

PICK1 在肝纤维化中的表达变化及功能研究

陈培杰^{1,2,3}, 李俊^{1,2,3}, 黄成^{1,2,3}, 孟晓明^{1,2,3}, 蔡双朋^{1,2,3}

摘要 目的 研究蛋白激酶 C 结合蛋白 1(PICK1) 在小鼠肝纤维化及活化的肝星状细胞中的表达变化,并探讨其对肝星状细胞株(LX-2)活化的影响。方法 建立四氯化碳(CCl₄)诱导的小鼠肝纤维化模型,观察 PICK1 在肝纤维化过程中的表达变化;转化生长因子 β1(TGF-β1)刺激 LX-2 活化,Western blot 测定 PICK1 的蛋白表达情况;转染 PICK1 过表达质粒至 LX-2 中,再以 TGF-β1 诱导活化,Western blot 检测 PICK1、α 平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、I 型胶原(Coll1a1)和 Smad2、3 及其磷酸化水平的蛋白表达情况。结果 正常组小鼠肝脏中 PICK1 表达较高,随着肝纤维化的加重,PICK1 的表达逐渐递减。TGF-β1 诱导活化的 LX-2 细胞中 PICK1 表达降低。转染 PICK1 过表达质粒后,TGF-β1 诱导的 α-SMA、Coll1a1 的表达明显减少,且 Smad2、3 磷酸化水平显著下降。结论 PICK1 在纤维化肝组织及活化的 HSC 中表达下调。过表达 PICK1 可抑制 TGF-β1 诱导的 LX-2 活化,可能是通过抑制 TGF-β/Smad 通路而发挥作用,为肝纤维化的防治研究提供了新的思路和靶点。

关键词 PICK1; 肝纤维化; 肝星状细胞

中图分类号 R 322.47; R 329.25; R 575; R 965

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)11-1606-05

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是由多种病因引起的肝脏慢性损伤修复反应,以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的沉积为特征^[1-2]。研究^[2]显示肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)增殖并活化为肌成纤维细胞是 HF 发病的核心环节,HSC 可以被多种细胞因子激活,其中以转化生长因子 β1(transforming growth factor β1, TGF-β1)为代表。

蛋白激酶 C 结合蛋白 1(protein interacting with Ca-kinase-1, PICK1)在细胞的增殖、凋亡等多种生理过程中发挥重要作用^[3-4],但其在 HF 中的表达

和功能研究尚没有报道。研究^[5]表明 PICK1 可以负调控 TGF-β 通路,使细胞对 TGF-β1 的反应性增强,提示 PICK1 可能参与了肝纤维化的发展。因此该研究观察 PICK1 在肝纤维化过程中的表达情况,并转染 PICK1 质粒,检测 α-肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)和 I 型胶原(collagen type I, Coll1a1)的表达水平,探讨 PICK1 对 HSC 活化的作用及作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 40 只雄性 C57BL/6J 小鼠,普通级 6~8 周龄,由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 细胞株 人肝星状细胞株(LX-2)由上海中医药大学附属曙光医院徐列明教授馈赠。

1.1.3 主要材料与试剂 四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄) (上海汕头西陇化工厂);重组人转化生长因子 β1(TGF-β1) (英国 PeproTech 公司);DMEM 培养液、OPTI-MEM、胎牛血清、胰酶、青-链霉素溶液(美国 Gibco 公司);Lipofectamine™ 2000 (美国 Invitrogen 公司);人 PICK1 质粒(上海吉凯公司);Rabbit pAb anti-PICK1 抗体(美国 Abcam 公司);Rabbit anti-Coll1a1 (北京博奥森公司);Mouse anti-β-actin (北京中杉金桥公司);Mouse anti-α-SMA、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)、山羊抗兔 IgG(H+L) (武汉博士德生物工程有限公司);化学发光(ECL)试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.1.4 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);Sigam3-46K 高速离心机(美国 Sigma 公司);冷冻离心机 TGL-18R(珠海黑马医学仪器有限公司);Western blot 设备(美国 Biorad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与肝纤维模型的建立 小鼠适应性喂养 1 周后,随机分为正常对照组、模型 4 周组、模型 6 周组、模型 8 周组,每组 10 只。模型组每只小鼠按 0.02 ml/g 体重腹腔注射 10% CCl₄(按体积

2015-06-29 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81273526、81473268);安徽省重点科技攻关项目(编号:1301042212);安徽省自然科学基金(编号:1308085MH145);高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20123420120001)

作者单位:安徽医科大学¹药学院、²肝病研究所、³安徽省创新药物产业共性研究院,合肥 230032

作者简介:陈培杰,女,硕士研究生;

李俊,男,博士,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: li-jun@ahmu.edu.cn

比 CCl_4 : 橄榄油 = 1 : 9) ,每周 2 次 ,持续 4 周 ,之后每周 1 次。分别于第 4、6、8 周处死动物。正常对照组小鼠在相同的时间点腹腔注射同等体积的橄榄油。在末次注射 24 h 后 ,引颈处死动物 ,立即摘取部分肝脏 - 80 °C 保存备用。另取一部分组织于 10% 甲醛溶液中固定 ,用于组织病理学观察。

1.2.2 病理学检查 取相同部位小鼠肝脏右叶组织 ,石蜡包埋 ,切片 ,分别进行苏木精 - 伊红 (HE) 染色和 Masson 胶原纤维染色 ,观察肝脏组织的病理学改变和胶原纤维增生情况 ,分析和评价 CCl_4 诱导小鼠肝损伤和纤维化程度。

1.2.3 LX-2 细胞培养和传代 LX-2 细胞使用含有 10% 胎牛血清及 100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素的高糖培养基 ,置于 37 °C、5% CO_2 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按所需浓度接种培养瓶、培养板。

1.2.4 LX-2 的诱导活化 取对数生长期的细胞接种于 6 孔板中 ,置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 12 h 使细胞贴壁 ,然后添加终浓度为 0、2、5、10 ng/ml 的 $\text{TGF-}\beta 1$,于培养箱中继续培养 24 h 使细胞活化。

1.2.5 转染 LX-2 细胞生长融合大约 80% 时 ,用 Opti-MEM 培养液分别稀释 Lipofectamine™ 2000 和质粒至所需浓度 ,室温静置 5 min。将稀释后的质粒与 Lipofectamine™ 2000 小心吹打混匀 ,室温再静置 20 min 以形成稳定的质粒 - 脂质体复合物。随后弃去旧培养液 ,将上述含有复合物的培养液加入待转染细胞 ,6 h 后更换完全培养基 DMEM ,并加入 $\text{TGF-}\beta 1$ (5 ng/ml) ,继续作用 24 h。实验分组为正常组: 不做任何处理; 模型组: 以等体积的 Opti-MEM 代替转染液; 阴性对照组: 转染 GV144-control 空载质粒; PICK1 过表达组: 转染 GV144-PICK1 质粒。

1.2.6 Western blot 检测蛋白水平 收集肝组织及处理后的细胞 ,加入 RIPA 蛋白裂解液 ,冰上裂解 ,4 °C、12 000 r/min 离心 30 min ,取上清液进行蛋白定量后加入上样缓冲液 ,100 °C 加热 10 min 使蛋白变性 ,然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后按蛋白分子量大小切胶转膜 ,以 5% 的脱脂奶粉室温封闭 3 h ,Tris-HCl-Tween (TBST) 洗膜后 ,分别用相应的抗体 (1 : 500) 孵育 ,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 ,ECL 发光试剂盒显影 ,以 β -actin 为内参 ,Image J 软件扫描并分析蛋白质表达相对含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析 ,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,用 One-Way ANOVA 检验各组间差异的显著性。

2 结果

2.1 小鼠肝纤维化进程中肝脏病理学改变

2.1.1 小鼠肝组织大体观察 正常对照组小鼠肝脏表面光滑、柔软 ,边缘锐利 ,颜色呈红棕色 ,可以看见肝组织中有丰富的血管。模型组小鼠肝脏肿胀偏大 ,质地较硬 ,表面粗糙 ,且可以看到有中等量到大量的灰黄色的结节。

2.1.2 肝脏组织学改变 HE 染色及 Masson 染色显示: 正常对照组小鼠肝细胞排列整齐 ,肝小叶结构完整 ,未见病理性改变 ,只有极少量细小的蓝色纤维组织 ,位于血管周围。 CCl_4 造模 4 周后肝小叶结构开始紊乱 ,并伴有脂肪空泡 ,有少量胶原纤维沉积。造模第 6 周可见肝小叶结构破坏 ,并伴有大量脂肪空泡 ,纤维间隔明显增厚 ,形成假小叶。造模第 8 周肝小叶结构明显破坏 ,肝脏出现广泛的脂肪变性。提示小鼠肝纤维化模型建立成功。见图 1。

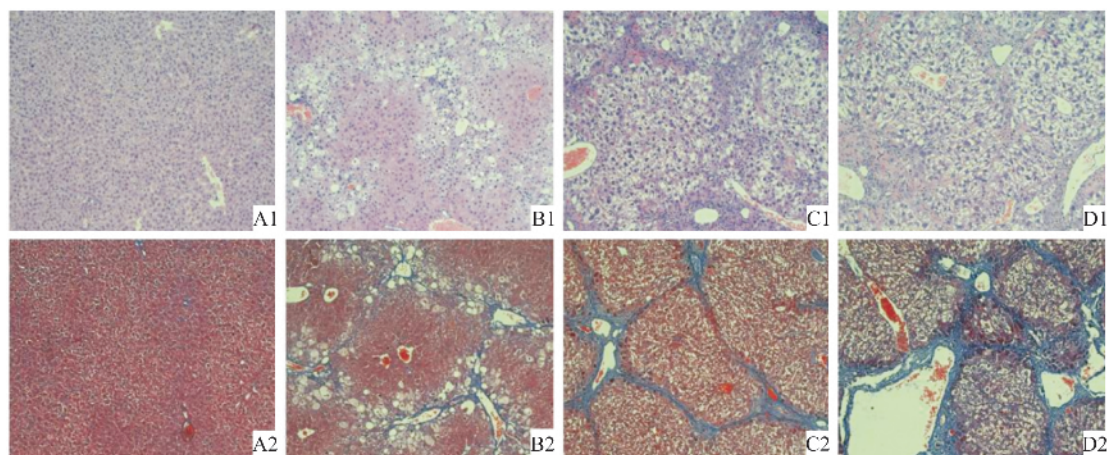


图 1 CCl_4 诱导的小鼠肝纤维化模型 $\times 100$

A: 正常对照组; B: 模型 4 周组; C: 模型 6 周组; D: 模型 8 周组; 1: HE; 2: Masson 染色

2.2 PICK1 在 CCl_4 诱导的小鼠肝纤维化组织中的蛋白表达 Western blot 结果显示,正常对照组小鼠肝组织 PICK1 表达量较高,模型组小鼠肝组织 PICK1 表达量较正常对照组明显降低,并且随 CCl_4 造模时间的延长及纤维化程度加重,表达量逐渐下降,差异有统计学意义($F = 193.123, P < 0.05$); α -SMA 在肝组织中的表达及变化趋势与其相反,与正常对照组比较差异有统计学意义($F = 464.929, P < 0.05$)。见图 2。

2.3 TGF- β 1 诱导的肝星状细胞中 PICK1 蛋白表达 Western blot 检测结果显示,TGF- β 1 诱导 LX-2 细胞活化后, α -SMA 蛋白表达显著增加,与正常对照组比较差异有统计学意义($F = 80.04, P < 0.05$),但 PICK1 蛋白较正常对照组表达则显著下降($F = 8.932, P < 0.05$)。见图 3。

2.4 过表达 PICK1 对 TGF- β 1 诱导的肝星状细胞活化的影响 Western blot 结果显示,转染 GV144-PICK1 质粒后,LX-2 细胞内 PICK1 蛋白表达水平与阴性对照组相比显著升高,差异有统计学意义($F = 14.458, P < 0.05$)。与正常组比较,模型组 α -SMA 蛋白水平明显升高($F = 57.34, P < 0.01$),Coll α 1 蛋白水平也显著上升($F = 24.539, P < 0.01$),提示 TGF- β 1 成功诱导 LX-2 细胞活化。而转染 GV144-PICK1 质粒后, α -SMA 蛋白水平较阴性对照组显著下降($F = 57.34, P < 0.01$),Coll α 1 蛋白水平也明显降低($F = 24.539, P < 0.01$)。表明过表达 PICK1

可以抑制 TGF- β 1 诱导的 LX-2 的活化。见图 4。

2.5 过表达 PICK1 对 TGF- β 1 诱导的肝星状细胞中 Smad2 和 Smad3 磷酸化水平的影响 为了进一步研究 PICK1 的作用机制,笔者进一步检测了 PICK1 过表达后,LX-2 中 Smad2、3 及二者的磷酸化水平,Western blot 结果显示,与正常组比较,模型组 Smad2 蛋白磷酸化水平显著升高($F = 82.289, P < 0.05$),Smad3 蛋白磷酸化水平也显著上升($F = 8.732, P < 0.05$);而转染 GV144-PICK1 质粒后,Smad2 蛋白磷酸化水平显著下降($F = 82.289, P < 0.05$),Smad3 蛋白磷酸化水平也明显降低($F = 8.732, P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

研究^[6-7]表明 TGF- β 1 是肝纤维化最重要的启动因子之一,TGF- β 1 可以促进 HSC 增殖活化及 ECM 的合成,其主要通过 TGF- β /Smad 通路发挥效应,因此拮抗 TGF- β 1 对细胞的作用、抑制 TGF- β /Smad 通路对于抗肝纤维化研究至关重要。

研究^[5]显示 PICK1 能够负调控 TGF- β /Smad 通路,影响细胞对 TGF- β 1 的反应性。因此,本研究首先建立了小鼠肝纤维化模型,发现 PICK1 在正常对照组表达量较高,而随着肝纤维化程度的加重,PICK1 的表达逐渐降低,与 α -SMA 表达趋势相反,提示 PICK1 可能参与了肝纤维化的发展。然后课题组应用 TGF- β 1 诱导 LX-2 活化并检测 PICK1 的蛋

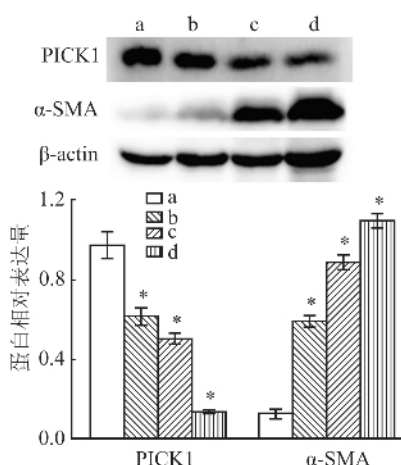


图2 PICK1 在小鼠肝纤维化肝组织中的表达情况

a: 正常对照组; b: 模型 4 周组; c: 模型 6 周组; d: 模型 8 周组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$

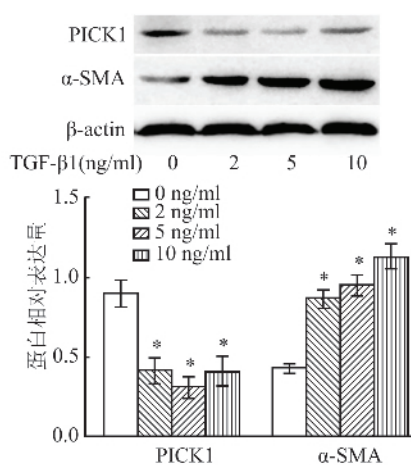


图3 PICK1 在 TGF- β 1 (0、2、5、10 ng/ml) 诱导活化的 LX-2 中的表达情况

与 0 ng/ml TGF- β 1 比较: * $P < 0.05$

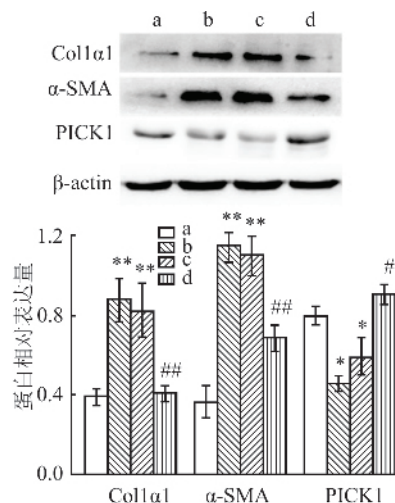


图4 过表达 PICK1 对 TGF- β 1 诱导的 LX-2 活化的影响

a: 正常组; b: 模型组; c: 阴性对照组; d: PICK1 过表达组; 与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

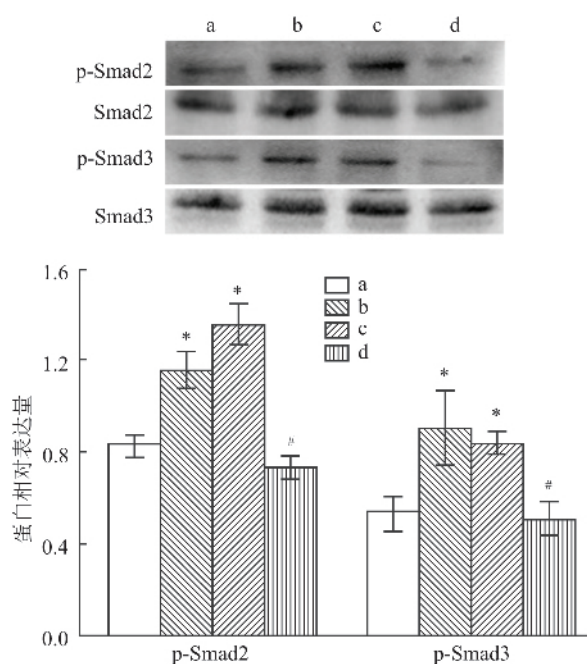


图5 过表达 PICK1 对 TGF- β 1 诱导的 LX-2 中 Smad2 和 Smad3 磷酸化水平的影响

a: 正常组; b: 模型组; c: 阴性对照组; d: PICK1 过表达组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

白水平,结果显示 TGF- β 1 诱导 LX-2 活化后, PICK1 较正常组明显降低,这与小鼠纤维化肝组织检测结果一致,表明 PICK1 可能参与了 HSC 的活化。为进一步明确其在 HSC 中的作用,本实验室转染 PICK1 质粒,观察 PICK1 对 LX-2 活化及胶原分泌的影响,Western blot 结果显示随着 PICK1 表达水平的增加, α -SMA 及 Col1 α 1 的蛋白表达水平较阴性对照组均显著降低,表明过表达 PICK1 可以明显抑制 TGF- β 1 诱导的 LX-2 的活化和胶原的分泌。有研究^[5]报道,敲除 PICK1,小鼠胚胎成纤维细胞对 TGF- β 1 反应会明显增强,TGF- β 1 引起的细胞形态

改变更加显著、细胞迁移能力明显增强,本研究结果与之一致。另外有研究^[4-5]显示 PICK1 的表达情况通常与 TGF- β 通路蛋白呈明显负相关,过表达 PICK1 可明显抑制 TGF- β 1 的转录活性及 Smad2 的磷酸化,并且 PICK1 可通过抑制 TGF- β 通路,拮抗 TGF- β 1 对乳腺癌细胞的效应,参与乳腺癌的发生发展。因此,笔者推测 PICK1 影响 HSC 的活化可能与 TGF- β /Smad 通路有关,为此课题组检测了 TGF- β /Smad 通路蛋白的表达变化,结果显示过表达 PICK1 后,Smad2 及 Smad3 磷酸化水平显著下降,表明在 LX-2 中 PICK1 可以抑制 TGF- β /Smad 通路,并且这可能是 PICK1 参与肝纤维化病程的机制之一。

参考文献

- [1] 占书箱,黄成,马陶陶,等. 抑制 p70S6K 对 HSC-T6 增殖活化的作用研究[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(8): 1062-6.
- [2] Lee Y A, Wallace M C, Friedman S L. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story [J]. Gut, 2015, 64(5): 830-41.
- [3] Xu J, Xia J. Structure and function of PICK1 [J]. Neurosignals, 2006-2007, 15(4): 190-201.
- [4] Zhang B, Cao W, Zhang F, et al. Protein interacting with C alpha kinase 1 (PICK1) is involved in promoting tumor growth and correlates with poor prognosis of human breast cancer [J]. Cancer sci, 2010, 101(6): 1536-42.
- [5] Zhao B, Wang Q, Du J, et al. PICK1 promotes caveolin-dependent degradation of TGF-beta type I receptor [J]. Cell Res, 2012, 22(10): 1467-78.
- [6] Thatcher J D. The TGF-beta signal transduction pathway [J]. Sci signal, 2010, 3(119): tr4.
- [7] Shen H, Huang G J, Gong Y W. Effect of transforming growth factor beta and bone morphogenetic proteins on rat hepatic stellate cell proliferation and trans-differentiation [J]. World J gastroenterol, 2003, 9(4): 784-7.

The expression and effect of PICK1 in liver fibrosis

Chen Peijie^{1,2,3}, Li Jun^{1,2,3}, Huang Cheng^{1,2,3}, et al

(¹School of Pharmacy, Anhui Medical University; ²Institute for Liver Diseases of Anhui Medical University;

³Anhui Institute of Innovative Drugs, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the expression of protein interacting with Ca-kinase-1 (PICK1) in fibrotic liver of mice and activated hepatic stellate cell, and investigate the effect of PICK1 on the activation of hepatic stellate cell strain (LX-2). **Methods** Liver fibrosis model in mice was induced by CCl₄ and then the PICK1 level was detected in fibrotic liver tissue. LX-2 cells were activated by transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), and the protein level of PICK1 was detected by Western blot. After transfected with the plasmid expressing PICK1, LX-2 was stimulated with TGF- β 1, the levels of α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen type I (Col1 α 1), Smad2, 3 and phosphorylation level of them were determined by Western blot. **Results** PICK1 was highly expressed in normal

人 $\beta 4\text{GalT II}$ 基因在哺乳动物细胞株中的表达与定位

徐雪琴, 潘林鑫, 耿慧武, 刘晓颖, 范礼斌

摘要 目的 运用基因克隆技术构建人源 $\beta 1,4$ -半乳糖转移酶 II ($\beta 4\text{GalT II}$) 真核表达质粒, 并将其转染到 COS7 细胞中, 观察蛋白在细胞内的定位, 同时转染到 HEK 293T 细胞中检测其表达。方法 分别设计带 FLAG 标签和 GFP 标签的 $\beta 4\text{GalT II}$ 基因的特异性引物, 以含人 $\beta 4\text{GalT II}$ 全长 cDNA 序列为模板, 定向构建到 pcDNA3.1(+) 及 pCDGFP 真核表达载体中, 构建重组表达质粒。通过酶切和测序鉴定阳性重组质粒, 利用 Lipofectamine 2000 分别转染 COS7、HEK 293T 细胞, 免疫荧光显微镜观察重组蛋白在细胞内的定位, Western blot 法鉴定重组蛋白的表达。结果 成功构建 pcDNA3.1- $\beta 4\text{GalT II}$ -FLAG 和 pCDGFP- $\beta 4\text{GalT II}$ 重组表达载体, 定位实验表明: $\beta 4\text{GalT II}$ -FLAG 和 GFP- $\beta 4\text{GalT II}$ 二者在 COS7 细胞中均主要定位在细胞核周围, 并有明显的块状染色, 胞核中未见明显分布; Western blot 法检测显示重组 $\beta 4\text{GalT II}$ 蛋白在 HEK 293T 细胞中稳定表达。结论 获得了人 $\beta 4\text{GalT II}$ 的真核表达质粒, 并能在 COS7 和 HEK 293T 细胞中表达, 为进一步研究 $\beta 4\text{GalT II}$ 的功能及其与其他蛋白的相互作用奠定了一定基础。

关键词 $\beta 4\text{GalT II}$; 转染; 细胞定位; 蛋白表达

中图分类号 R 341; R 394.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1610-05

$\beta 1,4$ -半乳糖转移酶 II ($\beta 1,4$ -galactosyltrans-

ferase II, $\beta 4\text{GalT II}$) 是 $\beta 1,4$ -半乳糖转移酶家族的一员, Raquel 利用 EST 数据库独立发现的, 其与家族中首个被发现的 $\beta 4\text{GalT I}$ 有高达 55% 的序列同源性, 在胎脑中表达较高, 在心脏、骨骼肌、胰腺、睾丸、前列腺、卵巢、小肠中也均有表达^[1-3]。人 $\beta 4\text{GalT II}$ 基因定位于 1p34-p33, 包含 10 个外显子, 基因全长 111 970 bp, mRNA 全长 2 209 bp, 编码含 372 个氨基酸残基的约 42 ku 的 $\beta 4\text{GalT II}$ 蛋白^[1,4]。 $\beta 4\text{GalT II}$ 与大多数的糖基转移酶有着相似的结构域, 主要包括短的胞质区 N-末端肽段、跨膜结构域以及催化结构域, 其跨膜结构域可能对其在高尔基复合体上的定位是至关重要的^[5]。该研究通过在 pcDNA3.1(+) 载体及 pCDGFP 载体的多克隆位点插入 $\beta 4\text{GalT II}$ 的 cDNA 片段, 分别构建了带 FLAG 标签的真核表达质粒 pcDNA3.1- $\beta 4\text{GalT II}$ -FLAG 和带 GFP 标签的真核表达质粒 pCDGFP- $\beta 4\text{GalT II}$, 并将其转染进 COS7 和 HEK 293T 细胞中, 初步观察 $\beta 4\text{GalT II}$ 在哺乳动物细胞内的定位及表达情况, 为后续探究该蛋白的生物学功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与细胞 含人 $\beta 4\text{GalT II}$ 全长 cDNA 序列的模板由安徽医科大学李俊教授提供; 质粒 pcDNA3.1(+) 购自 Invitrogen 公司; pCDGFP 质粒、TG1 菌株、COS7 及 HEK 293T 细胞株均由安徽医科大学生物实验室保存。

1.2 主要试剂 PCR 引物合成和测序均由上海英

2015-07-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(编号: 81201368)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 徐雪琴, 女, 硕士研究生;

范礼斌, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lfan@ahmu.edu.cn;

刘晓颖, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: liuxiaoying@ahmu.edu.cn

liver tissues and progressively down-regulated as liver fibrosis progressed. The expression of PICK1 was down-regulated in activated LX-2 induced by TGF- $\beta 1$. The hepatic stellate cell transfected with PICK1-plasmid showed remarkably decreased TGF- $\beta 1$ -induced α -SMA and Col1a1 expression and obviously declined phosphorylation levels of Smad2 and Smad3. **Conclusion** The expression of PICK1 decreases in fibrotic livers and activated hepatic stellate cell. Over-expression of PICK1 can suppress the activation of hepatic stellate cell induced by TGF- $\beta 1$, and probably because of the inhibitory effect on TGF- β /Smad pathway, which provides new ideas and targets for the prevention and treatment of liver fibrosis.

Key words PICK1; Liver Fibrosis; hepatic stellate cell