

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.003.html>

## 糖氧剥夺/再灌注损伤对人正常肝 L02 细胞自噬水平的影响

马秀雅, 李元海

**摘要** 目的 探讨糖氧剥夺/再灌注损伤(OGD/R)对人正常肝 L02 细胞自噬水平的影响。方法 体外培养人正常肝 L02 细胞,制备 OGD/R 模型,模拟临床的肝脏缺血再灌注损伤。分为 5 组:正常对照组、OGD 6 h/R 1、3、6、12 h 组。随后在倒置显微镜下观察 L02 细胞形态;采用 MTT 比色法检测 L02 细胞的相对增殖情况;Western blot 法检测自噬相关蛋白 LC3、Beclin-1 和 p62 的表达变化。结果 与正常对照组相比,随着再灌注时间的延长,OGD/R 组处理 L02 细胞的形态损伤逐渐加剧,增殖活性逐渐降低,呈时间依赖性。自噬相关蛋白 LC3 和 Beclin-1 在 OGD 6 h/R 1 h 即有所增高,随着再灌注时间的延长,LC3 的表达量逐渐增高并于再灌注 6 h 时大量增加,于再灌注 12 h 时达到最大值( $P < 0.01$ );Beclin-1 蛋白的表达量随再灌注时间的延长逐渐增加于 6 h

和 12 h 急剧增加( $P < 0.01$ );p62 蛋白于 OGD 6 h/R 1 h 时和 3 h 无明显变化,而在再灌注 6 h 时开始急剧增加,于 12 h 达到最大值( $P < 0.01$ )。结论 OGD/R 可诱导人正常肝 L02 细胞自噬水平上调,并且导致细胞的自噬性死亡。

**关键词** 自噬;糖氧剥夺;再灌注;L02 细胞

**中图分类号** R 614.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2017)04-0475-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.003

肝脏缺血再灌注损伤(hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI)是外科常见的病理生理过程,血液灌流量的减少使肝脏组织发生缺血性损伤,恢复血液灌流后,肝细胞功能代谢及结构破坏反而加重。肝脏缺血再灌注后细胞损伤的机制主要有:氧自由基的产生、钙超载、Kupffer 细胞激活及中性粒细胞的聚集、微循环功能障碍等<sup>[1]</sup>。近年来研究<sup>[2]</sup>表明,其还可能与凋亡和自噬有关。自噬可利用溶酶体来降解损伤蛋白及细胞器,生理情况下,低水平自噬可作为保护机制,及时地清除有害物质,恢复细胞

2017-02-05 接收

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20133420110009)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院麻醉科,合肥 230022

作者简介:马秀雅,女,硕士研究生;

李元海,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: liyuanhai-1@163.com

## Effect of targeting SIRT1 silence on proliferation of cardiac fibroblasts in neonatal rat

Shi Peng<sup>1,2</sup>, Tao Hui<sup>1,2</sup>, Zhang Jia Gui<sup>1,2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Cardio-Thoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

<sup>2</sup>Dept of Cardiovascular Disease Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To investigate the effect of silent information regulator 1 (SIRT1) on the proliferation of cardiac fibroblasts in neonatal rat. **Methods** The original generation of rats cardiac fibroblasts were delt with TGF- $\beta$ 1. qRT-PCR was applied to assess the mRNA expression levels of SIRT1 and  $\alpha$ -SMA. The protein expression levels of SIRT1 and  $\alpha$ -SMA were detected by Western blot. MTT assay was used to determine the cytoactive of cardiac fibroblasts. Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Reagent was used to transfected cardiac fibroblasts with siRNA-SIRT1. **Results** The expression of SIRT1 protein and mRNA was down-regulated in the cardiac fibroblasts transfected with siRNA-SIRT1, as well as the  $\alpha$ -SMA protein and mRNA expression. The activity of cardiac fibroblasts was restrained after transfected with siRNA-SIRT1. **Conclusion** siRNA-SIRT1 can suppress proliferative activity of cardiac fibroblasts obviously. SIRT1 could be a new therapeutic target of preventing cardiac remodeling. The application of its regulator will provide the new idea and method for the prevention and treatment programs of myocardial fibrosis.

**Key words** SIRT1; cardiac fibroblasts;  $\alpha$ -SMA

形态和功能的完整性,减少细胞死亡;而在氧化应激、缺血再灌注等病理情况下,过度的自噬可导致细胞功能代谢障碍加重及结构破坏甚至引起自噬性的肝细胞死亡<sup>[3]</sup>。该研究使用人正常肝 L02 细胞糖氧剥夺/再灌注(oxygen glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)模型模拟临床肝缺血再灌注损伤过程,观察 OGD/R 损伤时 L02 细胞自噬水平的变化情况,为临床中通过调节自噬水平的来实现肝脏保护作用提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞及主要试剂** 人正常肝 L02 细胞为本实验室保存,改良型 RPMI-1640 培养基、ECL 底物发光试剂盒购自美国 Thermo 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;甲基偶氮唑盐(methythiazolyltetrazolium, MTT)、p62、LC3、 $\alpha$ -tubulin 抗体购自美国 Sigma 公司;Beclin-1 抗体购自美国 Abcam 公司;Galaxy 170R 三气培养箱购自德国 Eppendorf 公司;Synergy HT 型多功能酶标仪购自美国 BioTek 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 人正常肝 L02 细胞培养于含 10% 胎牛血清的改良型 RPMI-1640 培养基中,置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃、饱和湿度培养箱中,每日换液 3~4 d 传代 1 次。

**1.2.2 OGD/R 损伤模型的建立** 收集对数生长期人正常肝 L02 细胞,待细胞贴壁后除正常对照组,其余在 OGD 期更换为预热的无葡萄糖平衡盐溶液:NaCl 116 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 26.2 mmol/L, KCl 5.4 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1.8 mmol/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.8 mmol/L, 甘氨酸 0.01 mmol/L, pH 7.4。放入含 1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub>、37℃ 的三气培养箱中,维持培养箱内 O<sub>2</sub> 浓度低于 1%,并开始计时进行 OGD 处理 6 h。OGD 结束后所有组更换含 10% 胎牛血清的 1640 培养基,分别进行再灌注 1、3、6、12 h 处理,之后测定下述指标。

**1.2.3 MTT 法检测细胞存活率** 接种于 96 孔板的人正常肝 L02 细胞在处理结束后加入 5 g/L MTT 溶液 10  $\mu$ l(终浓度为 0.5 g/L)作用 4 h,之后加入 150  $\mu$ l DMSO 溶液使结晶物甲瓚溶解,室温震荡 10 min,采用酶标分析仪测定吸光度(optical density, OD)值,波长 490 nm,反映细胞活力。

**1.2.4 Western blot 法检测自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3、p62 的表达水平** 人正常肝 L02 细胞接种于 6

孔板,处理结束后将其置于冰上,弃去培养液,使用 Sample buffer 裂解液提取细胞总蛋白,并于冰上振荡 10 min,100℃煮沸 10 min 使蛋白质变性。每组分别取 10  $\mu$ l 蛋白样品,进行 SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜。含 5% 脱脂奶粉的 PBST(含 0.05% 吐温的磷酸盐缓冲液)室温封闭 1 h, PBST 洗膜 10 min,重复 3 次,分别加入 Beclin-1 抗体(稀释度 1:2 000,批号:ab55878,美国 Abcam 公司), LC3 抗体(稀释度 1:1 000,批号:L7543,美国 Sigma 公司), p62 抗体(稀释度 1:1 000,批号:P0067,美国 Abcam 公司)于 4℃孵育过夜。PBST 洗膜 10 min,重复 3 次,滴加 1:4 000 辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h,洗膜 10 min,重复 3 次。ECL 底物发光 A、B 显色剂(美国 Thermo scientific pierce 公司)按照 1:1 比例混匀后滴加于膜上,采用 ChemiCapture 成像系统曝光,Adobe Photoshop CS5 Extended 软件计算灰度值并进行统计学分析,以目的蛋白条带的灰度值与 Tubulin 灰度值的比值反映 Beclin-1、LC3 和 p62 蛋白表达水平。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间数据的显著性检验采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 OGD/R 损伤对人正常肝 L02 细胞形态的影响** 倒置显微镜下可见:正常培养的正常对照组 L02 细胞呈单层贴壁生并且贴壁牢固,相邻细胞连接成片,表面光滑,折光度良好,胞内可见大而完整的细胞核(图 1A)。经过 OGD/R 处理后继续观察细胞形态,随着再灌注时间的延长, L02 细胞的形态损伤逐渐加剧: OGD 6 h/R 1 h 组细胞状态欠佳,细胞内染色质颗粒增多(图 1B); OGD 6 h/R 3 h 组细胞收缩变圆,细胞之间分离,细胞核周围出现空泡样结构(图 1C); OGD 6 h/R 6 h 组细胞呈现广泛空泡化,细胞核固缩、碎裂,漂浮细胞明显增多(图 1D); OGD 6 h/R 12 h 组贴壁细胞减少明显,并出现大量的漂浮细胞团块(图 1E)。

**2.2 OGD/R 损伤对人正常肝 L02 细胞增殖活性的影响** 采用 MTT 比色法,通过 OD 值的变化检测正常对照组和 OGD/R 组处理各再灌注时间点的细胞相对增殖活性。结果表明:随着再灌注时间的增加, L02 细胞增殖活性逐渐降低,呈时间依赖性。与正常对照组比较, OGD 6 h/R 1 h、OGD 6 h/R 3 h、OGD 6 h/R 6 h、OGD 6 h/R 12 h 时,细胞增殖率显

著降低 ( $P < 0.01$ ) ,见表 1、图 2。

表 1 OGD/R 损伤对人肝  
L02 细胞增殖活性的影响 ( $n=6 \bar{x} \pm s$ )

组别	OD 值	t 值
正常对照	0.644 ± 0.024	—
OGD 6 h/R 1 h	0.586 ± 0.034 **	3.33
OGD 6 h/R 3 h	0.561 ± 0.018 **	6.52
OGD 6 h/R 6 h	0.493 ± 0.052 **	6.80
OGD 6 h/R 12 h	0.464 ± 0.031 **	11.07

与正常对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.3 OGD/R 对人正常肝 L02 细胞自噬相关蛋白 Beclin-1 表达的影响** 与正常对照组比较,自噬相关蛋白 Beclin-1 在 OGD/R 1 h 时即有所增高,随着再灌注时间的延长,Beclin-1 蛋白的表达量逐渐增加于 6 h 和 12 h 急剧增加 ( $P < 0.01$ ) ,见表 2、图 3。

**2.4 OGD/R 对人正常肝 L02 细胞自噬相关蛋白 LC3 表达的影响** 与正常对照组比较,自噬相关蛋白 LC3 于 OGD/R 1 h 时即有所增高,随着再灌注时间的延长 LC3 的表达量逐渐增高并于再灌注 6 h 时大量增加,于再灌注 12 h 时达到最大值 ( $P < 0.01$ ) ,见表 2、图 4。

**2.5 OGD/R 对人正常肝 L02 细胞自噬相关蛋白**

**LC3、Beclin-1 和 p62 的表达的影响** 与正常对照组比较, p62 蛋白于 OGD/R 1 h 时和 3 h 无明显变化,而在再灌注 6 h 时开始急剧增加,于 12 h 达到最大值 ( $P < 0.01$ ) ,见表 2、图 5。

### 3 讨论

本研究使用体外培养的人正常肝细胞 L02 细胞 OGD/R 模型模拟临床的 HIRI。于不同时间点观察 L02 细胞的形态学和增殖率变化的情况,结果表明与正常对照组相比,随着再灌注时间的延长, OGD/R 组处理 L02 细胞的形态损伤逐渐加剧,细胞增殖率明显下降,呈时间依赖性。Western blot 的结果表明, OGD/R 损伤可以影响自噬的活性,本研究中所涉及的自噬相关蛋白的表达水平均有不同程度的提高。

自噬是一种动态的过程,包含了自噬的诱导、自噬体的形成及成熟、自噬体的降解,这种动态过程称之为自噬流<sup>[4]</sup>。自噬对细胞的存活是一把双刃剑:低水平自噬可作为保护机制,清除有害物质,减少细胞死亡;而大量自噬可导致细胞自我消化的自噬性死亡。Beclin-1 为自噬相关蛋白 Atg6/Vps30 的同源基因,参与组成 Class III PI3 复合物,可介导自噬相

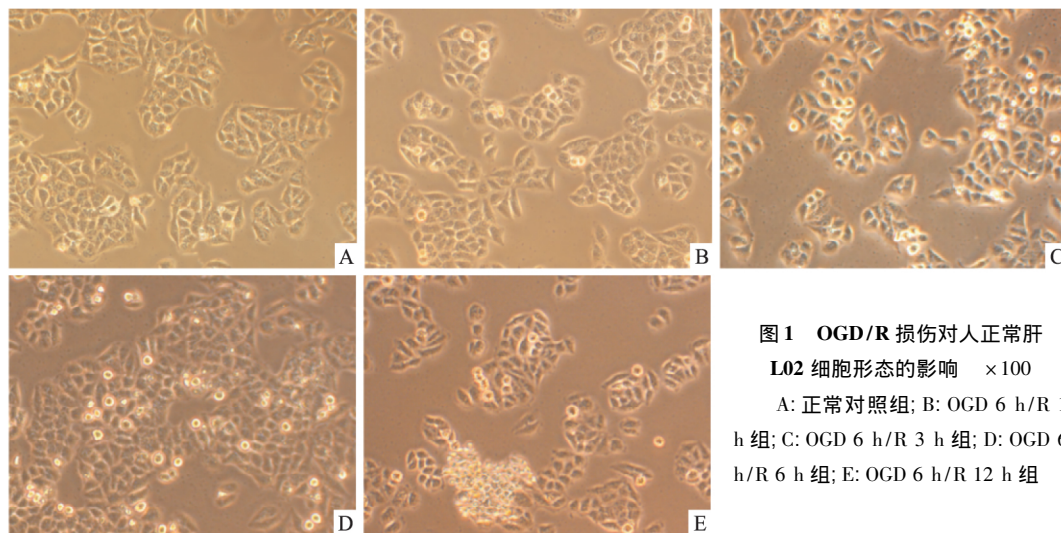


图 1 OGD/R 损伤对人正常肝  
L02 细胞形态的影响 ×100

A: 正常对照组; B: OGD 6 h/R 1 h 组; C: OGD 6 h/R 3 h 组; D: OGD 6 h/R 6 h 组; E: OGD 6 h/R 12 h 组

表 2 OGD/R 对肝 L02 细胞自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 和 p62 的表达的影响 ( $n=3 \bar{x} \pm s$ )

组别	Beclin-1	t 值	LC3	t 值	p62	t 值
正常对照	0.221 ± 0.017	—	0.103 ± 0.002	—	0.715 ± 0.010	—
OGD 6 h/R 1 h	0.689 ± 0.092 **	-10.01	0.424 ± 0.015 **	-42.48	0.712 ± 0.043	0.11
OGD 6 h/R 3 h	0.818 ± 0.029 **	-34.79	0.596 ± 0.031 **	-31.89	0.681 ± 0.040	1.62
OGD 6 h/R 6 h	1.136 ± 0.064 **	-27.6	0.962 ± 0.083 **	-20.86	1.131 ± 0.049 **	-23.84
OGD 6 h/R 12 h	1.596 ± 0.093 **	-29.1	1.423 ± 0.045 **	-59.12	1.568 ± 0.076 **	-22.45

与正常对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

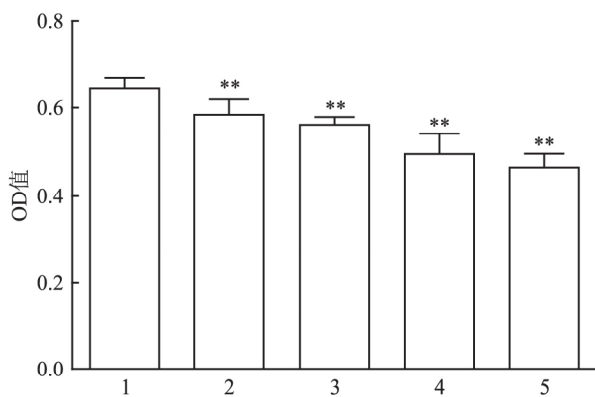


图2 OGD/R 损伤对人正常肝 L02 细胞增殖活性的影响

1: 正常对照组; 2: OGD 6 h/R 1 h 组; 3: OGD 6 h/R 3 h 组; 4: OGD 6 h/R 6 h 组; 5: OGD 6 h/R 12 h 组; 与正常对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

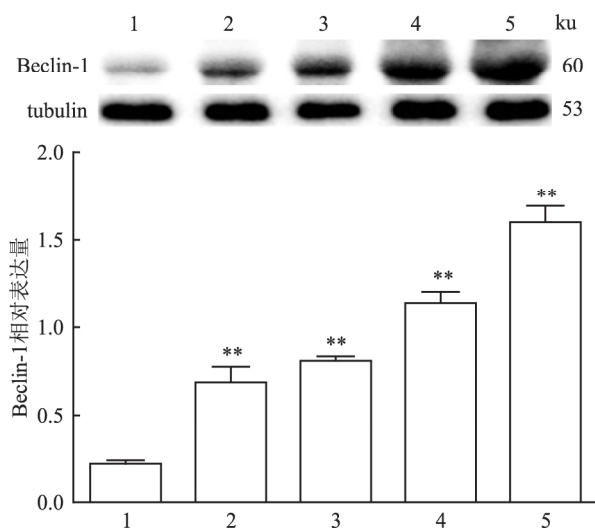


图3 OGD/R 对肝 L02 细胞自噬相关蛋白 Beclin-1 表达的影响

1: 正常对照组; 2: OGD 6 h/R 1 h 组; 3: OGD 6 h/R 3 h 组; 4: OGD 6 h/R 6 h 组; 5: OGD 6 h/R 12 h 组; 与正常对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

关蛋白定位于吞噬泡,通过诱导自噬体双层膜的形成来调控自噬,在自噬体的诱导和成熟中起至关重要的作用<sup>[5]</sup>。研究<sup>[6]</sup>表明,Beclin-1 的水平可作为自噬机制转录引发的传感器,对自噬溶酶体相关蛋白有指令作用,再灌注时,由 ROS 诱导的 Beclin-1 的升高可通过抑制自噬小体与溶酶体的融合来抑制其成熟,进而引起自噬小体的清除受损,导致细胞的死亡。LC3 是酵母自噬相关基因 Atg8 的同源物<sup>[7]</sup>,在泛素样酶 Atg7 和 Atg13 的作用下游离型 LC3 可转变为结合型 LC3。结合型 LC3 定位于前自噬泡和自噬泡膜表面,是细胞自噬泡膜的特异性标志物,其含量的多少可以反映细胞的自噬活性,作为监测自

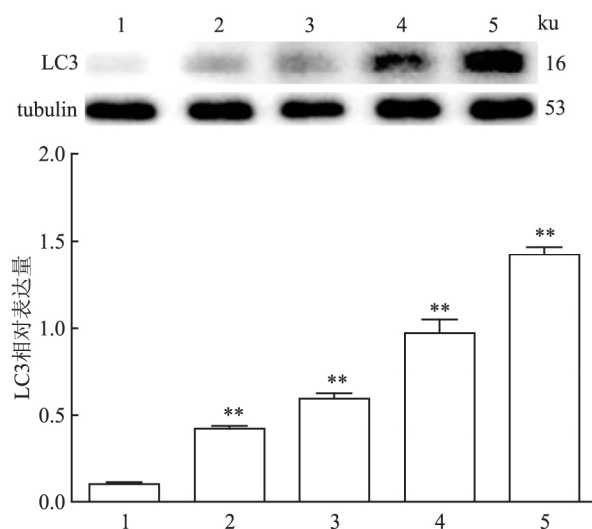


图4 OGD/R 对肝 L02 细胞自噬相关蛋白 LC3 表达的影响

1: 正常对照组; 2: OGD 6 h/R 1 h 组; 3: OGD 6 h/R 3 h 组; 4: OGD 6 h/R 6 h 组; 5: OGD 6 h/R 12 h 组; 与正常对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

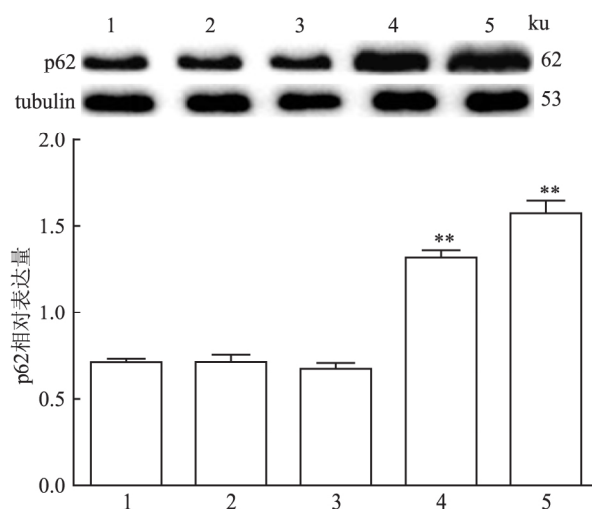


图5 OGD/R 对肝 L02 细胞自噬相关蛋白 p62 的表达的影响

1: 正常对照组; 2: OGD 6 h/R 1 h 组; 3: OGD 6 h/R 3 h 组; 4: OGD 6 h/R 6 h 组; 5: OGD 6 h/R 12 h 组; 与正常对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

噬的标志性分子。p62 是异常蛋白的受体蛋白,可选择性连接并降解泛素化的蛋白<sup>[8]</sup>。p62 的 LRS 结构域可与 LC3 相互作用,把待自噬的底物转运到处于自噬小体,从而驱动了其降解。在自噬的调节中,p62 的表达水平可以作为自噬流动态的测定指标<sup>[9]</sup>:自噬上游的表达增加或者自噬下游的自噬正常对照组相比,OGD 6 h/R 1 h 和 OGD 6 h/R 3 h,当自噬标志物 Beclin-1 和 LC3 表达增加时,p62 蛋白无明显变化,其原因可能为:此时处于 OGD/R 的早期,自噬水平有所增高,自噬小体能与溶酶体的融合

形成自噬溶酶体,从而 p62 及其连接的底物降解可顺利被水解酶降解;而在再灌注 6 h 和 12 h 时,Bec-1、LC3、p62 蛋白的表达水平上调,可能因为此时由于 OGD/R 的时间增加,自噬水平迅速升高,自噬小体大量聚集并且与溶酶体的融合发生障碍,导致了细胞内待降解的细胞器和蛋白质的清除作用受损,表现为 p62 蛋白的含量急剧增加,并促使了细胞的死亡。

综上所述,此研究的结果表明 OGD/R 损伤可诱导人正常肝 L02 细胞自噬水平上调,并且导致了细胞的自噬性死亡。因此,对于自噬水平的调节可能作为将来预防和治疗 HIRI 的潜在途径,为临床治疗提供了新的思路。

### 参考文献

- [1] Gracia-Sancho J, Casillas-Ramírez A, Peralta C, et al. Molecular pathways in protecting the liver from ischemia/reperfusion injury: a 2015 update[J]. *Clin Sci( Lond)* 2015, 129(4): 345–62.
- [2] 杨秀丽, 汤为香, 王立奎, 等. 异丙酚预处理对缺氧复氧诱发 HEPG2 细胞内质网应激的影响[J]. *中华麻醉学杂志* 2014, 34(4): 489–91.
- [3] Filomeni G, De Zio D, Cecconi F, et al. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs[J]. *Cell Death Differ* 2015, 22(3): 377–88.
- [4] Sheen J H, Zoncu R, Kim D, et al. Defective regulation of autophagy upon leucine deprivation reveals a targetable liability of human melanoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Cell* 2011, 19(5): 613–28.
- [5] Jaber N, Dou Z, Chen J S. Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109(6): 2003–8.
- [6] Ma X, Liu H, Foyil S R, et al. Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation* 2012, 125(25): 3170–81.
- [7] Popelka H, Klionsky D J. Analysis of the native conformation of the LIR/AIM motif in the Atg8/LC3/GABARAP-binding proteins [J]. *Autophagy* 2015, 11(12): 2153–9.
- [8] Geisler S, Holmstrom K M, Skujat D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1 [J]. *Nat Cell Biol* 2010, 12(2): 119–31.
- [9] Jiang P, Mizushima N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells [J]. *Methods* 2015, 75: 13–8.

## The level of autophagy induced by oxygen glucose deprivation/reperfusion injury in L02 cell

Ma Xiuya, Li Yuanhai

(Dept of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To explore the level of autophagy induced by oxygen glucose deprivation/reperfusion( OGD/R) injury in L02 cell. **Methods** L02 cells were cultured to establish the model of OGD/R injury and simulate clinical hepatic ischemia-reperfusion injury. The L02 cells were randomly divided into 5 groups: normal control group, oxygen-glucose deprivation 6 h/reperfusion 1, 3, 6, 12 h group ( OGD 6 h/R 1, 3, 6, 12 h). Then observe the form changes of the L02 cells by optical microscope. The appreciation of the company's relative L02 cells was detected by MTT. The expression of autophagy related proteins such as Beclin-1, LC3 and p62 were evaluated by Western blot. **Results** Compared with the normal control group, the form damaged and the cells proliferation activity of L02 cells in the OGD/R group were gradually increased in a time-dependent manner. Compared with the normal control group, autophagy related proteins LC3, Beclin-1 were increased at OGD 6 h/R 1 h. The expression of LC3 was gradually increased as the time went on and was increased gradually at OGD 6 h/R 6 h, reached a peak at OGD 6 h/R 12 h ( $P < 0.01$ ). The expression of Beclin-1 was gradually increased as the time went on and was increased gradually at OGD 6 h/R 6 h and OGD 6 h/R 12 h ( $P < 0.01$ ). The expression of p62 had no obvious change at OGD 6 h/R 1 h and OGD 6 h/R 3 h, began to increase sharply at OGD 6 h/R 6 h and reached a peak at OGD 6 h/R 12 h ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Our data suggests that oxygen-glucose deprivation/reperfusion may increase the level of autophagy and lead to autophagic cell death in L02 cell.

**Key words** autophagy; oxygen glucose deprivation; reperfusion; L02 cell