

小鼠乳腺上皮细胞热应激模型的建立

冉晓威

(西藏自治区兽医生物药品制造厂, 西藏 拉萨 850009)

摘要: 为构建乳腺上皮细胞系(HC II)的热应激模型, 将 HC II 细胞分为常温组(Con 组)、热应激组(HS 组)和热应激缓和组(HS-组), 用 CCK-8 法测定细胞活性, 微板法检测细胞乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)、总抗氧化能力(T-AOC)、过氧化氢酶(CAT)活性和活性氧(ROS)、一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)含量, 流式细胞仪测定细胞凋亡比例和细胞周期。结果发现: 与 Con 组相比, HS 组和 HS-组细胞活力显著下降, LDH 活性及细胞内 ROS、MDA、NO 含量显著增加, SOD、GSH、T-AOC 和 CAT 活性显著下降, 细胞凋亡显著上升, 细胞周期发生阻滞。与 HS 组相比, HS-组 MDA、NO 含量显著增加, SOD 和 GSH 活性显著下降, 细胞凋亡上升。综上得出, 42 °C 热应激处理小鼠乳腺上皮细胞 3 h, 而后 37 °C 缓和 6 h, 可构建小鼠乳腺上皮细胞的热应激模型。

关键词: 乳腺上皮细胞; 细胞活力; 抗氧化性能; 细胞凋亡

中图分类号: S852

文献标识码: A

Establishment of A Heat Stress Model for Mouse Mammary Epithelial Cells

RAN Xiaowei

(Xizang Veterinary Biological Products Factory, Lhasa Xizang 850009, China)

Abstract: To construct a heat stress model for HC II cells, HC II cells were divided into normothermic groups (Con), heat stress groups (HS), and heat stress-alleviation groups (HS-), and cellular activity was measured by the CCK-8 method. Cellular lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH) activity, total antioxidant capacity (T-AOC), catalase (CAT), reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO), and malondialdehyde (MDA) contents were measured by the microplate method. The apoptosis and cell cycle were determined by flow cytometry. The results showed that compared with the Con group, in the HS and HS-groups, cell viability was significantly decreased, LDH activity and intracellular ROS, MDA, and NO contents were significantly increased, SOD, GSH, T-AOC, and CAT activities were significantly decreased, apoptosis was significantly increased, and the cell cycle was blocked. Compared to the HS group, the HS-group showed a significant increase in cellular MDA and NO content, a significant decrease in SOD and GSH activity, and a rise in apoptosis. In conclusion, subjecting mouse mammary epithelial cells to heat stress at 42 °C for 3 hours, followed by recovery at 37 °C for 6 hours, can establish a mouse mammary epithelial cell heat stress model.

Key words: HC II cells; cell viability; antioxidant properties; apoptosis

温室效应导致全球温度正在缓慢上升, 据 IPCC 预测, 2030—2052 年地球表面温度将上升 1.5 °C^[1]。随着全球温度的逐年上升, 动物热应激问题也越来越受到人们的关注。夏季环境温度和相对湿度的升高会破坏动物的体温调节机

制, 影响热损失, 造成动物热负荷增加, 导致动物体温调节失衡, 引起非特异性应答反应, 使动物产生热应激^[2]。

研究发现, 热应激(HS)被认为是夏季家畜氧化应激的主要原因之一^[3]。氧化应激被用来

收稿日期: 2024-10-05

作者简介: 冉晓威(1997—), 男, 助理兽医师, 主要从事疫苗研发、动物防疫研究, E-mail: 616249880@qq.com。

指示动物体内细胞和组织的生理状态^[4]。HS 可以诱导机体内产生过量的自由基和活性氧 (ROS),降低机体的抗氧化能力,引起机体氧化应激。氧化应激会导致细胞 DNA、蛋白质和脂质氧化损伤,并造成细胞凋亡^[5-7]。HS 对动物的生理、代谢产生了许多负面影响^[8]。当动物 HS 无法调节自身体内温度时,会对动物的体温、机体健康、生产性能、生殖功能和各种生产性状产生巨大的负面影响^[9-12]。本试验用小鼠乳腺上皮细胞系(HC II)构建小鼠乳腺上皮细胞体外热应激损伤模型,为进一步研究细胞在热应激状态下的反应提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

试剂:DMEM 培养基,上海生工生物工程有限公司;胎牛血清、青-链霉素,HyClone 公司;胰蛋白酶,Gibco 公司;活性氧(ROS)试剂盒,碧云天生物有限公司;LDH、MDA、SOD、CAT、T-AOC、NO、GSH 试剂盒,南京建成生物工程研究所;CCK-8 试剂盒、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒,诺唯赞生物科技股份有限公司。

仪器:CO₂ 培养箱,Thermo;倒置显微镜,Motic;全自动荧光酶标仪,Thermo;流式细胞仪,伯乐;超净工作台,杭州净化;低温高速离心机,Eppendorf;细胞超声破碎仪,新芝。

1.2 细胞培养与试验处理

乳腺上皮细胞系(HC II),货号:CL-0616,武汉普诺赛公司。

HC II 细胞培养在含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 mg/L 的 DMEM 培养液中,于 37℃、5% 的二氧化碳培养箱内培养,培养液每 2~3 d 更换 1 次。HC II 进入对数生长期后进行传代,后续根据试验要求进行不同条件的培养。

采用单因素完全随机试验,42℃ 处理 HC II 细胞 1、3、6、9、12 h,测定细胞存活率,初步筛选适宜的热应激时间。将高温 42℃ 作用 3 h 的细胞放到 37℃ 培养箱中缓和 0、3、6、9、12 h,测定细胞活力。将细胞分为对照组(37℃ 正常培养,Con 组)、热应激组(42℃ 处理 3 h,HS 组)和热应激缓和组(42℃ 处理 3 h 后缓和 6 h,HS-组),测定细胞抗氧化性能、ROS、细胞周期和细胞凋亡,进一步确定建立 HC II 细胞热应激模型的条

件。每组设 3 个重复。

1.3 细胞存活率($R_{存活}$)检测

取对数生长期的 HC II 细胞(1×10^5 个/mL)接种于 96 孔板上,每孔 100 μ L,按照要求处理后,将试验孔更换为等体积新鲜培养液,加入 10 μ L CCK-8 溶液,放回培养箱内孵育 4 h,用酶标仪在 450 nm 处测定吸光值(OD)。

$$R_{存活} = (OD_{试验组} - OD_{空白组}) / (OD_{对照组} - OD_{空白组}) \times 100\% \quad (1)$$

1.4 细胞内抗氧化性能测定

按照试验要求处理细胞后,收集各孔细胞,超声破碎后得到待测样品。按照试剂盒说明书,微板法检测细胞内 LDH、SOD、GSH、T-AOC、CAT 活性和 NO、MDA 含量。

1.5 细胞 ROS 测定

按照试剂盒说明书,利用荧光探针 DCFH-DA 测定细胞 ROS 含量,数据以荧光值相对空白对照组的倍数表示。

1.6 细胞周期和细胞凋亡测定

按照试剂盒说明书,用流式细胞仪测定细胞凋亡比例和细胞周期。

1.7 数据分析

试验数据先用 Excel 软件进行整理,再用 IBM SPSS 26.0 软件对数据进行 One-way ANOVA 程序单因素方差分析和 LSD 法多重比较。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,当 $p < 0.05$ 时,表示处理间差异有统计学意义。统计分析结果采用 GraphPad Prism 8.3 软件作图。

2 结果与分析

2.1 细胞存活率

为建立急性 HS 模型,将 HC II 细胞放到 42℃ 细胞培养箱分别处理 1、3、6、9、12 h,然后放到 37℃ 培养箱中恢复 0、3、6、9、12 h,评估细胞活力。由图 1 可知,细胞活力在热应激期间急剧下降,并随着热应激时间的延长,细胞活力极显著下降($p < 0.01$)。将细胞放到 42℃ 细胞培养箱中处理 3 h,然后在 37℃ 培养箱恢复 0、3、6、9、12 h,在恢复时间段内,细胞存活率在 HS 处理后极显著降低($p < 0.01$)。细胞活力随着恢复时间的延长而显著下降,在恢复 6 h 时达到最低值(对照组的 45%),随后在 6~12 h 内,随着恢复时间的延长,细胞活力逐渐增加。

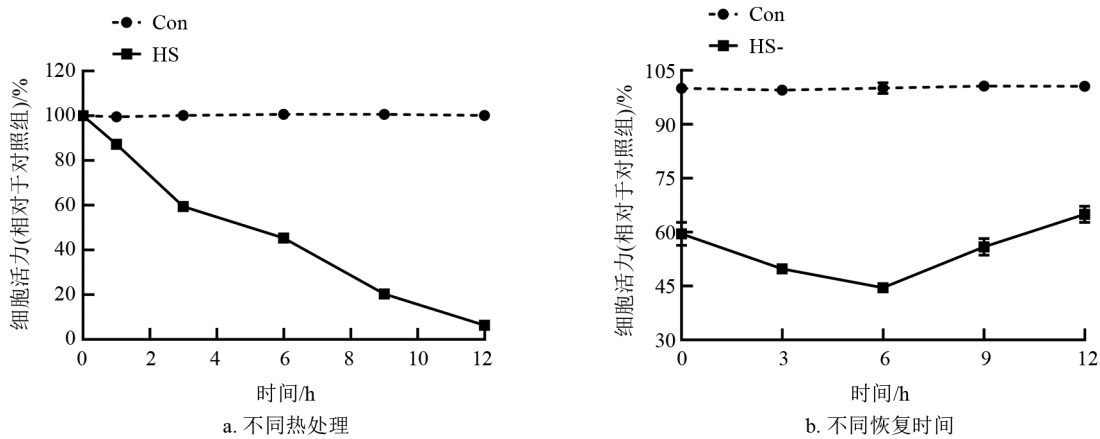


图 1 不同热处理和恢复时间对细胞活力的影响

2.2 热应激对 HC II 细胞抗氧化酶活性和活性氧的影响

为了评估 HS 处理对 HC II 细胞氧化应激的影响,检测 CAT、SOD、GSH、LDH、T-AOC 的活性和 MDA、NO 的含量。由表 1 可知,与常温组 (Con 组)相比,热应激组 (HS 组)极显著降低了细胞内 CAT 活性 ($p<0.01$),显著降低细胞内 SOD、GSH 和 T-AOC 活性 ($p<0.05$),并极显著增加了 LDH 活性和 MDA、NO 的含量 ($p<$

0.01);与 Con 组相比,热应激缓和组 (HS-组)极显著降低细胞内 SOD、GSH、T-AOC 和 CAT 活性 ($p<0.01$),极显著增加 LDH 活性和 MDA、NO 的含量 ($p<0.01$);与 HS 组相比,HS-组极显著降低了细胞内 SOD 活性 ($p<0.01$),显著降低细胞内 GSH 和 T-AOC 活性 ($p<0.05$),显著增加 MDA、NO 的含量 ($p<0.05$),对 CAT 和 LDH 活性影响不显著 ($p>0.05$)。

表 1 热应激对 HC II 细胞抗氧化酶相关活性的影响

组 别	常温组 (Con 组)	热应激组 (HS 组)	热应激缓和组 (HS-组)
MDA/(nmol · L ⁻¹ · mg ⁻¹)	0.62±0.02	0.96±0.05 [*]	1.28±0.03 ^{***#}
SOD/(U · mg ⁻¹)	21.37±1.65	16.44±1.87 [*]	10.33±1.22 ^{***#}
GSH/(U · mg ⁻¹)	60.38±2.55	49.66±3.94 [*]	38.75±2.67 ^{***#}
LDH/(U · mL ⁻¹)	18.46±1.54	27.79±0.89 ^{**}	29.33±1.93 ^{**}
NO/(μmol · L ⁻¹ · g ⁻¹)	1.55±0.18	1.98±0.14 ^{**}	2.37±0.23 ^{***#}
CAT/(U · mg ⁻¹)	4.53±0.47	3.28±0.23 ^{**}	3.04±0.41 ^{**}
T-AOC/(μmol · L ⁻¹ · mg ⁻¹)	0.061±0.003	0.042±0.002 [*]	0.026±0.002 ^{***#}

注:与常温组比较,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$;与热应激组比较,#表示 $p<0.05$,##表示 $p<0.01$,差异有统计学意义。

由表 2 和表 3 可知,与常温组 (Con 组)相比,随热应激处理时间的增加,显著增加了细胞内活性氧 (ROS) 的积累 ($p<0.05$);热应激 3 h

后,随着缓和时间的增加,细胞内 ROS 的含量显著增加,6 h 时达到最高,随着缓和时间的继续增加,细胞内 ROS 的含量显著降低 ($p<0.05$)。

表 2 热应激时间对 HC II 细胞活性氧的影响

热应激时间/h	0	1	3	6	9	12
活性氧(相对于常温组)	1d	1.24±0.05d	2.87±0.13c	3.48±0.09b	4.28±0.27a	4.59±0.36a

注:小写字母不同表示 $p<0.05$,差异有统计学意义。

表 3 热应激 3 h 后不同缓和时间对 HC II 细胞活性氧的影响

缓和时间/h	0	3	6	9	12
活性氧(相对于常温组)	2.79±0.12c	3.28±0.11b	4.36±0.24a	3.08±0.48b	2.53±0.26c

注:小写字母不同表示 $p<0.05$,差异有统计学意义。

2.3 热应激对 HC II 细胞凋亡和细胞周期的影响

通过 Annexin V-FITC/PI 检测试剂盒分析

HS 诱导的细胞凋亡。由表 4 可知,与常温组 (Con 组)相比,热应激组 (HS 组)极显著增加了

细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率和总凋亡率($p<0.01$);与 Con 组相比,热应激缓和组(HS-组)也极显著增加了细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率和总凋亡率($p<0.01$);与 HS 组相比,HS-组极显著增加了细胞早期凋亡率,显著增加了细胞的晚期凋亡率和总凋亡率($p<0.01$)。结果表明,HS 可以显著诱导细胞凋亡。

为了评估 HS 对细胞周期的调控作用,由表 5 可知,与常温组(Con 组)相比,热应激组(HS 组)显著增加了细胞 G1 期含量($p<0.05$),极显

著增加了细胞 G2 期含量($p<0.01$),极显著降低了细胞 S 期含量($p<0.01$);与 Con 组相比,HS-组显著增加了细胞 G1 期含量($p<0.05$),极显著增加了细胞 G2 期含量($p<0.01$),极显著降低了细胞 S 期含量($p<0.01$);与 HS 组相比,HS-组显著增加了细胞 S 期含量($p<0.05$),显著减低了细胞 G2 期含量($p<0.05$),对细胞 G1 期含量影响不显著($p>0.05$)。结果表明,HS 可以诱导细胞周期阻滞。

表 4 热应激对 HC II 细胞细胞凋亡的影响

组 别	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
常温组(Con 组)	1.55±0.08	2.23±0.07	3.78±0.11
热应激组(HS 组)	10.95±1.25**	20.38±2.73**	31.33±2.16**
热应激缓和组(HS-组)	22.36±1.86***#	15.33±2.49***#	37.69±2.24***#

注:与常温组比较,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$;与热应激组比较,#表示 $p<0.05$,##表示 $p<0.01$,差异有统计学意义。

表 5 热应激对 HC II 细胞细胞周期的影响

组 别	G1 期	S 期	G2 期
常温组(Con 组)	44.35±2.43	50.23±3.56	5.42±0.41
热应激组(HS 组)	48.52±1.89*	25.44±1.72**	26.04±1.46**
热应激缓和组(HS-组)	50.18±3.23*	30.53±1.23***#	18.29±0.89***#

注:与常温组比较,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$;与热应激组比较,#表示 $p<0.05$,差异有统计学意义。

3 讨论与结论

3.1 讨论

HS 是指机体在高温条件下的非特异性生理反应,是机体产生氧化应激的重要诱因之一^[13]。细胞存活率过高说明外界刺激不足,存活率过低则对细胞产生不可逆的损伤,选择一个合适的细胞存活率作为建模参数至关重要。孔令联等^[14]认为,不同的细胞建立 HS 模型呈现的条件因细胞本身的耐受力不同而各异,选用细胞存活率在 50%左右为宜。为了建立有效的 HS 模型,可将 HC II 细胞在 42℃中处理不同时间,在 37℃恢复以获得合适的热处理时间。由于在 42℃热应激处理 3 h 和在 37℃恢复 6 h 的细胞活力最接近对照组细胞活力的一半,因此选用上述处理用于建立本研究中的 HS 模型。

正常状态下,动物机体内氧化系统与抗氧化系统处于一个动态平衡状态,机体产生的自由基可以被体内的抗氧化酶及时清除^[15]。当外界环境发生剧烈变化时,机体的氧化还原系统动态平衡被打破,细胞内 ROS 发生失衡,易产生氧化应

激。ROS 是机体产生氧化应激的重要指标之一,过量的 ROS 导致机体抗氧化防御失衡产生氧化应激,对细胞脂质、蛋白质和 DNA 发生氧化^[16]。一方面,MDA 作为氧化应激的生物标志物,其含量可以间接反映细胞的损伤程度^[17];另一方面,CAT 和 SOD 是机体内重要的防御酶,可以抵抗 ROS 诱导的氧化损伤;T-AOC 可以反映机体整体的氧化应激水平;GSH 可以清除超氧阴离子自由基,是机体抗过氧化能力的重要指标,对机体的氧化还原平衡起关键作用。研究报告奶牛卵巢颗粒细胞在 40℃处理后显著降低了 SOD 和 GSH 的活性,增加了 MDA、NO 含量和 LDH 活性^[13]。西门塔尔和秦川杂交牛的空肠上皮细胞经 43℃处理 2 h 后 SOD 和 GSH 活力显著降低,MDA 含量显著增加^[18]。HS 通过氧化失活增加了猪肾小管(LLC-PK1)细胞内 ROS 水平并降低了 CAT、T-AOC 和 SOD 活性,对细胞产生氧化应激损伤^[19]。本研究中,HS 处理 HC II 细胞 3 h 和缓和 6 h 后,可观察到 ROS、LDH 和 MDA 水平升高,CAT、SOD、GSH 和 T-AOC 活性显著下降。这些结果均说明细胞在

HS状态下氧化还原平衡系统被打破,发生了氧化应激。

HS被认定为细胞毒性,它可以改变生物分子,扰乱细胞功能,激活凋亡途径和诱导细胞周期紊乱^[20]。有研究发现,HS会导致细胞周期停滞,阻碍细胞增殖^[21],诱发细胞凋亡^[22]。与本研究结果一致,HS处理HCⅡ细胞3h和缓和6h后,细胞发生显著凋亡。这些结果均说明HCⅡ细胞在HS状态下激活了细胞凋亡并诱导细胞周期停滞。

3.2 结论

本试验中,HCⅡ细胞42℃条件处理3h,然后37℃培养箱中缓和6h,可成功构建小鼠乳腺上皮细胞HS模型,为今后研究细胞热应激提供了一定的研究基础。

参考文献:

- [1] COFFEL E D, HORTON R M, DE SHERBININ A. Temperature and humidity based projections of a rapid rise in global heat stress exposure during the 21st century [J]. *Environmental Research Letters*, 2018, 13(1): 014001.
- [2] 王睿. 锰对热应激诱导鸡胚原代心肌细胞凋亡的作用及机制研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2022.
- [3] 陈小慧, 张玲玲, 谭胜男, 等. 奶牛氧化应激及抗氧化措施研究进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018(21): 53-56.
- [4] 刘洪丽. 基于多组学研究应激对生长肉兔血液及肠道代谢的影响 [D]. 泰安:山东农业大学,2021.
- [5] 张晓松. 生脉散对热应激致大鼠肝脏损伤保护作用及其机制研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2022.
- [6] 张鹏飞. 热应激诱发睾丸生殖细胞损伤机制的研究 [D]. 杨凌:西北农林科技大学,2020.
- [7] 何莎莎. 阿魏酸对热应激大鼠小肠黏膜屏障损伤的保护作用及机制[D].北京:中国农业大学,2016.
- [8] 严啊妮, 沈奔, 王洪荣. 热应激对反刍动物生产性能、瘤胃生理代谢和机体免疫功能的影响 [J]. *中国饲料*, 2022(21): 14-17.
- [9] GONZALEZ-RIVAS P A, CHAUHAN S S, HA M, et al. Effects of heat stress on animal physiology, metabolism, and meat quality: a review [J]. *Meat Science*, 2020, 162: 108025.
- [10] GHULAM MOHYUDDIN S, KHAN I, ZADA A, et al. Influence of heat stress on intestinal epithelial barrier function, tight junction protein, and immune and reproductive physiology [J]. *BioMed Research International*, 2022: 8547379.
- [11] 龙凡, 邹必成, 王丽华, 等. 饲料中添加烟酸对热应激肉牛屠宰性能、肉品质及脂肪代谢的影响 [J]. *动物营养学报*, 2023, 35(2): 941-952.
- [12] 邓谭杰, 苟文娟, 侯冠彧, 等. 热应激对鸡肠黏膜屏障的影响及其营养调控研究进展 [J]. *中国家禽*, 2023, 45(5): 92-99.
- [13] WANG Y R, YANG C X, ELSHEIKH N A H, et al. HO-1 reduces heat stress-induced apoptosis in bovine granulosa cells by suppressing oxidative stress [J]. *Aging*, 2019, 11(15): 5535-5547.
- [14] 孔令联, 崔艳军, 杨金勇, 等. 奶牛小肠上皮细胞氧化损伤模型的构建 [J]. *中国畜牧杂志*, 2018, 54(11): 79-83.
- [15] ABRAHAMOVYCH M, ABRAHAMOVYCH O, et al. Content of some endothelium-dependent vasoactive substances in the blood of patients, depending on the liver cirrhosis severity and the organism's redox system state [J]. *Lviv Clinical Bulletin*, 2019, 4(28): 14-20.
- [16] SHARMA N, JEONG D K. Stem cell research: a novel boulevard towards improved bovine mastitis management [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2013, 9(8): 818-829.
- [17] CHEN Y, LUO H Q, SUN L L, et al. Dihydromyricetin attenuates myocardial hypertrophy induced by transverse aortic constriction via oxidative stress inhibition and SIRT3 pathway enhancement [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(9): 2592.
- [18] LI X M, YANG Y, LIU S M, et al. Grape seed extract supplementation attenuates the heat stress-induced responses of jejunum epithelial cells in simmental×Qinchuan steers [J]. *The British Journal of Nutrition*, 2014, 112(3): 347-357.
- [19] ZHANG B Z, GUO X T, CHEN J W, et al. Saikosaponin-D attenuates heat stress-induced oxidative damage in LLC-PK1 cells by increasing the expression of anti-oxidant enzymes and HSP72 [J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2014, 42(5): 1261-1277.
- [20] HUSSEN J. Changes in cell vitality, phenotype, and function of dromedary camel leukocytes after whole blood exposure to heat stress *in vitro* [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 647609.
- [21] ABDELNOUR S A, SWELUM A A, ABD EL-HACK M E, et al. Cellular and functional adaptation to thermal stress in ovarian granulosa cells in mammals [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2020, 92: 102688.
- [22] CHEN K L, WANG H L, JIANG L Z, et al. Heat stress induces apoptosis through disruption of dynamic mitochondrial networks in dairy cow mammary epithelial Cells [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, 2020, 56(4): 322-331.