

网络出版时间: 2021-9-7 14:46 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210907.1402.017.html>

# 基于低糖低血清营养胁迫构建内质网应激和自噬模型及其评价

化 维 朱嫚嫚 刘加涛

**摘要** 目的 通过营养胁迫构建内质网应激和自噬模型并评价其对肿瘤增殖和凋亡的影响。方法 以含 1% 血清的低糖 DMEM 培养基分别处理 HepG2 细胞、Huh7 细胞不同时间, Western blot 检测内质网应激标志蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、活化转录因子-6 (ATF6)、必需肌醇 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ )、蛋白激酶 RNA 样内质网激蛋白 (PERK) 和自噬蛋白轻链 3 (LC3)、核孔蛋白 62 (P62)、自噬相关蛋白 1 (Beclin-1) 的表达。免疫荧光双染观察自噬蛋白 LC3 和 GRP78 的共表达情况。分别采用流式细胞术和 CCK-8 检测营养胁迫对细胞凋亡和增殖的影响。结果 Western blot 结果显示营养胁迫可时间依赖性的增加肝癌细胞内质网应激和自噬相关蛋白的表达,且在 36 h 达到高峰。激光共聚焦检测结果进一步证明营养胁迫 36 h 后肝癌细胞 GRP78 和 LC3 荧光强度显著增加。流式细胞术结果显示,低糖低血清营养胁迫模型不会增加肝癌细胞凋亡,但 CCK-8 实验提示营养胁迫可抑制肝癌细胞的增殖。结论 1% 血清低糖 DMEM 不仅可以诱导内质网应激和自噬且不增加肿瘤细胞凋亡,更符合微环境肿瘤细胞生存状态,为研究内质网应激和自噬提供一种新方法。

**关键词** 营养胁迫; 内质网应激; 自噬; 增殖; 凋亡

**中图分类号** R 735.7; Q 2-33

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2021)11-1779-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.11.019

2021-07-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82072687); 安徽省自然科学基金(编号: 2008085MH257); 高校优秀青年人才支持计划(编号: gxyq2020008)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院药剂科, 合肥 230022

作者简介: 化 维, 女, 硕士研究生, 初级药师;

刘加涛, 男, 副主任药师, 责任作者, E-mail: liujiatao@ahmu.edu.cn

肿瘤细胞增殖异常活跃,常处于缺血、低氧等营养缺乏的应激状态。肿瘤细胞可通过内质网应激和自噬过程应对恶劣的微环境,来维持自身存活<sup>[1]</sup>。多项研究<sup>[2]</sup>表明,内质网应激和自噬共同参与多种肿瘤的发生发展、侵袭转移、凋亡抵抗等生物学过程。目前,大部分研究者都采用化学药物体外构建内质网应激或自噬模型,如通过衣霉素阻止蛋白质合成过程中 N-糖基化的形成构建内质网应激模型,通过雷帕霉素特异性的抑制 mTOR 通路激活自噬。这些方法诱导内质网应激或自噬虽然操作简单,但也存在诸多的问题。此外,为了克服药物诱导模型的缺陷,部分研究者分别采用无血清基础培养基饥饿<sup>[3]</sup>或者 Hanks 液等平衡液使肿瘤细胞处于完全没有生长因子、葡萄糖等极端的状态诱导内质网应激或自噬模型。为尽可能规避化学药物和极端营养胁迫诱导应激模型造成的实验误差,该研究采用含 1% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基体外构建营养胁迫模型,检测该模型条件下肝癌细胞内质网应激和自噬水平,以期为体外研究内质网应激和自噬在肿瘤发生发展等过程中的作用和机制提供模型。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞** 人肝癌细胞 HepG2 购自中国科学院上海细胞库; 人肝癌细胞 Huh7 购自武汉普诺赛细胞生物有限公司。

**1.2 主要试剂** 细胞培养用胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM、低糖 DMEM 基础培养基均购自以色列 BI 公司; 1% 的青霉素-链霉素和胰蛋白酶购自上海碧云天有限公司; 山羊抗兔蛋白激酶

the MCs proliferation, increase the protein expression levels of GRK2 and p-p38, up-regulate the colocalization rates of GRK2 and p-p38, and increase the proportion of GRK2 into the cytoplasm. CP-25 (10, 100, 1 000 nmol/L) could inhibit the proliferation induced by Ang II to varying degrees, reduce the protein expression levels of GRK2, p-p38 and the co-localization rates of GRK2 and p-p38, and down-regulate the ratios of GRK2 into cytoplasm. **Conclusion** CP-25 can inhibit MCs' proliferation stimulated with Ang II, and its mechanism may be related to GRK2/p38MAPK signaling pathway.

**Key words** mesangial cell; proliferation; Ang II; GRK2; p38; CP-25

RNA 样内质网激蛋白 (protein kinase RNA-like ER kinase, PERK)、葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulatory protein 78, GRP78)、自噬相关蛋白 1 (autophagy-related protein 1, Beclin-1) 和活化转录因子-6 (activated transcription factor-6, ATF6) 抗体购自武汉 Abclonal 生物科技有限公司; 山羊抗兔必需肌醇 1 $\alpha$  (inositol requires 1 $\alpha$ , IRE1 $\alpha$ ) 抗体购自美国 Sigma 公司; 山羊抗鼠  $\beta$ -actin 抗体和荧光二抗购自美国 proteintech 公司; 山羊抗兔自噬蛋白轻链 3 (light chain 3, LC3) 抗体购自美国 cell signalling technology 公司; 山羊抗兔核孔蛋白 62 (nucleoporin 62, P62) 抗体购自英国 Abcam 公司; 山羊抗鼠 GRP78 抗体购自上海 arigobio 生物有限公司; CCK-8、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物科技公司; DAPI 染核液购自美国 Sigma 公司。

**1.3 仪器** CO<sub>2</sub> 细胞培养箱购自美国 DYY-7C 型; 电泳系统购自北京六一生物有限公司; Image Quant LAS 4000 荧光及发光成像系统购自美国 GE 公司; FC500 流式细胞仪购自美国 Beckman coulter 公司; M450 酶标仪购自美国 Bio Rad 公司; 激光共聚焦显微镜购自德国徕卡公司。

#### 1.4 方法

**1.4.1 细胞培养** HepG2 和 Huh7 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 的青霉素-链霉素的 DMEM 培养基在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养箱进行培养, 每隔 1 d 更换培养基, 直至细胞融合到 80% 左右用胰蛋白酶消化传代。营养胁迫组分: 含 1% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基。

**1.4.2 低糖低血清营养胁迫模型的构建** 将  $1 \times 10^5$  个对数生长期的 HepG2 或 Huh7 细胞接种到 6 孔板中, 培养贴壁 12 h 后, 对照组 (control 组) 和实验组分别换用含 10% FBS 的 DMEM 培养基以及含 1% FBS 的低糖 DMEM 培养基, 继续培养 0、6、12、24、36 和 48 h 以构建营养胁迫模型, 培养结束后收集细胞进行后续检测, 36 h 组为 1% FBS 的低糖 DMEM 培养基处理肝癌细胞 36 h。

**1.4.3 Western blot 检测内质网应激和自噬标志蛋白** 收集上述培养条件的细胞, 提取蛋白质, BCA 蛋白定量后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳将目标蛋白转至 PVDF 膜上, 通过 5% 牛奶封闭 2 h, 再用 PBS 清洗 10 min, 共清洗 3 次, 使用特异性一抗 (如  $\beta$ -actin、GRP78、ATF6、PERK 和 IRE1 $\alpha$  等) 按说明书内原抗体: 一抗稀释液 = 1 : 1 000 比例进行稀释, 孵育条带过夜, 按照二抗原液: 5% 牛奶 TBST = 1 : 50 000

敷育 2 h, 最后使用发光成像系统检测荧光信号并显色成像, 采用 Image-J 分析所得条带的灰度值, 利用目的蛋白的灰度值与内参灰度值的比值作为分析结果。

**1.4.4 流式细胞术检测细胞凋亡** 分别以 1% 血清低糖 DMEM 营养胁迫处理 Huh7 或 HepG2 细胞 0、36 h。培养结束后, 以预冷 PBS 轻柔清洗细胞两遍, 加不含 EDTA 的胰蛋白酶进行消化, 显微镜下观察待细胞变圆弃胰酶, 加入原培养上清液终止消化, 轻柔吹打制成单细胞悬液, 以 1 800 r/min 进行离心, 弃去上清液, 加入 PBS 洗涤同样条件下离心, 以 400  $\mu$ l 的 Annexin V 结合液重悬细胞并加入 5  $\mu$ l Annexin V-FITC 混匀, 4 °C 避光孵育 15 min, 然后加入 7.5  $\mu$ l 的 PI-PE 染液轻轻混匀置于 4 °C 避光孵育 5 min, PBS 清洗, 重悬后流式细胞仪检测细胞凋亡。

**1.4.5 免疫荧光试验** 以预冷 PBS 清洗 HepG2 或 Huh7 细胞 2 遍后使用 4% 多聚甲醛固定 30 min。PBS 再次清洗 2 遍, 使用 0.5% Triton X-100 破膜 10 min, 经 PBS 清洗后分别于山羊抗鼠 GRP78 和山羊抗兔 LC3 抗体孵育过夜, 清洗后孵育二抗, DAPI 染核后激光共聚焦显微镜检测 GRP78 与 LC3 共表达情况。

**1.4.6 CCK-8 检测细胞增殖** 取对数生长期的 HepG2 和 Huh7 细胞, 消化后制成单细胞悬液, 计数, 按照  $5 \times 10^3$  /孔接种到 96 孔板中。静置 6 h 后, 实验组换成含 1% 血清的低糖 DMEM 培养基, 每组设 5 个复孔, 继续培养 36 h 后, 每孔加入 CCK-8 试液 10  $\mu$ l, 继续孵育 2 h, 最后在 450 nm 波长下测定吸光度, 分别计算营养胁迫对 HepG2 和 Huh7 细胞增殖的影响。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理, 计量资料使用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组数据间的比较采用配对资料  $t$  检验, 两组以上数据的比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 低糖低血清营养胁迫促进肝癌细胞内质网应激** 为观察营养胁迫对内质网应激的影响, 分别使用含 1% 血清的低糖 DMEM 营养胁迫肝癌 HepG2 和 Huh7 细胞 0、6、12、24、36、48 h。Western blot 分析发现, 与正常培养 HepG2 细胞相比, 低糖低血清营养胁迫可时间依赖性地促进内质网应激标志蛋白 GRP78 ( $F = 12.40$ ,  $P < 0.001$ )、ATF6 ( $F = 6.33$ ,  $P < 0.01$ )、PERK ( $F = 10.20$ ,  $P < 0.001$ ) 和 IRE1 $\alpha$  ( $F =$

11.81,  $P < 0.001$ ) 表达, 且 36 h 表达水平与 48 h 差异无统计学意义, 见图 1A。与此相似, 低糖低血清也可时间依赖性地增加 Huh7 细胞内质网应激标志蛋白 GRP78 ( $F = 17.55$ ,  $P < 0.001$ ) 和 ATF6 ( $F = 8.565$ ,  $P < 0.001$ ) 的表达, 但对 Huh7 细胞 PERK 和 IRE1 $\alpha$  的表达无影响(图 1B)。上述结果表明, 低糖低血清营养胁迫肝癌细胞 36 h 是较好的内质网应激诱导条件。

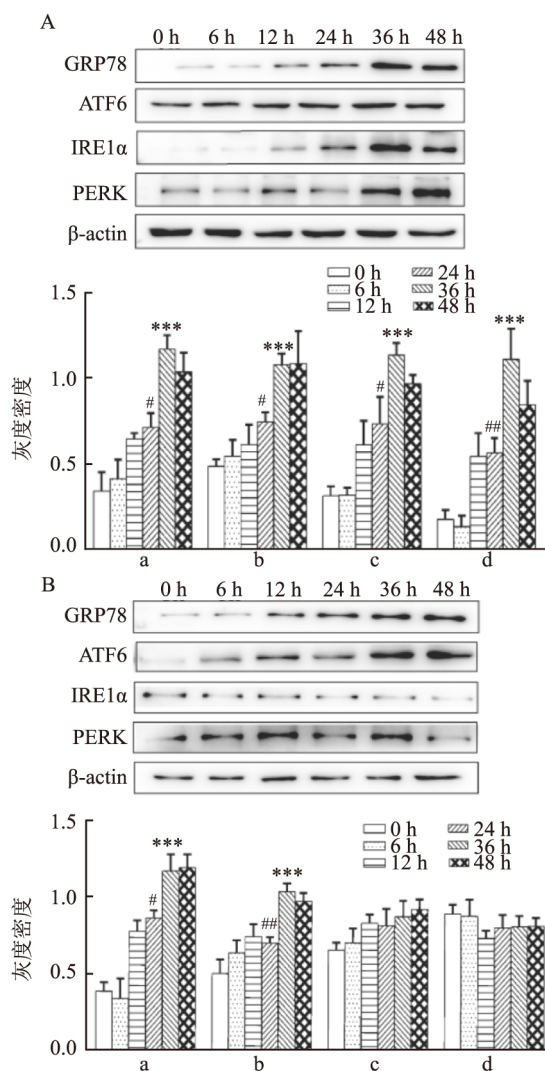


图1 低糖低血清营养胁迫促进肝癌细胞内质网应激

A: Western blot 检测营养胁迫刺激 HepG2 细胞不同时间各蛋白的表达变化; B: Western blot 检测营养胁迫刺激 Huh7 细胞不同时间各蛋白的表达变化; a: GRP78; b: ATF6; c: IRE1 $\alpha$ ; d: Perk; 与 0 h 组比较: \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 36 h 组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

**2.2 低糖低血清营养胁迫诱导肝癌细胞自噬** 进一步采用 Western blot 检测低糖低血清处理后肝癌细胞自噬相关蛋白的表达变化, 由图 2A 可见, 营养胁迫可时间依赖性的促进肝癌 HepG2 细胞 Beclin-1

( $F = 5.426$ ,  $P < 0.01$ ) 和 LC3-II/LC3-I ( $F = 14.19$ ,  $P < 0.001$ ) 蛋白表达, 并降低 P62 表达( $F = 17.64$ ,  $P < 0.001$ )。与诱导内质网应激一致的是, 36 h 和 48 h 组间自噬相关蛋白的表达水平无明显差异(图 2A)。此外, 上述条件处理 Huh7 细胞也可显著升高 Beclin-1 ( $F = 11.10$ ,  $P < 0.001$ ) 和 LC3-II/LC3-I ( $F = 10.14$ ,  $P < 0.001$ ) 的表达, 并降低 P62 蛋白( $F = 24.16$ ,  $P < 0.001$ ) 的表达(图 2B)。上述结果表明, 低糖低血清营养胁迫 36 h 也可诱导肝癌细胞发生明显的自噬。

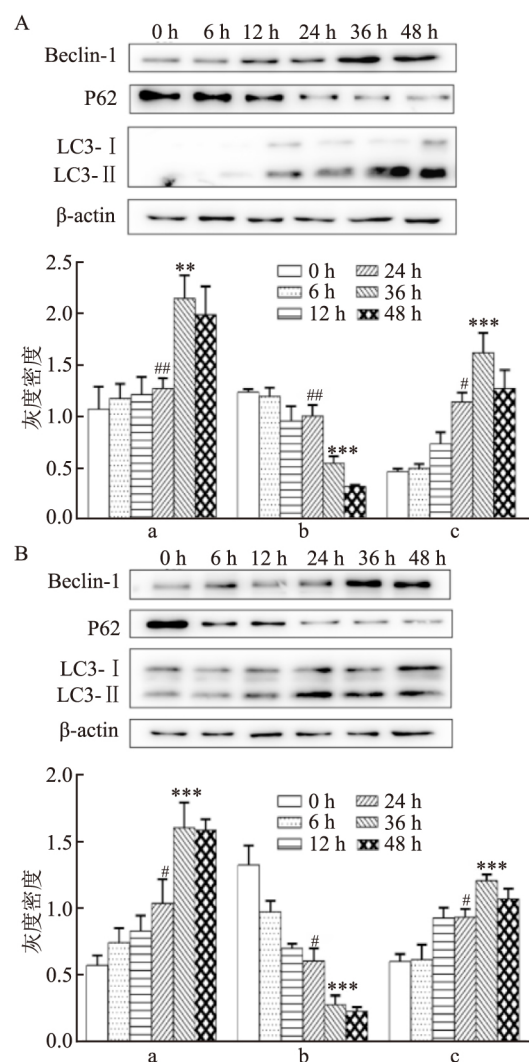


图2 低糖低血清营养胁迫促进肝癌细胞自噬

A: Western blot 检测营养胁迫刺激 HepG2 细胞不同时间 Beclin-1、P62、LC3 的表达水平; B: Western blot 检测营养胁迫刺激 Huh7 细胞不同时间 Beclin-1、P62、LC3-II/LC3-I 的表达水平; a: Beclin-1; b: P62; c: LC3-II/LC3-I; 与 0 h 组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 36 h 组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

**2.3 低糖低血清营养胁迫促进肝癌细胞内 GRP78 与 LC3 共表达** 为进一步证实低糖低血清营养胁迫

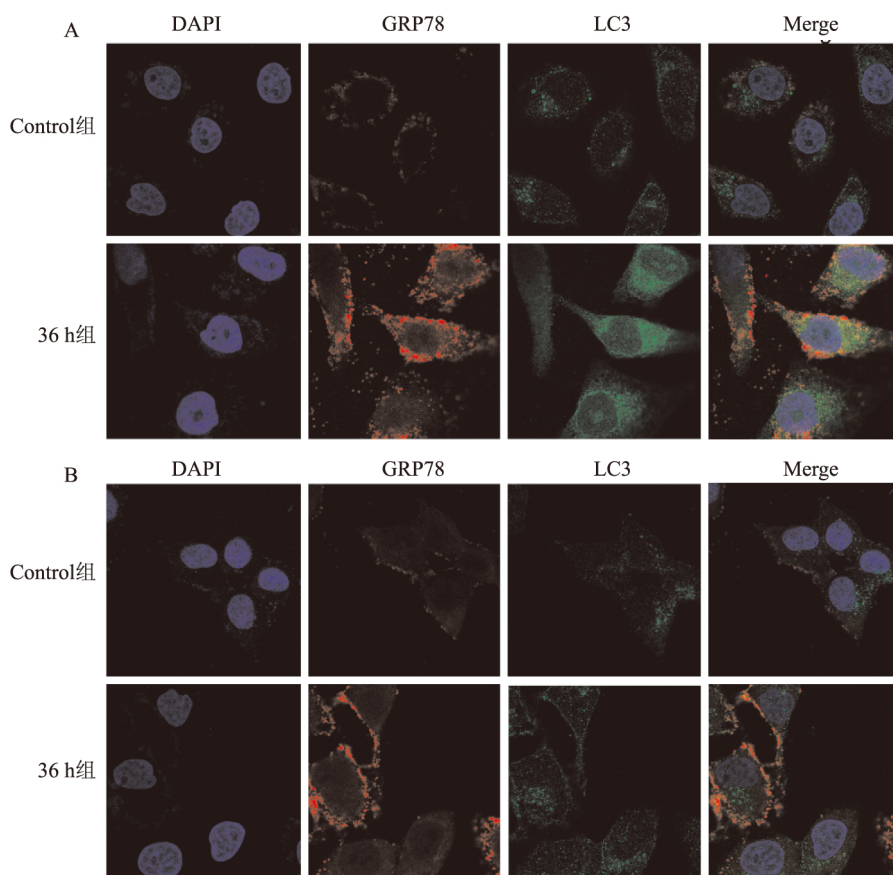


图3 低糖低血清营养胁迫促进肝癌细胞内 GRP78 与 LC3 共表达 ×400

A: 免疫荧光双染检测 HepG2 内 GRP78 与 LC3 的共表达; B: 免疫荧光双染检测 Huh7 内 GRP78 与 LC3 的共表达

迫 36 h 能否有效诱导肿瘤细胞自噬和内质网应激, 使用免疫荧光染色同时检测 GRP78 和 LC3 的表达。如图 3A 所示, 与 Control 组相比, 36 h 组中 HepG2 细胞核周围的 GRP78(红色)和 LC3(绿色)荧光强度明显增加。在 Huh7 细胞中也观察到了同样的现象(图 3B), 表明 36 h 组可以同时诱导肿瘤细胞发生明显的内质网应激和自噬。

#### 2.4 低糖低血清营养胁迫不增加肝癌细胞凋亡

由图 4 可见, Control 组与 36 h 组中 HepG2 细胞的凋亡率差异无统计学意义。此外, 与 Control 组相比, 36 h 组也未能增加 Huh7 细胞的凋亡。上述结果表明, 本研究建立的含 1% 血清营养胁迫模型能够较好的模拟微环境肿瘤细胞生存状态, 更贴合临床实际。

2.5 低糖低血清营养胁迫抑制肝癌细胞增殖 与正常培养的 HepG2 细胞相比, 36 h 组抑制肿瘤细胞增殖(图 5A)。与此相似, 36 h 组也可抑制 Huh7 细胞的增殖(图 5B)。

### 3 讨论

内质网应激在多种实体肿瘤(如肝癌)中普遍

激活, 其在血液系统恶性肿瘤中也发挥着重要作用<sup>[4]</sup>。当前对于内质网应激与肿瘤发生发展关系的研究多聚焦于内质网应激对肿瘤细胞侵袭迁移、耐药和免疫逃逸等的影响, 这些研究多采用化学药物(如衣霉素、毒胡萝卜素、二硫苏糖醇等)通过诱导氧化还原反应、改变氨基酸链的空间结构等方式来构建内质网应激模型。然而这些药物在诱导内质网应激的同时也可能给实验带来意想不到的干扰, 如衣霉素生产过程中单体分离率低, 常以混合物的形式存在, 毒胡萝卜素在导致钙稳态失衡的同时还可上调 caspase-3 凋亡通路<sup>[5]</sup>。因此, 有学者采取无血清的基础培养基饥饿胃癌细胞或 10% FBS 不含葡萄糖基础培养基研究内质网应激与细胞的侵袭、线粒体的呼吸速率等细胞生命活动的关系<sup>[3, 6]</sup>。这种低血清或者无碳源的营养胁迫模式不能完全阐述营养应激与肿瘤耐药、发展等过程的关系。在本研究中, 同时使用低血清(1%)和低糖模拟“饥饿”肿瘤微环境, 发现该方法可诱导明显的内质网应激且不增加肿瘤细胞凋亡, 该方法无外源性化学药物的干扰, 因此更符合微环境肿瘤细胞应激状态。



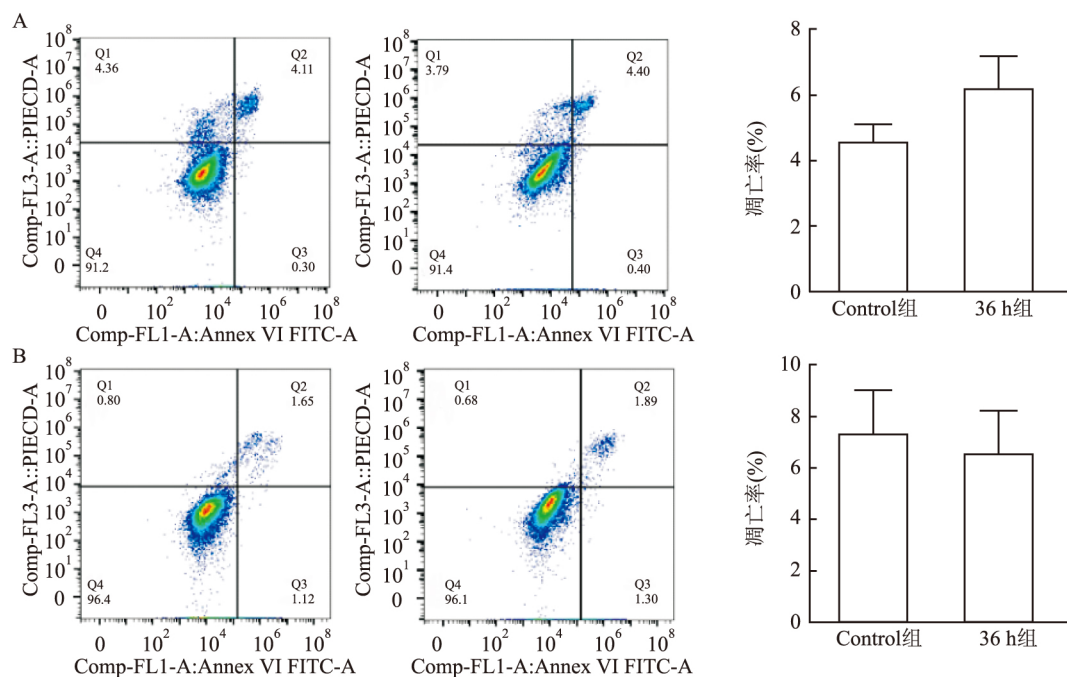


图4 低糖低血清营养胁迫不增加肝癌细胞凋亡

A: 流式细胞术检测 HepG2 细胞凋亡率; B: 流式细胞术检测 Huh7 细胞凋亡率

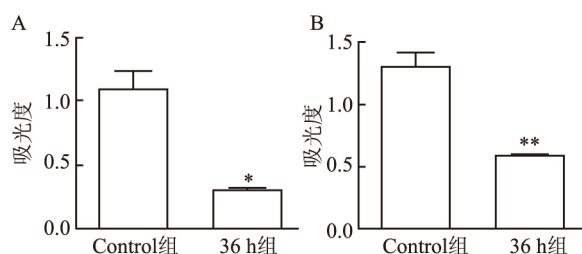


图5 低糖低血清营养胁迫抑制肝癌细胞增殖

A: CCK-8 检测 HepG2 细胞增殖率; B: CCK-8 检测 Huh7 细胞增殖率; 与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 

自噬激活在肿瘤细胞耐药和进展中发挥关键调控作用。LC3 被认为是自噬小体的标志,其以泛素样蛋白广泛存在肿瘤细胞质内。可溶形式的 LC3 (LC3-I) 和 LC3 自噬囊泡相关形式 (LC3-II) 是 LC3 的两种产生形式。肿瘤发生自噬的过程中,脂质结合导致 LC3-I 转化为 LC3-II 并被招募为自噬小体,因此 LC3-II / I 常被用来衡量自噬的水平。研究<sup>[7]</sup>表明,衣霉素在诱导内质网应激的同时也可促进 HepG2 自噬,降低化疗药物诱导的凋亡;索拉非尼可通过上调 IRE1 $\alpha$  信号激活自噬,促进肝癌细胞索拉非尼耐药<sup>[8]</sup>,表明自噬与内质网应激之间存在密切的联系。与此相似,本研究显示,使用低糖低血清营养胁迫 36 h 可促进肝癌细胞同时发生自噬和内质网应激。目前体外诱导自噬的常用方法包括使

用雷帕霉素、Torin-1 等药物的化学诱导法和使 Hanks、EBSS 等平衡液的非药物诱导法。这两类自噬诱导方法均存在与体外诱导肉质网应激相同的问题,不能很好的模拟微环境肿瘤细胞应激状态。此外,有研究<sup>[9]</sup>显示,10% FBS 无糖 DMEM、10% FBS 低糖 DMEM 和无血清 DMEM 的营养胁迫可造成 Huh7 等细胞乳酸脱氢酶严重下降,但短时间内 (16 h) 对 P62 等自噬蛋白则无明显影响。而本研究构建的低糖低血清营养胁迫 Huh7 细胞 12 h 时即可激活自噬,下调 P62 蛋白表达且营养胁迫 36 h 左右自噬达到顶峰。此外,有研究<sup>[10]</sup>表明,0.5% FBS DMEM 营养胁迫乳腺癌细胞 42 h 可导致肿瘤细胞发生明显的凋亡,而本实验以 1% FBS 低糖营养胁迫肝癌细胞 36 h 未发现细胞发生明显的凋亡,营养胁迫 48 h 凋亡稍有增加但差异无统计学意义,但 CCK-8 实验表明体外营养胁迫明显抑制肿瘤细胞的体外增殖。这可能是由于体内的肿瘤细胞可通过促进血管生成、改变代谢途径等方式代偿性满足自身增殖的营养需求有关。

综上所述,本实验采用低糖低血清策略模拟肿瘤微环境营养胁迫状态建立内质网应激和自噬模型,进一步评估发现本模型虽对肿瘤细胞增殖有所抑制但不引起细胞凋亡,与微环境中肿瘤细胞的应激状态较吻合,因此可作为内质网应激和自噬诱导

模型用于肿瘤研究。

### 参考文献

- [1] 张 涛,陈 强,杜卫东,等. 下调 PMEPA1 表达对肝癌细胞 HepG2 增殖与转移的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56( 5): 741 - 5.
- [2] Lin Y, Jiang M, Chen W, et al. Cancer and ER stress: mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109249.
- [3] Mohamed E, Cao Y, Rodriguez P C. Endoplasmic reticulum stress regulates tumor growth and anti-tumor immunity: a promising opportunity for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66( 8): 1069 - 78.
- [4] 史冠男,甘惠中,彭 琼,等. 血清饥饿诱导胃癌 SGC-7901 细胞内质网应激介导上皮间质转化的发生[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48( 2): 120 - 3.
- [5] 闫 宇,肖 坤,梁晓飞,等. 毒胡萝卜素对小鼠肺成纤维细胞内钙离子水平及 caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 四川大学学报( 医学版), 2018, 49( 3): 380 - 3, 413.
- [6] Balsa E, Soustek M S, Thomas A, et al. ER and nutrient stress promote assembly of respiratory chain supercomplexes through the PERK-eIF2 $\alpha$  axis [J]. *Mol Cell*, 2019, 74( 5): 877 - 90. e6.
- [7] Ma T, Li Y Y, Zhu J, et al. Enhanced autophagic flux by endoplasmic reticulum stress in human hepatocellular carcinoma cells contributes to the maintenance of cell viability [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30( 1): 433 - 40.
- [8] Shi Y H, Ding Z B, Zhou J, et al. Targeting autophagy enhances sorafenib lethality for hepatocellular carcinoma *via* ER stress-related apoptosis [J]. *Autophagy*, 2011, 7( 10): 1159 - 72.
- [9] Nguyen T B, Louie S M, Daniele J R, et al. DGAT1-dependent lipid droplet biogenesis protects mitochondrial function during starvation-induced autophagy [J]. *Dev Cell*, 2017, 42( 1): 9 - 21. e5.
- [10] Tong J, Sun D, Yang C, et al. Serum starvation and thymidine double blocking achieved efficient cell cycle synchronization and altered the expression of p27, p53, bcl-2 in canine breast cancer cells [J]. *Res Vet Sci*, 2016, 105: 10 - 4.

## Construction and evaluation of endoplasmic reticulum stress and autophagy models based on low-glucose and low-serum nutrient stress

Hua Wei, Zhu Manman, Liu Jiatao

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

**Abstract Objective** To construct the models of endoplasmic reticulum stress and autophagy through nutrient stress, and evaluate its effects on tumor proliferation and apoptosis. **Methods** HepG2 cells and Huh7 cells were treated with low-glucose DMEM containing 1% serum for different time. The endoplasmic reticulum stress marker proteins glucose regulatory protein 78 ( GRP78 ), activated transcription factor-6 ( ATF6 ), inositol requires 1 $\alpha$  ( IRE1 $\alpha$  ), include protein kinase RNA-like ER kinase ( PERK ) and autophagy-related proteins light chain 3 ( LC3 ), nucleoporin 62 ( P62 ), autophagy-related protein 1 ( Beclin-1 ) were detected by Western blot. Immunofluorescence was used to observe the co-localization of LC3 and GRP78. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis rate. CCK-8 was used to detect cell proliferation. **Results** Western blot showed that nutrient stress increased the expressions levels of GRP78, ATF6, IRE1 $\alpha$ , PERK, LC3, P62 and Beclin-1 in HepG2 cells and Huh7 cells in a time-dependent manner, and reached a peak at 36 h. Laser confocal microscopy further showed that the fluorescence intensity of GRP78 and LC3 significantly increased at 36 h. The flow cytometry showed that the low-glucose DMEM containing 1% serum did not increase the apoptosis of liver cancer cells. However, CCK-8 experiments found that nutrient stress could inhibit the proliferation of liver cancer cells. **Conclusion** Low-glucose DMEM containing 1% serum can not only induce endoplasmic reticulum stress and autophagy, but also not increase tumor cell apoptosis. The models are consistent with the real survival status of tumor cells, and provide a new and better method for studying endoplasmic reticulum stress and autophagy.

**Key words** nutrient stress; endoplasmic reticulum stress; autophagy; proliferation; apoptosis