

低热环境影响结直肠癌细胞增殖凋亡的机制研究

杜晓翔 叶蕾

[摘要] 目的 探讨低热环境对结直肠癌细胞增殖凋亡的影响。方法 分别以 37 ℃, 5% CO₂ 恒温培养和 39 ℃, 5% CO₂ 恒温培养的结直肠癌细胞株 Caco-2 为低热组和对照组。采用实时无标记细胞分析技术 (RTCA) 观察两组细胞增殖抑制情况; 采用流式细胞术检测活性氧水平与线粒体膜电位; 采用实时定量聚合酶链式反应 (QPCR) 检测增殖凋亡相关基因半胱天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 及热休克蛋白 70 (HSP70) 等的表达情况。结果 RTCA 结果显示: 对照组于铺板后的 48 h 左右进入平台期, 低热组于铺板后的 24 h 左右进入平台期; 流式细胞术结果显示: 低热组的活性氧与线粒体膜电位与对照组差异不大; QPCR 结果显示: 相较于对照组, 低热组 Caspase-3 表达下调, Bcl-2 表达上调, 同时 HSP70 的表达明显上调, 差异均有统计学意义 (t 分别=17.29、-33.38、-539.54, P 均 < 0.05)。结论 低热环境未对细胞产生明显的损伤, 反而使得 HSP70 表达明显提高, 并可促进结直肠癌细胞的增殖同时抑制细胞凋亡。

[关键词] 结直肠癌; 低热; 增殖; 凋亡; 半胱天冬氨酸蛋白酶-3; B 淋巴细胞瘤-2; 热休克蛋白 70

Mechanism of proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells affected by low-grade fever environment DU Xiaoxiang, YE lei. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of low-grade fever on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells. **Methods** Colorectal cancer cell lines Caco-2 were cultured at 37 ℃, 5% CO₂ and 39 ℃, 5% CO₂ constant temperature incubator as low-grade fever group and control group, respectively. RTCA real-time unlabeled cell assay was used to observe the cell growth and the inhibition of proliferation. Reactive oxygen species (ROS) level and mitochondrial membrane potential were detected by flow cytometry. The expressions of Caspase-3, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Heat shock protein 70 (HSP70) were detected by QPCR. **Results** RTCA results showed that the low-grade fever group entered the plateau stage earlier than the control group. Flow cytometry showed that the ROS level and mitochondrial membrane potential of the low-grade fever group were not significantly different from those of the control group. QPCR results showed that Caspase-3 expression was down-regulated, Bcl-2 expression was up-regulated, and HSP70 expression was significantly up-regulated in the low-grade fever group when compared with the control group (t =17.29, -33.38, -539.54, P <0.05). **Conclusion** Low-grade fever environment did not cause obvious damage to cells, but increased the expression of HSP70 significantly, and promoted the proliferation of colorectal cancer cells and inhibited apoptosis.

[Key words] colorectal cancer; low-grade fever; proliferation; apoptosis; Caspase-3; B-cell lymphoma-2; heat shock protein 70

结直肠癌是全世界仅次于肺癌和乳腺癌的第三大恶性肿瘤,也是癌症死亡的第二大常见原因^[1]。

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2019.05.006

作者单位: 325000 浙江温州, 温州医科大学附属第一医院药剂科

低热是其最常见的临床症状, 不仅病程较长且易反复, 严重影响患者的生活质量。低热环境是否影响肿瘤细胞的增殖和凋亡尚不明确。同时有文献报道热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 与发热相关^[2]。本次研究探讨低热环境对结直肠癌细

胞增殖凋亡的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 本次研究从2018年8月至2019年1月在温州医科大学附属第一医院外科实验室进行实验。将Caco-2细胞(由中科院上海生命科学研究院细胞资源中心提供)培养在含20%胎牛血清(由美国Gibco公司生产)的DMEM培养液(由美国Gibco公司生产)中,并置于37℃,5%CO₂培养箱。实验前,调整细胞至适当密度并铺板于6孔板中,当细胞融合度为50%时,开始正式实验。对照组置于37℃,5%CO₂培养箱;低热组置于39℃,5%CO₂培养箱(由美国Thermo公司生产)。两组细胞培养72h后,用倒置相差显微镜(由德国Leica公司生产)观察细胞形态学变化。

1.2 RTCA 观察细胞生长曲线 将RTCA实时无标记细胞分析仪(由美国ACEA Biosciences公司生产)分别置于37℃,5%CO₂培养箱和39℃,5%CO₂培养箱中以观察两组的细胞生长曲线,反映增殖抑制情况。以每孔10⁴个细胞进行铺板检测,观察铺板后72h内Caco-2细胞生长情况。

1.3 流式细胞术检测细胞活性氧 两组细胞中培养24h后利用0.25%胰酶消化,离心收集细胞,磷酸盐缓冲液清洗1次,弃去上清,用稀释好的活性氧标记溶液(由上海碧云天生物技术有限公司生产)重悬细胞,37℃避光孵育20min,清洗离心收集细胞,用400μl磷酸盐缓冲液重悬细胞,以标准程序用流式细胞仪(由美国BD公司生产)检测,计数并获取1万个细胞,结果用流式分析软件Flowjo分析细胞活性氧情况。

1.4 流式细胞术检测线粒体膜电位 两组细胞中培养24h后利用0.25%胰酶消化,离心收集细胞,磷酸盐缓冲液清洗1次,弃去上清,用制备的JC-10工作液(由北京索莱宝科技有限公司生产)重悬细胞,37℃避光孵育20min,清洗离心收集细胞,用400μl JC-10缓冲液重悬细胞,以标准程序用流式细胞仪检测,计数并获取1万个细胞,结果用流式分析软件Flowjo分析细胞线粒体膜电位情况。

1.5 real-time RT-PCR 检测 mRNA 表达 两组细胞中培养24h后采用Trizol试剂盒(由美国Gibco公司生产)提取各组细胞总RNA,测定260/280nm吸光度值以确定纯度和浓度。根据RT-PCR试剂说明书将RNA逆转录成cDNA。针对天冬氨酸蛋白水解

酶-3(cysteine-containing aspartate specific proteases-3, Caspase-3)、B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、HSP70 mRNA设计特异性引物,以GAPDH作为内参,采用real-time PCR相对定量法进行检测。引物序列见表1。

表1 扩增细胞增殖凋亡相关基因及HSP70 mRNA 特异性引物序列

基因	序列(5'→3')	长度/bp
Caspase-3	CAGCTGGTCACATGGTGAGG	178
	CCATAGGCACCCGACACCAAT	
Bcl-2	GGTGAAGTGGGGGAGGATTG	193
	GCCCAGACTCACATCACCAA	
HSP70	GCAGGCCAAGTTGCTGAATC	175
	TCGTAAACCGCTTCCTCAC	
GAPDH	CCGTATCGGACGCCTGGTT	126
	CCGTGGGTAGAGTCATACTGGAAC	

取逆转录产物1μl进行定量PCR,PCR扩增体系:5μl 2×SYBR Green 荧光定量试剂、上下游引物各1μl,终浓度为200nmol/L、1μl cDNA、2μl 反应缓冲液。扩增程序为:95℃ 5min、95℃ 10s、60℃ 35s,40个循环。通过溶解曲线评价PCR结果可靠性,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对mRNA表达量。

1.6 统计学方法 采用SPSS 13.0软件包进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。计量资料比较采用t检验;计数资料比较采用精确概率法。设P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低热环境对结直肠癌细胞生长的影响见图1

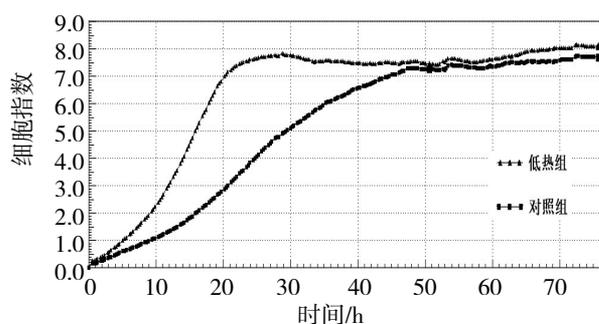


图1 低热环境对结直肠癌细胞生长的影响

由图1可见,对照组于铺板后的48h左右进入平台期,低热组于铺板后的24h左右进入平台期。

2.2 低热环境对结直肠癌细胞活性氧水平的影响见图2

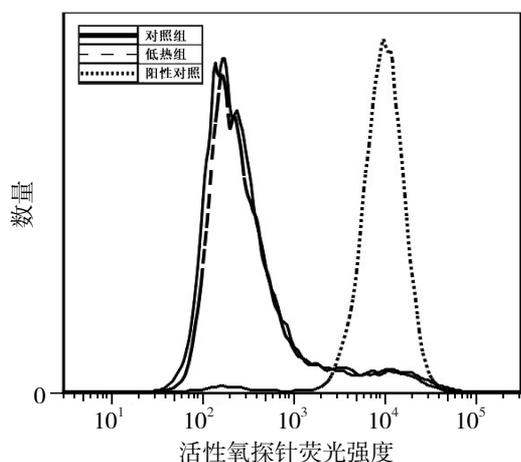


图2 低热环境对结直肠癌细胞活性氧水平的影响

由图2可见,相较于对照组,低热组细胞活性氧水平并未出现明显改变($P>0.05$)。

2.3 低热环境对结直肠癌细胞线粒体膜电位的影响见图3

由图3可见,与对照组比较,低热组细胞线粒体膜电位Q2区并未出现明显改变(0.16% vs 0.23%, $P>0.05$)。

2.4 低热环境对结直肠癌细胞 Caspase-3、Bcl-2、HSP70 mRNA 表达的影响见图4

由图4可见,相较于对照组,低热组 Caspase-3 表达下调,Bcl-2 表达上调,同时 HSP70 的表达明显上调,差异均有统计学意义(t 分别=17.29、-33.38、-539.54, P 均 <0.05)。

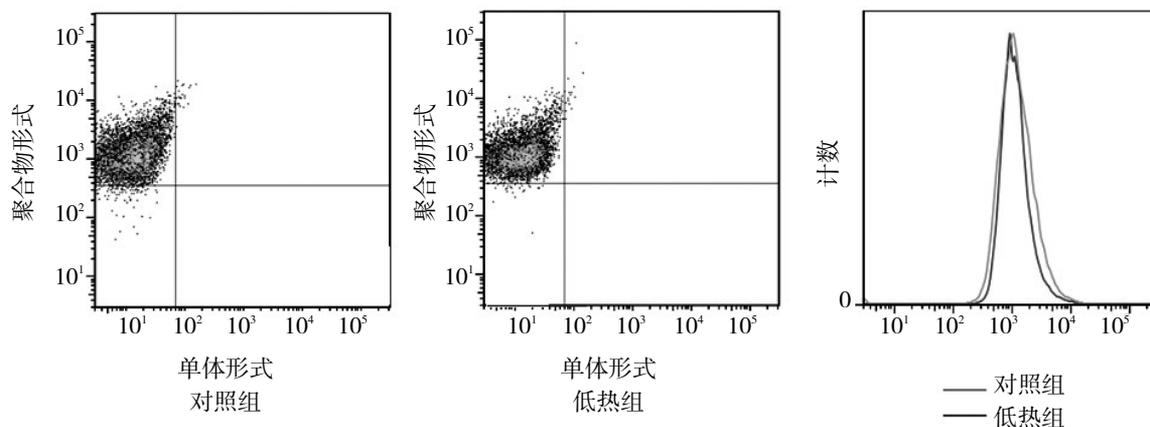


图3 低热环境对结直肠癌细胞线粒体膜电位的影响

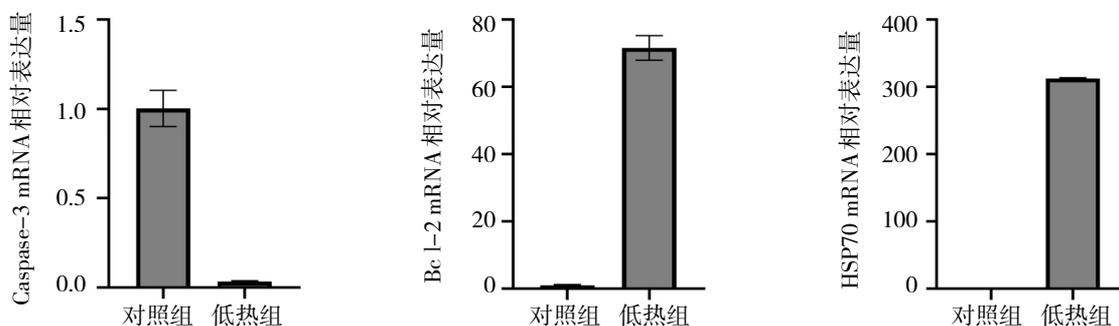


图4 低热环境对结直肠癌细胞 Caspase-3、Bcl-2、HSP70 mRNA 表达的影响

3 讨论

1962年,意大利遗传学家 Ritossa 等首次注意到,黑腹果蝇的唾液腺中有一组特定的基因在高温下被激活。1974年,该基因产物被鉴定并命名为 HSPs^[3]。HSPs 被认为是细胞内的伴侣,在维持蛋白质稳定、维持细胞在各种环境压力或损伤下的存活方面发挥着核心作用。HSPs 在许多修复过程中都有帮助,包括受损蛋白的重新折叠,以及清除那些会积累并引发细胞死亡或凋亡的不可修复的受

损蛋白^[4]。而在癌症中,HSPs 表达失调,导致表达升高,通过阻止程序性细胞死亡和支持自主细胞生长来促进癌症,最终导致对热、化疗和其他压力的抵抗^[5]。研究报道称,与癌旁组织相比,肿瘤组织中 HSP60、HSP70、HSP-90 α 的 mRNA、蛋白水平及阳性率均明显升高^[6]。HSP70 通过蛋白质质量控制调控肿瘤发生^[7]。HSP70 可参与蛋白质重塑来调节蛋白质稳态^[8,9]。

本次研究探讨低热环境对结直肠癌细胞增殖

凋亡的影响。低热作为结直肠癌常见的临床症状,持续时间可达数周以上,发热时应用抗生素和抗过敏药物效果常常不明显,但应用抗肿瘤药可退热。低热环境可能对肿瘤发生发展产生影响的研究却鲜有报道。在前期研究中偶然发现在偏高的温度中,Caco-2细胞增殖速度比37℃温度中更快。本次研究结果显示,低热组的活性氧水平与线粒体膜电位与对照组差异不大,提示低热环境不足以产生明显活性氧水平和线粒体膜电位的丧失,表明低热环境未对细胞产生明显的损伤。同时相较于对照组,低热组Caspase-3表达下调,Bcl-2表达上调,表达明显提高(P 均 <0.05),提示低热组凋亡减弱而增殖能力增强。HSP70参与细胞凋亡的抑制。可见低热的出现,对肿瘤细胞的进一步生长与发展是有正向作用的,低热环境上调了结直肠癌细胞HSP70的表达,诱导细胞增殖并抑制了其凋亡,对结直肠癌预后有不良影响。提示在临床上,对待肿瘤患者的低热表现应更加重视,可积极采取通过抑制HSP70水平等方法来解除肿瘤环境中的低热状态,从而抑制肿瘤的加速恶化。

参考文献

- 1 WHO. Cancer. [https:// www. who. int / en / news-room / fact - sheets/detail/cancer](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer).2018.9.12
- 2 Di YP, Repasky EA, Subjeck JR. Distribution of HSP70, protein kinase C, and spectrin is altered in

lymphocytes during a fever-like hyperthermia exposure[J]. J Cell Physiol,1997, 172(1): 44-54.

- 3 Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs[J]. J Mol Biol, 1974, 84(3): 389-398.
- 4 Doyle SM, Genest O, Wickner S. Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(10): 617-629.
- 5 Khong T, Spencer A. Targeting HSP 90 induces apoptosis and inhibits critical survival and proliferation pathways in multiple myeloma[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(10): 1909-1917.
- 6 Zhang WL, Gao XQ, Han JX, et al. Expressions of heat shock protein (HSP) family HSP 60, 70 and 90alpha in colorectal cancer tissues and their correlations to pathohistological characteristics[J]. Ai Zheng, 2009, 28(6): 612-618.
- 7 Seo J, Han SY, Seong D, et al. Multifaceted C-terminus of HSP70-interacting protein regulates tumorigenesis via protein quality control[J]. Arch Pharm Res, 2019, 42(1): 63-75.
- 8 Genest O, Wickner S, Doyle SM. Hsp90 and Hsp70 chaperones: Collaborators in protein remodeling[J]. J Biol Chem, 2019, 294(6): 2109-2120.

(收稿日期 2019-04-02)

(本文编辑 蔡华波)



欢迎投稿

欢迎征订