

急性热应激对草鱼肾细胞的影响

童娜 尹晓燕 李大鹏 汤蓉

华中农业大学水产学院/淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心/农业部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070

摘要 将草鱼肾细胞(CIK)在 28 °C 条件下培养 24 h 后, 分别置于 28(对照)、32、36 和 40 °C 的条件下暴露 2 h, 测定不同温度处理组的细胞乳酸脱氢酶(LDH)漏出率、细胞周期的改变、细胞内多泛素化蛋白水平以及 *caspase-3* 和 *bcl-2* 的表达变化; 置于 28(对照)、32、36 和 40 °C 的条件下暴露 12 h, 测定不同温度处理组的细胞活力。试验结果表明, 热应激引起细胞活力显著下降, 导致 CIK 细胞的 LDH 漏出率显著上升, 多泛素化蛋白表达量显著增加, *bcl-2* 的表达量显著下调和 *caspase-3* 的表达量显著上调, G₀/G₁ 期细胞显著减少。急性热应激可能会引起 CIK 的细胞膜通透性和蛋白质表达量的变化, 从而诱导细胞启动凋亡。

关键词 急性热应激; 草鱼肾细胞; 细胞凋亡

中图分类号 Q 952.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)04-0088-05

温度是影响鱼类生理活动最重要的环境因子^[1]。温度可以决定生物生活范围, 影响生物的生长速率、生理生化水平、新陈代谢和生命活动^[2]。环境温度的变化会影响细胞内生物分子和结构成分的组成和功能, 比如蛋白质的折叠、组装、活性和稳定性, 脂质的结构以及细胞膜的流动性和通透性等^[3]。急剧的温度变化往往会对动物机体产生急性热应激反应。热应激会改变膜脂的脂类, 引发大量的氧化损伤, 影响细胞分化和细胞凋亡等生物学事件。细胞凋亡是动物维持个体正常生理过程所必需的一种生物学行为, 受一系列的基因调控。鱼类细胞的凋亡涉及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)家族、B-细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(*bcl-2*)的表达产物 Bcl-2 和 P53 蛋白等^[4]。细胞凋亡根据凋亡信号的来源可以分成死亡受体途径、线粒体途径和内质网凋亡途径^[5]。各种死亡途径之间不是相互孤立的, 而是相互都有着关联。在细胞凋亡的调控中, Caspase 蛋白家族是细胞凋亡的主要执行者, 特别是 Caspase-3, 是细胞凋亡的主要效应因子, 而 Bcl-2 对于抑制细胞凋亡起主要作用^[6-7]。高温、活性氧、诱变剂等很多因素可以诱导细胞凋亡^[8-9]。水温升高也会导致鱼体发生氧化应激^[10], 培养温度

的升高会影响金鱼原代鳍条细胞的增殖^[11], 同时也会导致泛素蛋白表达增加^[12]。本文以草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肾脏细胞为研究对象, 研究热应激对鱼类细胞活力以及凋亡的影响, 旨在为深入了解温度变化对鱼类细胞生理活动的影响提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

草鱼肾脏细胞系(CIK)为华中农业大学淡水生物细胞保藏中心保存, 用 25 cm² 或者 75 cm² 培养瓶单层传代培养, 生长培养基为含有 10% 灭活的胎牛血清的 M199 培养基, 其中含有 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素。细胞于 28 °C、5% CO₂ 的培养箱中静置培养。

1.2 试剂材料

M199 培养基和胰蛋白酶购自 GIBCO 公司; 胎牛血清购自四季青公司; 青-链霉素购自吉诺公司; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(噻唑蓝, MTT)购自 Amersco 公司; 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购自南京建成生物公司; 细胞裂解液购自碧云天生物技术研究, 多泛素一抗购自

收稿日期: 2014-01-15

基金项目: 国家大宗淡水鱼类产业技术体系资金项目(CARS-46-15)、国家自然科学基金项目(30970529)和中央高校基本科研业务费专项(2013PY077)

童娜, 硕士研究生, 研究方向: 水生生物学. E-mail: tongna318@sina.com

通信作者: 汤蓉, 博士, 讲师, 研究方向: 鱼类生理学. E-mail: tangrong@mail.hzau.edu.cn

ENZO 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠二抗购自谷歌生物科技公司;Trizol 为 Invitrogen 公司生产;引物合成来自生工生物工程公司;反转录试剂盒和 SYBRGreen 购自 TaKaRa 公司。

1.3 试验设计

CIK 细胞传代后,在 28 °C 的培养箱里培养 4 h 贴壁后,分别放入 28、32、36 和 40 °C 的培养箱中培养 12 h,然后进行细胞活力检测。在检测细胞活力后,将在 28 °C 培养了 24 h 的传代 CIK 细胞分别转入 28、32、36 和 40 °C 的培养箱进行急性热应激暴露试验,以 28 °C 为对照温度,暴露时间为 2 h。急性热应激暴露结束后,每组细胞依据不同的检测指标所需的方法来收集细胞或者制成细胞匀浆,用于生化检测和相关基因转录水平研究。

1.4 细胞活力的检测

采用 MTT 微量酶标仪比色法检测细胞活力。取对数生长期的细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 。准备 4 块 96 孔板,每孔接 180 μL 的细胞悬液(每块细胞培养板均设置加入不含细胞的培养基的孔为空白对照)。细胞在 28 °C 的培养箱里培养 4 h 贴壁后,分别放入 28、32、36 和 40 °C 的培养箱中继续培养 12 h,培养结束后,每孔都加入 20 μL 的 MTT(5 mg/mL),28 °C 的孵育 4 h 后,吸弃含有 MTT 的培养基,每孔加入 150 μL 的二甲基亚砜(DMSO),室温震荡 10 min 后,在酶标仪 490 nm 处检测吸光值(D_{490})。以培养于 28 °C 的细胞所检测的细胞活力作为对照组,计算细胞相对活力。计算公式如下:

细胞相对活力 = (试验组 D 值 - 空白对照组 D 值) / (28 °C 组 D 值 - 空白对照组 D 值) $\times 100\%$

1.5 乳酸脱氢酶漏出率的检测

热应激暴露后,先收集每组的细胞培养液,用于后续对从细胞中漏到培养液中的 LDH 含量进行测定,使用 0.25% 胰蛋白酶将培养瓶中贴壁细胞消化后收集,1 200 r/min 离心 7 min 得到细胞沉淀,细胞沉淀用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次后,加入 2 mL 的 PBS,用超声波破碎仪破碎细胞,得到细胞匀浆,用于测定细胞中的 LDH 含量。

LDH 使用试剂盒(南京建成生物公司公司, A020-2)进行测定,并参考洪庆涛等^[13]的改进方法进行检测和计算。计算公式如下:

$$\text{细胞培养液 LDH 漏出率} = \frac{\text{培养液 } D \text{ 值}}{(\text{培养液 } D \text{ 值} + \text{细胞匀浆液 } D \text{ 值})} \times 100\%$$

1.6 蛋白斑点杂交

急性热应激暴露后,收集各个试验组的培养细胞,用细胞裂解液(碧云天生物技术研究,批号 p0013)提取总蛋白,将样品稀释到每 300 μL 蛋白样品含 50 ng 的总蛋白后,进行蛋白斑点杂交。使用多泛素化蛋白的一抗,检测多泛素蛋白, DAB 显色,拍照。采用 Image Studio Lite 3.1 软件读取各个斑点的灰度值,以对照组作为基值相比较,得出各个组的相对灰度值。

1.7 实时荧光定量 PCR

使用 Trizol 试剂提取样品的总 RNA,作为模板扩增 *bcl-2*、*caspase-3* 和 *ef1- α* 的基因片段,其中 *ef1- α* 作为内参物。引物参照 NCBI 上的草鱼基因序列,通过 Primer 5.0 软件设计引物,见表 1。然后进行实时荧光定量 PCR,得到各样品的 Ct 值,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算得到各基因的表达量。

表 1 被检测基因的引物序列

Table 1 Sequences of primers for the genes tested

基因 Gene	序列(5'-3') Primer sequence (5' to 3')	GenBank 序列号 GenBank accession No.
<i>bcl-2</i>	F: CCACCCATTGTCATACCTAACG R: ACCCACA GGGCTGTCACCTTCT	JQ713862.1
<i>caspase-3</i>	F: AGTCGCTGTGCTTCATTGTGTTT R: CGGTCTCTCTGAACAGGCTA	JQ793789.1
<i>eF1-α</i>	F: GGGCAAGGGCTCCTTCAAAT R: GCAACAATCAGCACGGCACA	GQ266394.1

1.8 细胞周期检测

采用 PI 染色法检测细胞周期。用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞(1 200 r/min 离心 7 min,弃上清),用 PBS 清洗 2 次(1 200 r/min 离心 7 min,弃上清),加 1 mL 预冷的 70% 乙醇,4 °C 固定过夜。细胞检测前,离心收集细胞,用 PBS 洗涤 1 次,加入 500 μL 的碘化丙啶(PI)染色液(含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNaseA)。4 °C 避光孵育 30 min,上流式细胞仪检测处于不同细胞时相的细胞比例。

1.9 数据分析

各处理组设置 3 个重复,数据以“平均数 \pm 标准差”表示,采用 SPSS19.0 软件进行单因素方差分析,差异显著表示为 $P < 0.05$,差异极显著表示为 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 细胞活力

与 28 °C 对照组相比,32、36 和 40 °C 处理组的

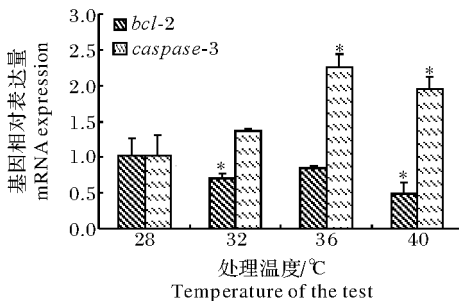
细胞活力分别为 79.86%、37.31% 和 32.90%。随着培养温度的升高,32、36 和 40 °C 处理组细胞活力均显著下降 ($P < 0.05$), 分别下降了 20.14%、62.69% 和 67.10%。

2.2 乳酸脱氢酶漏出率

热应激处理后,32、36 和 40 °C 组的 LDH 漏出率分别为:10.81%、11.93%、12.63%, 对照组 28 °C 组的漏出率为 9.07%。随着培养温度的升高,LDH 漏出率逐步上升,其中 36 °C 和 40 °C 处理组细胞的 LDH 漏出率与 28 °C 处理组(对照组)相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.3 *bcl-2* 和 *caspase-3* 的基因表达检测

通过实时荧光定量 PCR 的结果(图 1)可见,随着培养温度的升高,*bcl-2* 表达量呈现下调的趋势,



* 表示与对照组差异显著, $P < 0.05$ 。* indicates significant difference between treatment and control, $P < 0.05$.

图 1 培养温度对细胞 *bcl-2* 和 *caspase-3* 基因表达量的影响

Fig.1 Effect of temperature variations on the relative expression level of genes

32 °C 和 40 °C 处理组的表达量与 28 °C 处理组(对照组)存在显著性差异 ($P < 0.05$)。 *caspase-3* 表达量呈现上调的趋势,36 °C 处理组的表达量最高,36 °C 和 40 °C 处理组的表达量与 28 °C 处理组(对照组)有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.4 多泛素蛋白表达检测

与 28 °C 对照组相比,32、36 和 40 °C 处理组的多泛素蛋白相对表达量分别为 1.05、1.11 和 1.10。随着培养温度的升高,CIK 细胞的多泛素化蛋白的表达量逐渐增多,36 °C 和 40 °C 处理组与 28 °C 处理组(对照组)存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.5 细胞周期检测结果

随着培养温度的上升,G0/G1 期细胞显著减少,S 期和 G2/M 期细胞呈上升趋势,但无显著性差异(表 2)。32 °C 处理组和 36 °C 处理组与 28 °C 处理组(对照组)相比,G0/G1 期细胞显著减少 ($P < 0.05$),而 40 °C 处理组处于 G0/G1 期的细胞稍高于 36 °C 处理组。

3 讨论

不同种类、不同个体大小的鱼类适宜生长温度迥异。作为广温性鱼类的草鱼,其适宜存活温度范围为 20~32 °C^[14]。一般来说,淡水鱼类生存的水体温差会比较小,当水体温度升高的时候,鱼类将会出现呼吸困难的症状,同时可能会使蛋白发生错误折叠或者降解并最终导致细胞死亡^[15-16]。本研究发现,28 °C 是 CIK 相对适宜的培养温度。这与左文功

表 2 温度变化对细胞周期的影响¹⁾

Table 2 Effect of temperature variations on the cell cycle

细胞周期时相 Phases of cell cycle	温度/°C Temperature			
	28	32	36	40
G0/G1	62.140±2.935	55.640±2.874*	55.360±1.287*	58.480±3.807
S	29.097±2.910	32.397±1.163	34.167±2.121	30.200±4.365
G2/M	8.757±0.483	11.963±3.145	10.470±0.871	11.317±0.673

1) * 表示与对照组差异显著, $P < 0.05$ 。* indicates significant difference between treatment and control, $P < 0.05$.

等^[17]建立 CIK 细胞系时所得的结论一致。CIK 在 32、36 和 40 °C 的培养箱中培养 12 h 后,与对照组(28 °C)相比,细胞活力显著下降。这说明急性的热应激可抑制细胞的存活。LDH 存在于正常细胞的胞质中,当细胞受到损伤时,细胞膜的通透性会发生变化,LDH 就会从胞内释放到胞外,因此,通过检测乳酸脱氢酶的漏出率可以检测细胞膜的完整性。Nishad 等^[18]发现,当温度升高时,伯式肩孔南极鱼

(*Trematomus bernacchii*)的骨骼肌组织的 LDH 的漏出率会升高。我们的试验结果显示,随着热应激温度的升高,CIK 细胞的 LDH 漏出率逐步上升(图 1),说明热应激会引起细胞损伤,使细胞膜的通透性增加。

在蛋白质的降解和蛋白质的相互作用等过程中,泛素化是必不可少的^[19]。当细胞受到应激时,泛素-蛋白酶体途径启动,选择性降解某些蛋白质,

泛素蛋白酶体途径参与细胞凋亡、细胞信号转导等一系列生理功能。当外界环境温度发生变化的时候,为了适应环境,广温性的鱼类自身编码细胞应激反应相关蛋白基因的表达会发生变化。我们的试验结果表明,36℃和40℃处理组的CIK细胞的多泛素结合蛋白的表达与28℃处理组(对照组)相比显著性地升高。Logan等^[12]也发现热应激会导致虾虎鱼(*Gillichthys mirabilis*)体内HSP70和泛素蛋白基因的表达都上调。细胞内多泛素化蛋白的表达量增多说明急性的热应激使蛋白发生了损伤,泛素结合到了这些因为应激损伤而需要被降解的蛋白上。

Lewis等^[16]发现虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)在受到热应激后,血细胞中与凋亡和造血功能相关的基因表达都发生上调。而Cao等^[20]发现水体中所含的氟化物可导致鲤的肝脏细胞发生凋亡,凋亡相关基因**bcl-2**的表达量与氟化物的含量呈负相关。我们的试验结果显示,凋亡基因**caspase-3**的表达随着CIK培养温度的升高出现上调,而抑制凋亡基因**bcl-2**的表达随着温度的升高出现下调。高温可能破坏了线粒体膜导致**bcl-2**蛋白减少,细胞色素C释放到胞外激活**caspase-3**,开始诱导细胞凋亡。G0/G1期是DNA合成前期,是一个敏感点,若细胞在此时被某些因素抑制则无法顺利进入到DNA合成期(S期),会导致处于G0/G1期的细胞量增多,而S期和DNA合成后期G2/M期的细胞量会减少,在我们的试验中随着处理温度的升高G0/G1期细胞显著减少,S期和G2/M期细胞呈上升趋势,但无显著性差异,说明热应激并没有导致细胞周期的阻遏。这可能是因为升温处理的时间较短,并没有达到凋亡的高峰期。

总之,细胞培养温度的升高会抑制CIK的存活,短期的急性升温会导致CIK细胞的细胞膜和蛋白质损伤,并启动细胞凋亡的信号通路。升温诱导CIK发生凋亡的具体机制还需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 龙华. 温度对鱼类生存的影响[J]. 中山大学学报:自然科学版, 2005, 44(6): 254-257.
- [2] ELLIOT T A. A comparison of thermal polygons for British freshwater teleosts[J]. Freshwater Forum, 1995, 5: 178-184.
- [3] LONG Y, LI L, LI Q, et al. Transcriptomic characterization of temperature stress responses in larval zebrafish[J]. PloS One, 2012, 7(5): 1-14.
- [4] ARAVIND L, DIXIT V M, KOONIN E V. Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons[J]. Science, 2001, 291: 1279-1284.
- [5] FISCHER U, JÄNICKE R U, SCHULZE O K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates[J]. Cell Death and Differentiation, 2003, 10(1): 76-100.
- [6] TAKLE H, ANDERSE N Φ. Caspases and apoptosis in fish[J]. Journal of Fish Biology, 2007, 71: 326-349.
- [7] YAMASHITA M. Apoptosis in zebrafish development[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2003, 136: 731-742.
- [8] CAO J L, CHEN J J, WANG J D, et al. Effects of fluoride on liver apoptosis and Bcl-2, Bax protein expression in freshwater teleost, *Cyprinus carpio* [J]. Chemosphere, 2013, 91: 1203-1212.
- [9] WANG B, YU T, DONG X, et al. *Edwardsiella tarda* invasion of fish cell lines and the activation of divergent cell death pathways[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 163: 282-289.
- [10] 李大鹏, 刘松岩, 谢从新, 等. 水温对中华鲟血清活性氧含量及抗氧化防御系统的影响[J]. 水生生物学报, 2008, 32(3): 327-332.
- [11] KONDO H, WATABE S. Temperature-dependent enhancement of cell proliferation and mRNA expression for type I collagen and HSP70 in primary cultured goldfish cells[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 2004, 138: 221-228.
- [12] LOGAN C A, SOMERO G N. Effects of thermal acclimation on transcriptional responses to acute heat stress in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper)[J]. American Journal of Physiology, 2011, 300: 1373-1383.
- [13] 洪庆涛, 宋岳涛, 唐一鹏, 等. 细胞培养液乳酸脱氢酶漏出率的比色测定及其应用[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(1): 89-92.
- [14] 姜礼燊. 热冲击对鱼类影响的研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(2): 77-81.
- [15] MADEIRA D, NARCISO L, CABRAL H N, et al. Thermal tolerance and potential impacts of climate change on coastal and estuarine organisms[J]. Journal of Sea Research, 2012, 70: 32-41.
- [16] LEWIS J M, KLEIN G, WALSH P J, et al. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) shift the age composition of circulating red blood cells towards a younger cohort when exposed to thermal stress[J]. J Comp Physiol B, 2012, 182: 663-671.
- [17] 左文功, 钱华鑫, 许映芳, 等. 草鱼肾组织细胞系 CIK 的建立及其生物学特性[J]. 水产学报, 1986, 3(10): 11-17.
- [18] NISHAD J, HEALY T M, SOMERO G N. Effects of temperature acclimation on cardiorespiratory performance of the Antarctic notothenioid *Trematomus bernacchii* [J]. Polar Biology, 2013, 36: 1047-1057.
- [19] SADOWSKI M, SARCEVIC B. Mechanisms of mono- and poly-ubiquitination; ubiquitination specificity depends on compatibil-

ity between the E2 catalytic core and amino acid residues proximal to the lysine[J]. Cell Division, 2010, 5: 19. doi: 10. 1186/1747-1028-5-19. <http://www.celldiv.com/content/5/1/19>.

[20] CAO J, CHEN J, WANG J, et al. Effects of fluoride on liver apoptosis and Bcl-2, Bax protein expression in freshwater teleost, *Cyprinus carpio*[J]. Chemosphere, 2013, 91: 1203-1212.

Effects of acute thermal stress on kidney cell of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

TONG Na YIN Xiao-yan LI Da-peng TANG Rong

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Wuhan 430070, China

Abstract The kidney cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) were exposed to 28 °C, 32 °C, 36 °C and 40 °C for 2 h or 12 h, respectively. The 28 °C group was taken as control. LDH leakage rates of CIK cells were determined by the trace detection of LDH kit. The cell cycles were measured by flow cytometry. The polyubiquitinated protein was measured by dot blot, and the expressions of *caspase-3* and *bcl-2* genes of cells were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that the LDH leakage rate, the content of polyubiquitinated proteins, and the *caspase-3* expression increased significantly with the increase of incubation temperature. While the expression of *bcl-2* and the cells at G0/G1 phase decreased significantly with the increasing incubation temperature. Acute thermal stress could induce the damage of cell membrane, protein, and even promote cell apoptosis.

Key words acute thermal stress; *Ctenopharyngodon idellus* kidney cell; apoptosis

(责任编辑:边书京)