

## 金属硫蛋白降低 GRP78 和 CHOP 蛋白表达减轻大鼠砷中毒肝细胞凋亡

薛启祥<sup>1</sup>, 沈 雪<sup>1</sup>, 田 甜<sup>1</sup>, 韩 冰<sup>1</sup>, 谢汝佳<sup>1</sup>, 何 艳<sup>2</sup>, 杨 勤<sup>1\*</sup>

(贵阳医学院 1. 病理生理学教研室; 2. 生理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

**摘要:**目的 研究葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、C/EBP 环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白 (CHOP) 在金属硫蛋白 (MT) 减轻大鼠砷中毒肝细胞凋亡中的作用。方法 建立 MT 治疗亚砷酸钠 ( $\text{NaAsO}_2$ ) 诱导的大鼠砷中毒肝损伤模型, 用 MT 治疗 2 周, 以 TUNEL 法检测肝细胞凋亡, 免疫组化法、Western blot 检测大鼠肝脏 GRP78、CHOP 蛋白表达。结果 砷中毒模型组大鼠肝细胞凋亡、肝组织 GRP78 和 CHOP 蛋白表达较对照组显著升高 ( $P < 0.05$ ), MT 治疗组肝细胞凋亡、肝组织 GRP78 和 CHOP 蛋白表达明显回降 ( $P < 0.05$ ), 但仍然高于对照组 ( $P < 0.05$ )。结论 MT 可通过降低 GRP78 和 CHOP 蛋白表达减轻大鼠砷中毒所致的肝细胞凋亡。

**关键词:** 金属硫蛋白; 砷中毒; 肝损伤; 凋亡; 内质网应激; 葡萄糖调节蛋白 78; C/EBP 环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白

中图分类号: R363 文献标志码: A

## Metallothionein decreases the expression of GRP78 and CHOP proteins followed by apoptosis of liver cells in arsenic poisoning rats

XUE Qi-xiang<sup>1</sup>, SHEN Xue<sup>1</sup>, TIAN Tian<sup>1</sup>, HAN Bing<sup>1</sup>, XIE Ru-jia<sup>1</sup>, HE Yan<sup>2</sup>, YANG Qin<sup>1\*</sup>

(1. Dept. of Pathophysiology; 2. Dept. of Physiology, Guiyang Medical College, Guizhou 550004, China)

**Abstract: Objective** To investigate the function of GRP78 and CHOP in the process of reducing apoptosis of liver cells in arsenic poisoning rats by metallothionein. **Methods** The model of  $\text{NaAsO}_2$ -induced liver injury and then treated with MT for two weeks was established. Apoptosis in liver was detected by TUNEL method. The expression levels of GRP78 and CHOP proteins in liver tissue were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** The apoptosis of liver cells and the expression of GRP78 and CHOP proteins in the arsenic poisoning model group were higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). The apoptosis of liver cells and the expression of GRP78 and CHOP proteins in the treatment group with MT were lower than that of the arsenic poisoning model group ( $P < 0.05$ ), but still higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** MT may reduce apoptosis of liver cells in arsenic poisoning rats by decreasing expression of GRP78 and CHOP proteins.

**Key words:** metallothionein; arsenic poisoning; liver injury; apoptosis; endoplasmic reticulum stress; GRP78; CHOP

砷是严重危害人体健康的环境毒物。流行病学调查和动物实验表明砷中毒可引起不同程度的肝脏损伤<sup>[1]</sup>, 并且砷致肝损伤的发生机制中有细胞凋亡参

与<sup>[2]</sup>。内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 途径是继线粒体途径和死亡受体途径后新发现的又一个诱导细胞凋亡的途径, 并且 ERS 诱导的细

收稿日期: 2014-12-26 修回日期: 2015-03-30

基金项目: 国家自然科学基金 (81100284, 81460484)

\* 通信作者 (corresponding author): qinyang@gmc.edu.cn

胞凋亡在中毒性肝病、非酒精性脂肪肝、病毒性肝炎等所致的肝损伤中发挥了重要作用<sup>[3]</sup>。有研究发现金属硫蛋白(metallothionein, MT)对急性化学性肝损伤有一定的保护作用<sup>[4]</sup>。MT能否通过减少ERS减轻砷中毒肝细胞凋亡尚未见研究报道。本研究拟观察MT治疗大鼠砷中毒肝损伤过程中肝组织ERS相关蛋白葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein78, GRP78)、C/EBP环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)和肝细胞凋亡三者的表达并探讨其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

清洁级雄性Wistar大鼠24只, 体重150~180 g [贵阳医学院实验动物中心(许可证号: SCXK(黔)2002-0001)]; 亚砷酸钠( $\text{NaAsO}_2$ ) (Sigma公司); MT(上海源叶公司); 超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所); 组织细胞裂解液和BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京鼎国昌盛公司); PVDF膜、ECL发光试剂(Millipore公司); CHOP抗体(Bioworld公司);  $\beta$ -actin抗体(Cell Signaling公司); GRP78抗体DAB显色试剂盒和TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德公司); DAPI染色试剂盒(南京凯基公司)等。

### 1.2 方法

1.2.1 模型复制: 将大鼠随机分为对照组、砷中毒模型组和MT治疗组, 每组8只。给予砷中毒模型组大鼠含200 mg/L的 $\text{NaAsO}_2$ 自来水溶液, 饮用8周后改用自来水2周。MT治疗组大鼠于8周后停止饮用 $\text{NaAsO}_2$ 自来水溶液, 改用自来水并开始隔日1次按2 mL/100 g体重给予浓度为200 mg/L的MT溶液灌胃, 继续喂养2周。

1.2.2 标本采集: 实验结束后大鼠股动脉放血处死, 收集血清, 检查肝功能指标; 留取右叶部分肝组织用4%甲醛溶液固定, 其余肝组织置-80℃低温冰箱冻存。

1.2.3 生化检测: 用全自动生化分析仪检测血清ALT、AST水平, 按照相应测定试剂盒说明书操作检测肝组织匀浆SOD活性。

1.2.4 组织学检测: 肝组织石蜡包埋, 常规制片, HE染色, 光学显微镜下观察肝组织损伤变化。

1.2.5 TUNEL法检测凋亡: 肝组织切片常规脱蜡

入水, 滴加ProteinaseK, 37℃消化10 min, 滴加含TdT和DIG-d-UTP的标记液, 37℃湿盒中标记2 h, 滴加封闭液, 37℃封闭30 min, 滴加生物素化抗地高辛抗体(1:100), 37℃反应30 min, 滴加SABC-FITC+POD(1:100), 37℃反应30 min, DAPI染色液复染细胞核, 室温避光反应10 min, 洗去DAPI染液, 封片。荧光显微镜观察1个视野, 在以490/45 nm激发光激发时显示明亮黄绿光染色, 同时在以340/380 nm激发光激发时显示强蓝光的细胞为阳性细胞。高倍镜下随机观察8个视野, 以每100个细胞中凋亡细胞平均个数作为凋亡指数(apoptosis index, AI)。

1.2.6 免疫组化法检测: 采用SABC法, 严格按照试剂盒说明书操作。I抗浓度均为1:100, 阴性对照以PBS液代替I抗。光镜下观察细胞染成棕黄色为阳性细胞, 观察GRP78和CHOP在肝细胞的表达, 用BI-2000医学图像分析系统测定平均吸光度(average absorbance, AA值)。

1.2.7 Western blot法检测: 取-80℃冻存肝组织称重, 裂解, 匀浆后取上清, BCA蛋白浓度测定法测定样品总蛋白浓度。10% SDS-PAGE分离, 转膜, 常温封闭1 h, 分别加入 $\beta$ -actin I抗(1:200)、GRP78 I抗(1:400)、CHOP I抗(1:600)置4℃冰箱振荡孵育过夜。次日洗膜, 加入II抗(1:4000)室温孵育1 h, ECL化学发光显影, 凝胶图像分析系统扫描分析, 目的蛋白的相对表达水平为目的蛋白的吸光度值与 $\beta$ -actin蛋白的吸光度值之比。

### 1.3 统计学分析

用SPSS19.0统计软件进行分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 均数比较用方差分析, 如方差不齐, 采用秩和检验。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠血清生化指标及肝组织SOD活性测定结果

砷中毒模型组血清ALT、AST水平较对照组明显增高( $P < 0.05$ ), MT治疗组血清ALT、AST水平明显回降( $P < 0.05$ ), 但仍然高于对照组( $P < 0.05$ )。砷中毒模型组肝组织SOD活性较对照组明显降低( $P < 0.05$ ), MT治疗组肝组织SOD活性明显回升( $P < 0.05$ ), 但仍然低于对照组( $P < 0.05$ ) (表1)。

2.2 各组大鼠肝脏组织病理形态学观察

对照组大鼠肝细胞以中央静脉为中心,呈放射状排列,无肝细胞变性、坏死及炎性细胞浸润,肝小叶结构完整;砷中毒模型组大鼠门管区少许炎性细胞浸润,肝细胞胞质疏松,有不同程度的气球样变性;MT 治疗组大鼠肝细胞以中央静脉为中心,呈放射状排列,无肝细胞变性、坏死及炎性细胞浸润,肝小叶结构完整,近似于对照组(图 1)。

2.3 各组大鼠肝细胞凋亡检测

砷中毒模型组肝细胞 AI 较对照组明显增高

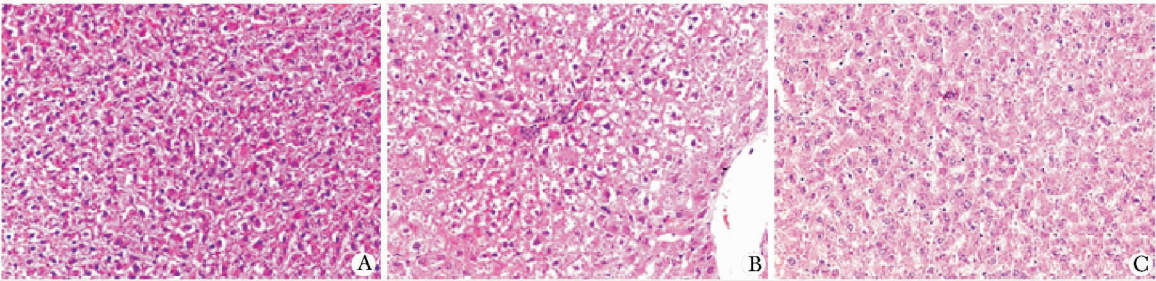
表 1 各组大鼠血清生化指标及肝组织 SOD 活性测定结果

Table 1 The levels of serum ALT/AST and hepatic SOD in each groups rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

group	ALT( U/L)	AST( U/L)	SOD( U/mgprot)
control	22. 65 $\pm$ 1. 36	43. 63 $\pm$ 4. 55	111. 51 $\pm$ 6. 42
model	99. 04 $\pm$ 7. 53 *	134. 21 $\pm$ 15. 30 *	45. 46 $\pm$ 6. 74 *
treatment	38. 89 $\pm$ 7. 23 *#	65. 61 $\pm$ 9. 08 *#	91. 51 $\pm$ 5. 31 *#

\* $P < 0.05$  compared with control group; # $P < 0.05$  compared with model group.

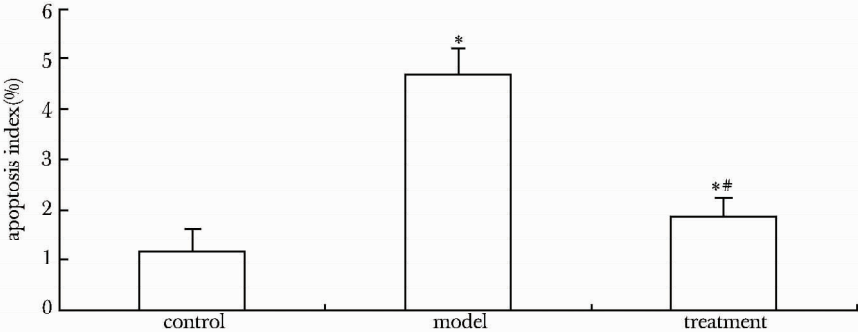
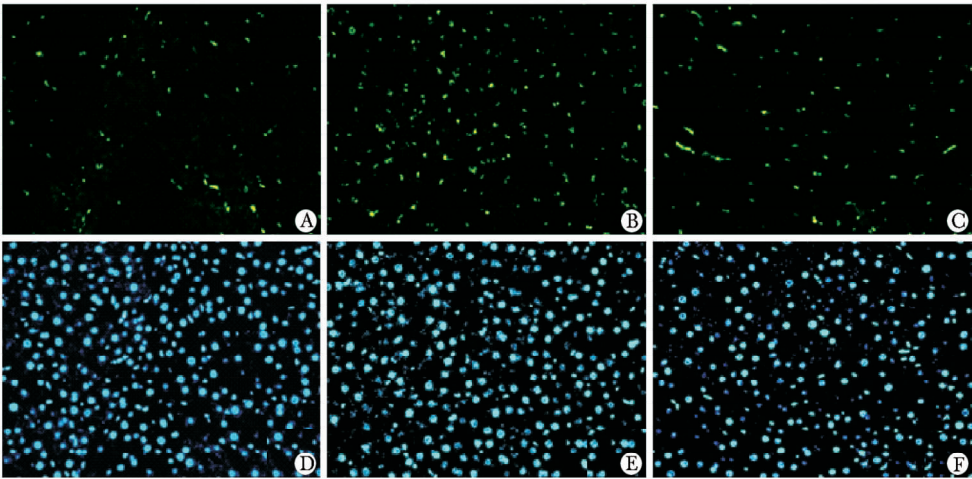
( $P < 0.05$ ),MT 治疗组肝细胞 AI 明显回降,但仍然高于对照组( $P < 0.05$ )(图 2)。



A. control group; B. model group; C. treatment group

图 1 各组大鼠肝组织 HE 染色结果

Fig 1 HE staining in rats' hepatic tissue of each group (  $\times 200$  )



A ~ C. TUNEL staining; D ~ F. DAPI staining; A, D. control group; B, E. model group; C, F. treatment group; \* $P < 0.05$  compared with control group; # $P < 0.05$  compared with model group

图 2 TUNEL 法结合 DAPI 法检测肝细胞凋亡指数

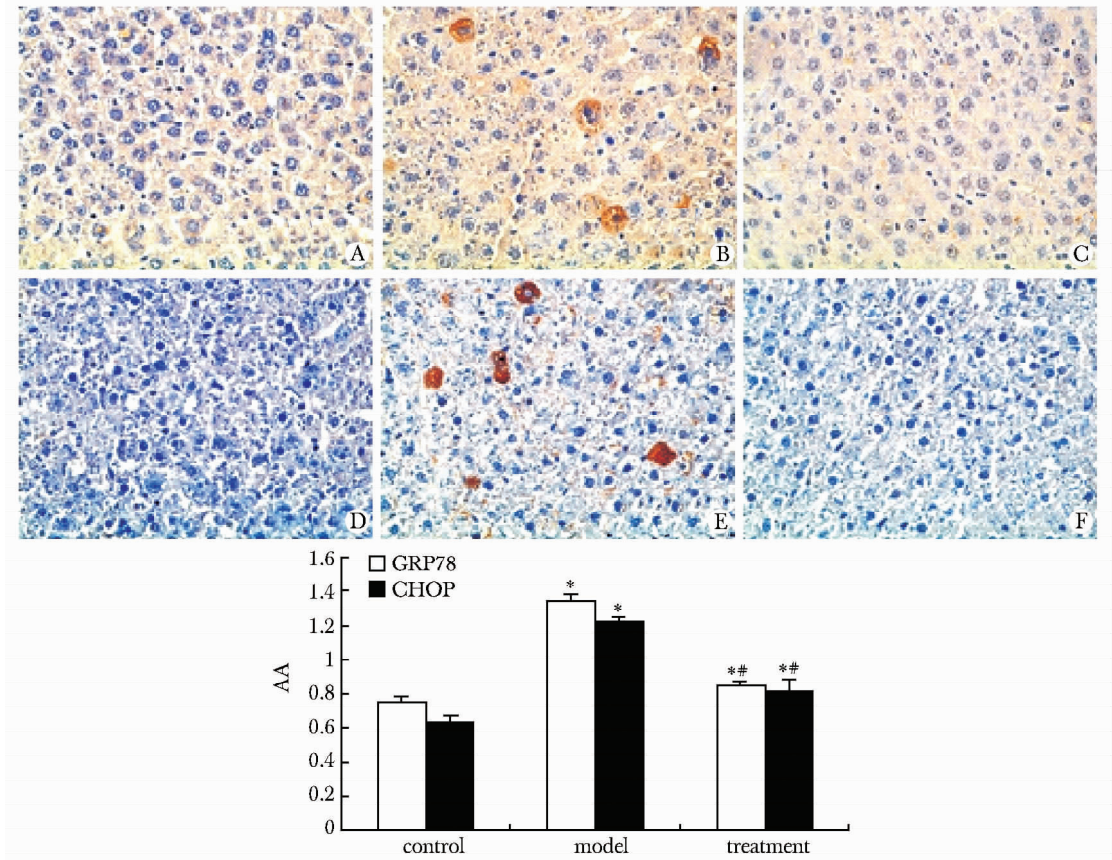
Fig 2 Apoptosis of liver cells detected by TNNEL and DAPI staining (  $\times 200$  )

2.4 各组大鼠肝组织 GRP78 和 CHOP 表达免疫组化法检测

正常对照组大鼠肝组织鲜见 GRP78 和 CHOP 表达阳性细胞;砷中毒模型组大鼠肝组织中可见较多棕黄色染色的阳性细胞,且呈胞质表达阳性;治疗组大鼠肝组织中也鲜见 GRP78 和 CHOP 阳性表达的细胞(图 3)。

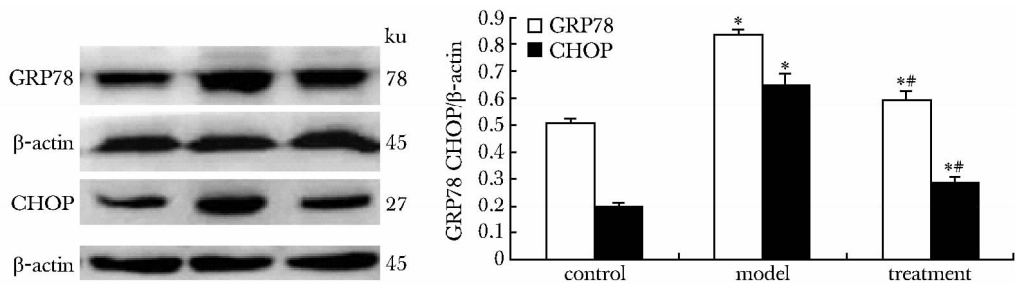
2.5 各组大鼠肝脏 GRP78 和 CHOP 蛋白表达水平 Western blot 检测

砷中毒模型组肝组织 GRP78 和 CHOP 蛋白表达量较对照组明显增高( $P < 0.05$ ),MT 治疗组肝组织 GRP78 和 CHOP 蛋白表达量明显回降( $P < 0.05$ ),但仍然高于对照组( $P < 0.05$ )(图 4)。



A ~ C. GRP78 group; D ~ F. CHOP group; A, D. control group; B, E. model group; C, F. treatment group; \* $P < 0.05$  compared with control group; # $P < 0.05$  compared with model group

图 3 免疫组化法检测大鼠肝组织 GRP78 和 CHOP 蛋白表达  
Fig 3 The expression of GRP78 and CHOP proteins in liver of each group rats (SABC,  $\times 400$ )



\* $P < 0.05$  compared with control group; # $P < 0.05$  compared with model group

图 4 Western blot 检测大鼠肝脏 GRP78 和 CHOP 蛋白表达水平  
Fig 4 The expression of GRP78 and CHOP proteins in liver of each group rats detected by Western blot



### 3 讨论

目前对砷中毒肝损伤的发生机制及防治的研究发现砷在肝脏内代谢过程中可产生大量的氧自由基,引起的肝细胞凋亡增加是砷中毒致肝损伤的主要因素之一<sup>[5]</sup>。有研究发现 MT 对 CCl<sub>4</sub> 肝损伤的保护作用很可能与 MT 提高组织抗氧化能力、清除过多的自由基有关<sup>[4]</sup>。还有研究发现 MT 可能参与了砷暴露大鼠肝损伤的发生过程,汉丹肝乐可能是通过其诱导砷暴露大鼠肝脏 MT 表达,提高抗氧化效应而起到保护肝细胞的作用<sup>[6]</sup>。

本研究复制砷中毒致大鼠肝损伤及 MT 治疗动物模型。肝组织病理形态学结合反映肝损伤的重要生化指标 ALT、AST 显示砷中毒模型组肝损伤复制成功,MT 治疗组肝损伤得到改善。砷中毒模型组肝组织 SOD 活性明显降低,肝细胞凋亡明显增高,MT 治疗组肝组织 SOD 活性明显回升,肝细胞凋亡明显回降。提示 MT 通过其抗氧化作用减轻肝细胞氧化损伤,从而减少大鼠砷中毒肝细胞凋亡,对大鼠砷中毒肝损伤起保护作用。

目前研究发现砷可能通过上调 Fas/FasL 和 Bax 的表达<sup>[2]</sup>及启动 P53 介导的线粒体凋亡通路导致的

肝细胞凋亡从而引起肝损伤发生<sup>[7]</sup>。ERS 通路是新发现的又一致细胞凋亡机制<sup>[8]</sup>。GRP78 作为内质网稳态的感受器,是启动 ERS 关键因子之一<sup>[9]</sup>。当细胞发生 ERS 时,表达增多的 GRP78 可通过 3 个内质网跨膜蛋白启动其下游的信号分子 CHOP 蛋白表达增加而介导细胞凋亡<sup>[10]</sup>。CHOP 蛋白是一个特异性的 ERS 转导因子<sup>[11]</sup>,是 ERS 通路中一个由抗凋亡向促凋亡转换的重要的信号分子<sup>[12]</sup>。

免疫组化法和 Western blot 法均显示 ERS 的标志蛋白 GRP78 和 ERS 诱导的细胞凋亡信号蛋白 CHOP 的表达量在砷中毒模型组肝组织均较对照组都明显增高,在 MT 治疗组都明显回降,与肝细胞凋亡变化和肝损伤一致。提示砷中毒致大鼠肝损伤中存在 ERS 通路的激活,ERS 诱导的细胞凋亡参与了砷中毒致大鼠肝损伤发生机制,并与肝组织的抗氧化能力降低相关。

综上所述,本研究提示在治疗大鼠砷中毒肝损伤过程中,MT 可能通过其抗氧化作用减轻肝细胞氧化损伤<sup>[6]</sup>,有减少肝细胞 ERS,降低 GRP78 和 CHOP 的表达,从而减轻 ERS 诱导的肝细胞凋亡,达到改善肝损伤的目的。上述结果为使使用 MT 治疗砷中毒肝损伤提供了新的思路。

### 参考文献:

- [1] 李玲,吴君,蒋玲,等. 不同价态饮水型砷暴露对小鼠肝脏的损伤作用[J]. 第二军医大学学报,2008,29:499-503.
- [2] Yang DP,Li J,Huang XX, *et al.* Apoptosis in arsenic poisoning hepatic injury caused by coal burning[J]. J Mil Surg Southwest China,2005,7:1-3.
- [3] Zhang XQ,Xu CF,Yu CH, *et al.* Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20:1768-1776.
- [4] 王毅,徐松柏,谷斌斌,等. 金属硫蛋白对急性化学性肝损伤的保护作用研究[J]. 上海预防医学杂志,2008,20:528-530.
- [5] 钟源霞,孙文长. 砷暴露对肝脏、肾脏氧化损害的研究进展[J]. 大连医科大学学报,2013,35:77-80.
- [6] 王一帆,程明亮,吴君. 复方中药制剂对砷暴露大鼠肝脏损伤的保护研究[J]. 当代医学,2014,20:18-19.
- [7] 谢婷婷,张爱华. p53 介导的线粒体凋亡通路在燃煤型砷中毒大鼠肝损伤中的作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2014,28:210-215.
- [8] 陈文强,于森,李健. 内质网应激反应诱导细胞凋亡研究[J]. 哈尔滨商业大学学报,2014,30:21-24.
- [9] Mu YP,Ogawa T,Kawada N. Reversibility of fibrosis, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in the liver of rats fed a methionine-choline-deficient diet[J]. Lab Invest,2010,90:245-256.
- [10] Hotamisligil G S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease[J]. Cell,2010,140:900-917.
- [11] 吴芳,安永康,朱艳琴. 内质网应激与肿瘤细胞凋亡研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2014,22:2228-2231.
- [12] 袁小青,马向华,沈捷. 核转录因子 CHOP 研究进展[J]. 医学研究杂志,2008,37: 15-18.