

[文章编号] 1003—4684(2021)04-0042-04

稳定表达荧光素酶 BGC823 细胞系的构建

王 琳, 张紫怡, 金 静, 段海潇, 王润杨, 胡 翰, 汪 洋, 刘滨磊

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068)

[摘 要] 目的:建立稳定表达荧光素酶的人胃癌细胞系(BGC823),为建立活体成像的人胃癌裸鼠移植瘤模型及治疗研究奠定基础。方法:含绿色荧光蛋白(GFP)及荧光素酶的质粒用脂质体转染法稳转到胃癌细胞 BGC823 中。不同浓度的嘌呤霉素用于筛选细胞,单克隆细胞用有限稀释法挑选,用流式细胞仪检验构建的 BGC823-FLuc 细胞的纯度。细胞的荧光素酶表达量用荧光素酶底物试剂检测。MTS 比较改造前后 BGC823 细胞的增殖。结果:流式检测显示单克隆细胞系阳性率达到 99.9 %,且多功能酶标仪检测到荧光信号值。MTS 法检测发现改造前后细胞增殖基本一致,说明加入荧光素酶基因未对细胞增殖产生明显影响。结论:表达荧光素酶及绿色荧光蛋白的单克隆胃癌细胞系构建成功。此细胞系具有可用于体外及体内实验以研究肿瘤模型的优势的。

[关键词] 绿色荧光蛋白; 荧光素酶; 胃癌细胞

[中图分类号] R153 [文献标识码] A

胃癌的形态学、分子特征复杂,具有高度异质性,为了鉴定病理和分子生化机制,已经在大鼠和小鼠中建立了各种实验动物模型^[1]。生物发光是存在于生物体内的一种特殊类型的发光现象,主要指在酶的催化作用下将生物能转化成光能的过程,而不依赖于有机体对光的吸收^[2]。生物发光成像技术具有非侵袭性、可定量、高灵敏度、操作简单,以及能够实时及连续动态监测等优点,被广泛应用于生物医学研究等领域^[3]。

荧光素酶(luciferase)报告系统是生物发光最常见的系统之一,是 luciferase 以荧光素(luciferin)、三磷酸腺苷(ATP)和 O₂ 为底物,在 Mg²⁺ 存在时发生酶促反应产生光子的过程^[4]。荧光素酶报告基因被广泛应用于构建特殊的单克隆细胞系,用于抗肿瘤药物的筛选。被荧光素酶标记的肿瘤细胞可通过腹腔植瘤到动物体内,可用生物发光成像仪进行检测。柯宗煌等人构建了稳定表达荧光素酶的 B16R 细胞系,并构建适用于小动物活体成像观察的 C57 小鼠皮下移植瘤模型^[5]。

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是重要的探针分子,广泛应用于标记特定分子或细胞^[6],其缺陷是不能像酶一样有信号放大作用^[7],表达量低时不易检测。荧光素酶标记的细胞检测时需添加荧光素酶底物,可快速、无创地进行活体检测,具有较高的灵敏性、特异性和组织穿透能

力,适用于体内成像^[8]。荧光蛋白作为一种自发荧光,受到激发光源后可在倒置显微镜下观察到,因为自发荧光的体内成像可能被生物体内部一些组织干扰,比较适用体外的相关研究。本研究构建含单色荧光素酶以及 GFP 绿色荧光蛋白的 BGC823 细胞系,形成双荧光标记,生物发光和荧光成像的优点被应用在一起,在实际应用中有更多兼容性。

1 材料与方法

1.1 细胞试剂和仪器

实验使用的细胞株(BGC823)购于北京协和医院细胞资源中心;细胞所用的培养基是 DME/F-12 (HyClone, USA);lipofectamine 3000 转染试剂盒购于 Thermo Fisher Scientific 公司;PiggyBac-Dual-Promoter-Firefly Luciferase (PBDF-FLUC) 重组质粒和 PBDF 转座酶,本实验室提供。大肠杆菌菌株 DH5 α ,本团队制备;质粒 DNA 小量抽提试剂盒(天根生物公司)。嘌呤霉素和 MTS 购自碧云天生物;BD 流式细胞检测仪,倒置荧光显微镜,Nikon 公司)。多功能酶标仪 Thermo Fisher Scientific;荧光素酶底物(翊圣);北京东联生物安全柜。

1.2 质粒的提取

从-80℃超低温冰箱中取出用甘油保存的 PBDF-FLuc 质粒大肠杆菌。该质粒由实验室前期构建并保存,在室温快速解冻后以 1 : 1000 的比例与

LB 液体培养基混匀,放 37℃ 摇床 1600 r/min 进行摇菌 15 h。质粒提取按照天根小提质粒试剂盒说明书操作。

1.3 细胞培养和转染

BGC823 细胞复苏后培养在含 10% 胎牛血清的 DME/F12 培养基。转染前一天,胰酶消化并将 BGC823 细胞并传代至 24 孔板 10^5 个细胞每孔,细胞存活率 97%。当细胞密度达到 80% 左右时,质粒 PBDP-FLuc 和 PBDP-transposase 以 5 : 1 比例根据 Lip3000 说明书进行转染操作。BGC823 细胞转染 24 h 后在倒置显微镜的蓝光和白光下可观察到 GFP 阳性率。

1.4 细胞敏感性实验及单克隆筛选

将细胞扩培到 T 25 瓶后,铺 24 孔板。当 24 孔板中细胞覆盖率达到 80% 时,弃去原细胞培养液。分别配置含嘌呤霉素浓度为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 $\mu\text{g/mL}$ 的 DME/F12 完全培养基,各 3 mL;给 24 孔板做好嘌呤霉素浓度标记,分别将含嘌呤霉素的 DME/F12 培养基加入对应孔,每种嘌呤霉素浓度设置 3 个孔平行对照。将 24 孔板转移至 CO_2 细胞培养箱中,温度设置为 37℃, CO_2 浓度设置为 5% 进行细胞培养,连续观察细胞状态,2 d 更换一次培养基,最终以第 4 天杀死 24 孔板中所有细胞的最低嘌呤霉素浓度为最佳嘌呤霉素筛选浓度。

有限稀释法获得 BGC823 单克隆,用 DME/F12 完全培养基(含 10% FBS)将细胞稀释至 1000 个/mL。取干净无菌 96 孔板,每孔中加入 100 μL DME/F12 完全培养基(含 10% FBS),再加入稀释后的细胞悬液 1 μL ,于 CO_2 细胞培养箱中,37℃ 恒温,5% CO_2 浓度进行细胞培养。待细胞贴壁后(7 d 左右),在倒置显微镜下观察,记录只有单个细胞增殖成团的孔。继续在 CO_2 细胞培养箱中,37℃ 恒温,5% CO_2 浓度进行细胞培养。待细胞长至 80%,在倒置荧光显微镜下检测细胞发光情况,观察到一个孔全部细胞均发光后,进行扩大培养,依次扩大到 24 孔板、6 孔板,再到 T-25 cm^2 细胞培养瓶中进行培养,细胞长满 T-25 cm^2 细胞培养瓶。每个细胞样品取 10^6 个用于后续流式检测。

1.5 流式细胞仪检测 BGC823-FLuc 细胞纯度

用流式细胞仪对 BGC823-FLuc 单克隆细胞系进行纯度鉴定。分别收集 BGC823 细胞和 BGC823-FLuc 细胞各 10^6 个于 EP 管中,将细胞悬液离心(800 r/min \times 4 min),弃去旧培养液,加入 1 mL PBS 洗涤,离心(800 r/min \times 4 min),加 500 μL PBS 重悬,将上样密度调整为 2×10^6 个/mL,过细胞滤网,流式细胞仪设置上样细胞数为 5×10^5 个,

检测细胞纯度,纯度大于 98% 即为单克隆稳转细胞系。

1.6 MTS 实验检测细胞活力与生长曲线

取 5 块干净无菌 96 孔板,将培养的 BGC823 细胞和 BGC823-FLuc 细胞消化计数后,接种到同一块 96 孔板中(共 3 个平行孔),每孔加 100 μL 密度为 5×10^5 个/mL 的细胞悬液, CO_2 细胞培养箱中,37℃ 恒温,5% CO_2 浓度进行细胞培养。5 块 96 孔板的培养时间分别为 0、24、48、72、96 h。

培养结束后参照 MTS 说明书进行如下操作:加入 MTS 20 μL , CO_2 细胞培养箱中继续孵育 4 h 后,置于多功能酶标仪上,在 490 nm 波长处,以培养基所在孔测定的吸光度值作为背景值,计算时所有样品测定的吸光度值均减去背景值。生长曲线的纵坐标是吸光度值,横坐标是 BGC823 细胞数目,Excel 绘制细胞生长曲线。

1.7 荧光素酶活性鉴定

细胞传代培养后,收集细胞,梯度稀释后加入到 96 孔板中,每孔 100 μL ,BGC823-FLuc 细胞数分别为 5×10^4 、 2.5×10^4 、 1.25×10^4 、6250、3125、1563 个,每种密度设置 4 个平行孔。设置对照孔,加入 100 μL PBS 缓冲液,设置 4 个平行孔。按照荧光素酶底物使用说明书,全程避光,各孔均加入稀释 50 倍的荧光素酶底物 100 μL ,使荧光素酶底物浓度为 0.15 mg/mL,培养箱孵育 5 min,多功能酶标仪检测化学发光。

1.8 BGC823 细胞和 BGC823-FLuc 细胞的裸鼠体内成瘤实验

随机选取 5~6 周龄裸鼠 9 只,分成 3 组,每组 3 只。对第一组裸鼠均腹腔注射 100 μL ,密度为 5×10^6 个/mL 的 BGC823-FLuc 细胞;对第二组裸鼠均腹腔注射 100 μL ,密度为 5×10^6 个/mL 的 BGC823 细胞;对第三组裸鼠腹腔注射 100 μL PBS 缓冲液。接种 7 d 后,按照荧光素酶底物使用说明书,腹腔注射荧光素酶反应底物,底物用量 30 mg/mL,100 μL /只,让裸鼠自由活动 10 min 后,麻醉裸鼠,再进行动物活体成像,拍摄记录三组裸鼠体内荧光素酶发光情况。

2 结果

2.1 BGC823 细胞对嘌呤霉素敏感性实验

通过查阅文献,选取嘌呤霉素的浓度范围为 1~10 $\mu\text{g/mL}$ 进行细胞敏感性实验。通过最终绘制曲线可知,4 天内杀死所有细胞的最低嘌呤霉素浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$ 。因此 6 $\mu\text{g/mL}$ 作为嘌呤霉素加压筛选的最佳浓度。

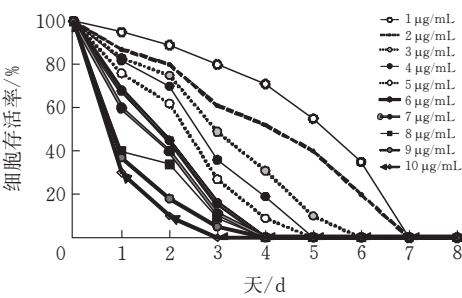


图1 BGC823 细胞对不同浓度嘌呤霉素敏感性曲线

2.2 流式细胞仪检测 BGC823-FLuc 细胞纯度

对稳转 BGC823-FLuc 细胞与 BGC823 细胞进行流式细胞仪鉴定。通过对比两者流式检测结果可知,FL1-A+表示 GFP 阳性率,与对照组相比 GFP 阳性率为 99.9%,说明 BGC823-Fluc 单克隆细胞系构建成功。

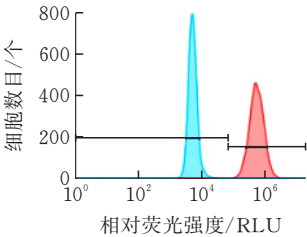


图2 流式细胞仪检测 BGC823-Fluc 单克隆细胞纯度

2.3 MTS 实验测定 BGC823 细胞与 BGC823-FLuc 细胞生长曲线

MTS 法检测 BGC823 细胞活力值。OD 490 显示,与对照组相比,转染了荧光素酶基因的细胞在 0、24、48、72、96 这几个时间点吸光度值差异无显著性($P>0.05$),说明稳转荧光素酶基因对 BGC823 细胞增殖几乎无影响。

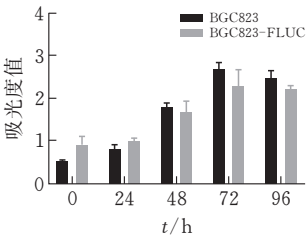


图3 BGC823 细胞与 FLuc-BGC823 细胞生长对比

2.4 荧光素酶检测

以细胞数目为横坐标,相对荧光值为纵坐标,绘制细胞数目与相对荧光值的相关性曲线,相对荧光值和 BGC823-Fluc 细胞数目成正比例关系,且细胞数目和相对荧光值相关性为 0.9791,说明荧光素酶在单克隆细胞系中表达。

2.5 BGC823-FLuc 和 BGC823 裸鼠腹腔植瘤结果

裸鼠腹腔进行 BGC823-Fluc 和 BGC823 细胞注射后,7 d 后腹腔注射荧光素酶反应底物 30 mg/mL,100 μL/只,让裸鼠自由活动 10 min

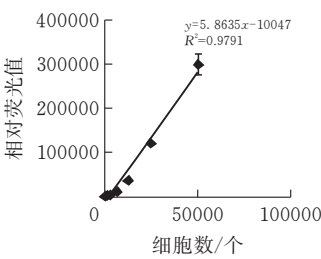


图4 相对荧光值与细胞数目的相关性曲线

后,在动物活体成像系统中检测裸鼠体内发光情况。第一组 3 只裸鼠体内注射 BGC823-Fluc,活体动物成像显示,3 只老鼠体内均能检测到荧光,可以通过荧光来判断裸鼠体内肿瘤进展。第二组 3 只裸鼠体内注射 BGC823,未检测到荧光。第三组 3 只裸鼠体内注射 PBS,也未检测到明显荧光。

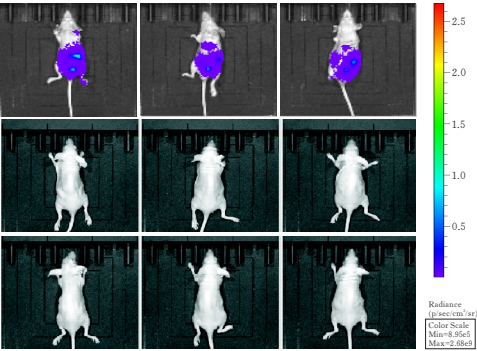


图5 活体动物拍摄裸鼠腹腔植瘤

3 讨论与结论

通过脂质体转染的方法,将含 GFP 和荧光素酶的重组质粒转染到胃癌细胞(BGC823)中,经过嘌呤霉素加压筛选,有限稀释法挑选单克隆,经扩大培养后,MTS 实验进行细胞活力鉴定并绘制生长曲线,流式细胞仪鉴定,阳性率为 99.9%,表明成功构建表达 GFP 及荧光素酶基因(FLuc)的胃癌细胞系(BGC823-FLuc)。葛晓梅等构建的人胃癌细胞系显示 PDX 模型来源的肿瘤细胞系不能完全替代 PDX 模型,需要和 PDX 模型结合使用^[9],在单个细胞系中结合不同的生物读数提供了优于常规基于细胞的测定的显著优势,并接种到裸鼠皮下,建立裸鼠胃癌细胞模型,结合动物活体成像技术监测肿瘤的生长过程。

这一模型的成功构建,能够为胃癌治疗药物筛选、胃癌免疫学治疗、肿瘤的联合治疗手段等动物水平实验提供极大的便利,能够让观察者直观而精确地判断肿瘤在体内的进展。与绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白等报告基因相比,荧光素酶灵敏度更高,稳定性更好,背景干扰更低,在动物体内的穿透性更强^[10-13],使荧光素酶报告基因在肿瘤治疗和其他生物学领域发挥更大作用。

[参 考 文 献]

[1] TSUKAMOTO T, MIZOSHITA T. Animal models of stomach carcinogenesis [J]. Toxicologic Pathology, 2007,35(5): 636-648.

[2] SCOTT D, DIKICI E. Bioluminescence and Its Impact on Bioanalysis [J]. Annual Review of Analytical Chemistry, 2011,4(1):297-319.

[3] 张华腾. 基于萤火虫生物发光原理的成像探针及抑制剂的研究.[D]. 济南:山东大学, 2016.

[4] 王爽. 荧光素酶生物发光报告体系的优化及在肝癌荷瘤裸鼠模型中的应用 [J]. 实用肝脏病杂志, 2019, 22(4):482-483

[5] 柯总煌. 建立稳定表达荧光素酶的 B16R 细胞系[J]. 湖北科技学院学报, 2020,34(3):214-215.

[6] 李颖, 纪木火, 杨建军. 绿色荧光蛋白细胞毒性研究进展[J]. 东南大学学报(医学版), 2020,39(1):116-119.

[7] HIRIPI L. GFP transgenic animals in biomedical research: a review of potential disadvantages [J]. Physiological Research, 2019,9(1):525-530.

[8] PENG Y, XIE M, DUAN X. Generation of a luciferase-expressing human embryonic stem cell line: NERCe002-A-2 [J]. Stem Cell Research, 2018, 10(28):172-176.

[9] 葛晓梅, 张一心, 谢付波, 等. 人胃癌细胞系的建立及其评价[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(4):257-265.

[10] ZANELLA F, ROSADO A. Using multiplexed regulation of luciferase activity and GFP translocation to screen for FOXO modulators [J]. BMC Cell Biology, 2009,10(1):112-115

[11] AIBA K, KOBAYASHI Y, AOKI S. Bioluminescence burst caused by a process in carbohydrate metabolism in a luciferase reporter strain of Escherichia coli[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020,532(2):185-189.

[12] SCHRAMM S, AL-HANDAWI M B, KAROTHU D P, et al. Mechanically Assisted Bioluminescence with Natural Luciferase[J]. Angewandte Chemie, 2020,59(38):485-489.

[13] 饶玉良. 绿色荧光蛋白和生物荧光素酶双标记前列腺癌裸鼠模型的构建[A]//中国毒理学会会议论文集[C]. 重庆:2018:18-19.

Construction of BGC823 Cell Line Stably Expressing Luciferase

WANG Lin, ZHANG Ziyi ,JIN Jing, DUAN Haixiao,
WANG Runyang, HU Han, WANG Yang, LIU Binlei

(School of Biological Engineering and Food Science , Hubei Univ. of Tech. , Wuhan 430068, China)

Abstract: Objective: The establishment of a human gastric cancer cell line (BGC823) stably expressing luciferase will lay the foundation for the establishment of an in vivo imaging human gastric cancer xenograft tumor model and treatment research. Methods: Plasmid containing green fluorescent protein (GFP) and luciferase was stably transferred to gastric cancer cell BGC823 by liposome transfection. Puromycin at a different concentration was used to select cells. Monoclonal cells were selected by the limiting dilution method. Finally, the purity of the constructed BGC823-FLuc cells was checked by flow cytometry. The expression level of luciferase in the cells is detected with a luciferase substrate reagent. MTS compares the proliferation of BGC823 cells before and after transformation. Results: Flow cytometry showed that the positive rate of the monoclonal cell line reached 99.9%, and the fluorescence signal value was detected by the multifunctional microplate reader. The MTS method detected the cell proliferation before and after the transformation and found that the proliferation was basically the same, indicating that the addition of luciferase gene did not have a significant effect on cell proliferation. The above results indicate that the construction of a monoclonal gastric cancer cell line expressing luciferase and green fluorescent protein was successful. This cell line has the advantage that it can be used in vitro and in vivo experiments, which is convenient for subsequent tumor model research.

Keywords: Green fluorescent protein; Firely luciferase; BGC823