

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00950

· 论 著 ·

荧光标记人卵巢癌细胞株的建立

张小梅,方廖琼,王智彪*

重庆医科大学生物医学工程学院,重庆 400016

[摘要] **目的** 建立稳定高表达增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的人卵巢癌细胞株。**方法** 采用基因转染的方法,将EGFP基因导入人卵巢癌细胞HO8910PM中,通过G418筛选、亚克隆扩增获得稳定表达绿色荧光蛋白的EGFP-HO8910PM细胞株,并用流式细胞术检测所获细胞株的EGFP表达率,通过细胞生长曲线、黏附实验、侵袭迁移实验比较EGFP-HO8910PM细胞和HO8910PM细胞的生物学行为。**结果** 筛选出的EGFP-HO8910PM细胞经流式细胞仪检测EGFP阳性表达率达99%以上,EGFP-HO8910PM细胞和HO8910PM细胞生长、黏附及侵袭迁移能力无统计学差异。**结论** 成功建立了稳定表达EGFP且保持母株细胞特性的人卵巢癌细胞株EGFP-HO8910PM,为人卵巢癌整体活体应用中可视化研究打下基础。

[关键词] 卵巢肿瘤;HO8910PM细胞株;绿色荧光蛋白质类;转染

[中图分类号] R 737.31

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2012)09-0950-04

Establishment of a fluorescence-labeled human ovarian cancer cell line

ZHANG Xiao-mei, FANG Liao-qiong, WANG Zhi-biao*

Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To establish a human ovarian cancer cell line stably expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP), so as to carry out visualized research on whole ovarian cancer. **Methods** We transfected human ovarian cancer cell line HO8910PM by gene transfection, and obtained cells stably expressing EGFP by sub-cloning amplification and selection with G418-resistance. The expression rate of EGFP was analyzed by flow cytometry (FC). The growth curve, adhesion, migration and invasion experiments were employed to study the biological behaviors of the cells transfected with EGFP. **Results** Flow cytometry results showed that EGFP positive rate of screened EGFP-HO8910PM cells was higher than 99%. The cell growth, adhesion, invasion and migration abilities of cells were not significantly changed after transfection. **Conclusion** We have successfully established a cell line EGFP-HO8910PM stably expressing EGFP and at mean time maintaining the characteristics of the parent cell line, which lays a foundation for whole-body visualization research of human ovarian cancer *in vivo*.

[Key words] ovarian neoplasms; HO8910PM cell line; green fluorescent proteins; transfection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(9):950-953]

人卵巢癌有恶性度高、易复发、易产生多药耐药的特性,其发病率在女性生殖系统恶性肿瘤中仅次于宫颈癌和子宫体癌,但病死率却在所有妇科肿瘤中高居首位^[1],成为女性第五大死亡原因^[2],并且近年来其发病率呈逐年上升趋势。在肿瘤的发生发展机制研究中,选择合适的模型及观察手段非常重要。绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是目前最为常用的细胞标记手段,具有分子量小、稳定、对细胞无毒性等优点,改造后的增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的

荧光强度和稳定性都大大提高^[3]。

本研究选用新型的阳离子聚合物试剂 GenEscort™ II, 将EGFP基因转染进入人卵巢癌细胞高转移株HO8910PM细胞中,筛选出稳定表达EGFP的EGFP-HO8910PM细胞,为后续人卵巢癌成瘤实验整体可视化研究提供良好的实验材料。

1 材料和方法

1.1 材料 (1)细胞株:人卵巢癌细胞高转移株HO8910PM,购自中国科学院上海生命科学研究院

[收稿日期] 2012-04-27 **[接受日期]** 2012-07-17

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(“973”计划,2011CB707902)。Supported by National Key Basic Research Development Program (“973” Program, 2011CB707902)。

[作者简介] 张小梅,硕士生。E-mail: zhbshi998@163.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 023-68485021, E-mail: wangzhibiao@haifu.com

细胞资源中心。(2)主要试剂与仪器:RPMI 1640 (Gibco);小牛血清、0.25%胰蛋白酶(Hyclone);G418、四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲亚砜(DMSO)(Gibco和Sigma);EGFP质粒pGensil-1(重庆医科大学医学超声工程研究所保存);D6943-01型质粒抽提试剂盒(Plasmid mini kit I, OMEGA);GenEscort™ II质粒转染试剂盒(南京慧基生物技术有限公司);培养板(Biousing);IX70型倒置荧光显微镜(Olympus);XDS-1B型倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司);ELX800型酶标定量检测仪(Bio-Tech);流式细胞仪(Bection-Dickinson);Transwell小室(无胶型 Millipore, 铺胶型 Coster)。

1.2 荧光标记 HO8910PM 细胞株的建立

1.2.1 G418 对 HO8910PM 细胞最小致死浓度的测定 将 HO8910PM 细胞传代至 24 孔板中,待 80%~90%汇合度时,以 0、100、200、300、400、500、600、700、800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度梯度将 G418 加至细胞孔中继续培养,观察细胞生长及死亡情况,每 3 d 换 1 次含 G418 浓度的新鲜培养液。2 周后,在倒置显微镜下观察,无活细胞的最低 G418 浓度为最佳筛选浓度,经反复试验,确定 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 浓度为 HO8910PM 细胞的最佳筛选浓度。

1.2.2 质粒转染及阳性细胞筛选 取对数生长期 HO8910PM 细胞,以每孔 0.5×10^5 个细胞接种于 24 孔板,每孔加 500 μl 含 10%小牛血清的 RPMI 1640,于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,按 GenEscort™ II 转染试剂说明书将 EGFP 质粒 pGensil-1 转染入细胞。转染 24 h 后换含有 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 的选择性培养液再培养,细胞汇合度达 70%后,用 0.25%胰蛋白酶消化,以有限稀释法将细胞接种到 96 孔板,保持 G418 筛选浓度。2 周后,挑取阳性克隆,扩大培养,保持 G418 筛选浓度。培养 20 代后,检测转染 EGFP 基因后的 HO8910PM 细胞(EGFP-HO8910PM 细胞)的荧光表达情况及生物学行为。

1.3 EGFP-HO8910PM 细胞荧光表达情况检测 在倒置荧光显微镜下观察细胞形态及绿色荧光的分布并拍照。收集对数期生长的 HO8910PM 细胞和 EGFP-HO8910PM 细胞,锥虫蓝拒染法计数活细胞,各取 2×10^6 个细胞上流式细胞仪检测,计算表达绿色荧光蛋白的阳性细胞所占比例。

1.4 EGFP-HO8910PM 细胞生物学行为分析

1.4.1 细胞生长情况检测 分别取对数生长期的 HO8910PM 细胞和 EGFP-HO8910PM 细胞,待细胞汇合度达 90%左右时,用 0.25%胰蛋白酶消化,锥虫蓝拒染法细胞计数后,分别以 1.0×10^4 /孔细胞

量接种于 24 孔板中。每种细胞分别接种于两块 24 孔板,从接种次日开始每天随机选择 6 孔进行细胞计数,连续 8 d,重复 3 次,绘制 HO8910PM 细胞株转染前后的生长曲线。

1.4.2 细胞黏附实验 收集 HO8910PM 与 EGFP-HO8910PM 细胞,用无血清培养基重悬,锥虫蓝拒染法计数细胞,以 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 密度、每孔 200 μl 接种于 96 孔培养板中,37℃分别孵育 3 h 和 5 h 后,利用 MTT 法测定各孔光密度(D)值。以 1 h 和 3 h 的 D 值代表各时间组的细胞黏附量。每次实验 5 孔/组,各组实验重复 5 次。

1.4.3 细胞侵袭、迁移实验 将 HO8910PM 与 EGFP-HO8910PM 细胞消化离心后用无血清培养基重悬、计数,以 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 密度、每孔 200 μl 分别接种于 Transwell 小室(铺胶型和无胶型)的上室内,下室加入含 10%胎牛血清的完全培养液,培养 24 h 后,取出滤膜,用棉签轻轻擦去基质胶。甲醛固定 20 min,常规 H-E 染色。低倍镜下,每个滤膜分别取上、下、左、右、中心 5 个视野,高倍镜下计数穿过聚碳酸酯滤膜的细胞数,计算每个视野的平均数以表示肿瘤细胞的侵袭能力。实验重复 5 次。

1.5 统计学处理 用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析比较组间差异。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 EGFP-HO8910PM 细胞形态及荧光表达情况 稳定高表达 EGFP 的 HO8910PM 细胞贴壁生长,利用倒置荧光显微镜在紫外光下进行观察,可见几乎所有细胞均呈现出很强的绿色荧光,且荧光较为均匀地分布在细胞内(图 1)。5 次利用流式细胞仪检测,EGFP-HO8910PM 细胞中绿色荧光蛋白阳性表达率均达 99%以上(图 2)。

2.2 EGFP-HO8910PM 细胞生物学行为 由图 3 可见,EGFP-HO8910PM 细胞生长情况与 HO8910PM 细胞相似,第 1~3 天生长缓慢,此后细胞增殖明显,进入对数生长期,到第 7 天时进入平台期。细胞黏附实验结果显示,EGFP-HO8910PM 细胞体外黏附能力与 HO8910PM 细胞比较差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。细胞侵袭及迁移实验显示,EGFP-HO8910PM 细胞穿膜细胞数目与 HO8910PM 细胞比较差异无统计学意义($P > 0.05$),结果见图 4。

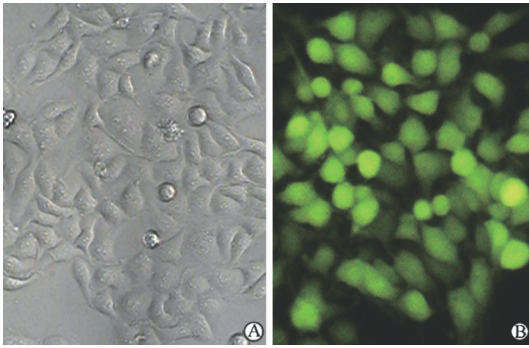


图 1 自然光和紫外光下观察

EGFP-HO8910PM 细胞形态和荧光表达

Fig 1 EGFP-HO8910PM cells under natural light and UV light

A: Natural light; B: Ultraviolet light. Original magnification: $\times 200$

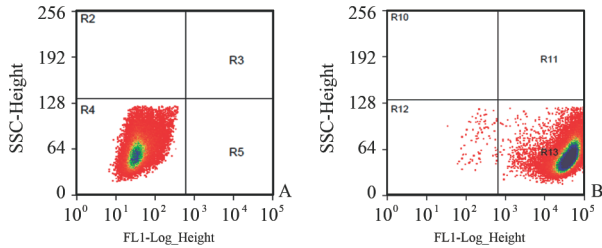


图 2 流式细胞术检测 EGFP-HO8910PM

细胞绿色荧光蛋白的表达

Fig 2 Flow cytometric histogram of EGFP-HO8910PM cells

A: HO8910PM cell; B: EGFP-HO8910PM cell

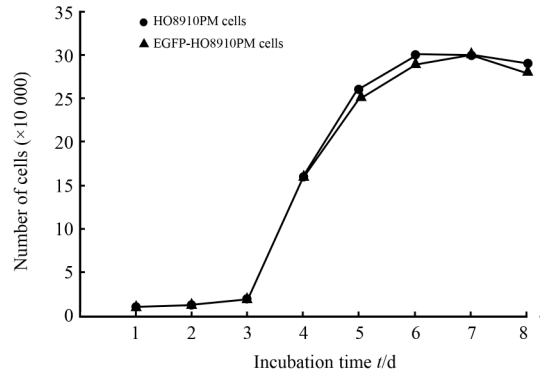


图 3 EGFP-HO8910PM 细胞和 HO8910PM 细胞生长曲线

Fig 3 Cell growth curves of EGFP-HO8910PM cells and HO8910PM cells

表 1 EGFP-HO8910PM 细胞和 HO8910PM 细胞体外黏附能力

Tab 1 Adhesion ability of EGFP-HO8910PM cells and HO8910PM cells

$n=5, \bar{x} \pm s, D$

Group	Incubation time t/h	
	3	5
HO8910PM cell	0.208 ± 0.014	0.216 ± 0.013
EGFP-HO8910PM cell	0.205 ± 0.016	0.208 ± 0.018

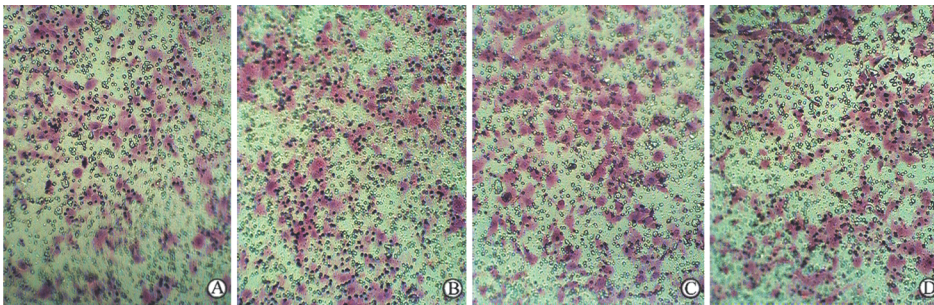
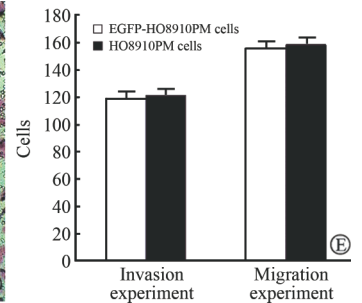


图 4 HO8910PM 与 EGFP-HO8910PM 细胞体外侵袭、迁移能力

Fig Migration and invasion abilities of HO8910PM cells and EGFP-HO8910PM cells

A: H-E staining of HO8910PM in invasion experiment; B: H-E staining of EGFP-HO8910PM in invasion experiment; C: H-E staining of HO8910PM in migration experiment; D: H-E staining of EGFP-HO8910PM in migration experiment. E: Number of transferred cells. Original magnification: $\times 100$ (A-D). $n=5, \bar{x} \pm s$



3 讨论

在肿瘤的研究中,往往需要长期观察各种靶细胞的定殖、迁移以及各种干预因素导致的变化。在缺乏理想的活细胞标志物之前,动态监测和活体中肿瘤细胞生长与早期成瘤过程及机制的研究受到了极大的限制。目前荧光蛋白基因标记是体内外识别靶细胞的最有效方法之一。

GFP 最早在一种学名 *Aequorea victoria* 的水

母中发现。由于只有 238 个氨基酸,与其他蛋白融合后不影响自身的发光功能,GFP 的这一特性已经在生物学、生态学及医学研究领域中被广泛地应用。本实验使用载体中的 EGFP 是 GFP 的突变型,将丝氨酸 65 用苏氨酸代替,苯丙氨酸 64 用亮氨酸代替后,荧光强度增加了 35 倍,大大提高了检测灵敏度。

GFP 和 EGFP 作为报告蛋白在肿瘤研究中的应用极为广泛,如体外^[4]/体内^[5]研究肿瘤转移过程、肿瘤新生血管生长^[6]及肿瘤基因治疗^[7]等。但

要将 GFP 用于活体实验研究, 首先必须获得在体外条件下可以长期、稳定及高纯度表达 GFP 的细胞株系。利用基因载体将荧光蛋白基因导入待标记细胞中, 通过筛选获得稳定表达荧光蛋白的细胞, 这些细胞可以通过荧光显微镜直接观察, 植入体内后仍然可以在一定时间范围内表达荧光蛋白, 因而也可应用于活体细胞的实时检测。本研究按照 GenEscort™ II 转染试剂说明书将 EGFP 质粒 pGen-sil-1 转染入 HO8910PM 细胞, 通过 G418 抗性筛选获得稳定表达 EGFP 的细胞, 然后将其进行单克隆增殖, 获得稳定高表达 EGFP 的单克隆细胞。连续传代 20 代以上后荧光显微镜下可见几乎所有细胞均呈现出很强的绿色荧光, 且荧光较为均匀地分布在细胞内, 经流式细胞仪检测其荧光蛋白表达率在 99% 以上。

黏附、侵袭是转移发生的最初阶段, 是转移性肿瘤必备的基本特性之一。本实验发现, 稳定转染 EGFP 对人卵巢癌细胞 HO8910PM 的细胞生长情况、细胞黏附、侵袭转移等生物学特性没有明显影响。可以说, 稳定表达 EGFP 的人卵巢癌细胞株 EGFP-HO8910PM 仍然保持了原来细胞株的生物学特性。

本实验建立了稳定表达绿色荧光蛋白的 EGFP-HO8910PM 细胞株, 为后续从细胞水平和活体水平上实时研究人卵巢癌的发生、发展以及药物筛选等相关研究提供了重要实验材料。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Dhillon V S, Young A R, Husain S A, Aslam M. Promoter hypermethylation of MGMT, CDHI, RAR-beta and SYK tumour suppressor genes in granulose cell tumours(GCTs) of ovarian origin[J]. Br J Cancer, 2004, 90:874-881.
- [2] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60:277-300.
- [3] Cormack B P, Valdivia R H, Falkows. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein(GFP)[J]. Gene, 1996, 173:33-38.
- [4] Klemke M, Rafael M T, Wabnitz G H, Weschenfelder T, Konstandin M H, Garbi N, et al. Phosphorylation of ectopically expressed L-plastin enhances invasiveness of human melanoma cells[J]. Int J Cancer, 2007, 120:2590-2599.
- [5] Boissonnas A, Fetler L, Eelenberg I S, Hugues S, Amigorena S. *In vivo* imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor[J]. J Exp Med, 2007, 204:345-356.
- [6] Anmh Y, Li L, Katsuoka K, Bouvet M, Hoffman R M. GFP-expressing vascularization of Gelfoam as a rapid *in vivo* assay of angiogenesis stimulatots and inhibitors [J]. Biotechniques, 2007, 42:294, 296, 298.
- [7] Goding S, Yang Q, Mi Z, Robbins P D, Basse P H. Targeting of products of genes to tumor sites using adoptively transferred A-NK and T-LAK cells[J]. Cancer Gene Ther, 2007, 14:441-450.

[本文编辑] 徐佳, 孙岩

《军医大学学报(英文版)》征稿、征订启事

《军医大学学报(英文版)》(*Journal of Medical Colleges of PLA*)是由第二、三、四军医大学及南方医科大学(原第一军医大学)共同主办、国内外公开发行人(CN 31-1002/R, ISSN 1000-1948)的高级医药学综合性英文学术刊物, 1986年6月创刊。本刊主要报道基础、临床、预防、军事医学、药理学和中国医学等领域的最新科研成果、新理论、新技术和新方法。辟有专家论坛、基础研究、临床研究、经验交流、短篇报道、个案报告等栏目。

本刊为中国英文版科技论文统计源期刊, 并被纳入中国期刊网、万方数据库和中文科技期刊数据库等国内所有重要检索系统, 已被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(VINITI Abstract Journal)、波兰《哥白尼索引》(IC)和荷兰《斯高帕斯》(Scopus)等国际知名检索系统收录, 期刊全文已进入爱思唯尔(Elsevier)科技出版集团所属的 ScienceDirect 全文数据库(<http://www.elsevier.com/locate/jmcpa>)。

为了弘扬科研创新精神, 推动医学事业发展, 促进海内外学术交流, 本刊面向全国和海外作者征稿。

来稿要求: 来稿请附中文的文题、作者姓名、单位名称及较详细的中文摘要和 3~8 个关键词, 参考文献放在文末。来稿务必写清个人通讯地址及联系电话, 编辑部在接到稿件 30 日内通知作者稿件是否被采用。

刊发周期: 由全国相关学科领域的知名专家和权威人士进行审稿, 对审稿通过的论文 2~6 个月内安排刊出。国家、省部级基金资助和重点攻关项目稿件优先发表。

本刊为双月刊, A4 开本, 80 g 铜版纸彩色印刷, 每期定价 15 元, 全年 90 元。可在当地邮局订阅(邮发代号 4-725), 漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。

地址: 上海市翔殷路 800 号《军医大学学报(英文版)》编辑部, 邮编: 200433

联系人: 徐佳 电话: 021-81870788 转 818 分机

E-mail: jydxxb@yahoo.com.cn