

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.27.001

文章编号: 1005-8982 (2018) 27-0001-04

基础研究 · 论著

## C/EBP- $\alpha$ 基因在大鼠肝星状细胞株 HSC-T6 自噬中的作用 \*

陈耀丽<sup>1</sup>, 翟颖真<sup>2</sup>, 刘桓余<sup>1</sup>, 彭继英<sup>1</sup>, 尹为华<sup>1</sup>, 陶丽丽<sup>1</sup>, 刘秀萍<sup>3</sup>

(1. 北京大学深圳医院 病理科, 广东 深圳 518036; 3. 复旦大学上海医学院 病理学系, 上海 200032; 2. 上海阿克曼医学检验所, 上海 200331)

**摘要:目的** 探讨 CCAT 增强子结合蛋白  $\alpha$  (C/EBP- $\alpha$ ) 在肝星状细胞(HSCs)自噬过程中是否发挥作用。**方法** 构建携带 C/EBP- $\alpha$  的慢病毒载体 Lenti-C/EBP- $\alpha$ , 感染大鼠肝星状细胞株 HSC-T6, Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3 (微管相关蛋白 1 轻链 3) 表达; 采用自噬激活剂 Rapamycin 处理 HSC-T6, Western blot 检测 C/EBP- $\alpha$  和 LC3 的表达; 将 HSC-T6 经 Lenti-C/EBP- $\alpha$  及自噬激活剂 Rapamycin 共处理, Western blot 检测 C/EBP- $\alpha$  和 LC3 的改变。**结果** HSC-T6 感染 Lenti-C/EBP- $\alpha$  后, 自噬活性降低, LC3 表达下降; Rapamycin 处理 HSC-T6 后, 自噬活性增高, C/EBP- $\alpha$  表达下降, LC3 表达增多; HSC-T6 经 Lenti-C/EBP- $\alpha$  及自噬激活剂 Rapamycin 共处理, 与单纯使用 Rapamycin 比较, C/EBP- $\alpha$  表达升高, LC3 激活减少, 抑制 HSCs 激活。**结论** C/EBP- $\alpha$  可以抑制自噬激活, 从而抑制 HSCs 激活, 为 C/EBP- $\alpha$  抗肝纤维化提出了新思路。

**关键词:** 肝星状细胞; CCAT 增强子结合蛋白  $\alpha$ ; 自噬; 肝纤维化

**中图分类号:** R364.32

**文献标识码:** A

## Effect of C/EBP- $\alpha$ on autophagy in rat hepatic stellate cell line HSC-T6\*

Yao-li Chen<sup>1</sup>, Ying-zhen Zhai<sup>2</sup>, Huan-yu Liu<sup>1</sup>, Ji-ying Peng<sup>1</sup>, Wei-hua Yin<sup>1</sup>, Li-li Tao<sup>1</sup>, Xiu-ping Liu<sup>3</sup>  
(1. Department of Pathology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen, Guangdong 518036, China; 2. Shanghai Ackerman Medical Laboratory, Shanghai 200032, China; 3. Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200331, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role of CCAT enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP- $\alpha$ ) in autophagy of hepatic stellate cells (HSCs). **Methods** C/EBP- $\alpha$  Lentiviral vector was constructed. HSC-T6 was treated with C/EBP- $\alpha$  Lentiviral vector, autophagy activator Rapamycin or C/EBP- $\alpha$  Lentiviral vector plus Rapamycin. Autophagy-related protein LC3 and C/EBP- $\alpha$  were detected with Western blotting. **Results** Treatment of Lenti-C/EBP- $\alpha$  induced decreased expression of LC3 in HSC-T6 while Rapamycin upregulated levels of LC3 and downregulated expression of C/EBP- $\alpha$ . Co-incubation of Lenti-C/EBP- $\alpha$  and Rapamycin suggested that C/EBP- $\alpha$  expression was increased and LC3 expression was decreased when compared with Rapamycin only group. **Conclusion** C/EBP- $\alpha$  inhibits activation of HSC-T6 inhibition of autophagy, which may be a novel approach for anti-hepatic fibrosis.

**Keywords:** hepatic stellate cells; CCAT enhancer binding protein- $\alpha$ ; autophagy; liver fibrosis

收稿日期: 2017-11-09

\* 基金项目: 北京大学深圳医院课题 (No: JCYJ2017010); 广东省自然科学基金博士科研启动项目 (No: 2015A030310031)

[通信作者] 陶丽丽, E-mail: 651055473@qq.com; Tel: 0755-8392333-2267

肝纤维化是肝脏对各种慢性损伤的一种修复反应,是各种慢性肝病进展至肝硬化的必经阶段,目前尚缺少有效的治疗方法。其中肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的激活在肝纤维化过程中起关键作用<sup>[1-2]</sup>。CCAT 增强子结合蛋白  $\alpha$  (CCAT/enhancer binding protein, C/EBP- $\alpha$ ) 是一种核转录因子,本课题组前期研究发现其可促进激活的 HSCs 转向静止状态,恢复其贮存脂滴和维生素 A 功能,并诱导其凋亡<sup>[3-5]</sup>。近来有报道发现自噬可通过调节 HSCs 脂滴促进 HSCs 激活<sup>[6-7]</sup>。由于 C/EBP- $\alpha$  与自噬均参与 HSCs 脂滴的调控,因此它们之间可能有相关性。本研究拟从两者之间的关系着手,探讨诱导 HSCs 自噬激活的可能机制,为肝纤维化早期干预提供新的理论线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 细胞来源** 大鼠肝星状细胞株 HSC-T6 由上海中医药大学徐列明教授馈赠。

**1.1.2 药物与试剂** 兔抗大鼠多克隆抗体 C/EBP- $\alpha$  购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,兔单克隆抗体 LC3 抗体美国 Cell Signal Technology 公司, $\alpha$ -SMA 抗体、Collagen(胶原)抗体、HRP 标记的羊抗鼠/兔二抗购于北京鼎国生物技术有限责任公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** HSC-T6 使用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基中培养,取呈指数生长的细胞进行实验。

**1.2.2 携带 C/EBP- $\alpha$  的慢病毒载体 Lenti-C/EBP- $\alpha$  的构建** 质粒 PDC316-C/EBP- $\alpha$  由本实验室前期构建,携带 C/EBP- $\alpha$  的慢病毒载体 Lenti-C/EBP- $\alpha$  由北京本元正阳生物公司构建。

**1.2.3 Western blot 检测各目标蛋白表达** 以未感染 Lenti-C/EBP- $\alpha$  的 HSC-T6 为对照组, Lenti-C/EBP- $\alpha$  感染大鼠肝星状细胞株 HSC-T6 为感染组; Western blot 检测自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 表达;采用自噬激活剂 Rapamycin 处理 HSC-T6 (处理组), Western blot 检测 C/EBP- $\alpha$  和 LC3 的表达;将 HSC-T6 经 Lenti-C/EBP- $\alpha$  及自噬激活剂 Rapamycin 共处理(共处理组), Western blot 检测 C/EBP- $\alpha$  和 LC3 的改变。细胞经过不同处理因素后,搜集细胞,裂解组织,抽提蛋白;进行变性电泳、转膜封闭、洗膜后分别加入鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(1 : 1 000 TBST

稀释)或兔抗 C/EBP- $\alpha$  抗体(1 : 2 000 TBST 稀释)、鼠抗  $\alpha$ -SMA 及胶原蛋白单克隆抗体(1 : 1 000 TBST 稀释);37℃ 孵育 1 h 后 4℃ 过夜;加入二抗(1 : 2 000 TBST 稀释);用 ECL 发光液显示蛋白条带,以 GAPDH 为内对照,用 GEL PRO 蛋白条带分析软件测定 Western blot 条带灰度值,并与内参照结果相比较,计算其比值,比较各组差异。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 11.0 统计软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,比较做 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HSC-T6 感染 Lenti-C/EBP- $\alpha$ 后胶原蛋白、C/EBP- $\alpha$ 、LC3 的表达

与正常对照组比较, HSC-T6 感染 Lenti-C/EBP- $\alpha$  后, Western blot 结果显示, C/EBP- $\alpha$  表达量增高,而 LC3 激活减少,提示自噬活性下降;胶原蛋白表达量减少,提示 HSCs 激活受到抑制;两组比较,采用 *t* 检验分析,差异有统计学意义, Lenti-C/EBP- $\alpha$  组 C/EBP- $\alpha$  表达高于对照组,而 LC3 和胶原蛋白表达低于对照组 ( $P < 0.05$ )。见表 1 和图 1。

表 1 HSC-T6 感染 Lenti-C/EBP- $\alpha$  后胶原蛋白、C/EBP- $\alpha$ 、LC3 的表达

组别	胶原蛋白	C/EBP- $\alpha$	LC3
感染组	0.283 $\pm$ 0.044	3.482 $\pm$ 1.203	0.014 $\pm$ 0.007
对照组	2.432 $\pm$ 1.202	0.241 $\pm$ 0.056	1.725 $\pm$ 0.063
<i>t</i> 值	3.094	4.664	2.463
<i>P</i> 值	0.00	0.000	0.003

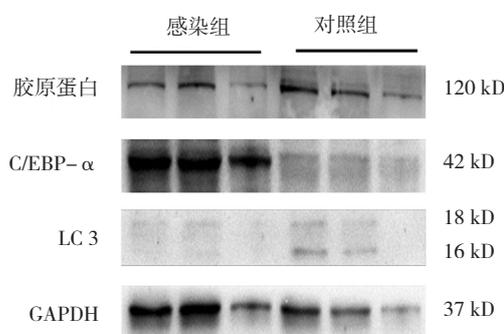


图 1 HSC-T6 感染 Lenti-C/EBP- $\alpha$  后胶原蛋白、C/EBP- $\alpha$ 、LC3 的表达

### 2.2 Rapamycin 处理 HSC-T6 后 C/EBP- $\alpha$ 及 LC3 的表达

与对照组比较, 经 Rapamycin 处理后, HSC-T6 细胞 C/EBP- $\alpha$  表达量下降, 而 LC3 激活增多, 自噬活性增高, 两组比较, 采用 *t* 检验分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 2 和表 2。

表 2 自噬激活剂 Rapamycin 处理 HSC-T6 后 C/EBP- $\alpha$ 、LC3 的表达

组别	C/EBP- $\alpha$	LC3
处理组	0.363 $\pm$ 0.158	1.558 $\pm$ 0.785
对照组	1.872 $\pm$ 0.840	0.402 $\pm$ 0.184
<i>t</i> 值	3.057	2.341
<i>P</i> 值	0.009	0.037

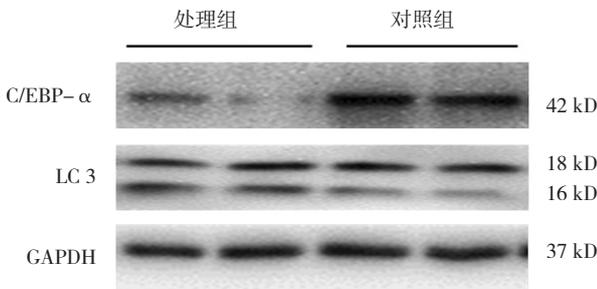


图 2 Rapamycin 处理 HSC-T6 后 C/EBP- $\alpha$ 、LC3 的表达

### 2.3 HSC-T6 经 Lenti-C/EBP- $\alpha$ 和 Rapamycin 共处理后 C/EBP- $\alpha$ 及 LC3 的表达

HSC-T6 经 Lenti-C/EBP- $\alpha$  和 Rapamycin 共处理后, Western blot 结果显示与单纯使用 Rapamycin (处理组) 比较, C/EBP- $\alpha$  表达升高, LC3 激活减少, 自噬活性下降,  $\alpha$ -SMA 表达减少, 提示 HSCs 激活受到抑制。两组比较, 采用 *t* 检验分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 3 和表 3。

表 3 HSC-T6 经 Lenti-C/EBP- $\alpha$  和 Rapamycin 共处理后  $\alpha$ -SMA、C/EBP- $\alpha$  及 LC3 的表达

组别	$\alpha$ -SMA	C/EBP- $\alpha$	LC3
共处理组	1.251 $\pm$ 0.201	0.804 $\pm$ 0.328	0.144 $\pm$ 0.071
处理组	1.924 $\pm$ 0.275	0.160 $\pm$ 0.089	0.832 $\pm$ 0.333
<i>t</i> 值	3.423	3.276	3.500
<i>P</i> 值	0.005	0.006	0.000

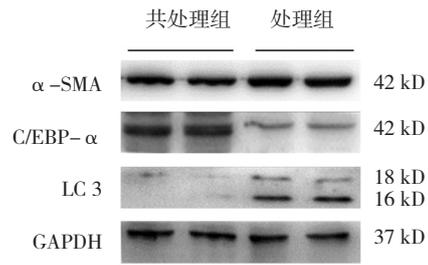


图 3 HSC-T6 经 Lenti-C/EBP- $\alpha$  和 Rapamycin 共处理后  $\alpha$ -SMA、C/EBP- $\alpha$  及 LC3 的表达

## 3 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病进展至肝硬化的必经阶段, 临床治疗的疗效不甚理想, 迄今仍是消化内科的难治之症及研究热点。近年发现肝纤维化的过程可以逆转, 其中心环节是活化的 HSC 发生凋亡<sup>[1-2]</sup>。激活的 HSCs 表达  $\alpha$ -SMA 和胶原蛋白, 而静止 HSCs 不表达, 因此检测这两个指标侧面反映 HSCs 激活状态的改变; 此外静息的 HSCs 贮存脂滴, 激活的 HSCs 失去贮存脂滴的功能。因此一些特异性调控脂肪细胞的基因很可能参与了 HSCs 的调控。C/EBP- $\alpha$  基因可以调控脂肪细胞成熟分化过程中细胞增殖状态<sup>[8]</sup>。笔者课题组前期发现 C/EBP- $\alpha$  在体内和体外都可以诱导 HSCs 发生凋亡, 而对肝细胞的凋亡作用影响很小, 对肝脏功能亦无明显损伤<sup>[3-5]</sup>。

自噬是普遍存在于大部分真核细胞中的一种现象, 从酵母到人类具有高度的保守性且非常复杂的分子调控机制。自噬是膜结构的溶酶体依赖性的降解途径, 此过程中一些自噬相关基因 (Autophagy related gene, Atg) 如 Atg5、Atg7、Atg8 (LC3)、Atg12 等的表达对自噬的形成至关重要<sup>[9-10]</sup>。LC3 是自噬标志物, 自噬形成时, 胞浆型 LC3 (即 LC3-I) 会酶解掉一小段多肽, 转变为膜型 (即 LC3-II), LC3-II / I 比值的大小可估计自噬水平的高低, 因此笔者选用 LC3 反映自噬激活的状况。

自噬在脂类代谢中的作用早有相关报道<sup>[11-12]</sup>。但研究 HSCs 激活及脂滴代谢中的作用的文献较少, VAN GRUNSVEN 等发现 HSCs 激活过程中, 自噬增加, 而使用自噬抑制剂后, 可以部分抑制 HSCs 的激活<sup>[6]</sup>。2012 年 FRIEDMAN SCOTT 等发现<sup>[7]</sup>自噬通过调节 HSCs 脂滴促进 HSCs 激活。近年有一些相关研究认为一些药物可以通过调控自噬来治疗肝纤维化<sup>[13-14]</sup>。

结合文献和笔者前期研究结果, 并通过初步研究,

发现 *C/EBP- $\alpha$*  基因参与 HSCs 的自噬过程<sup>[15-17]</sup>, 在本研究中, 笔者构建携带 *C/EBP- $\alpha$*  的慢病毒载体, 并采用一直以来研究的大鼠 HSCs 株 (HSC-T6), 用自噬激动剂 Rapamycin 和 (或) *C/EBP- $\alpha$*  共处理, 研究表明, 在 HSCs 中 *C/EBP- $\alpha$*  表达与自噬有关, *C/EBP- $\alpha$*  可以抑制自噬激活, 从而抑制 HSCs 激活, 其机制有待于进一步深入研究, 为以后开发高选择性抗纤维化药物提供新的潜在的作用靶点。

#### 参 考 文 献:

- [1] ARTHUR MJP. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C[J]. *Gastroenterology*, 2002, 122 (5):1525-1528.
- [2] WANLESS I R. Use of corticosteroid therapy in autoimmune hepatitis resulting in the resolution of cirrhosis[J]. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2001, 32(5): 371-372.
- [3] WANG X Q, HUANG G C, MEI S, et al. Over-expression of *C/EBP-alpha* induces apoptosis in cultured rat hepatic stellate cells depending on p53 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380(2): 286-291.
- [4] TAO L L, CHENG Y Y, DING D, et al. *C/EBP-alpha* ameliorates CCl4-induced liver fibrosis in mice through promoting apoptosis of hepatic stellate cells with little apoptotic effect on hepatocytes in vitro and in vivo[J]. *Apoptosis*, 2012, 17(5): 492-502.
- [5] 陶丽丽, 丁笛, 张继君, 等. CCAAT/增强子结合蛋白- $\alpha$  基因对小鼠肝纤维化的治疗作用[J]. *中华消化杂志*, 2014, 34(11): 734-737.
- [6] THOEN L F, GUIMARÃES E L, DOLLÉ L, et al. A role for autophagy during hepatic stellate cell activation[J]. *J Hepatol*, 2011, 55(6): 1353-1360.
- [7] HERNÁNDEZ-GEA V, GHIASSI-NEJAD Z, ROZENFELD R, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(4): 938-946.
- [8] MAIURI M C, MALIK S A, MORSELLI E, et al. Stimulation of autophagy by the p53 target gene *Sestrin2*[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(10): 1571-1576.
- [9] ZHANG J W, TANG Q Q, VINSON C, et al. Dominant-negative *C/EBP* disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(1): 43-47.
- [10] BRÖKER L E, KRUYT F A, GIACCONE G. Cell death independent of caspases: a review[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(9): 3155-3162.
- [11] MIZUSHIMA N, KOMATSU M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [12] OUIMET M, FRANKLIN V, MAK E, et al. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase[J]. *Cell Metab*, 2011, 13(6): 655-667.
- [13] SINGH R, KAUSHIK S, WANG Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism[J]. *Nature*, 2009, 458(7242): 1131-1135.
- [14] GE M, LIU H, ZHANG Y, et al. The anti-hepatic fibrosis effects of dihydrotanshinone I are mediated by disrupting the YAP and TEAD2 complex and stimulating autophagy[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(10): 1147-1160.
- [15] YANG N, DANG S, SHI J, et al. Caffeic acid phenethyl ester attenuates liver fibrosis via inhibition of TGF- $\beta_1$ /Smad3 pathway and induction of autophagy pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(1): 22-28.
- [16] 陈耀丽, 陶丽丽, 余光银, 等. <http://med.wanfangdata.com.cn/Author/General/A007604605>. *C/EBP- $\alpha$*  基因诱导肝细胞和肝星状细胞自噬和凋亡的差异研究[J]. *中国实用医刊*, 2016, 43(22): 30-32.
- [17] TAO L L, ZHAI Y Z, DING D, et al. The role of *C/EBP- $\alpha$*  expression in human liver and liver fibrosis and its relationship with autophagy[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10): 13102-13107.

(王荣兵 编辑)