

空间环境对黑色素瘤 B16 细胞致瘤基因和蛋白质表达的影响

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] 初步探讨了空间环境对黑色素瘤 B16 细胞致瘤基因和蛋白质表达的影响。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, 筛选出性状变异明显的空间诱变 B16 细胞株, 检测空间诱变 B16 细胞基因和蛋白质表达的变化。将筛选出的空间诱变 B16 细胞接种于 C57BL/6 小鼠, 2 周后, 处死荷瘤小鼠, 取出移植瘤, 利用免疫组化方法, 检测接种空间诱变 B16 细胞的荷瘤小鼠移植瘤细胞 Melan-A 和 VEGF 蛋白的表达情况; 利用 RT-PCR 方法, 检测蛋白质水平上表达变化明显的空间诱变 B16 细胞 melan-a, gp100, bag-3 和 l-pgds 基因的表达情况。与对照细胞相比, 1 株空间诱变 B16 细胞荷瘤小鼠移植瘤细胞 Melan-A 和 VEGF 蛋白表达明显增加, 其他细胞 2 种蛋白质的表达无明显变化。RT-PCR 结果显示: 此株细胞的 melan-a, gp100 和 l-pgds 基因表达增加, bag-3 基因表达降低。空间环境的复合因素可诱导 B16 细胞基因和蛋白质表达产生变化。

[关键词] 空间环境; 黑色素瘤; B16; 基因表达; 蛋白质表达

[中图分类号] R85

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)03-0034-05

Effects of Space Environments on the Expression of Proteins and Genes 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 100084, China

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

Abstract: Preliminary studies were carried out on the effects of space environments on the expression of proteins and genes of melanoma B16 cells. Four B16 cells which were on board of China's 20th recoverable satellite were selected whose biological characteristics had changed obviously in the experiments in vitro, in order to detect changes of cells' expression of proteins and genes. B16 cells selected were inoculated into C57BL/6 mice under the chest skin. The tumor mice were killed when space cells had been inoculated for 2 weeks, then, tumors of tumor mice were ablated. To detect the expression of Melan-A (Melanoma Antigen Recognized by T cells 1, MART-1) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in the carcinomas of tumor mice, the method of Immunohistochemistry (IH) was used. According to the above results, the space B16 cells were chosen, whose biological characteristics changed obviously and the expression variations of melan-a, gp100, bcl-2-associated anthranogene-3 (bag-3) and Lipocalin-type Prostaglandin D2 synthase (l-pgds) were determined with the method of Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). It was found that space environments might change the expression of proteins and genes of melanoma B16 cells.

收稿日期: 2006-12-25

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, 北京市朝阳区樱花园东街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, 北京市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, 研究方向为肿瘤治疗;

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

Key Words: space environments; melanoma; B16; expression of proteins; expression of genes

CLC Number: R85

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)03-0034-05

空间环境中,对生物体最主要的影响因素是空间辐射、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。目前,国外在空间生命科学研究中,对空间环境在整体水平的生物效应方面研究较多,细胞水平的研究还处于初级阶段,空间环境影响生物体特别是动物体的作用机制还不清楚。细胞是构成生命有机体的基本结构和功能单位。早在 1925 年,著名的细胞生物学家 B. Wilson 就指出:生命科学问题的答案必定从细胞中去寻找。细胞水平上的空间生物学研究是空间生物学发展的基础。

本实验中,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,筛选出性状变异明显的空间诱变 B16 细胞株,检测空间诱变 B16 细胞基因和蛋白质表达的变化。将筛选出的空间诱变 B16 细胞接种于 C57BL/6 小鼠,检测荷瘤小鼠移植瘤细胞 Melan-A 和 VEGF 的表达情况;利用 RT-PCR 方法检测蛋白质水平上表达变化明显的空间诱变 B16 细胞的 melan-a, gp100, bag-3 和 l-pgds 基因的表达情况。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

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;卫星搭载舱内为 1 个大气压,温度为 15℃~26℃;飞行近地点轨道高度约为 175 km,远地点高度约为 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,获得了 110 株空间诱变的 B16 细胞,按顺序编号。从中选取 10 株,内部编号为 3[#], 4[#],

9[#], 10[#], 11[#], 12[#], 13[#], 14[#], 15[#] 和 16[#] 的空间诱变 B16 细胞,进行体外和体内实验,筛选出形态、增殖和周期性性状变异明显的空间诱变 B16 细胞 4 株(4[#], 9[#], 11[#] 和 15[#]),作为本次实验的对象。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的 B16 细胞。

1.2 细胞培养

将空间诱变 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 移植瘤蛋白质表达

1.3.1 移植瘤获取

常规培养筛选出的空间诱变、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,共计 5×10⁵ 个细胞,每株实验细胞接种 10 只小鼠。至皮下接种实验细胞的荷瘤小鼠生存至 2 周时,处死,分离荷瘤小鼠移植瘤,利用 4%多聚甲醛固定分离出的荷瘤小鼠移植瘤,制作成石蜡切片。

1.3.2 免疫组化显色

按以下步骤进行免疫组化,检测

荷瘤小鼠移植瘤细胞 Melan-A 和 VEGF 蛋白质的表达情况。石蜡切片脱蜡至水;3% H₂O₂ 室温孵育,以消除内源性过氧化物酶的活性;1.5%正常非免疫血清封闭,室温孵育;滴加适当比例稀释的一抗,孵育;滴加适当比例稀释的生物素标记二抗,孵育;滴加适当比例稀释的辣根酶标记链霉卵白素,孵育;DAB 显色剂显色;苏木素复染,盐酸分化,氨水返蓝,上行至二甲苯,封片,镜下观察,拍照。

1.3.3 图片分析

电荷耦合器件 (Charge Coupled Device, CCD) 采集免疫组化表达信息,利用图像处理软件 Image Pro Plus 定量分析各实验组的蛋白表达水平。

1.4 基因表达检测

根据以上实验结果,从 4 株空间诱变 B16 细胞中选择蛋白质水平上表达变化较为明显的 11[#] 空间诱变 B16 细胞,利用 RT-PCR 方法检测其 melan-a, gp100, bag-3 和 l-pgds 基因的离体表达情况。

1.4.1 RNA 提取

常规培养 11[#] 空间诱变 B16 细胞至对数生长期,用 Trizol 溶解细胞成悬液,然后加入冷氯仿、异丙醇和 75%乙醇,4℃ 13 500 r/min 间隔离心,抽提法提取 RNA。

表 1 RT-PCR 反应引物序列

Table 1 Primes sequence of RT-PCR

	引物	Sequence (5'-3')	循环数	T _m /℃	扩增片段
β actin	sense	TCT ACG AGG GCT ATG CTC TCC	25	54	303 bp
	antisense	GGA TGC CAC AGG ATT CCA TAC			
melan-a	sense	GGG GCA CAG ACG CTC CTA T	30	54	243 bp
	antisense	ACG GGC TGA TGG GAT TTC T			
gp100	sense	TGC CCA TCT GGT CCT AAA	30	54	207 bp
	antisense	GGT TGA ACT GGC GTG AGC			
l-pgds	sense	ATG CTG TGG ATG GGT TTG G	30	54	397 bp
	antisense	CIT GGT GCC TCT GCT GAA T			
bag-3	sense	GTA GAC CCT GAA GGA CGA GC	30	54	240 bp
	antisense	TTG GCT TTC AGT TTG TGG AT			

1.4.2 RT-PCR

将 mRNA 逆转录为 cDNA, 在 PCR 反应体系中同时加入内参照 β -actin 和扩增目标片段引物(见表 1), 同时扩增出内参照和目标片段产物。将扩增出的 PCR 产物于含有 EB 的 2%琼脂糖凝胶中进行电泳, 分离扩增的目标片段条带。

1.4.3 图片分析

利用图像采集系统拍照, 并用图像分析软件 Scion Image 分析各条带灰度值, 比较各实验细胞基因表达的水平。

1.5 统计学分析

对实验所得数据应用 SPSS 10.0 统计软件进行处理, 对计量资料则利用独立样本 t 检验并进行分析, $P < 0.05$ 则认为有显著性差异。

2 结果

2.1 移植瘤细胞蛋白表达

免疫组化结果表明: 与野生型 B16 细胞相比, 11[#] 空间诱变 B16 细胞荷瘤小鼠移植瘤细胞的 Melan-A 和 VEGF 蛋白表达明显增加, 其他细胞的 2 种蛋白质表达无明显变化(见图 1 和表 2、表 3)。

2.2 空间诱变 B16 细胞基因表达变化

选择 11[#] 空间诱变 B16 细胞, 检测其 4 种基因的表达水平, RT-PCR 结果显示: melan-a, gp100 和 l-pgds 基因表达增加, bag-3 基因表达降低(见表 4 和图 2~图 5)。

3 讨论和结论

宇宙飞行过程中, 由于受到空间辐射的影响, 植物种子和微生物染色体可能产生突变, 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性的。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,

表 2 空间诱变 B16 细胞荷瘤小鼠移植瘤的 Melan-A 蛋白表达(积分光密度)
Table 2 Expression of Melan-A in inoculating tumor cells (light intensity)

组别	Con	Gro	4 [#]	9 [#]	11 [#]	15 [#]
均数	341 026	449 896	336 262	354 842	852 333	291 710
标准差	124 248	238 482	188 709	121 809	445 281	167 660
t		1.13	0.06	0.23	3.12	0.67
P		0.23	0.96	0.83	0.01	0.52

注: t 值和 P 值为各组与野生组的独立 t 检验结果。

表 3 空间诱变 B16 细胞荷瘤小鼠移植瘤的 VEGF 蛋白表达(积分光密度)
Table 3 Expression of VEGF in inoculating tumor cells (light intensity)

组别	Con	Gro	4 [#]	9 [#]	11 [#]	15 [#]
均数	243 867	180 425	257 347	194 104	1 311 668	260 178
标准差	56 991	59 762	92 845	47 804	388 521	72 560
t		2.00	0.30	1.64	6.66	0.43
P		0.07	0.77	0.13	0	0.67

注: t 值和 P 值为各组与野生组的独立 t 检验结果。

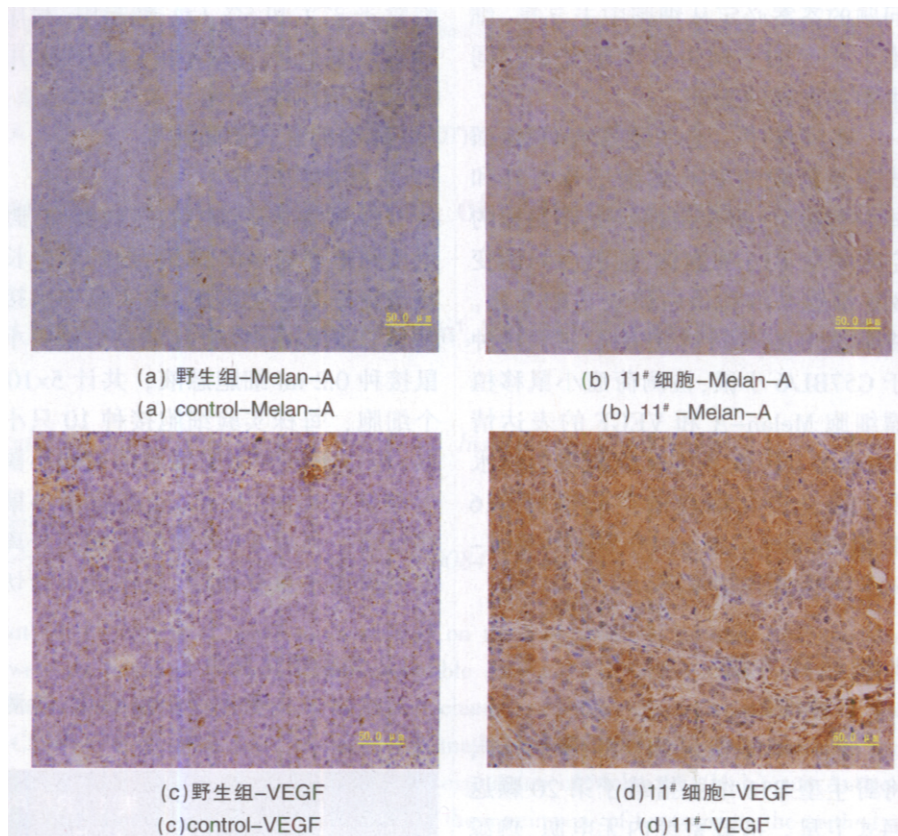


图 1 空间诱变 B16 细胞荷瘤小鼠肿瘤组织的蛋白质表达

Fig. 1 Expression of proteins of transplanted space B16 tumor cells

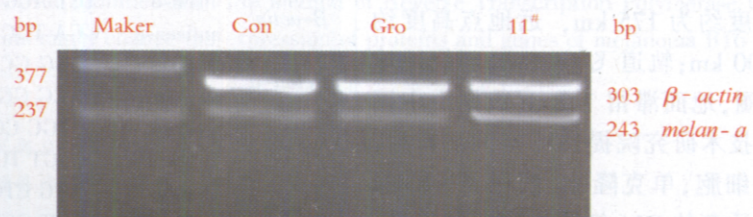


图 2 空间诱变 B16 细胞的 melan-a 基因表达变化

Fig. 2 Expression change of space B16 cells melan-a gene

表 4 空间诱变 B16 细胞基因表达变化(光密度)
Table 4 Expression of genes of space B16 cells (light intensity)

基因	组别	野生组				地面组			11 [#]		
		X $\pm$		t		P		X $\pm$		t	
gp100		0.16 $\pm$ 0.03		0.17 $\pm$ 0.05		0.87		0.28 $\pm$ 0.04		6.41	
melan-a		0.31 $\pm$ 0.02		0.30 $\pm$ 0.04		0.39		0.42 $\pm$ 0.02		7.94	
l-pgds		0.29 $\pm$ 0.04		0.53 $\pm$ 0.07		7.29		1.07 $\pm$ 0.12		13.92	
bag-3		0.59 $\pm$ 0.04		0.70 $\pm$ 0.10		2.18		0.53 $\pm$ 0.02		2.53	
						0.07				0.04	

注: t 值和 P 值为各组与野生组的独立 t 检验结果。

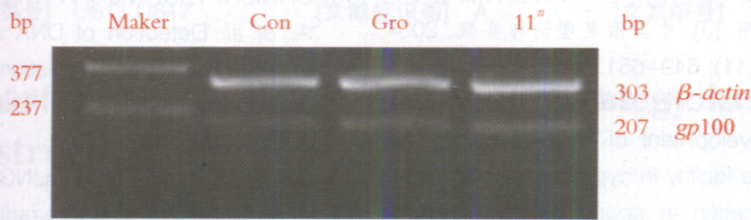


图 3 空间诱变 B16 细胞的 gp100 基因表达变化
Fig. 3 Expression change of space B16 cells gp100 gene

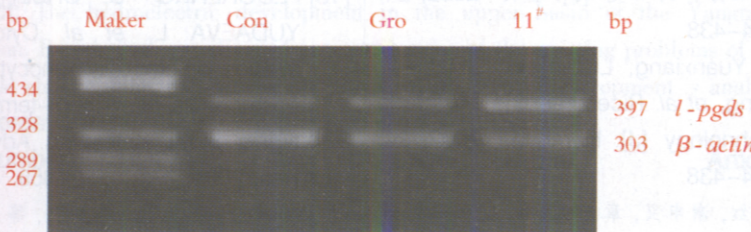


图 4 空间诱变 B16 细胞的 l-pgds 基因表达变化
Fig. 4 Expression change of space B16 cells l-pgds gene



图 5 空间诱变 B16 细胞的 bag-3 基因表达变化
Fig. 5 Expression change of space B16 cells bag-3 gene

引发细胞修复系统进行修复。当损伤较严重而修复系统未能及时修复时,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中的时间密切相关,时间越长损伤越严重,而且微重力还可能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]。

本实验选择了 Melan-A 和 VEGF 作为荷瘤小鼠移植瘤细胞蛋白质水平上的检测指标,研究空间环

境对 B16 细胞免疫原性和血管形成能力的影响。

Melan-A 亦称 T 细胞 1 识别的黑色素瘤抗原 (Melanoma Antigen Recognized by T cells-1, MART-1),被几乎所有新鲜的黑色素瘤标本所表达,其他正常组织不表达,且是最易为体外黑色素瘤的多肽激活的外周血淋巴细胞 (PBL) 和肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 所识别的黑色素瘤相关抗原,是一种抗原性较强的蛋白。VEGF 是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂素,它不仅能增加微血管的通透性,促进血浆纤维蛋白外渗,为血管形成过程中的多种细胞迁移提供一个纤维网络;还能通过与内皮细胞上特殊受体的结合,直接刺激内皮细胞的分裂、游走和增殖,从而促进血管形成^[11]。近年来,在人和动物的多种肿瘤组织中发现了 VEGF 的过度表达,且其过度表达与肿瘤的侵袭、转移密切相关^[12]。

免疫组化结果显示:与野生型 B16 细胞相比,11[#] 空间诱变 B16 细胞荷瘤小鼠移植瘤细胞的 Melan-A 和 VEGF 蛋白表达明显增加,其他细胞两种蛋白质的表达无明显变化。Melan-A 表达增加表明,11[#] 空间诱变 B16 细胞免疫原性可能增加。11[#] 空间诱变 B16 细胞荷瘤小鼠移植瘤体积较小,内部血管增生较少,但移植瘤上的 VEGF 表达却明显增加,此实验结果有待进一步讨论。

本实验选择了 melan-a, gp100, l-pgds 和 bag-3 基因作为 11[#] 空间诱

变 B16 细胞基因水平上的检测指标, 研究空间环境对 B16 细胞免疫原性、分化和抗凋亡能力的影响。

脑型 PGDS (Lipocalin - type prostaglandin D synthase, L- PGDS) 又称谷胱甘肽非依赖性 PGDS, 主要存在于脑、心脏、脊索、血清、睾丸、附睾、精浆及羊水中。PGD2 是 L- PGDS 催化生成的产物, 它具有抗肿瘤的效应, 在体外和体内均具有抑制肿瘤细胞增殖的作用。PGD2 也可抑制接种人卵巢癌的裸鼠的肿瘤生长, 延长裸鼠生存期, 但是, PGD2 却可促使肺癌细胞及其支持血管生长。目前, 对于 L- PGDS 对黑色素瘤细胞作用的研究较少。根据前期基因芯片结果提示, 11[#] 空间诱变 B16 细胞的 l- pgds 基因表达增加。利用本实验可以验证基因芯片结果, 检测 11[#] 空间诱变 B16 细胞 l- pgds 基因的表达情况, 探讨 l- pgds 基因的生物学作用。bag- 3 是一种新发现的抗凋亡蛋白, 能与抗凋亡蛋白 Bcl- 2 结合并发挥协同作用, 拮抗 Bax 和 FasI/Fas 介导的细胞凋亡作用。根据前期基因芯片结果提示, 11[#] 空间诱变 B16 细胞 bag- 3 基因表达增加。利用本实验可以验证基因芯片结果, 检测 11[#] 空间诱变 B16 细胞 bag- 3 基因的表达情况, 研究 11[#] 空间诱变 B16 细胞抗凋亡能力变化情况。

RT- PCR 结果显示: melan- a, gp100 和 l- pgds 基因表达增加, bag- 3 基因表达降低。melan- a, gp100 和 l- pgds 基因表达增加, 表明 11[#] 空间诱变 B16 细胞免疫原性可能有所增加; bag- 3 基因表达降低, 表明 11[#] 空间诱变 B16 细胞抗凋亡能力降低。

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基因和蛋白质表达方面无明显性差异, 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。

前期研究发现, 空间环境可以诱导黑色素瘤 B16 细胞形态、黑色素分泌、增殖、细胞周期、成瘤性、免疫原性等生物学特性产生变异, 这可能与空间诱变 B16 细胞基因及蛋白质水平上的变化有关。

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 Radiat Res, 2002,(s): s13- 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 Radiat Res, 2002, 43(s): s129- 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, AKAIEVA 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 Radiat Res, 2002, 43(s): s133- s136.
- [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 (s1): 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] 彭瑞云, 王德文, 高亚兵, 等. 大鼠皮肤伤口内 VEGF 基因表达的定量病理研究. 中国体视学与图像分析, 2001, 6(2): 95- 98.
PENG Ruiyun, WANG Dewen, GAO Yabing, et al. Quantitative studies on the expression of VEGF in rat skin wounds [J]. Chin J Stereol Ima Ana, 2001, 6(2): 95- 98.
- [12] 高冬玲, 郝志芳, 殷智榕, 等. 卵巢上皮性肿瘤组织中微血管密度与 VEGF 的表达 [J]. 郑州大学学报 (医学版), 2002, 37(2): 179- 181.
GAO Dongling, HAO Zhifang, YIN Zhirong, et al. Relationships between vascular endothelial growth factor and tumor micro- vessel density in cases of epithelial ovarian neoplasm [J]. J Zhengzhou Univ (Med Sci ed), 2002, 37 (2): 179- 181.

(责任编辑 朱宇)