

马钺延,杨星九,史旭东,等. 双光子显微镜技术下胶质瘤-壁细胞在体多荧光示踪小鼠模型的建立及应用 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 702-711.

MA C Y, YANG X J, SHI X D, et al. Establishment and utilization of a living genetically engineered mouse model for examination of fluorescently labeled glioma cells and mural cells using two-photon microscopy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 702-711.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.06.003

双光子显微镜技术下胶质瘤-壁细胞在体多荧光示踪小鼠模型的建立及应用

马钺延^{1,2,3,4}, 杨星九^{1,2,3,4}, 史旭东^{1,2,3,4}, 高蓐^{1,2,3,4*}

- (1. 中国医学科学院医学实验动物研究所 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021;
2. 国家人类疾病动物模型资源库, 北京 100021; 3. 国家卫生健康委员会比较医学重点实验室,
北京 100021; 4. 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立双光子显微镜下可视化胶质瘤、壁细胞和血管的活体自发荧光的基因小鼠模型并进行评价。**方法** 以 PDGFR β -Cre^{+/+}; Rosa26-tdTomato^{+/+} 基因工程小鼠为观察壁细胞和血管结构的载体, 接种 GL261-CFP 小鼠胶质瘤细胞并对颅骨进行透明化, 通过双光子显微镜动态跟踪观察胶质瘤增殖侵袭过程中血管与壁细胞的动态变化。**结果** 通过基因鉴定证实 PDGFR β -Cre^{+/+}; Rosa26-tdTomato^{+/+} 基因工程小鼠成功繁育。对比 C57BL/6 小鼠, 基因工程小鼠的形态外观和繁殖等无显著性差异, 组织苏木素-伊红 (HE) 染色切片分析显示脏器发育无异常。Tamoxifen 诱导下基因工程小鼠的 Cre 重组酶活性至第 7 天作用完全。接种 GL261-CFP 后观察到胶质瘤增殖侵袭的动态过程及肿瘤内血管形态结构紊乱、游离壁细胞增多。**结论** 成功构建了荧光可视化壁细胞的基因工程小鼠, 分别利用异硫氰酸荧光素-葡聚糖标记血管和青色荧光标记肿瘤细胞, 使用玻璃圆片与固定环替代小鼠颅骨, 实现了活体状态下长期稳定地动态跟踪小鼠接种脑肿瘤后血管及血管支持细胞的形态结构变化, 为研究脑胶质瘤提供了病理可视化的动物模型。

【关键词】 双光子显微镜; 胶质瘤; 壁细胞; 基因工程小鼠; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 06-0702-10

Establishment and utilization of a living genetically engineered mouse model for examination of fluorescently labeled glioma cells and mural cells using two-photon microscopy

MA Chengyan^{1,2,3,4}, YANG Xingjiu^{1,2,3,4}, SHI Xudong^{1,2,3,4}, GAO Ran^{1,2,3,4*}

- (1. Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science (CAMS), Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China; 2. National Human Disease Animal Model Resource Center, Beijing 100021, China; 3. NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing 100021, China; 4. Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)

Corresponding author: GAO Ran. E-mail: gaoran@cnilas.org

【Abstract】 Objective This study was performed to develop and assess a genetically engineered mouse model for visualizing *in vivo* fluorescence of glioma cells, mural cells, and blood vessels using two-photon microscopy. **Methods** PDGFR β -Cre^{+/+}; Rosa26-tdTomato^{+/+} genetically engineered mice underwent skull clearance and were injected

【基金项目】 国家重点研发计划 (2022YFF0710700)。

Funded by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF0710700)。

【作者简介】 马钺延, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 肿瘤转移与肿瘤动物模型。Email: m17761940482@163.com

【通信作者】 高蓐, 女, 研究员, 博士, 研究方向: 肿瘤转移与肿瘤动物模型。Email: gaoran@cnilas.org

with GL261-CFP. This was performed to study the dynamic alterations in blood vessels and mural cells during the progression and invasion of glioma using two-photon microscopy. **Results** PDGFR β -Cre $^{+/-}$; Rosa26-tdTomato $^{+/-}$ mice were successfully bred and subjected to hematoxylin-eosin section analysis of functional organ tissues. The mice exhibited no discernible differences from C57BL/6 mice in terms of appearance and morphology. Cre recombinase activity was fully induced following tamoxifen treatment on day 7. Subsequent GL261-CFP inoculation demonstrated the dynamic progression of glioma proliferation and invasion, as well as vascular abnormalities and increased mural cell detachment within the tumor. **Conclusions** Genetically engineered mice expressing fluorescent mural cells were successfully bred. Blood vessels labeled with fluorescein isothiocyanate-dextran and blue fluorescent tumor cells were utilized. Glass discs and fixed rings were employed to replace the skulls of the mice. This allowed for the tracking of morphological and structural changes in blood vessels and vascular supporting cells following the development of brain tumors *in vivo* over an extended period. This model offers a valuable tool for studying brain diseases through pathological visualization.

[Keywords] two-photon microscopy; glioma; mural cells; genetically engineered mice; animal models

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 是最常见的颅内原发肿瘤,致死率高、预后差,急需探索新的治疗手段^[1-2]。GBM 的恶性增殖往往伴随着血管的病变及增生。血管主要由基底膜内的内皮细胞和基底膜外的壁细胞 (血管平滑肌细胞和周细胞) 组成^[3]。壁细胞作为血脑屏障的重要组成部分,除了维护生理状态下血管的结构与稳态,还在调节功能性血流量^[4]、启动新生血管形成和促进血管成熟中发挥重要作用^[5-6]。胶质瘤干细胞能够生成壁细胞来促进肿瘤增殖^[7];壁细胞作为肿瘤微环境中的一部分,与肿瘤干细胞的相互转分化促进了肿瘤的转移与定植^[8];壁细胞在胶质瘤中参与形成血肿瘤屏障,过滤了大多数抗癌药物和免疫细胞对肿瘤的浸润,靶向敲除后能够促进化疗药物的浸润^[9]。然而壁细胞在胶质瘤中的动态变化和作用机制尚不明确,因此,建立可视化追踪胶质瘤-壁细胞变化的动物模型是研究和治疗胶质瘤的重要工具。

血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 由内皮细胞分泌,并与壁细胞上的同源受体 (PDGFR β) 结合^[10],是负责内皮细胞-壁细胞相互作用的分子^[11-13]。此外,血管生成和血管重塑过程中壁细胞的募集依赖于 PDGF/PDGFR 信号^[14]。PDGFR β 能有效识别所有的血管壁细胞,而神经胶质抗原 2 (neural/glial antigen 2, NG2)、黑色素瘤细胞粘附分子 (CD146) 等其他标志物在不同的壁细胞表型中呈现异质性分布,特异性不高^[15-16]。NG2 于血管生成期间的壁细胞表面表达,主要用于标记幼鼠大脑的壁细胞,同时也在少突胶质细胞祖细胞和施万细胞上表达^[17-19];CD146 参与 PDGFR β 的激活与血脑屏障的完整性,可用作脑壁细胞的标记物,但 CD146 在大血管中的表达显著高于小血

管,而且也在血脑屏障发育中的内皮细胞上表达^[20-21]。因此,选用介导 Cre 重组酶表达的 PDGFR β -Cre $^{+/+}$ 小鼠与 Rosa26-tdTomato $^{+/+}$ 繁育的后代作为载体,其在 Tamoxifen 诱导下,壁细胞可特异性表达红色荧光蛋白。

目前在影像学方面研究胶质瘤的方法主要有两类:一类是构建能稳定表达荧光素酶的胶质瘤细胞株,通过传统小动物活体荧光成像 (small animal optical *in vivo* imaging) 观察肿瘤的生长及转移,发光强度与肿瘤细胞的数目呈线性相关;另一类是核磁共振成像技术 (magnetic resonance imaging, MRI),MRI 使用强磁场、磁场梯度和无线电波来生成体内器官的图像,但无法跟踪胶质瘤具体的动态变化。而双光子显微技术不仅可以观察胶质瘤的增殖和脑转移,还可以跟踪显示目的区域的动态变化^[22]。根据瑞利散射定理:散射量与波长的四次方成反比^[23]。双光子显微镜使用两个光子激发荧光,散射减少,可以提高信噪比,从而激发更深位置的生物组织荧光。基于此,本研究选用 CFP 荧光蛋白标记胶质瘤细胞系 GL261, FITC-dextran 标记血管,壁细胞自发红色荧光的基因小鼠,建立通过双光子显微成像技术长期动态跟踪观察的胶质瘤-壁细胞荧光活体基因小鼠模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

10 只 8 ~ 12 周龄 SPF 级雄性 B6. Cg-*Pdgfrb*^{tm1.1(cre/ERT2)Csl}/J 小鼠 (简称为 PDGFR β -Cre $^{+/+}$), 体重 18 ~ 24 g, 购自美国杰克逊实验室 (stock no. 030201); 8 ~ 12 周龄 SPF 级雌性 B6.

Cg-Gt(*ROSA*)26Sor^{tm14(CAG-tdTomato)^{Hze}}/J 小鼠 30 只(简称为 Rosa26-tdtomato^{+/+}),体重 18 ~ 24 g,购自美国杰克逊实验室(stock no. 007914)。PDGFRβ-Cre^{+/+}与 Rosa26-tdTomato^{+/+}配种繁育的子代用于实验研究。所有小鼠均饲养在中国医学科学院医学实验动物研究所动物房 SPF 级屏障环境中【SYXK(京)2019-0014】,提供不受限制的食物和水;温度控制在 22 ~ 25 °C;相对湿度控制在 40% ~ 70%;明暗周期为 12 h/12 h,以建立昼夜节律。所有动物实验均按照《北京市动物实验福利条例》进行,并经中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会批准(IACUC: GR20005)。

1.1.2 细胞系

GL261 小鼠胶质瘤细胞系来源于北京协和医学院细胞资源中心(PCRC)。采用 DAPI 染色法检测细胞的支原体感染情况。在含 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 培养基中培养细胞系。

1.1.3 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;麻醉剂异氟烷(isoflurane)购自瑞沃德公司;异硫氰酸荧光素-葡聚糖(fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-dextran, HY-128868I);CFP 慢病毒(吉凯基因);复方氯胺酮注射液(中牧倍康);青霉素(AMRESCO, 69-57-8);脱毛膏(薇婷);眼膏(Bepanthen, 87419290);牙科水泥乙基氰基丙烯酸酯液体(DW6993443, HAGER);美洛昔康注射液(美康,保定阳光本草药业有限公司)。

手术器械(FST 公司,德国);立体定位仪(瑞沃德,中国);Hamilton 注射针筒(瑞沃德,7635-01,中国);注射器针头-6 cm 尖头 31 G(瑞沃德,7803-03,中国);台式双目体视显微镜(瑞沃德,77001,中国);微型手持颅钻(瑞沃德,78001,中国);钻头 0.5 mm HM1005-圆头(瑞沃德,78040,中国);300 g 热玻璃珠灭菌器(瑞沃德,RS3002,中国);Cover Slips 玻璃圆片(Avantor, 631-0168, 美国);TCS SP8 DIVE 双光子共聚焦显微镜(徕卡,德国)。

1.2 方法

1.2.1 基因工程小鼠的繁殖与鉴定

将壁细胞特异性 PDGFRβ-Cre^{+/+}小鼠与 Rosa26-tdTomato^{+/+}小鼠杂交,产生 Tamoxifen 诱导下壁细胞特异性表达 tdTomato 红色荧光蛋白的 PDGFRβ-Cre^{+/+}; Rosa26-tdTomato^{+/+}小鼠用于实验。

PDGFRβ-Cre PCR 引物:野生型引物:5'-AGCT TGTGGCAGTGTAGCTG-3';突变型引物:5'-ACATG TCCATCAGGTTCCTTGC-3'。共用引物:5'-CCACCTT GAATGAAGTCAACAC-3'。Rosa26-tdTomato PCR 引物:野生型正向引物:5'-AAGGGAGCTGCAGTGGAG TA-3',反向引物:5'-CCGAAAATCTGTGGGAAGTC-3'。突变正向引物:5'-CTGTTCTCTGTACGGCATGG-3',反向引物:5'-GGCATTAAAGCAGCGTATCC-3'。所有引物根据杰克逊实验室官网的序列订购自生物工程股份有限公司(Sango Biotech)。

PCR 反应在 20 μL 反应中分别加入 10 μL PreMix Taq™(TaKaRa 2.0 plus dye)、2 μL 鼠尾基因组 DNA、1 μL 10 nmol/L 前向引物和反向引物,最后加入 6 μL ddH₂O。PCR 程序在 95 °C 初始变性 5 min, 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s 的 35 个循环中运行,最后在 72 °C 延长 10 min。

1.2.2 慢病毒感染实验

用完全培养基制备 5 × 10⁴/mL 的 GL261 细胞悬液,并于 6 孔板中每孔接种 2 mL。37 °C 培养 24 h,在 MOI = 100 的条件加入 CFP 慢病毒,继续培养 16 h,中途换液保持细胞活性。感染约 72 h 后,加入 500 μg/mL G418 筛选至稳定。

1.2.3 器官组织形态学观察

各取 3 只 8 周龄的 C57BL/6 和 PDGFRβ-Cre^{+/+}; Rosa26-tdTomato^{+/+}小鼠的脑、心脏、肺、肝、脾和肾等器官于 4% 多聚甲醛中固定,24 h 换固定液 1 次,固定 48 h,脱水、透明、石蜡包埋。苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下拍照。

1.2.4 玻璃颅窗动物模型的手术制备方法

提前 4 周准备颅窗,小鼠使用异氟烷气体麻醉诱导,术中麻醉采用腹腔注射氯胺酮、甲苯噻和盐酸苯甲酸盐(注射剂量 0.0375、0.0375、0.000 125 mg/g)麻醉小鼠。皮下注射青霉素(40 mg/kg)减少感染。小鼠麻醉完全后,使用脱毛膏除净小鼠头部的毛发。随后将小鼠固定在立体定位仪上。使用眼膏以避免小鼠眼部脱水和刺激。剪去头皮,使用颅钻轻轻磨去颅骨,用镊子挑去硬脑膜。用直径 6 mm 的透明颅窗覆盖大脑,并用牙科水泥乙基氰基丙烯酸酯液体(简称牙科水泥)密封。术后皮下注射 4 剂镇痛药:每隔 6 h 注射一剂美洛昔康注射液(0.1 mg/kg)。第 -2、-1、0 天每天腹腔注射一剂他莫昔芬(75 mg/kg),在第 3、5、7、14 天使用双光子活体动态跟踪观察,见图 1。

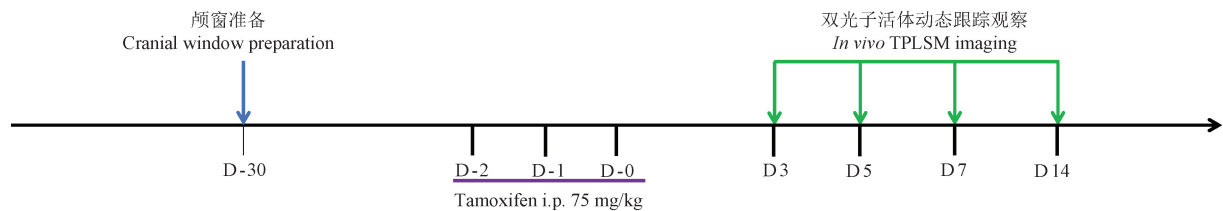


图 1 生理状态下小鼠模型制备与观察的时间轴

Figure 1 Timeline of mouse model preparation and observation in a physiological state

1.2.5 胶质瘤活体动物模型制备方法

首先制备使用玻璃颅窗替代颅骨的小鼠,4 周后除去小鼠脑表的玻璃片与固定环,用 2500 μ L PBS 制备 GL261-CFP 细胞悬液,使用 10 μ L 的汉密尔顿微量注射器和 6 cm-31 G 针头,与水平面成 60° 的方向将含 5×10^3 GL-261-CFP 的细胞悬液以 0.5 mm/min 的速度立体定向到小鼠脑内,进针深度 1.5 mm,停留 2 min 后,退至 1 mm 深度,以 0.5 μ L/min 注射 2 μ L 肿瘤细胞悬液,注射完停针 5 min 后缓慢退针。注射点位于矢状窦外侧约 1 mm,前囟前方约 2 mm,脑实质内深度 1 mm。注射完毕后停留 5 min 后,以 1 mm/min 的速度退针。使用生理盐水清洁脑表,使用牙科水泥粘住玻璃圆片与固定环。术后皮下注射 4 针镇痛药:每隔 6 h 注射一剂美洛昔康注射液(0.1 mg/kg),见图 2。

1.2.6 双光子显微镜观察

图像采集使用徕卡 TCS SP8 DIVE 共聚焦显微镜,配备变色龙超激光系统(680 ~ 1300 nm)和 25 $\times$

水浸物镜(数值孔径 0.95)。单幅图像采集深度为 0 ~ 300 μ m,深度 z:间隔为 3 μ m。FITC-dextran 与 TdTomato 的激发波长为 975 nm, GL261-CFP 的激发波长为 860 nm, 1024 $\times$ 1024 像素。为了显示脑血管,通过小鼠尾静脉注射 10 mg/mL 的 FITC-dextran (2×10^6 分子量,绿色)0.2 mL。TdTomato 的发射波长为 570 ~ 640 nm, FITC-dextran 的发射波长为 500 ~ 550 nm, GL261-CFP 肿瘤细胞的发射波长为 450 ~ 490 nm。用异氟醚麻醉小鼠,以 0.8% ~ 2.0% (根据小鼠身体状况尽可能低的流量)恒定流量(1 mL/min)维持。激光功率也限制在最低百分比,尽量避免光毒性。

1.3 统计学分析

通过双光子显微镜获取到的 IMS 文件,由 Imaris x64 9.7.2 软件量化分析。计量资料均以平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 描述,采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

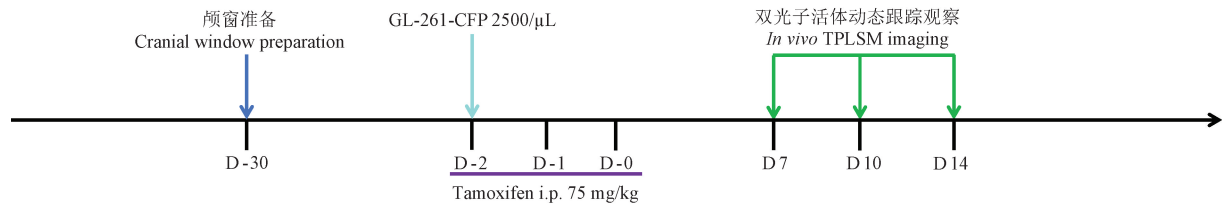


图 2 双光子显微镜技术下胶质瘤-壁细胞在体多荧光示踪小鼠模型制备的时间轴

Figure 2 Timeline of the mouse model preparation of fluorescently labeled glioma cells and mural cells using two-photon microscopy

2 结果

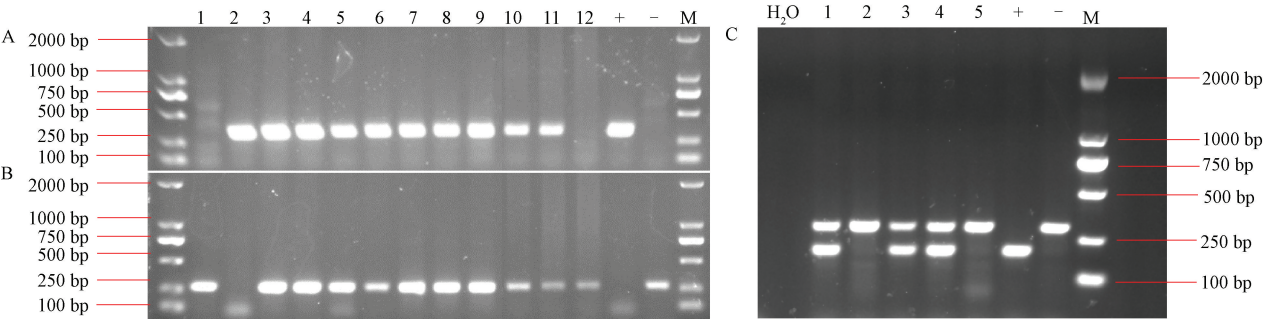
2.1 PDGFR β -Cre^{+/+}; Rosa26-tdTomato^{+/+} 基因鉴定

通过试剂盒提取鼠尾基因组 DNA 并进行 PCR 扩增,使用凝胶电泳实验鉴定产物。PDGFR β -Cre 野生型等位基因的条带大小为 272 bp, PDGFR β -Cre 突变型等位基因的条带大小约为 320 bp。Rosa26-tdTomato 突变等位基因条带大小约 200 bp,野生型

等位基因条带大小约为 297 bp。经鉴定,图 3A ~ 3B 中的 1 号、12 号样品为 PDGFR β -Cre^{-/-}, 2 号样品为 PDGFR β -Cre^{+/+}, 3 ~ 11 号样品为 PDGFR β -Cre^{+/+}。图 3C 中的 1 号、3 号、4 号样品为 Rosa26-tdTomato^{+/+}, 2 号、5 号样品为 Rosa26-tdTomato^{-/-}。

2.2 PDGFR β -Cre^{+/+}; Rosa26-tdTomato^{+/+} 小鼠表型分析

C57BL/6 遗传背景的 PDGFR β + 细胞特异性携带红色荧光的小鼠与 C57BL/6 小鼠的外观形态、



注:A:PDGFRβ-Cre 突变型产物;B:PDGFRβ-Cre 野生型产物;+ :PDGFRβ-Cre 突变型对照;-:野生型对照;C:Rosa26-tdTomato 的基因鉴定产物;+ :Rosa26-tdTomato 阳性对照;-:Rosa26-tdTomato 阴性对照。

图 3 小鼠的基因鉴定

Note. A. PDGFRβ-Cre mutant product. B. PDGFRβ-Cre wild type product. +. PDGFRβ-Cre mutant control. -. Wild type control. C. Gene identification products of Rosa26-tdTomato. +. Positive control of Rosa26-tdTomato. -. Negative control of Rosa26-tdTomato.

Figure 3 Genetic identification of mice

生长速度、繁殖能力无显著性差异。HE 结果显示, PDGFRβ-Cre^{+/-};Rosa26-tdTomato^{+/-}小鼠与 C57BL/6 小鼠的脑、肺、心脏、肝、脾和肾等无显著性差异(图 4)。

2.3 PDGFRβ-Cre^{+/-};Rosa26-tdTomato^{+/-}小鼠手术颅窗

准备 8 ~ 12 周龄的 PDGFRβ-Cre^{+/-};Rosa26-tdTomato^{+/-}小鼠,以矢状缝与冠状缝焦点(前囟)为

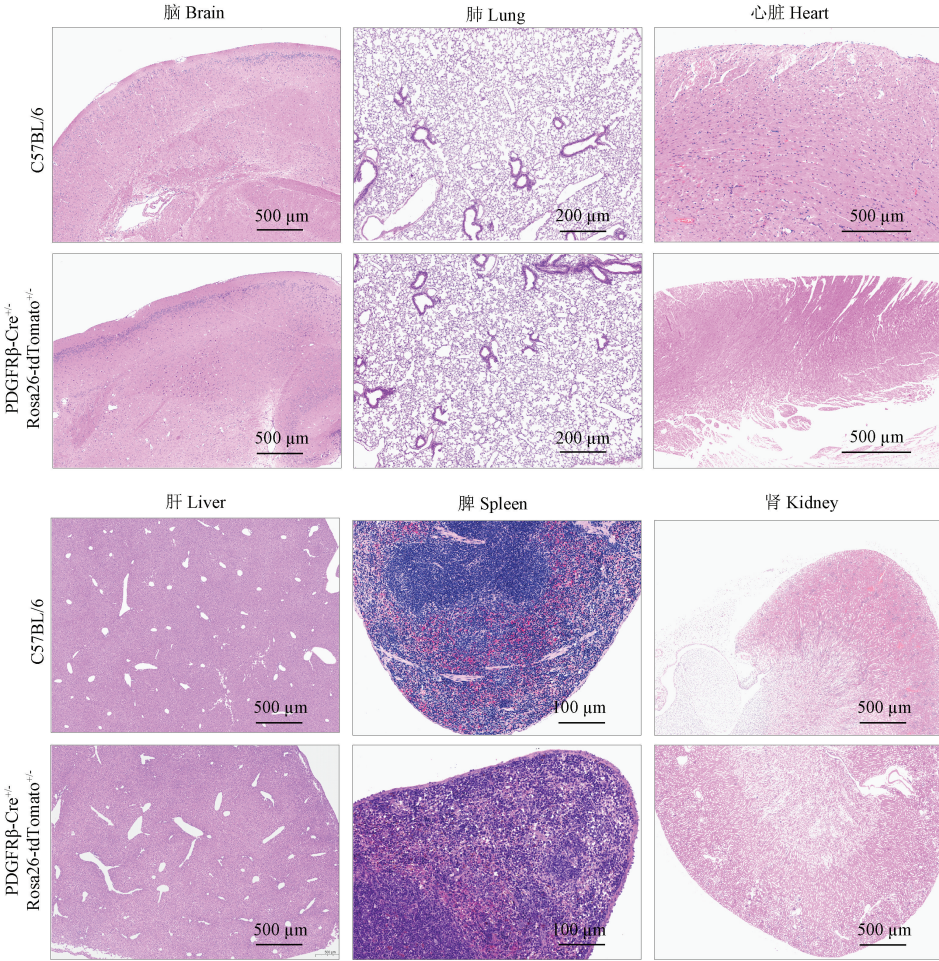


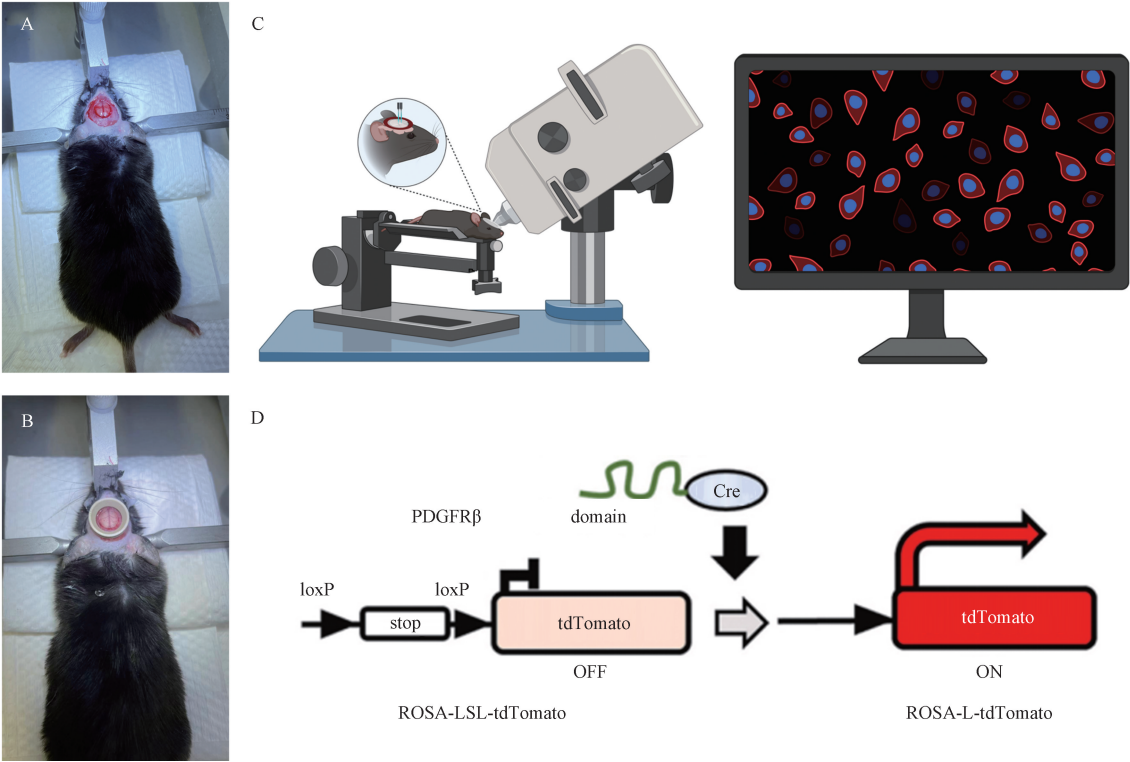
图 4 主要器官组织形态学

Figure 4 Histomorphology of the principal organs

圆心,使用颅钻轻柔地磨去直径 6 mm 的颅骨,在脑表贴上 6 mm 的玻璃圆片(图 5A)。围绕玻璃圆片在干燥的颅骨表面填涂牙科水泥,立刻放置固定环,在固定环与颅骨的间隙补充涂满牙科水泥使之粘牢(图 5B),等待 4 周使小鼠大脑中因手术造成的炎症消退后,使用异氟烷麻醉小鼠固定于双光子显微镜下,尾静脉注射 200 μ L FITC-dextran,进行活体

双光子显微镜图像采集(图 5C)。

在无 Tamoxifen 诱导的情况下,PDGFR β -CreERT2 在细胞质内处于无活性状态;当 Tamoxifen 诱导后,Tamoxifen 的代谢产物 4-OHT(雌激素类似物)与 ERT 结合,可使 PDGFR β -CreERT2 进核发挥 Cre 重组酶活性,切掉 LoxP 位点之间的终止子,诱导 tdTomato 红色荧光蛋白表达(图 5D)。



注:A:磨去小鼠颅骨的效果图;B:借助牙科水泥使用固定环与玻璃圆片替代小鼠的颅骨;C:在双光子显微镜下获取图像;D:PDGFR β -Cre 切割 LoxP 的原理图。

图 5 PDGFR β -Cre^{+/−};Rosa26-tdTomato^{+/−}小鼠的长期颅窗制备

Note. A. All illustration of mouse skull that grinded. B. Skulls of mice were replaced with fixation rings and glass discs using dental cement. C. Observed under a two-photon microscope. D. Schematic diagram of PDGFR β -Cre cutting LoxP.

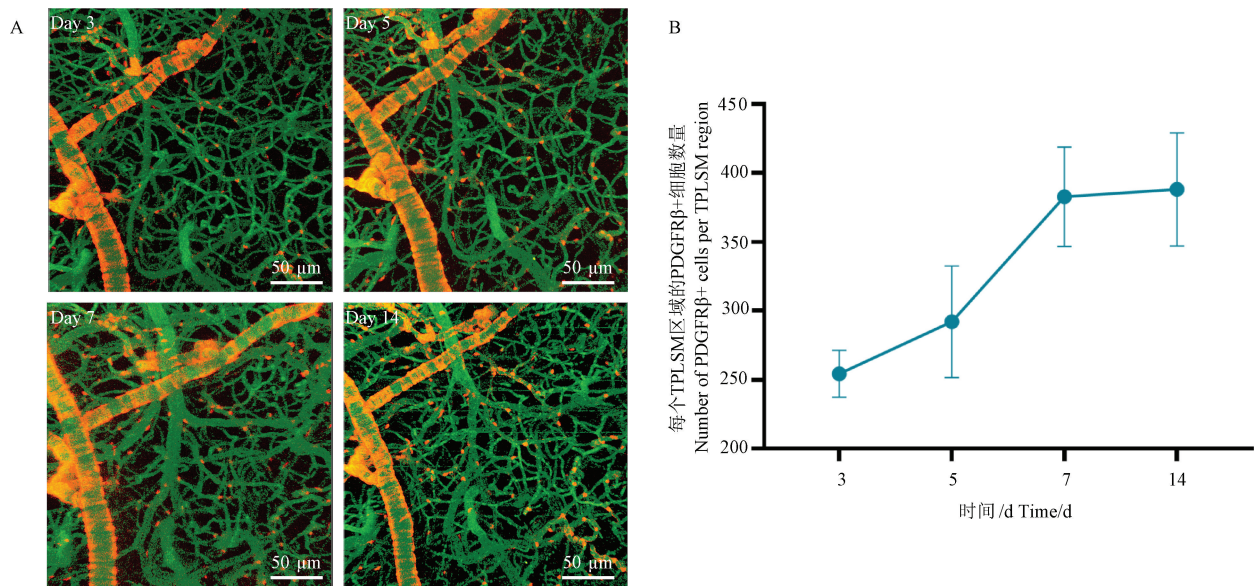
Figure 5 Long-term cranial window preparation in PDGFR β -Cre^{+/−};Rosa26-tdTomato^{+/−} mice

2.4 PDGFR β -Cre^{+/−};Rosa26-tdTomato^{+/−}小鼠模型的活体双光子显微成像

第 - 30 天取 3 只 PDGFR β -Cre^{+/−}; Rosa26-tdTomato^{+/−}小鼠手术制备颅窗,第-2、-1、0 天每只每天以 75 mg/kg 剂量腹腔注射 1 针 Tamoxifen。第 3 天开始进行双光子动态跟踪拍摄(图 6A),可以观察到,从第 3 ~ 7 天,PDGFR β -Cre 诱导的 tdTomato 红色荧光蛋白表达逐渐增加(图 6B),至第 7 天以后 PDGFR β + 细胞中红色荧光表达趋于稳定(图 6B)。证明 Tamoxifen 诱导下,所有 PDGFR β + 的细胞表达红色荧光蛋白需要 7 d 左右的代谢期。

2.5 构建基于 PDGFR β -Cre^{+/−};Rosa26-tdTomato^{+/−}小鼠的胶质瘤模型

使用 CFP 慢病毒感染 GL261 细胞 72 h 后,通过 500 μ g/mL G418 筛选至稳定。GL261-CFP 在荧光显微镜下发出青蓝色荧光(图 7A)。将 5 $\times$ 10³ 个 GL261-CFP 细胞缓慢注射到大脑皮层(图 7B)。注射点选在前囟两侧 1 mm,前方 2 mm 处(图 7C)。注射完毕后使用生理盐水温柔地清洁脑表,贴上玻璃圆片,沿着玻璃圆片涂上牙科水泥,立刻放置固定环。胶质瘤的 HE 染色(虚线所示)可见多形性胶质瘤细胞,细胞核增大深染,胞浆嗜酸性染色阳性

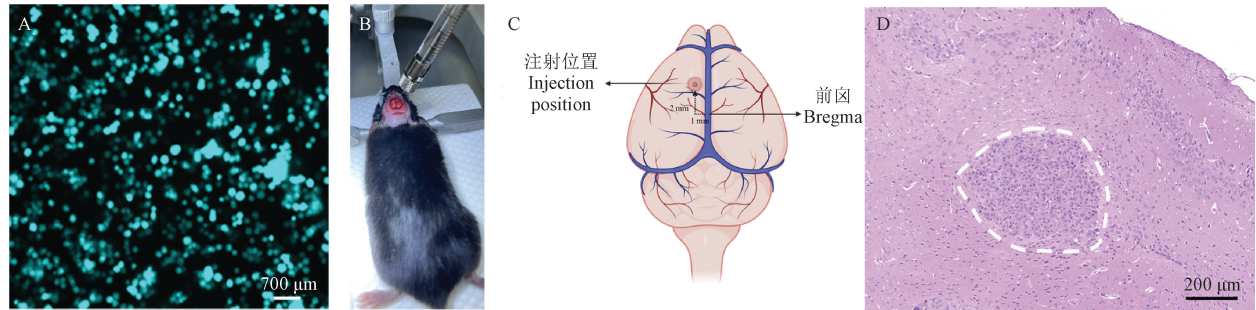


注:A:动态跟踪拍摄生理条件下血管(绿色)与壁细胞的(红色)的变化;B:拍摄区域壁细胞数量变化曲线。

图 6 使用 PDGFRβ-Cre^{+/−};Rosa26-tdTomato^{+/−}小鼠模型观察壁细胞与血管的效果(*n* = 3)

Note. A. Dynamic tracking of changes in blood vessels (green) and parietal cells (red) under physiological conditions. B. Curve of mural cell number change in the photographed area.

Figure 6 Effects of mural cells and blood vessels observed by a PDGFRβ-Cre^{+/−};Rosa26-tdTomato^{+/−} mouse model(*n* = 3)



注:A:GL261 细胞系携带青色荧光;B:在 PDGFRβ-Cre^{+/−};Rosa26-tdTomato^{+/−}大脑皮质中接种胶质瘤;C:胶质瘤接种的位置;D:HE 染色显示多形性胶质瘤细胞,细胞核增大深染,胞浆嗜酸性染色阳性。

图 7 基因小鼠大脑内接种 GL261-CFP 细胞

Note. A. GL261 cell line was transfected with cyan fluorescence. B. Gliomas were seeded in PDGFRβ-Cre^{+/−};Rosa26-tdTomato^{+/−} cerebral cortex. C. Location of glioma inoculation. D. HE staining showed pleomorphic glioma cells with enlarged nucleus and positive eosinophilic staining in the cytoplasm.

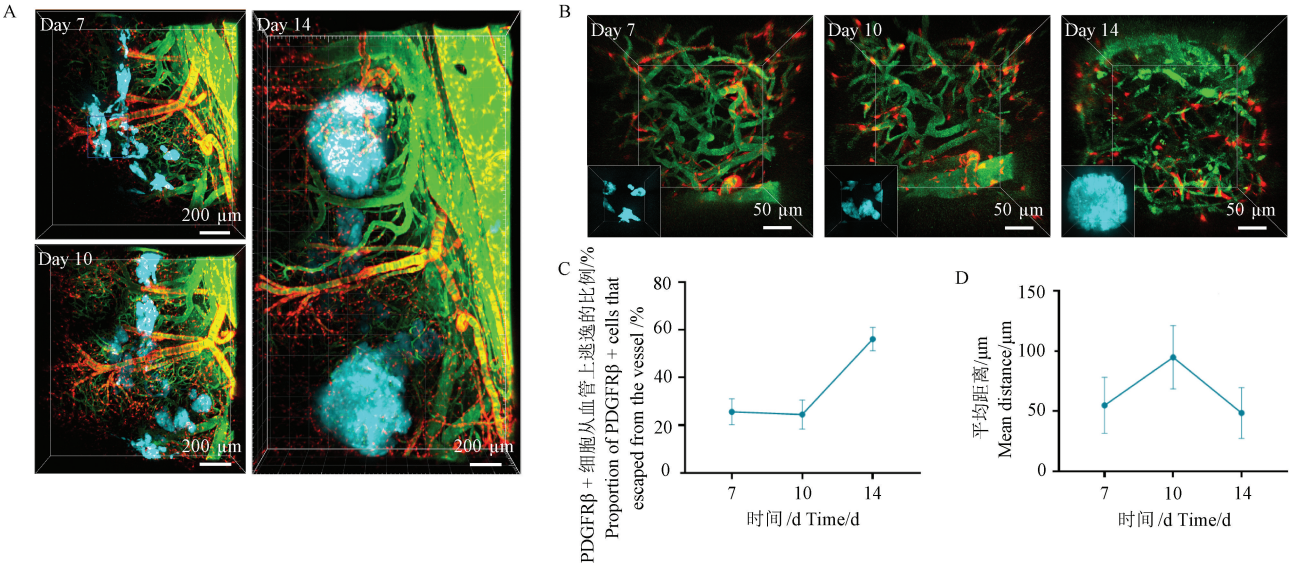
Figure 7 GL261-CFP cells were inoculated into the brains of transgenic mice

(图 7D)。

2.6 胶质瘤内壁细胞及血管形态结构异常

如图 2 所示的时间线所示,第-30 天于 PDGFRβ-Cre^{+/−};Rosa26-tdTomato^{+/−}小鼠准备颅窗,第-2 天接种 5 × 10³ 个 GL261-CFP 细胞,第-2、-1、0 天每天以 75 mg/kg 腹腔注射 1 针他莫昔芬。如图 8A 所示,第 7 天通过双光子显微镜观察到胶质瘤侵袭增殖,第 10 天观察到胶质瘤形成多发性病灶,第 14 天观察到胶质瘤占位明显,肿瘤内血管失

去正常形态。选取 3 只小鼠第 7 ~ 14 天的 300 μm × 300 μm × 300 μm 的区域跟踪分析统计(图 8B),第 7 天 25.65% 的 PDGFRβ + 壁细胞游离出血管壁,第 14 天多达 56.11% 的 PDGFRβ + 壁细胞游离出血管壁(图 8C)。从第 7 ~ 10 天,壁细胞与血管表面的平均距离由 54.87 μm 上升为 94.86 μm,证明有更多的壁细胞游离出血管;第 14 天,破碎的血管脉络增多、新生血管形成,造成血管与游离的壁细胞平均距离降低,为 48.51 μm(图 8D)。综上,双



注:A:动态跟踪拍摄胶质瘤(青色)增殖侵袭过程中血管(绿色)与壁细胞(红色)的变化;B:跟踪统计分析相同大小区域的肿瘤中血管与壁细胞的变化;C:量化统计区域中游离出血管的壁细胞比例变化折线图;D:量化统计区域中壁细胞与血管表面距离的变化折线图。

图 8 双光子胶质瘤-壁细胞荧光活体基因小鼠模型建立与评价($n = 3$)

Note. A. Dynamic tracking of the changes of blood vessels (green) and mural cells (red) during the proliferation and invasion of glioma (cyan), depth. B. Statistically analyze alterations in blood vessels and mural cells within tumors of equivalent area. C. Line graph illustrating variations in the percentage of mural cells that detached from blood vessels within the statistical region. D. Quantifying the distance between mural cells and the surface of blood vessels within the statistical area.

Figure 8 Establishment and evaluation of a two-photon glioma-mural cell fluorescent *in vivo* genetically engineered mouse model($n = 3$)

光子胶质瘤-壁细胞荧光活体基因小鼠能够精确地从细胞层面上观察到胶质瘤侵袭增殖的过程,以及肿瘤内血管结构的变化。

3 讨论

研究胶质瘤与壁细胞的相互作用离不开有效的动物模型,借助双光子荧光显微镜可以在活体水平形象化、数据化胶质瘤、血管和壁细胞的动态变化,为研究大脑微环境中肿瘤与壁细胞的生物学特征提供了高效的工具。传统小动物活体荧光成像只能从二维层面上半定量肿瘤的生长及转移,无法具体到三维立体的细胞层面;核磁成像技术虽然能够精确地测量肿瘤的增殖大小,但由于价格高、时间长、操作繁琐以及无法展现肿瘤内具体的血管结构等原因,并不适合长期频繁地跟踪肿瘤的动态变化。在本研究中,研究人员借助 CFP 荧光蛋白标记胶质瘤细胞系 GL261,小鼠尾静脉注射 FITC-dextran 标记血管,壁细胞条件性表达 tdTomato 红色荧光的小鼠,构建了在双光子显微镜下能够良好地模拟胶质瘤增殖中血管和壁细胞动态变化并且可以观察量化、统计参数的小鼠模型。

第一个双光子显微镜系统由 DENK 等^[24]于 1990 年开发。与共聚焦成像相比,其提供高分辨率成像(亚微米),具有更低的光毒性和更深的组织穿透力。双光子显微镜能够在活组织内长时间成像(几百微米),光漂白几乎可以忽略不计,是迄今为止长时程在体观察生物组织的最佳选择。双光子显微镜是用于全景式解析脑图谱和功能动态图谱的最广泛的研究工具之一^{〔25〕},例如学习记忆、原发性 and 转移性脑肿瘤、阿尔茨海默病等脑疾病。与大多数类型的荧光显微镜一样,可视化需要外源导入表达荧光蛋白的信号源,这可能会限制应用的细胞范围,目前转基因小鼠品系的名单有限,可供研究者选择的较少,但随着如 CRISPR/Cas9、Cre-Loxp 等基因编辑工具的引入,相信可供双光子显微镜成像的动物模型会越来越多。在选择多种荧光时,发射波相近的荧光蛋白之间的串色问题也会困扰研究者。应用的动物模型方面,除了在脑部疾病的示踪观察应用外,在皮肤、肺、肾等方面也获得了应用,但由于胸腔负压与腹腔脏器移动的原因,限制了肺窗、肾窗等技术下对肺、肾的长期示踪观察。临床应用方面,许多研究已经将双光子显微镜用于人体

成像和疾病诊断,包括眼部成像、血管和心血管成像、药物递送成像、肝或其他器官纤维化诊断、皮肤病诊断等^[26-27]。例如,在皮肤黑色素瘤的诊断上,研究人员检查了 83 例患者的色素皮肤,区分痣和黑色素瘤的准确率高达 97%^[28-30]。

本实验采用 Cre-LoxP 系统构建了 Tamoxifen 诱导下壁细胞特异性表达 tdTomato 红色荧光蛋白的基因工程小鼠,通过提取鼠尾 DNA、PCR 扩增和凝胶电泳等实验验证 PDGFR β -Cre^{+/+}: Rosa26-tdTomato^{+/+}的成功繁育构建;组织 HE 染色显示基因工程小鼠与 C57BL/6 小鼠的脑、肺、心脏、肝、脾和肾等功能性脏器间无显著性差异;通过正常 PDGFR β -Cre^{+/+}: Rosa26-tdTomato^{+/+}小鼠的颅窗观察到 PDGFR β + 的细胞表达红色荧光蛋白需要 7 d 左右的代谢期;小鼠颅内接种 GL261-CFP 后,观察到胶质瘤内血管紊乱,壁细胞变形游离增多,游离比例由第 7 天的 25.65% 增到第 14 天的 56.11%,完整地示踪了胶质瘤与壁细胞的动态变化。目前尚未有使用双光子活体成像技术对该类模型进行相关研究的报道。

原发性脑肿瘤,尤其是胶质母细胞瘤,是治疗耐药性最强的肿瘤之一,同时化疗药物难以透过血脑屏障,造成了大部分疗法都难以阻止它们的快速增殖。壁细胞作为血脑屏障的一部分,在胶质瘤增殖过程中发挥着巨大的作用。因此本研究构建壁细胞自发荧光的 PDGFR β -Cre^{+/+}: Rosa26-tdTomato^{+/+}基因小鼠,分别借助异硫氰酸荧光素-葡聚糖标记血管和青色荧光肿瘤细胞,在双光子显微活体成像技术下,为研究胶质瘤的发病、侵袭、转移和治疗等提供了一种具备高对比度、高穿透深度、低光毒性的动物模型。该模型有望为胶质瘤治疗药物的开发和疗效评价提供有力的工具。

参 考 文 献(References)

- [1] MUIR M, GOPAKUMAR S, TRAYLOR J, et al. Glioblastoma multiforme: novel therapeutic targets [J]. Expert Opin Ther Targets, 2020, 24(7): 605-614.
- [2] LI M, LI G, KIYOKAWA J, et al. Characterization and oncolytic virus targeting of FAP-expressing tumor-associated pericytes in glioblastoma [J]. Acta Neuropathol Commun, 2020, 8(1): 221.
- [3] VANLANDEWIJCK M, HE L, MÄE M A, et al. A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature [J]. Nature, 2018, 554(7693): 475-480.
- [4] HARTMANN D A, BERTHIAUME A A, GRANT R I, et al. Brain capillary pericytes exert a substantial but slow influence on blood flow [J]. Nat Neurosci, 2021, 24(5): 633-645.
- [5] NEHLS V, DENZER K, DRECKHAHN D. Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis *in situ* [J]. Cell Tissue Res, 1992, 270(3): 469-474.
- [6] YONEKURA H, SAKURAI S, LIU X, et al. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis [J]. J Biol Chem, 1999, 274(49): 35172-35178.
- [7] CHENG L, HUANG Z, ZHOU W, et al. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth [J]. Cell, 2013, 153(1): 139-152.
- [8] HUANG Q, LIU L, XIAO D, et al. CD44⁺ lung cancer stem cell-derived pericyte-like cells cause brain metastases through GPR124-enhanced trans-endothelial migration [J]. Cancer Cell, 2023, 41(9): 1621-1636.
- [9] ZHOU W, CHEN C, SHI Y, et al. Targeting glioma stem cell-derived pericytes disrupts the blood-tumor barrier and improves chemotherapeutic efficacy [J]. Cell Stem Cell, 2017, 21(5): 591-603.
- [10] SENNINO B, FALCÓN B L, MCCAULEY D, et al. Sequential loss of tumor vessel pericytes and endothelial cells after inhibition of platelet-derived growth factor B by selective aptamer AX102 [J]. Cancer Res, 2007, 67(15): 7358-7367.
- [11] DORE-DUFFY P, KATYCHEV A, WANG X. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(5): 613-624.
- [12] DORE-DUFFY P, MEHEDI A, WANG X, et al. Immortalized CNS pericytes are quiescent smooth muscle actin-negative and pluripotent [J]. Microvasc Res, 2011, 82(1): 18-27.
- [13] DORE-DUFFY P, CLEARY K. Morphology and properties of pericytes [J]. Methods Mol Biol, 2011, 686: 49-68.
- [14] SEMELA D, DAS A, LANGER D, et al. Platelet-derived growth factor signaling through ephrin-b2 regulates hepatic vascular structure and function [J]. Gastroenterology, 2008, 135(2): 671-679.
- [15] RUSTENHOVEN J, JANSSON D, SMYTH L C, et al. Brain pericytes As mediators of neuroinflammation [J]. Trends Pharmacol Sci, 2017, 38(3): 291-304.
- [16] PAYNE L B, ZHAO H, JAMES C C, et al. The pericyte microenvironment during vascular development [J]. Microcirculation, 2019, 26(8): e12554.
- [17] HUGHES S, CHAN-LING T. Characterization of smooth muscle cell and pericyte differentiation in the rat retina *in vivo* [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(8): 2795.
- [18] SCHULTZ N, BYMAN E, FEX M, et al. Amylin alters human brain pericyte viability and NG2 expression [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37(4): 1470-1482.
- [19] NARANJO O, OSBORNE O, TORICES S, et al. *In vivo* targeting of the neurovascular unit: challenges and advancements [J]. Cell Mol Neurobiol, 2022, 42(7): 2131-2146.
- [20] SMYTH L C D, RUSTENHOVEN J, SCOTTER E L, et al.

Markers for human brain pericytes and smooth muscle cells [J]. J Chem Neuroanat, 2018, 92: 48–60.

[21] GUEZGUEZ B, VIGNERON P, LAMERANT N, et al. Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor [J]. J Immunol, 2007, 179(10): 6673–6685.

[22] HARTMANN D A, UNDERLY R G, GRANT R I, et al. Pericyte structure and distribution in the cerebral cortex revealed by high-resolution imaging of transgenic mice [J]. Neurophotonics, 2015, 2(4): 041402.

[23] FRANK K H, KESSLER M, APPELBAUM K, et al. Measurements of angular distributions of Rayleigh and Mie scattering events in biological models [J]. Phys Med Biol, 1989, 34(12): 1901–1916.

[24] DENK W, STRICKLER J H, WEBB W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy [J]. Science, 1990, 248(4951): 73–76.

[25] DE GIORGI V, MASSI D, SESTINI S, et al. Combined non-linear laser imaging (two-photon excitation fluorescence microscopy, fluorescence lifetime imaging microscopy, multispectral multiphoton microscopy) in cutaneous tumours: first experiences [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2009, 23(3): 314–316.

[26] GUO H, ALEYASIN H, HOWARD S S, et al. Two-photon fluorescence imaging of intracellular hydrogen peroxide with chemoselective fluorescent probes [J]. J Biomed Opt, 2013, 18(10): 106002.

[27] CAMPAGNOLA P. Second harmonic generation imaging microscopy: applications to diseases diagnostics [J]. Anal Chem, 2011, 83(9): 3224–3231.

[28] KOEHLER M J, SPEICHER M, LANGE-ASSCHENFELDT S, et al. Clinical application of multiphoton tomography in combination with confocal laser scanning microscopy for *in vivo* evaluation of skin diseases [J]. Exp Dermatol, 2011, 20(7): 589–594.

[29] WANG B G, KÖNIG K, HALBHUBER K J. Two-photon microscopy of deep intravital tissues and its merits in clinical research [J]. J Microsc, 2010, 238(1): 1–20.

[30] DIMITROW E, RIEMANN I, EHLERS A, et al. Spectral fluorescence lifetime detection and selective melanin imaging by multiphoton laser tomography for melanoma diagnosis [J]. Exp Dermatol, 2009, 18(6): 509–515.

[收稿日期] 2023-03-13

利用小鼠模型、细胞平台和人类临床数据对头颈部鳞状细胞癌进行系统遗传学分析

肺癌是全世界严重威胁人类生命的癌症死亡原因。尽管手术和化疗提供了生存可能,但复发性晚期肺癌患者经常加重,且预后仍然很差。近年来,随着免疫检查点抑制剂(ICIs)治疗复发性和难治性肺癌的突破,深入了解肿瘤免疫系统越来越受到重视。诱导性 T 细胞共刺激剂(T-cell co-stimulator, ICOS)属于 B7-CD28 免疫球蛋白家族,通过与唯一配体(inducible T-cell co-stimulator and its ligand, ICOSL)结合,在调节 T 细胞激活和分化中发挥重要作用。ICOS 或 ICOSL 在各种癌症类型中失调,并有助于肿瘤免疫逃逸。然而,ICOS/ICOSL 在肺癌中的作用尚不十分清楚。本文开展了关于 ICOS 和 ICOSL 在中国患者肺癌中的表达和预后的综合性探索研究。借助 TCGA 数据挖掘探讨了人类 NSCLC 中 ICOS 和 ICOSL 的表达及其与临床结果的相关性,同时使用选定的肺癌患者新鲜切除的肿瘤组织进行免疫组织化学分析。结果表明 ICOS/ICOSL 轴激活可能影响肿瘤分期、总生存期(overall survival, OS)和无病生存期(disease-free interval, DFS)。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(5): 464-473. doi: 10.1002/ame2.12355)。