[文章编号] 1003－4684(2025)02-0068-05

运用慢病毒系统构建稳定表达 CD19-FLUC-GFP 的 4T1 细胞系

郭雨洁，程奕宁，汪 洋，刘滨磊

（湖北工业大学生物工程与食品学院，湖北 武汉 4300668）

[摘 要] 为构建稳定表达 CD19、萤火虫荧光素酶(FLUC)和绿色荧光蛋白(GFP)的乳腺癌 4T1 细胞系，以用作 CD19 嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T)的靶细胞模型，通过提取质粒、慢病毒包装及浓缩，感染 4T1 细胞后，经嘌呤霉素筛选和有限稀释法获得单克隆稳转细胞株 4T1-CD19-FLUC-GFP。实时定量 PCR 和流式细胞术检测显示，4T1-CD19-FLUC-GFP 细胞中 CD19 的 mRNA 和膜蛋白表达水平显著高于对照组 4T1 细胞。体内实验中，腋下植瘤 4T1-CD19-FLUC-GFP 细胞一周后，活体成像仪可检测到腋下部位的荧光信号。结果表明，成功构建了稳定表达 CD19-FLUC-GFP 的 4T1 细胞株，为 CAR-T 细胞抗肿瘤疗效机制研究提供了可靠的靶细胞模型和研究基础。

[关键词] 4T1 细胞；慢病毒；CD19；绿色荧光蛋白；萤火虫荧光素酶

[中图分类号] R737.9 [文献标识码] A

乳腺癌是全球范围内女性癌症相关死亡的主要原因之一[1]，并且其发病率在女性癌症中位居首位[2]。为应对这一全球性健康挑战，乳腺健康全球倡议组织制定了一系列预防和治疗指南[3-5]。目前，乳腺癌的传统治疗手段主要包括手术治疗、新辅助放疗和辅助化疗。然而，这些方法的疗效仍不尽如人意。由于缺乏能够准确模拟自然转移过程的动物肿瘤模型，使得这种转移性疾病的治疗变得尤为复杂[6]。近年来，靶向免疫疗法的兴起为乳腺癌治疗带来了新的希望。这类疗法能够精准靶向癌细胞的特定分子，在有效杀伤癌细胞的同时，最大限度地减少对正常细胞的损害，并避免了传统放化疗的副作用。其中，PD-1/PD-L1(程序性细胞死亡蛋白 1/程序性死亡配体 1)靶向免疫疗法[7]和 CD19 CAR-T(嵌合抗原受体 T 细胞)靶向免疫疗法[8]备受关注

CD19 在 B 细胞成熟和分化过程中具有重要作用[9-11]。研究表明，CD19 单克隆抗体结合生物毒素治疗非霍奇金淋巴瘤(non-hodgkin lymphoma，NHL)和急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia，ALL)在体外和动物模型中均显示出良好的疗效。因此，CD19 不仅可作为这些疾病的诊后评判指标，还可作为重要的治疗靶点[12]。在动物模型选择上，小鼠因其繁殖周期短、实验成本低、操作简便等优势[13]，仍然是药物发现和新兴疗法的临床前评估重要手段[14-15]。随着现代成像技术的发展，研究者可以根据实验需求选择多种细胞系和转基因建模方法。在实验技术方面，慢病毒载体因其可塑性强、宿主细胞范围广等优势已被用于多种疾病的基因治疗。慢病毒能够高效转染多种细胞系和哺乳动物细胞，并可将目的基因稳定整合进宿主基因组中，实现外源基因的长期稳定表达[16-17]。

生物发光成像技术实现了对荷瘤小鼠实时、连续及非侵入性观察，能够动态监控小鼠体内肿瘤细胞的生长和转移情况[18]。所以本研究采用慢病毒系统构建稳定表达 CD19 和萤火虫荧光素酶基因的乳腺癌细胞株，通过体外特性研究荷瘤小鼠活体成像实验，探索 CD19 CAR-T 免疫疗法对乳腺癌靶细胞的治疗效果。这一研究不仅为乳腺癌疗效机制的研究提供了新的思路，也为药物治疗效果的评估开辟了新的途径[19]。

1 材料与方法

1.1 材料

表达 CD19-FLUC-GFP 的慢病毒载体质粒、4T1 细胞、大肠杆菌 DH5α 感受态、AMP-LB 平板，本实验室提供；质粒小提试剂盒和反转录试剂盒，南京诺唯赞生物科技有限公司；RNA 提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒，天根生化科技(北京)

[收稿日期] 2023－11－16

[第一作者] 郭雨洁(1998－)，女，江苏连云港人，湖北工业大学硕士研究生，研究方向为生物与医药。

[通信作者] 刘滨磊(1962－)，男，湖北武汉人，湖北工业大学教授，研究方向为生物制药。

有限公司；LipofectamineTM8000 转染试剂和嘌呤霉素(puromycin dihydrochloride)，碧云天生物技术有限公司；慢病毒浓缩液，TAKARA 生物技术公司；Anti-human PE CD19 抗体，Biolegend；实时定量 PCR 试剂 SYBR © GreenRealtime PCR Master Mix，ToYoBo；引物合成，擎科生物科技有限公司。6～8 周龄 BALB/c 雌性小鼠，湖北食品药品安全评价中心，饲养于武汉滨会生物科技股份有限公司动物房。

1.2　方法

1.2.1　经慢病毒感染的过表达 CD19-FLUC-GFP 的 4T1 筛选稳定表达株

本实验使用诺唯赞小提试剂盒提取保存的慢病毒质粒，随后进行慢病毒包装和滴度测定[20]。将所获得的慢病毒浓缩后，保存于－80℃备用。由于 CD19-FLUC-GFP 为融合蛋白，因此可通过 GFP 的表达来筛选稳定表达该融合蛋白的单克隆细胞株。

接下来，收集 4T1 细胞，以 500×g 离心 5 min，弃上清后重悬细胞并进行计数。将 4T1 细胞接种于 24 孔板，每孔细胞数为 2×10^5 个，放置 37℃、5% CO_2 培养箱培养，次日，当细胞长至 80%融合度时，更换新鲜培养基，并避光加入梯度浓度的嘌呤霉素。连续 4 d 观察细胞存活率，期间每 48 h 更换含嘌呤霉素的新鲜培养基。第 4 天确定最低致死浓度。

在 96 孔板中接种状态良好的 4T1 细胞 2×10^4 个，培养 24 h 至细胞融合度达 80%后，更换含有 6 μg/mL Polybrene 的新鲜培养基，置于 CO_2 培养箱孵育 30 min，随后，取 10 μL 浓缩后的慢病毒转导至 4T1 细胞[21]。转导 48 h 后，将细胞扩培至 24 孔板，更换含有最低致死浓度的嘌呤霉素的 10% FBS DMEM/F12 培养基继续培养 3 d，弃掉含有嘌呤霉素的培养基，继续培养至细胞适宜密度。

通过倒置荧光显微镜观察，确认细胞全部表达绿色荧光。采用有限稀释法将其密度稀释至 500 个/mL，96 孔板预先加入 100 μL 培养基，每孔接种 2 μL 细胞悬液。将 96 孔板置于细胞培养箱中，定期观察单克隆生长情况。随后依次扩培至 6 孔板，得到稳定表达 CD19-FLUC-GFP 基因的 4T1 单克隆细胞株。最后，通过流式细胞术筛选出 CD19 表达量最高的单克隆细胞株。

1.2.2　流式检测稳转细胞株中 CD19 的稳定表达

将 4T1 细胞(阴性对照)和 4T1-CD19-FLUC-GFP 细胞以 1×10^6 个/ mL 密度接种 6 于孔板，48 h 后，收集 6 孔板内的 4T1 细胞(阴性对照)和 4T1-CD19-FLUC-GFP 细胞，分别转移至 1.5 mL EP 管中，以 500×g 离心 5 min，弃去上清。随后，用 100 μL PBS 重悬 4T1 和 4T1-CD19-FLUC-GFP 细胞，并向每个样本中加入 5 μL anti-human PE-CD19 抗体，在 4℃条件下避光孵育 30 min。孵育完成后，用 500μL PBS 洗涤细胞，以 500×g 离心 5 min，弃去上清。重复润洗 3 次后，重悬细胞，并使用上流式细胞仪检测，以 PE 的相对荧光强度作为 CD19 表达的量化指标。

1.2.3　RT-qPCR 检测 4T1-CD19-FLUC-GFP 细胞 CD19 mRNA 表达

按照 RNA 提取试剂盒说明书，分别提取 4T1 细胞和 4T1-CD19-FLUC-GFP 细胞的 RNA。随后，利用反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录成 cDNA，以便进行实时定量 PCR 检测，以评估 CD19 在转录水平的表达情况。

实时定量 PCR 的反应体系为 50 μL，具体包括：SYBR © Green Realtime PCR Master Mix，25 μL；上下游引物(浓度均为 10 μmol/L)，各 2 μL；模板 cDNA，5 μL；蒸馏水，16 μL。

反应条件设置为：95℃，15 s；60℃，15 s；72℃，45 s。共进行 40 个循环。hCD19 正向引物 5'-CTACCTGATCTTCTGCCT-3'，反向引物 5'-ATCCTCTTCCTCTTCCTC-3'；内参 mGAPDH 正向引物 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'，反向引物 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAG-GTCA-3'。

1.2.4　多功能酶标仪检测稳转细胞株中 FLUC 的表达

将 4T1 细胞(阴性对照)和 4T1-CD19-FLUC-GFP 单克隆细胞分别以 4.5×10^4 个/孔的密度接种 96 孔板，每组设 3 个复孔。次日，预先配制浓度为 15 mg/mL 的 D-荧光素钾盐溶液，弃掉 96 孔板中旧培养基，每孔加入 100 μL 已配制的 D-荧光素钾盐溶液，置于 37℃培养箱孵育 10 min。孵育完成后，使用多功能酶标仪检测各孔中 FLUC 的相对表达量。

1.2.5　4T1-CD19-FLUC-GFP 体内试验

为检测 4T1-CD19-FLUC-GFP 稳转细胞系在体内成瘤后 FLUC 的表达情况，选用 6～8 周龄 BALB/c 雌性小鼠，购后适应一周，于小鼠腋下进行植瘤操作。

实验设置对照组和实验组，每组包括 3 只小鼠。取 4T1 亲本细胞和 4T1-CD19-FLUC-GFP 单克隆细胞，经胰酶消化后制成单细胞悬液，并用无菌 PBS 调整细胞密度至 1×10^7 个/mL。然后，每只小鼠皮下注射 100 μL 细胞悬液。

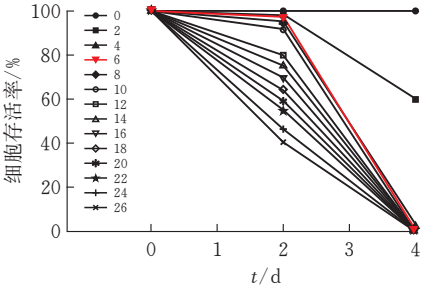
植瘤一周后，观察肿瘤的生长情况。随后，对荷瘤小鼠每只腹腔注射 100 μL D-荧光素钾盐。10 min 后，使用小动物活体成像仪观察病灶部位的荧光信号，以评估 FLUC 的表达水平。

1.2.6 统计分析 采用 GraphPad Prism 7.0 软件对数据进行统计分析。结果以均值±标准差(±s)的形式表示。两组间的比较用 t 检验,当 $P<0.05$ 时,认为差异具有统计学意义。

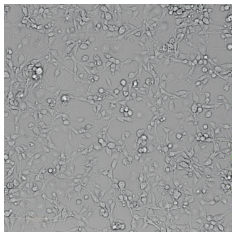
2 结果

2.1 稳定表达 CD19-FLUC-GFP 的 4T1 细胞株的筛选

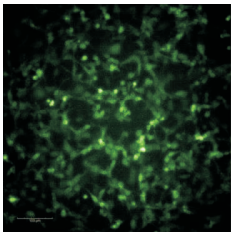
在 4T1 细胞经嘌呤霉素处理的第 4 天,观察到当剂量达到 6 μg/mL 时,细胞全部死亡。因此,后续筛选实验中确定的嘌呤霉素浓度为 6 μg/mL(图 1a)。此外,浓缩后的慢病毒滴度为 4.1×10^7 TU/mL ,将过表达 CD19-FLUC-GFP 的慢病毒转导至 4T1 细胞中,48 h 后,通过倒置荧光显微镜下可观察到 GFP 的表达,这表明慢病毒转导成功。经过嘌呤霉素筛选出的单克隆细胞培养一周后,获得一株稳定表达 GFP 的 4T1-CD19-FLUC-GFP 单克隆细胞(图 1b)。



(a)4T1 细胞对嘌呤霉素的敏感度曲线



(b)明场下4T1-CD19-FLUC-GFP 单克隆细胞株的GFP表达



(c)暗场下4T1-CD19-FLUC-GFP 单克隆细胞株的GFP表达

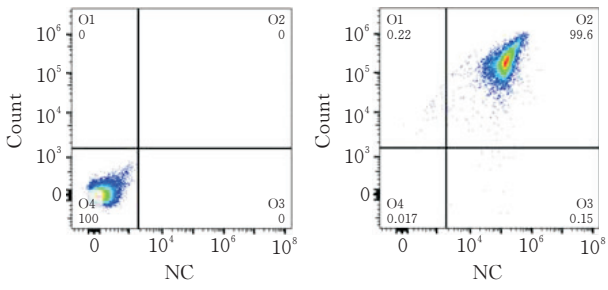
图 1 单克隆细胞株的筛选

2.2 检测单克隆细胞株 CD19 的表达

以 4T1 为对照细胞,通过流式细胞仪检测 4T1-CD19-FLUC-GFP 单克隆细胞系的纯度及 CD19 在细胞膜上的表达水平。结果显示,GFP 和 CD19 双阳性率均高于 98%(图 2),表明 CD19 和 GFP 在该单克隆细胞株中呈现高效且稳定的表达(图 3)。

2.3 CD19 mRNA 在 4T1-CD19-FLUC-GFP 细胞系中高表达

对已筛选的单克隆细胞系进行 CD19 mRNA 的转录分析,随后对其转录产物进行 mRNA 相对定量检测(图 4),结果显示:与亲本细胞 4T1 相比,



(a) 4T1亲本细胞 (b) 4T1-C5细胞株双阳性表达GFP/CD192

图 2 GFP 和 CD19 在 4T1-CD19-FLUC-GFP 单克隆细胞膜上的表达

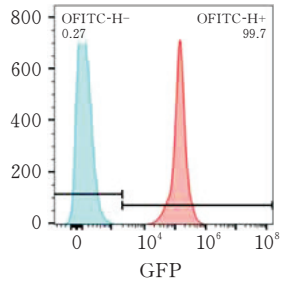


图 3 4T1-CD19-FLUC-GFP 单克隆细胞系 GFP 表达丰度检测

4T1-CD19-FLUC-GFP 单克隆细胞中 CD19 mRNA 表达量显著升高,差异高达约 1000 倍。这表明 CD19 mRNA 在 4T1-CD19-FLUC-GFP 细胞系中实现了高效转录。

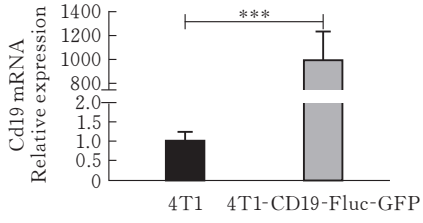


图 4 4T1-CD19-FLUC-GFP 细胞系中 CD19 mRNA 表达

2.4 检测单克隆细胞株 FLUC 的表达

通过多功能酶标仪对 FLUC 的表达进行检测,结果显示,4T1-CD19-FLUC-GFP 单克隆细胞株的相对荧光强度(RLU)显著高于对照组,差异倍数超过 8000 倍(图 5)。这表明在 4T1-CD19-FLUC-GFP 细胞系中,FLUC 实现了高效且稳定的表达。

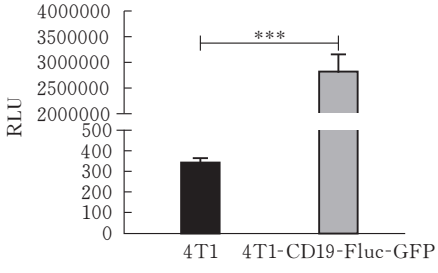
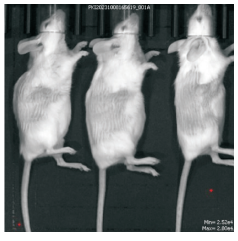


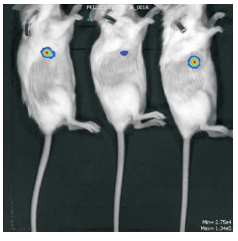
图 5 检测 4T1-CD19-FLUC-GFP 单克隆细胞株的 FLUC

2.5　4T1-CD19-FLUC-GFP 稳转细胞系体内功能鉴定

将 4T1 亲本细胞和 4T1-CD19-FLUC-GFP 单克隆细胞分别接种于小鼠腋下，植瘤一周后，小鼠腹腔注射 D-荧光素钾盐，并通过小动物活体成像仪观察病灶部位 FLUC 的表达(图 6)。结果表明，4T1-CD19-FLUC-GFP 单克隆细胞在体内能稳定表达 FLUC。



(a)对照组小鼠荷瘤亲本细胞



(b)实验组小鼠荷瘤单克隆细胞

图 6　4T1-CD19-FLUC-GFP 细胞株体内成瘤和 FLUC 的表达

3　结果与讨论

本研究成功构建了用于 CD19 CAR-T 细胞治疗实体瘤的 4T1 靶细胞模型，实验结果表明，该细胞模型在流式细胞术检测中呈现 GFP 和 CD19 双阳性高表达，并通过多功能酶标仪检测证实 FLUC 高表达水平。体内实验进一步验证了该细胞系的成瘤能力和 Fluc 的稳定表达，为后续研究奠定了坚实基础。

CD19 抗原在 B 细胞的发育和成熟过程中有着重要作用，其表达水平与免疫缺陷病和自身免疫性疾病的发展密切相关。CD19 靶向免疫疗法，特别是 CAR-T 细胞免疫疗法。在 B 细胞癌治疗中展现出显著疗效，一些临床试验表明，即使在 CD19 阴性肿瘤复发患者中，CAR-CD19 T 细胞仍能持续存在，并维持 B 细胞再生障碍，这充分证明 CAR-CD19 T 细胞具有持久性。

本研究构建的 4T1-CD19-FLUC-GFP 单克隆细胞系，不仅为体外评估 CD19-CAR 改造 T 细胞抗实体瘤疗效机制研究提供了理想的靶细胞模型，同时也为深入研究 CAR-T 细胞在动物模型体内的浸润及其抗实体瘤疗效奠定基础。与常规 4T1 相关细胞系相比，本研究构建的细胞系具有显著优势，其 CD19 抗原的表达，为研究 CD19 抗原相关的癌症治疗和肿瘤免疫疗法提供了独特平台，且荧光标记的引入使得该细胞系在追踪、定量和实时监测细胞生长、转移或者药物治疗方面具有更多应用潜力。

此外，本研究构建的细胞系还为乳腺癌其他扩展模型的建立提供了思路与依据。在乳腺癌中，HER-2 是一个重要靶点，且针对 HER-2 的单抗、ADC、小分子抑制剂均已上市，anti-HER-2 的 CAR-T 也在临床试验中。因此，构建针对 HER-2，并表达 FLUC 和 GFP 的乳腺癌细胞系，有望为探索治疗乳腺癌的发生进展机制和候选药物提供可靠动物模型。

这些研究成果为临床前研究提供了强有力的技术支撑，也为开发具有安全性的新一代疗法提供了潜在策略。本研究构建的 CD19 CAR-T 细胞乳腺癌靶细胞模型，不仅为探索乳腺癌免疫疗法、阐明疾病发生发展机制和候选药物的高通量筛选提供了有力支持，更为肿瘤转移机制研究和新抗癌药物发现等领域提供了可靠有效的实验平台。

[参 考 文 献]

[1] MA Q Z，CHEN Y，QIN Q，et al.CXCL13 expression in mouse 4T1 breast cancer microenvironment elicits antitumor immune response by regulating immune cell infiltration[J]. Precision clinical medicine，2021，4(03)：155-167.

[2] SUNG H，FERLAY J，SIEGEL R L，et al.Global Cancer Statistics 2020：GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin，2021，71(03)：209-249.

[3] ANDERSON B O，CAZAP E，EL SAGHIR N S，et al. Optimisation of breast cancer management in low-resource and middle-resource countries：executive summary of the Breast Health Global Initiative consensus，2010[J]. Lancet Oncol，2011，12：387- 398.

[4] DVALADZE A，DUGGAN C，ANDERSON B O. Phased implementation for breast cancer management in low-income and middle-income countries：a proposal for the strategic application of resource-stratified guidelines by the Breast Health Global Initiative[J]. Cancer，2020，126(suppl 10)：2337- 2338.

[5] DUGGAN C，DVALADZE A，ROSITCH A F，et al. The Breast Health Global Initiative 2018 Global Summit on Improving Breast Healthcare Through Resource-Stratified Phased Implementation：methods and overview[J]. Cancer，2020，126(suppl 10)：2339-2352.

[6] PULASKI B A，OSTRAND-ROSENBERG S. Mouse 4T1 breast tumor model[J]. Current protocols in immunology，2001，Chapter 20：Unit 20. 2.

[7] XIE W，MEDEIROS L J，LI S，et al.PD-1/PD-L1 Pathway：A Therapeutic Target in CD30 + Large Cell Lymphomas[J]. Biomedicines，2022，4(07)：1587.

[8] DENLINGER N，BOND D，JAGLOWSKI S. CAR T-cell therapy for B-cell lymphoma[J]. Current problems

in cancer, 2022,46(01):100826.
[9] WOYACH J A,AWAN F,FLINN I W,et al.A phase 1 trial of the Fc-engineered CD19 antibody XmAb5574 (MOR00208) demonstrates safety and preliminary efficacy in relapsed CLL[J]. Blood, 2014, 124(24): 3553-3560.
[10] ZALEVSKY J,LEUNG IW,KARKI S,et al.The impact of Fc engineering on an anti-CD19 antibody: increased Fcgamma receptor affinity enhances B-cell clearing in nonhuman primates[J]. Blood, 2009, 113(16):3735-3743.
[11] POE J C,MINARD-COLIN V,KOUNTIKOV E I,et al. Ac-Myc and surface CD19 signaling amplification loop promotes B cell lymphoma development and progression in mice[J]. J Immunol, 2012;189(05):2318-2325.
[12]I MURA Y,ANDO M,KONDO T,et al.CD19-targeted CAR regulatory T cells suppress B cell pathology without GvHD[J]. JCI Insight, 2020,5(14):e136185.
[13] KHALED W T,LIU P.Cancer mouse models: past, present and future [J]. Semin Cell Dev Biol,2014,27(03):54-60.
[14] HANGAUER M J,VISWANATHAN V S,RYAN M J,et al.Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition [J]. Nature,2017,551(7679): 247-250.
[15] LÖSCHER W. Animal models of seizures and epilepsy: past,present,and future role for the discovery of antiseizure drugs [J]. Neurochem Res,2017,42(07): 1873-1888.
[16] TIFFEN J C,BAILEY C G,NG C,et al.Luciferase expression and bioluminescence does not affect tumor cell growth in vitro,or in vivo [J]. Molecular cancer,2010, 9(01):1-8.
[17] NASRI M,KARIMI A,FARSANI M A.Production, purification and titration of a lentivirus-based vector for gene delivery purposes [J]. Cytotechnol,2014,66(06):1031-1038.
[18] HANSEN A E,FLIEDNER F P, HENRIKSEN J R,et al.Liposome accumulation in irradiated tumors display important tumor and dose dependent differences [J]. Nanomedicine,2018, 14(01): 27-34.
[19] BRAY F,FERLAY J,SOERJOMATARAM I,et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in185 countries[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2018,68(06):394-424.
[20] SEGURA M M,MANGION M,GAILLET B,et al. New developments in lentiviral vector design, production and purification[J]. Expert Opin Biol Ther, 2013, 13(07):987-1011.
[21] 敖罗权，敖翔，郭韡，等. 稳定表达 CD19 的 HeLa 细胞株的构建及其作为 CD19-CAR-T 细胞的靶细胞功能鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2020，36(12)：1095-1101.

Construction of 4T1 Cell Line Stably Expressing CD19-FLUC-GFP Using Lentivirus System

GUO Yujie, CHENG Yining, WANG Yang, LIU Binlei

(*School of Bioengineering and Food Science, Hubei Univ. of Tech., Wuhan* 430068, *China*)

Abstract: This study aims to construct a breast cancer 4T1 cell line stably expressing CD19, firefly luciferase (FLUC), and green fluorescent protein (GFP) to serve as a target cell model for CD19 chimeric antigen receptor T cells (CAR-T). Through plasmid extraction, lentiviral packaging, and concentration, 4T1 cells were infected and subsequently subjected to puromycin selection and limited dilution to obtain the monoclonal stable cell line 4T1-CD19-FLUC-GFP. Quantitative real—time PCR and flow cytometry analysis revealed that the mRNA and membrane protein expression levels of CD19 in 4T1-CD19-FLUC-GFP cells were significantly higher than those in the control 4T1 cells. In vivo experiments showed that one week after the implantation of 4T1-CD19-FLUC-GFP cells into the axilla, fluorescence signals in the axillary region could be detected using an in vivo imaging system. The results demonstrated the successful construction of a 4T1 cell line stably expressing CD19-FLUC-GFP, providing a reliable target cell model and research foundation for investigating the anti—-tumor efficacy mechanisms of CAR-T cells.

Keywords: 4T1 cells; Chronic virus; CD19; Green fluorescent protein; Firefly luciferase

[责任编校：张 众]