

技术与方法

肿瘤细胞的标记及其活体荧光成像*

金鹰邢达**

(华南师范大学激光生命科学广东省重点实验室, 广州 510631)

摘要 以绿色荧光蛋白 (GFP) 作为标记基因转入人类肺癌细胞系 (ASTC-a1), 经 800 mg/L G418 筛选, 获得 5 株高表达细胞系. 利用流式细胞仪对 GFP 表达的稳定性进行了初步研究, 结果表明本实验中有些细胞株间 GFP 表达稳定性有显著差异 ($P < 0.01$). 将稳定表达的细胞系 (3#) 植入裸鼠皮下, 成瘤后用氩离子激光器产生的 488 nm 蓝光经扩束后直接激发, 瘤体部位发出强烈的绿色荧光. 用 530 nm 长通滤色片滤除激发光, 数码相机记录荧光的分布情况. 实验尝试利用激光作为激发光源, 检测 GFP 标记的肿瘤细胞在裸鼠中的定位, 期望建立一种新的肿瘤早期检测技术并改进肿瘤转移研究的手段, 实验取得了阶段性进展.

关键词 绿色荧光蛋白, 人类肺癌细胞 (ASTC-a1), 流式细胞仪, 裸鼠, 氩离子激光器

学科分类号 Q789

早期对来自水母 (*Aequorea victoria*) 的绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 的研究表明: 这种蛋白质在接受紫外或蓝光辐射时引发生物发光反应 (bioluminescence reaction) 并辐射出绿光, 其吸收峰为 $\lambda_{\max} = 395 \text{ nm}$ 和 $\lambda_{\min} = 470 \text{ nm}$, 发射峰为 $\lambda = 509 \text{ nm}$. 野生型 gfp 为 238 个氨基酸构成的 27 ku 单体蛋白, 含有环化三肽构成的发光色基, 本身就是一个生物发光系统, 其发光过程不同于其他生物发光组织, 是不需荧光素酶参与的. 光激发 gfp 荧光是一个特异性的独立过程, 并不需要任何的协同因子、底物或其他来自于水母的基因表达产物. 当能量由 Ca^{2+} -激活光蛋白 (aequorin) 传递给 gfp 时引发荧光. GFP 的克隆及其在异源系统中的表达使其成为一种新的遗传标记系统^[1~3]. 另外, 可以通过对不同位置的碱基进行突变来获得具有不同激发和发射特性的 GFP 突变体.

利用 GFP 作为标记可以方便地对活细胞的蛋白质分布、基因表达及标记细胞的组织分布等进行实时的、无损的、高灵敏度的检测^[4]. 本实验利用质粒转染试剂, 将编码 gfp 的真核表达质粒转入哺乳动物肿瘤细胞中, 并建立稳定表达的细胞株系, 通过荧光显微镜和激光共焦显微镜对表达 GFP 的细胞进行检测. 将这种转染 GFP 的肿瘤细胞植入裸鼠皮下, 通过激光激发的手段观测肿瘤细胞的成长和分布, 期望对肿瘤早期诊断和迁移研究作出有益的尝试.

1 材料和方法

1.1 质粒扩增及纯化

质粒表达载体 (pEGFP-C1) 购自 Clontech 公司, 宿主菌 (DH5 α) 购自鼎国公司, 按常规方法^[5]制备感受态细胞并进行细菌转化. 质粒纯化试剂盒购自 Life Technologies 公司 (Concert High Purity Plasmid Miniprep), 纯化过程参照各自的操作指南进行. 所获得的质粒利用紫外分光光度计 (HITACHI U-3400) 进行纯度及浓度测定, 常规电泳观测质粒构型及分子质量定标^[5], 凝胶成像系统为 BIO RAD 公司的 Gel Doc 1000 系统.

1.2 细胞培养及转染

细胞培养液为 RPMI 1640 (GIBCO/BRL), 添加 15% 胎牛血清 (FCS, GIBCO/BRL)、2 mmol/L 谷氨酰胺 (glutamine)、25 mmol/L HEPES、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素. 进行转染时, 将 30% ~ 50% 汇聚的肿瘤细胞与 Lipofectin Reagent (Life Technologies Inc.) 和足量质粒载体的悬浮液共培养 6 h, 之后补充适量新鲜培养液. 转染 48 h 后用 0.25% Trypsin 收集细胞, 以 1:15 比例在选择性培养基 (含 200~800 mg/L G418, GIBCO/BRL) 进行选择培养, 得到 gfp 阳性细胞株.

* 广东省自然科学基金团队项目 (015012), 国家教育部骨干教师基金和广东省自然科学基金 (000679) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 020-85210089, E-mail: xingda@scau.edu.cn

收稿日期: 2002-05-15, 接受日期: 2002-07-23

1.3 筛选稳定高表达的细胞株

用 0.25% Trypsin 收获上述阳性细胞株. 利用有限稀释法将细胞培养于 24 孔培养板, 早期培养阶段于倒置荧光镜 (Leitz) 下观测 *gfp* 表达情况, 随时除去不表达或表达强度较低的细胞 (株), 保留高效表达、阳性率接近 100% 的细胞株.

1.4 荧光和共焦显微镜观测

观测系统采用配备氙光源、氩光源和配套滤镜系统的 Nikon 荧光显微镜 (ECLIPSE E600) 及 MRC-600 共焦成像系统 (BIO-RAD).

1.5 细胞株阳性率的检测

利用流式细胞仪 (FACSCALIBAR, Becton Dickinson Cormpony) 计数样品细胞群中阳性细胞所占比例. 将上述完成基因转染操作的肿瘤细胞制备成 2×10^6 /ml 的细胞悬液. 调整流式细胞仪的工作条件为: 激发光波长 488 nm, 发射波长 510 nm. 将所获得的 5 个阳性细胞株进行测定, 同样的细胞

株进行正常传代, 传代后再次检测, 共测 3 代, 每次每个样品获取细胞总数为 10 000 个.

1.6 肿瘤细胞的植入及活体成像

收集正常培养的转染细胞, 稀释至 1×10^7 /ml, 取裸鼠 (暨南大学医学院) 进行皮下注射, 注射 0.3 ml. 饲喂 2~3 周成瘤后, 常规麻醉, 活体照相. 裸鼠肿瘤部位由 488 nm 氩离子激光 (INNOVA 70, Coherent Corp.) 激发, 经 520 nm 长通滤光片滤光, Nikon 数码相机成像 (CoolPix 995).

2 结 果

2.1 稳定高表达肿瘤细胞株的分离

携带有 neomycin 抗性基因的质粒载体经扩增和纯化后可以有效地转染人类肺癌细胞株, 在含有 200~800 mg/L G418 培养液中可筛选出稳定高表达的阳性细胞株, 并发出亮绿色的 GFP 荧光 (图 1a 和图 1b).

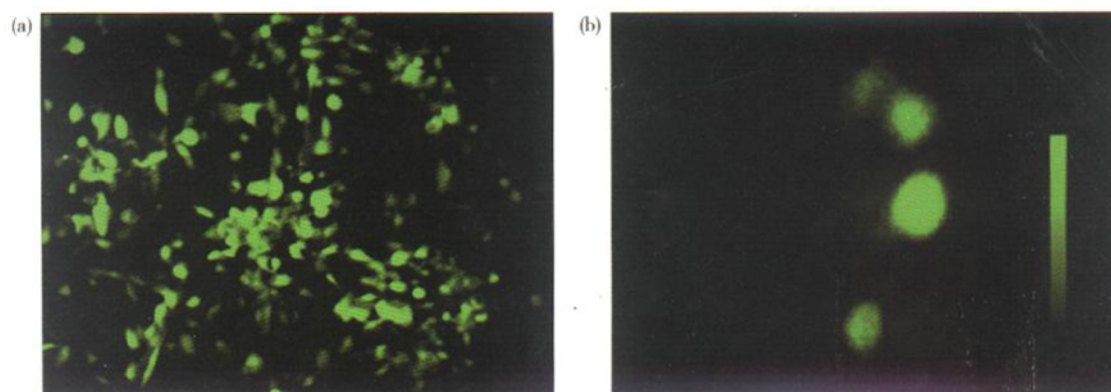


Fig. 1 Stable high-level expression GFP transfectants *in vitro*

(a) fluorescent microscope (200 $\times$); (b) laser scanning confocal microscope.

2.2 传代培养对转染细胞 GFP 表达的影响

本实验通过早期筛选采集了 5 个表达强度较高的细胞株, 在 3 次传代过程中对每株取一定量的细胞分别进行了 3 次流式细胞仪检测, 以观察 GFP 基因表达情况的改变. 结果表明不同细胞株 GFP 表达率的下降 (ρ 值) 差异显著.

2.3 GFP 在裸鼠中的表达

皮下注射转染细胞的裸鼠饲喂 3 周后, 成瘤直径约为 15 mm, 肿瘤组织发出强烈的绿色荧光, 说明肿瘤细胞在体内增值过程中有 GFP 稳定、高水平的表达 (图 2).



Fig. 2 Whole body fluorescence image of EGFP gene expression in human lung cancer cells in nude mouse

3 讨 论

GFP 作为新一代的生物源性荧光标记, 具有高效、稳定、无毒、易于检测等特性, 已广泛应用于各种蛋白质、细胞器的标记和特定基因表达的研究^[3,6]. 将这种标记用于活体实验, 必需获得在非选择条件下长期、稳定表达 GFP 的细胞株系. 本文利用脂质体介导的转染试剂 (lipofectin) 将携带 EGFP 基因的质粒转染到人类肺癌细胞株中, 并获得了 5 株具有较高表达活性的阳性株 (表 1). 实验中观察到, 4# 和 5# 细胞株的荧光强度最强, 而 1#、2#、3# 相对较弱 (未显示结果), 但发光较强的细胞株在随后的传代过程中阳性细胞所占比例急剧下降 (表 1). 需要说明的是各株细胞在最初选定时的阳性率均接近 100%. 相关报告的研究者并未对此现象加以说明, 有些研究以细胞倍增时间作为指标描述细胞转染后的生长状况^[7,8]. 本实验利用流式细胞仪对同步传代的 5 个细胞株的阳性率进行检测, 阳性率的下降速率表现出较显著的差异 (ρ 值), 不排除外源基因的整合拷贝数、整合位点及表达强度对表达稳定性的影响, 而这些正是转基因研究的热点, 详细机制有待于进一步的实验证实.

Table 1 The gene transfect efficiency of human lung cancer cells determined by flow cytometry (Gated %)

G	Control	1#	2#	3#	4#	5#
1	0.93	54.1	92.5	96.3	16.5	41.7
2	1.90	40.8	80.1	92.5	14.2	20.3
3	1.76	29.4	75.2	87.6	9.6	13.4
ρ		46% ²⁾	19% ¹⁾	9%	42% ²⁾	68% ²⁾

G: number of generation, $\rho = (\text{Value}_T - \text{Value}_3) / \text{Value}_1$, ¹⁾ $P < 0.05$,

²⁾ $P > 0.01$.

利用光学成像对 GFP 表达产物的分布进行定位, 能够提供特异、灵敏、便捷、实时的观测手段. 在 Chishima^[7] 和 Yang^[8] 等的报道中使用质粒

载体或逆转录病毒将 GFP 基因导入肿瘤细胞, 将阳性细胞经皮下、静脉或原位植入的方法接种到裸鼠体内, 可在肿瘤发生的不同时期对其进行观测. 用体视荧光镜可清晰地记录到 gfp 荧光在皮下和各种组织中的表达 (包括大脑、肺、肝、脾、胰、骨骼等). 该技术通过对荧光的跟踪, 可方便地实现对发光肿瘤组织在活体内的定位. 本实验利用前述方法成功地获得了植入阳性肿瘤细胞株并成瘤的裸鼠. 直接利用氩离子激光器作为激发光源, 选择 488 nm 波段经扩束使光斑完全覆盖裸鼠体表. 在相机镜头前加装相应滤色片即可记录 gfp 荧光, 激光光源具有连续可调光谱, 对荧光标记具有更广泛的适用性. 通过改变光路设计亦可实现无遮蔽激发, 使该检测方法用于更大体形动物甚至人体成为可能. 本实验建立的荧光活体成像技术是一个初步的模型, 为深入研究肿瘤的发生、迁移及早期诊断打下基础.

参 考 文 献

- Hasting J W. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene*, 1996, **173** (1): 5~11
- Inouye S, Tsuji F I. *Aequorea* green fluorescent protein: Expression of the gene and fluorescent characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters*, 1994, **341** (2): 277~280
- Wang S, Hazelrigg T. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* organism. *Nature*, 1994, **369** (6479): 400~403
- Ogawa H, Inouye S, Tsuji F I. Location, trafficking, and temperature dependence of the *Aequorea* green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (24): 11899~11903
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991. 304~316
- Cheng L, Fu J, Tsukamoto A, *et al.* Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 1996, **14** (6): 606~609
- Chishima T, Miyagi Y, Wang X, *et al.* Cancer invasion and micrometastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression. *Cancer Res*, 1997, **57** (10): 2042~2047
- Yang M, Baranov E, Jiang P. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (3): 1206~1211

Whole-body Fluorescent Imaging of GFP-expressing Tumors^{*}

JIN Ying, XING Da^{**}

(Institute of Laser and Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract Human lung cancer cells (ASTC-a1) were infected with EGFP plasmid vectors, and incubated in RPMI 1640 culture medium supplemented with 15% FCS and 800 mg/L G418. Strong fluorescence of five cell clones were observed after several generations. The flow cytometry was used to determine the GFP expression stability, the results showed that there was significant difference between 2# (3#) and 4# (5#) ($P < 0.01$). The nude mouse, 6 weeks of age, was injected s. c. with a single dose of 3×10^6 infected tumor cells. The GFP fluorescence was directly excited by 488 nm argon ion laser and recorded by digital camera with 530 nm long pass filter.

Key words green fluorescence protein (GFP), human lung cancer cells (ASTC-a1), flow cytometry, nude mouse

^{*} This work was supported by a grant from The National Science Fund for Distinguished Young Scholars of China (69725009).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-20-85210089, E-mail: xingda@snnu.edu.cn

Received: May 15, 2002 Accepted: July 23, 2002

欢迎订阅 欢迎投稿 《生物化学与生物物理进展》2003 年征订启事

《生物化学与生物物理进展》是国内外公开发行的全国性学术期刊,由中国科学院生物物理研究所和中国生物物理学会共同主办。主要报道生物化学、分子生物学、生物物理学及神经科学等领域的国内外最新进展,设有微型述评、综述与专论、研究报告、技术与方法、研究快报等十几个栏目。本刊自 1974 年创刊以来,始终以推动生命科学发展和促进国家经济建设为宗旨,不断提高学术、编辑和出版质量。经过二十余年的不懈努力,已成为一个在我国生命科学、基础医学及其他相关领域具有一定影响、深受广大读者欢迎及专家好评的学术期刊。1999 年荣获首届中国期刊奖提名奖,被 SCIE、CA 等国际权威检索系统收录。ISI 最新出版的期刊引征报告表明,本刊 2001 年影响因子(即 SCI 影响因子) 0.112。

本刊国际连续出版物号: ISSN 1000-3282, 国内统一刊号: CN 11-2161/Q, 邮发代号: 2-816。目前为双月刊(逢双月 20 日发行),国际标准开本(210 mm × 297 mm),164 页,每本订价 ¥25.00 元(全年 150.00 元)。若错过邮局订阅,请直接与编辑部联系。

编辑部地址: 北京朝阳区大屯路 15 号中国科学院生物物理研究所

邮政编码: 100101

电话: (010) 64888459

E-mail: prog@sun5.ibp.ac.cn

网址: <http://www.pibb.ac.cn>