

· 综述 ·

高温对细胞骨架的影响

刘宇炜 余达经

肿瘤是一类严重危害人类健康的疾病,目前临床上针对肿瘤的治疗方法较多,主要包括放疗、化疗、介入等等。近 20 年来,随着相关研究的不断深入及热疗设备的开发研制,高温热疗在肿瘤治疗领域获得了迅猛发展^[1],如采用温和性高温诱发肿瘤细胞死亡已成为目前最热门的研究课题之一。

高温热疗因其作用温度、时间等不同,所引发的细胞损伤机制也不尽相同。有报道认为,高温可以对细胞核及其核仁产生直接的热效应,但更常见的热效应还是继发于温和性高温所致的细胞膜结构及骨架的损伤^[1];当细胞骨架发生变化时,可影响细胞对外界环境变化及刺激时所作的反应^[2]。由此可见,要深入了解高温作用下肿瘤细胞凋亡(apoptosis)的相关机制,必须充分了解高温对细胞骨架的影响情况。

高温作用的生物学机制

高温作用可导致细胞生物大分子及其生化代谢功能发生显著改变,包括:①高温使生物大分子 DNA、RNA 和蛋白质的变构及去稳定性;②经高温作用后,由于细胞代谢失调加快了代谢反应速度等。

一、高温对生物大分子的影响

生物大分子靠氢键等相互连接从而形成对外环境的稳定性;而 40~45℃ 高温作用可以诱发细胞蛋白结构发生改变,并且细胞外液 pH 值水平对生物大分子功能也有一定的影响。

二、高温对细胞膜的影响

癌细胞膜是高温热疗时的主要靶器官之一。当癌细胞膜经高温作用后,其主要成分(如磷脂质、脂肪酸、胆固醇、蛋白质等)将受到明显影响,此时细胞膜的流动性和通透性均会发生显著改变,最终导致癌细胞死亡。

三、高温对细胞 RNA、DNA 及蛋白质合成功能的影响

将癌细胞置于 43℃ 环境中持续 2 h,可发现癌细胞聚合酶解聚,粗面内质网脱颗粒;由于粗面内质网与蛋白合成功能密切相关,从而造成癌细胞热疗后蛋白合成功能障碍,细胞内 RNA 和 DNA 合成功能减弱,核分裂活动减缓,表现为癌细胞繁殖及生长功能受抑制,阻止癌细胞进入分裂期,并且还能导致与 DNA 结合的染色体蛋白质发生损伤。

四、高温对癌细胞生化代谢特征的影响

目前人们一般认为,高温作用对癌细胞的杀灭效应主要表现为癌细胞代谢功能障碍,如 RNA 代谢异常,合成速度减缓, DNA 及蛋白质合成功能障碍,细胞丧失增殖能力等等;此外,正常组织经高温作用后,其 RNA、DNA 及蛋白质也会发生类似变化。

高温作用的细胞毒性

高温作用对癌细胞核及细胞浆均有显著影响,例如高温可直接作用于细胞核,从而引发细胞聚合酶活性丧失,同时高温还能间接作用于 DNA 合成、染色体、细胞内构件及细胞骨架等,从而引发一系列的相关反应。

一、高温与细胞膜的关系

由于细胞膜具有双层磷脂结构,其黏度随温度的变化而改变,故凡能增加膜流动性的因素均可加剧高温作用诱发的损伤,而细胞膜损伤很可能是导致细胞凋亡的主要原因之一。

二、高温与蛋白的关系

高温热疗的热杀伤能量与导致蛋白损伤及抑制蛋白合成的能量一致,由于细胞内膜损伤后,不能继续进行分裂,将于 G₁ 期死亡。

三、高温与 DNA 的关系

45℃ 高温作用可以诱导癌细胞染色体产生畸变,但高温治疗诱发的 DNA 损伤不是细胞死亡的主要机制,其主要机制很可能与高温诱发的 DNA 相关酶类损伤有关,而不是损伤 DNA 本身。

四、高温与 pH 值间的关系

不同细胞系对高温作用的敏感性存在着较大差异,但总体而言,恶性肿瘤细胞对高温均有较高的敏感性。迄今未发现正常细胞与癌细胞间对热反应的程度具有显著差别,但是细胞外环境可以改变其对高温作用的敏感性。由于癌细胞普遍处于慢性缺氧的微酸性环境中,其平均 pH 值为 (7.06 ± 0.05);在体外细胞实验中,如果热疗后细胞外液 pH 值(pHe)迅速降低,可使癌细胞热耐受能力丧失;反之如果先使癌细胞适应低 pHe 环境,则可保留其耐热功能,提示酸性环境有助于高温诱发的癌细胞凋亡及对癌细胞生长周期的干扰^[3]。

五、高温与热耐受及热休克蛋白间的关系

所谓热耐受是指在热休克反应中存活细胞产生的不具有继承性的一过性热抵抗能力。将癌细胞暴露于 <43℃ 环境中 2~3 h 即可以产生热耐受,但是当环境温度超过 43℃ 时即丧失这种热耐受能力;当所处温度由 43℃ 降至 37℃ 后,细胞在此后的 8~10 h 内将具有热耐受能力。因此,如果 2 次热疗的间距时间过短,则随后进行的热疗可能达不到预期效果。热耐受的产生与热休克蛋白(heat shock protein, HSP)合成增加有关,其热保护作用依赖于稳定的细胞骨架功能^[4]。

细胞骨架概述

细胞骨架(cytoskeleton)包括微丝(microfilament, MF)、微管(microtubule, MT)及中间丝(intermediate filament, IF),分布于细胞核及细胞膜内侧面的纤维状蛋白质中,广泛参与细胞内的多项生理功能。三种细胞骨架成分在细胞内始终处于动态装配状态,其动态平衡点可受多种因素影响,如离子浓度、pH 值、温度

等等。

一、微丝

微丝是由肌动蛋白(actin)组成、直径约 7 nm 的纤维样物质,其基本成分肌动蛋白的分子量为 43 kDa,具有三种异构体,即 α 、 β 及 γ 肌动蛋白,脊椎动物细胞内均含有这三种异构体。

二、微管

微管是真核细胞所独有、并普遍存在的结构之一,在不同类型的细胞中具有相似的形态特征。微管为直径 24 ~ 26 nm 的管状纤维,其长度变化较大,主要由管蛋白(tubulin)构成;而管蛋白则以 α 及 β 两种管蛋白单体形式存在,每一种单体的分子量大约为 50 kDa,装配成异二聚体(dimers)后,其分子量约为 100 kDa。

三、中间丝

中间丝为直径 8 ~ 11 nm 的中空管状物体,可分为三大类型,包括细胞角蛋白类、波形纤维蛋白类及神经纤维蛋白类,它主要存在于脊椎动物细胞内,与上述两种近球状单体不同,其单体为纤维状蛋白样物质。

高温对细胞骨架的影响

细胞骨架的特性决定了它对高温作用异常敏感,并且由于其在细胞内的广泛分布及涉及多项细胞功能,从而可以通过观察细胞骨架的变化对高温热疗的细胞毒性作出预测,也可以通过研究细胞骨架变化从而探寻高温治疗的相关机制。另外,由于细胞骨架上述三种成分的分布、性状等均不尽相同,所以它们在热疗过程中的变化也不完全一致。由于目前涉及高温热疗对中间丝影响的报道较少,故本研究只总结了热疗对细胞微丝、微管及其结合蛋白方面的影响。现分述如下。

一、高温对微丝的影响

高温热疗首先引发细胞膜改变,破坏细胞膜的稳定性,使膜的通透性增加^[5]。高温能抑制细胞 Na^+ 泵功能,导致细胞内 K^+ 浓度降低,同时细胞膜的有限损伤可导致细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,其作用过程是由与微丝解聚密切相关的三磷酸肌醇所介导的^[6]。在低 K^+ 高 Ca^{2+} 条件下,聚合态的 F-actin 趋向于解聚成球状的 G-肌动蛋白;也有学者认为,微丝解聚不仅能导致细胞内 Ca^{2+} 释放,而且其自身也是细胞内 Ca^{2+} 的存贮场所,并且能在解聚时释放 Ca^{2+} 到细胞内^[7]。高浓度的 Ca^{2+} 能激活 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖性核酸内切酶,从而诱发细胞凋亡^[8]。

贴壁培养细胞的正常生长除有赖于完整细胞骨架所保持的细胞形状外,还有赖于细胞之间或细胞与基质表面间的附着力,而微丝(应力纤维)在其中发挥着重要作用。应力纤维刺端(正极)从内至外通过接头蛋白(主要包括踝蛋白、纽蛋白和 α -辅肌动蛋白)与膜相关蛋白整合素(integrin)、细胞外基质的纤维连接蛋白(fibronectin)相连。高温热疗能下调整合素水平^[9],致使由整合素介导的粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)活性受到抑制,进一步导致粘着斑成分脱磷酸化,继而解体、消失。由于肌动蛋白刺端与粘着斑相接触,粘着斑的消失使微丝趋于解聚^[10],同时也使细胞贴壁能力减弱、胞体变圆而浮起。

肌动蛋白是蛋白水解酶半胱氨酸天冬氨酸的作用底物,该酶可将其切断降解为 15 kD 和 31 kD 两个片段,使之不能重新聚合,而且 15 kD 片段还可引发凋亡细胞形态改变^[11]。肌动蛋白纤维的点端与脱氧核糖核酸酶 1(DNase1)相结合,当热疗致

其解聚后, DNase1 活性不再受到抑制,能进入细胞核内将 DNA 链核小体连接区切成缺口,形成若干 180 ~ 200 bp 或其倍数的寡核苷酸片段^[12],在琼脂糖凝胶电泳上呈现“阶梯状”(ladder pattern)图谱。

二、高温对微丝结合蛋白的影响

当半胱氨酸天冬氨酸攻击肌动蛋白的同时,半胱氨酸天冬氨酸-3 还能切断微丝结合蛋白凝胶溶酶素(gelsolin),形成 39 kD 的 N-末端和 41 kD 的 C-末端两个片段,其中 N-末端片段产物作用于肌动蛋白,导致微丝解聚,进而诱发核碎裂等凋亡改变^[13];而前纤维蛋白抑制蛋白(profilin)在高温下对维持纤维状肌动蛋白正常水平则具有重要作用。有研究发现,突变后缺乏抑制蛋白的酵母细胞在高温作用下,其纤维状肌动蛋白水平下降迅速,并且恢复较慢;可见在高温作用下,肌动蛋白在细胞内极不稳定,此时抑制蛋白可能通过某种方式刺激肌动蛋白聚合^[14]。

三、高温对微管的影响

高温热疗对细胞膜的损伤可以导致肌醇三磷酸介导的细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,肌动蛋白解聚也能释放 Ca^{2+} ,有报道称微管也能释放 Ca^{2+} ^[15]。细胞内 Ca^{2+} 浓度的增高能直接导致微管趋向解聚,同时微管的破坏又能增加电压依赖性 Ca^{2+} 通道的活性及半衰期。 Ca^{2+} 浓度的升高导致 c-Jun 氨基端激酶 1(JNK1)活性升高,使抗凋亡蛋白 Bcl-2 磷酸化而失活。在另一方面,Bcl-2 的失活可导致细胞内酸化,而且 Bcl-2 的 87/70 丝氨酸位点磷酸化,还可导致 Bcl-2 与 Bax 的结合能力降低,致使 Bcl-2/Bax 比值下降,抗凋亡活性丧失^[16]。

在正常组织细胞内,特殊序列的转录因子 NF κ B 与其抑制因子 I κ B 相连,在细胞质内构成复合物,处于无活性状态^[17]。I κ B 的稳定性取决于其是否锚定于 MT 上,当 MT 解聚时,I κ B 被释放、降解,此时 NF κ B 得以释放,活化后进入细胞核内,其 DNA 结合活性大大提高,影响了细胞核基因的正常表达,启动了凋亡程序。

中心体在高温热疗过程中也会受到显著作用。如果蝇细胞经高温作用后,其中心体结构和功能均受影响;在恢复过程中,有丝分裂细胞可见有明显的环状高电子密度物质聚集在中心体周围;经 42℃ 作用 30 min 后,其淋巴细胞中心体周围物质增多,微管组织中心(microtubule organizing center, MTOC)方向性减弱甚至丧失。在微管重组过程中, γ -管蛋白(γ -tubulin)可能在微管组织中心方向性方面扮演重要角色^[18]。

四、高温对微管结合蛋白的影响

高温热疗能导致整合素消失,可诱发微管相关蛋白激酶失活,致使微管相关蛋白质磷酸化,失去结合微管的能力,从而导致微管解聚^[19]。实验室里培养的 N-18 细胞,秋水仙素可使其细胞骨架解聚,突起回缩、膜发泡乃至细胞死亡;而加入 S-100 β 后,它能通过蛋白激酶 C 阻止两种微管结合蛋白 MAP-2 及 tau 的磷酸化,从而大大降低细胞的凋亡率^[20]。由此可见,微管结合蛋白磷酸化减弱会降低微管的聚合及稳定功能。

高温作用后细胞骨架的变化

细胞骨架的特殊性决定了它在高温作用结束后仍会发生显著改变,并且这些变化对细胞的生命活动将产生巨大影响。现分述如下。

一、高温作用后微丝的改变

42.5℃ 高温作用于人内皮细胞 1~4 h 可导致其应力纤维解聚,然后重排于细胞-细胞接触处^[21];43℃ 作用 1 h 可使人脐带内皮细胞肌动蛋白纤维解聚,并于 24 h 内重排^[22];HL60 细胞经高温作用后,在其凋亡早期即可出现肌动蛋白重排、再聚现象,并且可能与凋亡发生过程中染色质重排现象有关^[23]。微丝网络结构的重组也是凋亡小体形成中所必须的过程之一,在细胞凋亡小体中可见完好的微丝网络,用微丝干扰因子可阻断细胞凋亡小体的形成^[11]。

二、高温作用后微管的改变

42℃ 高温作用细胞 30 min 后,即可观察到细胞微管重排。据 Huang 等^[10]研究发现,43℃、45℃ 高温作用均可导致 CHO 细胞微管解聚,而其长度的恢复与细胞 G₁ 期的生存率有关,可以作为一项预测临床热疗效果的指标。

热休克蛋白

高温作用可诱发细胞 HSPs 合成及细胞骨架重组,如高温所产生的 HSP27 能增加细胞应力纤维的稳定性,其蛋白表达水平伴随着应力纤维稳定性的提高而升高,提示温和性高温所致的 HSP27 聚集已足够使细胞获得热耐受能力^[24]。除了高温作用外,其它因素也可诱发热休克蛋白合成,如 43℃ 高温能导致 CHO 细胞核周微管解聚,如先将其置入 pH 值 6.7 的培养液中适应一段时间后,即可表达 HSP27,从而产生一定程度的热耐受能力^[25]。由此可见,在实施肿瘤热疗或其它治疗时,要充分考虑热休克蛋白的作用。

综上所述,肿瘤作为临床上一种常见的严重危害性疾病,其治疗一直为人们所重视。热疗这一既古老又陌生的治疗手段,在近年来得到了迅猛发展,使人们看到了治疗肿瘤的希望;虽然其治疗操作简便、易行,但其作用机制却十分复杂,而且热疗的温度、时间、外部环境及辅助治疗等对不同肿瘤细胞的作用机制均不尽相同,需要不断摸索、总结。细胞骨架作为一种独特、弥漫性分布于整个细胞内的有形成分,对高温热疗十分敏感,可被诱发出一系列相关改变,如细胞骨架微丝、微管、中间丝及其结合蛋白在热疗过程中均将发生显著变化,其中的确切机制还有待我们更深入进行研究。

参 考 文 献

- 林世寅,李瑞英,主编.现代肿瘤热疗学.北京:学苑出版社,1998.8.
- Janmey PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev*, 1998, 78: 763-781.
- 梁寒,郝希山.热疗的生物学机制.国外医学肿瘤学分册,2001,28: 438-441.
- Klose MK, Armstrong G, Robertson RM. A role for the cytoskeleton in heat-shock-mediated thermoprotection of locust neuromuscular junctions. *J Neurobiol*, 2004, 60: 453-462.
- 张萍,王大章,郑光勇,等.热疗对肿瘤细胞耐药性的影响.华西口腔医学杂志,2003,21: 127-129.
- Hajnoczky GC, Lind AP. Luminal communication between intracellular calcium stores modulated by GTP and the cytoskeleton. *J Biol Chem*, 1994, 269: 10280-10287.
- 李云峰,张汉霆,罗质璞.细胞骨架与信号转导.国外医学药学分册,1998,25: 261-266.
- 何永文,毛祖彝.热诱导肿瘤细胞凋亡及其特点.国外医学口腔医学分册,2000,27: 331-334.
- Luchetti F, Mannello F, Canonico B, et al. Integrin and cytoskeleton behaviour in human neuroblastoma cells during hyperthermia-related apoptosis. *Apoptosis*, 2004, 9: 635-648.
- Huang SH, Yang KJ, Wu JC, et al. Effects of hyperthermia on the cytoskeleton and focal adhesion proteins in a human thyroid carcinoma cell line. *J Cell Biol*, 1999, 75: 327-337.
- 蔡军,姜叙诚.凋亡时细胞骨架蛋白结构的改变.国外医学生理病理科学与临床分册,2001,21: 276-278.
- 刘定燮,骆抗先.细胞凋亡信号的基本转导通路.国外医学生理病理科学与临床分册,1999,19: 198-201.
- 夏伟,周建伟.细胞骨架与细胞凋亡及细胞内信息通路的关系.细胞生物学杂志,2001,23: 205-209.
- Yeh J, Haarer BK. Profilin is required for the normal timing of actin polymerization in response to the thermal stress. *FEBS Lett*, 1996, 398: 303-307.
- Rosania GR, Swanson JA. Microtubules can modulate pseudopod activity from a distance inside macrophages. *Cell Motil Cytos*, 1996, 34: 230-245.
- Basu A, Haldar S. Microtubule-damaging drugs triggered bc12 phosphorylation-requirement of phosphorylation on both serine-70 and serine-87 residues of bc12 protein. *Int J Oncol*, 1998, 13: 659-664.
- Rosette C, Karin M. Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF-kappa B. *J Cell Biol*, 1995, 128: 1111-1119.
- Debec A, Marcaillou C. Structural alterations of the mitotic apparatus induced by the heat shock response in drosophila cells. *Biol Cell*, 1997, 89: 67-78.
- Chen Q, Kinch MS, Lin TH. Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, 1994, 269: 26602-26605.
- Brewton LS, Haddad L, Azmitia EC. Colchicine-induced cytoskeletal collapse and apoptosis in N-18 neuroblastoma cultures is rapidly reversed by applied S-100 beta. *Brain Res*, 2001, 912: 9-16.
- Romanov IA, Kabaeva NV, Buravkova LB. Morphological and functional study of human endothelium response to hyperthermia in vitro. *Aviakosm Ekolog Med*, 2001, 35: 40-46.
- Lin PS, Ho KC, Sung SJ, et al. Effect of tumour necrosis factor, heat, and radiation on the viability and microfilament organization in cultured endothelial cells. *Int J Hypertherm*, 1992, 8: 667-677.
- Luchetti F, Burattini S, Ferri P, et al. Actin involvement in apoptotic chromatin changes of hemopoietic cells undergoing hyperthermia. *Apoptosis*, 2002, 7: 143-152.
- Lavoie JN, Gingras BG, Tanguay RM, et al. Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock-HSP27 stabilization of the microfilament organization. *J Biol Chem*, 1993, 268: 3420-3429.
- Coss RA, Sedar AW, Sistrun SS, et al. Hsp27 protects the cytoskeleton and nucleus from the effects of 42 degrees C at pH 6.7 in CHO cells adapted to growth at pH 6.7. *Int J Hypertherm*, 2002, 18: 216-232.

(修回日期:2006-04-29)

(本文编辑:易 浩)