

空间环境对黑色素瘤 B16 细胞体内增殖及免疫原性的影响

耿传营¹, 向青¹, 徐梅¹, 郭宇鹏², 李红艳¹, 徐波¹, 房青¹, 刘玉凤³, 唐劲天³

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. 清华大学玉泉医院, 北京 100049

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] 初步探讨空间环境对黑色素瘤 B16 细胞增殖及免疫原性的影响。选择 4 株经体外实验筛选出生物学性状变异明显的第 20 颗返回式卫星搭载的空间培养 B16 细胞, 检测其体内增殖能力及免疫原性的变化。将筛选出的 4 株空间培养 B16 细胞接种于 C57BL/6 小鼠, 其中一组接种于腹腔, 观察荷瘤小鼠生存期; 另一组接种于腋下皮肤, 检测小鼠出瘤时间。接种至 2 周时, 处死, 分离荷瘤小鼠移植瘤和血清。称重荷瘤小鼠移植瘤, 观察空间培养 B16 细胞增殖能力; 利用 HE 染色法观察荷瘤小鼠移植瘤切片细胞形态; 采用放射免疫分析法(Radioimmunoassay, RIA)测定荷瘤小鼠血清白介素-2 (InterLeukin-2, IL-2) 浓度, 观察空间培养 B16 细胞免疫原性变化情况。与对照细胞相比, 1 株空间培养 B16 细胞的荷瘤小鼠生存期明显缩短, 出瘤时间明显延长。HE 结果显示: 此株空间培养 B16 肿瘤组织内有淋巴细胞浸润; RIA 结果显示: 3 株空间培养 B16 细胞荷瘤小鼠血清 IL-2 浓度明显增加。空间环境的复合因素可诱导 B16 细胞增殖能力及免疫原性产生变化。

[关键词] 空间环境; 黑色素瘤; B16; 增殖; 免疫原性

[中图分类号] R85

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)01-0024-04

Effects of Space Environment on Proliferation Ability in vivo and Immunogenicity of Melanoma B16 Cells

GENG Chuanying¹, XIANG Qing¹, XU Mei¹, GUO Yupeng², LI Hongyan¹, XU Bo¹, FANG Qing¹, LIU Yufeng³, TANG Jintian³

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, China-Japan Friendship Institute of Clinical Medical Sciences, Beijing 100029, China

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

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

Abstract: The effects of space environment on the proliferation ability and immunogenicity of melanoma B16 cells are studied in this paper. Four B16 cells, which were on board in the 20th recoverable satellite, are selected. Their biological characteristics are found changed significantly in experiments in vitro. B16 cells selected were inoculated into C57BL/6 mice; each kind of space cells was injected into 20 mice, which were divided into two groups randomly, with ten mice in each group inoculated with experimental cells and one group were inoculated in the abdominal cavities to observe the survival time of tumor mice, and the other group were inoculated under the chest skins to record the time named as the forming-tumor time when the diameters of tumors exceeded 3 mm. The tumor mice were killed 2 weeks after the space cells were inoculated. Then, tumors were ablated and serum was separated. The tumors were weighted to measure the abilities of space mutant B16 cells in forming tumors; tumor slices were stained to observe the changes of shape of space mutant B16 cells; the concentration of InterLeukin-2 (IL-2) of the serum of tumor mice was determined to observe the immunogenicity of space cells with the method of radioimmunoassay (RIA). Compared

收稿日期: 2006-11-22

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: 耿传营, 男, 中日友好临床医学研究所, 实习研究员, 研究方向为肿瘤治疗学; E-mail: gengcy2000@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, 研究方向为肿瘤治疗;

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

with wild melanoma B16 cells, the survival time of the tumor mice with inoculated 11[#] cells was found to be shortened significantly, while that with 4[#], 9[#], 15[#] and Gro cells saw no apparent changes; the time in forming tumors for tumor mice inoculated with 11[#] and Gro cells was prolonged significantly, while that with 4[#], 9[#] and 15[#] cells saw no apparent changes; the weight of carcinomas of tumor mice inoculated with 11[#] cell decreased significantly, that with 15[#] cells increased, while that with 4[#], 9[#] and Gro cell saw no apparent changes. Tumor slices stained by the method of HE showed that the necrotic area of carcinomas of 11[#] space cells was reduced and there were lymphocytes within the tumor tissues in tumor mice inoculated with 11[#] and 15[#] space mutant cells. RIA tests showed that the IL-2 concentration in the serum of tumor mice inoculated with 9[#], 11[#], 15[#] and Gro cells increased, especially that with 11[#] cells; while that with 4[#] cells saw no changes. Space environment may change the proliferation ability and immunogenicity of melanoma B16 cells.

Key Words: space environments; melanoma; B16; proliferation; immunogenicity

CLC Number: R85

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)01-0024-04

空间环境中对生物体影响最主要的因素是空间辐射、微磁场和微重力环境。空间环境有许多不同于地面的特性,对生命有多方面的影响。比如,对人体心血管、骨骼和免疫等系统的影响;在细胞和基因水平上,细胞增殖和分化、基因表达、信号传导、细胞骨架、遗传变异等方面有显著改变。利用空间环境特殊性研究基础生命过程,可以帮助人类理解某些重大生命科学问题,包括生命起源、演化、个体和系统发育乃至疾病发生机理。目前,国际空间生命科学对空间环境在整体水平的生物效应研究较多,而细胞水平的研究还处在初级阶段。明确空间环境影响细胞生命活动的有关情况,更有利于研究空间环境影响动物体的机制。

选择经第 20 颗返回式卫星搭载的 B16 细胞,进行体外和体内实验后,筛选性状变异明显的空间培养 B16 细胞株,接种于 C57BL/6 小鼠。观察小鼠出瘤时间、瘤组织重量、瘤细胞形态、荷瘤小鼠生存期以及空间培养 B16 细胞对小鼠免疫系统的刺激作用,检测空间培养 B16 细胞的体内增殖能力及免疫原性。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

选择前期实验筛选出的 4 株空间培养 B16 细胞,4 株细胞的内部编号分别为 4[#]、9[#]、11[#] 和 15[#]。空间培养 B16 细胞的获得:利用‘细胞低温长期生存系统’^[1]将野生型 B16 细胞搭载于第 20 颗返回式卫星。搭载系统内无电源、热源和气源,卫星搭载舱内 1 个大气压,温度 15~26℃,飞行近地点轨道高度约 175 km,远地点高度约 500 km,轨道飞行 18 d,环绕地球 286 圈,地面滞留 7~8 d(数据由中国空间技术研究院提供)。空间飞行后,回收细胞,单克隆化,获得 110 株空间 B16 细胞,按顺序编号。从中选取 3[#]、4[#]、9[#]、10[#]、11[#]、12[#]、13[#]、14[#]、15[#] 和 16[#] 共 10 株空间培养 B16 细胞进行体外和体内实验,筛选出 4[#]、9[#]、11[#] 和 15[#] 共 4 株性状变异明显的空间培养 B16 细胞,为本次实验的对象。对照细胞为 1 株野生型 B16 细胞和 1 株地面细胞;地面细胞是培养于‘细胞在常温条件下长期存活装置’中,通过模拟搭载时间和

卫星配重舱中的温度而获得 B16 细胞。

1.2 细胞培养

将空间培养 B16 细胞和对照细胞置于 37℃和 5% CO₂ 孵箱中,利用 10% DMEM 培养基培养,传代时用 0.25%胰酶消化细胞。

1.3 荷瘤小鼠生存期

常规培养筛选出的空间培养、野生型和地面组 B16 细胞,至细胞生长状态良好时,消化细胞,将实验细胞接种于 C57BL/6 小鼠腹腔,每只小鼠接种 0.2 ml 细胞悬液,共 5×10⁵ 个细胞,每株实验细胞接种 10 只小鼠。然后,观察荷瘤小鼠生存天数,记为荷瘤小鼠生存期。

1.4 荷瘤小鼠出瘤时间

常规培养筛选出的空间培养、野生型和地面组 B16 细胞,至细胞生长状态良好时,消化细胞,将实验细胞接种于 C57BL/6 小鼠胸前皮下,每只小鼠接种 0.2 ml 细胞悬液,共 5×10⁵ 个细胞。11[#] 空间培养 B16 细胞接种于 20 只小鼠,其余实验细胞每株接种 10 只小鼠。然后,游标卡尺测量荷瘤小鼠肿瘤组织直径,记录直径为 3 mm 时所需天数,观察荷瘤小鼠出瘤时间。

1.5 移植瘤重量

至皮下接种实验细胞的荷瘤小鼠生存至 2 周时,处死。分离荷瘤小鼠肿瘤组织,称重,检测荷瘤小鼠移植瘤重量。

1.6 移植瘤细胞形态

利用 4%多聚甲醛固定分离出的荷瘤小鼠移植瘤,制成石蜡切片,脱蜡,HE 染色,封片后,观察移植瘤细胞形态。

1.7 荷瘤小鼠血清细胞因子

至皮下接种实验细胞的荷瘤小鼠生存至 2 周时,处死。取出荷瘤小鼠外周血,分离血清,利用 RIA 方法检测细胞因子 IL-2 血清浓度。

1.8 统计学分析

应用 SPSS 10.0 统计软件处理实验所得数据,利用独立样本 t 检验和对数秩检验进行分析, P<0.05 即认为有显著性差异。

2 结果

2.1 荷瘤小鼠生存期

与野生型 B16 相比, 接种 11[#] 空间培养 B16 细胞的荷瘤小鼠生存期明显缩短, 4[#]、9[#]、15[#] 和地面组 B16 细胞荷瘤小鼠生存期无明显变化(见表 1)。

表 1 空间培养 B16 细胞荷瘤小鼠生存期(d) Table 1 Survival time of the tumor mice inoculated by space B16 cells (d)						
组别	Con	Gro	4 [#]	9 [#]	11 [#]	15 [#]
均数	16.40	15.20	16.90	16.70	24.20	15.70
标准差	1.17	1.62	1.73	2.41	2.15	1.70
χ 值		2.60	1.36	1.12	20.64	0.45
P 值		0.11	0.241	0.29	0	0.50

注: χ 值和 P 值为各组与野生组的独立对数秩检验结果。

2.2 荷瘤小鼠出瘤时间

与野生型 B16 相比, 接种 11[#] 和地面组空间培养 B16 细胞的荷瘤小鼠出瘤时间明显延长, 4[#]、9[#] 和 15[#] B16 细胞出瘤时间变化不明显(见表 2)。

表 2 空间培养 B16 细胞出瘤时间(d) Table 2 Forming-tumor time of space B16 cells (d)						
组别	Con	Gro	4 [#]	9 [#]	11 [#]	15 [#]
均数	5.60	7.40	5.80	16.70	24.20	15.70
标准差	0.84	2.12	1.32	2.41	2.15	1.70
χ 值		7.60	0.11	1.12	20.64	0.45
P 值		0.01	0.74	0.29	0	0.50

注: χ 值和 P 值为各组与野生组的独立对数秩检验结果。

2.3 移植瘤重量

与野生型 B16 细胞相比, 11[#] 空间培养 B16 细胞荷瘤小鼠移植瘤重量明显减低, 15[#] B16 细胞荷瘤小鼠移植瘤重量增加, 4[#]、9[#] 和地面组 B16 细胞荷瘤小鼠移植瘤重量无明显变化(见表 3)。

表 3 空间培养 B16 细胞移植瘤重量(g) Table 3 Weights of transplanted carcinomas of space B16 cells (g)						
组别	Con	Gro	4 [#]	9 [#]	11 [#]	15 [#]
均数	1.61	1.76	1.14	1.43	0.14	2.48
标准差	0.80	0.74	0.54	0.42	0.10	0.65
t 值		0.43	1.52	0.60	8.15	2.67
P 值		0.67	0.15	0.56	0	0.02

注: t 值和 P 值为各组与野生组的独立 t 检验结果。

2.4 移植瘤细胞形态

肿瘤组织切片 HE 染色结果显示, 野生型和地面组 B16 细胞荷瘤小鼠移植瘤内部可见较多坏死区域, 肿瘤细胞围绕血管生长, 呈袖套状。11[#] B16 细胞荷瘤小鼠移植瘤坏死组织较少, 肿瘤组织内可见淋巴细胞浸润(图 1 箭头所示)。

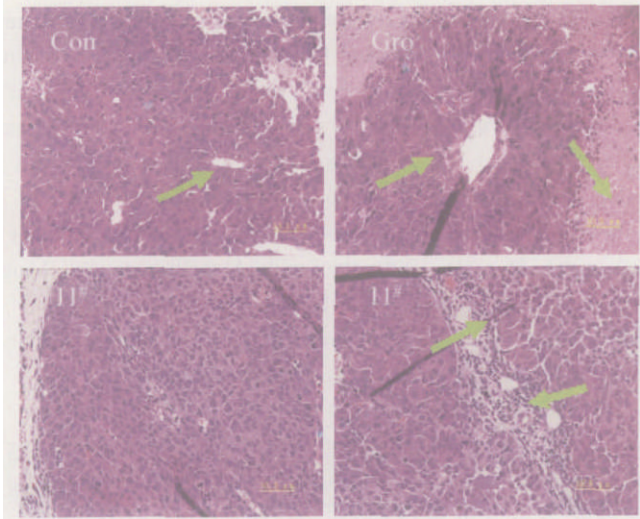


图 1 空间诱变 B16 细胞荷瘤小鼠移植瘤细胞形态
Fig. 1 Morphological changes of transplanted cell

2.5 荷瘤小鼠血清细胞因子浓度

RIA 结果显示: 9[#]、11[#]、15[#] 和地面组 B16 细胞荷瘤小鼠 IL-2 血清浓度增加, 其中 11[#] B16 细胞增加最明显, 4[#] B16 细胞荷瘤小鼠 IL-2 血清浓度无明显变化(见表 4)。

表 4 空间培养 B16 细胞荷瘤小鼠 IL-2 血清浓度(ng/ml) Table 4 Concentrations of IL-2 of the serum of tumor mice (ng/ml)						
组别	Con	Gro	4 [#]	9 [#]	11 [#]	15 [#]
均数	2.30	3.30	2.46	3.70	5.07	4.67
标准差	0.60	1.04	0.65	1.06	1.69	1.42
t 值		2.51	0.51	3.46	6.57	4.67
P 值		0.02	0.62	0	0	0

注: t 值和 P 值为各组与野生组的独立 t 检验结果。

3 讨论

空间飞行过程中, 由于受空间辐射影响, 植物种子和微生物染色体可产生突变, 从而诱导植物和微生物性状产生多向性变异, 其中有些变异是可遗传的。回收空间诱变的植物种子和微生物进行地面培育, 即可从中筛选出理想的突变品系^[2-3]。空间环境中的高能粒子和高能电磁射线击中细胞 DNA 链, 使其受到损伤, 引发细胞修复系统进行修复, 当损失较严重的未能被修复系统及时修复时, 就会导致细胞基因组变异, 产生染色体畸变。细胞 DNA 的损伤程度与暴露于空间辐射的时间密切相关, 时间越长损伤越严重。同时, 微重力还可增加细胞对放射线的敏感性, 空间环境的复合作用更易于诱发细胞变异^[4-8]。空间飞行后的宇航员淋巴细胞染色体失常增多, 简单易位明显增加。培养于空间环境中的淋巴细胞染色体畸变增加, 出现双着丝粒染色体和着丝粒环, 导致其基因产生突变, 进而可能使其生物学特性发生变异^[9-10]。

4[#]、9[#]、11[#]、15[#]、野生型和地面 B16 细胞接种 C57BL/6 小鼠后,观察荷瘤小鼠生存期发现,与野生型 B16 细胞相比,接种 11[#] 空间诱变 B16 细胞的荷瘤小鼠生存期明显缩短,而 4[#]、9[#]、15[#] 和地面组 B16 细胞荷瘤小鼠生存期无明显变化,提示 11[#] 空间诱变 B16 细胞成瘤性可能有所减弱。观察各组 B16 细胞出瘤时间发现,11[#] 和地面组 B16 细胞出瘤时间明显延长,4[#]、9[#] 和 15[#] B16 细胞出瘤时间变化不明显,提示 11[#] 和地面组 B16 细胞成瘤性可能有所减低。与野生型 B16 细胞相比,接种实验细胞的荷瘤小鼠移植瘤重量发生改变。11[#] 空间诱变 B16 细胞荷瘤小鼠移植瘤重量明显减低,15[#] B16 细胞荷瘤小鼠移植瘤重量增加,4[#]、9[#] 和地面组 B16 细胞荷瘤小鼠移植瘤重量无明显变化,提示 15[#] 空间诱变 B16 细胞成瘤性可能有所增加,而 11[#] 空间诱变 B16 细胞成瘤性可能有所减弱。接种实验细胞的荷瘤小鼠生存期、出瘤时间和移植瘤重量的实验结果表明:与野生型 B16 细胞相比,11[#] 空间诱变 B16 细胞成瘤性减低,15[#] 空间诱变 B16 细胞成瘤性可能有所增加,而 4[#]、9[#] 和地面 B16 细胞成瘤性变化不明显。

4[#]、9[#]、15[#]、野生型和地面 B16 细胞接种于 C57BL/6 小鼠后,形成较大肿瘤组织,移植瘤切片 HE 染色结果显示肿瘤组织内部出现大量坏死灶,血管周围可见大量肿瘤细胞增生,呈套袖状,提示这几株细胞成瘤性较强。11[#] 空间诱变 B16 细胞接种小鼠后,形成的肿瘤组织较小,移植瘤切片 HE 染色显示:肿瘤组织内部坏死组织较少,某些肿瘤组织内部可见淋巴细胞浸润,提示 11[#] 空间诱变 B16 细胞成瘤性较低,15[#] 空间诱变 B16 细胞接种小鼠后,肿瘤组织内偶尔也可见淋巴细胞浸润,但由于肿瘤组织坏死较严重,不能说明其成瘤性有所减低。

IL-2 是近年来研究较多的具有抗肿瘤活性的细胞因子,能影响其他诸多细胞因子或促进血细胞生成、分化与增殖,是具有多种生物活性的多肽或低分子量糖蛋白。它作为特异性免疫和非特异性的蛋白介质,在机体免疫调节中起着关键作用,在增强机体免疫功能和防止肿瘤生长等方面发挥重要功能。IL-2 能作用于 T 细胞、大颗粒淋巴细胞、单核细胞和 B 细胞,促进细胞增殖和分泌细胞因子。IL-2 还能增强 CTL 细胞毒性、促进细胞移动、增强细胞间接触和诱导细胞分泌细胞因子(INF- α 、IL-4、TNF 和 CSF 等)^[1]。将 6 株实验细胞接种于 C57BL/6 小鼠后发现,9[#]、11[#]、15[#] 和地面组 B16 细胞荷瘤小鼠 IL-2 血清浓度增加,其中 11[#] B16 细胞增加最明显,4[#] B16 细胞荷瘤小鼠 IL-2 血清浓度无明显变化。结果显示 11[#] 空间诱变 B16 细胞能明显激发小鼠机体产生免疫反应,杀伤肿瘤细胞,说明其免疫原性可能有所增强。

本研究中,与对照组相比,模拟搭载时间和低温状态的地面组细胞在增殖和免疫原性方面无明显性差异,提示“细胞在常温条件下长期存活装置”中的条件对细

胞的影响较小。

空间环境可以诱导黑色素瘤 B16 细胞产生生物学特性改变。B16 细胞经空间复合因素作用后,其在小鼠体内的增殖能力及诱导小鼠产生免疫应答的能力产生变化,但 B16 细胞产生这些变化的机制还有待进一步阐明。

参考文献(References)

- [1] 房青,徐梅,徐波,等.细胞低温长期生存系统的研究以及在空间搭载中的应用[J].中国康复理论与实践,2004,10(11): 649-651.
FANG Qing, XU Mei, XU Bo, et al. Development of long-term cell culture facility in hypothermia and its application in space biology research[J]. Chin J Rehab Theo Prac, 2004, 10(11): 649-651.
- [2] 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 Handong, et al. Rice breeding by space technology[J]. Hereditas, 2002, 24: 434-438.
- [3] 印红,谢申义,章光明,等.空间飞行对红曲霉菌产量的影响[J].航天医学与医学工程,2003,16(5): 374-376.
YIN Hong, XIE Shenyi, ZHANG Guangming, et al. Effect of space flight on yield of monascus purpureus[J]. Space Med Med, 2003, 16(5): 374-376.
- [4] BELLI M, SAPORA O, TABOCCHINI M A. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection[J]. J Rad Res, 2002,(s): 13-19.
- [5] GEORGE K, WU H, WILLINGHAM V, et al. Analysis of complex-type chromosome exchanges in astronauts' lymphocytes after space flight as a biomarker of high-LET exposure[J]. J Rad Res, 2002, 43(s): 129-132.
- [6] GEORGE K, DURANTE M, WILLINGHAM V, et al. Chromosome aberrations of clonal origin are present in astronauts' blood lymphocytes[J]. Cytogenet Genome Res, 2004,104(1-4): 245-251.
- [7] DURANTE M, SNIGIRYOVA G, AKAEVA E, et al. Chromosome aberration dosimetry in cosmonauts after single or multiple space flights[J]. Cytogenet Genome Res, 2003, 103(1-2): 40-46.
- [8] OHNISHI T, OHNISHI K, TAKAHASHI A, et al. Detection of DNA damage induced by space radiation in Mir and space shuttle[J]. J Rad Res, 2002, 43(s): 133-136.
- [9] GEORGE K, WU H, WILLINGHAM V, et al. The effect of space radiation on the induction of chromosome damage[J]. Phys Med, 2001; 17(s)1: 222-225.
- [10] FEDORENKO B, DRUZHININ S, YUDAEVA L, et al. Cytogenetic studies of blood lymphocytes from cosmonauts after long-term space flights on Mir station[J]. Adv Space Res, 2001, 27(2): 355-359.
- [11] TARTOU E, MEHTALI M, SASTRE G X, et al. Phase I clinical trial with IL-2 trasfected xenogeneic cells administered in subcutaneous metastatic tumours: clinical and immunological findings[J]. Br J Cancer, 2000, 83(11):1454-1461. (责任编辑 王 芷)