

何琦琳,郎巧利,余琳,等. 稳定高表达人 GPC3 的 SK-Hep-1 细胞系的构建[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 59-63.  
He QL, Lang QL, Yu L, et al. The generation of a SK-Hep-1 cell line stably expressing human GPC3 [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(2): 59-63.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.02.009

# 稳定高表达人 GPC3 的 SK-Hep-1 细胞系的构建

何琦琳,郎巧利,余琳,黄楠,杨希,葛良鹏\*

(重庆市畜牧科学院,重庆市医用动物资源开发与利用工程技术研究中心,重庆 402460)

**【摘要】 目的** 获得稳定高表达人 GPC3 的 SK-Hep-1 细胞系。**方法** 构建人 GPC3 真核表达载体 pcDNA3.1-GPC3,通过电穿孔的方法转染至 SK-Hep-1 细胞,利用 G418 进行细胞筛选,获得稳定高表达 GPC3 的细胞系。再利用 Western blot 和流式细胞术进行鉴定,分析稳定转染细胞表面 GPC3 蛋白的表达情况。**结果** 成功构建的真核表达质粒 pcDNA3.1-GPC3,检测发现 SK-Hep-1 细胞 G418 最佳筛选浓度为 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,利用该浓度 G418 筛选转染 SK-Hep-1 细胞,获得了细胞表面能够稳定高表达人 GPC3 蛋白的 SK-Hep-1 细胞系。**结论** 建立高表达人 GPC3 蛋白的 SK-Hep-1 稳定细胞系,为研究靶向 GPC3 肝癌抗体提供了物质基础。

**【关键词】** 人 GPC3;SK-Hep-1;稳定转染;电穿孔法

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】**1671-7856(2020) 02-0059-05

## The generation of a SK-Hep-1 cell line stably expressing human GPC3

HE Qilin, LANG Qiaoli, YU Lin, HUANG Nan, YANG Xi, GE Liangpeng\*

(Chongqing Academy of Animal Sciences Bioengineering institute, Chongqing 402460, China)

**【Abstract】 Objective** To establish a stably expressing human GPC3 SK-Hep-1 cell line. **Methods** The eukaryotic expression vector pcDNA3.1-GPC3 was constructed and transfected into SK-Hep-1 cells by electroporation. The G418 optimum screening concentration for SK-Hep-1 cells was 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Transfected cells with the target gene were screened with G418 for 20 days. Analysis of GPC3 expression in the stable cell line was performed by Western blot and flow cytometry. **Results** Western blot result showed that the GPC3 expressing level of SK-Hep-1/GPC3 was markedly higher than that of HepG2. Flow cytometry demonstrated GPC3 protein on the surface of SK-Hep-1/GPC3 cells. **Conclusions** SK-Hep-1/GPC3 cells that stably expressed GPC3 protein were successfully established. These result provide a solid foundation for further research on GPC3 therapeutic antibodies.

**【Keywords】** human GPC3; SK-Hep-1; stable transfection; electroporation

磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 (glypican-3, GPC3) 是一种表达于细胞表面的硫酸乙酰肝素蛋白类聚糖,通过细胞膜上的糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 锚定连接于细胞表面<sup>[1-2]</sup>。人 GPC3 基因位于人染色体 Xq26 上,编码 580 个氨

基酸,核心蛋白约  $70 \times 10^3$ ,在第 358 位和 359 位氨基酸之间,可被弗林蛋白酶裂解成一个与膜结合的大小为  $30 \times 10^3$  羧基端蛋白和一个大小为  $40 \times 10^3$  的氨基末端蛋白<sup>[3-4]</sup>。GPC3 与多种癌症的发生发展有密切关系,特别是肝癌,GPC3 常在肝癌患者中高

**【基金项目】**重庆市农发资金资助项目(17406);重庆市科研院所绩效激励引导专项(cqjxj201709);国家自然科学基金(5167070727)。

**【作者简介】**何琦琳(1995—),女,本科,抗体工程。E-mail:1596916489@qq.com

**【通信作者】**葛良鹏(1982—),男,研究员,生物工程。E-mail:geliangpeng1982@163.com

表达 (72% ~ 81%), GPC3 是原发性肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 细胞表面特异性膜蛋白, 可作为肝癌肿瘤抗原的理想靶点<sup>[5-12]</sup>。目前已开发有多个 GPC3 治疗性抗体<sup>[13-17]</sup>, 发现 GPC3 治疗性抗体对 HCC 有明显的抑制作用, 但进入临床以后的效果良莠不齐, 研究和开发 GPC3 治疗性抗体任重而道远。目前, 在 GPC3 治疗性抗体的研发中, 需要能稳定高表达 GPC3 蛋白的肝癌细胞对抗体进行功能性验证。其中能够表达 GPC3 蛋白的肝癌细胞系有 HepG2、Hep3B、HT17、HuH6、HuH7 及 PLC/PRF/5<sup>[18]</sup>, 但大多表达量不高不能满足研究的要求。因此, 本研究将利用电穿孔法将 pcDNA3.1-GPC3 载体转染至 SK-Hep-1 肝癌细胞中, 构建稳定高表达 GPC3 的 SK-Hep-1 细胞系, 为进一步开发 GPC3 治疗性抗体奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

SK-Hep-1 细胞购自美国 ATCC。

### 1.2 主要试剂与仪器

Amamax<sup>TM</sup> Cell Line Nucleofector<sup>TM</sup> Kit V 转染试剂购自瑞士 LONZA; 载体质粒 pcDNA3.1(+) 购买自美国 invitrogen 公司; 细胞培养试剂 DMEM、青链霉素、G418 及 PBS 均购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自以色列 Biological Industries; 0.25% 胰酶购自武汉 Procell; EasyPureHipur Plasmid Maxiprep Kit 试剂盒购自北京全式金; Tween20 和细胞裂解液均购自上海碧云天; Anti-Glypican 3 antibody、Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)、Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488) 抗体均购自英国 abcam 公司。

细胞 CO<sub>2</sub> 培养箱 (Eppendorf 公司, 德国); Lonza 电转化仪 (Lonza 公司, 德国); 超净工作台 (北京哈东联); FACSVerse<sup>TM</sup> 流式细胞仪 (BD, 美国); Odyssey CLx 双红外激光成像系统 (LICOR 公司, 美国); CloneSelect Imager 细胞生长分析系统 (molecular devices 公司, 美国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 pcDNA3.1-GPC3 质粒构建与鉴定

以 GenBank 中人的 GPC3 基因序列 (Gene ID: 2719) 为参考模板, 构建人 GPC3 cDNA 序列至真核表达质粒 pcDNA3.1(+) 中, 重组质粒构建及测序由金唯智公司完成。将构建的含重组质粒 pcDNA3.1-GPC3 的大肠杆菌接种至 LB 培养基中, 扩大培养过

夜, 提取质粒 DNA 用 *Nhe* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定。重组质粒 pcDNA3.1-GPC3 表达的 GPC3 蛋白不带任何标签。

#### 1.3.2 SK-Hep-1 细胞最佳 G418 筛选浓度的确定

取生长良好的 SK-Hep-1 细胞, 消化后制备成细胞悬液, 按  $1 \times 10^4$  / 孔接种入 24 孔板中, 24 h 后开始 G418 加压。分别用含 0  $\mu\text{g/mL}$ 、200  $\mu\text{g/mL}$ 、300  $\mu\text{g/mL}$ 、400  $\mu\text{g/mL}$ 、500  $\mu\text{g/mL}$ 、600  $\mu\text{g/mL}$ 、700  $\mu\text{g/mL}$ 、800  $\mu\text{g/mL}$ 、900  $\mu\text{g/mL}$ 、1000  $\mu\text{g/mL}$  的 G418 筛选培养基进行筛选, 每个梯度做 3 个重复, 10~20 d 后选择能够使所有细胞死亡的最小 G418 浓度即为最佳筛选浓度。

#### 1.3.3 SK-Hep-1 细胞电转及筛选

转染前一天将细胞传代至 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中培养, 待贴壁细胞长至 70%~90% 时转染。配制转染液 1 管 100  $\mu\text{L}$  (81  $\mu\text{L}$  Nucleofector solution, 19  $\mu\text{L}$  supplement) 轻轻混匀, 室温放置 30 min。将细胞从培养箱取出, 弃掉液体, 用 PBS 洗 2 遍, 加入 0.25% 胰酶消化细胞后加入预热的培养基终止重悬, 吸至 15 mL 离心管 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 洗涤一次后用 1 mL PBS 重悬计数, 取  $1 \times 10^4$  cell 加至 1.5 mL 离心管中, 1500 r/min 离心 5 min。吸干液体, 加入 100  $\mu\text{L}$  转染混合液重悬细胞沉淀。再加入总量为 2  $\mu\text{g}$  的质粒混合后加至电转杯中, 放入电转染仪中转染 10 s。电转完后立即取出电转杯, 加入预热的培养基 0.5 mL 至电转杯中, 将细胞吸取至含有 0.5 mL 培养基的 24 孔板中, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养, 并设置转染 pcDNA3.1(+) 空载体的 SK-Hep-1 细胞作空白对照。转染 48 h 后更换含有筛选浓度 G418 的培养基进行筛选培养。16 d 后, 将筛选获得的阳性细胞扩大培养, 扩大培养后使用含筛选浓度一半的 G418 培养基维持培养并保存。取 10 代以内的稳定转染细胞进行后续试验。

#### 1.3.4 Western blot 检测 GPC3 蛋白表达情况

收集筛选获得的稳转细胞 SK-Hep-1-GPC3, 加入细胞裂解液, 用枪反复吹打后孵育 3 min 裂解细胞。取裂解后细胞上清, 向样品中加入上样缓冲液及还原剂, 沸水煮 5 min 后进行 SDS-PAGE 电泳, 再电转至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1 h, 再 anti-Glypican-3 antibody (稀释比例为 1:3000) 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。PBST 洗 3 次后, 加入 Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (稀释比例为 1:8000) 室温孵育 1 h, PBST 洗 3 次后, 用 Odyssey CLx 仪器

进行扫描成像。

### 1.3.5 流式检测细胞表面 GPC3 表达情况

将生长良好的 SK-Hep-1-GPC3 细胞消化后,用 PBS(含有 2% FBS)稀释成  $5 \times 10^5$ /mL 的细胞悬液,800 r/min 4℃ 离心 5 min。加入 Anti-Glypican-3 antibody 抗体,4℃ 孵育 30 min,PBS 洗细胞 2 次后加入 Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488),PBS 洗细胞 2 次,再加入 500 μL 的 PBS 重悬,用 BD FACSVerse™ 进行流式检测。

## 2 结果

### 2.1 GPC3 的合成及表达载体构建

本实验根据 NCBI 中公布的 GPC3 序列(Gene ID: 2719)合成了 GPC3 基因序列并插入到真核表达载体 pcDNA3.1(+),构建 pcDNA3.1-GPC3 重组质粒。经测序检测证明插入序列与公布的 GPC3 序列一致(部分测序图见图 1)。

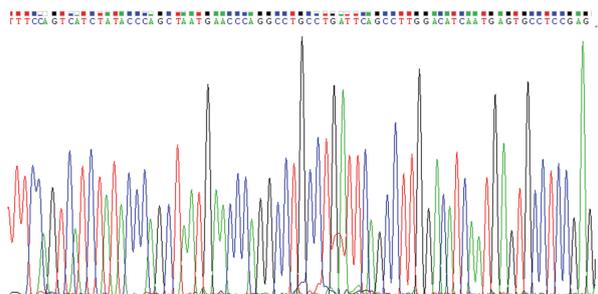


图 1 部分测序图

Figure 1 Part of the sequencing map

### 2.2 重组真核表达质粒鉴定

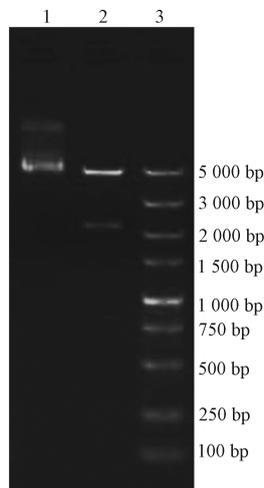
重组的 pcDNA3.1-GPC3 质粒提取后,经 *Nhe*I 和 *Xba*I 双酶切后,获得两条片段,与预期条带大小一致(见图 2)。

### 2.3 SK-Hep-1 细胞最佳 G418 筛选浓度确定

G418 筛选 7 d 后细胞开始大量死亡(图 3A),筛选后第 15 天,700 μg/mL 组细胞死亡 80%(图 3B),第 20 天细胞全部死亡的最小 G418 浓度为 700 μg/mL(图 3C),未转染细胞生长状态良好(图 3D)。故 SK-Hep-1 G418 最佳筛选浓度为 700 μg/mL。

### 2.4 Western blot 检测 GPC3 的表达

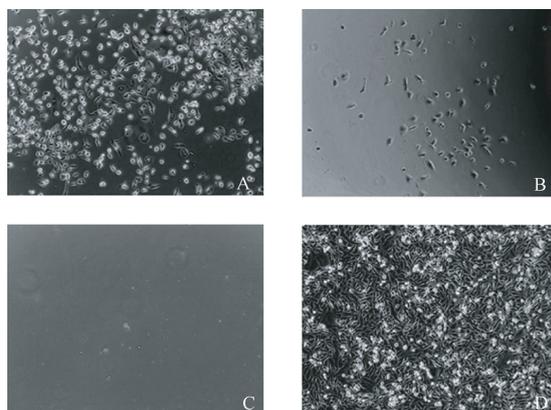
Western blot 检测稳定转染细胞 GPC3 的表达,同时与 HepG2 细胞的 GPC3 蛋白表达量进行比较,结果显示 SK-Hep-1 细胞不能表达 GPC3 蛋白,而稳定转染细胞 SK-Hep-1-GPC3 能够表达 GPC3 蛋白,并且表达量显著高于 HepG2 细胞(见图 4)。



注:1:质粒 pcDNA3.1-GPC3;2:双酶切重组质粒;3:DL5000 marker。

图 2 pcDNA3.1-GPC3 重组质粒双酶切鉴定  
Note. 1, pcDNA3.1-GPC3; 2, Double enzymes digestion of pcDNA3.1-GPC3; 3, DL5000 marker.

Figure 2 Identification of pcDNA3.1-GPC3 digested by *Nhe*I and *Xba*I



注:A:第 7 天(G418 浓度为 700 μg/mL 组);B:第 15 天(G418 浓度为 700 μg/mL 组);C:第 20 天(G418 浓度为 700 μg/mL 组);D:对照细胞(未加 G418)。

图 3 最佳 G418 筛选浓度的确定

Note. A, Culture at the seventh day (700 μg/mL group). B, Culture at the 15th day (700 μg/mL group). C, Culture at the twentieth day (700 μg/mL group). D, Control cells (0 μg/mL group).

Figure 3 Determination of the optimal screening concentration of G418

### 2.5 流式细胞检测稳定转染细胞表面 GPC3 的表达

利用流式细胞术检测稳定转染细胞系 SK-Hep-1-GPC3 细胞表面 GPC3 的表达,同时用正常的未转染 SK-Hep-1 细胞作对照,结果获得细胞表明 GPC3 蛋白阳性率为 100%的稳定细胞系(见图 5)。

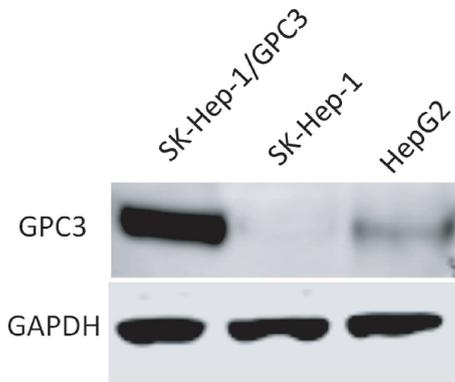


图 4 Western blot

Figure 4 Western blot

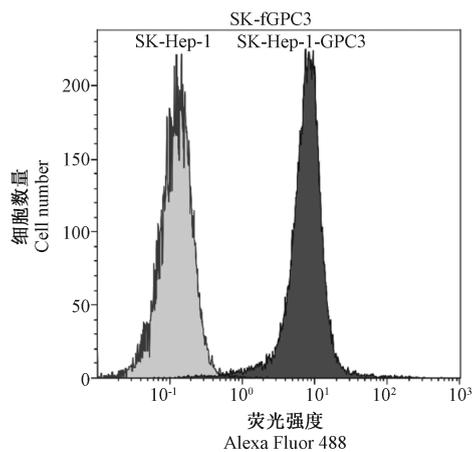


图 5 流式细胞术

Figure 5 Flow cytometry

### 3 讨论

癌症一直以来给人类生命健康造成了巨大的危害,在我国癌症已经位居主要疾病死亡率的首位。其中我国肝癌(主要是原发性肝细胞癌)的病例数占全球的 46.7%,成为我国第二大癌症,其发病率和死亡率均呈现逐年上升的趋势<sup>[19-21]</sup>。因此,肝癌研究在中国意义重大,越来越多的中国专家学者开展了相关研究<sup>[22-26]</sup>。由于大部分肝癌发现时已处于晚期,采取靶向治疗和免疫治疗的研究越来越多,出现了许多分子靶向药物和治疗性抗体来靶向治疗肝细胞癌<sup>[27]</sup>。研究与开发肝癌特异性靶点药物具有十分重要意义。GPC3 在肝细胞瘤组织中高表达,而在正常肝组织中几乎不表达,其是 HCC 病理诊断的肿瘤标志物<sup>[28-30]</sup>,也是肝癌治疗性抗体研发的新靶点。能否获得靶蛋白高效表达稳定转染细胞系是抗体药物开发的关键。然而,目前可购买的野生型肝癌细胞中,细胞表面 GPC3 表达量均

相对较低。本研究根据 NCBI 中报道的 GPC3 序列,成功构建了真核表达载体 pcDNA3.1-GPC3,酶切鉴定结果与预期相符(图 2)。通过电穿孔法成功将 pcDNA3.1-GPC3 转染至 SK-Hep-1,并通过 G418 筛选获得稳定表达 GPC3 的 SK-Hep-1-GPC3 细胞系。Western blot 和流式鉴定细胞表面 GPC3 表达情况(图 4 和图 5),表明 SK-Hep-1-GPC3 细胞系能在细胞表面稳定表达 GPC3 蛋白,且其表达量较能天然表达 GPC3 的 HepG2 细胞更高。

本研究采用电穿孔转染方法将 pcDNA3.1-GPC3 转染至 SK-Hep-1 细胞,并筛选获得了稳定高表达 GPC3 的 SK-Hep-1-GPC3 的稳转细胞系,为进一步研究与开发治疗性 GPC3 抗体奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Filmus J, Shi W, Wong ZM, et al. Identification of a new membrane-bound heparan sulphate proteoglycan [J]. *Biochem J*, 1995, 311(2): 561-565.
- [2] Cabibi D, Bisanti A, Lanza D, et al. Glypican-3 and Hep Par-1 are useful biomarkers in the cytologic assessment of ascites [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2019, 27(1): 65-69.
- [3] Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, et al. Identification of soluble NH2-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(7): 2418-2423.
- [4] Sawada Y, Yoshikawa T, Ofuji K, et al. Phase II study of the GPC3-derived peptide vaccine as an adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma patients [J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(5): e1129483.
- [5] Filmus J, Capurro M, Rast J. Glypicans [J]. *Genome Biol*, 2008, 9(5): 224.
- [6] Suzuki M, Sugimoto K, Tanaka J, et al. Up-regulation of glypican-3 in human hepatocellular carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(12): 5055-5061.
- [7] Yukihiro H, Kataoka H. Glypican-3 is a prognostic factor and an immunotherapeutic target in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(1): 275-283.
- [8] Zhou F, Shang W, Yu X, et al. Glypican-3: A promising biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis and treatment [J]. *Med Res Rev*, 2018, 38(2): 741-767.
- [9] Wu Y, Liu H, Ding H. GPC-3 in hepatocellular carcinoma: current perspectives [J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2016, 3: 63-67.
- [10] Feng M, Ho M. Glypican-3 antibodies: a new therapeutic target for liver cancer [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(2): 377-382.
- [11] Wang L, Pan L, Yao M, et al. Expression of oncofetal antigen glypican-3 associates significantly with poor prognosis in HBV-related hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(27): 42150-42158.

- [12] Yu J, Ma Q, Zhang B, et al. Clinical application of specific antibody against glypican-3 for hepatocellular carcinoma diagnosis [J]. *Sci China Life Sci*, 2013, 56(3): 234-239.
- [13] Zhu AX, Gold PJ, El-Khoueiry AB, et al. First-in-man phase I study of GC33, a novel recombinant humanized antibody against glypican-3, in patients with advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(4): 920-928.
- [14] Tang X, Chen L, Li A, et al. Anti-GPC3 antibody-modified sorafenib-loaded nanoparticles significantly inhibited HepG2 hepatocellular carcinoma [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 1484-1494.
- [15] Ishiguro T, Sugimoto M, Kinoshita Y, et al. Anti-glypican 3 antibody as a potential antitumor agent for human liver cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(23): 9832-9838.
- [16] Phung Y, Gao W, Man YG, et al. High-affinity monoclonal antibodies to cell surface tumor antigen glypican-3 generated through a combination of peptide immunization and flow cytometry screening [J]. *MAbs*, 2012, 4(5): 592-599.
- [17] Midorikawa Y, Ishikawa S, Iwanari H, et al. Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling [J]. *Int J Cancer*, 2003, 103(4): 455-465.
- [18] Iglesias BV, Centeno G, Pascucci H, et al. Expression pattern of glypican-3 (GPC3) during human embryonic and fetal development [J]. *Histol Histopathol*, 2008, 23(11): 1333-1340.
- [19] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [20] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2016, 66(2): 115-132.
- [21] Hartke J, Johnson M, Ghabril M. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Semin Diagn Pathol*. 2017, 34(2): 153-159.
- [22] 陈峰, 周磊, 苏静, 等. 肝癌相关指征在化学诱发小鼠肝癌过程中的动态研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(10): 105-111.
- [23] 赵源, 张超超, 路璐, 等. 生物发光人肝癌裸小鼠原位癌模型的构建 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(9): 68-74.
- [24] 尹君, 李景丁莎, 左从林, 等. 人源性肝癌细胞小鼠原位移植瘤模型的建立及特点的比较研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(12): 68-74.
- [25] 王小明, 余珊, 赵晓姬. miR-206 过表达靶向 VEGFA 对人肝癌 HepG2 细胞侵袭和迁移的抑制作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(8): 95-100.
- [26] 黄昊, 李宝亮, 杨星九, 等. 肝癌人源肿瘤异种移植模型构建及初步应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(8): 60-65.
- [27] Sun B, Zhang J, Liu M, et al. Alkannin inhibits proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via regulation of miR-92a [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 108782.
- [28] Chen L, Wu LL, Zhang ZL, et al. Biofunctionalized magnetic nanospheres-based cell sorting strategy for efficient isolation, detection and subtype analyses of heterogeneous circulating hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 85: 633-640.
- [29] Kaseb AO, Hassan M, Lacin S, et al. Evaluating clinical and prognostic implications of glypican-3 in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(43): 69916-69926.
- [30] Ishiguro T, Sugimoto M, Kinoshita Y, et al. Anti-glypican 3 antibody as a potential antitumor agent for human liver cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(23): 9832-9838.

[收稿日期]2019-06-10