

太空环境对肿瘤细胞生理特性的影响^{*}

向 青 房 青 陈志华 李红艳 徐 波 徐 梅
周东辉 赵天德 唐劲天 陈惟昌

(中日友好临床医学研究所肿瘤学-分子生物学研究室 北京 100029)

摘 要

将3种肿瘤细胞搭载于“神舟4号”的卫星返回舱内,经过7天太空飞行,回收后对存活细胞进行单克隆化,观察细胞形态,并测定了细胞周期、黏附力及细胞因子表达。结果显示,经太空飞行,小鼠黑色素瘤B16细胞的周期发生改变,G1期细胞明显增多($p < 0.05$),并表现多种细胞形态;人肺鳞癌细胞L78对血管内皮细胞黏附力明显减弱,但经传代培养其黏附力恢复且超过对照组细胞;Caski细胞IL-2、IL-8、TNF和TGF的表达均明显增加,而L78细胞上述4种细胞因子的表达均显著下降。结论,太空环境可影响肿瘤细胞的某些生理特性,但可否影响肿瘤细胞的免疫原性,仍需做进一步的实验。

关键词 太空环境; 肿瘤细胞

1 引言

太空中有强宇宙射线辐射、微重力、微磁场等,是一种特殊的生存环境。实验表明:重力的改变可以导致细胞许多生理功能的显著变化,离子辐射亦可改变细胞的生长特性^[1]。因此,太空特殊环境可能更易于诱发细胞变异^{[2],[3]}。微生物和植物种子经卫星搭载,其产量亦有所提高。本实验将肿瘤细胞搭载于“神舟4号”飞船,并对搭载后的肿瘤细胞进行形态学观察以及细胞周期、黏附力及细胞因子分泌水平的检测,以期筛选出免疫原性增强的细胞株,为“太空瘤苗”的研究提供一条新途径。

2 材料与方法

2.1 材料

细胞:小鼠黑色素瘤细胞B16、人宫颈癌细胞Caski和人肺鳞癌细胞L78,分别购自中国医学科学院药物所及基础医学研究所细胞库;人脐静脉内皮细胞由本研究所从人脐静脉分离。

细胞太空生存装置:本研究室开发的专利产品,专利申请号:03120906.8。

放射免疫测定试剂盒:均购自解放军总医院东亚放免研究所。

2.2 方法

搭载条件:将3株肿瘤细胞培养于细胞太空生存装置中,搭载于“神舟4号”飞船运

^{*} 国家自然科学基金资助项目(30240035, 30371324)

2003-12-01 收到原稿, 2004-04-15 收到修定稿

载的返回式卫星的返回舱内。细胞所处环境同卫星返回舱条件, 为 1 个大气压、常温 (18—22°C)、无源 (电源、热源等)。细胞在飞船发射基地滞留 8 天, 随“神舟 4 号”飞船绕地飞行 7 天, 共 108 圈。

肿瘤细胞单克隆化: 搭载于“神舟 4 号”飞船的肿瘤细胞 (以下称为太空肿瘤细胞) 返回后, 收集细胞培养液并冻存; 同时, 更换新鲜的太空细胞培养液, 置 37°C、5% CO₂ 的细胞培养箱中孵温 10 h, 胰酶消化, 重悬, 接种于 96 孔细胞培养板进行单克隆化, 扩增培养, 冻存 (太空细胞培养液 +20% 胎牛血清 +10%DMSO)。

细胞周期的测定: 随机选取 1 株太空搭载的单克隆化的细胞, 以正常培养的 B16 细胞为对照, 接种于 6 孔板, 分别收集培养 3 天的细胞, 70% 乙醇固定, PI 染色, 流式细胞仪检测。

细胞形态观察: 对单克隆化后不同形态的细胞克隆用相差显微镜进行观察。

细胞黏附力的测定: 采用微吸管负压系统测量单细胞对的黏附力。分别吸取 10 对实验组和地面对照组人肺鳞癌 L78 细胞及人宫颈癌 Caski 细胞与人脐静脉内皮细胞配对进行黏附实验, 利用计算机控制的微操纵器使细胞进行碰撞, 控制接触时间, 记录黏附频率。

细胞因子的测定: 将 400 μ l 的细胞培养液冷冻干燥, 用 100 μ L 水复溶, 用放免试剂盒分别测定白介素 -2 (InterLeukin-2, IL-2)、白介素 -8 (InterLeukin-8, IL-8)、肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF) 及转化生长因子 (Transforming Growth Factor, TGF) 的含量。

3 结果

3.1 太空肿瘤细胞的单克隆化

对 3 株搭载肿瘤细胞的单克隆化共接种 96 孔板 360 块, 得到太空肿瘤细胞约 4000 株。

3.2 太空肿瘤细胞周期的变化

如表 1 所示: 太空的 B16 细胞, 其细胞周期改变, 与野生型 B16 细胞相比, G1 期细胞明显增多, S 期及 G2 期细胞减少。

表 1 太空环境对 B16 细胞细胞周期的影响
Table 1 Effect of outer space on cell cycle in B16 cells

细胞株	G1 期 / (%) (mean $\pm$ SD)	S 期 / (%) (mean $\pm$ SD)	G2 期 / (%) (mean $\pm$ SD)
野生型 B16	44.50 $\pm$ 1.95	37.33 $\pm$ 0.61	18.03 $\pm$ 2.37
诱变株 B16	58.30 $\pm$ 0.60*	26.33 $\pm$ 1.01*	15.40 $\pm$ 1.11*

* 诱变株 B16 与野生型 B16 比较: $p < 0.05$

3.3 太空肿瘤细胞的形态变化

地面培养的 B16 细胞呈均一形态 (未经单克隆化), 而单克隆化的太空肿瘤细胞出现多种细胞形态, 见图 1。

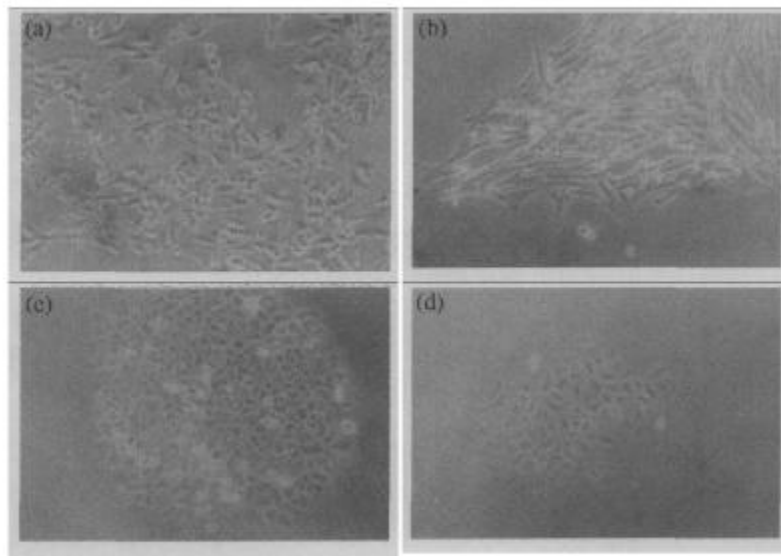


图 1 小鼠黑色素瘤 B16 细胞经太空诱变后出现多种细胞形态 ($\times 100$)
(a) 地面培养的 B16 细胞, (b)、(c)、(d) 诱变后的 B16 细胞
Fig.1 Multiple morphology of B16 cells mutated by outer space ($\times 100$)

3.4 太空肿瘤细胞黏附力的变化

实验发现, 在人肺鳞癌细胞 L78, 其地面对照组与正常培养组对血管内皮细胞的黏附频率无明显变化, 而太空搭载组与地面对照组相比, 黏附频率变化明显, 前者对血管内皮细胞黏附频率明显降低, 但搭载传代组其黏附频率不仅恢复且超过正常培养组; 在另一株宫颈癌细胞 Caski, 搭载前后细胞黏附频率没有明显改变 (见图 2).

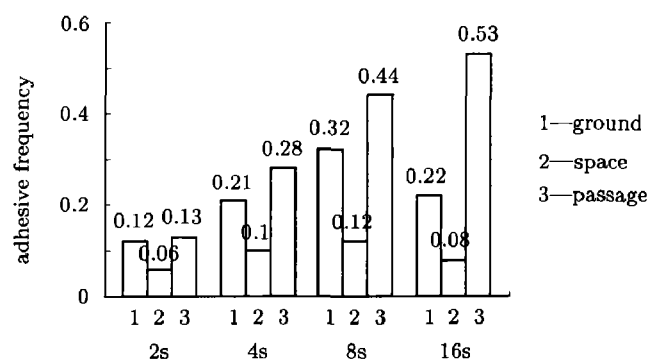


图 2 L78 细胞对内皮细胞的黏附频率
Fig.2 Adhesive frequency of L78 cell to endothelial cell

3.5 太空肿瘤细胞细胞因子表达的改变

如图 3—6 所示, 太空环境对不同肿瘤细胞株不同细胞因子所引起的变化各不相同. 在 B16 细胞, 对 IL-2 和 IL-8 的表达影响不大, 但使 TNF 的表达明显增加, TGF 明显降低; 而对于 Caski 细胞, IL-2、IL-8、TNF 和 TGF 的表达均明显增加; 与 Caski 细

胞相反, 在 L78 细胞, 上述 4 种细胞因子在太空环境作用下, 其表达均显著下降。

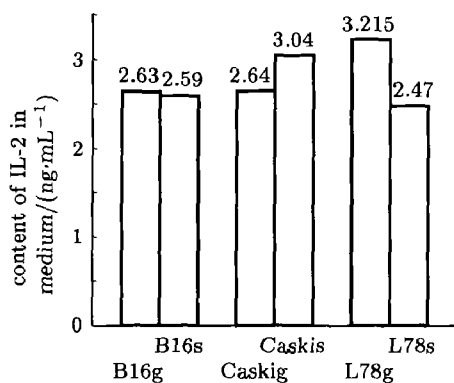


图 3 太空环境对肿瘤细胞 IL-2 表达的影响
Fig.3 Effect of outer space on IL-2 expression in tumor cells

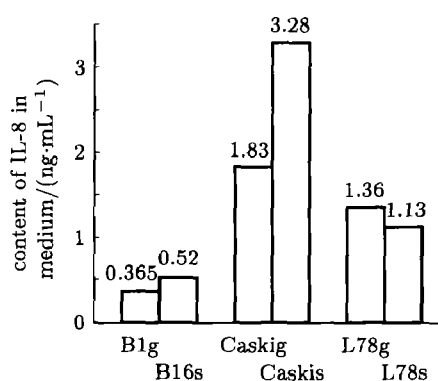


图 4 太空环境对肿瘤细胞 IL-8 分泌的影响
Fig.4 Effect of outer space on IL-8 expression in tumor cells

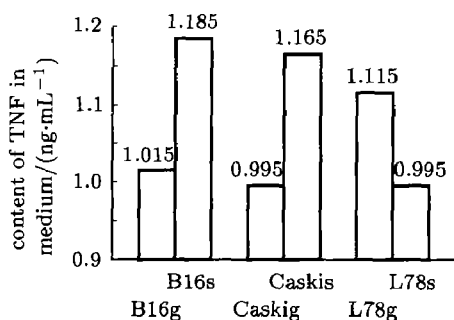


图 5 太空环境对肿瘤细胞 TNF 分泌的影响
Fig.5 Effect of outer space on TNF expression in tumor cells

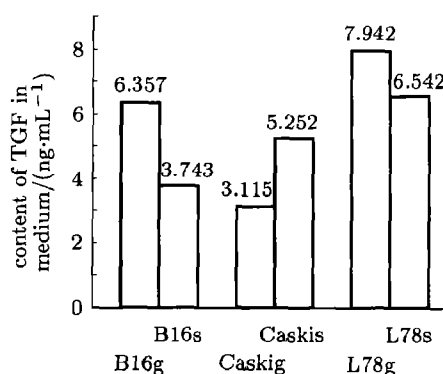


图 6 太空环境对肿瘤细胞 TGF 分泌的影响
Fig.6 Effect of outer space on TGF expression in tumor cells

4 讨论

肿瘤细胞免疫原性较弱, 且抗原提呈过程中存在多个环节缺陷, 使肿瘤可逃避机体的免疫监控。利用肿瘤疫苗主动免疫, 达到治疗及预防肿瘤的目的, 已成为突破方向之一。太空特殊环境的复合作用易于诱发细胞产生变异, 进而导致细胞生理功能发生变化。如微重力培养可以加速骨髓祖细胞的增殖与分化^[4], 可改变细胞的基因表达、信号传导、骨架结构等^[5]。重力亦影响结缔组织的生物合成, 如在微重力下胶原合成量比在 1g 下增加 40%, 在超重下其合成量比正常条件下低^[6]。造血干细胞在微重力下培养可以减少细胞的增殖和分化^[7]。

本课题将小鼠黑色素瘤细胞、人宫颈癌细胞和人肺鳞癌细胞三株肿瘤细胞搭载于“神舟 4 号”, 研究了太空特殊环境对其生理特性的影响, 结果发现: 太空环境可引起 B16 细胞细胞周期的变化, G1 期细胞增多, 而 G2 和 S 期细胞减少, 其原因可能是由于太空中

多种宇宙射线的照射, 导致细胞 DNA 损伤, 使细胞无法进入合成期, 进而影响细胞的生长速度. 在对 B16 细胞形态的研究中发现, 单克隆化的细胞出现多种细胞形态, 提示太空环境可引起细胞发生多方向的变化, 但这种变化是否均为可遗传的变异, 需进一步观察. 已有的研究表明: 细胞黏附力的改变与肿瘤的转移密切相关. 在黏附频率实验测定中, Caski 细胞搭载后与地面对照组相比, 没有明显变化; 而 L78 细胞在搭载后与地面对照组相比, 对人体内皮细胞的黏附明显减弱, 但传代后其黏附频率不仅恢复且超过对照组, 可能是由于太空环境导致 L78 细胞黏附力下降, 当环境因素消除后, 反而刺激了细胞内某些黏附因子的表达, 此结果为肿瘤转移机理的研究提供了新的研究线索. 近年来, 细胞因子在肿瘤治疗中的意义引起了人们的广泛关注, 特别是对 IL-2 的研究, 发现其在众多细胞因子中, 具有统筹作用, 在免疫调节中处于中心地位. IL-2 可刺激效应细胞的细胞毒活性, 还可通过诱导其他细胞因子如 TNF 而产生抗癌作用. TGF 是细胞因子中的负调控因子, 它可在 T 细胞的活化过程中抑制 IL-2 刺激作用^[8]. 在对内皮细胞的研究中发现 TNF 可刺激 IL-8 的释放, IL-8 的高表达可诱导内皮细胞黏附力增加, 而黏附力的增强通过“整合依赖”机理, 更进一步诱导 IL-8 的表达^{[9],[10]}. 本课题的实验结果也显示: L78 细胞 IL-2、IL-8 和 TNF 表达降低, 虽有 TGF 的负调控作用, 但通过上述机理, 最终导致其黏附力的下降; 而 Caski 细胞虽 IL-2、IL-8 和 TNF 表达增高, 但可能由于表达也同时增高的 TGF 的负调控作用, 使得 Caski 细胞的黏附力没有明显变化.

上述实验结果提示: 太空环境可影响肿瘤细胞的生理特性, 但肿瘤细胞在细胞因子表达及黏附力等方面的变化, 特别是对 IL-2 表达的影响, 是否会增强肿瘤细胞的免疫原性, 仍需做进一步的研究和探讨. 本项目利用太空特殊环境诱变肿瘤细胞, 希望使肿瘤细胞的免疫原性增强, 开拓肿瘤免疫治疗的新途径, 为太空生物学开辟更为广阔的研究领域.

致谢: 此课题得到以下各位老师的大力协助, 在此表示衷心感谢. 董晞, 孙瑞娟(中日友好临床医学研究所心血管生物工程研究室). 孔晶, 高福云, 刘国玲(中日友好临床医学研究所免疫学-组织工程研究室). 吴前进, 姜东, 蒋兴村(东方红宇航技术有限公司).

参 考 文 献

- [1] Ogai V B, Novoselova E G, Makar V R *et al.* Seasonal changes in tumor necrosis factor production in hibernating animals in normal conditions and under the effects of electromagnetic and ionizing radiation. *Radiats Biol. Radioecol*, 2002, **42**:141—146
- [2] Zhukov-Verezhnikov N N, Volkov M N, Maisky I N *et al.* Experiments with micro-organisms and human cell cultures in the Zond 5 and Zond 7 flights. *Life Sci. Space Res.*, 1971, **9**:99—103
- [3] Michurina T V, Domaratskaya E I, Nikonova T M *et al.* Blood and clonogenic hematopoietic cells of newts after the space flight. *Adv. Space Res.*, 1996, **17**:295—298
- [4] Davis T A, Wiesmann W, Kidwell W *et al.* Effect of space flight on human stem cell hematopoiesis: suppression of erythropoiesis and myelopoiesis. *J. Leukoc Biol.*, 1996, **60**:69—76
- [5] Seitzer U, Bodo M, Muller P K *et al.* Gravity effects on connective tissue biosynthesis by cultured mesenchymal cells. *Adv. Space Res.*, 1995, **16**:235—238
- [6] Plett P A, Frankovitz S M, Abonour R *et al.* Proliferation of human hematopoietic bone marrow cells in simulated microgravity. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 2001, **37**:73—78
- [7] Esposito R D, Durante M, Gialanella G *et al.* A model of radiation-induced myelopoiesis in space. *Phys. Med.*, 2001, **17** (Supp.):181—182

- [8] Cao Shilong. Oncology. Shanghai: Shanghai Science-Technology and Education Publishing Company. 1997. 12—20. in Chinese (曹世龙. 肿瘤学. 上海: 上海科技教育出版社, 1997.12—20)
- [9] Kazachkov M Y, Hu P C, Carson J L *et al.* Release of cytokines by human nasal epithelial cell and peripheral blood mononuclear cells infected with *Mycoplasma pneumoniae*. *Exp. Biol. Med.*, 2002, **227**(5):330—335
- [10] Arici A. Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2002, **955**:101—109

EFFECTS ON PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TUMOR CELL LINES BY SPACE ENVIRONMENT

XIANG Qing FANG Qing CHEN Zhihua LI Hongyan XU Bo XU Mei
ZHOU Donghui ZHAO Tiande TANG Jintian CHEN Weichang

(Department of Oncology and Molecular Biology, Institute of Clinical Medical Sciences,
China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029)

Abstract

To investigate the effects on physiological characteristics of tumor cell lines by space environment and inaugurate a new pathway of immune therapy in cancer, three tumor cell lines were carried in the returning module of spacecraft launched by Shenzhou-4 (SZ-4). Three cell lines were returned after 7 days' flying in space. All survival cells were monocloned and the cell cycle, morphology, adhesive force and expression of cytokines were studied. The cell cycle of mouse melanoma B16 cells was changed after the flight. Comparing with the control group on the ground, the cell number of G1 phase was increased markedly ($p < 0.05$). With that simultaneously, B16 cells showed multiple cell morphological changes. Adhesion to vascular endothelial cell was decreased in human lung carcinoma L78 cells, however, it was enhanced after passage for 2—3 times in L78 cells. The expression of cytokine IL-2, IL-8, TNF and TGF were improved in human cervical carcinoma Caski cells. In contrast, the expression of these cytokines was reduced in L78 cells. All these results revealed that physiological function of tumor cells were affected by the space environment. Whether the immunity was strengthened in tumor cell should be further studied.

Key words Space environment, Tumor cell