

· 基础研究 ·

Apelin 通过调节 ROS 水平抑制 TNF- α 诱导的 HepG2 细胞凋亡 *

褚娇娇 黄秀清 黎 健 王 抒[△]

(卫生部北京医院 / 卫生部北京老年医学研究所 卫生部老年医学重点实验室 北京 100730)

摘要 目的 探讨 apelin 在肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)诱导的肝细胞凋亡中的作用及可能机制。方法 :PCR 检测 HepG2 细胞和原代小鼠肝细胞中 APJ 受体的表达 ;采用 Hoechst 33342 染色检测 TNF- α 诱导的 HepG2 细胞凋亡 ;用活性氧 (ROS)检测试剂盒结合流式细胞术测定细胞内 ROS 水平 ,通过 Western blot 检测信号分子 JNK 的磷酸化水平 ,比较给予 apelin 处理对上述指标的影响。结果 :HepG2 细胞和原代小鼠肝细胞均表达 APJ 受体 ,apelin 可抑制 TNF- α 导致的细胞内 ROS 生成增多和 JNK 磷酸化水平升高并减少 TNF- α 诱导的 HepG2 细胞凋亡。结论 :Apelin 可能通过拮抗 TNF- α 诱导的细胞内 ROS 水平升高 ,使 JNK 信号失活 ,从而抑制 HepG2 细胞凋亡。

关键词 HepG2 细胞 ;Apelin ;TNF- α ;凋亡

中图分类号 :R34, R593.1 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2012)16-3001-03

Apelin Inhibits TNF- α -Induced HepG2 Cell Apoptosis by Regulating ROS Level*

CHU Jiao-jiao, HUANG Xiu-qing, LI Jian, WANG Shu[△]

(The Key Laboratory of Geriatrics, Beijing Hospital & Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing 100730, P. R. China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of apelin on TNF- α -induced apoptosis of HepG2 cells. **Methods:** HepG2 cells were treated with TNF- α to induce apoptosis. The expression of APJ receptor in HepG2 cells and primary mouse hepatocytes was detected by RT-PCR. Hoechst 33342 staining was performed to analyze the apoptosis of HepG2 cells. Intracellular ROS levels were measured by ROS detection kit combined with flow cytometry. Phosphorylation of JNK was detected through Western blot. **Results:** APJ receptor expressed in HepG2 cells and primary hepatocytes. In the TNF- α treated HepG2 cell, JNK phosphorylation was activated, the level of ROS increased and cell apoptosis was induced. However, apelin treatment significantly decreased JNK phosphorylation and ROS level, and protected cells from apoptosis. **Conclusion:** Apelin may protect HepG2 cells from TNF- α -induced apoptosis by reducing intracellular ROS level and inactivating JNK signaling.

Key words: HepG2 cells; Apelin; TNF- α ; Apoptosis

Chinese Library Classification: R34, R593.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)16-3001-03

前言

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)是重要的炎症因子,参与细胞增殖、分化、凋亡等过程^[1],在多种病理状态下的肝细胞损伤和死亡中起到不可或缺的作用。已经证实 TNF- α 能促进肝细胞活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS)过度产生,使 JNK(c-jun-N-terminal kinase)持续活化,进而介导细胞凋亡^[2]。

Apelin 是近年新发现的一种肽类激素,广泛分布于多个组织、器官,并发挥不同的生理功能^[3]。研究表明,在多种肝脏病理情况下(如非酒精性脂肪肝、肝硬化、缺血、炎症等),循环血中 apelin 水平升高^[4-6],但肝细胞是否表达 apelin 的特异性受体 APJ 仍存争议。然而在这些肝损伤状态下增多的 apelin 发挥何种功能尚不明确。本文检测了 APJ 受体在肝细胞中的表达,通过观察 apelin 处理对 TNF- α 诱导的 HepG2 细胞凋亡的影响,

并测定 ROS 水平及 JNK 信号分子磷酸化水平的变化,探讨 apelin 在 TNF- α 诱导的 HepG2 细胞凋亡中的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、引物 人肝癌细胞株 HepG2 购自中国医学科学院基础研究所细胞中心。原代小鼠肝细胞分离自 C57BL 小鼠, C57BL 小鼠购自北京维通利华公司。APJ 基因引物由北京赛百盛公司合成。

1.1.2 试剂 MEM 培养基(GIBCO),特级胎牛血清(Hyclone); 胰蛋白酶(GIBCO);TNF- α (Cal-bio);apelin(phoenixbiotech); TRIzol(Invitrogen);逆转录试剂盒(TAKARA);Taq DNA 聚合酶(TAKARA);DL5000(宝生物公司);ROS 检测试剂盒(南京碧云天);Hoechst 33342、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(Sig-

* 基金项目 国家自然科学基金(81070634, 30801218)

作者简介 褚娇娇(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向 脂肪因子 apelin 和糖脂代谢调节及机制 E-mail: doc_echo@163.com

[△]通讯作者 王抒 E-mail: ws3704@yahoo.com.cn

(收稿日期 2012-03-06 接受日期 2012-03-31)

ma) HRP 标记山羊抗兔 IgG(艾比玛特生物医药(上海)有限公司);兔抗 actin 抗体、JNK 抗体、P-JNK 抗体(Cell Signal Technology) PVDF 膜、发光液(美国 Millipore 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 HepG2 细胞培养于含 10%胎牛血清的 MEM 培养基中,在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中孵育。按 20 万个/孔接种细胞,传代 18h 后处理细胞。实验分成 4 组 对照组为不加 TNF-α 和 apelin,TNF-α 诱导凋亡组加入 TNF-α(20ng.ml⁻¹) apelin 处理的 TNF-α 诱导凋亡组加入 apelin(10nmol.l⁻¹) 和 TNF-α(20ng.ml⁻¹) apelin 对照组加入 apelin(10nmol.l⁻¹),分别培养 24h。

1.2.2 RNA 提取及 RT-PCR 单层贴壁的 HepG2 细胞和原代小鼠肝细胞培养至预定时间,使用 TRIzol 提取总 RNA,对 RNA 定量后,应用逆转录酶 MMLV 进行逆转录。使用 Taq DNA 聚合酶对 APJ 基因进行扩增。根据 GenBank 提供的 APJ 全基因序列,参照引物设计原则设计引物序列,交由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

人 APJ 基因引物序列:

上游引物 5'-TTCTGCAAGCTCAGCAGCTA-3';

下游引物 5'-GTGCGTAACACCATGACAGC-3'。

每管反应体系为 20μl,反应条件 94℃ 变性 2min 94℃ 30s 54℃ 1min 72℃ 1min 进行 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。

小鼠 APJ 基因引物序列:

上游引物 5'-CTCAGCAGCTACCTCATCTTTGT-3';

下游引物 5'-TGAAGTGCCACCATAGAGTAGT-3'。

每管反应体系为 20μl,反应条件 94℃ 变性 2min 94℃ 30s 61℃ 15s 72℃ 30s 进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。

1.2.3 Hoechst33342 染色检测细胞凋亡 6 孔板内放玻片,按 20 万个/孔接种细胞,传代 18h 后处理细胞。取出玻片,PBS 洗涤 5min×3 次,10ng.ml⁻¹ Hoechst33342 避光 37℃ 孵育 10min,PBS 洗片 5min×3 次,盖上盖玻片,荧光显微镜下观察。

1.2.4 ROS 水平检测 采用活性氧检测试剂盒,通过流式细胞术检测细胞内 ROS 水平。将 DCFH-DA 荧光探针按 1:1000 稀释于无血清 MEM 培养基中,37℃ 避光孵育 30min,同时设空白对照和阳性对照:空白对照孔加入无血清 MEM 孵育细胞;阳性对照孔加入活性氧阳性对照(Rosup)孵育于含有探针的培养基中。用胰蛋白酶消化并收集细胞至离心管中,离心,弃去含有探针的培养基,用 PBS 洗涤两遍,收集细胞。用流式细胞仪检测 ROS 水平。

1.2.5 Western blot 收集 HepG2 细胞于含磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂和 PMSF 的 RIPA 细胞裂解液中,置于冰上充分裂解,12000rpm 4℃ 离心 20min,取上清。BCA 法测定蛋白浓度。加入相应体积的蛋白上样缓冲液,沸水浴 10min。蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳后,转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜以 5%脱脂牛奶室温封闭 2h,一抗(11000 稀释)孵育过夜。以 PBST 洗涤 3 次,每次 10min,加入 HRP 标记的二抗(1:5000 稀释),室温孵育 2h,用 PBST 洗涤。用 ECL 化学发光,经成像系统显影后保存图片。

1.2.6 统计学分析 用方差分析进行多组数据的比较,组间比较采用 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝细胞表达 APJ 基因

Apelin 通过结合于特异性受体 APJ 发挥作用,为此我们首先采用 PCR 方法检测 HepG2 细胞和原代小鼠肝细胞中 APJ 受体基因的表达情况。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,在预期片段长度处可见一清晰条带(图 1),表明 APJ 表达于 HepG2 细胞和原代小鼠肝细胞中。

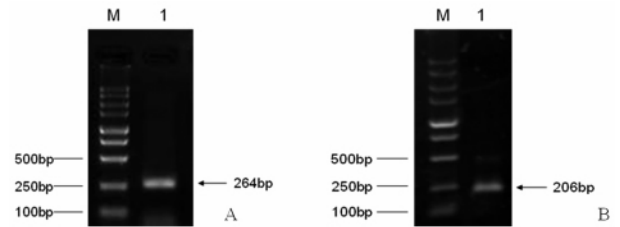


图 1 PCR 检测 APJ 受体基因的表达:A. 原代小鼠肝细胞 APJ 基因表达;B. HepG2 细胞中 APJ 基因表达。M. Marker;1. APJ 基因扩增产物
Fig. 1 The expression of APJ receptor was detected by PCR: A. APJ gene expression in primary mouse hepatocytes; B. APJ gene expression in HepG2 cells

2.2 Apelin 减少 TNF-α 诱导的 ROS 生成

我们通过流式细胞术检测了 apelin 处理对 HepG2 细胞内 ROS 水平的影响。观察到 TNF-α 可使 ROS 水平显著升高,而 apelin 与 TNF-α 共处理后 ROS 水平较对照组未发生明显改变(图 2)。表明 apelin 可能使 TNF-α 诱导的 ROS 过度生成受到抑制。

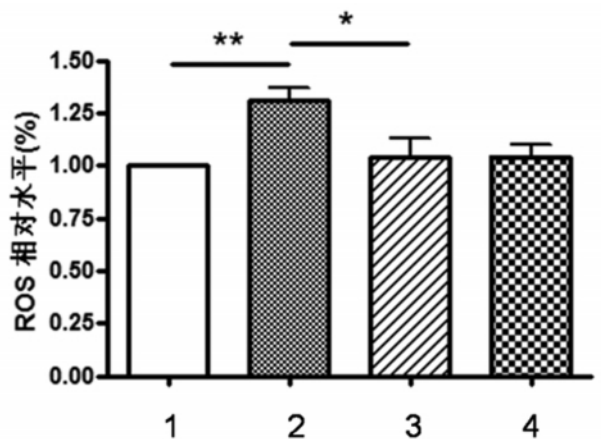


图 2 HepG2 细胞内 ROS 水平检测:1. 对照组 2. TNF-α(20ng.ml⁻¹) 3. TNF-α(20ng.ml⁻¹)与 apelin(10nmol.l⁻¹)共处理 4. apelin(10nmol.l⁻¹)。
*P<0.05, **P<0.01

Fig. 2 Intracellular ROS levels in HepG2 cells were measured by ROS detection kit combined with flow cytometry: 1. Control; 2. The group treated with TNF-α(20ng.ml⁻¹) 3. The group co-treated with TNF-α(20ng.ml⁻¹) and apelin(10nmol.l⁻¹); 4. The group treated with apelin(10nmol.l⁻¹). * P<0.05, ** P<0.01

2.3 Apelin 抑制 JNK 磷酸化

用 Western blot 检测 JNK 磷酸化水平变化的结果显示：TNF- α 处理组 JNK 信号分子被激活，JNK 磷酸化水平显著升高，而加 apelin 共处理使 JNK 磷酸化水平降低，JNK 的活性被抑制(图 3)。

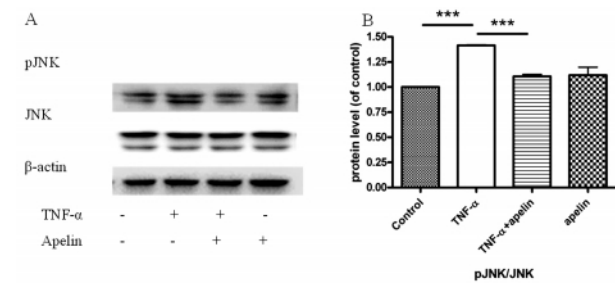


图 3 Western blot 检测 JNK 磷酸化水平 :A. JNK 磷酸化水平 Western blot 检测结果 B. pJNK/JNK 相对蛋白磷酸化水平统计结果。*** P<0.001

Fig. 3 JNK phosphorylation was detected by Western blot: A. Levels of pJNK and JNK; B. Relative value of pJNK/JNK. *** P<0.001

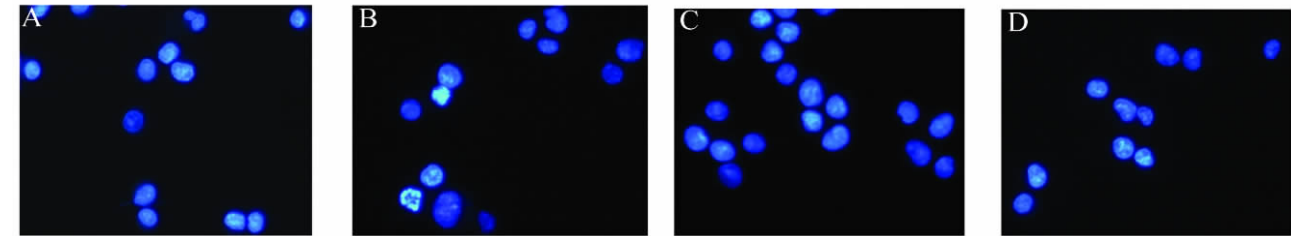


图 4 Hoechst33342 染色检测细胞凋亡 :A. Control ;B. TNF- α 诱导凋亡组 ;C. apelin 处理的 TNF- α 诱导凋亡组 ;D. apelin 处理组。200X

Fig. 4 Cell apoptosis was analyzed through Hoechst33342 staining:

A. Control; B. The group treated with TNF- α (20ng.ml⁻¹); C. The group co-treated with TNF- α (20ng.ml⁻¹) and apelin(10nmol.l⁻¹); D. The group treated with apelin(10nmol.l⁻¹). 200X

TNF- α 含量或影响 TNF- α 的作用，如 leptin(瘦素)可通过诱导 TNF- α 间接激活人嗜中性粒细胞^[10]，也可保护 HepG2 细胞，抑制乙醇诱导的氧化应激、TNF- α 反应和细胞凋亡^[11]。adiponectin(脂联素)能通过调节 TNF- α 抑制 LPS 诱导的肝损伤^[12]。我们的结果显示 apelin 可抑制 TNF- α 诱导的 HepG2 细胞凋亡。

ROS 生成增多是 TNF- α 诱导肝细胞凋亡的重要机制之一。有研究显示，TNF- α 诱导 ROS 产生，ROS 过度累积使 JNK 失活磷酸酶的催化半胱氨酸转化为次磺酸，酶活性受到抑制，致使 JNK 持续活化，而 JNK 的活化是凋亡相关的细胞色素 C 释放和 Caspase3 裂解所需的^[3]。近年研究发现 apelin 可能通过 JNK、PI3K/Akt 等信号机制参与抑制人血管平滑肌细胞、大鼠骨髓间叶干细胞、成骨细胞和心肌细胞等的凋亡过程。Apelin 还可激活过氧化氢酶活性，防止 ROS 所致的心肌细胞肥大^[13]，并参与抑制 3T3L1 脂肪细胞和小鼠皮层神经元中 ROS 的产生^[14,15]。本研究也证实脂肪细胞因子 apelin 对 TNF- α 诱导的 HepG2 细胞 ROS 生成增加、JNK 信号分子活化及细胞凋亡的影响，提示在肝细胞损伤时，apelin 可能在 APJ 受体的介导下，通过减少细胞内 ROS、使 JNK 信号失活，从而抑制 TNF- α 介导的细胞凋亡。但 apelin 调节肝细胞内 ROS 水平的具体机制还有待进一步阐明。

2.4 Apelin 抑制 TNF- α 诱导的 HepG2 细胞凋亡

如图 4 所示，20ng.ml⁻¹ TNF- α 处理 24h 可诱导 HepG2 细胞发生凋亡，而 10nmol.l⁻¹ apelin 与 TNF- α 共处理 24h，细胞凋亡情况较对照组未发生明显变化。提示 apelin 可抑制 TNF- α 诱导细胞凋亡的作用。

3 讨论

Apelin 是机体内广泛分布的生物活性肽，也是脂肪细胞因子。已发现 apelin 在多个组织、器官中发挥重要功能，但其在肝脏中的作用研究目前较少。有报道显示，非酒精性脂肪肝患者血中 apelin 水平升高^[4]，发生肝硬化时 apelin 血清水平和肝脏中的表达水平增加^[6]。然而 APJ 在肝细胞中是否表达仍存在争议^[7-9]。本文通过 PCR 检测证实，在人肝癌细胞 HepG2 和小鼠原代肝细胞中均有 APJ 受体表达，由此推测 APJ 可能介导 apelin 在肝细胞中发挥功能。

TNF- α 作为重要的炎症因子参与多种细胞过程，比如细胞分化、增殖和凋亡。有报道显示，一些脂肪细胞因子参与调节

参考文献(References)

[1] Han D, Ybanez MD, Ahmadi S, et al. Redox regulation of tumor necrosis factor signaling[J]. Antioxidants & redox signaling, 2009, 11 (9):2245-2263

[2] Kamata H, Honda S, Maeda S, et al. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases[J]. Cell, 2005, 120(5):649-661

[3] Falcao-pires I, Ladeiras-lobos R, Leite-moreira A F. The apelinergic system: a promising therapeutic target[J]. Expert opinion on therapeutic targets, 2010, 14(6):633-645

[4] Ercin CN, Dogru T, Tapan S, et al. Plasma apelin levels in subjects with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Metabolism: clinical and experimental, 2010, 59(7):977-981

[5] Melgar-lesmes P, Pauta M, Reichenbach V, et al. Hypoxia and proinflammatory factors upregulate apelin receptor expression in human stellate cells and hepatocytes[J]. Gut, 2011, 60(10):1404-1411

[6] Principe A, Melgar-lesmes P, Fernandez-varo G, et al. The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease[J]. Hepatology, 2008, 48(4):1193-1201

[7] Dray C, Knauf C, Daviaud D, et al. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice [J]. Cell metabolism, 2008, 8(5):437-445

(下转第 3011 页)

- astum or SUPPressors and ontogenes[J]. *Oncogene*, 2006,25:6188-6196
- [3] Pfeffer S, Voinnet O. Viruses, micro-RNAs and cancer [J]. *Oncogene*, 2006,25:6211-6219
- [4] Engels BM, Hutvagner G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation [J]. *Oncogene*, 2006,25:6163-6169
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function [J]. *Cell*, 2004,116(2):281-297
- [6] Triboulet R, Mari B, Lin Y L, et al. Suppression of microRNA - silencing pathway by HIV-1 during virus replication [J]. *Science*, 2007, 315:1579-1582
- [7] Eisenberg I, Alexander MS, Kunkel LM. MiRNAs in normal and diseased skeletal muscle[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13:2-11
- [8] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6:857-866
- [9] Chang J, Nicolas E, Marks D, et al. MiRNAs 122 a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT [J]. *RNA Biof*, 2004,1:106-113
- [10] Girard M, Jacquemin E, Munnich A, et al. MiRNAs-122 a paradigm for the role of microRNAs in the liver[J]. *Hepatology*, 2008,48:648-656
- [11] Esau C, Davis S, Murray SF, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting [J]. *Cell*, 2006,3: 87-98
- [12] Fabbri M, Ivan M, Cimmino A, et al. Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer[J]. *Expert Opin Biol*, 2007,7:1009-1019
- [13] Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, et al. Relief of microRNA - mediated translational repression in human cells subjected to stress[J]. *Cell*, 2006, 125:1111-1124

(上接第 3003 页)

- [8] Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, et al. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2001, 1538(2-3):162-171
- [9] Kleinz MJ, Davenport A P. Emerging roles of apelin in biology and medicine[J]. *Pharmacology & therapeutics*, 2005, 107(2):198-211
- [10] Zarkesh-esfahani H, Pockley A G, Wu Z, et al. Leptin indirectly activates human neutrophils via induction of TNF-alpha [J]. *J Immunol*, 2004, 172(3):1809-1814
- [11] Balasubramanian V, Shukla R, Murugaiyan G, et al. Mouse recombinant leptin protects human hepatoma HepG2 against apoptosis, TNF-alpha response and oxidative stress induced by the hepatotoxin-ethanol [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2007, 1770 (8): 1136-1144
- [12] Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, et al. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice[J]. *Hepatology*, 2004, 40(1):177-184
- [13] Foussal C, Lairez O, Calise D, et al. Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy[J]. *FEBS letters*, 2010, 584(11):2363-2370
- [14] Hung WW, Hsieh TJ, Lin T, et al. Blockade of the renin-angiotensin system ameliorates apelin production in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Cardiovascular drugs and therapy sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, 2011, 25(1):3-12
- [15] Zeng XJ, Yu SP, Zhang L, et al. Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons [J]. *Experimental cell research*, 2010, 316(11):1773-1783