

单一或连续高温处理对奶牛乳腺细胞的生长及凋亡的影响

郭亮^{1,2}, 杜娟¹, 狄和双¹, 李忠浩¹, 王根林^{1*}

(1. 南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095; 2. 安徽科技学院动物科学学院, 安徽 凤阳 233100)

摘要: 用细胞流式、台盼蓝染色、免疫组织化学等方法研究单一高温 (40 °C 1 h) 或连续高温 (40 °C 1 h · d⁻¹) 3~7 d 对乳腺上皮细胞细胞周期、凋亡及热休克蛋白 (HSP₇₀) 表达的影响。结果表明: 40 °C 1 h 单一高温处理乳腺上皮细胞后 24 h, G₂ 比例极显著高于对照组 (37 °C) ($P < 0.01$), 细胞死亡率在热处理后 6 h 达到最大值, 并极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。高温 (40 °C 1 h) 诱导细胞 HSP₇₀ 的表达, HSP₇₀ 阳性细胞比率在热处理后 3 h 达到最大值。连续的 40 °C 1 h · d⁻¹ 诱导细胞产生 G₂ 期阻滞; 连续 4 d 以上的 40 °C 1 h 热处理显著地抑制了细胞的增殖 ($P < 0.05$)。结果提示: 高温诱导乳腺细胞周期阻滞, 促进细胞凋亡, 并诱导乳腺细胞 HSP₇₀ 的表达。

关键词: 高温; 细胞周期; 凋亡; 热休克蛋白 70 (HSP₇₀)

中图分类号: S852.21 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2007) 03-0100-05

Effects of unitary or successive heat treatment on mammary epithelial cells proliferation and apoptosis

GUO Liang^{1,2}, DU Juan¹, DI He-shuang¹, LI Zhong-hao¹, WANG Gen-lin^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Department of Animal Science, Anhui Technology College, Fengyang 233100, China)

Abstract: Bovine mammary epithelial cells were exposed to 40 °C for 1 hour or successive 40 °C 1 h · d⁻¹ (3-7 d) to study the effects of hyperthermia on cell cycle, apoptosis and heat shock protein (HSP₇₀) expression, by low cytometry, trypan blue dying, and immunohistochemistry. The results showed as follows: the percent of G₂ phase of heat treatment group at 24 hour after hyperthermia was significantly higher than the 37 °C control ($P < 0.01$), and apoptosis rate was the highest at 6 hour after heat treatment. Hyperthermia induced HSP₇₀ expression, and the rate of HSP₇₀ positive expression cells maximized at the 3 hour after heat treatment. Successive 40 °C 1 h · d⁻¹ heat treatment induced cell cycle block at G₂ phase. The cell numbers of heat-treated group (treated for more than 4 days) were significant lower than those in 37 °C control group ($P < 0.05$). It is suggested that hyperthermia induces cell cycle arrest, apoptosis and HSP₇₀ expression.

Key words: hyperthermia; cell cycle; apoptosis; heat shock protein 70 (HSP₇₀)

高温可以诱导细胞产生应激, 引起复杂的生理生化反应。随着研究的不断深入, 相继报道了小鼠肝细胞^[1]、人血管内皮细胞^[2]、奶牛外周血淋巴细胞^[3]、奶牛卵泡细胞^[4]等不同类型细胞的热应激应答机制, 但是对高温奶牛乳腺上皮细胞的应答反应却未见报道。Lim 等^[5]研究发现, 细胞的热应激调控过程因细胞类型、温度、作用时间的不同而存在差异。笔者通过组织块培养法获得乳腺细胞, 体外环境下研究高温强度对奶牛乳腺细胞生长及凋亡的影响, 继 41 °C 1 h 深度热刺激对乳腺细胞生长阻滞的研究基础上^[6], 我们继续研究温和热刺激 (40 °C 1 h) 对细胞周期及凋亡的影响, 为深入探讨高温对奶牛乳腺细胞凋亡等细胞生物学特征的影响提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 组织块培养法获得乳腺上皮细胞

对屠宰的健康泌乳的荷斯坦奶牛乳区用体积分数为 70% 乙醇进行消毒, 选择脂肪较少而富含乳腺

收稿日期: 2006-12-28

基金项目: 科技部“十一五”奶业支撑计划 (2006BAD04A01, 2006BAD04A12); 2005 年度江苏省“研究生”创新计划项目; 安徽省教育厅自然科学基金项目 (2006KJ201B)

作者简介: 郭亮, 副教授, 主要从事养牛教学与科研及畜禽场环境控制研究。* 通讯作者: E-mail: glwang@njau.edu.cn。

小叶的部位切下 5 g 左右小块, 冲洗后浸入 Hanks 液中带回实验室。用 PBS 反复冲洗乳腺组织去除乳汁, 剪成 1 mm^3 的小块, 置入铺有鼠尾胶原的培养瓶中, 加入含有 10% 小牛血清 (GIBCO) 的 MEM-F12 (Hyclone) 培养液 (培养液中添加 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胰岛素、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氢化可的松、 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 孕酮、 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 雌激素、 $1\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 催乳素、 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素、 $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素), 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养至贴壁 80%~90% 时, 用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化传代。运用差酶法和反复消化法纯化上皮细胞^[7]。对传代的乳腺细胞进行角蛋白 8&18、vimentin 免疫组化染色, 鉴定为上皮细胞后, 再运用细胞流式术和 Griemsa 染色对上皮细胞 DNA 整倍体及核型进行检测, 试验表明乳腺细胞遗传特性完备^[7]。

1.2 乳腺细胞热处理及分组

在试验前 24 h 给细胞换液, 并取对数期细胞用于试验。试验组细胞的高温热处理分为: 单一高温处理和连续高温处理。单一高温处理法: 将 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 正常培养的乳腺细胞进行 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 1 h 的热处理, 立即放回 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恢复培养, 分别在恢复培养后 0、6、12、24 h 收集细胞样品。连续高温处理法: 将 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 正常培养的乳腺细胞进行 $40\text{ }^\circ\text{C}$ $1\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 的高温处理, 方法同前, 在每次热处理后的 24 h 收集细胞样品, 连续收集 3~7 d。对照组均为同批次接种的 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养的乳腺细胞。

1.3 流式细胞术检测细胞周期及凋亡率

采用 PI 法检测细胞周期。收集各处理组的乳腺细胞, 用冰冷的 PBS 洗涤 2 次, 70% 乙醇固定, 加入 PI 综合染液 ($0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ PI, $0.01\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ RNase, 0.0025% Triton X-100, $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 柠檬酸钠, pH 7.2~7.6), 调整细胞数量达 10^6 mL^{-1} , $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光染色 30 min, 上流式细胞仪检测 (FACS Star, Becton Dickinson)。氩离子激光器功率为 15 mW, 激发光波长为 488 nm, 每份样品检测 10 000 个细胞。

采用 AnnexinV/PI 双标试剂盒 (BD Pharmingen, CAT: 556547) 检测细胞凋亡, 方法参照操作手册。

1.4 台盼蓝染色法绘制细胞生长曲线

制备 $1\times 10^4\sim 5\times 10^4\text{ mL}^{-1}$ 的乳腺细胞悬液, 接种 24 孔培养板, 每孔 1 mL, 补加培养液 1 mL。试验设立对照组 ($37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养) 和连续高温处理组 ($40\text{ }^\circ\text{C}$ $1\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$)。采用台盼蓝染色法检测活细胞数, 每天设 3 个独立重复, 连续计数 7 d, 绘制生长曲线。

1.5 免疫组化法检测 HSP₇₀ 的表达

在细胞热处理 ($40\text{ }^\circ\text{C}$ 1 h) 后恢复培养 0、6、12 和 24 h, 分别从 24 孔培养板取出细胞爬片, 甲醇-丙酮 (体积比为 1:1) 固定, 甲醇-过氧化氢 (体积比为 50:1) 浸泡 30 min 消除内源过氧化酶, 用即用型 SABC 免疫组化试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司) 进行免疫组织化学染色。一抗为 HSP₇₀ 小鼠单克隆抗体 (1:200 稀释), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h; 二抗为羊抗小鼠 IgG, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 20 min; ABC 复合物 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 20 min, DAB 显色, 苏木精轻度复染、脱水、透明、封片。显微镜下观察, 细胞浆或细胞核内见棕黄色颗粒沉着为阳性细胞。取 5 个视野, 每个视野分别统计 100 个细胞, 以阳性细胞占该细胞爬片区域观察的细胞总数的百分率来表示 HSP₇₀ 阳性细胞的比例。

1.6 数据分析

试验中各处理组内设置 3~12 个重复, 每个试验独立重复 3 次。数据以 $\bar{x}\pm SD$ 表示, 采用 SPSS11.5 软件进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 单一高温对细胞周期及凋亡的影响

与对照组相比, $40\text{ }^\circ\text{C}$ 1 h 高温处理后恢复培养 12 h 细胞 G_1/G_0 期比例显著降低 ($P<0.05$), 24 h G_1/G_0 期比例极显著降低 ($P<0.01$), G_2 期比例极显著升高 ($P<0.01$) (图 1)。说明高温诱导乳腺细胞的 G_2 期阻滞。

使用 AnnexinV/PI 凋亡试剂盒定量检测凋亡细胞的数量。Annexin 和 PI 的双重染色将细胞分为 3 类: 活细胞 (AnnexinV/PI 染色均为阴性)、凋亡细胞 (AnnexinV 染色阳性, PI 染色阴性) 和晚期凋亡/

坏死细胞 (AnnexinV/PI 染色均为阳性)。试验表明, 细胞受到温和热刺激后, 细胞凋亡比例逐渐增加, 而后下降。高温处理后 6 h 细胞凋亡率极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 12 h 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。晚期凋亡/坏死率的变化趋势与凋亡率相同, 在热修复后 6 h 和 12 h 分别极显著 ($P < 0.01$)、显著 ($P < 0.05$) 高于对照 (图 2)。统计结果表明, 晚期凋亡/坏死的细胞是 40 °C 高温诱导乳腺细胞死亡的主要方式, 凋亡也是不可忽略的途径。

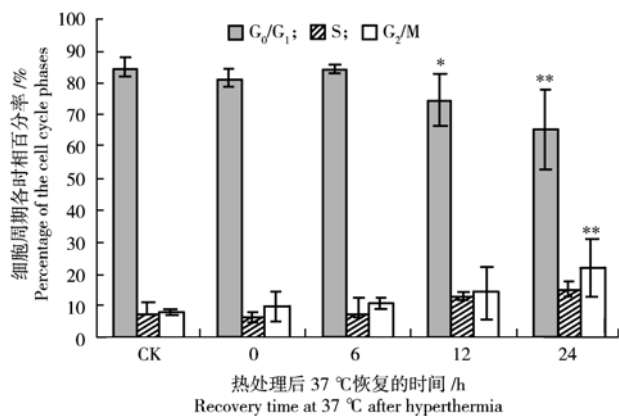


图 1 40 °C 高温对细胞周期的影响 (n = 5)

Fig. 1 Effect of 40 °C hyperthermia on cell cycle

CK: 37 °C 对照组 Control group at 37 °C; * $P < 0.05$, ** $P <$

0.01. The same as follows.

2.2 高温对 HSP₇₀ 蛋白表达的影响

免疫组化染色结果表明, 40 °C 1 h 高温处理后 3 h HSP₇₀ 细胞阳性表达率达到最大值, 极显著高于 0 和 24 h ($P < 0.01$), 显著高于 12 h ($P < 0.05$), 但与 6 h 无显著差异 ($P > 0.05$)。6 h HSP₇₀ 阳性比率较 3 h 有所降低, 但仍然极显著高于 0 和 24 h ($P < 0.01$), 但与 12 h 无显著差异 ($P > 0.05$)。0、12 和 24 h HSP₇₀ 阳性表达比率之间无显著差异 ($P > 0.05$)。表明细胞受到高温刺激后 3 ~ 6 h 是 HSP₇₀ 蛋白被诱导表达的高峰期 (图 3)。

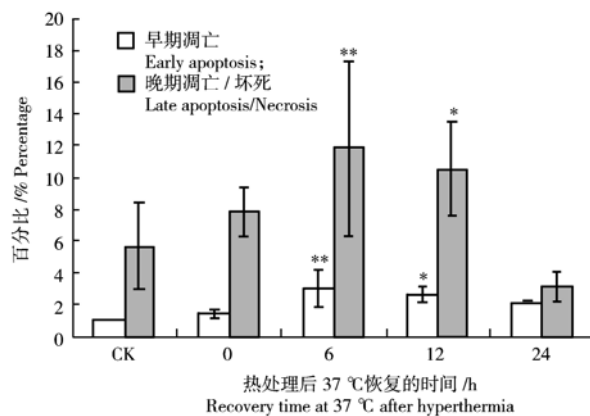


图 2 40 °C 高温对细胞凋亡率的影响 (n = 3)

Fig. 2 Effect of 40 °C hyperthermia on cell apoptosis

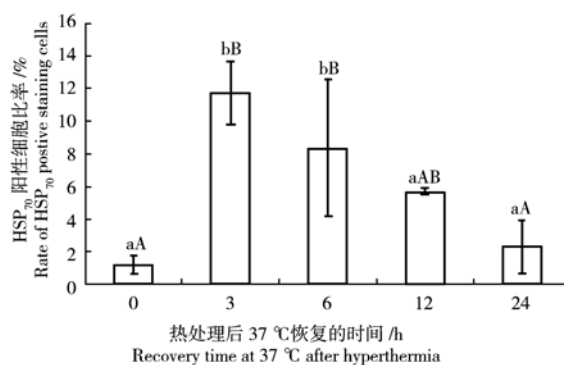
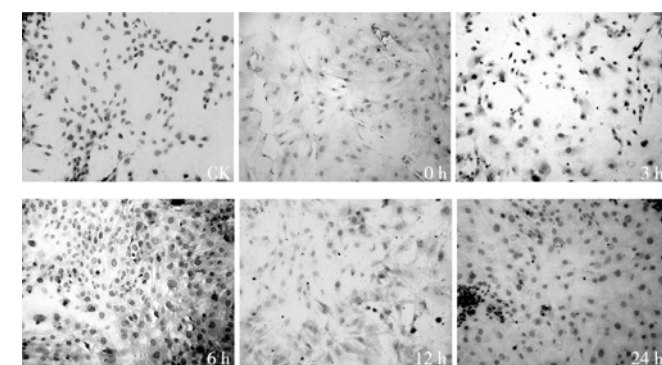


图 3 40 °C 1 h 高温对 HSP₇₀ 阳性细胞表达 (左) 及比率 (右) 的影响

Fig. 3 Effect of 40 °C 1 h hyperthermia on copression (left) and percentage (right) of HSP₇₀ positive staining cells

2.3 连续高温热处理对乳腺细胞增殖的影响

试验结果表明, 40 °C 1 h · d⁻¹ 热处理有效抑制了细胞的生长。热处理 1 ~ 7 d 细胞总数始终低于正常对照组, 1 ~ 3 d 低于对照组但差异不显著 ($P > 0.05$), 高温处理 4 ~ 7 d 热处理组显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 4 - A)。

连续 40 °C 热处理 1 ~ 3 d 细胞的 G₁/G₀ 期细胞均极显著低于对照组 ($P < 0.01$), G₂ 期均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 不同热处理时间细胞周期时相差均不显著 ($P > 0.05$) (图 4 - B)。

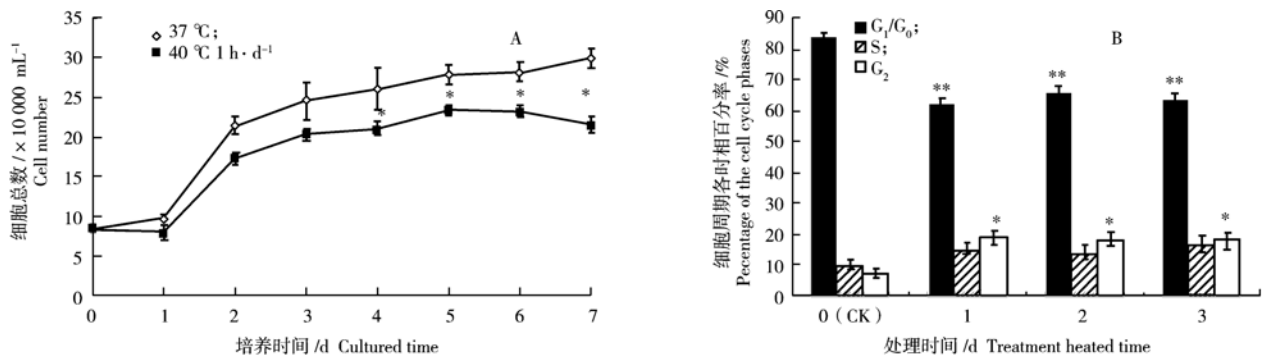


图4 40 °C 1 h · d⁻¹连续高温对细胞生长曲线 (A) 及细胞周期 (B) 的影响 ($n=3$)

Fig. 4 Effect of 40 °C 1 h · d⁻¹ successive hyperthermia on cell growth curve (A) and cell cycle (B)

3 讨论

3.1 高温对乳腺细胞周期阻滞的影响

对细胞周期的检测结果表明,单一一次40 °C 1 h高温处理和连续40 °C 1 h · d⁻¹高温热处理均可使细胞产生G₂期阻滞。细胞周期调控有两个关键点,G₁/G₀和G₂期调控点,S期位于两个调控点中间,是进行DNA复制的重要时期。研究表明,S期细胞对高热最敏感,处于S期的细胞受热处理后膜的损伤严重,并可造成染色体的畸形和DNA的损伤^[8]。G₂期是细胞进入有丝分裂最后的关键点,其间合成有丝分裂中新细胞形成所必需的物质,如合成有丝分裂蛋白复合物,激活DNA修复系统,使细胞在进入分裂期之前完成对染色体组的检测和对DNA修复,维持基因组的遗传稳定性等。若此时蛋白质的合成受阻,或DNA复制减速或停止(如当DNA损坏而需修复时),就会形成G₂期细胞阻滞。本试验高温诱导G₂期细胞阻滞的结果提示,高温可能导致DNA局部损伤,从而抑制基因组DNA的复制。本实验室曾经报导41 °C 1 h高温热处理可使乳腺细胞富集在S期及G₂期,说明随着高温处理强度的增加,对细胞周期的阻滞作用越明显,使S期延长,并使S期阻滞逐渐转变为G₂期细胞阻滞,这与Parr等^[9]报道43 °C热处理使Jurkat细胞富集在S+G₂期的试验结果一致。

3.2 高温使乳腺细胞产生热耐受性

高温对乳腺细胞产生抑制作用的同时,也诱导乳腺细胞产生热耐受性。乳腺细胞连续40 °C 1 h · d⁻¹热处理的最初3天,细胞总数低于对照组($P>0.05$),但细胞仍处于增殖状态,与Tadashi等^[10]报道的U87-MG细胞每日43 °C 2 h热处理的细胞生长曲线相类似。但是,本试验中乳腺细胞在连续5 d热刺激后便进入平台期,增殖能力显著低于热处理的U87-MG细胞,这可能是由于细胞类型不同引起的,U87-MG细胞为人恶性神经胶质瘤细胞,而本试验所用的是正常二倍体乳腺细胞。从连续高温对乳腺细胞生长曲线的影响中可以看出,一方面热刺激对乳腺细胞的生长抑制作用具有累积性,另一方面乳腺细胞经过37 °C 24 h热修复产生了对连续热刺激的耐受性。研究表明细胞热耐受性的形成依赖于细胞周期所处的阶段^[11],G₁期细胞要快于G₂/M期,S期细胞几乎没有耐受性。此外还发现位于平台期的细胞对热损伤的抵抗力高于呈指数分裂期的细胞。在本试验中,连续高温处理缩短了细胞的指数增长期,使之提前进入平台期。这说明处于对数生长期的细胞对连续高温热刺激更加敏感,并通过缩短对数生长期来适应连续高温对细胞的负面作用,降低因热刺激引发的DNA复制、RNA剪接、蛋白质翻译等环节错误而造成细胞突变的机率,也是机体自我保护机制的体现。

目前对细胞热耐受性的形成机制还不是很清晰。研究表明热耐受性的形成与热休克蛋白的诱导表达相关,HSP₇₀对细胞热耐受性的产生发挥重要的作用。热应激后HSP₇₀的表达可以提高细胞形成克隆的能力^[12-13],同时降低热应激诱导的凋亡^[14-16]和坏死^[13],其作用机制可能与HSP₇₀通过结合错误折叠多肽,防止蛋白质聚集以及加速损伤蛋白的重新折叠或降解来提高细胞的活性有关^[17]。细胞流式的检测结果表明,细胞的最大凋亡率和坏死率均出现在热修复的后6 h,而HSP₇₀蛋白的表达主要集中在热修复后第3~6 h,说明乳腺细胞启动热修复的机制早于出现最大细胞死亡率的时间,也就是说细胞在死亡前就已经启动自我修复的机制,这可以最大限度地降低高温对细胞的损伤。

参考文献:

- [1] Santos-Marques M J, Carvalho F, Sousa C, et al. Cytotoxicity and cell signalling induced by continuous mild hyperthermia in freshly isolated mouse hepatocytes [J]. *Toxicology*, 2006, 224: 210–218
- [2] Chen B, Zhou M, Xu L X. Study of vascular endothelial cell morphology during hyperthermia [J]. *J Therm Biol*, 2005, 30: 111–117
- [3] Lacetera N, Bernabucci U, Scalia D, et al. Heat stress elicits different responses in peripheral blood mononuclear cells from brown Swiss and Holstein cows [J]. *J Dairy Sci*, 2006, 89: 4606–4612
- [4] Bridges P J, Brusie M A, Fortune J E. Elevated temperature(heat stress) *in vitro* reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles [J]. *Domest Anim Endocrin*, 2005, 29: 508–522
- [5] Lim C U, Zhang Y, Fox M H. Cell cycle dependent apoptosis and cell cycle blocks induced by hyperthermia in HL-60 cells [J]. *Int Hyperthermia*, 2006, 22(1): 77–91
- [6] 杜娟, 狄和双, 郭亮, 等. 高温对乳腺上皮细胞生长及凋亡的影响 [J]. *动物学报*, 2006, 52(5), 959–965
- [7] 杜娟, 狄和双, 王根林. 奶牛乳腺上皮细胞系的建立及高温对细胞超微结构的影响 [J]. *生物工程学报*, 2007, 23(3): 133–138
- [8] Wong T H, Tekant Y, Ngoi S S, et al. The surgical treatment of squamous cell carcinoma of the oesophagus in Singapore [J]. *Ann Acad Med Singapore*, 1990, 19(6): 807–810
- [9] Parr T B, Hofman F M, Kiener P A, et al. Cell cycle phase-specific survival of CD95 ligand-challenged Jurkat cells: upregulation of heat-shock response [J]. *Cell Immunol*, 2001, 211: 21–29
- [10] Tadashi K, Takao K, Takeo N, et al. Mild heat shock induces autophagic growth arrest, but not apoptosis in U251-MG and U87-MG human malignant glioma cells [J]. *Journal of Neuro-Oncology*, 2004, 68(2): 101–111
- [11] Park H G, Han S I, Oh S Y, et al. Cellular responses to mild heat stress [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62: 10–23
- [12] Li G C, Li L G, Liu Y K, et al. Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70 kDa heat shock protein-encoding gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(5): 1681–1685
- [13] Angelidis C E, Lazaridis I, Pagoulatos G N. Constitutive expression of heat shock protein 70 in mammalian cells confers thermotolerance [J]. *Eur J Biochem*, 1991, 199: 35–39
- [14] Goodson M L, Sarge K D. Heat-inducible DNA binding of purified heat shock transcription factor 1 [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 2447–2450
- [15] Larson J S, Schuetz T J, Kingston R E. *In vitro* activation of purified human heat shock factor by heat [J]. *Biochemistry*, 1995, 34: 1902–1911
- [16] Zhong M, Orosz A, Wu C. Direct sensing of heat and oxidation by drosophila heat shock transcription factor [J]. *Mol Cell*, 1998, 2: 101–108
- [17] Ahn S G, Liu P C C, Klyachko K, et al. The loop domain of heat shock transcription factor 1 dictates DNA-binding specificity and responses to heat stress [J]. *Genes Dev*, 2001, 15: 2134–2145

责任编辑: 周广礼