

• 论 著 •

内质网应激对非酒精性脂肪性肝病细胞线粒体凋亡影响研究^{*}

吴鹏波, 吴晓曼, 俞媛洁, 郭一天, 李 明[△], 谭诗云
(武汉大学人民医院消化内科, 湖北武汉 430060)

摘 要:目的 探讨内质网应激对非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)细胞模型中线粒体途径凋亡的影响。方法 采用油酸诱导 HepG2 细胞建立非酒精性脂肪变性细胞模型, 将实验细胞分为对照组、造模 12 h 组、造模 16 h 组和 4-苯基丁酸(4-PBA, 加入内质网抑制剂)组, BODIPY 493/503 染色检测细胞内脂肪变性; 采用 Hoechst 33258 染色观察各组细胞凋亡情况及 Annexin V-FITC/PI 双染法检测各组 HepG2 细胞凋亡率; 采用 JC-1 法检测各组细胞线粒体膜电位(MMP)变化。采用免疫蛋白印迹(Western blot)检测内质网应激蛋白葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)及 C/EBP 环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白(CHOP)及线粒体途径凋亡相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的以及细胞质细胞色素 C(CytC)的表达。**结果** 与对照组相比, 造模组细胞内脂质沉积明显增加; 与造模 16 h 组相比, 4-PBA 组细胞内脂质沉积明显降低。Hoechst 33258 染色及 Annexin V-FITC/PI 双染法检测提示与对照组相比, 造模后细胞凋亡增加; 与造模 16 h 组相比, 4-PBA 组细胞凋亡率明显降低。JC-1 法检测显示与对照组相比, 造模后细胞 MMP 下降, 加用 4-PBA 后细胞 MMP 升高。Western blot 检测显示造模后细胞 Bax、Caspase-3、GRP78、CHOP、胞质 CytC 蛋白表达增加, 而 Bcl-2 表达降低; 加用 4-PBA 后细胞 GRP78、CHOP、Bax、Caspase-3、胞质 CytC 蛋白表达降低, 而 Bcl-2 表达增加。**结论** 内质网应激可诱导 NAFLD 细胞线粒体途径凋亡。

关键词:内质网应激; 非酒精性脂肪性肝病; 线粒体; 凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.17.009

中图法分类号:R575

文章编号:1673-4130(2020)17-2088-04

文献标识码:A

Study the effect of endoplasmic reticulum stress on mitochondrial apoptosis in non-alcoholic fatty liver disease^{*}

WU Pengbo, WU Xiaoman, YU Yuanjie, GUO Yitian, LI Ming[△], TAN Shiyun
(Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of endoplasmic reticulum stress on mitochondrial apoptosis in a cell model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** HepG2 cells were induced by oleic acid to establish a non-alcoholic steatosis cell model. The test cells were divided into a control group, a 12-hour modeling group, a 16-hour modeling group, and 4-Phenylbutyric acid (4-PBA, adding endoplasmic reticulum inhibit) group. BODIPY 493/503 staining was used to detect intracellular fatty degeneration; Hoechst 33258 staining was used to observe cell apoptosis in each group and Annexin V-FITC/PI double staining method was used to detect the apoptosis rate of HepG2 cells in each group; JC-1 method was used to detect mitochondrial membrane potential (MMP) changes in each group. Western blot was used to detect the expression of endoplasmic reticulum stress proteins glucose regulatory protein 78 (GRP78) and C/EBP cyclic adenosine monophosphate response element binding transcription factor homologous protein (CHOP) and mitochondrial pathway apoptosis-related protein caspase-3 (caspase-3), B lymphoma-2 gene (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax) and cytoplasmic cytochrome C (CytC). **Results** Compared with the control group, the intracellular lipid deposition of the model group was significantly increased. Compared with the 16 h group, the intracellular lipid deposition of the 4-PBA group was significantly reduced. Hoechst 33258 staining and Annexin V-FITC/

^{*} 基金项目:湖北省自然科学基金项目(2018CFB236);湖北省卫生和计划生育委员会面上项目(WJ2017M019);武汉大学人民医院引导基金项目(RMYD2018M29)。

作者简介:吴鹏波,男,主治医师,主要从事非酒精性脂肪性肝病基础研究。 [△] 通信作者, E-mail:549192709@qq.com。

本文引用格式:吴鹏波,吴晓曼,俞媛洁,等.内质网应激对非酒精性脂肪性肝病细胞线粒体凋亡影响研究[J].国际检验医学杂志,2020,41(17):2088-2091.

PI double staining method showed that compared with the control group, apoptosis increased after modeling; Compared with the 16 h group, the apoptosis rate of 4-PBA group was significantly lower. JC-1 method showed that compared with the control group, cell MMP decreased after modeling, and cell MMP increased after adding 4-PBA. Western blot detection showed that the expression of Bax, Caspase-3, GRP78, CHOP, CytC protein in the cells increased, while the expression of Bcl-2 decreased after modeling; the cells GRP78, CHOP, Bax, Caspase-3, CytC protein expression decreased in cytoplasm, while Bcl-2 protein expression increased with the 4-PBA group. **Conclusion** Endoplasmic reticulum stress can induce mitochondrial apoptosis of NAFLD cells.

Key words: endoplasmic reticulum stress; non-alcoholic fatty liver disease; mitochondria; apoptosis

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是发病率较高的消化系统疾病, 目前尚无安全有效的治疗手段^[1]。既往研究一致表明 NAFLD 患者肝细胞过度凋亡, 但细胞凋亡的调控机制仍不明^[2-3]。多种病理生理过程参与细胞凋亡的调控, 其中内质网应激在多种疾病细胞凋亡的调控过程中发挥重要作用^[4-5]。部分研究报道内质网应激通过影响线粒体参与 NAFLD 发病^[6-7], 本研究着重探讨内质网应激对 NAFLD 细胞模型凋亡特别是线粒体途径凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 一般资料 HepG2 细胞购于中国科学院上海生命科学院细胞库。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 正置荧光显微镜购于日本 Olympus 公司; 流式细胞仪购于 Beckman 公司; Western Blot 电转仪购于 Invitrogen。

1.2.2 主要试剂 油酸、4-苯基丁酸 (4-PBA) 购于 Sigma 公司; BODIPY 493/503 荧光染料购于 Invitrogen 公司; Hoechst 33258 染料、Annexin V-FITC/PI 双染料、荧光探针 JC-1 均购于上海碧云天生物技术有限公司; 葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 及 C/EBP 磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白 (CHOP) 及线粒体途径凋亡相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 的以及细胞质细胞色素 C (CytC) 抗体购于 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 在含有 10% 胎牛血清的培养基中培养 HepG2 细胞至对数生长期。油酸诱导构建 NAFLD 细胞模型进行造模^[4]。实验细胞分为 4 组: 对照组、造模 12 h 组、造模 16 h 组、4-PBA 组 (细胞接种过夜后加入油酸和内质网应激抑制剂 4-PBA 培养 16 h, 其中 4-PBA 工作浓度为 1 mmol/L)。

1.3.2 BODIPY 493/503 染色 细胞分组处理后磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 充分洗涤, 甲醛固定后 PBS 再次充分洗涤, 再加入适量的 BODIPY 493/503 荧光染料, 工作浓度为 0.1 mg/L, 充分摇匀后常温下染色 6 min, 荧光显微镜观察细胞中的荧光强度。

1.3.3 Hoechst 33258 染色 细胞分组处理后 PBS

充分洗涤, 甲醛固定后 PBS 再次充分洗涤, 再加入适量的 Hoechst 33258 染料, 室温下充分摇匀避光染色 5 min, 吸干含有染料的培养液后充分洗涤细胞, 晾干后在 352 nm 的激发波长下荧光显微镜观察 HepG2 细胞中的荧光强度。Hoechst 33258 染料可穿透细胞, 当细胞核或细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光即判定细胞凋亡。

1.3.4 Annexin V-FITC/PI 双染色 细胞分组处理后充分洗涤, 用胰蛋白酶消化各组细胞, 离心洗涤悬浮细胞经过过滤再次离心后加入 Annexin V-FITC 和 PI 染液, 常温下避光孵育 20 min, 加入缓冲液悬浮细胞, 上机检测各组细胞凋亡率。

1.3.5 JC-1 法检测线粒体膜电位 (MMP) 细胞分组处理后充分洗涤, 制成悬浮液后加入荧光探针 JC-1, 工作浓度为 5 μ mol/L, 常温下孵育 15 min 后荧光显微镜观察细胞红、绿色荧光强度。以红色与绿色荧光强度的比值来衡量线粒体去极化程度, 比值越高提示线粒体膜电位越高。

1.3.6 免疫蛋白印迹 (Western blot) 检测蛋白表达 细胞经过消化离心裂解后采用水煮法制作蛋白样品, 蛋白样品在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离胶中分离, 将分离胶中蛋白转至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 根据各个目标蛋白分子量参照内参切膜, 经过洗涤、封闭后加入 GRP78、CHOP、Bax、Bcl-2、Caspase-3 以及细胞质 CytC 抗体孵育 12 h, 次日清晨充分洗涤加入辣根过氧化物酶标记的二抗后孵育 2 h, 经过显影定影根据灰度判定各蛋白的相对表达量。

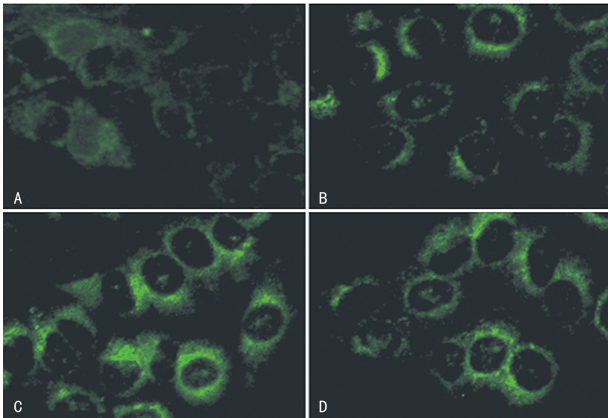
1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞脂肪变性情况 采用 BODIPY 493/503 染色, 可见对照组细胞内较为稀少的绿色荧光, 造模 12 h 及 16 h 后 HepG2 细胞绿色荧光呈时间依赖性增加; 4-PBA 组 HepG2 细胞内绿色荧光相比造模 16 h 组显著减少。见图 1。

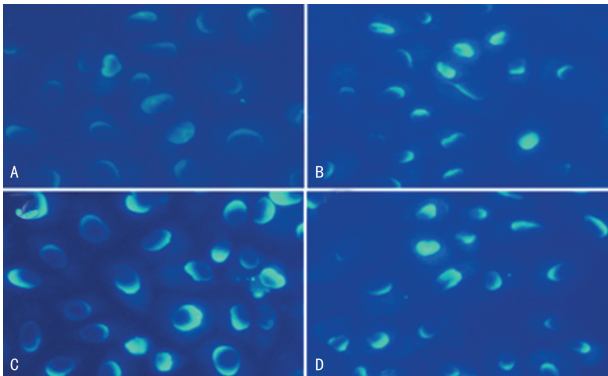
2.2 Hoechst 33258 染色 对照组中较少细胞出现凋亡, 造模 12 h 和 16 h 后细胞凋亡呈时间依赖性增

加,相比造模 16 h 组,加用 4-PBA 后细胞凋亡明显减少,见图 2。



注:A 为对照组;B 为造模 12 h 组;C 为造模 16 h 组;D 为 4-PBA 组。

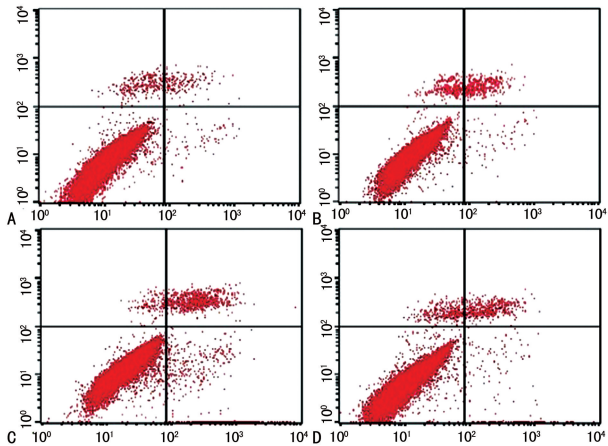
图 1 各组细胞内脂肪变性情况



注:A 为对照组;B 为造模 12 h 组;C 为造模 16 h 组;D 为 4-PBA 组。

图 2 各组细胞自噬情况

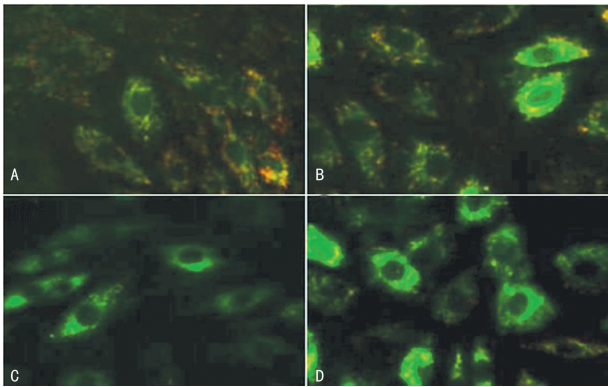
2.3 Annexin V-FITC/PI 检测凋亡情况 对照组细胞较少出现凋亡[(1.31±0.12)%],造模 12 h 和 16 h 后细胞凋亡率明显上升[(1.91±0.13)%、(5.11±0.16)%],相比造模 16 h 组,加用 4-PBA 组细胞凋亡率下降[(2.87±0.15)%]。见图 3。



注:A 为对照组;B 为造模 12 h 组;C 为造模 16 h 组;D 为 4-PBA 组。

图 3 各组细胞凋亡情况

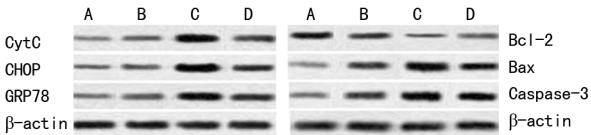
2.4 MMP 变化 与对照组比较,经造模后 HepG2 细胞 MMP 逐步降低,以造模 16 h 组最为明显,相比造模 16 h 组加用 4-PBA 后细胞 MMP 升高。见图 4。



注:A 为对照组;B 为造模 12 h 组;C 为造模 16 h 组;D 为 4-PBA 组。

图 4 各组细胞 MMP 检测

2.5 内质网应激、自噬相关蛋白表达 造模 2 h 组和造模 6 h 组细胞 Bax、Caspse-3、GRP78、CHOP、胞质 CytC 蛋白表达增加,而 Bcl-2 表达降低;4-PBA 抑制内质网应激后细胞 GRP78、CHOP、Bax、Caspse-3、胞质 CytC 蛋白表达降低,而 Bcl-2 蛋白表达增加。见图 5。



注:A 为对照组;B 为造模 12 h 组;C 为造模 16 h 组;D 为 4-PBA 组。

图 5 内质网应激及线粒体途径凋亡相关蛋白表达

3 讨论

内质网是真核细胞内重要的细胞器,它参与蛋白加工、钙离子储存、脂代谢和细胞解毒,对维持细胞内环境稳态具有至关重要的作用^[8]。肝细胞中存在较多的内质网,当肝细胞长期受到油酸等有害刺激时,内质网会出现功能紊乱即内质网应激^[8]。国内外学者对内质网应激在 NAFLD 中的作用进行研究,多数结果认为内质网应激对 NAFLD 具有促进其发病的作用^[9],本研究通过染色发现抑制细胞内质网应激后肝细胞脂肪沉积明显缓解,结果与既往研究结论一致。

细胞凋亡是细胞在受到内源性或者外源性信号刺激下为维持细胞内环境稳态而启动的多种信号通路和基因调控的生理性死亡^[10-11]。既往研究发现凋亡在 NAFLD 发生及发展过程中具有重要的作用^[10]。凋亡启动途径有线粒体途径、死亡受体途径及内质网途径^[11]。本研究着重研究的是线粒体途径凋亡。生理状态下,Bcl-2 和 Bax 蛋白通过保持线粒体膜的完整性维持正常的线粒体功能^[12-13]。病理生理状态下线粒体出现膜通透性改变,随之出现 MMP 改变,CytC 被释放至胞质中^[10-11]。因此,Bcl-2 和 Bax 是线粒体途径凋亡关键的启动因子,膜电位改变是线粒体途径凋亡的特征性改变,CytC 释放至细胞质是线粒体途径凋亡的关键环节。本研究 JC-1 法检测结果显示造模后细胞 MMP 下降,Western blot 结果显示 Bax、Caspse-3、胞质 CytC 蛋白表达增加,Bcl-2 表达

降低提示线粒体途径凋亡可能参与 NAFLD 的发生及发展。

本研究发现在 NAFLD 中内质网应激和凋亡率均升高。为探讨内质网对细胞的影响,4-PBA 抑制内质网应激后细胞膜电位下降,Caspase-3、细胞质 CytC 蛋白表达降低,而 Bcl-2 蛋白表达增加,提示内质网应激对 NAFLD 细胞凋亡具有促进作用。既往有学者针对内质网应激与凋亡在 NAFLD 中的关系进行了研究,认为改善内质网应激可以抑制细胞凋亡^[14]。内质网应激可诱导细胞内钙离子稳态失衡,细胞内异常的钙离子水平促使线粒体钙离子超载的发生,线粒体内钙离子的大量增加会打开膜渗透转换孔,膜渗透转换孔开放后引起线粒体膜变化,诱发 CytC 释放启动线粒体途径凋亡^[15-16]。

4 结 论

本研究发现在 NAFLD 细胞凋亡和内质网应激增加,减轻内质网应激后可降低线粒体途径凋亡率,结果提示内质网应激对 NAFLD 的发病有影响。但细胞内质网应激通过何种分子机制诱导细胞线粒体途径凋亡仍有待进一步探讨。

参考文献

[1] 赵泽华,刘晓琳,范建高. 重视非酒精性脂肪性肝病自然史的研究[J]. 中华肝脏病杂志,2017,25(2):81-84.

[2] 常业飞,胡滔,洪颖,等. 高血糖对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝脏超微结构及细胞凋亡的影响[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(18):2234-2237.

[3] 敖娜,杨晶,都健. 利拉鲁肽对棕榈酸诱导 HepG2 细胞凋亡的影响及其可能机制[J]. 中华肝脏病杂志,2019,27(6):445-449.

[4] ZHENG Y, QU H, XIONG X, et al. Deficiency of Mitochondrial Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase Contributes to Hepatic Steatosis[J]. Hepatology, 2019, 70(1):84-97.

[5] SHIN S K, CHO H W, SONG S E, et al. Ablation of catalase promotes non-alcoholic fatty liver via oxidative stress and mitochondrial dysfunction in diet-induced obese mice [J]. Pflugers Arch, 2019, 471(6):829-843.

[6] MAIERS J L, MALHI H. Endoplasmic reticulum stress in metabolic liver diseases and hepatic fibrosis[J]. Semin Liver Dis, 2019, 39(2):235-248.

[7] HERNÁNDEZ-ALVAREZ M I, SEBASTIÁN D, VIVES S, et al. Deficient endoplasmic reticulum-mitochondrial phosphatidylserine transfer causes liver disease[J]. Cell, 2019, 177(4):881-895.

[8] SMITH M, WILKINSON S. ER homeostasis and autophagy[J]. Essays Biochem, 2017, 61(6):625-635.

[9] KIM H M, KIM Y, LEE E S, et al. Caffeic acid ameliorates hepatic steatosis and reduces ER stress in high fat diet-induced obese mice by regulating autophagy[J]. Nutrition, 2018, 56:63-70.

[10] KANDA T, MATSUOKA S, YAMAZAKI M, et al. Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(25):2661-2672.

[11] BAKER P R, FRIEDMAN J E. Mitochondrial role in the neonatal predisposition to developing nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Clin Invest, 2018, 128(9):3692-3703.

[12] 宋霞,陈涛,张炜,等. 高三尖杉酯碱对 HL60 细胞程序性凋亡的影响及机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(20):2471-2474.

[13] 郭英. 黄芪甲苷通过抑制 AKT 和 NF-κB 通路诱导胃癌 MGC-803 细胞凋亡 [J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(19):2341-2344.

[14] TAKAHARA I, AKAZAWA Y, TABUCHI M, et al. Toyocamycin attenuates free fatty acid-induced hepatic steatosis and apoptosis in cultured hepatocytes and ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. PLoS One, 2017, 12(3):e0170591.

[15] ZHANG Y, XUE R, ZHANG Z, et al. Palmitic and linoleic acids induce ER stress and apoptosis in hepatoma cells [J]. Lipids Health Dis, 2012, 5(11):1-5.

[16] EGNATCHIK R A, LEAMY A K, JACOBSON D A, et al. ER calcium release promotes mitochondrial dysfunction and hepatic cell lipotoxicity in response to palmitate overload[J]. Mol Metab, 2014, 3(5):544-553.

(收稿日期:2020-01-16 修回日期:2020-04-25)

(上接第 2087 页)

mutations in colorectal cancer. [J]. Biomed Rep, 2019, 11(6):269-273.

[12] 罗妙玲,徐韞健. 结直肠癌 KRAS、BRAF 及 PIK3CA 基因突变状态分析[J]. 热带医学杂志, 2016, 16(7):843-846.

[13] 祝继原,吴鹤,张震,等. 结直肠癌患者 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变检测分析[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2017, 51(6):500-503.

[14] 张莹,王哲,杨向红. 结直肠癌患者应用 ARMS 法检测 KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF 基因突变分析[J]. 诊断病理学杂志, 2019, 26(8):506-511.

[15] 李学琴. 酶切富集 PCR-焦磷酸测序技术检测 NSCLC 患者癌组织及外周血 KRAS 基因突变[D]. 重庆:第三军医

大学, 2014.

[16] 崔发强,李涛,王铮,等. 原发性肝癌患者外周血 KRAS 基因水平及其对西妥昔单抗克隆抗体治疗疗效的影响[J]. 实用肝脏病杂志, 2019, 22(4):565-568.

[17] 伍洁. 结直肠癌组织和静脉血中 KRAS 基因突变分析及临床意义[J]. 中外医疗, 2016, 35(4):51-52.

[18] BOTEZATU I V, KONDRATOVA V N, SHELEPOV V P, et al. Asymmetric mutant-enriched polymerase chain reaction and quantitative DNA melting analysis of KRAS mutation in colorectal cancer. [J]. Anal Biochem, 2020, 590:113517.

(收稿日期:2020-02-07 修回日期:2020-05-15)