



一种新型细胞微阵列的制作和应用*

范松青 肖炳燚 曹利熊 炜 欧阳珏 谭琛 李伟芳 唐珂 李桂源**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 为了高通量地检测大量培养细胞中基因原位表达, 发明了一种制作细胞微阵列的新方法, 成功地制作含 20 种细胞系共 100 个供体细胞石蜡混合物点阵的细胞微阵列. 免疫组化检测 P53, P21, PTEN、P16 基因在细胞微阵列中的蛋白质表达. 原位杂交检测 BRD7、NGX6 基因在细胞微阵列中 mRNA 原位表达. 建立了 P53、P21、PTEN、P16 蛋白和 BRD7、NGX6 mRNA 在不同培养细胞中的原位表达谱. 细胞微阵列为基因功能研究提供一种新的高通量工具. 细胞微阵列可广泛用于 DNA、RNA 和蛋白质水平上的基因原位表达研究. 细胞微阵列还可用于筛选药物作用靶标的研究.

关键词 细胞微阵列, 原位杂交, 免疫组化

学科分类号 Q78

随着人类基因组计划的完成, cDNA 微阵列、组织微阵列等技术能高通量、快速、大规模地研究新基因在大量肿瘤和正常组织中的原位表达, 阐明新基因的生物学功能, 筛选肿瘤临床诊断、治疗和预后预测新的分子靶标^[1]. 研究细胞中各种基因的功能和大规模筛选各种蛋白质或药物分子靶点时, 尽管流式细胞仪等高通量仪器能为各种细胞中不同分子的研究筛选提供强有力工具, 但这些方法需要培养细胞并维持活细胞状态, 是一种劳力费钱的方法^[2~4]. 此外, 细胞体外培养传代可导致细胞蛋白质表型和基因型改变, 引起实验误差, 这种方法需要复杂和昂贵的仪器设备, 限制了其应用范围. 目前, 培养细胞制备石蜡细胞微阵列的方法包括: 细胞离心沉淀后, 纸包固定的石蜡包埋法, 琼脂糖为基质固定的石蜡包埋法, 琼脂糖平板上凿孔, 孔内灌注细胞固定的石蜡包埋法^[5,6]. 这些方法均有欠缺, 前两种方法导致细胞过于弥散, 第三种方法能得到均匀一致、密度较高的供体细胞, 但这种方法用于制作细胞或组织微阵列时, 仍需从细胞石蜡块中穿取供体细胞. 由于培养细胞无间质纤维, 穿取供体细胞时常可导致细胞石蜡块碎裂、分散, 不利于重复利用供体细胞石蜡块制作细胞微阵列^[5]. 因此, 研究细胞微阵列制作新技术, 用于高通量地检测不同细胞中基因的原位表达具有重要实用价值. 我们研究发明一种细胞微阵列制作新方法(专利申请号: 200410022819.4), 并应用于同一实验条件下, 研究基因在不同细胞类型中的原位表达.

1 材料与方法

1.1 材料

本实验室引进或稳定转染并鉴定的细胞

Table 1 The cell lines for construction of cell microarrays

Cell lines	
1	African green monkey kidney cell lines: COS7
2	Mouse fibroblast cell lines: 3T3
3	China nasopharyngeal carcinoma cell lines-1: CNE-1
4	Human nasopharyngeal carcinoma cell lines-1: HNE1
5	Human cervical carcinoma cell lines: HeLa
6	Human glioblastoma cell lines: U251
7	Rat glioma cell lines: C6
8	Human colorectal adenocarcinoma cell lines: HT29
9	Human colorectal adenocarcinoma cell lines: SW480
10	Human osteogenic sarcoma cell lines: Soas-2
11	Human osteosarcoma cell lines: MG-63
12	Human chronic myelogenous leukemia cell lines: K562
13	Mouse melanoma cell lines: B16
14	Hamster kidney cell lines: BHK-21
15	Human kidney cell lines: 293
16	Human nasopharyngeal carcinoma cell lines-1 transfected with the BRD7 gene: CNE-1-BRD7
17	Human nasopharyngeal carcinoma cell lines-1 transfected with the LMP-1 gene: CNE-1-LMP1
18	Clone-2 of human colorectal adenocarcinoma cell lines transfected with the NGX6 gene: HT29-NGX6-2
19	Clone-10 of human colorectal adenocarcinoma cell lines transfected with the NGX6 gene: HT29-NGX6-10
20	Human glioblastoma cell lines transfected with the LRRRC4 gene: U251-LRRRC4

* 国家“十五”科技攻关项目(2002BA711A03)和国家自然科学基金资助项目(30200312, 30270429).

** 通讯联系人. Tel: 0731-4805383, E-mail: ligy@xyssm.net
收稿日期: 2004-02-17, 接受日期: 2004-03-28

系共 20 种(表 1). 石蜡切片胶带转移系统(Instrumedics, Inc). EnVision 两步法免疫组化检测试剂盒(DAKO 公司). 鼠抗人单克隆抗体 P53、P21、PTEN 和 P16 (Santa Cruz 公司). 生物素随机引物标记试剂盒(KPL 公司). 原位杂交检测试剂盒(TSA 信号放大系统, PE 公司).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、固定、脱水: 含 15% 胎牛血清的 1640 培养基培养细胞, 每种细胞用 100 cm² 培养瓶培养 5 瓶. 细胞形态良好, 待细胞长至 90%, 细胞计数达 1×10^9 /ml 时, 洗涤并收集细胞, 移入 1.0 ml Tube 管中, 离心, 1 500 r/min, 10 min, 弃去 D-Hank 液, Tube 管中加入 1.0 ml 10% 多聚甲醛吹散细胞为单细胞悬液, 4℃ 固定 18 ~ 20 h. 依次按以下 6 个步骤梯级乙醇脱水, 70% 乙醇(含 0.5% 伊红染料, 使细胞染成红色便于观察和操作) 40 min, 80% 乙醇 40 min, 90% 乙醇 45 min, 95% 乙醇 45 min, 100% 乙醇 60 min, 100% 乙醇 60 min. 每次脱水后, 离心 2 000 r/min, 每次 10 min. 弃去前一步的脱水剂.

1.2.2 制作细胞浸蜡模具, 细胞透明、浸蜡: 定制细胞浸蜡模具, 楔形薄壁透明的塑料模具规格为底部直径 1.0 mm, 上部直径 3.0 mm, 长度 40 mm. 细胞脱水后, 离心, 2 000 r/min, 10 min, 松节油透明(二甲苯具有毒性, 用松节油代替二甲苯) 60 min × 2. 离心 2 000 r/min, 10 min, 吸去上层 0.6 ml 松节油, 反复轻轻敲打细胞形成松节油细胞悬液, 细胞悬液移入底部直径为 1.0 mm 楔形透明塑料浸蜡模具中, 模具底部塞有少量棉花阻挡细胞并有利于松节油经模具底部流出, 在重力作用下, 细胞均匀沉积在楔形模具中. 装有细胞的模具直立放置于模具架上, 依次浸入低熔点石蜡容器中(熔点为 58℃) 浸蜡 30 min, 45 min, 60 min. 楔形模具中的细胞石蜡混合物, 置于 4℃ 贮存.

1.2.3 石蜡细胞混合物的制备: 楔形模具中的细胞石蜡混合物放置 37℃、30 min, 软化细胞石蜡混合物. 截去模具下端, 止血钳夹住楔形模具上端逐步往下移动, 从切口端挤出直径 1.0 mm 条形细胞石蜡混合物(图 1a). 截切至 5 mm/段, 可直接作为供体细胞用于制作细胞微阵列, 或编号保存于 Tube 管中, 4℃ 长期保存.

1.2.4 细胞微阵列受体蜡块的制备: 石蜡(58℃, Leica 公司)与蜂蜡(9:1)混合制作 2.0 cm ×

2.0 cm × 2.0 cm 原始受体蜡块. 间距为 2 mm, 含 100 个点阵的网格纸贴于受体蜡块上引导制作受体孔, 自制打孔针在受体蜡块打孔, 受体孔直径 1.0 mm, 深度 5.0 mm. 直径 1.0 mm, 长度 5 mm 条形供体石蜡细胞混合物移入受体石蜡块受体孔. 每种细胞系制作 5 个相同的细胞石蜡混合物点阵, 全部受体孔中填满石蜡细胞混合物后, 受体蜡块水平放置于 37℃ 60 min, 使石蜡细胞混合物与受体蜡块受体孔紧密融合. 载玻片轻压受体蜡块表面, 使所有供体细胞石蜡混合物处于同一平面.

1.2.5 细胞微阵列切片的制作, 苏木素-伊红(HE)染色及质量检测: 石蜡胶带转移系统辅助切片, 按胶带转移系统说明书进行. 溶解剥离胶带后的切片, 即可常规脱蜡水化, 进行各种研究, 长期保存的切片表面覆盖薄层石蜡, 4℃ 贮存. 随机抽取一张切片进行 HE 染色, 图像分析系统对所有细胞系的点阵图像进行计数分析, 高倍镜下观察细胞形态特点.

1.2.6 免疫组化检测 P53, P21, P16 和 PTEN 蛋白质在细胞微阵列中的表达: 免疫组化方法参照文献[6]. 切片脱蜡至水, 3% 的 H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶 30 min, 微波抗原修复 20 min. 小鼠抗人单克隆抗体 P53, P21, P16 和 PTEN (Santa Cruz 公司) 4℃ 温盒中过夜, PBS 洗, 3 × 5 min, 二抗室温孵育 45 min, 3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)显色, 镜下控制显色反应, 苏木素复染.

1.2.7 原位杂交检测 BRD7 和 NGX6 基因在细胞微阵列中的 mRNA 表达: 在 BRD7 (GenBank: AF179285) 和 NGX6 (GenBank: AF188239) 基因阅读框内设计引物, PCR 分别扩增 350 bp 和 400 bp 大小目的片段, 胶回收, 生物素随机引物标记法标记探针. 原位杂交按文献[7, 8]并作部分修改, 切片脱蜡后, DEPC 水洗, 加入 3% 双氧水, 室温, 15 min. 0.05% 蛋白酶 K, 37℃ 15 min. 42℃ 预杂交 3 h. 含生物素标记探针(20 mg/L)的杂交液 95℃ 变性 10 min, 置冰上, 10 min, 杂交液 100 μl/片, 封口膜覆盖, 42℃ 杂交 18 h. SA-HRP (链霉卵白素-辣根过氧化物酶) 室温 30 min, 信号放大试剂(Biotinyl Tyamid), 室温 10 min. SA-HRP, 室温 30 min. 3',3'-二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木素复染. 看家基因 GAPDH 的寡核苷酸探针作阳性对照, 以不加探针的预杂交液作实验阴性对照.

1.2.8 结果判断: 按阳性细胞数的百分率进行半

定量, 着色细胞 <5% 为 0 分, 5% ~ 25% 为 1 分, 26% ~ 50% 为 2 分, >50% 为 3 分, P53 阳性表达细胞大于 10% 为阳性.

2 结 果

2.1 供体细胞石蜡混合物和细胞微阵列切片

发明一种制作不同规格供体细胞的新方法, 这种石蜡细胞混合物的供体细胞不但可用于制作细胞

微阵列和组织微阵列, 并提供一种保存细胞的新方法. 成功地制作含 20 种细胞系共 100 个石蜡细胞混合物点阵的细胞微阵列受体蜡块和切片 (图 1b 和图 1c). 细胞微阵列切片 HE 染色, 镜下观察. 结果证实: 细胞结构清晰, 细胞均匀一致, 形态整齐, 高倍镜下细胞核膜和核仁清晰可见. 细胞点阵计数结果为每个细胞点阵含 1 150 ~ 1 324 个细胞 (图 2a 和图 2b).

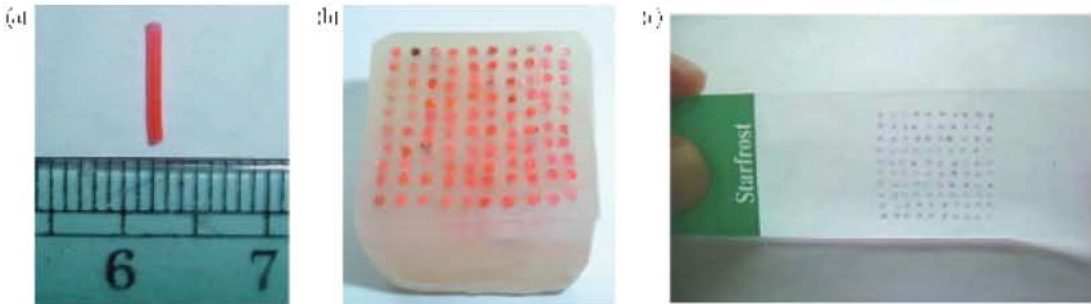


Fig. 1 Mixture of the graft cells and paraffin, and the receptive block and section of the cell microarrays
(a) Mixture of the graft cells and paraffin was 1.0 mm diameter; (b) The receptive block had 100 spot arrays of the mixtures of the graft cells and paraffin; (c) HE-stained section of the cell microarrays.

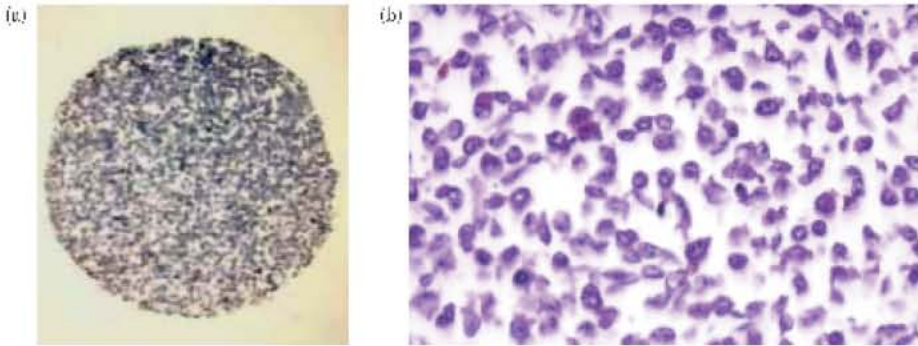


Fig. 2 Low and high magnification images of the HNE1 cells on the HE-stained section of the cell microarrays
(a) HNE1 cells, HE staining, 4 ×; (b) HNE1 cells, HE staining, 20 ×.

2.2 相关基因在细胞微阵列中蛋白或 mRNA 表达

细胞微阵列进行原位杂交和免疫组化检测, 结果证实细胞微阵列无细胞掉片 (图 3 和图 4), 检测结果见表 2 和表 3. PTEN, P53, P21 和 P16 蛋白在 20 种不同细胞系中的阳性表达率分别为 45% (9/20), 55% (11/20), 85% (17/20), 65% (13/20). BRD7 和 NGX6 基因在细胞微阵列中的 mRNA 阳性表达率分别为 60% (12/20), 65% (13/20).

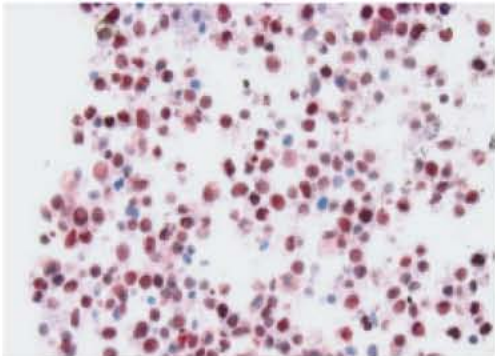


Fig. 3 HT29 cells, ICH, P53 positive expression (+ + +)
AEC staining, 20 ×

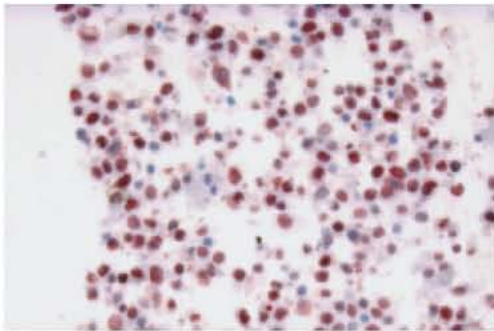


Fig. 4 HT29 cells, ICH, P21 positive expression (+ + +)
AEC staining, 20 ×

Table 2 Expression profiles of P53, P21, PTEN and P16 protein in the 20 kinds of cell lines

Cell	PTEN	P53	P21	P16
COS7	0	0	2	2
3T3	0	3	3	0
CNE1	0	0	1	1
HNE1	1	0	1	1
B16	0	0	3	0
HeLa	0	0	2	1
Soas-2	1	0	0	1
U251	1	3	3	0
C6	2	3	3	1
HT29	0	3	3	0
K562	1	3	3	0
MG63	0	3	1	1
SW480	0	3	3	0
293	0	0	2	1
BHK-21	1	3	2	0
CNE1-LMP1	1	0	0	1
CNE1-BRD7	0	0	0	1
HT29-NGX6-2	0	3	3	1
HT29-NGX6-10	2	3	2	1
U251-LRRC4	1	3	3	1

Table 3 Expression profiles of BRD7 and NGX6 mRNA in the 20 kinds of cell lines

Cell	BRD7	NGX6	Cell	BRD7	NGX6
COS7	0	0	K562	1	3
3T3	2	2	MG63	1	1
CNE-1	0	0	SW480	1	1
HNE1	1	1	293	0	1
B16	1	1	BHK-21	0	0
HeLa	1	0	CNE-1-LMP1	1	0
Soas-2	0	0	CNE-BRD7	2	0
U251	1	1	HT29-NGX6-2	0	2
C6	2	2	HT29-NGX6-10	0	3
HT29	0	1	U251-LRRC4	1	1

3 讨 论

目前的微阵列技术，不能满足于大规模原位检测培养细胞和各种永生化的良恶性细胞系中的蛋白质和基因表达。细胞微阵列与组织微阵列一样，可用于基因原位表达的研究，如原位杂交、原位PCR、免疫组化、免疫荧光等^[4~6]。此外，细胞微阵列还具有组织微阵列不可替代的用途^[4~6]：a. 不同细胞系各自表达相应高水平的相关蛋白，包含不同蛋白质表达特征细胞组成的细胞微阵列可视为一种蛋白质微阵列。细胞微阵列可作为蛋白质微阵列的替代工具用于证实药物作用靶点；b. 研究改变细胞生理功能的基因产物；c. 研究基因转染细胞的基因构型改变；d. 筛选存在转染目的基因的阳性克隆细胞。

组织微阵列已高通量地用于各种原位表达研究，但许多特异性分子靶标首先是在细胞系中发现和表达，因此在制作组织微阵列时常需考虑利用这些培养细胞作为原位表达的阳性对照分子标志。组织微阵列中含有与肿瘤组织匹配的一系列细胞系，在同一切片中研究基因在体内与体外组织中表达，是对组织微阵列这种高通量原位表达技术的进一步完善^[9,10]。制作细胞微阵列或组织细胞混合微阵列的关键在于，微阵列切片能提供可研究的供体细胞数目和质量。细胞微阵列为高通量地原位定量、半定量检测蛋白质和RNA表达，DNA扩增以及其他各种细胞原位染色研究提供一种简单，快速的工具。细胞微阵列不但可弥补组织微阵列技术的不足之处，而且可与组织微阵列和cDNA微阵列共同用于基因的功能研究。

目前文献报道制作石蜡细胞微阵列的技术仍存在诸多缺陷^[5,6]。我们发明一种简单实用制作供体细胞石蜡混合物和细胞微阵列的新方法，可直接制作出不同规格的供体石蜡细胞混合物。这种条形供体石蜡细胞混合物有3种用途：a. 提供大量供体细胞石蜡混合物用于制作细胞微阵列；b. 提供用于组织微阵列的阳性或阴性对照分子标志物的供体细胞；c. 这种石蜡细胞均匀混合物与组织石蜡块一样能长期保存，石蜡细胞混合物保存于Tube管，4℃长期保存，这种供体石蜡细胞混合物的制作为长期保存各种细胞提供一种经济简单的新方法。

我们利用这一方法成功地制备含20种不同组织和器官来源的细胞微阵列，经HE染色，细胞计数结果显示，每一个供体细胞石蜡混合物点阵的细

胞数为 1 150 ~ 1 324 个, 与文献报道基本一致^[5]. 高倍镜下观察显示: 细胞形态清楚, 无挤压变形, 核膜、核仁清晰可见. 免疫组化检测抑癌基因 P53, P16, P21 和 PTEN 在细胞微阵列中的原位表达, 建立 P53, P16, P21 和 PTEN 基因在各种细胞中的蛋白质原位表达谱, 其结果与 P53, P16, P21 和 PTEN 基因在相应细胞中的原位表达特征一致^[11]. 原位杂交检测我室克隆的新基因 BRD7 和 NGX6 基因在各种细胞系中的 mRNA 表达, 与前期实验结果完全相符^[12,13]. 不同培养细胞系中 BRD7 和 NGX6 基因原位表达谱的建立, 为体外研究 BRD7 和 NGX6 基因功能, 选用最佳细胞系提供非常有用的信息.

细胞微阵列这一高通量工具与常规检测方法相比, 具有省时, 操作简单方便, 极大地节约试剂, 而且实验结果可比性好. 我们发明这种简单实用、低成本的供体细胞石蜡混合物和细胞微阵列的制作新方法具有推广应用的价值.

参 考 文 献

- 1 Kallioniemi O P, Wagner U, Kononen J, *et al.* Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*, 2001, **10** (7): 657 ~ 662
- 2 Ziauddin J, Sabatini D M. Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature*, 2001, **411** (6833): 107-110
- 3 Rieseberg M, Kasper C, Reardon K F, *et al.* Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56** (3~4): 350

- ~ 360
- 4 Oode K, Furuya T, Harada K, *et al.* The development of a cell array and its combination with laser-scanning cytometry allows a high-throughput analysis of nuclear DNA content. *Am J Pathol*, 2000, **157** (3): 723 ~ 728
- 5 Moskaluk C A, Stoler M H. Agarose mold embedding of cultured cells for tissue microarrays. *Diagn Mol Pathol*, 2002, **11** (4): 234 ~ 238
- 6 Abbott R T, Tripp S, Perkins S L, *et al.* Analysis of the PI-3-kinase-PTEN-AKT pathway in human lymphoma and leukemia using a cell line microarray. *Mod Pathol*, 2003, **16** (6): 607 ~ 612
- 7 Moorman A F, Houweling A C, de Boer P A, *et al.* Sensitive nonradioactive detection of mRNA in tissue sections: novel application of the whole-mount *in situ* hybridization protocol. *J Histochem Cytochem*, 2001, **49** (1): 1 ~ 8
- 8 Holm R. A highly sensitive nonisotopic detection method for *in situ* hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2000, **8** (2): 162 ~ 165
- 9 Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest*, 2001, **81** (10): 1331 ~ 1338
- 10 Moskaluk C A. Standardization of clinical immunohistochemistry: why, how, and by whom? *Am J Clin Pathol*, 2002, **118** (5): 669 ~ 671
- 11 Schumacher U, Adam E, Feldhaus S, *et al.* Cell differentiation and chemotherapy influence p53 and Mdm2 immunoreactivity in human HT29 colon cancer cells grown in scid mice. *Cancer Lett*, 2001, **166** (2): 215 ~ 221
- 12 Li J, Tan C, Xiang Q, *et al.* Proteomic detection of changes in protein synthesis induced by NGX6 transfected in human nasopharyngeal carcinoma cells. *J Protein Chem*, 2001, **20** (3): 265 ~ 271
- 13 Peng C, Liang S P, Li G Y, *et al.* Researching a novel NPC-related candidate suppressor gene BRD7 by two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF-MS. *Acta Biochem Biophys Sin*, 2003, **35** (9): 816 ~ 822

A New Method to Construct The Cell Microarrays and Its Application *

FAN Song-Qing, XIAO Bing-Yi, CAO Li, XIONG Wei,

OUYANG-Jue, TAN Chen, LI Wei-Fang, TANG Ke, LI Gui-Yuan **

(Cancer Research Institute, Xiangya Medical School, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract To investigate the *in situ* expression of the genes in large numbers of cultured cells, a high-throughput technique was established. A novel method of constructing the cell microarrays was devised and the cell microarrays including 100 spot arrays of mixture of the graft cells and paraffin from 20 kinds of cell lines was made successfully. Expression of P53, P21, PTEN and P16 protein in the cell microarrays was detected by immunohistochemistry. Meanwhile, expression of BRD7 and NGX6 mRNA in the cell microarrays was estimated by *in situ* hybridization. *In situ* expression profiles of P53, P21, PTEN, P16 protein and BRD7, NGX6 mRNA in different kinds of cultured cells were established. The cell microarrays provided a new high-throughput tool for biological function studies of the genes. The cell microarrays could be widely used the *in situ* analysis of the gene expression at the DNA, RNA, and protein level. In additional, the cell microarrays could also be applied to estimate drug target validations.

Key words cell microarrays, *in situ* hybridization, immunohistochemistry

* This work was supported by grants from The State "Ten-five" 863 High Technology R&D Project of China (2002BA711A03) and The National Natural Sciences Foundations of China (30200312 and 30270429).

** Corresponding author. Tel: 86-731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

Received: February 17, 2004 Accepted: March 28, 2004