

模拟微重力诱导 PC12 细胞衰老的初步探讨 *

汪丹丹 李呼伦 王菁华 刘怡希 王广友 孙 博 刘希君 穆莉莉[△]

(哈尔滨医科大学神经生物学教研室,黑龙江省高校神经生物学重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要 目的 构建模拟微重力条件下 PC12 细胞的培养体系,探讨模拟微重力对 PC12 细胞衰老的影响。方法 用 Cytodex-3 型微载体作为 PC12 细胞的贴附载体,旋转细胞培养系统所提供 10-2g 的微重力环境进行模拟微重力条件下的细胞培养。在倒置显微镜下观察 PC12 细胞的生长情况;用扫描电镜观察 PC12 细胞超微结构的变化;衰老相关 β 半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 特异性染色对衰老的 PC12 细胞进行评估。结果 光镜下模拟微重力培养的 PC12 细胞表现出类衰老细胞的形态,扫描电子显微镜下观察发现其微绒毛增多。SA- β -gal 染色的结果显示在模拟微重力的作用下,PC12 细胞 SA- β -gal 的活性升高。结论:模拟微重力可以引起 PC12 细胞衰老样的形态变化,以及 SA- β -gal 的活性升高。

关键词 细胞衰老 衰老相关 β 半乳糖苷酶 模拟微重力 PC12 细胞

中图分类号 Q813,R856.74 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 01-52-04

Influence of Simulated Microgravity on Cellular Senescence of PC12 Cells*

WANG Dan-dan, LI Hu-lun, WANG Jing-hua, LIU Yi-xi, WANG Guang-you, SUN Bo, LIU Xi-jun, MU Li-li[△]

(Department of Neurobiology, Harbin Medical University, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Neurobiology, 150081, Harbin, China)

ABSTRACT Objective: To develop PC12 cell culture system under the condition of simulated microgravity and to investigate the influence of simulated microgravity on cellular senescence of PC12 cells. **Methods:** Cytodex-3 micro-carriers were used as the adherent carrier of PC12 cells. The microgravity environment was simulated by a rotary cell culture system. The growth of PC12 cells cultured on micro-carriers was detected by inverted microscope. The ultrastructure was detected by the scanning electron microscope. Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) was employed to distinguish the senescent PC12 cells. **Results:** Simulated microgravity induced senescent-like morphologic changes, the microvillus were abundance on simulated microgravity cultured PC12 cells. The SA- β -gal activity was upregulated by simulated microgravity culture. **Conclusion:** Simulated microgravity induced senescent-like morphologic changes and upregulated SA- β -gal activity.

Key words: cell senescence; SA- β -gal; simulated microgravity; PC12 cell

Chinese Library Classification: Q813, R856.74 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)01-52-04

前言

随着近年来航天技术的飞跃发展和载人航天飞行取得的巨大成功,人们越来越重视对空间生命科学和空间生物技术的探索和研究^[1]。微重力是空间生物学研究的重要因素,是航天医学研究的侧重点之一^[2]。近些年的研究显示宇航员和飞行试验动物在飞行过程中或飞行后,他们的很多器官都发生了生理变化,这其中包括脑脊液流动改变^[3],体液电解质丧失^[4],肌肉萎缩^[5],免疫系统功能下降^[6,7],太空运动病等。科学家们在研究这些现象时发现失重对生物体造成的影响与老化有惊人的相似^[8]。这些提示在微重力环境下引发机体功能的改变可能与衰老有关。因此,本实验选择了肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 作为研究对象,体外模拟微重力条件,探讨微重力环境下对细胞衰老的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大鼠嗜铬细胞瘤细胞 (PC12) 为哈尔滨医科大学神经生物学教研室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 建立模拟微重力条件下的细胞培养体系 称取 0.05 g 微载体,用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 浸泡 3 h,高压蒸汽灭菌 15 磅 20 min,无菌条件下弃 PBS,DMEM 冲洗一次,换含血清的 DMEM 培养液浸泡,4℃ 备用;用前 1 h 放入 37℃ 孵箱预温后使用。取对数生长期的 PC12 细胞,加入消化液 (0.25%胰蛋白酶 + 0.02%EDTA) 消化贴壁细胞,弃去消化液,用含 10% 马血清和 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液将细胞吹打均匀,进行细胞计数,按 4×10^5 细胞 /ml 的密度接种于预先处理好的微载体上,放入硅烷化剂处理过的培养瓶中,将细胞与微载体充分混匀后置于 37℃,5% CO_2 ,饱和湿度孵箱内培养,24 h 后形成 PC12 细胞-微载体复合物。

* 基金项目 黑龙江医药卫生科技计划项目 (2009-206),哈尔滨医科大学研究生创新基金 (HCXB2008004)

作者简介 汪丹丹 (1973),女,硕士研究生,研究方向 神经生物学

[△]通讯作者 穆莉莉,女,Tel:0451-86662943 Email: mulili1982@yahoo.com.cn

(收稿日期 2010-10-05 接受日期 2010-10-31)

1.2.2 细胞的模拟微重力培养 将 PC12 细胞悬液或 PC12 细胞 - 微载体复合物或者神经细胞 - 微载体复合物转移入 HARV 中进行模拟微重力条件下的细胞培养。按照旋转细胞培养系统 (Rotary Cell Culture System, RCCS) 的说明书根据不同细胞的选择不同的转速,并在培养的过程中随时调整;另取等量的细胞 - 微载体复合物在硅烷化处理的培养瓶中进行培养,作为正常重力对照组。两组细胞都置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内,根据不同的实验要求选取不同的培养时间。

1.2.3 微载体培养细胞扫描电镜标本的制备 将收获的细胞 - 微载体复合物用 PB 液洗一次,静置 4-5min,弃上清后加两倍体积的 2.5%戊二醛磷酸缓冲液 4℃固定 12h,详细标记后送至哈尔滨医科大学电镜中心。

1.2.4 SA-β-gal 染色方法 在结束培养后,吸除细胞培养液,用 PBS 洗涤一次,加入 1 毫升 β-gal 染色固定液,室温固定 15min 吸除细胞固定液,用 PBS 洗 3 次,每次 3min 吸除 PBS,加入 1 毫升染色工作液 (10ul β-gal 染色液 A+10ul β-gal 染色

液 B+930ul β-gal 染色液 C+50ul X-gal 溶液);37℃水浴孵育过夜,PBS 清洗后用连有 CCD 的计算机观察并拍照。

2 结果

2.1 PC12 细胞在模拟微重力条件下的三维生长情况

将 PC12 细胞按 $4 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度分别接种于 HARV (模拟微重力条件)、经硅烷化处理的 25cm² 细胞培养瓶 (正常重力悬浮培养条件) 和未经硅烷化处理的 25cm² 细胞培养瓶 (正常重力贴壁培养条件) 中,于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的条件下继续培养 24 h。倒置相差显微镜下观察可见在模拟微重力条件下培养的 PC12 细胞呈三维结构生长,并在生长的过程中形成巨大集落,其直径为 $300.88 \pm 17.91 \mu\text{m}$ (图 1A),正常重力悬浮培养条件下培养的 PC12 细胞呈小集落生长,其直径为 $57.82 \pm 10.35 \mu\text{m}$ (图 1B),而正常重力贴壁培养条件下培养的 PC12 细胞并不形成集落 (图 1C)。

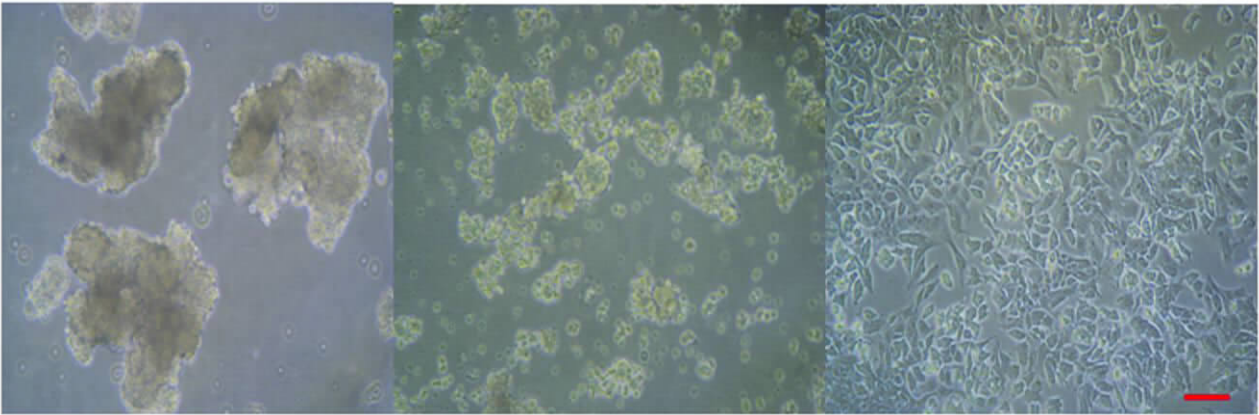


图 1 PC12 细胞在模拟微重力、正常重力悬浮培养和正常重力贴壁状态下的生长情况。(A) 模拟微重力条件下培养的 PC12 细胞;(B) 正常重力悬浮培养的 PC12 细胞;(C) 正常重力贴壁状态下培养的 PC12 细胞

Fig. 1 PC12 cells cultured under simulated microgravity, suspending and adherence conditions. (A) simulated microgravity culture; (B) suspending culture; (C) adherence culture Bar:100 μ m

2.2 模拟微重力条件对 PC12 细胞衰老的影响

将 PC12 细胞按 $4 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度种植在 Cytodex-3 型微载体上 (0.005g/ml) (图 2A),在经过硅烷化处理的 25cm² 培养瓶中培养 24 h,倒置显微镜下观察可见细胞在微载体上分布均匀,与微载体贴附紧密,形成 PC12 细胞 - 微载体复合物 (图 2B)。

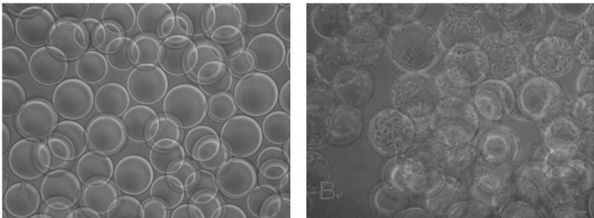


图 2 在微载体上生长的 PC12 细胞。(A) Cytodex-3 型微载体;(B) PC12 细胞 - 微载体复合物。

Fig. 2 PC12 cells cultured on Cytodex-3 microcarriers. (A) Cytodex-3 microcarrier; (B) PC12 cell-microcarrier complex. Bar:100 μ m

倒置显微镜观察模拟微重力培养 48 h 的 PC12 细胞,可见经过模拟微重力培养的部分 PC12 细胞胞体变大,变扁平,胞浆内颗粒增多,折光性增强,表现出类衰老细胞的形态 (图 3A)。在正常重力条件下培养的 PC12 细胞形态无明显变化 (图 3B)。

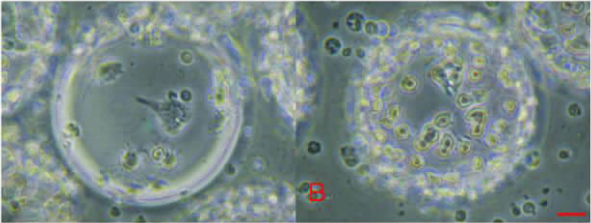


图 3 模拟微重力条件下培养的 PC12 细胞形态变化。(A) 模拟微重力培养的 PC12 细胞;(B) 正常重力条件下培养的 PC12 细胞。

Fig. 3 The morphologic changes of PC12 cells cultured under simulated microgravity. (A) PC12 cells cultured under simulated microgravity; (B) PC12 cells cultured under normal microgravity. Bar:25 μ m

由于衰老的细胞表面微绒毛会代偿性增多,我们用扫描电子显微镜进一步观察了模拟微重力和正常重力条件下培养的 PC12 细胞表面结构的变化,从图中可见模拟微重力培养 48 h 的 PC12 细胞表面有丰富的微绒毛存在(图 4A),而正常重力培养的 PC12 细胞表面比较光滑,微绒毛不丰富(图 4B)。

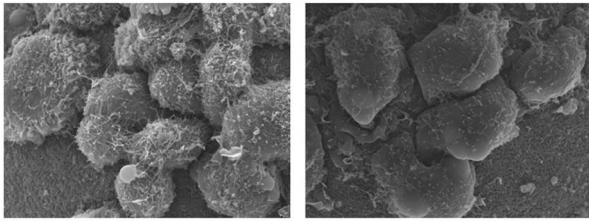


图 4 模拟微重力与正常重力条件下培养 PC12 细胞的扫描电镜观察。(A) 模拟微重力培养的 PC12 细胞;(B) 正常重力条件下培养的 PC12 细胞。

Fig. 4 The morphologic changes of simulated microgravity and normal gravity cultured PC12 cells under SEM. (A) PC12 cells cultured under simulated microgravity; (B) PC12 cells cultured under normal microgravity. ($\times 3500$)

鉴于如上模拟微重力条件下培养的 PC12 细胞表现出衰老样的形态,为了进一步探讨这种形态学变化是否和衰老有直接的关系,我们用 SA- β -gal 对模拟微重力条件下培养 48 h 的细胞进行衰老特异性染色,并用苏木素复染,上述胞体大而扁平的细胞呈蓝色的 SA- β -gal 阳性染色,没有衰老的细胞不被着色(图 5A)。局部放大后可见 SA- β -gal 染色阳性细胞胞浆内蓝染的溶酶体颗粒(图 5B)。

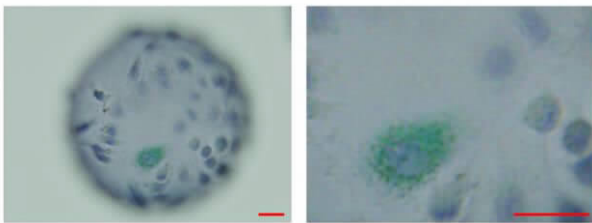


图 5 模拟微重力条件下培养的 PC12 细胞 SA- β -gal 染色。(A) SA- β -gal 染色阳性的 PC12 细胞;(B) SA- β -gal 染色阳性细胞局部放大

Fig.5 SA- β -gal stains of PC12 cells cultured under simulated microgravity. (A) a typical SA- β -gal positive cell; (B) local magnification of (A). Bar:25 μ m

3 讨论

失重飞行过程中,多数字航员表现出记忆力减退,运动、感觉障碍^[9],因此,失重环境对于神经系统乃至神经细胞的影响是不可忽视。在失重飞行后,机体对于失重的反应在运动系统、内分泌系统以及免疫系统中与机体衰老所发生的变化有着惊人的相似,而失重状态所造成记忆力减退更是机体衰老的特征改变。但失重是否可以在细胞层面上影响细胞的老化,从未有人证实。本实验首先利用 NASA 为模拟空间失重效应而设计的

RCCS 及其配套的 HARV 进行了 PC12 细胞微重力条件下培养体系的初步构建。PC12 细胞为贴壁细胞,在正常情况下呈单层生长,不形成集落。在 RCCS 培养的过程中,PC12 细胞呈三维生长,并在生长过程中形成巨大集落。尽管在经过硅烷化处理的培养瓶中 PC12 细胞也可以呈集落生长,但是在 RCCS 培养过程中所形成的 PC12 集落体积是在硅烷化处理的培养瓶中所形成集落体积的 140 倍,这种巨大集落在正常重力条件下是没有办法形成的^[10]。这种巨大的细胞集落与宇航员们在空间站中培养肝脏细胞所获得的结果相似。由此可以认为 RCCS 培养确实提供了一个类似微重力的细胞生长环境。

为了使 PC12 细胞在模拟微重力的环境下也能够贴壁生长,我们选择了 Cytodex-3 型微载体作为 PC12 细胞贴附的载体。PC12 细胞在 Cytodex-3 型微载体表面生长的过程中均匀分布,贴附紧密,形成 PC12 细胞-微载体复合物。在后续的实验里,我们采取首先将 PC12 细胞接种在 Cytodex-3 微载体上,而后转移入 RCCS 中进行培养的方法来模拟微重力条件。

在模拟微重力培养 48 h 后,通过光镜观察发现模拟微重力培养的 PC12 细胞中有部分细胞胞体变大,变扁平,表现出类似衰老细胞的形态。而相同培养时间正常重力培养组的 PC12 细胞却很少有这种变化。在扫描电子显微镜下观察模拟微重力培养和正常重力培养的 PC12 细胞,模拟微重力培养的 PC12 细胞表面微绒毛丰富而正常重力培养下的 PC12 细胞表面比较光滑。这种细胞膜上的微绒毛数目增加,其可能的原因是为了代偿衰老时细胞间联系的衰退,以利于保持细胞内环境的稳定。由于如上模拟微重力条件下培养的 PC12 细胞表现出衰老样的变化,为了进一步探讨这种形态学变化是否和细胞衰老有直接的关系,本实验用衰老特异性标志 SA- β -gal 对模拟微重力条件下培养 48 h 的细胞进行衰老特异性染色。在 SA- β -gal 染色过程中发现上述胞体大而扁平的细胞呈蓝色的 SA- β -gal 阳性染色。1995 年 Dimri 等学者发现体外培养的人二倍体成纤维细胞在 pH6 时其 β 半乳糖苷酶染色的阳性率随代龄增加而增加,并把这种中性条件下表达升高的 β 半乳糖苷酶定义为衰老相关的 β 半乳糖苷酶(SA- β -gal)^[11]。随后的研究发现,永生化细胞检测不到 SA- β -gal 活性,血清饥饿引发的细胞生长抑制也不能提高 SA- β -gal 活性,但正常衰老细胞或其他因素诱发的早老细胞其 SA- β -gal 活性均升高,且阳性率随衰老程度增加而增高,老年个体皮肤组织切片 SA- β -gal 阳性率显著高于年轻个体。多数细胞都能表达溶酶体 β 半乳糖苷酶,该酶最适 pH 为 4.5。衰老细胞及非衰老细胞在此 pH 条件下均可检测到 β 半乳糖苷酶。最近的研究表明,溶酶体的 β 半乳糖苷酶由基因 GLBI 编码表达,衰老细胞中 β 半乳糖苷酶阳性率升高与溶酶体 β 半乳糖苷酶蛋白增加有关。SA- β -gal 阳性率能较好地反应细胞群体或个体组织的老化速度,是反映衰老程度的重要生物学指标,并且被广泛认可和应用^[12]。由此,我们推测在模拟微重力培养的过程中,PC12 细胞表现出衰老样的变化。Kwon 等在模拟微重力培养的 PC12 细胞中观察到氧化应激的变化^[13],而氧化应激状态与细胞的衰老有着非常密切的关系^[14],因此本研究所观察到的现象是否与 PC12 的氧化应激有关还需要进一步的研究。

综上所述,本实验通过对模拟微重力条件下培养 PC12 细胞的研究,发现了模拟微重力对于 PC12 细胞具有诱导细胞衰老的作用,但是关于模拟微重力是如何影响 PC12 细胞衰老的细胞和分子生物学机制还有待更深入的发掘和探讨。

参考文献(References)

- [1] Clement JQ, Yokota H. Genomics in space life sciences [J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2008,6(1):1-3
- [2] Russomano T, Cardoso R, Duval V, et al. Space technologies used to improve health care in remote areas [J]. Aviat Space Environ Med, 2009,80(1):62-63
- [3] Stevens SA, Lakin WD, Penar PL. Modeling steady-state intracranial pressures in supine, head-down tilt and microgravity conditions [J]. Aviat Space Environ Med, 2005,76(4):329-338
- [4] Reddi LN, Xiao M, Steinberg SL. Discontinuous pore fluid distribution under microgravity--KC-135 flight investigations [J]. Soil Sci Soc Am J, 2005,69(3):593-598
- [5] Blottner D, Salanova M, Pü ttmann B, et al. Human skeletal muscle structure and function preserved by vibration muscle exercise following 55 days of bed rest [J]. Eur J Appl Physiol, 2006,97(3):261-271
- [6] Sonnenfeld G. Use of animal models for space flight physiology studies, with special focus on the immune system [J]. Gravit Space Biol Bull, 2005,18(2):31-35
- [7] Sonnenfeld G. The immune system in space, including Earth-based benefits of space-based research [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2005,6(4):343-349
- [8] Biolo G, Heer M, Narici M, Strollo F. Microgravity as a model of aging [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2003,6(1):31-40
- [9] Stoilova IM, Zdravev TK, Yanev TK. How human sleep in space--investigations during space flights [J]. Adv Space Res, 2003,31(6):1611-1615
- [10] Unsworth BR, Lelkes PI. Growing tissues in microgravity [J]. Nat Med, 1998, 4(8):901-907
- [11] Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci, 1995,92(20):9363-9367
- [12] Debaq CF, Erusalimsky JD, Campisi J, et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo [J]. Nat Protoc, 2009,4(12):1798-1806
- [13] Kwon O, Sartor M, Tomlinson CR, et al. Effect of simulated microgravity on oxidation-sensitive gene expression in PC12 cells [J]. Adv Space Res, 2006,38(6):1168-1176
- [14] Jennings BJ, Ozanne SE, Hales CN. Nutrition, oxidative damage, telomere shortening, and cellular senescence: individual or connected agents of aging [J]? Mol Genet Metab, 2000,71(1-2):32-42.
- [15] Sangiorgi E, Capecchi MR. Bmi1 lineage tracing identifies a self-renewing pancreatic acinar cell subpopulation capable of maintaining pancreatic organ homeostasis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(17):7101-7106
- [16] Dor Y, Brown J, Martinez OI, et al. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation [J]. Nature, 2004, 429:41-46
- [17] Zhang L, Teng C, An T. Progress in treating diabetes mellitus with adult stem cells [J]. Chin J Biotech, 2008, 24(2):177-182
- [18] Xu X, D'Hoker J, Stange G, et al. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas [J]. Cell, 2008, 132:197-207
- [19] Desai BM, Oliver KJ, De Leon DD, et al. Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet beta cell, regeneration [J]. J Clin Invest, 2007, 117(4):971-977
- [20] Sangiorgi E, Capecchi MR. Bmi1 lineage tracing identifies a self-renewing pancreatic acinar cell subpopulation capable of maintaining pancreatic organ homeostasis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(17): 7101-7106
- [21] Zhang L, Ju X, Wang F, et al. Cell lineage tracing of regenerating cells after partial pancreatectomy using pseudo-type retrovirus [J]. Chin J Biotech, 2008, 24(4):604-609

(上接第 29 页)