

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2001)-01-0040-04

β 淀粉样蛋白诱导 U937 细胞凋亡

刘江红¹, 杨向东², 杨永宗², 唐蔚青¹, 王抒¹, 黎健¹

(1. 北京医院卫生部北京老年医学研究所生物化学研究室, 北京 100730;

2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[主题词] β 淀粉样蛋白; 细胞凋亡; U937 细胞; 流式细胞术

[摘要] 为探讨 β 淀粉样蛋白对 U937 细胞的作用, 用 β 淀粉样蛋白处理培养的 U937 细胞, 以原位凋亡法、DNA 琼脂糖凝胶电泳以及流式细胞分析法检测细胞凋亡。结果发现, β 淀粉样蛋白可引起 U937 细胞凋亡, 表现在原位凋亡染色呈现阳性, DNA 图谱呈现典型的梯形, 而在流式细胞仪测得的直方图上显示出凋亡特征性的亚二倍体峰 (亚 G1 峰)。

[中图分类号] Q253

[文献标识码] A

β - Amyloid Protein Induces Apoptosis in U937 Cells

LIU Jiang- Hong, YANG Xiang- Dong¹, YANG Yong- Zong¹, TANG Wei- Qing, WANG Shu, and LI Jian

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

MeSH Amyloid beta Protein; Apoptosis; U937 Cells; Flow Cytometry

ABSTRACT **Aim** β - amyloid protein (β -AP) may play some important role in the pathogenesis of atherosclerosis. The purpose of this study is to investigate the effect of β -AP on U937 cells. **Methods** The β - amyloid protein was added to the media of U937 cells and the apoptosis of the cells was determined by terminal deoxynucleotidyl transferase- mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and agarose gel electrophoresis, the cell cycle of U937 cells was analyzed with flow cytometry. **Results** TUNEL and flow cytometry showed that β - amyloid protein was able to induced apoptosis of U937 cells. Electrophoresis of genomic DNA showed internucleosomal fragments of DNA. **Conclusions** β - amyloid protein could induce apoptosis in U937 cells.

在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生发展中, 单核巨噬细胞来源的泡沫细胞的死亡对 As 脂质中心的形成起重要作用, 但其死亡的机制尚不十分清楚^[1]。作者以前的研究说明 As 斑块中受损的内皮细胞和增殖的平滑肌细胞分泌的 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, β -AP) 增加, β -AP 可引起血管内皮细胞损伤^[2], 提示 β -AP 在动脉粥样硬化的发生发展中可能起重要作用。 β -AP 有多种来源, 包括脑内皮细胞、平滑肌细胞和循环血小板^[3]。 β -AP 是否可以诱导单核细胞凋亡, 至今未见报道。本文以 β -AP 处理单核细胞来源的 U937 细胞, 用原位凋亡检测, DNA 琼脂糖凝胶电泳及流式细胞术分析 β -AP 对 U

937 细胞凋亡的诱导作用。

1 材料与方法

1.1 U937 细胞的培养及处理

将人髓系白血病细胞 U937 细胞 (购自中国科学院上海细胞生物学研究所) 复苏后用含 10% 胎牛血清 (Hyclone) 的 RPMI1640 培养基 (GIBCO) (加入 100 ku/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素) 于 CO₂ 培养箱中培养。收集 6 份细胞, 每份计数约为 5×10^5 个细胞, 分别加到六孔板中, 每孔各加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的 1640 培养基, 其中两孔为正常对照, 不加其它试剂, 另两孔每孔再加入 β -API-40 0.1 mg (终浓度为 11.550 mmol/L), 最后的两孔每孔再加入 β -API-42 0.1 mg (终浓度为 11.076 mmol/L), 分别于 12 h 和 24 h 收集细胞。用免疫组织化学法检测 p21 和 Fas^[3] (阳性可初步的定性证明凋亡) 蛋白表达。以此结果作为以下实验的依据。

[作者简介] 刘江红, 女, 1974 年 6 月出生, 河北省唐山市人, 北京医科大学临床医学专业毕业, 现是卫生部北京老年医学研究所硕士研究生。王抒, 女, 北京市人, 北京医科大学毕业, 副研究员, 发表论文多篇, 曾获卫生部科技进步三等奖二项, 国家级科技进步三等奖一项。黎健, 男, 广西人, 硕士研究生导师, 发表论文多篇, 曾获卫生部科技进步三等奖各一项。

1.2 流式细胞检测——碘化丙啶染色法^[4]

收集 β -AP 处理的细胞于离心管中, 计数为 1×10^6 细胞, 800~1 000 r/min, 离心 5 min, 用 PBS 重悬细胞, 离心, 弃上清, 用 1 mL 70% 乙醇 4℃ 固定过夜后, 离心, 800 r/min, 8 min, 弃上清, PBS 洗, 再离心, 保留 0.2 mL 液体, 加 RNA 酶 10 μ L (终浓度为 50 g/L) 摇匀, 37℃ 45 min。加碘化丙啶 (promide iodine, PI) 50 μ L (终浓度为 50 g/L) 后, 加 PBS 至 0.5 mL, 摇匀。4℃ 避光保存 1 h。尼龙网滤过, 流式细胞仪 (美国 BD 公司, FACS420) 测试, 记录激发波长 488 nm 处红色荧光。

1.3 细胞 DNA 的提取及凝胶电泳^[4]

用 β -AP 处理细胞 24 h。收集约 10^7 细胞, 用 $200 \times g$ 离心 10 min, 弃上清。用 1 mL PBS 重悬细胞, 离心, 弃上清。加裂解液 400 μ L, 重悬细胞, 37℃ 保温 12~24 h。加 450 μ L 平衡酚, 混匀, 用 $5 000 \times g$ 离心 10 min。转移上层水相, 重复抽提一次; 转移上层水相, 加入 450 μ L 氯仿: 异戊醇 (24: 1), 混匀, 用 $5 000 \times g$ 离心 10 min。转移上层水相, 加入 0.1 体积 3 mol 乙酸钠和 2.5 倍体积无水乙醇, 混匀。置液氮冷冻 10 min 或 -20℃ 60 min, 用 $10 000 \times g$ 离心 10 min。70% 乙醇洗涤 2 次, 吹干或真空抽干。沉淀溶入 100 μ L 含 RNase 的 TE 缓冲液中, 置 -20℃ 保存。DNA 样品用 Beckman DU-640 分光光度计定量。1% 琼脂糖凝胶电泳后, 在 Image Master VDS (Pharmacia Biotech) 仪下观察 DNA 图谱并拍照。

1.4 原位凋亡^[5]

用 in situ cell death detection Kit。细胞的处理同

1.1, 但每组只要一孔, 24 h 收集细胞。用 4% 多聚甲醛于室温固定 30 min, PBS 洗, 加 0.1% TritonX-100 及 0.1% 柠檬酸钠, 置 4℃ 2 min。PBS 洗涤, 加 50 μ L TUNEL 反应混和液, 37℃ 反应 60 min。加 50 μ L 带有碱性磷酸酶的抗荧光抗体, 37℃ 反应 30 min。加 100 μ L 底物, 室温孵育 10 min。PBS 洗, 镜下观察。

2 结果

2.1 p21 和 Fas 的免疫组织化学结果

分别用 β -API-40、 β -API-42 处理 12 h, 以 p21 和 Fas 为一抗, 经 DAB 染色, 棕色颗粒很少; 以 24 h 的 β -API-42 组 p21 为一抗, 有较多的粗大棕色颗粒于细胞核中; 以 Fas 为一抗, 也有较多的粗大棕色颗粒于胞膜和胞浆中。而以 β -API-40 组 p21 为一抗时, 有中等量的粗大棕色颗粒于细胞核中, 以 Fas 为一抗, 有中等量的粗大棕色颗粒于胞膜和胞浆中。

2.2 流式细胞检测结果

用 β -AP 处理的 U937 细胞经流式细胞术检测发现, 经 β -API-42 处理的 U937 细胞 G1 峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰型 (图 1, Figure 1)。这种特征与细胞凋亡时的特征相符, 说明 β -API-42 可使 U937 细胞凋亡。经 β -API-40 处理的 U937 细胞, 虽没出现明显的亚二倍体细胞群的峰型, 但其测量参数介于对照组和 β -API-42 组之间。经 β -API-42 处理的 U937 细胞凋亡率为 34.4%, 经 β -API-40 处理的 U937 细胞凋亡率为 3.0%, 对照组凋亡率为 0.9%。

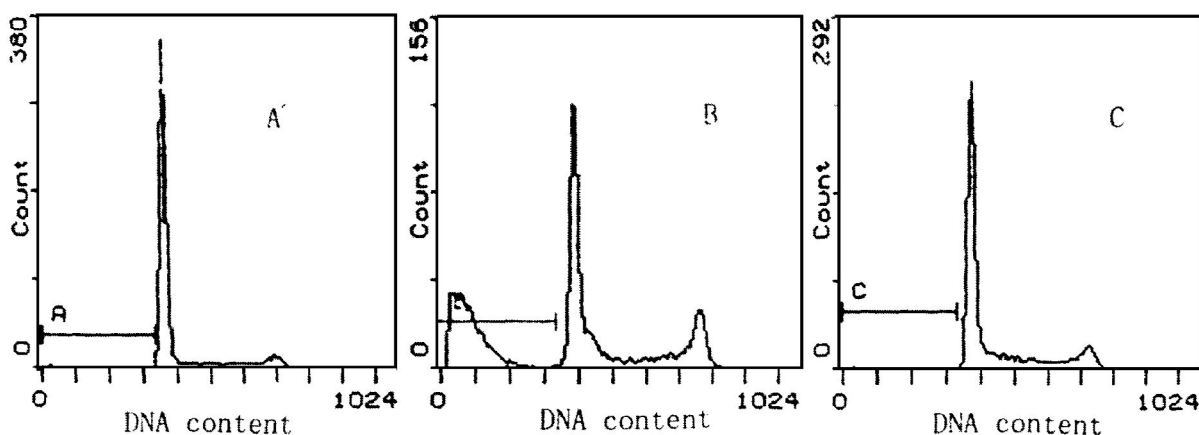


图 1 流式细胞术测定细胞周期

Figure 1 Flow cytometric determination of cell circle progression. A: cultured U937 cells, B: U937 cells treated with β -API-42, C: U937 cells treated with β -API-40

2.3 DNA 凝胶电泳结果

用 β -API-40 和 β -API-42 处理的 U937 细胞其 DNA 图谱呈现梯状, 但经 β -API-42 处理的 U937 细胞的梯状图谱更明显, 其第一条带约为 180~200 bp, 依次倍增; 而对照组的 DNA 未发生明显断裂, 仅在近电泳点样处出现基因组条带(图 2, Figure 2),

说明 β -AP 可以诱导 U937 细胞凋亡。且 β -API-42 的致凋亡作用要强于 β -API-40。

2.4 原位凋亡检测结果

对照组细胞核呈现均一的粉红色, 而实验组细胞的核中有棕黑色的粗大颗粒(图 3, Figure 3)。

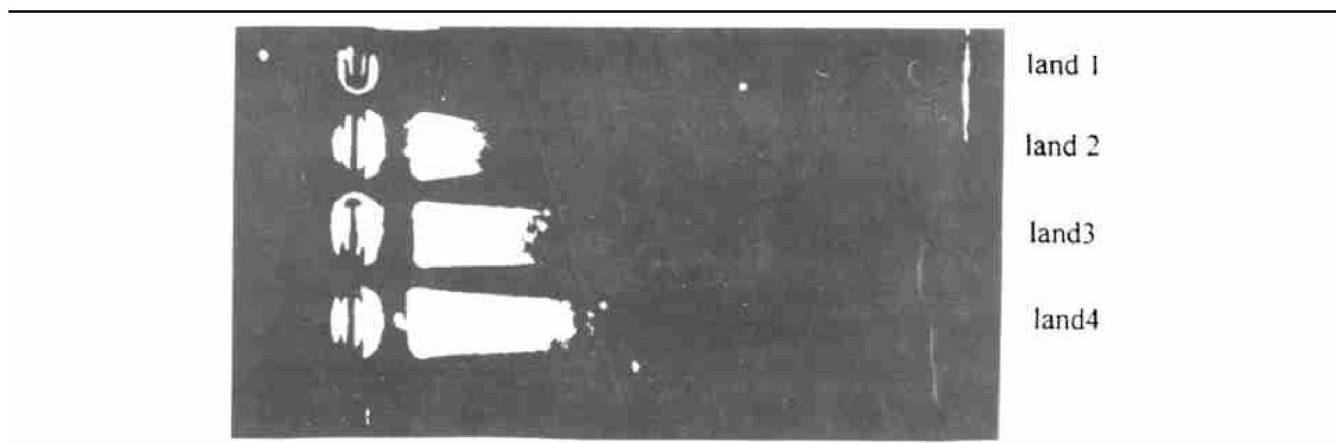


图 2 总细胞 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of extracted total cellular DNA. Land 1: 100 bp marker; land 2: control DNA; land 3: DNA of U937 treated with β -API-40; land 4: DNA of U937 treated with β -API-42.

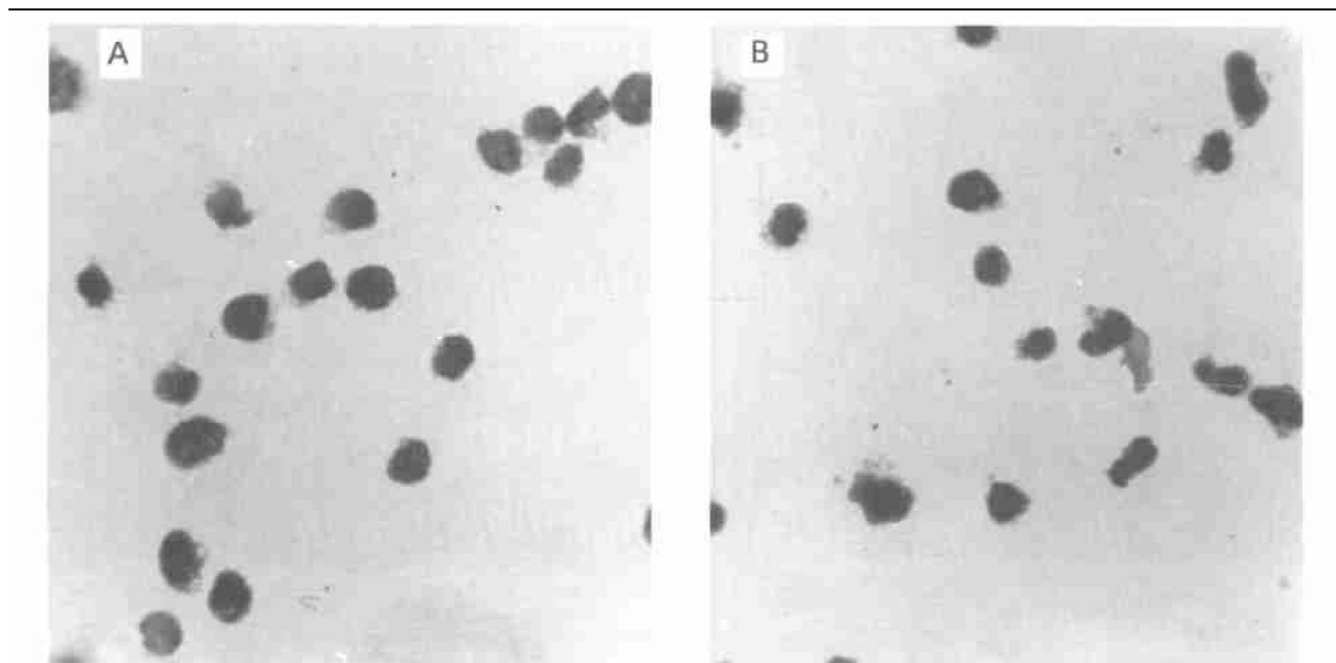


图 3 末端脱氧核糖转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 U937 细胞的凋亡

Figure 3 Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling apoptotic nucleus of U937. A: control group, B: test group treated with β -AP.

3 讨论

β 淀粉样蛋白(β -AP) 是 β 淀粉样蛋白前体 APP

的一个 40~43 个氨基酸片段, β -AP 有形成纤维的明显倾向^[6]。以往的研究表明, β -AP 有神经毒性并且可提高神经对外毒素的易感性以及易被氧化剂损

伤,近年来,对于 β -AP 的研究不仅仅局限于神经系统,在动脉粥样硬化病人的尸检标本中可见有大量泡沫细胞的死亡。泡沫细胞来源于单核巨噬细胞,它的死亡对 As 脂质中心的形成起重要作用,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斑块的稳定^[7],为检测 β -AP 是否对单核细胞也同样有毒性作用,我们加入外源性 β -AP 来处理培养的 U937 细胞(U937 细胞为单核细胞系),发现 β -AP 可导致 U937 细胞的凋亡,说明 β -AP 对于单核细胞也有细胞毒作用。 β -AP 可能通过诱导单核细胞凋亡而促进 As 的发生发展。动脉粥样硬化斑块的形成一般经历脂纹期、脂斑期(脆性斑块期)、纤维斑块期和粥样斑块期。单核/巨噬细胞在脆性或不稳定性脂质丰富斑块的破裂中起重要作用,单核/巨噬细胞可摄取和代谢脂质,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)^[8]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。以往的研究表明,动脉粥样硬化斑块中受损的 EC 以及增殖的 SMC 分泌出高于正常的 β -AP,这使得斑块中及斑块周围的单核细胞处于一个大的 β -AP 池中(β -AP pool)^[9]。这些 β -AP 作为外源性致损伤因素作用于单核细胞,诱导其凋亡。即斑块中单核细胞来源的泡沫细胞的死亡是与凋亡相关的。某些致动脉粥样硬化因素(如 ox-LDL)可促进动脉粥样硬化的发生,而动脉粥样硬化可导致 EC 损伤和 SMC 增殖,这促进了 β -AP 池的生成。即致 As 因素促进 β -AP 池的产生,而 β -AP 池的细胞毒作用又促进单核细胞凋亡,更加速了 As 的发生发展。另外,老年痴呆患者的老年斑和脑动脉斑块也是由于 β -AP 的异常沉积所造成的^[10]。那么,As 患者外周血 β -AP 含量是否

增加以及 β -AP 池中的 β -AP 是否能够通过血脑屏障进入中枢成为异常沉积的 β -AP 的来源,从而加重老年痴呆患者的病理表现和临床症状,也成为临床和基础科研要解决的一个问题。

参考文献

- [1] Ball RY, Stowers EC, Burton JH, et al. Evidence that the death of macrophage foam cell contributes to the lipid core of atheroma [J]. *Atherosclerosis*, 1995, **114**: 45- 54
- [2] Jahroudi N, Kitney J, Greenberger JS, et al. Endothelial cell dysfunction in response to intracellular overexpression of amyloid precursor protein [J]. *J Neurosci Res*, 1998, **54** (6): 828- 839
- [3] Selkoe DJ. Alzheimer's disease: a central role for amyloid [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1994, **53**: 438- 447
- [4] 唐蔚青,王抒,黎健. 野生型 P53 基因诱导血管平滑肌细胞 P21 基因表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (4): 283- 286
- [5] Arends MJ. Apoptosis: the role of the endonuclease [J]. *Am J Pathol*, 1990, **136**: 593- 608
- [6] Kosik KS. Alzheimer's disease: a cell biological perspective [J]. *Science*, 1992, **256**: 780- 783
- [7] 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
- [8] Welgus HG, et al. Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development [J]. *J Clin Invest*, 1990, **86**: 1 496
- [9] Duff K. Alzheimer transgenic mouse models come of age [J]. *TINS*, 1997, **20**: 279
- [10] Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ, et al. Matrix metalloproteinase - 9 (MMP- 9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid- beta peptide (1- 40) [J]. *J Neurosci*, 1996, **16** (24): 7 910

(此文 2000- 05- 22 收到, 2000- 11- 16 修回)

(此文编辑 胡必利)