

内质网应激调节肝星状细胞 HGF 表达的作用机制

刘雨亭, 李 书, 陈建亮, 周 澍, 曹守纪, 俞 悦, 李国强*

(南京医科大学第一附属医院肝脏外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨内质网应激对肝星状细胞分泌肝细胞生长因子(hypatocyte growth factor,HGF)的影响及其可能机制。方法:通过在培养的大鼠肝星状细胞 T6 中分别加入 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 衣霉素或 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 毒胡萝卜素建立肝星状细胞内质网应激模型,4.0 mmol/L 4-苯基丁酸钠(4-phenylbutyrate,4-PBA)和 200.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ salubrinal 作为内质网应激抑制剂对 T6 细胞进行预处理,重组慢病毒 LV-eIf2 α -shRNA-GFP 敲减 T6 细胞中的 eIf2 α mRNA 表达,并提取 mRNA 和全蛋白进行 RT-PCR 和 Western blot 实验检测 HGF、分子伴侣重链结合蛋白(glucose-regulated protein 78,GRP78)、真核翻译起始因子 2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α ,eIf2 α)、磷酸化 eIf2 α 、激活转录因子 4(activating transcription factor 4,ATF4)以及凋亡信号分子 C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein,CHOP)。结果:衣霉素、毒胡萝卜素可诱导 T6 细胞 GRP78 升高,激活内质网应激状态的同时抑制 HGF 表达,4-PBA 和 salubrinal 可阻止内质网应激引起的 HGF 降低,但对 ATF4 和 CHOP 的表达作用不同。慢病毒转染 T6 降低细胞 eIf2 α 表达的同时成比例降低 HGF 表达。结论:ERS 激活后可通过影响 eIf2 α 表达从而抑制 HGF 表达。

[关键词] 内质网应激;肝细胞生长因子;真核翻译起始因子 2 α ;肝星状细胞;苯基丁酸钠盐;salubrinal

[中图分类号] R363

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)09-1046-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20160905

Mechanism of HGF expression regulated by endoplasmic reticulum stress in hepatic stellate cells

Liu Yuting, Li Shu, Chen Jianliang, Zhou Shu, Cao Shouji, Yu Yue, Li Guoqiang*

(Department of Liver Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To detect whether suppression of endoplasmic reticulum (ER) stress maintains hepatocyte growth factor (HGF) expression in hepatic stellate cells (HSCs) and its potential mechanism. **Methods:** Rat hepatic stellate cell line HSC-T6 was treated with the ER stress agonists 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tunicamycin and 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ thapsigargin, and ER stress inhibitors sodium 4-phenylbutyrate (4-PBA) 4.0 mmol/L and salubrinal 200.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ were used as pretreatment. Recombinant lentivirus LV-eIf2 α -shRNA-GFP was produced to block eIf2 α activated by ER stress. Levels of HGF, glucose-regulated protein 78 (GRP78), eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIf2 α), phospho-eIf2 α , activating transcription factor 4 (ATF4) and C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) homologous protein (CHOP) *in vitro* were measured by quantitative RT-PCR and Western blot. **Results:** Our results demonstrated that tunicamycin or thapsigargin stimulated GRP78 expression, and activation of ER stress inhibited HGF expression in HSC-T6 cells. The inhibition of HGF could be partly prevented in the presence of 4-PBA or salubrinal, but their effects on ATF4 and CHOP expression were different. Interfering eIf2 α mRNA proportionately down-regulated HGF expression. **Conclusion:** The activation of ER stress inhibits HGF expression of HSCs through decreasing eIf2 α expression.

[Key words] endoplasmic reticulum stress; hepatocyte growth factor; eukaryotic translation initiation factors 2 α ; hepatic stellate cells; sodium 4-phenylbutyrate; salubrinal

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(09): 1046-1051]

[基金项目] 国家自然科学基金(81070380);江苏省自然科学基金(BK20131445);国家卫计委行业基金(20132009)

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

内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)是指各种因素刺激细胞引起细胞内质网结构和功能发生紊乱,错误折叠或未折叠的蛋白质在内质网腔内聚集、钙稳态失衡等亚细胞器的一种病理状态^[1]。当细胞内质网内未折叠或错误折叠蛋白累

积过多超过内质网折叠能力时可激活未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),从而调节细胞蛋白质合成和恢复内质网稳态平衡。这种生理适应性反应对于富含内质网和负责蛋白质合成的细胞特别重要,如淋巴细胞、胰腺 β 细胞、腺泡细胞、肝细胞以及肝星状细胞等。目前研究认为:肝脏细胞内存在相当数量的内质网,诱导其发生 ERS 的因素有很多,例如感染病毒、酒精损伤、药物中毒、缺血再灌注损伤、低氧/复氧、钙离子失衡、氧化应激、代谢障碍、突变基因表达的结构异常蛋白在内质网堆积等^[2]。

UPR 是由 3 种镶嵌在内质网上的跨膜传感器所介导的应激反应,具有保护性质,其中一种跨膜传感蛋白为双链 RNA 依赖性蛋白激酶样 ER 激酶(PKR-like ER kinase, PERK)。ERS 未激活时,PERK 在内质网上和分子伴侣重链结合蛋白(glucose-regulated protein 78, GRP78)结合,处于无活性状态。ERS 激活可使 GRP78 与 PERK 解离,并结合未折叠蛋白从而促进蛋白质的正确折叠。细胞中 GRP78 蛋白的增加常被视为 ERS 的标志。PERK 解离后被磷酸化,并进一步磷酸化真核翻译起始因子 2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α , eIF2 α)。若 ERS 状态仍未终止,磷酸化的 eIF2 α 可进一步促进激活转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4) 以及凋亡信号分子 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 的表达从而启动细胞凋亡信号途径^[1]。

肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 可通过结合肝细胞表面受体 c-Met 从而参与肝脏损伤后的再生及修复^[3]。尽管最初认为 HGF 只是一种肝细胞的有丝分裂原,但进一步调查显示, HGF 还拥有促有丝分裂、抗纤维化、抗凋亡和肿瘤抑制等多种有益效果^[4]。肝脏间质细胞,包括肝星状细胞和枯否细胞,是肝脏中主要分泌 HGF 的细胞,对肝实质细胞的生长调控起着重要作用^[5]。有报道表明血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达受 ERS 调控^[6]。而 HGF 与 VEGF 都是具有促进增殖再生作用的细胞因子,因此推测 HGF 的表达或许也受到 ERS 的调控。

本研究以大鼠肝星状细胞系 T6 细胞建立的 ERS 细胞模型为研究对象,探讨衣霉素或毒胡萝卜素诱导的 ERS 对肝星状细胞分泌 HGF 的影响及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠肝星状细胞株 T6 为南京医科大学病理生理实验室田文芳^[7]提供,是 SV40 转染 SD 大鼠肝星状细胞所得,其表型为活化的肝星状细胞。衣霉素(tunicamycin, TM)、毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)、4-苯基丁酸钠盐(4-phenylbutyrate, 4-PBA)、salubrinol 试剂(Sigma 公司,美国);兔抗大鼠 HGF 一抗、兔抗大鼠 GAPDH 一抗(Santa Cruz Biotechnology 公司,美国);兔抗大鼠 eIF2 α 一抗、兔抗大鼠 p-eIF2 α 一抗、兔抗大鼠 GRP78 一抗、兔抗大鼠 ATF4 一抗、小鼠抗大鼠 CHOP 一抗(Cell Signaling Technology 公司,美国);HRP 标记羊抗兔二抗、HRP 标记羊抗鼠二抗(杭州碧云天生物研究所);总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);TaKaRa 逆转录试剂盒、TaKaRa RT-PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组设计

5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TM、0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ TG 分别作为 ERS 激活剂处理 T6 细胞,4.0 mmol/L 4-PBA 与 200.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ salubrinol 分别作为 ERS 抑制剂于激活剂处理前 1 h 加入。激活剂处理细胞 0、1、2、4、8、12 h 取材后保存,以便进行下一步实验研究。

1.2.2 Western blot 检测蛋白表达

十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白后,转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,室温条件下将膜浸入含有 5% 牛血清白蛋白(BSA)的封闭液中封闭 1 h,然后加入稀释的一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜。TBST 洗膜 4 次,每次 10 min。最后使用 ECL 化学发光法曝光结果(采用 Image Lab 软件)。

1.2.3 荧光实时定量聚合酶链式反应实验(RT-PCR)

根据试剂盒说明书提取细胞 mRNA 并通过逆转录反应合成 cDNA。引物由 Invitrogen 公司设计与合成,根据说明书加无 RNA 酶水稀释后待用,引物序列如下:GAPDH 上游引物:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游引物:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3';GRP78 上游引物:5'-CTGTGAGACACCTGACCGAC-3',下游引物:5'-GACGCAGGAA-TAGGTGCTCC-3';HGF 上游引物:5'-CTCACTGTTTCAAGTTGAATGCAT-3',下游引物:5'-CGGTGTGGTGTCTGCTGATC-3';eIF2 α 上游引物:5'-CACTTCAGAATGCCGGGTCT-3',下游引物:5'-AA-CAAGCTGACATAGGCCCC-3'。使用 96 孔板,每个

样本3个复孔,每孔20 μL反应体系。采用 StepOne 荧光定量 PCR 仪,第1阶段:95℃ 30 s,预变性;第2阶段:95℃ 5 s,60℃ 30 s,40个循环。

1.2.4 RNA 干扰慢病毒载体构建

由上海吉凯公司设计并合成1条 eIF2α-shRNA 序列(5'-GTACAAGAGACCTGGATAT-3')和1条阴性对照序列 NC-shRNA (5'-TTCTCCGAACGTGT-CACGT-3')。采用 GV248 载体,元件顺序为 hu6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin。连接、转化及鉴定后,根据 Invitrogen 公司的 Lipofectamine 2000 使用说明共转染 293T 细胞,转染 9 h 后换液为完全培养基(DMEM),继续培养细胞 48 h 后收集细胞上清,对其浓缩后即可得到高滴度的慢病毒浓缩液并在 293T 细胞中测定病毒滴度。病毒感染细胞 3 d 后,观察荧光率大于 90%者,将细胞分成 2 份,收集细胞分别用于 RNA 提取和蛋白提取,再根据 Western blot 及 PCR 检测结果鉴定 RNA 干扰效果。

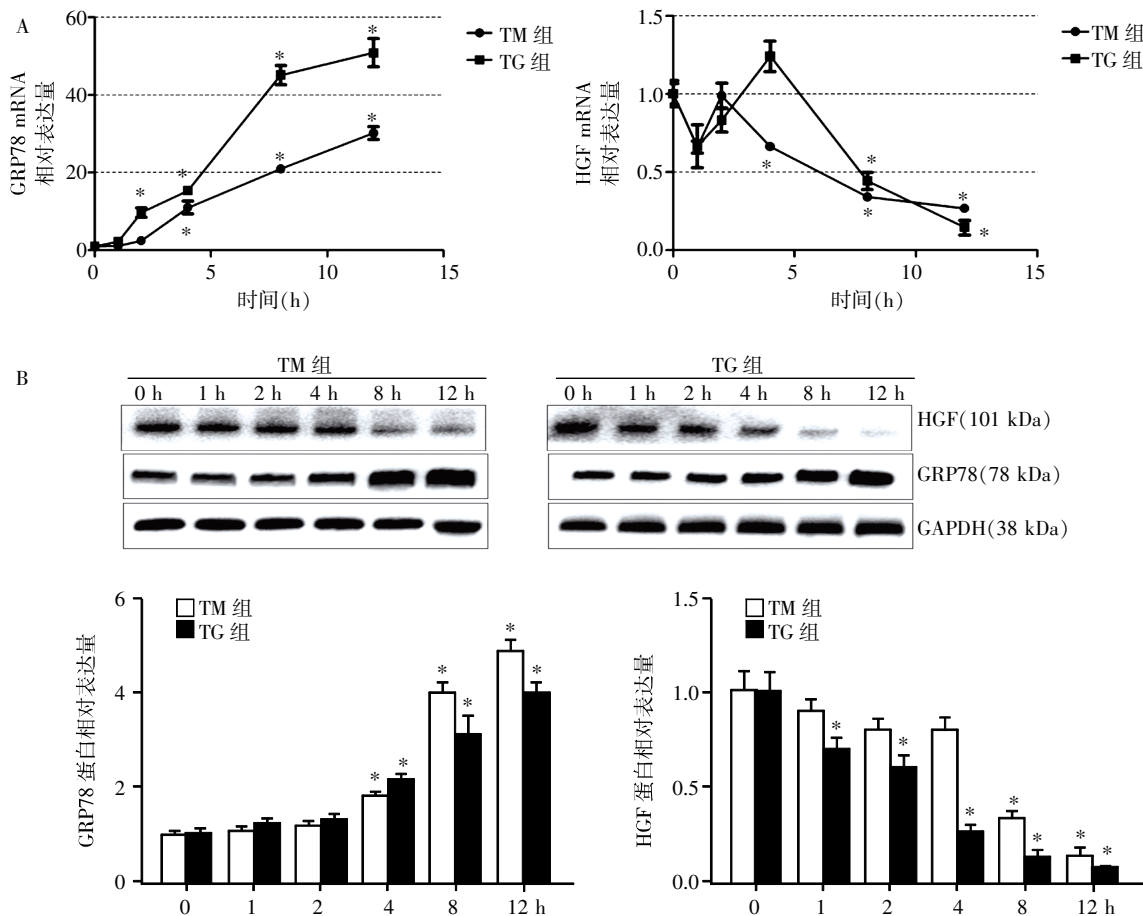
1.3 统计学方法

应用 SPSS19.0 软件进行统计分析,所有实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,用 *t* 检验进行两组之间的比较, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ERS 抑制 T6 细胞 HGF 表达

T6 细胞在 5.0 μg/mL TM 或 0.2 μmol/L TG 处理 0、1、2、4、8、12 h 后检测 HGF、GRP78 表达。RT-PCR 检测发现(图 1A),TM 或 TG 处理细胞 12 h 较处理前,ERS 激活标志蛋白 GRP78 mRNA 均显著增高($P < 0.05$),而 HGF mRNA 显著降低($P < 0.05$)。Western blot 发现(图 1B),随着 TM 或 TG 处理时间延长,HGF 蛋白水平逐渐降低,与 RT-PCR 结果一致。GRP78 蛋白表达增加证明 T6 细胞发生 ERS,可见 ERS 激活可抑制 HGF 表达。



A: RT-PCR 检测 GRP78 mRNA 和 HGF mRNA 相对表达量,与 0 h 相比, * $P < 0.05$ ($n=3$); B: Western blot 检测 GRP78 和 HGF 蛋白的表达,与 0 h 相比, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

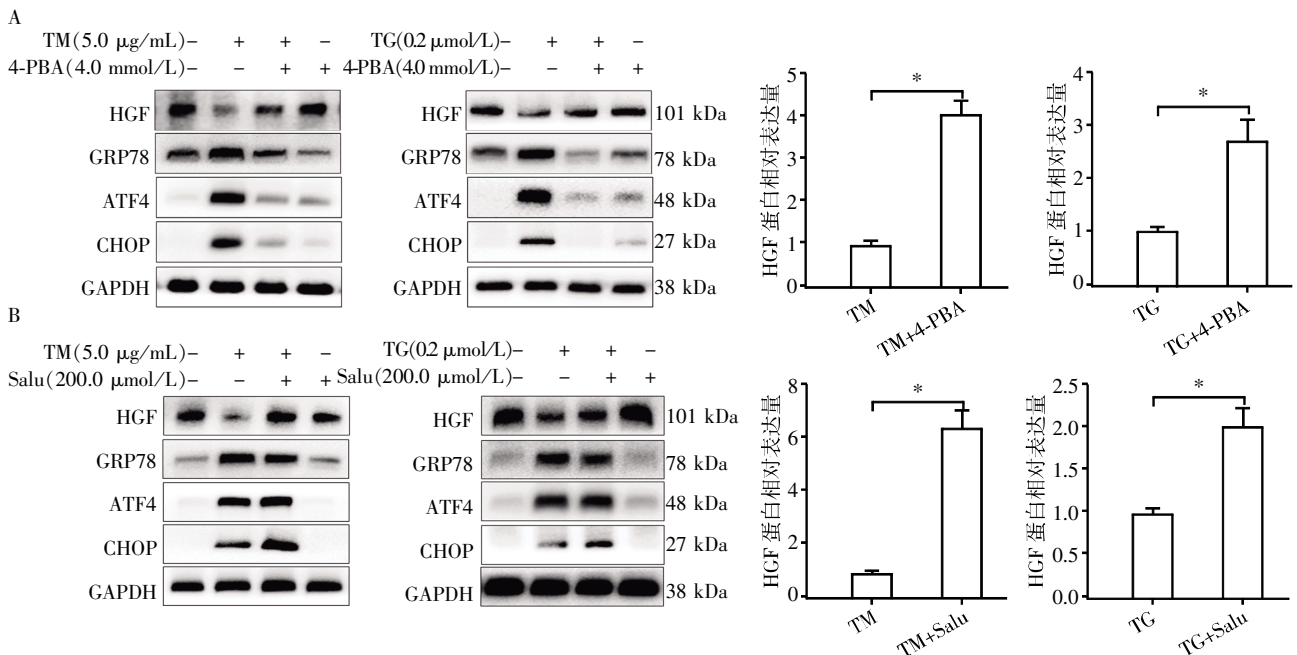
图 1 激活 T6 细胞 ERS 可抑制 HGF 表达

Figure 1 Activation of ERS reduced HGF in HSC-T6 cells

2.2 4-PBA 和 salubrinal 可阻止 T6 细胞 ERS

分别用 4.0 mmol/L 4-PBA 和 200.0 $\mu\text{mol/L}$ salubrinal (Salu) 预处理 1 h, 5.0 $\mu\text{g/mL}$ TM 或 0.2 $\mu\text{mol/L}$ TG 处理 T6 细胞 12 h 后,通过 Western blot 方法检测 HGF、GRP78、ATF4 和 CHOP 表达情况(图 2)。4-PBA 预处理阻止了 ERS 引起的 GRP78、ATF4 和 CHOP 的增加和 HGF 的降低($P < 0.05, n=3$, 图 2A)。salubrinal 同样阻止了 ERS 引起的 HGF 降

低($P < 0.05, n=3$),但 ATF4 和 CHOP 蛋白反而进一步增加(图 2B)。而根据 Salubrinal 选择性抑制 p-eIF2 α 去磷酸化过程的特性,可推测出 salubrinal 可以使 ERS 引起的 ATF4 和 CHOP 增加更多,这也与本结果相符。但 4-PBA 和 salubrinal 都阻止 ERS 抑制 HGF 的过程,推测 HGF 的表达与 ATF4 和 CHOP 关系不大(包括他们引起的后续变化),而 eIF2 α 可能是调控 HGF 表达的关键蛋白。



A: Western blot 检测 4-PBA 预处理对 TM 和 TG 引起的蛋白表达改变的影响,两组比较, * $P < 0.05 (n=3)$; B: Western blot 检测 Salubrinal 预处理对 TM 和 TG 引起的蛋白表达改变的影响,两组比较, * $P < 0.05 (n=3)$ 。

图 2 4-PBA 和 salubrinal 可阻止 ERS 抑制 HGF 过程

Figure 2 4-PBA and salubrinal inhibited the effect of ERS on the expression of HGF

2.3 敲减 T6 细胞中的 eIF2 α mRNA 可降低其 HGF 表达

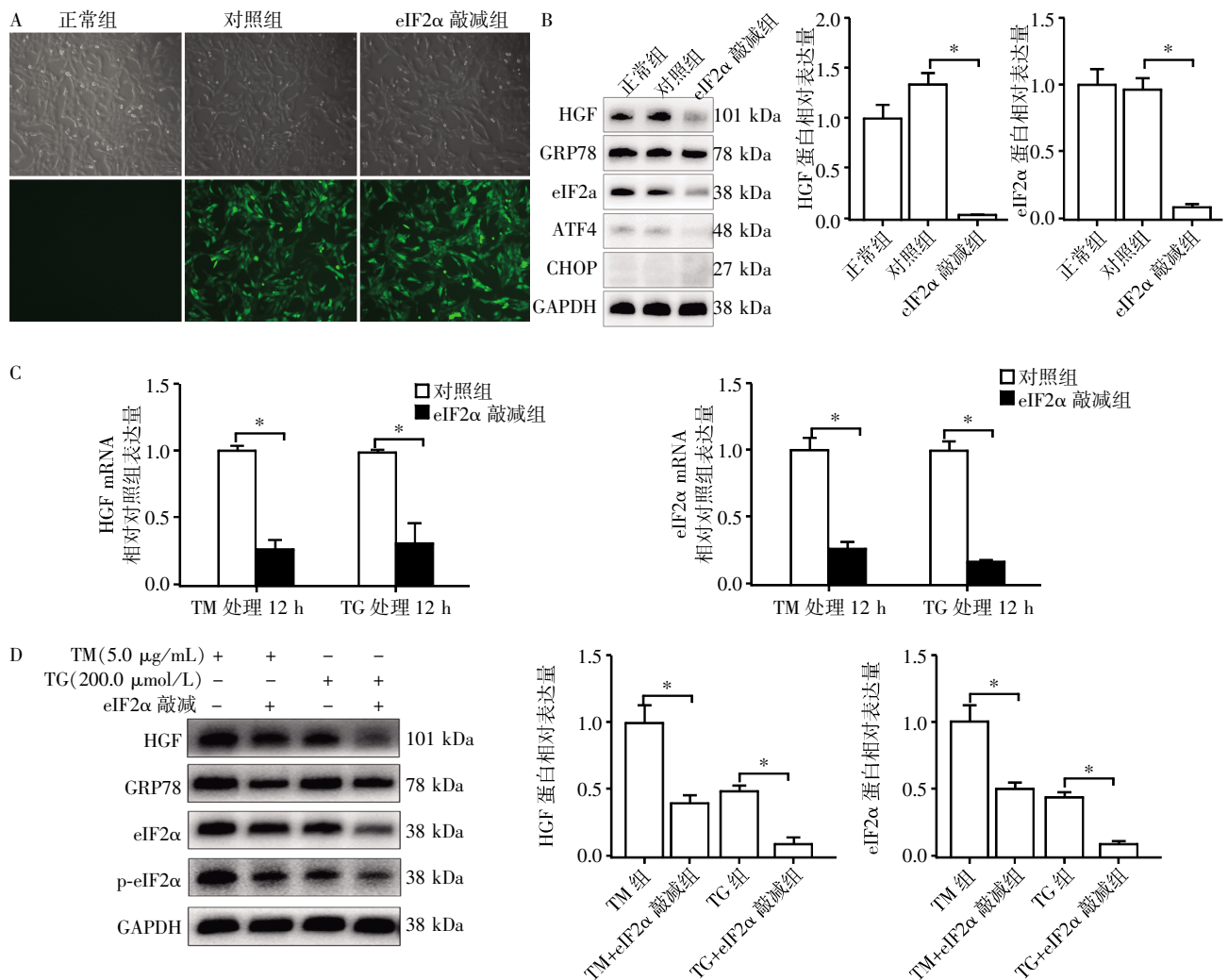
为了进一步验证 eIF2 α 与 HGF 表达的关系,通过慢病毒转染建立 2 株细胞系,对照组(阴性对照病毒感染)和 eIF2 α 敲减组(荧光率大于 90%,图 3A),通过 RT-PCR 或 Western blot 方法检测正常状态 and ERS 状态(5.0 $\mu\text{g/mL}$ TM 或 0.2 $\mu\text{mol/L}$ TG 处理 12 h)下 HGF、GRP78 等蛋白的表达(图 3)。正常状态下,对照组细胞和正常组细胞在相关分子表达上无显著差异(图 3B),敲减 eIF2 α 可显著降低 HGF 和 eIF2 α 水平($P < 0.05, n=3$),而 GRP78 和 CHOP 水平基本无变化(图 3B)。ERS 状态下,eIF2 α 敲减后 HGF 和 eIF2 α mRNA 水平全部降低($P < 0.05, n=3$, 图 3C)。ERS 状态下敲减 eIF2 α 不仅明显降低 HGF 水平,还一定程度上降低 GRP78 和 p-eIF2 α 蛋白水平(图 3D)

3 讨论

ERS 在调节各种肝脏疾病的病理生理变化过程中扮演重要角色。已知在 LO2 细胞中 ERS 可通过下调 HGF 受体 c-Met 的表达而抑制肝细胞增殖^[8]。这表明,在肝再生过程中 ERS 和 HGF 有潜在联系。本研究亦发现 ERS 激活会抑制肝星状细胞 HGF 的表达。

肝星状细胞是肝脏组织中分泌 HGF 的主要细胞,而占据大部分肝脏体积的肝细胞基本不分泌 HGF^[9]。可是从鲜活肝脏组织中提取原代肝星状细胞培养会使细胞逐渐转化为肌成纤维样细胞,随着时间推移,细胞表达 HGF 会逐渐减少^[10]。因此,我们利用一种培养期间具有稳定表型可持续分泌 HGF 的 T6 细胞^[11],来进行细胞实验研究 ERS 与 HGF 之间的关系。

TM 可以阻断合成蛋白的 N 链糖基化过程使未



A: 荧光显微镜观察 HSC-T6 绿色荧光蛋白表达($\times 200$); B: Western blot 检测各组 HGF 等蛋白表达水平, 两组比较, $*P < 0.05 (n=3)$; C: qRT-PCR 检测 ERS 时 HGF、eIF2 α mRNA 水平, 两组比较, $*P < 0.05 (n=3)$; D: Western blot 检测 ERS 时 HGF 等蛋白表达水平, 两组比较, $*P < 0.05 (n=3)$ 。

图 3 shRNA 敲减 eIF2 α mRNA 降低 HGF 表达

Figure 3 Down-regulation of HGF by knockout of eIF2 α -specific shRNA

折叠蛋白增多从而激活细胞 UPR 反应^[12]。而 TG 可诱导胞浆内 Ca²⁺浓度上升和内质网储存钙的下降而激活 ERS^[13]。本研究中 TM 和 TG 被分别用来激活 T6 细胞的 UPR 反应, 进一步强调 ERS 在调控 HGF 表达中的作用。已知 TM 和 TG 诱导的 ERS 均可上调血管内皮生长因子 VEGF 表达^[6], 但本研究结果显示, 肝星状细胞的 HGF 表达均能被 TM 或 TG 抑制。进一步研究发现, ERS 引起的 VEGF 表达上调和 HGF 表达抑制均能被 4-PBA 阻止。4-PBA 是一种广泛使用的 ERS 抑制剂, 可直接抑制 GRP78 上调。因此推测虽然与 VEGF 的调控方式不同, 但 HGF 表达也应受到 ERS 的调控, 特别是与 UPR 反应通路中的某种或某几种蛋白有关。

细胞 ERS 激活时, 磷酸化的 PERK 通过磷酸化

eIF2 α 可以下调抑制大部分蛋白质翻译过程, 以减少内质网内错误蛋白或未折叠蛋白的堆积, 减轻内质网负担和促进细胞内环境平衡^[14]。本研究使用的 salubrinal 是一种 p-eIF2 α 去磷酸化抑制剂, 作为一种选择性 ERS 抑制剂^[15], 本研究发现它与 4-PBA 一样能阻止 ERS 引起的 HGF 表达抑制。因此推测 salubrinal 主要影响的 PERK-eIF2 α 信号通路是 UPR 调控 HGF 的主要通路, 但其信号通路中的下游蛋白 ATF4 和 CHOP 在 4-PBA 和 salubrinal 处理下却有了不同的变化趋势 (图 2 中, 4-PBA 处理使 ATF4 和 CHOP 减少, salubrinal 处理二者却进一步增加), 暗示 ATF4 和 CHOP 蛋白与 HGF 表达无关。考虑到 salubrinal 特异性抑制 p-eIF2 α 的去磷酸化, 进一步推测 HGF 表达与 eIF2 α 或 p-eIF2 α 有关。为了证

实二者之间的关系,本研究采用重组慢病毒转染 T6 细胞的方式构建了 1 株敲减了 eIF2 α mRNA (约 50%)的肝星状细胞,并分别于正常状态和 ERS 状态下进行 RT-PCR 和 Western blot 分析,结果显示相比正常细胞,HGF 表达同样下降且降低比例与 eIF2 α 的降低相似(图 3)。由此可见,HGF 的表达受 PERK 通路中 eIF2 α 的调控,但依然不排除 p-eIF2 α 的潜在调控可能,有待进一步探究。

综上所述,ERS 激活可抑制肝星状细胞 HGF 的表达,其中 eIF2 α 蛋白起到至关重要作用。以 eIF2 α 蛋白为靶点可能成为 HGF 治疗肝脏再生功能障碍疾病的新方向,至于 eIF2 α 调控 HGF 表达的具体机制还有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Folch-Puy E, Panisello A, Oliva J, et al. Relevance of endoplasmic reticulum stress cell signaling in liver cold ischemia reperfusion injury [J]. *Int J Mol Sci*,2016,17(6):6
- [2] Dara L, Ji C, Kaplowitz N. The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases [J]. *Hepatology*, 2011,53(5):1752-1763
- [3] Shupe TD, Petersen BE. Liver regeneration: A consequence of complex, well-orchestrated signals[J]. *Hepatology*,2015,62(2):644-645
- [4] Gambella M, Palumbo A, Rocci A. Met/HGF pathway in multiple myeloma: from diagnosis to targeted therapy? [J]. *Expert Rev Mol Diagn*,2015,15(7):881-893
- [5] Ichihara A. BCA, HGF, and proteasomes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,1999,266(3):647-651
- [6] Abcouwer SF, Marjon PL, Loper RK, et al. Response of VEGF expression to amino acid deprivation and inducers of endoplasmic reticulum stress[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2002,43(8):2791-2798
- [7] Tian W, Hao C, Fan Z, et al. Myocardin related transcription factor A programs epigenetic activation of hepatic stellate cells[J]. *J Hepatol*,2015,62(1):165-174
- [8] He Y, Long J, Zhong W, et al. Sustained endoplasmic reticulum stress inhibits hepatocyte proliferation via downregulation of c-Met expression[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014,389(1/2):151-158
- [9] Chen L, Zhang W, Zhou QD, et al. HSCs play a distinct role in different phases of oval cell-mediated liver regeneration[J]. *Cell Biochem Funct*,2012,30(7):588-596
- [10] Kmieć Z. Cooperation of liver cells in health and disease [J]. *Adv Anat Embryol Cell Biol*,2001,161:III-VIII, 1-151
- [11] Tomiya T, Inoue Y, Yanase M, et al. Leucine stimulates the secretion of hepatocyte growth factor by hepatic stellate cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2002,297(5):1108-1111
- [12] Chan SW, Egan PA. Hepatitis C virus envelope proteins regulate CHOP via induction of the unfolded protein response[J]. *FASEB J*,2005,19(11):1510-1512
- [13] Hakii H, Fujiki H, Suganuma M, et al. Thapsigargin, a histamine secretagogue, is a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*,1986,111(3):177-181
- [14] Fullwood MJ, Zhou W, Shenolikar S. Targeting phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α to treat human disease[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*,2012,106:75-106
- [15] Gao B, Zhang XY, Han R, et al. The endoplasmic reticulum stress inhibitor salubrinal inhibits the activation of autophagy and neuroprotection induced by brain ischemic preconditioning [J]. *Acta Pharmacol Sin*,2013,34(5):657-666

[收稿日期] 2016-05-07