

研究论文

可稳定表达*ZsGreen1*基因的正常细胞来源单核细胞株的构建

黄嘉莹 谭智海 颜梓淇 崔毅峙 王通 郭嘉慧*

(暨南大学生命与健康工程研究院, 广州 510632)

摘要 为探索构建可表达外源基因的正常细胞来源单核细胞株的可行方案, 该研究分别尝试以脂质体转染法、腺病毒载体感染法和含*Tet-On*调控元件的慢病毒载体感染法, 构建可表达绿色荧光蛋白的SC细胞株。经慢病毒感染和靶向扩增获得稳定表达目的基因的SC细胞后, 该研究进而验证了该细胞可否在PMA诱导下分化为典型的巨噬细胞。研究结果显示, 脂质体转染法和腺病毒载体感染法未能有效导入外源基因至SC细胞; 经慢病毒感染和靶向扩增, 该研究成功构建了2株可稳定表达*ZsGreen1*基因的SC细胞株(SC-*ZsGreen1*), 其*ZsGreen1*阳性表达率均高于95%; SC-*ZsGreen1*细胞与SC细胞经PMA处理后均具相似的巨噬细胞表型特征, 包括CD11b和CD14表达升高、吞噬能力上调和趋化因子IL-8分泌水平上升。综上, 该研究报道了一种构建可稳定表达外源基因的正常人外周血来源单核细胞株的可行方案。

关键词 正常细胞; 单核细胞; 稳定表达; 外源基因; *Tet-On*慢病毒

Establishment of Normal Cell-Derived Monocyte Cell Line Stably Expressing the *ZsGreen1* Gene

Huang Jiaying, Tan Zhihai, Yan Ziqi, Cui Yizhi, Wang Tong, Guo Jiahui*

(Institute of Life and Health Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract It is demanded in the field of immunology to establish monocyte cell lines derived from normal human cells that stably express exogenous genes. To address this question, we employed multiple methods to transfect the *ZsGreen1* gene into the normal human SC monocytic cells, including Lipofectamine® 3000, adenovirus and *Tet-on* element containing lentivirus. We found that the transfection/infection rates by using Lipofectamine® 3000 and adenovirus in SC cells were 0.66% and 0%, respectively. The infection rate of *Tet-on* lentivirus was 8.5% in SC cells. *ZsGreen1*⁺ SC cells (SC-*ZsGreen1* cells) were then screened out and cultured, resulting in the acquisition of two SC-*ZsGreen1* cell strains. Both strains reached over 95% of the positive *ZsGreen1* expression rate. Next, we used PMA to allow these cells to differentiate into macrophages. In addition to the upregulated phagocytotic effect, PMA introduced increased CD11b and CD14 expression, and promoted IL-8 secretion in both SC-*ZsGreen1* cell strains, similar to SC cells. In conclusion, we reported a feasible strategy for the establishment of

收稿日期: 2018-06-04 接受日期: 2018-07-23

国家自然科学基金(批准号: 81372135)资助的课题

*通讯作者: Tel: 020-85222616, E-mail: guojiahui01@email.jnu.edu.cn

Received: June 4, 2018

Accepted: July 23, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81372135)

*Corresponding author: Tel: +86-20-85222616, E-mail: guojiahui01@email.jnu.edu.cn

网络出版时间: 2018-09-26 16:45:10

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180926.1644.002.html>

normal cell-derived monocyte cell lines stably expressing the exogenous gene of *ZsGreen1*.

Keywords normal cell; monocytes; stable expression; exogenous gene; *Tet-on* lentivirus

巨噬细胞是天然免疫的主要执行者,主导外来病原体的清除、经典炎症微环境(即M1型活化)的形成以及凋亡小体的吞噬等重要生物过程^[1]。同时,巨噬细胞在病毒感染状态下和肿瘤微环境中也存在活化现象,该活化形式被称为M2型活化,其在调控疾病的发生和进展中扮演重要的角色^[2-3]。

目前,肿瘤来源的单核细胞系往往被用来诱导分化为巨噬细胞,这些细胞系包括THP-1、ML-2和U937细胞^[4]。在涉及肿瘤机制的研究中,这些细胞模型因不能代表正常巨噬细胞而存在局限性^[5-6]。而以人原代单核来源巨噬细胞(monocyte-derived macrophages, MDM)为代表的细胞模型虽然来源于正常细胞,但其受限于血源严重不足,分离操作繁琐等因素,因此,需消耗大量时间和科研经费才能获得足够量的细胞^[4,7]。为了解决上述问题,本研究团队已对一株正常单核细胞来源的SC细胞株进行了表征,并证明了其在PMA诱导后可分化成巨噬细胞(SC-巨噬细胞),且经LPS活化后具有典型的M1表型特征(待发表)。可见,SC-巨噬细胞是理想的人巨噬细胞体外模型,其获取简便,可极大提高研究效率。

在分子细胞生物学领域,外源基因的过表达是机制研究的必要手段。然而,正常人单核/巨噬细胞的低转染效率是领域内的一个突出问题^[8]。即使利用肿瘤来源细胞株进行实验,也难以达到令人满意的转染效率。例如,颜文杰等^[9]曾利用脂质体转染*GFP*基因至THP-1巨噬细胞中,其*GFP*阳性表达率仅2%左右。既然SC细胞具备无限扩增能力,又来源于正常单核细胞,那么即便瞬时转染无法达到较高的转染效率,也可通过扩增携带目的基因的SC细胞建立过表达模型。据此,本研究分别使用了3种实验室常用的外源基因导入法(脂质体转染法、腺病毒载体感染法和慢病毒载体感染法)将报告基因(绿色荧光蛋白基因)导入SC细胞,探索构建可表达外源基因的正常人外周血来源单核细胞株的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要细胞 SC(CRL-9855TM)细胞、HEK-293细胞和293T细胞均购自美国典型培养物保藏中心

(American Type Culture Collection, ATCC)。

1.1.2 主要试剂与仪器 Lipofectamine[®] 3000(lipo3000)转染试剂盒、0.5 μ m FluoSpheres[®] carboxylate-modified Fluorescent microspheres(0.5 μ m 荧光微球)、IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、HT添加剂(次黄嘌呤钠和胸腺嘧啶)、丙酮酸钠、青霉素和链霉素购自ThermoFisher Scientific公司; 2-巯基乙醇(2-Mercaptoethanol)、碳酸氢钠(sodium bicarbonate)和豆蔻佛波醇乙酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)购自Sigma公司; 环丙沙星购自广州南新制药有限公司; 强力霉素(doxycycline, DOX)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 流式抗体PE anti-human CD11b Antibody、FITC anti-human CD14 Antibody、Human TruStain FcXTM和同型对照抗体均购自Biolegend公司; 人炎症相关细胞因子检测试剂盒[BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit]购自BD Biosciences公司; 携*eGFP*基因的腺病毒载体(Ad-*eGFP*)购自百恩维生物科技有限公司; 绿色荧光蛋白真核表达质粒pEGFP-N1、慢病毒包装用质粒载体pMD2.G、psPAX2、pLVX-Tet3G和pLVX-TRE3G-*ZsGreen1*均为本实验室保存。

C6流式细胞分析仪(BD AccuriTM C6 flow cytometer)购自BD Biosciences公司; 倒置荧光显微镜购自Olympus公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SC细胞以完全IMDM培养基(含10% FBS、0.05 mmol/L 2-巯基乙醇、0.1 mmol/L 次黄嘌呤钠、0.016 mmol/L胸腺嘧啶和1.5 g/L碳酸氢钠)进行培养。HEK-293细胞和293T细胞以完全DMEM培养基(含10% FBS、1 mmol/L丙酮酸钠、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素和10 mg/L环丙沙星)进行培养。

1.2.2 脂质体转染法导入外源基因 脂质体转染实验依照Lipo3000转染试剂盒说明书进行。细胞按 4×10^5 个/孔接种于6孔板中过夜培养。转染时,先将培养上清更换为1 mL不含血清的培养基。以不含血清的培养基分别稀释试剂盒提供的lipo3000和

P3000, 终体积50 μL 。取2 μg pEGFP-N1质粒, 与稀释后的P3000和lipo3000先后混匀。室温孵育20 min后, 加至细胞培养体系中。置培养箱内孵育6 h后, 更换新鲜完全培养基继续培养24 h后置于倒置荧光显微镜下观察。

1.2.3 腺病毒感染法导入外源基因 感染过程参照Tang等^[10]的实验方法作相应修改后进行。于6孔板中每孔接种 4×10^5 个细胞, 过夜培养。感染时将培养上清更换为不含血清的培养基, 并依据感染复数(multiplicity of infection, MOI)加入Ad-eGFP; 本研究采用MOI=1。感染2 h后, 更换新鲜完全培养基继续培养24 h, 然后置于倒置荧光显微镜下观察。

1.2.4 慢病毒感染法导入外源基因 本研究采用含Tet-On调控元件的慢病毒载体系统, 构建条件表达绿色荧光蛋白ZsGreen1的SC细胞株。该慢病毒载体系统由2个慢病毒组成, 分别为Lenti-Tet-On和Lenti-ZsGreen1。双慢病毒感染流程参照Khader等^[11]的方法加以修改。293T细胞培养至覆盖度约80%时, 按1.2.2所述方法转染2 μg pMD2.G质粒、psPAX2质粒及pLVX-Tet-On 3G质粒。24 h后收集培养上清, 以0.45 μm 滤膜过滤去除细胞碎片, 获得Lenti-Tet-On病毒原液。以相同方法转染2 μg pMD2.G质粒、psPAX2质粒及pLVX-TRE3G-ZsGreen1质粒至293T细胞, 包装携ZsGreen1基因的慢病毒(Lenti-ZsGreen1)。以Lenti-Tet-On病毒原液感染SC细胞, 孵育7 h后重复感染1次, 7 h后更换完全培养基培养24 h。再以Lenti-ZsGreen1病毒原液感染同一SC细胞2次, 继续培养24 h。

1.2.5 ZsGreen1⁺ SC细胞挑选及扩增 强力霉素(doxycycline, DOX)为四环素类抗生素, 可开放Tet-On元件调控的基因表达。本研究以5 mg/L DOX诱导1.2.4中构建的SC细胞24 h, 使其表达ZsGreen1。调整细胞悬液浓度至5个/mL, 接种于96孔板, 每孔200 μL 。以含20% FBS的完全IMDM培养基培养24 h后, 置荧光显微镜下观察。挑选仅含ZsGreen1⁺ SC细胞的孔, 继续培养并观察ZsGreen1表达情况。待细胞增殖, 获得SC-ZsGreen1细胞株。

1.2.6 PMA诱导SC细胞分化 细胞按 4×10^5 个/孔接种于6孔板中, 加入终浓度为60 $\mu\text{g/L}$ PMA诱导培养48 h, 使其分化为巨噬细胞(待发表)。

1.2.7 表面标志物检测 轻柔吹落并离心收集细胞, 并以PBS洗涤2次。以PBS重悬细胞后加入

Human TruStain FcXTM, 室温孵育15 min以封闭Fc受体。根据实验目的分别加入PE anti-human CD11b Antibody、FITC anti-human CD14 Antibody或相应的同型对照抗体, 室温避光孵育20 min后, 离心弃上清。加入PBS重悬细胞, 以70 μm 滤膜过滤除去黏连细胞团, 以C6流式细胞分析仪分析。

1.2.8 吞噬能力检测 向SC细胞或PMA诱导后的巨噬细胞中加入0.5 μm 荧光微球(80个微球/细胞), 于培养箱孵育。24 h后吹打收集细胞, 离心并用PBS洗涤2次。以C6流式细胞分析仪进行分析。

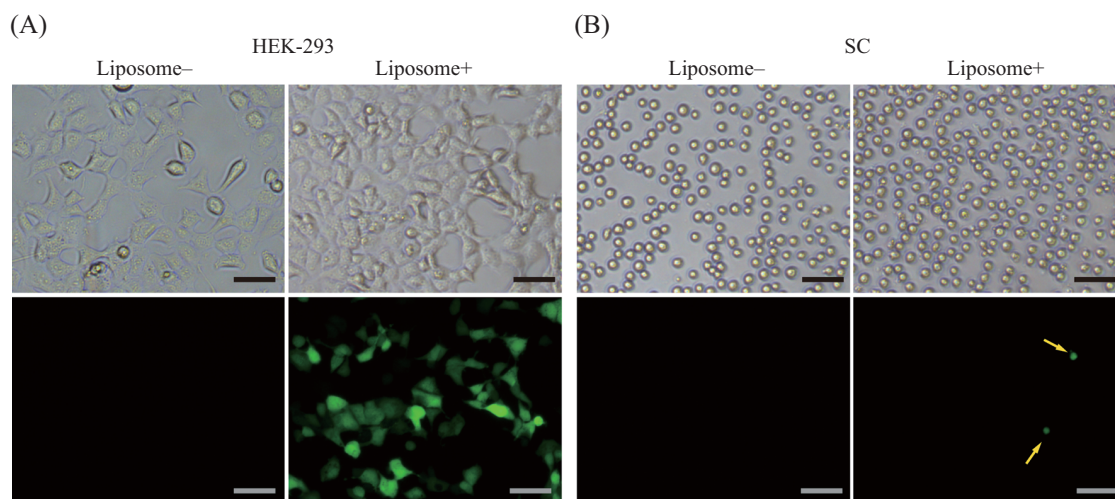
1.2.9 炎症相关细胞因子分泌水平检测 上清中参与炎症反应的细胞因子IL-12p70、TNF- α 、IL-10、IL-6、IL-1 β 和IL-8的定量测定依据本团队以往的方法^[12]进行。将PMA诱导前后的SC细胞的培养基更换为不含血清的培养基。分泌24 h后, 收集上清, 300 $\times\text{g}$ 离心10 min去除细胞。将人炎症相关细胞因子检测试剂盒提供的6种捕获珠和带PE荧光素的检测抗体与待检测上清混匀, 室温避光孵育3 h, 使其通过抗原抗体反应“形成捕获珠-细胞因子-检测抗体”的三明治样复合物。200 $\times\text{g}$ 离心5 min, 弃上清, 加入洗涤液洗涤沉淀1次。200 $\times\text{g}$ 离心5 min, 弃上清, 以洗涤液重悬沉淀, 于C6流式细胞分析仪上样分析。

2 结果

2.1 脂质体转染法对SC细胞的转染效率较低

本研究中首先尝试使用脂质体转染法将eGFP基因导入SC细胞。对HEK-293细胞也进行同样的操作, 作为阳性对照, 并在转染24 h后观察细胞的绿色荧光蛋白表达情况(图1)。与各自未经转染的细胞(阴性对照)相比, HEK-293细胞和SC细胞经脂质体转染后均未见明显的细胞形态改变。HEK-293细胞经转染后保持扁平多边形的形态特征(图1A), 而SC细胞经脂质体转染后仍保持清澈透亮的球状形态(图1B)。

在紫外光激发下, 上述两株细胞经脂质体转染后均出现绿色荧光(图1)。对典型视野进行图像采集, 并使用Image J对图像中的细胞进行了计数。结果显示, HEK-293细胞中超过一半细胞在脂质体转染后可表达eGFP蛋白, 转染效率为52.05%(76/146)(图1A)。而只有极少量的SC细胞在脂质体转染后可显示出绿色荧光, 在典型视野中转染效率仅0.66%(2/305)(图1B)。这些结果显示, 使用脂质体转

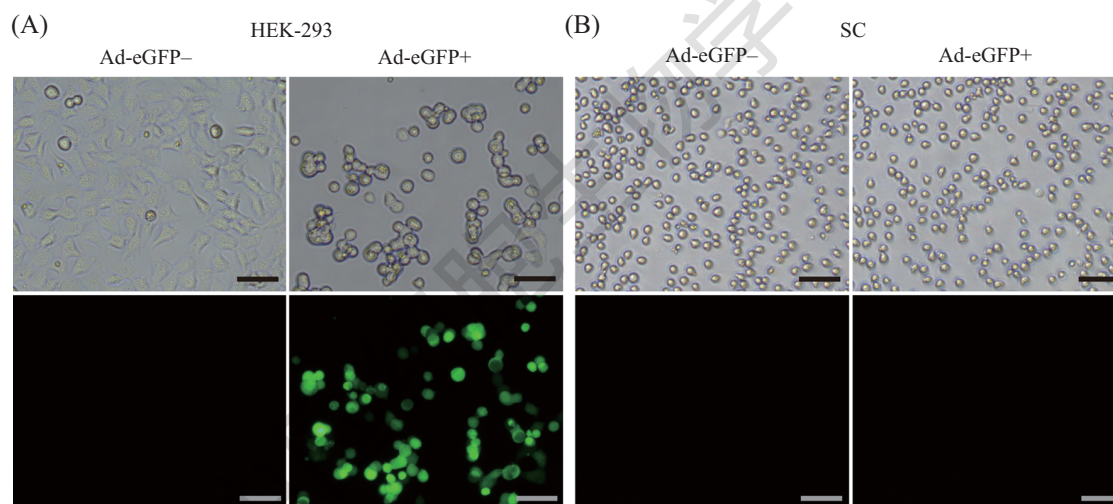


HEK-293细胞(A)和SC细胞(B)经脂质体转染前后的明场和荧光图像。黄色箭头指示成功转染的SC细胞。标尺=200 μm。

Representative bright field and fluorescent images of HEK-293 cells (A) and SC cells (B) with Lipofectamine® 3000 transfection. Yellow arrows indicate the GFP⁺ SC cells. Scale bars=200 μm.

图1 脂质体法eGFP基因转染HEK-293细胞和SC细胞效果的比较

Fig.1 Comparison of the transfection effect of eGFP on HEK-293 and SC cells with Lipofectamine® 3000



腺病毒载体(Ad-eGFP)感染HEK-293细胞(A)和SC细胞(B)的明场和荧光图像。标尺=200 μm。

Representative bright field and fluorescent images of HEK-293 cells (A) and SC cells (B) infected by the adenovirus of Ad-eGFP. Scale bars=200 μm.

图2 腺病毒载体(Ad-eGFP)法感染HEK-293细胞和SC细胞效果的比较

Fig.2 Comparison of infection effects of adenovirus of Ad-eGFP on HEK-293 cells and SC cells

染法将eGFP基因导入SC细胞的效率欠佳。

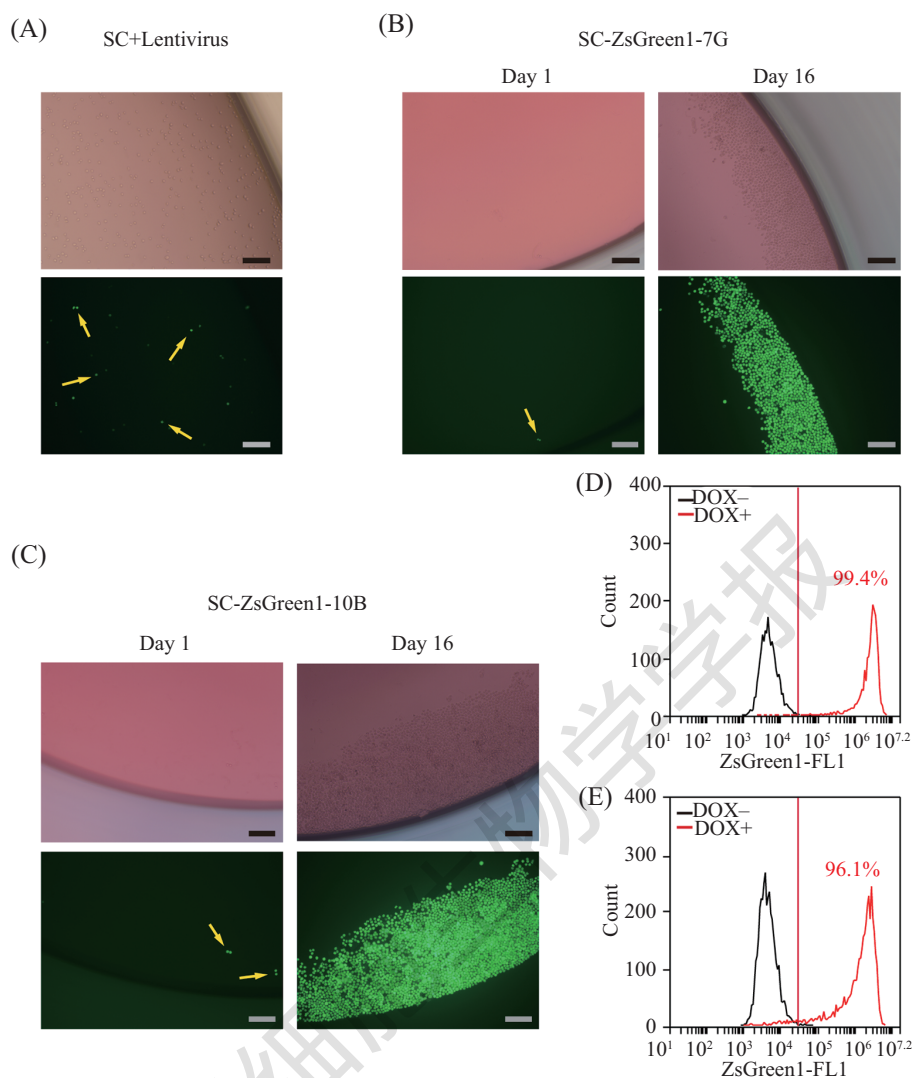
2.2 腺病毒载体感染法未能将eGFP基因导入SC细胞

在常规细胞转染应用中,以腺病毒为载体将外源基因导入靶细胞的方法比脂质体转染法具更高的转染效率^[13]。因此,本研究尝试使用该方法将eGFP基因导入SC细胞。结果显示,以1 MOI的Ad-eGFP感染后,HEK-293细胞出现以皱缩变圆和抱团黏连为特征的细胞病理变化,而感染后的SC细胞未见明显形态异常(图2)。

在典型视野下,85%(90/105)HEK-293细胞可表达eGFP蛋白(图2A);而SC细胞并未出现绿色荧光,阳性表达率为0%(0/705)(图2B)。可见,腺病毒载体感染法也不适用于将外源基因导入SC细胞。

2.3 慢病毒载体感染法成功导入ZsGreen1基因至SC细胞

与脂质体和腺病毒载体相比较,慢病毒载体可将外源基因整合至宿主细胞基因组中,并稳定遗传至子代细胞^[14]。利用这一特性,本研究使用含Tet-On调控元件的慢病毒载体系统,尝试构建稳定表达



A: *Tet-On*慢病毒感染后SC细胞的明场和荧光图像; B、C: SC-ZsGreen1-7G细胞株(B)和SC-ZsGreen1-10B细胞株(C)在筛选扩增第1天(左)和第16天(右)时的生长情况。黄色箭头指示成功感染Lenti-*Tet-On*和Lenti-*ZsGreen1*的SC细胞。标尺=200 μm 。D、E: SC-ZsGreen1-7G细胞株(D)和SC-ZsGreen1-10B细胞株(E)经DOX诱导前后ZsGreen1的阳性表达率流式细胞术结果。DOX诱导前后分别以黑色和红色线表示, 阳性表达率以红字表示。

A: representative bright field and fluorescent images of SC cells infected by both Lenti-*Tet-On* and Lenti-*ZsGreen1*. B,C: SC-ZsGreen1-7G cells (B) and SC-ZsGreen1-10B cells (C) cultured for 1 day (left) and 16 day (right), respectively. Yellow arrows indicate the *Tet-on*⁺ *ZsGreen1*⁺ SC cells. Scale bars=200 μm . D,E: the positive ZsGreen1 expression rate in SC-ZsGreen1-7G cells (D) and SC-ZsGreen1-10B cells (E) per flow cytometry. Red and black lines indicate the expression of ZsGreen1 in SC-ZsGreen1 cells with and without treatment of DOX, respectively. The percentages of ZsGreen1⁺ cells are shown in red.

图3 利用*Tet-On*慢病毒载体系统构建的SC-ZsGreen1细胞株及其绿色荧光蛋白表达情况

Fig.3 SC-ZsGreen1 cell strains constructed with the *Tet-On* lentivirus and the ZsGreen1 expression

ZsGreen1的SC细胞株。

SC细胞完成双慢病毒感染后, 在DOX诱导下, 将开放ZsGreen1基因表达绿色荧光蛋白。在典型视野下, 部分SC细胞出现绿色荧光, 表明*Tet-On*和ZsGreen1双基因的成功导入。典型视野下ZsGreen1表达的细胞占比为8.5%(33/388)(图3A)。

由于目标基因已被整合至SC细胞基因组, 故可通过挑选并扩增阳性细胞, 提高ZsGreen1的阳性表

达率。将上述SC细胞稀释并接种于96孔板, 每孔约1个细胞。选择阳性表达ZsGreen1的细胞进行扩增培养。培养16天后, 对细胞ZsGreen1蛋白表达情况再次进行观察, 发现其中两个孔内的细胞已大量增殖, 且绝大部分细胞在荧光激发下可发出绿色荧光(图3B和图3C)。继续扩增, 得到2株ZsGreen1⁺ SC细胞, 分别命名为: SC-ZsGreen1-7G和SC-ZsGreen1-10B。其ZsGreen1的阳性表达率分别为99.4%和96.1%(图

3D和图3E)。

2.4 SC-ZsGreen1细胞经PMA诱导后CD11b和CD14表达量上调

本团队已在另一项研究中证明了SC细胞可被PMA诱导分化成巨噬细胞(待发表)。因此,本研究接下来验证了所构建的2株SC-ZsGreen1细胞株经PMA诱导后,是否仍可高表达巨噬细胞表面标志物CD14和CD11b。流式结果显示,2株SC-ZsGreen1细胞经PMA处理后均高表达CD14和CD11b,符合巨噬细胞的表型特征。其表达量的上调幅度及变异系数(coefficient of variation, CV)均小于SC细胞。与SC细胞相比,2株SC-ZsGreen1细胞在PMA处理前的CD14本底表达量均稍高于SC细胞, MFI均为4 800左右。PMA处理后, SC-ZsGreen1-7G细胞的MFI为9 609.31, 约为处理前的2倍; SC-ZsGreen1-10B细胞的MFI为8 853.88, 约为处理前的1.8倍。而CV分别为46.20%和36.99%, 均小于SC细胞(CV=93.84%)(图4A)。

在CD11b方面, 2株SC-ZsGreen1细胞的本底表达量均略低于SC细胞, 其MFI分别为2 245.81(SC-

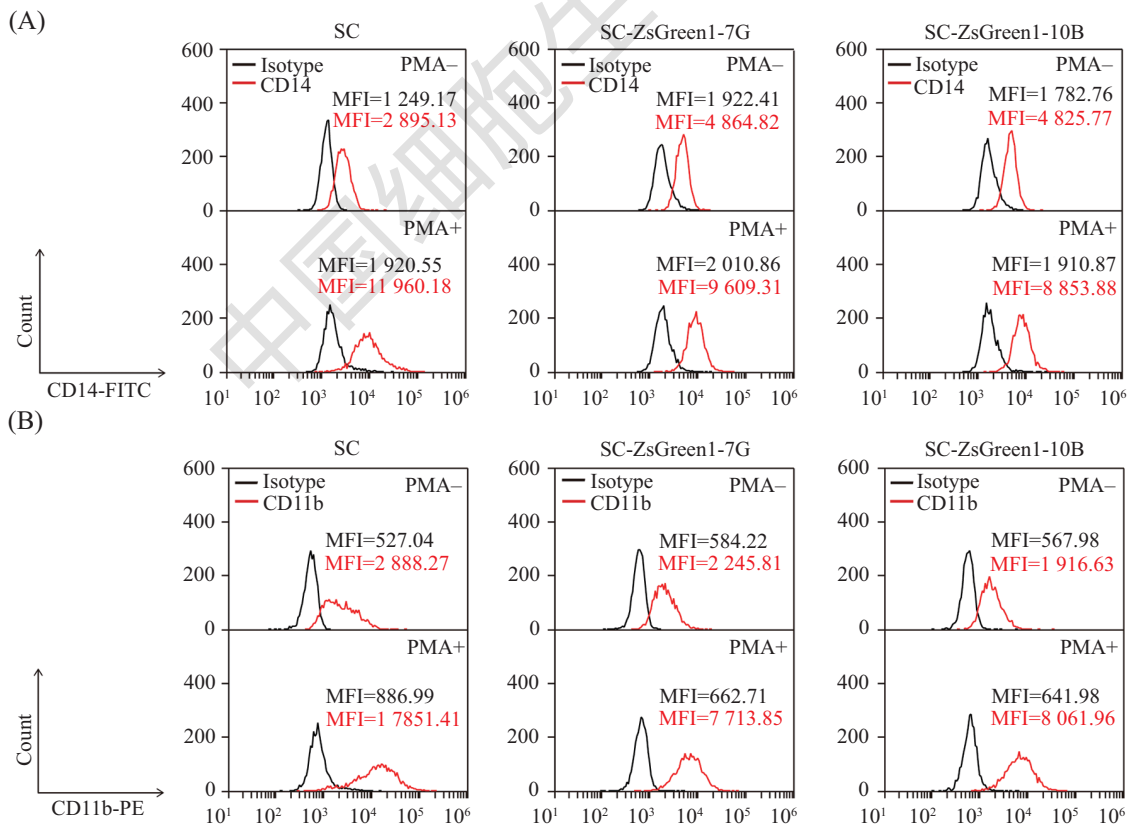
ZsGreen1-7G)和1 916.63(SC-ZsGreen1-10B), 但CV值均小于SC细胞(CV=94.11%), 分别为59.19%和63.50%。经PMA处理后, SC-ZsGreen1-7G细胞和SC-ZsGreen1-10B细胞的CD11b表达量分别约为处理前的3.4倍(MFI=7 713.85)和4.2倍(MFI=8 061.96); CV分别为68.74%和70.29%, 均小于SC细胞的97.33%(图4B)。

2.5 PMA诱导后的SC-ZsGreen1细胞具吞噬能力

具吞噬能力是巨噬细胞的基本表型特征之一^[1], 故可利用0.5 μm 荧光微球检测细胞的吞噬能力。流式结果显示, 与荧光微球孵育24 h后, 仅1.6%的SC细胞吞入荧光微球, 2株SC-ZsGreen1细胞中该比例分别为1.0%和1.3%, 基本不具吞噬能力。经PMA处理后, 41.7%的SC细胞可吞入荧光微球。而相同条件下, SC-ZsGreen1-7G和SC-ZsGreen1-10B细胞具较弱的吞噬能力, 可吞噬荧光微球的细胞分别占总细胞数的13.8%和9.7%(图5)。

2.6 PMA可诱导SC-ZsGreen1细胞的趋化因子分泌水平上升

巨噬细胞可分泌多种炎症相关细胞因子^[1]。因

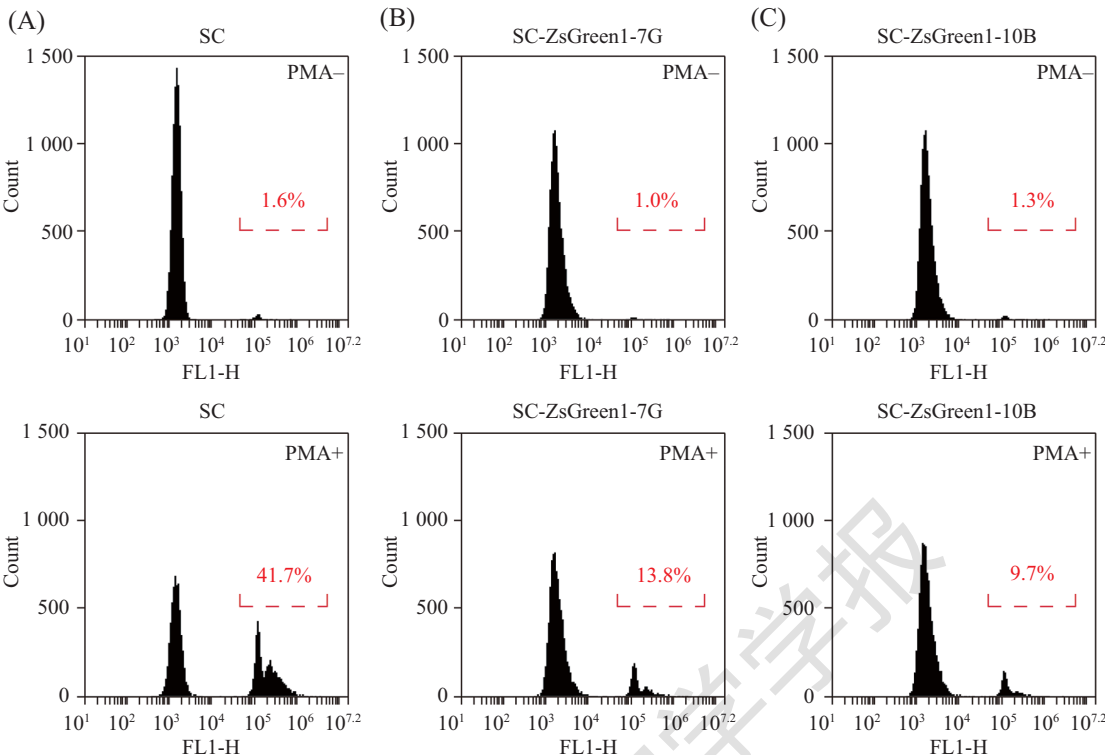


PMA介导的SC细胞、SC-ZsGreen1-7G细胞和SC-ZsGreen1-10B细胞的CD14(A)和CD11b(B)流式细胞术分析结果。

Flow cytometry analysis of CD14 (A) and CD11b (B) expression of SC cells, SC-ZsGreen1-7G cells and SC-ZsGreen1-10B cells.

图4 PMA介导的SC细胞和SC-ZsGreen1细胞株的CD14和CD11b表达

Fig.4 Expression of CD14 and CD11b in SC cells and SC-ZsGreen1 cells mediated by PMA



PMA处理前后SC细胞(A)、SC-ZsGreen1-7G细胞(B)和SC-ZsGreen1-10B细胞(C)吞噬能力的流式细胞分析结果。吞入荧光微球的细胞占比以红字表示。
Phagocytosis of SC cells (A), SC-ZsGreen1-7G cells (B) and SC-ZsGreen1-10B cells (C) pre- and post-treatment with PMA, respectively. The percentages of phagocytic cells are shown in red.

图5 PMA处理后SC细胞和SC-ZsGreen1细胞株的吞噬能力
Fig.5 Phagocytosis of SC cells and SC-ZsGreen1 cells treated with PMA

表1 PMA处理前后SC-ZsGreen1细胞株和SC细胞分泌的炎症相关细胞因子水平

Table 1 Concentration of inflammatory cytokines in the supernatant of PMA-treated SC and SC-ZsGreen1 cells

炎症因子 Inflammatory cytokines	SC (ng/L)		SC-ZsGreen1-7G (ng/L)		SC-ZsGreen1-10B (ng/L)	
	PMA-	PMA+	PMA-	PMA+	PMA-	PMA+
IL-12p70	0.05 ^a	2.05	0.05 ^a	0.39 ^a	1.14 ^a	1.52 ^a
TNF-α	0 ^a	1.03 ^a	0 ^a	0.28 ^a	0.68 ^a	0 ^a
IL-10	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
IL-6	0 ^a	17.47	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
IL-1β	0 ^a	0.2 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
IL-8	1.44 ^a	789.9	0 ^a	16.75	1.62 ^a	23.56

^a低于试剂盒检出下限。各炎症相关细胞因子检出下限值具体如下: IL-12p70为1.9 ng/L、TNF-α为3.7 ng/L、IL-10为3.3 ng/L、IL-6为2.5 ng/L、IL-1β为7.2 ng/L和IL-8为3.6 ng/L。
^a below the low limit of detection limit (LLD). The LLDs were 1.9 ng/L for IL-12p70, 3.7 ng/L for TNF-α, 3.3 ng/L for IL-10, 2.5 ng/L for IL-6, 7.2 ng/L for IL-1β and 3.6 ng/L for IL-8.

此, 本研究对细胞培养上清中的细胞因子IL-12p70、TNF-α、IL-10、IL-6、IL-1β和IL-8进行了定量检测(表1)。结果显示, 在SC细胞分泌的上清中, 上述6种细胞因子的浓度均低于检出限。经PMA处理后, SC细胞分泌少量T细胞刺激因子IL-12p70, 浓度为2.05 ng/L; 促炎细胞因子IL-6和趋化因子IL-8分泌

量明显增加, 分别为17.47 ng/L和789.9 ng/L; 促炎细胞因子TNF-α和IL-1β以及抑炎因子IL-10的浓度均低于检出限。SC-ZsGreen1-7G和SC-ZsGreen1-10B细胞的细胞因子分泌情况与SC细胞大体一致: IL-12p70、TNF-α、IL-10和IL-1β在PMA处理前后的分泌量基本不变且与SC细胞相当; IL-8的分泌量明显

增加, 分别为16.75 ng/L和23.56 ng/L, 但增加幅度明显低于SC细胞。而IL-6在2株SC-ZsGreen1细胞的培养上清中的浓度均低于检出限。

3 讨论

单核细胞在人体免疫系统中有重要地位, 其在一定条件下可诱导成树突状细胞或巨噬细胞^[15-17]。外源基因导入是研究特定基因产物对细胞功能影响的常用手段。然而, 单核细胞难转染或转染效率低是研究者面临的难题之一。就M2型活化, 本团队曾报道, 结直肠癌细胞可通过外泌体向小鼠骨髓来源巨噬细胞转运以骨架重排为中心的蛋白质单元, 诱导后者转变为肿瘤相关巨噬细胞, 并进而促进结直肠癌细胞的活化及迁移^[18]。本团队也曾以人原代MDM作为研究材料, 从艾滋病患者原代单核细胞中分离获得特殊的HIV-1病毒^[19]。在上述的研究中, 均曾遇到要研究某一靶基因功能, 却受限于难以将外源基因导入单核/巨噬细胞的问题。

本研究利用慢病毒和靶向扩增的方法, 成功构建了2株可稳定表达外源基因ZsGreen1的正常人来源单核细胞株, 它们在PMA诱导分化后均可表现出典型的巨噬细胞表型。上述结论提示, 在单核/巨噬细胞中, 研究其他外源基因的功能机制时可考虑应用此方法。不仅如此, 本研究还展示了诸多阴性结果, 证明了这些转染或感染方法并不能满足上述研究需要, 可为领域提供一定的参考。

本研究与其他团队在单核/巨噬细胞中导入外源基因的工作有一定的可比性。目前研究者常使用脂质体转染法、腺病毒载体感染法、慢病毒载体感染法或电转染法向单核细胞导入外源基因^[20-21]。例如, Na等^[22]利用腺病毒载体将GFP基因导入U937细胞系, 其转染效率约62%。Schnoor等^[15]在THP-1细胞中使用优化的核转染技术, 转染效率达50%。然而, 这些研究或以白血病等疾病来源的单核细胞为目标, 或仅能实现瞬时表达。虽然不常见报道, 李涛等^[23]指出用AMAXA NucleoFector II电转仪电转染原代外周血单核细胞, 可达60%的转染效率。但该研究未能提供电转后的细胞生存率数据, 且后续研究较少。

值得强调的是, 本研究利用的含Tet-On调控元件的慢病毒载体系统, 在导入外源报告基因的同时, 引入了Tet-On转录调控表达系统。该系统广泛应用于真核细胞的外源基因过表达, 具低剂量依赖性

和无毒性等优势^[24]。构建成功的SC-ZsGreen1细胞株仅在培养基含DOX时, 方开放外源报告基因的转录。因此, 可人为操纵该细胞株的外源基因表达时机, 降低外源基因产物对细胞的影响。这在研究具毒性的蛋白质时尤其有利。

不仅如此, 本研究构建的SC-ZsGreen1细胞株仍保留了SC细胞的基本形态及功能特征, 包括: 细胞形态无明显改变, 以及经PMA诱导后具高表达CD14和CD11b、吞噬能力上调和趋化因子IL-8分泌量明显升高的巨噬细胞表型特征。与本研究的结果相比, Hultgren等^[25]也发现, SC-巨噬细胞具备细胞伪足伸出、高表达巨噬细胞表面受体等特征。

同时, 本研究所构建的2株SC-ZsGreen1细胞株与SC细胞有表型差异, 具体表现在分化成SC-巨噬细胞后, 细胞CD14和CD11b表达量、吞噬能力和炎症相关细胞因子分泌水平方面。具体地, SC细胞经PMA处理后, CD14和CD11b的荧光强度CV值分别高达93.84%和97.33%, 提示SC细胞在单细胞水平存在异质性。Stiebing等^[26]发现, 用PMA诱导THP-1细胞分化成巨噬细胞后, THP-1巨噬细胞的棕榈酸吸收能力也存在异质性。另外, Lu等^[27]在U937巨噬细胞中发现, 单个细胞间存在不同的分泌蛋白模式。Cassanelli等^[28]的研究也发现, 在MCF-7细胞系中, 各个细胞间的孕酮受体表达量存在较大差异, 且由这些单细胞增殖而成的亚细胞系与原MCF-7细胞系具明显的表型差异。据此可推测, SC-ZsGreen1-7G和SC-ZsGreen1-10B细胞与SC细胞之间的表型差异现象可以用SC细胞系本身的细胞异质性的来解释。

综上, 本研究首次报道了一种构建可稳定表达外源基因的正常人外周血来源单核细胞株的可行方案。使用含Tet-On调控元件的慢病毒载体系统结合筛选扩增的方法, 可获得高阳性表达率的正常单核细胞株, 且不改变单核细胞的基本特征。所获得的稳定表达外源基因的SC细胞株有望广泛应用于单核和巨噬细胞相关研究。

参考文献 (References)

- 1 Moghaddam AS, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, *et al.* Macrophage plasticity, polarization and function in health and disease. *J Cell Physiol* 2018; 233(9): 6425-40.
- 2 Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *J Clin Invest* 2012; 122(3): 787-95.

- 3 Bility MT, Cheng L, Zhang Z, Luan Y, Li F, Chi L, *et al.* Hepatitis B virus infection and immunopathogenesis in a humanized mouse model: induction of human-specific liver fibrosis and M2-like macrophages. *PLoS Pathog* 2014; 10(3): e1004032.
- 4 Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* 2012; 221(1): 2-11.
- 5 Fu J, Yuan D, Xiao L, Tu W, Dong C, Liu W, *et al.* The crosstalk between alpha-irradiated Beas-2B cells and its bystander U937 cells through MAPK and NF-kappaB signaling pathways. *Mutat Res* 2016; 783: 1-8.
- 6 Shen C, Chen MT, Zhang XH, Yin XL, Ning HM, Su R, *et al.* The PU.1-Modulated MicroRNA-22 is a regulator of monocyte/macrophage differentiation and acute myeloid leukemia. *PLoS Genet* 2016; 12(9): e1006259.
- 7 Rindi L, Lari N, Garzelli C. Virulence of *Mycobacterium avium* Subsp. *hominissuis* human isolates in an *in vitro* macrophage infection model. *Int J Mycobacteriol* 2018; 7(1): 48-52.
- 8 Lee JS, Hmama Z, Mui A, Reiner NE. Stable gene silencing in human monocytic cell lines using lentiviral-delivered small interference RNA. Silencing of the p110alpha isoform of phosphoinositide 3-kinase reveals differential regulation of adherence induced by 1alpha,25-dihydroxycholecalciferol and bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2004; 279(10): 9379-88.
- 9 颜文杰, 孙文逵, 李培, 苏欣, 施毅. 三种不同方法转染THP-1巨噬细胞效果比较. *中华肺部疾病杂志(电子版)*[Yan Wenjie, Sun Wenkui, Li Pei, Su Xin, Shi Yi. Comparison of transfection of THP-1 macrophage by three different methods. *Chinese Journal of Lung Diseases (Electronic Edition)*] 2015; 8(1): 7-12.
- 10 Tang J, Wu Q, Li Y, Wu X, Wang Y, Zhu L, *et al.* Construction of a general albumin promoter reporter system for real-time monitoring of the differentiation status of functional hepatocytes from stem cells in mouse, rat and human. *Biomed Rep* 2017; 6(6): 627-32.
- 11 Khader H, Solodushko V, Al-Mehdi AB, Audia J, Fouty B. Overlap of doxycycline fluorescence with that of the redox-sensitive intracellular reporter roGFP. *J Fluoresc* 2014; 24(2): 305-11.
- 12 Tang S, Deng S, Guo J, Chen X, Zhang W, Cui Y, *et al.* Deep coverage tissue and cellular proteomics revealed IL-1beta can independently induce the secretion of TNF-associated proteins from human synoviocytes. *J Immunol* 2018; 200(2): 821-33.
- 13 范凌云, 谢庆军. 腺病毒载体的研究进展. *中国生物制品学杂志*(Fan Lingyun, Xie Qingjun. Construction of adenovirus vector. *Chinese Journal of Biologicals*) 2008; 21(2): 153-7.
- 14 Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2010; 58(2): 107-19.
- 15 Schnoor M, Buers I, Sietmann A, Brodde MF, Hofnagel O, Robenek H, *et al.* Efficient non-viral transfection of THP-1 cells. *J Immunol Methods* 2009; 344(2): 109-15.
- 16 Maurisse R, De Semir D, Emamekhoo H, Bedayat B, Abdolmohammadi A, Parsi H, *et al.* Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BMC Biotechnol* 2010; 10: 9.
- 17 Goudot C, Coillard A, Villani AC, Gueguen P, Cros A, Sarkizova S, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor controls monocyte differentiation into dendritic cells versus macrophages. *Immunity* 2017; 47(3): 582-96.e6.
- 18 Chen Z, Yang L, Cui Y, Zhou Y, Yin X, Guo J, *et al.* Cytoskeleton-centric protein transportation by exosomes transforms tumor-favorable macrophages. *Oncotarget* 2016; 7(41): 67387-402.
- 19 Wang T, Xu Y, Zhu H, Andrus T, Ivanov SB, Pan C, *et al.* Successful isolation of infectious and high titer human monocyte-derived HIV-1 from two subjects with discontinued therapy. *PLoS One* 2013; 8(5): e65071.
- 20 Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* 2009; 11(9): 1143-9.
- 21 Gao H, Jiang Q, Han Y, Peng J, Wang C. shRNA-mediated EMMPRIN silencing inhibits human leukemic monocyte lymphoma U937 cell proliferation and increases chemosensitivity to adriamycin. *Cell Biochem Biophys* 2015; 71(2): 827-35.
- 22 Na M, Fan X. Design of Ad5F35 vectors for coordinated dual gene expression in candidate human hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2010; 38(6): 446-52.
- 23 李涛, 满江红, 巩伟丽, 靳宝锋. 人外周血单核细胞的分离和电穿孔法转染. *生物技术通讯*(Li Tao, Man Jianghong, Gong Weili, Jin Baofeng. Isolation of human monocytes from peripheral blood and transfection via electroporation. *Letters in Biotechnology*) 2010; 21(5): 673-6.
- 24 Das AT, Tenenbaum L, Berkhout B. Tet-On systems for doxycycline-inducible gene expression. *Curr Gene Ther* 2016; 16(3): 156-67.
- 25 Hultgren EM, Patrick ME, Evans RL, Stoos CT, Eglund KA. SUSD2 promotes tumor-associated macrophage recruitment by increasing levels of MCP-1 in breast cancer. *PLoS One* 2017; 12(5): e0177089.
- 26 Stiebing C, Meyer T, Rimke I, Matthaus C, Schmitt M, Lorkowski S, *et al.* Real-time Raman and SRS imaging of living human macrophages reveals cell-to-cell heterogeneity and dynamics of lipid uptake. *J Biophotonics* 2017; 10(9): 1217-26.
- 27 Lu Y, Xue Q, Eisele MR, Sulistijo ES, Brower K, Han L, *et al.* Highly multiplexed profiling of single-cell effector functions reveals deep functional heterogeneity in response to pathogenic ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(7): E607-15.
- 28 Cassanelli S, Louis J, Seigneurin D. Progesterone receptor heterogeneity in MCF-7 cell subclones is related to clonal origin and kinetics data. *Tumour Biol* 1995; 16(4): 222-9.