

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.04.009

· 基础研究 ·

活体成像系统检测携荧光素酶增殖缺陷型腺病毒在小鼠体内的表达和分布

孟希亭¹, 林晨¹, 梅佳¹, 王海娟¹, 马飞¹, 张金龙^{1,2}, 张颖³, 钱海利^{1△} (1. 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院肿瘤研究所暨分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021; 2. 潍坊医学院附属医院肿瘤科, 山东潍坊 261031; 3. 首都医科大学附属北京妇产科医院微创科, 北京 100020)

[摘要] 目的: 研究携带荧光素酶的增殖缺陷型腺病毒(Ad-luciferase, Ad-Luci)经不同途径注射后小鼠体内荧光素酶的表达和分布, 为肿瘤的腺病毒载体基因治疗提供参考。方法: 建立人胰腺癌 PANC-1 细胞裸鼠移植瘤模型, Ad-Luci 病毒单次或多次瘤体内注射, 或者肌内、尾静脉和腹腔注射 Ad-Luci 病毒至正常小鼠, 采用 IVIS Lumina 活体成像系统观察荧光素酶在小鼠体内的分布和表达, 并观察 Ad-Luci 病毒的毒性作用。结果: 单次瘤内注射 Ad-Luci 荧光素酶在瘤内持续表达 15 d, 多次瘤内注射后表达时间更长。肌内注射组荧光素酶随时间延长表达减弱, 注射后 48 h 无荧光素酶表达。尾静脉注射组荧光素酶大部分聚集在肝脏, 注射后 18 d 仍有表达。腹腔注射组 4 h 后可见荧光素酶的表达, 但 7 d 后无表达。Ad-Luci 各注射组小鼠均未出现明显的毒性反应。结论: 腺病毒携带外源基因经瘤内注射可在瘤内表达较长时间, 多次注射可延长表达时间; 经尾静脉注射后主要聚集在肝脏, 且表达时间较长。

[关键词] 腺病毒载体; 胰腺癌; 荧光素酶; 活体成像系统; 基因治疗

[中图分类号] R735.9; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)04-0389-05

In vivo imaging system in detecting expression and distribution of replication-deficient adenovirus carrying luciferase in mice

MENG Xi-ting¹, LIN Chen¹, MEI Jia¹, WANG Hai-juan¹, MA Fei¹, ZHANG Jin-long^{1,2}, ZHANG Ying³, QIAN Hai-li^{1△} (1. State Key Laboratory of Molecular Oncology & Cancer Institute of Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Union Medical Hospital, Beijing 100021, China; 2. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261031, Shandong, China; 3. Department of Microsurgery, Affiliated Beijing Obstetrics Hospital of Capital Medical University, Beijing 100020, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of luciferase in mice delivered by replication-deficient adenovirus carrying luciferase (Ad-luciferase, Ad-Luci) through different injection routes, so as to provide information for adenovirus-mediated tumor gene therapy. **Methods:** Nude mouse model bearing human pancreatic cancer PANC-1 cells was established and Ad-Luci was administered into transplanted tumors with single or multiple intratumoral injections. Ad-Luci was also administered into normal mice through intramuscular, intravenous and intraperitoneal injections. The distribution and expression of luciferase in mice were monitored by *in vivo* IVIS Lumina imaging system and the toxicity of Ad-Luci was also studied. **Results:** Single intratumoral injection of Ad-Luci resulted in continuous luciferase expression for at least 15 d, while multiple injections resulted in even longer expression. Intramuscular injection of Ad-Luci gave a weaker and shorter duration of luciferase expression for no longer than 48 h. The majority of Ad-Luci injected through tail-vein homed to liver and expressed luciferase for at least 18 d. Expression of luciferase by intraperitoneal injection decreased with time-lapse

[基金项目] 国家高科技研究发展计划(863计划)资助项目(No. 2007AA021001);国家自然科学基金资助项目(No. 30772527)。Project supported by the National High Science and Technology Research and Development Program (863 Program) of China (No. 2007AA021001), and the National Natural Science Foundation of China (No. 30772527)

[作者简介] 孟希亭(1987-),女,北京市人,学士,主要从事肿瘤生物治疗研究。E-mail: aocron31@xinhuanet.com

[通信作者] 林晨(LIN Chen, corresponding author), E-mail: clinwk@yahoo.com.cn; 钱海利(Qian Hai-li, corresponding author), E-mail: qianhai-li001@163.com. [△]共同通信作者

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110714.1100.006.html>

and lasted for about 7 d. No significant toxic reactions were observed in all groups during the study. **Conclusion:** Intratumoral injection of adenovirus carrying exogenous gene gives a continuous expression of gene for a long duration, while multiple injections result in even longer expression; liver is the main target organ after tail intravenous administration and provides long expression duration.

[**Key words**] adenovirus vector; pancreatic cancer; luciferase; *in vivo* imaging system; gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(4): 389-393]

腺病毒是肿瘤基因治疗中应用最广泛的病毒载体之一^[1,2],具有感染效率高、安全性好、理化性质较稳定、外源基因容纳量大等多种优点^[3]。肿瘤基因治疗实验的给药途径有局部给药、系统给药等方法^[1,4]。但在诸多的基因治疗实验研究中,腺病毒载体的给药方案差别很大,给药间隔时间也尚无标准,影响基因治疗实验方案的确定。生物发光成像技术是近年发展起来的一项可在活体动物中直接测定生物发光信号的新技术^[5]。荧光素酶(luciferase)在底物D-荧光素(luciferin)存在的情况下催化底物产生生物发光,可被成像系统检测。将肿瘤细胞用荧光素酶标记,可以在活体动物水平观察肿瘤的生长和变化情况,具有高效、灵敏、快速、非损伤等特点^[5],已有大量的研究应用荧光素酶体内成像技术进行了肿瘤治疗的研究^[6-8]。荧光素酶只在活细胞内产生发光现象,光的强度与标记细胞的数目成正比,为实验研究提供了很好的定量指标^[9]。携带荧光素酶的腺病毒载体(Ad-luciferase, Ad-Luci)系统能较好地反映外源基因在体内的表达水平^[10]。本研究通过肌内、静脉和腹腔注射将 Ad-Luci 注射入人胰腺癌 PANC-1 细胞荷瘤裸鼠体内,然后经腹腔给予底物 D-荧光素,利用 IVIS Lumina 成像系统检测外源基因在小鼠体内的表达和分布,为腺病毒在肿瘤治疗中的应用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 小鼠、试剂和细胞系

BALB/c 裸鼠购自中国医学科学院实验动物中心,雄性,4~6 周龄,体质量(17~19)g,动物合格证号为 SCXK(京)2009-0004。C57BL/6 小鼠购自维通利华实验动物中心,雄性,4~6 周龄,体质量 18~20 g,动物合格证号为 SCXK(京)2006-0009。雄性 BALB/c 小鼠(方法 1.4 用鼠)购自中国医学科学院实验动物中心,17~19 g,动物合格证号为 SCXK(京)2009-0007。雌性 BALB/c 小鼠(方法 1.5 用鼠)购自维通利华实验动物中心,4~6 周龄,体质量 18~20 g,动物合格证号为 SCXK(京)2006-0009。Ad-Luci 购自北方诺赛基因组研究中心有限公司,

D-Luciferin 购自 Synchem 公司,麻醉剂戊巴比妥钠由动物室提供,RPMI 1640 培养液购自弘博康医药科技有限公司,胎牛血清为北方同正公司产品。人胰腺癌细胞株 PANC-1 由本实验室保存。IVIS Lumina 成像系统购自 Xenogen Corporation 公司。

1.2 活体成像系统检测 PANC-1 细胞裸鼠移植瘤内注射 Ad-Luci 后荧光素酶的表达

将对数生长期的 PANC-1 细胞消化,离心后去除消化液,用生理盐水洗 2 次,调整细胞密度为 1×10^7 /ml,取 200 μ l 接种于 12 只裸鼠右腋下,待瘤体生长至 5 mm \times 5 mm 时备用。实验分为对照组、单次 Ad-Luci 注射组(第 1 天瘤内注射 1×10^8 pfu/100 μ l)、多次 Ad-Luci 注射组(第 1、4、7 天分别注射 1×10^8 pfu/100 μ l)3 组,每组 3 只。注射后第 1、4、7、10、15、18、22 天经腹腔给予荧光素(150 mg/kg 体质量)及麻醉剂戊巴比妥钠(55 mg/kg 体质量),注射后 10 min 在活体成像系统下观察荧光素酶在移植瘤内的表达情况。

1.4 活体成像系统检测肌内注射 Ad-Luci 后注射部位荧光素酶的表达

实验分高剂量组、低剂量组、对照组,C57BL/6 小鼠经腿部肌内注射 Ad-Luci 病毒 1×10^9 pfu 或 2×10^8 pfu,并设无病毒空白对照,注射后的 24、48 h 给予荧光素及麻醉剂,在活体成像系统下观察腿部肌内注射部位荧光素酶的表达情况。

1.5 活体成像系统检测腹腔及尾静脉注射 Ad-Luci 后小鼠体内荧光素酶的表达

经 BALB/c 小鼠腹腔、尾静脉注射 1×10^9 pfu 的 Ad-Luci 病毒,分别在注射后的 4 h 和第 2、3、4、7、10、14、18 天给予荧光素及麻醉剂,在活体成像系统下观察小鼠体内荧光素酶的表达情况。

1.6 Ad-Luci 经尾静脉途径注射对小鼠的毒性作用

经 BALB/c 小鼠尾静脉分别注射 1×10^9 、 2×10^9 、 1×10^{10} pfu 的 Ad-Luci 病毒,每组 3 只,观察小鼠生命体征的变化。

1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件组间差异采用 *t* 检验或秩和检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$

表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Ad-Luci 瘤内注射后荧光素酶的表达

移植瘤内直接注射 Ad-Luci 腺病毒后, 荧光素酶可在瘤内持续表达相当长时间, 单次注射后表达可持续 20 d 以上, 多次注射在第 10、18 天荧光素酶的表达强度是单次注射的 2.2 倍和 4.8 倍 ($P < 0.01$, 图 1、2、3)。

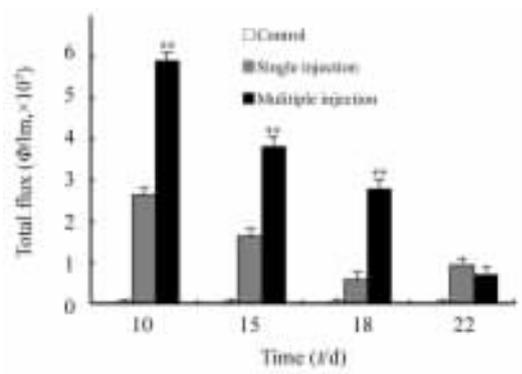


图 1 瘤内注射 Ad-Luci 后肿瘤中荧光素酶的表达

Fig. 1 Luciferase expression in tumors after intratumoral injection of Ad-Luci

** $P < 0.01$ vs single injection

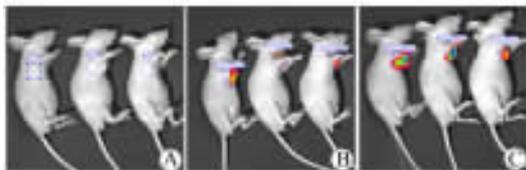


图 2 Ad-Luci 瘤内注射后 10 d 小鼠的活体成像结果

Fig. 2 *In vivo* imaging of mice 10 d after intratumoral injection of Ad-Luci

A: Control; B: Single injection; C: Multiple injection

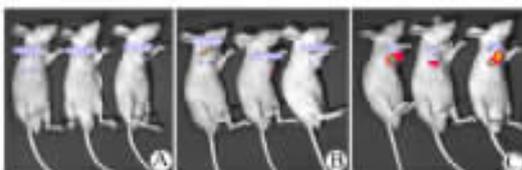


图 3 Ad-Luci 瘤内注射后 22 d 的活体成像结果

Fig. 3 *In vivo* imaging of mice 22 d after intratumoral injection of Ad-Luci

A: Control; B: Single injection; C: Multiple injection

2.2 Ad-Luci 肌内注射后荧光素酶的表达

经肌内注射不同剂量 Ad-Luci 病毒 24 h 后, 2×10^8 pfu 组荧光素酶通量值为 3.06×10^4 , 1×10^9 pfu 高剂量组荧光素酶通量值较高 (3.64×10^5), 两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 48 h 再次观察时, 无论低剂量组还是高剂量组均不能再检测到荧光素酶的表达 (图 4、5、6)。可见, Ad-Luci 经肌内注射后外源基因的表达持续时间较短。

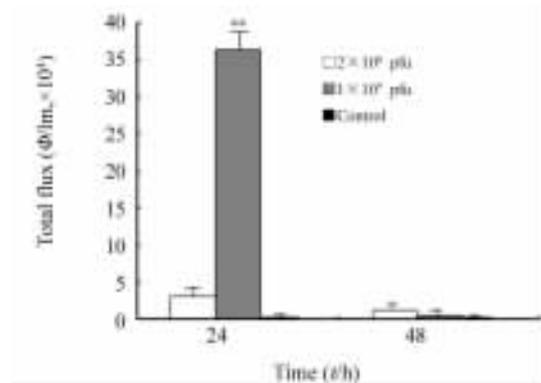


图 4 肌内注射 Ad-Luci 后肿瘤中荧光素酶的表达

Fig. 4 Luciferase expression in tumors after intramuscular injection of Ad-Luci

** $P < 0.01$ vs 2×10^8 pfu group

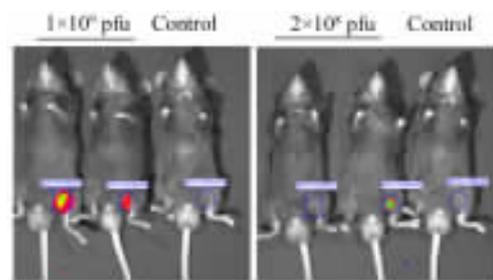


图 5 不同剂量 Ad-Luci 肌内注射后 24 h 的活体成像结果

Fig. 5 *In vivo* imaging of mice 24 h after intramuscular injection of different concentrations of Ad-Luci

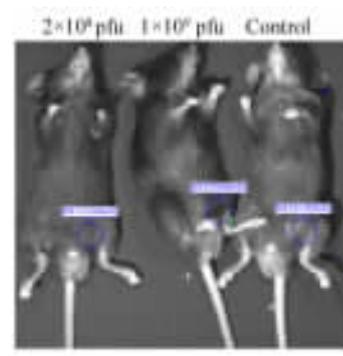


图 6 不同剂量 Ad-Luci 肌内注射后 48 h 的活体成像结果

Fig. 6 *In vivo* imaging of mice 48 h after intramuscular injection of different concentrations of Ad-Luci

2.3 Ad-Luci 尾静脉和腹腔注射后荧光素酶的表达
 经尾静脉注射 Ad-Luci 后, Ad-Luci 绝大部分聚集在肝脏并很快表达外源荧光素酶, 持续相当长时间, 直至 18 d 仍能见到明显表达。腹腔注射 Ad-Luci 4 h 后, 观察可见腹腔内外源荧光素的表达, 但随着时间的延长表达逐渐减弱, 注射后 7 d 基本检测不到其表达(图 7、8)。

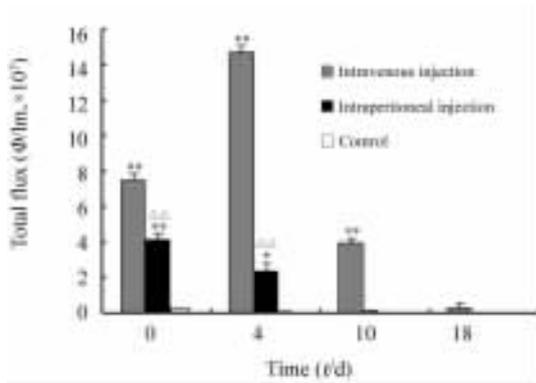


图 7 Ad-Luci 尾静脉和腹腔注射后小鼠荧光素酶的表达
 Fig. 7 Luciferase expression in mice after tail intravenous and intraperitoneal injection of Ad-Luci

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$
 $\Delta\Delta P < 0.01$ vs intravenous injection group

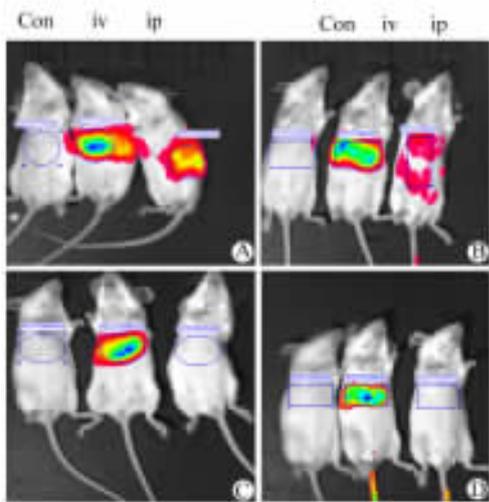


图 8 Ad-Luci 尾静脉和腹腔注射后不同时间小鼠活体成像
 Fig. 8 In vivo imaging of mice at different time points after tail intravenous and intraperitoneal injection of Ad-Luci

Con: Control; iv: Intravenous injection (tail);
 ip: Intraperitoneal injection
 A: 4 h; B: 4 d; C: 10 d; D: 18 d

2.4 Ad-Luci 对小鼠的毒性作用

以尾静脉途径给予不同剂量 Ad-Luci 后, 连续

观察数日, 小鼠状态良好, 体重未见下降, 进食及排泄均正常, 毛色润泽, 活动正常, 未见死亡, 组间未见差异。由此表明, 小鼠对 Ad-Luci 腺病毒载体有较好的耐受性, 在大剂量下 Ad-Luci 未对小鼠产生毒性作用。

3 讨论

肿瘤基因治疗中最常用的是腺病毒载体, 它能有效地把外源基因转运到各种靶细胞和组织中, 大量的肿瘤基因治疗实验采用了腺病毒为作载体^[1, 3, 11], 但腺病毒在体内的分布及外源基因表达持续时间仍无明确的答案^[12]。生物发光和荧光成像作为近年来新兴的活体动物体内光学成像技术, 以其操作简便及直观性成为研究小动物活体成像的一种理想方法, 在生命科学研究中得以不断发展。利用这种成像技术, 可以实时观察标记的基因及细胞在活体动物体内的变化及运动^[13]。

荧光素酶是广泛表达于萤火虫体内的一种蛋白, 因为具备无毒、成像时间短(1 min)、背景低、半衰期短等优点而被广泛使用^[14-15]。荧光素酶能持续在哺乳动物细胞内表达^[16-17], 在底物荧光素及 Mg^{2+} 存在的条件下发生酶促反应^[18], 使用 IVIS Lumina 成像系统可在体内、体外进行荧光检测, 通过细胞或组织发出荧光的光子数来分析荧光素酶表达情况, 该方法能用于肿瘤生长及治疗效果的研究^[19-20]。

肿瘤基因治疗的给药方案有系统给药、局部给药方式。不同的给药方式会直接影响基因治疗的疗效^[21]。因此, 需要有详细准确的数据为腺病毒载体的肿瘤基因治疗方案提供指导。本研究使用活体动物成像技术直观地显示腺病毒载体进入体内后的主要分布器官和表达时间, 便于实时观察外源基因在活体动物体内的表达。

本研究结果表明, Ad-Luci 腺病毒直接瘤内注射后可以持续表达相当长时间, 单次注射后腺病毒携带的荧光素酶信号可持续表达 20 d 以上, 多次注射腺病毒可在一定程度上增加基因表达和持续时间, 这为腺病毒载体的肿瘤基因治疗方案中病毒注射间隔和强度的确定奠定了基础。本研究还发现, 腺病毒的肌肉注射表达持续时间较短, 肌肉注射腺病毒 48 h 后, 荧光素酶的表达即趋于消失, 表明肌肉可能不适合腺病毒携带的外源基因表达, 这与 Wang 等^[22]以肌肉作为肿瘤腺病毒疫苗的接种部位未能产生有效免疫保护的结果一致。其原因可能与肌肉组织中缺乏相应的腺病毒受体有关。

另外,腺病毒尾静脉注射后主要分布于肝脏,且表达外源基因时间较长,这为腺病毒为载体的基因治疗有很好的提示作用。一方面,腺病毒的静脉注射可能会导致相当多的腺病毒被阻滞在肝脏,降低肝脏以外目标部位的有效载体荷量;另一方面,以腺病毒为载体的肿瘤基因治疗经静脉进行全身给药对于肝内肿瘤可能有较好的效果。腹腔给药也是腺病毒载体的潜在注射途径之一。本研究发现,尽管腺病毒腹腔注射后外源荧光素酶表达的持续时间短于尾静脉注射,但在一段时间内仍可维持有效的表达强度,因此,腹腔注射对于卵巢癌及其腹腔转移等局限性肿瘤可能有较好的效果。

需要注意的是,腺病毒载体的小鼠感染谱与人感染谱可能存在一定的差异,将本研究结果推论至人体应用时应谨慎,需参考腺病毒在人体的生物分布数据。总之,本研究为小鼠模型中以腺病毒为载体的肿瘤基因治疗提供了有用的参考数据。

[参 考 文 献]

- [1] Liu X, Li J, Tian Y, et al. Enhanced pancreatic cancer gene therapy by combination of adenoviral vector expressing c-erb-B2 (Her-2/neu)-targeted immunotoxin with a replication-competent adenovirus or etoposide [J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(2): 157-170.
- [2] Lu J, Yu D. Adenoviral-vector based siRNA for mutant K-ras as a promising tool for lung cancer gene therapy: A license to kill [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(12): 1724-1725.
- [3] Sharma A, Tandon M, Bangari DS, et al. Adenoviral vector-based strategies for cancer therapy [J]. *Curr Drug Ther*, 2009, 4(2): 117-138.
- [4] Pramudji C, Shimura S, Ebara S, et al. *In situ* prostate cancer gene therapy using a novel adenoviral vector regulated by the caveolin-1 promoter [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(12): 4272-4279.
- [5] 孙宝昌, 靳宝锋, 侗冬青. 荧光素酶标记的 BEL-7405 细胞体内外成像及肿瘤动物模型建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(1): 1-4.
- [6] Guse K, Dias JD, Bauerschmitz GJ, et al. Luciferase imaging for evaluation of oncolytic adenovirus replication *in vivo* [J]. *Gene Ther*, 2007, 14(11): 902-911.
- [7] Santos EB, Yeh R, Lee J, et al. Sensitive *in vivo* imaging of T cells using a membrane-bound gaussian princeps luciferase [J]. *Nat Med*, 2009, 15(3): 338-344.
- [8] Toyoshima M, Tanaka Y, Matumoto M, et al. Generation of a syngeneic mouse model to study the intraperitoneal dissemination of ovarian cancer with *in vivo* luciferase imaging [J]. *Luminescence*, 2009, 24(5): 324-331.
- [9] 张怡, 韩或, 赵春林. 活体动物体内光学成像技术的研究进展 [J]. *生命科学*, 2006, 18(1): 25-30.
- [10] Cresce AW, Dandu R, Burger A, et al. Characterization and real-time imaging of gene expression of adenovirus embedded silk-elastinlike protein polymer hydrogels [J]. *Mol Pharm*, 2008, 5(5): 891-897.
- [11] Wang Y, Ma L, Wang S, et al. Assessment of CAR- or CD46-dependent adenoviral vector-mediated TRAIL gene therapy in clinical adenocarcinoma lung cancer cells [J]. *Oncology*, 2009, 77(6): 366-377.
- [12] 刘思景, 郭伟韬, 王辉. 腺病毒载体的研究新进展 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2010, 19(3): 1669-1670.
- [13] 张怡, 韩或, 赵春林. 活体动物体内光学成像技术的研究进展 [J]. *生命科学*, 2006, 18(1): 25-30.
- [14] Hickson J, Ackler S, Klaubert D, et al. Noninvasive molecular imaging of apoptosis *in vivo* using a modified firefly luciferase substrate, Z-DEVD-aminoluciferin [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(6): 1003-1010.
- [15] Mezzanotte L, Que I, Kaijzel E, et al. Sensitive dual color *in vivo* bioluminescence imaging using a new red codon optimized firefly luciferase and a green click beetle luciferase [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19277.
- [16] de Wet JR, Wood KV, de Luca M, et al. Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells [J]. *Mol Cell Biol*, 1987, 7(2): 725-737.
- [17] de Wet JR, Wood KV, Jekinski DR, et al. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia Coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985, 82(23): 7870-7883.
- [18] Bronstein I, Fortin J, Stanley PE, et al. Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays [J]. *Analyt Biochem*, 1994, 219(2): 169-181.
- [19] Takahashi K, Onodera S, Tohyama H, et al. *In vivo* imaging of particle-induced inflammation and osteolysis in the calvariae of NFkappaB/luciferase transgenic mice [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, [Epub ahead of print].
- [20] de Vocht N, Bergwerf I, Vanhoutte G, et al. Labeling of luciferase/eGFP-expressing bone marrow-derived stromal cells with fluorescent micron-sized iron oxide particles improves quantitative and qualitative multimodal imaging of cellular grafts *in vivo* [J]. *Mol Imaging Biol*, 2011, [Epub ahead of print].
- [21] Holst PJ, Orskov C, Thomsen AR, et al. Quality of the transgene-specific CD8⁺ T cell response induced by adenoviral vector immunization is critically influenced by virus dose and route of vaccination [J]. *J Immunol*, 2010, 184(8): 4431-4439.
- [22] Wang J, Thorson L, Stokes RW, et al. Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis [J]. *J Immunol*, 2004, 173(10): 6357-6365.

[收稿日期] 2011-04-22

[修回日期] 2011-06-10

[本文编辑] 王莹