

[文章编号] 1674-8115(2011)04-0417-04

· 论著 ·

MML-1 细胞 G₁ 期阻断对 Fas 诱导细胞凋亡的抑制作用

李玉峰，沈加，吴伟岚，陈同辛，陈慧敏，林芊，董瑜，金晶，卫敏江
(上海交通大学医学院附属新华医院儿内科，上海 200092)

[摘要] 目的 分析 Fas 诱导的 B 淋巴瘤细胞株 MML-1 凋亡过程中，PMA 阻断 MML-1 进入细胞周期后细胞凋亡敏感性降低的原因。方法 采用 10 nmol/L PMA 预处理 MML-1 细胞 24 h，用流式细胞仪检测 PMA 阻断细胞周期前后 50 ng/mL 抗 Fas 抗体诱导的 MML-1 细胞凋亡率的变化。采用 PI-Triton X 和 active caspase-3/8 双染色、Western blotting 技术分析 PMA 处理前后，经抗 Fas 抗体诱导的 MML-1 细胞内活化 caspase-3/8 的表达。通过 Western blotting 技术检测 G₁ 期细胞的凋亡相关蛋白 caspase-3/8、Bcl-2、FLIP 和 Akt 的表达。结果 PMA 预处理 MML-1 细胞 24 h 后，G₁ 期细胞比例显著升高，达 93.77%。PMA 预处理前，抗 Fas 抗体诱导 6 h 后的 MML-1 细胞凋亡率为 56%；经 PMA 预处理，抗 Fas 抗体诱导 6 h 后的 MML-1 细胞凋亡率为 14%。流式细胞术和 Western blotting 检测发现经 PMA 预处理，抗 Fas 抗体诱导后活化 caspase-3 和 caspase-8 蛋白的表达受到显著抑制。Western blotting 检测显示 G₁ 期细胞中凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达上调。结论 将 MML-1 细胞阻断在 G₁ 期能够抑制 Fas 诱导的细胞凋亡，可能与凋亡抑制分子 Bcl-2 在 G₁ 期的表达上调有关。

[关键词] 细胞凋亡；Bcl-2；G₁ 期；Fas

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.04.007

[中图分类号] R329

[文献标志码] A

Inhibition of Fas-mediated apoptosis by arrest of MML-1 cells in G₁ phase

LI Yu-feng, SHEN Jia, WU Wei-lan, CHEN Tong-xin, CHEN Hui-min, LIN Qian, DONG Yu, JIN Jing, WEI Min-jiang
(Department of Pediatrics, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

[Abstract] Objective To investigate the mechanism of Fas-mediated apoptosis of MML-1 cells inhibited in G₁ phase by PMA. Methods MML-1 cells were pretreated by 10 nmol/L PMA for 24 h, and the apoptosis rates of MML-1 cells induced by 50 ng/mL anti-Fas antibody were detected by flow cytometry before and after cell cycle arrest by PMA. The expression of active caspase-3/8 in anti-Fas antibody-induced MML-1 cells was detected by PI-Triton X and active caspase-3/8 double staining and Western blotting before and after PMA treatment. The expression of apoptosis related protein of caspase-3/8, Bcl-2, FLIP and Akt in cells of G₁ phase was detected by Western blotting. Results Twenty-four hours after treatment of MML-1 cells by PMA, the percentage of cells in G₁ phase significantly increased (93.77%). Before PMA treatment, the apoptosis rate of MML-1 cells was 56% after Fas-mediated apoptosis for 6 h. Whereas after PMA treatment, the apoptosis rate of MML-1 cells was 14% after Fas-mediated apoptosis for 6 h. It was revealed by flow cytometry and Western blotting that the expression of active caspase-3/8 was significantly inhibited after PMA treatment. Western blotting demonstrated that the expression of Bcl-2 was up-regulated in cells of G₁ phase. Conclusion Fas-mediated apoptosis would be inhibited in MML-1 cells arrested in G₁ phase, which might be related to the up-regulation of Bcl-2 in G₁ phase.

[Key words] apoptosis; Bcl-2; G₁ phase; Fas

Fas 与 FasL 配体结合诱导细胞凋亡是体内多种凋亡机制之一。众多研究表明细胞凋亡与细胞周期相关。静止期细胞不能被 Fas 诱导凋亡^[1]；激活 - 诱导细胞死亡 (activation-induced cell death, AICD) 实验^[2-3]证明免疫细胞活化后在 G₁ 后期被诱导凋亡；

另有研究^[4-5]发现，把细胞阻断在 G₁ 中期前可有效抑制 Fas 诱导的细胞凋亡。

本研究组前期实验^[6-7]发现，在 Fas 诱导 T、B 淋巴瘤细胞凋亡过程中，细胞凋亡的效应分子 caspase-3、8 的活化与细胞周期有关，G₁ 后期是 Fas 诱导细胞凋亡

[基金项目] 上海交通大学医学院基金(09XJ076) (Foundation of Shanghai Jiaotong University School of Medicine, 09XJ076)。

[作者简介] 李玉峰(1977—)，男，主治医师，博士；电子信箱：mieuniversity@hotmail.com。

[通信作者] 卫敏江，电子信箱：wmj10@126.com。

的敏感期。对于淋巴瘤细胞进入 G₁ 后期易被诱导凋亡的机制, 目前尚不明确。本研究利用 Fas 诱导 B 淋巴瘤细胞株 MML-1 (MML-1 是增殖非常活跃的 B 淋巴瘤细胞,S 期和 G₂/M 期细胞约占 2/3) 凋亡, 通过佛波醇 - 12 - 肉豆蔻酯 - 13 - 乙酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 阻断 MML-1 细胞在 G₁ 早期^[5], 采用 Western blotting 技术检测阻断细胞周期前后凋亡相关蛋白的表达, 探讨细胞凋亡与细胞周期的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

B 淋巴瘤细胞株 MML-1 (日本三重大学小儿科驹田美弘教授馈赠), 添加含 10% 灭活牛血清的 RPMI-1640 培养液后, 置 37 ℃ 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 每 5 d 更换 1 次培养液。抗 Fas 单克隆抗体 (CH-11) 和 MEBCYTO[®] Apoptosis Kit (MBL); FITC-active caspase-3 抗体和 PE - 山羊抗鼠抗体(二抗) (BD Pharmingen); APO LOGIXTM Carboxyfluorescein caspase8 试剂盒 (Cell Technology); PMA (Sigma); 抗 caspase-3 抗体 (clone: 19, ImmunoTech); 抗 caspase-8 抗体 (clone: 5F7, MBL); 抗 Actin 抗体 (Sigma); 抗 FLIP 抗体 (clone: G-11, Santa Cruz); 抗 Akt 抗体 (Cell Signaling); 抗 Bcl-2 抗体 (Santa Cruz); 羊抗鼠二抗 (GE Healthcare)。

1.2 方法

1.2.1 细胞凋亡率检测 MML-1 细胞计数并定容为 1×10^5 个/mL。取 2 mL (每支试管 2×10^5 个细胞) 细胞, 以抗 Fas 抗体 (终质量浓度 50 ng/mL) 于 37 ℃ 条件下孵育 0、2、4、6 h 诱导细胞凋亡, $900 \times g$ 离心 5 min, 去上清液。以 Annexin V-FITC 和 PI 分别对细胞膜和断裂 DNA 进行染色, 操作方法参照 MEBCYTO[®] Apoptosis Kit 说明书。流式细胞仪 (Becton Dickinson) 检测 10 000 个细胞 Annexin V 的表达量。所得数据采用 CELL-Quest 软件 (Becton Dickinson) 进行分析, 以 Annexin V 阳性率表示 MML-1 细胞凋亡率。

1.2.2 细胞 DNA 含量和活化 caspase-3 的双染色分析 抗 Fas 抗体诱导细胞凋亡, 方法同 1.2.1。加冰冷 PBS (4 mL) 洗涤细胞 1 次, 离心后去上清液; 添加 20 μL FITC-active caspase-3 和 100 μL PI-Triton X, 于室温下暗处共孵育 15 min; PBS (4 mL) 洗涤 1 次, 以 500 μL FACScan 液混匀后上流式细胞仪检测 50 000 个细胞活化 caspase-3 的表达量。所得数据采用 CELL-Quest 软件分析。

1.2.3 细胞 DNA 含量和活化 caspase-8 的双染色分析 抗 Fas 抗体诱导细胞凋亡, 方法同 1.2.1。加冰冷 PBS (4 mL) 洗涤细胞 1 次, 离心后去上清液; 添加 10 μL FAM-peptide8-FMK 于 37 ℃ 下暗处共孵育 60 min, 再与 100 μL PI-Triton X 于室温下暗处共孵育 15 min; PBS (4 mL) 洗涤 1 次, 以 500 μL FACScan 液混匀后上流式细胞仪检测 50 000 个细胞活化 caspase-8 的表达量。所得数据采用 CELL-Quest 软件分析。

1.2.4 PMA 阻断 MML-1 细胞周期 PMA 具有细胞毒性, 预实验表明 10 nmol/L 的 PMA 细胞毒性最小。PMA 阻断 MML-1 细胞在 G₁ 期呈时间依赖性, 10 nmol/L PMA 预处理 MML-1 细胞 4 h 和 6 h 的 G₁ 期细胞百分比分别是 28.6% 和 32.4%。采用 10 nmol/L PMA 预处理 MML-1 细胞 24 h, 取 2 mL (每支试管 2×10^5 个细胞) 细胞, $900 \times g$ 离心 5 min, 去上清液; 加冰冷 PBS (4 mL) 洗涤细胞 1 次, 离心后去上清液; 添加 100 μL PI-Triton X, 于室温下暗处共孵育 15 min; 以 500 μL FACScan 液混匀后上流式细胞仪检测 50 000 个细胞的 DNA 含量。所得数据采用 CELL-Quest 软件分析。

1.2.5 Western blotting 检测 G₁ 期细胞中凋亡相关蛋白的表达 收集细胞 (1×10^7), 加冰冷 PBS (4 mL) 洗涤细胞 1 次, $1000 \times g$ 离心 5 min 后去上清液; 添加细胞裂解液 (20 mmol/L HEPES, pH7.9, 10 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L EDTA, 10% 甘油, 0.5 mmol/L PMSF, 1 μg/mL aprotinin, 1 μg/mL pepstatin, 1 μg/mL leupeptin, 1 mmol/L DTT), 加 0.2% NP-40 溶液 4 ℃ 裂解 5 min; 然后 4 ℃ 离心 ($8000 \times g$) 10 s, 收集上清液; 用 Total Protein Assays 定量蛋白后上样 (30 μg/lane)。10% SDS 凝胶电泳, 醋酸纤维膜 200 mA 转膜 2 h; 抗 caspase-3 (1:1 000), 抗 caspase-8 (1:1 000), 抗 Bcl-2 (1:200), 抗 FLIP (1:200), 抗 Akt (1:1 000) 或抗 actin (1:1 000) 4 ℃ 孵育过夜; 0.05% PBST 洗涤 3 次后, HRP 抗鼠 IgG 或抗兔抗体 (1:1 000) 室温下孵育; 0.05% PBST 洗涤 3 次后行 ECL 检测。

2 结果

2.1 MML-1 细胞凋亡率

PMA 预处理前, 抗 Fas 抗体诱导 6 h 后 MML-1 细胞凋亡率为 56%。经 PMA 预处理 24 h, 抗 Fas 抗体诱导 4 h 后的 MML-1 细胞凋亡率为 11.7%, 诱导 6 h 后的 MML-1 细胞凋亡率为 14% (图 1)。

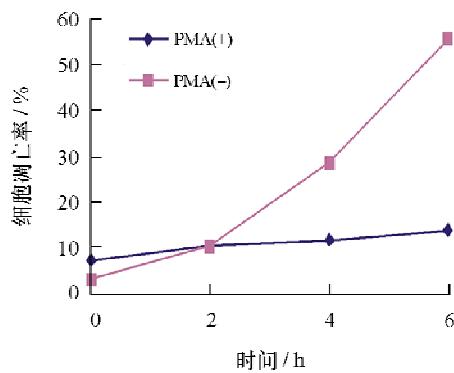


图 1 PMA 处理前后不同时间点 MML-1 细胞凋亡率

Fig 1 Apoptosis rates of MML-1 cells treated with or without PMA at different time points

2.2 MML-1 细胞周期的变化

PMA 预处理 MML-1 细胞 24 h 后, G₁期细胞比例显著升高, 达 93.77%; S 期和 G₂/M 期 MML-1 细胞仅占约 6% (图 2)。

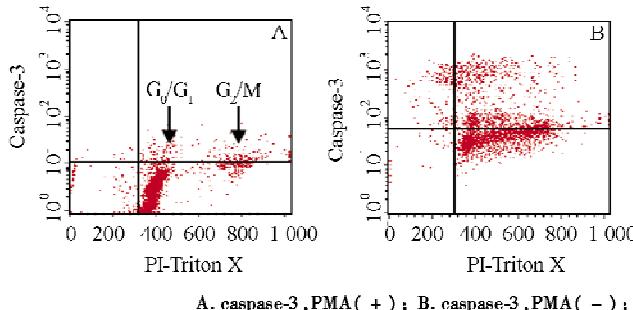


图 2 PMA 处理前后 MML-1 细胞周期变化

Fig 2 Cell cycle before and after PMA treatment

2.3 活化 caspase-3/8 在 G₁期 MML-1 细胞中的表达
经 PMA 预处理, 流式细胞术检测发现抗 Fas 抗体诱导 4 h 后, 活化 caspase-3 和 caspase-8 的表达受到显著抑制 (图 3)。抗 Fas 抗体分别诱导 2、4 和 6 h 后, Western blotting 检测显示活化 caspase-3 和 caspase-8 蛋白的表达受到抑制 (图 4)。

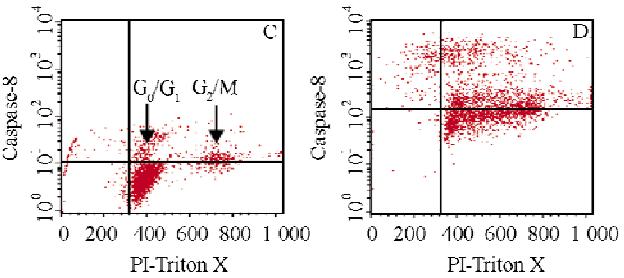
图 3 流式细胞术检测活化 caspase-3/8 在 G₁期 MML-1 细胞中的表达

Fig 3 Expression of active caspase-3/8 in MML-1 cells of G₁ phase detected by flow cytometry

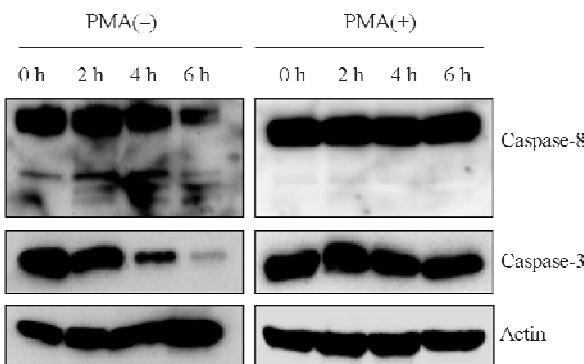
图 4 Western blotting 检测 G₁期 MML-1 细胞活化 caspase-3/8 蛋白表达

Fig 4 Expression of active caspase-3/8 protein in MML-1 cells of G₁ phase detected by Western blotting

2.4 G₁期细胞中凋亡相关蛋白的表达

Western blotting 检测 MML-1 细胞被阻断在 G₁期后凋亡相关蛋白的表达, 结果显示: caspase-3、caspase-8、FLIP 和 Akt 蛋白的表达没有显著变化, G₁期细胞中凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达上调 (图 5)。

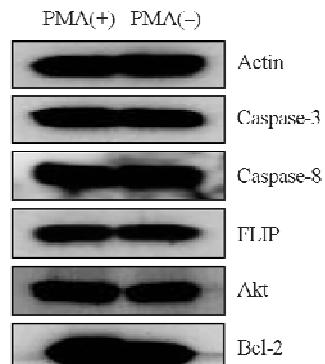
图 5 Western blotting 检测 G₁期 MML-1 细胞凋亡相关蛋白表达

Fig 5 Expression of apoptosis related protein in MML-1 cells of G₁ phase detected by Western blotting

3 讨 论

越来越多的研究^[1-6]表明, 不同的细胞亚期对于细胞凋亡的敏感性存在差异。G₁后期/S 早期对 Fas 诱导的细胞凋亡敏感性最高; G₁后期可能是 Fas 诱导细胞凋亡的窗口期, 这可能与 G₁期细胞内凋亡的促

进分子和抑制分子的表达平衡有关。PMA 阻断细胞在 G₁早期,本研究通过 PMA 阻断细胞在 G₁亚期,获得高纯度 G₁期细胞,高达 93.77%;且因 PMA 毒性作用引起的细胞死亡率较低,实验可信度高。

Fas 凋亡信号转导通路中的上游 caspase-8 和通过线粒体依赖或不依赖的信号转导通路活化的下游效应分子 caspase-3 是细胞凋亡两大重要 caspase 分子。通过流式细胞仪和 Western blotting 技术检测 caspase-3/8 分子发现,细胞阻断在 G₁期后 caspase-3/8 分子的活化受到明显抑制。Caspase-8 的抑制分子——FLIP (Fas 相关死亡域样白介素 1 β 转换酶抑制蛋白) 的表达与细胞周期关系密切;在细胞从 G₁后期到 S 期的过程中,FLIP 的表达量逐渐降低。活化的 T 细胞高表达 FLIP,当细胞从 G₁期过渡到 S 期时,FLIP 的表达迅速降低^[8]。推测凋亡信号通路上游分子 caspase-8 易被活化,导致细胞凋亡敏感性增高。本研究中,并没有发现 FLIP 在 G₁期细胞内的表达发生明显变化,可能是因为 PMA 阻断 MML-1 细胞在 G₁早期而非 G₁后期。Bcl-2 是 caspase-3 和 caspase-8 的活化抑制分子,在记忆 T 细胞中表达较高,在效应 T 细胞中表达较低,推测可能与 AICD 有关^[9-10]。采用 Western blotting 技术检测 G₁期细胞的胞质蛋白发现,caspase-3/8、FLIP、Akt 分子没有明显变化,细胞凋亡抑制分子 Bcl-2 的表达明显上调,推测 Bcl-2 的表达上调可能是 G₁期细胞对 Fas 凋亡敏感性降低的原因之一。

【参考文献】

- [1] 杨长永,谢大兴,周毅,等.膜受体介导的细胞凋亡与细胞周期的关系[J].癌症,2006,25(5):576-581.
- [2] Li QS, Tanaka S, Kisenge RR, et al. Activation-induced T cell death occurs at G₁A phase of the cell cycle[J]. Eur J Immunol, 2000, 30(11): 3329-3337.
- [3] 胡静,何小军,冯永东,等.正常人外周血淋巴细胞凋亡受体的表达与细胞凋亡的关系[J].中国实验血液学杂志,2007,15(3):533-536.
- [4] Feng Y, Wu J, Feng X, et al. Timing of apoptosis onset depends on cell cycle progression in peripheral blood lymphocytes and lymphocytic leukemia cells[J]. Oncol Rep, 2007, 17(6): 1437-1444.
- [5] Komada Y, Zhou YW, Zhang XL, et al. Fas receptor (CD95)-mediated apoptosis is induced in leukemic cells entering G1B compartment of the cell cycle[J]. Blood, 1995, 86(10): 3848-3860.
- [6] Li Y, Dida F, Iwao A, Deguchi T, et al. Cell cycle dependency of caspase activation in Fas-induced apoptosis in leukemia cells[J]. Cancer Sci, 2007, 98(8): 1174-1183.
- [7] 林萍,吴伟岚,卫敏江,等. Fas 诱导 MML-1 凋亡时活化 caspase-3 表达与细胞周期的关系[J].上海交通大学学报:医学版,2010,30(2):125-128.
- [8] Algeciras-Schimmin A, Griffith TS, Lynch DH, et al. Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis[J]. J Immunol, 1999, 162(9): 5205-5211.
- [9] Rion C, Dumont AR, Yassine-Diab B, et al. IL-4 influences the differentiation and the susceptibility to activation-induced cell death of human naive CD8⁺ T cells[J]. Int Immunopharmacol, 2006, 18(6): 827-835.
- [10] Wojciechowski S, Tripathi P, Bourdeau T, et al. Bim/Bcl-2 balance is critical for maintaining naive and memory T cell homeostasis [J]. J Exp Med, 2007, 204(7): 1665-1675.

【收稿日期】 2010-11-17

【本文编辑】 吴洋