

# GLT25D2 基因在对乙酰氨基酚诱导肝毒性损伤中对自噬的调控作用

张晓慧 郭乐乐 刘贞利 张晶 任锋

100069 首都医科大学附属北京佑安医院丙肝与中毒性肝病科(张晓慧、郭乐乐、刘贞利、张晶),肝病研究所(任锋)

通讯作者:任锋, Email: renfeng7512@hotmail.com

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2018.09.012

**【摘要】** 目的 探讨GLT25D2基因在对乙酰氨基酚(APAP)诱导的肝毒性损伤中是否对自噬有调控作用。**方法** 选择GLT25D2<sup>+/+</sup>野生型C57BL/6J小鼠和GLT25D2<sup>-/-</sup>基因敲除C57BL/6J小鼠为研究对象。①体内实验:将20只野生型小鼠和20只GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠分别按随机数字表法分为磷酸盐缓冲液(PBS)对照组和APAP干预组,每组10只。腹腔注射25 g/L的APAP溶液500 mg/kg建立小鼠肝毒性损伤模型;PBS对照组腹腔注射等量PBS。制模成功后立即处死小鼠取肝组织,采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肝组织自噬相关蛋白ATG5、ATG7、微管相关蛋白1轻链3(LC3)、P62的表达;电镜下观察肝组织超微结构改变,评估自噬水平。②体外实验:另取野生型小鼠和GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠各1只,采用两步胶原灌注法提取原代肝细胞并分为两部分:一部分以5 mmol/L APAP溶液干预0、8、12 h后收集细胞,采用Western Blot试验检测肝细胞自噬相关蛋白ATG5、ATG7、LC3、P62的表达;另一部分用绿色荧光蛋白-LC3质粒(GFP-LC3)转染24 h,分别给予PBS(PBS对照组)和5 mmol/L APAP(APAP干预组)温育12 h,荧光显微镜下观察GFP-LC3阳性表达以反映自噬体的形成情况。**结果** ①体内实验结果显示:与相应PBS对照组相比,经APAP干预后,野生型及GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠肝组织中自噬正性相关蛋白ATG5、ATG7、LC3-II表达下调,而负性相关蛋白P62表达上调,说明APAP处理后自噬整体水平降低。与野生型小鼠相比,GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠肝组织自噬正性相关蛋白ATG7、ATG5表达上调(ATG5/ $\beta$ -actin: 1.21 $\pm$ 0.29比0.84 $\pm$ 0.19, ATG7/ $\beta$ -actin: 1.29 $\pm$ 0.14比1.54 $\pm$ 0.40, 均 $P > 0.05$ ), LC3-II表达略下调(LC3-II/ $\beta$ -actin: 0.52 $\pm$ 0.06比0.58 $\pm$ 0.06,  $P > 0.05$ ),而负性相关蛋白P62表达下调(P62/ $\beta$ -actin: 1.13 $\pm$ 0.94比1.54 $\pm$ 0.40,  $P > 0.05$ ),说明基因敲除后小鼠自噬表达水平高于野生型小鼠。电镜下观察超微结构显示,与相应PBS对照组相比,经APAP干预后,野生型小鼠肝组织自噬体数量无明显变化,但GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠自噬体数量增多。②体外实验结果显示:随APAP干预时间延长,野生型及GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠原代肝细胞自噬正性相关蛋白ATG5、ATG7表达逐渐上调,LC3略有波动,而负性相关蛋白P62表达逐渐下调,12 h分别达峰或谷值,说明APAP刺激细胞自噬表达增强,并呈一定时间依赖性;与野生型小鼠相比,GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠12 h原代肝细胞自噬正性相关蛋白ATG5、ATG7、LC3-II及负性相关蛋白P62表达上调(ATG5/ $\beta$ -actin: 0.93 $\pm$ 0.09比0.74 $\pm$ 0.06, ATG7/ $\beta$ -actin: 0.80 $\pm$ 0.09比0.65 $\pm$ 0.10, LC3-II/ $\beta$ -actin: 1.35 $\pm$ 0.30比1.15 $\pm$ 0.20, P62/ $\beta$ -actin: 0.36 $\pm$ 0.02比0.31 $\pm$ 0.03, 均 $P > 0.05$ ),说明基因敲除后自噬水平增强。荧光显微镜下观察显示,经APAP干预后,野生型及GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠原代肝细胞GFP-LC3阳性细胞均较PBS对照组明显增加;GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠GFP-LC3阳性细胞比例明显高于野生型小鼠(0.64 $\pm$ 0.08比0.36 $\pm$ 0.05,  $P < 0.05$ )。**结论** GLT25D2是自噬负性调控因子,敲除GLT25D2基因能够增强APAP诱导肝毒性损伤小鼠的自噬水平。

**【关键词】** 自噬; 对乙酰氨基酚; GLT25D2基因; 肝毒性损伤

**基金项目:** 国家自然科学基金(81770611, 81270532);北京市自然科学基金(7162085);北京市科技计划项目(Z161100000516113);北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划项目(2013-3-075)

**Regulation of autophagy by GLT25D2 gene in acetaminophen-induced hepatotoxicity injury** Zhang Xiaohui, Guo Lele, Liu Zhenli, Zhang Jing, Ren Feng  
Department of Hepatitis C and Toxic Liver Disease, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China (Zhang XH, Guo LL, Liu ZL, Zhang J); Beijing Institute of Hepatology, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China (Ren F)

Corresponding author: Ren Feng, Email: renfeng7512@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To investigate whether GLT25D2 gene regulates autophagy in acetaminophen (APAP)-induced hepatotoxicity injury. **Methods** GLT25D2<sup>+/+</sup> wild-type C57BL/6J mice and GLT25D2<sup>-/-</sup> C57BL/6J mice were selected as subjects. ① *In vivo* experiment: 20 for wild-type mice and 20 for GLT25D2<sup>-/-</sup> mice were respectively divided into phosphate buffer (PBS) control group and APAP intervention group according to random number table, with 10 mice in each group. The hepatotoxicity injury model of mice was reproduced by intraperitoneal injection of 25 g/L APAP solution 500 mg/kg. The PBS control group was intraperitoneally injected with the same amount of PBS. The mice

were sacrificed immediately after model reproduction, and the liver tissues were harvested. Western Blot was used to detect the expressions of autophagy-related proteins ATG5, ATG7, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and P62. The ultrastructural changes in liver tissue were observed under electron microscope to observe the level of autophagy. ② *In vitro* experiment: primary hepatocytes extracted by two-step collagen perfusion from one GLT25D2<sup>+/+</sup> wild-type mouse and one GLT25D2<sup>-/-</sup> mouse were divided into two parts respectively. One part was treated with 5 mmol/L APAP solution. The cells were harvested at 0, 8, and 12 hours, and the expressions of autophagy-related proteins ATG5, ATG7, LC3, and P62 were determined by Western Blot. The other part was transfected with the green fluorescent protein-LC3 plasmid (GFP-LC3) for 24 hours. The cells were cultured with PBS (PBS control group) or 5 mmol/L APAP (APAP intervention group) for 12 hours, and the positive expression of GFP-LC3 was observed under the fluorescence microscope, thereby reflecting the expression of autophagosomes. **Results** ① *In vivo* experiment: compared with the corresponding PBS control group, the expressions of the positive-associated proteins ATG5, ATG7 and LC3-II in liver tissue of the APAP intervention group were down-regulated in the wild-type and GLT25D2<sup>-/-</sup> mice, while the expression of the negative correlation protein P62 was up-regulated, indicating that the overall level of autophagy decreased after treatment with APAP. Compared with wild-type mice, the expressions of autophagy positive correlation proteins ATG5 and ATG7 were up-regulated in GLT25D2<sup>-/-</sup> mice (ATG5/ $\beta$ -actin:  $1.21 \pm 0.29$  vs.  $0.84 \pm 0.19$ , ATG7/ $\beta$ -actin:  $1.29 \pm 0.14$  vs.  $1.54 \pm 0.40$ , both  $P > 0.05$ ), LC3-II expression was slightly down-regulated (LC3-II/ $\beta$ -actin:  $0.52 \pm 0.06$  vs.  $0.58 \pm 0.06$ ,  $P > 0.05$ ), while negative correlation protein P62 was down-regulated (P62/ $\beta$ -actin:  $1.13 \pm 0.94$  vs.  $1.54 \pm 0.40$ ,  $P > 0.05$ ), indicating that the expression of autophagy in GLT25D2<sup>-/-</sup> mice was higher than that in wild-type mice. Ultrastructural observation under electron microscope showed that the number of autophagosomes in the liver tissue of wild-type mice did not change significantly after APAP intervention as compared with that in PBS control group, but the number of autophagosomes in GLT25D2<sup>-/-</sup> mice was increased. ② *In vitro* experiment: with the prolongation of APAP intervention, the expressions of ATG5 and ATG7 in the primary hepatocytes of wild-type and GLT25D2<sup>-/-</sup> mice were up-regulated, LC3 was slightly fluctuated, and the expression of negative-related protein P62 was gradually down-regulated. The peak value or the trough value reached at 12 hours. It was indicated that the expression of autophagy in APAP-stimulated cells was enhanced with a time-dependent manner. Compared with wild-type mice, the expressions of autophagy correlation proteins ATG5, ATG7, LC3-II and P62 were up-regulated in GLT25D2<sup>-/-</sup> mice at 12 hours (ATG5/ $\beta$ -actin:  $0.93 \pm 0.09$  vs.  $0.74 \pm 0.06$ , ATG7/ $\beta$ -actin:  $0.80 \pm 0.09$  vs.  $0.65 \pm 0.10$ , LC3-II/ $\beta$ -actin:  $1.35 \pm 0.30$  vs.  $1.15 \pm 0.20$ , P62/ $\beta$ -actin:  $0.36 \pm 0.02$  vs.  $0.31 \pm 0.03$ , all  $P > 0.05$ ), indicating that the expression of autophagy was enhanced after gene knockout. Fluorescence microscopy showed that GFP-LC3 positive cells in both wild-type and GLT25D2<sup>-/-</sup> mice hepatocytes were significantly increased after APAP intervention as compared with those of PBS control group, and the proportion of GFP-LC3 positive cells in GLT25D2<sup>-/-</sup> mice was significantly higher than that in wild-type mice ( $0.64 \pm 0.08$  vs.  $0.36 \pm 0.05$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusions** GLT25D2 is a negative regulator of autophagy. Knockout of GLT25D2 gene can enhance the autophagy level of APAP-induced hepatotoxicity injury in mice.

**【Key words】** Autophagy; Acetaminophen; GLT25D2 gene; Hepatotoxicity injury

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81770611, 81270532); Beijing Natural Science Foundation of China (7162085); Beijing Science and Technology Planning Project (Z161100000516113); Beijing Municipal Health System High-level Health Technician Training Program (2013-3-075)

自噬是在饥饿、压力或感染条件下细胞存活的重要溶酶体降解机制,该机制可演变为从细胞内物质(细胞质、细胞器、蛋白质聚集体等)再生能量以满足低营养条件下的能量需求<sup>[1]</sup>。近年来,大量文献显示自噬参与到肝脏疾病的多个领域<sup>[2-5]</sup>,适度自噬是细胞完成自身代谢和细胞器更新的重要方式,对维持机体内环境稳定及调控细胞损伤和老化具有重要意义。药物性肝损伤已成为急性肝衰竭的主要原因,其中对乙酰氨基酚(APAP)是最主要的致病因子<sup>[6]</sup>。研究显示,APAP过量可引起自噬,通过自噬清除损伤的线粒体以减轻APAP导致的肝细胞坏死,阐明了自噬在APAP诱导的药物性肝损伤中的保护性作用<sup>[7-8]</sup>。还有研究表明,GLT25D2基因对肝细胞再生有调控作用<sup>[9]</sup>,而GLT25D2基因能否调控自噬,进而影响APAP诱导的药物性肝损伤,目前尚未见报道。本研究旨在初步探讨

GLT25D2基因是否在APAP诱导的肝毒性损伤中对自噬有调控作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物:**SPF级GLT25D2<sup>+/+</sup>野生型C57BL/6J小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0006,在首都医科大学附属北京佑安医院动物中心饲养;SPF级GLT25D2<sup>-/-</sup>基因敲除小鼠亲代由首都医科大学附属北京地坛医院魏红山教授提供,许可证号:SCXK(京)2011-0012,经鉴定后于首都医科大学动物饲养中心繁殖,之后在首都医科大学附属北京佑安医院动物中心饲养1周进行实验,自由进水与饮食。所有小鼠均为雄性,6~8周龄,体重18~23g。

**1.2 主要试剂:**APAP、胶原酶、10×Hanks缓冲液购于美国Sigma公司;自噬调控相关蛋白ATG5、ATG7、微管相关蛋白1轻链3(LC3)、P62和兔抗 $\beta$ -肌动

蛋白( $\beta$ -actin)抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG抗体均购自美国Cell Signaling公司;质粒转染试剂lipofectamine 3000、DMEM培养基购于美国Thermo Fisher公司;目的克隆绿色荧光蛋白-LC3质粒(GFP-LC3)由北京市肝病研究所任峰教授提供;胶原包被板购于美国BD公司;胎牛血清购于美国Hyclone公司;增强化学发光(ECL)试剂盒购自美国Thermo Scientific公司。主要试剂配制:将APAP溶于无菌磷酸盐缓冲液(PBS)中,浓度为25 g/L(体内)和200 mmol/L(体外),55℃水浴锅加热至完全溶解,现用现配。

### 1.3 模型制备

**1.3.1 APAP体内诱导动物损伤模型制备及处理:**将20只GLT25D2<sup>+/+</sup>野生型小鼠和20只GLT25D2<sup>-/-</sup>基因敲除小鼠分别按随机数字表法分为PBS对照组和APAP干预组,每组10只。所有小鼠均禁食、不禁水12 h(20:00至次日08:00)。APAP干预组小鼠均腹腔注射25 g/L的APAP溶液,注射剂量为500 mg/kg;PBS对照组腹腔注射等量PBS。然后继续禁食、不禁水,8 h后肝毒性损伤模型制备成功,取肝脏组织用于蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)。

**1.3.2 APAP体外诱导细胞损伤模型制备及处理:**另取GLT25D2<sup>+/+</sup>小鼠和GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠各1只,禁食、不禁水12 h(20:00至次日08:00),采用两步胶原灌注法提取原代肝细胞,用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养细胞,以 $2 \times 10^5$ /孔铺于胶原包被12孔板,4 h后换液去除未贴壁细胞,12 h后将200 mmol/L APAP溶液稀释成5 mmol/L干预,分别于0、8、12 h后收集细胞用于Western Blot检测。采用同样的方式提取原代肝细胞,以 $4 \times 10^5$ /孔铺于胶原包被6孔板,用GFP-LC3质粒转染24 h,分别给予PBS(PBS对照组)和5 mmol/L APAP(APAP干预组)温育,12 h后观察自噬体的形成情况。

**1.4 伦理学:**本实验中动物处置方法均符合动物伦理学标准,并通过首都医科大学动物实验及实验动物福利委员会审批(审批号:AEEI-2015-126)。

### 1.5 模型评价

**1.5.1 Western Blot测定自噬相关蛋白的表达:**体内实验取小鼠肝组织约30 mg,立即置于0.5 mL预冷的组织裂解液中,冰浴下充分匀浆,然后于冰上静置30 min;体外实验取小鼠原代肝细胞,去上清,用预冷的PBS洗涤3次,加入100  $\mu$ L细胞裂解液后将细胞刮下,收集细胞,反复冻融3次。4℃下12 000 $\times$ g

离心5 min,收集上清(肝组织),用Bio-RadDc蛋白分析微孔板法测定上清液中蛋白浓度。取50  $\mu$ g肝组织蛋白或20  $\mu$ g细胞蛋白上样,并进行电泳(开始80 V,蛋白标记Marker电泳至分离胶后调整为120 V,直至蛋白充分分离)、转至聚偏氟乙烯膜(300 mA转膜),加一抗4℃孵育过夜(1:1 000稀释),加二抗室温孵育1 h(1:2 000稀释),用含吐温20的Tris-HCl缓冲液(TBST)漂洗3次,取等量ECL试剂A液和B液混匀后,孵育聚偏氟乙烯膜,压片曝光,用Image J软件评估定量结果,以 $\beta$ -actin为内参,表达量以目标蛋白与内参的灰度值比值表示。

**1.5.2 体内自噬水平评估:**取小鼠肝脏,滴加冷却的0.1 mmol磷酸缓冲戊二醛固定液,切成3个约1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm的小块,放入盛有冷的新鲜固定液的加盖青霉素小瓶中,置冰箱冷藏室低温固定(4℃)过夜。之后送首都医科大学附属北京天坛医院电子显微镜实验室,电镜下观察自噬体形成情况。

**1.5.3 体外自噬水平评估:**倒置荧光显微镜下观察肝细胞中GFP-LC3绿色荧光表达情况。阳性细胞定义为显示明亮点状染色的细胞。计数约50个细胞,重复实验至少3次。

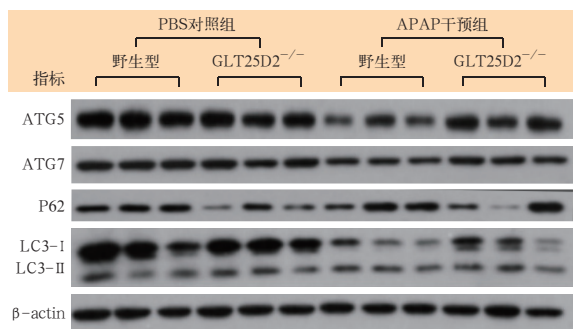
**1.6 统计学分析:**采用SPSS 16.0软件进行统计处理。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组样本均数之间比较采用两独立样本 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体内实验结果

**2.1.1 敲除GLT25D2基因可促进APAP干预后肝组织自噬相关蛋白表达(图1;表1):**与相应PBS对照组相比,野生型及GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠经APAP干预后,肝组织中自噬正性相关蛋白ATG5、ATG7、LC3-II表达下调,而负性相关蛋白P62表达上调,说明APAP干预后自噬整体水平降低;与野生型APAP干预组相比,GLT25D2<sup>-/-</sup>APAP干预组小鼠肝组织中自噬正性相关蛋白ATG5、ATG7上调,LC3-II略下调,而负性相关蛋白P62表达下调,说明基因敲除后自噬表达水平高于野生型小鼠。

**2.1.2 敲除GLT25D2基因可促进APAP干预后肝组织自噬体形成(图2):**电镜下观察肝组织超微结构显示,野生型与GLT25D2<sup>-/-</sup>PBS对照组可见自噬体;APAP干预后,野生型小鼠自噬体与PBS对照组无明显变化,但数量明显少于GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠,可见自噬体包裹或正在包裹错误折叠蛋白或细胞器等。



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, APAP 为对乙酰氨基酚, PBS 为磷酸盐缓冲液, ATG5、ATG7 为自噬正性相关蛋白, P62 为自噬负性相关蛋白, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白

图 1 Western Blot 检测 GLT25D2 基因敲除对 APAP 诱导肝毒性损伤小鼠肝组织自噬相关蛋白表达的影响

表 1 GLT25D2 基因敲除对 APAP 诱导肝毒性损伤小鼠肝组织自噬相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

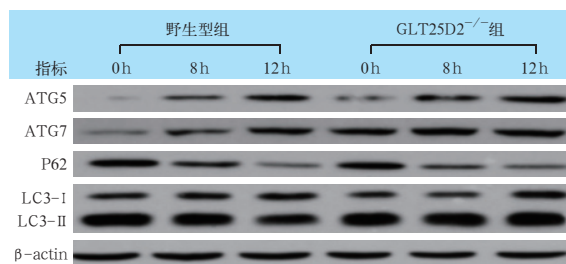
组别	动物数 (只)	ATG5/ $\beta$ -actin	ATG7/ $\beta$ -actin	P62/ $\beta$ -actin	LC3-II/ $\beta$ -actin
野生型 PBS 对照组	10	1.32 ± 0.08	1.37 ± 0.07	1.30 ± 0.14	0.92 ± 0.29
野生型 APAP 干预组	10	0.84 ± 0.19	1.54 ± 0.40	1.54 ± 0.40	0.58 ± 0.06
GLT25D2 <sup>-/-</sup> PBS 对照组	10	1.31 ± 0.11	1.47 ± 0.27	0.80 ± 0.33	0.64 ± 0.08
GLT25D2 <sup>-/-</sup> APAP 干预组	10	1.21 ± 0.29	1.29 ± 0.14	1.13 ± 0.94	0.52 ± 0.06

注: APAP 为对乙酰氨基酚, PBS 为磷酸盐缓冲液, ATG5、ATG7 为自噬正性相关蛋白, P62 为自噬负性相关蛋白, LC3-II 为微管相关蛋白 1 轻链 3-II,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白

## 2.2 体外实验结果

### 2.2.1 敲除 GLT25D2 基因可促进 APAP 干预后原代肝细胞自噬相关蛋白表达 (图 3; 表 2):

野生型与 GLT25D2<sup>-/-</sup> 小鼠原代肝细胞在 0 h 自噬相关蛋白表达基本一致, ATG5 及 ATG7 的表达在 GLT25D2<sup>-/-</sup> 小鼠稍高; 随 APAP 干预时间延长, 自噬正性相关蛋白 ATG5、ATG7 逐渐上调, 而 LC3-II 略下调, 自噬负性相关蛋白 P62 表达逐渐下调, 说明 APAP 促进自噬表达。与野生型小鼠相比, GLT25D2<sup>-/-</sup> 小鼠的自噬正性相关蛋白 ATG5、ATG7、LC3-II 及负性相关蛋白 P62 表达稍高, 说明 GLT25D2 基因敲除后, 自噬的整体水平稍高于野生型小鼠。



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, APAP 为对乙酰氨基酚, ATG5、ATG7 为自噬正性相关蛋白, P62 为自噬负性相关蛋白, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白

图 3 Western Blot 检测 GLT25D2 基因敲除对 APAP 诱导肝毒性损伤小鼠原代肝细胞各时间点自噬相关蛋白表达的影响

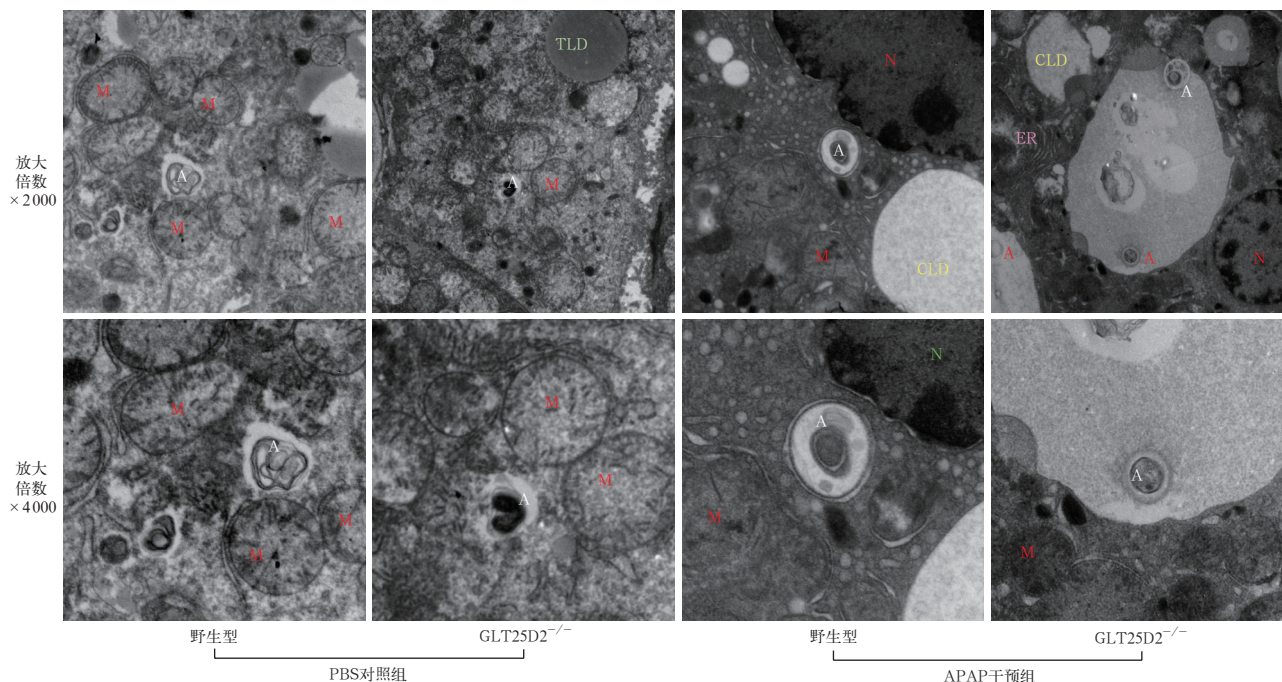


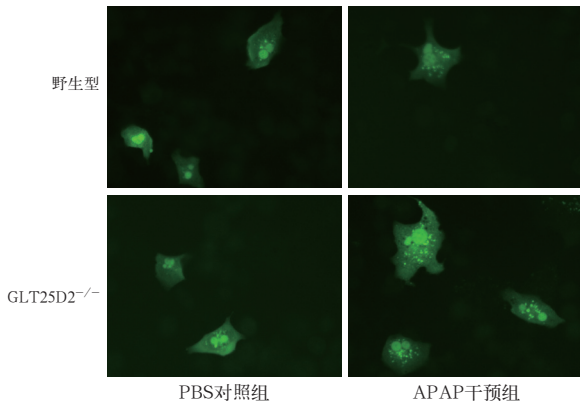
图 2 电镜下观察 GLT25D2 基因敲除在对乙酰氨基酚(APAP)诱导小鼠肝毒性损伤时对肝组织自噬体形成的影响 GLT25D2<sup>+/+</sup> 野生型和 GLT25D2<sup>-/-</sup> 基因敲除磷酸盐缓冲液(PBS)对照组均可见丰富的细胞器, 线粒体多见, 形态完整, 自噬体包裹内质网及线粒体。给予 APAP 干预后, 野生型小鼠肝组织可见大小不等的脂滴, 线粒体肿胀, 形态各异, 嵴断裂甚至消失, 细胞核不规则, 染色质分布不均, 自噬体包裹线粒体等; GLT25D2<sup>-/-</sup> 小鼠肝组织亦可见大小不等的脂滴、变形线粒体及细胞核, 但程度较野生型小鼠轻, 自噬体包裹线粒体及错误折叠蛋白质等明显增多。A 为自噬体, M 为线粒体, ER 为内质网, N 为细胞核, CLD 为胆固醇脂滴, TLD 为三酰甘油脂滴 乙酸双氧钼-柠檬酸铅双染

**表 2 GLT25D2 基因敲除对 APAP 诱导肝毒性损伤小鼠原代肝细胞各时间点自噬相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )**

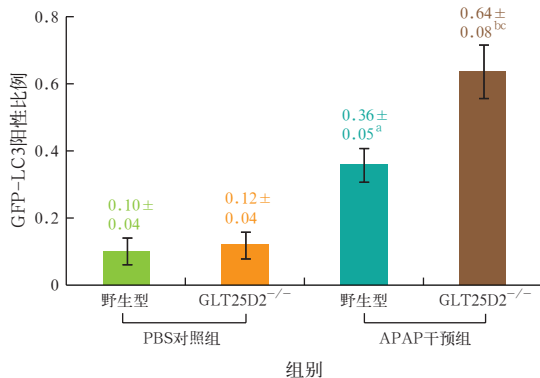
组别	时间	样本数 (孔)	ATG5/ β-actin	ATG7/ β-actin	P62/ β-actin	LC3-II / β-actin
野生型组	0 h	4	0.03 ± 0.01	0.19 ± 0.02	1.00 ± 0.11	1.50 ± 0.20
	8 h	4	0.37 ± 0.03	0.37 ± 0.01	0.60 ± 0.07	1.19 ± 0.10
	12 h	4	0.74 ± 0.06	0.65 ± 0.10	0.31 ± 0.03	1.15 ± 0.20
GLT25D2 <sup>-/-</sup> 组	0 h	4	0.34 ± 0.04	0.71 ± 0.05	1.01 ± 0.08	1.52 ± 0.20
	8 h	4	0.74 ± 0.10	0.82 ± 0.10	0.51 ± 0.05	1.57 ± 0.12
	12 h	4	0.93 ± 0.09	0.80 ± 0.09	0.36 ± 0.02	1.35 ± 0.30

注: APAP 为对乙酰氨基酚, ATG5、ATG7 为自噬正性相关蛋白, P62 为自噬负性相关蛋白, LC3-II 为微管相关蛋白 1 轻链 3-II, β-actin 为 β-肌动蛋白

**2.2.2 敲除 GLT25D2 基因可促进 APAP 干预后原代肝细胞自噬相关蛋白 LC3 表达 (图 4~5):**质粒转染后,野生型和 GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠在 PBS 对照组 LC3 斑点均较少;经 APAP 干预后,LC3 斑点较 PBS 对照组增加,以 GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠数量更多 ( $P < 0.05$ )。



**图 4** 荧光显微镜下观察 GLT25D2 基因敲除在对乙酰氨基酚 (APAP) 诱导小鼠肝毒性损伤时对自噬蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 表达的影响 LC3 阳性细胞为明亮点状染色的细胞。GLT25D2<sup>+/+</sup>野生型和 GLT25D2<sup>-/-</sup>基因敲除小鼠原代肝细胞在磷酸盐缓冲液 (PBS) 对照组可见少量 LC3 荧光斑点;而 APAP 干预后 LC3 阳性斑点数量明显增多,以 GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠更为显著 绿色荧光蛋白 (GFP) 染色 高倍放大



**图 5** GLT25D2 基因敲除对 APAP 诱导肝毒性损伤小鼠原代肝细胞自噬相关蛋白 LC3 表达的影响

注: APAP 为对乙酰氨基酚, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, GFP 为绿色荧光蛋白, PBS 为磷酸盐缓冲液;与野生型 PBS 对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 GLT25D2<sup>-/-</sup> PBS 对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与野生型 APAP 干预组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论

APAP 在治疗剂量下是安全有效的镇痛药。然而, APAP 过量可导致动物<sup>[10]</sup>和人类<sup>[11]</sup>肝脏损伤,甚至发生肝衰竭。APAP 诱导肝损伤的机制之一为活性代谢产物 N-乙酸-对苯醌亚胺 (NAPQI) 的形成,其消耗谷胱甘肽并结合细胞内蛋白质,造成细胞功能障碍。对此,临床唯一使用的解毒剂是 N-乙酰半胱氨酸 (NAC),作为谷胱甘肽合成的前体药物, NAC 在 APAP 过量 8 h 内给药效果显著,而在 12 h 内给药效力则明显降低<sup>[12-13]</sup>。NAC 延迟治疗可以增加急性肝衰竭的风险,提示我们必须发展其他的治疗方向。

近年来有大量文献显示自噬参与到肝脏疾病的多个领域<sup>[2-5, 14-15]</sup>。研究表明,血红素加氧酶-1 (HO-1) 可以调控肝缺血/再灌注 (I/R) 时自噬的表达,而自噬可能介导了 HO-1 减轻肝脏 I/R 损伤的作用<sup>[14]</sup>。于瑶等<sup>[15]</sup>应用牡荆素能够减轻肝 I/R 损伤,其机制也与抑制肝细胞自噬有关。近年来有关自噬的研究逐渐成为热点<sup>[16]</sup>。自噬的发生受到多种自噬相关蛋白的调控,如 ATG7、LC3、ATG5、P62 等。在哺乳动物细胞中, ATG12 经 ATG7 活化后,与 ATG5 结合,形成前自噬体,存在于胞质中。随后,在自噬泡的不断伸张扩张过程中,孤立的前自噬体膜连接在一起,形成了成熟的自噬体<sup>[17]</sup>。同时, ATG7 可以催化 LC3-I 与自噬体膜表面的磷脂酰乙醇胺 (PE) 结合形成 LC3-II,使之成为自噬体的标志分子,在自噬体的形成中起重要作用<sup>[7]</sup>。LC3-PE 位于自噬体的内膜和外膜,在伸长期间,自噬体上的 LC3 蛋白可以通过自噬受体蛋白 P62 与错误折叠和多聚泛素化蛋白质相互接触<sup>[18-19]</sup>。LC3 修饰靶蛋白质以递送至溶酶体,形成自噬溶酶体后降解。由于溶酶体在降解过程中与底物结合的 P62 被蛋白水解酶降解,故自噬的水平与 P62 水平呈负相关,而与 ATG5、ATG7、LC3-II 呈正相关。

有研究表明, APAP 过量可引起肝自噬被激活,从而缓解肝损伤<sup>[7-8, 20]</sup>。为此,本研究通过 Western Blot 试验检测了 APAP 干预后小鼠肝组织与原代肝细胞中自噬相关蛋白 ATG5、ATG7、LC3、P62 的表达情况。结果显示,与野生型小鼠相比, GLT25D2<sup>-/-</sup>小鼠的自噬正性相关蛋白 ATG5、ATG7 表达上调, LC3-II 略下调,而负性相关蛋白 P62 表达下调,说明 GLT25D2 基因敲除后自噬水平升高。一般认为,电镜下直接观察自噬体的形成情况是评估自噬的最

可靠方法,本研究中从电镜下超微结构可以看到,APAP 干预后 GLT25D2<sup>-/-</sup> 小鼠自噬体数量多于野生型小鼠,进一步说明了 GLT25D2 基因敲除后自噬的表达是增强的。

LC3 是自噬的标志性蛋白,在自噬体形成中发挥重要作用。LC3-II 定位于前自噬体和自噬体膜表面,是细胞自噬体膜的特异性标志物,其含量可以反映细胞的自噬活性<sup>[21-22]</sup>。以荧光标记的 LC3 为指标结合荧光显微镜观察,能够在活细胞中动态研究自噬过程,将 LC3 与 GFP 融合,应用荧光检测方法可以更简单直观地观察自噬的发生和定位。本实验结果显示, GLT25D2 基因敲除增加了 GFP-LC3 斑点数量,进一步验证了 Western Blot 试验和电镜下的观察结果。

综上所述,与野生型小鼠相比, GLT25D2 基因敲除小鼠自噬体聚集,且 ATG5、ATG7 水平增加,并促进了 P62 的降解。原代培养小鼠肝细胞自噬观察结果与体内实验结果一致,与野生型小鼠相比, GLT25D2 基因敲除增加了 GFP-LC3 斑点和 ATG5、ATG7 的水平,且促进了 APAP 诱导的原代培养小鼠肝细胞中 P62 的降解。尽管结果未出现统计学差异,但仍可以看出基因敲除后自噬水平有一定程度升高,且肝组织电镜下观察及质粒转染的结果也验证了基因对自噬有一定调控作用。因此,在 APAP 诱导肝毒性损伤期间,敲除 GLT25D2 基因可一定程度促进自噬,从而推测 GLT25D2 基因可能是 APAP 自噬反应的负调节器,增加了对 APAP 诱导肝毒性损伤机制的进一步认识,并提供了 GLT25D2 基因在调节肝损伤中的新发现,即部分由 GLT25D2 自噬途径介导。GLT25D2 可能成为缓解 APAP 过量诱导肝损伤的另一个有效靶点。

志谢 感谢首都医科大学附属北京地坛医院魏红山教授提供 GLT25D2 基因敲除小鼠

#### 参考文献

- [1] He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy [J]. Annu Rev Genet, 2009, 43: 67-93. DOI: 10.1146/annurev-genet-102808-114910.
- [2] Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation [J]. Nature, 2011, 469 (7330): 323-335. DOI: 10.1038/nature09782.
- [3] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. Nature, 2008, 451 (7182): 1069-1075. DOI: 10.1038/nature06639.
- [4] Yang L, Li P, Fu S, et al. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance [J]. Cell Metab, 2010, 11 (6): 467-478. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.04.005.
- [5] Gotoh K, Lu Z, Morita M, et al. Participation of autophagy in the

initiation of graft dysfunction after rat liver transplantation [J]. Autophagy, 2009, 5 (3): 351-360. DOI: 10.4161/auto.5.3.7650.

- [6] de Achaval S, Suarez-Almazor M. Acetaminophen overdose: a little recognized public health threat [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 2011, 20 (8): 827-829. DOI: 10.1002/pds.2162.
- [7] Ni HM, Bockus A, Boggess N, et al. Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity [J]. Hepatology, 2012, 55 (1): 222-232. DOI: 10.1002/hep.24690.
- [8] Ni HM, McGill MR, Chao X, et al. Removal of acetaminophen protein adducts by autophagy protects against acetaminophen-induced liver injury in mice [J]. J Hepatol, 2016, 65 (2): 354-362. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.04.025.
- [9] 王智强, 杨琪, 王建文, 等. 糖基转移酶 Colgalt2 基因敲除对肝细胞再生过程中增殖和凋亡的作用研究 [J/CD]. 中国肝脏病杂志 (电子版), 2015, 7 (1): 26-31. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2015.01.10.
- [9] Wang ZQ, Yang Q, Wang JW, et al. Effect of glycosyltransferase Colgalt2 gene knockout on hepatocyte proliferation and apoptosis on course of hepatocyte regeneration [J/CD]. Chin Liver Dis (Electr Version), 2015, 7 (1): 26-31. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2015.01.10.
- [10] Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, et al. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1973, 187 (1): 185-194.
- [11] Larson AM, Polson J, Fontana RJ, et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study [J]. Hepatology, 2005, 42 (6): 1364-1372. DOI: 10.1002/hep.20948.
- [12] Smilkstein MJ, Knapp GL, Kulig KW, et al. Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the national multicenter study (1976 to 1985) [J]. N Engl J Med, 1988, 319 (24): 1557-1562. DOI: 10.1056/NEJM198812153192401
- [13] Jaeschke H. Acetaminophen: dose-dependent drug hepatotoxicity and acute liver failure in patients [J]. Dig Dis, 2015, 33 (4): 464-471. DOI: 10.1159/000374090.
- [14] 蓝升, 李金泰, 刘毅. 自噬在血红素氧合酶 1 抑制大鼠肝脏缺血/再灌注损伤中的作用 [J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29 (3): 233-238. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.008.
- [14] Lan S, Li JT, Liu Y. Study on the role of autophagy in hemoxygenase 1 preventing hepatic ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (3): 233-238. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.008.
- [15] 于瑶, 何金丹, 王振, 等. 牡荆素调节自噬对小鼠肝缺血/再灌注损伤的保护作用 [J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2016, 4 (1): 27-31. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2016.01.005.
- [15] Yu Y, He JD, Wang Z, et al. Vitexin: the protective effect of hepatic ischemia-reperfusion injury through the autophagy regulation in mice [J/CD]. Prac J Organ Transplant (Electronic Version), 2016, 4 (1): 27-31. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2016.01.005.
- [16] Wang H, Lu Q, Cheng S, et al. Autophagy activity contributes to programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* [J]. Autophagy, 2013, 9 (12): 1975-1982.
- [17] Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? [J]. J Clin Invest, 2005, 115 (10): 2679-2688. DOI: 10.1172/JCI26390.
- [18] Kirkin V, McEwan DG, Novak I, et al. A role for ubiquitin in selective autophagy [J]. Mol Cell, 2009, 34 (3): 259-269. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.04.026.
- [19] Puissant A, Fenouille N, Auberger P. When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1 [J]. Am J Cancer Res, 2012, 2 (4): 397-413.
- [20] Igusa Y, Yamashina S, Izumi K, et al. Loss of autophagy promotes murine acetaminophen hepatot [J]. J Gastroenterol, 2012, 47 (4): 433-443. DOI: 10.1007/s00535-011-0500-0.
- [21] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36 (12): 2491-502. DOI: 10.1016/j.biocel.2004.02.005.
- [22] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research [J]. Cell, 2010, 140 (3): 313-326. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.028.

(收稿日期: 2018-04-09)