

GFP/Luc 双标食管癌细胞动物模型建立及其活体成像观察

柏文^{1,2}, 彭晓清¹, 王佩文², 鞠前前¹, 史辉³, 蒋茂荣^{1*}

(南通大学 1. 实验动物中心; 2. 医学院; 3. 附属医院心胸外科, 江苏 南通 226001)

【摘要】 目的 建立绿色荧光蛋白 (GFP)/荧光素酶 (Luc) 双标的人食管癌 ECA109 细胞系 (ECA109-Luc-GFP), 采用一种非侵入性的生物活体成像方法监测食管癌裸鼠肿瘤模型。**方法** MTT、流式细胞仪、划痕实验分析法检测 ECA109-Luc-GFP 细胞系与正常 ECA109 细胞的生物学特性差异。利用活体成像系统示踪肿瘤。**结果** 与正常 ECA109 相比, ECA109-Luc-GFP 细胞在细胞活力、增殖和迁移能力方面差异均无显著性 ($P > 0.05$)。利用小动物活体成像实验技术观察了肿瘤生长、转移等生物学特性。**结论** 成功构建了 GFP/Luc 双标的人食管癌 ECA109 细胞系 (ECA109-Luc-GFP), 应用小动物活体成像应用技术并活体观察食管癌动物模型的生长、转移。

【关键词】 荧光素酶; 食管癌; 移植瘤; 肿瘤小鼠模型; 活体成像

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-00089-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.015

Establishment of luciferase and green fluorescent protein-labeled esophageal cancer cells for application in a mouse model and *in vivo* imaging

BAI Wen^{1,2}, PENG Xiaqing¹, WANG Peiwen², JU qianqian¹, SHI Hui³, JIANG Maorong^{1*}

(1. Laboratory Animal Center; 2. Medical School; 3. Department of Thoracic Surgery of Affiliated Hospital, Nantong University, Nantong 226001, China)

【Abstract】 Objective To establish a green fluorescent protein (GFP)/firefly luciferase (Luc) double-labeled ECA109 human esophageal cancer cells (ECA109-Luc-GFP) and apply them to a mouse model of esophageal cancer for non-invasive bioimaging. **Methods** MTT, flow cytometry (FCM), and wound healing assays were used to analyze biological differences between ECA109-Luc-GFP cells and parental ECA109 cells. Esophageal cancer xenografts were established by subcutaneous or tail vein injections of ECA109-Luc-GFP cells into nude mice. An *in vivo* imaging system was used to observe the growth of xenografts. **Results** MTT, FCM, and wound healing assays showed no differences between ECA109-Luc-GFP and parental cells in terms of cell viability, proliferation, and metastasis ($P > 0.05$). The growth and metastasis of xenografts established by ECA109-Luc-GFP cells were observed using the *in vivo* imaging system. **Conclusions** A GFP/Luc double-labeled human esophageal cancer cell line is established, and the growth and metastasis of xenografts can be observed by an *in vivo* imaging system. This study provides the experimental basis for an esophageal cancer mouse model and clinical study.

【Keywords】 firefly luciferase; esophageal cancer; xenograft; tumor mouse model; *in vivo* imaging

【基金项目】 国家自然科学基金(81101159); 江苏省自然科学基金(BK20151268)。

【作者简介】 柏文(1996—), 男, 本科, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: 731608949@qq.com

【通信作者】 蒋茂荣(1977—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: jiangmr@ntu.edu.cn

中国是食管癌的高发地区,发病率位居世界第一。随着以手术切除为主的系列治疗的开展,食管癌的控制率有了显著提高,但是食管癌的预后仍然很差。动物肿瘤模型是介于体外细胞实验和临床试验之间的重要环节,弥补了实验室与临床的差距。其中,利用免疫缺陷动物建立皮下、原位和转移肿瘤模型是阐明食管癌的分子机制以及抗癌药物开发的重要工具。然而,传统的动物实验研究无法实时监测肿瘤的生长状况和治疗效果,特别是对于从外部看不到的肿瘤。

活体发光成像技术是非侵入性监测体内肿瘤生长的一种方法,实时连续动态监测体内的各种生物学过程,可以直接在活体动物体内观察肿瘤的发生、发展和转移等一系列生物学特性变化,以及抗肿瘤药物在动物体内的分布、代谢及疗效。主要采用生物发光和荧光发光两种技术。生物发光是将编码萤火虫荧光素酶(luciferase, Luc)基因标记的肿瘤细胞移植到相应动物体内,并将酶底物注入动物体内。借助小动物活体成像系统,研究人员可以观测活体动物体内肿瘤的生长及转移等生物学过程^[1]。由于硬件的进步,尤其是高灵敏冷却 CCD 相机,可以灵敏地检测活体肿瘤模型动物体内微小病灶的生物发光,保证动物的安全和测量结果的准确可靠,使得该技术成为临床前肿瘤学研究极有价值的工具^[2]。

本研究采用慢病毒转染方法,构建了稳定表达绿色荧光蛋白(GFP)和 Luc 的人食管癌细胞系(ECA109-Luc-GFP),并分析比较该细胞与正常 ECA109 细胞生物学特性的差异。通过小动物活体成像系统观察了利用该细胞建立的食管癌动物模型的生长、转移,为肿瘤动物模型的推广应用和临床食管癌防治研究提供了实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 人食管癌细胞系

人食管癌细胞系 ECA109,购自中国科学院细胞库。

1.1.2 实验动物

5 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠 10 只,体重 18~22 g,购自中国科学院上海实验动物中心(SLACCAS)[SCXK(沪)2017-0005]。实验和饲养于南通大学实验动物中心 SPF 屏障环境内

[SYXK(苏)2017-0046],实验和饲养条件严格遵守标准化操作规程的规范要求(南通大学实验动物使用与管理委员会批准号:20170303-004)。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.3 质粒构建、质粒提取和细胞转染相关试剂

重组慢病毒载体 pCDH-CMV-*fluc*-EF1 α -CopGFP 由江苏大学于峰惠赠。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基、胎牛血清及 0.25% 胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司;DH5 α 感受态细胞、质粒提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司;DNA 电泳标记物(Marker)购自日本 Takara 公司;Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;聚凝胺(polybrene)和 MTT 购自美国 Sigma 公司;Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒和碘化丙啶(PI)均购自上海碧云天生物技术有限公司;D-荧光素(D-Luciferin)购自上海翊圣生物科技有限公司;复合麻醉剂(10 mg/kg 甲苯噻嗪,95 mg/kg 氯胺酮,0.7 mg/kg 乙酰丙嗪)。小动物活体成像系统(IVIS Lumina XR Series III)购自美国珀金埃尔默(PerkinElmer)公司;酶标仪(ELX-800)购自美国 Bio-Tek 公司;倒置荧光显微镜(Eclipse TS100)购自日本尼康公司。

1.3 实验方法

1.3.1 GFP/Luc 双标的人食管癌 ECA109 细胞系(ECA109-Luc-GFP)的建立

载体构建和慢病毒包装:重组慢病毒载体 pCDH-CMV-*fluc*-EF1 α -CopGFP 转化 DH5 α 感受态细胞,根据试剂盒说明书,提取重组 DNA。将 293T 细胞提前一天接种于 6 孔板的培养孔中,将慢病毒载体 pCDH-CMV-*fluc*-EF1 α -CopGFP、pMD2G 和 pSPAX2 与 Lipofectamine2000 脂质体混合,室温静置 20 min,加入培养基中,6 h 后更换新鲜培养基,继续培养。

慢病毒感染:转染 4 d 后,收集细胞培养上清,并进行病毒滴度测定。将正常 ECA109 接种于 6 孔板中,第二天每孔加入 6×10^6 单位病毒颗粒。病毒感染后 48 h,荧光倒置显微镜下直接观察各孔中 GFP 的表达。

活体成像系统体外检测 Luc 的表达:稳定转染细胞(ECA109-Luc-GFP)培养至对数生长期,直接在荧光显微镜下进行观察和检测。同时胰酶消化计数,每孔 2×10^4 个 ECA109-*fluc*-GFP 细胞和正常 ECA109 细胞接种于 96 孔板,正常 ECA109 细胞作

为对照,每孔加入终浓度 150 $\mu\text{g/mL}$ 的荧光素酶底物(D-荧光素),2~3 min 后,置于活体成像系统内成像,检测细胞在体外的 Luc 的表达情况。

1.3.2 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞生物学特性的比较

MTT 分析法检测两种细胞活力的差异:每孔 1×10^4 个 ECA109-Luc-GFP 细胞和正常 ECA109 细胞接种于 96 孔板,置于 5% CO_2 培养箱孵育 48 h,弃上清液,每孔加入 MTT(终浓度 5 mg/mL)10 μL ,置于 5% CO_2 培养箱继续孵育 4 h 后,每孔加入 DMSO 100 μL 。酶标仪(吸收波长 570 nm)上检测各孔 OD 值。实验重复 3 次。

流式细胞仪分析法检测两种细胞增殖和凋亡的差异:每孔 5×10^5 个 ECA109-Luc-GFP 细胞和正常 ECA109 细胞接种于 6 孔板,置于 5% CO_2 培养箱孵育 48 h 后。胰酶消化细胞,并用 PBS 洗两遍,加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,室温避光放置 20 min,用流式细胞仪进行细胞凋亡检测。同样的方法,只用 10 μL PI 染色,进行细胞周期分析。

划痕实验检测两种细胞迁移能力的差异:每孔 1×10^5 个 ECA109-Luc-GFP 细胞和正常 ECA109 细胞接种于 24 孔板,置于 5% CO_2 培养箱培养至融合度达 90%,用 100 μL 移液器枪头在培养孔中央划一条直线,继续培养 48 h 后,置于倒置显微镜下观察拍照。实验重复三次。

1.3.3 肿瘤模型的构建及活体成像观察

食管癌皮下移植瘤构建和活体成像观察:消化 ECA109-Luc-GFP 细胞,计数,用无菌 PBS 悬浮,制成单细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。每只裸鼠右侧腋背部皮下接种 0.2 mL 细胞(约 2×10^6)。待皮下移植瘤体积达到约 100 mm^3 时,每只裸鼠经腹腔注射复合麻醉剂麻醉后,再按照 150 mg/kg 的 D-荧光素/体重浓度进行腹腔注射。10 min 后,放入活体成像仪暗箱内观察。

食管癌转移瘤构建和活体成像观察:消化 ECA109-Luc-GFP 细胞,计数,用无菌 PBS 悬浮,制成单细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。每只裸鼠尾静脉接种 0.2 mL 细胞(约 2×10^6)。接种 10 d 后,每只裸鼠经腹腔注射复合麻醉剂麻醉后,再按照 150 mg/kg 的 D-荧光素/体重浓度进行腹腔注射。10 min 后,放入活体成像仪暗箱内观察。

1.4 统计学方法

实验结果测量均重复三次,SPSS 17.0 统计学

软件进行数据分析,实验结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, t 检验进行差异显著性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 GFP/Luc 双标的人食管癌 ECA109 细胞系(ECA109-Luc-GFP)的建立

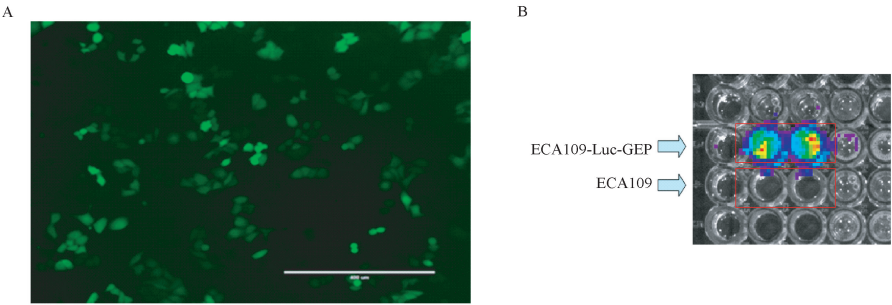
利用编码 GFP 和 Luc 慢病毒感染人食管癌细胞 ECA109,来建立 GFP/Luc 双标的 ECA109 细胞系(ECA109-Luc-GFP)。GFP/Luc 双标的 ECA109-Luc-GFP 细胞生长较快,倒置荧光显微镜下观察可见细胞内绿色荧光信号较强,绿色荧光均匀分布于整个细胞内,GFP 表达率高于 90%,如图 1A 所示。通过活体成像系统体外检测 ECA109-Luc-GFP 细胞内 Luc 的表达,检测结果显示:ECA109-Luc-GFP 细胞内可观察到明显的 Luc 表达,正常 ECA109 细胞内观察不到 Luc 表达信号,具体如图 1B 所示。

2.2 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞生物学特性的比较

首先通过 MTT 分析法比较 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞活力的差异。统计结果显示:与正常 ECA109 相比,ECA109-Luc-GFP 细胞的细胞活力差异无显著性($P > 0.05$),结果见图 2A。其次通过流式细胞仪分析法比较两种细胞细胞周期和凋亡的差异。细胞周期分析结果显示:ECA109 和 ECA109-Luc-GFP 细胞的 G1 期、S 期和 G2 期所占比例分别约为 39%、48% 和 13%,两者相比差异无显著性($P > 0.05$),结果见图 2B。细胞凋亡分析结果显示:两种细胞的凋亡率均为 4% 左右,两者相比差异无显著性($P > 0.05$),结果见图 2C。最后,通过划痕实验分析两种迁移能力的差异。划伤 48 h 后,分析结果显示:两种细胞的愈合率均为 45% 左右,两者相比差异无显著性($P > 0.05$),结果见图 2D。以上分析结果均显示,GFP/Luc 双标的 ECA109-Luc-GFP 细胞与正常 ECA109 细胞相比,细胞生物学特性无差异,说明 GFP/Luc 双标没有改变 ECA109 细胞的生物学特性。

2.3 肿瘤模型的构建及活体成像观察

食管癌皮下移植瘤构建后活体成像观察结果显示:裸鼠皮下种植 ECA109-Luc-GFP 细胞后,当皮下移植瘤体积达到约 100 mm^3 时,可以明显地观察到强烈荧光,而移植正常 ECA109 细胞的裸鼠未见荧光信号。具体见图 3A。食管癌转移瘤构建

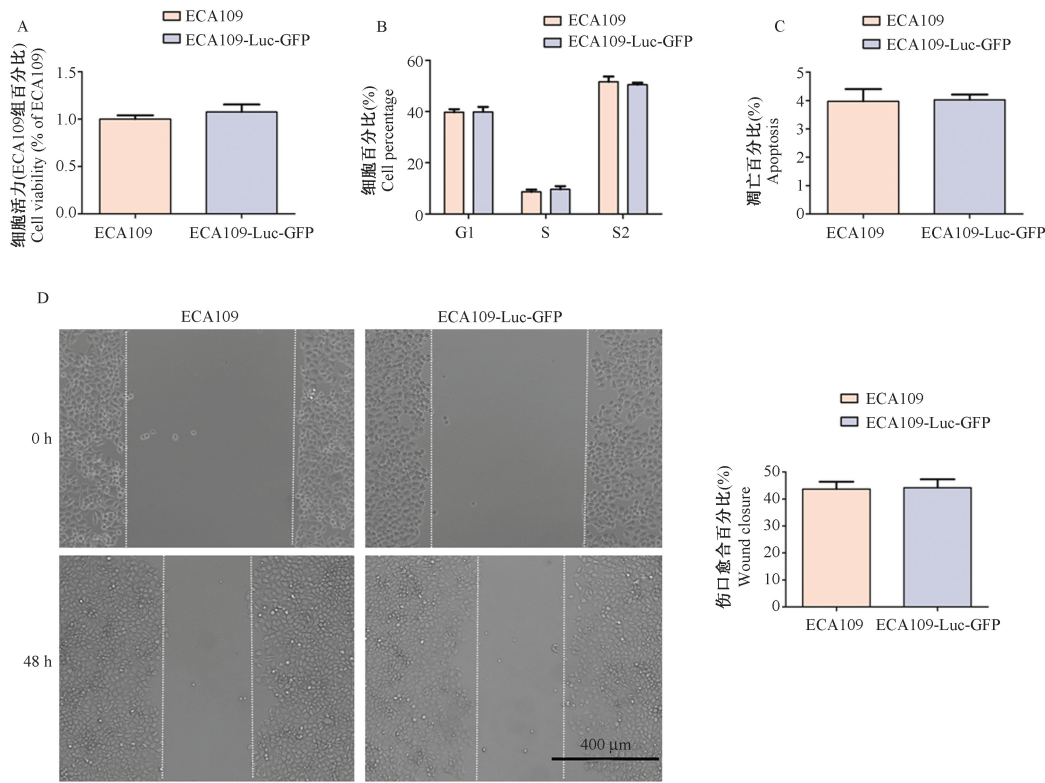


注:A:倒置荧光显微镜下 ECA109-Luc-GFP 细胞观察 GFP 的表达,标尺为 400 μm。B:活体成像系统体外检测 ECA109-Luc-GFP 细胞内 Luc 的表达。

图 1 GFP/Luc 双标的人食管癌 ECA109 细胞系 (ECA109-Luc-GFP) 的建立

Note. A: GFP expression in ECA109-Luc-GFP cells was observed under an inverted fluorescence microscope. Bar = 400 μm. B: Luc expression in ECA109-Luc-GFP cells was observed by *in vivo* imaging.

Figure 1 Establishment of a GFP/Luc double-labeled esophageal cancer cell line (ECA109-Luc-GFP)



注:A:MTT 分析法比较 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞活力的差异。B:流式细胞仪分析法比较 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞周期的差异。C:流式细胞仪分析法比较 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞凋亡的差异。D:划痕实验比较 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞迁移能力的差异。标尺为 400 μm。

图 2 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞生物学特性的比较

Note. A: MTT assay was used to analyze the difference in cell viability of ECA109-Luc-GFP and parental cells. B: Flow cytometry was used to analyze the difference in the cell cycle of ECA109-Luc-GFP and parental cells. C: Flow cytometry was used to analyze the difference in apoptosis of ECA109-Luc-GFP and parental cells. D: Wound healing assay was used to analyze ECA109-Luc-GFP and parental cells. Bar = 400 μm.

Figure 2 Comparison of the biological characteristics of ECA109-Luc-GFP and parental cells

后活体成像观察结果显示:裸鼠经尾静脉注射 ECA109-Luc-GFP 细胞后 10 d,可以观察到小鼠肺部出现强烈荧光信号,而注射正常 ECA109 细胞的裸鼠未观察到荧光信号,结果见图 3B。结果提示,

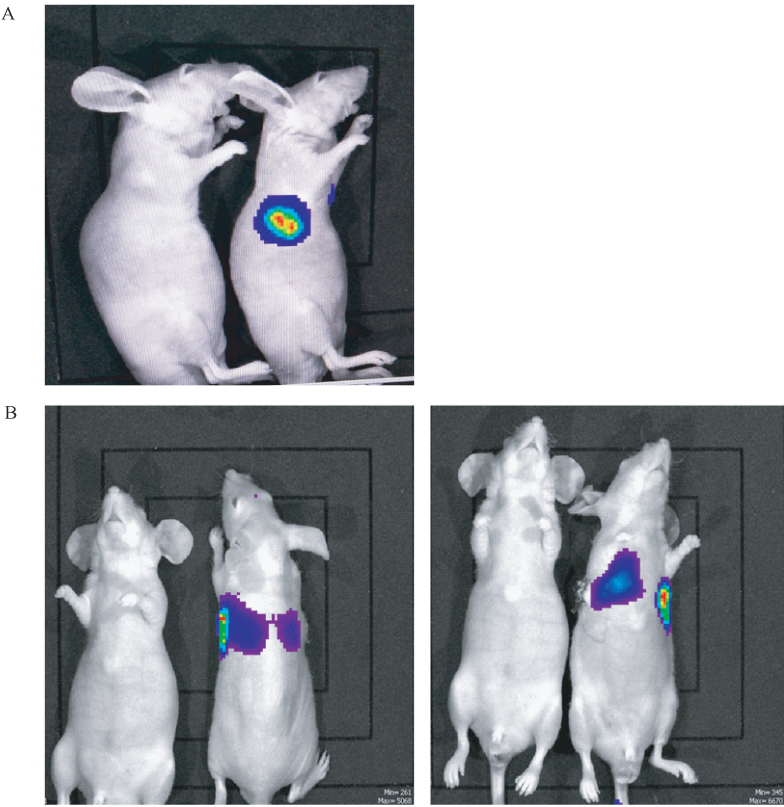
食管癌细胞经尾静脉注射后,主要转移集中生长于小鼠肺部。

3 讨论

我们通过慢病毒转导构建了稳定表达 Luc 和 GFP 的人食管癌 ECA109 细胞系,用于皮下肿瘤模型以及肿瘤转移模型的构建。实际上,原位肿瘤模型与人类肿瘤微环境相近,与人类疾病进展密切相关,是最理想的动物模型。但由于小鼠食管的解剖位置以及建立原位模型的技术难度,往往难以实现^[3]。绿色荧光蛋白基因(GFP)和荧光素酶基因(Luc)作为常用的报告基因(即其表达产物非常容易鉴定),可在异源组织中表达并发光,是理想的标记物^[4]。由于自身发光特性的缺陷,其应用往往具有一定的局限性。其中,GFP 单标需要光的激发才能发出波长较长的可见光,并且由于生物体内发光

的干扰,不能保证特异性,仅可用于浅表组织的检测。同时,除了荧光素酶及其底物之外,还需要氧和 ATP,因此仅能标记代谢活性肿瘤细胞。通过将 GFP 标记技术与 Luc 标记技术相结合,一定程度上弥补了其局限性。

在本研究中,我们用携带 Luc-GFP 的慢病毒感染人食管癌细胞,48 h 后观察 GFP 表达情况,GFP 感染效率可达 80% 以上,我们挑选表达 GFP 的单克隆株进行培养增殖,并通过体外活体成像实验检测到生物发光信号,证明用慢病毒转染方法,能够构建稳定表达 GFP 和 Luc 的人食管癌细胞系(ECA109-Luc-GFP)。实验所采取的 ECA109-Luc-GFP 细胞均为感染后传 5 代以上的细胞,GFP/Luc 双标的 ECA109-Luc-GFP 细胞系非常稳定,并且显微镜下观察传代后 2 种发光信号的强度没有发生变化。



注:A:食管癌皮下移植瘤构建后活体成像观察结果。B:食管癌转移瘤构建后活体成像观察结果。左侧裸鼠为注射正常 ECA109 细胞,右侧裸鼠为注射 ECA109-Luc-GFP 细胞。

图3 肿瘤模型的构建及活体成像观察

Note. A: Observation by *in vivo* imaging of esophageal cancer xenografts established by subcutaneous injection. B: Observation by *in vivo* imaging of esophageal cancer xenografts established by tail vein injection. The left nude mouse was injected with parental ECA109 cells. The right nude mouse was injected with ECA109-Luc-GFP cells.

Figure 3 Cancer xenograft establishment and observation by *in vivo* imaging

本研究中,活体成像技术准确直观的反映了肿瘤的生长和转移,为肿瘤负荷的测量提供了快速而有效的方法。在体内食管癌模型研究中,活体成像与传统方法相比具有明显优势,首先,作为一种非侵入性成像技术,活体成像技术可以采集同一动物的动态数据,减少了实验动物数量。其次,三只甚至五只小鼠可以同时成像。但是在整个身体仅出现微弱荧光信号时,为了提高灵敏度,每次只能成像一个或两个动物,并且将动物放置在靠近相机的位置^[5]。第三,与其他检测手段相比,提供了治疗效果的相对评估,因为它仅代表代谢活性肿瘤细胞,而不是肿瘤体积^[6]。第四,可以作为肿瘤细胞是否成功植入的指标,从而排除了可能由于异种移植不成功所导致药物的不良反应。

活体成像技术为肿瘤的早期发展,治疗反应,肿瘤复发,转移性肿瘤和自发性肿瘤等动态生物学过程提供了一种良好的研究平台,并且是监测体内抗肿瘤药物治疗效果的理想方法。活体成像技术应用潜力很大,本实验中所提供的方法,有待进一步完善。活体成像技术仅在二维平面上以表面加权的方式收集肿瘤信号,这意味着靠近表面的较弱的光源与深层组织中较强的光源将具有相同的光强度^[7]。因此,可以尝试配合生物发光断层扫描(BLT),重建三维生物发光分布,监测肿瘤进展期间的立体形态和发光信号变化^[8]。由于生物组织具有强散射和低吸收的特性,从而表现出各种光学行为,包括吸收、散射、反射和传播等,导致图像分辨率较低。通过改进现有的成像系统和降噪方法可以帮助获得更高分辨率的图像^[9]。底物荧光素可通过腹腔、静脉或皮下注射。每一种方法都有其优点和缺点,应针对不同情况,采用不同的注射方法^[10]。静脉注射可以使生物发光快速产生,因为底物能立即达到最大的血液浓度。然而,在处理动物时,静脉注射在技术上具有一定难度。腹腔内注射操作简单,在大多数肿瘤模型中,在 5~10 min 内可以获得生物发光峰值。皮下注射也可用于全身传递,但生物发光缓慢。Genevois 等人提出了 iRFP/Luc 双标技术用于活体成像监测,同样结合了两报告基因的优势,扩大了活体成像的应用范围^[11]。

本文将 GFP/Luc 双标技术与活体成像技术相结合,对食管癌裸鼠肿瘤模型进行活体的动态示踪,清晰了解食管癌的生物行为及特性,快速准确、简便灵敏,为抗食管癌药物研发、基因治疗效果验证提供了新思路。

参考文献:

- [1] O'Neill K, Lyons SK, Gallagher WM, et al. Bioluminescent imaging: a critical tool in pre-clinical oncology research [J]. J Pathol, 2010, 220(3): 317-327.
- [2] Ando Y, Niwa K, Yamada N, et al. Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission [J]. Nat Photonics, 2007, 2(1): 44-47.
- [3] Tetreault MP. Esophageal cancer: insights from mouse models [J]. Cancer Growth Metastasis, 2015, 8(Suppl 1): 37-46.
- [4] Ruijter NCA, Verhees J, Leeuwen W, et al. Evaluation and comparison of the GUS, LUC and GFP reporter system for gene expression studies in plants [J]. Plant Biology, 2003, 5: 103-115.
- [5] Saha D, Dunn H, Zhou H, et al. *In vivo* bioluminescence imaging of tumor hypoxia dynamics of breast cancer brain metastasis in a mouse model [J]. J Vis Exp, 2011, 3(56): 3175.
- [6] Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, et al. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis [J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(8): 733-744.
- [7] Doubrovin M, Serganova I, Mayer-Kuckuk P, et al. Multimodality *in vivo* molecular-genetic imaging [J]. Bioconjug Chem, 2004, 15(6): 1376-1388.
- [8] Luker GD, Luker KE. Optical imaging: current applications and future directions [J]. J Nucl Med, 2008, 49(1): 1-4.
- [9] Chen ZY, Wang YX, Yang F, et al. New researches and application progress of commonly used optical molecular imaging technology [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 429198.
- [10] Tseng JC, Kung AL. Quantitative bioluminescence imaging of mouse tumor models [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2015, 2015(1): pdb.prot078261.
- [11] Genevois C, Loiseau H, Couillaud F. *In vivo* follow-up of brain tumor growth via bioluminescence imaging and fluorescence tomography [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(11): E1815.

[收稿日期] 2018-06-11