

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.10.008

KGF 联合 HIF-1 α 对 BECN1 敲除 IEC-6 细胞缺氧的保护作用及机制*

王晓辉^{1,2} 徐倩^{1,2} 杨志华^{1,2} 李兵^{1,2} 邢媛¹ 张媛媛^{1,2} 高保东¹ 哈小琴^{1,2 Δ}

(1 解放军联勤保障部队第九四〇医院检验科 甘肃 兰州 730050; 2 甘肃省干细胞与基因药物重点实验室 甘肃 兰州 730050)

摘要 目的:探讨 KGF 联合 HIF-1 α 对 BECN1 敲除后的 IEC-6 细胞在缺氧应激状态下的保护作用及相关机制。**方法:**构建敲除 BECN1 基因的稳定细胞系 IEC-6B- 细胞,分为空白对照组(BC)、阴性对照组(NC)、HIF-1 α 组、KGF 联合 HIF-1 α 组(KH)。观察细胞形态学改变。检测细胞存活率、ATP 含量、细胞周期和细胞凋亡率。检测自噬相关基因表达水平和凋亡、自噬相关蛋白的表达。**结果:**低氧处理 24 h 后,各组细胞可见梭形、星形及其它异常形态变化;NC 组细胞胞质内可见大量大小不一的吞噬溶酶体泡;其他各组细胞呈现细胞早期凋亡形态变化,BC 组和 KH 组细胞胞质中可见自噬泡。与 BC 组相比较,各敲除组细胞存活率均显著降低 ($P<0.01$),其中 KH 组细胞存活率高于 NC 组、KGF 组及 HIF-1 α 组 ($P<0.05$)。BC 组细胞内 ATP 含量均显著高于其他各组 ($P<0.05$)。与 BC 组和 KH 组比较,其他三组细胞 G₀/G₁ 期百分比显著增加,细胞凋亡率均显著增加 ($P<0.05$)。与 BC 组相比较,其余各组细胞自噬基因 BECN1、SQSTM1 及 LC3 基因 mRNA 表达均显著降低 ($P<0.05$);Beclin 1 蛋白及 LC3 II/LC3 I 的比值均显著降低 ($P<0.05$),且 p62 蛋白表达显著增加 ($P<0.05$)。KH 组的 Bax/Bcl-2 的比值、Caspase3 蛋白表达低于 NC 组 ($P<0.05$)。**结论:**KGF 联合 HIF-1 α 能促进细胞增殖、增强细胞能量代谢、减少 G₀/G₁ 期阻滞细胞率、抑制细胞凋亡作用,对低氧应激的 IEC-6B- 细胞具有保护作用。

关键词:角质细胞生长因子;缺氧诱导因子 1;肠影窝上皮细胞;缺氧;自噬

中图分类号:R-33;Q78;Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)10-1849-08

Protective Effect and Mechanism of KGF Combined with HIF-1 α on Hypoxia in BECN1 Knockout IEC-6 Cells*

WANG Xiao-hui^{1,2}, XU Qian^{1,2}, YANG Zhi-hua^{1,2}, LI Bing^{1,2}, XING Yuan¹, ZHANG Yuan-yuan^{1,2},
GAO Bao-dong¹, HA Xiao-qin^{1,2 Δ}

(1 Department of Clinical Laboratory, the People's Liberation Army Joint Service Support Unit 940 Hospital, Lanzhou, Gansu, 730050, China; 2 Key Laboratory of Stem Cells and Gene Drug of Gansu Province, Lanzhou, Gansu, 730050, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effect and mechanism of KGF combined with HIF-1 α on IEC-6 cells knocked out by BECN1 under hypoxia stress. **Methods:** The stable BECN1 knockout cell line IEC-6B-cells were constructed and divided into blank control group (BC), negative control group (NC) and HIF-1 α Group, KGF joint HIF-1 α Group (KH). Observed the changes of cell morphology in each group. Cell survival rate, ATP content, cell cycle and apoptosis rate, autophagy related gene expression, apoptosis and autophagy related protein expression were detected in each group. **Results:** After 24 hours of hypoxia treatment, spindle, star and other abnormal morphological changes were observed in cells of each group. Electron microscopy showed that a large number of lysosomal vesicles with different sizes were found in the cytoplasm of NC cells. Other groups of cells showed morphological changes of early apoptosis, and autophagic vesicles were found in the cytoplasm of cells in BC group and KH group. Compared with BC group, the cell survival rate of each knockout group was significantly lower ($P<0.01$), and the cell survival rate of KH group was higher than NC group, KGF group and HIF-1 α group ($P<0.05$). The content of ATP in BC group was significantly higher than that in other groups ($P<0.05$). Compared with BC group and KH group, the percentage of G₀/G₁ phase and apoptosis rate of other three groups were significantly increased ($P<0.05$). There was no significant difference between KH group and BC group ($P>0.05$). Compared with BC group, the expression of BECN1, SQSTM1 and LC3 genes in NC group, KGF group, HIF-1 α group and KH group decreased significantly ($P<0.05$). Compared with BC group, the expression of Beclin1 protein and LC3 II/LC3 I in NC group, KGF group, HIF-1 α group and KH group decreased significantly ($P<0.05$), and the expression of p62 protein increased significantly ($P<0.05$). The ratio of Bax/Bcl-2 and the expression of Caspase3 protein in KH group were lower than those in NC group ($P<0.05$). **Conclusion:** KGF combined with HIF-1 α can protect IEC-6B- cells from hypoxia stress by promoting cell proliferation, enhancing cell energy metabolism, reducing cell arrest rate in G₀/G₁ phase and inhibiting apoptosis.

* 基金项目:兰州市创新人才项目(2016-RC-61);军队后勤科研项目(CWH17C008)

作者简介:王晓辉(1982-),副主任医师,主要研究方向:干细胞及其外泌体相关研究,E-mail: w.x27@163.com

Δ 通讯作者:哈小琴(1965-),主任医师,E-mail: haxiaoqin2013@163.com

(收稿日期:2022-09-30 接受日期:2022-10-28)

Key words: Keratinocyte Growth Factor; Hypoxia Inducible Factor 1; Intestinal Epithelial Cells; Hypoxia; Autophagy

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)10-1849-08

前言

胃肠低氧应激损伤主要是指机体长期或突然处于低氧环境中时,引起胃肠道粘膜缺氧缺血而导致胃肠道消化吸收功能的紊乱或丧失,主要临床表现为食欲不振、恶心、呕吐、腹胀、便秘腹泻交替出现等。长期或频繁的胃肠道应激不仅会引起营养不良、贫血、自身免疫性疾病及消化道肿瘤等疾病^[1,2]。胃肠道低氧应激反应引起的“瀑布效应”是低氧地区消化系统疾病发病率高,生活质量较差及寿命较短的重要原因^[3]。本课题组前期将携带角质细胞生长因子(Keratinocyte Growth Factor, KGF)和缺氧诱导因子1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 α , HIF-1 α)双基因的质粒转入减毒沙门菌 Ty21a 后制成基因制剂 Ty21a-pIRES-HIF-KGF (TPKH),可促进肠道 IEC-6 细胞低氧状态下的细胞增殖;在动物实验中,TPKH 利用减毒沙门菌对肠粘膜的特嗜性而特异性地作用于肠道并持续表达活性蛋白 KGF 和 HIF-1 α 对胃肠道低氧应激性损伤作用具有保护,并取得了良好的治疗效果^[4,5]。

自噬(autophagy)作为细胞进化中的一种保守机制,主要通过特征性的双层膜结构----自噬小体吞噬、清除并降解受损或长寿的细胞器,释放 ATP、氨基酸等小分子从而维持应激状态下细胞的自稳^[6]。正常状态下,细胞内自噬蛋白 Beclin1 与抑凋亡蛋白 Bcl-2/Bcl-XL 相互结合形成复合物,而在缺氧应激状态下,高水平的自噬可诱导该复合物的解离,促进分离的 Bcl-2/Bcl-XL 进一步发挥其抗凋亡作用^[7],缺氧诱导的自噬不仅是细胞应激状态下的一种自我保护的机制,过度的细胞自噬还可引起正常细胞的损害^[8]。

因此,本研究中利用 CRISPR/Cas9 技术敲除自噬蛋白 Beclin1 的基因 BECN1,慢病毒转染 IEC-6 细胞抑制细胞自噬,构建 BECN1 敲除 IEC-6 细胞(IEC-6B-细胞),探讨 KGF 联合 HIF-1 α 对细胞缺氧的保护作用及相关机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株及慢病毒来源

大鼠小肠隐窝上皮细胞(IEC-6)购自中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库(KCB200720YJ)。慢病毒 Lv-Cas9-Puro、Lv-EGFP 及 Lv-BECN1-EGFP 购自上海吉凯基因有限公司。

1.2 主要试剂及仪器

胎牛血清(FBS)为日本 PAN 公司产品,DMEM 培养基(高糖)、100 \times 胰蛋白酶为美国 Gibco 公司产品,嘌呤霉素为索莱宝公司产品,重组 KGF 活性蛋白为美国 PEPROTECH 公司产品,重组 HIF-1 α 活性蛋白为英国 Millipore 公司产品,Annexin V-FITC 7-AAD、Annexin V-FITC PI 检测试剂盒为美国 BD Pharmingen 公司产品,Beclin1 多克隆抗体、LC3B 多克隆抗体、SQSTM1 多克隆抗体、Bax 单克隆抗体、Bcl-2 多克隆抗体为美国 Abcam 公司产品,Cleaved Caspase-3 多克隆抗体为美

国 Cell Signaling Technology 公司产品,CCK8 试剂盒为日本 DOJINDO 公司产品,ATP 含量测试盒为南京建成生物工程研究所产品,引物合成及荧光定量 PCR 相关试剂为中国大连 Takara 公司产品。CO₂ 细胞培养箱为德国 menmert 公司产品,三气培养箱为美国 Thermo SCIENTIFIC 公司产品,定量荧光 PCR 仪为美国 ABI 公司产品,流式细胞分析仪为美国 BD 公司产品,全波长多功能酶标仪为瑞士 Tecan 集团公司产品,全自动化学发光成像分析仪为美国 UVP 公司产品。

1.3 BECN1 敲除 IEC-6 细胞系的构建及实验分组

IEC-6 细胞以 2×10^4 个/孔接种于 6 孔板中,培养 24 h 后,细胞计数后按照 MOI=10 加入 LV-Cas9-Puro 慢病毒,24 h 后更换 DMEM 高糖完全培养基,48 h 后加入终浓度为 2 μ g/mL 的嘌呤霉素筛选 1 周。再按照上述方法转染 Lv-Becn1-EGFP 慢病毒,1 μ g/mL 嘌呤霉素 +DMEM 高糖完全培养基稳定筛选培养。以正常 IEC-6 细胞为空白对照,Lv-EGFP 病毒转染为阴性对照,Western Blot 检测细胞 BECN1 蛋白敲除效果。将敲除 BECN1 蛋白的 IEC-6 细胞稳定细胞系命名为 IEC-6B-细胞。

实验分组:空白对照组(Blank control group,BC 组),为转染 Lv-EGFP 病毒的 IEC-6 细胞;阴性对照组(Negative control group,NC 组),为 IEC-6B-细胞;KGF 组,含 0.5 ng/mL KGF 的 DMEM 培养基培养的 IEC-6B-细胞;HIF-1 α 组,含 30 ng/mL HIF-1 α 的 DMEM 培养基培养的 IEC-6B-细胞;KGF 联合 HIF-1 α 组(KH 组),含 0.5 ng/mL KGF 和 30 ng/mL HIF-1 α 的 DMEM 培养基培养的 IEC-6B-细胞。各组细胞接种于 75 cm² 细胞瓶中,培养至生长面积约 60%时置于三气培养箱中 5%氧浓度培养 24 h,然后进行后续实验。

1.4 细胞形态学观察

各组细胞低氧处理 24 h 后,光学显微镜下观察各组细胞形态变化。胰酶消化,离心收集细胞。预冷 PBS 缓冲液洗涤 2 遍,最后 1 mL 新鲜配制 3%戊二醛溶液充分重悬,进行细胞固定,后送至兰州大学电镜中心,电镜下观察细胞超微结构。

1.5 CCK-8 法检测细胞存活率

各组细胞以 4×10^4 个/孔接种于 96 孔板中培养,每组重复 4 次,并以无细胞的培养基为调零。缺氧培养 24 h 后,按照每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,混匀后避光培养 3 h,全波长多功能酶标仪检测各孔 450 nm 的 OD 值,并按照下列公式计算各组细胞存活率,细胞存活率=(OD 值实验组 - OD 值调零)/(OD 值对照组 - OD 值调零) \times 100%。

1.6 分光光度法检测细胞 ATP 含量

胰酶消化并收集各组细胞至 5 mL EP 管,每管加 2 mL 预冷 PBS 缓冲液吹打混匀,超声细胞破碎仪低温充分破碎,4 $^{\circ}$ C,12000 rpm 离心 10 min,取上清,取 10 μ L 进行蛋白定量,按照 ATP 含量测试盒说明书方法测定各组细胞 ATP 含量。

1.7 流式细胞分析仪检测细胞周期和细胞凋亡

细胞周期检测:各组细胞胰酶消化并用预冷 PBS 缓冲液

洗涤细胞两次, -20℃预冷 75%无水乙醇 2 mL 重悬细胞, 轻弹管壁混匀, -20℃过夜固定细胞。固定后的细胞离心, 预冷 PBS 缓冲液洗涤两次, 50 μL 预冷 PBS 重悬后加入 300 μL 的 PI 染液, 4℃避光孵育 30 min, 200 目筛网过滤后流式细胞仪上机检测。细胞凋亡检测: 胰酶消化并收集细胞, 预冷 PBS 缓冲液洗涤两次, 200 μL 的 1× Budding Buffer 重悬, 加入 5 μL 的 FITC-Annexin V 室温避光孵育 15 min。最后加入 5 μL 的 7-AAD 避光孵育 5 min 后上机检测, 同时设阴性对照组和 FITC-Annexin V、7-AAD 的单阳对照。

1.8 实时荧光定量 PCR 法检测自噬相关基因 mRNA 表达水平

各组细胞预冷 PBS 缓冲液洗涤两次, 加入 RNAiso Plus 1 mL, 冰上反应 5 分钟, 氯仿 / 异丙醇法回收细胞核酸沉淀, DEPC 水配置的 75%乙醇溶液洗涤 1 遍, 室温干燥 1-2 min 后, 取 25 μL DEPC 水溶解沉淀后, 测定各样本在 260 nm、280 nm 和

320 nm 处 OD 值, 计算各组 RNA 纯度和浓度。按照 Takara 公司反转录试剂盒说明书配置反转录反应体系, 按照 35℃反应 15 min, 85℃反应 5 s, 4℃条件进行反转录。实时荧光定量 PCR 检测自噬相关基因 BECN1 (NC_051345.1)、LC3 (NC_051345.1)、SQSTM1 (NC_051345.1) 及内参基因 β-actin (NM_031144.2), GeneBank 查找目的基因 cDNA 全序列, 在跨两个外显子序列中, 选取 60-150bp, GC 含量 ≤ 60% 的序列作为靶序列, BLAST 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 检查靶序列的特异性。以 cDNA 靶序列上下游 18 到 24 个核苷为模板设计引物。引物中 GC 含量控制在 30-80%, 上下游引物之间的 TM 相差小于 2℃。利用 oligo6 工具验证引物自身的特性, 避免发夹结构、引物自身二聚体、错配和引物间二聚体的形成。各基因引物设计见表 1, 由宝生物工程(大连)有限公司合成。

表 1 实时荧光定量 PCR 检测目的基因上下游引物序列

Table 1 Primer sequence of target gene detected by real-time fluorescent quantitative PCR

Target gene	Primers
BECN1	F: 5'-AGCTCTGAAGGCAACAACAGCAACA-3'
	R: 5'-GCTCCATGCAGGTAGCAGGAA-3'
LC3	F: 5'-AGCTCTGAAGGCAACAACAGCAACA-3'
	R: 5'-GCTCCATGCAGGTAGCAGGAA-3'
SQSTM1	F: 5'-TGTGGTGGGAACCTCGCTATAAGT-3'
	R: 5'-AAAGGGGTTGGGAAAGAAAGATGAG-3'
β-actin	F: 5'-GGAGATTACTGCCTGGCTCCTA-3'
	R: 5'-ACTCATCGTACTCCTGCTTGTCTG-3'

实时荧光定量 PCR 反应体系 (20 μL): SYBR Premix Ex TaqII (2×), 12.5 μL; 上下游引物各 1 μL; cDNA 模板 2 μL; dH₂O, 8.5 μL。实时荧光定量 PCR 仪上机检测: 95℃, 预变性 30 s。PCR 反应 95℃, 5 s; 60℃, 30 s 共 40 个循环。溶解阶段 95℃, 15s; 60℃, 60 s; 95℃, 15s。

1.9 Western blot 法检测凋亡及自噬相关蛋白表达

消化回收各组细胞, 预冷 PBS 缓冲液洗涤两次, 加入 100 μL 的 RIPA 细胞裂解液, 冰浴 30 min, BCA 法蛋白定量。按照总蛋白 50 μg/孔上样, SDS-PAGE 凝胶电泳, 再将蛋白电泳转至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜置于 5% 的脱脂奶粉中 4℃封闭过夜。TBST 缓冲液洗涤, 加入稀释后的目的蛋白一抗室温摇床上孵育 2 h, TBST 缓冲液洗涤, 加入与一抗来源对应的稀释后二抗, 室温摇床上孵育 2 h。TBST 缓冲液洗涤, 吸去膜上残留缓冲液后滴加 ECL 超敏化学发光液显色, 化学发光自动成像系统拍照并半定量分析。

1.10 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计学分析, 计量资料均采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验 (方差齐性) 或 Games-Howell 检验 (方差不齐), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IEC-6B- 细胞系的构建及 Beclin1 蛋白敲除效率检测

镜下可见, IEC-6 细胞呈单层贴壁紧密生长, 细胞形态多为椭圆形、圆形, 胞质清晰; 慢病毒转染后的 IEC-6-EGFP 和 IEC-6B- 细胞形态未见明显异常, 但细胞稀疏, 荧光下可见强绿色荧光蛋白表达, 如图 1 所示。Western Blot 进一步检测, IEC-6B- 细胞中未见 Beclin1 蛋白表达, IEC-6 细胞和 IEC-6-EGFP 细胞 Beclin1 蛋白表达阳性, 如图 2 所示。由此说明成功构建了 Beclin1 蛋白敲除的 IEC-6B- 细胞系。

2.2 缺氧处理后各组细胞形态学改变

低氧处理 24 h 后, 各组细胞状态均较差, 镜下可见梭形、星形及其它异常形态变化。其中, NC 组细胞异形性较为明显, 细胞细长突起, 呈长梭形, 细胞稀疏, 较多细胞悬浮; BC 组和 KH 组细胞形态变化较小, 荧光下观察结果与可见光一致, 如图 3 所示。透射电镜观察各组细胞超微结构, 低氧处理 24 h 后, NC 组细胞核内染色质固缩聚集, 不规则分散, 胞质内可见大小不一的吞噬溶酶体泡; 其他各组细胞胞质疏松, 胞核皱缩不规则, 核内染色质分散边缘聚集, 呈现细胞早期凋亡形态变化, 其中 BC 组和 KH 组细胞状态相对较好, 胞质中可见较大大小不一、呈椭圆形或圆形双层膜结构的自噬泡, 如图 4 箭头所示。

2.3 各组细胞缺氧处理后的细胞存活率

低氧处理 24 h 后 BC 组、NC 组、KGF 组、HIF-1 α 组及 KH 组细胞存活率分别为 (105.54 \pm 4.96)%、(31.21 \pm 3.62)%、(39.54 \pm 4.20)%、(43.89 \pm 3.45)%和(53.67 \pm 5.99)%, 相比 BC 组,各敲除组细胞存活率均显著降低(** P <0.01),KH 组细胞存活率高于 NC 组、KGF 组及 HIF-1 α 组(# P <0.05),如图 5 所示。

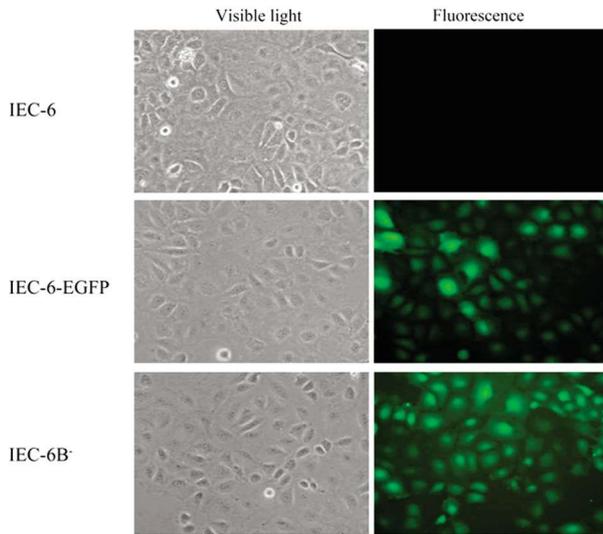


图 1 慢病毒转染 IEC-6 细胞后的细胞形态(100 \times)

Fig.1 Morphology of IEC-6 cells transfected with lentivirus (100 \times)

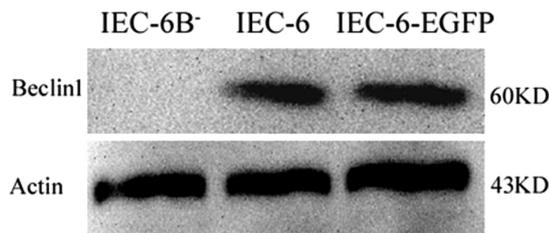


图 2 慢病毒转染 IEC-6 细胞后 Beclin1 蛋白的表达

Fig.2 Expression of Beclin1 protein in IEC-6 cells transfected with lentivirus

2.4 各组细胞缺氧处理后的 ATP 含量

低氧处理 24 h 后 BC 组、NC 组、KGF 组、HIF-1 α 组及 KH 组细胞 ATP 含量分别为(477.99 \pm 48.9) μ mol/gprot、(310.51 \pm 38.94) μ mol/gprot、(320.77 \pm 53.84) μ mol/gprot、(356.20 \pm 58.03) μ mol/gprot 和(367.66 \pm 52.65) μ mol/gprot, 与 BC 组相比较,其余组细胞内 ATP 含量均明显降低 (P <0.01 或 P <0.05),NC 组、KGF 组、HIF-1 α 组及 KH 组之间无显著差异,如图 6 所示。

2.5 各组细胞缺氧处理后的细胞周期及细胞凋亡率

经过缺氧培养 24h,与 BC 组和 KH 组相比较,NC 组、KGF 组及 HIF-1 α 组细胞 G0/G1 期百分比显著增加,同时 S 期细胞百分比显著降低,具有统计学意义(* P <0.05,# P <0.05),G2 期细胞百分比各组之间无统计学差异,如图 7 所示。BC 组、NC 组、KGF 组及 HIF-1 α 组及 KH 组细胞凋亡率分别为 (30.42 \pm 1.52)%、(45.04 \pm 2.01)%、(39.73 \pm 6.90)%、(37.81 \pm 4.14)%和(30.63 \pm 2.14)%, 相比于 BC 组和 KH 组,NC 组、KGF 组及 HIF-1 α 组细胞凋亡率均显著增加(P <0.05),KH 组与 BC 组之间细胞凋亡率无显著差异(P >0.05),如图 8 所示。

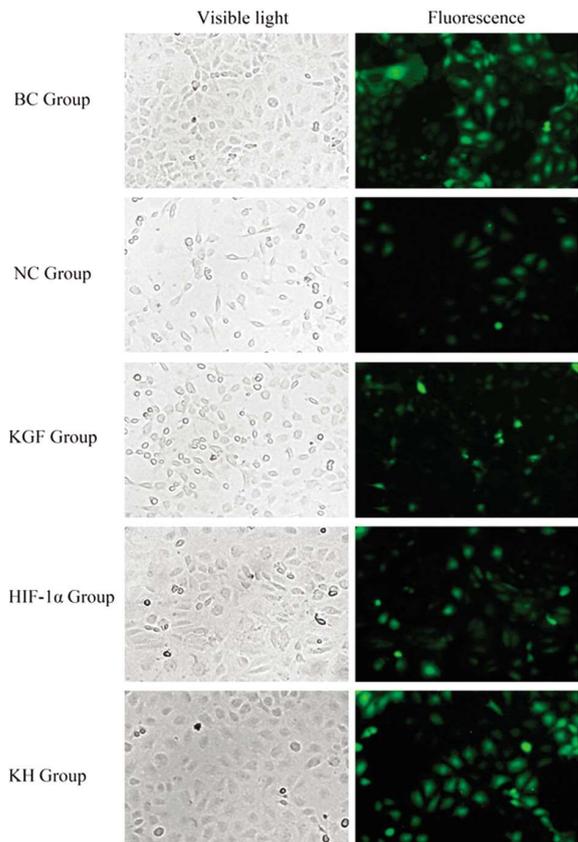


图 3 各组细胞缺氧处理 24 h 后细胞形态变化(100 \times)

Fig.3 Morphological changes of cells in each group after hypoxia treatment for 24 hours (100 \times)

2.6 各组细胞自噬相关基因的 mRNA 表达

实时荧光定量 PCR 检测,与 BC 组相比较,NC 组、KGF 组、HIF-1 α 组及 KH 组细胞自噬基因 BECN1、SQSTM1 及 LC3 的 mRNA 表达均显著降低 (P <0.05),其中 KH 组细胞中 LC3 核酸水平明显高于 NC 组、KGF 组、HIF-1 α 组,SQSTM1 基因高于 NC 组,具有统计学差异 (P <0.05),而 NC 组、KGF 组、HIF-1 α 组及 KH 组细胞的 BECN1 基因和 KGF 组、HIF-1 α 组及 KH 组细胞的 SQSTM1 基因核酸表达水平无显著差异(P > 0.05),如表 2 和图 9 所示。

2.7 各组细胞凋亡蛋白和自噬蛋白的表达

经缺氧培养后,与 BC 组相比较,NC 组、KGF 组、HIF-1 α 组及 KH 组细胞 Bax/Bcl-2 的比值均显著增加(P <0.05),且 NC 组、KGF 组及 KH 组细胞在 Caspase3 蛋白表达相比 BC 组显著增加(P <0.05),其 KH 组与 NC 组相比较 Bax/Bcl-2 的比值、Caspase3 蛋白表达相比 NC 组均降低,具有统计学差异(P <0.05),如图 10 所示。与 BC 组相比较,NC 组、KGF 组、HIF-1 α 组及 KH 组细胞 Beclin 1 蛋白及 LC3 II/LC3 I 的比值均显著降低 (P <0.05),且 p62 蛋白表达显著增加(P <0.05),NC 组、KGF 组、HIF-1 α 组及 KH 组之间 Beclin 1 蛋白、LC3 II/LC3 I 的比值、p62 蛋白表达无显著差异(P >0.05),如图 11 所示。

3 讨论

胃肠道作为人体重要的吸收消化系统,不仅调节水盐电解质平衡,营养物质的消化吸收,同时,肠道粘膜还是人体最大的免疫器官,粘膜覆盖面积达 400 m²,其中寄生的大量微生物与肠道粘膜功能的成熟、免疫系统功能、能量代谢及神经系统发

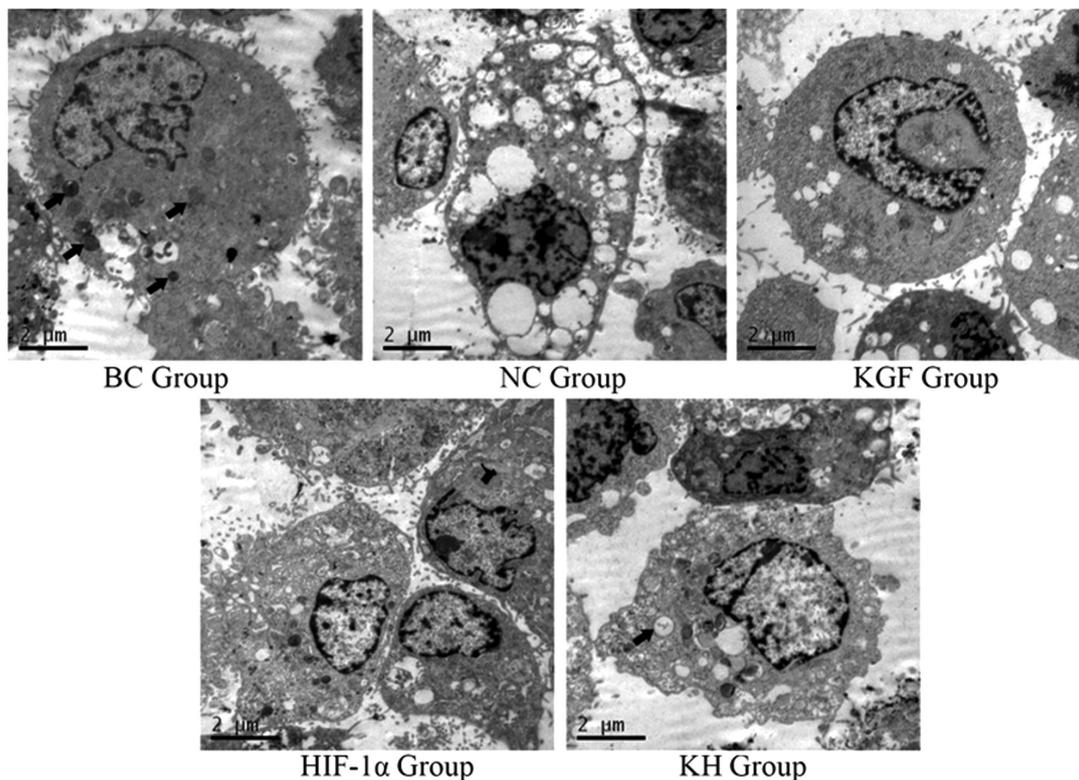


图 4 各组细胞缺氧处理 24 h 后细胞超微结构观察。(8000×)

Fig. 4 Ultrastructural observation of cells in each group after hypoxia treatment for 24 hours. (8000×)

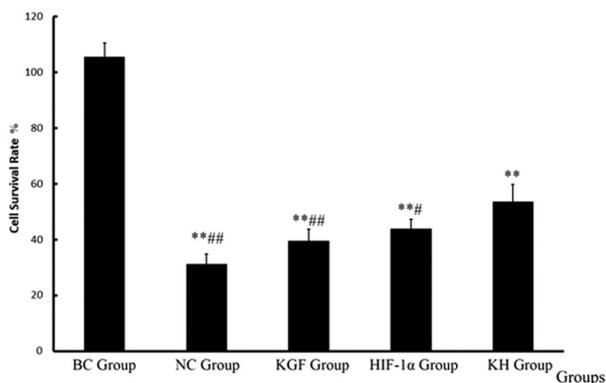


图 5 各组细胞缺氧处理后的细胞存活率。

Fig. 5 Cell survival rate in each group after hypoxia treatment.

Note: compared with BC group, ** $P < 0.01$. Compared with KH group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

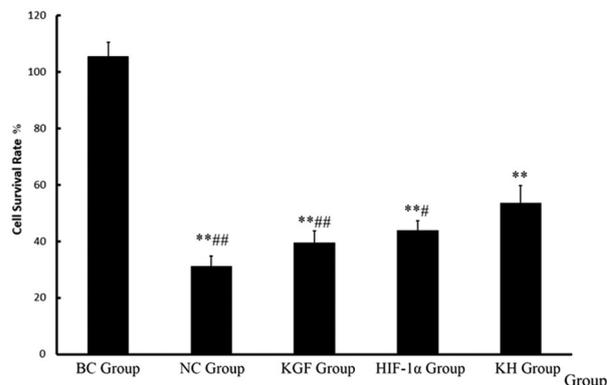


图 6 各组细胞缺氧处理后的 ATP 含量

Fig. 6 ATP content in each group after hypoxia treatment

Note: compared with BC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

育等密切相关^[9,10]。因此,维持胃肠粘膜结构及功能的完整性对机体低氧应激环境下的正常生理功能意义重大。细胞自噬属于细胞程序性死亡的一种,参与多种生理及病理过程,进化上相对保守,主要在细胞质中进行的一种自我吞噬现象。正常情况下自噬处于比较低的水平,但是对缺氧、饥饿等多种应激反应高度敏感,激活后可以对胞内异常的蛋白质、细胞器降解,增加细胞对外部应激环境的适应能力,是机体应激状态下的一种保护性机制^[11]。Unc-51 样激酶 1(Unc-51-like kinase 1,ULK1)是自噬启动的开关,有研究发现,无论是在急性还是慢性缺氧中,细胞内均可检测到 ULK1 的转录,证实了缺氧可诱导自噬发生^[12]。自噬一般可通过以下作用对机体低氧应激损伤起到保护作用:1、直接或降解受损线粒体间接清除 ROS,避免细胞的氧化损伤^[3];2、清除其他氧化受损的细胞器或蛋白质维持细胞自

稳;3、自噬还可以通过氧化代谢产物释放 ATP,维持缺氧状态下细胞的能量需求^[14,15]。此外,正常生理条件下自噬蛋白 Beclin 1 和凋亡蛋白 Bcl-2 共同构成机体的环境营养感受因子,缺氧时 Beclin 1 蛋白的游离参与自噬小体的形成过程,同时游离的 Beclin 1 蛋白还可与抑凋亡蛋白 Bcl-2/Bcl-XL,形成磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol3-kinase,PI3K)复合体,从而抑制细胞的凋亡^[7]。因此,Beclin 1 蛋白是自噬的重要蛋白分子之一,本研究通过构建稳定敲除 Beclin 1 蛋白表达基因 BECN1 的 IEC-6 细胞,抑制低氧应激状态下细胞的自噬水平,进一步观察 KGF 联合 HIF-1α 对增殖、能量代谢、周期、凋亡等生物学效应的影响。

LC3 II/LC3 I 比值及 p62 蛋白常作为自噬的重要标志物。自噬形成时,胞浆型 LC3,(即 LC3 I)其 C' 端会酶切掉一小段

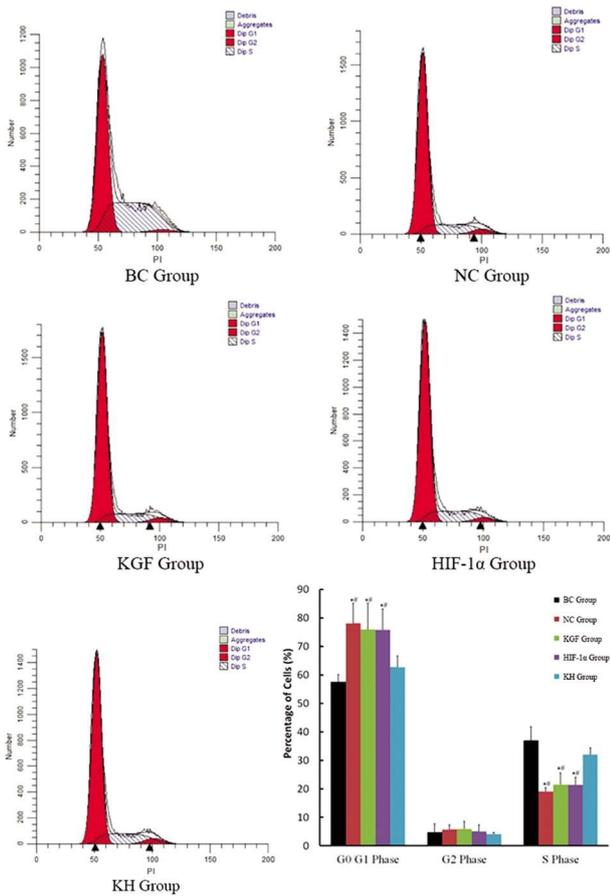


图7 各组细胞缺氧处理后的细胞周期
 Fig. 7 Cell cycle after hypoxia treatment in each group
 Note: compared with BC group, * $P < 0.05$.
 Compared with KH group, # $P < 0.05$.

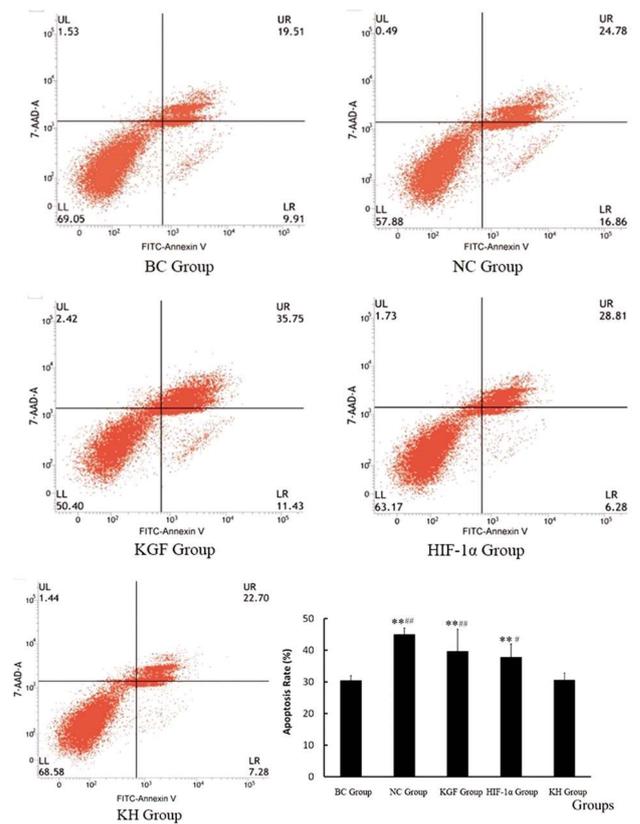


图8 各组细胞缺氧处理后的细胞凋亡率
 Fig. 8 Apoptosis rate of cells in each group after hypoxia treatment
 Note: compared with BC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.
 Compared with KH group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

表2 缺氧处理后各组细胞自噬基因 mRNA 相对表达量($2^{-\Delta\Delta CT}$)

Table 2 Relative expression of autophagy gene mRNA in each group after hypoxia treatment ($2^{-\Delta\Delta CT}$)

	BC Group	NC Group	KGF Group	HIF-1α Group	KH Group
BEN1	1.04 ± 0.35	0.28 ± 0.03**	0.27 ± 0.01**	0.30 ± 0.01**	0.27 ± 0.03**
LC3	1.02 ± 0.23	0.55 ± 0.06*#	0.52 ± 0.02*#	0.52 ± 0.07*#	0.73 ± 0.03*
SQSTM1	1.01 ± 0.13	0.45 ± 0.01*#	0.48 ± 0.03*	0.51 ± 0.03*	0.59 ± 0.01*

Note: compared with BC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with KH group, # $P < 0.05$.

多肽,暴露甘氨酸,进一步磷脂酰乙醇胺的修饰,转变为自噬体膜型(即 LC3 II),由于 LC3 II 的电荷变化,在 SDS-PAGE 中迁移速率更快,所以显得分子量比 LC3 I 小,因此 LC3 II/LC3 I 比值的大小可明确的反映细胞自噬水平^[16]。p62 蛋白是自噬小体形成的前体底物,细胞自噬的发生必然伴随着 p62 蛋白的减少,是反应细胞自噬顺利进行的重要标志蛋白^[17]。为了验证各组细胞中 BECN1 基因的敲除效果及其敲除后对细胞自噬水平的抑制作用,本研究分别从基因水平和蛋白水平,检测了自噬基因 BECN1、LC3 和 SQSTM1 及自噬蛋白 Beclin-1、LC3 II/LC3 I 比值及 p62 的相对表达量。检测结果显示与 BC 组,其余各组 IEC-6B- 细胞自噬基因 BECN1、LC3 和 SQSTM1 核酸表达量均显著降低, WB 检测结果与 RT-PCR 检测结果一致,充分说明本研究中敲除基因 BECN1 达到了抑制细胞自噬的目的。

低氧应激条件下,细胞内产生的大量过氧化物及受损粘附

细胞释放的各种炎性因子可直接或通过激活细胞能量感受因子 AMPK 及 HIF 等间接方式诱导细胞自噬发生,从而维持细胞的能量需求,促进肠道粘膜上皮细胞的存活^[18,19]。一方面,自噬主要通过吞噬降解受损的细胞器释放 ATP,为低氧应激细胞修复提供能量,抑制自噬直接减少了细胞的能量供应^[15];另一方面,自噬可通过调控细胞的新陈代谢,诱导细胞静止化,降低细胞能量的消耗,抑制自噬间接增大了细胞的能量需求^[20]。此外,细胞自噬还可抑制应激状态下上皮细胞中过氧化物如 ROS 等积累,从而避免了线粒体等能量供应细胞器的氧化损伤,因此自噬是细胞应激状态下能量供应的重要环节^[21]。本研究中低氧环境下 IEC-6B- 细胞组相对于 BC 组均发生明显的细胞形态学变化,细胞存活率及胞内 ATP 含量均显著降低($P < 0.05$),该结果可能与抑制细胞自噬反应,细胞的能量供应不足有关,而能量的供应不足是引起细胞周期阻滞的重要原因。本研究

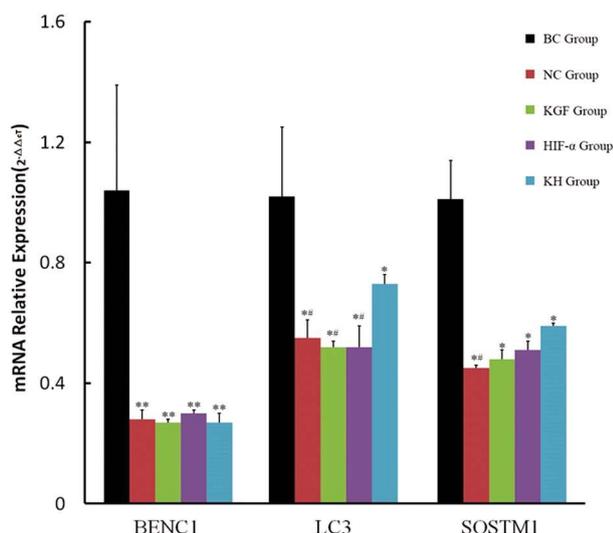


图9 各组细胞缺氧处理后自噬基因 mRNA 的相对表达量

Fig. 9 Relative expression of autophagy gene mRNA after hypoxia treatment in each group

中,低氧应激状态下各敲除组细胞 G0/G1 期阻滞程度均明显增加,且伴 S 期百分比显著降低。

KGF 是由肠道粘膜皮下组织成纤维细胞以旁分泌方式释放于肠道内的一种多功能活性蛋白,具有促进上皮细胞的增殖、再生、分化迁移及 DNA 修复等功能。局部高表达 KGF 可明显缓解大鼠溃疡性结肠炎,并可促进受损胃肠道上皮细胞的再生及功能恢复^[22]。HIF-1 α 是机体在应对低氧应激反应过程中起核心调控作用的一种转录因子,可作为上游转录调控因子调控下游血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管素 (angiopoietin-1, Ang-1)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、促红细胞生成素 (Erythropoietin, EPO)、自噬基因及能量代谢等基因的表达活性,通过激活细胞抗凋亡通路、促进的细胞糖酵解反应、促进细胞代谢及修复等作用,从而抵抗机体的低氧应激损伤^[23-28]。本研究中发现, KGF 联合 HIF-1 α 对低氧应激状态下的 IEC-6B- 细胞具有一定的保护作用,相对于 NC 组及单独应用的 KGF 组、HIF-1 α 组,其细胞状态、细胞存活率和细胞周期均有明显改善 ($P < 0.05$)。

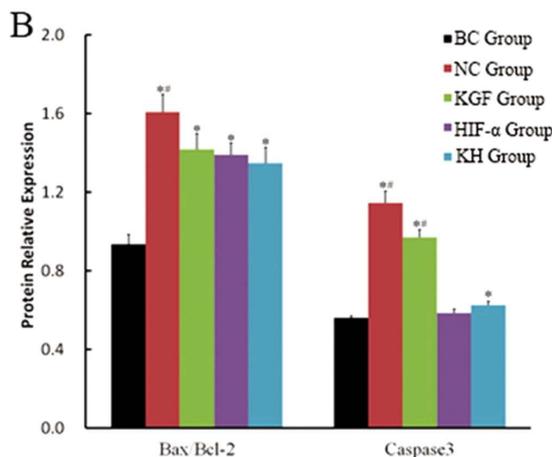
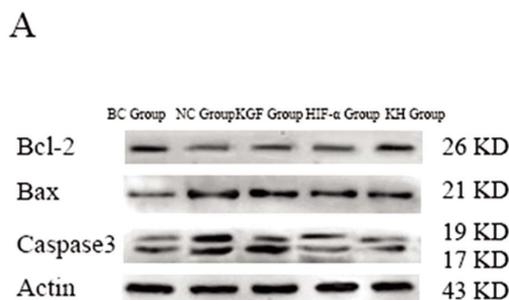


图10 凋亡蛋白 Bax/Bcl-2 和 Caspase3 表达

Fig. 10 Expression of Bax / Bcl-2 and caspase 3

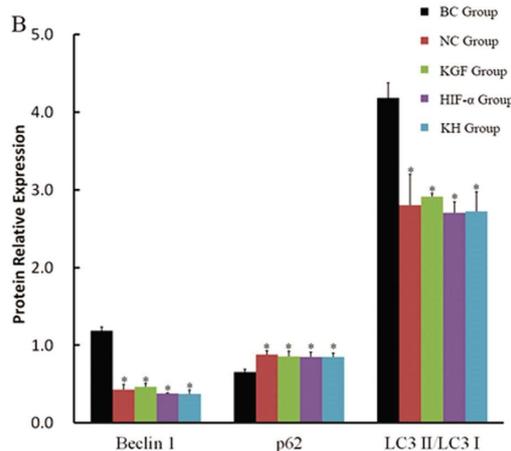
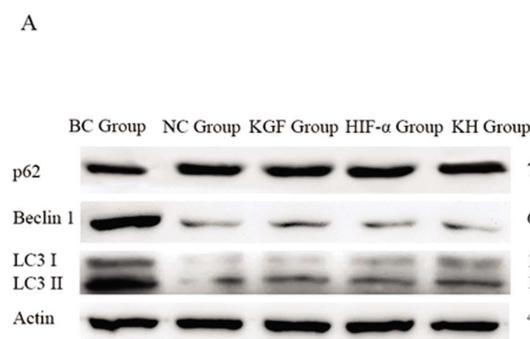


图11 自噬蛋白 Beclin 1、LC3 II/LC3 I 及 p62 表达

Fig. 11 Expression of Beclin 1, LC3 II / LC3 I and p62

在哺乳动物中 Bcl-2 基因及其相关蛋白可抑制钙离子跨膜流动、减少氧自由基产生和脂质过氧化物的形成,在细胞凋亡过程中起重要调控作用。Bax 基因是 Bcl-2 家族中的促凋亡成员,与 Bcl-2 形成异源二聚体,发挥调节细胞凋亡作用。在异

源二聚体中, Bax/Bcl-2 的比值决定着细胞凋亡的走向, Bax/Bcl-2 比值上调,促进细胞凋亡;反之,则抑制细胞凋亡^[29]。本研究结果发现,低氧应激下 IEC-6B- 细胞中 Bax/Bcl-2 和 Caspase3 蛋白表达均显著增加,提示抑制细胞自噬可上调调

亡蛋白 Bax/Bcl-2 比值和 Caspase3 依赖途径增加细胞在低氧应激环境下的凋亡水平,但 KH 组细胞流式仪检测细胞凋亡率与 BC 组无明显差异,提示了 KGF 联合 HIF-1 α 确实对低氧应激 IEC-6B- 细胞可能存在其他途径的保护作用。

本研究存在的不足之处:1、本研究预实验发现,IEC-6 细胞对氧浓度极度敏感,5%的氧浓度 24 h 即发生形态学上明显改变,随着继续培养细胞存活率显著降低,大量细胞死亡,无法进行后期实验。因此本研究只选择了 5%的氧浓度 24 h 这一个时间节点,只检测了早晚期发生凋亡细胞,而凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 或 Caspase3 可在凋亡全过程中持续表达存在,并且凋亡后期及坏死阶段的细胞未能检测。2、未能探讨敲除 BECN1 基因后对 IEC-6 细胞缺氧应激的影响,从而确定自噬对 IEC-6 细胞在缺氧条件下细胞代谢、细胞周期、细胞凋亡等方面的生理功能。综上所述,结果表明 KGF 联合 HIF-1 α 在低氧应激 IEC-6B- 细胞中,具有促进细胞增殖、增强细胞能量代谢、减少 G0/G1 期阻滞细胞率、抑制细胞凋亡作用,从而在细胞自噬受到抑制时对低氧应激状态下的 IEC-6 细胞发挥保护作用。为下一步 KGF 联合 HIF-1 α 用于高原缺氧引发的胃肠道疾病的治疗,及自噬与胃肠道疾病的相关作用及机制研究提供研究方向与实验基础。

参考文献(References)

- [1] Bretin A, Carrière J, Dalmaso G, et al. Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2 α -ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive Escherichia coli infection [J]. *Autophagy*, 2016, 12: 770-783
- [2] Mosher CA, Brown GR, Weideman RA, et al. Incidence of colorectal cancer and extracolonic cancers in veteran patients with inflammatory bowel disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24(3): 617-623
- [3] Cummins EP, Crean D. Hypoxia and inflammatory bowel disease[J]. *Microbes Infect*, 2017, 19(3): 210-221
- [4] 哈小琴,李晓云,邓芝云,等.低氧诱导因子-1 α 和角质细胞生长因子双基因重组减毒沙门菌菌株的构建及其在肠上皮细胞中的表达[J].*解放军医药杂志*, 2013, 25(11): 7-11
- [5] 白燕青,徐倩,曾通旭,等.携带低氧诱导因子-1 α 及角质细胞生长因子的减毒沙门菌 TPK 的构建及其在低氧应激大鼠胃肠组织中的表达[J].*中国生物制品学杂志*, 2017, 30(2): 137-140
- [6] Shinojima N, Yokoyama T, Kondo Y, et al. Roles of the Akt/mTOR/p70S6K and ERK1/2 signaling pathways in curcumin-induced autophagy[J]. *Autophagy*, 2007, 3(6): 635-637
- [7] Ciechomska IA, Goemans GC, Skepper JN, et al. Bcl-2 complexed with Beclin-1 maintains full anti-apoptotic function [J]. *Oncogene*, 2009, 28(21): 2128
- [8] Sharma PK, Suri TM, Venigalla PM, et al. Atrophic gastritis with high prevalence of Helicobacter pylori is a predominant feature in patients with dyspepsia in a high altitude area [J]. *Tropical Gastroenterology*, 2015, 35(4): 246-251
- [9] Cox LM, Weiner HL. Microbiota signaling pathways that influence neurologic disease[J]. *Neurotherapeutics*, 2018: 1-11
- [10] Murphy M, Phelps A, Swede H, et al. Hypoxia-induced response of cell cycle and apoptosis regulators in melanoma [J]. *International journal of dermatology*, 2012, 51(10): 1263-1267
- [11] Feng Y, He D, Yao Z, et al. The machinery of macroautophagy[J]. *Cell Res*, 2014, 24(1): 24-41
- [12] Goldberg AA, Nkengfac B, Sanchez AM, et al. Regulation of ULK1 Expression and Autophagy by STAT1[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(5): 1899-1909
- [14] Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 280-293
- [15] Thomas M, Davis T, Loos B, et al. Autophagy is essential for the maintenance of amino acids and ATP levels during acute amino acid starvation in MDAMB231 cells[J]. *Cell Biochem Funct*, 2018, 36(2): 65-79
- [16] Martinez J, Malireddi RK, Lu Q, et al. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(7): 893-906
- [17] Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer[J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1001-1004
- [18] Ling J, Kang Y, Zhao R, et al. Kras G12D-induced IKK2/ β /NF- κ B activation by IL-1 α and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Cancer cell*, 2012, 21: 105-120
- [19] Li R, Du J, Chang Y. Role of autophagy in hypoxia-induced angiogenesis of RF/6A Cells in vitro [J]. *Current eye research*, 2016, 41(12): 1566-1570
- [20] Wang L, Shang Z, Zhou Y, et al. Autophagy mediates glucose starvation-induced glioblastoma cell quiescence and chemoresistance through coordinating cell metabolism, cell cycle, and survival[J]. *Cell death & disease*, 2018, 9(2): 213-220
- [21] Manent J, Banerjee S, de Matos Simoes R, et al. Autophagy suppresses Ras-driven epithelial tumorigenesis by limiting the accumulation of reactive oxygen species[J]. *Oncogene*, 2017, 36(40): 5658-5660
- [22] Yang K, Yin J, Sheng B, et al. AhR-E2F1-KGFR signaling is involved in KGF-induced intestinal epithelial cell proliferation [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(5): 3019-3026
- [23] Zhang W, Chen C, Zhou Z, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha correlates with tumor-associated macrophages infiltration, influences survival of gastric cancer patients [J]. *Journal of Cancer*, 2017, 8(10): 1818-1825
- [24] Chen Y, Zhao B, Zhu Y, et al. HIF-1-VEGF-Notch mediates angiogenesis in temporomandibular joint osteoarthritis [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(5): 2969-2982
- [25] Lai K, Luo C, Zhang X, et al. Regulation of angiogenin expression and epithelial-mesenchymal transition by HIF-1 α signaling in hypoxic retinal pigment epithelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(9): 1594-1607
- [26] Hou Y, Wang J, Feng J. The neuroprotective effects of curcumin are associated with the regulation of the reciprocal function between autophagy and HIF-1 α in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13:1135-1144
- [27] Courtney R, Ngo DC, Malik N, et al. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K [J]. *Mol Biol Rep*, 2015, 42(4): 841-851
- [28] Dehne N, Kerkweg U, Flohé SB, et al. Activation of hypoxia-inducible factor 1 in skeletal muscle cells after exposure to damaged muscle cell debris[J]. *Shock*, 2011, 35(6): 632-638
- [29] Song Y, Zhong M, Cai FC. Oxcarbazepine causes neurocyte apoptosis and developing brain damage by triggering Bax/Bcl-2 signaling pathway mediated caspase 3 activation in neonatal rats[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(1): 250-261