

空间环境对恶性黑色素瘤 B16 细胞间通讯功能的影响

柴大敏¹, 向青², 徐梅², 徐波², 李红艳², 耿传营², 陈志华², 陶仪声¹, 唐劲天³

1. 蚌埠医学院病理学教研室, 安徽蚌埠 233003

2. 中日友好临床医学研究所生物化学-分子生物学研究室, 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] 观察空间诱变后恶性黑色素瘤 B16 细胞株的细胞间通讯功能及细胞间黏附能力的变化, 并探讨可能的机理。应用细胞低温长期生存系统, 将 B16 细胞株搭载于“第 20 颗返回式卫星”, 返地后单克隆化, 从得到的 110 株单克隆空间诱变 B16 细胞株中随机选取 6 株, 编号为 39#~44#, 常规培养 6 代后和对照细胞株同时做 MTT 和 FCM, 检测细胞增殖和周期分布; 用划痕标记染料示踪技术检测细胞间通讯功能; 将有变异的细胞接种 C57BL/6J 小鼠, 免疫组化观测 CD31 蛋白的表达量。初步筛选出两株(39#、44#)变化比较明显的细胞株, 44# 细胞增殖能力降低、G1 期分布增加、细胞间通讯功能增强、CD31 蛋白表达增强; 39# 细胞增殖能力升高、G1 期分布减少、细胞间通讯功能减弱、CD31 蛋白表达减少。空间环境的作用使体外培养肿瘤细胞产生多向变异, 有可能筛选出有意义的细胞株做进一步的研究。

[关键词] 空间环境; B16 细胞; 诱变; CD31; 细胞间隙通讯功能

[中图分类号] R85

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)02-0041-04

Gap Junction Inter cellular Communications of Melanoma B16 Cell Clones Mutagenized by Outer Space Environment

CHAI Damin¹, XIANG Qing², XU Mei², XU Bo², LI Hongyan², GENG Chuanying², CHEN Zhihua², TAO Yisheng¹, TANG Jintian³

1. Bengbu Medical College, Bengbu 233003, Anhui Province, China

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

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

收稿日期: 2006-11-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.30371324) 国家科技部 973 计划前期项目[2003(CA04200)]

作者简介: 柴大敏, 女, 安徽蚌埠市治淮路 801 号蚌埠医学院病理学教研室, 硕士生, 研究方向为病理学; E-mail: msautumn@163.com
唐劲天(通讯作者), 男, 北京市海淀区清华园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

- GAOKA S, et al. Recovery of *Deinococcus radiodurans* from radiation damage was enhanced under microgravity [J]. *Biol Sci Space*, 1996, 10: 97-101.
- [27] CUCINOTTA FA, SCHIMMERLING W, WILSON J W, et al. Space radiation cancer risks and uncertainties for Mars missions [J]. *Radiat Res*, 2001, 156: 682-88.
- [28] Wakeford R. The cancer epidemiol-

- ogy of radiation [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 6404-6428.
- [29] 唐劲天, 房青, 向青, 等. 太空环境诱导肿瘤细胞变异的初步结果 [J]. *中日友好医院学报*, 2003, 17(4): 229-231.
- TANG Jintian, FANG Qing, XIANG Qing, et al. Preliminary results of variations of tumor cells induced by exposing to the space environment [J]. *Journal of China-Japan Friendship Hospital*. 2003, 17(4): 229-231.

- [30] 杨丞, 李官成. 太空诱变宫颈癌细胞的差异表达基因初探 [J]. *科技导报*, 2006, 24(8): 31-35.
- YANG Cheng, LI Guancheng. Differential gene expression of uterine cervix cancer cell induced by exposing to the space environment [J]. *Science & Technology Review*, 2006, 24(8): 31-35.
- (责任编辑 王士泉)

Abstract: To study the gap junction intercellular communication and adhesion of the melanoma B16 cell clones mutagenized by space environment, and the possible mechanism. B16 cells were put on board of the Chinese 20th recoverable satellite, and were harvested after 18 days' spaceflight and then monocloned. Six cell clones numbered as 39[#]~44[#] were randomly selected from the total 110 clones obtained, and the control clones were routinely cultured. After six generations, the cultured cells were experimented with MTT assay and FCM methods for cell growth characteristics; with scrape loading dye transfer method for gap junction intercellular communication; with immunohistochemistry method for the CD31 contents. Two clones were selected as remarkably different from the control clone in growth characteristics, gap junction intercellular communication, intercellular adhesion. Cultured melanoma B16 cells in vitro were found to be mutated by the outer space environment. One may screen out mutagenesis B16 cell clones to carry out studies useful for human beings.

Key Words: outer space environment; B16 cell; mutagenesis; CD31; gap junction intercellular communication

CLC Number: R85

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)02-0041-04

细胞间隙连接通讯 (gap junction intercellular communication, GJIC) 是细胞间交换信息离子和小分子物质的膜性途径, 在调节细胞生长分化方面起重要作用。GJIC 的阻断, 可导致细胞生长分化失控和肿瘤生成, 其中恶性肿瘤的发生及其恶性表型可能与间隙连接通讯功能的抑制密切相关^[1-2]。本课题组前期研究表明: 空间环境的复合作用使恶性黑色素瘤 B16 体内成瘤性和基因、蛋白水平发生改变^[3]。本研究从搭载于第 20 颗返回式卫星而获得的大量空间诱变单克隆细胞株^[4]中, 随机选取 6 株进行细胞增殖能力、周期分布情况、GJIC 和 CD31 蛋白的检测, 希望筛选出今后进一步研究所需的细胞株。

1 材料和方法

1.1 细胞株

野生型对照组小鼠黑色素瘤 B16 细胞株购自中国科学院上海细胞库; 实验组 B16 为野生型细胞株, 单克隆纯化后, 配合卫星发射周期接种于“细胞低温长期生存系统”(专利申请号: 0312090618), 并搭载于我国第 20 颗返回式卫星, 其中搭载条件为: 无电源、热源、气源, 舱内 1 个大气压, 温度 15~26 (数据由中国空间技术研究院提供), 轨道飞行 18 d, 地面滞留 7~8 d^[5]。返地后从获得的 110 株空间诱变细胞株中随机选取 6 株, 内部编号为 39[#]~44[#]; 同时在实验室中将同批野生型 B16 细胞株正常传代, 作为对照组细胞。

1.2 空间诱变 B16 细胞返地单克隆化

细胞返地后更换新鲜的“细胞低温长期生存系统”培养基, 置 37 °C 培养箱中复温 8 h。0.5% 胰酶消化细胞, 计数后稀释接种于 96 孔板中。置培养箱中培养, 细胞增殖(单克隆)后传代、冻存。使用传 6 代的细胞作为实验用细胞。

1.3 细胞增殖能力检测

各组细胞分别胰酶消化后接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 2 000 个细胞, 37 °C, 5%CO₂ 培养 6 d。用 MTT 法^[6]酶标仪测定 492 nm 处的 OD 值, 连续 5 d 作生长曲

线。

1.4 流式细胞仪测定细胞的周期(FCM)

细胞接种于 6 孔板, 每孔 1×10^5 细胞, 37 °C, 5%CO₂ 培养 3 d 后, 胰酶消化, PBS 洗 2 次, 70%乙醇固定, PI 染色, 流式细胞仪检测。

1.5 划痕标记染料示踪技术 (Scrape loading dye transfer, SLDT) 检测细胞间隙通讯功能(GJIC)

35 mm 培养皿内细胞达饱和密度, PBS 洗 3 遍, 用锐刀划痕后, 加 0.05% 的罗氏黄染料 (Lucifer Yellow, LY, Sigma, USA) 2 ml, 37 °C, 5%CO₂ 孵箱孵育 3 min, 吸弃染料, PBS 洗数遍, 加 2 ml 含 10%FBS 的 DMEM 培养基, 在倒置相差荧光显微镜下观察染料传输情况。荧光染料于划痕边缘只传递至单列细胞为阴性; 向临近传递两列细胞以上为阳性。

1.6 免疫组化检测 CD31 表达

分别培养 39[#], 44[#] 和野生型 B16 细胞, 调整细胞悬液浓度为 2.5×10^6 /ml, 接种 C57BL/6J 小鼠, 每只小鼠注射 0.2 ml, 每株细胞注射 1 组小鼠, 每组 10 只, 接种于右侧腋下, 14 d 后取出瘤体用 4 % 中性多聚甲醛溶液固定, 切片 5 μ m 厚薄, 免疫组化检测 CD31 蛋白的含量: 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶 (SP) 法, 第一抗体 CD31 为兔抗多克隆抗体, 购自 Santa Cruz 公司, 按照试剂盒说明书步骤进行。

1.7 统计方法

采用 SPSS13.0 软件包对各组样本进行独立样本 T 检验。

2 结果

2.1 细胞增殖

与野生型 B16 比较, 39[#] 细胞增殖速度加快; 44[#] 细胞增殖减慢。接种第三天 OD 值 39[#], 44[#] 结果有统计学意义 ($P < 0.05$), 如图 1 所示。

2.2 细胞周期分布 (FCM)

与野生型 B16 相比, 39[#] 细胞 G1 期分布减少, S 期分布增加 ($P < 0.05$); 44[#] 细胞 G1 期分布增加, S 期分布

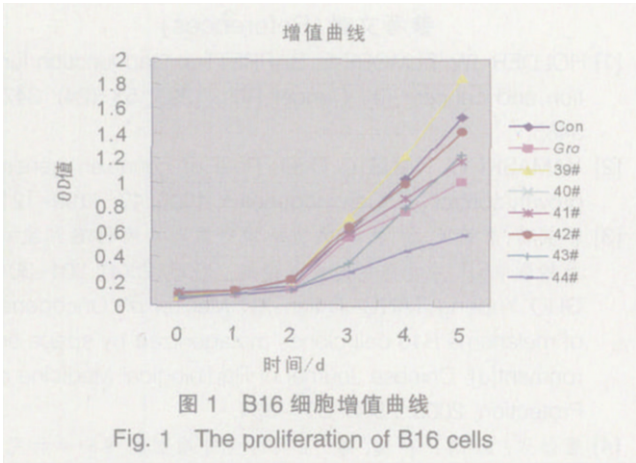


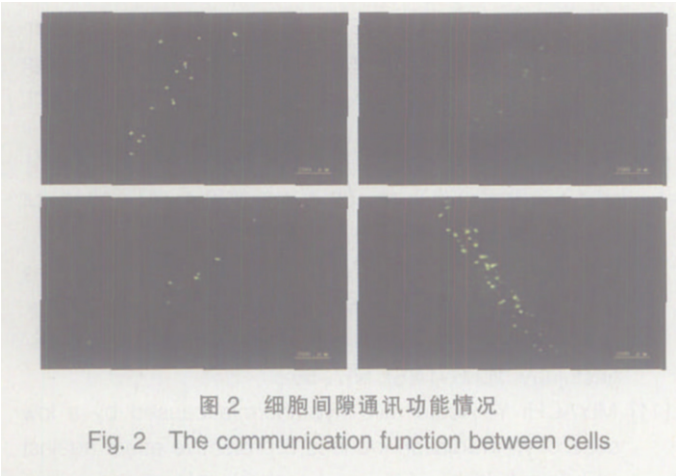
图 1 B16 细胞增值曲线
Fig. 1 The proliferation of B16 cells

表 1 各组细胞周期分布情况 Table 1 Distribution of cell phases				
组别	G1 期	G2 期	G2/G1	S 期
Con	60.7 ±1.41	8.27 ±0.46	1.90 ±0.03	31.07 ±1.89
Gro	63.47 ±5.12*	8.83 ±3.69	1.85 ±0.05	17.70 ±2.29*
39#	52.93 ±1.42*	8.70 ±0.61	1.92 ±0.01	38.33 ±1.90*
40#	65.97 ±2.31*	6.57 ±3.33	1.92 ±0.07	27.50 ±3.72
41#	58.13 ±2.02*	7.90 ±1.31	1.91 ±0.02	24.00 ±1.73*
42#	59.25 ±0.23	11.23 ±0.35	0.92 ±0.03	24.06 ±2.78
43#	57.57 ±0.35	12.30 ±2.1*	1.91 ±0.03	30.13 ±2.15
44#	66.13 ±2.58*	10.43 ±0.68	1.90 ±0.01	23.43 ±1.61*

注: * 与野生型 B16 组相比 $P < 0.05$

2.3 细胞 GJIC 变化

荧光染料传递表明, 空间诱变 B16 细胞 39# 变化不明显, 44# 细胞 GJIC 增强, 即划痕细胞内的荧光染料可传至毗邻 2~3 列细胞(图 2)。



2.4 CD31 蛋白表达

CD31 表达于血管内皮细胞的胞浆和胞膜, 也表达于黑色素瘤。其阳性的判断标准是: 胞浆和胞膜表达棕色

颗粒为阳性。采用专业图像分析软件 IPP5.0 进行图像的积分光密度分析, 结果见表 2。与野生型 B16 比较, 空间诱变 39# 细胞的 CD31 蛋白含量减少, 44# 细胞 CD31 蛋白的含量增加, 如图 3 箭头所示。

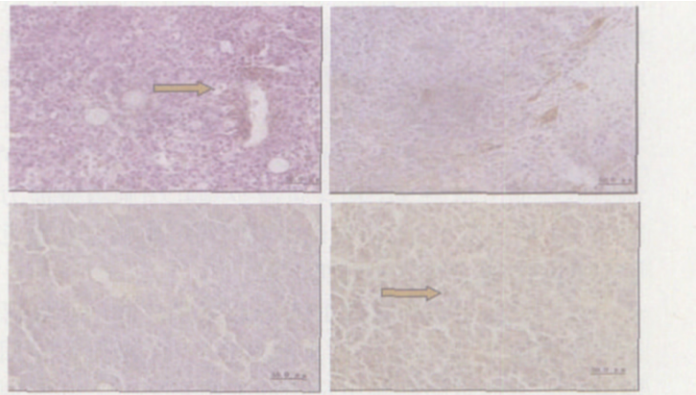


图 3 各组 CD31 蛋白的含量(x400)
Fig. 3 The expression of CD31 protein

表 2 CD31 积分光密度 Table 2 Integral optical density of CD31				
	Con	Gro	39#	44#
Mean	396 481	446 346	231 308	1 228 080
S	123 635	166 196	151 689	468 303
t		0.912	3.269	6.65
P		0.371	0.003	0.000

注: t 值和 P 值为各组与野生组的独立 t 检验结果

3 讨论

距离地球表面 100 km 以上的外层空间被称之为空间环境, 它没有地球稠密大气层的保护, 存在着复杂的宇宙辐射。主要有银河宇宙线 (galactic cosmic rays, GCRs) 和太阳粒子事件。GCRs 是一些从遥远的超新星爆炸中产生的粒子, 被加速到了接近光速。在高度 1 000 km 以下的近地空间, 宇宙辐射虽受地磁场屏蔽, 强度较星际空间大为减小, 但高能 GCRs 不能被有效屏蔽。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速器所产生的最高能量的重离子束, 比太阳粒子事件的主要成分——高速质子的能量也要高得多。航天器舱内除贯穿的初级粒子(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(LET)比初级粒子还要大。另外, 次级电子也可导致细胞内的生物效应, 引起 DNA 损伤和突变; 而且低温可以增加细胞对放射的敏感性^[7]。课题组采用“细胞低温长期生存系

统”通过返回式卫星搭载,利用空间特殊环境,尤其是空间的微重力、亚磁场和各种辐射的生物学效应,对体外培养状态下的各种肿瘤细胞和正常细胞进行实验。

关于细胞增殖情况和周期分布的检测是目前公认的细胞学方面的实验指标,如果细胞增殖速度减慢、G1期含量增加,说明细胞停滞在G1期,其有丝分裂速度和分裂能力减弱,对于肿瘤细胞来说就是其侵袭和转移能力降低。本实验所选取的6株细胞中有两株经过空间诱变,与野生型B16相比发生变化比较明显:39[#]细胞增殖能力增强、G1期含量减少;44[#]细胞增殖能力减弱、G1期含量增加。初步说明空间环境影响恶性黑色素瘤B16的细胞增殖和周期分布。

本实验所用黑色素瘤B16细胞系是皮肤的高度恶性肿瘤细胞系,主要是经过血液发生转移,是研究空间辐射对人类健康的影响中常用的细胞系之一。其肿瘤细胞具有比一般来源的正常组织更低的黏着性,主要原因可能是瘤细胞间失去了间隙连接或间隙连接通讯功能(GJIC)减弱,引起肿瘤细胞间失去正常的调控信息和接触抑制,密度依赖性生长和器官整体调控的作用丧失,导致肿瘤细胞脱落并向张力低的基质间隙侵袭^[8-9]。有研究表明:低分化胃癌组织中伴随GJIC的完全关闭,Cx43的表达完全缺失,同时,不能向免疫细胞提供cAMP、蛋白激酶、IP3等信息物质,不能激活免疫细胞,来自正常细胞的生长调控信息不能到达肿瘤细胞,使得肿瘤细胞逃避正常生长控制及免疫监视,更易于生长扩散和转移^[10]。体内实验所用的细胞株:39[#]细胞间通讯功能减弱,44[#]细胞间通讯功能增强。

CD31即血小板-内皮细胞粘附分子-1(platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1),是一种分子量为130kD的跨膜糖蛋白,在血管内皮细胞的连接处有高水平表达,参与体内多种生理过程,并能介导多种配体相互作用,广泛分布在血管的各种细胞上,免疫组化检测可作为机体血管生成的标志^[11]。CD31抗原在恶性黑色素瘤细胞的胞浆和胞膜也有表达,CD31蛋白的表达强阳性说明肿瘤细胞间的黏附力强。本实验初步得出:经过空间诱变后44[#]细胞株的细胞间黏附力与正常细胞株相比增加,而39[#]细胞株的细胞间黏附力与正常细胞株相比减弱。说明空间环境可能经过某些我们还不清楚的途径,使体外培养恶性黑色素瘤B16细胞株发生基因或蛋白水平的变化,导致体内移植瘤的病理学特征发生改变。

通过本次实验结果可以看出空间环境对肿瘤细胞B16的诱变作用是多向的,有希望选出理想的诱变细胞株进行进一步肿瘤疫苗的研制,为以后空间科学和医学的结合搭建桥梁。

参考文献(References)

- [1] HOLDER JW, ELMORE E, BARRETT J. Gap junction function and cancer [J]. *Cancer Res*, 1993, 53 (24): 3475-3485.
- [2] YAMASKI H, NAUS C C G. Role of connexin genes in growth control [J]. *Carcinogenesis*, 1996, 17: 1199-1213.
- [3] 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]. *中华防射与防护杂志*, 2005, 25(4): 301-304.
GUO Yupeng, TANG Jintian, XU Mei, et al. Oncogenesis of melanoma B16 cell clones mutagenized by space environment[J]. *Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection*, 2005, 25(4): 301-304.
- [4] 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(11): 641-643.
TANG Jintian, XIANG Qing, XU Mei, et al. Primary investigation of space mutated tumor cells [J]. *Chinese Journal of Rehabilitation Theory and Practice*, 2004(11): 641-643.
- [5] 徐梅,向青,李红艳,等.小鼠黑色素瘤B16细胞空间无源搭载条件的筛选[J]. *中国康复理论与实践*, 2005(1): 16-17.
XU Mei, XIANG Qing, LI Hongyan, et al. Screening of conditions carrying murine melanoma B16 cells in spaceflights without care[J]. *Chinese Journal of Rehabilitation Theory and Practice*, 2005(1): 16-17.
- [6] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55.
- [7] SHIRAKAWA K, KOBAYASHI H, SOBAJIMA J, et al. Inflammatory breast cancer: vesiculogenic mimicry and its hemodynamics of an inflammatory breast cancer xenograft model[J]. *Breast Cancer Res*, 2003, 5(3): 136-139.
- [8] MURRAY SA, DAVIS K, FISHMAN LM, et al. Alpha1 connexin43 gap junctions are decreased in human adrenocortical tumors [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85: 890-895.
- [9] HABERMANN H, RAY V, HABERMANN W, et al. Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer [J]. *J Urol*, 2001, 166: 2267-2272.
- [10] 吴瑾,王翠华,周红凤,等.间隙连接蛋白32,43的表达对胃癌侵袭转移潜能的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(6): 557-562.
WU Jin, WANG Cuihua, ZHOU Hongfeng, et al. Relations of connexin 32 and 43 expression with metastatic potential of gastric cancer [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2006, 14(6): 557-562.
- [11] 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.

(责任编辑 王芷)