

[文章编号] 1003—4684(2021)02-0046-04

萤火虫荧光素酶标记结直肠癌模型的建立

杨俊寒, 段海潇, 张紫怡, 王润杨, 刘滨磊, 胡 翰, 汪 洋

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068)

[摘 要] 针对小鼠结直肠癌细胞(CT26)构建能够稳定表达萤火虫荧光素酶 Firefly luciferase(Fluc)以及具有嘌呤霉素抗性的 CT26-Fluc 细胞株,并建立其荷瘤鼠模型。采用同源重组技术将 Firefly luciferase 基因片段整合至转座子系统中得到质粒,将所得质粒转染进入 CT26 原始细胞株,使其在该细胞内表达。后通过细胞敏感性实验获得 CT26 最低致死浓度,筛选获得稳定表达荧光素酶的 CT26-Fluc 单克隆细胞系。流式细胞仪检测 CT26-Fluc 单克隆的纯度。同时利用显微观察等方法证实细胞增殖和细胞形态与 CT26 原始细胞系不存在显著差异。将构建成功的 CT26-Fluc 植入 BALB/c 小鼠右侧背部皮下,通过小动物活体成像仪验证该细胞系能稳定表达荧光素酶,且能够用于小鼠结直肠癌成瘤模型。本实验成功构建了稳定表达 Firefly luciferase 的 CT26-Fluc 细胞系,为小鼠结直肠癌模型及其病灶转移机制的研究建立了技术基础。

[关键词] 小鼠结直肠癌细胞; 萤火虫荧光素酶; 荧光成像

[中图分类号] R153 [文献标识码] A

结直肠癌作为消化道的恶性肿瘤之一,死亡率位居所有癌症第 4 位^[1],在中老年人群中发病率极高,且每年发病率都有增加。遗憾的是,有 1/5 的结直肠癌患者在病情确诊时都伴随远处转移,而该类患者 5 年生存率仅为 12%。结直肠癌的治疗方法主要分为三大类:首先是外科手术治疗,即通过手术切除肿瘤,但是通过该方法进行治疗方法通常不够彻底,无法根除肿瘤;其次是放疗和化疗,这种疗法虽然可以有效针对肿瘤细胞,但是它们对机体正常细胞也会产生较大伤害;最后就是近年来受到研究者青睐的肿瘤免疫治疗,其能重新启动并维持患者自身免疫系统对肿瘤细胞的识别和杀伤,诱导机体慢慢恢复其抗肿瘤免疫反应。肿瘤免疫治疗不仅效果好,而且避免了治疗过程中对机体的二次损伤。但由于 CT26 细胞不带任何标记,在研究肿瘤细胞成瘤和病灶转移的过程中无法对其进行有效观察及检测。因此需要通过某些手段对其进行标记,且能通过仪器对标记进行捕捉和记录。肿瘤免疫治疗中常用的一项技术——生物发光分析法标记生物,正好解决这一问题。

萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase, Fluc)是生物发光中研究最为深入、透彻的发光系统。其发光机制是荧光素酶与底物在 Mg^{2+} 的作用下反应形成的腺苷酸荧光素酰化复合物,能够与酶结合且经过氧化脱羧作用即转化至激活状态的氧化荧光素,

最后发射光子^[2]。将表达 Fluc 的基因转入到真核细胞中使其能稳定表达,且不影响细胞正常生长^[3]。由于其发射的光子可以被仪器捕捉记录,因此可将它作为一种标记方法来检测特定细胞所在位置及大体数量。作为建立动物肿瘤模型是癌症研究中一个最为重要的环节, BALB/c 小鼠是常见的荷瘤鼠模型,在小鼠结直肠癌肿瘤模型建立方面是比较适合的。本研究通过在 BALB/c 小鼠右侧背部皮下植入构建成功的 CT26-Fluc,观察记录所植入肿瘤细胞的繁殖变化情况,并在小动物活体成像设备中对荷瘤鼠的成瘤效果及相对荧光强度进行测量评估^[4]。

1 实验材料

实验材料及来源见表 1。

2 实验方法

2.1 CT26 细胞敏感性试验

按照标准方案对需实验的细胞进行培养。培养基为含 10% 胎牛血清的 DME/F-12。收集细胞, 500 g 离心 5 min,用 DME/F-12(无血清培养基)重悬并进行细胞计数。用完全培养基(10% 胎牛血清 + DME/F-12)将细胞密度稀释至 2×10^5 个/mL,然后接种于 24 孔板,置入 CO_2 培养箱中进行培养,培养箱温度 $37^\circ C$, CO_2 浓度 5%。翌日观察 24 孔板

[收稿日期] 2020—08—04

[第一作者] 杨俊寒(1997—),男,湖北随州人,湖北工业大学硕士研究生,研究方向为生物工程

中细胞汇合度,待其汇合度达到 90%左右,将不同浓度梯度的嘌呤霉素加入到 24 孔板中,此时记为第 0 天,此后每天同一时间在显微镜下对细胞生存情况进行观察记录,以第四天观察时细胞全部死亡所对应的嘌呤霉素浓度为最低致死浓度^[5]。

表 1 实验材料及来源

材料	来源
Firefly Luciferase 基因	金斯瑞生物合成
引物合成和测序	擎科生物
辅助质粒 pSPBT	System Biosciences 公司
CT26 细胞	北京协和医院细胞资源中心惠赠
细胞培养基	
DME/F-12	HyClone, USA
转染用培养基 MEM	HyClone, USA
胎牛血清	四季青
Lipofactamine 3000	ThermoFisher Scientific 公司
转染试剂盒	
oHSV2-GFP	
载体质粒 PBDB	滨会生物惠赠

2.2 PBDB-Fluc 质粒构建

Firefly luciferase cDNA 的序列长 1653 bp,通过 CMV 启动子转录,用 T2A 连接 PuroR 和 GFP 基因,连接后的序列共用 EF1α 启动子来启动,最终得到 PBDB-Flu 质粒。

2.3 细胞转染试验

按照标准方案对细胞进行培养。完全培养基为含 10%胎牛血清的 DME/F-12。收集细胞,500 g 离心 5 min,用 DME/F-12 重悬并进行细胞计数,用完全培养基(10%胎牛血清+ DME/F-12)将细胞密度稀释至 2×10⁵个/mL,然后接种于 24 孔板,置入 CO₂培养箱中培养,培养箱温度 37℃,CO₂浓度 5%。翌日观察 24 孔板中细胞汇合度,待其汇合度达到 70% ~ 90%时,将质粒 pSPBT 和 pPBDB-Fluc 以质量比 1 : 5 混合加入至含 MEM 的管 A 中,随后用 MEM 稀释 Lipofactamine 3000 加至 B 管。A,B 两管溶液 1 : 1 混合孵育且于室温静置 10 min。将混合溶液均匀滴加至到铺有细胞的 24 孔板中并置于在 CO₂培养箱,37℃培养 2~4 d^[6]。在倒置荧光显微镜下观察细胞是否存在 GFP。

2.4 CT26-Fluc 细胞的单克隆获取

收集经嘌呤霉素筛选过后的 CT26-Fluc 细胞并进行计数,再以 10 倍浓度梯度对细胞悬液进行稀释,以 500 个/mL 的细胞浓度接种于 96 孔板,每孔 100 μL 细胞悬液,置入 CO₂培养箱培养,待细胞完全贴壁后,用荧光显微镜观察细胞,当整个孔中仅有一个细胞分裂而成的细胞团,且转染成功(发绿色荧光)时,对该孔进行标记,并将其消化扩大培养^[7]。

2.5 流式细胞术检测 CT26-Fluc 细胞纯度

将 CT26 原始细胞作为对照组细胞,收集扩增后的 CT26-Fluc 单克隆细胞^[8],用 BD C6 流式细胞仪(BD Biosciences)检测 CT26-Fluc 中 GFP 的表达率并分析结果。

2.6 oHSV2-GFP^[9]体外杀伤 CT26-Fluc

按照标准方案对需实验的细胞进行培养。培养基为含 10%胎牛血清的 DME/F-12。收集细胞,500 g 离心 5 min,重悬至 DME/F-12 并铺板,待细胞汇合度达到 80% ~ 90%时,按照病毒浓度 1×10⁵、0.5×10⁵、0.25×10⁵、0.125×10⁵/孔接种毒株,于 CO₂培养箱培养 30 h 后,加入荧光素酶底物 10 μL(15 mg/mL),孵育 5 min 后放入多功能酶标仪中检测荧光素表达量。

2.7 CT26-Fluc 细胞成瘤性评估

于 BALB/c 小鼠右侧肋腹皮下注射 100 μL 含有 1×10⁶个 CT26-Fluc 的细胞悬液^[10],待肿瘤体积至 100 mm³,记录观察肿瘤大小,用动物活体成像系统对其进行麻醉拍摄。

3 实验结果

3.1 PBDB-Fluc 质粒构建

PBDB-Fluc 质粒构建见图 1。

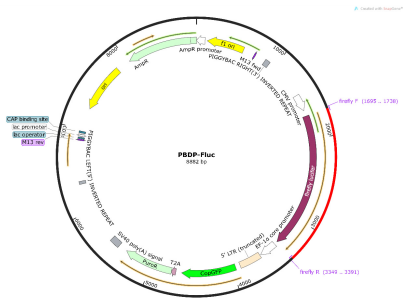
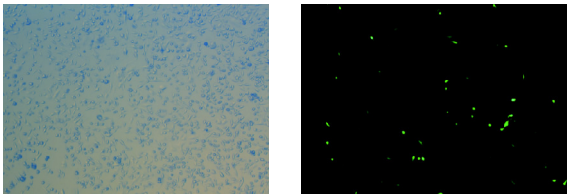


图 1 PBDB-Flu 质粒

3.2 CT26 细胞质粒转染及 CT26-Fluc 单克隆细胞的挑取、扩培

PBDB-Fluc 和辅助质粒转染 CT26 细胞,转染成功即可见发绿色荧光的 CT26-Fluc。图 2 放大倍数为 40,图 3 放大倍数为 100。



(a) 白光 (b) 绿光

图 2 PBDB-Fluc-GFP 转染 CT26

3.3 流式细胞仪检测 CT26-Fluc 单克隆细胞

流式细胞仪检测对照组(CT26)和实验组

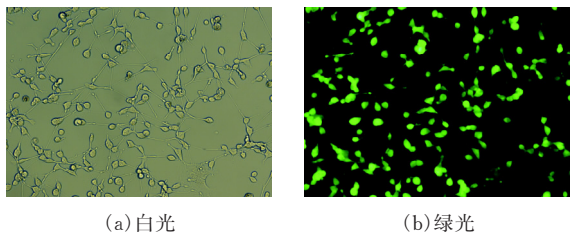


图 3 CT26-Fluc 单克隆细胞扩增

(CT26-Fluc)GFP 的表达(图 4),结果显示实验组 GFP(GFP 所在通道即为 FL1-H)表达率达到 99.8%,表明 CT26-Fluc 细胞系是单克隆细胞系。

3.4 多功能酶标仪检测 oHSV2-GFP 体外杀伤 CT26-Fluc

接种毒株后 30 h,用多功能酶标仪检测 CT26-Fluc 的荧光素表达(图 5)。结果显示,病毒感染复数(MOI)越高,亦即病毒滴度越高时,检测到的荧光素酶荧光强度表达量越低,说明活细胞数越少。而未加病毒的 mock 组荧光素酶荧光强度表达量最高,Negative 组(阴性对照,仅为 CT26 原始细胞系)检测不到荧光素信号。

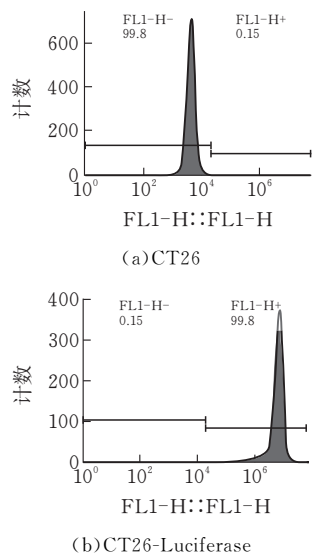


图 4 流式细胞仪检测 CT26-Fluc 单克隆细胞 GFP 表达

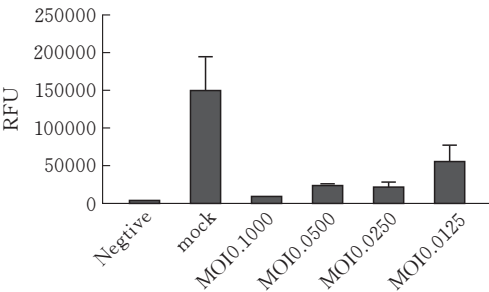


图 5 酶标仪检测病毒杀伤 CT26-Fluc 细胞荧光素荧光强度表达

3.5 CT26-Fluc BALB/c 模型建立

为了证明 CT26-Fluc 细胞系能够在 BALB/c

小鼠体内表达 Firefly luciferase,在小鼠右侧背部植入 CT26-Fluc(图 6)。第 5 天时,用小动物活体成像系统观察到植瘤部位有明显的 CT26-Fluc 肿瘤生长。

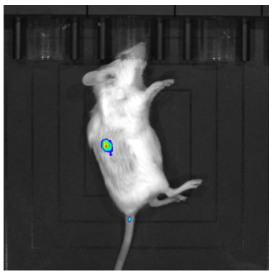


图 6 动物活体成像拍摄 CT26-Fluc

4 结论

研究发现,Firefly luciferase 的表达不影响 CT26-Fluc 细胞系的细胞形态、细胞增殖等细胞学特征,因此可以以此为基础建立新的体外杀伤肿瘤细胞检测方法,即通过向孔板内加入荧光素酶底物,检测板孔内的荧光素信号并与空白对照进行对比,从而反映所研究物质对肿瘤细胞的杀伤作用。与传统方法相比,该方法更便捷也更准确客观。同时,为了验证 CT26-Fluc 细胞是否可用于建立小鼠结直肠癌成瘤模型,以及 Fluc 基因是否可在荷瘤鼠模型中稳定表达,又将 CT26-Fluc 细胞对 BALB/c 小鼠进行右侧背部皮下植瘤,饲养期间注射部位出现结节,随后对其成瘤情况进行了活体成像拍摄。结果表明,在结节形成部位有明确的荧光显示,说明 CT26-Fluc 细胞不仅可以用于建立小鼠结直肠癌成瘤模型,而且 Firefly luciferase 基因能够在成瘤部位表达。以该方法标记替代传统的游标卡尺测量肿瘤大小,减少了各种误差,具有更明显的客观性。同时也降低了传统测量方法给实验人员带来的安全隐患,在肿瘤细胞在活体动物体内的生长和转移方面,也提供了更为直观、快捷的方法。

[参 考 文 献]

[1] 喻琴,张赞,毕杨,等. 构建稳定表达 RFP 及嘌呤霉素抗性的 K562 细胞株[J]. 医学分子生物学杂志, 2011,8(4):304-308.

[2] 石海鹏. shRNA 抑制 maspin 表达对胃癌细胞 SGC-7901 侵袭能力的影响[D]. 重庆:重庆医科大学, 2009.

[3] 毛成毅,杜娟,马瑜,等. 人 PD-L1 真核表达载体的构建及结肠癌细胞稳定表达单克隆株的筛选和鉴定[J]. 现代肿瘤医学, 2018,26(6):843-847.

[4] 刘锡娟,丁慧荣,田志华,等. FACSria 流式细胞仪无菌操作分选高纯度细胞亚群[J]. 安徽医科大学学

报, 2014, 49(12):1811-1815.

[5] 尹磊, 孙燕来, 赵春红, 等. 重组溶瘤单纯疱疹病毒 oHSV2 治疗结直肠癌的实验研究[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(3):101-106.

[6] 胡敬志. 萤火虫荧光素酶的性质和应用的研究[D]. 上海:华东师范大学, 2007.

[7] 周鑫. 稳定表达荧光素酶的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系的构建及其活性表征[D]. 哈尔滨:东北师范大学, 2015.

[8] Honigman A, Zeira E, Ohana P, et al. Imaging trans-gene expression in live animals[J]. Mol Ther, 2001, 4(3):239-249.

[9] Cai L K, Hu H, Duan H X, et al. The construction of a new oncolytic herpes simplex virus expressing murine interleukin-15 with gene-editing technology[J]. Journal of Medical Virology, 2020, 92(12):3617-3627

[10] 陆洋. MiR-200a 对人胰腺癌干细胞上皮-间质转化 (EMT) 及体外生物学行为影响的实验研究[D]. 苏州:苏州大学, 2014.

Construction of Colorectal Cancer Model with the Stable Expression of Firefly Luciferase

YANG Junhan, DUAN Haixiao, ZHANG Ziyi, WANG Runyang, LIU Binlei, HU Han, WANG Yang
(School of Biological Engineering and Food Science, Hubei Univ., of Tech. Wuhan 430068, China)

Abstract: The tumor bearing mouse model was established for mouse colon cancer cells (CT26), which could stably express Firefly luciferase (Fluc) and CT26 Fluc cell lines with puromycin resistance. The Firefly luciferase gene fragments were integrated into the transposon subsystem by homologous recombination technique to obtain the plasmid, and the resulting plasmid was transfected into the CT26 cell line to make it express in the cell. CT26 Fluc monoclonal cell lines with stable luciferase expression were obtained by purinomycin screening. The purity of CT26-Fluc clones was detected by flow cytometry, and the cell proliferation and morphology were not different from the CT26 cell lines. The constructed CT26 Fluc cell line was implanted BALB/c mouse subcutaneous, and it was determined by in vivo fluorescence of animals that the cell line could stably express luciferase and be used in mouse colorectal cancer tumor model. This experiment successfully constructed CT26 Fluc cell lines with stable expression of Firefly luciferase. It contributes to the study of tumorigenesis and metastasis mechanism of mouse colorectal cancer.

Keywords: firefly luciferase; ct26; fluorescence imaging

[责任编辑: 张 众]