

细胞太空无源搭载装置中的微载体技术初步研究

房青¹, 徐波¹, 徐梅¹, 向青¹, 李红艳¹, 陈志华¹, 赵天德¹, 唐劲天²

1. 中日友好临床医学研究所生物化学-分子生物化学研究室, 北京 100029

2. 清华大学工程物理系医学物理与工程研究所, 北京 100084

[摘要] 探讨基于微载体技术的改良细胞单克隆化方法, 及直接研究微载体上细胞形态、细胞增殖、核酸提取的方法。利用快速染色法直接观察微载体上的细胞形态, 并用 MTT 法直接分析细胞增殖, 用 Trizol 试剂和吸附柱直接从微载体提取细胞核酸。对微载体上的细胞可直接进行染色, 观察正常细胞和凋亡细胞的形态。MTT 分析显示细胞数和 OD 值呈直线关系。从微载体上直接提取的 RNA 完整性好, 可用于 RT-PCR 分析, 提取的 DNA 含量较高。改良细胞单克隆化方法操作简便, 细胞活性好; 不消化细胞, 可以直接研究微载体上的细胞形态、细胞增殖, 提取核酸。

[关键词] 微载体; 空间; 细胞; 核酸

[中图分类号] R73.35, R49

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)01-0015-04

A Preliminary Study on Micro-carrier Technique in the Space Cell Culture System

FANG Qing¹, XU Bo¹, XU Mei¹, XIANG Qing¹, LI Hongyan¹, CHEN Zhihua¹, ZHAO Tiande¹, TANG Jintian²

1. China-Japan Friendship Institute of Clinical Medical Sciences, Beijing 100029, China

2. Institute of Medical Physics and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: In this paper, a refined cell monoclonization protocol is explored, together with methods of obtaining the cell shape and proliferation, and the method of isolation of nucleic acids from cells on micro-carriers. Without dissociating cells with trypsin from micro-carrier, morphological characteristics of normal and apoptotic cells are analyzed by staining and microscopic observation, while the cell proliferation is analyzed by MTT methods. The RNA and DNA are directly isolated with Trizol reagent and QIAamp DNA kit from cells adhered on micro-carriers. Cells can be morphologically observed and photographed when attached to micro-carrier. MTT analysis shows that a linear relation exists between cell amount and OD value. RNA isolated from cells on micro-carriers is intact and can be used for RT-PCR. DNA quantity of directly isolated group is larger than that of trypsin group. Cell monoclonization protocol modified by us is simpler and cheaper with acceptable viability. The shape and proliferation of cells attached on micro-carriers can be directly observed, and nucleic acids can be isolated.

Key Words: micro-carrier; space; cell; nucleic acids

CLC Numbers: R73.35, R49

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)01-0015-04

空间环境中特有的空间辐射、微磁场和微重力对地球生命有多方面的影响, 对其进行研究有助于理解重

大生命科学问题^[1]。目前, 空间细胞生物学的研究还处于起步阶段, 主要原因是细胞在空间环境中难以存活。我

们设计的细胞太空搭载装置^[2]已成功地将小鼠黑色素瘤细胞 B16、基因工程细胞 CHO-dhfr、骨髓间充质干细

收稿日期: 2006-11-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371324), 科学技术部 973 计划前期项目[2003(CA04200)]

作者简介: 房青, 女, 北京和平里樱花东路中日友好临床医学研究所生物化学-分子生物化学研究室, 助理研究员, 主要研究方向为细胞和分子生物学; E-mail: qingfang71@yahoo.com

唐劲天(通讯作者), 男, 清华大学工程物理系医学物理与工程研究所, 研究员, 主要研究方向为肿瘤治疗;

E-mail: tangjt@mail.tsinghua.edu.cn

胞等 10 种细胞无源搭载第 18、20、22 颗返回式卫星, 细胞在其中可生存 30 d 以上。

经空间环境作用后的细胞, 其生物特性发生多方向的变化^[3-4], 故需细胞单克隆化、扩增冻存后, 逐株筛选研究, 工作量巨大。本文探讨了基于微载体技术的改良细胞单克隆化方法, 以及不消化细胞直接研究微载体上细胞形态、细胞增殖、细胞凋亡和提取 DNA、RNA 的方法, 为动物细胞的空间无源搭载和后续研究提供方法学支持。

1 材料和方法

1.1 实验材料

微载体 Cytopore™2 购自 Amer-sham Biosciences 公司; 胎牛血清和 DMEM 培养基购自 Gibco 公司; Tri-zol 试剂为 Invitrogen 公司产品; Qi-Aamp DNA Mini Kit 购自 QIAGEN 公司; AMV 逆转录酶和 Taq 酶购自 Promega 公司; 人肝癌细胞系 BEL-7402 为本室保存。

1.2 改良细胞单克隆化及细胞复苏、细胞扩增

1.2.1 细胞单克隆化和扩增

将培养于微载体上的 BEL-7402 细胞 0.25% 胰酶消化, 按每孔 1 个细胞的浓度接种于 96 孔板; 细胞形成较大单克隆后, 消化, 转种于 24 孔板中的 0.4 ml 微载体上。

1.2.2 细胞冻存

细胞在微载体上约 60%~80% 融合后, 分 2 份吸入细胞冻存管中, 待微载体沉降后, 吸去旧培养液, 加入细胞冻存液, 大量棉花包裹, 置于 -70 数日, 转入液氮中长期保存。

1.2.3 细胞复苏

从液氮中取出细胞冻存管, 立即投入 37 温水中, 融解后静置片刻微载体沉降, 吸去上清, 将微载体转入 6 孔板中, 加入新鲜培养液置于 37, 5% CO₂ 培养, 2 d 后染色观察细胞状态。

1.2.4 细胞扩增

吸去旧培养液, 加入含微载体的

新鲜培养基, 37, 5% CO₂ 培养。

1.2.5 细胞形态

取 2 份微载体, 分为正常培养组和细胞凋亡组, 用 3 μmol/l 阿霉素作用 24 h 诱导细胞凋亡。吸取 1 滴微载体, 滴于载玻片上, 加 1 滴快速染液, 混匀染色 30 s, 显微镜下观察、摄影。

1.3 MTT 法测定细胞增殖

吸取 200 μl 微载体加入微量离心管中, 倍比稀释。每个浓度设 3 个平行管。每管中加入 20 μl MTT 液, 终浓度为 0.5 mg/ml, 培养 4 h。吸去上清, 加 150 μl DMSO, 剧烈振荡 15 s; 将上清吸至酶标板中, 测量 492 nm 的 OD 值。

1.4 提取细胞总 RNA 和 RT-PCR 分析

取出 0.1~0.2 ml 微载体, 吸净上清。加入 1 ml Trizol, 剧烈振荡 15 s, 室温放置 5 min。加入 0.2 ml 氯仿分相; 上层水相中加入 600 μl 异丙醇沉淀 RNA, 80% 乙醇洗沉淀, 50 μl DEPC 水溶解 RNA。取 15 μl 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。EB 染色, 紫外光下观察, 拍照。RT-PCR 按试剂说明书操作扩增看家基因 β-actin, 引物序列见文献[5]。

1.5 细胞 DNA 的提取

分别取出 0.1~0.2 ml 微载体, 放入 2 个离心管中。一组为直接提取组, 吸净上清, 加入 20~40 μl QIA-

GEN 蛋白酶, 混匀, 加入 200 μl 裂解液, 56 水浴 10 min; 一组为消化组, 将细胞从微载体上消化下来, 离心收集细胞后, 吸净上清, 同上加入蛋白酶和裂解液, 56 水浴。各组加入 200 μl 无水乙醇, 剧烈振荡, 上清吸入离心柱中, 吸附的 DNA 洗 2 次后, 用 200 μl TE (pH8.0) 重溶。分光光度法测定 DNA 浓度, 各取 15 μl 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

2 结果

2.1 改良细胞单克隆化及细胞复苏

冻存的细胞复苏后染色, 可见微载体上有细胞贴附生长。细胞核大, 核仁清楚, 胞膜完整, 部分细胞处于分裂相, 细胞存活, 状态良好 (见图 1)。

2.2 快速染色法观察正常细胞状态和细胞凋亡

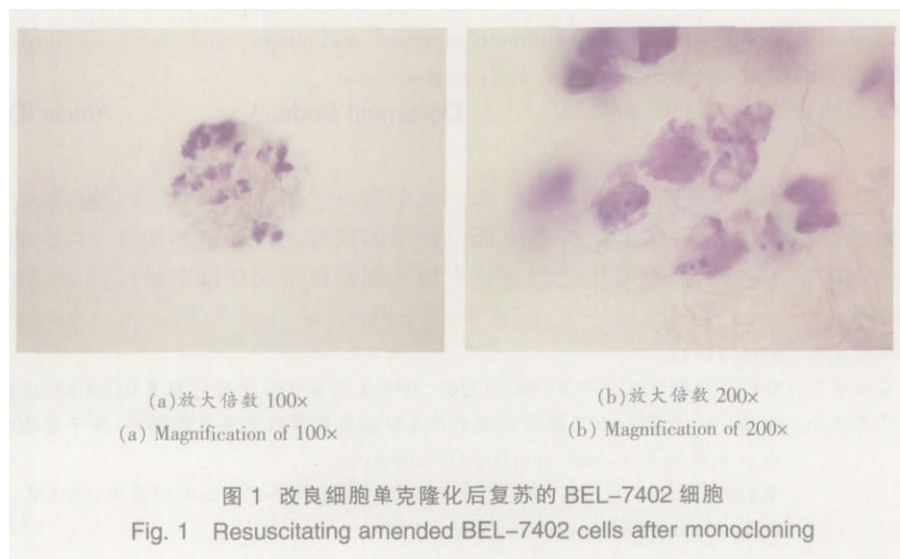
快速染色法将微载体上的细胞核染成蓝色, 核仁清晰, 胞膜明显。诱导凋亡组可见染色质边集、核碎裂、凋亡小体形成等细胞凋亡形态, 而微载体本身不着色 (见图 2)。

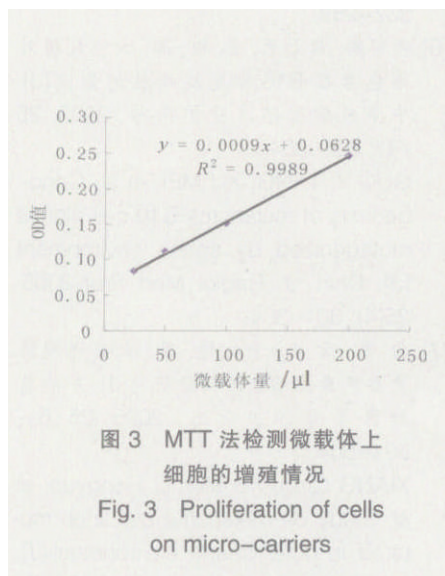
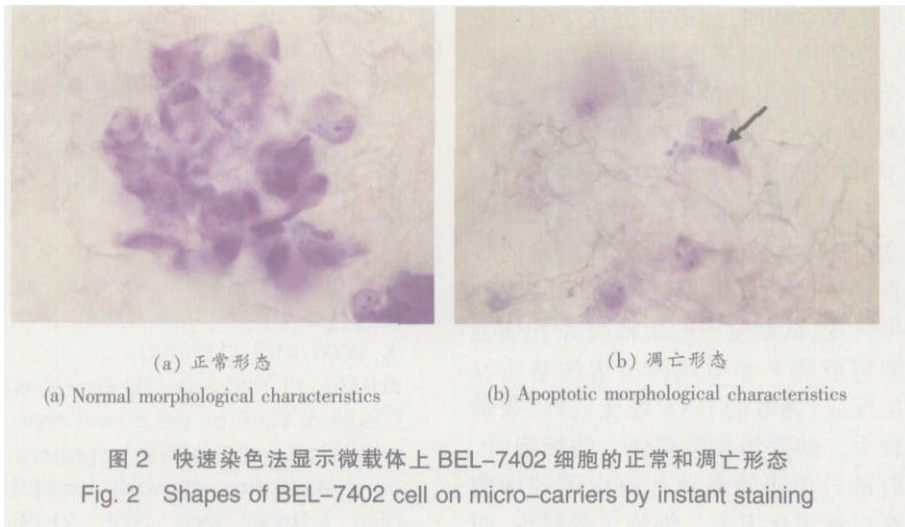
2.3 MTT 法测定细胞增殖

改良 MTT 法直接检测微载体上细胞增殖, 将 492 nm 的 OD 值对稀释倍数作图, 可见二者成直线关系, R² 值为 0.998 9 (见图 3)。

2.4 提取的细胞总 RNA

贴附于微载体上的细胞不经消





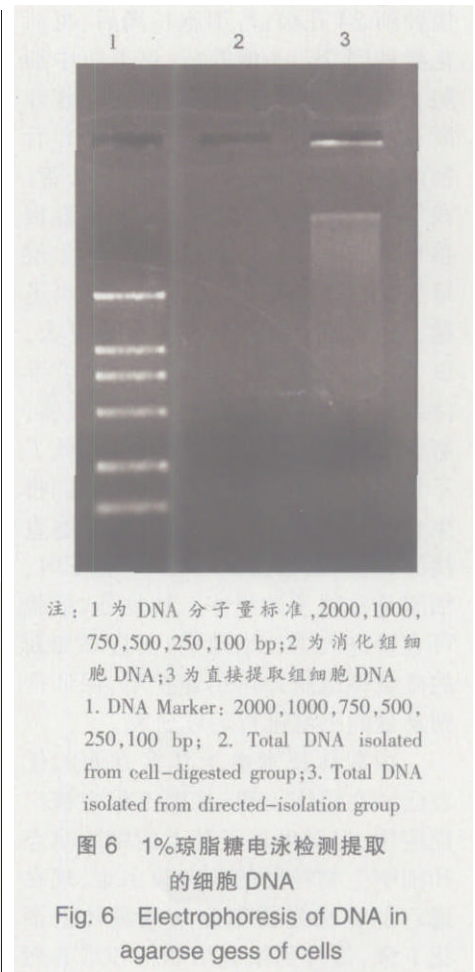
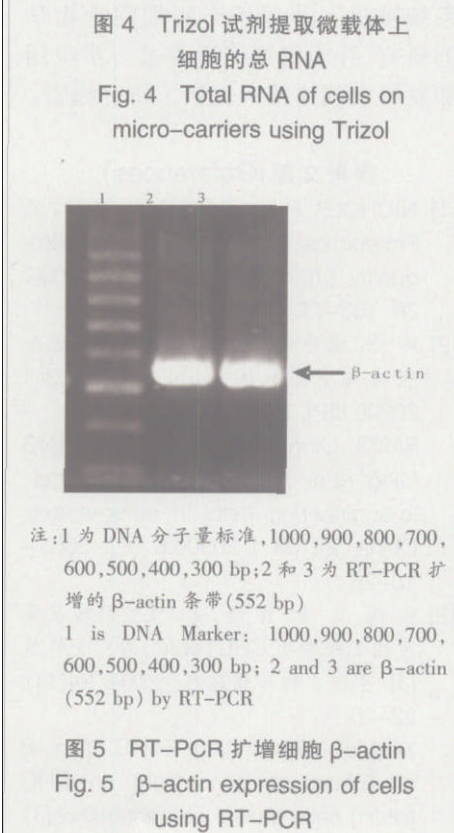
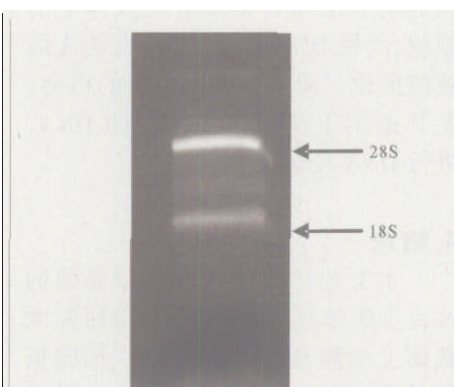
化, 直接加入 Trizol 试剂, 按常规提取细胞总 RNA, 检测 OD260/OD280 为 1.9, 电泳结果显示 RNA 条带清楚, 28S 和 18S RNA 约为 2:1, RNA 完整性较好(见图 4)。RT-PCR 结果可见, β -actin 条带清楚, 无杂带(见图 5)。

2.5 细胞 DNA

直接提取组和消化组从等量微载体上分别提取到 3280.7 ng 和 307.5 ng DNA, 前者是后者的 10.7 倍。电泳结果显示, 直接提取组 DNA 完整性较好, 消化组 DNA 则不可见(见图 6)。

3 讨论

在我国现阶段, 研究空间环境对



动物细胞的影响主要利用返回式卫星, 但其要求无电源、无热源、无供氧、 CO_2 、细胞不更换培养液存活约 30 d, 细胞存活成为空间细胞生物学研究的首要障碍。本课题组研制的细胞太空搭载装置已成功无源搭载小鼠黑色素瘤细胞 B16、人肺鳞癌细胞 L78、人宫颈癌细胞 Caski、基因工程细胞 CHO-dhfr、人牙髓基质细胞、人牙周基质细胞、兔及人骨髓间充质干细胞、人 T 淋巴细胞 Jurkat、人主动脉内皮细胞等 10 种细胞; 并已对部分细胞进行了细胞增殖、细胞凋亡、细胞黏附力、细胞因子分泌、致癌性、基因和蛋白表达等生物特性研究^[35-7], 发现经空间环境作用后的细胞发生多个方向的变化, 故而需将回收的细胞先进行单克隆化, 然后进行研究。

常规的细胞单克隆化程序需先将细胞以 0.5 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板, 形成单克隆后, 消化下来

接种到 24 孔板;待细胞长满后,再消化接种到 25 ml 培养瓶;培养瓶中细胞长满后再消化接种 100 ml 培养瓶;细胞长满后再消化下来,离心后换细胞冻存液,在液氮中冻存 2 管。我们的改良方法将细胞单克隆直接接种于微载体上,相对于常规的单层培养,微载体的特性为细胞贴壁更迅速,营养交换更充分、相对面积更大,仅需换液和添加新的微载体即可维持细胞的连续生长,细胞增殖旺盛,避免了频繁的消化传代,大大减低了工作量和污染的机会^[9]。另外,我们将生长于微载体上的未经消化细胞直接冻存,对细胞的损害较小;复苏时,细胞是贴附于微载体上被复苏,细胞可直接进入生长增殖期;而且添加新的微载体细胞即可迅速扩增,保证得到足量的细胞进行后续研究。

微载体技术由于其多方面的优点已经在组织工程、基因工程中被广泛应用,但对生长于其上的细胞状态和细胞生物特性的研究较困难,现在通行的方法是将细胞从微载体上消化下来,接种到细胞培养板和培养瓶中再进行研究。此方法的弊端是操作繁杂,不能反映细胞当时的状态,部分发生变化的细胞,如凋亡细胞和分裂的细胞容易丢失。

现在检测微载体上细胞生长状态的方法主要是间接地检测培养液中的葡萄糖和乳酸含量^[9],本课题采用的快速染色法可以实时、直接地观察微载体上的细胞形态,且染色迅速、背景干净,无需固定洗涤等程序,避免了凋亡细胞等的丢失。

本课题的改良 MTT 法是将微载体在微量离心管中培养,无需专门的试剂,相对耗资较少。以测得的 OD 值对微载体的稀释倍数作图,二者为直线关系, $R^2=0.9989$,说明可用 OD 值表示微载体上细胞增殖状态。

从微载体上直接提取 RNA,将 Trizol 加入微载体悬液中直接溶解细胞,不仅简化了操作步骤,而且避免了细胞消化时对细胞的损害,减少了 RNA 降解的概率。另外,在离心后吸

取上层水相时,微载体混在中间层蛋白杂质中,使蛋白层不易被牵动,含 RNA 的水相的吸取更为容易。经测定, RNA 较纯,完整性较好,可用于 RT-PCR 分析细胞中的基因表达。

现在提取细胞 DNA 有多种试剂盒可用。本实验测定此类试剂盒能否直接从微载体上提取 DNA。实验结果发现,试剂盒中的蛋白酶 K 和细胞裂解液都不和微载体的惰性基质发生反应,提取的 DNA 纯度较好,数量较大。胰酶消化微载体上的细胞时,有部分位于微载体孔道内部的细胞难以被消化下来,细胞总数减少,而我们的方法是直接裂解微载体上的细胞,所得 DNA 数量较多。此法无需胰酶消化,减少了细胞丢失的机会,尤其适用于提取凋亡细胞的 DNA,进行 DNA Ladder 实验。

4 结论

本文初步探讨了操作较简便的改良细胞单克隆程序,及直接研究微载体上细胞形态、细胞增殖、细胞核酸提取的方法,有利于细胞太空搭载系统被进一步用于空间细胞生物学的研究,并为组织工程等进一步应用和发展微载体技术提供了研究线索。

参考文献(References)

- [1] NICHOLS H L, ZHANG N, WEN X. Proteomics and genomics of microgravity [J]. *Physiol Genomics*. 2006, 26: 163- 71.
- [2] 房青,唐劲天,向青,等.基因工程细胞的太空搭载装置:中国,ZL 03 1 20906.8[P]. 2005- 10- 26
FANG Qing, TANG Jintian, XIANG Qing, et al. The equipment for genetic engineering cells in outer space: China, ZL 03 1 20906.8 [P]. 2005- 10- 26.
- [3] 徐梅,向青,房青,等.太空环境改变生物工程细胞 CHO(dhfr⁻)的生长特性[J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(11): 22- 25.
XU Mei, XIANG Qing, FANG Qing, et al. Effects of spaceflight on CHO (dhfr⁻) cells growth characteristics[J]. *China Biotech*, 2004, 24(11): 22- 25.
- [4] KANO M, KITANO T, IKEMOTO M, et al. Isolation and characterization of a novel gene sfig in rat skeletal muscle up-regulated by spaceflight (STS-90) [J]. *J Med Invest*, 2003, 50(1- 2): 39- 47.
- [5] 徐梅,李红艳,徐波,等.鬼臼乙叉甙对肺癌 A549 细胞生长特性及 Fas/FasL 表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2006, 21(3): 237- 239.
XU Mei, LI Hongyan, XU Bo, et al. Effects of Vp16 on the growth characteristics and Fas/FasL expression on human carcinoma A549 cells [J]. *Chin J Rehab Med*, 2006, 21 (3): 237- 239.
- [6] 郭宇鹏,唐劲天,徐梅,等.太空环境对黑色素瘤 B16 细胞成瘤性的影响[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2005, 25 (4): 301- 304.
GUO Y, TANG, XU MEI, et al. Oncogenesis of melanoma B16 cell clones mutagenized by space environment [J]. *Chin J Radiol Med Prot*, 2005, 25(4): 301- 304.
- [7] 向青,徐梅,李红艳,等.太空环境诱导黑色素瘤细胞的实验研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2005, 25 (6): 501- 504.
XIANG Qing, XU Mei, LI Hongyan, et al. Study on melanoma cell lines mutated in outer space environment [J]. *Chin J Radi Med Prot*, 2005, 25 (6): 501- 504.
- [8] MALDA J, FRONDOZA CG. Microcarriers in the engineering of cartilage and bone[J]. *Trends Biotech*, 2006, 24(7): 299- 304.
- [9] MELERO- MARTIN J M, DOWLING M A, SMITH M, et al. Expansion of chondroprogenitor cells on macroporous microcarriers as an alternative to conventional monolayer systems [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(15):2970- 2979.
- [10] GENZEL Y, FISCHER M, REICHL U. Serum-free influenza virus production avoiding washing steps and medium exchange in large-scale microcarrier culture[J]. *Vaccine*, 2006, 24(16): 3261- 3272.

(责任编辑 王士泉)