

[文章编号] 1007-3949(2003)11-04-0287-04

• 实验研究 •

氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞凋亡时 泛素缀合酶和 p53 的表达

杨向东, 刘俊文, 唐蔚青¹, 李红霞¹, 王仁

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001; 1. 北京医院卫生部老年医学研究所, 北京市 100730)

[关键词] 病理生理学; 氧化型低密度脂蛋白致 U937 细胞凋亡的机制; 逆转录聚合酶链反应; 单核细胞; 泛素缀合酶; p53; 载脂蛋白 B

[摘要] 为研究氧化型低密度脂蛋白致 U937 细胞凋亡时泛素-蛋白酶体通路中泛素缀合酶、p53 与泡沫细胞凋亡之间的关系, 用氧化型低密度脂蛋白处理人单核细胞 U937 细胞, 诱导其凋亡, 采用 DNA 琼脂糖凝胶电泳和流式细胞术检测细胞凋亡, 逆转录聚合酶链反应检测泛素缀合酶和 p53 的基因表达; 流式细胞术分析泛素缀合酶、载脂蛋白 B 和 P53 的蛋白表达。结果发现, 氧化型低密度脂蛋白可以诱导 U937 细胞凋亡, 在 U937 细胞凋亡过程中泛素缀合酶表达降低, p53 表达增高, 而且细胞内载脂蛋白 B 也增加。结果提示, 泛素缀合酶的表达降低可能使 P53 和载脂蛋白 B 经泛素-蛋白酶体通路的降解减慢, 从而引起 P53 和载脂蛋白 B 在细胞内积聚, 导致 U937 细胞凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of Ubiquitin-Conjugating Enzyme and p53 in the Apoptosis of U937 Cells Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

YANG Xiang-Dong, LIU Jun-Wen, TANG Wei-Qing¹, LI Hong-Xia¹, and WANG Ren

(Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001; 1. Department of Biochemistry, Beijing Institute of Geriatrics, Beijing 100730, China)

[KEY WORDS] Monocyte Cell; Ubiquitin-Conjugating Enzyme; p53; Apolipoprotein B; Oxidized Low Density Lipoprotein; U937 Cell

[ABSTRACT] **Aim** To investigate expression of ubiquitin conjugating enzyme (Ubc E2) and p53 in the apoptosis of human monocyte cell line U937 induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** U937 cells were incubated with ox-LDL. The apoptotic cells were determined by DNA fragment analysis and flow cytometric analysis. The level of p53 and ubiquitin conjugating enzyme mRNA were quantified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein contents of ubiquitin conjugating enzyme, P53 and apolipoprotein B (apo B) were analyzed by immunofluorescence staining and flow cytometric method. **Results** The results showed that the increase of the degree of U937 cell apoptosis was concentration dependent. Ox-LDL could down regulate the gene/protein expression of ubiquitin conjugating enzyme and up regulate the gene/protein expression of P53, meanwhile, the apo B accumulated in U937 cells. **Conclusion** The results implicated that ox-LDL induced U937 cell apoptosis by accumulation of P53 and apo B through down regulating ubiquitin conjugating enzyme. Cellular defense system, either dependent or independent on the ubiquitin system, was weakened by the ox-LDL induced toxicity.

泛素在真核生物中普遍存在, 是一种高度保守的含 76 个氨基酸残基的蛋白, 属于热休克蛋白基因家族。泛素-蛋白酶体通路 (ubiquitin proteasome pathway, UPP) 不仅能降解变性的、异常的或短命的蛋白质, 而且能降解转录因子、内膜蛋白和细胞周期蛋白等天然蛋白。UPP 在真核细胞的转录、蛋白质降解、蛋白质稳定、受体胞吞、细胞凋亡和应激

反应等过程中, 均参与重要的调控作用^[1-3]。UPP 在细胞防御氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 的细胞毒性方面亦有重要作用^[4]。p53 是一个重要的抑癌基因, P53 是细胞周期阻滞和细胞凋亡的关键介质, p53 可通过 p21^{waf1} 途径影响细胞周期的进程。研究发现, P53 和载脂蛋白 B (apolipoprotein B, apo B) 也是 UPP 的酶解底物, 肝细胞系 hep G2 细胞对载脂蛋白 B 的降解是通过 UPP, 对未与脂质结合的载脂蛋白 B 的降解可以防止载脂蛋白 B 的异常积聚所导致的毒性作用^[5,6]。UPP、载脂蛋白 B 与泡沫细胞形成和凋亡的关系研究尚少, 我们在前期工作中发现, ox-LDL 可以诱导 U937 细胞泡沫化和凋亡, 泛素缀合酶 E2A (ubiquitin

[收稿日期] 2002-11-22 [修回日期] 2003-04-15

[基金项目] 国家自然科学基金 (3002103) 和湖南省自然科学基金 (00JJY2027, 02JJY4011) 资助

[作者简介] 杨向东, 男, 1970 年出生, 湖南省衡阳市人, 病理生理学副教授, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事心血管病相关基因的克隆及功能研究和细胞凋亡机制研究, E-mail 地址: XDY7@263.net。唐蔚青, 女, 1969 年出生, 助理研究员, 主要从事血脂与动脉粥样硬化关系的分子生物学研究。刘俊文, 女, 1980 年出生, 硕士研究生。

conjugating enzyme ZA, E2A) 在泡沫细胞中表达降低^[7,8]。本实验旨在观察 Ubc E2、载脂蛋白 B 和 P53 在 U937 细胞泡沫化及凋亡过程中的表达, 研究泡沫细胞中 Ubc E2 的表达降低是否会导致细胞内载脂蛋白 B 和 P53 的积聚, 并初步探讨其与 U937 细胞凋亡的关系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人髓系白血病细胞 U937 购自中科院上海细胞生物研究所。Trizol 试剂和胎牛血清购自 Gibco, 逆转录试剂盒和 DNA 聚合酶购自 Promega, Ubc E2、p53 和看家基因 GAPDH 引物由赛百盛公司合成, 一抗鼠抗人 Ubc E2 单抗、鼠抗人 P53 单抗和 FITC 标记的马抗鼠 IgG 或兔抗羊 IgG 系美国 Santa Cruz 公司产品, 羊抗人载脂蛋白 B 多抗由卫生部老年医学研究所生化室制备。其余试剂均为分析纯。

1.2 U937 细胞培养

U937 细胞($5 \times 10^8/L$)用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37℃、5% CO₂ 培养, 每 24 h~ 48 h 传代一次。

1.3 低密度脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

人血浆低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL; d= 1.03~ 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 溶液(pH 7.2)中, 37℃温育 24 h。氧化修饰后的 LDL 置含 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

对照组不加 ox-LDL, 处理组加 ox-LDL, 终浓度为 100 mg/L 和 200 mg/L。培养 48 h 后细胞采用酚-氯仿法抽提 DNA, 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5 流式细胞术分析细胞周期

U937 细胞处理同 1.4, 每个样本收集 1×10^6 细胞, PBS 洗 2 次, 用冷的 70% 乙醇 4℃过夜固定细胞, 离心弃乙醇, PBS 重悬, 加 RNase A, 终浓度为 50 mg/L, 37℃水浴 45 min, 加碘化丙啶 50 μL, 混匀, 4℃避光放置 60 min, 尼龙网滤过, 流式细胞仪上样检测。

1.6 细胞总 RNA 的提取和逆转录聚合酶链反应检测泛素缀合酶及 p53 mRNA 的表达

对照组不加 ox-LDL, 处理组根据细胞凋亡分析结果采用 ox-LDL 终浓度为 200 mg/L, 孵育 48 h。Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA, 溶于无 RNase 的水

中, 紫外分光光度计测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值在 1.8~ 2.0 之间。Ubc E2 引物: sense: 5' ATG ATC TGG CAC GGG ACC CT-3', antisense: 5'-AGG ATC ATC TGG ATT GGG AT-3', 303 bp; p53 引物: sense: 5'-CTA ACC GCG GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAG-3', antisense: 5'-TAC AGT CAG AGC CAA CCT CAG GCG-3', 409 bp; GAPDH 引物: sense: 5'-TGA AG GTC GGA GTC AAC GGA TTT T-3', antisense: 5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC ACC AG-3', 983 bp; 首次循环 94℃变性 5 min, 分别为 94℃变性 30 s, 52℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 共 32 个循环, 最后一次循环在 72℃延伸 7 min, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.7 流式细胞术分析泛素缀合酶、载脂蛋白 B、P53 的蛋白表达

细胞分组同 1.6。每个样本收集细胞 5×10^6 个, PBS 洗涤 1 次, 加 4% 多聚甲醛 1 mL 固定 1 h, PBS 洗涤 1 次, 分别加一抗鼠抗人 Ubc E2 单抗、鼠抗人 P53 单抗或羊抗人载脂蛋白 B 多抗 (1: 100 稀释), 冰浴 40 min, PBS 洗涤 2 次, 二抗为 FITC 标记的马抗鼠 IgG 或兔抗羊 IgG (1: 100 稀释), 冰浴 40 min, PBS 离心洗涤 2 次, 0.5 mL PBS 重悬细胞, 尼龙膜过滤, 每个样本流式细胞术分析检测 10000 个细胞。

2 结 果

2.1 DNA 断裂琼脂糖电泳分析

100 mg/L ox-LDL 作用 U937 细胞 48 h 后, DNA 电泳出现细胞凋亡特有的间隔 180 bp~ 200 bp 梯状条带(DNA ladder), 但条带较弱; 当 ox-LDL 浓度为 200 mg/L 时电泳条带明显加强(图 1, Figure 1)。

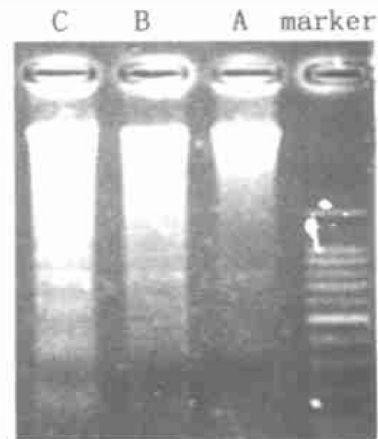


图 1. 琼脂糖凝胶电泳检测氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞凋亡 Marker: 标准物; A: 对照组; B: 100 mg/L 氧化型低密度脂蛋白; C: 200 mg/L 氧化型低密度脂蛋白。

Figure 1. The apoptosis of U937 induced by ox-LDL were analyzed by agarose gel electrophoresis

2.2 流式细胞术分析细胞周期

对照组 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%, G₁ 期细胞增多, G₁ 期前出现小的凋亡峰; ox-LDL 浓度为 200 mg/L 时细胞凋亡率增为 22.2%, 凋亡峰更加明显(图 2, Figure 2)。

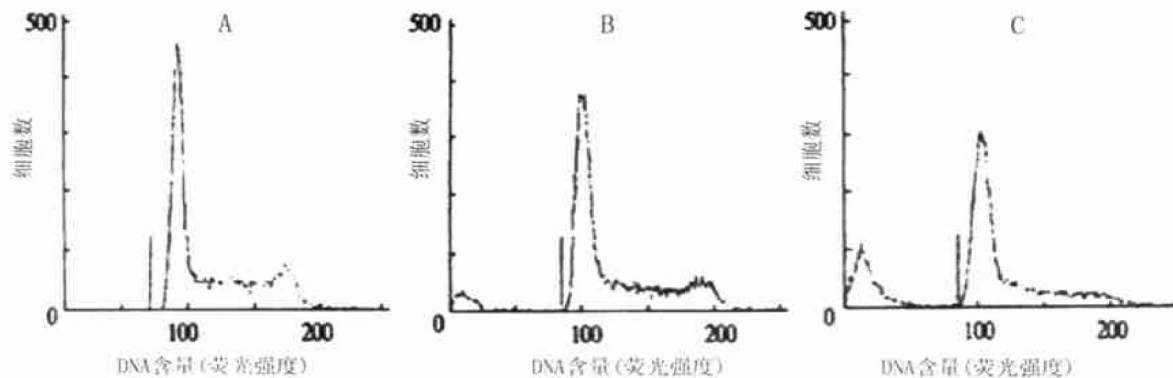


图 2. 流式细胞术检测氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞凋亡 A: 对照组; B: 100 mg/L 氧化型低密度脂蛋白; C: 200 mg/L 氧化型低密度脂蛋白。

Figure 2. Flow cytometric analysis for apoptosis on U937 cells induced by ox-LDL

2.3 逆转录聚合酶链反应半定量检测泛素缀合酶和 p53 mRNA 的表达

逆转录聚合酶链反应结果发现, Ubc E2 mRNA

表达水平降低, 而 p53 mRNA 表达水平增高(图 3 和 4, Figure 3 and 4)。

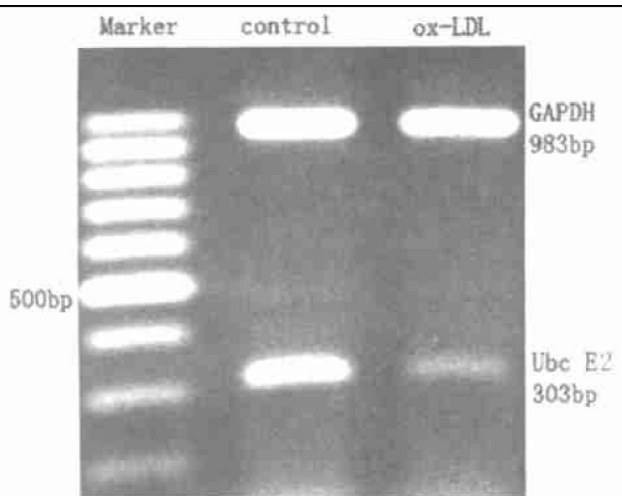


图 3. 逆转录聚合酶链反应检测泛素缀合酶 mRNA 表达水平
Figure 3. Expression of Ubc E2 mRNA on U937 cells incubation with 200 mg/L ox-LDL

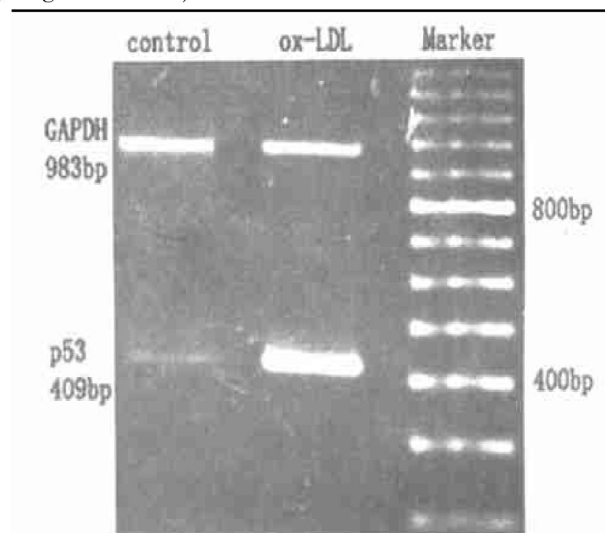


图 4. 逆转录聚合酶链反应检测 p53 mRNA 表达水平
Figure 4. Expression of p53 mRNA on U937 cells incubation with 200 mg/L ox-LDL

2.4 流式细胞术分析泛素缀合酶、P53 和载脂蛋白 B 的蛋白表达

流式分析 U937 细胞经 ox-LDL 处理后, Ubc E2 表达降低, 主峰左移, 而 P53 和载脂蛋白 B 的表达增高, 主峰右移(图 5, Figure 5)。流式分析蛋白表达结果与逆转录聚合酶链反应半定量检测 Ubc E2 和 P53 mRNA 的表达结果一致。

泛素-蛋白水解酶体通路(UPP)由泛素(ubiquitin)、泛素活化酶(ubiquitin activating enzyme, Uba E1)、泛素缀合酶(ubiquitin conjugating enzyme, Ubc E2)、泛素-蛋白连接酶(ubiquitin protein ligase, Ubl E3)和蛋白酶体(proteasome)组成。UPP 是生物体内进行蛋白质选择性降解的重要途径之一, 是依赖于 ATP 的非溶酶体途径的蛋白降解通路。UPP 可以高效并高度选择性进行细胞内蛋白转换, UPP 降解蛋白质的主要步骤为: ①识别被降解的靶蛋白; ②多个泛素分子共价结合到蛋白质底物上, 形成多泛素链;

3 讨论

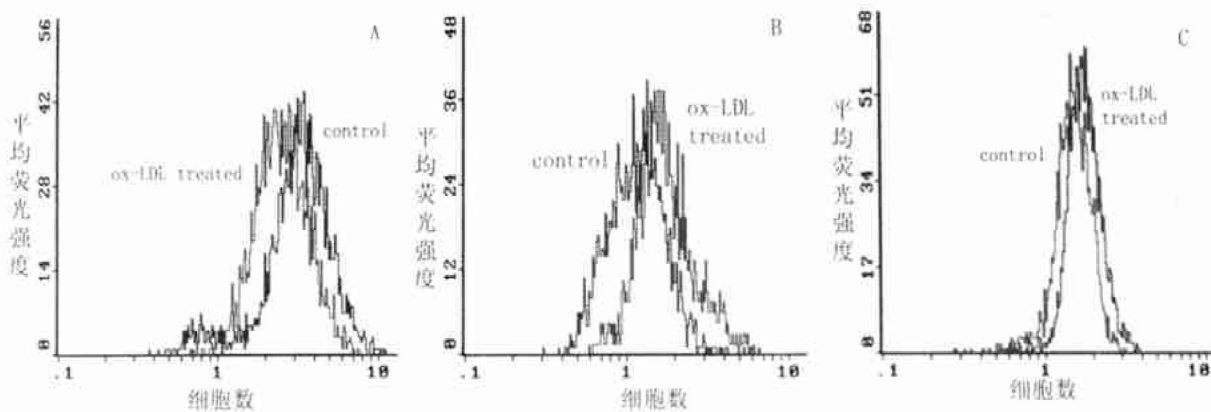


图 5. 流式细胞术分析泛素缀合酶、P53 和载脂蛋白 B 的蛋白表达 A: 泛素缀合酶; B: P53; C: 载脂蛋白 B。

Figure 5. Expression of Ubq E2, P53 and apo B protein were determined by cytoplasmic immunofluorescence staining and flow cytometric analysis after treatment with 200 mg/L ox-LDL ($n = 3, P < 0.05$)

通过 26 s 的蛋白酶体降解靶蛋白,同时释放游离的、可重新利用的泛素分子。UPP 在细胞凋亡调控中具有重要作用。研究发现, P53 由癌蛋白 E6-AP (一种 E3) 介导经泛素—水解酶 Ubc H8 (一种 E2) 进行降解,应用蛋白酶体抑制剂 Leptomycin B 可以完全抑制依赖于 MDM2 和 E6-AP 的 P53 降解过程^[9]。P53 的泛素化发生在核内,可能是被运送出核后降解的,有假说认为连接酶就像“分子伴侣(chaperon)”一样伴随 P53 转运出核。研究发现, ox-LDL 可以诱导 U937 细胞凋亡,在 U937 细胞泡沫化或凋亡过程中有 P53 的表达增高,而 Ubc E2 的表达是降低的。泡沫细胞(脂质负荷的巨噬细胞)中 P53 的表达增高可能与 p53 转录增强、P53 表达增高和 P53 经 UPP 途径降解减少导致细胞内积聚有关。研究发现,肝细胞系 hep G2 细胞对载脂蛋白 B 的降解是通过泛素—蛋白酶体通路,采用二硝基酚和 2-脱氧-葡萄糖抑制 ATP 的产生,可以显著减少载脂蛋白 B 的降解^[10]。U937 细胞通过脂蛋白吞噬相关受体吞噬 ox-LDL,使得 U937 细胞内载脂蛋白 B 的蓄积增多,而且细胞因氧化应激、氧自由基损伤可致 ATP 生成减少,依赖于 ATP 的 UPP 活性降低可能导致载脂蛋白 B 以及其它修饰的异常蛋白降解减少。

对 UPP 在动脉粥样硬化疾病发生和发展中的作用研究,提示 UPP 是细胞防御 ox-LDL 引起的细胞毒性作用的重要手段,调控 UPP 的表达可能是调控泡沫细胞凋亡的重要手段。UPP 对 ox-LDL 的防御作用与 ox-LDL 的浓度有关,低浓度的 ox-LDL (无毒

性)时,UPP 可以通过蛋白酶体降解结构和功能改变的蛋白起到防御作用;而在高浓度的 ox-LDL (有毒性)时,UPP 的活性只能短时间发挥作用,随后蛋白酶体的活性被抑制(26 s 蛋白酶体在 5 h, 20 s 蛋白酶体在 14 h),导致细胞内异常蛋白聚积,最终引起细胞凋亡^[4]。现在对 UPP 在心血管系统中的作用研究非常重视,它可能成为防治血管再狭窄和动脉粥样硬化性疾病的重要靶标^[3]。

[参考文献]

- [1] Strous GJ, Govers R. The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Science*, 1999, **112**: 1 417-423
- [2] Marx J. Cell biology. Ubiquitin lives up to its name. *Science*, 2002, **297** (5588): 1 792-794
- [3] Meiners S, Laule M, Rother W, Guenther C, Prauka I, Muschick P. Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis. *Circulation*, 2002, **105** (4): 408-410
- [4] Vieira O, Escargueil-Blanc I, Jurgens G, Borner C, Almeida L, Salvayre R. Oxidized LDL alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *FASEB J*, 2000, **14** (3): 532-542
- [5] Gusarova V, Caplan AJ, Brodsky JL. Apoprotein B degradation is promoted by the molecular chaperones hsp 90 and hsp 70. *J Biol Chem*, 2001, **276** (27): 24 891-900
- [6] Sakata N, Dixon JL. Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of apolipoprotein B100 in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1 437** (1): 71-79
- [7] 杨向东, 杨永宗, 黎健. 氧化修饰 LDL 诱导 U937 细胞凋亡及其机制探讨. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (2): 197-200
- [8] 杨向东, 王抒, 唐蔚青, 易光辉, 何淑雅, 唐朝枢. 人单核细胞泡沫化敏感候选基因的筛选. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (3): 195-198
- [9] Traidej M, Chen L, Yu D, Agrawal S, Chen J. The roles of E6-AP and MDM2 in p53 regulation in human papillomavirus-positive cervical cancer cells. *Anti-sense Nucleic Acid Drug Dev*, 2000, **10** (1): 17-27
- [10] Yeung SJ, Chen SH, Chan L. Ubiquitin-proteasome pathway mediates intracellular degradation of apolipoprotein B. *Biochemistry*, 1996, **35** (43): 13 843-848

(此文编辑 文玉珊)