

# ERO1 $\alpha$ 介导同型半胱氨酸诱导的肝细胞内质网应激

周龙霞, 杨安宁, 陈久凯, 赵丽, 王艳华, 刘现梅, 蔡欣, 张鸣号, 姜怡邓, 曹军

## ■背景资料

同型半胱氨酸是多种疾病的危险因素, 可引起细胞发生内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS), ERS反应过强可引起细胞功能障碍, 导致细胞凋亡, 促进疾病的发生发展, 目前同型半胱氨酸致ERS的机制尚未完全阐明, 因此对于其机制的研究已成为研究热点。

周龙霞, 杨安宁, 刘现梅, 张鸣号, 姜怡邓, 曹军, 宁夏医科大学基础医学院病理学与病理生理学系 宁夏回族自治区银川市 750004

陈久凯, 赵丽, 王艳华, 蔡欣, 宁夏医科大学检验学院临床检验诊断学教研室 宁夏回族自治区银川市 750004

周龙霞, 在读硕士, 主要从事心血管病理生理的研究。

国家自然科学基金资助项目, Nos. 81260063, 81360073

作者贡献分布: 此课题由曹军与姜怡邓共同设计; 实验由周龙霞、赵丽、蔡欣及刘现梅完成; 数据整理与分析由杨安宁、周龙霞、陈久凯及王艳华完成; 论文撰写由周龙霞、杨安宁及曹军完成; 实验监督由张鸣号完成。

通讯作者: 曹军, 教授, 750004, 宁夏回族自治区银川市兴庆区胜利南街1160号, 宁夏医科大学基础医学院病理学与病理生理学系, jwcjyd@163.com

电话: 0951-6980998

收稿日期: 2014-08-26 修回日期: 2014-10-26

接受日期: 2014-11-04 在线出版日期: 2014-12-08

## Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 $\alpha$ mediates homocysteine-induced hepatocyte endoplasmic reticulum stress

Long-Xia Zhou, An-Ning Yang, Jiu-Kai Chen, Li Zhao, Yan-Hua Wang, Xian-Mei Liu, Xin Cai, Ming-Hao Zhang, Yi-Deng Jiang, Jun Cao

Long-Xia Zhou, An-Ning Yang, Xian-Mei Liu, Ming-Hao Zhang, Yi-Deng Jiang, Jun Cao, Department of Preclinical Medicine College, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Jiu-Kai Chen, Li Zhao, Yan-Hua Wang, Xin Cai, Department of Inspection College, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 81260063 and 81360073

Correspondence to: Jun Cao, Professor, Department of Pathology and Pathophysiology, Ningxia Medical University, 1160 Shengli South Street, Xingqing District, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China. jwcjyd@163.com

Received: 2014-08-26 Revised: 2014-10-26

Accepted: 2014-11-04 Published online: 2014-12-08

## Abstract

**AIM:** To assess the role of endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 $\alpha$  (ERO1 $\alpha$ ) in homocysteine (Hcy)-induced endoplasmic reticulum stress (ERS).

**METHODS:** Hepatocytes were cultured in the presence or absence of Hcy (100  $\mu$ mol/L), and

ELISA was used to determine the concentrations of glucose-regulated protein 78 (GRP78), X-box binding protein-1 (XBP-1), protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and activating transcription factor 6 (ATF6). Hepatocytes were then cultured with different concentrations of Hcy (0, 50, 100, 200, 500  $\mu$ mol/L) and 100  $\mu$ mol/L Hcy plus folic acid and vitamin B<sub>12</sub>, and the expression of ERO1 $\alpha$  was detected by qRT-PCR and Western blot. ERO1 $\alpha$  recombinant plasmid and ERO1 $\alpha$  small interfering RNAs were then used to transfect hepatocytes, and the expression of ERO1 $\alpha$  and the concentrations of GRP78, PERK, ATF6 and XBP-1 were measured.

**RESULTS:** Compared with non-treated cells, the concentrations of GRP78, PERK, ATF6 and XBP-1 significantly increased in Hcy-treated cells ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Hcy decreased the expression of ERO1 $\alpha$  at mRNA and protein levels ( $P < 0.01$ ) in a dose-dependent manner. Transfection with ERO1 $\alpha$  recombinant plasmid significantly increased the expression of ERO1 $\alpha$  ( $P < 0.01$ ), while transfection with three ERO1 $\alpha$  small interfering RNAs significantly decreased the expression of ERO1 $\alpha$ , with siRNA2 having the most significant effect ( $P < 0.01$ ). Compared with the Hcy group, the concentrations of GRP78, PERK, ATF6 and XBP-1 significantly decreased in the Hcy + pERO1 $\alpha$  recombinant plasmid group ( $P < 0.05$ ), but increased in the Hcy + siRNA2 group ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** ERO1 $\alpha$  may be involved in Hcy-induced hepatocyte ERS possibly by regulation of the GRP78-XBP-1/PERK/ATF6 signal pathway.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Homocysteine; Endoplasmic reticulum stress; Endoplasmic reticulum oxidoreductin-1 $\alpha$ ; Hepatocytes; GRP78-XBP-1/PERK/ATF6

Zhou LX, Yang AN, Chen JK, Zhao L, Wang YH, Liu XM, Cai X, Zhang MH, Jiang YD, Cao J. Endoplasmic

## ■同行评议者

邱伟华, 主任医师, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

reticulum oxidoreductin 1 $\alpha$  mediates homocysteine-induced hepatocyte endoplasmic reticulum stress. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(34): 5228-5234 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/5228.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i34.5228>

## 摘要

**目的:** 探讨内质网氧化还原酶-1 $\alpha$ (endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 $\alpha$ , ERO1 $\alpha$ )在同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)诱导的肝细胞内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)中的作用及机制。

**方法:** 培养人肝细胞, 用Hcy(100  $\mu$ mol/L)干预, 同时设对照组, 使用酶联免疫法(ELISA)检测ERS相关蛋白葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78)、X盒结合蛋白-1(X-box binding protein-1, XBP-1)、内质网类似激酶(protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)及激活转录因子6(activating transcription factor 6, ATF6)的水平; 用不同浓度Hcy(0、50、100、200、500  $\mu$ mol/L)和100  $\mu$ mol/L Hcy+叶酸+维生素B<sub>12</sub>(VB<sub>12</sub>)干预, 运用实时定量PCR和Western blot检测ERO1 $\alpha$  mRNA和蛋白水平; 构建ERO1 $\alpha$ 基因重组质粒和RNA干扰片段并感染肝细胞, 检测ERO1 $\alpha$  mRNA和蛋白表达变化; 采用ELISA法检测其对ERS相关蛋白的调控作用。

**结果:** 与对照组比较, Hcy组GRP78、ATF6、PERK、XBP-1水平升高( $P<0.01$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 不同浓度Hcy干预后, 肝细胞内ERO1 $\alpha$  mRNA及蛋白水平呈下降趋势, 且随着Hcy浓度的增加而减少( $P<0.01$ ), 呈剂量依赖关系; 将ERO1 $\alpha$ 重组质粒转染肝细胞后, ERO1 $\alpha$  mRNA及蛋白表达明显增加( $P<0.01$ ); 将三个不同的ERO1 $\alpha$  siRNA片段转染肝细胞后, ERO1 $\alpha$  mRNA及蛋白表达降低( $P<0.01$ ), 其中siRNA2作用最明显( $P<0.01$ ); 与Hcy组相比, Hcy+pERO1 $\alpha$ 组GRP78、XBP-1、PERK及ATF6均明显降低( $P<0.01$ ), 而Hcy+siRNA2组均明显升高( $P<0.01$ )。

**结论:** Hcy可能通过下调ERO1 $\alpha$ 引起肝细胞GRP78-XBP-1/PERK/ATF6表达增加促进ERS发生。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 同型半胱氨酸; 内质网应激; 内质网氧化还原酶-1 $\alpha$ ; 肝细胞; GRP78-XBP-1/PERK/ATF6

**核心提示:** 内质网氧化还原酶-1 $\alpha$ (endoplasmic

reticulum oxidoreductin 1 $\alpha$ )调控葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78), 激活转录因子6(activating transcription factor 6), 内质网类似激酶(protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase), X盒结合蛋白-1(X-box binding protein-1)在同型半胱氨酸引起的肝细胞内质网应激过程中发挥重要作用。

周龙霞, 杨安宁, 陈久凯, 赵丽, 王艳华, 刘现梅, 蔡欣, 张鸣号, 姜怡邓, 曹军. ERO1 $\alpha$ 介导同型半胱氨酸诱导肝细胞的内质网应激. 世界华人消化杂志 2014; 22(34): 5228-5234 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/5228.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i34.5228>

## ■研发前沿

内质网氧化还原酶-1 $\alpha$ (endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 $\alpha$ , ERO1 $\alpha$ )是存在于内质网的一种氧化酶, 是调控内质网腔中蛋白合成、折叠的关键基因, 对维持内质网稳态发挥重要作用。目前关于ERO1 $\alpha$ 是否参与了同型半胱氨酸致肝脏ERS的病理过程及调控机制鲜有报道。

## 0 引言

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是指在多种生理或病理条件下细胞内质网钙稳态失衡或蛋白质加工运输障碍、生理功能发生紊乱的一种亚细胞器的病理过程<sup>[1-3]</sup>, 涉及内质网类似激酶(protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)/真核细胞翻译起始因子2 $\alpha$ (eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ )、激活转录因子6(activating transcription factor 6, ATF6)和需肌醇酶-1(inositol-requiring kinase 1, IRE-1 $\alpha$ )/X盒结合蛋白-1(X-box binding protein-1, XBP-1)等信号通路<sup>[4-6]</sup>, 而葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78)是细胞ERS状态的标志物<sup>[7,8]</sup>。内质网氧化还原酶-1 $\alpha$ (endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 $\alpha$ , ERO1 $\alpha$ )是调控内质网腔中蛋白合成、折叠的关键基因<sup>[9,10]</sup>。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是多种疾病的危险因素, 可引起肝脏ERS<sup>[11,12]</sup>。本研究主要探讨Hcy诱导肝细胞ERS过程中ERO1 $\alpha$ 的调控作用及可能机制, 为进一步寻找Hcy致肝脏ERS中的作用靶点提供实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HL7220肝细胞株(四川大学华西医学中心, 中国); 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司, 中国); CO<sub>2</sub>培养箱(Heraeus, 德国); 5415D型微量台式离心机(Eppendorf, 德国); BS110S型精密天平(Sartorius, 德国); 荧光显微镜(奥林巴斯公司, 日本); 荧光定量PCR仪(上海枫岭生物技术有限公司, 中国); 垂直电泳仪和Model680全自动酶标仪(Bio-Rad公司, 美国); HyClone RPMI 1640培养基(Thermo); 胎牛血清(杭州四季青生

## ■相关报道

有研究发现,萝卜硫素能通过核转录因子Nrf2及其下游抗氧化酶减弱同型半胱氨酸诱导的人肝细胞ERS.

物工程材料研究所); Hcy(Sigma); RNA提取试剂盒(北京天根生物技术有限公司, 中国); 逆转录和qRT-PCR试剂盒(美国Invitrogen公司); 蛋白提取试剂盒、蛋白定量试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司, 中国); ERO1 $\alpha$ 兔抗人一抗(Abcam公司), 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(北京博奥森生物技术有限公司, 中国); GRP78、PERK、ATF6、XBP-1 ELISA试剂盒(北京雅安达公司, 中国); 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成.

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将人肝细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基置于37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中传代培养. 细胞密度达到80%左右时, 用终浓度为0、50、100、200、500  $\mu$ mol/L Hcy和100  $\mu$ mol/L Hcy+叶酸+VB<sub>12</sub>干预, 其中0  $\mu$ mol/L Hcy为对照组, 48 h后收集细胞, 用于后续试验.

1.2.2 ELISA检测ERS相关蛋白GRP78、PERK、ATF6、XBP-1的水平: ELISA试剂盒室温平衡15 min, 分别设空白孔、待测样品孔. 空白孔加样品稀释液100  $\mu$ L, 余孔分别加标准品或待测样品100  $\mu$ L(待测样品蛋白上样浓度统一为21 g/L), 37 °C反应30 min. 洗板5次, 各1 min, 拍干. 每孔加酶标液100  $\mu$ L, 37 °C反应30 min, 洗板5次, 各1 min, 拍干. 加显色试剂A液和B液, 37 °C显色15 min. 加终止液, 15 min内, 酶标仪上读取各孔A<sub>450</sub>值.

1.2.3 实时定量PCR检测ERO1 $\alpha$  mRNA水平: 按照RNA提取试剂盒说明书提取细胞RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性. 按逆转录试剂盒说明书逆转录合成cDNA; 采用Primer 5.0软件设计引物, ERO1 $\alpha$ : 5'-ATCCTTTG-GCTTCTGGTCAAG-3'(上游)和5'-GTTGT-GTCCCCATTTCTTTTCT-3'(下游);  $\beta$ -actin: 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'(上游)和5'-CTGGAAGGTGGACAGCGACG-3'(下游). PCR条件: 94 °C预变性10 min, 94 °C变性30 s、58 °C退火30 s、72 °C延长30 s, 扩增40个循环. 待反应结束后, 结合扩增曲线及溶解曲线, 选择符合要求的qRT-PCR原始数据, 结果用2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法分析.

1.2.4 Western blot检测ERO1 $\alpha$ 的蛋白表达改变: 细胞裂解法提取各组细胞总蛋白, 取总蛋白18  $\mu$ L, 经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 80 V 30 min, 120 V 60 min, 15 V恒压转膜10 min, 与ERO1 $\alpha$ 特异性一抗4 °C过夜; 与二抗

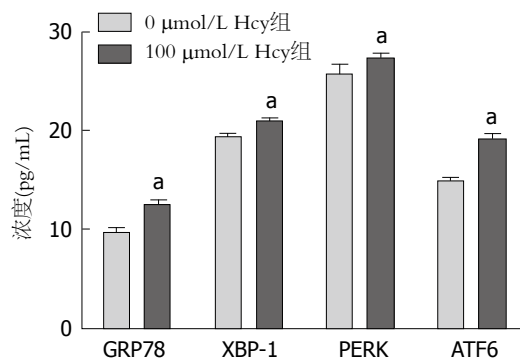


图1 Hcy对GRP78、XBP-1、PERK及ATF6的影响. \* $P$ <0.05 vs 0  $\mu$ mol/L Hcy组. GRP78: 葡萄糖调节蛋白78; XBP-1: X盒结合蛋白-1; PERK: 内质网类似激酶; ATF6: 激活转录因子6; Hcy: 同型半胱氨酸.

室温孵育1.5 h后, 加入显色底物, 以 $\beta$ -actin为内参, 凝胶成像分析仪上成像分析, 计算ERO1 $\alpha$ 与 $\beta$ -actin灰度值的比值, 进行分析.

1.2.5 ERO1 $\alpha$ 重组质粒及siRNA质粒构建: ERO1 $\alpha$ 重组质粒委托上海汉恒生物技术有限公司完成. ERO1 $\alpha$ 三个不同siRNA片段委托上海吉凯生物技术有限公司完成.

1.2.6 细胞转染: 转染前2 d取对数期生长的肝细胞接种于6孔板中, 分别用空质粒(pEGFP-N1)和ERO1 $\alpha$ 重组质粒(pERO1 $\alpha$ )及siRNA三个不同片段转染肝细胞, 并设立空白对照组. 操作步骤: Lipofectamine™ 2000( $\mu$ L)和质粒DNA( $\mu$ g)比例为3:1, 分别溶于无血清培养液中, 室温孵育5 min后将两者混匀, 室温孵育20 min, 与适量无血清培养液轻轻混匀后加入细胞中, 6 h后弃培养液, 加入含血清的培养液继续培养48 h后, 荧光倒置显微镜观察细胞转染效率.

**统计学处理** 采用Prism 6.0统计软件对实验数据进行分析, 计量资料以mean $\pm$ SD表示, 两组间比较采用 $t$ 检验, 多组间两两比较采用单因素方差分析,  $P$ <0.05表示差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 Hcy对肝细胞ERS相关蛋白GRP78、XBP-1、PERK及ATF6的影响 用100  $\mu$ mol/L Hcy干预肝细胞后, ERS相关蛋白GRP78、XBP-1、PERK及ATF6的含量较对照组分别升高了1.29、1.27、1.06、1.08倍, 差异有统计学意义( $P$ <0.05)(图1).

2.2 不同浓度Hcy对肝细胞ERO1 $\alpha$ 表达的影响 分别用0、50、100、200、500  $\mu$ mol/L Hcy干预肝细胞后, ERO1 $\alpha$  mRNA和蛋白表达水平均有所降低. 其中50  $\mu$ mol/L组与0  $\mu$ mol/L组比较无



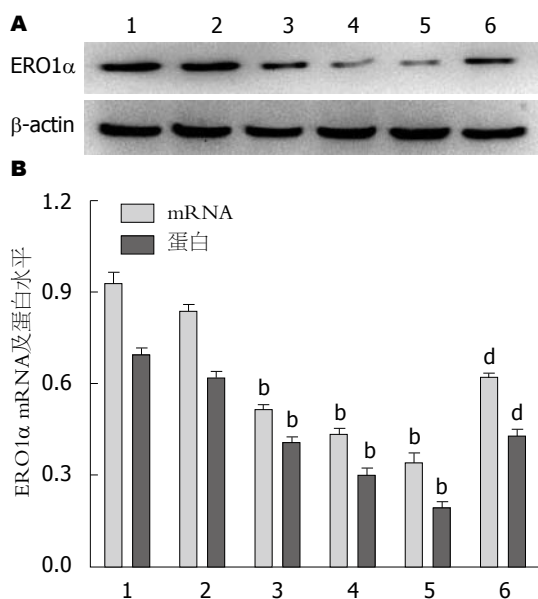


图2 不同浓度Hcy对ERO1 $\alpha$  mRNA和蛋白表达的影响. A: Western blot图; B: ERO1 $\alpha$ 的mRNA及蛋白水平. 1: 0  $\mu$ mol/L Hcy组; 2: 50  $\mu$ mol/L Hcy组; 3: 100  $\mu$ mol/L Hcy组; 4: 200  $\mu$ mol/L Hcy组; 5: 500  $\mu$ mol/L Hcy组; 6: 100  $\mu$ mol/L Hcy+叶酸+VB<sub>12</sub>组. <sup>b</sup> $P$ <0.01 vs 0  $\mu$ mol/L Hcy组; <sup>d</sup> $P$ <0.01 vs 100  $\mu$ mol/L Hcy组. ERO1 $\alpha$ : 内质网氧化还原酶-1 $\alpha$ ; Hcy: 同型半胱氨酸.

明显差异; 其余组随着Hcy浓度的增加, ERO1 $\alpha$  mRNA和蛋白表达水平均显著减少( $P$ <0.01), 且呈剂量依赖关系; 而给予叶酸和VB<sub>12</sub>干预后, ERO1 $\alpha$ 表达水平明显增加( $P$ <0.01)(图2).

**2.3 荧光倒置显微镜观察肝细胞转染效率** 为了分析ERO1 $\alpha$ 对肝细胞ERS相关蛋白的调控作用, 运用脂质体Lipofectamine™ 2000将pEGFP-N1、pERO1 $\alpha$ 重组质粒及siRNA三个不同片段转染肝细胞48 h后, 荧光显微镜下观察可见绿色荧光蛋白表达明显, 说明转染成功, 可以进行后续实验(图3).

**2.4 验证基因重组或RNA干扰质粒转染肝细胞后ERO1 $\alpha$ 表达改变** 将pEGFP-N1空质粒及ERO1 $\alpha$ 过表达质粒分别转染肝细胞, 检测ERO1 $\alpha$  mRNA及蛋白表达, 结果显示pERO1 $\alpha$ 组ERO1 $\alpha$  mRNA及蛋白表达水平明显增加( $P$ <0.01)(图4A, B), 证实pERO1 $\alpha$ 转染成功; 将三个不同的ERO1 $\alpha$  siRNA片段转染肝细胞, 三个片段均可以降低ERO1 $\alpha$  mRNA及蛋白表达明显增加( $P$ <0.01), 尤其以siRNA2作用最为明显(图4C, D).

**2.5 ERO1 $\alpha$ 表达改变对肝细胞ERS相关蛋白表达的影响** 为了进一步明确ERO1 $\alpha$ 在Hcy诱导肝细胞ERS中的作用, 分别将ERO1 $\alpha$ 过表达质粒及ERO1 $\alpha$  siRNA片段转染肝细胞并与Hcy(100

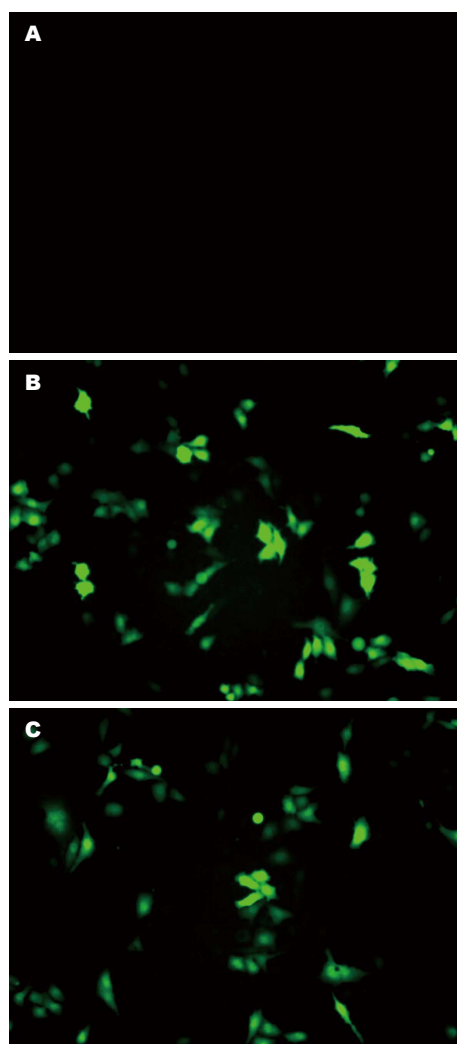


图3 荧光倒置显微镜观察肝细胞转染效率( $\times 100$ ). A: 对照组; B: pERO1 $\alpha$ 组; C: siRNA2组.

$\mu$ mol/L)共同孵育48 h后, 检测GRP78、ATF6、PERK、XBP-1的表达变化, 结果显示与Hcy组相比, Hcy+pERO1 $\alpha$ 组GRP78、ATF6、PERK、XBP-1均明显降低( $P$ <0.01); 而Hcy+siRNA2组, GRP78、ATF6、PERK、XBP-1均明显升高( $P$ <0.01)(图5).

### 3 讨论

ERS反应是细胞的一种自我保护机制, 在保护机体有效应对各种外在刺激中涉及多个信号通路及相关基因的表达调控, 构成一个完整体系, 发挥维持细胞存活和凋亡平衡的重要调节作用<sup>[13,14]</sup>. 适度的ERS反应有助于保护细胞, 维持生存, 但ERS反应过强不可逆转时则可引起细胞功能障碍, 导致细胞凋亡, 促进疾病的发生发展<sup>[15]</sup>. Hcy是一种含硫氨基酸, 是体内蛋氨酸代谢的中间产物, 正常机体中含量很低, 当Hcy代

### ■创新盘点

本次研究发现, 同型半胱氨酸可能通过下调ERO1 $\alpha$ 引起肝细胞葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78)-X盒结合蛋白-1(X-box binding protein-1, XBP-1)/内质网类似激酶(protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)/激活转录因子6(activating transcription factor 6, ATF6)表达增加促进ERS发生, 同时ERO1 $\alpha$ 在同型半胱氨酸致肝细胞ERS过程中发挥重要调控作用.

## ■应用要点

ERS是同型半胱氨酸诱导肝细胞损伤的重要致病环节, ERO1 $\alpha$ 在内质网应激过程中发挥重要调控作用, 可能成为治疗同型半胱氨酸致肝细胞损伤的重要靶点。

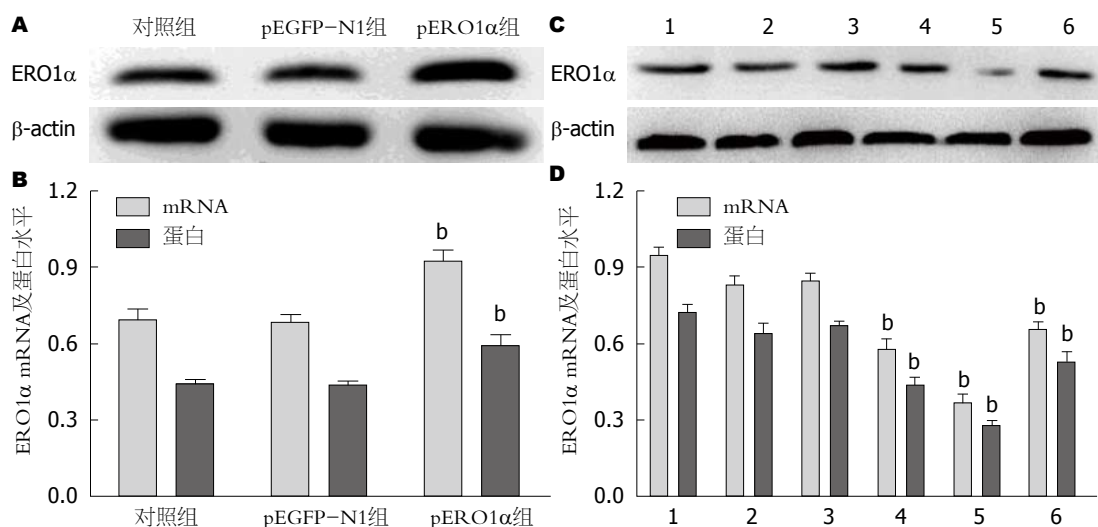


图4 重组和RNA干扰后ERO1 $\alpha$ 表达改变。A: 重组ERO1 $\alpha$ 质粒ERO1 $\alpha$ 表达的Western blot图; B: ERO1 $\alpha$ 的mRNA及蛋白水平; C: RNA干扰后ERO1 $\alpha$ 表达的Western blot图; D: 干扰后ERO1 $\alpha$ 的mRNA及蛋白水平。1: 对照组; 2: FAM组; 3: NC组; 4: siRNA1组; 5: siRNA2组; 6: siRNA3组。\* $P < 0.01$  vs 对照组。ERO1 $\alpha$ : 内质网氧化还原酶-1 $\alpha$ 。

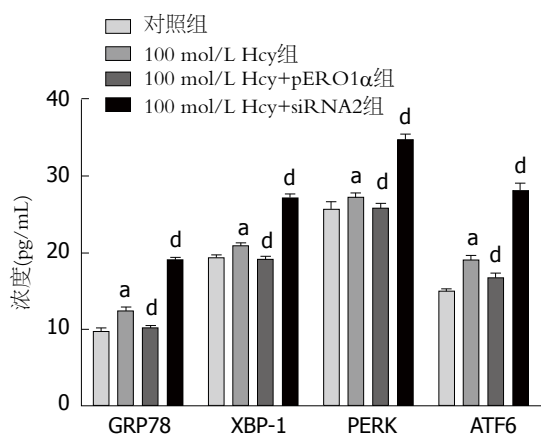


图5 ERO1 $\alpha$ 表达改变对肝细胞内质网应激相关蛋白表达的影响。\* $P < 0.05$  vs 对照组; \* $P < 0.01$  vs 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy组。ERO1 $\alpha$ : 内质网氧化还原酶-1 $\alpha$ ; Hcy: 同型半胱氨酸。

谢受阻, 就会在体内积聚, 使其在血中的水平持续升高发生高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)<sup>[16,17]</sup>, 是临床多种疾病的危险因素<sup>[18]</sup>。研究<sup>[19,20]</sup>显示: Hcy参与心肌细胞ERS, 为ERS的诱导因素之一, 而肝脏是调节Hcy代谢的重要器官, 含有丰富的内质网, 在调节Hcy代谢过程中, 更容易发生ERS反应<sup>[21,22]</sup>。GRP78是一种内质网分子伴侣, 是ERS反应的主要标志性蛋白, 在内质网非应激状态下, PERK、ATF6、IRE1与GRP78结合处于非活性状态, ERS时, GRP78则与这三种转录因子解离并启动PERK/eIF2 $\alpha$ 、ATF6、IRE-1 $\alpha$ /XBP-1信号转导途径<sup>[23]</sup>。本实验研究结果提示Hcy干预后, 肝细胞内GRP78、PERK、ATF6与XBP-1表达升高, 表明Hcy可导致肝细胞发生ERS。

ERO1定位于人14号染色体上, 是一种紧

贴于ER膜腔面的糖基化黄素酶, 主要参与维持ER内氧化状态<sup>[24]</sup>。ERO1参与氧化二硫键异构酶, 维持蛋白折叠过程能够持续进行<sup>[25]</sup>。ERO1在形成二硫键的过程中可产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 因此ERO1激活是细胞内活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)产生的重要来源之一<sup>[26]</sup>。过多的ROS产生, 超过细胞抗氧化防御能力就会影响细胞内氧化还原稳态, 引起氧化应激和ERS等过程<sup>[27]</sup>。人类细胞中含有两种ERO1同源异构体, ERO1 $\alpha$ 和ERO1 $\beta$ 。Wright等<sup>[28]</sup>发现, ERO1 $\alpha$ 限制胰岛素原突变体诱导的ERS。另有研究<sup>[29,30]</sup>发现, ERO1 $\alpha$ 蛋白可能参与高血压诱导的血管内皮细胞损伤, 并可以作为ERS导致细胞凋亡通路的重要标志蛋白, 表明ERO1 $\alpha$ 是调控内质网腔中蛋白合成、折叠的关键基因。我们用不同浓度Hcy刺激肝细胞, 结果显示, Hcy可以引起ERO1 $\alpha$ 表达下降, 且呈剂量依赖性, 提示ERO1 $\alpha$ 参与了Hcy引起的肝细胞ERS。为了进一步明确ERO1 $\alpha$ 在Hcy致肝细胞ERS中的作用, 我们分别在肝细胞中过表达和干扰ERO1 $\alpha$ , 结果发现过表达ERO1 $\alpha$ 后, ERS相关蛋白GRP78、PERK、ATF6与XBP-1表达减少, 而抑制ERO1 $\alpha$ 表达后ERS相关蛋白表达升高, 表明ERO1 $\alpha$ 对ERS起到负性调控作用。因此, ERO1 $\alpha$ 可能是Hcy引起的肝细胞ERS过程的关键基因, 是Hcy导致肝细胞ERS过程中的一个重要开关或桥梁。

## 4 参考文献

- 1 胡晓霞, 王艳, 王晋星. Calnexin及GRP78在大鼠非

- 酒精性脂肪肝细胞凋亡中的作用. 世界华人消化杂志 2014; 22: 2740-2745
- 2 Jiang P, Gan M, Lin WL, Yen SH. Nutrient deprivation induces  $\alpha$ -synuclein aggregation through endoplasmic reticulum stress response and SREBP2 pathway. *Front Aging Neurosci* 2014; 6: 268 [PMID: 25339898 DOI: 10.3389/fnagi.2014.00268]
- 3 Min KJ, Jung KJ, Kwon TK. Carnosic Acid Induces Apoptosis Through Reactive Oxygen Species-mediated Endoplasmic Reticulum Stress Induction in Human Renal Carcinoma Caki Cells. *J Cancer Prev* 2014; 19: 170-178 [PMID: 25337586 DOI: 10.15430/JCP.2014.19.3.170]
- 4 Shen S, Zhang Y, Wang Z, Liu R, Gong X. Bufalin induces the interplay between apoptosis and autophagy in glioma cells through endoplasmic reticulum stress. *Int J Biol Sci* 2014; 10: 212-224 [PMID: 24550689 DOI: 10.7150/ijbs.8056]
- 5 Zhang XF, Huang HP, Ding WX, Ding N, Lu G, Liu JN, Zhang XL. Adiponectin protects the genioglossus of rats against chronic intermittent hypoxia-induced injury via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Chin Med J (Engl)* 2013; 126: 3270-3275 [PMID: 24033948]
- 6 McCloy RA, Shelley EJ, Roberts CG, Boslem E, Biden TJ, Nicholson RI, Gee JM, Sutherland RL, Musgrove EA, Burgess A, Butt AJ. Role of endoplasmic reticulum stress induction by the plant toxin, persin, in overcoming resistance to the apoptotic effects of tamoxifen in human breast cancer cells. *Br J Cancer* 2013; 109: 3034-3041 [PMID: 24178758 DOI: 10.1038/bjc.2013.693]
- 7 Cao Y, Hao Y, Li H, Liu Q, Gao F, Liu W, Duan H. Role of endoplasmic reticulum stress in apoptosis of differentiated mouse podocytes induced by high glucose. *Int J Mol Med* 2014; 33: 809-816 [PMID: 24503896 DOI: 10.3892/ijmm.2014.1642]
- 8 Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Nakamura M, Wu S, Mikata R, Yokosuka O. Knock-down of glucose-regulated protein 78 enhances poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in human pancreatic cancer cells exposed to endoplasmic reticulum stress. *Oncol Rep* 2014; 32: 2343-2348 [PMID: 25333575 DOI: 10.3892/or.2014.3533]
- 9 Zhang L, Niu Y, Zhu L, Fang J, Wang X, Wang L, Wang CC. Different Interaction Modes for Protein-disulfide Isomerase (PDI) as an Efficient Regulator and a Specific Substrate of Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin-1 $\alpha$  (Ero1 $\alpha$ ). *J Biol Chem* 2014; 289: 31188-31199 [PMID: 25258311]
- 10 Wang L, Zhang L, Niu Y, Sitia R, Wang CC. Glutathione peroxidase 7 utilizes hydrogen peroxide generated by Ero1 $\alpha$  to promote oxidative protein folding. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20: 545-556 [PMID: 23919619 DOI: 10.1089/ars.2013.5236]
- 11 McDonald I, Connolly M, Tobin AM. A review of psoriasis, a known risk factor for cardiovascular disease and its impact on folate and homocysteine metabolism. *J Nutr Metab* 2012; 2012: 965385 [PMID: 22690330 DOI: 10.1155/2012/965385]
- 12 王磊, 田珏, 曹成建, 杨程, 蔡欣, 周龙霞, 杨晓玲, 姜怡邓. 高同型半胱氨酸血症经内质网途径影响ApoE $^{-/-}$ 鼠肝细胞凋亡. 中国药理学通报 2014; 30: 261-265
- 13 Yadav RK, Chae SW, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic reticulum stress and cancer. *J Cancer Prev* 2014; 19: 75-88 [PMID: 25337575 DOI: 10.15430/JCP.2014.19.2.75]
- 14 Yao ST, Zhao L, Miao C, Tian H, Yang NN, Guo SD, Zhai L, Chen J, Wang YW, Qin SC. [Endoplasmic reticulum stress mediates oxidized low density lipoprotein-induced scavenger receptor A1 upregulation in macrophages]. *Shengli Xuebao* 2014; 66: 612-618 [PMID: 25332008]
- 15 Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833: 3460-3470 [PMID: 23850759 DOI: 10.1016/j.bbamer.2013.06.028]
- 16 Liang Y, Yang X, Ma L, Cai X, Wang L, Yang C, Li G, Zhang M, Sun W, Jiang Y. Homocysteine-mediated cholesterol efflux via ABCA1 and ACAT1 DNA methylation in THP-1 monocyte-derived foam cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2013; 45: 220-228 [PMID: 23305686 DOI: 10.1093/abbs/gms119]
- 17 杨慧君, 李倩, 崔玲, 钱玉中, 李文静, 唐燕. 非酒精性脂肪肝患者同型半胱氨酸浓度及叶酸与维生素B12浓度变化及相关性. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1449-1452
- 18 Sirdah MM, Yassin MM, El Shekhi S, Lubbad AM. Homocysteine and vitamin B12 status and iron deficiency anemia in female university students from Gaza Strip, Palestine. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2014; 36: 208-212 [PMID: 25031061 DOI: 10.1016/j.bjhh.2014.03.005]
- 19 张志敏, 赵连友, 卢凡, 邹青, 李雪, 丁璐, 卫聪颖. 高同型半胱氨酸对高血压大鼠心肌细胞GRP78和CHOP表达及左室肥厚的影响. 中国循证心血管医学杂志 2014; 6: 223-228
- 20 Wei H, Zhang R, Jin H, Liu D, Tang X, Tang C, Du J. Hydrogen sulfide attenuates hyperhomocysteinemia-induced cardiomyocytic endoplasmic reticulum stress in rats. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12: 1079-1091 [PMID: 19769458 DOI: 10.1089/ars.2009.2898]
- 21 Lentz SR. Homocysteine and vascular dysfunction. *Life Sci* 1997; 61: 1205-1215 [PMID: 9324062]
- 22 Dara L, Ji C, Kaplowitz N. The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases. *Hepatology* 2011; 53: 1752-1763 [PMID: 21384408 DOI: 10.1002/hep.24279]
- 23 王洪岩, 刘晓璐, 杜雅菊, 赵磊. 内质网应激与肝脏疾病研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20: 451-459
- 24 Araki K, Inaba K. Structure, mechanism, and evolution of Ero1 family enzymes. *Antioxid Redox Signal* 2012; 16: 790-799 [PMID: 22145624 DOI: 10.1089/ars.2011.4418]
- 25 Benham AM, van Lith M, Sitia R, Braakman I. Ero1-PDI interactions, the response to redox flux and the implications for disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013; 368: 20110403 [PMID: 23530257 DOI: 10.1098/rstb.2011.0403]
- 26 Ozgur R, Turkan I, Uzilday B, Sekmen AH. Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* 2014; 65: 1377-1390 [PMID: 24558072 DOI: 10.1093/jxb/eru034]
- 27 Hou CH, Lin FL, Hou SM, Liu JF. Hyperthermia induces apoptosis through endoplasmic reticulum and reactive oxygen species in human osteosarcoma cells. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 17380-17395 [PMID: 25268613 DOI: 10.3390/ijms151017380]
- 28 Wright J, Birk J, Haataja L, Liu M, Ramming T, Weiss MA, Appenzeller-Herzog C, Arvan P. En-

**■名词解释**

内质网应激(ERS): 指在多种生理或病理条件下细胞内质网钙稳态失衡或蛋白质加工运输障碍、生理功能发生紊乱的一种亚细胞器的病理过程, 涉及PERK/eIF2 $\alpha$ 、ATF6、IRE-1 $\alpha$ /XBP-1等信号通路。

## ■同行评价

本研究设计合理, 技术可靠, 内容丰富, 学术价值好。

- 29 doplasmic reticulum oxidoreductin-1 $\alpha$  (Ero1 $\alpha$ ) improves folding and secretion of mutant proinsulin and limits mutant proinsulin-induced endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2013; 288: 31010-31018 [PMID: 24022479 DOI: 10.1074/jbc.M113.510065]
- 王李瑶, 路静, 张建忠, 董俭达, 曹相玫, 郭凤英, 贺茂

- 30 涛, 景丽. 内质网氧化还原酶1-L在高血压血管内皮损伤中的作用. *广东医学* 2014; 35: 824-827
- Lenna S, Han R, Trojanowska M. Endoplasmic reticulum stress and endothelial dysfunction. *IUBMB Life* 2014; 66: 530-537 [PMID: 25130181 DOI: 10.1002/iub.1292]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

## • 消息 •

## 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版)

本刊讯 依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 以及学科专家评审, 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》2011年版(即第六版)核心期刊。

对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种, 统计到的文献数量共计221177余万篇次, 涉及期刊14400余种。参加核心期刊评审的学科专家达8200多位。经过定量筛选和专家定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊。

《世界华人消化杂志》在编委、作者和读者的支持下, 期刊学术水平稳步提升, 编校质量稳定, 再次被北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2011年版)收录。在此, 向关心、支持《世界华人消化杂志》的编委、作者和读者, 表示衷心的感谢! (《世界华人消化杂志》编辑部)