

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01183

## 慢病毒介导人 *PERK* 基因修饰对内质网应激介导凋亡的影响

张 鹏, 夏 飞, 李美玲, 韩晓凤, 郭凤劲\*

1. 重庆医科大学细胞生物学及遗传学教研室, 重庆 400016

2. 重庆医科大学发育生物学与模式动物平台, 重庆 400016

**[摘要]** **目的** 构建人蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase, PERK)慢病毒载体并包装慢病毒颗粒(lentivirus),探讨成肌细胞 C2C12 中 *PERK* 基因慢病毒修饰对内质网应激介导凋亡的作用。**方法** 设计并合成 *PERK* 基因的上、下游引物,采用 PCR 方法从真核质粒 pcDNA3.1(-)-*PERK* 中扩增目的基因。鉴定后与慢病毒载体 pWPT-GFP 进行重组,再将重组慢病毒载体 pWPT-GFP-*PERK* 与慢病毒包装质粒 pMD2G、pSPAX2 共转入 293T 细胞中,进一步包装形成 *PERK* 慢病毒(LV-*PERK*);收集转染后 48 h 的细胞上清,体外感染成肌细胞 C2C12,观察绿色荧光蛋白(GFP)感染效率,并应用流式细胞仪(FCM)检测内质网应激时重组慢病毒 *PERK* 对 C2C12 细胞增殖凋亡的影响,蛋白质印迹法检测凋亡相关基因 Cleaved Caspase-3 与 Chop 蛋白的表达。**结果** 成功构建和包装了滴度为  $4.2 \times 10^8$  efu/mL 的 *PERK* 重组慢病毒。FCM 检测结果表明, TM+LV-*PERK* 处理组  $G_1$  期细胞比例为 54.37%, 低于 TM 组(77.91%)和 LV-GFP 组(66.41%); TM+LV-*PERK* 处理组 S 期细胞比例为 31.36%, 高于 TM 组(12.14%)和 LV-GFP 组(16.96%), 各组差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ );此外, TM+LV-*PERK* 处理组细胞凋亡率为 25.91%, 高于 TM 组(11.79%)和 Ad-GFP 组(11.24%), 各组差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。免疫印迹检测 Cleaved Caspase-3 和 Chop 蛋白的表达与 FCM 结果一致。**结论** 成功构建和包装 LV-*PERK* 重组慢病毒颗粒,在内质网应激时, LV-*PERK* 慢病毒可促进 C2C12 细胞的增殖和凋亡。

**[关键词]** *PERK*; 慢病毒; 成肌细胞; 内质网应激; 细胞凋亡**[中图分类号]** R349.5**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2014)11-1183-08

### Influence of lentivirus modification of human *PERK* gene on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis

ZHANG Peng, XIA Fei, LI Mei-ling, HAN Xiao-feng, GUO Feng-jin\*

1. Department of Cell Biology and Genetics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Platform of Development Biology and Model Animal, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**[Abstract]** **Objective** To construct the lentivirus vector targeting human protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (*PERK*) gene, and to study the effect of lentivirus modification of human *PERK* gene on endoplasmic reticulum(ER) stress-mediated apoptosis in C2C12 cells. **Methods** Primer pairs of *PERK* gene were designed and synthesized. Human *PERK* gene was amplified by PCR from the expression plasmid pCDNA3.1(-)-*PERK* and was cloned into pWPT-GFP lentivirus vector. Then the recombinant *PERK* lentivirus were produced in 293T cells following co-transfection between pWPT-GFP-*PERK* and the lentivirus packaging plasmids pMD2G, pSPAX2. The supernatants were collected 48 h after transfection and myoblast C2C12 were infected *in vitro*. Infection efficiency of green fluorescent protein (GFP) was observed. The effect of recombinant lentivirus *PERK* on proliferation and apoptosis in C2C12 cells was detected by flow cytometry (FCM) in ER stress. Western blotting analysis was used to examine the expression of apoptosis-related proteins Cleaved Caspase-3 and Chop. **Results** The recombinant lentivirus *PERK* was successfully constructed, with a titer of  $4.2 \times 10^8$  efu/mL. FCM analysis showed that under ER stress condition, the ratio of  $G_1$  phase C2C12 cells in the TM+LV-*PERK* group (54.37%) was significantly lower than those in the TM group (77.91%) and LV-GFP (66.41%,  $P < 0.05$ ); the ratio of S phase C2C12 cells in the TM+LV-*PERK* group

**[收稿日期]** 2014-03-19 **[接受日期]** 2014-05-16

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81371928,81171697),教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-12-1090),人力资源和社会保障部留学回国人员择优资助项目(2011-235). Supported by National Natural Science Foundation of China(81371928,81171697), Program for New Century Excellent Talents of Ministry of Education (NCET-12-1090), and the Foundation for Returned Overseas Chinese Scholars of Human Resources and Social Security(2011-235).

**[作者简介]** 张 鹏, 硕士生. E-mail: 912446689@qq.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-68485806, E-mail: guo.fengjin@gmail.com

(31.36%) was significantly higher than those in the TM group (12.14%) and LV-GFP (16.96%,  $P < 0.05$ ). The apoptosis rate in the TM+LV-PERK group (25.91%) was significantly higher than those in the TM group (11.79%) and Ad-GFP group (11.24%,  $P < 0.05$ ). Western blotting analysis showed that the expression of Cleaved Caspase-3 and Chop protein was consistent with the results of FCM. **Conclusion** We have successfully constructed and packaged recombinant lentivirus PERK. Under ER stress condition, LV-PERK can promote the proliferation and apoptosis in C2C12 cells.

[Key words] PERK; lentivirus; myoblasts; endoplasmic reticulum; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(11):1183-1190]

内质网是蛋白质折叠以及修饰、钙离子储存的场所,蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like ER kinase, PERK) 是一种位于内质网膜上的 I 型跨膜蛋白,属于 eIF2 $\alpha$  上游激酶家族,具有丝/苏氨酸蛋白激酶的活性<sup>[1]</sup>。当内质网中聚集大量错误折叠蛋白质时,会激活内质网应激 (ER stress),这时,PERK 作为内质网应激一个重要的信号分子,会进一步被激活,通过磷酸化真核细胞起始因子 2 $\alpha$  (eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ ) 抑制蛋白质合成,同时通过活化转录活化因子 4 (ATF4) 上调 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, Chop) 基因的表达,进而活化细胞凋亡途径的发生,参与细胞的整合应激反应过程,参与各种代谢异常、组织损伤等病理过程的发生、发展和转变<sup>[2]</sup>。

近年来,骨骼肌的损伤和修复日益引起研究人员的关注,本实验成功构建和包装了人 PERK 基因重组慢病毒颗粒,并观察其对小鼠成肌细胞 C2C12 在内质网应激状态时增殖及凋亡的影响,为进一步研究人 PERK 基因在骨骼肌细胞中的生物学功能奠定基础,也为研究骨骼肌损伤及修复的分子机制提供一定的理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 慢病毒表达载体 pWPT-GFP、慢病毒包装原件载体 pMD2G 和 pSPAX2 由第二军医大学何志颖教授惠赠,HEK-293T 细胞、C2C12 细胞株由本实验室保存。Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司); TRIzol 试剂、SYBR Real-time PCR Master Mix (TaKaRa 公司), Exo III 外切核酸酶 III 为 TaKaRa 公司产品; BamH I、Mlu I 内切酶、胶纯化、DNA 回收试剂盒及合成引物为大连宝生物 (TaKaRa) 公司产品;质粒小量提取试剂盒购自 Omega 公司; DMEM、胎牛血清购自 Hyclone 公司;细胞培养皿购自 NEST 公司;ECL 发光试剂盒购自北京鼎国昌盛

生物技术有限公司;PVDF 膜和 NC 膜购自美国 Milipore 公司; $\beta$ -actin 抗体、PERK 抗体、HRP 标记山羊抗兔/山羊抗鼠抗体均购自 Santa Cruz 公司;RIPA 蛋白裂解液购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

### 1.2 PERK 慢病毒载体的构建

1.2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 中人 PERK 中 CDS 区的基因序列,设计并合成 PERK 的扩增引物, Sense Primer: tcgtgacgcGGATCCATGGAGCGGCCATCAGC; Antisense Primer: agcgctaggacgcgctATTGCTTGCAAAGGGCTATGG (下划线分别为 BamH I、Mlu I 酶切位点),以真核表达载体 pcDNA3.1(-)-PERK 为模板扩增 PERK 基因,扩增 PERK 基因大小为 3 348 bp。

1.2.2 目的基因的 PCR 扩增以及含 PERK 基因的重组慢病毒的构建 采用 100  $\mu$ L PCR 体系从真核表达载体 pcDNA3.1(-)-PERK 中扩增 PERK 基因: 2 $\times$  Taq Master Mix 50  $\mu$ L、上游、下游引物各 2.5  $\mu$ L、模板 5  $\mu$ L、灭菌双蒸水 40  $\mu$ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 64 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min 45 s, 共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。4 $^{\circ}$ C 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 结果。用限制性内切酶 BamH I、Mlu I 双酶切慢病毒载体 pWPT-GFP, 将上述纯化的 PCR 产物和双酶切慢病毒载体 pWPT-GFP 通过 LIC (ligation-independent cloning) 连接, 构建载体 pWPT-GFP-PERK。连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态菌, 37 $^{\circ}$ C 摇床过夜, 质粒小量提取试剂盒提取质粒 DNA 并酶切和 PCR 鉴定, 测序鉴定。

1.3 慢病毒重组体的包装和靶细胞感染 转染前 1 d 在 2 个 6 cm 的培养皿中接种对数生长期的 293T 细胞, 次日将慢病毒载体 pWPT-GFP 和重组慢病毒载体 pWPT-GFP-PERK 分别与辅助包装质粒 pSPAX2、pMD2G 混合, 按照 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 脂质体说明

书分别将 3 种质粒充分混合分别转染入 293T 细胞中, 3 种质粒各自加入 12.5  $\mu\text{g}$ 、7  $\mu\text{g}$  和 3.5  $\mu\text{g}$ <sup>[3-4]</sup>。5 h 后换新鲜的细胞培养液, 48 h、72 h 分别收集培养上清, 0.45  $\mu\text{m}$  滤器过滤后 -80 $^{\circ}\text{C}$  保存。

1.4 病毒滴度的检测 感染前 1 d 在 24 孔板中接种 293T 细胞, 按照孔稀释法倍比稀释浓缩的病毒上清, 取 200  $\mu\text{L}$  加入细胞中, 每个稀释倍数设置 2 个复孔。孵箱过夜, 第 2 天更换 DMEM 完全培养液, 48 h 后荧光显微镜下观察绿色荧光数。1 个发绿色荧光的细胞为 1 个表达单位 (expression forming units, efu), 根据下面公式计算病毒滴度 (efu/mL)<sup>[5-6]</sup> 和感染复数 (MOI): 病毒滴度 = 发绿色荧光的细胞数  $\times$  病毒稀释倍数 / 0.25, MOI = 病毒滴度  $\times$  加入病毒体积 / 感染的细胞数。

1.5 RT-PCR 检测 LV-PERK 感染 C2C12 细胞后 mRNA 表达 收集 6 cm 的培养皿中长至 90% 的 C2C12 细胞, 作为空白对照 A 组, 感染慢病毒空对照 LV-GFP 的 C2C12 细胞为 B 组, 感染慢病毒 LV-PERK 的 C2C12 细胞为 C 组。用 TRIzol 提取其总 RNA, 再用 TaKaRa 公司的 PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit 试剂盒反转录成 cDNA, PCR 扩增后 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。PERK 的引物序列: 上游: 5'-AGC ACT CAG ATG GAG AGA GTC AG-3', 下游: 5'-GCT ATG GGA GTT GTT GGA CT GT-3', 产物大小为 260 bp;  $\beta$ -actin 的引物序列: 上游: 5'-GAC CCA GAT CAT GTT TGA GAC C-3', 下游: 5'-ATC TCC TTC TGC ATC CTG TCG-3', 产物大小为 550 bp; RT-PCR 反应体系: 2  $\times$  Taq Master Mix 5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , 模板 2  $\mu\text{L}$ , 灭菌双蒸水 2.2  $\mu\text{L}$ ; 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  再延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.6 蛋白质印迹检测 LV-PERK 在 C2C12 细胞中的表达 取 6 cm 培养皿的 90% C2C12 细胞作为空白对照 A 组, 感染慢病毒空对照 LV-GFP 的 C2C12 细胞为 B 组, 感染慢病毒 LV-PERK 的 C2C12 细胞为 C 组。各组细胞分别经预冷的 PBS 冲洗 3 次后, 加入 200  $\mu\text{L}$  的蛋白裂解液, 用细胞刮缓缓刮下收集至 1.5 mL 的 EP 管中, 放置冰上充分裂解 40 min, 12 000  $\times g$  4 $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min。取上清至新的 EP 管

中, 加入 4  $\times$  SDS 上样缓冲液, 分装后至 -80 $^{\circ}\text{C}$  保存。3 种蛋白各取 20  $\mu\text{L}$  于 10% 的 SDS-PAGE 电泳后, 电转移至 PVDF 膜上 1 h, 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h; 分别加入  $\beta$ -actin 鼠抗抗体 (1 : 1 000) 和 PERK 兔抗抗体 (1 : 1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。次日吸取抗体液, 分别加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (羊抗鼠 1 : 5 000) 和二抗 (羊抗兔 1 : 5 000), ECL 显影。

1.7 FCM 检测 PERK 重组慢病毒对 C2C12 细胞周期和凋亡的影响

1.7.1 细胞周期的检测 取对数期生长的 C2C12 细胞接种于 6 孔板, 待细胞长至 80% 时分别加入慢病毒 pWPT-GFP-PERK 和慢病毒 pWPT-GFP, 并设立空白对照 NC 组。每个实验设置 2 个复孔, 重复 3 次。一组实验样品不加衣霉素 (tunicamycin, TM), 另外一组感染 72 h 后加入 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TM 处理 24 h, 收集各组细胞用 1.5 mL 的 70% 乙醇固定 24 h, 加入等体积的染料 PI, 4 $^{\circ}\text{C}$  放置 20~30 min 后尼龙膜过滤, FCM 测定各组细胞周期情况。该检测由重庆医科大学生命科学院完成。

1.7.2 细胞凋亡的检测 取对数生长期 C2C12 细胞接种于 6 孔板, 待细胞长至 80% 时分别加入慢病毒 LV-PERK 和对照 LV-GFP, 并设立空白对照 NC 组。每个实验设置 2 个复孔, 重复 3 次。一组实验样品不加 TM, 另外一组感染 72 h 后加入 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TM 处理 24 h, 收集各组细胞 PBS 洗涤 3 次, 加入等体积 PBS, 应用 FCM Annexin PE 法检测细胞凋亡。该检测由重庆医科大学生命科学院完成。

1.8 蛋白质印迹法检测 PERK 重组慢病毒对 C2C12 细胞凋亡相关基因蛋白表达的影响 取对数生长期的 C2C12 细胞接种于 6 孔板, 待细胞长至 80% 时分别加入慢病毒 LV-PERK 和对照 LV-GFP, 并设立空白对照 NC 组。感染慢病毒 72 h 后, 加入 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TM 处理 24 h, 提取各组细胞总蛋白, 蛋白质印迹法检测 PERK 蛋白的表达及凋亡相关基因 Cleaved Caspase-3 和 Chop 蛋白的表达。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 15.0 统计软件对组间差异进行方差分析。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 慢病毒表达载体的构建 以 pcDNA3.1(-)-PERK 为模板扩增目的基因 PERK, 扩增目的基因



大小为 3 348 bp,与预期一致(图 1A)。目的基因 PERK 与慢病毒载体 pWPT-GFP 分别以 BamH I、Mlu I 双酶切后纯化、连接,转化并提质粒后进行酶切鉴定。由于 PERK 基因中含有 BamH I 的酶切位点,所以只需使用 BamH I 单酶切鉴定即可,如图 1B 所示,在 1 210 bp 和 11 608 bp 处出现 2 条带,对照质粒只出现 1 条带。结果表明慢病毒表达载体 pWPT-GFP-PERK 构建成功。

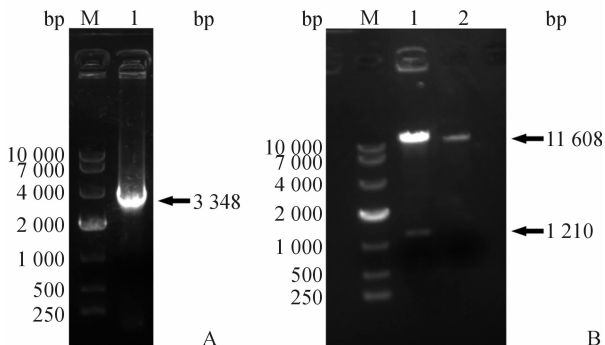


图 1 PERK 基因 PCR 以及慢病毒载体 pWPT-GFP-PERK 酶切结果

Fig 1 PCR products of PERK gene and lentivirus pWPT-GFP-PERK vector digestion

A: PCR results of PERK (M: DL10000; 1: pcDNA3.1(-)-PERK); B: BamH I digestion results of pWPT-GFP-PERK (M: DL10000; 1: pWPT-GFP-PERK; 2: pWPT-GFP)

2.2 慢病毒的包装及对 C2C12 细胞的感染 将慢病毒表达载体 pWPT-GFP-PERK 和包装载体 pMD2G、pSPAX2 在 293T 细胞中共转 48 h 后荧光显微镜下观察,可见明显绿色荧光,细胞停止生长,说明慢病毒包装成功(图 2A)。包装好的 LV-PERK 慢病毒经 0.45 μm 滤器过滤后感染 C2C12 细胞,72 h 后可见明显绿色荧光,GFP 表达 >90%(图 2B)。

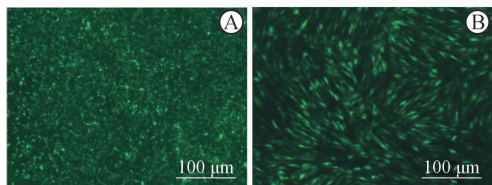


图 2 慢病毒的包装以及对 C2C12 细胞的感染

Fig 2 Lentivirus packaging and infection of C2C12 cells

A: Lentivirus packaging in 293T cells; B: Lentivirus LV-PERK infected C2C12 cells

2.3 病毒滴度的检测 将慢病毒表达载体 pWPT-GFP-PERK 和包装载体 pMD2G、pSPAX2 在 293T

细胞中包装形成慢病毒,经倍比稀释法测定得到慢病毒 LV-PERK 的滴度约为  $4.2 \times 10^8$  efu/mL,可用于后续实验。LV-PERK 慢病毒分别按 MOI = 20 (图 3A)、MOI = 40(图 3B)、MOI = 100(图 3C)的梯度感染 C2C12 细胞,72 h 后,当感染复数 MOI 为 40 时 GFP 表达量达到 80% 以上,MOI 为 100 时 GFP 表达量反而降低,说明 LV-PERK 慢病毒对 C2C12 细胞的最佳感染复数是 40。

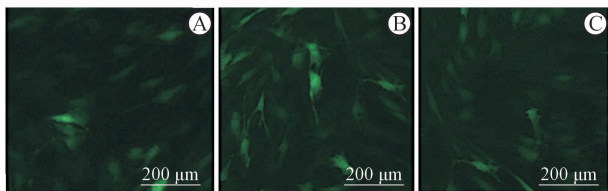


图 3 C2C12 细胞中病毒滴度的检测

Fig 3 Detection of virus titer in C2C12 cells

A: MOI=20; B: MOI=40; C: MOI=100

2.4 RT-PCR 和蛋白质印迹检测 C2C12 细胞中 PERK 的表达 RT-PCR 结果(图 4A)显示,感染慢病毒 LV-PERK 组在 260 bp 处可见明显的特异性条带,550 bp 处出现明亮的 β-actin 条带;NC 组和 LV-GFP 对照组 PERK 表达量很少。蛋白质印迹结果(图 4B)显示: C2C12 细胞感染慢病毒 LV-PERK 72 h 后,细胞中 PERK 的表达明显高于 NC 组及 LV-GFP 对照组。

2.5 FCM 检测 PERK 重组慢病毒对 C2C12 细胞周期的影响 从图 5 中可以看出,在无 TM 处理下,各实验组的细胞周期均无明显变化;而在 TM 诱导内质网应激条件下,LV-PERK 组 C2C12 细胞 G<sub>1</sub> 期(54.37%)比例低于 TM 组、LV-GFP 对照组(分别为 77.91%、66.41%,  $P < 0.05$ ),LV-PERK 组 C2C12 细胞 S 期(31.36%)比例高于 TM 组、LV-GFP 对照组(分别为 12.14%、16.96%,  $P < 0.05$ )。结果表明 PERK 在内质网应激状态下能促进 C2C12 细胞增殖。

2.6 FCM 检测 PERK 重组慢病毒对 C2C12 细胞凋亡的影响 从图 6 可以看出,在无 TM 处理下,C2C12 细胞凋亡率约为 3.44%;在 TM 处理下,感染慢病毒 LV-PERK 组 C2C12 细胞的凋亡率明显高于无 TM 处理组、TM 组、TM + LV-GFP 组( $P < 0.05$ )。结果表明 PERK 在内质网应激状态下能加速 C2C12 细胞的凋亡。

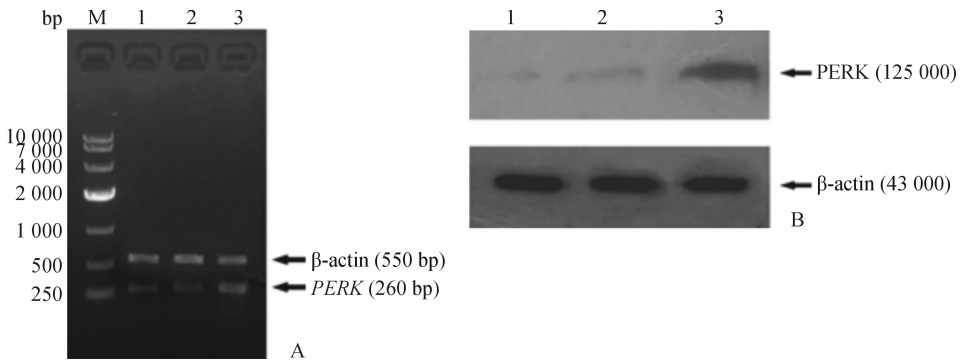


图 4 慢病毒 LV-PERK 在 C2C12 细胞中的表达

Fig 4 Expression of LV-PERK in C2C12 cells

A: The expression of *PERK* mRNA in C2C12 cell was detected by RT-PCR (M; DL2000; 1; NC group; 2; LV-GFP group; 3; LV-PERK group); B: The expression of PERK protein in C2C12 cell was detected by Western blotting analysis (1; NC group; 2; LV-GFP group; 3; LV-PERK group)

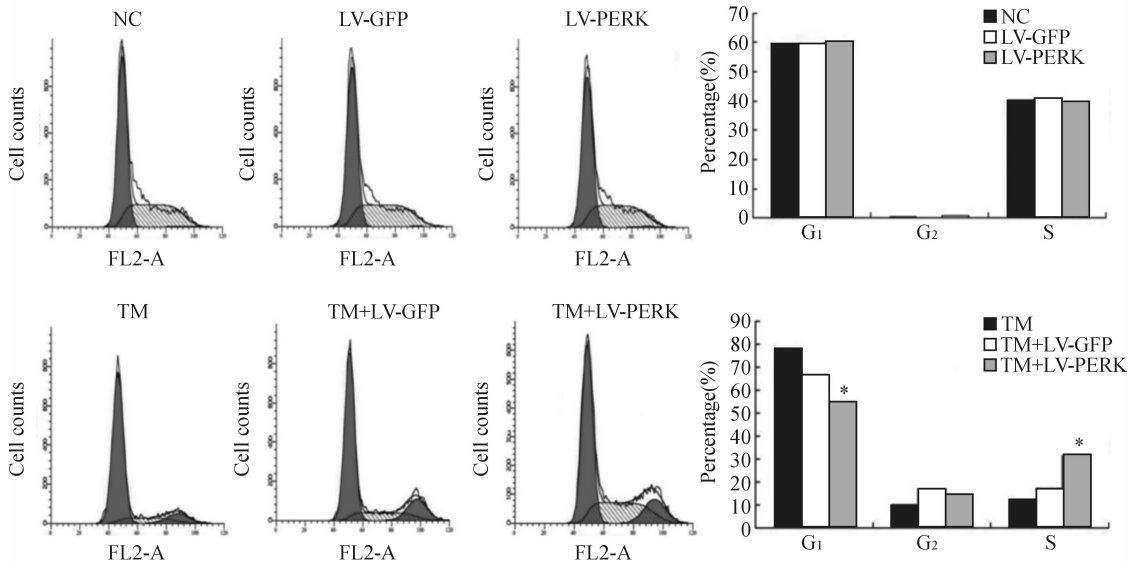


图 5 FCM 检测在衣霉素(TM)处理条件下慢病毒 LV-PERK 对 C2C12 细胞周期的影响

Fig 5 FCM analysis of cell cycle in C2C12 cells infected by LV-PERK with or without tunicamycin (TM) treatment

\*  $P < 0.05$  vs TM and TM+LV-GFP groups;  $n = 3, \bar{x} \pm s$

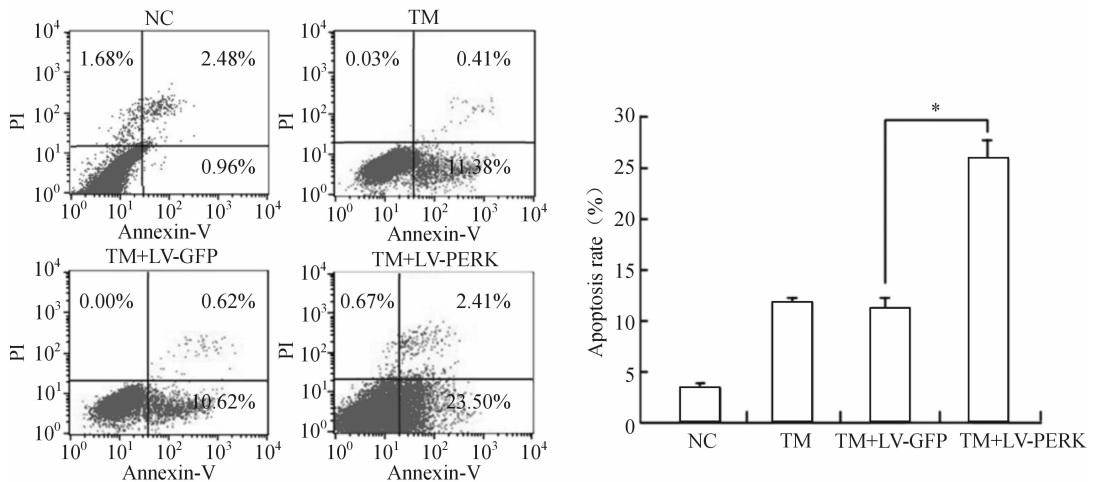


图 6 FCM 检测各组 C2C12 细胞凋亡的结果

Fig 6 FCM analysis of apoptosis rate in C2C12 cells of each group

\*  $P < 0.05$ ;  $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.7 内质网应激时 PERK 蛋白的表达及 LV-PERK 对 C2C12 细胞凋亡的影响 采用蛋白质印迹法检测内质网应激状态下 PERK 蛋白及凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3、Chop 的表达。结果(图 7)显示:与正常对照组相比, TM 处理 C2C12 细胞处于内质网应激状态时, 细胞内源性 PERK 表达有轻微增加, 而感染 LV-PERK 慢病毒后, 与未感染组

相比, C2C12 中 PERK 表达明显增加; LV-PERK 感染 C2C12 细胞后, 在内质网应激状态下, Cleaved Caspase-3 与 Chop 蛋白的表达与 TM 组和 TM+LV-GFP 对照组相比明显上升。结果说明 LV-PERK 在内质网应激状态下对 C2C12 细胞的凋亡有促进作用。

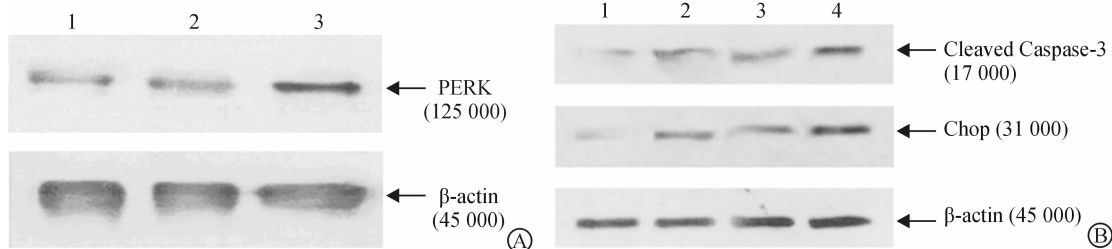


图 7 蛋白质印迹检测 PERK 及内质网应激介导凋亡相关蛋白的表达

Fig 7 Western blotting analysis of expression of PERK and ER stress-mediated apoptosis related proteins

A: The expression of PERK in C2C12 cells in ER stress (1: NC group; 2: TM group; 3: TM+LV-PERK group); B: The expression of ER stress-mediated apoptosis related proteins in C2C12 (1: NC group; 2: TM group; 3: TM+LV-GFP group; 4: TM+LV-PERK group). ER: Endoplasmic reticulum; TM: Tunicamycin

### 3 讨论

内质网是细胞内重要的细胞器,是真核细胞蛋白质修饰折叠和加工的主要场所,同时也是细胞储存钙离子的场所,当上述过程受到各种因素影响时就会导致未折叠蛋白或错误折叠蛋白在内质网腔内聚积或打破细胞内钙稳态而引起内质网应激<sup>[3]</sup>。PERK 是内质网内 I 型跨膜蛋白,具有丝/苏氨酸蛋白激酶活性<sup>[6]</sup>,在内质网应激状态时 PERK 通路被激活。此时,PERK 可以磷酸化真核起始因子 2 (eIF2 $\alpha$ ),进而抑制翻译起始复合物中 GDP 和 GTP 的交换,导致蛋白质的合成和翻译受到抑制<sup>[7]</sup>。内质网应激介导凋亡的过程中,一方面 PERK 促使蛋白质的合成暂时终止;另一方面随着内质网应激时间的持续和加重,PERK 活化激活转录因子 4 (ATF4)从而上调 C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein, Chop)的表达<sup>[8-9]</sup>,Chop 进而抑制 Bcl-2 的表达,最终导致 Caspase-3 执行细胞的凋亡。

众所周知,骨骼肌细胞大约占据了机体细胞干质量的一半,大面积烧伤或烫伤后机体为了获取能量,便开始进行蛋白质的高分解代谢<sup>[10-12]</sup>,在骨骼肌中这表现为显著的骨骼肌消耗,骨骼肌消耗是肌纤维降解和肌细胞核数目减少综合导致的结果<sup>[13-14]</sup>,

其机制主要包括骨骼肌纤维蛋白降解、肌细胞核凋亡、解偶联蛋白增加等<sup>[15]</sup>。近期研究发现烧伤后骨骼肌细胞凋亡增加,凋亡执行分子 Caspase-3 的表达及活性增加,使肌肉蛋白降解速率增加<sup>[16-17]</sup>。同时另一项研究显示大鼠烫伤后 4 d、14 d,烫伤大鼠的胫骨前肌 Caspase-12 活性表达较对照组明显升高,大鼠烫伤后 1、4、7、14 d 的胫骨前肌中 Chop 表达均明显增高<sup>[18]</sup>,这些结果表明凋亡是烧伤后骨骼肌消耗的重要机制。研究认为骨骼肌细胞的凋亡不仅是骨骼肌消耗的重要途径,也可能是重要的始动因素<sup>[19]</sup>,而内质网应激介导凋亡是非常重要的细胞凋亡途径之一<sup>[20]</sup>。大面积烧伤或烫伤主要影响肌肉受损后的葡萄糖摄取、代谢和蛋白质代谢等<sup>[7-8]</sup>。严重烧伤后机体会出现显著的高分解代谢反应,蛋白质分解速率远大于合成速率,在临床上表现为显著的体质量减轻<sup>[9-10]</sup>。近年来,内质网应激作为烧伤引起的骨骼肌消耗日益受到研究人员的关注。研究显示在 60% TBSA III 度烧伤的 SD 大鼠模型中,在肝脏中检测到了 PERK、IRE1、ATF6 的表达均有不同程度的增高<sup>[21]</sup>。关于烧伤后骨骼肌细胞中内质网应激的研究则相对较少。

在本实验中,我们运用慢病毒 LV-PERK 感染成肌细胞 C2C12,并且运用 TM 持续作用于 C2C12

细胞,建立一个经典的内质网应激模型<sup>[22]</sup>。通过流式细胞术以及蛋白质印迹检测内质网应激介导凋亡的凋亡通路中特征性分子 Chop 和 Caspase-3,来探讨 ER 相关基因 PERK 对 C2C12 成肌细胞内质网应激诱导的凋亡的影响。FCM 结果显示,ER 应激持续状态下,TM+LV-PERK 实验组 C2C12 细胞的增殖率高于 TM 对照组,TM+LV-PERK 实验组 C2C12 细胞处于 S 期的比例高于 TM 对照组,G<sub>1</sub> 期的比例低于 TM 对照组,表明 PERK 可在 ER 应激持续状态下促进 C2C12 从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期,从而促进细胞的增殖。FCM 凋亡结果显示,TM 组细胞凋亡率明显高于 NC 组,而 TM+LV-PERK 实验组 C2C12 细胞凋亡率高于 TM 对照组,说明内质网应激持续时 PERK 能促进 C2C12 细胞的凋亡。蛋白质印迹结果与 FCM 也是一致的,TM 组和 TM+LV-GFP 组 Cleaved Caspase-3 和 Chop 的表达明显上调,而 TM+LV-PERK 实验组 C2C12 细胞凋亡率更高于 TM 对照组。结果表明 PERK 在 ER 应激状态下能加速 C2C12 细胞的凋亡。蛋白质印迹结果与 FCM 也是一致的,表现为 TM+LV-PERK 感染后凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3 和 Chop 的表达明显上调。

综上所述,本研究发现内质网应激的状态下,PERK 能够加速骨骼肌 C2C12 细胞的凋亡,这是由于当处于内质网应激时,PERK 活化并且激活了其下游的凋亡通路。烧伤后内质网应激在骨骼肌消耗的分子机制目前才刚开始被渐渐关注,而 PERK 作为 ERS 三大相关基因之一,在骨骼肌消耗中的作用尚不明确。本实验在体外实验中发现内质网应激的状态下 PERK 能够加速骨骼肌 C2C12 细胞的凋亡,然而在情况更为复杂的人体中,是否有相关表现尚不明确。今后的相关研究将关注在动物烧伤模型以及临床试验中 PERK 是否有与体外实验相同的作用,这将为揭开内质网应激在烧伤中的作用奠定基础。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Maedler K, Schulthess F T, Bielman C, Berney T, Bon-

ny C, Prentki M, et al. Glucose and leptin induce apoptosis in human beta-cells and impair glucose-stimulated insulin secretion through activation of c-Jun N-terminal kinases[J]. *FASEB J*, 2008, 22: 1905-1913.

- [2] 范 威, 潘翠萍, 张懿敏, 廖仕翀, 魏 文, 马 彪, 等. 内质网应激对乳腺癌 MCF-7 细胞 CCL5 表达的影响[J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39: 385-388.
- [3] 龙晓兰, 周 敏, 石必枝, 谢海龙, 李宗海. Cofilin-1 慢病毒载体的构建及其在 Huh-7 中的过表达[J]. *中南医学科学杂志*, 2012, 40: 65-69.
- [4] 杜永亮, 贾晓民, 李海泉, 赵 杰, 王海清. IGF1R-shRNA 重组慢病毒的构建及对肺癌 A549 细胞增殖的影响[J]. *山西医科大学学报*, 2013, 44: 106-110.
- [5] 韩腾龙, 王立峰, 张 璟, 刘新平, 药立波. pWPT-GFP 慢病毒载体的改构及鉴定[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10: 447-449.
- [6] 武丽红, 王金河, 王 茜, 贾懂懂, 梁建琴. Survivin shRNA 重组慢病毒的构建及对 A549 细胞增殖的影响[J]. *中国肿瘤杂志*, 2011, 14: 903-907.
- [7] Tzika A A, Mintzopoulos D, Mindrinos M, Zhang J, Rahme L G, Tompkins R G. Microarray analysis suggests that burn injury results in mitochondrial dysfunction in human skeletal muscle[J]. *Int J Mol Med*, 2009, 24: 387-392.
- [8] Price J, Zaidi A K, Bohensky J, Srinivas V, Shapiro I M, Ali H. Akt-1 mediates survival of chondrocytes from endoplasmic reticulum-induced stress[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 222: 502-508.
- [9] Hotamisligil G S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease[J]. *Cell*, 2010, 140: 900-917.
- [10] Eizirik D L, Cardozo A K, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus[J]. *Endocr Rev*, 2008, 29: 42-61.
- [11] Gauglitz G G, Halder S, Boehning D F, Kulp G A, Herndon D N, Barral J M, et al. Post-burn hepatic insulin resistance is associated with endoplasmic reticulum (ER) stress[J]. *Shock*, 2010, 33: 299-305.
- [12] Rayavarapu S, Coley W, Nagaraju K. Endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle homeostasis and disease[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2012, 14: 238-243.
- [13] Jeschke M G, Boehning D. Endoplasmic reticulum stress and insulin resistance post-trauma; similarities to type 2 diabetes[J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16: 437-444.
- [14] Lee H Y, Kaneki M, Andreas J, Tompkins R G, Martyn

- J A. Novel mitochondria-targeted antioxidant peptide ameliorates burn-induced apoptosis and endoplasmic reticulum stress in the skeletal muscle of mice[J]. *Shock*, 2011,36:580-585.
- [15] Chai J, Wu Y, Sheng Z. The relationship between skeletal muscle proteolysis and ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in burned rats[J]. *Burns*, 2002, 28: 527-533.
- [16] Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1[J]. *Dev Cell*, 2007,13:365-376.
- [17] Hollien J, Lin J H, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman J S. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells[J]. *J Cell Biol*, 2009, 186: 323-331.
- [18] Wu T, Dong Z, Geng J, Sun Y, Liu G, Kang W, et al. Valsartan protects against ER stress-induced myocardial apoptosis *via* CHOP/Puma signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011,42:496-502.
- [19] Mecott G A, Al-Mousawi A M, Gauglitz G G, Herndon D N, Jeschke M G. The role of hyperglycemia in burned patients: evidence-based studies[J]. *Shock*, 2010, 33: 5-13.
- [20] Hummasti S, Hotamisligil G S. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes[J]. *Circ Res*, 2010,107:579-591.
- [21] Jeschke M G, Kraft R, Song J, Gauglitz G G, Cox R A, Brooks N C, et al. Insulin protects against hepatic damage postburn[J]. *Mol Med*, 2011,17(5-6):516-522.
- [22] Jeschke M G, Finnerty C C, Herndon D N, Song J, Boehning D, Tompkins R G, et al. Severe injury is associated with insulin resistance, endoplasmic reticulum stress response, and unfolded protein response[J]. *Ann Surg*, 2012,255:370-378.
- [22] Guo F, Lin E A, Liu P, Lin J, Liu C. XBP1U inhibits the XBP1S-mediated upregulation of the iNOS gene expression in mammalian ER stress response[J]. *Cell Signal*, 2010,22:1818-1828.

[本文编辑] 孙岩