

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.16.003

沉默 MAPK1 对牛磺胆酸钠诱导的胰腺腺泡细胞内胰蛋白酶原的细胞内激活及自噬流的影响 *

陈子昂 宋宗工 王 昊 苗 壮 蒋彦峰 薛东波[△]

(哈尔滨医科大学附属第一医院普外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨沉默丝裂素活化蛋白激酶(MAPK1)对牛磺胆酸钠诱导的胰腺腺泡细胞内胰蛋白酶原激活及自噬流的影响。**方法:**选择体外培养的 AR42J 细胞分为 AR42J 细胞 + 空白对照组, AR42J 细胞 + 牛磺胆酸钠 (TLC)(200 μ M 的 TLC 作用 40 min), AR42J 细胞 + RNA1(MAPK1)。分别转染 MAPK1 siRNA 以及阴性对照, 采用 BZiPAR、流式细胞术及激光共聚焦显微镜检测胰蛋白酶原激活, western blot 技术检测各组自噬相关蛋白 LC3、Beclin1、Cathepsin L, 组织蛋白酶 L(Cathepsin L, CTSL, 也称为 CTSL1) 和溶酶体膜蛋白(Lysosomal associated membrane protein 2, LAMP2)。**结果:**TLC 处理 AR42J 细胞后, 胰蛋白酶原激活显著增加(阳性细胞相对比: 15.12% $\pm$ 1.46% vs. 7.82% $\pm$ 1.86%, $P < 0.05$, 平均荧光强度: 7.65 $\pm$ 0.72 vs. 3.76 $\pm$ 0.57, $P < 0.05$), MAPK1 siRNA 转染后 TLC 处理 AR42J 细胞后细胞内胰蛋白酶原激活则较 TLC 组明显降低(阳性细胞相对比: 9.25% $\pm$ 1.16% vs. 15.12% $\pm$ 1.46%, $P < 0.05$, 平均荧光强度: 4.31 $\pm$ 0.27 vs. 7.65 $\pm$ 0.72, $P < 0.05$)。TLC 组 Beclin1 与 LC3 表达显著性高于对照组(Beclin1: 2.237 $\pm$ 0.097 vs. 1.103 $\pm$ 0.057, $P < 0.05$), LC3: 1.908 $\pm$ 0.039 vs. 0.973 $\pm$ 0.081, $P < 0.05$), TLC + MAPK1 siRNA 组 Beclin1 与 LC3 的表达显著低于 TLC 组(Beclin1: 1.214 $\pm$ 0.049 vs. 2.237 $\pm$ 0.097, $P < 0.05$), LC3: 1.315 $\pm$ 0.037 vs. 1.908 $\pm$ 0.039, $P < 0.05$); 而 TLC 组 LAMP2 及 CTSL1 表达较对照组显著下调(LAMP2: 0.462 $\pm$ 0.025 vs. 1.009 $\pm$ 0.039, $P < 0.05$), CTSL1: 0.563 $\pm$ 0.028 vs. 1.135 $\pm$ 0.041, $P < 0.05$), TLC + MAPK1 siRNA 组 LAMP2 及 CTSL1 表达显著高于 TLC 组(LAMP2: 1.007 $\pm$ 0.019 vs. 0.462 $\pm$ 0.025, $P < 0.05$), CTSL1: 0.921 $\pm$ 0.030 vs. 0.563 $\pm$ 0.028, $P < 0.05$)。**结论:**沉默 MAPK1 对 TLC 诱导的 AR42J 细胞中的胰蛋白酶原激活具有抑制作用, 可能通过抑制 MAPK1 通路抑制自噬发生, 同时使 LAMP2 及 CTSL1 的表达增强, 自噬溶酶体的功能正常, 自噬过程顺利进行, 从而抑制胰蛋白酶原的激活, 减轻急性胰腺炎。

关键词:沉默 MAPK1; 自噬; 急性胰腺炎**中图分类号:**R33; R576 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)16-3012-05

Effect of Silenced MAPK1 on the Intracellular Activation of Trypsinogen and Autophagic Flux in Tauroolithocholic-induced Acute Acinar Cells*

CHEN Zi-gang, SONG Zong-gong, WANG Hao, MIAO Zhuang, JIANG Yan-feng, XUE Dong-bo[△]

(Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate silenced mitogen-activated protein kinase (MAPK1) has an effect on the intracellular activation of trypsinogen and autophagic flux in tauroolithocholic-induced pancreatic acinar cells. **Methods:** AR42J cells cultured in vitro were divided into three groups: AR42J cells adding blank control group, AR42J cells adding tauroolithocholic (TLC) (TLC effect of 200 μ M for 40 minute), AR42J cells adding RNA1 (MAPK1). The above groups were transfected with MAPK1 siRNA respectively and negative control. There were many means to detect the activation of trypsinogen by BZiPAR, flow cytometry and laser confocal microscopy. Western blot was used to detect the expression of autophagy-related proteins LC3, Beclin1, Cathepsin L, (CTSL, also known as CTSL1) and Lysosomal associated membrane protein 2 (LAMP2) in each group. **Results:** After the treatment of AR42J cells with TLC, the activation of trypsin was significantly increased (relative proportion for positive cells: 15.12% $\pm$ 1.46% vs. 7.82% $\pm$ 1.86%, $P < 0.05$, mean fluorescence intensity: 7.65 $\pm$ 0.72 vs. 3.76 $\pm$ 0.57, $P < 0.05$). After MAPK1 siRNA transfection, the intracellular trypsinogen activation in TLC-treated AR42J cells was significantly lower than that in TLC group (relative proportion for positive cells: 9.25% $\pm$ 1.16% vs. 15.12% $\pm$ 1.46%, $P < 0.05$, mean fluorescence Intensity: 4.31 $\pm$ 0.27 vs. 7.65 $\pm$ 0.72, $P < 0.05$). Beclin1 and LC3 expression in TLC group was significantly higher than that in control group (Beclin1: 2.237 $\pm$ 0.097 vs. 1.103 $\pm$ 0.057, $P < 0.05$), LC3: 1.908 $\pm$ 0.039 vs. 0.973 $\pm$ 0.081, $P < 0.05$). The expression of Beclin1 and LC3 in TLC adding MAPK1 siRNA group was significantly lower than that in TLC group (Beclin1: 1.214 $\pm$ 0.049 vs. 2.237 $\pm$ 0.097, $P < 0.05$), LC3: 1.315 $\pm$ 0.037 vs. 1.908 $\pm$ 0.039, $P < 0.05$). But, The expression of LAMP2 and CTSL1 in TLC group was significantly lower than that in control group (LAMP2: 0.462 $\pm$ 0.025 vs. 1.009 $\pm$ 0.039, $P < 0.05$), CTSL1: 0.563 $\pm$ 0.028 vs. 1.135 $\pm$ 0.041, $P < 0.05$). The expression of LAMP2 and CTSL1 in TLC adding

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81370566)

作者简介: 陈子昂(1992-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 急性胰腺炎与自噬, 电话: 18846182931, E-mail: 545668686@qq.com

[△] 通讯作者: 薛东波, 男, 硕士生导师, 主任医师, 主要研究方向: 急性胰腺炎与自噬, 电话: 13845103698, E-mail: dongbo_xue@126.com

(收稿日期: 2018-01-22 接受日期: 2018-02-28)

MAPK1siRNA group was significantly higher than that in TLC group (LAMP2: 1.007 ± 0.019 vs. 0.462 ± 0.025 , $P < 0.05$. CTSL1: 0.921 ± 0.030 vs. 0.563 ± 0.028 , $P < 0.05$). **Conclusions:** Silenced MAPK1 can inhibit the trypsinogen activation induced by TLC in AR42J cells, and it may inhibit autophagy by inhibiting the MAPK1 pathway. At the same time, the expression of LAMP2 and CTSL1 enhanced, the functions of autophagy lysosomes are normal and the process of autophagy proceeds smoothly, thereby inhibiting the activation of trypsinogen and reducing acute pancreatitis.

Key words: Silenced MAPK1; Autophagy; Acute pancreatitis

Chinese Library Classification(CLC): R33; R576 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)16-3012-05

前言

急性胰腺炎(Acute pancreatitis, AP)在全球都有较高的发病率和死亡率,危害着人类的健康。尽管其发病机制尚未完全明确,但目前学者普遍认为胰蛋白酶原在胰腺腺泡细胞内异常激活,从而引起细胞自身消化是所有类型 AP 的始动因素;同时伴随着胰腺腺泡细胞内自噬通路的异常导致胰腺腺泡细胞形成大量的空泡,并且引发胰蛋白酶原的激活^[1-4]。自噬、溶酶体及线粒体的功能障碍是 AP 发病的重要因素^[4]。

丝裂素活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK1) 是一组由丝氨酸 - 苏氨酸介导细胞内信号传导的激酶,主要参与细胞增殖、分化、存活、死亡和转化等^[5]。MAPK1 在 AP 的发展和发病中发挥着重要的作用。因此,本研究通过沉默腺泡细胞中 MAPK1 后,检测自噬相关蛋白 LC3、Beclin1、组织蛋白酶 L(Cathepsin L, CTSL, 也称为 CTSL1)和溶酶体膜蛋白(Lysosomal associated membrane protein 2, LAMP2),探究其在 AP 时腺泡内自噬的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

大鼠 AR42J 细胞自购美国 ATCC 公司;1640 培养基、PBS 购自美国 Hyclone 公司;胚胎牛血清自美国 PAN-Biotech;牛磺胆酸钠(Taurothiocholic TLC)购自 Sigma;兔抗大鼠 LC3 抗体、Beclin1 抗体、LAMP2 羊多抗、Cathepsin L 羊多抗自美国 Santa Cruz Biotech 公司; β -actin 购自美国 Immunoway 公司, BZiPAR 购自美国 Molecular Probes 公司。流式细胞仪(Callibur II)购自美国 Bioscience 公司,激光共聚焦显微镜(A1R)购自日本 Nikon 公司。

1.2 实验方法及步骤

1.2.1 AR42J 细胞的培养及分组 细胞转染 48 h 后,细胞用 0.25 %胰酶消化,用含 10 %FBS 的培养基终止胰酶反应,调整细胞密度为 1.0×10^5 个/mL,接种 1000 μ L 于 6 孔细胞培养板孔内;待细胞贴壁后分为如下 6 组进行细胞模型:AR42J 细胞 + 空白对照组,AR42J 细胞 + TLC (200 μ M 的 TLC 作用 40 min),AR42J 细胞 + RNA1(MAPK1)。继续作用 40 min。

1.2.2 细胞转染 转染前一天细胞铺板,细胞每孔 2×10^5 个,每孔 800 μ L 相应的培养基(培养基加 FBS,不加双抗);铺板后培养至少 12 h。对于各个需要转染的样本,应按照以下步骤准备 siRNA-lipoRNAiMAX 混合液:稀释 siRNA:用 100 μ L 不含血清培养基 Opti-MEM 稀释 2.5 μ L 20 μ M 的 siRNA 储存液,轻轻混匀,室温孵育 5 min;稀释 lipo RNAiMAX:用 100 μ L 不

含血清培养基 Opti-MEM 稀释 2 μ L lipo RNAiMAX,轻轻混匀并室温孵育 5 min;将 a 和 b 轻轻地震荡混匀,室温孵育 20 min (溶液可能会有发生浑浊,但对转染无显著影响);将 siRNA-lipo RNAiMAX 混合液加入含有 cell 的 800 μ L 培养基的培养孔中,以十字法进行 A 摇匀;培养 4-6 h 后,将孔内含有 siRNA-lipo RNAiMAX 混合液的培养基移除,更新培养基 (含 FBS,双抗);把培养板放入 37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱内培养 48 h 后,收集细胞。

Negative control (5'to3'): UUCUCCGAACGUGU-CACGUTT,

ACGUGACACGUUCGGAGAATT;

MAPK1-rat-274 (5'to3'): CAUGGUUUCUGCGUUU-UAUTT,

AUAAGCAGAACAAACCAUGTT。

1.2.3 流式细胞仪检测胰蛋白酶原激活 消化收集细胞,各组取 1×10^6 个细胞,1000 rpm 离心 5 min;弃上清,加入 500 μ L 1 $\times$ PBS 洗涤 2 次,每次洗涤均 1000 rpm 离心 5 min;用 200 μ L BZiPAR 工作液重悬细胞,室温避光反应 60 min;用 1000 rpm 离心 5 min 后,用 500 μ L 1 $\times$ PBS 重悬细胞,上流式细胞仪检测,CellQuest 软件收集细胞,用 Flowing 软件分析实验数据, FSC/SSC 观察细胞状态,FL1 观察细胞荧光强度变化。

1.2.4 激光共聚焦显微镜检测胰蛋白酶原激活 将共聚焦皿内的细胞用 PBS 洗涤 2-3 次;加入 4 %的多聚甲醛 150 μ L 固定共聚焦皿内的细胞,室温反应 15 min;用 PBS 洗涤 2-3 次,含 2 %Tween-20 的 PBS,室温孵育细胞 10 min;用 PBS 洗涤 2-3 次,加入 BZiPAR 染料工作液,室温避光反应 60 min;用 PBS 洗涤 2-3 次,直接用激光共聚焦显微镜观察。

1.2.5 Western Blot 检测蛋白表达 取 1×10^7 个细胞,抽提蛋白,BCA 法蛋白定量。10 μ g/孔上样,浓缩胶恒压 90 V,约 20 min;分离胶恒压 160 V,通过预染蛋白 marker 来确定电泳停止时间。湿转法,转膜条件:300 mA 恒流,0.45 μ m 孔径 NC 膜,转膜时间 1 h。转膜完成后丽春红染色试剂对膜进行染色,观察转膜效果。封闭:将膜完全浸没 3 %BSA-TBST 中室温轻摇 30 min。一抗孵育:LAMP2 羊多抗(1:200, sc-8100);Cathepsin L 羊多抗(CTSL1, 1:200, sc-6498); β -actin (1:5000, YM3028)。室温孵育 10 min 后放置 4 $^{\circ}$ C 过夜。洗膜:TBST 洗膜 5 次,每次 3 min。二抗孵育:用 5 %脱脂奶粉 -TBST 稀释二抗,兔抗山羊 IgG(H+L) HRP(1:20000, Cat No.S001),加入一抗对应种属 NC 膜内,室温轻摇 40 min 后,洗膜:TBST 洗膜 6 次,每次 3 min;ECL 加到膜上后反应 3-5 min,胶片曝光:2 min,显影 2 min,定影。

1.3 统计学分析

各参数均以均值±标准差表示, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。以上均采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 沉默 MAPK1 对 AR42J 细胞胰蛋白酶原激活的影响

BZiPAR 是一种特异性的丝氨酸蛋白酶底物, 当在激活的胰蛋白酶的作用下裂解为两个寡肽链时, 该底物就会发出绿色荧光。本实验通过流式细胞仪进行定量研究, 以绿色荧光阳性细胞的相对比例和绿色荧光的平均荧光强度来评估胰蛋白酶原的激活程度。激光共聚焦显微镜检测结果显示: TLC 组荧光

强度较对照组显著增高, 提示胰蛋白酶激活增强, 而 TLC+MAPK1 siRNA 组荧光强度较 TLC 组则明显减弱, 见图 1A。流式细胞术定量检测结果显示 TLC 处理 AR42J 细胞后, 胰蛋白酶原激活显著增加(阳性细胞相对比: $15.12\% \pm 1.46\%$ vs. $7.82\% \pm 1.86\%$, $P<0.05$, 平均荧光强度: 7.65 ± 0.72 vs. 3.76 ± 0.57 , $P<0.05$), MAPK1 siRNA 转染后 TLC 处理 AR42J 细胞后细胞内胰蛋白酶原激活则较 TLC 组明显降低(阳性细胞相对比: $9.25\% \pm 1.16\%$ vs. $15.12\% \pm 1.46\%$, $P<0.05$, 平均荧光强度: 4.31 ± 0.27 vs. 7.65 ± 0.72 , $P<0.05$)。提示沉默 MAPK1 对 AR42J 细胞胰蛋白酶原激活具有抑制作用, 见图 1B、图 1C、图 1D。

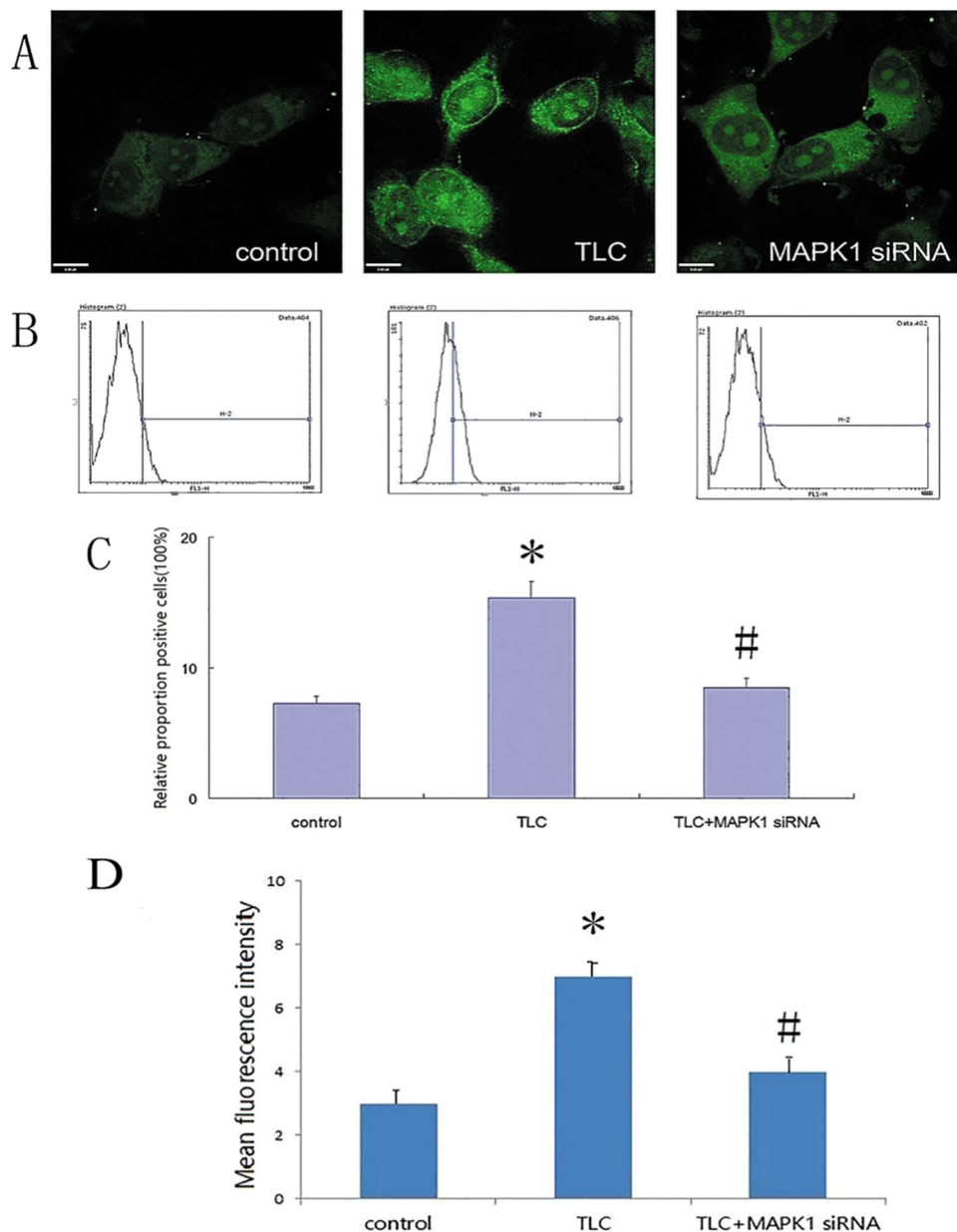


图 1 胰蛋白酶原激活程度的检测结果

(A)激光共聚焦显微镜照片;(B)流式细胞检测直方图;(C)统计图;(D)统计图

Fig.1 Test results of trypsinogen activation. (A) Laser confocal microscopy images. (B) Flow cytometry histogram. (C) Statistics. (D) Statistics.

注: * 与对照组比较, $P<0.05$, # 与 TLC 组比较, $P<0.05$ 。

Note: * Compared with the control group, $P<0.05$, # compared with the TLC group, $P<0.05$;

The green fluorescent is the activated pancreatic enzyme. The blue oval is the nucleus.

2.2 沉默 MAPK1 对 AR42J 细胞 Beclin1、LC3、LAMP2 和 CTSL1 表达的影响

如图 2 所示, TLC 组 Beclin1 与 LC3 表达显著高于对照组 (Beclin1: 2.237 ± 0.097 vs. 1.103 ± 0.057 , $P < 0.05$ 。LC3:

1.908 ± 0.039 vs. 0.973 ± 0.081 , $P < 0.05$), TLC + MAPK1siRNA 组 Beclin1 与 LC3 的表达显著低于 TLC 组 (Beclin1: 1.214 ± 0.049 vs. 2.237 ± 0.097 , $P < 0.05$ 。LC3: 1.315 ± 0.037 vs. 1.908 ± 0.039 , $P < 0.05$)。

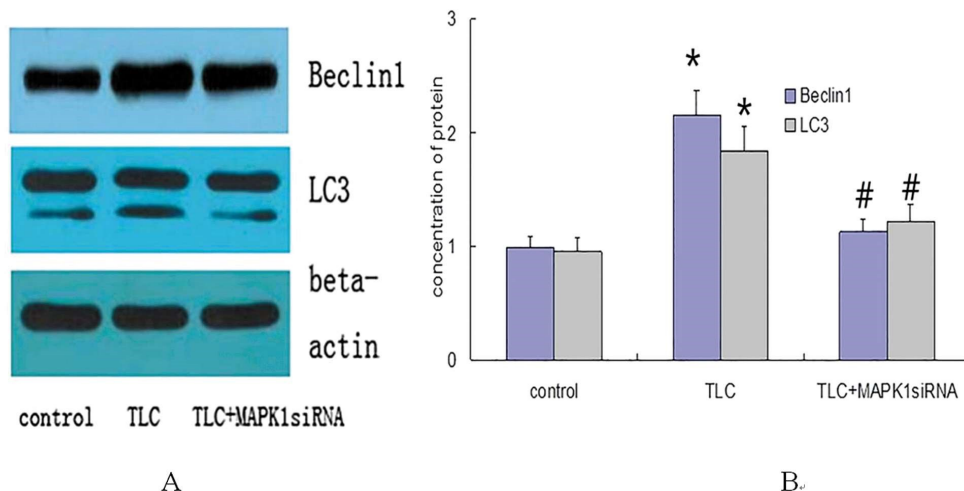


图 2 沉默 MAPK1 对 AR42J 细胞 Beclin1、LC3 表达的影响

(A)电泳图;(B)Beclin1 表达统计图;(C)LC3 表达统计图。

Fig.2 Effect of MAPK siRNA on the Beclin1 and LC3 expressions in AR42J cells

(A) Electrophoresis. (B) Beclin1 expression statistics. (C) LC3 expression statistics.

注:* 与对照组相比, $P < 0.05$; # 与 TLC 组相比, $P < 0.05$ 。

Note: * Compared with the control group, $P < 0.05$, # compared with the TLC group, $P < 0.05$.

如图 3 所示,沉默 MAPK1 对 AR42J 细胞 LAMP2 和 CTSL1 蛋白的影响:TLC 组 LAMP2 及 CTSL1 表达较对照组显著下调(LAMP2: 0.462 ± 0.025 vs. 1.009 ± 0.039 , $P < 0.05$ 。CTSL1: 0.563 ± 0.028 vs. 1.135 ± 0.041 , $P < 0.05$), TLC + MAPK1siRNA

组 LAMP2 及 CTSL1 表达显著高于 TLC 组 (LAMP2: 1.007 ± 0.019 vs. 0.462 ± 0.025 , $P < 0.05$ 。CTSL1: 0.921 ± 0.030 vs. 0.563 ± 0.028 , $P < 0.05$)。

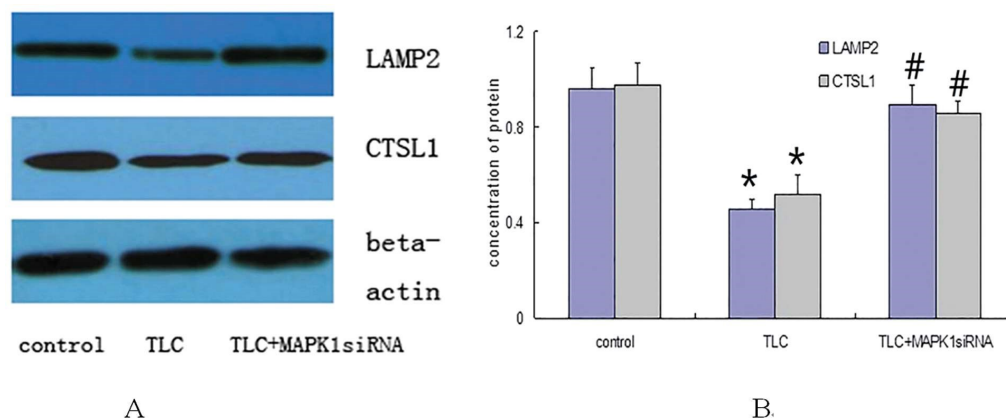


图 3 沉默 MAPK1 对 AR42J 细胞 LAMP2、CTSL1 表达的影响

(A)电泳图;(B)统计图

注:* 与对照组相比, $P < 0.05$; # 与 TLC 组相比, $P < 0.05$ 。

Fig.3 Effect of MAPK siRNA on the LAMP2 and CTSL1 expressions in AR42J cells

(A) Electrophoresis;(B) Statistics

Note: * Compared with the control group, $P < 0.05$, # compared with the TLC group, $P < 0.05$.

3 讨论

自噬主要是巨自噬,首先是自噬体的形成,然后自噬体包裹需要被降解的物质,最终自噬体和溶酶体融合形成自噬溶酶体,其内的溶酶体水解酶如组织蛋白酶 B(CTSB)、CTSL1 发挥

分解作用^[3,6]。Ohmuraya 等^[7]的实验表明敲除 Spink3 的小鼠表现出过度的自噬,继而诱发胰蛋白酶原的异常激活。Yang S 等^[8]认为在牛黄胆酸钠胰管注射诱导的重症 AP 大鼠, NF- κ B 通路被激活,促使了自噬体的形成及胰蛋白酶原的激活。自噬体的形成由一系列在进化上高度保守的自噬相关蛋白介导完成,

自噬的过程非常依赖溶酶体的功能^[9]。Orlichenko 等^[9]认为蛙皮素诱导的 AP 时,ARF1 通过促进溶酶体蛋白水解酶 CTSB 前体的运输加工和自噬体的成熟促进胰蛋白酶原的激活。

长期以来,基础和临床病理研究表明 AP 显著的病理特征是胰腺腺泡细胞内有很多大空泡形成并积聚,这些空泡是自噬来源的,AP 早期胰蛋白酶原的细胞内激活即发生于这些大空泡内,提示自噬在胰蛋白酶原细胞内激活过程中可能发挥着至关重要的作用。

MAPK1 与氧化应激和炎症有关。当这两个过程的阻断时,伴随着 MAPK1 的抑制,可以减少 AP 的炎症和与 AP 的发展和进展相关的反应性物质的产生^[10,11]。一些研究表明,MAPK1 与自噬的发生有着密切的关系。Hirota 等^[12]的研究表明 mito-Keima 细胞及 cyto-Keima 细胞在饥饿诱导下,敲除 MAPK1 及 MAPK14 后,线粒体自噬受到抑制,而对巨自噬无影响,同时,MAPK1 和 MAPK14 是线粒体自噬的发生所必需的。Shang 等^[13]在研究中发现,在黑色素瘤细胞中,p38 MAPK 可以同时促进和抑制自噬过程。p38MAPK 总水平的降低可能导致基因组不稳定,并且在应激反应中延迟激活或抑制自噬。因此,本研究主要探讨了沉默 MAPK1 是否可以通过调节自噬流而影响胰蛋白酶原的激活。

LC3 是最初识别微管的连接和细胞骨架的功能的一种可溶性细胞质蛋白质,可识别和封闭自噬体上的目标蛋白。LC3 定位于自噬体结构被广泛用作自噬发生的标志物,反映自噬的强度^[14]。Beclin1 是一种高度保守的真核生物蛋白,是细胞自噬的关键调控因子,作为 III 类磷脂酰肌醇 3- 激酶复合物的核心成分介导自噬。Beclin1 可以作为自噬的标志蛋白^[15]。本研究中,TLC 诱导的 AR42J 细胞中沉默 MAPK1 组 Beclin1 与 LC3 的表达显著低于 TLC 组表明,AP 的发生过程中伴随着自噬的发生,沉默 MAPK1 可能通过抑制 MAPK 通路,阻止自噬的发生,从而抑制胰蛋白酶原的激活,使炎症反应减轻。

LAMP2 是正常人体内的胰腺组织中溶酶体膜的主要组成部分,主要调节自噬过程的最后阶段:自噬体与溶酶体的融合^[16]。LAMP2 的消耗在早期 AP 的发病过程中发挥着关键性作用,可使自噬过程受损。由于 AP 小鼠胰腺腺泡细胞中 LAMP2 表达显著降低,引起溶酶体和自噬体融合过程产生障碍,自噬流障碍,细胞中出现的大量空泡为自噬体,而非溶酶体。但是,有些证据表明那些空泡很有可能是自噬溶酶体,其积累是自噬通路受损造成的^[18,19]。目前研究普遍认为 AP 存在自噬溶酶体功能障碍。缺乏 LAMP2 会导致人患 Danon 病,表现出多种类型的细胞质空泡积累,包括胰腺腺泡细胞^[20]。细胞质空泡与胰蛋白酶原颗粒的激活和自噬体的形成有着密切的关系,细胞质空泡是 AP 细胞和组织损伤的早期迹象之一,但其确切机制仍不明确。

CTSL1 属于半胱氨酸蛋白酶,在溶酶体的降解功能中发挥着重要的作用,能够降解胰蛋白酶及胰蛋白酶原^[21-23]。有研究发现,CTSL1 作用于胰蛋白酶原的 G26-G27 位点上,水解胰蛋白酶原,同时作用于钙结合环的 E82-E83 位点上,水解胰蛋白酶原和胰蛋白酶。有研究表明,AP 时存在胰腺腺泡细胞自噬通路受阻,成熟的 CTSL1 减少^[24]。若 CTSL1 加工成熟过程受阻或活性不足,可导致溶酶体降解功能的下降,导致自噬功能下降,自噬溶酶体中活性胰蛋白酶增加^[25]。TLC 诱导的 AR42J 细胞中

沉默 MAPK1 组 LAMP2 及 CTSL1 表达显著高于 TLC 组,但与对照组相比无显著变化。实验结果表明,TLC 诱导的 AR42J 细胞发生的 AP 过程中,发生了自噬,但 LAMP2 及 CTSL1 表达减少表明自噬溶酶体的功能下降,从而使自噬通路受阻,胰蛋白酶原激活;沉默 MAPK1 后,通过抑制 MAPK 通路,促使 LAMP2 及 CTSL1 表达增强,自噬溶酶体的功能无障碍,自噬通路正常,抑制胰蛋白酶原的激活,减轻了 AP。

综上所述,沉默 MAPK1 对 TLC 诱导的 AR42J 细胞中的胰蛋白酶原激活具有抑制作用。沉默 MAPK1 抑制 MAPK 通路,可降低自噬发生的强度,同时使 LAMP2 及 CTSL1 的表达增强,自噬溶酶体的功能正常,确保了自噬过程顺利进行,从而抑制胰蛋白酶原的激活,减轻 AP 的发生。本研究为 AP 治疗提供了新的线索。

参考文献(References)

- [1] Xiang JX, Hu LS, Liu P, et al. Impact of cigarette smoking on recurrence of hyperlipidemic acute pancreatitis [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(47): 8387-8394
- [2] Wen W, Zheng H, Jiang Y, et al. Effect of intestinal epithelial autophagy on bacterial translocation in severe acute pancreatitis [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2017, 41(6): 703-710
- [3] Mareninova OA, Hermann K, French SW, et al. Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis [J]. J Clin Invest, 2009, 119(11): 3340-3355
- [4] Gukovsky I, Pandol SJ, Gukovskaya AS. Organellar dysfunction in the pathogenesis of pancreatitis[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(10): 2699-2710
- [5] Kong Q, Zhang S, Liang C, et al. LncRNA XIST functions as a molecular sponge of miR-194-5p to regulate MAPK1 expression in hepatocellular carcinoma cell[J]. J Cell Biochem, 2017, [Epub ahead of print]
- [6] Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(3): 460-473
- [7] Ohmuraya M, Hirota M, Araki K, et al. Enhanced trypsin activity in pancreatic acinar cells deficient for serine protease inhibitor kazal type 3[J]. Pancreas, 2006, 33(1): 104-106
- [8] Yang S, Bing M, Chen F, et al. Autophagy regulation by the nuclear factor κ B signal axis in acute pancreatitis [J]. Pancreas, 2012, 41(3): 367-373
- [9] Orlichenko L, Stolz DB, Noel P, et al. ADP-ribosylation factor 1 protein regulates trypsinogen activation via organellar trafficking of procathepsin B protein and autophagic maturation in acute pancreatitis[J]. J Biol Chem, 2012, 287(29): 24284-24293
- [10] Chen Z, Chen Y, Pan L, et al. Dachengqi Decoction Attenuates Inflammatory Response via Inhibiting HMGB1 Mediated NF- κ B and P38 MAPK Signaling Pathways in Severe Acute Pancreatitis [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(4): 1379-1389
- [11] Shi Q, Chen C, Deng WH, et al. Hydrogen-Rich Saline Attenuates Acute Hepatic Injury in Acute Necrotizing Pancreatitis by Inhibiting Inflammation and Apoptosis, Involving JNK and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-dependent Reactive Oxygen Species [J]. Pancreas, 2016, 45(10): 1424-1431

- export of inflammatory mRNAs[J]. *Elife*, 2017
- [14] Loomis R J, Naoe Y, Parker J B, et al. Chromatin binding of SRp20 and ASF/SF2 and dissociation from mitotic chromosomes is modulated by histone H3 serine 10 phosphorylation [J]. *Molecular Cell*, 2009, 33(4): 450
- [15] Pozzi B, Bragado L, Will CL, et al. SUMO conjugation to spliceosomal proteins is required for efficient pre-mRNA splicing[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(11): 6729-6745
- [16] Kędzierska H, Piekiełko WA. Splicing factors of SR and hnRNP families as regulators of apoptosis in cancer [J]. *Cancer Lett*, 2017, 396: 53-65
- [17] Das S, Anczuków O, Akerman M, et al. Oncogenic splicing factor SRSF1 is a critical transcriptional target of MYC [J]. *Cell Rep*, 2012, 1: 110-117
- [18] Hu ZY, Wang XY, Guo W, et al. Long non-coding RNA MALAT1 increases AKAP-9 expression by promoting SRPK1-catalyzed SRSF1 phosphorylation in colorectal cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 11733
- [19] Tian J, Al-Odaini AA, Wang Y, et al. KiSS1 gene as a novel mediator of TGF β -mediated cell invasion in triple negative breast cancer[J]. *Cell Signal*, 2017, 42: 1-10
- [20] Adams F, Heckl D, Hoffmann T, et al. An optimized lentiviral vector system for conditional RNAi and efficient cloning of microRNA embedded short hairpin RNA libraries [J]. *Biomaterials*, 2017, 139: 102-115
- [21] Liu L, Zhang N, Liu J, et al. Lentivirus-mediated siRNA interference targeting SGO-1 inhibits human NSCLC cell growth[J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(2): 515-521
- [22] Ezzat A, Pereira A, Clarke IJ. Kisspeptin is a Component of the Pulse Generator for GnRH Secretion in Female Sheep but not the Pulse Generator[J]. *Endocrinology*, 2015, 156: 1828-1837
- [23] Finley J. Alteration of splice site selection in the LMNA gene and inhibition of progerin production via AMPK activation [J]. *Med Hypotheses*, 2014, 83(5): 580-587
- [24] Shimoni SA, Lebenthal LI, Zender L, et al. RRM1 domain of the splicing oncoprotein SRSF1 is required for MEK1-MAPK-ERK activation and cellular transformation [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(11): 2498-2504
- [25] Terasaka T, Otsuka F, Tsukamoto N, et al. Mutual interaction of kisspeptin, estrogen and bone morphogenetic protein-4 activity in GnRH regulation by GT1-7 cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 381(1-2): 8-15
- [26] Damm E, Buech TR, Gudermann T, et al. Melanocortin-induced PKA Activation Inhibits AMPK activity via ERK-1/2 and LKB-1 in hypothalamic GT1-7 cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2012, 26(4): 643-654
- [27] Lee SH, Lee HK, Kim C, et al. The splicing factor SRSF1 modulates pattern formation by inhibiting transcription of tissue specific genes during embryogenesis [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2016, 477(4): 1011-1016
- [28] Feng D, Su RC, Zou L. Increase of a group of PTC (+) transcripts by curcumin through inhibition of the NMD pathway [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(8): 1104-1115
- [29] Gonçalves V, Jordan P. Posttranscriptional Regulation of Splicing Factor SRSF1 and Its Role in Cancer Cell Biology [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 287048

(上接第 3016 页)

- [12] Hirota Y, Yamashita S, Kurihara Y, et al. Mitophagy is primarily due to alternative autophagy and requires the MAPK1 and MAPK14 signaling pathways[J]. *Autophagy*, 2015, 11(2): 332-343
- [13] Shang YY, Yao M, Zhou ZW, et al. Alisertib promotes apoptosis and autophagy in melanoma through p38 MAPK-mediated aurora a signaling[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(63): 107076-107088
- [14] Zhang L, Zhang J, Shea K, et al. Autophagy in pancreatic acinar cells in caerulein-treated mice: immunolocalization of related proteins and their potential as markers of pancreatitis [J]. *Toxicol Pathol*, 2014, 42(2): 435-457
- [15] Glover K, Li Y, Mukhopadhyay S, et al. Structural transitions in conserved, ordered Beclin 1 domains essential to regulating autophagy[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(39): 16235-16248
- [16] Furuta K, Yang XL, Chen JS, et al. Differential expression of the lysosome-associated membrane proteins in normal human tissues[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 365(1): 75-82
- [17] Zhu H, Yu X, Zhu S, et al. The fusion of autophagosome with lysosome is impaired in L-arginine-induced acute pancreatitis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 11164-11170
- [18] Gukovskaya AS, Gukovsky I. Autophagy and pancreatitis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303(9): G993-993G1003
- [19] Gukovsky I, Li N, Todoric J, et al. Inflammation, autophagy, and obesity: common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(6): 1199-1209.e4
- [20] Bednarczyk M, Muc-Wierzoń M, Waniczek D, et al. Autophagy-related gene expression in colorectal cancer patients [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2017, 31(4): 923-927
- [21] Shen JD, Cai QF, Yan LJ, et al. Cathepsin L is an immune-related protein in Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*)--Purification and characterization. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 47(2): 986-995
- [22] Hu X, Hu X, Hu B, et al. Molecular cloning and characterization of cathepsin L from freshwater mussel, *Cristaria plicata*. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 40(2): 446-454
- [23] Mehanna S, Suzuki C, Shibata M, et al. Cathepsin D in pancreatic acinar cells is implicated in cathepsin B and L degradation, but not in autophagic activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469(3): 405-411
- [24] Wartmann T, Mayerle J, K?hne T, et al. Cathepsin L inactivates human trypsinogen, whereas cathepsin L-deletion reduces the severity of pancreatitis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(2): 726-737
- [25] Zhu H, Yu X, Zhu S, et al. The fusion of autophagosome with lysosome is impaired in L-arginine-induced acute pancreatitis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 11164-11170