

双荧光标记的胶质瘤原位移植瘤模型的建立

李旺¹, 黄焱², 田新华³, 李良成⁴, 穆军博¹, 童俊江²

(1. 厦门大学医学院, 厦门 福建 361002; 2. 福建医科大学, 福州 福建 350122;
3. 厦门大学附属中山医院, 厦门 福建 361004; 4. 厦门大学药学院, 厦门 福建 361102)

【摘要】 目的 建立一种稳定、可实时监测的胶质瘤原位移植瘤裸鼠模型。方法 用带有荧光素酶 (luciferase-Luc) 和绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein-GFP) 基因的慢病毒感染 U251 神经胶质瘤细胞, 流式细胞仪筛选稳定表达 GFP-Luc 荧光的细胞系, 并通过 CCK-8 实验、细胞周期实验、Transwell 肿瘤迁移及侵袭实验等评价荧光细胞的增殖、迁移和侵袭能力是否改变; 将细胞接种至裸鼠大脑尾状核, 建立胶质瘤原位移植瘤模型, 利用小鼠活体成像系统监测脑内肿瘤的生长情况, 并通过石蜡切片, HE 染色评价细胞在裸鼠脑内的病理特征及成瘤能力。结果 成功构建稳定表达 GFP 荧光和 luciferase 荧光的 U251 胶质瘤细胞系及动物模型, 慢病毒整合并未改变细胞的增殖、迁移及侵袭能力; 模型生长周期适中, 成瘤率高, 瘤体在颅内生长稳定, HE 切片符合人胶质瘤特征。结论 双荧光标记的胶质瘤细胞相比于传统细胞更有利于胶质瘤动物模型的实验研究; U251-GFP-Luc 胶质瘤细胞裸鼠模型, 其肿瘤生长和病理特性与人胶质瘤相似, 且可实时观察肿瘤生长, 可作为胶质瘤实验研究的理想动物模型。

【关键词】 神经胶质瘤; 荧光; 活体成像; 模型; 动物; 原位移植

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 04-0001-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.04.001

Establishment of a nude mouse model of glioma orthotopic xenograft with double-fluorescent labeling

LI Wang¹, HUANG Yan², TIAN Xin-hua³, LI Liang-cheng⁴,
MU Jun-bo¹, TONG Jun-jiang²

(1. Medical College of Xiamen University, Xiamen 361002, China; 2. Fujian Medical University, Fuzhou 350122;
3. Zhongshan Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004;
4. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361002)

【Abstract】 Objective To establish a stable and real-time monitorable nude mouse model of orthotopic glioma xenograft. **Methods** U251 glioma cell line was infected by a lentiviral vector containing green fluorescent protein (GFP) and luciferase (Luc) gene. Cells stably expressing fluorescence of GFP and Luc were sorted by flow cytometry. CCK-8 test and Transwell tumor invasion and migration assay were used to compare the biological features between the cells stably expressing GFP-Luc fluorescence and cells without fluorescence. Then the cells were implanted intracranially in the right caudate nucleus of athymic Balb/c nude mice to establish the tumor model. The growth of intracerebral tumor was monitored over time by a bioluminescence imaging (BLI) system. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to evaluate

[基金项目] 国家自然科学基金 (编号: 30970733)。

[作者简介] 李旺 (1990 -), 男, 研究方向: 胶质瘤。E-mail: whatliwang@qq.com。

[通讯作者] 田新华 (1965 -), 男, 研究方向: 神经外科肿瘤。E-mail: txhmd@163.com。

the histopathological features and tumorigenicity of the transplanted glioma cells in the brain of nude mice. **Results** U251 glioma cell line with stably expressing GFP-Luc fluorescence and the corresponding orthotopic xenograft model were successfully established. There was no statistically significant difference in the proliferation, invasion and migration abilities between the cells with stably expressing GFP-Luc fluorescence and the control cells. This model showed a high tumor formation rate and stable tumor growth, and takes a moderate time to establish this model. **Conclusions** Compared with the traditional glioma cells, GFP-Luc-transfected human glioma cells are more feasible for the studies of glioma in vivo. The tumor growth and pathological characteristics in this U251-GFP-Luc glioma model are similar to human glioma, and the growth of this tumor can be real-time monitored. It can be used as an ideal animal model for experimental studies of glioma.

【Key words】 Glioma; Fluorescence; In vivo imaging; Nude mouse models; Orthotopic xenograft

神经胶质瘤是颅内最常见的肿瘤之一,因其高死亡率受到神经外科医师的关注,虽然手术、放疗、化疗技术不断改进,但复发率高,预后仍然很差^[1]。究其原因在于未能阐明胶质瘤的发生发展过程,特别在肿瘤生长阶段难以实时观测其颅内生长状况,因此建立一种无创的、可实时监测的胶质瘤动物模型,是研究脑胶质瘤的发病机制和探索治疗方法的必要所在^[2]。

目前,颅内肿瘤的监测一般需 CT、MRI、PET 等影像学设备,操作复杂、价格昂贵,不适合样本量较大的动物实验,随着生物示踪技术的发展及应用,GFP 和 luciferase 基因标记的双荧光系统标记的细胞在肿瘤动物模型的研究中显示出安全性高、操作方便、价格低廉、可实时定量监测等巨大的优势已成功应用于实验研究^[3-8]。本研究选取常用的人胶质瘤细胞 U251,并采用 GFP-luciferase 基因标记后筛选出稳转细胞株,建立一种无创的、可实时监测的胶质瘤动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

细胞和小鼠 U251 胶质瘤细胞购于上海中科院细胞库。BALB/c 裸小鼠 12 只,购于厦门大学实验动物中心【SCXK(沪)2012-0002】,体重 18~20 克,鼠龄 6~8 周,饲养于厦门大学实验动物中心 SPF 环境【SYXK(闽)2013-0006】,所做动物实验均按实验动物使用的“3R”原则给予人道的关怀。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂: DMEM 培养基和 PBS 缓冲液购于 Hyclone 公司; 胎牛血清 FBS 购于 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司; Transwell 试剂盒购自美国 Corning 公司; 荧光素酶底物购自美国 Gold Biotechnology 公司。

1.2.2 仪器: 倒置荧光显微镜购于德国 Carl Zeiss

公司,小鼠脑立体定向仪购于安徽正华生物仪器有限公司,Hamilton 微量注射器、微量注射泵购于保定兰格公司,IVIS Lumina II 小动物活体成像系统。

1.3 方法

1.3.1 慢病毒的生产: 转染前 1 d 将 293FT 细胞按 50%~70% 汇合度接种于 100 mm 培养皿中,转染前将完全培养基换成无血清培养基。将 5 质粒(pHCMV-G, pHCMV-gag-pol, pHCMVRev, pcDNA-Tat 以及 pHIV1SDmCMVeGFP2Aluc) 与 polyethylenimine (PEI) 试剂按 1:5 体积比混匀后加入 293FT 细胞中,4 h 后弃上清液,并换完全培养基继续培养(48~72) h 后取病毒上清液,用 0.45 μm 滤膜过滤,收慢病毒于 -80℃ 保存。

1.3.2 细胞感染及稳转细胞的筛选: 取对数生长期的胶质瘤细胞接种于 100 mm 培养皿中,待汇合度达到 70%~80% 时,用收集的慢病毒感染细胞,感染 24 h 后在倒置荧光显微镜下观察 GFP 荧光的表达情况,评估慢病毒感染胶质瘤细胞的效率,并用流式细胞仪筛选出能够稳定表达 GFP-Luc 的 U251 单细胞克隆,将其命名为 U251-GFP-Luc。

1.3.3 U251-GFP-Luc 细胞的体外发光检测: 将荧光细胞倍比稀释于 96 孔板中,细胞数目依次为: 1×10^6 , 5×10^5 , 2.5×10^5 , 1.25×10^5 , 6.25×10^4 , 3.12×10^4 个,将未带荧光标记的细胞以相同的稀释倍数作为对照。加入荧光素酶底物(150 μg/mL),10~15 min 后将该板置于活体发光成像系统中检测各孔的发光强度,以每秒光子量(photons/s)表示,并采用一元线性回归分析法分析发光强度与细胞数量的相关性。

1.3.4 U251-GFP-Luc 细胞与 U251-Control 细胞生物学特性的比较:

1.3.4.1 CCK-8 细胞增殖实验: 将细胞铺于 96 孔板中,每孔 2000 个细胞,每孔含 100 μL 培养基,并于铺板后的第 0 h、24 h、48 h、72 h 每孔加入 10 μL

的 CCK-8 溶液, 37℃ 孵育 2~3 h 后测其 450 nm 处 A 值并绘制增殖曲线。

1.3.4.2 细胞周期检测: 取对数生长期的细胞, 0.25% 胰酶消化, 离心弃上清液, PBS 洗后加入预冷 70% 甲醇 4℃ 固定过夜。第二日, 将细胞离心弃甲醇后用 PBS 洗两次, 加入 PI 工作液(含 0.05 mg/mL 碘化丙啶, 0.02 mg/mL RNase A) 室温避光孵育 30 min 后流式细胞仪检测, Modfit 软件进行周期分析。

1.3.4.3 Transwell 细胞侵袭及迁移实验: Matrigel 胶和 DMEM 按 1:8 的比例稀释后取 100 μL 铺于 Transwell 小室的上室, 37℃ 孵育过夜。取对数生长期的细胞, 用不含 FBS 的 DMEM 培养液将细胞浓度调整为每毫升 1×10^5 个, 取细胞 200 μL 接种于 Transwell 上室, 下室加入 10% FBS 的 DMEM 培养液 600 μL, 37℃、5% CO₂ 培养 48 h 后, 固定、染色、干燥后显微镜下随机选取 5 个不同视野, 计算穿膜细胞数。Transwell 细胞迁移实验除不用铺胶外, 其余步骤相同。

1.3.5 体内胶质瘤模型的建立及生物发光活体成像: 称量裸鼠的体重, 建立基础体重曲线。5% 水合氯醛 8 μL/g 麻醉, 将麻醉的裸鼠固定在小鼠脑立体定向仪上, 酒精消毒后延矢状缝剪开头皮 1 cm, 在矢状缝和冠状缝焦点(前囟) 偏右 3 mm, 靠上 1 mm 处(定位于尾状核) 钻骨窗, 直径约 0.5 mm, 将 U251 和 U251-GFP-Luc 细胞分别用 PBS 制备细胞悬液, 每只裸鼠 1×10^6 个细胞通过微量注射泵缓慢注入颅内(从骨窗处进针 3.5 mm, 退针 1 mm, 注射 20 min, 注射完停针 5 min 后缓慢退出)。用骨蜡封好骨窗, 并缝合好头皮, 碘伏消毒。

定期观察裸鼠的后期反应。分别于移植后的第 0、7、14、21、28 天, 腹腔注射荧光素酶底物 10~15 min(底物浓度 15 mg/mL, 10 μL/g) 在小动物活体成像仪上进行显像, 并利用活体成像分析软件分别记录在接种胶质瘤细胞后的的荧光图像及荧光强度值。

1.3.6 肿瘤的生长以及小鼠生存率的评估: 记录小鼠的生存状态。每天观察小鼠的生长状态, 每周称量 1 次小鼠体重。

1.3.7 病理切片: 濒死的裸鼠经 10% 的水合氯醛 5 μL/g 麻醉后, 暴露胸腔, 经 4% 多聚甲醛心脏灌流至躯体发白, 取出脑组织, 浸泡在 4% 多聚甲醛中 24 h 梯度脱水后石蜡包埋、切片、HE 染色, 在镜下观察肿瘤情况。

1.3.8 统计学方法: 用 SPSS 13.0 统计软件进行结果分析。计量资料均以均数 ± 标准差表示, 两组均数比较用 *t*-检验; 生存分析采用 Kaplan-Meier 曲线法, 生存曲线的比较用 Log-rank test。P < 0.05 为差异有统计学意义, 反之为差异无统计学意义。

2 结果

2.1 带荧光细胞的分选

经慢病毒感染细胞 24 h 后, 在荧光显微镜下观察感染效率均在 90% 以上, 经流式细胞仪分选且长期培养后荧光信号并无明显衰减(图 1)。

2.2 病毒感染后胶质瘤细胞体外荧光素酶(Luciferase)活性的检测和评估

由图 2 可见, 细胞在 96 孔板中经倍比稀释后其荧光强度与细胞数呈现了良好的相关性($R^2 = 0.992$) (图 2)。

2.3 细胞生物学特性

图 3A 的增殖曲线表明: 细胞经慢病毒转染后其增殖能力无明显改变, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 细胞周期检测: GFP-Luc 组与对照组均以 G0/G1 期细胞为主, 各期细胞数差异无统计学意义($P > 0.05$) (图 3 B, C); 迁移实验中, GFP-Luc 组与对照组的细胞数分别为 353.8 ± 12.07 , 355.8 ± 10.43 , 差异无统计学意义($P > 0.05$) (见图 3 D, E); 侵袭实验中, GFP-Luc 组与对照组的细胞数分别为 344.4 ± 11.59 , 348.4 ± 13.5 , 差异无统计学意义($P > 0.05$) (图 3 F, G)。

2.4 胶质瘤细胞裸鼠原位模型的评价

2.4.1 Balb/c 裸鼠胶质瘤原位移植模型的建立: 所有裸鼠都成功接种, 术后均恢复良好。

2.4.2 裸鼠的生存状况: 两组均在第 16~20 天开始出现觅食、饮水减少; 第 27~29 天开始出现身体消瘦, 皮肤弹性下降, 反应迟钝; 32~34 d 出现明显颅内高压症状, 眼球突起, 躯体向一侧偏瘫, 精神极度萎靡, 躯体枯瘦如柴, 呈现濒死状态, 中位生存期为 32 d, 分别绘制其生存曲线, 经比较两组生存曲线差异无统计学意义(Log-rank test, $P > 0.05$) (图 4)。

2.5 裸鼠生物发光活体成像

U251-GFP-Luc 组在接种第 1 周后即可检测到脑部荧光信号, 且随着时间的推移, 所有可检测到的荧光信号逐渐增强, 在第 4 周时信号强度达到饱和(图 5)。

2.6 脑组织形态及病理检测

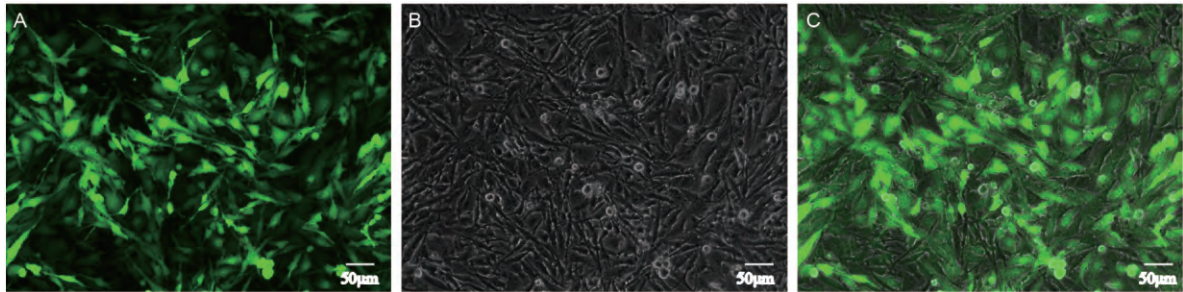
如图 6 所示:肉眼可见脑组织在右侧尾状核部位呈现圆形黄绿色区域,并可见明显中线左移,HE 切片显示肿瘤区无明显包膜,与正常脑组织界限清楚,核异形性显著,大小不均一。

3 讨论

近年来,随着人们对胶质瘤研究的逐步深入,

各种治疗的新思路、新方法陆续投入到临床前及临床应用中,但效果不太理想,大量在动物实验成功而临床评价较差的经验说明动物模型并没有反应出患者肿瘤真实的生理学特性,因此建立一种可靠的、稳定的胶质瘤原位移植模型是科研工作者急需解决的问题。

成功建立胶质瘤原位移植模型的关键在于能够实时、无创、准确地观测肿瘤在脑内的发生发展



注: A 荧光镜下 GFP 的表达(标尺 = 50 μm); B 白光下细胞形态(标尺 = 50 μm); C 叠加光下细胞形态(标尺 = 50 μm)

图 1 稳转细胞系 U251-GFP-Luc 表达 GFP 情况

Note. A. Expression of GFP in the U251 cells observed under a fluorescent microscope. Bar = 50 μm.

B. Microscopic morphology of cells seen under the white light. (Bar = 50 μm. C. The superposition graph of A and B. Bar = 50 μm.

Fig. 1 The expression of GFP in U251-GFP-Luc cells stably expressing fluorescence

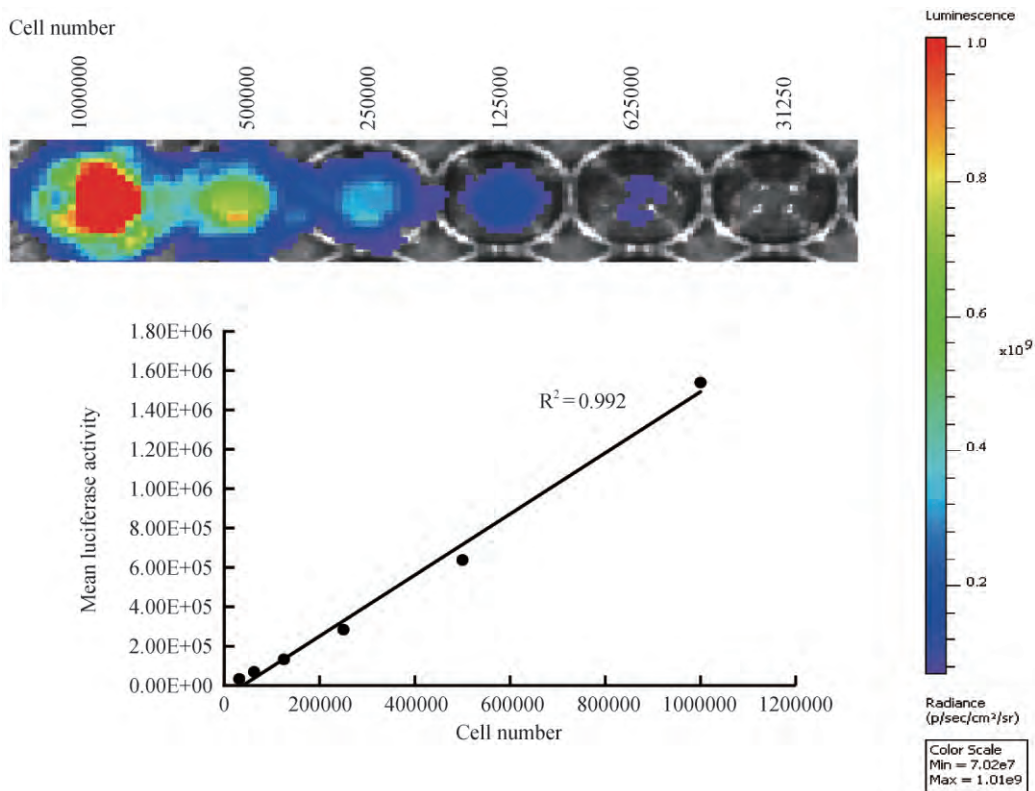
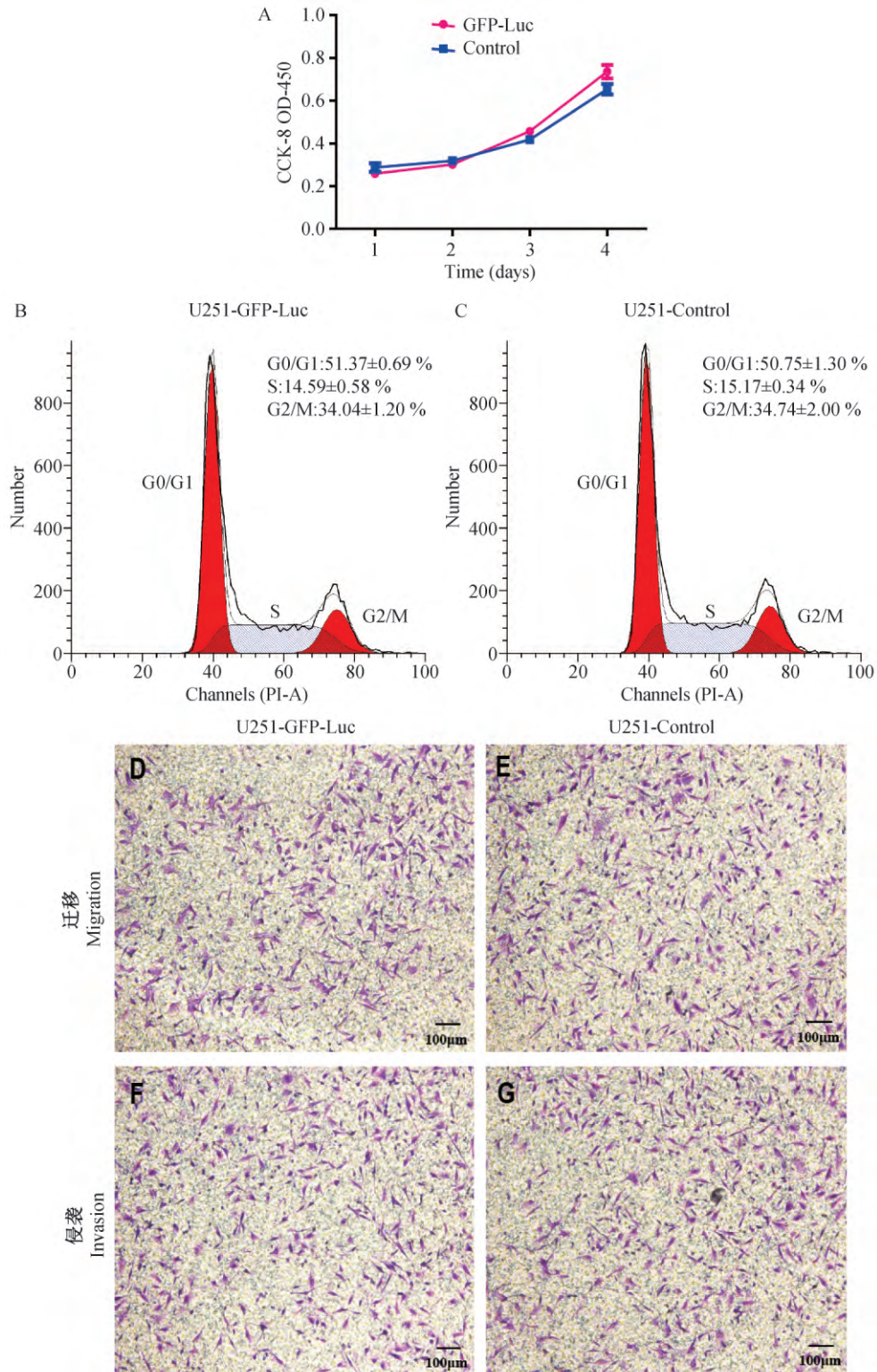


图 2 U251-GFP-Luc 体外荧光素酶活性与细胞数的相关性

Fig. 2 Correlation between the number of U251-GFP-Luc cells and luciferase activity in vitro



注: A. 两组细胞增殖曲线的比较 $P > 0.05$; B, C. 两组细胞周期分布检测, 各期细胞数 $P > 0.05$; D, E. 两组细胞迁移能力比较 (标尺 = 100 μm) $P > 0.05$; F, G. U251-GFP-Luc 与 U251-control 细胞侵袭能力的比较 (标尺 = 100 μm) $P > 0.05$ 。

图 3 U251-GFP-Luc 与 U251-Control 细胞生物学功能的比较

ote. A. Comparison of cell proliferation curves between the two groups $P > 0.05$. B, C. Detection of cell cycle distribution between the two groups $P > 0.05$. D, E. Transwell migration assay of the two groups. Bar = 100 μm , $P > 0.05$. E, G. Transwell invasion assay of the two groups. Bar = 100 μm , $P > 0.05$.

Fig. 3 Comparison of the biological function between U251-GFP-Luc cells and U251-control cells

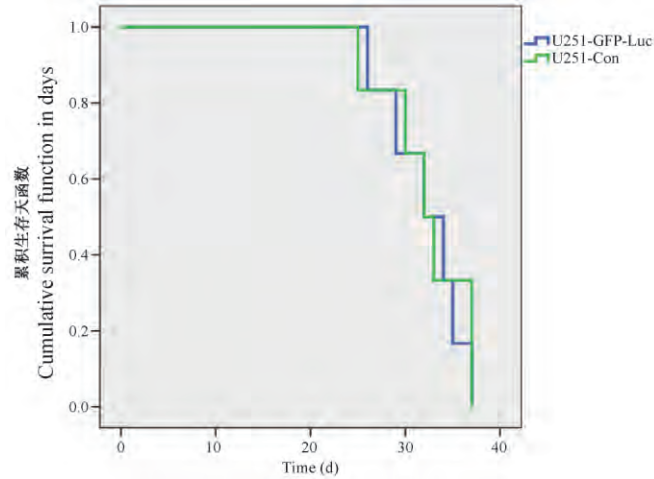


图 4 U251-GFP-Luc 组与 U251-Control 组裸鼠生存曲线

Fig. 4 Survival curves of the nude mice in U251-GFP-Luc group and U251-Control group

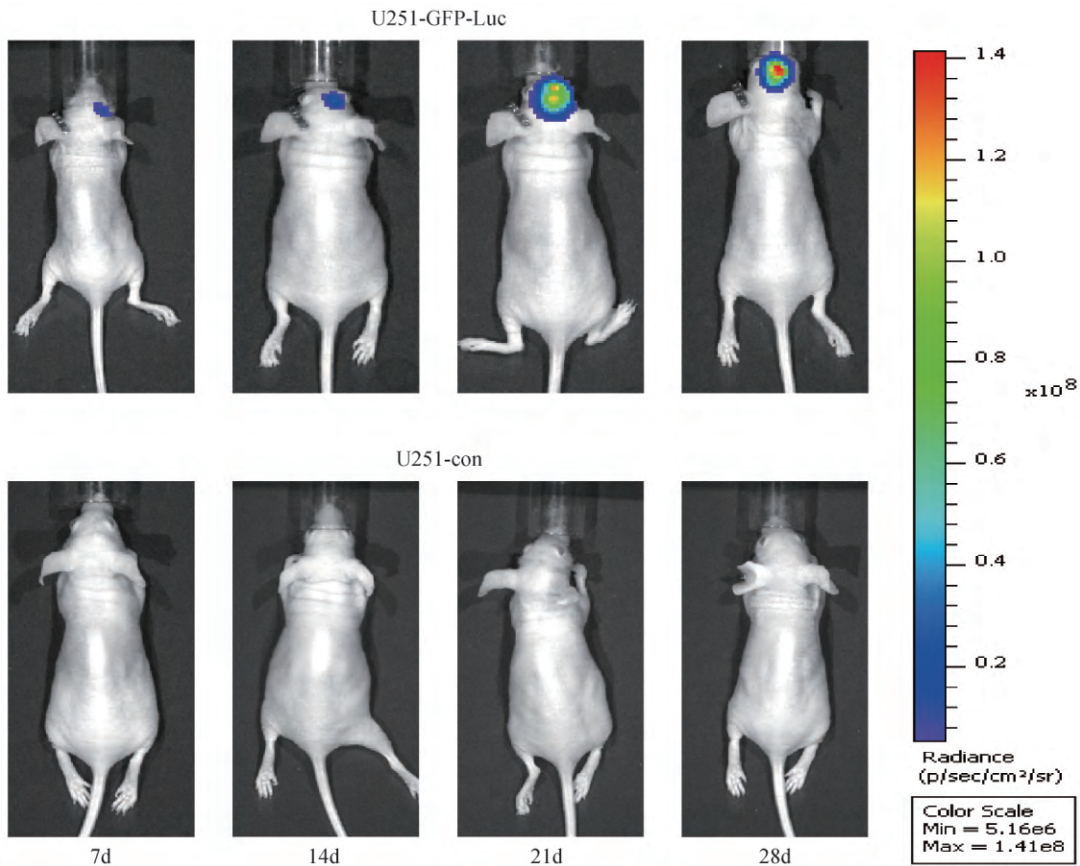
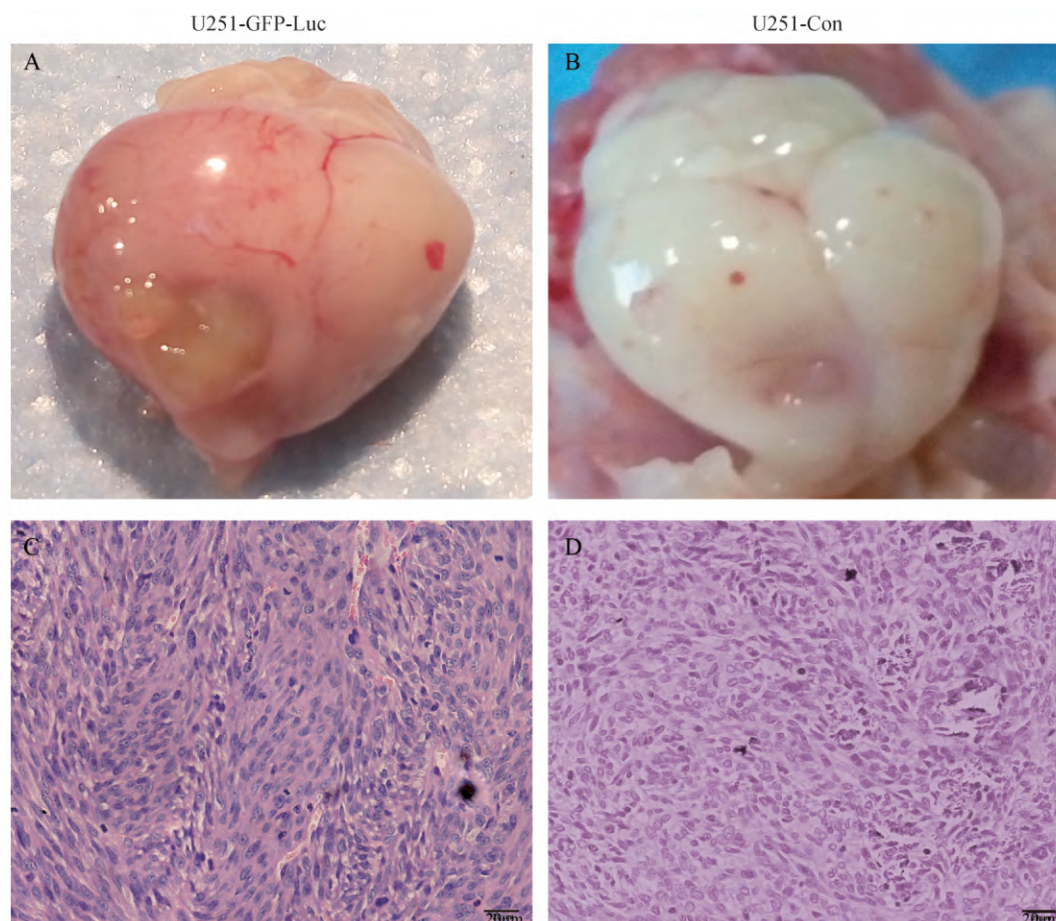


图 5 U251-GFP-Luc 组与 U251-Control 组裸鼠原位移植模型活体成像

Fig. 5 The in vivo images of nude mouse models of orthotopic transplanted glioma in the U251-GFP-Luc and U251-control groups

情况, 荧光示踪技术正是解决这一问题的良好途径。荧光示踪技术分为生物发光和激发荧光两种。激发荧光技术是指应用 GFP 或者 RFP 等荧光蛋白标记目的细胞, 利用紫外光激发使细胞发散出相应波长的光, 再通过荧光成像装置进行显像^[9-11]。激发荧光需要激发光照射, 在活体成像上动物的皮

毛、肌肉、内脏等都会产生较强的背景光干扰^[12,13]。但 GFP 操作简单、易观测、成像不需要注射底物。生物发光技术是将荧光素酶基因 (Luc) 整合到细胞 DNA 中, 在观测前通过腹腔或者静脉注射荧光素底物, 经过荧光素酶的催化反应再进行荧光显像^[14]。生物发光因其是体内的酶促反应, 不需要外源性的



注: A, B. 裸鼠脑组织形态; C, D. 肿瘤组织。HE 染色 标尺 = 20 μm 。

图 6 脑组织形态及病理检测

Note. A, B: The gross appearance of brain in the nude mice; C, D. Histological appearance of the tumor tissues. HE staining. Bar = 20 μm .

Fig. 6 Gross appearance and histopathological detection of brain tumors in the nude mice

激发光源,所以排除了背景光的干扰,且光强度与荧光细胞数成呈线性相关,大大提高了影像学上的精确性^[15,16]。Jessamy 等^[3]证明 GFP 和 Luc 的表达具有良好的线性关系($r^2 = 0.9819$),从而可以利用 GFP 荧光进行 GFP-Luc 稳转株的筛选,使体外实验更易进行。然而目前国内胶质瘤领域应用荧光示踪技术甚少,相关文献报道已经构建的并且应用于活体成像的胶质瘤细胞系大多只是 C6-GFP 在大鼠上的移植瘤模型,由于 GFP 有较强的背景干扰,其敏感性和精确度都大大降低,且 C6 是鼠源性胶质瘤细胞,肿瘤并不能完全模拟人胶质瘤的生物学特征^[17]。U251 细胞系是由 Poten 及其团队在从一位 75 岁恶性胶质瘤男性患者脑肿瘤组织中发现建立的^[18]。在过去的几十年中,U251 已经广泛应用于皮下及原位移植模型中,可以模拟大部分胶质瘤患者的生物学特性^[19]。因此本研究选取人胶质瘤 U251 细胞并用 GFP-Luc 双荧光系统对其进行标记,

实现了两种发光系统的优势互补。

大量的细胞及动物实验证明,GFP-Luc 双荧光标记的胶质瘤细胞同时还具备以下优势:(1)有利于体外实验研究,GFP 荧光可以直接在荧光显微镜下观察,更利于镜下分析,如在实验中进行慢病毒感染效率的考察,阳性细胞的比重以及纯化情况。(2)可在早期监测肿瘤模型是否制作成功,在接种后当天进行 Luc 生物发光活体成像检测,如果在脑室或者椎管中发现肿瘤细胞,多表明细胞误注入脑室中进入脑脊液循环扩散到其它位置,该模型是不符合实验要求的。早期剔除实验不仅可以保证实验数据的准确性,同时也避免了不必要的时间和资金浪费。

本实验中,U251-Luc-GFP 裸鼠模型成瘤率高,载瘤裸鼠的生存期稳定,活体成像结果显示随时间推移,荧光强度逐渐增强,显示与肿瘤体积有良好的线性关系,证明肿瘤在逐渐长大。以上实验结果

表明 U251 裸鼠模成瘤时间适中,小鼠生存期稳定,重复性好,是一种理想的胶质瘤原位移植瘤模型,并且为将来胶质瘤进一步研究提供了良好的可视化工具,同时也可以为研究胶质瘤的起源、信号转导途径、血管生成以及评估基因治疗疗效方面提供了强大的可视化监测工具拥有广泛的应用前景^[20-23]。

参考文献:

- [1] Meyer MA, Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(17): 492-507.
- [2] De Vries NA, Beijnen JH, van Tellingen O. High-grade glioma mouse models and their applicability for preclinical testing [J]. *Cancer Treat Rev*, 2009, 35(8): 714-723.
- [3] Cynthia N, Bailey CG, Tiffen JC, et al. Luciferase expression and bioluminescence does not affect tumor cell growth in vitro or in vivo [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9(1): 299.
- [4] Choy G, O'Connor S, Diehn FE, et al. Comparison of noninvasive fluorescent and bioluminescent small animal optical imaging [J]. *Biotechniques*, 2003, 35(5): 1022-1030.
- [5] Wang K, Xie S, Ren Y, et al. Establishment of a bioluminescent MDA-MB-231 cell line for human triple-negative breast cancer research [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(6): 1981-1989.
- [6] Wei F, Rong XX, Xie RY, et al. Cytokine-induced killer cells efficiently kill stem-like cancer cells of nasopharyngeal carcinoma via the NKG2D-ligands recognition [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33): 35023-35039.
- [7] Ji X, Cheng L, Wei F, et al. Noninvasive visualization of retinoblastoma growth and metastasis via bioluminescence imaging [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(12): 5544-5551.
- [8] Cai Q, Chen Z, Kong DK, et al. Novel microcatheter-based intracarotid delivery approach for MCAO/R mice [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 597: 127-131.
- [9] Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(10): 969-973.
- [10] Livet J, Weissman TA, Kang H, et al. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system [J]. *Nature*, 2007, 450(7166): 56-62.
- [11] Cai D, Cohen KB, Luo T, et al. Improved tools for the Brainbow toolbox [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(6): 540-547.
- [12] Coralli C, Cemazar M, Kanthou C, et al. Limitations of the reporter green fluorescent protein under simulated tumor conditions [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(12): 4784-4790.
- [13] Guo B, Pearce AG, KEA T, et al. Fluorescence produced by transfection reagents can be confused with green fluorescent proteins in mammalian cells [J]. *Biotechniques*, 2001, 31(2): 314-321.
- [14] De Wet JR, Wood KV, Helinski 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): 7870-7873.
- [15] Caceres G, Zhu XY, Jiao JA, et al. Imaging of luciferase and GFP-transfected human tumours in nude mice [J]. *Luminescence*, 2003, 18(4): 218-223.
- [16] Christopher H, Spilman SD, Contag PR, et al. Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter [J]. *Photochem Photobiol*. 1997. 66(4): 523-531.
- [17] Coralli C, Cemazar M, Kanthou C, et al. Limitations of the reporter green fluorescent protein under simulated tumor conditions [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(12): 4784-4790.
- [18] Ponten J, Elizabeth Macintyre EH. Long term culture of normal and neoplastic human glia [J]. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1968, 74(4): 465-486.
- [19] Candolfi M, Curtin JF, Nichols WS, et al. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression [J]. *J Neurooncol*, 2007, 85(2): 133-148.
- [20] Luker GD, Luker KE. Luciferase protein complementation assays for bioluminescence imaging of cells and mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 680: 29-43.
- [21] Woolfenden S, Zhu H, Al Charest, et al. A Cre/LoxP conditional luciferase reporter transgenic mouse for bioluminescence monitoring of tumorigenesis [J]. *Genesis*, 2009, 47(10): 659-666.
- [22] Sun A. Firefly luciferase-based dynamic bioluminescence imaging: A noninvasive technique to assess tumor angiogenesis [J]. *Neurosurgery*, 2010, 66(4): 751-757.
- [23] Maguire CA, Bovenberg MS, Crommentuijn MH, et al. Triple bioluminescence imaging for in vivo monitoring of cellular processes [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, 2: e99.

(修回日期)2016-12-14