

电转系统介导的荧光素酶稳定表达PANC-1细胞的构建及其生物发光成像检测

屠 珏 黄 宇 凌 云 齐月寒 陈民利*
(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学中心, 杭州 310053)

摘要 在构建稳定表达荧光素酶的人胰腺癌PANC-1细胞的基础上, 建立适合活体成像研究的胰腺癌动物模型, 为深入研究胰腺癌发病机制打下基础。该研究运用Lonza Nucleofector™核转染系统将携带有荧光素酶基因(firefly luciferase, *luc*)的质粒(GV258)稳定转染PANC-1细胞, 利用嘌呤霉素筛选出能稳定表达荧光素酶的细胞株PANC-1-LUC, 并应用活体成像系统对其体内外生物发光进行检测。进一步构建PANC-1-LUC裸鼠皮下移植瘤, 同样方法接种慢病毒载体构建的PANC-1-luc细胞作为对照, 观察成瘤率、瘤体积, 检测生物发光强度。体内外生物发光检测结果均显示, 光通量值与细胞数之间呈显著的直线相关($P < 0.01$)。PANC-1-LUC细胞皮下接种裸鼠, 1周成瘤率即达80%以上, 瘤体积可达平均100 mm³。观察6周, 裸鼠皮下肿瘤生长符合Gompertzian曲线。每周的生物发光检测结果均显示, PANC-1-LUC移植瘤的光强度与瘤体积有显著的线性关系($P < 0.05$)。以上结果说明, 该文所构建的PANC-1-LUC细胞株能够稳定、长期地表达荧光素酶, 更适合构建活体成像研究的裸鼠胰腺癌模型。

关键词 Nucleofector核转染系统; 荧光素酶; PANC-1细胞; 生物发光

Establishment of Pancreatic Cancer Cell Line Stably Expressing Luciferase Mediated by Nucleofector System and Detection with Bioluminescence Imaging System

Tu Jue, Huang Yu, Ling Yun, Qi Yuehan, Chen Minli*

(Laboratory Animal Research Center/Comparative Medical Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract The paper aimed to establish a pancreatic cancer cell line which could stably produce luciferase and suit for constructing xenotransplanted tumor model in nude mice. PANC-1 cells were transfected with plasmid (GV258) with *luc* gene mediated by Lonza Nucleofector™ System and monoclonal cell line PANC-1-LUC was screened with puromycin. The luciferase expression of PANC-1-LUC cells was detected by bioluminescence imaging system *in vitro* and *in vivo*. The results showed that the bioluminescence density of PANC-1-LUC cells correlated significantly to the cell numbers *in vitro* and *in vivo* ($P < 0.01$). Furthermore, the PANC-1-LUC cells were inoculated subcutaneously into back of nude mice. A week later, the tumor growth and bioluminescence of xenotransplanted tumor were investigated. The high tumorigenicity above 80% was observed and the curve of tumor growth was accorded with Gompertzian curve. The results of weekly bioluminescence detection inferred a

收稿日期: 2016-02-24 接受日期: 2016-05-20

浙江中医药大学比较医学创新团队项目(批准号: XTD201301)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86613662, E-mail: cml1991@aliyun.com

Received: February 24, 2016 Accepted: May 20, 2016

This work was supported by the Comparative Medical Innovation Team of Zhejiang Chinese Medical University (Grant No.XTD201301)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86613662, E-mail: cml1991@aliyun.com

网络出版时间: 2016-08-01 16:25:16 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160801.1625.018.html>

significant correlation between total flux value of bioluminescence and volume of xenotransplanted tumor ($P < 0.05$). Overall, we have successfully established a pancreatic cancer cell line, PANC-1-LUC, which could produce luciferase stably and persistently.

Keywords Nucleofector System; luciferase; PANC-1 cell; bioluminescence

胰腺癌是一种全球常见的消化道恶性肿瘤,发病率和死亡率近年来明显上升,五年生存率不足1%,是预后最差的恶性肿瘤之一,严重威胁着人类健康^[1-2]。早期确诊率低和术后转移是胰腺癌死亡高的主要原因^[3],临床上很难得到新鲜的、不同时期的胰腺癌病理组织标本,制约了对胰腺癌发生、发展过程的研究。近年来,小动物活体生物发光技术被广泛应用于肿瘤研究,可以无创地动态观察、定量检测小动物体内肿瘤细胞的变化、肿瘤生长和转移情况^[4]。因此,构建生物发光标记的胰腺癌细胞,在此基础上建立胰腺癌实验动物模型,对深入探讨胰腺癌的发病机制、寻找新的有效治疗手段有着非常重要的意义。本研究通过电穿孔的方法将携带有荧光素酶基因(firefly luciferase, *luc*)的质粒稳定转染人胰腺癌PANC-1细胞,利用嘌呤霉素筛选出能稳定表达荧光素酶的细胞株PANC-1-LUC,并采用活体成像技术对构建的细胞株进行体内外生物发光的检测。

1 材料与方法

1.1 细胞和实验动物

人胰腺癌PANC-1细胞购于美国模式菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC),由本实验室保存。慢病毒载体构建的稳定表达荧光素酶的人胰腺癌PANC-1-*luc*细胞由浙一医院卫生部多器官联合移植重点实验室惠赠。

BALB/c-nu/nu裸鼠(SPF级,5周龄,雄性)购于上海斯莱克实验动物有限公司。饲养及无菌实验操作均在浙江中医药大学动物实验研究中心屏障系统内进行。

1.2 试剂与仪器

DMEM培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、青霉素-链霉素双抗购自Gibco公司;带有荧光素酶基因的质粒载体GV258、嘌呤霉素购自上海吉凯基因化学技术有限公司;BioTeke™细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)购自北京百泰克生物技术有限公司;SYBR™ Premix EX Taq II试剂盒购自TaKaRa公司;D-荧光素钾盐购自Goldbio公司;Cell

Line Optimization Nucleofector™ Solution SE Kit购自Lonza公司。Forma 3111型CO₂培养箱、1300型生物安全柜购自Thermo公司;Axiovert 200荧光倒置显微镜购自ZEISS公司;Bio-Rad IQ5 PCR仪购自Bio-Rad公司;小动物麻醉机购自Summit公司;IVIS Lumia LT小动物活体成像系统购自PerkinElmer公司;4D-Nucleofector™ System购自Lonza公司。

1.3 质粒制备

质粒抽提过程参照TIANGEN无内毒素质粒小提中量试剂盒[DP118,天根生化科技(北京)有限公司]说明书进行。提取的质粒用紫外分光光度计测定浓度,保证浓度至少达到1 μg/μL。GV258载体图谱如图1所示。

1.4 嘌呤霉素最佳筛选浓度的测定

将处于对数生长期的PANC-1细胞用0.25%胰蛋白酶消化,以50%的细胞密度接种于6孔板中,加入含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基于37 °C、5% CO₂培养箱培养过夜。第2 d加入不同浓度的嘌呤霉素(1、2.5、5、7.5、10 μg/mL),每2 d更换新的含有不同浓度嘌呤霉素的培养基,选择4 d后致细胞全部死亡的最小浓度作为筛选浓度。

1.5 细胞转染

参照Lonza Cell Line Nucleofector® Kit说明书的操作步骤进行。取复苏后第4代细胞,处于对数生长期时,以0.25%胰蛋白酶+0.02% EDTA消化细胞,1 000 r/min离心5 min,收集细胞,取 5×10^6 个细胞,轻轻弹试管底部将细胞混匀,以Nucleofector® SE Solution重悬细胞(避免气泡产生),加入8 μg表达荧光素酶的GV258质粒载体,将细胞悬液轻轻加入电转杯中,4D-Nucleofector™ System核转染系统以DN-100程序进行细胞转染。以37 °C预热的培养基将电转杯中的细胞转移至6孔细胞培养板中,37 °C、5% CO₂培养箱培养48 h。

1.6 稳定表达荧光素酶的PANC-1细胞筛选

收集6孔细胞培养板中PANC-1细胞,以 2×10^3 个细胞接种于96孔细胞培养板,第2 d待细胞贴壁后,加入7.5 μg/mL嘌呤霉素,每2~3 d更换新鲜含嘌呤霉

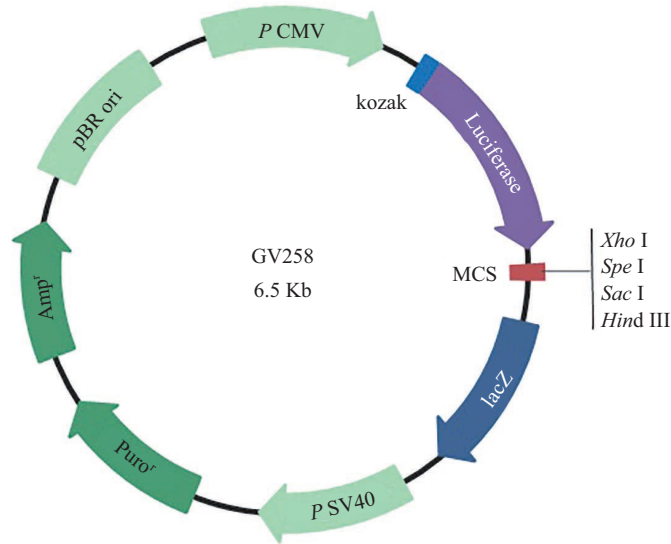


图1 带有荧光素酶基因的GV258质粒载体图谱

Fig.1 Illustration of GV258 vector with firefly luciferase report gene

素的培养基。嘌呤霉素处理后未转染细胞大量死亡, 耐药细胞克隆继续生长, 连续观察21 d。21 d后撤去嘌呤霉素, 存活的单克隆细胞继续常规扩增培养。

1.7 PANC-1-LUC细胞基因组DNA荧光素酶基因的PCR检测

参照BioTeke™细胞/组织基因组DNA提取试剂盒说明书, 采用离心柱法抽提细胞基因组DNA, 于-20 °C储存备用。根据已知萤火虫荧光素酶基因序列(GeneBank序列号M15077.1)设计引物。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列F: 5'-CTG GGA CGA AGA CGA ACA C-3', 引物序列R: 5'-GAA GAC CTG CGA CAC CTG-3', 扩增长度143 bp。Real-time PCR检测细胞基因组DNA目的基因的表达水平, 以 β -actin作内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。

1.8 活体成像系统检测PANC-1-LUC细胞荧光素酶的表达

取对数生长期的PANC-1-LUC细胞消化、计数, 将细胞浓度调整为 5×10^5 /mL, 每孔100 μ L接种于黑色的96孔板中, 依次逐孔倍比稀释, 每个数量级的细胞设3个平行孔, 各孔加入100 μ L D-荧光素(150 μ g/mL), 于IVIS活体成像系统中进行检测。

1.9 活体成像系统检测小鼠体内的荧光素酶表达

取对数生长期的PANC-1-LUC细胞消化、计数, 调整细胞密度为 5×10^7 /mL, 再依次稀释为 2.5×10^7 /mL、 1.0×10^7 /mL、 5.0×10^6 /mL、 2.5×10^6 /mL、 1.0×10^6 /mL,

分别取200 μ L接种于3只裸鼠的背侧皮下(共12个点)。瘤细胞接种后1 h经腹腔给予D-荧光素(150 mg/kg), 注射15 min后, 用麻醉机进行小鼠异氟烷麻醉, 置于小动物活体成像仪中检测荧光素酶的表达情况。

1.10 PANC-1-LUC裸鼠皮下移植瘤生物发光检测

取对数生长期PANC-1-LUC细胞, 调整细胞浓度为 2.5×10^7 /mL, 取200 μ L皮下接种于裸鼠颈背部, 以同样方法皮下接种相同浓度慢病毒载体构建的PANC-1-luc细胞作为对照。1周后观察成瘤率, 并以游标卡尺测量裸鼠移植瘤的瘤结节最大直径a和最小径b, 计算瘤体积(TV), 计算公式为: $TV = 1/2 \times a \times b^2$, 同时, 每周1次按1.7方法检测肿瘤生物发光强度。

1.11 统计学处理

用SPSS 16.0软件进行统计分析, 所有数据以均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm S.E.M.$)表示, 组间比较采用LSD-*t*检验。体内外接种的细胞数、瘤体积与生物发光成像系统中的光通量值的相关性检验采用线性回归分析。 $P < 0.05$ 表示有统计学意义, $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 表示有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 嘌呤霉素最佳筛选浓度的测定结果

按实验设计加入不同浓度的嘌呤霉素(1、2.5、5、7.5、10 μ g/mL), 培养第2 d, 5 μ g/mL以上剂量嘌呤霉素孔中细胞出现大量死亡。培养3 d后, 每孔均可见不同程度的细胞死亡。培养4 d后, 嘌呤霉素浓度

为7.5 $\mu\text{g/mL}$ 和10 $\mu\text{g/mL}$ 的孔中细胞全部死亡。因此,确定嘌呤霉素对人胰腺癌PANC-1细胞的最佳筛选浓度为7.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 PANC-1-LUC阳性克隆的形成

处于对数生长期的PANC-1细胞经4D-Nucleofector™ System核转染系统转染携带有 luc 基因的质粒GV258。48 h后,加入嘌呤霉素(7.5 $\mu\text{g/mL}$),第2 d细胞出现大量死亡,仅有少部分细胞存活。14 d形成克隆,形成的克隆继续在含嘌呤霉素的培养基中筛选培养。第21 d撤去嘌呤霉素,存活的细胞克隆继续常规扩开培养(图2)。

2.3 PANC-1-LUC细胞基因组DNA荧光素酶基因的表达

离心柱法抽提PANC-1-LUC细胞的基因组DNA,以 $luciferase$ 引物对PANC-1-LUC细胞基因组DNA进行Real-time PCR扩增。结果显示,在PANC-1-LUC细胞中,基因组DNA $luciferase$ 的相对表达量是PANC-1细胞的44.3倍(图3)。结果证明,荧光素酶基因已经稳定转入PANC-1细胞,并整合到细胞染

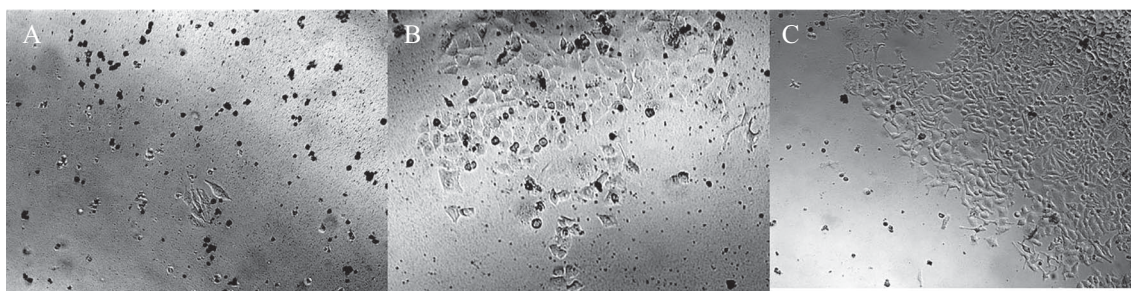
色体DNA中,能稳定表达荧光素酶基因的PANC-1-LUC细胞株构建成功。

2.4 活体成像系统检测PANC-1-LUC细胞荧光素酶的表达

携带有 luc 基因的质粒经4D-Nucleofector™ System核转染系统可以有效转染PANC-1细胞(图4A),经7.5 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素筛选21 d得到高表达荧光素酶的阳性细胞株。在活体成像系统中观察不同接种浓度细胞的生物发光情况,在接种6 250个细胞的孔内可见明显的蓝色,并且孔底面的颜色随着接种细胞数的增多而变亮(图4B),经SPSS线性回归分析,细胞数目与发光值呈直线相关($P<0.01$), $R^2=0.977 5$ (图4C),说明PANC-1-LUC细胞能稳定表达荧光素酶。

2.5 活体成像系统检测PANC-1-LUC细胞在裸鼠体内荧光素酶的表达

皮下接种不同浓度PANC-1-LUC细胞后1 h,活体成像系统中可明确检测到接种部位有生物发光(图5A),且光强度随接种细胞数的增多而增强。经SPSS线性回归分析,接种细胞数与发光值具有显著

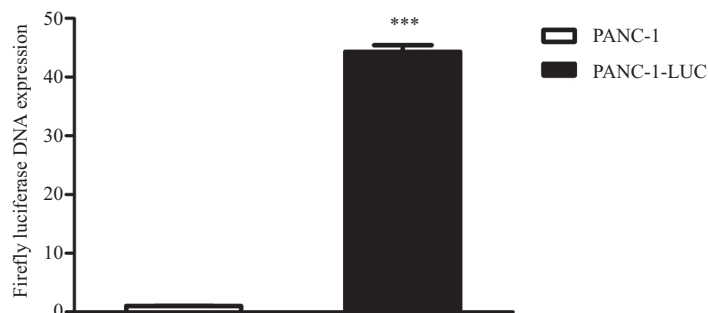


A: PANC-1细胞转染后加嘌呤霉素筛选24 h后的细胞形态; B: 筛选14 d单克隆的细胞形态; C: 筛选21 d阳性克隆增殖的细胞形态。

A: the morphology of PANC-1 cells transfected with Lonza Nucleofector™ after 24 h of being treated by puromycin; B: the morphology of the monoclonal cells after 14 days of being treated by puromycin; C: the proliferation of positive cell clones after 21 days of being treated by puromycin.

图2 显微镜观察PANC-1细胞转染后经嘌呤霉素筛选的细胞形态(100 \times)

Fig.2 Morphology of PANC-1 cells after being transfected with Lonza Nucleofector™ and treated by puromycin by microscopy (100 \times)

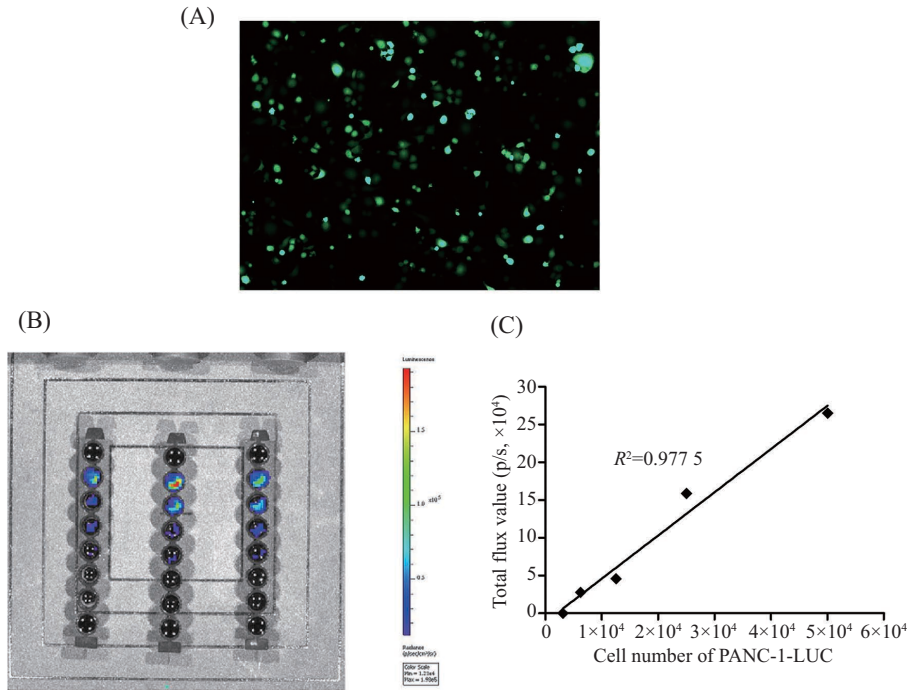


*** $P<0.001$, 与PANC-1细胞相比较。

*** $P<0.001$ vs PANC-1 cells.

图3 PANC-1-LUC细胞基因组DNA荧光素酶基因的表达

Fig.3 Gene expression of firefly luciferase in PANC-1-LUC cells



A: PANC-1细胞转染带有荧光素酶基因的质粒GV258(GFP标记)24 h后, 荧光显微镜下观察细胞GFP表达情况, 90%以上的细胞表达绿色荧光, 100×; B: PANC-1-LUC细胞生物发光图; C: PANC-1-LUC细胞生物发光值。

A: GFP expression of PANC-1 cells was investigated by fluorescence microscopy after transfection with GV258 for 24 h. Above 90% cells expressed green fluorescence, 100×; B: *in vitro* bioluminescence image of PANC-1-LUC cells; C: bioluminescence values of PANC-1-LUC cells *in vitro*.

图4 PANC-1-LUC细胞荧光素酶的表达

Fig.4 Luciferase expression of PANC-1-LUC cells

的线性关系($P<0.01$), $R^2=0.8517$ (图5B)。

2.6 PANC-1-LUC裸鼠皮下移植瘤生长及生物发光特点分析

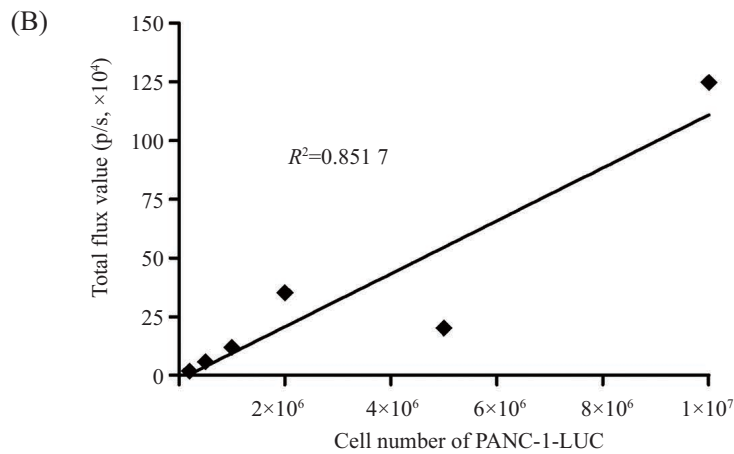
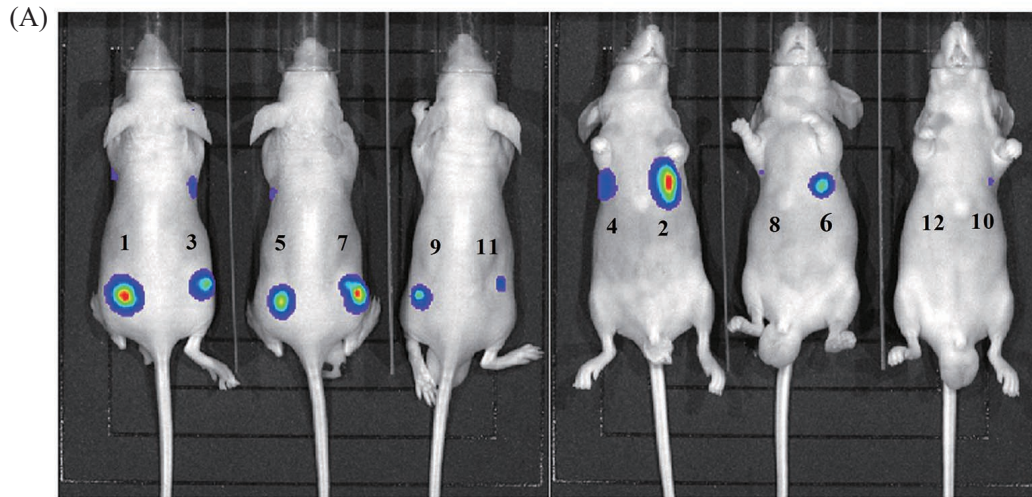
PANC-1-LUC细胞皮下接种裸鼠, 潜伏期为3~5 d, 1周后成瘤率达到80%以上。而同样条件下接种的慢病毒载体构建的PANC-1-luc细胞, 其潜伏期需10~14 d, 接种10 d后成瘤率仅为30%, 19 d后成瘤率才达到80%。观察6周, PANC-1-LUC裸鼠皮下肿瘤生长曲线符合Gompertzian曲线, 而慢病毒载体构建的PANC-1-luc细胞移植瘤接种30 d后才出现对数生长(图6)。

活体成像系统检测移植瘤生物发光强度, 分析其与瘤体积的相关性, 结果如表1所示。接种后10、19、27、34、40 d均可明确检测到接种部位有生物发光, 并且在后4次检测中, PANC-1-LUC移植瘤的光强度与瘤体积具有显著的线性关系($P<0.05$)。而慢病毒载体构建的PANC-1-luc移植瘤在前3次的检测中, 光强度与瘤体积相关系数很小, 未呈现线性关系($P>0.05$), 在34 d和40 d的检测中, 两者呈现较高的相关系数, 具有显著的线性关系($P<0.01$)。

3 讨论

近年来, 活体成像技术作为一种高效、灵敏的新兴检测手段被广泛应用于肿瘤研究。小动物活体成像技术能够无创地连续动态检测各种癌症动物模型中肿瘤的生长及转移及对药物的反应, 评价肿瘤治疗的效果, 实现在实验动物体内肿瘤细胞及分子的示踪^[5-7], 对深入研究肿瘤发生发展机制、相关信号转导通路及肿瘤微环境具有重要意义。活体成像主要包括生物发光和荧光成像两种技术, 其中生物发光是利用荧光素酶基因(*luc*)标记细胞, 表达荧光素酶与小分子底物荧光素在氧和Mg²⁺存在的条件下消耗ATP发生氧化反应而发光, 因此只有在活细胞内才会产生发光现象, 并且荧光强度与标记细胞的数目线性相关^[8-9]。相比较荧光标记, 生物发光具有信号干扰小、成像本底较低、信噪比高且组织穿透力强等优点, 特别适用于动物成像。

目前, *luc*标记细胞最常用的方法是慢病毒载体介导的细胞转染, 慢病毒载体能通过感染细胞将外源基因有效整合到细胞染色体上, 从而达到持久性表达^[10-11]。然而, 慢病毒作为“自杀”性病毒, 虽然其



A: 皮下注射不同浓度PANC-1-LUC细胞1 h后裸鼠的生物发光成像; 编号1~12分别代表了不同的细胞数, 1、2: 1×10⁷, 3、4: 5×10⁶, 5、6: 2×10⁶, 7、8: 1×10⁶, 9、10: 5×10⁵, 11、12: 2×10⁵. B: PANC-1-LUC细胞在裸鼠体内的生物发光值。

A: bioluminescence image in nude mice 1 hour after subcutaneous injection of PANC-1-LUC cells. The number 1 to 12 represent different cell population. Number 1 and 2 represent 1×10⁷ cells, 3 and 4 represent 5×10⁶ cells, 5 and 6 represent 2×10⁶ cells, 7 and 8 represent 1×10⁶ cells, 9 and 10 represent 5×10⁵ cells, 11 and 12 represent 2×10⁵ cells. B: bioluminescence values of PANC-1-LUC cells in nude mice.

图5 PANC-1-LUC细胞在裸鼠体内荧光素酶的强度

Fig.5 Luciferase intensity of PANC-1-LUC cells in nude mice

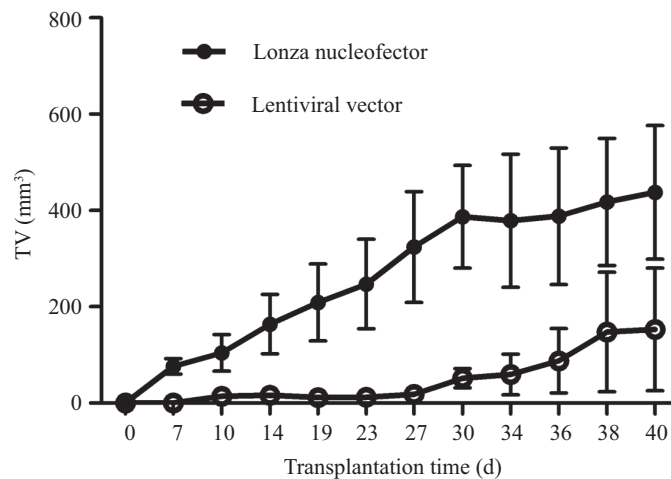


图6 裸鼠皮下移植瘤生长曲线

Fig.6 The curve of the transplantation tumor growth

表1 裸鼠皮下移植瘤生物发光强度及其与瘤体积的相关性

Table 1 Correlation between total flux value of bioluminescence and volume of xenotransplanted tumor

时间(d) Time (d)	Lonza nucleofector-PANC-1-LUC		Lentiviral vector-PANC-1-luc	
	光通量(p/s, $\times 10^7$) Total flux (p/s, $\times 10^7$)	相关系数 <i>r</i>	光通量(p/s, $\times 10^7$) Total flux (p/s, $\times 10^7$)	相关系数 <i>r</i>
10	1.61±1.25	0.757	4.31±1.28	0.095
19	4.07±1.96	0.912*	5.58±1.51	0.386
27	3.40±1.28	0.973**	11.37±4.77	0.203
34	4.08±1.41	0.923**	12.35±10.35	0.985**
40	8.36±2.92	0.822*	102.41±73.41	0.982**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 生物发光强度与瘤体积线性关系的显著性检验。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significance test in linear correlation between total flux value of bioluminescence and volume of xenotransplanted tumor.

毒性基因已经被剔除并被外源性目的基因所取代,但是该病毒仍然具有可能的潜在生物学危险,易激发细胞免疫反应,同时,病毒核酸会随机插入宿主细胞从而影响细胞正常生长。因此,通过慢病毒转染获得稳定表达荧光素酶的肿瘤细胞系在构建小鼠移植瘤模型的过程中,往往出现成瘤率低、潜伏期大大延长、肿瘤生长不正常、裸鼠状态差等问题。本文运用Nucleofector核转染技术,通过电穿孔的方法直接把携带有 luc 基因的质粒导入人胰腺癌PANC-1细胞的细胞核中,24 h后达到90%以上的转染效率(图4A),经嘌呤霉素筛选21 d得到高表达荧光素酶的阳性细胞(图2)。实时定量PCR检测结果证实,荧光素酶基因已经整合到细胞染色体DNA中,能稳定表达荧光素酶基因的PANC-1-LUC细胞株构建成功(图3)。生长曲线表明,与PANC-1细胞比较,本研究获得的PANC-1-LUC细胞生长和形态均未受影响(数据未显示)。

体外生物发光检测结果显示,所筛选的稳定细胞株PANC-1-LUC的生物发光光通量强度与细胞数目呈显著的直线相关,说明PANC-1-LUC细胞能稳定表达荧光素酶。大量研究表明,荧光素腹腔注射裸鼠后,表达荧光素酶的细胞在10~15 min左右发光强度达到最强,并持续20~30 min开始衰弱,约3 h后荧光素排出体外^[12-15]。因此,本研究在给裸鼠腹腔注射荧光素15 min后进行生物发光检测,体内检测结果表明,皮下接种不同浓度PANC-1-LUC细胞后1 h,活体成像系统可明确检测到接种部位有生物发光(图5A),光强度与接种细胞数有显著的线性关系,但 $R^2=0.8517$,说明除了接种细胞数外,还有其他因素可能影响光通量的大小。研究表明,构建裸鼠皮下移植瘤时接种部位、进针角度、注射深度等均会影

响生物发光检测时光通量值^[16]。

进一步用PANC-1-LUC细胞构建裸鼠皮下移植瘤,研究发现,相比同样条件下接种的慢病毒载体构建的PANC-1-luc细胞,Lonza Nucleofector™核转染系统介导构建的PANC-1-LUC细胞在裸鼠体内成瘤的潜伏期大大缩短,接种1周成瘤率即达80%以上,瘤体积可达平均100 mm³;观察6周,裸鼠皮下肿瘤生长符合Gompertzian曲线,与体外细胞生长曲线结果一致(数据未显示)。每周的生物发光检测结果显示,PANC-1-LUC移植瘤的光强度与瘤体积具有显著的线性关系($P < 0.05$)。而慢病毒载体构建的PANC-1-luc移植瘤在接种30 d后的检测中,两者才呈现良好的线性关系($P < 0.01$),这可能与PANC-1-luc移植瘤在30 d后才出现对数生长有关。由此可见,只有当肿瘤生长处于对数生长期的时候,生物发光值与瘤体积才会呈现显著的线性关系。已有研究显示,生物发光的光通量强度与培养皿中标记细胞数之间存在良好的线性关系,但必须以细胞处于对数生长期为前提^[16],这在本研究中得到了体内实验的验证。

体内外生物发光检测结果证实了本文所构建的PANC-1-LUC细胞株能够稳定、长期地表达荧光素酶。相比较慢病毒载体构建的PANC-1-luc细胞,具有体外增殖速度快、体内成瘤潜伏期短、成瘤率高、肿瘤生长符合PANC-1移植瘤的生长特点等优势,更适合构建活体成像研究的裸鼠胰腺癌模型。这为深入研究胰腺癌发生、发展、转移、肿瘤微环境以及肿瘤对药物的反应等打下了基础。

参考文献 (References)

- 1 Luo J, Xiao L, Wu C, Zheng Y, Zhao N. The incidence and sur-

- vival rate of population-based pancreatic cancer patients: Shanghai Cancer Registry 2004-2009. *PLoS One* 2013; 8(10): e76052.
- 2 Jemal A, Bray F, Center MM, Ward E, Ferlay J, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011, 61: 69-90.
- 3 卞石惠, 李 杰, 龚爱华, 陈 晖, 蒋小猛, 张允历, 等. *LIN28*基因对人胰腺癌细胞PANC1和SW1990增殖和迁移的影响. *中国细胞生物学学报*(Bian Shihui, Li Jie, Gong Aihua, Chen Hui, Jiang Xiaomeng, Zhang Youli, *et al.* Effects of *LIN28* gene on proliferation and migration of human pancreatic cancer cells PANC1 and SW1990. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(2): 178-84.
- 4 刘晓霓, 王 爽, 杨 庆, 王娅杰, 陈德喜, 朱晓新. 应用生物发光活体成像技术进行抗肿瘤研究进展. *中国肿瘤*(Liu Xiaoni, Wang Shuang, Yang Qing, Wang Yajie, Chen Dexi, Zhu Xiaoxin. Research progress in the technique of bioluminescence molecular imaging for antitumor. *China Cancer*) 2015; 124(10): 844-8.
- 5 傅惠英, 屠 珏, 凌 云, 张利棕, 寿旗扬, 陈民利. 活体生物发光示踪术观察中国被毛孢抑制小鼠4T1-luc乳腺癌肺转移作用. *浙江中医药大学学报*(Fu Huiying, Tu Jue, Ling Yun, Zhang Lizong, Shou Qiyang, Chen Minli. Effect of *Hirsutella sinensis* mycelium inhibiting lung metastasis by bioluminescent imaging in the 4T1-luc mouse breast cancer model. *Journal of Zhejiang Chinese Medical University*) 2013; 37(2): 121-4.
- 6 Tinkum KL, Marpegan L, White LS. Bioluminescence imaging captures the expression and dynamics of endogenous p21 promoter activity in living mice and intact cells. *Mol Cell Biol* 2011; 31(18): 3759-72.
- 7 Xin J, Zhan YH, Liu MH, Hu H, Xia LM, Nie YZ, *et al.* ApoG2 induces ER stress-dependent apoptosis in gastric cancer cells *in vitro* and its real-time evaluation by bioluminescence imaging *in vivo*. *Cancer Lett* 2013; 336(2): 260-9.
- 8 任苑蓉, 陈 军, 刘红雨, 闫慧琴, 王玉丽, 刘承飞, 等. 应用活体内生物发光技术对人高转移大细胞肺癌细胞L9981成瘤性和转移性研究. *中国肺癌杂志*(Ren Yuanrong, Chen Jun, Liu Hongyu, Yan Huiqin, Wang Yuli, Liu Chengfei, *et al.* The study of the tumorigenicity and metastasis ability in human lung cancer cell line L9981 using *in vivo* imaging. *Chinese Journal of Lung Cancer*) 2008; 11(3): 321-6.
- 9 刘静静, 胡晓俊, 李征然, 李 丹, 颜荣华, 覃 杰, 等. Luciferase2/mKate2双报告基因对小鼠骨髓间充质干细胞的标记及活体光学成像研究. *中山大学学报(医学科学版)*(Liu Jingjing, Hu Xiaojun, Li Zhengran, Li Dan, Yan Ronghua, Qin Jie, *et al.* Bioluminescence imaging and fluorescence imaging on murine BM-MSCs labeled with dual optical reporter gene of Luciferase2/mKate2. *Journal of Sun Yat-sen University, Medical Sciences edition*) 2014; 35(3): 334-9.
- 10 王红明, 朱大兴, 吴志浩, 周清华. 稳定表达荧光素酶的nm23-H1表达缺失人肺癌细胞株的构建及其体内外活性检测. *中国肺癌杂志*(Wang Hongming, Zhu Daxing, Wu Zhihao, Zhou Qinghua. Establishment of the cell line that human lung adenocarcinoma can stably express luciferase which is absent of nm23-H1 expression and detecting its luminescence *in vitro* and *in vivo*. *Chinese Journal of Lung Cancer*) 2012; 15(3): 152-8.
- 11 Akhtar J, Wang Z, Zhang ZP, Bi MM. Lentiviral-mediated RNA interference targeting stathmin1 gene in human gastric cancer cells inhibits proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo*. *J Transl Med* 2013; 11: 212-20.
- 12 Kargiotis O, Chetty C, Gondi CS, Tsung AJ, Dinh DH, Gujrati M, *et al.* Adenovirus-mediated transfer of siRNA against MMP-2 mRNA results in impaired invasion and tumor-induced angiogenesis, induces apoptosis *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo* in glioblastoma. *Oncogene* 2008; 27(35): 4830-40.
- 13 Zuluaga MF, Sekkat N, Gabriel D, van den Bergh H, Lange N. Selective photodetection and photodynamic therapy for prostate cancer through targeting of proteolytic activity. *Mol Cancer Ther* 2013; 12(3): 306-13.
- 14 Kim H, Morgan DE, Buchsbaum DJ, Zeng H, Grizzle WE, Warram JM, *et al.* Early therapy evaluation of combined anti-death receptor 5 antibody and gemcitabine in orthotopic pancreatic tumor xenografts by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Cancer Res* 2008; 68(20): 8369-76.
- 15 Beck BH, Kim HG, Kim H, Samuel S, Liu ZY, Shrestha R, *et al.* Adoptively transferred *ex vivo* expanded gammadelta-T cells mediate *in vivo* antitumor activity in preclinical mouse models of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 122(1): 135-44.
- 16 王海娟, 孟希婷, 栾青春, 梁 萧, 张雪燕, 付 明, 等. 反转录病毒介导的Luciferase基因稳定转染细胞株的建立及其生物发光成像检测. *解放军医学杂志*(Wang Haijuan, Meng Xiting, Luan Qingchun, Liang Xiao, Zhang Xueyan, Fu Ming, *et al.* Establishment of cell strains stably-transfected with luciferase gene mediated by retrovirus and their detection with bioluminescence imaging system. *Med J Chin PLA*) 2012; 37(5): 409-14.