

# 影响 C<sub>6</sub> 大鼠神经胶质瘤细胞表达 HSP68 的因素分析\*

徐存拴 夏 民 伍 雁 胡轶红 卢爱玲 赵绪永

(河南师范大学生物系 新乡 453002)

自 1962 年 Ritossa 发现果蝇 (*Drosophila larven*) 热休克反应<sup>[1]</sup>以来,人们已广泛、深入地研究了诱导生物发生热休克反应的因素和条件、热休克基因的表达和调控、热休克蛋白的种类、结构、功能和特性,热休克反应的机理和生物学意义等<sup>[2,3]</sup>。

在研究生物的热休克反应时,国内外许多学者用体外培养细胞作实验材料。一方面,体外培养的细胞不受机体调节的影响,不可控因素少,干扰小,研究结果可靠;另一方面,体外培养的细胞基本上是直接和环境接触,培养条件可直接影响细胞的生理、代谢、功能和热休克反应特性,因此,用体外培养细胞为材料研究生物热休克反应的分子机理时,首先应该弄清各种环境条件、细胞培养条件、细胞的生理条件等对细胞应激反应的影响,然后再研究分析细胞应激反应的分子机制,这样,实验的可重复性强,实验结果相对可靠,有可能揭示生物热休克反应的分子本质。然而,在研究生物的热休克反应时,人们往往对应激因子如何诱导生物发生热休克反应考虑较多,而对细胞本身的状况对生物应激反应的影响重视不够,因而影响了实验结果。针对这一问题,本文用 C<sub>6</sub> 细胞作实验材料,系统分析了细胞的生长状况、培养基、血清、营养条件等对细胞热休克反应和合成 HSP68 的影响。现将实验结果报告如下。

## 材料与 方法

### 1. 细胞培养、生长曲线测定和热休克处理

C<sub>6</sub> 大鼠神经胶质瘤细胞由德国 Bremen 大学赠送。细胞培养在 37℃、10%CO<sub>2</sub> 培养箱里,除特别指明外,培养基均为含 10%小牛血清(Gibco 产品)的 Dulbecco's 修改的 Eagle's DMEM 培养基(Gibco 产品)。

按常用方法测定细胞的生长曲线。

热休克处理:在对细胞进行热休克处理前,除特别

指出外,均换上新鲜培养基,置 44℃、30min,然后在正常培养条件下恢复培养至实验结果所示时间。

### 2. 细胞匀浆液制备和蛋白质浓度测定

收集细胞,悬浮于 PBS 中,用探头式超声仪(上海超声波仪器四厂的 CQ50 超声发生器)处理细胞 2min,1000g 离心 5min,收集上清,按 Neuhoff 等方法<sup>[4]</sup>测定蛋白质浓度后备用。

### 3. HSP68 的定性、定量分析

用 SDS-PAGE 分离样品后,按 Towbin 等的 Western 印迹方法显示 HSP68。硝酸纤维素膜购自东方试剂公司(Schleicher & Schuell),一抗(抗 HSP70 抗体,Stress Gen 公司产品,SPA-820)为鼠源性单克隆抗体,1:1000 稀释,与 HSP68 反应 1hr;二抗为碱性磷酸酶标记的兔抗鼠抗体(Boehringer Mannheim),1:5000 稀释,与 HSP70 抗体反应 1hr,然后用 NBT/X-Phosphate-PBS 显色 20min,TE-缓冲液固定 10min,于室温将膜干燥后,用密度计(Video-Computer-System, Intas)测定 HSP68 的量,并计算相对含量。

### 4. 蛋白水解酶活性分析

按徐存拴等<sup>[5]</sup>的蛋白水解酶活性电泳(SDS-G-PAGE)方法进行。每槽加 50μl 细胞匀浆液(含 75μg 总蛋白)。

## 结 果

### 1. 血清对 HSP68 合成的影响

细胞生长至对数期时,换上含 0%、1%、2.5%、5%、7.5%、10%、20%、30%、40%血清的 DMEM 培养基培养三天,再换上相应的新鲜培养基后,进行 44℃、30min 的热休克处理,恢复至图 1 所示的时间取材,用 Western 印迹方法分析 HSP68 的量。结果表明,在含 0—2.5%血清的 DMEM 培养基中生长的细胞,热休克后恢复 4hr 即有 HSP68 合成;在含 5%—20%血清的 DMEM 培养基中生长的细胞,热休克后恢复 6hr 检出有 HSP68 合成;而在含 ≥30%血清的 DMEM 培养基中生长的细胞,热

\* 国家自然科学基金资助项目(39670372)。

休克后恢复 8hr 才可检出有 HSP68 合成(图 1)。

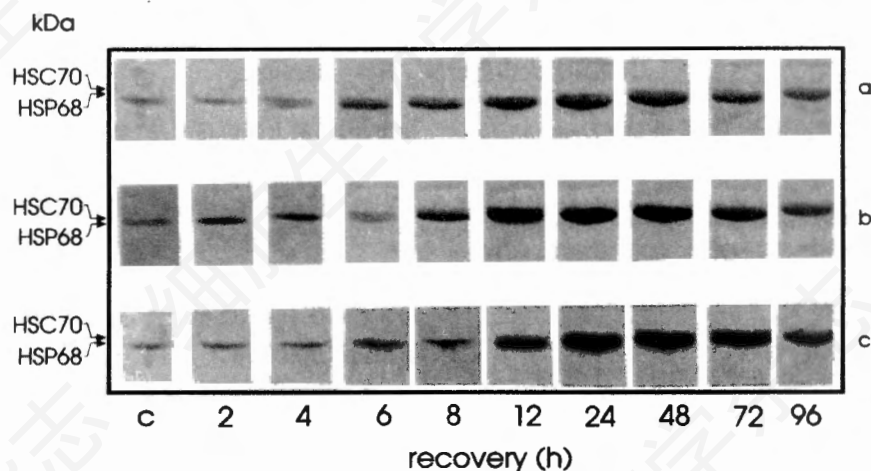


图 1 血清对 HSP68 合成的影响  
a. 不含血清; b. 7.5%血清; c. 30%血清。

## 2. 新鲜培养基与营养耗竭培养基对 HSP68 合成的影响

细胞长满培养瓶时(处于生长的稳定期), 取三瓶换上新鲜培养基, 另取三瓶不换培养基, 在 44℃ 处理 30min, 然后, 在正常条件下恢复至图 2 所示的时间取材, 用 Western 印迹方法显

示 HSP68 的量, 并用密度计作定量分析, 绘出相对含量图。结果表明, 生长在新鲜培养基与生长在营养耗竭培养基里的细胞合成 HSP68 的时间无明显差异, 但是, 后者含的 HSP68 最高量只及前者的 40%(图 2)。

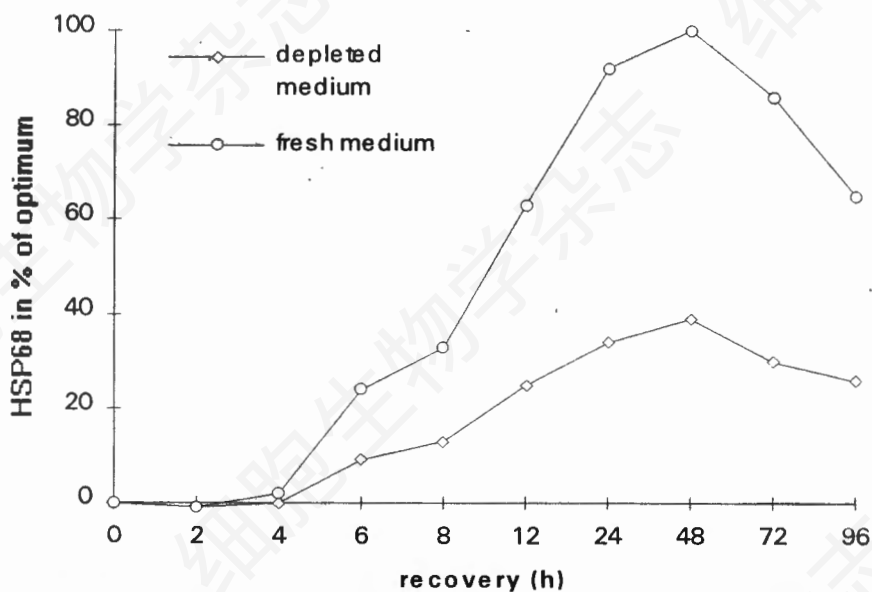


图 2 新鲜培养基(○)与营养耗竭培养基(◇)对细胞合成 HSP68 的影响

### 3. 血清饥饿对细胞合成 HSP68 的影响

细胞生长至对数期时,将细胞分成四组(I-N),组 I 在 PBS (13.7mmol/L NaCl、0.27 mmol/L KCl、0.43mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.14mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、pH7.2) 里存留 3 天;组 I-N 分别在含 0%、10%和 15%血清的 DMEM 培养基里生长三天,每组取三瓶细胞作蛋白水解酶活性分析(图 3);每组的另三瓶细胞均换上含 10%血清的 DMEM 培养基进行 44°C、30min 的热休克处理,恢复至 12hr 时,收集细胞,用 Western 印迹方法分析组 I-N 细胞合成 HSP68 的情况。结果表明,当组 IV 细胞合成 HSP68 时,组 I 细胞则未能检出有 HSP68 合成(图 4),虽然,台盼蓝染色表明,组 I 细胞并未死亡(未出示照片)。

### 4. 对数期细胞与稳定期细胞合成 HSP68 的差异

取生长至对数期( $4 \times 10^5$  个细胞/ $\Phi 9\text{cm}$  培

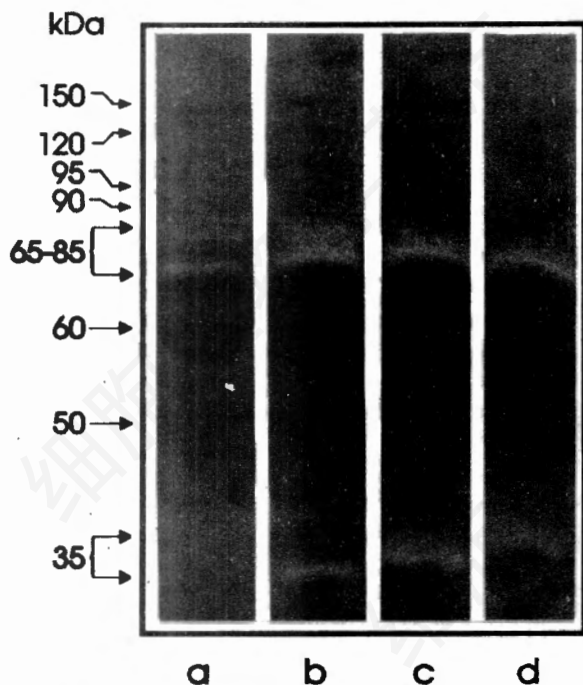


图 3 用 SDS-G-PAGE 分析血清饥饿对 C<sub>6</sub> 细胞的蛋白质和蛋白水解酶种类、活性和含量影响  
a. 细胞在 PBS 中维持 3 天; b-d. 细胞分别在含 0%、10%和 15%血清的 DMEM 培养基中生长 3 天。

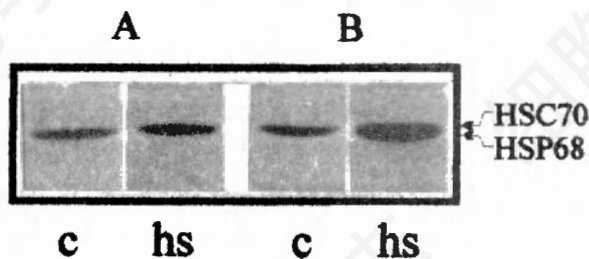


图 4 血清饥饿对细胞合成 HSP68 的影响

A. 细胞生长在含 10%血清的 DMEM 培养基中; B. 细胞在 PBS 中存留 3 天,然后生长在含 10%血清的 DMEM 培养基中; c. 对照; hs. 热休克处理(44°C, 30min, 恢复 12hr)。

养皿)和稳定期( $4 \times 10^7$  个细胞/ $\Phi 9\text{cm}$  培养皿)的细胞,换上新鲜培养基,44°C 热休克 30min 后,恢复至图 5 所示的时间取材,测定细胞数目和合成 HSP68 量,绘制出细胞生长与 HSP68 含量变化曲线。结果表明,处于两个不同生长阶段的细胞,虽然其启动 HSP68 合成的时间相同,但稳定期细胞表达 HSP68 的最佳量和总量明显高于对数期细胞(图 5)。

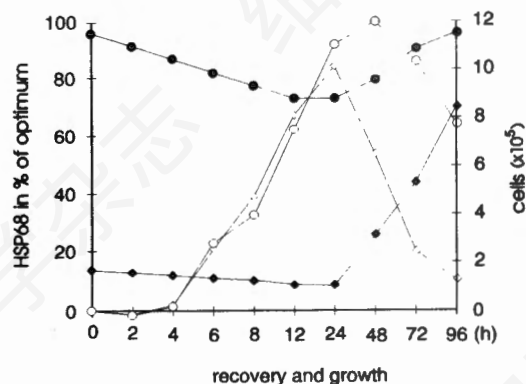


图 5 细胞生长对 HSP68 合成的影响

◇ 对数期细胞的 HSP68; ○ 稳定期细胞的 HSP68;  
◆ 对数期细胞在热休克后的生长; ● 稳定期细胞在热休克后的生长。

## 讨 论

C<sub>6</sub> 细胞是正常大鼠神经胶质细胞在亚硝基甲基脲(N-Nitro-somethylurea)作用下发生

转化而得到的一个细胞系,虽然 C<sub>6</sub> 细胞属于转化细胞,但是,在很多方面,例如:抗原性、酶特征、对激素的反应、热休克反应等都与星形神经胶质细胞和寡突神经胶质细胞极为相似,因此,它仍然还是一个研究正常动物细胞,特别是神经胶质细胞的良好模型<sup>[6]</sup>。

血清的化学成分非常复杂,它对细胞的作用,既可表现出它含的营养成分对细胞代谢的影响,又可表现出含的生长因子和/或激素对细胞生理、代谢的作用<sup>[7]</sup>。有关血清对细胞应激反应的影响,研究者至少已得出两点结论:(1)血清能促进 HSP70 合成,血清在促进 HSP70 合成的同时,也促进 DNA 合成;(2)上述作用不能为血清以外的其他因子代替<sup>[8]</sup>。这意味着,热休克蛋白基因的启动,至少可通过两条不同途径,即:血清活化途径和应激因子(包括热休克)活化途径,后者只涉及 HSP70 表达,前者则既涉及 HSP70 表达,又涉及 DNA 合成。本文结果表明,血清可改变启动 HSP68 合成的时间;细胞生长可减少 HSP68 的合成量。其原因可能是,培养基中的血清浓度越高,G<sub>1</sub>/S 期细胞所占比例越低,同时,血清刺激 DNA 合成的作用,进一步减少了群体中 G<sub>1</sub>/S 期细胞的积累,因为,HSP70 是在细胞周期的 G<sub>1</sub>/S 期合成,G<sub>1</sub>/S 期细胞的减少和细胞从周期的其他时相进入 G<sub>1</sub>/S 期需要时间,导致出现对数期细胞合成 HSP68 少、高血清浓度使细胞合成 HSP68 延迟现象。

有趣的是,当细胞生长在新鲜培养基和营养耗竭培养基里时,HSP70 的合成只表现出量的差异(图 2),而当细胞存留在既不含营养,又不含血清的 PBS 溶液里时,热休克不能诱导细胞合成 HSP70(图 4),相反,诱导了一个不属于热休克蛋白的 60kDa 蛋白质合成(图 3),这说明,总营养条件的缺乏,不同于糖饥饿<sup>[9]</sup>和血清诱导,后两者分别诱导 GRP78 和 HSP70 合成,而前者抑制了 HSP70 和 GRP78 合成,这提示,细胞内有可能还存在着两类既不属于热休克调节,又不属于血清调节的应激反应系统,这个系

统是否存在及如何运作尚待进一步研究。

总而言之,由于体外培养的高等动物细胞有生长的血清依赖性<sup>[7]</sup>、密度依赖性和更易受环境、营养、污染等因素的直接作用<sup>[10]</sup>,这些因素都会强烈影响细胞的热休克反应,对这些问题的注意和考虑,将有助于我们更加准确地分析生物热休克反应的分子机制和本质。

## 摘 要

为了解各种因素对细胞热休克反应的影响,本文用 Western 印迹、蛋白水解酶活性电泳(renatured electrophoresis)、密度测定等方法分析了营养、血清、细胞密度等对 C<sub>6</sub> 细胞合成热休克蛋白 68(HSP68)量和时间的作用。结果表明,在一定血清浓度范围内(≤30%),培养基含的血清浓度越高,细胞启动 HSP68 合成的时间越长;营养条件的差异影响 HSP68 合成的量和时间;不同生长阶段的细胞热休克反应有差异,生长到稳定期的细胞是研究细胞应激反应的较合适材料。

关键词: C<sub>6</sub> 大鼠神经胶质瘤细胞(C<sub>6</sub> 细胞) 培养基 小牛血清 热休克蛋白 68 (HSP68)

## 参 考 文 献

- [1] Ritossa F., 1962, *Experientia*, **18**: 571-573.
- [2] Ananthan J., et al., 1986, *Science*, **232**: 5220-5224.
- [3] Pratt W. B., 1993, *J. Biol. Chem.*, **268**: 21455-21458.
- [4] Neuhoff V., et al., 1979, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **36**: 1657-1670.
- [5] 徐存拴等, 1998, *河南科学*, **16**(2): 185-192.
- [6] Kumar S., et al., 1984, *J. Neurochem.*, **43**: 1455-1463.
- [7] Ernst W. H., et al., 1995, *FEBS*, **357**: 45-49.
- [8] Van-Wijk R., et al., 1993, *J. Cell. Physiol.*, **155**: 265-272.
- [9] Pelham H. R. B., 1986, *Cell*, **46**: 959-961.
- [10] Goldman J. E., et al., 1984, *J. Neurochem.*, **42**: 175-184.

## ANALYSIS OF AFFECTING FACTORS OF HSP68 SYNTHESIS IN C<sub>6</sub>RAT GLIOMA CELLS

XU Cun Shuan XIA Min WU Yan HU Yi Hong LU Ai Ling ZHAO Xu Yong  
(Biology Department, Henan Normal University, Xin Xiang 453002)

### ABSTRACT

In this paper, effect of serum, nutrition, cellular density etc on heat shock response of C<sub>6</sub> rat glioma cells (C<sub>6</sub> cells) was analyzed by western blot, protease renatured electrophoresis, density measure and so on. The results show, within certain serum concentration in medium ( $\leq 30\%$ ), the higher concentration is, the longer it takes time to switch on the synthesis of HSP68; different nutrition can affect quantity and time of C<sub>6</sub> cells in synthesizing HSP68. In addition, the heat shock response of C<sub>6</sub> cell in different growth stages is quite distinct, it is suggested that the cells in stable phase are suitable materials for the study of stress mechanism of heat shock.

**Key words:** C<sub>6</sub> rat glioma cells Medium New born calf serum Heat shock protein68(HSP68)

### 实验技术

## 酸性磷酸酶法检测体外培养细胞数

陈学清 杨晓鸣 潘国宗 朱 峰

(中国医学科学院 中国协和医科大学 北京协和医院消化内科 北京 100730)

在体外细胞增殖和抑制/杀伤试验中,活细胞计数是一个常用的指标。它常可用于测定细胞对一些生长因子刺激的反应,或评价化疗药物对瘤细胞杀伤的效果。但要进行准确的细胞计数,并非易事<sup>[1]</sup>。如常用的显微镜下直接计数,不仅费时,而且差异很大( $>20\%$ )。在细胞数较少的时候,准确的细胞计数则更困难。为了便于临床和科研工作,本文将介绍一种简便、准确的细胞计数方法。其适用于96孔板培养中的贴壁和悬浮的培养细胞。

### 材 料 和 方 法

#### 一、材料和试剂

硝基苯磷酸盐(p-nitrophenyl phosphate, Sigma104)、胰蛋白酶、顺铂(cisplatin)、RPMI 1640为Sigma公司产品。Triton X-100为Serva产品。胎牛血清

(医科院血研所)购自天象人生物公司。人重组表皮生长因子(hrEGF)购自邦定公司。其他试剂为国产分析纯。96孔细胞培养板为Costar产品。

#### 二、细胞和细胞系及其培养

小鼠成纤维细胞系(NIH3T3)、小鼠骨髓瘤细胞系(SP2/0)、人大肠癌细胞系(LOVO)和人白血病细胞系(K562)均接种于10%胎牛血清(FCS)RPMI 1640培养液中(含青霉素80U/ml,链霉素100U/ml),置5%CO<sub>2</sub>,37℃水饱和培养箱中培养。3-4天传代培养(贴壁细胞用传代前常规胰酶消化)。

#### 三、瘤细胞增殖和杀伤试验

将大肠癌细胞按一定浓度接种于96孔细胞培养板中,并加入一定浓度的顺铂或hrEGF。分别于培养第3天、第5天用酸性磷酸酶法作细胞计数。活细胞计数用台盼蓝拒染法。

#### 四、酸性磷酸酶细胞计数法<sup>[1]</sup>

培养于96孔细胞板的细胞去细胞培养液(悬浮细胞用离心法),每孔用0.01mol/L PBS(pH7.0)200 $\mu$ l洗