

[文章编号] 1007-3949(2004)12-03-0271-04

·实验研究·

蛋白酶体抑制剂 MG132 诱导人巨噬细胞 THP-1 凋亡

刘俊文, 杨向东, 王仁, 屈顺林, 杨永宗

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; MG132 诱导 THP-1 细胞凋亡; 流式细胞术; 蛋白酶体抑制剂; 巨噬细胞; 凋亡; 载脂蛋白 B

[摘要] 泛素—蛋白酶体途径是生物体内进行蛋白质选择性降解的重要途径之一, 广泛参与细胞周期调控、DNA 修复、细胞信号转导、细胞凋亡等多种生理过程。为了研究调控泛素—蛋白酶体途径表达对巨噬细胞 THP-1 凋亡和细胞内载脂蛋白 B 的蓄积的影响, 本实验采用蛋白酶体抑制剂 MG132 (5 $\mu\text{mol/L}$) 处理 THP-1 细胞, 流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞内载脂蛋白 B 含量, 用半定量逆转录—聚合酶链反应检测细胞内 UPP 途径相关基因的表达。结果发现: MG132 可以诱导 THP-1 细胞凋亡; 实验组细胞内载脂蛋白 B 蓄积增加; 实验组细胞内泛素活化酶、泛素缓合酶和泛素—蛋白连接酶 mRNA 表达均降低, 而 26S 蛋白酶体 mRNA 无显著改变。结果提示, 蛋白酶体抑制剂 MG132 能够诱导 THP-1 细胞凋亡, 其机制可能与 MG132 抑制泛素—蛋白酶体途径中泛素活化酶、泛素缓合酶和泛素—蛋白连接酶活性, 使细胞内载脂蛋白 B 经泛素—蛋白酶体途径降解减少, 在细胞内蓄积而使细胞凋亡率增加。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Proteasome Inhibitor MG132 on Apoptosis in THP-1 Cells and its Mechanism

LIU Jun-Wen, YANG Xiang-Dong, WANG Ren, QU Shun-Lin, and YANG Yong-Zong

(Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Ubiquitin-Proteasome Pathway; Proteasome Inhibitor; Apoptosis; Apolipoprotein B; THP-1 Cells

[ABSTRACT] **Aim** Ubiquitin-proteasome pathway is an important pathway of protein degradation in cells, it is involved in many physiological processes including cell cycle regulation, DNA repair and cell apoptosis. To study the effect of ubiquitin-proteasome pathway on apoptosis in THP-1 cells and the possible mechanism of apoptosis, THP-1 cells were treated and the related indexes were detected. **Methods** THP-1 cells were treated with MG132 (5 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. Ubiquitin, ubiquitin-activating enzyme (E1), ubiquitin-conjugating enzyme (E2), ubiquitin-protein ligase (E3) and 26S proteasome genes expression were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Apolipoprotein B (ApoB) concentration in THP-1 cells and cell apoptosis rate were detected by flow cytometric analysis (FCA). **Results** RT-PCR showed that E1, E2, E3 genes expression were decreased in treatment group and the concentration of ApoB and apoptosis rate were increased obviously. **Conclusions** Proteasome inhibitor MG132 could inhibit the expression of E1, E2 and E3, UPP activity was inhibited. Degradation of ApoB decreased and so cells apoptosis rate increased. The apoptosis of macrophages in the early stage of atherosclerosis could delay the atherogenesis. This experiment is to detect the novel mechanism of macrophages from the regulation of ubiquitin-proteasome pathway, it could be a new target to prevent the atherogenesis.

多数急性冠状动脉事件的发生往往是由于动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块破裂和微小血栓形成所致。而斑块破裂的部位往往是在斑块纤维帽边缘, 该部位含有大量巨噬细胞源性泡沫细胞, 这提示巨噬细胞泡沫化和细胞凋亡转归在 As 斑块的演变和并发症的发生中具有重要意义^[1,2]。泛素—蛋白酶体途径 (ubiquitin-proteasome pathway, UPP) 广泛参

与多种生理过程如细胞周期调控、DNA 修复、细胞信号转导、细胞凋亡、蛋白的跨膜定位和细胞膜表面受体的内化等^[3,4]。低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 及其氧化产物 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 是重要的致 As 危险因素, 载脂蛋白 B (apolipoprotein B) 是低密度脂蛋白颗粒中主要的蛋白质成分, 主要由肝细胞和小肠上皮细胞合成和分泌。研究发现, 肝细胞内新生载脂蛋白 B 的降解是通过 UPP 介导的, 载脂蛋白 B 的降解异常将引起细胞内载脂蛋白 B 的蓄积而导致细胞毒性^[5]。目前尚未见调控巨噬细胞 UPP 活性对细胞 UPP 表达及细胞内载脂蛋白 B 蓄积影响的报道。本实验采用蛋白酶体抑制剂 MG132 处理 THP-1 细胞, 研究调控 UPP 表达对巨噬细胞 THP-1 凋亡和细胞内载脂蛋白

[收稿日期] 2003-12-19 [修回日期] 2004-05-22

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30200103)、湖南省自然科学基金 (02JJY4011) 和教育厅青年基金 (02B039) 资助

[作者简介] 刘俊文, 硕士研究生。杨向东, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管疾病相关基因克隆及细胞凋亡机制研究。杨永宗, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化病因学及发病机制研究, 本文通讯作者, 联系电话 0734-8281288, E-mail 为 yzyang@mail.hy.hn.cn.

B的蓄积的影响,探讨巨噬细胞凋亡的新机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人单核细胞系 THP-1 购自中科院上海细胞生物研究所。MG132 购自 Sigma 公司, Trizol 试剂和 RPMI1640 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司, 逆转录试剂盒和 DNA 聚合酶购自 Promega 公司, 泛素、泛素活化酶 (ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素缀合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, E2)、泛素-蛋白连接酶 (ubiquitin-protein ligase, E3)、26S 蛋白酶体和 GAPDH 引物由上海生物工程公司合成, 羊抗人载脂蛋白 B 多抗由卫生部老年医学研究所生物化学室制备, FITC 标记的兔抗羊 IgG 购自北京中山公司, 其余试剂均为分析纯。

1.2 细胞培养

THP-1 细胞用含 15% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基于 37℃、5% CO₂ 培养, 每 24 h ~ 48 h 传代一次。100 μmol/L 佛波脂 (PMA) 孵育细胞 24 h, 诱导细胞分化为巨噬细胞。对照组不加 MG132, 实验组细胞培养液中加入 MG132 (5 μmol/L), 继续培养 24 h。

1.3 细胞总 RNA 的提取和逆转录-聚合酶链反应检测

收集对照组和实验组细胞, Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 溶于无 RNase 的水中, 紫外分光光度计测定 A260/280 的比值在 1.8 ~ 2.0 之间。泛素引物的正义链为 5'-TTG TTA GAC AAT GCA GAT-3', 反义链为 5'-GCC TTG ACG TTC TCG ATT-3', 长 319 bp; E1 引物的正义链为 5'-AGT CCG TGT TGT CCG AAG TG-3', 反义链为 5'-GCA CTG CCC TGG TCA TGT AG-3', 长 240 bp; E2 引物的正义链为 5'-ATG ATC TGG CAC GGG ACC CT-3', 反义链为 5'-AGG ATC ATC TGG ATT GGG AT-3', 长 303 bp; E3 引物的正义链为 5'-GAC CTG TGC CAA ATG TAA CC-3', 反义链为 5'-ATC CAT GTA CTC TGC GTC CT-3', 长 314 bp; 26S 蛋白酶体引物的正义链为 5'-CGA CAT CCC GTA TCT TAG TT-3', 反义链为 5'-ATC CTT GCC TTC GGT AAC CAT-3', 长 223 bp; GAPDH 引物的正义链为 5'-TCA CCA TCT TCC CAG GCG CGA G-3', 反义链为 5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3', 长 697 bp。首次循环 94℃ 变性 5 min, 分别为 94℃ 变性 30 s → 55℃ 退火 45 s → 72℃ 延伸 1 min, 共 32 个循环, 最后一次循环在 72℃ 延伸 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。每组重复 3 次。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

收集两组细胞, PBS 洗 2 次, 用冷的 70% 乙醇 4℃ 固定细胞, 静置过夜, 离心弃乙醇, PBS 重悬, 加入 Rnase A (终浓度为 50 mg/L), 37℃ 水浴 40 min, 加入碘化丙啶 (PI) 50 μL, 混匀, 4℃ 避光放置 60 min, 200 目尼龙网滤过, 流式细胞仪上样检测, 每组重复 3 次。

1.5 流式细胞术检测载脂蛋白 B 的总量

收集两组细胞, PBS 洗涤 1 次, 4% 多聚甲醛固定 1 h, PBS 再洗涤 1 次, 加入一抗羊抗人载脂蛋白 B 多抗 (1:100 稀释), 冰浴 40 min, PBS 洗涤 2 次, 二抗为 FITC 标记兔抗羊 IgG (1:100 稀释), 冰浴 40 min, PBS 离心洗涤 2 次, PBS 重悬细胞, 200 目尼龙膜过滤, 每个样本流式细胞术分析检测 10 000 个细胞, 每组重复 3 次。

2 结果

2.1 泛素、泛素活化酶、泛素缀合酶、泛素-蛋白连接酶和 26S 蛋白酶体 mRNA 的表达

采用半定量逆转录-聚合酶链反应检测 mRNA 的表达, 结果如图 1 (Figure 1) 所示, 实验组细胞内 E1、E2 和 E3 mRNA 表达水平降低, 而泛素和 26S 蛋白酶体 mRNA 表达水平无明显改变, 说明 MG132 能够降低 E1、E2 和 E3 的表达。

2.2 细胞凋亡率的改变

流式细胞仪检测的细胞凋亡结果见图 2 (Figure 2), 对照组细胞凋亡率为 4.1%; 5 μmol/L MG132 作用 24 h 后, 细胞凋亡率为 30.2%。两组比较, 差异有显著性统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 细胞内载脂蛋白 B 含量的改变

经流式细胞仪检测, MG132 处理 THP-1 细胞 24 h 后, 对照组载脂蛋白 B 荧光强度为 3.14 ± 0.79 , MG132 组为 4.85 ± 0.81 , 细胞内载脂蛋白 B 的总量较对照组增高 ($P < 0.05$)。

3 讨论

真核生物中广泛存在着一种序列高度保守的 76 个氨基酸组成的小分子蛋白质, 这种蛋白质称为泛素。泛素的分子质量为 8.45 kDa, 它是一种非常小的球形蛋白, 广泛分布于各种真核细胞, 常常通过与其他蛋白质进行共价结合而发挥生物学作用, 泛素所涉及的作用路径称为泛素-蛋白酶体途径 (UPP)。UPP 主要由泛素、泛素活化酶 (E1)、泛素缀合酶 (E2)、泛素-蛋白连接酶 (E3) 和 26S 蛋白酶体

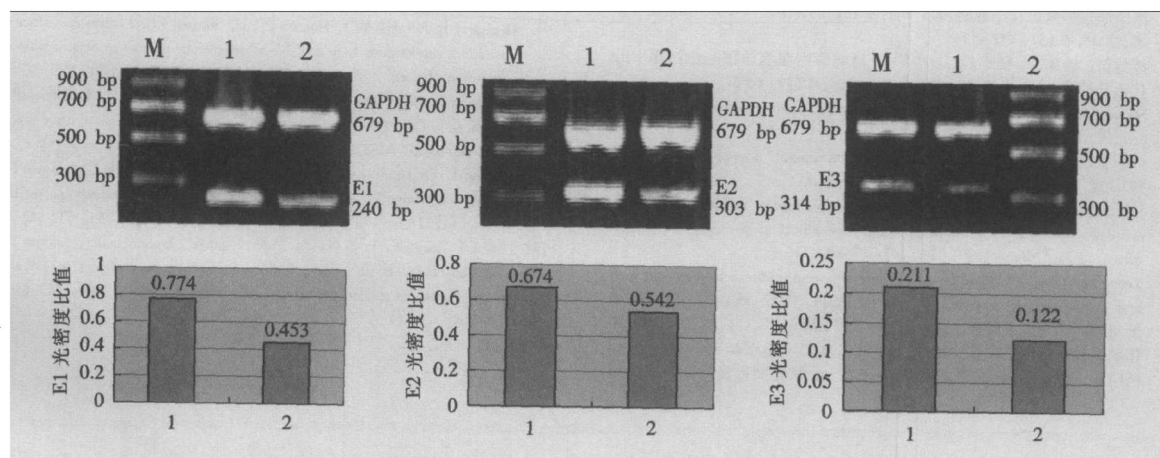


图 1. 蛋白酶体抑制剂 MG132 处理细胞 24 h 后细胞内 E1、E2 和 E3 mRNA 的差异表达 M 为 DNA 分子质量标准物, 1 为对照组, 2 为 MG132 组。

Figure 1. Differential expression of E1, E2 and E3 mRNA in THP-1 cells treated with MG132 for 24 h

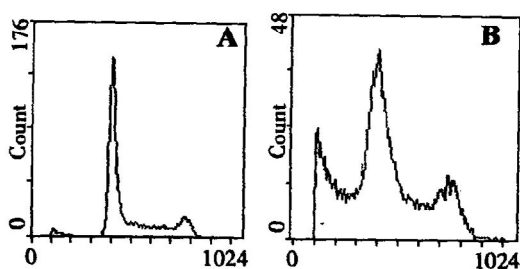


图 2. 流式细胞术检测细胞凋亡率的变化 A 为对照组, B 为 MG132 组。

Figure 2. Detection of apoptosis rate of THP-1 by flow cytometric analysis

组成,是生物体内进行蛋白质选择性降解的重要途径之一,其降解蛋白质的主要步骤为:①E1 活化泛素后,E2 与泛素形成复合物,同时在 E3 的作用下识别靶蛋白并与靶蛋白结合;②多个泛素分子共价结合到蛋白质底物上,形成多泛素链;③26S 蛋白酶体降解靶蛋白,同时释放可被重新利用的泛素分子。载脂蛋白 B 是 LDL 的主要载脂蛋白,正常血浆中的载脂蛋白 B 主要由肝脏和小肠合成。Yeung 等人^[6]发现,UPP 是载脂蛋白 B 在细胞内降解的主要途径,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。在以前的研究中^[7],我们采用抑制消减杂交法,筛选单核细胞 U937 细胞经低浓度 ox-LDL 孵育形成泡沫化细胞过程中差异表达的基因,发现 E2 表达增高;较高浓度(100 ~ 200 mg/L) ox-LDL 处理 U937 细胞,可以引

起细胞凋亡和 E2 表达降低^[8];Hermann 等^[9,10]发现在急性冠状动脉综合征病人的不稳定性斑块中泛素表达高于稳定性斑块,而且在喂食高胆固醇饮食的猪冠状动脉中膜平滑肌细胞中也有 E2 表达的明显增加,说明 UPP 在动脉粥样硬化发生发展中可能具有一定的作用。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(26S 蛋白酶体在 5 h,20S 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^[11]。本实验中对对照组 THP-1 细胞内的载脂蛋白 B,可能是来源于加血清的培养基。MG132 是一种针对蛋白酶体的特异性抑制剂,目前广泛用于细胞内 UPP 研究,本实验采用 MG132 对 UPP 进行干预,发现 MG132 诱导 THP-1 细胞凋亡,经过 MG132 处理 24 h 的细胞 E1、E2、E3 mRNA 的表达均降低,UPP 活性受到抑制,细胞内载脂蛋白 B 总量增加。实验组细胞内载脂蛋白 B 含量较对照组显著增加,可能机制为 UPP 受到抑制后载脂蛋白 B 降解减少,从而引起在细胞内的蓄积,引起细胞毒性或细胞损伤。在动脉粥样硬化的早期,巨噬细胞的凋亡能够减缓斑块病变的形成^[12],本实验从调控 UPP 的活性,探讨巨噬细胞凋亡的新机制,UPP 可能成为早期干预动脉粥样硬化病变的形成防止病变发展的新靶点。

[参考文献]

- [1] 张国兵, 陈灏珠, 江智文, 温心竹, 顾青, 王丰, 等. 巨噬细胞源性泡沫细胞形成过程中载脂蛋白 E 基因表达的变化. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (5): 441-442
- [2] 谭键苗, 杨永宗, 杨小毅, 袁小华. 巨噬细胞在泡沫细胞化过程中的代谢活性变化. 中国动脉硬化杂志, 1996, 4 (1): 66-67
- [3] Strous GJ, Govers R. The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci*, 1999, 112 (10): 1 417-423
- [4] Marx J. Cell biology. Ubiquitin lives up to its name. *Science*, 2002, 297: 1 792-794
- [5] Sakata N, Stoops JD, Dixon JL. Cytosolic components are required for proteasomal degradation of newly synthesized apolipoprotein B in permeabilized HepG2 cells. *J Biol Chem*, 1999, 274 (24): 17 068-074
- [6] Yeung SJ, Chen SH, Chan L. Ubiquitin-proteasome pathway mediates intracellular degradation of apolipoprotein B. *J Biochem*, 1996, 35 (43): 13 843-848
- [7] 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
- [8] 杨向东, 刘俊文, 唐蔚青, 李红霞, 王仁. 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. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (4): 287-290
- [9] Hermann J, Edwards WD, Holmes DR Jr, Shogren KL, Lerman A. Increased ubiquitin immunoreactivity in unstable atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 40 (11): 1 919-927
- [10] Hermann J, Gulati R, Napoli C, Woodrum JE, Lerman LO, Rodriguez-Portel M, et al. Oxidative stress-related increase in ubiquitination in early coronary atherogenesis. *FASEB J*, 2003, 17 (12): 1 730-732
- [11] Vieira O, Escargueil-Blanc I, Jurgens G, Bomer 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
- [12] Frank D Kolodgie, Jagat Narula, Allen P Burke, Nezam Haider, Andrew Farb, You Hui-Liang, et al. Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am J Pathol*, 2000, 157 (4): 1 259-268

(此文编辑 胡必利)