

氧化修饰 LDL 诱导 U937 细胞凋亡及其机制探讨

杨向东¹⁾ 杨永宗

(衡阳医学院心血管病研究所, 衡阳 421001)

黎健

(卫生部北京老年医学研究所, 北京 100730)

摘要 用氧化修饰低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导人髓系白血病细胞株 U937 细胞凋亡, 并研究其作用机制. 用脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 切口末端标记技术 (TUNEL 法)、流式细胞仪和 DNA 断裂分析检测细胞凋亡; 用免疫组化检测 *c-fos*、*c-jun* 和 *c-myc* 蛋白表达, RT-PCR 显示 *c-fos*、*c-jun* 和 *c-myc* mRNA 表达水平. 结果表明 ox-LDL 可致 U937 细胞凋亡, 其作用具有浓度效应; ox-LDL 可以上调 *c-fos*、*c-jun* 和 *c-myc* 基因表达, 使 *c-fos*、*c-jun* 和 *c-myc* 蛋白合成增多, 最终诱导 U937 细胞凋亡.

关键词 氧化修饰低密度脂蛋白, U937 细胞, 基因调控, 细胞凋亡

学科分类号 Q513

泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的早期病变, 由单核细胞/巨噬细胞和血管平滑肌细胞吞噬胆固醇脂并蓄集脂质形成. 许多急慢性心血管疾病如脑卒中、心肌梗塞等的发生与 AS 斑块脂质中心的破裂有关. AS 斑块中的泡沫细胞存在凋亡现象, 泡沫细胞的堆积和死亡对 AS 脂质中心的形成起着重要作用^[1]. 氧化修饰低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 与 AS 的发生和发展有着密切关系, 它可以通过多条途径促进 AS 的发生、发展^[2]. 90 年代以来, 研究发现氧化应激对细胞凋亡的作用机制与超氧阴离子的产生和脂质过氧化有关^[3,4]. 我们用 ox-LDL 处理人髓系白血病细胞株 U937 细胞, 发现 U937 细胞能吞噬脂蛋白并蓄集在胞内, 建立了一种新的泡沫细胞模型^[5]. 尚未见文献报道用 ox-LDL 诱导 U937 细胞凋亡, 本实验以 U937 细胞为研究对象, 以 ox-LDL 诱导其凋亡, 并观察 *c-fos*、*c-jun* 和 *c-myc* 基因表达在凋亡过程中的变化, 初步探讨其在泡沫细胞凋亡过程中的调控作用.

1 材料和方法

1.1 细胞培养

U937 细胞以含 100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素和 10% 胎牛血清 (GIBCO) RPMI1640 (GIBCO) 培养. 对照组不加 ox-LDL, 实验组 ox-LDL 终浓度分别为 100 mg/L 和 200 mg/L, 培养 48 h.

1.2 LDL 的分离、氧化修饰及鉴定

人血浆 LDL ($d = 1.03 \sim 1.05$) 采用超速离心法分离, 经琼脂糖电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电

泳和免疫电泳, 均显示为单一蛋白质带. 将 LDL 置于含 10 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 的 PBS 溶液 (pH 7.2) 中, 37 $^\circ\text{C}$ 温育 24 h. 氧化修饰后的 LDL 置含 200 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 的 PBS 中透析 24 h, 滤过除菌后 4 $^\circ\text{C}$ 保存.

1.3 U937 细胞原位凋亡测定

收集对照组及处理组细胞涂片, 按原位细胞凋亡测定试剂盒 (Boehringer mannheim) 说明操作.

1.4 细胞周期分析

收集 1×10^6 细胞, 用 PBS 洗 2 次, 加入冷冻的 70% 乙醇, 4 $^\circ\text{C}$ 过夜固定细胞, 离心 800 r/min $\times 5$ min, 弃乙醇, 500 μl PBS 重悬, 加 RNaseA, 终浓度为 50 mg/L, 37 $^\circ\text{C}$ 水浴 45 min, 加入碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 50 μl , 混匀, 4 $^\circ\text{C}$ 避光放置 60 min, 尼龙网滤过, 流式细胞仪 (美国 BD 公司, FACS420) 上样检测.

1.5 DNA 断裂琼脂糖电泳分析

酚: 氯仿法提取细胞 DNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析.

1.6 *c-fos*、*c-jun* 和 *c-myc* 蛋白测定

200 mg/L ox-LDL 处理细胞 48 h, 收集细胞, 涂于用胶原蛋白预处理的玻片, 按免疫组化法染色. 所用抗体均系美国 Santa Cruz 公司产品, *c-fos*、*c-jun* 抗体为兔抗人抗血清, *c-myc* 抗体为鼠抗人单克隆抗体.

1.7 *c-fos*、*c-jun* 和 *c-myc* mRNA 表达

用 TRIZOL reagent (GIBCO) 提取细胞总

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (010) 65130302, E-mail: xdy7@263.net

收稿日期: 1999-02-08, 修回日期: 1999-09-06

RNA, 逆转录合成 CDNA. 以 GAPDH 为内对照, 进行半定量 RT-PCR 反应, GAPDH、c-fos、c-jun 和 c-myc 引物序列参见文献 [6], 首次循环先在 94℃ 变性 5 min, 变性、退火、延伸分别为 95℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 共 30 个循环, 最后一次循环在 72℃ 延伸 10 min; PCR 产物用含 0.5 mg/L 溴化乙啶的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析.

2 结 果

2.1 ox-LDL 诱导 U937 细胞凋亡

2.1.1 原位检测细胞凋亡: 用 100 mg/L 和

200 mg/L ox-LDL 孵育 U937 细胞 48 h, 部分细胞呈现 TUNEL 阳性, 胞核中可见黑色颗粒 (图 1, 见图版 I). 说明 ox-LDL 可诱导 U937 细胞凋亡; 且随浓度增高, TUNEL 阳性细胞增多, ox-LDL 的作用具有浓度效应.

2.1.2 细胞周期分析: 正常培养的 U937 细胞, 经流式细胞仪检测, 细胞凋亡率为 1.2%, 100 mg/L ox-LDL 作用 48 h 后, 凋亡率为 7.3%, G₂、M 期细胞数减少, G₁ 期前出现亚 G₁ 峰, 即凋亡峰 (AP), ox-LDL 浓度增至 200 mg/L 时细胞凋亡率增为 22.2%, AP 峰更加明显 (图 2).

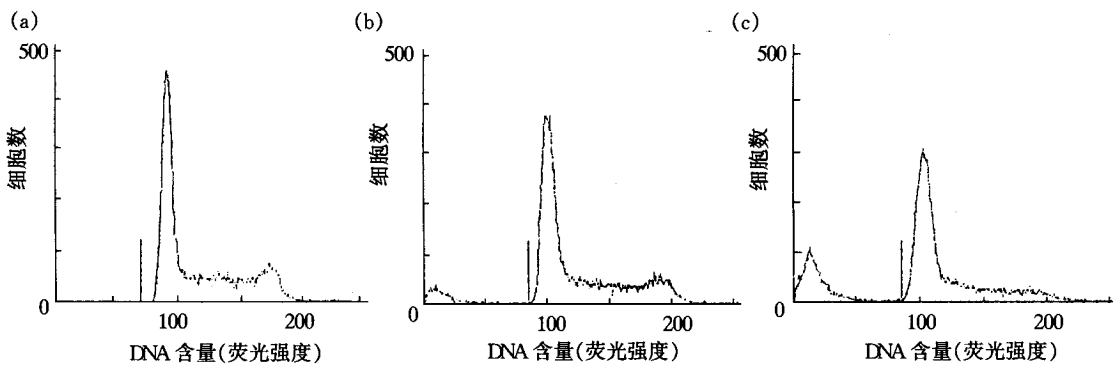


图 2 流式细胞术检测 ox-LDL 诱导 U937 细胞凋亡

(a): 正常培养的 U937 细胞; (b): 100 mg/L ox-LDL; (c): 200 mg/L ox-LDL.

2.1.3 细胞 DNA 琼脂糖电泳: 100 mg/L ox-LDL 作用 48 h, 出现细胞凋亡特有的梯状条带 (DNA ladder), 浓度增至 200 mg/L 时条带更加明显 (图 3).

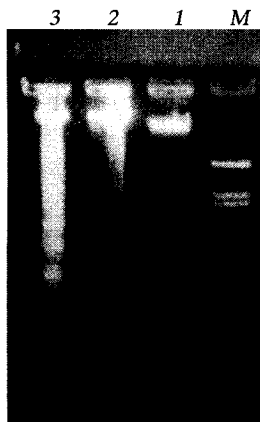


图 3 普通琼脂糖凝胶电泳

M: PBR322/BstNI 分子质量标准; 1: 正常对照的细胞 DNA; 2: 100 mg/L ox-LDL 处理组; 3: 200 mg/L ox-LDL 处理组.

2.2 c-fos、c-jun 和 c-myc 蛋白表达情况

应用免疫组化法观察 U937 细胞 c-fos、c-jun 和 c-myc 蛋白水平. 在正常对照组中, 检测不到这三种蛋白或表达水平很低, 然而, U937 细胞经过 ox-LDL 处理后, c-fos、c-jun 和 c-myc 蛋白水平显著增高, 说明 ox-LDL 可诱导 c-fos、c-jun 和 c-myc 蛋白表达. 结果见图 4 (见图版 II).

2.3 c-fos、c-jun 和 c-myc mRNA 表达水平

应用半定量 RT-PCR 检测 mRNA 水平, 结果如图 5 所示, 对照组和处理组均检出 c-fos、c-jun 和 c-myc 的 mRNA, 电泳图谱显示两条区带, 一条为对照组基因 GAPDH 的 PCR 产物, 其扩增片段长度为 457 bp, 另一条分别为 c-fos、c-jun 或 c-myc 的扩增产物, 其扩增片段长度分别为 236 bp、325 bp、187 bp. 从图 5 可以看出, 经 ox-LDL 处理的 U937 细胞, c-fos、c-jun 和 c-myc mRNA 表达水平增高.

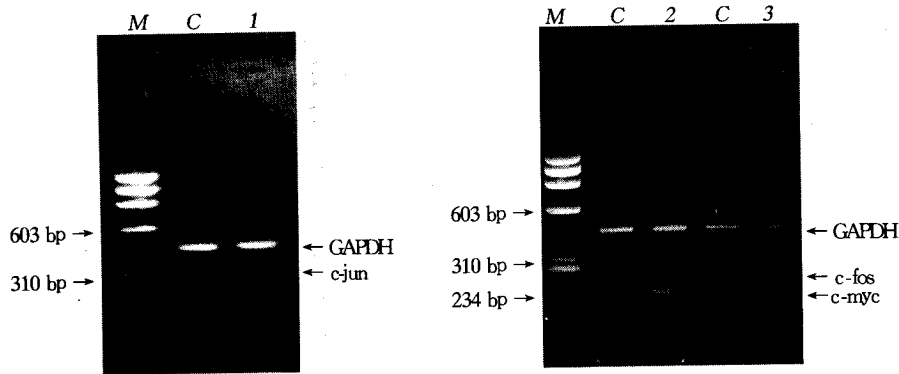


图5 RT-PCR检测c-fos、c-jun和c-myc mRNA表达水平

GAPDH: 457 bp; c-fos: 236 bp; c-jun: 325 bp; c-myc: 187 bp. M: Φ X174 / *hae* III, C: 正常对照. 1: c-jun; 2: c-fos; 3: c-myc.

3 讨 论

多数动脉粥样硬化斑块中央部位的粥样物质越多, 越趋于不稳定. 斑块破裂形成的小碎片可以阻塞中小血管, 导致梗塞局部器官的缺血、坏死. 血管内膜下 LDL 蓄积氧化修饰形成 ox-LDL, 可以损伤内皮细胞, 减少舒血管物质如一氧化氮的生成; 可以促进血小板聚积和血栓形成; 可以刺激平滑肌细胞的迁移增殖; 可以诱导内皮细胞、平滑肌细胞、单核细胞的凋亡, 加剧斑块的不稳定性. 文献报道^[7-9], ox-LDL 诱导单核细胞凋亡的机制与氧自由基产生过多, 膜脂质过氧化和溶酶体损伤有关, 凋亡细胞锰超氧化物歧化酶 (manganese superoxide dismutase, MnSOD) 和 p53 表达增高, 应用 p53 反义寡核苷酸片段, 可以部分抑制细胞凋亡; ox-LDL 诱导平滑肌细胞凋亡是通过 CPP32 蛋白酶活化和 Bcl-2 蛋白表达下调所致. U937 细胞为人髓系白血病细胞株, 具有单核母细胞 (monoblast) 和未成熟单核细胞的特性, 转化生长因子- β (TGF- β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、佛波酯 (PMA) 和 γ -干扰素 (IFN- γ) 等均可诱导 U937 细胞分化^[10], ox-LDL 也可以刺激 U937 细胞向巨噬细胞分化并增强其粘附吞噬能力^[8]. 我们在研究中发现 ox-LDL 可以诱导 U937 细胞泡沫化、凋亡, 通过 TUNEL 法、流式细胞仪和 DNA 断裂分析观察到细胞的凋亡征象, 且随 ox-LDL 浓度增高, 细胞凋亡增多.

研究表明^[11], 原癌基因 c-fos、c-jun 和 c-myc 与细胞凋亡有密切关系, 这些原癌基因编码的蛋白, 在核内起着转录因子的作用, 参与细胞增殖、分化和细胞凋亡的调控. c-fos 蛋白和 c-jun 蛋白组

成异源二聚体 Fos-Jun, 即 AP-1, 通过 Leucine Zipper 结合于 DNA 上, 参与基因表达的复杂调控网络. c-myc 基因编码的蛋白, 既参与调节细胞的增殖, 也参与细胞的凋亡. LDL 氧化修饰后新产生的成分主要有: 脂质过氧化物, 活性醛类物质, 溶血卵磷脂, 氧化胆固醇等. 脂质过氧化物的增多可以引起细胞内 Ca^{2+} 的显著增加, Ca^{2+} 的增加是诱发细胞凋亡所必需的. 有文献报道氧自由基的激活可增高 c-fos 的表达, 导致软骨细胞凋亡^[12]. 我们研究了 ox-LDL 对 U937 细胞表达 c-fos、c-jun 和 c-myc 基因的影响, 本文结果显示, ox-LDL 可诱导 U937 细胞凋亡, 在 ox-LDL 诱导细胞凋亡过程中, c-fos、c-jun 和 c-myc 基因表达均增加, 其蛋白表达水平也明显上调. 因此我们推测, ox-LDL 可能通过氧自由基增多上调 c-fos、c-jun 和 c-myc 基因表达而诱导 U937 细胞凋亡. 其胞内信号传导机制尚不清楚, 是否与升高胞内 Ca^{2+} 浓度和 PKC 的激活有关还有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Bjorkerud S, Bjorkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol*, 1996, **149** (2): 367~380
- 2 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362** (29): 801~809
- 3 Hockenbrey D M, Oltvai Z N, Yin X M, *et al.* Bcl-2 function in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 1993, **75** (2): 241~251
- 4 Kinscherf R, Claus R, Wanger M, *et al.* Apoptosis caused by oxidized LDL is manganese superoxide dismutase and p53 dependent. *FASEB J*, 1998, **12** (6): 461~467
- 5 李全忠, 杨永宗, 易光辉, 等. U937 泡沫细胞模型的建立. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (2): 152~154
Li Q Z, Yang Y Z, Yi G H, *et al.* *Chin J Arterioscler*, 1999, **7**

- (2): 152~ 154
- 6 Irving J, Feng J L, Wistrom C, *et al.* An altered repertoire of fos/jun (AP-1) at the onset of replicative senescence. *Exp Cell Res*, 1992, **202** (1): 161~ 166
 - 7 Yuan X M, Li W, Olsson A G, *et al.* The toxicity to macrophages of low-density lipoprotein is mediated through lysosomal damage. *Atherosclerosis*, 1997, **133** (2): 153~ 161
 - 8 Nishio E, Watanabe Y. Oxysterols induced apoptosis in cultured smooth muscle cells through CPP32 protease activation and bcl-2 protein downregulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **226** (3): 928~ 934
 - 9 Hardwick S J, Hegyi L, Clare K, *et al.* Apoptosis in human monocyte macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein. *J Pathol*, 1996, **179** (3): 294~ 302
 - 10 吴炯, 王明伦, 徐赞, 等. TNF- α 在 PMA 和 IFN- γ 诱导 U937 细胞生长和分化过程中的作用. *实验生物学报*, 1994, **27** (3): 307~ 313
Wu J, Wang M L, Xu Z, *et al.* *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*, 1994, **27** (3): 307~ 313
 - 11 Smeyne R J, Vendrell M V, Hayward M, *et al.* Continuous c-fos expression precedes programmed cell death *in vivo*. *Nature*, 1993, **363** (13): 166~ 169
 - 12 Lo Y Y C, Cruz T F. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem*, 1995, **270** (20): 11727~ 11730

Mechanism Involved in the Apoptosis of U937 Cells Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein.

YANG Xiang-Dong, YANG Yong-Zong (*Institute*

of Cardiovascular Disease, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China); LI Jian (*Department of Biochemistry, Beijing Institute of Geriatrics, Beijing 100730, China*).

Abstract To investigate the mechanism involved in the apoptosis of human monocyte cell line U937 induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). The increase of the degree of cell apoptosis was concentration dependent. The apoptotic cells were detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL), flow cytometry and DNA fragment analysis. The protein contents of c-fos, c-jun and c-myc were analyzed by immunochemical staining. The expression of c-fos, c-jun and c-myc mRNA were quantified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The results show that ox-LDL could upregulate the gene expression of c-fos, c-jun and c-myc, which induced the apoptosis of U937 cells.

Key words oxidized low density lipoprotein, U937 cell, gene regulation, cell apoptosis

第七届全国生物膜学术讨论会通讯

由中国生物化学与分子生物学学会、中国生物物理学会和中国细胞生物学会联合举办的第七届全国生物膜学术讨论会于1999年11月8日~11日在祖国南疆春城——昆明召开。全国生物膜学术讨论会每三年一次按期举行。来自中国科学院、中国医学科学院、军事医学科学院和全国各高等院校等40余个单位的百余名从事生物膜研究的科学工作者聚集在一起,就当前生物膜研究的发展动向和进展进行了认真的交流,与会代表普遍反映此次会议学术性强,学术活动安排得好,时间紧凑,交流和对学术报告的讨论都很认真、热烈,学术气氛活跃,收益不小,不少代表说这是参加生物膜学术讨论会以来印象深刻收益最大的一次会议。

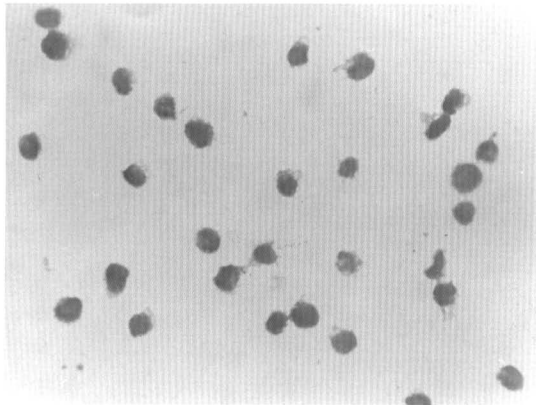
为了较深刻地反映当前国内外生物膜的研究现状、发展动向和研究热点,经过认真组织准备,会议筹备组组织了十个特邀大会综述报告,就有关信号跨膜转导,生物膜与细胞程序性死亡,膜蛋白的三维结构,生物膜在从分子向细胞的发展中的地位与作用,光合膜的结构与功能,离子通道,生物膜与疾病,以及生物膜与膜工程等方面进行了较深入的有启示作用的报告,与会者感到有新意。

由于与会代表的共同努力,会议收到了满意的效果。在总结这次会议时,我们体会到这次会议具有以下特点:1.认真。报告人认真报告,听会者专心。安排了做报告者自始至终无一缺席报告,还要求增加报告。代表的出席率高,提问和讨论较活跃,做到了畅所欲言。2.体现了老中青三结合。从综述报告到一般报告年青人都占了较大比例;不仅老一辈科学家提问,很多年轻人踊跃提问,思想比较活跃。3.综述报告与个人学术发言交流穿插进行,觉得自始至终都有想听和想了解的信息,充满了新鲜感。4.榜样的作用,无形的激励。与会的老一辈科学家自始至终坚持到会,认真听会,平等讨论,细心交流,以身作则,对年轻的科研工作者是无形的引导和激励。5.会议规模适中,提供了与同行们见面多,熟悉快,谈得深的良好客观条件和氛围。这些条件,对于开好这次会议起到了积极的促进作用。

代表们对我国生物膜的研究在21世纪中抓什么,对今后是否建立网络以加强同行们的经常交流和协作,在两次会议之间可组织一些重要专题的小型讨论会以及今后报告应向使用多媒体工具的方向引导等方面提出了许多积极的建议,这些将通过发挥专业委员会的作用加以组织和落实。

杨向东等：“氧化修饰 LDL 诱导 U937 细胞凋亡及其机制探讨” 一文 的图 1

(a)



(b)

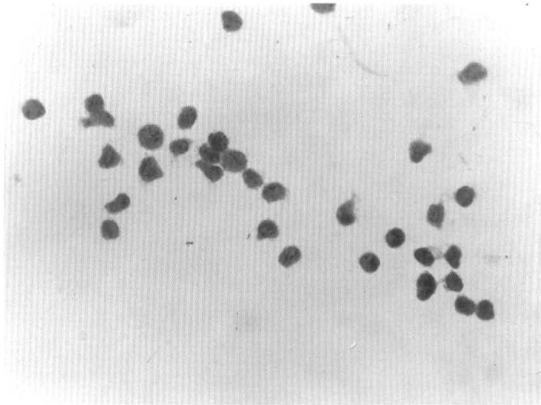
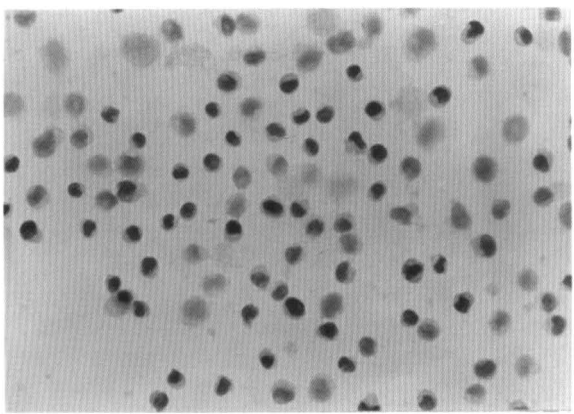
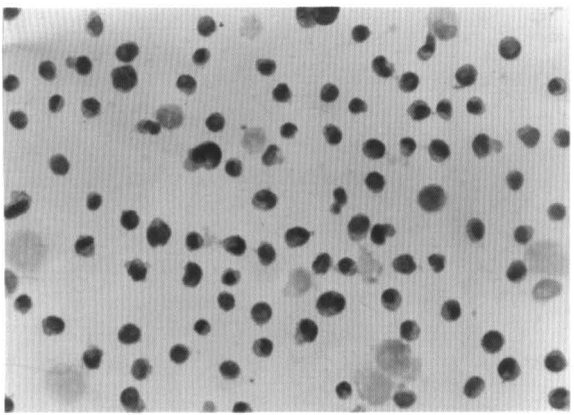
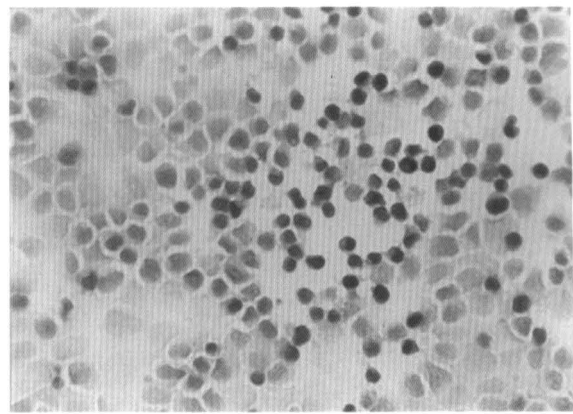


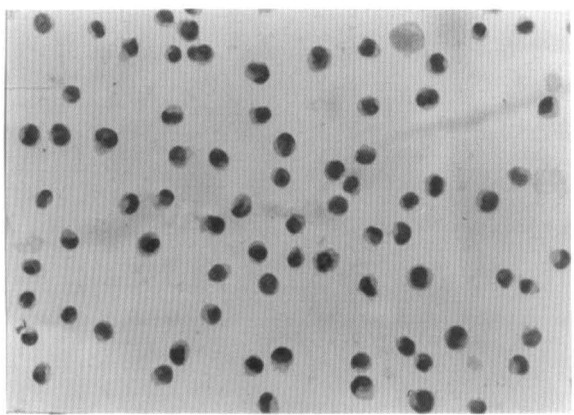
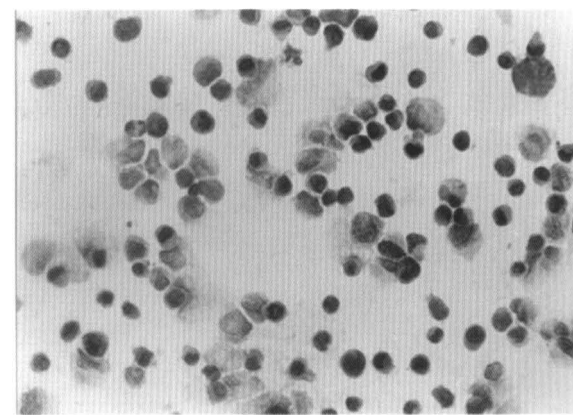
图 1 TUNEL 法检测 ox-LDL 诱导的 U937 细胞凋亡
(a) 正常培养的 U937 细胞； (b) 200 mg/L ox-LDL . (放大倍数：× 400)



(b)



(d)



(f)

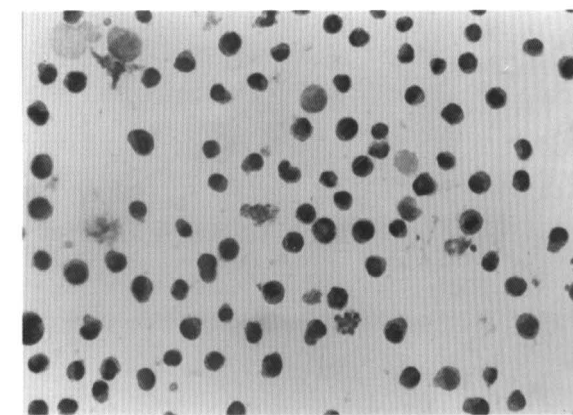


图 4 U937 细胞 c-fos、c-jun 和 c-myc 蛋白表达的免疫组化染色

(a) 与 (b) 分别为正常对照及 ox-LDL 处理的 U937 细胞 c-fos 免疫组化染色；(c) 与 (d) 分别为正常对照及 ox-LDL 处理的 U937 细胞 c-jun 免疫组化染色；(e) 与 (f) 分别为正常对照及 ox-LDL 处理的 U937 细胞 c-myc 免疫组化染色。
(放大倍数：× 400)