

小鼠囊胚与黑色素瘤细胞共培养模型优化

张弘 丁晓燕 方廖琼 王智彪* 乔海

(超声医学工程重庆市市级重点实验室, 重庆医科大学生物医学工程系, 重庆 400016)

摘要 采用基因转染的方法, 将 *EGFP* (增强型绿色荧光蛋白) 基因导入 B16 黑色素瘤细胞中, 筛选出稳定表达绿色荧光蛋白的 *EGFP*-B16 细胞株, 利用 RT-PCR 法检测细胞中 *EGFP* 基因的 mRNA 表达, 流式细胞仪分析荧光细胞阳性率。利用 *EGFP*-B16 细胞与 C57BL/6 小鼠囊胚共培养, 在激光共聚焦荧光显微镜下观察, 比普通倒置显微镜下观察 B16 细胞与 C57BL/6 小鼠囊胚共培养的模式能更加直观的表达胚胎与肿瘤的相互作用关系。

关键词 *EGFP* (增强型绿色荧光蛋白); 基因转染; 囊胚; 肿瘤; 共培养

胚胎植入子宫内膜与肿瘤侵袭正常组织在病理生理过程、细胞侵袭相关基因表达、细胞凋亡、免疫逃逸等方面都具有极大的相似性。为了从细胞整体调控水平上认识胚胎与肿瘤这两种看似对立却极其相似的生命形式, 后晓南等^[1]首次建立了小鼠囊胚与未经任何处理的肿瘤细胞体外共培养的模式, 发现胚胎在具有侵袭能力的肿瘤细胞层上粘附、扩展, 将增殖旺盛的肿瘤细胞阻止在自己的空间之外。李大强^[2]、王焕英^[3]用该模型对胚胎侵袭肿瘤细胞现象进行了研究。肿瘤与早期胚胎具有高度相似性, 如果没有有效细胞识别标志来分辨来源于肿瘤和胚胎的细胞, 将制约该研究的深入。

本研究通过基因转染技术, 将 *EGFP* (增强型绿色荧光蛋白) 基因转染进入来源于 C57BL/6 小鼠的 B16 黑色素瘤细胞, 筛选出稳定表达绿色荧光蛋白的 *EGFP*-B16 细胞株。利用 *EGFP*-B16 细胞与 C57BL/6 小鼠的囊胚共培养, 旨在优化小鼠囊胚与肿瘤细胞体外共培养模型, 更直观显示胚胎与肿瘤的相互作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及动物来源

C57BL/6 小鼠 B16 黑色素瘤细胞株, 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。清洁级 C57BL/6 小鼠 10 只, 雌雄各半, 4~6 周龄, 16~18 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 质粒转染及阳性细胞筛选

取对数生长期 B16 细胞, 以每孔 0.5×10^5 个细胞接种于 24 孔板 (Costar 公司), 每孔加 500 μ l 含 10% 胎牛血清 (Gibco 公司) 的 PRIM 1640 (Gibco 公司), 于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 小时。按 GenEscortII

转染试剂 (南京慧基生物技术公司) 说明书将 *EGFP* 质粒 pGensil-1 (武汉晶赛生物公司) 转染入细胞。

转染 24 小时后换含有 1 000 μ g/ml G418 (Gibco 公司) 的选择性培养基培养, 细胞汇合度达 70% 后, 用 0.25% 胰蛋白酶 (Hyclone 公司) 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 代以后, 检测转染 *EGFP* 基因后的 B16 细胞 (*EGFP*-B16 细胞) 的形态以及基因表达情况。

1.3 转染后 B16 细胞中 *EGFP* 基因的表达情况

1.3.1 RT-PCR 法检测 *EGFP* 基因的 mRNA 表达情况

用 RT-PCR kit (TaKaRa 公司) 提取 RNA, 进行逆转录反应, 用 PCR 仪 (BIO-RAD, 美国) 进行 PCR 扩增, 琼脂糖电泳鉴定 PCR 产物, 凝胶成像仪 (BIO-RAD, 美国) 显影。

1.3.2 激光共聚焦荧光显微镜观察细胞形态及荧光情况

接种 1×10^5 个 *EGFP*-B16 细胞于 24 孔板中, 24 小时后, TCL SP2 激光共聚焦荧光显微镜 (Leica, 德国) 观察细胞形态及荧光情况。

1.3.3 流式细胞仪分析 *EGFP* 基因的蛋白表达情况

收集 2×10^6 个 *EGFP*-B16 细胞, 流式细胞仪 (Becton-Dickinson, 美国) 检测表达绿色荧光蛋白阳性细胞率。

1.4 小鼠囊胚的获得及共培养

C57BL/6 小鼠在 25°C 环境下饲养, 光照周期 14L : 10D。腹腔注射 PMSG (孕马血清促性腺激素) (宁波第二激素厂) 7.5U/只, 48 h 后腹腔注射 hCG (大

收稿日期: 2010-07-05 接受日期: 2010-09-08

重庆市自然科学基金计划 (No.2008BB5361) 和重庆市教育委员会科学技术研究 (No.KJ090302) 资助项目

* 通讯作者。Tel: 023-68485021, E-mail: wangzhibiao@haifu.com.cn

绒毛膜促性腺激素)(宁波第二激素厂)7.5 U/只, 此后雌鼠和雄鼠按 1:1 合笼过夜, 次晨发现阴栓者为第一天(d_1)孕鼠。取 d_4 小鼠, 颈椎脱臼法人道处死, 75% 酒精常规消毒, 剪取双侧子宫, 用 1 ml 注射器吸取 D-MEM/F-12 (Hyclone 公司)培养基冲洗子宫腔。在 SZX12 体视显微镜(Olympus, 日本)下收集发育至中晚期的囊胚。方法参考《小鼠胚胎操作实验手册》^[4]。

将胚胎移入到 EGFP-B16 细胞铺底的培养皿中, 每个皿中放 10 枚胚胎。将培养皿置于无菌湿盒内, 于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 每 24 h 添换含 20% 胎牛血清的 D-MEM/F-12 培养液, 激光共聚焦荧光显微镜下观察胚胎的发育以及肿瘤细胞的变化。小鼠囊胚与 B16 细胞株共培养为对照, IX70 显微镜(Olympus, 日本)下观察。

2 结果

2.1 RT-PCR 法检测 EGFP 基因的 mRNA 表达情况

RT-PCR 结果显示: B16 组及 EGFP-B16 组均扩增出内参基因 *GAPDH* 的条带, 大小为 311 bp, 见图 1 B16 组显示条带(中)。EGFP-B16 组除了内参条带外, 其下方 190 bp 处有一明显条带, 该条带为 *EGFP* 目的基因, 见图 1, EGFP-B16 组显示条带(右)。

2.2 激光共聚焦荧光显微镜观察细胞形态及荧光情况

激光共聚焦荧光显微镜下观察, 细胞内 EGFP 高表达, 见图 2。

2.3 流式细胞仪检测细胞中 EGFP 蛋白的表达情况

流式细胞仪检测 EGFP-B16 细胞中 99.88% 为绿色荧光蛋白表达阳性, 见图 3。

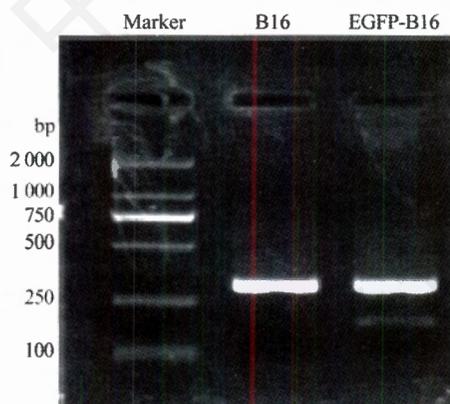


Fig.1 The expression of *EGFP* mRNA in EGFP-B16 and B16 cells detected by RT-PCR

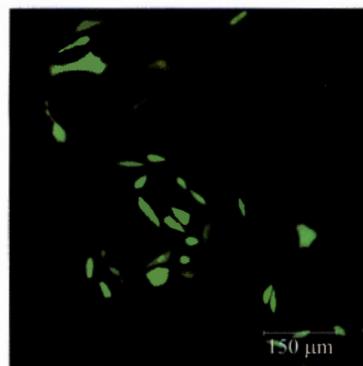


Fig.2 The expression of EGFP in EGFP-B16 cells observed by LCFM (20×10)

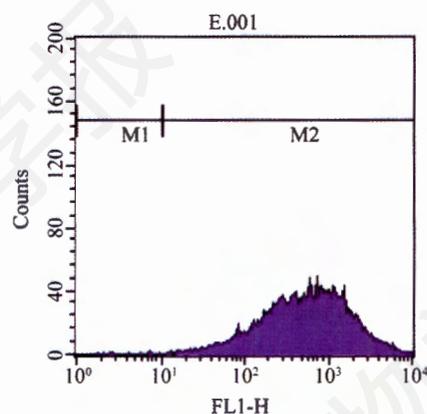


Fig. 3 The protein expression of the *EGFP* gene in cells analysed by FC

2.4 共培养模型

激光共聚焦荧光显微镜下观察 EGFP-B16 与囊胚共培养 120 h 后, 囊胚植入 EGFP-B16 细胞层中, 并且扩展, 无荧光的胚胎被呈现绿色的 EGFP-B16 细胞包围, 界限清晰, 见图 4。

3 讨论

绿色荧光蛋白(Green Fluorescence Protein, GFP)首先在水母中被发现, 其发出的绿色荧光在荧光显微镜下即可观察到, 在多种异源生物中表达且无细胞毒性, 在热、极端 pH 值和化学变性剂等苛刻条件下都能稳定表达, 被广泛用于肿瘤研究。增强型绿色荧光蛋白(Enhance Green Fluorescence Protein, EGFP)产生的荧光较普通绿色荧光蛋白强 100 倍^[5], 具有广阔的应用前景。

后晓南等^[1]首次建立了小鼠囊胚体外与未经任何处理的人肺癌上皮细胞株 A549 共培养模型, 发现

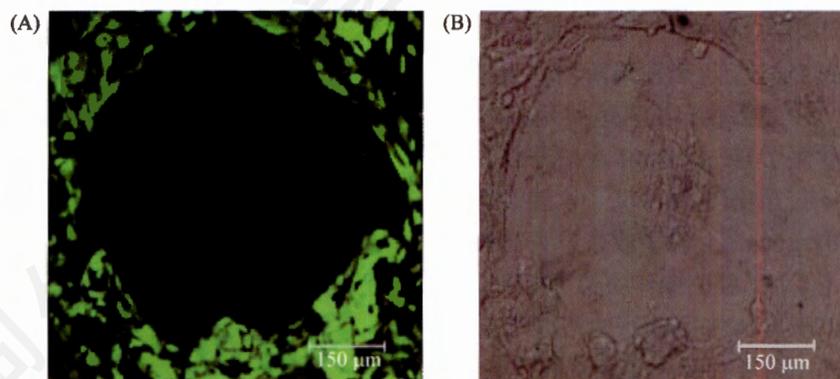


Fig.4 The blastosphere expanded on the EGFP-B16 cells layer observed by LCFM (A) and phase contrast microscope (B)(20×10)

胚胎可植入肿瘤细胞层,并扩展。李大强等^[2]发现在小鼠成纤维细胞与小鼠囊胚共培养以及不同侵袭转移潜能的肝癌细胞与小鼠囊胚共培养模型中,该现象普遍存在。但是,通过普通倒置显微镜难以清晰分辨交界区域的肿瘤和胚胎细胞。除形态学观察外,寻求标记区分胚胎与肿瘤细胞也面临一定的困难。肿瘤与早期胚胎细胞共同表达多种标志物,比如整合素^[6,7]、焦点粘附激酶 FAK^[8,9]、基质金属蛋白酶 MMP-9^[10,11]、CD44^[12,13]、OCT-4^[14]等,此共培养模型中对这些标志物的检测可能出现假阳性。

本研究借助目前成熟的基因转染技术,获得了稳定表达绿色荧光蛋白的 EGFP-B16 细胞株,在激光共聚焦荧光显微镜下可清楚的看到肿瘤细胞呈现绿色,为共培养中的肿瘤细胞设置了一个明确且可稳定表达的标记物。

后晓南^[1]、李大强^[2]使用的囊胚源于 KM 小鼠,肿瘤细胞源于人,成纤维细胞来于 NIH 小鼠,这无疑留下一个疑惑。这些 KM 小鼠囊胚与人肿瘤细胞或 NIH 小鼠成纤维细胞是否因为异种排斥而产生如此现象?本研究选取 C57BL/6 小鼠囊胚,选择了由 Filder 等^[15]建立的 C57BL/6 小鼠来源的 B16 黑色素瘤细胞株。结果显示, C57BL/6 小鼠囊胚与 B16 黑色素瘤细胞共培养后能继续自己的生命进程,且能将高度恶性的肿瘤细胞阻挡在自己的生长空间之外。

本研究建立的共培养模型,在激光共聚焦荧光显微镜下,能明确显示胚胎与肿瘤细胞界限,清晰界定胚胎的范围,直观表现出胚胎在肿瘤细胞中植入、扩展的生命现象,为进一步研究提供了新的材料和思路。随着基因转染技术的进步和广泛应用,多种荧光蛋白层出不穷,比如红色荧光蛋白^[16],经过遗传基因改造的各种颜色的荧光动物陆续出现。荧光动物遗传基因被改造,不仅通体细胞表达荧光,可以在活

体观察荧光,其胚胎也带有荧光。另外,胚胎直接基因注射方法也使得荧光胚胎的获得越发方便,这为进一步优化该模型奠定了基础。Hoffman^[17]在总结荧光蛋白在肿瘤研究中的作用时提出,利用转染后表达荧光蛋白的肿瘤细胞和不同颜色荧光蛋白的转基因小鼠,可以获得肿瘤细胞与宿主细胞相互作用的双色图像,这为胚胎与肿瘤的相互作用研究模型优化也提供了新的方向,使用表达红色荧光小鼠囊胚,与表达绿色荧光蛋白的肿瘤细胞共培养,通过荧光成像系统进行连续拍摄记录整个变化的过程,分析胚胎发育过程中与肿瘤细胞之间的相互作用,这可能为胚胎与肿瘤的相互作用研究带来新的突破。

参考文献(References)

- 1 后晓南,谭毅,赵劼,胡凯,白晋,王智彪.小鼠囊胚与肿瘤细胞共培养时的生长行为观察.第三军医大学学报 2001; 23 (8): 954-6.
- 2 李大强,王智彪,白晋,赵劼,胡凯,王媛,等.小鼠囊胚与不同侵袭转移潜能肝细胞系共培养模型的建立及生物学行为观察.中国病理生理杂志 2004; 20 (1): 32-7.
- 3 王焕英,赵劼,王媛,胡凯,姚紫薇,王智彪.与小鼠囊胚共培养后人子宫内黏膜癌细胞侵袭、粘附和运动性的变化.重庆医科大学学报 2005; 30 (1): 9-11.
- 4 Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. Manipulating The mouse embryo: A laboratory manual, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003, 201-3.
- 5 Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). Gene 1996; 173 (1): 33-8.
- 6 Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fässler R. Integrins in invasive growth. J Clin Invest 2002; 109(8): 999-1006.
- 7 Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. Development 1993; 119(4): 1175-86.
- 8 Owens LV, Xu LW, Craven RJ, Dent GA, Weiner TM, Kornberg L, et al. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125^{FAK}) in invasive human tumors. Cancer Res 1995; 55(13): 2752-5.
- 9 MacPhee DJ, Mostachfi H, Han R, Lye SJ, Post M, Caniggia I.

- Focal adhesion kinase is a key mediator of human trophoblast development. *Lab Invest* 2001; 81(11): 1469-83.
- 10 Sakata K, Shigemasa K, Nagai N, Ohama K. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. *In J Oncol* 2000; 17(4): 673-81.
- 11 Bass KE, Li HX, Hawkes SP, Howard E, Bullen E, Vu TK, *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression is upregulated during human cytotrophoblast invasion *in vitro*. *Dev Genet* 1997; 21(1): 61-7.
- 12 Günther U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zöller M, Haussmann I, *et al.* A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65(1): 13-24.
- 13 Goshen R, Ariel I, Shuster S, Hochberg A, Vlodavsky I, Groot N, *et al.* Hyaluronan, CD44 and its variant exons in human trophoblast invasion and placental angiogenesis. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(9): 685-91.
- 14 Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Bahrami AR. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer* 2007; 120(7): 1598-602.
- 15 Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival *in vivo*. *Cancer Res* 1975; 35: 218-24.
- 16 Shcherbo D, Merzlyak EM, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Ermakova GV, Solovieva E A, *et al.* Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat Methods* 2007; 4 (9): 741-6.
- 17 Hoffman RM. The multiple uses of cancer *in vivo* fluorescent proteins to visualize. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 796-806.

An Optimized Co-culture Model of Mouse Blastocysts and Melanoma Cells

Hong Zhang, Xiao-Yan Ding, Liao-Qiong Fang, Zhi-Biao Wang*, Hai Qiao

(Chongqing Key laboratory of Ultrasound in Medicine and Engineering of Chongqing Science and Technology Commission, Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract *EGFP* (Enhanced Green Fluorescent Protein) gene was transfected into B16 melanoma cells, and sorted out EGFP-B16 cells which expressed EGFP stably. *EGFP* mRNA was detected by RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) and EGFP expression was analysed by flow cytometry (FC). EGFP-B16 cells were used to co-culture with mouse blastocysts derived from C57BL/6 mouse. B16 cells co-cultured with C57BL/6 mouse blastocysts were served as control groups. The co-culture of EGFP-B16 cells and blastocysts observed under laser confocal fluorescent microscope (LCFM) was better to display the interaction of embryos and tumor cells than control groups observed under inverted microscope.

Key words EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein); gene transfection; blastocyst; tumor; co-culture

Received: July 5, 2010 Accepted: September 8, 2010

This work was supported by Natural Science Foundation of Chongqing (No.2008BB5361) and Science and Technology Research Project of Chongqing Education Committee (No.KJ090302).

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485021, E-mail: wangzhibiao@haifu.com.cn