

猴头菇提取物通过抑制线粒体膜通透性转移孔的开放对酒精性肝损害的保护作用

谢宇曦, 王红阳, 程爱斌

(华北理工大学附属医院, 河北省唐山市 063000)

饮酒是人类自远古时代既留传下来的习惯, 随着医学科学的发展, 过量饮酒会导致肝损害已成为了人们的共识^[1]。长期饮酒引起的氧化应激会导致体内氧化状态的失衡^[2]。当氧化应激持续加重后会导致脂肪肝、肝纤维化、肝硬化等^[3-5]。

目前人们对酒精性肝损害的有关机制仍未完全了解^[6-8]。但氧化应激在酒精性肝损害的进展过程中居于核心位置已无人否认。同时, 现有研究提示 mPTP 在氧化应激损伤中起着至关重要的作用, 对 mPTP 开放的调节被认为是多种针对氧化应激损伤的细胞保护机制的共同效应器。最初作为糖原代谢调节物为人们所认识的 GSK-3 β 现已被确认具有多重作用。同时, GSK-3 β 也是许多细胞信号转导通路的整合点, 并在传输作用于下游靶位置 mPTP 的保护性信号过程中发挥了关键性作用。由于氧化应激诱导的细胞凋亡涉及线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 的损失, 而 ($\Delta\Psi_m$) 损失的直接原因为 mPTP 的开放, 同时 GSK-3 β 为 mPTP 的直接上游调节物。故我们推测 HEM 抑制氧化应激引起的 mPTP 开放的阻断可能是通过失活 GSK-3 β 所引起的。

猴头菇是一种在中国被广泛商业化种植的真菌。既往的研究显示, 这种真菌对乙醇诱导的大鼠胃溃疡模型具有细胞保护作用。本人既往的研究已在细胞水平上证实猴头菇提取物 (HEM) 对饮酒引起氧化应激进而导致的酒精性肝损害具有明确保护作用^[9], 但 HEM 是否能够通过抑制 mPTP 的开放进而保护肝细胞仍未明确。在本研究中, 我们首先验证 HEM 是否能够阻止 mPTP 的开放及减轻乙醇对肝细胞

的氧化应激损伤。随后, 我们探讨了 HEM 产生相关作用的分子机制, 特别是聚焦了 HEM 在 GSK-3 β 通路上的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

实验大鼠肝细胞为来自 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) 的肝细胞。细胞培养液为 (DMEM) 并加入 10% 胎牛血清及 100U 双抗。孵于 37 $^{\circ}$ C, 50%CO₂-95%空气温箱。

1.2 试剂和抗体

本实验所用猴头菇提取物 (HEM) 及相关所有试剂均购于 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)。所有抗体均购自 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)。TMRE 来自 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)。

1.3 线粒体膜电位的共聚焦成像

通过共聚焦显微镜对行 TMRE 荧光染色的肝细胞的观测来监测线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$)。首先将细胞致于特制培养皿中 (Mat Tek, MA, USA), 并以 100 nM TMRE 荧光孵育致于标准 Tyrode 液 [(mM) NaCl 140, KCl 6, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, HEPES 5, and glucose 5.8 (pH 7.4)] 中的细胞 10min。随后将细胞分为四组, 分别为单纯应用 H₂O₂ 处理 20min 组 (对照组) 及不同浓度 HEM (100 μ M, 300 μ M, 500 μ M) 处理细胞 20min 后再以 H₂O₂ 处理 20min 组, 每组各 20 枚培养皿, 去除实验过程中各干扰因素影响细胞后每组各剩余 9 枚培养皿。将上述处理后各组细胞之培养皿分别至于

Olympus FLUOVIEW FV 1000 激光扫描共聚焦显微镜下。在 543nm 时激发红色氦氖激光,图像通过 560nm 波长滤波器成像。此时维持温度为 37°C,记录相关荧光数值变化。

1.4 GSK-3 β 丝氨酸 9 位点磷酸化效果

再以上述相同分组及处理方法处置后,每组各取 7 枚培养皿细胞。实验前以 PBS 液冲洗细胞 2 次并孵育于 Tyrode 液后置于温箱 2min。检测 HEM 对 GSK-3 β 丝氨酸 9 位点磷酸化效果。

1.5 Western blotting 分析

将细胞分为四组,各组分别为: H₂O₂ 处理 20min 组, 500 μ M HEM 处理 20min 后再以 H₂O₂ 处理 20min 组, PI3K 抑制剂 LY294002 处理细胞 20min+500 μ M HEM 处理 20min 后再以 H₂O₂ 处理 20min 组, 及 LY294002 单独处理组, 每组剔除不合要求样品后各留取 9 组样品。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳系统将获得的蛋白质样品按分子量大小进行分离。将分离后的蛋白质转移至固相支持物(PVDF 膜)上,用抗靶蛋白的特异性抗体(一抗)(1:1000)与膜上的靶蛋白(phosphorylation of GSK-3 β , VASP, and Akt) 进行结合,应用针对一抗的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1000)及 ECL 荧光染料对抗原抗体复合物进行标记,最后通过荧光成像系统检测。内参选择为总 GSK-3 β , AKT or tubulin。

1.6 统计学方法

实验所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

为明确氧化应激对 mPTP 开放的效果, 我们检测了 HEM 是否能够阻遏氧化应激诱导的线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 的缺失, 此实验采用共聚焦显微镜观察 TMRE 荧光变化的方法。由表 1 可以看出, 采用的 H₂O₂ 对细胞处理 20min, 此时作为指示剂的 TMREY 荧光淬灭明显, 这说明氧化损伤会导致 mPTP 的开放。但在应用

100, 300, 500 μ M HEM 处理后, 细胞内 TMRE 荧光淬灭程度会显著下降, 这其中尤以 500 μ M 浓度为甚。这意味着抑制氧化应激能够阻止 mPTP 的开放。

表 1 不同浓度 HEM 对 TMRE 荧光的影响

组 别	数量	荧光值
对照组	9	0.21 \pm 0.06
HEM (100 μ M)	9	0.53 \pm 0.06*
HEM (300 μ M)	9	0.69 \pm 0.02*
HEM (500 μ M)	9	0.81 \pm 0.07*

注: 与对照组比较, *P < 0.05

为明确抑制氧化应激是否能灭活肝细胞的 GSK-3 β 。我们判定了 HEM 能够磷酸化 GSK-3 β 9 位点的丝氨酸, 由表 2 可以看出, 这种作用呈浓度依赖性, 特别是在 500 μ M 浓度时表现最为突出。这就提示 HEM 可能通过使 GSK-3 β 失活的方式抑制氧化应激。

表 2 不同浓度 HEM 对 GSK-3 β (Ser9) 磷酸化的影响

组 别	数量	Phospho-GSK-3 β
对照组	7	100.0
HEM (100 μ M)	7	230.0 \pm 9.9*
HEM (300 μ M)	7	237.0 \pm 9.4*
HEM (500 μ M)	7	285.6 \pm 9.9 [#]

注: 与对照组比较, *P < 0.05

表 3 TUDCA 对磷酸化 AKT(Ser473)的作用

组 别	数量	Phospho-AKT
对照组	9	100.0
HEM (500 μ M)	9	148.8 \pm 4.8*
LY294002 + HEM	9	63.6 \pm 3.7*
LY294002 + HEM	9	53.5 \pm 3.1*

注: 与对照组比较, *P < 0.05; 与 HEM 组比较, [#]P < 0.05

为明确 HEM 失活 GSK-3 β 的机制, 我们采用 PI3K 抑制剂 LY294002 作用于细胞并观察其对 HEM 活性的影响。由表 3 可以看出, HEM 致 GSK-3 β 失活的作用能够被 LY294002 所显著抑制。这说明 PI3K/Akt 途径参与了

HEM 诱导的 GSK-3 β 的失活。这强烈提示 PI3K/Akt 信号通路调节了 HEM 通过对 GSK-3 β 的作用而产生的对 mPTP 的影响。

3 讨论

目前的研究能够证明, HEM 能够调节肝细胞 mPTP 的开放及缓解氧化应激损伤^[10]。这种作用似乎是通过灭活 PI3K/Akt 通路的 GSK-3 β 来实现的^[11-13]。mPTP 的开放已被证明是肝细胞氧化应激损伤的关键环节, 因此针对 mPTP 的处理也成为了肝细胞保护的重要措施。

本研究显示, H₂O₂作用下肝细胞的 TMRE 荧光衰减明显, 这意味着氧化应激能够使线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 显著丧失。由于线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 损失的主要原因为 mPTP 开放, 这也又一次证实了氧化应激与 mPTP 开放的关系。与此形成对照的是, 不同浓度 HEM 能在不同程度上减缓 TMRE 荧光的衰减程度, 这其中产生最佳效果的是 500 μ M。此实验可以证实抑制氧化应激能够阻碍氧化应激诱导的 mPTP 开放。

目前虽然关于通过阻止 mPTP 开放而发挥肝细胞保护作用的细胞信号转导机制尚未完全明确, 但 GSK-3 β 被认为是此过程中的居间调节者^[14]。GSK-3 β 的活性调节主要是通过对其 9 位点丝氨酸酪氨酸 216 位点磷酸化时 GSK-3 β 的活性增强。在对参与肝细胞保护的细胞信号通路进行的研究中发现, GSK-3 β 主要是通过抑制 mPTP 开放来发挥调节作用的^[15]。在本研究中, 500 μ M 的 HEM 能够显著提升 GSK-3 β 丝氨酸 9 位点磷酸化水平, 这提示在肝细胞中抑制氧化应激能够灭活 GSK-3 β 。

综上所述, 我们认为 PI3K/Akt-GSK-3 β 信号通路能够直接调解 mPTP 的开放。HEM 对 GSK-3 β 磷酸化的作用能够被 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 所逆转, 这提示 PI3K/Akt 在 HEM 抑制 GSK-3 β 活性过程中是必须的。

参考文献

- [1] L. Pari and K. KarthiKesan. Protective role of caffeic acid against alcohol-induced biochemical changes in rats[J].Fundamental and Clinical Pharmacology,2007, 21(4)355-361
- [2] R. Nordmann,C. Ribicrc,H.Rouach. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury [J].Free Radical Biology and Medicine,1992,12(3): 219-240
- [3] Nelson S.,and J.K.Kolls. Alcohol,host defense and society [J].Nat Rev Immuno1,2002,2:205-209
- [4] Szabo,U. Monocytes,alcohol use,and altered immunity [J].Alcoholism;Clin Exp Res,1998,22:217s-220s
- [5] Cook,R T. Alcohol abuse alcoholism,and damage to the immune system [J].Alcoholism;Clin Exp Res,1998, 22:1927-1942
- [6] J.C. Fernandez-Checa,C. Garera Ruiz A. Colell,et al. Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione [J].Bio Factors,1998,8(1-2):7-11
- [7] C. Gare'la-Ruiz,A. Morales,A. Ballesta,et al. Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes [J].Journal of Clinical investigation, 1994,9(1):193-201
- [8] J.C.Fernandez-Checa,T.Hirano,H. Tsukamoto,et al. Mitochondrial glutathione depletion in alcoholic liver disease[J].Alcohol,1993,10(6):469-475
- [9] Lijun Hao,Yuxi Xic,Guikai Wu. Protective Effect of Hericium erinaceus on Alcohol Induced Hepatotoxicity in Mice [J].Evid Based Complement Alternat Med,2015;418023
- [10] Shinohara M,Ybanez MD,Win S. Silencing glycogen synthase kinasc-3beta inhibits acetamino- phen hepatotoxicity and attenuates JNK activation and loss of glutamate cysteine ligase and myeloid cell leukemia sequence 1 [J].J Biol Chem,2010,285(11):8244-8255
- [11] Mittal SP,Kholc S,Jagadish N. Andrographolide protects liver cells from H2O2 induced cell death by upregulation of Nrf-2/HO-1 mediated via adenosine A2a receptor signaling [J]. Biochim Biophys Acta Nov,2016,1860(11):2377-2390
- [12] Shi Q,Shi X,Zuo U. Anticancer effect of 20 (S)-ginsenoside Rh2 on HepG2 liver carcinoma

- cells;Activating GSK-3 β and degrading β -catenin [J].Oncol Rep,2016,36(4);2059-2070
- [13] Liu D,Mai K,Ghang Y. GSK-3 β participates in the regulation of hepatic lipid deposition in large yellow croaker(Larmichthys crocea)[J].Fish Physiol Biochcm,2016,42(1):379-388
- [14] Liu W,Li J,Cai Y. Hepatic IGF-1R over-expression combined with the activation of GSK-3 β and FOXO3a in the development of livercir- rhosis [J].Life Sci, 2016,15(147):97-102
- [15] Gao Y,Zhang M,Wu T. Effects of D-Pinitol on insulin Resistance through the PI3K/Akt Signaling Pathway in Type 2 Diabetes Mellitus Rats [J].J Agric Food Chcm, 2015,63(26):6019-6026

