

[文章编号] 1007- 3949(2000) - 01- 0021- 05

• 实验研究 •

氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞凋亡 及其对 p53、p21 和 *Bcl- 2* 表达的影响

杨向东, 黎 健¹, 田育茜¹, 张 彤, 杨和平, 杨永宗

(衡阳医学院心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001; 1. 卫生部北京老年医学研究所, 北京 100730)

[主题词] 氧化修饰; 脂蛋白, 低密度; U937; 细胞凋亡; 癌基因

[摘 要] 为研究单核细胞源性泡沫细胞凋亡机制, 以氧化型低密度脂蛋白诱导人髓系白血病细胞 U937 凋亡, 观察 p53、p21 和 *Bcl- 2* 的表达。用流式细胞术和 DNA 断裂分析检测细胞凋亡; 用细胞免疫荧光标记结合流式细胞术检测 p53、p21 和 *Bcl- 2* 蛋白表达, 反转录聚合酶链反应显示 p53、p21 和 *Bcl- 2* mRNA 表达水平。结果表明氧化型低密度脂蛋白可致 U937 细胞凋亡, 其作用具有浓度效应; 氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞凋亡过程中, p53、p21 mRNA 和蛋白表达增加, *Bcl- 2* mRNA 和蛋白表达减少。提示氧化型低密度脂蛋白可能通过上调 p53、p21 基因表达, 下调 *Bcl- 2* 基因, 导致 U937 细胞凋亡。

[中图分类号] R329.8⁺8

[文献标识码] A

Effect of Oxidized Low Density Lipoprotein on Apoptosis and Expression of p53, p21 and *Bcl- 2* Gene in U937 Cells

YANG Xiang- Dong¹, LI Jian², TIAN Yu- Qian², ZHANG Tong¹, YANG He- Ping¹, and YANG Yong- Zong¹

(1. Institute of Cardiovascular Disease, Hengyang Medical College, Hengyang 421001; 2. Department of Biochemistry, Beijing Institute of Geriatrics, Beijing 100730, China)

MeSH Oxidized Modification; Lipoprotein, LDL; U937; Apoptosis; Oncogene

ABSTRACT **Aim** To investigate the mechanism involved in the apoptosis of human myeloid leukemia U937 cells induced by oxidized low density lipoprotein (ox- LDL). **Methods** The apoptotic cells were determined by flow cytometry and DNA fragmentation assay. The content of p53, p21 and *Bcl- 2* protein were analyzed by immunofluorescence staining and flow cytometric analysis. The level of p53, p21 and *Bcl- 2* mRNA were quantified by reverse transcription- polymerase chain reaction (RT- PCR). **Results** Ox- LDL induced apoptosis of U937, which is concentration dependent, and upregulate the level of p53 and p21 mRNA and protein as detected by RT- PCR and flow cytometric analysis. However, expression of *Bcl- 2* was downregulated after treatment with ox- LDL. **Conclusion** Ox- LDL upregulated the gene expression of p53, p21 and downregulated *Bcl- 2* expression, which induced apoptosis of U937 cells.

泡沫细胞是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 早期病变的主要病理细胞, 由单核细胞/ 巨噬细胞或血管平滑肌细胞吞噬并蓄集脂质而形成。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影响 As 脂质斑块的稳定^[1]。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox- LDL) 与 As 有着密切的关系, 它可以通过多条途径促进 As 的发生、发展。90 年代以来, 研究发现氧化应激对细胞凋亡的作用与超氧阴离子的产生和脂质过氧化有关, 与控制细胞凋亡的关键基因 p53 和 *Bcl- 2* 也有一定

关系^[2~ 5]。我们用氧化型低密度脂蛋白处理人髓系白血病细胞 U937, 促其向单核细胞分化, 发现 U937 能吞噬氧化修饰的低密度脂蛋白并蓄集在细胞内, 形成泡沫细胞^[6]。本实验以 U937 细胞为研究对象, 以氧化型低密度脂蛋白诱导其凋亡, 并观察 p53、p21 和 *Bcl- 2* 基因及其编码蛋白在凋亡过程中的变化, 初步探讨其在单核细胞源性泡沫细胞凋亡过程中的调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料

人髓系白血病细胞 U937 购自中国科学院上海细胞生物学研究所。RPMI1640 培养基、胎牛血清和

[基金项目] 本课题由 1997 年湖南省科委青年基金资助(1997- 7)

[作者简介] 杨向东, 男, 29 岁, 现为湖南医科大学病理生理学专业 97 级博士, 主要从事动脉粥样硬化性心脑血管疾病的机理研究。

Trizol Reagent 购自 GIBCO 公司, Reverse transcription system 和 PCR core system 购自 Promega 公司。p53、p21、*Bcl-2* 和 GAPDH 引物由赛百盛公司合成, *Bcl-2* 抗体为兔抗人抗血清, p53 和 p21 抗体为鼠抗人单克隆抗体, 二抗为 FITC 标记羊抗兔 IgG 和 FITC 标记羊抗鼠 IgG, 所用抗体均系美国 Santa Cruz 公司产品。

1.2 细胞培养及分组

U937 细胞($4 \times 10^8/L$) 用含 1×10^5 u/L 青霉素、100 mg/L 链霉素和 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。对照组不加氧化型低密度脂蛋白, 实验组中氧化型低密度脂蛋白终浓度分别为 100 mg/L 和 200 mg/L, 培养 48 h。

1.3 低密度脂蛋白的分离和氧化

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, 均显示为单一蛋白带。将 LDL 置于含 10 μmol/L CuSO₄ 的 PBS (pH 7.2) 中, 37℃温育 24 h。氧化修饰后的 LDL 置于含 200 μmol/L EDTA 的 PBS 中透析 24 h, 超滤除菌后 4℃保存。

1.4 DNA 断裂琼脂糖电泳分析

参照文献[7]提取细胞 DNA 进行琼脂糖电泳分析。

1.5 流式细胞术

1.5.1 分析细胞周期亚 G1 峰 收集 1×10^6 细胞, 用 PBS 洗 2 次, 用冷冻的 70% 乙醇 4℃过夜固定细胞, 离心 800 r/min × 5 min, 弃乙醇, 500 μL PBS 重悬, 加 Rnase A, 终浓度为 50 g/L, 37℃水浴 45 min, 加入碘化丙啶(promide iodine, PI) 50 g/L, 混匀, 4℃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。

1.5.2 p53、p21 和 *Bcl-2* 蛋白的表达 200 mg/L 氧化型低密度脂蛋白温育 U937 细胞 48 h, 收集细胞 3×10^6 个, 用冷 PBS 2 mL 洗涤细胞一次, 800 r/min × 5 min 离心; 4% 多聚甲醛 2 mL 室温固定细胞 40 min, 800 r/min × 5 min 离心; PBS 2 mL 重悬细胞, 800 r/min × 5 min 离心; 用含 0.2% Triton-X100 和 5% 血清的 PBS 1 mL 重悬细胞, 冰上放置 20 min, 均分为三份, 800 r/min × 5 min 离心去上清。分别将 p53、p21 单抗 1:100 稀释, *Bcl-2* 多抗 1:40 稀释, 饱和剂量加入, 冰上放置 40 min, 800 r/min × 5 min 离心, 用冷 PBS 2 mL 重悬细胞, 800 r/min × 5 min 离心, 洗去未结合一抗, 重复一次。加入 FITC 标记的二抗, 冰上避光放置 40 min 后, 800 r/min × 5 min 离心, 去上清, PBS 洗涤两次, 加入 1% 多聚甲醛 0.5 mL 重

悬细胞; 流式细胞仪检测, 计数 10 000 个细胞。

1.6 反转录聚合酶链反应

应用 TRIZOL 提取细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA, 以 GAPDH 为内对照, 进行半定量反转录聚合酶链反应。GAPDH 引物为: 正义链 5'-TGAAGGTCG-GAGTCAACGGATTTT-3', 反义链 5'-CATGTGGG-CATGAGGTCCACCAC-3', 共 983 bp。p53 引物为: 正义链 5'-CTAACC GCGGTCCCTTCCCAGAAAACCT-AC-3', 反义链 5'-TACAGTCAGAGC-CAACCTCAGGCG-3', 共 409 bp。p21 引物为: 正义链 5'-GGAATTCATGTCAG AACC GGCTGG-3'), 反义链 5'-GCGGA TCCTTAGGGCTTCCTCTTG-3', 共 500 bp; *Bcl-2* 引物为: 正义链 5'-ACTTGTGGC-CCAGATAG GCACCCAG-3', 为: 正义链 5'-CGACTTCGCCGAGATGTCCAG CCAG-3', 共 382 bp。首次循环先在 94℃变性 5 min, 变性、退火、延伸分别为 94℃1 min, 56℃1 min, 72℃1.5 min, 共 30 个循环, 最后一次循环在 72℃延伸 10 min; 聚合酶链反应产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果

2.1 细胞周期分析

对照组 U937 细胞经流式细胞仪检测, 细胞凋亡率为 1.2%, 用 100 mg/L 氧化型低密度脂蛋白作用 48 h 后, 凋亡率为 7.3%, G2 期和 S 期细胞数减少, G1 期细胞增多, G1 期前出现亚 G1 峰, 即凋亡峰, 氧化型低密度脂蛋白浓度增至 200 mg/L 时细胞凋亡率增至 22.2%, 峰更加明显(图 1, Figure 1)。

2.2 细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳

分别提取对照组、100 mg/L 氧化型低密度脂蛋白组和 200 mg/L 氧化型低密度脂蛋白组细胞 DNA, 进行凝胶电泳分析。从图 2 (Figure 2) 可见 100 mg/L 氧化型低密度脂蛋白作用 U937 48 h 后, DNA 电泳出现细胞凋亡特有的间隔 180~200 bp 梯状条带(DNA ladder), 但条带较弱; 当氧化型低密度脂蛋白浓度增至 200 mg/L 时条带更加明显。

2.3 p53、p21 和 *Bcl-2* 蛋白的表达

流式细胞术检测 10 000 个 FITC 荧光抗体标记的 U937, 图 3 (Figure 3) 显示氧化型低密度脂蛋白处理后 p53 和 p21 的表达增高, 主峰右移, p53 阳性的细胞数由 15.7% 增至 64.2%, p21 阳性的细胞数由 12.5% 增至 67.4%; 而 *Bcl-2* 的表达降低, 主峰左移, *Bcl-2* 阳性的细胞数由 30.0% 减少至 5.5%。每组样本重复 3 次。

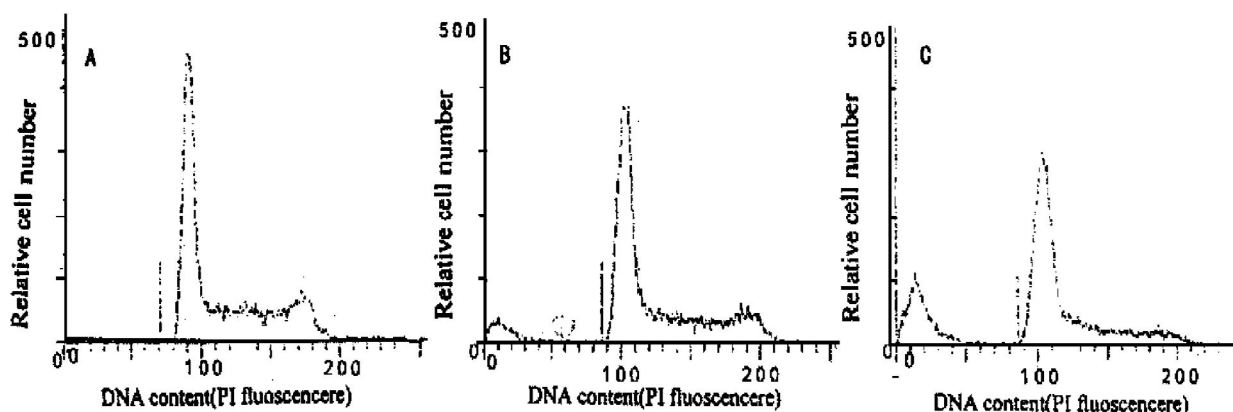


图 1. 氧化型低密度脂蛋白对 U937 细胞周期的影响

Figure 1. Flow cytometric analysis for apoptosis on U937 cells induced by ox-LDL. A: control (1.2%), B: 100 mg/L ox-LDL (7.3%), C: 200 mg/L ox-LDL (22.2%)

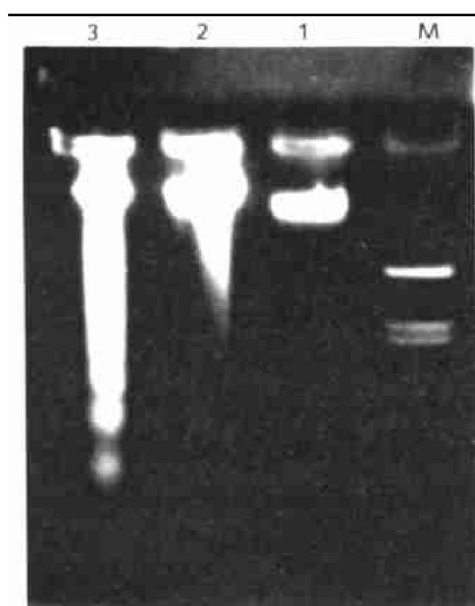


图 2. DNA 凝胶电泳图谱

Figure 2. The apoptosis of U937 induced by ox-LDL were analyzed by agarose gel electrophoresis. M: PBR322/ BstNI MW, 1: Control, 2: Incubation with 100 mg/L ox-LDL, 3: Incubation with 200 mg/L ox-LDL

2.4 氧化型低密度脂蛋白对 p53、p21 和 Bcl-2 mRNA 表达水平的影响

应用反转录聚合酶链反应半定量检测 mRNA 水平, 结果如图 4 (Figure 4) 所示, 对照组和处理组均检出 p53、p21 和 Bcl-2 的 mRNA。电泳图谱显示两条区带, 一条为内对照 GAPDH 的聚合酶链反应产物, 其扩增片段长度为 983 bp, 另一条分别为 p53、p21 或

Bcl-2 的扩增产物, 其扩增片段长度分别为 409 bp、500 bp 和 382 bp。从图 4 可以看出, 经氧化型低密度脂蛋白处理的 U937 细胞, p53 和 p21 mRNA 表达水平增高, Bcl-2 mRNA 表达水平降低。反转录聚合酶链反应结果与流式细胞术检测 p53、p21 和 Bcl-2 蛋白表达结果一致。

3 讨论

动脉粥样硬化斑块的形成一般经历脂质条纹期、脆性动脉粥样斑块期、纤维斑块期和粥样斑块期。大量研究证实, 临床常见急性冠状动脉事件如心绞痛、急性心肌梗塞和冠状动脉猝死的发生主要取决于斑块的类型(斑块的组成成分及脆性), 而与粥样病变狭窄严重程度并无明显的关系。巨噬细胞在脆性或不稳定性脂质丰富斑块的破裂中起很重要的作用, 巨噬细胞可吞噬代谢脂质, 促进脂质池的形成; 可分泌细胞因子促进平滑肌细胞的迁移、增殖; 可释放蛋白酶(弹性酶和胶原酶)与巨噬细胞代谢产生的自由基和脂质过氧化物一起加速血管壁的损伤。文献[8]报道氧化型低密度脂蛋白可以诱导内皮细胞、平滑肌细胞和单核细胞凋亡, 其作用机制多样, 与氧自由基产生过多、膜脂质过氧化和溶酶体损伤有关。氧化型低密度脂蛋白与 U937 孵育, 可诱导 U937 向单核细胞分化并增强其粘附吞噬能力, U937 吞噬并大量蓄积脂质形成一种稳定的、同一性好的泡沫细胞模型^[5,9]。我们在研究中通过细胞周期分析和 DNA 断裂分析发现较高浓度的 ox-LDL 可以

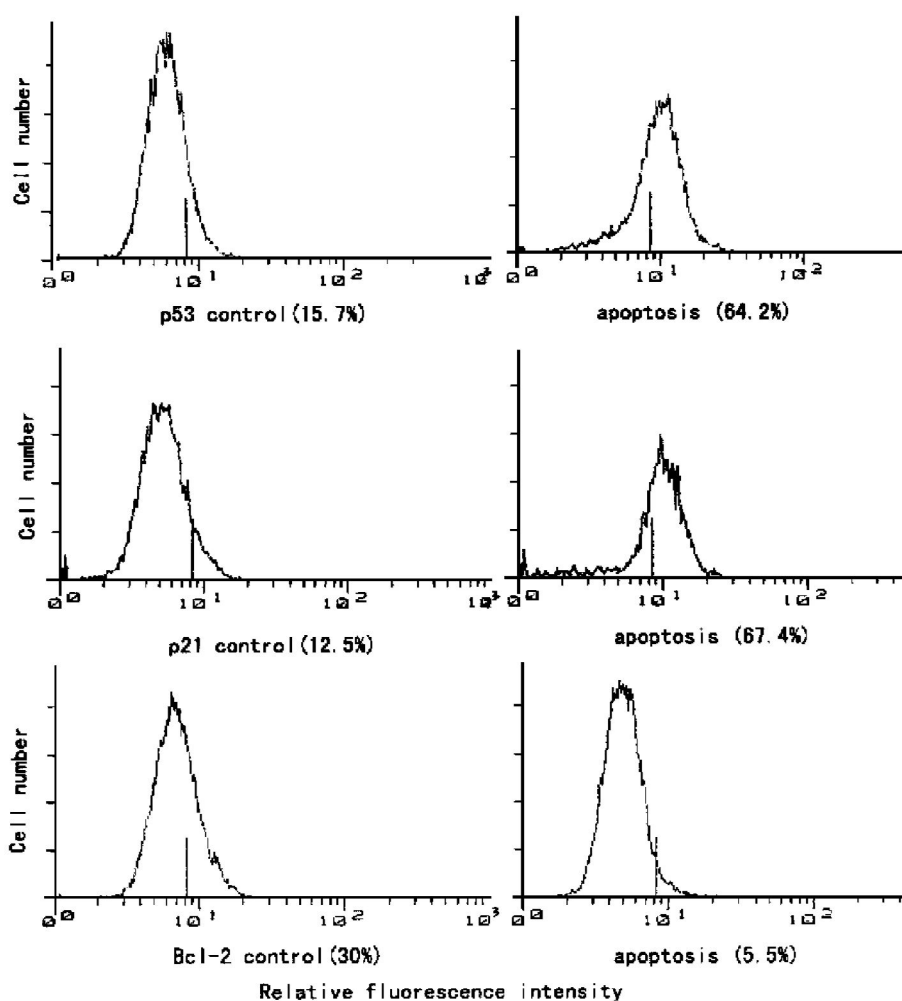


图3. 流式细胞术分析 p53、p21 和 Bcl-2 蛋白的表达

Figure 3. Expression of p53, p21 and Bcl-2 protein were determined by cytoplasmic immunofluorescence staining and flow cytometric analysis after treatment with 200 mg/L ox-LDL. Results are from one representative experiment ($n=3$, $P<0.01$). M: 100 bp DNA marker, C: control group, A: incubation with 200 mg/L ox-LDL group

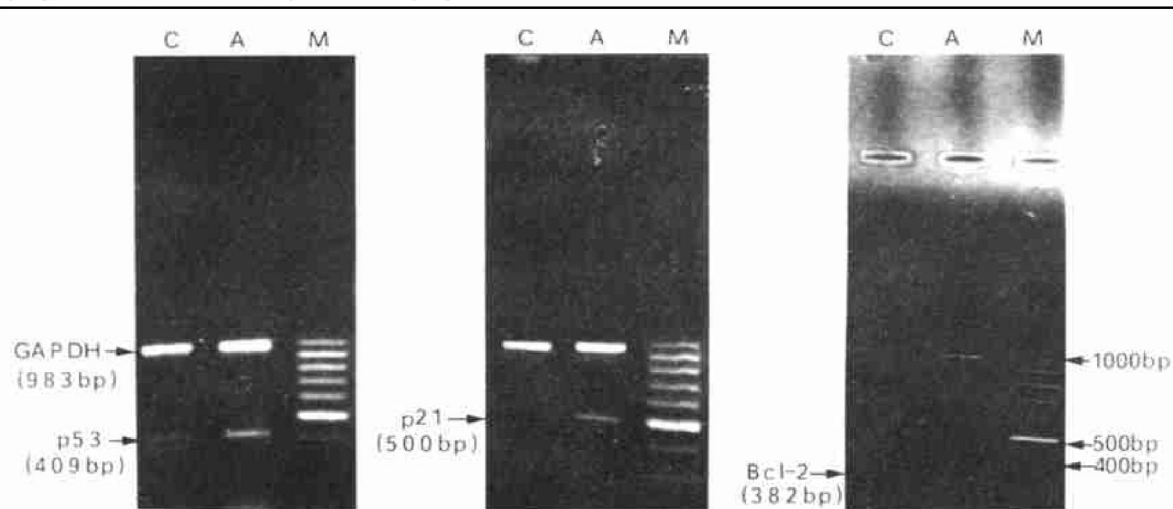


图4. 反转录聚合酶链反应扩增 p53、p21 和 Bcl-2 基因的琼脂糖凝胶电泳分析

Figure 4. Expression of p53, p21 and Bcl-2 mRNA on U937 cells Incubation with 200 mg/L ox-LDL. Results of RT-PCR showed that p53 and p21 mRNA level were upregulated, Bcl-2 mRNA level was downregulated after treatment with 200 mg/L ox-LDL for 48 h

诱导 U937 细胞凋亡, 且随 ox- LDL 浓度增高, 细胞凋亡增多。我们还发现 ox- LDL 在诱导 U937 凋亡过程中可上调原癌基因 *c-fos*、*c-jun* 和 *c-myc* 基因表达(待发表资料)。

p53 基因是一个重要的抑癌基因, 它是细胞基因的“看守卫士”, 监视基因的完整性, p53 蛋白是细胞周期阻滞和细胞凋亡的关键介质。物理和化学因素造成的 DNA 损伤和某些原癌基因的激活和氧化应激(oxidative stress) 均可促进 p53 基因和蛋白表达, p53 可通过 p21waf- 1 途径, 既调控 G1 关卡, 也参与 G2/M 关卡的调控, 影响细胞周期的进程。Bcl- 2 基因家族是凋亡研究中最受重视的癌基因, 其成员分为两类: 一类能促进细胞的凋亡, 有 *Bax*, *Bcl- xs*, *Bad*, *Bak*; 一类能抵抗细胞凋亡, 有 *Bcl- 2*, *Bcl- xl*, *Mcl- 1* 等。*Bax* 能和 *Bcl- 2* 形成异源二聚体分子, *Bax* 自身还能形成同源二聚体, 细胞内 *Bcl- 2/Bax* 和 *Bax/Bax* 二聚体的比例决定了细胞对凋亡信号的易感性^[10]。我们研究表明 ox- LDL 诱导 U937 凋亡过程中有突变型 p53 和 p21 的基因转录及蛋白表达增高, *Bcl- 2* 的转录表达下调。U937 源泡沫细胞的脂质蓄积代谢使细胞内氧自由基和脂质过氧化物增多, 引起细胞 DNA 损伤, 促进突变型 p53 表达增高, 启动 p21 基因表达。p21 表达升高导致 U937 停滞在 G1 期, U937 增殖受抑, 向单核/巨噬细胞分化增多, 增强其对 ox- LDL 的吞噬。细胞内脂质过氧化物和氧自由基增多促进突变型 p53 基因表达进而抑制抗凋亡基因 *Bcl- 2* 的表达, 或是 ox- LDL 通过胞内其它途径调节 *Bcl- 2* 的表达, 改变了 *Bcl- 2/Bax* 的比例, 增加细胞对凋亡信号敏感性, 最终诱导 U937 凋亡。泡沫细胞的凋亡和裂解降低了血管壁斑块中脂质的外运, 促进脂质核心的形成, 增加了斑块的不稳定性。U937 细胞 p53 为突变型, 一般认为 p53 突变后失去其抑癌功能, 且能促进细胞增殖, 但最近有文献报道突变型 p53 亦能诱发某些肿瘤细胞如肝癌细胞 Hep3B 凋亡, *c-myc* 的表达对 Hep3B 的凋亡有强的促进作用, 我们的实验结果与其一致, 突变型 p53 和 *c-myc* 在 ox- LDL 致 U937 源泡沫细胞凋亡中的作用机制需进一步深入研究^[12, 13]。

[致 谢] 中国中医研究院基础理论研究所庞大本和池旭

生两位老师为流式检测提供帮助。

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[J]. *Am J Pathol*, 1996, **149**: 367- 380
- [2] Hockenbrey DM, Oltvai ZN, Yin XiaoMing, et al. Bcl- 2 function in an antioxidant pathway to prevent apoptosis[J]. *Cell*, 1993, **75**: 241- 251
- [3] Palinski W, Rosenfeld ME, YlaHettuala S, et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 372- 376
- [4] Kinscherf R, Claus R, Wanger M, et al. Apoptosis caused by oxidized LDL is manganese superoxide dismutase and p53 dependent[J]. *FASEB J*, 1998, **12**: 461- 467
- [5] Mariko HS, Mikio K, Hiroshi K, et al. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms[J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 9681- 687
- [6] 李全忠, 杨永宗, 易光辉, 等. U937 泡沫细胞模型的建立[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7**(2): 152- 154
- [7] 姜泊, 张亚历, 周殿元(主编). 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996: 65
- [8] Yuan XM, Li W, Olsson AG, et al. The toxicity to macrophages of low- density lipoprotein is mediated through lysosomal damage[J]. *Atherosclerosis*, 1997, **133**(2): 153- 161
- [9] Li DY, Yang BC, Mehta JL. ox- LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl- 2, and Fas[J]. *Am J Physiol*, 1998, **275**(2Pt2): H568- 576
- [10] Frostegard J, Nilsson J, Haegerstrand A, et al. Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocyte cell line U937[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 904- 908
- [11] Rosse T, Olivier R, Monney L, et al. Bcl- 2 prolongs survival after Bax- induced release of cytochrome c[J]. *Nature*, 1998, **391**: 496- 499
- [12] Ehinger M, Bergh G, Olofsson T, et al. Expression of the p53 tumor suppressor gene induces differentiation and promotes induction of differentiation by 1, 25- Dihydroxycholecalciferol in leukemic U937 cells[J]. *Blood*, 1996, **87**(3): 1064- 074
- [13] Stahler F, Roemer K. Mutant p53 can provoke apoptosis in p53- deficient Hep3B cells with delayed kinetics relative to wild- type p53[J]. *Oncogene*, 1998, **17**(26): 3507- 512

(此文 1999- 07- 09 收到, 2000- 01- 20 修回)

(此文编辑 朱雯霞)