

荧光素酶标记人胃癌细胞裸鼠原位移植模型的建立

李小颖¹, 董伟¹, 张连峰²

- (1. 中国医学科学院北京协和医学院实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021;
2. 国家中医药局人类疾病动物模型3级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立荧光素酶标记人胃癌原位异种移植模型。方法 将萤火虫荧光素酶作为标记基因导入人胃癌 MGC803 细胞, 建立稳定表达荧光素酶的细胞, 将其接种裸鼠胃壁浆膜下, 建立胃癌裸鼠原位肿瘤模型。用活体荧光成像系统检测肿瘤的发生发展, 并进行小动物超声影像和病理学分析。结果 裸鼠原位成瘤率为 100%, 活体荧光成像观察发现在接种第 7 天, 就可以观察到肿瘤发光。21 d 后肿瘤进入对数生长期, 28 d 后肿瘤出现明显坏死, 平均荧光光子数呈现下降趋势。超声成像发现小鼠胃部有直径为 8.39 mm, 面积为 28.92 mm² 瘤块。结论 荧光素酶标记可以实时监测原位异种移植人胃癌生长状况。

【关键词】 人胃癌细胞; 肿瘤模型; 荧光素酶; 生物发光; 小动物超声

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)04-0028-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.04.007

Establishment of a Human Gastric Cancer Orthotopic Transplantation Model Labeled with Luciferase

LI Xiao-ying¹, DONG Wei¹, ZHANG Lian-feng^{1,2}

- (1. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China; 2. Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021)

【Abstract】 Objective To establish a human gastric cancer orthotopic xenograft model labeled with luciferase. **Methods** Luciferase labeled MGC803 cells were cloned with G418 selection (MGC803-Luc). MGC803-Luc cells were implanted into the stomach wall of BALB/cA-nu mice to establish the tumor-bearing mouse models. Whole-body optical imaging technique was used to monitor the growth of the implanted tumor. **Results** The successful rate of orthotopic transplantation was 100%. The whole-body optical imaging found that the fluorescence could be detected at 7 days after transplantation. The tumor growth became logarithmic after 21 days. However, the mean fluorescent intensity tended to decline when the tumor had apparent necrosis after 28 days. Ultrasonic imaging found a tumor on the stomach, approximately 8.39 mm in diameter and 28.92 mm² in area. **Conclusions** It is possible to real-time monitoring the growth of human gastric cancer labeled with luciferase in animals.

【Key words】 Human gastric carcinoma; Tumor model; Luciferase; Bioluminescent imaging; Small-animal ultrasound

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,在我国其发病率居各类肿瘤的首位,胃癌可发生于任何年

[基金项目] 卫生部项目,实验动物和人类疾病动物模型资源扩展(200802036)和十一五新药专项支持(2009ZX09501-026)。

[作者简介] 李小颖(1981-),女,实习研究员。E-mail: lixiaoyinghebei@163.com。

[通讯作者] 张连峰, E-mail: zhanglf@cnilas.org。

龄,每年约 17 万人死于胃癌。理想的胃癌裸小鼠人类肿瘤动物模型是研究肿瘤生长和转移生物学以及寻求抗癌新药和新方法的重要工具。人胃癌裸小鼠原位移植模型自 1993 年 Furukawa 等^[1]首次报道建立后,逐渐被应用于胃癌的浸润转移机制及抗胃癌转移药物的研究。但传统的动物模型由于缺乏理想的细胞标记,不易实时记录肿瘤生长情况及评价抗肿瘤药物治疗效果^[1-3]。生物发光成像技术是利用底物荧光素在荧光素酶(luciferase, Luc)标记的肿瘤细胞中,能够被稳定表达的荧光素酶催化而发光,在活体动物水平观察肿瘤变化情况的一种新技术,广泛用于肿瘤生长的示踪和治疗效果的评价。

本实验利用萤火虫荧光素酶基因标记人胃癌细胞 MGC803,并建立表达荧光素酶的人胃癌裸小鼠原位移植模型,利用生物发光成像技术对此模型内的肿瘤生长进行非侵入性的连续监测,以便建立便于即时监测胃癌生长和药物治疗效果评价的生物发光模型。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器:人胃癌细胞 MGC803 冻存于本实验室,L-谷氨酰胺、双抗、DMEM、胎牛血清(Gibco 公司)、G418(Amresco 公司)、脂质体 2000(Invitrogen 公司)。活体荧光影像系统(I. C. E.,日本 Roper 公司)、倒置显微镜(Nikon TS100)。Vevo770TM 小动物超声探测系统(加拿大 VisualSonics 公司)。

1.1.2 实验动物: BALB/cA-nu 裸小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司[XCXK(京)2007-0001],鼠龄 5 周,体重 15~18 g,在本实验室无特定病原体(specific-pathogen free, SPF)的饲养间(SYXK(京)2009-0003)饲养。所有实验操作程序均经过实验动物研究所实验动物使用管理委员会批准(批准号为 GC-09-2001)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:用含 10% 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基作为 MGC803 细胞的培养液,于 5% CO₂, 37℃ 细胞培养箱内常规培养。

1.2.2 构建带有筛选标记的载体:pCAGGS-Neo-Luc 由本实验室构建^[4]。

1.2.3 细胞转染和筛选:采用脂质体 2000 转染

MGC803 细胞(具体转染步骤参照脂质体 2000 操作说明)。转染后 24 h,用含 1 000 μg/mL G418 的培养液筛选细胞,直至形成肉眼可见的单克隆,挑取单克隆于 96 孔板,于 5% CO₂, 37℃ 细胞培养箱内培养,汇合度达 70%~90%后,传代(1:2 传代),取其中一块 96 孔板加入用 DMEM 配置的底物 luciferin(1 mg/mL) 20 μL,放入活体荧光影像系统摄像 15 min,Slide Book 4.0 软件进行分析。

1.2.4 裸鼠胃癌原位移植模型的建立和活体荧光观察:收集处于生长对数期的转染细胞,稀释至 2×10^6 cells/mL。取 250 μL 细胞悬液接种于已禁食 24 h 的裸鼠胃壁浆膜下,并可见浆膜下鼓起一透亮小泡为标志,共接种 3 只。分别在接种的 7、14、21、28 和 35 d 观察肿瘤的生长情况。观察前每只裸鼠腹腔注射荧光素底物(1.5 mg/10 g),饱和三溴乙醇(0.18 mL/10 g)麻醉后放入活体荧光影像系统摄像,Slide Book 4.0 软件进行分析。以肿瘤细胞发射的光子数对小鼠荷瘤时间作图,得到荧光素酶标记肿瘤细胞在裸鼠体内的生长曲线。

1.2.5 超声图像采集:肿瘤长到第五周时,用三溴乙醇注射麻醉后(0.18 mL/10 g 体重),置于检测台上,将台温设定为 40℃,小鼠四肢用医用胶布固定于涂有导电胶的电极上,记录生理指标。用 VisualSonics® Vevo770® 操作系统和专门用于小鼠的 RMV704 高频超声探头,进行 B 型检测。通过 VisualSonics® Vevo770® 高分辨率小动物超声系统的软件进行数据分析。

2 结果

2.1 稳定高表达 Luc 的单克隆细胞株

获得稳定表达荧光素酶基因的细胞克隆(图 1 箭头所示),经过多次传代表达水平稳定,标记细胞的形态、生长方式、生长速度等与未转染细胞无明显差异。

2.2 Luc 标记 MGC803 小鼠胃癌原位肿瘤模型的动态观察

从图 2 可见肿瘤接种第 7 天,就可以观察到肿瘤发光,随着观察天数的增加,发光强度增强。图 3 发现肿瘤接种 21 d 后进入对数生长期,28 d 后肿瘤的发光强度逐渐减弱,推测肿瘤出现了坏死。

2.3 小动物超声影像学 and 病理学观察

肿瘤接种 35 d 后,超声成像发现小鼠胃部有直径为 8.39 mm,面积为 28.92 mm² 瘤块(图 4A)。脱

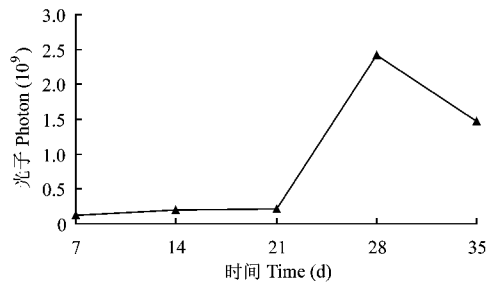


图3 荧光素酶标记的 MGC803-Luc⁺ 肿瘤生长曲线
注:纵坐标为肿瘤镜像面发射的总光子数

Fig. 3 The growth curve of MGC803-Luc⁺ tumor in vivo
Note: The Y-axis is the total number of photon emission from the mirror of tumor.

颈处死小鼠并解剖,暴露胃部,发现胃上有灰白色的肿瘤组织,表面呈结节状,质地较硬(图4B),(图1 2 4 见封三)。

3 讨论

原位胃癌肿瘤模型已经在实验研究中显示出其优势,尤其移植模型的方法改进已经使其成为联系实验和临床的工具。1993年,Furukawa等^[1]首次报道将组织学完整的瘤组织缝挂于裸鼠胃壁,建立人胃癌原位移植模型,该模型能动态反映胃癌从原位生长、局部浸润到远处转移的发展过程,是研究胃癌的生长和转移特点的良好模型。1997年,汪芳裕等^[2]首次采用荷包缝合的方法,在裸鼠胃壁缝制粘膜小囊包埋肿瘤组织,建立原位肿瘤移植模型,克服了组织缝挂法的瘤组织早期未与胃壁粘膜接触的缺点。2005年,陈亚琳等^[3]将手术方法经适当的改进,采用OB胶粘贴法将完整的瘤组织粘贴于裸鼠胃壁,建立人胃癌原位移植模型,该模型取代了胃囊法,既有胃囊法的优点,又操作相对简便,对裸鼠的创伤小。近些年来国内外学者主要集中于上述三种移植模型的方法研究^[5-8]。但是由于肿瘤组织在体内不便监测,不能对肿瘤生长进行连续监测,需要在不同时间点牺牲小鼠、解剖、染色、病理分析等实验过程。

本实验利用萤火虫荧光素酶基因标记人胃癌细胞 MGC803,使胃癌细胞成为发光源,然后将其原

位接种裸鼠胃壁浆膜下,用活体荧光成像系统连续观察胃癌细胞在裸鼠体内的生长情况,发现在接种的第7天,就可以观察到肿瘤发光,21 d后肿瘤进入对数生长期,28 d后肿瘤的发光强度减弱,推测肿瘤出现了坏死。肿瘤接种35 d后,超声成像发现小鼠胃部有直径为8.39 mm,面积为28.92 mm²瘤块。另外解剖学观察,进一步验证了该方法的可行性。此模型克服了以往胃癌模型不宜动态观察的不足,应用该模型能够更准确地反映肿瘤生长的实际情况,使实验动物的用量大为减少,有效排除了动物个体间差异的影响,可对癌症治疗之前和过程中的癌细胞变化进行实时观测和评估,荧光素酶标记的人胃癌原位转移模型是研究胃癌原位转移简便可行的新方法。

参考文献:

- [1] Furukawa T, Fu XY, Kubota T, et al. Nude mouse metastatic models of human stomach cancer constructed using orthotopic implantation of histologically intact tissue [J]. *Cancer Res*, 1993, 53:1204-1208.
- [2] 汪芳裕,朱人敏,王琳,等. 建立裸小鼠人胃癌原位移植模型的一种新方法[J]. *金陵医院学报* 2007, 10(2):238-240.
- [3] 陈亚琳,魏品康,许玲,等. 采用OB胶粘贴法建立人胃癌裸鼠原位种植转移模型[J]. *癌症* 2005, 24(2):246-248.
- [4] 李颖,高凯,董伟,等. 荧光素酶标的人肝癌细胞裸鼠异种移植瘤模型的生物发光成像和PET-CT成像比较[J]. *中国比较医学杂志* 21(3):10-13.
- [5] 杨波,脱帅,脱朝伟,等. 原位移植体内连续筛选法建立人胃恶性淋巴瘤裸小鼠高转移模型系统[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(6):413-417.
- [6] Shi J, Wei PK, Zhang S, et al. OB glue paste technique for establishing nude mouse human gastric cancer orthotopic transplantation models [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(30):4800-4804.
- [7] Cui JH, Kruger U, Vogel I, et al. Intact tissue of gastrointestinal cancer specimen orthotopically transplanted into nude mice [J]. *Hepatogastroenterology*, 1998, 45(24):2087-2096.
- [8] Li Q, Zhang N, Jia Z, et al. Critical role and regulation of transcription factor FoxM1 in human gastric cancer angiogenesis and progression [J]. *Cancer Res* 2009, 69(8):3501-3509.

(修回日期)2010-10-09

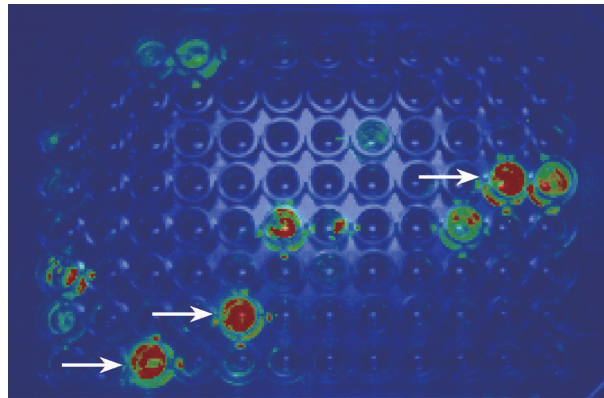
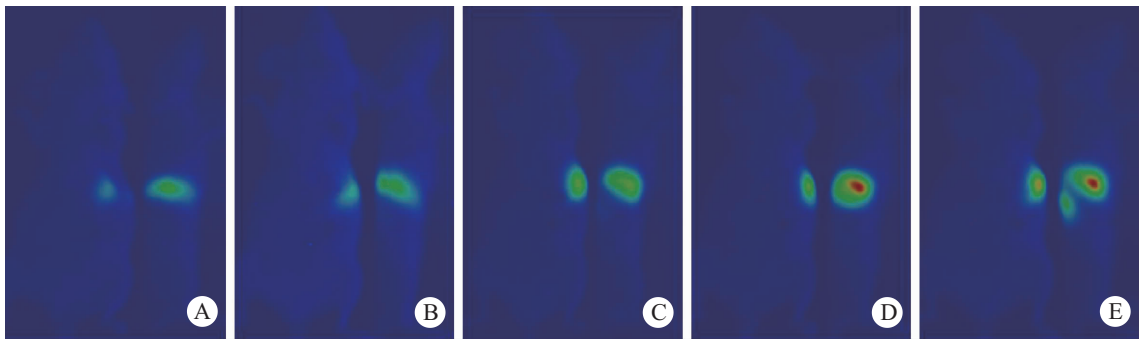


图 1 荧光素酶标记的 MGC803 细胞系,箭头所指为 MGC803-Luc⁺ 阳性克隆株

Fig. 1 The Luc-labeled MGC803 cell line. The arrow points to the MGC803-Luc⁺ clone strains

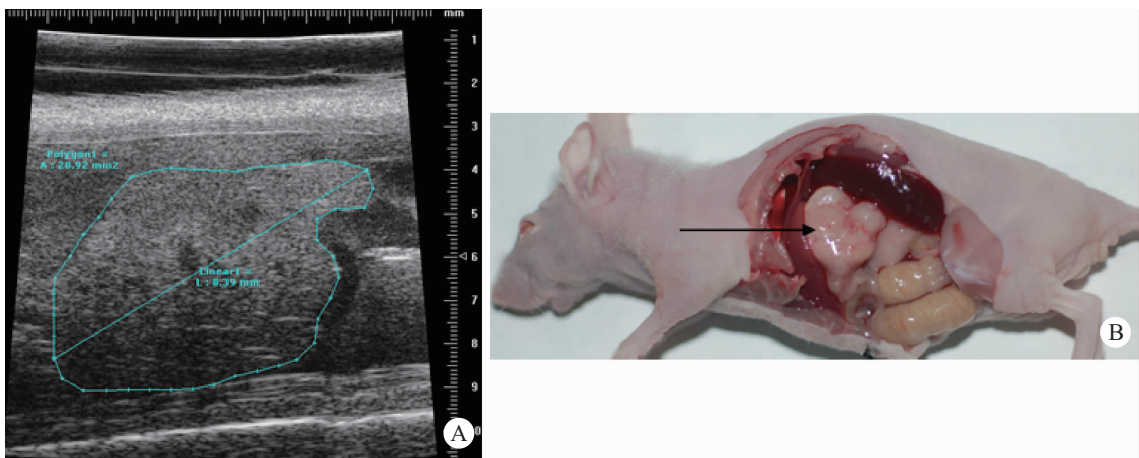


注:图为小鼠仰卧,小鼠右侧放一个三棱镜所拍摄;A~E 分别是接种 7、14、21、28 和 35 d 小动物活体荧光成像观察

图 2 胃原位接种 MGC803-Luc⁺ 肿瘤生长影像分析

Note: The imaging was obtained by putting a prism on the right of mouse when the mouse supined. A to D: The bioluminescence imaging of tumors at 7, 14, 21, 28 and 35 days after transplantation.

Fig. 2 Image analysis of growth of the orthotopic transplanted MGC803-Luc⁺ tumor



注:A 接种 35 d 后,小动物超声影像学观察;B 接种 35 d 后,肿瘤的病理学观察,箭头所指为胃部肿瘤

图 4 胃原位接种 35d 后,肿瘤的小动物超声影像学 and 病理学观察

Note: A: Ultrasonic observation at 35 days after transplantation; B: Gross pathological observation at 35 days after transplantation. The arrow points to the tumor growing on the stomach.

Fig. 4 Ultrasound and pathological observation at 35 days after orthotopically transplantation