

荧光素酶基因标记乳腺癌细胞系鉴定

王 明 崔红霞 刘吉成

摘 要 **目的** 利用三阴性人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,对稳定表达荧光素酶的细胞系 MDA-MB-231-Luc 进行功能评价及鉴定。**方法** 构建荧光素酶的 HIV 慢病毒载体,体外感染乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,经嘌呤霉素筛选后得到稳定表达的细胞系,采用 MTT 法,利用 Transwell 侵袭模型,应用伤口愈合细胞划痕实验评价细胞增殖、侵袭和转移能力。**结果** 利用慢病毒转染的 MDA-MB-231 细胞能稳定表达荧光素酶,与亲本细胞相比,细胞的增殖、侵袭、迁移能力无显著影响($P > 0.05$)。**结论** 慢病毒感染乳腺癌细胞能稳定表达荧光素酶,对 MDA-MB-231 细胞的增殖、侵袭、转移能力无明显影响,为后续的小动物活体成像实验提供细胞模型。

关键词 MDA-MB-231 细胞 荧光素酶 增殖 侵袭 转移

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.03.010

Establishment of Luciferase-labeled Breast Cancer Cell for in vivo Bioluminescence Imaging. Wang Ming, Cui Hongxia, Liu Jicheng. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Heilongjiang 150040, China

Abstract **Objective** To establishment of triple-negative human breast cancer MDA-MB-231 with stable expression of luciferase by lentivirus vector. **Methods** Human breast cancer cell line MDA-MB-231 which can stably express luciferase was infected by HIV lentivirus and screened out by puromycin. The proliferation, invasion and migration abilities of MDA-MB-231-Luc cells were detected by MTT assay, transwell invasion assay and wound healing assay. **Results** Luciferase transfected into MDA-MB-231 by lentivirus vector can be stable expression. Analysis experiment results demonstrated that MDA-MB-231-Luc cell line showed similar ability of proliferation, invasion and migration to the MDA-MB-231 cells ($P > 0.05$). **Conclusion** The luciferase gene can be stably transfected into MDA-MB-231 cell by lentivirus. There is no significant effect on biological behavior with MDA-MB-231 and applied to animal bioluminescence imaging in vivo.

Key words MDA-MB-231 cell line; Luciferase; Proliferation; Invasion; Migration

三阴性乳腺癌(TNBC)是指雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)及人类上皮细胞生长因子受体2(HER2)均无表达的一类乳腺癌,其临床发病年龄小、预后差、生存率低,缺乏有效的治疗手段,在学术界受到广泛关注^[1]。三阴性乳腺癌容易出现肺转移和肝转移,这可能是导致三阴性乳腺癌预后较差的重要原因^[2]。由于三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 具有高转移能力,常在基础研究中作为研究侵袭转移的很好的细胞工具。本实验中以 HIV 病毒作为载体,建立人乳腺癌 MDA-MB-231 稳定表达荧光素酶细胞系,研究此细胞模型的增殖能力,侵袭及迁移能力等

生物学行为否有影响,为后续的小动物活体成像实验提供细胞模型。

材料和方法

1. 细胞:人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,购于中科院上海细胞库。

2. 主要试剂:胎牛血清(FBS)、人工基质胶 Matrigel 购自 Hyclone 公司。L-15 培养基、MTT 购自 Sigma 公司。Transwell 小室购自 Costar 公司。

3. 慢病毒载体的包装及收集:病毒包装,293T 细胞接种至 15cm 培养皿中,37℃、5% CO₂ 培养过夜。取离心管,加入 1.5ml 无血清 DMEM,按比例加入穿梭质粒包装质粒,混匀,另取 5ml 离心管,加 1.5ml 无血清 DMEM 和 300μl RNAi-Mate,混匀,室温放置 5 分钟后将两管混合,室温放置 20min。弃去培养皿中培养液,加入 8ml 无血清的 DMEM 培养液。将转染混合物逐滴加入培养皿中,培养箱中温育 6h。吸弃转染液,加入 18ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养液。继

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81302308);黑龙江省自然科学基金资助项目(H201353)

作者单位:150040 哈尔滨,黑龙江中医药大学(王明、刘吉成);161006 齐齐哈尔医学院(崔红霞)

通讯作者:刘吉成,电子信箱:qyybliu@126.com;崔红霞,电子信箱:xutianfang@sohu.com

续培养 72h。病毒收集,上清液吸到 50ml 离心管中,4℃、4000r/min,离心 4min。低速离心后,上清液倒入 50ml 注射器内,过滤器过滤。4℃、20000r/min,离心 2h。收集上清, -80℃ 保存。

4. 细胞转染及稳定细胞系的建立:取对数期 MDA-MB-231 细胞,接种至 24 孔板,24h 后细胞融合度为 40%~60% 时用于病毒转染。病毒滴入,并加入 Polybrene (10μg/ml),12h 换液。用嘌呤霉素 2μg/ml 抗性筛选 8 周。稳转细胞记做 MDA-MB-231-Luc。

5. MDA-MB-231-Luc 体外荧光素酶活性检测:取对数生长期的 MDA-MB-231-Luc 细胞消化、计数后,调整细胞浓度。按等比稀释法设 1×10^5 、 5×10^4 、 2.5×10^4 、 1.25×10^4 、 0.625×10^4 、 0.313×10^4 、 0.156×10^4 、 0.078×10^4 、 0.039×10^4 、 0.02×10^4 个/毫升 10 个浓度。每个浓度取 100μl 加入不透明的 96 孔板中,每组设 3 个复孔。每孔加 20μl 细胞裂解液,再加入 100μl 荧光素酶底物,检测发光情况。

6. 绘制细胞生长曲线:采用 MTT 法测定 MDA-MB-231 和 MDA-MB-231-Luc 细胞的增殖情况并绘制生长曲线。

7. 细胞与 Matrigel 黏附实验:Matrigel 包被 96 孔板,放置 37℃ 成胶 30min,弃上清,加 1% BSA 封闭 30min,PBS 洗板 3 次待用。每孔加 2.5×10^4 细胞,培养箱中黏附 30min,PBS 洗去未黏附的细胞,0.1% 结晶紫染色,显微镜下记录 5 个视野细胞数。

8. 细胞侵袭力实验:用 Matrigel 包被 Transwell 小室底部膜的内表面,培养箱成胶 30min,按每孔 1×10^5 细胞重悬于 100μl 1% 血清培养基中,加入到上室,下室加 600μl 含 10% 血清的培养基,培养 24h。取出小室,用棉签擦去上室细胞,穿过膜的细胞浸泡在甲醇中固定 30min,风干后 0.1% 的结晶紫染色 30min,PBS 冲洗 3 次,显微镜下记录 5 个视野细胞数。

9. 伤口愈合细胞划痕实验:取 24 孔板,用 marker 笔在板底均匀画横线,作为标记。每孔加 5×10^5 个细胞,细胞贴壁后,用枪头垂直于背后的横线划痕,用 PBS 洗去划掉的细胞,加入 1% 血清的培养基培养,24、48h 镜下拍照。通过测定各划痕在对应的时间上的宽度计算细胞迁移的距离。计算公式:细胞迁移距离 = $1/2(0h$ 划痕宽度 - 各时间点划痕宽度)。

10. 统计学方法:用 SPSS 13.0 统计软件进行结果分析。计量资料均以均数($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,对于重复测量数据采用重复测量方差分析,以 P

<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞荧光素酶表达情况:MDA-MB-231 转染后荧光素酶活性较高,细胞经等比稀释后,荧光素酶的荧光值与细胞个数呈良好的相关性(图 1)。

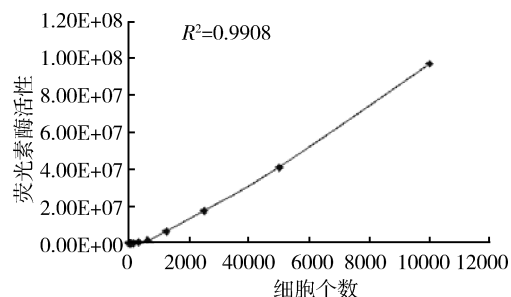


图 1 MDA-MB-231 和 MDA-MB-231-Luc 的荧光素酶活性与细胞数的相关性

2. 细胞增殖情况:采用 MTT 法测 MDA-MB-231 和 MDA-MB-231-Luc 细胞 5 天的生长情况。结果如图 2,MDA-MB-231 与 MDA-MB-231-Luc 细胞生长趋势基本一致,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

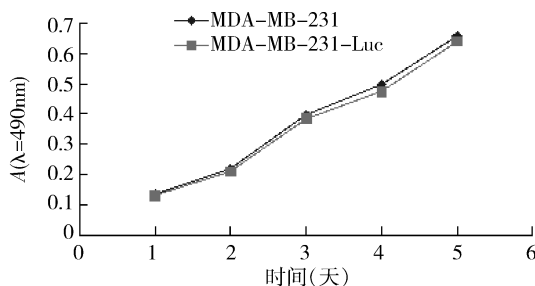


图 2 MDA-MB-231 与 MDA-MB-231-Luc 的生长曲线

3. MDA-MB-231-Luc 与 Matrigel 黏附能力的影响:MDA-MB-231-Luc 与 Matrigel 黏附 30min 后,PBS 洗去未黏附的细胞,结晶紫染色,计算 5 个视野的细胞数,MDA-MB-231 细胞数为 100、105、100、109、111 个;MDA-MB-231-Luc 细胞数为 95、98、101、100、92 个。如图 3,MDA-MB-231 与 MDA-MB-231-Luc 黏附的细胞差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4. MDA-MB-231-Luc 侵袭能力的影响:细胞侵袭是肿瘤转移发生的基本步骤,利用 Transwell 小室实验检测肿瘤细胞对细胞外基质的侵袭能力,差异无统计学意义($P > 0.05$),如图 4 所示。

5. MDA-MB-231-Luc 迁移运动能力的影响:

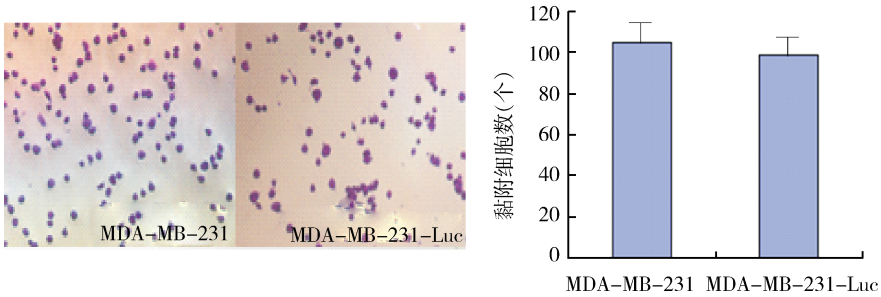


图3 MDA-MB-231与MDA-MB-231-Luc的黏附能力比较(×100)

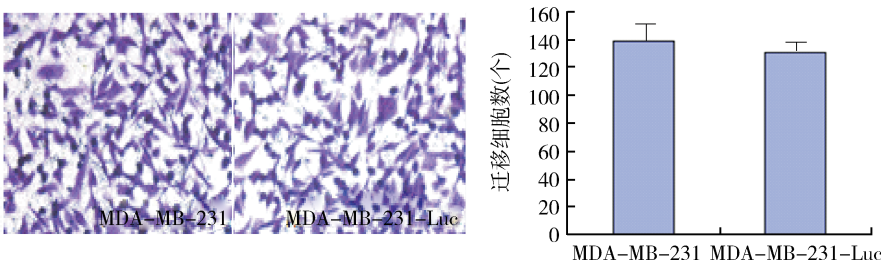


图4 MDA-MB-231与MDA-MB-231-Luc侵袭能力的比较(×100)

划痕实验显示,划线0h后边缘整齐,24h后细胞开始向线内生长且边缘不整齐,48h后MDA-MB-231和MDA-MB-231-Luc划线两侧细胞大部分已经开始融合,MDA-MB-231和MDA-MB-231-Luc的24h迁移距离为 $250.41 \pm 3.82 \mu\text{m}$,48h迁移距离为 $94.61 \pm 4.07 \mu\text{m}$,差异无统计学意义($P > 0.05$),结果如图5。

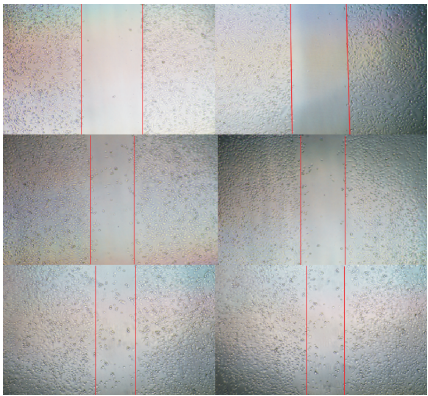


图5 MDA-MB-231与MDA-MB-231-Luc的迁移能力比较(×40)

讨 论

乳腺癌是全世界女性常见的恶性肿瘤之一,发生率呈逐年增高的趋势,严重威胁女性健康^[3]。三阴性乳腺癌是一类特殊类型的乳腺癌,具有不同的分子病理及基因亚型,遗传多样性则导致该类患者对药物治疗的反应存在很大的差异性;病理类型以浸润性导

管癌为主等特点,患者容易较早发生局部复发和远处转移,这也是三阴性乳腺癌患者治疗失败及死亡的主要原因^[4,5]。所以在肿瘤侵袭转移实验中,常以三阴性乳腺癌MDA-MB-231为工具细胞进行研究。

目前,基因治疗中转入基因的载体大体上可以分为病毒载体和非病毒载体两大类。然而,慢病毒载体是近年来迅速发展起来的基因载体,具有高效、稳定的特点,常用于科研实验中^[6]。慢病毒属于反转录病毒科,为RNA病毒,通过病毒衣壳蛋白与细胞膜上的特异受体结合而进入易感靶细胞^[7,8]。对分裂和非分裂的细胞均具有很强的感染力,能承载大片段的外源基因,并且基因在感染细胞中能稳定表达,转给子代细胞,宿主免疫反应小等特点^[9]。所以本次实验采用慢病毒作为基因转运载体。

在肿瘤转移复杂的过程中,原发灶瘤细胞要突破基膜侵入间质,在间质中移行并接触脉管,突破血管血管内皮及其下基膜进入血流,在血中存活的细胞到达远端器官,在组织中存活、增殖,形成转移灶^[10]。所以细胞与细胞外基质的黏附、侵袭和迁移运动是转移到远处器官的关键步骤^[11]。本研究采用了高转移能力的人乳腺癌MDA-MB-231细胞作为研究模型,通过慢病毒感染法将荧光素酶基因转入细胞内,来探索荧光素酶对细胞本身的行为学性质是否有影响,为后续的小鼠活体成像实验提供了理论基础。本实验通过MTT法测定细胞生长曲线,利用与组织相

似的人工重组基膜 Matrigel 作为黏附基质,检测了细胞的侵袭能力,利用伤口愈合细胞划痕实验检测了迁移运动能力,实验结果表明荧光素酶在细胞内能够稳定表达,且对细胞本身的生物学行为差异无统计学意义($P>0.05$)。此稳定转染细胞系的构建为今后的细胞功能学研究提供了基础。

参考文献

- 1 洪勇. 三阴性乳腺癌研究进展[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2012, 19(1):92-93
- 2 Yuan ZY, Wang SS. Clinical characteristics and prognosis of Triple - negative breast cancer: A report of 305 cases[J]. Chin J Cancer, 2008, 27(6):561-565
- 3 郑莹,吴春晓,张敏. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(8): 561-569
- 4 Chu J. Clinicopathological characteristics and prognosis factors of the triple negative breast cancer[J]. Modern Oncol, 2011, 19(5):921-924
- 5 Ni C, Li T. Progress on chemotherapy for triple negative breast cancer [J]. China Oncol, 2014, 24(4):316-320
- 6 王淑艳,张愚. 慢病毒载体的设计及应用进展[J]. China Biotechnol, 2006, 26(11):70-75
- 7 汤海涛,安春丽. 慢病毒载体的构建及其在基因治疗方面的应用[J]. Asia - Pac Tradit Med, 2009, 5(2):142-144
- 8 Mao YJ, Zheng YQ. Progress in study on lentiviral vectors and their application[J]. Chin J Biologi February, 2009, 22(2):196-200
- 9 曾锦芳,慢病毒载体及其在血液病研究中的应用进展[J]. Medical Recapitulate, 2011, 17(8):1146-1148
- 10 Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis [J]. Science, 2011, 331(6024):1559-1564
- 11 Adams LS, Phung S, Yee N, et al. Blueberry phytochemicals inhibit growth and metastatic potential of MDA - MB - 231 breast cancer cells through modulation of the phosphatidy - inositol 3 - kinase pathway [J]. Cancer Res, 2010, 70(9):3594-3605

(收稿日期:2015-06-01)

(修回日期:2015-07-11)

综合 ICU 多重耐药产气肠杆菌流行特点分析

易玲娴 张长春 易 勇 贾晓君 张淑敏 高 洁 王 嵩 姜生茂

摘 要 **目的** 了解笔者医院综合 ICU 病房多重耐药产气肠杆菌的流行特点。**方法** 收集笔者医院 2014 年 5 月 1 日~7 月 30 日综合 ICU 病房内检出产气肠杆菌的患者,统计其相关临床资料,并对检出菌株进行药敏分析。**结果** 24 例患者共检出 33 株产气肠杆菌,其主要来源为呼吸道标本,占 72.7% (24/33)。其中多重耐药菌株(multi - drug resistant, MDR)检出 32 株,占 97.0%,广泛耐药(extensive - drug resistant, EDR)菌株检出 7 株,占 21.2%。产气肠杆菌除对替加环素全部敏感外,对喹诺酮类、氨基糖苷类、 β 内酰胺复合制剂及 β - 内酰胺类抗生素的耐药率分别达到 97.0%、78.8%、93.9% 及 90.9%。对碳青霉烯类抗生素亚胺培南、厄他培南及美罗培南的耐药率分别达到 93.9%、90.9% 和 100%。**结论** 多重耐药产气肠杆菌对常用抗生素均具有很高的耐药率,临床工作者应予以重视并采取积极措施降低其耐药率。

关键词 肠杆菌属 产气肠杆菌 耐药性

中图分类号 R446.4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.03.011

Analysis on Epidemiological Characterization of Multi - drug Resistant Enterobacter Aerogens in General ICU. Yi Lingxian, Zhang Changchun, Yi Yong, et al. Intensive Care Unit, The 306th Hospital of PLA, Beijing 100101, China

Abstract Objective To investigate the epidemiological characterization of multi - drug resistant (MDR) *Enterobacter aerogens* in general ICU. **Methods** General ICU patients, whose secreta were isolated *Enterobacter aerogenes*, were analyzed from 1st May to 30th July in 2014. Then, their clinical data and drug resistance was analyzed. **Results** Totally 33 strains *Enterobacter aerogenes* were isolated from 24 cases patients (24/33). The main source of the isolates was respiratory tract specimen, accounting for 72.7%. MDR was detected 32 strains, accounting for 97.0%. EDR was detected 7 strains, accounting for 21.2%. *Enterobacter aerogenes* was sensitive to tigecycline, overall. But, most of *Enterobacter aerogenes* was resistant to Quinolones, Aminoglycosides, β - lactam compound preparation and β - lactam antibiotic, respectively 97.0%, 78.8%, 93.9% and 90.9%. And, the drug - resistant ratio of Imipenem, Ertapenem and Mero-

基金项目:全军“十二五”课题(面上项目)(CWS11J174)

作者单位:100101 北京,中国人民解放军第 306 医院 ICU(易玲娴、张长春、贾晓君、张淑敏、高洁、王嵩、姜生茂),检验科(易勇)

通讯作者:张长春,电子信箱:ylx306@126.com