

·基础研究·

卵巢癌腹腔转移工具细胞的构建及其应用

万里舟¹, 杜汝沛², 陈康梅³

(1. 中山大学孙逸仙纪念医院基础与转化医学研究中心, 广东广州 510120; 2. 华南理工大学生物医学科学与工程学院, 广东广州 511442; 3. 中山大学孙逸仙纪念医院检验科, 广东广州 510120)

摘要:【目的】构建稳定共表达荧光素酶(Luc)和增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的人源卵巢癌细胞 SKOV3 (SK-Luc-EGFP)并探究其在卵巢癌腹腔转移的体内外研究中的应用。【方法】利用重叠PCR扩增得到的Luc-T2A-EGFP基因片段,构建重组质粒pCDH-Luc-T2A-EGFP-Puro;采用三质粒慢病毒包装系统转染HEK 293T细胞,收集病毒液感染SKOV3细胞;通过嘌呤霉素筛选,流式细胞术检测,筛选高效表达EGFP的细胞(SK-Luc-EGFP),并通过体外生物发光实验验证Luc的表达。对SK-Luc-EGFP细胞进行如下应用的探究:利用流式细胞术和激光共聚焦区分SK-Luc-EGFP细胞与腹水微环境中的非肿瘤细胞,利用荧光显微镜观察SK-Luc-EGFP与间皮细胞的黏附,利用小动物活体成像仪观察SK-Luc-EGFP细胞的大网膜黏附以及体内成瘤的过程。【结果】成功构建慢病毒载体pCDH-Luc-T2A-EGFP-Puro;感染并筛选得到SK-Luc-EGFP单克隆细胞株。通过荧光显微镜和流式细胞术均能检测到EGFP的表达,细胞纯度达100%;通过流式细胞术和激光共聚焦成像可直观辨别SK-Luc-EGFP细胞与腹水微环境细胞。体外生物发光试验成功验证Luc的表达,且细胞数和生物发光信号的线性相关系数为0.997 9。细胞黏附试验中通过荧光成像直接观察到SK-Luc-EGFP细胞对间皮细胞的黏附;经腹腔注射SK-Luc-EGFP细胞观察到细胞在裸鼠大网膜上的黏附;在SK-Luc-EGFP细胞建立的卵巢癌腹腔转移模型中,利用小动物活体成像仪实现对腹腔肿瘤的活体监测。【结论】SK-Luc-EGFP细胞株在卵巢癌腹腔转移的体内外研究中具有多重应用潜力。

关键词:卵巢癌;腹腔转移;荧光素酶;增强型绿色荧光蛋白;构建

中图分类号:R737.31

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2023)06-0965-09

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0610

Construction of Artificial Cells with Application to Investigate Peritoneal Metastasis in Ovarian Cancer

WAN Li-zhou¹, DU Ru-pei², CHEN Kang-mei³

(1. Medical Research Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2. School of Biomedical Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 511442, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Correspondence to: CHEN Kang-mei; E-mail: chenkm7@outlook.com

Abstract:【Objective】To construct a human ovarian cancer cell line SKOV3 (SK-Luc-EGFP) stably co-expressing luciferase (Luc) and enhanced green fluorescent protein (EGFP) and to explore its application in ovarian cancer research both *in vitro* and *in vivo*.【Methods】The recombinant plasmid pCDH-Luc-T2A-EGFP-Puro was constructed by introducing a Luc-T2A-EGFP fusion gene fragment amplified by Overlap PCR into plasmid vector. The three-plasmid lentivirus packaging system was transfected into HEK 293T cells and the viral supernatant was harvested to infect SKOV3 cells. SK-Luc-EGFP cell line with the highest fluorescence intensity of EGFP was obtained by puromycin selection and flow cytometry assessment, and the Luc expression of the cell line was subsequently validated by *in vitro* bioluminescent assay. SK-

收稿日期:2023-08-08

基金项目:国家自然科学基金(82002698);广东省基础与应用基础研究基金(2019A1515110502)

作者简介:万里舟,第一作者,研究方向:妇科肿瘤发生发展及靶向治疗研究,E-mail: wanlizhouwz@foxmail.com;陈康梅,通信作者,硕士生导师,E-mail: chenkm7@outlook.com

Luc-EGFP cells were further explored for the following applications: distinguishing SK-Luc-EGFP cells from non-tumor cells in ascites by flow cytometry and confocal microscopy; visualizing adhesion of SK-Luc-EGFP cells to mesothelial cells or omentum by fluorescence microscopy; monitoring process of SK-Luc-EGFP tumorigenesis by *in vivo* bioluminescence imaging. 【Results】 A recombinant lentiviral expression plasmid pCDH-Luc-T2A-EGFP-Puro was constructed and packaged into lentiviral particles that were then transfected into SKOV3 cells to generate SK-Luc-EGFP cell line. The purity of SK-Luc-EGFP cells based on EGFP expression was 100% as validated by fluorescence microscopy and flow cytometry; SK-Luc-EGFP cells could be visually distinguished from non-tumor cells in ascitic fluid by flow cytometry and confocal imaging. Moreover, Luc expression in SK-Luc-EGFP cells was verified by *in vitro* bioluminescence assay, and a linear relationship with a correlation coefficient of 0.997 9 was found between cell number and the bioluminescent signal. Adhesion of SK-Luc-EGFP cells to mesothelial cells was directly observed by fluorescence imaging in *in vitro* adhesion assay; peritoneal adhesion of SK-Luc-EGFP cells to omentum was also observed after intraperitoneal (i.p.) injection of SK-Luc-EGFP cells in nude mice; in the peritoneal metastasis mouse model established by i.p. injection of SK-Luc-EGFP cells, monitoring of tumorigenesis process was achieved by *in vivo* bioluminescence imaging. 【Conclusion】 SK-Luc-EGFP cell line is a useful tool for investigating ovarian cancer *in vitro* and *in vivo*.

Key words: ovarian cancer; peritoneal metastasis; luciferase; enhanced green fluorescent protein; construction

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2023, 44(6):965-973]

卵巢癌的死亡率位居妇科肿瘤之首,5年生存率低于50%^[1-2]。由于早期筛查和诊断困难^[3],超过80%的卵巢癌患者被确诊时已是晚期^[4],此时肿瘤细胞已经从原发部位脱落进入腹腔,以单细胞或细胞簇的形式向腹膜和网膜进行转移^[5]。目前晚期卵巢癌有80%的患者会在治疗后的15个月(中位数)复发^[6]。治疗后腹腔残留的游离癌细胞或微小病灶在腹腔的种植转移是卵巢癌复发的关键因素^[7]。因此,针对晚期卵巢癌以及术后残留癌细胞在腹腔的游离、种植及再转移的这一过程开展研究具有重大意义。腹腔转移模型是研究卵巢癌转移、扩散的有力工具,而利用非侵入性技术监测肿瘤并实时评估肿瘤生长和疗效至关重要^[8]。与皮下肿瘤监测不同,腹腔内肿瘤无法可视化或难以通过游标卡尺等工具量化,其必须依托磁共振成像(MRI)、计算机断层扫描(CT)和超声等影像学检查^[9]。但是这些检测方式成本较高、操作复杂且效果也不理想^[10],例如小动物CT采集时间长会使得造影剂在组织内达到平衡而导致组织间的对比度下降,影响成像效果^[11]。此外,卵巢癌腹膜和网膜黏附是其腹腔转移种植的最初步骤^[12],通过体内外实验研究卵巢癌细胞的黏附特性和作用机制具有重要的理论与实践价值。因此,构建一株能同时用于体内实时监测和体外机制探究的细胞可有助于将卵巢癌宏观和微观层面的研究相结合,为卵巢癌腹腔转移的机制与疗效研究提供极大的便利。近年来,荧光素酶(luciferase, Luc)成像系统在动物体

内研究中备受关注^[13];荧光素酶基因标记的肿瘤细胞可通过荧光素酶催化荧光素氧化产生生物发光而被检测,从而实现从微观到宏观水平上对肿瘤进程的可视化研究^[14];其具有无放射性、高灵敏度、设备成本相对较低、操作简单等优点,被广泛应用于小动物体内肿瘤细胞的示踪、肿瘤进展监测和量化分析^[15]。此外,荧光成像技术则是监测细胞动态过程的重要手段;增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)是目前最常用的报告基因之一,其发光无需辅因子、底物或酶成分的参与,而是由其蛋白序列固有的发色团产生荧光,常用于分子、亚细胞水平的成像^[16]。综上,本研究拟通过慢病毒感染构建同时稳定表达Luc和EGFP的人源卵巢癌细胞SKOV3(SK-Luc-EGFP),并利用该细胞株的光学双标记在体内外进行不同应用,将生物发光和荧光成像的优点相结合,为开展卵巢癌研究提供强有力的工具。

1 材料与方法

1.1 细胞和实验动物

人源卵巢癌细胞系SKOV3、人胚胎肾上皮细胞系HEK 293T源自美国典型生物资源保藏中心(ATCC);人源间皮细胞系MeT-5A购自武汉普诺赛生命科技有限公司;感受态细胞DH5 α 购自北京擎科生物科技有限公司;雌性BALB/c裸鼠购自广

州斯嘉景达生物科技有限公司。

1.2 质粒及引物

含有EGFP基因的质粒pEGFP-C1和含有Luc基因的质粒pGL3-Basic、慢病毒载体质粒pCDH-EF1-MCS-IRES-Puro和包装质粒psPAX2、pMD2.G均保存在本实验室。本文所用的PCR引物序列如表1所示。

表1 PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequences

Primers	Primer sequences(5'-3')
Luc	Forward: GCTAGCGAATTCATGGAAGACGC- CAAAAAATATAAG
	Reverse: CGACGTCACCGCATGTTAG- CAGACTTCCTCTGCCCTCCACGGC- GATCTTTCCGCC
EGFP	Forward: CTAACATGCGGTGACGTCGAG- GAGAATCCTGGCCCACTGAGCAAGGGC- GAGGAGC
	Reverse: GGCCGCGGATCCTTACTTGT- CAGCTCGTCCATGCC

1.3 主要试剂与仪器

D-荧光素钾盐购自大连美仑生物技术有限公司;DMEM高糖培养基购自美国Gibco公司;胰酶细胞消化液(0.25%胰酶,含酚红)、磷酸钙法细胞转染试剂盒和DNA凝胶回收试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;T4 DNA连接酶、限制性内切酶*EcoRI*、*BamHI*和Fast Digest绿色缓冲液(10×)购自美国赛默飞公司;高纯度低电渗琼脂糖、Gel-Red核酸凝胶染料和DL5000 DNA marker购自北京擎科生物科技有限公司;1-5™ 2X High-Fidelity Master Mix源自美国MCLAB公司;水平电泳仪源自美国BIO-RAD公司;倒置荧光显微镜源自日本Nikon公司;全自动数码凝胶图像分析系统源自中国天能公司;全波长微孔板酶标仪源自瑞士TECAN公司;激光共聚焦显微镜源自德国Zeiss公司;四色流式细胞仪源自美国BD公司;小动物活体成像仪源自美国PerkinElmer公司。

1.4 目的质粒的构建

1.4.1 目的序列的获取 以质粒pGL3-Basic和pEGFP-C1为模板,分别使用Luc和EGFP的引物将Luc-T2A和T2A-EGFP目的序列进行扩增,经琼脂

糖凝胶电泳确认,然后将扩增的两条目的序列DNA产物回收后混合作为模板,以T2A作为重叠序列,使用Luc的F端的引物和EGFP的R端的引物进行重叠PCR,得到Luc-T2A-EGFP目的序列,进行琼脂糖凝胶电泳确认并回收片段。

1.4.2 慢病毒载体以及目的片段的酶切及回收 使用限制性内切酶*EcoR I*和*BamH I*对载体质粒pCDH-EF1-MCS-IRES-Puro和重叠PCR后的产物在37℃酶切1h后,对酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,使用DNA凝胶回收试剂盒回收目的条带。

1.4.3 连接、转化及鉴定 按照以下体系进行连接:线性化载体DNA 20 ng,片段DNA 60 ng,10×T4 DNA连接缓冲液2 μL,T4 DNA连接酶1 μL,用超纯水将反应体系补齐至20 μL,在室温下反应30 min。将连接产物与100 μL的感受态细胞混合,冰浴15 min,42℃热激90 s,冰浴15 min;将菌液涂在含氨苄青霉素的LB琼脂平板上,37℃培养过夜,挑取5个单克隆菌落于液体LB培养基扩大培养;取2 μL菌液作为模板,使用Luc F端引物和EGFP R端引物进行菌落PCR。对菌落PCR的产物进行琼脂糖凝胶电泳验证。挑选含有目的基因的阳性菌落在50 mL含有氨苄青霉素(100 μg/mL)的LB液体培养基中扩增培养,使用质粒中提试剂盒提取质粒。采用限制性内切酶*EcoR I*和*BamH I*对提取的质粒进行双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳进行验证,而后通过DNA测序进行确认。

1.5 慢病毒包装

胰酶消化HEK 293T细胞并计数,按照 1.5×10^6 个细胞/孔在6孔板中进行铺板,37℃,体积分数5% CO₂培养12 h。在转染前1 h用无血清无抗生素培养基替换原培养液。将4 μg目的质粒、2 μg慢病毒包装因子psPAX2和1.5 μg pMD2.G加入至150 μL的氯化钙溶液中,把上述混合液加到150 μL的BBS溶液,混匀后室温静置20 min,并将上述转染复合物加到细胞孔中,轻轻摇匀,37℃,体积分数5% CO₂培养。6 h后,吸去无血清无抗生素培养基,加入含10% FBS的完全培养基,48 h后收集培养液上清,500 × g离心10 min,0.45 μm滤膜过滤上清得到病毒液。

1.6 细胞感染与筛选稳定表达细胞株

胰酶消化SKOV3细胞并计数,按照 5×10^5 个细胞/孔6孔板中进行铺板,37℃,体积分数5% CO₂培养12 h。吸走原培养基,加入含有Polybrene(10 μg/mL)的1.5 mL病毒液感染24 h,而后替换成含10% FBS

的完全培养基培养72 h。

在荧光显微镜下观察EGFP的表达情况,吸去原有培养液,加入含嘌呤霉素($1\ \mu\text{g}/\text{mL}$)的完全培养基进行筛选。每2 d换一次含嘌呤霉素($1\ \mu\text{g}/\text{mL}$)的培养基并观察细胞形态以及EGFP表达情况,直至无细胞死亡,得到稳定表达细胞池。消化细胞并计数,调整细胞悬液至 $10\ \text{个}/\text{mL}$,混合均匀后按照 $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 种于96孔板进行扩大培养。通过流式细胞术检测选取EGFP表达效率最高的单克隆细胞,命名为SK-Luc-EGFP,在含嘌呤霉素($1\ \mu\text{g}/\text{mL}$)的完全培养基中继续扩大培养。

1.7 检测EGFP基因的表达

1.7.1 荧光显微镜检测EGFP SK-Luc-EGFP和SKOV3细胞以 1×10^5 个/孔分别铺板24孔板,培养12 h后,用含Hoechst 33342($10\ \mu\text{g}/\text{mL}$)的完全培养基在 $37\ ^\circ\text{C}$ 下孵育10 min后,用荧光显微镜成像。

1.7.2 流式细胞术检测EGFP 胰酶消化SK-Luc-EGFP和SKOV3细胞并计数,用1% PBA(PBS加1% BSA)溶液重悬,200目尼龙筛网过滤,用流式细胞仪分别检测SK-Luc-EGFP和SKOV3细胞。

1.8 检测Luc基因的表达

胰酶消化SK-Luc-EGFP细胞并计数,调整为 8×10^5 个/mL的细胞悬液,用完全培养基梯度稀释至 8×10^5 、 4×10^5 、 2×10^5 、 1×10^5 、 0.5×10^5 个/mL,按照 $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 接种至黑色透明底96孔细胞培养板,待细胞贴壁后,用完全培养基将D-荧光素钾盐母液稀释成 $150\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的工作液,每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 与细胞在 $37\ ^\circ\text{C}$ 下孵育30 min,用全波长微孔板酶标仪检测其生物发光强度。

1.9 体外水平区分SK-Luc-EGFP与未标记细胞

SK-Luc-EGFP和未标记的SKOV3细胞分别以 1×10^5 个/孔分别铺板24孔板,培养12 h后,胰酶消化,用1% PBA溶液重悬,200目尼龙筛网过滤,用流式细胞仪检测两种细胞的混合样品。

1.10 动物水平区分SK-Luc-EGFP细胞与非肿瘤细胞

腹腔注射SK-Luc-EGFP细胞(1×10^7 个/只)至裸鼠体内,建立卵巢癌腹腔转移模型;14 d后,以脊椎脱臼法牺牲小鼠,吸取腹腔灌洗液,离心收集细胞。

1.10.1 流式细胞术检测SK-Luc-EGFP细胞与非肿瘤细胞 使用含Collagenase IV($0.2\ \text{mg}/\text{mL}$)和DNase I($0.15\ \text{mg}/\text{mL}$)的DMEM重悬收集到的细胞,

$37\ ^\circ\text{C}$ 消化10 min,离心后裂解红细胞,用1% PBA重悬,以200目尼龙网过滤,加入 $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 碘化丙啶避光孵育5 min后用流式细胞仪检测。

1.10.2 共聚焦检测SK-Luc-EGFP细胞与非肿瘤细胞 用红细胞裂解液处理收集到的细胞,细胞计数后调整为 10^6 个/mL,用 $40\ \text{g}/\text{L}$ 多聚甲醛室温固定20 min,离心,弃上清,用 $200\ \mu\text{L}$ 去离子水重悬,取 $10\ \mu\text{L}$ 涂抹在洁净载玻片上制备细胞涂片,待其自然干燥后,用DAPI($2\ \mu\text{g}/\text{mL}$)染色5 min,滴加适量抗荧光淬灭剂,加盖盖玻片封片,使用激光共聚焦显微镜观察。

1.11 SK-Luc-EGFP细胞-间皮细胞黏附试验与体内黏附的检测

胰酶消化MeT-5A间皮细胞并计数,以 3×10^6 个细胞/孔铺板24孔板,培养24 h至细胞汇合度接近100%;吸去上清,用含Hoechst 33342($10\ \mu\text{g}/\text{mL}$)的培养基 $37\ ^\circ\text{C}$ 染色10 min并用PBS漂洗。同时,将SKOV3和SK-Luc-EGFP细胞分别用胰酶消化计数,按照 1×10^5 个/孔分别将细胞悬液加入MeT-5A细胞上层,30 min后,用PBS漂洗后,使用荧光显微镜成像。

以 1×10^7 个/只的细胞量分别腹腔注射SKOV3和SK-Luc-EGFP细胞至裸鼠体内,4 h后,按照 $10\ \mu\text{L}/\text{g}$ 的剂量腹腔注射 $15\ \text{mg}/\text{mL}$ 的D-荧光素钾盐溶液,15 min后,脊椎脱臼法牺牲小鼠,取出大网膜,PBS漂洗3遍,置于含有PBS溶液的12孔板中,使用小动物活体成像仪观测。

1.12 SK-Luc-EGFP细胞体内成瘤及监测

腹腔注射SK-Luc-EGFP细胞(1×10^7 个/只)至裸鼠体内,建立卵巢癌腹腔转移模型;分别在植瘤后第3、6、11、14天,用异氟烷气体麻醉小鼠,按照 $10\ \mu\text{L}/\text{g}$ 的剂量腹腔注射 $15\ \text{mg}/\text{mL}$ 的D-荧光素钾盐溶液,15 min后用小动物活体成像仪监测生物发光强度。第21天,牺牲小鼠,观察腹腔内肿瘤结节生长情况并拍照计数,取大网膜和子宫附近的结节、完整的附有结节的肠系膜、心脏、肺、肝脏、脾脏以及肾脏,通过小动物成像系统检测EGFP荧光信号。

1.13 数据处理及统计学方法

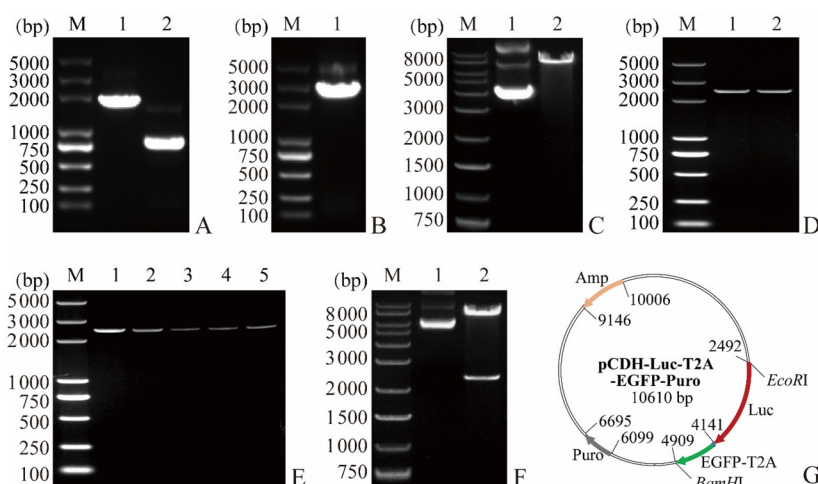
使用SPSS 22.0进行数据的统计学分析并使用GraphPad Prism 8.0软件进行可视化,结果以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验进行差异显著性分析,当 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 重组慢病毒载体的构建

分别使用 pGL3-Basic 和 pEGFP-C1 作为模板,加入相应引物,扩增得到 Luc-T2A (1.7 kb) 和 T2A-EGFP (0.77 kb) 片段 (图 1A); 将上述两个 PCR 产物作为模板,加入 Luc 的前引物 F (含酶切位点 *EcoR* I) 和 EGFP 的后引物 R (含酶切位点 *BamH* I), 通过重叠 PCR 得到 Luc-T2A-EGFP 片段 (约 2.5 kb)

(图 1B); 利用 *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切 pCDH-EF1-MCS-IRES-Puro 载体 (图 1C) 及 Luc-T2A-EGFP 片段 (图 1D); 回收后进行连接转化, 挑取 5 个单克隆菌落进行 PCR 验证, 片段大小均与预期相符合 (图 1E); 而后挑选 1 号菌落进行扩增培养提取质粒 DNA 并通过 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切验证, 得到 2.5 kb 左右的条带, 与 Luc-T2A-EGFP 片段大小相符 (图 1F); 对构建好的质粒进行测序, 所得结果与理论序列相符; 证明质粒成功构建, 重组质粒的图谱如图 1G 所示。



A: PCR products of Luc and EGFP gene. 1: Luc-T2A fragment; 2: EGFP fragment. B: Overlap PCR product of Luc-T2A-EGFP. 1: Luc-T2A-EGFP fragment. C: Restriction digestion of vector pCDH-EF1-MCS-IRES-Puro. 1: undigested vector; 2: digested vector. D: Restriction digestion of Luc-T2A-EGFP fragment. 1: undigested fragment; 2: digested fragment. E: Colony PCR shows that all selected colonies contain Luc-T2A-EGFP fragment. 1-5: PCR products from different colonies. F: Restriction digestion of recombinant plasmid pCDH-Luc-T2A-EGFP-Puro with *EcoR*I and *BamH*I shows a resulting fragment of 2.5 kb as expected. 1: undigested plasmid; 2: product of digestion. G: Schematic representation of the recombinant plasmid pCDH-Luc-T2A-EGFP-Puro. M: DNA marker.

图 1 重组质粒 pCDH-Luc-T2A-EGFP-Puro 的构建

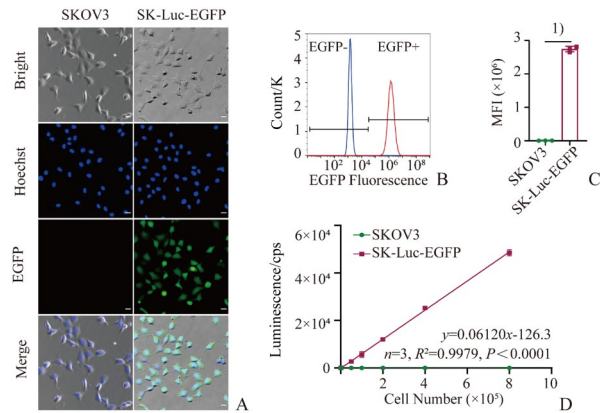
Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pCDH-Luc-T2A-EGFP-Puro

2.2 SK-Luc-EGFP 细胞的构建和表征

利用磷酸钙转染法将三质粒慢病毒系统 (psPAX2、pMD2.G 及 pCDH-Luc-T2A-EGFP-Puro) 转染至 HEK 293T 细胞, 48 h 后收集病毒上清液, 并感染 SKOV3 细胞, 经过嘌呤霉素筛选, 获得稳定表达 Luc 和 EGFP 的 SKOV3 细胞, 通过荧光显微镜发现其有明显的绿色荧光信号 (图 2A)。采用极限稀释法对表达 EGFP 的细胞进行单克隆筛选, 而后利用流式细胞术检测 EGFP 强度, 挑选强度最高的单克隆得到 SK-Luc-EGFP 细胞株。对比 SKOV3 和 SK-Luc-EGFP 细胞的 EGFP 荧光信号, 发现 SK-Luc-EGFP 的 EGFP 荧光阳性率达 100% (图 2B), 证明 EGFP 的成功表达。对两种细胞的 EGFP 荧光强

度进行分析, SK-Luc-EGFP 的平均荧光信号强度 (平均值为 2.74×10^6) 是 SKOV3 细胞 (平均值为 2.58×10^3) 的 1062 倍 (图 2C), 且差异具有统计学意义 ($t = 57.011, P < 0.001$)。

为进一步验证 SK-Luc-EGFP 细胞的荧光素酶表达, 将细胞和 D-荧光素钾盐共孵育后, 检测其生物发光强度。以细胞数为横坐标, 生物发光强度为纵坐标, 绘制相关曲线 (图 2D)。随着细胞数目的增多, 其生物发光强度也增强, 相关系数为 0.997 9 ($P < 0.000 1$), 证明 SK-Luc-EGFP 的细胞数和生物发光强度呈线性相关。综上, 我们成功构建了稳定高效表达 Luc 和 EGFP 的 SK-Luc-EGFP 细胞株。



A: Visualization of EGFP by fluorescence microscopy shows high expression of EGFP in SK-Luc-EGFP cells. Blue: Hoechst; Green: EGFP. Scale bar: 20 μm . B: Flow cytometry analysis shows that the purity of SK-Luc-EGFP cells expressing EGFP reaches 100%. Blue: SKOV3 cells; Red: SK-Luc-EGFP cells. C: Quantitative analysis of mean EGFP fluorescence intensity shows an approximately 1062-fold increase in SK-Luc-EGFP cells compared to SKOV3 cells. Data with normal distribution are presented as $\bar{x} \pm s$, $n = 3$, $t = 57.011$, $1) P < 0.001$ compared with SKOV3 group. D: *In vitro* bioluminescence assay of Luc expression shows a linear relationship between cell number and bioluminescent signal in SK-Luc-EGFP cells. cps: count per second.

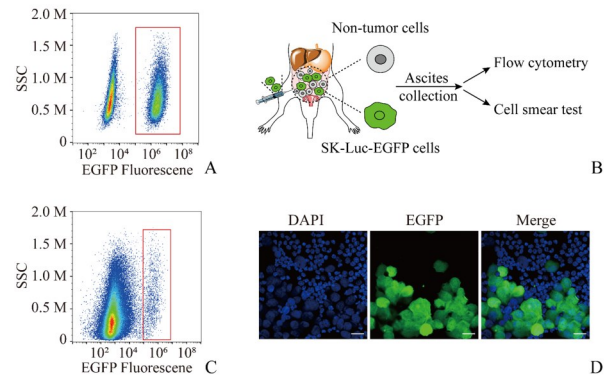
图2 SK-Luc-EGFP细胞株的表征

Fig. 2 Characterization of SK-Luc-EGFP cell line

2.3 SK-Luc-EGFP细胞在研究卵巢癌转移中的应用

研究卵巢癌细胞在腹腔的种植与转移,首先需要明确地区分肿瘤细胞与其他组织细胞。由于SK-Luc-EGFP细胞高效表达EGFP,因此在体内外均可将SK-Luc-EGFP细胞与其他细胞进行区分,无需其他特异性荧光抗体。在体外实验中,通过流式细胞术可以清楚地区分SK-Luc-EGFP细胞与其他非荧光标记细胞(图3A)。进一步,在SK-Luc-EGFP细胞构建的卵巢癌腹腔转移模型小鼠中取出腹水,收集细胞,用流式细胞术和激光共聚焦分别检测腹水中游离肿瘤细胞SK-Luc-EGFP及腹水微环境中的其他细胞包括巨噬细胞、成纤维细胞、脂肪细胞等的EGFP表达(图3B);流式结果显示,SK-Luc-EGFP与腹水中其他细胞可以通过EGFP信号进行分群(图3C);同时腹水细胞涂片的共聚焦检测中更直观、清晰地观察到呈现绿色荧光的SK-Luc-EGFP细胞,可与其他细胞进行区分(图3D)。因此,基于EGFP的荧光特性,可以较好地区分并筛选出卵巢癌细胞SK-Luc-EGFP。

卵巢癌腹腔转移过程中首先累及腹膜间皮细



A: Flow cytometry analysis shows that SK-Luc-EGFP cells are reliably distinguished from non-EGFP-expressing cells *in vitro*. The red box indicates SK-Luc-EGFP cells. B: Schematic figure of experimental design for C and D. C: Flow cytometry shows that SK-Luc-EGFP cells are readily separated from non-tumor cells present in the mouse ascites. The red box indicates SK-Luc-EGFP cells. D: Representative confocal images of ascites cell smear clearly show SK-Luc-EGFP cells and non-EGFP-expressing cells. Blue: DAPI; Green: EGFP. Scale bar: 20 μm .

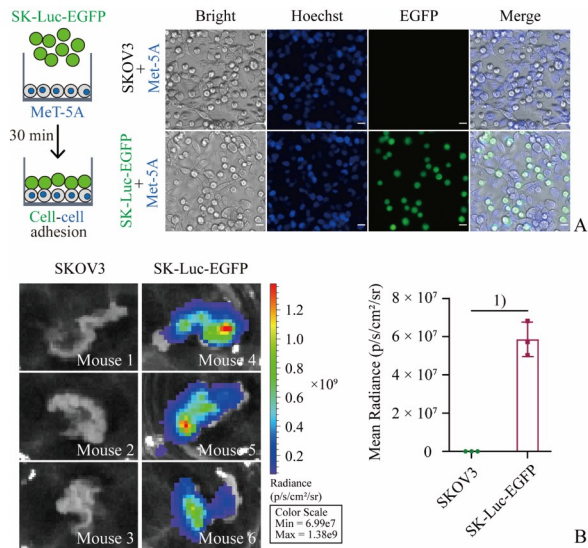
图3 利用EGFP在体内外区分SK-Luc-EGFP细胞与未标记细胞

Fig. 3 SK-Luc-EGFP cells can be distinguished from cells without EGFP labeling *in vitro* and *in vivo*

胞,因此可以通过细胞间黏附实验研究卵巢癌细胞对间皮的黏附特性和机制。研究两种细胞之间的黏附需要分别对两者进行不同荧光的标记,而使用SK-Luc-EGFP细胞可以使黏附实验研究更加简单直接。MeT-5A细胞(人源永生化间皮细胞)通过Hoechst 33342进行细胞核标记,而SK-Luc-EGFP细胞无需荧光染料染色就可以被观察和定位。黏附实验结果显示,Hoechst 33342染色细胞上层有明显的EGFP信号(图4A),说明SK-Luc-EGFP细胞黏附在MeT-5A细胞上。

在最常见的浆液性卵巢癌中,80%的患者都存在网膜转移^[17],大网膜是一个从胃延伸并覆盖肠道的脂肪垫,作为内分泌器官和能量密集型脂质的储存场所发挥作用^[18-19];观察肿瘤细胞与大网膜的相互作用对研究卵巢癌的黏附转移具有重要意义,而利用SK-Luc-EGFP细胞可以直观地展示卵巢癌细胞在大网膜上的黏附。经腹腔分别注射SK-Luc-EGFP细胞和SKOV3细胞至裸鼠体内,4 h后取出小鼠的大网膜,利用小动物活体成像仪检测大网膜上的生物发光信号来研究卵巢癌细胞的在大网膜上的转移和定植情况。相较于SKOV3组,注射了SK-Luc-EGFP细胞的小鼠大网膜上有明显的生物发光信号,且差异具有统计学意义($t = 11.235$, $P <$

0.001),说明其上黏附有大量的SK-Luc-EGFP细胞(图4B)。



A: Tumor cell-mesothelial cell adhesion assay. Representative images show that SK-Luc-EGFP cells adhere to MeT-5A cells. Blue: nuclei of MeT-5A cells; Green: SK-Luc-EGFP cells. Scale bar: 20 μm . B: *Ex vivo* omentum bioluminescence imaging (left) and quantitative data (right) show the adhesion of SK-Luc-EGFP cells to omentum at 4 h after the i.p. injection of cells into nude mice. Bioluminescent signal intensity was expressed as photons/second/cm²/steradian (p/s/cm²/sr). Data with normal distribution are presented as $\bar{x} \pm s$, $n = 3$, $t = 11.235$, $1) P < 0.001$ compared with SKOV3 group.

图4 SK-Luc-EGFP细胞的体内外黏附实验

Fig. 4 Adhesion assay of SK-Luc-EGFP cells *in vitro* and *in vivo*

目前一般经小鼠腹腔注射卵巢癌细胞构建卵巢癌腹腔转移模型,然而如何实时监测癌细胞的生长是该模型面临的技术难题。通过腹腔注射SK-Luc-EGFP细胞建立卵巢癌腹腔转移模型,在植瘤3、6、11、14天后通过小动物活体成像仪检测每只小鼠腹部的生物发光强度即可观察SK-Luc-EGFP的成瘤情况(图5D)。实验组小鼠于第3天即可见明显的生物发光信号,并且随着时间推移而不断增强,证明SK-Luc-EGFP细胞在小鼠体内具有良好的成瘤能力,且可以通过生物发光信号监测和量化肿瘤的生长情况(图5A)。待21天后牺牲小鼠,对其腹腔成瘤情况进行拍照记录,结果显示,与空白组小鼠相比,SKOV3及SK-Luc-EGFP荷瘤小鼠腹腔的大网膜、肠系膜及子宫脂肪组织上均分布有大量大小不一的粟粒样结节(图5B);剥离小鼠大网膜、子宫附近的结节及完整的附有结节的肠系膜,

并取腹腔各脏器通过小动物成像系统检测EGFP荧光信号,可以看到相较于SKOV3组及其他脏器,SK-Luc-EGFP组小鼠的各结节及肠系膜上呈现明显的EGFP肿瘤信号,说明粟粒样结节为SK-Luc-EGFP细胞诱导形成的转移性肿瘤结节(图5C)。

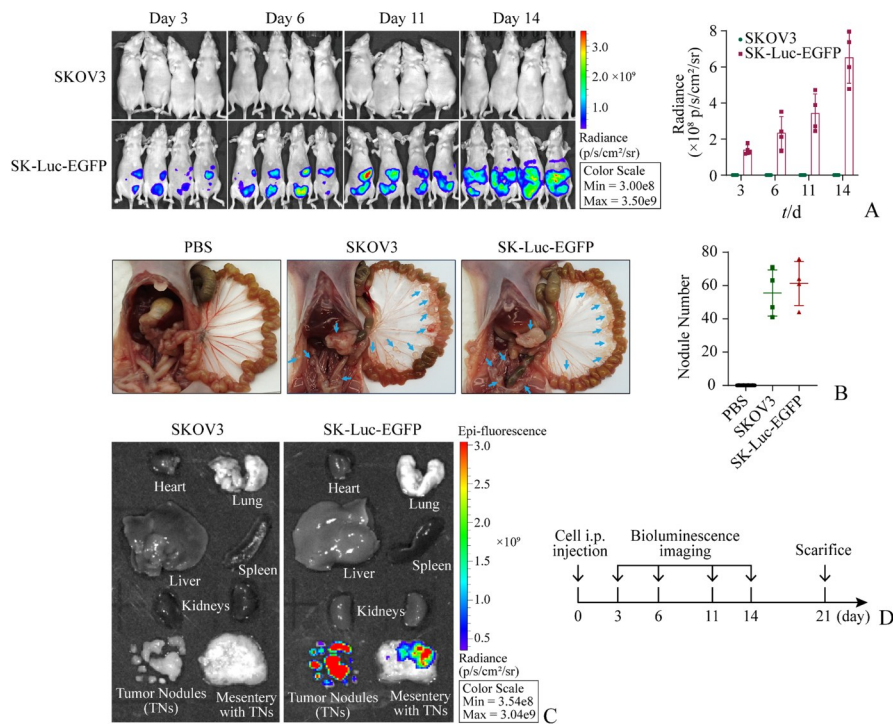
综上所述,SK-Luc-EGFP细胞在体内外均能稳定表达Luc和EGFP,可广泛地用于卵巢癌体内外的生长、黏附、转移等研究。

3 讨论

腹腔种植转移是晚期卵巢癌最常见的转移方式,也是卵巢癌高发率和死亡率的主要原因^[20]。针对卵巢癌细胞在腹膜腔生长、黏附、侵袭和转移的特性,开发一种高效且实用的光学成像工具细胞,对实现其在体内动物模型中的可视化监测和体外细胞水平的机制研究具有重要意义。

本研究利用慢病毒基因载体^[21],将Luc基因及EGFP基因整合进卵巢癌细胞基因组,使两种标记基因高效、稳定和长期表达。一方面在构建细胞株过程中可将EGFP作为阳性标志进行筛选;另一方面,EGFP无需额外辅助因子,只需分子氧形成发色团,相较于生物发光仅能应用于活细胞以及需要添加底物进行发光的限制,EGFP可以对固定样品中的靶细胞或蛋白进行检测^[22],并且可以直接应用于需要多种荧光共同成像的机制研究中。本研究构建的SK-Luc-EGFP细胞株高表达EGFP,可通过流式细胞术、荧光显微镜、激光共聚焦等技术手段轻易地区分肿瘤细胞与腹水微环境中的其他细胞,可用于研究其在体内外的生长、黏附机制;然而在动物体内成像中,EGFP因激光穿透能力的限制及非特异荧光产生的背景信号干扰,其体内成像质量较差^[23]。与之不同的是,生物发光由于成像技术与分辨率等的条件限制,其在细胞以及分子水平的观测较为困难;但在体内活体动物成像中特异性好、灵敏度强和检测深度高;本研究通过SK-Luc-EGFP细胞结合活体成像技术,有效实现了活体实时监测小鼠腹腔内肿瘤的生长。因此,将两种光学成像技术有机的结合起来,应用于卵巢癌腹腔转移的体内外研究中,具有重要的理论与实际价值。

值得注意的是,本研究中所用的萤火虫荧光素酶(F-Luc)在荧光素酶家族中,并不是目前最为出彩的成员。来源于深海虾改造后的NanoLuc(N-



A: *In vivo* bioluminescence imaging (left) and quantitative data (right) show intense bioluminescent signals that can gradually increase over time in the abdomen of mice ($n = 4$) injected with SK-Luc-EGFP cells. B: Representative anatomic images show disseminated peritoneal nodules indicated by blue arrows (left), and total nodule number is shown (right). C: *Ex vivo* fluorescence images show strong EGFP fluorescent signals in the nodules on omentum, uterus fat and mesentery collected from mice with SK-Luc-EGFP xenograft transplantation. D: Schematic diagram of the experiment. Bioluminescent signal intensity was expressed as photons/second/cm²/steradian (p/s/cm²/sr).

图5 通过活体成像对卵巢癌腹腔转移模型小鼠的成瘤情况进行监测

Fig. 5 *In vivo* bioluminescence imaging for monitoring tumor growth in ovarian cancer peritoneal metastasis mouse model

Luc)是一种新型荧光素酶^[24-25],其分子量(19 ku)与F-Luc(61 ku)相比更小,热稳定性高,且更为耐受强酸、强碱和高盐环境;其自发光背景低,发光强度是F-Luc的150倍,信号持续时间更是高出2.5倍,半衰期大于2 h^[26]。这些优点使得N-Luc与F-Luc相比具有更好的灵敏度,其在肿瘤细胞较少的情况下或可检测到更高亮度的发光信号,后续研究若替换为N-Luc有望得到更好的监测效果。

此外,荧光素酶的生物发光与EGFP的荧光成像的发射波长都处于可见光范围。由于生物体中存在多种成分,例如黑色素、血红蛋白、细胞色素等,对可见光波段有较高的吸收或散射,进而导致可见光组织穿透性较差,且在此波段内生物组织有一定的自发荧光干扰;使得体内成像中,生物发光的组织穿透能力欠佳,分辨率较低^[27-28]。相比之下,人体组织对近红外光吸收和散射较低,因而近年来近红外荧光活体成像技术快速发展。然而,近红外荧光成像高度依赖于荧光染料,其除了应具备

近红外区的吸收光谱和发射光谱以及较高的耐光漂白性外,还应具有良好的水溶性、低毒性、高组织靶向性及组织穿透能力等,才能达到安全、高效、灵敏成像的目的^[29]。此外,大部分荧光染料缺乏组织细胞特异性;在通过化学修饰对染料进行改性的同时,还必须考虑到其结构变化对细胞毒性或组织安全性的影响,且染料在成像过程中是否容易和蛋白、DNA等活性分子相互作用,从而影响其发光性能或细胞的生理功能也是值得关注的问题^[30]。总之,在生物医学研究中,各种检测手段都具有其局限性;将多种荧光成像手段有机结合,才能实现多维度的全面诊疗。

综上所述,本文联合生物发光和荧光探针技术,成功构建了稳定表达Luc与EGFP的双标记卵巢癌工具细胞SK-Luc-EGFP,其可应用于体内外监测卵巢癌细胞黏附、生长、转移等实验研究中,为后续卵巢癌的发病机制、创新药物和治疗策略研究等提供了重要、便利的实验基础。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7–33.
- [2] Zheng R, Zhang S, Zeng H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016[J]. *J Natl Cancer Cent*, 2022, 2(1): 1–9.
- [3] Castellani F, Nganga EC, Dumas L, et al. Imaging in the pre-operative staging of ovarian cancer[J]. *Abdom Radiol (NY)*, 2019, 44(2): 685–696.
- [4] Bast RC, Han CY, Lu Z, et al. Next steps in the early detection of ovarian cancer[J]. *Commun Med (Lond)*, 2021, 1: 36.
- [5] Prat J. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2014, 124(1): 1–5.
- [6] Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer[J]. *Lancet*, 2009, 374(9698): 1371–1382.
- [7] Azañs H, Vignion-Dewalle AS, Carrier M, et al. Microscopic peritoneal residual disease after complete macroscopic cytoreductive surgery for advanced high grade serous ovarian cancer[J]. *J Clin Med*, 2020, 10(1): 41.
- [8] Fu SL, Chen CA, Hung LC, et al. Preliminary results of a non-invasive method to measure tumor size and distribution in vivo[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(6): 3614–3620.
- [9] Klerk CP, Overmeer RM, Niers TM, et al. Validity of bioluminescence measurements for noninvasive in vivo imaging of tumor load in small animals[J]. *Biotechniques*, 2007, 43(1 Suppl): 7–13;+30.
- [10] Kagadis GC, Loudos G, Katsanos K, et al. In vivo small animal imaging: current status and future prospects[J]. *Med Phys*, 2010, 37(12): 6421–6442.
- [11] Rampurwala M, Ravoori MK, Wei W, et al. Visualization and quantification of intraperitoneal tumors by in vivo computed tomography using negative contrast enhancement strategy in a mouse model of ovarian cancer[J]. *Transl Oncol*, 2009, 2(2): 96–106.
- [12] Mei SS, Chen X, Wang K, et al. Tumor microenvironment in ovarian cancer peritoneal metastasis[J]. *Cancer Cell Int*, 2023, 23(1): 1–13.
- [13] Jiang Y, Pu K. Molecular probes for autofluorescence-free optical imaging[J]. *Chem Rev*, 2021, 121(21): 13086–13131.
- [14] Serkova NJ, Glunde K, Haney CR, et al. Preclinical applications of multi-platform imaging in animal models of cancer[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(5): 1189–1200.
- [15] Alsawafah N, Farooq A, Dhou S, et al. Bioluminescence imaging applications in cancer: a comprehensive review[J]. *IEEE Rev Biomed Eng*, 2021, 14: 307–326.
- [16] Ohba Y, Fujioka Y, Nakada S, et al. Fluorescent protein-based biosensors and their clinical applications[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2013, 113: 313–348.
- [17] Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth[J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1498–1503.
- [18] Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis[J]. *The Am J Pathol*, 2010, 177(3): 1053–1064.
- [19] Mukherjee A, Chiang CY, Daifotis HA, et al. Adipocyte-induced FABP4 expression in ovarian cancer cells promotes metastasis and mediates carboplatin resistance[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(8): 1748–1761.
- [20] Van Baal J, Van Noorden CJF, Nieuwland R, et al. Development of peritoneal carcinomatosis in epithelial ovarian cancer: a review[J]. *J Histochem Cytochem*, 2018, 66(2): 67–83.
- [21] Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational[J]. *Biochem J*, 2012, 443(3): 603–618.
- [22] Scott DJ, Gunn NJ, Yong KJ, et al. A novel ultra-stable, monomeric green fluorescent protein for direct volumetric imaging of whole organs using CLARITY[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 667.
- [23] Tam JM, Upadhyay R, Pittet MJ, et al. Improved in vivo whole-animal detection limits of green fluorescent protein-expressing tumor lines by spectral fluorescence imaging[J]. *Mol Imaging*, 2007, 6(4): 269–276.
- [24] Hall MP, Unch J, Binkowski BF, et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate[J]. *ACS Chem Biol*, 2012, 7(11): 1848–1857.
- [25] Syed AJ, Anderson JC. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond[J]. *Chem Soc Rev*, 2021, 50(9): 5668–5705.
- [26] Sfaric I, Bui T, Daniels EC, et al. Nanoluciferase-based method for detecting gene expression in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Genetics*, 2019, 213(4): 1197–1207.
- [27] Miao Q, Pu K. Organic Semiconducting agents for deep-tissue molecular imaging: second near-infrared fluorescence, self-luminescence, and photoacoustics[J]. *Adv Mater*, 2018, 30(49): e1801778.
- [28] Yoon S, Cheon SY, Park S, et al. Recent advances in optical imaging through deep tissue: imaging probes and techniques[J]. *Biomater Res*, 2022, 26(1): 57.
- [29] Chen Y, Wang S, Zhang F. Near-infrared luminescence high-contrast in vivo biomedical imaging[J]. *Nat Rev Biomed Eng*, 2023, 1: 60–78.
- [30] Yue Y, Zhao T, Wang Y, et al. HSA-Lys-161 covalent bound fluorescent dye for in vivo blood drug dynamic imaging and tumor mapping[J]. *Chem sci*, 2021, 13(1): 218–224.