

砷酸氢钠对人肝星状细胞凋亡和自噬的影响

惠瑜, 袁艳杰, 孙立, 吴顺华

新疆医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学教研室, 新疆 乌鲁木齐 830011

摘要:

[背景] 肝星状细胞是肝脏主要的效应细胞, 其活化被认为是促进肝纤维化发展的主要机制之一。自噬和凋亡在肝星状细胞的激活中起关键作用。

[目的] 探讨砷酸氢钠 (Na_2HAsO_4) 对人肝星状细胞 (LX-2 细胞) 凋亡和自噬的影响。

[方法] 体外培养 LX-2 细胞株, 使用红色荧光蛋白 (RFP) - 绿色荧光蛋白 (GFP) - 微管相关蛋白轻链 3 (LC3) 慢病毒稳定感染 LX-2 细胞, 采用流式细胞仪进行筛选和感染率的测定。用不同浓度 Na_2HAsO_4 (0、0.6、6、60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 孵育慢病毒稳定感染的 LX-2 细胞, 同时设立未经慢病毒感染正常培养的 LX-2 细胞为空白组。采用 CCK-8 法检测 LX-2 细胞活性; 采用流式细胞仪检测 LX-2 细胞凋亡; 采用实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 检测自噬指标 [LC3、重组人自噬效应蛋白 (Beclin-1)、泛素结合蛋白 P62 (SQSTM-1/P62)] 以及凋亡指标 [B 淋巴细胞瘤-2 (BCL-2)]。

[结果] RFP-GFP-LC3 慢病毒稳定感染后, LX-2 细胞慢病毒感染率为 70%, 在激光共聚焦下观察 RFP 和 GFP 的荧光强度无明显差异。 Na_2HAsO_4 处理 LX-2 细胞 24、48、72 h 后, 与 Na_2HAsO_4 (0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 比较, 除 LC3+ Na_2HAsO_4 (0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组外, 其余各剂量组细胞抑制率均升高 ($P < 0.05$)。随着 Na_2HAsO_4 染毒剂量的增加, 凋亡率呈上升趋势, 且与 Na_2HAsO_4 (0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组间 LC3 ($F=5.64, 340.66$)、Beclin-1 ($F=20.59, 87.70$)、SQSTM-1/P62 ($F=15.91, 107.24$)、BCL-2 ($F=113.29, 9.41$) mRNA 和蛋白表达水平差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

[结论] Na_2HAsO_4 可诱导 LX-2 细胞发生细胞凋亡和自噬, 凋亡和自噬之间可能存在拮抗作用。

关键词: 砷; 肝星状细胞; 凋亡; 自噬

Effects of sodium arsenate on apoptosis and autophagy of human hepatic stellate cells HUI Yu, YUAN Yan-jie, SUN Li, WU Shun-hua (Department of Labor and Environmental Hygiene, School of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

Abstract:

[Background] Hepatic stellate cells are the main effector cells of the liver, and their activation is considered to be one of the main mechanisms that promote the development of liver fibrosis. Autophagy and apoptosis have been reported to play a key role in the activation of hepatic stellate cells.

[Objective] This experiment explores the effects of sodium arsenate on the apoptosis and autophagy of human hepatic stellate cells (LX-2 cells).

[Methods] A LX-2 cell line was cultured *in vitro*, and stably infected with the red fluorescent protein (RFP)-green fluorescent protein (GFP)-microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) lentivirus. Flow cytometry was used to screen and determine the infection rate. LX-2 cells infected with lentivirus were treated with different concentrations of Na_2HAsO_4 (0, 0.6, 6, and 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and LX-2 cells without lentivirus infection were used as blank control group. CCK-8 method was used to detect the activity of LX-2 cells, flow cytometry for the apoptosis of LX-2 cells, and real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR) and Western blotting for autophagy indicators [LC3, recombinant human autophagy effector protein (Beclin-1), and sequestosome 1/P62 (SQSTM-1/P62)] and apoptosis indicator [B-cell lymphoma-2 (BCL-2)].

[Results] After the RFP-GFP-LC3 lentivirus infection, the lentivirus infection rate of the LX-2 cells was 70%. The fluorescence expression intensity was not different between RFP and GFP under laser confocal microscope. After designed Na_2HAsO_4 treatment for 24, 48, and 72 h, compared

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19835

基金项目

新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2017D01C192)

作者简介

惠瑜 (1993—), 女, 硕士生;
E-mail: 1282120251@qq.com

通信作者

吴顺华, E-mail: wushunhua@126.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-12-04

录用日期 2020-08-25

文章编号 2095-9982(2020)10-1011-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

惠瑜, 袁艳杰, 孙立, 等. 砷酸氢钠对人肝星状细胞凋亡和自噬的影响 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (10): 1011-1016.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19835

Funding

This study was funded.

Correspondence to

WU Shun-hua, E-mail: wushunhua@126.com

Competing interests None declared

Received 2019-12-04

Accepted 2020-08-25

►To cite

HUI Yu, YUAN Yan-jie, SUN Li, et al. Effects of sodium arsenate on apoptosis and autophagy of human hepatic stellate cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(10): 1011-1016.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19835

with the Na_2HAsO_4 ($0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, the cell inhibition rate of the other Na_2HAsO_4 dose groups all increased ($P<0.05$), except the $\text{LC3}+\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ($0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group. With the increase of Na_2HAsO_4 dose, the apoptosis rate showed an upward trend, and was significantly higher than that of the Na_2HAsO_4 ($0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group ($P<0.05$). The mRNA and protein expression levels of *LC3* ($F=5.64, 340.66$), *Beclin-1* ($F=20.59, 87.70$), *SQSTM-1/P62* ($F=15.91, 107.24$), and *BCL-2* ($F=113.29, 9.41$) were different among the designed groups ($P<0.05$).

[Conclusion] Na_2HAsO_4 can induce apoptosis and autophagy in LX-2 cells, and there may be an antagonistic effect between apoptosis and autophagy.

Keywords: arsenic; hepatic stellate cell; apoptosis; autophagy

砷作为一种有毒的化学物质,主要在肝脏中完成代谢。砷代谢涉及一系列氧化还原反应,在此反应过程中五价态的砷化合物被还原为毒性更强的三价态砷化合物^[1-2]。无机砷可诱发肝脏癌变,相关机制研究主要集中在染色体变异、DNA甲基化、氧化应激及表观遗传等方面^[3-5]。细胞自噬在砷致肝损伤中起关键作用。自噬可以通过降解脂滴为肝星状细胞的活化提供能量,从而促进肝纤维化的发生^[6]。细胞凋亡是细胞的自然程序性死亡,在饥饿或细胞损伤时维持体内平衡,凋亡和自噬可相互作用^[7],但其机制有待进一步研究。自噬是一个动态过程,在电镜下观察自噬小体或自噬溶酶体是检测自噬的金标准。以慢病毒感染人肝星状细胞(LX-2细胞),可观察自噬的动态变化。基于本课题组以往研究^[8-9],本研究拟探讨不同浓度砷酸氢钠对慢病毒感染的LX-2细胞凋亡和自噬的影响,从凋亡和自噬的角度进一步探讨无机砷致肝纤维化发生的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 LX-2细胞(中国武汉普诺赛生命科技有限公司),具有短串联重复序列鉴定报告。

1.1.2 仪器和试剂 超净工作台(中国江苏苏净集团有限公司),Leica DMI4000B/DM5000B激光扫描共聚焦显微镜(美国Leica公司),流式细胞仪、实时荧光定量PCR仪、凝胶成像分析系统、Western blotting电泳装置及转膜装置(美国Bio-Rad公司)。砷酸氢钠(Na_2HAsO_4)(中国北京化学试剂三厂),胎牛血清、DMEM高糖培养基(美国Hyclone公司),CCK-8试剂盒(中国武汉博士德生物公司),红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)-绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)-微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)自噬慢病毒载体(中国上海吉凯基因生物公司),Western Breeze化学发光蛋白印迹检测试剂盒、总RNA提取试剂盒、实时荧光定量PCR检测试

剂盒、RIPA裂解液、Tizol试剂盒(美国赛默飞公司),LC3、重组人自噬效应蛋白(*Beclin-1*)、泛素结合蛋白P62(sequestosome 1/P62, *SQSTM-1/P62*)、B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma, *BCL-2*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)基因引物序列设计与合成(中国深圳华大基因股份有限公司),4×蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、碱性磷酸酯酶显色试剂盒(中国北京索莱宝科技有限公司),LC3、Beclin-1、*SQSTM-1/P62*、*BCL-2*、*GAPDH*抗体(英国Abcam公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用含10%胎牛血清、双抗的高糖培养基,在5% CO_2 、37℃条件下培养细胞。细胞隔两天换一次液,待细胞生长融合度达到80%左右时,使用0.25%胰酶消化收集细胞,依照1:2进行传代培养,收集生长状况良好且处于对数生长期的细胞进行后续试验。

1.2.2 细胞感染 感染前1d,将LX-2细胞接种于6孔板内,培养16~24h,待细胞融合度达50%左右。在感染前吸出旧培养基,用含有病毒滴度为 $1\times 10^7\ \text{TU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 慢病毒的培养基继续培养。转染72h后,在荧光显微镜下观察RFP和GFP。收集感染后的细胞,采用流式细胞术进行筛选,将筛选过的细胞转移到新的T25瓶中用完全培养基继续培养6d,收集部分感染病毒的稳定细胞株(已携带自噬标记蛋白LC3),采用流式细胞术检测RFP、GFP的表达,并在激光共聚焦显微镜下观察和拍摄感染后的细胞。

1.2.3 细胞染毒和分组 Na_2HAsO_4 用灭菌纯水制备浓度为 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液,并用 $0.22\ \mu\text{m}$ 的微孔滤器过滤除菌后储备于4℃冰箱,用无血清的DMEM培养基配制所需浓度的应用液。将细胞融合度达80%的LX-2细胞以每孔5000个细胞接种于96孔板中,至次日细胞融合度达60%左右加入不同浓度梯度的 Na_2HAsO_4 (0、5、10、20、40、80、 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),分别处理24、48、72h,用CCK-8试剂盒测定细胞活性,并计算细胞抑制率,

用 GraphPad5 软件通过细胞抑制率和染毒剂量计算得到 IC_{50} 为 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。根据实验需求,以 IC_{50} 为参照制定所需浓度,将染毒剂量梯度设置为 10 倍,故该实验分为 Na_2HAsO_4 ($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 $\text{LC3}+\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 $\text{LC3}+\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ($0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 $\text{LC3}+\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ($6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 $\text{LC3}+\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组。

1.2.4 CCK-8 法测定细胞抑制率 将未加任何处理的 LX-2 细胞及慢病毒稳定感染后的 LX-2 细胞以每孔 5 000 个细胞接种到 96 孔板中,待细胞融合度达到 80% 时,弃去旧培养基,加入相应浓度的 Na_2HAsO_4 。染毒 24、48、72 h 后,向每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液,置于 37°C 孵育箱继续孵育 2 h,用酶标仪测定其在 450 nm 处的光密度 (D)。细胞抑制率 = $(1 - D_{\text{实验组}} / D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.2.5 流式细胞术测定细胞凋亡率 取对数生长期 LX-2 细胞株于 T25 瓶,根据细胞活性检测结果,在 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 48 h 后收集细胞,将细胞悬于 $500 \mu\text{L}$ 结合缓冲液。加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC,再加入 $5 \mu\text{L}$ 碘化丙啶,轻轻混匀,避光,室温反应 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测 LC3 、 Beclin-1 、 SQSTM-1/P62 、 BCL-2 mRNA 表达 收集 48 h 的细胞,使用试剂盒提取 LX-2 细胞总 RNA,经纯度及完整性鉴定后反转录生成 cDNA。根据实时荧光定量 PCR 试剂盒说明建立反应体系。以 GAPDH 用作内参基因,确定每个样品和每个基因扩增的循环阈值 (cycle threshold, C_t),依据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因的相对表达量。所有引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 RT-PCR primer sequences

基因名称	序列 (5'-3')
LC3	正向引物: AGGCGCTTACAGCTCAATG
	反向引物: CTGGGAGGCATAGACCATGT
Beclin-1	正向引物: CCATGCAGGTGAGCTTCGT
	反向引物: GAATCTGCGAGAGACACCATC
SQSTM-1/P62	正向引物: CCATGCAGGTGAGCTTCGT
	反向引物: GAATCTGCGAGAGACACCATC
BCL-2	正向引物: GGTGGGGTCATGTGTGTGG
	反向引物: CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC
GAPDH	正向引物: CACCCACTCTCCACCTTTG
	反向引物: CCACCACTCTGTTGCTGTAG

1.2.7 Western blotting 法检测 LC3 、 Beclin-1 、 SQSTM-1/P62 、 BCL-2 蛋白表达 收集 48 h 的细胞,用放射免疫沉淀裂解液提取各组细胞总蛋白,聚氰基丙烯酸正丁酯法测定蛋白浓度,取相同质量的蛋白上样,经 SDS-PAGE 转

移至聚偏二氟乙烯膜,用 Western Breeze 试剂盒中的封闭液室温封闭 30 min, LC3 一抗 (稀释比 1:1 000)、 Beclin-1 一抗 (稀释比 1:2 000)、 SQSTM-1/P62 一抗 (稀释比 1:1 000)、 BCL-2 一抗 (稀释比 1:500)、 GAPDH (稀释比 1:10 000), 4°C 摇床孵育过夜,抗体洗液漂洗 3 次,二抗室温孵育 30 min,抗体洗液漂洗 3 次,碱性磷酸酯酶显色试剂盒显影。使用图像分析软件 Image J v1.51 测量条带的灰度值,并计算每组蛋白质的相对表达。

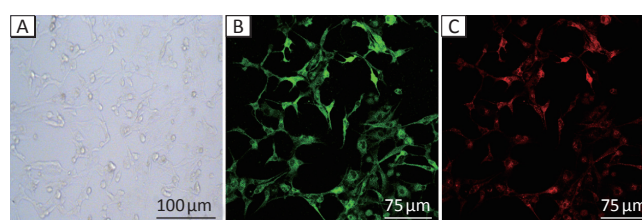
1.3 统计学分析

选用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。数据均呈正态分布且方差齐,多组间比较采用单因素方差分析,多组样本两两比较采用 LSD 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 慢病毒感染 LX-2 细胞 RFP、GFP 的表达结果

感染 72 h 后,可在荧光显微镜下观察到绿色荧光和红色荧光,流式细胞仪测定其感染率为 70%。用激光共聚焦显微镜观测 RFP 和 GFP 的荧光强度无明显差别,说明稳定表达 RFP-GFP-LC3 融合蛋白的 LX-2 细胞株筛选成功。见图 1。



[注] A: 透射光源下的 LX-2 细胞; B: 蓝色激发光源下的 LX-2 细胞; C: 绿色激发光源下的 LX-2 细胞。

图 1 激光共聚焦显微镜下 RFP、GFP 在 RFP-GFP-LC3-LX2 细胞中的表达

Figure 1 Expressions of RFP and GFP in RFP-GFP-LC3-LX2 cells under laser confocal microscope

2.2 Na_2HAsO_4 对感染后 LX-2 细胞抑制率的影响

与 Na_2HAsO_4 ($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组比较,除 $\text{LC3}+\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ($0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组外,其余各组细胞抑制率均升高 (均 $P < 0.05$);与 $\text{LC3}+\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组比较,24、48、72 h 时, $\text{LC3}+\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ($0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、 $\text{LC3}+\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ($6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组的细胞抑制率降低 (均 $P < 0.05$)。同一时间点,随着染毒浓度的降低,细胞抑制率呈下降趋势。见表 2。同一剂量,与 24 h 比较,高剂量组在 48 h 时细胞抑制率降低,出现增殖现象 ($P < 0.05$),故选用 48 h 进行后续的实验。

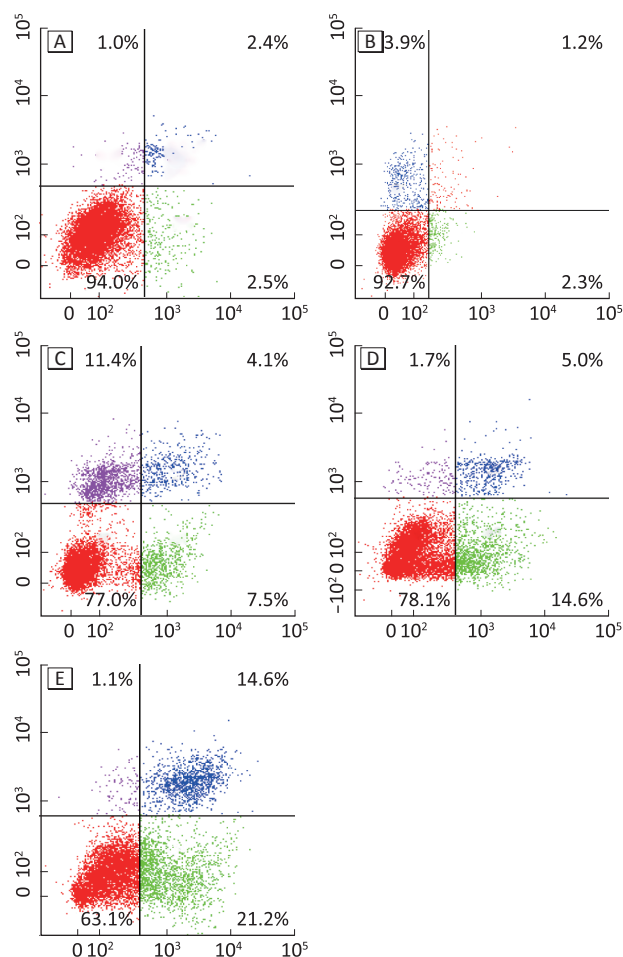
表2 Na₂HAsO₄对感染后LX-2细胞抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 2 Effect of Na₂HAsO₄ on the inhibition rate of LX-2 cells after infection ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

单位 (Unit) : %			
组别	24h	48h	72h
Na ₂ HAsO ₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
LC3+Na ₂ HAsO ₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.68±0.02	0.42±0.02	0.55±0.01
LC3+Na ₂ HAsO ₄ (0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	4.70±0.07 ^{ab}	10.91±1.00 ^{ab*}	46.98±0.50 ^{ab*}
LC3+Na ₂ HAsO ₄ (6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	6.65±0.10 ^{abc}	11.90±0.15 ^{abc*}	49.67±0.64 ^{abc*}
LC3+Na ₂ HAsO ₄ (60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	12.05±1.00 ^{abcd}	8.20±0.32 ^{abcd*}	54.99±1.53 ^{abcd*}

[注] a : 与 Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组相比, $P < 0.05$; b : 与 LC3+Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组相比, $P < 0.05$; c : 与 LC3+Na₂HAsO₄ (0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组相比, $P < 0.05$; d : 与 LC3+Na₂HAsO₄ (6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组相比, $P < 0.05$; * : 与 24h 相比, $P < 0.05$ 。

2.3 Na₂HAsO₄对感染后LX-2细胞凋亡的影响

经流式细胞术的检测结果分析, 不同剂量组间的细胞凋亡率差异具有统计学意义 ($F=194.033$, $P < 0.05$)。随着 Na₂HAsO₄ 浓度的增加, 凋亡率逐渐升高, 各砷染毒剂量组与 Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组相比较, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。见图2和表3。



[注] A : Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) ; B : LC3+Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) ; C : LC3+Na₂HAsO₄ (0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) ; D : LC3+Na₂HAsO₄ (6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) ; E : LC3+Na₂HAsO₄ (60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

图2 Na₂HAsO₄对感染后LX-2的细胞凋亡的影响Figure 2 Effect of Na₂HAsO₄ on the apoptosis of LX-2 after infection表3 Na₂HAsO₄对感染后LX-2细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 3 Effect of Na₂HAsO₄ on the apoptosis rate of LX-2 cells after infection ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	凋亡率/%
Na ₂ HAsO ₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.36±0.17
LC3+Na ₂ HAsO ₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.19±0.21
LC3+Na ₂ HAsO ₄ (0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	9.40±0.87 ^{ab}
LC3+Na ₂ HAsO ₄ (6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	15.68±0.81 ^{abc}
LC3+Na ₂ HAsO ₄ (60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	22.06±1.53 ^{abcd}

[注] a : 与 Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组相比, $P < 0.05$; b : 与 LC3+Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组相比, $P < 0.05$; c : 与 LC3+Na₂HAsO₄ (0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组相比, $P < 0.05$; d : 与 LC3+Na₂HAsO₄ (6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组相比, $P < 0.05$ 。

2.4 Na₂HAsO₄对感染后LX-2细胞LC3、Beclin-1、SQSTM-1/P62、BCL-2 mRNA水平的影响

各组LC3、Beclin-1、SQSTM-1/P62、BCL-2 mRNA水平差异均有统计学意义 ($F=5.64$ 、20.59、15.91、113.29, 均 $P < 0.05$)。LC3 mRNA水平: 除LC3+Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组外, 其余各剂量组均高于 Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; LC3+Na₂HAsO₄ (6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组高于 LC3+Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 (均 $P < 0.05$)。Beclin-1 mRNA水平: 除LC3+Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组外, 其余各剂量组均高于 Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; LC3+Na₂HAsO₄ (6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组、LC3+Na₂HAsO₄ (60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组高于 LC3+Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; LC3+Na₂HAsO₄ (6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组高于 LC3+Na₂HAsO₄ (0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; LC3+Na₂HAsO₄ (60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组低于 LC3+Na₂HAsO₄ (6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 (均 $P < 0.05$)。SQSTM-1/P62 mRNA水平: LC3+Na₂HAsO₄ (6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组、LC3+Na₂HAsO₄ (60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组高于 Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; LC3+Na₂HAsO₄ (60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组高于其余各剂量组 (均 $P < 0.05$)。BCL-2 mRNA水平: 除LC3+Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组外, 其余各剂量组均高于 Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 并随着 Na₂HAsO₄ 浓度的升高而上调 (均 $P < 0.05$)。见表4。

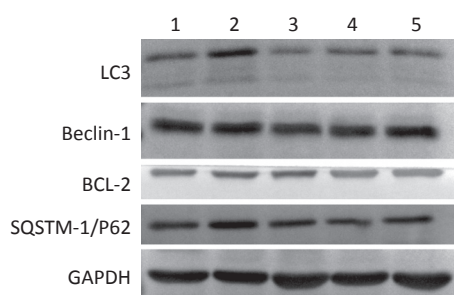
表4 Na₂HAsO₄对感染后LX-2细胞LC3、Beclin-1、SQSTM-1/P62、BCL-2 mRNA水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 4 Effect of Na₂HAsO₄ on the mRNA levels of LC3, Beclin-1, SQSTM-1/P62, and BCL-2 in LX-2 cells after infection ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	LC3	Beclin-1	SQSTM-1/P62	BCL-2
Na ₂ HAsO ₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.01±0.24	1.01±0.13	1.09±0.37	1.04±0.35
LC3+Na ₂ HAsO ₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	6.37±3.31	1.88±0.49	2.55±0.83	2.39±0.18
LC3+Na ₂ HAsO ₄ (0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	8.57±1.24 ^a	2.47±0.13 ^a	5.75±0.72	5.32±0.42 ^{ab}
LC3+Na ₂ HAsO ₄ (6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	13.05±5.76 ^{ab}	5.02±1.01 ^{abc}	8.17±2.89 ^a	16.94±2.69 ^{abc}
LC3+Na ₂ HAsO ₄ (60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	11.17±2.71 ^a	2.97±0.17 ^{abcd}	20.47±6.80 ^{abcd}	21.49±1.91 ^{abcd}
F	5.64	20.59	15.91	113.29
P	0.02	0.01	<0.01	<0.01

[注] a : 与 Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组相比, $P < 0.05$; b : 与 LC3+Na₂HAsO₄ (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组相比, $P < 0.05$; c : 与 LC3+Na₂HAsO₄ (0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组相比, $P < 0.05$; d : 与 LC3+Na₂HAsO₄ (6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组相比, $P < 0.05$ 。

2.5 Na₂HAsO₄对感染后 LX-2 细胞 LC3、Beclin-1、SQSTM-1/P62、BCL-2 蛋白表达的影响

各组 LC3、Beclin-1、SQSTM-1/P62、BCL-2 蛋白表达水平差异均有统计学意义 ($F=340.66$ 、 87.70 、 107.24 、 9.41 ，均 $P<0.05$)。LC3 蛋白：各剂量组高于 Na₂HAsO₄ ($0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组；LC3+Na₂HAsO₄ ($6\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组低于 LC3+Na₂HAsO₄ ($0.6\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组；LC3+Na₂HAsO₄ ($60\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组高于 LC3+Na₂HAsO₄ ($6\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组 (均 $P<0.05$)。Beclin-1 蛋白：除 LC3+Na₂HAsO₄ ($0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组外，其余各剂量组均高于 Na₂HAsO₄ ($0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组，随着 Na₂HAsO₄ 浓度的升高呈下调趋势 (均 $P<0.05$)。SQSTM-1/P62 蛋白：LC3+Na₂HAsO₄ ($60\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组高于其余各剂量组；LC3+Na₂HAsO₄ ($6\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组低于 LC3+Na₂HAsO₄ ($0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、LC3+Na₂HAsO₄ ($0.6\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组 (均 $P<0.05$)。BCL-2 蛋白：LC3+Na₂HAsO₄ ($6\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组高于 Na₂HAsO₄ ($0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组，LC3+Na₂HAsO₄ ($60\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组高于其于各剂量组 (均 $P<0.05$)。见图 3、表 5。



[注] 1~5 分别为 Na₂HAsO₄ ($0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、LC3+Na₂HAsO₄ ($0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、LC3+Na₂HAsO₄ ($6\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、LC3+Na₂HAsO₄ ($60\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、LC3+Na₂HAsO₄ ($0.6\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组。

图3 蛋白免疫印迹法检测 Na₂HAsO₄ 对感染后 LX-2 细胞 LC3、Beclin-1、SQSTM-1/P62、BCL-2 蛋白表达水平电泳图
Figure 3 Western blotting results of Na₂HAsO₄ on the protein expression levels of LC3, Beclin-1, SQSTM-1/P62, BCL-2 in LX-2 cells after infection

表5 Na₂HAsO₄对感染后 LX-2 细胞 LC3、Beclin-1、SQSTM-1/P62、BCL-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 5 Effect of Na₂HAsO₄ on the protein levels of LC3, Beclin-1, SQSTM-1/P62, and BCL-2 in LX-2 cells after infection ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	LC3	Beclin-1	SQSTM-1/P62	BCL-2
Na ₂ HAsO ₄ ($0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.08±0.02	0.31±0.01	0.36±0.01	1.00±0.46
LC3+Na ₂ HAsO ₄ ($0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.13±0.02 ^a	0.32±0.01	0.37±0.01	1.07±0.38
LC3+Na ₂ HAsO ₄ ($0.6\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.46±0.01 ^{ab}	0.48±0.02 ^{ab}	0.38±0.01	1.21±0.36
LC3+Na ₂ HAsO ₄ ($6\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.33±0.01 ^{abc}	0.42±0.02 ^{abc}	0.33±0.01 ^{bc}	1.79±0.23 ^a
LC3+Na ₂ HAsO ₄ ($60\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.46±0.02 ^{abcd}	0.38±0.01 ^{abcd}	0.55±0.02 ^{abcd}	3.07±0.51 ^{abcd}
<i>F</i>	340.66	87.70	107.24	9.41
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	0.02

[注] a：与 Na₂HAsO₄ ($0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组相比， $P<0.05$ ；b：与 LC3+Na₂HAsO₄ ($0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组相比， $P<0.05$ ；c：与 LC3+Na₂HAsO₄ ($0.6\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组相比， $P<0.05$ ；d：与 LC3+Na₂HAsO₄ ($6\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组相比， $P<0.05$ 。

3 讨论

自噬是一种哺乳动物细胞中特殊的自我消化过程，巨自噬是其主要的形式。自噬是一种分解大细胞器及蛋白质聚集体的独特机制。自噬是一个动态过程，可通过在透射显微镜下观察自噬体和自噬溶酶体。本研究用 RFP-GFP-LC3 慢病毒感染 LX-2 细胞，在激光共聚焦显微镜下可见绿色荧光斑点和红色荧光斑点，两者的荧光斑点强度无明显差别，证明成功构建慢病毒稳定感染的 LX-2 细胞株。

在肝脏中，慢性疾病多伴随着肝细胞的凋亡，是肝脏发生癌变的突出病理特征。体外细胞实验表明，活化的肝星状细胞会自发凋亡^[10]。本实验用 Na₂HAsO₄ 干预 LX-2 细胞，发现随着染砷时间延长及染砷剂量增加，细胞的生存能力明显降低。在同一时间点，随着染毒剂量的增加，细胞凋亡率呈上升趋势。这可能与砷代谢激活 LX-2 细胞的凋亡机制有关。细胞凋亡受自噬活性的调控，适当的自噬是一种自我保护机制，而过度自噬则导致细胞死亡^[11-12]。自噬活性和生物学功能受 LC3、SQSTM-1/P62、Beclin-1、BCL-2 等各种自噬基因和自噬蛋白的调节^[13]。细胞内存在两种形式的 LC3 蛋白，LC3-I 和 LC3-II，当自噬发生时，胞质中的 LC3-I 降解转化为 LC3-II，LC3-II 位于自噬体膜上，其含量与自噬泡数量呈正比^[14]。当存在受损的 DNA、细胞器或蛋白聚集时，SQSTM-1/P62 会形成双层膜结构的自噬体，吞噬受损物质。故 LC3 和 SQSTM-1/P62 被视为自噬的生物标记物^[15]。Beclin-1 是自噬关键调节因子，其的增加促进 LC3-I 向 LC3-II 的转化，反映自噬被激活^[16]。BCL-2 是特性良好的抗凋亡蛋白，也是调控自噬的关键因子，可通过与 Beclin-1 的 BH-3 结构域结合，抑制细胞自噬，并且 BCL-2 表达的上调提示细胞自噬紊乱^[17]。Beclin-1 可结合 BCL-2 形成 BCL-2/Beclin-1 复合体，降低 Beclin-1 单体，从而抑制自噬^[18]。本研究中，实时荧光定量 PCR 结果显示，Na₂HAsO₄ 干预 LX-2 细胞后，LC3、Beclin-1 mRNA 水平升高，除 LC3+Na₂HAsO₄ ($0.6\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组外，其余各剂量组 SQSTM-1/P62 mRNA 水平升高，BCL-2 mRNA 表达水平随着染砷浓度的增加逐渐升高。Western blotting 结果显示，各剂量组 LC3 蛋白表达水平上调，LC3+Na₂HAsO₄ ($60\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组 SQSTM-1/P62 蛋白表达水平上调，说明高剂量的砷促进了自噬的发生；随着染砷浓度的增加，Beclin-1 蛋白表达水平呈下调趋势，BCL-2 蛋白表达水平呈现上调趋势，在 LC3+Na₂HAsO₄

($60\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组中明显上调。其中, *LC3*、*SQSTM-1/P62*、*Beclin-1* 基因水平与蛋白表达水平出现不一致情况, 有可能存在从蛋白水平上调节该基因的表达, 或由于蛋白降解及稳定性的降低, 导致转录水平及蛋白水平上的调节变化^[19]。综合上述结果, Na_2HAsO_4 可激活 LX-2 细胞发生自噬, 并导致自噬体过度积累, 从而造成自噬受损, 其可能与无机砷导致肝损伤的机制有关。随着 Na_2HAsO_4 剂量的增加, *Beclin-1*、*BCL-2* 在 $\text{LC3}+\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ($60\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组的拮抗作用最强, 提示高剂量的砷可促进 *BCL-2* 与 *Beclin-1* 拮抗作用, 抑制自噬发生, 导致自噬紊乱。细胞凋亡和细胞自噬作为引起细胞程序性死亡的两种不同方式, 并非是独立存在的。自噬反应早于凋亡细胞死亡, 自噬的过度激活可能通过不受抑制的降解过程导致细胞凋亡死亡。

综合以上研究结果, Na_2HAsO_4 可以导致 LX-2 细胞发生细胞凋亡和自噬, 二者可能存在拮抗作用。

参考文献

- [1] XUE XM, YAN Y, XIONG C, et al. Arsenic biotransformation by a cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7120 [J]. *Environ Pollut*, 2017, 228 : 111-117.
- [2] YANG HC, FU HL, LIN YF, et al. Pathways of arsenic uptake and efflux [J]. *Curr Top Membr*, 2012, 69 : 325-358.
- [3] BENTLEY R, CHASTEEN TG. Microbial methylation of metalloids : arsenic, antimony, and bismuth [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66 (2) : 250-271.
- [4] EZHILARASAN D, SOKAL E, NAJIMI M. Hepatic fibrosis : it is time to go with hepatic stellate cell-specific therapeutic targets [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2018, 17 (3) : 192-197.
- [5] HIGASHI T, FRIEDMAN SL, HOSHIDA Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121 : 27-42.
- [6] 范丽丽, 陈雄, 邹忠兰, 等. 亚砷酸钠对人肝星状细胞活化及细胞外基质分泌的影响 [J]. *中华预防医学杂志*, 2018, 52 (10) : 983-987.
- [7] D'ARCY MS. Cell death : a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43 (6) : 582-592.
- [8] 陈文军, 李静, 吴顺华. 无机砷及其代谢物诱导人成纤维细胞凋亡的实验研究 [J]. *实用临床医药杂志*, 2013, 17 (7) : 1-4, 11.
- [9] 王晨璐, 吴顺华, 张露露. 亚砷酸钠对大鼠肝星状细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *环境与健康杂志*, 2017, 34 (2) : 102-105.
- [10] HUANG Y, HUANG D, WENG J, et al. Effect of reversine on cell cycle, apoptosis, and activation of hepatic stellate cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 423 (1/2) : 9-20.
- [11] LIU G, PEI F, YANG F, et al. Role of autophagy and apoptosis in non-small-cell lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (2) : 367.
- [12] NIKOLETOPOULOU V, MARKAKI M, PALIKARAS K, et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833 (12) : 3448-3459.
- [13] MARTINEZ VD, VUCIC EA, BECKER-SANTOS DD, et al. Arsenic exposure and the induction of human cancers [J]. *J Toxicol*, 2011, 2011 : 431287.
- [14] SHEN S, LI XF, CULLEN WR, et al. Arsenic binding to proteins [J]. *Chem Rev*, 2013, 113 (10) : 7769-7792.
- [15] SHAO YZ, ZHAO HJ, WANG Y, et al. The apoptosis in arsenic-induced oxidative stress is associated with autophagy in the testis tissues of chicken [J]. *Poult Sci*, 2018, 97 (9) : 3248-3257.
- [16] ZHAO H, YANG M, ZHAO B. Beclin 1 and LC3 as predictive biomarkers for metastatic colorectal carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 35 (8) : 59058-59067.
- [17] MAIURI MC, ZALCKVAR E, KIMCHI A, et al. Self-eating and self-killing : crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8 (9) : 741-752.
- [18] LEVINE B, SINHA SC, KROEMER G. Bcl-2 family members : Dual regulators of apoptosis and autophagy [J]. *Autophagy*, 2008, 4 (5) : 600-606.
- [19] DE SOUSA ABREU R, PENALVA LO, MARCOTTE EM, et al. Global signatures of protein and mRNA expression levels [J]. *Mol Biosyst*, 2009, 5 (12) : 1512-1526.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 汪源)