

Hela细胞HGPRT缺陷型细胞系构建

郭惠东 特日格乐 尚爱萍 郑文静 刘刚 道日娜 王蓉蓉 李瑶 李煜*
(内蒙古大学哺乳动物生殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021)

摘要 建立稳定的次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)缺陷的Hela细胞系, 为细胞融合相关研究和人源化单克隆抗体制备提供有利于筛选的亲本细胞。通过诱变剂N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)对Hela细胞进行诱变, 逐步提高培养基中6-巯基鸟嘌呤(6-TG)的浓度, 筛选出对6-TG稳定耐受的细胞, 在次黄嘌呤-氨基喋呤-胸腺嘧啶(hypoxanthine-aminopterin-thymidine, HAT)培养基中鉴定其敏感性, 最后对筛选得到的Hela-HGPRT⁻进行生物学鉴定。在此基础上, 将Hela-HGPRT⁻细胞系与人淋巴细胞融合, 在HAT培养基中筛选杂交细胞。筛选得到了能够长期在含20 μg/mL 6-TG培养基中生长的Hela-HGPRT⁻细胞, 并且在HAT培养基中不能存活。Hela-HGPRT⁻细胞与人淋巴细胞成功融合, 获得能够连续传代培养的杂交瘤细胞。经MNNG诱导和6-TG筛选, 得到了稳定传代的Hela-HGPRT⁻细胞系, 该细胞系可用于细胞融合相关研究。

关键词 Hela细胞; HGPRT缺陷; MNNG; 6-TG; 细胞融合

Establishment and Identification of HGPRT Deficient Hela Cell Line

Guo Huidong, Tergel, Shang Aiping, Zheng Wenjing, Liu Gang, Daorna, Wang Rongrong, Li Yao, Li Yu*
(Key Laboratory of Ministry of Education, Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract To establish an HGPRT⁻ deficient Hela cell line for creation of hybridoma to produce humanized monoclonal antibody. Mutation of Hela cells was induced with MNNG and selected in gradient concentrations of 6-TG. Then, the sensitivity of mutant cells to HAT medium was tested. After the stable Hela-HGPRT⁻ cells were developed, they were fused with human B lymphocytes and selected in HAT medium. Hela-HGPRT⁻ cells could survive in medium containing 20 μg/mL 6-TG in the long term and could not live in HAT medium. We also succeeded in fusing human B lymphocytes with Hela-HGPRT⁻ cells and the hybridoma cells could be continually cultured. Using the methods of induction with MNNG and screening with 6-TG, we obtained a stable Hela-HGPRT⁻ cell line and it could be continually cultured. This Hela-HGPRT⁻ cells could be used in the research of cell fusion.

Key words Hela; HGPRT; MNNG; 6-TG; cell fusion

融合细胞的筛选在细胞工程领域占有十分重要的地位。获得具有筛选标记的亲本细胞是高效制备杂交细胞的必备条件。次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)缺陷基因是常用筛选标记之一, 被广泛应用于鼠源性单克隆抗体制备。现有的

HGPRT缺陷型细胞系有: 小鼠骨髓瘤细胞SP2/0细胞系、人T淋巴细胞白血病细胞系6T-CEM、人肝脏细胞HepG2细胞系^[1]、人T淋巴细胞瘤Jurkat细胞系^[2]等。目前, 含有HGPRT缺陷型的细胞系数量极为有限, 限制了细胞杂交在细胞工程领域的应用。

收稿日期: 2012-07-10 接受日期: 2012-11-29

国家大学生创新性实验计划项目(批准号: 101012618)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-4995867-8017, E-mail: liyu@life.imu.edu.cn

Received: July 10, 2012 Accepted: November 29, 2012

This work was supported by the National University Student Innovation Program (Grant No.101012618)

*Corresponding author. Tel: +86-471-4995867-8017, E-mail: liyu@life.imu.edu.cn

HeLa细胞是建系较早的人宫颈癌细胞系,广泛用于细胞工程相关研究。HeLa细胞是否可用于淋巴细胞杂交瘤的制备,目前还未见报道。由于HeLa细胞的人源性,体外生长稳定,具有贴壁生长等特点,建立其具有HGPRT缺陷性细胞系,在细胞工程领域具有重要意义。现已知将正常HeLa MR细胞用 ^{60}Co γ 射线进行照射后,在含6-巯基鸟嘌呤(6-TG)的培养基中克隆和筛选,可以得到HGPRT基因突变细胞^[3]。本研究用化学诱变剂MNNG对HeLa细胞进行了突变诱导,用6-TG筛选HGPRT缺陷型细胞,对得到的突变细胞的生长特性、遗传特性和细胞融合特性进行了初步分析。

1 材料与方法

1.1 细胞系

HeLa细胞为本实验室引进并保存。

1.2 生化试剂

N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)以二甲基亚砜(DMSO)助溶,用无血清培养基DMEM配成100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 母液,过滤除菌,保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 。6-TG以DMSO助溶,用无血清培养基DMEM配成100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 母液,过滤除菌,保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 。次黄嘌呤(H)、胸腺嘧啶(T)配成100倍母液,氨基嘌呤(A)配成100倍母液,储存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。培养基高糖DMEM、缓冲液PBS、秋水仙素、融合剂PEG,以上试剂均为Sigma公司产品。

1.3 HeLa细胞HGPRT缺陷型诱导及筛选

1.3.1 MNNG诱导HGPRT缺陷型HeLa细胞 收集对数生长期的HeLa细胞,重新培养于10%FBS-高糖DMEM的培养基中,待细胞生长到汇合度在90%时,分别加入终浓度为2, 3, 4, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的MNNG,培养于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中,24 h后台盼蓝染色计数细胞存活率,选取存活率约70%的浓度作为最终浓度。然后换用不含MNNG的完全培养基传代两次,使突变稳定。

1.3.2 6-TG筛选HGPRT缺陷型HeLa细胞 待MNNG处理后的细胞生长到汇合度达到90%时,用浓度梯度筛选法筛选诱导处理后的细胞。在培养瓶中换加含0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的6-TG的完全培养基培养,3 d后增加6-TG浓度至1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,然后每隔3 d,倍增完全培养基中6-TG的浓度,使终浓度分别达到2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。最后在20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的6-TG培养基中稳定生长的细胞即为筛选得到的HGPRT缺陷型细胞。得到的HGPRT

缺陷型细胞培养于含20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 6-TG的10% FBS-DMEM培养液中。

1.4 HeLa细胞HGPRT缺陷型的生物学特性鉴定

1.4.1 不同浓度6-TG对细胞的影响 将正常细胞与HGPRT缺陷型细胞以 $5.0 \times 10^4/\text{mL}$ 的浓度分别培养于高糖DMEM完全培养基及终浓度分别为1, 10, 20, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的6-TG培养液中,96 h后消化并进行台盼蓝染色计活细胞数,进行3次重复实验,各组细胞计数两次计算平均值,确定最终的存活率。

1.4.2 HAT敏感性检测 将配好的100 \times 浓度HT、A浓缩液按比例加入10% FBS-DMEM中,配成HAT选择培养液。将正常细胞与HGPRT缺陷型HeLa细胞分别消化传代,加入含HAT的选择性培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养两周,期间视细胞培养情况进行换液,最后台盼蓝染色确定细胞的存活率。

1.4.3 形态学观察 将HGPRT缺陷型细胞在对数生长期时用台盼蓝染色后计数确定细胞的存活率[细胞存活率=活细胞数/(活细胞数+死细胞数) $\times 100\%$],将细胞浓度调至 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$,接入12孔板中,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,观察细胞形态及生长状况。

1.4.4 生长曲线 将处于对数生长期的细胞按 $3.0 \times 10^4/\text{mL}$ 的浓度接入24孔培养板中,连续培养八天,按常规方法观察计数绘制生长曲线。

1.4.5 染色体分析 将缺陷型细胞传代培养后,待细胞结合度达到90%,加入秋水仙素至终浓度为0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,处理4 h,按常规方法制备染色体标本。

1.5 HeLa-HGPRT⁻与人淋巴细胞融合

将解冻后培养的人体B淋巴细胞,调细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。收集对数生长期的HGPRT缺陷型HeLa细胞,调细胞浓度至 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 。将调好pH(7.6~7.8)的PEG(MW=4 000,终浓度为50%)过滤除菌,在40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅预热。取 1×10^7 人淋巴细胞和 2×10^6 HeLa-HGPRT⁻细胞(即淋巴细胞:HeLa-HGPRT⁻=5:1)置于50 mL离心管中进行融合。离心管置于40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,一只手均匀转动离心管,另一只手吸取配好的1 mL PEG液,沿转动的融合管一滴一滴地缓缓加入,速度控制在60 s内完成。接着离心管中加入25 mL完全高糖DMEM以终止PEG的融合作用。融合后的细胞接种于60 mm培养皿,含HAT培养基,置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。HAT培养基连续培养14天后,改换HT培养基继续培养。

2 结果

2.1 HeLa细胞HGPRT缺陷型细胞系建立

2.1.1 梯度MNNG浓度梯度诱变结果 如表1所示,在终浓度4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的MNNG诱导HeLa细胞24 h后,计数存活率为69.7%,最适合对HeLa细胞进行诱变。选取该浓度作为诱变实验的终浓度。

2.1.2 比较正常细胞和缺陷型对6-TG的耐受限度 两种细胞在6-TG培养基的存活率比较如表2所示。结果显示,筛选后的突变HeLa细胞在浓度为60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的6-TG培养液中培养96 h后仍然有87.10%的存活率,而正常的HeLa细胞不能在含6-TG培养液中存活,这说明经6-TG筛选后,得到了稳定遗传的缺陷型HeLa细胞。

表1 MNNG浓度梯度诱变HeLa细胞存活率
Table 1 survival rate of HeLa under MNNG gradient concentrations inducing

MNNG浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) The concentration of MNNG($\mu\text{g}/\text{mL}$)	细胞存活率(%) Cell survival rate(%)
2	81.9
3	77.5
4	69.7
5	68.2

方差分析表明, MNNG浓度在4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量之间细胞存活率无显著差异($P>0.05$),其余各组间均有显著差异($P<0.01$)。The analysis of variance showed that the cell survival rate had no significant difference under the MNNG concentration of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P>0.05$), but significant difference among others ($P<0.01$).

表2 不同浓度6-TG对正常细胞和诱变后细胞的影响

Table 2 The effect of different concentrations of 6-TG in normal cells and cells after mutagenesis

6-TG($\mu\text{g}/\text{mL}$)	正常HeLa(%) Normal HeLa(%)	诱变后HeLa(%) Mutant HeLa(%)
0	100	100
1	0	93.97
10	0	89.33
20	0	88.06
60	0	87.10

方差分析表明,正常HeLa细胞与诱变后HeLa细胞在6-TG中的存活率有显著差别;10, 20, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的6-TG添加量之间,对诱变细胞存活率的影响没有显著差别($P>0.05$),但这三个剂量组与1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加组均有显著差别($P<0.01$)。

The analysis of variance showed that the normal HeLa cells and mutant HeLa cells had significant difference of cell survival rate, when they were cultured in the medium with 6-TG. No significant difference of cell survival was found, when the mutation cells were cultured under the MNNG concentrations of 10, 20, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P>0.05$), but there was significant difference between these three doses groups and the group with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P<0.01$).

2.1.3 细胞的HAT敏感性检测结果 表3显示了缺陷型细胞在HAT培养基中的生长状况。培养到第11天时缺陷型HeLa细胞存活率为0.11%,说明细胞对HAT敏感,不能在含有HAT的培养基中长期培养,筛选得到的细胞具有HGPRT缺陷的特征。

2.2 HeLa-HGPRT⁻细胞的形态学观察

在倒置显微镜下观察缺陷型HeLa细胞,发现缺陷型细胞的细胞形态发生转变,具有成纤维样生长的特征,并且细胞颗粒增多,细胞生长旺盛,分裂相比较多,并且出现重叠生长现象。

2.3 HeLa-HGPRT⁻细胞生长曲线

细胞计数结果列于表4。图3为HeLa-HGPRT⁻和

表3 诱变后的HeLa细胞在HAT培养基中的存活率比较
Table 3 The comparison of the cells after mutagenesis's survival in the HAT medium

时间 Days	存活率(%) Cell survival rate(%)	对照(%) Control(%)
D1	99.6	95.55
D2	89.84	93.76
D3	85.88	90.20
D4	66.27	88.45
D5	39.36	85.93
D6	37.02	85.02
D7	35.92	83.72
D8	25.76	84.15
D9	14.26	79.85
D10	4.56	76.61
D12	0.11	72.67

独立样本 t 检验表明诱变后细胞与正常细胞存在差异($P<0.05$)。

The independent-sample t test showed that there was difference between HGPRT⁻ cells and normal HeLa cells ($P<0.05$).

表4 HeLa-HGPRT⁻细胞生长计数
Table 4 Counting of HeLa-HGPRT⁻ cell

时间 Days	HGPRT ⁻ 细胞($\times 10^4$) HGPRT ⁻ cells($\times 10^4$)	淋巴细胞($\times 10^4$) Lymphocyte($\times 10^4$)
D1	1.21	1.27
D2	2.45	1.41
D3	3.18	1.73
D4	6.82	1.97
D5	9.81	1.84
D6	9.62	1.50
D7	8.76	0.79
D8	7.78	0.36
D9	7.69	0.09

独立样本 t 检验表明,诱变后细胞与正常淋巴细胞存在差异($P<0.05$)。

The independent-sample t test showed that there was difference between HGPRT⁻ cells and lymphocytes ($P<0.05$).

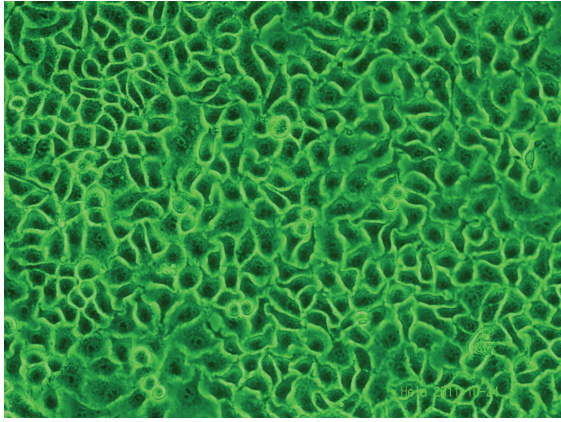


图1 正常HeLa细胞(200×)
Fig.1 The normal HeLa cells(200×)

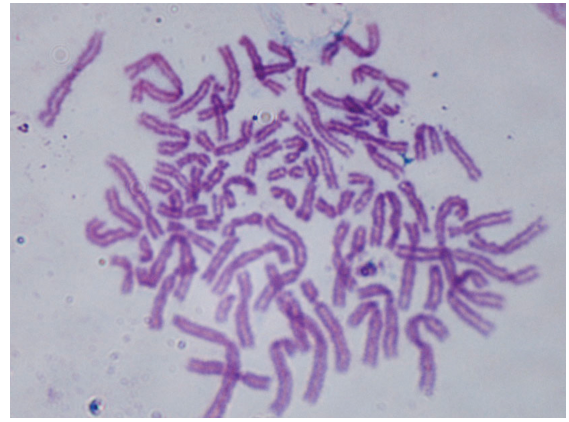


图4 HeLa-HGPRT⁻细胞染色体
Fig.4 The Chromosome of HeLa-HGPRT⁻ cell

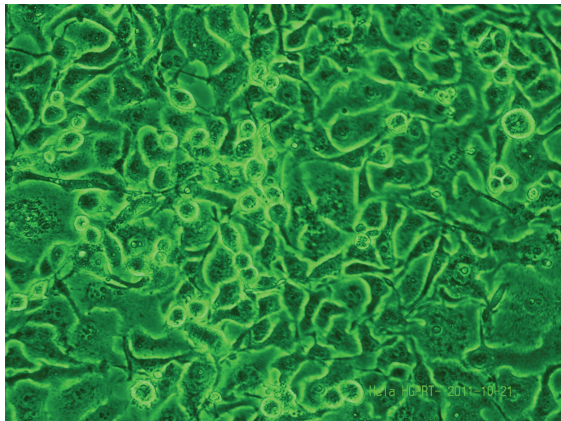


图2 HeLa-HGPRT⁻缺陷型细胞(200×)
Fig.2 The HeLa-HGPRT⁻cell(200×)

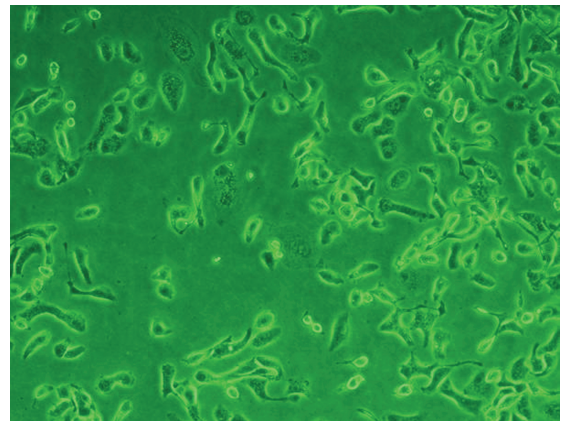


图5 淋巴细胞与HeLa-HGPRT⁻融合后24 d(100×)
Fig.5 The hybridoma between lymphocytes and HeLa-HGPRT⁻ cultured for 24 d(100×)

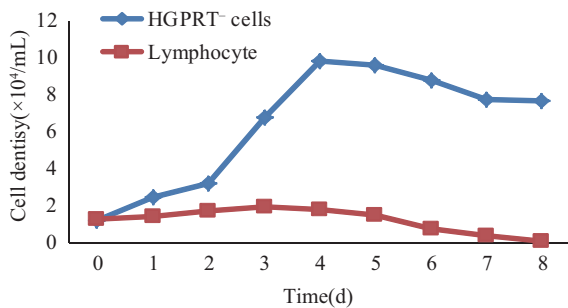


图3 HeLa-HGPRT⁻细胞生长曲线
Fig.3 The growth curve of HeLa-HGPRT⁻ cells

淋巴细胞的生长曲线。HeLa-HGPRT⁻细胞在接种后第3天进入对数生长期,第6天达到最大细胞密度。而接种后的淋巴细胞生长缓慢,并不显现出典型S型生长曲线特征,在接种4~5天后,细胞开始死亡。通过这个实验证实了HeLa-HGPRT⁻与淋巴细胞均不能

在HAT培养基中连续培养,从而可以通过HAT培养基选择出成功融合的杂交瘤细胞。

2.4 HeLa-HGPRT⁻细胞的染色体分析

得到的HeLa-HGPRT⁻细胞具有多倍体特征,并且染色体数目不均一,染色体数目主要在58至74之间。图4为HeLa-HGPRT⁻细胞染色体图。

2.5 HeLa-HGPRT⁻与人淋巴细胞融合

将人淋巴细胞与HeLa-HGPRT⁻融合后的杂交瘤细胞培养于HAT选择培养基中进行筛选。图5为杂交瘤细胞在10%FBS-高糖DMEM完全培养基中传代培养的形态。此时,杂交瘤细胞已连续培养培养24天。杂交瘤细胞扩增迅速,生长状态良好,细胞形态与HeLa HGPRT⁻细胞及人淋巴细胞均有较大差别,并且具有较强的折光性。

3 讨论

HGPRT基因缺陷是筛选杂交瘤细胞的一个重要选择性遗传标记。HGPRT是细胞合成嘌呤核苷酸补救通路的关键酶,但该酶并不具有很强的特异性,可将环境中存在8-氮杂鸟嘌呤(8-AG)、6-巯基鸟嘌呤(6-TG)、6-巯基嘌呤(6-MP)等嘌呤类似物合成到DNA中,引起细胞中毒死亡^[4]。HGPRT缺陷后,由于上述补救途径的中断,细胞能够在含有嘌呤类似物的培养基中存活^[5]。在HAT培养基中,HGPRT缺陷细胞由于不能利用次黄嘌呤合成代谢所需的次黄苷酸,因而不能存活。本研究最终获得的细胞具有对6-TG的稳定耐受性和对HAT的敏感性,说明该细胞系是HGPRT缺陷型,并且细胞具有成纤维样生长的特征,细胞生长旺盛,具有进一步筛选HGPRT缺陷型细胞株的实用价值。

在用MNNG对Hela细胞进行诱变时需用高糖DMEM完全培养基调节MNNG的终浓度,本实验证实增加MNNG的浓度进行诱变会使细胞的死亡率大幅度提高。我们在用6-TG筛选Hela-HGPRT⁻细胞的过程中,采取渐进增加浓度的方式,最终得到对6-TG耐受性稳定的缺陷型细胞。培养过程中观察发现,得到的HGPRT缺陷型细胞会出现回复突变,需隔段时间进行重复筛选。也可较长时间培养在低浓度6-TG筛选剂中,以保证细胞的缺陷特征。此外,6-TG培养基应现用现配,在配制过程中,注意控制助溶剂DMSO的剂量,若DMSO量太大,将对细胞的生长状况产生极大影响,极容易致死细胞。

Hela-HGPRT⁻与人淋巴细胞融合是杂交瘤技术的中心环节,但在诱导因子的选择上,PEG为首选因子,因为PEG是非生物试剂,融合效率高,易于标准

化。在融合过程中缺陷型瘤细胞与淋巴细胞的比值为1:5进行,并且保证两种细胞在融合前都具有较高活性;另外应该注意融合细胞对培养基的要求,尤其对血清质量的要求很高。

研究结果证实,MNNG可以用于Hela细胞HGPRT缺陷型基因突变的诱导,经6-TG、HAT筛选和细胞融合初步证实,得到的细胞具有HGPRT缺陷型细胞的基本属性,可用于细胞杂交相关领域的研究,拓宽了Hela细胞的应用范围。

参考文献 (References)

- 1 特日格乐, 郝大鹏, 刘刚, 道日娜, 王蓉蓉, 郭惠东, 等. 人肝癌细胞系HepG2的HGPRT缺陷型的建立. 中国畜牧兽医 (Tergel, Tai Dapeng, Liu Gang, Daorna, Wang Rongrong, Guo Huidong, *et al.* Establishment of hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase mutant from human liver cancer cell line HepG2. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*) 2011; 38(12): 92-5.
- 2 翁秀芳, 吴雄文, 梁智辉, 陆盛军, 卢小玲, 张彩娥, 等. HGPRT缺陷型T淋巴瘤细胞系的建立与鉴定. 华中科技大学学报(医学版)(Weng Xiufang, Wu Xiongwen, Liang Zhihui, Lu Shengjun, Lu Xiaoling, Zhang Caie, *et al.* Establishment and identification of HGPRT deficient T cell line. *Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong*) 2006; 35(6): 701-4.
- 3 赵艳华, 邢瑞云, 马平, 王惠琛, 夏寿萱. ⁶⁰Co γ射线所致Hela MR细胞基因突变谱研究. 辐射研究与辐射工艺学报(Zhao Yanhua, Xing Ruiyun, Ma Ping, Wang Huichen, Xia Shouxuan. Study on the mutation spectrum of hprt gene in Hela MR cell induced by ⁶⁰Co γ ray. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*) 1998; 6(1): 20-4.
- 4 Littlefield JW. The use of drug-resistant markers to study the hybridization of mouse fibroblasts. *Exp Cell Res* 1966; 41(1): 190-6.
- 5 Nelson PN, Reynolds GM, Walaron EE, Ward E, Giannopoulos K, Murray PG. Monoclonal antibodies. *Mol Pathol* 2000; 53(3): 111-7.