

氢醌对 L-02 肝细胞自噬的影响

郑作兵^{1,2}, 张伟³, 熊亮³, 刘婷婷³, 吴杨娜³, 杨嘉辉³, 胡恭华^{1,2,3}

摘要 目的 研究氢醌(HQ)对人 L-02 肝细胞自噬的影响。方法 用不同浓度 HQ(0、10、20、40 和 80 $\mu\text{mol/L}$)处理 L-02 细胞 24 h 后,采用透射电镜观察自噬体形成;采用 mCherry-GFP-LC3B 融合蛋白示踪自噬体形成;采用 Western blot 实验检测自噬标志蛋白 LC3、Beclin-1、P62 的表达;采用免疫荧光实验检测自噬蛋白 LC3、Beclin-1、P62 的亚细胞定位及表达。结果 透射电镜下,观察到 HQ 作用后 L-02 细胞自噬体和溶酶体增多。荧光显微镜下,GFP-LC3B 点状黄色斑点数量随 HQ 剂量增加而增多,而红色片状斑点减少。Western blot 结果显示,HQ 提高 L-02 细胞 LC3 II/LC3 I 蛋白的比值水平,各处理组与对照组差异均有统计学意义($P < 0.05$);HQ 对 L-02 细胞的 Beclin-1 和 P62 蛋白表达无明显影响($P > 0.05$)。免疫荧光实验结果显示,LC3 和 Beclin-1 在 L-02 细胞的胞核和胞质中均有表达,HQ 对 L-02 细胞内 LC3 和 Beclin-1 的亚细胞定位未产生影响,而 40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的 HQ 则可诱导 L-02 细胞内的 P62 由胞质向胞核转位。结论 HQ 诱导 L-02 细胞的自噬体增多,可能与其导致的自噬体清除障碍有关。

关键词 氢醌;肝细胞;自噬

中图分类号 R 114

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1425-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.016

氢醌(hydroquinone, HQ)是一种常见的环境化学物质,广泛应用于工业和医疗等领域,人类可通过饮食、职业和环境的暴露接触到 HQ。HQ 可经消化道、呼吸道、皮肤等途径进入人体,主要在肝肾代谢,可对肝、肾、造血系统等造成损害。自噬是维持机体内环境稳态的自身消化代谢过程,可以将胞质中的细胞器、蛋白和大分子等物质分解后再利用^[1]。已有研究阐明了 HQ 对人正常 L-02 肝细胞的细胞周

期、增殖、凋亡的影响,并发现其对 L-02 细胞的 DNA 损伤作用^[2],而 HQ 对 L-02 细胞自噬的影响尚未见报道。为此,该研究以 L-02 细胞为研究对象,HQ 为受试物,观察不同剂量 HQ 对人正常肝 L-02 细胞自噬的影响,为扩展 HQ 介导的毒理学特征及深入研究自噬在 HQ 致肝细胞损伤中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞与受试物 人正常肝细胞(L-02 细胞)由深圳市疾病预防控制中心惠赠。HQ 购自美国 Sigma 公司,色谱纯,纯度 $\geq 99.0\%$ 。

1.2 仪器与试剂 倒置荧光显微镜(德国 Laica 公司),CO₂ 恒温培养箱和多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司),AI600 超灵敏多功能成像仪(美国 GE 公司),Zeiss LSM 880 共聚焦显微镜(德国 Carl Zeiss 公司),透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司),电泳仪、垂直电泳槽和电转槽(美国 Bio-rad 公司),胎牛血清、RPMI-1640 培养基和胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);双抗(青霉素、链霉素混合液)(美国 Sigma 公司);LC3A/B 抗体、LC3B 抗体、Beclin-1 抗体、P62 抗体、GAPDH 抗体、抗兔二抗和抗鼠二抗(美国 Abcam 公司);AdPlus-mCherry-GFP-LC3B(上海碧云天生物技术有限公司);RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);TGX FastCast Kit 12%(美国 Bio-Rad 公司);PVDF 膜、ECL 化学发光液(美国 Millipore 公司);电镜固定液、丙酮、无水乙醇、牛血清白蛋白[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与分组 L-02 细胞用含体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO₂ 恒温培养箱中培养,2 ~ 3 d 换新培养基。90% 融合度后用胰酶消化,取对数生长期的细胞进行实验。根据课题组前期实验获得的 DNA 损伤、细胞活力、细胞凋亡和细胞周期的检测结果^[2],实验分组设置 HQ 浓度分别为 0(阴性对照组)、10、20、40 和 80 $\mu\text{mol/L}$,共 5 个实验组,处理时间为 24 h。

1.3.2 透射电镜检测自噬体形成 用胰酶消化收

2021-12-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81960599、81460504、81260434、81060241)

作者单位:¹ 南昌大学公共卫生学院,南昌 330006

² 江西省预防医学重点实验室,南昌 330006

³ 赣南医学院公共卫生与健康管理学院,赣州 341000

作者简介:郑作兵,男,硕士研究生;

胡恭华,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:hgh0129@163.com

集细胞,移至 1.5 ml 离心管中,加 1 ml PBS 离心 2 次,弃上清液,加入电镜固定液,室温固定细胞 4 h。PBS 洗涤 2 次,用 4 °C 预冷的体积分数为 0.01 锇酸固定 2 h,PBS 洗涤 3 次,体积分数为 0.5、0.7、0.8、0.9、1.0 的乙醇和体积分数为 1.0 的丙酮梯度脱水,环氧树脂浸透、包埋,切片,醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色,使用透射电镜观察拍照。

1.3.3 mCherry-GFP-LC3B 融合蛋白来示踪自噬形成 根据说明书,通过查阅文献^[3]及预实验确定腺病毒最佳感染浓度及时间,确定腺病毒感染浓度为 40 感染复数(multiplicity of infection, MOI),感染时间为 24 h。在 24 孔板中接种 5×10^4 个细胞,24 h 后每孔加入 50 μ l 的 AdPlus-mCherry-GFP-LC3B 试剂,转染 24 h。腺病毒成功转染后,用不同剂量 HQ 处理细胞,至处理时间终点,用 Laica 倒置荧光显微镜观察拍照^[4]。用 Image J 软件计数荧光颗粒数,每个处理组至少随机计数 10 个转染成功的细胞。

1.3.4 Western blot 检测 LC3、Beclin-1、P62 表达 细胞处理时间终点时,用含 1 mmol/L PMSF 和 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,用 BCA 法测定总蛋白浓度。按照 SDS-PAGE 凝胶配方表制备 12% 分离胶和 5% 浓缩胶。以每泳道 15 μ g 总蛋白上样,随后凝胶电泳,并转移到 PVDF 膜上。用 5% 的脱脂奶粉将膜封闭 1 h,加入 LC3A/B (1 : 500)、Beclin-1 (1 : 1 000)、P62 (1 : 1 000)、GAPDH(1 : 2 000)一抗,在 4 °C 下孵育过夜。至第 2 天,室温下用二抗(1 : 10 000)孵育 1 h,随后进行化学发光拍照。分析条带光密度值,利用

目的蛋白的光密度值与内参光密度值的比值作为分析结果。

1.3.5 免疫荧光检测 LC3、Beclin-1、P62 亚细胞定位及表达 在 24 孔板中接种 5×10^4 个细胞做细胞爬片,到处理时间终点,用 4% 多聚甲醛固定细胞,用含体积分数 0.3% Trion X 的 5% BSA 通透及封闭 1 h。分别加入 LC3B(1 μ g/ml)、Beclin-1 (1 : 200)、P62(1 : 50)一抗在 4 °C 下孵育过夜,至第 2 天,加入抗兔荧光二抗,湿盒中孵育 1 h,DAPI 复染 5 min。在载玻片上滴加抗荧光淬灭剂,取出细胞爬片,有细胞的一面与载玻片接触,并用指甲油固定爬片。用共聚焦显微镜观察拍照。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 版软件进行数据分析,Western blot 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,GFP-LC3B 结果用平均值表示。多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时采用 LSD 法进行两两比较,方差不齐时采用 Dunnett-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HQ 对 L-02 细胞自噬形成的影响 低倍镜下 ($\times 1\ 500$),对照组细胞中较少观察到自噬相关结构或细胞器。而在 HQ 处理组中,胞质出现大量空泡,细胞呈蜂窝状,伴有自噬样改变。高倍镜下 ($\times 15\ 000$)可以观察到 HQ 处理组细胞中存在大量双膜结构,内含待降解的细胞器成分的自噬体,未和自噬体融合的溶酶体以及自噬末期出现的单层膜的自噬溶酶体,其中包裹的细胞器成分已降解,见图 1。

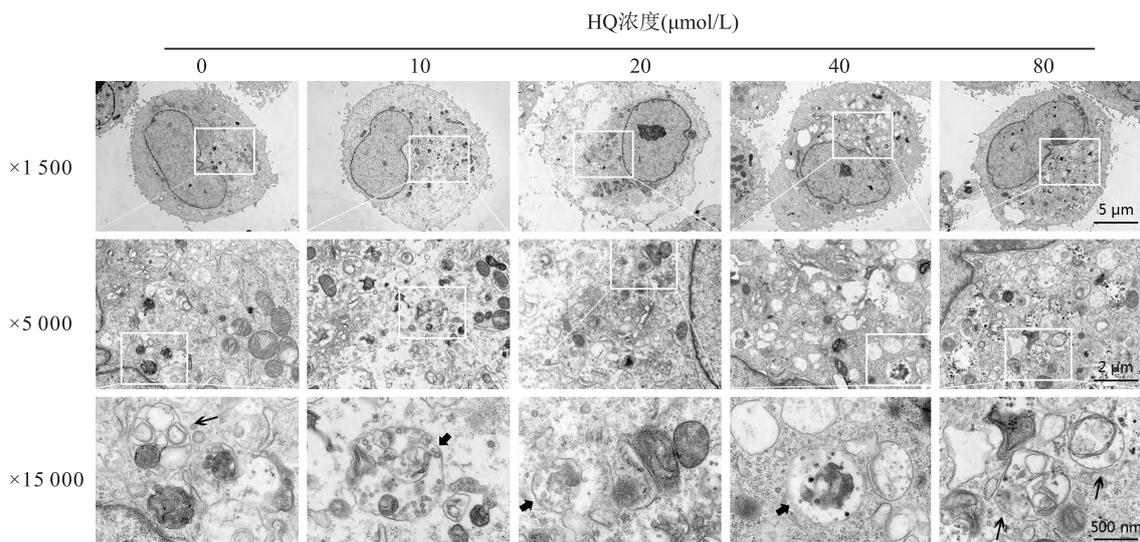


图 1 透射电镜检测不同剂量 HQ 诱导 L-02 细胞自噬体形成
黑色细箭头指示自噬体;粗箭头指示自噬溶酶体

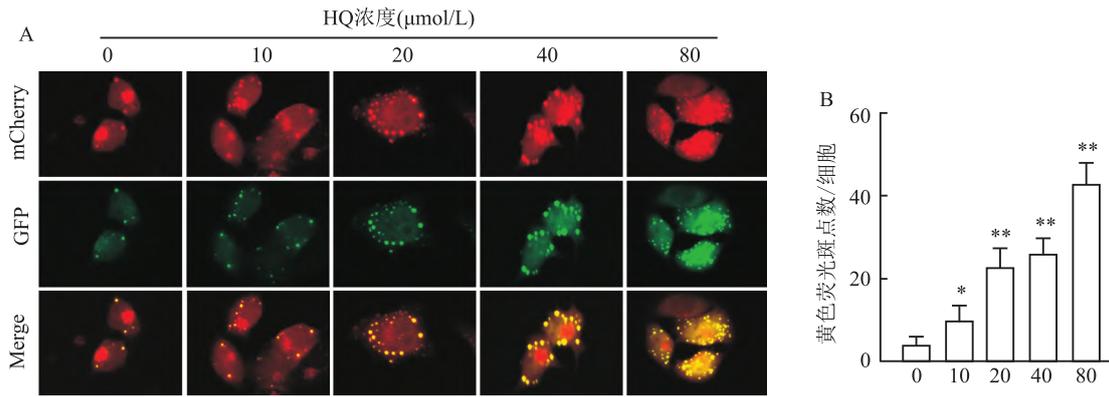


图2 不同剂量HQ对L-02细胞瞬时转染GFP-LC3B表达的影响

A: 荧光显微镜下不同浓度HQ对肝细胞GFP-LC3B融合蛋白的影响; B: 黄色斑点定量结果; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 HQ对L-02细胞GFP-LC3B融合蛋白形成的影响

AdPlus-mCherry-GFP-LC3B是一种重组腺病毒,用于感染细胞后的自噬检测。GFP信号对溶酶体腔内的酸性和/或蛋白水解条件敏感,而mCherry则更稳定。因此,GFP和mCherry荧光的共定位表明自噬体未与溶酶体融合。在非自噬的情况下,mCherry-GFP-LC3B以弥散的黄色荧光形式存在于细胞质中,而在自噬的情况下,GFP-LC3B则聚集在自噬体膜上,以黄色的斑点的形式表现出来,当自噬体与溶酶体融合后,因GFP荧光的部分淬灭而以红色斑点的形式表现出来。实验结果显示,黄色斑点荧光数量随着HQ作用剂量的升高而增多,而红色的片状斑点有明显减少的趋势,见图2。

2.3 HQ对L-02细胞自噬蛋白表达的影响

与对照组比较,HQ处理提高了LC3 II/LC3 I ($F = 6.10$, $P < 0.01$)的蛋白质表达水平;但对Beclin-1 ($F = 0.20$, $P > 0.05$)和P62 ($F = 1.70$, $P > 0.05$)蛋白表达无明显影响,见图3。

2.4 HQ对L-02细胞自噬相关蛋白亚细胞定位的影响

免疫荧光结果显示,LC3蛋白在细胞核和细胞质中均有表达,主要分布于细胞核中,HQ处理后LC3在细胞核周围聚集,荧光强度均明显高于对照组;Beclin-1在细胞核和细胞质均有表达,HQ处理组Beclin-1的亚细胞定位及荧光强度与对照组差异无统计学意义;在对照组和低剂量HQ处理组(10、20 μmol/L)中,P62蛋白只在细胞质中表达,而在高剂量HQ处理组中,观察到P62蛋白在细胞质与细胞核中均有表达,见图4。

3 讨论

研究^[5]表明,自噬与许多化学物引起的细胞毒

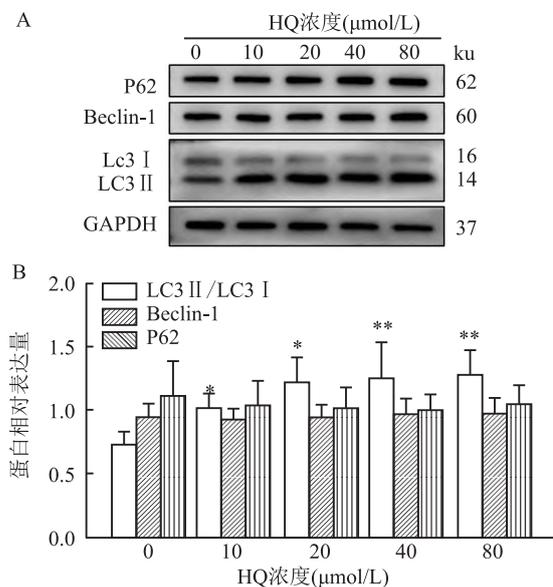


图3 HQ对L-02细胞自噬蛋白表达的影响

A: Western blot检测自噬蛋白LC3 II/LC3 I、Beclin-1和P62的表达水平; B: 蛋白定量结果; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

性机制如线粒体功能障碍、DNA损伤、氧化应激、内质网改变、溶酶体功能受损和炎症等密切相关。不受调控的自噬严重影响重要的细胞过程,如程序性细胞死亡,从而在许多疾病的发病机制中发挥关键作用。然而,其根本机制目前仍不清楚。HQ已被其他体外实验证明可以在一些细胞中诱导自噬^[6-7],而目前HQ对肝细胞的自噬影响及机制尚不明确。在透射电镜下通过测量自噬体的形成研究自噬活性,是最广泛被接受的监测自噬的方法之一^[8]。本研究中,电镜下观察到HQ作用L-02细胞后出现自噬样改变,自噬体和自噬溶酶体结构显著增多,证实HQ可以诱导L-02细胞自噬体的生成。mCherry-GFP-LC3B实验结果表明HQ诱导自噬体

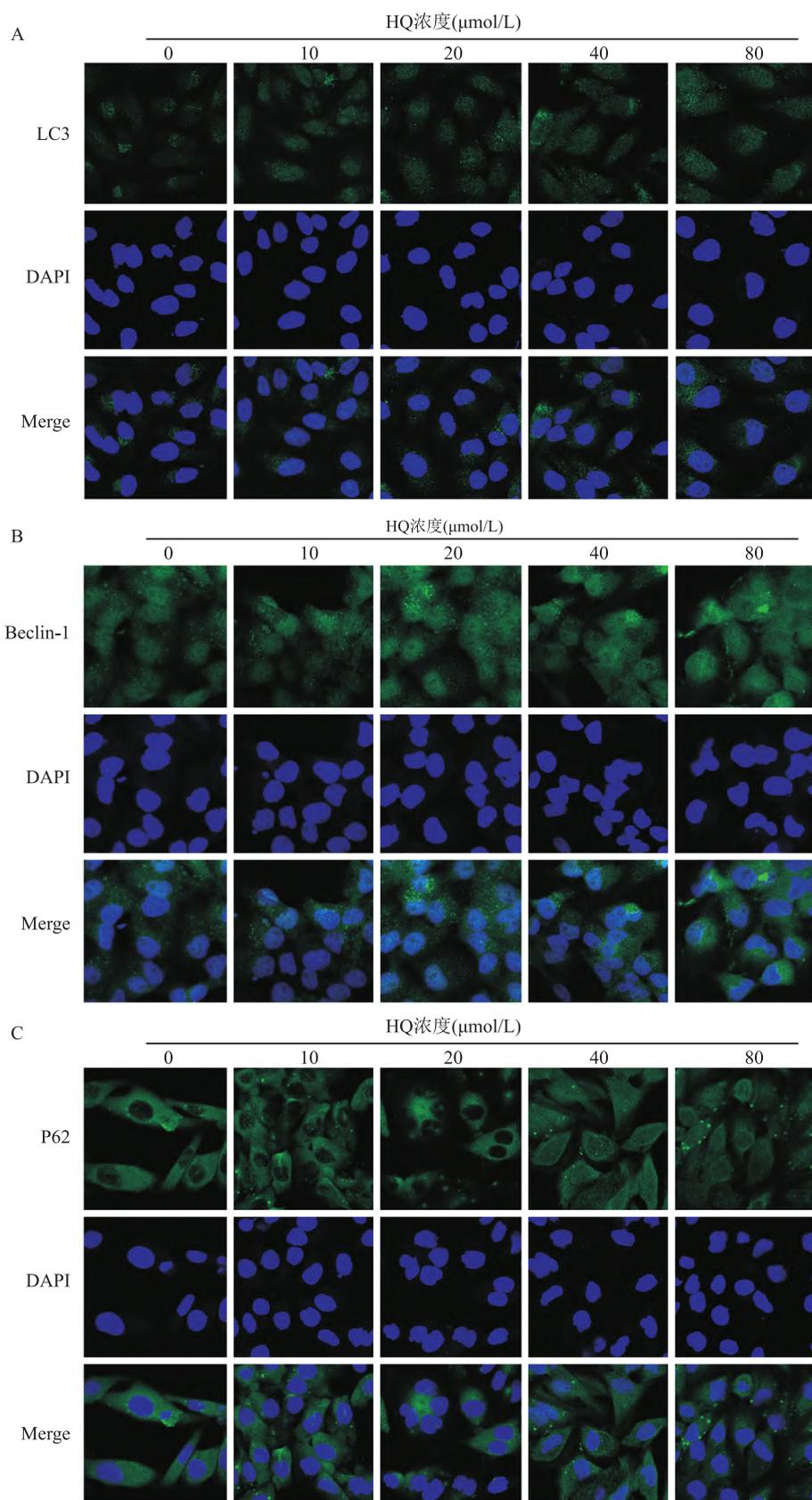


图4 HQ对L-02细胞自噬相关蛋白亚细胞定位的影响 $\times 630$

A~C: LC3、Beclin-1、P62的免疫荧光实验结果

增多但自噬溶酶体减少,这说明 HQ 处理可能导致 L-02 细胞自噬体和溶酶体融合受阻。

自噬过程是动态变化的,而自噬体仅是整个自噬通路过程中的一个中间结构,因此自噬通量检测较单纯自噬体检测更能反映自噬活性。目前,用于监测自噬通量的常用标志物主要有 LC3、Beclin-1 和 P62 蛋白。LC3 是自噬体膜上的标志性蛋白,在自噬过程中,胞浆型 LC3 I 会被泛素化修饰加工成膜型 LC3 II,LC3 II/LC3 I 的比值变化可以评价自噬体的形成;Beclin-1 是自噬启动的核心蛋白之一;而 P62 则是一种多功能癌基因蛋白,参与了靶向底物进入自噬体的降解过程^[9]。本研究结果显示,HQ 作用可以显著提高 L-02 细胞 LC3 II/LC3 I 蛋白的比值,这表明 HQ 的作用促进了 L-02 细胞的自噬体生成;而 Beclin-1 表达未受 HQ 影响,提示 HQ 可能通过非 Beclin-1 依赖途径影响自噬^[10]。P62 的表达在 HQ 处理前后都没有明显变化,提示 HQ 可能没有改变肝细胞的自噬流或自噬状态,但结合本研究的其他结果,P62 变化不明显的更可能的解释是 HQ 作用可能诱使 P62 的转录活性降低,使其翻译产生的 P62 蛋白减少,虽然自噬流阻滞减少了 P62 蛋白的消耗,但表现出细胞内 P62 蛋白水平没有明显变化,这需要进一步检测 P62 的转录活性加以证明^[11];此外,还可能由于 P62 参与 Ras、Raf、MAPK 和 NF- κ B 等信号通路的调节,P62 参与的其他细胞过程消耗了因自噬流阻滞所带来的升高部分^[12]。免疫荧光实验发现了 LC3 在细胞核和细胞质均有表达,LC3 能够在细胞质和细胞核之间循环,当细胞营养缺乏时,细胞核内的 LC3 能够被去乙酰化酶 SIRT1 去乙酰化,促进其回到细胞质中^[13]。LC3 的核功能可能与其促进自噬降解细胞核纤层元件,诱发细胞衰老,从而防止自身癌变有关^[14]。Beclin-1 存在于胞浆和核定位,Beclin-1 的核定位一般与其非自噬功能相关。此外,本研究还发现高剂量 HQ 可以诱导 L-02 细胞内的 P62 由胞质向核转位现

象。结果表明,P62 可能参与了细胞核内 DNA 损伤的应答过程^[15]。

参考文献

- [1] 王月涵,黄颖. HDAC3 负性调控 mTOR 促进低氧诱导 H9C2 心肌细胞自噬[J]. 安徽医科大学学报,2021,56(10):1575-9.
- [2] 胡恭华,庄志雄,夏芳莲,等. 氢醌对 L-02 肝细胞 DNA 损伤及细胞周期的影响[J]. 环境与健康杂志,2007,24(4):201-3.
- [3] Zhang Z, Ren Z, Chen S, et al. Ros generation and JNK activation contribute to 4-methoxy-tempo-induced cytotoxicity, autophagy, and DNA damage in HEPG2 cells[J]. Arch Toxicol,2018,92(2):717-28.
- [4] Von Muhlinen N. Methods to measure autophagy in cancer metabolism[J]. Methods Mol Biol,2019,1928:149-73.
- [5] Galati S, Boni C, Gerra M C, et al. Autophagy: A player in response to oxidative stress and DNA damage[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019,2019(14):1-12.
- [6] 吴丽群,王敏,刘想想,等. 苯代谢物氢醌促进人 T 细胞白血病细胞自噬的研究[J]. 环境与健康杂志,2016,33(9):753-6,847.
- [7] Bhattarai N, Korhonen E, Toppila M, et al. Resvega alleviates hydroquinone-induced oxidative stress in ARPE-19 cells[J]. Int J Mol Sci,2020,21(6):2066.
- [8] Du Toit A, Hofmeyr J S, Gniadek T J, et al. Measuring autophagosome flux[J]. Autophagy,2018,14(6):1060-71.
- [9] Klionsky D J, Abdel-Aziz A K, Abdelfatah S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition) (1) [J]. Autophagy,2021,17(1):91-5.
- [10] Zhang H, Zhang Z, Huang Y, et al. Repurposing antitussive benpropine phosphate against pancreatic cancer depends on autophagy arrest[J]. Mol Oncol,2021,15(2):725-38.
- [11] 范晓燕,李铭哲,刘小美. 预知子籽提取物对 HepG2 细胞自噬的影响[J]. 上海中医药大学学报,2021,35(3):52-7.
- [12] Hennig P, Fenini G, Di Filippo M, et al. The pathways underlying the multiple roles of P62 in inflammation and cancer[J]. Biomedicines,2021,9(7):707.
- [13] Huang R, Liu W. Identifying an essential role of nuclear LC3 for autophagy[J]. Autophagy,2015,11(5):852-3.
- [14] Dou Z, Xu C, Donahue G, et al. Autophagy mediates degradation of nuclear lamina[J]. Nature,2015,527(7576):105-9.
- [15] Wang Y N, Zhang N, Zhang L Y, et al. Autophagy regulates chromatin ubiquitination in DNA damage response through elimination of SQSTM1/P62[J]. Molecular Cell,2016,63(1):34-48.

The effect of hydroquinone on autophagy of L-02 hepatocytes

Zheng Zuobing^{1,2}, Zhang Wei³, Xiong Liang³, Liu Tingting³, Wu Yangna³, Yang Jiahui³, Hu Gonghua^{1,2,3}

(¹School of Public Health, Nanchang University, Nanchang 330006;

²Jiangxi Provincial Key Laboratory of Preventive Medicine, Nanchang 330006;

³School of Public Health and Health Management, Gannan Medical University, Ganzhou 341000)

Abstract Objective To study the effect of hydroquinone on autophagy of human L-02 hepatocytes. **Methods** L-02 cells were treated with different concentrations of hydroquinone (0, 10, 20, 40 and 80 μ mol/L) for 24 hours, the

BoneCeramic 与 Bio-Oss 促进大鼠 PAOO 术后成骨与骨髓基质细胞成骨分化效果的比较研究

李伟琼,张雨晴,徐建光,张红艳

摘要 **目的** 比较 BoneCeramic 与 Bio-Oss 对促进 SD 大鼠牙周加速成骨正畸 (PAOO) 术后成骨与骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 成骨分化效果。**方法** 将 36 只 8 周龄 SD 大鼠分成 3 组:右上第一磨牙单纯骨皮质切开组 (CO 组);骨皮质切开 + Bio-Oss 植入组 (BO 组);骨皮质切开 + BoneCeramic 植入组 (BC 组)。术后即刻标准正畸弹簧 (50 N/kg) 加力牵引右上第一磨牙近中移动。在加力后的 28、60 d 分别从各组中随机抽取 6 只处死, Micro-CT 检测第一磨牙近中移动距离、腭侧牙槽骨高度丧失 (ABHL)、相关区域骨体积分数 (BVF)。体外检测这两种材料对大鼠 BMSCs 成骨向分化的影响。**结果** 三组牙齿移动距离差异无统计学意义;在 28、60 d 时 CO 组 ABHL 值高于 BO、BC 组,且 BVF 值低于两组,同时在 60 d 时 BO 组 ABHL 值高于 BC 组, BVF 值低于 BC 组。SEM 显示 BMSCs 在 BoneCeramic 材料表面分布更多;

CCK-8 实验显示两种材料对 BMSCs 生长无抑制作用;ALP 活性检测显示 BMSCs 在 BoneCeramic 材料表面的 ALP 活性更高,并且 RUNX-2、OPN 和 OCN 的 mRNA 表达更高。**结论** BoneCeramic 更有利于 SD 大鼠 PAOO 术后成骨及 BMSCs 成骨分化。

关键词 BoneCeramic; Bio-Oss; 牙周加速成骨正畸治疗; 骨髓间充质干细胞; 成骨

中图分类号 R 783.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1430-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.017

随着生活水平提高越来越多的成年人寻求正畸治疗^[1],但成年人治疗时间较长,同时易发生牙周破坏等情况^[2-4]。为此正畸科医师提出牙周加速成骨正畸 (periodontally accelerated osteogenic orthodontics, PAOO) 这一观点^[5-6]。PAOO 是指在相关区域牙槽骨进行骨皮质切开,移植颗粒骨并结合正畸牙移动,从而达到加速牙齿移动,增加牙槽骨骨量的目的^[7-8]。研究^[9]表明当牙根唇颊侧牙槽骨厚度 < 2 mm 时,骨皮质切开的同时需要植骨,同时材料的降解速率应当适中,不能影响牙齿的移动^[10]。目前 PAOO 术中常用的骨移植材料为 Bio-Oss^[11],但相关

2022-01-10 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1908085MH255);安徽省高校自然科学基金项目(编号:KJ2020A0165);安徽医科大学口腔医学院 2020 年学科建设项目(编号:2020kqsy01)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究重点实验室,合肥 230032

作者简介:李伟琼,女,硕士研究生;

张红艳,女,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail:toothyan@126.com

formation of autophagosomes was observed by transmission electron microscope; autophagosome formation was traced by mCheery-GFP-LC3B fusion protein. Western blot experiment was used to detect the expression of autophagy marker proteins LC3, Beclin-1, P62; immunofluorescence experiment was used to detect the subcellular localization and expression of autophagy proteins LC3, Beclin-1, P62. **Results** Under the transmission electron microscope, it was observed that the autophagosomes and lysosomes of L-02 cells increased after the action of hydroquinone. Under the fluorescence microscope, the number of GFP-LC3B punctate yellow spots increased with the increase of hydroquinone dose, while the red flake spots decreased. Western blot results showed that hydroquinone increased the ratio of LC3 II/LC3 I protein in L-02 cells, and the difference between treatment groups and the control group was statistically significant ($P < 0.05$). Hydroquinone had no significant effect on Beclin-1 and P62 protein expression in L-02 cells ($P > 0.05$). The results of immunofluorescence experiments showed that LC3 and Beclin-1 were both expressed in the nucleus and cytoplasm of L-02 cells, hydroquinone had no effect on the subcellular localization of LC3 and Beclin-1 in L-02 cells, while 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$ hydroquinone could induce the translocation of P62 in L-02 cells from the cytoplasm to the nucleus. **Conclusion** Hydroquinone induces the increase of autophagosomes in L-02 cells, which may be related to the obstacles to autophagosome clearance.

Key words hydroquinone; hepatocyte; autophagy