

HepG2细胞在不同琼脂糖浓度下克隆形成能力的比较

丁洁, 魏德全, 蒋吉英, 王宝松, 姜栋栋, 于树娜, 王晓萃

■背景资料

软琼脂克隆形成实验是一种可用于分离具有不同增值能力的细胞的方法。通过将单个细胞在软琼脂中形成集落, 可以筛选不同增值能力的细胞。

丁洁, 魏德全, 蒋吉英, 王宝松, 姜栋栋, 于树娜, 王晓萃, 潍坊医学院人体解剖教研室 山东省潍坊市 261042
山东省“泰山学者”建设工程专项基金资助项目
山东省科技攻关计划基金资助项目, No. 2006GG3202016
作者贡献分布: 丁洁与蒋吉英对此文所作贡献均等; 此课题由丁洁、魏德全、蒋吉英及于树娜共同设计; 研究所用试剂及分析工具由丁洁、魏德全、蒋吉英及王晓萃提供; 数据分析由丁洁、魏德全、王宝松及姜栋栋完成; 本论文写作由丁洁、魏德全及蒋吉英完成。
通讯作者: 蒋吉英, 教授, 261042, 山东省潍坊市, 潍坊医学院人体解剖教研室. jiangjiying2002@163.com
电话: 0536-2602504
收稿日期: 2009-04-07 修回日期: 2009-06-12
接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-08

Comparison of colony-forming capacity of HepG2 cells in different soft agar systems

Jie Ding, De-Quan Wei, Ji-Ying Jiang, Bao-Song Wang, Dong-Dong Jiang, Shu-Na Yu, Xiao-Cui Wang

Jie Ding, De-Quan Wei, Ji-Ying Jiang, Bao-Song Wang, Dong-Dong Jiang, Shu-Na Yu, Xiao-Cui Wang, Department of Anatomy, Weifang Medical University, Weifang 261042, Shandong Province, China

Supported by: the Shandong Provincial Special Fund for "Mount Tai scholars"; the Key Science and Technology Program of Shandong Province, No. 2006GG3202016

Correspondence to: Professor Ji-Ying Jiang, Department of Anatomy, Weifang Medical University, Weifang 261042, Shandong Province, China. jiangjiying2002@163.com

Received: 2009-04-07 Revised: 2009-06-12

Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-08

Abstract

AIM: To determine the optimal cell density and agar concentration for separation of cell clones and thereby provide a reference for screening of tumor stem cells.

METHODS: HepG2 cells were mixed with 10 g/L agarose and inoculated in 2 g/L (group A) and 3 g/L (group B) soft agar at different densities. After 14 days of culture, the number of cell clones was counted and the rate of colony formation was calculated.

RESULTS: The number of clones formed in group A was significantly higher than that in group B ($t = 4.36, P < 0.05$). The rates of colony formation observed in both group A and group

B increased with the increase in cell density that varied between 100 and 500 cells per well. In contrast, the rate of colony formation decreased with the increase in cell density that varied between 600 and 1000 cells per well.

CONCLUSION: The optimal concentration of agar in the upper layer for colony formation is 3 g/L, with 10% agarose as a stock agar. The maximum rate of colony formation is achieved when cells are inoculated at a density of 500 cells per well.

Key Words: Soft agar cloning; HepG2 cell line; Rate of colony formation

Ding J, Wei DQ, Jiang JY, Wang BS, Jiang DD, Yu SN, Wang XC. Comparison of colony-forming capacity of HepG2 cells in different soft agar systems. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1986-1989

摘要

目的: 探讨分离细胞克隆的最佳细胞密度和最适琼脂浓度, 为肿瘤干细胞的筛选提供更广阔的思路。

方法: 将HepG2单细胞悬液与10 g/L的琼脂糖相混合, 在2 g/L(A组)和3 g/L(B组)琼脂中接种不同密度的HepG2细胞, 14 d后观察克隆形成。

结果: 100-1000个/孔的各个实验组中, A组细胞的克隆数高于B组, 差异有统计学意义($t = 4.36, P < 0.05$); 在细胞密度为100-500个/孔时, A、B组细胞克隆形成率随着细胞密度的增加逐渐增加; 600-1000个/孔, A、B组均随着细胞密度的逐渐加大, 克隆形成率呈现下降趋势。

结论: 在进行软琼脂克隆形成实验时, 可以采用2 g/L的上层琼脂浓度, 并采用10 g/L的琼脂糖凝胶作为储备胶, HepG2细胞在500个/孔时的克隆形成率最高。

关键词: 软琼脂克隆; HepG2细胞; 克隆形成率

丁洁, 魏德全, 蒋吉英, 王宝松, 姜栋栋, 于树娜, 王晓萃. HepG2细胞在不同琼脂糖浓度下克隆形成能力的比较. 世界华人消化

■同行评议者

梁力建, 教授, 中山大学附属第一医院肝胆外科

杂志 2009; 17(19): 1986-1989

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1986.asp>

0 引言

软琼脂克隆形成实验作为体外检测细胞增殖能力和致瘤性的一种常规方法, 常用来分离和纯化肿瘤细胞^[1], 单克隆抗体杂交瘤细胞的克隆筛选以及抗肿瘤药物体外抑瘤能力的评价^[2-4], 随着肿瘤干细胞学说的兴起, 也被用来筛选具有干细胞性质的细胞^[5], 为此, WHO及美国FDA等机构认为可采用软琼脂克隆法等体外方法检测细胞的致瘤性. 但以往报道中所采用的凝胶浓度以及细胞密度不尽相同, 从而使克隆形成率不一致^[6-7]. 因此, 本课题对不同细胞密度和不同琼脂糖浓度下HepG2细胞的克隆形成能力进行了比较.

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM高糖培养基购自美国Gibco公司; 低熔点琼脂购自上海YITO Bio-instrument公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物技术有限公司; HepG2细胞株由本校免疫学教研室梁淑娟博士惠赠.

1.2 方法

1.2.1 制备底层琼脂: (1)50 g/L储备胶的制备: 称取琼脂糖粉末0.5 g, 溶于装有10 mL D-Hanks液的青霉素小瓶中, 高压灭菌备用. (2)10 g/L储备胶的制备: 称取琼脂糖粉末0.1 g, 溶于装有10 mL D-Hanks液的青霉素小瓶中, 高压灭菌备用. (3)6 g/L底层琼脂的制备: 将10 g/L的琼脂糖凝胶置于沸水浴中融化, 待冷却至50℃时取出6份与4份预热至37℃的新鲜培养基充分混匀后迅速倒入24孔培养板中, 每孔0.8 mL, 室温静置冷却备用.

1.2.2 制备上层琼脂: (1)不同密度细胞悬液的制备: 取对数生长期的HepG2细胞, 用2.5 g/L的胰蛋白酶消化后, 用细胞计数板计数, 调整细胞密度为 1×10^7 /L. (2)2 g/L上层琼脂的制备: 将10 g/L的琼脂糖凝胶置于沸水浴中融化后, 待冷却至50℃时, 用刻度吸管取出0.48 mL迅速分别与预热至37℃的1.92 mL的不同密度的细胞悬液相混合, 制备2 g/L上层琼脂, 同法制备3 g/L上层琼脂, 分别为A组和B组. 然后分别将各组的琼脂迅速倒入到24孔板中, 每孔0.8 mL, 每种细胞密度重复接种3个孔, 调节6种细胞密度最终分别为100、300、500、600、800、1000个/孔. 所有的实验组重复3次.

1.2.3 细胞培养及结果观察: 在各孔添加适当的完全培养基覆盖琼脂表面, 防止表面干燥, 然后放入37℃, 含50 mL/L CO₂的培养箱中培养, 每隔1-2 d补加适量培养基, 连续培养至14 d, 参考Li *et al*^[8]的方法, 将 $\geq 50 \mu\text{m}$ 或50个细胞的细胞团视为一个克隆, 观察所形成的克隆数目, 并计算克隆形成率. 克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 \times 100%.

统计学处理 统计数据用SAS 8.2软件进行处理, 采用 t 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

在培养的第1-2天, 细胞呈单个、散在的均匀分布; 第3天开始形成克隆, 此时的克隆呈桑葚状, 由4-6个细胞组成, 随着克隆的增长, 克隆中心细胞相互重叠, 克隆边缘有不规则的互相延续的单个细胞存在(图1). 随着培养时间的延长, 细胞在2 g/L的上层琼脂中的克隆增殖速度大于其在3 g/L的上层琼脂中的克隆增殖速度.

在克隆培养14 d时, 100、300、500个/孔的3个实验组在2 g/L的上层琼脂中的克隆形成数分别为 35.04 ± 2.11 个、 170.37 ± 4.23 个、 294.00 ± 7.65 个, 克隆形成率分别为 $35.04\% \pm 2.11\%$ 、 $56.79\% \pm 1.53\%$ 、 $58.80\% \pm 1.41\%$; 其在3 g/L的上层琼脂中的克隆形成数分别为 28.56 ± 2.31 个、 149.19 ± 4.74 个、 260.50 ± 7.50 个, 克隆形成率分别为 $28.56\% \pm 2.31\%$ 、 $49.73\% \pm 1.58\%$ 、 $52.10\% \pm 1.50\%$. 随着细胞密度的增加, HepG2细胞在2种浓度的上层胶中克隆形成率逐渐增加. 600、800、1000个/孔的3个实验组在2 g/L的上层琼脂中的克隆形成数分别为 326.22 ± 11.28 个、 427.92 ± 18.88 个、 523.30 ± 12.90 个, 克隆形成率分别为 $54.37\% \pm 1.88\%$ 、 $53.49\% \pm 2.36\%$ 、 $52.33\% \pm 1.29\%$; 其在3 g/L的上层琼脂中的克隆形成数分别为 305.34 ± 11.46 个、 400.48 ± 11.20 个、 489.6 ± 13.30 个, 克隆形成率分别为 $50.89\% \pm 1.91\%$ 、 $50.06\% \pm 1.40\%$ 、 $48.96\% \pm 1.33\%$. 随着细胞密度的逐渐加大, 在2种不同浓度的上层胶中细胞克隆形成率均呈现下降趋势. 从100个/孔到1000个/孔的各个实验组中, HepG2细胞在2 g/L的上层琼脂中的克隆形成率均高于其在3 g/L的上层琼脂中克隆形成率, 经统计学处理, 差异显著($t = 4.36$, $P < 0.05$).

3 讨论

对于储备胶的制备, 以往文献报道不一, 有研究

■创新盘点

本研究通过软琼脂克隆形成实验分离出克隆形成细胞, 并探索了分离细胞克隆的最佳细胞密度和最佳琼脂浓度.

■应用要点

软琼脂克隆形成实验可用于分离不同增殖能力的细胞,为肿瘤的基础与临床研究提供基础。

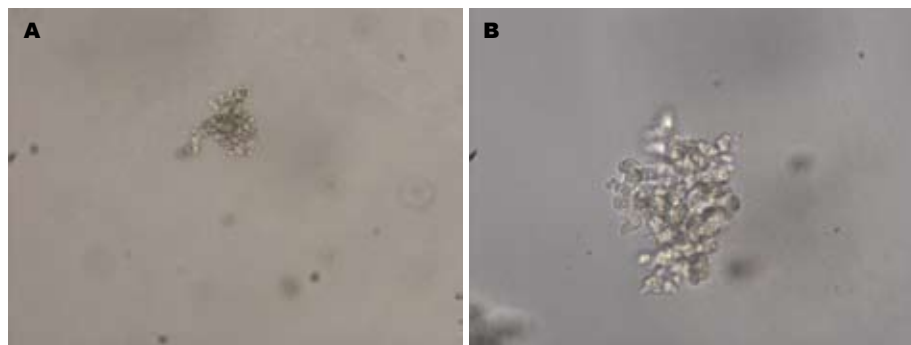


图1 HepG2在软琼脂中形成的克隆。
A: 10×; B: 20×。

者^[9]使用50 g/L的琼脂糖凝胶作为储备胶,亦有人^[10-11]使用10 g/L的琼脂糖凝胶作为储备胶,本课题组通过实验发现50 g/L的凝胶融化速度较慢,而且由于胶的浓度较大,在与培养基混合时容易形成小的凝块,不利于使细胞分布均匀,从而影响克隆的生长和分离。10 g/L的琼脂糖凝胶由于浓度低,不易形成凝块,细胞分布也较均匀,因此在进行软琼脂克隆形成实验时,可以采用10 g/L的琼脂糖凝胶作为储备胶。

祝葆华 *et al*^[12]采用上层琼脂糖浓度为3 g/L的琼脂, HepG2细胞密度为400个/孔,其结果显示细胞的克隆形成率为50.40%±3.21%。张鸽文 *et al*^[13]发现,在相同的上层琼脂糖浓度下,细胞密度为500个/孔, HepG2细胞的克隆形成率为33.24%±1.91%,二者的结果提示在上层琼脂糖浓度不变的情况下,同一细胞的克隆形成率随着细胞密度的改变而发生变化。

本研究结果显示,在2 g/L的上层琼脂中细胞的克隆数明显多于其在上层琼脂为3 g/L中的克隆数,提示上层胶浓度增大不利于细胞克隆的形成。另外,我们在预实验中发现,由于1 g/L上层琼脂的硬度较小,在移动培养板时,克隆容易移位,从而与其周围的克隆或细胞混合。因此在进行软琼脂克隆形成实验时,可以采用2 g/L的上层琼脂浓度。本实验还发现,在细胞密度为100-500个/孔时, HepG2细胞的克隆形成数和克隆形成率随着细胞浓度的增加而逐渐增加;在细胞密度在500-1000个/孔时,细胞克隆形成数和克隆形成率均随细胞浓度的升高呈现下降趋势,表明细胞的克隆形成率并非是随着细胞数量的增加而增加,而是存在着一个最佳的细胞浓度, HepG2细胞在500个/孔时的克隆形成率最高。

细胞克隆可采用眼科镊挑取^[14]或是加样器吸取的方法分离,然后将取出的单克隆放在96孔板中培养,而后放入12孔板、6孔板直至培养瓶中扩大培养。本实验发现,在上层胶浓度比较稀时,可以用微量加样器吸取的方法分离克隆,

但用吸取时要注意吸引的力度,以避免克隆群落边缘细胞向克隆方向的扩散;在上层胶的浓度较大时,琼脂具有一定的硬度,可用眼科镊挑取克隆的方法进行分离。

4 参考文献

- 1 Helgason CD, Miller CL. Basic cell culture protocols. 3rd ed. New Jersey: Humana Press, 2002: 72
- 2 谢斌, 左莉, 江志奎, 徐大林, 朱华庆, 周青, 胡若磊, 桂淑玉, 汪渊. 全反式维甲酸诱导HepG2细胞分化和降低软琼脂克隆形成. 安徽医科大学学报 2007; 42: 143-146
- 3 Hansen NJ, Wylie RC, Phipps SM, Love WK, Andrews LG, Tollefsbol TO. The low-toxicity 9-cis UAB30 novel retinoid down-regulates the DNA methyltransferases and has anti-telomerase activity in human breast cancer cells. *Int J Oncol* 2007; 30: 641-650
- 4 Ikezoe T, Hisatake Y, Takeuchi T, Ohtsuki Y, Yang Y, Said JW, Taguchi H, Koeffler HP. HIV-1 protease inhibitor, ritonavir: a potent inhibitor of CYP3A4, enhanced the anticancer effects of docetaxel in androgen-independent prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2004; 64: 7426-7431
- 5 Dou J, Pan M, Wen P, Li Y, Tang Q, Chu L, Zhao F, Jiang C, Hu W, Hu K, Gu N. Isolation and identification of cancer stem-like cells from murine melanoma cell lines. *Cell Mol Immunol* 2007; 4: 467-472
- 6 Zhu BH, Yao ZX, Luo SJ, Jiang LM, Xiao JW, Liu SC, Liu JB, Sun JM, Pei ZY. Effects of antisense oligonucleotides of PKC-alpha on proliferation and apoptosis of HepG2 in vitro. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 75-79
- 7 Simile MM, De Miglio MR, Muroni MR, Frau M, Asara G, Serra S, Muntoni MD, Seddaiu MA, Daino L, Feo F, Pascale RM. Down-regulation of c-myc and Cyclin D1 genes by antisense oligodeoxy nucleotides inhibits the expression of E2F1 and in vitro growth of HepG2 and Morris 5123 liver cancer cells. *Carcinogenesis* 2004; 25: 333-341
- 8 Li X, Pan Y, Fan R, Jin H, Han S, Liu J, Wu K, Fan D. Adenovirus-delivered CIAPIN1 small interfering RNA inhibits HCC growth in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1587-1593
- 9 乔玲, 徐治立, 谭旭, 叶丽虹, 张晓东. 间充质干细胞释放Dkk-1抑制乳腺癌细胞Wnt/ β -catenin途径的实验研究. 生物化学与生物物理进展 2007; 34: 702-708
- 10 孟淑芳, 林林, 李修兰, 冯建平, 王佑春, 李德富. 软琼

- 脂克隆法与裸鼠体内接种法检测细胞致瘤性的比较. 中国生物制品学杂志 2006; 19: 516-519
- 11 范钰, 郑树, 赵刚. 青蒿琥酯对乳腺癌MCF-7细胞抗失巢凋亡的影响. 中国病理生理杂志 2006; 22: 748-751
- 12 祝葆华, 姚榛祥, 江黎明, 吴平, 杨展, 何惠娟. 10-羟基喜树碱对HepG2体外生长及其小鼠肾包膜下移植瘤的影响. 中华实验外科杂志 2004; 21: 286-287
- 13 张鸽文, 汤恢煊, 王志明, 冯超, 魏伟. Survivin反义寡核苷酸对人肝癌细胞的抑制作用. 中国普通外科杂志 2007; 16: 646-649
- 14 章静波, 张世馥, 黄东阳. 组织和细胞培养技术. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 154-155

■同行评价

本研究选题实用, 设计尚可, 结果可靠, 具有很好的参考价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2007 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	19	44	-0.98	0.059	44	-0.89
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	4431	1	3.46	0.745	10	0.38
G803	肝脏	467	28	-0.53	0.537	17	-0.01
G938	国际呼吸杂志	521	25	-0.48	0.386	32	-0.29
G415	国际内分泌代谢杂志	654	20	-0.34	0.520	19	-0.04
G939	国际脑血管病杂志	662	19	-0.33	0.480	22	-0.11
G501	临床肝胆病杂志	497	26	-0.50	0.318	36	-0.41
G291	临床骨科杂志	689	18	-0.31	0.455	25	-0.16
G658	临床荟萃	1169	13	0.18	0.233	40	-0.57
G257	临床内科杂志	651	21	-0.35	0.367	34	-0.32
G855	临床消化病杂志	292	36	-0.71	0.394	30	-0.27
G261	临床心血管病杂志	866	17	-0.13	0.474	24	-0.12
G293	临床血液学杂志	341	34	-0.66	0.347	35	-0.36
G491	岭南心血管病杂志	157	41	-0.84	0.110	43	-0.79
G662	内科急危重症杂志	276	37	-0.72	0.318	36	-0.41
G746	实用肝脏病杂志	297	35	-0.70	1.100	3	1.04
G190	世界华人消化杂志	2353	5	1.37	0.568	15	0.05
G800	胃肠病学	376	33	-0.62	0.372	33	-0.31
G326	胃肠病学和肝病学杂志	468	27	-0.53	0.399	29	-0.26
G451	现代消化及介入诊疗	84	43	-0.92	0.230	41	-0.58
G083	心肺血管病杂志	214	40	-0.78	0.206	42	-0.62
G419	心血管病学进展	467	28	-0.53	0.419	27	-0.23
G260	心脏杂志	523	24	-0.47	0.392	31	-0.28
G610	胰腺病学	223	38	-0.78	0.282	38	-0.48
G234	中国动脉硬化杂志	869	16	-0.13	0.521	18	-0.04
G422	中国脑血管病杂志	223	38	-0.78	0.503	21	-0.07
G267	中国实用内科杂志	2121	7	1.13	0.601	13	0.11
G211	中国糖尿病杂志	1284	11	0.29	0.931	7	0.72
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	616	23	-0.38	0.599	14	0.11
G633	中国血液净化	449	31	-0.55	0.478	23	-0.12
G119	中国循环杂志	643	22	-0.35	0.411	28	-0.24
G231	中华肝脏病杂志	2746	4	1.76	1.056	4	0.95
G235	中华高血压杂志	982	15	-0.01	0.757	9	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	143	42	-0.86	0.235	39	-0.57
G876	中华老年心脑血管病杂志	465	30	-0.53	0.431	26	-0.20
G150	中华老年医学杂志	1010	14	0.02	0.510	20	-0.06
G155	中华内分泌代谢杂志	1548	9	0.56	1.032	5	0.91
G156	中华内科杂志	3238	3	2.26	0.847	8	0.57
G161	中华肾脏病杂志	1477	10	0.49	1.018	6	0.88
G285	中华消化内镜杂志	1271	12	0.28	0.607	12	0.12
G168	中华消化杂志	2249	6	1.26	1.123	2	1.08
G892	中华心律失常学杂志	384	32	-0.61	0.568	15	0.05
G170	中华心血管病杂志	3705	2	2.73	1.217	1	1.25
G172	中华血液学杂志	1632	8	0.64	0.633	11	0.17
	平均值	994			0.541		

以上数据摘自《中国科技期刊引证报告》(2008年版). 科学技术文献出版社, 160-161.