

高良姜素对臭氧所致 COPD 气道炎症的影响

王晓月,葛爱,孙培莉,曾晓宁,黄茂*

(南京医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**研究高良姜素对臭氧所致慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)小鼠气道炎症的影响并探讨其可能机制。**方法:**32 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为正常对照组、COPD 组、COPD+高良姜素组、高良姜素单独给药组。COPD 组和 COPD+高良姜素组反复给予臭氧吸入,每周 3 次、1 次 3 h,共 12 周;对照组吸入空气。取肺组织切片行苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察气管旁及血管旁炎性细胞浸润;收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),并用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测 BALF 中炎症因子水平;实时荧光定量(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测肺组织核转录因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid related factor 2, Nrf-2)及 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein1, Keap1)mRNA 的表达。**结果:**与正常对照组相比,COPD 模型组小鼠气道内炎症细胞浸润程度明显,BALF 中炎性细胞亦明显增多;BALF 中白介素(interleukin, IL)-6、IL-8 及肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 水平显著增高($P < 0.05$);给予高良姜素可显著缓解炎症严重程度并抑制 IL-6、IL-8 及 TNF- α 分泌($P < 0.05$)。同时高良姜素可使 COPD 组肺组织 Nrf-2 水平增高而 Keap1 未见明显变化。**结论:**高良姜素可以有效抑制 COPD 小鼠气道炎症的发生和进展,其机制可能与 Nrf-2-Keap1 抗氧化系统有关。

[关键词] 高良姜素;COPD;白细胞介素;Nrf-2;Keap1

[中图分类号] R563

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)06-700-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160611

Effect of galangin on ozone exposure-induced airway inflammation of COPD

Wang Xiaoyue, Ge Ai, Sun Peili, Zeng Xiaoning, Huang Mao*

(Department of Respiratory Medicine and Critical Care, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of galangin on ozone exposure-induced airway inflammation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in mice and to explore its possible mechanism. **Methods:** A total of 32 male C57BL/6 mice were randomly divided into four classes: the control group, COPD group, COPD+galangin group and galangin group. They were exposed to ozone for 3 h per day, twice a week for a period of 12 weeks. The control mice were exposed to normal air. Lung sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) to assess inflammatory cell infiltration. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected to detect cell counts and cytokines level by enzyme linked immunosorbent test (ELISA). Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to assess the expression of nuclear factor-erythroid related factor 2 (Nrf-2) mRNA and Kelch-like ECH-associated protein1 (Keap1) mRNA. **Results:** Airway inflammatory cell infiltration in the COPD group significantly increased, and inflammatory cells, interleukin (IL-) 6, IL-8 and TNF- α in the BALF were also notably increased in the COPD group compared with the control group ($P < 0.05$). Galangin significantly alleviated the severity of airway inflammation and inhibited IL-6, IL-8 and TNF- α secretion ($P < 0.05$). At the same time, galangin significantly increased Nrf-2 mRNA expression, while Keap1 mRNA had no significant change. **Conclusion:** Galangin can effectively inhibit the occurrence and progression of COPD airway inflammation, possibly due to the Nrf2-keap1 antioxidant system.

[Key words] galangin; COPD; interleukin; Nrf-2; Keap1

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(06): 700-704]

[基金项目] 江苏省科技创新与成果转化(生命健康科技)专项项目(BL2012012)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: huangmao6114@126.com

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以慢性炎症、肺泡的损伤和破坏、不完全可逆的气流受限为特征的疾病。我国 40 岁以上的患病人群占 8.2%, 预计 2020 年它将成为死亡原因的第 3 位^[1]。COPD 主要发病机制包括持续的慢性气道炎症、氧化应激、蛋白酶-抗蛋白酶失衡及凋亡。其中,氧化应激可以进一步增强炎症反应,从而导致气道重塑,肺组织破坏,气流受限的持续发展^[2]。因此,改善 COPD 相关的气道炎症水平及氧化应激,探求治疗 COPD 的新方法意义重大。

核转录因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid related factor 2, Nrf-2)是近年来新发现的一个转录因子,在许多病理生理过程中起重要作用,是机体抵抗氧化应激的重要因子,激活后可以启动多种抗氧化基因的表达。目前普遍认为 Nrf-2 信号调控机制以 Keap1—Nrf-2—ARE 通路为主。生理状态下, Nrf-2 存在于细胞浆中,与 Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein1, Keap1) 耦连,并与胞浆肌动蛋白结合并被锚定在胞浆,处于被抑制状态。在氧化应激源作用下, Nrf-2 与 Keap1 解耦联后转移入核,与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)结合,启动 ARE 调控的 II 相解毒酶及抗氧化酶基因的表达,增加细胞对氧化应激的抗性^[3]。

高良姜素(galangin, Ga)是一种黄酮醇类的类黄酮化合物,广泛存在于高良姜和蜂胶中,以往在亚洲地区常被用做香料及草药治疗各种疾病,如咳嗽、糖尿病、感冒、胃痛及腹泻等^[4]。Ga 具有多种生物学活性,如抗突变^[4]、抗病毒^[5]、抗微生物^[6]、抗炎、抗氧化、清除氧自由基^[7]的作用,但 Ga 是否能够抑制小鼠 COPD 模型的气道炎症及其对氧化应激的影响目前尚不明确。

目前 COPD 仍以改善症状为主要治疗方向,尚无明确治疗措施能治愈。基于 COPD 的主要特点是气道炎症反应和氧化应激,而 Ga 具有抗炎、抗氧化和氧自由基的作用。我们推测, Ga 能有效抑制 COPD 小鼠气道炎症的发生及进展,其机制可能与 Nrf-2—Keap1 抗氧化系统有关。

1 材料和方法

1.1 材料

6~8 周龄的 C57BL/6 雄性小鼠, SPF 级, 体重 22~25 g, 购于北京维通利华实验室动物技术有限公司。Ga(Sigma-Aldrich 公司, 德国), HE 染液(南京建

成科技有限公司), 小鼠白介素(interleukin, IL)-6、IL-8 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(R&D 公司, 美国), TRIzol 试剂(Invitrogen 公司, 美国), PrimeScript™ RT Master Mix Perfect Real Time 试剂盒(TaKaRa 公司, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模及分组

32 只 C57BL/6 雄性小鼠适应性饲养 1 周后, 按照随机表法分为 4 组, 每组 8 只。即正常对照(control)组、COPD 组、COPD+Ga 组、Ga 组。其中 COPD 组和 COPD+Ga 组反复给予臭氧吸入, 每周 3 次、1 次 3 h, 共 12 周^[8]。正常对照组在同等条件下给予新鲜空气吸入, COPD+Ga 组在注射 Ga 2 h 后给予臭氧吸入。Ga 组只给予 Ga 注射, Ga 剂量为 1.5 mg/kg。

1.2.2 动物的一般情况监察

每日观察小鼠活动情况, 对外界反应的敏感度, 皮毛光泽, 饮食饮水, 体重变化, 死亡情况以及有无 COPD 特征性表现: 如呼吸急促, 咳嗽频繁, 拱背蜷卧等。

1.2.3 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中的细胞分离与计数

4 组小鼠进行眼球摘除采血后, 在环状软骨上用血管钳固定气管, 其下作横行切口, 置入连接注射器的硅胶管, 用细线将气管和硅胶管扎紧, 分 3 次缓慢注入 PBS, 每次注入量为 0.4 mL, 每次灌洗后立即回收置于离心管中, 计量, 于 4℃ 储存, 2 h 内作细胞分离, BALF 于 1 000 r/min 离心 15 min, 上清液-80℃ 冻存, 留作细胞因子水平的测定; 下层细胞采用血球计数器计数细胞。BALF 中的 IL-6、IL-8 及 TNF- α 的水平测定分别采用小鼠 IL-6、IL-8、TNF- α (R&D 公司, 美国) ELISA 检测试剂盒, 按试剂盒说明书进行操作, 根据吸光度值计算出标本中所测细胞因子含量。

1.2.4 肺组织病理染色

小鼠行肺泡灌洗后, 打开胸腔, 取右肺下叶组织, 4% 中性福尔马林固定过夜。石蜡切片后进行 HE 染色, 光镜下观察肺组织的炎性细胞浸润情况。

1.2.5 实时荧光定量检测

通过实时荧光定量检测 Nrf-2 和 Keap1 mRNA 的表达, 采用 TRIzol (Invitrogen 公司, 美国) 法提取每组总 RNA。应用 PrimeScript™ RT Master Mix Perfect Real Time 试剂盒, 将 RNA 反转录为 cDNA,

Nrf-2 的引物序列：上游 5'-CACATCCCAAACAA GATGC-3'，下游 5'-GCTGCCTCCAGAGAGCTATT-3'，产物长度 176 bp；Keap1 的引物序列：上游 5'-CAT GAGGCATCACCTAGTG-3'，下游 5'-GCATTCCAC ACTGTCCAGAA-3'，产物长度 73 bp，退火温度 56℃。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6、SPSS18.0 统计学软件进行统计分析，所有数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，两个样本均数比较采用 *t* 检验，多个样本间比较采用方差分析，多个样本均数间两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠的一般情况

观察期间，COPD 组小鼠出现呼吸急促，点头样喘息，咳嗽频发，毛发无光泽，精神萎靡，食量减少；COPD+Ga 组小鼠呼吸急促、点头样呼吸症状均较轻，而对照组小鼠则无此类表现。

2.2 各组小鼠肺组织病理及 BALF 中细胞总数及细胞分类

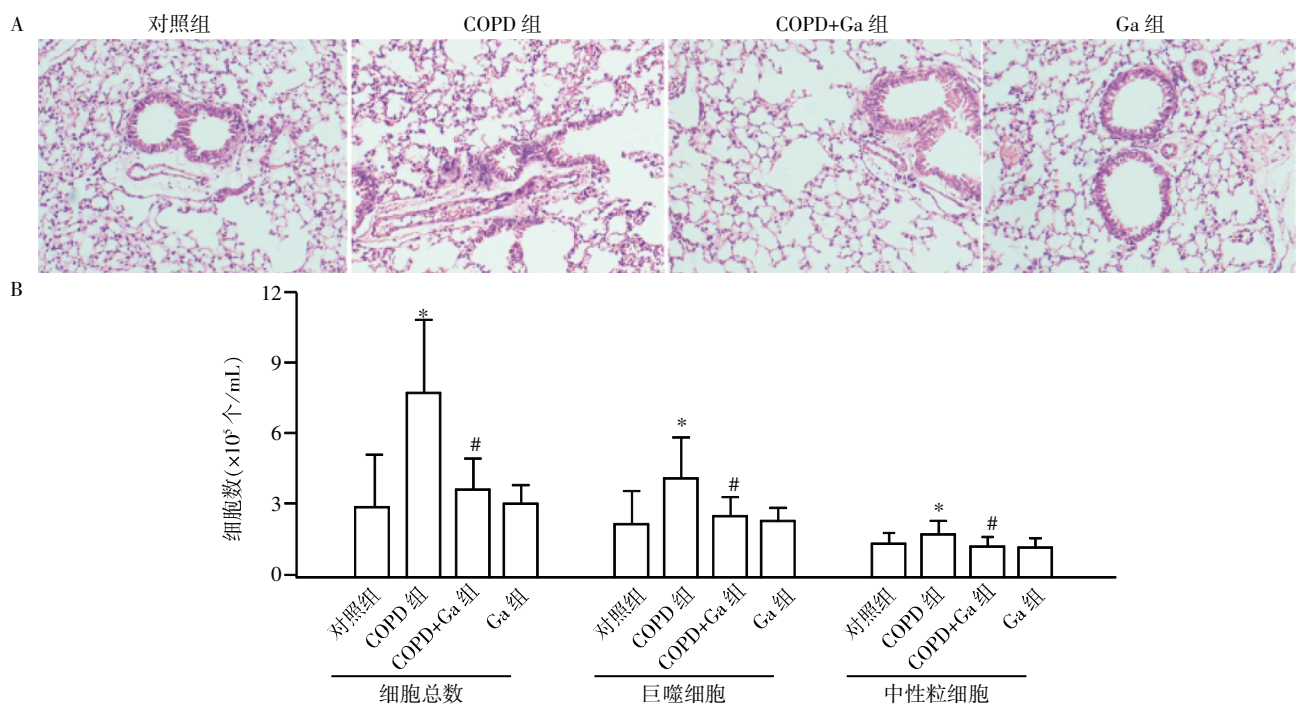
对照组小鼠气道上皮结构完整，纤毛整齐，肺泡结构正常，气道及血管周围炎性细胞浸润较少；COPD 组细支气管狭窄变形，部分管壁增厚，肺泡腔变大，气道和血管周围可见明显炎性细胞浸润；

COPD+Ga 组小鼠气管和血管周围炎性细胞浸润明显减轻；Ga 组与对照组相似(图 1A)。

COPD 组小鼠 BALF 中的细胞总数 (7.67 ± 2.43) $\times 10^5$ 个/mL、巨噬细胞数(4.10 ± 1.72) $\times 10^5$ 个/mL、中性粒细胞数(1.81 ± 0.38) $\times 10^5$ 个/mL，均较对照组显著增高 [总细胞数： $(2.96 \pm 1.05)\times 10^5$ 个/mL；巨噬细胞数： $(2.29 \pm 1.31)\times 10^5$ 个/mL；中性粒细胞数： $(1.29 \pm 0.33)\times 10^5$ 个/mL； P 均 <0.05]。COPD+Ga 组小鼠 BALF 中细胞总数 (3.58 ± 1.29) $\times 10^5$ 个/mL、巨噬细胞数 (2.59 ± 0.71) $\times 10^5$ 个/mL、中性粒细胞数 (1.25 ± 0.34) $\times 10^5$ 个/mL，较 COPD 组显著减少，Ga 组与对照组相比，各组细胞计数相似，差异无统计学意义($P > 0.05$ ，图 1B)。

2.3 各组小鼠 BALF 中细胞因子水平

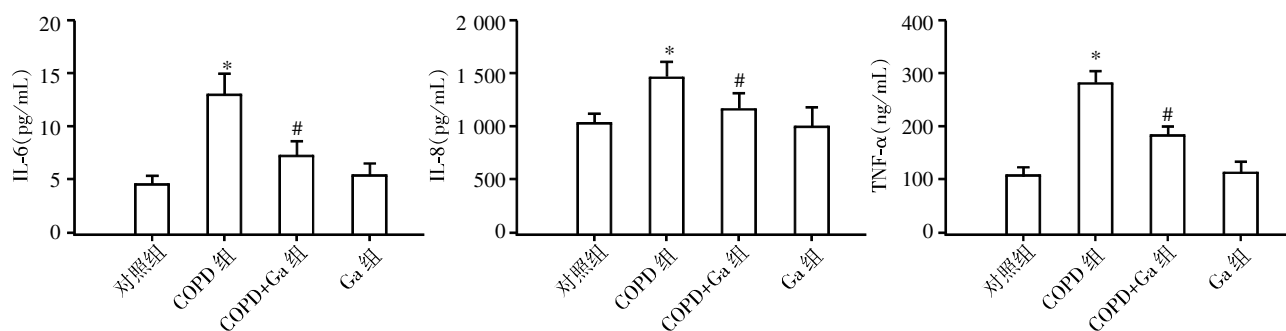
实验结果表明，与对照组[IL-6： (4.5 ± 0.91) pg/mL；IL-8： $(1\ 040.83 \pm 106.98)$ pg/mL；TNF- α ： (108.33 ± 14.47) ng/mL]相比，COPD 组中的 IL-6(12.90 ± 1.86)pg/mL、IL-8 ($1\ 489.50 \pm 160.88$)pg/mL 和 TNF- α (283.00 ± 23.38)ng/mL 明显升高，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；在 COPD+Ga 组中，IL-6 (7.02 ± 1.44)pg/mL、IL-8 ($1\ 179.83 \pm 172.10$)pg/mL 和 TNF- α (184.00 ± 18.32)ng/mL 水平均下降，与 COPD 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 Ga 组与对照组相比无明显差异 (图 2)。



A: 4 组小鼠肺组织 HE 染色；B: 4 组小鼠的 BALF 细胞总数、巨噬细胞数和中性粒细胞数 ($\bar{x} \pm s, n=8$)。与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 COPD 组比较，# $P < 0.05$ 。

图 1 肺组织 HE 染色和 BALF 中细胞计数

Figure 1 Mouse lungs stained with hematoxylin and eosin as well as cell count in BALF



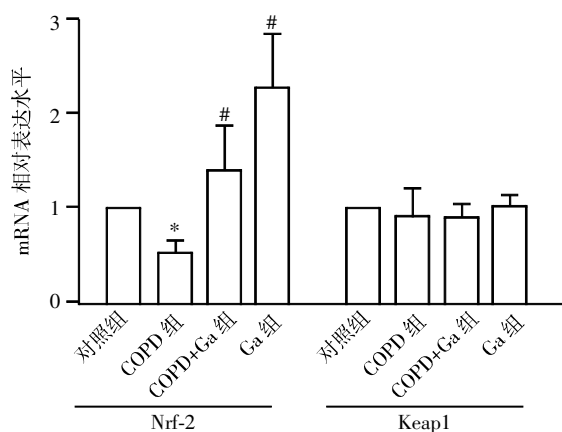
与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 COPD 组比较, * $P < 0.05$ ($n=8$)。

图 2 各组小鼠 BALF 中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平比较

Figure 2 Comparison of the levels of IL-6, IL-8 and TNF- α in BALF in each group

2.4 RT-PCR 检测 Nrf-2 与 Keap1 的表达

COPD 组 Nrf-2 mRNA 较对照组降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); COPD+Ga 组和 Ga 组 Nrf-2 mRNA 均较 COPD 组显著增高, 分别增高 2.64 倍和 4.28 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组 Keap1 mRNA 之间无明显差异(图 3)。



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 COPD 组比较, * $P < 0.05$ ($n=8$)。

图 3 各组 Nrf-2 mRNA 及 Keap1 mRNA 的表达

Figure 3 Expression of Nrf-2 mRNA and Keap1 mRNA in each group

3 讨论

本研究首次证实 Ga 对臭氧诱导下的小鼠 COPD 模型起到了一定保护作用, 降低气道炎症反应。这种保护作用可能通过 Nrf-2-Keap1 抗氧化系统信号途径发挥作用。

TNF- α 是一种强有力的致炎症因子, 可以刺激白细胞和内皮细胞表达黏附分子, 并上调其他致炎细胞因子如 IL-1 和 IL-6 的表达^[2,9]。IL-8 和 IL-6 是中性粒细胞和 T 淋巴细胞的重要趋化因子, 能使局部炎症细胞增加, 促进甚至加重气道炎症反应, 并在一定程度上反映气道炎症的严重程度^[10]。有研究表明, 臭氧可以引起肺部炎症因子和趋化因子的释

放, 如细胞因子诱导的中性粒细胞趋化因子、巨噬细胞炎症蛋白-2、TNF- α 、IL-1, 这些对中性粒细胞浸润起到一定作用^[11]。本研究发现, COPD 组小鼠 BALF 中的细胞数量如中性粒细胞、巨噬细胞等, 以及炎症因子如 IL-6、IL-8 和 TNF- α 均较对照组显著增高, 提示臭氧暴露能够增加炎症细胞及炎症因子的表达。通过给小鼠注射 Ga, 发现小鼠 BALF 中的中性粒细胞和巨噬细胞数目与 COPD 组相比明显下降, IL-6 和 IL-8 也相应下降, 说明 Ga 对 COPD 气道炎症反应具有抑制作用。

氧化应激是 COPD 的重要发病机制之一, 机体在各种氧化应激情况下, 体内活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 增加, 超出了抗氧化物质的清除能力, 导致氧化/抗氧化失衡, 从而造成肺部损伤, 气流受限进行性加重^[12]。近年研究发现, Nrf-2-Keap1 组成的抗氧化系统在细胞抗氧化应激反应中发挥重要的作用^[13]。Nrf-2 是调节抗氧化应激反应的重要转录因子, 生理状态下它与胞浆蛋白伴侣分子 Keap1 结合处于活性相对抑制状态。氧化应激作用下, Nrf-2 与 Keap1 解耦联后转移入核, 与 ARE 结合, 启动 ARE 调控的解毒酶、谷胱甘肽还原酶、抗氧化蛋白等, 增强细胞对氧化应激的对抗, 使细胞恢复稳态环境^[3]。随后, Keap1 转位进入细胞核内, 与 Nrf-2 一起出核并使 Nrf-2 在胞浆内持续被蛋白酶降解, 激活终止。在 COPD 患者中, Nrf-2 mRNA 的表达通常是下降的^[14]。有文献表明, 臭氧吸入会增加 COPD 组 Nrf-2 及 Keap1 的 mRNA 表达^[8], 而我们通过 RT-PCR 检测发现, COPD 组小鼠中 Nrf-2 mRNA 较对照组降低, 但在 COPD+Ga 组中小鼠肺组织 Nrf-2 的 mRNA 水平明显高于 COPD 组, 但 Nrf-2 的负性调节基因 Keap1 的 mRNA 水平在实验组和对照组均无明显变化。可能的解释是短期 (1~3 周) 臭氧暴露产生轻度的氧化应激, 会导致 Nrf-2 入核与

ARE 结合进而促进抗氧化基因的表达,对机体进行自我保护;而当臭氧暴露 3~6 周或者更长长时间后,由于产生了过量的氧化应激,此时 Nrf-2 失活,对机体造成损伤^[8,15]。本研究检测的是小鼠吸入臭氧第 12 周时的表达,故 Nrf-2 mRNA 水平是下降的。最新研究表明 Ga 能够通过减少 ROS 的产生来减轻哮喘的气道炎症^[16],证实 Ga 具有抗氧化作用。本研究显示 Ga 可以通过增强 Nrf-2 mRNA 的表达对抗 COPD 的氧化应激,对其起到了一定的保护作用。有文献报道 Keap1 除了调控 Nrf-2,还可以与其他蛋白产生相互作用,所以我们推测在小鼠 COPD 组中,Keap1 通过其他通路处于一个稳定状态,其具体调控机制还有待进一步研究。

Ga 可能通过增强 Nrf-2-Keap1 通路来抑制炎症及氧化应激,改善 COPD 症状,为 COPD 的治疗提供了新思路。

[参考文献]

- [1] Frago CA. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in aging populations [J]. COPD, 2015 [2016-03-10]. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/15412555.2015.1077506>. DOI: 10.3109/15412555.2015.1077506
- [2] Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Clin Chest Med, 2014, 35 (1): 71-86
- [3] Goven D, Boutten A, Leçon-Malas V, et al. Altered Nrf2/Keap1-Bach1 equilibrium in pulmonary emphysema [J]. Thorax, 2008, 63(10): 916-924
- [4] Heo MY. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate [J]. Mutat Res, 2001, 488 (2): 135-150
- [5] Schnitzler P, Neuner A, Nolkemper S, et al. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds [J]. Phytother Res, 2010, 24 (Suppl 1): S20-S28
- [6] Cushnie TP, Lamb AJ. Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus* [J]. Phytomedicine, 2006, 13(3): 187-191
- [7] Shu YS, Tao W, Miao QB, et al. Galangin dampens mice lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. Inflammation, 2014, 37(5): 1661-1668
- [8] Wiegman CH, Li F, Clarke CJ, et al. A comprehensive analysis of oxidative stress in the ozone-induced lung inflammation mouse model [J]. Clin Sci (Lond), 2014, 126 (6): 425-440
- [9] Zhao YL, Shang JH, Pu SB, et al. Effect of total alkaloids from *Alstonia scholaris* on airway inflammation in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 178(1): 258-265
- [10] Wouters FE. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Proc Am Thorac Soc, 2005, 2(1): 26-33
- [11] Pirozzi C, Sturrock A, Weng HY, et al. Effect of naturally occurring ozone air pollution episodes on pulmonary oxidative stress and inflammation [J]. Int J Environ Res Public Health, 2015, 12(5): 5061-5075
- [12] Matera MG. Cazzola, oxidation pathway and exacerbations in COPD: the role of NAC [J]. Expert Rev Respir Med, 2016, 10(1): 89-97
- [13] Li Q, Cheng Y, Bi M, et al. Effects of N-butylphthalide on the activation of Keap1/Nrf-2 signal pathway in rats after Carbon monoxide poisoning [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2015, 40(1): 22-29
- [14] Malhotra D. Expression of concern: Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1 [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 178(6): 592-604
- [15] Boutten A, Goven D, Boczkowski J, et al. Oxidative stress targets in pulmonary emphysema: focus on the Nrf2 pathway [J]. Expert Opin Ther Targets, 2010, 14 (3): 329-346
- [16] Liu YN, Zha WJ, Ma Y, et al. Galangin attenuates airway remodelling by inhibiting TGF-beta1-mediated ROS generation and MAPK/Akt phosphorylation in asthma [J]. Sci Rep, 2015, 5: 11758

[收稿日期] 2015-10-14

HepG2 细胞胰岛素抵抗模型中脂代谢的改变

周楠¹, 蒋维维², 刘娟¹, 戴焱焱¹, 杨帆¹, 李晓南^{1,3*}

(¹南京医科大学附属南京儿童医院儿童保健科,²新生儿外科,江苏 南京 210008;³南京医科大学儿科研究所,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)对肝细胞脂代谢酶的影响。方法:用不同浓度胰岛素刺激 HepG2 细胞,建立肝细胞 IR 模型;用油红 O 染色观察细胞形态及胞内脂滴形成;应用甘油三酯(triglyceride, TG)检测试剂盒检测细胞中 TG 含量;Real-time PCR 检测乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)、肝型脂肪酸结合蛋白(liver-type fatty acid-binding protein, L-FABP)、脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)、肉碱棕榈酰转移酶(carnitine palmitoyltransferase 1, CPT1)、微粒体甘油三酯转移蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, MTP)等脂代谢相关因子及转录因子胆固醇调节元件结合蛋白-1c(sterol regulatory element-binding protein-1c, SREBP-1c)、过氧化物酶体增生生物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor α , PPAR α)的 mRNA 表达水平。结果:用浓度 1×10^{-4} mol/L 的胰岛素刺激细胞 36 h 后形成 IR。IR 细胞内脂滴增多, TG 含量增加;IR 细胞内脂合成相关的 ACC、SREBP-1c 的 mRNA 水平较对照组升高;LPL、CPT1、MTP、PPAR α 的 mRNA 水平较对照组降低;L-FABP mRNA 水平与对照组相比无差异。结论:IR 通过提高肝细胞脂合成、降低脂氧化过程,导致肝细胞内脂质异常堆积。

[关键词] HepG2 细胞;胰岛素抵抗;肝脏脂代谢;非酒精性脂肪肝

[中图分类号] R587.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)06-705-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160612

Changes of lipid metabolism in HepG2 cells model of insulin resistance

Zhou Nan¹, Jiang Weiwei², Liu Juan¹, Dai Yanyan¹, Yang Fan¹, Li Xiaonan^{1,3*}

(¹Departments of Children Health Care, ²Neonatal Surgery, Nanjing Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008; ³Institute of Pediatric Research, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of insulin resistance on hepatic lipid metabolism. **Methods:** We used RPMI 1640 with different insulin concentrations to stimulate HepG2 cells, and cells were divided into the insulin resistance (IR) group and the control group. Oil red O staining was performed to observe the cell morphology and intracellular lipid droplets. Triglyceride was detected with the triglyceride assay kit. The expression of acetyl-CoA carboxylase (ACC), liver-type fatty acid-binding protein (L-FABP), lipoprotein lipase (LPL), carnitine palmitoyltransferase1 (CPT1), microsomal triglyceride transfer protein (MTP) and transcription regulatory factors sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), and peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) were detected by real-time PCR. **Results:** HepG2 cell model of insulin resistance was induced after 1×10^{-4} mol/L insulin stimulated cells for 36 h. The intracellular lipid droplets and triglyceride content were increased in the IR group than in the control group. The mRNA expressions of ACC and SREBP-1c in the IR group were higher than in the control group, and L-FABP had no significant difference compared with the control group. The mRNA expressions of LPL, CPT1, MTP and PPAR α in the IR group were lower than those in the control group. **Conclusion:** Insulin resistance could induce abnormal lipid accumulation in HepG2 cells via increasing lipid synthesis and reducing lipid oxidation process.

[Key words] HepG2 cells; insulin resistance; hepatic lipid metabolism; non-alcoholic fatty liver disease

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(06): 705-709]

[基金项目] 国家自然科学基金(81273064)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xnli@njmu.edu.cn

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是代谢综合征表现之一,主要特征为弥漫性肝细胞大泡性脂肪变。脂代谢紊乱被认为是 NAFLD 发生发展的中心环节^[1]。肝脏脂代谢包括脂肪酸的摄入、合成、氧化和输出,当脂肪酸的摄入合成超过氧化输出时,过多的甘油三酯(triglyceride, TG)在肝脏中沉积,促使 NAFLD 的发生^[2]。而肝脏脂代谢涉及乙酰辅酶 a 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)、肝型脂肪酸结合蛋白(liver-type fatty acid-binding protein, L-FABP)、脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)、肉碱棕榈酰转移酶(carnitine palmitoyltransferase1, CPT1)、微粒体甘油三酯转移蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, MTP)及转录因子胆固醇调节元件结合蛋白-1c(sterol regulatory element-binding protein-1c, SREBP-1c)、过氧化物酶体增生物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor α , PPAR α)等酶和核受体的调控,是维持肝脏脂代谢的关键环节。大量动物试验和临床研究表明,胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)可作为原发病因参与 NAFLD 的发生发展。但 IR 形成前期及持续状态下肝脏脂代谢相关基因表达谱会发生如何改变,是否与肥胖造成的脂代谢紊乱相一致尚不清楚。本研究通过 HepG2 细胞 IR 模型,探讨 IR 通过调节肝细胞脂代谢酶的基因表达参与 NAFLD 发生发展的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

RPMI1640 培养基、胰酶(南京维森特生物技术有限公司),胎牛血清(Gibco 公司,美国),胰岛素、油红 O、苏木素(Sigma 公司,美国);甘油三酯检测试剂盒(北京普利莱公司),BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo 公司,美国),DEPC(杭州碧云天生物技术有限公司),TRIzol(Invitrogen 公司,美国),反转录试剂盒(上海罗氏制药有限公司),SYBR Green PCR 混合液(Life 公司,美国),PCR 引物(上海基远生物技术有限公司),葡萄糖检测试剂盒(四川迈克生物技术股份有限公司);自动生化分析仪(DiaSys 公司,德国),DG 5032 型酶联免疫检测仪(南京华东电子设备有限公司);人肝癌细胞株 HepG2 细胞(中国科学院上海生科院细胞库)。

1.2 方法

1.2.1 HepG2 细胞培养、模型建立及鉴定

用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养

HepG2 细胞,在 37°C、5%CO₂ 的饱和湿度条件下培养,每 2~3 d 用 0.25%的胰蛋白酶消化细胞,按 1:3 进行传代,取对数生长期细胞用于实验。将细胞消化后,培养基调整细胞密度为 1×10⁵ 个/mL,转入 12 孔细胞培养板中继续培养,每块板均分为对照组及胰岛素刺激组。待细胞培养 12 h 后,对照组加入 RPMI 1640 培养基,胰岛素刺激组分别加入新配制的含 1×10⁻⁵、5×10⁻⁵、1×10⁻⁴ mol/L 胰岛素的 RPMI1640,于 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24、36、48 h 后,取出培养基上清液,应用多功能自动生化仪葡萄糖测定试剂盒(葡萄糖-己糖激酶法)检测上清葡萄糖含量,计算葡萄糖消耗量。葡萄糖消耗量=对照组葡萄糖含量-抵抗组葡萄糖含量。选择葡萄糖消耗量最小的胰岛素作用浓度作为胰岛素最佳作用浓度^[3]。

1.2.2 油红 O 染色

油红 O 工作液配制:油红 O 溶于异丙醇配成 0.5%油红 O 贮备液,以 6:4 的比例将贮备液与蒸馏水混匀后过滤 2 次,至液体澄清为止,得到油红 O 工作液。按上述方法复制 IR 模型,培养结束后吸尽孔中培养基,用 PBS 清洗 2 遍,4%多聚甲醛固定 10 min,每孔加 500 μ L 油红 O 工作液,于室温下染色 15 min,洗净背景,在显微镜下观察细胞形态及脂滴形成。

1.2.3 细胞内 TG 含量检测

将细胞用胰酶消化后,加入裂解液进行裂解。离心后,取部分上层清液用试剂盒检测 TG 含量;剩余部分上清液可用 BCA 法蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。最后以每克蛋白浓度校正 TG 含量。

1.2.4 检测细胞脂代谢相关基因的表达水平

细胞转入 12 孔板后按照上述方法复制 IR 模型。模型建立后,每孔加入 TRIzol 0.5 mL,提取细胞总 RNA,进一步逆转录成 cDNA,建立 PCR 反应体系,上机扩增,得出实验数据分析,相关引物序列见表 1。

1.3 统计学方法

应用 SPSS20.0 统计软件进行分析,采用单因素方差分析,结果用均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰岛素对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的时间和剂量效应

不同浓度胰岛素作用下,随着时间的延长,培养上清葡萄糖含量呈现下降趋势;作用 24 h 后,上

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primers of RT-PCR

产物名称	正义链(5'→3')	反义链(5'→3')
ACC	CACGCTCAAGTCACCAAGAA	GCAAATGGGAGGCAATAAGA
SREBP-1c	TTCCCAGCCCCTCAGATAC	GAGAAGCACCAAGGAGACGA
L-FABP	TTCAAGTTCACCATCACC GC	TTATGTCGCCGTTGAGTTCG
LPL	TTCTCGTTGGCAGGGTTPGAT	CTGACACTGTTTTCACGCCA
CPT1	CAACTCAGATTCAGGCAGCA	CGATGTGCTTGCTGTCTCTC
MTP	CTGCTCAGACCTCAGACTCA	TCTCTGATGTCAGTCTACCA
PPAR α	CCAGCATCCTCTCTCCA ACT	AGGAAAACGAAGACCCAAAGAT
GAPDH	GTCGGAGTCAACGGATTTGG	CATGGGTGGAATCATATTGGA

清葡萄糖含量与对照组相比下降, 降糖作用明显。用 1×10^{-5} 、 5×10^{-5} mol/L 的胰岛素作用于细胞 36 h 后, 上清葡萄糖含量明显低于对照组; 但 1×10^{-4} mol/L 胰岛素刺激组上清葡萄糖含量与对照组无差异;

1×10^{-4} mol/L 胰岛素作用 48 h 后, 上清葡萄糖含量明显高于对照组, 说明细胞的 IR 状态持续存在, 因此选取 1×10^{-4} mol/L 胰岛素作用 48 h 后的细胞作为 IR 细胞(表 2)。

表 2 不同浓度胰岛素作用细胞 24、36、48 h 后上清葡萄糖含量比较

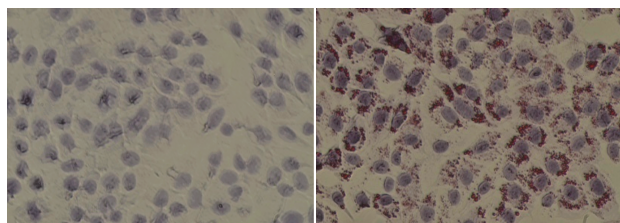
Table 2 Comparisons of glucose levels in supernatant after different concentrations of insulin stimulation for 24, 36, 48 h (mmol/L, $\bar{x} \pm s, n=6$)

作用时间	对照组	胰岛素刺激组		
		1×10^{-5} mol/L	5×10^{-5} mol/L	1×10^{-4} mol/L
24 h	8.12 ± 0.10	$7.53 \pm 0.76^*$	$6.13 \pm 0.71^*$	$7.08 \pm 0.05^*$
36 h	5.35 ± 0.07	$4.32 \pm 0.58^*$	$3.91 \pm 0.77^*$	5.11 ± 0.59
48 h	2.44 ± 0.46	$2.28 \pm 0.11^*$	$2.26 \pm 0.12^*$	$3.57 \pm 0.57^*$

与对照组比较, $*P < 0.05, n=6$ 。

2.2 IR 形成后 HepG2 细胞的形态学变化

用 1×10^{-4} mol/L 胰岛素作用 HepG2 细胞 48 h 后, IR 细胞体积增大、细胞中红色脂滴明显高于对照组(图 1)。



正常细胞

IR 细胞

图 1 正常细胞与 IR 细胞形态学比较(油红 O 染色, $\times 400$)
Figure 1 Morphological comparison between normal and IR cells (Oil red staining, $\times 400$)

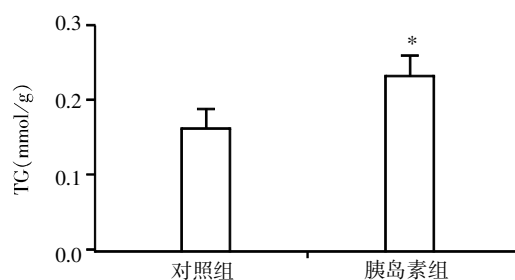
2.3 IR 形成后细胞 TG 含量的变化

用 1×10^{-4} mol/L 胰岛素作用 HepG2 细胞 48 h 后, IR 细胞内 TG 含量明显高于对照组($P < 0.05$, 图 2)。

2.4 不同刺激时间对肝细胞脂肪酸合成和摄取相关基因 mRNA 表达的影响

1×10^{-4} mol/L 胰岛素作用于 HepG2 细胞 24 h 时, 与对照组比较 ACC mRNA 水平降低, 但 36 h 后升高并持续至 48 h(图 3A); SREBP-1c mRNA 水平胰岛素在作用 24 h 无明显变化, 36 h 升高, 并持续

至 48 h(图 3B); 在胰岛素作用 24 h L-FABP mRNA 水平比对照组降低, 36 h 至 48 h 与对照组比较差异均无统计学意义(图 3C)。



与对照组比较, $*P < 0.05, n=6$ 。

图 2 1×10^{-4} mol/L 胰岛素刺激下 HepG2 细胞中 TG 含量变化

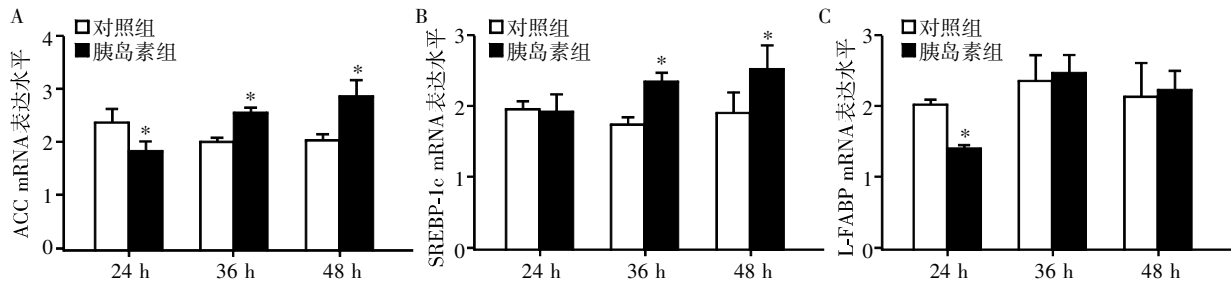
Figure 2 TG content of HepG2 cells with 1×10^{-4} mol/L insulin stimulation

2.5 不同刺激时间对肝细胞中 TG 水解酶、脂肪酸氧化输出相关基因 mRNA 表达的影响

1×10^{-4} mol/L 胰岛素作用 HepG2 细胞 24 h 后, 与对照组比较, LPL mRNA 水平无明显变化, 36 h 后降低, 并持续至 48 h; CPT1、MTP、PPAR α mRNA 水平在 24 h 即明显下降, 并持续至 48 h(图 4)。

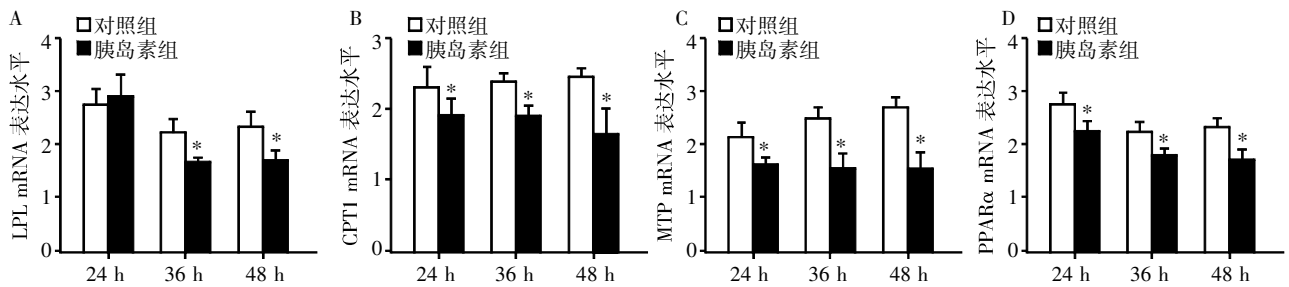
3 讨论

IR 是许多内分泌代谢失调相关疾病的共同病



与对照组比较, * $P < 0.05$, $n = 6$ 。

图 3 1×10^{-4} mol/L 胰岛素刺激不同时间 HepG2 细胞中 ACC(A)、SREBP-1c(B)、L-FABP(C) mRNA 水平的变化
Figure 3 Expressions of ACC(A), SREBP-1c(B), L-FABP(C) in HepG2 cells with insulin stimulation at different times



与对照组比较, * $P < 0.05$, $n = 6$ 。

图 4 1×10^{-4} mol/L 胰岛素刺激不同时间 HepG2 细胞中 LPL(A)、CPT1(B)、MTP(C)、PPARα(D) mRNA 水平的变化
Figure 4 Expressions of LPL(A), CPT1(B), MTP(C), PPARα(D) in HepG2 cells with insulin stimulation at different times

理生理基础。本研究通过体外构建肝细胞 IR 模型发现, IR 形成初期细胞内脂滴数目迅速增加, 脂质氧化输出减弱; 当 IR 持续存在, 胞内脂滴进一步增多, 肝细胞脂质合成增强, 脂质氧化持续减弱, 最终形成“脂肪肝”。大量动物实验和临床研究均证明, NAFLD 伴随 IR^[4-7], 而伴有 IR 的孕母其子代同样会引发 NAFLD^[8]; 这些均提示 IR 可能是 NAFLD 的原发因素之一^[9]。

胰岛素是体内重要的合成激素, 主要通过与其靶细胞膜表面的特异受体结合启动细胞代谢。当机体发生 IR, 糖脂代谢紊乱导致内脏脂肪过度分解, 随之释放大量的游离脂肪酸流入肝细胞, 造成肝脏的脂肪异位沉积^[10]。而肝脏是胰岛素的主要效应器官, 参与肝脏脂代谢的酶和核受体均受胰岛素直接或间接调控。在 IR 引起的脂肪肝中, 初次打击主要是 IR 导致肝细胞脂质堆积, 而脂肪变性的肝细胞活力不足, 并为脂质过氧化提供反应基质; 二次打击主要为活性氧导致脂质过氧化损伤及其相关事件, 引起脂肪性肝炎。IR 在肝细胞脂代谢异常发病机制中作用于多个环节, 它可以直接控制肝细胞内许多与脂蛋白合成有关的酶促反应。其中 ACC 和 L-FABP 被证实与脂肪酸合成、摄入密切相关, 而 SREBP-1c 参与其调控, 它们均在 NAFLD 的发生发展中发挥着重要作用。动物实验发现 IR 时, ACC 及其核调控因子 SREBP-1c 的活性增强, 与肝脏摄取葡萄糖降

低、摄入游离脂肪酸增多有关^[2, 11-12]。本研究发现, IR 后肝细胞内 TG 含量增多, ACC mRNA 表达先降低后升高并持续至 48 h, 提示在 IR 初期, 细胞内 ACC 反馈性降低, 随着 IR 进一步增强, ACC 表达逐步增加。SREBP-1c 表达水平与 ACC 表达变化相似。表明在 IR 下主要通过 SREBP-1c 途径调节 ACC 的表达, 参与肝脏脂代谢。而 L-FABP mRNA 表达在 24 h 仅呈现一过性降低, 说明 IR 对其调控表达无明显影响。另一方面, CPT1 和 MTP 分别是调控脂肪酸 β 氧化和 TG 输出的关键酶, 受 PPARα 的正向调节。其他研究已发现, 给予 CPT1 基因敲除的小鼠高脂膳食后会发生严重的 IR^[13]; 在 NAFLD 患者肝脏中, MTP 表达明显下降^[14]; PPARα 激动剂 MHY908 添加至大鼠饮食中, 可以有效改善 IR 及 2 型糖尿病^[15]。与之结果类似, 本研究在 IR 形成前, CPT1、MTP 及 PPARα mRNA 表达即降低, IR 形成后继续下降, 并持续至 48 h, 提示 CPT1、MTP 及 PPARα 对胰岛素的敏感性较 ACC、SREBP-1c、L-FABP 更强。除此之外, LPL 是胰岛素敏感酶, 主要负责将 TG 脂蛋白中的 TG 水解成游离脂肪酸, 胰岛素可以刺激 LPL 合成增加。临床调查发现伴有高 TG 血症的 2 型糖尿病和非糖尿病人群中, IR 导致 LPL 活性下降, VLDL 降解减慢, 是导致 TG 升高的原因之一^[16]。本研究中, LPL 表达早期并无明显变化, IR 形成后表达下降, 水解 TG 能力减弱, 进一步解释了肝脏细胞中

TG的异常堆积。综上所述,在IR形成初期,即明显减弱脂氧化酶活性,后期又伴有脂合成酶的异常表达,这些改变之间形成恶性循环,是促进脂肪肝难以逆转的重要原因。

此外,肥胖也是导致NAFLD的重要因素之一。研究发现,肥胖早期ACC、SREBP-1c明显升高,并持续至NAFLD形成;而LPL、CPT1、MTP、PPAR α 的表达水平在早期并未发生明显变化,后期开始下降,考虑IR形成^[17]。因此,肥胖相关的NAFLD,早期主要是通过促进脂质合成途径发挥作用;而IR早期通过减少脂质氧化,后期进一步促进脂质合成,使肝细胞内脂质异常堆积,引发疾病。虽然造成NAFLD的机制有差异,但两者最终均通过促进肝脏脂肪酸摄取合成、抑制氧化输出的叠加作用,才促使NAFLD的发生。

本研究通过体外建立IR模型,发现在IR下肝细胞脂肪酸合成摄入增加、氧化输出下降,导致胞内脂质堆积异常增多。证明IR的确是肝细胞脂肪变性的原发因素之一,并通过异常调节肝细胞脂代谢进一步加速疾病进展,为临床NAFLD的预防和治疗提供科学依据。

[参考文献]

[1] Park KS, Lee YS, Park HW, et al. Factors associated or related to with pathological severity of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Korean J Intern Med, 2004, 19(1): 19-26

[2] Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. Prog Lipid Res, 2009, 48(1): 1-26

[3] Li L, Li G, Wei H, et al. The endoplasmic reticulum stress response is associated with insulin resistance-mediated drug resistance in HepG2 cells[J]. Neoplasma, 2015, 62(2): 180-190

[4] Kessoku T, Yoneda M, Sumida Y, et al. Insulin resistance correlated with the severity of liver histology in Japanese NAFLD patients: a multicenter retrospective study[J]. J Clin Gastroenterol, 2015, 49(2): 169-170

[5] Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(39): 16381-16385

[6] Jegatheesan P, Beutheu S, Ventura G, et al. Citrulline and nonessential amino acids prevent fructose-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats [J]. J Nutr, 2015, 145(10): 2273-2279

[7] Luukkonen PK, Zhou Y, Sädevirta S, et al. Hepatic ce-

ramides dissociate steatosis and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease [J/OL]. J Hepatol, 2016 [2016-03-10]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827816000052> DOI:10.1016/j.jhep.2016.01.002

[8] Thorn SR, Baquero KC, Newsom SA, et al. Early life exposure to maternal insulin resistance has persistent effects on hepatic NAFLD in juvenile nonhuman primates [J]. Diabetes, 2014, 63(8): 2702-2713

[9] Bugianesi E, Zannoni C, Vanni E, et al. Non-alcoholic fatty liver and insulin resistance: a cause-effect relationship? [J]. Dig Liver Dis, 2004, 36(3): 165-173

[10] Camporez JP, Kanda S, Petersen MC, et al. ApoA5 knock-down improves whole-body insulin sensitivity in high-fat-fed mice by reducing ectopic lipid content [J]. J Lipid Res, 2015, 56(3): 526-536

[11] Liu X, Xue Y, Liu C, et al. Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipid ameliorates insulin resistance and lipid metabolism in diet-induced-obese mice [J]. Lipids Health Dis, 2013, 12: 109

[12] Zhang T, Zhao S, Li W, et al. High-fat diet from perilla oil induces insulin resistance despite lower serum lipids and increases hepatic fatty acid oxidation in rats [J]. Lipids Health Dis, 2014, 13: 15

[13] Kim T, Moore JF, Sharer JD, et al. Carnitine palmitoyltransferase 1b deficient mice develop severe insulin resistance after prolonged high fat Diet feeding [J/OL]. J Diabetes Metab, 2014 [2016-03-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4286342/>. DOI:10.4172/2155-6156.1000401

[14] Higuchi N, Kato M, Tanaka M, et al. Effects of insulin resistance and hepatic lipid accumulation on hepatic mRNA expression levels of apoB, MTP and L-FABP in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Exp Ther Med, 2011, 2(6): 1077-1081

[15] Park MH, Kim DH, Kim MJ, et al. Effects of MHY908, a new synthetic PPAR α/γ dual agonist, on inflammatory responses and insulin resistance in aged rats [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2016, 71(3): 300-309

[16] Miyashita Y, Shirai K, Itoh Y, et al. Low lipoprotein lipase mass in preheparin serum of type 2 diabetes mellitus patients and its recovery with insulin therapy [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2002, 56(3): 181-187

[17] Ji C, Dai Y, Jiang W, et al. Postnatal overfeeding promotes early onset and exaggeration of high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease through disordered hepatic lipid metabolism in rats [J]. J Nutr Biochem, 2014, 25(11): 1108-1116

重组质粒 pEGFP-N2/Pim-3 转染对胰腺细胞损伤的保护作用

简捷¹, 黄缘², 刘利珍³, 李双¹, 邓峰¹

(¹南昌大学第三附属医院消化内科, 江西 南昌 330008; ²南昌大学第二附属医院消化内科, 江西 南昌 330006; ³上海市嘉定区中心医院肿瘤科, 上海 201800)

[摘要] 目的: 研究重组质粒 pEGFP-N2/Pim-3 转染对内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)引起的大鼠胰腺 AR4-2J 细胞损伤的保护机制。方法: 实验分为 4 组: A 组(正常对照组), B 组(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 处理组), C 组(空载质粒 pEGFP-N2 转染+5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 处理组), D 组(重组质粒 pEGFP-N2/Pim-3 转染+5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 处理组)。流式细胞仪检测各组处理 24 h 后细胞凋亡情况。处理 0、6、12、24 h 后分别提取各组总 RNA 及蛋白, RT-PCR 及 Western blot 分别检测 Pim-3、细胞间黏附分子(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、紧密连接蛋白闭锁蛋白(Occludin) mRNA 及蛋白的表达。结果: 处理 24 h, 各组细胞凋亡率分别为: A 组(7.85 \pm 1.14)%, B 组(53.13 \pm 5.73)%, C 组(51.76 \pm 5.17)%, D 组(21.13 \pm 4.15)%, D 组细胞相对 B、C 组凋亡明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$); D 组 Pim-3 表达与 A、B、C 组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$); 处理 12 h 后 B、C、D 组 ICAM-1 高表达, 24 h 达高峰, 相对于 A 组, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), D 组与 B、C 组差异有统计学意义($P < 0.05$); 处理 6 h 后, B、C、D 组 Occludin 高表达, 12 h 达高峰, 相对于 A 组, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), D 组与 B、C 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 丝/苏氨酸激酶 Pim-3 能够抑制胰腺细胞炎症反应和胰腺细胞凋亡, 可能与上调闭锁蛋白和下调细胞间黏附分子的表达有关。

[关键词] 丝/苏氨酸激酶 Pim-3; 紧密连接蛋白闭锁蛋白; 细胞间黏附分子; 凋亡; 脂多糖

[中图分类号] R393

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)06-710-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20160613

Protective role of recombinant plasmid pEGFP-N2/Pim-3 transfecting in rat pancreatic acinar cells damaged by lipopolysaccharide

Jian Jie¹, Huang Yuan², Liu Lizhen³, Li Shuang¹, Deng Feng¹

(¹Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330008;

²Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006;

³Department of Oncology, the Jiading District Central Hospital of Shanghai, Shanghai 201800, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective role of recombinant plasmid pEGFP-N2/Pim-3 transfecting in rat pancreatic acinar cells AR4-2J damaged by lipopolysaccharide(LPS). **Methods:** AR4-2J cells were divided into 4 groups: Group A, as the normal control group; Group B, treated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS; Group C, transfected with blank plasmid pEGFP-N2 and treated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS; Group D, transfected with recombinant plasmid pEGFP-N2 /Pim-3 and treated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS. Flow cytometry examined the apoptosis of AR4-2J cells in four groups after 24 h. RT-PCR was performed to detect the mRNA expression of Pim-3, intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), and Occludin in AR4-2J cells of four groups treated in 0, 6, 12, 24 h, and Western blot was performed to detect the protein expression of Pim-3, ICAM-1, and Occludin in each group. **Results:** The apoptotic rates of Groups B and C were(53.13 \pm 5.73)% and (51.76 \pm 5.17)%, respectively, both significantly higher than that of Group D (21.13 \pm 4.15)% (both $P < 0.05$). The expressions of Pim-3 mRNA and protein in Groups A, B and C remained a low level. The Pim-3 expression of Group D was significantly higher than those in Groups A, B and C(both $P < 0.05$). The ICAM-1 mRNA and protein expression levels of Groups B, C and D were constantly upregulated 6 h later, all significantly higher than those of Group A (all $P < 0.01$), and the ICAM-1 expressions of Groups B and C were significantly higher than Group D(both $P < 0.05$). The Occludin mRNA and protein expression levels of Groups B, C and D began to increase 6 h later, and peaked 12 h later, all significantly higher than those of Group A (all $P < 0.01$), and the Occludin expressions of Groups B and C were significantly lower than that of Group D(both $P < 0.05$). **Conclusion:** Pim-3 gene can inhibit the apoptosis of pancreatic acinar cell damaged by LPS,

and also can upregulate the expression of Occludin and downregulate the expression of ICAM-1 to inhibit the pancreatic inflammatory reaction induced by LPS.

[Key words] Pim-3; Occludin; ICAM-1; apoptosis; lipopolysaccharide

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(06):710-715]

急性胰腺损伤主要由于胰腺胰蛋白酶的自身消化作用而引起胰腺水肿、充血,或者出血、坏死。如何保护胰腺细胞功能成为急性胰腺损伤研究领域的热点。以往研究主要集中在药物抑制胰液分泌、抑酸、抗炎等治疗方面,但对于一些重症胰腺坏死,药物治疗的效果差、病死率高。现在研究多集中在胰腺细胞损伤的分子机制及基因治疗方面^[1-3]。

原癌基因能通过各种分子途径促进肿瘤的发生、发展和转移。但在各种组织器官急性损伤时,原癌基因能及时刺激细胞生长、增殖,从而促进损伤组织修复。丝/苏氨酸激酶 Pim-3 是一种原癌基因,它广泛表达于人类各个组织细胞中,能使在细胞生长通路中起关键作用的蛋白质分子内的丝/苏氨酸残基磷酸化,并通过不同于 PI3K-Akt-MTOR 分子途径的另一条通路,促进细胞的生长和增殖。

多种细胞生长因子、细胞生长通路可介导 Pim-3 的表达^[4]。细胞黏附分子(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)能够介导异型细胞间及细胞-胞外基质之间的黏附作用,参与免疫、炎症及肿瘤转移等一系列重要的生理和病理过程^[5-6]。炎症细胞浸润与上皮细胞的通透性密切相关。紧密连接蛋白闭锁蛋白(Occludin)是上皮细胞紧密连接中最重要的结构蛋白,可通过外环以拉链式结合产生严密的细胞旁封闭,还能与不同的分子结合,参与紧密连接形成的信号调节^[7-8]。本研究观察 Pim-3 基因细胞转染对损坏胰腺细胞的抗凋亡作用,以及对 ICAM-1 及 Occludin 表达的影响,探讨 Pim-3 基因在损坏胰腺细胞中的保护机制。

1 材料和方法

1.1 材料

AR4-2J 大鼠胰腺腺泡细胞系购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。胎牛血清(Hyclone 公司,美国),DMEM 培养基(Gibco 公司,美国),Annexin V-FITC 试剂盒(Beckman Coulter 公司,美国),DL2000 标准参照物(北京天根公司),无内毒素质粒小提取试剂盒、Lipofectamine™ 2000 及 TRIzol 试剂盒(In-

vitrogen 公司,美国),Pim-3、ICAM-1、Occludin、β-肌动蛋白、兔抗鼠多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国),*E.coli JM109* 菌株、空载质粒 pEGFP-N2 及重组质粒 pEGFP-N2/Pim-3(江西省分子医学重点实验室)。引物由上海 Sangon 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

A 组:正常对照组,不作任何处理,6 只;B 组:内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理组, LPS 终浓度 5 μg/mL, 6 只;C 组:空载质粒转染 LPS 处理组, 5 μg/mL LPS, pEGFP-N2 转染, n=6 只;D 组:重组质粒转染 LPS 处理组, 5 μg/mL LPS, pEGFP-N2/Pim-3 转染, 6 只。

1.2.2 细胞培养

AR4-2J 细胞在含 20%胎牛血清、100 U/mL 青霉素的 DMEM 培养基于 5%CO₂ 37℃培养箱中培养,每 2 d 更换 1 次培养液,用 0.25%EDTA 消化细胞,以 1:4 传代,取对数生长期细胞,以 1×10⁶ 个/孔接种于 24 孔培养板。

1.2.3 质粒提取及细胞转染

按无内毒素质粒小提取试剂盒说明书进行操作,提取物经 10 g/L 低熔点琼脂糖凝胶电泳,与 DL10000 参照物对照,并用核酸蛋白检测仪进行浓度及纯度检测。所提取质粒按 Lipofectamine 2000 说明书进行操作,48 h 后在倒置显微镜下观察细胞内绿色荧光蛋白,确认转染成功。

1.2.4 LPS 处理细胞

将 LPS 加入细胞培养液中混匀,致其终浓度为 5 μg/mL。

1.2.5 流式细胞仪检测 AR4-2J 细胞的凋亡情况

各处理组处理 AR4-2J 细胞 24 h 后,收集细胞, PBS 洗涤 1 次,400 μL Binding Buffer 重悬细胞。取 200 μL 细胞悬液加入 Annexin V 5 μL, PI 10 μL, 避光 20 min, 加入 200 μL Binding Buffer 上机检测细胞凋亡率。用 Cellquest 软件获取数据,用 ModFit 软件进行数据分析。

1.2.6 RT-PCR 检测 Pim-3、ICAM-1、Occludin mRNA 表达

以 β-actin 为内参照,设计引物序列如下:Pim-3

上游引物为 5'-CACTGACTTTGATGGCACCC-3', 下游引物为 5'-ATGCCAGACGAAGACCAG-3', 扩增产物长度为 770 bp; ICAM-1 上游引物为 5'-TCAAACGGGAGATGAATGG-3', 下游引物为 5'-CC-TCCTCCTGAGCCTTCTG-3', 扩增产物长度为 230 bp; Occludin 上游引物为 5'-CTGTCTATGCTCGT-CATCG-3', 下游引物为 5'-CATTCCCCGATCTAAT-GACG-3', 扩增产物长度 294 bp; β -actin 上游引物 5'-CTTCTTGGGCATGGAGTC-3', 下游引物为 5'-GCC-GATCCACACGGAGTA-3', 扩增产物长度 445 bp。分 4 个时间段(0、6、12、24 h)收集各处理组 AR4-2J 细胞, 总 RNA 提取按照 TRIzol 试剂说明书的操作步骤进行。逆转录为 cDNA 后使用 TaKaRa 公司的 LA Taq 扩增 Pim-3、ICAM-1、Occludin 编码区域。PCR 产物全部加入 1% 低熔点琼脂糖凝胶进行电泳检测。利用 Bandleader3.0 软件分析 PCR 产物条带密度。基因表达值以目的基因密度值/ β -actin 基因密度值 $\times 100\%$ 表示, 进行数据分析处理。

1.2.7 Western blot 检测 Pim-3、ICAM-1、Occludin 蛋白表达

分 4 个时间段(0、6、12、24 h)收集各处理组 AR4-2J 细胞, 提取细胞总蛋白, 用 Bradford 法测

定蛋白浓度。取 5×10^6 个细胞, 与 $2 \times$ SDS 凝胶加样缓冲液等体积混合, 100°C 加热 5 min 后分装于 -70°C 冻存。细胞总蛋白每泳道上样 30 μg , 12.5% SDS 凝胶电泳, 1 mA/ cm^2 半干转印 100 min, 以含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2h, 分别加入一抗 4°C 孵育过夜, 二抗 37°C 1 h, ECL 显影, 凝胶成像系统扫描各条带灰度值, 以 β -actin 为参照, 计算比值为统计值。

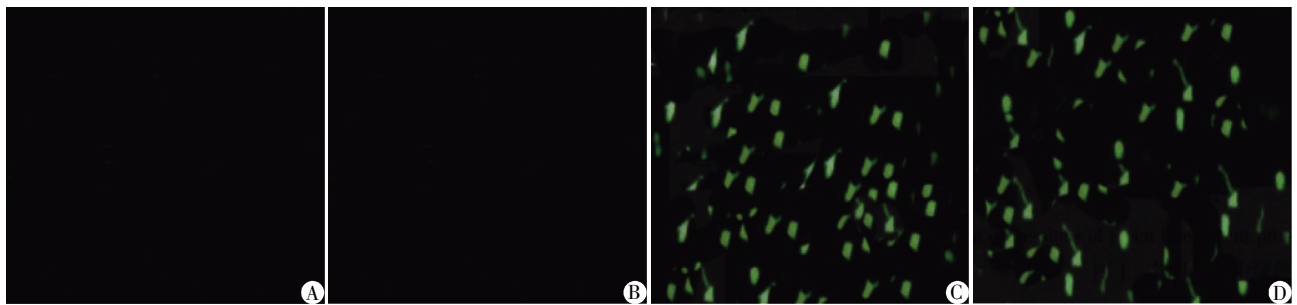
1.3 统计学方法

所有实验至少重复 3 次, 所有数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS12.0 统计软件进行单因素方差分析, 组间比较用 LSD-*t* 法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒转染成功的鉴定

pEGFP-N2 载体带有绿色荧光蛋白报告基因, 将空载质粒 pEGFP-N2 和重组质粒 pEGFP-N2/Pim-3 转染入 AR4-2J 细胞后, 可观察到空载质粒转染 LPS 处理组及重组质粒转染 LPS 处理组细胞表达绿色荧光蛋白, 而未转染质粒的正常对照组及 LPS 处理组细胞未见绿色荧光, 表明质粒转染成功(图 1)。



A: 正常对照组; B: LPS 处理组; C: 空载质粒转染 LPS 处理组; D: 重组质粒转染 LPS 处理组。

图 1 荧光显微镜下各组细胞中绿色荧光蛋白的表达($\times 100$)

Figure 1 The expression of green fluorescent protein of four groups under immunofluorescence microscope($\times 100$)

2.2 细胞凋亡检测结果

各组经分别处理 24 h 后, Annexin V/PI 法检测细胞凋亡率分别为: A 组(7.85 ± 1.14)%、B 组(53.13 ± 5.73)%、C 组(51.76 ± 5.17)%、D 组(21.13 ± 4.15)%。D 组细胞相对 B、C 组凋亡明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 2)。

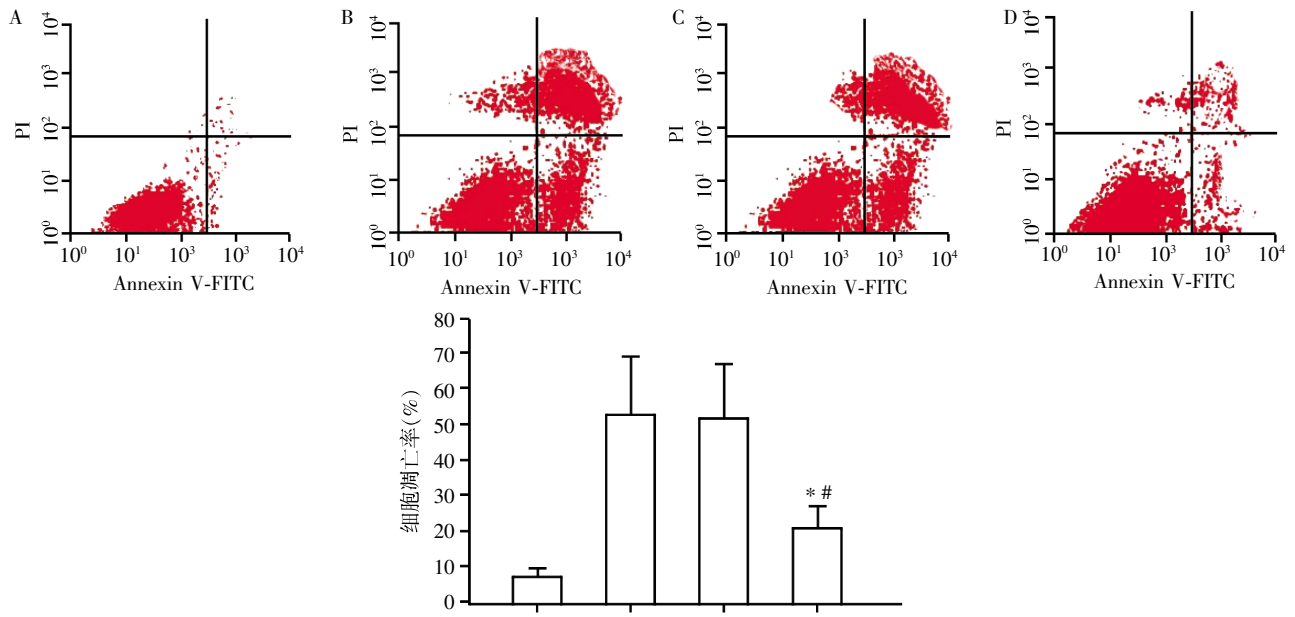
2.3 RT-PCR 结果

分 4 个时间段(处理 0、6、12、24 h)收集各处理组 AR4-2J 细胞进行 RT-PCR 检测。A、B、C 组 Pim-3 mRNA 一直处于低表达水平, D 组 Pim-3 mRNA 表达与 A、B、C 组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$,

图 3); A 组 ICAM-1 mRNA 一直处于低表达水平, 处理 12 h 后, B、C、D 组 ICAM-1 mRNA 高表达, 24 h 达高峰, 相对于 A 组, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), D 组与 B、C 组差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 4); A 组 Occludin mRNA 一直处于低表达水平, 处理 6 h 后, B、C、D 组 Occludin mRNA 高表达, 12 h 达高峰, 相对于 A 组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), D 组与 B、C 组差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 5)。

2.4 Western blot 结果

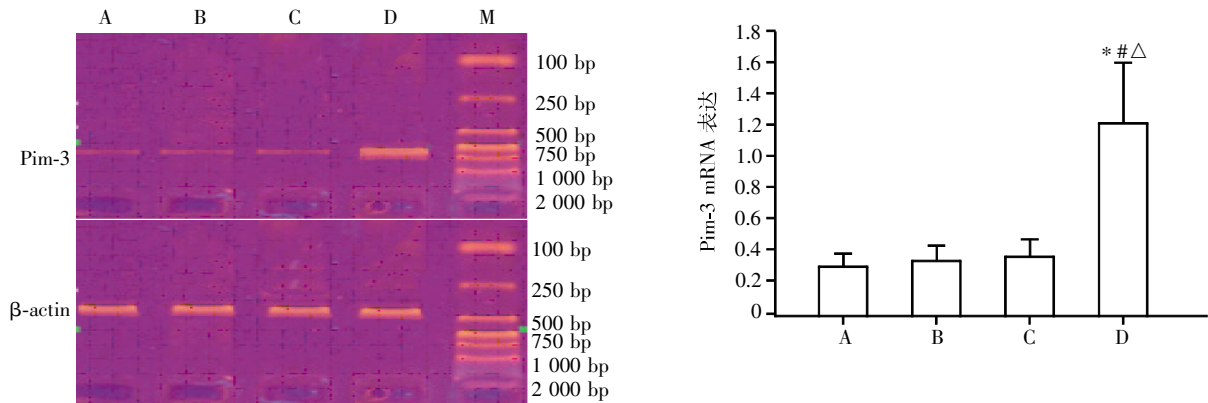
分 4 个时间段(处理 0、6、12、24 h)收集各处理组 AR4-2J 细胞进行 Western blot 检测(图 6)。A、B、



A: 正常对照组; B: LPS 处理组; C: 空载质粒转染 LPS 处理组; D: 重组质粒转染 LPS 处理组; 与 B 组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 流式细胞仪检测各组 AR4-2J 细胞的凋亡情况

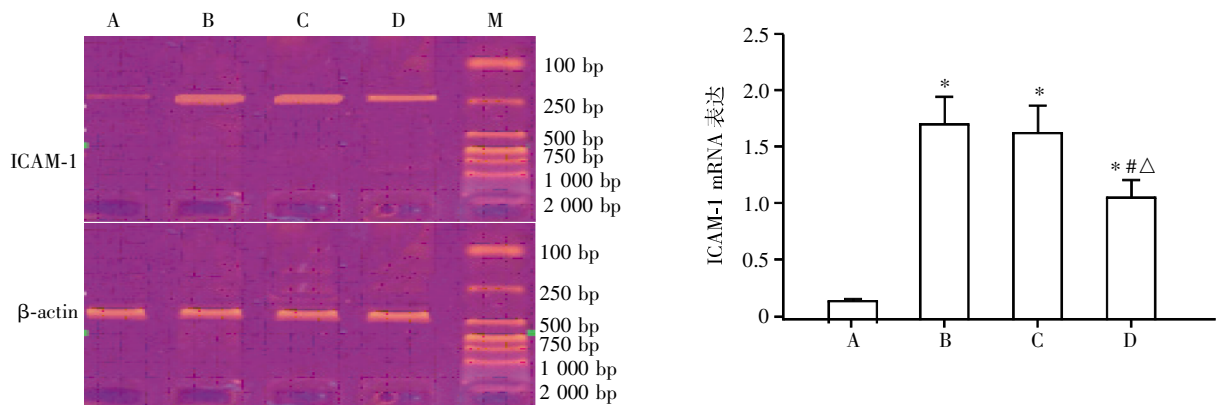
Figure 2 AR4-2J cells apoptosis in four groups by flow cytometry analysis



M: DL2 000 marker; A: 正常对照组; B: LPS 处理组; C: 空载质粒转染 LPS 处理组; D: 重组质粒转染 LPS 处理组; 与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 B 组比较, # $P < 0.05$; 与 C 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 3 RT-PCR 检测各组 Pim-3 mRNA 表达结果 (24 h)

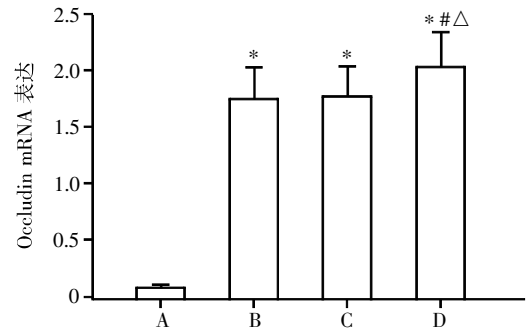
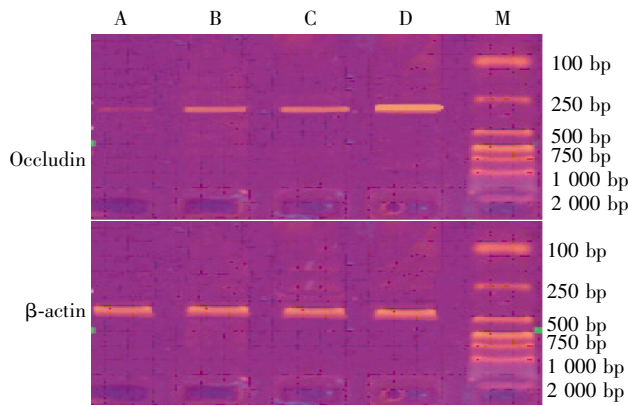
Figure 3 RT-PCR product of Pim-3 mRNA (24 h)



M: DL2 000 marker; A: 正常对照组; B: LPS 处理组; C: 空载质粒转染 LPS 处理组; D: 重组质粒转染 LPS 处理组; 与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 B 组比较, # $P < 0.05$; 与 C 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 4 RT-PCR 检测各组 ICAM-1 mRNA 表达结果 (24 h)

Figure 4 RT-PCR product of ICAM-1 mRNA (24 h)



M;DL2 000 marker; A:正常对照组;B:LPS 处理组;C:空载质粒转染 LPS 处理组;D:重组质粒转染 LPS 处理组。与 A 组比较,* $P < 0.01$;与 B 组比较,# $P < 0.05$;与 C 组比较,Δ $P < 0.05$ 。

图 5 RT-PCR 检测各组 Ooccludin mRNA 表达结果(12 h)

Figure 5 RT-PCR product of Ooccludin mRNA (12 h)

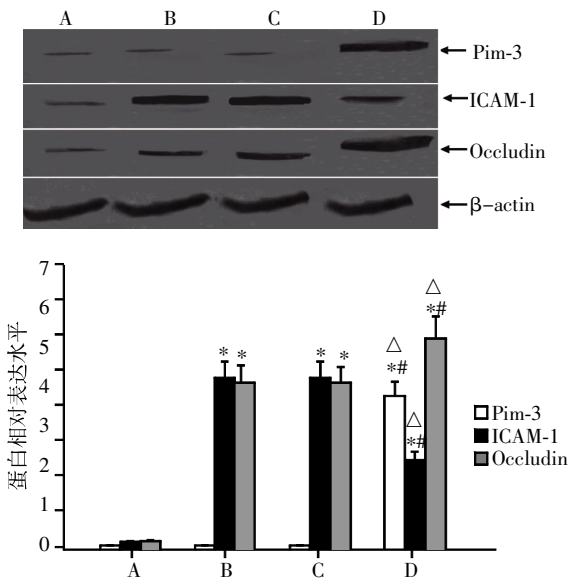
C 组 Pim-3 蛋白一直处于低表达水平,D 组 Pim-3 蛋白表达与 A、B、C 组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$);A 组 ICAM-1 蛋白一直处于低表达水平,处理 12 h 后 B、C、D 组 ICAM-1 蛋白高表达,24 h 达高峰,相对于 A 组,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),D 组与 B、C 组差异有统计学意义($P < 0.05$);A 组 Occludin 蛋白一直处于低表达水平,处理 6 h 后, B、C、D 组 Occludin 蛋白高表达,12 h 达高峰,相对于 A 组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),D 组与 B、C 组差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

胰腺损伤多表现为胰腺细胞炎症、坏死,在临床上急性胰腺损伤发病危急,进展快,严重并发症多,其发病机制尚未完全阐明。大量实验证实,胰腺损伤后可激活多种炎症介质,如肿瘤坏死因子、缓激肽、血小板激活因子、内皮素等,引起炎症反应,激活多种蛋白酶,导致胰腺及周围组织自身消化^[9-12]。

Pim 激酶家族是一组钙/钙调蛋白调节激酶 (CAMP) 家族,该家族成员包括 Pim-1、Pim-2、Pim-3,它们在激酶结构域高度同源,其生物学功能也存在显著重叠。Pim 激酶家族能够通过磷酸化细胞生长通路中起关键作用蛋白质分子内的丝/苏氨酸残基,促进细胞增殖及分化。Pim-1、Pim-2 已被大量实验证实是细胞生物通路中的关键分子,然而 Pim-3 的生物学功能研究较少。Pim-3 作为一个新型的 Pim 家族成员,定位于染色体 22q13,表达丝/苏氨酸激酶活性,能磷酸化众多特异性底物,分别在细胞增殖、分化、凋亡中发挥着重要调控作用。研究发现 Pim-3 在肝癌、胰腺癌、结肠癌、胃癌等内胚层衍生的消化道肿瘤中表达异常增加。Pim-3 可活化 Bad 凋亡蛋白,使其 112 位丝氨酸磷酸化,从而失去活性,抑制细胞凋亡,促进细胞增殖。研究也表明原癌基因 Pim-3 能够正性调控胰腺细胞增生及修复,抑制胰腺细胞凋亡^[13]。本研究也证实 Pim-3 细胞转染对胰腺细胞损伤具有明显保护作用,抑制细胞凋亡。

ICAM-1 作为黏附分子,一方面参与细胞免疫屏障功能,另一方面也促进了细胞的炎症反应。细胞炎症进展,需借助于其细胞表面黏附分子与细胞外基质及其他细胞的一系列相互作用,研究表



A:正常对照组;B:LPS 处理组;C:空载质粒转染 LPS 处理组;D:重组质粒转染 LPS 处理组;与 A 组比较,* $P < 0.01$;与 B 组比较,# $P < 0.05$;与 C 组比较,Δ $P < 0.05$ 。

图 6 Western blot 检测各组 Pim-3(24 h)、ICAM-1(24 h)、Occludin(12 h) 蛋白表达

Figure 6 Protein expressions of Pim-3(24 h),ICAM-1(24 h) and Occludin(12 h) by Western blot in each group