

# 大剂量地塞米松快速高效诱导巨噬细胞凋亡

黄行许 陈练波<sup>1)</sup> 鲍永耀<sup>1)</sup> 朴英杰<sup>1)</sup> 黄有国<sup>2)</sup>

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要** 运用透射电镜、DNA 琼脂糖凝胶电泳、流式细胞术、原位末端标记法 (TUNEL) 染色等技术, 检测了大剂量地塞米松处理小鼠腹腔巨噬细胞的各种变化。结果显示, 大剂量地塞米松处理的巨噬细胞发生胞体皱缩、染色质凝聚、胞质浓缩; TUNEL 染色呈阳性; 0.5 h 后 DNA 凝胶电泳即呈梯状条带; 流式细胞术作周期分析出现凋亡峰等明显的凋亡特征。并且随处理时间延长凋亡率升高。结果表明, 大剂量地塞米松快速、高效诱导小鼠腹腔巨噬细胞凋亡。

**关键词** 小鼠, 腹腔巨噬细胞, 凋亡, 地塞米松

**学科分类号** Q28

---

<sup>1)</sup>第一军医大学中心实验室, 广州 510515.   <sup>2)</sup>通讯联系人.

Tel : ( 010 ) 64888518 , E-mail : huang@sun5.ibp.ac.cn   收稿日期 : 1999-10-12 , 修回日期 : 2000-03-07

作为免疫调节和免疫效应细胞,巨噬细胞与细胞凋亡的密切关系首先是因其作为凋亡细胞的主要清除者而受到关注,随着对细胞凋亡研究的深入,人们发现巨噬细胞主要通过凋亡实现其生物学意义:第一、机体每天产生大约  $10^{10}$  个巨噬细胞,通过细胞凋亡机体以同样的速度清除衰老的巨噬细胞<sup>[1]</sup>;第二、巨噬细胞在清除侵入机体的病原微生物时,易感染、携带细菌、病毒、寄生虫等致病微生物,机体通过促进感染的巨噬细胞凋亡从而清除这些病原体<sup>[2]</sup>;第三、巨噬细胞经干扰素(IFN)- $\gamma$  等炎性细胞因子激活后发挥作用,同时机体通过介导激活巨噬细胞的凋亡来限制其危害<sup>[3]</sup>。

巨噬细胞凋亡的重要作用显示出巨噬细胞凋亡研究的重要性,并引起了人们的关注.已有的报道表明,常用于诱发巨噬细胞凋亡的因素有激素、细胞因子、生物因素和化学物质等<sup>[2,4~8]</sup>,它们可通过 NO 介导巨噬细胞凋亡.不过这些介导体使巨噬细胞凋亡时或是诱导效率低,如 IFN- $\alpha$  和脂多糖(LPS)只能诱导百分之十几的巨噬细胞凋亡,或是诱导时间长,如 NO 发生剂如 SNP(sodium nitroprusside)、SNAP(S-nitroso-N-acetylpenicillamine)、GSNO(S-nitrosoglutathione)等诱导巨噬细胞凋亡的发生时间需十多小时<sup>[4,5]</sup>。

为了更好地追踪巨噬细胞凋亡的生物物理和生物化学变化,认识巨噬细胞凋亡的特点,我们用地塞米松作凋亡诱导剂,通过形态学观察、DNA 琼脂糖凝胶电泳、流式细胞术、TUNEL 染色等检测,发现大剂量地塞米松可快速高效诱导巨噬细胞凋亡,是适于快速、实时研究细胞凋亡过程特征及其生物学意义的理想实验模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:18~20 g 雌性昆明种小鼠。

1.1.2 实验试剂:碘化丙啶(propidium iodide, PI)、巯基乙醇酸钠(thioglycolate)、地塞米松(dexamethasone)、戊二醛(glutaraldehyde)、钨酸(osmium tetroxide)、环氧树脂(spurr's resin),购自美国 Sigma 公司。RPMI-1640,购自德国 GIBCO BRL 公司。TUNEL 试剂盒、核糖核酸酶(RNase)、蛋白酶 K(proteinase K),购自德国 Boehringer Mannheim 公司。放线菌酮(cycloheximide),美国 SERVA 公司产品。小牛血清,购自杭州四季青生物材料厂。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养:18~20 g 雌性昆明种小鼠,按每天 1 次,每次 1 ml 连续三天腹腔注射 1% 巯基乙醇酸钠,停一天,按鄂征等的方法<sup>[9]</sup>取腹腔巨噬细胞(台酚蓝吞噬实验显示 99% 为巨噬细胞),以  $1 \times 10^6$  个/ml 接种于六孔细胞培养板(Nunc,丹麦),用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养于 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 孵箱(Quene System, 美国)内,12 h 后加入大剂量地塞米松( $1 \times 10^{-4}$  mol/L)处理细胞。

1.2.2 透射电镜观察:上述条件培养、处理的巨噬细胞按每个样品  $1 \times 10^6$  个细胞用细胞刮(rubber policeman)从培养板上刮下,用琼脂预包埋法<sup>[10]</sup>制样,按常规固定、漂洗、脱水、渗透、包埋、切片、染色, JEM-1200EX 透射电镜(JEOL, 日本)观察、摄片,加速电压 80 kV。

1.2.3 原位末端标记法(TUNEL):TUNEL 染色(terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) mediated deoxyridine triphosphate(dUTP) nick end labeling)按 Gavrieli 等<sup>[11]</sup>的方法进行。

1.2.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳:按 Mebmer 等<sup>[4]</sup>的方法进行.电泳后凝胶用计算机图象分析系统(computer documentation analysis system, CDAS)和 GelBase/GelBlot 软件(UVP ImageStore 7500, 英国)作定量分析。

1.2.5 流式细胞术:按上述条件分离、培养和处理的巨噬细胞,按每个样品  $1 \times 10^6$  个,用细胞刮从培养板上刮下,离心收集.按 Schmid 方法<sup>[12]</sup>制样,PI 染色,Elite 流式细胞仪(COULTER, 美国)采集数据(激发光波长 488 nm,发射光波长 633 nm),并用 Multicycle 分析软件分析,通过计数凋亡区(亚二倍体区)细胞数量得出凋亡率。

## 2 结果和讨论

### 2.1 地塞米松诱导凋亡的巨噬细胞的形态学变化

地塞米松是一种常用作凋亡诱导剂的糖皮质激素类药物<sup>[12]</sup>。Nguyen<sup>[13]</sup>报道,地塞米松可引起中枢神经系统和周围神经系统内的巨噬细胞凋亡.我们用  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 地塞米松处理也肯定了其诱导巨噬细胞凋亡的作用,但诱发时间长达 18 h<sup>[14]</sup>。电镜观察显示,大剂量地塞米松( $1 \times 10^{-4}$  mol/L)处理,0.5 h 后胞膜、胞核未见明显变化,胞质中出现大量溶酶体,聚集在细胞核附近,线粒体分布在溶酶体周围.1.0 h 后,胞核中染色质固缩成均

质状、电子密度高的染色质块边集在核膜下(图1)。4.0 h后,巨噬细胞的胞核固缩成均质、高电子密度的染色质块,胞质更加浓缩,胞质中基本上见不到溶酶体,但有许多变得致密的线粒体分布。有些细胞中,除高密度均质的固缩染色体外,遍布有大量线粒体,在线粒体周围,大量游离的核糖体聚集形成糖元湖。结果表明大剂量地塞米松处理引起巨噬细胞发生了凋亡形态学特征变化。

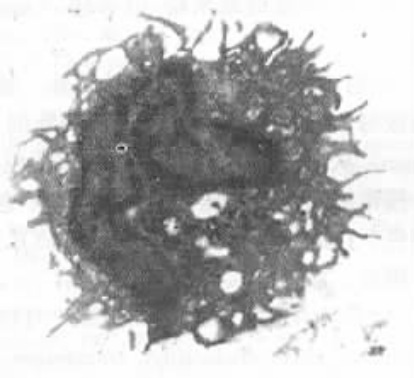


图1  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 地塞米松处理巨噬细胞的透射电镜图

小鼠腹腔巨噬细胞经  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 地塞米松处理 1.0 h 后,巨噬细胞胞核中染色质固缩成均质状,电子密度高的染色质块边集在核膜下。胞内出现大量空泡,并有许多变得致密的线粒体分布。

## 2.2 地塞米松处理巨噬细胞的 TUNEL 染色阳性

TUNEL 法可原位直接检测核酸内切酶分解 DNA 形成的断端<sup>[11]</sup>,而琼脂糖凝胶电泳和流式细胞术检测则需要 DNA 分解的一定积累。因此它是一种较琼脂糖凝胶电泳和流式细胞术更敏感的细胞凋亡的特异性检测方法。TUNEL 染色结果显示,大剂量地塞米松处理 4.0 h,巨噬细胞几乎全都表现为 TUNEL 阳性(图2),而对照细胞呈 TUNEL 阴性。表明大剂量地塞米松诱导巨噬细胞凋亡。

## 2.3 地塞米松使巨噬细胞 DNA 琼脂糖电泳呈梯状条带

DNA 琼脂糖凝胶电泳呈特征性的梯状条带是凋亡细胞的生化特征<sup>[15]</sup>。图3结果显示,大剂量地塞米松处理 0.5 h 后 DNA 即开始分解,并出现少量条带。1.0 h 后条带呈典型的梯状。电泳结果肯定了大剂量地塞米松使巨噬细胞发生典型的凋亡生化变化:DNA 被核酸内切酶分解成 180~200 bp 的整数倍的寡聚核苷酸片段。用 CDAS 分析经地塞米

松处理 0、0.5、1.0、2.0、4.0 h 后巨噬细胞片段化 DNA 的比例(%)分别为 0、16.37、30.72、35.87、56.60。和通常凋亡细胞经十余小时出现梯状条带相比,大量地塞米松处理的巨噬细胞快速发生 DNA 片段化,且在较早时间(0.5 h)即呈现了清晰的 DNA 梯状条带特征。

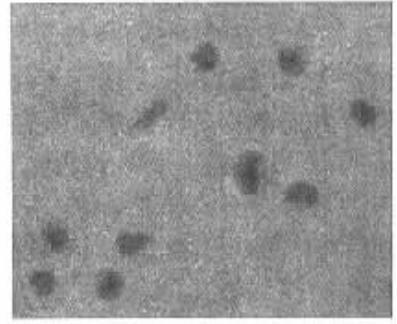


图2 凋亡巨噬细胞 TUNEL 染色  
小鼠腹腔巨噬细胞经  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 地塞米松处理 1.0 h 后,固定, TUNEL 染色后光镜观察。(放大倍数:  $\times 200$ )。

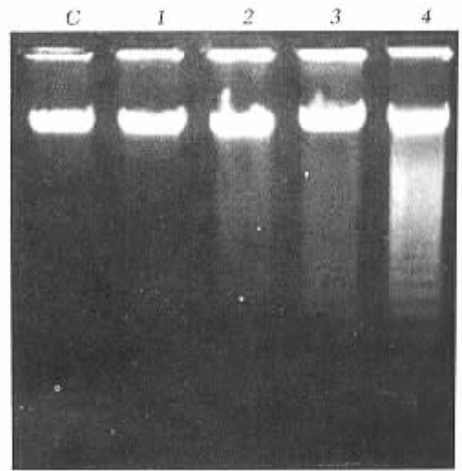


图3 地塞米松诱发巨噬细胞 DNA 梯状条带  
小鼠腹腔巨噬细胞经  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 地塞米松作用 0、0.5、1.0、2.0、4.0 h 后,1% 琼脂糖凝胶电泳检测梯状条带。C:对照(0 h); 1:0.5 h; 2:1.0 h; 3:2.0 h; 4:4.0 h。

## 2.4 地塞米松诱导巨噬细胞的典型凋亡峰

利用流式细胞术对凋亡细胞作周期分析时出现特征性的凋亡峰,并可根据凋亡峰快速计数细胞的凋亡率<sup>[16]</sup>。我们利用流式细胞仪检测发现,大剂量地塞米松( $1 \times 10^{-4}$  mol/L)处理巨噬细胞出现特征性的凋亡峰(图4)。地塞米松处理时间越长,凋亡峰越明显。统计分析结果表明,经地塞米松处

理 0、0.5、1.0、2.0、4.0 和 8.0 h 巨噬细胞的凋亡率 (%) 分别为: 0、18.0、25.5、36.3、56.4、76.1。表明在 8 h 内巨噬细胞的凋亡率随着地塞米松处理时间延长而增高。与 CDAS 分析结果比较发

现, 流式细胞术得出的凋亡率和 CDAS 检测的片段化 DNA 比例基本一致, 表明 DNA 琼脂糖凝胶电泳不仅是一种特异性的凋亡定性研究方法, 亦可对凋亡细胞作较准确的定量分析。

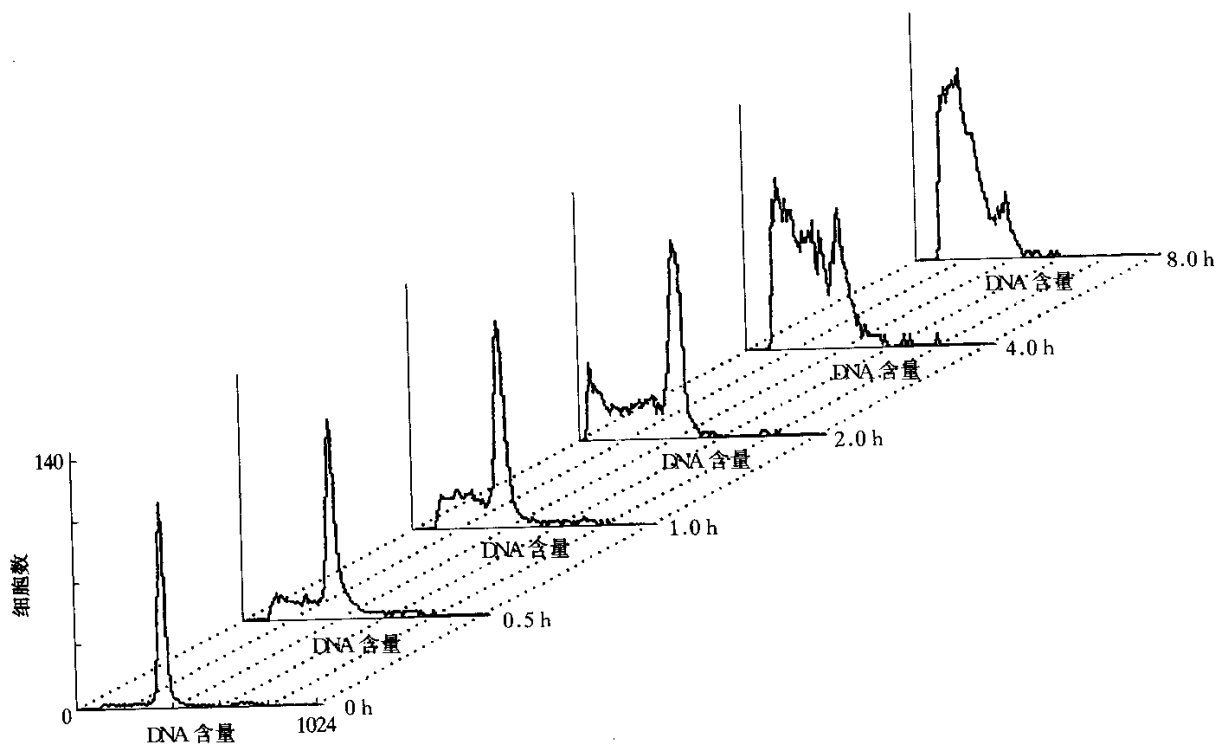


图 4 地塞米松诱发巨噬细胞 DNA 凋亡峰

小鼠腹腔巨噬细胞经  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 地塞米松作用 0、0.5、1.0、2.0、4.0 h、8.0 h 后, 流式细胞仪检测 DNA 凋亡峰。

上述有关形态学观察、TUNEL 染色、DNA 凝胶电泳以及流式细胞术的凋亡峰等检测结果均显示了大剂量地塞米松 ( $1 \times 10^{-4}$  mol/L) 处理使巨噬细胞呈现特征性的凋亡变化, 而且凋亡发生早、变化典型、检出率高。这些结果可能提示大剂量地塞米松的处理可快速、高效诱发包括巨噬细胞在内的细胞凋亡, 这为快速、实时了解细胞凋亡过程中的形态、生化和生物物理等重要凋亡特征变化提供了可行性。同时, 我们的结果还显示, 加入放线菌酮, 巨噬细胞凋亡率无明显变化, 表明地塞米松可能通过不需新合成蛋白质介入的转导机制<sup>[17]</sup>而诱导巨噬细胞的凋亡。

### 参 考 文 献

- Richardson B C, Lalwani N D, Johnson K J, *et al.* Fas ligation triggers apoptosis in macrophages but not endothelial cells. *Eur J Immunol*, 1994, **24** (11): 2640 ~ 2645
- Adler B, Adler H, Pfister H, *et al.* Macrophages infected with

- cytopathic bovine viral diarrhea virus release a factor (s) capable of priming uninfected macrophages for activation-induced apoptosis. *J Virol*, 1997, **71** (4): 3255 ~ 3258
- Munn D H, Beal A C, Song D, *et al.* Activation-induced apoptosis: developmental regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon gamma. *J Exp Med*, 1995, **181** (1): 127 ~ 136
- Mebmer U K, Lapetina E G, Brune B. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C- and protein kinase A-activating compounds. *Mol Pharmacol*, 1995, **47** (4): 757 ~ 765
- Mebmer U K, Brune B. Nitric oxide (NO) in apoptotic versus necrotic RAW 264.7 macrophage cell death: the role of NO-donor exposure, NAD<sup>+</sup> content, and p53 accumulation. *Arch Biochem Biophys*, 1996, **327** (1): 1 ~ 10
- Singhal P C, Reddy K, Ding G, *et al.* Ethanol-induced macrophage apoptosis: the role of TGF-beta. *J Immunol*, 1999, **162** (5): 3031 ~ 3036
- Bermudez L E, Parker A, Petrofsky M. Apoptosis of Mycobacterium avium-infected macrophages is mediated by both tumour necrosis factor (TNF) and Fas, and involves the activation of caspases. *Clin Exp Immunol*, 1999, **116** (1): 94 ~ 99
- Brown S B, Savill J. Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J Immunol*, 1999,

- 162 (1): 480 ~ 485
- 9 鄂 征主编. 组织培养技术. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 185 ~ 189  
E Z. Techniques for Tissue Culture. Beijing: People Health Press, 1993. 185 ~ 189
- 10 洪 涛主编. 生物医学超微结构与电子显微镜技术. 北京: 科学出版社, 1984. 125  
Hong T. Biomedical Ultrastructure and Electron Microscopy. Beijing: Science Press, 1984. 125
- 11 Gavrieli Y, Sherman Y, Shmuel A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992, **119** (2): 493 ~ 502
- 12 Schmid I, Uittenbogaart C H, Keld B, *et al.* A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J Immunol Methods*, 1994, **170** (1): 145 ~ 157
- 13 Nguyen K B, McCombe P A, Pender M P. Increased apoptosis of T cells and macrophages in the central and peripheral nervous systems of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis treated with dexamethasone. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1997, **56** (1): 58 ~ 69
- 14 黄行许, 鲍永耀, 黄 辉, 等. 利用共聚焦检测凋亡早期巨噬细胞内 pH 的变化. 第一军医大学学报, 1998, **18** (2): 143  
Huang X X, Bao Y Y, Huang H, *et al.* Journal of First Military Medicine University, 1998, **18** (2): 143
- 15 Hale A J, Smith C A, Sutherland L C, *et al.* Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem*, 1996, **236** (1): 1 ~ 26
- 16 Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, *et al.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 1991, **139** (2): 271 ~ 279
- 17 Tsao N, Lei H Y. Activation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter,  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  cotransporter, or  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger in spontaneous thymocyte apoptosis. *J Immunol*, 1996, **157** (3): 1107 ~ 1116

**Dexamethasone.** HUANG Xing-Xu, CHEN Lian-Bo<sup>1)</sup>, BAO Yong-Yao<sup>1)</sup>, PIAO Ying-Jie<sup>1)</sup>, HUANG You-Guo (National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; <sup>1)</sup>Central Laboratory, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China).

**Abstract** By transmission electron microscopy, DNA agarose gel electrophoresis, flow cytometry and TUNEL staining, changes of the murine peritoneal macrophages treated with high dose of dexamethasone were observed. The results clearly showed that, treated with high dose of dexamethasone, the macrophages presented various changes in ultrastructure: chromatin condensed and abutted sharply against the nuclear membrane, and cytoplasm condensed. Half hour after dexamethasone treatment, DNA ladder was visualized by agarose gel electrophoresis. The macrophages displayed TUNEL positive. The characteristic apoptosis peak of DNA was showed by flow cytometry. The results indicated that the macrophages treated with high dose of dexamesathone may develop apoptosis rapidly and efficiently.

**Key words** murine, peritoneal macrophage, apoptosis, dexamethasone