

文章编号:2095-0411(2016)05-0078-04

## GFP 标记的人葡萄膜黑色素瘤裸鼠模型的构建

王祯莲<sup>1</sup>, 金 畅<sup>2</sup>

(1.常州大学 护理学院,江苏 常州 213164;2.温州医科大学 眼视光学院,浙江 温州 325003)

**摘要:**探讨通过构建稳定表达 GFP 的人葡萄膜黑色素瘤细胞系,建立新型人葡萄膜黑色素瘤裸鼠皮下移植模型。培养人葡萄膜黑色素瘤细胞系 M17 和 M23,收集细胞并制备细胞悬液,每只裸鼠于腹部皮下注射细胞悬液 0.1mL 约  $2 \times 10^6$  个细胞,观察 M17 和 M23 细胞系成瘤率、成瘤时间、肿瘤生长、转移情况及组织病理学形态。用绿色荧光蛋白(GFP)表达质粒转染 M17 和 M23 细胞,筛选稳定克隆。在荧光显微镜下观察 GFP 转染阳性率。将稳定克隆腹部皮下注射裸鼠,接种 6 周后处死裸鼠,取新鲜肿瘤组织块做病理切片,免疫组化观察组织块荧光表达情况。实验发现裸鼠成瘤率 100%,病理切片检查证实为黑色素瘤。成瘤时间为 2 周左右,其中一只裸鼠于接种 4 周后出现腹水、肝内转移。GFP 转染率达 90%以上。裸鼠肿瘤新鲜组织块发出绿色荧光,而包围瘤块的正常皮肤没有荧光。以 GFP 基因标记的葡萄膜黑色素瘤细胞经裸鼠腹部皮下移植建立的葡萄膜黑色素瘤模型,为研究自然状态下肿瘤的生长和转移提供了一个简单、可靠的方法。

**关键词:**葡萄膜黑色素瘤;绿色荧光蛋白;动物模型;

**中图分类号:**R 739.7

**文献标志码:**A

**doi:**10.3969/j.issn.2095-0411.2016.05.014

## Establishment of an Experimental Animal Model of Uveal Melanoma in Mouse Engineered by Green Fluorescent Protein

WANG Zhenlian<sup>1</sup>, JIN Chang<sup>2</sup>

(1. School of Nursing, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 2. School of Ophthalmology and Optometry, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325003, China)

**Abstract:** To establish a novel human uveal melanoma mouse model methods, human uveal melanoma cell lines M17 and M23 were cultured in vitro. Aliquots of  $2 \times 10^6$  cells per 0.1mL suspension was subcutaneously transplanted in the abdomen of BALB/C nude mice. The growth condition of implanted tumors and the metastases were investigated. pEGFP-N1 was transferred into M17 and M23 cell lines by liposome lipofectamine, the cell clones with stable GFP expression were screened out by means of G418 and fluorescence microscope. GFP positive M17 or M23 cells were subcutaneously injected into nude mice to establish uveal melanoma animal models. All the animals were sacrificed after 6 weeks. Pathological detection and immunohistochemical staining of GFP was carried out. The rates of tumor induction were 100%. At 4 weeks, histologic examination showed that one mouse formed hepatic micrometastases. 90% of uveal melanoma cells stably expressed EGFP. GFP-labeled tumor cells displayed green fluorescence under fluorescent microscopy. The model of uveal melanoma set up via injection of human uveal melanoma cells labeled by GFP into the subcutaneous of nude mice may provide a new approach to investigate the nat-

收稿日期:2016-01-23。

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81201657)。

作者简介:王祯莲(1980—),女,山西阳泉人,硕士,讲师,主要从事肿瘤侵袭转移研究。

ural courses of growth and metastasis of malignant uveal melanoma.

**Key words:** uveal melanoma; GFP; animal model

葡萄膜黑色素瘤是成人最常见的原发性眼内恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。建立一种易于观察、能够体现葡萄膜黑色素瘤遗传特点的动物模型,不仅能够有效地研究葡萄膜黑色素瘤的发生、发展机制,而且能为葡萄膜黑色素瘤药物的筛选和临床治疗研究提供良好的平台<sup>[2]</sup>。GFP作为一个很好的活体标记,可直接在荧光体视镜下观察肿瘤细胞的生长情况,可望全面评价肿瘤转移恶化情况。本研究建立了葡萄膜黑色素瘤细胞移植瘤模型,可通过荧光成像观察动物模型肿瘤生长和转移的生物学特性。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 裸鼠

BALB/C nu/nu品系鼠,4周龄,体重 $20\pm 2\text{g}$ ,购自中科院上海实验动物中心,饲养在温州医科大学动物实验中心SPF级别环境内的层流架内。

### 1.2 细胞

人葡萄膜黑色素瘤细胞系M17和M23,正常黑色素细胞系UM,均为永生株,美国纽约医学院胡诞宁教授实验室建立并惠赠,本实验室保存,用于鉴定其裸鼠致瘤性及其它实验;冻存细胞快速 $37^{\circ}\text{C}$ 解冻,常规复苏和传代。含10%胎牛血清的DMEM培养液(Gibco公司产品,美国), $37^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$ 培养箱内培养。细胞贴壁80%时收集细胞,计数。

### 1.3 接种

0.05%胰酶-EDTA消化细胞,离心收集,去上清,加入无血清DMEM稀释细胞,调整细胞悬液浓度为 $2\times 10^7$ 个/mL,30min内送到动物房,接种裸鼠腹部皮下,每只裸鼠接种0.1mL约 $2\times 10^6$ 个细胞,M17细胞接种3只裸鼠(分别编号1、2、3),M23细胞接种2只裸鼠,分别编号4、5,人正常黑色素细胞UM接种1只裸鼠两侧腹部。

### 1.4 观察

接种后观察肿瘤生长情况,用游标卡尺测量肿瘤块的长径、短径和高度,计算肿瘤体积=长径 $\times$ 短

径 $\times$ 高度。

### 1.5 病理切片

过量乙醚麻醉法处死裸鼠,取皮下肿瘤块和眼睛、肝、肺及其他重要脏器,4%多聚甲醛室温固定24h后,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片 $5\mu\text{m}$ 厚(Leica切片机,德国),常规苏木素-伊红染色,镜下观察,拍摄(Zeiss显微镜,德国)。

### 1.6 免疫组织化学

组织切片经脱蜡、梯度酒精水化后,用羊血清封闭非特异性抗体5min,加一抗,室温孵育10min,PBS洗,加生物素化的二抗室温孵育10min,PBS洗,加过氧化物酶结合的抗生物素蛋白链菌素作用10min,PBS洗,DAB显色,苏木素复染,梯度酒精脱水,封片观察,拍照。抗体包括抗人Cytokeratin单克隆抗体、抗牛S-100多克隆抗体、抗人HMB45单克隆抗体和抗人MART1单克隆抗体(抗人HMB45单克隆抗体购自丹麦DAKO公司,其他均购自美国Ventana公司)。

### 1.7 GFP细胞转染

pEGFP-N1质粒转染M17和M23细胞,G418筛选。经过约3个星期的筛选,抗性克隆开始形成。形成抗性克隆时,0.25%的胰蛋白酶溶液消化,制备低密度细胞悬液接种,吹打细胞,制备出分散成单个细胞的悬液,计数,然后用培养液稀释细胞,稀释成密度为1个/ $100\mu\text{L}$ 的细胞悬液。向96孔培养板每孔内加入 $100\mu\text{L}$ 。在倒置显微镜台上观察和标记96孔培养板含单个细胞的孔,然后置于 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 的培养箱中培养。待孔内细胞增至500~600个时,进行分离培养。将单细胞克隆分离、重新接种和培养。挑选生长良好的单细胞克隆孔。先吸去旧培养液,用PBS洗1~2次。然后,加适量0.25%胰蛋白酶溶液进行消化。置于倒置显微镜下观察,待细胞变圆时,加入 $100\mu\text{L}$ 含10%血清的培养液终止胰酶活性。用吸管轻轻吹打,当细胞脱壁悬浮后吸入管内,移至另一培养瓶中。

## 2 结果

### 2.1 M17 和 M23 细胞系和 UM 在裸鼠腹部皮下接种后的生长情况

人葡萄膜黑色素瘤细胞 M17 和 M23 细胞系在接种裸鼠腹部皮下后,5 只小鼠均有瘤块生长,并持续增长(图 1 中 1#~5#),人正常黑色素细胞 UM 在裸鼠腹部皮下接种后,没有肿瘤生长(图 1 中 6#)。

### 2.2 形态学结果

M17 和 M23 细胞接种裸鼠后两周开始,瘤块明显生长,向表面突出,解剖后肉眼可见切面有坏死。1# 裸鼠于 30d 开始观察到消瘦,蛙状腹,活动

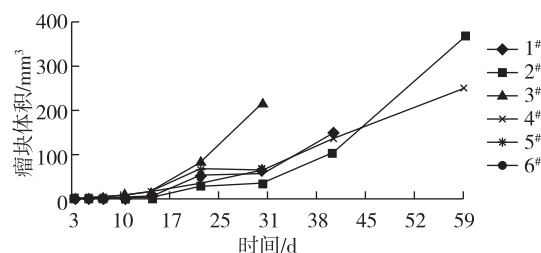


图 1 肿瘤块体积的变化

Fig.1 Growth of xenograft tumors

减少,解剖后可见腹水、有肝内转移,胃、肠及淋巴结转移,并经病理切片证实。6# 为正常 UM 黑色素细胞接种小鼠,2# 为 M17 接种小鼠,白色箭头所指示腹部接种瘤块(见图 2(a))。1# 裸鼠肉眼观察,白色箭头所指示腹部接种瘤块(见图 2(b))。1# 裸鼠肝脏组织切片,★为肝内转移灶(见图 2(c))。



图 2 肿瘤块形态学观察

Fig.2 Morphological results of tumor inoculation block

### 2.3 移植瘤鉴定结果

M17 的皮下及肝肿块以及 M23 的皮下肿块,其肿瘤细胞的免疫组化研究均对抗黑色素瘤抗体 HMB45(见图 3(a))及 MART1(见图 3(b))显示强

阳性反应,细胞被 DAB 染成深棕色;对抗黑色素细胞抗体 S-100 呈弱至中度阳性反应,大部分细胞被 DAB 染成浅棕色(见图 3(c));对抗上皮细胞抗体 Cytokeratin 则呈阴性反应,细胞均未染色(见图 3(d))。

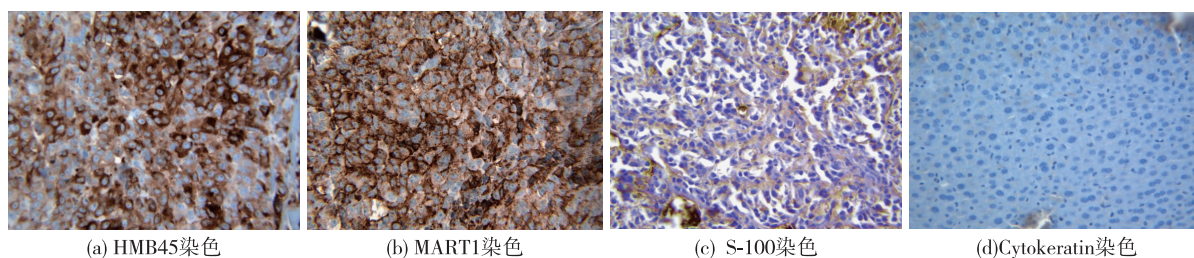


图 3 免疫组化结果(放大 400 倍)

Fig.3 Hematoxylin and eosin (H&E) staining and immunohistochemical analysis(magnification  $\times 400$ )

### 2.4 GFP 的表达

pEGFP-N1 质粒转染后的 M17 细胞在倒置荧

光显微镜下观察,结果显示绝大部分细胞有绿色荧光,具体见图 4,GFP 转染率达 90% 以上。用前述方法将 GFP 转染后的细胞接种裸鼠 10 只,待瘤块



生长后,直接取材做冰冻切片,荧光显微镜下观察,发现瘤块内的肿瘤细胞均发出绿色荧光,而包围瘤块的正常皮肤没有荧光,具体见图 5。

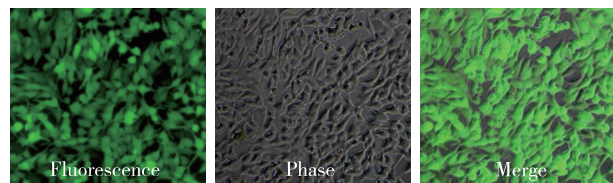
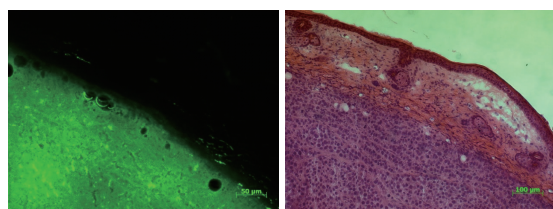


图 4 荧光显微镜下观察 GFP 转染后的细胞(放大 200 倍)

Fig.4 The images of tumor cells transfected GFP under fluorescence and light microscopy (magnification×200)



(a) 荧光显微镜  
直接观察肿瘤组织块 (b) HE染色,  
普通光源显微镜观察肿瘤组织块

图 5 肿瘤组织的荧光检测及免疫组化染色

Fig.5 Fluorescence detection and immunohistochemical staining of tumor inoculation block

### 3 讨 论

肿瘤细胞的裸鼠致瘤性试验是肿瘤生物学特性观察的一项重要指标,本实验室保存的人葡萄膜黑色素瘤永生细胞系 M17、M23,由于尚未报道其裸鼠致瘤性,故在本实验中将 M17、M23 细胞接种到裸鼠腹部皮下,观察这两株细胞是否具有裸鼠致瘤性。由于腹部皮下为容易观察部位,为鉴定裸鼠致瘤性的最佳部位之一,本实验结果显示,人葡萄膜 M17 和 M23 裸鼠皮下致瘤率高,肿瘤生长速度稳定,易于观察。

本实验的免疫组织化学用的抗体是 3 种最主要的用于鉴定葡萄膜黑色素瘤的抗体,即抗 S-100 抗体、抗 HMB-45 抗体和抗 A103 抗体,分别用于检测 S-100 蛋白、melanosome gp 100 蛋白和 Melan-A/Mart-1 蛋白,细胞角蛋白 Cytokeratin 具有上皮细胞特异性,可作为黑色素瘤细胞和上皮细胞的鉴别<sup>[3-8]</sup>。免疫组化研究结果指示所有肿块内细胞均符合人类葡萄膜黑色素瘤细胞之免疫组化特征。

1992 年发现的 GFP 是迄今为止最佳的活体分

子标记物之一<sup>[6]</sup>。其具有分子量小、对细胞无毒、使用方便及容易检测等优点,并且不需要任何外源底物或协同因子,在长波紫外光激发下发出性质稳定的荧光,使 GFP 在细胞水平和亚细胞水平的研究中得以广泛应用。尤其是在判断肿瘤体积及浸润范围等方面更具优势<sup>[9]</sup>。本实验运用 pEGFP-N1 质粒转染到人葡萄膜黑色素瘤细胞 M17、M23 中,通过直接在荧光显微镜下观察细胞,并通过裸鼠接种实验,验证其在体内和体外均有自我复制以及良好的标记能力。由此可见,GFP 转染细胞可以作为一个很好的活体标记,可直接在荧光体视镜下观察肿瘤细胞的生长情况,可望全面评价肿瘤转移恶化情况。

### 4 结 论

人葡萄膜 M17 和 M23 裸鼠皮下致瘤率高,肿瘤生长速度稳定,易于观察,免疫组化研究指示所有肿块内细胞均符合人类葡萄膜黑色素瘤细胞之免疫组化特征。GFP 基因标记的葡萄膜黑色素瘤细胞经裸鼠腹部皮下移植后,成功建立了葡萄膜黑色素瘤模型,可做为葡萄膜黑色素瘤药物筛选、临床研究等的良好平台。

### 参考文献:

- [1]FIELD M G, HARBOUR J W. Recent developments in prognostic and predictive testing in uveal melanoma[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2014, 25(3): 234-239.
- [2]OZAKI S, VUYYURU R, KAGEYAMA K, et al. Establishment and characterization of orthotopic mouse models for human uveal melanoma hepatic colonization [J]. Am J Pathol, 2016, 186(1):43-56.
- [3]ALGHAMDI SA, ZOROQUIAIN P, DIAS AB, et al. Diagnostic value of SOX-10 immunohistochemical staining for the detection of uveal melanoma[J]. Ecancer-medicalscience, 2015, 9:566.
- [4]MERCEDES N L, CRISTIAN P, MARCOS R, et al. Melanocortin 1 receptor is expressed by uveal malignant melanoma and can be considered a new target for diagnosis and immunotherapy[J]. Invest Ophthalmol-VisSci, 2007, 48(3): 1219-1227.
- [5]KEIJSER S, MISSOTTEN G S, BONFRER J M, et al. Immunophenotypic markers to differentiate between benign and malignant melanocytic lesions[J]. BrJ Ophthalmol, 2006, 90(2): 213-217.

- [2] LYU Q W, ZHANG W, SHI Q, et al. Comparison of Tripterygium wilfordii Hook F with methotrexate in the treatment of active rheumatoid arthritis (TRIFRA): a randomised, controlled clinical trial[J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(6):1078-1086.
- [3] 谢艳, 郭云鹏. 雷公藤治疗类风湿关节炎的作用机制研究进展[J]. *风湿病与关节炎*, 2013, 2(4): 72-75.
- [4] BAO J, DAI S M. A Chinese herb Tripterygium wilfordii Hook F in the treatment of rheumatoid arthritis: mechanism, efficacy, and safety[J]. *Rheumatology International*, 2011, 31(9):1123-1129.
- [5] LIU Y F, TU S H, GAO W N, et al. Extracts of Tripterygium wilfordii Hook F in the treatment of rheumatoid arthritis: asystemic review and meta-analysis of randomised controlled trials[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/410793>.
- [6] WALKER M E, HATFIELD J K, BROWN M A. New insights into the role of mast cells in autoimmunity: evidence for a common mechanism of action? [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822(1):57-65.
- [7] REBER L L, FROSSARD N. Targeting mast cells in inflammatory diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(3): 416-435.
- [8] ANAND P, SINGH B, JAGGI A S, et al. Mast cells: an expanding pathophysiological role from allergy to other disorders[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2012, 385(7): 657-670.
- [9] SISMANOPOULOS N, DELIVANIS D A, ALYSANDRATOS K D, et al. Mast cells in allergic and inflammatory diseases[J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(16): 2261-2277.
- [10] AMIN K. The role of mast cells in allergic inflammation [J]. *Respir Med*, 2012, 106(1): 9-14.
- [11] 李春, 穆荣. 肥大细胞在类风湿关节炎中的致病机制及研究新进展[J]. *中华风湿病学杂志*, 2011, 15(5): 351-353.
- [12] RODEWALD H R, FEYERABEND T B. Widespread immunological functions of mast cells: fact or fiction? [J]. *Immunity*, 2012, 37(1): 13-24.
- [13] ADACHI R, GURISH M F, GOBEZIE R, et al. Mast cells contribute to autoimmune inflammatory arthritis via their tryptase/heparin complexes[J]. *J Immunol*, 2009, 182(1): 647-656.
- [14] GUO Y, WU Q, NI B, et al. Tryptase is a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis [J]. *Immunology*, 2014, 142(1):67-77.

(责任编辑:殷丽莉)

#### 【上接第 81 页】

- [6] IWAMOTO S, BURROWS R C, KALINA R E, et al. Immunophenotypic differences between uveal and cutaneous melanomas[J]. *Arch Ophthalmol*, 2002, 120(4): 466-470.
- [7] HEEGAARD S, JENSEN O A, PRAUSE J U. Immunohistochemical diagnosis of malignant melanoma of the conjunctiva and uvea: comparison of the novel antibody against melan-A with S100 protein and HMB-45 [J]. *Melanoma Res*, 2000(4), 10:350-354.
- [8] ADEMA G J, BOER A J, HULLENAAR R, et al. Melanocyte lineage-specific antigens recognized by monoclonal antibodies NKI-beteb, HMB-50, and HMB-45 are encoded by a single cDNA [J]. *Am J Pathol*, 1993, 143(6): 1579-1585.
- [9] 杨柏霖, 陈红锦, 谷云飞, 等. 绿色荧光蛋白标记的裸鼠结肠癌荧光原位移植模型的建立及生物学特性[J]. *中华消化外科杂志*, 2013, 12(8):626-628.

(责任编辑:殷丽莉)