

· 实验研究 ·

小鼠视锥细胞系 661W 细胞凋亡模型的构建及自噬对其的保护性作用

高文娜 谢佳 杜剑彤 朱瑞琳 杨柳

100034 北京大学第一医院眼科

通信作者:杨柳, Email: lucy02114@163. com

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 09. 003

【摘要】 目的 构建小鼠视锥细胞系 661W 细胞凋亡模型,探讨不同自噬水平下细胞生存状态的变化。

方法 采用不同质量浓度抗 Fas 抗体处理细胞,采用 Western blot 法检测 caspase-3 蛋白表达量,并确定凋亡细胞模型适宜抗 Fas 抗体刺激浓度;分别采用不同浓度自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)和自噬诱导剂雷帕霉素处理细胞,采用 Western blot 法检测细胞中微管相关蛋白质 1 轻链 3(LC-3) II/LC-3 I 蛋白表达,筛选合适的作用浓度。将细胞分为空白对照组、单纯 3-MA 组、单纯雷帕霉素组、模型对照组、模型+3-MA 组、模型+雷帕霉素组,采用 Western blot 法检测各组细胞诱导后 0、3、6、12、24 和 48 h caspase-3、caspase-8、自噬相关基因 5(Atg-5)和 LC-3 II/LC-3 I 蛋白表达,采用流式细胞术检测细胞凋亡率。**结果** 成功构建 661W 细胞凋亡模型,抗 Fas 抗体的适宜刺激质量浓度为 2.0 $\mu\text{g/ml}$;在 Fas 抗体刺激下,661W 细胞 caspase-3、caspase-8 相对表达量从 6 h 开始增加,12 h 达高峰,并持续至 48 h,而 Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 蛋白相对表达量从 3 h 开始增加,24 h 达高峰,并于 48 h 时降至基线水平。3-MA 和雷帕霉素的适宜作用浓度分别为 20 nmol/L 和 2.0 nmol/L。空白对照组、单纯 3-MA 组和单纯雷帕霉素组诱导后各时间点 caspase-3、caspase-8 的相对表达量及细胞凋亡率总体比较,差异均无统计学意义(均 $P < 0.05$)。单纯雷帕霉素组各时间点细胞 Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 蛋白相对表达量显著高于相应时间点空白对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。模型+3-MA 组 caspase-3、caspase-8 相对表达量以及细胞凋亡率在诱导后 3、6、12、24 和 48 h 均显著高于模型对照组,Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量在诱导后 3、6、12 和 24 h 均明显低于模型对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);模型+雷帕霉素组 caspase-3、caspase-8 相对表达量以及细胞凋亡率在诱导后 6、12、24 和 48 h 均显著低于模型对照组,Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量在诱导后 3、6、12 和 24 h 均明显高于模型对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 在抗 Fas 抗体诱导 661W 细胞凋亡条件下,增强自噬可降低细胞凋亡率,而抑制自噬则会增加细胞凋亡率,自噬可能对 661W 细胞起到保护性作用。

【关键词】 凋亡; 自噬; 661W 细胞

基金项目: 国家自然科学基金项目(81470650、81670841);北京市自然科学基金项目(7172218)

Establishment of apoptosis model in mouse cone cell line 661W cells and the primary research on protective effects of autophagy Gao Wenna, Xie Jia, Du Jiantong, Zhu Ruilin, Yang Liu

Department of Ophthalmology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Corresponding author: Yang Liu, Email: lucy02114@163. com

【Abstract】 Objective To establish the apoptosis model in mouse cone cell line 661W cells and to investigate the viability of 661W cells in the conditions of different levels of autophagy. **Methods** Different concentrations of anti-Fas antibody were added to establish the apoptosis model of 661W cells, the expression of caspase-3 was detected by Western blot and the appropriate concentration of anti-Fas antibody was screened. Different concentrations of the autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) or autophagy inducer rapamycin were added to inhibit or induce autophagy, the expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC-3) II/LC-3 I were detected by Western blot and the appropriate concentrations were also screened. The cultured cells were divided into 6 groups: control group, simple 3-MA group, simple rapamycin group, model group, model+3-MA group and model+rapamycin group. Western blot was adopted to detect the expression of caspase-3, caspase-8, autophagy related genes 5 (Atg-5) and LC-3 II/LC-3 I at 0 hour, 3, 6, 12, 24 and 48 hours after induction. Flowcytometer was adopted to detect the apoptosis rate of 661W cells. **Results** The apoptosis model of 661W cells was successfully established, and the appropriate concentration of anti-Fas antibody was 2.0 $\mu\text{g/ml}$. After stimulated by the anti-Fas antibody, the

expression of caspase-3 and caspase-8 of 661W cells increased from the time point of 6 hours, peaked at 12 hours, and sustained to 48 hours. However, the expression of Atg-5 and LC-3 II/LC-3 I raised from the time point of 3 hours, peaked at 24 hours, and decreased to the basic level at 48 hours. In addition, the appropriate concentrations of 3-MA and rapamycin were 20 nmol/L and 2.0 nmol/L, respectively. There was no statistical difference among the control group, simple 3-MA group and simple rapamycin group on the expression of caspase-3 and caspase-8 and the apoptosis rate of 661W cells at different time points (all at $P>0.05$). The expressions of Atg-5 and LC-3 II/LC-3 I in the simple rapamycin group were significantly higher than those in the control group at different time points (all at $P<0.05$). The expressions of caspase-3 and caspase-8 and the apoptosis rate in the model + 3-MA group were significantly higher than those in the model group at 3, 6, 12, 24 and 48 hours after induction, while the expressions of Atg-5 and LC-3 II/LC-3 I were obviously lower than those in the model group at 3, 6, 12 and 24 hours after induction (all at $P<0.05$). The expressions of caspase-3 and caspase-8 and the apoptosis rate at 6, 12, 24 and 48 hours after induction in the model+rapamycin group were significantly lower than those in the model group, while the expressions of Atg-5 and LC-3 II/LC-3 I at the time points of 3, 6, 12 and 24 hours after induction were obviously higher than those in the model group (all at $P<0.05$). **Conclusions** Under the condition of anti Fas antibody inducing apoptosis, enhancing autophagy can reduce the apoptosis rate of cells, inhibiting autophagy can increase the apoptosis rate. Autophagy may play a protective role in 661W cells.

[Key words] Apoptosis; Autophagy; 661W cells

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81470650, 81670841); Beijing Municipal Natural Science Foundation (7172218)

光感受器细胞作为视网膜的一级神经元,是视觉通路的起点。研究表明各种致盲视网膜疾病,包括视网膜脱离、年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)、视网膜色素变性等的发病原因和临床表现不尽相同,但具有共同的病理机制——光感受器细胞的死亡^[1]。光感受器细胞属于中枢神经元,是一种高度特化的终末分化细胞,其受损后无法修复和再生^[2],因此可造成患者视力的不可逆性损伤,甚至盲。然而,目前这些致盲视网膜疾病中光感受器细胞死亡的确切机制尚不清楚。因此,研究光感受器细胞的死亡机制,并对其进行保护,已成为目前亟待解决的问题。细胞的死亡方式主要包括凋亡、自噬和坏死。其中,自噬作为一种存在于正常细胞和病态细胞中的非选择性降解机制,尽管被归类于细胞死亡方式的一种,但由于其具有清除细胞内代谢废物、移除异常折叠的蛋白质等功能,故又被描述为一种细胞的更新过程。细胞凋亡是神经科学研究的热点,对很多光感受器细胞死亡机制的研究较多集中在凋亡方面,并取得了重要的研究成果。然而,随着研究的深入,多项眼科疾病研究表明,自噬达到一定水平可促使光感受器细胞凋亡和坏死^[3-4]。而目前,在病理情况下,对自噬水平是如何变化以影响细胞生存状态这一问题还有很多疑问。本研究通过构建小鼠 661W 视锥细胞系凋亡模型,并分别采用自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)和自噬激活剂雷帕霉素对 661W 细胞进行抑制自噬和诱导自噬的处理,观察不同自噬水平下 661W 细胞在诱导凋亡后不同时间点凋亡水平

的变化,为自噬水平的变化对细胞生存状态的影响研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

661W 细胞(北京华泰昕生物医疗技术有限公司); DMEM 高糖培养基(11995065)、青链霉素(15140122)(美国 Gibco 公司); 特级胎牛血清(VS500-T, 澳大利亚 Ausbian 公司); 质量分数 0.25% 不含 EDTA 的胰蛋白酶(15050065, 美国 Life Technology 公司); 兔抗小鼠 Fas 抗体(ab82419)、兔抗小鼠自噬相关基因(autophagy related gene, Atg)-5 抗体(ab108327)、兔抗小鼠微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC-3)抗体(ab48394)、兔抗小鼠 caspase-3 抗体(ab49822)(美国 Abcam 公司); 兔抗小鼠 GAPDH 抗体(TA-08)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(ZB-2301)、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(ZB-2305)(北京中杉金桥公司); 兔抗小鼠 caspase-8 抗体(3473, 美国 Prosci Incorporated 公司); 细胞凋亡检测试剂盒(V13241, 美国 Invitrogen 公司); 3-MA(M9281, 美国 Sigma 公司); 雷帕霉素(HY-10219, 美国 MCE 公司)。直径 100 mm 培养皿、6 孔板(美国 Corning 公司); 摇床(天津欧诺仪器仪表有限公司); 隔水式恒温培养箱、离心机(美国 Thermo 公司); 迷你垂直电泳仪(BG-verMINI, 北京百晶生物技术有限公司); 凝胶图像分析系统(英国 Syngene 公司); 流式细胞仪(FACSC Calibur, 美国 Becton-Dickinson 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/ml(商品单位)青霉素及 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养基培养 661W 细胞,于体积分数 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下培养,当细胞生长至 70% ~ 80% 融合时进行传代。

1.2.2 建立 661W 细胞凋亡模型 将 661W 细胞以 2×10^6 /孔的密度接种于 6 孔板中,培养 24 h 后,更换新鲜培养基,分别加入终质量浓度为 0、0.5、1.0、2.0、4.0 和 8.0 μ g/ml 的抗 Fas 抗体,继续培养 12 h,收集细胞,采用 Western blot 法检测各质量浓度抗 Fas 抗体处理后细胞活化的 caspase-3 蛋白表达量,确定适宜的抗 Fas 抗体的造模浓度。

1.2.3 检测造模后不同时间点细胞凋亡和自噬状态 取正常培养的 661W 细胞,加入适宜浓度的抗 Fas 抗体建立细胞凋亡模型,同时设置正常培养的细胞为空白对照组,分别于抗 Fas 抗体处理后 0、3、6、12、24 和 48 h 收集贴壁细胞及上清液中细胞,采用 Western blot 法检测各时间点 caspase-3、caspase-8、Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 蛋白表达量,采用流式细胞术检测细胞凋亡率。

1.2.4 检测不同浓度 3-MA 处理细胞凋亡模型后细胞的自噬状态 取正常接种的 661W 细胞,分别加入终浓度为 0、2.5、5.0、10、20 和 40 nmol/L 的 3-MA,继续培养 1 h,再加入适宜浓度的抗 Fas 抗体建立细胞凋亡模型,继续培养 12 h,收集贴壁及细胞上清液中细胞,采用 Western blot 法检测细胞 LC-3 II/LC-3 I 蛋白表达。

1.2.5 检测不同浓度雷帕霉素处理后细胞的自噬状态 取正常接种的 661W 细胞,分别加入终浓度为 0、0.25、0.50、1.0、2.0 和 4.0 nmol/L 的雷帕霉素,继续培养 1 h,收集贴壁细胞及上清液中细胞,采用 Western blot 法检测细胞 LC-3 II/LC-3 I 蛋白表达。

1.2.6 检测不同自噬水平下各时间点细胞凋亡与自噬情况 将细胞接种至 6 孔板中,分为 6 个组。空白对照组细胞常规培养;单纯 3-MA 组和单纯雷帕霉素组细胞分别加入适宜浓度 3-MA 和雷帕霉素进行处理;模型对照组细胞加入适宜浓度抗 Fas 抗体处理;模型+3-MA 组和模型+雷帕霉素组细胞在模型对照组的基础上分别加入适宜浓度的 3-MA 和雷帕霉素进行预处理。各组分别在处理后 0、3、6、12、24 和 48 h 收集贴壁细胞及上清液中细胞,采用 Western blot 法检测活化的 caspase-3、活化的 caspase-8、Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 蛋白表达,采用流式细胞术检测细胞凋亡率。

1.2.7 Western blot 法检测活化的 caspase-3、活化的

caspase-8、Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 蛋白表达量 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,使用冷 PBS 轻柔冲洗收集的细胞 3 次,弃去 PBS。用 RIPA 裂解液与苯甲基磺酰氟以体积比 99:1 配制 100 μ l 细胞裂解液,并加入适当的蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂,混匀后,均匀铺于细胞表面,冰上裂解 30 min,收集裂解产物。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,离心半径 8.6 cm,12 000 r/min 离心 20 min。取上清,BCA 法测蛋白浓度。取 20 μ g 总蛋白于质量分数 10% SDS-PAGE 凝胶上电泳,300 mA 转膜 1.5 h;TBST 洗膜,每次 5 min,共 3 次;用质量分数 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h;加入 caspase-3、caspase-8、Atg-5、LC-3 和 GAPDH 一抗(稀释比例均为 1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育;TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;加入相应二抗(稀释比例为 1:5 000)室温下孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;电化学发光法显影。使用 Image J 软件分析条带灰度值。以 GAPDH 为内参照,按照灰度值比值计算各目的蛋白相对表达量。

1.2.8 流式细胞术检测细胞凋亡情况 用冷 PBS 洗涤收集的细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,1 000 r/min 离心 5 min,弃去 PBS,重复 3 次;加入 300 μ l 结合缓冲液重悬细胞,并取 100 μ l 细胞悬液加入流式管中。每管中加入 5 μ l annexin-V-FITC、1 μ l 碘化丙啶(propidium iodide,PI),轻轻混匀后,室温下孵育 15 min。应用经 annexin-V-FITC(+)PI(-)、annexin-V-FITC(-)PI(+)标记的细胞来调整荧光补偿,去除光谱重叠。根据 annexin-V-FITC(-)PI(-)、annexin-V-FITC(+)PI(-)以及 annexin-V-FITC(-)PI(+)标记的细胞分析设定十字门的位置进行数据校正;经 Bisciences FACS Calibur 流式细胞仪分析,得出细胞存活、凋亡以及坏死百分比。判定标准为:左下象限为活细胞,annexin-V-FITC、PI 均低染;右下象限为早期凋亡细胞,annexin-V-FITC 高染、PI 低染;右上象限为晚期凋亡细胞,annexin-V-FITC、PI 均高染;左上象限为坏死细胞,annexin-V-FITC 低染、PI 高染。早期凋亡和晚期凋亡均归为凋亡,计算细胞凋亡率。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。本研究中各指标的数据资料经 Sapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据经 Levene 检验证实方差齐。采用完全随机分组单因素干预多水平研究设计,不同浓度抗 Fas 抗体、3-MA 和雷帕霉素处理后细胞活化的 caspase-3 或 LC-3 II/LC-3 I 蛋白相对表达量总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验;空白对照组与模型组在 3-MA 和雷帕霉素处理后 caspase-3、caspase-8、Atg-5 和

LC-3 II/LC-3 I 蛋白表达量及细胞凋亡率总体比较采用两因素方差分析,组间两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。采用双尾检验法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同质量浓度抗 Fas 抗体处理后 661W 细胞活化的 caspase-3 蛋白相对表达量变化

0、0.5、1.0、2.0、4.0 和 8.0 $\mu\text{g/ml}$ 抗 Fas 抗体处理后,661W 细胞中活化的 caspase-3 蛋白的相对表达量分别为 0.41 ± 0.04 、 0.39 ± 0.04 、 0.56 ± 0.06 、 0.68 ± 0.03 、 0.58 ± 0.08 和 0.30 ± 0.07 ,组间总体比较差异有统计学意义($F=19.55$, $P<0.05$)。随着抗 Fas 抗体质量浓度的不断升高,caspase-3 相对表达量逐渐增加,2.0 $\mu\text{g/ml}$ 组达高峰,4.0 $\mu\text{g/ml}$ 组、8.0 $\mu\text{g/ml}$ 组逐渐下降;2.0 $\mu\text{g/ml}$ 组 caspase-3 相对表达量显著高于其余各组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图 1)。选取 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 抗 Fas 抗体作为细胞凋亡模型建立的合适质量浓度。

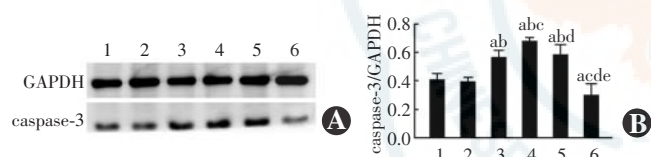


图 1 不同质量浓度抗 Fas 抗体处理后 661W 细胞活化的 caspase-3 相对表达量比较 A: Western blot 法检测 caspase-3 蛋白表达电泳图

1.0 $\mu\text{g/ml}$ 组、2.0 $\mu\text{g/ml}$ 组和 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 组 caspase-3 条带强度较 0 $\mu\text{g/ml}$ 组强,8.0 $\mu\text{g/ml}$ 组 caspase-3 条带强度与 0 $\mu\text{g/ml}$ 组无明显差别 B:不同质量浓度抗 Fas 抗体处理 661W 细胞 caspase-3 相对表达量量化比较 随着抗 Fas 抗体质量浓度不断升高,caspase-3 相对表达量逐渐增加,2.0 $\mu\text{g/ml}$ 组达高峰,4.0 $\mu\text{g/ml}$ 组、8.0 $\mu\text{g/ml}$ 组逐渐下降 $F=19.55$, $P<0.05$ 。与 0 $\mu\text{g/ml}$ 组比较, $^aP<0.05$;与 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 组比较, $^bP<0.05$;与 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 组比较, $^cP<0.05$;与 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 组比较, $^dP<0.05$;与 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 组比较, $^eP<0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验, $n=3$) 1:0 $\mu\text{g/ml}$ 组 2:0.5 $\mu\text{g/ml}$ 组 3:1.0 $\mu\text{g/ml}$ 组 4:2.0 $\mu\text{g/ml}$ 组 5:4.0 $\mu\text{g/ml}$ 组 6:8.0 $\mu\text{g/ml}$ 组

2.2 抗 Fas 抗体诱导 661W 细胞凋亡后不同时间点活化的 caspase-3、活化的 caspase-8、Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 蛋白表达量及细胞凋亡率变化

空白对照组在 0、3、6、12、24 和 48 h 时,活化的 caspase-3 和 caspase-8、Atg-5 以及 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量总体比较,差异均无统计学意义($F=0.11$ 、 0.05 、 0.07 、 0.71 ,均 $P>0.05$)(图 2,表 1)。空白对照组在 0、3、6、12、24 和 48 h 时,细胞凋亡率分别为 $(5.49\pm0.74)\%$ 、 $(5.44\pm0.86)\%$ 、 $(5.23\pm0.88)\%$ 、 $(5.39\pm0.86)\%$ 、 $(5.40\pm0.98)\%$ 和 $(5.33\pm0.96)\%$,组间总体比较差异无统计学意义($F=0.03$, $P=0.99$)(图 3)。

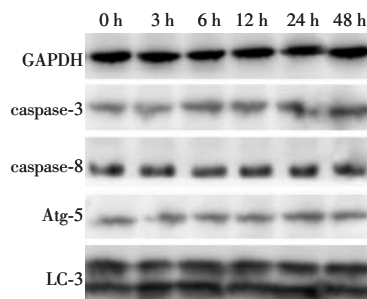


图 2 Western blot 法检测空白对照组不同时间点活化的 caspase-3、活化的 caspase-8、Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 表达电泳图 各时间点蛋白表达条带量均没有明显变化 Atg-5:自噬相关基因 5;LC-3:抗微管相关蛋白 1 轻链 3

表 1 空白对照组不同时间点 caspase-3、caspase-8、Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

时间点	样本量	caspase-3	caspase-8	Atg-5	LC-3 II/LC-3 I
0 h	3	0.27 ± 0.04	0.17 ± 0.04	0.29 ± 0.05	1.01 ± 0.12
3 h	3	0.27 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.30 ± 0.06	1.07 ± 0.09
6 h	3	0.26 ± 0.04	0.16 ± 0.03	0.30 ± 0.04	1.06 ± 0.16
12 h	3	0.26 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.30 ± 0.06	1.01 ± 0.08
24 h	3	0.26 ± 0.03	0.16 ± 0.05	0.32 ± 0.04	0.96 ± 0.05
48 h	3	0.26 ± 0.05	0.16 ± 0.13	0.30 ± 0.06	0.96 ± 0.06
F 值		0.11	0.05	0.07	0.71
P 值		0.99	0.99	0.99	0.63

注:Atg-5:自噬相关基因 5;LC-3:微管相关蛋白 1 轻链 3(单因素方差分析)

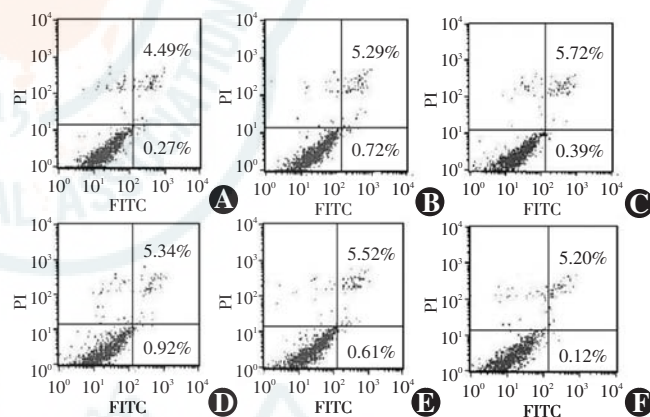


图 3 流式细胞术检测空白对照组不同时间点细胞凋亡状态 空白对照组各时间点细胞凋亡率无明显差异 A:诱导后 0 h B:诱导后 3 h C:诱导后 6 h D:诱导后 12 h E:诱导后 24 h F:诱导后 48 h

抗 Fas 抗体诱导 661W 细胞 0、3、6、12、24 和 48 h 时,活化的 caspase-3 和 caspase-8、Atg-5 以及 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F=62.96$ 、 38.20 、 137.12 、 72.10 ,均 $P<0.05$)。其中,活化的 caspase-3、活化的 caspase-8 相对表达量从诱导后 6 h 开始明显增加,并持续至 48 h;诱导后 6 h caspase-3、caspase-8 相对表达量显著高于诱导后 0 h,诱导后 12 h caspase-3、caspase-8 相对表达量显著高于诱导后 0 h 和 6 h,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),诱导后 12、24 和 48 h caspase-3、caspase-8 相对表达量两两比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。Atg-5、

LC-3 II/LC-3 I 相对表达量从诱导后 3 h 开始持续增加,于 24 h 达高峰,并于 48 h 下降至基线水平;诱导后 6、12、24 h Atg-5、LC-3 II/LC-3 I 相对表达量均明显高于诱导后 0 h,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),诱导后 0 h 和 48 h Atg-5、LC-3 II/LC-3 I 相对表达量比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(图 4,表 2)。

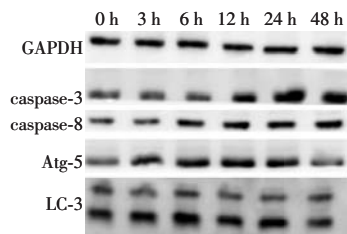


图 4 Western blot 法检测抗 Fas 抗体诱导 661W 细胞凋亡后活化的 caspase-3、活化的 caspase-8、Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 表达电泳图

活化的 caspase-3、活化的 caspase-8 相对表达量从诱导后 6 h 开始明显增加,并持续至诱导后 48 h; Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 相对表达量从诱导后 3 h 开始持续增加,诱导后 24 h 达高峰,并于诱导后 48 h 降至基线水平 Atg:自噬相关基因;LC-3:微管相关蛋白 1 轻链 3

表 2 抗 Fas 抗体诱导后不同时间点 caspase-3、caspase-8、Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

时间点	样本量	caspase-3	caspase-8	Atg-5	LC-3 II/LC-3 I
诱导后 0 h	3	0.56±0.04	0.52±0.05	0.36±0.05	1.22±0.20
诱导后 3 h	3	0.54±0.07	0.55±0.04	0.56±0.05 ^a	1.97±0.10 ^a
诱导后 6 h	3	0.72±0.04 ^{ab}	0.81±0.05 ^{ab}	1.01±0.05 ^{ab}	2.26±0.15 ^{ab}
诱导后 12 h	3	1.12±0.05 ^{abc}	1.00±0.08 ^{abc}	1.27±0.08 ^{abc}	2.58±0.16 ^{abc}
诱导后 24 h	3	1.24±0.11 ^{abc}	1.11±0.10 ^{abc}	1.56±0.12 ^{abc}	2.85±0.11 ^{abc}
诱导后 48 h	3	1.12±0.10 ^{abc}	1.11±0.11 ^{abc}	0.33±0.07	1.14±0.10
F 值		62.96	38.20	137.12	72.10
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与诱导后 0 h 比较,^a $P < 0.05$;与诱导后 3 h 比较,^b $P < 0.05$;与诱导后 6 h 比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) Atg:自噬相关基因;LC-3:微管相关蛋白 1 轻链 3

抗 Fas 抗体诱导后 0、3、6、12、24 和 48 h 时细胞凋亡率分别为 (5.60±0.87)%、(5.89±0.82)%、(11.83±2.40)%、(27.00±2.14)%、(27.23±1.58)% 和 (28.33±1.32)%,组间总体比较差异有统计学意义($F = 137.54, P < 0.05$)。其中,与诱导后 0 h 组相比,诱导后 3 h 细胞凋亡率变化不明显,差异无统计学意义($P = 0.84$),诱导后 6、12、24 和 48 h 细胞凋亡率均升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与诱导后 3 h 和 6 h 相比,诱导后 12、24 和 48 h 细胞凋亡率均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);诱导后 12 h 与诱导后 24 h 和 48 h 细胞凋亡率两两比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(图 5)。

2.3 不同浓度 3-MA 处理细胞凋亡模型后细胞 LC-3 II/LC-3 I 蛋白表达变化

0、2.5、5.0、10、20 和 40 nmol/L 3-MA 处理后细胞 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量为 2.06±0.08、2.02±0.07、2.02±0.10、1.92±0.05、1.45±0.05 和 1.35±

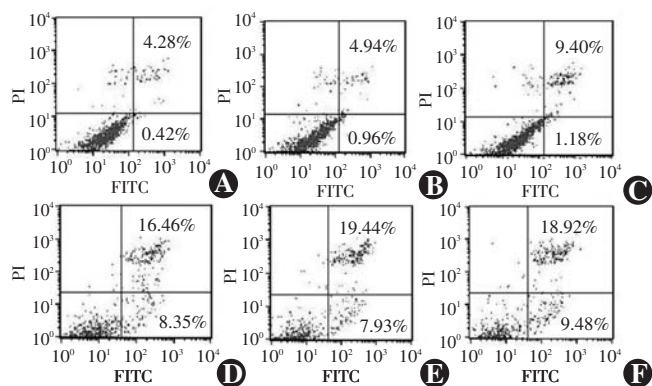


图 5 流式细胞术检测抗 Fas 抗体诱导后不同时间点细胞凋亡状态 细胞凋亡率从诱导后 6 h 开始增加,12 h 达高峰,并持续至 48 h A:诱导后 0 h B:诱导后 3 h C:诱导后 6 h D:诱导后 12 h E:诱导后 24 h F:诱导后 48 h

0.05,组间总体比较差异有统计学意义($F = 57.59, P < 0.05$)。与 0 nmol/L 组相比,2.5 nmol/L 组和 5.0 nmol/L 组 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量均无明显变化,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),10 nmol/L 组、20 nmol/L 组和 40 nmol/L 组 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量均降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);20 nmol/L 组和 40 nmol/L 组 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量较 2.5 nmol/L 组、5.0 nmol/L 组和 10 nmol/L 组均明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 6)。

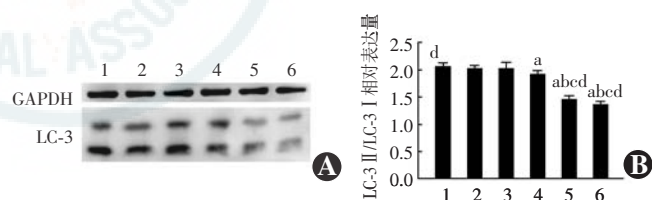


图 6 不同浓度 3-MA 处理后 661W 细胞 LC-3 II/LC-3 I 相对表达量比较 A:Western blot 法检测不同浓度 3-MA 处理下 LC-3 II/LC-3 I 表达电泳图 B:不同浓度 3-MA 处理下细胞 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量量化比较 $F = 57.59, P < 0.05$ 。与 0 nmol/L 组相比,^a $P < 0.05$;与 2.5 nmol/L 组相比,^b $P < 0.05$;与 5.0 nmol/L 组相比,^c $P < 0.05$;与 10 nmol/L 组相比,^d $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验, $n = 3$) 1:0 nmol/L 组 2:2.5 nmol/L 组 3:5.0 nmol/L 组 4:10 nmol/L 组 5:20 nmol/L 组 6:40 nmol/L 组;LC-3:抗微管相关蛋白 1 轻链 3

2.4 不同浓度雷帕霉素处理后细胞 LC-3 II/LC-3 I 蛋白表达变化

0、0.25、0.50、1.0、2.0 和 4.0 nmol/L 雷帕霉素处理后细胞 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量分别为 1.04±0.13、1.46±0.19、1.90±0.14、2.32±0.23、4.70±0.23 和 4.77±0.25,组间总体比较差异具有统计学意义($F = 197.97, P < 0.05$)。2.0 nmol/L 组和 4.0 nmol/L 组 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量比较,差异无统计学意义($P = 0.69$),其余各组随着雷帕霉素浓度的升高,LC-3 II/LC-3 I

的相对表达量逐渐增加,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 7)。

2.5 空白对照组、单纯 3-MA 组和单纯雷帕霉素组细胞不同时间点活化的 caspase-3、活化的 caspase-8、Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 蛋白相对表达量及细胞凋亡率变化

空白对照组、单纯 3-MA 组和单纯雷帕霉素组诱导后 0、3、6、12、24 和 48 h, caspase-3、caspase-8 的相对表达量总体比较,差异均无统计学意义(caspase-3: $F_{\text{分组}} = 0.14, P = 0.87; F_{\text{时间}} = 0.09, P = 0.99$. caspase-8: $F_{\text{分组}} = 0.02, P = 0.98; F_{\text{时间}} = 0.22, P = 0.95$)(图 8,表 3,4)。

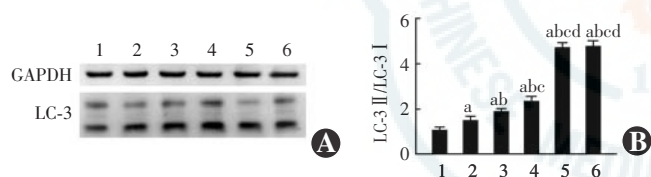


图 7 不同浓度雷帕霉素处理后细胞 LC-3 II/LC-3 I 相对表达量比较 A: Western blot 法检测 LC-3 蛋白电泳图 B: 不同浓度雷帕霉素处理后细胞 LC-3 II/LC-3 I 相对表达量量化比较 $F = 197.97, P < 0.05$. 与 0 nmol/L 组相比, $^a P < 0.05$; 与 0.25 nmol/L 组相比, $^b P < 0.05$; 与 0.50 nmol/L 组相比, $^c P < 0.05$; 与 1.0 nmol/L 组相比, $^d P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) 1: 0 nmol/L 组 2: 0.25 nmol/L 组 3: 0.50 nmol/L 组 4: 1.0 nmol/L 组 5: 2.0 nmol/L 组 6: 4.0 nmol/L 组 LC-3: 抗微管相关蛋白 1 轻链 3

空白对照组、单纯 3-MA 组和单纯雷帕霉素组诱导后各时间点 Atg-5 及 LC-3 II/LC-3 I 总体比较,差异均有统计学意义(Atg-5: $F_{\text{分组}} = 380.75, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 17.11, P < 0.05$. LC-3 II/LC-3 I: $F_{\text{分组}} = 292.20, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 11.73, P < 0.05$)。单纯 3-MA 组与空白对照组各时间点 Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);单纯雷帕霉素组诱导后 0、3、6、12 和 24 h 时 Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量较空白对照组均增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),而在诱导后 48 h 时 2 个组间 Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量变化不明显,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(图 8,表 5,6)。

表 3 空白对照组、单纯 3-MA 组和单纯雷帕霉素组细胞诱导后不同时间点 caspase-3 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	诱导后不同时间点 caspase-3 相对表达量					
		0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
空白对照组	3	0.22±0.02	0.21±0.03	0.21±0.02	0.22±0.05	0.22±0.03	0.23±0.05
单纯 3-MA 组	3	0.22±0.03	0.22±0.04	0.22±0.03	0.22±0.04	0.21±0.05	0.22±0.04
单纯雷帕霉素组	3	0.21±0.01	0.22±0.02	0.20±0.03	0.22±0.03	0.21±0.03	0.21±0.03

注: $F_{\text{分组}} = 0.14, P = 0.87; F_{\text{时间}} = 0.09, P = 0.99$ (两因素方差分析) 3-MA: 3-甲基腺嘌呤

表 4 空白对照组、单纯 3-MA 组和单纯雷帕霉素组细胞诱导后不同时间点 caspase-8 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	诱导后不同时间点 caspase-8 相对表达量					
		0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
空白对照组	3	0.22±0.04	0.21±0.02	0.21±0.03	0.21±0.04	0.21±0.03	0.22±0.03
单纯 3-MA 组	3	0.22±0.03	0.21±0.05	0.22±0.04	0.22±0.02	0.21±0.04	0.21±0.03
单纯雷帕霉素组	3	0.23±0.04	0.20±0.03	0.21±0.03	0.21±0.03	0.21±0.03	0.21±0.04

注: $F_{\text{分组}} = 0.02, P = 0.98; F_{\text{时间}} = 0.22, P = 0.95$ (两因素方差分析) 3-MA: 3-甲基腺嘌呤

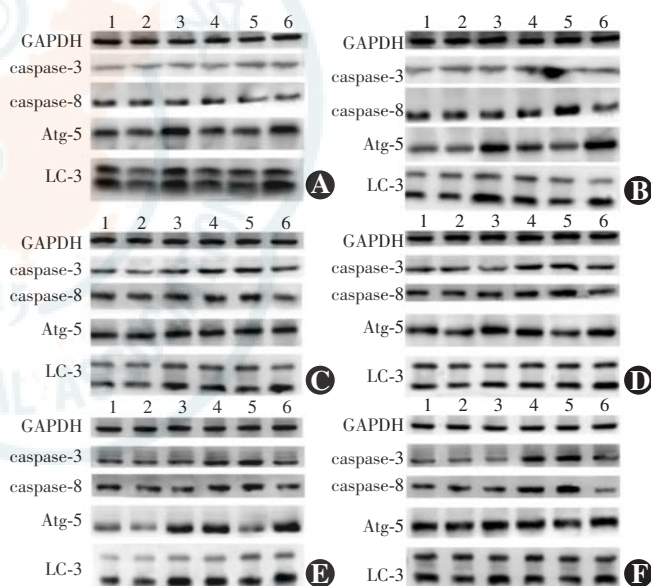


图 8 Western blot 法检测各组细胞不同时间点 caspase-3、caspase-8、Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 相对表达 A: 诱导后 0 h B: 诱导后 3 h C: 诱导后 6 h D: 诱导后 12 h E: 诱导后 24 h F: 诱导后 48 h 1: 空白对照组 2: 单纯 3-MA 组 3: 单纯雷帕霉素组 4: 模型对照组 5: 模型+3-MA 组 6: 模型+雷帕霉素组 3-MA: 3-甲基腺嘌呤; Atg: 抗自噬相关基因; LC-3: 抗微管相关蛋白 1 轻链 3

流式细胞术检测结果显示,3 个组各时间点细胞凋亡率总体比较,差异均无统计学意义($F_{\text{分组}} = 0.07, P = 0.93; F_{\text{时间}} = 0.18, P = 0.97$)(图 9,表 7)。

2.6 模型对照组、模型+3-MA 组和模型+雷帕霉素组细胞不同时间点 caspase-3、caspase-8、Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 蛋白相对表达量及细胞凋亡率变化

各组细胞诱导后不同时间点 caspase-3 及 caspase-8 相对表达量总体比较,差异均有统计学意义(caspase-3: $F_{\text{分组}} = 297.94, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 150.35, P <$

0.05. caspase-8: $F_{\text{分组}} = 285.96, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 112.48, P < 0.05$ 。与模型对照组比较,模型+3-MA 组 caspase-3 和 caspase-8 相对表达量在诱导后 3、6、12、24 和 48 h 均

升高,模型+雷帕霉素组 caspase-3 和 caspase-8 相对表达量在诱导后 6、12、24 和 48 h 均显著降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 8,表 8,9)。

表 5 空白对照组、单纯 3-MA 组和单纯雷帕霉素组细胞诱导后不同时间点 Atg-5 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	诱导后不同时间点 Atg-5 相对表达量					
		0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
空白对照组	3	0.24±0.04	0.27±0.06	0.24±0.03	0.23±0.04	0.25±0.05	0.21±0.05
单纯 3-MA 组	3	0.23±0.03	0.25±0.05	0.23±0.02	0.21±0.04	0.22±0.07	0.23±0.07
单纯雷帕霉素组	3	0.71±0.09 ^a	0.74±0.08 ^a	0.76±0.08 ^a	0.83±0.08 ^a	0.85±0.05 ^a	0.24±0.03

注: $F_{\text{分组}} = 380.75, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 17.11, P < 0.05$ 。与同时时间点空白对照组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素方差分析, Dunnett-*t* 检验) 3-MA:3-甲基腺嘌呤; Atg:抗自噬相关基因

表 6 空白对照组、单纯 3-MA 组和单纯雷帕霉素组细胞诱导后不同时间点 LC-3 II/LC-3 I 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	诱导后不同时间点 LC-3 II/LC-3 I 相对表达量					
		0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
空白对照组	3	1.19±0.17	1.20±0.23	1.20±0.16	1.13±0.21	1.16±0.19	1.12±0.12
单纯 3-MA 组	3	1.10±0.10	1.11±0.13	1.05±0.09	1.11±0.16	1.11±0.13	1.06±0.10
单纯雷帕霉素组	3	2.64±0.23 ^a	2.62±0.20 ^a	2.61±0.28 ^a	2.68±0.22 ^a	2.64±0.27 ^a	1.20±0.13

注: $F_{\text{分组}} = 292.20, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 11.73, P < 0.05$ 。与同时时间点空白对照组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素方差分析, Dunnett-*t* 检验) LC-3:抗微管相关蛋白 1 轻链 3;3-MA:3-甲基腺嘌呤

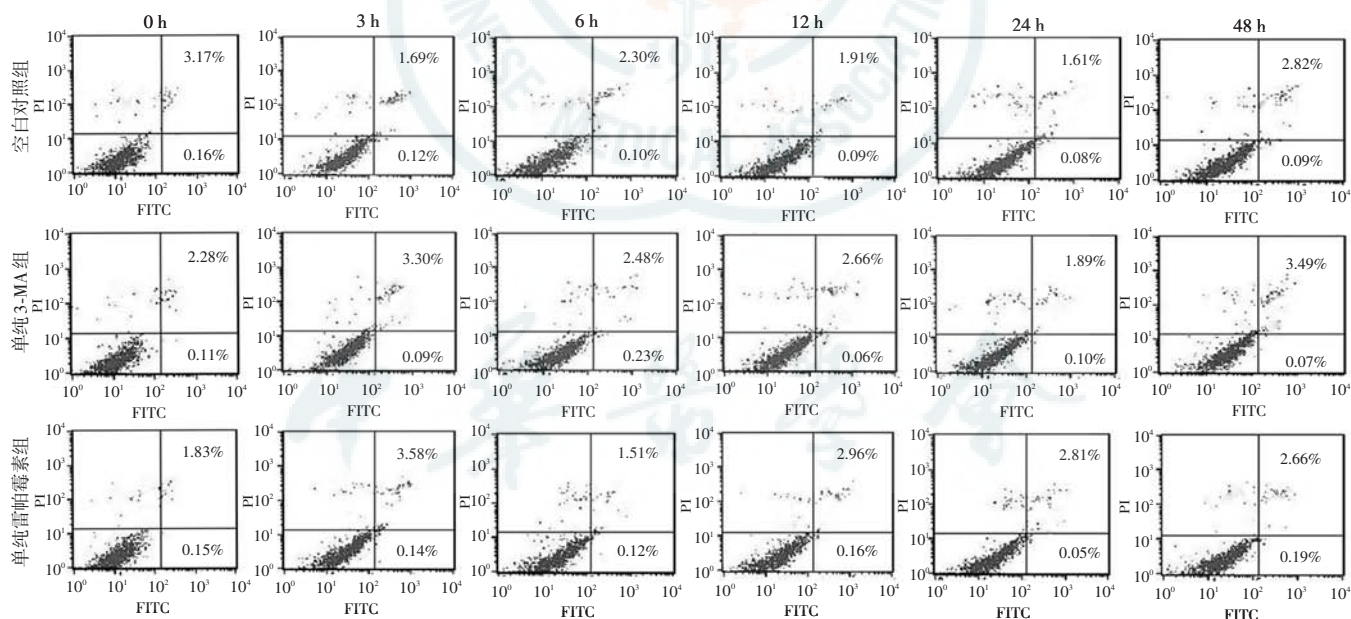


图 9 流式细胞术检测各组不同时间点细胞凋亡百分比 3 个组各时间点凋亡细胞百分比变化不明显

表 7 空白对照组、单纯 3-MA 组和单纯雷帕霉素组细胞诱导后不同时间点细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	诱导后不同时间点细胞凋亡率					
		0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
空白对照组	3	2.75±0.67	2.77±0.87	2.80±0.34	2.71±0.75	2.63±1.14	2.98±0.38
单纯 3-MA 组	3	2.70±0.32	2.98±0.45	2.75±0.29	2.64±0.61	2.75±0.67	2.98±0.61
单纯雷帕霉素组	3	2.56±0.52	2.90±0.88	2.71±0.53	2.71±0.61	2.75±0.58	2.68±0.83

注: $F_{\text{分组}} = 0.07, P = 0.93; F_{\text{时间}} = 0.18, P = 0.97$ (两因素方差分析) 3-MA:3-甲基腺嘌呤

表 8 模型对照组、模型+3-MA 组、模型+雷帕霉素组细胞诱导后不同时间点 caspase-3 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	诱导后不同时间点 caspase-3 相对表达量					
		0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
模型对照组	3	0.21±0.02	0.23±0.03	0.44±0.05	0.79±0.11	0.82±0.10	0.78±0.10
模型+3-MA 组	3	0.21±0.02	0.32±0.04 ^a	0.57±0.08 ^a	1.15±0.06 ^a	1.12±0.11 ^a	1.14±0.08 ^a
模型+雷帕霉素组	3	0.21±0.01	0.23±0.03	0.24±0.02 ^a	0.24±0.04 ^a	0.22±0.02 ^a	0.39±0.06 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 297.94, P < 0.05$; $F_{\text{时间}} = 150.35, P < 0.05$ 。与模型对照组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素方差分析, Dunnett- t 检验) 3-MA: 3-甲基腺嘌呤表 9 模型对照组、模型+3-MA 组、模型+雷帕霉素组细胞诱导后不同时间点 caspase-8 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	诱导后不同时间点 caspase-8 相对表达量					
		0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
模型对照组	3	0.52±0.08	0.52±0.05	0.83±0.05	1.14±0.11	1.18±0.07	1.13±0.10
模型+3-MA 组	3	0.54±0.05	0.73±0.05 ^a	1.12±0.09 ^a	1.63±0.16 ^a	1.68±0.11 ^a	1.67±0.06 ^a
模型+雷帕霉素组	3	0.55±0.03	0.54±0.03	0.54±0.07 ^a	0.56±0.06 ^a	0.58±0.08 ^a	0.73±0.09 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 285.96, P < 0.05$; $F_{\text{时间}} = 112.48, P < 0.05$ 。与模型对照组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素方差分析, Dunnett- t 检验) 3-MA: 3-甲基腺嘌呤

各组细胞诱导后不同时间点 Atg-5 及 LC-3 II/LC-3 I 相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{Atg-5}} = 341.55, P < 0.05$; $F_{\text{时间}} = 89.66, P < 0.05$; $F_{\text{LC-3 II/LC-3 I}} = 480.32, P < 0.05$; $F_{\text{时间}} = 77.53, P < 0.05$)。与模型对照组比较, 模型+3-MA 组 Atg-5

和 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量在诱导后 3、6、12 和 24 h 均明显降低, 模型+雷帕霉素组 Atg-5 和 LC-3 II/LC-3 I 的相对表达量在诱导后 0、3、6、12、24 和 48 h 均明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 8, 表 10, 11)。

表 10 模型对照组、模型+3-MA 组、模型+雷帕霉素组细胞诱导后不同时间点 Atg-5 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	诱导后不同时间点 Atg-5 相对表达量					
		0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
模型对照组	3	0.28±0.04	0.54±0.14	0.64±0.07	0.75±0.11	1.43±0.11	0.23±0.05
模型+3-MA 组	3	0.26±0.03	0.27±0.03 ^a	0.27±0.05 ^a	0.24±0.03 ^a	0.27±0.05 ^a	0.23±0.05
模型+雷帕霉素组	3	0.93±0.13 ^a	0.95±0.10 ^a	0.96±0.09 ^a	0.99±0.19 ^a	1.54±0.08 ^a	0.52±0.09 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 341.55, P < 0.05$; $F_{\text{时间}} = 89.66, P < 0.05$ 。与模型对照组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素方差分析, Dunnett- t 检验) 3-MA: 3-甲基腺嘌呤; Atg: 抗自噬相关基因表 11 模型对照组、模型+3-MA 组、模型+雷帕霉素组细胞诱导后不同时间点 LC-3 II/LC-3 I 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	诱导后不同时间点 LC-3 II/LC-3 I 相对表达量					
		0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
模型对照组	3	1.16±0.06	1.74±0.17	2.21±0.22	2.58±0.19	4.96±0.88	1.15±0.10
模型+3-MA 组	3	1.04±0.15	1.06±0.09 ^a	1.08±0.24 ^a	0.97±0.13 ^a	0.93±0.10 ^a	0.97±0.10
模型+雷帕霉素组	3	3.91±0.33 ^a	3.86±0.36 ^a	4.04±0.30 ^a	4.58±0.30 ^a	6.42±0.44 ^a	2.17±0.20 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 480.32, P < 0.05$; $F_{\text{时间}} = 77.53, P < 0.05$ 。与模型对照组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素方差分析, Dunnett- t 检验) 3-MA: 3-甲基腺嘌呤; LC-3: 抗微管相关蛋白 1 轻链 3

3 个组各时间点细胞凋亡率总体比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 973.07, P < 0.05$; $F_{\text{时间}} = 346.18, P < 0.05$)。与模型对照组比较, 模型+3-MA 组诱导后 3、6、

12、24 和 48 h 细胞凋亡率均明显升高, 模型+雷帕霉素组诱导后 6、12、24 和 48 h 细胞凋亡率均明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 10, 表 12)。

表 12 模型对照组、模型+3-MA 组、模型+雷帕霉素组细胞各时间点细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	诱导后不同时间点细胞凋亡率					
		0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
模型对照组	3	2.82±0.68	3.89±0.85	11.02±1.96	26.98±1.93	27.09±2.01	26.00±3.00
模型+3-MA 组	3	2.76±0.82	11.32±2.52 ^a	21.06±2.61 ^a	55.83±2.55 ^a	56.19±3.63 ^a	56.77±3.34 ^a
模型+雷帕霉素组	3	3.07±0.80	3.05±0.93	3.26±0.89 ^a	3.14±1.15 ^a	4.42±1.67 ^a	8.08±1.40 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 973.067, P < 0.05$; $F_{\text{时间}} = 346.18, P < 0.05$ 。与模型对照组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素方差分析, Dunnett- t 检验) 3-MA: 3-甲基腺嘌呤

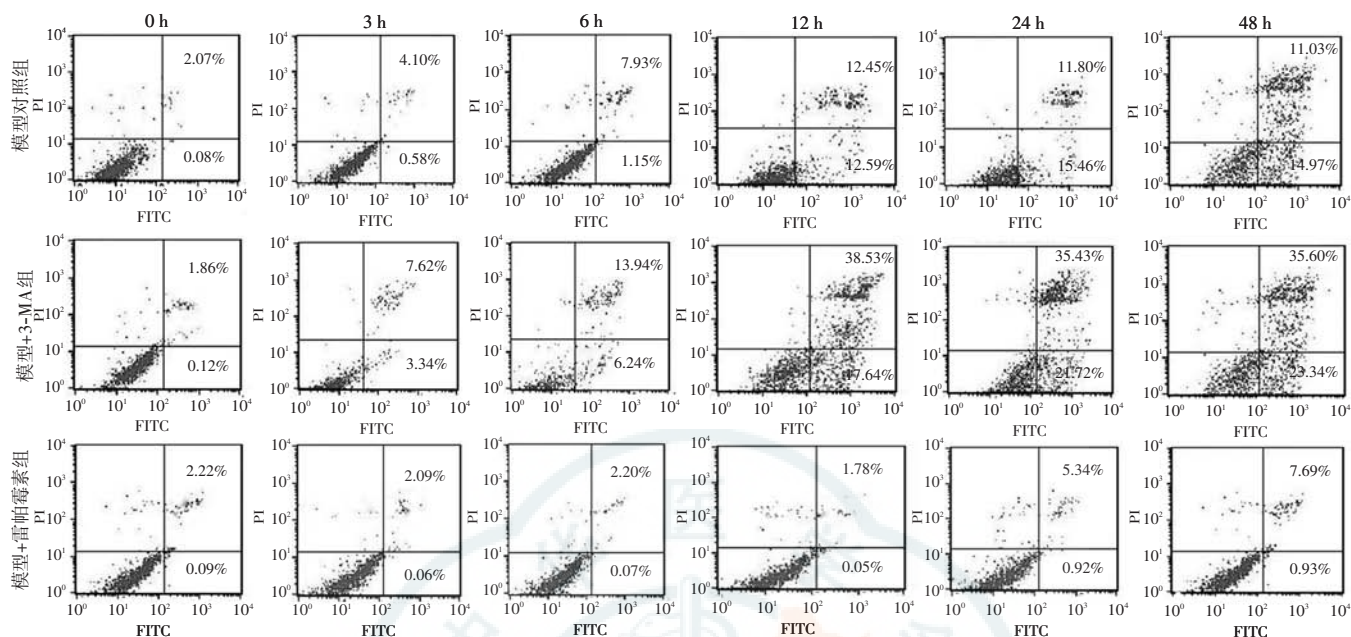


图 10 流式细胞术检测各组不同时间点细胞凋亡百分比 与模型对照组比较,模型+3-MA 组细胞凋亡率明显升高,而模型+雷帕霉素组细胞凋亡率明显降低

3 讨论

Fas 是一种在多种细胞表面广泛表达的跨膜糖蛋白,其位于胞内的死亡结构域,可介导细胞发生死亡。研究表明,激活 Fas 受体可诱导 661W 细胞发生死亡^[5],故本研究中通过加入抗 Fas 抗体诱导 661W 细胞发生凋亡。首先,本研究中对诱导 661W 细胞发生凋亡的适宜抗 Fas 抗体浓度进行筛选,通过检测活化的 caspase-3 相对表达量的变化来反映细胞的凋亡水平。实验结果表明,随着抗 Fas 抗体浓度的增加,661W 细胞中活化 caspase-3 相对表达量逐渐升高,即凋亡细胞逐渐增多,并在 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时达高峰,此后继续提高抗体质量浓度,活化 caspase-3 相对表达量反而减少,这可能是由于高浓度的抗 Fas 抗体可对 661W 细胞产生毒性作用,使细胞通过凋亡途径之外的方式发生死亡^[6]。因此,本实验中选用 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗 Fas 抗体诱导 661W 细胞发生凋亡。

本课题组之前的研究表明,在小鼠视网膜脱离模型中,光感受器细胞的凋亡呈时间相关性,即在造模后 1 d 即可发生凋亡,3 d 时凋亡率达高峰,7 d 时凋亡率明显下降^[7]。同样地,为了探讨抗 Fas 抗体诱导 661W 细胞凋亡的时间相关性,本研究中对细胞凋亡模型进行动态观察,发现加入抗 Fas 抗体后细胞的凋亡率从诱导后 6 h 开始增加,12 h 达高峰,并持续至 48 h。另外,活化的 caspase-8 是细胞凋亡的外源性途径中的启动者,其相对表达量的变化与活化的 caspase-3 呈现相

同的趋势,因此认为抗 Fas 抗体可通过外源性途径激活 661W 细胞的凋亡。

Mitter 等^[8]发现在小鼠 AMD 模型中,早期阶段(1~3 个月)LC-3 自噬标志物表达增加,而晚期阶段(6 个月)LC-3 表达减少;同样地,AMD 患者视网膜组织中自噬标志物的变化也有类似趋势,说明自噬在 AMD 早期增强,在 AMD 晚期减弱。本研究中以 LC-3II/LC-3 I 的相对变化量以及 Atg-5 的相对表达量来反映细胞内自噬的激活水平,结果表明加入抗 Fas 抗体诱导后 3 h,661W 细胞的自噬水平开始升高,24 h 达高峰,并于 48 h 时降至基线水平。

自噬需要超过 20 种自噬相关基因编码蛋白的共同参与^[9],其中当细胞出现能量供应不足或哺乳动物雷帕霉素靶点(mammalian target of rapamycin, mTOR)被阻断时,其胞内非协同 51 样激酶 1 可被激活,自噬被启动^[10],而雷帕霉素作为目前常用的自噬诱导剂,可以通过抑制 mTOR 来启动自噬过程^[11-12];磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)在自噬体形成的成核阶段发挥着重要作用^[13],而 3-MA 是一种选择性 PI3K 抑制剂,能够影响自噬体的成核和组装^[11-12]。自噬体形成后,经过一系列反应,表达 LC3 的自噬体通过微管系统转运至溶酶体,并与之融合,形成自噬溶酶体^[14]。

越来越多的研究表明,自噬与众多疾病,如视网膜脱离、AMD 和人视网膜色素上皮细胞增生的发生和发展密切相关^[15-17],但是,关于自噬在疾病中发挥的作

用一直未达成明确的共识。Leinonen 等^[18]研究认为当自噬被阻断时,可能会促进小鼠神经元蜡样脂褐质沉积症模型中视网膜变性的发生。而 Levine 等^[19]的研究结果显示,当自噬强度过高时,其可以作为一种细胞程序性死亡机制,诱导细胞发生主动死亡。Kunchithapautham 等^[20]在使用过氧化物刺激 661W 细胞后,发现自噬和凋亡水平均升高,凋亡抑制因子表达量下降,抑制自噬可使凋亡水平下降,提高细胞存活率,从而推测自噬可促进光感受器细胞的凋亡。本研究中分别通过 3-MA 抑制自噬和雷帕霉素诱导自噬来观察不同时间点细胞凋亡模型生存状态的变化。本研究表明 3-MA 对凋亡细胞模型 661W 细胞自噬的抑制作用在 20 nmol/L 时最强,而雷帕霉素对凋亡细胞模型自噬的诱导作用在 2.0 nmol/L 时最强,随着二者浓度的升高,661W 细胞自噬水平无明显变化。因此,本研究中分别选取 20 nmol/L 3-MA 和 2.0 nmol/L 雷帕霉素抑制或诱导 661W 细胞自噬。

本研究中结果显示,与相应时间点空白对照组相比,单纯使用 3-MA 抑制自噬后 0~48 h,661W 细胞的自噬水平无明显变化,其原因可能是正常细胞自噬水平本身就极低;而使用雷帕霉素诱导自噬后 0~24 h,细胞的自噬水平均处于增强状态,48 h 时则可能由于雷帕霉素在细胞内代谢完全而降至基线水平。单独使用 3-MA 或者雷帕霉素均不会影响 661W 细胞的凋亡率。

本研究表明,凋亡细胞模型经 3-MA 抑制自噬后 3 h 开始出现凋亡率增强,经雷帕霉素诱导自噬后 6 h 开始出现凋亡率降低,故推测自噬对细胞具有保护性作用,与既往研究结果一致^[5,21]。

综上所述,抗 Fas 抗体可通过外源性途径激活 661W 细胞的凋亡,并且在该过程中增强自噬可降低细胞的凋亡率,而抑制自噬则会使细胞凋亡率升高。本研究动态观察了不同自噬水平下 661W 细胞在受到损伤刺激后生存状态的变化,为研究自噬对细胞生存状态的影响提供了更清晰、直观的实验基础。

参考文献

- [1] Murakami Y, Notomi S, Hisatomi T, et al. Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2013, 37: 114-140. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.08.001.
- [2] Karl MO, Reh TA. Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms [J]. *Trends Mol Med*, 2010, 16 (4): 193-202. DOI: 10.1016/j.molmed.2010.02.003.
- [3] 谢佳. 自噬在年龄相关性黄斑变性和视网膜脱离中的研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34 (12): 1145-1148. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.12.021.
- Xie J. Research progress of autophagy in age-related macular degeneration and retinal detachment [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34 (12): 1145-1148. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.12.021.
- [4] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19 (1): 107-120. DOI: 10.1038/cdd.2011.96.
- [5] Besirli CG, Chinskey ND, Zheng QD, et al. Autophagy activation in the injured photoreceptor inhibits fas-mediated apoptosis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (7): 4193-4199. DOI: 10.1167/iovs.10-7090.
- [6] Chang Q, Peter ME, Grassi MA. Fas ligand-Fas signaling participates in light-induced apoptotic death in photoreceptor cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53 (7): 3703-3716. DOI: 10.1167/iovs.11-8928.
- [7] Yang L, Bula D, Arroyo JG, et al. Preventing retinal detachment-associated photoreceptor cell loss in Bax-deficient mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45 (2): 648-654.
- [8] Mitter SK, Song C, Qi X, et al. Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD [J]. *Autophagy*, 2014, 10 (11): 1989-2005. DOI: 10.4161/autophagy.26184.
- [9] Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEBS Lett*, 1993, 333 (1-2): 169-174.
- [10] Jung CH, Jun CB, Ro SH, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20 (7): 1992-2003. DOI: 10.1091/mbc.08-12-1249.
- [11] Wu YT, Tan HL, Shui G, et al. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (14): 10850-10861. DOI: 10.1074/jbc.M109.080796.
- [12] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. *Autophagy*, 2016, 12 (1): 1-222. DOI: 10.1080/15548627.2015.1100356.
- [13] Walker S, Chandra P, Maniava M, et al. Making autophagosomes: localized synthesis of phosphatidylinositol 3-phosphate holds the clue [J]. *Autophagy*, 2008, 4 (8): 1093-1096.
- [14] Pankiv S, Alemu EA, Brech A, et al. FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport [J]. *J Cell Biol*, 2010, 188 (2): 253-269. DOI: 10.1083/jcb.200907015.
- [15] Besirli CG, Chinskey ND, Zheng QD, et al. Inhibition of retinal detachment-induced apoptosis in photoreceptors by a small peptide inhibitor of the fas receptor [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51 (4): 2177-2184. DOI: 10.1167/iovs.09-4439.
- [16] Mitter SK, Rao HV, Qi X, et al. Autophagy in the retina: a potential role in age-related macular degeneration [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 723: 83-90. DOI: 10.1007/978-1-4614-0631-0_12.
- [17] 侯文文, 石焕琦, 张真, 等. 自噬抑制剂 3-MA 对高糖诱导的人视网膜色素上皮细胞增生的抑制作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35 (1): 5-9. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.01.002.
- Hou WW, Shi HQ, Zhang Z, et al. Inhibitory effects of autophagy inhibitor 3-MA on high glucose-induced proliferation of human retinal pigment epithelium cells [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35 (1): 5-9. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.01.002.
- [18] Leinonen H, Keksa-Goldsteine V, Ragauskas S, et al. Retinal degeneration in a mouse model of CLN5 disease is associated with compromised autophagy [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 1597 [2018-03-22]. <http://europepmc.org/articles/PMC5431647>. DOI: 10.1038/s41598-017-01716-1.
- [19] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. *Cell*, 2008, 132 (1): 27-42. DOI: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
- [20] Kunchithapautham K, Rohrer B. Apoptosis and autophagy in photoreceptors exposed to oxidative stress [J]. *Autophagy*, 2007, 3 (5): 433-441.
- [21] Chinskey ND, Zheng QD, Zacks DN. Control of photoreceptor autophagy after retinal detachment: the switch from survival to death [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55 (2): 688-695. DOI: 10.1167/iovs.13-12951.

(收稿日期: 2018-02-11 修回日期: 2018-07-26)

(本文编辑: 张宇)