

· 基础研究 ·

高温对 HeLa 细胞周期及周期因子 Cyclin E 和 Cyclin A 的影响

刘仁刚 罗贤雯 周洁萍 刘云华 骆清铭

【摘要】目的 探讨高温时 HeLa 细胞周期进程受阻与细胞周期因子 Cyclin E 和 Cyclin A 表达的关系。**方法** 将人宫颈癌细胞株(HeLa 细胞)分为 37℃、40℃ 和 43℃ 3 个温度组,每组均以相应的温度作用 1 h。采用流式细胞仪检测各组 HeLa 细胞的细胞周期、免疫细胞化学方法测定其 Cyclin E 和 Cyclin A 的表达,并以图像分析仪测定免疫组织化学反应物的光密度(OD)。**结果** 40℃ 和 43℃ 时,细胞周期受阻,大量细胞滞留于 G₁ 期,S 期和 G₂/M 期的细胞明显减少。Cyclin E 和 Cyclin A 免疫反应阳性细胞明显减少、反应强度明显减弱。随着温度的升高,Cyclin E 和 Cyclin A 免疫反应产物的平均 OD 值逐渐减小。**结论** 高温抑制了 Cyclin E 和 Cyclin A 的活性,阻滞了细胞周期的进程,使 HeLa 细胞滞留于 G₁ 期。

【关键词】 高温; 细胞周期; Cyclin E; Cyclin A

Effects of hyperthermia on the cell cycle and Cyclins E and A of HeLa cells LIU Ren-gang*, LUO Xian-wen, ZHOU Jie-ping, LIU Yun-hua, LUO Qing-ming. * Department of Anatomy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】Objective To investigate the relationship between the expression of Cyclins E and A and the cell cycle block caused by hyperthermia of HeLa cells. **Methods** The HeLa cells were divided into three groups and treated with temperatures of 37℃, 40℃ and 43℃, respectively, for 1h. Then the cell cycle phases were measured by use of the flow cytometry, and the expression of Cyclins E and A were assessed by use of immunocytochemistry methods. The optical densities (OD) of immunohistochemical reactants were appraised by use of image analyzer. **Results** The cell cycle of HeLa cells was blocked at 40℃ and 43℃, and a large number of cells were arrested in G₁ phase while the cells in S and G₂/M phases were decreased markedly. The positive cells of immunoreaction of Cyclins E and A were decreased significantly and the immunoactivities of Cyclins E and A were weakened significantly. The average ODs of immunoreaction of Cyclins E and A were reduced gradually from 37℃ to 43℃. **Conclusion** The activities of Cyclins E and A were inhibited by hyperthermia, and the cell cycle of HeLa cells was blocked and arrested in G₁ phase.

【Key words】 Hyperthermia; Cell cycle; Cyclin E; Cyclin A

继化疗、放疗、手术治疗和生物学治疗后,热疗已成为一种治疗肿瘤的新方法。临床上常用 40~43℃ 的高温(单独或联合化疗、放疗)治疗肿瘤。在对肿瘤热疗的机理和生物学效应的研究中,我们发现 40~45℃ 的高温对肿瘤细胞有一定的杀伤作用^[1]。为了进一步阐明 40~43℃ 高温段对肿瘤细胞的生物学效应,我们应用流式细胞仪检测法和免疫细胞化学 SABC 法研究高温对 HeLa 细胞周期进程的影响及其机制。报道如下。

材料和方法

一、主要仪器和试剂

1. 仪器:上海产水浴恒温箱(温差为 ±0.5℃)、SL2300 二氧化碳培养箱(美国 Sheldon 公司)、FACS-can 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)、

HPIAS-1000 高清晰图像分析系统和 UFX-II 光学显微镜(日本 Nikon 公司)。

2. 试剂:1 640 培养基、小牛血清为美国 Gibco 公司产品,碘化吡啶(pyridine iodide, PI)为美国 Sigma 公司产品,兔抗人 Cyclin E 和 Cyclin A 抗体为美国 Santa Cruz Biotechnology 公司产品,SABC 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒为美国 Zymed 公司产品。

二、样本制备

1. 细胞株:人宫颈癌细胞株(HeLa 细胞,购于武汉大学中国典型培养物保藏中心)。

2. 培养增殖:HeLa 细胞接种于 1 640 培养基(含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素),置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养,隔日传代。

3. 收集细胞(用于流式细胞仪检测):当传代后的细胞处于指数增生期时收集细胞,制成 2 × 10⁶ 个/ml 的细胞悬液。将细胞悬液分装于 9 只 Ep 管中,每管 1 ml。

4. 细胞爬片(用于免疫细胞化学染色):增殖后的

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(No. 59836240)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院解剖学系(刘仁刚、罗贤雯、周洁萍、刘云华),生命科学院(骆清铭)

HeLa 细胞培养于若干个培养皿内,细胞密度为 10^4 个/ cm^2 ,每只培养皿内放入涂有多聚赖氨酸的 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 盖玻片 2 张,让细胞贴壁生长于玻片上(细胞爬片)。培养皿置于 37°C 、5% CO_2 条件下,当细胞处于指数增生期时进行分组加温处理。

三、分组加温

1. 分组:培养的 HeLa 细胞分为 37°C 、 40°C 和 43°C 3 个温度组,每组 3 管(或皿)。

2. 加温:水浴恒温箱 3 个,预先将温度分别调至 37°C 、 40°C 和 43°C ,并稳定 4 h 以上。将各组 HeLa 细胞分别置于相应的水浴恒温箱内,10 min 后开始计时。1 h 后取出各组细胞,置于培养箱中,于 37°C 、5% CO_2 条件下培养 12 h,然后进行流式细胞仪检测和免疫细胞化学染色分析。

四、流式细胞仪检测细胞周期

经加温处理的各组 HeLa 细胞,以预冷的 70% 乙醇固定,PI 染色,采用 FACScan 型流式细胞仪进行细胞周期的检测。每管检测 5 000 个细胞,用细胞指数(细胞指数 = 各时相的细胞数/5 000 $\times$ 100)表示细胞周期各时相所含细胞的百分数。

五、免疫细胞化学染色和图像分析

1. SABC 法免疫细胞化学染色:将加温后的细胞爬片进行 SABC 法免疫细胞化学染色。每一培养皿中的 2 张细胞爬片经 2% 多聚甲醛固定、过氧化氢消除内源性过氧化物酶、正常羊血清封闭非特异性抗体等处理后,其中一张加入兔抗血清 Cyclin E 抗体,另一张加入兔抗血清 Cyclin A 抗体, 4°C 孵育 72 h。随后依次加入生物素化羊抗兔 IgG, 37°C 孵育 1 h;SABC 复合物, 37°C 孵育 1 h;DAB 显色 5 min。每个步骤间均用 PBS 充分洗涤。最后经脱水、透明、中性树胶封片后,光镜下观察、摄片。

以正常兔血清和 PBS 替代一抗作对照染色,结果为阴性。

2. 图像分析:用 HPIAS-1000 高清晰图像分析系统对 Cyclin A 和 Cyclin E 免疫反应阳性细胞的平均光密度(optical density, OD)进行测定并对 OD 值进行分析。

六、统计学分析

数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,应用 SPSS 统计软件,采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、流式细胞仪检测

由表 1 数据可知,经不同温度处理后,HeLa 细胞的细胞周期受到显著的影响。 40°C 时细胞周期进程即受到明显阻滞,大量细胞滞留于 G_1 期,细胞指数较 37°C (即生理温度时)时增加了 14.76 ($P < 0.01$);S 期

细胞明显减少,细胞指数较 37°C 时下降了 9.13 ($P < 0.01$); G_2/M 期细胞指数较 37°C 时下降了 5.63 ($P < 0.01$)。 43°C 时,细胞周期各时相的细胞指数与 40°C 时比较,差异无统计学意义, G_1 期细胞指数较 37°C 时增加了 13.77 ($P < 0.01$),较 40°C 时减少了 0.99 ($P > 0.05$);S 期细胞指数较 37°C 时减少了 7.72 ($P < 0.01$),较 40°C 时增加了 1.41 ($P > 0.05$); G_2/M 期细胞指数较 37°C 时下降了 6.05 ($P < 0.01$),较 40°C 时下降了 0.42 ($P > 0.05$)。

表 1 不同温度组 HeLa 细胞在细胞周期各时相的细胞指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	G_1	S	G_2/M
37°C 组	63.03 ± 2.24	17.51 ± 1.83	19.46 ± 1.89
40°C 组	$77.79 \pm 3.17^*$	$8.38 \pm 1.68^*$	$13.83 \pm 1.88^*$
43°C 组	$76.80 \pm 3.32^*$	$9.79 \pm 3.11^*$	$13.41 \pm 1.93^*$

注:与 37°C 组相比, * $P < 0.01$

二、免疫细胞化学检测

1. 光镜观察结果:各温度组的 HeLa 细胞均呈多边形,核大、椭圆形、位于细胞中央。Cyclin E 免疫反应阳性产物为棕黄色,位于细胞核内,其免疫反应强度于 37°C 时最强, 40°C 时有所下降, 43°C 时最弱。阳性细胞数于 40°C 时稍有减少, 43°C 时明显减少(图 1 ~ 3)。Cyclin A 免疫细胞化学反应的演变趋势与 Cyclin E 相同(图 4 ~ 6)。

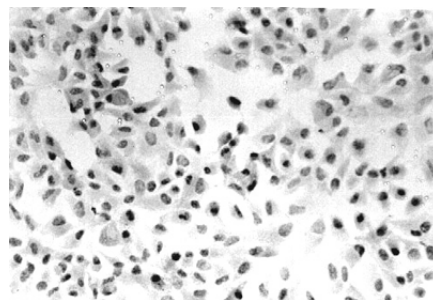


图 1 37°C 时,HeLa 细胞呈多边形,核大、椭圆形、位于细胞中央;Cyclin E 免疫反应阳性产物为棕黄色,位于细胞核内,染色深(SABC 法 DAB 染色, $\times 100$)

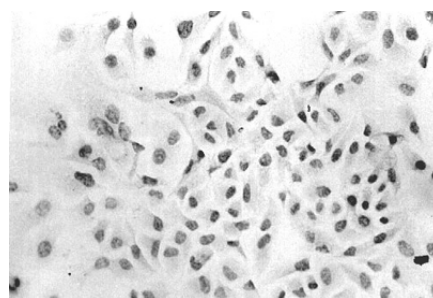


图 2 40°C 时,细胞形态无明显改变;Cyclin E 免疫反应阳性产物位于细胞核内,染色较 37°C 时浅,阳性细胞稍有减少(SABC 法 DAB 染色, $\times 100$)

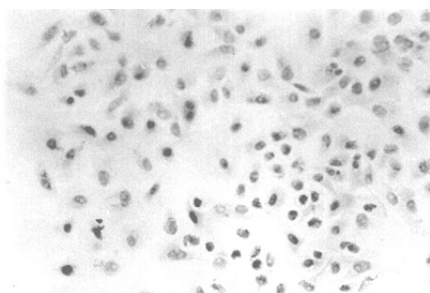


图3 43℃时,细胞形态改变不明显;Cyclin E 免疫反应阳性产物位于细胞核内,染色更浅,阳性细胞明显减少(SABC 法 DAB 染色,×100)

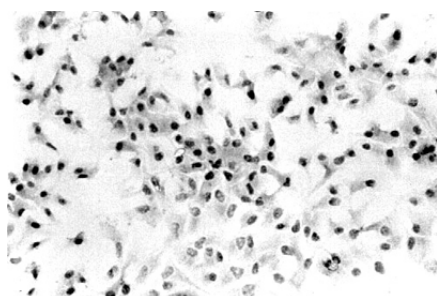


图4 37℃时,HeLa 细胞呈多边形,核大、椭圆形、位于细胞中央;Cyclin A 免疫反应阳性产物为棕黄色,位于细胞核内,染色深(SABC 法 DAB 染色,×100)

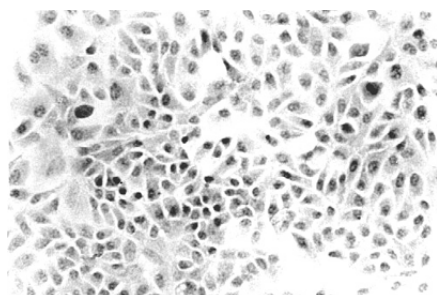


图5 40℃时,细胞形态无明显改变;Cyclin A 免疫反应阳性产物位于细胞核内,染色较 37℃时浅,阳性细胞稍有减少(SABC 法 DAB 染色,×100)

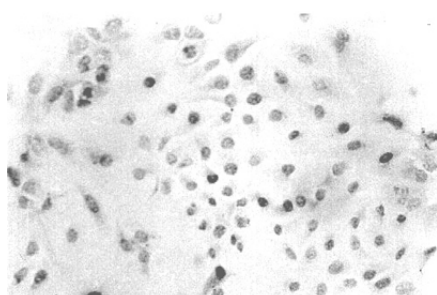


图6 43℃时,细胞形态改变不明显;Cyclin A 免疫反应阳性产物位于细胞核内,染色更浅,阳性细胞明显减少(SABC 法 DAB 染色,×100)

2. 图像分析结果:不同温度下,HeLa 细胞 Cyclin E 和 Cyclin A 免疫反应产物的平均 OD 值均随温度的升高而减小(表 2)。

表2 不同温度组 HeLa 细胞 Cyclins 免疫反应产物的 OD 值比较($\bar{x} \pm s$)

分 组	Cyclin E	Cyclin A
37℃组	0.285 ± 0.047	0.323 ± 0.082
40℃组	0.262 ± 0.062 *	0.250 ± 0.042 *
43℃组	0.237 ± 0.042 *	0.185 ± 0.044 *

注:与 37℃组相比, * $P < 0.01$

讨 论

我们的研究表明,40 ~ 43℃ 的高温可明显抑制 HeLa 细胞周期的进程。40℃ 时,其细胞周期的进程即明显受到阻滞,大量细胞滞留于 G_1 期, S 期和 G_2 /M 期的细胞明显减少。

细胞周期的进程是受控制的,周期因子依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)控制着细胞周期各时相之间的顺序转换,其活性由周期因子(Cyclin)激活^[2]。细胞周期各时相的 CDK/Cyclin 各不相同。 G_1 期首先出现 Cyclin D,并同时诱导 CDK₂、CDK₄ 及 CDK₅ 的表达,分别结合成 CDK₂-Cyclin D、CDK₄-Cyclin D 及 CDK₅-Cyclin D,促使细胞通过细胞周期 G_1 的限制点。同时,Cyclin E 累积合成,并与 CDK₂ 结合成 CDK₂-Cyclin E,使 DNA 复制的启动因子磷酸化而激活,促进细胞由 G_1 进入 S 期。S 期以 CDK₂-Cyclin A 的作用为主,由 G_2 进入 M 期时,则以 CDC₂ (即 CDK₁)-Cyclin B 及 CDC₂-Cyclin A 的作用为主^[3,4]。一般来说,CDC₂ 或 CDK 的含量比较恒定,其活性主要受 Cyclin 的调节,而在细胞周期各时相会有不同的 Cyclin 进行合成与降解。CDC₂ 或 CDK 必须与 Cyclin 结合,并在一定的部位被磷酸化,才能显示其激酶活性^[5,6]。我们的研究结果显示,HeLa 细胞在 40℃ 时,其 Cyclin E 的免疫反应强度明显下降,43℃ 时,下降更明显。结果表明,高温抑制了 Cyclin E 的表达,使 CDK₂ 不能与 Cyclin E 结合,导致 DNA 复制的启动因子不能被磷酸化而激活,细胞滞留于 G_1 期。

我们的研究结果进一步显示,在 40 ~ 43℃, HeLa 细胞的 Cyclin A 的免疫反应强度也随温度的升高而明显下降,表明高温同时抑制了 Cyclin A 的表达。转录因子 E2F 最初是与抑癌基因 Rb 蛋白结合而处于失活状态,当 Cyclin A 与 CDK₂ 结合而活化时,可使 Rb 蛋白磷酸化,E2F 即与磷酸化的 Rb 蛋白分离,游离的 E2F 具有转录活性,可促使与 DNA 合成有关的基因获得表达,从而促进 DNA 的合成^[7,8]。当 Cyclin A 的表达受到高温的抑制时,DNA 合成即受到抑制。

Abe 等^[9]的研究发现,人胶质细胞瘤经高温作用后,其 CDK 抑制因子 p21 有明显的增加。p21 能抑制 CDK-Cyclin 复合物的活性,从而使细胞周期发生阻

滞。Ohshita 等^[10]的研究表明,高温使人成胶质细胞瘤滞留于 G₂ 期,同时使 Cyclin B 明显减少。由此可见,高温对肿瘤细胞周期的影响是多方面的。对同一肿瘤,高温可影响细胞周期的正向和负向调节因子,使细胞周期停留于某一时相;对不同的肿瘤,高温可能影响不同的细胞周期调节因子,使细胞停留于不同的时相。我们的研究表明,高温抑制 Cyclin E 和 Cyclin A 的表达可能是使 HeLa 细胞滞留于 G₁ 期的原因之一。

参 考 文 献

- 1 刘仁刚,罗贤雯,周洁萍,等. 高温对 HeLa 细胞的杀伤作用. 中华物理医学与康复杂志,2003,25:495-498.
- 2 Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. Environ Health Perspect, 1999, 107:5-24.
- 3 Pedram A, Razandi M, Hu RM, et al. Astrocyte progression from G₁ to S phase of the cell cycle depends upon multiple protein interaction. J Biol Chem, 1998, 273:13966-13972.
- 4 Boonstra J. Progression through the G₁-phase of the on-going cell cycle. J Cell Biochem, 2003, 90:244-252.
- 5 Papst PJ, Sugiyama H, Nagasawa M, et al. Cdc2-cyclin B phosphorylates p70 S6 kinase on Ser411 at mitosis. J Biol Chem, 1998, 273:15077-15084.
- 6 Chow JP, Siu WY, Ho HT, et al. Differential contribution of inhibitory phosphorylation of CDC2 and CDK2 for unperturbed cell cycle control and DNA integrity checkpoints. J Biol Chem, 2003, 278:40815-40828.
- 7 Akamatsu E, Tanaka T, Kato JY. Transcription factor E2F and cyclin E-Cdk2 complex cooperate to induce chromosomal DNA replication in Xenopus oocytes. J Biol Chem, 1998, 273:16494-16500.
- 8 Mitnacht S. Control of pRB phosphorylation. Curr Opin Genet Dev, 1998, 8:21-27.
- 9 Abe T, Tamiya T, Ono Y, et al. Accumulation of cell cycle regulatory proteins, p21 and p27, induced after hyperthermia in human glioma cells. Int J Hyperthermia, 2001, 17:499-507.
- 10 Ohshita N, Nishizaki T, Ishihara H, et al. Effect of hyperthermia on cyclin B expression in a human glioblastoma cell line. J Neurooncol, 1995, 25:127-133.

(收稿日期:2003-11-17)

(本文编辑:吴 倩)

· 短篇论著 ·

分米波腔内治疗呼吸道阻塞的应用及疗效

叶燕青 徐启勇 邹世清 刘瑛琳 戴莉

各种原因所致的呼吸道阻塞,严重影响患者肺功能,甚至危及生命。手术治疗虽然能解除阻塞,但有创伤大、风险大,且术后并发症多等不利的情况。呼吸道由于其特殊的解剖结构和生理功能,既往使用的激光气道内治疗方法亦因创伤大、烟雾大、设备成本高等原因限制了其使用范围。分米波是波长为 10~100 cm 的高频电磁波,因其具有反射、折射、绕射等特性而蕴含有一定的能量,它能引起生物组织的热效应,起到微创或无创的治疗作用。近 1 年来,我院采用分米波在呼吸道内治疗(简称腔内治疗)不同原因所致的呼吸道阻塞或狭窄患者 10 例,现就其应用和疗效报道如下。

一、资料与方法

呼吸道阻塞或狭窄患者 10 例,其中男 3 例,女 7 例;年龄 20~75 岁;均因咳嗽、咳痰或咯血引起不同程度的呼吸困难,X 线胸片或 CT 检查发现肺不张或膨胀不全,经纤维支气管镜检查发现呼吸道有阻塞性病变,且经活组织检查确诊。其中支气管内膜结核 3 例,息肉 2 例,多发性向心性肉芽肿 2 例,慢性炎症 2 例,肺癌 1 例。阻塞部位分别在左、右主支气管、段支气管。内膜结核和慢性炎症患者分别经规范抗结核治疗和合理抗生素治疗,阻塞不能解除。肺癌患者因失去手术、放射治疗和化学治疗的机会,而采取分米波治疗。

纤维支气管镜检查前作常规术前准备,鼻咽部用 1% 地卡因表面麻醉,气管、支气管粘膜用 2% 利多卡因表面麻醉。首先

将纤维支气管镜插到病变一侧,到达病变稍上方,然后经纤维支气管镜活检孔插入分米波辐射器,谨慎地使辐射器接触病变部位,对准病灶进行分米波治疗(安徽产 HJ 系列分米波治疗机)。使用的分米波功率根据病变的性质和部位选定,一般内膜结核、肉芽肿、慢性炎症 30~70 W,每次 5~6 s;肺癌、息肉 40~80 W,每次 5~6 s。可重复多次治疗,但每次须间隔 5~10 s,以免辐射器及导丝过热损伤纤维支气管镜,同时须注意避免损伤病变周围的正常组织。较小的息肉经分米波腔内治疗 1 次即可达到消除病变的效果;范围较大、阻塞明显的病变,则需反复多次腔内治疗,每次间隔 2~3 d。

二、结果

10 例患者中,9 例良性病变者,经分米波腔内治疗后原不张的肺完全复张,每 3 个月经纤维支气管镜复查 1 次,随访最长者已近 1 年,未发现病灶复发,治疗效果良好。1 例肺癌患者经治疗后气道阻塞基本缓解,患者呼吸困得到明显改善。

三、讨论

利用波长为 10~100 cm 的电磁波治疗疾病的方法,称分米波疗法,是最新的高频电疗技术之一。分米波和其他方法相比有产热大、作用深等优点,广泛应用于肌腱、关节损伤的治疗^[1-3]。分米波腔内治疗主要是利用其有关物理特性而开发的一种新的治疗手段^[4]。分米波与一般物理加温不同,辐射器可在瞬间产生高温,病变组织在高温下发生血流停滞、淤血缺氧、细胞色素氧化酶活性降低,导致内呼吸受抑制。内镜下可见溶