

内质网应激在肝细胞凋亡中的意义

刘海防¹, 谢青²

[摘要]目的:探讨内质网应激在肝细胞凋亡中的意义。方法:原位二步灌注法分离并培养 BALBC 小鼠原代肝细胞,化学合成法制备抗半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-12 小分子干扰 RNA (caspase-12 siRNA),脂质体包裹转染小鼠原代肝细胞。毒胡萝卜素 4 $\mu\text{mol/L}$ 诱导肝细胞凋亡。RT-PCR、Western blot 检测抑制效果;MTT 比色试验检测细胞活力,反映细胞凋亡。结果:siRNA 对小鼠原代肝细胞 caspase-12 mRNA 在浓度 200 nmol/L 时抑制率为 86.22%;对凋亡细胞 procaspase-12 抑制率为 50.04%,与单纯诱导凋亡细胞差异有统计学意义($P < 0.01$);MTT 比色试验检测发现,与单纯诱导凋亡细胞相比,转染 siRNA 后细胞活力增高 51.65%,两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:抑制内质网应激介导细胞凋亡的特异酶 caspase-12,能在一定程度上阻抑小鼠原代肝细胞凋亡的发生,内质网应激在肝细胞凋亡中具有重要意义。

[关键词] 细胞凋亡;肝细胞;内质网应激;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-12;小分子干扰 RNA;小鼠,近交 BALBC

[中国图书资料分类法分类号] R 329.25 **[文献标识码]** A

Significance of endoplasmic reticulum stress in hepatocytes apoptosis

LIU Hai-fang¹, XIE Qing²

(1. Department of Digestion, Huaibei General Miner Hospital, Huaibei Anhui 235000;

2. Department of Infectious Diseases, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective:** To study the significance of endoplasmic reticulum stress in hepatocytes apoptosis. **Methods:** The BALB/c mouse primary hepatocytes were isolated by two-step in situ liver perfusion, and then induced apoptosis with 4 $\mu\text{mol/L}$ thapsigargin. siRNA against caspase-12 were synthesized chemically, then transfected into mouse primary hepatocytes by liposomes. Efficacy of caspase-12-siRNA inhibition was analyzed with RT-PCR and Western blot; viability of hepatocyte following apoptosis was evaluated with MTT. **Results:** The inhibition of caspase-12 mRNA and procaspase-12 expression were 86.22% and 50.04% respectively with 200 nmol/L siRNA ($P < 0.01$). Contrasted with apoptotic hepatocytes, the cell activity analyzed with MTT increased by 51.65% ($P < 0.05$). **Conclusions:** The mouse primary hepatocyte apoptosis can be reduced when endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 is inhibited. Endoplasmic reticulum stress plays an important role in hepatocyte apoptosis.

[Key words] apoptosis; hepatocytes; endoplasmic reticulum stress; caspase-12; small interfering RNA; mice, inbred BALBC

凋亡是细胞在一定的生理或病理条件下,遵循自身程序,结束其自身生命的过程。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是细胞凋亡的重要途径。caspase-12 是 ERS 介导细胞凋亡的特异酶^[1]。多种肝脏疾病的发生与 ERS 介导的细胞凋亡有关,如乙型肝炎、丙型肝炎、非酒精性脂肪肝、胆汁郁积等。本研究应用 RNA 干扰技术抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-12 (caspase-12) 的表达,观察对小鼠原代肝细胞凋亡的影响,揭示 ERS 在肝细胞凋亡中的意义,为肝病诊治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 BALB/c 小鼠,6~8 周龄,雄性,由

中国科学院上海生命科学研究院动物中心提供。

1.2 主要试剂 IV 型胶原酶、MTT 为美国 Sigma 公司产品;RT-PCR 一步法试剂盒为日本 TakaRa 公司产品;Trizol、脂质体 oligofectamine、DNA 提取试剂 Easy-DNATM Kit 为美国 Invitrogen 公司产品;肝细胞生长因子为美国 Biosource 公司产品;兔抗小鼠 pro caspase-12 多克隆一抗为美国 Exalpha Biological 公司产品,小鼠抗小鼠 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆一抗为美国 Sigma 公司产品;pro caspase-12 及 β -actin 二抗为美国 Amersham Biosciences 公司产品。

1.3 RT-PCR 引物 caspase-12 引物,扩增片断 587 bp:上游引物 5'-AGG ATG ATG GAC CTC AGA AG-3',下游引物 5'-TCT CAG ACT CCG ACA GTT AG-3'。 β -actin 引物,扩增片断 311 bp:上游引物 5'-CTA CAA TGA GCT GCG TGT GG-3',下游引物 5'-CGG TCA GGA TCT TCA TGA GG-3',由上海博亚生物工程公司合成。

1.4 siRNA 序列 siRNA 设计规则参照文献[2]。

[收稿日期] 2009-10-14

[作者单位] 1. 淮北矿工总医院 消化内科,安徽 淮北 235000;2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院 感染病科,上海 200025

[作者简介] 刘海防(1972-),男,主治医师。

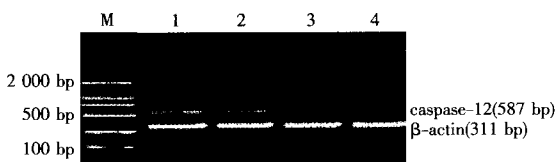
siRNA 正义链 5'-CUU CUU AGA GAA AAC AGA CTT-3', 反义链 5'-GUC UGU UUU CUC UAA GAA GTT-3'。非特异性 siRNA: 5'-CAG CAG CAG GAA GCA GUA UTT-3', 5'-AUA CUG CUU CCU GCU GCU GTT-3'。由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所合成。

1.5 方法 BALB/c 小鼠原代肝细胞分离培养: 原位二步灌注法分离小鼠原代肝细胞^[3], 并在一定条件下接种培养。siRNA 转染细胞: 小鼠原代肝细胞培养第 4 天时转染 siRNA。转染试剂为 oligofectamine 和 opti-MEM-1, 转染浓度为 200 nmol/L。RT-PCR 检测: 设空白、脂质体、非特异性 siRNA 对照, 转染 48 h 后收集细胞。用 Trizol 试剂, 按操作说明书提取 RNA。参照试剂说明, 一步法进行 RT-PCR。反应参数为 50 °C 30 min 反转录; 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 30 s 变性, 58 °C 40 s 退火, 72 °C 1 min 延伸, caspase-12 为 28 循环, β -actin 为 21 循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。Western blot 检测: 样本分为正常细胞组(对照组)、单纯诱导凋亡组(TG 组)和 siRNA + TG 组。siRNA 转染细胞 48 h 后, 以 TG 4 μ mol/L 诱导凋亡, 再 48 h 后收集细胞。按试剂操作说明及一定步骤抽提细胞蛋白质, 配制并灌注聚丙烯酰胺凝胶, 上样、电泳、转膜, 加一抗、二抗, 洗膜、洗片。以 β -actin 为内参照, 根据条带对 β -actin 的相对灰度半定量计算抑制率。MTT 比色试验: 由于小鼠原代肝细胞体积较大, 且大小不均, 我们以 MTT 比色试验检测细胞活力来反映细胞凋亡情况。样本分组参照 Western blot 检测。siRNA 转染细胞 48 h 后, 以 TG 4 μ mol/L 诱导凋亡, 再 48 h 后做 MTT 比色试验。根据吸光值计算细胞活力。

1.6 统计学方法 采用方差分析及 q 检验。

2 结果

2.1 siRNA 的抑制效率 脂质体以及非特异性 siRNA 均无明显抑制作用。siRNA 浓度为 200 nmol/L 时对 caspase-12 mRNA 的抑制率为 86.22% (见图 1)。



M: 分子量标准; 1: 空白; 2: 脂质体; 3: 非特异性 siRNA; 4: caspase-12 siRNA

图 1 siRNA 对 caspase-12 mRNA 的抑制

2.2 siRNA 抑制 pro caspase-12 表达 4 μ mol/L 浓

度 TG 诱导小鼠原代肝细胞凋亡, 提取不同时间点细胞 DNA 电泳, 发现诱导 24 h 后即可见到 DNA Ladder, 36 h、48 h 更加明显 (见图 2)。细胞凋亡晚期 pro caspase-12 减少, TG 诱导肝细胞凋亡 48 h 后减少 53.42%; siRNA 对凋亡细胞 pro caspase-12 抑制率为 50.04%, 与 TG 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (见图 3、表 1)。

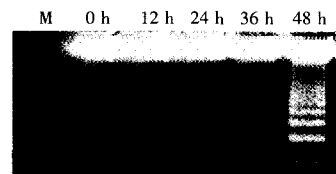
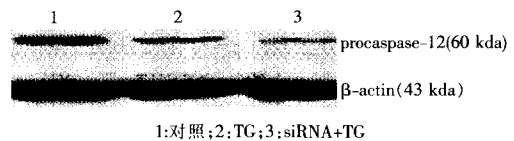


图 2 TG 4 μ mol/L 诱导 0、12、24、36、48 h 后 DNA Ladder



1: 对照; 2: TG; 3: siRNA+TG

图 3 siRNA 对凋亡细胞 pro caspase-12 的抑制

2.3 siRNA 抑制细胞凋亡 用 MTT 比色试验检测细胞活力, 并以此反映细胞凋亡情况。与 TG 组比较, 转染 siRNA 后细胞活力增高了 51.65% ($P < 0.05$) (见表 1)。

表 1 MTT 比色试验细胞吸光值 ($n_i = 6; \bar{x} \pm s$) 及 pro caspase-12/ β -actin 相对灰度值 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	MTT 吸光值	相对灰度值
对照组	0.58 \pm 0.11	0.24 \pm 0.02
TG 组	0.20 \pm 0.03 **	0.11 \pm 0.01 **
siRNA + TG 组	0.31 \pm 0.04 **	0.06 \pm 0.02 Δ *
<i>F</i>	23.57	86.33
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01
<i>MS</i> 组内	0.005	0.000 3

q 检验: 与对照组比较 ** $P < 0.01$; 与 TG 组比较 $\Delta P < 0.05$

3 讨论

肝细胞凋亡是肝脏损伤和肝脏疾病的中心环节, 也是肝细胞维持正常生理功能的重要机制^[4]。凋亡和坏死有本质的区别。凋亡主要表现为细胞皱缩变小, 细胞膜完整, 胞质浓缩, 内质网(ER)扩张呈泡状并与细胞膜融合, 核染色质固缩并边缘化, 核 DNA 被核酸酶降解为规则的 DNA 片段; 后期形成具有完整膜结构的凋亡小体, 并很快被邻近的吞噬细胞所吞噬, 不引起炎症反应。坏死主要表现为细胞肿胀, 细胞膜破裂, 进而形成嗜酸性小体或溶解, DNA 降解不充分; 后期胞质内容物及炎症因子溢

出,引起局部炎症反应。

细胞凋亡包括3条途径,即死亡受体途径、线粒体途径及ERS。缺血再灌注损伤、氧化应激、同型半胱氨酸、病毒感染、各种理化损伤等均可引起ERS,ERS是机体的一种自我保护机制,但过度应激会导致细胞凋亡。caspase-12是ERS介导细胞凋亡的特异酶。ERS时caspase-12激活的主要方式为 Ca^{2+} 依赖性calpain的活化;TRAF2依赖性机制;caspase-7 ER转位。正常情况下它以pro caspase-12蛋白酶原的形式存在,ERS时,在天冬氨酸残基的羧基端水解肽链去除原域,成为有活性的caspase-12蛋白酶,它通过依次激活caspase-9、caspase-3引起细胞凋亡。caspase-12仅存在于鼠体内,它在人体内的同源类似物为caspase-4,亦定位于ER膜,可能是人体ERS介导细胞凋亡的特异酶^[5-6]。

多种肝病,如非酒精性脂肪肝、肝纤维化、病毒性肝炎、移植排斥性肝炎、自身免疫性肝炎、酒精性肝病、暴发性肝衰竭等均与ERS介导的肝细胞凋亡有关。对于脂肪肝,ERS可以通过内质网联合跨膜固醇联合蛋白介导引起细胞内脂质累积,脂质的过度累积即可诱发脂肪肝。在丙型肝炎的致病中,病毒蛋白大量堆积在病毒感染的细胞内导致未折叠蛋白反应,致细胞损伤;而且丙型肝炎病毒基因的表达增高了细胞内胆固醇水平,导致 Ca^{2+} 从ER内释放,引起ERS,导致肝细胞凋亡。乙型肝炎病毒的致病亦与ERS有关,其表面包膜蛋白的过表达会导致乙型肝炎病毒表面抗原的分泌障碍,从而堆积在内质网内腔中,造成肝细胞玻璃样变性和对细胞因子的高敏,造成肝脏实质损伤^[7]。在酒精性肝病,高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, Hhcy)是重要的致病因素之一。长期饮酒可引起Hhcy,而细胞内Hhcy可以引发ERS。对此,晏春根等^[8]给小鼠高蛋白饮食建立Hhcy动物模型,结果发现Hhcy可使小鼠肝细胞合成或摄取甘油三脂和胆固醇增加,引起肝细胞脂肪变,进一步发展可引起细胞凋亡。其机制为Hhcy激活了ERS蛋白葡萄糖调节蛋白78与固醇调节元件结合蛋白-1(sterol regulatory element-binding protein, SREBP-1),而SREBP-1是细胞内脂质聚集的关键,然后可能再进一步激活caspase家族而引起细胞凋亡。ERS在急性肝功能

衰竭的发病中更具有重要作用,周惠娟等^[9]以D-氨基半乳糖联合脂多糖诱导小鼠急性肝功能衰竭模型中发现,caspase-12 mRNA在用药早期逐渐升高,后期下降;而pro caspase-12表达则逐渐下降,与肝细胞凋亡发生的时相一致,这说明ERS既与肝细胞凋亡有关,又与急性肝功能衰竭有关。

实验中,我们用TG(Ca^{2+} -ATP酶抑制剂,它引起ER Ca^{2+} 失衡,是ERS特异性诱导剂)诱导肝细胞凋亡,48 h后pro caspase-12减少53.42%,且出现明显的DNA梯带,与周惠娟等^[9]的实验结果相吻合,表明ERS是肝细胞凋亡的重要途径。而且我们进一步用siRNA作为工具,沉默caspase-12 mRNA,MIT比色试验检测细胞活力增高了51.65%,再次验证了ERS在肝细胞凋亡中的重要意义。因此,了解ERS在肝细胞凋亡过程中的意义及机制,将为肝脏疾病的治疗提供新思路。

[参 考 文 献]

- [1] Xie Q, Khaoustov VI, Chung CC, et al. Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation [J]. *Hepatology*, 2002, 36 (3): 592-601.
- [2] Kumiko UT, Naito Y, Takahashi F, et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32 (3): 936-947.
- [3] Zhang GQ, Yu H, Zhou XQ, et al. TNF- α induced apoptosis and necrosis of mice hepatocytes [J]. *World J Gastroenterol*, 2000, 8 (3): 303-306.
- [4] 吴涛,季光,郑培永,等.内质网应激与肝细胞凋亡[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(23): 2507-2515.
- [5] 关丽英,许彩民,潘华珍.内质网应激介导的细胞凋亡[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(11): 1136-1141.
- [6] Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, et al. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(37): 34287-34294.
- [7] 王茜婷,张卫光.内质网应激介导肝细胞凋亡[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(18): 3549-3552.
- [8] 晏春根,任光圆,朱冬芳,等.同型半胱氨酸介导的内质网应激对肝细胞脂质代谢的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(12): 2414-2418.
- [9] 周惠娟,谢青,姜山,等. Caspase-12在D-氨基半乳糖联合脂多糖诱导小鼠急性肝功能衰竭中的表达及作用[J]. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(9): 685-688.

欢 迎 订 阅

欢 迎 投 稿