

· 实验研究 ·

丙烯腈对 T 淋巴细胞膜脂筏及膜蛋白 Bcl10 水平的影响

Effects of acrylonitrile on levels of lipid raft and Bcl10 protein in T lymphocytes

李秀菊¹, 黄简抒¹, 王朋¹, 周元陵¹, 范卫¹, 刘淑朋²LI Xiu-ju¹, HUANG Jian-shu¹, WANG Peng¹, ZHOU Yuan-ling¹, FAN Wei¹, LIU Shu-peng²

(1. 复旦大学附属金山医院职业病科, 上海 201508; 2. 第二军医大学, 上海 200000)

摘要: 采取体外细胞培养技术, 将 T 淋巴细胞 Jurkat 细胞株分为空白对照组和丙烯腈 (acrylonitrile, AN) 低浓度、中浓度、高浓度染毒组, AN 浓度分别为 20、100、500 $\mu\text{mol/L}$ 。采用蔗糖密度梯度低速超速离心技术对细胞膜脂筏进行分离, 利用 FACS 技术结合 β -环糊精去除脂筏内胆固醇, 并对脂筏内信号蛋白分子 Bcl10 进行分析。结果显示, 随染毒浓度增加, 各染毒组细胞膜胆固醇含量下降, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示脂筏数量越少。Bcl10 蛋白偏离脂筏正常情况下应该所在的密度层面。

关键词: 丙烯腈; T lymphocyte; 脂筏; Bcl10 蛋白

中图分类号: R992; O623.761 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2012)05-0364-02

研究表明丙烯腈 (acrylonitrile, AN) 具有多方面的毒性效应, 如在免疫毒性方面, 可有 CD4、CD8 细胞百分率及 CD4/CD8 比值明显降低, 脾脏抗体形成细胞数目减少等^[1,2]。脂筏 (lipid raft) 为富含胆固醇和鞘磷脂的细胞膜结构微区, 广泛存在于粒细胞、淋巴细胞等质膜, 是具有特殊结构与功能的局限性结构域, 参与细胞内外的物质转运、细胞信号的跨膜转导等重要的生物学功能。本研究拟以 T 淋巴细胞 Jurkat 细胞株为对象, 观察丙烯腈染毒后细胞膜脂筏及蛋白 Bcl10 水平变化, 探讨其影响跨膜转导及免疫毒性的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

T 淋巴细胞 Jurkat 细胞株由上海中科院提供, 抗神经节苷脂抗体 (GM1) ELISA 试剂盒由上海工研生物科技提供, 霍乱毒素 B 亚单位由上海爱必信生物科技有限公司提供, Vybrant 脂筏标记试剂盒 V-34404 由生命科学上海分部提供, AN (纯度 99%) 由上海金山石化股份公司提供; 激光共聚焦显微镜由第二军医大学提供。

1.2 细胞培养及染毒

Jurkat 细胞株用 RPMI-1640 培养基放于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。复苏 2~3 代后用于实验, 2~3 d 传代 1 次, 将 AN 溶于含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 使其终浓度分别为 0、20、100、500 $\mu\text{mol/L}$, 用含 AN 的培养液染毒细胞, 各染毒组染毒 4、12、24 h 后终止染毒。细胞铺入 96 孔

板, 加入 MTT 试剂 (20 μl 每孔, Promega, Madison, WI, USA), 37℃ 孵育 3 h, 检测反应细胞活性状态的 OD450 吸光度值。

1.3 脂筏分离及蛋白 Bcl10 变化

操作在冰上进行, 离心收集不同浓度 AN (浓度分别为 0、20、100、500 $\mu\text{mol/L}$) 处理的 Jurkat T 淋巴细胞 (5×10^7), 用冷 PBS 液洗 2 遍, 加入预冷的新鲜配制裂解缓冲液, 混匀, 冰上孵育 30 min, 加入 2.5 ml 预冷的含 80% 蔗糖的 MNE 缓冲液, 与裂解物混匀, 将混合后终浓度含 40% 蔗糖的细胞裂解物转移到预冷的 Dounce 玻璃匀浆器中, 冰上操作, 研磨 10 次; 将 3.2 ml 含 40% 蔗糖的裂解匀浆产物铺于 8.5 ml 的冷冻超速离心机的专用离心管底部; 上层小心的加入 3.2 ml 预冷的含 30% 蔗糖的 MNE 缓冲液; 最后用预冷的含 5% 蔗糖的 MNE 缓冲液铺于最上方, 冰上操作, 避免气泡产生。天平上配平后放入超速离心机, 4℃, 36 000 r/min, 离心 18 h。离心结束后, 从上到下小心收集 12 个不同蔗糖密度梯度的组份, 每份 1 ml, 然后做蛋白免疫印记组化分析。通过比较目的蛋白和脂筏标记、非标记蛋白的共定位情况来判定 AN 对于目的蛋白脂筏定位的影响, 条带缺如说明蛋白不在该密度层分布, 也说明 AN 处理破坏了脂筏结构, 导致脂筏标记蛋白、Bcl10 蛋白与脂筏分离。

1.4 统计学分析

采用重复测量和单因素方差分析, 应用 SPSS11.5 软件进行统计分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较用 q 检验法, 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞存活率变化

空白对照组细胞紧贴于瓶底, 折光性强, 染毒组可见圆缩漂浮的细胞。可通过 OD 值来评估细胞经过 AN 处理以后的活性状态, 说明 AN 对细胞的毒性程度。结果可见 OD450 值随染毒剂量的增加而降低, 说明 AN 染毒浓度越高, 处理时间越长, AN 对细胞的毒性越大, 各组间及与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 细胞膜胆固醇含量检测

脂筏是指细胞膜表面胆固醇富集的区域, 当脂筏遭到破坏时, 膜胆固醇的含量下降, 因此可间接反映 AN 对于脂筏的影响。

本研究中检测不同浓度 AN 处理细胞 4 h 后, 结果显示 AN 浓度越高, 胆固醇含量越低, 提示脂筏的数量越少, AN

收稿日期: 2012-03-13; 修回日期: 2012-05-31

作者简介: 李秀菊 (1981—), 女, 医师。

通讯作者: 周元陵, zhouy12000@sina.com.cn。

对脂筏的破坏程度越大, 各组间及与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见表1)。

表1 不同浓度 AN 处理细胞 4 h 后膜胆固醇含量比较

组别	胆固醇含量 ($\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值
对照组	100.00 \pm 2.21		
低浓度染毒组	79.33 \pm 4.04*	215.42	<0.05
中浓度染毒组	59.67 \pm 4.51*#		
高浓度染毒组	30.33 \pm 3.51***		

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 两两比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

2.3 Bcl10 蛋白变化

反映在结果上就是蛋白偏离脂筏正常情况下应该所在的密度层面, 染毒浓度越高, 对脂筏的破坏程度越大, 蛋白 Bcl10 亦向下位组区集中越明显, 图1显示低、中、高浓度 AN 组蛋白集中趋势呈浓度依赖性变化。

本研究中 Caveolin-1 为脂筏标记蛋白, 亦向下位组区集中, 但移位趋势未必如蛋白 Bcl10 遵循一定规律。CD71 为非标记蛋白。

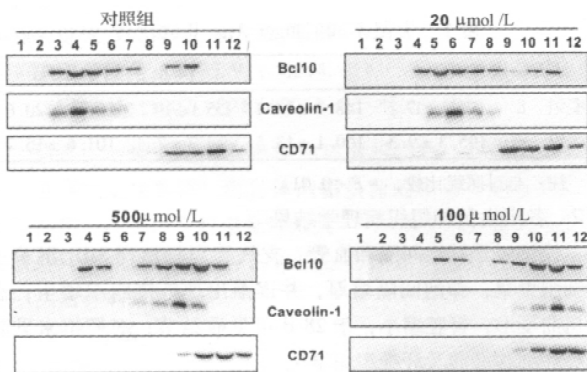


图1 不同浓度 AN 对 Jurkat 细胞上脂筏及脂筏特异性蛋白 Bcl10 的影响

3 讨论

AN 具有一定的细胞毒性, 本研究显示, 随染毒剂量的增加, 细胞存活率降低, 提示 AN 浓度越高, 对细胞的毒性越大。

目前多认为细胞膜表面的各种脂筏在细胞间接触处汇集而形成“免疫突触”, 故脂筏是免疫突触的必要组成部分^[2,3], 细胞接受抗原刺激后, 脂筏发生动态变化, 富集信号分子聚集到激发部位^[4,5]。Bcl10 是一种接头蛋白质, 如抗原受体介导的 NF- κ B 的激活及淋巴细胞的发育及功能过程中, 能触发有效的信号并向胞内传导, 促进 IL-2 的分泌^[6,7]。本研究发现, 低、中、高浓度 AN 组, 随着细胞染毒浓度的升高, 细胞膜胆固醇含量下降, 提示对脂筏的破坏程度越大,

各组间及与对照组比较差异有统计学意义, 表明染毒浓度越高, 对脂筏的破坏程度越大, AN 对脂筏的破坏呈浓度依赖性。蛋白 Bcl10 在静息的 T 细胞均匀地分布于细胞膜, 集中在脂筏的 3、4、5、6、7、9、10 组区, 随染毒浓度增加, 蛋白 Bcl10 向下位组区 8、9、10、11、12 区移位, 脂筏标记蛋白 Caveolin-1 随染毒浓度增加在脂筏的定位也向下位组区集中 (非标记蛋白 CD71 在脂筏的定位基本不变)。

本文发现 AN 破坏脂筏不影响细胞总 Bcl10 表达水平, 而是导致 Bcl10 向非筏区重新分布。文献指出同种受体在质膜上脂筏和非筏区的分布方式, 可能决定其激活不同的下游信号通路^[8], 造成这种特异性的原因可能是由于生理条件下, 在不同细胞类型中 TNFR1 在脂筏的分布不同^[9]。因此, 本研究发现的 Bcl10 蛋白重新分布, 亦可能影响其下游信号通路的激活, 使信号传导过程受到抑制或中断而发挥免疫毒性, 本课题拟进一步探讨 NF- κ B 信号通路^[9-11]/酪氨酸激酶信号传导等内容以充实此研究。

参考文献:

- [1] 张丽丽, 肖卫. 丙烯腈对 V79 细胞通透性、线粒体膜电位及超微结构的影响 [J]. 中国职业医学, 2009, 36 (1): 14-17.
- [2] Gupta N, DeFranco A L. Lipid rafts and B cell signaling [J]. Semin Cell Dev Biol, 2007, 18 (5): 616-626.
- [3] Cherukuri A, Dykstra M, Pierce S K. Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation [J]. Immunity, 2001, 14 (6): 657-660.
- [4] 王文举, 李鸿钧, 孙茂盛. 脂筏与 T 细胞信号转导 [J]. 生命科学, 2007, 19 (5): 531-535.
- [5] Humrich J Y, Morbach H, Undeutsch R. Homeostatic imbalance of regulatory and effector T cells due to IL-2 deprivation amplifies murine lupus [J]. Proc Natl Acad Sci, 2009, 14 (25): 125-128.
- [6] Yang C H, Tian L, Ling G S, et al. Immunological mechanisms and clinical implications of regulatory T cell deficiency in a systemic autoimmune disorder: roles of IL-2 versus IL-15 [J]. Eur J Immunol, 2008, 38 (6): 1664-1676.
- [7] Magge T, Pirinen N, Adler J, et al. Lipid raft: cell surface platforms for T cell signaling [J]. Biol Res, 2002, 35 (2): 127-131.
- [8] Fielding C J, Fielding P E. Membrane cholesterol and the regulation of signal transduction [J]. Biochem Soc Trans, 2004, 32: 65-69.
- [9] 焦振泉, 裴晓燕, 郭云昌, 等. 丙烯腈对大鼠脑组织和神经胶质细胞中核因子信号传导通路活性及相关基因表达的影响 [J]. 卫生研究, 2008, 37 (3): 264-268.
- [10] Wegene E, Oekinghaus A, PaPadoPoulou N, et al. Essential role for I κ B kinase beta in remodeling carmal-Bcl10-malt1 complexes upon T cell activation [J]. Mol Cell, 2006, 23: 13-23.
- [11] 刘涛, 陈克清, 张述, 等. 脂筏对跨膜型 TNF- α 信号的影响 [J]. 免疫学杂志, 2010, 26 (5): 376-380.