

◇ 基础医学研究 ◇

TRAIL 通过内质网应激对肝星状细胞凋亡的调控及部分机制的研究

李晓慧^{1,2}, 李俊^{1,2}, 黄艳^{1,2}, 黄成^{1,2}, 王雅蕊^{1,2}, 王欢^{1,2}, 孙仕伟^{1,2}, 黄蒙蒙^{1,2}

摘要 目的 探讨肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 与内质网应激 (ERS) 相关蛋白对大鼠肝星状细胞系 (HSC-T6) 凋亡的影响及内在联系。方法 体外血小板源性生长因子 (PDGF) 诱导活化的肝星状细胞 (HSC), 再分别加入 TRAIL 与 ERS 诱导剂衣霉素 (TN) 处理后, Hoechst 33258 染色和流式细胞仪检测细胞凋亡变化; RT-PCR 法检测 mRNA 的表达; Western blot 检测蛋白表达变化。结果 与 PDGF 诱导活化的 HSC 组作为对照组比较, 荧光显微镜观察到 TRAIL 与 TN 分别处理的 HSC, Hoechst 33258 染色细胞呈核固缩等凋亡形态变化, 同流式细胞仪检测结果; 与对照组相比, RT-PCR 和 Western blot 结果显示, TRAIL 组与 TN 组细胞凋亡基因 Bax mRNA、凋亡蛋白 C-Caspase-3 的表达明显上调, 而且 ERS 蛋白 C-Caspase-12、CHOP、GRP78 的表达均明显上调。结论 TRAIL 能通过明显上调凋亡基因 Bax mRNA、凋亡蛋白 C-Caspase-3 的表达, 诱导 PDGF 活化的 HSC 凋亡, 其机制可能与诱导 ERS 相关蛋白 CHOP、GRP78、Caspase-12 的表达有关。

关键词 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; 肝星状细胞; 内质网应激; 凋亡; Caspase-12

中图分类号 R 575.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)07-0863-05

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是多种慢性肝病发展的共同病理基础, 其中心环节是静止的肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 活化增殖, 导致以胶原为主的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度沉积^[1]。近来研究^[2]显示, HSC 在 HF 的形成和逆转过程中起关键作用。因此, 促进活化的 HSC 凋亡是防治 HF 的重要手段^[3]。研究^[4]表明, HF 逆转期枯否细胞 (kuffer cell, KC) 分泌大量的肿瘤坏死

因子相关凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis inducing-ligand, TRAIL), 诱导活化的 HSC 凋亡, 但其诱导 HSC 凋亡机制还不明确。实验室前期研究^[5]显示内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 也参与 HSC 凋亡, ERS 可通过标志性蛋白 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CCAAT/enhancerbinding protein homologous protein, CHOP) 和葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78) 调控 TRAIL 受体 DR5 的表达, 说明 ERS 有可能参与 TRAIL 调控的凋亡机制。TRAIL 调控 HSC 凋亡是否通过 ERS 途径还未见文献报道。因此, 该研究以大鼠肝星状细胞系 (HSC-T6) 为研究对象, 探讨 TRAIL 与 ERS 相关蛋白对 HSC 凋亡的影响及内在联系, 为 HF 的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞系 大鼠 HSC-T6 购自中国科学院上海细胞库。以 10% 胎牛血清、100 IU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 高糖培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度恒温培养箱条件下常规培养。取对数生长期细胞用于实验。

1.2 主要试剂 胎牛血清购自杭州四季青公司; DMEM 高糖培养基购自美国 Hyclone 公司; TRIzol、MML-V 逆转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; RT-PCR 扩增试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; RT-PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司; RIPA、Hoechst 33258 染料和苯甲基磺酰氟 (PMSF) 和非选择性 Caspase 抑制剂 (Z-VAD-fmk) 购自碧云天公司; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、衣霉素购自美国 Sigma 公司; 兔抗 Caspase-3 多克隆抗体购自美国 Cell Signal 公司; 兔抗 CHOP 多克隆抗体购自美国 Bioworld 公司; β -actin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 辣根酶标记抗兔和抗鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; ECL 化学发光试剂盒购自美国 Pierce 公司。

1.3 主要仪器 NAPCO-6100 型细胞培养箱购自美国 SHELLAB 公司; SWCJ-4F 型超净工作台购自

2014-02-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81072686、81273526、81102493); 高等学校博士学科点专项科研基金 (编号: 20103420120001); 安徽医科大学 2013 年国家级大学生创新创业训练计划 (编号: 201310366030)

作者单位: 安徽医科大学¹ 药学院、² 肝病研究所, 合肥 230032

作者简介: 李晓慧, 女, 硕士研究生;

李俊, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lj@ahmu.edu.cn

江苏苏州安泰空气技术有限公司; IX71-MP5. 0-2PE 型荧光倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司; 3-16K 高速冷冻离心机购自美国 Sigma 公司; PCR 扩增仪购自德国 Eppendoff 公司; Bio-rad 电泳仪购自美国伯乐公司。

1.4 方法

1.4.1 Hoechst 33258 染色法 取未加任何刺激的 HSC 作为正常组、给予 20 ng/ml PDGF 诱导 HSC 活化作为 PDGF 组,在活化的 HSC 中加入 500 ng/ml TRAIL(TRAIL 组) 或 ERS 诱导剂 2 μmol/L 衣霉素 (tunicamycin ,TN) (TN 组) 。将各组细胞分别涂至防脱载玻片上,4% 多聚甲醛固定 30 min ,透化 30 min ,滴加 Hoechst 33258 工作液,避光常温孵育 20 min ,再用 PBS 洗涤 3 次后于荧光显微镜下观察。

1.4.2 细胞凋亡检测 取冷 PBS 洗涤 2 次,2 000 r/min 离心 5 min 后,收集细胞。然后用 400 μl Annexin V 结合液悬浮细胞,再加入 5 μl Annexin V-FITC 染色液,轻轻混匀后 2~8 ℃ 避光孵育 15 min 。最后在上述细胞悬液中加入 10 μl PI 染色液,轻轻混匀后 2~8 ℃ 避光孵育 5 min ,流式细胞仪检测。

1.4.3 RT-PCR 测定 Bax mRNA 的表达 按 TRIzol 一步法提取经处理后的 HSC 总 RNA ,紫外分光光度计测定 A₂₆₀: A₂₈₀ 比值,重复 3 次,测得该比值稳定于 1.8~2.0。逆转录得到 cDNA 后扩增目的基因,最后所得的 PCR 产物在质量浓度为 12 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,通过光密度扫描,以目的基因与内参基因的光密度比值作为目的基因的相对转录量进行统计学分析。见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'→3')	退火温度 (℃)	产物长度 (bp)
Bax	F: TCATCCAGGATCGAGCAGA	56	260
	R: AAGTAGAAHAGGGCAACCAC		
β-actin	F: TGGATCTCTGCGATCCATGAAAC	51	345
	R: ACCGAGCTCAGTAACAGTCCG		

1.4.4 Western blot 法检测 CHOP、GRP78、Caspase-12 和 Caspase-3 蛋白表达 取经处理后的 HSC ,加 500 μl RIPA 细胞裂解液,5 μl PMSF 于冰上裂解 30 min 后置于 4 ℃ 离心机上 12 000 r/min 离心 30 min 。取上清液,用 BCA 法进行蛋白定量。聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转移法将蛋白转移至 PVDF 滤膜上。用 5% 的脱脂牛奶封闭 3 h 后,与 1:500 一抗 4 ℃ 孵育过夜。再与 1:5 000 的 HRP 标记的辣根过氧化物酶标记 IgG 室温孵育 1 h ,ECL 显色,Quantity

One 软件测定分析结果。采用 β-actin 作为内参照,分别以相应蛋白与 β-actin 光密度比值表示该蛋白相对表达水平。

1.5 统计学处理 使用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析进行统计学检验。

2 结果

2.1 荧光显微镜观察 取正常组、PDGF 组、TRAIL 组和 TN 组,Hoechst 33258 染色后,荧光显微镜观察 TRAIL 组与 TN 组细胞呈典型的凋亡形态变化,早期凋亡细胞核染色质呈固缩状、圆珠状或斑块状;晚期凋亡细胞核染色质呈固缩状或斑块状。结果显示,与 PDGF 组相比,TRAIL 组与 TN 组细胞早期凋亡率和坏死率均明显增加,见图 1。

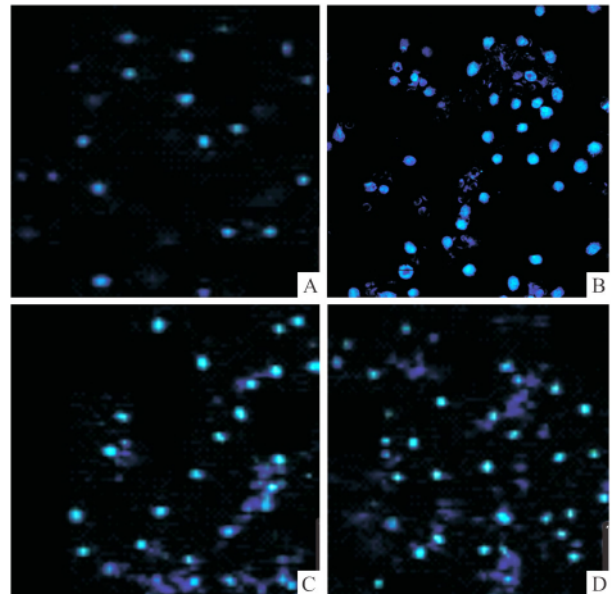


图 1 各实验组 HSCs Hoechst 33258 染色的变化 SP×400 A: 正常组; B: PDGF 组; C: TRAIL 组; D: TN 组

2.2 细胞凋亡检测 取正常组、PDGF 组、TRAIL 组和 TN 组,流式细胞仪检测 HSC 的凋亡变化。结果显示,与 PDGF 组(9.43% ± 1.34%) 相比,TRAIL 组(39.30% ± 1.93%) 与 TN 组(35.47% ± 1.54%) 细胞早期凋亡率和坏死率均有增加,差异有统计学意义(P < 0.05, F = 145.922),见图 2。

2.3 Bax 基因的表达变化 与 PDGF 组(27.25% ± 2.03%) 相比,TRAIL 组(52.24% ± 4.35%) 和 TN(52.44% ± 3.57%) 组 Bax mRNA 表达显著上调,差异有统计学意义(P < 0.05, F = 94.547),见图 3。

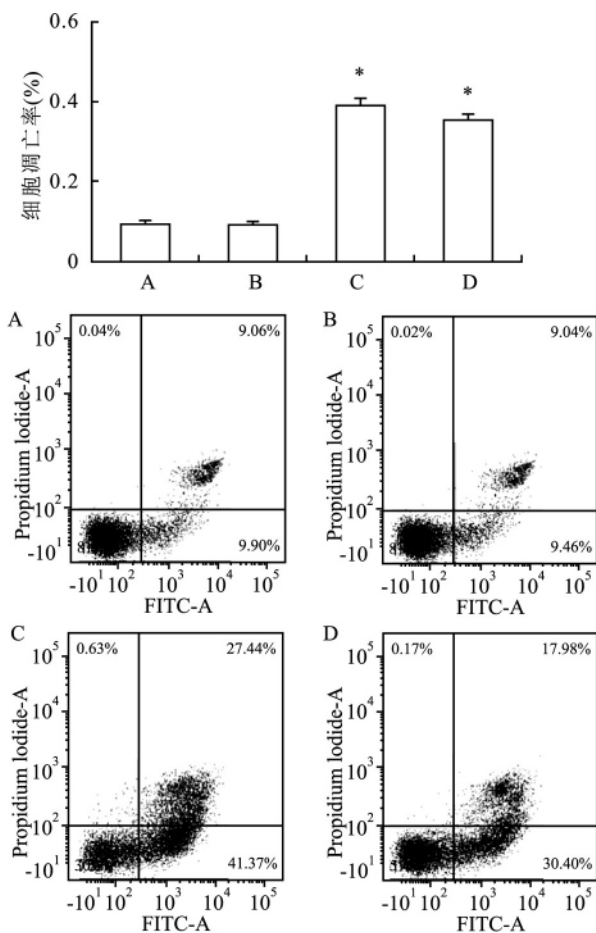


图2 各实验组 HSCs 凋亡的变化水平

A: 正常组; B: PDGF 组; C: TRAIL 组; D: TN 组; 与正常组比较:

* $P < 0.05$

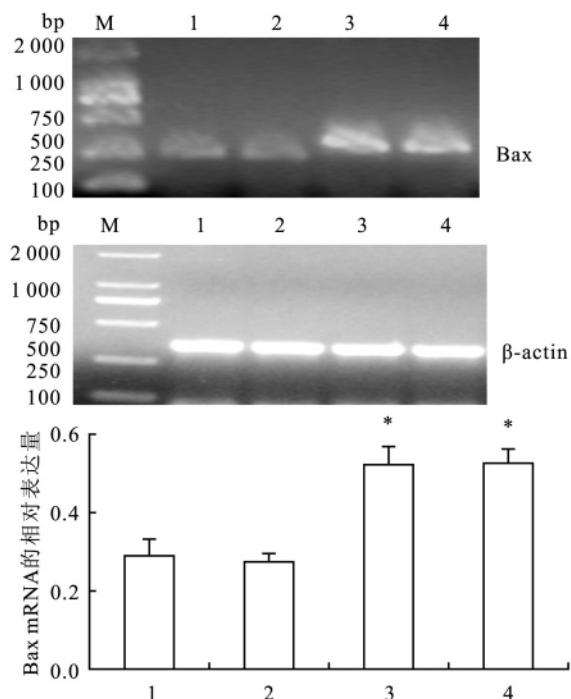


图3 各实验组 HSCs Bax 基因水平的表达

M: Marker; 1: 正常组; 2: PDGF 组; 3: TRAIL 组; 4: TN 组; 与正常

组比较: * $P < 0.05$

2.4 ERS 特征性蛋白 Caspase-12 和 GRP78、CHOP 的表达变化 与 PDGF 组 ($24.26\% \pm 8.04\%$) 相比, TRAIL 组 ($58.18\% \pm 2.86\%$) 和 TN 组 ($48.73\% \pm 0.86\%$) 裂解的 C-Caspase-12 的蛋白表达明显上调, 而预加入 Caspase 抑制剂 Z-VAD-fkm 组 ($35.88\% \pm 0.88\%$), 与 TRAIL 组和 TN 组相比, 裂解的 C-Caspase-12 的蛋白表达明显下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $F = 132.976$), 见图 4; 与 PDGF 组 ($40.47\% \pm 8.72\%$) 相比, TRAIL 组 ($60.14\% \pm 7.80\%$) 和 TN 组 ($57.87\% \pm 5.04\%$), CHOP 蛋白表达明显上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $F = 92.54$); 与 PDGF 组 ($51.47\% \pm 3.46\%$) 相比, TRAIL 组 ($107.72\% \pm 11.88\%$) 和 TN 组 ($101.25\% \pm 5.74\%$) GRP78 的蛋白表达明显上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $F = 88.113$), 见图 5。

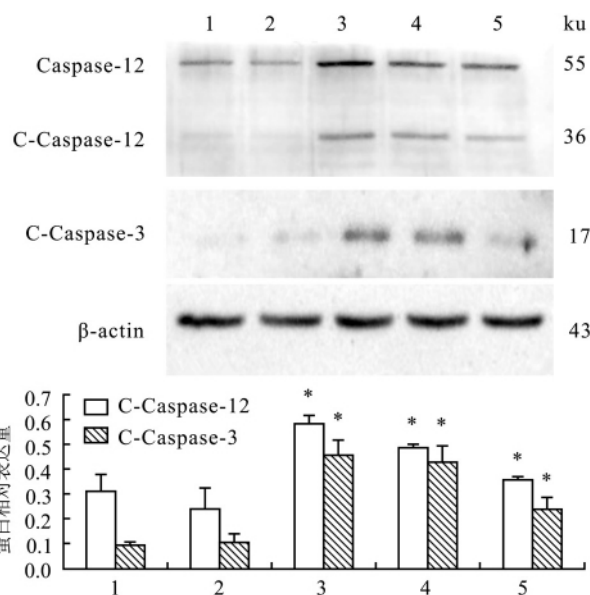


图4 各实验组 HSC C-Caspase-12 和 C-Caspase-3 蛋白表达

1: 正常组; 2: PDGF 组; 3: TRAIL 组; 4: TN 组; 5: PDGF + TRAIL + Z-VAD-fkm 组; 与正常组比较: * $P < 0.05$

2.5 Caspase-3 蛋白表达变化 与 PDGF 组 ($10.67\% \pm 3.39\%$) 相比, TRAIL 组 ($45.82\% \pm 5.62\%$) 和 TN 组 ($42.57\% \pm 6.74\%$) 裂解的 C-Caspase-3 的蛋白表达明显上调; 而预加入 Caspase 抑制剂 Z-VAD-fkm 组 ($24.25\% \pm 4.38\%$), 与 TRAIL 组 ($45.82\% \pm 5.62\%$) 和 ($42.57\% \pm 6.74\%$) TN 组相比, 裂解的 C-Caspase-3 的蛋白表达明显下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $F = 101.25$), 见图 4。

3 讨论

HF 是慢性肝病最常见肝脏病理改变之一, KC

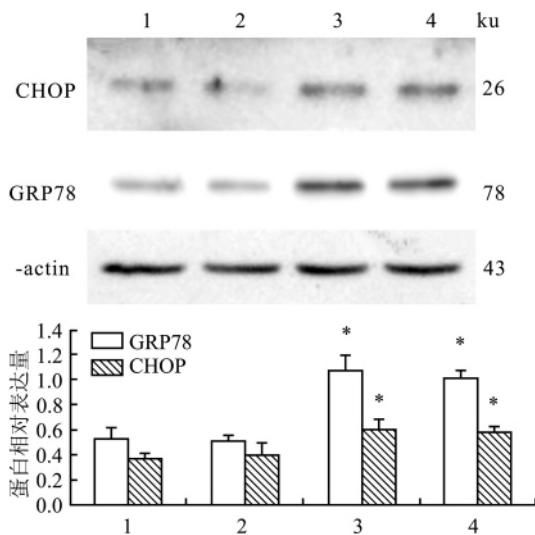


图5 各实验组 HSCs 中 GRP78 和 CHOP 蛋白的表达

1: 正常组; 2: PDGF 组; 3: TRAIL 组; 4: TN 组; 与正常组比较: * P < 0.05

分泌TGF-β、PDGF等能够促进 HSC 活化增殖,导致大量 ECM 过度沉积,而 HF 恢复期 KC 分泌 TRAIL 等诱导活化的 HSC 凋亡,从而促进 HF 的逆转^[6-7]。根据 TRAIL 在 HF 恢复期对 HSC 凋亡的影响,本研究采用体外培养大鼠肝星状细胞系(HSC-T6),观察 TRAIL 对 HSC 凋亡的机制研究及内在联系,为 HF 的治疗提供新思路。

TRAIL 属于肿瘤坏死因子超家族,诱导细胞凋亡是作用于细胞后引起的一系列细胞内包括 Caspase 的激活以及细胞内蛋白裂解级联反应的一个生物化学过程^[8]。TRAIL 作用于 TRAIL-R1 和 TRAIL-R2 形成 TRAIL 受体复合体,可能导致细胞内多个致死性级联反应,其中 Caspase 的激活在细胞凋亡中起到了重要作用^[9]。有研究^[10]显示,TRAIL 诱导人结肠癌细胞(SW480 cells)凋亡,不仅通过 Caspase-8、Caspase-3 的激活,而且还伴有线粒体特征性蛋白 Caspase-9 的激活。本研究以 TRAIL 体外诱导 HSC 凋亡,Hoechst 33258 染色后,荧光显微镜下观察细胞出现核固缩等典型的凋亡形态。流式细胞仪检测结果也发现,TRAIL 明显上调 HSC 的凋亡率。为进一步探讨 TRAIL 在活化的 HSC 凋亡中的作用,本研究分别检测了 C-Caspase-3 及 Bax mRNA 的表达,结果显示 C-Caspase-3 蛋白及 Bax mRNA 的表达均显著上调,但是 TRAIL 促进 HSC 凋亡的发生机制仍不明确。

ERS 所诱导的细胞凋亡是近年来新被认识的一种凋亡途径,不同于既往经典线粒体、死亡受体介导的细胞凋亡^[11]。持续性的 ERS 启动一系列凋亡途

径如 CHOP、JNK、Caspase 等,加速诱导细胞凋亡^[12]。课题组的前期研究^[13]表明,CHOP 和 JNK 可通过毒胡萝卜素诱导 ERS 上调 TRAIL 受体 DR5 和 Caspase-8 的表达,提示 TRAIL 可能通过在 Caspase-8 调控 HSC 的凋亡,而且与 ERS 存在一定的联系。由此提出设想,TRAIL 是否通过 ERS 相关蛋白 Caspase-12 其中 TRAIL 是否通过 ERS 和死亡受体调控 HSC 的凋亡,同时还检测了 TRAIL 刺激下 HSC 中 CHOP、GRP78、C-Caspase-12 等 ERS 凋亡途径的相关蛋白的表达情况。结果显示,TRAIL 可明显促进 C-Caspase-3 蛋白和 Bax mRNA 表达的增加并上调 CHOP、GRP78、C-Caspase-12 蛋白的表达,表明 TRAIL 可能通过 ERS 凋亡途径参与 HSC 的凋亡。

综上所述,TRAIL 可明显促进活化的 HSC 凋亡,其促凋亡机制可能通过 ERS 标志性蛋白 CHOP、GRP78 和 Caspase-12 介导,提示 TRAIL 可能是通过 ERS 途径调控 HSC 凋亡,为 HF 的治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Lee U E, Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2011, 25(2): 195-206.
- [2] Yin C, Evason K J, Asahina K, et al. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer [J]. Clin Invest 2013, 123(5): 1902-10.
- [3] Huang Y, Huang C, Li J. Effect of cytokines secreted from Kupffer cell on HSC proliferation, apoptosis in hepatic fibrosis process [J]. Chin Pharmacol Bull, 2010, 26(1-2): 9-13.
- [4] Tang X, Yang J, Li J. Accelerative effect of leflunomide on recovery from hepatic fibrosis involves TRAIL-mediated hepatic stellate cell apoptosis [J]. Life Sci 2009, 84(15-16): 552-7.
- [5] De Minicis S, Candelaresi C, Agostinelli L, et al. Endoplasmic Reticulum stress induces hepatic stellate cell apoptosis and contributes to fibrosis resolution [J]. Liver Int 2012, 32(10): 1574-84.
- [6] Liu H, Li J, Huang Y, et al. Inhibition of transient receptor potential melastain 7 channel increases HSC apoptosis induced by TRAIL [J]. Life Sci, 2012, 90(15-16): 612-8.
- [7] 黄艳, 黄成, 李俊. 肝纤维化病程中 Kupffer 细胞分泌的细胞因子对肝星状细胞活化增殖、凋亡的调控 [J]. 中国药理学通报 2010, 26(1): 9-13.
- [8] You M, Savaraj N, Kuo M T, et al. TRAIL induces autophagic protein cleavage through caspase activation in melanoma cell lines under arginine deprivation [J]. Mol Cell Biochem, 2013, 374(1-2): 181-90.
- [9] Mazumdar B, Meyer K, Ray R. N-terminal region of gelsolin induces apoptosis of activated hepatic stellate cells by a caspase-dependent mechanism [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e44461.
- [10] Sinicrope F A, Penington R C, Tang X M. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis is inhibited by Bcl-2 but restored by the small molecule Bcl-2 inhibitor, HA 14-1, in human colon cancer cells [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(24): 8284-92.

全反式维甲酸对人胃腺癌细胞株 BGC-823 迁移的影响

杨艳艳¹, 胡安拉^{1,2}, 张素梅¹, 周青¹, 汪渊¹

摘要 目的 研究全反式维甲酸(ATRA) 对人胃腺癌细胞株 BGC-823 细胞迁移能力的影响及其可能机制。方法 不同浓度 ATRA 处理 BGC-823 后, MTT 法检测 ATRA 对细胞增殖的影响并计算半数抑制率(IC₅₀) , 倒置显微镜下观察细胞形态学变化, 划痕法检测其对细胞迁移能力的作用, 平板克隆法观察其对细胞体外克隆形成能力的影响, Western blot 法检测可能与迁移相关蛋白的表达。结果 ATRA 对 BGC-

823 细胞增殖具有明显的抑制作用, 呈浓度依赖性, IC₅₀ 为 42. 402 5 μmol/L; ATRA 可抑制细胞生长速度, 使细胞形态拉长; ATRA 可抑制 BGC-823 细胞的迁移; ATRA 可明显降低细胞克隆形成数($P < 0. 05$); Western blot 结果显示 ATRA 显著降低肌球蛋白轻链激酶(MLCK) 的表达和肌球蛋白轻链(MLC) 的磷酸化。结论 ATRA 对人胃腺癌细胞株 BGC-823 细胞的迁移具有抑制作用, 可能与降低 MLCK 表达和 MLC 磷酸化水平有关。

关键词 ATRA; 胃癌; 迁移; 肌球蛋白轻链激酶; 肌球蛋白轻链

中图分类号 R 735; R 966; R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)07-0867-05

2014-02-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81272399); 安徽省自然科学基金(编号: 090413116)

作者单位: ¹ 安徽医科大学分子生物学实验室、生物化学与分子生物学教研室、安徽省/省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室, 合肥 230032

² 安徽医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 合肥 230032

作者简介: 杨艳艳, 女, 硕士研究生;

汪渊, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wangyuan@ahmu.edu.cn

2008 年, 全球大约共新增 989 600 例胃癌患者和 738 000 例癌症死亡患者, 占全球除皮肤癌以外的癌症总发病率的 8% 以及新增癌症死亡人数的 10%^[1], 进展期胃癌的淋巴转移率高达约 70%。肿瘤细胞迁移与肿瘤转移的基础, 其过程十分复杂, 与

[11] Murai M, Inoue T, Suzuki-Karasaki M, et al. Diallyl trisulfide sensitizes human melanoma cells to TRAIL-induced cell death by promoting endoplasmic reticulum-mediated apoptosis[J]. Int J Oncol, 2012, 41(6): 2029-37.

[12] Inoue T, Suzuki-Karasaki Y. Mitochondrial superoxide mediates

mitochondrial and endoplasmic reticulum dysfunctions in TRAIL-induced apoptosis in Jurkat cells[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 61C: 273-84.

[13] 谢加力. ERS 与 TRAIL 在大鼠肝星状细胞凋亡中的相互关系探讨[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.

Effects of TRAIL on the hepatic stellate cells apoptosis in hepatic stellate cells and relevant mechanism

Li Xiaohui^{1,2}, Li Jun^{1,2}, Huang Yan^{1,2}, et al

(¹School of Pharmacy, ²Institute for Liver Diseases, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To detect the effect of ER stress and TRAIL in rat hepatic stellate cell lines (HSC-T6) and to explore the possible apoptosis pathway. **Methods** Hepatic stellate cell (HSC) apoptosis was measured by Hoechst staining apoptosis detection kit and flow cytometric analysis. CHOP, GRP78, C-Caspase-12 and -3 protein expression were analyzed by Western blot; Bax mRNA expression was evaluated by RT-PCR. **Results** It showed that PDGF-induced HSC as control. The increased of HSC apoptosis was measured by Hoechst 33258 and flow cytometry. In addition, TRAIL increased the expression of Bax and C-Caspase-3 in activated HSC. TRAIL also increased C-Caspase-12, CHOP and GRP78 in activated HSC. These results suggested that TRAIL induced apoptosis through ERS-mediated pathways in HSC. **Conclusion** These results demonstrate that TRAIL induces apoptosis through ERS-mediated pathways in HSC.

Key words TNF-related apoptosis inducing-ligand; hepatic stellate cell; apoptosis; endoplasmic reticulum stress; Caspase-12