

自噬抑制剂在内质网应激状态下 对肝癌 HepG2 细胞和正常肝细胞 L-02 作用的差异

李文成, 刘加涛, 高爽, 于瀚卿, 吴圣, 范璐璐, 孙国平

摘要 目的 研究自噬在内质网应激(ERS)状态下对肝癌 HepG2 细胞和正常肝细胞 L-02 作用的差异。方法 体外常规培养的人肝癌 HepG2 细胞和正常肝细胞 L-02, 分别给予衣霉素(TM) 单药和 TM 联合自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(TM+3-MA) 或氯喹(TM+CQ) 作用 12、24、48 h 后, 采用噻唑蓝(MTT) 法检测细胞活力变化, 流式细胞术检测细胞凋亡率, Western blot 法检测自噬蛋白 LC3 的变化。结果 TM 可引起 HepG2 细胞和 L-02 细胞死亡并呈时间依赖关系, 3-MA 或 CQ 均可增加 TM 对 HepG2 细胞的生长抑制作用, 24 h 细胞存活率分别为 TM+3-MA 组(60%)、TM+CQ 组(72%)、TM 组(86%), 差异有统计学意义($P < 0.01$); 但对于 L-02 细胞, 其存活率分别为 83%、84%、83%, 活力没有明显差异; 流式细胞术显示 TM+3-MA、TM+CQ 和 TM 组对 HepG2 细胞的凋亡率分别为 15%、11%、7%, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 但对 L-02 细胞, 凋亡率分别为 16%、17%、16%, 未见明显差异; Western blot 法结果显示 TM 作用引起两种细胞自噬增加, 自噬抑制剂 3-MA 与 CQ 可引起两种细胞自噬作用减弱。结论 自噬抑制剂(3-MA 或 CQ) 均可显著增加 TM 对肝癌 HepG2 细胞的生长抑制作用, 但对正常肝细胞 L-02 的生长抑制作用差异无统计学意义。自噬在 ERS 状态下可对肝癌细胞的生存提供保护, 但对正常肝细胞无保护作用。

关键词 自噬抑制剂; 内质网应激; 肝癌; 肝正常细胞

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0884-05

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma,

2015-03-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81272739); 安徽省科技攻关项目(编号: 12010402122)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 合肥 230022

作者简介: 李文成, 女, 硕士研究生;

孙国平, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: sunguoping@ahmu.edu.cn

HCC) 在我国的发病率仅次于肺癌和胃癌, 死亡率在所有肿瘤中位居前三位^[1]。肝癌细胞对化学治疗药物相对不敏感, 有效率 $\leq 20\%$ ^[2]。如何能提高 HCC 的化疗敏感性已成为当今研究的热点。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS) 是细胞对一系列可以干扰内质网稳态的因素所做出的反应。自噬是细胞对恶劣环境及压力的一种反应, 但其对细胞生存的意义并不清楚^[3]。该研究旨在观察自噬在 ERS 状态下对肝癌 HepG2 细胞及正常肝细胞 L-02 生存影响的差异, 探寻肿瘤特异性治疗的新方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 噻唑蓝(MTT)、衣霉素(tunicamycin, TM)、3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)、氯喹(chloroquine, CQ)、兔抗人微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3) 多克隆抗体均购自美国 Sigma 公司; 抗 β -actin 多克隆抗体、山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Annexin V-FITC 细胞双染凋亡试剂购自上海贝博公司。

1.2 主要仪器设备 包括 Acpo-6100 CO₂ 培养箱(美国杜邦公司); YJ-1450 型医学净化工作台(苏州净化设备公司); 倒置式显微镜(日本 Olympus 公司); Elx-800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 仪器公司); EPICS XL/XL-MCL 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); ImageQuant™ LAS-4000 型发光成像系统(日本通用电气医疗集团生命科学部)。

1.3 细胞系 人 HepG2 肝癌细胞株购自中科院上海生命科学院细胞库; 人 L-02 细胞购自武汉细胞库。

ules. However, PGE2 had no effect on CD80 expression in all of concentrations. PGE2 (1.25, 2.5, 5, 10, 20 nmol/L) significantly inhibited the ability of antigen uptake of DCs. DCs stimulated by PGE2 (2.5, 5, 10 nmol/L) could promote T cell proliferation. PGE2 (2.5, 5, 10 nmol/L) increased EP4 expression on DCs surface. **Conclusion** PGE2 could regulate DCs function, which might be related to EP4 receptor expression affected by PGE2.

Key words EP4R; dendritic cells; PGE2

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养液及细胞悬液的制备 人肝癌 HepG2 细胞和人正常肝细胞 L-02 分别培养于含 10% 新生胎牛血清的 DMEM 和 1640 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,隔天换液,取对数生长期细胞用于实验。

1.4.2 MTT 法检测增殖抑制率 取对数生长期的 HepG2 及 L-02 细胞,以 5.0×10^3 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板中,设实验组(TM + 3-MA 组、TM + CQ、TM 组)、细胞对照组和空白组。待细胞贴壁后,分别加入 3-MA(5 mmol/L) 和 CQ(5 μg/ml) 预处理细胞 1 h,然后每孔加入 3 μmol/L 的 TM,以只加培养液的细胞设为细胞对照组,每组设 5 个复孔。共同培养 12、24、48 h 后,每孔加入 MTT 溶液继续孵育 4 h,吸出各孔培养液,再加入 DMSO 150 μl,用酶标仪在 490 nm 波长下测定各孔吸光度(optical density, OD) 值,并计算细胞存活率。细胞存活率(%) = $(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.4.3 流式细胞术检测细胞凋亡 将未处理及药物处理组的 HepG2 细胞和 L-02 细胞终止培养,消化后收集离心、PBS 溶液洗涤 2 次,重混悬于 400 μl 结合缓冲液中。按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书分别加入 Annexin V 和 PI 染液,立刻进行流式细胞术检测,FlowJo 软件进行数据分析。将全部细胞分为 4 群,Q4: Annexin V-PI 认为是存活细胞;Q3: Annexin V + PI 认为是早期凋亡细胞;Q2: Annexin V + PI + 认为是凋亡后继发坏死细胞;Q1: Annexin V-PI + 认为是坏死细胞。计算细胞凋亡率(%) = $(\text{Annexin V} + \text{PI} + \text{细胞数} + \text{Annexin V} + \text{PI} - \text{细胞数}) / 10\,000 \times 100\%$ 。

1.4.4 Western blot 法检测自噬相关蛋白 LC3 的表达 将未处理及药物处理组的 HepG2 细胞和 L-02 细胞终止培养,冷 PBS 洗 3 遍,冰上裂解后离心,收集上清液,采用 BCA 法蛋白定量后,加入 5 × 蛋白上样缓冲液,煮沸 10 min,取 10 μl 蛋白进行实验:用 12.5% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,转膜,用含 5% 脱脂奶粉的封闭液封闭 2 h,洗膜后,加入一抗置于湿盒中 4 °C 孵育过夜。次日,洗膜后,加入二抗室温孵育 2 h,最后加入电化学发光试剂,采用 ImageQuant™ LAS-4000 型发光成像系统检测蛋白荧光信号并显像。ImageJ 分别测量 LC3-I 和 LC3-II 条带的积分光密度值,以 LC3-II/LC3-I 值来反映 LC3 的转变。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析和 LSD 法进行两两比较。图表均在 GraphPad Prism 5 软件中完成。

2 结果

2.1 3-MA 或 CQ 对两种细胞的增殖抑制率 MTT 检测结果显示,3-MA 或 CQ 联合 TM 共同培养 HepG2 细胞 12、24、48 h 后,HepG2 细胞活力明显下降($F = 41.782、30.215、131.806, P < 0.01$),见图 1A。3-MA 或 CQ 联合 TM 共同培养 L-02 细胞 12、24、48 h 后,48 h TM + CQ 组与 TM 组比较,L-02 细胞活力明显下降($F_{48\text{h}} = 24.563, P < 0.05$),其他组细胞活力差异均无统计学意义($F_{12\text{h}} = 0.898, F_{24\text{h}} = 0.437$)。见图 1B。自噬对肝癌 HepG2 细胞可能发挥着保护作用;但对正常肝细胞 L-02 无保护作用。

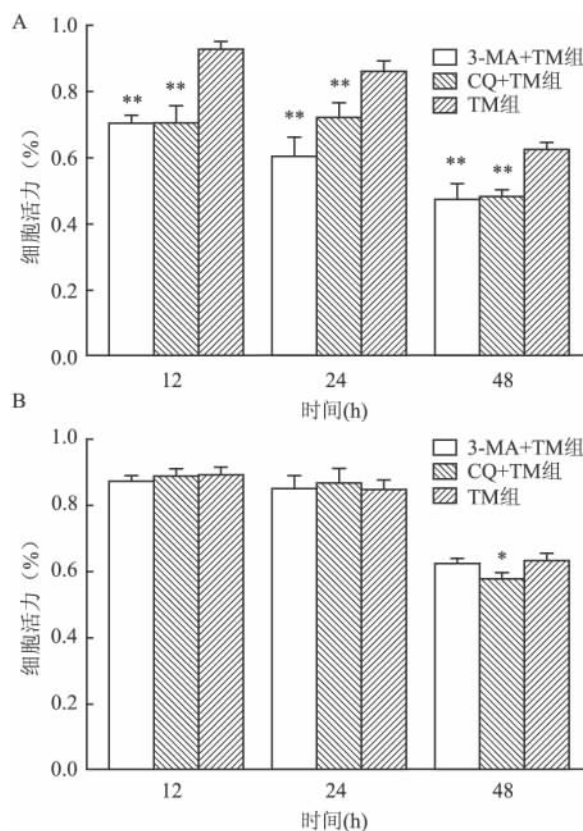


图1 MTT 检测 3-MA 或 CQ 对两种细胞的增殖抑制率 A: HepG2; B: L-02; 与 TM 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 3-MA 或 CQ 对两种细胞凋亡的影响 流式细胞术检测结果显示,3-MA 或 CQ 联合 TM 作用 HepG2 细胞 24 h,HepG2 细胞凋亡率均显著高于 TM

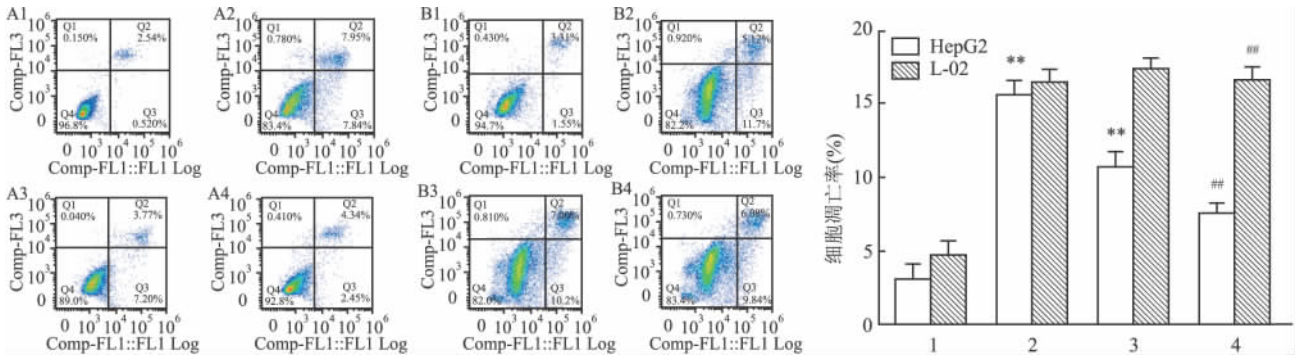


图2 流式细胞术检测 TM 联合 3-MA 或 CQ 作用 24 h 后对两种细胞凋亡的影响

A: HepG2; B: L-02; 1: 细胞对照组; 2: TM + 3-MA 组; 3: TM + CQ 组; 4: TM 组; 与 TM 组比较: ** $P < 0.01$; 与细胞对照组比较: ### $P < 0.01$

组 ($F = 97.757, P < 0.01$)。TM 和 TM 联合 3-MA 或 CQ 分别作用于 L-02 细胞 24 h, 实验组凋亡率均高于细胞对照组 ($F = 142.506, P < 0.01$) , 但各实验组间凋亡率差异无统计学意义 ($F = 0.674, P > 0.05$) 。见图 2。

2.3 自噬相关蛋白 LC3 的表达水平 Western blot 法检测显示 ,HepG2 细胞经 TM 作用 24 h 后 ,LC3-II /LC3-I 灰度值比值较细胞对照组明显升高 ,加入自噬抑制剂 3-MA 或 CQ 后 ,LC3-II /LC3-I 较 TM 组下降 ($F = 168.306, P < 0.01$) 。L-02 细胞亦可见相似的改变 ($F = 225.420, P < 0.01$) ,见图 3。

3 讨论

ERS 即未折叠/错误折叠蛋白的积聚。轻度 ERS 时 ,内质网可以通过激活未折叠蛋白反应启动自噬^[4] ,清除那些超出蛋白酶体清除能力的错误折叠蛋白 ,以恢复内质网稳态 ,促使细胞存活^[5] 。而过度或持久 ERS 时 ,一方面可通过启动内质网相关性死亡途径^[6] 促使细胞凋亡; 另一方面可通过过度激活内噬致使自噬性细胞死亡 (autophagic cell death , ACD)^[7] 。ERS 诱导剂 TM 抑制蛋白质的 N - 端的糖基化 ,从而使不能折叠的蛋白质在内质网内发生大量蓄积 ,从而引起 ERS 的发生^[8] 。TM 作用后两种细胞 LC3-I 向 LC3-II 转化均明显增加 ,说明 ERS 状态下自噬是激活的。

ERS 可以诱导自噬 ,为观察 ERS 状态下使用不同作用机制的自噬抑制剂抑制自噬对于细胞生存的影响 ,本研究分别选择作用于自噬通路上游激酶 III 类磷脂酰肌醇-3 激酶 ,促进早期自噬体成核阶段的 3-MA 和抑制自噬晚期阶段溶酶体降解的 CQ ,观察 ERS 状态下抑制自噬对于细胞增殖、凋亡的影响。与 TM 组比较 ,联合自噬抑制剂组的 HepG2 细胞活

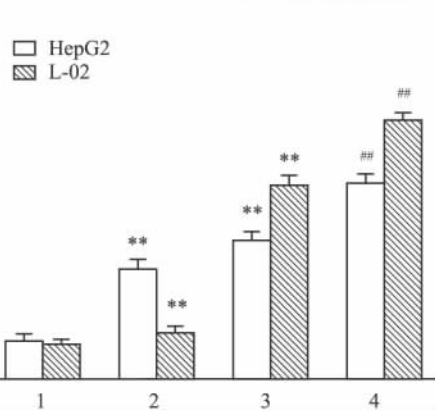
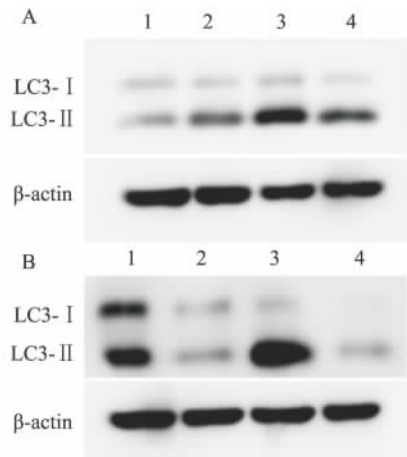


图3 Western blot 检测 TM 联合 3-MA 或 CQ 作用 24 h 后两种细胞自噬相关蛋白 LC3 的表达

A: HepG2; B: L-02; 1: 细胞对照组; 2: TM + 3-MA 组; 3: TM + CQ 组; 4: TM 组; 与 TM 组比较: ** $P < 0.01$; 与细胞对照组比较: ### $P < 0.01$

力明显下降 ,凋亡明显增加。但相同条件下 ,在 L-02 细胞中加入 3-MA 3 个时间点均未见 L-02 细胞活力有明显差异; 而 TM + CQ 组仅在作用 48 h 后 ,显示细胞活力下降 ,提示在 ERS 状态下 ,CQ 长时间作用 ,可导致自噬体不断积聚 ,但其降解途径受阻 ,故细胞结构大量破坏 ,或可导致 ACD ,从而增加细

胞死亡率。推测自噬在 ERS 状态下可对肝癌细胞提供生存保护,对正常肝细胞 L-02 的增殖和凋亡无明显影响。研究^[3]显示,ERS 诱导的自噬作用是清除多泛素化蛋白的聚集和减少在 HCT116 结肠癌细胞和 DU145 前列腺癌细胞空泡化,从而减轻 ERS 和防止细胞死亡。与此相反,相同的化学品诱导的自噬不会为正常的人类结肠细胞提供保护,并在未转化的小鼠胚胎成纤维细胞反而促进细胞死亡。体外研究^[9]表明,抑制自噬后,蛋白酶体抑制剂诱导凋亡的效果会在恶性转化的细胞中增加,而在正常细胞中无明显变化。

LC3 蛋白是酵母自噬相关蛋白的同源蛋白,理论上自噬时应表现为 LC3-II/LC3-I 的增加,通过 LC3-II/LC3-I 或者 LC3-II/(LC3-I + LC3-II) 即可反映自噬水平^[10]。本实验显示,两种细胞在分别加入 3-MA 后,与 TM 组比较,均观察到相应的 LC3-I 的增加及 LC3-II 的减少,符合 3-MA 阻断 LC3-I 向 LC3-II 转变的作用机制,从而抑制自噬的发生。加入 CQ 后,可见 LC3-II 蛋白明显积聚,通过这种基于自噬性降解的自噬流分析,可见自噬活性被抑制,同时,也可反映整个自噬过程是通畅的。在 L-02 细胞中,TM 组看不到 LC3 灰度值上调的现象,但 TM + CQ 组 LC3-II 蛋白的高表达,可推测因细胞自噬活性很强,自噬体降解速度很快,自噬的激活不断消耗胞质内的 LC3,所以仅检测出很弱的表达^[11]。

综上所述,本研究证实自噬在 ERS 状态下可对肝癌细胞提供生存保护,而同样的条件下,却未能为正常的肝细胞提供保护作用。这种正常细胞与肿瘤细胞对自噬反应差异的原因仍需进一步研究。如果这种现象得到证实,那么 ERS 诱导剂和自噬抑制剂的联合使用对于癌症的治疗将会起着重要的作用,或可为肿瘤的特异性治疗提供新的方向。本研究仅限于体外培养的细胞株的观察,进一步的分子机制及体内的效应有待进一步研究。

参考文献

- [1] Calvisi D F, Frau M, Tomasi M L, et al. Deregulation of signaling pathways in prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma: novel insights from interspecies comparison[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1826(1): 215–37.
- [2] Bosetti C, Levi F, Boffetta P, et al. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980–2004[J]. *Hepatology*, 2008, 48(1): 137–45.
- [3] Ding W X, Ni H M, Gao W, et al. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(7): 4702–10.
- [4] Guerin R, Arseneau G, Dumont S, et al. Calnexin is involved in apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in the fission yeast[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(10): 4404–20.
- [5] Scheper W, Nijholt D A, Hoozemans J J. The unfolded protein response and proteostasis in Alzheimer disease: preferential activation of autophagy by endoplasmic reticulum stress[J]. *Autophagy*, 2011, 7(8): 910–1.
- [6] Meir O, Dvash E, Werman A, et al. C/EBP- β regulates endoplasmic reticulum stress-triggered cell death in mouse and human models[J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9616.
- [7] 刘东雷, 王建军, 杨洋, 等. 自噬在顺铂诱导的食管癌细胞死亡中的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2010, 27(9): 1198–9.
- [8] Barba-Espin G, Dedvisitsakul P, Haglund P, et al. Gibberellic acid-induced aleurone layers responding to heat shock or tunicamycin provide insight into the N-glycoproteome, protein secretion, and endoplasmic reticulum stress[J]. *Plant Physiol*, 2014, 164(2): 951–65.
- [9] Furuta S, Hidaka E, Ogata A, et al. Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase[J]. *Oncogene*, 2004, 23(22): 3898–904.
- [10] Kadowki M, Karim M R. Cytosolic LC3 ratio as a quantitative index of macroautophagy[J]. *Methods Enzymol*, 2009, 452: 199–213.
- [11] 马泰, 孙国平, 李家斌. 细胞自噬的研究方法[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2012, 39(3): 204–9.

The different function of autophagy inhibitors between HepG2 liver cancer cells and normal liver cells L-02 in the endoplasmic reticulum stress state

Li Wencheng, Liu Jiatao, Gao Shuang, et al

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

Abstract Objective To investigate the difference in function of autophagy inhibitors between HepG2 and L-02 cells in the state of endoplasmic reticulum stress. **Methods** The HepG2 cells and L-02 cells were routinely cultured *in vitro* and treated either with tunicamycin (TM) or combination with the autophagy inhibitors 3-methylade-

C57BL/6 小鼠动脉粥样硬化中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 和 TGF- β 的表达及其意义

陈越峰 陶琳琳 王庆航 朱洁 周碧蓉

摘要 目的 通过建立 C57BL/6 小鼠动脉粥样硬化模型探讨 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(Treg)在动脉粥样硬化发病及治疗过程中的作用。方法 24 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组: 正常对照组、动脉粥样硬化组、阿托伐他汀组。正常对照组给予基础饲料, 其余组给予高脂饲料。高脂饲养 4 周后, 阿托伐他汀组继续高脂饲养并加用阿托伐他汀干预, 3 组共观察 16 周。苏木精染色观察血管病变情况, 流式细胞仪检测外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 的表达情况, ELISA 法检测外周血 TGF- β 浓度。结果 ① 动脉粥样硬化组的动脉血管的内膜显著增生, CD4⁺ CD25⁺ Treg/CD4⁺ T 细胞比例显著低于正常对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。阿托伐他汀组的动脉血管较动脉粥样硬化组病变明显减轻。阿托伐他汀组的 CD4⁺ CD25⁺ Treg/CD4⁺ T 细胞比例较动脉粥样硬化组有显著提升($P < 0.01$), 与正常对照组差异无统计学意义。② 动脉粥样硬化组 TGF- β 浓度较正常对照组明显降低($P < 0.01$)。阿托伐他汀组的 TGF- β 的浓度显著高于动

脉粥样硬化组($P < 0.01$); 较正常对照组略低, 差异无统计学意义。结论 CD4⁺ CD25⁺ Treg 及其分泌的 TGF- β 具有抑制动脉粥样硬化发展的作用, 有望成为治疗动脉粥样硬化的新靶点。

关键词 调节性 T 细胞; 动脉粥样硬化; 流式细胞仪; 阿托伐他汀

中图分类号 R 541.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0888-04

动脉粥样硬化是一种血管壁有大量脂质沉积的慢性炎症疾病, 好发于大动脉并伴随有免疫细胞的浸润, 如巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和 T 淋巴细胞^[1]。研究^[2]证明免疫反应在动脉粥样硬化的发展中起着重要的作用, 但是其相关的机制并不明确。CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)是一种具有抑制功能的 T 细胞亚群, Treg 在红斑狼疮、白血病以及动脉粥样硬化的病理过程中发挥着重要的作用^[3]。Treg 数量的减少将会破坏机体自身免疫耐受调节^[4]。转化生长因子 β (transforming growth factor, TGF- β) 是 CD4⁺ CD25⁺ Treg 主要产生的一种细胞因子^[5]。Treg 在动脉粥样硬化中的作用已经成为当前研究的热点。该研究通过建立

2015-02-09 接收

基金项目: 安徽医科大学第一附属医院博士启动基金; 安徽省高校省级自然科学研究重点项目(编号: KJ2011A158)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院心血管内科, 合肥 230022

作者简介: 陈越峰, 男, 硕士研究生;

周碧蓉, 女, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: zhoubirong1@hotmail.com

nine (3-MA) or chloroquine (CQ). The cell viability was detected by MTT assay. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The change of autophagy-related protein LC3 was analysed by Western blot assay. **Results** MTT assay demonstrated that TM could time-dependently induce the death of HepG2 cells and L-02 cells, and the cell viability of HepG2 cells was significantly restrained when it was administrated in combination with 3-MA or CQ, the cell survival rates of 24 h were: 3-MA + TM (60%), CQ + TM (72%), TM (86%) respectively, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). However, it had no significant effect with L-02 cells because of its cell survival rates of 24 h were: 83%, 84% and 83%. Flow cytometry apoptosis experiment found that: TM + 3-MA, CQ + TM and TM group on HepG2 cell apoptosis rates were 15%, 11% and 7% respectively, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). But for L-02 cell group, the apoptosis rates were 16%, 17%, 16% which had no obvious difference. According to the results of Western blot, TM could cause increased autophagy, and autophagy inhibitor CQ could lead to increased autophagy tide. **Conclusion** The cell viability of HepG2 cells, not the L-02 cells, can be significantly restrained by TM combined with different autolysosome inhibitor 3-MA or CQ. So the autophagy can protect the hepatocarcinoma cell line HepG2 under the state of endoplasmic reticulum stress, and it can't provide the same protection to L-02 cell line.

Key words autophagy inhibitors; endoplasmic reticulum stress; liver neoplasms; liver cell