

构建一种可评价脂肪间充质干细胞成骨向分化的荧光素酶报告系统

葛雯姝¹, 汤祎熲², 张 晓², 刘云松², 周永胜^{2△}

(北京大学口腔医学院·口腔医院 1. 综合二科, 2. 修复科, 北京 100081)

[摘要] **目的:** 构建一种可用于评价人脂肪间充质干细胞(human adipose-derived stem cells, hASCs)成骨向分化的荧光素酶报告系统, 以期能够快捷、特异且定量的检测出细胞在体外的成骨向分化情况, 并且使将来活体监测小型实验动物外源移植细胞的成骨分化成为可能。 **方法:** 将骨钙素(osteocalcin, OC)基因的启动子克隆到荧光素酶 luciferase 报告基因的上游, 构建 pLVX-OC_{pro}-Luc-Puro 载体, 进行慢病毒包装后感染人脂肪间充质干细胞, 嘌呤霉素(puromycin)筛选阳性克隆, 获得稳定整合 OC_{pro}-Luc-Puro 的细胞株, 将该细胞在成骨诱导培养基中培养的第 7 和 14 天, 观察其在成骨诱导环境下分化的情况。在成骨诱导培养的第 7 和 14 天检测荧光素酶的活性, 同时进行茜素红(Alizarin red S)染色定量及成骨相关基因表达水平的检测, 通过比较验证该荧光素酶报告系统用于成骨评价的可行性。 **结果:** 成功构建 pLVX-OC_{pro}-Luc-Puro 载体获得稳定整合报告基因的 hASCs 细胞株。在 OC_{pro}-Luc-Puro-hASCs 成骨诱导的第 7 和 14 天, 茜素红钙化结节染色结果均为阳性, 且第 14 天的染色及定量结果明显强于第 7 天。OC、Runx2 及碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)基因的 mRNA 水平在成骨分化刺激下, 其表达水平逐渐上升, 同时, 荧光素酶被激活, 且荧光素酶的活性在第 14 天明显强于第 7 天, 即荧光素酶表达的趋势与茜素红染色定量及成骨相关基因表达水平一致。 **结论:** 成功构建了一种可用于评价成骨向分化的荧光素酶报告系统, 并通过与传统的检测成骨向分化方法(茜素红染色定量、成骨相关基因表达)对比, 验证了该系统的有效性。

[关键词] 荧光素酶类; 脂肪组织; 间充质干细胞; 骨生成; 细胞分化

[中图分类号] R329.28 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2016)01-0170-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-167X.2016.01.031

Establishing a luciferase reporter system to evaluate osteogenic differentiation potential of human adipose-derived stem cells

GE Wen-shu¹, TANG Yi-man², ZHANG Xiao², LIU Yun-song², ZHOU Yong-sheng^{2△}

(1. Department of General Dentistry II; 2. Department of Prosthodontics, Peking University School and Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China)

ABSTRACT Objective: Human adipose-derived stem cells (hASCs) are a highly attractive source in bone tissue engineering. To generate a luciferase reporter system that could be used to quantitatively and rapidly examine osteogenic differentiation potential of human adipose-derived stem cells (hASCs) *in vitro*, and eventually make it possible to monitor the osteogenic differentiation of transplanted cells *in vivo*. **Methods:** The genomic DNA harboring promoter regions of osteocalcin and DNA sequences encoding luciferase genes were amplified by PCR and cloned into the pLVX-pTRE-puro vector to generate the OC_{pro}-Luc-Puro construct. Then, the OC_{pro}-Luc-Puro construct together with three assistant vectors: pMDLg/pRRE, pRSV-REV, and pVSVG, were transiently transfected into HEK293T cells followed by viral supernatants collection, filtration and concentration. Next, the hASCs stably expressing luciferase reporter gene driven by osteocalcin promoter were created with the lentivirus carrying OC_{pro}-Luc-Puro cassette under puromycin selection. The OC_{pro}-Luc-hASCs were then cultured in the absence or presence of osteogenic differentiation medium. On the 7th and 14th days, after osteogenic induction, cellular extracts were collected and analyzed by luciferase reporter assay. Meanwhile, alizarin red staining and quantification as well as quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) analysis of osteogenic associated genes osteocalcin (OC), runt-related transcription factor 2 (Runx2) and alkaline phosphatase (ALP) were used to assess the osteogenic differentiation ability of OC_{pro}-Luc-hASCs. **Results:** OC_{pro}-Luc-Puro plasmid and OC_{pro}-Luc-hASCs were successfully generated. On the 7th and 14th days after osteogenic induction, the luciferase activity of the cellular extracts from OC_{pro}-Luc-hASCs was dramatically increased. Consistently, the extracellular matrix mineralization, as shown by Alizarin red S (ARS) staining and quantification was also markedly intensified and a marked increase of the mRNA expression levels of OC, Runx2 and ALP,

基金项目: 国家自然科学基金(81200763)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (81200763)

△ Corresponding author's e-mail, kqzhouysh@hsc.pku.edu.cn

网络出版时间: 2016-1-18 14:01:34 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20160118.1401.018.html>

although to variable extent, was observed upon osteogenic differentiation. These results indicated that the observations from traditional experiments examining hASCs osteogenic differentiation were largely in agreement with that of our luciferase reporter assay in OC_{pro}-Luc-hASCs. **Conclusion:** We established a luciferase reporter system that could be used to rapidly, quantitatively and specifically determine osteogenic differentiation ability of hASCs. Comparing with the traditional time-consuming methods, the system we generated here was highly effective. This system not only can be used to examine osteogenic differentiation of hASCs in a high throughput manner, but also provides a way to monitor osteogenic differentiation of cells *in vivo*.

KEY WORDS Luciferases; Adipose tissue; Mesenchymal stromal cells; Osteogenesis; Cell differentiation

临床治疗中经常面临着由于各种原因导致的骨缺损,目前采用的自体移植、同种异体移植和人工骨代用品植入等治疗手段尚不尽人意,以组织工程的原理和方法产生的新型组织工程化细胞型人工骨的出现为这一研究领域带来了生机^[1]。近年来的研究主要集中在种子细胞、支架材料、促进成骨向分化的因子等方面^[2-3],而无论哪方面的研究,都需要进行成骨向分化的评价。现有的成骨检测方法如碱性磷酸酶染色及定量、茜素红(Alizarin red S)染色、成骨向分化基因的检测等可应用于体外试验^[4],但都在不同程度上存在检测标记物的特异性不足或者方法繁琐的限制。

人脂肪间充质干细胞(human adipose-derived stem cells, hASCs)是成体间充质干细胞的一种,具有来源广泛、采集容易、患者痛苦小、易于接受、易于扩增等优点,是骨组织工程技术中极具有吸引力的一种成体干细胞来源^[4],本研究将利用该细胞构建系统。骨钙素(osteocalcin, OC)是成骨细胞能够特异表达的少数几个蛋白之一,它主要在矿化形成期出现,是成骨细胞功能的特殊标志物^[4]。本研究将OC基因的启动子克隆到荧光素酶 luciferase 报告基因的上游,筛选出阳性克隆,进行慢病毒的包装后感染人脂肪间充质干细胞,成功构建出了可用于评价成骨向分化的荧光素酶报告系统,该方法能够快捷、特异且定量的检测出细胞在体外的成骨向分化情况,并且使将来活体监测小动物外源移植细胞的成骨分化成为可能。

1 资料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Hyclone 公司;慢病毒包装质粒(pMDLg/pRRE、pRSV-REV、pVSVG)载体购自美国 Addgene 质粒库;pLentiX-pTRE-puro 载体购自美国 Clontech 公司;DH5 α 菌株购自北京全式金科技有限公司;限制性内切酶 *Xho* I 和 *Bam*H I、T4 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司;Prime Star、rTaq 聚合酶购

自日本 Takara 公司; β -磷酸甘油、抗坏血酸、茜素红、地塞米松购自美国 Sigma 公司;hASCs 购自美国 ScienCell 公司。

1.2 构建 pLVX-OC_{pro}-Luc-Puro 载体

以基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 OC 基因启动子(OC_{pro}),以及以 ERE-tk-Luc 载体为模板 PCR 扩增 Luciferase (Luc) 的编码序列;使用 *Xho* I / *Bam*H I 酶切 OC 基因启动子的 PCR 产物, *Bam*H I / *Not* I 酶切 Luc 编码序列的 PCR 产物,将二者纯化作为插入片段;利用 *Xho* I 和 *Not* I 将 pLentiX-pTRE-Puro 的 pTRE 启动子序列切掉后将剩余质粒片段作为载体,用琼脂糖凝胶回收试剂盒(Qiagen, 德国)回收线性化的载体,将以上三者按照 OC_{pro}: Luc: 载体 = 6:6:1 (分子数比)的比例混合,用 T4 DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 DH5 (感受态菌株),在含氨苄青霉素(100 mg/L)的平皿培养 12 ~ 16 h。挑单克隆培养 12 h 后,利用 PCR 方法鉴定 OC_{pro} 以及 Luc 是否成功插入载体中,将阳性克隆送上海英俊生物技术有限公司测序。

1.3 慢病毒的包装

质量比 pLVX-OC_{pro}-Luc-Puro : pMDLg/pRRE : pRSV-REV : pVSVG = 2:1:1:1,共 25 g 质粒。1.5 mL 无血清的 DMEM 培养基稀释 60 μ L 脂质体 Lipofectamin 2000 (Invitrogen, 美国),混匀,25 $^{\circ}$ C 放置 5 min;1.5 mL 无血清的 DMEM 培养基稀释 25 μ g DNA,混匀;将上述稀释液混合后,混匀,25 $^{\circ}$ C 放置 20 min。将 3 mL 的混合液加入含有适量培养基的 293T 细胞的培养皿(10 cm)中,37 $^{\circ}$ C 孵育,4 ~ 6 h 更换新鲜的培养基,24 h 收集上清液;4 $^{\circ}$ C 避光保存,48 h 再次收集上清液,4 000 \times g 离心 5 min,弃沉淀,0.45 μ m 滤器过滤上清液,超速离心,浓缩含病毒的上清液,收集病毒浓缩液,分装适量的病毒液进行感染实验。

1.4 嘌呤霉素(puromycin)筛选阳性克隆

由于构建的 pLVX-OC_{pro}-Luc-Puro 质粒带有嘌呤霉素抗性,因此经慢病毒 pLVX-OC_{pro}-Luc-Puro 感染的 hASCs 细胞能在嘌呤霉素抗性培养基中存活。

在慢病毒感染的 hASCs 培养基中加入 puromycin (1 mg/L) 4 ~ 5 d 后,可筛选出阳性克隆,获得稳定整合 OC_{pro}-Luc-Puro 的 hASCs 细胞株。

1.5 OC_{pro}-Luc-Puro-hASCs 的成骨向分化诱导

OC_{pro}-Luc- hASC 接种于 6 孔板,慢病毒感染细胞使用增殖培养基 [DMEM + 10% (体积分数) FBS + 抗生素]或成骨诱导培养基 [DMEM + 10% (体积分数) FBS + 100 nmol/L 地塞米松 + 0.2 mmol/L 抗坏血酸 + 10 mmol/L β-甘油磷酸 + 抗生素]分别培养 7 ~ 14 d,观察 OC_{pro}-Luc- hASCs 在成骨诱导环境下分化的情况。

1.6 OC_{pro}-Luc-Puro-hASC 成骨向分化的检测

通过检测成骨向分化后荧光素酶的活性,与茜素红染色以及内容源性 OC 基因表达水平变化相比较,验证荧光素酶报告系统用于成骨评价的可行性。

1.6.1 荧光素酶报告基因分析 (luciferase reporter assay) 成骨诱导分化第 7 和 14 天,用冷 PBS 清洗 2 次细胞,将细胞裂解液 (PLB) 100 μL 加入每个细胞培养孔,室温孵育 15 min,使细胞充分裂解,所得到的细胞裂解液可直接用于荧光测量。将荧光素酶底物冷冻干粉溶于 10 mL 荧光素酶分析缓冲液中,所得溶液为 LAR II,分装, -70 °C 保存。测量时将 20 μL 细胞裂解液放入 96 孔荧光测量板,加入 50 μL LAR II,测量荧光素酶,测量条件为延迟 2 s,测量 10 s。

1.6.2 OC、Runx2 及 ALP 基因 mRNA 表达水平的检测 成骨诱导分化第 7 和 14 天,利用 RNA 提取试剂提取细胞总 RNA,反转录合成 cDNA,实时定量 PCR 检测 OC、Runx2、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 基因 mRNA 的表达水平。OC 引物上游为 5'-GTCCAGCGCCTGAATGAATT-3', 下游为 5'-GCAACAATCTTGCTCAAAGCATA-3'; Runx2 引物上游为 5'-CCGCCTCAGTGATTTAGGGC-3', 下游为 5'-GGTCTGTAATCTGACTCTGTCC-3'; ALP 引物上游为 5'-ATGGGATGGGTGTCTCCACA-3', 下游为 5'-CCACGAAGGGGAAGTTGTC-3'。

1.6.3 茜素红矿化结节染色实验 成骨诱导分化第 7 和 14 天, hASCs 茜素红钙化结节染色。70% (体积分数) 乙醇室温下固定 30 min,蒸馏水冲洗 2 次后, 1% (质量分数) 茜素红 [1% (质量分数) KOH 调节 pH 值至 4.2] 500 μL/孔固定,室温孵育 30 min,蒸馏水冲洗 3 次,弃去冲洗蒸馏水,进行大体及镜下观察。加入 100 nmol/L 十六烷基吡啶溶解与钙螯合的茜素红染料,室温放置 1 h,测定 562 nm 的光密度 (D) 值。

2 结果

2.1 pLVX-OC_{pro}-Luc-Puro 质粒的构建

构建 pLVX-OC_{pro}-Luc-Puro 质粒,用 PCR 方法鉴定。OC_{pro}片段大小 1.2 kb,在 1% (质量分数) 琼脂糖凝胶上,通过与阳性对照 (P) 以及阴性对照 (N) 对比,可以准确地判断阳性克隆 (图 1)。经测序,进一步挑选与设计序列相符的重组阳性质粒,最终构建的质粒如图 2。

2.2 OC_{pro}-Luc-Pur-hASCs 成骨向分化的检测结果

2.2.1 茜素红矿化结节染色及定量结果 在 OC_{pro}-Luc-Pur-hASCs 成骨诱导的第 7 和 14 天,茜素红钙化结节染色结果均为阳性,且第 14 天的染色及定量结果明显强于第 7 天 (图 3A, B),第 0、7、14 天的细胞数没有明显差异 (图 3C)。

2.2.2 荧光素酶报告基因分析结果 在 OC_{pro}-Luc-Pur-hASCs 成骨诱导的第 7 和 14 天,荧光素酶被激活,且荧光素酶的活性在第 14 天明显强于第 7 天 (图 4)。荧光素酶表达的趋势与茜素红染色一致,验证了该系统的良好效能,同时发现与 OC 启动子转录活性增强相一致,内源性 OC、Runx2 及 ALP 基因的 mRNA 水平也在成骨分化刺激下逐渐上升 (图 5)。

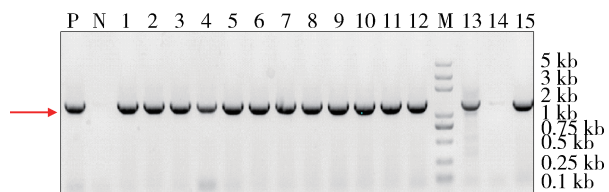


图 1 琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆

Figure 1 Identification of positive clones by agarose gel electrophoresis

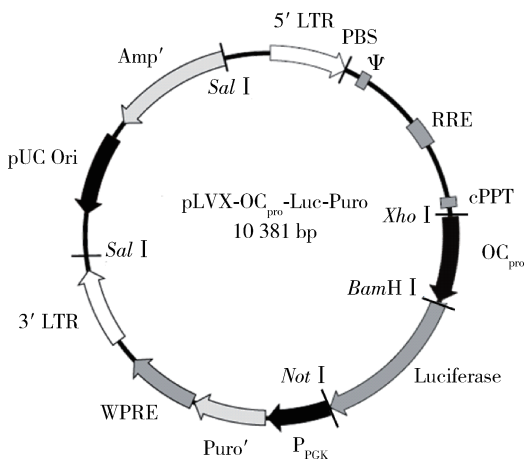
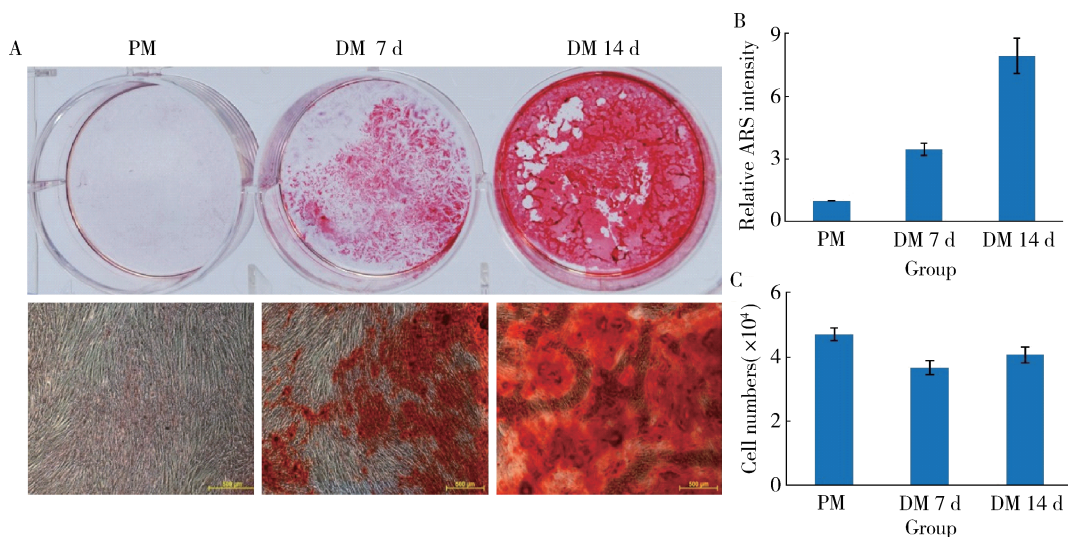


图 2 pLVX- OC_{pro}-Luc-Puro 质粒构建示意图

Figure 2 Schematic diagram of pLVX- OC_{pro}-Luc-Puro construct



A, Alizarin red staining; B, Alizarin red quantification; C, cell number counting of hASCs cultured in respective medium.

图3 hASCs 成骨分化诱导第7,14天的茜素红矿化结节染色及定量结果

Figure 3 Alizarin red staining and quantification of hASCs cultured in differentiation medium for 7 or 14 days

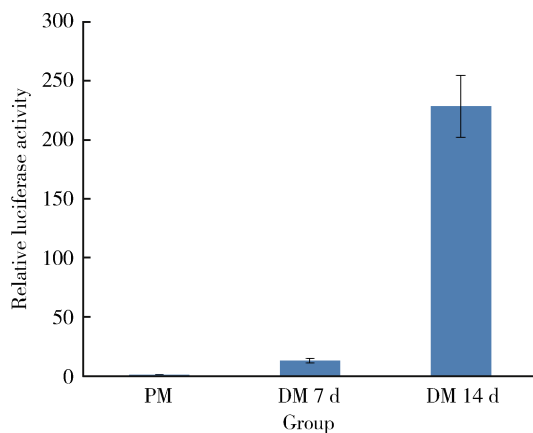


图4 hASCs 成骨分化诱导第7和14天的荧光素酶报告基因分析结果

Figure 4 Luciferase reporter assay with cellular extracts from hASCs cultured in differentiation medium for 7 or 14 days

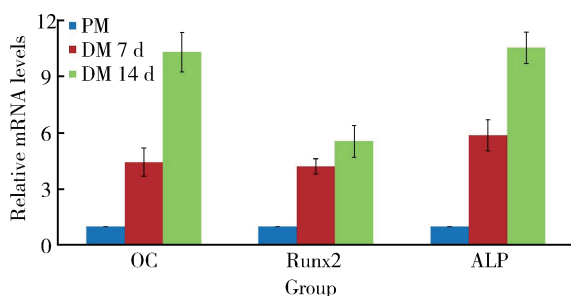


图5 hASCs 成骨分化诱导第7和14天实时荧光定量PCR检测OC, Runx2及ALP基因表达情况

Figure 5 Quantitative reverse-transcription PCR analysis of the expression levels of OC, Runx2 and ALP in hASCs cultured in differentiation medium for 7 or 14 days

3 讨论

自从提出组织工程的概念以来,组织工程尤其是骨组织工程获得了飞速发展,目前被认为是最快能获实际应用的领域。十余年来大量工作均围绕骨组织工程三要素(细胞、支架材料和生长因子)开展,而几乎所有的研究都会用到成骨的检测与评价。

现有比较常用的成骨向分化检测方法包括碱性磷酸酶活性检测、茜素红染色等检测钙的含量以及反转录-实时定量PCR检测骨形成的分化标记物(如I型胶原、骨钙蛋白和骨桥蛋白等)。碱性磷酸酶能通过水解磷脂释放出无机磷,增加局部钙、磷的浓度,并在胶原原纤维中沉积,从而促进基质钙化。碱性磷酸酶检测是骨组织工程使用最多的检测骨形成和骨间质矿化的手段,碱性磷酸酶活性的高低是反映成骨细胞成熟状态的一个重要指标^[5],然而该方法的特异性较低,因此在应用时受到了一定的限制;茜素红能与钙离子以螯合方式形成复合物,用来识别组织细胞的钙盐成分,通过茜素红染色,产生桔红色沉积(即钙结节),但会受到其他金属离子的干扰^[6]。反转录实时定量PCR虽然在检测成骨分化时具备特异性高、敏感性高等特点^[7],但是其操作需经历RNA提取反转录等繁琐步骤,另外由于荧光定量试剂的高成本,不适合处理较大样本。

OC是成骨标志物的一种,本研究将OC启动子克隆到荧光素酶luciferase报告基因的上游,当细胞向成骨细胞分化时,OC的启动子转录活性增强,从而激活荧光素酶表达。为了验证该系统的有效性,

在 hASCs 成骨诱导的第 7 和 14 天,本研究同时进行了荧光素酶报告基因的检测、茜素红染色和定量实验,以及成骨相关基因的检测。结果显示荧光素酶表达的趋势与茜素红染色以及内源性 OC、Runx2、ALP 基因表达激活相一致,验证了该系统的良好效能。

本研究构建的检测成骨向分化的荧光素酶报告系统,可以通过荧光素活性的高低定量、快捷且特异性地评价 hASCs 成骨向分化的能力,并且该系统可以作为高通量筛选影响 hASCs 成骨分化重要因子的平台。高通量筛选技术是近年来应用广泛的一门技术^[8],并随着组合化学、微芯片技术和基因组学的发展而不断发展;在本研究构建系统的基础上,通过 RNAi 筛选或小分子药物的筛选^[9-10],就可以全面、系统、快速地筛选出与成骨向分化相关的重要因子,为研究干细胞成骨向分化打下基础。该系统基于慢病毒载体构建和药物压力筛选稳定克隆,除了用于评价 hASCs 的成骨分化,还可以用于研究骨髓间充质干细胞以及其他多潜能干细胞的成骨分化机制。

在体外实验时碱性磷酸酶和茜素红染色等方法都可以用来检测细胞成骨向的分化,但是当需要观察细胞在体内的成骨向分化情况时以上方法就都不再适用了。目前常用的方法是取材后进行 X 射线照射、CT 扫描、HE 染色和免疫组织化学等,若是需要观察细胞随时间的成骨向分化情况,则需要不同的时间点取材^[11],这样实验的时间和成本都很高。目前尚未见报道可以不用体外取材,在体连续观察细胞的成骨向分化研究。

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^[12],荧光素酶在底物荧光素存在的情况下催化底物产生生物发光,可被成像系统检测到。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^[13]。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,该方法已用于肿瘤生长及治疗效果的研究,但在骨组织工程领域尚未见应用^[14-15]。本研究构建了 pLVX-OC_{pro}-Luc-Puro 载体,并筛选到可以进行正常成骨分化的 OC_{pro}-Luc- hASCs 细胞,在将来的工作中,本课题组将致力于通过该系统将活体动物体内光学成像技术引入骨组织工程学,使在体观察细胞的成骨向分化

成为可能。

本研究成功建立了可评价干细胞成骨向分化的荧光素酶报告基因系统,并通过传统的成骨向分化检测方法对该系统的有效性进行了验证。该系统的建立,为骨组织工程学中成骨检测提供了一种新的方法,对于成骨相关因子的筛选,以及干细胞在体内外成骨向分化的检测都具有非常重要的意义。

参考文献

- [1] Montjovent MO, Burri N, Mark S, et al. Fetal bone cells for tissue engineering [J]. Bone, 2004, 35(6): 1323-1333.
- [2] Moshaverinia A, Ansari S, Chen C, et al. Co-encapsulation of anti-BMP2 monoclonal antibody and mesenchymal stem cells in alginate microspheres for bone tissue engineering [J]. Biomaterials, 2013, 34(28): 6572-6579.
- [3] Yamada Y, Nakamura S, Ito K, et al. Injectable bone tissue engineering using expanded mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2013, 31(3): 572-580.
- [4] Ge W, Shi L, Zhou Y, et al. Inhibition of osteogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells by retinoblastoma binding protein 2 repression of RUNX2-activated transcription [J]. Stem Cells, 2011, 29(7): 1112-1125.
- [5] Kim HK, Cho SG, Kim JH, et al. Mevinolin enhances osteogenic genes (ALP, type I collagen and osteocalcin), CD44, CD47 and CD51 expression during osteogenic differentiation [J]. Life Sci, 2009, 84(9/10): 290-295.
- [6] Wise LD, Winkelmann CT. Evaluation of hydroxyurea-induced fetal skeletal changes in Dutch belted rabbits by micro-computed tomography and alizarin red staining [J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2009, 86(3): 220-226.
- [7] Ronay V, Belibasakis GN, Attin T, et al. Expression of embryonic stem cell markers and osteogenic differentiation potential in cells derived from periodontal granulation tissue [J]. Cell Biol Int, 2014, 38(2): 179-186.
- [8] Grabley S, Thiericke R. Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application [J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 1999, 64: 101-154.
- [9] Varble A, Benitez AA, Schmid S, et al. An *in vivo* RNAi screening approach to identify host determinants of virus replication [J]. Cell Host Microbe, 2013, 14(3): 346-356.
- [10] Wu JH, Zhang SH, Gao FJ, et al. RNAi screening identifies GSK3beta as a regulator of DRP1 and the neuroprotection of lithium chloride against elevated pressure involved in down regulation of DRP1 [J]. Neurosci Lett, 2013, 554: 99-104.
- [11] 刘云松,周永胜,葛雯妹,等. 原代人脂肪基质细胞体内成骨能力的检测 [J]. 北京大学学报:医学版, 2012, 44(1): 55-58.
- [12] 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.
- [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] 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.
- [15] Khalil AA, Jameson MJ, Broadus WC, et al. The influence of hypoxia and pH on bioluminescence imaging of luciferase-transfected tumor cells and xenografts [J]. Int J Mol Imaging, 2013, 2013: 287697.