

人肝细胞氧化应激模型中热休克蛋白 90 α 对细胞周期蛋白 B1 的降解调控机制研究

段丹萍¹, 黄婷苑², 刘晨阳³, 李艳³, 李燕茹¹, 邹飞³, 王致¹, 陈雪梅³

1. 广州市职业病防治院 广州市第十二人民医院职业环境与健康重点实验室, 广东 广州 510620; 2. 广州市疾病预防控制中心慢性非传染性疾病预防与控制部, 广东 广州 510440; 3. 南方医科大学公共卫生学院职业卫生与职业医学系, 广东 广州 510515

摘要: **目的** 观察人肝细胞(L02)氧化应激模型中热休克蛋白 90 α (heat shock protein 90 α , Hsp90 α) 和相关底物蛋白细胞周期蛋白 B1 (Cyclin B1) 的蛋白水平变化, 以及 Hsp90 α 表达下调后对 Cyclin B1 表达的影响, 明确 Hsp90 α 对 Cyclin B1 功能的影响, 为氧化应激相关的肝脏疾病防治提供新思路。 **方法** 以 200 μ M H₂O₂ 建立氧化应激 L02 细胞损伤模型; 通过 CCK-8 法观察氧化应激对细胞存活的影响, 比色法测定细胞内谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量, 流式细胞术检测细胞周期, 免疫印迹法检测氧化应激对细胞内 Hsp90 α 及 Cyclin B1 蛋白水平的影响。 **结果** 随着氧化应激刺激时间的延长, GSH 含量逐渐减少, 抗氧化能力不断降低。从 6 h 开始, 胞内 GSH 水平较对照组明显下降 (均 $P < 0.05$); H₂O₂ 对 L02 细胞增殖的抑制程度增强; 氧化应激后细胞周期检测点 G2/M 期阻滞明显; 氧化应激导致胞内 Hsp90 α 蛋白水平先增加后降低, 在刺激 24 h 时 Hsp90 α 表达出现明显下降, Cyclin B1 蛋白水平则在 24 h 明显增加, 与对照组相比, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。 **结论** 氧化应激可动态影响细胞内 Hsp90 α 及 Cyclin B1 蛋白表达水平; 氧化应激下, Hsp90 α 表达降低可影响与 G2/M 期调节有关的底物蛋白 Cyclin B1 水平, Hsp90 α 对 Cyclin B1 功能维持起保护性作用。

关键词: 人肝细胞 L02; H₂O₂; 氧化应激; 热休克蛋白 90 α ; 细胞周期蛋白 B1; G2/M 期阻滞

中图分类号: R575.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2023)02-0152-05 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2023.02.006

Effect of heat shock protein 90 α on Cyclin B1 in L02 cells under oxidative stress

DUAN Dan-ping¹, HUANG Ting-yuan², LIU Chen-yang³, LI Yan³, LI Yan-ru¹, ZOU Fei³, WANG Zhi¹, CHEN Xue-mei³

1. Guangzhou Hospital for Occupational Disease Prevention and Treatment, Key Laboratory of Occupational Environment and Health, Guangzhou Twelfth People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510620, China;

2. Department of Chronic Non-communicable Disease Prevention and Control, Guangzhou Municipal Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong 510440, China;

3. Department of Occupational Health and Occupational Medicine, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China

Corresponding authors: CHEN Xue-mei, E-mail: cxmcsz@smu.edu.cn; WANG Zhi, E-mail: zhi_wang@outlook.com

Abstract: **Objective** To observe the changes of heat shock protein 90 α (Hsp90 α) and Cyclin B1 in L02 cells under the condition of oxidative stress, to detect the changes of Cyclin B1 activity after down-regulated expression of Hsp90 α , to identify the effect of Hsp90 α on the function of Cyclin B1, and to provide a novel idea for prevention and control of liver disease related to oxidative stress. **Methods** We established a model for oxidative stress in L02 cells induced by 200 μ M H₂O₂, and then used CCK-8 method to observe the effect of oxidative stress on cell survival. The intracellular levels of glutathione (GSH) were observed by colorimetric method. Flow cytometer was used to examine the cell cycle. The effect of oxidative stress on intracellular synthesis of Hsp90 α and Cyclin B1 was detected by Western-blotting. **Results** Under 200 μ M H₂O₂ concentration, the intracellular levels of GSH were negatively time dependent, and the antioxidant capacity was continuously reduced. Compared with the control group, the intracellular levels of GSH significantly decreased after 6 hours stimulation (all $P < 0.05$). The inhibition of cell proliferation was time dependent. G2/M phase arrest in L02 cells after oxidative stress was significant. Oxidative stress led to first increased and then decreased intracellular expression of Hsp90 α . The expression of Hsp90 α decreased significantly after 24 hours stimulation, while Cyclin B1 expression increased significantly, showing statistically significant differences as compared with the control group

基金项目: 国家自然科学基金 (81171876, 82072105); 广州市卫生健康科技项目 (20201A010037)

作者简介: 段丹萍 (1987-), 女, 硕士研究生, 副主任医师, 主要从事职业病防控工作。

通信作者: 陈雪梅, E-mail: cxmcsz@smu.edu.cn; 王致, E-mail: zhi_wang@outlook.com。

(both $P < 0.05$). **Conclusion** Oxidative stress can dynamically affect the intracellular expression of Hsp90 α and Cyclin B1, suggesting that in this process, Hsp90 plays a protective role, reduces the direct damage caused by stress, and maintains the stability of Cyclin B1 function.

Keywords: L02 cell; H₂O₂; oxidative stress; Hsp90 α ; Cyclin B1; G2/M phase arrest

氧化应激是肝脏疾病发生发展的重要机制之一^[1-3], 当体内活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的产生超过细胞抗氧化能力时, 就会发生氧化应激, 导致肝脏细胞和组织氧化损伤, 最终使细胞坏死或凋亡^[4-5]。在细胞模型中, 氧化剂、高温均可诱导氧化应激的发生, 并与多种信号转导通路机制有关, 氧化应激相关的治疗策略已被运用到肝脏疾病的治疗中^[6-7]。热休克蛋白 90(heat shock protein 90, Hsp90)是与应激密切相关的保护性分子^[8], 主要包括两种亚型, 分别为应激诱导下表达升高的 Hsp90 α 和结构性表达的 Hsp90 β ^[9], 如高温、缺血和过氧化等多种应激因素均可诱导其生成增加^[10-11]。此外, 由于 Hsp90 作用的 200 多种底物与多个关键细胞信号转导通路密切相关^[12], 并与疾病的发生发展及其预后有密切的关系, 已成为临床治疗的重要靶点。作为 Hsp90 的底物蛋白之一, 细胞周期蛋白 B1(Cyclin B1)是细胞增殖过程中参与周期调控的关键蛋白, 在细胞周期检查点 G2/M 期具有调控细胞周期的重要作用, 表达水平随细胞周期进程而动态变化^[13-14], 其异常增高可导致细胞周期的调节失控, 造成细胞过度增殖, 是肝脏疾病发生的重要原因^[15]。本研究旨在借助 L02 体外细胞模型, 研究氧化应激与肝脏疾病的可能关系, 初步探讨在氧化应激诱导的 G2/M 期阻滞中 Hsp90 α 对 Cyclin B1 的降解调控机制, 为肝脏疾病的防治提供科学基础。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 人肝细胞株 L02 细胞(南方医科大学公共卫生学院职业卫生实验室保存); 胎牛血清、RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司); 酶标仪(美国 Bio-Rad Laboratories 公司); 流式细胞仪(美国 GUAVA Millipore 公司); Bradford DC 蛋白质定量试剂盒(美国 BIO-RAD 公司); Hsp90 α 大鼠单抗、Cyclin B1 小鼠单抗(美国 Santa Cruz 公司); 细胞计数试剂-8(Cell Counting Kit-8, CCK-8)(日本 Dojindo 公司); 谷胱甘肽(glutathione, GSH)(南京建成生物工程研究所); H₂O₂(广州化学试剂厂)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 L02 细胞接种至 24 孔板、96 孔板及 100 ml 培养瓶中, 用含 10% 胎牛血清的 1640 培

养基(青霉素和链霉素各 100 000 U/L)在 37 °C, 含有 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 细胞融合至 70% 进行实验。

1.2.2 H₂O₂ 诱导细胞氧化损伤模型建立 将人肝细胞株 L02 细胞接种至 96 孔板中, 培养 24 h 后, 进行 H₂O₂ 不同时间浓度梯度刺激培养, 共分为 8 组: 对照组和 3 种 H₂O₂ 浓度(100 μ M、200 μ M、300 μ M) H₂O₂ 刺激 2 h 组、4 h 组、6 h 组、8 h 组、10 h 组、12 h 组、24 h 组。根据细胞活性数据, 浓度为 200 μ M 的 H₂O₂ 诱导的细胞损伤呈中等状态, 因此以此浓度作为后续实验的造模条件。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞活力 取对数生长期的 L02 细胞, 以 0.25% 胰酶消化、计数、接种于 96 孔培养板内, 使每孔细胞密度为 1.0×10^5 个, 每组设 5 个平行孔并设不含细胞的空白对照, 37 °C 培养 24 h 使细胞贴壁, 每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂, 继续培养 4 h, 酶标仪检测各孔 A 值($\lambda = 450$ nm), 计算细胞存活率。细胞存活率(%) = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.2.4 GSH 检测 200 μ M H₂O₂ 作用后, 胰酶消化细胞, PBS 洗一次, 低速离心收集沉淀细胞, 再加入 500 μ l PBS 制成细胞悬液, 超声细胞后取 0.1 ml 细胞悬液与 0.1 ml 沉淀剂混匀, 3 500 ~ 4 000 转/分离心 10 min 待测。取各样品标准品及待测样品各 100 μ l/孔, 依次加入 96 孔板后, 再在各孔中分别加入 100 μ l 缓冲液及 25 μ l 显色剂, 轻轻摇动板孔, 静置 5 min, 酶标仪检测各孔 A 值($\lambda = 405$ nm)。用标准曲线确定所得样本溶液的 GSH 浓度。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 接种 1.0×10^5 个 L02 细胞, 培养 24 h 后加 H₂O₂, 实验分组同前, H₂O₂ 作用 24 h 后, 收集细胞, PBS 洗 2 次, 75% 冷乙醇固定过夜。固定后的细胞离心, 去上清, 摇匀, 加入 PBS 洗 1 次, 500 转/分离心 5 min 后收集细胞, 弃乙醇; 将细胞悬浮于含有 1 mg/ml 碘化丙啶、0.5 mg/ml RNA 酶的染液中, 4 °C 避光 30 min, 过滤后上机进行细胞周期和 DNA 含量分析。

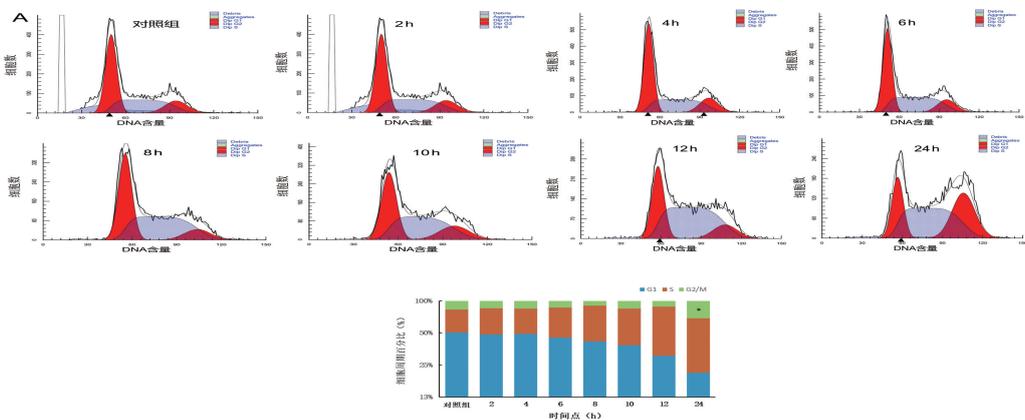
1.2.6 蛋白免疫印迹法(Western blotting, WB)检测细胞内蛋白表达 提取全细胞可溶蛋白, Bradford DC 法测定总蛋白浓度, 取 20 μ g 蛋白上样, 将蛋白在 10%

SDS-PAGE 中电泳分离,并在冰浴条件下以 300 mA 的恒流转膜 2.5 h,在摇床条件下用 5% BSA 封闭液轻轻摇封闭 2 h,然后用洗涤缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min,放入一抗,于 4 °C 下轻摇孵育过夜。次日,使用洗涤缓冲液清洗后,放入二抗于 4 °C 孵育 1.5 h,洗涤缓冲液清洗后,采用 ECL 试剂发色液显色,用图象分析仪扫描,拍照,Image J 图像软件进行条带灰度分析。

1.3 统计学分析 用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, n 表示独立样本量。氧化应激致使组间细胞存活率不同、胞内 GSH 含量、G2/M 期阻滞及各蛋白表达差异比较均采用完全随机设计资料的方差分析,若数据不满足正态分布,则采用 Kruskal-Wallis H 检验来比较组间差异,检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

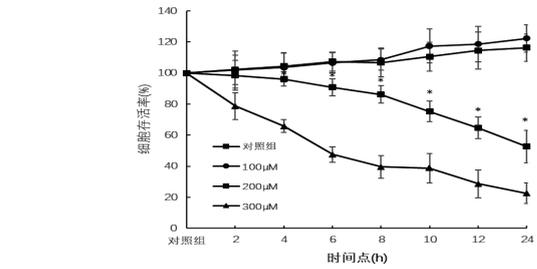
2.1 不同浓度 H_2O_2 对细胞存活率的影响 3 种 H_2O_2 浓度 (100、200、300 μM) 分别作用于 L02 细胞 24 h。用 CCK-8 法检测细胞活性,结果发现随着 H_2O_2 刺激细胞时间的延长,200、300 μM 浓度组的细胞存活率在氧化应激刺激的不同时间点呈逐步下降趋势,其他两组下降不明显。同时, H_2O_2 刺激 24 h 后,100 μM 浓度组细胞存活率有轻微的刺激后增长现象,300 μM 浓度组细胞存活率则不足 30%,相比较,200 μM 浓度组细胞存活率在 50% 左右,且随着 H_2O_2 刺激细胞时间的延长,细胞存活率也在不断下降,与对照组相比,细胞存活率的下降差异有统计学意义 (均 $P<0.05$, $n=5$),见图 1。



注: * 与对照组相比 $P<0.05$ 。

图 3 H_2O_2 (200 μM) 对 L02 细胞周期的影响

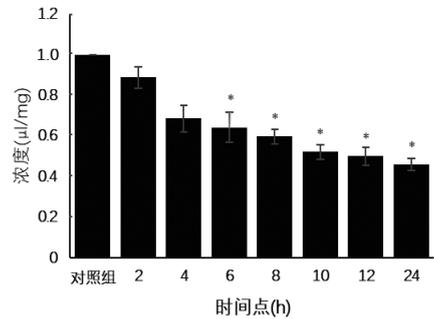
2.4 氧化应激对胞内 Hsp90 α 及底物蛋白 Cyclin B1 表达的影响 随着氧化应激时间的延长,Hsp90 α 在氧化应激后表达量先增加后降低;在 H_2O_2 刺激 6、8、10 h



注: * 与对照组同时时间点相比 $P<0.05$ 。

图 1 不同浓度 H_2O_2 对 L02 细胞存活率的影响

2.2 200 μM H_2O_2 降低细胞内 GSH 的水平 H_2O_2 刺激 L02 细胞不同时间后,GSH 含量有明显的变化,随着刺激时间的延长,GSH 逐渐减少,抗氧化能力不断降低。从 6 h 开始,胞内 GSH 水平较对照组明显下降 (均 $P<0.05$, $n=5$),见图 2。



注: * 与对照组相比 $P<0.05$ 。

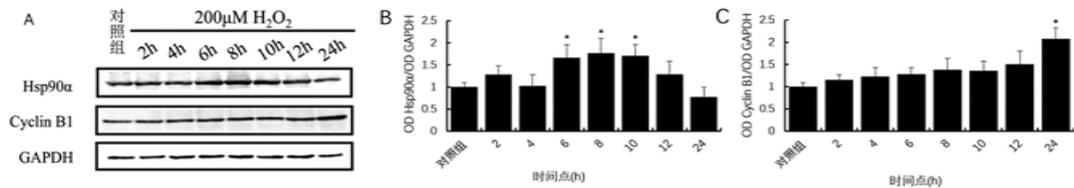
图 2 H_2O_2 (200 μM) 对 L02 细胞 GSH 的影响

2.3 氧化应激导致细胞 G2/M 周期阻滞 与对照组细胞相比, H_2O_2 刺激组细胞生长受阻,随着刺激时间的延长,在 24 h 出现明显的 G2/M 期阻滞现象 ($P<0.05$, $n=5$),见图 3。

这三个时间点处 Hsp90 α 的表达呈大幅度的增加,在刺激 24 h 时 Hsp90 α 表达出现明显下降。Cyclin B1 在氧化应激后表达平稳,随着氧化应激时间的延长,刺

激 24 h 时表达增加明显,与对照组相比,差异有统计

学意义($P < 0.05, n = 5$),见图 4。



注: * 与对照组相比 $P < 0.05$ 。

A. 200 μM H_2O_2 刺激 24 h 后相关蛋白表达的 WB 分析; B. 200 μM H_2O_2 刺激 24 h 后 Hsp90 α 的表达变化; C. 200 μM H_2O_2 刺激 24 h 后 Cyclin B1 的表达变化。

图 4 氧化应激对胞内 Hsp90 α 和 Cyclin B1 的表达的影响

3 讨论

氧化应激是指机体在有害刺激条件下,细胞内 ROS 的产生与清除之间不平衡引起的生理和病理反应^[16-17]。正常情况下,细胞处于蛋白质合成与降解的动态平衡之中,发生氧化应激时,过度生成的 ROS 可直接作用于蛋白质,导致蛋白质出现结构上的错误折叠和失活^[18]。ROS 主要来源于线粒体中的电子传递链,肝脏中含有大量的线粒体,是 ROS 攻击的主要器官。因此,氧化应激可能是肝病发病的共同机制^[18],探索氧化应激所致机体保护性反应和损伤的信号通路,对氧化应激下肝脏疾病的防治有重要意义。

正常状态下, Hsp90 占细胞内总蛋白的 1%~2%,一旦受到应激刺激,则可上调至细胞内总蛋白的 4%~6%^[19]。本研究中,随着氧化应激时间的延长,细胞内 Hsp90 α 表达逐步增加,直到 12 h 才出现下降,24 h 下降尤为明显,这可能是因为细胞受 H_2O_2 刺激后诱发了氧化应激,而 Hsp90 的高表达能发挥细胞保护作用,抑制细胞凋亡。同时,相比易受有丝分裂诱导的 Hsp90 β , Hsp90 α 则更易受应激诱导,因此,为使细胞适应应激, Hsp90 α 诱导性表达增多,起到自我保护的作用,与相关研究一致^[12]。氧化应激可直接导致细胞周期阻滞效应的发生。Cyclin B1 作为 Hsp90 的底物蛋白,同时也是控制细胞进入周期检查点 G2/M 期的关键调节因子,主要参与 G2/M 期转变的调节,最早出现于 G1 晚期, S 期明显增加,到 G2 期达到最大并维持到 M 期的中期阶段,因此,可作为与细胞周期调控密切相关的效应指标。如 Cyclin B1 降解受到阻碍,则可能导致蛋白堆积,细胞将被阻滞在 M 期。本研究中,细胞受 H_2O_2 刺激后 24 h, Cyclin B1 大量堆积,出现明显的 G2/M 期凋亡,这可能是因为,在氧化应激过程中,变性的蛋白需要重新折叠,若变性的蛋白不能被重新折叠且堆积过多,细胞就会发生未折叠蛋白反应^[20],这些变性蛋白若不能及时被修复或者降解,细胞就会因蛋白平衡紊乱而发生凋亡^[12],而大部分变性

蛋白最终需经过 Hsp90 α 的最后折叠才能恢复成正确的构象^[21]。本研究发现,在氧化应激刺激 24 h 后,随着 Hsp90 α 表达下降,不足以维持蛋白稳定,对 Cyclin B1 功能造成影响,继而出现蛋白蓄积现象。

综上所述,本研究通过构建氧化应激细胞模型,观察到氧化应激下人肝细胞中 GSH 含量随氧化应激时间的延长而减少,抗氧化能力不断降低。尽管在氧化应激状态下,细胞内 Hsp90 α 的表达上调有助于重新折叠变性蛋白,但持续的氧化应激会使细胞内变性蛋白越来越多, Hsp90 α 则不足以维持所有增多了的蛋白的稳定,即随着应激时间的延长而数量减少,最终使得 Hsp90 α 的底物蛋白 Cyclin B1 不能被有效降解而堆积在细胞中,出现细胞周期检测点 G2/M 期的阻滞现象,并致细胞死亡。通过本研究,进一步明确了 Hsp90 α 在细胞生长中的重要作用,其表达或功能受抑制均可抑制细胞生长, Hsp90 α 在细胞周期尤其是 G2/M 期中调节其周期蛋白 Cyclin B1 的保护性机制,为氧化应激状态下肝脏相关疾病的损伤机制提供理论依据和新的思路。

参考文献

- [1] Pan X, Wen SW, Kaminga AC, et al. Gut metabolites and inflammation factors in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 8848.
- [2] Tu W, Wang H, Li S, et al. The anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in chronic diseases[J]. Aging Dis, 2019, 10(3): 637-651.
- [3] 赵杰, 齐永芬, 鱼艳荣. 氧化应激在肝纤维化发生发展中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(9): 2067-2071.
- [4] Jia P, Ji S, Zhang H, et al. Piceatannol ameliorates hepatic oxidative damage and mitochondrial dysfunction of weaned piglets challenged with diquat[J]. Animals (Basel), 2020, 10(7): 1239.
- [5] 郑坤, 嘎鲁, 马宇衡, 等. 活性氧(ROS)依赖性抗肿瘤药物的研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2022, 38(1): 130-136.
- [6] 刘巍, 徐兆发, 郭美欣, 等. 莱菔硫烷对汞致大鼠肝脏氧化应激的拮抗作用研究[J]. 实用预防医学, 2016, 23(6): 671-674.
- [7] 窦博, 马重阳, 侯伟欣, 等. 基于 TLR4/NF- κ B/iNOS 通路的截断逆转方药血清对 L02 细胞氧化应激损伤的影响[J]. 中国中医药杂志, 2022, 29(4): 87-91.
- [8] Chebotareva N, Bobkova I, Shilov E. Heat shock proteins and kidney disease: perspectives of HSP therapy[J]. Cell Stress Chaperones, 2017, 22(3): 319-343.