

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0162-03

单核—巨噬细胞和 ECV304 内皮细胞表达死亡相关蛋白

苏波¹, 万艳平², 廖端芳¹

(南华大学 1. 药物药理研究所, 2. 病原微生物研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 死亡相关蛋白; 单核—巨噬细胞; ECV304 内皮细胞; 氧化应激

[摘要] 为研究单核—巨噬细胞和 ECV304 细胞是否表达死亡相关蛋白以及影响死亡相关蛋白表达的因素。分别用氧化型低密度脂蛋白(100 mg/L) 孵育 THP-1 细胞, H₂O₂(1 mmol/L) 孵育 ECV304 细胞, 用逆转录聚合酶链反应检测死亡相关蛋白 mRNA 的表达。结果发现, THP-1 细胞及 ECV304 细胞均表达死亡相关蛋白, 氧化型低密度脂蛋白和 H₂O₂ 能分别诱导 THP-1 细胞和 ECV304 细胞死亡相关蛋白 mRNA 表达增高。实验结果提示死亡相关蛋白可能参与调节氧化应激诱导的单核—巨噬细胞和内皮细胞的凋亡。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Expression of Death-Associated Protein in Monocyte-derived Macrophages and ECV304 Endothelial Cells

SU Bo¹, WAN Yarr Ping², and LIAO Duarr Fang¹

(1. Department of Pharmacology, 2. Institute of Pathogenic Biology, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Death-Associated Protein; Monocyte-derived Macrophage; ECV304 Cells; Oxidative Stress

[ABSTRACT] **Aim** To explore whether monocyte-derived macrophages and ECV304 endothelial cells express death-associated protein (Daxx) and expression induced by oxidative stress. **Methods** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed to detect Daxx mRNA expression in THP-1 monocyte-derived macrophages and ECV304 cells induced by ox-LDL and H₂O₂ respectively. **Results** THP-1 monocyte-derived macrophages and ECV304 cells expressed Daxx, Daxx mRNA expression increased after THP-1 monocyte-derived macrophages and ECV304 cells were incubated with ox-LDL (100 mg/L) and H₂O₂ (1 mmol/L) respectively. **Conclusion** Daxx may be involved in apoptosis induced by Oxidative stress in THP-1 monocyte-derived macrophages and ECV304 cells.

死亡相关蛋白 (death-associated protein, Daxx) 是定位于细胞核亚核结构早幼粒细胞白血病蛋白 (promyelocytic leukemia protein, PML) 癌基因结构域 (PML oncogenic domains, POD) 的核蛋白^[1]。最初发现它是一种 Fas 受体胞浆死亡结构域结合蛋白, 经 Fas-Daxx-ASK1-JNK1 信号通路介导细胞凋亡^[2]。Daxx 可在多种应激情况下介导 Fas 诱导的细胞凋亡^[3,4]。此外, 它具有多个功能结构域, 能与核内多种蛋白质相互作用, 具有调控转录的作用^[5]。与 Daxx 促凋亡的报道相反, Michaelson 等^[6]发现缺乏 Daxx 基因鼠胚胎发育受损, 大量胚胎干细胞系出现凋亡, 用 RNAi 干扰内源性 Daxx mRNA 的表达, 结果发现 Daxx 耗竭的细胞凋亡增加。Daxx 广泛分布于哺乳动物组织细胞及肿瘤细胞, 如肝、肾、心、睾丸以及 293 细胞、淋巴细胞、HeLa 细胞^[7]。目前, Daxx 是否在单核和内皮细胞中表达尚未见文献报道。本文

研究 Daxx 在人单核细胞/巨噬细胞和内皮细胞中是否表达, 并探讨氧化应激对 Daxx 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞株 ECV304 和人单核细胞系 THP-1 细胞购自武汉大学细胞馆藏中心。Trizol Reagent 购自 GIBCO, 逆转录系统和聚合酶链系统购自 Promega。DMEM 和 RPMI1640 培养基购自 GIBCO。小牛血清购自杭州四季清公司。Daxx 和 β -actin 引物由上海捷倍思公司合成。其余试剂均为分析纯。

1.2 低密度脂蛋白的分离和氧化修饰

血浆低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL; $d = 1.03 \sim 1.05$) 采用超速离心法获得。将 LDL 置于含 10 μ mol/L CuSO₄ 的 PBS (pH 7.2) 中, 37℃ 温育 24 h, 使其氧化修饰成为氧化型 LDL (oxidized LDL, ox-LDL)。然后置于含 200 μ mol/L EDTA 的 PBS 中透析 24 h, 经琼脂糖凝胶电泳, 显示为单一条带, 说明 LDL 已氧化修饰成为 ox-LDL, 超滤除菌后保存。

[收稿日期] 2004-02-23

[修回日期] 2004-03-20

[作者简介] 苏波, 讲师, 硕士研究生。万艳平, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, 本文通讯作者, E-mail 为 yanpingwan@hotmail.com。廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, 本文通讯作者, E-mail 为 DFLiao@Hotmail.com。

1.3 细胞培养及分组

内皮细胞株 ECV304 和单核细胞株 THP-1 分别用含 100 U/L 青霉素、100 U/L 链霉素、10% 小牛血清的 DMEM 培养基、RPMI1640 培养基于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。用 100 nmol/L 佛波脂孵育 THP-1 细胞 24 h, 诱导其分化成为巨噬细胞。对照组不加处理因素, 实验组 H₂O₂ 浓度为 1 mmol/L, ox-LDL 浓度为 100 mg/L, 分别孵育 ECV304 细胞和 THP-1 细胞 6 h、12 h、18 h 和 24 h。

1.4 半定量逆转录-聚合酶链反应检测死亡相关蛋白 mRNA 的表达

提取各时间点细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA, 以 β -actin 为内对照, 进行半定量逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), Daxx 正义链为 5'-GCA GCA AAC AAA GGA CGC-3', 反义链为 5'-GGT GGG CTG GGC AGG GTA C-3', 长度 450 bp; β -actin 正义链为 5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC-3', 反义链为 5'-TCG GGG CAT CGG AAC CGC TCA-3', 长度 420 bp。PCR 步骤如下: 首先 94℃ 变性 5 min, 然后 94℃ 变性 1 min $\rightarrow$ 58℃ 退火 1 min $\rightarrow$ 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后一次循环再 72℃ 延伸 10 min; PCR 产物用 0.5 mg/L 溴化乙锭的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳。用 Labwork 凝胶图像分析系统对电泳图谱进行灰度扫描, 以对照组的面积灰度为 1, 处理组的灰度值以处理组实测灰度值与对照组灰度值之比。

1.5 统计学方法

两组间比较采用单因素方差分析及 *t* 检验, 由 SPSS 软件完成。

2 结果

2.1 低密度脂蛋白的氧化程度鉴定

取氧化前后的 LDL, 经 0.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 2.5% 考马斯亮蓝染色, 脱色后可见单一的条带 (图 1, Figure 1), 说明自然 LDL 已变成 ox-LDL。



图 1. 低密度脂蛋白琼脂糖凝胶电泳图 n-LDL 为自然低密度脂蛋白; ox-LDL 为氧化型低密度脂蛋白。

Figure 1. Agar sugar gel electrophoresis of low density lipoprotein samples

2.2 正常 ECV304 内皮细胞和 THP-1 细胞源性巨噬细胞能表达死亡相关蛋白

提取 ECV304 内皮细胞和 THP-1 细胞源性巨噬细胞的总 RNA, 应用 RTPCR 检测 Daxx mRNA 表达, 结果如图 2 (Figure 2) 所示, 说明正常的 THP-1 细胞源性巨噬细胞和 ECV304 内皮细胞均能表达 Daxx。

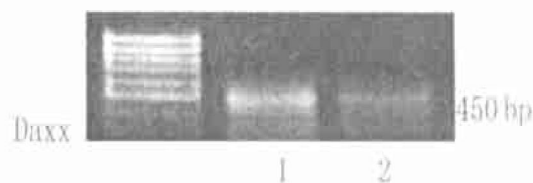


图 2. 逆转录-聚合酶链反应检测死亡相关蛋白 mRNA 在 ECV304 内皮细胞和 THP-1 细胞源性巨噬细胞中的表达 1 为 ECV304 细胞; 2 为 THP-1 细胞

Figure 2. Daxx mRNA expression in THP-1 monocyte-derived macrophages and ECV304 endothelial cells

2.3 氧化型低密度脂蛋白对 THP-1 细胞源性巨噬细胞表达死亡相关蛋白 mRNA 的影响

用 100 mg/L 浓度的 ox-LDL 处理 THP-1 细胞, 应用半定量 RT-PCR 检测 mRNA 表达水平。结果如图 3 (Figure 3) 所示。与正常组的面积灰度值比较, 0 h、6 h、12 h、18 h 和 24 h 时面积灰度值分别增加 1.0、1.26、0.83、0.82 和 0.68 倍, 表明 Daxx mRNA 的表达 6 h 前已增加, 6 h 表达最高, 6 h 后表达下降。ox-LDL 能够诱导 Daxx mRNA 表达增高。

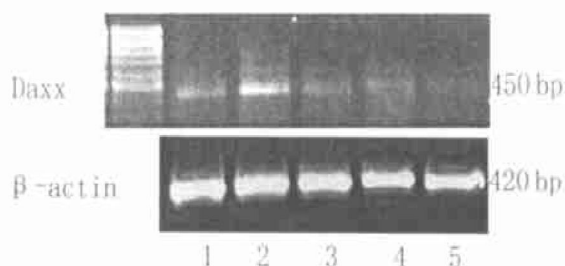


图 3. 死亡相关蛋白 mRNA 在氧化型低密度脂蛋白处理不同时间的 THP-1 细胞源性巨噬细胞中的表达差异 1 为正常组, 2 为 6 h, 3 为 12 h, 4 为 18 h, 5 为 24 h。

Figure 3. RT-PCR analysis for Daxx mRNA expression in THP-1 monocyte-derived macrophages

2.4 过氧化氢对 ECV304 内皮细胞表达死亡相关蛋白 mRNA 的影响

用 1 mmol/L 浓度的 H₂O₂ 处理的 ECV304 细胞, 应用半定量 RT-PCR 检测 mRNA 表达水平。结果如图 4 (Figure 4) 所示。与正常组的面积灰度值比较, 0 h、6 h、12 h、18 h 和 24 h 时面积灰度值分别增加 1、

1. 27、1. 21、1. 29、1. 64 倍, Daxx mRNA 表达增高, 24 h 表达最高。H₂O₂ 能够诱导 Daxx mRNA 表达增高。

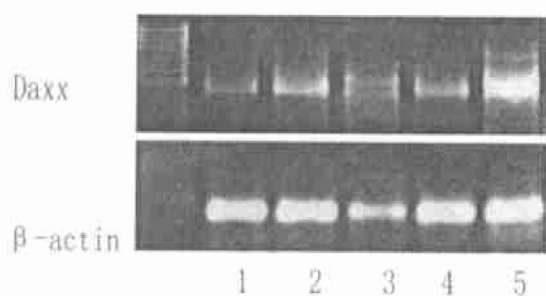


图4. 死亡相关蛋白 mRNA 在过氧化氢处理不同时间的 ECV304 内皮细胞中的表达差异 1 为正常组, 2 为 6 h, 3 为 12 h, 4 为 18 h, 5 为 24 h。

Figure 4. RT-PCR analysis for Daxx mRNA expression in ECV-304 cells

3 讨论

研究表明, Daxx 在人单核源性细胞巨噬细胞及内皮细胞中表达, 并且 ox-LDL、H₂O₂ 能诱导 Daxx mRNA 表达增加, 提示 Daxx 可能参与氧化应激诱导人巨噬细胞及内皮细胞凋亡的过程。目前已知^[8,9], 氧化应激损伤是动脉粥样硬化发生、发展中重要因素。内皮细胞损伤或凋亡是动脉粥样硬化发生的早期事件, 活性氧能诱导内皮细胞粘附因子和单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1) 表达, 吸引单核细胞进入血管壁, 分化为巨噬细胞。后者经清道夫受体摄取 ox-LDL, 导致巨噬细胞泡沫化、凋亡及脂质在内膜的沉积^[10]。ox-LDL 既能诱导巨噬细胞活化、增殖、分泌炎症介质, 又能诱导巨噬细胞凋亡。巨噬细胞的凋亡又影响粥样斑块的稳定性。Daxx 作为一种信号调节蛋白, 通常位于细胞核亚核结构早幼粒细胞白血病蛋白癌基因结构域(POD), 能与多种转录调控因子相互作用, 抑制细胞基础水平的转录。作者所在实验室发现腺病毒 E1B55kD 癌蛋白在细胞内与 Daxx 直接结合, 打破 Daxx 与 PML 在核内 PODs 的共定位, 并且这一过程可能影响 Daxx 调节转录的活性^[11,12]。而在多种应激情况下 Daxx 由胞核转移至胞浆介导 Fas 诱导的细胞凋亡。目前对于 Daxx 调控细胞凋亡的功能方面仍存在争议, 许多文献报道 Daxx 过高表达能促进细胞凋亡, 而 Michaelson 等^[6]发现敲除 Daxx 基因的鼠胚胎发育受损, 大量胚胎干细胞系出现凋亡。用 RNAi 处理以前过高表达实验所使用过的细胞系, 耗竭内源性 Daxx 基因, 结果显示 Daxx 耗竭的细胞凋亡增加。此外, 在 TF-1 细胞 Daxx 过高表达能抑制 CD43 单克隆抗体 MEM59 诱

导的凋亡。最近研究发现, 用 RNA 干扰技术抑制 Daxx 蛋白表达, 导致 HeLa 细胞对应激诱导凋亡的敏感性增加^[13]。本实验发现 Daxx 在人单核-巨噬细胞及内皮细胞中表达, ox-LDL 和 H₂O₂ 能诱导 Daxx mRNA 表达增加, THP-1 细胞 Daxx mRNA 表达在 6 h 前即已增加, 并且在 6 h 达到高峰, 6 h 后表达下降, ECV304 细胞 Daxx mRNA 24 h 表达最高, 提示 Daxx 可能参与调节单核-巨噬细胞及内皮细胞的凋亡, 而其在氧化应激诱导人巨噬细胞及内皮细胞凋亡的过程中的作用目前尚不清楚。研究 Daxx 在细胞凋亡过程中的作用及机制, 为进一步弄清巨噬细胞及内皮细胞凋亡的调节机制以及如何维护动脉粥样硬化斑块的稳定提供了新的靶点。

[参考文献]

- [1] Everett RD, Earnshaw WC, Pluta AF, Sternsdorf T, Ainsztein AM, Camena M. A dynamic connection between centromeres and ND10 proteins. *J Cell Sci*, 1999, **112**: 3 443-454
- [2] Ko YG, Kang YS, Park H, Seol W, Kim J, Kim T. Apoptosis signal-regulating kinase 1 controls the proapoptotic function of death-associated protein (Daxx) in the cytoplasm. *J Biol Chem*, 2001, **276** (42): 39 103-106
- [3] Wu S, Loke HN, Rehemtulla A. Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by Daxx. *Neoplasia*, 2002, **4** (6): 486-492
- [4] Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore LC, Devarajan P. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int*, 2003, **63** (5): 1 714-724
- [5] Hollenbach AD, McPherson CJ, Mientjes EJ, Iyengar R, Grosveld G. Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J Cell Sci*, 2002, **115** (16): 3 319-330
- [6] Michaelson JS, Leder P. RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX. *J Cell Sci*, 2003, **116** (2): 345-352
- [7] Yang X, Khosravi FR, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*, 1997, **89** (7): 1 067-076
- [8] Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 2003, **10** (2): 63-71
- [9] Takahashi K, Takeya M, Sakashita N. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc*, 2002, **35** (4): 179-203
- [10] Feng JW, Han Jh, Pearce SFA, Silverstein RL, Gotto AM, David Jr, Hajjar P. Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J Lipid Res*, 2000, **41** (5): 688-696
- [11] 万艳平, 吴移谋, 谭立志, 廖端芳. 腺病毒 E1B55KD 癌蛋白与 hDaxx 相互作用. *中国病毒学*, 2002, **17** (3): 230-233
- [12] 万艳平, 谭立志, 刘传爱, 吴移谋. 腺病毒 E1B55KD 癌蛋白打破 hDaxx 与 PML 在细胞核的共定位. *微生物学杂志*, 2001, **21** (4): 46-48
- [13] Chen LY, Chen JD. Daxx silencing sensitizes cell to multiple apoptotic pathways. *Mol Cell Biol*, 2003, **23** (20): 7 108-121

(此文编辑 胡必利)