

[文章编号] 1003—4684(2020)05-0075-03

# 荧光素酶表达的脑胶质瘤小鼠模型的建立

李雨莹, 罗凯伦, 邹宗幸, 刘滨磊, 汪 洋

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068)

[摘 要] 运用 PiggyBac 转座子系统,通过嘌呤霉素筛选构建稳定表达荧光素酶的 U87MG 细胞株(U87MG-FLUC)。通过流式细胞术检测 U87MG-FLUC 细胞株纯度达到 100%。该细胞系传代后能稳定表达荧光素酶,且生物发光的强度与细胞个数成正比。将该稳定表达荧光素酶的细胞接种于免疫缺陷型小鼠的颅内,肿瘤接种后的 7 d,利用活体成像仪对植瘤小鼠进行检测,确定肿瘤的大小以及位置。结果表明:接种了 U87MG-FLUC 细胞的裸鼠,均长出肿瘤;成功构建了表达荧光素酶的 U87MG 细胞株,且人脑胶质瘤细胞系的裸鼠肿瘤模型构建成功。

[关键词] U87MG; 荧光素酶; 生物发光; 细胞株

[中图分类号] R73 [文献标识码] A

脑胶质瘤是对神经功能影响最大、最直接的神 经外科疾病。脑胶质瘤具有较高的侵袭性,即便采 取手术及放化疗等治疗措施,预后依然较差,大部分 脑胶质瘤患者在接受综合治疗后仍容易复发<sup>[1]</sup>。建 立一个稳定的胶质瘤动物模型可以更好地帮助研究 针对脑胶质瘤的治疗方法。常见的脑胶质瘤模型通 常需要处死荷瘤小鼠,这样一来就不能实时且准确 地反映肿瘤在裸鼠体内的生长状况<sup>[2-3]</sup>。活体动物 体内光学成像技术主要包含生物发光或激发荧光两 种技术,前者如荧光素酶,后者如绿色荧光蛋白 等<sup>[4]</sup>。荧光成像既可以标记动物、细胞和微生物,也 可以是抗体或纳米材料等较广泛的对象。生物发光 不需要激发光源背景,且具有较高的特异性和灵敏 性,是研究肿瘤生长及发展稳定且有效的技术手段<sup>[5-7]</sup>。人脑胶质瘤的研究中,U87MG 是最常用的 细胞系之一<sup>[8]</sup>,将带有荧光素酶(luciferase)的质粒 PBDP-Firely Luciferase 利用 Lipofactamine 3000 转染进入 U87MG 细胞,得到稳定表达荧光素酶的 细胞系。将表达荧光素酶的 U87MG 细胞原位注射 进入裸鼠的颅内,建立表达荧光素酶的裸鼠模型,并 通过动物活体成像技术观察脑胶质瘤在裸鼠体内的 生长和发展<sup>[9]</sup>,并对该细胞株的成瘤性进行评估。

## 1 实验材料

PBDP-Firely Luciferase 质粒由本实验室前期 的实验研究中构建完成;pSPBT 辅助质粒由 Sys- tem Biosciences 公司获得;U87MG 细胞从中国科

学院细胞库购得;U87MG 及改造后的细胞株 U87MG-FLUC 均用 DME/F-12 (HyClone, USA) 培养;胎牛血清购自四季青品牌(浙江天杭生物科技 股份有限公司);转染试剂盒 Lipofactamine 3000 购 自 ThermoFisher Scientific 公司;转染介质培养基 用 MEM(HyClone, USA),荧光素酶底物购自碧云 天生物技术公司;无内毒素大提试剂盒购自天根生 物科技有限公司;嘌呤霉素购自 Promega。

## 2 实验方法

### 2.1 筛选 U87MG 的最佳嘌呤霉素浓度

将培养于 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中的 U87MG 细胞消化得细胞悬液,按照  $5\times 10^4$  个/孔的 细胞量接种于 24 孔板中,放置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 培 养箱中培养 24 h。嘌呤霉素按照 0、5、10、15、20、 25、30 μg/mL 设置浓度梯度,连续观察 U87MG 细 胞的生长及存活状态。细胞在 5~7 d 内全部死亡 的孔所对应的嘌呤霉素浓度,将最低致死浓度选为 筛选单克隆 U87MG 细胞的最佳浓度。

### 2.2 转染 U87MG 细胞

将处于对数生长期的 U87MG 细胞,以  $5\times 10^4$  个/孔的细胞量接种于 24 孔板中培养 24 h,当细胞 汇合度达到 90%左右时转染质粒。按照 Lipofac- tamine 3000 说明书进行转染实验,将 PBDP-Firely Luciferase 质粒和 pSPBT 质粒按照 5:1 的质量比 加入到无血清的 MEM 培养基中记为 A 管,向 A 管 中加入 P3000 试剂。将 Lipofactamine 3000 与 MEM 混合记为 B 管,A 管与 B 管轻微混匀室温静

置 10 min 后,加入到培养的 U87MG 细胞中,并继续培养 48~72 h,观察 GFP 荧光蛋白表达的情况,并用嘌呤霉素进行筛选。

2.3 筛选单克隆细胞

用嘌呤霉素筛选后的细胞,GFP 表达达到 70% 以上时消化细胞获得细胞悬液,再将细胞悬液梯度稀释至 500 个/mL 接种于 96 孔板中,使每孔 1~2 个细胞。培养 24 h 以上观察细胞,记录仅有单个细胞的孔。

2.4 流式细胞术检测单克隆细胞株的纯度

荧光显微镜下选取表达 GFP 荧光蛋白的单克隆细胞,扩培至 6 孔板中,待细胞汇合度达到 90% 时,消化细胞并用 PBS 清洗重悬细胞,用 BD C6 流式细胞仪检测 U87MG-FLUC 中 GFP 的表达率,并用 FlowJo VX 分析流式结果。

2.5 各单克隆细胞株荧光值检测

消化筛选出来的单克隆阳性细胞株,用 PBS 重悬细胞并按照梯度稀释为  $4\times10^5$ 、 $2\times10^5$ 、 $1\times10^5$ 、 $5\times10^4$ 、 $2.5\times10^4$ 、 $1.25\times10^4$ 、6250、3125 个细胞接种到 96 孔板中,设置仅有 PBS 的孔作为空白对照,加入等体积工作浓度的 D-Luciferin,使用多功能酶标仪分析生物发光强度。

2.6 细胞生长曲线绘制

取筛选的 U87MG-FLUC 细胞和为改造的 U87MG 细胞,按照  $1\times10^4$ /孔接种至 96 孔板中,接种后的 24, 48, 72 及 96 h 消化细胞并计数。

2.7 BALB/c 裸鼠颅内植瘤模型的建立

BALB/c 裸鼠,6 周龄雌性 2 只。收集 U87MG-FLUC 单克隆细胞,用 PBS 清洗重悬为  $2\times10^7$ /mL。2 只裸鼠颅内接种 50  $\mu$ L 的 U87MG-FLUC 细胞悬液。注射细胞悬液后的 7 d,用动物活体成像系统(PerkinElmer, MA, USA)拍摄生物发光。

3 实验结果

3.1 质粒转染 U87MG 细胞并用嘌呤霉素筛选

选用 PB 转座子载体质粒 PBDP-Firely Luciferase 和辅助质粒 pSPBT。其中 PBDP-Firely Luciferase 质粒上带有绿色荧光蛋白 GFP 标签,作为质粒转染细胞的检测标记物。

经过嘌呤霉素筛选之后,确定了添加嘌呤霉素的最佳添加浓度为 15  $\mu$ g/mL。将 PiggyBac(PB)转座子载体质粒系统 PBDP-Firely Luciferase 质粒和辅助质粒 pSPBT 转染进入 U87MG 细胞中,24 h 后可见明显的绿色荧光,表明转染成功。向转染后的细胞中加入 15  $\mu$ g/mL 的嘌呤霉素,每 24 h 观察

U87MG 细胞,5 d 后质粒未转染成功的细胞死亡,存活的均为 U87MG-FLUC 细胞。

3.2 挑取 U87MG-FLUC 单克隆细胞株

将转染成功的 U87MG-FLUC 细胞,稀释加入 96 孔板中培养。24 h 后挑出仅有单个细胞的孔继续培养扩增,当细胞汇合度达到 80% 以上后选取细胞形态未发生变化的 U87MG-FLUC 单克隆细胞株两株,观察其表达绿色荧光蛋白的情况(图 1)。

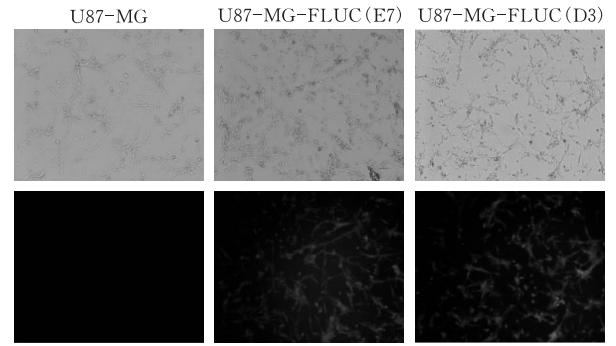


图 1 U87MG-FLUC 单克隆细胞

3.3 流式细胞仪检测 U87MG-FLUC 单克隆细胞

通过流式细胞仪检测 U87MG-FLUC 细胞株的绿色荧光蛋白 GFP 的表达,对照组为未转染质粒的 U87MG 培养细胞(图 2),E7 细胞株的 GFP 表达率达到 98.7%,D3 细胞株的 GFP 表达率达到 100%,选取 D3 株做进一步的研究。

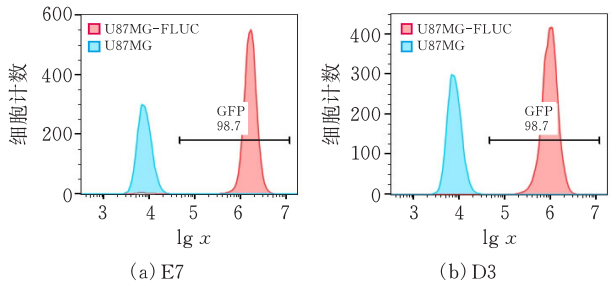


图 2 流式细胞仪检测单克隆细胞

3.4 U87MG-FLUC 细胞系的生长特性及荧光素酶的表达

对不同培养时间的 U87MG-FLUC 单克隆细胞进行细胞计数。观察到 U87MG-FLUC 单克隆细胞与未改造的 U87MG 细胞有相似生长曲线(图 3)。选取第 6,9,12 代次的 U87MG-FLUC 细胞加入荧光素酶底物检测,随着细胞培养代次的增加,荧光素酶活性保持稳定(图 4)。进一步,取第 12 代进行梯度稀释,荧光素酶活性与细胞个数成线性相关( $R^2=0.9706$ )(图 5)。

3.5 裸鼠颅内植瘤模型的建立

收集 U87MG-FLUC 细胞,对裸鼠颅内接种。7 d 后使用小鼠活体成像系统检测到裸鼠颅内有明显的荧光信号。

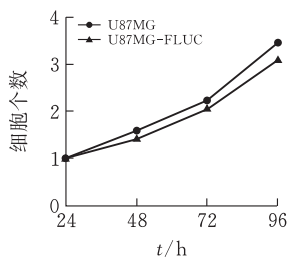


图 3  U87MG 和 U87MG-FLUC 生长曲线

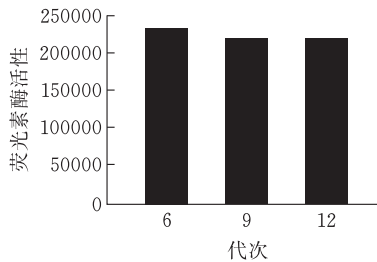


图 4  不同代次细胞的荧光强度

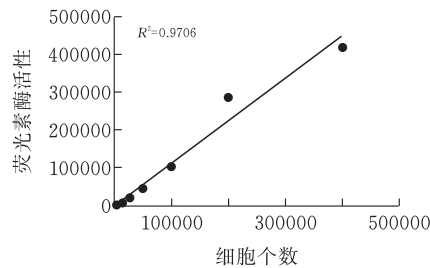


图 5  细胞个数与荧光强度相关

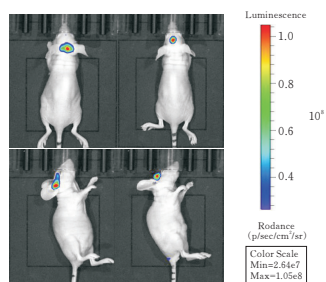


图 6  动物活体成像拍摄

4  结束语

通过转染质粒,构建了稳定表达荧光素酶的人脑胶质瘤细胞系。细胞内表达荧光素酶可以催化体外导入的荧光素酶底物 D-荧光素,所产生的 550~580 nm 的荧光,具有较强的组织穿透能力,可有效穿透深层组织<sup>[5]</sup>。对于无法使用游标卡尺直接对病灶进行测量的脑胶质瘤的模型而言,产生荧光素酶的肿瘤细胞系更能清晰反映肿瘤的发生和发展过程,为观察肿瘤病灶的形成提供直观且可以量化的数据<sup>[7,10]</sup>。

本实验将 PBDP-Firely Luciferase 和 pSPBT 转入到 U87MG 中,通过嘌呤霉素筛选出稳定表达荧光素酶的细胞株,并通过流式细胞仪选取高纯度的 U87MG-FLUC 细胞。得到的细胞株能稳定表达荧

光素酶,且其表达量及强度不会随着细胞传代而衰减。进一步建立的裸鼠颅内植瘤模型,则通过对实验裸鼠正位和侧位的拍摄确定了瘤体在颅内目标位置形成,有较强的生物荧光信号。本实验可以延长裸鼠颅内成瘤的观察时间及裸鼠荷瘤的生存期。

目前研究中活体动物体内光学成像技术多应用近红外 iRFP 和 GFP 蛋白来成像,但是对于脑胶质瘤这种成瘤位置较深、能植入细胞悬液体积较少的瘤体模型来说,荧光素酶成像更加灵敏,是更为合适的选择。

[ 参 考 文 献 ]

[1]  刘伟国. 脑胶质瘤综合治疗进展[J]. 实用肿瘤杂志 (6):462-464.

[2]  Antunes L, Angioi-Duprez K S, Bracard S R, et al. Analysis of tissue chimerism in nude mouse brain and abdominal xenograft models of human glioblastoma multiforme; what does it tell us about the models and about glioblastoma biology and therapy[J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2000, 48 (6): 847-858.

[3]  闫明霞, 刘蕾, 莫德水, 等. 人脑星型胶质母细胞瘤裸小鼠术后转移模型的建立[J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(4):204-208.

[4]  邵合队, 谭国伟, 蓝佛琳, 等. 荧光裸小鼠源的人脑胶质母细胞瘤原位移植模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(6):1196-1197.

[5]  Caceres G, Zhu X Y, Jiao J A, et al. Imaging of luciferase and GFP-transfected human tumours in nude mice[J]. Luminescence, 2003, 18(4):218-223.

[6]  Gisela, Caceres, Ralitz, et al. Determination of chemotherapeutic activity in vivo by luminescent imaging of luciferase-transfected human tumors. [J]. Anti Cancer Drugs, 2003,14(7):569-574.

[7]  Yang M, Li L, Jiang P, et al. Dual-color fluorescence imaging distinguishes tumor cells from induced host angiogenic vessels and stromal cells[J]. Proceedings of the National Academy of sciences, 2003, 100 (24): 14259-14262.

[8]  王艳华, 楚建杰, 杨志福, 等. 人 U87-MG 脑胶质瘤细胞裸鼠原位移植模型的建立[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016(10):1065-1065.

[9]  张绘宇, 郑国兵, 张金栋, 等. 利用荧光素酶标记的肿瘤细胞建立活体成像动物模型[J]. 中国体视学与图像分析, 2013(1):67-72.

[10]  Notting I C, Buijs J T, Que I, et al. Whole-body bioluminescent imaging of human uveal melanoma in a new mouse model of local tumor growth and metastasis[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2005, 46(5):1581-1587.