

添加 RGD 短肽的新型培养基对细胞生长、融合及外源基因表达的影响*

王佩佩, 魏大鹏, 朱彤波[△]

四川大学华西基础医学与法医学院 免疫学教研室(成都 610041)

【摘要】 目的 在普通培养基中添加 RGD 短肽制备新型培养基,观察新型培养基对细胞生长状态、杂交瘤细胞融合和外源基因表达的影响。**方法** 以普通培养基为对照,在普通培养基中添加不同质量浓度的 RGD 制备新型培养基,通过观察人胰腺上皮细胞株 HPDE6-C7 的生长增殖情况确定 RGD 的最佳质量浓度,然后,在培养基中接种不同浓度(5×10^4 、 10^5 、 5×10^5 mL⁻¹)的 HPDE6-C7 细胞,通过倒置显微镜观察细胞的形态、贴壁、长势和密度情况;再分别用普通培养基和添加 RGD 短肽的新型培养基进行杂交瘤细胞的融合,比较两种培养基融合后克隆形成率和克隆阳性率的差异;通过转染含绿色荧光蛋白(GFP)的质粒观察其荧光强度的方法和转染过表达 KRAS 质粒观察其蛋白表达的方法,观察添加 RGD 短肽的新型培养基相比普通培养基在转染外源基因表达水平方面的优势。**结果** RGD 短肽使用的最佳质量浓度为 10 ng/mL;添加 RGD 短肽的新型培养基所培养的细胞相比普通培养基形态更佳、贴壁更好、增殖更快。同时,添加 RGD 短肽的新型培养基应用于细胞融合所形成克隆的百分率和克隆阳性率均高于普通培养基($P < 0.05$);与普通培养基比较,此新型培养基在转染外源基因 GFP 后荧光强度更高($P < 0.05$),表达外源基因 KRAS 的蛋白水平也更高($P < 0.05$)。**结论** 添加 RGD 短肽的新型培养基在细胞生长状态、杂交瘤细胞融合及外源基因表达方面有突出优势,RGD 短肽应用于细胞培养可能具有广泛前景和潜在的价值。

【关键词】 新型培养基 RGD 细胞融合 外源基因

The Influence of New Medium with RGD on Cell Growth, Cell Fusion and Expression of Exogenous Gene WANG Pei-pe, WEI Da-peng, ZHU Tong-bo[△]. Department of Immunology, West China School of Basic Sciences and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: tbzhu@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the influence of a new culture medium added with RGD on cell growth, cell fusion and expression of exogenous gene. **Methods** A new medium was prepared by adding different concentrations of RGD to ordinary culture medium. The optimum concentration of RGD was determined by observation of the growth of human pancreatic epithelial cell line HPDE6-C7. After determining the optimum concentration of RGD, different concentrations of cells HPDE6-C7 (5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 mL⁻¹) were inoculated in the two mediums. The morphology, adherence, growth and density of the cells were observed by inverted microscope; The ratio of clone formation and the positive rate of cloning were compared between the two cultures after fusion; The fluorescence intensity after the transfection of plasmid with green fluorescent protein (GFP) and the protein expression after transfection of plasmid with KRAS were observed to compare the expression of exogenous genes between the new medium with ordinary medium. **Results** Firstly, the optimal concentration of RGD was 10 ng/mL. Compared with the normal medium, the cultured cells with RGD had better morphology, adhesion and faster proliferation. In addition, both of the number and positive rate of clones formed in the new medium were significantly higher than that in the ordinary medium ($P < 0.05$); The fluorescence intensity after transfection of exogenous gene GFP in the new medium was significantly higher than that in normal medium ($P < 0.05$); Expression level of exogenous gene KRAS of the new medium was also significantly higher than that in normal medium. **Conclusion** The new culture medium has highlighted advantages in cell growth, cell fusion and expression of exogenous genes. RGD peptide has widely prospect and potential value in the cell culture.

【Key words】 New culture medium RGD Cell fusion technique Exogenous gene

细胞培养技术在现代医学和生物学领域占据了举足轻重的地位,而细胞培养基的选择是细胞培养技术的关键^[1]。将细胞所需的营养物质按其种类和

* 国家自然科学基金(No. 81472555)资助

[△] 通信作者, E-mail: tbzhu@163.com

所需数量严格配制而成的培养基,称为基础培养基。通常在使用基础培养基时,需加入血清、血浆等一些天然成分^[2]。近年来,许多研究者通过尝试在基础培养基中添加一些特殊成分从而达到改善培养细胞生长状态的目的^[3-4]。

RGD 序列是包含了 3 个氨基酸即精氨酸、甘氨酸和天冬氨酸的短肽序列,也是细胞外基质中含有的高度保守序列,能与细胞表面的整合素受体特异性结合,具有生物活性^[5-11]。已有研究表明, RGD 序列为人纤维连接蛋白(FN)与其受体的结合位点,具有高效促黏附性^[6,12-14]。细胞与基质的黏附作用是细胞生长和生存的生理基础, RGD 序列在介导细胞与基质间的黏附作用中至关重要^[8]。而细胞表面的整合素也与细胞的黏附作用有关,介导着细胞与细胞以及细胞与底物之间的相互作用,并参与许多生物学过程^[6]。RGD 短肽作为配体与细胞表面的整合素受体特异性结合,结合后可以有效地促进细胞对生物材料的选择性黏附及调节细胞的相互作用,从而可直接影响到细胞的生长、增殖^[5]。目前,有许多药物化学研究者对 RGD 序列进行了改造,通过化学修饰、氨基酸改变或与其它药物载体偶联等方式,藉此提高 RGD 序列的生物稳定性和药效^[5-6,15]。在本实验中使用的 RGD 短肽也是由人工合成的一种含 RGD 序列的新型短肽。

因 RGD 肽具有的黏附作用及对细胞生长增殖的影响,本实验通过观察在细胞的培养基中添加新型 RGD 短肽后与普通培养基相比细胞生长状态的变化,探索此新型培养基在细胞培养技术方面的应用前景。

1 材料和方法

1.1 细胞

人胰腺上皮细胞株 HPDE6-C7(上海歌凡公司);骨髓瘤细胞株 SP2/0(美国 ATCC,四川大学华西基础医学与法医学院免疫教研室贮存);RPMI 1640 粉末,按使用说明配制成基础培养基(Gibco 公司);小牛血清和胎牛血清(兰州民海公司);含 RGD 序列的短肽(成都源泉生物科技有限公司合成)。

1.2 试剂

KRAS 和 GAPDH 一抗购自成都正能生物技术有限公司,山羊抗兔的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司, DNA 转染试剂购自 Invitrogen 公司, Western blot 相关试剂(制胶试剂盒、BCA 定量试剂盒、ECL 化学发光试剂等)购自宝信生物工程

有限公司。质粒 pLL3.7 和 pCDNA3.1 为四川大学华西基础医学与法医学院免疫学教研室贮存,质粒 pCDNA-KRAS 为本课题组构建重组质粒。

1.3 确定 RGD 短肽使用的最佳质量浓度

培养 HPDE6-C7 细胞至对数期,调整细胞浓度为 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 接种至 96 孔板,分别用添加不同质量浓度 RGD 短肽的培养基培养。实验设计 RGD 质量浓度梯度为 1 000、750、500、250、100、75、50、25、10、0 ng/mL,每种质量浓度设置复孔 3 个。常规培养 24 h 后,通过倒置显微镜观察细胞状态并计算活细胞数,以 RGD 质量浓度为横坐标,活细胞数为纵坐标,绘制细胞生长增殖曲线。以对细胞存活无影响的最低质量浓度为最佳质量浓度。

1.4 观察细胞生长状态

通过 1.3 确定 RGD 短肽的最佳质量浓度,设置两组实验:对照组(普通培养基)和实验组(添加 RGD 短肽的新型培养基),分别接种不同浓度(5×10^4 、 10^5 、 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$)的 HPDE6-C7 细胞,每种浓度设置 3 孔,常规培养 24 h 后,通过倒置显微镜观察细胞的形态、贴壁、长势和密度情况。

1.5 杂交瘤细胞融合

1.5.1 融合形成的克隆数 按杂交瘤细胞融合的基本原理,前期进行小鼠免疫及血清效价测定,于融合前 1 d 收集饲养细胞^[16-17](促进少量或单个的细胞生长繁殖成群体而加入的细胞称之为饲养细胞,本实验主要用的是腹腔巨噬细胞),收集的饲养细胞等分两份,分别用普通培养基和添加 RGD 短肽的新型培养基重悬细胞(即对照组和实验组),接种于 96 孔板,各 4 板。准备生长状态良好的 SP2/0 细胞,并将免疫小鼠的脾脏制备成细胞悬液备用。

细胞融合时首先对 SP2/0 细胞和脾细胞进行计数,将 SP2/0 和脾细胞以 1 : 10 比例混合,离心后加入质量浓度为 1 mg/mL 的 PEG4000,再次离心后用无血清的培养基洗涤细胞。最后用含次黄嘌呤(HAT)的两种不同的培养基重悬细胞,吹匀后加入到各自有饲养细胞生长的培养板中,每种培养基各 4 个板,置 37 °C、50 mL/L CO₂ 细胞培养箱中培养。期间观察 96 孔板里细胞群落(克隆)的形成。待 7 d 后计算两组培养板内的克隆数,计算克隆形成率(96 孔板形成单一细胞群落的孔记为一个克隆,每个孔板形成克隆数除以 96 孔板的孔数即为每个孔板的克隆形成率)。

1.5.2 ELISA 间接法检测存活克隆的阳性率 待细胞群落超过孔的底部面积一半时即取上清进行检

测,用间接 ELISA 法进行杂交瘤细胞的阳性筛选。根据间接 ELISA 法的原理,首先于 96 孔板中包被抗原,然后分别取 1.5.1 中形成克隆的上清平均加入每孔中,实验分为两组:对照组为加入普通培养基融合形成的克隆上清,实验组为加入新型培养基融合形成的克隆上清,每组各设置 4 个板。并设置阴性对照组即不加上清只加相应的培养基。最后用酶标仪检测 450 nm 处的光密度(OD)值,OD 值高于阴性对照 2 倍以上即为阳性孔,计算两组形成克隆的阳性率。

1.6 检测外源基因的表达水平

1.6.1 转染外源基因的荧光观察 分别采用添加 RGD 短肽的新型培养基(实验组)和普通培养基(对照组)同时接种培养 HPDE6-C7 细胞(培养基不加抗生素,接种 10^6 /皿细胞于直径 60 mm 培养皿),24 h 后两组细胞均转染含 GFP 的质粒 pLL3.7(质粒 5 μ g),正常培养 6~8 h 后,分别更换培养基(添加 RGD 新型培养基或普通培养基),48 h 后在荧光显微镜下观察两组荧光,并拍摄图片。荧光图片采用 Image 软件进行处理,将荧光强度转换为 OD 值。

1.6.2 Western blot 检测外源蛋白 KRAS 的表达 实验设计 4 组:对照组 A、实验组 A、对照组 B 和实验组 B,其中 A 组细胞用普通培养基培养,B 组细胞用添加 RGD 短肽的新型培养基培养;对照组 A、B 转染质粒 pCDNA3.1,实验组 A、B 均转染过表达 KRAS^{G12C} 的质粒 pCDNA-KRAS。各组同时接种培养 HPDE6-C7 细胞(培养基不加抗生素),24 h 后实验组 A、B 转染质粒 pCDNA-KRAS,对照组转染质粒 pCDNA3.1(质粒 5 μ g),正常培养 6~8 h 后,分别更换培养基(普通培养基或添加 RGD 新型培养基),48 h 收集细胞,用 RIPA 裂解细胞,提取总蛋白,利用 BCA 试剂盒对蛋白总量进行定量,然后进行 Western blot 实验检测 HPDE6-C7 细胞内 KRAS 蛋白的表达变化,以 GAPDH 为内参,取 40 μ g/20 μ L 的蛋白经 SDS-PAGE 分离后转至 PVDF 膜上,室温封闭 1 h 后,分别加入 KRAS(1:500)和 GAPDH 一抗(1:5 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第 2 天 PBST 洗涤 3 次,加入山羊抗兔的二抗(1:5 000),室温孵育 1 h,再用 PBST 洗涤后,ECL 发光液显色,Bio-Rad 仪器曝光,再用灰度扫描软件分析条带的灰度值。以目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量,对照组的蛋白的相对表达量为 1。

1.7 统计学方法

组间比较采用 *t* 检验或卡方检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 确定 RGD 的最适质量浓度

结果见图 1。RGD 为 250~1 000 ng/mL 时,对细胞的增殖有抑制作用($P < 0.05$),RGD 为 10~100 ng/mL 时,对细胞增殖有促进作用($P < 0.05$),但 RGD 10~100 ng/mL 组间对细胞生长增殖的影响无明显差异(图 1),因此确定 RGD 的最适质量浓度为 10 ng/mL。后续实验均采用此质量浓度。

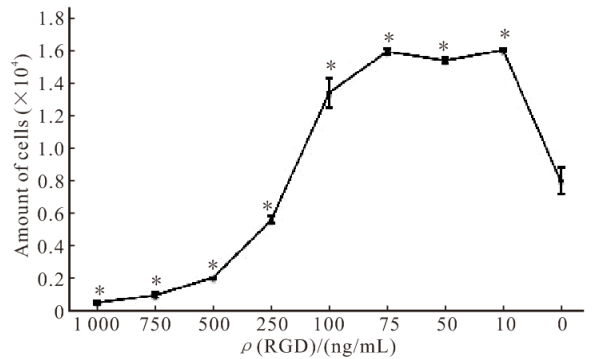


图 1 HPDE6-C7 细胞的生长增殖曲线

Fig 1 Growth curve of HPDE6-C7

* $P < 0.05$, vs. 0 ng/mL RGD

2.2 细胞生长状态比较

结果见图 2。从细胞的贴壁、密度、形态等状态来看,实验组贴壁情况更佳,形态也较好,细胞长势迅速,密度更大。实验组相比对照组在细胞生长状态方面优势明显。

2.3 杂交瘤细胞融合的克隆形成率及克隆阳性率比较

对照组克隆形成率为 $20.0\% \pm 2.6\%$,实验组克隆形成率为 $67.5\% \pm 5.0\%$,实验组高于对照组($P < 0.05$)。对照组克隆阳性率为 $20.0\% \pm 5.5\%$,实验组克隆阳性率为 $46.0\% \pm 4.8\%$,实验组高于对照组($P < 0.05$)。

2.4 外源基因表达水平的比较

2.4.1 转染 GFP 基因后细胞荧光强度 结果见图 3。转染 GFP 基因后,对照组细胞荧光强度为 17.7 ± 8.9 ,实验组细胞荧光强度为 31.9 ± 8.0 ,实验组高于对照组($P < 0.05$)。

2.4.2 转染 KRAS 基因后细胞蛋白表达水平 结果见图 4。实验组 A KRAS 蛋白的相对表达量为 1.16,实验组 B KRAS 蛋白的相对表达量为 1.56,

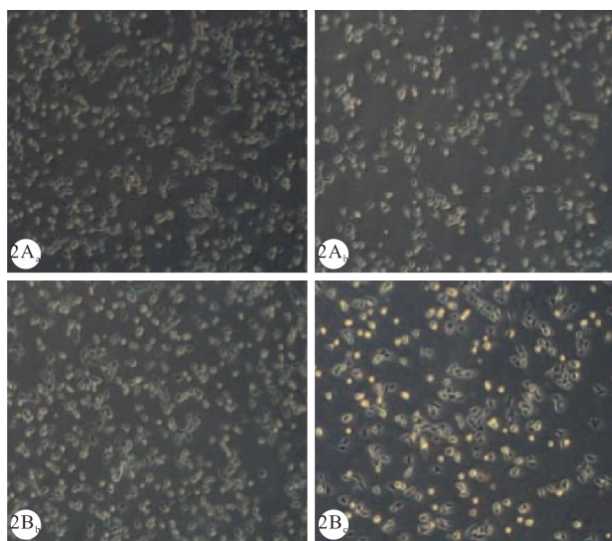


图 2 HPDE6-C7 细胞的生长状态。×20

Fig 2 Growth state of HPDE6-C7. ×20

A: General culture medium; B: New culture medium added with RGD; a-c: Concentrations of inoculated cells were $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 10^5 mL^{-1} , $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, respectively

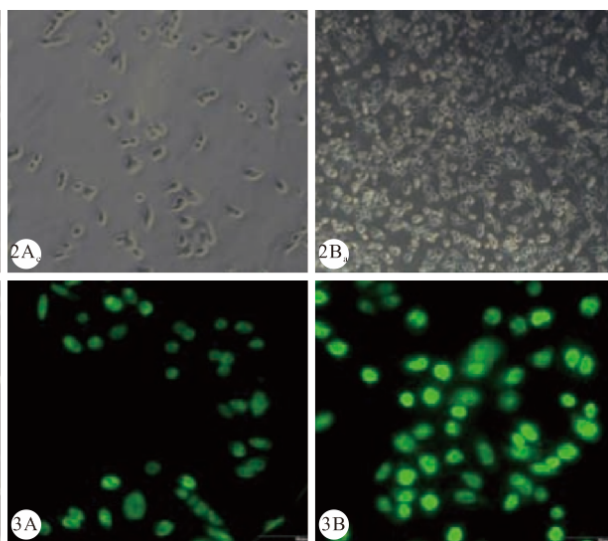


图 3 HPDE6-C7 细胞的荧光强度。×20

Fig 3 Fluorescence intensity of HPDE6-C7. ×20

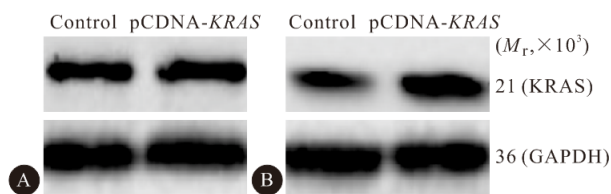


图 4 HPDE6-C7 细胞 KRAS 蛋白的表达

Fig 4 Expression of KRAS protein in HPDE6-C7 cells

A: General culture medium; B: New culture medium added with RGD; Control: pCDNA3.1

实验组 B 高于实验组 A ($P < 0.05$)。

3 讨论

细胞培养基不仅是细胞培养中供给细胞营养和促使细胞繁殖的基础物质,也是培养细胞生长和繁殖的生存环境^[2]。合适的培养基可维持渗透压和酸碱度的平衡,有利于细胞的快速生长和繁殖,到实验预期结果。

RGD 短肽是应用于结合细胞表面蛋白质的首选序列,它能介导细胞表面与细胞外基质的黏附作用,细胞与基质的黏附是细胞生长和生存的生理基础, RGD 短肽可作为配体与细胞表面的整合素受体特异性结合,结合后可调节细胞的相互作用从而直接影响细胞的生长状态^[5]。

本研究在普通培养基中添加 RGD 短肽制备成新型培养基后,观察到培养细胞生长状态良好、应用

于杂交瘤细胞融合优势明显及转染外源基因后蛋白表达水平提高,从 3 方面说明 RGD 短肽应用于细胞培养中的潜在价值。

首先,通过观察培养基中添加的不同质量浓度 RGD 短肽对细胞生长的毒性作用,确定 RGD 短肽使用的最佳质量浓度为 10 ng/mL。然后设置两组实验,即对照组为普通的完全培养基,实验组为添加 RGD 短肽的新型培养基,分别培养不同浓度的 HPDE6-C7 细胞,24 h 后观察细胞的生长状态,发现实验组贴壁情况更佳,形态也较好,细胞长势迅速,密度更大。因此我们猜测 RGD 短肽可能会促进细胞的生长和增殖,这可能与 RGD 短肽具有的高效黏附性有关^[18]。

其次,比较两种培养基应用于杂交瘤细胞融合方面的差异,我们分别用普通培养基和添加 RGD 短肽的新型培养基进行杂交瘤细胞的融合,而后比较两种培养基融合后克隆形成率和克隆阳性率的差异,发现实验组相对对照组在杂交瘤细胞融合中克隆形成率及克隆阳性率更高。在细胞融合过程中 PEG 对细胞有一定的毒性,PEG 质量浓度、pH 值和处理时间均会影响其对细胞的毒性程度,从而影响最后克隆的形成。添加 RGD 短肽的培养基用于细胞融合后形成的克隆数较多,可能与 RGD 短肽促进细胞生长和增殖有关^[5], RGD 短肽可能降低了细胞融合过程中产生的细胞毒性,有利于融合后细胞生长和状态恢复。

最后,比较两种培养基在转染外源基因表达水平方面的差异,我们通过转染含 *GFP* 的质粒观察其荧光强度的方法和转染过表达 *KRAS* 质粒观察其蛋白表达的方法,探索添加 RGD 新型培养基相比普通培养基在转染外源基因表达水平方面的优势,结果显示,添加 RGD 短肽培养基培养的细胞荧光更强、*KRAS* 蛋白表达水平更高。在转染外源基因时,因转染试剂对细胞有严重的破坏作用,甚至转染后的细胞可能会发生坏死及凋亡,当更换添加 RGD 短肽的培养基时,可能因 RGD 短肽有促进细胞生长状态的作用^[5],相比普通培养基更有利于转染后的细胞生长状态恢复,从而导致检测的外源基因表达也相对增高。

上述3个方面的实验结果显示,添加 RGD 短肽的新型培养基对细胞生长状态、杂交瘤细胞融合及转染外源基因的表达都有影响。然而目前,关于 RGD 短肽对细胞生长状态影响的相关研究并不多, RGD 短肽促进细胞生长和增殖的机制尚无详细报道,并且本研究中出现的 RGD 短肽对杂交瘤细胞融合的影响及对转染外源基因表达的影响的机制是否如猜测一样是因为 RGD 短肽促进细胞生长且有利于细胞状态恢复有关,又或者有其他的因素参与其中,尚需进一步验证。

但不可否认, RGD 短肽确实具有高效的促黏附性,可直接影响到细胞的生长和增殖。同时人工合成的含 RGD 短肽的化合物及类似物因其高效的黏附性而成为多种药物设计的新靶点,可应用于多种生物工程和疾病的治疗。本研究也证明了 RGD 短肽可促进细胞生长且有利于细胞状态恢复,应用于细胞融合和转染外源基因的表达也有其潜在价值,因此该新型培养基具有一定的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 占今舜,邢月腾,张彬.细胞培养技术的应用研究进展.饲料博览,2013(1):8-11.
- [2] 郭涛,何明生,王廷华,等.不同培养基和不同体积分数小牛血清对许旺细胞生长状态的影响.中国组织工程研究与临床康复,2009,13(23):4462-4466.
- [3] 商瑜,张启明,李悦,等.动物细胞无血清培养基的发展和应.陕西师范大学学报(自然科学版),2015,43(4):68-72.
- [4] 杨颜慈,郭斌,殷红.无血清培养基的成分改进及应用现状.生物学杂志,2013,30(1):82-85.
- [5] 朱丽红,吴勇,袁理,等.RGD七肽固定胶原对人牙周膜成纤维细胞增殖的影响.华中科技大学学报(医学版),2010,39(6):856-859.
- [6] 陈治宇,厚今,王兴发.含 RGD 序列肽及类似物的合成.承德医学院学报,2003,20(3):246-247.
- [7] 柴宁莉,徐世平,石卉,等.精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸对氧化苦参碱脂质体减轻肝纤维化的增强作用研究.环球中医药,2012,5(9):645-650.
- [8] 张光辉,姚武,郝长付,等.RGD短肽对二氧化硅致肺成纤维细胞激活的抑制效应.现代预防医学,2010,37(11):2016-2018.
- [9] 侯瑞珍,王巍,李春蓉,等.RGD对人纤维肉瘤细胞HT1080增殖、黏附及转移影响的研究.东北师大学报(自然科学版),2008,40(1):120-124.
- [10] 史嘉玮,董念国.RGD肽在组织工程领域的应用.中华实验外科杂志,2005,22(9):1150-1152.
- [11] KOSTETSKI PV, ARTEMEV IV. Conformational analysis of biologically active RGD-containing cyclopepta peptides. J Bioorg Khim,2000,26(4):290-298.
- [12] OCHSENHIRT SE, KOKKOLI E, MCCARTHY JB, *et al.* Effect of RGD secondary structure and the synergy site PHSRN on cell adhesion, spreading and specific integrin engagement. Biomaterials,2006,27(20):3863-3874.
- [13] 战德松,赵宝红,田维明,等.RGD修饰纯钛表面对人牙根成纤维细胞生物学行为的影响.材料研究学报,2005,19(3):320-324.
- [14] CHOLLET C, LAZARE S, GUILLEMOT F, *et al.* Impact of RGD micro-patterns on cell adhesion. Colloids Surf B Biointerfaces,2010,75(1):107-114.
- [15] 杨大成,杨宇,肖晴,等.含 RGD 序列环肽以及类似物的合成方法研究.有机化学,2002,22(4):239-247.
- [16] 聂晶,范永星,赵洪礼.小鼠腹腔细胞作为人杂交瘤细胞饲养细胞的实验研究.沈阳部队医药,1998,4(11):373-374.
- [17] 周丽,林春荣,车玉梅,等.饲养细胞制备过程中巨噬细胞采集方法的改进.齐齐哈尔医学院杂志,1999,5(20):510.
- [18] HERSEL U, DAHMEN C, KESSLER H, *et al.* RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. Biomaterials,2003,24(24):4385-4415.

(2017-09-09 收稿,2017-11-30 修回)

编辑 余琳