文章编号:1000-5404(2011)18-1935-04

论著

内质网应激在软脂酸钠诱导的脂肪变性L02肝细胞凋亡中的作用

曹 洁[1],杨朝霞[1],沈 薇[1],姚 隆[2] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院消化科[1];402260 重庆,江津区中心医院重症医学科[2])

[摘要] **目的** 观察内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)蛋白在软脂酸钠诱导的脂肪变性L02肝细胞凋亡过程中的改变,探讨ERS与脂变肝细胞凋亡的关系。**方法** 用软脂酸钠(饱和脂肪酸)诱导建立L02肝细胞脂肪变性模型。将细胞分为正常对照组和实验组(软脂酸钠72 μmol/L)。MTT法筛选软脂酸钠最佳作用浓度;油红O染色和甘油三酯(TG)试剂盒检测细胞内脂变程度;流式细胞术Annexin V-PE/7-AAD双染检测细胞凋亡率;Western blot检测GRP78、CHOP、磷酸化JNK(p-JNK)蛋白表达。**结果** 软脂酸钠在体外能够诱导肝细胞发生脂肪变性以及脂变肝细胞凋亡,与对照组(1.38±0.42)比较,实验组48 h细胞凋亡率(5.95±0.37)显著增加($P<0.05$)。Western blot检测示软脂酸钠刺激肝细胞12 h,GRP78表达(0.50±0.03)较0 h(0.37±0.02)明显增加,48 h(0.83±0.01)达高峰($P<0.05$)。CHOP和p-JNK表达与GRP78几乎同步增加。**结论** 软脂酸钠对L02肝细胞具有较强的脂毒性,可以诱导肝细胞发生ERS反应。ERS上调CHOP和P-JNK表达可能在软脂酸钠诱导脂肪变性肝细胞凋亡中具有重要作用。

[关键词] 软脂酸钠;内质网应激;非酒精性脂肪性肝病;凋亡
[中图法分类号] R575.202;R363;R329.25 [文献标志码] A

Role of endoplasmic reticulum stress in palmitate sodium-induced apoptosis in steatotic L02 hepatocytes

Cao Jie[1], Yang Zhaoxia[1], Shen Wei[1], Yao Long[2] ([1]Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Department of Intensive-care Medicine, Central Hospital of Jiangjin District, Chongqing, 402260, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the role of endoplasmic reticulum stress (ERS) proteins in palmitate sodium-induced apoptosis of human steatotic L02 hepatocytes and study the relation between ERS and apoptosis in steatotic hepatocytes. **Methods** A steatosis model of human L02 hepatocytes was induced by palmitate sodium. Hepatocytes were divided into normal control group and experimental group containing 72 μmol/L palmitate sodium. Optimal palmitate sodium concentration was selected by MTT assay. A triglyceride (TG) kit was used to detect lipid accumulation in hepatocytes with oil red O staining. Apoptosis of hepatocytes was detected by flow cytometry with Annexin V-PE/7-AAD staining. Expression of GRP78, CHOP and P-JNK was tdetected by Western blotting. **Results** Palmitate sodium induced steatosis and apoptosis of L02 hepatocytes *in vitro*. The apoptosis rate of L02 hepatocytes was significantly higher in experimental group than in control group 48 h after the model was induced by palmitate sodium(5.95±0.37 *vs* 1.38±0.42, $P<0.05$). Western blot analysis showed that the expression level of GRP78 was significantly higher at 12 h than at 0 h after the model was induced by palmitate sodium(0.50±0.03 *vs* 0.37±0.02, $P<0.05$)and reached its peak at 48 h(0.83±0.01). An almost similar increase was observed in expression of CHOP, P-JNK, and GRP78. **Conclusion** Palmitate sodium is rather lipotoxic to L02 hepatocytes and can induce ERS. ERS up-regulated CHOP and P-JNK expression may play an important role in palmitate sodium-induced apoptosis of steatotic L02 hepatocytes.

[**Key words**] palmitate sodium;endoplasmic reticulum stress;non-alcoholic fatty liver disease;apoptosis

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5404) and the Project of Medical Science and Technology of Chongqing (2008-2-401). Corresponding author: Yang Zhaoxia, E-mail: yangzhx2003@163.com

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种获得性代谢应激相关的肝脏损伤,包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)和脂肪性肝硬化3种类型[1-2],在我国,是仅次于病毒性肝炎的常见肝病。但目前NAFLD的发病机制尚未完全明确。近年来关于内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)信号通路及其效应在代谢综合征中的研究十分广泛[3],但在NAFLD中鲜有报道。ERS既是细胞抵抗各种应激的

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5404);重庆市医学科技计划项目(2008-2-401)
[通信作者] 杨朝霞,E-mail:yangzhx2003@163.com

生理反应,又是造成细胞损伤的重要机制[4]。葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78,GRP78)是ERS的信号蛋白,在ERS时大量表达,以维持内质网的稳定[5]。CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)和c-Jun氨基末端激酶(JNK)广泛表达于哺乳动物细胞,CHOP是ERS介导细胞凋亡的主要转录调节因子,JNK在ERS状态下发生磷酸化修饰后,可导致抗凋亡基因与促凋亡基因之间的平衡失调,从而导致凋亡。

本研究用软脂酸钠(饱和脂肪酸)刺激肝细胞株L02,构建NAFLD细胞模型,采用Western blot方法动态观察上述ERS蛋白表达在软脂酸钠诱导的脂变肝细胞凋亡过程中的变化,初步探讨ERS与NAFLD的关系,为最终防治NAFLD提供新的理论依据和治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和细胞

RPMI1640培养基(GIBCO公司,美国),胎牛血清(杭州四季青生物公司),MIT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、Annexin V-PE/7-AAD细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物有限公司,南京),油红O和软脂酸钠(Sigma-Aldrich公司,美国),兔抗磷酸化JNK多克隆抗体(p-JNK, Santa Cruz公司,美国),兔抗GRP78多克隆抗体(Abcam公司,美国)和鼠抗CHOP多克隆抗体(Cell Signal Technology公司,美国),正常人肝细胞株L02由我院消化科实验室提供。

1.2 细胞培养及分组

L02肝细胞用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基(含双抗:青霉素0.062 5 g/L,链霉素0.1 g/L)传代培养,分为对照组(培养基中不加药物),实验组(培养基加入软脂酸钠72 μmol/L)。

1.3 MTT法筛选软脂酸钠最佳作用浓度

5×10^4/ml L02细胞接种于96孔板,细胞贴壁后,更换培养基,分别加入终浓度为18、36、72、118 μmol/L的软脂酸钠,孵育24、48 h后,每孔加入MTT(5 mg/ml)20 μl,继续培养4 h,弃去培养基,每孔加入150 μl DMSO,用酶标仪在490 nm波长处检测每孔的光密度。每组设6个复孔,至少重复3次。NOSA 2.30软件Bliss法计算半抑制浓度IC_{50},选择对细胞会造成一定损伤但又不会使细胞大量死亡的浓度作为诱导L02肝细胞脂肪变性的最佳浓度。

1.4 油红O染色检测L02细胞内脂滴含量

预先将1 cm×1 cm大小的盖玻片放置于培养板内,5×10^4/ml L02细胞接种,按实验分组及一定的时间段,每6孔为1个样本,细胞贴壁后开始干预,分别于12、24、48 h后取出,用PBS漂洗,4%多聚甲醛固定,油红O染色,60%异丙醇脱底色,苏木精细胞核复染,水封片,倒置显微镜下观察细胞内橘红色脂滴含量并拍照。

1.5 检测细胞内甘油三酯(TG)含量

将细胞接种于培养板内,按实验分组及时间段,每6孔为1个样本,细胞贴壁后开始干预,分别于12、24、48 h后收集细胞,反复冻融裂解细胞,12 000 r/min离心20 min,取上清检测TG的含量,按试剂盒说明进行操作,BCA法检测蛋白含量,计算每毫克蛋白所对应的TG含量(μg/mg)。

1.6 Annexin V-PE/7-AAD流式细胞术检测细胞凋亡率

收集各组细胞,PBS漂洗2次,用1 μl Annexin V-PE和5 μl 7-AAD避光染色10 min后,将细胞置激发光为488 nm波长的FACS Calibur型流式细胞仪上检测,上机测定时获取2×10^5个以上细胞,重复3次。得到的数据用ModFit LT软件分析。染色后将细胞分为3个亚群:活细胞细胞膜完整,磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,PS)无外化,为Annexin V-PE^-/7-AAD^-亚群;早期凋亡细胞细胞膜完整,PS外化,为Annexin V-PE^+/7-AAD^-亚群;晚期凋亡或坏死细胞细胞膜不完整,PS外化,为Annexin V-PE^+/7-AAD^+亚群。

1.7 Western blot检测GRP78、P-JNK、CHOP蛋白的表达

按总蛋白提取试剂盒说明步骤提取细胞中总蛋白,BCA法进行蛋白定量,分装后-80 ℃保存,避免反复冻融。蛋白经SDS-PAGE电泳后,电转移至PVDF膜上,加入兔抗GRP78多克隆抗体(1∶1 000稀释)、兔抗P-JNK多克隆抗体(1∶1 000稀释)、鼠抗CHOP多克隆抗体(1∶500稀释),再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(1∶5 000稀释)或辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG(1∶5 000稀释),ECL显影。以β-actin为内参照。Quntity one4.52图像分析软件进行图像分析,将每个样本的积分光密度值与β-actin的积分光密度值相比的值,代表其蛋白含量。

1.8 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,多个样本均数的比较采用单因素方差分析,两个样本均数的比较采用t检验。

2 结果

2.1 软脂酸钠在体外成功诱导建立NAFLD细胞模型

2.1.1 软脂酸钠最佳作用浓度的确定 MTT法检测示,不同浓度的软脂酸钠刺激肝细胞24 h,细胞存活率变化不明显,当浓度超过72 μmol/L刺激肝细胞48 h后细胞存活率明显降低,软脂酸钠作用48 h抑制肝细胞存活的50%的抑制浓度(IC_{50})为118 μmol/L(图1)。为了降低软脂酸钠对肝细胞的毒性作用,结合文献报道,在后续实验中,我们将选用接近48 h的1/3~2/3的IC_{50}浓度(72 μmol/L)作为软脂酸钠最佳诱导浓度。

2.1.2 各组肝细胞脂肪变性情况 油红O染色:对照组仅见少量橘红色脂滴;实验组12 h肝细胞内脂滴变化不明显,24、48 h都可见明显脂滴,随培养时间的延长更为明显,并伴有不同程度的脂滴融合现象。见图2。

2.1.3 各组肝细胞内TG含量 软脂酸钠作用肝细胞12 h,细胞内TG含量为(23.9±1.3)μg/mg,与对照组[(22.3±1.9)μg/mg]比较,差异无统计学意义($P>0.05$);24、48 h细胞内的TG含量均明显增加,分别为(63.4±1.3)、(72.3±2.1) μg/mg,对照组分别为(23.7±2.5)、(22.5±1.9) μg/mg,与对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。表明软脂酸钠可诱导肝细胞脂肪变性。

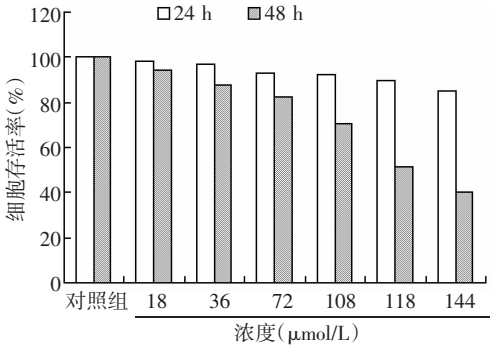


图 1　软脂酸钠对 L02 肝细胞存活率的影响

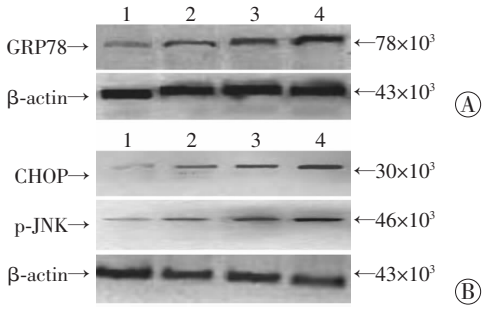
2.2　软脂酸钠在体外诱导脂变 L02 细胞凋亡的定量分析

与对照组相比(24、48 h 分别为 1.35%、1.38%),实验组 24 h 肝细胞的凋亡不明显(1.41%,$P>0.05$),48 h 肝细胞的凋亡率(5.95%)明显升高,其差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3　ERS 标志蛋白 GRP78 及凋亡相关蛋白 CHOP、p-JNK的表达分析

GRP78 在 0 h 细胞有基础水平的表达(0.37 ± 0.02)。与 0 h 比较,72 μmol/L 软脂酸钠刺激肝细胞 12 h 后,GRP78 的表达显著增加(0.50 ± 0.03),24、48 h 其表达逐渐升高[分别为(0.65 ± 0.05)、(0.83 ± 0.01)],任意 2 个时间点蛋白含量比较,差异均具有统计学意义($P<0.05$),提示软脂酸钠刺激后的肝细胞发生了明显的 ERS 反应。

CHOP 和 P-JNK 在 0 h 细胞中表达很低[分别为(0.19 ± 0.03)、(0.23 ± 0.04)]。与 0 h 比较,CHOP 和 P-JNK 表达在软脂酸钠刺激肝细胞 12 h 后,均有不同程度的增加[分别为(0.38 ± 0.06)、(0.35 ± 0.05)],24 h 二者表达继续上调[分别为(0.49 ± 0.03)、(0.51 ± 0.03)],48 h 到高峰[分别为(0.63 ± 0.02)、(0.62 ± 0.05)],任意 2 个时间点蛋白含量比较,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

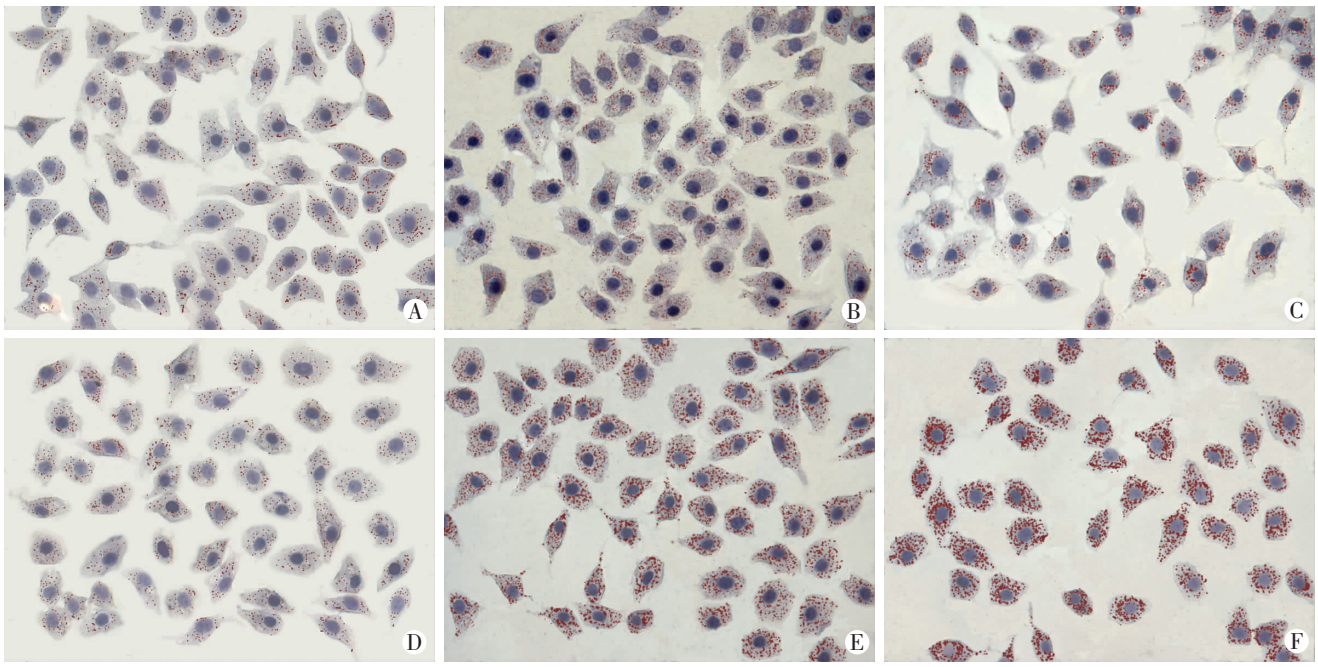


1~4:软脂酸钠刺激肝细胞 0、12、24、48 h

图 3　Western blot 检测软脂酸钠刺激 L02 肝细胞不同时间后 GRP78(A)和 CHOP、p-JNK 蛋白(B)的表达

3　讨论

内质网(endoplasmie reticulum,ER)是真核细胞内重要的亚细胞器,含多种酶系统,参与脂类代谢过程。多种生理或病理条件会引起未折叠蛋白或错误折叠蛋白在 ER 聚集,损伤 ER 的正常生理功能,称为内质网应激。ERS 是细胞启动的一种自我保护反应机制,有利于细胞内环境稳态的恢复和维持细胞存活,但长期持续的 ERS 则可以损伤 ER 的功能,ER 无法恢复平衡时,细胞将启动 ER 相关的凋亡程序[6]。文献报道 ERS 与酒精性肝病、糖尿病、神经元变性等疾病有关,但其与 NAFLD 发病机制之间的关系研究甚少。Lai 等[7]



A、B、C:正常对照组(12、24、48 h);D、E、F:72 μmol/L 软脂酸钠实验组(12、24、48 h)

图 2　油红 O 染色观察各组细胞的脂滴变化　(×400)

在人的胰岛以及鼠INS-1和MIN6细胞的研究中发现，饱和脂肪酸（软脂酸）能够诱导ERS发生，激活ERS凋亡信号通路，致细胞凋亡。肝细胞凋亡与NASH的发生、发展密切相关，但是NASH肝细胞凋亡是否有ERS的参与，目前尚不十分清楚。不同性质的脂肪酸对细胞都具有一定的脂毒性，但是饱和脂肪酸比不饱和脂肪酸更易诱导细胞凋亡[8]。无论在正常人体内，还是NAFLD患者体内，软脂酸都是含量较多的一种饱和脂肪酸[2]。因此，我们用软脂酸钠（饱和脂肪酸）刺激肝细胞株L02，构建NAFLD细胞模型，在该模型中观察脂肪变性肝细胞凋亡以及ERS蛋白的表达。

细胞内TG含量检测和油红O染色结果证实，肝细胞与软脂酸钠（72 μmol/L）共培养12 h后，细胞内TG含量和脂滴变化不明显，24、48 h后，TG含量升高并可见明显脂滴，说明一定浓度的软脂酸钠能够诱导L02肝细胞发生脂肪变性。我们通过Annexin V-PE/7-AAD双标记流式细胞术检测发现，软脂酸钠刺激L02肝细胞24 h后，肝细胞的凋亡率无明显变化，48 h后，凋亡率显著升高，表明软脂酸钠在体外对肝细胞的脂毒性主要是通过诱导其凋亡来实现的。此结果在鼠H4IIE肝癌细胞 、鼠原代脂肪细胞以及鼠INS-1和MIN6细胞中也得到证实[7,9-10]。其作用机制尚不清楚。

Western blot结果显示，GRP78蛋白在L02肝细胞有基础水平的表达，软脂酸钠刺激肝细胞12 h后，GRP78的表达开始增加，48 h达高峰，说明软脂酸钠刺激后的肝细胞发生了明显的ERS。由此，我们推测，软脂酸钠可以诱导肝细胞发生ERS反应，从而介导脂变肝细胞凋亡。过渡ERS启动的细胞凋亡途径（ER-associated death，ERAD）则是近年来才发现的一种不同于经典途径的新的凋亡途径。ERS触发细胞的凋亡机制：活化Caspase-12；活化p-JNK；转录产生CHOP/GADD153（生长停滞及DNA损伤基因），从而导致肝细胞损伤，产生凋亡[11]。由于Caspase-12仅在鼠体内表达，所以我们仅研究了p-JNK和CHOP蛋白的表达。Western blot结果证实，CHOP和p-JNK在肝细胞中表达很低，软脂酸钠刺激肝细胞12 h后，CHOP的表达开始增加，后随时间延长逐渐升高，p-JNK水平也同步增加，提示软脂酸钠刺激后的L02肝细胞不仅发生了明显的ERS反应，同时还启动了ERS相关的凋亡程序。在本实验中，Annexin V-PE/7-AAD双标记流式细胞术和Western blot检测结果已经证实，肝细胞凋亡的发生迟于ERS，表明早期的ERS是一种适应性的反应，增加ER对初生蛋白的加工能力，诱导少量具有功能障碍的细胞凋亡，促进正常肝细胞生存，但是随着应激时间的延长、程度的加剧，早期的ERS反应已不足以保护细胞功能，此时的ERS已成为促进细胞凋亡的重要途径。Puri等[12]在21例单纯性脂肪肝和21例NASH患者的肝脏组织学的检查中发现，ERS都有不同程度的激活，但是在大多数单纯性脂肪肝患者中，凋亡信号通路ATF4-CHOP-GADD34并未激活，这可能与ERS的激活程度有关。

综上所述，本研究从体外实验进一步证实软脂酸钠（饱和脂肪酸）对人肝细胞株L02具有较强的脂毒性，可引起ERS反应。早期的ERS对L02肝细胞具有保护性效应，晚期的ERS通过上调CHOP和p-JNK的表达介导脂肪变性L02肝细胞凋亡，这可能是NAFLD重要的发病机制之一。

参考文献：

[1] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 临床肝胆病杂志, 2010, 26(2): 120-124.

[2] Kim C H, Younossi Z M. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome[J]. Cleve Clin J Med, 2008, 75(10): 721-728.

[3] Marciniak S J, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease[J]. Physiol Rev, 2006, 86(4): 1133-1149.

[4] Schroder M, Kaufman R J. ER stress and the unfolded protein response[J]. Mutat Res, 2005, 569(1/2): 29-63.

[5] 童玉娜，杨聚荣，张建国，等. 内质网应激在大鼠肾小管上皮细胞缺氧复氧损伤炎症反应中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(5): 455-458.

[6] Kapoor A, Sanyal A J. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response[J]. Clin Liver Dis, 2009, 13 (4):581-590.

[7] Lai E, Bikopoulos G, Wheeler M B, *et al*. Differential activation of ER stress and apoptosis in response to chronically elevated free fatty acids in pancreatic beta-cells[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008, 294(3): E540-E550.

[8] Wei Y, Wang D, Gentile C L, *et al*. Reduced endoplasmic reticulum luminal calcium links saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and cell death in liver cells[J]. Mol Cell Biochem, 2009, 331(1/2): 31-40.

[9] Wei Y, Wang D, Pagliassotti M J. Saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis are augmented by trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid in liver cells[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 303(1/2): 105-113.

[10] Guo W, Wong S, Xie W, *et al*. Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007, 293(2): E576-E586.

[11] Rasheva V I, Domingos P M. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis[J]. Apoptosis, 2009, 14(8): 996-1007.

[12] Puri P, Mirshahi F, Cheung O, *et al*. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Gastroenterology, 2008, 134(2): 568-576.

（**收稿**：2011-04-18；**修回**：2011-05-27）

（编辑 王 红）