

# cAMP 与小鼠胸腺细胞凋亡相关性的研究

梁福佑 陈哲生 郑莉 赵俊萍

(首都医科大学细胞生物学教研室 免疫学教研室 北京 100054)

**摘要** 本文采用 Forskolin 诱导小鼠胸腺细胞凋亡,探讨胞内 cAMP 浓度上升与细胞凋亡的相关性。采用透射电镜、FCM 和 MTT 法。结果显示, Forskolin 能诱导小鼠胸腺细胞凋亡,不同浓度其作用程度不同,已由 FCM 证实。透射电镜显示细胞凋亡的形态学特征。Forskolin 激活胞内腺苷酸环化酶,产生大量 cAMP,其诱发细胞凋亡数目最多的浓度, MTT 法显示其光密度( $OD_{570}$ )值最高,表示细胞活性最强。我们认为胞内 cAMP 浓度上升,导致 PKA 途径激活可能与小鼠胸腺细胞凋亡相关。

**关键词** 细胞凋亡 包皮素 蛋白激酶 A

细胞凋亡 (Apoptosis), 亦称程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD), 是多细胞生物体普遍存在的细胞死亡形式之一, 为维持机体自身稳定, 参与胚胎发生、组织塑型、细胞发育、衰老等生理过程, 以及自身免疫病、肿瘤、许多种其他疾病 (如神经系统) 等病理过程<sup>[1]</sup>。

T 淋巴细胞是构成免疫系统最重要的细胞, 它是来自骨髓的前胸腺 T 细胞 (pre-thymus T cell), 在胸腺内分裂、繁殖, 经过阳性和阴性选择, 95% 的细胞发生细胞凋亡, 5%

的细胞发育成具有自身 MHC 限制和自身耐受的双重特性单阳性细胞 ( $CD^{4+}/CD^{8+}$ ), 离开胸腺进入外周组织和血液。因此, 成熟的 T 淋巴细胞, 在发育过程中, 在胸腺内呈现的细胞凋亡是一种生理功能。

T 淋巴细胞在胸腺内阳性和阴性选择机制, 倍受人们关注。

---

第一作者介绍: 梁福佑, 女, 55 岁, 学士, 副教授;

收稿日期: 1997-12-25; 修回日期: 1998-04-13

本文将采用包皮素(Forskolin)诱导小鼠胸腺细胞凋亡,探讨细胞凋亡与环磷酸腺苷(cAMP)相关性。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** (1) 实验动物 昆明小鼠(6g),雌雄兼用,本校实验动物部提供;(2) 主要材料

包皮素, FN410.5, SIGMA 公司;二甲亚砜(DMSO), SIGMA 公司;淋巴细胞分离液,上海试剂二厂。

**1.2 方法** (1) 小鼠胸腺细胞悬液制作

将 5 只小鼠处死,浸泡在 75% 乙醇中 5 分钟,无菌操作不取出胸腺,置细胞培养液(RPMI - 1640)平皿中,除去脂肪和结缔组织,用 RPMI - 1640 洗两次,经 180 目细胞筛,收细胞悬液,用淋巴细胞分离液分离细胞,洗三次,台盼蓝检测细胞活性(95%),细胞计数( $10^7$ /ml),分管备用;(2) 透射电镜法 将备用小鼠胸腺细胞悬液分组(每组三管),分别加入等体积 0.01  $\mu\text{mol/L}$ , 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$

Forskolin, 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 2 小时,离心洗二次,2.5% 戊二醛固定 2 小时,0.1 mol/L PBS 洗二次,2% 锇酸固定 2 小时,洗二次,每次 15 分钟,用 70%、90%、100% 丙酮依次脱水,每次 15 分钟,100% 丙酮再次脱水 20 分钟,包埋剂(丙酮:618=1:1),1 小时浸透,包埋、超薄切片(40 nm)醋酸铀染色 20 分钟,双蒸水洗,硝酸铅染色 20 分钟,双蒸水洗,透射电镜下观察、摄片;

(3) MTT 法 将备用小鼠胸腺细胞悬液分组(每组三管),加入等体积 0.01  $\mu\text{mol/L}$ , 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  Forskolin, 对照组(三管)用相同浓度 DMSO 代替。37 $^{\circ}\text{C}$  温育 2 小时,加入 20  $\mu\text{l}$  (5mg/ml) MTT, 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 4 小时,再加入 200  $\mu\text{l}$  10% SDS(十二烷基硫酸钠) 37 $^{\circ}\text{C}$  温箱过夜,酶联免疫吸附仪(奥地利 SLT)测 OD<sub>570</sub> 值;(4) 流式细胞仪(FCM)检测 将备用小鼠胸腺细胞悬液分组(每组三管),分别加入等体积 0.01  $\mu\text{mol/L}$ , 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  Forskolin, 对照组(三管)用 DMSO 相同浓度代替 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 2 小时,离心

洗 3 次,加入预冷的乙醇 1ml,迅速吹打,固定,用 PBS 洗 3 次,加 200  $\mu\text{l}$  RNase A 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 分钟,再加入 800  $\mu\text{l}$  碘化丙啶(PI)染液,4 $^{\circ}\text{C}$  30 分钟。上机测试,电脑记录激发波长 488nm 红色荧光。

### 2 结果

**2.1 透射电镜法** 透射电镜下可见小鼠胸腺细胞经 Forskolin 诱导后,细胞体积缩小,细胞膜起皱,核固缩,染色质成为致密的斑块,线粒体没有形态学改变(见图 1)。

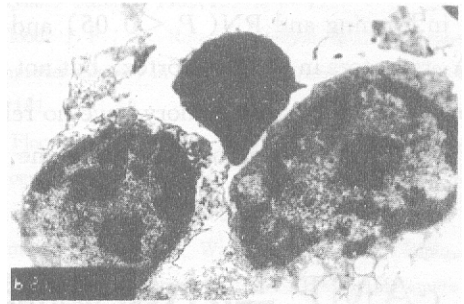


图 1 包皮素诱导小鼠胸腺细胞凋亡透射电镜照片(染色质固缩,边缘化,  $\times 10\ 000$ )

**2.2 MTT 法** 不同浓度 Forskolin 作用小鼠胸腺细胞,其结果(见图 2)。其中 0.1  $\mu\text{mol/L}$  Forskolin 激活小鼠胸腺细胞活性最佳( $p = 0.002$ )。

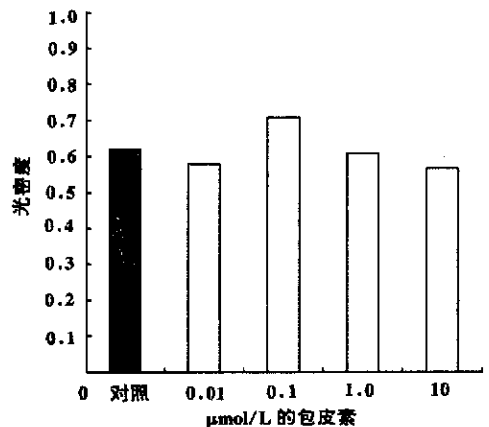


图 2 小鼠胸腺细胞的活性

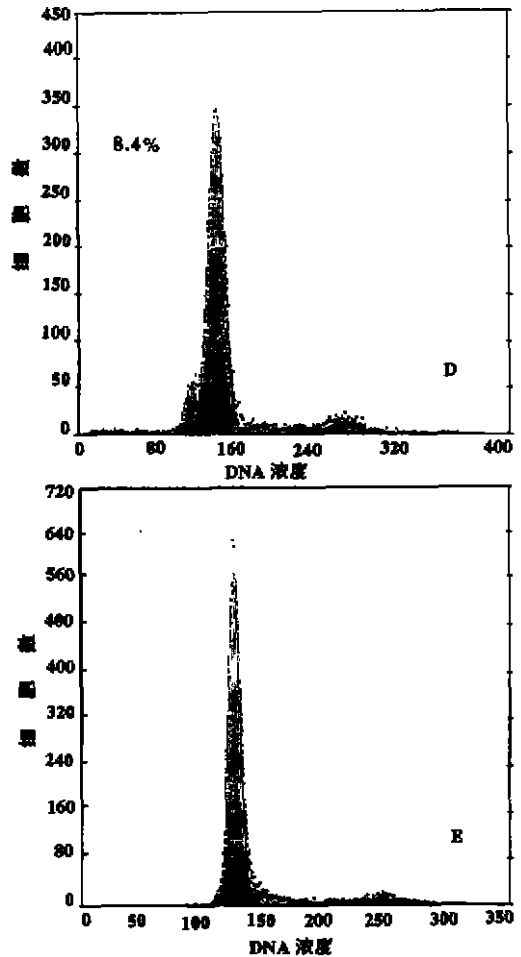
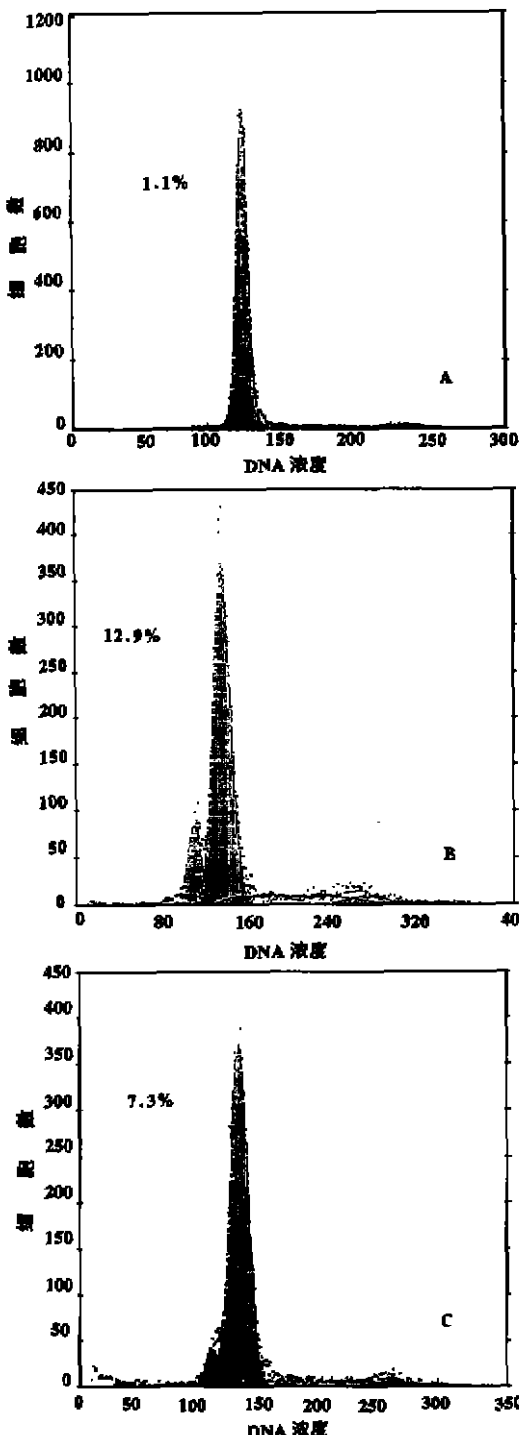


图3 包皮素诱导小鼠胸腺细胞凋亡的流式细胞仪图

A. 0.01 μmol/L 包皮素; B. 0.1 μmol/L 包皮素 C. 1.0 μmol/L 包皮素; D. 10.0 μmol/L 包皮素; E. 对照

2.3 流式细胞仪(FCM)检测结果 细胞凋亡时, G<sub>1</sub> 峰左侧出现亚二倍体细胞群峰型, 在光散射图谱上, 前向光散射低于正常, 侧向光散射高于正常。其结果(见图 3A~E)。其中 0.1 μmol/L Forskolin 诱导小鼠胸腺细胞凋亡数目最多为 12.9%。

### 3 讨论

细胞凋亡是多细胞生物生命活动基本特征, 是在种系和个体发育中不可缺少的现象。它与人类免疫细胞的发育, 分化成熟, 以及执行免疫功能密切相关。免疫功能中的防御, 自稳和监视三大功能都有细胞凋亡的参加, 影响细胞凋亡的因素, 必然导致免疫功能的异常。T 淋巴细胞在胸腺内的分化、发育成熟的机制, 是当今热门课题之一。

FCM 结果中显示, Forskolin 能诱导小鼠胸腺细胞凋亡, 浓度不同诱发细胞凋亡的程度也

不同,其形态学特征已被透射电镜证实<sup>[2-3]</sup>。

Forskolin 是二萜类化合物,能直接活化胞内腺苷酸环化酶,导致胞内 cAMP 浓度上升。许多学者证实,胞内 cAMP 浓度升高可诱发内源性核酸内切酶活化,裂解 DNA,导致细胞凋亡。在胸腺内,T 淋巴细胞的阴性选择,cAMP 浓度的上升可能起到至关重要的作用<sup>[4-6]</sup>。

MTT 法是噻唑蓝比色法的简称。噻唑蓝在溶液中呈黄色,被活细胞摄取后,在细胞线粒体脱氢酶还原作用下,在 570 nm 下测其 OD 值。代谢旺盛的细胞,其脱氢酶还原 MTT 能力强,死的细胞和红细胞没有这种能力,而活化细胞又比静止细胞还原作用强。因此,MTT 法常用来研究细胞的活力或增殖,可用来检测由各种有丝分裂原激活 T 细胞,B 细胞,骨髓瘤细胞等。我们曾报道,胞内 cAMP 浓度升高,MTT 法显示其 OD 值也高<sup>[7-9]</sup>(虽然 MTT 法具有敏感、简便、快速、安全等优点,但是该法的敏感性和稳定性尚待改进)。

本文在 MTT 法中,其 0.1  $\mu\text{mol/L}$  Forskolin 的浓度,OD 值最高,意味着胞内 cAMP 浓度最高,经 FCM 证实诱导小鼠胸腺内细胞凋亡数最多(12.9%)<sup>[5-6]</sup>。阐明胞内 cAMP 浓度升高,与小鼠胸腺内细胞凋亡相关联。本实验结果与国外学者的观点一致<sup>[4]</sup>。

## 参 考 文 献

- 1 Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie, A. R. Currie. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 1972, 26:1239~1257.
- 2 魏子权,赵震.流式细胞术在细胞生物学及分子生物学研究上的应用. *华西医学*, 1996, 11(4):436.
- 3 胡庆柳,丁振华.流式细胞术在细胞凋亡研究中的应用. *细胞生物学杂志*, 1997, 19(3):119~123.
- 4 McConkey, D. J., S. Orrenius, M. Jondal. Agents that elevate cAMP stimulate DNA fragmentation in thymocytes. *J. Immunol.*, 1990, 145(4):1227~1230.
- 5 Kizaki, H., K. Suzuki, T. Tadakuma, Y. Ishimura. Adenosine receptor-mediated accumulation of cyclic AMP induced T-lymphocyte death through internucleosomal DNA cleavage. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265(9):5280~5284.
- 6 Lee, M. R., M. L. Liou, M. Li. Liou, Y. F. Yang, M. Z. Lai. cAMP analogs prevent activation-induced apoptosis of T cell hybridomas. *J. Immunol.*, 1993, 151(10):5208~5217.
- 7 陈哲生,孙明杰,刘振龙,张力平,沈海中.噻唑蓝比色法用来研究人淋巴细胞和小鼠巨噬细胞的活性. *上海免疫学杂志*, 1993, 12(5):269.
- 8 周炳荣,焦炳祥,杜平.细胞凋亡 DNA 断裂的分子机制. *国外医学免疫学分册*, 1998, 21(1):6~10.
- 9 张建华,田志刚. MTT 比色法测定细胞毒效应的应用进展. *国外医学肿瘤学分册*, 1997, 240:196~198.