

## • 专题 •

空间诱变致生长减慢 CHO(dhfr<sup>-</sup>) 细胞株的特性

李红艳 徐梅 向青 房青 徐波 高福云 刘国铃 唐劲天\*

[摘要] 目的 了解空间环境下生物工程细胞 CHO(dhfr<sup>-</sup>) 在形态、生长和周期等方面的变化。方法 将 CHO(dhfr<sup>-</sup>) 生物工程细胞株搭载于我国第 18 颗返回式卫星, 返地的细胞在倍增之前进行单克隆化。从中随机选取 4 株细胞, 经 5 代培养确定一株生长速度最慢的细胞株, 利用光镜、MTT 法、FCM 分析法观察细胞生长特性。结果 返地后的 CHO(dhfr<sup>-</sup>) 细胞经过单克隆化、扩增, 获得 159 个细胞株。经空间诱变后的细胞出现细胞形态改变、生长增殖速度减慢、G1 期细胞明显增多。结论 生物工程 CHO(dhfr<sup>-</sup>) 细胞经空间诱变可引起生长特性的改变, 为筛选优化的生物工程制药细胞提供可能。

[关键词] CHO(dhfr<sup>-</sup>) 细胞; 空间; 生长特性

Characteristic of growth decreased CHO(dhfr<sup>-</sup>) cell line mutated by outer space LI Hong-yan, XU Mei, XIANG Qing, et al. Department of Biochemistry and Molecular Biology, China-Japan Friendship Clinical Medicine Institute, Beijing 100029, China

[Abstract] Objective To investigate the changes of the morphology, growth and cycle of CHO(dhfr<sup>-</sup>) cells after space flight. Methods CHO(dhfr<sup>-</sup>) cells were carried in the No. 18 recoverable satellite and monocloned harvesting cells before multiplying. 4 cell lines were selected randomly, and the growth characteristics of the most slowly growing one at the fifth passage was observed by methods of MTT and FCM as well as the cells' shape. Results 159 cell strains were obtained after monocloning and multiplying. The cells' morphology changes, growth speed decrease and the number of G1 phase increased markedly. Conclusion Space flight induced morphological changes of cells and it is impossible to screen out finer bioengineering cells.

[Key words] CHO(dhfr<sup>-</sup>) cell; outer space; growth characteristic

中图分类号: R85 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2004)11-0647-02

[本文著录格式] 李红艳, 徐梅, 向青, 等. 空间诱变致生长减慢 CHO(dhfr<sup>-</sup>) 细胞株的特性[J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10(11): 647-648.

生物工程细胞 CHO(dhfr<sup>-</sup>) 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<sup>-</sup>)、且广泛应用于生物制药的哺乳动物基因表达受体细胞之一<sup>[1]</sup>。在生物工程制药中, 可通过改造宿主细胞特性来提高药物的产量。因空间环境受强宇宙射线辐射、微重力、微磁场等综合因素的影响; 且已有空间生物学研究表明, 空间的特殊环境作用易诱导细胞产生变异<sup>[2-3]</sup>。我们将培养状态的 CHO(dhfr<sup>-</sup>) 搭载于我国第 18 颗返回式卫星, 观察特殊空间环境对 CHO(dhfr<sup>-</sup>) 细胞生长特性的影响, 以探索经空间诱变的细胞株能否变异成为有利于总蛋白或特异性蛋白的表达的生物工程细胞株。

## 1 材料与方法

1.1 细胞搭载条件 将 CHO(dhfr<sup>-</sup>) 细胞(由基础医学细胞中心提供)在本课题组研制的细胞空间搭载装置<sup>[4]</sup>中培养(此系统具有无热源、无 CO<sub>2</sub>、不需换液等特点), 固定于我国第 18 颗返回式卫星配重舱内, 舱内条件为 1 个大气压, 温度 18℃-30℃, 细胞在卫星发射基地滞留 8 d, 绕地球飞行 18 d, 期间经历 2 次太阳风暴。

基金项目: 国家科技部“973”前期[2003(CA04200)]; 国家自然科学基金(No. 30371324)。

作者单位: 100029 北京市, 中日友好医院临床医学研究所生化及分子生物学研究室。作者简介: 李红艳(1967-), 女, 北京市人, 主管技师, 主要研究方向: 肿瘤及生化分子生物学。\*通讯作者: 唐劲天。

1.2 细胞单克隆化 细胞返地后, 更换新鲜空间细胞培养液(成分见专利<sup>[4]</sup>), 置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中复温 8 h, 胰酶消化, 适量培养基重悬, 接种于 96 孔细胞培养板进行单克隆化。扩增培养后共得到了 159 株单克隆细胞。

1.3 实验分组 将地面正常培养的 CHO(dhfr<sup>-</sup>) 细胞作为正常对照组, 在搭载后得到 159 株单克隆细胞株中, 随机选取 4 株细胞, 经各项实验确定一株生长速度最慢的细胞, 编号为 CHOI, 培养传至第 5 代后进行实验。

1.4 细胞形态观察 将正常对照组细胞与 CHOI 细胞在相差 33 倍光学显微镜(日本 Olympus TL4)下观察细胞形态并拍照。

1.5 MTT 法测定细胞的生长曲线 将对数生长期的 2 组细胞分别胰酶消化后接种于 24 孔细胞培养板, 每孔  $1 \times 10^4$  个细胞, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养 6 d。用 MTT 法<sup>[5]</sup>测定 OD 值, 连续 5 d 作生长曲线。

1.6 流式细胞仪测定细胞的周期 细胞接种于 6 孔板, 每孔  $1 \times 10^5$  细胞, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养 3 d 后, 胰酶消化, PBS 洗两次, 70% 乙醇固定, PI 染色, 流式细胞仪检测。

## 2 结果

2.1 细胞形态 与正常对照组相比, CHOI 细胞大小不均, 形状不规则。见图 1。

2.2 细胞的生长速度 与正常对照组相比, CHOI 细胞生长速度发生明显改变, 其中第 3 d 的抑制率为

56.62 %。见图 2。

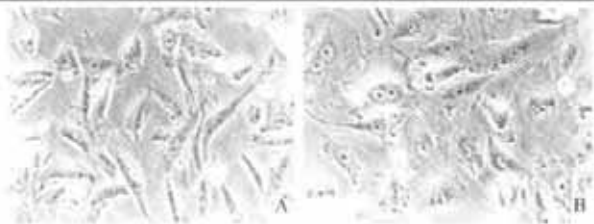


图 1 CHO(dhfr<sup>-</sup>) 细胞的形态

A: 正常对照组; B: CHO1

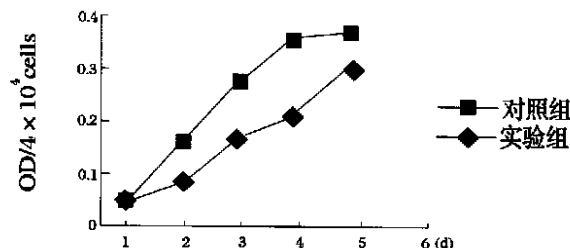


图 2 CHO(dhfr<sup>-</sup>) 细胞的生长曲线

2.3 细胞周期分布 CHO1 细胞在 G<sub>1</sub> 期为 (64.3 ± 4.81) %, 在 S 期为 (9.55 ± 2.47) %, 在 G<sub>2</sub> + M 期为 (26.1 ± 2.4) %。与正常对照组相比, G<sub>1</sub> 期增加, S 期减少 (均  $P < 0.05$ )。见图 3。

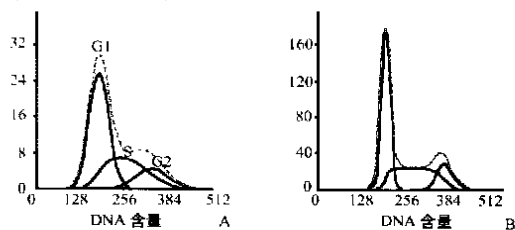


图 3 空间环境对生物工程细胞 CHO (dhfr<sup>-</sup>) 细胞周期的影响

A: 正常对照组; B: CHO1

### 3 讨论

在生物工程制药中, 可通过改造宿主细胞特性, 如延长细胞周期, 提高工程细胞原始表达水平等来提高药物的产量<sup>[6]</sup>。基因工程技术也使一些新型药物如核酸、蛋白质类药物的产量增加, 成本降低。而 CHO (dhfr<sup>-</sup>) 作为重要的基因表达受体细胞, 已成功应用于表达促红细胞生成素 (EPO)、重组乙型肝炎疫苗等生物制药领域<sup>[7]</sup>。我国在利用空间诱变改良微生物制药菌种及植物种子等方面已取得了很好的成果<sup>[8-9]</sup>。

空间特殊环境包括辐射、微重力、微磁场等。空间生物学研究表明, 重力的改变可以导致细胞生理功能的显著变化, 影响细胞的增殖与分化<sup>[10]</sup>, 而离子辐射是主要影响因素<sup>[11]</sup>。空间辐射可导致细胞形态的变化: 小鼠黑色素瘤 B16 细胞经空间诱变后, 细胞核由椭圆型趋于圆形, 染色质聚集, 核仁变化不明显<sup>[12]</sup>; 大鼠胚胎层神经元细胞空间飞行 15 d 后, 胶质细胞成片状, 核不明显, 其形成的突起也明显减少<sup>[6]</sup>。

细胞周期是细胞生命活动的基本过程, 正常的细胞周期保证 DNA 在 S 期能得到准确复制。而空间特殊环境可能导致细胞周期的改变: 4 株培养的猴肾细胞株 JTC-12 空间飞行 8 d 后, 其细胞增值速度减慢, 细胞贴壁延迟<sup>[13]</sup>。我们曾将肿瘤细胞搭载于飞船, 存活细胞的生长速度减慢, G<sub>1</sub> 期细胞明显增多<sup>[12]</sup>。

在上述研究的基础上, 本课题组将 CHO (dhfr<sup>-</sup>) 细胞搭载于返回式卫星, 研究空间环境对 CHO (dhfr<sup>-</sup>) 细胞生长特性的影响。我们的研究表明, 空间特殊环境使 CHO (dhfr<sup>-</sup>) 细胞形态的周期发生了很大改变, 其中细胞周期的改变可能是由于空间中各种射线辐射导致细胞 DNA 突变和损伤, 引起抑癌基因 p53 过表达, 作为转录因子, 进而诱导 p21、mdm2 及 GADD45 等基因的表达, 启动了细胞的自动修复机制, 使细胞停滞在 G<sub>1</sub> 期, 使细胞有机会修复其 DNA<sup>[14]</sup>。空间诱变对其生长特性的影响导致结构与功能发生了改变。

空间诱变后的 CHO (dhfr<sup>-</sup>) 细胞, 虽然在细胞周期延长等方面有利于提高目的蛋白的产量, 但最终是否符合生物制药细胞的各项指标要求, 成为一株优化的生物工程宿主细胞还需进一步的研究。

### [参考文献]

- [1] 王耀东, 陈志明, 宋未, 等. 返回式科学卫星搭载食用菌的空间生物学效应[J]. 航天医学与医学工程, 1998, 11(4): 249 - 253.
- [2] Zhukov V, Verezhnikov NN, Volkov MN, Maisky IN, et al. Experiments with micro-organisms and human cell cultures in the Zond 7 flights[J]. Life Sci Space Res, 1971, 9: 99 - 103.
- [3] Michurina TV, Domaratskaya EI, Nikonova TM, et al. Blood and clonogenic hematopoietic cells of newts after the space flight[J]. Adv Space Res, 1995, 16: 235 - 238.
- [4] 房青, 唐劲天, 向青, 等. 基因工程细胞的太空搭载装置[P]. 中华人民共和国: 20041000829.2, 2004 - 3.
- [5] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55.
- [6] De Boer L, Gray PP, Sunstrom NA. Enhanced productivity of G<sub>1</sub> phase Chinese hamster ovary cells using the GADD153 promoter[J]. Biotechnol Lett, 2004, 26(1): 61 - 65.
- [7] 李校堃, 袁辉. 基因工程药物的制备原理与应用[M]. 广州: 暨南大学出版社, 2003. 204 - 219.
- [8] 中国空间技术研究院. 中国返回式卫星搭载实验研究数据汇编[C]. 北京: 1999. 图 32.37.
- [9] 中国空间技术研究院. 中国返回式卫星搭载实验研究数据汇编[C]. 北京: 1999. 416 - 417.
- [10] Davis TA, Wiesmann W, Kidwell W, et al. Effect of space flight on human stem cell hematopoiesis: suppression of erythropoiesis and myelopoiesis[J]. J Leukoc Biol, 1996, 60(1): 69 - 76.
- [11] Ogai VB, Novoselova EG, Makar VR, et al. Seasonal changes in tumor necrosis factor production in hibernating animals in normal conditions and under the effects of electromagnetic and ionizing radiation[J]. Radiat Biol Radioecol, 2002, 42: 141 - 146.
- [12] 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 - 232.
- [13] Sato A, Kumei Y, Sato K, et al. Studies on the effects of microgravity on the ultrastructure and function of cultured mammalian cells[J]. Biol Sci Space, 2001, 15(Suppl): S61 - S63.
- [14] Ohnishi T, Takahashi A, Ohnishi K, et al. DNA damage formation and p53 accumulation in mammalian cells exposed to the space environment[J]. Biol Sci Space, 1999, 13(2): 82 - 87.

(收稿日期: 2004-10-13)