

# 人胰腺癌裸鼠异种移植瘤模型的生物发光成像和超声成像比较

李小颖,董伟,张连峰

(中国医学科学院,北京协和医学院,医学实验动物研究所,卫生部人类疾病比较医学重点实验室,  
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021)

**【摘要】** 目的 利用荧光素酶基因标记的人胰腺癌细胞株 Capan-2 建立胰腺癌裸鼠移植模型,评价生物发光和小动物超声成像在移植瘤模型建立中的作用。方法 将表达荧光素酶基因的真核表达载体转入人胰腺癌细胞 Capan-2,将  $1 \times 10^6$  人胰腺癌细胞悬液分别接种于裸鼠胰腺和右后肢皮下,使其成瘤。生物发光成像和小动物超声成像系统观察肿瘤的生长情况。结果 肿瘤细胞原位移植成功率为 75%,皮下移植成功率为 100%。生物发光成像系统在肿瘤细胞原位接种第 7 天,可以观察到肿瘤发光;小动物超声成像系统在肿瘤细胞皮下接种第 7 天,可以测量肿瘤的大小,但在肿瘤细胞原位接种的第 7 天不能测量肿瘤的大小。另外肿瘤细胞在裸鼠皮下生长的速度比原位生长速度快 3 倍左右。结论 生物发光成像系统更适用于肿瘤早期监测,为深入研究胰腺癌的发生发展、侵袭转移机制提供理想工具。

**【关键词】** 人胰腺癌细胞;生物发光;小动物超声;原位移植;皮下移植

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)07-0013-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.07.003

## Comparison of Bioluminescent Imaging and Ultrasound Imaging in a Mouse Model of Pancreatic Cancer

LI Xiao-ying, DONG Wei, ZHANG Lian-feng

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Beijing Union Medicine College, Beijing 100021, China)

**【Abstract】 Objective** To establishment of human pancreatic cancer mouse model labeled with luciferase and evaluate bioluminescent imaging and ultrasound imaging for tumor burden and tumor progression in a mouse model of pancreatic cancer. **Method** The human pancreatic cancer cell line Capan-2, engineered for stable, high-level expression of luciferin (LUC), was implanted into pancreas and subcutaneous tissue of nude mice. The tumors were allowed to grow over a period of one to several weeks during which time the mice were imaged using both bioluminescent imaging and ultrasound imaging to monitor tumor growth. **Result** The successful rate of orthotopic and subcutaneous transplantation was 75% and 100% separately. The whole-body optical imaging found that the fluorescence could be detected after 7 days of orthotopic transplantation. The size of tumor can be measured after 7 days of subcutaneous transplantation by ultrasound

[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。

imaging but it can't be done in orthotopic transplantation. Otherwise the growth rate of tumor besides subcutaneous is about 3 times faster than pancreas. **Conclusion** Bioluminescent imaging is more suitable for monitoring the tumor at the early stage, and provides an ideal tool to further study the development of tumor and the mechanism of metastasis.

**【Key words】** Human pancreatic cancer cell; Bioluminescent imaging; Ultrasound imaging; Orthotopic transplantation; Subcutaneous transplantation

胰腺癌是源发于胰腺的恶性肿瘤,文献报道已建立胰腺癌细胞系有 SW1990<sup>[1]</sup>、Capan-2<sup>[11]</sup>、Patu8988<sup>[2]</sup> 等约 20 余株<sup>[3]</sup>,其发病率和死亡率比大概是 1:0.99。手术切除是胰腺癌能够达到根治的唯一选择,但胰腺癌早期缺少特异性症状,发现比较晚。同时胰腺癌对放疗、化疗不敏感,因此建立适宜的人胰腺癌动物模型,可以为深入研究胰腺癌的发生发展、侵袭转移机制以及寻找新的治疗策略提供有效的手段。

在临床肿瘤学中,影像学方法测量肿瘤大小的改变是监测患者对抗肿瘤治疗反应的常规方法,包括 CT (computed tomography, CT)、磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI)、正电子发射 X 线断层摄影术 (positron emission tomography, PET) 和超声 (ultrasound, US)。目前这些技术已经应用于小鼠肿瘤模型的监测<sup>[4-7]</sup>。除此之外还有生物发光成像技术。每种技术都有不同的优缺点,但彼此可以互补<sup>[8]</sup>。本实验利用萤火虫荧光素酶基因标记人胰腺癌细胞 Capan-2 并建立表达荧光素酶的胰腺癌裸鼠模型,利用生物发光成像和超声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。同时评价了生物发光成像和小动物超声探测系统在胰腺癌裸鼠模型分析中的应用和优缺点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器:人胰腺癌细胞 Capan-2 本实验室冻存, L-谷氨酰胺 (GIBCO 公司)、双抗 (GIBCO 公司)、DMEM (GIBCO 公司)、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)。Vevo770<sup>TM</sup> 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 [SCXK (京) 2007-0001] 6 周龄, 体重 18~20 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  $\mu$ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基作为 Capan-2 细胞的培养液, 于 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 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<sup>[8]</sup>

1.2.3 细胞转染和筛选: 采用脂质体 2000 转染 Capan-2 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 1000  $\mu$ g/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 孔板培养至汇合度达 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  $\mu$ L, 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 裸鼠胰腺癌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  $1 \times 10^7$  cells/mL。取 0.1 mL 细胞悬液接种于裸鼠右后肢皮下; 同时三溴乙醇腹腔内麻醉裸鼠, 75% 酒精消毒皮肤, 左上腹直肠旁线处行 1.5 cm 的纵行切口, 仔细分开胃和脾之间的薄膜, 暴露胰腺, 取 0.1 mL 细胞悬液接种于裸鼠胰腺被膜, 并可见被膜下鼓起一透亮小泡为标志, 各接种 3 只。分别在接种的 7 d、14 d、21 d 和 28 d 4 个时间点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。

1.2.5 超声图像采集: 实验小鼠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°C, 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<sup>®</sup> Vevo770<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> Vevo770<sup>®</sup> 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

经过转染,筛选获得稳定表达荧光素酶基因的细胞克隆(封2图1),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,选取高表达 Luc 的克隆株扩大培养并接种裸鼠。

### 2.2 裸鼠胰腺癌肿瘤模型的生物发光成像和小动物超声影像学观察

在胰腺原位裸鼠接种胰腺癌肿瘤细胞后第 7 天,用生物发光成像系统可以观察到肿瘤发光(封2图2,A-D),随着观察天数的增加,发光强度增强。超声影像系统在肿瘤细胞原位接种的第 7 天不能测量肿瘤的大小,细胞接种第 14 天能测量肿瘤的大

小,随着接种时间的增加,肿瘤的面积逐渐增大(封2图2,E-H)。

### 2.3 胰腺癌裸鼠皮下和原位移植瘤模型的小动物超声影像学观察

小动物超声成像系统在肿瘤细胞皮下接种第 7 天,可以测量肿瘤的大小(图3,A),但在肿瘤细胞原位接种的第 7 天不能测量肿瘤的大小(图3,E)。肿瘤细胞皮下和原位接种第 14 天后,随着接种时间的增加,肿瘤的面积逐渐增大(图3,I)。肿瘤细胞在皮下生长的速度比原位生长速度快 3 倍左右。

## 3 讨论

高分清晰小动物活体影像实时显微成像系统是 小动物成像的专用设备,空间分辨率可达到 30 ~

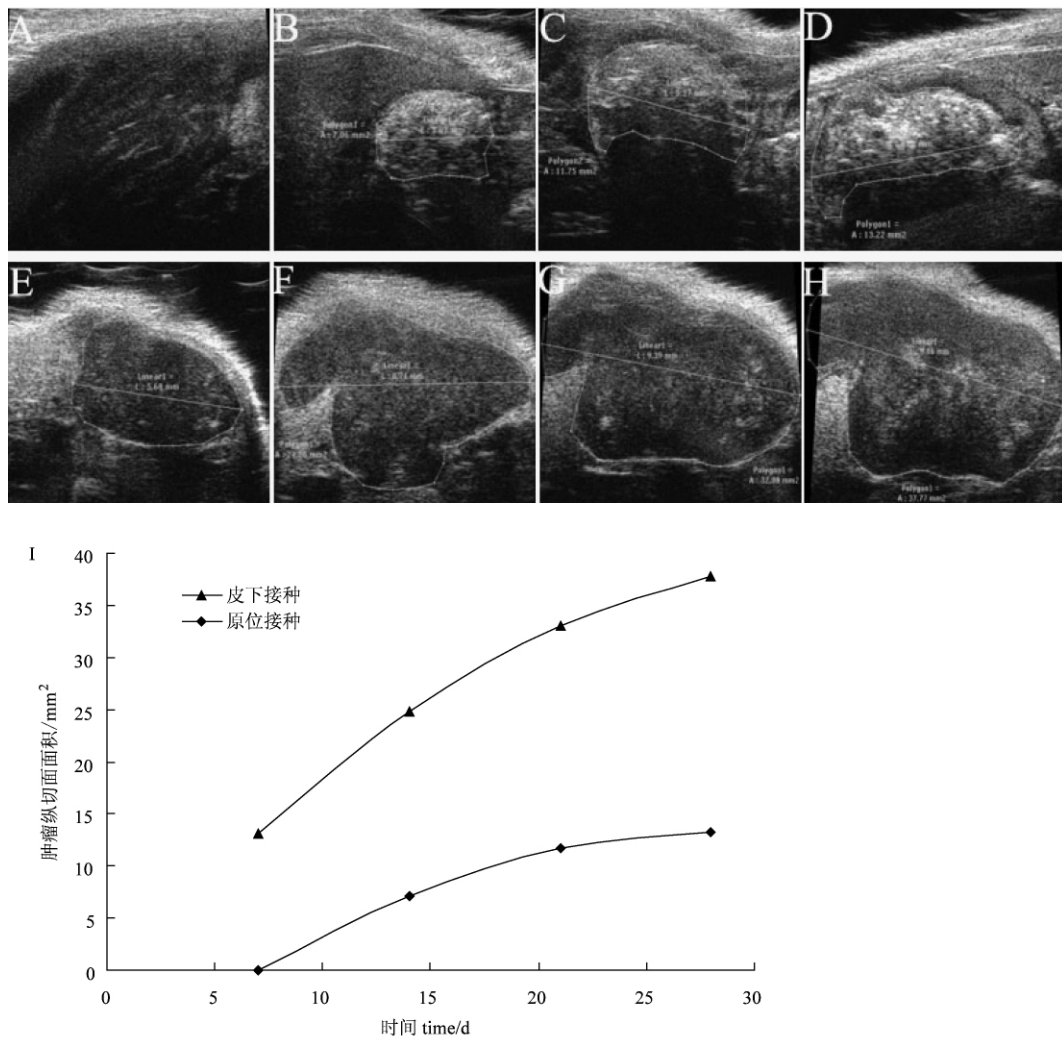


图 3 人胰腺癌皮下和原位移植瘤的小动物超声成像比较 A-D 为原位移植瘤的小动物超声成像; E-H 为皮下移植瘤的小动物超声成像,绿圈所指为肿瘤的面积; I 为皮下和原位移植瘤生长曲线的比较

Fig. 3 Comparison of subcutaneous and orthotopically implanted cancer cells by ultrasound imaging A-D was the ultrasound imaging of orthotopic xenografts. E-H was the ultrasound imaging of subcutaneous xenografts. Green circles point to the tumor size. I was the comparison of tumor growth between subcutaneous and orthotopic xenografts

100  $\mu\text{m}$ , 已被广泛应用于各种小动物的成像研究。如观测小鼠胚胎在子宫内的生长状态、引导显微穿刺或吸引操作、神经发育监测、心血管功能量化检测、微血管血液流量评估、肿瘤生长进行量化追踪等。也可用于活体探测与癌相关的生物标记早期分子的表达<sup>[9-11]</sup>。

作为分子影像学的方法之一,生物发光成像技术因其操作简单、所得结果直观、灵敏度高的特点,越来越广泛地被应用于生命科学、医学研究及药物开发等方面。本实验利用萤火虫荧光素酶基因标记人胰腺癌细胞 Capan-2, 获得稳定表达荧光素酶基因的细胞克隆, 将其接种于裸鼠胰腺被膜及右后肢皮下, 利用生物发光成像和超声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。我们发现肿瘤细胞裸鼠胰腺原位移植成功率为 75%, 裸鼠皮下移植成功率为 100%。人胰腺癌肿瘤细胞在裸鼠皮下生长的速度比原位生长速度快 3 倍左右。

生物发光成像和小动物超声成像系统能够进行无创、实时、动态的动物活体观察, 从而对同一实验对象进行不同时间点的观察, 减少实验动物个体间差异, 与传统的实验方法相比, 可以大大减少动物的用量, 符合替代、减少、优化的“3R”原则。生物发光成像与小动物超声成像系统相比具有 (1) 灵敏度高: 生物发光成像系统在肿瘤细胞原位接种第 7 天, 可以观察到肿瘤发光; 小动物超声成像系统肿瘤细胞原位接种的第 7 天不能测量肿瘤的大小。(2) 直观简便: 试验中只需将动物置于图像采集箱中, 即可见肿瘤的生长部位, 大小。(3) 视野大: 可对小动物整体成像。但是由于肿瘤细胞通常没有特定的光学性质来区分正常组织, 多采取可检测的特异性标记物来标记肿瘤细胞, 使肿瘤细胞成为发光源, 然后接种活体实现肿瘤细胞的活体成像, 实验周期较长; 肿瘤的大小以靶细胞单位时间内发射的光子数的绝对值表示, 不能直接测量肿瘤的大小<sup>[12]</sup>。小动物超声影像与生物发光成像相比具有 (1) 实验周期短: 小动物超声成像是利用不同介质对超声波的回波强度不同成像的, 因此不需要用特异性标记物来标记肿瘤细胞, 实验周期较小动物活体成像短。(2) 实时生成图像, 检查操作者可动态选择对诊断最有用的部分观察记录, 也可边操作边记录。但超声的检查视野较生物发光成像小, 探查深度有限, 且不能为骨骼或者存在气体的结构成像, 成像质量有赖于操作者的经验。

人胰腺癌皮下移植瘤模型, 虽能维持来源肿瘤的组织结构和生化特性, 但由于皮下移植瘤易形成纤维性假包膜, 肿瘤呈局限性、膨胀式生长, 很少发生远处脏器的转移<sup>[13]</sup>, 不符合人胰腺癌的生物学术

性。人胰腺癌原位移植瘤模型不仅维持了原有瘤组织的结构, 还更好地模拟人胰腺癌在体内的血供和生长环境, 它在宿主体内能以类似于患者体内的方式显示其恶性行为包括了原发肿瘤的生长、局部的浸润和随后远处脏器的转移整个过程<sup>[13]</sup>。

综上, 生物发光成像和超声成像系统能够无创、实时、动态的监测在体肿瘤的生长情况, 生物发光成像与超声成像相比, 具有早期敏感和直观简便的优点, 为肿瘤模型的研究提供了理想工具。

#### 参考文献:

- [1] 李颖, 苏卫, 张连峰, 等. SW1990 和 Capan-2 红色荧光标记胰腺癌移植瘤模型的建立和比较[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(3): 12-18.
- [2] 王凤力, 李德春, 张子祥, 等. 胰腺癌裸鼠皮下瘤模型建立的比较研究[J]. 苏州大学学报(医学版), 2007, 27(3): 359-360.
- [3] 崔全才, 陈杰, 顾长芳, 等. 一株人胰腺癌细胞系的建立及其特性[J]. 基础医学与临床, 1992, 12(6): 50-52.
- [4] Deroose CM, De A, Loening AM, et al. Multimodality imaging of tumor xenografts and metastases in mice with combined small-animal PET, small-animal CT and bioluminescence imaging [J]. J Nucl Med, 2007, 48(2): 295-303.
- [5] Hsu CX, Ross BD, Chrisp CE, et al. Longitudinal cohort analysis of lethal prostate cancer progression in transgenic mice [J]. J Urol, 1998, 160(4): 1500-1505.
- [6] Snyder CS, Kaushal S, Kono Y, et al. Complementarity of ultrasound and fluorescence imaging in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer [J]. BMC Cancer, 2009, 1471-2407/9/106.
- [7] Turnbull DH, Ramsay JA, Shivji GS, et al. Ultrasound Backscatter Microscope Analysis of Mouse Melanoma Progression [J]. Ultrasound in Med & Biol, 1996, 22(7): 845-853.
- [8] 李颖, 高凯, 董伟, 等. 荧光素酶标记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
- [9] 武国军, 王福利, 李晓武, 等. 转基因小鼠前列腺癌及转移的三维超声微成像[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(3): 354-356.
- [10] 杨娅, 李治安, 王艳红, 等. 小鼠心血管超声生物显微镜显像与磁共振成像的对照研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2010, 19(1): 56-60.
- [11] Beronja S, Livshits G, Williams S, et al. Rapid functional dissection of genetic networks via tissue-specific transduction and RNAi in mouse embryos [J]. Nat Med, 2010, 16(7): 821-827. doi: 10.1038/nm.2167.
- [12] 李颖, 高凯, 刘学丽, 等. 人结肠癌细胞 HCT-8 绿色荧光标记肿瘤模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(7): 19-22.
- [13] 余泽前, 周家华, 胡亮, 等. 人胰腺癌细胞 CFPAC-1 裸小鼠原位移植瘤模型的建立[J]. 东南大学学报(医学版), 2008, 27(1): 27-30.

(修回日期) 2011-01-17

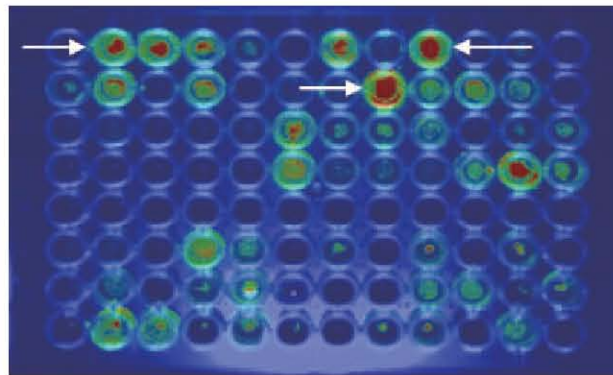


图 1 荧光素酶标记 Capan-2 细胞系,箭头所指为 Capan-2-Luc<sup>+</sup> 阳性克隆株

Fig. 1 The Capan-2 cell line labeled with Luc and the arrow points to the Capan-2-Luc<sup>+</sup>

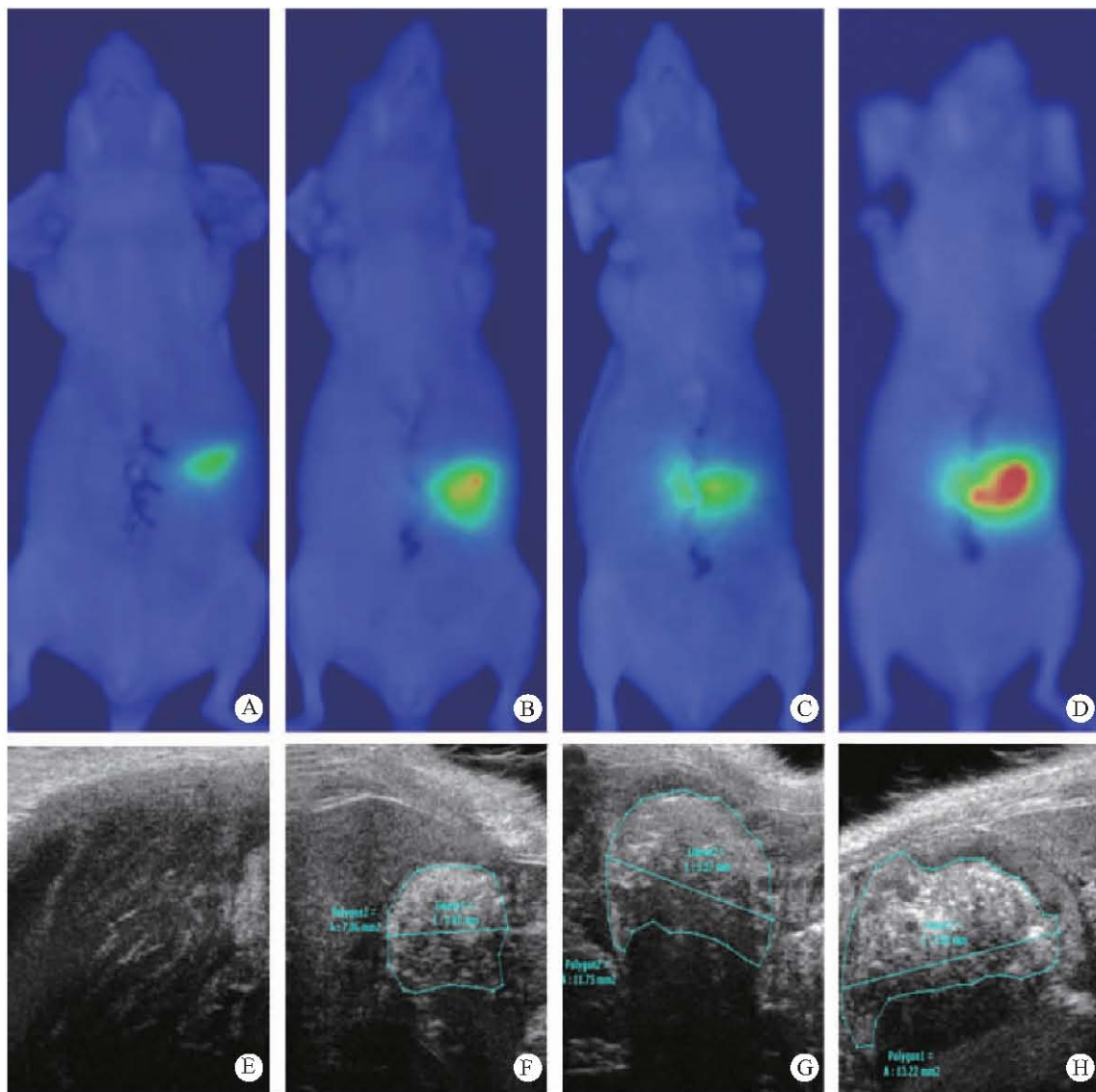


图 2 人胰腺癌原位移植瘤的生物发光成像和小动物超声成像比较

注: A-D 为原位移植瘤的生物发光成像; E-H 为原位移植瘤的小动物超声成像,绿圈所指为肿瘤的面积

Fig. 2 Comparison of orthotopically implanted cancer cells by bioluminescent imaging and ultrasound imaging

Note: A-D was the bioluminescent imaging of orthotopic xenografts. E-H was the ultrasound imaging of orthotopic xenografts. Green circles point to the tumor size