DOI:10.16016/j.1000-5404.202104150

生长激素受体敲低状态下棕榈酸通过线粒体途径加重肝细胞凋亡

王蕴婷,郑晓雅,陈 月,钱文杰,伍 询,任 伟 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院内分泌内科

[摘要] **目的** 研究生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)敲低后棕榈酸(palmitic acid, PA)增加肝细胞的脂质沉积及其机制。**方法** 构建稳定低表达 GHR 的永生化肝 L02 细胞株,用不同浓度 PA(0、75、150、300 μmol/L)和不同时间(12、24、48 h)处理细胞,检测细胞活力。将实验分为 GHR 敲低(shRNAGHR)组和空载病毒(Vector)组,分别给予 PA 干预,油红"O"、BODIPY 荧光染色观察细胞内脂质沉积;流式细胞仪检测细胞凋亡和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; JC-1 检测线粒体膜电位的变化;MitoSox 荧光检测线粒体内 ROS 水平,Western blot 检测经典线粒体凋亡通路相关蛋白表达;靶向线粒体抗氧化剂 MitoTEMPO 预处理细胞,观察 PA 诱导的 ROS 水平变化及凋亡情况。**结果** PA 抑制 L02 细胞存活率并呈浓度依赖性。与对照组相比,150 μmol/L PA 处理细胞 12、24、48 h,GHR 敲低组细胞内 ROS 水平以及线粒体内 ROS 水平显著升高,细胞凋亡增加。油红"O"、BODIPY 荧光染色均证实 GHR 敲低组细胞在相同 PA 刺激下更易发生脂质聚集。GHR 敲低组细胞线粒体凋亡通路相关蛋白细胞色素 c、Cleaved-Caspase 9、Cleaved-Caspase3、PARP 蛋白水平显著高于 Vector 组。差异均具有统计学意义($P<0.05$)。采用靶向线粒体抗氧化剂 MitoTEMPO 预处理细胞后,敲低组肝 L02 细胞凋亡有明显改善。**结论** 生长激素受体敲低状态下会加重肝细胞脂质沉积和肝细胞凋亡,PA 通过线粒体/ROS 途径发挥重要作用。

[关键词] 生长激素受体敲低;线粒体;活性氧;细胞凋亡
[中图法分类号] R347.511; R363.21; R575.5 [文献标志码] A

Palmitic acid increases apoptosis by mitochondrial pathway in hepatocytes with growth hormone deficiency

WANG Yunting, ZHENG Xiaoya, CHEN Yue, QIAN Wenjie, WU Xun, REN Wei Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the specific molecular mechanisms of palmitic acid (PA)-induced lipid deposition in cultured hepatocytes with knockdown of growth hormone receptor (GHR). **Methods** Hepatic L02 cells were treated with different concentrations of PA (0, 75, 150 and 300 μmol/L) for 12, 24, and 48 h, respectively, and cell viability was measured. Then the L02 cells were transinfected with GHR-lentiviral vector (shRNAGHR group) or control vector (vector group). Oil red "O" staining and boron-dipyrromethene (BODIPY) fluorescence staining were used to observe lipid deposition. Flow cytometry was employed to detect the apoptosis and production of reactive oxygen species (ROS). JC-1 mitochondrial membrane potential assay was applied to detect the changes in membrane potential. MitoSox fluorescence was used to detect mitochondrial ROS level. Western blotting was carried out to measure mitochondrial-mediated apoptotic protein expression. After pretreated with targeted mitochondrial antioxidant, mitoTEMPO, the cells were further observed whether it could offset PA-induced changes in ROS level and apoptosis. **Results** PA inhibited the survival rate of the L02 cells in a concentration-dependent manner. Compared with the control

[通信作者] 任 伟,E-mail:renwei67@sina.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

group, treatment of 150 μmol/L PA for 12, 24, and 48 h resulted in significantly increased intracellular ROS level, mitochondrial ROS level and cell apoptosis in the shRNAGHR. Oil red "O" staining and BODIPY fluorescence confirmed that shRNAGHR group was more prone to lipid deposition with same dose of PA stimulation. Western blotting showed the levels of cytochrome C protein, Cleaved-Caspase 9, Cleaved-Caspase 3, and polymerase (PARP) were significantly higher in the shRNAGHR group than the vector group ($P<0.05$). Pretreatment of targeted mitochondrial antioxidant mitoTEMPO significantly ameliorated shRNAGHR induced cells apoptosis. **Conclusion** Knockdown of GHR aggravates lipid deposition and apoptosis in hepatocytes, and PA plays an important role in the process through mitochondria/ROS pathway.

[**Key words**] growth hormone receptor knockdown; mitochondria; reactive oxygen species; apoptosis

Correspondence author: REN Wei, E-mail: renwei67@sina.com

生长激素(growth hormone,GH)是一种由腺垂体分泌的肽类激素,其通过血液作用于全身,主要通过血液循环作用于肝脏的生长激素受体(growth hormone receptor, GHR),结合后促进肝内胰岛素样生长因子-1(insulin growth factor-1,IGF-1)分泌,对人体的生长和代谢起着重要作用[1-3]。近年来越来越多的证据表明体内生长激素的缺乏与非酒精性脂肪肝的发生密切相关,早期补充生长激素可以一定程度改善患者代谢紊乱。有研究表明肝脏特异性敲低生长激素受体的小鼠更容易发生脂肪肝,而有效的生长激素替代治疗可以改善小鼠的血清转氨酶以及肝脏组织形态学的变化[4]。垂体功能减退患者的非酒精性脂肪肝发生率明显高于正常人,一项儿童起病的生长激素缺乏患者的研究中,患者10年非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发生率为20%,20年NAFLD的发生率超过了30%[5],成人生长激素缺乏症(adult growth hormone deficiency, AGHD)患者有效的补充GH可以改善患者肝酶水平,甚至逆转NAFLD纤维化[6]。因此,我们推测GH可能是AGHD患者人群NAFLD发生的主要因素之一。

线粒体作为一种重要的膜性细胞器为细胞和机体提供能量,调节细胞生理过程,线粒体结构功能的完整性才能保证细胞的正常功能和工作[7-8]。当细胞受到外界不当的刺激,过度的ROS产生打破线粒体能量代谢的平衡,通过氧化应激诱导细胞发生线粒体凋亡[9-10]。随着人们生活习惯及饮食结构的改变,非酒精性脂肪肝的发生率越来越高,在最经典的"二次打击学说中",线粒体功能降低加剧肝细胞的氧化应激程度,引起肝脏的脂质沉积,导致肝细胞凋亡。我们既往研究表明,AGHD患者内脏脂肪指数明显高于正常人[11],并且生长激素受体敲低状态下的肝细胞更容易发生脂肪沉积。本研究旨在研究生长激素受体敲低后肝细胞可能发生的线粒体的凋亡通路,以期为临床诊治提供较好的实验支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

棕榈酸(palmitic acid,PA)、二甲基亚砜(DMSO)、苏木精染液、油红"O"、BODIPY均购自美国Sigma公司;RPMI1640培养基购自美国Gibco公司;青霉素-链霉素溶液、胰蛋白酶、蛋白提取试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、BCA蛋白提取试剂盒、JC-1荧光探针、DAPI均购自中国上海碧云天生物技术公司;PVDF膜购自美国Millipore公司;引物、TRIzol、cDNA扩增及逆转录试剂盒、SYBR Green qPCR Mix染料均购自TaKaRa生物工程公司;CCK-8比色试剂盒购自日本东仁公司;MitoSox荧光探针购自Invitrogen公司;β-actin及β-Tublin购自天津三箭生物技术公司;Bcl-2单克隆抗体、Cleaved-Caspase9单克隆抗体、Cleaved-Caspase3单克隆抗体、PRRP单克隆抗体购自CST公司;Bax单克隆抗体购自Proteintech公司;山羊抗兔lgG二抗(HRP标记)、山羊抗鼠lgG二抗(HRP标记)购自中山金桥公司,细胞色素c单克隆抗体购自Abcam公司,DHE荧光试剂盒购自中国凯基公司,FITC Annexin V凋亡试剂盒、PE Annexin凋亡试剂盒购自美国BD公司,ECL发光试剂盒购自美国Advansta。

1.2 方法

1.2.1 肝L02细胞的分组和处理 实验分组①:对照组(Ctrl),空载病毒组(Vector),GHR敲低组(shRNAGHR)。实验分组②:对照组(Ctrl),75 μmol/L PA组,150 μmol/L PA组,300 μmol/L PA组。实验分组③:空载病毒组(Vector Ctrl),空载体病毒干预12 h组(Vector PA 12 h),空载体病毒干预24 h组(Vector PA 24 h),空载体病毒干预48 h组(Vector PA 48 h),

GHR 敲低组(shRNAGHR Ctrl),GHR 敲低 PA 干预 12 h 组(shRNAGHR PA 12 h),GHR 敲低 PA 干预 24 h 组(shRNAGHR PA 24 h),GHR 敲低 PA 干预 48 h 组(shRNAGHR PA 48 h)。实验分组④:空载病毒组(Vector),空载体病毒 PA 干预组(Vector+PA),GHR 敲低组(shRNAGHR),GHR 敲低 PA 干预组(shRNAGHR + PA)。实验分组⑤:GHR 敲低组(shRNAGHR),GHR 敲低 PA 干预组(PA),GHR 敲低 Mitotempo 干预组(Mitotempo),GHR 敲低组 PA + Mitotempo 干预组(PA+Mitotempo)。

1.2.2 细胞培养以及 GHR 慢病毒转染 永生化人正常肝 L02 细胞株购于通派(上海)生物科技公司,本实验室保存。肝 L02 细胞用 10% 灭活的胎牛血清、1 000 U/L 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基在 37 ℃、5% CO_2 培养箱内传代培养,用于后续实验。

本课题组前期已构建生长激素受体敲低慢病毒序列,选取的人 GHR 基因序列为 GenBank NM_001242399,由上海吉凯基因化学技术有限公司合成 GHR 干扰序列,正义链分别为:5′-ATCTGGATACCTTATTGTA-3′;反义链分别为:5′-TACAATAAGGTATCCAGATGG-3′,并且验证该序列有效。取对数生长期的 L02 细胞于转染前 1 d 接种于 6 孔板,按照说明书确定的感染复数(multiplicity of infection,MOI)加入 GHR 敲低慢病毒与对照空载病毒感染细胞(MOI = 30),加入 5 μg/mL 的转染增敏剂凝聚胺(polybrene)。12 h 后更换完全培养基,72 h 后加入嘌呤霉素(1.0 μg/mL)进行压力筛选,即获得稳定的 GHR 敲低组以及空载病毒组细胞株。相关实验按照实验分组①分为 3 组。

1.2.3 PA 对 L02 细胞的干预条件 按照实验分组②将细胞分为 4 组,当 L02 细胞汇合率达 70%~80% 时分别加入含有不同浓度 PA(终浓度分别为 0、75、150、300 μmol/L)的完全培养基培养 12、24、48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 反应液,在培养箱内继续培养 2 h。酶标仪 450 nm 测光密度值 $D(450)$,绘制生存曲线计算细胞存活率。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞活性氧与凋亡水平 将细胞均匀铺在 12 孔板内,待细胞贴壁后,用含有 150 μmol/L PA 的完全培养基培养细胞 12、24、48 h;用不含 EDTA 的胰消化酶消化细胞离心,收集细胞,PBS 洗涤细胞,200 mL PBS 重悬细胞,采用 DHE 荧光试剂盒检测 ROS 水平,采用 FITC Annexin V 凋亡试剂盒检测细胞凋亡水平。相关实验按照实验分组③分为 8 组。

1.2.5 Mitosox 染色检测线粒体内活性氧水平 按照实验分组④将细胞分为 4 组,种于 12 孔板爬片中,PA 干预 24 h 后去除培养基,PBS 润洗 3 次,加入配制好的 Mitosox 染色工作液 500 mL/孔,培养箱内避光孵育 30 min,PBS 润洗 3 次洗去多余染料,荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.6 Western blot 检测相关凋亡蛋白的表达 按照实验分组④将细胞分为 4 组,加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 10 min,超声 10~15 次,4 ℃离心机、12 000 ×g 离心 20 min,收集上清,使用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒进行蛋白浓度的测定,分离胶使用 8%(PARP)、12%(细胞色素 c、Cleaved-Caspase9、Cleaved-Caspase3、bax、bcl-2),上样量为 40 μg。10% SDS-PAGE 电泳,250 mA 电转;取出 PVDF 膜,浸泡在相应的一抗中,4 ℃孵育过夜;TBST 漂洗 10 min×5 次,加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 60 min,浸泡于 ECL 发光试剂盒显色,凝胶成像图像分析系统显像,Fusion 软件进行灰度定量分析。实验重复 3 次。

1.2.7 油红"O"染色与 BODIPY 荧光染色检测细胞内脂质沉积 按照实验分组④将细胞分为 4 组,种于 12 孔板爬片中,PA 干预 24 h 后去除培养基,PBS 润洗 3 次;4% 多聚甲醛固定 1~2 h;油红避光染色 30 min;流水冲洗,60% 异丙醇漂洗 1 次;苏木精避光染色 2~5 min,流水冲洗;甘油明胶封片;避光配制 BODIPY 染液(10 μg/mL),每孔 500 μL 放于孵箱内孵育 1 h;PBS 润洗 3 次后使用 DAPI 染核,抗荧光淬灭剂封片。显微镜下采集图像。

1.2.8 细胞内 ATP 水平检测 按照实验分组④将细胞分为 4 组,种于 6 孔板中,吸除培养基 PBS 润洗 3 次,加入裂解液反复吹打后 4 ℃ 12 000×g 离心 5 min,取上清,配制 ATP 检测工作液到 96 孔板内,室温放置 3~5 min 使本底性的 ATP 全部消耗,再在检测孔内加入 20 μL 待测样本以及标准品,使用化学荧光酶标仪检测光密度值,根据标准曲线计算细胞内 ATP 水平。

1.2.9 JC-1 检测细胞线粒体膜电位 按照实验分组④将细胞分为 4 组,细胞经过 PA 干预 24 h 后去除培养基,PBS 清洗 3 次,加入 1 mL 的细胞培养液,按照说明书配制 JC-1 工作液(300 nmol/L),剧烈振荡充分溶解并混匀 JC-1,再加入 1 mL 配制好的 JC-1 染色工作液,避光孵育 30 min,孵育结束后洗出上清,用 JC-1 缓冲液洗涤 2 次,加入细胞培养液,荧光显微镜下观察 JC-1 单体(JC-1 monomers)与 JC-1 聚合体(JC-1 aggregates)并采集图像。

1.2.10　Mitotempo 干预细胞　　按照实验分组⑤将细胞分为 4 组,将 Mitotempo 粉末用无菌 PBS 溶解,配制终浓度为 100 nmol 工作液,首先预处理 shRNAGHR 组细胞 2 h,再用 PA 干预 24 h 后去除培养基,流式细胞仪以及 Western blot 检测细胞凋亡变化。

1.3　统计学分析

采用 GrapgPad 7.0,SPSS 22.0 统计软件,资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。全部试验重复次数≥3 次,3 组及以上比较采用单因素方差分析,组间进一步两两分析采用 Turkey 法。两组之间比较采用 t 检验,设检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　不同浓度 PA 对细胞活力的影响以及慢病毒敲低生长激素受体效果验证

在一定浓度范围内 PA 干预后,细胞存活率呈浓度依赖性下降($P<0.05$,图 1A)。结果显示,PA 对肝细胞具有一定的细胞毒性作用。PA 浓度 150 μmol/L,干预 24 h 后细胞率存活约 70%,故在后续的实验中选取该浓度来观察脂质沉积以及线粒体凋亡通路相关蛋白变化。

感染慢病毒后生长激素受体基因敲低效率>70%,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 1B),提示稳定低表达生长激素受体的肝细胞模型建立成功。

2.2　敲低 GHR 对细胞凋亡及 ROS 水平的影响

分析 PA 干预 shRNAGHR 组与 Vector 组不同时间点的凋亡以及 ROS 水平,结果显示,与 Vector 组相比,GHR 敲低组细胞在 PA 干预 12、24、48 h 后凋亡细胞数明显高于 Vector 组(图 2A、C),细胞内 ROS 平均荧光值均高于 Vector 组(图 2B、D),差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3　敲低 GHR 对线粒体膜电位、线粒体内 ROS、ATP 以及脂质沉积的影响

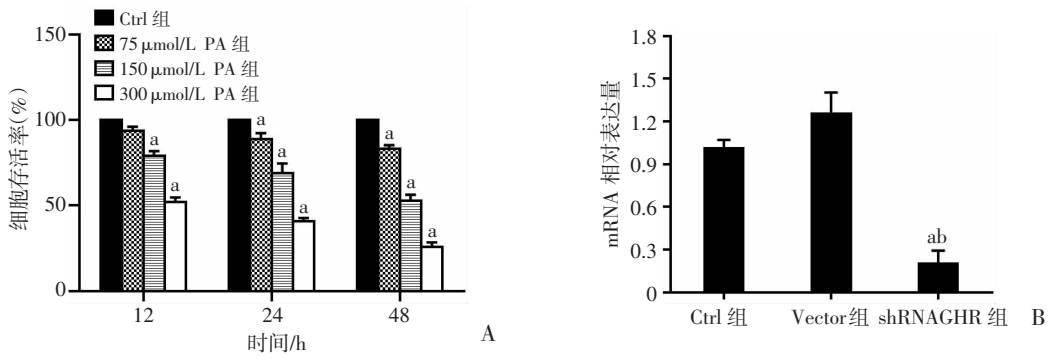
图 3A 中证实了 PA 干预后,敲低 GHR 的肝细胞 JC-1 染色复合体与单体比率明显下降,提示细胞线粒体膜电位去极化损伤更加严重;图 3B 提示与 Vector 组相比,敲低 GHR 组在 PA 干预细胞后线粒体内 ROS 明显增加。同时 PA 干预敲低 GHR 组细胞后,ATP 水平明显更低,证实了线粒体功能受损,利用 ROS 产生 ATP 的能力下降,细胞内氧自由基清除能力受损(图 3C),以上组间差异均有统计学意义($P<0.05$)。

GHR 敲低组与 Vector 组相比肝细胞内油红颗粒聚集更加明显,BODIPY 胞质内荧光染色脂质颗粒更丰富,提示 PA 干预敲低 GHR 的肝细胞更容易发生脂质沉积(图 3D)。

Western blot 检测结果显示(图 4):PA 干预 GHR 敲低的肝细胞后,细胞色素 c 产生更多,并且 Cleaved-Caspase9、Cleaved-Caspase3 以及 PARP 与 Vector 组比较都明显增多,并且差异具有统计学意义($P<0.05$);GHR 敲低的肝细胞在 PA 的干预下,Bax 蛋白集聚以及 bcl-2 蛋白的减少($P<0.05$)。以上结果均提示,GHR 敲低加重肝细胞凋亡是通过线粒体途径实现的。

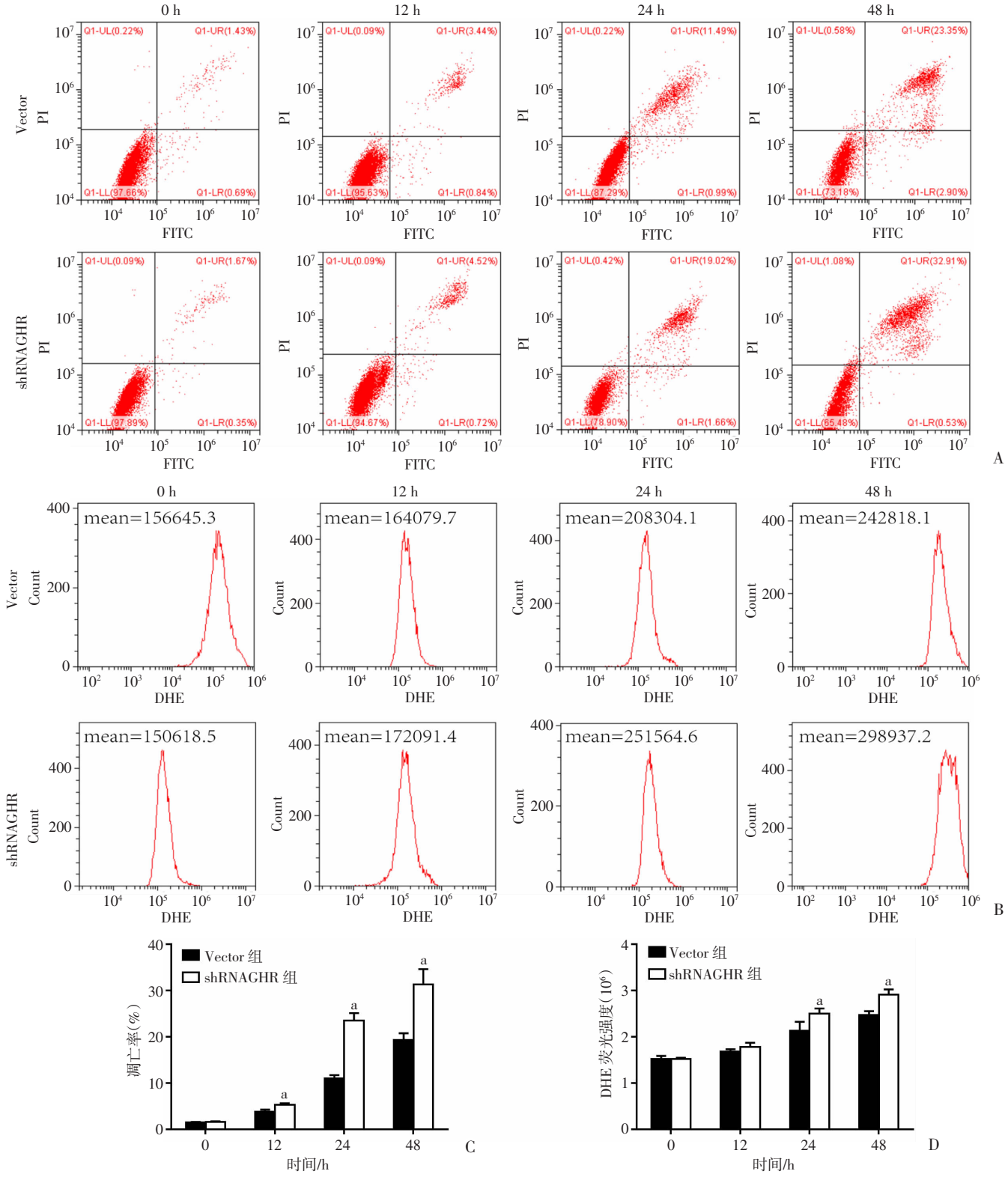
2.4　Mitotempo 处理对细胞凋亡的影响

为了探究 PA 诱导的线粒体 ROS 加重 GHR 敲低细胞凋亡的作用,我们使用 Mitotempo 特异性清除线粒体内 ROS,结果提示肝细胞凋亡数明显下降,并且 Cleaved-Caspase3 蛋白也有明显的合成减少($P<0.05$,图 5),表明 Mitotempo 抑制了 GHR 敲低介导的肝细胞凋亡。以上结果表示,线粒体抗氧化剂的预处理可以对抗 GHR 敲低加重的细胞凋亡,GHR 敲低加重肝细胞的凋亡是通过线粒体途径实现的,并且线粒体的 ROS 产生介导了 GHR 敲低的肝细胞凋亡。



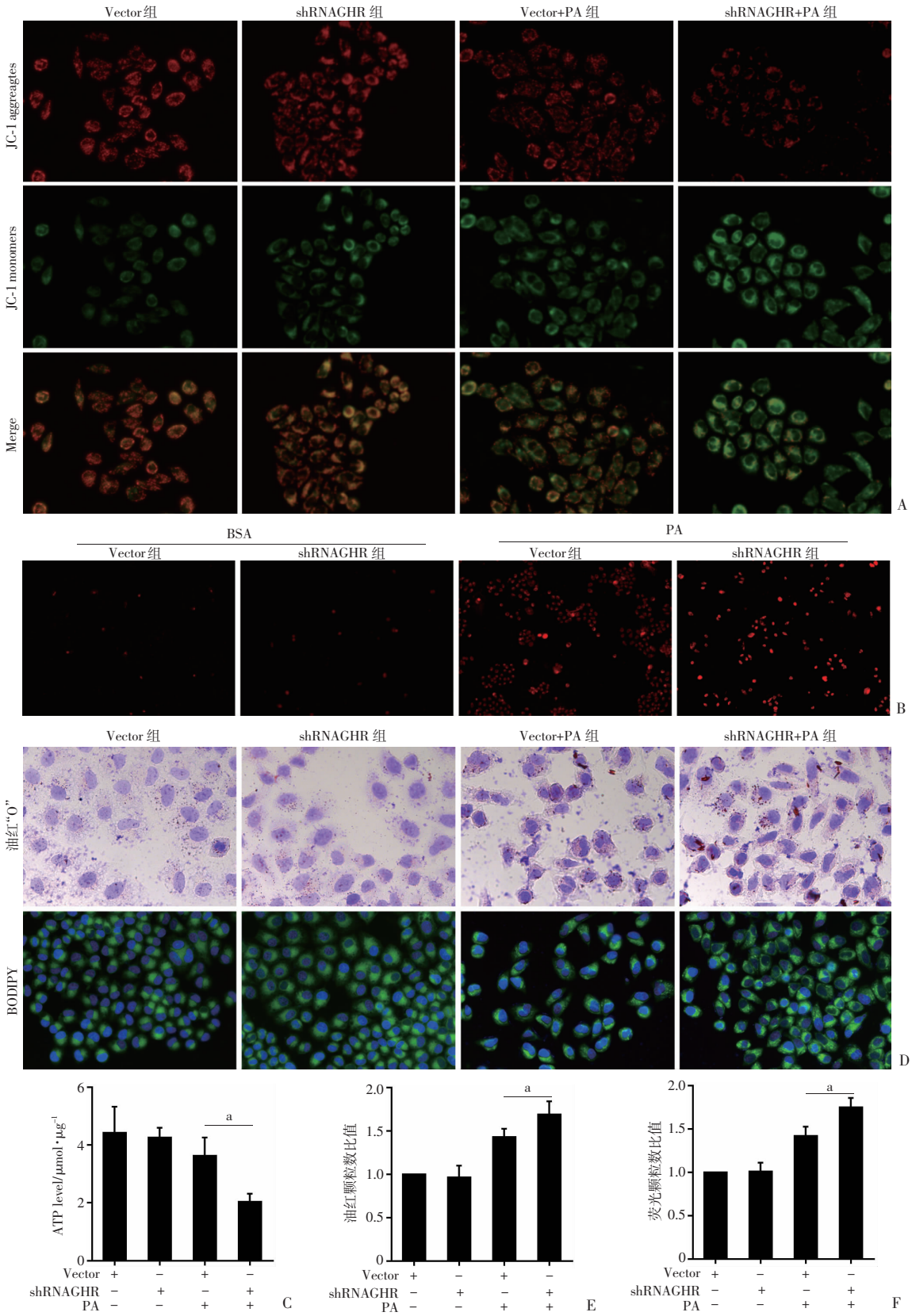
a:$P<0.05$,与 Ctrl 组比较;b:$P<0.05$,与 Vector 组比较　A:CCK-8 分析 PA 对 L02 细胞增殖影响;B:慢病毒转染后细胞 mRNA 表达

图 1　PA 对正常肝 L02 细胞活力的影响及重组慢病毒转染 L02 细胞抑制 GHR 表达



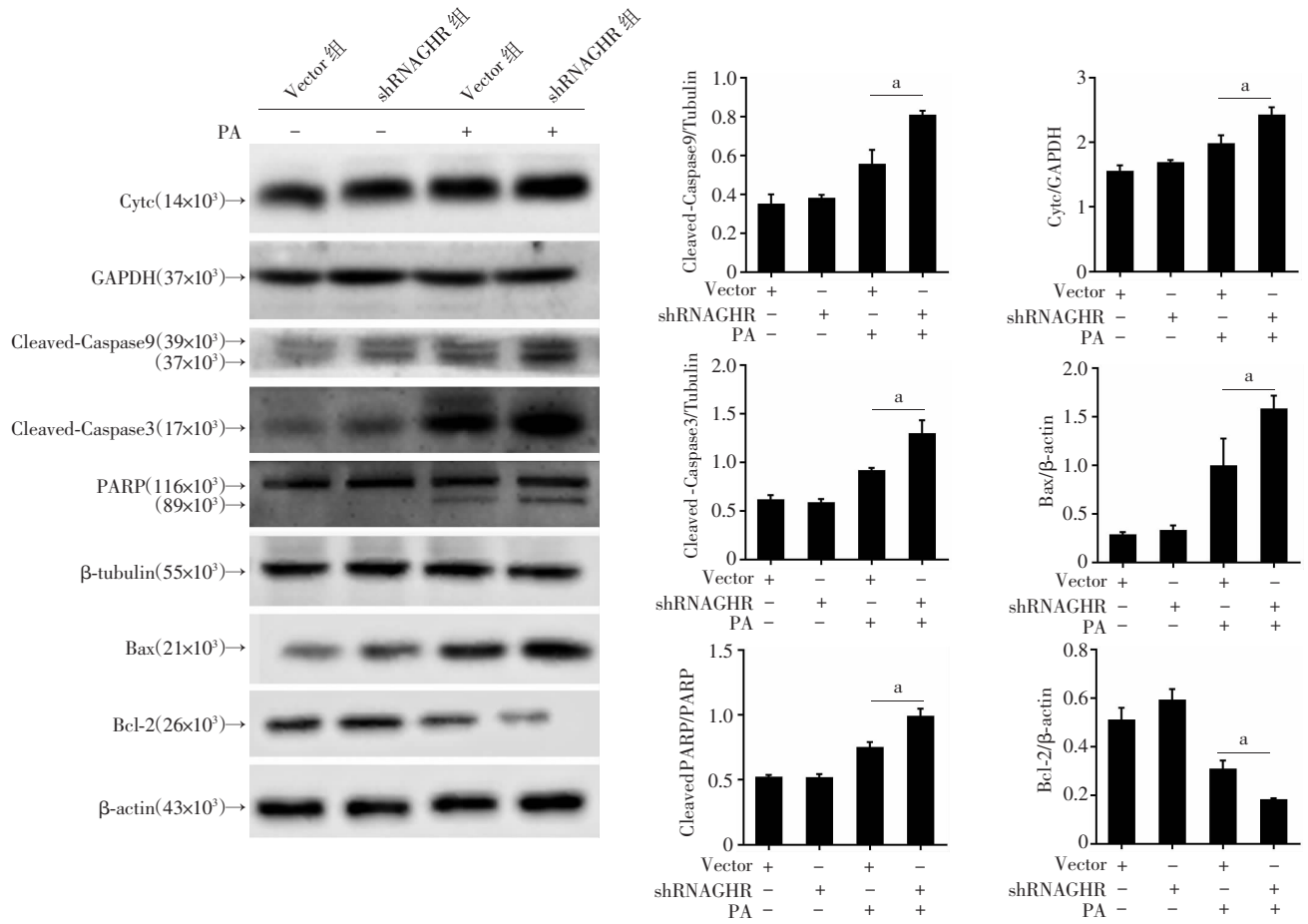
A:流式细胞仪检测细胞凋亡率;B:流式细胞仪检测细胞 ROS 水平;C:凋亡率定量分析;D:ROS 荧光强度定量分析 a:$P<0.05$,与 Vector 组比较

图 2 流式细胞仪检测 PA 干预 shRNAGHR 组与 Vector 组细胞不同时间的凋亡及 ROS 水平



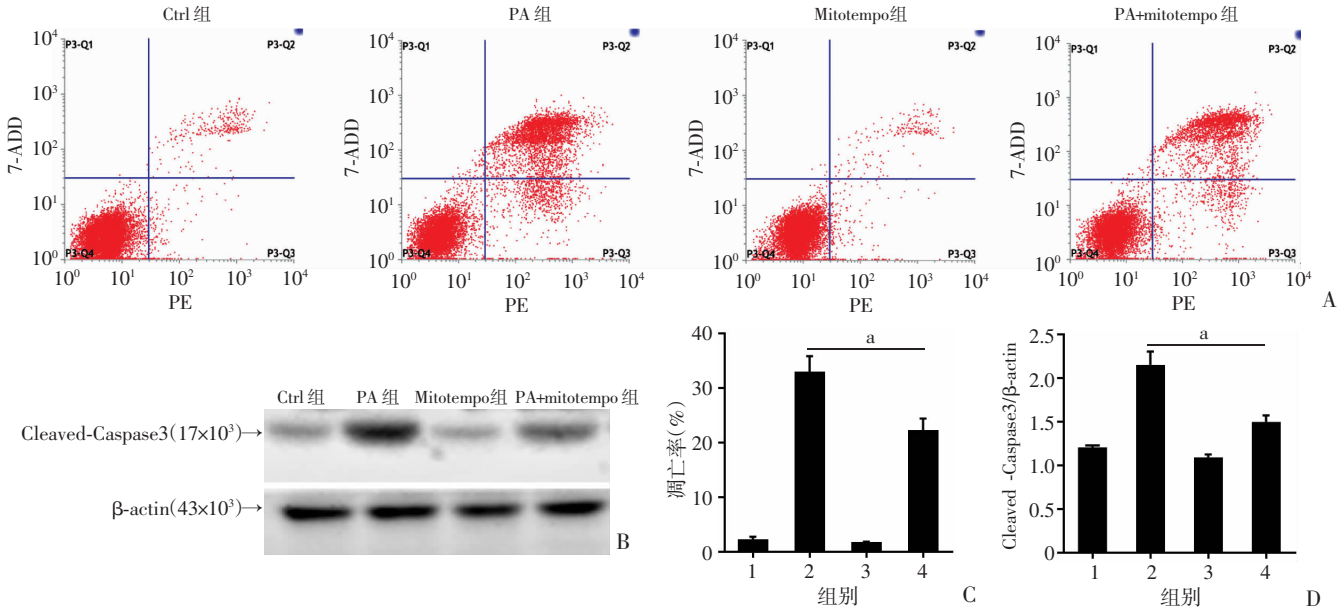
A:JC-1 染色检测细胞线粒体膜电位(×400);B:MitoSox 染色检测细胞线粒体 ROS(×50);C:ATP 水平测定;D:油红"O"染色与 BODIPY 荧光染色检测脂肪颗粒(×400);E:油红"O"染色颗粒定量分析;F:BODIPY 荧光颗粒定量分析 a:$P<0.05$

图 3 敲低 GHR 对线粒体膜电位、线粒体 ROS、ATP 以及脂肪沉积影响



a: $P<0.05$

图 4 Western blot 检测各组细胞相关凋亡蛋白表达



A: 流式细胞仪检测细胞凋亡;B: Western blot 检测细胞相关凋亡蛋白表达;C:凋亡率定量分析;D:蛋白定量分析 1:Ctrl 组;2:PA 组;3:Mitotempo 组;4:PA+mitotempo 组;a: $P<0.05$

图 5 Mitotempo 处理减轻 PA 干预 shRNAGHR 细胞的凋亡

3 讨论

生长激素作用广泛,生物效应复杂,对机体的一系列代谢过程具有重要影响。生长激素可以促进脂肪分解,抑制脂肪合成,促进游离的脂肪酸进入循环代谢[12-14]。非酒精性脂肪肝通常是代谢综合征及其合并症的肝病表现,一项大型横断面研究表明,普通人群血清生长激素水平与非酒精性脂肪肝发病率呈明显负相关;与健康人相比,患有非酒精性脂肪肝的人群中血清生长激素水平更低,在相关性分析中生长激素水平与血脂、血糖、腰围等代谢性指标呈明显负相关[15],以上研究均证实,生长激素缺乏可能是非酒精性脂肪肝发病的危险因素,在非酒精性脂肪肝的病程中扮演重要作用。我们既往研究中也证实,成人生长激素缺乏患者的内脏脂肪以及内脏脂肪指数均高于正常对照组人群,而肌肉组织重量明显低于正常对照组[16-17]。本研究中生长激素受体敲低的状态下,PA 会加重肝细胞脂质聚集,诱导肝细胞发生凋亡。

凋亡是细胞为维持内环境稳定出现的自发性的死亡过程,是一种主动、高度有序、基因控制、信号依赖以及一系列酶参与的过程,在维持组织细胞内环境稳态和控制感染方面起着重要作用[18]。ROS 产生和消耗主要发生在线粒体内,病理状态下,ROS 产生与清除失调,在细胞内堆积过多,活性氧自由基可以与多不饱和脂肪酸过氧化反应生成过氧化脂质,该过程会导致一系列毒性作用包括细胞内蛋白以及酶变形、DNA 氧化修饰、生物膜脂质过氧化,增加细胞对外界刺激的敏感性,从而导致肝细胞更容易发生凋亡[19],但在 GHR 缺乏状态下 ROS 是否通过线粒体途径加重肝细胞凋亡目前尚少见研究报道。本研究观察 PA 干预后 shRNAGHR 组与 Vector 组细胞的 ROS 与细胞凋亡水平都呈现浓度依赖性增加,但是 GHR 敲低组的细胞内 ROS 更易堆积,凋亡细胞数目明显增加,特异性线粒体抗氧化剂 mitotempo 预处理细胞明显改善了 PA 诱导的 shRNAGHR 肝细胞凋亡,表明 GHR 敲低加重肝细胞凋亡可能是由过量线粒体 ROS 累积,导致线粒体结构功能发生障碍,导致敲低 GHR 的肝细胞凋亡程度更明显,证实了来源于线粒体的氧化应激介导了 GHR 降低带来的肝细胞凋亡。同时,线粒体膜电位是线粒体发挥功能的重要保证,线粒体膜电位去极化代表线粒体凋亡的早期发生。本研究中 shRNAGHR 肝细胞在 PA 干预后 JC-1 复合体与单体比率明显下降,膜电位去极化更严重,代表了线粒体膜功能完整性缺失更严重,触发细胞色素 c 更容易从损伤的线粒体释放,从而激活下游 Caspase 级联反应和线粒体介导的细胞凋亡。

线粒体凋亡通路是由线粒体损伤触发。含半胱氨酸的天冬氨酸水解酶(Caspase)分为凋亡启动因子、凋亡执行因子和炎症介导因子,细胞色素 c 从线粒体被释放到细胞质,募集启动因子 Caspase9 到凋亡小体继而发生凋亡级联反应,累及下游关键执行因子 Caspase3 活化,从而导致细胞凋亡[20-22]。PARP 是 Caspase 的切割底物,其发生活化剪切形式被认为是线粒体凋亡通路激活的一个重要指标。Bax 与 bcl-2 蛋白正常情况下结合在线粒体膜上,不同的比例变化对线粒体凋亡通路也起着至关重要的作用,控制着整个凋亡过程[23-24]。本研究中,PA 干预 24 h 后,shRNAGHR 组细胞活化形式的 Caspase3、Caspase9 以及 PARP 均呈现明显的升高,同时 Bax 与 Bcl-2 比值也明显高于对照组,这些结果显示,敲低生长激素受体的肝细胞发生更严重的凋亡,是通过线粒体凋亡途径产生的。既往有动物研究证实肝脏特异敲除 GHR 基因或者 IGF-1 的小鼠中,肝脏的脂质沉积加重,可能与凋亡相关,但是该研究未进一步阐述是否通过线粒体途径引起凋亡[25]。

综上,本研究通过体外细胞实验观察生长激素受体敲低状态下 PA 对肝细胞的功能影响以及机制,GHR 敲低会加重肝细胞的凋亡,诱导脂质沉积加剧。清除线粒体中 ROS 可以明显改善 GHR 加重的细胞凋亡。然而,本实验由于试剂限制,没有进行外源性生长激素干预实验,但在实验过程中,我们观察到 shRNAGHR 组细胞生长速度较 Vector 组明显缓慢,我们推测在细胞培养基与胎牛血清中可能存在某些生长因子或者短肽类物质作用于生长激素受体促进细胞生长,后续工作仍需进一步研讨体内生长激素受体敲低状态下线粒体介导的凋亡的通路关系,以期能为 AGHD 患者更易发生非酒精性脂肪肝这一临床现象提供良好的理论基础。

参考文献:

[1] ABDU T A, NEARY R, ELHADD T A, *et al*. Coronary risk in growth hormone deficient hypopituitary adults: increased predicted risk is due largely to lipid profile abnormalities[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2001, 55(2): 209-216. DOI:10.1046/j.1365-2265.2001.01320.x.

[2] MURRAY R D, ADAMS J E, SHALET S M. Adults with partial growth hormone deficiency have an adverse body composition[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(4): 1586-1591. DOI:10.1210/jc.2003-030761.

[3] VIJAYAKUMAR A, NOVOSYADLYY R, WU Y, *et al*. Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism[J]. Growth Horm IGF Res, 2010, 20(1): 1-7. DOI:10.1016/j.ghir.2009.09.002.

[4] MUELLER K M, KORNFELD J W, FRIEDBICHLER K, *et al*. Impairment of hepatic growth hormone and glucocorticoid receptor signaling causes steatosis and hepatocellular carcinoma in mice[J]. Hepatology, 2011, 54(4): 1398-1409. DOI:10.1002/hep.24509.

[5] FUKUDA I, HIZUKA N, YASUMOTO K, *et al*. Metabolic co-morbidities revealed in patients with childhood-onset adult GH deficiency after cessation of GH replacement therapy for short stature[J]. Endocr J, 2008, 55(6): 977-984. DOI: 10.1507/endocrj.k08e-079.

[6] TAKAHASHI Y, IIDA K, TAKAHASHI K, *et al*. Growth hormone reverses nonalcoholic steatohepatitis in a patient with adult growth hormone deficiency[J]. Gastroenterology, 2007, 132(3): 938-943. DOI:10.1053/j.gastro.2006.12.024.

[7] SCHEFFLER I E. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives[J]. Mitochondrion, 2001, 1(1): 3-31. DOI:10.1016/s1567-7249(00)00002-7.

[8] SCHEFFLER I E. Mitochondria make a come back[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 49(1/2): 3-26. DOI:10.1016/s0169-409x(01)00123-5.

[9] MARCHI S, GIORGI C, SUSKI J M, *et al*. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging[J]. J Signal Transduct, 2012, 2012: 329635. DOI: 10.1155/2012/329635.

[10] SHIH C M, KO W C, WU J S, *et al*. Mediating of caspase-independent apoptosis by cadmium through the mitochondria-ROS pathway in MRC-5 fibroblasts[J]. J Cell Biochem, 2004,91(2):384-397. DOI: 10.1002/jcb.10761.

[11] XIE X, LI Q, ZHANG L M, *et al*. Lipid accumulation product, visceral adiposity index, and Chinese visceral adiposity index as markers of cardiometabolic risk in adult growth hormone deficiency patients: a cross-sectional study[J]. Endocr Pract, 2018, 24(1): 33-39. DOI:10.4158/EP-2017-0007.

[12] BREDELLA M A, KARASTERGIOU K, BOS S A, *et al*. GH administration decreases subcutaneous abdominal adipocyte size in men with abdominal obesity[J]. Growth Horm IGF Res, 2017, 35: 17-20. DOI:10.1016/j.ghir.2017.06.001.

[13] TROIKE K M, HENRY B E, JENSEN E A, *et al*. Impact of growth hormone on regulation of adipose tissue[J]. Compr Physiol, 2017, 7(3): 819-840. DOI: 10.1002/cphy.c160027.

[14] WANG Y T, ZHENG X Y, XIE X, *et al*. Correlation of increased serum adipsin with increased cardiovascular risks in adult patients with growth hormone deficiency[J]. Endocr Pract, 2019, 25(5): 446-453. DOI:10.4158/EP-2018-0541.

[15] XU L, XU C, YU C, *et al*. Association between serum growth hormone levels and nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study[J]. PLoS ONE, 2012, 7(8): e44136. DOI:10.1371/journal.pone.0044136.

[16] QING L, WEI R, CHAN L, *et al*. Sensitivity of various body indices and visceral adiposity index in predicting metabolic syndrome among Chinese patients with adult growth hormone deficiency[J]. J Endocrinol Invest, 2017, 40(6): 653-661. DOI:10.1007/s40618-017-0621-2.

[17] ZHENG X, CHENG Q, LONG J, *et al*. Prevalence of low lean mass in patients with adult growth hormone deficiency with or without low-dose growth hormone therapy[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2019, 90(6): 834-841. DOI: 10.1111/cen.13958.

[18] JIANG X, LIAO X H, HUANG L L, *et al*. Overexpression of augmenter of liver regeneration (ALR) mitigates the effect of H_2O_2-induced endoplasmic Reticulum stress in renal tubule epithelial cells[J]. Apoptosis, 2019, 24(3/4): 278-289. DOI:10.1007/s10495-019-01517-z.

[19] RIVES C, FOUGERAT A, ELLERO-SIMATOS S, *et al*. Oxidative stress in NAFLD: role of nutrients and food contaminants[J]. Biomolecules, 2020, 10(12): E1702. DOI:10.3390/biom10121702.

[20] PORTER A G, JÄNICKE R U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(2): 99-104. DOI:10.1038/sj.cdd.4400476.

[21] RIEDL S J, SHI Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(11): 897-907. DOI:10.1038/nrm1496.

[22] HUANG Y, DONG F, DU Q, *et al*. Swainsonine induces apoptosis through mitochondrial pathway and caspase activation in goat trophoblasts[J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(7): 789-797. DOI:10.7150/ijbs.9168.

[23] HSU Y T, WOLTER K G, YOULE R J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(8): 3668-3672. DOI:10.1073/pnas.94.8.3668.

[24] KUWANA T, MACKEY M R, PERKINS G, *et al*. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane[J]. Cell, 2002, 111(3): 331-342. DOI:10.1016/s0092-8674(02)01036-x.

[25] NISHIZAWA H, TAKAHASHI M, FUKUOKA H, *et al*. GH-independent IGF-I action is essential to prevent the development of nonalcoholic steatohepatitis in a GH-deficient rat model[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 423(2): 295-300. DOI:10.1016/j.bbrc.2012.05.115.

(收稿:2021-04-22;修回:2021-07-16)

(编辑 吴培红)