基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1338-03

甘氨脱氧胆酸盐诱导人正常肝细胞株 HL-7702 凋亡过程中 caspase-3,8 活性与 mRNA 表达水平变化

传良敏,黄文芳,饶绍琴,洪 华,邓 君,杨永长
(四川省医学科学院·四川省人民医院检验科,成都 610072)

【摘 要】目的:观察甘氨脱氧胆酸盐(Glycodeoxycholate,GCDC)诱导人正常肝细胞株 HL-7702 凋亡过程中 caspase-3,8 活性与 mRNA 表达水平的变化,探讨 GCDC 诱导肝细胞凋亡的机制。方法:体外培养 HL-7702 细胞,不同浓度的 GCDC 为处理因素,用 Annexin V-FITC/PI 双染色法结合流式细胞技术仪检测细胞凋亡率,比色法测定 caspase-3,8 活性,RT-PCR 检测 caspase-3,8mRNA 表达水平。结果:100~250 μmol/L 的 GCDC 处理 HL-7702 细胞 24 h 后,其细胞凋亡率、caspase-3,8 活性与 mRNA 表达水平明显升高,并与 GCDC 呈浓度依赖性。结论:caspase-3,8 参与 GCDC 诱导 HL-7702 细胞凋亡的调控,GCDC 通过活化 caspase-8,并进一步活化 caspase-3 从而诱导肝细胞凋亡。

【关键词】甘氨脱氧胆酸盐;细胞凋亡;Caspase
【中国图书分类法分类号】R575 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-02-26

Changes in caspase-3,8 activity and mRNA expression of normal human hepato-cyte HL-7702 cell in the process of apoptosis induced by glycodeoxycholate

CHUAN Liang-min, et al
(*Department of Clinical Laboratory, Sichuan Medical Science Academy, Sichuan Provincial People's Hospital*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the apoptosis and changes of caspase-3,8 activity and mRNA expression induced by glycodeoxycholate (GCDC) in cultured normal human hepatocyte HL-7702 cell in vitro and to explore the possible mechanism of hepatocyte apoptosis. *Methods*: HL-7702 cells were cultured with GCDC, the final concentration of which were 100、150、200 and 250 μmol/L respectively. The apoptosis ratio of HL-7702 cell was determined by Annexin V-FITC/PI double staining. Colorimetric method was used to measure caspase-3,8 activity. The expression of caspase-3,8 mRNA was determined by RT-PCR. *Results*: When hepatocytes were incubated with GCDC for 24 hours, the apoptotic ratio of hepatocyte, caspase-3,8 activity and mRNA expression of HL-7702 cells increased remarkably and were concentration-dependent on GCDC. *Conclusion*: The caspase-3,8 were concerned with the hepatocyte apoptosis induced by GCDC. The mechanism might be related to the upregulation of caspase-8 activity which subsequently transforms caspase-3 into its active form.

【Keywords】Glycodeoxycholate; Apoptosis; Caspase

甘氨脱氧胆酸盐(Glycodeoxycholate,GCDC)是体内的主要结合胆汁酸,在前期实验中已证实它可诱导人正常肝细胞株 HL-7702 凋亡,细胞凋亡率与 GCDC 呈时间与剂量依赖性[1],但其凋亡机理尚不清楚。半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(Cysteinyl aspartate specific protease, caspase)是一类蛋白水解酶,与细胞凋亡密切相关,其中 caspase-8 是死亡受体凋亡途径的关键蛋白酶,caspase-3 是重要的效应性蛋白裂解酶,与 DNA 断裂、染色体凝聚和凋亡小体形成有关,为研究 caspase-3,8 在 GCDC 诱导肝细胞凋亡中的作用,本实验以 GCDC 作用于体外培养的人正常肝细胞株 HL-7702,诱导其凋亡并观察凋亡过程中 caspase-3,-8 活性与 mRNA 表达水平的变化,从而探讨其凋亡机制。

作者介绍:传良敏(1970-),女,硕士,副主任技师,研究方向:肝细胞凋亡的分子机制。
通讯作者:黄文芳,男,博士,主任技师,E-mail:huangwf2002@21cn.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人正常肝细胞株 HL-7702 购自四川大学华西临床医学院基础与法医学免疫室。

1.1.2 仪器与试剂 RPMI 1640 培养基购自美国 GIBCO 公

司；小牛血清购自美国 GM 公司；GCDC 购自 sigma 公司；胰酶细胞消化液购自碧云天生物技术研究所；Annexin V-FITC 和 caspase-3,8 分光光度法检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司；RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒、DNA marker、引物合成均由北京赛北盛基因技术有限公司提供；BioRAD PCR 扩增仪；数字化凝胶成像分析仪；流式细胞仪（美国 BD 公司）、CO_2 培养箱。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将浓度为 1×10^5 个 /ml 的 HL-7702 细胞接种于含 10%小牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml 的 RPMI 1640 培养基中，在 37℃、饱和湿度、5% CO_2 培养箱中常规培养 24 h 后换液，实验组加入 GCDC，使终浓度分别为 100、150、200、250 μmol/L，同时设立阴性对照组（不加 GCDC），培养 24 h，收集各 GCDC 实验组和阴性对照组细胞，进行凋亡率、caspase-3,8 活性测定和 caspase-3,8 mRNA 表达水平的分析。

1.2.2 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡率 按照试剂盒说明书进行。

1.2.3 caspase-3,8 活性测定 按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 RT-PCR 检测 caspase-3,8 mRNA 表达水平 按试剂盒说明提取总 RNA，5-磷酸甘油醛脱氢酶（Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH、caspase-3、8 的引物及扩增片断的长度见表 1。RT-PCR 按说明书进行，扩增条件：94℃ 5 min；94℃ 30 s，56℃ 45 s，72℃ 90 s，30 循环；最后 72℃ 延伸 5 min，caspase-8 的退火温度为 60℃ 45 s。PCR 产物用含 0.5 mg/L 溴化乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶电泳，用凝胶成像系统 Quantity one 软件分析结果，以目的基因与 GAPDH 条带的相对含量比值表示。

1.2.5 统计学处理 结果以均数 ± 标准差表示，对照组与各处理组的比较采用方差分析中最小有意义差异法分析，检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 GCDC 诱导细胞凋亡率变化

不同浓度的 GCDC 均能诱导 HL-7702 细胞凋亡，细胞凋亡率与 GCDC 呈浓度依赖性。结果见表 2。

2.2 caspase-3,8 活性变化

分光光度法检测 caspase-3 或 8 活性是将 caspase-3 或 8 序列特异性的多肽偶联至发色基团，当该底物被 caspase-3 或 8 剪切后，发色基团即游离出来，通过检测其 $\lambda=405$ nm 的吸光度来表示 caspase-3 或 8 的活化程度。caspase-3,8 活性与 GCDC 浓度的关系如表 3 所示。

2.3 caspase-3,8 mRNA 表达水平的变化

不同浓度 GCDC 诱导 HL7702 细胞凋亡后，caspase-3,8 mRNA 表达水平均明显增强，具有显著性差异（$P<0.05$），结果见图 1、2。

3 讨 论

肝脏疾病是威胁人类生命的主要疾病之一。许多肝脏疾病（如免疫、炎症或阻塞等）可使胆汁的分泌或（和）排泄受阻导致胆汁淤积，而胆汁在细胞内的堆积是导致肝细胞损伤的主要原因之一[2]。

胆汁淤积性肝病时，大量的毒性胆盐在肝细胞

表 1 caspase-3,8 及内参的引物序列

基因类型	引物序列	扩增片断长度	基因库位置
内参 GAPDH	上游：5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 下游：5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	450 bp	
Caspase-8	上游：5'-AGATCTGGCCTCCCTCAAGT-3' 下游：5'-TTCCCTTTCCATCTCCTCCT-3'	217 bp	NM033358
Caspase-3	上游：5'-CATTATTCAGGCCTGCCGTG-3' 下游：5'-TATGGTCACCTCCGGCTGAA-3'	106 bp	NM032991

表 2 GCDC 对 HL-7702 细胞凋亡率的影响（n=3；$\bar{x}\pm s$）

GCDC 浓度(μmol/L)	阴性对照	100	150	200	250
凋亡率(%)	2.2 ± 0.6	13.16 ± 2.9* (t=6.41)	20.3 ± 3.0* (t=10.22)	25.02 ± 2.1* (t=18.11)	45.02 ± 3.5* (t=28.89)

注：* 表示与对照组相比，$P<0.05$

表 3 GCDC 对 HL-7702 细胞 caspase-3,8 活性的影响（n=3；$\bar{x}\pm s$）

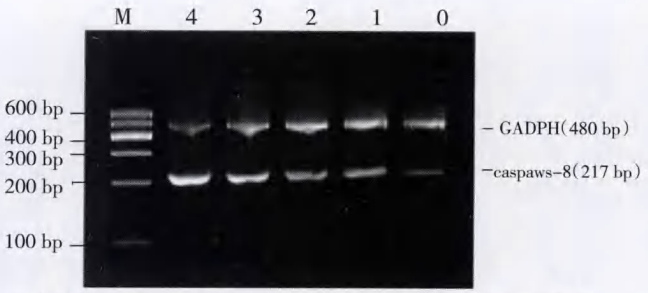
GCDC 浓度(μmol/L)	阴性对照	100	150	200	250
caspase-3	0.070 ± 0.011	0.130 ± 0.011* (t=6.68)	0.175 ± 0.012* (t=11.17)	0.290 ± 0.013* (t=23.4)	0.42 ± 0.011* (t=33.52)
caspase-8	0.080 ± 0.010	0.181 ± 0.011* (t=7.14)	0.343 ± 0.013* (t=17.32)	0.450 ± 0.013* (t=30.36)	0.567 ± 0.011* (t=40.25)

注：* 表示与对照组相比，$P<0.05$



(0 泳道:对照;1、2、3、4 泳道:GCDC 浓度分别为 100、150 、200 、250 mol/l;M 泳道为 DNA Marker)

图 1 不同浓度 GCDC 诱导 HL-7702 细胞凋亡过程中 caspase-3 mRNA 表达水平变化



(0 泳道:对照;1、2、3、4 泳道:GCDC 浓度分别为 100、150 、200 、250 mol/l;M 泳道为 DNA Marker)

图 2 不同浓度 GCDC 诱导 HL-7702 细胞凋亡时 caspase-8 mRNA 表达水平的变化

内堆积,可导致肝细胞的损伤。胆盐是表面活性剂,对多种细胞有毒性。胆盐分为疏水性和亲水性两种,胆盐的细胞毒性作用与其疏水性密切相关[3]。国外研究,高浓度的胆汁酸(500~1 000 μmol/L)主要通过诱导细胞坏死途径而对肝脏产生损伤[4];而低浓度的胆汁酸(25~250 μmol/L)通过凋亡诱导途径对肝脏产生毒性作用[5]。但在胆汁淤积时,血和肝中的胆汁酸浓度不可能达到因去垢性作用而导致细胞膜广泛溶解和破坏的程度。因此,在胆汁淤积时,胆盐可能是通过凋亡途径对肝细胞进行损伤。

GCDC 是体内的主要结合胆汁酸,近来的研究表明,甘氨脱氧胆酸盐 GCDC 能诱导原代培养的大鼠肝细胞凋亡,且凋亡率与 GCDC 浓度及作用时间呈正相关[6]。但 GCDC 能否诱导人正常肝细胞凋亡,尚未见相关报道。在本实验中,以 GCDC 诱导 HL-7702,通过流式细胞 Annexin Ⅴ-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡率,结果显示,GCDC 能诱导 HL-7702 凋亡,同时细胞凋亡率与 GCDC 浓度呈依赖性。

本实验结果表明,GCDC 能使 HL-7702 细胞中 caspase-3,8 的活性增强,同时其 mRNA 表达水平也增强,并且与 GCDC 浓度呈依赖性,提示 caspase-3,8 参与了 GCDC 诱导肝细胞 HL-7702 凋亡的调控。GCDC 可能通过活化 caspase-8,后者进一步活化 caspase-3 从而诱导肝细胞凋亡。caspase 是一类蛋白水解酶,以无活性的酶原形式存在于细胞中。caspase 的活化途径主要有 3 条,它们是:线粒体通路[7];死亡受体通路[8];内质网通路[9]。Caspase-8 是死亡受体通路的关键蛋白酶,当细胞受到各种凋亡因素的刺激时,可使死亡配体(TNFα、Fas、TRAIL)和相应的死亡受体相结合,引起上游的 caspase-8 活化,激活 caspase "瀑布效应";在 caspase 家族中,caspase-3 是关键的执行分子,它与 DNA 断裂、染色质凝聚和凋亡小体形成有关[10]。

总之,在 GCDC 诱导肝细胞凋亡机制中,caspase-3,8 扮演了重要角色,如何有效阻断胆汁淤积疾病中 caspase 蛋白酶的活化进而阻止肝细胞的过度凋亡,将为临床治疗胆汁淤积性肝病寻找新策略提供新的思路和理论基础。

参 考 文 献

[1] 传良敏,李 萍,黄文芳,等.甘氨脱氧胆酸盐诱导 HL-7702 凋亡及细胞内 Ca^{2+} 浓度变化[J].国际检验医学杂志,2007,28(5):397-398.

[2] Bove KE, Daugherty CC, Tyson W, et al. Bile acid synthetic defects and liver disease[J].Pediatr Dev Pathol, 2000, 3(1): 1-16.

[3] Scholmerich J, Becher MS, Schmidt K, et al. Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane damaging properties-studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles[J].Hepatology, 1984, 4(4): 661-666.

[4] Sokol RJ, Winklhofer-Roob BM, Devereaux MW, et al. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids[J].Gastroenterology, 1995, 109(4): 1249-1256.

[5] Gumpricht E, Devereaux M W, Dahl R, et al.Glutathione status of isolated rat hepatocytes affects bile acid-induced cellular necrosis but no apoptosis[J]. Toxicol Appl Phar-macol, 2000, 164(1): 102-111.

[6] 黄文方,康格非,杨明清,等.甘氨脱氧胆酸诱导大鼠肝细胞凋亡[J].中华肝脏病杂志,2000,8(5):305-307.

[7] Dseagher S, Martinou J C. Mitochondria as the central control point of apoptosis[J].Trends Cell Biol, 2000, 10(9): 369-377.

[8] Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptors: signaling and modulation [J]. Science, 1998, 281(5381): 1305-1308.

[9] Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K , et al.Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis [J] .J Cell Biol, 2000, 150(4): 731-740.

[10] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al.Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade[J]. Cell, 1997, 91(4): 479-489.

(责任编辑:关蕴良)