

网络出版时间: 2016-6-22 14:44:58 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160622.1444.018.html

自噬在内质网应激诱导的肝星状细胞凋亡中的作用研究

汪应红¹, 王欢¹, 左龙泉¹, 王亚飞², 黄涛², 范宇哲², 李凡杰², 王旭东², 黄艳¹

摘要 目的 研究内质网应激诱导 HSC 凋亡的过程中自噬的发生与否及其作用, 为肝纤维化的逆转提供新的思路。方法 采用血小板衍生生长因子(PDGF-BB)诱导大鼠肝星状细胞系 HSC-T6 活化模型, 在此基础上, 给予 ERS 诱导剂毒胡萝卜素(TG)刺激 24 h, Western blot 法检测自噬相关蛋白 LC3B 的表达, MDC 染色法观察自噬小体的生成, 观察 TG 对 HSC 自噬的影响, 进一步采用 3-MA 阻断自噬, 流式细胞术检测各组细胞凋亡率, 观察自噬在内质网应激诱导的肝星状细胞凋亡中的作用。结果 TG 可以诱导 HSC 凋亡, 伴随着自噬的发生, 用 3-MA 阻断自噬可以增强 TG 诱导的 HSC 凋亡。结论 内质网应激诱导 HSC 凋亡的过程伴随自噬, 阻断自噬可以增强内质网应激诱导的 HSC 凋亡。

关键词 内质网应激; 自噬; 肝星状细胞; 肝纤维化; 凋亡

中图分类号 R 966

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)08-1115-05

肝纤维化是肝脏对各种慢性损伤的修复反应, 是受到各种致病因子的侵袭所致的慢性炎症性疾

病, 本质是 Collagen I 等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)相关主要成分的大量累积^[1]。研究^[2]表明静止的肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化增殖、大量过度分泌 ECM 是导致肝纤维化发生的主要原因。因此, 促进活化的 HSC 发生凋亡是一种有效的肝纤维化防治方法。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是内质网功能紊乱导致的内质网未折叠和错误折叠蛋白的累积、细胞内钙离子平衡失调^[3-4]。内质网应激所诱导的细胞凋亡是最近几年才被了解的一种新的凋亡途径, 与经典的线粒体和死亡受体介导的细胞凋亡明显不同。目前已知由 ERS 激活凋亡的路径有三条: ①通过 PERK/eIF2 α 路径激活 CHOP 基因的转录, 下调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达, 促进细胞凋亡; ②通过 IRE1 激活 JNK 信号通路下调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达, 激活线粒体凋亡级联反应、上调促凋亡基因 Bim; ③ERS 特有的 Caspase-12 的激活, 进一步激活凋亡启动因子 Caspase-9 及凋亡执行因子 Caspase-3^[5]。ERS 通过减少未折叠或错误折叠蛋白沉积, 激活促凋亡信号通路, 被证实与许多疾病密切相关^[6]。前期研究^[7]显示 ERS 能够抑制活化的 HSC 分泌 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和 I 型胶原(Collagen I, Col-I), 促进活化的 HSC 凋亡。自噬是一个细胞吞噬自身细胞质蛋白或细胞器, 使其进入囊泡, 并与溶酶体融合后形成自噬溶酶体的过程, 通过自噬溶酶体降解其所包裹的

2016-04-19 接收

基金项目: 安徽省学术技术带头人后备人选课题(编号: 2015H040); 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(编号: gxyqZD2016049); 安徽医科大学“青年拔尖人才支持计划”; 安徽医科大学临床医学“5+3”一体化专业学生“早期接触科研”训练计划项目(编号: 2015-ZQKY-46)

作者单位: 安徽医科大学¹药学院基础与临床药理教研室、²第二临床医学院, 合肥 230032

作者简介: 汪应红, 男, 硕士研究生;

黄艳, 女, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: aydhy@126.com

: H7(EHEC O157 : H7) with λ Red recombination system. **Methods** Kanamycin-resistant gene with two FRT sites and homologous regions which were cloned from EHEC O157 : H7 by PCR were inserted into plasmid pUC19 to construct a recombinant vector. z4832 was deleted with the recombination function of plasmid pKD46. The kanamycin-resistant gene was deleted with the recombination function of plasmid pCP20. The gene deletion mutant was obtained and identified by PCR and sequencing. Then the growth curve was determined and the change of survival rate were checked in LB or M9 medium containing ofloxacin. **Results** The acetyltransferase gene z4832 defective mutant of EHEC O157 : H7 was successfully constructed. The growth curve of the mutant had no significant difference with that of wild strain. The viability of deletion mutant increased in the culture with LB medium($P < 0.05$) but reduced with M9 medium($P < 0.05$). **Conclusion** The construction of z4832 defective mutant would be helpful for study of the effect of z4832 on antibiotic tolerance and the mechanism by which acetyltransferase works.

Key words EHEC O157 : H7; λ Red recombinant system; acetyltransferase; antibiotics

内容物,从而实现细胞自身的代谢需求和某些细胞器的更新^[8]。自噬是广泛存在于真核细胞内的一种自我保护机制,在调节细胞生存、死亡的过程中扮演着重要的角色。然而自噬相关基因如 ATG5、Bec-1、lin1 等过度上调亦能引起细胞死亡^[9]。内质网应激可以诱导自噬^[10-11],该研究旨在探讨内质网应激诱导 HSC 凋亡的过程中自噬的发生与否及其作用,为肝纤维化的恢复、逆转提供新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 细胞株 HSC-T6 细胞株购自中国科学院上海细胞库,为永生化大鼠 HSC。

1.2 主要材料与试剂 DMEM 培养液(南京凯基生物科技发展有限公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);重组小鼠血小板衍生生长因子(PDGF-BB)(英国 PEPROTECH 公司);毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)、3-methyl adenine (3-MA)、MDC 染料、DMSO(美国 Sigma 公司);细胞组织裂解液 RIPA、蛋白酶抑制剂 PMSF(上海碧云天公司);山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)、 α -SMA、Col-I、GRP78、CHOP、 β -actin 一抗(北京博奥森生物技术有限公司);LC3B 一抗(武汉伊莱特公司);Caspase-12 一抗(美国 CST 公司);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(中国 BestBio 公司)。

1.3 主要仪器 NAPCO-6100 型细胞培养箱(美国 SHELLAB 公司);SW-CJ-4F 型超净工作台(江苏苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);Western blot 设备(美国 Biorad 公司);Sigma3-16K 高速离心机(美国 Sigma 公司);荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);FA2004 型电子天平(上海精天平厂);4℃、-20℃低温冰箱(日本三洋公司);GSG2000 II 型凝胶成像系统(珠海黑马公司);流式细胞仪(美国贝克曼公司)。

1.4 方法

1.4.1 HSC-T6 细胞培养和传代 HSC-T6 细胞使用含有 10% 四季青胎牛血清及 100 IU/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的低糖培养基(1 000 mg/L),置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。当细胞生长融合达到约 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,或接种于培养瓶、6 孔板。

1.4.2 Western blot 法检测 HSC 中 GRP78、CHOP、Caspase-12、LC3B、 α -SMA 和 Col-I 蛋白表达 课题组前期研究^[6]选出最适 PDGF 浓度(20 ng/ml)和

TG 浓度(1 μ mol/L)、3-MA 浓度(5 mmol/L)和作用时间(24 h),分为对照组、PDGF 组、PDGF + TG 组、PDGF + TG + 3-MA 组,同时给药刺激 24 h 后,收集细胞蛋白检测 GRP78、CHOP、Caspase-12、LC3B、 α -SMA 和 Col-I 的表达;具体步骤如下:收集各组细胞,加蛋白裂解液(RIPA:PMSF=100:1 配成),冰上摇晃裂解,每隔 10 min 晃动下培养瓶或 6 孔板,使裂解液充分铺满,裂解 30 min。吸取裂解液于 1.5 ml EP 管中,4℃、12 000 r/min 离心 30 min,取上清液。用定量仪对蛋白样品定量,调整各组蛋白浓度一致,后加入 5 $\times$ SDS 蛋白上样缓冲液,100℃加热 10 min 使蛋白变性。胶配好后,每孔上样 20 μ l 总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,采用湿转法将胶上蛋白转至 PVDF 膜上,膜置于室温下用 5% 脱脂奶粉(TBST 新鲜配制)封闭 3 h,后用 TBST 清洗 3 遍,每遍 15 min,用待检测蛋白的一抗孵育,放于 4℃冰箱过夜。次日,膜用 TBST 清洗后,用与一抗种属相匹配的二抗室温孵育 1 h,用 TBST 清洗 3 遍,每遍 15 min,用 ECL 发光试剂盒显影,以 β -actin 为内参,Image J 软件分析条带的灰度值。

1.4.3 MDC 染色法检测 HSC-T6 细胞自噬水平 细胞分组及处理同 1.4.2,染色前接种于含盖玻片的 6 孔板内。处理时间完成后,弃培养基,用 1 $\times$ PBS 缓冲液轻轻洗涤细胞 3 遍,每遍 5 min,再往每孔分别加入 1 ml 1 $\times$ PBS 缓冲液及 1 μ l 配置好的 100 mmol/L MDC 储存液,形成 100 μ mol/L 的 MDC 工作液,锡箔纸包裹 6 孔板,置于培养箱中避光孵育 30 min。最后吸干含 MDC 的 PBS 溶液,用干净的 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤细胞 2 遍,每遍 5 min,然后将盖玻片置于荧光显微镜下进行自噬小体的观察。

1.4.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 细胞分组及处理同 1.4.2,消化收集各组细胞,以 2 000 r/min 的转速离心 5 min,弃去培养基,用冷的 PBS 溶液洗涤细胞 2 次,用 400 μ l 1 $\times$ Binding Buffer 悬浮 HSC-T6 细胞,浓度大致为 1 $\times$ 10⁶ 个/ml,在细胞悬浮液中加入 5 μ l Annexin V-FITC,轻柔混匀后于 2~8℃条件下避光孵育 15 min,后加入 10 μ l PI 后轻轻混匀于 2~8℃条件下避光孵育 5 min,处理完成后在 1 h 内用流式细胞仪检测。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用方差分析。所有检验为双侧检验。

2 结果

2.1 TG 对 PDGF 活化的 HSC 内质网应激相关

蛋白表达的影响 Western blot 结果见图 1, GRP78、CHOP、c-Caspase-12 蛋白的表达 4 组总体比较差异均有统计学意义 ($F = 129.483, P < 0.001$; $F = 95.739, P < 0.001$; $F = 120.624, P < 0.001$)。TG 能增加 PDGF 活化的 HSC 内 GRP78、CHOP、c-Caspase-12 的表达, 促进 HSC 凋亡, 与 PDGF 组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 PDGF + TG 组比较 3-MA 能减少 GRP78 的表达, 增强内质网应激相关凋亡蛋白 CHOP、c-Caspase-12 的表达, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

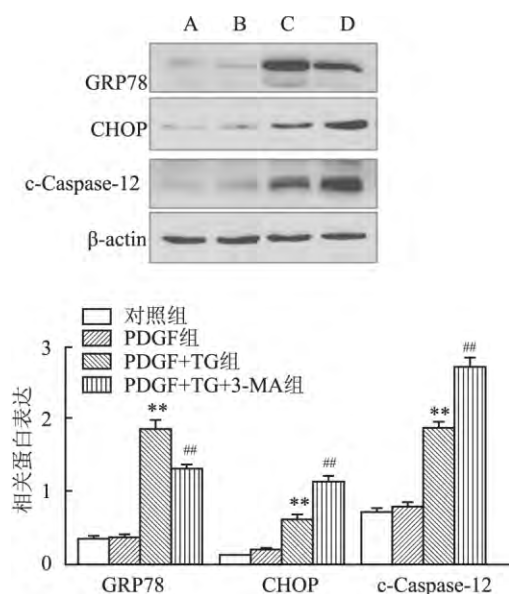


图1 Western blot 法检测 ERS 相关蛋白的表达

A: 对照组; B: PDGF 组; C: PDGF + TG 组; D: PDGF + TG + 3-MA 组; 与 PDGF 组比较: ** $P < 0.01$; 与 PDGF + TG 组比较: ## $P < 0.01$

2.2 HSC 自噬相关蛋白表达的变化 Western blot 结果见图 2, LC3B 的表达 4 组总体比较差异均有统计学意义 ($F = 10.148, P = 0.004$)。TG 能显著增强 HSC 自噬的强度, 与 PDGF 组比较, LC3B II 的表达明显增多, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 3-MA 能阻断自噬, 与 PDGF + TG 组比较, 相应的蛋白 LC3B II 表达降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 α -SMA 和 Col-I 蛋白表达的变化 Western blot 结果见图 3, α -SMA 和 Col-I 蛋白的表达 4 组总体比较差异均有统计学意义 ($F = 44.889, P < 0.001$; $F = 30.223, P < 0.001$)。PDGF 能明显活化 HSC, PDGF 组 α -SMA 和 Col-I 蛋白的表达较对照组增多, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); TG 能显著降低 HSC 内 α -SMA 和 Col-I 蛋白的表达, 与 PDGF 组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 而 3-

MA 能进一步抑制 α -SMA 和 Col-I 蛋白的表达, 与 PDGF + TG 组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

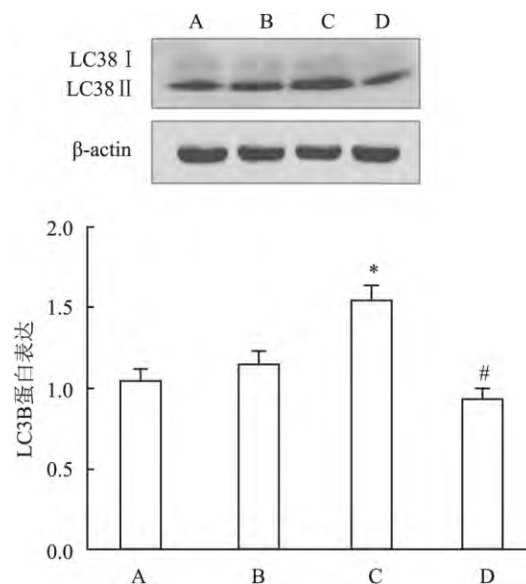


图2 Western blot 法检测自噬相关蛋白的表达

A: 对照组; B: PDGF 组; C: PDGF + TG 组; D: PDGF + TG + 3-MA 组; 与 PDGF 组比较: * $P < 0.05$; 与 PDGF + TG 组比较: # $P < 0.05$

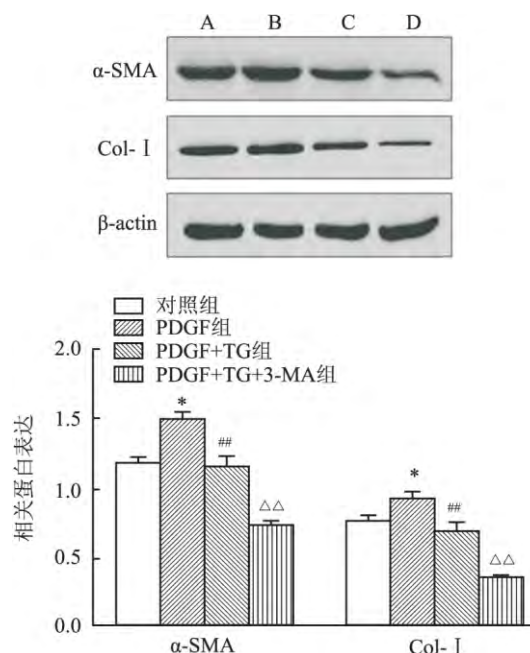


图3 Western blot 法检测 α -SMA 和 Col-I 的表达

A: 对照组; B: PDGF 组; C: PDGF + TG 组; D: PDGF + TG + 3-MA 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 PDGF 组比较: ## $P < 0.01$; 与 PDGF + TG 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

2.4 MDC 染色观察 HSC 自噬小体的生成 MDC 染色结果见图 4, 对照组和 PDGF 组荧光强度较弱, 表明自噬程度较低, 而 PDGF + TG 组较 PDGF 组荧

光强度较高且在细胞质可见明显聚集的荧光颗粒,在加 3-MA 阻断自噬后,PDGF + TG + 3-MA 组荧光强度减弱。以上结果提示: TG 可诱发 HSC 自噬,而 3-MA 能阻断 TG 诱发的 HSC 自噬。

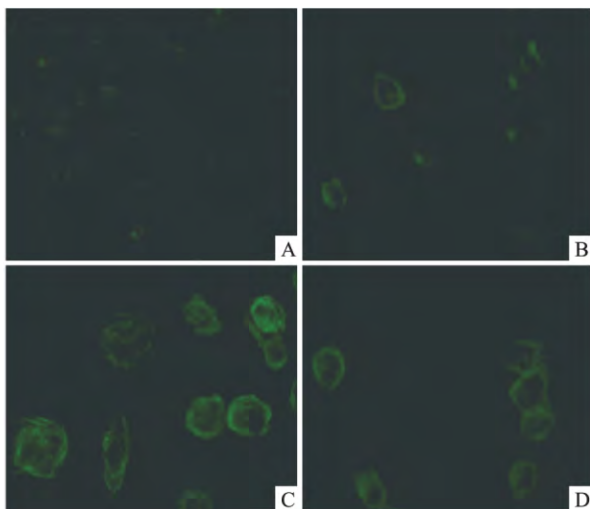


图4 荧光显微镜观察 MDC 染色后 HSC 中自噬泡分布情况 ×400
A: 对照组; B: PDGF 组; C: PDGF + TG 组; D: PDGF + TG + 3-MA 组

2.5 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 流式细胞术检测各组细胞的凋亡率见图 5。4 组凋亡率总体比较差异均有统计学意义 ($F = 234.251, P < 0.001$)。对照组和 PDGF 组凋亡率较低, PDGF + TG 组凋亡率较 PDGF 组明显升高,与 PDGF 组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),而 PDGF + TG + 3-MA 组凋亡率较 PDGF + TG 组进一步升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果表明 TG 可以促进 HSC 凋亡,而 3-MA 可增强 TG 诱导的 HSC 凋亡。

3 讨论

TG 是 Ca^{2+} -ATP 酶选择性抑制剂,通过激活内质网 Ca^{2+} 通道促进 Ca^{2+} 进入细胞质,使细胞质内 Ca^{2+} 浓度持续升高而诱导 ERS。TG 是一种诱导内质网应激的特异性经典工具药^[12]。课题组前期研究^[7]表明 TG 可以促进 HSC 凋亡,有利于肝纤维化的逆转。本研究显示在 TG 诱导 HSC 凋亡的过程中伴随着自噬的发生,可能通过 Ca^{2+} 激活钙调蛋白依赖激酶- β ,进而使 5'-磷酸腺苷激活蛋白激酶磷酸化增多,从而抑制雷帕霉素靶蛋白的表达,最终导致自噬上调^[13]。具体机制有待于下一步实验证实。自噬参与体内各种病理生理过程,对机体反应具有双向调节作用^[14]。就肝纤维化而言,自噬可以通过激

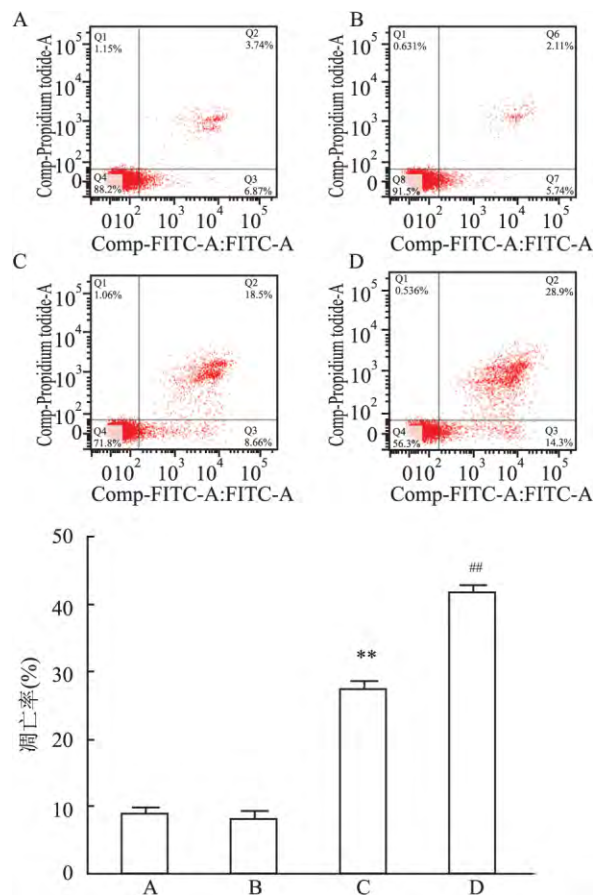


图5 流式细胞术检测细胞凋亡率

A: 对照组; B: PDGF 组; C: PDGF + TG 组; D: PDGF + TG + 3-MA 组; 与 PDGF 组比较: ** $P < 0.01$; 与 PDGF + TG 组比较: ## $P < 0.01$

活肝星状细胞促进肝纤维化,通过保护肝细胞减少细胞外基质的产生减轻肝纤维化,自噬可降解受损的蛋白以及减少 DNA 的损伤等途径来保护细胞免于发生凋亡^[15]。本研究结果显示:自噬对于在 ERS 诱导的 HSC 凋亡过程中起着保护作用,自噬可以抑制内质网应激诱导的 HSC 凋亡,ERS 诱导的自噬可减轻内质网膨胀,清除聚集过多的蛋白质,缓解内质网遭受的强烈而持久的刺激,保护细胞,可以抑制毒胡萝卜素或衣霉素引起的细胞死亡。3-MA 是自噬的抑制剂,通过抑制 III 型 PI3K,干扰自噬隔离膜的形成。本研究结果表明,在内质网应激细胞模型基础上用 3-MA 阻断自噬,内质网应激相关凋亡蛋白 CHOP 和 Caspase-12 表达增多, HSC 活化增殖相关蛋白 α -SMA、Col-I 表达减少, HSC 凋亡明显增强,流式细胞术结果进一步证实了 3-MA 增强内质网应激诱导的 HSC 凋亡。综上所述,本研究表明,自噬可以抑制内质网应激诱导的 HSC 凋亡,在肝纤维化恢复期,如果能通过阻断自噬而靶向诱导 HSC 凋

亡,将能为抗肝纤维化提供新的靶点,为新药研发提供新的思路。

参考文献

- [1] Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale J P, et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 181–94.
- [2] Safadi R, Friedman S L. Hepatic fibrosis-role of hepatic stellate cell activation[J]. *Med Gen Med*, 2002, 4(3): 27.
- [3] Bravo R, Parra V, Gatica D, et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2013, 301(10): 215–90.
- [4] 刘宝琴, 王华芹. 内质网应激与未折叠蛋白反应的研究进展 [J]. *中华肿瘤防治杂志* 2010, 17(11): 869–72.
- [5] 付裕, 李滢, 杨方万等. 内质网应激诱导自噬的分子机制及意义 [J]. *现代生物医学进展* 2013, 13(12): 2393–7.
- [6] De Minicis S, Candelaresi C, Agostinelli L, et al. Endoplasmic reticulum stress induces hepatic stellate cell apoptosis and contributes to fibrosis resolution [J]. *Liver Int*, 2012, 32(10): 1574–84.
- [7] Huang Y, Li X, Wang Y, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced hepatic stellate cell apoptosis through calcium-mediated JNK/p38 MAPK and Calpain/Caspase-12 pathways [J]. *Mol Cell Biochem* 2014, 394(1–2): 1–12.
- [8] Glick D, Barth S, Macleod K F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms [J]. *J Pathol* 2010, 221(1): 3–12.
- [9] Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells [J]. *Cell Struct Funct*, 2002, 27(6): 421–9.
- [10] Yang X, Srivastava R, Howell S H, et al. Activation of autophagy by unfolded proteins during endoplasmic reticulum stress [J]. *Plant J* 2016, 85(1): 83–95.
- [11] Rashid H O, Yadav R K, Kim H R, et al. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection [J]. *Autophagy*, 2015, 11(11): 1956–77.
- [12] Ganley I G, Wong P M, Gammoh N, et al. Distinct autophagosomal-lysosomal fusion mechanism revealed by thapsigargin-induced autophagy arrest [J]. *Mol Cell* 2011, 42(6): 731–43.
- [13] Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase- β , and Bcl-2 [J]. *Mol Cell*, 2007, 25(2): 193–205.
- [14] Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, et al. Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview [J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010, 298(4): 776–85.
- [15] Bernales S, McDonald K L, Walter P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response [J]. *PLoS Biol* 2006, 4(12): e423.

Role of autophagy in hepatic stellate cell apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress

Wang Yinghong, Wang Huan, Zuo Longquan, et al

(School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore whether autophagy occurs or not and its effect during endoplasmic reticulum stress induced by TG, provides new train of thought for reversal of hepatic fibrosis. **Methods** Platelet-derived growth factor (PDGF-BB) was used to induce rat hepatic stellate cell (HSC-T6) activation model, on this basis, ERS inducer poison carotene (TG) was given to stimulate cells for 24 h. The autophagy related LC3B protein expression was detected by Western blot and the formation of autophagosome was detected by the MDC staining so as to observe the effect of TG on HSC autophagy. The 3-MA was used to block autophagy, each cell apoptosis rate was detected by flow cytometry, the role of autophagy in hepatic stellate cell apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress was observed. **Results** HSC apoptosis was induced by TG, accompanied by the occurrence of autophagy, while 3-MA blocked autophagy and enhanced the HSC apoptosis induced by TG. **Conclusion** HSC apoptosis can be induced by TG with the occurrence of autophagy. 3-MA can enhance the HSC apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress.

Key words ERS; autophagy; hepatic stellate cells; liver fibrosis; apoptosis