

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.02.002

雷公藤甲素诱导肝细胞选择性自噬的形态学观察*

蒋杨雨 江始源 曹 丹 王海燕 邹昊靖 李 健[△]

(北京中医药大学中医学院组胚教研室 北京 102488)

摘要 目的:观察雷公藤甲素诱导肝细胞选择性自噬的水平。**方法:**在雷公藤甲素给药处理小鼠的尾静脉高压注射 GFP-LC3 质粒,制备肝细胞自噬示踪模型,观察雷公藤甲素在动物体内诱导肝细胞自噬的水平。在 GFP-LC3 稳定表达的 L02 细胞株中转入 RFP-P62 质粒,用活细胞工作站和荧光显微镜动态观察雷公藤甲素诱导 L02 细胞选择性自噬的轮廓,同时也观察细胞自噬复合体 LC3-P62 的变化。**结果:**动物实验结果表明,雷公藤甲素可显著诱导肝细胞自噬体的形成,Western blot 结果显示 P62 蛋白和 LC3II 蛋白的表达趋势一致。活细胞动态观察及免疫荧光双标记实验结果表明 LC3-P62 存在共定位,提示雷公藤甲素可诱导肝细胞自噬流的形成。**结论:**雷公藤甲素可诱导肝细胞选择自噬,其生物学意义可能与肝细胞损伤后修复相关。

关键词:选择性自噬;雷公藤甲素;肝细胞;形态学

中图分类号:R-33;Q593.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)02-206-05

Morphologic Observation of Hepatocyte Selectively Autophagy Induced by Triptolide*

JIANG Yang-yu, JIANG Shi-yuan, CAO Dan, WANG Hai-yan, ZOU Hao-jing, LI Jian[△]

(Department of Histology and Embryology, School of Traditional Chinese Medicine, BUCM, Beijing, 102488, China)

ABSTRACT Objective: To observe the level of hepatocyte selective autophagy induced by triptolide. **Methods:** An autophagy tracing model in hepatocytes was established by rapid tail vein injection of GFP-LC3 plasmids into mice treated with triptolide to observe the hepatocyte autophagy level induced by triptolide in vivo. GFP-LC3 stable expressed L02 cells were transfected with RFP-P62 plasmid, and the selective autophagy profile of L02 and LC3-P62 complex induced by triptolide were dynamically observed by live cell imaging system and fluorescence microscopy. **Results:** The results of in vivo experiments showed that triptolide significantly induced autophagy in hepatocytes. And a similar trend on the protein expression of LC3II and P62 was demonstrated by Western blot. The results of live cell imaging system and fluorescence microscopy showed the co-localization of LC3 and P62 suggesting that the triptolide could induce autophagy flux. **Conclusion:** Triptolide induced selective autophagy in hepatocytes and its biological function might be associated with hepatocyte damage repairing after injury.

Key words: Selectively autophagy; Triptolide; Hepatocyte; Morphology

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q593.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)02-206-05

前言

雷公藤甲素 (Triptolide, TP) 是环氧二萜内酯化合物,是中药雷公藤中最主要的活性成分和质控成分,也是导致雷公藤制剂在临床应用中出现各类不良事件/副反应的主要物质^[1,2]。已有的研究结果揭示,雷公藤甲素的毒理机制包括:诱导氧化应激,导致细胞损伤^[3];抑制相关通路致胆汁酸代谢紊乱,抑制糖异生^[4];损伤线粒体功能,诱导细胞自噬及凋亡^[5,6]等。

近年来,从细胞自噬和凋亡的角度探讨雷公藤毒理机制是研究热点之一^[6-8]。作者所在课题组已报道了肝细胞自噬与雷公藤甲素的肝毒性有关^[9]。为了进一步探究雷公藤甲素是否促进

肝细胞自噬流的发生及其相关作用机制,本文应用动物和细胞实验,动态观察了自噬体形成标志蛋白 LC3-II 与自噬流形成关键蛋白 P62 的表达模式,明确了雷公藤甲素通过促进 LC3 与 P62 的耦连,短暂升高 P62 蛋白的表达,诱导自噬流的形成。该实验结果能初步揭示雷公藤制剂诱导肝毒性的毒理机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

GFP-LC3 稳定转染 L02 细胞株(人正常肝细胞系)为本实验室保存的细胞株;6 周龄雄性昆明种小鼠购自北京维通利华实验动物公司(动物许可证号:SCXK(京)2016-0011),动物实验

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81873099)

作者简介:蒋杨雨(1996-),女,硕士研究生,研究方向:有毒中药“毒/效”相关的机制,E-mail:Jiangyangyu0316@163.com

[△] 通讯作者:李健,博士,教授,博士生导师,研究方向:中医药防治肝病(脂肪肝、脂肪性肝炎、肝纤维化)的作用机制;有毒中药“毒/效”相关的机制,E-mail:lijian@bucm.edu.cn

(收稿日期:2022-04-23 接受日期:2022-05-18)

各项操作通过北京中医药大学动物实验伦理委员会批准;雷公藤甲素购自南京泽朗医药科技有限公司(纯度 $\geq 99\%$);LC3-B 抗体(Cat:Ab51520)和 P62 抗体(Cat:Ab207305)购自 Abcam 公司; β -actin 抗体 (Cat:66009-1-Ig)、 α -tubulin 抗体 (Cat: 66031-1-Ig)和羊抗鼠 IgG (Cat:SA00001-1)购自 Proteintech 公司;GFP-LC3 质粒由北京医科大学佑安医院实验中心娄金丽教授惠赠,质粒抽提试剂盒购自 Promega 公司。质粒转染试剂 (Lipofectamin 2000)购自 Thermo Fisher Scientific 公司。其余常规试剂、耗材均购自北京百诺威生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠尾静脉高压注射 GFP-LC3 质粒法探测雷公藤甲素诱导肝细胞自噬 依照常规方法扩增、抽提 GFP-LC3 质粒。15 只雄性昆明种小鼠适应性喂养一周后,将 10 μ g GFP-LC3 质粒混合于 2 mL PBS 溶液中,在 10 s 内经尾静脉注射到小鼠体内^[10]。质粒注射 48 h 后,将小鼠随机分为 2 组,溶剂对照组(3 只)和药物干预组(12 只)。根据课题组前期实验结果,将药物干预组小鼠腹腔注射雷公藤甲素的干预剂量定为 0.5 mg/kg,溶剂对照组小鼠腹腔注射 DMSO 溶液。于注射后 3、6、12 及 24 h,从药物干预组和溶剂对照组各随机选取 3 只小鼠麻醉、处死、取肝组织。一部分肝组织经 OCT 包埋、冰冻切片、在荧光显微镜下观察 LC3 的表达;另一部分肝组织经匀浆、总蛋白抽提及蛋白定量,用于 Western blot 检测。

1.2.2 LC3 与 P62 蛋白共定位的动态观察 (1)质粒转染及药物孵育:复苏并扩增稳定转染 GFP-LC3 的 L02 细胞,取对数生长期的 L02 细胞接种于 5 个共聚焦显微镜专用培养皿,贴壁后用质粒瞬时转染试剂将 RFP-P62 质粒转入 L02 细胞内。经荧光显微镜初步鉴定并确认质粒转染成功后,分别加入 DMSO 和 10 nM、25 nM、50 nM、100 nM 的雷公藤甲素工作液,孵育 24 h,经冷丙酮固定,于荧光显微镜下观察、摄影。

(2)活细胞观察:实验分组及干预同前,将培养皿置入活细胞工作站,加入雷公藤甲素(50 nM)后,每 20 min 记录一次 GFP-LC3 和 P62 的轮廓,累计观察 120 min,分析雷公藤甲素对细胞内 P62 蛋白水平变化的影响。

1.3 统计学分析

对肝组织内 GFP-LC3 的荧光强度照片(10 个视野/组)做图像分析,计算荧光面积,定量数据用 SPSS 25.0 软件作 ANOVA 单因素方差分析,组间比较采用 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 表示组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雷公藤甲素可激活小鼠肝细胞自噬

尾静脉高压注射 GFP-LC3 质粒的小鼠,经小剂量雷公藤甲素暴露后,GFP-LC3 主要聚集在肝区(图 1-A),肝细胞内可探测到由于 GFP-LC3 聚集而显现出的绿色荧光,且随给药时间增加强度加大(图 1-B,图 1-C),说明雷公藤甲素可诱导 LC3 向肝脏聚集,为自噬的发生奠定基础。肝组织蛋白 Western blot 结果显示,随着雷公藤甲素作用时间的增加,LC3-II 的表达量呈增加趋势(图 1-D),表明雷公藤甲素可以激活肝细胞自噬。而 P62 蛋白的表达量在雷公藤甲素的诱导下,呈先降低后升高的趋势(图 1-D),提示雷公藤甲素低剂量暴露时能诱导激活肝

细胞自噬,而高剂量暴露会造成 P62 的累积,阻碍自噬体的清除。

2.2 雷公藤甲素影响 LC3 和 P62 蛋白在肝细胞中的共定位

为了探明雷公藤甲素诱导的肝细胞自噬体能够被有效降解,我们应用荧光显微镜和活细胞工作站观察了 LC3 和 P62 蛋白在细胞内的共定位,P62 阳性表达呈红色荧光,LC3 阳性表达显绿色荧光,若二者共定位则呈现黄色荧光。结果显示:溶剂对照组,细胞质内能观察到 P62 和 LC3 的荧光,提示 P62 质粒转染成功,LC3 稳转细胞系表型正常(图 2 A)。经 10nM、25nM、50nM、100nM 雷公藤甲素孵育后,L02 细胞内出现明显的黄色荧光,提示 P62 和 LC3 存在共定位(图 2 B-F)。

用 50nM 雷公藤甲素孵育 L02 细胞,活细胞工作站动态观察发现,雷公藤甲素能诱导肝细胞内红色荧光和黄色荧光在短时间内显著增高,标记 P62 蛋白的红色荧光强度短暂增加,120 min 时消失。且显示 P62 和 LC3 共定位的黄色荧光随时间增加亦呈减弱趋势(图 2 G1~G6)。

3 讨论

自噬是一种溶酶体依赖型的细胞内降解系统。正常情况下,基础水平的自噬通过 "self-eating" 行为清除细胞内错误折叠的蛋白质、受损的细胞器等而维持细胞内的稳态^[9,10]。而在应激状态下,自噬可表现出 "双面性":如在缺氧、中毒等条件下,肝细胞可通过自噬阻止细胞凋亡及坏死,以及在由刀豆球蛋白 A 诱导的小鼠急性肝损伤模型中,自噬又可促进细胞凋亡及坏死^[13,14]。正是由于自噬 "双面性" 的特性,将其作为新的疾病治疗靶点的研究已取得了一定的进展^[13,14]。同时,在药物性肝损伤过程中,自噬的作用也被广泛关注。

雷公藤甲素来源于卫矛科植物雷公藤的根茎,是雷公藤中活性成分最高的环氧二萜内酯化合物,具有广泛的抗炎^[17]、抗肿瘤^[18,19]、免疫抑制^[20]等活性,临床上对于类风湿性关节炎^[21]、肺癌^[22]、胰腺癌^[18]、结直肠癌^[23]等多种癌症的治疗具有良好的效果。然而,关于其导致多器官损害尤其发生肝、肾毒性的相关报道也逐渐增多^[1],成为了限制其临床用的主要原因。我们前期研究发现,雷公藤甲素诱导肝细胞自噬是其肝毒性的重要分子机制之一^[24,25]。为了进一步探明其对肝细胞自噬的影响,我们在小鼠体内注射 GFP 标记的 LC3 质粒检测自噬是否发生,将 L02 细胞在不同浓度/时间的雷公藤甲素暴露后,检测自噬相关蛋白的表达。

微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3,LC3)是哺乳动物细胞中的一种可溶性蛋白,是自噬过程的重要标志物。未发生自噬时,LC3 主要以 LC3-I 的形式存在于胞质中,而前体 LC3 可由半胱氨酸蛋白酶 Atg4 水解形成可溶性的 LC3 (LC3-I),LC3-I 进一步被 Atg7 活化,随后由 Atg3 催化并与磷脂酰乙醇胺 (Phosphatidylethanolamine, PE) 共价结合形成自噬体膜型 LC3 (LC3-II),此时便以膜结合的形式 LC3-II 聚集在自噬体膜上参与自噬,LC3-II 是 LC3-I 与磷脂酰乙醇胺(PE)的共轭产物,是自噬小体形成过程中所必需的分子,因此,LC3-II 或 LC3-II/LC3-I 比值升高被认为是自噬激活的典型和标准标志^[26-28]。本研究结果表明,在小鼠经尾静脉高压注射 GFP-LC3 质粒后,药物干预组小鼠肝细胞内可探测到大

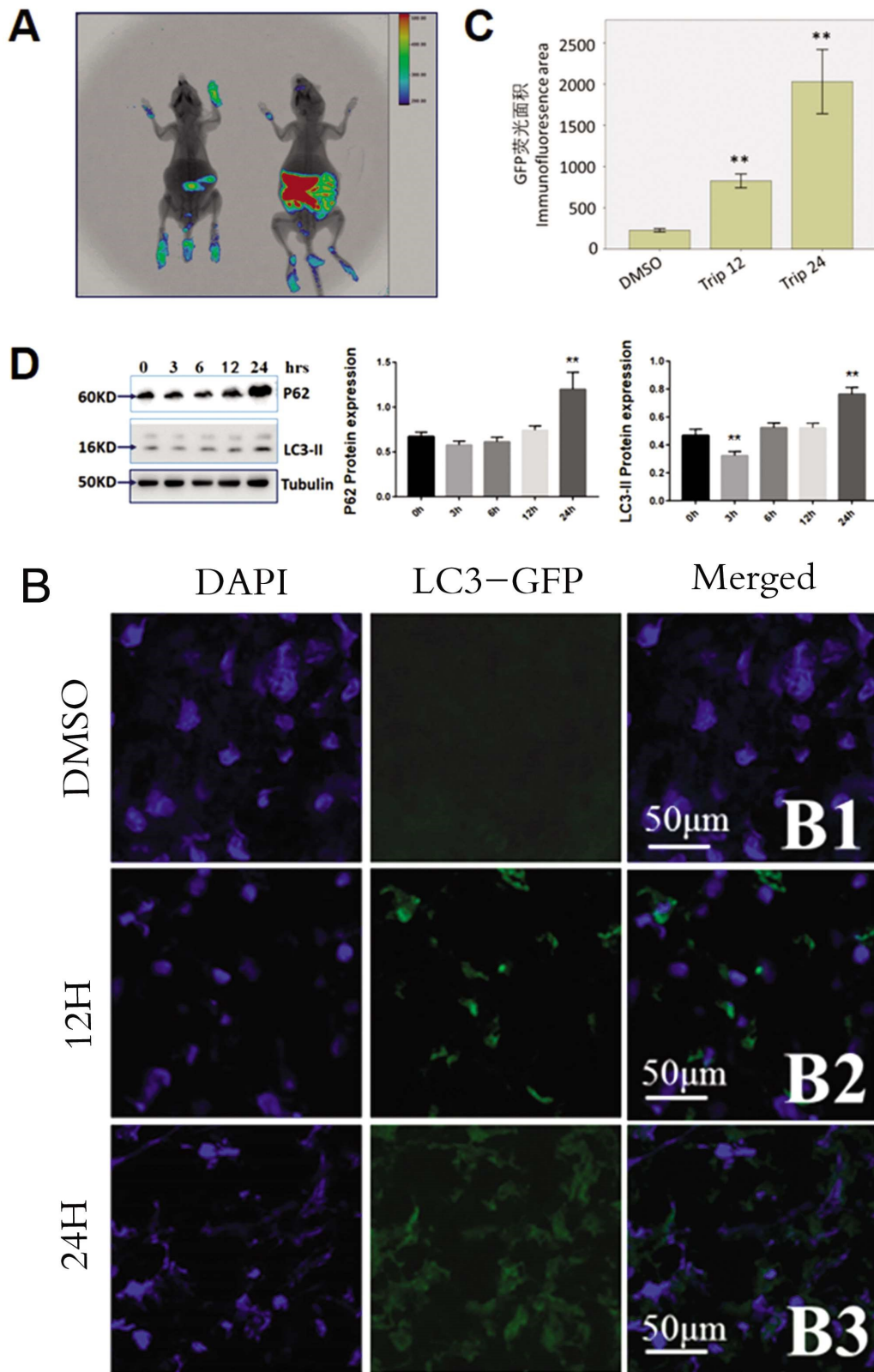


图1 雷公藤甲素在体诱导肝细胞自噬

注:A. 小鼠注射雷公藤甲素后,小动物荧光成像观察绿色荧光的分布(左图是溶剂对照,右图是雷公藤甲素动物,方框示绿色荧光的强度);

B. 肝组织冰冻切片,荧光显微镜观察;C. 肝组织冰冻切片绿色荧光面积的 ANOVA 统计结果,**表示 $P<0.05$;

D. 肝组织 LC3-II 及 P62 蛋白 Western blot 检测;E.蛋白表达半定量结果,**表示 $P<0.05$ 。

Fig.1 Triptolide induces hepatocyte autophagy in vivo

Note: A : After high pressure injection of GFP-LC3 plasmid into the tail vein of mice, small animals were observed by imaging(On the left is the solvent control, on the right is for triptolide, the box shows green fluorescent protein expression); B: Liver tissue was frozen section and observed by fluorescence microscope; C: Statistical results of green fluorescence area; D: Western blot detection of lc3-II and p62 protein in liver tissue;

E. Protein expression(** $P<0.05$).

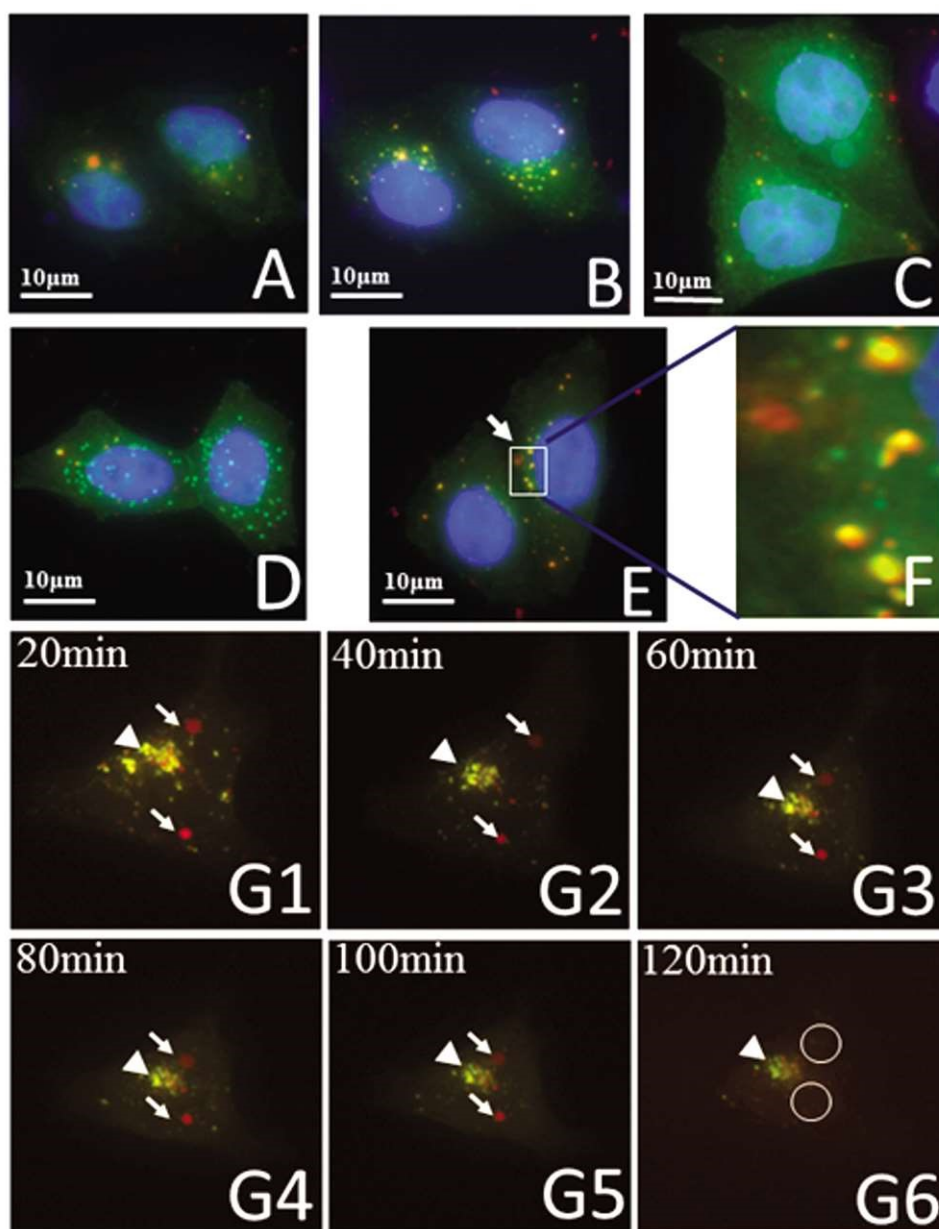


图2 不同条件雷公藤甲素 inL02 细胞后 P62 和 LC3 共定位的荧光显微镜观察

注:A:DMSO 组;B~E:分别是 10 nM、25 nM、50 nM 和 100 nM 雷公藤甲素孵育组;G1~G6:50 nM 雷公藤甲素分别孵育 20 min、40 min、60 min、80 min、100 min、120 min 组。

Fig.2 The colocalization of P62 and LC3 in L02 cells were detected under fluorescence microscope after incubation with different condition of triptolide. Note: A: DMSO; B~E: 10 nM, 25 nM, 50 nM, and 100 nM triptolide incubation; 50 nM triptolide was incubated for 20 min, 40 min, 60 min, 80 min, 100 min and 120 min groups.

量自噬激活时形成的绿色荧光,且随给药时间增加而荧光强度加大。肝组织蛋白 Western blot 结果显示,随着雷公藤甲素作用时间的增加,LC3-II 和 P62 蛋白的表达量呈增加趋势,说明雷公藤甲素不仅能诱导肝细胞自噬,而且能诱导 P62 蛋白高表达。为了探明雷公藤甲素诱导的肝细胞自噬体能够被有效降解,我们应用荧光显微镜和活细胞工作站观察了 LC3 和 P62 蛋白在细胞内的共定位,发现雷公藤甲素可诱导肝细胞自噬流的形成。P62 蛋白是选择性自噬的运载蛋白,是连接 LC3 与待降解泛素化底物的重要桥梁^[29]。P62 蛋白与泛素化底物结合后进入到自噬体并最终与溶酶体结合形成自噬溶酶体从而清除待降解底物,同时 P62 也被清除,故而当自噬流活化时 P62 蛋

白含量下降,相反,当自噬流抑制时,P62 含量增多^[30]。研究结果发现,用 50nM 雷公藤甲素孵育 L02 细胞,雷公藤甲素能诱导肝细胞内 P62 蛋白的水平呈现短暂增加,而 P62 和 LC3 的耦连随时间增加呈减弱趋势,说明雷公藤甲素可诱导肝细胞选择性自噬,其生物学意义可能与肝细胞损伤后修复相关。

目前,自噬在雷公藤甲素致肝毒性中的作用研究已取得了一定的进展^[16]。对于正常状态下的肝细胞,一定剂量的雷公藤甲素可通过诱发肝细胞自噬的发生而致肝损伤,而在肝损伤状态下,一定剂量的雷公藤甲素反而可以起到较好的保护及修复作用^[31]。鉴于自噬“双面性”的特性,雷公藤甲素调节的自噬是否对病理组织具有足够的选择性,同时又能使正常组织免受其

害,值得进一步验证;自噬在雷公藤甲素修复肝损伤的过程中是否发挥作用以及发挥何种作用也需深入探索。

参考文献(References)

- [1] Xi C, Peng S, Wu Z, et al. Toxicity of triptolide and the molecular mechanisms involved[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 531-541
- [2] Li X J, Jiang Z Z, Zhang L Y. Triptolide: progress on research in pharmacodynamics and toxicology [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155 (1): 67-79
- [3] Yuan Z, Hasnat M, Liang P, et al. The role of inflammasome activation in Triptolide-induced acute liver toxicity [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 75: 105754
- [4] Yang J, Sun L, Wang L, et al. Activation of Sirt1/FXR Signaling Pathway Attenuates Triptolide-Induced Hepatotoxicity in Rats [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 260
- [5] Zhou L, Zhou C, Feng Z, et al. Triptolide-induced hepatotoxicity can be alleviated when combined with Panax notoginseng saponins and Catapol[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 214: 232-239
- [6] Huo J, Yu Q, Zhang Y, et al. Triptolide-induced hepatotoxicity via apoptosis and autophagy in zebrafish [J]. J Appl Toxicol, 2019, 39 (11): 1532-1540
- [7] Wei Y M, Luan Z H, Liu B W, et al. Autophagy in Triptolide-Mediated Cytotoxicity in Hepatic Cells[J]. Int J Toxicol, 2019, 38(5): 436-444
- [8] Hasnat M, Yuan Z, Naveed M, et al. Drp1-associated mitochondrial dysfunction and mitochondrial autophagy: a novel mechanism in triptolide-induced hepatotoxicity [J]. Cell Biol Toxicol, 2019, 35(3): 267-280
- [9] 许可嘉. 自噬介导的雷公藤甲素肝脏毒性研究 [D]. 北京中医药大学, 2016
- [10] 朱传龙, 宁琴, 严伟明, 等. 尾静脉高压注射质粒 DNA 后体内表达的规律[J]. 中国比较医学杂志, 2006, (04): 226-229
- [11] Mizushima N, Murphy L O. Autophagy Assays for Biological Discovery and Therapeutic Development [J]. Trends Biochem Sci, 2020, 45(12): 1080-1093
- [12] Bialik S, Dasari S K, Kimchi A. Autophagy-dependent cell death - where, how and why a cell eats itself to death[J]. J Cell Sci, 2018, 131 (18): jcs215152
- [13] Bhogal R H, Weston C J, Curbishley S M, et al. Autophagy: a cyto-protective mechanism which prevents primary human hepatocyte apoptosis during oxidative stress[J]. Autophagy, 2012, 8(4): 545-558
- [14] Yang M C, Chang C P, Lei H Y. Endothelial cells are damaged by autophagic induction before hepatocytes in Con A-induced acute hepatitis[J]. Int Immunol, 2010, 22(8): 661-670
- [15] Allaire M, Rautou P E, Codogno P, et al. Autophagy in liver diseases: Time for translation?[J]. J Hepatol, 2019, 70(5): 985-998
- [16] Li Y, Liu R, Wu J, et al. Self-eating: friend or foe? The emerging role of autophagy in fibrotic diseases [J]. Theranostics, 2020, 10 (18): 7993-8017
- [17] Yuan K, Li X, Lu Q, et al. Application and Mechanisms of Triptolide in the Treatment of Inflammatory Diseases-A Review [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1469
- [18] Noel P, Von Hoff D D, Saluja A K, et al. Triptolide and Its Derivatives as Cancer Therapies [J]. Trends Pharmacol Sci, 2019, 40 (5): 327-341
- [19] Yu D, Liu Y, Zhou Y, et al. Triptolide suppresses IDH1-mutated malignancy via Nrf2-driven glutathione metabolism [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(18): 9964-9972
- [20] Luo Z, Liao T, Zhang Y, et al. Triptolide Attenuates Transplant Vasculopathy Through Multiple Pathways [J]. Front Immunol, 2020, 11: 612
- [21] Fan D, Guo Q, Shen J, et al. The Effect of Triptolide in Rheumatoid Arthritis: From Basic Research towards Clinical Translation [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 376
- [22] Li F, Cui H, Jin X, et al. Triptolide inhibits epithelial-mesenchymal transition and induces apoptosis in gefitinib-resistant lung cancer cells [J]. Oncol Rep, 2020, 43(5): 1569-1579
- [23] Liang X, Xie R, Su J, et al. Inhibition of RNA polymerase III transcription by Triptolide attenuates colorectal tumorigenesis [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 217
- [24] 刘泽洲, 许可嘉, 张天娇, 等. 雷公藤甲素诱导小鼠急性肝损伤的形态学研究[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(17): 3207-3211
- [25] 许可嘉, 张天娇, 韩森, 等. 细胞自噬参与雷公藤甲素诱导的肝细胞损伤[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(26): 5012-5014
- [26] Agrotis A, Pengo N, Burden J J, et al. Redundancy of human ATG4 protease isoforms in autophagy and LC3/GABARAP processing revealed in cells[J]. Autophagy, 2019, 15(6): 976-997
- [27] Liu X, Klionsky D J. Regulation of JMY's actin nucleation activity by TTC5/STRAP and LC3 during autophagy[J]. Autophagy, 2019, 15(3): 373-374
- [28] Liang S, Jin J, Shen X, et al. Triptolide protects podocytes via autophagy in immunoglobulin A nephropathy [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(3): 2275-2280
- [29] Jiang P, Mizushima N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells [J]. Methods, 2015, 75: 13-18
- [30] 吕晓希, 胡卓伟. 自噬流的检测方法 [J]. 药学报, 2016, 51(01): 45-51
- [31] 卫博文, 蒋杨雨, 曹丹, 等. 雷公藤甲素对 Con A 诱导小鼠急性肝损伤的保护作用及机制 [J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(14): 2607-2611