

曲格列酮增加 HeLa 细胞的自噬和混合型细胞死亡

张蔚^{1,2}, 孟祥爱³, 闫金国^{1,2}, 姜学军^{1*}

(¹中国科学院微生物研究所, 北京 100101)(²中国科学院研究生院, 北京 100049)

(³山东省章丘市人民医院, 章丘 250200)

摘要:【目的】为了研究 Troglitazone (Trog) 对 HeLa 细胞自噬和程序性细胞死亡的影响。【方法】利用电镜、荧光显微镜、免疫杂交、流式细胞计数等对经 Trog 处理后的 HeLa 细胞进行了细胞发生自噬和死亡情况的观察。【结果】电镜、荧光显微镜的结果均提示, Trog 能够诱导 HeLa 细胞自噬活动的增加; 免疫杂交显示, 该药物能增加自噬相关基因 LC3 的表达, 并于刺激后 4 h 达到高峰; 除了能使细胞凋亡外, Trog 也可以造成细胞的坏死。【结论】上述结果表明, 曲格列酮可以引起混合型细胞死亡。

关键词: 曲格列酮; 过氧化酶体增殖激活受体; 自噬; LC3; 细胞程序性死亡

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 08-1095-05

过氧化酶体增殖激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 属于细胞核激素型受体超家族, 具有配体激活转录因子功能, 分 α 、 β 、 γ 三种类型。最初发现其与脂肪细胞的分化、代谢密切相关。近来的研究表明, 该类受体参与多种重要的细胞生理、病理过程, 包括: 细胞的增殖、炎症、凋亡、血管再生、免疫反应等^[1, 2]。

曲格列酮 (Trog) 是过氧化酶体增殖激活受体 gamma (PPAR γ) 的配体之一, 是该类配体中第一个用于临床治疗 2 型糖尿病的药物, 由于其肝脏毒性大, 在上市 3 年后被美国 FDA 撤出了临床; 尽管如此, 曲格列酮仍被广泛地应用在相关的实验研究中^[3]。PPAR γ 是 3 类受体中研究的较多的一类, 其配体 (又称激动剂) 有两种, 即生理性配体和药理性配体。其中, 生理性配体有 15-脱氧前列腺素 J2 (15d-PGJ2)、白三烯 (LTIM) 和不饱和脂肪酸, 药理性配体有胰岛素增敏剂噻唑烷酮类化合物 (TZDs) 和对心血管病有治疗价值的 fibrate。Trog 就属于噻唑烷酮类化合物, 是 PPAR γ 的高效配体^[4]。该类配体除了能与其自

身的受体结合外, 还可以引起表皮生长因子受体 (EGFR) 的信号转导^[5]。

自噬 (autophagy) 一词来源于希腊语, 意为自体吞噬, 简称自噬。自噬是 20 世纪 60 年代发现的生物现象, 它是指细胞内的溶酶体降解自身细胞器和其他大分子的过程。自噬主要降解长半衰期蛋白, 也是细胞能够完整降解细胞器的唯一途径^[6]。当细胞在缺乏营养或发生应激反应时, 可发生细胞自噬现象。自噬被诱导后, 细胞开始在胞浆中形成直径 300~900 nm 的多层膜的自噬体, 其中包裹着要被降解的物质。随后自噬体与溶酶体发生融合形成自噬溶酶体, 自噬体中的物质在酸性环境和溶酶体酶的共同作用下被降解。通过自噬溶酶体的降解, 蛋白质和其他物质被分解成氨基酸和核苷酸等, 进入三羧酸循环, 产生小分子和能量 (ATP), 再被细胞所利用。因此, 长期以来细胞自噬被认为是细胞的自救行为, 溶酶体参与其中的全过程。但近年发现, 在某些条件下, 过度的细胞自噬也能导致细胞死亡, 是细胞的三大死亡方式之一 (第二类程序性细胞死亡或自噬性细胞死亡)。除

基金项目: 国家自然科学基金(30470855)

*通讯作者。Tel: +86-10-64807558; Fax: +86-10-64807288; E-mail: jiangxj@im.ac.cn

作者简介: 张蔚(1983-), 女, 湖南人, 硕士, 研究方向为细胞与分子生物学。Tel: +86-10-64807589; E-mail: zhangwei_zifeiyu@hotmail.com

收稿日期: 2008-04-14; 修回日期: 2008-05-18

除此之外,自噬还参与细胞生长、分化、细胞防御(如抵制细菌和病毒的入侵)、细胞免疫、肿瘤的发生、组织重塑及适应外界环境等功能的调节^[7,8]。

有研究表明 Trog 可以引起细胞的凋亡反应,但其是否会影响细胞自噬至今还未见报道^[9]。我们发现 PPAR γ 的配体 Trog 能引起 HeLa 细胞的自噬反应;在自噬抑制剂存在的情况下,该配体引起的凋亡受到抑制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒: HeLa 细胞由本实验室提供; GFP-LC3 质粒由日本大阪大学 Tamotsu Yoshimori 教授惠赠。

1.1.2 药品与仪器: 曲格列酮 (Troglitazone)、3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA)、抗 LC3 和 β -actin 的抗体购自 Sigma 公司 (美国)。胎牛血清、lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。质粒提取试剂盒购于博大泰克公司 (中国)。Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒来自 KeyGEN 公司 (中国)。电子显微镜 (JM1230, 日本); 流式细胞仪 (BD 公司, 美国) (Ex=488 nm; Em=530);

1.2 细胞培养

含有 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 细胞培养箱中培养。在 Trog 处理之前,细胞先用 PBS 洗涤 2 次,换成无血清的 DMEM 培养基。

1.3 细胞形态学观察

将细胞接种到 6 孔板内,每孔大约 5.0×10^5 个细胞。培养过夜后,加入 Trog (25 μ mol/L),继续培养,分别于 2、4、6、8 h 在相差显微镜下观察细胞形态的变化。

1.4 荧光显微镜观察

将细胞接种到 6 孔板内,培养过夜,使细胞密度达到 60%~70%。用 lipofectamine 2000 转染 GFP-LC3 质粒 DNA,24 h 后换液。将转染后细胞接种到铺好爬片的 6 孔板中,培养过夜。加入 Trog (25 μ mol/L) 处理细胞 4 h,取出爬片,PBS 洗 3 次,用新配的 4% 多聚甲醛室温固定 10~15 min,然后 PBS 洗 3 次,封片。在荧光显微镜 (Zeiss, 德国) 下观察,对 GFP-LC3 的阳性点数进行统计。

1.5 电镜观察

将细胞接种到 60 mm 培养皿中,培养过夜,加

入 Trog (25 μ mol/L) 处理 8 小时,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,PBS 洗 3 次,加入新配的 4% 多聚甲醛,4 过夜。然后将细胞沉淀放入 1% 的四氧化锇中,室温固定 1 小时,经一系列的乙醇梯度脱水后用氧化丙烯处理 30 min,经树脂包埋切片,固定于铜网上用电镜观察。

1.6 免疫杂交检测

将细胞接种到六孔板内,培养过夜,使细胞密度达到 60%~70%。加入 Trog (25 μ mol/L) 分别处理 1、2、4、8 h 后收集细胞,冷 PBS 洗 2 次,加入细胞裂解液于 4 $^{\circ}$ C 裂解 20 分钟,12000 r/min 离心 20 min,收集上清即为全细胞裂解液。等量样品经过 SDS 凝胶电泳,转膜至硝酸纤维素膜上,硝酸纤维素膜用封闭液室温封闭 2 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,将漂洗后的硝酸纤维素膜放在大小合适的保鲜膜上,在膜上加发光液,放入暗盒中,将 X 光片压于膜上,适当时间后洗片。扫描记录结果,进行灰度值计算。

1.7 流式细胞分析

细胞加入 Trog (25 μ mol/L) 培养 8 h,用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,按照凯基 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒的说明书处理细胞,然后进行流式细胞仪检测。Annexin V-FITC 染色阳性为细胞凋亡、碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 染色阳性为细胞坏死。

1.8 统计学分析

统计对照组和处理组单个细胞中 GFP-LC3 点数,每组至少统计 20 个细胞。数值为正态分布,利用 one-way ANOVA 和 Student-Newman-Keuls 进行数据分析。

2 结果

2.1 Trog 增加 HeLa 细胞的自噬

电子显微镜是观察细胞自噬的最好的方法之一。利用电镜手段,我们发现用 Trog 刺激 HeLa 细胞 8 h,细胞内的自噬体明显增加 (图 1)。

2.2 Trog 引起 HeLa 细胞中 GFP-LC3 点状分布增加

GFP-LC3 被认为是自噬体特异性标签。HeLa 细胞转染 GFP-LC3 后,用 Trog 刺激 4 h,在荧光显微镜下观察并对 GFP-LC3 的点状显色数进行统计。结果显示,相对于对照细胞,Trog 明显增加细胞自噬体的数量 ($P < 0.01$) (图 2)。

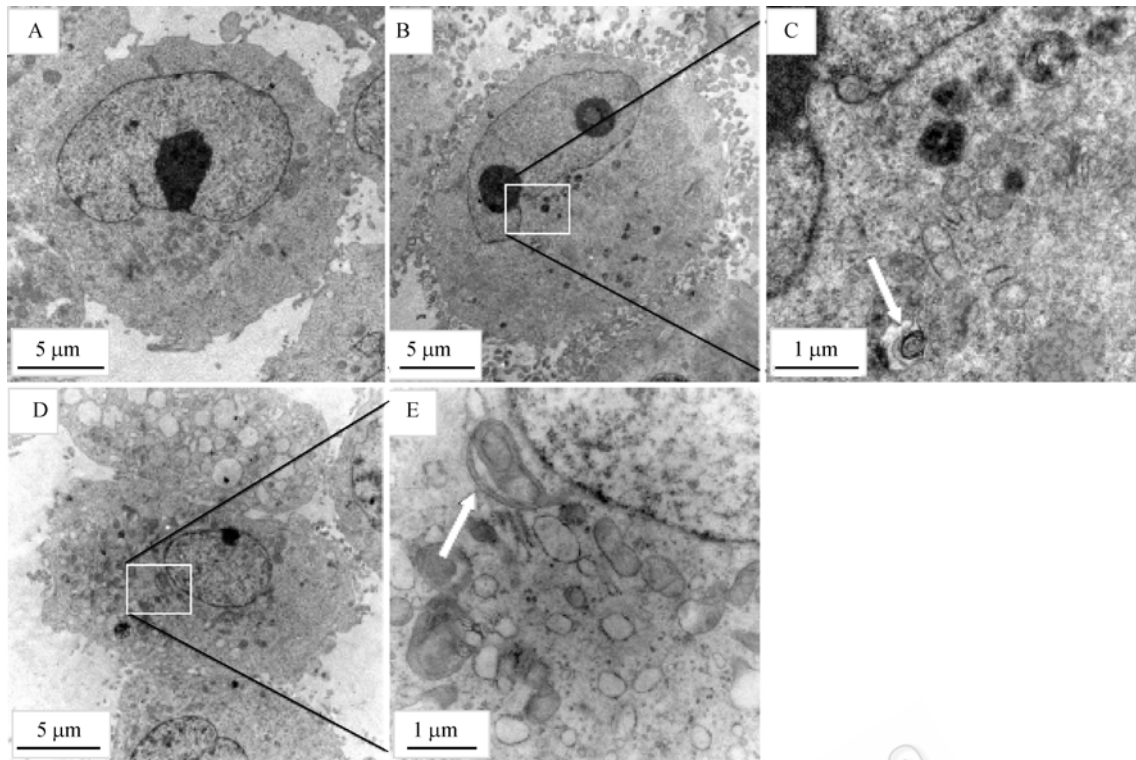


图 1 电镜观察经 Troglitazone 刺激后 HeLa 细胞内自噬体的变化

Fig. 1 Detection of autophagosome formation upon stimulation of troglitazone by transmission electron microscopy. A: cells without treatment as control; B and D: cells were stimulated with troglitazone (25 μmol/L, 8 hours) before observation. C and E: magnified images of optical section in the Middles of B and D. Arrows denote the typical autophagosomes.

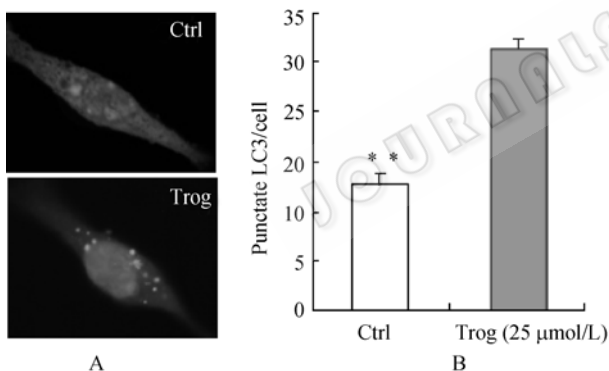


图 2 荧光显微镜观察经 Troglitazone 刺激后 HeLa 中 GFP-LC3 的分布变化

Fig. 2 Detection of the GFP-LC3 displayed in HeLa cells by fluorescence microscopy. A: 24 hours after the transfection of GFP-LC3, HeLa cells were splitted onto coverslips and treated with troglitazone (25 μmol/L, 4 hours) before allowing image; Ctrl means control group, whereas Trogl represents treated. B: The data was presented as the mean of at least 20 cells counted for each group, normally distributed and statistically analyzed using one-way ANOVA and Student-Newman-Keuls analysis. The double asterisk indicates the group is statistically different from the Trogl treated one, P<0.01.

2.3 Troglitazone 引起 LC3-II 蛋白表达量增加

LC3 有两种形式存在(18 kDa, 16 kDa),前体 LC3 合成出来后经过加工形成 LC3-I (18 kDa),后者与自

噬体膜上的磷脂酰乙醇胺结合成为 LC3-II。在自噬增加的情况下, LC3-I 会减少而 LC3-II 会增加。利用免疫杂交,我们检测了经 Troglitazone 刺激后, LC3 蛋白变化情况。结果表明,比较对照组, Troglitazone 会明显的增加 LC3-II 的表达 (图 3)。

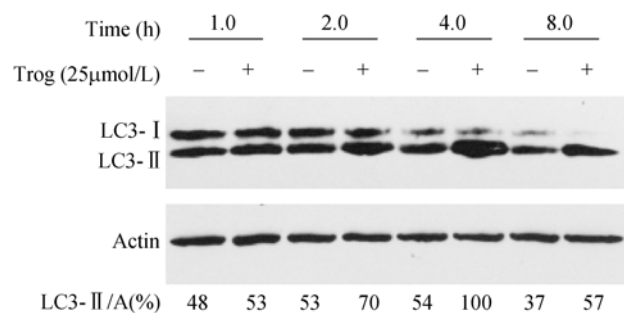


图 3 Troglitazone 增加 LC3-II 蛋白表达

Fig. 3 Detection of the expression of LC3. HeLa cells were treated with troglitazone (25 μmol/L) upon 8 hours. Cells were lysed, electrophoresed on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes, and immune-blotting was carried out using antibodies indicated. Densitometry was performed for quantification and, the ratio of LC3-II and actin was presented below the panels.

2.3 Troglitazone 引起混合型细胞死亡

目前将细胞死亡分为 3 类；凋亡、自噬性细胞死亡和细胞坏死。利用流式细胞计数，我们发现，Troglitazone 不仅可以增加细胞的凋亡，也可以增加细胞的坏死。综合形态学结果进行分析，Troglitazone 可以引起混合型细胞死亡。

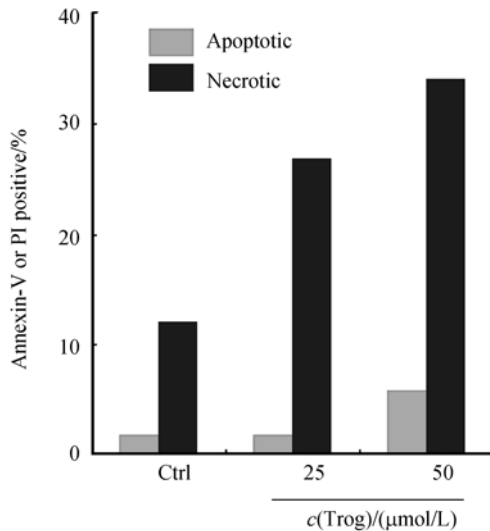


图 4 流式细胞计数检测 Troglitazone 引起的细胞凋亡和坏死

Fig. 4 Detection of programmed cell death by flow cytometry. HeLa cells were incubated with troglitazone (25, 50 μmol/L) upon 8 hours before flow cytometry analysis. Annexin-V staining is considered as apoptotic, whereas PI positive is measured as necrotic.

3 讨论

在该研究中，通过电镜、荧光显微镜以及免疫杂交，我们证实，PPAR γ 的配体曲格列酮 (Troglitazone) 能够增加 HeLa 细胞的自噬反应。据我们所知，这是第一次关于该方面的报道。除了能够增加细胞的自噬外，Troglitazone 还可以引起细胞自噬程序性死亡；而且，流式细胞计数检测的结果充分表明，Troglitazone 引起的是混合型细胞死亡。

很多学者认为，要检测细胞自噬的状况最好利用多种手段，包括电镜、单丹磺酰尸胺 (monodansylcadaverine, MDC) 染色、荧光显微镜观察 GFP-LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) 的变化等^[10]。第一次观察到细胞自噬就是通过电镜，目前也是广泛用于检测细胞自噬的方法。为了减少人为因素造成的偏差，最好用无偏性体视学对所获电镜图像进行定量分析。LC3 是哺乳动物细胞中酵母 ATG8 (Aut7/Apg8) 的同源基因，定位于前自噬泡和自噬泡膜表面，是检测细胞自噬泡的通用标记物。通过构建

LC3 与绿色荧光蛋白 (GFP) 的融合蛋白，借助于荧光显微镜，我们可以很方便的观察到 LC3 在细胞中的定位。由于自噬溶酶体表面的 LC3 比自噬体要少得多，因此，其荧光信号也要减少很多甚至消失^[11]。如果自噬体的直径大于 1 μm，在荧光显微镜下可见其环状结构；直径小的时候，荧光显微镜下表现为点状。自噬增加的情况下，GFP-LC3 大部分呈点状分布，而自噬受抑制时，GFP-LC3 弥散分布于细胞中。从图 2 中可以看出，Troglitazone 能够显著性的增加 GFP-LC3 点数，而对照组细胞 GFP-LC3 呈弥散性分布。最近有人认为，免疫杂交检测 LC3-I 与 LC3-II 之间的变换情况更能客观的反映细胞自噬的状况^[12]。自噬增加的情况下，LC3-II 与 actin 的比值会增加。在该研究中，我们不仅利用电镜和荧光显微镜观察了 Troglitazone 引起细胞自噬的情况；同时，我们的免疫杂交结果也充分显示 Troglitazone 会增加 LC3-II 的表达，表明该药物在一定的时间内会改变细胞的自噬。综合考虑得到的自噬结果和流式检测结果，很有可能，Troglitazone 增加的细胞自噬可能会先于细胞的凋亡。

最新的研究将细胞死亡分为 3 类：细胞凋亡、自噬性细胞死亡和坏死。目前这 3 类细胞死亡均可以被调控^[13]。有研究发现，自噬与凋亡的机制之间关系密切，存在着许多重叠的部分。Bauvy 等研究发现，自噬抑制剂 3-MA 的存在使直肠癌细胞系 HT-29 对 sulindac sulfide 引起的细胞凋亡更敏感^[14]。Boya 等发现，在自噬抑制剂存在或自噬相关基因被敲除的条件下，HeLa 细胞通过凋亡途径而死亡^[15]。而另有一些观点则认为自噬是凋亡必需的，自噬受到抑制会延缓凋亡的发生，此时细胞死亡能被自噬抑制剂如 3-MA 抑制，但不能被 caspase 抑制剂抑制。在神经元中，自噬机制通过调控线粒体介导的细胞凋亡与程序性细胞死亡联系起来^[16]。在肝癌细胞系中，Yoshizawa 等人发现 Troglitazone 通过上调细胞周期依赖性激酶抑制剂 P27 和 P21 来抑制细胞的增殖；且可以引起细胞的 caspase 依赖的和非依赖的细胞凋亡^[17]。最近有研究表明，Troglitazone 的类似物 ciglitazone 也可以诱导 caspase 非依赖性的细胞凋亡^[18]。目前通常认为所谓的细胞 caspase 非依赖性死亡与细胞自噬性死亡的关系甚为密切^[19]。我们的研究也发现，在有血清的情况下，3-MA 增加了 Troglitazone 引起的细胞凋亡，细胞死亡数没有明显的改变；而在无血清的条件下，3-MA 可以抑制部分的细胞死亡 (结果未列出)。因此，我们有

理由相信, Troglitazone 除了能够引起细胞的凋亡外, 还可以造成细胞的自噬型程序性死亡。由于自噬与凋亡之间以及自噬型死亡与凋亡之间仍然存在着很多不明之处, 因此, 需要今后进行大量、细致的研究。总之, 我们认为, 该研究不仅有利于此类工作在哺乳类细胞的展开, 同时, 也将会对今后在其他真核细胞(如酵母细胞)开展有关自噬的研究具有较好的借鉴作用。

参 考 文 献

- [1] Issenmann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 1990, 347: 645–650.
- [2] Keshamouni VG, Arenberg DA, Reddy RC, et al. PPAR-gamma activation inhibits angiogenesis by blocking ELR+CXC chemokine production in non-small cell lung cancer. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 2005, 7: 294–301.
- [3] Shearer BG, Hoekstra WJ. Recent advances in peroxisome proliferator-activated receptor science. *Curr Med Chem*, 2003, 10: 267–280.
- [4] Zhou YM, Wen YH, Kang XY, et al. Troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, induces growth inhibition and apoptosis of HepG2 human liver cancer cells. *World J Gastroenterol*, 2008, 14: 2168–2173.
- [5] Gardner OS, Dewar BJ, Earp HS, et al. Dependence of peroxisome proliferator-activated receptor ligand-induced mitogen-activated protein kinase signaling on epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem*, 2003, 278: 46261–46269.
- [6] Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, 2005, 12: 1542–1555.
- [7] Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7: 767–777.
- [8] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004, 306: 990–995.
- [9] Li M, Lee TW, Yim AP, et al. Apoptosis induced by troglitazone is both peroxisome proliferator-activated receptor-gamma- and ERK-dependent in human non-small lung cancer cells. *J Cell Physiol*, 2006, 209: 428–438.
- [10] Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 2008, 4: 151–175.
- [11] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J*, 2000, 19: 5720–5728.
- [12] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 2007, 3: 542–545.
- [13] Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16: 663–669.
- [14] Bauvy C, Gane P, Arico S, et al. Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the human intestinal colon cancer cell line HT-29. *Exp Cell Res*, 2001, 268: 139–149.
- [15] Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, et al. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 1025–1040.
- [16] Wand Y, Han R, Liang ZQ, et al. An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons induced by the non-N-methyl-D-aspartate receptor agonist kainic acid. neuronal injury. 2008, *Autophagy*, 4: 214–226.
- [17] Yoshizawa K, Cioca DP, Kawa S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand troglitazone induces cell cycle arrest and apoptosis of hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer*, 2002, 95: 2243–2251.
- [18] Kwon CH, Yoon CS, Kim YK. Ciglitazone induces caspase-independent apoptosis via p38-dependent AIF nuclear translocation in renal epithelial cells. *Toxicol* 2008, 244:13–24.
- [19] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol*, 2007, 78: 217–245.

Stimulating autophagosome formation and inducing mixed cell death in HeLa cells by Troglitazone

Wei Zhang^{1,2}, Xiang'ai Meng³, Jinguo Yan^{1,2}, Xuejun Jiang^{1*}

¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

² Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

³ Zhangqiu People's Hospital of Zhangqiu City, Shandong Province, Zhangqiu 250200, China)

Abstract: [Objective] To study the effect of troglitazone on autophagy and programmed cell death of HeLa cells. [Methods] Fluorescence microscopy, electron microscopy, western-blotting and flow cytometry were used. [Results] Troglitazone increased the autophagosome formation of HeLa cell as observed by fluorescence and electron microscopy. Immunoblotting further confirmed cell morphology observation upon the reagent stimulating by detecting an enhanced expression of LC3, an autophagic related gene. Besides apoptosis, troglitazone triggered a necrotic cell death in flow cytometry analysis. [Conclusion] Troglitazone induced mixed type of cell death in HeLa cells.

Keywords: troglitazone; PPAR; autophagy; LC3; programmed cell death

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470855)

*Corresponding author. Tel: +86-10-64807558; Fax: +86-10-64807288; E-mail: jiangxj@im.ac.cn

Received: 14 April 2008/ Revised: 11 May 2008