

· 综述 ·

绿色荧光蛋白在肿瘤研究中的应用

梅雀林 李彦豪

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)来源于海洋生物水母,是近年来细胞生物学中应用最为广泛的标记性蛋白质之一。GFP 的 cDNA 全长约 2.6kb,编码 238 个氨基酸残基,分子量为 27×10^3 u。无需加外源性分子,在 395 nm、470 nm 波长光线激发下,GFP 肽链内部第 65~67 位的氨基酸残基通过自身环化和氧化形成一个绿色荧光基团,性质稳定,使用普通荧光显微镜即可观察到^[1,2]。改进后的 GFP 突变型,所发荧光强度高,吸收峰单一,极大地提高其应用价值。目前,GFP 在肿瘤的发病机制、生物学行为、药效评价和基因治疗等方面得到了广泛的应用。

一、在肿瘤发病机制研究中的应用

GFP 是一个分子量较小的蛋白,易与其他一些目的基因形成融合蛋白且不影响自身的目的基因产物的空间构象和功能。GFP 与目的基因融合,将目的基因标记为绿色,即可定量分析目的基因的表达水平,显示其在肿瘤细胞内的表达位置和量的变化,为探讨该基因在肿瘤发生、发展中的作用及其分子机制提供便利条件。如乙型肝炎病毒的 X 基因为调控基因,影响着乙型肝炎发展、预后,并与肝癌的发生密切相关。用 GFP 转染 X 基因,发现乙型肝炎病毒感染的肝细胞,不管其处于什么周期,X 蛋白主要定位于细胞质,与胞液蛋白酶共同分布,其中一部分紧紧地附着在核膜上。据此推测 X 蛋白是通过蛋白酶体影响肝细胞的功能。

在肿瘤的形成过程中,增殖和凋亡是一对相互矛盾的统一体。若肿瘤细胞凋亡占优势,肿瘤组织将长期处于休眠状态或自行消亡。肿瘤细胞的凋亡受凋亡相关基因调控。用 GFP 转染肿瘤细胞凋亡相关基因,并与正常组织进行比较,若过表达,则大致可判断此基因为抑制肿瘤细胞凋亡的基因;反之,为促进肿瘤细胞凋亡的基因。Wong 等^[3]在研究凋亡与肿瘤转移形成的关系中发现,bcl-2 过表达的瘤细胞,经周围静脉注入后,肿瘤细胞在肺脏内增殖活

跃、凋亡减弱,易于形成转移灶。用 GFP 转染含或不含有某种凋亡调控基因的肿瘤细胞,并对这些肿瘤细胞在体内的生物学行为进行观察,可确定这种凋亡调控基因的功能。Varghese 等^[4]用含 ras 基因的 PAP2 肿瘤细胞和不含 ras 基因的 NIH 3T3 肿瘤细胞分别注入小鼠的门静脉,结果显示 PAP2 细胞在肝窦内异常增生,而 NIH 3T3 细胞因凋亡而难以形成转移灶。提示 ras 基因具有抗凋亡的作用。

肿瘤细胞浸润是肿瘤细胞粘连、酶降解、移动和基质内增殖等一系列过程的表现,其根本原因在于肿瘤细胞内某些基因表达异常。利用 GFP 的示踪特性,研究肿瘤细胞内某些基因异常表达与肿瘤细胞浸润的关系,即可揭示肿瘤细胞浸润的某些机制。何诚等^[5]为研究 nm23-H1 对肿瘤细胞侵袭能力的影响,将 nm23-H1-GFP 分别转染 95D、95C 人肺巨细胞癌,结果转染 nm23-H1 的 95D、95C 细胞体外侵袭能力明显低于未转染组。提示 nm23-H1 具有抑制肿瘤细胞体外侵袭的能力。

二、在肿瘤生物学行为研究方面的应用

研究肿瘤生长、浸润和转移的传统方法是将载瘤动物分阶段处死,做成光学或免疫组化切片进行观察,或采用 CT、ECT、MRI、PET 等影像仪器进行检测。为了详细了解肿瘤的生物行为特征,即使使用大量的动物和昂贵的设备,也难以对肿瘤细胞的生长、瘤体形成过程进行连续、动态的观察。曾有报道将标记了荧光染料的肿瘤细胞经血管注射到动物体内,研究转移病灶形成过程,但由于标记后肿瘤细胞的荧光信号很易衰减,加上肿瘤细胞分裂,通常 2~3 d 后便难以显示或跟踪经荧光标记过的肿瘤细胞^[6]。为了克服上述缺陷,Yang 等^[7]建立了一种在活体内可连续、重复、动态观察肿瘤细胞生长及瘤体形成过程的方法。首先把 GFP 转染到肿瘤细胞上,然后原位移植至裸鼠体内,采用 LZ12 立体荧光显微镜,以 D425/60、470DCXR 双色滤片过滤后的蓝光作为激发源,直接观察活体内原位瘤的生长和转移过程,通过附于显微镜上的摄像装置摄像,图像同步输入计算机存储并分析,获取裸鼠全身瘤灶的影像。也可不利用 LZ12 立体荧光显微镜,而将裸鼠放入携

有 490 nm 蓝光的箱子里,通过(charge-coupled device, CCD)相机直接摄像获得。采用这些方法,他们在体外观察到了脑、肺、纵隔、肝、胃、肠、骨骼和腹腔淋巴结内的瘤灶。初步经验显示,荧光的强弱与肿瘤大小、深度有关,肿瘤位于皮下 0.5 mm 时,可检测到的最小瘤灶为 59 μm ;距皮下 2.2 mm 时,能够检测到的瘤体约为 1.8 mm;深在部位的肿瘤,其所发出的荧光由于受周围组织,尤其是皮肤的干扰,小的瘤灶常难以显示。为此, Yang 等^[8]在欲检测的器官做一个可逆性的皮瓣,观察时打开皮瓣,建立一条荧光通路,大大提高了检测的敏感性,从而可检测出脑内、肝内单个肿瘤细胞,以及由数个肿瘤细胞形成的肺内微小瘤灶。

三、在检测肿瘤血管形成方面的应用

肿瘤血管形成是肿瘤生长、浸润和转移的必备条件,如果没有新生血管供应营养,肿瘤达到 1~2 mm 的直径将不再增大。因此,测定肿瘤内微血管密度(microvessel density, MVD),可以判断患者预后,通常测定 MVD 的方法是以抗血管内皮细胞抗体显示血管,计数阳性染色的新生血管数目。由于切片固定和脱水过程中可出现组织体积和形状的改变,采用免疫组化法获得的 MVD 值可靠性较差^[9]。Anna 等^[10]将 GFP 转染 9L 胶质瘤细胞后接种于大鼠脑内,2 周后处死大鼠,行鼠脑切片和荧光显微镜观察,无荧光标记的暗区(block spots)为肿瘤血管区,由此计数肿瘤内的 MVD。此法操作简便,结果可靠。最近, Yang 等^[11]将 GFP 分别转染 PC3、Bx-PC3、MDA-MB-435 前列腺癌细胞和 Lewis 肺癌细胞,然后原位移植至裸鼠体内,采用 LZ12 立体荧光显微镜对移植瘤进行适时观察,瘤内肿瘤血管在荧光的对照下异常清晰,可以在活体内动态监测肿瘤血管的形成和发展。

四、在观测抗肿瘤疗效中的应用

GFP 作为一种报告基因,转染肿瘤细胞后,将随着肿瘤细胞的分裂、生长而传给下代,也将随着肿瘤细胞的死亡而消亡。根据这一特性,人们已将 GFP 应用于抗癌药物的疗效评价、肿瘤耐药机制的研究。Chambers 等^[12]将 GFP 转染卵巢癌细胞 SKOV3,在筛选出的阳性细胞内加入抗癌药物阿霉素,结果大部分肿瘤细胞荧光消失,并且证实失去荧光的肿瘤细胞均已死亡。随后的体内实验结果也与体外实验一致。Hoffmar^[13]用 GFP 转染的肿瘤细胞建立了 10 余种大鼠原位移植瘤模型,并已用于多种药物的疗效评价。这些模型不仅可以动态观察药物对肿瘤细胞

生长的影响,还可以连续检测药物对肿瘤细胞侵袭和转移的影响,是进行新药筛选、药理作用探讨的标准模型,有望成为临床前和临床实验的桥梁。

五、GFP 在肿瘤基因治疗中的应用

肿瘤基因治疗的关键在于目的基因的高效转染和表达。既往常采用 β -半乳糖苷酶、荧光素酶检测目的基因的转染和表达效率,但两者均有明显的缺陷。前者要求固定组织或细胞,不能进行动态观察,此外,某些组织或细胞内存在内源性的 β -半乳糖苷酶,可干扰检测结果;后者需要荧光素做底物,而荧光素随着时间的推移和肿瘤细胞的分裂会逐渐消失,通常 2~3 d 后便很难显示被标记过的肿瘤细胞。GFP 具有性能稳定、无需底物、能在活体内连续检测的特性,并已成为检测目的基因转染效率和表达方式的最好报告基因^[4]。Flotte 等^[15]为了探索原位动态检测目的基因转染效率的方法,将 Ad-CMV-GFP、AAV-CMV-GFP 分别注入新西兰大白兔的支气管内,于转染后的第 13、21、30 天,采用改装后能够检测绿色荧光的纤维支气管镜进行观察,并于第 30 天时处死动物行免疫组化对照分析,结果显示 GFP 能够准确地检测目的基因的转染效率。

综上所述, GFP 具有无毒、性能稳定、无需底物或辅酶和能在活体内动态观测等特性,为研究肿瘤的发病机制、生物学行为、血管形成以及评价抗癌药物的疗效和基因转染效率提供了一种简便可靠的观察方法。

参考文献

- 1 Cubitt AB, Heim R, Adams SR, et al. Understanding, improving and using green fluorescent protein. Trends Biochem Sci, 1995, 20: 448-455.
- 2 Heim R, Prasher DC, Tsien RY, et al. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 12501-12504.
- 3 Wong CW, Lee A, Shientag L, et al. Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. Cancer Res, 2001, 61: 333-338.
- 4 Varghese HJ, Davidson MTM, MacDonald IC, et al. Activated ras regulates the proliferation/apoptosis balance and early survival of developing micrometastases. Cancer Res, 2002, 62: 887-891.
- 5 何诚, 贺平, 朱运松. nm23-H1-GFP 融合蛋白在人肺癌细胞株中的表达及其对肿瘤细胞体外侵袭能力的影响. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16: 51-56.
- 6 Chambers AF, Macdonald IC, Schmidt EE, et al. Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy. Cancer Metastasis Rev, 1995, 14: 279-301.
- 7 Yang M, Baranov E, Jiang P, et al. Real-time optical imaging of primary tumor growth and multiple metastatic events in a pancreatic cancer orthotopic model. Cancer Res, 2002, 62: 1534-1540.
- 8 Yang M, Baranov E, Wang JW, et al. Direct external imaging of

nascent cancer , tumor progression , angiogenesis , and metastasis on internal organs in the fluorescent orthotopic model . Proc Natl Acad Sci USA , 2002 , 99 : 3824-3829 .

9 Tanigawa N , Lu C , Mitsui T , et al . Quantitation of sinusoid-like vessel in hepatocellular carcinoma : its clinical and prognostic significance . Hepatology , 1997 , 26 : 1216-1223 .

10 Anna M , Edgrado M , Simonova M , et al . Novel gliosarcoma cell line expressing green fluorescent protein : a model for quantitative assessment of angiogenesis . Microvascular Res , 1998 , 56 : 145-153 .

11 Yang M , Baranov E , Li XM , et al . Whole-body and intravital optical imaging of angiogenesis in orthotopically implanted tumors . Proc Natl Acad Sci USA , 2001 , 98 : 2616-2621 .

12 Chaudhuri TR , Mountz JM , Rogers BE , et al . Light-based imaging of green fluorescent protein-positive ovarian cancer xenografts during therapy . Gynecol Oncol , 2001 , 82 : 581-589 .

13 Hoffman RM . Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation : a bridge to the clinic . Invest New Drugs , 1999 , 17 : 343-359 .

14 Klein D , Indraccolo S , Von Rombs K , et al . Rapid identification of viable retrovirus-transduced cells using the green fluorescent protein as a marker . Gene Ther , 1997 , 4 : 1256-1260 .

15 Flotte TR , Beck SE , Chesnut K , et al . A fluorescence video-endoscopy technique for detection of gene transfer and expression . Gene Ther , 1998 , 5 : 166-173 .

(收稿日期 2003-03-12)

· 病例报告 ·

全覆膜分叉形气管支架治疗食管气管瘘一例

殷世武 项延森 叶录安

患者女 65 岁 2003 年 4 月因进行性进食困难行食管吞钡检查及胃镜检查 , 明确为食管中段鳞状细胞癌 , 病变长约 12 cm , 于 2003 年 7 月经伽玛刀治疗后进食状况有所缓解。于 2003 年 9 月出现饮水呛咳 , 食管碘水造影示食管气管瘘 , 瘘口位于气管隆突部位 , 食管扩张度良好 (图 1)。

于 2003 年 10 月来我院行食管支架置入术后造影见瘘口未能完全封闭 , 仍然存在瘘 , 10 d 后复查支架出现下移 , 随即取出支架 , 由于患者的食管狭窄不明显 , 且瘘口位于气管隆突部位 , 考虑用食管支架封闭瘘口比较困难。决定换用气管分叉形气管支架进行瘘口封堵术 , 该支架以 Z 形不锈钢丝作为骨架 , 内外覆以硅橡胶膜。

手术经过 先行胸部 CT 检查 , 明确该患者的气管及支气管的管径。患者取仰卧位 , 在透视下经口直接气管插管置入 0.038 英寸导丝至左主支气管内 , 沿导丝送入支架输送器的导引鞘 , 退出导引头保留外鞘以维持呼吸道通畅 , 压缩气管支架至输送器内管内。将内管置入外鞘内 , 电视透视下定位适中后固定顶推管 , 后退外鞘 , 先将分叉型支架的长臂释放于左侧的支气管内 , 短臂部分释放在气管内 , 向前推动支架 , 使短臂进入右侧支气管。术后复查支架扩张度好 , 瘘口封闭完全 , 进食水通畅 (图 2)。

讨论 食管癌放疗后引起食管气管瘘是一种比较常见的并发症 , 由于患者不能进食 , 且合并肺部感染等。目前大多数均可以用食管支架置入来封闭瘘口 , 但对于瘘口位于气管隆突部位的患者单独放置气管或支气管支架瘘口不容易封闭成功 , 如果放置气管支架容易移位引起支气管开口阻塞。采用全覆膜气管分叉型支架治疗气管瘘可以根据 CT 显示气管和支气管的管径定制合适的支架 , 便于封闭瘘口 , 减少术后的反应。

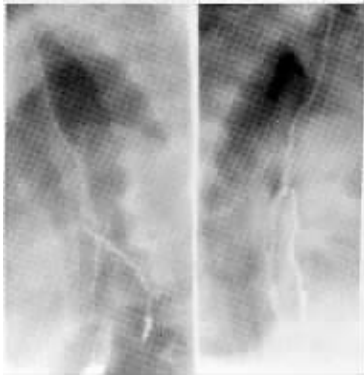


图 1 食管吞钡示食管中段癌合并食管气管瘘 , 瘘口位于气管隆突部位

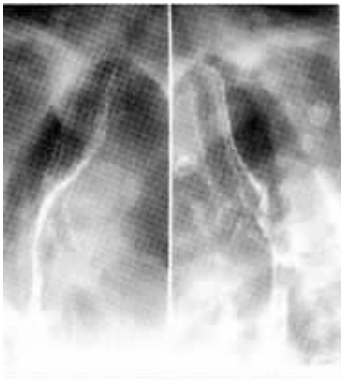
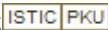


图 2 气管支架置入后瘘口封闭良好

采用三套管支架释放系统 , 外套管在释放支架前留在气管内 , 保持呼吸道通畅 , 减少了术中患者限制通气的时间 , 使得释放支架更加安全、简便易行 , 易于被患者接受。

(收稿日期 2004-08-23)

作者: 梅雀林, 李彦豪
作者单位: 510515, 广州, 第一军医大学南方医院介入科
刊名: 介入放射学杂志 
英文刊名: JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY
年, 卷(期): 2004, 13(5)
被引用次数: 3次

参考文献(15条)

1. Cubitt Ab, Heim R, Adams SR Understading, improving and using green fluorescent protein 1995
2. Heim R, Prasher DC, Tsien RY Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein 1994
3. Wong CW, Lee A, Shientag L Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency 2001
4. Varghese HJ, Davidson MTM, MacDonald IC Activated ras regulates the proliferation/apoptosis balance and early survival of developing micrometastases 2002
5. 何诚, 贺平, 朱运松 nm23-H1-GFP融合蛋白在人肺癌细胞株中的表达及其对肿瘤细胞体外侵袭能力的影响[期刊论文]-中国生物化学与分子生物学报 2000
6. Chambers AF, Macdonald IC, Schmidt EE Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy 1995
7. Yang M, Baranov E, Jiang P Real-time optical imaging of primary tumor growth and multiple metastatic events in a pancreatic cancer orthotopic model 2002
8. Yang M, Baranov E, Wang JW Direct external imaging of nascent cancer, tumor progression, angiogenesis, and metastasis on internal organs in the fluorescent orthotopic model 2002
9. Tanigawa N, Lu C, Mitsui T Quantitation of sinusoid-like vessel in hepatocellular carcinoma: its clinical and prognostic significance 1997
10. Anna M, Edgrado M, Simonova M Novel gliosarcoma cell line expressing green fluorescent protein: a model for quantitative assessment of angiogenesis 1998
11. Yang M, Baranov E, Li XM Whole-body and intravital optical imaging of angiogenesis in orthotopically implanted tumors 2001
12. Chaudhuri TR, Mountz JM, Rogers BE Light-based imaging of green fluorescent protein-positive ovarian cancer xenografts during therapy 2001
13. Hoffman RM Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic 1999
14. Klein D, Indraccolo S, Von Rombs K Rapid identification of viable retrovirus-transduced cells using the green fluorescent protein as a marker 1997
15. Flotte TR, Beck SE, Chesnut K A fluorescence video-endoscopy technique for detection of gene transfer and expression 1998

引证文献(3条)

1. 王勇, 冯敢生, 田慧, 张智红, 熊涛 原位肝肿瘤血管生成及自发转移的荧光成像[期刊论文]-中华医学杂志 2007(46)

2. [王斌](#). [贾新秋](#). [赵岐刚](#). [傅庆诏](#) [超声微泡造影剂促进GFP质粒转染卵巢癌细胞的实验研究](#)[期刊论文]-[现代妇产科进展](#) 2007(10)
3. [王斌](#). [傅艺兵](#). [李晓翠](#). [孙丽](#). [傅庆诏](#) [超声造影剂介导PTEN基因影响卵巢癌侵袭的实验研究](#)[期刊论文]-[中华超声影像学杂志](#) 2006(1)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfsxzz200405033.aspx

授权使用: qkxb11(qkxb11), 授权号: 269de62f-0859-4338-85c2-9e2b00d2dec5

下载时间: 2010年11月11日