

· 基础研究 ·

高温对 HeLa 细胞张力原纤维和微管纤维的影响

刘宇炜 余达经 刘仁刚 刘云华 周洁萍

【摘要】目的 研究高温对肿瘤细胞张力原纤维和微管纤维的影响。**方法** 将 HeLa 细胞分成 8 组,置于不同温度(37,40,43 和 45℃)下,分别经不同时间(1 h 和 2 h)水浴处理后,倒置显微镜下观察其形态变化,然后用考马斯亮蓝 R250 显示其张力原纤维,SABC 法显示其微管纤维。**结果** 当温度由 40℃ 升至 43℃ 的过程中,首先引起 HeLa 细胞张力原纤维的解聚,进而引起微管纤维的解聚,随着温度的升高和时间的延长,两者的变化逐渐趋同。而微管组织中心具有较强的保护作用。**结论** 温和性高温对 HeLa 细胞张力原纤维的影响可能强于微管纤维,两者都呈现出渐进式的解聚变化,这些变化都和高温导致的细胞毒性及凋亡有着非常密切的关系。

【关键词】 高温; HeLa 细胞; 张力原纤维; 微管纤维

Effects of hyperthermia on microfilaments and microtubules of HeLa cells LIU Yu-wei*, YU Da-jing, LIU Ren-gang, LIU Yun-hua, ZHOU Jie-ping. * Department of Anatomy, School of Medicine and Life Sciences, Jiangnan University, Wuhan 430056, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of hyperthermia on tonofibrils and microtubules of tumor cells. **Methods** HeLa cells were divided into eight groups, placed respectively in 37℃, 40℃, 43℃ and 45℃, incubated for 1h or 2hs. Inverted microscope was used to observe its morphologic changes, Coomassie Blue R250 and SABC method were used to show its tonofibrils and microtubules. **Results** Hyperthermia led to depolymerization of tonofibrils of HeLa cells earlier, then depolymerization of microtubules in the process of temperature ascending from 40℃ to 43℃. As the temperature decreases and the action time prolongs, both changes tend to become the same. The microtubule organizing center(MTOC) had powerful protection functions. **Conclusion** The mild hyperthermia exerted stronger effects on tonofibrils than on microtubules; Under the hyperthermia, both tonofibrils and microtubules presented gradually changes of depolymerization, which closely related with cytotoxicity and apoptosis induced by heat.

【Key words】 Hyperthermia; HeLa cells; Tonofibril; Microtubule

自 1866 年 Busch 发现高温对肿瘤细胞有杀伤作用以来,热疗已经成为一种较普遍的肿瘤治疗手段。近 20 年来,这一古老的疗法得到了迅速发展,并在临床上显示出了很好的效果,现已被公认为是除了手术、放疗、化疗和生物疗法以外的第 5 种疗法。临床上和实验中均已观察到高温单独或联合化疗、放疗,甚至手术治疗肿瘤的成功报道。

细胞骨架(cytoskeleton)包括微丝(microfilament, MF)、微管(microtubule, MT)和中间丝(intermediate filament, IF),是位于细胞质内的纤维状蛋白质,结构上呈网状、束状或带状等不同形态,广泛参与细胞内的多种功能,如细胞形态支撑与形态建成、细胞运动以及与膜相关的性质和功能、信息传递等^[1]。与正常细胞相比,肿瘤细胞的微丝和微管结构发生了明显的变化,而

中间丝则变化不大。这些由各种不同类型蛋白质组成的纤维,在细胞内均处于活跃的装配动态平衡之中,其平衡受包括温度在内的多种因素的影响^[1],而且各种细胞骨架结构对热疗的耐受情况也不尽相同^[2,3]。微丝多以贯穿细胞全长的张力原纤维形式存在,微管则从微管组织中心向外呈放射状排列,它们均属电镜下观察的细胞超微结构,但通过光镜观察到的纤维结构变化,可以从大体上描绘出其变化规律,为我们今后进一步通过电镜观察其重点部分的变化提供指导。为了探讨高温对肿瘤细胞骨架的影响,我们采用 HeLa 细胞作为模型进行了实验研究,以期进一步了解热疗的机制。

材料与方法

一、主要仪器设备

Shellab Model 2300 型自控式 CO₂ 孵育箱(Shellab 公司);YJ-450 型超净工作台(苏州净化设备厂);重庆 XSZ_D 倒置显微镜(重庆光学仪器厂);BS₂ 型电热恒温水浴箱(北京市医疗设备总厂)。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(NO.59836240)

作者单位:430056 武汉,江汉大学医学与生命科学学院解剖学教研室(刘宇炜);华中科技大学同济医学院解剖学教研室(余达经、刘仁刚、刘云华、周洁萍)

二、主要试剂

RPMI1640 培养基(美国 GIBCO BRL 公司产);考马斯亮蓝 R250(Fluka 进口分装);Tubulin- α Ab-2 小鼠单克隆抗体(美国 Neomarkers 公司产);SP-9002 免疫组化染色试剂盒和 DAB 试剂盒(北京中山生物技术公司产)。

三、细胞培养

人宫颈癌细胞系(HeLa)购自武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC, ATCC 引进),接种于含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基中,入 37℃、5% CO₂ 孵育箱培养。3 d 后细胞成片生长,用 0.25% 胰酶消化,分别转入 8 个放有盖玻片的 60 mm 培养皿中,加入适量 RPMI1640 培养基,使细胞单层生长于盖玻片上,形成细胞爬片,培养 24 h。

四、细胞加热

恒温水浴箱 4 个,预先将水温分别调至 37、40、43 和 45℃,并稳定 4 h 以上再进行实验。将 8 个培养皿分别放入 4 个水浴箱中,15 min 后开始计时,分别在 1 h 和 2 h 时从水浴箱中取出。

五、倒置显微镜下观察细胞形态变化

六、张力原纤维显示方法^[4]

弃去培养基,将盖玻片用 PBS 清洗 2 次;1% TritonX-100 抽提缓冲液处理 10 min 后, PBS 清洗 3 次;再用 2.5% 戊二醛固定 30 min,蒸馏水漂洗 2 次;然后用 0.2% 考马斯亮蓝 R250 染色 30 min,蒸馏水漂洗 2 次;置入含甲醇冰醋酸碟皿中(不含染料),在倒置显微镜直接窥视下,见细胞质内张力原纤维逐渐明显,背景清亮即终止。蒸馏水漂洗 3 次,次日干燥后用加拿大树胶封片,普通光镜观察并照相。

七、微管纤维显示方法

弃去培养基,将盖玻片用 PBS 清洗 3 次;室温下 4% 甲醛液固定 20 min, PBS 清洗 3 次;3% H₂O₂ 孵育 10 min, PBS 清洗 2 次;1% TritonX-100 抽提缓冲液处理 10 min 后,蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min。正常山羊血清工作液室温孵育 15 min。Tubulin Ab-2 一抗 1:100 稀释后室温孵育 1 h,生物素标记羊抗小鼠 IgG 室温孵育 15 min,辣根酶标记链霉卵白素(S-A/HRP)室温孵育 15 min,以上步骤间均用 PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。DAB 显色,自来水冲洗,加拿大树胶封片,普通光镜下观察并照相。

结 果

一、倒置显微镜下观察细胞形态学特征

37℃ 水浴后,细胞贴壁生长良好,呈扁平不规则多角形,细胞形态完整,核仁明显,并可见有大量核分裂

相;40℃ 水浴后,细胞形态与 37℃ 水浴后基本无差异,极少数可见梭形改变;43℃ 水浴后,有部分细胞浮起在培养基中,少量贴壁细胞有皱缩、变圆趋势,核凝集,胞浆浓缩,以 2 h 加热组为甚;45℃ 水浴后,有大量细胞坏死浮起在培养基中,贴壁细胞呈现明显坏死改变,细胞肿胀,2 h 组出现大量核碎裂现象。

二、张力原纤维改变

37℃ 水浴后,HeLa 细胞张力原纤维完整,有大量张力纤维贯穿细胞全长,接近平行分布,也有的交叉成网状(图 1);40℃ 水浴后,HeLa 细胞张力原纤维和细胞核染色加深,1 h 组变化不大,2 h 组贯穿细胞全长的张力原纤维数量减少;43℃ 水浴后,1 h 组张力原纤维分布较为散乱,少有贯穿细胞全长,多见较短支;2 h 组张力原纤维和细胞核明显深染,张力原纤维明显解聚变短,排列已无规则(图 2);45℃ 水浴后,HeLa 细胞张力原纤维和细胞核更加深染,张力原纤维较稀疏,排列极为紊乱,明显变短,出现许多小点状分布于细胞内(图 3)。

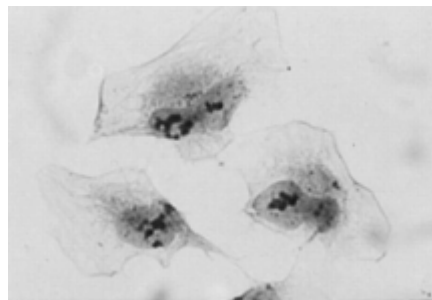


图 1 37℃ 水浴 2 h 后,HeLa 细胞张力原纤维的分布(×400)

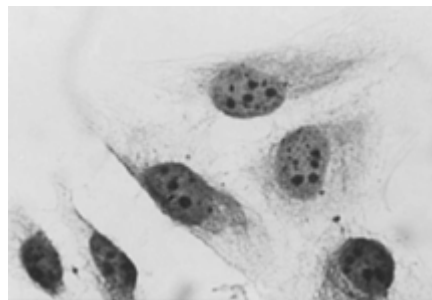


图 2 43℃ 水浴 1 h 后,HeLa 细胞张力原纤维的分布(×400)

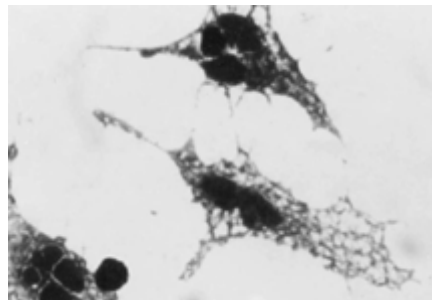


图 3 45℃ 水浴 2h 后,HeLa 细胞张力原纤维的分布(×400)

三、微管纤维改变

37℃ 和 40℃ 水浴后, HeLa 细胞内可见许多微管纤维组成网状结构, 从核周的微管组织中心 (microtubule organizing center, MTOC) 向胞质外缘伸展 (图 4); 43℃ 水浴后, HeLa 细胞内微管纤维变短, 密度变稀, 尤其是 2 h 组分布明显呈收缩趋势, 仅见 MTOC 附近有少量微管纤维存在 (图 5); 45℃ 水浴后, HeLa 细胞内微管纤维显色变深, 进一步变短、变少, 但 MTOC 仍可见, 2 h 组 MTOC 显色变浅, 附近有极少量微管纤维分布, 大部分已解聚 (图 6)。

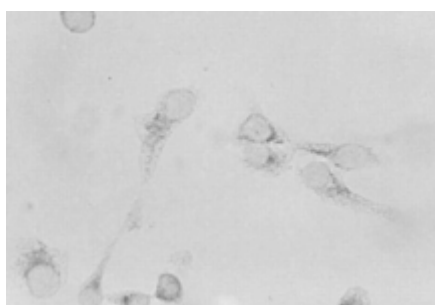


图 4 37℃ 水浴 2 h 后, HeLa 细胞微管纤维的分布 (×200)

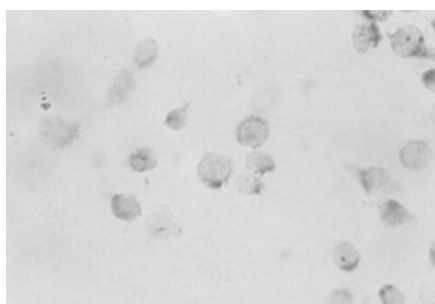


图 5 43℃ 水浴 2 h 后, HeLa 细胞微管纤维的分布 (×200)

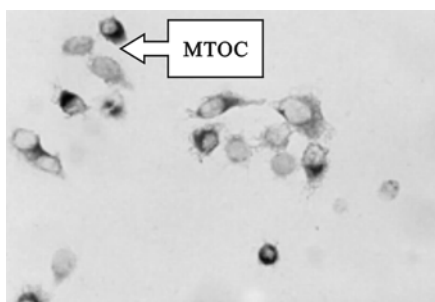


图 6 45℃ 水浴 1 h 后, HeLa 细胞微管纤维的分布 (×200)

讨 论

高温对肿瘤细胞的作用机制极为复杂, 且随着温度的升高和作用时间的延长, 其机制也会发生变化, 这已为我们先前的研究所证实^[5]。HeLa 细胞是人宫颈癌细胞, 细胞处于活跃的增殖状态。本研究表明 37℃ 时, 细胞处于旺盛的生长进程和分裂阶段, 图 1 中可见大量核分裂相, 张力原纤维和微管纤维

也处于活跃的装配平衡之中。40℃ 时, 细胞周期未受明显影响, 细胞的增殖活动似乎更趋活跃^[5], 这是因为处于胞质内的微管所受温度影响不明显, 结构变化不大; 而温度的升高却首先引起细胞膜的变化, 进而抑制 Na^+ 泵的功能^[6], 导致细胞内 K^+ 浓度下降, 同时细胞膜的有限损伤导致细胞内 Ca^{2+} 浓度升高^[7], 在低 K^+ 、高 Ca^{2+} 条件下, 聚合态的微丝和微管趋向于解聚成球状^[1]。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, 并能在解聚时将其释放入细胞内^[8]。有报道认为微管解聚后也能释放 Ca^{2+} ^[9]。 Ca^{2+} 浓度的升高能激活 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖性核酸内切酶, 诱发细胞凋亡^[10], 还可导致 JNK1 活性升高, 使抗凋亡蛋白 Bcl-2 磷酸化而失活。一方面, Bcl-2 的失活可使细胞内酸化; 另一方面, Bcl-2 的 87/70 丝氨酸位点磷酸化, 可导致 Bcl-2 与 Bax 结合能力下降, Bcl-2/Bax 比值低, 抗凋亡活性丧失^[11]。同时, 在细胞内, 肌动蛋白纤维 (微丝) 的点端还和 DNase1 相结合^[12], 在热疗致其解聚后, DNase1 活性不再受抑制^[13], 能进入核内将 DNA 链在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^[14], 在琼脂糖凝胶电泳上呈“阶梯状” (ladder pattern) 图谱。另外, Janmey^[3] 认为, 特殊序列的转录因子 NF κ B 与其抑制因子 I κ B 相连, 处于无活性状态。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, 活化后进入核内, 与 DNA 结合, 活性大大提高, 影响了核基因的正常表达, 启动了凋亡程序^[3]。可见, 热处理后微丝和微管的解聚可能和细胞凋亡有密切的关系。

随着温度的升高和 (或) 时间的延长, 高温对细胞膜的损伤进一步增加。Huang 等^[2] 的研究证明, 人甲状腺癌细胞在高温作用下引起 Integrin 消失, 进一步导致粘着斑成分脱磷酸化、解体而消失, 使微丝趋于解聚, 细胞贴壁能力因此而减弱, 胞体变圆而浮起。我们在实验中也看到 40℃ 作用 2 h 和 43℃ 作用后, HeLa 细胞张力原纤维都趋向解聚, 但后者显然更加明显, 尤其是 43℃ 作用 2 h 后, 张力原纤维大部分都已解聚变短。微管纤维和张力原纤维的变化情况大体相同, 证明细胞膜受损破裂后, 高温对细胞骨架的影响趋于一致。而当温度上升至 45℃, 可以导致细胞骨架迅速、持久的解聚变化, 但微管组织中心却可以保持 1 h 以上, 显示其具有较强的保护作用, 因而 HeLa 细胞微管纤维的热耐受能力可能强于张力原纤维。

结果提示, 高温对 HeLa 细胞骨架的影响, 随着

温度的升高和时间的延长而发生改变,而在热疗剂量的这两要素中,温度又处于决定性的地位,这一点也为其他学者的研究所证实^[15]。在温和性高温作用下,即当温度由 40℃ 升至 43℃ 的过程中,高温首先引起细胞膜的改变,继而引起张力原纤维的解聚,再进一步引起微管纤维的解聚,随着温度的升高和时间的延长,两者的变化逐渐趋同。可见,这是一个渐进式的过程,张力原纤维和微管纤维的解聚都和温度、时间呈正相关,在很大程度上又都受温度影响,同时两者和高温导致的细胞毒性及凋亡有着非常密切的关系。

参 考 文 献

- 1 汪堃仁,薛绍白,柳惠图,主编. 细胞生物学. 第 2 版. 北京:北京师范大学出版社,2001. 5: 226-299.
- 2 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.
- 3 Janney PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev*, 1998, 78: 763-781.
- 4 鄂征,主编. 组织培养和分子细胞学技术. 北京:北京出版社,2001. 139-161.
- 5 刘仁刚,张炼,周洁萍,等. 高温影响 HepA 细胞周期进程的研究. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24: 144-146.
- 6 Mikkelsen RB, Asher CR. Effects of hyperthermia on the membrane

- potential and Na⁺ transport of V79 fibroblast. *J Cell Physiol*, 1990, 144: 216-221.
- 7 Hajnoczky G, Lin C, Thomas AP. Luminal communication between intracellular calcium stores modulated by GTP and the cytoskeleton. *J Biol Chem*, 1994, 269: 10280-10287.
 - 8 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.
 - 9 Rosania GR, Swanson JA. Microtubules can modulate pseudopod activity from a distance inside macrophages. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1996, 34: 230-245.
 - 10 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.
 - 11 Basu A, Haldar S. Microtubule-damaging drugs triggered bcl2 phosphorylation-requirement of phosphorylation on both serine-70 and serine-87 residues of bcl2 protein. *Int J Oncol*, 1998, 13: 659-664.
 - 12 Podolski JL, Steck TL. Association of deoxyribonuclease I with the pointed ends of actin filaments in human red blood cell membrane skeletons. *J Biol Chem*, 1988, 263: 638-645.
 - 13 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.
 - 14 Mannherz HG, Peitsch MC, Zanotti S, et al. A new function for an old enzyme: the role of DNase I in apoptosis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1995, 198: 161-17.
 - 15 倪秉强,金志魁. 高温对人宫颈癌细胞系(HeLa)生物学和生物化学作用的实验研究. *现代妇产科进展*, 1994, 3: 125-128.

(修回日期:2003-08-18)

(本文编辑:熊芝兰)

· 病例报道 ·

氦-氖激光照射治愈结肠外瘘 1 例

耿仁起 卞学平

患者,男,59 岁,因阑尾周围脓肿行脓肿切开引流术,治疗 25 d 痊愈出院。10 d 后突感下腹疼痛伴发冷、发热,原右下腹切口处溢出脓性液体,即来院就诊。B 超示:右下腹囊实性占位病变。外科诊断为阑尾周围脓肿术后并发腹腔脓肿。经应用抗生素及对症治疗 4 d 后无好转,又在硬膜外麻醉下行腹腔脓肿引流术,术中吸出脓液约 259 ml,脓腔约 18 cm × 16 cm × 10 cm,置烟卷引流。术后 2 d 患者出现电解质紊乱,引流口溢出大量粪便样肠内容物。行瘘管插管造影,诊断为回盲部结肠外瘘。经引流、抗感染、纠正酸碱平衡及支持疗法治疗 8 d,全身症状改善,随后转入我科。查体,患者右下腹有一长约 10 cm 纵形手术瘢痕,其外侧下 1/3 见一约 1 cm × 0.8 cm 肠瘘外口,压迫可见粪便样物溢出,周围皮肤糜烂,可触及约 8 cm × 8 cm 包块,边界不清,质地中等,压痛明显。采用上海产 HN2SQ-Z 型氦-氖激光照射器,输出功率为 25 mW,耦合光纤输出功率 15 mW,光斑直径 0.2 cm,功率密度为

428 mW/cm²,套入直径为 0.5 cm 无菌玻璃管内,插入瘘管由内向外照射 10 min 后换扩束镜,表面照射 10 min,创面以无菌凡士林不覆盖包扎,每日 1 次。照射 3 d 后瘘管溢出物减少,周围皮肤糜烂减轻。照射 6 d 后外瘘口缩小至 0.5 cm × 0.4 cm,周围皮肤结痂。照射 10 d 外瘘口无溢出物,肛门排便正常。照射 13 d 外瘘口闭合结痂,右下腹包块消失。仅行表面照射,照射 17 d 创面愈合,消化道钡剂造影示回盲部结肠瘘口消失,痊愈出院,随访半年无复发。

讨论 回盲部结肠瘘多继发于阑尾周围脓肿、创伤和肿瘤等。由于肠液丢失可致脱水、电解质紊乱和营养不良,且肠液中消化酶的腐蚀作用,可引起周围组织和皮肤糜烂,并由于肠内细菌污染而引起不同程度局部和全身性感染,导致肠瘘难以愈合。氦-氖激光照射可增强免疫功能和细胞膜的通透性,改善局部血液循环,使组织中各种酶的活性增强,加速成纤维细胞增生,促使肉芽组织和上皮细胞增生和胶原的形成,促进创口愈合。

(收稿日期:2003-06-11)

(本文编辑:阮仕衡)