

回转器模拟失重对 SGC-7901 细胞增生和周期的影响

朱 鸣, 吴本俨, 聂捷琳, 李莹辉

朱鸣, 吴本俨, 解放军总医院南楼消化科 北京市 100853
聂捷琳, 李莹辉, 航天医院工程研究所第十三研究室 北京市 100094
朱鸣, 女, 1969-02-04 生, 浙江省宁波市人, 汉族, 2002 年军医进修学院医学硕士, 主治医师, 主要从事胃肠道免疫方面的研究。
总装备部预研基金项目, No. 51400020204JB1002
通讯作者: 吴本俨, 100853, 北京市复兴路 28 号, 解放军总医院南楼消化科。
zm6924@vip.sina.com
电话: 010-66937393
收稿日期: 2005-01-31 接受日期: 2005-02-26

Effects of rotating clinostat simulated weightlessness on cell proliferation and cell cycle of human gastric carcinoma cell line SGC-7901

Ming Zhu, Ben-Yan Wu, Jie-Lin Nie, Ying-Hui Li

Ming Zhu, Ben-Yan Wu, Department of Gastroenterology, South Building, the General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Jie-Lin Nie, Ying-Hui Li, the 13th laboratory of Institute of Space Medico-Engineering, Beijing 100094, China
Supported by the Preparative Research Foundation of the Main Equipment Department, No. 51400020204JB1002
Correspondence to: Ben-Yan Wu, Department of Gastroenterology, South Building, the General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. zm6924@vip.sina.com
Received: 2005-01-31 Accepted: 2005-02-26

Abstract

AIM: To investigate the effect of simulated weightlessness on cell cycle and proliferation of human gastric carcinoma cell line SGC-7901.

METHODS: A rotating clinostat was used to simulate weightlessness. The expression of PCNA was examined by immunohistochemical staining. The changes of cell cycle were examined by flow cytometry.

RESULTS: The expression of PCNA did not change significantly after 12 h, 24 h, and 36 h of simulated weightlessness, but decreased significantly after 48 h and 72 h ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). The cell cycle of 12 h, 24 h, and 36 h groups did not change significantly. However, the cells in G_0+G_1 phase in 48 h and 72 h groups were increased significantly ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively), while the cells in $S+G_2+M$ phase were decreased significantly ($P < 0.01$ and $P < 0.05$).

CONCLUSION: Simulated weightlessness by a clinostat can prevent the transition of cells from G_1 phase to S phase, and thus the proliferation of SGC-7901 cells was inhibited.

Key Words: Simulated weightlessness; Gastric cancer; Cell proliferation; Cell cycle

Zhu M, Wu BY, Nie JL, Li YH. Effects of rotating clinostat simulated weightlessness on cell proliferation and cell cycle of human gastric carcinoma cell line SGC-7901. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(7):856-859

摘要

目的: 探讨模拟失重对胃癌 SGC-7901 细胞的细胞增生和细胞周期的影响。

方法: 采用回转器模拟失重, 用免疫组化法观察 SGC-7901 细胞 PCNA 表达的变化, 并用流式细胞仪测定其细胞周期的变化。

结果: 模拟失重后 12, 24, 36 h 回转组 PCNA 抗体阳性细胞比率与对照组相比无明显差异, 48, 72 h 回转组的 PCNA 抗体阳性细胞明显减少 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$)。12, 24, 36 h 回转组的细胞周期与对照组相比无明显差异, 48, 72 h 后 G_0+G_1 期细胞显著增多 ($P < 0.01$ 及 $P < 0.05$), $S+G_2+M$ 期细胞则显著减少 ($P < 0.01$ 及 $P < 0.05$)。

结论: 回转器模拟失重抑制 SGC-7901 细胞的增生, 抑制细胞 G_1 期向 S 期的转化。

关键词: 模拟失重; 胃癌; 细胞增生; 细胞周期

朱鸣, 吴本俨, 聂捷琳, 李莹辉. 回转器模拟失重对 SGC-7901 细胞增生和周期的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(7):856-859
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/856.asp>

0 引言

太空飞行可导致骨质疏松^[1]、肌肉萎缩^[2]、贫血和免疫抑制^[3], 这给我们带来一个疑问: 在太空中细胞的活性是否都有所下降? 细胞活性的降低是否是细胞分化、细胞周期、细胞增生和细胞凋亡的结果? 尤其是肿瘤细胞的活性是否也下降? 以往未见对失重状态下胃癌细胞的研究, 我们把胃癌 SGC-7901 细胞置于回转器模拟失重的状态下, 观察其细胞增生和细胞周期的变化。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌细胞系 SGC-7901 细胞为本实验室所保存; DMEM 培养基及灭活小牛血清, 由华美公司提供;

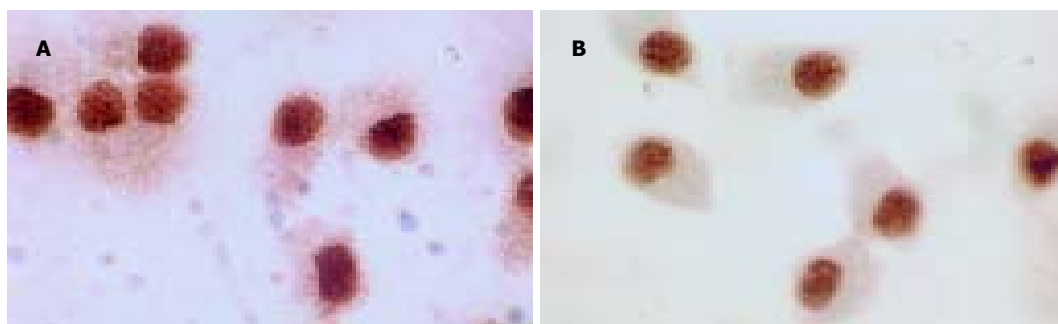


图1 12 h SGC-7901 细胞 PCNA 抗体的表达 SABC $\times 400$. A: 回转组; B: 对照组.

MG3 型回转器, 生物物理所研制; PCNA 抗体、PV9000 及 DAB 染色液, 由中山公司提供; FACSCalibur (B-D 公司, 美国) 型流式细胞仪.

1.2 方法 接种 SGC-7901 细胞 60 瓶 (20 mL), 密度 2×10^5 /瓶, 加入 DMEM 培养基 (含 100 mL/L 灭活小牛血清, 100 kU/L 的双抗, 50 g/L 碳酸氢钠, 调 pH 至 7.2) 5 mL. 24 h 待细胞完全贴壁后, 瓶中灌满培养基, 将其随机分为两组, 每组各 30 瓶. 一组放置在回转器 (30 r/min, 37°C) 中培养, 另一组正常生长作为对照. 分别在模拟失重 12, 24, 36, 48 和 72 h 后, 两组各取 6 瓶细胞, 取出细胞爬片, 用 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗, 700 mL/L 乙醇固定 30 min 以上, PBS 清洗后, 采用二步法免疫组化检测 PCNA 抗体. 细胞爬片用 30 mL/L 过氧化氢孵育 10 min, 用正常山羊血清封闭 30 min, 滴加一抗, 室温过夜; TBS 洗 3 次, 各 5 min 后, 滴加 PV-9000, 37°C 孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染, 甘油明胶封片, 显微镜下观察. 阴

性对照 用和第一抗体同比稀释的正常兔血清代替第一抗体染色. 在光学显微镜下分别计数 PCNA 抗体阳性细胞的密度 (阳性细胞百分比). 分别在模拟失重 12, 24, 36, 48 和 72 h 后, 两组各取 6 瓶细胞, 以胰蛋白酶消化后离心收集细胞, 悬于 1 mL 700 mL/L 冷乙醇, 4°C 冰箱中保存至少 24 h. 测定时, 将细胞离心 (1 500 r/min, 5 min) 收集, 用 PBS 清洗后悬细胞于 50 mg/L 的核糖核酸酶 (ribonuclease, RNase) A 中 30 min, 再加入 PI (50 mg/L) 染色 30 min 后, 在流式细胞仪上进行细胞周期测定. 测出各周期细胞所占百分比.

统计学处理 采用 *t* 检验比较回转组与对照组间的差异.

2 结果

SGC-7901 胃癌细胞形态多样、大小不一. PCNA 抗体阳性细胞的胞核呈棕色, 背景清晰 (图 1A-B; 图 2A-B; 图 3A-

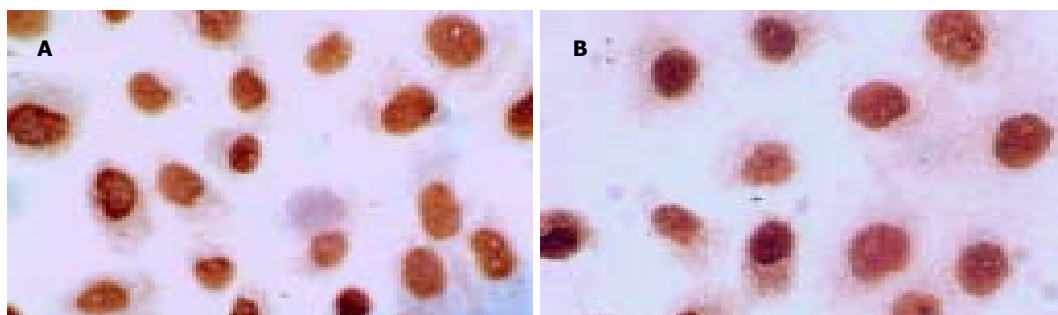


图2 24 h SGC-7901 细胞 PCNA 抗体的表达 SABC $\times 400$. A: 回转组; B: 对照组.

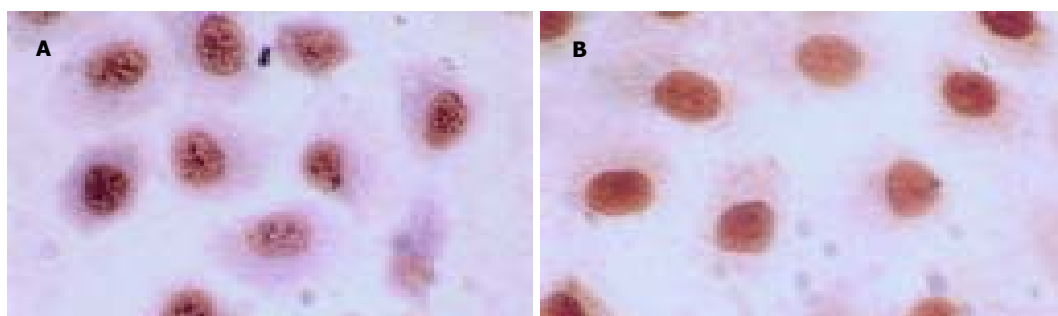


图3 36 h SGC-7901 细胞 PCNA 抗体的表达 SABC $\times 400$. A: 回转组; B: 对照组.

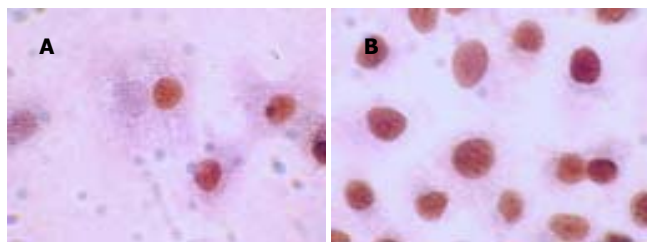


图4 48 h SGC-7901 细胞 PCNA 抗体的表达 SABC $\times 400$. A: 回转组; B: 对照组.

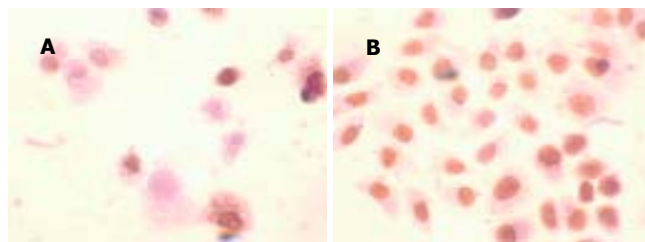


图5 72 h SGC-7901 细胞 PCNA 抗体的表达 SABC $\times 400$. A: 回转组; B: 对照组.

表1 模拟失重作用下 SGC-7901 细胞的 PCNA 表达和细胞周期(mean \pm SD, %, $n = 6$)

分组		12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
对照	PCNA	92.0 \pm 1.09	93.2 \pm 2.70	97.0 \pm 0.93	93.2 \pm 1.13	95.1 \pm 1.95
	G ₀ +G ₁	46.8 \pm 3.76	57.2 \pm 4.33	63.7 \pm 1.82	55.8 \pm 2.29	57.5 \pm 3.49
	G ₂ +M	13.0 \pm 5.85	19.1 \pm 5.47	3.7 \pm 1.61	3.1 \pm 1.07	4.1 \pm 2.21
	S	40.1 \pm 2.95	23.8 \pm 2.67	32.6 \pm 2.04	41.2 \pm 2.89	38.6 \pm 4.87
	G ₂ +M+S	53.2 \pm 3.76	42.8 \pm 4.33	36.3 \pm 1.82	44.2 \pm 2.29	42.7 \pm 3.44
回转	PCNA	90.4 \pm 2.75	94.1 \pm 1.32	91.9 \pm 2.32	87.1 \pm 2.17 ^a	86.0 \pm 1.56 ^b
	G ₀ +G ₁	44.1 \pm 5.04	63.2 \pm 3.98	67.7 \pm 4.23	71.0 \pm 3.92 ^b	67.0 \pm 1.98 ^a
	G ₂ +M	11.4 \pm 5.32	9.4 \pm 3.07	4.7 \pm 1.53	11.3 \pm 6.40	5.7 \pm 1.89
	S	44.5 \pm 3.80	27.4 \pm 2.55	27.8 \pm 5.53	17.9 \pm 5.98	27.2 \pm 2.98
	G ₂ +M+S	56.0 \pm 5.04	36.8 \pm 3.95	32.5 \pm 4.26	29.2 \pm 3.97	33.0 \pm 1.98

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

B;图4A-B;图5A-B). 阴性对照切片未见特异性着色. 与正常对照组相比, 回转组 12, 24 及 36 h 的 PCNA 抗体阳性细胞的比率无明显差异; 48, 72 h 回转组 PCNA 抗体阳性细胞比率明显减少($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$, 表 1). 12, 24, 36 h 回转组的 G₀+G₁ 期、S 期和 G₂+M 期细胞比例与对照组相比无明显差异, 48, 72 h 回转组 G₀+G₁ 期细胞比例较对照组明显增多($P < 0.01$ 及 $P < 0.05$, 表 1), 单独比较 48, 72 h 组的 S 期及 G₂+M 期细胞比例, 无统计学差异, 但 S 期与 G₂+M 期细胞之和较对照组显著减少($P < 0.01$ 及 $P < 0.05$, 表 1).

3 讨论

PCNA 的表达与细胞周期有关, 能反映全部细胞的增生情况, 故常将 PCNA 作为衡量组织内细胞增生水平的客观指标之一^[4]. PCNA 的表达能够较好地反映胃腺癌的浸润、转移能力^[5-6]. 我们以细胞中 PCNA 抗体的表达研究细胞增生的变化, 并用流式细胞仪测试 SGC-7901 细胞的细胞周期的变化. 因为在太空中做试验受到许多条件的限制, 有一种地面模拟失重的方法是利用回转器^[7], 达到模拟微重力的效果, 常用于单细胞生物实验^[8]. 本实验显示在回转器模拟失重条件下胃癌细胞的增生受到抑制, G₀+G₁ 期细胞的比例增加, 推测在模拟失重状态下, 胃癌细胞细胞周期的正常转化

受到一定的影响, 使一部分细胞停滞在 G₀、G₁ 期, 延迟了向 S 期的转化, 并进一步导致细胞延迟进入 G₂+M 期. 这与以往关于失重或模拟失重状态下肿瘤细胞增生和周期变化的研究基本一致, 在回转器模拟失重状态下, 人大肠癌细胞 MIP-101 较对照增生比率降低, 而凋亡比率增高^[9]; 人前列腺癌细胞 DU-145 生长慢、增生少、分化好^[10]; 一种转染 Sp2/0 骨髓瘤细胞系 P3A2 的生长显著减少^[11]; 模拟失重可导致人甲状腺滤泡细胞 ML-1 进入早期细胞程序死亡^[12-14]. 人乳腺癌细胞 MCF-7 放入太空舱内飞行后, 细胞增生也减少了^[15]. 但是在回转器模拟失重状态下, 人胰腺癌 NOR-P1 细胞较对照组出现较多的有丝分裂细胞 (Ki-67 阳性细胞) 和较少的凋亡细胞^[16].

失重对正常细胞的增生和周期的影响也基本是抑制的: 在回转器模拟失重后, 人骨髓 CD34⁺ 细胞细胞分化、移行的潜力和细胞周期的进行都可被显著抑制^[17-18]; 成骨细胞增生受到抑制^[19], G₁ 期细胞显著增多, 而 S 期细胞则显著减少, G₂+M 期的细胞也明显少于对照组^[20]; 其数量减少或凋亡增多^[21-22]; C6 神经胶质细胞回转器模拟失重 30 min 后出现典型的凋亡改变, 但是 20 或 32 h 后凋亡的细胞减少^[23-25]; 人血管内皮细胞细胞增生的活力明显下降^[26]. 但是, 回转器中红细胞倍增的时间仅是 1 g 对照组的一半, 细胞凋亡则没有区别^[27].

综上所述, 失重对大多数细胞的增生是抑制的, 并可发生细胞周期的阻滞. 与之相关的因素有: 细胞凋亡增加、线粒体和微管的破坏和重分布^[14], 信号转导系统发生变化^[10], 另外, 调控细胞增生的基因发生改变, 如: 抑癌基因 p53 增加^[28], 大鼠骨骼肌细胞和成骨细胞的增生的基因被抑制^[29-30]. 我们希望发现模拟失重对胃癌细胞细胞增生和周期的影响, 并在这种新的模型下对其生物学行为的变化进行研究, 进而更深入地了解肿瘤细胞的生存、生长规律.

4 参考文献

- Nakamura H, Kumei Y, Morita S, Shimokawa H, Ohya K, Shinomiya K. Suppression of osteoblastic phenotypes and modulation of pro- and anti-apoptotic features in normal human osteoblastic cells under a vector-averaged gravity condition. *J Med Dent Sci* 2003;50:167-176
- Shenkman BS, Nemirovskaya TL, Belozerova IN, Mazin MG, Matveeva OA. Mitochondrial adaptations in skeletal muscle cells in mammals exposed to gravitational unloading. *J Gravit Physiol* 2002;9:159-162
- Plett PA, Abonour R, Frankovitz SM, Orschell CM. Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 2004;32:773-781
- 赵岚, 吴坤, 邱隽. 临床胃癌 Fas、PCNA 表达与癌浸润转移的关系. *卫生毒理学杂志* 2002;16:76-78
- 邱文才, 陈刚, 席时富, 章宜芬, 张丽华, 孟凡青, 丁义涛. PCNA, C-erbB-2, Cyclin D1 及 MMP2 的表达与胃癌预后因子的相关性分析. *中国普通外科杂志* 2004;13:300-302
- 徐妙生, 李光, 王丽霞. 幽门螺杆菌感染及 PCNA 表达与胃癌的相关性研究. *临床荟萃* 2001;16:729-730
- Huitema C, Beaudette LA, Trevors JT. Simulated microgravity (SMG) and bacteria. *Riv Biol* 2002;95:497-503
- Klaus DM. Clinostats and bioreactors. *Gravit Space Biol Bull* 2001;14:55-64
- Jessup JM, Frantz M, Sonmez-Alpan E, Locker J, Skena K, Waller H, Battle P, Nachman A, Bhatti, Weber ME, Thomas DA, Curbeam RL Jr, Baker TL, Goodwin TJ. Microgravity culture reduces apoptosis and increases the differentiation of a human colorectal carcinoma cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2000;36:367-373
- Clejan S, O'Connor K, Rosensweig N. Tri-dimensional prostate cell cultures in simulated microgravity and induced changes in lipid second messengers and signal transduction. *J Cell Mol Med* 2001;5:60-73
- Foster LJ, Catzel D, Atwa S, Zarka M, Mahler SM. Increase in synthesis of human monoclonal antibodies by transfected Sp2/0 myeloma mouse cell line under conditions of microgravity. *Biotechnol Lett* 2003;25:1271-1274
- Kossmehl P, Shakibaei M, Cogoli A, Pickenhahn H, Paul M, Grimm D. Simulated microgravity induces programmed cell death in human thyroid carcinoma cells. *J Gravit Physiol* 2002;9:P295-296
- Grimm D, Bauer J, Kossmehl P, Shakibaei M, Schoberger J, Pickenhahn H, Schulze-Tanzil G, Vetter R, Eilles C, Paul M, Cogoli A. Simulated microgravity alters differentiation and increases apoptosis in human follicular thyroid carcinoma cells. *FASEB J* 2002;16:604-606
- Kossmehl P, Shakibaei M, Cogoli A, Infanger M, Curcio F, Schonberger J, Eilles C, Bauer J, Pickenhahn H, Schulze-Tanzil G, Paul M, Grimm D. Weightlessness induced apoptosis in normal thyroid cells and papillary thyroid carcinoma cells via extrinsic and intrinsic pathways. *Endocrinology* 2003;144:4172-4179
- Vassy J, Portet S, Beil M, Millot G, Fauvel-Lafeve F, Gasset G, Schoevaert D. Weightlessness acts on human breast cancer cell line MCF-7. *Adv Space Res* 2003;32:1595-1603
- Nakamura K, Kuga H, Morisaki T, Baba E, Sato N, Mizumoto K, Sueishi K, Tanaka M, Katano M. Simulated microgravity culture system for a 3-D carcinoma tissue model. *Biotechniques* 2002;33:1068-1070
- Plett PA, Abonour R, Frankovitz SM, Orschell CM. Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 2004;32:773-781
- Plett PA, Frankovitz SM, Abonour R, Orschell-Traycoff CM. Proliferation of human hematopoietic bone marrow cells in simulated microgravity. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2001;37:73-78
- 孙联文, 庄逢源. 微重力导致航天员骨质疏松的研究进展. *中华航空航天医学杂志* 2004;15:54-58
- 张晓铀, 汪恭质, 丁柏, 李莹辉, 谭映军. 模拟失重对成骨样细胞细胞周期变化的影响. *中华航空航天医学杂志* 2000;11:43-45
- Bucaro MA, Fertala J, Adams CS, Steinbeck M, Ayyaswamy P, Mukundakrishnan K, Shapiro IM, Risbud MV. Bone cell survival in microgravity: evidence that modeled microgravity increases osteoblast sensitivity to apoptogens. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1027:64-73
- Basso N, Bellows CG, Heersche JN. Effect of simulated weightlessness on osteoprogenitor cell number and proliferation in young and adult rats. *Bone* 2005;36:173-183
- Uva BM, Masini MA, Sturla M, Bruzzone F, Giuliani M, Tagliaferro G, Strollo F. Microgravity-induced apoptosis in cultured glial cells. *Eur J Histochem* 2002;46:209-214
- Uva BM, Masini MA, Sturla M, Tagliaferro G, Strollo F. Microgravity-induced programmed cell death in astrocytes. *J Gravit Physiol* 2002;9:275-276
- Uva BM, Masini MA, Sturla M, Prato P, Passalacqua M, Giuliani M, Tagliaferro G, Strollo F. Clinorotation-induced weightlessness influences the cytoskeleton of glial cells in culture. *Brain Res* 2002;934:132-139
- Buravkova LB, Romanov YA. The role of cytoskeleton in cell changes under condition of simulated microgravity. *Acta Astronaut* 2001;48:647-650
- Sytkowski AJ, Davis KL. Erythroid cell growth and differentiation in vitro in the simulated microgravity environment of the NASA rotating wall vessel bioreactor. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2001;37:79-83
- Ohnishi T, Wang X, Fukuda S, Takahashi A, Ohnishi K, Nagaoka S. Accumulation of tumor suppressor p53 in rat muscle after a space flight. *Adv Space Res* 2000;25:2119-2122
- Taylor WE, Bhasin S, Lalani R, Datta A, Gonzalez-Cadavid NF. Alteration of gene expression profiles in skeletal muscle of rats exposed to microgravity during a spaceflight. *J Gravit Physiol* 2002;9:61-70
- 王冰, 张舒, 吴兴裕. 失重对成骨细胞基因表达和细胞功能影响的研究进展. *航天医学与医学工程* 2003;16:227-230

编辑 潘伯荣 审读 张海宁