

赵源,张超超,路璐,等. 生物发光人肝癌裸小鼠原位癌模型的构建 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 68-74.
Zhao Y, Zhang CC, Lu L, et al. Establishment of an nude mouse orthotopic tumor model of human hepatocellular carcinoma with luciferase expression [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(9): 68-74.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.09.010

生物发光人肝癌裸小鼠原位癌模型的构建

赵源¹,张超超¹,路璐²,吴文斌¹,朱贤丹¹,樊海艇¹,丁越^{2*}

(1.上海中医药大学实验动物中心,上海 201315; 2.上海中医药大学教学实验中心,上海 201315)

【摘要】 目的 选用稳定表达荧光素酶报告基因的人源性肝癌细胞株(HCCLM3-Luc),构建人肝癌细胞株原位癌荷瘤裸鼠动物模型。方法 活体成像仪定量分析不同细胞数量 HCCLM3-Luc 的荧光强度表达情况,并检测各细胞数量的荧光素酶活性,探索 HCCLM3-Luc 荧光素酶产生的光子量与肿瘤细胞数量之间的线性相关性。采用肝叶原位接种 HCCLM3-Luc 瘤块组织和尾静脉注射 HCCLM3-Luc 细胞悬液,分别构建人肝癌裸小鼠原位癌模型;比较两种方法构建人肝癌细胞株原位癌裸鼠模型的可行性,并优化模型构建中的关键因素。结果 HCCLM3-Luc 细胞数量的成正相关,(相关系数 $R^2 = 0.9989$,直线方程式: $Y = 1155.8X + 1 \times 10^6$),平均 ROI 值约为每个细胞 140 光子/s。采用肝叶原位接种组的原位瘤成瘤率[(82.5 ± 7.2)%]明显高于尾静脉注射[(34.1 ± 13.2)%]。结论 本课题构建了生物发光人肝癌细胞株原位癌裸鼠模型,该模型可采用小动物成像仪实时监测肿瘤生长情况。

【关键词】 生物发光;荧光素酶报告基因;HCCLM3-Luc;人肝癌原位癌模型;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019)09-0068-07

Establishment of an nude mouse orthotopic tumor model of human hepatocellular carcinoma with luciferase expression

ZHAO Yuan¹, ZHANG Chaochao¹, LU Lu², WU Wenbin¹, ZHU Xiandan¹, FAN Haiting¹, DING Yue^{2*}

(1. Laboratory Animal Research Center, Shanghai Chinese Medical University, Shanghai 201315, China.

2. Teaching Experiment Center, Shanghai Chinese Medical University, Shanghai 201315)

【Abstract】 Objective A human hepatocellular carcinoma cell line (HCCLM3-Luc) stably expressing a luciferase reporter gene was used to establish an orthotopic mouse model. **Methods** An imaging system for living animals was used to quantitatively analyze the bioluminescence intensity of HCCLM3-Luc cells, which reflects the luciferase activity in cells. Then, the linear correlation between the photon quantity generated by HCCLM3-Luc luciferase and the number of HCCLM3-Luc cells was explored. The nude mouse model of orthotopic human hepatocellular carcinoma was constructed by in situ inoculation of HCCLM3-Luc tumor tissue in the hepatic lobe or injection with HCCLM3-Luc cell suspension through the tail vein. The two methods were evaluated and compared based on the tumor formation rate, the time of formation and the change of tumor shape. **Results** The bioluminescence intensity of the cells was positively correlated with the number of cells (correlation coefficient $R^2 = 0.9989$, linear equation: $Y = 1155.8X + 1 \times 10^6$), and the average ROI value was approximately 140 photons/s per cell. **Conclusions** In this study, an orthotopic hepatocellular carcinoma-bearing mouse model using a bioluminescent human hepatocellular carcinoma cell line was established. The tumor growth was assessed by measuring the bioluminescence in real time using the IVIS Lumina XR Imaging System.

【基金项目】 上海市科委“酶解法制备知母皂苷 AⅢ及其抗肿瘤候选药物研究”(13401900301)。

【作者简介】 赵源(1981—),男,硕士研究生,研究方向:实验动物模型。E-mail: 37477120@qq.com

【通信作者】 丁越(1983—),男,教授,硕士生导师。E-mail: cmx_1@126.com

【Keywords】 bioluminescence; luciferase reporter gene; HCCLM3-Luc; orthotopic tumor model of human hepatocellular carcinoma; nude mouse

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)是全球恶性程度最高的消化系统癌症之一^[1-2],并且临床上手术切除等传统治疗效果差,术后转移及复发率高^[3-4]。国内外研究人员做了许多关于癌症转移及复发的基础性工作,获得了显著的成果,但现在急需一些符合临床研究需求的合格动物肝癌模型,用于抗肿瘤新药的筛选。

常用于癌症研究的实验动物是裸小鼠,因其天然缺乏免疫力,而且该品系动物形态较小,易于饲养及运用小动物成像仪评价。HCCLM3 细胞株是中山医院肝病所运用重复多次肺转移筛选法,从人肝癌 MHCC97H 细胞株裸小鼠皮下接种模型的肺转移灶挑选所得^[5]。肝癌的高死亡率及疗效差的根本原因是肝癌患者五年内易发生转移与复发,基于以上考虑,我们构建一个可定量分析肿瘤转归过程的癌症动物模型,利用该模型筛选具有抗癌活性的中药新药及评价适合的肝癌治疗手段^[6-7]。

荧光素酶基因是一种 ATP 酶的报告基因,其成像原理为荧光素酶(luciferase, Luc)、ATP、荧光底物(D-luciferin)、Mg²⁺与 O₂为底物,在 Mg²⁺催化条件下,转化化学能为光能,并激发的光谱位于 560 nm 之间的可见光,对机体正常细胞无电离辐射作用,正常组织器官的机能不受影响^[8-10]。利用活体成像设备可以定量分析标记细胞在机体体表的表达区域以及产生光子数量。生物发光人肝癌裸小鼠原位癌模型是可用于模拟人类肝癌的生长增殖情况,而且利用小动物活体成像仪可客观地、有效地定量分析动物模型,该模型可用于癌症治疗手段评估、抗癌症复发与转移效果及筛选抗癌中药新药等领域。将在本文中着重研究 HCCLM3-Luc 肝癌裸小鼠原位癌模型的构建与评价。

1 材料和方法

1.1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c-nu 裸小鼠 20 只,6 周龄左右,雄性,体重 18~20 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司[SCXK(沪)2013-0016],饲养于上海中医药大学实验动物中心的 SPF 级屏障系统[SYXK(沪)2014-0008]IVC 笼架内,自由摄取饲料、饮水,饲料由⁶⁰Co 辐射灭菌,垫料、饮水、笼具等均经蒸汽高压灭

菌,环境温度控制在 18℃~25℃,相对湿度 40%~70%。动物购入经适应性饲养 5 d 后开展动物实验,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。实验方案和动物操作均经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准编号:SZY 201803004。

1.1.2 细胞系

稳定表达荧光素酶 Luc 的人高转移肝癌细胞系(HCCLM3-Luc)保存于上海中医药大学教学实验中心附属实验室内液氮罐中。

1.2 主要试剂与仪器

D-荧光素钾盐(英国,Perkin Elmer 公司,批号 K9909PE);胎牛血清(以色列,BioInd 公司,批号:1608795);DMEM 培养液(美国,HyClone 公司,批号:AE26543270);红霉素眼药膏(中国,马应龙药业集团股份有限公司,批号:180202)。快速灭菌器(中国,上海晓航贸易有限公司,型号 FST350);小鼠独立通风系统(意大利,泰尼百斯有限公司,型号 S.P.A);小动物麻醉机(中国,上海乾福生物科技有限公司,型号 MSS-3);高压灭菌器(日本,三洋机电株式会社,型号 HVE 50);冷光源灯(中国,瑞沃德生命科技公司,型号 F-150C);活体动物可见光成像系统(美国,珀金埃尔默股份有限公司,型号 Lumina II Living Image 4.3 型);CO₂ 培养箱(德国,Binder 有限公司,型号:binder cell 150 型);倒置荧光显微镜及荧光成像系统(中国,麦克奥迪(厦门)实业集团,型号:BA400EF-UPR)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞复苏

将存有 HCCLM3-Luc 的冻存管从液氮罐中取出,迅速放入 37℃ 恒温水浴锅中快速解冻,其间用镊子夹住细胞冻存管在温水中轻轻晃动,使冻存管内细胞可均匀受热快速融解。用微量移液枪充分混匀解冻的 HCCLM3-Luc 细胞液,然后抽取 1 mL 细胞液加入预存有 10 mL 室温 PBS 的离心管,再用移液管反复吹打、混匀若干次。用低温离心机以 800 r/min 离心 5 min,弃上清液,再加入 10 mL 室温 PBS,重复三次。用移液枪轻轻悬浮细胞,并加入完全培养液,计数细胞。接种细胞到 50 mL 的培养瓶中,起始密度为每毫升 2×10⁵ 个细胞。

1.3.2 细胞培养

将复苏的细胞悬液接种至含 10% 胎牛血清的

DMEM 细胞培养瓶中,定容至 10 mL,800 r/min 低速离心 5 min,弃上清液,加新鲜的高糖 DMEM 培养液,轻轻吹打多次,重悬细胞液,转移至培养瓶,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中增殖培育。每天在倒置显微镜下观察 HCCLM3-Luc 细胞的形态和生长情况,并根据细胞生长状态进行换液、转瓶扩增。

1.3.3 细胞收集

收集进入对数生长期的 HCCLM3-Luc 细胞,将生长状态好的细胞悬液用 PBS 溶液漂洗 3 次,在倒置显微镜下使用血细胞计数板,调定细胞数量,将 PBS 重悬的细胞悬液暂存于盛有碎冰盒内,争取 30 min 内完成皮下注射及尾静脉注射细胞悬液的实验。

1.3.4 活体成像仪检测细胞荧光素酶表达情况

将传代培养后进入对数生长期的 HCCLM3-Luc 细胞按不同细胞数量 (1×10^5 、 5×10^4 、 2.5×10^4 、 1.25×10^4 、 5×10^3 、 2.5×10^3) 分别置于无菌 96 孔细胞板中,利用小动物活体成像仪测定不同细胞数量 HCCLM3-Luc 细胞的荧光素酶生物发光表达情况,探索细胞数量与荧光素酶生物发光值的线性关系。

1.3.5 HCCLM3-Luc 尾静脉注射构建肝癌原位癌动物模型

选用 6 只裸小鼠,先用医用消毒片轻轻从裸小鼠尾尖部开始擦拭 2 min,扩张尾部血管,助手轻轻压迫裸小鼠尾部双侧静脉,操作人员用 1 mL 胰岛素注射器抽取已重悬 HCCLM3-Luc 细胞悬浮液,距约尾尖 1/3 处进针,根据预实验报道确定注射细胞接种量,以每只 0.2 mL 将 2.5×10^7 个细胞/mL 经尾静脉注入裸小鼠体内。25~35 s 内完毕注射以防止动物发生肺部栓塞死亡。

造模成功后,观察动物的一般生长情况,且记录模型的成瘤时间、成瘤时间、成瘤率、生存期等肿瘤一般生长情况,同时利用小动物成像仪,定期定量分析模型的体表区域的荧光表达情况以及发光强度。

1.3.6 原位癌模型的建立方法

将 HCCLM3-Luc 皮下瘤源供体动物(颈椎脱臼法)安乐死后,切取供体瘤源。瘤块取下后置于 4℃ 生理盐水中轻柔地冲洗三遍去除血渍,同时用眼科剪刀和眼科镊修饰瘤块,将非活体肿瘤组织(外周的皮肤、肌肉、凋亡细胞或结缔组织等)去除,挑选如新鲜鱼肉样、色泽明亮呈半透明样的活性良好瘤块作为移植手术瘤源,将其切成大小 1 mm^3 的瘤

块小块备用,受体动物用小动物呼吸麻醉机麻醉固定于手术操作台上,使用碘伏和 70% 乙醇对上腹部手术区域皮肤进行消毒处理后,在上腹部偏左肝的部位切开长度约 1 cm 的斜切口,将肝左侧叶用无菌棉签拖出腹腔暴露。使用显微剪在肝左叶上做一个十字切开小切口,将供体的瘤块用 5-0 缝合线缝合在肝上,迅速完成十字交叉缝合。用无菌棉棒将肝轻柔推回腹中,使用 4-0 带针缝合线逐层缝合肌层和外皮,最后用红霉素眼药膏对创口进行消炎处理,手术好的裸小鼠放于恒温加热垫上保温,待其完全苏醒后放回 IVC 笼盒内。

1.4 统计学方法

计量资料以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS 21.0 统计软件进行数据处理,采用 *t* 检验进行数据分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

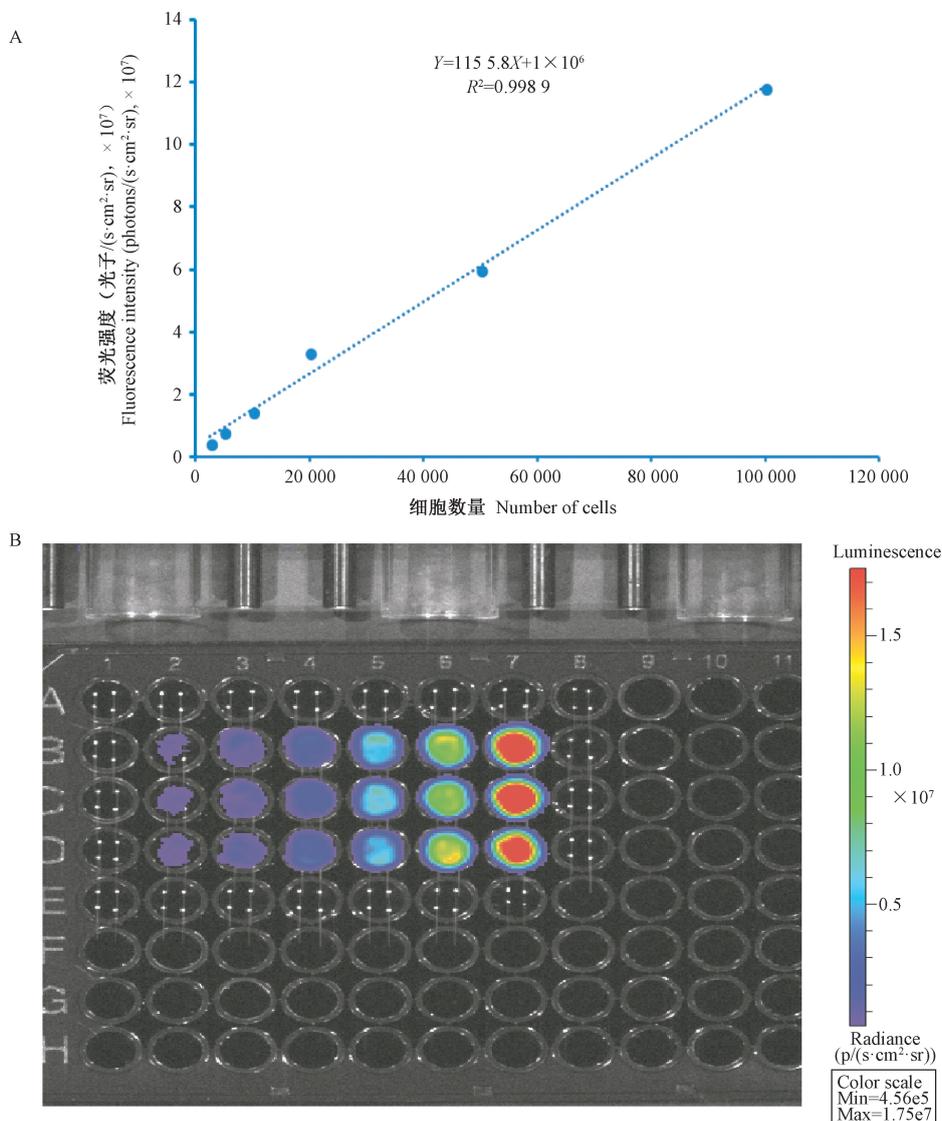
2.1 HCCLM3-Luc 细胞荧光酶表达情况测定

将含有处于对数生长期的 HCCLM3-Luc 细胞的黑色 96 孔板,置于 Lumina II 活体成像暗室内定量分析;在 96 孔细胞板中,检测到含不同细胞数量 HCCLM3-Luc 的细胞孔均发出荧光表达不同强度的光点,说明 HCCLM3 细胞利用病毒转染荧光素酶基因后细胞活力良好,基本保持了 HCCLM3 细胞株的生长情况,并且体外增殖培养后,荧光表达强度稳定,与细胞数量成正比例关系。

用高糖 DMEM 培养基将 HCCLM3-Luc 细胞在黑色的 96 孔板中进行倍比稀释,细胞数从 2500 个/孔至 100 000 个/孔,活体成像前 15 min 加入 15 mg/kg 荧光素底物,然后使用 Living Image 4.2 软件检测各孔的荧光值,并进行数据收集和定量分析。

通过绘制标记荧光素酶报告基因的肿瘤细胞数与生物发光光子量曲线图(图 1A),可得知发光强度与 HCCLM3-Luc 细胞数量有较好的线性关系 ($R^2 = 0.9989$, 直线方程式为 $Y = 1155.8X + 1 \times 10^6$),说明我们可以通过定量分析肿瘤细胞的光子量来推导出活体肿瘤的数量。

此实验最小检测的细胞数量约为 2500 个/孔,平均 ROI 值约为每个细胞 140 光子/s,表明 Luc 荧光基因已稳定转染入 HCCLM3 细胞株,说明了研究者定量分析体表的荧光值可以客观全面地反映机体内活体肿瘤细胞的生长情况(图 1B)。



注:A; HCCLM3-luc 细胞数与生物发光光子量曲线图; B: HCCLM3-luc 细胞体外生物发光成像。由图可见, 细胞数量与生物发光强度有线性关系。

图 1 HCCLM3-luc 生物发光成像

Note. A, Curve of linear correlation between the HCCLM3-luc cell numbers and the fluorescence intensity of bioluminescence photons. B, Bioluminescence imaging of the HCCLM3-Luc cells *in vitro*. As shown in the figure, the bioluminescence intensity of cells was positively correlated with the number of cells.

Figure 1 Bioluminescence imaging of the HCCLM3-Luc cells

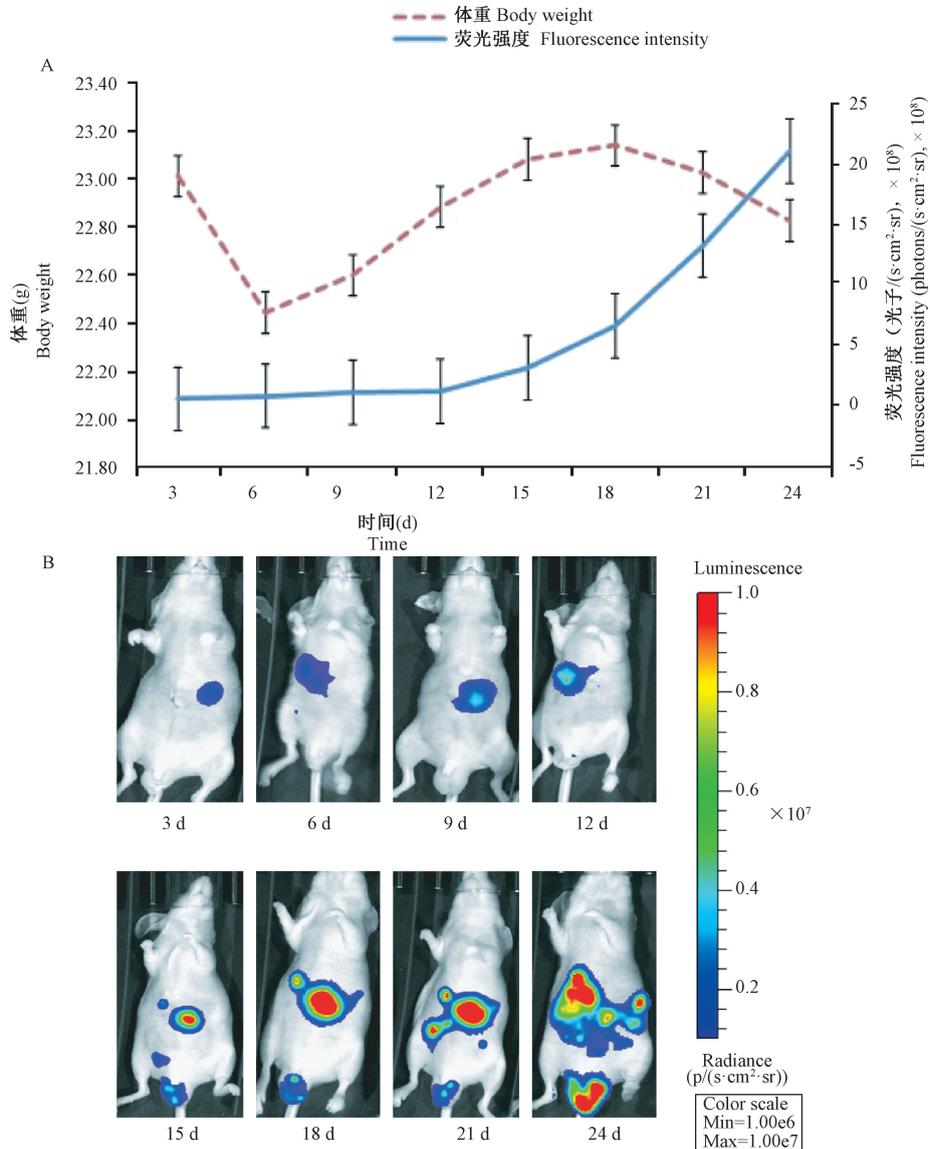
2.2 动态监测接种 1 mm³ 瘤块原位癌模型的一般生长情况

接种 1 mm³ 瘤块经原位接种途径造模, 发现 BALB/c-nu 裸小鼠在第 3 天生物发光成像中, 可观察到裸小鼠腹部肝区域出现一块明显的生物成像光斑点, 接种后 7 d 观察裸小鼠腹部肝区域强发光点逐渐增强, 并且向腹腔转移趋势, 同时我们发现裸鼠的生物发光强度逐渐增强, 并且在接种后 21 d 裸小鼠全腹腔皆出现全身广泛的生物发光成像发

光点, 表示 BALB/c-nu 裸小鼠的原位移植癌模型通过接种瘤块方式可模拟人类肝癌疾病模型的多种症状。如图 2 所示。

2.3 尾静脉注射 HCCLM3-Luc 肝癌原位模型的构建

尾静脉途径造模组的 BALB/C-nu 裸小鼠在第 3 天生物发光成像中, 可观察到裸小鼠体表区域有强烈的荧光表达情况, 主要集中在两肺区域, 并且两肺有两块强烈的发光的点, 右肺光子量表达明显



注:A:HCCLM3-Luc 细胞的肝原位癌接种肿瘤生长曲线;接种后 18 d,肿瘤组织的荧光值加速升高;B: BALB/c-nu 裸鼠原位移植肝癌后肿瘤生长情况的活体成像图;在接种后 18 d,裸鼠的肿瘤组织荧光值加速升高,并出现多处转移灶。

图 2 BALB/c-nu 裸小鼠原位癌模型的生长情况

Note. A, Orthotopic inoculation tumor growth curve of HCCLM3-Luc cells. The bioluminescence intensity of the tumor tissues was significantly increased 18 days after inoculation. B, Bioluminescence imaging of orthotopic inoculation tumor growth. The bioluminescence intensity of tumor tissues of the nude mice was significantly increased and multiple metastases were found in the nude mice in different regions 18 days after inoculation.

Figure 2 Growth conditions of the BALB/c-nu nude mouse model of orthotopic inoculation tumor

地强于左肺,这现象符合肿瘤细胞血行播散的特点,因为肿瘤细胞经尾静脉注射进入动物体内后,经右心房、右心室、抵达肺的微小血管组织内着床,因此,模型动物早期体表两肺区域有强的生物发光表达。

接种后 7 d 观察到裸小鼠肺部强发光点逐渐减

弱,并且有向腋窝,腹股沟部分转移趋势,接种后 15 d 仅出现腹部有明显的生物成像发光点,最后接种后 21 d 裸小鼠皆出现全身广泛的生物发光成像发光点,表示 HCCLM3-Luc 细胞株可能已经全身通过血行,扩散至动物全身,可能出现肝、脾等器官转移(图 3)。

结果显示:通过尾静脉注射肿瘤细胞造模方式的肝癌原位模型成瘤率为 $(35.24 \pm 11.36)\%$ (根据体表区域荧光表达达到 1×10^5 为标准)。造模第 25 天,全部 6 只模型动物安乐死后,解剖取材时在裸鼠肝组织肉眼尚未可见有明显的肝癌癌巢等肝病表现,可见采用尾静脉注射构建肝癌原位癌模型时肿瘤细胞容易发生转移,不只是生成肝原位癌。

3 讨论

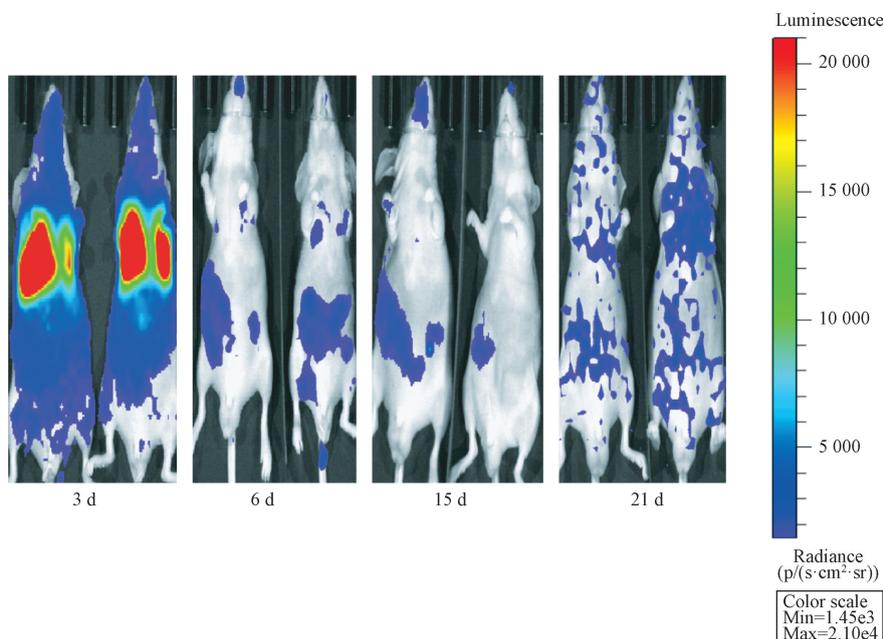
近十年来,分子影像成像技术被广泛运用于肿瘤动物模型研究。人们运用分子影像技术可以直观地、无创性检测动物体内肿瘤转归过程,并且为寻找有效的抗肿瘤新靶点提供新的实验技术方法。

随着高新科技的不断出现,科研人员设想得到一种安全可靠的检验手段,以期可早期诊断体内肿瘤。光学成像具有众多优点^[11]:灵敏度高、实时、非侵入、安全性好以及成像系统费用相对较低,使得光学成像尤为适合小动物肿瘤研究。一般常用的小动物活体成像仪集合了 X 光检测(X-ray inspection)、活体动物荧光成像(fluorescence imaging, FLI)和生物发光成像(bioluminescence imaging, BLI)三大功能模块。荧光技术采用荧光报

告基团标记肿瘤细胞或细菌等研究对象,而生物发光成像是用荧光素酶报告基因对其进行转染^[12]。利用精度灵敏的发光检测仪,可以在活体内直接动态监测细胞活动。同其他类型成像技术比较,生物发光成像以其高灵敏性、时效性高、实验数据直观、非放射性及费用低廉等优点,在短短的几年时间内,迅速地成为生命科学及医学等研究领域的热点技术^[13]。

在本研究中,我们将荧光素酶基因转染人肝癌细胞株 HCCLM3,让其在体外可稳定表达荧光值,同时评价其发光能力。分别采用尾静脉注射细胞悬液和原位癌接种瘤块的方式,构建人肝癌裸小鼠原位癌动物模型,结合生物发光技术,在整体水平上运用 Lumina II 型活体动物可见光成像系统对肿瘤组织的生长进行实时监测,成功地构建了稳定表达荧光素酶报告基因的人肝癌荷瘤裸小鼠模型,可为示踪肿瘤生长和评价中药抗癌活性化合物的治疗效果提供研究基础。

在成功构建的人肝癌裸小鼠原位癌动物模型中,利用 Lumina II 型小动物活体成像仪检测,可观察到肿瘤的实时动态荧光表达情况。而在传统的荷瘤裸鼠模型中,皮下瘤通常采用测量瘤径大小的



注:接种后约 21 d,尾静脉途径造模组呈现全身转移病灶。

图 3 BALB/c-nu 裸小鼠尾静脉接种 HCCLM3-Luc 克隆细胞后肿瘤生长情况的活体成像
Note. Multiple metastases were found in the nude mice in different regions 21 days after injection with HCCLM3-Luc cell suspension through the tail vein.

Figure 3 *In vivo* imaging of the tumor growth of HCCLM3-Luc clone cells intravenously injected into the BALB/c-nu nude mice through the tail vein

方法检查肿瘤的生长情况,然而这种检测方式在造模初期,无法观测肿瘤的生长情况。而对于普通的肝癌原位癌模型,需要借鉴超声波技术检测体内肿瘤大小,这个增加了实验操作的难度。而本实验构建的 HCCLM3-Luc 肝癌肿瘤模型在造模后第 3 天,就能测量到肿瘤细胞生物发光表达,且我们定量分析到肿瘤的荧光素酶表达强度,随着造模的时间增长而不断增强。因此利用生物发光成像技术追踪肿瘤细胞的增殖、转移等生长情况,不仅可以观察到体外已经成瘤的瘤块,而且观察到模型造模早期存有少量肿瘤细胞的荧光表达情况,在肿瘤模型上具有一定的先进性。

综上,本章初步建立了稳定表达荧光酶基因的人肝癌裸小鼠原位癌模型,通过优化原位癌模型的种植部位和体积数量,并且优选了人肝癌裸小鼠原位癌的构建方法,采用肝叶移植肿瘤组织,通过条件优化,目前成功率高达(75.2 ± 7.2)%。该动物模型具备高成瘤率、操作方法重复性高、手术技术要求低、造模时间短,可客观真实地监测肿瘤组织生长等优点,该动物模型可用于中药抗肿瘤活性成分的筛选。

参考文献:

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(1): 7-30.

[2] 陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2017, 26(1): 1-7.

[3] Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma [J]. Semin Liver Dis, 2005, 25(2): 181-200.

[4] Fuks D, Dokmak S, Paradis V, et al. Benefit of initial resection of hepatocellular carcinoma followed by transplantation in case of recurrence: an intention-to-treat analysis [J]. Hepatology, 2012, 55(1): 132-140.

[5] Guo DW, Sun WY, Zhu L, et al. Knockdown of BDNF suppressed invasion of HepG2 and HCCLM3 cells, a mechanism associated with inactivation of Rho A or Rac1 and actin skeleton disorganization [J]. APMIS, 2012, 120: 469-476.

[6] Tang S, Fu C, Tan L, et al. Imaging-guided synergetic therapy of orthotopic transplantation tumor by superselectively arterial administration of microwave-induced microcapsules [J]. Biomaterials, 2017, 133: 144-153.

[7] Zhang S, Zhang H, He H, et al. *In vivo* real-time imaging of gemcitabine-leaded growth inhibition in the orthotopic transplantation model of human pancreatic tumor [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2011, 1(4): 220-225.

[8] Hofmann J, Schmidt M, Arne O, et al. Non-invasive bioluminescence imaging as a standardized assessment measure in mouse models of dermal inflammation [J]. J Dermatol Sci, 2018, 91(2): 153-163.

[9] Velde G, Kucharčková S, Dijck P, et al. Bioluminescence imaging increases *in vivo* screening efficiency for antifungal activity against device-associated *Candida albicans* biofilms [J]. Int J Antimicrob Agents, 2018, 52(1): 42-51.

[10] Lamid-Ochir O, Nakajima T, Miyazaki M, et al. Bioluminescence image as a quantitative imaging biomarker for preclinical evaluation of cryoablation in a murine model [J]. J Vasc Interv Radiol, 2018, 29(7): 1034-1040.

[11] 赵瑜, 林紫薇, 孙赟, 等. 利用小动物成像技术在体非创评估小鼠胰岛 B 细胞容量 [J]. 上海医学, 2016, 39(1): 1015-1021.

[12] Nakanishi T, Kokubun K, Oda H, et al. Bioluminescence imaging of bone formation using hairless osteocalcin-luciferase transgenic mice [J]. Bone (New York), 2012, 51(3): 369-375.

[13] Americo JL, Sood CL, Cotter CA, et al. Susceptibility of the wild-derived inbred CAST/Ei mouse to infection by orthopoxviruses analyzed by live bioluminescence imaging [J]. Virology, 2014, 449: 120-132.

[收稿日期] 2019-03-22