

对乙酰氨基酚耐受肝细胞株的建立及其作用机制研究

曹欢欢^{1,2} 茅育蕾^{1,3} 陈娟慧¹ 陈佳媛¹ 郑锐攀¹ 岑梦娇¹ 倪 坚¹ 金立方^{1,2*}

(¹绍兴文理学院生命科学学院, 绍兴 312000; ²杭州精准医药研究中心, 杭州 310018;

³绍兴文理学院附属医院, 绍兴 312000)

摘要 对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)是引起急性肝衰竭最主要的原因,但其确切的作用机制仍不明。该研究建立了不同浓度的APAP耐药肝细胞,并对其耐药机制进行初步研究。克隆状密度培养的AML-12小鼠肝细胞浓度递增诱导建立APAP耐药细胞系;细胞计数检测细胞增殖能力;Mito Tracker和H₂DCF-DA分别检测线粒体膜电位和氧自由基水平;GSH/GSSH检测细胞抗氧化能力;qPCR检测细胞基因表达水平;Western blot检测蛋白质水平。成功建立了增殖和耐药稳定的1.25和2.50 mmol/L APAP耐药AML-12肝细胞。在相应浓度APAP处理后,与对照组相比,耐药组细胞增殖能力强,氧自由基水平低,线粒体膜电位水平高,GSH/GSSH值高。进一步研究结果显示,耐药组细胞抗氧化通路Nrf2及其靶基因表达活性提高,而凋亡相关信号通路JNK及其相关基因活性下降。肝细胞表型特征分析显示,耐药组细胞肝功能相关基因表达水平并未发生显著变化,但与染色体重塑相关的转录因子Foxa1和Foxa2 mRNA和蛋白质水平显著升高。该研究建立了增殖和耐药性状稳定的APAP耐药肝细胞,耐药性状的获得与抗氧化能力和抗凋亡能力的提高相关,并提示染色体重塑相关转录因子也可能参与这一过程,为深入研究耐药机制奠定了基础。

关键词 肝细胞;对乙酰氨基酚;耐药;氧化应激

Establishment of Acetaminophen-Resistant Liver Cell Line and Its Possible Mechanism

Cao Huanhuan^{1,2}, Mao Yulei^{1,3}, Chen Juanhui¹, Chen Jiayuan¹, Zheng Ruipan¹,

Cen Mengjiao¹, Ni Jian¹, Jin Lifang^{1,2*}

(¹College of Life Science, Shaoxing University, Shaoxing 31200, China; ²Hangzhou Precision Medicine Research Center, Hangzhou 310018, China; ³Affiliated Hospital of Shaoxing University, Shaoxing 312000, China)

Abstract Acetaminophen (APAP) is the most important common cause of acute liver failure; however, the exact mechanism of toxicity of this analgesic drug is not elucidated. In the present study, we generated APAP-resistant liver cell line and determined their basic properties. AML-12 mouse hepatocytes were cultured with clonal cell density to generate APAP-resistant cells by means of gradually increasing the concentration of the APAP drug. Cell proliferation was determined by cell counting. The levels of reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential (MMP) were determined by H₂DCF-DA and MitoTracker detection, respectively. The levels of mRNA and protein were determined by qPCR and Western blot analysis, respectively. We successfully established 1.25 and 2.50 mmol/L APAP-resistant AML-12 cell lines (ARCs). Cell proliferation analysis revealed that, compared to the control group, ARCs had high proliferation capacity, low ROS levels, and high MMP and GSH/

收稿日期: 2018-01-12 接受日期: 2018-02-06

浙江省自然科学基金(批准号: Y2110911)资助的课题

*通讯作者. Tel: 0575-88345007, E-mail: lifangj@sohu.com

Received: January 12, 2018 Accepted: February 6, 2018

This work was supported by the Natural Sciences Foundation of Zhejiang Province (Grant No. Y2110911)

*Corresponding author. Tel: +86-575-88345007, E-mail: lifangj@sohu.com

网络出版时间: 2018-05-15 18:09:13 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180515.1809.008.html>

GSSH levels. Furthermore, Western blot and qPCR analysis showed that the expression level of the Nrf2 signaling pathway was up-regulated, whereas the level of the JNK signaling pathway was down-regulated. In addition, ARCs retained normal hepatocytic phenotypes, except for the high expressions of Foxa1 and Foxa2 genes, which were related to chromatin remodeling. We successfully established APAP-resistant hepatocyte lines with low oxidative stress levels but with retained normal hepatocytic phenotypes. Activation of Nrf2 and inactivation of JNK signaling pathway appeared to be involved in the protection of hepatocytes against APAP-induced cell apoptosis.

Keywords hepatocytes; acetaminophen; drug resistant; oxidant stress

药物诱导性肝损伤(drug induced liver injury, DILI)是临床急性肝衰竭的主要病因, 已知全球有1 100多种上市药物具有潜在肝毒性, 其中对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)是引起DILI最主要的原因。APAP为常见的退热止痛药, 是多种感冒药和止痛药的主要成分。在治疗剂量下使用APAP是安全的, 但过量会造成急性肝衰竭^[1-2]。APAP主要在肝脏内代谢, 进入肝细胞后代谢生成活性产物N-乙酰-p-苯醌亚胺(NAPQI)^[3-4]。NAPQI可被体内谷胱甘肽(GSH)所代谢, 但由于细胞内生成GSH有限, 过量的APAP会与细胞蛋白质的半胱氨酸巯基结合而形成APAP蛋白质复合物, 诱发氧化应激反应, 生成大量ROS, 造成过氧化损伤。

研究显示, APAP诱导的肝损伤与JNK信号通路活性升高关系密切。活化的JNK增强转录因子复合物AP-1活性, 从而促进p53、Bax、FasL、TNF等促凋亡蛋白质的表达; 磷酸化的JNK跨膜进入线粒体, 进一步放大氧化应激引起的线粒体损伤作用^[5]。此外, 对JNK活化有影响的其他信号通路同样参与了APAP诱导的肝细胞损伤, 包括与JNK信号通路早期反应有关GSK3 β 和MLK1/3信号通路的激活^[6-7], 以及晚期反应有关的ASK-1信号通路^[8]。除诱导毒性外, 有研究显示, 治疗剂量下的APAP处理可代偿性激活生理性调控机制Nrf2(nuclear factor erythroid 2-related factor)-Keap1通路, Nrf2与抗氧化还原酶上游启动子区域的抗氧化反应元件, 进而促进抗氧化基因如*Gclc*、*SOD*等表达水平增加, 保护由过量ROS诱导的肝细胞损伤, 并促进损伤后的肝细胞再生^[9-10]。因此, 以JNK诱导的凋亡过程和Nrf2参与的保护机制构成了APAP诱导肝细胞损伤反应的两个主要事件, 但具体作用的细节以及是否还受其他细胞分子的影响, 仍有待进一步的揭示。APAP耐药细胞株的建立是揭示作用细节的有效方法之一, 基于转录组学或蛋白质组学等方法比较耐药细胞株和正

常细胞株差异分子, 有望发现新的APAP作用靶点以及治疗靶点, 为临床上提高APAP耐受研究提供一些思路, 以降低肝细胞对药物的损伤反应。但迄今国内外尚无APAP耐药肝细胞细胞株建立的报道。

本研究通过药物梯度诱导实验建立APAP药物耐受AML-12肝细胞株, 并对其进行了基本的生物学特性分析和耐药机制探究, 为今后深入机制研究和新的药物治疗靶点发现提供了理想的研究平台。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 小鼠肝细胞株AML-12购于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。

1.1.2 主要材料 主要试剂包括: D-PBS(Hyclone, SH30028.02)、0.05%胰蛋白酶(Hyclone, 25300-054)、胎牛血清(FBS)(浙江天杭生物科技有限公司, 11011-8611)、Trizol(南京诺唯赞生物科技有限公司, R401-01)、Mito Tracker[®] Deep Red FM线粒体检测试剂盒(Invitrogen, M22426)、F12/DMEM(Gibco公司)、ITS(Sigma, 13146)、地塞米松(Dex)(Sigma, D1756)、DMSO(Sigma, 67-68-5)、对乙酰氨基酚(APAP)(MCE, HY66005)、ROS检测试剂盒(碧云天生物技术研究所, S0033)、GSH/GSSH检测试剂盒(碧云天, S0053)、BCA蛋白含量检测试剂盒(碧云天, P0010)、细胞裂解液(碧云天, P0013)、HRP标记羊抗兔二抗(碧云天, A0208)、GAPDH抗体(碧云天, AF1186)、Nrf2抗体(Abcam, ab62352)、JNK(碧云天, AF1048)、p-JNK(碧云天, AF1762)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠AML-12肝细胞的培养及耐药细胞株的建立 AML-12细胞培养: AML-12细胞在含10%胎牛血清的F12/DMEM(添加100 $\times$ ITS和10⁻⁷ mmol/L Dex)肝细胞培养基, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂及饱和湿度的条件下培

养;待细胞长至90%汇合时,胰蛋白酶消化,常规传代。

耐药细胞株的建立: 将 3.4×10^4 个细胞接种至10 cm培养皿,每皿加入8~10 mL含APAP的肝细胞培养基。以1.25 mmol/L作为起始诱导剂量,连续诱导3~4周,待其细胞生长稳定后消化传代; 3.4×10^4 个传代细胞接种至10 cm培养皿,并将APAP剂量提高至2.50 mmol/L,保持3~4周,直至细胞稳定生长。吉姆萨染色整体观察细胞克隆。

1.2.2 细胞增殖能力分析 将对照组、1.25 mmol/L和2.50 mmol/L APAP耐药组各 3.4×10^4 个细胞接种至10 cm培养皿,正常培养基或含相应APAP浓度的肝细胞培养基培养7~10天,细胞消化计数。

1.2.3 活性氧类(reactive oxygen species, ROS)和线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)测定 将对照组、1.25 mmol/L APAP耐药组和2.50 mmol/L APAP耐药组各10 000个细胞接种至96孔板,正常培养基或2.50 mmol/L APAP的肝细胞培养基培养24 h。根据H₂DCF-DA活性氧和Mito Tracker® Deep Red FM线粒体含量操作说明书分别检测细胞ROS和MMP的荧光强度。设定对照组MMP强度水平为1,通过与对照组比较确定实验组荧光强度。设定H₂O₂刺激对照组细胞产生的ROS荧光强度为100%,通过与对照组比较确定实验组荧光强度的百分比。

1.2.4 GSH和GSSG含量测定 将对照组、1.25 mmol/L APAP耐药组和2.50 mmol/L APAP耐药组各10 000个细胞接种至96孔板,正常培养基或含2.5 mmol/L APAP肝细胞培养基培养24 h。根据GSH和GSSG试剂盒进行实验操作,用酶标仪测定GSSG和总谷胱甘肽含量,依据操作说明书计算出GSH和GSSG的含量和比值。

1.2.5 qPCR检测基因表达水平 对照组、1.25 mmol/L APAP耐药组和2.50 mmol/L APAP耐药细胞接种在10 cm培养皿中,待细胞生长至90%汇合时,Trizol法提细胞总RNA,并按照逆转录试剂盒将RNA转录成cDNA。采用SYBR® Green法分别检测各样本的基因表达情况。20 μL PCR反应体系: 10 μL SYBRGreen qPCR Master Mix、1 μL引物F(10 μmol/L)、1 μL引物R(10 μmol/L)、7 μL ddH₂O、1 μL模板(cDNA)。反应程序: 95 °C 2 min, 95 °C 10 s, 60 °C 40 s, 以0.5 °C/s的速度从65 °C到95 °C每隔5 s记录一次荧光值,最后获得熔解曲线。完成上述步骤后,加样到96孔板,置于LightCycler 480 II 型荧光定量PCR仪中进行反应,采用相对定量法分别分析各组基因标志物的mRNA水平,其计算公式为: 基因标志物相对表达量= $2^{-\Delta\Delta Ct}\times 100\%$, 其中 $\Delta Ct=Ct_{\text{目的基因}}-Ct_{\text{内参基因}}$ 。以GAPDH为内参基因,引物序列如表1。

表 1 qPCR引物序列表
Table 1 Primer sequence of qPCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	扩增片段长度(bp) Fragment length (bp)	退火温度(°C) Annealing temperature (°C)
Bax-F	TTC AAC TGG GGC CGC GTG GTT	95	60
Bax-R	GGA GAG GAG GCC TTC CCA GCC A		
Bcl-F	ACG GAG GCT GGG ATG CCT TTG TG	106	60
Bcl-R	GCA CCC AGA GTG ATG CAG		
GAPDH-F	AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG	102	60
GAPDH-R	TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA		
Gclc-F	GGG GTG ACG AGG TGG AGT A	124	60
Gclc-R	GTT GGG GTT TGT CCT CTC CC		
GSR-F	GCT ATG CAA CAT TCG CAG ATG	65	60
GSR-R	AGC GGT AAA CTT TTT CCC ATT G		
Foxa1-F	CAA GGA TGC CTC TCC ACA CTT	96	60
Foxa1-R	TGA CCA TGA TGG CTC TCT GAA		
Foxa2-F	GAC ATA CCG ACG CAG CTA CA	216	60
Foxa2-R	GGC ACC TTG AGA AAG CAG TC		
Nrf2-F	CCT CGC TGG AAA AAG AAG TG	80	60
Nrf2-R	GGA GAG GAT GCT GCT GAA AG		
SOD1-F	GTG ATT GGG ATT GCG CAG TA	113	60
SOD1-R	TGG TTT GAG GGT AGC AGA TGA GT		

1.2.6 Western blot检测蛋白质水平 将对照组、1.25 mmol/L APAP耐药组和2.50 mmol/L APAP耐药组细胞接种在10 cm培养皿中,待细胞生长至90%汇合时,用预冷的PBS洗涤细胞2次,加入细胞裂解液(RIPA,含1% PMSF)裂解细胞,BCA法测定蛋白质浓度。进行SDS-PAGE,湿法转膜转印蛋白质至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,加入相应一抗(Nrf2, 1:1 000; p-JNK, 1:1 000; JNK, 1:1 000),4 °C孵过夜,TBST洗涤3次,每次10 min。加入HRP标记的二抗(1:5 000),室温孵育2 h,TBST洗3次,ECL化学发光,成像系统中曝光拍摄。实验重复3次。

1.2.7 统计学分析 所得实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用Graph Prism 5.0生物医学软件做图。两组之间比较采用 t 检验,多组间两两比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 APAP耐药细胞株的建立

克隆状密度培养的AML-12细胞经1.25 mmol/L APAP耐药诱导后,大部分细胞发生凋亡,部分存活的细胞开始增殖形成克隆;培养3~4周后细胞克隆可增大至消化传代的要求(图1A)。将APAP浓度由1.25 mmol/L提升至2.50 mmol/L后,已耐药细胞再次发生凋亡,部分存活细胞增殖形成新的耐药集落(图1B)。经过两轮耐药筛选(总共7~8周),分别建立1.25 mmol/L和2.50 mmol/L的APAP耐药细胞(APAP-resistant AML-12 cell lines, ARCs)。耐药细胞基本呈

上皮样集落,但集落整体较为松散(图1C)。

2.2 耐药细胞株耐药特性的分析

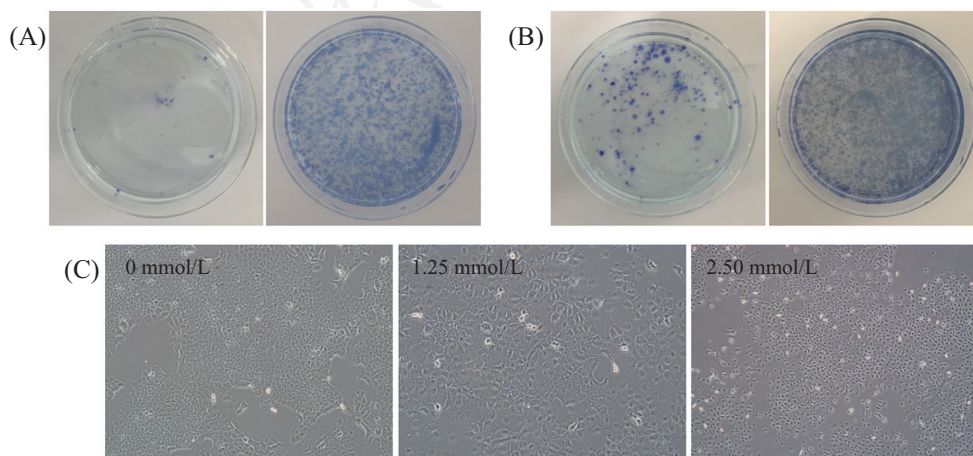
耐药组细胞在撤药培养30天时,我们首先检测了各组细胞在不含APAP的正常培养基中的增殖情况,结果显示,与对照组相比较,1.25 mmol/L APAP耐药组细胞增殖能力并未发生显著下降;而2.50 mmol/L APAP耐药组细胞增殖能力则有所减弱(图2A)。随后,我们检测了耐药细胞是否具有APAP耐药特性,当用1.25和2.50 mmol/L APAP分别处理细胞后,结果显示,耐药组细胞增殖数量明显高于对照组(图2B和图2C)。耐药组细胞在撤药培养60天后,即使再用相应耐药浓度的APAP培养7~10天,细胞仍能保持较好的耐药特性(图2D和图2E)。

2.3 ROS、MMP以及GSH/GSSH在细胞中的检测

APAP诱导的氧化应激是造成肝细胞损伤的主要因素。耐药组细胞在撤药培养30天后,首先检测了药物未处理情况下各组细胞ROS、MMP和GSH/GSSH水平,结果显示,各组之间ROS本底水平无显著差异(图3A),但MMP和GSH/GSSH在耐药细胞中表达水平显著高于对照组(图3B和图3C)。而加药处理24 h后,耐药组细胞ROS水平显著低于对照组细胞(图3A),而MMP和GSH/GSSH则显著高于对照组细胞(图3B和图3C),且成耐药剂量依赖关系。

2.4 Nrf2和JNK信号通路在细胞中的检测

Nrf2信号通路在APAP诱导的细胞抗氧化过程中具有积极的作用,耐药组细胞在撤药培养30天后,采用qPCR和蛋白质印迹技术检测了各组细胞相



A: 吉姆萨染色观察1.25 mmol/L ARCs的集落; B: 2.50 mmol/L ARCs的集落; C: 显微镜下的各组细胞形态。

A: Giemsa staining observation colonies of 1.25 mmol/L ARCs; B: 2.50 mmol/L ARCs colony; C: morphology of cells in different groups.

图1 APAP耐药肝细胞(ARCs)株的建立及细胞形态

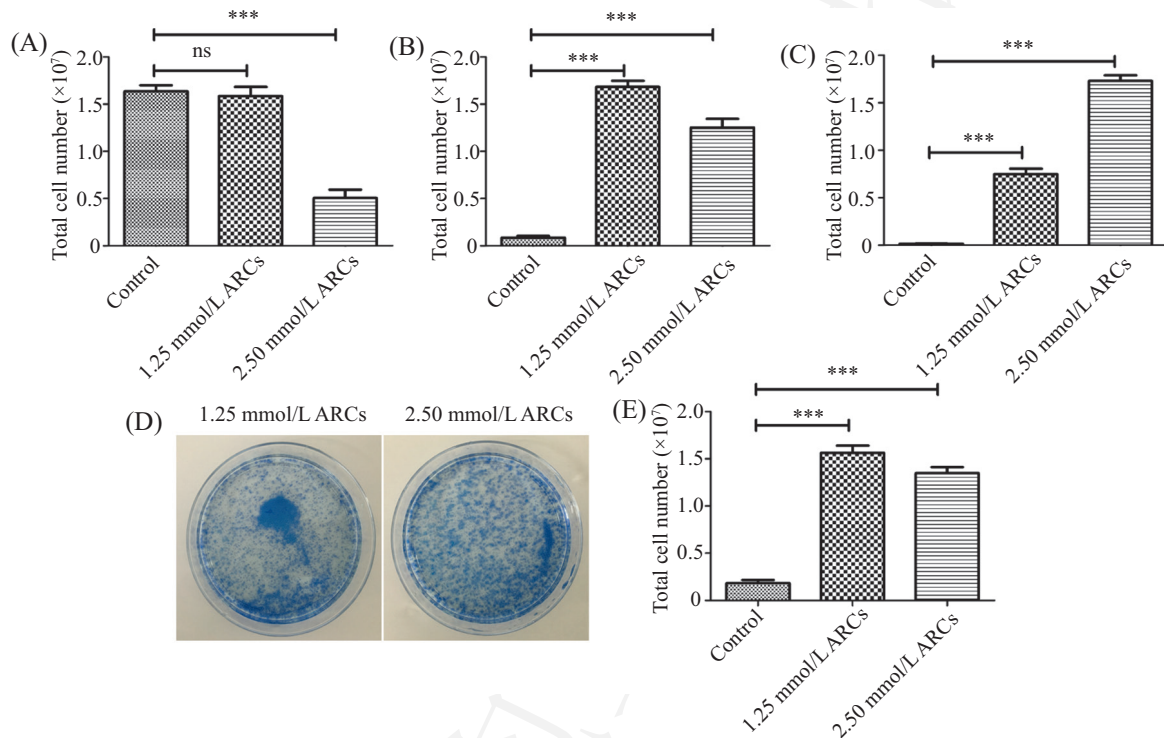
Fig.1 Generation of APAP-resistant AML-12 cell lines and their morphology

关mRNA和蛋白质水平。研究结果显示, Nrf2蛋白质(图4A)和及其靶基因[*Nrf2*(图4B)、*Gclc*(图4C)、*SOD1*(图4D)、*GSR*(图4E)]在耐药细胞中蛋白质水平显著高于对照组细胞。JNK信号的激活与细胞的凋亡或坏死有关, 检测结果显示, JNK信号通路在耐

药的细胞中表达是沉默的(图4A), 而反映抗凋亡能力的Bcl-2/Bax的值在耐药组细胞中明显高于对照组细胞(图4F)。

2.5 肝细胞转录因子在细胞中的检测

接下来, 我们研究了耐药细胞的肝细胞表型

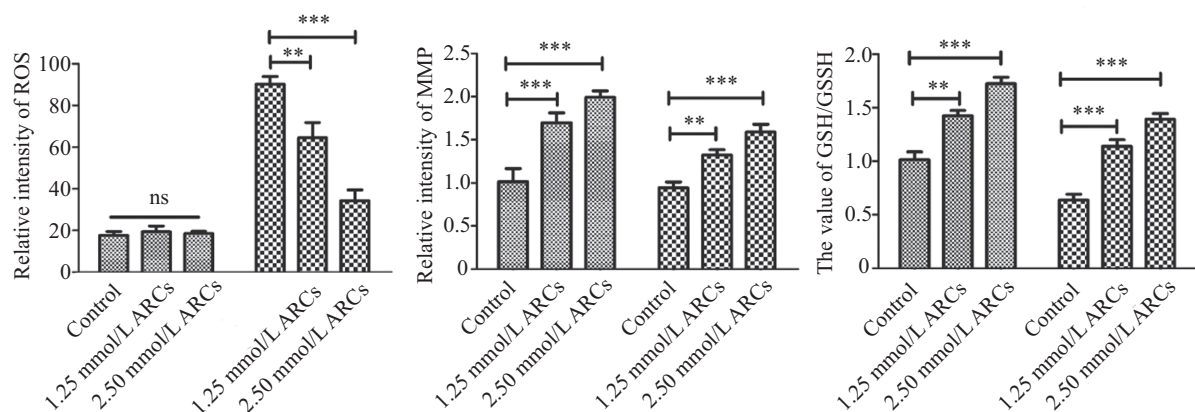


A~C: 各组细胞分别在肝细胞培养基(A)、含1.25 mmol/L ARC(B)、含2.50 mmol/L ARC(C)肝细胞培养基中的细胞数量统计; D~E: 撤药培养60天的耐药细胞在相应浓度APAP处理后的吉姆萨染色形态图及细胞数量统计。*** $P < 0.001$; ns: 差异不显著。

A~C: cell proliferation analysis between control and ARC groups after hepatocytes culture medium (A) hepatocytes culture medium containing 1.25 mmol/L (B) and containing 2.50 mmol/L (C). APAP withdraw of APAP for 60 days, Giemsa staining observation morphology (D) and proliferation analysis (E) in ARC groups with corresponding APAP treatment. *** $P < 0.001$; ns: no significant.

图2 APAP耐药肝细胞(ARC)株增殖能力分析

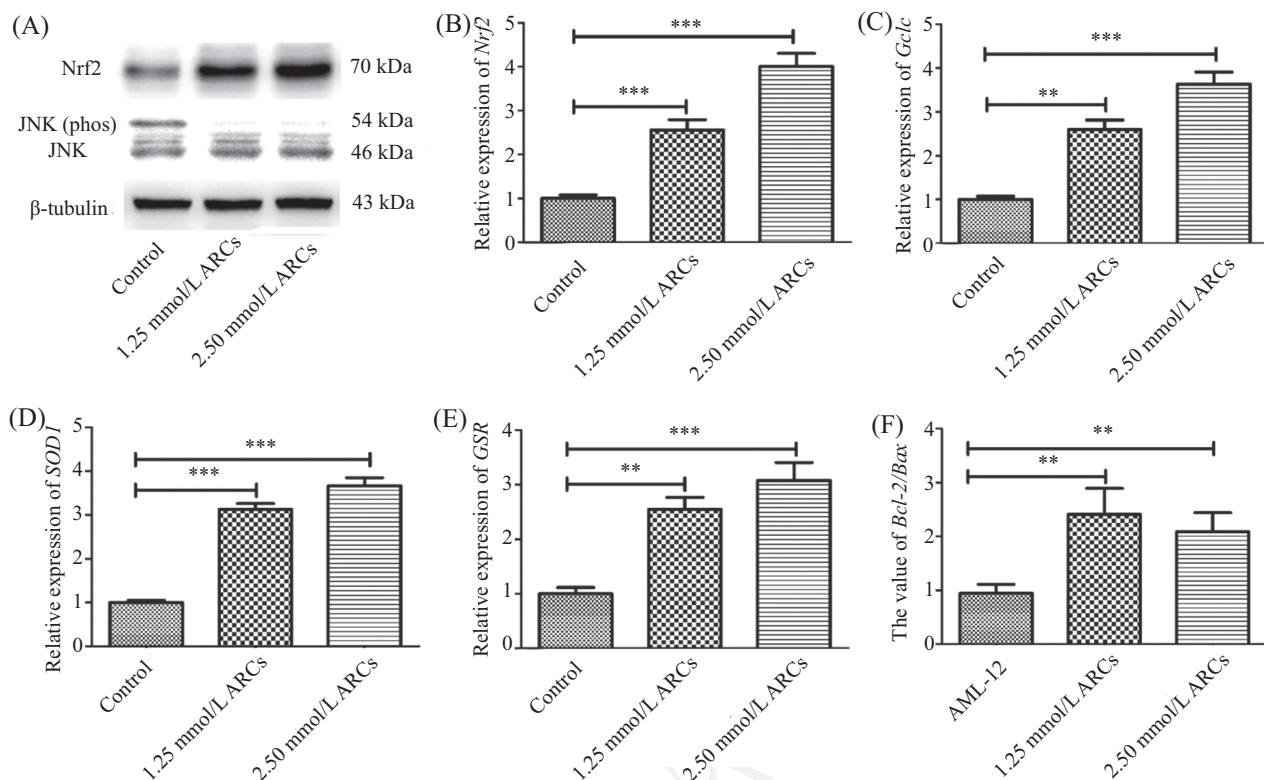
Fig.2 Proliferation analysis of ARC groups



** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图3 APAP处理对各组细胞的ROS、MMP以及GSH/GSSH表达水平影响

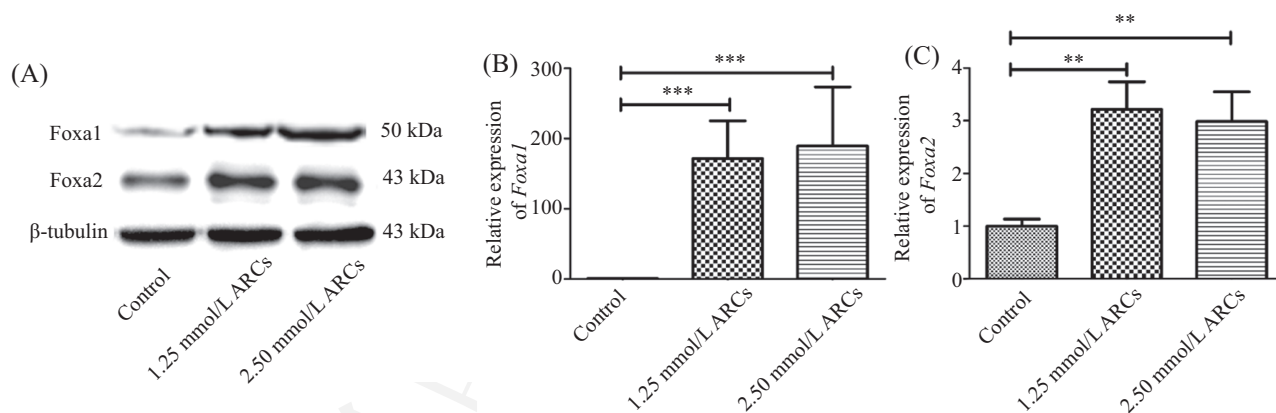
Fig.3 The effect of APAP on the levels of ROS, MMP and GSH/GSSH between control cells and ARC groups



A: Western blot检测对照细胞和耐药细胞Nrf2和p-JNK蛋白质水平; B-E: qPCR检测对照组和耐药细胞抗氧化相关的基因水平; F: 抗凋亡基因表达水平。** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: Western blot analysis protein level of Nrf2 and p-JNK in control and ARCs groups; B-E: qPCR analysis the level of anti-oxidation related genes; F: anti-apoptosis related genes in control and ARCs groups. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图4 APAP耐药细胞抗氧化和凋亡能力分析
Fig.4 Anti-oxidation and anti-apoptosis analysis of ARCs



A: Western blot检测对照组和耐药组细胞Foxa1和Foxa2蛋白质水平; B: qPCR检测对照组和耐药组细胞Foxa1水平; C: qPCR检测对照组和耐药组细胞Foxa2 mRNA水平。** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: Western blot analysis protein level of Foxa1 and Foxa2 in control and ARC groups; B: qPCR analysis mRNA level of Foxa1; C: Foxa2 mRNA level in control and ARC groups. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图5 APAP耐药细胞Foxa1和Foxa2蛋白质和mRNA水平检测

Fig.5 The mRNA and protein levels of Foxa1 and Foxa2 in control cells and ARCs groups

是否发生改变, 耐药组细胞在撤药培养30天后, 采用qPCR和Western blot检测了各组细胞相关基因和蛋白表达水平。结果如图5所示, 肝功能相关基

因Alb(albumin)和AAT(alpha 1 antitrypsin), 以及多个核转录因子HNF1α(hepatocytes nuclear factor 1 α)、HNF1β、HNF4α以及HNF6β表达水平并未发

生显著变化(结果未显示)。而Foxa1(HNF3 α)以及Foxa2(HNF3 β)在耐药细胞中蛋白质和mRNA水平显著高于非耐药组, 其中, Foxa1 mRNA水平甚至比对照组高出近200倍, 而Foxa2 mRNA高出约3倍。

3 讨论

小鼠、大鼠以及非人灵长类动物是常用的APAP毒性试验动物^[11-12], 其肝损伤严重程度与人相似, 因此可将研究结果用于人类临床试验上。体外细胞模型是动物模型的重要补充, 也是研究APAP诱导肝损伤机制的重要平台, 因此相当一部分机制成果是通过对分离肝细胞获取的^[13-14], 但是原代肝细胞培养和扩增仍存在技术上的局限性。与原代培养的肝细胞相对应, 肝细胞系相对容易获取, 并具有增殖容易、冷冻保存不会损失功能和操作容易等优势。虽然永生化的细胞系与原代肝细胞存在一定生物学上的差异性, 但是仍保留了大部分肝细胞特征, 如AML-12小鼠肝细胞系对APAP仍然具有良好的反应^[15-16], 因此可满足作为体外细胞模型研究APAP毒性机制和药物筛选的要求。

本研究中, 我们采用了分阶段适度浓度递增的作用方式, 在体外成功建立1.25和2.50 mmol/L浓度的APAP耐药小鼠AML-12肝细胞系。在这一过程中, 细胞密度的把控是耐药细胞系建立过程的重要因素, 本研究采用了克隆状密度(500~600个细胞/cm²)的诱导方法, 在这一密度下, 1.25 mmol/L APAP处理可诱导95%以上的细胞凋亡, 而筛选存活的细胞产生很好的耐药特征, 并在APAP存在的情况下可持续增殖; 而较高密度的细胞, 1.25 mmol/L APAP并不能促使绝大部分细胞死亡(结果未显示), 这一原因可能源于较高密度细胞之间的相互作用而保护APAP诱导的毒性反应。耐药细胞可在相应浓度的APAP作用下扩增培养, 与正常未耐药细胞具有相似的增殖能力。此外, 耐药细胞在撤药培养60天后, 仍能保持耐药特征, 说明其具有耐药稳定性。

耐药细胞仍然维持着较好的肝细胞生物学特性。增殖方面, 1.25 mmol/L APAP耐药细胞株增殖能力与对照组接近, 而2.50 mmol/L APAP耐药细胞增殖能力有所下降, 这可能源于其将更多的代谢能量用于中和APAP诱导产生的毒性; 形态方面, 耐药细胞虽然整体形态较为松散, 但仍能保持较好的上皮形态; 此外, 与未耐药组相比, 耐药组细胞仍能

维持正常肝细胞表型特征, 如与肝细胞功能相关的Alb和AAT, 以及多个核转录因子HNF1 α 、HNF1 β 、HNF4 α 、HNF6 β 的表达水平并未发生显著变化。这些肝性特征的保留为耐药机制研究提供了可靠的基础。

APAP诱导的肝细胞损伤是通过ROS诱导的氧化应激反应引起的, 处理后可导致细胞内ROS水平升高, MMP的下降以及GSH的耗竭^[3-4]。本研究结果显示, 耐药细胞在经APAP处理后, 胞内维持了较低的ROS水平, 较高的MMP水平和GSH/GSSH含量, 从而保护细胞免受ROS的损伤。进一步的研究发现, 与正常AML-12细胞相比, 耐药细胞主要的抗氧化系统Nrf2及其靶基因表达水平显著升高, 而与凋亡相关的JNK信号通路处于非激活状态。有研究结果显示APAP诱导的肝损伤与JNK信号通路活性升高关系密切^[5-8], 并伴随着代偿性的Nrf2信号通路活性的升高^[9-10]。综合分析, 本研究中耐药细胞主要通过提高细胞的抗氧化和抗凋亡系统抵御APAP诱导的细胞毒性, 而这也正是APAP诱导肝细胞损伤的主要途径。

多个细胞信号分子可作用上述通路而影响APAP对肝细胞的损伤作用, 但具体作用细节仍未明了。而APAP耐药细胞株的建立是筛选有效信号分子的可靠方法之一。通过检测肝转录因子在耐药和非耐药细胞中表达的情况, 我们首次发现, Foxa1和Foxa2的表达发生显著提高, 其中Foxa1基因表达水平甚至提高了近200倍。Foxa1和Foxa2作为先锋因子, 在染色质的重塑中发挥重要作用, 它们可以打开染色体结构, 使其他转录因子能结合在染色体上, 启动广泛的基因表达^[17]。此外, 有研究显示, Foxa1还与药物的耐药性有关^[18-20], 有研究发现, Foxa1可改变雌激素和雄激素受体分布, 造成乳腺癌^[18-19]和前列腺癌^[20]抗肿瘤药物的作用靶点移位, 因此与肿瘤药物的耐药性密切相关。但Foxa1和Foxa2是否参与耐药过程还有待进一步的研究。

通过克隆状密度和浓度梯度诱导实验, 我们建立了APAP耐药细胞株, 并且发现耐药性状的获得与氧化信号通路Nrf2和凋亡信号通路JNK活性的改变有关, 研究同时提示, 染色体重塑相关转录因子Foxa1和Foxa2也可能参与这一过程。在后续的研究中, 借助转录组学或蛋白质组学等方法比较耐药细胞株和正常细胞株差异信号分子, 有望筛选出新的

APAP作用靶点以及治疗靶点。因此, 本研究所建立的耐药细胞为深入研究毒性机制和发现抗耐药靶点提供了理想的模型。

参考文献 (References)

- Bunchorntavakul C, Reddy KR. Acetaminophen-related Hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* 2013; 17(4): 587-607.
- Herndon CM, Dankenbring DM. Patient perception and knowledge of acetaminophen in a large family medicine service. *J Pain Palliat Care Pharmacother* 2014; 28(2): 109-16.
- Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* 2012; 44(1): 88-106.
- Jaeschke H, McGill MR. Cytochrome P450-derived versus mitochondrial oxidant stress in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 2015; 235(3): 216-7.
- Ramachandran A, Jaeschke H. Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology. *J Clin Transl Res* 2017; 3(Suppl 1): 157-69.
- Shinohara M, Ybanez MD, Win S, Than TA, Jain S, Gaarde WA, *et al.* Silencing glycogen synthase-3beta inhibits acetaminophen hepatotoxicity and attenuates JNK activation and loss of glutamate cysteine ligase and myeloid cell leukemia sequence 1. *J Biol Chem* 2010; 285(11): 8244-55.
- Mishra R, Barthwal MK, Sondarva G, Rana B, Wong L, Chatterjee M, *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta induces neuronal cell death via direct phosphorylation of mixed lineage kinase 3. *J Biol Chem* 2007; 282(42): 30393-405.
- Nakagawa H, Maeda S, Hikiba Y, Ohmae T, Shibata W, Yanai A, *et al.* Deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates acetaminophen induced liver injury by inhibiting c-Jun N-terminal kinase activation. *Gastroenterology* 2008; 135(4): 1311-21.
- Wang W, Guan C, Sun X, Zhao Z, Li J, Fu X, *et al.* Tanshinone IIA protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity via activating the Nrf2 pathway. *Phytomedicine* 2016; 23(6): 589-96.
- Ahmed MM, Wang T, Luo Y, Ye S, Wu Q, Guo Z, *et al.* Aldo-keto reductase-7A protects liver cells and tissues from acetaminophen-induced oxidative stress and hepatotoxicity. *Hepatology* 2011; 54(4): 1322-32.
- McGill MR, Williams CD, Xie Y, Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 264(3): 387-94.
- Tamai S, Iguchi T, Niino N, Mikamoto K, Sakurai K, Sayama A, *et al.* A monkey model of acetaminophen-induced hepatotoxicity; phenotypic similarity to human. *J Toxicol Sci* 2017; 42(1): 73-84.
- Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, Bode JG, Bolleyn J, *et al.* Recent advances in 2D and 3D *in vitro* systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* 2013; 87(8): 1315-30.
- Toyoda Y, Kashikura K, Soga T, Tagawa YI. Metabolomics of an *in vitro* liver model containing primary hepatocytes assembling around an endothelial cell network: comparative study on the metabolic stability and the effect of acetaminophen treatment. *J Toxicol Sci* 2017; 42(4): 445-54.
- Ahmed MM, Al-Obosi JA, Osman HM, Shayoub ME. Overexpression of Aldose Reductase Render Mouse Hepatocytes More Sensitive to Acetaminophen Induced Oxidative Stress and Cell Death. *Indian J Clin Biochem* 2016; 31(2): 162-70.
- Zhang H, Cook J, Nickel J, Yu R, Stecker K, Myers K, Dean NM. Reduction of liver Fas expression by an antisense oligonucleotide protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Biotechnol* 2000; 18(8): 862-7.
- Besnard V, Wert SE, Hull WM, Whitsett JA. Immunohistochemical localization of Foxa1 and Foxa2 in mouse embryos and adult tissues. *Gene Expr Patterns* 2004; 5(2): 193-208.
- Fu X, Jeselsohn R, Pereira R, Hollingsworth EF, Creighton CJ, Li F, *et al.* FOXA1 overexpression mediates endocrine resistance by altering the ER transcriptome and IL-8 expression in ER-positive breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113(43): E6600-9.
- Tanaka K, Tokunaga E, Yamashita N, Sagara Y, Ohi Y, Taguchi K, *et al.* The relationship between the expression of FOXA1 and GATA3 and the efficacy of neoadjuvant endocrine therapy. *Breast Cancer* 2017; 24(3): 384-92.
- Zhao JC, Fong KW, Jin HJ, Yang YA, Kim J, Yu J. FOXA1 acts upstream of GATA2 and AR in hormonal regulation of gene expression. *Oncogene* 2016; 35(33): 4335-44.