

敲低 MANF 对利福平诱导 HepG2 细胞损伤的影响及机制

戴琼¹, 张卫平¹, 陈刚¹, 王鹏², 许建明¹, 梅俏¹

摘要 目的 探讨敲低中脑星型胶质细胞源性神经生长因子(MANF)对利福平(RFP)诱导HepG2细胞损伤的影响及机制。方法 慢病毒转染技术构建MANF敲低稳转细胞株(MANF Y25)及其对照细胞株(MANF Y07)。实验分为4组:MANF Y07 + DMSO组、MANF Y07 + RFP组、MANF Y25 + DMSO组、MANF Y25 + RFP组。给予HepG2细胞100 μ mol/L RFP 24 h后,Western blot和qRT-PCR检测各组细胞MANF及未折叠蛋白反应(UPR)相关基因葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、蛋白酶R样内质网激酶(PERK)、真核翻译启动因子2 α (eIF2 α)、活化转录因子4(ATF4)、CCAAT/增强子结合蛋白(CHOP)、Tribbles同源蛋白3(TRIB3)、肌醇需求激酶1(IRE1)、剪接型X-盒结合蛋白1(XBP1-S)、非剪接型X-盒结合蛋白1(XBP1-U)、活化转录因子6(ATF6)的蛋白及基因表达水平;Annexin V-PE/7-AAD双染法检测各组细胞凋亡率;CCK-8法检测各组细胞增殖变化;试剂盒检测各组细胞培养上清液中细胞损伤标志物谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(AKP)、总胆红素(TBIL)、间接胆红素(IBIL)相对含量变化。结果 在蛋白水平,RFP激活MANF、GRP78、p-eIF2 α 、ATF4、ATF6的蛋白表达;在基因水平,RFP诱导HepG2细胞MANF、GRP78、PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP、TRIB3的基因表达,并且MANF敲低后GRP78、p-PERK、p-eIF2 α 、ATF4、ATF6蛋白表达水平及上述UPR相关基因的基因表达水平进一步上调($P < 0.05$),MANF敲低后细胞凋亡率升高($P < 0.01$),细胞增殖能力降低($P < 0.01$),细胞培养上清液中ALT、AST、AKP、TBIL、IBIL水平升高($P < 0.05$),说明细胞损伤加重。结论 RFP可激活UPR,敲低MANF后这种效应进一步加强,同时细胞损伤加重,表明MANF可能通过调节UPR而在RFP诱导HepG2细胞损伤中发挥保护作用。

关键词 中脑星型胶质细胞源性神经生长因子;利福平;内质网应激;细胞损伤;机制

中图分类号 R 595.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)10-1541-09

2021-07-01 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81370529、81700521);安徽省自然科学基金(编号:1808085QH238)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022

²安徽医科大学基础医学院,合肥 230032

作者简介:戴琼,女,硕士研究生;

梅俏,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:meiqiaomq@aliyun.com

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.007

抗结核药物诱导肝脏产生适应性反应是药物性肝损伤领域研究的热点。课题组前期的体外研究^[1]发现未折叠蛋白反应(unfolded protein response,UPR)中的PERK通路介导了利福平(rifampicin,RFP)诱导的适应性反应,同时发现分泌型蛋白中脑星型胶质细胞源性神经生长因子(mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor,MANF)的表达也发生了改变。UPR由PERK、IRE1和ATF6 3条信号通路组成^[2]。有研究^[3-4]报道UPR 3条通路的靶蛋白分子可以调节MANF的表达,过表达ATF6后MANF表达增加,XBP1可以增加MANF的表达。但是MANF对UPR 3条通路是否具有反馈调节作用以使UPR维持在合适的强度未见文献报道。该研究通过分子生物学技术敲低HepG2细胞的MANF基因,观察敲低MANF对RFP诱导HepG2细胞损伤及UPR相关基因表达的影响,探讨其细胞保护作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料 携带MANF敲低序列的慢病毒以及空白慢病毒购自和元生物技术(上海)股份有限公司;DMEM高糖细胞培养液购自美国Hyclone公司;胰酶消化酶、胎牛血清购自美国Gibco公司;PVDF膜购自Millipore公司;蛋白Marker、ECL显影液购自Thermo scientific公司;MANF、非剪接型X-盒结合蛋白1(non-spliced X-box binding protein 1-U,XBP1-U)抗体购自美国Abcam公司;葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78,GRP78)、蛋白酶R样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase,PERK)、p-PERK、真核翻译启动因子2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α ,eIF2 α)、p-eIF2 α 、活化转录因子4(activating transcription factor 4,ATF4)、CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP-homologous protein,CHOP)、Tribbles同源蛋白3(Tribbles homolog 3,TRIB3)、肌醇需求激酶1(inositol-requiring enzyme 1,IRE1)、p-IRE1、剪接型X-盒结合蛋

白 1 (spliced X-box binding protein1-S , XBP1-S)、活化转录因子 6 (activating transcription factor 6 , ATF6) 抗体购自美国 CST 公司; TRIzol 购自美国 Thermo 公司; 逆转录试剂盒和 PCR 扩增试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; GRP78、PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP、TRIB3、IRE1、XBP1-S、XBP1-U、ATF6 引物购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; RFP (R3501)、DMSO 购于美国 Sigma 公司; 谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase , ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase , AST)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase , AKP)、总胆红素 (total bilirubin , TBIL) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 人间接胆红素 (indirect bilirubin , IBIL) ELISA 试剂盒购于上海易利生物科技有限公司; 青霉素/链霉素、BCA 蛋白测定试剂盒、GAPDH 抗体、二抗、CCK-8 试剂盒购自上海碧云天公司; PE Annexin V 凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物公司; 细胞培养板购于美国 TrueLine 公司; 酶标仪购自美国 PE 公司 (Enspire) ; 流式细胞仪购于美国贝克曼公司 (CytoFLEX)。

1.2 细胞分组及其培养 HepG2 细胞购自中国科学院上海分院细胞库; 利用慢病毒转染技术构建 MANF 敲低稳转细胞株 (MANF Y25) 及其对照细胞株 (MANF Y07) , 实验分成 4 组: MANF Y07 + DMSO 组、MANF Y07 + RFP 组、MANF Y25 + DMSO 组、MANF Y25 + RFP 组。用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 高糖培养基培养。在含 5% CO₂、37 °C 的培养箱中培养, 每天半量换液, 取对数生长期的细胞用于实验。细胞转染时采用不含血清及双抗的 DMEM 高糖培养基培养。

1.3 慢病毒构建及转染 将生长至对数生长期的目的细胞胰酶消化后, 以每孔 5×10^4 个细胞的密度均匀铺在 12 孔板上, 当细胞生长至汇合度 30% ~ 40% 时感染慢病毒, 同时将培养基更换成不含血清和双抗的 DMEM 高糖培养基, 培养 8 ~ 12 h 后, 更换成含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养, 48 ~ 72 h 后用嘌呤霉素筛选阳性克隆细胞 2 周左右。

1.4 Western blot 检测蛋白表达水平 将生长至对数生长期的 MANF Y07、MANF Y25 细胞胰酶消化后, 以每孔 2.0×10^5 个细胞的密度均匀接种在 6 孔板上, 当细胞生长至汇合度达到 70% ~ 80% 时, 加入 100 $\mu\text{mol/L}$ RFP 诱导 24 h, 然后收集各组细胞。用蛋白提取试剂盒提取蛋白, 用 BCA 蛋白测定试剂盒进行蛋白定量, 上样后于 SDS-PAGE 凝胶上进行电泳、分离, 再转入 PVDF 膜上转膜 5% 脱脂奶

粉 TBST 溶液室温封闭 1 h, 再分别加入 GAPDH (1 : 5 000)、MANF、GRP78、p-PERK、PERK、p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF4、CHOP、TRIB3、p-IRE1、IRE1、XBP1-S、XBP1-U、ATF6 抗体 (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜。次日 PVDF 膜恢复室温后用 TBST 洗膜 5 次, 每次 8 min, 分别加入二抗 (1 : 5 000) , 于室温下孵育 1 h, 再次用 TBST 洗膜 5 次, 每次 8 min, 最后加 ECL 显影液显影。GAPDH 作为内参, 采用 Image J 软件分析结果。蛋白表达水平以与内参比值的平均灰度表示。

1.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 MANF 及 UPR 相关基因表达水平 收集 100 $\mu\text{mol/L}$ RFP 处理后的各组细胞, 用 TRIzol 提取各组细胞中的总 RNA。根据逆转录试剂盒的操作说明将 RNA 逆转录成 cDNA, 逆转录条件: 37 °C , 15 min (逆转录反应) 85 °C 5 s (逆转录酶失活) 4 °C , 然后用 PCR 扩增试剂盒扩增 PCR。扩增条件: 变性 95 °C 5 s , 退火 60 °C 30 s , 延伸 60 °C 30 s , 共 40 个循环。读取每个反应的 Ct 值, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示基因相对表达量。所用 qRT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')
MANF	F: TCACATTCTCACCAGCCACT R: CAGGTCGATCTGCTGTGCATAC
GRP78	F: GCACAGACGGGTCATTCCAC R: TCCTATGTCCGCTTCACTCC
IRE1	F: CCAGCACCAGCAGTCCAGAAAG R: CCGTCCTGAGCCGTGTCTCC
XBP1-S	F: GGCCTTGTAGTTGAGAACCAGGAG R: GCCACTGGCCTCACTTCATTCC
XBP1-U	F: TCCGCAGCACTCAGACTACGTG R: CTCCAGGCTGGCAGGCTCTG
PERK	F: GCCCACTTTCACCTTCAGAG R: CTGGTCTTTGTTGCTTGG
eIF2 α	F: ACTGCACTCCTTCGACCTCCTG R: AAGTAGTGTAAAGGCTGCCAGTTG
ATF4	F: GTCCTGTCTCCACTCCAGA R: GGGTGTCTTCTCTTTATGC
CHOP	F: TCTTCTCTCTTCTCTCTG R: CACTCTTGACCCTGCTTCTC
TRIB3	F: CGTGCTTTCGCCAGATG R: CTCCAGCACCAGCTTCTTCT
ATF6	F: GAGGCACAGGACACATCAGATGG R: GCTGACAAGGAGGTGGAGGAATG
GAPDH	F: CCACTCCTCCACTTTG R: CACCACCTGTGCTGT

1.6 Annexin V-PE/7-AAD 双染法检测细胞凋亡率 将生长至对数生长期的 MANF Y07、MANF Y25 细胞胰酶消化后, 以每孔 2.0×10^5 个细胞的密度均匀接种在 6 孔板上, 当细胞生长至汇合度达到 70%

~80%时,加入100 $\mu\text{mol/L}$ RFP 诱导24 h,然后收集各组细胞。预冷的PBS洗涤细胞2次,结合缓冲液重悬细胞,再加入5 μl Annexin V-PE 和7-AAD 避光孵育15 min,最后加入200 μl 结合缓冲液,1 h内流式细胞仪检测。

1.7 CCK-8 法检测细胞增殖 取对数生长期的MANF Y07、MANF Y25 细胞胰酶消化后,以每孔 2.5×10^3 个细胞的密度均匀接种在96孔板上,边缘孔用无菌PBS填充。当细胞生长至汇合度达到70%~80%时,加入100 $\mu\text{mol/L}$ RFP 诱导24 h后,每个孔中分别加入10 μl CCK-8 溶液和90 μl 的纯DMEM 培养液,轻轻敲击培养板,使两者充分混匀,于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光孵育1~4 h。使用酶标仪测定450 nm 波长处的吸光度(optical density, OD) 值。

1.8 细胞培养上清液中细胞损伤标志物相对含量检测 收集各组细胞培养上清液(约2 ml),以3 000 r/min 离心10 min。立即测定上清液或储存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱以备,注意避免反复冻融以及含有RFP 的样本注意避光保存。分别根据ALT、AST、AKP、TBIL、IBIL 检测试剂盒的操作说明,设定标准孔、样

品孔、对照孔和空白孔,将各组样品与试剂盒里的试剂按照要求加到标准孔、样品孔、对照孔和空白孔中,轻轻敲击96孔板,使之充分混匀,于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光孵育一定时间,最后根据各自所要求的波长,用酶标仪测定各组细胞培养上清液所对应的吸光度,根据计算公式或者标准曲线得出各组细胞损伤标志物(ALT、AST、AKP、TBIL、IBIL) 的相对含量。

1.9 统计学处理 采用SPSS 19.0 软件进行统计分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析。各组实验重复3次以上。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MANF 在 HepG2 稳转细胞株中的表达及敲低 MANF 对 GRP78 表达的影响 MANF 基因敲低效率通过 Western blot 和 qRT-PCR 检测。与对照细胞株(MANF Y07) 相比,在 MANF 敲低稳转细胞株(MANF Y25) 中,MANF 蛋白表达减少了约40% ($F = 18.44$, $P < 0.05$),MANF 基因表达减少了约90% ($F = 1 067.41$, $P < 0.01$),见图1,表明MANF 敲低

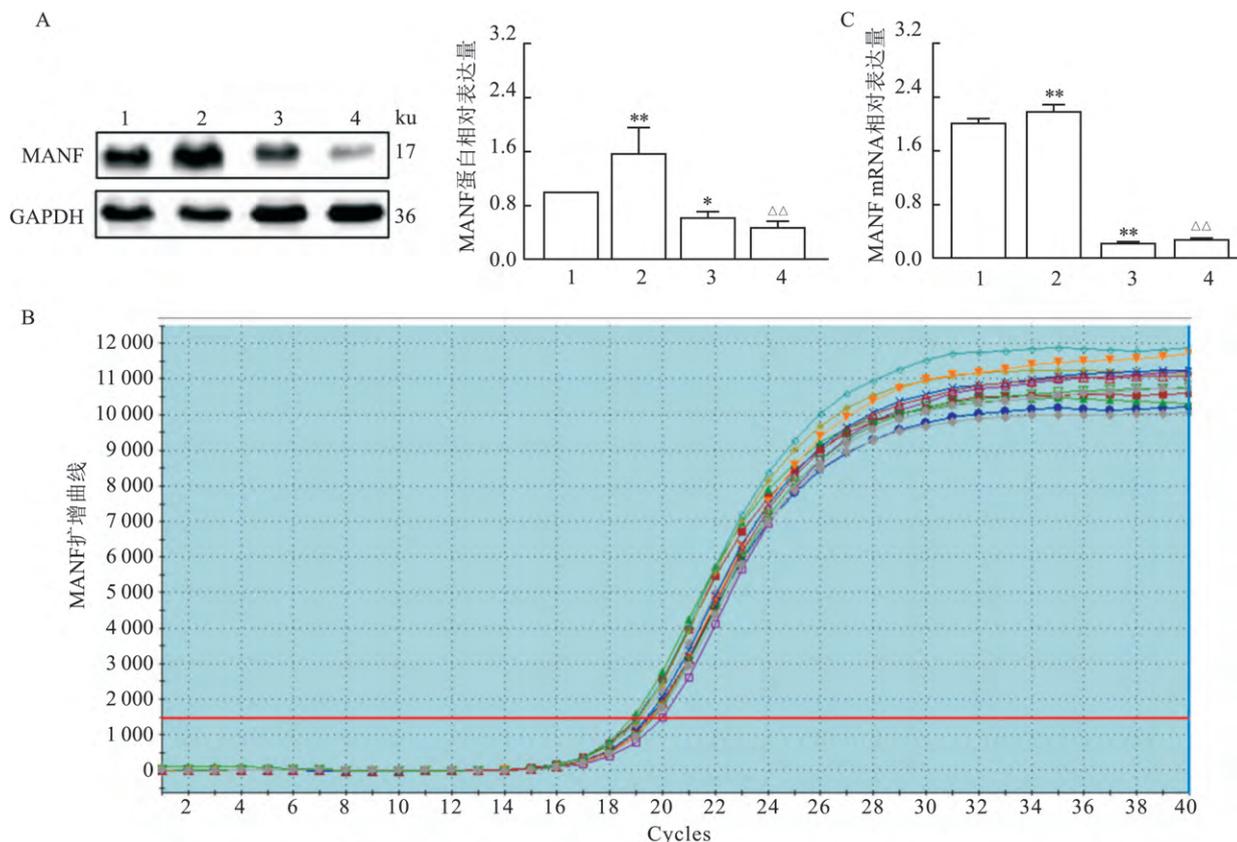


图1 MANF 在 HepG2 稳转细胞株中的表达

A: 各组 MANF 蛋白表达水平; B: MANF 的扩增曲线; C: 各组 MANF 基因表达水平; 1: MANF Y07 + DMSO 组; 2: MANF Y07 + RFP 组; 3: MANF Y25 + DMSO 组; 4: MANF Y25 + RFP 组; 与 MANF Y07 + DMSO 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 MANF Y07 + RFP 组比较: △△ $P < 0.01$

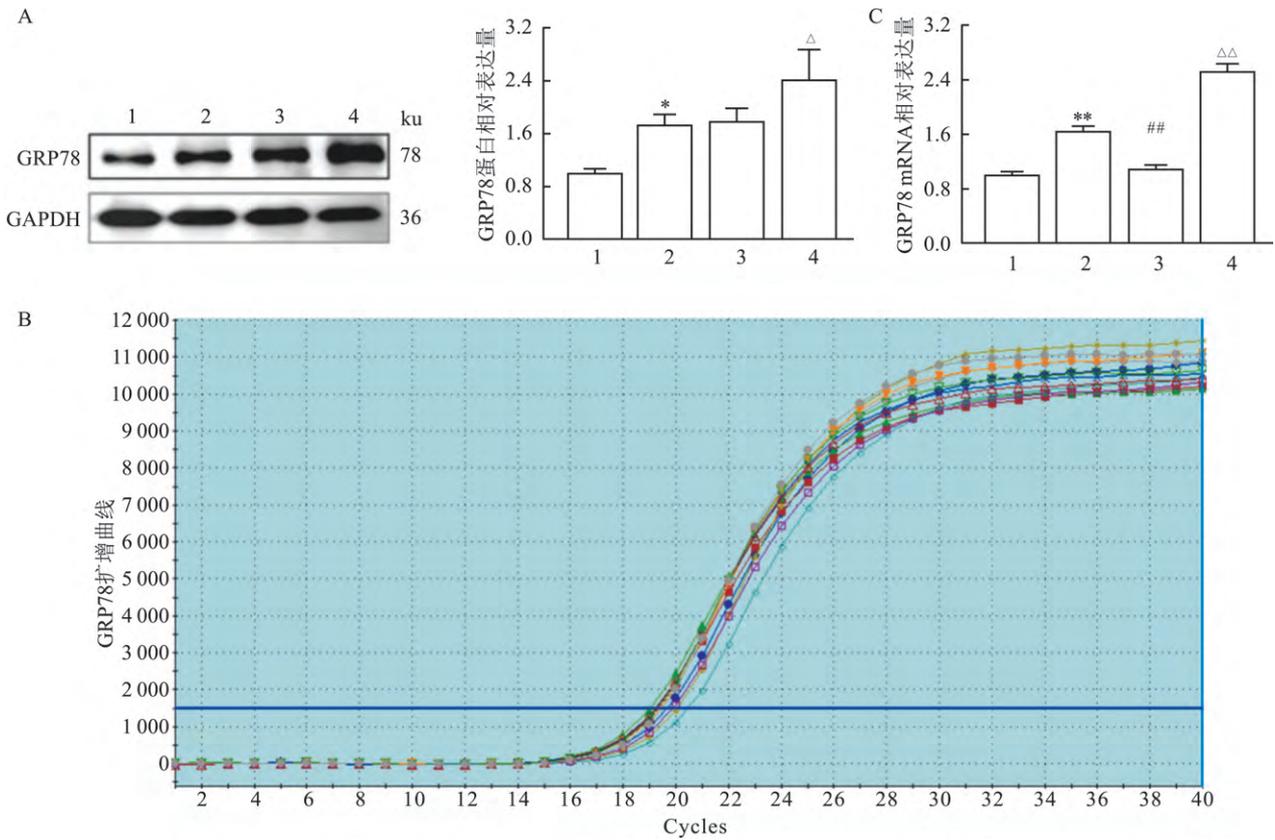


图2 敲低 MANF 对 GRP78 表达的影响

A: 各组 GRP78 蛋白表达水平; B: GRP78 的扩增曲线; C: 各组 GRP78 基因表达水平; 1: MANF Y07 + DMSO 组; 2: MANF Y07 + RFP 组; 3: MANF Y25 + DMSO 组; 4: MANF Y25 + RFP 组; 与 MANF Y07 + DMSO 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 MANF Y25 + RFP 组比较: ## $P < 0.01$; 与 MANF Y07 + RFP 组比较: [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

稳转细胞株构建成功。100 $\mu\text{mol/L}$ RFP 给药 24 h 后可增加 MANF 的蛋白及基因表达 ($P < 0.01$)。本研究首先观察了 RFP 处理的 HepG2 细胞中 GRP78 蛋白及基因表达的变化。Western blot 和 qRT-PCR 分析均表明 RFP 处理可上调 GRP78 蛋白及基因的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，见图 2。MANF 敲低前后对比发现，敲低后 GRP78 蛋白 ($F = 15.12$, $P < 0.05$) 及基因 ($F = 359.32$, $P < 0.01$) 表达水平进一步升高，表明 RFP 可以激活 GRP78，而在敲低 MANF 后这种激活效应进一步加强。

2.2 MANF 敲低对 HepG2 细胞 UPR 3 条信号通路的影响

2.2.1 MANF 敲低对 HepG2 细胞 PERK - ATF4 - CHOP 信号通路的影响

用 RFP 处理 HepG2 细胞 24 h 后，结果如图 3 所示。在 MANF 敲低前，RFP 可以诱导 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4 的蛋白表达 ($P < 0.01$) 以及 PERK ($P < 0.05$)、eIF2 α ($P < 0.01$)、ATF4 ($P < 0.01$)、CHOP ($P < 0.05$)、TRIB3 ($P < 0.01$) 基因表达，MANF 基因敲低后发现 p-PERK/

PERK ($F = 349.3$, $P < 0.01$)、p-eIF2 α /eIF2 α ($F = 626.0$, $P < 0.01$)、ATF4 ($F = 87.38$, $P < 0.01$) 的蛋白表达水平进一步升高，同时发现 PERK ($F = 121.50$, $P < 0.01$)、eIF2 α ($F = 49.02$, $P < 0.01$)、ATF4 ($F = 48.96$, $P < 0.01$)、CHOP ($F = 92.99$, $P < 0.01$)、TRIB3 ($F = 35.14$, $P < 0.01$) 的基因表达水平也进一步升高。说明 RFP 可以激活 PERK-ATF4-CHOP 信号通路，在敲低 MANF 后这种激活效应进一步加强。

2.2.2 MANF 敲低对 HepG2 细胞 IRE1-XBP1 信号通路的影响

如图 4 所示，MANF 敲低前后对比发现，MANF 敲低后 RFP 诱导 IRE1 ($F = 56.04$, $P < 0.01$)、XBP1-S/XBP1-U ($F = 40.38$, $P < 0.01$) 基因表达水平升高，表明 RFP 可以激活 IRE1-XBP1 信号通路，在敲低 MANF 后这种激活效应进一步加强。

2.2.3 MANF 敲低后对 ATF6 信号通路的影响

如图 5 所示，在 MANF 敲低前，RFP 诱导 ATF6 蛋白的表达，MANF 基因敲低后发现 ATF6 的蛋白 ($F = 364.7$, $P < 0.01$) 和基因 ($F = 29.90$, $P < 0.01$) 表达

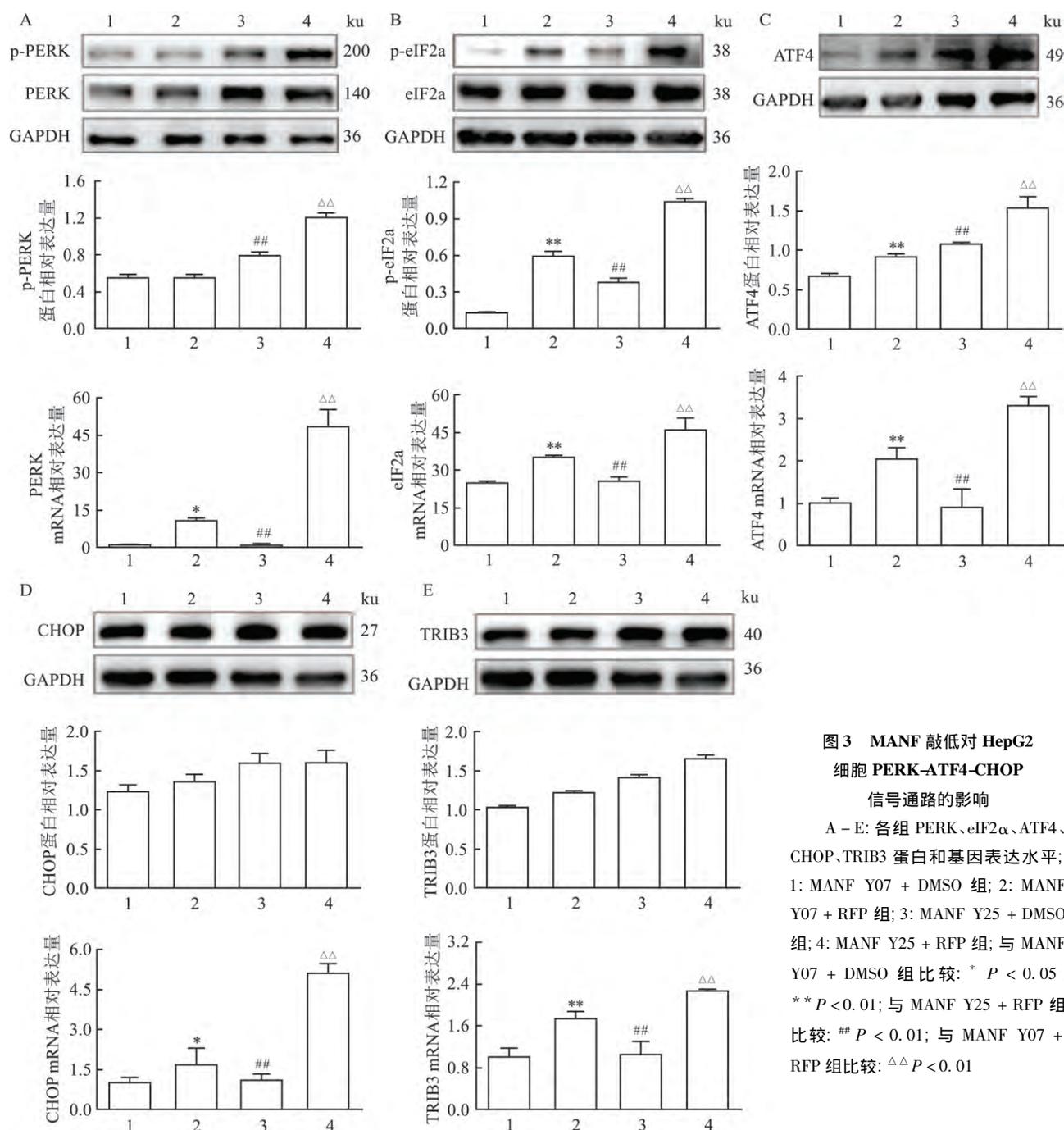


图3 MANF 敲低对 HepG2 细胞 PERK-ATF4-CHOP 信号通路的影响

A - E: 各组 PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP、TRIB3 蛋白和基因表达水平; 1: MANF Y07 + DMSO 组; 2: MANF Y07 + RFP 组; 3: MANF Y25 + DMSO 组; 4: MANF Y25 + RFP 组; 与 MANF Y07 + DMSO 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 MANF Y25 + RFP 组比较: ## $P < 0.01$; 与 MANF Y07 + RFP 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

水平均进一步升高。说明 RFP 可以激活 ATF6 信号通路, 在敲低 MANF 后这种激活效应进一步加强。

2.3 MANF 敲低后对 HepG2 细胞损伤的影响

Annexin V-PE/7-AAD 双染法结果显示: 与 MANF Y07 + RFP 组 (11.64 ± 0.99) % 比较, MANF Y25 + RFP 组 (16.48 ± 1.14) % 细胞凋亡率升高 ($F = 35.80, P < 0.01$), 见图 6A; CCK-8 检测结果显示: MANF Y25 + RFP 组 (1.96 ± 0.08) 细胞 OD 值较 MANF Y07 + RFP 组 (2.29 ± 0.04) 降低 ($F = 56.59, P < 0.01$), 见图 6B; 细胞培养上清液结果显示: 与

MANF Y07 + RFP 组 [(12.87 ± 0.85) 、 (4.27 ± 0.17) 、 (2.08 ± 0.02) 、 (11.53 ± 0.64) 、 (2.77 ± 0.53) U/L] 比较, MANF Y25 + RFP 组 [(29.81 ± 0.85) 、 (6.58 ± 0.93) 、 (2.43 ± 0.05) 、 (15.49 ± 0.59) 、 (5.97 ± 0.53) U/L] 细胞培养上清液中的细胞损伤标志物 ALT ($F = 27.97, P < 0.01$)、AST ($F = 14.41, P < 0.05$)、AKP ($F = 46.17, P < 0.01$)、TBIL ($F = 378.58, P < 0.01$)、IBIL ($F = 32.71, P < 0.01$) 均升高, 见图 6C-6G。表明 MANF 敲低后加重了 RFP 诱导的 HepG2 细胞损伤。

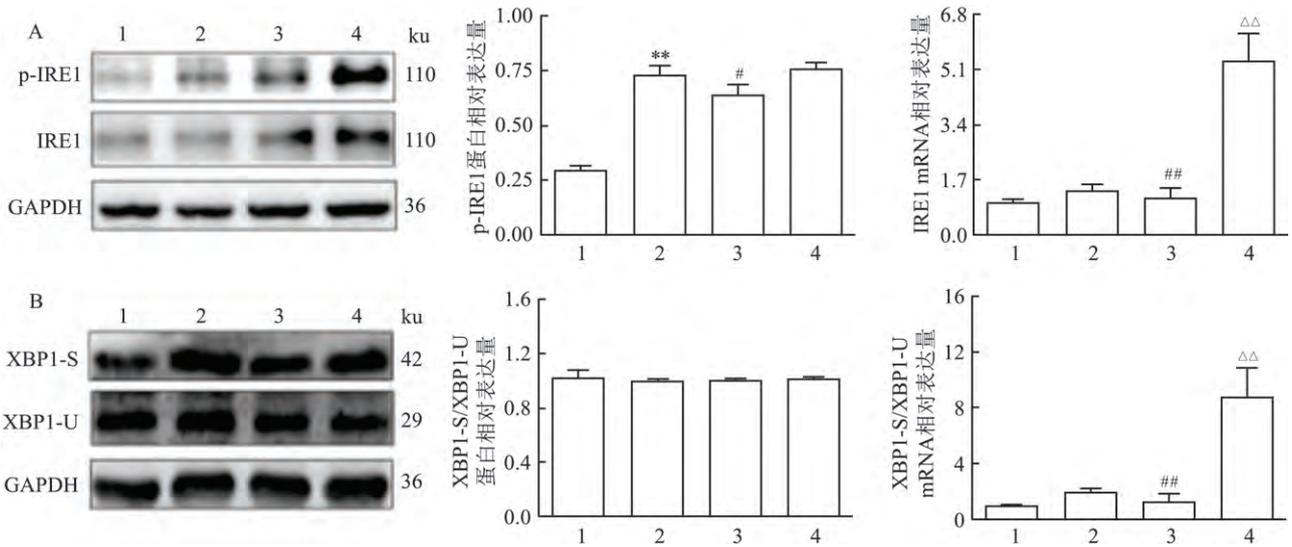


图4 MANF 敲低对 HepG2 细胞 IRE1-XBP1 信号通路的影响

A、B: 各组 IRE1、XBP1-S、XBP1-U 蛋白和基因表达水平; 1: MANF Y07 + DMSO 组; 2: MANF Y07 + RFP 组; 3: MANF Y25 + DMSO 组; 4: MANF Y25 + RFP 组; 与 MANF Y07 + DMSO 组比较: ** $P < 0.01$; 与 MANF Y25 + RFP 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 MANF Y07 + RFP 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

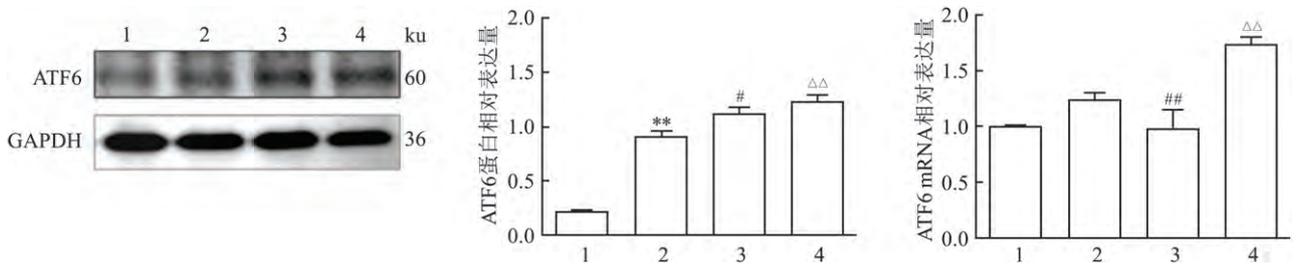


图5 MANF 敲低后对 ATF6 蛋白和基因表达的影响

1: MANF Y07 + DMSO 组; 2: MANF Y07 + RFP 组; 3: MANF Y25 + DMSO 组; 4: MANF Y25 + RFP 组; 与 MANF Y07 + DMSO 组比较: ** $P < 0.01$; 与 MANF Y25 + RFP 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 MANF Y07 + RFP 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

3 讨论

当机体在毒性药物、感染、低氧、氧应激等条件诱导下,内质网中未折叠或错误折叠的蛋白质聚集导致内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)。ERS 可以触发适应性保护机制-UPR,旨在清除未折叠或错误折叠的蛋白质来恢复内质网平衡。内质网伴侣蛋白 GRP78,是内质网稳态的主要调节因子,对于 ERS 的启动非常重要^[5]。在非应激条件下,GRP78 与跨膜应激传感器 PERK、IRE1 和 ATF6 结合;在应激条件下,错误折叠的蛋白质与这些传感器竞争与 GRP78 结合,释放 PERK、IRE1 和 ATF6 应激传感器以激活 UPR^[6]。随着 ERS 时间的延长,PERK 多聚化并激活 eIF2 α 磷酸化,促进 ATF4 的翻译,从而激活包括 CHOP 和 TRIB3 在内的特异性 UPR 靶基因的转录诱导细胞凋亡^[7-8]。

持续应激下,IRE1 可以通过激活 c-jun 氨基末端激酶(JNK)通路和招募凋亡信号调节激酶(ASK1)来触发细胞凋亡^[9]。ATF6 是 UPR 的关键调节因子,既可以通过诱导 CHOP 的表达,驱动细胞凋亡机制;也可以通过调节 ERS 期间的蛋白质折叠能力促进细胞存活^[10-11]。本研究结果提示 RFP 可以激活 GRP78 以及 PERK-ATF4-CHOP、IRE1-XBP1、ATF6 3 条 UPR 信号通路,并且 MANF 敲低后,上述激活效应进一步加强,同时细胞损伤加重。这说明 MANF 可能通过调节 UPR,恢复内质网稳态,来发挥细胞保护作用。有文献^[12]报道 MANF 可以通过抑制 ERS 的凋亡信号通路来介导细胞保护作用,本研究结果与之一致。

MANF 是 ERS 最敏感的基因^[13],具有独特的三维结构,N 端 saposin 样结构域和 C 端 SAP(SAF-A/B, Acinus and PIAS, SAP) 结构域,MANF 的 C 末

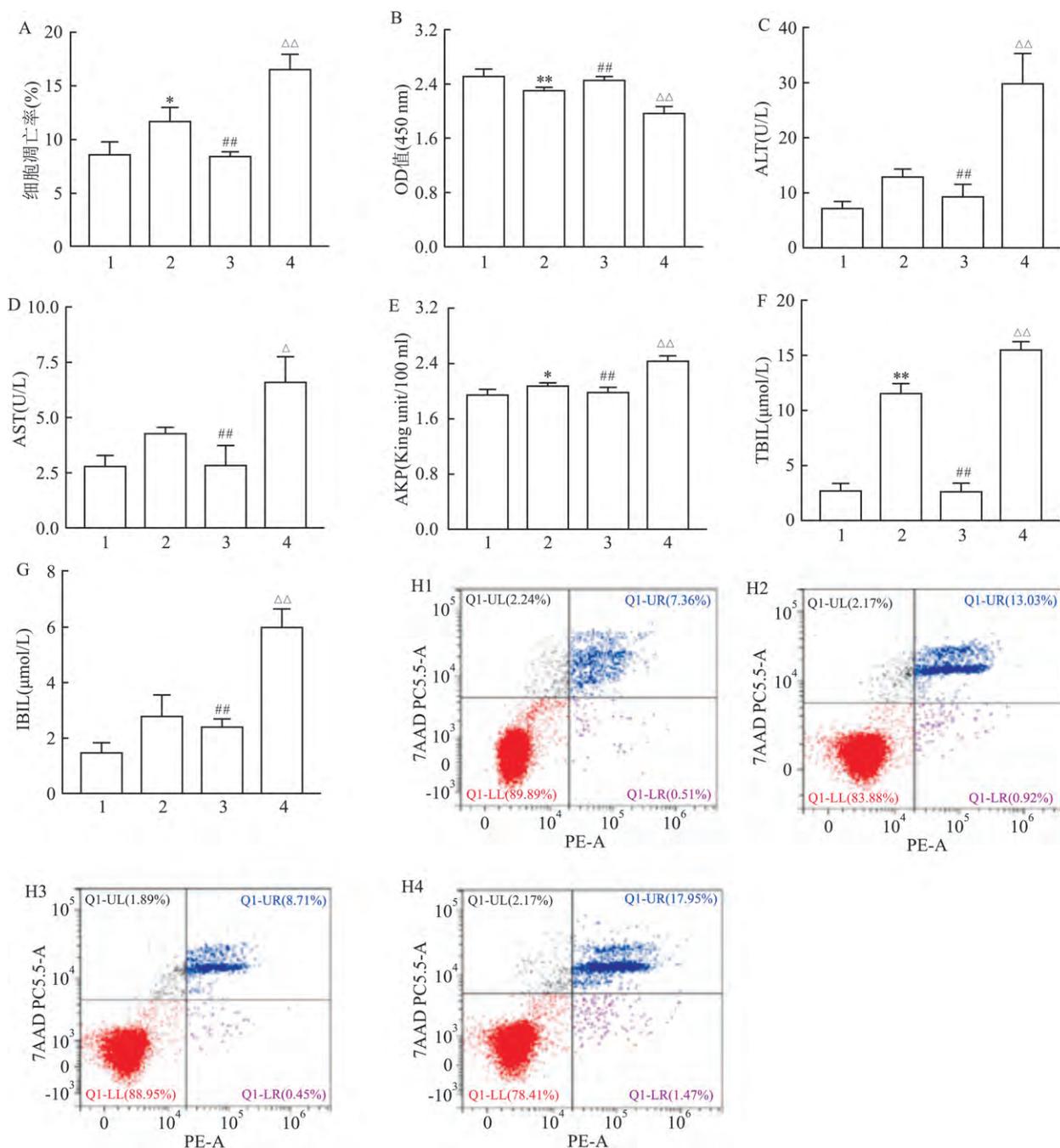


图6 MANF 敲低后对 HepG2 细胞损伤的影响

A: MANF 敲低后对 HepG2 细胞凋亡的影响; B: MANF 敲低后对 HepG2 细胞增殖的影响; C - G: MANF 敲低后各组细胞培养上清液中细胞损伤标志物 ALT、AST、AKP、TBIL、IBIL 的变化; H: 各组 HepG2 细胞凋亡的流式图; 1: MANF Y07 + DMSO 组; 2: MANF Y07 + RFP 组; 3: MANF Y25 + DMSO 组; 4: MANF Y25 + RFP 组; 与 MANF Y07 + DMSO 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 MANF Y25 + RFP 组比较: ## $P < 0.01$; 与 MANF Y07 + RFP 组比较: [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

端与 Ku70 的 SAP 结构域同源, Ku70 是促凋亡 Bax 蛋白的抑制剂, 发挥抗细胞凋亡的作用, 因此推测 MANF 的 SAP 结构域与其抗凋亡作用有关^[14]。遇到炎症和 ERS 时, MANF 通过 C 端 SAP 结构域与核因子-κB (NF-κB) p65 亚基的 DNA 结合结构域相互作用而负调控 NF-κB 通路, 从而起到抑制炎症反应

的作用。本次体外研究显示: RFP 可以诱导 MANF 的蛋白及基因表达; 敲低 MANF 后, HepG2 细胞凋亡率升高, 细胞增殖能力降低。此研究结果可以证明 ERS 增加了 MANF 的表达和分泌以及 MANF 在 RFP 诱导 HepG2 细胞损伤中发挥细胞保护作用, 这可能和 MANF 有抗细胞凋亡与抑制炎症反应作用

有关。Yang et al^[15] 研究发现: MANF 基因缺失激活了 ATF4/CHOP 和 JNK/c-JUN/CHOP 信号通路, 并且加重了肝缺血再灌注诱导的肝损伤, 本研究得出的结论与之基本一致。

ALT、AST、AKP、TBIL、IBIL 是临床上反映肝功能状态的重要指标, 细胞培养上清液中 ALT、AST、AKP、TBIL、IBIL 的含量与细胞损伤程度密切相关。本研究观察到 RFP 可以诱导细胞培养上清液中细胞损伤标志物 ALT、AST、AKP、TBIL、IBIL 水平升高, 并且 MANF 敲低后这些指标进一步升高, 间接说明敲低 MANF 加重了 RFP 对 HepG2 细胞的损伤。与敲低 MANF 升高了 HepG2 细胞凋亡率及降低了细胞增殖能力这些结果相结合, 可以进一步说明 MANF 有细胞保护作用。

参考文献

- [1] Zhang W, Chen L, Shen Y, et al. Rifampicin-induced injury in L02 cells is alleviated by 4-PBA *via* inhibition of the PERK-ATF4-CHOP pathway [J]. *Toxicol In Vitro*, 2016, 36: 186-96.
- [2] Young C N, Cao X, Guruju M R, et al. ER stress in the brain subfornical organ mediates angiotensin-dependent hypertension [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(11): 3960-4.
- [3] Krawczyk K K, Ekman M, Rippe C, et al. Assessing the contribution of thrombospondin-4 induction and ATF6 α activation to endoplasmic reticulum expansion and phenotypic modulation in bladder outlet obstruction [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32449.
- [4] Lindström R, Lindholm P, Kallijärvi J, et al. Exploring the conserved role of MANF in the unfolded protein response in *Drosophila melanogaster* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151550.
- [5] Kamada Y, Nawata Y, Sugimoto Y. Lysozyme mutants accumulate in cells while associated at their N-terminal alpha-domain with the endoplasmic reticulum chaperone GRP78/BiP [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(2): 184-97.
- [6] Zhu G, Lee A S. Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(7): 1413-20.
- [7] Cai Y, Zheng Y, Gu J, et al. Betulinic acid chemosensitizes breast cancer by triggering ER stress-mediated apoptosis by directly targeting GRP78 [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 636.
- [8] Chen S, Xuan J, Wan L, et al. Sertraline, an antidepressant, induces apoptosis in hepatic cells through the mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Toxicol Sci*, 2014, 137(2): 404-15.
- [9] Wang X, Zhang Y, Jolicoeur E M, et al. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses [J]. *EMBO J*, 1998, 17(19): 5708-17.
- [10] Yoshida H, Okada T, Haze K, et al. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(18): 6755-67.
- [11] Wu J, Rutkowski D T, Dubois M, et al. ATF6 α optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress [J]. *Dev Cell*, 2007, 13(3): 351-64.
- [12] 陈滢, 李成锦, 杨文, 等. MANF 对内质网应激诱导的细胞凋亡的保护作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(11): 1308-12.
- [13] Apostolou A, Shen Y, Liang Y, et al. Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(13): 2454-67.
- [14] Hellman M, Arumäe U, Yu L, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) has a unique mechanism to rescue apoptotic neurons [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(4): 2675-80.
- [15] Yang Y, Wang P, Zhang C, et al. Hepatocyte-derived MANF alleviates hepatic ischaemia-reperfusion injury *via* regulating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in mice [J]. *Liver Int*, 2021, 41(3): 623-39.

The effects and mechanism of knockdown MANF on rifampicin induced HepG2 cell injury

Dai Qiong, Zhang Weiping, Chen Gang, et al

(Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effects and mechanism of knockdown mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) on rifampicin (RFP) induced HepG2 cell injury. **Methods** A MANF-knockdown stable cell line (MANF Y25) and a control cell line (MANF Y07) were constructed by lentivirus transfection. After HepG2 cells were treated with 100 μ mol/L RFP for 24 h, the experiment was divided into MANF Y07 + DMSO group, MANF Y07 + RFP group, MANF Y25 + DMSO group and MANF Y25 + RFP group. Western blot and qRT-PCR were used to detect the protein and gene expression levels of MANF and unfolded protein response (UPR)-related genes such as glucose-regulated protein 78 (GRP78), protein kinase R-like ER kinase (PERK), eukaryotic

网络出版时间: 2021-8-19 16:09 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210819.1122.008.html>

芹菜素对人牙髓间充质细胞增殖和成骨分化的影响

汪芹芹¹, 徐燕¹, 胡韶光¹, 刘珂珂¹, 桂双英²

摘要 目的 探讨芹菜素对人牙髓间充质细胞(hDPSCs)增殖与成骨分化的影响。方法 CCK-8法检测不同浓度芹菜素对hDPSCs增殖的影响;碱性磷酸酶活性检测及碱性磷酸酶染色(ALP)和茜素红染色观察芹菜素对hDPSCs矿化能力的影响;Real-time PCR检测芹菜素影响下hDPSCs成骨向分化相关基因表达情况。构建兔颅骨缺损模型(4个直径8mm圆形缺损),分四组:空白组、骨粉组、普通培养的hDPSCs复合骨粉组、含5 μmol/L芹菜素培养的hDPSCs复合骨粉组。术后4、8周取标本行Micro-CT测量骨体积分数。结果 CCK-8检测显示5 μmol/L芹菜素对hDPSCs增殖影响最优;茜素红染色结果显示5 μmol/L芹菜素组钙结节的数量明显增多,碱性磷酸酶活性显著提高($P < 0.001$);PCR结

果显示5 μmol/L芹菜素组RUNX2和OCN表达上调。Micro-CT显示在4、8周含5 μmol/L芹菜素培养的hDPSCs复合骨粉组的新骨形成较普通培养的hDPSCs复合骨粉组多,空白组与骨粉组成骨效果不明显。结论 芹菜素能促进hDPSCs的增殖和成骨分化,为临床治疗牙周骨缺损提供新思路。

关键词 芹菜素;人牙髓间充质细胞;骨再生;牙周炎
中图分类号 R 285.5; R 780.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)10-1549-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.008

2021-06-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81873019); 安徽高校自然科学研究项目(编号: KJ2017ZD17)

作者单位: ¹ 安徽医科大学口腔医学院, 安徽省口腔疾病研究中心实验室, 合肥 230032

² 安徽中医药大学药学院, 合肥 230013

作者简介: 汪芹芹, 女, 硕士研究生;

徐燕, 女, 教授, 硕士生导师, 主任医师, 责任作者, E-mail: 173236344@qq.com

牙周炎是导致牙周组织缺损的重要因素之一, 随着再生医学和牙周组织工程的发展, 以自体来源的种子细胞复合生物材料植入牙周病损部位, 修复牙周缺损受到越来越多学者的关注^[1-2]。但是, 如何获取大量种子细胞仍是一个难题。芹菜素(4', 5', 7-三羟基黄酮)是一种黄酮类化合物, 无毒且无致突变性, 还有抗炎、抗氧化、抗病毒活性及抗肿瘤等药理作用^[3]。许周媚等^[4]证实了芹菜素可显著促进MC3T3-E1细胞成骨分化和矿化。人牙髓间充质

translation initiation factor 2 α (eIF2 α), activating transcription factor 4 (ATF4), C/EBP-homologous protein (CHOP), tribbles homolog 3 (TRIB3), inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), spliced X-box binding protein1-S (XBP1-S), non-spliced X-box binding protein 1-U (XBP1-U) and activating transcription factor 6 (ATF6); Annexin V-PE/7-AAD double staining was used to detect the apoptosis rate of cells in each group; The changes in the cell proliferation ability were determined by the cell counting kit-8 assay; The relative contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (AKP), total bilirubin (TBIL) and indirect bilirubin (IBIL) in the supernatant of cell culture were detected by kits. **Results** At the protein level, RFP induced the protein expression of MANF, GRP78, p-eIF2 α , ATF4 and ATF6; at the gene level, RFP induced the gene expression of MANF and UPR-related genes GRP78, PERK, eIF2 α , ATF4, CHOP and TRIB3 in HepG2 cells. After MANF knockdown, the protein expression levels of GRP78, p-PERK, p-eIF2 α , ATF4, ATF6 and the genes expression levels of UPR-related genes mentioned above were further up-regulated ($P < 0.05$). Moreover, it was also found that after MANF knockdown, the rate of apoptosis increased ($P < 0.01$), the cell proliferation ability decreased ($P < 0.01$), and the levels of cell injury markers ALT, AST, AKP, TBIL and IBIL in the supernatant of cell culture increased ($P < 0.05$). **Conclusion** RFP activates the UPR, which is further enhanced by MANF knockdown, and cell injury is aggravated, indicating that MANF may play a protective role in RFP-induced HepG2 cell injury by regulating the UPR.

Key words mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor; rifampicin; endoplasmic reticulum stress; cell injury; mechanism