

法藤化环境对细胞的影响

2020 年研究报告

2021/2/8

NextGeM Inc.

【目的】

关于法藤化环境对生物的影响有各种各样的报告,显示会带来各种各样的身体症状的改善,但其详细的机制并未明确。NextGeM 株式会社一直以来都在对细胞水平,特别是细胞增殖以及细胞游走进行相关分析,虽然在法藤化环境中细胞的增生能力以及游走能力有亢进的倾向,但是变化是很微小的。得出的结论是,为了进行更详细的分析,捕捉一个细胞水平的变化是很重要的。

因此 2020 年,为了更详细地分析至今为止进行的关于在法藤化环境中对细胞影响的研究,目的已经不是是在以往的细胞集团中分析细胞增殖能力,而是对在 1 个细胞层面进行分析。

在细胞增殖能力的分析中使用了荧光色素 Cell Trace™ Violet,在不影响形态或生理功能的情况下可以长时间跟踪细胞分裂。另一方面,由于在法藤环境中细胞分裂亢进也暗示了有促进抗癌剂药效的可能性,所以也进行了在法藤环境中对抗癌剂 Etoposide 的药效评价。

【材料及方法】

(材料)

- Ba/F3 细胞 (小鼠 pro-B 细胞株) (RCB4476、理研细胞库)
- CellTrace™ Violet 细胞增殖抑制试剂 (Thermo Fisher Scientific, MA, U.S.)
- SYTOX™ Blue Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific, MA., U.S.A.)
- Etoposide (和光纯药,东京)
- 96 well plate (空白对照板·法藤化板) (Corning, NY, U.S.A)
- BD FACSAria™ III cell sorter 细胞分选设备 (Becton, Dickinson and Company, NJ, U.S.A.)
- BD FACSCanto™ II 流式细胞仪 (Becton, Dickinson and Company, NJ, U.S.A.)
- FlowJo™ 解析用软件 (Becton, Dickinson and Company, NJ, U.S.A.)

(细胞增殖能力的单细胞分析)

1. 使用 CellTrace™ Violet 进行细胞染色 (和产品说明书同一方法下实施)
2. 96 well 板进行 200 uL 的培养基分注 (法藤化板、未处理板)
3. 通过 BD FACSAria™ III 对 Ba/F3 细胞进行 1500 cells/well 排序 (n=16)
4. 在 CO2 保温培养箱中进行 37°C、72 小时的培养。

在同一保温箱内放置对照板和法藤化板。

但是,法藤化板用铅片 (厚度 3mm) 进行遮蔽,上下左右方向也尽量保持距离进行配置,培养 (图 1)。

5. 通过 BD FACSCanto™ II 进行荧光强度测定。
6. 使用 FlowJo™ 解析软件,检测活细胞数和细胞分裂次数。

CO₂ 培养箱

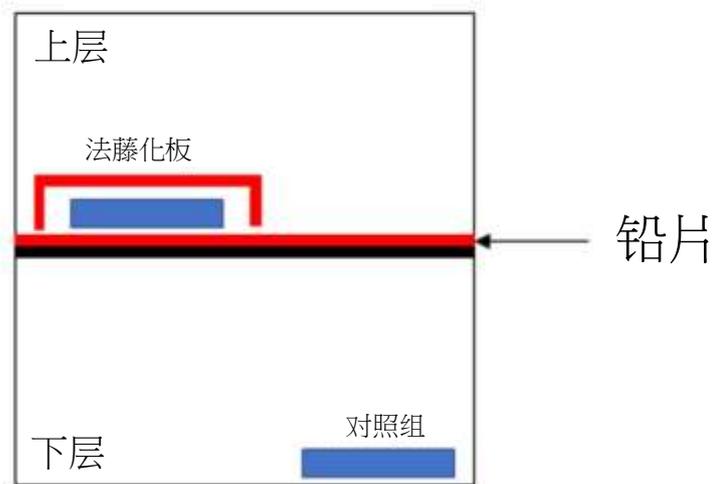


图 1 在 CO₂ 培养箱内放置培养板

(抗癌药剂的药效评价)

1. 在 96 well 板上分注含有 200uL 的 Etoposide 培养基(终浓度 0 uM, 1 uM, 10 uM, 100 uM)
2. 使用 FACS AriaIII 在 5000 个 cells/well 中对 Ba/F3 细胞进行排序 (n=8)
3. 在 CO₂ 培养箱中进行 37°C、72 小时的培养。
4. 用 SYTOX Blue (终浓度 1/10000 稀释) 染色死亡细胞
5. 通过 FACS Canto 测定
6. 使用 FlowJo 计算每个样本的活细胞数
7. 按 Etoposide 的浓度对活细胞数进行比较

【结果】

细胞繁殖能力的单细胞解析

将 Ba/F3 细胞用法藤板和未处理板在 37°C 下培养 72 小时,对活细胞数和细胞分裂次数进行了 5 次比较研究 (各 N=16)。其结果是,在 3 次实验中,在法藤板的培养环境中发现明显的细胞数减少 (图 2 实验 1~3)。另一方面,在两次实验中没有发现明显差异 (图 2 实验 4~5)。

进一步讨论了分裂次数的结果,在被认可的活细胞数的显著减少的实验 1-3 中,特别是在实验 3 中,在法藤化板中发现了分裂次数多 (5 次以上) 的细胞组有显著减少 (各 N=16)。另一方面,在没有发现活细胞数量显著差异的实验 4~5 中,关于细胞分裂的次数,用对照板和法藤化板并没有明显的差别 (图 3)。

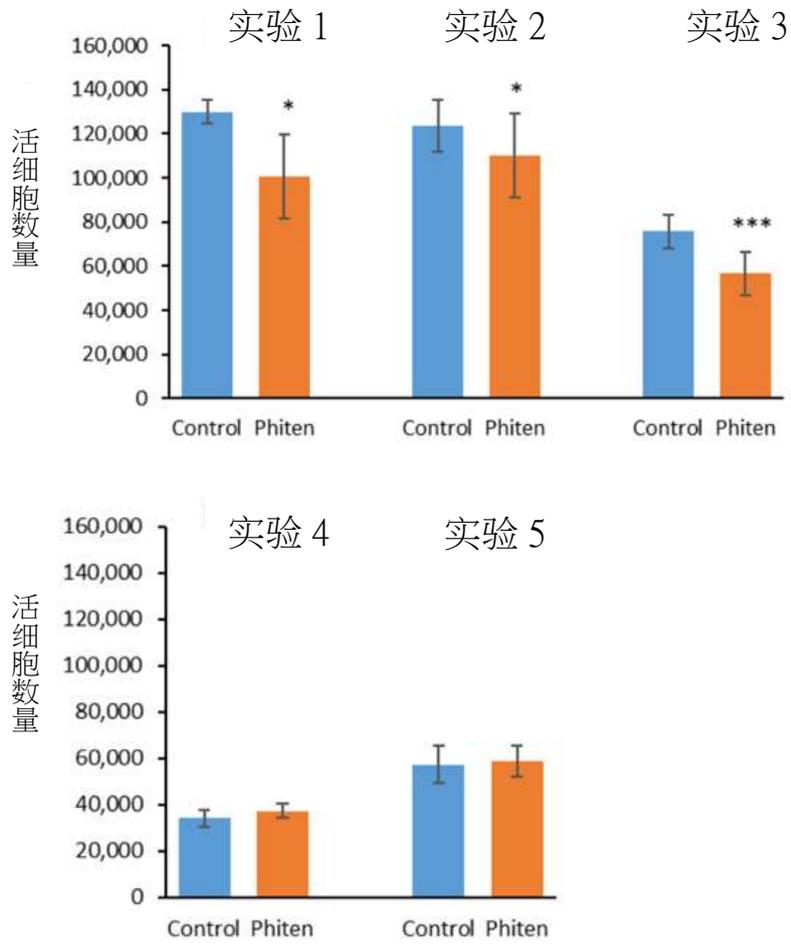
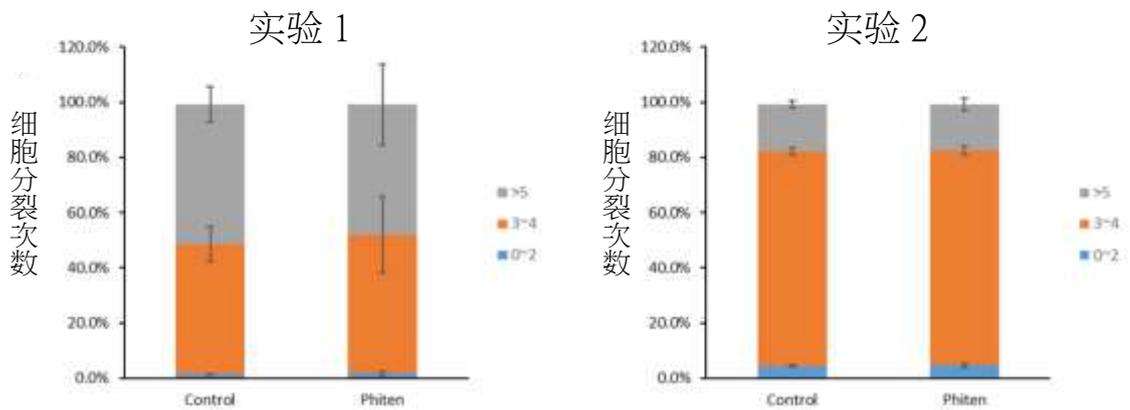


图 2 在法藤化环境中活细胞数的变化



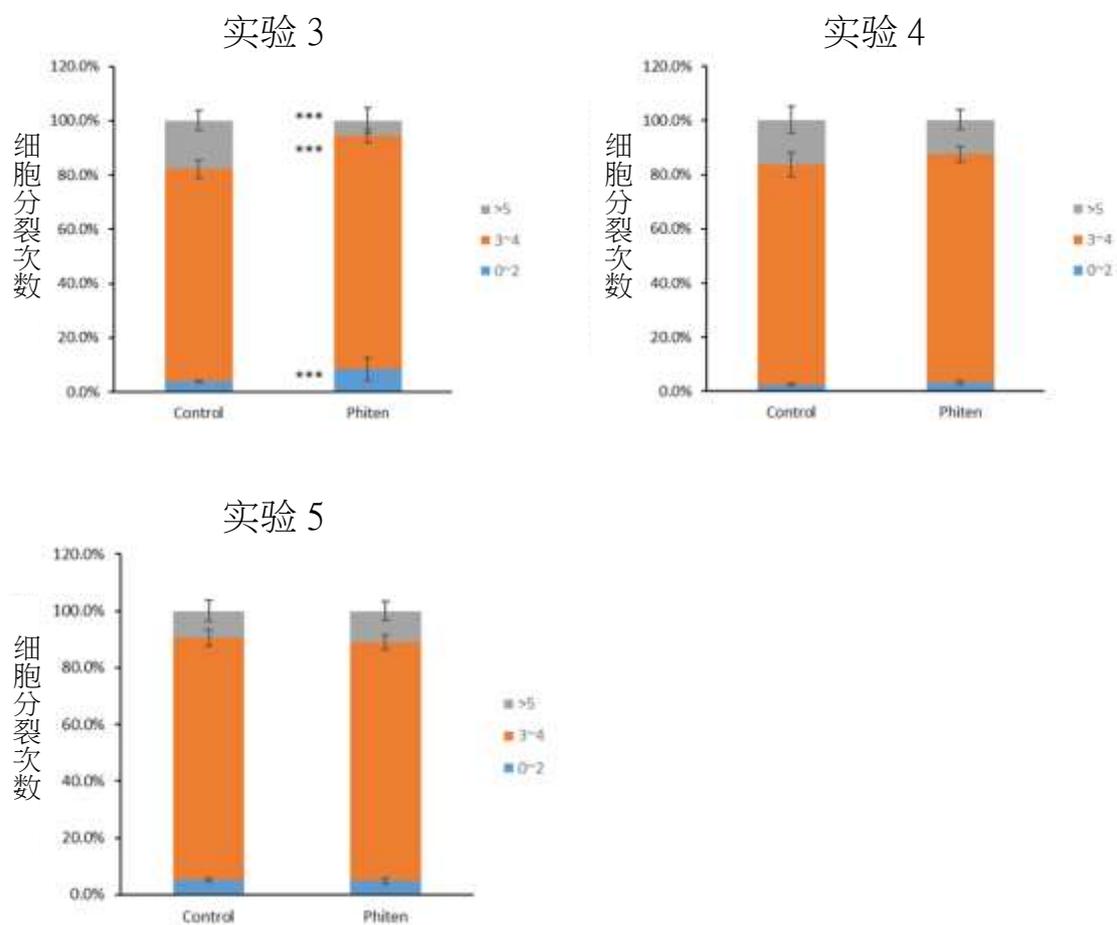


图 3 在法藤化环境中细胞分裂次数的变化

抗癌药剂的药效评价

对 Ba/F3 细胞进行了 24 小时 Etoposide 处理。其结果是, Etoposide 的细胞障碍性, 即活细胞率的减少被认为在 10 和 100uM 群中, 特别是在高浓度 Etoposide 条件 (100uM) 下, 与对照板相比, 在使用法藤化板的情况下被承认活细胞率有减少的倾向 (N=8, p=0.08) (图 4)。

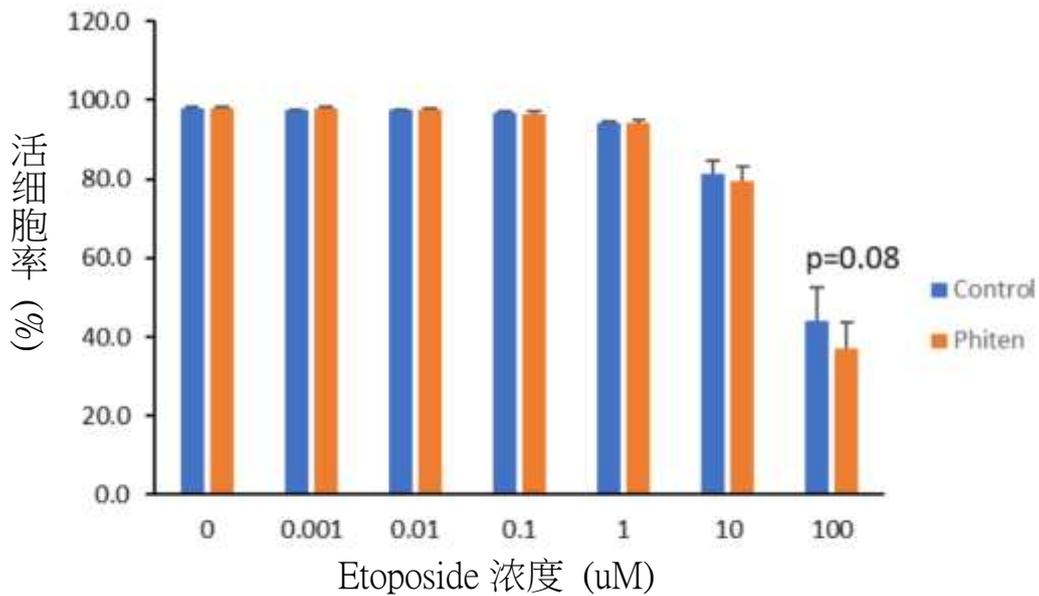


图 4 在法藤化环境里对抗癌药 Etoposide 的药效评价

【讨论】

关于法藤化环境对细胞增殖能力的影响,在法藤化环境和对照环境中对癌细胞 Ba/F3 细胞进行了比较培养,结果显示在各 N=16 进行的 5 次实验中有 3 次活细胞数显著减少,但其余 2 次实验中没有发现明显差异。

在之前的报告(2020 年 7 月 27 日)中,采用了水溶性四环素盐 WST-8 的发色法,在法藤化环境中显示有若干细胞数的增加,但上次的报告会(2020 年 11 月 11 日)上所述,根据浮动控制法对单细胞进行分析并没有显示明显的差别。

这次,为了能检测出微小的变化,以尽可能接近同一环境进行比较为目的,反复进行了各种各样的预备实验后,将对照板和厚度为 3mm 的铅片遮蔽的法藤化板如图 1 所示安装在同一培养箱内进行培养。另一方面,到上次为止,两个组都是用不同的培养箱进行培养的。在通常的细胞生物学实验中,虽然没有发现因培养箱而产生差异的情况,但是从这次更为严格的实验结果来看,之前的结果表明,培养箱之间微小的环境差异也可能对实验结果产生影响。

另外,如上所述,在本次实验中,通过用铅片包住法藤化板来防止从法藤化板对对照板产生影响,但由于法藤化的物理化学机制尚不明确,不能确定仅仅用铅片包起来就可以完全避免对对照板产生影响。

在考虑实验设计时,由于法藤化的物理化学机制是未知的,这是一个很大的课题。在调查细胞生物学影响的同时,观察,分析物理化学现象也是很有必要吧。例如,除了培养液的成分以外,培养容器的电荷对细胞的增殖也会产生影响,具体地说,报告显示材料表面的 zeta 电位

与促进细胞粘连和细胞增殖有着很大关系。因此,为了评估法藤化板对细胞的影响,也许有必要测量伴随着法藤化在培养板上产生的电荷的变化。

另外,本实验与一般的基础细胞生物学实验同样使用癌细胞株,不过,假设癌细胞株已经处于被促进增殖的状态,法藤化环境对细胞增殖带来正面的影响,已经处于增殖促进状态的癌细胞株也有可能很难捕捉到这种变化。作为另一个方案,虽然实验的难度会上升,但是使用正常细胞进行评价对于调查法藤化环境的影响也是必要的。

另一方面,关于抗癌剂的药效评价,对癌细胞 Ba/F3 细胞进行 24 小时抗癌剂 Etoposide 处理的结果,被认为在 10 和 100 μ M 浓度下 Etoposide 的细胞障碍性即活细胞率的有所减少。特别是在高浓度 Etoposide 条件 (100 μ M) 下,与对照板相比,在法藤化板环境下有明显的活细胞率减少倾向,所以被认为抗癌剂 Etoposide 的药效有通过法藤化板增强的倾向。

Etoposide 是以美国哈卡克兰 (Podophyllumpeltatum) 的地下茎中含有的 Podophyllootoxin 为原料在 1966 年合成的,1983 年被美国 FDA (Food and Drug Administration) 认可为抗癌剂。其作用机制是与切断、再结合两条链 DNA 的酶 DNA topoisomerase II 结合,阻碍 DNA 的复制,结果被认为可以抑制细胞增殖或引起细胞死亡。其作用是在癌细胞那样的 DNA topoisomerase II 表达水平较高的细胞中发挥更大的药效。

本实验表明,在法藤环境中,Etoposide 的药效有被促进的倾向,从而暗示了法藤化环境直接或间接地促进了 DNA topoisomerase II 的表达水平。虽然其详细的机制在现阶段还不清楚,但是可以通过以 DNA topoisomerase II 为开端,对细胞周期相关遗传因子的表达水平进行全面分析,从而可以明确法藤化环境对细胞分裂的影响。

另一方面,从临床角度考察的话,根据法藤化环境下 DNA topoisomerase II 的表达水平的增强,进而促进 Etoposide 的药效,是在人类的癌症治疗中使癌症局部或全身处于法藤化环境中,期待抗癌剂作用的增强效果。但是,也有必要充分考察原本表达水平亢进的癌细胞的 DNA topoisomerase II 出现表达更为亢进的情况而产生负面影响。

近年来,癌细胞株不再是均匀的细胞集团,而是已经明确了存在 sub population。由于这些细胞具有自我复制能力、多分化能力、造肿瘤能力、所以被命名为“癌干细胞”,还发现了 aldehyde dehydrogenase1 (ALDH1) 等具有特征的标记分子 5。

在本研究中,通过使用流式细胞仪进行单细胞分析,可以比将到上次为止的整个细胞作为一个整体进行测定的方法更详细的分析假设存在通过在归档环境中培养而导致细胞分裂变化的集团,并进行了各种讨论。但是如上所述,虽然承认了对高浓度抗癌剂的药效评价有增强的倾向,但是关于细胞增殖能力,从 5 次实验来看 (各 N=16) 没有明确的显著差异。

由此看来,法藤化环境对细胞的影响并不像抗癌剂那样显著,而是极为微小的。为了能检测这样微小的变化,在控制环境和法藤化环境中的差异仅仅认为是“法藤化”的原因是理想化的,如上所述,还必须考虑物理化学机制进行实验设计的探讨。

【结论】

通过本研究分析了法藤环境对细胞的影响。其结果是,关于细胞增殖,无法得出关于法藤化环境的影响的结论。另一方面,明确了法藤化环境增强了抗癌剂在高浓度下的药效,暗示了法藤化环境对细胞内分子的发现有着某种影响。以本研究成果为开端,对其分子结构进行更详细的研究,使法藤化环境对细胞的影响可以更加明确。

【参考文献】

1. Metwally S, Stachewicz U. Surface potential and charges impact on cell responses on biomaterials interfaces for medical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Nov;104:109883. doi: 10.1016/j.msec.2019.109883.
2. Montecucco A, Zanetta F, Biamonti G. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J*. 2015 Jan 19;14:95-108. doi: 10.17179/excli2015-561. eCollection 2015.
3. Hainsworth JD, Greco FA. Etoposide: twenty years later. *Ann Oncol*. 1995 Apr;6(4):325-41. doi: 10.1093/oxfordjournals.annonc.a059180.
4. Ewards CM, Glisson BS, King CK et al. Etoposide-induced DNA cleavage in human leukemia cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987; 20:162-8.
5. Li D, Zhang T, Gu W, Li P, Cheng X, Tong T, Wang W. The ALDH1+ subpopulation of the human NMFH-1 cell line exhibits cancer stem-like characteristics. *Oncol Rep*. 2015 May;33(5):2291-8. doi: 10.3892/or.2015.3842.