

Pre-heat Shock Protects CHL Cells from the Genotoxicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

DONG Zheng-wei¹, HU Hu², LIU Guang-yi¹,
SHEN Xiao-jun¹, YANG Jun^{1,*}

(1. Institute of Toxicology, School of Public Health, Zhejiang University; 2. Department of Pathology & Pathophysiology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

热休克预处理可抑制 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍对 CHL 细胞的遗传毒性

董正伟¹/胡 虎²/刘广义¹/
沈筱筠¹/杨 军^{1,*}

(1. 浙江大学公共卫生学院毒理学研究所;
2. 浙江大学医学院病理及病理生理教研室,
浙江 杭州 310058)

【摘要】背景与目的: 探讨热休克是否可诱导中国仓鼠肺细胞(CHL)中 γ H2AX焦点的形成,以及热休克对N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)诱导 γ H2AX焦点形成的影响。材料与方法: 用MTT实验检测热休克处理后细胞的生存率,用免疫荧光及流式细胞术检测细胞的 γ H2AX焦点的形成。结果: MTT结果表明热休克对CHL细胞有细胞毒性作用;免疫荧光实验发现热休克处理后细胞中 γ H2AX焦点数量与对照组相比无显著差异($P > 0.05$);流式细胞检测结果发现经过热休克预处理再经MNNG处理的细胞与只经过MNNG处理的细胞相比, γ H2AX荧光强度由 0.316 ± 0.042 下降为 0.194 ± 0.011 ,其差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 热休克可以使CHL细胞死亡,但是并不引起细胞的遗传毒性,热休克预处理可减少MNNG所诱导的 γ H2AX焦点的形成。

【关键词】热休克; γ H2AX; DNA损伤; 遗传毒性

中图分类号: R994.6

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2007)02-0089-04

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To study whether heat shock could induce the formation of γ H2AX foci in CHL cells, and the effect of heat shock on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)-induced γ H2AX foci formation. MATERIALS AND METHODS: The cytotoxic effect of heat shock was evaluated by MTT test. The phosphorylation of γ H2AX was assessed using immunofluorescent microscopy and flow cytometry. RESULTS: MTT test showed that heat shock decreased cell viability. There was no significant difference in the number of γ H2AX foci between heat-shock treated group and control group as shown by immunofluorescent microscopy. Flow cytometry analysis revealed that pre-heat shock followed by MNNG treatment decreased the mean γ H2AX fluorescent intensity from 0.316 ± 0.042 in the MNNG-treatment alone group to 0.194 ± 0.011 . CONCLUSION: Heat shock did not induce γ H2AX foci formation in CHL cells. In addition, heat shock could inhibit the phosphorylation of H2AX induced by MNNG.

【KEY WORDS】heat shock; γ H2AX; DNA damage; genotoxicity

热休克,尤其当其温度超过 42 °C 时能引起细胞死亡^[1],但是这其中的分子机制还不十分清楚。已有文献报道 DNA 损伤有可能参与了这个过程^[2],也有研究发现热休克并不能诱导 DNA 的损伤^[3-4]。所以进一步研究热休克导致细胞死亡的机制中是否有 DNA 损伤的参与是非常必要的。

最近以 γ H2AX(组蛋白 H2AX 的磷酸化形式)焦点的

形成来衡量 DNA 双链断裂(double strand breaks,DSBs)已经成为一种敏感、特异的方法。我们在前期研究中以 γ H2AX 焦点作为指标衡量了一些化学、物理因素的 DNA 损伤特性^[5-6],同时还系统比较了彗星实验和 γ H2AX 焦点这两种方法检测烷化剂 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)导致的 DNA 损伤的敏感性,发现检测 γ H2AX 焦点在检测低剂

收稿日期: 2006-11-06; 修订日期: 2006-12-07

基金项目: 国家高技术研究发展规划(863)项目(No. 2004AA649120) 霍英东基金会高校青年教师基金(101036),教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-05-0520) 国家自然科学基金(30600486)

作者简介: 董正伟(1981-),女,浙江绍兴人,硕士研究生,研究方向:细胞对 DNA 损伤的应激反应。

* Correspondence to: YANG Jun, Tel:0571-88208140, E-mail: gastate@zju.edu.cn

量、早期时间点时更敏感^[7]。应用 γ H2AX 焦点的形成作为指标,已有报道热休克可在一些细胞中诱导 DSBs 的产生^[2,8]。但应用同样的方法,我们在热休克后的人绒毛膜 FL 细胞中没有检测到 γ H2AX 焦点的形成^[5]。

前期研究中我们已发现 MNNG 可在中国仓鼠肺细胞 (CHL) 中诱导 γ H2AX 焦点的形成^[9],因此,为了进一步探讨热休克是否确实可引起 DNA 损伤,我们利用免疫荧光方法检测热休克处理后的 CHL 细胞中 γ H2AX 焦点的形成情况。同时,为了明确热休克是否可影响 γ H2AX 焦点形成的过程,我们还研究了热休克预处理对 MNNG 诱导的 γ H2AX 焦点形成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

CHL 细胞为本实验室保存。最低必需培养基 (Eagle's minimum essential medium, MEM)、L-谷氨酰胺、小牛血清均为美国 Gibco 公司产品。MNNG、二甲基亚砜 (DMSO)、噻唑蓝 (MTT)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 购自美国 Sigma 公司。鼠抗 H2AX 单克隆抗体购自美国 Upstate Technology 公司。FITC 标记山羊抗小鼠 IgG、进口羊血清工作液购自北京中山金桥生物技术有限公司。Olympus AX70 荧光显微镜 (日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 培养液包含 MEM、10% 小牛血清、0.03% L-谷氨酰胺、 1×10^4 U/L 青霉素、125 mg/L 链霉素。培养条件为 37 °C 5% CO₂。

1.2.2 细胞毒性试验 (MTT 比色法) 取 10 块 96 孔板,用 5 块 96 孔板进行热休克处理后分别放置 0、0.5、2、8 和 24 h,每个时间点分设空白组。将细胞制成单细胞悬液后,调节细胞浓度至 4×10^7 /L,按每孔 100 μ l 接种到 96 孔板,每组设 4 个复孔,培养 1 d 后进行 45 °C、30 min 的热休克处理。细胞分别继续培养 0、0.5、2、8 和 24 h,每个时间点后加 5 g/L MTT 20 μ l,37 °C 条件下继续孵育 4 h 后终止培养。小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 μ l DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解,选择 490 nm 波长,在酶标仪上测定各孔吸光值 (A₄₉₀) 按下式计算细胞存活率:

相对存活率 = 实验组吸光值平均值 / 对照组吸光值平均值 \times 100%。

另一组 MTT 试验的分组方法为: MNNG 单独处理 2 h 组和 45 °C、30 min 的热休克处理后再用 MNNG 处理 2 h,其余方法同上。

1.2.3 免疫荧光和 γ H2AX 焦点定量 免疫荧光方法按 Zhou 等^[5]的方法并稍加改变。将 2 ml 浓度为

1×10^5 /ml 的细胞接种到每孔内已放有盖玻片的 6 孔板中,分设空白组 (未经热休克处理) 和 1 mg/L MNNG 阳性处理组。细胞培养 24 h 后用热休克处理 30 min。处理结束后,间隔 0、0.5、2 和 8 h,细胞在 4% 多聚甲醛中固定 15 min, PBS 洗涤, 0.2% Triton-X100 破膜 15 min, 羊血清工作液封闭 1.5 h, 接着用鼠抗 γ H2AX 单抗 (1:1000) 孵育 2 h, 再与 FITC 标记二抗 (1:500) 作用 1 h。然后 DAPI 进行细胞核衬染 15 min, 90% 甘油封片, 荧光显微镜下观察。

γ H2AX 焦点定量按 Daniel 等的方法^[10]。为防止在细胞选择上出现偏差,一个视野中的所有细胞 (至少 50 个) 都统计了 γ H2AX 焦点。应用 Image Pro Plus 软件计数细胞中的 γ H2AX 焦点数目。

1.2.4 流式细胞术 以 10^7 个细胞为 1 组, 共 3 组, 设空白组 (未经热休克及 MNNG 处理), 热休克 45 °C、30 min 后加 1 mg/L MNNG 处理 2 h 组和单独 1 mg/L MNNG 处理 2 h 组。在 70% 甲醇中固定细胞。用 TPBS 润洗细胞并离心收集。细胞在 4% 多聚甲醛中固定 15 min, PBS 洗涤, 0.2% Triton-X100 破膜 15 min, 羊血清工作液封闭 1.5 h, 接着用鼠抗 γ H2AX 单抗 (1:1000) 孵育 2 h, 再与 FITC 标记二抗 (1:500) 作用 1 h。Beckman Coulter 流式细胞仪分析。

1.3 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS12.0 软件进行单因素方差分析和 Student's *t* 检验, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水平。

2 结果

2.1 热休克对 CHL 细胞的细胞毒性

CHL 细胞在 45 °C 热休克处理 30 min 后 (定义为时间 0), 立即用 MTT 实验检测其相对存活率, 或将细胞继续在 37 °C 放置 0.5、2、8 和 24 h 后检测。发现热休克 30 min 即可使 CHL 细胞的存活率下降至 0.871 ± 0.002 (表 1)。将细胞放置于 37 °C 继续孵育并不能逆转热休克后生存率下降的趋势, 在热休克后 0.5、2、8 和 24 h, CHL 细胞的存活率与未经热休克处理的对照组相比差异均

表 1 CHL 细胞在经过热休克处理后的细胞生存率 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)
Table 1 Results of relative survival of CHL cells after heat shock. ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Time after heat shock	Relative survival of CHL cells
Control [△]	1
0 h	$0.871 \pm 0.002^*$
0.5 h	$0.903 \pm 0.008^*$
2 h	$0.825 \pm 0.014^*$
8 h	$0.863 \pm 0.026^*$
24 h	$0.731 \pm 0.034^*$

Compared with control, * $P < 0.05$; [△]control: without heat shock.

有统计学意义 ($P < 0.05$) ,见表 1。表明热休克具有细胞毒性。在此基础上 我们选择了热休克后 0、0.5、2 和 8 h 这 4 个时间点来检测 γ H2AX 焦点的形成。

2.2 热休克不能诱导 γ H2AX 焦点的形成

图 1 为 CHL 细胞在 45 °C 热休克 30 min 后继续在 37 °C 孵育不同时间后 γ H2AX 焦点形成的免疫荧光图像 ,MNNG 处理 8 h 为阳性对照。发现在大多数空白组细胞中 (约 80%) 没有 γ H2AX 焦点的存在 ,但仍有小部分细胞 (约 20%) 含有 1~10 个或以上的焦点 (表 2)。热休克处理 30 min 后 ,以及 37 °C 继续孵育 0.5、2 和 8 h 后 ,CHL 细胞中 γ H2AX 焦点的数量无明显变化 ,仅 2 h 的时候 CHL 细胞中 γ H2AX 焦点的数量稍有增加 (约有 40% 的细胞中出现 γ H2AX 焦点) ,而 0 h、0.5 h、8 h 时间点仍然是多数细胞 (约 80%) 无 γ H2AX 焦点的存在 (表 2)。统计分析显示热休克处理组和空白对照组没有显著性差异 ($P > 0.05$)。然而在用 1 mg/L MNNG 处理 8 h 后 ,其包含有多于 20 个焦点的细胞比率达到了 42.3% ,明显高于空白对照组 ($P < 0.05$)。这些结果表明热休克不能诱导 γ H2AX 焦点的形成。

2.3 热休克预处理可减少 MNNG 诱导的 γ H2AX 焦点的形成

为了研究热休克是否可以影响 γ H2AX 焦点的形成

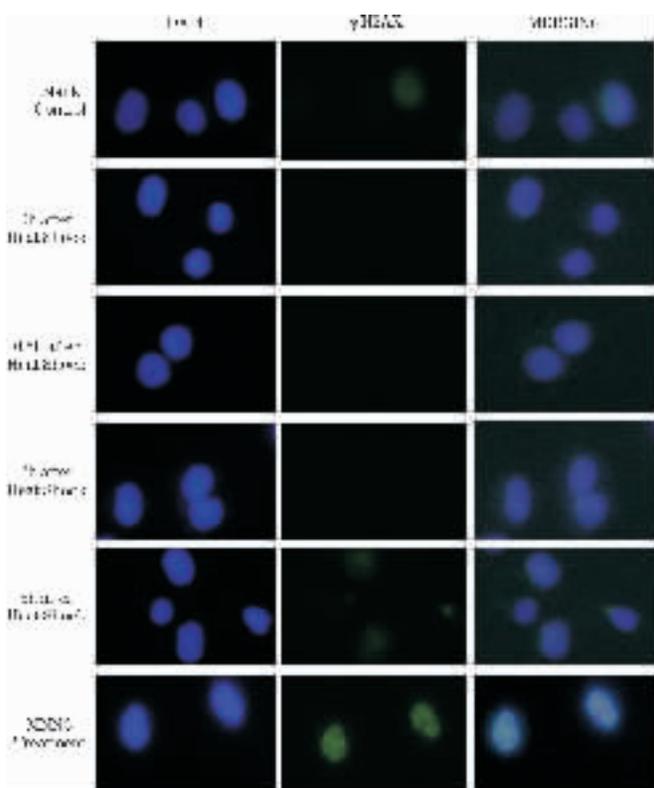


图 1 热休克处理后 CHL 细胞中 γ H2AX 焦点形成的典型图片。
Figure 1 Representative images of heat shock-induced γ H2AX foci formation.

表 2 CHL 细胞经过热休克处理后不同时间 γ H2AX 焦点的计数 ($n = 3, \bar{x} \pm s, \%$)

Table 2 Quantification of γ H2AX foci formation in heat shocked CHL cells ($n = 3, \bar{x} \pm s, \%$)

Time after heat shock	γ H2AX foci			
	0	1-10	11-20	> 20
Control [△]	86.8 ± 3.1	12.9 ± 2.4	0.5 ± 0.9	0.0 ± 0.0
0 h	88.8 ± 3.1	11.2 ± 3.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
0.5 h	81.3 ± 1.4	18.1 ± 0.4	0.6 ± 0.1	0.0 ± 0.0
2 h	59.0 ± 2.3	36.4 ± 1.9	4.7 ± 0.4	0.0 ± 0.0
8 h	80.5 ± 1.7	19.5 ± 16.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MNNG [#]	34.6 ± 1.4 [*]	7.1 ± 0.5	16.0 ± 4.7 [*]	42.3 ± 5.2 [*]

Compared with control, ^{*} $P < 0.05$; [△]control: without heat shock; [#]MNNG: treatment with 1 mg/L MNNG for 8 h.

过程 ,我们首先将 CHL 在 45 °C 热休克 30 min ,再用 MNNG 处理 2 h。然后以 γ H2AX 的平均荧光强度做为指标 ,用流式细胞仪进行分析。发现 1 mg/L MNNG 单独处理 2 h 能够强烈诱导 CHL 细胞中 γ H2AX 的荧光强度 ,从对照组的 0.026 ± 0.006 上升为 0.316 ± 0.042 ($P < 0.05$,表 3)。然而 ,当 CHL 细胞在热休克预处理后 ,再用 MNNG 处理 2 h ,尽管 γ H2AX 的平均荧光强度也较对照组显著升高 ,但是与没有热休克预处理的 MNNG 组相比有了明显的下降 ($P < 0.05$,表 3)。为了排除由于细胞死亡数增加而导致细胞荧光强度减低的可能性 ,我们用 MTT 试验检测了 CHL 在 45 °C 热休克 30 min 然后用 MNNG 处理 2 h 的细胞生存率以及单独用 MNNG 处理 2 h 的细胞生存率。发现两者之间的细胞生存率差异并不大 ,分别为空白对照的 0.762 和 0.804 (表 4)。

表 3 CHL 细胞经过热休克预处理后在 MNNG 诱导下 γ H2AX 的平均荧光强度 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 The mean γ H2AX fluorescent intensity induced by MNNG in pre-heat shocked CHL cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	Mean γ H2AX fluorescent intensity
Control	0.026 ± 0.006
Pre-heat + MNNG	0.194 ± 0.011 ^{#, *}
MNNG	0.316 ± 0.042 [*]

Compared with control, ^{*} $P < 0.05$; compared with MNNG group, [#] $P < 0.05$

表 4 CHL 细胞经过热休克预处理后在 MNNG 诱导下的细胞生存率的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 The relative survival of CHL cells induced by MNNG in pre-heat shocked CHL cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	Relative survival of CHL cells
Control	1
Pre-heat + MNNG	0.762 ± 0.051 [*]
MNNG	0.804 ± 0.008 [*]

Compared with control, ^{*} $P < 0.05$

3 讨论

关于热休克的遗传毒性目前还没有定论。有部分实验证据表明热休克不能导致 DNA 损伤 [3] ,但也有研究发现热休克可以导致 DNA 损伤 [11]。已有研究报道发现热休克可在一些细胞中诱导 γ H2AX 焦点的形成 ,说明

热休克具有遗传毒性^[2, 8]。然而我们在热休克处理的人FL细胞中未能观察到 γ H2AX焦点的形成^[5],本研究中的CHL细胞在热休克处理后也没有 γ H2AX焦点的形成,这些数据都支持热休克没有遗传毒性的结论。我们已证明某些特定刺激诱导 γ H2AX焦点的形成是具有细胞特异性的^[5],因此,我们与其他研究得到的不同结果极有可能是由于使用了不同的细胞系造成的。当然热休克处理还要考虑其作用的温度和时间,不同的温度和不同的作用时间对细胞的影响也是不一样的,本文中的实验条件是在Kaneko H等^[8]报道的方法与条件下进行的,所以具有代表性,对细胞的影响与其他文献也具有可比性。综合以上信息,我们认为热休克的遗传毒性很可能是细胞特异性的,但其细胞毒性则无细胞特异性,即各种细胞经热休克处理后其生存率都会降低。

虽然在我们的研究中热休克不能诱导 γ H2AX焦点的形成,但是热休克能否影响 γ H2AX焦点的形成过程?为了回答这个问题,我们首先将细胞用热休克预处理,再用烷化剂MNNG处理细胞,观察 γ H2AX焦点的形成。发现热休克预处理明显降低了MNNG诱导的 γ H2AX荧光强度,即抑制了MNNG对细胞的遗传毒性作用(表3)。但是荧光强度的改变(下降)会不会是因为细胞死亡数的增加从而导致细胞数的减少所致?为了排除这个可能性对结果的影响,我们检测了预热休克对CHL细胞在MNNG处理后细胞生存率的变化。实验结果显示预热休克并不会造成大量细胞的死亡,从而降低免疫荧光的强度。因此,热休克可影响 γ H2AX焦点的形成。虽然其中的具体机制并不清楚,但是我们发现MNNG诱导 γ H2AX焦点的形成需要phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)家族成员的参与,因为PI3K的抑制剂wortmannin能抑制MNNG诱导的 γ H2AX焦点的形成。而有报道wortmannin可使中国仓鼠V79细胞对热休克诱导的细胞死亡更敏感^[12],因此,我们推测热休克可能通过影响PI3K家族成员而使H2AX的磷酸化受到抑制。

综上,我们的数据显示,虽然热休克可以诱导CHL细胞死亡,但是不能诱导细胞 γ H2AX焦点的形成。另外,热休克的预处理可以降低MNNG对细胞的遗传毒性作用,推测其原因可能是热休克影响了参与 γ H2AX焦点形成的蛋白激酶的功能。这一假设需要进一步的实验验证。

参考文献:

- [1] Dewhirst MW, Viglianti BL, Lora-Michiels M, et al. Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia[J]. *Int J Hyperthermia*, 2003, 19(3): 267-294.
- [2] Takahashi A, Matsumoto H, Nagayama K, et al. Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(24): 8839-8845.
- [3] Mittler S. Effects of hyperthermia on radiation-induced chromosome breakage and loss in excision repair deficient *Drosophila melanogaster*[J]. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 1986, 50(2): 225-230.
- [4] Iliakis G, Seamer R, Okayasu R. Effects of hyperthermia on the repair of radiation-induced DNA single- and double-strand breaks in DNA double-strand break repair-deficient and repair-proficient cell lines[J]. *Int J Hyperthermia*, 1990, 6(4): 813-833.
- [5] Zhou C, Li Z, Diao H, et al. DNA damage evaluated by gammaH2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors[J]. *Mutat Res*, 2006, 604(1-2): 8-18.
- [6] Li Z, Yang J, Huang H. Oxidative stress induces H2AX phosphorylation in human spermatozoa[J]. *FEBS Lett*, 2006, doi: 10.1016/j.febslet.2006.10.016
- [7] Yu Y, Zhu W, Diao H, et al. A comparative study of using comet assay and gammaH2AX foci formation in the detection of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced DNA damage[J]. *Toxicol In Vitro*, 2006, 20(6): 959-965.
- [8] Kaneko H, Igarashi K, Kataoka K, et al. Heat shock induces phosphorylation of histone H2AX in mammalian cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328(4): 1101-1106.
- [9] 石为, 余艳柯, 朱心强, 等. 甲基硝基亚硝基胍诱导CHL细胞中 γ H2AX焦点的形成[J]. *癌变·畸变·突变*, 2006, 18(6): 417-419.
- [10] Daniel R, Ramcharan J, Rogakou E, et al. Histone H2AX is phosphorylated at sites of retroviral DNA integration but is dispensable for postintegration repair[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(44): 45810-45814.
- [11] Anitha B, Chandra N, M. GP, et al. Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius auratus*)[J]. *Mutat Res*, 2000, 469(1): 1-8.
- [12] Tomita M, Suzuki N, Matsumoto Y, et al. Sensitization by wortmannin of heat- or X-ray induced cell death in cultured Chinese hamster V79 cells[J]. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2000, 41(2): 93-102.