胃癌细胞中铁死亡调控因子筛选—PI/ Hoechst 染色法

Screening of Ferroptosis Regulators in Gastric Cancer Cell—PI/Hoechst Staining

汤扬¹, 焦石², 周兆才^{3,*}

¹ 同济大学癌症中心, 附属第十人民医院, 同济大学医学院, 上海; ² 中国科学院分子细胞科学卓越中心, 中国科学院大学, 上海; ³ 生命科学学院, 复旦大学, 上海

*通讯作者邮箱: zczhou@sibcb.ac.cn

引用格式: 汤扬, 焦石, 周兆才. (2021). 胃癌细胞中铁死亡调控因子筛选—PI/ Hoechst 染色法. *Bio-101* e1010823. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010823.

How to cite: Tang, Y. Jiao, S. and Zhou, Z. C. (2021). Screening of Ferroptosis Regulators in Gastric Cancer Cell—PI/Hoechst Staining. *Bio-101* e1010823. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010823. (in Chinese)

摘要: 铁死亡是一种铁依赖性的新型细胞程序性死亡方式, 细胞膜上高表达的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化, 从而诱导细胞死亡。目前已经发现了铁死亡诱导剂 RSL3 和抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1), 为了寻找铁死亡中关键的调控因子, 我们选取 Human ON-TARGETplus (OTP) 全基因组 siRNA 文库进行筛选, 利用铁死亡诱导剂 RSL3 处理胃癌细胞, 以细胞存活率作为筛选指标。我们的筛选体系与其他体系区别在于, 我们选取的背景是胃癌细胞系, 以胃癌为切入点来阐明铁死亡的新型调控元件。首先在胃癌细胞系 HGC-27 中转染不同的 siRNAs, 加入 RSL3 诱导铁死亡, 利用 PI/Hoechst 染色后计算细胞存活率, 以期获得铁死亡调控因子。

关键词: 铁死亡, 胃癌, PI/Hoechst 染色, siRNA 高通量筛选

材料与试剂

1. 15 ml 离心管 (Corning, catalog number: CLS430791)
2. 50 ml 离心管 (Corning, catalog number: CLS430828)
3. 10 ml 移液管 (Corning, catalog number: 4488)
4. 1.5 ml 离心管 (Axygen, catalog number: MCT-150-C)
5. 96 孔圆底板 (Corning, catalog number: CLS3879)

6. 384 孔黑色板 (Corning, catalog number: COR-3712)
7. RPMI 1640 (Thermo, catalog number: 11875093)
8. Opti-MEM (Thermo, catalog number: 31985088)
9. FBS (Biological Industries, catalog number: 04-001-1A)
10. Trypsin-EDTA (0.25%) (Thermo, catalog number: 25200072)
11. Penicillin/streptomycin (Thermo, catalog number: 15070063)
12. Lipofectamine RNAiMAX reagent (Thermo, catalog number: 13778075)
13. RSL3 reagent (MCE, catalog number: HY-100218A)
14. Ferrostatin-1 reagent (MCE, catalog number: HY-100579)
15. DMSO reagent (Sigma, catalog number: D2650)
16. Propidium Iodide reagent (Thermo, catalog number: P3566)
17. Hoechst 33342 reagent (Thermo, catalog number: P3570)
18. 1640 完全细胞培养液 (见溶液配方)
19. PBS 缓冲液 (见溶液配方)

细胞系

HGC-27 细胞 (上海生命科学研究院细胞资源中心, TCHu 22)

仪器设备

1. Multidrop 自动分液器 (Thermo Fisher, model: Multidrop Combi)
2. 隔水式恒温培养箱 (上海精宏实验设备有限公司)
3. 水平冷冻离心机 (Eppendorf, model: 5810R)
4. 细胞计数仪 (Invitrogen, model: Countess)
5. 二氧化碳恒温细胞培养箱 (Thermo Fisher, model: Thermo Series 8000)
6. 电动移液器 (Eppendorf)
7. Ensign 多功能微孔板检测仪 (Perkin Elmer, model: Ensign)
8. 非接触式数码滴定仪 (Tecan, model: D300e)
9. Beckman 大型液体工作站 (Beckman, model: Biomek FXP)

实验步骤

在本实验中，我们选择胃癌细胞系 HGC-27 作为实验对象，利用已报道的铁死亡诱导剂 RSL3 和抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1) 进行铁死亡调节因子筛选 (Bersuker *et al.*, 2019; Doll *et al.*, 2019)。

1. 选择 Human ON-TARGETplus (OTP) 全基因组 siRNA 亚文库进行筛选，使用 Beckman 大型液体工作站将亚文库 siRNAs 铺至 384 孔板中，用 Opti-MEM 稀释 siRNA 至终浓度为 20 nM，每孔加入 10 μ l siRNA。
2. 用 Multidrop 自动分液器进行 RNAiMAX 试剂加样，每孔 10 μ l 体系 (0.1 μ l RNAiMAX/孔 + 9.9 μ l Opti-MEM)。
3. 加入 siRNA 和 RNAiMAX 试剂后，800 rpm 水平离心 1 分钟，室温静置 30 分钟，使两者充分混匀。
4. 在 siRNA 和 RNAiMAX 试剂静置过程中，准备细胞。用 Trypsin-EDTA (0.25%) 将 HGC-27 细胞消化后，用 1640 完全培养基重悬细胞，随后利用细胞计数仪进行细胞计数，用 Multidrop 自动分液器加细胞，每孔加入 30 μ l 对应密度的细胞量 (1,000 个细胞每孔)。(由于血清的终浓度为 10%，用 Opti-MEM 配制 siRNA 和转染试剂中未加入血清，因此在 1640 完全培养基中的血清浓度为 16.7%)。
5. 每孔加入对应密度的细胞后，800 rpm 水平离心 1 分钟，使细胞沉降在板底。随后将 384 孔板放置在含有 5% CO₂ 的 37° 培养箱中培养 48 小时。
6. 用 Ensight 多功能微孔板检测仪进行明场拍照，观察每个孔之间细胞密度的差异，排除细胞密度对后续实验的影响。
7. 自动化加药：
使用非接触式数码滴定仪进行加药，RSL3 和 Fer-1 终浓度为 0.2 μ M 和 1 μ M。加样设置如图 1，灰色区域加入 RSL3。红色部分加入 RSL3 和 Fer-1 是做为阳性参照，Fer-1 可以部分 rescue 由 RSL3 诱导的铁死亡，促进胃癌细胞的存活率。
8. 加药后，800 rpm 水平离心 1 分钟，将 384 孔板放置在含有 5% CO₂ 的 37° 培养箱中培养 24 小时。
9. PI/Hoechst 染色：使用 Multidrop 自动分液器进行加样，5 μ l 每孔，用完全培养基进行稀释，PI/Hoechst 终浓度 1:1,000 稀释。染色后，37° 培养箱中孵育 15-20 分钟。

10. 用 Ensign 多功能微孔板检测仪进行 PI/Hoechst 拍照，计算每组的细胞数目，得到细胞存活率。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	A																						NC-RSL3-Fer-1	
B	B																							
C	B																							
D	B																							
E	C	NC-RSL3																					NC-DMSO	
F	C																							
G	D																							
H	D																							
I	E																							
G	E																							
K	F	NC-DMSO																						
L	F																							
M	G																							
N	G																							
O	H	NC-RSL3-Fer-1																						
P	H																							

图 1. 整板加药设置

结果与分析

Hoechst 染色后计数：细胞总数

PI 染色后计数：死细胞数目

siNC 存活率 (%)：[1- (siNC 死细胞数目/siNC 细胞总数)]*100%

siRNA 存活率 (%)：[1- (siRNA 死细胞数目/siRNA 细胞总数)]*100%

存活比例值= siRNA 存活率 (%) / siNC 存活率 (%)

将存活比例值与每组重复之间的 p-value 值进行作图，如图 2 所示，分析即可得到铁死亡候选调节因子。

图 2. 铁死亡调控因子筛选结果

失败经验

1. 预实验时需要摸索细胞密度和铁死亡诱导剂 **RSL3** 浓度，细胞不能过稀或者过密。不同细胞对铁死亡诱导剂 **RSL3** 敏感程度不一样，做筛选之前需要测试细胞对 **RSL3** 的 IC_{50} 值，选择合适的 **RSL3** 浓度，将细胞存活率控制在 30% 左右。此步是影响筛选成败的关键步骤，需要做好预实验。
2. **PI/Hoechst** 染色时间不易过长，时间过长会导致细胞死亡，影响实验结果，因此在 **PI/Hoechst** 染色这一步建议前一块板子染色拍照后再进行下一块板子的染色。

溶液配方

1. 1640 完全细胞培养液

16.7% FBS, penicillin/streptomycin (v/v: 1:100) 加入到 1640 基础培养基中，4 °C 保存，使用前 37 °C 水浴加热。

2. PBS 缓冲液

8 g NaCl, 0.2 g KCl, 14.2 g Na_2HPO_4 , 0.27 g KH_2PO_4 , 加入 800 ml 双蒸水溶解，用 HCl 调 pH 值至 7.4，加水定容至 1 L, 0.22 μm 滤膜过滤后，高压蒸汽灭菌，室温或 4 °C 保存。

致谢

感谢中国科学院分子细胞科学卓越中心化学生物学技术平台对本实验方法的帮助和改进。本实验得到国家自然科学基金项目 (81725014, 81822035) 以及中国博士后科学基

金（2020T130477） 的资助。

参考文献

- 1 Bersuker, K., Hendricks, J. M., Li, Z., Magtanong, L., Ford, B., Tang, P. H., Roberts, M. A., Tong, B., Maimone, T. J., Zoncu, R. *et al.* (2019). [The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis.](#) *Nature* 575(7784): 688-692.
- 2 Doll, S., Freitas, F. P., Shah, R., Aldrovandi, M., da Silva, M. C., Ingold, I., Goya Grocin, A., Xavier da Silva, T. N., Panzilius, E., Scheel, C. H. *et al.* (2019). [FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor.](#) *Nature* 575(7784): 693-698.