

基于 PINK1/Parkin 信号通路探讨莪术醇对肝星状细胞线粒体自噬的作用

肖华业¹, 汪磊¹, 王佳慧¹, 赵铁建¹, 郑洋¹, 段雪琳²

(广西中医药大学¹ 赛恩斯新医药学院医学系、² 壮医药学院, 广西南宁 530222)

摘要 **目的** 探究莪术醇对肝星状细胞线粒体自噬的作用机制及其抗肝纤维化的分子机制。**方法** 将肝星状细胞分为空白组、模型组(脂多糖 5 mg/L)、莪术醇低中高组(12.5、25、50 mg/L);噻唑兰(MTT)检测莪术醇对肝星状细胞活力的作用;细胞流式检测莪术醇对肝星状细胞凋亡的作用;5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基-咪唑碳花青碘化物(JC-1)检测线粒体膜电位;透射电镜检测莪术醇对线粒体形态和自噬小体的作用;荧光探针检测莪术醇对线粒体定位的影响;免疫印迹实验检测莪术醇对 PTEN 诱导假定激酶 1(PINK1)、帕金森病蛋白(Parkin)、微管相关蛋白轻链 3(LC3)、自噬相关蛋白(Beclin1)、线粒体内膜转位酶 23(Timm23)、线粒体外膜易位酶 20(Tomm20)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl2)、cleaved-半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase3)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I 型胶原蛋白(Collagen I)、III 型胶原蛋白(Collagen III)蛋白表达的作用。**结果** 与空白对照组比较,模型组细胞增殖率、Caspase3、Bcl2、LC3 II、Beclin1、PINK1、Parkin、 α -SMA、Collagen I、Collagen III 蛋白均明显增加($P < 0.01$),线粒体与溶酶体共定位增多,线粒体自噬小体数量明显增多($P < 0.01$),而 Timm23 和 Tomm20 蛋白、线粒体膜电位均明显下降($P < 0.01$),细胞凋亡率下降,Bax 蛋白表达下降。与模型组比较,莪术醇干预后,莪术醇低、中、高浓度组细胞增殖率、Bcl2、Timm23、Tomm20、 α -SMA、Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达明显下降($P < 0.01$),线粒体膜电位明显下降($P < 0.01$),而细胞凋亡率、Caspase3、Bax、LC3 II、Beclin1、PINK1 和 Parkin 蛋白均明显增加($P < 0.05$),线粒体与溶酶体共定位增多,线粒体自噬小体数量明显增多($P < 0.01$)。**结论** 莪术醇通过调控 PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体过度自噬,促进肝星状细胞凋亡,从而发挥改善肝纤维化的作用。

关键词 莪术醇;肝纤维化;肝星状细胞;线粒体自噬;凋亡;PINK1/Parkin 信号通路

中图分类号 R 285

文献标志码 A

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是慢性肝病中以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)大量沉积为特征的病理过程^[1]。HF 主要由病毒性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、酒精性肝病等慢性肝损伤引起^[2]。随着 HF 的持续恶化,会导致肝硬化和肝细胞癌的发生,但由于 HF 的发病机制尚未明确,除肝移植外,晚期 HF 患者缺乏有效疗法^[3]。无论病因

如何,肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)都是 HF 发展过程中的关键角色。当肝脏受到损伤时, HSC 会被激活,转变成肌成纤维细胞,表达 α -平滑肌肌动蛋白等 ECM 成分^[4]。因此,靶向 HSC 是防治 HF 的关键策略。线粒体自噬是指细胞利用自噬小体选择性吞噬和降解异常线粒体的过程^[5]。线粒体自噬一方面能提高细胞对外界应激的耐受能力;另一方面也能促进细胞凋亡^[6]。有研究^[7]表明,促进 HSC 线粒体自噬,可以抑制 HSC 活化。莪术醇作为广西道地药材莪术的主要活性成分,具有抗炎、抗肿瘤、保肝等药理作用,课题组研究^[8]表明,莪术醇具有确切的抗 HF 作用,但其具体的机制尚未被完全揭示。本研究旨在探究莪术醇对 HSC 线粒体自噬的作用,进一步揭示其抗 HF 的机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器 低速离心机(湖南可成仪器设备有限公司,型号:L2-4K);水平摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司,型号:TS-1);酶标仪(美国

2025-01-22 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82204755);广西自然科学基金项目(编号:2023GXNSFBA026274、2024GXNSFAA010235);广西壮瑶药重点实验室基金资助项目(编号:GXZYKF2023-05);广西研究生教育创新计划项目(编号:YCBZ2024150);广西中医药大学赛恩斯新医药学院校级科研项目(编号:2024ZZA002、2024ZZA003、2024ZZB007、2024ZZB010)。

作者简介:肖华业,男,副教授;

郑洋,男,讲师,通信作者, E-mail: 1793853705@qq.com;

段雪琳,女,副教授,通信作者, E-mail: 403605650@qq.com

Bio-Rad 公司, 型号: 1681130); 流式细胞仪(美国 Beckman 公司, 型号: CytoFLEX); 透射电镜(日本 Hitachi 公司, 型号: Multiskan FC); 倒置显微镜(日本 Olympus 公司, 型号: IX51)。

1.2 细胞 大鼠 HSC(HSC-T6 细胞)购自中国武汉普诺赛生命科技有限公司, 货号: CL-0116。

1.3 主要药物与试剂 莪术醇(中国上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号: C114054); 噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)(美国 MedChemExpress 公司, 货号: HY-15924); 脂多糖(lipopolysacchride, LPS)(美国 Sigma 公司, 批号: L2880-100MG); 5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基-咪唑碳花青碘化物(5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide, JC-1)检测试剂盒(中国上海碧云天生物技术股份有限公司, 货号: C2006); Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(中国南京凯基生物科技发展有限公司, 批号: KGA108); 兔多抗 I 型胶原蛋白(CollagenI)(批号: AF7001)、兔多抗 III 型胶原蛋白(CollagenIII)(批号: AF5457)、兔多抗 α -SMA(批号: AF032)、兔多抗 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax, 批号: AF0120)购自美国 Affinity 公司, 兔多抗线粒体外膜易位酶 20(translocase of outer mitochondrial membrane 20, Tomm20)(英国 abcam 公司, 批号: ab186735); 兔多抗线粒体内膜转位酶 23(translocase of inner mitochondrial membrane 23, Timm23)(批号: A8688)、兔多抗 PTEN 诱导假定激酶 1(PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)(批号: A11435)、兔多抗自噬相关蛋白(Beclin1)(批号: A7353)、兔多抗 cleaved-半胱氨酸蛋白酶 3(cleaved-cysteine proteinase 3, cleaved-caspase 3)(批号: A2156)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 兔多抗帕金森病蛋白(Parkin)(批号: 14060-1-AP)、兔多抗 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)(批号: 68103-1-Ig)、小鼠单抗 β -肌动蛋白(β -actin)(批号: 66009-1-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司; 兔多抗微管相关蛋白轻链 3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)(美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号: 83506S); MitoTracker® Green FM(货号: 40742ES50)、LysoTracker Red DND-99(货号: 40739ES50)购自上海翊圣生物科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞分组及培养 将 HSC-T6 细胞进行复苏后接种于无菌培养瓶中, 加入含 10% 胎牛血清和

1% 青-链霉素的高糖 DMEM 培养液, 将其置于 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞呈单层贴壁生长, 当细胞呈亚融合状态时传代培养, 选用生长状态旺盛的对数期细胞进行实验。HSC-T6 细胞培养至贴壁状况良好, 细胞密度为 90% 时, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化后, 将细胞分为空白对照组、模型组(LPS 5mg/L)、莪术醇 12.5 mg/L 组、莪术醇 25 mg/L 组、莪术醇 50 mg/L 组。莪术醇各组先用 LPS 活化 HSC-T6 细胞模型 4 h, 再加入相应的药物干预 48 h, 模型组先用 LPS 活化 HSC-T6 细胞模型 4 h, 再加入等量的培养液培养 48 h, 空白对照组无需使用 LPS 活化, 全程使用培养液培养。

1.4.2 MTT 检测各组细胞增殖率 将各组细胞按照 5×10^4 个细胞/孔接种 HSC-T6 细胞于 96 孔板, 37℃ 培养 12 h 或 24 h 后, 每孔加 20 μ l MTT 溶液, 再培养 4 h; 每孔加 100 μ l 三联液(10% 十二烷基硫酸钠, 5% 异丁醇, 0.012 mol/L 盐酸), 培养 12 h, 适当振摇, 加速结晶溶解; 用酶标仪在 570 nm 测定吸光度(A 值)。计算细胞增殖率。细胞增殖率 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{调零组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{调零组}}) \times 100\%$ 。

1.4.3 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h 后, 收集上清液, 用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞, 终止消化后收集细胞; 用 PBS 将细胞润洗 2 次, 1 300 r/min 离心 5 min; 按照 Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒操作说明进行: 加入 500 μ l Binding Buffer, 重悬细胞; 加入 5 μ l Annexin V-APC 混匀后加入 5 μ l 7-AAD; 混匀后室温避光反应 5~15 min; 流式细胞仪上机检测。

1.4.4 JC-1 检测线粒体膜电位 根据操作说明每孔中加入 1 ml JC-1 染液(工作浓度为 1 μ g/ml), 避光孵育 20 min; PBS 洗涤 2 次后加入新鲜培养液(不含血清和青-链霉素)1 ml 重悬细胞, 通过流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位的变化。线粒体膜电位较高时, JC-1 聚集在线粒体基质形成聚合物, 发出红色荧光; 线粒体膜电位降低时, JC-1 为单体, 不能聚集在线粒体基质中, 产生绿色荧光。红/绿荧光强度比值反应线粒体膜电位的变化。

1.4.5 透射电镜检测各组细胞自噬小体情况 将对数生长期的 HSC-T6 细胞接种于 6 孔板培养, 按照上述分组对细胞进行干预。用含有 EDTA 的胰酶进行消化, 反复轻柔吹打, 尽可能使全部的贴壁细胞混悬, 巴氏吸管将细胞悬液转移至 15 ml 离心管, 1 000 r/min 离心 5 min, 吸弃上清液; 将 3% 的戊二

醛溶液加入离心管中,加入量必须没过细胞沉淀,将离心管放置于4℃冰箱内固定2 h以上;固定好的标本送电镜室进行包埋、超薄切片后置于透射电子显微镜下观察细胞内自噬体的变化并拍照记录。

1.4.6 荧光探针检测线粒体与溶酶体共定位情况

取处于对数生长期,生长状态良好的细胞,用DMEM完全培养基调整细胞密度到 1×10^5 个/ml;分别在预先接好爬片的12孔板中接入1 ml细胞悬液,轻轻吹打混匀,37℃、5% CO₂培养箱培养过夜;根据不同分组和细胞处理设置分别处理细胞,37℃、5% CO₂培养箱中培养,细胞处理完成后,吸除培养液,加入37℃预热的MitoTracker® Green FM和LysoTracker Red DND-99染色工作液(200 nmol/L)。在正常培养条件下孵育30 min,然后置于荧光显微镜下观察拍照。

1.4.7 Western blot 检测蛋白表达 提取各组细胞总蛋白,采用BCA法测定各组细胞蛋白浓度,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶电泳,转至PVDF膜,用5%牛血清白蛋白封闭1 h,加入Caspase3、Bcl2、Bax、LC3 II、Beclin1、Timm23、Tomm20、PINK1、Parkin、 α -SMA抗体、Collagen I、Collagen III抗体(均1:1 000)和内参 β -actin抗体(1:3 000),4℃孵育过夜,洗涤后孵育HRP标记的二抗(1:10 000)结合。用成像系统凝胶显影,并分析多条带的灰度值,以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值表示蛋白相对表达水平。

1.4.8 统计学处理 使用SPSS 22.0软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐时多组间比较采用单因素方差分析,进一步组内比较用LSD-*t*检验,方差不齐用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 莪术醇抑制 HSC 增殖 MTT检测结果发现各组间的细胞活力和增殖率差异均有统计学意义($F = 106.545, P < 0.01$),与空白对照组比较,模型组细胞增殖率升高(LSD-*t* = 5.354, $P < 0.01$);与模型组比较,莪术醇各组细胞增殖率均下降(LSD-*t* = 8.237、14.622、18.332,均 $P < 0.01$)。表明莪术醇可以抑制HSC增殖。见图1。

2.2 莪术醇促进 HSC 凋亡 流式细胞仪检测细胞凋亡发现各组间的细胞凋亡率差异有统计学意义

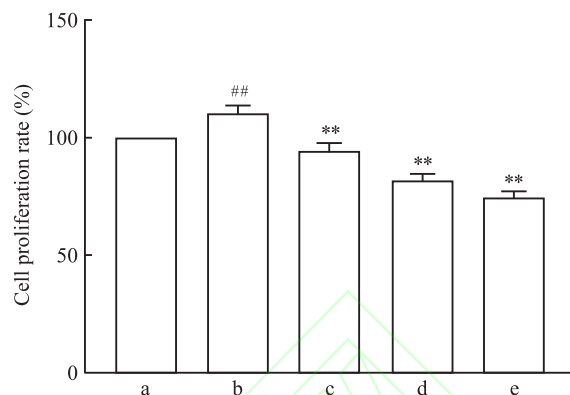


图1 不同浓度莪术醇下HSC增殖情况

Fig.1 HSC proliferation under different concentrations of curcumin

a: blank control group; b: model group; c: curcumin 12.5 mg/L group; d: curcumin 25 mg/L group; e: curcumin 50 mg/L group; ## $P < 0.01$ vs blank control group; ** $P < 0.01$ vs model group.

($F = 20.496, P < 0.01$),与空白对照组比较,模型组细胞凋亡率下降,但差异无统计学意义;与模型组比较,莪术醇各组细胞凋亡率均增加(LSD-*t* = 2.445、4.781、7.628,均 $P < 0.05$)。Western blot检测凋亡相关蛋白发现各组间的Bax和Bcl2以及Caspase3表达差异有统计学意义($F = 43.053、48.791、58.287, P < 0.01$)。与空白对照组比较,模型组Bax表达下降,但差异无统计学意义;与模型组比较,莪术醇各组Bax表达均增加(LSD-*t* = 5.143、7.981、10.551,均 $P < 0.01$);与空白对照组比较,模型组Bcl2表达增加(LSD-*t* = 12.824, $P < 0.01$);与模型组比较,莪术醇各组Bcl2表达均下降(LSD-*t* = 3.306、6.412、8.817,均 $P < 0.01$);与空白对照组比较,模型组Caspase3表达增加(LSD-*t* = 3.610, $P < 0.01$);与模型组比较,莪术醇各组Caspase3表达均增加(LSD-*t* = 3.300、6.704、10.107,均 $P < 0.01$)。见图2。

2.3 莪术醇对HSC线粒体自噬相关蛋白表达的作用

Western blot检测线粒体自噬相关蛋白发现各组Beclin1、LC3 II、Timm23和Tomm20表达差异有统计学意义($F = 110.943、84.248、52.556、43.028$,均 $P < 0.01$)。与空白对照组比较,模型组Beclin1和LC3 II表达增加(LSD-*t* = 5.750、4.052,均 $P < 0.01$);与模型组比较,莪术醇各组Beclin1(LSD-*t* = 4.423、8.698、13.416,均 $P < 0.01$)和LC3 II(LSD-*t* = 4.652、8.855、12.007,均 $P < 0.01$)表达均增加;与空白对照组比较,模型组Timm23和Tomm20表达下降(LSD-*t* = 3.372、3.293,均 $P < 0.01$);与模型组

比较, 莪术醇各组 Timm23 (LSD- t = 4.495、6.968、9.215, 均 $P < 0.01$) 和 Tomm20 (LSD- t = 3.892、6.287、8.084, 均 $P < 0.01$) 表达均下降。见图 3。

2.4 莪术醇对 HSC 线粒体膜电位的作用 JC-1 检测发现各组线粒体膜电位差异具有统计学意义 ($F = 52.007, P < 0.01$)。与空白对照组比较, 模型组线粒体膜电位下降 (LSD- t = 3.730, $P < 0.01$)；与模型组比较, 莪术醇各组线粒体膜电位均下降 (LSD- t = 8.430、11.164、11.988, 均 $P < 0.01$)。见图 4。

2.5 莪术醇对 HSC 线粒体与溶酶体共定位的作用 荧光探针检测发现, 与空白对照组比较, 模型组线

粒体与溶酶体共定位增多; 与模型组比较, 莪术醇各组线粒体与溶酶体共定位增多。见图 5。

2.6 莪术醇对 HSC 线粒体结构及自噬小体的影响 透射电镜检测细胞超微结构发现, 空白对照组线粒体未见明显肿胀, 嵴结构清晰, 排列较整齐; 模型组线粒体发生轻度肿胀, 排列紊乱; 莪术醇各组线粒体明显肿胀, 嵴断裂; 对线粒体自噬小体数量定量分析发现各组间差异具有统计学意义 ($F = 78.335, P < 0.01$)。与空白对照组比较, 模型组线粒体自噬小体数量增加 (LSD- t = 5.699, $P < 0.01$)；与模型组比较, 莪术醇各组线粒体自噬小体数量进一步增加 (LSD- t = 3.983、7.528、10.121, 均 $P < 0.01$)。见图 6。

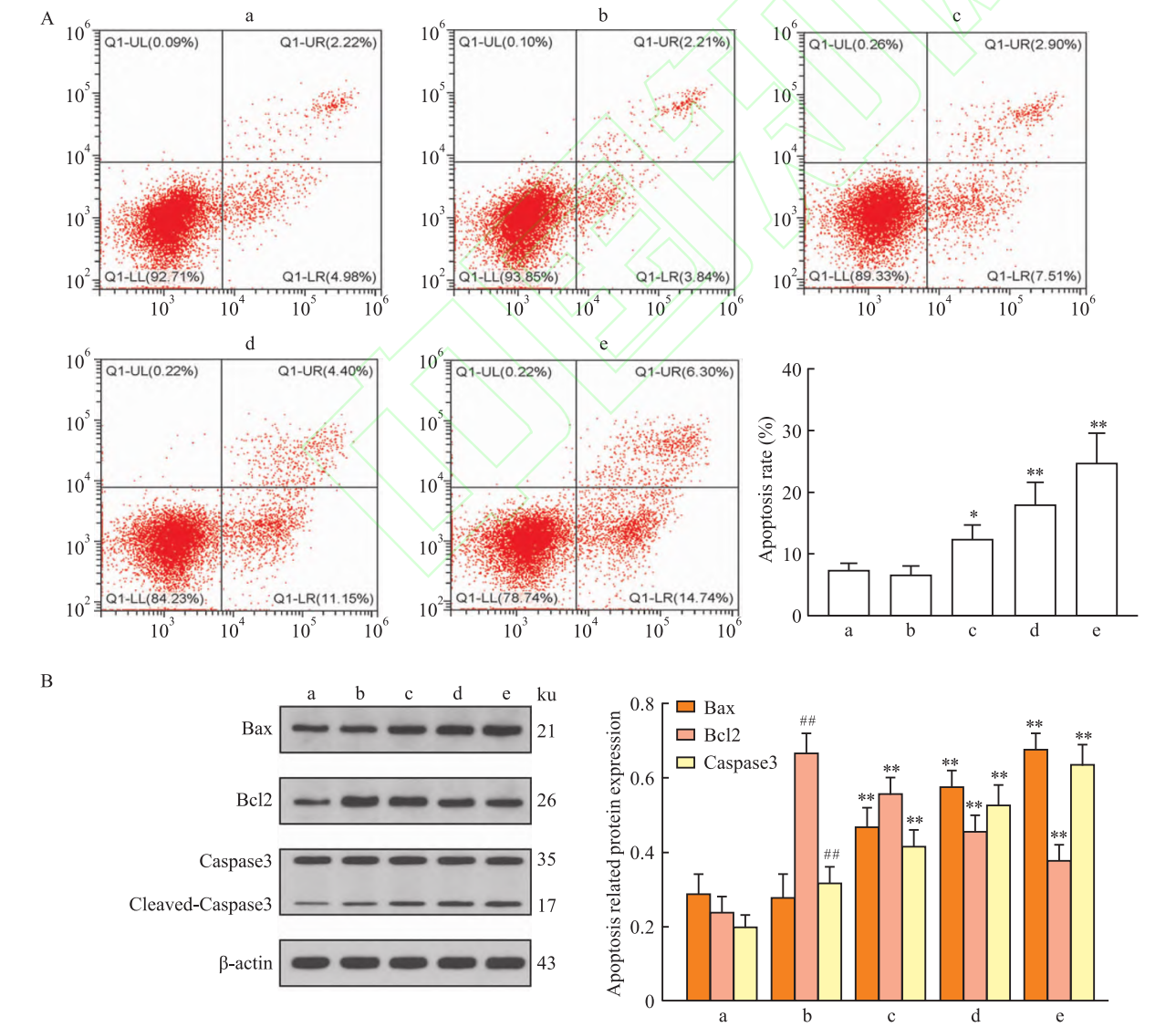


图2 莪术醇诱导 HSC 凋亡
Fig.2 Curcumin induced apoptosis in HSC

A: Apoptosis flow chart; B: Apoptosis-related protein expression; a: blank control group; b: model group; c: curcumin 12.5 mg/L group; d: curcumin 25 mg/L group; e: curcumin 50 mg/L group; ## $P < 0.01$ vs blank control group; * $P < 0.01$ vs model group.

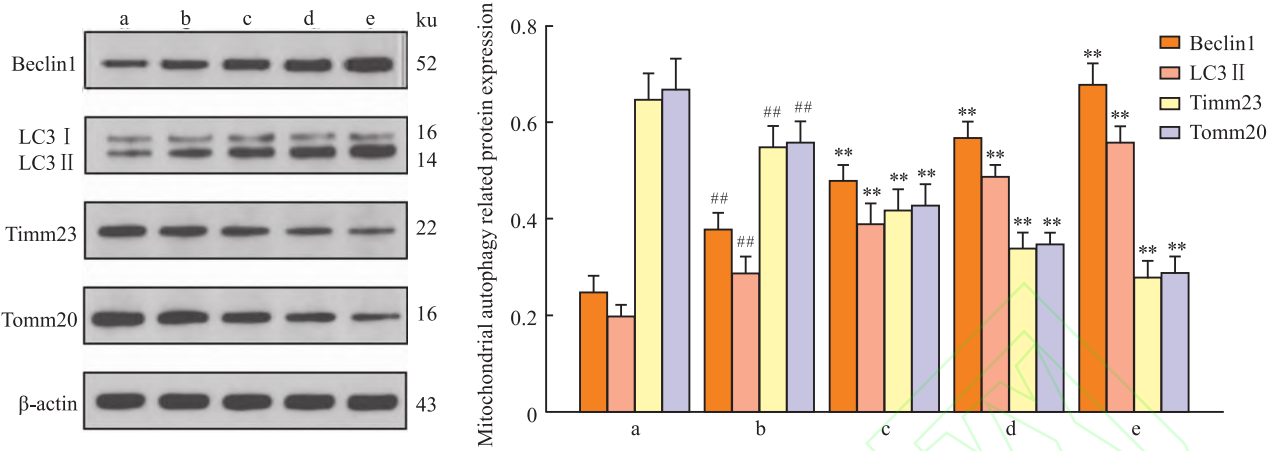


图3 莪术醇对线粒体相关蛋白表达的影响

Fig.3 The effect of curcumin on the expression of mitochondria-related proteins

a: blank control group; b: model group; c: curcumin 12.5 mg/L group; d: curcumin 25 mg/L group; e: curcumin 50 mg/L group; ## $P < 0.01$ vs blank control group; * $P < 0.01$ vs model group.

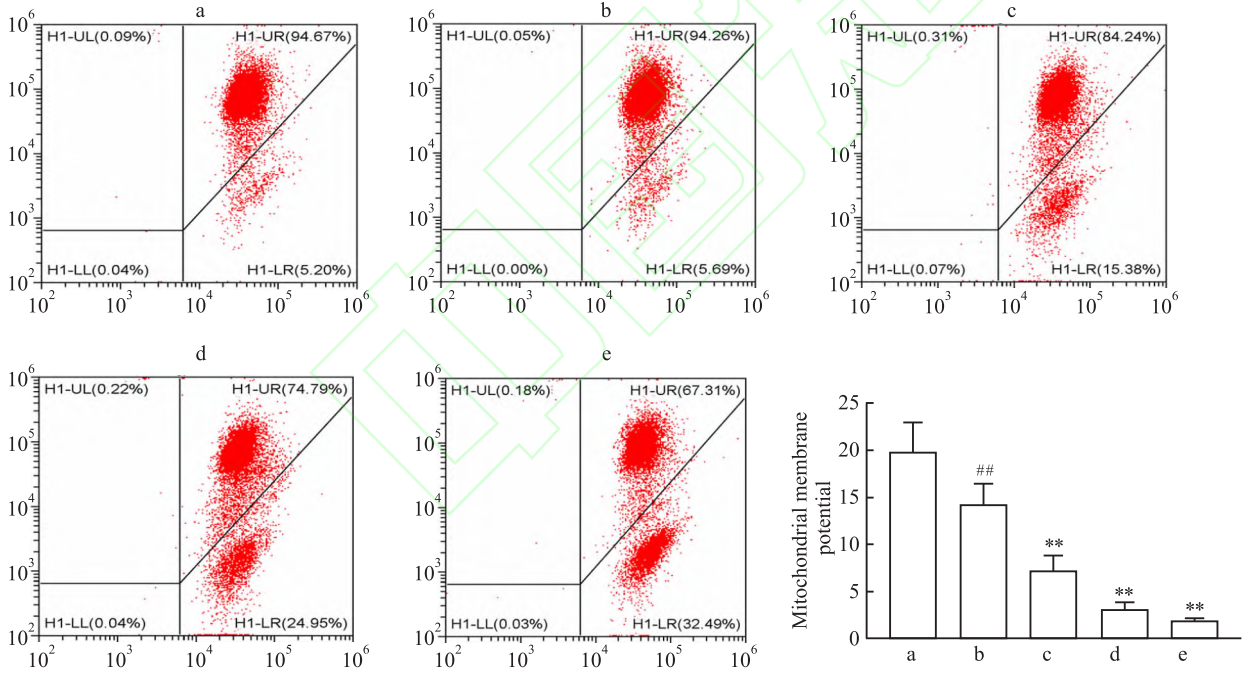


图4 莪术醇对线粒体膜电位的作用

Fig.4 The effect of curcumin on mitochondrial membrane potential

a: blank control group; b: model group; c: curcumin 12.5 mg/L group; d: curcumin 25 mg/L group; e: curcumin 50 mg/L group; ## $P < 0.01$ vs blank control group; * $P < 0.01$ vs model group.

2.7 莪术醇对 PINK1/Parkin 信号通路的作用

Western blot 检测 PINK1/Parkin 信号通路发现各组间 PINK1 和 Parkin 表达差异具有统计学意义 ($F = 58.795, 61.986$, 均 $P < 0.01$)。与空白对照组比较, 模型组 PINK1 和 Parkin 表达增加 ($LSD-t = 3.805, 3.868$, 均 $P < 0.01$); 与模型组比较, 莪术醇各组 PINK1 ($LSD-t = 3.690, 6.803, 9.916$, 均 $P < 0.01$) 和

Parkin ($LSD-t = 3.868, 7.032, 10.197$, 均 $P < 0.01$) 表达均增加。见图7。

2.8 莪术醇对细胞外基质表达的作用

Western blot 检测细胞外基质发现各组 Collagen I 和 Collagen III 以及 α -SMA 表达差异具有统计学意义 ($F = 57.152, 44.170, 67.305$, 均 $P < 0.01$)。与空白对照组比较, 模型组 Collagen I 和 Collagen III 以及

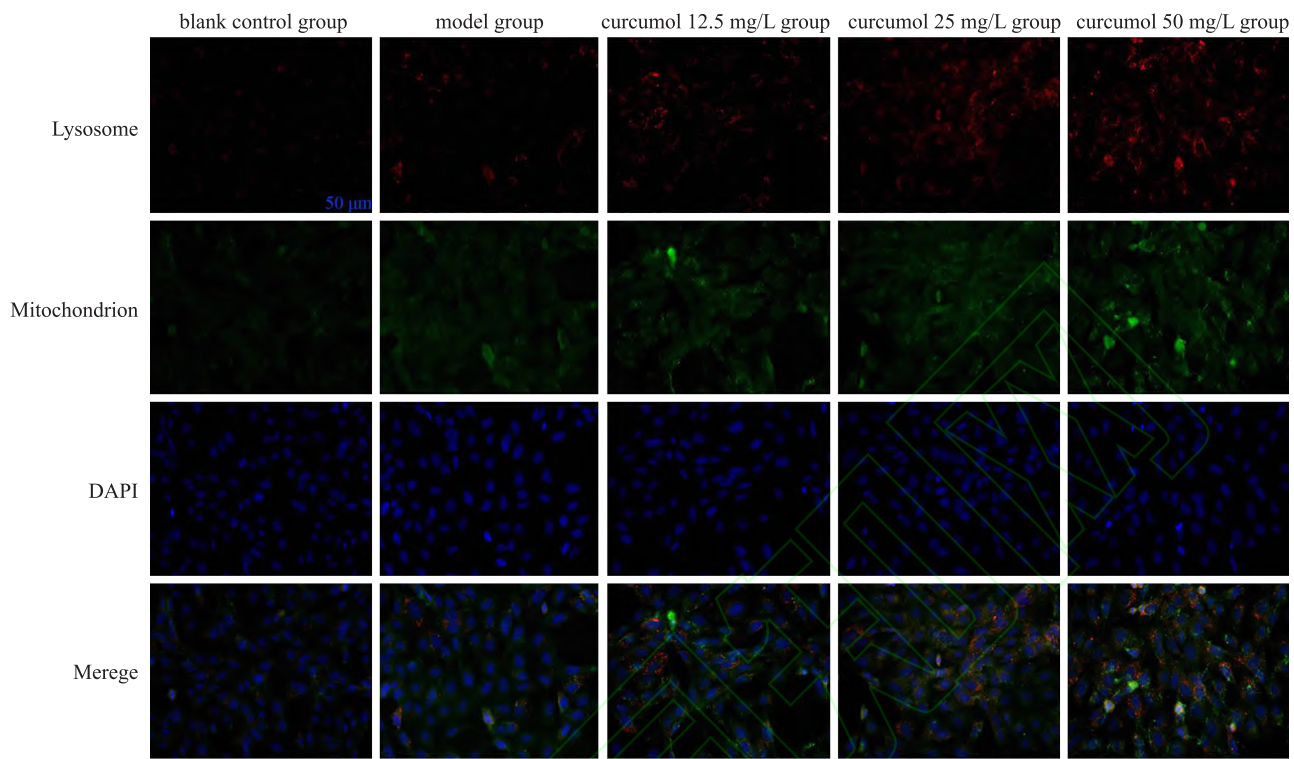


图5 姜黄素对线粒体与溶酶体共定位的影响 ×400

Fig.5 The effect of curcumin on co-localization of mitochondria and lysosomes ×400

a: blank control group; b: model group; c: curcumin 12.5 mg/L group; d: curcumin 25 mg/L group; e: curcumin 50 mg/L group.

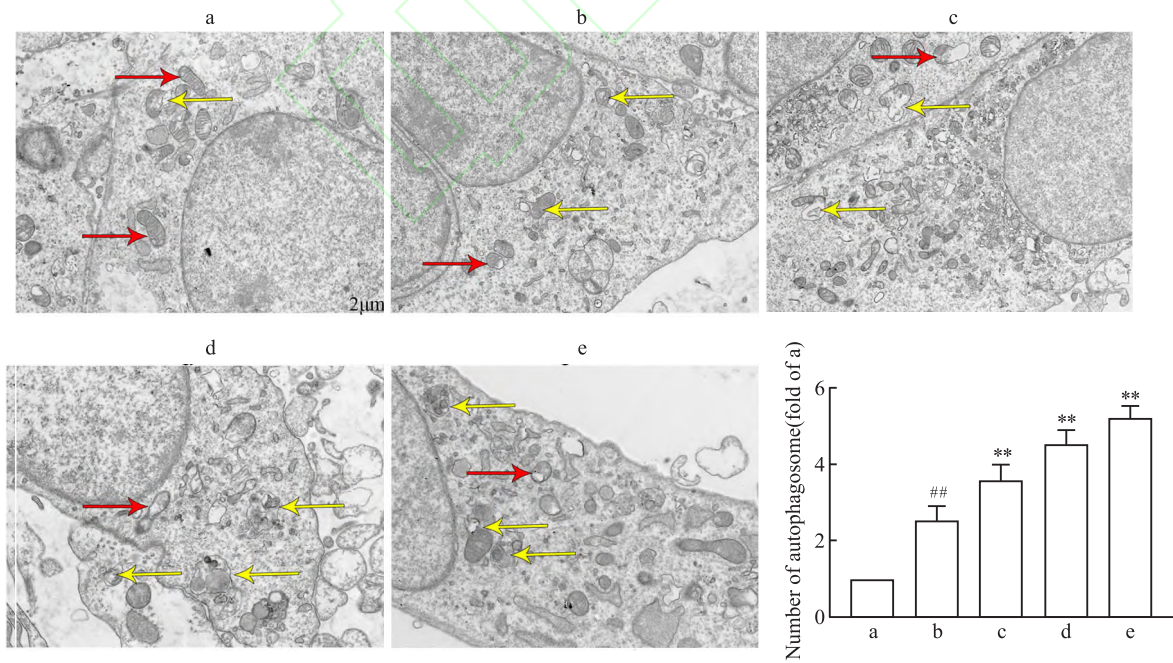


图6 姜黄素对线粒体结构及自噬小体的影响 ×5 000

Fig.6 The effect of curcumin on mitochondrial structure and autophagosome ×5 000

a: blank control group; b: model group; c: curcumin 12.5 mg/L group; d: curcumin 25 mg/L group; e: curcumin 50 mg/L group; ## $P < 0.01$ vs blank control group; * $P < 0.01$ vs model group; red arrows point to mitochondria; yellow arrowheads point to autophagosomes.

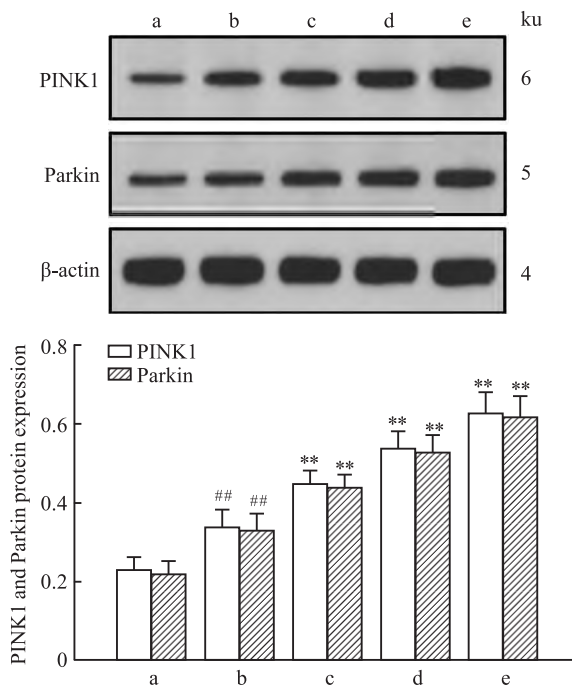


图7 莪术醇对 PINK1/Parkin 信号通路的作用

Fig.7 The effects of curcumin on PINK1/Parkin signaling pathway

a: blank control group; b: model group; c: curcumin 12.5 mg/L group; d: curcumin 25 mg/L group; e: curcumin 50 mg/L group; ## $P < 0.01$ vs blank control group; * $P < 0.01$ vs model group.

α -SMA (LSD- $t = 14.085, 13.256, 15.220$, 均 $P < 0.01$) 表达均增加;与模型组比较,莪术醇各组 Collagen I (LSD- $t = 4.797, 7.859, 10.206$, 均 $P < 0.01$) 和 Collagen III (LSD- $t = 3.870, 7.644, 10.235$, 均 $P < 0.01$) 以及 α -SMA (LSD- $t = 5.348, 8.227, 11.381$, 均 $P < 0.01$) 表达均下降。见图8。

3 讨论

HF 是慢性肝病的一个共同特征,与晚期疾病进展和不良预后相关,除非得到有效治疗,否则纤维化会导致肝功能衰竭。HSC 的活化分泌 ECM 是 HF 的核心病理事件,因此围绕 HSC 活化或者凋亡是慢性肝病研究热点问题。本研究结果表明莪术醇可以抑制 HSC 增殖,减少 ECM 中 α -SMA、Collagen I、Collagen III 蛋白的表达,表明莪术醇具有抗 HF 的作用。

线粒体可以为细胞提供能量,同时参与调控细胞钙稳态、细胞信息传递、细胞凋亡、细胞生长和分化等过程。线粒体自噬是调节细胞内线粒体质量和维持线粒体正常功能的重要环节。目前已知调控线粒体自噬的机制主要有两种:一种是 Parkin 依赖性

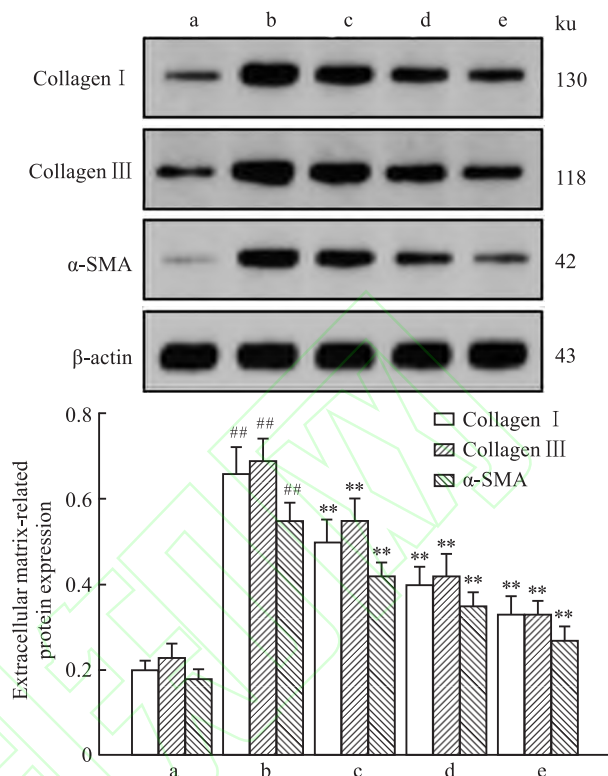


图8 莪术醇对细胞外基质分子表达的作用

Fig.8 The effect of curcumin on the expression of extracellular matrix molecules

a: blank control group; b: model group; c: curcumin 12.5 mg/L group; d: curcumin 25 mg/L group; e: curcumin 50 mg/L group; ## $P < 0.01$ vs blank control group; * $P < 0.01$ vs model group.

线粒体自噬,另一种是 Parkin 非依赖性线粒体自噬,分别由 FUN14 结构域蛋白 1 (FUN14 domain containing 1, FUNDC1) 和 BCL2 相互作用蛋白 3 样 (BCL2 interacting protein 3 like, BNIP3)/Nip3 样蛋白 X (NIP3-like protein X, NIX) 介导^[9]。PINK1/Parkin 是最重要的一种调节方式,当线粒体受损时,线粒体膜发生去极化,导致 PINK1 在线粒体外膜的胞质面上稳定聚集,使线粒体融合蛋白 2 (mitofusin2, Mfn2) 和泛素分子磷酸化,从而导致 Parkin 发生磷酸化并与磷酸化泛素结合,Mfn2 是 Parkin 的受体,两者相互作用促进多个线粒体相关蛋白泛素化形成多聚泛素链,磷酸化的多泛素链与线粒体自噬接头蛋白等相互识别并结合,其泛素结合区域与自噬标志物 LC3 连接,从而介导线粒体自噬清除受损线粒体^[10]。LC3 存在 LC3 I 和 LC3 II 两种形式,LC3 I 分布于细胞质内,自噬发生时,LC3 I 可被招募至自噬小体膜上,转变为 LC3 II 并定位于自噬体内膜和外膜,LC3 II 则始终稳定地保留在自噬体膜上直到与溶酶体融合,因此被作为自噬体的标记。Beclin1

是哺乳动物主要的自噬调节基因,在自噬初始阶段,其通过与Ⅲ型磷脂酰肌醇-3 激酶(classⅢ phosphoinositide 3-kinase, PI3KC3)结合参与自噬体形成,从而起到关键作用^[11]。

在本研究中发现模型组线粒体自噬被激活,这与之之前的一项报道^[12]结果相同,转化生长因子 β 1通过PINK1/Parkin途径诱导HSC线粒体自噬激活,导致HF的发生。同时观察到莪术醇增加PINK1和Parkin蛋白的表达,减少了Timm23和Tomm20蛋白的表达,透射电镜发现莪术醇增加线粒体自噬小体的数量;JC-1检测发现莪术醇降低了线粒体膜电位;荧光探针发现莪术醇增加了线粒体与溶酶体的共电位,表明莪术醇可能通过PINK1/Parkin途径促进线粒体自噬的发生,并且破坏了线粒体功能,从而抑制HSC的活化。令人感兴趣的是,这里有一项与本研究结果不一致的报道,褪黑素通过抑制活性氧(reactive oxygen species, ROS)介导的HSC线粒体自噬发挥防治HF的作用^[13]。造成这种不一致的原因可能和线粒体自噬的抑制会导致能量代谢降低,抑制HSC活化,也可能和过度的线粒体自噬也可降解正常的线粒体,破坏线粒体微环境稳定性并导致细胞死亡有关^[14]。综合上述结果表明线粒体自噬作用的双重性,未来需要更多实验揭示线粒体自噬在HF中作用。同时有研究^[15]发现,过度的线粒体自噬也可导致自噬依赖的细胞凋亡,而在本研究中莪术醇也可以诱导HSC的凋亡。

本研究也存在一些缺陷,例如没有进行体内实验验证;没有对莪术醇与PINK1之间的作用模式进行深入探究。进一步课题组将在动物水平揭示莪术醇与线粒体自噬的关系,并且借助计算生物学和线粒体组学明确莪术醇与PINK1之间的靶向关系和调控线粒体自噬的分子机制。

综上所述,莪术醇通过靶向PINK1/Parkin信号通路诱导HSC线粒体过度自噬,导致HSC线粒体功能障碍,从而抑制HSC活化和介导HSC凋亡,减少ECM的表达发挥抗HF的作用。

参考文献

- [1] 陈涤非, 揭磊, 黄启鸣, 等. 褪黑素调控自噬抑制肝星状细胞增殖的作用及机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(11): 1910–5. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.11.018.
- [1] Chen D F, Jie L, Huang Q M, et al. Effects and mechanisms of melatonin on autophagy and inhibition of hepatic stellate cell proliferation[J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(11): 1910–5.
- [2] Kumar S, Duan Q, Wu R, et al. Pathophysiological communication between hepatocytes and non-parenchymal cells in liver injury from NAFLD to liver fibrosis[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 176: 113869. doi: 10.1016/j.addr.2021.113869.
- [3] Lemmer A, VanWagner L B, Ganger D. Assessment of advanced liver fibrosis and the risk for hepatic decompensation in patients with congestive hepatopathy[J]. Hepatology, 2018, 68(4): 1633–41. doi: 10.1002/hep.30048.
- [4] Arroyo N, Villamayor L, Díaz I, et al. GATA4 induces liver fibrosis regression by deactivating hepatic stellate cells[J]. JCI Insight, 2021, 6(23): e150059. doi: 10.1172/jci.insight.150059.
- [5] Ma X, McKeen T, Zhang J, et al. Role and mechanisms of mitophagy in liver diseases[J]. Cells, 2020, 9(4): 837. doi: 10.3390/cells9040837.
- [6] Chen Y, Chen H N, Wang K, et al. Ketoconazole exacerbates mitophagy to induce apoptosis by downregulating cyclooxygenase-2 in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2019, 70(1): 66–77. doi: 10.1016/j.jhep.2018.09.022.
- [7] Dou S D, Zhang J N, Xie X L, et al. MitoQ inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by enhancing PINK1/parkin-mediated mitophagy[J]. Open Med (Wars), 2021, 16(1): 1718–27. doi: 10.1515/med-2021-0394.
- [8] Zheng Y, Zhao T, Wang J, et al. Curcumol alleviates liver fibrosis through inducing autophagy and ferroptosis in hepatic stellate cells[J]. FASEB J, 2022, 36(12): e22665. doi: 10.1096/fj.202200933RR.
- [9] Wang Y, Tang C, Cai J, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is activated in cisplatin nephrotoxicity to protect against kidney injury[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(11): 1113. doi: 10.1038/s41419-018-1152-2.
- [10] Yamada T, Dawson T M, Yanagawa T, et al. SQSTM1/p62 promotes mitochondrial ubiquitination independently of PINK1 and PRKN/parkin in mitophagy[J]. Autophagy, 2019, 15(11): 2012–8. doi: 10.1080/15548627.2019.1643185.
- [11] Wang S, Wuniquiemu T, Tang W, et al. Luteolin inhibits autophagy in allergic asthma by activating PI3K/Akt/mTOR signaling and inhibiting Beclin-1-PI3KC3 complex[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 94: 107460. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107460.
- [12] Lee J H, Kim K M, Jung E H, et al. Parkin-mediated mitophagy by TGF- β is connected with hepatic stellate cell activation[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(19): 14826. doi: 10.3390/ijms241914826.
- [13] Zhu L, Zhang Q, Hua C, et al. Melatonin alleviates particulate matter-induced liver fibrosis by inhibiting ROS-mediated mitophagy and inflammation via Nrf2 activation[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 268: 115717. doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.115717.
- [14] 赵永才, 高炳宏. 线粒体动力学与细胞能量代谢的关系及运动干预研究进展[J]. 生理学报, 2019, 71(4): 625–36. doi: 10.13294/j.aps.2019.0037.
- [14] Zhao Y C, Gao B H. Research advances in relationship between

mitochondrial dynamics and cellular energy metabolism and exercise intervention[J]. *Acta Physiol Sin*, 2019, 71(4): 625–36. doi: 10.13294/j.aps.2019.0037.

[15] 陈禧禅, 曾继涛, 瞿思铭, 等. IGFBP5 增龄性表达促进胸腺上皮细胞线粒体自噬和凋亡[J]. *陆军军医大学学报*, 2024,

46(6): 567–77. doi: 10.16016/j.2097-0927.202312068.

[15] Chen X C Zeng J T, Qu S M, et al. Age-related increase of IGFBP5 promotes mitophagy and apoptosis in thymic epithelial cells [J]. *J Army Med Univ*, 2024, 46(6): 567–77. doi: 10.16016/j.2097-0927.202312068.

Exploring the role of curcuminol on mitochondrial autophagy in hepatic stellate cells based on the PINK1/Parkin signalling pathway

Xiao Huaye¹, Wang Lei¹, Wang Jiahui¹, Zhao Tiejian¹, Zheng Yang¹, Duan Xuelin²

(¹Dept of Medicine, Faculty of Chinese Medicine Science, ²School of Zhuang Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222)

Abstract Objective To investigate the mechanism of action of curcuminol on mitochondrial autophagy in hepatic stellate cells and its molecular mechanism against liver fibrosis. **Methods** Hepatic stellate cells were divided into blank group, model group (lipopolysaccharide 5mg/L), and low, medium and high curcuminol group (12.5, 25 and 50mg/L); Thiazolyland (MTT) was used to detect the effects of curcuminol on the viability of hepatic stellate cells; flow cytometry was used to detect the effects of curcuminol on apoptosis of hepatic stellate cells; 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylimidacarbocyanine iodide (JC-1) was used to detect the mitochondrial membrane potential; effects of curcuminol on mitochondrial morphology and autophagosome were detected by transmission electron microscopy; effect of curcuminol on mitochondrial localisation were detected by fluorescent probe; Immunoblotting assay was performed to detect the effects of curcuminol on PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1), Parkinson's disease protein (Parkin), microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), autophagy-associated protein (Beclin1), mitochondrial inner membrane translocase 23 (Timm23), mitochondrial outer membrane translocase 20 (Tomm20), Bcl-2 associated X protein (Bax), B lymphocytoma-2 (Bcl2), cleaved-cysteine protease 3 (Caspase3), α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen type I (Collagen I), and collagen type III (Collagen III) protein expression. **Results** Compared with the blank control group, cell proliferation rate, Caspase3, Bcl2, LC3 II, Beclin1, PINK1, Parkin, α -SMA, Collagen I, Collagen III proteins significantly increased in the model group ($P < 0.01$), co-localisation of mitochondria and lysosomes increased, and the number of mitochondrial autophagosome significantly increased ($P < 0.01$), while Timm23 and Tomm20 proteins, mitochondrial membrane potential decreased significantly ($P < 0.01$), apoptosis rate decreased, and Bax protein expression decreased. Compared with the model group, after curcuminol intervention, cell proliferation rate, Bcl2, Timm23, Tomm20, α -SMA, Collagen I and Collagen III protein expression significantly decreased in the curcuminol low-, medium- and high-concentration groups ($P < 0.01$), and the mitochondrial membrane potential significantly decreased ($P < 0.01$), whereas apoptosis rate, Caspase3, Bax, LC3 II, Beclin1, PINK1 and Parkin proteins significantly increased ($P < 0.05$), the co-localisation of mitochondria and lysosomes increased, and the number of mitochondrial autophagosome significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Curcuminol exerts ameliorative effects on hepatic fibrosis by modulating mitochondrial hyperautophagy mediated by the PINK1/Parkin signaling pathway, and promoting hepatic stellate cell apoptosis.

Key words curcuminol; liver fibrosis; hepatic stellate cells; mitochondrial autophagy; apoptosis; PINK1/Parkin signalling pathway

Fund programs National Natural Science Foundation of China (Nos. 82204755); Natural Science Foundation of Guangxi Province (No. 2023GXNSFBA026274, 2024GXNSFAA010235); Foundation of Guangxi Key Laboratory of Zhuang and Yao Medicines (No. GXZYKF2023-05); Graduate Education Innovation Plan Project of Guangxi

METTL3 促进非小细胞肺癌细胞增殖, 迁移和侵袭

金 丹¹, 邵 爽¹, 李 睿², 郭纪伟¹(滨州医学院附属医院¹ 医学研究中心、² 消化内科, 滨州 256601)

摘要 **目的** 探讨甲基转移酶样 3 (METTL3) 作为 m⁶A 修饰的甲基转移酶对非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞增殖、克隆和迁移能力的影响。**方法** 通过生物信息学探讨 METTL3 表达水平与 NSCLC 患者预后的关系, 通过 RT-PCR、Western blot、m⁶A 定量检测、CCK-8、免疫荧光、克隆形成和细胞划痕实验等探讨敲减或高表达 METTL3 后 NSCLC 细胞 METTL3 mRNA 和蛋白水平、m⁶A 水平、增殖、克隆形成、迁移及凋亡能力的变化。**结果** 生物信息学分析表明 METTL3 在 NSCLC 中高表达且与患者生存期呈负相关。RT-PCR 和 Western blot 实验显示 METTL3 在 NSCLC 细胞系中高表达。在 A549 细胞中, 高表达 METTL3 后显著增加 NSCLC 细胞 m⁶A 水平并促进其增殖、生长、肿瘤形成和细胞迁移, 且抑制细胞凋亡并上调波形蛋白 (Vimentin), 下调 E-钙黏着蛋白 (E-cadherin) 的 mRNA 和蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 从而促进 A549 细胞的上皮-间质转化进程 (EMT)。但在 A549 细胞中靶向敲除 METTL3 则得到相反结果 ($P < 0.01$)。**结论** 过表达 METTL3 增加 NSCLC 细胞 m⁶A 水平并促进其增殖、克隆形成和细胞迁移能力, 为今后以 METTL3 为靶点的 NSCLC 早期诊断与靶向药物开发奠定理论基础。

关键词 METTL3; m⁶A; 增殖; 迁移; 侵袭; EMT; NSCLC

中图分类号 R 394.2

文献标志码 A

近些年来, 肺癌的发病率在全球范围内呈上升趋势^[1]。中国的肺癌死亡人数已高达全球肺癌死亡人数的 40%, 已成为病死率最高的癌症^[2]。但目前非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 发病的分子机制尚不明确。N⁶-甲基腺苷 (N⁶-methyladenosine, m⁶A) 是真核生物 RNA 最常见的表观遗传修饰方式之一, 是指腺苷碱基第 6 号 N 原子上的甲基化^[3]。m⁶A 修饰是动态可逆的, 由甲基转移酶、去甲基化酶和甲基化识别蛋白等调控^[4]。近年来的研究^[5]表明, m⁶A 修饰在肿瘤的发生发展中发挥着重要作用, m⁶A 修饰及相关调控蛋白异常影响癌症的进展。近期研究^[6-9]表明 m⁶A 甲基转移酶样 3 (methyltransferase like 3, METTL3)

功能异常与肝癌, 肺癌, 乳腺癌, 胃癌等多种癌症密切相关。由 METTL3 介导的 m⁶A 表观遗传修饰将成为包括 NSCLC 在内的患者的早期诊断和预后的潜在指标, 并能够为临床治疗癌症提供分子靶点。因此, 本研究旨在探讨 METTL3 调控对 NSCLC 细胞增殖、克隆和迁移能力的影响, 阐明 METTL3 在 NSCLC 发病过程中的作用及机制, 这对于探索新的 NSCLC 临床治疗途径具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 细胞培皿和培养板采购于美国 Corning 公司; 细胞培养基 RPMI-1640 和胎牛血清 (货号: SH30809.01、SH30071.03) 购于美国 Hyclone 公司; 转染试剂 LipofectamineTM 2000 (货号: 11668027) 购于美国 Invitrogen 公司; BCA 试剂盒 (货号: PC0020) 购于北京 Solarbio 公司; 一抗 METTL3, E-钙黏着蛋白, 波形蛋白, β -Tubulin, Annexin V 等单克隆抗体及羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor[®])

2025-01-05 接收

基金项目: 山东省高等学校“青创科技支持计划”项目 (编号: 2020KJK002)

作者简介: 金 丹, 女, 技师

郭纪伟, 男, 副主任技师, 通信作者, E-mail: guojw0510@bzmc.edu.cn

Province (No. YCBZ2024150); Scientific Research Program of Faculty of Chinese Medicine Science Guangxi University of Chinese Medicine (Nos. 2024ZZA002, 2024ZZA003, 2024ZZB007, 2024ZZB010)

Corresponding authors Zheng Yang, Email: 1793853705@qq.com; Duan Xuelin, Email: 403605650@qq.com