

Tca8113 细胞株电穿孔法 p53 基因转染及 G418 体外筛选条件的研究

陈谦明 李秉琦 彭文珍 傅继梁

摘要 通过体外细胞培养方法,研究了进行舌鳞癌细胞株 Tca8113 p53 基因电穿孔法转染的最佳实验条件。结果显示在细胞培养至 36 h、电场强度为 625 V/cm 时转染效果最佳,转染后选择剂 G418 的最佳浓度为 300 μg/ml。按此条件已成功地进行了 p53 基因的体外转染。

关键词 电穿孔 基因转染 口腔鳞状细胞癌株 p53 基因

通过作者自行建立的银染聚合酶链反应 - 单链构象多态分析方法的研究发现,在口腔粘膜鳞状细胞癌的发生发展过程中存在着 p53 基因的异常^{1~3},而且,已筛选出了 p53 基因缺陷的口腔粘膜鳞癌细胞株 Tca8113⁴。由于 p53 基因是较为重要的抑癌基因,研究者们设想将它应用于人类肿瘤的基因治疗,要达到这一目的,首先应证实它能否在体外培养状态下抑制具有 p53 基因功能缺陷细胞株的生长。而基因的转染成功,是该实验的关键,所以本文的研究目的是研究进行舌鳞癌细胞株 Tca8113 p53 基因电穿孔转染时的最佳条件。

1 材料和方法

1.1 材料

细胞株:人舌部鳞状上皮细胞癌株 Tca8113 由上海第二医科大学口腔医学院建株⁵,转引自华西医科大学肿瘤研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:参考鄂征⁶介绍的技术进行。癌细胞用 RPMI 1640 培养基培养,培养基内含 15% 新生小牛血清、青霉素和链霉素各 20 万单位/L,在 37℃,5% CO₂ 和 70%~80% 湿度的 CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司产)内培养,0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)消化传代。

1.2.2 舌癌细胞株的生物学特性鉴定

(a) 形态学观察:仔细观察、记录癌细胞的形态学、生长特点、移行方式、培养基的变化等。

(b) 克隆形成率:细胞均以 200 细胞/孔接种 60

cm² 平皿,13 d 后弃培养基,甲醇固定,结晶紫染色,计数克隆数,以所计的克隆数除以接种细胞数即得该细胞的克隆形成率。

(c) 生长曲线测定:两株细胞均以 1 × 10⁵ 细胞/孔接种 24 孔板,每天随机取 2 孔消化、计数,共计 13 d,以时间为 X 轴,细胞数为 Y 轴,经计算机自动进行 9 种曲线拟合,得最佳曲线方程,根据细胞对数生长期曲线最佳方程,求得群体倍增时间。

1.2.3 G418 对舌鳞状细胞癌株 Tca8113 的毒性试验:Tca8113 细胞以 2.75 × 10⁵/孔接种 24 孔板,同时或细胞贴壁(24 h)后加入 100~1000 μg/ml 的选择剂 G418,补充培养基至 1 ml,每 3 d 换液一次,并与空白对照孔对照连续观察 13 d,注意细胞毒性出现时间;13 d 后弃培养基,PBS 缓冲液清洗,观察残留细胞数,以求得最佳效果的最小药物使用剂量。

1.2.4 电场强度与舌鳞状细胞癌株 Tca8113 存活率的关系:根据 GIBCO 公司电穿孔仪操作手册,采用 0.4 cm 电穿孔杯,在 0~330 μF、低电阻恒定条件下,对舌癌细胞株 Tca8113 细胞进行了 0~400 V 电击存活率试验。

1.2.5 p53 基因转染舌鳞状细胞癌株 Tca8113 实验条件的初步应用:根据本研究所摸索的 p53 基因转染舌鳞状细胞癌株的条件,进行电击转移,完成后静置于冰

国家自然科学基金资助及美国纽约中华医学基金会(CMB)资助课题

作者单位:610041 华西医科大学口腔医学院(陈谦明,李秉琦),华西医科大学医学分子生物学研究室(彭文珍),第二军医大学生物学教研室(傅继梁)

水浴中 10 min,再将细胞/DNA 电穿孔混合物接种于 15 cm² 培养瓶中(各 2 瓶),加入含血清培养基中常规培养 24 h 后,更换不含选择剂的常规培养基继续培养 48 h,更换含 G418 300 μg/ml 的选择性培养基进行筛选,每 3 d 换液一次,注意观察细胞的形态学变化。转染分为 4 组进行,1 组为未转染任何基因的空白对照;2 组为空白载体;3 组为携带野生型 p53 基因的质粒;4 组为携带突变型 p53 基因的质粒。

2 结果和讨论

2.1 舌癌细胞株的生物学特性

舌癌细胞株 Tca8113 细胞呈较小的立方形,核多居边,光密度均匀,群体异质性小,增殖方式呈原位岛状,与细胞量关系不大,脱落细胞少,细胞分化程度低,甚至无分化,细胞生长无接触抑制,甚至重叠生长,培养基 pH 变化较慢,在本实验培养条件下,其克隆形成率较高,约为 92%;9 种曲线拟合后计算发现,其群体倍增时间约为 36 h,说明在细胞传代培养 36 h 左右,最适合进行基因转染。

2.2 G418 对舌癌细胞株 Tca8113 的毒性试验

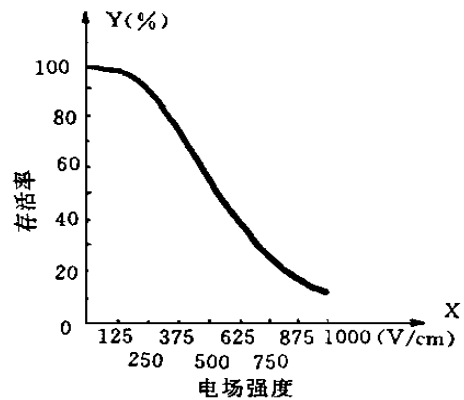
G418 是细胞基因转染过程中常用的选择抗生素。当作用于普通细胞时,由于细胞不含抗 G418 的抗性基因,因而会中毒死亡;相反,当转染质粒中携带的抗 G418 的抗性基因 neo^R 基因表达时,则细胞获得对 G418 的抗性而不死亡,从而区别出基因是否已转染成功⁷。由于作者所获得的携带野生型 p53 基因、突变型 p53 基因 cDNA 的表达型载体以及作者构建的空白对照载体 pCMV-neo-Bam 中⁴ 均以 neo^R 为选择标记,而不同细胞株对 G418 的敏感性不同,因此,作者设计了 G418 对舌癌细胞株 Tca8113 的毒性实验。结果显示,舌癌细胞株对 G418 不甚敏感,至染毒 7 d 后 500 μg/ml 以上组才出现中毒颗粒,8 d 后开始出现 800 μg/ml 以上组细胞死亡。13 d 弃培养基,PBS 清洗后染色观察发现,500 μg/ml 以上剂量组细胞基本全部死亡;300 ~ 400 μg/ml 组残存少许成活细胞,而 100 ~ 200 μg/ml 组成活细胞较多。考虑到在基因转染时需挑选出具有 G418 抗性的细胞克隆,但采用电穿孔进行基因转染时细

胞曾受轻度损伤,选择压力不宜过高,故选择了 G418 300 μg/ml 用于正式实验。

2.3 不同电场强度与舌癌细胞株 Tca8113 细胞存活率的关系

附表 不同电场强度下 Tca8113 细胞的存活率

电场(V/cm)	存活率(%)	相对存活率(%)
0	98	100
125	97	98.97
250	94	95.92
375	75	76.53
500	58	59.18
625	43	43.88
750	21	21.43
875	18	18.37
1000	9	9.18



附图 不同电场强度下 Tca8113 细胞的存活率曲线

基因转染的方法有多种类型,如经典的磷酸钙沉淀法等。而电穿孔法是一种通过瞬间放电的电场作用使细胞膜通透性发生短暂改变而将外源 DNA 导入细胞的一种方法。该法适用的细胞范围广,转染效率高,而对质粒的纯度要求不太严格,操作简便、快速、条件易于控制,实验数据重复性强,是哺乳动物细胞转染方法中的一种较为稳定可靠的方法⁸。由于电穿孔时击穿电压的选择对于提高基因转移成功率,保证转染后细胞的活性是至关重要的,但不同细胞对电场的耐受性各异,因而一般选择细胞经电击后成活率为 50%左右的电场强度转染,可

达最高的转染效率。从附表和附图中可见,舌癌细胞株 Tca8113 50 %细胞存活的电场强度约为 625 V/cm,说明以 625 V/cm 电场强度进行该细胞株的基因转染效果最佳。

2.4 p53 基因电穿孔法转染舌癌细胞株 Tca8113 的效果

按本研究所获得条件进行 p53 基因的电穿孔转染后观察,至筛选第 14 d 后,未转染任何质粒的 Tca8113 细胞全部死亡,转染 pCMV-neo-Bam 载体组、突变型 p53 基因组和野生型 p53 基因组的细胞都有不同量的细胞生长。从分化度来看,转染突变型 p53 基因及 pCMV-neo-Bam 载体细胞的形态、大小、核/浆比值与未转染前差别不大,细胞重叠生长仍可形成重叠生长;而转染野生型 p53 基因组的细胞伸展更趋平坦、充分,一些细胞核/浆比值缩小,胞浆内颗粒物质增多,核仁数目减少,几乎无重叠生长现象,说明细胞重新获得了或部分获得了接触抑制。由此可见,转染野生型 p53 基因后,可能恢复或部分恢复了舌癌细胞株 Tca8113 内源性 p53 基因丧失的功能,从而促进了细胞的分化。突变型 p53 基因由于丧失了正常功能,转染入已具有内源性 p53 基因缺陷的细胞株后,其效应都是表现为使 p53 基因失去对细胞生长的负调控作用,因此,对细胞分化无明显的影响。

因而也证实了本研究获得的基因转移条件的确实性。

3 参考文献

- 1 陈谦明,傅继梁,杨光华,等. 口腔粘膜鳞状细胞癌发生发展过程中 p53 基因突变的银染聚合酶链反应 - 单链构象多态分析. 中华口腔医学杂志,1996;31(5) 排版中
- 2 陈谦明,杨光华,傅继梁,等. 口腔粘膜癌变过程中 p53 基因突变与 p53 蛋白异常表达的关系. 华西医科大学学报,1996;27(3) 240
- 3 陈谦明,傅继梁,杨光华,等. 口腔粘膜鳞状细胞癌发生发展过程中 p53 基因、p53 蛋白及 PCNA 抗原改变的临床意义. 华西口腔医学杂志,1996(待发表)
- 4 陈谦明,彭文珍,傅继梁,等. p53 基因抑制口腔粘膜鳞癌细胞株生长的体内外观察. 中华医学杂志,1996 排版中
- 5 何荣根,徐秀祺,周晓健,等. 人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞系的建立及其生物学特性. 肿瘤,1983; 3(3) 97
- 6 鄂 征著. 组织培养技术. 第 2 版. 北京:人民教育出版社,1988
- 7 Jimenez A, Davies J. Expression of a transposable antibiotic resistance element in saccharomyces. Nature, 1980;287 869
- 8 Toneguzzo F. Electric field-mediated DNA transfer transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells. Mol Cell Biol, 1986;6 703

(1995 - 08 - 15 收稿)

A Study on the Conditions for p53 Gene Transfection and G418 Selection in Vitro in Tca8113 Cell Line by Electroporation

Chen Qianming, Li Bingqi, Peng Wenzhen, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

The best conditions for p53 gene transfection in Tca8113 cell line by electroporation have been studied in vitro. The results showed that the effect reached the top when cell had been cultured till 36 hours and electric field intensity was 625 V/cm. The most suitable concentration of G418 which was used as selection agent was 300 µg/ml. The p53 gene had been successfully transfected based on these conditons.

Key words: electroporation gene transfection oral squamous cell carcinoma p53 gene