

# Salubrinal 对铜负荷诱导的 PERK/eIF2 $\alpha$ 内质网应激信号通路介导肝细胞凋亡的干预作用

陈永华<sup>1),2)</sup>, 杨文明<sup>2)\*</sup>, 江海林<sup>1)</sup>, 唐露露<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>安徽中医药大学 研究生院,合肥 230031;<sup>2)</sup>安徽中医药大学第一附属医院 脑病中心,合肥 230038)

**摘要** Wilson 病是一种以肝损害为常见临床表现的常染色体隐性遗传铜代谢障碍性疾病,但铜蓄积导致的肝细胞损害的具体分子机制尚不明确。本研究拟采用硫酸铜模拟肝细胞铜负荷进行体外实验,选用 Western 印迹法测试铜负荷肝细胞内蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 及 p-eIF2 $\alpha$  蛋白质的表达;并探究特异性 eIF2 $\alpha$  磷酸化抑制剂 Salubrinal 对铜负荷诱导的肝细胞凋亡、胱天蛋白酶-3 活性、C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) mRNA 转录的影响。选用流式细胞仪测试肝细胞凋亡率;比色法测试肝细胞内的胱天蛋白酶-3 活性;Real-time PCR 法检测肝细胞内 CHOP mRNA 转录水平。本研究结果显示: (1) 铜负荷显示出时间依赖性地增加肝细胞内 PERK 及 p-eIF2 $\alpha$  蛋白质表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。 (2) 相比较对照组,铜负荷培养肝细胞 24 h 明显增加了肝细胞的凋亡率 ( $P < 0.01$ ),增强了肝细胞内的胱天蛋白酶-3 活性,促进肝细胞内 CHOP mRNA 的转录,加入特异性 eIF2 $\alpha$  磷酸化抑制剂 Salubrinal 后可抑制上述过程。 (3) 相比较对照组,铜负荷促进肝细胞 PERK 及 p-eIF2 $\alpha$  蛋白质表达,加入特异性 eIF2 $\alpha$  磷酸化抑制剂 Salubrinal 后,对铜负荷诱导的肝细胞 PERK 蛋白质表达无影响 ( $P > 0.05$ ),但可显著抑制铜负荷诱导的肝细胞 p-eIF2 $\alpha$  蛋白质表达 ( $P < 0.01$ )。本研究结果提示,铜负荷可以诱发肝细胞内质网应激,铜负荷引起的肝细胞凋亡机制与激活内质网应激 PERK/eIF2 $\alpha$  信号通路密切相关,Salubrinal 具有干预该信号通路作用,能够抑制铜负荷后肝细胞的凋亡。

**关键词** 铜负荷; 凋亡; 内质网应激; 蛋白激酶 R 样内质网激酶; OUMS29 人肝细胞系; Salubrinal  
**中图分类号** R-331

## Copper Loading Induces PERK/eIF2 $\alpha$ Endoplasmic Reticulum Stress Signaling Pathway-Mediated Hepatocyte Apoptosis and Its Intervention by Salubrinal

CHEN Yong-Hua<sup>1),2)</sup>, YANG Wen-Ming<sup>2)\*</sup>, JIANG Hai-Lin<sup>1)</sup>, TANG Lu-Lu<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> Graduate Institute, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China;

<sup>2)</sup> Encephalopathy Center, First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

**Abstract** The Wilson's disease is an autosomal recessive copper metabolism disorder with liver damage as the most common clinical manifestations. However, the molecular mechanism of hepatocyte damages caused by copper accumulation is unclear. In this study, copper sulfate was used to simulate the

收稿日期: 2018-02-10; 修回日期: 2018-04-15; 接受日期: 2018-06-14

国家自然科学基金项目资助 (No. 81373599)

\* 通讯作者 Tel: 0551-62838514; E-mail: yangwm8810@126.com

Received: February 10, 2018; Revised: April 15, 2018; Accepted: June 14, 2018

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81373599)

\* Corresponding author Tel: 0551-62838514; E-mail: yangwm8810@126.com

copper overload of hepatocytes *in vitro*. The abundance of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and p-eIF2 $\alpha$  proteins in hepatocytes was measured by Western blotting, and the effect of specific eIF2 $\alpha$  phosphorylation inhibitor Salubrinol on hepatocytes apoptosis, caspase-3 activity and C/EBP homologous protein (CHOP) mRNA transcription induced by copper overload were investigated, respectively. The rate of hepatocytes apoptosis was tested by flow cytometry, the caspase-3 activity in hepatocytes was measured by colorimetric assay, and the CHOP mRNA level in hepatocytes was measured by real-time PCR. The results of this study are as follows: (1) The copper overload hepatocytes showed a time dependent increase in the expression of PERK and p-eIF2 $\alpha$  protein ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). (2) Compared with the control group, copper overload-cultured hepatocytes in 24 h significantly increased the hepatocytes apoptosis rate ( $P < 0.01$ ), enhanced caspase-3 activity, increased transcription CHOP mRNA. And adding specific eIF2 $\alpha$  phosphorylation inhibitor Salubrinol could inhibit the process. (3) Compared with the control group, copper overload promoted the expression of PERK and p-eIF2 $\alpha$  proteins in hepatocytes. After adding the specific eIF2 $\alpha$  phosphorylation inhibitor Salubrinol, it could not inhibit the expression of PERK proteins in hepatocytes ( $P > 0.05$ ), but it could significantly inhibit the expression of p-eIF2 $\alpha$  proteins in hepatocytes ( $P < 0.01$ ). This study showed that copper overloaded hepatocytes can induce the endoplasmic reticulum stress of hepatocytes. Moreover, the mechanism of hepatocytes apoptosis is closely related to the activation of endoplasmic reticulum stress PERK/eIF2 $\alpha$  signaling pathway. Salubrinol has the effect of interfering this signaling pathway and inhibiting the apoptosis of hepatocytes.

**Key words** copper overload; apoptosis; endoplasmic reticulum stress; protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK); OUMS29 human hepatocyte cell line; Salubrinol

铜是一种重要的微量元素,且对细胞代谢不可或缺。一系列的细胞活动均需要铜的参与,包括铜蓝蛋白合成,黑色素生成,细胞色素 C 氧化等<sup>[1, 2]</sup>。然而,过多的铜离子在体内的不断蓄积,最终在体内对多种组织及多种器官的细胞都造成损害。目前, Wilson 病被认为是由于 *ATP7B* 基因突变引起的一种常染色体隐性遗传性铜代谢障碍性疾病,其特点是过多的铜在多种器官组织中的蓄积,导致临床主要表现肝损害、神经精神症状、角膜 K-F 环、肾组织病变、皮肤损害、骨代谢异常等。其中,以肝损害最为常见,是目前为数不多但可干预并取得较好临床疗效的可治疗性遗传代谢性疾病。关于该病的基础研究已取得一定的进展, *ATP7B* 基因作为一种 Wilson 病的致病基因已经被克隆<sup>[3, 4]</sup>。此基因的表达产物是 ATP7B 蛋白。目前认为,此蛋白质是分布在肝细胞高尔基体内质网处的负责铜转运的一种蛋白酶<sup>[5, 6]</sup>。ATP7B 蛋白具体准确定位仍然有一定争议,以及它在肝和大脑的转运过量铜蓄积的功能机制尚未完全阐明。

目前,尚无关于 Wilson 病肝细胞内质网应激导致肝细胞凋亡的相关信号通路的研究报道。但肝细胞凋亡主要是通过外源性途径,即死亡受体途径、线粒体途径、内质网应激途径这 3 种途径进行的;采用免疫印迹法及免疫荧光显微镜研究 Wilson 病患者

肝细胞,发现过量铜蓄积引起肝细胞内质网应激及肝细胞凋亡。这些结果表明,内质网应激在 Wilson 病肝细胞损害中发挥了关键性作用<sup>[7]</sup>。而内质网应激途径中最常见的细胞凋亡途径为 PERK/eIF2 $\alpha$  信号通路<sup>[8]</sup>。为此推测, Wilson 病患者的肝细胞凋亡通过内质网应激 PERK/eIF2 $\alpha$  信号通路所介导。本研究设计检测铜负荷对肝细胞内蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 蛋白及 p-eIF2 $\alpha$  蛋白表达的影响,并比较研究特异性 eIF2 $\alpha$  磷酸化抑制剂对铜负荷诱导的肝细胞的凋亡、肝细胞内胱天蛋白酶-3 的活性、肝细胞内的 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) mRNA 转录的影响,明确铜负荷诱导的肝细胞凋亡是否通过内质网应激 PERK/eIF2 $\alpha$  信号通路所介导,并观察特异性的 eIF2 $\alpha$  磷酸化的抑制剂 Salubrinol 对铜负荷肝细胞凋亡的抑制作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

选用高度分化的永久人肝细胞 (OUMS29)<sup>[9]</sup>, 肝细胞培养在 10% 的胎牛血清与抗生素混合的杜尔伯科改良伊格尔培养基 (Dulbecco modified Eagle medium, DMEM) 中,细胞保持在含 5% CO<sub>2</sub> 及温度在 37℃ 的培养箱中。

## 1.2 材料

硫酸铜购自日本京都 Nacalai Tesque 公司。硫酸铜给药 (300  $\mu\text{mol/L}$ ) 0、12、24、48 h。前期预实验显示,硫酸铜给药 300  $\mu\text{mol/L}$  培养肝细胞 12 h, 显示有明显的肝细胞凋亡现象。特异性的 eIF2 $\alpha$  磷酸化的抑制剂 Salubrinal 购自美国 Sigma 公司。前期预实验用不同浓度 Salubrinal 预处理硫酸铜模拟铜负荷肝细胞, 观察发现 Salubrinal 浓度在 40  $\mu\text{mol/L}$  时可以明显抑制肝细胞的凋亡。

## 1.3 硫酸铜模拟铜负荷诱导肝细胞内 PERK 及 p-eIF2 $\alpha$ 蛋白表达

将培养肝细胞的 9 孔板细胞随机分为 8 组: 对照组, 在不同时间阶段培养肝细胞 (不加其他干预手段, 用 DMEM 培养肝细胞 0、12、24、48 h) 和硫酸铜模拟铜负荷组, 在不同时间段 (在 DMEM 中加用 300  $\mu\text{mol/L}$  硫酸铜, 培养肝细胞 0、12、24、48 h), 选用 Western 印迹法检测肝细胞内 PERK 蛋白及 p-eIF2 $\alpha$  蛋白的表达。蛋白质电泳及转膜后, 5% 脱脂奶粉封闭, 加 PERK 及 p-eIF2 $\alpha$  一抗,  $\beta$ -肌动蛋白为内参, 4 $^{\circ}\text{C}$  摇床培养过夜。第 2 d, 取缓冲溶液并进行振摇和洗膜 6 次, 每次 15 min。鼠抗兔二抗由封闭液按照 1:2 000 浓度进行相应稀释, 转膜蛋白质面侧向下, 并在常温下孵育 1.5 h, 然后用 TBST 振摇, 并且进行洗膜 6 次, 每次振摇洗膜时间为 15 min。选用辣根过氧化酶 HRP-ECL 发光法, 选择图像分析软件 IPWIN 7.0, 检测目标蛋白质和  $\beta$ -肌动蛋白的光密度, 目标蛋白质与  $\beta$ -肌动蛋白的光密度的比值作为目标蛋白质半定量的相对值, 经过该软件分析系统进行相应的结果数据分析。

## 1.4 Salubrinal 对铜负荷诱导的肝细胞凋亡的检测

培养肝细胞分为 4 组: ① 对照组: 不加任何干预因素, DMEM 培养液培养肝细胞 24 h; ② 铜负荷组: 在培养肝细胞的 DMEM 培养液中, 加入 300  $\mu\text{mol/L}$  硫酸铜模拟铜负荷组, 培养肝细胞 24 h; ③ 铜负荷 + Salubrinal 组: 在培养肝细胞的 DMEM 培养液中加入 40  $\mu\text{mol/L}$  Salubrinal 预处理肝细胞 1 h 后, 再加入 300  $\mu\text{mol/L}$  硫酸铜模拟铜负荷的肝细胞, 在 DMEM 培养液继续培养 24 h。④ 单纯 Salubrinal 组: 在培养肝细胞的 DMEM 培养液中, 加入 40  $\mu\text{mol/L}$  Salubrinal 预处理肝细胞 1 h 后, 不加其他干预因素继续培养 24 h, 用流式细胞仪检测肝细胞的凋亡率。

## 1.5 Salubrinal 对铜负荷肝细胞胱天蛋白酶-3 活性的分析

培养的肝细胞分为 4 组: ① 对照组; ② 铜负荷组; ③ 铜负荷 + Salubrinal 组; ④ 单纯 Salubrinal 组。检测胱天蛋白酶-3 活性的步骤, 遵照胱天蛋白酶-3 活性测定试剂盒 (Promega 公司) 的说明书, 按步骤进行相应的操作, 采用比色法测试肝细胞内的胱天蛋白酶-3 活性。

## 1.6 Salubrinal 对铜负荷肝细胞 CHOP mRNA 表达的检测

培养的肝细胞同样分成 4 组。应用 Real-time PCR 方法检测肝细胞内 CHOP mRNA 的转录水平。按照 Invitrogen 公司 Trizol 试剂盒使用说明方法步骤进行肝细胞总 RNA 提取; 按照赛诺菲公司逆转录试剂盒的使用操作步骤将 RNA 逆转录成 cDNA, 再按照试剂盒提供的说明书操作规范步骤, 检测 CHOP mRNA 的转录水平。PERK 引物序列上游 5'-ACCTGTGTTAAGACACC-3', 5'-TGGACTGTCAGCATCGA-3'。

## 1.7 Salubrinal 对铜负荷肝细胞 PERK 及 p-eIF2 $\alpha$ 蛋白表达测定

**1.7.1 肝细胞总蛋白质提取** 培养肝细胞同样分为 4 组。将每组肝细胞加入 RIPA 裂解液约 0.5 mL 至于冰上。用超声匀浆器进行匀浆, 以不产生泡沫为准。待裂解完成后, 冰上放置 0.5 h, 再进行离心, 离心后取上清分别装于 0.2 mL 离心管中, 放置于 -20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱暂时保存备用。

**1.7.2 Western 印迹法检测 PERK 蛋白及 p-eIF2 $\alpha$  蛋白的表达** 按照 1.3 的方法及步骤进行, 并用同样的软件进行数据结果分析。

## 1.8 统计学方法

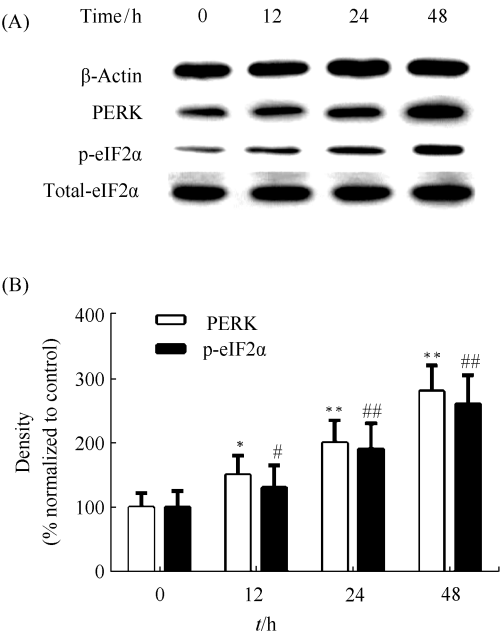
采用 SPSS 20.0 统计软件进行相关数据的统计分析。同一份样本给予同步检测 3 次, 然后取 3 次的平均值。连续型的变量资料选用“均数士标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )”进行统计学的描述。  $P < 0.05$  表示有统计学意义的差异,  $P < 0.01$  表示有显著统计学意义的差异。

## 2 结果

### 2.1 硫酸铜呈时间依赖性地增加肝细胞 PERK 及 p-eIF2 $\alpha$ 蛋白的表达

在 DMEM 中加用 300  $\mu\text{mol/L}$  硫酸铜, 该培养液培养肝细胞 0、12、24、48 h。结果显示, 硫酸铜模拟铜负荷后, 肝细胞内 PERK 及 p-eIF2 $\alpha$  在蛋白质

水平表达的增加呈现时间依赖性趋势( $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ ), 见 Fig. 1。



**Fig. 1 Effects of 300 μmol/L cupric sulfates on the expression of PERK and p-eIF2α proteins of hepatocytes at different time periods** 300 μmol/L copper sulfate was used to culture hepatocytes for 0, 12, 24, 48 hours. (A) Detection of the expression of PERK and p-eIF2α proteins by Western blotting; (B) Gray scale scanning values for the protein expression of the image. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with the 0 h PERK group. <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , <sup>##</sup>  $P < 0.01$ , compared with the 0 h p-eIF2α group

2.2 Salubrinl 对铜负荷诱导的肝细胞凋亡有明显抑制作用

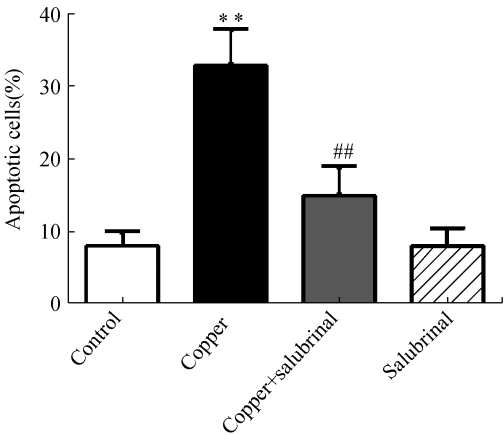
铜负荷显著增加肝细胞的凋亡,加入特异性的抑制剂 Salubrinl 之后,肝细胞的凋亡率较铜负荷组相比有显著性的下降,单纯使用 Salubrinl 之后肝细胞的凋亡率较对照组无明显变化。见 Fig. 2。

2.3 Salubrinl 对铜负荷诱导的肝细胞内胱天蛋白酶-3 活性有明显抑制作用

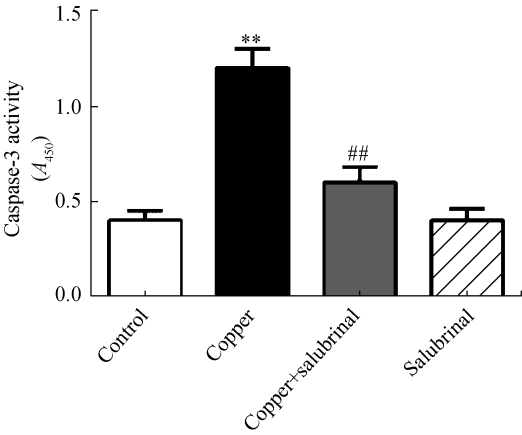
与对照组比较,铜负荷后可以显著增加肝细胞内胱天蛋白酶-3 的活性。加入 Salubrinl 后能显著降低肝细胞内胱天蛋白酶-3 的活性,单独给予 Salubrinl 后肝细胞内胱天蛋白酶-3 的活性无明显变化。见 Fig. 3。

2.4 Salubrinl 对铜负荷诱导的肝细胞内 CHOP mRNA 转录有明显抑制作用

与对照组相比较,铜负荷组可以显著增加肝细胞内 CHOP mRNA 的转录,Salubrinl 可以显著抑制铜负荷后肝细胞内 CHOP mRNA 的转录,单独给予



**Fig. 2 Effects of Salubrinl on the apoptosis of copper overload hepatocytes** Pretreatment of hepatocytes with Salubrinl of 40 μmol/L for 1 hour in the copper + Salubrinl group and Salubrinl group. The four groups continued to cultivate hepatocytes for 24 hours, and then the hepatocyte apoptosis was detected by flow cytometry 24 hours later. \*\*  $P < 0.01$ , compared with the control group; <sup>##</sup>  $P < 0.01$ , compared with the copper group



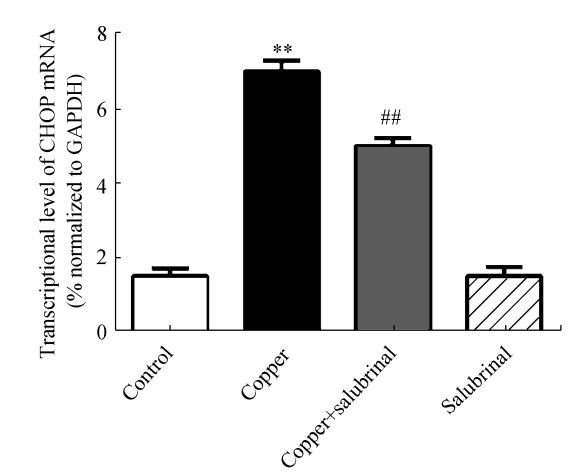
**Fig. 3 The effect of Salubrinl on the activity of Caspase-3 in copper overload hepatocytes** Pretreatment of hepatocytes with Salubrinl of 40 μmol/L concentration for 1 hour in the copper + Salubrinl group and Salubrinl group. The four groups continued to cultivate hepatocytes for 24 hours, and the caspase-3 activity of hepatocytes was detected by the colorimetric method 24 hours later. \*\*  $P < 0.01$ , compared with the control group; <sup>##</sup>  $P < 0.01$ , compared with the copper group

Salubrinl 后肝细胞内 CHOP mRNA 的转录无明显变化。见 Fig. 4。

2.5 Salubrinl 对铜负荷诱导的肝细胞 PERK 蛋白表达无影响,对铜负荷诱导的肝细胞 p-eIF2α 蛋白表达有明显抑制作用

与对照组相比较,硫酸铜模拟铜负荷组可以显





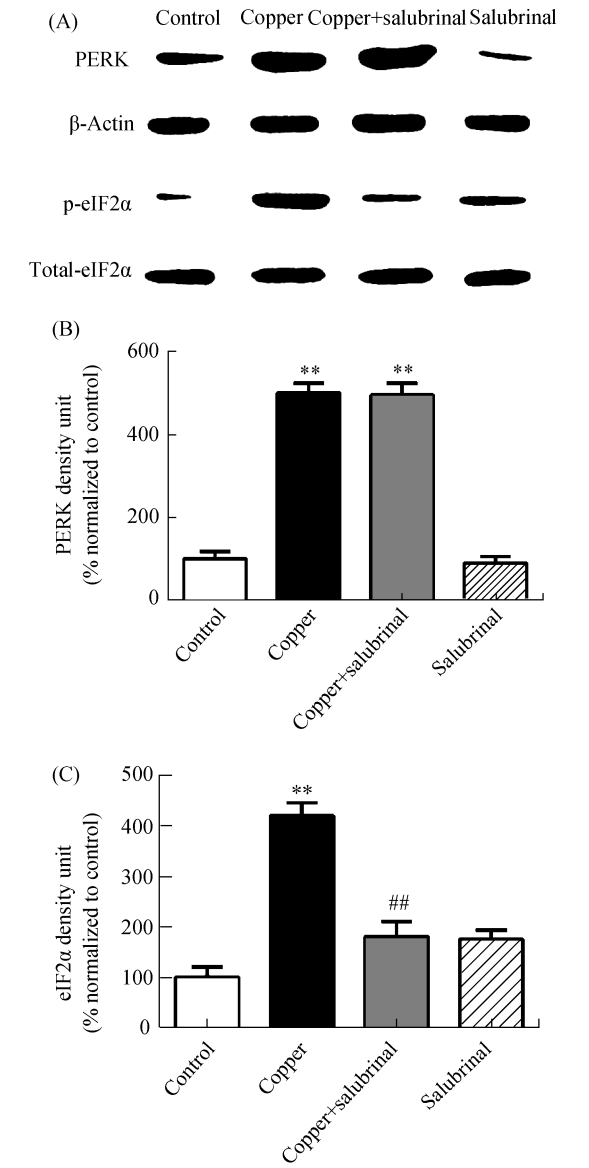
**Fig. 4 The effect of Salubrinol on CHOP mRNA transcription in copper overload hepatocytes**  
Pretreatment of hepatocytes with Salubrinol of 40  $\mu\text{mol/L}$  concentration for 1 hour in the copper + Salubrinol group and Salubrinol group. The four groups continued to cultivate hepatocytes for 24 hours, and then the transcriptional level of CHOP mRNA 24 hours later was detected by RT-PCR. \*\*  $P < 0.01$ , compared with the control group; ##  $P < 0.01$ , compared with the copper group

著增加肝细胞内 PERK、p-eIF2 $\alpha$  蛋白质的表达, Salubrinol 对铜负荷后 PERK 蛋白表达无影响,但可以显著抑制铜负荷后肝细胞内 p-eIF2 $\alpha$  蛋白的表达。见 Fig. 5。

3 讨论

肝损害是 Wilson 病患者最常见的临床表现之一,并且铜蓄积是 Wilson 病患者肝损害最主要的原因。然而,铜蓄积导致的肝损害的确切分子机制尚不清楚。近年有研究显示,内质网应激与 Wilson 病的肝损害过程相关,过度的内质网应激最终激活了肝细胞的凋亡信号通路;电镜观察显示,Wilson 病患者肝细胞内质网结构异常。通过体外培养的铜负荷肝细胞研究也显示,肝细胞存在明显的内质网应激。体内及体外研究均显示,铜负荷肝细胞的损害与过度的内质网应激密切相关;Wilson 病患者肝细胞过量铜的蓄积可以诱发肝细胞内质网应激,肝细胞通过未折叠蛋白质应对肝细胞铜中毒。如果铜中毒诱因去除,未折叠蛋白质反应可以恢复肝细胞的内质网稳态,肝细胞可不发生明显损害;如果铜中毒持续存在,未折叠蛋白质反应不能恢复细胞的内质网稳态,将激活凋亡信号通路,从而最终将引发肝细胞凋亡<sup>[7]</sup>。

内质网是合成和折叠蛋白质的关键亚细胞器。



**Fig. 5 The effect of Salubrinol on the expression of PERK and p-eIF2 $\alpha$  proteins in copper overload hepatocytes**  
Pretreatment of hepatocytes with Salubrinol of 40  $\mu\text{mol/L}$  concentration for 1 hour in the copper + Salubrinol group and Salubrinol group. Four groups continued to cultivate hepatocytes for 24 hours, and the expression of PERK and p-eIF2 $\alpha$  proteins 24 hours later was detected. (A) Detection of the expression of PERK and p-eIF2 $\alpha$  proteins by Western blotting. (B, C). Gray scale scanning values for the protein expression of the image (A). \*\*  $P < 0.01$ , compared with the control group; ##  $P < 0.01$ , compared with the copper group

各种各样的生理和病理的干扰因素,均可影响内质网腔对初步合成蛋白质的折叠加工,导致未折叠及错误折叠蛋白质增多并发生集聚,此为内质网应激;内质网应答各种因素导致的内质网应激,从而激活了细胞内各种信号转导通路,称为未折叠蛋白质反

应(unfolded protein reaction, UPR),如果这种反应不能帮助恢复细胞的内质网稳态,就启动细胞的凋亡信号通路,最终可以导致细胞的凋亡<sup>[10, 11]</sup>。内质网应激时,可通过激活三种应激感受器,从而激活内质网应激的下游信号通路,而 PERK、ATF6、IRE1 为目前明确的内质网应激感受器下游的 3 个分支,可以积极恢复细胞的功能稳态,也可能诱导细胞的凋亡<sup>[12]</sup>。未折叠蛋白质反应也是通过上述 3 种主要类型的应激感受器 PERK, ATF6 和 IRE1 介导的。这 3 条 UPR 分支平行的作用,并且每条分支使用特殊的信号转导机制去控制特殊转录因子的表达,以及调制一系列 UPR 下游反应的信号事件,使其适应内质网应激<sup>[13]</sup>。PERK 是一种可以阻止蛋白质翻译的跨膜蛋白激酶,需要无活性的真核翻译起始因子 2 $\alpha$ -亚基(eIF2 $\alpha$ )的丝氨酸磷酸化才能起作用,丝氨酸磷酸化可以增加 ATF4 的翻译,而 ATF4 是上调包括 *CHOP* 的 UPR 基因子集的转录因子,*CHOP* 具备促细胞凋亡活动的作用,并且对内质网应激促进细胞的凋亡发挥至关重要的作用<sup>[14]</sup>。相关研究显示,特异性 eIF2 $\alpha$  磷酸化抑制剂 Salubrinol,可以显著抑制由于内质网过度应激诱导的细胞凋亡。因为它可以抑制 eIF2 $\alpha$  的翻译起始活性,从而全面降低细胞蛋白质合成。此内质网应激信号通路的调控是防止异种毒物引起细胞损伤的一个重要途径<sup>[15]</sup>。据报道,内质网应激参与和介导脑死亡大鼠的肝损伤和肝细胞凋亡,而 Salubrinol 通过干预 PERK/eIF2 $\alpha$  信号通路来实现对肝细胞的保护作用,抑制肝细胞的凋亡<sup>[16]</sup>。

本文的研究,用铜负荷培养高度分化的永久人肝细胞(OUMS29)作为 Wilson 病肝细胞模型。前期预实验显示,铜给药 300  $\mu\text{mol/L}$  和 12 h,显示适当细胞毒作用。而我们实验的确发现,在铜负荷 300  $\mu\text{mol/L}$  时增加了 PERK 的表达,呈时间依赖性,并且硫酸铜模拟的铜负荷浓度达 300  $\mu\text{mol/L}$  以及持续 24 h 时,可以明显诱导 PERK 蛋白表达、eIF2 $\alpha$  的磷酸化和 *CHOP* mRNA 的转录,硫酸铜模拟铜负荷可以明显的激活肝细胞的 PERK/eIF2 $\alpha$  内质网应激凋亡信号通路。本文的研究显示,硫酸铜模拟的铜负荷肝细胞模型后,导致肝细胞内质网应激凋亡信号通路的激活,诱发了肝细胞发生明显的凋亡,提示铜负荷是肝细胞内质网应激凋亡关键性的诱发因素。这与先前研究显示的铜负荷是诱导肝细胞功能异常,以及凋亡的关键性因素的结果一致<sup>[7]</sup>。铜负荷的促肝细胞凋亡作用能被选择性的 eIF2 $\alpha$  磷酸化

抑制剂 Salubrinol 明显的抑制,证实本文的研究结果为铜负荷诱导肝细胞的凋亡主要是通过 PERK/eIF2 $\alpha$  信号通路。这些研究结果与 PERK 调节内质网应激的双向作用的概念是相符的。肝细胞凋亡是可能发生在 eIF2 $\alpha$  的磷酸化水平,Salubrinol 可以避免肝细胞的凋亡是最好的佐证。本文的研究结果与以前报道的有关该信号通路的结果也基本一致,均显示出 Salubrinol 具有保护细胞减轻缓解内质网遭受应激而诱导的凋亡<sup>[17, 18]</sup>。有研究显示,4-苯基丁酸(4-phenylbutyric acid, 4-PBA)可以通过抑制内质网应激,从而缓解因为长期高糖饮食饲养诱导的大鼠肝细胞的内质网应激及氧化应激导致的肝损害<sup>[19]</sup>。4-PBA 可抑制未折叠蛋白质反应及内质网应激,从而起到保护神经元细胞以及抑制神经元细胞的凋亡作用<sup>[20]</sup>。熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA),为另一种化学伴侣蛋白质,通过增加谷胱甘肽和巯基蛋白质,从而保护肝细胞免受缺血再灌注及氧化损伤<sup>[21]</sup>。上述研究均显示,细胞的保护作用与改善内质网应激有关。本文的结果与这些研究的结果基本是一致的,只是具体的信号通路不完全一致。在这项研究中,仅仅探讨了铜负荷对 UPR 的 PERK 分支的调节作用。未折叠蛋白质反应的另外两个分支,即 ATF6 和 IRE1 分支,本文未做检测。引起我们关注的是,硫酸铜模拟铜负荷诱导肝细胞的凋亡及肝细胞内胱天蛋白酶-3 活性仅被 Salubrinol 抑制了 60% ~ 75% 左右,提示铜负荷介导的细胞凋亡除了通过 PERK/eIF2 $\alpha$  信号通路,还有其他信号旁路的参与。需要研究进一步证实 ATF6 和 IRE1 分支的内质网应激信号通路,在铜负荷介导的细胞凋亡中所起作用的比例。总之,这是一项全新的关于 Wilson 病模型体外细胞研究,显示过量铜蓄积可以通过激活内质网应激 PERK/eIF2 $\alpha$  凋亡信号通路诱导肝细胞凋亡,这对铜负荷诱导的肝细胞凋亡的分子生物学机制增加新的见解,为阐明 Wilson 病患者肝损害的机制研究提供重要思路,为积极寻找 Wilson 病的新的治疗药物提供依据。

## 参考文献 (References)

- [1] Herrera C, Pettiglio MA, Bartnikas TB. Investigating the role of transferrin in the distribution of iron, manganese, copper and zinc [J]. J Biol Inorg Chem, 2014, 19(6):869-877
- [2] Harada M. Pathogenesis and management of Wilson disease[J]. Hepatol Res, 2014, 44(4):395-402
- [3] Petrukhin K, Fischer SG, Pirastu M, et al. Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene[J]. Nat Genet, 1993, 5(4):338-343
- [4] Amvrosiadou M, Petropoulou M, Poulou M, et al. Multi-allele

- genotyping platform for the simultaneous detection of mutations in the Wilson disease related ATP7B gene [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, **1006**:201-208
- [ 5 ] Polishchuk EV, Concilli M, Iacobacci S, *et al.* Wilson disease protein ATP7B utilizes lysosomal exocytosis to maintain copper homeostasis [J]. *Dev Cell*, 2014, **29**(6):686-700
- [ 6 ] Yanagimoto C, Harada M, Kumemura H, *et al.* Copper incorporation into ceruloplasmin is regulated by Niemann-Pick C1 protein [J]. *Hepatol Res*, 2011, **41**(5):484-491
- [ 7 ] Oe S, Miyagawa K, Honma Y, *et al.* Copper induces hepatocyte injury due to the endoplasmic reticulum stress in cultured cells and patients with Wilson disease [J]. *Exp Cell Res*, 2016, **347**(1):192-200
- [ 8 ] 曹洁, 姚隆. PERK/ATF4/CHOP 信号通路在饱和脂肪酸诱导肝细胞脂毒性凋亡中的作用 [J]. *中国生物制品学杂志* (Cao J, Yao L. Role of PERK/ATF4/CHOP signaling pathway in saturated fatty acid-induced lipopoptosis in human liver cells [J]. *Chin J Biol*), 2017, **30**(8):811-818
- [ 9 ] Kobayashi N, Miyazaki M, Fukaya K, *et al.* Transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes to treat acute liver failure [J]. *Transplantation*, 2000, **69**(2):202-207
- [ 10 ] 许文虎, 金春子, 王晓龙, 等. 内质网应激信号通路在棕榈酸诱导的血管内皮细胞凋亡中的作用 [J]. *中国药理学通报* (Xu WH, Jin CZ, Wang XL, *et al.* Role of endoplasmic reticulum stress signaling pathway in high fat-induced cell apoptosis in vascular endothelial cells [J]. *Chin Pharmacol Bull*), 2017, **33**(12):1668-1672
- [ 11 ] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation [J]. *Science*, 2011, **334**(6059):1081-1086
- [ 12 ] Zhou B, Xie J, Liu X, *et al.* Functional and transcriptomic analysis of the key unfolded protein response transcription factor HacA in *Aspergillus oryzae* [J]. *Gene*, 2016, **593**(1):143-153
- [ 13 ] 李锐, 邹双, 高征征, 等. NGF 通过抑制内质网应激途径保护 SCs 在高糖环境诱导的凋亡 [J]. *中国生物化学与分子生物学报* (Li R, Zou S, Gao ZZ, *et al.* Nerve growth factor inhibits high glucose-induced schwann cell apoptosis by regulating endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2016, **32**(12):1334-1340
- [ 14 ] Rao J, Zhang C, Wang P, *et al.* C/EBP homologous protein (CHOP) contributes to hepatocyte death via the promotion of ERO1 $\alpha$  signalling in acute liver failure [J]. *Biochem J*, 2015, **466**(2):369-378
- [ 15 ] Matsuoka M, Komoike Y. Experimental evidence shows salubrinol, an eIF2 $\alpha$  dephosphorylation inhibitor, reduces xenotoxicant-induced cellular damage [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, **16**(7):16275-16287
- [ 16 ] Wang T, Zhang SJ, Cao SL, *et al.* Protective effects of salubrinol on liver injury in rat models of brain death [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2015, **128**(11):1523-1528
- [ 17 ] Wu L, Luo N, Zhao HR, *et al.* Salubrinol protects against rotenone-induced SH-SY5Y cell death via ATF4-parkin pathway [J]. *Brain Res*, 2014, **1549**(3):52-62
- [ 18 ] 李捷, 郭文治, 阎冰, 等. Salubrinol 减轻脑死亡大鼠肝细胞凋亡的机制研究 [J]. *中华器官移植杂志* (Li J, Guo WZ, Yan B, *et al.* Protective effects of Salubrinol in brain death-induced liver injury [J]. *Chin J Organ Transplant*), 2016, **37**(12):716-719
- [ 19 ] 任路平, 张璞, 张雪梅, 等. 4-苯基丁酸对高果糖喂养大鼠肝脏脂质沉积及氧化应激的影响 [J]. *解放军医药杂志* (Ren LP, Zhang P, Zhang XM, *et al.* Effect of 4-phenyl butyric acid on hepatic lipid deposition and oxidative stress induced by high-fructose feeding in rats [J]. *Med & Pharm J Chin PLA*), 2016, **28**(3):1-4
- [ 20 ] 谭婷, 王岩, 涂柳, 等. 4-苯基丁酸钠通过抑制内质网应激减轻皮层神经元氧糖剥夺/再灌注损伤 [J]. *中国生物化学与分子生物学报* (Tan T, Wang Y, Tu L, *et al.* 4-Phenylbutyric acid reduces oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury in cortical neurons by inhibiting endoplasmic reticulum stress [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2018, **34**(1):53-60
- [ 21 ] 何宗全, 章安庆, 叶显道, 等. 牛磺熊去氧胆酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国普通外科杂志* (He ZQ, Zhang AQ, Ye XD, *et al.* Protective effect of tauroursodeoxycholic acid against hepatic ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Gen Surg*), 2015, **24**(7):990-995