

氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞凋亡时 细胞间粘附分子-1 的表达时序

全智华¹, 杨向东², 刘江华¹, 张彤²

(南华大学 1. 附属第一医院内科; 2. 心血管病研究所, 衡阳 421001)

[关键词] 脂蛋白, 低密度, 氧化型; 泡沫细胞; 细胞凋亡; 细胞间粘附分子-1

[摘要] 研究氧化型低密度脂蛋白诱导人单核细胞 U937 细胞吞噬脂质发生凋亡过程中对细胞间粘附分子-1 表达的影响。用胸腺嘧啶核苷将 U937 细胞阻滞在 G₁ 期, 流式细胞仪监测同步化处理效果; 流式细胞术检测 U937 细胞泡沫化过程中细胞凋亡和细胞间粘附分子-1 的表达; 逆转录-聚合酶链反应分析细胞间粘附分子-1 mRNA 的表达。结果显示, 80 mg/L 氧化型低密度脂蛋白温育 U937 细胞 48 h 可形成典型的泡沫细胞, 72 h 可见凋亡细胞增多; 氧化型低密度脂蛋白温育 U937 细胞 12 h 即可检测到细胞间粘附分子-1 表达, 24 h 时达到最高值, 48 h 略有降低, 72 h 时则明显降低。结果表明, 氧化型低密度脂蛋白可以促进 U937 细胞细胞间粘附分子-1 表达, 细胞间粘附分子-1 的表达增强有利于巨噬细胞的趋化运动和对脂质的吞噬。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Time Course of ICAM-1 Gene and Protein Expression in U937 Cell-Derived Foam Cells Induced by ox-LDL

QUAN Zhi-Hua¹, YANG Xiang-Dong², LIU Jiang-Hua¹, and ZHANG Tong²

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, 2. Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

MeSH Lipoprotein, Low Density, Oxidized; Foam Cells; Apoptosis; Intercellular Cell Adhesion Molecule-1

ABSTRACT **Aim** To explore the time course of expression of ICAM-1 gene and protein in macrophages foamy process induced by ox-LDL. **Methods** Cell cycle of Human myeloid leukemia U937 cells was arrested in G₁ by preincubated with thymidine (2.0 mmol/L) for 24 h, then cells released at the same time. U937 cells were incubated with ox-LDL (80 mg/L) for time course(12 h, 24 h, 48 h or 72 h) treatment. **Results** Flow cytometric analysis results revealed that ICAM-1 protein expression increased from 12 h to 24 h and was highest at 24 h, but ICAM-1 decreased at 48 h. RT-PCR results showed that ICAM-1 mRNA level increased consistently with protein expression. **Conclusions** These results proved that ox-LDL could increase ICAM-1 gene and protein expression on U937 cells. Accumulation of cholesteryl esters in U937 cells has no negative feedback control on ICAM-1 gene and protein expression.

白细胞的粘附在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生中的作用受到人们重视,尤其在 As 病变早期起着关键作用,而粘附分子家族成员众多,其中细胞间粘附分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞间粘附分子和 P-选择素(P-selectin)在 As 中的作用比较重要。单核细胞由 ICAM-1 等介导附着并穿过内皮细胞,在内膜下分化为巨噬细胞,巨噬细胞通过清道夫受体吞噬氧化型低密度

脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)形成泡沫细胞。粘附分子的表达具有一定时相性,在粘附早期 P-选择素起主要作用,在粘附后期主要是内皮细胞表面的 ICAM-1 和血管细胞间粘附分子-1 起主要作用。本实验研究观察 U937 细胞泡沫化过程中和泡沫细胞凋亡时 ICAM-1 的表达时序。

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 Reagent 和胎牛血清购自 GIBCO, Reverse transcription system 和 PCR core system 购自 Promega, ICAM-1 和 GAPDH 引物由赛百盛公司合

[基金项目] 湖南省自然科学基金(00JJY2027)和湖南省教育厅课题(00C151)资助。

[作者简介] 全智华,男,1961 年出生,湖南省衡阳人,副教授,硕士研究生导师,主要研究心血管疾病发生分子机制。杨向东,男,博士,主要研究动脉粥样硬化相关基因筛选,为本文通讯作者。

成, FITC-anti-ICAM-1 购自美国 Pharmingen 公司, 其余试剂均为分析纯。

1.2 低密度脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

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 $10 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4 的 PBS 溶液 ($\text{pH} 7.2$) 中, 37°C 温育 24 h。ox-LDL 置含 $200 \mu\text{mol/L}$ EDTA 的 PBS 中透析 24 h, 超滤除菌后 4°C 保存。

1.3 U937 细胞培养、同步化处理 and 分组

U937 细胞以含 100 mg/L 青霉素、 100 mg/L 链霉素和 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养。取对数生长期的 U937 细胞 $5 \times 10^8/\text{L}$, 加入胸腺嘧啶核苷 (TdR 终浓度为 2 mmol/L) 培养, 进行药物周期阻断, 用流式细胞仪监控细胞周期阻断效果。未用 TdR 处理者 G_1 期细胞占 49.4% , TdR 处理 8 h 者 G_1 期细胞占 59.2% , 16 h G_1 期细胞占 84.4% , 24 h G_1 期细胞占 95.7% , 细胞凋亡率与正常对照无明显差别。细胞释放后 8 h G_1 期细胞为 82.1% , 16 h G_1 期细胞为 75.3% 。同步化处理的 U937 细胞 $800 \text{ rpm} \times 5 \text{ min}$ 离心收集, 用无血清的 1640 培养液洗 3 次后加入含 10% 血清的 1640 培养液。

将同步化处理的 U937 细胞分为两组, 对照组不加 ox-LDL, 实验组加入 ox-LDL (终浓度为 80 mg/L)。

1.4 流式细胞术

1.4.1 细胞周期的检测 参照文献 [1] 检测 U937 细胞周期变化。

1.4.2 细胞间粘附分子-1 表达的检测 依次于 0 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 各收集细胞 1×10^6 个,

$800 \text{ rpm} \times 5 \text{ min}$ 离心, 4°C PBS 洗一次。用 4% 多聚甲醛 1 mL 室温固定 40 min 。用含 5% 人血清 PBS 1 mL 重悬, 冰上孵育 10 min , $800 \text{ rpm} \times 5 \text{ min}$ 离心去上清, 加入 $200 \mu\text{L}$ 含 0.5% BSA 和饱和剂量 FITC 标记 ICAM-1 单抗 ($2.5 \times 10^{10}/\text{L}$) 的 PBS, 避光冰上放置 30 min , 加入 $200 \mu\text{L}$ 1% 多聚甲醛。用流式细胞仪检测荧光值, 每管计数 $10\,000$ 个细胞。

1.5 逆转录-聚合酶链反应

提取各时间点细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA。以 GAPDH 为内对照, GAPDH sense: $5' \text{-TGAAGGTCCGAGTCAACGGATTTT-3'}$, antisense: $5' \text{-CATGTGGCC-CATGAGGTCCACCAG-3'}$, 457 bp ; ICAM-1 sense: $5' \text{-GTCCCCCTCAAAGTCATCC-3'}$, antisense: $5' \text{-AACCCCATTCAGCGTCACCT-3'}$, 943 bp 。先 94°C 变性 5 min , 再分别变性、退火、延伸 94°C 60 s , 58°C 30 s , 72°C 90 s 30 个循环, 72°C 延伸 10 min 。PCR 产物用含 0.5 mg/L 溴化乙锭的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果

2.1 U937 细胞周期分析

同步化处理后的 U937 细胞经流式细胞仪检测, 细胞凋亡率为 2.5% , 80 mg/L ox-LDL 作用 24 h 后, 凋亡率为 4.3% , ox-LDL 作用 48 h 后, 凋亡率为 12.8% , G_2 、M 期细胞数减少, G_1 期前出现亚 G_1 峰, 即凋亡峰 (AP), ox-LDL 作用 72 h 时细胞凋亡率增为 21.2% , AP 峰更加明显 (图 1, Figure 1)。

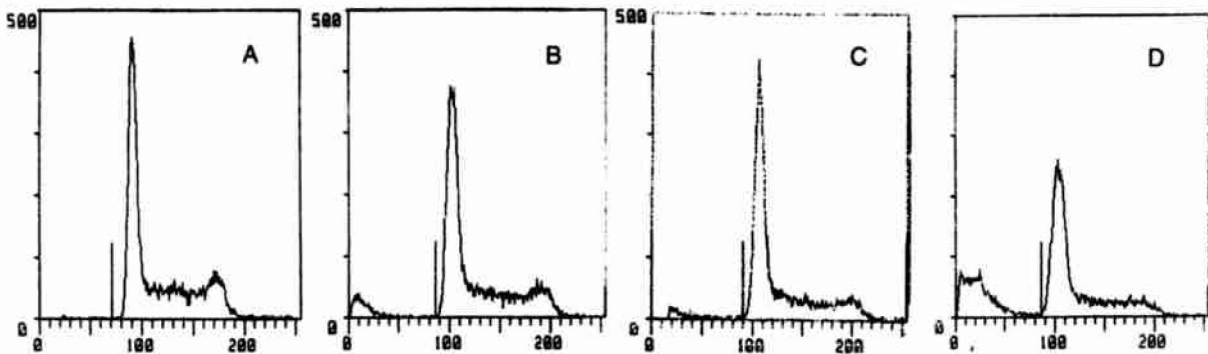


图 1. 流式细胞术检测 80 mg/L 氧化型低密度脂蛋白处理后的 U937 细胞周期

Figure 1. Flow cytometric analysis for apoptosis on U937 cells induced by ox-LDL (80 mg/L). A: control group, B: 24 h, C: 48 h, D: 72 h.

2.2 细胞间粘附分子-1 的表达

图 2 (Figure 2) 显示 ox-LDL 处理后 ICAM-1 的表达

增高, 主峰右移, ICAM-1 阳性的细胞数在泡沫细胞形成早期随着细胞脂质吞噬增多而增加, 24 h 达到高

峰, 48 h 时略为降低, 但在泡沫细胞形成晚期(72 h)却明显降低。每组样本重复 3 次。

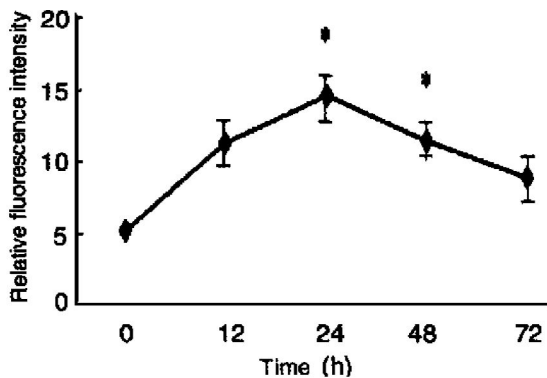


图 2. α -LDL 处理的 U937 细胞细胞间粘附分子-1 的表达
Figure 2. Expression of ICAM-1 protein on U937 cells incubated with 80 mg/L α -LDL. * : $P < 0.05$.

2.3 氧化型低密度脂蛋白对细胞间粘附分子-1 mRNA 表达水平的影响

细胞间粘附分子-1 扩增片段长度为 943 bp。图 3 (Figure 3) 显示, 经 α -LDL 处理的 U937 细胞 ICAM-1 mRNA 表达水平增高, 48 h 后降低。

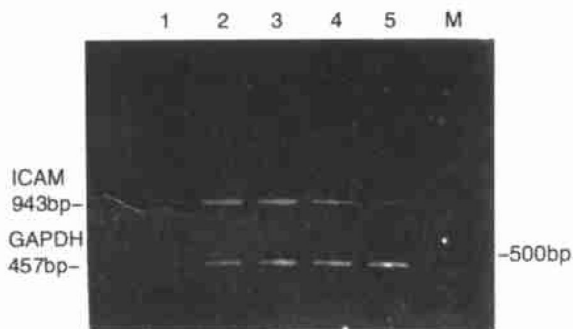


图 3. 细胞间粘附分子-1 mRNA 的表达
Figure 3. Expression of ICAM-1 mRNA in U937 cells induced by α -LDL. M: Marker, lane 1: control group, lane 2: 12 h, lane 3: 24 h, lane 4: 48 h, lane 5: 72 h.

4 讨论

细胞粘附分子参与细胞的信号传导与活化、细胞的伸展与移动、细胞的生长与分化、胚胎发育、伤口愈合及肿瘤转移等一系列重要的生理和病理过程。细胞间粘附分子(ICAM-1)广泛分布于内皮细胞、表皮细胞和巨噬细胞。ICAM-1/LFA-1 是首先证实的介导白细胞间和白细胞与内皮细胞粘附的分子对, 对白细胞的附壁及移位有重要作用。我们的研究表明 α -LDL 可促进 U937 细胞向泡沫细胞转变并最终促使其凋亡, c -fos、 c -jun 和 c -myc 等原癌基因参与其调控; 清道

夫受体 CD36 介导了 α -LDL 诱导 U937 细胞泡沫化和凋亡。Ox-LDL 促进粘附分子 ICAM-1 的表达, 泡沫细胞的形成过程中 ICAM-1 的表达是时序性增高的, 但在晚期泡沫细胞凋亡时 ICAM-1 的表达却明显降低。粘附分子的表达变化可能与其功能有关, 早期巨噬细胞粘附分子表达增高有利于细胞的移动和吞噬运动, 促进泡沫细胞的形成; 当泡沫细胞形成后, 细胞内脂质过氧化物的增多对细胞的功能有损伤作用, 使细胞进入老化和凋亡状态, 粘附分子的表达降低削弱了细胞携脂外运能力, 在斑块局部微环境中泡沫细胞更易发生凋亡^[2,3]。Ox-LDL 促使细胞粘附分子表达的确切机制目前尚不清楚, 研究发现, 蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 途径可能是溶血磷脂酰胆碱诱导粘附分子表达细胞内信号传递的关键^[4-7]。PKC 激活后可以使 NF- κ B 的抑制因子 I κ B 和 Rel 蛋白前体 p105 磷酸化并与泛素 (ubiquitin) 连接、降解, 从而使 NF- κ B 游离活化进入核内, 结合靶基因特定序列, 与其它转录活化因子结合形成启动子复合体, 从而激活基因的转录反应^[8]。我们用抑制消减杂交 (SSH) 克隆 U937 细胞泡沫化过程中差异表达基因, 其中有泛素缀合酶 E2A, 该酶可能在 α -LDL 诱导 U937 细胞粘附分子表达过程中发挥作用, 具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 杨向东, 杨永宗, 黎键. α -LDL 诱导 U937 细胞凋亡及其机制探讨 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(2): 197-200
- [2] 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
- [3] 杨向东, 李红霞, 王抒, 等. CD36 介导 α -LDL 诱导 U937 细胞泡沫化及凋亡 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8(4): 315-318
- [4] Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, et al. Lysophosphatidylcholine inhibits surface receptor mediated intracellular signals in endothelial cells by a pathway involving protein Kinase C [J]. *Circ Res*, 1992, 71: 422-428
- [5] Hara YO, Peterson TE, Zheng B, et al. Lysophosphatidylcholine increase vascular superoxide anion production via protein Kinase C activation [J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14(6): 1 007-013
- [6] Murohara T, Scalia R, Lefer AM, et al. Lysophosphatidylcholine promotes P-selectin expression in platelets and endothelial cells. Possible involvement of Protein Kinase C activation and its inhibition by nitric oxide donors [J]. *Circ Res*, 1996, 78: 780-789
- [7] Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, et al. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140 [J]. *Nature*, 1990, 343: 757-760
- [8] Vieira O, Escargueil B, Jurgens G, et al. oxidized LDL alter the of the ubiquitin proteasome pathway: potential role in oxidized LDL induced apoptosis [J]. *FASEB J*, 2000, 14(3): 532-542

(此文 2001-05-17 收到, 2001-11-04 修回)

(此文编辑 朱雯霞)