

【基础研究】

vitrogen 公司), 杜尔伯科改良伊格尔培养基 (Dulbecco modified Eagle medium, DMEM)、胎牛血清 (美国 Gibco 公司), 小动物活体成像系统 (美国 Lumina II, Caliper 公司), 小动物麻醉机 (XGI-8, Gas Anesthesia System, 美国)。

1.2 实验动物 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 10 只, 无特定病原 (specific pathogen-free, SPF) 级, 体质量 20 ~ 22 g, 由维通利华生物科技有限公司提供, 在首都医科大学附属北京安贞医院-北京市心肺血管疾病研究所实验动物中心所属的 SPF 级动物房饲养。

1.3 细胞系体外培养 将液氮保存的 Panc02 细胞取出, 迅速放入 37 °C 水浴中解冻, 离心 $1\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ($r = 150\text{ mm}$, 5 min), 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 重悬, 洗涤后, 置于 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 的培养箱, 以不含双抗、体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基温育培养, 经换液传代到对数生长期, 调整细胞浓度至 $5 \times 10^8\text{ L}^{-1}$, 即可用于小鼠体内实验接种。

1.4 稳定细胞株建立 Panc02 细胞接种于 10 cm 培养皿中, 接种量以转染时细胞密度达到 90% 为宜, 培养 24 h 后进行转染。将总量为 1 μg pGL4.20 质粒 (美国 Promega 公司) 与 500 μL 无血清无抗生素的培养基混合, 再将 2.5 μL Lipofectamine 2000 与 500 μL 无血清无抗生素的培养基混合, 然后将上述 2 种溶液轻轻混合, 室温放置 20 min, 加入培养皿中。37 °C、体积分数 5% CO₂ 常规培养。细胞转染 24 h 后, 加入嘌呤霉素筛选 2 周, 根据细胞生长情况, 每 1 ~ 3 d 更换 1 次培养基。嘌呤霉素处理后未转染细胞死亡时, 耐药克隆继续生长, 直至细胞不再死亡为止, 获得单个阳性细胞克隆。将单细胞克隆再进行培养, 并对获得的多个单克隆细胞株进行活性测定。

1.5 小鼠皮下接种 Panc02 细胞 小鼠麻醉后 (腹腔注射质量分数 1% 戊巴比妥), 固定小鼠呈俯卧位, 体积分数 75% 乙醇消毒手术部位皮肤, 于背部皮肤、后肢上端背部皮肤进行接种, 小鼠胰腺癌 Panc02 (2×10^6 个细胞) 细胞株皮下接种后用消毒棉球按压。术后继续在 SPF 条件下饲养, 术后 0、3、7、10、14 d 利用游标卡尺测定肿瘤大小, 并测定荧光素酶活性。

1.6 小动物活体成像检测 细胞置于 96 孔板中, 加入荧光素酶底物 ($150\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 利用 Lumina II 进行检测。小鼠提前 10 min 腹腔注射荧光素酶底物 $150\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 再用异氟烷麻醉, 置于 Lumina II 操作台中进行活性检测, 整个操作过程中操作台温度保持 37 °C。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行实验数据处理。数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 稳定表达荧光素酶 Panc02 细胞株筛选 经嘌呤霉素浓度梯度筛选, 确定 Panc02 细胞的最佳嘌呤霉素浓度为 $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由于转染后筛选过程中质粒载体是随机整合在细胞染色体上, 根据不同克隆的荧光素酶活性的表达高低, 确定有荧光素酶表达的克隆 Panc02 细胞为阳性克隆。

2.2 Panc02 细胞株体内肿瘤大体观察 所有接种肿瘤细胞的小鼠存活, 术后小鼠活动及摄食无影响, 体质量无变化。肿瘤从第 7 天开始明显变大。0、3、7、10、14 d 肿瘤大小分别为 (0.000 ± 0.000)、(0.000 ± 0.000)、(0.077 ± 0.022)、(0.234 ± 0.032)、(0.673 ± 0.086) cm^3 , 肿瘤大小在 3、7、10、14 d 各个时间点比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。第 14 天剪开皮肤剥离肿瘤, 收获肿瘤。

2.3 Panc02 细胞株体内荧光素酶活性测定 所有接受皮下原位接种 Panc02 细胞的小鼠存活, 术后小鼠活动及摄食无影响, 体质量无变化。0、3、7、10、14 d 肿瘤荧光素酶活性分别为 ($4\,123 \pm 1\,937$)、($43\,607 \pm 31\,900$)、($164\,000 \pm 24\,400$)、($360\,000 \pm 267\,000$)、($2\,300\,000 \pm 430\,000$) $\text{p} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1}$, 各时间点荧光素酶活性比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

随着对肿瘤机制与相关细胞信号通路研究的深入, 需要直接快速地测量各种癌症模型中肿瘤的生长和转移, 并可对癌症治疗中癌细胞的变化进行实时观测和评估。小动物活体成像能够无创伤地定量检测小鼠整体的原位瘤、转移瘤及自发瘤用于肿瘤病理生理的研究^[8]。采用发光基团标记肿瘤细胞, 使之成为发光源, 然后接种活体就可实现肿瘤细胞活体成像。在一定范围内, 随细胞增多发光信号逐渐增强。利用荧光素酶标记的胃癌细胞, 通过观察 ApoG2 蛋白体外抑制胃癌细胞生长的效果, 发现随该蛋白量增加, 检测到胃癌细胞荧光素酶活性逐渐降低^[9]。通过探针标记乳腺癌细胞后, 甚至可以在单细胞水平动态观察药代动力学变化^[10]。通过观察在细胞内用荧光素酶标记 p16 蛋白从而建立细胞模型, 可以适时检测肿瘤生成和细胞衰老情况^[11]。因此, 活体成像技术是肿瘤形成强有力的研究工具。

本研究采用的荧光素酶的水溶性和脂溶性都很好,具有易穿透细胞膜屏障的特点,其荧光波长为 540 ~ 600 nm,组织吸收和散射较少^[12]。动物肿瘤模型光学活体成像技术目前的主要目标是扩大标记靶标的范围、增加检测的灵敏度、减少报告分子对活体环境的干扰、提高模拟活体环境相似度。随着相关技术的逐渐成熟,应用范围逐渐扩大,动物活体内组织、细胞、分子水平的研究已经逐渐取代离体研究,在检测设备不断发展的情况下,更多的生命活动在动物活体内被不断研究探索。

作者为了研究胰腺癌细胞在动物体内的发生发展,建立了稳定高表达荧光素酶基因的 Panc02 细胞株,并观察到荧光素酶在小鼠体内的增殖,为深入研究胰腺癌打下了良好的基础。

参考文献:

[1] Edinger M, Cao Y A, Verneris M R, *et al.* Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using *in vivo* bioluminescence imaging[J]. *Blood*, 2003, 101 (2) : 640-648.

[2] Ntziachristos V, Ripoll J, Wang L V, *et al.* Looking and listening to light; the evolution of whole-body photonic imaging[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23 (3) : 313-320.

[3] Matsumoto S, Tanaka F, Sato K, *et al.* Monitoring with a non-invasive bioluminescent *in vivo* imaging system of pleural metastasis of lung carcinoma[J]. *Lung Cancer*, 2009, 66 (1) : 75-79.

[4] Close D M, Xu T, Sayler G S, *et al.* *In vivo* bioluminescent imaging

(BLI): noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals [J]. *Sensors (Basel)*, 2011, 11 (1) : 180-206.

[5] Wilson K, Yu J, Lee A, *et al.* *In vitro* and *in vivo* bioluminescence reporter gene imaging of human embryonic stem cells [J]. *J Vis Exp*, 2008 (14) : e740.

[6] Lee C J, Spalding A C, Ben-Josef E, *et al.* *In vivo* bioluminescent imaging of irradiated orthotopic pancreatic cancer xenografts in nonobese diabetic-severe combined immunodeficient mice: a novel method for targeting and assaying efficacy of ionizing radiation[J]. *Transl Oncol*, 2010, 3 (3) : 153-159.

[7] 李珂, 赵光. 活体动物成像光学技术的应用研究[J]. 新乡医学院学报, 2011, 28 (6) : 778-779.

[8] Lim E, Modi K D, Kim J. *In vivo* bioluminescent imaging of mammary tumors using IVIS spectrum[J]. *J Vis Exp*, 2009 (26) : 1210.

[9] Xin J, Zhan Y, Liu M, *et al.* ApoG2 induces ER stress-dependent apoptosis in gastric cancer cells *in vitro* and its real-time evaluation by bioluminescence imaging *in vivo* [J]. *Cancer Lett*, 2013, 336 (2) : 260-269.

[10] Thurber G M, Yang K S, Reiner T, *et al.* Single-cell and subcellular pharmacokinetic imaging allows insight into drug action *in vivo* [J]. *Nat Commun*, 2013 (4) : 1504.

[11] Burd C E, Sorrentino J A, Clark K S, *et al.* Monitoring tumorigenesis and senescence *in vivo* with a p16 (INK4a)-luciferase model [J]. *Cell*, 2013, 152 (1/2) : 340-351.

[12] Serganova I, Blasberg R. Reporter gene imaging: potential impact on therapy[J]. *Nucl Med Biol*, 2005, 32 (7) : 763-780.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)

(上接第 416 页)

[7] 蒋小云, 容丽萍. 儿童高血压的诊断与治疗研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28 (13) : 1037-1040.

[8] Funke-Kaiser H, Reichenberger F, Kopke K, *et al.* Differential binding of transcription factor E2F-2 to the endothelin-converting enzyme-1b promoter affects blood pressure regulation[J]. *Hum Mol Genet*, 2003, 12 (4) : 423-433.

[9] Chang Y P, Liu X, Kim J D, *et al.* Multiple genes for essential-hypertension susceptibility on chromosome 1q[J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 80 (2) : 253-264.

[10] Frossard P M, Hill S H, Elshahat Y I, *et al.* Associations of angiotensinogen gene mutations with hypertension and myocardial infarction in a gulf population[J]. *Clin Genet*, 1998, 54 (4) : 285-293.

[11] Kobashi G, Hata A, Ohta K, *et al.* A1166C variant of angiotensin II type 1 receptor gene is associated with severe hypertension in pregnancy independently of T235 variant of angiotensinogen gene [J]. *J Hum Genet*, 2004, 49 (4) : 182-186.

[12] Cusi D, Barlassina C, Azzani T, *et al.* Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension [J]. *Lancet*, 1997, 349 (9062) : 1353-1357.

[13] Thompson E E, Kuttub-Boulos H, Witonsky D, *et al.* CYP3A variation and the evolution of salt-sensitivity variants[J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 75 (6) : 1059-1069.

[14] Jachymova M, Horky K, Bultas J, *et al.* Association of the

Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284 (2) : 426-430.

[15] Siffert W, Rosskopf D, Siffert G, *et al.* Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension [J]. *Nat Genet*, 1998, 18 (1) : 45-48.

[16] Rutherford S, Johnson M P, Curtain R P, *et al.* Chromosome 17 and the inducible nitric oxide synthase gene in human essential hypertension [J]. *Hum Genet*, 2001, 109 (4) : 408-415.

[17] Hilbert P, Lindpaintner K, Beckmann J S, *et al.* Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats [J]. *Nature*, 1991, 353 (6344) : 521-529.

[18] Nakayama T, Soma M, Watanabe Y, *et al.* Splicing mutation of the prostacyclin synthase gene in a family associated with hypertension [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297 (5) : 1135-1139.

[19] Manunta P, Cusi D, Barlassina C, *et al.* Alpha-adducin polymorphisms and renal sodium handling in essential hypertensive patients [J]. *Kidney Int*, 1998, 53 (6) : 1471-1478.

[20] Manunta P, Burnier M, D'Amico M, *et al.* Adducin polymorphism affects renal proximal tubule reabsorption in hypertension [J]. *Hypertension*, 1999, 33 (2) : 694-697.

(本文编辑:王 燕 英文编辑:王 燕)