

# 温和冷应激及复温对牦牛卵巢颗粒细胞的影响

杨 琨, 张 倩, 李谷月, 潘阳阳, 余四九, 何俊峰, 崔 燕\*

(甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

**摘要:** 细胞冷应激反应是一个复杂的过程, 它包括低温本身的应激阶段和复温后的应激阶段。本研究以牦牛卵巢颗粒细胞为研究对象, 利用实时荧光定量 PCR、Western blot 技术, 分析温和冷处理 1、5 d 及复温 1、2、4、8 及 24 h 条件下, 细胞内 *CIRBP*、*HSP70* 及 *P53* 变化规律。结果显示, 细胞在 25 °C 培养 5 d, 然后通过复温至 37 °C, 会影响细胞生理状态以及诱导细胞应激反应。*CIRBP* 的表达量在 25 °C 温和冷处理第 1 天开始上升, 并且在复温后 24 h 左右恢复到正常水平。*HSP70* 的表达量在 37 °C 复温培养后逐步上升, 复温 8 h 出现峰值, 随后下降。*P53* mRNA 表达水平在复温培养 4 h 出现峰值, 随后下降, 并且其在 *CIRBP* 及 *HSP70* mRNA 高表达时, 均有明显的下降。结果表明, 低温会诱导细胞 *CIRBP* mRNA 和蛋白表达水平的上升; *HSP70* 能够被冷应激后的复温诱导; *CIRBP* 和 *HSP70* 都具有抗应激损害和细胞凋亡的作用。这些数据将为亚低温和复温在各种研究和治疗领域的应用提供参考。

**关键词:** 牦牛; 卵巢颗粒细胞; 温和冷应激; 复温; *CIRBP*; *HSP70*; *P53*

中图分类号: S823.8<sup>+</sup>5.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)05-0738-08

## Effects of Mild Cold Shock Followed by Warming Up at 37 °C on the Ovarian Granulosa Cellular Stress Response of the Yak

YANG Kun, ZHANG Qian, LI Gu-yue, PAN Yang-yang, YU Si-jiu, HE Jun-feng, CUI Yan\*

(College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** The cellular effects of hypothermia has been recognized a complex process including a stress response to cold and subsequent rewarming. In this study, real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot techniques were used to observe the dynamic expression of *CIRBP*, *HSP70* and *P53* in the yak ovarian granulosa cells. Cells were preincubated at 25 °C for 1 and 5 d, and rewarmed at 37 °C for 1, 2, 4, 8 and 24 h. The results showed that hypothermia and subsequent rewarming affected cell biology and induced a cellular stress response. The expression of *CIRBP* was increased at 25 °C already at day 1 and returned to basal level upon rewarming after 24 h. While the expression of *HSP70* was gradually increased upon rewarming at 37 °C, maximal expression was occurred at 8 h after rewarming and followed by decline. Moreover the maximal expression of *P53* was appeared at 4 h after rewarming and followed by a decline. Additionally, the observation that *P53* mRNA was significantly decreased, a process that accompanied a maximal expression of *CIRBP* and *HSP70* mRNA, suggested that the expression of *CIRBP* mRNA and protein was increased upon exposure to hypothermia, and *HSP70* was induced upon rewarming. Overall, the *CIRBP* and *HSP70* were shown to play a role in protecting cells from the deleterious effects of stress and apoptosis. These findings would bring new insights into the potential beneficial effects of mild hypothermia and rewarming used in various research and therapeutical

收稿日期: 2014-12-11

基金项目: 国家自然科学基金(31360594; 31272616)

作者简介: 杨 琨(1986-), 男, 山东诸城人, 博士, 主要从事动物组织学与胚胎学研究, E-mail: 119260378@qq.com

\* 通信作者: 崔 燕, 教授, E-mail: cuiyan369@sina.com

fields.

**Key words:** yak; ovarian granulosa cells; mild cold shock; rewarm; CIRBP; HSP70; P53

细胞应激反应普遍存在于生物界,热、冷、缺氧、低渗等应激因素均可打破细胞代谢的相对平衡,并引发细胞内一系列复杂的基因表达和生理适应性反应过程。目前,人们已对热休克效应进行了深入研究,而冷应激方面的研究资料相对较少。另外,正常生理或意外情况下,恒温动物或培养条件下的细胞、组织和器官都有可能受到各种温度冷应激及复温的影响,例如心脏手术或脑损伤治疗过程中常需降低体温,器官和细胞的保存运输通常也在低温下进行,以及提升重组蛋白质产量也是通过降低温度得到实现<sup>[1-4]</sup>。冷应激后复温至正常温度,观察到的过高热表型变化,表明细胞正在以某种方式使其自身适应温和温度,并感应相对而不是绝对的低温<sup>[5]</sup>。温和冷应激(25~35℃)和热休克都是以某种方式诱导相似的表型修饰,有研究报道,虽然一些对温度变化较敏感的蛋白质表达量不变或增加,但其转录和翻译速率会普遍下降<sup>[6-7]</sup>。另外,冷应激还会影响 mRNA 稳定性的调节、替代转录起始位点和影响最终剪接<sup>[8]</sup>。还有资料显示,温和冷应激也能够引起代谢下降<sup>[9-10]</sup>、细胞周期停滞<sup>[11]</sup>、凋亡程序活化、细胞骨架分解等<sup>[4,10-12]</sup>。

在众多的冷休克蛋白(Cold shock protein, CSP)中,冷诱导 RNA 结合蛋白(Cold inducible RNA binding protein, CIRBP)受到广泛关注。CIRBP mRNA 表达是通过控制启动子的冷应激元件进行转录<sup>[4]</sup>。在亚低温其表达显著增加,这似乎是适应冷应激的关键决定因素,并且能通过各种机制诱导冷特异性因子转录、翻译<sup>[7,10,13]</sup>,另外,研究发现 CIRBP 基因具有抗应激损害和细胞凋亡的作用。热应激蛋白(Heat stress proteins, HSPs)是由细胞核内高度保守的热应激基因编码的蛋白,普遍存在于整个生物界,几乎所有的细胞均能合成 HSPs。HSP 充当蛋白质的分子伴侣,参与许多细胞的正常生理过程,直接参与蛋白质从初生链合成到多亚基复合体折叠、装配的整个生物合成,并参与蛋白质向内质网的移位、参与分解错装的蛋白质等,并与新生肽和多肽链中错配的部分结合,对调节细胞内环境的稳定具有重要作用。另外,研究表明 HSPs 还可调节细胞的氧化还原状态<sup>[14]</sup>,并在一些促凋亡效应发生时,能够防止细胞凋亡。另外,

HSPs 能够被热应激或冷应激后的复温诱导<sup>[15]</sup>。HSP70 是一族最保守和最重要的热休克蛋白,其在正常细胞内表达水平较低,而在应激状态下显著升高,可作为应激反应和评价组织细胞处于危险状态的分子生物标志,因此已成为 HSPs 中关注的焦点。P53 肿瘤抑制蛋白是含有 P53、P63 以及 P73 的 P53 蛋白超家族内一名成员。P53 蛋白在细胞凋亡过程中发挥至关重要的作用,能够将来自细胞应激反应的各种信息,如 DNA 损伤、缺氧、核苷酸缺失等信号传递给相关基因,诱导细胞周期停滞和细胞凋亡<sup>[16-17]</sup>。

牦牛常年生活在低温、低氧和高海拔的青藏高原,其繁殖效率受到严重影响,本课题组主要从事牦牛胚胎移植的研究。通常将器官、细胞从高原运输到实验室有较长时间的延迟,在此期间,细胞通常保持在 22~25℃,为其提供一个“睡眠模式”,避免在运输过程中受到各种干扰<sup>[18]</sup>,其后,培养物转移到 37℃ 培养箱中进行培养。在前期试验中,发现细胞在 25℃ 处理 5 d,37℃ 复温后,形态发生变化。因此,将进一步对 25℃ 细胞储存期间及 37℃ 复温后, CIRBP、HSP70 以及 P53 mRNA 及蛋白的表达变化及相关性进行研究。这些数据带来的一些新的细胞和分子机制,可能对组织和器官的低温储存提供参考,并为研究生理低温、治疗低温或意外低温后复温的适应性提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

青海省西宁市乐家湾屠宰场 3 岁左右的健康母牦牛。

### 1.2 主要试剂

胎牛血清、Trizol 购自美国 Invitrogen 公司。反转录酶、Taq 酶、限制性内切酶、pMD18-T vector、荧光定量试剂盒均为大连宝生物公司产品。DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶、DEPC、Tris 碱、四甲基联苯胺和 TEMED 购自 Sigma 公司。丙烯酰胺和 N,N'-亚甲双丙烯酰胺购自 Amresco 公司。蛋白分子质量标准 marker 和预染蛋白质 marker 购自 Fermentas 公司。SDS 购于合肥博美生物科技有限责任公司,滤纸购自美国伯乐公司。PVDF 膜购

自 Millipor 公司, 蛋白裂解液购自 Solarbio 公司, ECL 曝光液购自碧云天公司。普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒、免疫组化 SP 试剂盒、增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒购自北京天根有限公司。山羊源 *CIRBP* 多克隆抗体 (ab106230) 及兔源 *HSP70* 多克隆抗体 (ab79852) 购自英国 Abcam, 鼠源内参 *Actin* 抗体 (I-19) 购自 Santa Cruz 公司, 兔源 *FSHR* 多克隆抗体 (bs-0895R)、兔抗羊 (bs-0295G-HRP)、羊抗兔 (bs-0294R-HRP)、羊抗鼠 (bs-0296G-HRP) 购自北京博奥森公司。引物由 TaKaRa 公司合成, 测序由华大基因公司完成。

### 1.3 试验方法

1.3.1 卵巢颗粒细胞的培养 按照 F. Caloni 等<sup>[19]</sup>方法, 并适当调整进行常规卵巢颗粒细胞培养试验。待细胞汇合率达 90% 以上代, 同时冷冻保存。将传至 3~5 代的细胞用于试验 (图 1A)。

表 1 PCR 扩增引物和荧光定量 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in the RT-PCR and real-time RT-PCR

引物名称 Primers name	引物序列 (5'-3') Primers composition	产物大小/ bp PCR products size/bp
Yak <i>P53</i> senseprimer-1	CGACCTCGGAGCGTGCAT	1 390
Yak <i>P53</i> antisenseprimer-1	GCCACAGGCTGAGCAGATGA	
Yak <i>P53</i> senseprimer-2	GGTGCTTAGACCTCTGCTTGG	707
Yak <i>P53</i> antisenseprimer-2	GGTGACATGGTGTGCCTTGC	
Yak <i>CIRBP</i> real-time S	GTATGCCGTTTTCTTTGGCTTC	126
Yak <i>CIRBP</i> real-time AS	GCTCTACTCTGCCTGCCTCAA	
Yak <i>HSP70</i> real-time S	ACCTTCGACGTGTCCATCCT	145
Yak <i>HSP70</i> real-time AS	CCTTCTTGTGCTTGCCTTTG	
Yak <i>P53</i> real-time S	CCCATCCTCACCATCATCAC	80
Yak <i>P53</i> real-time AS	GCACAAACACGCACCTCAA	
Yak <i><math>\beta</math>actin</i> real-time S	AGGCTGTGCTGTCCCTGTATG	207
Yak <i><math>\beta</math>actin</i> real-time AS	GCTCGGCTGTGGTGGTAAA	

### 1.3.4 mRNA 的提取, 反转录 cDNA 及 PCR 扩增

收集颗粒细胞, 用 TRIzol 提取总 RNA, 反转录成 cDNA。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L (模板 1  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.5  $\mu$ L, Taq PCR Master Mix 10  $\mu$ L, 无菌去离子水 8  $\mu$ L)。取 10  $\mu$ L PCR 产物, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 150 V 20 min。紫外灯下观察并用凝胶成像系统采集图像。胶回收试剂盒回收

冷处理和复温试验中, 细胞进行胰蛋白酶消化并以 10 000 个  $\cdot$  cm<sup>-2</sup> 接种并在 37  $^{\circ}$ C 下培养。在冻存细胞前, 收集部分细胞样品作为对照组 (0 d), 并提取 RNA 或蛋白质。对于温和低温试验, 细胞在相同培养基 25  $^{\circ}$ C 下处理 1~5 d, 然后转至 37  $^{\circ}$ C 下进行 1~24 h 复温。

1.3.2 *FSHR* 免疫细胞化学染色 采用免疫细胞化学技术测定促卵泡刺激素受体 (*FSHR*) 在颗粒细胞的特异性表达, 具体步骤参照文献 [20-21]。

1.3.3 引物设计与合成 牦牛 *P53* 基因测序引物 (yak *P53*-1, *P53*-2) 根据 GenBank 中家牛 (NM174201)、瘤牛 (U74486)、绵羊 (NM001009403)、野猪 (AF124298) 的 *P53* 基因序列设计得到; 根据牦牛 *CIRBP* (KF682140)、*HSP70* (KC790105)、 *$\beta$ actin* (DQ838049) 及提交的 *P53* (KF682141) 基因序列设计荧光定量引物, 由 TaKaRa 公司合成 (表 1)。序列分析使用 NCBI 在线软件、MEGA5 和 DNAMAN 软件。

PCR 产物片段, 华大基因公司测序。

1.3.5 荧光定量 PCR 使用罗氏 480 仪器进行试验。反应体系: 10  $\mu$ L SYBR Premax Tag、0.5  $\mu$ L 上、下游引物、1  $\mu$ L cDNA 样品和 8  $\mu$ L 灭菌超纯水。反应程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 62  $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 共 45 个循环。扩增结束后进行熔解曲线分析。每管样品设 4 个重

复,每个试验重复3次。试验数据用SPSS 21.0软件进行方差分析,Duncan法进行均值的多重比较。

1.3.6 Western blot 方法检测组织中蛋白水平的表达 收集细胞,裂解30 min,4℃ 1 200 g离心5 min,收集上清,测定蛋白浓度。(1)加入上样缓冲液,沸水煮10 min。(2)SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,每孔上样10 μL,蛋白至分离胶,电压由80 V切换为100V直至电泳结束。(3)转膜用300 mA的电流,4℃电泳1~2 h。(4)牛奶封闭2 h,一抗4℃过夜孵育、二抗37℃孵育2 h。(5)加入曝光液显色5~10 min观察结果。取3次曝光结果,通过ImageJ软件测定WB条带表达量,重复3次。

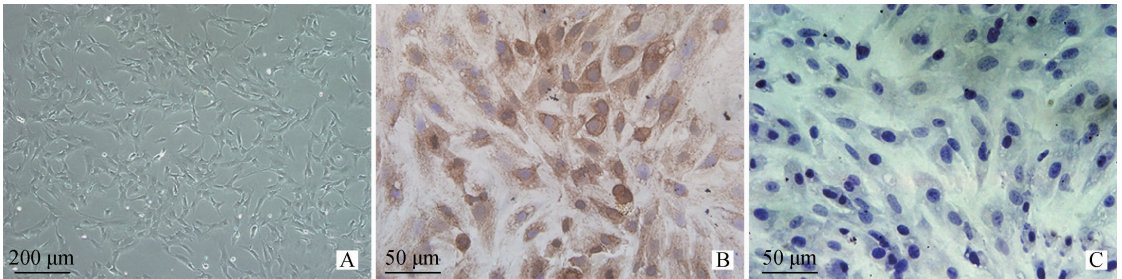
1.3.7 数据处理 试验数据用SPSS 21.0统计

分析软件 One-way ANOVA 进行方差分析和显著性检验,结果用“平均值±标准差( $\bar{x} \pm SE$ )”表示, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著, $P > 0.05$ 为差异不显著。

## 2 结果

### 2.1 免疫组织化学染色鉴定颗粒细胞

*FSHR* 免疫细胞化学染色是卵巢颗粒细胞的特异性染色。收集正常培养的卵巢颗粒细胞(图1A);进行*FSHR*免疫染色,阳性定位于细胞胞浆,呈棕褐色着色(图1B);阴性对照组并未检测到阳性表达(图1C)。



A. 牦牛卵巢颗粒细胞培养照片(倒置显微镜 100×);B. 牦牛卵巢颗粒细胞 *FSHR* 免疫细胞化学染色,颗粒细胞呈阳性(400×);C. 牦牛颗粒细胞 *FSHR* 免疫细胞染色的阴性对照(400×)

A. Cultured ovary granulosa cells of yak after 48 h(100×);B. Immunohistochemical staining of *FSHR* in cultured yak ovary granulosa cells, and the nucleus of granulosa cells was positive for the expression of *FSHR*(400×);C. The negative control of *FSHR* immunohistochemical staining in granulosa cells of yak(400×)

图1 牦牛卵巢颗粒细胞形态及免疫组化

Fig.1 Morphological characteristic and immunohistochemistry of yak ovarian granular cells

### 2.2 *CIRBP* 的表达

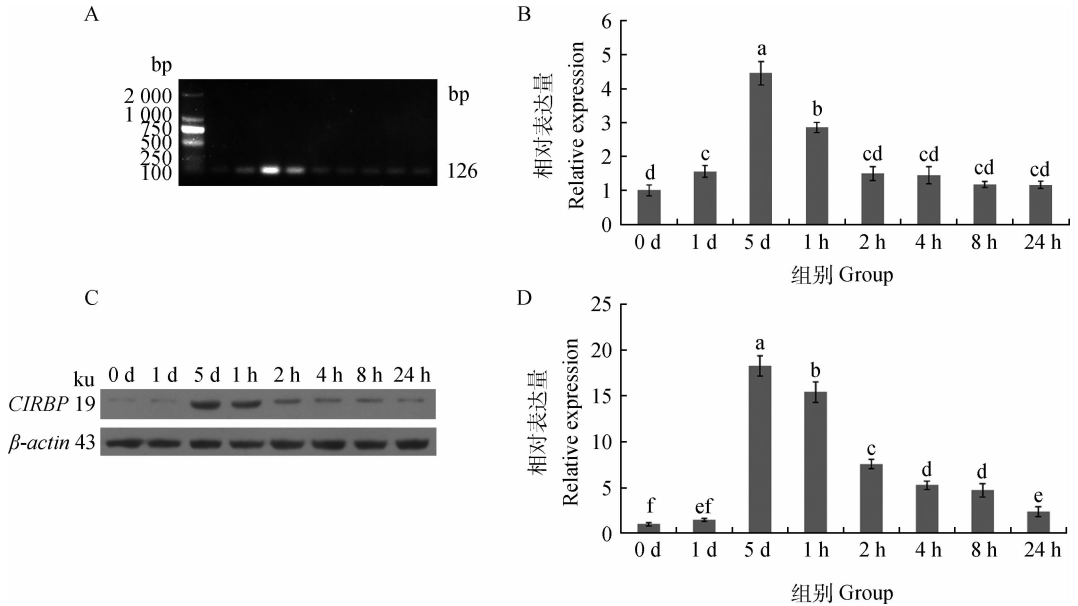
2.2.1 *CIRBP* mRNA 表达 通过 RT-PCR 检测 *CIRBP* 荧光定量引物,发现条带单一,片段大小符合试验设计(图 2A)。qRT-PCR 检测 *CIRBP* mRNA 的表达水平,细胞在 25℃ 处理第 1 天时,*CIRBP* 表达水平开始升高为对照组的 1.5 倍,在 25℃ 培养第 5 天时,表达量为对照组的 4.6 倍。在 25℃ 低温处理 5 d 后,进行复温培养,*CIRBP* 表达量迅速下降,24 h 后接近对照组表达水平(图 2B)。

2.2.2 *CIRBP* 蛋白的表达 通过 Western blot 检测 *CIRBP* 蛋白的表达情况,细胞在 25℃ 处理第 1 天时,*CIRBP* 表达水平开始升高为对照组的 1.6 倍,在 25℃ 培养第 5 天时,表达量为对照组的 18 倍。在 25℃ 低温处理 5 d 后,进行复温培养,*CIRBP* 表达量迅速下降,24 h 后为对照组表达水平 3 倍左右(图 2C 和图 2D)。

### 2.3 *HSP70* 的表达

2.3.1 *HSP70* mRNA 表达 通过 RT-PCR 检测 *HSP70* 荧光定量引物,发现条带单一,片段大小符合试验设计(图 3A)。通过 qRT-PCR 检测 *HSP70* mRNA 的表达水平,细胞在 25℃ 冷处理 5 d 期间,*HSP70* mRNA 表达量无显著变化,然而,37℃ 复温培养后,导致表达量逐步增加(8 h 时高达对照组的 4.7 倍),随后下降(图 3B)。

2.3.2 *HSP70* 蛋白表达 通过 Western blot 检测 *HSP70* 蛋白的表达情况,细胞在 25℃ 冷处理的 5 d 期间,*HSP70* 蛋白的表达量无明显变化,只在第 5 天有略微上升,为对照组的 1.2 倍。在 25℃ 低温处理 5 d 后进行复温培养,*HSP70* 表达量逐渐上升,8 h 后达到峰值,为对照组的 3.6 倍,随后表达量下降,24 h 后为对照组表达水平 2 倍左右(图 3C 和图 3D)。



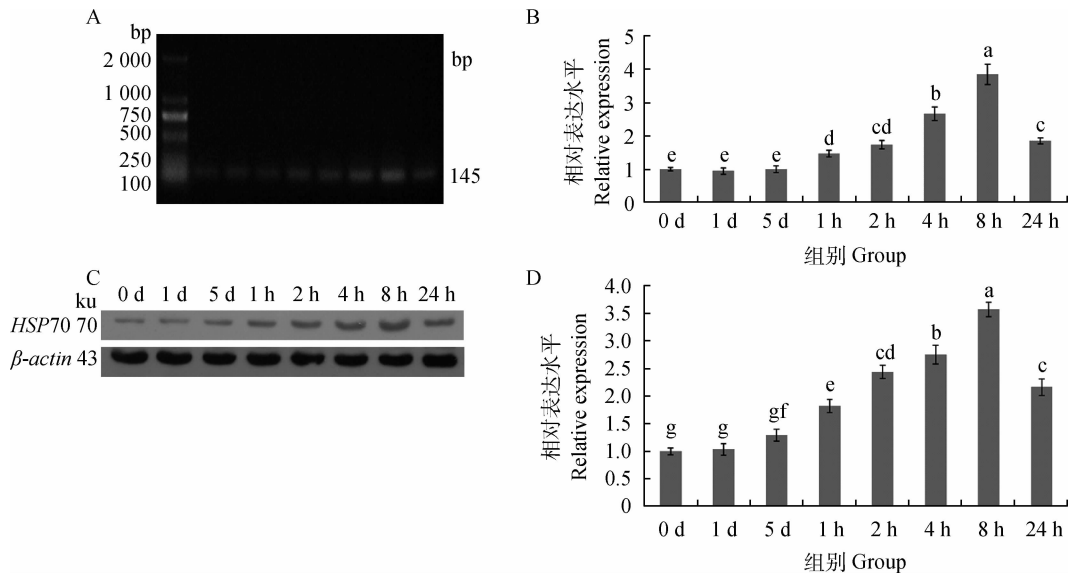
表达量=平均值±SE,  $n=3$ , 对照组 0 d 值确定为 1。0 d. 正常对照组, 1 d 和 5 d. 25 °C 培养 1 和 5 d, 1、2、4、8 和 24 h, 25 °C 冷处理后, 复温 37 °C 培养 1、2、4、8 和 24 h。标有<sup>a-b,c,d</sup>不同字母的组间差异极显著( $P<0.01$ ), 标有相同字母的组间无差异( $P>0.05$ )。下同。A. *CIRBP* 荧光定量引物的 RT-PCR 反应凝胶电泳图; B. 荧光定量 PCR 反应结果; C. *CIRBP*(19 ku) 及  $\beta$ -actin(43 ku) 蛋白 Western blot 结果; D. ImageJ 对 Western blot 结果分析

The expression are mean  $\pm$  SE,  $n=3$ . Values at 0 d were arbitrary taken as 1. 0 d. The control group; 1 d and 5 d. 1 or 5 days at 25 °C; 1 h, 2 h, 4 h, 8 h and 24 h, 5 days at 25 °C followed by 1 to 24 h at 37 °C. Different letters mean significant difference between the groups( $P<0.01$ ), same letters mean no difference between groups( $P>0.05$ ). The same as below.

A. The picture of RT-PCR amplification products with agarose gel electrophoresis; B. The qRT-PCR result of *CIRBP* mRNA levels; C. The picture is the Western blot expression of *CIRBP*(19 ku) and  $\beta$ -actin(43 ku) antibody; D. The ratio of *CIRBP* protein expressed quantity to  $\beta$ -actin protein expressed quantity calculated by the software ImageJ

图 2 冷应激及复温后 *CIRBP* 表达变化

Fig. 2 Cold-shock and rewarming affect *CIRBP* expression



A. *HSP70* 荧光定量引物的 RT-PCR 反应凝胶电泳图; B. 荧光定量 PCR 反应结果; C. *HSP70*(70 ku) 及  $\beta$ -actin(43 ku) 蛋白 Western blot 结果; D. ImageJ 对 Western blot 结果分析

A. The picture of RT-PCR amplification products with agarose gel electrophoresis; B. The qRT-PCR result of *HSP70* mRNA levels; C. The picture is the Western blot expression of *HSP70*(70 ku) and  $\beta$ -actin(43 ku) antibody; D. The ratio of *HSP70* protein expressed quantity to  $\beta$ -actin protein expressed quantity calculated by the software ImageJ

图 3 冷应激及复温后 *HSP70* 表达变化

Fig. 3 Cold-shock and rewarming affect *HSP70* expression

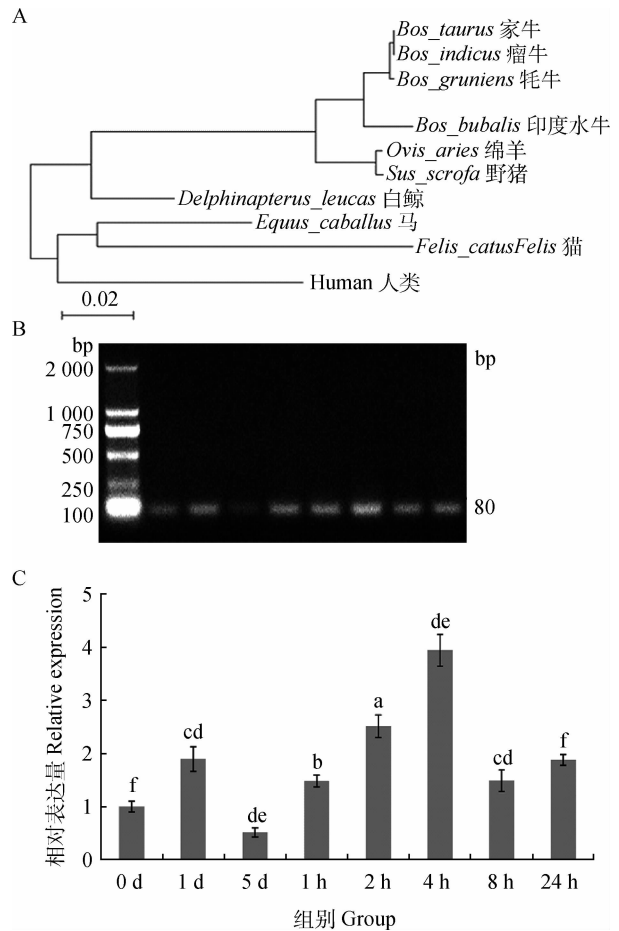
## 2.4 P53 基因克隆和表达

2.4.1 P53 基因克隆 将 P53-1 及 P53-2 扩增得到的 2 段基因序列进行拼接(MEGA5 软件),得到牦牛 P53 mRNA 序列,全长 2 002 bp,并提交至 GenBank(KF682141)。使用 DNAMAN 软件分析可知牦牛 P53 mRNA 的编码区为 52~1 210 bp,全长 1 159 bp,预测编码蛋白大小约为 43 ku。通过 NCBI 在线 BLAST 软件分析发现牦牛 P53 mRNA 与家牛、瘤牛的序列相似性较高,达到 99%,与印度水牛相似性为 98%,与绵羊和野猪的相似性为 95% (图 4A)。

2.4.2 P53 mRNA 的表达 通过 RT-PCR 检测 HSP70 荧光定量引物,发现条带单一,片段大小符合试验设计(图 4B),细胞在 25 °C 冷处理 5 d 期间,P53 mRNA 表达水平在第 1 天显著上升约为对照组 2 倍,第 5 天则明显下降,约为对照组表达量的一半。37 °C 复温培养后,P53 表达量迅速上升,在复温培养 4 h 出现峰值,为对照组的 4 倍;8 h 时明显下降,随后 24 h 又略微上升为对照组 2 倍(图 4C)。

## 3 讨论

笔者重点研究了在亚低温及返回正常生理温度时期,细胞内 CIRBP、HSP70、P53 mRNA 和蛋白的变化规律及相互联系,与其他学者研究结果相同,认为低温能够诱导一些基因的表达、RNA 加工和细胞内信号的重新编码,并影响细胞形态和生存。此外,返回到生理温度(37 °C)后,冷应激造成的影响会持续或加剧<sup>[1,3,10]</sup>。在低温冷处理期,基因转录和翻译速率降低,但有一些特定的基因仍然能够继续以正常速率表达<sup>[2,22]</sup>,低温也可以调节特定的转录产物如 CIRBP 的表达水平与稳定性<sup>[23]</sup>。BALB/3T3 小鼠成纤维细胞 CIRBP 在各种冷处理温度下持续表达,培养温度从 37 °C 降至 32 °C,6 h 后,能够诱导 CIRBP mRNA 和蛋白质的显著表达,在 32 °C 培养 24 h 后,诱导 CIRBP mRNA 和蛋白的强烈表达,而在 39 或 42 °C 培养时,CIRBP 的表达下降<sup>[24]</sup>。同时,H. Nishiyama 等还发现,对不同来源细胞系如小鼠 TAMA26 支持细胞、BMA1 骨髓基质细胞和 HepG2 人类肝癌细胞,进行温和冷处理也会诱发上述类似的效应<sup>[24-25]</sup>。与上述报道一致,本研究显示在 25 °C 培养时,颗粒细胞 CIRBP 的表达量上升,复温后,表达量返回到基础水平。这表明低温会诱导细胞 CIRBP mRNA 和蛋白表达水



A. 牦牛 P53 基因进化树; B. P53 荧光定量引物的 RT-PCR 反应凝胶电泳图; C. 荧光定量 PCR 反应结果

A. The phylogenetic tree of yak P53 with its closely related counterparts based on the P53 cDNA sequences; B. The picture of RT-PCR amplification products with agarose gel electrophoresis; C. The qRT-PCR result of P53 mRNA levels

图 4 冷应激及复温后 P53 mRNA 表达变化

Fig. 4 Cold-shock and rewarming affect P53 mRNA expression

平的上升,可能有保护细胞免受冷应激损伤的作用。试验结果中出现蛋白表达高于基因的情况,如: CIRBP 蛋白的表达在 25 °C 培养第 5 天时,基因的表达量为对照组的 4.6 倍(qRT-PCR),而蛋白的表达量为对照组的 18 倍。在排除试验误差的情况下,qRT-PCR 约是 2<sup>n</sup> 次方变化与 Western blot 不同,且两种方法的敏感性不一样,一个是拷贝数的差异,一个是微克数的变化。如果一种增加,另一种降低,这往往与 RNA 或蛋白在细胞内的稳定性相关。如 RNA 稳定性差,易降解,则出现 RNA 表达降低,蛋白表达相对增加,反之亦然。探究出现该结果的真正原因及相关调节机制,需要进行后续深入的研究

证实。

E. Laios 等<sup>[26]</sup>报道,大鼠心肌细胞在 4℃低温冷处理 1 h,检测不到 HSP,然而 37℃复温 2 h 后,检测到 HSP70,复温 4~6 h, HSP70 表达水平最高,在 6 h 后开始下降,同时他们还发现,细胞在 4、10、15、20 或 25℃冷处理后,37℃复温 4 h,都可以检测到 HSP70。与其它过高热研究结果一致,冷应激后返回到常温会诱导细胞热休克样反应, HSP70 表达水平在复温后的 8 h,表达量超过了常温时期的正常水平<sup>[5,10,26]</sup>。本研究显示,细胞 HSP70 mRNA 和蛋白表达水平在 25℃温和冷处理 5 d 期间,无显著变化,然而 37℃复温导致其表达水平的逐步上升,随后下降。这说明过高热应激时检测到热休克的感应机制是相对的而不是绝对的,因为在复温后的应激阶段,同样也会检测到热休克效应。

研究显示,人类恶性胶质瘤 A-172 细胞在 4、15 或 20℃冷处理 1 h,随后 37℃复温培养 10 h,会诱导 P53 积累<sup>[27]</sup>。此外,C. D. Gregory 报道,体外培养的 Burkitt 淋巴瘤衍生的细胞系保留了亲代细胞的增殖和细胞凋亡能力,将其在 1℃冷处理 20~30 min 或 25℃处理 4 h,复温培养 1~2 h 后,通过形态学特征和 DNA 片段检测到细胞凋亡<sup>[28]</sup>。有关亚低温对细胞凋亡的影响存在争议,一些研究表明冷应激诱导细胞凋亡,而另一些研究认为它能够抵抗随后热诱导的细胞凋亡,具有一定保护作用<sup>[28-29]</sup>。这些差异可能是由于所使用的细胞、温度变化后的分析时间和分析方法不同所导致。在本研究的试验模型中,温和低温处理期间,细胞凋亡因子 P53 mRNA 表达在第 1 天明显上升,而在第 5 天明显下降并低于正常水平,随后复温期间其表达量急剧增加,在 4 h 达到峰值后,8 h 显著下降。综上可知,在 CIRBP 和 HSP70 mRNA 表达量达到峰值时,P53 mRNA 的表达也显著下降,有可能说明 CIRBP 和 HSP70 可保护细胞免受应激诱导的凋亡,具体机制需要进一步研究,以确定冷应激处理如何以及在多大程度上阻止或诱导细胞凋亡。

#### 4 结论

本研究对低温本身的应激阶段和复温后的应激阶段内牦牛卵巢颗粒细胞内 CIRBP、HSP70 和 P53 mRNA 及蛋白表达量进行了初探,研究结果对组织和器官的低温储存提供参考,并为研究生理低温、治疗低温或意外低温后复温的适应性提供依据。

#### 参考文献(References):

- [1] AL-FAGEEH M B, MARCHANT R J, CARDEN M J, et al. The cold - shock response in cultured mammalian cells: Harnessing the response for the improvement of recombinant protein production[J]. *Bio-technol Bioeng*, 2006, 93(5): 829-835.
- [2] AL-FAGEEH M, SMALES C. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems [J]. *Biochem J*, 2006, 397: 247-259.
- [3] ROOBOL A, CARDEN M J, NEWSAM R J, et al. Biochemical insights into the mechanisms central to the response of mammalian cells to cold stress and subsequent rewarming[J]. *Febs J*, 2009, 276(1): 286-302.
- [4] FUJITA J. Cold shock response in mammalian cells [J]. *J Mol Microb Biotech*, 1999, 1(2): 243-255.
- [5] LIU A Y, BIAN H, HUANG L E, et al. Transient cold shock induces the heat shock response upon recovery at 37 degrees C in human cells [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(20): 14768-14775.
- [6] ERMOLENKO D N, MAKHATADZE G I. Bacterial cold-shock proteins [J]. *Cmls-Cell Mol Life Sci*, 2002, 59(11): 1902-1913.
- [7] DRESIOS J, ASCHRAFI A, OWENS G C, et al. Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(6): 1865-1870.
- [8] ARS E, SERRA E, DE LA LUNA S, et al. Cold shock induces the insertion of a cryptic exon in the neurofibromatosis type 1 (NF1) mRNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(6): 1307-1312.
- [9] PLESOFSKY N, BRAMBL R. Glucose metabolism in *Neurospora* is altered by heat shock and by disruption of HSP30 [J]. *Bba-Mol Cell Res*, 1999, 1449(1): 73-82.
- [10] SONNA L A, FUJITA J, GAFFIN S L, et al. Invited review: effects of heat and cold stress on mammalian gene expression [J]. *J Appl Physiol*, 2002, 92(4): 1725-1742.
- [11] SHAPIRO I M, LUBENNIKOVA E I. Population kinetics of cells in tissue culture incubated at low temperature [J]. *Exp Cell Res*, 1968, 49(2): 305-316.
- [12] CREAGH E M, SHEEHAN D, COTTER T G. Heat shock proteins-modulators of apoptosis in tumour cells [J]. *Leukemia*, 2000, 14(7): 1161-1173.
- [13] LADOMERY M. Problems and paradigms: Multifunc-

- tional proteins suggest connections between transcriptional and post - transcriptional processes[J]. *Bioessays*,1997,19(10):903-909.
- [14] JIAN Z, LI K, LIU L, et al. Heme oxygenase-1 protects human melanocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress via the Nrf2-ARE pathway[J]. *J Invest Dermatol*,2011,131(7):1420-1427.
- [15] FUJITA J. Cold shock response in mammalian cells [J]. *J Mol Microb Biotech*,1999,1(2):243-255.
- [16] MOLLEREAU B, MA D. The P53 control of apoptosis and proliferation; lessons from *Drosophila*[J]. *Apoptosis*,2014,19(10):1421-1429.
- [17] GOTTLIEB T M, OREN M. P53 and apoptosis[J]. *Semin Cancer Biol*,1998,8(5):359-368.
- [18] HUNT L, HACKER D L, GROSJEAN F, et al. Low-temperature pausing of cultivated mammalian cells [J]. *Biotechnol Bioeng*,2005,89(2):157-163.
- [19] CALONI F, RANZENIGO G, CREMONESI F, et al. Effects of a trichothecene, T-2 toxin, on proliferation and steroid production by porcine granulosa cells[J]. *Toxicol*,2009,54(3):337-344.
- [20] WU J, WANG Y, XIAO W, et al. Assessment of recombinant porcine follicle-stimulating hormone receptor using a novel polyclonal ectodomain antibody[J]. *Endocr Res*,2004,30(2):269-285.
- [21] TARU SHARMA G, DUBEY P K, SAI KUMAR G. Localization and expression of follicle - stimulating hormone receptor gene in buffalo (*Bubalus bubalis*) Pre-antral follicles[J]. *Reprod Domest Anim*,2011,46(1):114-120.
- [22] BURDON R H. Temperature and animal cell protein synthesis[C]. *Symp Soc Exp Biol*,1986,41:113-133.
- [23] AL-FAGEEH M B, SMALES C M. Cold-inducible RNA binding protein(*CIRBP*) expression is modulated by alternative mRNAs[J]. *RNA*,2009,15(6):1164-1176.
- [24] NISHIYAMA H, ITOH K, KANEKO Y, et al. A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth[J]. *J Cell Biol*,1997a,137(4):899-908.
- [25] NISHIYAMA H, HIGASHITSUJI H, YOKOI H, et al. Cloning and characterization of human *CIRBP* (cold-inducible RNA-binding protein) cDNA and chromosomal assignment of the gene [J]. *Gene*,1997b,204(1):115-120.
- [26] LAIOS E, REBEYKA I M, PRODY C A. Characterization of cold-induced heat shock protein expression in neonatal rat cardiomyocytes[J]. *Mol Cell Biochem*,1997,173(1-2):153-159.
- [27] OHTSUBO T, WANG X, TAKAHASHI A, et al. P53-dependent induction of WAF1 by a low-pH culture condition in human glioblastoma cells[J]. *Cancer Res*,1997,57(18):3910-3913.
- [28] GREGORY C D, MILNER A E. Regulation of cell survival in burkitt lymphoma: Implications from studies of apoptosis following cold - shock treatment[J]. *Int J Cancer*,1994,57(3):419-426.
- [29] GUEDEZ L, STETLER-STEVENSON W G, WOLFF L, et al. *In vitro* suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1[J]. *J Clin Invest*,1998,102(11):2002.

(编辑 程金华)