

IL-6 影响骨髓基质细胞凋亡机理的初步探讨

李楠 林旭 王和鸣 郑良朴 林一萍 沈霖 周琳瑛 钟秀容 林芳

摘要: **目的** 通过观察 IL-6 对体外培养骨髓基质细胞凋亡的影响,探讨骨髓基质细胞凋亡的机理。**方法** 取 1 月龄 SD 大鼠的骨髓基质细胞进行体外培养,通过透射电子显微镜观察、bax、bcl-2 蛋白免疫组化染色、流式细胞仪检测凋亡细胞周期变化及线粒体跨膜电位改变、RT-PCR 法检测凋亡细胞 bax、bcl-2 mRNA 表达等指标进行观察。**结果** IL-6 组细胞 G1 期、凋亡率和线粒体膜电位改变均非常显著高于对照组;随着诱导时间的延长,Bcl-2 mRNA 表达呈逐渐下降趋势,BaxmRNA 表达呈逐渐升高趋势。Bcl-2/Bax:随着诱导时间的延长呈下降趋势。**结论** IL-6 使大量细胞停留在 G1 期,阻滞细胞进入 S 期,使 DNA 合成受阻;IL-6 促进凋亡的作用是通过 1 促进 bax 从胞浆中移至线粒体膜上而使 bax 在与 bcl-2 形成的异二聚体中占据优势来促进线粒体上的 PT 孔道开放,使内膜离子通道改变,线粒体内膜电位下降或丧失,导致 Cyto c 等蛋白的释放来调节细胞凋亡。

关键词: 骨质疏松/药物作用;骨髓基质细胞;凋亡;线粒体膜电位; bcl-2; bax

Mechanism of IL-6 influencing apoptosis of marrow stromal cells cultured *in vitro* LI Nan*, LIN Xu, WANG Heming, et al. * Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China

Abstract: Objective To investigating at the mechanism of the effect of IL-6 on apoptosis of marrow stromal cells *in vitro*. **Methods** Marrow stromal cells were separated from the extremities of 30-day SD rats *in vitro*. Cell ultra-structure was observed, flow cytometry was used for studying apoptotic cell cycle and mitochondrion membrane potential changes, immunohisto-chemistry for bcl-2 and bax protein, and RT-PCR for bax and bcl-2 mRNA expression of apoptotic cells. **Results** Cell cycle G1, rate of apoptosis, and mitochondrion membrane potential in IL-6 group were significantly higher than in control group. along with prolonging induction time, the expression of Bcl-2 mRNA gradually declined, and bax mRNA increased contrarily. **Conclusions** IL-6 increases the cells that are blocked at G1, stopping them from composing DNA. It promotes apoptosis by faciditating the transfer of bax protein from cyto plasm to mitochondrial membrane so that bax predominates in the dimer formed by bax and bcl-2; precipitating opening of permeability transforming pores of mitochondria, change in channels of nito chondrial, inner membrane and dropor loss of mitochondrial membrane potential, leading to relense of cyto c and other profeins to regnlate cell apoptosis.

Key words: Osteoporosis; Pharmacologic action; Bone marrow stromal cells; Apoptosis; Mitochondria; Membrane potential; Bcl-2; Bax

骨质疏松严重威胁老年人身体健康,由此而引起的骨折会给家庭和社会带来沉重的精神和经济负担。目前治疗骨质疏松的药物虽很多,但均存在着不同程度的问题或副作用。治疗骨质疏松尚缺乏令医患双方均满意的方法。造成此种情况的原因之一

是对骨质疏松的发病机制尚不清楚。近 10 年来,随着分子生物学的不断发展,人们对骨质疏松症有了进一步的认识。骨系细胞的凋亡及其调控在骨质疏松的病理机制、预防和治疗中起着重要作用。本研究通过透射电镜、流式细胞术和 RT-PCR 等方法,探讨大鼠骨髓基质细胞(MSC)凋亡与细胞周期和线粒体膜电位改变的关系、bcl-2/bax 与 MSC 凋亡的影响,阐述凋亡基因在 MSC 凋亡过程中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂: IL-6(Sigma)、兔抗人 Bax、Bcl-2 一抗

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271630);福建省卫生厅基金资助项目(2002-201)

作者单位:350003 福建中医学院(李楠、王和鸣、郑良朴、林一萍);武汉华中理工大学附属协和医院(沈霖);福建医科大学(林旭、周琳瑛、钟秀容);福建省协和医院血液病研究所(林芳)

通讯作者:ShenLihb@Yahoo.com.cn

(Santa Cruz)、ABC 试剂盒 (Vector)、浓缩型 DAB 试剂盒 (北京中山)、细胞凋亡线粒体流式检测试剂盒 (BioVision)、bax、bcl-2、 β -actin 上下游引物 (上海博亚)、Trizol reagent (Invitrogen)、Titan One Tube RT-PCR System (Roche)。

1.2 实验方法与步骤

1.2.1 取材:取 1 月龄 SD 大鼠的股骨和胫骨,切去骺软骨,暴露骨髓腔,注射器吸取含 15% 新生牛血清 (NCS) 的 α -MEM 反复冲洗,离心,培养液反复吹打制成细胞悬液,调整有核细胞数为 2×10^5 个/ml 接种于 250 ml 培养瓶中,置二氧化碳培养箱中培养。72 h 后半量换液,至细胞汇合成单层,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,吹打混匀,重新接种于培养瓶中。重复以上操作,取 2 代细胞计数有核细胞,调整细胞浓度为 5×10^5 /ml,进行实验。

1.2.2 分组:对照组仅加 5% NCS 的 α -MEM, IL-6 诱导组分别加入 10^{-4} M 的 IL-6。

1.2.3 透射电子显微镜观察^[1]。

1.2.4 bax、bcl-2 蛋白免疫组化染色:以 2 ml/孔加入 6 孔培养板,培养 1 d 后分为两组。24 h 后按 ABC 试剂盒说明书进行染色。

1.2.5 流式细胞仪 (FCM) 检测凋亡细胞周期变化:以 5 ml/瓶加入 50 ml 培养瓶,培养 1 d 后分为两组,分别培养 48 h 后在紫外激光检测记录 400 ~ 500 nm 处蓝色荧光和大于 630 nm 处红色荧光。观察凋亡细胞的亚 G1 峰,并测定所占细胞的百分数。

1.2.6 FCM 检测 MSC 线粒体跨膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 改变:以 5 ml/瓶加入 50 ml 培养瓶,培养 1 d 后分为两组,24 和 48 h 后按线粒体检测试剂盒说明书进行。

1.2.7 凋亡 MSC bax、bcl-2 mRNA 表达:以 5 ml/瓶加入 50 ml 培养瓶,培养 1 d 后分为两组,分别培养 24、48 和 72 d 后按以下步骤操作:

按美国 Invitrogen 公司提供的 Trizol Reagent 说明书抽提总 RNA, 根据 Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 查找大鼠 bax、bcl-2 cDNA 序列,应用 oligo 5.0 软件程序设计 bax、bcl-2 有意义引物序列;另设计 1 个特定竞争性内参照 β -actin。Bax、bcl-2、 β -actin 上、下游引物序列分别为:

Bax: 59 CACCAAGAAGCTGAGCGAGTG 276
TAGTGCACAGCCTTGAGC

bcl-2: 382 TCCTTCCAGCCTGAGAGCA 784 TGT-GCAGATGCCGGTTCA

β -actin: 185 GAGGCATCCTGACCCTGAAG 459
CATCACAATGCCAGTGCTACG

RT-PCR, 2% 琼脂糖凝胶电泳, BIO-RAD 凝胶成像系统观察结果,应用 BIO-RAD 公司 Quantitation 软件 Quantity one 比较基因 bax、bcl-2 与 β -actin 的相对表达量。

2 结果

2.1 透射电子显微镜观察

IL-6 作用 24 h 后细胞绒毛变细、脱落,细胞膜局部破裂,胞浆浓缩并出现空泡,粗面内质网扩张,线粒体肿胀,细胞核内出现染色质呈颗粒、块状凝集,集聚在核膜边缘,呈环状小体,核膜不规则等凋亡的早期表现 (图 1)。



图 1 IL-6 诱导 24 h 的凋亡 MSC (透射电镜 6000 $\times$)

IL-6 作用 48 h 后多数细胞微绒毛消失,胞浆内出现大量空泡以及大量溶酶体,内质网变疏松,细胞核可见核仁消失,凋亡后期的细胞内的核碎片凝集成凋亡小体 (图 2),偶可见死亡细胞。

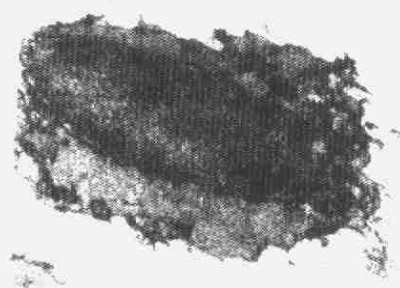


图 2 IL-6 诱导 48 h 的凋亡 MSC (透射电镜 7000 $\times$)

2.2 bax、bcl-2 蛋白免疫组化染色观察

对照组 MSC 的 bcl-2 蛋白呈棕色的阳性表达 (图 3), IL-6 诱导组 MSC 的 bax 蛋白呈阳性表达 (图 4)。

2.3 凋亡细胞周期变化 FCM 检测

表 1 不同处理组对 MSC 细胞周期和凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数 (n)	G1	G2	S	凋亡率
对照组	6	57.27 $\pm$ 2.38	11.17 $\pm$ 3.32	31.61 $\pm$ 2.15	0
IL-6 组	6	82.76 $\pm$ 4.90*	10.98 $\pm$ 4.49	6.26 $\pm$ 1.26	37.07 $\pm$ 2.81

注:与对照组比较 * $P < 0.01$

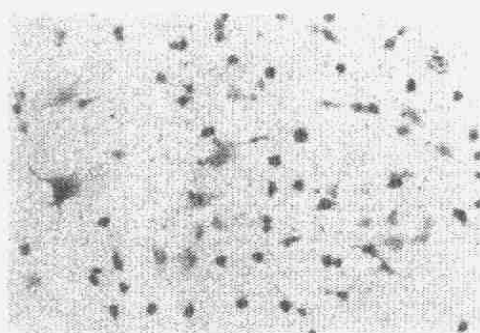


图3 对照组 bcl-2 染色阳性(100×)

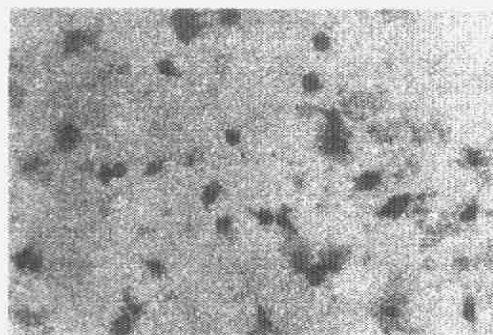


图4 IL-6 组 bax 染色阳性(100×)

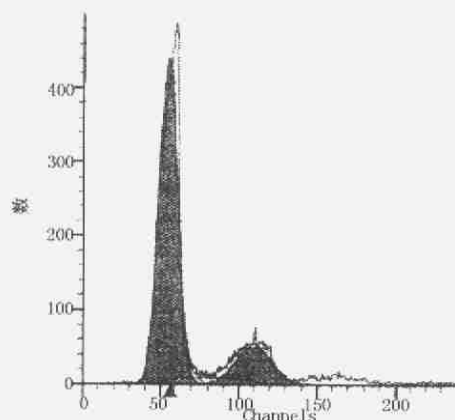


图5 对照组 FCM 检测无凋亡峰

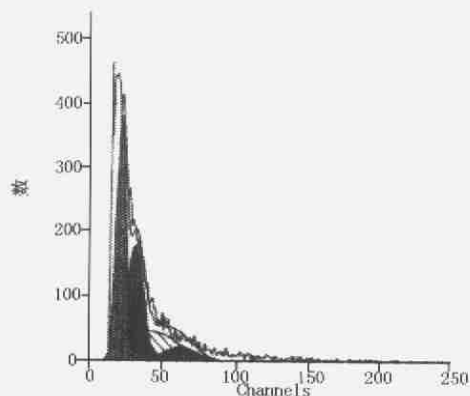


图6 IL-6 组 24 h 可见蓝色陡立的凋亡峰

图 5、6 显示:对照组流式细胞术检测无亚 G1 峰,IL-6 组在 G1 期前出现一陡立的凋亡峰。

表 1 显示,G1 期:IL-6 组 48 h 后平均为 $(82.76 \pm 4.90)\%$,与对照组 $(57.27 \pm 2.38)\%$ 比较差异有非常显著性;S 期:IL-6 为 $(6.26 \pm 1.26)\%$,与对照组 $(31.61 \pm 2.15)\%$ 比较具有非常显著的下降;凋亡率:对照组为 0,IL-6 诱导组为 $(37.07 \pm 2.81)\%$ 。

2.4 FCM 检测 MSC $\Delta\Psi_m$ 改变结果

表 2 不同处理组对 MSC $\Delta\Psi_m$ 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (n)	FITC(+)	细胞百分率(%)
		24 h	48 h
对照组	5	0.58 ± 0.16	
IL-6 组	5	$6.91 \pm 0.45^*$	$62.79 \pm 1.48^*$

注:与对照组比较 * $P < 0.01$;与 IL-6 诱导组 24 h 比较 * $P < 0.01$

表 2 显示: 10^{-4} M IL-6 诱导 MSC 24 h,FITC(+) 细胞百分率为 6.91 ± 0.45 ,与对照组比较有非常显著增高($P < 0.01$);48 h FITC(+) 细胞百分率迅速升高到 62.79 ± 1.48 。提示 MSC 在 IL-6 诱导下,发生调亡的线粒体改变,PT 孔道开放, $\Delta\Psi_m$ 下降。随 IL-6 作用时间延长而呈现增高趋势。

2.5 凋亡 MSC bax、bcl-2mRNA 表达检测结果

表 3 不同处理组 MSC 不同时间内 bax、bcl-2mRNA 的相对表达量

分组	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
对照组	0.2274	0.1	2.274
诱导组			
1d	0.0827	0.3323	0.2489
2d	0.0593	0.6216	0.0954
3d	0.0391	0.6322	0.0619

表 3 显示:IL-6 诱导组在 MSC 凋亡 1、2、3 d 3 个时间点 Bcl-2mRNA 表达呈逐渐下降趋势,Bax mRNA 表达呈逐渐升高趋势。Bcl-2/Bax:随着诱导时间的延长呈下降趋势。

3 讨论

3.1 IL-6 对 MSC 凋亡细胞周期的影响

细胞周期中 G1 期为 DNA 和蛋白质合成的准备阶段,DNA 复制和组蛋白的合成在 S 期完成。本实验流式细胞术分析显示,经 IL-6 处理的凋亡细胞大量停留于 G0/G1 期的增多,S 期明显减少,与对照组比较差异有非常显著性。凋亡细胞大量出现说明 IL-6 使大量细胞停留在 G0/G1 期,从而阻滞细胞进入 S 期,使 DNA 合成受阻,抑制细胞有丝分裂,诱导

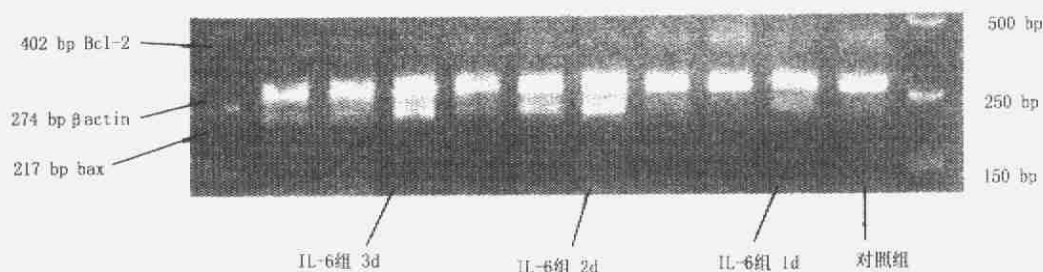


图 7 不同处理组 bax, bcl-2 mRNA 表达

细胞发生凋亡。

3.2 IL-6 对 MSC 凋亡基因 bcl-2 与 bax 的影响

细胞凋亡严格受基因控制, bcl-2 基因是在滤泡性淋巴细胞中染色体易位 t(14;18) 的断点上发现的一种原癌基因。这种易位使 bcl-2 从正常的 18q21 移至 14q32 而与免疫球蛋白重链基因位点相连, 从而导致转录激活^[2]。由此可见, bcl-2 基因位于 MSC 凋亡过程的一个重要调控点上, 可以阻断细胞死亡途径, bcl-2 表达的下调是 MSC 凋亡的分子机制之一。与膜结合的 bcl-2 蛋白主要位于核膜内质网与线粒体膜上, 它可能通过改变线粒体的功能来消除活性氧化自由基, 减少氧化损伤引起的细胞凋亡^[3,4]。bcl-2 抑制细胞凋亡在免疫调节中发挥重要作用。bax 与 bcl-2 有 45% 的同源性, 实验中它的过表达可拮抗 bcl-2 的保护效应而使细胞趋于凋亡。Bax 是一个水溶性蛋白, 存在于细胞胞浆中。

本研究结果显示, 在 IL-6 诱导 MSC 凋亡过程中, 随着 IL-6 作用时间的延长 bcl-2 的表达逐渐下降, 而 bax 的表达却逐渐上升, 提示 bcl-2 和 bax 在 IL-6 诱导的 MSC 凋亡中起着重要的作用。凋亡时 bax 从胞浆中移至线粒体膜上与线粒体膜的通透性转换孔复合体 (PTPC) 结合后, 打开膜孔, 使内膜离子通道改变, 线粒体内膜电位下降或丧失, 导致 Cyto c 等蛋白的释放来调节细胞凋亡^[5]。而 bcl-2 主要定位于线粒体膜上, 它能与 bax 形成异二聚体来调节细胞凋亡。当 bcl-2 的表达量超过 bax, 多余的 bcl-2 就形成同源二聚体而抑制细胞的凋亡; 反之, 则形成的 bax 同源二聚体促进细胞的凋亡^[6]。因此 bcl-2/bax 的比值是影响细胞凋亡的关键。

3.3 IL-6 对 MSC 凋亡线粒体膜电位改变的影响

线粒体是真核细胞的重要细胞器, 是细胞进行呼吸链、电子传递、三羧酸循环和氧化磷酸化的场所, 也是动物细胞生成 ATP 的主要地点^[7]。近年来发现线粒体跨膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 与线粒体通透性改变在细胞凋亡过程中起着重要作用^[8], 而 $\Delta\Psi_m$ 下降

是细胞凋亡级联反应中的较早事件。

近年来陆续有报道说明线粒体 $\Delta\Psi_m$ 的耗散早于核酸酶的激活, 也早于磷脂酰丝氨酸暴露于细胞表面。而一旦线粒体 $\Delta\Psi_m$ 耗散, 细胞就会进入不可逆的凋亡过程^[9]。在细胞凋亡过程中线粒体 $\Delta\Psi_m$ 耗散主要是由于线粒体内膜的通透性转变, 这是由于生成了动态的由多个蛋白质组成的, 位于线粒体内膜与外膜接触点的通透性转变孔道 (PT 孔道)。PT 孔道由线粒体各部分的蛋白质与细胞质中蛋白质联合构成, PT 孔道关闭能防止细胞凋亡; 在 PT 孔道开放时线粒体释放细胞凋亡诱导因子, 造成线粒体膜电位和生物合成破坏, 细胞的能量代谢受损, 氧化呼吸链解偶联, 线粒体内 Ca^{2+} 和谷胱甘肽释放, 基质渗透压升高, 线粒体体积扩大, 外膜破裂, 细胞内 ROS 增多, 可溶性膜间蛋白, 包括 Cyto c 释放, 激发胞质半胱氨酸蛋白酶的连锁反应, 从而激活核酸内切酶、蛋白酶, 使细胞内 Ca^{2+} 分布改变, 从而启动了凋亡^[10]。因此凡是能够专一作用于线粒体诱导 PT 孔道生成的物质, 都有可能引起细胞凋亡。

线粒体 $\Delta\Psi_m$ 下降是细胞凋亡发生的早期事件, 细胞凋亡线粒体流式检测试剂盒能敏感检测出其变化。本研究结果显示: 线粒体的 $\Delta\Psi_m$ 下降是 IL-6 诱导 MSC 凋亡的通路; IL-6 诱导 24 h, 可使 MSC 线粒体 $\Delta\Psi_m$ 显著下降; 线粒体发生 PT, 造成线粒体膜电位和生物合成破坏, 细胞的能量代谢受损, 启动细胞凋亡的细胞质途径, 使 MSC 进入不可逆性的凋亡过程; 至 48 h 线粒体 $\Delta\Psi_m$ 显著下降, 大部分细胞发生凋亡; 说明 IL-6 通过某种途径促进 PT 孔道开放诱导细胞凋亡。有研究表明, 细胞凋亡调节蛋白不论是抑制凋亡的 Bcl-2 家族, 还是促进细胞凋亡的 Bax 家族均以线粒体作为靶细胞器^[11]。Bcl-2 C 端的疏水肽段能插入线粒体外膜, bax 蛋白通过形成线粒体通透孔道, 促进线粒体中细胞色素 C 的释放, 使 APAF-1 与 bcl-2 蛋白分离, 激活 CPP32 促进细胞凋亡^[12]。因此我们认为, IL-6 促进凋亡的作用是

通过促进 bax 从胞浆中移至线粒体膜上,使 bax 在与 bcl-2 形成的异二聚体中占据优势来促进线粒体上的 PT 孔道开放,从而促进线粒体释放凋亡诱导因子造成的线粒体膜电位和生物合成的破坏,而达到促进凋亡的目的。

【参 考 文 献】

- [1] Soector DL, Goldman RD, Leinwand LA, 主编. 细胞实验指南. 北京:科学出版社,2001. 1165-1193.
- [2] 彭黎明,王曾礼,主编. 细胞凋亡的基础与临床. 北京:人民卫生出版社,2000. 23.
- [3] Hockenbery D, Oltval ZN, Yin XM, et al. Bcl-2 function in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell, 1993, 75:241.
- [4] 王媛,曾凡杰,黄晓明,等. 抗氧化剂阻抑 TNF 诱导的 U937 细胞凋亡. 肿瘤, 1999, 19:35-38.
- [5] Li PF, Dietz R, Harsdorf R. P53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome C-in-
- dependent apoptosis blocked by bcl-2. EMBO J, 1999, 18: 6027-6038.
- [6] Oltari Z, Milliman C, Korsmeyer ST. Bcl-2 heterodimers *in vivo* with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. Cell, 1993, 74:609-619.
- [7] 彭黎明,王曾礼,主编. 细胞凋亡的基础与临床. 北京:人民卫生出版社, 2000. 66-68.
- [8] Kunz-Schughart LA, Habberset RC, Freyer JP. Mitochondrial function in oncogene-transfected rat fibroblasts isolated from multicellular spheroids. Am J Physiol, 1997, 273: 1487-1495.
- [9] Osborne BA, Smith SW, Liu ZG, et al. Identification of genes induced during apoptosis in T cells. Immunol Rev, 1994, 142:301-320.
- [10] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science, 1998, 281:1309-1312.
- [11] Cheng EH, Kisch DG, Clem RT, et al. Conversion of bcl-2 to bax-like death factor by caspases. Science, 1997, 278: 1966-1968.
- [12] Read JC. Double identity for proteins of the bcl-2 family. Nature, 1997, 387 (6635): 773-776.