

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2019) 01-0005-04

棕榈酸对肝细胞自噬和凋亡的影响

杜 卉¹ 张 扬^{2a} 孟祥健¹ 吕康甲^{2a} 吴晓莉^{2a} 王李卓^{2b} 邢春燕¹ 何春玲¹ 高家林¹

(1.皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 内分泌科,安徽 芜湖 241001; 2.皖南医学院 a.临床医学院; b.生物化学与分子生物学教研室,安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 探究棕榈酸对肝细胞内自噬和凋亡途径的影响。方法: 不同浓度棕榈酸处理肝细胞并检测自噬相关蛋白的改变; CCK-8 法检测不同浓度棕榈酸对肝细胞活性的影响; 棕榈酸培养细胞不同时间, 观察细胞数量和形态的改变; 棕榈酸培养细胞 8 h 后用 DAPI 染色观察细胞核形态。结果: 棕榈酸使自噬相关蛋白表达增加, 但并不表现为剂量依赖性; 随着棕榈酸浓度的增加, 细胞活力下降; 随着棕榈酸作用时间的增加, 细胞数量减少; 和对照组相比, 棕榈酸处理组细胞核致密浓染。结论: 棕榈酸能够引起肝细胞凋亡, 细胞活力下降, 同时通过 Erk1/2 通路引起肝细胞自噬增强。

【关键词】自噬; 凋亡; 棕榈酸; Erk1/2 信号通路; 肝细胞

【中图分类号】R 285; R 575 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2019.01.002

Effects of palmitate on autophagy and apoptosis of hepatocytes

DU Hui, ZHANG Yang, MENG Xiangjian, LYU Kangjia, WU Xiaoli, WANG Lizhuo, XING Chunyan, HE Chunling, GAO Jialin

Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To observe the effect of palmitate on autophagy and apoptosis of hepatocytes. **Methods:** The hepatocytes were treated with palmitic acid in different concentration, the changes of autophagy-related proteins were detected. CCK-8 assay was performed to determine the effect of palmitic acid in different dose on the activity of hepatocytes. Hepatic cells were cultured in diverse time phase to observe the changes of cell count and morphology, and also cultured with palmitic acid for 8 h and stained with DAPI to observe alteration of the nuclei. **Results:** Palmitic acid increased the expression of autophagy-related protein, yet the expression was not in a dose-dependent manner. Hepatic cell activity was decreased with added dose of palmitate, and the cell count was reduced with prolonged treatment of palmitic acid. Hepatocytes treated with palmitic acid presented with densely stained nuclei as compared with the control group. **Conclusion:** Palmitic acid can induce apoptosis of hepatocytes and decrease cell viability. Palmitate-induced autophagy of hepatocytes may be involved in Erk1/2 signaling pathway.

【Key words】 autophagy; apoptosis; hepatocytes; Erk1/2 signaling; palmitic acid

自噬和凋亡是真核生物体内两种重要的生理过程。自噬是体内物质降解的重要途径, 借助具有双层膜结构的自噬小泡, 将降解底物运送至溶酶体内降解。多种体内外刺激因素引起内环境改变, 使自噬上游调控通路被激活, ULK1/ULK2 复合体活化使自噬起始, 随后在 Beclin1-Vps34-Vps15 复合体的作用下成核, 借助 Atg12-Atg5 系统和 LC3 修饰这两个泛素样系统调控自噬体膜的形成和延伸, 最终形成自噬体并与溶酶体融合, 底物进入溶酶体内降解, 形

成一个完整的自噬过程。细胞内破损或衰老的细胞器、错误合成或错误折叠的蛋白质等可以通过自噬被降解, 从而维持细胞内的相对稳定。凋亡也是体内促进细胞数量相对稳定的自我平衡机制, 同时可以发挥防御功能, 凋亡通过 caspase 家族发挥作用, 通过级联反应导致细胞核固缩、DNA 断裂和细胞核的崩解, 最终形成凋亡小体被周围细胞吞噬。自噬和凋亡参与癌症发病^[1-2], 脂性凋亡^[3]和脂质自噬^[4]在脂质诱导机体病变的过程中发挥重要

基金项目: 国家自然科学基金项目(81800766); 安徽省自然科学基金项目(1708085MH188); 皖南医学院重点科研项目培育基金(WK2016ZF01); 皖南医学院中青年科研基金项目(WK2016F01)。

收稿日期: 2018-03-22

作者简介: 杜 卉(1992-), 女, 2015 级硕士研究生, (电话) 18895372049, (电子信箱) duhui_sd@163.com;

高家林, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, (电子信箱) jialing.gao@yahoo.com, 通信作者。

作用。

棕榈酸为饱和脂肪酸,对于脂质代谢相关疾病的发病具有重要意义,饱和脂肪酸摄入过多能够增加心血管疾病的发病风险^[5],前期研究中发现脂质和自噬及凋亡有密切联系,所以我们希望明确棕榈酸对于自噬和凋亡的具体影响,从而进一步明确脂质与自噬和凋亡的关系,指导相关疾病的防治。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 小鼠正常肝细胞(AML12 细胞)购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC),人肝癌细胞(HepG2 细胞)购自中国科学院细胞库。棕榈酸处理前细胞均经过 1% FBS 培养基预处理。

1.1.2 主要材料与试剂 棕榈酸钠购自 Sigma 公司;无脂肪酸牛血清白蛋白购自生工生物公司;AML12 细胞完全培养液(SCSP-654)购自中国科学院细胞库;p-mTOR、Atg5、p-erk 均购自 Cell Signaling Technology; Bcl2 购自 Proteintech; LC3B、β-actin 购自美国 Sigma 公司;P62 购自 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)及 DAPI 染色液购自碧云天公司;化学发光底物和彩色预染蛋白质分子量标准(10~180 ku)购自赛默飞世尔科技;Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒购自北京索莱宝公司;甲醇(AR)购自国药集团化学试剂有限公司,实验用水均为超纯水(产自 Millipore 超纯水系统)。

1.2 方法

1.2.1 药物配制 用甲醇配制棕榈酸钠母液,用含 1%无脂肪酸牛血清蛋白的完全培养液稀释至所需浓度。

1.2.2 CCK8 法检测细胞活力 细胞接种于 96 孔板,37℃,5%CO₂ 预培养 24 h,向孔内加入 10 μL 不同浓度棕榈酸溶液,培养箱内孵育 8 h,更换新鲜培养基,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,在培养箱内孵育 4 h,酶标仪测定 450 nm 处吸光度。

1.2.3 DAPI 染色 吸弃培液,PBS 漂洗 1 次,加入适量 DAPI 染色液室温避光染色 5 min,吸弃 DAPI 染色液,PBS 清洗 3 次,每次 5 min,在半智能荧光倒置显微镜下观察。

1.2.4 western blotting 检测蛋白水平 处理后的贴壁细胞,PBS 洗涤后加入适量蛋白裂解液,将细胞收集至洁净的 1.5 mL EP 管,细胞破碎仪破碎细胞后

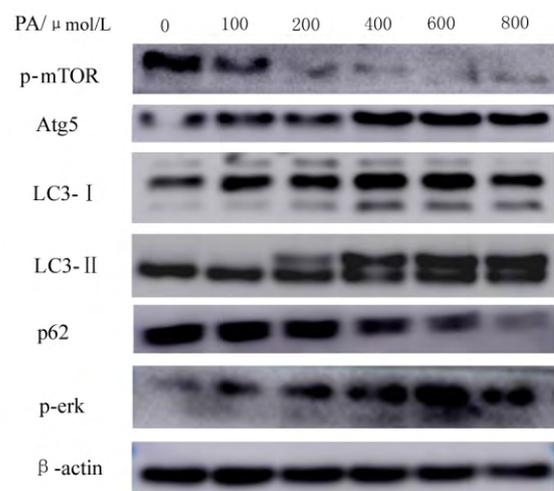
于冰上静置 30 min,随后 4℃、12 000 r/min 离心 15 min,上清即为细胞总蛋白。按照蛋白 60 μg/孔上样,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,转膜,封闭,一抗 4℃ 孵育过夜,1×TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,二抗室温孵育 1 h,1×TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,ECL 发光法显影。

1.2.5 统计学处理 利用 Microsoft Excel 2007、SPSS 16.0 和 GraphPad Prism 5 软件处理数据,数据分析采用单因素方差分析(One-way ANOVA),P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 western blotting 检测棕榈酸对细胞的影响 不同浓度的棕榈酸溶液孵育 HepG2 细胞 8 h,检测自噬及凋亡相关蛋白的表达。mTOR 是自噬调控蛋白,mTOR 被抑制时,Atg13 去磷酸化,形成 ULK1-Atg13-FIP200 复合物,促进吞噬泡的形成;而 Atg12-Atg5-Atg16 复合物和 LC3 II 能够促进自噬体形成,LC3 II/LC3 I 的比例与自噬泡的数量正相关。实验结果显示从棕榈酸浓度达到 200 μmol/L 开始,p-mTOR 下降,Atg5 增加,LC3 II/LC3 I 增加,表明自噬开始增强,可能由于棕榈酸使自噬降解底物基数增加,所以 P62 表达也增加,与此同时,p-erk 表达增加,表明棕榈酸可能通过 Erk1/2 通路发挥作用,同时发现 Bcl2 在棕榈酸处理后表达增加(图 1、表 1)。

2.2 CCK-8 检测棕榈酸对细胞活力的影响 不同浓度棕榈酸处理细胞,CCK-8 试剂盒检测细胞活性,CCK-8 可在电子载体的作用下被细胞中的脱氢酶还原为水溶性的黄色甲臞产物,OD 值越大,则活细胞数量越多,在实验中发现随着棕榈酸浓度增高细胞数量不断减少(图 2)。



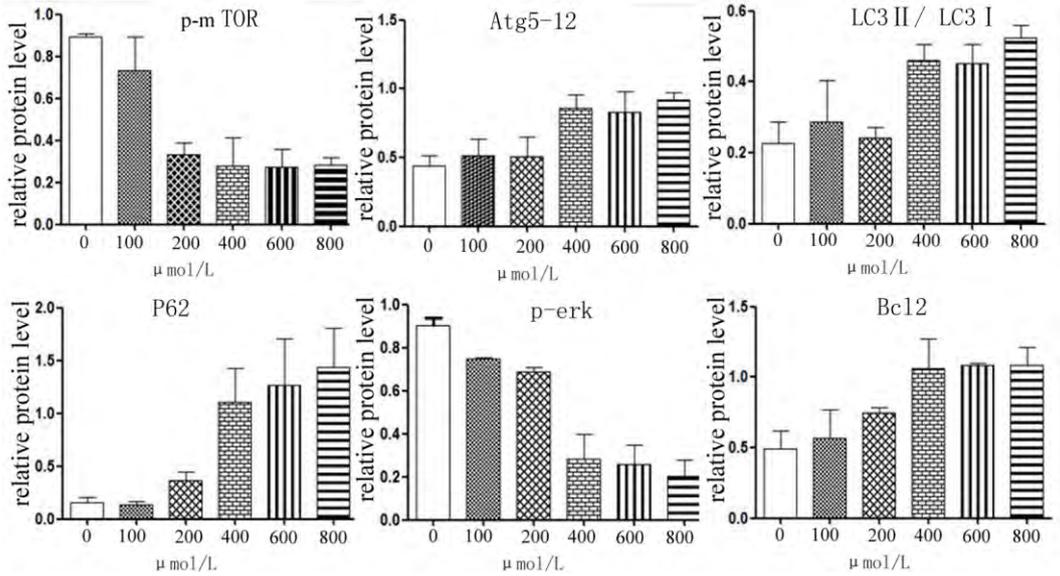


图1 western blotting 检测棕榈酸对细胞的影响

表1 棕榈酸对细胞中自噬相关蛋白的影响

蛋白	F	P
p-mTOR	16.52	0.0019**
Atg5-12	7.733	0.0136*
LC3 II / I	8.100	0.0121*
P62	9.363	0.0084**
p-erk	37.67	0.0002***
Bcl2	7.445	0.0149*

*P<0.05 ,**P<0.01 ,***P<0.001。

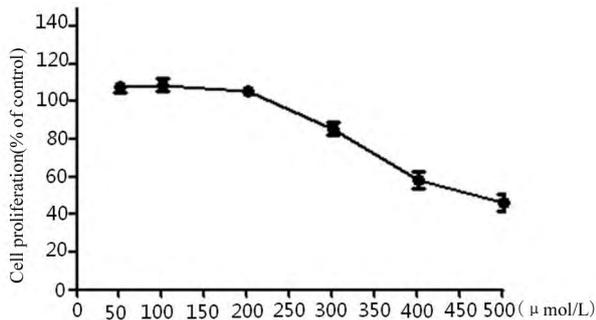
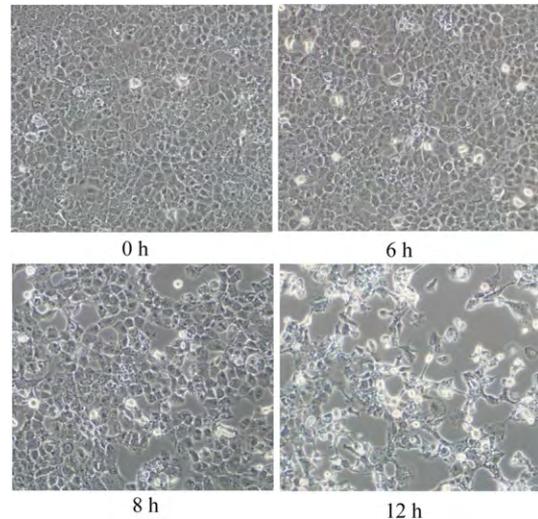


图2 不同浓度棕榈酸对 AML12 细胞活力的影响

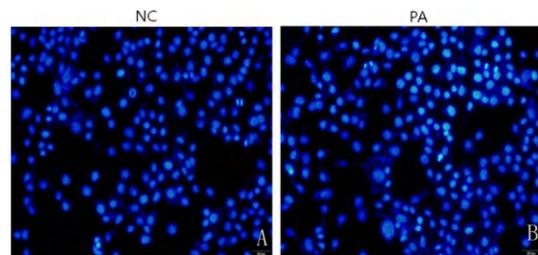
2.3 棕榈酸处理不同时间对细胞的影响 根据图2 浓度作用曲线选取 200 μmol/L 的棕榈酸作用于细胞,观察不同作用时间对细胞的影响,结果显示随着作用时间延长,细胞活力不断下降,存活细胞不断减少(图3)。

2.4 DAPI 染色检测棕榈酸对细胞的影响 用 200 μmol/L 棕榈酸作用于 AML12 细胞,DAPI 染色检测细胞核变化,结果显示棕榈酸处理后细胞核染色加深、变亮,提示核固缩(图4)。



200 μmol/L 的棕榈酸分别作用于细胞 0、6、8、12 h 后细胞数量 (20×)

图3 棕榈酸处理不同时间对 AML12 细胞的影响



A.正常培养的 AML12 细胞细胞 DAPI 染色(20×); B.棕榈酸处理后的 AML12 细胞 DAPI 染色(20×)。

图4 棕榈酸对 AML12 细胞的影响

3 讨论

非酒精性脂肪肝病是常见的慢性疾病,流行病学研究显示,在工业化国家中约有 14%~27% 的人口患有非酒精性脂肪肝病^[6],非酒精性脂肪肝病已

经成为慢性肝病最常见的原因^[7],但同时研究也表明非酒精性脂肪肝病在一定程度上是可逆的,肥胖病人在进行减肥手术后不仅肝脂肪变能够得到好转^[8],肝纤维化的比例也有所下降^[9],由此可见肥胖与非酒精性脂肪肝病的发病关系密切,而肥胖人群中脂肪酸的含量,则被证明是影响脂肪肝最重要的因素^[10]。脂肪酸分为饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸,而饱和脂肪酸是引起非酒精性脂肪肝病进展的重要原因,饱和脂肪酸能够诱导 JNK 依赖性的肝细胞脂性凋亡^[11],明确饱和脂肪酸对机体的影响,对于进一步的疾病预防和治疗具有重要意义。

许多蛋白、因子被发现可以通过影响自噬过程来改善或加剧 NAFLD 的进程^[12],有研究显示在肝细胞中棕榈酸能够通过活化 JNK2 通路激活自噬^[13]。种种研究显示饱和脂肪酸影响 NAFLD 的机制和自噬与凋亡密切相关,因此,了解饱和脂肪酸影响自噬和凋亡的机制十分必要。棕榈酸属于饱和脂肪酸,研究棕榈酸对于肝细胞的作用能够很好地帮助我们了解饱和脂肪酸影响肝脏的机制。

我们检测了 HepG2 细胞在不同浓度棕榈酸作用下自噬的变化,发现 p-mTOR 下降、Atg5 及 LC3 II / LC3 I 增加,说明自噬活化增加, P62 增加可能是由于底物总量过多导致的。实验结果说明棕榈酸能够激活自噬,但到达一定浓度后再增加棕榈酸浓度自噬活性并不会随之增高。Erk1/2 能够作用于 mTOR 继而影响自噬,因此棕榈酸对于自噬的影响可能是通过抑制 Erk1/2 通路,使 p-mTOR 下降,进而激活自噬下游通路而实现的;此外我们也发现 Bcl2 表达增加(图 1),Bcl2 一般被认为是抗凋亡蛋白,可以抑制细胞色素 C 的释放,从而阻止凋亡的发生;同时,Bcl2 能与 Bcl2 家族的促凋亡蛋白形成异二聚体保护细胞不进入凋亡程序^[14]。

考虑到癌症与凋亡的密切联系^[15],我们选择小鼠正常肝细胞检测凋亡的改变。CCK-8 结果显示随着棕榈酸浓度升高细胞存活率不断下降(图 2),延长棕榈酸作用的时间,存活细胞不断减少(图 3),用 DAPI 染色发现棕榈酸处理后细胞核致密、浓染,说明细胞凋亡增加;但在前期实验中发现抗凋亡蛋白 Bcl2 在棕榈酸处理后增加,我们猜想可能是棕榈酸介导的细胞凋亡并不主要由 Bcl2 调节。另有文献报道 Bcl2 家族中促凋亡蛋白及抗凋亡蛋白的表达程度并非是决定细胞凋亡的唯一因素^[16],因此细胞凋亡的程度与 Bcl2 的表达量可能不完全一致。总之,通过实验我们确定棕榈酸可以促进细胞凋亡,同时通过 Erk1/2 信号通路途径来激活自噬。

【参考文献】

- [1] KRAJEWSKA M, KITADA S, WINTER J N, *et al.* Bcl-2 expression in human epithelial and non-epithelial malignancies [J]. *Clinical Cancer Research* 2008, 14(10) : 3011-3021.
- [2] WHITE E. The role for autophagy in cancer [J]. *The Journal of Clinical Investigation* 2015, 125(1) : 42-46.
- [3] RAO H, MA LX, XU TT, *et al.* Lipid rafts and Fas/FasL pathway may involve in elaidic acid-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014, 62(3) : 798-807.
- [4] RAMBOLD AS, COHEN S, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics [J]. *Developmental Cell* 2015, 32(6) : 678-692.
- [5] SAKATA Y, SHIMOKAWA H. Saturated fatty acid intake and cardiovascular risk [J]. *European Heart Journal* 2013, 34(16) : 1178-1180.
- [6] WEI J, RAU M, GEIER A. Non-alcoholic fatty liver disease: Epidemiology, clinical course, investigation, and treatment [J]. *Deutsches Ärzteblatt International* 2014, 111(26) : 447-452.
- [7] BLACHIER M, LELEU H, PECK-RADOSAVLJEVIC M, *et al.* The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data [J]. *Journal of Hepatology* 2013, 58(3) : 593-608.
- [8] MOTTIN CC, MORETTO M, PADOIN AV, *et al.* Histological behavior of hepatic steatosis in morbidly obese patients after weight loss induced by bariatric surgery [J]. *Obesity Surgery* 2005, 15(6) : 788-793.
- [9] MORETTO M, KUPSKI C, DA SILVA VD, *et al.* Effect of bariatric surgery on liver fibrosis [J]. *Obesity Surgery* 2012, 22(7) : 1044-1049.
- [10] WANG XH, LI CY, MUHAMMAD I, *et al.* Fatty acid composition in serum correlates with that in the liver and non-alcoholic fatty liver disease activity scores in mice fed a high-fat diet [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2016, 44: 140-150.
- [11] MALHI H, BRONK SF, WERNEBURG NW, *et al.* Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipopoptosis [J]. *The Journal of Biological Chemistry* 2006, 281(17) : 12093-12101.
- [12] TANAKA S, HIKITA H. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. *Hepatology* 2016, 64(6) : 1994-2014.
- [13] TU Q, ZHENG R, LI J, *et al.* Palmitic acid induces autophagy in hepatocytes via JNK2 activation [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2014, 35(4) : 504-512.
- [14] DEGTEREV A, LUGOVSKOY A, CARDONE M, *et al.* Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL [J]. *Nature Cell Biology* 2001, 3(2) : 173.
- [15] CHEN GG, LAI PB. Apoptosis in carcinogenesis and cancer therapy [J]. *Current Cancer Drug Targets* 2010, 10(6) : 554.
- [16] KATAOKA T, HOLLER N, MICHEAU O, *et al.* Bcl-2-rambo, a novel Bcl-2 homologue that induces apoptosis via its unique c-terminal extension [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(22) : 19548.