

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.08.004

饥饿及雨蛙素诱导的 AR42J 细胞中自噬基因 LC3 及 beclin-1 表达的变化*

张伟辉¹ 乔 昕² 吕 航¹ 马文超¹ 王端平¹ 高 博¹ 孙 旺^{1,Δ}

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 加利福尼亚大学洛杉矶分校 美国 洛杉矶 ca90001)

摘要 目的: 观察饥饿及雨蛙素诱导的大鼠胰腺腺泡细胞 AR42J 中自噬基因 LC3 及 beclin-1 表达的变化, 初步探讨吞噬 (autophagy) 在急性胰腺炎中的作用。**方法:** 选择体外培养的生长状态良好的大鼠胰腺腺泡 AR42J 细胞, 随机分为 3 组, 饥饿组 (N=10), 雨蛙素处理组 (N=10), 空白对照组 (N=10)。饥饿组加入充足的平衡盐溶液, 雨蛙素处理组加入含 10^{-7} mol/L 雨蛙素的全营养培养液, 空白对照组加入含 20% 灭活胎牛血清的 F12-K 培养液 (pH7.2-7.4), 各组分别于处理后 2、4、6 h 收集细胞并提取蛋白质。采用免疫印迹法检测三组不同时间胰腺腺泡细胞 AR42J 中自噬基因 Beclin-1 和 LC3 的蛋白表达。**结果:** 空白对照组不同时间 beclin-1 和 LC3-II 均呈低表达, 且各时间点比较差异无统计学意义 ($P < 0.05$)。饥饿组和雨蛙素处理组 beclin-1 和 LC3-II 的表达随处理时间的延长逐渐增加, 且不同时间 beclin-1 和 LC3-II 的表达均较空白对照组显著增高, 差异均具统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** 雨蛙素和饥饿刺激可导致大鼠胰腺腺泡细胞 AR42J 中 LC3-II 及 beclin-1 蛋白表达随作用时间的延长而增加, 自噬可能参与了胰腺炎的发生发展过程。

关键词: 胰腺炎; Beclin-1; 微管相关蛋白 LC3; 自噬性程序性细胞死亡; 胰腺腺泡细胞

中图分类号: Q291 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)08-1415-03

Changes of LC3 and Beclin 1 Expression in the Starvation and Cerulein induced AR42J Cells*

ZHANG Wei-hui¹, QIAO Xin², LV Hang¹, MA Wen-chao¹, WANG Duan-ping¹, GAO Bo¹, SUN Wang^{1,Δ}

(1 First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 University of California at Los Angeles, Los Angeles, USA, ca90001)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of phagocytosis (autophagy) in patients with acute pancreatitis by observing the change of the expression of LC3 and beclin-1 gene in starvation and caerulein induced AR42J rat pancreatic acinar cells. **Methods:** The growth state of good rat pancreatic acini AR42J cells in vitro were randomly divided into 3 groups, starvation group (N = 10), caerulein treated group (N = 10), blank control group (N = 10). Balanced salt solution sufficient to join the starvation group, caerulein treated group added with full nutrient solution containing 10^{-7} mol/L of caerulein, blank control group added with inactivated containing 20% fetal bovine serum F12 - K nutrient solution (pH7.2-7.4), all the group collected cells and extracted proteins at 2, 4, 6 h respectively after treatment. Detected the expression of protein of autophagy genes Beclin-1 and LC3 by Western blot in each groups at different time points of AR42J pancreatic acinar cells. **Results:** The blank control group at different time points of beclin-1 and LC3- II showed low expression and no significant different at each time point ($P < 0.05$). The expression of beclin-1 and LC3- II were increased gradually with the prolonged time in starvation and caerulein treatment group, and both of them were significantly increased compared with blank control group at different time points, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Caerulein and starvation can lead to increase of the expression of LC3- II and beclin-1 in AR42J rats pancreatic acinar cells with the prolongation of time, autophagy may participate in the occurrence and development of pancreatitis.

Key words: Acute pancreatitis; Beclin-1; Microtubule associated protein LC3; Autophagy programmed cell death

Chinese Library Classification (CLC): Q291 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)08-1415-03

前言

自噬 (autophagy) 是胞质蛋白质和细胞器在膜包裹泡形成

的自噬体中降解成氨基酸、核酸小分子的生物学过程, 主要通过溶酶体降解长效蛋白、脂类、及胞质细胞器等^[1], 在维持内环境稳定、清除废物及结构重建中起重要作用, 而自噬损伤与多

* 基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究基金项目 (12511242)。

作者简介: 张伟辉 (1957-), 男, 博士生导师, 主要研究方向: 微创技术及最新进展、肝硬化时对骨髓内皮细胞影响

Δ 通讯作者: 孙旺 (1988-), E-mail: sunqi88@163.com

(收稿日期: 2014-04-14 接受日期: 2014-05-10)

种疾病相关^[2]。目前的研究表明自噬为细胞对不良环境的一种防御机制,在细胞成熟分化、生长发育、死亡中发挥了重要的作用。微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1-LC3, LC3) 是反映自噬活性、较为可靠的生物学标志物^[3]。而与自噬密切相关的 Beclin-1 蛋白是自噬通路必须的磷脂酰肌醇 3 磷酸激酶(PI3K)复合物的组成部分^[4]。本研究通过检测饥饿或雨蛙素刺激的大鼠胰腺腺泡细胞中 Beclin-1 和 LC3 表达的变化,旨在了解自噬与急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的关系,为 AP 的治疗提供更多的参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

生长状态良好的 AR42J 成熟细胞系,购自武汉中国典型培养物保藏中心(CCTCC),雨蛙素购自 Sigma 公司,LC3 和 Beclin-1 兔多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自中杉金桥生物公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 AR42J 细胞用含 20% 灭活胎牛血清的 F12-K 培养基(pH7.2~7.4),于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,2-3 d 换液,0.25% 胰蛋白酶和 0.01% EDTA 消化,1:3-1:4 传代待用。

1.2.2 实验分组 取生长状态良好且密度大致相同的大鼠胰腺腺泡 AR42J 细胞若干瓶,随机分为 3 组:饥饿组(N=10)、雨蛙素处理组(N=10)、空白对照组(N=10)。

1.2.3 造模方法 饥饿组:取生长状态良好的胰腺腺泡 AR42J 细胞,弃去培养液用 PBS 反复轻轻冲洗 3 次,加入充足的平衡盐溶液后分别于 2、4、6 h 三个时间点收集细胞提取蛋白质;雨蛙素处理组:取生长状态良好的胰腺腺泡细胞加入含浓度为 10⁻⁷ mol/L 雨蛙素的全营养培养液后,分别于 2、4、6 h 三个时间点收集细胞提取蛋白质;空白对照组:取生长状态良好的胰腺腺泡细胞单纯加入全营养培养液后,分别于 2、4、6 h 三个时间点收集细胞提取蛋白质。

1.2.4 细胞总蛋白的提取及 Western blot 法检测 Beclin-1 和 LC3 蛋白的表达 使用全蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,计算蛋白量。取 20 μg 蛋白,经 10% SDS-PAGE 胶 80V 电泳 30 min,120V 电泳 60 min,300 mA 电转 90 min,5% 脱脂牛奶室温下封闭 2 h,抗 Beclin-1 和 LC3 抗体 (1:1000 稀释)4℃ 孵育过夜,TBST 洗 10min×3 次,山羊抗兔二抗(1:1000 稀释)室温孵育 2 h,TBS-T 洗 10 min×3 次,化学发光后暗室曝光显影后定影出片。

1.3 统计学分析

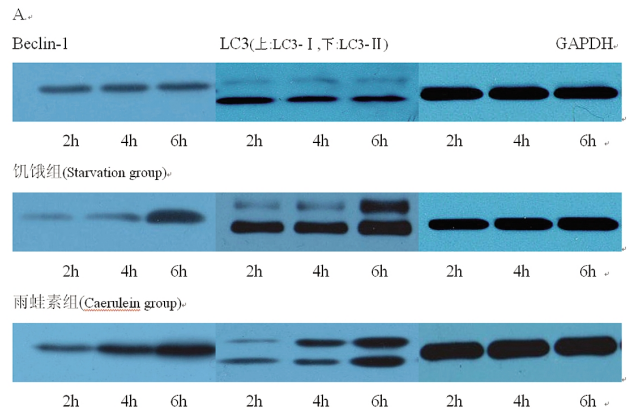
应用 SPSS 12.0 软件对所得数据进行处理,各数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 建议,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

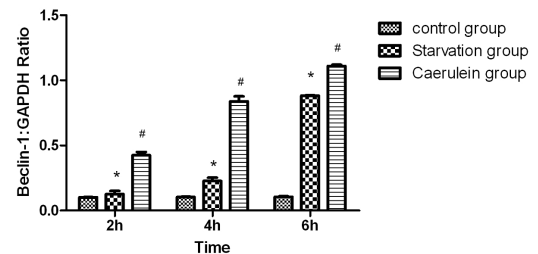
各组细胞中 beclin-1 和 LC3-II 蛋白表达的结果如图 1 所示:空白对照组 beclin-1 和 LC3-II 蛋白在不同的时间点的表达较平稳,无明显递增或递减趋势;饥饿实验组随着饥饿刺激时间的延长,beclin-1 和 LC3-II 的表达呈现逐渐递增趋势(P<0.

05);雨蛙素实验组随着雨蛙素刺激时间的延长,beclin-1 和 LC3-II 的表达也呈现逐渐递增趋势(P<0.05),且表达量较同一时间点饥饿实验组有所升高(P<0.05)。

空白对照组(Control group)



B.



C.

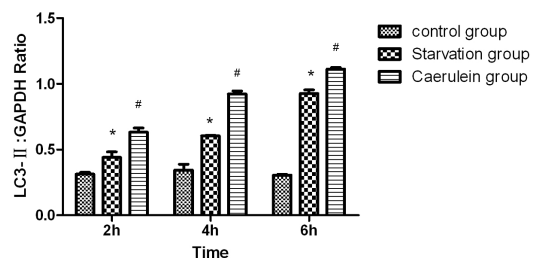


图 1 各组不同时间点 Beclin-1 和 LC3-II 蛋白的表达

Fig. 1 The protein expression of Beclin 1 and LC3-II in different groups at different time points

* 饥饿组各时间点组间比较 P<0.05, # 雨蛙素刺激组各时间点组间比较 P<0.05。

3 讨论

自噬源于希腊语自体吞噬,为细胞利用自体内的溶酶体降解大分子物质、受损细胞器的过程,为生物进化中保留下来的一种蛋白和细胞器的循环再利用的有效机制。诸多研究表明自噬对于细胞在环境突变情况下的生存起至关重要的作用,主要是通过长效蛋白质、受损细胞器的降解和再次利用^[5]。几乎在所有的衰老组织和细胞中都发现自噬活性的降低,进而导致受损细胞器及代谢大分子物质在胞内的集聚,促进细胞死亡^[6]。随着对自噬的研究不断深入,自噬在各类疾病发生发展中的作用引起了广泛的关注。急性胰腺炎是一种发病率和死亡率极高的疾病^[7],尽管通过广大医务者的不断努力,关于 AP 的临床诊治和发生发展机制的研究有了一定的进展和突破,但对 AP 尤其是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的治疗上尚无

特效的治疗手段, SAP 有可能发展扩散为全身的炎症反应, 从而导致胰腺坏死最终引发多器官功能障碍, 导致患者死亡^[8]。最新研究显示胰腺炎时, 堆积的液泡多为自噬性的^[9], 伴有胰腺腺泡中大量空泡堆积是胰腺炎最明显的特征^[10]。最新的临床及实验室研究发现自噬活性的异常与 AP 的发生发展密切相关^[11], 是目前胰腺炎研究和治疗的最新热点。

自噬主要分为三类: 分子伴侣介导自噬、微自噬、巨自噬^[12], 以巨自噬(macroautophagy)为主要形式。巨自噬由多个步骤组成, 以形成自噬小体作为起点^[13]。自噬小体的直径正常为 300~900 nm, 平均 500 nm 左右, 许多实验室研究证实 LC3 是自噬小体的特异性分子标志物^[14]。LC3 以两种分子形式存在, 即 LC3-I 和 LC3-II, 分子量分别为 18kDa 和 16kDa, 在凝胶电泳过程中, LC3-I 的迁移速率慢于 LC3-II, 因此 LC3 的凝胶电泳通常呈现双条带, LC3-II/LC3-I 的比例与自噬小体形成的数量密切相关^[15]。通常情况下, LC3-I 向 LC3-II 的转化率增加或细胞内 LC3 的含量升高一般意味着细胞内正在发生着自噬, 或者用 Western blotting 检测 LC3-II 含量及 LC3-II/LC3-I 比值可以反映自噬活性^[16]。Beclin-1 基因为酵母 ATG6 的同源物, 为参与自噬的特异性基因。Liang 等于 1998 年在致死性 Sinbis 病毒性脑炎的大鼠中发现 Beclin-1 蛋白, 分子量为 60ku, 将编码此蛋白质的基因命名为 beclin-1^[17]。Beclin-1 参与自噬形成的某些步骤, 但并不是整个过程中, 因而 beclin-1 是自噬的一个调节蛋白而并非必须蛋白。近期的研究表明 beclin-1 不仅参与调节自噬, 同时也参与调节细胞凋亡, 凋亡抑制因子 bcl-2 通过与 beclin-1 的相互作用可抑制酵母和哺乳动物细胞中饥饿诱导的自噬^[18]。此外, 大量研究表明 beclin1 通过对自噬活性的调节对肿瘤发生、发展起着重要的抑制作用^[19]。被剪切后的 beclin-1 具有促进凋亡的功能, 可以促进化疗后肿瘤细胞的凋亡。因此, beclin-1 的缺失可能是某些肿瘤化疗耐药的机制^[20]。

大量文献报道雨蛙素诱导胰腺炎自噬模型伴有溶酶体功能障碍, 将出现自噬性溶酶体堆积, 导致胞内 LC3-II 和 beclin-1 水平增加, 从而引发自噬受损; 而饥饿诱导的自噬则无溶酶体功能障碍, 无自噬性溶酶体堆积^[21]。本研究结果显示饥饿和雨蛙素诱导的胰腺腺泡细胞中 LC3-II 和 beclin-1 的表达均随着刺激时间的延长而逐渐上调, 提示饥饿和雨蛙素刺激可促进胰腺腺泡细胞发生自噬。目前, AP 发生过程中自噬激活的详细机制尚未完全明确。但随着人们对自噬研究的不断深入, 阐明自噬在 AP 的发生发展全过程中的作用和机制, 将为 AP 的治疗提供新的靶点。

参考文献(References)

- [1] Czaja MJ. Functions of autophagy in hepatic and pancreatic physiology and disease[J]. Gastroenterology, 2011, 140(7): 1895-1908
- [2] Ravikumar B, Sarkar S, Davies J E, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology [J]. Physiological reviews, 2010, 90(4): 1383-1435
- [3] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(12): 2491-2502
- [4] Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy[J]. Antioxid850 Redox Signal, 2011, 14(11): 2201-2214
- [5] Duprez L, Wirawan E, VandenBerghe T, et al. Major cell death pathways at a glance.Microbes[J]. Infect, 2009, 11(13): 1050-1062
- [6] Cuervo AM. Autophagy and aging:keeping that old broom working[J]. Trends Genet, 2008, 24(12): 604-612
- [7] Everhart JE, Ruhl CE. Burden of digestive diseases in the United States Part III: Liver,biliary tract, and pancreas [J]. Gastroenterology, 2009, 136(4): 1134-1144
- [8] Kylanpää ML, Repo H, Puolakkainen PA. Inflammation and immunosuppression in severe acute pancreatitis.World [J]. Gastroenterol, 2010, 16(23): 2867-2872
- [9] Mareninova OA, Hermann K, French SW, et al. Impairedautophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis[J]. Clin Invest, 2009, 119(11): 3340-3355
- [10] Adler G, Rohr G, Kern HF. Alteration of membrane fusion as a cause of acute pancreatitis in the rat[J]. Dig Dis Sci, 1982, 27(11): 993-1002
- [11] Fortunato F, Kroemer G. Impaired autophagosomelysosome fusion in the pathogenesis of pancreatitis[M]. Autophagy, 2009, 5(6): 850-853
- [12] Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms[J]. J Pathol, 2010, 221(1): 3-12
- [13] Barth S, Glick D, Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts [J]. Pathol, 2010, 221(2): 117-124
- [14] SalminenA, KaamirantaK. Regulation of the aging Process by autophagy[J]. TrendesMol Med, 2009, 15(5): 217-224
- [15] VellaiT. Autophagy genes and ageing[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(1): 94-102
- [16] Kim J, Huang WP, KlionskyDJ. Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex [J]. Cell Biol, 2001, 152(1): 51-64
- [17] Liang XH, JacksonS, SeamanM, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin1 [J]. Nature, 1999, 402(6762): 672-676
- [18] Gaytan M, MoralesC, Sanchez-CriadoJE, et al. Immunolocalization of beclin 1, a bcl-2-binding, autophagy-related protein,in the human ovary:possible relation to life span of corpus luteum [J]. Cell T issue Res, 2008, 331(2): 509-517
- [19] AitaVM, Liang XH, Murty VV, et al. Cloning and genomic organization of beclin 1,a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21[J]. Genomics, 1999, 59(1): 59-65
- [20] Maiuri MC, Tasdemir E, Ciriello A, et al. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(1): 87-93
- [21] Gukovsky I, Pandol SJ, Mareninova OA, et al.Impaired autophagy and organellar dysfunction in pancreatitis[J]. Gastroenterol Hepatol27 Suppl, 2012, 2(s2): 27-32