

建立分泌型荧光素酶基因标记的原位肝癌模型及用于干扰素 β 基因治疗评价

王刚¹, 连忠辉², 田文洪^{1,2}, 董小岩³, 尉迟捷¹, 吴小兵^{1,4}

1 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所, 北京 100052

2 吉林大学 生命科学学院, 吉林 长春 130012

3 北京五加和分子医学研究所, 北京 100176

4 北京亦庄国际生物医药投资管理有限公司, 北京 100111

王刚, 连忠辉, 田文洪, 等. 建立分泌型荧光素酶基因标记的原位肝癌模型及用于干扰素 β 基因治疗评价. 生物工程学报, 2012, 28(10): 1236-1244.

Wang G, Lian ZH, Tian WH, et al. Application of secretary luciferase labeled orthotopic transplant model of hepatocellular carcinoma to evaluate tumor response to interferon- β gene therapy. Chin J Biotech, 2012, 28(10): 1236-1244.

摘 要: 旨在建立一种分泌型荧光素酶基因标记的小鼠原位移植型肝癌模型并观察其对干扰素 β 基因治疗的反应。首先建立稳定表达分泌型荧光素酶 *Gluc* (*Gaussia princeps* luciferase) 的小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6/*Gluc*; 将该细胞通过脾注射至 C57BL/6 小鼠肝脏建立原位移植型肝癌模型, 通过检测外周血 *Gluc* 活性监测小鼠体内肿瘤生长情况; 用此模型观察水动力注射干扰素 β 质粒 DNA 的抗肿瘤效果。结果表明, 通过脾注射 *Gluc* 基因标记的 Hepa 1-6 细胞可以建立小鼠原位移植型肝癌模型; 外周血 *Gluc* 活性可以有效反映体内接种肿瘤细胞的数量和肿瘤的生长情况; 通过监测外周血 *Gluc* 活性可灵敏反映干扰素 β 基因治疗对肿瘤生长的抑制作用。本研究表明, 利用 *Gluc* 为报告基因建立的小鼠原位移植型肝癌模型可以体外实时监测肿瘤的生长情况, 并能灵敏可靠地用于抗肿瘤治疗效果的评价。

关键词: 荧光素酶, *Gluc*, 肝癌模型, IFN- β , 基因治疗

Received: March 28, 2012; **Accepted:** May 19, 2012

Supported by: National Science and Technology Major Project (Nos. 2008ZX10002-023, 2012AA020810).

Corresponding author: Xiaobing Wu. Tel: +86-10-6352-3187; Fax: +86-10-6353-6871; E-mail: wuxb0168@vip.sina.com

国家科技重大专项 (Nos. 2008ZX10002-023, 2012AA020810) 资助。

Application of secretary luciferase labeled orthotopic transplant model of hepatocellular carcinoma to evaluate tumor response to interferon- β gene therapy

Gang Wang¹, Zhonghui Lian², Wenhong Tian^{1,2}, Xiaoyan Dong³,
Jie Yuchi¹, and Xiaobing Wu^{1,4}

1 Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

2 School of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, Jilin, China

3 Beijing Five Plus Molecular Medicine Institute, Beijing 100176, China

4 Beijing Yizhuang International Biomedical Investment & Management Co. Ltd., Beijing 100111, China

Abstract: To establish an orthotopic transplant mouse model of hepatocellular carcinoma (HCC) labeled with secretary luciferase and to study its response to anti-tumor treatment with interferon- β gene therapy. We labeled the murine hepatoma Hepa1-6 cells with secretary *Gaussia princeps* luciferase (Gluc), and then injected Gluc labeled Hepa1-6 cells intrasplenically in C57BL/6 mice. We monitored blood Gluc to evaluate the tumor development and anti-tumor effects of hydrodynamic injection with interferon- β expressing plasmid. We successfully established the orthotopic mouse model of HCC by intrasplenic injection of Gluc labeled Hepa1-6 cells. The Gluc blood assay could reflect the amount of cancer cells *in vivo*, tumor progression, as well as anti-tumor effect of interferon- β gene therapy. In conclusion, Gluc labeled orthotopic transplant mouse model of HCC can *ex vivo* real-time monitor the tumor development and tumor response to treatments.

Keywords: luciferase, Gluc, model of hepatocellular carcinoma, IFN- β , gene therapy

肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC, 简称肝癌) 是最为常见的肝脏原发恶性病变。动物肝癌模型是研究肿瘤体内生长、转移以及抗肿瘤药物开发的重要工具。通常情况下, 模型体内肿瘤生长情况的监测是比较困难的, 肿瘤需要生长到一定程度才能在体外触及, 往往需要在不同时间处死动物才能测量肿瘤大小, 因此难以获得连续的肿瘤生长数据。这为研究肿瘤的发生和发展, 尤其给肿瘤治疗效果的评价造成了不便。

Gluc 是一种来自于海洋挠脚类动物 *Gaussia princeps* 的分泌型荧光素酶^[1], 是一个理想的体外实时监测体内生物学过程的报告基因^[2-3]。通

过检测外周血中的 Gluc 已经实现了方便地监测接种在动物体内的神经胶质瘤、乳腺癌和肝母细胞瘤^[2-5]。我们试图建立以 Gluc 为报告基因的小鼠原位移植型肝癌模型, 用以方便灵敏地体外实时监测体内肿瘤生长情况, 并尝试用这种模型实时监测和评价肿瘤治疗效果。

1 材料与方法

1.1 材料

含有 *neo* 基因并以 CAG (Cytomegalovirus enhancer, chicken β -actin promoter, β -globin poly A signal) 为启动子的 Gluc 真核表达质粒

pAAV2neo-CAG-Gluc、人干扰素 β (Interferon- β , IFN- β) 真核表达质粒 pAAV2neo-CAG-IFN- β 和增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced green fluorescent protein, EGFP) 真核表达质粒 pAAV2neo-CAG-EGFP 由本室构建和保存。来源于 C57L 小鼠的肝癌细胞株 Hepa 1-6 购自美国 ATCC, 由本室保存。3~4 周龄雄性 C57BL/6 小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司。质粒大提试剂盒购自德国 Qiagen 公司; DMEM 培养基、胎牛血清和脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司; G418 和戊巴比妥钠购自北京欣经科生物技术有限公司; Gaussia 荧光素酶检测试剂盒购自美国 NEB 公司; VeriKine-HS™ Human IFN- β ELISA 检测试剂盒购自美国 PBL 公司。

1.2 细胞培养、转染和筛选

Hepa 1-6 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液于 5% 的 CO₂ 培养箱中培养。用脂质体 lipofectamine™ 2000 按说明书将 pAAV2neo-CAG-Gluc 质粒转染 Hepa 1-6 细胞, 用含 G418 (400 μ g/mL) 的选择性培养基培养 15 d, 获得稳定表达 Gluc 的 Hepa 1-6 细胞 (Hepa 1-6/Gluc)。

1.3 细胞生长曲线和培养上清中 Gluc 活性测定

取 Hepa 1-6/Gluc 细胞, 接种于 24 孔板, 接种密度为 5×10^3 cell/孔, 每天更换培养基。接种后 1~8 d, 每天取 3 孔细胞的培养上清, 用 PBS 缓冲液稀释 100 倍后取 2.5 μ L 使用 Gaussia 荧光素酶检测试剂盒检测, 按照说明书进行操作, 使用发光检测仪收集 10 s 光信号并测定其相对光强度(Relative light units, RLU)。然后用胰蛋白酶消化上述 3 孔细胞, 用血球计数板测定细胞数,

并绘制细胞生长曲线。

1.4 脾注射法制备小鼠原位肝癌模型

取对数生长期的 Hepa 1-6 细胞, 常规消化、吹打, 尽量分散细胞。用 PBS 缓冲液洗涤细胞两次, 并计数, 最终用 PBS 缓冲液稀释成 1×10^7 cell/mL 浓度的细胞悬液, 置于 4 $^{\circ}$ C 备用。取 3~4 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, 按照 75 mg/kg 剂量腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉。小鼠右侧卧位, 固定于鼠板, 常规消毒, 于背侧中部、左侧腋中线与腋后线间剪开约 0.5~0.8 cm 左右切口, 完全游离脾脏, 用 30 G 的胰岛素注射器吸取 100 μ L 的 Hepa 1-6 细胞悬液 (1×10^6 cell), 于脾脏上极沿脾脏纵轴进针, 缓慢注入脾内, 结扎脾蒂切除脾脏, 全层缝合腹壁。

1.5 外周血 Gluc 活性检测

小鼠接种 Hepa 1-6/Gluc 细胞后, 尾静脉采血 2.5 μ L, 加入 Gaussia 荧光素酶检测试剂盒中的底物 50 μ L, 使用发光检测仪收集 10 s 光信号并测定其相对光强度。

1.6 水动力法体内转染 IFN- β 基因和 EGFP 基因并检测其表达

取小鼠体重 10% 的生理盐水, 将 10 μ g 的 pAAV2neo-CAG-IFN- β 或 pAAV2neo-CAG-EGFP 溶于其中, 并于 5~7 s 内经小鼠尾静脉快速注射入体内。尾静脉采血, 分离血清, 用 VeriKine-HS™ Human IFN- β ELISA 检测试剂盒按说明书操作检测外周血 IFN- β 水平。取小鼠肝脏制作冰冻切片, 于荧光显微镜下观察 EGFP 在肝脏的表达。

1.7 肿瘤大体和病理

小鼠接种 Hepa 1-6/Gluc 细胞后不同时间,

观察肿瘤大体并照相,取肿瘤组织做石蜡切片,常规 HE 染色观察病理形态。

2 结果

2.1 Gluc 标记的 Hepa 1-6 细胞的鉴定

通过 G418 筛选获得稳定表达 Gluc 的 Hepa 1-6/Gluc 细胞株,生长曲线(图 1A)显示 Hepa 1-6/Gluc 细胞经历了潜伏期、指数生长期并进入平台期,细胞生长良好。24 孔板中的细胞数目在 8 d 的培养中从 $(7.01 \pm 0.78) \times 10^3$ cell 增长至 $(1.15 \pm 0.15) \times 10^6$ cell,增殖了 164 倍。细胞培养上清 Gluc 检测结果显示(图 1B),Gluc 活性从 $(5.27 \pm 0.94) \times 10^4$ RLU 增长至 $(5.18 \pm 0.07) \times 10^6$ RLU,增长了 98 倍,Gluc 监测曲线很好地体现出细胞生长的潜伏期、指数生长期和平台期;Gluc 活性与细胞数两者均数之间具有极好的相关性 ($R^2=0.998$) (图 1C)。以上结果说明,Gluc 能可靠、灵敏地反映体外培养 Hepa 1-6/Gluc 细胞的数量和生长情况。

2.2 Gluc 标记小鼠原位肝癌模型的建立

将 1×10^5 、 3×10^5 、 1×10^6 、 3×10^6 和 1×10^7 cell

的 Hepa 1-6/Gluc 细胞通过脾注射接种至 C57BL/6 小鼠 ($n=4$),在接种后 2 h 检测外周血 Gluc 活性,观察 Gluc 活性是否可靠反映接种细胞的数目。结果发现, 1×10^5 cell 的 Hepa 1-6/Gluc 细胞接种即可在外周血检测到 Gluc 的表达,Gluc 活性随细胞接种量的增加而升高, 1×10^7 cell 的细胞接种后可达到 $(3.35 \pm 0.52) \times 10^4$ RLU; Gluc 活性与接种细胞数具有很好的相关性 ($R^2=0.925$) (图 2A)。

然后观察了 Hepa 1-6/Gluc 细胞的成瘤性, 1×10^6 cell 以上的 Hepa 1-6/Gluc 细胞脾注射均可造成 100% 小鼠出现移植型肝癌。 1×10^6 cell 的 Hepa 1-6/Gluc 细胞注射的小鼠在接种后 5 d,肝表面出现肉眼可见的散在白色结节,多出现在肝缘部位。在接种后 20 d,肝表面出现弥漫性的白色结节(图 2B),除肝脏外,脾脏的注射部位也出现了白色结节(图 2B),其他脏器未见结节。

然后用 1×10^6 cell 的 Hepa 1-6/Gluc 细胞脾注射制作了小鼠原位肝癌模型并检测了外周血 Gluc 活性的变化。由于 Hepa 1-6/Gluc 细胞在脾脏的生长会影响 Gluc 监测肝脏肿瘤的准确性,

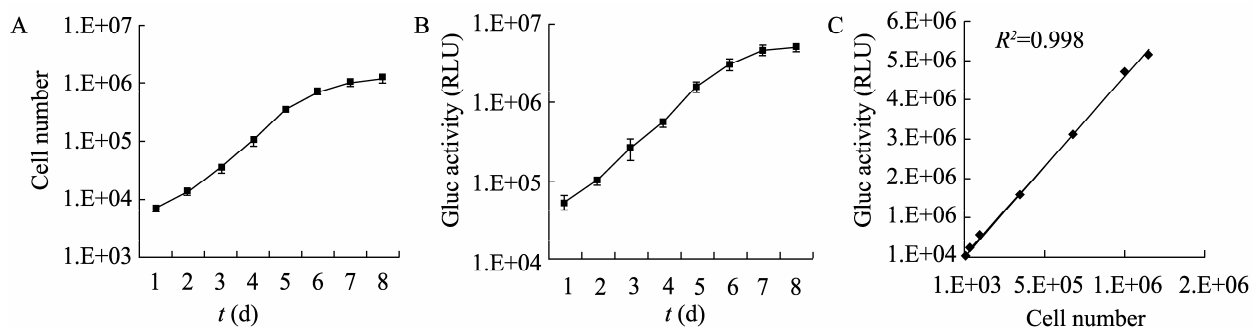


图 1 Gluc 标记的 Hepa 1-6 细胞 (Hepa 1-6/Gluc) 的鉴定

Fig. 1 Identification of the Gluc labeled Hepa 1-6 cell (Hepa 1-6/Gluc). (A) Growth curve of the Hepa 1-6/Gluc cell. (B) Time-course data of the Gluc activities in the Hepa 1-6/Gluc cell culture supernatants. (C) Correlation of the cell culture supernatant Gluc activity to the Hepa 1-6/Gluc cell number.

因此我们在制作模型时将脾脏进行了切除。结果显示 (图 2C), 接种 2 h 后外周血 Gluc 活性为 $(1.01 \pm 0.16) \times 10^4$ RLU, 接种 1 d 后下降至 $(8.29 \pm 1.4) \times 10^3$ RLU, 从接种 2 d 起 Gluc 活性出现指数级升高, 在 18 d 时达到 $(6.28 \pm 1.16) \times 10^6$ RLU, 指数增长期一直持续至 18~21 d, 随后 Gluc 增长进入平台期。模型动物从 23 d 出现死亡, 存

活期为 (27.00 ± 2.92) d。

为了探讨外周血 Gluc 水平能否反映肝脏肿瘤的生长情况, 分别在 1×10^6 cell 的 Hepa 1-6/Gluc 细胞接种后 3 d、7 d、14 d 和 21 d, 各取 3 只小鼠, 观察肝脏肿瘤大体, 与外周血 Gluc 活性进行对比。结果显示 (图 2D, E), 在接种后 3 d 肝脏未形成明显结节, 但肝脏表面尤其肝缘部位出

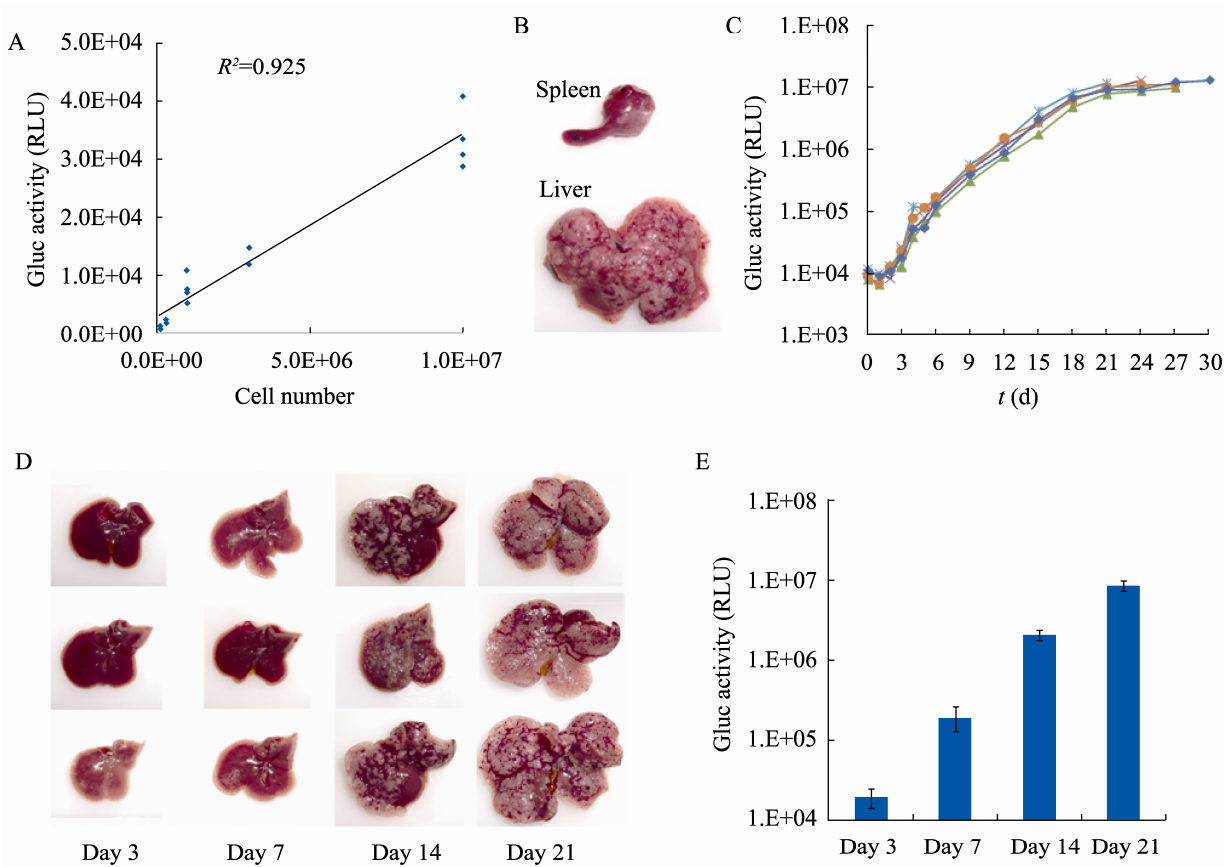


图 2 建立 Gluc 标记的原位移植型肝癌模型

Fig. 2 Establishment of the Gluc labeled orthotopic transplant model of HCC. (A) Correlation of the blood Gluc activity to the inoculated Hepa 1-6/Gluc cell number ($n=4$). (B) Tumor mass in the spleen (upper) and the liver (lower) 20 d after intrasplenic injection of Hepa 1-6/Gluc cells. (C) Time-course data of the blood Gluc activity in five independent mouse models. (D) Tumor mass in the liver on 3 d, 7 d, 14 d and 21 d after intrasplenic injection of Hepa 1-6/Gluc cells. (E) Blood Gluc activities on 3 d, 7 d, 14 d and 21 d after intrasplenic injection of Hepa 1-6/Gluc cells.

现苍白色,外周血 Gluc 值为 $(1.90\pm 0.50)\times 10^4$ RLU;接种后 7 d 肝脏表面出现十几个至数十个不等的白色结节,肝缘部位有少量结节汇合成片,外周血 Gluc 值为 $(1.91\pm 0.64)\times 10^5$ RLU;接种后 14 d 肝脏表面出现大量白色结节,50%以上汇合成片,外周血 Gluc 值为 $(2.02\pm 0.37)\times 10^6$ RLU;接种后 21 d 肝脏表面出现弥漫性白色结节,几乎不见正常肝组织,外周血 Gluc 值为 $(8.79\pm 1.27)\times 10^6$ RLU。上述结果显示,外周血 Gluc 活性随肿瘤的生长而升高,与肿瘤大体符合,可以客观反映肝脏肿瘤的生长情况。

2.3 利用 Gluc 实时监测肝癌模型对干扰素 β 基因治疗的反应

随后我们对建立的肝癌模型进行了干扰素 β 的基因治疗,小鼠接种 1×10^6 cell 的 Hepa 1-6/Gluc 细胞后 5 d,通过尾静脉水动力注射 10 μg 的 pAAV2neo-CAG-IFN- β 质粒 ($n=5$) 和对照质粒 pAAV2neo-CAG-EGFP ($n=5$),探讨通过监测外周血 Gluc 水平能否可靠反映抗肿瘤治疗的效果。

首先检测了 EGFP 和 IFN- β 在小鼠模型中的表达情况。水动力注射后 24 h 做肝脏冰冻切片,荧光显微镜观察后做 HE 染色区别肝组织和肿瘤组织。结果见图 3A,HE 染色显示在正常肝组织中出现数个肿瘤团块;荧光显微镜观察显示水动力注射造成约 30% 的肝细胞表达了 EGFP,而所有肿瘤组织中未见绿色荧光。这说明水动力注射质粒至小鼠移植型肝癌模型能造成外源基因转导正常肝脏组织,而不能转导肝癌组织。小鼠模型水动力注射 IFN- β 表达质粒后 24 h 外周血中

IFN- β 的检测值为 $(3\ 362\pm 605)$ pg/mL。

外周血 Gluc 监测结果 (图 3B) 发现, Hepa 1-6/Gluc 细胞接种后,外周血 Gluc 活性与先前的研究结果一致,1 d 后出现轻度的下降,从 2 d 起进入指数级的增长,在第 5 d 给予 IFN- β 基因治疗前 Gluc 活性为 $(8.17\pm 1.89)\times 10^4$ RLU。EGFP 对照组小鼠在质粒注射后,外周血 Gluc 活性仍呈指数级增长,直至 18~21 d 进入平台期,随后出现小鼠死亡。与 EGFP 对照组相比,IFN- β 注射组的 3 只小鼠在治疗后 4 d 出现 Gluc 活性的明显抑制,随后出现迅速下降,分别在 21~24 d 时降至阴性水平 (<300 RLU);IFN- β 组的另 2 只小鼠 Gluc 活性也出现一定程度的抑制,但仍持续升高,直至小鼠死亡。观察小鼠的生存情况 (图 3C) 显示,EGFP 对照组小鼠在 50 d 的观察期内全部死亡,平均生存期为 21.60 d;而 IFN- β 组存活率为 60%,Gluc 转阴的 3 只小鼠均未出现死亡,2 只死亡小鼠的平均生存期为 27.50 d,较对照组延长。治疗 50 d 后观察 Gluc 转阴的小鼠肝脏大体情况,发现肝脏肿瘤消失,肝组织 HE 染色未见肿瘤组织 (图 3D)。IFN- β 注射组中肿瘤获得清除的 3 只小鼠治疗后 20 d 外周血 IFN- β 的检测值为 $(2\ 475\pm 589)$ pg/mL,而肿瘤持续生长的 2 只小鼠外周血 IFN- β 的检测值明显降低,分别为 413 pg/mL 和阴性 (<250 pg/mL),这可能是肿瘤生长造成正常肝细胞不能良好表达 IFN- β 。上述结果说明,IFN- β 基因治疗有效抑制了小鼠肝癌模型中肿瘤的生长,甚至可以完全清除肝癌细胞,外周血 Gluc 活性灵敏可靠地反映了 IFN- β 的抗肿瘤治疗效果。

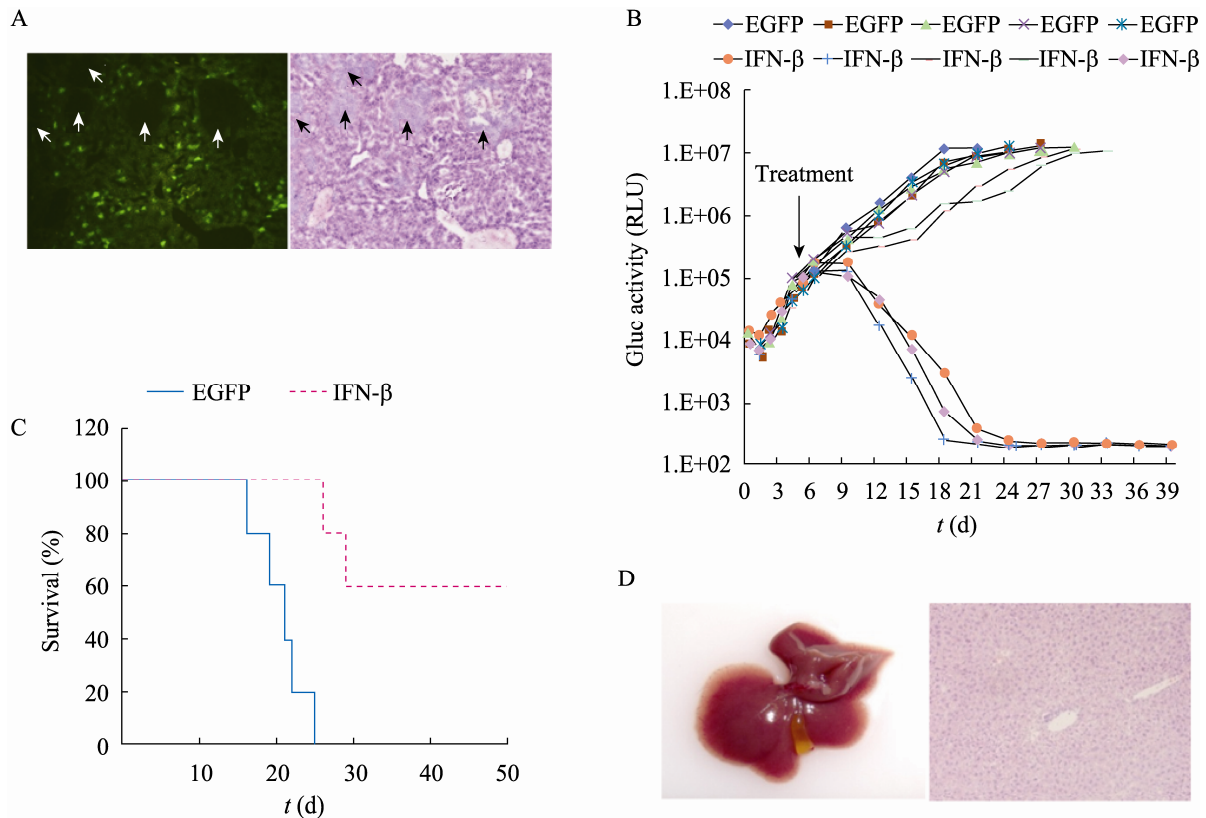


图3 利用 Gluc 监测肿瘤对干扰素 β 基因治疗的反应

Fig. 3 Using Gluc to monitor tumor response to the interferon- β gene therapy. (A) Expression of EGFP in the tumor and the liver for the mouse model hydrodynamic injection with EGFP expressing plasmid (arrows indicate tumors). (left) Fluorescence (100 \times), (right) HE staining (100 \times). (B) Blood Gluc activities for independent mouse models with hydrodynamic injection of IFN- β or EGFP expressing plasmid ($n=5$). (C) Survival curve in IFN- β treated mouse models vs EGFP control animals ($n=5$). (D) Liver mass (left) and HE staining (200 \times) (right) for IFN- β treated mouse models surviving beyond 50 d.

3 讨论

传统的原位移植型肝癌模型难以实现无侵入性的、实时连续监测体内肿瘤的生长情况,限制了对肿瘤发生、发展的研究和治疗效果的评价。利用荧光素酶标记肿瘤细胞并结合动物活体成像定位和监测肿瘤的生长可以一定程度解决这个困难,但需要注射底物和麻醉动物,并且光

学信号需要透过组织得到接收,使得精确性较差^[2-6]。目前仍需要更灵敏和更方便的方法实现体外监测动物模型体内肿瘤的生长情况。因此,本研究尝试以分泌型荧光素酶 Gluc 为报告基因,建立可以体外实时监测肿瘤生长情况的小鼠原位移植型肝癌模型。Gluc 具有极高的灵敏度,较萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶灵敏 2 000 倍,较分泌型碱性磷酸酶灵敏 20 000 倍^[1-3]。Gluc 可

以分泌入血,通过尾静脉微量采血测定 Gluc 活性可以方便地监测体内生物学过程^[2-3]。Gluc 在血液中具有很短的半衰期(大约 20 min),不会随时间而积累,可以得到体内的实时信息^[2-3]。Gluc 已经开始用于体外监测体内生物学情况,比如实时监测小鼠肿瘤模型中肿瘤的生长^[2-6]、小鼠体内基因表达^[7-8]和肝脏 miRNA 活性^[9]。

选择来源于 C57L 小鼠的肝癌细胞系 Hepa 1-6 作为肝癌模型的接种细胞。利用 Gluc 标记 Hepa 1-6 细胞后,体外培养时细胞生长良好,培养上清中 Gluc 活性可以灵敏可靠地反映细胞数量和细胞的生长情况。将 1×10^6 cell 的 Gluc 标记 Hepa 1-6 细胞通过脾注射至 C57BL/6 小鼠肝脏成功造成了原位移植型肝癌模型。由于脾脏也出现了肿瘤结节,因此我们在脾注射后将脾脏进行了切除。研究发现,小鼠模型外周血 Gluc 活性既能可靠反映体内接种的肿瘤细胞数量也能灵敏反映体内肿瘤的生长情况,Gluc 活性与肿瘤的大体情况一致。我们成功利用 Gluc 为报告基因建立了可以体外实时监测的小鼠原位移植型肝癌模型。

为证实外周血 Gluc 活性能否反映抗肿瘤治疗的效果,我们通过水动力注射干扰素 β 表达质粒对小鼠肝癌模型进行基因治疗。干扰素是常用的抗肿瘤细胞因子,具有直接杀伤肿瘤细胞、免疫调节和抑制肿瘤血管生成的作用^[10-12]。注射干扰素 β 可以抑制肝癌细胞的生长并且抑制肝癌的复发^[13-14]。由于干扰素具有较高毒性,为实现在体内长期维持较低血药浓度,人们开始选择干扰素的基因治疗。利用腺相关病毒载体将 IFN- β 基因导入小鼠肝脏获得了长期低剂量表达 IFN- β , 成功预防和清除小鼠神经胶质瘤和黑色素瘤等肿

瘤^[15-16]。水动力注射法是简单高效的小鼠转基因方法,转导的基因可以高效在肝脏表达^[7-9,17-18]。本研究选择了水动力方法注射携带 IFN- β 基因质粒 DNA 至小鼠模型,进行 IFN- β 基因治疗。通过观察报告基因在肝脏和肿瘤的表达,我们证实水动力注射质粒至移植型肝癌模型可以造成外源基因转导正常肝脏组织,而不能转导肝癌组织。水动力注射 IFN- β 表达质粒后 1 d,小鼠外周血即检测到 IFN- β 表达,在注射后 20 d 仍维持在较高水平,从而达到了长期低剂量的 IFN- β 治疗。小鼠模型给予 IFN- β 基因治疗获得成功,实验组 60% 的小鼠肿瘤得以完全清除。外周血 Gluc 活性监测显示治疗组小鼠 Gluc 活性均出现抑制,部分小鼠 Gluc 出现下降,直至最终检测不到。肝脏大体和病理研究发现所有 Gluc 阴性小鼠的肿瘤均得以完全清除。因此,外周血 Gluc 活性可以灵敏可靠地反映 IFN- β 的抗肿瘤治疗效果。

本研究通过脾注射分泌型荧光素酶 Gluc 标记的 Hepa 1-6 细胞在 C57BL/6 小鼠建立了原位移植型肝癌模型。通过检测外周血 Gluc 水平可以体外实时定量监测体内肿瘤的生长情况并可以灵敏可靠地反映抗肿瘤治疗的效果。本方法具有方便、灵敏和实时监测的特点,实现了对单一动物个体的长期研究,有利于对肝癌的发生、发展以及抗肿瘤治疗效果的研究。

REFERENCES

- [1] Tannous BA, Kim DE, Fernandez JL, et al. Codon-optimized *Gaussia* luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and *in vivo*. *Mol Ther*, 2005, 11(3): 435-443.
- [2] Wurdinger T, Badr C, Pike L, et al. A secreted luciferase for *ex vivo* monitoring of *in vivo*

- processes. *Nat Methods*, 2008, 5(2): 171–173.
- [3] Bovenberg MSS, Degeling MH, Tannous BA. Enhanced *Gaussia* luciferase blood assay for monitoring of *in vivo* biological processes. *Anal Chem*, 2012, 84(2): 1189–1192.
- [4] Ellerkamp V, Armeanu-Ebinger S, Wenz J, et al. Successful establishment of an orthotopic hepatoblastoma *in vivo* model in NOD/LtSz-scid IL2R γ null mice. *PLoS ONE*, 2011, 6(8): e23419.
- [5] Chung E, Yamashita H, Au P, et al. Secreted *Gaussia* luciferase as a biomarker for monitoring tumor progression and treatment response of systemic metastases. *PLoS ONE*, 2009, 4(12): e8316.
- [6] Inoue Y, Sheng F, Kiryu S, et al. *Gaussia* luciferase for bioluminescence tumor monitoring in comparison with firefly luciferase. *Mol Imaging*, 2011, 10(5): 377–385.
- [7] Tian WH, Wang G, Luo ST, et al. Real time *ex vivo* detection and dynamic monitoring of *in vivo* expression of secreted luciferase gene injected by hydrodynamic method. *Chin J Biotech*, 2009, 25(10): 1552–1557.
田文洪, 王刚, 罗顺涛, 等. 体外实时动态监测水动力注射分泌型荧光素酶基因的表达. *生物工程学报*, 2009, 25(10): 1552–1557.
- [8] Luo ST, Tian WH, Wang G, et al. Comparison of TTR and CMV promoters *in vivo* and *in vitro* via a secreted luciferase reporter system. *Chin J Virol*, 2009, 25(6): 424–429.
罗顺涛, 田文洪, 王刚, 等. 用分泌型荧光素酶报告系统比较 TTR 启动子与 CMV 启动子的体内外表达特性. *病毒学报*, 2009, 25(6): 424–429.
- [9] Wang G, Dong XY, Hu JY, et al. Long-term *ex vivo* monitoring of *in vivo* microRNA activity in liver using a secreted luciferase sensor. *Sci China Life Sci*, 2011, 54(5): 418–425.
王刚, 董小岩, 胡键阳, 等. 利用分泌型荧光素酶体外长期监测小鼠肝脏 microRNA 活性. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41(4): 273–280.
- [10] Johns TG, Mackay IR, Callister KA, et al. Antiproliferative potencies of interferons on melanoma cell lines and xenografts: higher efficacy of interferon β . *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84(15): 1185–1190.
- [11] Sondak VK. How does interferon work? Does it even matter? *Cancer*, 2002, 95(5): 947–949.
- [12] Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(1): 11–22.
- [13] Wang L, Tang ZY, Qin LX, et al. High-dose and long-term therapy with interferon- α inhibits tumor growth and recurrence in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma xenografts with high metastatic potential. *Hepatology*, 2000, 32(1): 43–48.
- [14] Ikeda K, Arase Y, Saitoh S, et al. Interferon beta prevents recurrence of hepatocellular carcinoma after complete resection or ablation of the primary tumor-A prospective randomized study of hepatitis C virus-related liver cancer. *Hepatology*, 2000, 32(2): 228–232.
- [15] Streck CJ, Dickson PV, Ng CYC, et al. Adeno-associated virus vector-mediated systemic delivery of IFN- β combined with low-dose cyclophosphamide affects tumor regression in murine neuroblastoma models. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(16): 6020–6029.
- [16] Streck CJ, Dickson PV, Ng CYC, et al. Antitumor efficacy of AAV-mediated systemic delivery of interferon- β . *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(1): 99–106.
- [17] Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther*, 1999, 6(7): 1258–1266.
- [18] Kamimura K, Suda T, Zhang GS, et al. Advances in gene delivery systems. *Pharmaceut Med*, 2011, 25(5): 293–306.