

内质网应激预处理对人正常肝细胞缺氧再复氧损伤的保护作用*

郑志刚 吴楠 周倜 刘栋 陈勇[△]

(第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究内质网应激预处理对人肝细胞缺氧复氧损伤的保护作用。方法:将培养的人肝细胞分为4组:正常对照(C)组、细胞缺氧复氧损伤(H/R)组、内质网应激(ER)组、内质网应激预处理(ERP+H/R)组。收集各组细胞,以流式细胞仪检测细胞凋亡,Western-blotting及RT-PCR检测内质网应激特异蛋白GRP78表达水平,并通过透射电镜观察各组细胞超微结构改变。结果:ERP+H/R组细胞凋亡率明显低于H/R组($P<0.05$),ER及ERP+H/R组GRP78蛋白表达明显高于H/R组($P<0.05$)。结论:内质网应激预处理对肝细胞缺氧复氧损伤具有明显的保护作用,内质网应激特异性蛋白GRP78可能在肝细胞缺氧复氧损伤中作为一种关键性的保护蛋白出现。

关键词 内质网应激;预处理;人正常肝细胞;缺氧再复氧损伤

中图分类号 R364.12 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2012)08-1426-04

Protective Effect of Endoplasmic Reticulum Stress Preconditioning on the HL-7702 Cell Injured by Hypoxia-Reoxygenation*

ZHENG Zhi-gang, WU Nan, ZHOU Ti, LIU Dong, CHEN Yong[△]

(Department of Hepatic Surgery, Xi-Jing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To study the protective effects on the endoplasmic reticulum stress preconditioning on human hepatic cell hypoxia-reoxygenation injury. **Methods:** Cultured human liver cells into four groups, namely normal control (C) group, hypoxia-reoxygenation (H/R) group, endoplasmic reticulum stress (ER) group, endoplasmic reticulum stress preconditioning (ERP+H/R) group. The cells were collected to detect apoptosis by flow cytometry, Western-blotting and RT-PCR detection of endoplasmic reticulum stress protein GRP78-specific expression, and ultrastructural changes of cells were observed by transmission electron microscopy. **Results:** ERP+H/R cell apoptosis was significantly lower than H/R group ($P<0.05$), ER and ERP+H/R group GRP78 protein expression was significantly higher than the H/R group ($P<0.05$). **Conclusion:** Endoplasmic reticulum stress preconditioning on hypoxia-reoxygenation injury of liver cells has a significant protective effect. Endoplasmic reticulum stress-specific protein GRP78 is a key protective protein in liver cells injured by hypoxia-reoxygenation.

Key words: Endoplasmic reticulum stress; Preconditioning; HL7702 cell; Hypoxia/reoxygenation injury

Chinese Library Classification(CLC): R364.12 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)08-1426-04

前言

内质网(endoplasmic reticulum, ER)是一种重要的真核细胞器,是真核细胞中蛋白质翻译合成和细胞内钙离子的储存场所,对细胞应激反应起调节作用。内质网对于环境的改变非常敏感,缺氧、饥饿、钙离子平衡失调、自由基侵袭及药物等外界刺激均可引起内质网生理功能发生紊乱,钙稳态失衡,错误折叠或未折叠的蛋白质在内质网腔内聚集,一系列的亚细胞器的病理状态,称为内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)^[1],适度的内质网应激能够使未折叠蛋白质恢复正确构象并能够进一步加工,是一种细胞自我保护的机制。严重或持续的内质网应激则可能损伤内质网的功能,导致细胞凋亡。

肝细胞含有丰富的内质网,肝细胞缺氧复氧损伤损伤会引

起强烈的内质网应激,导致肝细胞的凋亡。衣霉素是目前最常用的内质网应激诱导剂^[2],本研究拟通过小剂量衣霉素诱导肝细胞产生保护性内质网应激反应,观察其对肝细胞缺氧复氧损伤的保护作用,并通过观察内质网应激特异性蛋白GRP78的表达差异^[3],讨论其在肝细胞内质网应激中的作用,为预防肝细胞缺氧复氧损伤提供依据。

1 材料与方法

1.1 肝细胞的复苏和培养

人正常肝细胞株 HL-7702 购于中国科学院细胞库。将冻存的细胞株于 37℃ 迅速复温,2000×g 离心 5min,弃去上清后,加入含 15% 胎牛血清(杭州四季青)的 1640 培养基混悬,按 5×10^5 的密度接种于培养瓶中,放入 37℃,5% CO₂、95% 空气、90

* 基金项目 国家自然科学基金(81070363)

作者简介 郑志刚(1984-)男,医师,硕士研究生,研究方向:肝癌、肝移植的基础与临床

电话:13892878726, E-mail: zhengzhigang007@yahoo.com.cn

[△]通讯作者 陈勇,电话:13891915509, E-mail: gdwkey@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2011-11-04 接受日期:2011-11-30)

%湿度的培养箱中。每 48 h 时更换一次培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将细胞分为 4 组, 每组 6 瓶, 细胞数约为 5×10^6 /瓶。①正常对照组(C 组): 正常培养基 培养条件不变。②内质网应激组(ER 组): 细胞正常培养 48 h 后, 弃去培养液, PBS 冲洗两遍后, 加入终浓度为 $0.2 \mu\text{g/ml}$ 的含衣霉素培养液, 继续培养 24 h。③细胞缺氧复氧损伤组(H/R 组): 以 KHH 缓冲液置换含 15 %胎牛血清的 1640 培养液, 于低氧培养箱(37°C 2 % O_2 、8 % CO_2 、90 % N_2)培养 12 h, 然后更换为正常培养基继续培养 6 h。④内质网应激预处理组(ERP+ H/R 组): 将衣霉素诱导内质网应激预处理后的细胞, 用含 15 %胎牛血清的 1640 培养液继续培养 24 h 后, 以 HEPES 液置换正常培养液, 于低氧培养箱(37°C 1 % CO_2 、9 % CO 、90 % N_2)培养 12 h, 然后更换为正常培养基继续培养 6 h。

1.2.2 细胞形态观察 收集细胞, 离心, 洗涤, 按透射电镜要求制片、染色, 镜下观察各组细胞形态。

1.2.3 细胞凋亡的检测 培养好的细胞以 0.25 %胰酶消化 5min, 加入培养基种植消化后, 将细胞悬液移入离心管, $1000 \times \text{g}$ 离心 5 min, 弃上清, PBS 清洗 2 次($1000 \times \text{g}$ 离心 5 min), 收集细胞, 按 TAKARA 细胞凋亡检测试剂盒说明操作, 对细胞进行染色。用流式细胞仪检测($\text{Ex}=488 \text{ nm}$, $\text{Em}=530 \text{ nm}$)细胞凋亡情况。

1.2.4 Western blot 收集细胞, 提取蛋白, 用 Bradford 法测蛋白浓度。取样本蛋白 $100 \mu\text{g}$, SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 湿法转移将蛋白条带转移至 PVDF 膜上, 50 g/L 脱脂奶粉封闭后依次加入一抗(羊 GRP78 抗体, 体积比 1 : 500, GAPDH 体积比 1 : 2000), 二抗(磷酸酶标记的兔抗羊 IgG 体积比 1 : 2000), γ -溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐/氮蓝四唑(BCIP/NBT)显色, 扫描后定量分析。

1.2.5 RT-PCR 测定 收集各组细胞后, 提取总 RNA, 逆转录后行 PCR。PKC- α 及 β -actin 引物参照 Gen-Bank 中 cDNA 序列用 Primer Premier 5.0 软件设计, PKC- α 引物序列为: 上游引物序列 5'-TCTGGTTGGCGGATCTACTC-3', 下游引物序列 5'-TCTTTGTGTCAGGGGTCGTTC-3', 扩增出 492 bp 片段。 β -actin 引物序列为: 上游引物序列 5'-ATCTGGCACCACACCTCC-3', 下游引物序列 5'-AGGCAGGTCCAGCA-3', 扩增出 512 bp 片段。PCR 反应条件为 94°C 预变性 5 min, 94°C 30 s, 56°C 20 s, 72°C 30 s, 共 35 个循环。产物在琼脂糖凝胶中电泳检测, 在 UV 凝胶成像系统下观察并记录结果。使用 bandleader 3.0 凝胶图像处理软件测灰度值, 并以目的序列为内参的比值进行统计学分析。

1.3 统计学处理

应用 SPSS10.0 统计软件, 实验结果均以均数 $\pm$ 标准差表示。多组资料均数比较采用 One-way ANOVA 检验, 组间比较用 LSD-t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电镜下肝细胞结构改变

正常肝细胞电镜下细胞质中充满线粒体和内质网(图

1A), 而 H/R 组中基本看不到内质网的存在, 线粒体水样变(图 1B); ER 组中线粒体和内质网正常存在于细胞质中(图 1C); ERP+H/R 组明显看到内质网和深染的线粒体在细胞质中(图 1D)。ERP+H/R 组与对照组 C 组相比结构无明显差异, H/R 组与之相比内质网数量明显减少, 线粒体密度深, 糖原消失。ER 组细胞结构无明显差异。

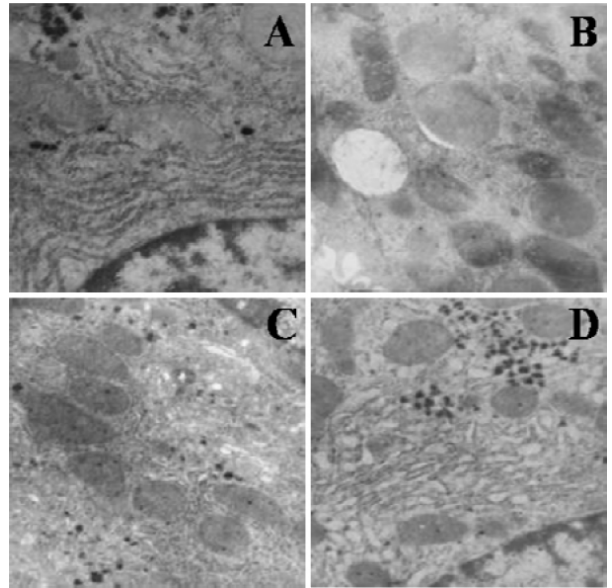


图 1 电镜检查结果(3000 $\times$)

注: A 正常对照组 B H/R 组 C ER 组 D ERP+H/R 组
Fig.1 The electron microscope photos of HL-7702 cells (3000 $\times$)
Note: A normal liver cells group, B H/R group, C ER group, D ERP+H/R group

2.2 细胞凋亡率

ERP+H/R 组的凋亡率明显低于单纯 H/R 组 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。ER 组凋亡率和对照组无明显差异(见图 2)。

2.3 RT-PCR

与对照组相比, H/R 组的 GRP78 mRNA 水平无明显变化 ($P > 0.05$), 而 ER 组和 ERP+H/R 组的 GRP78 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$), 但 ER 组与 ERP+H/R 组间比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 见图 3。

2.4 Western blot

ER 组和 ERP+H/R 组中 GRP78 蛋白均高表达, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示内质网应激特异性蛋白 GRP78 可能在肝细胞缺氧复氧损伤中作为一种关键性的保护蛋白出现, 见图 4。

3 讨论

内质网是细胞内重要的亚细胞结构, 蛋白质在内质网内进行修饰、折叠、组装, 再进入高尔基进行进一步的加工后被分泌到细胞质中。细胞如果受到缺血缺氧、葡萄糖/营养缺乏、蛋白质糖基化抑制、二硫键形成障碍、蛋白质转运异常或 Ca^{2+} 耗竭等刺激就会导致内质网内钙稳态失衡、蛋白质错误折叠并聚集, 引起内质网应激反应的发生。这些损伤性刺激统称为内质网应激(ER stress)^[5]。内质网应激可引起一系列细胞信号传

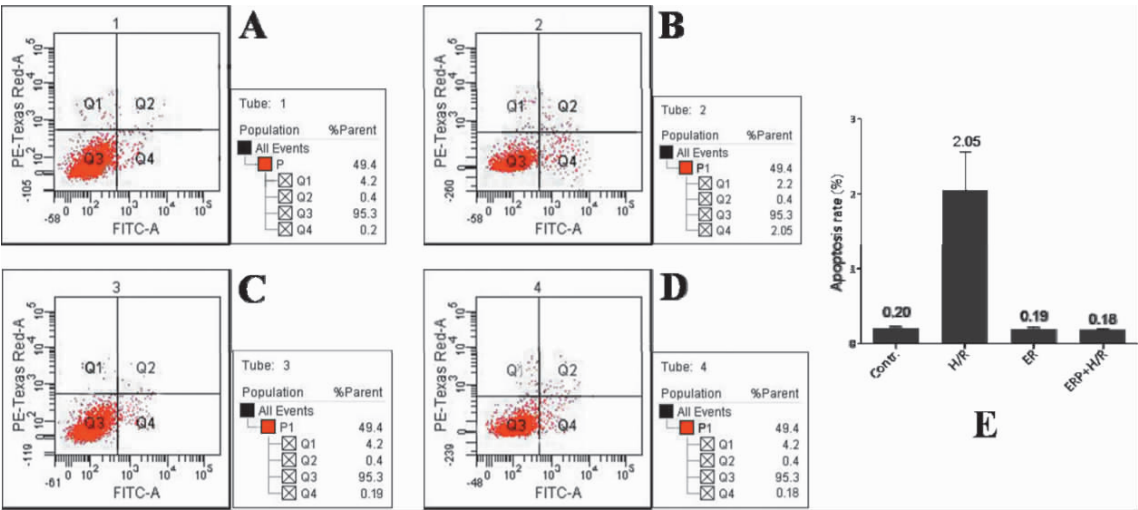


图2 流式细胞术检测细胞凋亡结果
注 :A 对照组 B H/R 组 C ER 组 D ERP +H/R 组 E 检测结果直方图

Fig.2 The results of apoptosis detected by FCM

Note :A Control group, B H/R group, C ER group, D ERP +H/R group, E The statistics histogram of apoptosis rates

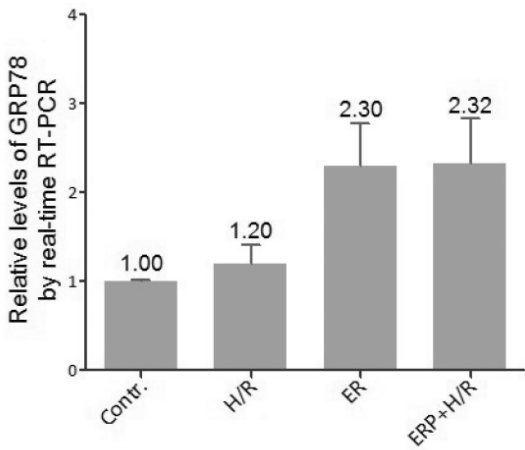


图3 GRP78 mRNA 的 RT-PCR 检测结果

Fig.3 The level of GRP78 mRNA detected by RT-PCR

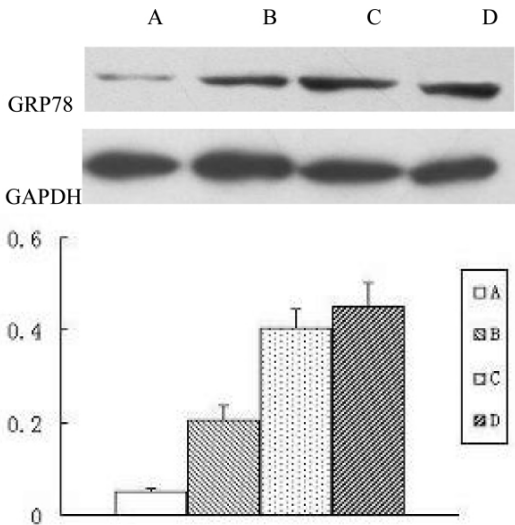


图4 GRP78 蛋白表达水平的检测结果

注 :A 对照组 B H/R 组 C ER 组 D ERP +H/R 组

Fig.4 The concentration of GRP78 protein detected by Western blot

Note :A Control group, B H/R group, C ER group, D ERP +H/R group

导通路的活化 ,总称为未折叠蛋白反应(Unfolded Protein Response ,UPR)^[6]。

当前对内质网应激的研究 ,主要集中在寻找调节内质网应激相关通路活性的药物上 ,从而可以探导出适度诱导内质网应激的药物和合适的药物浓度与作用时间 ,以达到治疗相关疾病和防止手术并发症的目的。目前已经发现了一些化合物可以用作内质网应激调节剂如 4- 丁酸苯酯能稳固蛋白质构象 ,促进内质网折叠蛋白质能力 ,降低内质网应激导致的有害影响^[7] ;一种高级聚糖化终产物抑制剂 TM2002 能抑制内质网应激导致的细胞凋亡 ,降低肾脏的缺血再灌注损伤^[8] ;已经发现一种新的 JNK 抑制剂 ,能抑制 JNK 通路——内质网应激诱导细胞凋亡的关键信号通路 ,EIF2 α 去磷酸化抑制剂能缓解环孢素导致的肾毒性作用^[9]。

本研究用衣霉素在人正常肝细胞内诱导内质网应激 ,并应用于体外缺氧复氧损伤模型中 ,以模拟体内缺血再灌注的病理过程。GRP78 是一种定位于内质网的分子伴侣 ,在多类细胞中广泛存在 ,可修复或降解内质网应激条件下错误折叠蛋白以促进细胞存活 ,其表达上调是内质网应激的特异性敏感标志^[4]。我们的研究结果显示 ,内质网应激反应对肝细胞缺氧复氧损伤具有一定的保护作用。在缺血复氧条件下 ,内质网应激可使肝细胞的显微镜结构维持正常状态 ,且显著降低细胞凋亡率。通过 PCR 及 Western blot 检测 ,我们发现内质网应激可明显提高缺血复氧条件下肝细胞内 GRP78 基因的 mRNA 和蛋白表达水平 ,这可能是肝细胞内质网应激预防肝细胞缺氧复氧损伤的分子机制之一。

缺血预处理保护作用已经在心脏、肾脏、肝脏、脑等模型中得到证实 ,其保护机制有很多 ,包括分子伴侣和抗氧化酶类的表达^[10]。基于内质网应激在局部缺血中的作用 ,我们推测缺血预处理激活了未折叠蛋白反应 ,使细胞发生自我保护的变化。这一推测已经在一些模型中得到体现。例如衣霉素预处理的心肌细胞在缺氧条件下释放的乳酸脱氢酶较未处理心肌细胞的低 ,提示预先诱导的内质网应激对心肌细胞产生某种保护

作用^[11] ,同样 ,内质网应激预处理能保护肾脏细胞对抗氧化损伤^[12-14]。在内质网应激条件下 细胞在自我保护和凋亡之间是如何选择的 ,如何将内质网应激的两面性应用于临床 ,将是下一阶段的研究重点。

参考文献(References)

- [1] Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, et al. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. *Hepatology*, 2000, 32(2):169-173
- [2] Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6):1641-1654
- [3] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. New insights into potential mechanisms of ischemic preconditioning[J]. *Circulation*, 1991, 84(1):442-445
- [4] Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications [J]. *Dig Surg*, 2003,20(5):383-396
- [5] Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase [J].*Nature*, 1999,398(6722):90
- [6] Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response [J]. *Mutat Res*, 2005,569(1-2):29-63
- [7] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta [J]. *Nature*, 2000, 403(6765):98-103
- [8] Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, et al. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses [J].*EMBO J*, 1998, 17(19): 5708-5717
- [9] Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, et al. Sodium 4-phenylbutyrate protects against liver ischemia reperfusion injury by inhibition of endoplasmic reticulum-stress mediated apoptosis [J]. *Surgery*,2005, 138(2): 342-351
- [10] Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications [J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, (8):504-510
- [11] Oikawa D, Kimata Y, Kohno K. Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1 [J]. *J Cell Sci*, 2007,120(Pt 9):1681-1618
- [12] Korennykh AV, Egea PF, Korostelev AA, et al. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1 [J]. *Nature*, 2008, 457(7230):687-693
- [13] Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species [J]. *BiochemJ*, 2009,417(1):1-13
- [14] Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism [J].*Cell*, 2009,137(2):216-233
- [11] Huang CY, Chueh PJ, Tseng CT, et al. ZAK re-programs atrial natriuretic factor expression and induces hypertrophic growth in H9C2 cardiomyoblast cells[J].*Biochem Biophys Res*, 2004,324(3):973-980
- [12] Watkin SJ, Borthwick GM, Arthur HM, et al. The H9C2 cell line and Primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro[J].*In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2010, 47(2):125-131
- [13] Huang Y, Zhang H, Shao Z, et al. Suppression of endothelin-1 induced cardiac myocyte hypertrophy by PPAR agonists: role of diacylglycerol kinase zeta [J]*Cardiovasc Res*, 2011, 90(2):267-275
- [14] Hou N, Luo MS, Liu SM, et al. Leptin induces hypertrophy through activating the peroxisome proliferator-activated receptor α pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(11):1087-1095
- [15] Li CB, Li XX, Chen YG, et al. Effects and mechanisms of PPAR α activator fenofibrate on myocardial remodelling in hypertension[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(11-12):4444-4452
- [16] Lebrasseur NK, Duhaney TA, De Silva DS, et al. Effects of fenofibrate on cardiac remodeling in aldosterone-induced hypertension [J]. *Hypertension*, 2007, 50(3):489-496
- [17] Brigadeau F, Gelé P, Wibaux M, et al. The PPAR α activator fenofibrate slows down the progression of the left ventricular dysfunction in porcine tachycardia-induced cardiomyopathy[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 49(6):408-415

(上接第 1451 页)