

## 生物发光显像技术对血管生成抑制因子 *vasostatin* 在肿瘤细胞 PC3 中活性监测

胡洁淼, 邱飞婵, 阴 彬, 龚燕华, 袁建刚, 强伯勤, 王世真, 彭小忠

中国医学科学院 北京协和医学院 基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室  
国家人类基因组北方基因中心, 北京 100005

通信作者: 彭小忠 电话: 010-65296411, 电子邮件: pengxiaozhong@pumc.edu.cn

**摘要:** 目的 应用非侵入性活体显像技术研究血管生成抑制因子 *vasostatin*。方法 采用融合表达方案, 将治疗基因 *vasostatin* 和报告基因 *fluc* 偶联构建融合表达载体, 使表达的融合蛋白中两个蛋白互相不干扰, 并有天然的特性。结果 将稳定表达 FLuc 阳性对照和 V<sub>10</sub> FL 融合蛋白的 PC3 细胞进行体外生物发光显像。用稳定表达 Fluc 的 PC3 细胞构建荷瘤模型, 用生物发光显像能检测到肿瘤的发生。结论 可应用非侵入性活体显像技术进行体内和体外基因表达的检测与监控。

**关键词:** 生物发光显像; *vasostatin*; 血管生成

中图分类号: R-331; Q-334 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2007)03-0312-06

## Bioluminescent Imaging Monitoring of a Anti-angiogenesis Therapeutic Gene *vasostatin* in Tumor Cell PC3

HU Jie-miao, QIU Fei-chan, YIN Bin, GONG Yan-hua, YUAN Jian-gang,  
QIANG Bo-qin, WANG Shi-zhen, PENG Xiao-zhong

National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC;  
Chinese National Human Genome Center at Beijing, Beijing 100005, China

Corresponding author: PENG Xiao-zhong Tel: 010-65296411, E-mail: pengxiaozhong@pumc.edu.cn

**ABSTRACT : Objective** To generate a sensitive tool for noninvasive monitoring of a therapeutic gene *vasostatin*. **Methods** We fused the bioluminescent reporter gene firefly luciferase to the therapeutic transgene *vasostatin* and ensured that these two proteins would not interrupt each other and kept their own natural character. **Results** We therefore examined clones of PC3 cells stably expressing fusion gene and positive control *fluc* with bioluminescence. *In vivo* imaging of PC3-Fluc subcutaneous tumors showed that the mean tumor bioluminescence increased in animals over several weeks. **Conclusion** Noninvasive monitoring facilitates the detection of gene expression *in vivo* and *in vitro*.

**Key words:** bioluminescent imaging; *vasostatin*; angiogenesis

*Acta Acad Med Sin*, 2007, 29(3): 312-317

生物发光显像 (bioluminescent imaging, BLI) 常用萤火虫荧光素酶 (FLuc) 作为报告基因进行显像。与现有其他活体显像技术相比, BLI 具有许多独特的优点: 非离子低能量辐射; 灵敏度高, 可以探测微米大小的物体; 可进行连续、实时监测, 测量快速; 费用低廉; 背景低, 只有报告基因 (如荧光素酶) 与底物 (如 D-luciferin) 发生反应才能检测到信号<sup>[1 2]</sup>。vasostatin 是从 Epstein-Barr virus 免疫细胞株的培养上清液中分离纯化的一种血管生成抑制因子, 经鉴定证实为人体一种多功能蛋白质 calreticulin 的 N 端 1 ~ 180 个氨基酸<sup>[3 4]</sup>。vasostatin 可抑制碱性成纤维细胞生长因子诱导的新生血管生成, 在无胸腺小鼠肿瘤形成实验中, vasostatin 可明显减低人 Burkitt 淋巴瘤和人结肠癌的生长, 延长带 Meth A 和 LL/2c 肿瘤小鼠的存活时间<sup>[3 5 6]</sup>。本研究采用融合表达方案, 将治疗基因 *vasostatin* 和报告基因 *fluc* 融合, 通过 BLI 技术对报告基因 *fluc* 显像监测治疗基因 *vasostatin* 的表达, 目的是了解治疗基因在活体动物体内的位置、活性及持续时间, 以期对肿瘤基因治疗提供一个优异方法, 同时也为 vasostatin 的功能提供便捷的评价与检测方法。

## 材料和方法

**质粒载体与试剂** pGEM-T、Dual-Luciferase Reporter Assay 购自 Promega 公司, LB 培养基 (Tryptone, Yeast Extract) 购自 Oxford 公司, F12、DMEM 高糖培养基、IMDM 培养基、1640 培养基为 GIBCO 公司产品, 胎牛血清为 Hyclone 公司产品, 胰酶 Trypsin 为 Sigma 公司产品, 细胞培养用的青霉素/链霉素购自 Gibco BRL。

**治疗基因 *vasostatin* 与生物发光报告基因 *fluc* 融合表达载体的构建** 根据 *vasostatin* 基因和 *fluc* 基因限制性内切酶谱分析, 分别在引物中引入 *Bam*H I / *Eco*R I 和 *Eco*R I / *Not* I 的酶切位点。从 pGEM-T 和 pGL3 basic 载体分别扩增 *vasostatin* 基因和 *fluc* 基因, 片段大小分别为 540 bp 和 1 663 bp。将 PCR 扩增得到的 *vasostatin* 基因经 *Bam*H I / *Eco*R I 双酶切, *fluc* 基因经 *Eco*R I / *Not* I 双酶切, 同时用相同的酶处理真核表达载体 pcDNA3.1 (+)。回收后用 T4 连接酶进行连接, 分别构建真核表达载体 pcDNA3.1 (+) / *vaso* 和 pcDNA3.1 (+) / *fluc*。

本研究在 *fluc* 报告基因的上游引物加入了不同

长度的 Linker, 一共设计了 4 条不同的上游引物, 分别编码不同长度的 (GGGS) 短肽, 包括 (GGGS)<sub>3</sub>、(GGGS)<sub>2</sub>、(GGGS)<sub>1</sub> 及 (GGGS)。(GGGS)<sub>3</sub>: 5'-cggaattcgggtggcgggtggctcgggcgggtgggtcg-ggtggcggcgatctatggaagacgccaaaacat-3'; (GGGS)<sub>2</sub>: 5'-cggaattcgggtggcgggtggctcgggcgggtgggtcgatggaagacgccaaaacat-3'; (GGGS)<sub>1</sub>: 5'-cggaattcgggtggcgggtggctcgatggaagacgccaaaacat-3'; (GGGS)<sub>0</sub>: 5'-cggaattcgggtggcgggtggctcgatggaagacgccaaaacat-3'。4 条引物均引入 *Eco*R I 酶切位点, *vasostatin* 基因的下游引物也引入 *Eco*R I 酶切位点。首先用含不同长度 Linker 的引物 PCR 扩增 *fluc* 基因, 经 *Eco*R I / *Not* I 双酶切, 同时用相同的酶处理已构建好的真核表达载体 pcDNA3.1 (+) / *vaso*, 回收后用 T4 连接酶进行连接, 将 *fluc* 基因连接到 *vasostatin* 基因的下游, 最终得到融合载体 pcDNA3.1 (+) / *v<sub>15</sub>fl* (GGGSGGGSGGGGS)、pcDNA3.1 (+) / *v<sub>10</sub>fl* (GGGSGGGGS)、pcDNA3.1 (+) / *v<sub>5</sub>fl* (GGGS) 和 pcDNA3.1 (+) / *v<sub>0</sub>fl* (GI)。

**稳定表达 V<sub>10</sub>FL 融合蛋白细胞株的建立** 选择 PC3 细胞来进行 V<sub>10</sub>FL 融合蛋白的稳定表达, 同时也进行了阳性对照 FLuc 的稳定表达。在 6 孔板中分别转染 pcDNA3.1 (+) / *fluc* 阳性对照质粒和 pcDNA3.1 (+) / *v<sub>10</sub>fl* 融合表达质粒, 用未转染的细胞作为对照。用 G418 筛选 3 个星期后未转染的对照孔细胞已完全死亡, 此时便获得了表达 FLuc 阳性对照和 V<sub>10</sub>FL 融合蛋白的两个细胞群 (pool)。扩增这两个细胞群, 并取一定量的细胞提取总蛋白, 对细胞群融合蛋白的表达进行再一次检测, 以确保在筛选过程中细胞未丧失外源蛋白表达能力。

**稳定表达 V<sub>10</sub>FL 融合蛋白的 PC3 细胞的体外 BLI** 将生物发光细胞按倍比稀释的方式 (100 000 ~ 196 个细胞) 接种于 96 孔板, 等到 90% 满度时, 每孔加入 D-luciferin 至终浓度为 150 μg/ml, 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 7 ~ 10 min, 将 96 孔板置于成像暗箱中显像 1 min, 用 Xenogen 公司的 IVIS<sup>®</sup> 显像系统进行图像获取及分析。

### 活体动物 BLI

**稳定细胞株的裸鼠移植:** (1) 用于接种的稳定细胞株在接种前传代以去除生长不好的细胞, 传代后第 2 天换液 1 次, 第 3、4 天即可获得处于最佳生长状态的细胞。(2) 用胰酶消化细胞, 用含血清培养基终止胰酶的反应。离心 (1 000 r/min, 10 min), 弃上清液, 再用 D-Hanks 洗细胞 1 次, 离心 (1 000

r/min, 10 min) 去除上清。(3) 将细胞沉淀用培养液重新悬浮后, 计数细胞密度。最后, 用 D-Hanks 将细胞配制成每 0.2 ml 含  $5 \times 10^6$  个细胞的细胞悬液。(4) 用无菌注射器将 0.2 ml 细胞悬液接种于裸鼠腋下。

体内显像: (1) 腹腔注射 D-luciferin (150 mg/kg) 于荷瘤小鼠后, 用 1% ~ 3% isoflurane 麻醉裸鼠。(2) 注射 D-luciferin 10 min 后, 以裸鼠背部朝上的形式进行图像采集 (Xenogen 公司的 IVIS<sup>®</sup> 显像系统)。(3) 用活体 BLI 每周观察 1 次, 至少观察 7 周。

结 果

治疗基因 *vasostatin* 与生物发光报告基因 *fluc* 融合表达载体的构建 采取融合表达方案, 通过不同长度的 Linker 将治疗基因 *vasostatin* 与生物发光报告基因 *fluc* 融合。分别构建真核表达载体 pcDNA3.1 (+) /*vaso* 和 pcDNA3.1 (+) /*fluc*, 重组质粒经酶切鉴定为阳性质粒, 测序结果表明插入方向及阅读框都正确。

在治疗基因 *vasostatin* 和报告基因 *fluc* 之间加入不同长度柔性短肽, 其氨基酸序列为 (GGGS)<sub>n</sub>, 将报告基因 *fluc* 放在治疗基因 *vasostatin* 下游, 最终得到融合载体 pcDNA3.1 (+) /*v<sub>15</sub>fl* (GGGSGGGGS-GGGGS), pcDNA3.1 (+) /*v<sub>10</sub>fl* (GGGSGGGGS), pcDNA3.1 (+) /*v<sub>5</sub>fl* (GGGS) 和 pcDNA3.1 (+) /

*v<sub>0</sub>fl* (GI)。图 1 显示的是部分融合载体的酶切鉴定图谱, 测序结果证实 pcDNA3.1 (+) /*v<sub>10</sub>fl* 融合载体中 Linker (GGGS) 的引入 (图 2)。其他融合载体的酶切鉴定及测序结果也都正确。

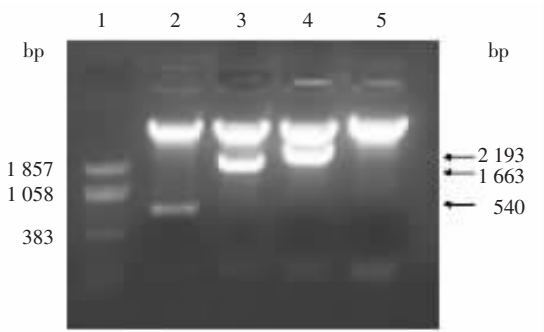


图 1 pcDNA3.1 (+) /*v<sub>10</sub>fl* 融合基因的限制性内切酶分析  
Fig 1 Restriction analysis of the fusion gene vector pcDNA3.1 (+) /*v<sub>10</sub>fl*

1. DNA 分子量标记; 2. 重组质粒 pcDNA3.1 (+) /*vaso* 经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切结果; 3. 重组质粒 pcDNA3.1 (+) /*fluc* 经限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Not* I 酶切结果; 4. 重组质粒 pcDNA3.1 (+) /*v<sub>10</sub>fl* 经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切结果; 5. 重组质粒 pcDNA3.1 (+) 经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切结果  
1. DNA molecular weight marker; 2. restriction analysis of recombinant plasmid pcDNA3.1 (+) /*vaso* with *Bam*H I and *Eco*R I; 3. restriction analysis of recombinant plasmid pcDNA3.1 (+) /*fluc* with *Eco*R I and *Not* I; 4. restriction analysis of recombinant plasmid pcDNA3.1 (+) /*v<sub>10</sub>fl* with *Bam*H I and *Not* I; 5. restriction analysis of the control plasmid pcDNA3.1 (+) with *Bam*H I and *Not* I

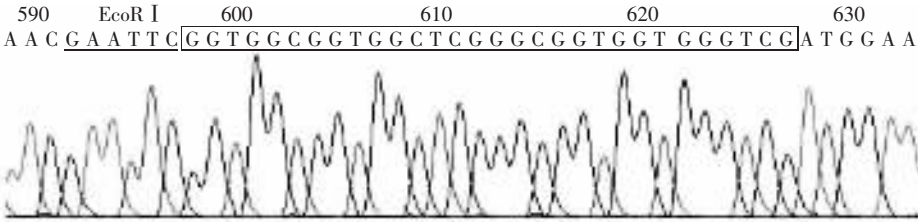


图 2 融合基因 *v<sub>10</sub>fl* 核苷酸序列

Fig 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the fuse gene *v<sub>10</sub>fl*

PCR 扩增 540 bp 片段 *vasostatin* 基因以及限制性内切酶位点 *Bam*H I /*Eco*R I, 4 个正向引物分别扩增 4 个 *fluc* 基因 (接头和 *fluc* 基因); 4 个引物 (GGGGS) 重复的数目不同, 后面紧接 *Eco*R I 位点, 然后是 *fluc* 编码区; 4 个不同的融合基因是由 4 个 *fluc* 基因之一与 *vasostatin* 基因相连, 根据 *fluc* 和 *vasostatin* 之间接头 (GGGGS) 重复的数目命名为 *v<sub>15</sub>fl*、*v<sub>10</sub>fl*、*v<sub>5</sub>fl* 和 *v<sub>0</sub>fl*  
PCR amplification of the *vasostatin* gene generated a 540 bp fragment with the restriction endonuclease flanking cut sites of *Bam*H I /*Eco*R I. Four versions of the *fluc* gene (linker plus *fluc*) were generated by PCR using different sense primers. The primers differed in the number of (gly<sub>4</sub>ser) repeats immediately following the *Eco*R I site and just before the *fluc* coding region. Four different fusion genes were generated by ligation of one of the four *fluc* genes to the *vasostatin* gene and were designated *v<sub>15</sub>fl*, *v<sub>10</sub>fl*, *v<sub>5</sub>fl*, and *v<sub>0</sub>fl* depending on the number of (gly<sub>4</sub>ser) repeats contained in the peptide linker between *fluc* and *vasostatin*

在 293ET 和 PC3 细胞系中融合蛋白 V<sub>10</sub>FL 的荧光素酶活性最佳 将融合载体 (*v<sub>15</sub>fl*, *v<sub>10</sub>fl*, *v<sub>5</sub>fl* 和 *v<sub>0</sub>fl*)、阳性对照 [ pcDNA3.1 ( + ) /*vaso* 和 pcDNA3.1 ( + ) /*fluc* ] 及阴性对照 [ pcDNA3.1 ( + ) ] 瞬时转染两种细胞系：293ET ( 图 3A ) 和 PC3 ( 图 3B )。为了平衡每个孔的转染效率，实验时共转 pRL-TK 作为内对照，该质粒编码海肾荧光素酶 ( Renilla , RL )。转染 36 h 后裂解细胞，分别测定 4 种融合蛋白、阳性对照及阴性对照的荧光素酶活性和内对照 RL 的活性，结果显示，在 293ET 细胞，4 种融合蛋白中 V<sub>5</sub>FL 的相对光子单位 ( relative light units , RLU )

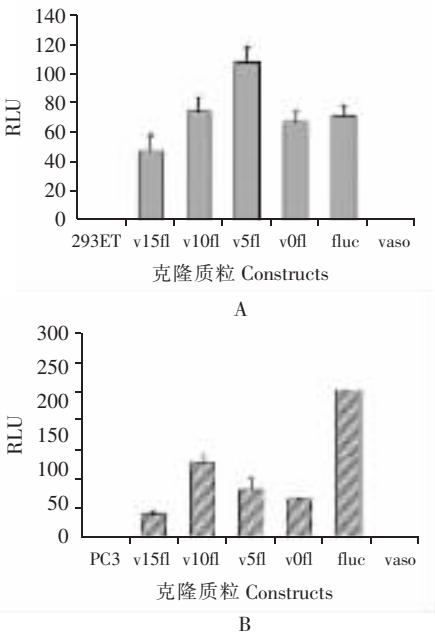


图 3 V-FL 融合蛋白功能及生化特点

Fig 3 Functional and biochemical characterization of V-FL fusion proteins

293ET 细胞 ( A ) 和 PC3 细胞 ( B ) 中融合克隆的荧光活性，细胞瞬时转染 *v<sub>15</sub>fl*、*v<sub>10</sub>fl*、*v<sub>5</sub>fl*、*v<sub>0</sub>fl*、*fluc*、*vaso* 和 *null*，并在 36 h 后收细胞检测荧光活性，荧光活性用相对光子单位表示，标准差为 3 次测量值计算结果；RLU：相对光子单位

FLuc activity exhibited by the fusion constructs in 293ET ( A ) and PC3 ( B ) cell lines , cells were transiently transfected with *v<sub>15</sub>fl* , *v<sub>10</sub>fl* , *v<sub>5</sub>fl* , *v<sub>0</sub>fl* , *fluc* , *vaso* , and *null* and harvested at 36 h and assayed for FLuc enzyme activities , the FLuc activity is expressed as relative light units. Error bars represent SE for triplicate measurements ; RLU : relative light units

稳定表达 V<sub>10</sub>FL 融合蛋白的 PC3 细胞的体外 BLI 选择 PC3 细胞初探 V<sub>10</sub>FL 融合蛋白的稳定表达，同时进行阳性对照 FLuc 的稳定表达，结果显示使用抗 FLuc 一抗可以检测到 V<sub>10</sub>FL 融合蛋白，相对

值最高，其他融合蛋白的 RLU 值与阳性对照 FLuc 相似。在 PC3 细胞，4 种融合蛋白的 RLU 值和荧光素酶活性均比阳性对照低很多，其中 V<sub>10</sub>FL 融合蛋白的 RLU 值最高，但只有阳性对照 FLuc 的 41%。综合以上结果，选择荧光素酶活性最佳的 *v<sub>10</sub>fl* 融合表达载体做进一步研究，并在 293ET 细胞中应用 Western blot 监测了 V<sub>10</sub>FL 融合蛋白的瞬时表达情况。如图 4 所示，用抗 Vaso 和抗 FLuc 特异性的抗体均能检测到相对分子质量约 85 000 的条带，与融合蛋白 V<sub>10</sub>FL 预期分子量一致 ( FLuc 相对分子质量 65 000 + Vaso 相对分子质量 20 000 )

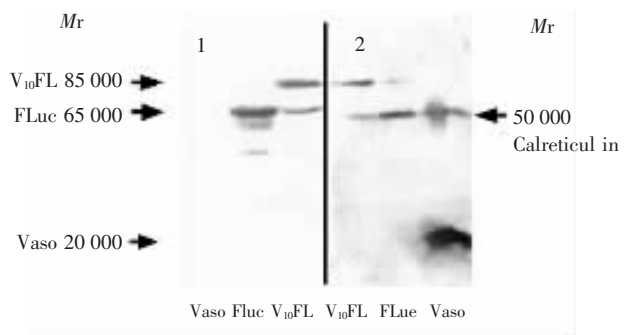


图 4 V10FL 融合蛋白的 Western blot 分析

Fig 4 Western blot analysis of V<sub>10</sub>FL fusion protein

裂解瞬时转染 *v<sub>10</sub>fl*、*vaso* 和 *fluc* 质粒的 293ET 细胞，将全细胞蛋白跑 12% SDS-PAGE 胶，转膜，并分别用 ( 1 ) 抗 FLuc 和 ( 2 ) 抗 Vaso 抗体检测，两个抗体都可以检测到 85 000 的 V<sub>10</sub>FL 融合蛋白，抗 FLuc 抗体可以检测到 65 000 部分切割的片段，抗 FLuc 多抗可以识别 65 000 的 FLuc ( 1 第 2 道 )，抗 Vaso 单抗可以识别 20 000 的 Vaso ( 2 第 3 道 )；Mr：相对分子质量

Total cellular protein obtained from the cell lysates of transiently transfected 293ET cells with *v<sub>10</sub>fl* , *vaso* , and *fluc* plasmids was resolved in a 12% SDS polyacrylamide gel , transferred , and probed with ( 1 ) anti-FLuc and ( 2 ) anti-Vaso antibodies , respectively. Both the antibodies recognize the V<sub>10</sub>FL fusion at 85 000 and a 65 000 ( by anti-FLuc antibody ) fragment as a result of partial cleavage. The polyclonal anti-FLuc antibody and monoclonal anti-Vaso antibody also recognize FLuc at -65 000 ( second lane from left in 1 ) and Vaso at 20 000 ( third lane from the left in 2 ) , respectively ; Mr : relative molecular mass

分子质量约为 85 000；阳性对照 FLuc 亦能被检测到，相对分子质量约为 65 000，说明所获得的稳定表达细胞群能够正常表达融合蛋白 ( 图 5 )。

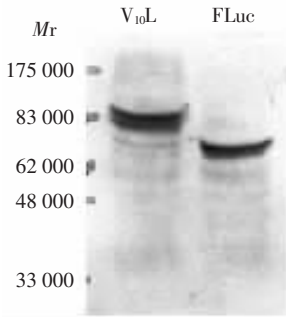


图5 Western blot 检测  $V_{10}$ FL 和 FLuc 稳定表达细胞株的蛋白表达

Fig 5 Protein expression of  $V_{10}$ FL and FLuc of the stably transfected cell pools, Goat polyclonal antibody anti-FLuc served as primary antibody

将稳定表达 FLuc 阳性对照和  $V_{10}$ FL 融合蛋白的 PC3 细胞进行体外 BLI, 显像时间为 1 min, 结果显示, 阳性对照 FLuc 能检测到的最少细胞数为 300 ~ 700/孔 (图 6A), 而  $V_{10}$ FL 融合蛋白能检测到的最少细胞数为 1 500 ~ 3 000/孔 (图 6B)。两种稳定细胞系中, 每孔发出的光子数与细胞数之间的相关性均很好 ( $r^2$  分别为 0.98 和 0.97) (图 6C)。

稳定表达 FLuc 的 PC3 细胞活体动物 BLI 根据体外 BLI 结果, 进行了稳定表达 FLuc 的 PC3 细胞活体动物 BLI, 用 BLI 每周观察 1 次, 观察了 4 周。结果显示, 从第 7 天开始, 所有荷瘤小鼠均能用 BLI 检测到肿瘤的发生, 而此时用肉眼并不能观察到瘤体, 直到第 14 天起才逐渐能用肉眼看到肿瘤。随着瘤体增大, 生物发光信号也逐渐增强 (图 7)。

## 讨 论

分子显像是近年来发展迅速的一个生物学新领域, 可将其定义为活体状态下在细胞和分子水平对生物过程显示以及定性和定量研究<sup>[9,14]</sup>。利用不同的分子显像设备对单个细胞或一组细胞乃至活体内的分子事件进行重复、无创伤的显像, 对了解正常生理状态和疾病进程非常重要<sup>[10,15]</sup>。BLI 利用酶 (荧光素酶) 作为报告基因, 荧光素酶催化外源注入的特异底物 (D-luciferin) 反应产生荧光, 使用高度灵敏的 CCD 相机可以观测并纪录发出的光子, 进行显像。

本研究采用融合表达方案将治疗基因 *vasostatin* 和报告基因 *fluc* 偶联构建融合表达载体。融合表达方案能够保证基因表达绝对偶联, 对报告基因的显

像能够直接给出融合的治疗基因的相应信息。但本研究发现治疗基因 *vasostatin* 和报告基因 *fluc* 直接融合所致的融合蛋白具荧光素酶活性明显比报告基因 *fluc* 本身活性低, 这可能由于各蛋白的直接融合彼此影响了构象。为使表达的融合蛋白中两个蛋白互不干扰, 并有天然特性, 本研究在治疗基因 *vasostatin* 和报告基因 *fluc* 之间加入了不同长度的柔性短肽。柔性短肽氨基酸的序列和组成可能对两边蛋白的活性有影响。目前用的较多的是 GS linker, 其优点是甘氨酸 (glycine, G) 相对分子质量最小、侧链最短, 可增加柔韧性; 丝氨酸 (serine, S) 是亲水性最强的氨基酸, 能增加亲水性。这样的柔性短肽放在融合蛋白之间不会影响两边蛋白的构象和功能发挥<sup>[11]</sup>。以往一些融合蛋白的研究还表明, 两个蛋白之间柔性短肽的长度在维持每种蛋白的功能上起了很大作用<sup>[12]</sup>。本研究中加入的柔性短肽其氨基酸序列为  $(GGGS)_n$ , 并构建了含 4 个不同长度柔性短肽的融合表达载体 pcDNA3.1 (+) /  $v_{15}fl$  (GGGSGGGSGGGGS)、pcDNA3.1 (+) /  $v_{10}fl$  (GGGSGGGGS)、pcDNA3.1 (+) /  $v_5fl$  (GGGS) 和 pcDNA3.1 (+) /  $v_0fl$  (GI), 其中以  $v_{10}fl$  的荧光素酶活性最佳, 也证实了柔性短肽的长短可影响下游报告基因的表达。应用抗 Vaso 和 Fluc 特异性的抗体进行 Western blot 检测, 进一步证明了  $V_{10}$ FL 融合蛋白表达很好。将报告基因和治疗基因偶联, 通过报告基因表达显像间接推断治疗基因的表达在策略理论上是非常可行的。因为只要治疗基因和报告基因的表达有很好的相关性, 同一种报告基因可以用来对每种感兴趣的治疗基因疗效进行评价。因此, 本研究用 G418 抗生素筛选稳定表达  $V_{10}$ FL 融合蛋白和阳性对照 FLuc 的 PC3 细胞后, 利用 Xenogen 公司的 IVIS<sup>®</sup> 显像系统进行体外 BLI, 结果显示两种稳定细胞系中发出的光子数与细胞数的相关性均很好。但由于没有对  $V_{10}$ FL 融合蛋白中 *vasostatin* 的活性做检测, 治疗基因 *vasostatin* 的活性和报告基因 *fluc* 的表达是否相关, 动物实验结果能否证实报告基因的 BLI 可以反映治疗基因 *vasostatin* 的量、分布位置、持续时间以及治疗效果, 尚需进一步实验证明。

目前已经有多种非侵入性活体显像技术可用于研究活体动物的报告基因显像<sup>[16,17]</sup>, 每种显像技术均有自己的用途、优点和缺点。利用 PET 和 BLI 对报告基因显像被广泛用于动物实验。由于  $V_{10}$ FL 融合蛋白荧光素酶活性明显比报告基因本身活性低,

目前尚不适合用于实验动物活体显像。本研究 BLI 体外显像结果显示,从第 7 天开始,所有荷瘤小鼠均能用 BLI 检测到肿瘤的发生,而此时用肉眼并不能观察到瘤体,直到第 14 天开始才逐渐能用肉眼看到肿瘤。随着瘤体增大,生物发光信号也逐渐增强。以上结果说明,用稳定表达 FLuc 的 PC3 细胞构建的荷瘤模型能很好地用于实验并依靠非侵入性的活体显像技术进行监测。

下一步实验,笔者将以稳定表达 FLuc 的 PC3 细胞接种裸鼠建立前列腺癌模型,通过 BLI 研究腺病毒介导的 vasostatin 抑制裸鼠前列腺癌的生长。进一步验证 vasostatin 是通过抑制血管生成来遏制肿瘤的生长。

(本文图 6,7 见插图第 3 页)

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Lewis JS , Achilefu S , Garbow JR , *et al.* Small animal imaging , current technology and perspectives for oncological imaging [ J ]. *Eur J Cancer* , 2002 , 38( 12 ) 2173-2188.
- [ 2 ] Hildebrandt IJ , Gambhir SS. Molecular imaging applications for immunology [ J ]. *Clin Immunol* , 2004 , 111( 2 ) 210-224.
- [ 3 ] Pike SE , Yao L , Jones KD , *et al.* Vasostatin , a calreticulin fragment , inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth [ J ]. *J Exp Med* , 1998 , 188( 12 ) 2349-2356.
- [ 4 ] Pike SE , Yao L , Setsuda J , *et al.* Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth [ J ]. *Blood* , 1999 , 94( 7 ) 2461-2468.
- [ 5 ] Yao L , Pike SE , Setsuda J , *et al.* Effective targeting of tumor vasculature by the angiogenesis inhibitors vasostatin and interleukin-12 [ J ]. *Blood* , 2000 , 96( 5 ) :1900-1905.
- [ 6 ] Xiao F , Wei Y , Yang L , *et al.* A gene therapy for cancer based on the angiogenesis inhibitor , vasostatin [ J ]. *Gene Ther* , 2002 , 9( 18 ) :1207-1213.
- [ 7 ] Edinger M , Cao YA , Hornig YS , *et al.* Advancing animal models of neoplasia through *in vivo* bioluminescence imaging [ J ]. *Eur J Cancer* , 2002 , 38( 16 ) 2128-2136.
- [ 8 ] Sadikot RT , Blackwell TS. Bioluminescence imaging [ J ]. *Proc Am Thorac Soc* , 2005 , ( 6 ) 537-540 , 511-512.
- [ 9 ] Hume SP , Myers R. Dedicated small animal scanners : a new tool for drug development [ J ]. *Curr Pharm Des* , 2002 , 8( 16 ) :1497-1511.
- [ 10 ] Weissleder R. Molecular imaging : exploring the next frontier [ J ]. *Radiology* , 1999 , 212( 3 ) 609-614.
- [ 11 ] Massoud TF , Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects : seeing fundamental biological processes in a new light [ J ]. *Genes Dev* , 2003 , 17( 3 ) 545-580.
- [ 12 ] Wahlfors J , Loimas S , Pasanen T , *et al.* Green fluorescent protein ( GFP ) fusion constructs in gene therapy research [ J ]. *Histochem Cell Biol* , 2001 , 115( 1 ) 59-65.
- [ 13 ] Li L , Yuan YZ , Lu J , *et al.* Treatment of pancreatic carcinoma by adenoviral mediated gene transfer of vasostatin in mice [ J ]. *Gut* , 2006 , 55( 2 ) 259-265.
- [ 14 ] Issad T , Blanquart C , Gonzalez-Yanes C. The use of bioluminescence resonance energy transfer for the study of therapeutic targets : application to tyrosine kinase receptors [ J ]. *Expert Opin Ther Targets* , 2007 , 11( 4 ) 541-556.
- [ 15 ] Inoue Y , Izawa K , Tojo A , *et al.* Monitoring of disease progression by bioluminescence imaging and magnetic resonance imaging in an animal model of hematologic malignancy [ J ]. *Exp Hematol* , 2007 , 35( 3 ) 407-415.
- [ 16 ] Contag CH. Molecular imaging using visible light to reveal biological changes in the brain [ J ]. *Neuroimaging Clin N Am* , 2006 , 16( 4 ) 633-654.
- [ 17 ] Li H , Li JZ , Helm GA , *et al.* Non-invasive imaging of firefly luciferase reporter gene expression using bioluminescence imaging in human prostate cancer models [ J ]. *Biotechnol Appl Biochem* , 2007 , 46( Pt 4 ) :179-184.

( 2007-01-15 收稿 )