

PI3KC3/Beclin1 复合物对染矽尘 NR8383 细胞自噬的调控作用

王路遥, 李宁, 宋瑞瑞, 张晓雪, 万斌斌, 李小明, 李清钊, 沈福海, 蒋守芳, 金玉兰

摘要:

[目的] 探讨 PI3KC3/Beclin1 复合物在染矽尘大鼠肺泡巨噬细胞(NR8383)自噬中的调控作用。

[方法] 常规培养 NR8383 细胞,随机分为 4 组:对照组,矽尘组,3-MA 组和 3-MA 干预组,分别孵育 1、3、6、12、20 h 后收集样品。采用蛋白免疫印迹方法检测自噬标记蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、自噬底物蛋白 p62 以及自噬相关蛋白 Beclin1、PI3KC3;采用激光扫描共聚焦显微镜观察孵育不同时间的自噬免疫荧光表达情况;采用免疫共沉淀检测 Beclin1 复合物表达。

[结果] 免疫荧光结果显示,矽尘组 LC3 点状聚集绿色荧光亮斑随时间先增强后减弱,在 6 h 时荧光最强,且各时间点较对照组和 3-MA 干预组荧光亮斑增强;3-MA 干预组 LC3 荧光标记绿色亮斑先增强后减弱,弱于矽尘组,但强于对照组。加入溶酶体抑制剂二磷酸氯喹后,各组 LC3 绿色荧光信号随时间均呈现增强的趋势。Western blot 结果显示,矽尘组 LC3-II/LC3-I 值呈先增加后减少趋势,且在各个时间点均高于对照组($P<0.05$);在 LC3-II/LC3-I 值达最高的 6 h 时间点,矽尘组的值是对照组的 248%,是 3-MA 组的 372%。3-MA 干预组 LC3-II/LC3-I 值也呈先增加后减少趋势;除 1 h 时间点外,余各时间点均低于矽尘组,但高于对照组($P<0.05$);在 LC3-II/LC3-I 值达最高的 6 h 时间点,3-MA 干预组的值是矽尘组的 90%,是对照组的 223%。Beclin1、PI3KC3 蛋白表达趋势与 LC3-II/LC3-I 值一致,p62 蛋白表达趋势与 LC3-II/LC3-I 值相反。免疫共沉淀显示,矽尘组 Beclin1 与 PI3K 结合增加,3-MA 干预后两者结合减少。

[结论] 矽尘诱导 NR8383 细胞的自噬活动随时间发生不同程度的改变,3-MA 可下调矽尘诱导的 NR8383 细胞自噬活动,推测 PI3KC3/Beclin1 信号通路参与矽尘诱导肺泡巨噬细胞的自噬过程。

关键词: 自噬; NR8383 细胞; Beclin1; III 型 PI3K; p62

引用: 王路遥, 李宁, 宋瑞瑞, 等. PI3KC3/Beclin1 复合物对染矽尘 NR8383 细胞自噬的调控作用[J]. 环境与职业医学, 2018, 35(9): 801-808. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.18114

Regulation of PI3KC3/Beclin1 complex on autophagy of NR8383 macrophages exposed to silica dust WANG Lu-yao, LI Ning, SONG Rui-rui, ZHANG Xiao-xue, WAN Bin-bin, LI Xiao-ming, LI Qing-zhao, SHEN Fu-hai, JIANG Shou-fang, JIN Yu-lan (School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China). Address correspondence to JIN Yu-lan, E-mail: 13932579151@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.
Abstract:

[Objective] To observe the regulation of PI3KC3/Beclin1 on silica dust-induced autophagy in NR8383 cells.

[Methods] NR8383 cells were randomly divided into four groups: control group, silica dust group, 3-MA group, and 3-MA intervention group. The samples were collected at 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, and 20 h after incubation. Western blot was used to detect microtubule associated protein light chain 3 (LC3), autophagy substrate p62, as well as autophagy related proteins Beclin1 and PI3KC3. Laser scanning confocal microscopy was used to observe the green fluorescence emitted by autophagy activity after varied incubation durations. Co-immunoprecipitation was used to detect the expression of Beclin1 complex.

[Results] The results of immunofluorescence showed that the green fluorescence spot of the silica dust group was enhanced first and then decreased, the fluorescence intensity was highest at 6 h, and the fluorescence intensity of the silica dust group was elevated at all selected time points compared with the control group and the 3-MA intervention group. In the 3-MA intervention group, the LC3 fluorescent marker green spot was first enhanced and weakened, and was weaker than the silica dust group, but stronger

• 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 81202161)

[作者简介] 王路遥(1993—),女,硕士生;研究方向:职业卫生安全;E-mail: 554200283@qq.com

[通信作者] 金玉兰, E-mail: 13932579151@163.com

[作者单位] 华北理工大学公共卫生学院,河北 唐山 063000

than the control group. After adding chloroquine diphosphate (CDP), the LC3 green fluorescence signal of each group showed an increasing trend with time. Western blot results showed that the value of LC3-II/LC3-I in the silica group increased first and then decreased, and was higher than the control group at each time point ($P < 0.05$). The value of LC3-II/LC3-I was highest at 6 h, when the value of the silica dust group was 248% of the control group and 372% of the 3-MA group. The value of LC3-II/LC3-I in the 3-MA intervention group increased first and then decreased, and was lower than the silica dust group at each time point, but was higher than the control group ($P < 0.05$). At 6 h when LC3-II/LC3-I value was highest, the value of the 3-MA intervention group was 90% of the silica dust group and 223% of the control group. The trend of Beclin1 and PI3KC3 protein expressions were consistent with LC3-II/LC3-I, and p62 protein expression was not. Co-immunoprecipitation results showed that the combination of Beclin1 and PI3K was increased in the silica dust group, and reduced after 3-MA intervention.

[Conclusion] Silica-induced autophagy activity in NR8383 cells changes over time, and can be down-regulated by 3-MA, suggesting that PI3KC3/Beclin1 signaling pathway participates in the autophagy of alveolar macrophages induced by silica dust.

Keywords: autophagy; NR8383 cell; Beclin1; PI3KC3; p62

Citation: WANG Lu-yao, LI Ning, SONG Rui-rui, et al. Regulation of PI3KC3/Beclin1 complex on autophagy of NR8383 macrophages exposed to silica dust[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2018, 35(9): 801-808. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.18114

自噬, 又被称为Ⅱ型程序性死亡, 是依赖胞质内溶酶体进行胞内降解的现象, 在很多生理过程如清除受损衰老的细胞器、变性或错误折叠的蛋白质以及不需要的生物大分子上发挥着重要作用^[1]。随着自噬研究的深入, 国内外很多研究报道自噬参与了多种疾病的进展, 包括肿瘤^[2]、神经退化^[3]、器官纤维化^[4]等。而自噬的调节是一个复杂的过程, 受多种信号通路调控, 经典的调节机制之一是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)非依赖性调节机制, 即Ⅲ型PI3K磷脂酰肌醇3激酶复合物(phosphoinositide 3-kinase class 3, PI3KC3)通过增加Beclin1蛋白的表达而诱导自噬。本课题组前期人群研究和动物实验发现不同期别矽肺患者和不同染尘时期大鼠的肺泡巨噬细胞中自噬活动的强度发生了相应的变化^[5-7], 提示巨噬细胞的自噬活动在矽肺纤维化中可能起到一定的作用, 但具体机制尚不清楚。本研究在细胞水平上, 通过给予自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA), 探讨PI3KC3/Beclin1复合物在染尘大鼠肺泡巨噬细胞(NR8383)自噬中的调控作用, 以期为矽肺纤维化的机制研究和预防提供理论基础和研究线索。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

NR8383细胞(菌种保藏中心, 美国); 3-MA (Sigma, 美国); F-12K培养基(Gibco, 美国); 胎牛血清、青链霉素(MP, 美国); 无定型SiO₂粉尘(Sigma, 美国), 用0.9%氯化钠溶液配制质量浓度为5 mg/mL的矽尘悬浮液, 高压蒸气灭菌备用; BCA蛋白定量

试剂盒(晶彩生物科技有限公司, 中国); RIPA裂解液(普利莱基因技术有限公司, 中国); 蛋白上样缓冲液(索莱宝科技有限公司, 中国); 脱脂奶粉(伊利集团乳业股份有限公司, 中国); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG抗体、兔源PI3KC3抗体、兔源Beclin1抗体(Cell Signaling, 美国); LC3抗体、p62抗体(Sigma, 美国); 二磷酸氯喹(chloroquine diphosphate, CDP)、超敏电化学ECL试剂盒(碧云天生物技术公司, 中国); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(Affinity biosciences, 美国); Alexa Fluor[®]488标记羊抗兔IgG抗体(Life technologies, 美国)。二氧化碳细胞培养箱(Thermo Scientific, 美国); T25无菌培养瓶(耐思生物科技有限公司, 中国); FV1000激光扫描共聚焦显微镜(Olympus, 日本); SpectraMax[®]M5多功能酶标仪(Molecular Devices, 美国); FlourChem[™]HD2高灵敏化学发光凝胶成像系统(Protein Simple, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及传代 将NR8383细胞置于含F-12K培养基(含体积分数为15%的胎牛血清和1%青链霉素)的T25无菌培养瓶中, 于37℃恒温、5%CO₂培养箱中培养, 待细胞长至80%~90%时进行传代。取生长状态良好、处于对数生长期的NR8383细胞进行后续实验。

1.2.2 细胞分组与处理 CCK-8法确定3-MA使用剂量为5 mmol/L后, 取经“1.2.1”传代培养后生长良好的对数期NR8383细胞, 反复吹打瓶身后吸取细胞悬液至15.0 mL离心管内, 1 000转/min离心5 min(离心半径10.0 cm, 后同), 弃上清液, 用F-12K培养基重悬细胞,

以 1×10^6 个/mL细胞密度接种于6孔板中。将6孔板中细胞分为对照组、矽尘组、3-MA组和3-MA干预组。对照组加入2 mL完全培养基,矽尘组加入矽尘悬浮液使其终质量浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$,3-MA组加入3-MA溶液使其终质量浓度为 5 mmol/L ,3-MA干预组加入矽尘悬浮液和3-MA溶液使其终质量浓度分别为 $50 \mu\text{g/mL}$ 和 5 mmol/L 。此外,在4组中分别加入浓度为 20 mg/L 的CDP,与未加入CDP的4组作比较。继续培养1、3、6、12、20 h后,在相应时间点收获细胞,每个时间点6个复孔。

1.2.3 激光共聚焦检测自噬相关蛋白LC3的表达 将NR8383细胞按细胞密度 1×10^6 个/mL接种于共聚焦培养皿中,孵育12 h后,根据分组加入不同的药物和矽尘悬浮液,处理方法同“1.2.2”,孵育1、3、6、12、20 h后分别去除培养基,PBS洗涤3次后用4%多聚甲醛溶液固定15 min,再以PBS洗涤3次,经0.2% Triton-100覆盖细胞,室温透膜10 min,洗涤3次后加入5%正常羊血清封闭1 h,之后加入滴度为1:200的LC3抗体 $200 \mu\text{L}$, 4°C 孵育过夜;次日经PBS洗涤3次后加入荧光二抗(滴度为1:400)室温避光孵育1 h,PBS洗涤细胞后,于激光共聚焦显微镜下观察LC3蛋白表达情况。

1.2.4 蛋白免疫印迹法检测细胞中自噬相关蛋白的表达 将接种于6孔板的4组细胞,按照“1.2.3”方法处理后,收集各组细胞,加入RIPA细胞裂解液,冰上裂解30 min, 4°C 12 000转/min离心5 min,收集上清,采用BCA蛋白定量法定量。经体积分数为12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,采用半干转方法转至PVDF膜上,用质量分数为5%脱脂奶粉室温封闭2 h,一抗 4°C 摇床孵育过夜,洗涤3次后室温孵育二抗2 h,经ECL显影后,用Fluro-Chem HD2凝胶成像系统成像检测Beclin1、p62、PI3KC3、LC3-II/LC3-I和GAPDH蛋白条带,其中以GAPDH为内参,计算相对灰度值。

1.2.5 免疫共沉淀检测Beclin1复合物的表达 将接种于6孔板的4组细胞,按照“1.2.2”方法处理,孵育6 h后收集各组细胞,加入RIPA细胞裂解液,冰上裂解30 min, 4°C 12 000转/min离心5 min,收集上清,采用BCA蛋白定量法定量,使总蛋白质量浓度为 1 g/L 。加入 $10 \mu\text{L}$ 的兔源PI3KC3抗体(滴度为1:50)至 1.5 mL 离心管中, 4°C 摇床缓慢摇动抗原抗体复合物过夜,加入 $20 \mu\text{L}$ 重悬的蛋白A-琼脂糖珠于 1.5 mL 离心管中,捕捉抗原抗

体复合物, 4°C 摇床缓慢摇动抗原抗体复合物过夜,收集免疫沉淀物,PBS洗涤后,加入 $40 \mu\text{L}$ 蛋白上样缓冲液重悬沉淀物, 100°C 5 min使蛋白变性,离心,取上清进行SDS-PAGE、Western blot分析。

1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0软件进行统计分析。计量资料经正态性检验符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 描述;多组间均数比较采用单因素方差分析,组间均数比较采用LSD检验;析因设计资料采用两因素(不同分组处理因素共4个水平,染尘时间因素为5个水平) 4×5 析因设计方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

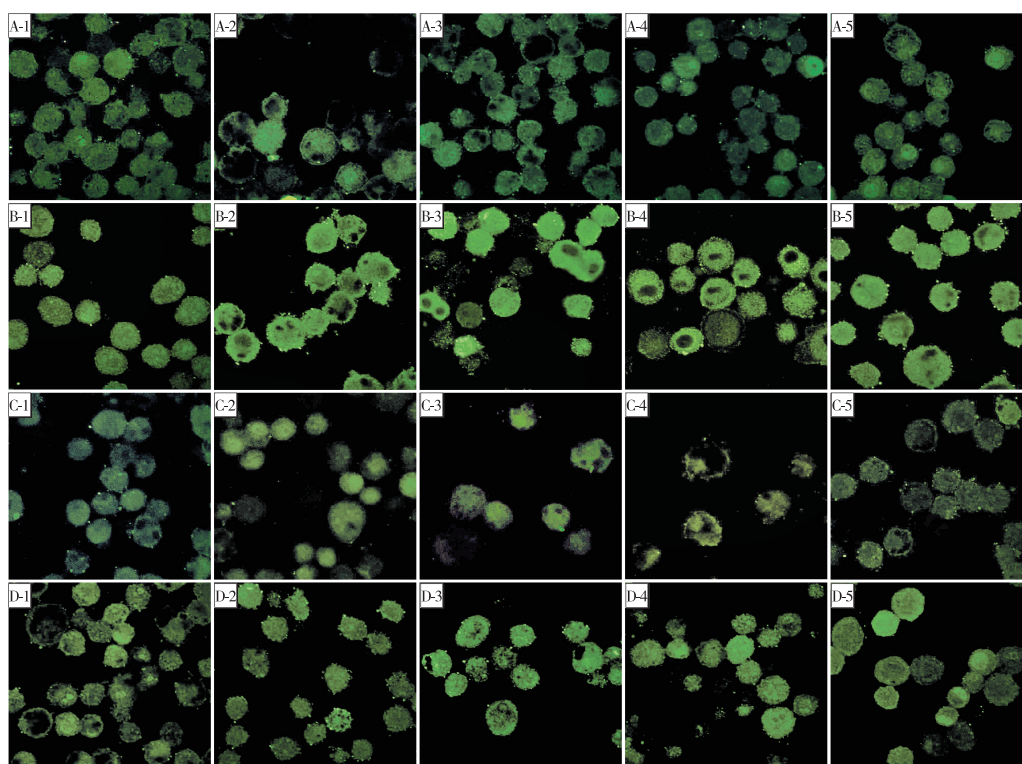
2.1 LC3蛋白荧光强度

NR8383细胞经染尘和不同干预后,通过激光共聚焦显微镜观察LC3的表达,如图1所示。对照组荧光强度处于较低水平,且各时间点强弱一致,矽尘组LC3点状聚集,绿色荧光亮斑随时间先增强后减弱,在6 h时荧光最强,且各时间点较同一时间点的对照组和3-MA干预组荧光亮斑增强;3-MA组LC3绿色亮斑自3 h开始减弱,至12 h基本保持不变,且弱于对照组;3-MA干预组LC3绿色亮斑6 h时最强,稍强于20 h,但稍弱于同一时间点的矽尘组,强于对照组。加入CDP抑制自噬体降解后,各组LC3绿色荧光信号随时间均呈现增强的趋势(见图2)。

2.2 LC3-II、LC3-I、p62蛋白表达

LC3-II、LC3-I蛋白表达水平见图3。LC3-II/LC3-I值经单因素方差分析和两两比较结果显示,各实验组在各个时间点差异有统计学意义($P<0.05$)。矽尘组在各时间点的LC3-II/LC3-I值呈先增加后减少趋势,在6 h时间点呈最高;且在各个时间点均高于对照组($P<0.05$)。3-MA组呈递减趋势;3-MA干预组LC3-II/LC3-I值变化趋势与矽尘组一致,除1 h时间点外,余各时间点均低于矽尘组,但高于对照组($P<0.05$)。见表1。

Western blot检测p62蛋白结果及分析见图4和表2。对照组和3-MA组在各个时间点p62蛋白表达均无差异($P>0.05$);矽尘组各时间点呈先减少后增加趋势,并在6 h时间点p62蛋白表达最低;且在各个时间点均低于对照组($P<0.05$)。3-MA干预组p62蛋白表达趋势与矽尘组一致,各时间点高于矽尘组,但低于对照组($P<0.05$)。

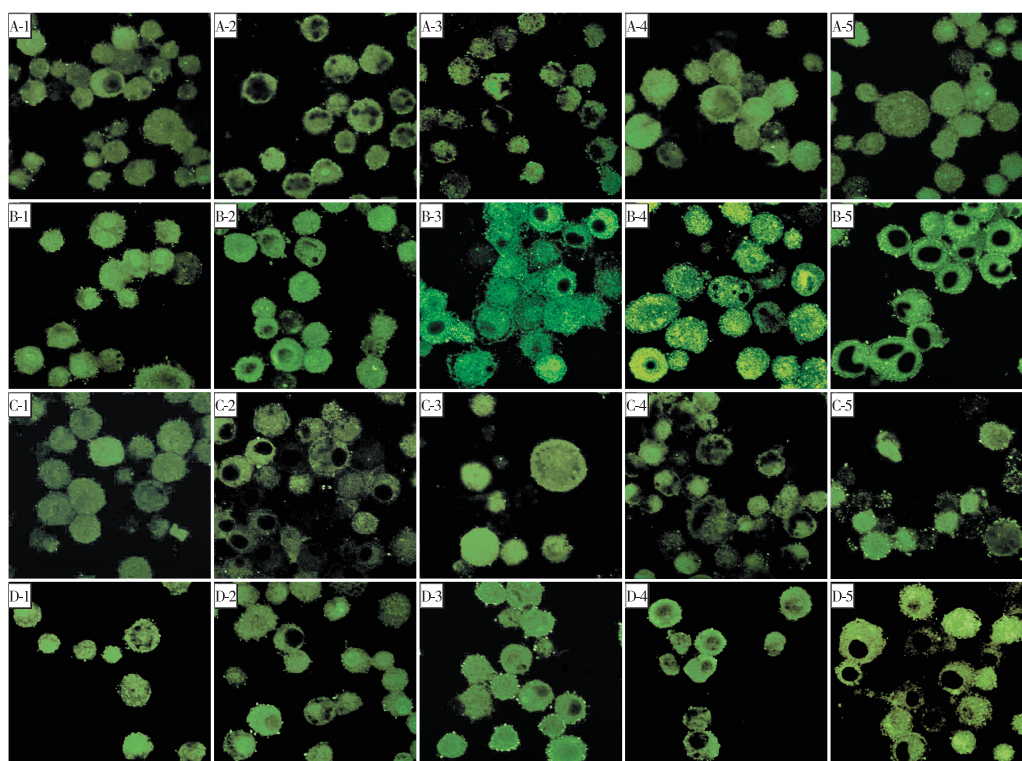


[注]A~D 分别代表对照组、矽尘组、3-MA 组和 3-MA 干预组；1~5 分别代表 1、3、6、12、20h。

[Note]A-D represent the control group, the silica dust group, the 3-MA group, and the 3-MA intervention group; 1-5 represent 1, 3, 6, 12, and 20h, respectively.

图 1 不同处理组 NR8383 细胞 LC3 荧光强度 (× 600)

Figure 1 Fluorescence intensity of LC3 in different treatment groups of NR8383 cells

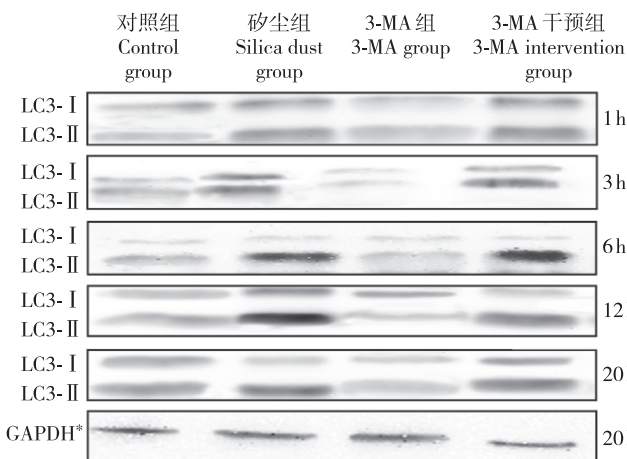


[注]A~D 分别代表加入 CDP 后的对照组、矽尘组、3-MA 组和 3-MA 干预组；1~5 分别代表 1、3、6、12、20h。

[Note]A-D represent the control group, the silica dust group, the 3-MA group, and the 3-MA intervention group after the addition of CDP; 1-5 represent 1, 3, 6, 12, and 20h, respectively.

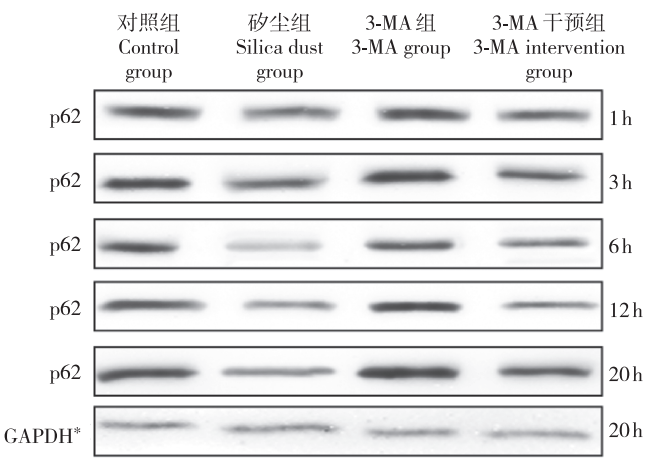
图 2 CDP 干预后不同处理组 NR8383 细胞 LC3 荧光强度 (× 600)

Figure 2 Fluorescence intensity of LC3 in different treatment groups of NR8383 cells after intervention by CDP



[注]*: 各时间点内参表达差异均无统计学意义, 此处选20h为例。
[Note]*: GAPDH expressions at 20h and no difference between each time point.

图3 不同组别不同时间NR8383细胞LC3-II、LC3-I蛋白表达水平
Figure 3 LC3-II and LC3-I levels of NR8383 cells in different groups at different time points



[注]*: 各时间点内参表达差异均无统计学意义, 此处选20h为例。
[Note]*: GAPDH expressions at 20h and no difference between each time point.

图4 不同组别不同时间NR8383细胞p62蛋白表达水平
Figure 4 p62 protein expression levels of NR8383 cells in different groups at different time points

表1 不同组别不同时间NR8383细胞LC3-II/LC3-I值比较($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 1 Expression of LC3-II/LC3-I in different groups at different time points of NR8383 cells

组别(Group)	1h	3h	6h	12h	20h	F	P
对照组(Control group)	0.77 ± 0.08	0.78 ± 0.11	0.75 ± 0.07	0.76 ± 0.10	0.77 ± 0.09	0.060	0.993
矽尘组(Silica dust group)	1.24 ± 0.07 ^{ab}	1.50 ± 0.12 ^{ab}	1.86 ± 0.10 ^a	1.85 ± 0.14 ^a	1.60 ± 0.08 ^a	37.501	0.000
3-MA组(3-MA group)	0.70 ± 0.06 ^{ab}	0.56 ± 0.10 ^{ab}	0.50 ± 0.10 ^{ab}	0.43 ± 0.02 ^{ab}	0.43 ± 0.03 ^{ab}	14.339	0.000
3-MA干预组(3-MA intervention group)	1.23 ± 0.05 ^{ab}	1.38 ± 0.03 ^{ab}	1.67 ± 0.07 ^{ab}	1.53 ± 0.06 ^{ab}	1.34 ± 0.06 ^{ab}	64.767	0.000
F	110.885	133.817	357.989	304.831	343.466	—	—
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—	—

[注]*: 与对照组比较, $P<0.05$; #: 与矽尘组比较, $P<0.05$; a: 与6h比较, $P<0.05$; b: 与20h比较, $P<0.05$ 。
[Note]*: Compared with the control group, $P<0.05$; #: Compared with the silica dust group, $P<0.05$; a: Compared with the 6h, $P<0.05$; b: Compared with the 20h, $P<0.05$.

表2 不同组别不同时间NR8383细胞p62蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 Expression of p62 in different groups at different time points of NR8383 cells

组别(Group)	1h	3h	6h	12h	20h	F	P
对照组(Control group)	1.74 ± 0.05	1.73 ± 0.06	1.73 ± 0.08	1.74 ± 0.07	1.74 ± 0.05	0.050	0.995
矽尘组(Silica dust group)	1.47 ± 0.02 ^{ab}	1.23 ± 0.03 ^{ab}	0.89 ± 0.05 ^a	0.94 ± 0.02 ^a	1.15 ± 0.09 ^a	150.342	0.000
3-MA组(3-MA group)	1.75 ± 0.04 ^a	1.81 ± 0.11 ^a	1.81 ± 0.11 ^a	1.83 ± 0.08 ^a	1.83 ± 0.11 ^a	0.662	0.624
3-MA干预组(3-MA intervention group)	1.58 ± 0.04 ^{ab}	1.37 ± 0.03 ^{ab}	1.03 ± 0.04 ^{ab}	1.03 ± 0.10 ^{ab}	1.38 ± 0.06 ^{ab}	101.562	0.000
F	79.692	118.003	244.795	242.598	99.371	—	—
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—	—

[注]*: 与对照组比较, $P<0.05$; #: 与矽尘组比较, $P<0.05$; a: 与6h比较, $P<0.05$; b: 与20h比较, $P<0.05$ 。
[Note]*: Compared with the control group, $P<0.05$; #: Compared with the silica dust group, $P<0.05$; a: Compared with the 6h, $P<0.05$; b: Compared with the 20h, $P<0.05$.

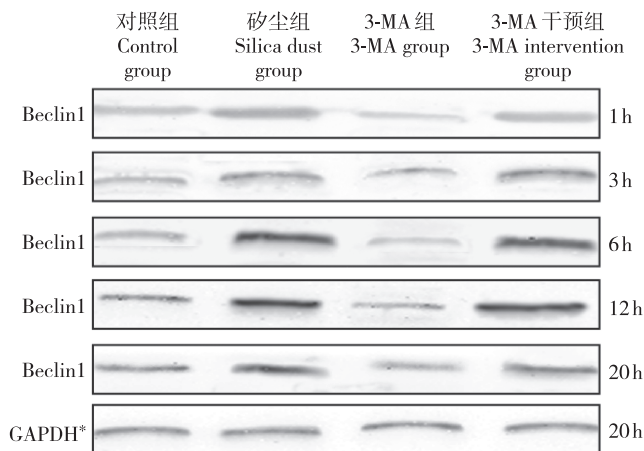
2.3 Beclin1、PI3KC3的表达

Western blot检测Beclin1蛋白结果如图5和表3。对照组在各个时间点Beclin1蛋白表达无差异($P>0.05$); 矽尘组在各时间点呈先增加后减少趋势, 在6h时间点Beclin1蛋白表达最高; 且在各个时间点均高于对照组($P<0.05$)。3-MA组Beclin1蛋白表达呈递减

趋势($P<0.05$); 3-MA干预组Beclin1蛋白表达趋势与矽尘组一致, 6h、12h时间点低于矽尘组, 但高于对照组($P<0.05$)。
Western blot检测PI3KC3蛋白表达结果见图6和表4。对照组在各个时间点PI3KC3蛋白表达无差异($P>0.05$); 矽尘组呈随时间先升高后减小的趋势, 在

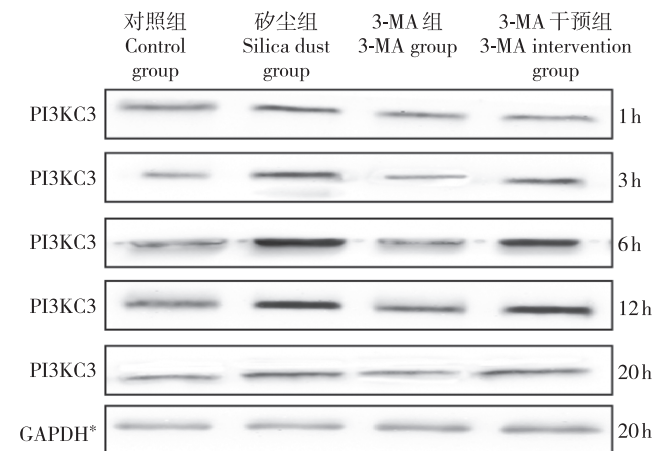
6h时间点PI3KC3蛋白表达最高;且在各个时间点均高于对照组($P<0.05$);3-MA组PI3KC3蛋白表达呈递减趋势($P<0.05$);3-MA干预组PI3KC3蛋白表达

趋势与矽尘组一致,各时间点均低于矽尘组,但高于对照组($P<0.05$)。



[注]*: 各时间点内参表达差异均无统计学意义,此处选20h为例。
[Note]*: GAPDH expressions at 20h and no difference between each time point.

图5 不同组别不同时间NR8383细胞Beclin1蛋白表达水平
Figure 5 Beclin1 protein expression levels of NR8383 cells in different groups at different time points



[注]*: 各时间点内参表达差异均无统计学意义,此处选20h为例。
[Note]*: GAPDH expressions at 20h and no difference between each time point.

图6 不同组别不同时间NR8383细胞PI3KC3蛋白表达水平
Figure 6 PI3KC3 protein expression levels in NR8383 cells in different groups at different time points

表3 不同组别不同时间NR8383细胞Beclin1蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 3 Expression of Bcln1 in different groups at different time points of NR8383 cells

组别(Group)	1h	3h	6h	12h	20h	F	P
对照组(Control group)	0.70 ± 0.03	0.72 ± 0.02	0.72 ± 0.04	0.71 ± 0.03	0.70 ± 0.01	0.798	0.538
矽尘组(Silica dust group)	1.14 ± 0.14 ^{ab}	1.55 ± 0.05 ^{ab}	1.79 ± 0.03 ^a	1.75 ± 0.03 ^a	1.54 ± 0.02 [*]	81.967	0.000
3-MA组(3-MA group)	0.65 ± 0.07 ^{ab}	0.52 ± 0.03 ^{ab}	0.42 ± 0.03 [#]	0.42 ± 0.03 [#]	0.41 ± 0.02 [#]	36.019	0.000
3-MA干预组(3-MA intervention group)	1.09 ± 0.09 ^{ab}	1.46 ± 0.03 ^b	1.65 ± 0.06 [#]	1.66 ± 0.02 ^{#a}	1.49 ± 0.05 [*]	101.289	0.000
F	47.277	1197.247	1667.070	3171.587	2263.831	—	—
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—	—

[注]*: 与对照组比较, $P<0.05$; #: 与矽尘组比较, $P<0.05$; a: 与6h比较, $P<0.05$; b: 与20h比较, $P<0.05$ 。
[Note]*: Compared with the control group, $P<0.05$; #: Compared with the silica dust group, $P<0.05$; a: Compared with the 6h, $P<0.05$; b: Compared with the 20h, $P<0.05$.

表4 不同组别不同时间NR8383细胞PI3KC3蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 4 Expression of PI3KC3 in different groups at different time points of NR8383 cells

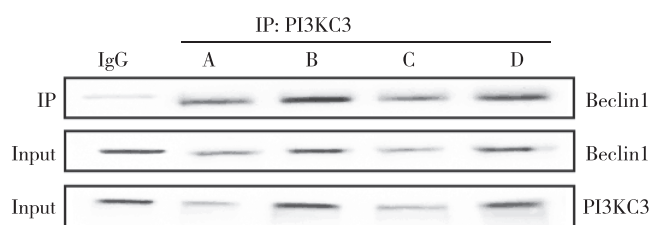
组别(Group)	1h	3h	6h	12h	20h	F	P
对照组(Control group)	0.56 ± 0.13	0.59 ± 0.09	0.59 ± 0.09	0.59 ± 0.11	0.58 ± 0.07	0.128	0.971
矽尘组(Silica dust group)	1.00 ± 0.08 ^{ab}	1.61 ± 0.09 ^b	1.96 ± 0.14 [*]	1.86 ± 0.16 ^a	1.59 ± 0.12 [*]	54.311	0.000
3-MA组(3-MA group)	0.53 ± 0.02 ^a	0.51 ± 0.04 ^a	0.50 ± 0.04 [#]	0.50 ± 0.05 ^{#a}	0.42 ± 0.04 [#]	7.220	0.001
3-MA干预组(3-MA intervention group)	0.78 ± 0.06 ^{ab}	1.26 ± 0.07 ^{ab}	1.58 ± 0.03 [#]	1.58 ± 0.03 ^{#a}	1.31 ± 0.08 [#]	199.007	0.000
F	40.598	291.241	409.504	267.545	283.530	—	—
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—	—

[注]*: 与对照组比较, $P<0.05$; #: 与矽尘组比较, $P<0.05$; a: 与6h比较, $P<0.05$; b: 与20h比较, $P<0.05$ 。
[Note]*: Compared with the control group, $P<0.05$; #: Compared with the silica dust group, $P<0.05$; a: Compared with the 6h, $P<0.05$; b: Compared with the 20h, $P<0.05$.

2.4 NR8383细胞中Beclin1复合物的表达

如图7所示。加入IgG的阴性对照中无蛋白条带,说明没有非特异性蛋白干扰,在PI3KC3沉淀的蛋白

中检测到Beclin1蛋白,说明两者有相互作用,且加入3-MA后两者结合减少,说明矽尘可以诱导Beclin1与PI3KC3结合,3-MA抑制两者结合。



[注]该图为用PI3KC3一抗免疫沉淀PI3KC3的结果示意图; IP: 沉淀的PI3KC3蛋白; Input: 总蛋白。A、B、C、D分别代表对照组、矽尘组、3-MA组和3-MA干预组。

[Note] This is a schematic diagram of the results of immunoprecipitation of PI3KC3 with PI3KC3 primary antibody. The top three bands represent Beclin1 protein in PI3KC3 precipitated protein, Beclin1 protein in total protein, and PI3KC3 protein in total protein. A, B, C, and D represent the control group, the silica dust group, the 3-MA group, and the 3-MA intervention group, respectively.

图7 不同组别Beclin1与PI3KC3的表达水平及相互作用

Figure 7 Expression levels and interaction of Beclin1 and PI3KC3 in different groups

3 讨论

矽肺是由于在生产过程中长期吸入游离二氧化硅粉尘并在体内滞留而引起的以肺部弥漫性纤维化为主的全身性疾病。近年来,关于矽肺纤维化发病机制的研究有不同的学说,如机械刺激学说、自由基学说^[8]、免疫因子学说^[9]、巨噬细胞作用机制^[10]等,但均不能充分说明矽肺形成的分子机制。研究表明,自噬与特发性纤维化之间有关联^[11],本课题组前期人群和动物实验均发现在不同期别矽肺患者和不同染尘时间大鼠模型中自噬活性发生了不同程度的改变^[5-7],而自噬在肺泡巨噬细胞中的具体分子机制尚不明确。

自噬为细胞提供能量,维持内环境稳态,与很多疾病密切相关^[1],其活性受很多信号通路调控,主要的正性调节机制是通过PI3KC3与Beclin1结合形成自噬体而诱发。PI3KC3是Vps34的同源物,在真核生物中能对磷脂酰肌醇的第三位点蛋白进行磷酸化,从而与Beclin1形成复合物参与自噬体的形成^[12],siRNA沉默PI3KC3的表达后减弱细胞自噬的表达^[13]。Beclin1是酵母ATG6的同源基因,也是正性调节机制中最主要的调节者^[14],缺失时小鼠自噬活性减弱,重新引入Beclin1后能有效调节自噬通路,增强细胞死亡代谢^[15]。p62是自噬作用的底物蛋白,将泛素结合物转运至自噬体并在自噬过程中消耗^[16],正常情况下,自噬活性越强,p62表达越低,在自噬受限时,p62聚集,故p62聚集可提示自噬受损。LC3是酵母Atg8的哺乳动物同源物,激活自噬后,LC3被蛋白酶水解形

成胞质蛋白LC3-I,与磷脂酰乙醇胺结合后,转变成膜蛋白LC3-II,位于自噬体膜上,因此激光共聚焦扫描显微镜下当自噬被激活时,LC3-II点状聚集,绿色荧光增多。通过检测LC3-II/LC3-I可以判断自噬体的多少进而推断自噬的强弱。3-MA是一种经典的自噬抑制剂,可以通过抑制Ⅲ型PI3K的活性抑制自噬体的形成,从而抑制自噬的活性^[13]。

Beclin1复合物是调控自噬最经典的信号通路之一,本研究用PI3KC3抑制剂3-MA通过降低PI3KC3活性抑制Beclin1/PI3KC3复合物,观察细胞自噬活性是否受到影响。本研究发现,对照组自噬表达处于较低水平,且各时间点差异无统计学意义,说明细胞本身有较低水平的基础自噬活性,为细胞提供能量,维持细胞内环境稳态^[17]。经免疫印迹法检测发现矽尘组LC3-II/LC3-I值在6h时达到最大,呈现出先升高后降低的趋势;3-MA干预组呈现出与矽尘组一致的趋势,但低于矽尘组,且3-MA干预组Ⅲ型PI3K蛋白表达低于同一时间点矽尘组Ⅲ型PI3K蛋白表达,Beclin1蛋白表达与Ⅲ型PI3K呈现相同趋势,提示3-MA可能通过抑制Ⅲ型PI3K的活性从而抑制Beclin1蛋白表达,继而抑制了矽尘诱导的NR8383细胞自噬的活性,即Ⅲ型PI3K/Beclin1可能参与了矽尘诱导的NR8383细胞的自噬活动。激光扫描共聚焦显微镜下观察各组细胞荧光强度发现,矽尘组自噬荧光强度高于3-MA干预组和对照组,其结果与免疫印迹法实验结果一致。为了确定自噬活性的增加是由于自噬本身被诱导而不是自噬降解过程受阻所致,实验过程中加入溶酶体抑制剂CDP,和3-MA联合处理,与不加CDP比较,发现自噬活性明显增强,说明自噬活性的增加是由于矽尘诱导NR8383细胞激活自噬,而不是自噬降解途径受阻所引起的自噬活性增强。免疫共沉淀结果显示经3-MA干预后Beclin1与PI3KC3结合较矽尘组减少,提示在矽尘诱导的NR8383细胞自噬中Beclin1复合物可能起着一定作用。

综上所述,本研究经矽尘处理细胞后,自噬活性随时间呈现先增强后减弱的趋势,在6h时达到最高,提示矽尘可诱导肺泡巨噬细胞NR8383产生自噬,且经3-MA干预后,自噬活性较矽尘组减弱,提示PI3KC3/Beclin1可能参与调控了自噬诱导的NR8383细胞自噬活性。但本研究仅是在细胞水平的干预研究,且仅使用了单一染毒剂量,有关结果向体内推测尚需进一步证实,仅为今后通过PI3KC3/Beclin1

调控自噬角度探讨矽肺的预防提供线索。基于目前PI3KC3/Beclin1为靶点的研究尚处于起步阶段,是否可作为预防矽肺的靶点尚需后续的研究进一步证实。

参考文献

- [1] HASPEL JA, CHOI AM. Autophagy: a core cellular process with emerging links to pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 184(11): 1237-1246.
- [2] LIVESEY KM, KANG R, VERNON P, et al. P53/HMGB1 complexes regulate autophagy and apoptosis[J]. Cancer Res, 2012, 72(8): 1996-2005.
- [3] 王冉, 方芳. 自噬在阿尔茨海默病中的作用及药物干预研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(5): 381-385.
- [4] 李智辉, 林寿宁. 中医药干预肝纤维化PI3K/AKT信号通路研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2014, 33(29): 80-81.
- [5] 王密琳, 金玉兰, 陈适, 等. 煤工尘肺患者肺灌洗液中肺泡巨噬细胞自噬活动的研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2015, 33(1): 41-44.
- [6] 时亚欣, 王晓艳, 陈颖, 等. 三甲基腺嘌呤和雷帕霉素对染尘大鼠肺巨噬细胞自噬及凋亡的影响[J]. 环境与职业医学, 2015, 32(10): 914-920.
- [7] 王晓艳, 宋瑞瑞, 张晓雪, 等. PI3K/Akt信号通路在染尘大鼠肺泡巨噬细胞自噬中作用[J]. 中国职业医学, 2016, 43(3): 247-255.
- [8] 高衍新, 王瑞. 矽尘致肺纤维化机制及细胞因子在矽肺纤维化中的作用[J]. 中国工业医学杂志, 2008, 29(1): 31-35.
- [9] WILLIS BC, LIEBLER JM, LUBY-PHELPS K, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor- β 1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Pathol, 2005, 166(5): 1321-1332.
- [10] FUBINI B, HUBBARD A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis[J]. Free Radic Biol Med, 2003, 34(12): 1507-1516.
- [11] PATEL AS, LIN L, GEYER A, et al. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41394.
- [12] 屈岳育. 细胞自噬抑制剂3-MA预防肝纤维化的实验性研究[D]. 长沙: 中南大学, 2014.
- [13] JUHÁSZ G, HILL JH, YAN Y, et al. The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in Drosophila[J]. J Cell Biol, 2008, 181(4): 655-666.
- [14] HE C, LEVINE B. The Beclin 1 interactome[J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 140-149.
- [15] SHIN JY, HONG SH, KANG B, et al. Overexpression of beclin1 induced autophagy and apoptosis in lungs of K-rasLA1 mice[J]. Lung Cancer, 2013, 81(3): 362-370.
- [16] 孙鸣宇. E1A激活基因阻遏子抑制小鼠巨噬细胞炎症的自噬-溶酶体调控机制[D]. 西安: 第四军医大学, 2015.
- [17] 张娟, 赵曼曼, 李冉, 等. 微管相关蛋白1轻链3及Beclin-1在硅沉着病大鼠肺泡巨噬细胞中的表达[J]. 解剖学报, 2014, 45(5): 646-651.

(收稿日期: 2018-01-06; 录用日期: 2018-07-10)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 陈姣)