

空间诱变致成瘤性减弱的 B16 细胞株形态学观察

郭宇鹏¹, 向青², 徐梅², 耿传营², 房青², 徐波², 李红艳², 陈志华², 杨鸿生¹, 唐劲天³

1. 清华大学玉泉医院, 北京 100049

2. 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

3. 清华大学工程物理系医学物理与工程研究所, 北京 100084

[摘要] 观察动物接种实验致瘤性显著减弱的空间诱变小鼠黑色素瘤 B16 细胞株的细胞形态、细胞骨架和表面结构与对照细胞株的差异。分别使用激光共聚焦显微镜观察筛选所得阳性细胞株与对照细胞株, 以及用荧光素标记的鬼笔环肽染色, 观察细胞骨架的异同。应用原子力显微镜(AFM)对筛选所得阳性细胞株和对照细胞株分别成像, 观察空间诱变细胞株与对照组细胞株所得图像的差异。激光共聚焦显微镜观察结果显示, 从空间诱变细胞株中筛选出的 8[#] 细胞株的细胞骨架荧光较对照组增强, 细胞骨架纤维比对照组粗大。AFM 图像显示, 8[#] 细胞株分泌的纤维粘连蛋白的纤维形态和分布与对照组细胞有较大差异, 其纤维较为扁平、走行弯曲或呈轻度迂曲状; 对照组细胞纤维呈山脊状、放射状, 源自细胞伪足部细胞膜。在 8[#] 细胞株图像中有少量“孔洞”样结构, 而在对照组细胞中未观察到类似结构。

[关键词] 肿瘤学; 空间环境; B16 细胞; 诱变

[中图分类号] R85

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)01-0019-05

Morphological Study on the Low Oncogenesis B16 Cell Clone Mutagenized by Space Environment

GUO Yupeng¹, XIANG Qing², XU Mei², GENG Chuanying², FANG Qing², XU Bo², LI Hongyan², CHEN Zhihua², YANG Hongsheng¹, TANG Jintian³

1. Yuquan Hospital, Tsinghua University, Beijing 100049, China

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

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

Abstract: The morphological characters of the low oncogenesis melanoma B16 cell clone mutagenized by space environment are studied. The mutated cell clones and control B16 cells were detected with immunofluorescence cytochemistry and confocal lasers scanning microscopy. The mutated cell clones and the control cell clones were imaged by AFM, and the differences between their images were observed. The fluorescent intensity of microfilaments increases in 8[#] cells. The fiber of cytoskeleton in 8[#] cells is enlarged. The AFM images show that the shape of the fibronectin secreted by 8[#] cell clone is different from that of the control clone, the fiber is flatter than that of the control clone, it is bent and circuitry; while the fiber of the control clone is like mountain ridge radiated from the cell pseudopodia. There is a few “well” or “hole” like structures on the surface of the 8[#] cell clone, but there is no such structures observed in the control clone. The surface structure and the distribution of cell cycle are different from those of the control clone. Whether the space environment could increase the immunogenicity of the tumor cells remains to be studied. The findings suggest that there are mutagenesis factors which could mutate the culture tumor cells in the outer space.

Key Words: oncology; extraterrestrial environment; B16 cell; mutagenesis

CLC Number: R85

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)01-0019-05

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: 郭宇鹏, 男, 北京西长安街清华大学玉泉医院, 住院医师, 主要研究方向为神经外科;

E-mail: guoyupeng@yahoo.com.cn

唐劲天(通讯作者), 男, 北京海淀区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

0 引言

空间细胞生物学研究是人类认识太空和征服太空的必由之路。空间技术的进步,为研究空间环境对细胞结构和功能的影响等问题提供了可能的技术平台。距地球表面 100 km 以上的外层空间,是与地面完全不同的特殊环境,存在着宇宙射线辐射、高能重离子辐射和长期微重力等诱变因素。搭载于空间飞行器中的微生物、植物种子、植物体、体外培养的细胞和动物,均会产生各种各样的变化^[1-2]。我国的生物科学家已经进行了一些植物种子、菌种和体外培养细胞的空间搭载诱变实验,至今已有 70 多种生物和种子被搭载,获得了一些世界首创和领先的结果。其中,水稻种子的搭载实验返地后,经过种植选育,从中筛选出了性状稳定的优良品系,并且从分子生物学水平证明了不同的水稻突变体与原种 DNA 之间存在不同程度的多态性差异^[3-4]。

在上述研究基础上,本课题组进行了无源搭载肿瘤细胞诱导变异实验。这是国内首次较大规模地、系统地进行活体细胞的空间诱变研究。从 2002 年底发射的“神舟”4 号开始搭载,至今已经进行了 3 次空间搭载,获得了大量的空间诱变单克隆小鼠黑色素瘤细胞(B16)细胞株^[5],并首次对空间诱变肿瘤细胞株进行了初步筛选,找到了 1 株致瘤性减弱、免疫原性可能提高的细胞株(8[#]细胞株)^[6]。我们首先使用了一些形态学实验技术对筛选得到的可疑阳性细胞株进行检测,观察其各种指标变化,希望能够找到肿瘤免疫原性改变的强化特征,为今后强化肿瘤细胞免疫原性及制备新型肿瘤疫苗打下基础。

1 材料和方法

1.1 光学显微镜观察

对 8[#]细胞株和对照细胞株进行常规培养,在对数生长期分别用相差显微镜和照相系统(Olympus IX51)进行观察并拍照。

1.2 激光共聚焦显微镜观察细胞骨架

8[#]细胞株和对照细胞株分别接种于放有洁净盖玻片的 6 孔板中(每孔细胞数为 1×10^5),培养 2 d; PBS 洗 2 遍,4%多聚甲醛室温固定 20 min; PBS 洗 2 遍,用 0.5% Triton X100 的 PHEM 缓冲液(60 mmol/l PIPES, 25 mmol/l HEPES, 10 mmol/l EGTA, 2 mmol/l $MgCl_2$)室温下渗透 15 min; PBS 洗 2 遍,0.5%BSA 覆盖 10 min; 部分细胞加 1/100 稀释(PBS 稀释)的四甲基异硫氰酸罗丹明标记的鬼笔环肽 TRITC-鬼笔环肽异(TrITC-Phalloidin, Sigma 公司),室温避光作用 1 h; PBS 洗 2 遍,加入 1 加 1/100 稀释(PBS 稀释)的 Hoechst 33258,室温作用 15 min; PBS 洗 1 遍,50%磷酸甘油缓冲液封片;使用 Leica LCS SP2 Laser Scanning Confocal Microscope LCS 软件采集和处理图像。

1.3 AFM 观察细胞表面结构

将 8[#]细胞株和对照细胞株分别传代于放有清洁盖玻片的 24 孔板中(每孔细胞数为 5×10^4),在含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养 1 d;再将培养基弃去,以生理盐水洗盖玻片 3 次,每次 5 min;0.5%戊二醛室温固定 30 min,超纯水清洗 3 遍,每遍 5 min;玻片风干后,将有新制备样品的盖玻片固定在 AFM (Autoprobe CP Research, Thermomicroscopes 公司)的 XY 扫描台上,用监视器定位所要

扫描的样品区域,在空气中应用 AFM 对样品进行扫描成像。实验采用 100 μm 扫描器,轻敲模式(tapping mode),UL20B 硅探针,力常数为 2.8 N/m;用仪器配置的软件(Thermomicroscopes proscan image processing software, Version 2.1)进行图像数据的采集和处理。对所有图像只进行平滑处理,并观察各株细胞所得图像的差异。

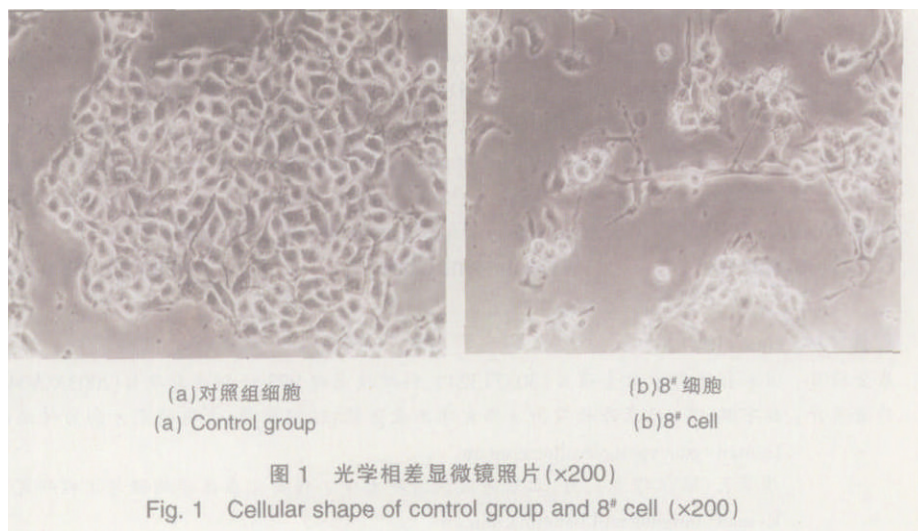
2 结果

2.1 光学相差显微镜对空间诱变 B16 细胞的观察

对照组 B16 细胞,有规律地均匀分布于视野,细胞大小类似、呈椭圆形或短梭型,细胞外周清晰、立体感强而发亮。由空间诱变后的 8[#] B16 细胞可见,细胞呈长梭型改变,细胞伪足增多变长,分支增多,细胞的周边较模糊,成团紧密聚集,大小不够规则,如图 1 所示。

2.2 激光共聚焦显微镜对细胞骨架的观察

图 2 给出了细胞的激光共聚焦显微镜图像。可以看出,TRITC-鬼笔环肽能与细胞内的 F-肌动蛋白(F-actin)特异性的结合显示橙红色荧光。Hoechst 33258 是与 DNA 特异结合的活性染料,紫外光激发时将发射明亮的蓝色荧光,可以显示胞核的位置和形态。由图 2 还可以看到 8[#]细胞内微丝的变化。对照组细胞的 F-



actin 荧光强度较弱, 在细胞核周集中分布的现象消失, 并且散在分布于细胞浆内, 荧光较为模糊; 与对照细胞相比, $8^{\#}$ 细胞内的 F-actin 结构清晰, 荧光强度强于对照组, 在胞浆内纤维较粗大, 主要分布在细胞膜附近和细胞质中, 较集中地分布于细胞核周围, 呈现沿细胞长轴直线走行的现象。

2.3 应用 AFM 对 B16 细胞成像实验结果

初步确定了适合空间诱变 B16 细胞 AFM 成像的实验方法和条件, 得到了清晰的 B16 细胞的 AFM 图像, 观察到了一些空间诱变肿瘤细胞与对照细胞表面结构的不同, 见图 3。AFM 图像显示, $8^{\#}$ 细胞株分泌的纤维粘连蛋白的纤维形态和分布与对照组细胞有较大差异: 两者纤维直径基本相同, 但对照组细胞纤维呈山脊状、放射状, 源自细胞伪足部细胞膜 (见图 3(a)), 而 $8^{\#}$ 细胞纤维较为扁平、走行弯曲或呈轻度迂曲状 (见图 3(c)); 从 $8^{\#}$ 细胞体上观察到少量深度达孔洞周边总厚度 $1/3$ 至 $1/2$ 、直径约 $2 \mu\text{m}$ 的“孔洞”样细胞膜凹陷 (见图 3(d)), 而在对照组细胞中未观察到类似结构 (见图 3(b))。

3 讨论与结论

在距离地球表面 100 km 以上的外层空间, 由于没有稠密的大气层的保护, 存在复杂的宇宙辐射。这些宇宙辐射主要来自于银河宇宙线 (Galactic Cosmic Rays, GCRs) 和太阳粒子事件。在高度 1 000 km 以下的近地空间, 宇宙辐射虽然受到地磁场的屏蔽作用, 强度较星际空间大为减小, 但高能 GCRs 不能被地磁场有效屏蔽。GCRs 是一些从遥远的超新星爆炸中产生的粒子, 它们被加速到接近光速, 一般质量厚度的被动屏蔽起不到明显的衰减作用。在这些粒子中, 对产生辐射生物学效应最有意义的是失去外层电子的离子化的高能重原子核, 其能量远高于地面人工加

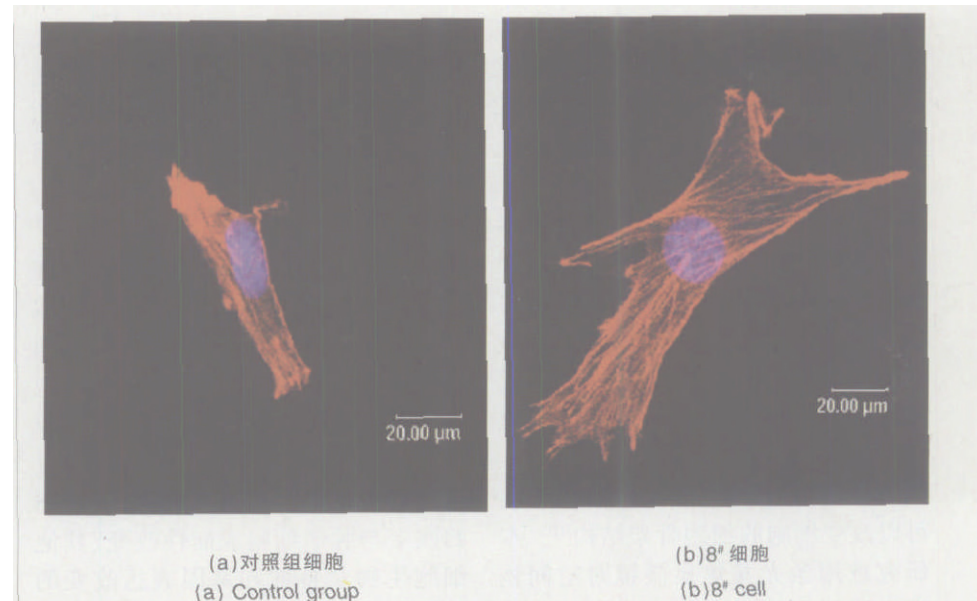


图 2 激光共聚焦显微镜图像

Fig. 2 Confocal images of control group and $8^{\#}$ cell

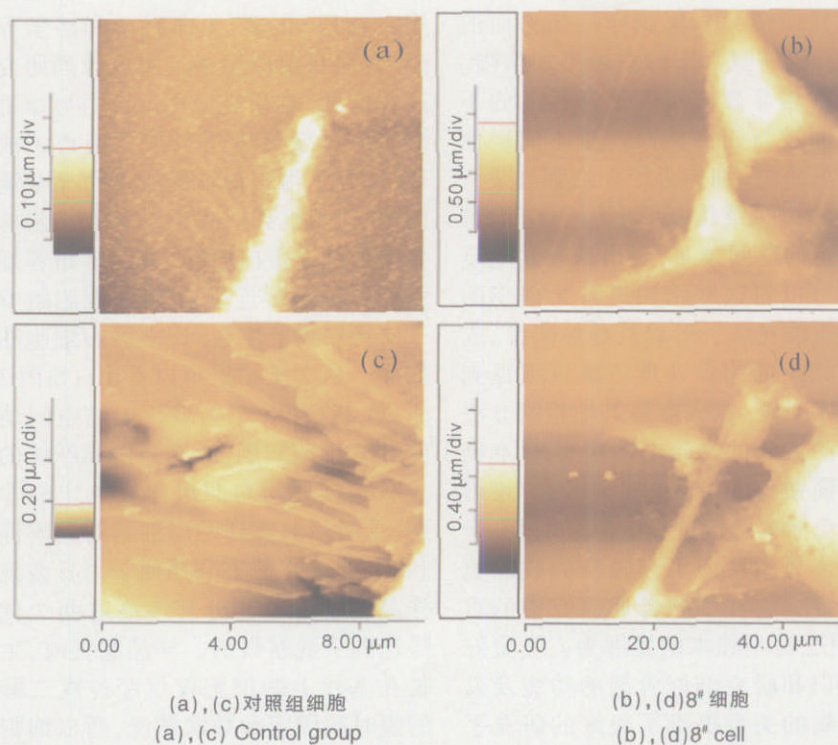


图 3 原子力显微镜图像

Fig. 3 AFM images of control group and $8^{\#}$ cell

速器所产生的最高能量的重离子束, 甚至比太阳粒子事件的主要成份高速质子的能量高得多。曾有实验测定, 近地轨道飞行的返回式卫星舱内总辐射剂量率为 0.11 mGy/d , 最大辐

射剂量率为 0.23 mGy/d , 重核离子密度为 $12 \sim 15 \text{ 径迹}/\text{cm}^2 \cdot \text{d}^{[7-9]}$ 。航天器舱内除有初级粒子 (质子、电子、 α 粒子、重离子) 外, 还有高能粒子穿过舱壁材料发生核反应产生的次级粒

子辐射,从而构成更为复杂的混合辐射场,其复杂程度目前在地面实验室内尚无法模拟。有些次级粒子,如低能的反冲核,其传能线密度(Linear Energy Transfer, LET)比初级粒子还要大。另外,次级电子也可能导致细胞内的生物效应,引起DNA损伤和突变^[9]。近地轨道飞行的返回式卫星舱内确实存在可能使培养肿瘤细胞发生变异的辐射。还有研究表明,低温可以增加细胞对辐射的敏感性^[10-11]。

已有研究证实,空间微重力环境可以改变细胞的细胞骨架结构^[12]。本研究选用激光共焦显微镜对空间诱变细胞株的细胞骨架进行了初步观察。激光共焦显微镜较传统显微镜的分辨率高1.4倍,对于观察细胞骨架等微细结构比传统荧光显微镜优越。共焦显微镜只采集到样品焦平面的图像,使细胞骨架的图像更加清晰。激光共焦显微镜实现了对样品的不同层面进行扫描从而产生不同层面的共焦图像。细胞骨架和细胞骨架所形成的一些结构,例如纺锤体,都具有一定的空间分布,利用激光共焦显微镜可以对这些结构进行无损伤的连续三维光切,形成其叠加图像,或经过共焦的图像处理三维重组得到其立体图像。这一点是其他检测方法所无法做到的。与电镜相比,标本制备要简便得多,既省时又省力,还可以避免标本制备过程中的假阳性。激光共焦显微镜因为其独特的成像原理决定了它在细胞骨架研究中的重要地位,这项技术的发展为人类更好地认识和研究细胞骨架的功能及其与疾病的关系提供了很好的研究手段。鬼笔环肽是从一种菌类 *Amanita Phalloides* 中提取出来的环肽。它与 F-actin 竞争性的结合,使荧光标记的鬼笔环肽在纳克 (ng) 水平就可以与 F-actin 选择性地结合并且易溶于水,为检测组织切片、培养细胞和无细胞体系中的 actin 的定位和定量提供了非常方便的标记方法。在肌细胞和其他细胞中,鬼笔环肽与 actin 亚

单位 1:1 结合,而不与 G-actin 结合。鬼笔环肽比 actin 的抗体标记更具优越性。首先,在不同种类生物中它的结合性质不会发生改变;其次,鬼笔环肽标记的非特异性信号可以忽略,因而图像的反差较好。本研究得到了比较清晰的空间诱变 B16 细胞了细胞骨架荧光切面图像,观察到的细胞骨架的大致结构及细胞骨架与细胞核的位置关系。空间诱变细胞的细胞骨架荧光较对照组细胞强,且纤维较粗大,其细胞骨架的立体形态改变有待进一步的实验观察。细胞骨架形态的改变与肿瘤细胞成瘤性改变、其他细胞生物学特性和基因表达改变的关系有待深入研究、揭示。

原子力显微术是 20 世纪 80 年代发展起来的新技术,具有样品制备简单和分辨率高等优点,被广泛地应用于物理、化学、生命科学和医学等领域,但目前应用于细胞成像的研究还较少见。本研究应用原子力显微镜对空间诱变 B16 进行成像获得了成功,得到了细胞清晰的原子力显微镜图像,并观察到空间诱变 B16 细胞株分泌的纤连蛋白原纤维。许多培养细胞能够分泌纤连蛋白^[13],使细胞附着于支持底物上生长,许多肿瘤细胞亦如此。从实验结果可以看出(如图 3 所示),在生长于盖玻片上的空间诱变 B16 细胞周围,纤连蛋白原纤维的分布和排列与对照组存在一定的差别,这必然影响到肿瘤细胞的黏附性和转移性。本研究利用原子力显微镜样品制备简单和分辨率高这两个优势达到了观察目的。样品制备时,生长在基片上的细胞仅仅经过戊二醛的短时间固定和数次漂洗,所以细胞分泌的纤连蛋白原纤维仍能较完整地保留在原来的位置。由于 AFM 的分辨率较高,才能清楚地观察到这种蛋白原纤维的精细结构及其分布和排列。而传统的普通光学显微镜或共聚焦显微镜只能看到细胞的形态,无法观察到细小的纤连蛋白原纤维;经过荧光标记后,荧光显微镜和共聚焦显微镜等虽然能够看到原纤维,但却

不够精细,不易分辨出这些原纤维的排列状况;电子显微镜虽具有非常高的分辨率,但由于其样品制备的复杂,很难保持纤连蛋白原纤维的原始位置,或者原纤维在取材、固定、脱水等过程中部分或全部丢失。原子力显微镜的这些优势,使得其在研究细胞和细胞外基质间的相互作用,以及细胞外基质的功能等方面的应用成为可能。而且,本研究还发现,在空间诱变 B16 细胞表面的“孔洞”样结构,空间诱变 B16 细胞表面结构变化的原因和对细胞生命活动的影响还有待进一步研究。

本研究对初步筛选的 1 株发生明显变异的空间诱变细胞株进行了一系列形态学观察。研究结果提示,近地空间可能存在使体外培养状态下的肿瘤细胞产生变异的环境因素。我们检测到了致瘤性减弱细胞株与对照细胞株在细胞形态、细胞骨架和细胞表面结构等方面的诸多差异,提示空间环境可能影响 B16 细胞的细胞骨架形态及纤连蛋白分泌和表面结构,也可能使 B16 细胞产生可遗传性变异。

可疑免疫原性增强的变异细胞株或许能为肿瘤新抗原的发现、肿瘤的过继免疫治疗和肿瘤疫苗的研制提供实验材料和研究线索。

参考文献(References)

- [1] ERMOLLENKO Z M, MARTOVETSKA-IA V A, CHUGUNOV V A, et al. Effect of space flight conditions on properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria[J]. Prikl Biokhim Mikrobiol, 2000, 36: 647-651.
- [2] ROUX S J, CHATTERJEE A, HILLIER S, et al. Early development of fern gametophytes in microgravity[J]. Adv Space Res, 2003, 31: 215-220.
- [3] 李源祥, 李金国, 刘汉东, 等. 水稻空间技术育种的研究[J]. 遗传, 2002, 24: 434-438.
- LI Yuanxiang, LI Jinguo, LIU Handedong, et al. Rice breeding by space technology[J]. Hereditas, 2002, 24:

434- 438.

- [4] 易继财, 庄楚雄, 姚涓, 等. 空间搭载诱导水稻种子突变的分子标记多态性分析[J]. 生物物理学报, 2002, 18: 478-483.

YI Jicai, ZHUANG Chuxiong, YAO Juan, et al. DNA polymorphic analysis of rice mutation induced by space flight with molecular markers [J]. Acta Biophys Sinica, 2002, 18: 478- 483.

- [5] 唐劲天, 向青, 徐梅, 等. 空间诱变肿瘤细胞的初步研究 [J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10: 641- 643.

TANG Jintian, XIANG Qing, XU Mei, et al. Primary investigation of space mutated tumor cells[J]. Chin J Rehab Theo Prac, 2004, 10: 641- 643.

- [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 Yupeng, TANG Jintian, XU Mei, et al. Oncogenesis of melanoma B16

cell clones mutagenized by space environment [J]. Chin J Rad Med Prot, 2005, 25(4): 301- 304.

- [7] 祁章年, 陈湄, 李向高. 近地轨道卫星舱内辐射测量 [J]. 航天医学与医学工程, 1994, (7): 105- 108.

QI Zhangnian, CHEN Mei, LI Xianggao. Radiation measurement in the cabin on board low earth orbit satellite [J]. Space Med Med Eng, 1994, 7: 105- 108.

- [8] 李向高, 陈湄, 祁章年, 等. 卫星舱内电离辐射强度的动态变化[J]. 航天医学与医学工程, 1996, (9): 25- 27.

LI Xianggao, CHEN Mei, QI Zhangnian, et al. Dynamic variation of ionizing radiation intensity inside the satellite module[J]. Space Med Med Eng, 1996, (9): 25- 27.

- [9] 吴国兴. 长期载人航天的医学和医学工程问题 [J]. 中国航天, 1999, (5): 20- 24.

WU Guoxing. The medicine and medical engineering problem in long

term manned space flight [J]. Aerospace China, 1999, (5): 20- 24.

- [10] MIYACHI Y. Acute mild hypothermia caused by a low dose of X- irradiation induces a protective effect against mid- lethal doses of X- rays, and a low level concentration of ozone may act as a radiomimetic[J]. Br J Radiol, 2000, 73: 298- 304.

- [11] ELMROTH K, NYGREN J, ERKELL L J, et al. Effect of hypothermic irradiation of the growth characteristics of two human cell lines[J]. Anticancer Res, 2000, 20(5B): 3429- 3433.

- [12] PIPPIA P, MELONI M A, COSSU G, et al. Cellular adhesion in neoplastic and syngeneic normal cells under altered gravitational conditions[J]. J Gravit Physiol, 1998, (5): 165- 166.

- [13] ROMBERGER D J. Fibronectin [J]. Int J Biochem Cell Biol, 1997, 29(7): 939- 943.

(责任编辑 朱宇)

·科技智力游戏·

轻松一刻——九宫填数

该游戏的填数规则为：在 9×9 的大九宫格内，出题者已给出若干数字，其他宫位的数字空留，需要读者根据逻辑推理填写剩下空格里的数字；填满数字的大九宫里，数字之间的关系必须满足：每一行与每一列都有 1 到 9 的数字，每个实线所标 3×3 的小九宫格里也有 1 到 9 的数字，且每个数字在每行、每列及每个小九宫格里只能出现一次，即既不能重复也不能缺少。答案请见下期。

(供稿 李建才 责任编辑 赵佳)

上期答案

九宫1 难度系数◆◆◆◆◆								
8	6	1	5	9	7	3	2	4
5	3	7	2	4	8	6	1	9
2	9	4	6	1	3	7	5	8
3	1	6	4	8	5	2	9	7
9	8	2	7	3	6	1	4	5
4	7	5	9	2	1	8	3	6
1	4	3	8	6	9	5	7	2
7	2	8	3	5	4	9	6	1
6	5	9	1	7	2	4	8	3

九宫1 难度系数◆◆◆◆◆

1	7			4	3			
		5	1	8			3	4
	4			6		5	1	2
7		3				6	4	
4			7			1	2	8
	2	1	4					7
2		4		7			9	1
8			3		9	4		5
				1	4	2	7	3

九宫2 难度系数◆◆◆◆◆

8				4		3	5	
7			9	1		2		
			3				8	
				2	5	9	7	
	4		6					
	5	7				6		
			4	9	6	3		
4								8
1				5			6	

九宫2 难度系数◆◆◆◆◆

6	3	8	2	1	4	7	9	5
2	9	7	3	6	5	4	1	8
4	1	5	9	8	7	2	6	3
9	5	3	6	4	1	8	2	7
8	7	2	5	3	9	1	4	6
1	6	4	7	2	8	5	3	9
7	4	1	8	9	6	3	5	2
3	8	6	4	5	2	9	7	1
5	2	9	1	7	3	6	8	4