼠, 将使活体肝脏免疫研究工具更加多样化, 也使实现长时程、动态示踪肝脏内免疫细胞运动、迁移、相互接触信息交互的研究目标指日可待; 在特异性标记肝脏内实质细胞以及非实质细胞上, 研发适用于多模态成像的光学探针也是一个趋势, 尤其是光声成像探针方面, 远比荧光探针匮乏, 亟待科研人员去探索. 除此之外, 对于肝脏代谢的分子探针的研发也是未来一热门领域.

最后, 在肝脏成像窗口模型去除呼吸运动、心跳抖动方面, 也需要科学家们进一步完善和改进, 从硬件和软件图像处理上共同跟进. 一方面需要进一步提升成像速度; 另一方面对稳固性装置有更高的要求, 在限制抖动的同时能够兼容心电或者呼吸门控技术以去除伪影; 最后还可结合图像处理方法, 例如采用一些 K-means 的聚类处理方法的算法, 以获得完美的视频图像效果等. 综上所述, 最终要实现活体长时程、动态、稳定地成像研究肝脏区域免疫状态, 需要多学科交叉, 医工、医理结合共同推进肝脏免疫学科发展.

参 考 文 献

[1] Jain R, Tikoo S, Weninger W. Recent advances in microscopic

- techniques for visualizing leukocytes *in vivo*. *F1000Res*, 2016, 5
- [2] Schiessl I M, Castrop H. Deep insights: intravital imaging with two-photon microscopy. *Pflugers Arch*, 2016, **468**(9): 1505–1516
 - [3] Racanelli V, Rehmann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology*, 2006, **43**(2 Suppl 1): S54–62
 - [4] Gao B, Jeong W I, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology*, 2008, **47**(2): 729–736
 - [5] Jenne C N, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol*, 2013, **14**(10): 996–1006
 - [6] Yu J, Chen Y, Wu Y, *et al.* The differential organogenesis and functionality of two liver-draining lymph nodes in mice. *Journal of Autoimmunity*, 2017
 - [7] Vidal-Vanaclocha F. Architectural and Functional Aspects of the Liver with Implications for Cancer Metastasis[M]//BRODT P. *Liver Metastasis: Biology and Clinical Management*. Dordrecht; Springer Netherlands, 2011: 9–42
 - [8] Tsung A, Geller D A. Gross and Cellular Anatomy of the Liver[M]//MONGA S P S. *Molecular Pathology of Liver Diseases*. Boston, MA; Springer US. 2011: 3–6
 - [9] Van Den Eynden G G, Majeed A W, Illemann M, *et al.* The multifaceted role of the microenvironment in liver metastasis: biology and clinical implications. *Cancer Res*, 2013, **73**(7): 2031–2043
 - [10] Viegas M S, Martins T C, Seco F, *et al.* An improved and cost-effective methodology for the reduction of autofluorescence in direct immunofluorescence studies on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 2007, **51**(1): 59–66
 - [11] Oheim M, Michael D J, Geisbauer M, *et al.* Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, **58**(7): 788–808
 - [12] Grzybowski A, Pietrzak K. Maria Goeppert-Mayer (1906-1972): two-photon effect on dermatology. *Clinics in Dermatology*, 2013, **31**(2): 221–225
 - [13] Berns M W. A possible two-photon effect *in vitro* using a focused laser beam. *Biophysical Journal*, 1976, **16**(8): 973–977
 - [14] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 1990, **248**(4951): 73–76
 - [15] Miller M J, Wei S H, Parker I, *et al.* Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science*, 2002, **296**(5574): 1869–1873
 - [16] Tomura M, Hata A, Matsuoka S, *et al.* Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci Rep*, 2014, **4**: 6030
 - [17] Honda T, Otsuka A, Kabashima K. Novel insights into cutaneous immune systems revealed by *in vivo* imaging. *Allergology International*, 2016, **65**(3): 228–234
 - [18] Lefrancais E, Ortiz-Munoz G, Caudrillier A, *et al.* The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*, 2017, **544**(7648): 105–109
 - [19] Ritsma L, Steller E J, Beerling E, *et al.* Intravital microscopy through an abdominal imaging window reveals a pre-micrometastasis stage during liver metastasis. *Sci Transl Med*, 2012, **4**(158): 158ra145
 - [20] Cheng S H, Li F C, Souris J S, *et al.* Visualizing dynamics of sub-hepatic distribution of nanoparticles using intravital multiphoton fluorescence microscopy. *ACS Nano*, 2012, **6**(5): 4122–4131
 - [21] Liang X, Grice J E, Zhu Y, *et al.* Intravital multiphoton imaging of the selective uptake of water-dispersible quantum dots into sinusoidal liver cells. *Small*, 2015, **11**(14): 1711–1720
 - [22] Germain R N, Robey E A, Cahalan M D. A decade of imaging cellular motility and interaction dynamics in the immune system. *Science*, 2012, **336**(6089): 1676–1681
 - [23] Bardehle S, Kruger M, Buggenthin F, *et al.* Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nat Neurosci*, 2013, **16**(5): 580–586
 - [24] Williams P R, Marincu B N, Sorbara C D, *et al.* A recoverable state of axon injury persists for hours after spinal cord contusion *in vivo*. *Nat Commun*, 2014, **5**: 5683
 - [25] Toomre D, Pawley J B. Disk-scanning confocal microscopy[M]//PAWLEY J B. *handbook of biological confocal microscopy*. Boston, MA; Springer US. 2006: 221–238
 - [26] Tanaami T, Otsuki S, Tomosada N, *et al.* High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and Nipkow disks. *Appl Opt*, 2002, **41**(22): 4704–4708
 - [27] Petr   M, Hadravsk   M, Egger M D, *et al.* Tandem-scanning reflected-light microscope. *J Opt Soc Am*, 1968, **58**(5): 661–664
 - [28] Xiao G Q, Corle T R, Kino G S. Real-time confocal scanning optical microscope. *Applied Physics Letters*, 1988, **53**(8): 716–718
 - [29] Nakano A. Spinning-disk confocal microscopy—a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic. *Cell Struct Funct*, 2002, **27**(5): 349–355
 - [30] Shimozawa T, Yamagata K, Kondo T, *et al.* Improving spinning disk confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(9): 3399–3404
 - [31] Lu H H, Wu Y M, Chang W T, *et al.* Molecular imaging of ischemia and reperfusion *in vivo* with mitochondrial autofluorescence. *Anal Chem*, 2014, **86**(10): 5024–5031
 - [32] Zipfel W R, Williams R M, Christie R, *et al.* Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(12): 7075–7080
 - [33] Senoo H, Imai K, Mezaki Y, *et al.* Accumulation of vitamin A in the hepatic stellate cell of arctic top predators. *Anat Rec (Hoboken)*, 2012, **295**(10): 1660–1668
 - [34] Mederacke I, Dapito D H, Affo S, *et al.* High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nat Protoc*, 2015, **10**(2): 305–315
 - [35] Wang H, Liang X, Mohammed Y H, *et al.* Real-time histology in liver disease using multiphoton microscopy with fluorescence lifetime imaging. *Biomed Opt Express*, 2015, **6**(3): 780–792
 - [36] Puche J E, Saiman Y, Friedman S L. Hepatic stellate cells and liver

- fibrosis. *Compr Physiol*, 2013, **3**(4): 1473–1492
- [37] Li C, Pastila R K, Lin C P. Label-free imaging immune cells and collagen in atherosclerosis with two-photon and second harmonic generation microscopy. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2016, **09**(01): 1640003
- [38] Rocheleau J V, Head W S, Piston D W. Quantitative NAD(P) H/flavoprotein autofluorescence imaging reveals metabolic mechanisms of pancreatic islet pyruvate response. *J Biol Chem*, 2004, **279**(30): 31780–31787
- [39] Sha S, Yang F, Wang A, *et al.* Fluorescent and quantitative mitochondrial redox imaging of tumor targeted by Octa-RGD probe. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2016, **09**(04): 1642002
- [40] Yang L, Jung Y, Omenetti A, *et al.* Fate-mapping evidence that hepatic stellate cells are epithelial progenitors in adult mouse livers. *Stem Cells*, 2008, **26**(8): 2104–2113
- [41] Mederacke I, Hsu C C, Troeger J S, *et al.* Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun*, 2013, **4**: 2823
- [42] Scott C L, Zheng F, De Baetselier P, *et al.* Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat Commun*, 2016, **7**: 10321
- [43] Geissmann F, Cameron T O, Sidobre S, *et al.* Intravascular immune surveillance by CXCR6⁺ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol*, 2005, **3**(4): e113
- [44] David B A, Rezende R M, Antunes M M, *et al.* Combination of mass cytometry and imaging analysis reveals origin, location, and functional repopulation of liver myeloid cells in mice. *Gastroenterology*, 2016, **151**(6): 1176–1191
- [45] Hasenberg A, Hasenberg M, Mann L, *et al.* Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat Methods*, 2015, **12**(5): 445–452
- [46] Dal-Secco D, Wang J, Zeng Z, *et al.* A dynamic spectrum of monocytes arising from the *in situ* reprogramming of CCR2⁺ monocytes at a site of sterile injury. *J Exp Med*, 2015, **212**(4): 447–456
- [47] Marques P E, Antunes M M, David B A, *et al.* Imaging liver biology *in vivo* using conventional confocal microscopy. *Nat Protoc*, 2015, **10**(2): 258–268
- [48] Wang J, Kubes P. A reservoir of mature cavity macrophages that can rapidly invade visceral organs to affect tissue repair. *Cell*, 2016, **165**(3): 668–678
- [49] Wang J, Hossain M, Thanabalasuriar A, *et al.* Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science*, 2017, **358**(6359): 111–116
- [50] Carambia A, Freund B, Schwinge D, *et al.* Nanoparticle-based autoantigen delivery to Treg-inducing liver sinusoidal endothelial cells enables control of autoimmunity in mice. *J Hepatol*, 2015, **62**(6): 1349–1356
- [51] Akhter A, Hayashi Y, Sakurai Y, *et al.* A liposomal delivery system that targets liver endothelial cells based on a new peptide motif present in the ApoB-100 sequence. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, **456**(1): 195–201
- [52] Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, *et al.* Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatology*, 2015, **62**(1): 279–291
- [53] Wong C H, Jenne C N, Petri B, *et al.* Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat Immunol*, 2013, **14**(8): 785–792
- [54] Akbari M, Kimura K, Houts J T, *et al.* Intravital imaging of the immune responses during liver-stage malaria infection: an improved approach for fixing the liver. *Parasitol Int*, 2016, **65** (5 Pt B): 502–505
- [55] Guidotti L G, Inverso D, Sironi L, *et al.* Immunosurveillance of the liver by intravascular effector CD8(+) T cells. *Cell*, 2015, **161**(3): 486–500
- [56] Inverso D, Iannacone M. Spatiotemporal dynamics of effector CD8⁺ T cell responses within the liver. *J Leukoc Biol*, 2016, **99**(1): 51–55
- [57] Iannacone M. Hepatic effector CD8(+) T-cell dynamics. *Cellular & Molecular Immunology*, 2015, **12**(3): 269–272
- [58] Benechet A P, Iannacone M. Determinants of hepatic effector CD8⁺ T cell dynamics. *J Hepatol*, 2017, **66**(1): 228–233
- [59] Tanaka K, Morimoto Y, Toiyama Y, *et al.* Intravital dual-colored visualization of colorectal liver metastasis in living mice using two photon laser scanning microscopy. *Microsc Res Tech*, 2012, **75**(3): 307–315
- [60] Heymann F, Niemietz P M, Peusquens J, *et al.* Long term intravital multiphoton microscopy imaging of immune cells in healthy and diseased liver using CXCR6. *Gfp Reporter Mice*. 2015, *J Vis Exp*, **97**: e52607
- [61] Babes L, Kubes P. Visualizing the tumor microenvironment of liver metastasis by spinning disk confocal microscopy. *Methods Mol Biol*, 2016, **1458**: 203–215
- [62] Ritsma L, Steller E J, Ellenbroek S I, *et al.* Surgical implantation of an abdominal imaging window for intravital microscopy. *Nat Protoc*, 2013, **8**(3): 583–594
- [63] Marques P E, Oliveira A G, Pereira R V, *et al.* Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. *Hepatology*, 2015, **61**(1): 348–360
- [64] McDonald B, Pittman K, Menezes G B, *et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, 2010, **330**(6002): 362–366
- [65] Yang X, Jiang B, Song X, *et al.* Fast axial-scanning photoacoustic microscopy using tunable acoustic gradient lens. *Opt Express*, 2017, **25**(7): 7349–7357
- [66] Jiang B, Yang X, Luo Q. Reflection-mode Bessel-beam photoacoustic microscopy for *in vivo* imaging of cerebral capillaries. *Opt Express*, 2016, **24**(18): 20167–20176
- [67] Wang L V, Yao J. A practical guide to photoacoustic tomography in the life sciences. *Nat Methods*, 2016, **13**(8): 627–638

Advances in Optical Microscopic Imaging for Visualizing Liver Immunology In vivo*

LIN Qiao-Ya^{1,2)}, HUANG Song-Lin^{1,2)}, LUO Qing-Ming^{1,2)}, ZHANG Zhi-Hong^{1,2)**}

⁽¹⁾ Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics—Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

⁽²⁾ MOE Key Laboratory for Biomedical Photonics, Collaborative Innovation Center for Biomedical Engineering, School of Engineering Sciences, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract Optical molecular imaging, which greatly promoted the development of immunology, is one of the best methods to investigate cell morphology, movement and function in a complex regional environment *in vivo*. The liver is a vital organ for maintaining body's metabolism and detoxification, and it as an immunological organ. Understanding the basic feature and function of liver immunology is significant for prevention and treatment of liver disease and associated systemic diseases. Visualization immune response under physiological or pathological condition *in vivo*, providing spatial-temporal and dynamic information of multiple cells involved in key events and their interactions, can greatly enrich the knowledge of liver unique immune response. This review will focus on the current liver intravital imaging techniques and methods, and the application of optical microscopic imaging techniques in liver immunology, such as multiphoton excitation confocal microscopy and spin-disk confocal microscopy, and future development directions and challenges of *in vivo* liver imaging are prospected.

Key words multiphoton excitation microscopic imaging, spin-disk confocal imaging, intravital abdominal window, liver metastasis, acute liver injury, focal liver injury and inflammation

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0390

*This work was supported by grants from The Major Research Plan of The National Natural Science Foundation of China (91542000, 91442201), The National Natural Science Foundation of China (81501593), National Science Fund for Distinguished Young Scholars (81625012), and the China Postdoctoral Science Foundation (2015M572148).

**Corresponding author.

Tel: 86-27-87792033, E-mail: czyzzh@mail.hust.edu.cn

Received: October 19, 2017

Accepted: November 6, 2017