

## 荧光蛋白在肿瘤研究中的应用进展

王小平, 庄志祥

### ■背景资料

过去, 研究者们因不能实时动态、非侵袭性、直观肿瘤的进展, 只能从静态结构上来探讨肿瘤的特性, 进而使肿瘤的研究受到许多限制。荧光蛋白的广泛应用后, 以前在体内不能观察到的现在可以清楚地看到, 革新了肿瘤的基础研究。

王小平, 庄志祥, 苏州大学附属第二医院肿瘤科 江苏省苏州市 215004  
王小平, 在读硕士, 主要从事肝癌的基础研究。  
苏州市科技发展计划基金资助项目, No. SYS201129  
作者贡献分布: 文献的查阅、分析及论文写作由王小平完成; 庄志祥审校。  
通讯作者: 庄志祥, 主任医师, 硕士生导师, 215004, 江苏省苏州市三香路1055号, 苏州大学附属第二医院肿瘤科。  
sdfeyzzx@sina.com  
电话: 0512-67784617  
收稿日期: 2014-12-23 修回日期: 2015-01-18  
接受日期: 2015-01-22 在线出版日期: 2015-03-18

### Application of fluorescent proteins in tumor research

Xiao-Ping Wang, Zhi-Xiang Zhuang

Xiao-Ping Wang, Zhi-Xiang Zhuang, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China  
Supported by: the Suzhou Science and Technology Development Program, No. SYS201129  
Correspondence to: Zhi-Xiang Zhuang, Chief Physician, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, 1055 Sanxiang Road, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China. sdfeyzzx@sina.com  
Received: 2014-12-23 Revised: 2015-01-18  
Accepted: 2015-01-22 Published online: 2015-03-18

### Abstract

Fluorescent proteins have been applied in multiple tumor research fields, including tumor cell growth, invasion, metastasis, angiogenesis, the interaction between tumor cells and host cells, and antitumor drugs. Fluorescent imaging has enabled what was formerly invisible to be seen clearly *in vivo* with fluorescent proteins. This article will make a brief review of the application of fluorescent proteins in tumor research.

### ■同行评议者

陈洪, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 东南大学附属中大医院消化科

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Fluorescent proteins; Tumor; Fluorescent imaging

Wang XP, Zhuang ZX. Application of fluorescent proteins in tumor research. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(8): 1272-1277 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/1272.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i8.1272>

### 摘要

荧光蛋白作为一种新型的标记技术, 广泛应用于肿瘤学的研究中, 包括肿瘤的生长、侵袭、转移、血管生成、肿瘤与宿主之间的关系、抗肿瘤药物等等。荧光蛋白结合荧光成像技术, 使以前在体内不能观察到的现在可以清楚地看到, 将肿瘤在体内的研究引领到一个新的领域。本文将对该方面进行综述。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 荧光蛋白; 肿瘤; 荧光成像

**核心提示:** 荧光蛋白广泛应用于监测肿瘤的进展及血管生成、发现肿瘤的微小转移灶及融合细胞和被诱导恶变的宿主细胞、探讨肿瘤与宿主之间的关系、抗肿瘤药物的研发、术中荧光导航等方面, 具有非侵袭性、方便、直观、实时动态观察肿瘤进展等优点。

王小平, 庄志祥. 荧光蛋白在肿瘤研究中的应用进展. *世界华人消化杂志* 2015; 23(8): 1272-1277 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/1272.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i8.1272>

## 0 引言

1962年Shimomura等<sup>[1]</sup>首次从水母中分离出绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP), 后来, 一些研究者深入研究GFP的工作原理, 并在此基础上对GFP进行化学改造, 不但大大增强了他的发光率, 还研究出了红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)、蓝色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP)、黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)等。近年来, 人们试图将这些荧光蛋白用来标记体内不可直观的基因或细胞, 就好像对基因或细胞装上了“摄像头”, 并结合荧光成像技术, 使原本不可见的部分在荧光显微镜下清晰可见。在上个世纪90年代, 美国Hoffman实验室, 通过采用荧光蛋白标记技术结合荧光成像技术, 在动物活体内探讨了肿瘤的进展和转移, 从而揭开了肿瘤研究的“荧光蛋白时代”的序幕<sup>[2,3]</sup>。此后, 荧光蛋白被广泛应用于生物医学研究领域, 为肿瘤的研究带来了许多革命性的突破<sup>[4,5]</sup>。GFP的发现者及改造者因此而获得了2008年的诺贝尔化学奖。

目前常用的荧光标记方法有: 荧光蛋白(fluorescent proteins)、有机小分子染料(organic dyes)、荧光半导体量子点(quantum dots)。有机小分子荧光染料标记的细胞会随着时间的推移和细胞的增殖而脱色, 只能短时间标记细胞<sup>[6]</sup>; 荧光半导体量子点对细胞产生毒性, 而且荧光成像的灵敏度低<sup>[7]</sup>, 所以有机小分子染料和荧光半导体量子点在标记活细胞时存在一些局限性。而荧光蛋白标记活细胞具有如下独特的优点<sup>[8-10]</sup>: (1)只标记活细胞, 若标记的细胞死亡后, 细胞内的荧光蛋白很快扩散并降解, 因此在标记细胞时不会产生假阳性; (2)对细胞不产生毒性, 不影响细胞的生物学特性; (3)灵敏度高, 在活体内能够稳定持续表达, 适合用来实时非侵袭性成像; (4)荧光成像时无需底物, 可直接在荧光显微镜下检测到。

## 1 常见的荧光蛋白及基本特性

GFP是一种能发出绿色荧光的特殊蛋白, 他是由238个氨基酸构成的27 kDa单体蛋白, 含有由环化三肽构成的生色基团, 生色基团性状稳定, 其在原核及真核细胞中均能表达, 并且不影响细胞的正常生长。GFP在激发光为470 nm, 发射光为508 nm无需底物参与, 即可

在荧光显微镜下发出绿色荧光<sup>[11]</sup>。1999年Matz等<sup>[12]</sup>从珊瑚虫中分离出最早的RFP DsRed, 各种优化的RFP突变体不断涌现, 如: mCherry、rsTagRFP、mKate2、mApple等。DsRed的最大吸收波长为558 nm, 发射波长为583 nm, 与GFP相比, RFP的发射波长更长, 灵敏度比GFP高, 聚光度较好, 适合深部组织的荧光成像, 为GFP提供了一个很好的互补工具, 拓展了肿瘤研究的视野<sup>[13,14]</sup>。

## 2 荧光蛋白在肿瘤研究中的应用

**2.1 建立肿瘤荧光动物模型** 目前在荧光蛋白介导下已建立了乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、胶质瘤等多种肿瘤的荧光动物模型<sup>[15-18]</sup>。肿瘤荧光模型在活体荧光成像仪下, 不仅能够实时动态非侵袭性观察肿瘤的生长、侵袭、转移, 还为筛选理想的抗肿瘤药物提供了方便快捷的平台。而在传统的无荧光模型中, 只能将动物处死解剖后才能看到肿瘤在体内进展情况<sup>[19]</sup>。我们所在的课题组也将稳定高表达RFP的人肝癌细胞株HepG2-RFP接种于全身表达增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的裸小鼠肝右叶, 成功建立了一个双色荧光示踪的人肝癌原位移植瘤模型, 分别在接种后第3、5、7周进行实时活体成像, 观察到了早期肉眼无法看到的肿瘤团块及微小转移灶, 同时红色肿瘤团块随着移植时间的延长而增大、增多, 并从肝区向肝外组织迁移。

**2.2 肿瘤亚细胞动力学改变** 在GFP发现以前, 因传统的荧光分子对细胞产生毒性大, 所以通常人们仅能够研究死亡肿瘤细胞的静态结构。而荧光蛋白对细胞的毒性非常弱, 适于标记活细胞, 因此观察肿瘤亚细胞的动力学的改变成为了可能。Hoffman等<sup>[20]</sup>将GFP标记肿瘤细胞核, RFP标记肿瘤细胞质, 高分辨率荧光显像可在活体内非侵袭性实时动态看到肿瘤细胞核质在整个细胞周期中极力拉长, 试图通过“瘦身”改变进入毛细血管和新生的肿瘤血管中。Yamamoto等<sup>[21]</sup>在双色标记肿瘤细胞的基础上, 进一步观察了细胞的整个凋亡过程: 首先是胞浆和核畸形改变, 然后是核膜破裂, 最后发展为核碎裂, 染色质被挤出, 肿瘤细胞即凋亡。也可通过观察肿瘤亚细胞的动力学改变, 来明确抗肿瘤药物对肿瘤细胞起作用的部位, Yang等<sup>[22]</sup>将双色标记的肿瘤细胞(GFP标

### ■ 研发前沿

近几年来, 荧光蛋白有效地应用肿瘤于放化疗疗效的评估, 耐药性的检测, 肿瘤新药的研发及术中荧光导航等。未来研发一种特异性标记肿瘤细胞的荧光蛋白, 将其广泛应用于临床工作中是我们亟待解决的问题。

### ■ 相关报道

美国Hoffman实验室将表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的人结肠癌细胞首先接种于表达红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)的裸鼠皮下, 2 wk后, 取出肿瘤组织接种于表达蓝色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP)的裸鼠皮下。再2 wk后, 观察到肿瘤组织是由表达GFP、RFP、CFP的3种颜色细胞组成, 即宿主本身也参与了肿瘤组织的“重构体”组成。

### ■ 创新盘点

本文系统地介绍了荧光蛋白在肿瘤的早期诊断、肿瘤的进展、抗肿瘤疗效监测及新药研发方面具有非侵袭性、方便、直观、准确等突出优点。同时, 因荧光蛋白的应用, 我们更深入的了解融合了融合细胞及被诱导恶变的宿主细胞, 这些都有较好的创新性。

记肿瘤细胞核, RFP标记肿瘤细胞质)接种于GFP转基因鼠, 建立了一种三色荧光蛋白的肿瘤模型, 观察到多柔比星在抗肿瘤的过程中主要作用于肿瘤细胞的细胞核, 而对细胞质几乎不起作用。

**2.3 肿瘤与宿主之间的相互关系** 肿瘤的发生发展离不开宿主提供的微环境<sup>[23]</sup>。如果我们将肿瘤与宿主分别标记不同颜色的荧光蛋白, 就能够更清楚更准确的辨别肿瘤与宿主在肿瘤进展中各自扮演着怎样的角色。Yang等<sup>[15]</sup>将表达RFP的黑素瘤、前列腺癌细胞等分别接种于C57/B6-GFP转基因小鼠, 建立双色荧光示踪的移植瘤模型, 在荧光显微镜下观察发现黑素瘤细胞B16F10-RFP接种于GFP转基因小鼠3 wk后, 新鲜的红色肿瘤组织中心及周围浸润着大量绿色宿主源性的树突状细胞及淋巴细胞, 形成一个肿瘤局部微环境下的免疫系统。甚至还可以在单细胞水平上直观绿色宿主源性巨噬细胞接触、包绕、吞噬、消化表达红色荧光的前列腺癌细胞。崔宝乾等<sup>[24,25]</sup>、吴金鼎等<sup>[26]</sup>在红绿双色荧光蛋白示踪的胶质瘤模型基础上, 分离出浸润在肿瘤组织中的绿色巨噬细胞、树突状细胞及胶质细胞, 体外培养并研究发现绿色的巨噬细胞、树突状细胞及胶质细胞已发生了癌变, 具有无限增殖力和致瘤力。这暗示着在肿瘤进展过程中宿主的部分免疫细胞(巨噬细胞、树突状细胞等)不再对肿瘤起免疫监视作用, 而是在肿瘤的诱导下“突变”为癌变的肿瘤相关免疫细胞(tumor-associated immunocyte, TAIC), 甚至宿主本身的主细胞也被肿瘤细胞改造, 成为肿瘤的增殖、侵袭及转移的“帮凶”<sup>[27]</sup>。

Dong等<sup>[28]</sup>在探讨胶质瘤干祖细胞在肿瘤组织重构中如何发挥作用的实验中发现肿瘤组织中, 除了红、绿色细胞, 还有少量的由红色肿瘤细胞与绿色宿主细胞融合而成的黄色融合细胞, 进一步研究表明黄色融合细胞的恶性程度相对于红色肿瘤细胞要高; 我们在双色荧光肝癌组织中也发现了黄色融合细胞。

**2.4 肿瘤新生血管** 在过去, 通常采用测定新生血管密度的方法来评估肿瘤生长情况, 这种方法组织均需要经过固定、脱水、染色等步骤, 部分新生血管在这个过程可能会出现变形而无法显示, 所以传统的方法不仅复杂而且不准确。Hoffman等<sup>[29]</sup>将HT-1080-RFP纤维肉瘤移植

于ND-GFP转基因裸鼠, 直接在荧光显微镜下就能够清晰的观察到发绿色荧光的肿瘤新生血管。因肿瘤和宿主分别被标记上不同颜色的荧光蛋白, 所以可以直接鉴别肿瘤新生血管的主要组成成分是宿主源性的细胞还是肿瘤源性细胞。张金石等<sup>[30]</sup>在双色荧光蛋白示踪的胶质瘤组织中发现肿瘤新生血管的起源细胞除了绿色宿主细胞, 还有红色肿瘤细胞和肿瘤细胞与宿主细胞融合后的黄色融合细胞。

Amoh等<sup>[31]</sup>将乳腺癌细胞(RFP标记细胞质, GFP标记细胞核)分别原位种植于免疫活性正常和免疫活性缺陷的ND-GFP小鼠。早期, 在荧光显微镜下观察到免疫活性缺陷的ND-GFP裸小鼠肿瘤组织中有许多表达GFP的新生血管, 而免疫活性正常的ND-GFP小鼠体内却没有发现任何新生血管, 这说明了肿瘤血管的生成与机体免疫力也有着密切关系。

**2.5 循环肿瘤细胞及肿瘤休眠细胞** 有研究<sup>[32,33]</sup>表明, 部分肿瘤细胞脱落后在血管中运动, 我们称这类细胞为循环肿瘤细胞(circulating tumour cell, CTC), 他是肿瘤向远处转移的重要前提条件之一。由此可见新生肿瘤血管既可为肿瘤生长提供营养, 又为肿瘤转移提供了有利的条件。Yamauchi等<sup>[34,35]</sup>将肿瘤细胞质标记上GFP, 细胞核标记上RFP, 然后在荧光显微镜下观察到肿瘤细胞在毛细血管中通过时需变形缩小以适应血管的宽度, 肿瘤细胞在毛细血管中的平均长度是本身的平均长度的4倍, 而细胞核是其本身平均长度的1.6倍, 肿瘤细胞在血管中每小时迁移距离约为8.0-48.3  $\mu\text{m}$ 不等, 实时双色荧光成像表明肿瘤细胞从血管迁徙出的过程中, 细胞核和细胞质都经过了“瘦身”改变, 细胞质先从血管中溢出, 然后细胞核跟随其后。

Goodison等<sup>[36]</sup>将GFP-NM2C5(NM2C5为一个非转移性的基因)标记的人乳腺癌细胞接种于裸鼠的乳腺后, 荧光显像发现有少量几个肿瘤细胞转移到肺部。切除原发肿瘤的半年内, 通过活体成像仪实时动态观察, 转移到肺的少量肿瘤细胞未见增殖和凋亡, 一直保持着“静止”状态定居在肺中。但这些细胞在体外培养仍然具有肿瘤细胞的生物学特性, 我们将这类称为“休眠细胞”, 他们在体内具有潜在的复发能力。“休眠细胞”的发现及其特性的研究解释了为什么当原发肿瘤被彻底切除后, 部分



患者仍存在复发的风险<sup>[37,38]</sup>。

**2.6 肿瘤的转移** 传统的病理方法需要将动物处死才可以看到肿瘤的转移灶, 而将荧光蛋白标记肿瘤细胞时, 不仅可以在活体内发现肿瘤的转移灶, 甚至早期的单个细胞形成的微小转移灶也能看到<sup>[39,40]</sup>。Hoffman<sup>[41,42]</sup>通过双色荧光蛋白标记的肿瘤细胞, 在亚细胞水平上动态观察肿瘤细胞的转移, 肿瘤细胞进入血管后, 通过血流及自身的动力运输到远处, 核质形态发生改变, 肿瘤细胞从血管中外渗到其他组织中, 并定居在此处形成转移灶。除上述循环肿瘤细胞外, 宿主提供的微环境在肿瘤转移过程中也扮演着重要的角色。Bouvet等<sup>[43]</sup>将RFP标记的人结肠癌细胞HCT-116接种于GFP转基因小鼠脾脏后, 在肝脏组织中观察到由肿瘤细胞和脾脏细胞形成的转移灶; 将GFP脾脏细胞和RFP肿瘤细胞混合静注入门静脉, 同样也可以在肝脏组织中看到脾脏细胞和肿瘤细胞形成的远处转移灶; 而当HCT-116-RFP单独静注入门静脉, 6 h后, 肿瘤细胞质发生了广泛的崩解, 肿瘤细胞几乎全都死亡, 实验结果表明宿主的脾脏细胞能够协助结肠癌肝转移。

**2.7 肿瘤的治疗** 肿瘤荧光模型结合荧光活体成像技术, 可用来研究活体内肿瘤对药物的敏感性、耐药性及药物作用肿瘤的机制等。同传统的动物模型相比, 建立的荧光肿瘤荧光模型, 有利于实验的序贯性研究, 减少了药物研发所需的动物的数量, 加快了筛选新治疗方案的进程<sup>[44,45]</sup>。Tanaka等<sup>[46]</sup>将表达RFP人结肠癌细胞(HT29-RFP)接种到表达GFP裸鼠的脾脏, 活体双光子激光扫描显微镜发现结肠癌肝转移后, 将5-氟尿嘧啶和伊立替康两种化疗药物分别注射于荷瘤鼠的腹腔, 实时动态观察转移到肝脏的结肠癌细胞对两种化疗药物的反应。其结果表明这两种化疗药物治疗结肠癌肝转移的疗效无差异无统计学意义。

国外学者Metildi等<sup>[47-49]</sup>已报道了将荧光蛋白标记及显像技术引用于外科切除结肠癌、胰腺癌等手术中, 总体提高了动物的存活时间。因肿瘤细胞被标记上了荧光蛋白, 肿瘤的境界能够真实准确显示, 所以荧光介导的外科手术能够彻底清除肿瘤, 包括小转移病灶, 从而提高了手术的疗效。

### 3 结论

荧光蛋白示踪技术已广泛用于探索肿瘤的生

长、转移、肿瘤与宿主之间的关系, 肿瘤血管的生成, 亚细胞的动力学、抗肿瘤药物的筛选等众多方面, 结合荧光成像技术, 肿瘤能够在活体内进行实时、动态、非侵袭性成像, 为肿瘤的基础研究带来了飞跃的进展, 也为今后临床实践中早期诊断肿瘤、提高抗肿瘤的疗效、术中成像等带来了希望。

未来, 荧光蛋白成像也将极大可能改变传统手术模式。很显然, 现在临床上使用的CT和MRI等检测肿瘤的手段, 都只是术前成像<sup>[50]</sup>。Kelly等<sup>[51]</sup>借助一种可以同时腹腔内进行荧光成像及探查的多功能内窥镜, 对荷瘤鼠模型中的卵巢癌腹腔转移现象进行成像。如果我们能够将荧光蛋白成像技术与内窥镜技术相结合, 应用于临床外科手术中, 不仅可以清楚地分辨出肿瘤的真实边界, 还可以较早地检测出微小转移灶, 尽可能地减小手术损伤, 提高手术的疗效。这将在外科手术中具有极高的应用价值, 希望在不久的将来我们能够将荧光蛋白标记技术应用于临床工作中。

### 应用要点

荧光蛋白标记的方法在肿瘤的生长、侵袭、转移、血管生成、肿瘤与宿主之间的关系等基础研究中广泛应用。也是肿瘤的疗效评估、新药物研发不可或缺的方法。将来应用于人体内肿瘤的早期诊断及肿瘤切除术中荧光导航的前景值得我们期待。

### 4 参考文献

- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea. *J Cell Comp Physiol* 1962; 59: 223-239 [PMID: 13911999]
- Hoffman RM. Orthotopic transplant mouse models with green fluorescent protein-expressing cancer cells to visualize metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1998-1999; 17: 271-277 [PMID: 10352880]
- Hoffman RM. Green fluorescent protein to visualize cancer progression and metastasis. *Methods Enzymol* 1999; 302: 20-31 [PMID: 12876758]
- Ohba Y, Fujioka Y, Nakada S, Tsuda M. Fluorescent protein-based biosensors and their clinical applications. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; 113: 313-348 [PMID: 23244794 DOI: 10.1016/B978-0-12-386932-6.00008-9]
- Hoffman RM. Fluorescent proteins as visible in vivo sensors. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; 113: 389-402 [PMID: 23244796 DOI: 10.1016/B978-0-12-386932-6.00010-7]
- Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Methods* 2008; 5: 763-775 [PMID: 18756197 DOI: 10.1038/nmeth.1248]
- Dave SR, White CC, Gao X, Kavanagh TJ. Luminescent quantum dots for molecular toxicology. *Adv Exp Med Biol* 2012; 745: 117-137 [PMID: 22437816 DOI: 10.1007/978-1-4614-3055-1\_8]
- Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev* 2010;

# ■ 名词解释

循环肿瘤细胞 (CTC): 通常将进入外周血中的肿瘤细胞称为循环肿瘤细胞。循环肿瘤细胞的检测有效地应用于对肿瘤的早期诊断、化疗药物的快速评估, 肿瘤的进展及复发等方面。

- 90: 1103-1163 [PMID: 20664080 DOI: 10.1152/physrev.00038.2009]
- 9 Nienhaus K, Nienhaus GU. Fluorescent proteins for live-cell imaging with super-resolution. *Chem Soc Rev* 2014; 43: 1088-1106 [PMID: 24056711 DOI: 10.1039/c3cs60171d]
- 10 Fili N, Toseland CP. Fluorescence and labelling: how to choose and what to do. *EXS* 2014; 105: 1-24 [PMID: 25095988 DOI: 10.1007/978-3-0348-0856-9\_1]
- 11 Markova SV, Burakova LP, Frank LA, Golz S, Korostileva KA, Vysotski ES. Green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Clytia gregaria*: cDNA cloning, expression, and characterization of novel recombinant protein. *Photochem Photobiol Sci* 2010; 9: 757-765 [PMID: 20442953 DOI: 10.1039/c0pp00023j]
- 12 Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 969-973 [PMID: 10504696 DOI: 10.1038/13657]
- 13 Shcherbakova DM, Subach OM, Verkhusha VV. Red fluorescent proteins: advanced imaging applications and future design. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012; 51: 10724-10738 [PMID: 22851529 DOI: 10.1002/anie.201200408]
- 14 Müller-Taubenberger A, Anderson KI. Recent advances using green and red fluorescent protein variants. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 77: 1-12 [PMID: 17704916 DOI: 10.1007/s00253-007-1131-5]
- 15 Yang M, Li L, Jiang P, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM. Dual-color fluorescence imaging distinguishes tumor cells from induced host angiogenic vessels and stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 14259-14262 [PMID: 14614130]
- 16 Zhang X, Zheng X, Jiang F, Zhang ZG, Katakowski M, Chopp M. Dual-color fluorescence imaging in a nude mouse orthotopic glioma model. *J Neurosci Methods* 2009; 181: 178-185 [PMID: 19447136 DOI: 10.1016/j.jneumeth.2009.05.004]
- 17 Bouvet M, Hoffman RM. In vivo imaging of pancreatic cancer with fluorescent proteins in mouse models. *Methods Mol Biol* 2012; 872: 51-67 [PMID: 22700403 DOI: 10.1007/978-1-61779-797-2\_4]
- 18 Hayashi K, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Amoh Y, Hoffman RM, Bouvet M. Dual-color imaging of angiogenesis and its inhibition in bone and soft tissue sarcoma. *J Surg Res* 2007; 140: 165-170 [PMID: 17418866 DOI: 10.1016/j.jss.2006.11.018]
- 19 Yagublu V, Ahmadova Z, Hafner M, Keese M. Review: Fluorescent protein-based tumor models. *In Vivo* 2012; 26: 599-607 [PMID: 22773574]
- 20 Hoffman RM. Cellular and subcellular imaging in live mice using fluorescent proteins. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13: 537-544 [PMID: 22214502]
- 21 Yamamoto N, Tsuchiya H, Hoffman RM. Tumor imaging with multicolor fluorescent protein expression. *Int J Clin Oncol* 2011; 16: 84-91 [PMID: 21347627 DOI: 10.1007/s10147-011-0201-y]
- 22 Yang M, Jiang P, Hoffman RM. Whole-body subcellular multicolor imaging of tumor-host interaction and drug response in real time. *Cancer Res* 2007; 67: 5195-5200 [PMID: 17545599]
- 23 Kucerova L, Skolekova S. Tumor microenvironment and the role of mesenchymal stromal cells. *Neoplasma* 2013; 60: 1-10 [PMID: 23067210 DOI: 10.4149/neo\_2013\_001]
- 24 崔宝乾, 费喜峰, 王爱东, 王之敏, 兰青, 董军, 黄强. 肿瘤相关巨噬细胞癌变: 在双色荧光示踪肿瘤模型中的发现. *中华微生物学与免疫杂志* 2012; 32: 1015-1016
- 25 崔宝乾, 费喜峰, 王爱东, 陈延明, 张金石, 代兴亮, 张全斌, 赵耀东, 王之敏. 胶质瘤干/祖细胞诱导宿主巨噬细胞癌变的实验研究. *中华神经医学杂志* 2013; 12: 865-869
- 26 吴金鼎, 王德林, 代兴亮, 中勇, 刘兵, 陆朝晖, 王爱东, 董军, 兰青. 胶质瘤干细胞可诱导宿主肝组织内胶质瘤间质细胞恶性转化. *中华医学杂志* 2014; 35: 2775-2780
- 27 Wu A, Wei J, Kong LY, Wang Y, Priebe W, Qiao W, Sawaya R, Heimberger AB. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro Oncol* 2010; 12: 1113-1125 [PMID: 20667896 DOI: 10.1093/neuonc/nuq082]
- 28 Dong J, Dai XL, Lu ZH, Fei XF, Chen H, Zhang QB, Zhao YD, Wang ZM, Wang AD, Lan Q, Huang Q. Incubation and application of transgenic green fluorescent nude mice in visualization studies on glioma tissue remodeling. *Chin Med J (Engl)* 2012; 125: 4349-4354 [PMID: 23253700]
- 29 Hoffman RM. Dual-color imaging of tumor angiogenesis. *Methods Mol Biol* 2009; 515: 45-61 [PMID: 19378118 DOI: 10.1007/978-1-59745-559-6\_4]
- 30 张金石, 陆朝晖, 费喜峰, 代兴亮, 吴金鼎, 万意, 王之敏, 王爱东, 董军. 双色荧光示踪胶质瘤原位移植裸鼠模型的建立及其特征分析. *中华肿瘤杂志* 2014; 36: 97-102
- 31 Amoh Y, Hamada Y, Katsuoka K, Hoffman RM. In vivo imaging of nuclear-cytoplasmic deformation and partition during cancer cell death due to immune rejection. *J Cell Biochem* 2012; 113: 465-472 [PMID: 21938737 DOI: 10.1002/jcb.23370]
- 32 Balic M, Williams A, Lin H, Datar R, Cote RJ. Circulating tumor cells: from bench to bedside. *Annu Rev Med* 2013; 64: 31-44 [PMID: 23092385 DOI: 10.1146/annurev-med-050311-163404]
- 33 Hong B, Zu Y. Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends. *Theranostics* 2013; 3: 377-394 [PMID: 23781285 DOI: 10.7150/thno.5195]
- 34 Yamauchi K, Yang M, Jiang P, Yamamoto N, Xu M, Amoh Y, Tsuji K, Bouvet M, Tsuchiya H, Tomita K, Moossa AR, Hoffman RM. Real-time in vivo dual-color imaging of intracapillary cancer cell and nucleus deformation and migration. *Cancer Res* 2005; 65: 4246-4252 [PMID: 15899816 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0069]
- 35 Yamauchi K, Yang M, Jiang P, Xu M, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Moossa AR, Bouvet M, Hoffman RM. Development of real-time subcellular dynamic multicolor imaging of cancer-cell trafficking in live mice with a variable-magnification whole-mouse imaging system. *Cancer Res* 2006; 66: 4208-4214 [PMID: 16618743]
- 36 Goodison S, Kawai K, Hihara J, Jiang P, Yang M, Urquidi V, Hoffman RM, Tarin D. Prolonged dormancy and site-specific growth potential of

- cancer cells spontaneously disseminated from nonmetastatic breast tumors as revealed by labeling with green fluorescent protein. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3808-3814 [PMID: 14506175]
- 37 Páez D, Labonte MJ, Bohanes P, Zhang W, Benhanim L, Ning Y, Wakatsuki T, Loupakis F, Lenz HJ. Cancer dormancy: a model of early dissemination and late cancer recurrence. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 645-653 [PMID: 22156560 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2186]
  - 38 Yu Y, Zhu Z. Cell dormancy and tumor refractory. *Anticancer Agents Med Chem* 2013; 13: 199-202 [PMID: 22934702]
  - 39 Kimura H, Hayashi K, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Kishimoto H, Bouvet M, Hoffman RM. Real-time imaging of single cancer-cell dynamics of lung metastasis. *J Cell Biochem* 2010; 109: 58-64 [PMID: 19911396 DOI: 10.1002/jcb.22379]
  - 40 Hoffman RM. Imageable clinically relevant mouse models of metastasis. *Methods Mol Biol* 2014; 1070: 141-170 [PMID: 24092438 DOI: 10.1007/978-1-4614-8244-4\_11]
  - 41 Hoffman RM. Imaging metastatic cell trafficking at the cellular level in vivo with fluorescent proteins. *Methods Mol Biol* 2014; 1070: 171-179 [PMID: 24092439 DOI: 10.1007/978-1-4614-8244-4\_12]
  - 42 Hoffman RM. Live cell imaging in live animals with fluorescent proteins. *Methods Enzymol* 2012; 506: 197-224 [PMID: 22341226 DOI: 10.1016/B978-0-12-391856-7.00035-4]
  - 43 Bouvet M, Tsuji K, Yang M, Jiang P, Moossa AR, Hoffman RM. In vivo color-coded imaging of the interaction of colon cancer cells and splenocytes in the formation of liver metastases. *Cancer Res* 2006; 66: 11293-11297 [PMID: 17145875]
  - 44 Hoffman RM. Real-time subcellular imaging in live animals: new visible targets for cancer drug discovery. *IDrugs* 2006; 9: 632-635 [PMID: 16952071]
  - 45 Hoffman RM. Orthotopic mouse models expressing fluorescent proteins for cancer drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2010; 5: 851-866 [PMID: 22823260 DOI: 10.1517/17460441.2010.510129]
  - 46 Tanaka K, Okigami M, Toiyama Y, Morimoto Y, Matsushita K, Kawamura M, Hashimoto K, Saigusa S, Okugawa Y, Inoue Y, Uchida K, Araki T, Mohri Y, Mizoguchi A, Kusunoki M. In vivo real-time imaging of chemotherapy response on the liver metastatic tumor microenvironment using multiphoton microscopy. *Oncol Rep* 2012; 28: 1822-1830 [PMID: 22923070 DOI: 10.3892/or.2012.1983]
  - 47 Metildi CA, Kaushal S, Hardamon CR, Snyder CS, Pu M, Messer KS, Talamini MA, Hoffman RM, Bouvet M. Fluorescence-guided surgery allows for more complete resection of pancreatic cancer, resulting in longer disease-free survival compared with standard surgery in orthotopic mouse models. *J Am Coll Surg* 2012; 215: 126-135; discussion 135-136 [PMID: 22632917 DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2012.02.021]
  - 48 Metildi CA, Kaushal S, Snyder CS, Hoffman RM, Bouvet M. Fluorescence-guided surgery of human colon cancer increases complete resection resulting in cures in an orthotopic nude mouse model. *J Surg Res* 2013; 179: 87-93 [PMID: 23079571 DOI: 10.1016/j.jss.2012.08.052]
  - 49 Metildi CA, Kaushal S, Pu M, Messer KA, Luiken GA, Moossa AR, Hoffman RM, Bouvet M. Fluorescence-guided surgery with a fluorophore-conjugated antibody to carcinoembryonic antigen (CEA), that highlights the tumor, improves surgical resection and increases survival in orthotopic mouse models of human pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 2014; 21: 1405-1411 [PMID: 24499827 DOI: 10.1245/s10434-014-3495-y]
  - 50 Abou-Elkacem L, Gremse F, Barth S, Hoffman RM, Kiessling F, Lederle W. Comparison of pCT, MRI and optical reflectance imaging for assessing the growth of GFP/RFP-expressing tumors. *Anticancer Res* 2011; 31: 2907-2913 [PMID: 21868537]
  - 51 Kelly KJ, Brader P, Woo Y, Li S, Chen N, Yu YA, Szalay AA, Fong Y. Real-time intraoperative detection of melanoma lymph node metastases using recombinant vaccinia virus GLV-1h68 in an immunocompetent animal model. *Int J Cancer* 2009; 124: 911-918 [PMID: 19035444 DOI: 10.1002/ijc.24037]

#### 同行评价

本文内容新颖, 展现了荧光蛋白在肿瘤研究中的先进进展。逻辑清晰, 文笔流畅, 可读性好。

编辑: 郭鹏 电编: 闫晋利

