

facilitative glucose transporter in human mesangial cells.

Key words: Glucose transporter Mesangial cells

胸腺素 α 原体外诱导小鼠胸腺细胞凋亡的初步探讨

郑金来 刘佃辛 李君文 高兰兴 张符光

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所 天津 300050)

李国亮 吴小枫

(南开大学生物化学系 天津 300071)

1972 年澳大利亚昆士兰大学医学院学者 Keer 等人发现了一类不同于坏死的细胞死亡方式,称之为细胞凋亡(apoptosis)。细胞凋亡是基因控制的细胞自我消亡过程,凋亡最突出的特征是染色质的有控降解,DNA 双链在核小体联结部位被 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 活化的核酸内切酶断裂而形成大小是核小体整数倍的 DNA 片段,其凝胶电泳呈现梯状。细胞凋亡对免疫系统的建立,免疫反应的进行及免疫耐受的维持等都有重要的意义,本文主要探讨了胸腺素 α 原(prothymosin α , ProT α)在体外对小鼠胸腺细胞凋亡的诱导作用。

材料与方 法

一、主要实验材料

6—8 周龄昆明种小鼠购自我院实验动物中心;ProT α 由本室制备^[1];PI 系 Sigma 公司产品;RPMI1640 系 Gibco 产品;琼脂糖系杭州微生物试剂厂产品;胎牛血清是天津血液制品厂产品;A₂₃₁₈₇、Fluo-3/AM、Pluromic F-127 购自北京岳泰公司;CO₂ 培养箱为美国 Harris 产品;普通凝胶电泳仪为北京六一仪器厂生产;MPF-4 荧光光度计是日立公司产品;流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

二、细胞培养

按常规制备胸腺细胞悬液,调整细胞浓度约为 1×10^7 /ml。实验分四组① 空白对照组,② 氢化考的松组,③ ProT α 组及④ 氢化考的松+ProT α 组,其中 ProT α 的终浓度为 10^{-9} mol/L,氢化考的松的终浓度为 10^{-7} mol/L。根据预试验将细胞放入培养箱内培养 12 小时,收集培养后的细胞备用。

三、DNA 片段化检验

取细胞悬液 1ml,以 2%胎牛血清 Hank's 液洗涤两次,加入 400 μ l 细胞裂解液(10mmol/L Tris,1mmol/L EDTA,0.5% TritonX-100,pH8.0)置 4 $^{\circ}$ C 30min,然后离心 10,000rpm 10min。上清中含片段化 DNA,沉淀为完整的高分子量的 DNA,上清作琼脂糖凝胶电泳定性分析 DNA 片段化。

四、流式细胞仪检测亚二倍体细胞百分率^[2]

取培养后的细胞悬液 100 μ l,70%的乙醇固定,染色前用 PBS(0.01mol/L,pH7.2)洗涤离心以除去固定液。加入 1mg/ml 的 RNaseA 200 μ l 后 37 $^{\circ}$ C 水浴 30min,再加入 800 μ l PI 染色液(PI 100 μ g/ml, Triton X-100 1.0%,NaCl 0.9%)混匀,4 $^{\circ}$ C 避光 30min 然后上机测试,记录激发波长 488nm 处的红色荧光。

五、 Ca^{2+} 浓度的测定^[3]

取细胞悬液 1ml,加入终浓度为 20 μ mol/L 的 Fluo-3/AM,1 μ l25%(体积比)Pluromic F-127,再培养一小时。以无血清的 RPMI1640 离心洗涤三次,并恢复原体积。在荧光光度计上检测细胞悬液的荧光强度,激发与测量波长分别为 490、520nm。细胞内游离 Ca^{2+} 浓度可由下式求出:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = kd(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$$

其中 kd 为 400nmol/L;F_{max} 为饱和时所测得的荧光强度,采用在细胞悬液中加入 1mmol/L CaCl₂,5 μ mol/L A₂₃₁₈₇ 后染色检测所得的荧光强度;F_{min} 为 Fluo-3 未与 Ca^{2+} 结合时所测得的荧光强度,采用细胞悬液中加入 1mmol/L MnSO₄ 后染色检测所得的荧光强度。

结 果

1. DNA 梯形成情况(见图 1)

胸腺细胞经 ProT α 和/或氢化考的松处理

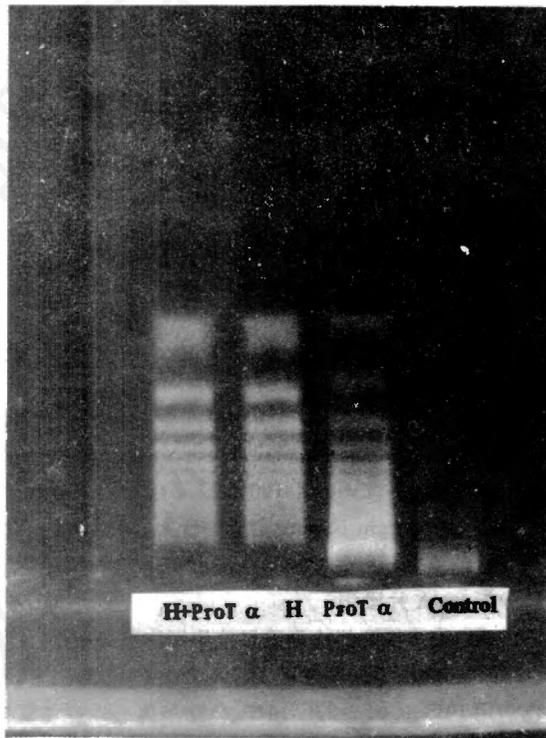


图1 凝胶电泳示DNA梯

Control:对照;H:氢化考的松,以下图表相同。

以后,通过琼脂糖凝胶电泳发现:ProTα组、氢化考的松组及二者混合组均出现明显的梯状DNA条带,而空白对照组没有出现明显梯状DNA条带,这说明胸腺细胞经ProTα处理以后发生了细胞凋亡。另外,该图还表明单独ProTα组与含氢化考的松的组(包括单独的氢化考的松组和二者联合应用组)相比低分子量DNA片段较少,而高分子量DNA片段较多一些。

2. 亚二倍体细胞百分率情况

流式细胞仪计数亚二倍体细胞见示意图2。结果(见表1)表明:与空白对照组相比,ProTα或氢化考的松或二者联合应用均能明显提高亚二倍体细胞百分率($P < 0.01$);其中,两者联合应用效果最佳,与单纯的氢化考的松或ProTα相比,亦有明显区别($P < 0.01$)。本实验揭示胸腺细胞经ProTα处理后的确发生了细

胞凋亡。

表1 ProTα对小鼠胸腺细胞亚二倍体细胞百分率的影响

组别	亚二倍体细胞百分率 ($\bar{X} \pm SD\%$)	n
空白对照	5.5 ± 0.3	8
ProTα	$24.7 \pm 0.2^*$	8
H	$46.2 \pm 0.4^*$	8
H+ProTα	$50.8 \pm 1.1^{*\Delta*}$	8

★:与空白对照组相比 $P < 0.01$;▲:与ProTα组相比 $P < 0.01$;※:与H组相比 $P < 0.01$ 。

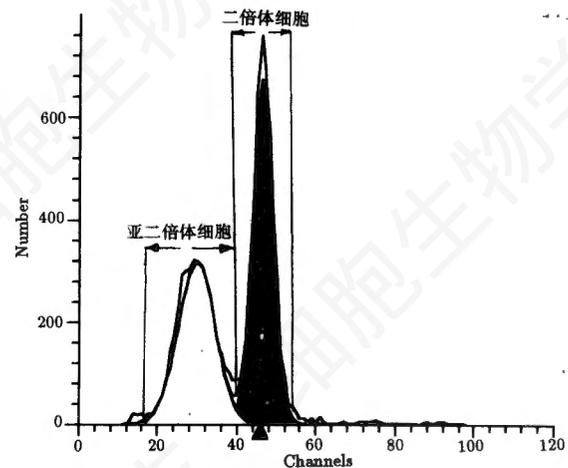


图2 流式细胞仪计数亚二倍体细胞百分率

注:在本图中亚二倍体细胞百分率为44.69%,二倍体细胞百分率为53.27%。

3. 细胞内游离钙离子浓度变化情况(见图3)

通过荧光光度计检验细胞内荧光强度进而转换为细胞内游离 Ca^{2+} 浓度,结果发现:与空白对照组相比,ProTα或氢化考的松或二者联合应用均能明显提高细胞内游离 Ca^{2+} 浓度($P < 0.01$);其中,二者联合应用效果更佳,与单纯的ProTα组或氢化考的松组相比亦有明显差别($P < 0.01$)。这说明ProTα可能通过提高胞内游离 Ca^{2+} 浓度而促进细胞凋亡。

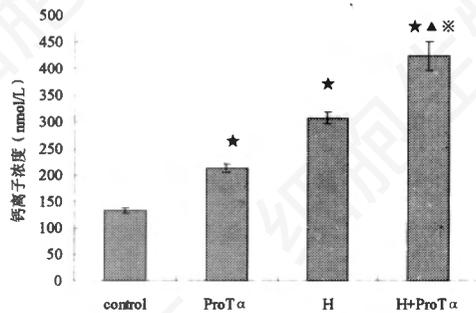


图 3 细胞内游离钙离子浓度

$n=3$; ★, 与空白对照组相比 $P<0.01$; ▲, 与 ProTα 组相比 $P<0.01$; ※, 与 H 组相比 $P<0.01$ 。

讨 论

ProTα 最初是作为胸腺素 α1 (Thymosinα1, Tα1) 的前体从小鼠胸腺中分离出来的,也是胸腺上皮细胞合成和分泌的一种多肽类激素。ProTα 含 109—111 个氨基酸残基,分子量大约为 12.5kD,因含有大量的 Glu、Asp 等酸性氨基酸残基,故其等电点很低,约为 3.55 左右,是一个高酸性蛋白。ProTα 在进化上高度保守,分布上极其广泛^[4],这提示 ProTα 可能具有很重要的功能并且可能不仅仅限于免疫功能。近年来研究表明 ProTα 至少有如下两方面的功能:① 作为核蛋白参与细胞增殖^[5];② 作为免疫刺激因子具有提高机体免疫功能的活性^[6-7]。这里我们的实验又明确表明了 ProTα 的另一种生物效应:在体外诱导胸腺细胞的凋亡。胸腺上皮细胞分泌的这种多肽居然能诱导胸腺细胞的凋亡,这的确是一个既让人奇怪又令人鼓舞的现象。

现在已有一些间接证据能够支持我们的实验:① 与 ProTα 同样来源于胸腺上皮细胞的胸腺素 β-10 是一种凋亡促进剂;② C-myc 蛋白作为与 ProTα 高协同表达^[4]的一种蛋白在生长因子缺乏等条件下也是一种强凋亡促进剂;③ Furuya 等人的研究给予了本实验最强有力的支持。他们通过控制循环雄激素水平来改变

前列腺细胞的生活状态—或增殖或凋亡,结果发现 ProTα mRNA 表达的提高仅在前列腺细胞凋亡时才发生,而细胞增殖时却没有变化^[8],这说明 ProTα 可能参与了前列腺细胞的凋亡,后来他们又用雄激素非依赖的 Dunning R-3327 AT-3 小鼠前列腺癌细胞作了进一步的实验,当用不同药物处理该细胞分别诱导增殖依赖的凋亡和非增殖依赖的凋亡时,仅在非增殖依赖的凋亡的启动时才发生 ProTα mRNA 的表达升高^[9],这表明 ProTα 很可能是通过参与非增殖依赖凋亡的启动过程而参加细胞凋亡的。

我们知道胸腺细胞在发育、分化、成熟、执行免疫功能的过程中,随时都可能发生凋亡,其中有两处发生明显的 T 细胞凋亡。① 是胸腺内:从骨髓来源的前-T 细胞在胸腺中发育分化成熟的过程中,大部分无功能的对自身有害的 T 细胞发生凋亡,只有大约 5% 左右的能识别自身 MHC 抗原并对自身抗原不发生反应的 T 细胞才能存活下来并输出到外周血或外周淋巴器官执行免疫功能;② 是外周血或外周淋巴器官内:免疫调节网络认为在抗原刺激发生免疫应答的过程中不仅有 T 细胞等淋巴细胞等的增殖、活化以消除异己,还发生着许多细胞克隆的凋亡以保障机体的稳态、防止免疫功能的缺陷、不足或过火,由抗原激活而诱发的包括 T 在内的淋巴细胞的凋亡是淋巴细胞从体内清除的一个机制。既然 ProTα 是一个凋亡诱导剂,那么在机体免疫系统发生如此普遍和众多的 T 细胞凋亡时,它是否也起了某一种作用呢,或者从更广泛意义上说 ProTα 是否对 T 细胞的发育、分化、成熟及功能执行等起某些作用呢。当然,目前我们还不能遽下断言本实验所采用的浓度就是生理浓度,因为在不同年龄阶段及不同的组织器官中 ProTα 浓度变化很大,其中以胸腺中含量最高,并且不同的研究者测出的结果往往也很不一致,因而也就不能说本实验所观察到的现象在机体内就一定能发生。但是,我们知道 T 细胞的分化、发育和成熟依赖于胸腺

微环境,而 ProT α 就属于该环境的一部分,而我们可大胆推测 ProT α 对 T 细胞分化、发育及成熟还是有一定作用的,但是这种作用到底是什么,其具体机制是什么,目前人们尚无明确的认识。

结合我们的实验,推测 ProT α 促进胸腺细胞的凋亡的机理可能是:在生理性或毒性因子等的作用下,细胞内 ProT α 的表达量上升,ProT α 导致 Ca $^{2+}$ 自钙库释放或内流使细胞内游离的 Ca $^{2+}$ 水平升高,Ca $^{2+}$ 与其受体 Calcineurin 相互作用活化某些蛋白(如转录因子 NF-AT)后又活化了细胞凋亡基因(如 nurr77, NF-AT 可大量促进该基因的表达),从而细胞就通过特殊的基因程序而发生了凋亡。

摘 要

胸腺细胞经 ProT α 和/或氢化考的松处理以后,采用 PI 染色法检测亚二倍体细胞百分率、荧光光度计检测细胞内游离 Ca $^{2+}$ 浓度及琼脂糖凝胶电泳定性检验 DNA 片段化。结果发现单独或与氢化考的松联合应用,ProT α 均可

明显促进 DNA 片断化、提高亚二倍体细胞百分率并且也明显提高细胞内游离 Ca $^{2+}$ 浓度。本实验说明 ProT α 能促进胸腺细胞的凋亡。

关键词:胸腺素 α 原 胸腺细胞 凋亡

参 考 文 献

- [1] 张符光等,1996,生物化学杂志,12:386-390.
- [2] 张亚历等,1996,分子生物学常用实验方法,姜波等主编,pp.170-183,人民军医出版社,北京.
- [3] 周 禾等,1994,实用免疫学新技术,钱玉昆等主编,pp.18-21,北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,北京.
- [4] Smith M. R.,1995,*Leuk Lymphoma*,18:209-214.
- [5] Gallego R., et al.,1992,*Acta Anat Basel*,143:219-222.
- [6] Grunberg E., et al.,1997,*J. Interferon. of Cytokine Res.*,17:159-165.
- [7] Cordero O. J., et al.,1995,*Immunopharmacology*,29:215-223.
- [8] Furuya Y., et al.,1993,*Endocrinology*,133:2660-2666.
- [9] Furuya Y., et al.,1994,*Prostate*,25:301-309.

PRIMARY STUDY OF THYMOCYTE APOPTOSIS INDUCED BY PROTHYMOSIN α IN VITRO

ZHENG Jin Lai LIU Dian Xin LI Jun Wei GAO Lan Xin ZHANG Fu Guang

(Institute of Hygiene and Enviromental Medicine,Tianjin 300050)

LI Guo Liang WU Xiao Feng

(Department of Biochemistry,Nankai University,Tianjin 300071)

ABSTRACT

To study the effect of ProT α on apoptosis in mice thymocyte we adopted PI staining to decide the percentage of hypodiploid cells,DNA gel electrophoresis to detect DNA fragmentation qualitatively and fluorescence-photometer to measure the alteration of intracellular Ca $^{2+}$ concentration in our experiment. The results showed that ProT α alone or together with hydrocortisone could promote fragmentation of DNA in mice thymocyte. Meantime, it also could markedly increase the percentage of hypodiploid cells and intracellular Ca $^{2+}$ concentration. Our experiment indicated that ProT α could promote the apoptosis of mice thymocyte.

Key words: ProT α Thymocyte Apoptosis