

bcl-2 对 IL-1 和 TNF α 表达的调节作用初探

何凤田 朱锡华 黄云辉

(第三军医大学免疫学教研室, 重庆 400038)

摘要 通过将反义 bcl-2 基因转染于 U937 细胞, 建立了 Bcl-2 蛋白表达受抑的 U937 细胞模型, 证实了模型细胞的增殖和存活表型无明显变化. 放线菌素 D-结晶紫试验和 ELISA 检测表明模型细胞上清中 TNF α 的活性和含量无明显变化, 小鼠胸腺细胞增殖试验表明模型细胞上清中 IL-1 活性升高, 提示 bcl-2 的表达对 TNF α 的表达无明显影响, 但可能在一定程度上抑制了 IL-1 的表达或活性. 探讨 bcl-2 对细胞因子表达的调节作用, 为其作用机制的研究积累了有益资料.

关键词 bcl-2, U937 细胞系, 白细胞介素-1, 肿瘤坏死因子

学科分类号 R392.11, Q253

bcl-2 作为一种重要凋亡调控基因, 与机体的多种生理和病理过程有关, 但其作用机制尚不十分清楚. 目前, 关于 bcl-2 与细胞因子间相互表达调节的研究受到诸多学者的重视. 现已证实, bcl-2 的表达可受到多种细胞因子的调节^[1,2], 也有人推测 bcl-2 可能也参与调节某些细胞因子的表达, 但尚未见明确报道^[3]. U937 细胞是一单核白血病细胞系, 能中等水平表达 bcl-2, 能够分泌白细胞介素 1 (IL-1) 和肿瘤坏死因子 α (TNF α) 等多种细胞因子; 且我们在最近研究中发现, 单独 bcl-2 反义寡脱氧核苷酸虽能有效抑制 Bcl-2 蛋白表达, 但对细胞增殖和存活表型无明显影响^[4]. 基于以上情况, 本文将反义 bcl-2 基因转染于 U937 细胞, 建立了 Bcl-2 蛋白表达受抑的 U937 细胞模型, 观察了模型细胞表达 IL-1 和 TNF α 水平的变化, 从一个侧面初步探讨了 bcl-2 对这两种细胞因子表达的调节作用, 为 bcl-2 作用机制的研究积累了资料.

1 材料与方法

1.1 Bcl-2 表达受抑的 U937 细胞模型的建立

用电穿孔法将反义 bcl-2 基因表达载体 pLXSN/as-bcl2 (本室构建)^[5] 转染于 PA317 包装细胞, 筛选出 G418 抗性克隆, 扩增培养, 收集上清, 利用 NIH/3T3 细胞测定病毒滴度. 用高滴度病毒上清与 U937 细胞共培养 20 h 后, 以有限稀释法筛选出 G418 抗性克隆, 命名为 U937/as-bcl2. 同法筛选出含空载体 pLXSN 的 U937 细胞, 命名为 U937/neo. 随机选 4 个 U937/as-bcl2 细胞克隆和一个 U937/neo 克隆, 参照文献 [6], 利用流式

细胞技术检测 Bcl-2 特异的细胞平均荧光强度 (MIF). 实验以 U937 细胞作对照, 计算 U937/as-bcl2 和 U937/neo 细胞的 MIF 与对照细胞 MIF 的比值. 最后选出 Bcl-2 表达受抑程度最高的一个 U937/as-bcl2 克隆作为模型细胞进行后续实验.

为了观察模型细胞的一般生长特性, 将 U937/as-bcl2、U937/neo 和 U937 细胞均调成 1×10^5 /ml 悬液, 接种于 96 孔板, 0.2 ml/孔. 然后连续 6 d, 每隔 24 h 取细胞经台盼蓝染色后计数, 绘制细胞的时间变化曲线, 计算存活细胞百分率. 实验设三个平行孔, 取其平均值.

1.2 U937/as-bcl2 细胞分泌 TNF α 水平测定

将各细胞调成 5×10^5 /ml, 加入十四烷酰佛波醇乙酯 (PMA, 12 μ g/L) 培养约 10 h, 离心洗涤后, 重悬调至 1×10^6 /ml, 加入脂多糖 (LPS, 10 mg/L) 和 PMA (12 μ g/L), 混匀培养 24 h, 离心取上清, 采用放线菌素 D-结晶紫法测定 TNF α 活性^[7], 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定 TNF α 含量.

1.3 U937/as-bcl2 细胞分泌的 IL-1 活性测定

将三种细胞洗涤后调至 5×10^5 /ml, 加入终浓度为 10 mg/L 的 LPS, 培养 48 h 后, 离心收集上清, 采用小鼠胸腺细胞增殖试验 (以 ³H-TdR 掺入量为指标) 检测 IL-1 活性.

2 结果

2.1 模型细胞 Bcl-2 水平及其一般生长特性

流式细胞仪分析结果如下: 四个克隆来源的

U937/as-bcl2 细胞的 MIF 分别为对照细胞 MIF 的 65.4%、58.1%、46.3% 和 42.8% ($P < 0.05$, 用最后一个克隆作为模型细胞进行后续实验); 而 U937/neo 细胞的 MIF 为对照细胞 MIF 的 100.4% ($P > 0.05$). 这一结果表明反义 bcl2 基因转染可明显抑制 Bcl2 的表达.

与文献 [4] 的结果相类似, U937/as-bcl2、U937/neo 和 U937 细胞在各时相点的细胞数及存活率间均无明显差异 ($P > 0.05$), 表明在 U937 细胞, 单独反义 bcl2 基因转染虽能明显抑制 Bcl2 的表达, 但对细胞增殖和存活表型无明显影响.

2.2 模型细胞表达 TNF α 和 IL-1 水平的变化

如表 1 所示: TNF α 的活性和含量在各细胞上清间均无明显差异 ($P > 0.05$); 如表 2 所示: U937/as-bcl2 细胞上清中 IL-1 的活性(以 cpm 值表示)明显高于 U937 和 U937/neo 细胞者 ($P < 0.05$), 而后两者间 IL-1 的活性无明显差别 ($P > 0.05$).

表 1 各细胞培养上清中 TNF α 活性和含量比较

上清	TNF α 活性/ $U \cdot ml^{-1}$	TNF α 含量/ $\mu g \cdot L^{-1}$
U937	420.8 \pm 28.9	98.62 \pm 8.1
U937/neo	400.2 \pm 14.8	93.93 \pm 5.6
U937/as-bcl2	410.6 \pm 15.6	95.32 \pm 4.5

表 2 各细胞培养上清中 IL-1 相对活性比较

上清	IL-1 活性/cpm
U937	12584.7 \pm 1159.6
U937/neo	13102.2 \pm 1215.1
U937/as-bcl2	16725.3 \pm 1324.5 ¹⁾

¹⁾ $P < 0.05$.

3 讨 论

诸多研究表明, bcl2 的表达可受到 IL-2、IL-4、IL-7、IL-10 和 TNF α 等多种细胞因子的调节^[1,2], 但关于 bcl2 是否参与调节细胞因子的表达和分泌仅有一些推测, 尚未见明确报道, 如: 有人推测, 在 T 淋巴细胞发育的成熟阶段, bcl2 可能对某些细胞因子分泌及细胞增殖有促进作用^[3]. 可见, 探讨 bcl2 对细胞因子表达的调节作用, 将有助于 bcl2 作用机制的阐明. 为此, 本文将反义 bcl2 基因导入 U937 细胞, 建立了 Bcl2 表达受抑的 U937 细胞模型, 并证实了模型细胞的增殖和存活表型无明显变化, 从而使影响本实验的因素变得单一. 在此基础上, 对模型细胞分泌 TNF α 和 IL-1

的水平或活性进行了测定, 结果表明, Bcl2 表达受抑对 TNF α 的表达水平或活性无明显影响, 但可使 IL-1 的活性升高. 提示在 U937 细胞, Bcl2 的表达可能在一定程度上抑制了 IL-1 的表达或活性. 至于其具体机制, 尚有待进一步研究.

参 考 文 献

- Miyazaki T, Liu Z-J, Kawahara A, *et al.* Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell*, 1995, **81** (2): 223~231
- May W S, Tyler P G, Ito T, *et al.* Interleukin-3 and bryostatins-1 mediate hyperphosphorylation of BCL2 alpha in association with suppression of apoptosis. *J Biol Chem*, 1994, **269** (43): 26865~26870
- Nunez G, Merino R, Grillot D, *et al.* Bcl2 and Bcl-x: regulatory switches for lymphoid death and survival. *Immunol Today*, 1994, **15** (12): 582~588
- 何凤田, 黄云辉, 朱锡华 (He F T, Huang Y H, Zhu X H). 反义 bcl2 寡脱氧核苷酸对 U937 细胞增殖和存活能力的影响. *免疫学杂志 (Immun J)*, 1998, **14** (2): 91~93
- 何凤田, 朱锡华 (He F T, Zhu X H). 人类 bcl2 cDNA 在 NIH/3T3 细胞中的表达. *免疫学杂志 (Immun J)*, 1997, **13** (4): 227~229
- Keith F J, Bradbury D A, Zhu Y-M, *et al.* Inhibition of bcl2 with antisense oligonucleotides induces apoptosis and increases the sensitivity of AML blasts to Ara-C. *Leukemia*, 1995, **9** (1): 131~138
- Flick D A, Gifford G E. Comparison of *in vitro* cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods*, 1984, **68** (1~2): 167~175

Primary Study on the Regulation of IL-1 and TNF α Expression by bcl-2. HE Feng-Tian, ZHU Xi-Hua, HUANG Yun-Hui (*Department of Immunology, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China*).

Abstract A U937 cell model, in which Bcl2 expression was suppressed, was established by transferring antisense bcl2 gene into U937 cell. The model cell had normal growth and survival. Crystal violet assay with actinomycin D and ELISA indicated that the activity and concentration of TNF α in the model cell supernatant had no change, but mouse thymocyte proliferation assay revealed that IL-1 activity increased in the supernatant significantly. The results suggested that Bcl2 expression has no effect on TNF α production and its activity, but it may suppress the expression or activity of IL-1. The study on the regulation of IL-1 and TNF α expression by bcl2 may provide some beneficial data for elucidating the mechanism of bcl2 action.

Key words bcl2, U937 cell line, interleukin-1, tumor necrosis factor