

## 用于活体成像的小鼠肺癌移植瘤模型的建立

张海燕<sup>1,2</sup>, 李艳<sup>1</sup>, 王喆<sup>1</sup>, 张必良<sup>1,2</sup>

1 中国科学院广州生物医药与健康研究院 呼吸疾病国家重点实验室, 广州 510663

2 中国科学技术大学, 合肥 230026

**摘要:** 本研究旨在建立可用于活体成像的小鼠肺癌移植瘤模型。利用脂质体将荧光素酶表达载体 pGL4.17(luc2/neo) 转染至人非小细胞肺癌细胞株 A549, 经 G418 筛选获得稳定表达荧光素酶的细胞克隆。根据体外生物发光情况及细胞的生长特性, 从中挑选合适克隆, 进行裸鼠皮下接种, SCID 鼠尾静脉接种, 建立肺癌移植瘤模型。利用活体成像系统监测肿瘤的生长转移情况, 并用切片 HE 染色进一步验证小鼠模型移植瘤的原位成瘤和转移能力。实验结果表明: 本研究成功地构建了可用于活体成像的小鼠肺癌移植瘤模型, 模型稳定可靠、直观、灵敏, 为肿瘤生长转移机制的研究及抗肿瘤药物的研发提供了重要工具。

**关键词:** 荧光素酶, A549 细胞, 动物模型, 移植瘤, 活体成像

## Establishment of xenograft mouse models to study human lung cancer by using *in vivo* imaging system

Haiyan Zhang<sup>1,2</sup>, Yan Li<sup>1</sup>, Zhe Wang<sup>1</sup>, and Biliang Zhang<sup>1,2</sup>

1 State Key Laboratory for Respiratory Diseases, Guangzhou Institute of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510663, China

2 University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China

**Abstract:** We established xenograft mouse models for studying human lung cancer by using an *in vivo* imaging system. We first transfected pGL4.17 (luc2/neo) plasmid into human non-small lung cancer A549 cells and screened cell lines stably expressing a luciferase reporter gene with G418. Then we analyzed the correlation of luciferase activity and cells number by *in vitro* bioluminescence. Furthermore, we compared cell growth characteristics by cell counting. We selected suitable clones and inoculated subcutaneously into nude mice or intravenously into SCID mice to construct lung cancer xenograft models. Using an *in vivo* imaging system, we monitored the growth and metastasis of the tumors. Finally, we verified the extents of tumorigenesis and metastasis by tissue sections with Hematoxylin and Eosin (HE) staining. In our study, we successfully established the xenograft mouse models for *in vivo* imaging with luciferase expressed lung cancer cells. These models provided convenient, sensitive, intuitive and stable tools for studying the mechanisms of lung cancer progression and development of anticancer drug.

**Keywords:** luciferase, A549 cell, animal model, xenograft, *in vivo* imaging system

**Received:** April 3, 2009; **Accepted:** May 20, 2009

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA02Z191), Bureau of Science and Technology of Guangzhou Municipality (No. 2007Z1-E4041), Science and Technology Development Funds of Guangzhou Development District (No. 2007G-P029).

**Corresponding author:** Biliang Zhang. Tel: +86-20-32290708; E-mail: zhang\_biliang@gibh.ac.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2006AA02Z191), 广州市科技攻关重大项目(No. 2007Z1-E4041), 广州经济开发区科技项目(No. 2007G-P029)资助。

癌症极大地威胁着人类的健康<sup>[1]</sup>, 世界卫生组织最新数据表明, 到 2010 年, 癌症将成为导致人类死亡的第一病因。在我国第 3 次居民死亡原因抽样调查中, 肺癌更是取代肝癌成为我国首位恶性肿瘤死亡原因。目前原发肿瘤的治疗已取得了较大进展, 但癌症的复发和转移仍是癌症治疗的瓶颈。利用免疫缺陷动物建立人类肿瘤动物模型是研究肿瘤体内生长、转移机制以及抗肿瘤药物开发的重要工具<sup>[2]</sup>。但是理想的体内肿瘤生长转移模型并不多, 而且在传统的动物实验中, 需要肿瘤生长到一定程度才能获得检测指标, 很难直观、活体、动态地连续观察肿瘤的生长转移情况, 限制了对肿瘤尤其是早期肿瘤发生、发展、转移、扩散和治疗效果的研究和评价。因此, 建立便于检测的人类肿瘤动物模型具有非常重要的意义。

活体成像技术可以利用活体生物发光或荧光成像直接检测活细胞在动物体内的生物学行为, 目前已成为广泛应用于医学、生物学及药物开发等研究领域的前沿技术<sup>[3-4]</sup>。荧光素酶(Luciferase)是一种常用的信号分子, 可以用来标记肿瘤细胞, 在活体成像技术中也得到了广泛的应用<sup>[5-7]</sup>。本研究采用 pGL4.17[luc2/neo]质粒转染人非小细胞肺癌细胞株 A549, 筛选后获得稳定表达荧光素酶的单克隆细胞株 A549-luc。经体外及体内相关生物学特性鉴定, 探讨这些荧光素酶标记的细胞株是否可用于构建活体成像检测肿瘤转移及药物治疗的模型, 为肺癌生长转移机制的研究和药物开发提供了新的有用工具。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人非小细胞肺癌细胞株 A549 由本实验室保存; pGL4.17[luc2/neo]质粒购自美国 Promega 公司, 含有荧光素酶(Luciferase)的编码基因和 G418 的抗性基因, 保存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 。Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 购自美国 Invitrogen 公司; G418 购自广州威佳生物科技有限公司; 荧光素底物购自北京龙脉得生物技术有限公司。裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司(SCXK(沪)2003-0003), SCID 小鼠购自南京模式动物研究所(SCXK(苏)2005-0002), 均饲养于高度洁净

的 SPF 环境下。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 G418 最佳筛选浓度的确定

A549 细胞常规培养于含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基。取对数生长期细胞, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^4/\text{mL}$ , 每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板中, 置于细胞培养箱常规培养。在细胞接种 24 h 后, 倍比稀释 G418, 建立 0~1 mg/mL 10 个梯度, 加入 96 孔板中, 每种浓度设置 6 个复孔。每天观察细胞生长情况, 在 10~14 d 内使细胞全部死亡的最低 G418 浓度, 即为筛选转染 A549 细胞的工作浓度。

#### 1.2.2 细胞转染

取对数生长期的 A549 细胞, 转染前 1 天将细胞接种于 6 孔板, 24 h 内待细胞融合度达到 70%~90% 即可转染。转染按照 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 试剂操作指南进行操作。转染后细胞置于培养箱常规培养。

#### 1.2.3 G418 筛选抗性细胞及其单克隆化

质粒转染后 48 h, 细胞 1:10 传代到 24 孔板, 同时以相同的密度传代未转染的细胞作为对照。细胞贴壁后, 加入 G418。根据细胞死亡情况和培养基的营养状况及时换液。待对照组细胞全部死亡后, 即得到初步抗性克隆。抗性克隆做荧光素酶活性检测, 表达荧光素酶的克隆制备成单细胞悬液, 接种于 96 孔板, 待其增殖后转入 24 孔板扩大培养。重复此单克隆化过程 3 次, 即得到稳定表达荧光素酶的 A549-luc 细胞。

#### 1.2.4 荧光素酶活性鉴定

调整 A549-luc 细胞浓度分别为  $5.0 \times 10^5/\text{mL}$ 、 $2.5 \times 10^5/\text{mL}$ 、 $1.25 \times 10^5/\text{mL}$ 、 $0.625 \times 10^5/\text{mL}$ 、 $0.313 \times 10^5/\text{mL}$  和  $0.156 \times 10^5/\text{mL}$ , 每孔 100  $\mu\text{L}$  加入 96 孔白板中, 每组设 3 个复孔。每孔加 0.5  $\mu\text{L}$  30 mg/mL 的荧光素底物,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min, 荧光照度计测荧光值。比较各克隆的荧光强度, 并分析荧光强度与细胞数之间的相关性。

#### 1.2.4 细胞生长曲线绘制

取 A549 细胞和表达荧光素酶的 A549-luc 细胞, 接种于 24 孔板, 接种密度为  $2 \times 10^4/\text{孔}$ 。细胞接种后 1~7 d, 每天胰蛋白酶消化其中 3 孔细胞, 用血球计数板测定细胞数。以细胞生长天数为横坐标, 细胞

数目为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。

### 1.2.5 裸鼠皮下移植瘤模型的建立

裸鼠, 6~7 周龄, 体重(20±2) g, 雌性。取对数生长期的 A549 细胞和 A549-luc 细胞制备单细胞悬液, PBS 调整细胞浓度为  $2.5 \times 10^7/\text{mL}$ 。经台盼蓝染色测定细胞活性后, 取 200  $\mu\text{L}$  悬液接种于裸鼠右背侧近腋部皮下, 共接种 3 只。采用美国精诺真活体成像系统(IVIS 200)观测皮下肿瘤细胞的生长情况。观测前每只鼠腹腔注射 150  $\mu\text{L}$  30 mg/mL 荧光素底物, 注射后 10~25 min 进行活体成像。每周 1 次, 连续 4 周。

### 1.2.6 SCID 鼠尾静脉移植瘤模型的建立

SCID 小鼠, 6~7 周龄, 体重为(20±2) g, 雌性。取对数生长期 A549 细胞和 A549-luc 细胞制备单细胞悬液, PBS 调整细胞浓度至  $2.5 \times 10^7/\text{mL}$ 。经台盼蓝染色测定细胞活性后, 取 200  $\mu\text{L}$  悬液尾静脉注射 SCID 鼠, 共接种 3 只。采用美国精诺真活体成像系统(IVIS 200)观测体内肿瘤的生长和转移情况。观测前每只鼠腹腔注射 150  $\mu\text{L}$  30 mg/mL 荧光素底物, 注射后 10~25 min 进行活体成像。每 3 天 1 次, 连续观察 4 周。

### 1.2.7 A549 及 A549-luc 细胞原位成瘤及转移能力的病理形态学观察

A549 细胞和 A549-luc 细胞皮下及尾静脉接种小鼠。皮下模型于接种后 26 d, 脱颈处死裸鼠, 取肿瘤组织; 尾静脉模型于接种后 30 d, 脱颈处死 SCID 鼠, 取肺、脑、心脏、肝、子宫。肿瘤组织和各脏

器制成石蜡切片, 切片厚度 3  $\mu\text{m}$ , 经 HE 染色后观察各细胞的原位成瘤和转移能力。

### 1.3 统计学处理

实验数据用均数 ± 标准差(means ± SD)表示, 采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 稳定表达荧光素酶的 A549 细胞系(A549-luc)的建立及鉴定

通过浓度梯度实验确定 A549 细胞的 G418 筛选浓度为 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 细胞转染 pGL4.17(luc2/neo)质粒后经此浓度的 G418 筛选, 单克隆化筛选出 9 个克隆, 利用荧光素酶活性进行鉴定, 结果如图 1A 所示。其中 A549-luc clone1 的荧光值最高, 其次为 A549-luc clone2 和 A549-luc clone7, 而 A549-luc clone5、A549-luc clone6、A549-luc clone8、A549-luc clone9 荧光值低, 与检测背景值差异不大。采用倍比稀释法稀释 A549-luc clone1、A549-luc clone2、A549-luc clone7, 测量不同细胞数对应的荧光素酶活性, 对细胞数与荧光值的相关性进行分析。分析结果显示, A549-luc clone1 和 A549-luc clone2 的相关系数  $R$  分别为 0.982 和 0.997, 表明荧光值与细胞数有非常强的相关性。A549-luc clone7 的相关系数  $R$  为 0.847, 表明荧光值与细胞数相关性稍差。因此, 通过体外荧光素酶活性检测, 初步鉴定了 A549-luc clone1、A549-luc clone2、A549-luc clone7 为阳性克隆。

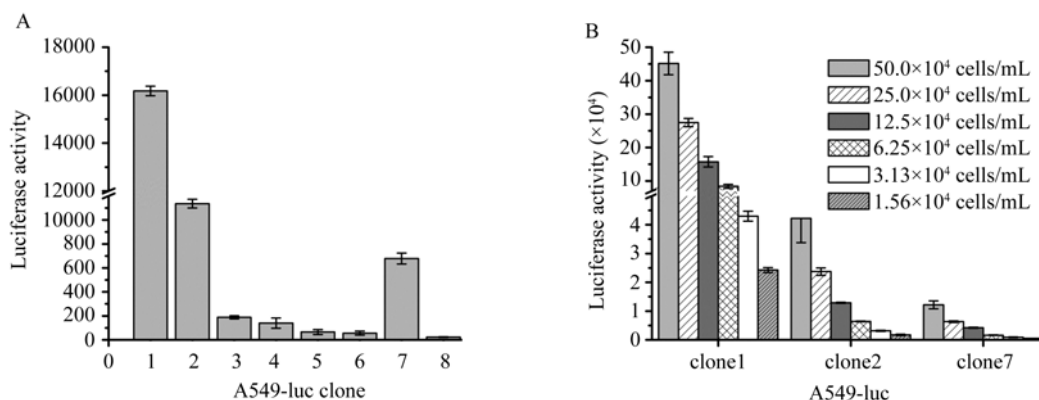


图 1 A549-luc 的荧光素酶鉴定

Fig. 1 Identification of luciferase activity in A549-luc cells. (A) *In vitro* bioluminescence of A549-luc cells. (B) The luciferase activity of different concentration of A549-luc cells.

### 2.2 稳定表达荧光素酶的 A549 细胞系的生长特性

细胞计数观察 A549 细胞和 A549-luc clone1、A549-luc clone2、A549-luc clone7 细胞的生长情况, 结果如图 2 所示。在前 4 天, A549 细胞和筛选出来的 A549-luc clone1、A549-luc clone2、A549-luc clone7 细胞具有相似的生长趋势; 第 5 天和第 6 天, A549-luc clone2 的生长稍快于 A549; 但在第 7 天, A549-luc clone2 生长情况与野生型 A549 相差不大。总体来说, 3 个 A549-luc 细胞株在较长生长周期内与 A549 细胞基本一致, 表明稳定细胞构建过程没有对 A549-luc clone1、A549-luc clone2、A549-luc clone7 的生长特性产生较大影响。

### 2.3 裸鼠皮下移植瘤模型的建立

A549、A549-luc clone1、A549-luc clone2、A549-luc clone7 细胞分别皮下接种裸鼠, 活体成像监测肿瘤细胞在体内的生长情况, 结果如图 3 所示。A549 细胞接种肿瘤体积随时间而增大, 在观察期内无荧光素酶活性(图片未提供), 而构建的稳定表达细胞株在接种 5 d 后均有荧光素酶表达, 其中, A549-luc clone1 的表达较强, A549-luc clone7 的表达则很弱。随着接种天数的增加, A549-luc clone1 荧光值快速增加, 在第 12 天就已达到饱和, 到第 26 天时,

肿瘤中心已出现坏死, 中心荧光值降低。究其原因, 是由于过高的荧光素酶表达, 增加了细胞的负担, 影响肿瘤的生长发展<sup>[8]</sup>。相反, A549-luc clone7 的荧光值增加则非常缓慢, 特别在第 19 天, 只在肿瘤局部检测到荧光, 说明荧光值不能反应肿瘤的增殖情况。分析原因, 很可能是 A549-luc clone7 在体内无 G418 的选择压力下, 由于肿瘤细胞的不断复制分离而导致新增肿瘤细胞荧光素酶基因丢失, 所以 A549-luc clone7 是个假阳性克隆, 不能用来构建用于活体成像的小鼠肺癌移植瘤模型。而 A549-luc

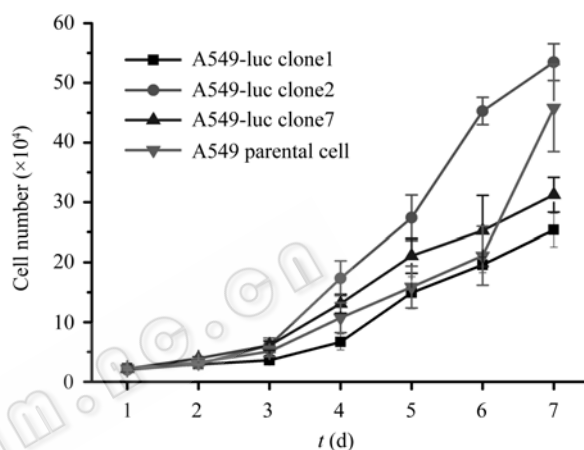


图 2 A549-luc 细胞的生长曲线  
Fig. 2 Growth curve of A549-luc cells.

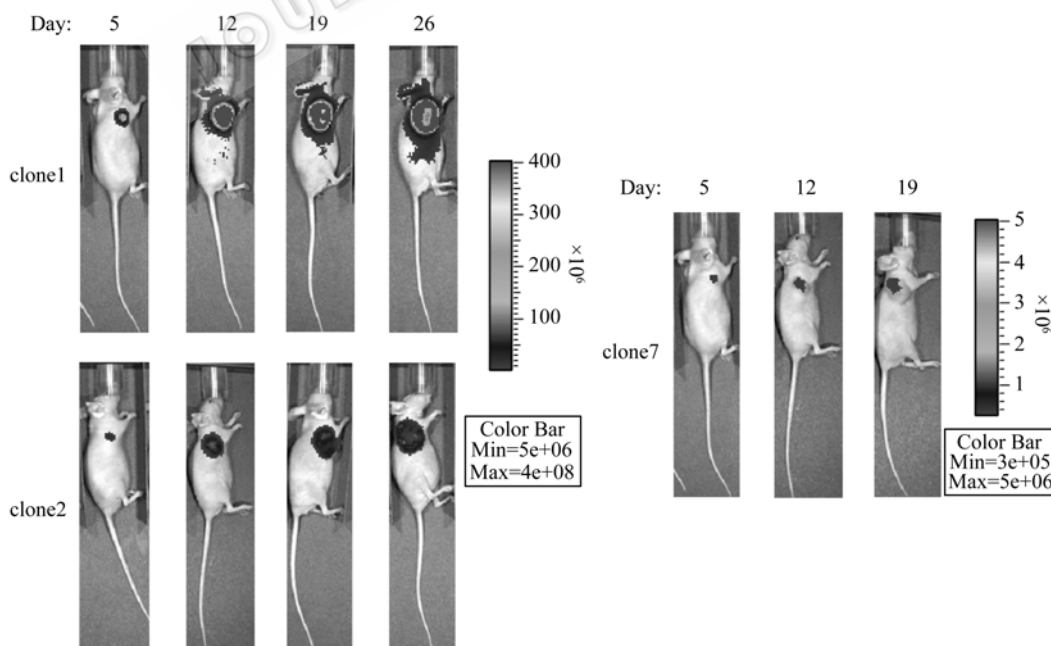


图 3 活体成像监测皮下接种的 A549-luc clone 在裸鼠体内生长情况(n=3)  
Fig. 3 *In vivo* imaging of subcutaneous tumor growth of A549-luc clone cell in nude mice (n=3).

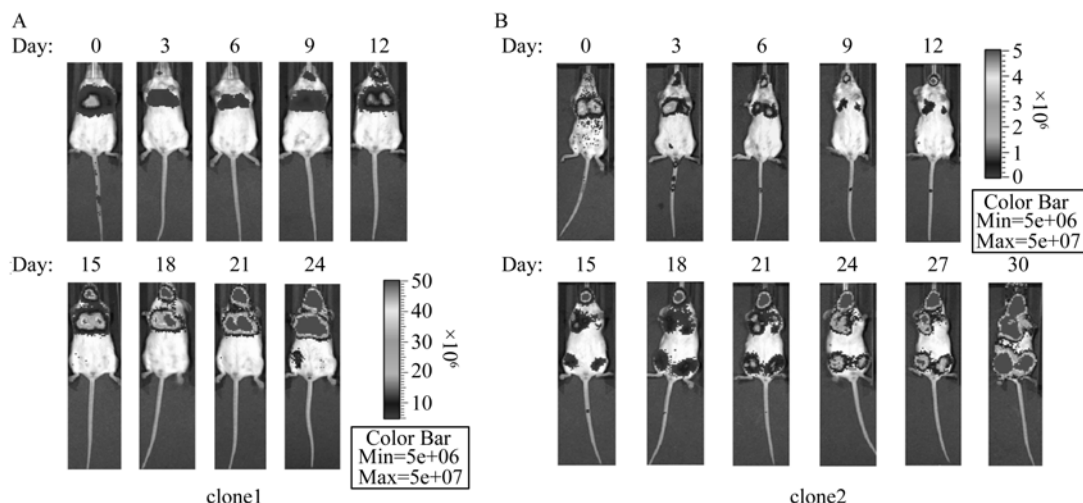


图 4 活体成像监测尾静脉接种的 A549-luc clone 在 SCID 鼠体内的生长情况(n=3)

Fig. 4 *In vivo* imaging of intravenous tumor growth of A549-luc clone cell in SCID mice (n=3). (A) *In vivo* imaging of intravenous tumor growth of A549-luc clone1 cell. (B) *In vivo* imaging of intravenous tumor growth of A549-luc clone2 cell.

clone2 皮下移植瘤的荧光值强度适中, 荧光信号随接种天数增加而逐渐增强, 成功构建了裸鼠皮下移植瘤模型。

#### 2.4 SCID 鼠尾静脉移植瘤模型的建立

A549-luc clone1、A549-luc clone2 细胞尾静脉接种 SCID 鼠, 活体成像监测肿瘤细胞的体内生长情况结果见图 4。由图可以看出, 接种完毕, A549-luc clone 1 细胞主要集中在肺部, A549-luc clone2 细胞则在 SCID 鼠全身分布, 其中肺部信号最强, 尾静脉接种成功。随后几天肿瘤荧光信号减弱, 但随即又逐渐增强, 这是接种后部分细胞死亡, 存活下来的细胞在体内适应繁殖的结果。从图 4 中还可以看出, A549-luc clone1 的荧光集中在 SCID 鼠头部和肺部, 荧光值非常强(图 4A)。SCID 鼠于接种 A549-luc clone1 细胞后第 24 天, 出现自然死亡, 分析其原因可能是过高的荧光素酶表达及其催化的荧光素酶反应消耗了大量能量, 影响 SCID 鼠的存活。而 A549-luc clone2 细胞在第 15 天时, 即在肺部、头部和下腹部均有分布, 说明肿瘤细胞已发生转移。第 30 天观察时, 荧光在 SCID 鼠全身均有分布, 且荧光值强, 反映 A549-luc clone2 细胞的高转移性(图 4B)。综上所述, 利用 A549-luc clone2 能成功构建 SCID 鼠尾静脉移植瘤模型, 该模型能灵敏直观地反映肿瘤在动物体内的生长转移过程。

#### 2.5 A549 及 A549-luc 细胞原位成瘤及转移能力的病理形态学观察

A549 细胞及 A549-luc 细胞皮下接种裸鼠, 26 d 后处死裸鼠, 取肿瘤组织, 观察病理变化, 结果如图 5 所示。各细胞株均在皮下成瘤, 除接种部位外未见其他转移灶。肿瘤组织细胞分裂象多见, 细胞形态不规则。A549-luc clone1 局部出现坏死, 与活体成像结果相吻合, A549、A549-luc clone2、A549-luc clone7 接种的肿瘤组织可见少量炎性细胞浸润, 细胞成瘤能力相差不大。将 A549 及 A549-luc clone1、

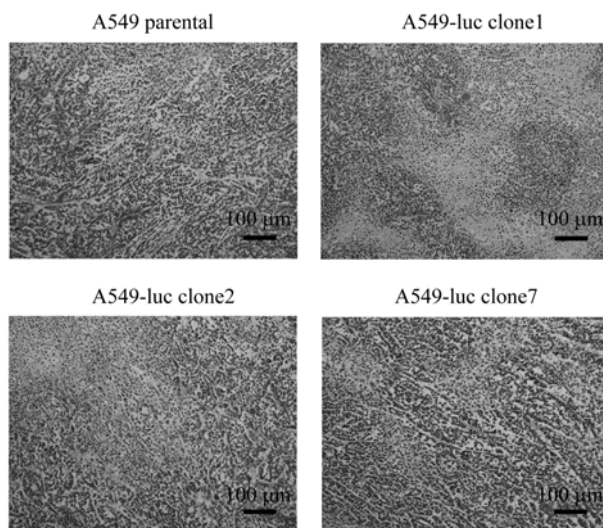


图 5 皮下移植瘤模型的 HE 切片(20×)

Fig. 5 HE staining of xenograft in subcutaneous implanted tumor models (20 ×).

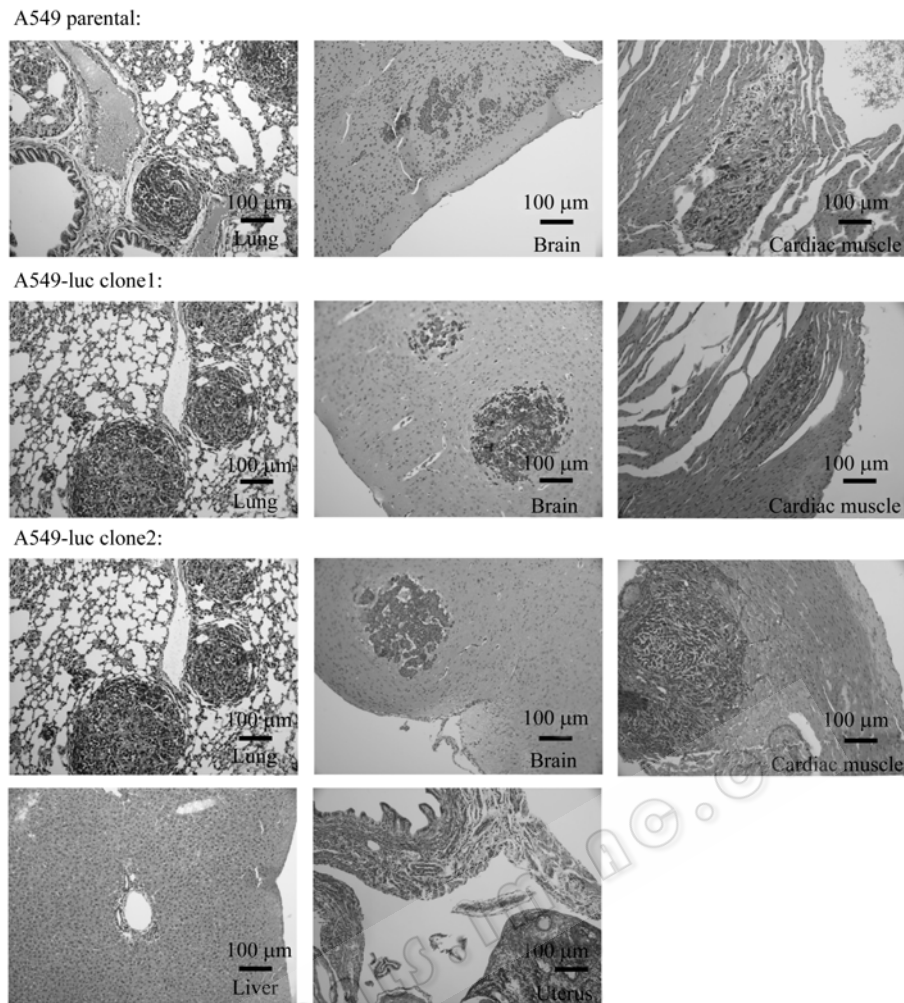


图 6 尾静脉接种模型脏器的 HE 切片 (20×)  
Fig. 6 HE staining of organs in intravenous models (20×).

A549-luc clone2 三株细胞分别尾静脉接种 SCID 鼠, 30 d 后处死 SCID, 取肺、脑、心脏、肝、子宫, 制备 HE 切片, 结果如图 6 所示。3 种细胞的尾静脉模型在肺、脑、心脏中均检测到发病灶, 且肺部成瘤能力明显强于脑和心脏。另外, A549-luc clone2 接种模型还在肝和子宫上检测到发病灶, 而 A549 和 A549-luc clone1 却未在这 2 种器官中检测到发病灶, 说明 A549-luc clone2 的转移能力高于 A549 和 A549-luc clone1 细胞, 更利于研究肺癌的转移情况。

### 3 讨论

活体荧光成像技术已经成为生命科学和医学研究的强有力的手段, 与之相关的活细胞标记技术也得到了越来越快的发展。由于肿瘤细胞通常没有特定的光学性质来区分正常组织, 所以多采取可检测

的特异性标记物来标记肿瘤细胞, 使肿瘤细胞成为发光源, 然后接种活体实现肿瘤细胞的活体成像<sup>[9]</sup>。荧光素酶是应用较多的标记物, 可以和体外导入的荧光素底物发生反应, 产生近红外波长的荧光, 穿透深层组织<sup>[10]</sup>, 是一种理想的活体成像信号分子。目前已有商业化的荧光素酶标记肿瘤细胞出售, 但细胞种类比较单一, 难以满足多样化的实验要求。结合本实验室的研究方向, 希望构建一个高转移肺癌移植瘤模型, 以研究肺癌的生长转移机制。

本研究通过转染 pGL4.17[luc2/neo]质粒构建稳定表达荧光素酶的 A549 细胞株。经过荧光素酶活性检测和体外生长曲线比较, 选择了 3 个克隆进行裸鼠皮下建模, 活体成像观察肿瘤的生长情况, 发现 A549-luc clone2 细胞接种的裸鼠皮下模型具有成模率高, 肿瘤生长稳定的特点。A549-luc clone1 和

A549-luc clone2 细胞尾静脉注射 SCID 小鼠, 活体成像监测细胞体内生长情况, 发现 A549-luc clone2 接种模型的小鼠成活率和肿瘤转移率较高。同时, 对 A549 细胞和 A549-luc 细胞皮下移植模型的肿瘤组织和尾静脉移植模型的脏器组织进行病理形态学分析, 进一步验证了 A549-luc clone2 较好的成瘤和转移能力。此外, 与传统肿瘤检测相比, 活体成像具备如下优点: 灵敏度高, 在接种当天即可检测到荧光值; 且荧光值读数客观, 易于分析; 活体成像结果直观, 可直接观察肿瘤的生长及转移情况; 可以对同一个研究个体进行长时间反复跟踪成像, 避免靠不同时间宰杀动物获得实验数据, 降低了实验成本以及动物组间人为操作差异, 这些特点为后续的研究提供了方便。

综上所述, 本研究成功构建了稳定表达荧光素酶的人非小细胞肺癌 A549-luc 细胞系, 利用该细胞株建立了小鼠肺癌移植瘤模型, 为肺癌的生长转移机制研究及抗肺癌药物的研发提供了一个稳定可靠、直观、方便、灵敏的动物模型。

## REFERENCES

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*, 2006, **56**(2): 106–130.
- [2] Rembrink K, Romijn JC, vanderKwast TH, *et al.* Orthotopic implantation of human prostate cancer cell lines: a clinically relevant animal model for metastatic prostate cancer. *Prostate*, 1997, **31**(3): 168–174.
- [3] Licha K, Olbrich C. Optical imaging in drug discovery and diagnostic applications. *Adv Drug Del Rev*, 2005, **57**(8): 1087–1108.
- [4] Ray P, Wu AM, Gambhir SS. Optical bioluminescence and positron emission tomography imaging of a novel fusion reporter gene in tumor xenografts of living mice. *Cancer Res*, 2003, **63**(6): 1160–1165.
- [5] Caceres G, Zankina R, Zhu X, *et al.* Determination of chemotherapeutic activity *in vivo* by luminescent imaging of luciferase-transfected human tumors. *Anticancer Drugs*, 2003, **14**(7): 569–574.
- [6] Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, *et al.* Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 2003, **20**(8): 733–744.
- [7] Zeamari S, Rumping G, Froot B, *et al.* *In vivo* bioluminescence imaging of locally disseminated colon carcinoma in rats. *Br J Cancer*, 2004, **90**(6): 1259–1264.
- [8] Brutkiewicz S, Mendonca M, Stantz K, *et al.* The expression level of luciferase within tumor cells can alter tumor growth upon *in vivo* bioluminescence imaging. *Luminescence*, 2007, **22**(3): 221–228.
- [9] Yu YA, Timiryasova T, Zhang Q, *et al.* Optical imaging: bacteria, viruses, and mammalian cells encoding light-emitting proteins reveal the locations of primary tumors and metastases in animals. *Anal Bioanal Chem*, 2003, **377**(6): 964–972.
- [10] Caceres G, Zhu XY, Jiao JA, *et al.* Imaging of luciferase and GFP-transfected human tumors in nude mice. *Luminescence*, 2003, **18**(4): 218–223.