

GFP 示踪观察移植瘤原代培养细胞的生长规律*

左埏莲^{1, 2)**} 卢建红^{1)**}, *** 俞海波¹⁾ 喻正源¹⁾ 晏其佳¹⁾
何 威¹⁾ 唐 珂¹⁾ 李桂源^{1)***}

(¹⁾中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078; ²⁾桂林医学院生物技术学院, 桂林 541004)

摘要 采用 GFP 稳定表达的细胞系(293-BAC)接种裸鼠形成移植瘤。取肿瘤组织进行原代培养, 通过 GFP 示踪和细胞形态学变化, 观察了肿瘤组织中细胞的生长规律。肿瘤细胞释放并生长在组织块附近, 向周围空间延伸。种植时散落的薄层组织细胞则直接贴壁生长。生长的鼠源间质细胞占总细胞量的 1%~3%, 散在或在组织新生肿瘤细胞外围集中生长。原代培养的细胞在传代 5 代以后, 其中的鼠源细胞消失。经过成瘤和传代过程的肿瘤细胞生长性能稳定、来源纯净, 是相关研究的好材料。观察到的细胞生长规律可为移植瘤的相关研究提供参考。

关键词 移植瘤, 原代培养, 生长, GFP 示踪
学科分类号 R73

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00568

使用细胞接种裸鼠产生移植瘤的实验, 通过观察成瘤时间和瘤体大小等, 可以用来分析细胞的转化能力。这个方法被广泛应用于肿瘤基础研究。移植瘤细胞不但能保留接种细胞的基本生物学特征, 而且经过成瘤过程中的选择性生长, 其生长能力更稳定, 所以, 使用移植瘤进行原代培养获得的肿瘤细胞可用于深入研究。组织的原代培养与通常的细胞系培养不一样, 细胞的生长规律也不一样, 而且有宿主源细胞共存, 在观察时容易混淆, 也较难确定传代中是否获得了纯净的肿瘤细胞。我们用自主建立的一个带有绿色荧光蛋白(GFP)标记且培养特性稳定的细胞系(293-BAC)接种裸鼠, 在移植瘤组织的原代培养中系统地观察了肿瘤细胞的生长, 结合新的细胞种鉴定方法以判断细胞来源, 可为肿瘤细胞和组织移植瘤的相关研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 细胞系、质粒和裸鼠等材料

人胚肾上皮细胞(293), ATCC 来源, 中南大学肿瘤研究所保存和传代, 使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养。含 EBV 全基因组的质粒(BAC-EBV) p2089^[1]由德国 GSF 国家环境与卫生研究中心

Hammerschmidt 教授惠赠。BAC-based 空白质粒(pM-BAC)系通过同源重组在 p2089 中切除 EBV 基因组后自主构建(另文报道)。将 pM-BAC 质粒按照报道的方法^[2]建立稳定转染的细胞系(293-BAC)。4 周龄 SPF Balb/c 裸鼠购自上海 SLAC 实验动物有限公司。

1.2 裸鼠移植瘤实验

细胞(293-BAC)悬液接种于 4 周龄 SPF 裸鼠腋窝皮下, 每只 0.2 ml(含 5×10^6 个细胞), 共接种 5 只, 观察裸鼠成瘤的日期和大小, 观察 7 周。

1.3 肿瘤组织原代培养

接种 7 周后, 将成瘤裸鼠脱颈致死, 无菌剥离肿瘤, 去除外包膜, 用含双抗的 D-Hank 氏液浸泡数分钟, 分别将肿瘤组织剪碎至直径 2~3 mm 大小

* 国家重大科学研究计划(2006CB910502), 湖南省发改委研发项目(2009-13910)和高等学校学科创新引智计划(111-2-12)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

卢建红. Tel: 0731-84805446, E-mail: jianhl@sohu.com

李桂源. Tel/Fax: 0731-84805383, E-mail: ligy@xysm.net

Tel: 0431-5099502, E-mail: baoyl800@nenu.edu.cn

收稿日期: 2010-11-05, 接受日期: 2011-01-11

的小块, 放置在 50 ml 培养瓶中. 种植培养 4 瓶、每瓶种植 7~8 小块组织. 加入少量的细胞培养基, 前 2~3 天每天换液, 以后每 2 天换液. 逐渐增加培养基的量至组织块底面均浸泡在培养基中. 每天在光学和荧光倒置显微镜下观察细胞生长情况和细胞的 GFP 表达情况.

1.4 肿瘤细胞传代培养

原代培养大约 13~15 天后, 组织块和新生的细胞一起消化, 尽量去掉较大的组织块, 细胞长满后以 1:2 的比例分瓶进行一般的传代培养. 消化后的细胞为第 1 代, 每天观察细胞生长和 GFP 表达情况. 第 4 代分 1 瓶以 1:10 进行低密度培养并同样进行观察.

1.5 培养细胞的种源鉴定

按文献[3]报道的多重 PCR, 这个新方法使用不同的引物能从不同种属细胞 gDNA 中扩增出大小特异的片段, 并能检测到 1% 以下的异种细胞污染. PCR 扩增条件在预实验的基础上与报道的方法^[3]略有不同, 反应条件如下: 95℃ 5 min 1 个循环; 95℃ 35 s、55℃ 30 s、72℃ 40 s 30 个循环、72℃ 7 min 1 个循环, 最后冷却至 4℃. 人源和鼠源细胞扩增片段长度分别为 391 bp 和 150 bp.

2 结 果

2.1 组织块周围的肿瘤细胞生长规律

对于直接放置在培养瓶中的组织块, 由于只有底部部分直接与培养瓶底面接触, 组织块中的细胞不能直接贴壁生长, 而是逐渐从组织块向周围释放, 然后贴壁生长. 组织块种植后第 3~4 天可见到新生细胞的生长. 靠近组织块的新生细胞主要来自接种裸鼠的 293-BAC 细胞, 由于在低密度条件下生长, 细胞的形态呈成纤维细胞样梭形, 在荧光显微镜下可见到细胞中的 GFP 表达. 随着培养时间的延长, 细胞生长逐渐致密, 但是仍然可见部分细胞呈梭形(图 1).

2.2 散落的薄层组织碎片中肿瘤细胞的生长规律

由于细胞的移植瘤体组织质脆, 在剪碎和种植过程中容易产生很小的薄层或少量细胞团. 这种少量的薄层细胞散落在瓶底并能直接贴壁. 细胞在生长时不需要向周围释放, 而是直接沿贴壁处向外生长. 新生的细胞形态接近于 293-BAC 的形态, 或在密度低的地方呈梭形, 并可见到 GFP 表达(图 2).

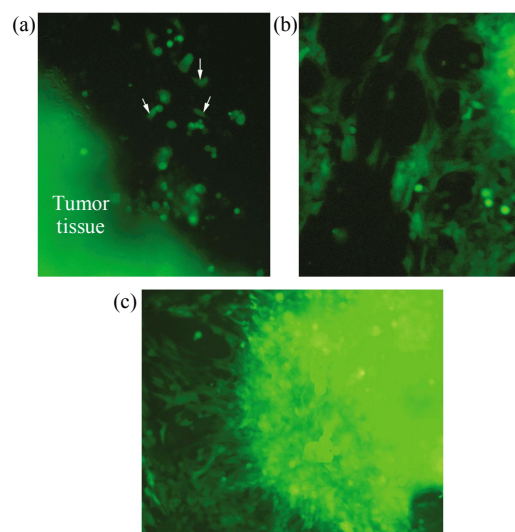


Fig. 1 Newly-grown cells around the tumor tissue pieces
(a) Four days after the planting. The cells were released to the out rim and some of them began to grow in the vicinity of the tissue (arrows indicated). (b) Eight days after the planting. (c) Thirteen days after the planting. Original magnification: $\times 100$.

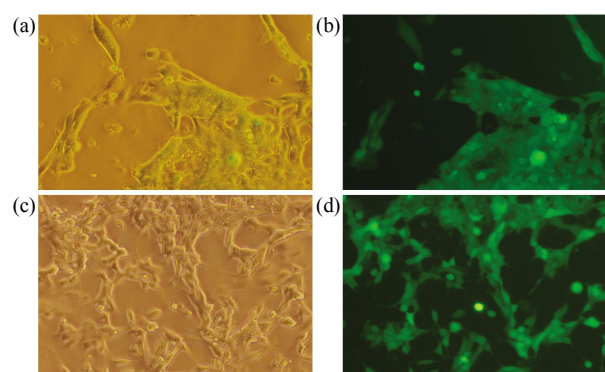


Fig. 2 Scattered thin tissue piece cells adhered to the flask wall and directly grew

(a, c) Phase contrast. Original magnification: $\times 200$ (a, b); $\times 100$ (c, d).

2.3 鼠源细胞的生长

在肿瘤组织块内主要来源是接种的细胞, 也存在鼠源间质和血管. 虽然原代培养取材时尽量避免取到间质和血管, 但是仍可见鼠源细胞的生长. 在组织块外围有一些细胞形态与 293-BAC 和新生的 293 梭形细胞都不一样, 主要呈多角形或多角长梭形, 无 GFP 表达, 核(1~2 个)周无色呈空泡状. 在原代培养约 13~15 天, 组织块周围生长的肿瘤细胞致密以后, 也可以见到鼠源细胞在外围聚集生

长、贴在组织块的新生肿瘤细胞层之外. 肿瘤细胞的生长是沿组织块向外的垂直方向, 而鼠源细胞多为纵向生长(图 3c). 在细胞消化分散后经计数, 这种细胞占的比例大约 1%~3%, 在不同肿瘤来源或培养瓶中有差异. 在显微镜下观察, 第 4 代时鼠源细胞数量很少(图 4), 至第 5 代已经完全消失. 用多重 PCR 对传代培养的细胞进行种源鉴定, 结果与用显微镜观察的一致, 在第 1~4 代中能扩增到鼠种特异片段, 第 5 代以后就扩增不到了(图 5).

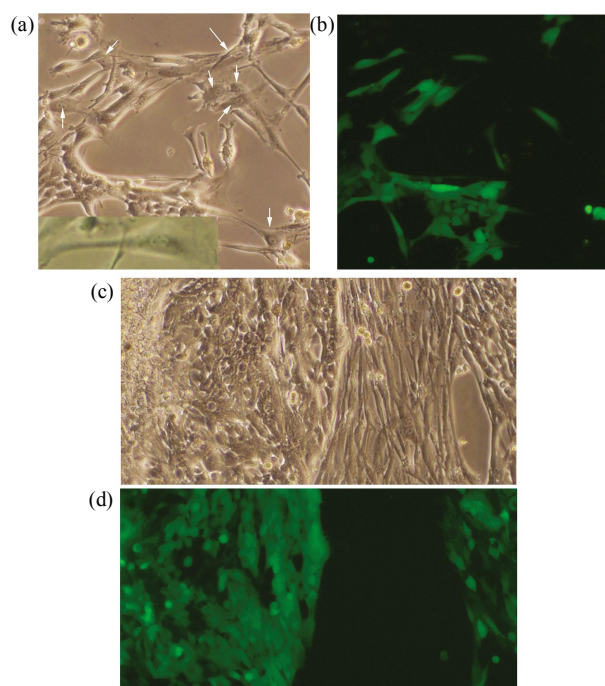


Fig. 3 The growth of mouse-origin cells in tumor primary culture

There was no GFP expression in mouse-origin cells. (a) Some of the mouse-origin cells were shown as the arrows indicated, with one being shown the magnified image at the lower left corner. (a, b) The mouse-origin cells (arrows indicated, non- fluorescence) grew among the tumor cells. (c, d) A cluster of mouse-origin stromal cells grew at the out rim of the newly-grown tumor cells. (a, c) Phase contrast. Original magnification: $\times 100$.

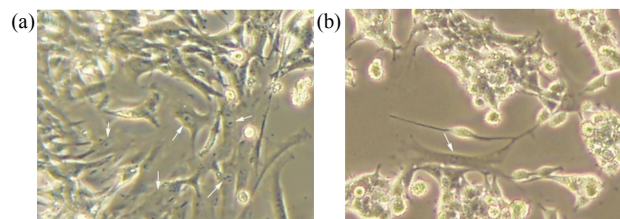


Fig. 4 The growth of mouse-origin cells during the first several passages

(a) There were some mouse-origin cells at the first passage as the arrows indicated. (b) A few mouse-origin cells could be found at passage 4. Original magnification: $\times 200$.

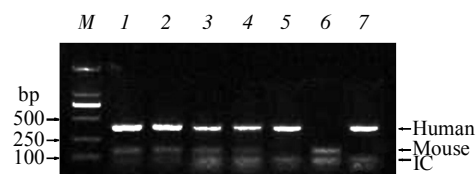


Fig. 5 Cell Species identification in different passages by multiplex PCR

M: DL2000 marker; 1~5: Passage 1~5 of the cells after primary culture; 6: NIH/3T3 cell line (mouse-origin control); 7: 293 cells (human-origin control). Human: 391 bp; Mouse: 150 bp; IC: Internal control, 70 bp.

2.4 肿瘤细胞在传代培养中的生长

在原代培养中, 肿瘤细胞的形态出现了一些变化, 所以进行传代培养以继续观察. 结果显示, 293-BAC 肿瘤细胞与接种前的 293 和 293-BAC 细胞在形态上基本一致, 但是具有肿瘤细胞的部分生长特性, 黏性比 293 细胞大, 可部分多层生长(图 6). 在第 1~2 代, 少部分肿瘤细胞呈纤维状(GFP 阳性), 在此后的传代中, 基本形态与 293 细胞一致. 在没有筛选压力的条件下, GFP 表达稳定, 在低密度培养条件下 GFP 仍然稳定维持(图 6), 到第 8 代, GFP 表达的细胞比例几乎仍为 100%.

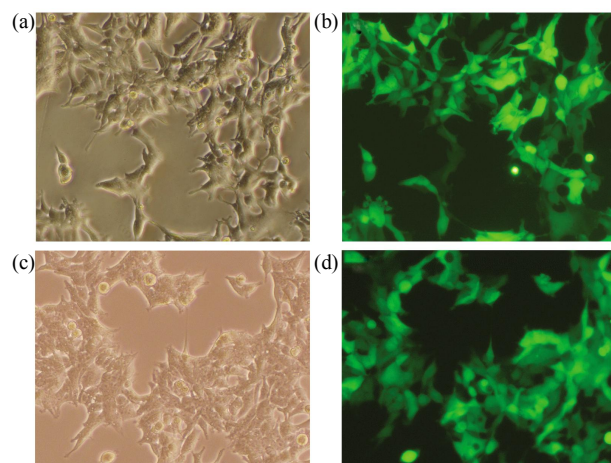


Fig. 6 The growth of tumor cells during passage

(a, b) Passage 2. (c, d) Three days after culture at low density (1 : 10) of passage 4. Almost all the tumor cells showed GFP expression. Original magnification: $\times 100$.

3 讨 论

通过移植瘤原代培养获得肿瘤细胞是肿瘤研究中广泛应用的方法. 与人肿瘤组织相比, 在转染细胞的裸鼠移植瘤模型中, 形成肿瘤的细胞来源相对

单一^[4]。然而,用组织进行原代培养与一般用细胞系进行单层培养不同,肿瘤细胞在生长时的规律也不一样。尤其是在组织块周围,由于密度由低到高的变化等原因,肿瘤细胞生长时的形态往往出现较大的变化,如有的细胞呈梭形、细胞群向外空间伸展,在显微镜下观察时,这些异形细胞容易被误认为是非肿瘤细胞。此前没有具体描述原代培养细胞生长规律的报道。GFP 具有分子质量小、荧光稳定、检测方便、对活细胞无伤害等优点,所以 GFP 示踪技术在细胞生物学中已得到广泛应用^[5]。在肿瘤研究中,GFP 示踪被应用于观察肿瘤细胞中特定基因的表达及肿瘤的血管生成、生长、侵袭转移和疗效等^[5-8]。本研究通过使用稳定标记 GFP 的细胞,观察和描述了移植瘤原代和传代培养中肿瘤细胞与宿主源细胞的生长规律,这将为肿瘤细胞和组织移植瘤的相关研究中观察细胞的生长规律及怎样获得纯净的肿瘤细胞等提供依据。

在前期的相关研究中,我们使用了一个基于细胞人工染色体(BAC)的 EB 病毒(EBV)全基因组^[2]。在这个 EBV 基因组中插入了一个 F 因子及原核和真核筛选标记的表达盒,约 11.5 kb。用带 GFP 标记的 EB 病毒(EBV)基因组感染的细胞接种裸鼠,在移植瘤细胞培养中,由于 EBV 不能稳定存在于细胞中,GFP 也容易随着 EBV 一起丢失^[9],所以不适合用来观察和判断肿瘤组织细胞原代培养的生长规律。为了建立稳定的对照细胞,我们切除了这个载体中的 EBV 全基因组(另文报道),用这个空白的 BAC-based 载体(pM-BAC)转染具有低致瘤能力的 293 细胞,经筛选建立细胞系(293-BAC),该细胞系的生长和转化能力无变化,GFP 表达强度高且稳定,在无筛选压力下低密度培养数代 GFP 表达的细胞仍能达到 100%。所以,这个细胞系适合用于观察移植瘤细胞培养规律。由于 GFP 在细胞中是稳定表达的,也证明了原代培养观察到的无 GFP 表达细胞不是接种细胞(293-BAC)来源而是宿主细胞来源。因为所用的 293 细胞系其成瘤具有剂量依赖性,本研究使用了前期实验证明可成瘤的剂量接种裸鼠。在肿瘤细胞的传代培养中发现,在没有筛选压力下,肿瘤细胞的 GFP 表达仍然稳定,即使在低密度的培养条件下也是这样。这与前期的、含 EBV 病毒基因组的细胞容易丢失 EBV 基因组不一样。因此,293-BAC 和原代培养后的肿瘤细胞也将是我们在 EBV 相关研究中的很好的对照。

在组织块周围生长的细胞部分呈梭形,这是在

低密度培养的条件下生长所致,但是,其形态与鼠源细胞的长梭形和多角状是有区别的。随着时间延长,细胞密度加大,仍可见细胞向外周空间延伸生长的趋势(图 1c)。传代后,形态逐渐恢复至原始形态,与 293 细胞和接种前的 293-BAC 一致。种植过程中散落的细胞一般是没有鼠基质支持的,完全由 293-BAC 细胞组成(图 2)。但是,由于培养瓶中的培养基在观察和换液过程中发生移动,有些新生细胞会偏离原来的位置,因此也会观察到鼠源细胞在散落的肿瘤细胞中生长。在移植瘤的原代培养中,可以从形态上区分鼠源间质细胞和肿瘤细胞。非肿瘤细胞来源的鼠源细胞不能无限传代生长,在此后的传代培养中,只有 1~4 代细胞中存在鼠源细胞。在多次的原代培养中,我们用多重 PCR 检测鼠源细胞,大多在 1~3 代存在。降低 PCR 的退火温度以提高检测的敏感性^[10],有时候在第 5 代能扩增到鼠种特异性片段,但是从未在第 6 代以后的细胞中检测到。鼠源细胞在不同代次中出现的差异与取材也有关。

经过裸鼠成瘤过程中的选择压力,肿瘤细胞生长能力强,生物学特性稳定,而且在原代培养后经过 5 代以上的传代,细胞来源纯净,因此适合用于进一步的肿瘤相关研究。

参 考 文 献

- [1] Delecluse H J, Hilsenrath T, Pich D, *et al.* Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(14): 8245-8250
- [2] 唐运莲, 卢建红, 武明花, 等. 裂解性复制诱导产生可视化重组 Epstein Barr 病毒. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(4): 418-424
Tang Y L, Lu J H, Wu M H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(4): 418-424
- [3] Cooper J K, Sykes G, King S, *et al.* Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. *In Vitro Cell Dev Biol—Animal*, 2007, **43**(10): 344-351
- [4] Graham F L. Growth of 293 cells in suspension culture. *J Gen Virol*, 1987, **68**(Pt3): 937-940
- [5] 储 军, 施 华, 杨 杰, 等. 分子与细胞事件的光学可视化——解读 2008 年诺贝尔化学奖. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(10): 1104-1111
Chu J, Shi H, Yang J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(10): 1104-1111
- [6] Tsai M H, Aki R, Amoh Y, *et al.* GFP-fluorescence-guided UVC irradiation inhibits melanoma growth and angiogenesis in nude mice. *Anticancer Res*, 2010, **30**(9): 3291-3294
- [7] Castano A P, Liu Q, Hamblin M R. A green fluorescent protein-expressing murine tumour but not its wild-type counterpart is cured

- by photodynamic therapy. Br J Cancer, 2006, **94**(3): 391–397
- [8] Zagzag D, Miller D C, Chiriboga L, *et al.* Green fluorescent protein immunohistochemistry as a novel experimental tool for the detection of glioma cell invasion *in vivo*. Brain Pathol, 2003, **13**(1): 34–37
- [9] Lu J H, Tang Y L, Yu H B, *et al.* Epstein-Barr virus infection facilitates the malignant potential of immortalized human epithelial cells: from latent genome to viral production and maintenance. Lab Invest, 2010, **90**(2): 196–209
- [10] 王 稳, 屈武斌, 申志勇, 等. 利用 MPprimer 设计引物并优化扩增条件以提高多重 PCR 效率的实验研究. 生物化学与生物物理进展, 2010, **37**(3): 342–346
- Wang W, Qu W B, Shen Z Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2010, **37**(3): 342–346

The Observation of Cell Growth in The Primary Culture of Transplantation Tumor Through GFP Readout*

ZUO Lie-Lian^{1,2)**}, LU Jian-Hong^{1)**,*}, YU Hai-Bo¹⁾, YU Zheng-Yuan¹⁾,
YAN Qi-Jia¹⁾, HE Wei¹⁾, TANG Ke¹⁾, LI Gui-Yuan^{1)***}

⁽¹⁾ Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China;

⁽²⁾ Department of Biology and Technology, Guilin School of Medicine, Guilin 541004, China)

Abstract The method to obtain tumor cells from the primary culture of xenograft is commonly used. As primary culture is distinct from usual culture of single-layer cells, it also follows different patterns of cell growth. In order to observe the cell growth law of xenograft, a cell line (293-BAC) which stably expressed GFP was firstly used to formed transplantation tumor in nude mice. Primary culture of the tumor tissue was then conducted. Due to the stable GFP expression in the 293-BAC cells, the cell growth was observed through GFP readout and by analyzing the morphology of the cells from tumor tissue. Tumor cells in the masses of tissue were released to the out rim, gradually extending to the vicinity space. Cells in thin pieces which were scattered during planting were able to adhere to the flask wall and directly grew. There were about 1%~3% of mouse-origin cells growing among the tumor cells or gathering at the outskirts of newly-grown tumor cells. The mouse-origin cells disappeared after 5 passages of subculture. After the process of tumor forming and serial subpassages, the tumor cells were pure-sourced with stable growth property, thereby becoming good material for further research. Cell growth patterns of reference value for transplantation tumor or related research were provided.

Key words transplantation tumor, primary culture, growth, GFP readout

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00568

*This work was supported by grants from The National Key Project of Scientific Research Programs (2006CB910502), The Research and Development Project of Hunan Development and Reform Commission (2009-13910) and The 111 Project (111-2-12).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

LU Jian-Hong. Tel: 86-731-84805446, E-mail: jianhl@sohu.com

LI Gui-Yuan. Tel/Fax: 86-731-84805383, E-mail: ligy@xysm.net

Received: November 5, 2010 Accepted: January 11, 2011