



绿色荧光裸鼠的建立和验证

闫 寒, 贺晓玉, 秦 超, 李小颖, 高 虹

(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 建立系统性表达绿色荧光蛋白的裸鼠, 接种人源肺癌细胞验证该模型是否具有免疫缺陷性, 并观察双色荧光的成像效果。**方法** 利用系统性表达绿色荧光蛋白的 C57BL/6J 小鼠与 BALB/C 裸小鼠多代杂交和互交, 建立稳定表达绿色荧光蛋白的裸鼠。大体解剖观察胸腺生长情况, 整体和器官荧光成像验证绿色荧光蛋白的表达情况。以 2×10^6 /只的剂量对其皮下接种表达红色荧光蛋白的人类 A549 肺癌细胞 (RFP-A549), 通过观测肿瘤生长来验证模型的免疫缺陷性。同时, 利用红色荧光标记的肿瘤和绿色宿主鼠, 对双色的整体成像效果进行观测。**结果** 构建出系统性表达绿色荧光蛋白的裸鼠, 大体解剖可见胸腺缺失。在激发光的激发下, 绿色荧光裸鼠全身发出清晰的绿色荧光, 脑、心脏、肺脏、肝脏、肾脏, 肠胃及胰腺等主要器官可见明显绿色荧光。接种 RFP-A549 细胞后, 成瘤率达到 100%, 整体动物荧光成像表现出清晰的双色。**结论** 本研究构建出的绿色荧光裸鼠, 动物整体可以清晰地表达绿色荧光并具有免疫缺陷性

【关键词】 绿色荧光裸鼠; RFP-A549 细胞; 双色荧光成像

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)06-0062-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.06.014

Establish and Verification of Transgenic EGFP Nude Mouse

YAN Han, HE Xiao-yu, HAN Rui-hong, QING Chao, LI Xiao-Ying, GAO Hong

(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; Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To develop a transgenic GFP nude mouse model, human lung carcinoma cells were implanted to test and verify the Immunodeficiency of the model, then observing the result of Dual-color fluorescence imaging. **Method** The GFP nude mouse was obtained by crossing BALB/c male nude mice with the transgenic EGFP female C57/B6 mouse. We observe the Thymus through Gross Anatomy, test GFP expression Through Whole-Body and Major Organs Fluorescence Imaging. Six-week-old nude EGFP mouse was injected RFP-expressing Human A549 lung carcinoma cells (RFP-A549) subcutaneously with a single dose of 2×10^6 , test and verify the Immunodeficiency of EGFP-expressing nude mice through The development of tumor. Meanwhile, a GFP mouse-RFP tumor model was established to evaluate the Dual-color fluorescence imaging. **Result** Developed EGFP-expressing nude mice, obvious fluorescence can be observed in whole-body and major organs include brain, heart, lungs, liver, kidney, intestines, stomach and pancreas. After implanted RFP-A549 cells subcutaneously, the percentage of tumorigenesis is 90%, fluorescence imaging show dual-color clearly. **Conclusion** Developed a transgenic GFP nude mouse model, the whole-body fluorescence imaging clearly

[基金项目] 重大新药创制科技重大专项课题 (2008ZX09305-001)。

[作者简介] 闫寒 (1984 -), 男, 硕士生, E-mail: yanhan0910@163.com。

[通讯作者] 高虹 (1968 -), 女, 副研究员 E-mail: gaohongdws@yahoo.com.cn。

and have Immunodeficiency.

【Key words】 EGFP nude mouse; RFP-A549 cell; Dual-color fluorescence imaging

系统性表达绿色荧光的小鼠是研究干细胞,肿瘤细胞的工具小鼠^[1]。将该小鼠与 BALB/C 裸小鼠杂交,通过多代筛选建立稳定的系统性表达绿色荧光的裸小鼠,为人源肿瘤模型的建立提供支持^[2]。在该小鼠基础上,初步尝试建立红色荧光标记的人类肺癌细胞 A549 皮下接种模型,对 EGFP 裸鼠模型进行验证。

1 材料和方法

1.1 仪器与设备

透明聚氯乙烯塑料薄膜隔离器, A2 级生物安全柜 (ESCO 新加坡忆思洁净设备有限公司, AC2-4S1), CO₂ 培养箱 (美国 SHELLAB, 2306-2), 倒置显微镜 (上海长方光学仪器有限公司, XSP-17CZ), 高速低温离心机 (美国贝克曼, 64R), 活体荧光影像系统 (日本 Roger 公司)。

1.2 绿色荧光裸鼠的建立

种鼠: 雌性 C57BL/6J-EGFP 转基因小鼠 10 只 (中国医学科学院, 实验动物研究所, SCXK 京 2009-0007), 雄性 BALB/C 裸小鼠 10 只 (中国食品药品鉴定研究所, 实验动物资源中心, SCXK 京 2009-0017), 5~7 周龄, 平均体重 20~25 g (使用许可证号: SYXK (京) 2008-0012)。构建方式 (1) F₀ 代交配方式: 雌性 EGFP-C57BL/6J 转基因小鼠与雄性 BALB/C 裸小鼠交配, 得到的 F₁ 子代均为有毛的小鼠, 保留表达绿色的雌性小鼠, 其余淘汰。(2) F₁ 代交配方式: F₁ 代雌性绿色有毛小鼠与雄性 BALB/C 裸小鼠交配, 得到的 F₂ 子代有四种表型: 无色裸鼠、无色有毛、绿色裸鼠和绿色有毛, 保留雌性绿色有毛的小鼠和雄性绿色裸鼠, 其余淘汰。(3) F₂ 代交配方式: F₂ 代雌性绿色有毛小鼠与 F₂ 代雄性绿色裸鼠兄妹交配, 得到的 F₃ 子代有四种表型: 无色裸鼠、无色有毛、绿色裸鼠和绿色有毛, 保留雌性绿色有毛鼠和雄性绿色裸鼠, 其余淘汰。(4) F₃ 和 F₄ 代重复 F₂ 代交配方式, 在得到的 F₅ 子代中绿色裸鼠和绿色有毛鼠的比例接近 1:1, 保留雌性绿色有毛鼠和雄性绿色裸鼠, 其余淘汰。(5) F₅ 代交配方式: F₅ 代雌性绿色有毛鼠与 F₄ 代雄性绿色裸鼠回交、F₄ 代雌性绿色有毛鼠与 F₅ 代雄性绿色裸鼠回交或 F₅ 代雌性绿色有毛鼠和 F₅ 代雄性绿色裸鼠兄妹交配, 在得到的 F₆ 子代中保留雌性绿色有毛的小鼠和

全部的绿色裸鼠^[3, 4]。

1.3 饲养

动物饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所隔离器中, 温度 24 ± 2℃, 湿度 40~70%, 机械送排风 10~20 次/h, 维持 10/14 昼夜交替, 工作照度 > 200 lx, 噪音 < 60 dB, 自由取食, 自由饮水。裸鼠由于免疫缺陷而体格较弱, 在饲养过程中需要对上述指标严格监控。

1.4 繁育

将用于构建的种鼠按照雌雄 2:1 的比例合笼, 每日检查雌鼠阴栓。将怀孕的雌鼠提出, 单置一笼。约 19~21 d 后, 雌鼠分娩, 记录出生小鼠仔数。在小鼠出生后 10 d 左右, 按照构建计划进行筛选。保留目标小鼠, 将非目标小鼠实施安乐死。21 d 后, 将小鼠离乳, 单笼饲养。

1.5 鉴定和筛选

孕鼠生产后, 利用无鼻毛或有少量卷曲鼻毛的特征来辨认新生仔鼠是否为裸鼠^[5]; 利用肛门与生殖器之间的距离辨认新生仔鼠的性别; 在小鼠出生后 10 d 左右可肉眼鉴定动物是否携带绿色荧光基因。并针对繁殖方式, 不需要的小鼠立即淘汰, 从而确保母鼠对目标小鼠的哺育, 保证动物哺乳期的营养。在离乳后进行活体成像, 明显具有绿色荧光的动物能用于下一代繁育。

1.6 细胞培养

将红色荧光蛋白标记的人肺癌 A549 细胞 (RFP-A549, 本所遗传中心赠送) 用含 10% 胎牛血清及双抗 (青霉素 100 IU/mL, 链霉素 100 IU/mL) 的 DMEM 完全培养液中培养, 置于 37℃, 5% CO₂ 混合气体孵箱中培养, 每 1~2 d 换液, 每 3 d 传代一次^[6]。

1.7 细胞接种

取对数生长期的细胞, 用 0.25% 胰酶消化。消化前 2 h 使用新鲜培养液换液 1 次, 消化后再用新鲜培养液洗 1 次。收集细胞, 离心去上清, 用无菌生理盐水洗涤两次, 并进行细胞计数, 调整活细胞浓度为 1 × 10⁷/mL, 立即对 F₆ 代 10 只六周龄的 EGFP 裸鼠进行皮下接种。接种前先对小鼠腋下皮肤进行酒精消毒, 以 1 mL 注射器将 200 μL 细胞悬液注入小鼠腋下, 针头稍停后拔针^[7]。

1.8 荧光成像

出生后 21 d 小鼠以 0.18 mL/10g 剂量腹腔注

射三溴乙醇,麻醉后进行整体荧光成像;在小鼠解剖后,取主要的脏器进行荧光成像;在接种 RFP-A549 细胞后 28 d,选取瘤体成长良好的动物分别在 GFP 模式、RFP 模式和 Merge 模式下荧光成像。

2 结果

2.1 绿色荧光裸鼠的建立

绿色荧光裸鼠生长健康,发育良好,在出生后 10 d 左右,裸鼠皮肤出现肉眼可见的绿色。大体解剖发现 EGFP 裸鼠表现出胸腺缺失,且胰腺表现出肉眼可见的绿色。在活体荧光成像中,相对于 EGFP-C57BL/6J 小鼠,EGFP 转基因裸鼠全身发出更均匀更明显的绿色荧光(封 3 图 1)。在小鼠解剖后,收集包括脑,心脏,肺脏,肝脏,肠胃及胰腺等主要器官,激发光照射后均发出了明显的绿色荧光(封 3 图 2)。

2.2 皮下移植瘤的成像

动物皮下腋下接种 RFP-A549 细胞后成瘤率为 100%,在接种 7 d 后,接种部位的圆形小皮丘开始消退,接种 14 d 后,移植成功的接种部位可见圆形光滑的实性瘤体,其形状逐渐呈现多样性。对接种后 28 d 的小鼠进行活体荧光成像,观测到清晰的双色荧光信号(彩插 4 图 3)。

3 讨论

绿色荧光蛋白具有荧光稳定,检测方便,对活细胞无伤害等优点,已被作为一种标记基因应用到生物研究的各个领域^[8]。系统性表达绿色荧光蛋白的转基因小鼠,可实现绿色荧光蛋白在全身各个组织器官中表达,尤其在胰腺、心脏、小肠、外周血细胞和脑组织等器官组织中表达量较高^[1]。由于该模型是以 C57BL/6J 为基础建立起来的,免疫排斥限制了它在更多领域的应用,并且在实际应用中动物的毛发对荧光有一定的遮掩现象。

本实验在 C57BL/6J-EGFP 转基因小鼠的基础上,通过与 BALB/C 裸小鼠多代的杂交和回交,成功的建立了系统性表达绿色荧光蛋白的转基因裸鼠。因为裸鼠缺乏 T 细胞,易受细菌、病毒和霉菌感染的损害,该模型在饲养和繁育中的环境条件必须严格的控制。同时,相对于绿色荧光转基因裸鼠,不表达绿色荧光的小鼠和免疫正常的非裸鼠在同一窝仔中具有明显的生长优势。因此,对小鼠的表型应尽早鉴定,对非构建需要的小鼠尽早给予安乐处死,来减少构建需要的小鼠在早期生长发育过程中所面临的竞争压力。

对该模型的大体解剖可见胸腺的缺失,并且在胰腺呈现肉眼可见的绿色。给予该模型 50 μ s 的激发光照射,即可在全身发出明亮的绿色荧光。同时,对器官的荧光成像表明,相同于 C57BL/6J-EGFP 转基因小鼠,绿色荧光蛋白在该模型的全身各个主要器官中表达。在该模型的基础上,我们将 RFP-A549 细胞皮下接种于绿色荧光转基因裸鼠,通过肿瘤的生长情况对裸鼠的免疫缺陷性进行验证,并利用双色荧光成像区分癌细胞和宿主动物。

本实验建立的绿色荧光转基因裸小鼠,拥有免疫缺陷性并系统性表达绿色荧光蛋白。由于没有毛发的遮掩,在整体荧光成像中可得到更清晰的图像。利用其免疫缺陷性,可以更广泛的应用于人源的肺癌模型,构建更清晰的活体双色成像模型,为进一步研究肿瘤细胞与宿主细胞相互作用提供了有力的工具动物和分子影像学技术手段,是活体荧光影像研究的重要实验动物模型^[10]。

参考文献:

- [1] 冯娟,高蓓,全雄志等. 红色荧光和绿色荧光转基因小鼠模型的建立[J]. 中国实验动物学报. 2007, 15(4): 267-270.
- [2] Yang M., Li L., Jiang P. et al. Dual-color fluorescence imaging distinguishes tumor cells from induced host angiogenic vessels and stromal cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003, 100(24): 14259-14262.
- [3] Yang M., Reynoso J., Bouvet M. et al. A transgenic red fluorescent protein-expressing nude mouse for color-coded imaging of the tumor microenvironment[J]. J Cell Biochem. 2009, 106(2): 279-284.
- [4] Yang M., Reynoso J., Jiang P. et al. Transgenic nude mouse with ubiquitous green fluorescent protein expression as a host for human tumors[J]. Cancer Res. 2004, 64(23): 8651-8656.
- [5] 吴芳洁,杨文祥,骆伟等. BALB/c-nu 裸小鼠繁殖中杂合仔鼠剔除时间对纯合裸鼠生长发育的影响[J]. 中国实验动物学报. 2010, 18(2): 172-175.
- [6] Zhang HL., Zhang ZX., Xu YJ. [Ciglitazone inhibits growth of lung cancer cells A549 in vitro and in vivo; an experimental study][J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 2004, 26(9): 531-534.
- [7] Li Z., Xu X., Huang Y. et al. Swainsonine Activates Mitochondria-mediated Apoptotic Pathway in Human Lung Cancer A549 Cells and Retards the Growth of Lung Cancer Xenografts[J]. Int J Biol Sci. 2012, 8(3): 394-405.
- [8] Chalfie M. GFP: lighting up life (Nobel Lecture)[J]. Angew Chem Int Ed Engl. 2009, 48(31): 5603-5611.
- [9] 吴文青,张晓春,张玉珍等. 裸小鼠肺癌模型的建立[J]. 江西医学院学报. 1999, 39(3): 1-3.
- [10] 高蓓,刘学丽,冯娟等. 荧光标记技术在肿瘤模型研究中的应用[J]. 中国比较医学杂志. 2008, 18(5): 59-61.

[修回日期]2012-04-20