

太空环境改变生物工程细胞 CHO(dhfr⁻)的生长特性*

徐 梅 向 青 房 青 李红艳 徐 波 高福云 唐劲天**

(中日友好医院临床医学研究所肿瘤学 分子生物学研究室 北京 100029)

摘要 目的:了解太空诱变对生物工程细胞 CHO(dhfr⁻) 生长特性的影响。方法:将 CHO(dhfr⁻) 生物工程细胞株搭载于我国第 18 颗返回式卫星,经 18 天太空飞行,回收后对存活细胞进行单克隆化,获得 159 株单克隆细胞。选取生长快、慢不同的 3 株克隆,利用光镜、MIT 法、FCM 分析及 ³H 掺入法观察细胞生长特性。结果:经太空诱变后,CHO(dhfr⁻) 细胞呈多种形态;G1 期细胞显著增多;生长速度和大分子生物合成呈现多向性变化,无特定规律性。结论:太空环境可影响生物工程细胞 CHO(dhfr⁻) 的生长特性,为进一步筛选优化的生物工程细胞提供了可能。

关键词 太空 CHO(dhfr⁻) 细胞 生长特性

太空环境具有强宇宙射线辐射、微重力、微磁场等。已有的太空生物学研究表明:太空环境的复合作用易诱导细胞产生变异^[1,2]。生物工程细胞 CHO(dhfr⁻) 是从中国仓鼠卵巢中分离的一株缺乏二氢叶酸还原酶(dehydrofolate reductase negative, dhfr⁻) 的上皮细胞,是广泛应用于生物制药的哺乳动物基因表达受体细胞之一^[3]。在本课题中我们将体外培养的 CHO(dhfr⁻) 搭载于我国第 18 颗返回式卫星,观察特殊空间环境对 CHO(dhfr⁻) 细胞生长特性的影响,以探索经太空诱变的某些细胞株能否变异为有利于总蛋白或特异性蛋白表达能力增强的生物工程细胞株。

1 材料与方法

1.1 细胞搭载条件

将 CHO(dhfr⁻) 细胞(由基础医学细胞中心提供)在本课题组建立的基因工程细胞太空搭载系统(已申报专利)^[4]中培养(此系统具有无热源、无 CO₂、不需换液等特点),经地面预实验成功后搭载于我国第 18 颗返回式卫星配重舱内,舱内条件为 1 个大气压,温度(4~40℃),在卫星发射基地前后共滞留 8 天,以近地点 200km,远地点 350km 的高度,

绕地球飞行 18 天,期间经历太阳风暴。

1.2 细胞单克隆化

经卫星搭载的 CHO(dhfr⁻) 细胞返地后,换新鲜太空细胞培养液(成分见专利)^[4],置 37℃ 5% CO₂ 孵箱中培养 8 小时,胰酶消化,重悬,接种于 96 孔细胞培养板进行单克隆化,共得到了 159 株单克隆细胞。

1.3 实验分组

将地面正常培养的 CHO(dhfr⁻) 细胞作为正常对照组(control),从搭载后得到 159 株单克隆细胞株中,选出生长快慢不同的 3 株作为太空细胞组,编号分别为:CHO20, CHO25, CHO35,培养传至第 5 代后进行下述实验。

1.4 细胞形态观察

相差光学显微镜(日本 Olympus TL4)下,观察各组细胞形态并拍照(200 倍)。

1.5 MIT 法测定细胞的生长曲线

将对数生长期的 CHO(dhfr⁻) 细胞胰酶消化后,以 1×10^4 细胞/每孔密度接种于 24 孔细胞培养板,37℃,5% CO₂ 培养 6 天。用 MIT 法^[5]测定 OD 值,连续 5 日作生长曲线。

1.6 流式细胞仪测定细胞的周期

以 1×10^5 细胞/每孔密度接种于 6 孔板,37℃,5% CO₂ 培养 72 小时后,胰酶消化, PBS 洗两次,70% 乙醇固定,PI 染色,流式细胞仪检测。

收稿日期:2004-06-01 修回日期:2004-08-18

* 国家科技部基础平台资助项目(2004 年度)

** 通讯作者,电子信箱: xumeimana@yahoo.com.cn

1.7 ³H 掺入测定细胞大分子生物合成

取对数生长期的各组细胞接种于 6 孔板中, 每孔 1×10^5 细胞, 37℃5% CO₂ 培养 72 小时后, 分别加氚-胸腺嘧啶 (³H-TdR, 80Ci/mmol), 氚-腺嘧啶 (³H-UdR 46Ci/mmol), 氚-亮氨酸 (³H-LeU, 186Ci/mmol), 2μCi/ml, 继续培养 12 小时, 胰酶消化, 收集细胞于 96 孔板, 用细胞收集器冲洗于硝酸纤维素膜上, 液闪计数仪计数。

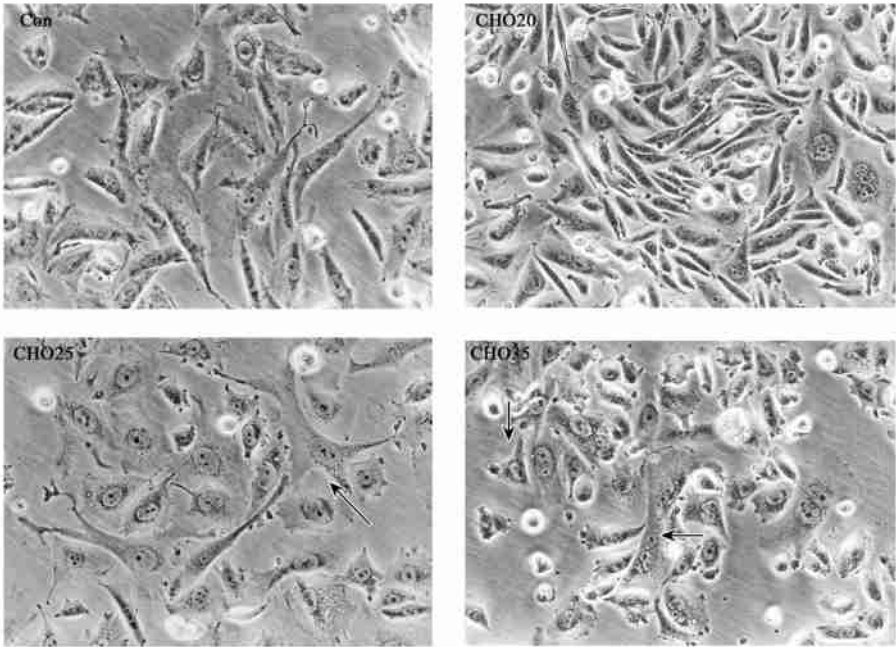


图 1 CHO(dhfr⁻) 细胞呈多种形态
箭头所示: CHO20 细长细胞, CHO25 巨大细胞, CHO35 不规则型细胞
Fig. 1 Variety morphological of CHO(dhfr⁻) cells
Arrow: CHO20 long and narrow cells; CHO25 giant cells; CHO35 variety morphological cells

2.2 太空环境对 CHO(dhfr⁻) 细胞的生长速度的影响

细胞培养 5 天, 每天用 MIT 法测定细胞数, 并绘制细胞生长曲线, 结果如图 2 所示, 与正常对照组相比, 太空组细胞生长速度发生改变。

2.3 太空环境改变 CHO(dhfr⁻) 细胞周期分布

流式细胞仪分析表明太空组细胞与正常对照组相比, 细胞周期出现明显变化, G1 期细胞显著增多, S 期细胞明显减少, 见表 1。

2.4 太空环境对 CHO(dhfr⁻) 细胞大分子合成的影响

如图 3 所示, 经太空环境作用下不同的 CHO(dhfr⁻) 细胞克隆株其大分子生物合成量各不相同。

2 结 果

2.1 太空对 CHO(dhfr⁻) 细胞形态的影响

CHO(dhfr⁻) 细胞经太空环境飞行后, 在大小和形状等方面发生改变, 如 CHO20 细胞体积变小, 出现一些细长细胞; CHO25 细胞体积增大, 出现巨大细胞; CHO35 细胞体积大小不均, 形状不规则 (图 1)。

同。

表 1 太空环境对生物工程细胞 CHO(dhfr⁻) 细胞周期的影响

Groups	G1 ± SD (%)	S ± SD (%)	G2+ M ± SD (%)
Control	31. 80 ± 0. 57	40. 75 ± 2. 62	27. 45 ± 2. 10
CHO20	44. 65 ± 1. 48*	28. 75 ± 1. 62*	26. 60 ± 0. 49
CHO25	49. 65 ± 0. 07*	21. 15 ± 0. 35*	29. 15 ± 0. 50
CHO35	52. 30 ± 0. 70*	18. 80 ± 1. 14*	28. 90 ± 0. 71

* compared with control $p < 0. 05$ $n = 3$

与正常对照组相比, CHO35 的 DNA, RNA, 蛋白质分别增加了 65%, 103%, 36%。CHO25 蛋白质合成增加了 161%。CHO20 的 DNA 合成增加 187%。

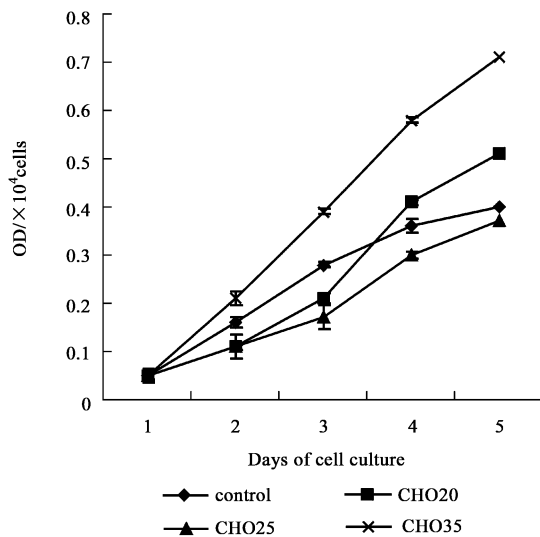


图 2 CHO (dhfr⁻) 细胞的生长曲线

Fig 2 CHO (dhfr⁻) cells growth curves

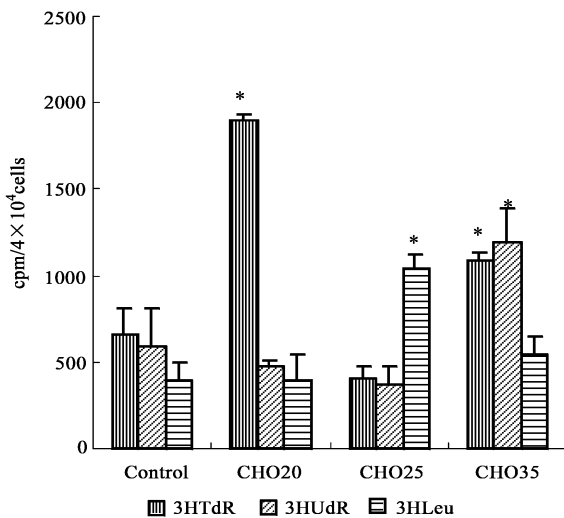


图 3 太空环境对 CHO (dhfr⁻) 细胞 DNA, RNA 及蛋白质合成的影响

Fig 3 Effects of outer space on biosynthesis of DNA, RNA and protein of CHO (dhfr⁻) cells compared with the control $p < 0.05$

3 讨 论

太空的生物学研究表明:重力的改变可以导致细胞生理功能的变化^[9],离子辐射亦可改变细胞的生长特性^[7]。太空的特殊环境不仅可影响细胞的生理特性,还可影响细胞内某些基因的表达^[8],太空环境的复合作用,更易于改变细胞的基因表达、信号传导、骨架结构等^[9]。本课题组曾将 3 株肿瘤

细胞搭载于“神州 4 号”飞船,存活的细胞与地面对照相比,生长速度减慢;G1 期细胞增多;对血管内皮细胞粘附力减弱,但经过 2~3 代后粘附力明显增强^[10,11];同时,TGF、IL8 等细胞因子表达改变。

在生物工程制药中,为了得到更多的目的蛋白,可通过改造宿主细胞特性,如增殖加快,延长细胞周期,蛋白质合成增加等来提高药物的产量^[12]。我国利用太空诱变改良微生物制药菌种曾取得了很好的效果。如红曲霉菌经太空诱变,可以筛选出他汀含量增高的菌株^[13]。抗真菌抗生素 Nikko 霉素生产菌株经卫星搭载后,筛选出的空间变异株,抗生素产量可提高 18%^[14]。CHO (dhfr⁻) 细胞是广泛应用的哺乳动物基因表达受体细胞之一,在一定条件下能稳定保持适合多种蛋白质的分泌表达和胞内表达的性质。经查新检索还没有获得利用太空环境优化诱变哺乳动物细胞表达系统 CHO (dhfr⁻) 的研究报道。

本课题研究太空环境对 CHO (dhfr⁻) 细胞生长特性的影响,探讨太空特殊生存条件是否能对哺乳动物细胞表达系统 CHO (dhfr⁻) 产生优化作用。我们的研究表明:太空环境使 CHO (dhfr⁻) 细胞出现了多种形态的变化,显示太空诱变可能导致细胞向多个方向变异,提示了可能影响其结构和功能,改变 CHO (dhfr⁻) 细胞的生理特性。上述实验均为第 5 代细胞,这种变化是否是可遗传变异,还有待于继续观察。CHO (dhfr⁻) 细胞经太空环境作用后,G1 期细胞显著增多,S 期明显减少。

同时,由于射线造成的 DNA 损伤有多种形式,其中包括单个碱基的突变、单链损伤、双链断裂。突变的基因可引起细胞产生变异^[15],一些与细胞增殖相关的基因发生变化(如 myc, ras 等)则影响了 CHO (dhfr⁻) 细胞生长的速度,因此,虽太空诱变 CHO (dhfr⁻) 细胞 G1 期均被延长,但在上述综合因素的作用下,较对照组细胞相比出现快、慢不一的生长速度。在本实验所选用的 3 组大分子生物合成中,没有出现一定的规律,可能是由于在复制、转录及翻译过程中,太空环境对相关基因造成多方面的影响及细胞存在的个体差异,最终导致大分子生物合成没有呈现规律性变化。同时,由于本次搭载历经太阳风暴更增加了影响因素的复杂性。3 株细胞中初步观察到 CHO35 生长速度加快,G1 期细胞明显增多,DNA, RNA, 及蛋白质均有不同程度的增多,是否可能作为目标蛋白合成的有用载体尚需

进一步实验观察。另外, 我们曾用一株克隆编号为 CHO1 的太空诱变细胞进行上述实验, 生长速度显著减慢, 以至无法同时完成大分子生物合成的实验内容。上述变化也提示, 太空复合作用, 对同一种细胞的不同个体造成影响各不相同。

综上所述, 太空环境对生物工程细胞 CHO(dhfr⁻) 生长特性影响是多方面的, 这些影响在不同的细胞个体间存在明显差异, 而造成这些差异的分子机制尚需进行进一步的实验研究。而正是这种单克隆细胞株之间的差异, 为我们从中筛选出优化的哺乳动物基因表达受体细胞提供了可能。

参考文献

- [1] Zhukov V, Verezhnikov N N, Volkov M N, Maisky I N, et al. Experiments with microorganisms and human cell cultures in the Zond 7 flights. *Life Sci Space Res*, 1971, 9: 99~ 103
- [2] Michurina T V, Domaratkaya E I, Nikonova T M. et al. Blood and clonogenic hematopoietic cells of newts after the space flight. *Adv Space Res*, 1995, 16: 235~ 238
- [3] 王耀东, 陈志和, 宋未, 等. 返回式科学卫星搭载食用菌的空间生物学效应. *航天医学与医学工程*, 1998, 11(4): 249~ 253
- [4] 房青, 唐劲天, 向青, 等. 基因工程细胞的太空搭载装置. *中华人民共和国 200410008829. 2*, 2004, 3
- [5] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and

survial: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55

- [6] Davis T A, Wiesmann W, Kidwell W, et al. Effect of space flight on human stem cell hematopoiesis: suppression of erythropoiesis and myelopoiesis. *J Leukoe Biol*, 1996, 60(1): 69~ 76
- [7] Ogai V B, Novoselova E G, Makar V R, et al. Seasonal changes in tumor necrosis factor production in hibernating animals in normal conditions and under the effects of electromagnetic and ionizing radiation. *Radiat Biol Radioecol*, 2002, 42: 141~ 146
- [8] Freed L E, Vunjak Novakovic G. Spaceflight bioreactor studies of cells and tissues. *Adv Space Biol Med*, 2002, 8: 177~ 195
- [9] Bakos A, Varkonyi A, Minarovits J, et al. Effect of simulated microgravity on the production of IL-12 by PBMCs. *J Gravit Physiol*, 2002, 9(1): 293~ 294
- [10] 向青, 房青, 陈志华, 等. 太空环境对肿瘤细胞生理特性的影响. *空间科学学报*, 2004, 5(4): 1~ 5
- [11] 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. *中日友好医院学报*, 2003, 17(4): 229~ 231
- [12] De Boer L, Gray P P, Sunstrom N A. Enhanced productivity of G1 phase Chinese hamster ovary cells using the GADD153 promoter. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(1): 61~ 65
- [13] 印红, 谢申义, 章光明, 等. 空间飞行对红曲霉菌产量的影响. *航天医学与医学工程*, 2003, 16(5): 374~ 376
- [14] 中国返回式卫星搭载实验研究数据汇编. 1999, 369~ 370
- [15] Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, et al. Skeletal muscle gene expression in space flown rats. *FASEB J*, 2004, 18(3): 522~ 524

Effects of Spaceflight on CHO(dhfr⁻) Cells Growth Characteristics

XU Mei XIANG Qing FANG Qing LI Hong-yan XU Bo GAO Fuyun TANG Jirrtian

(Department of Oncology and Molecular Biology, Institute of Clinical Medical Sciences, China Japan Friendship Hospital Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of spaceflight on CHO(dhfr⁻) cells growth characteristics
Methods: CHO(dhfr⁻) cells were loaded and flight 18days on the No. 18 recovered satellite. All survival cells were monocoloned and 159 cell lines were obtained. 3 cell lines selected randomly were used as cell models, the experimental methods such as cell morphological observation, MIT assay, FACS and 3H incorporation were used for analysis of cell growth characteristics. Results: Comparing with the control group, CHO(dhfr⁻) cells appeared multiple cell morphological changes and the cell number of G1 phase was increased markedly ($p < 0.05$). Growth rate, biosynthesis of nucleic acid and protein in mutated cells were varied without specifically disciplinarian. Conclusion: The data suggested that effects of spaceflight on growth characteristics were complicated and multiplex in CHO(dhfr⁻) cells.

Key words Outer space CHO(dhfr⁻) cell Growth charateristic