

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging ResearchSESN2 激活 ULK1 介导 JNK 信号通路在
肝星状细胞活化中的调节机制SESN2 activation of ULK1 mediates the regulatory mechanism of JNK signaling
pathway in hepatic stellate cell activation汤洁^{1,2}, 马天奇¹, 姜正伟^{1,2},
景源伟¹, 孙路翔¹, 程宏¹(1. 扬州大学 医学部, 江苏 扬州 225001; 2. 淮
安市第四人民医院 肝病科, 江苏 淮安 223002)TANG Jie^{1,2}, MA Tian - qi¹,
JIANG Zheng - wei^{1,2},
JING Yuan - wei¹,
SUN Lu - xiang¹, CHENG Hong¹(1. Faculty of Medicine, Yangzhou
University, Yangzhou 225001, Jiangsu
Province, China; 2. Department of
Hepatology, The Fourth People's
Hospital of Huai'an, Huai'an 223002,
Jiangsu Province, China)基金项目: 2024 年度淮安市卫生健康科研基金
资助项目(HAWJZ2024003)作者简介: 汤洁(1988 -), 女, 在读硕士, 主要
从事肝炎、肝硬化、肝硬化失代偿期
并发症、肝癌的诊治研究

通信作者: 程宏, 副教授

MP: 13773528387

E-mail: hcheng@yzu.edu.cn

摘要:目的 探讨应激诱导蛋白 2 (SESN2) 通过 unc - 51 样激酶 1 (ULK1) 对 JS - 1 细胞活化的作用及其机制。方法 将 JS - 1 细胞分为对照组 (正常培养)、si - NC 组 (转染 si - NC)、si - SESN2 组 (转染 si - SESN2)、模型组 (含 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 转化生长因子 - $\beta 1$ 的培养基培养 24 h)、模型 + oe - SESN2 组 (模型组基础上转染 oe - SESN2)、模型 + si - SESN2 组 (模型组基础上转染 si - SESN2)、模型 + si - SESN2 + oe - ULK1 组 (模型组基础上共转染 si - SESN2 和 oe - ULK1)。免疫荧光检测 F - 肌动蛋白 (F - actin) 水平; 实时定量反转录聚合酶链式反应检测 ULK1 mRNA 水平; 蛋白免疫印迹检测 SESN2、微管相关蛋白轻链 3 II / I (LC3 II / I)、结缔组织生长因子 (CTGF)、I 型胶原 $\alpha 1$ (Col1a1)、磷酸化 - 应激活化蛋白激酶 (p - JNK)、应激活化蛋白激酶 (JNK)、c - Jun、激活转录因子 2 (ATF2) 相对表达水平; 细胞计数试剂盒 - 8 检测细胞增殖率; Transwell 检测细胞侵袭能力。结果 对照组、模型组、模型 + oe - SESN2 组和模型 + si - SESN2 组 SESN2 蛋白的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.19 、 2.57 ± 0.49 、 3.61 ± 0.68 和 1.66 ± 0.31 , F - actin 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.18 、 4.57 ± 0.92 、 6.33 ± 1.19 和 2.81 ± 0.57 , ULK1 mRNA 的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 2.67 ± 0.48 、 3.52 ± 0.66 和 1.95 ± 0.37 。对照组、模型组、模型 + oe - SESN2 组、模型 + si - SESN2 组和模型 + si - SESN2 + oe - ULK1 组 LC3 II / I 蛋白的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.20 、 2.79 ± 0.53 、 3.57 ± 0.68 、 1.88 ± 0.35 和 2.51 ± 0.48 , 细胞增殖率分别为 $(100.00 \pm 2.23)\%$ 、 $(141.31 \pm 4.17)\%$ 、 $(156.52 \pm 8.84)\%$ 、 $(109.49 \pm 7.35)\%$ 和 $(127.08 \pm 8.16)\%$, 细胞侵袭个数分别为 66.04 ± 11.45 、 137.84 ± 21.73 、 215.19 ± 35.28 、 75.46 ± 13.51 和 124.27 ± 19.50 , CTGF 蛋白的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 、 2.65 ± 0.51 、 3.77 ± 0.72 、 1.51 ± 0.29 和 2.53 ± 0.51 , Col1a1 蛋白的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 2.93 ± 0.57 、 3.88 ± 0.75 、 1.61 ± 0.31 和 2.72 ± 0.52 , JNK 蛋白相对磷酸化水平分别为 1.00 ± 0.16 、 2.21 ± 0.42 、 3.08 ± 0.59 、 1.46 ± 0.29 和 2.04 ± 0.37 。模型组上述指标与对照组比较, 模型 + oe - SESN2 组或模型 + si - SESN2 组上述指标与模型组比较, 模型 + si - SESN2 + oe - ULK1 组上述指标与模型 + si - SESN2 组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。结论 SESN2 通过激活 ULK1, 促进 JS - 1 细胞活化, 促进细胞增殖和侵袭, 调控细胞稳态, 可能是通过激活 JNK 信号通路实现的。

关键词: 应激诱导蛋白 2; unc - 51 样激酶 1; 肝星状细胞; 应激活化蛋白激酶信号通路; 细胞增殖

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.23.009

中图分类号: R96

文献标志码: A

文章编号: 1001 - 6821 (2025) 23 - 3358 - 08

Abstract: Objective To investigate the effect of sestrin 2 (SESN2) on

JS-1 cell activation through unc-51-like kinase 1 (ULK1) and its mechanism. **Methods** The JS-1 cells were divided into seven groups: the control group (cultured under normal conditions), si-NC group (transfected with si-NC), the si-SESN2 group (transfected with si-SESN2), model group (cultured in medium containing $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ transforming growth factor- $\beta 1$ for 24 h), model + oe-SESN2 group (transfected with oe-SESN2 on the basis of the model group), model + si-SESN2 group (transfected with si-SESN2 on the basis of the model group), and model + si-SESN2 + oe-ULK1 group (co-transfected with si-SESN2 and oe-ULK1 on the basis of the model group). The levels of fibrous actin (F-actin) was detected by immunofluorescence. Quantitative real time polymerase chain reaction was used to detect the *ULK1* mRNA level. The relative expression levels of SESN2, light chain 3 II/I (LC3 II/I), connective tissue growth factor (CTGF), collagen type I $\alpha 1$ (Colla1), phospho-c-Jun N-terminal kinase (p-JNK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and activating transcription factor 2 (ATF2) were detected by Western Blot. Cell proliferation rate was detected by cell counting kit-8. Transwell assesses the ability of cells to invade. **Results** The relative expression levels of SESN2 protein in the control group, model group, model + oe-SESN2 group, and model + si-SESN2 group were 1.00 ± 0.19 , 2.57 ± 0.49 , 3.61 ± 0.68 , and 1.66 ± 0.31 , respectively; the relative fluorescence intensity of F-actin was 1.00 ± 0.18 , 4.57 ± 0.92 , 6.33 ± 1.19 , and 2.81 ± 0.57 , respectively; the relative expression levels of *ULK1* mRNA were 1.00 ± 0.15 , 2.67 ± 0.48 , 3.52 ± 0.66 , and 1.95 ± 0.37 , respectively. The relative expression levels of LC3 II/I protein in the control group, model group, model + oe-SESN2 group, model + si-SESN2 group, and model + si-SESN2 + oe-ULK1 group were 1.00 ± 0.20 , 2.79 ± 0.53 , 3.57 ± 0.68 , 1.88 ± 0.35 , and 2.51 ± 0.48 , respectively; the cell proliferation rates were $(100.00 \pm 2.23)\%$, $(141.31 \pm 4.17)\%$, $(156.52 \pm 8.84)\%$, $(109.49 \pm 7.35)\%$, and $(127.08 \pm 8.16)\%$, respectively; the number of cell invasions was 66.04 ± 11.45 , 137.84 ± 21.73 , 215.19 ± 35.28 , 75.46 ± 13.51 , and 124.27 ± 19.50 , respectively; the relative expression levels of CTGF protein were 1.00 ± 0.17 , 2.65 ± 0.51 , 3.77 ± 0.72 , 1.51 ± 0.29 , and 2.53 ± 0.51 , respectively; the relative expression levels of Colla1 protein were 1.00 ± 0.15 , 2.93 ± 0.57 , 3.88 ± 0.75 , 1.61 ± 0.31 , and 2.72 ± 0.52 , respectively; the relative phosphorylation levels of JNK protein were 1.00 ± 0.16 , 2.21 ± 0.42 , 3.08 ± 0.59 , 1.46 ± 0.29 , and 2.04 ± 0.37 , respectively. Compared with the control group, the above indicators of the model group showed statistically significant differences; compared with the model group, the above indicators of the model + oe-SESN2 group or model + si-SESN2 group showed statistically significant differences; compared with the model + si-SESN2 group, the above indicators of the model + si-SESN2 + oe-ULK1 group all showed statistically significant differences ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** SESN2 activates ULK1, promotes JS-1 cell activation, promotes cell proliferation and invasion, and regulates cell homeostasis, possibly through the activation of JNK signaling pathway.

Key words: sestrin 2; unc-51-like kinase 1; hepatic stellate cells; c-Jun N-terminal kinase signaling pathway; cell proliferation

肝纤维化是慢性肝病进展至肝硬化的核心病理过程,其核心机制在于肝星状细胞的异常活化^[1-2]。活化的肝星状细胞通过表型转化分泌大量细胞外基质,导致肝脏结构重塑与功能衰竭^[3]。近年研究发现,细胞自噬与应激信号通路在肝星状细胞活化中发挥重要调控作用,抑制应激活化蛋白激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路激活,已被证实能有效抑制促纤维化基因的表达,抑制肝星状细胞活化和增殖^[4]。应激诱导蛋白 2 (sestrin 2, SESN2) 作

为一种关键的氧化应激传感器,在调节细胞自噬过程中扮演了重要角色。SESN2 能够通过激活 unc-51 样激酶 1 (unc-51-like kinase 1, ULK1) 启动自噬程序,这一机制对于维持细胞稳态至关重要^[5]。然而,关于 SESN2 及 ULK1 在肝星状细胞活化中的具体调节机制,目前报道尚少。本研究旨在基于 JNK 信号通路,探讨 SESN2 介导 ULK1 参与肝星状细胞活化的分子通路,从而为肝纤维化的临床干预确立潜在的作用靶标并开拓新的理论视角。

材料与方法

1 材料

细胞 小鼠肝星状细胞系 JS-1, 购自上海淳麦生物科技有限公司。

药品与试剂 转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$), 规格: 50 μg , 批号: 0000502246, 纯度 $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich 公司生产。兔抗小鼠 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、波形蛋白 (Vimentin)、I 型胶原蛋白 (collagen type I, Collagen I)、F-肌动蛋白 (fibrous actin, F-actin)、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、N-钙粘蛋白 (neural-cadherin, N-cadherin)、SESN2、死骨片 1 (sequestosome 1, P62)、苺氯素 1 (Beclin1)、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF)、整合素 $\alpha 5$ (integrin $\alpha 5$, Itg $\alpha 5$)、多发性内分泌肿瘤 1 型 (multiple endocrine neoplasia-1, Menin)、JNK、激活转录因子 2 (activating transcription factor 2, ATF2)、微管相关蛋白轻链 3 II/I (light chain 3 II/I, LC3 II/I)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、 β -肌动蛋白 (beta-actin, β -actin)、I 型胶原 $\alpha 1$ (collagen type I $\alpha 1$, Col1a1) 抗体, 均由英国 Abcam 公司生产; 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚染色液, 北京康瑞纳生物科技有限公司生产; BeyoFast™ SYBR Green One-Step 实时定量反转录聚合酶链式反应 (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒, 上海碧云天生物技术股份有限公司生产; 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8), 武汉贝茵莱生物科技有限公司生产; 磷酸化-应激活化蛋白激酶 (phospho-c-Jun N-terminal kinase, p-JNK) 抗体, 沈阳万类生物科技有限公司生产; 原癌基因蛋白 (c-Jun proto-oncogene, c-Jun) 抗体, 杭州华安生物技术有限公司生产; 引物序列由北京合生基因公司提供; 质粒由上海吉凯生物基因有限公司提供。

仪器 Ri2 荧光倒置显微镜, 日本 Nikon (尼康) 公司产品; Multi-skan FC 酶标仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[6]

JS-1 细胞用含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素溶液的 DMEM 培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 及 5% CO_2 的细

胞培养箱中培养。

2.2 细胞分组与给药方法^[7]

将 JS-1 细胞分为对照组、si-NC 组、si-SESN2、模型组、模型+oe-SESN2 组、模型+si-SESN2 组、模型+si-SESN2+oe-ULK1 组。对照组: 正常培养; si-NC 组: 转染 si-NC (5'-UUCUC-CGAACGUGUCACGUTT-3') 后正常培养不做任何处理; si-SESN2 组: JS-1 细胞转染 si-SESN2 (5'-GCAUCAGAUACGAUGACUATT-3') 后正常培养不做任何处理; 模型组: JS-1 细胞以无血清 DMEM 培养基 (含 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- $\beta 1$) 进行诱导活化, 共培养 24 h; 模型+oe-SESN2 组: 模型组基础上转染 oe-SESN2; 模型+si-SESN2 组: 模型组基础上转染 si-SESN2; 模型+si-SESN2+oe-ULK1 组: 模型组基础上共转染 si-SESN2 和 oe-ULK1。

2.3 免疫荧光检测活化标志蛋白水平^[4]

细胞经 4% 多聚甲醛溶液室温固定 60 min 后, 依次进行磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 漂洗及 10% 山羊血清封闭处理 (30 min, 室温)。随后进行一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温孵育过夜, 次日经充分清洗后, 与荧光标记二抗 (37 $^{\circ}\text{C}$, 避光孵育 1 h) 结合。最后通过核染色 (5 min) 标记细胞核, 使用荧光倒置显微镜完成图像采集。

2.4 qRT-PCR 检测 SESN2、ULK1 mRNA 水平^[3]

细胞裂解后提取总 RNA, 使用逆转录试剂盒合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。SESN2 上游引物序列: 5'-CCGCTACATGACCTGACTCC-3', 下游引物序列: 5'-CTGCACATCACACACAAGCC-3'; ULK1 上游引物序列: 5'-AAGTTCGAGTTCTCTCGCAAG-3', 下游引物序列: 5'-ACCTCCAGGTCGTGCTTCT-3'; GAPDH 上游引物序列: 5'-CGCTCTCTGCTCCTCCTGTTT-3', 下游引物序列: 5'-ATCCGTTGACTCCGACCTTCAC-3'。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算各 mRNA 相对水平。

2.5 蛋白免疫印迹检测蛋白表达^[3]

收集各组细胞加裂解液冰上裂解 30 min, 12 000 rpm 离心 15 min 取上清。试剂盒定量后, 取等量蛋白进行电泳分离, 随后转膜。膜封闭采用 5% 脱脂奶粉室温振荡处理 2 h, 继而与稀释一抗置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行过夜孵育。洗膜, 在室温环境中与二抗共同孵育 60 min, 采用化学发光法进行条带显像, 蛋白条带灰度值采用 Image J 软件分析。

2.6 CCK-8 检测细胞增殖率^[4]

细胞按每孔 2×10^4 接种到 96 孔板中, 每孔加

100 μL 含 10% CCK-8 完全培养液孵育 2 h, 450 nm 处测吸光度。

2.7 Transwell 检测细胞侵袭能力^[8]

将基质胶稀释到 $1\text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度, 取 60 μL 均匀铺于 Transwell 上室表面, 随后在恒温培养箱中静置 30 min。于上室将细胞以每孔 1×10^4 个的密度铺板, 下室灌注 DMEM 培养基 (10% 胎牛血清)。培养结束后, 清除上室的未迁移细胞, 经固定 (30 min) 及结晶紫染色 (15 min) 后显微镜下计数并分析。

3 统计学处理

本研究用 SPSS 21.0、Image J 等进行数据统计分析与图像绘制, 符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较用独立样本 t 检验。

结 果

1 TGF- β 1 体外激活 JS-1 细胞

对照组和模型组的 α -SMA 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.15 和 5.31 ± 1.02 , Vimentin 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.18 和 4.78 ± 0.91 , Collagen I 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.16 和 6.25 ± 1.17 , 模型组的 α -SMA、Vimentin、Collagen I 相对荧光强度与对照组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$)。

2 SESN2 影响 JS-1 细胞活化

qRT-PCR 结果显示, si-NC 组和 si-SESN2 组的 SESN2 mRNA 表达水平分别为 1.00 ± 0.16 和 0.54 ± 0.11 , si-SESN2 组的 SESN2 mRNA 表达水平与 si-NC 组比较, 在统计学上差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。蛋白免疫印迹结果显示, 对照组、模型组、模型 + oe-SESN2 组和模型 + si-SESN2 组 SESN2 的表达水平分别为 1.00 ± 0.19 、 2.57 ± 0.49 、 3.61 ± 0.68 和 1.66 ± 0.31 , 见图 1。免疫荧光结果显示, F-actin 的荧光强度分别为 1.00 ± 0.18 、 4.57 ± 0.92 、 6.33 ± 1.19 和 2.81 ± 0.57 ; 模型组的 SESN2 的表达水平、F-actin 的荧光强度与对照组比较, 在统计学上差异有统计学意义 (均 $P < 0.001$); 模型 + oe-SESN2 组和模型 + si-SESN2 组 SESN2 的表达水平、F-actin 的荧光强度与模型组的比较, 在统计学上差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

3 SESN2 激活 ULK1 调节 JS-1 细胞自噬

对照组、模型组、模型 + oe-SESN2 组和模型 + si-SESN2 组 ULK1 mRNA 水平分别为 1.00 ± 0.15 、 2.67 ± 0.48 、 3.52 ± 0.66 和 1.95 ± 0.37 , 模型组的 ULK1 mRNA 水平与对照组比较, 在统计学上差异有

统计学意义 ($P < 0.001$); 模型 + oe-SESN2 组和模型 + si-SESN2 组 ULK1 mRNA 水平与模型组比较, 在统计学上差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。模型组与对照组比较, P62 蛋白相对表达水平显著下降, Beclin1 和 LC3 II/I 蛋白相对表达水平均显著升高 ($P < 0.001$); 模型 + oe-SESN2 组与模型组比较, P62 蛋白相对表达水平显著下降, Beclin1 和 LC3 II/I 蛋白相对表达水平均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 模型 + si-SESN2 组与模型组比较, P62 蛋白相对表达水平显著升高, Beclin1 和 LC3 II/I 蛋白相对表达水平均显著下降 ($P < 0.01$, $P < 0.001$); 模型 + si-SESN2 + oe-ULK1 组与模型 + si-SESN2 组比较, P62 蛋白相对表达水平显著下降, Beclin1 和 LC3 II/I 蛋白相对表达水平均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 2 和表 1。

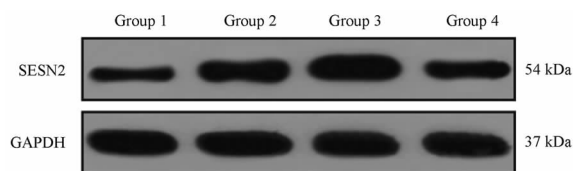


图 1 各组细胞中应激诱导蛋白 2 (SESN2) 表达水平比较

Figure 1 Comparison of sestrin 2 (SESN2) expression level in cells of each group

Group 1: Control group; Group 2: Model group; Group 3: Model + oe-SESN2 group; Group 4: Model + si-SESN2 group. Control group: Cultured under normal conditions; Model group: Cultured in medium containing $5\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β 1 for 24 h; Model + oe-SESN2 group: Transfected with oe-SESN2 on the basis of the model group; Model + si-SESN2 group: Transfected with si-SESN2 on the basis of the model group.

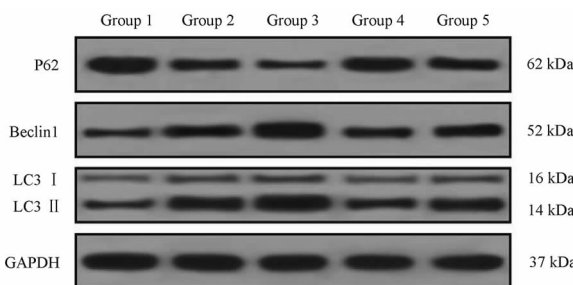


图 2 死骨片 1 (P62)、苜蓿素 1 (Beclin1) 和微管相关蛋白轻链 3 II/I (LC3 II/I) 蛋白表达水平的比较

Figure 2 Comparison of sequestosome 1 (P62), Beclin1 and light chain 3 II/I (LC3 II/I) protein expression levels

P62; Sequestosome 1; LC3 II/I; Light chain 3 II/I; Group 1: Control group; Group 2: Model group; Group 3: Model + oe-SESN2 group; Group 4: Model + si-SESN2 group; Group 5: Model + si-SESN2 + oe-ULK1 group; Model + si-SESN2 + oe-ULK1 group: Co-transfected with si-SESN2 and oe-ULK1 on the basis of the model group.

表1 各组细胞中自噬相关蛋白的相对表达水平($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 The relative expression levels of autophagy-related proteins in each group of cells ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Group	P62	Beclin1	LC3 II/I
Control	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.20
Model	0.57 ± 0.12***	2.44 ± 0.46***	2.79 ± 0.53***
Model + oe - SESN2	0.41 ± 0.09##	3.25 ± 0.61##	3.57 ± 0.68#
Model + si - SESN2	0.80 ± 0.15##	1.56 ± 0.29###	1.88 ± 0.35##
Model + si - SESN2 + oe - ULK1	0.63 ± 0.13 ^Δ	2.27 ± 0.41 ^{ΔΔ}	2.51 ± 0.48 ^{ΔΔ}

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with model + si - SESN2 group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$.

4 SESN2 激活 ULK1 调节 JS-1 细胞增殖与侵袭

CCK-8 结果显示,模型组与对照组相比,细胞增殖率和侵袭个数显著升高($P < 0.001$);模型 + oe - SESN2 组与模型组相比,细胞增殖率和侵袭个数显著升高($P < 0.001$),模型 + si - SESN2 组与模型组相比,细胞增殖率和侵袭个数显著降低($P < 0.001$);模型 + si - SESN2 + oe - ULK1 组与模型 + si - SESN2 组相比,细胞增殖率和侵袭个数显著升高($P < 0.001$),见表 2 和图 3。免疫荧光结果显示,模型组与对照组相比,PCNA 和 N-cadherin 蛋白表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$);与模型组相比,模型 + oe - SESN2 组中 PCNA 和 N-cadherin 蛋白表达水平均显著升

高(均 $P < 0.05$),模型 + si - SESN2 组中 PCNA 和 N-cadherin 表达水平均显著降低(均 $P < 0.001$);与模型 + si - SESN2 组相比,模型 + si - SESN2 + oe - ULK1 组中 PCNA 和 N-cadherin 表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$),见表 2。

5 SESN2 激活 ULK1 调节 JS-1 细胞稳态

蛋白免疫印迹结果显示,模型组与对照组相比,CTGF、Itgα5、Menin 及 Colla1 蛋白相对表达水平均显著升高($P < 0.001$);模型 + oe - SESN2 组与模型组相比,CTGF、Itgα5、Menin 及 Colla1 蛋白相对表达水平均显著升高($P < 0.05, P < 0.01$);模型 + si - SESN2 组与模型组相比,CTGF、Itgα5、Menin 及 Colla1 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.001$);与模型 + si - SESN2 组相比,模型 + si - SESN2 + oe - ULK1 组中 CTGF、Itgα5、Menin 及 Colla1 蛋白相对表达水平均显著上升($P < 0.01, P < 0.001$),见图 4 和表 3。

6 SESN2 激活 ULK1 调节 JNK 信号通路相关蛋白的表达

蛋白免疫印迹结果显示,模型组与对照组相比,JNK 磷酸化水平及 c-Jun 和 ATF2 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$);模型 + oe - SESN2 组与模型组相比,JNK 磷酸化水平及 c-Jun 和 ATF2 蛋白相对表达水平均显著升高($P < 0.05, P < 0.01$);模型 + si - SESN2 组与模型组相比,JNK 磷酸化水平及

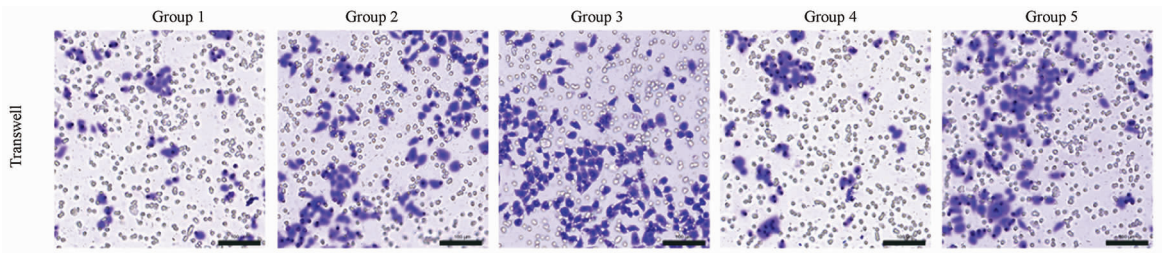


图3 各组细胞侵袭能力比较

Figure 3 Comparison of cell invasion ability in each group

Group 1: Control group; Group 2: Model group; Group 3: Model + oe - SESN2 group; Group 4: Model + si - SESN2 group; Group 5: Model + si - SESN2 + oe - ULK1 group.

表2 各组细胞增殖和侵袭及相关蛋白的水平($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 The levels of cell proliferation, invasion and related proteins in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Group	Proliferation rate(%)	Number of invasive cells(count)	PCNA	N-cadherin
Control	100.00 ± 2.23	66.04 ± 11.45	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.15
Model	141.31 ± 4.17***	137.84 ± 21.73***	5.52 ± 1.07***	4.91 ± 0.95***
Model + oe - SESN2	156.52 ± 8.84###	215.19 ± 35.28###	7.13 ± 1.38#	6.22 ± 1.23#
Model + si - SESN2	109.49 ± 7.35###	75.46 ± 13.51###	2.61 ± 0.51###	3.04 ± 0.58###
Model + si - SESN2 + oe - ULK1	127.08 ± 8.16 ^{ΔΔΔ}	124.27 ± 19.50 ^{ΔΔΔ}	4.85 ± 0.93 ^{ΔΔΔ}	4.76 ± 0.92 ^{ΔΔΔ}

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen; N-cadherin: Neural-cadherin; Compared with the control group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$. Compared with model + si - SESN2 group, ^{ΔΔΔ} $P < 0.001$.

c - Jun 和 ATF2 蛋白表达水平均显著降低(均 $P < 0.01$) ; 模型 + si - SESN2 + oe - ULK1 组与模型 + si - SESN2 组相比,JNK 磷酸化水平及 c - Jun 和 ATF2 蛋白表达水平均显著上升($P < 0.05, P < 0.01$),见表 4 和图 5。

表 3 各组细胞中稳态相关蛋白的表达水平($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 The expression levels of homeostasis - related proteins in each group of cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Group	CTGF	Itga5	Menin	Col1a1
Control	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.15
Model	2.65 ± 0.51 ***	3.27 ± 0.58 ***	3.14 ± 0.59 ***	2.93 ± 0.57 ***
Model + oe - SESN2	3.77 ± 0.72 ##	4.61 ± 0.87 ##	4.08 ± 0.78 #	3.88 ± 0.75 #
Model + si - SESN2	1.51 ± 0.29 ###	2.16 ± 0.44 ###	1.83 ± 0.37 ###	1.61 ± 0.31 ###
Model + si - SESN2 + oe - ULK1	2.53 ± 0.51 ΔΔΔ	3.14 ± 0.58 ΔΔ	2.79 ± 0.53 ΔΔΔ	2.72 ± 0.52 ΔΔΔ

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with model + si - SESN2 group, ΔΔ $P < 0.01$, ΔΔΔ $P < 0.001$.

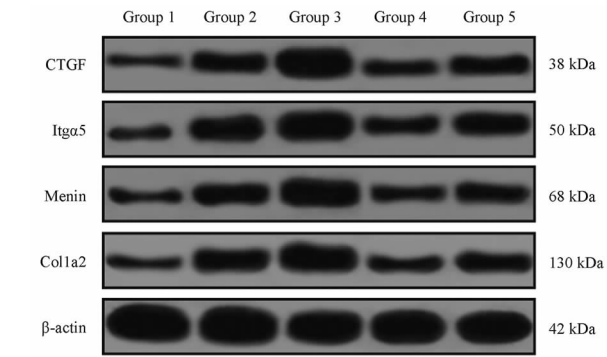


图 4 各组细胞中结缔组织生长因子(CTGF)、整合素 α5 (Itga5)、多发性内分泌肿瘤 1 型(Menin)及 Col1a1 蛋白表达水平比较

Figure 4 Comparison of expression levels of connective tissue growth factor (CTGF), integrin α5 (Itga5), multiple endocrine neoplasia - 1 (Menin) and Col1a1 in cells of each group

CTGF: Connective tissue growth factor; Itga5: Integrin α5; Menin: Multiple endocrine neoplasia - 1; Col1a1: Collagen type I α1; Group 1: Control group; Group 2: Model group; Group 3: Model + oe - SESN2 group; Group 4: Model + si - SESN2 group; Group 5: Model + si - SESN2 + oe - ULK1 group.

表 4 各组细胞中 JNK 信号通路相关蛋白的表达水平($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 The expression levels of JNK signaling pathway - related proteins in each group of cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Group	p - JNK/JNK	c - Jun	ATF2
Control	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.16
Model	2.21 ± 0.42 ***	1.97 ± 0.37 ***	2.06 ± 0.39 ***
Model + oe - SESN2	3.08 ± 0.59 ##	2.51 ± 0.47 #	2.66 ± 0.51 #
Model + si - SESN2	1.46 ± 0.29 ##	1.43 ± 0.27 ##	1.50 ± 0.29 ##
Model + si - SESN2 + oe - ULK1	2.04 ± 0.37 ΔΔ	1.82 ± 0.35 Δ	1.88 ± 0.35 Δ

Compared with the control group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with the model + si - SESN2 group, Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$.

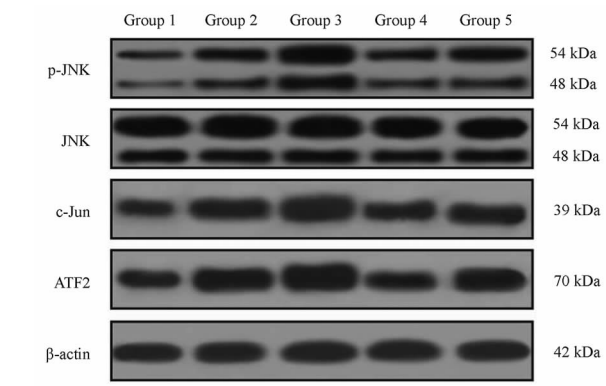


图 5 各组细胞中应激活化蛋白激酶(JNK)磷酸化水平及原癌基因蛋白(c - Jun)和激活转录因子 2(ATF2)蛋白表达水平比较

Figure 5 Comparison of c - Jun N - terminal kinase (JNK) phosphorylation levels and c - Jun proto - oncogene (c - Jun) and activating transcription factor 2 (ATF2) protein expression levels in each group

p - JNK: Phospho - c - Jun N - terminal kinase; JNK: C - Jun N - terminal kinase; c - Jun: C - Jun proto - oncogene; ATF2: Activating transcription factor 2; Group 1: Control group; Group 2: Model group; Group 3: Model + oe - SESN2 group; Group 4: Model + si - SESN2 group; Group 5: Model + si - SESN2 + oe - ULK1 group.

讨 论

肝脏受损时,肝星状细胞会逐渐活化。若未能及时阻止肝纤维化的进程,可能会逐步演变为肝硬化,乃至最终发展为肝癌^[9]。TGF - β1 是肝纤维化进程中驱动肝星状细胞活化的关键上游细胞因子,结合本研究中模型组 SESN2 表达上调的结果,推测 TGF - β1 激活的 Smad 蛋白(drosophila mothers against decapentaplegic protein, Smad)通路可能直接调控 SESN2 的转录表达,TGF - β1 可能通过 Smad2/3 的核转位直接结

合 SESN2 启动子,促进其转录^[10]。在肝星状细胞活化过程中,其内部的脂滴会逐渐减少,同时细胞表型转变为肌成纤维细胞样, α -SMA 表达增加,并促使以 Collagen I 为主要成分的细胞外基质大量沉积;而 Vimentin 白在晚期纤维化的肝星状细胞中强烈表达^[11-12]。本研究中,模型组 α -SMA、Collagen I、Vimentin 水平升高,提示 JS-1 细胞活化。SESN2 在肝脏中表达,通过调控代谢稳态来影响肝脏功能,而 F-actin 则是构成肝星状细胞骨架的重要蛋白^[13-14]。本研究中,模型组 JS-1 细胞 SESN2、F-actin 水平升高,而当敲低 SESN2 后,F-actin 水平下降,提示 SESN2 可能参与了 F-actin 的调控过程,进而影响了 JS-1 细胞的活化状态。

ULK1 在促进自噬过程中发挥着关键作用,它有助于形成自噬复合物并激活自噬,同时还能触发自噬级联反应^[15]。研究发现,在肝星状细胞自噬小体形成时,P62 水平升高,Bec1n1 和 LC3 II/I 水平降低^[16]。本研究中,模型组 P62 水平降低,Bec1n1 和 LC3 II/I 水平升高;当过表达 SESN2 后展现出同样趋势;而当敲低 SESN2 则指标趋势变化相反。此外,再次过表达 ULK1 时,则总体自噬水平又升高。在细胞增殖与侵袭实验结果中,JS-1 细胞活化或 SESN2/ULK1 过表达时,JS-1 细胞增殖升高、侵袭能力增强;而敲低 SESN2 则表现出对 JS-1 细胞生长的抑制作用。研究发现,PCNA 可作为肝星状细胞增殖活性的指标,同时 N-cadherin 表达增加表明肝组织上皮间质转化程度加剧^[17-19]。本研究中,JS-1 细胞活化 PCNA 和 N-cadherin 的表达水平上升,SESN2/ULK1 过表达时展现出同样趋势,敲低 SESN2 则二者水平下调。此结果提示,SESN2 通过激活 ULK1,促进 JS-1 细胞活化并抑制细胞自噬。

在多器官纤维化的演进过程中,CTGF 与 Itg α 5 之间存在着相互调节的关系。研究表明,针对肝纤维化和肝损伤发生时,CTGF 与 Itg α 5 的表达水平均有显著提升^[20]。另有报道指出,Coll1a1 可作为肝星状细胞活化标志物,反映纤维化进程^[21]。本研究发现,JS-1 细胞活化时 CTGF、Itg α 5、Menin 及 Coll1a1 表达水平升高,SESN2/ULK1 过表达时展现出同样趋势,敲低 SESN2 则各指标水平下调。结果提示,SESN2 通过激活 ULK1,调控 JS-1 细胞稳态,通过促进活化及纤维化因子表达,促进 JS-1 细胞活化,进而影响纤维化的进展。JNK 信号通路的活化在肝损伤进程中占据核心地位,其通过增强炎症反应、促进肝细胞凋亡及抑制肝脏再生,发挥着至关重要的作用^[22-23]。本研

究中,模型组 JNK 磷酸化水平及 c-Jun 和 ATF2 表达水平升高,SESN2/ULK1 过表达时展现出同样趋势,敲低 SESN2 则各指标水平下调。研究结果提示,SESN2/ULK1 可能是通过激活 JNK 信号通路,共同影响着肝纤维化的进程。TGF- β 1/Smad 通路是肝纤维化的核心通路,而本研究发现 SESN2/ULK1 激活 JNK 信号通路,与 TGF- β 1 信号密切相关,推测该通路可能是 TGF- β 1 的下游分支通路,TGF- β 1 先激活 Smad 通路启动纤维化,同时通过上述机制上调 SESN2,再经 SESN2/ULK1 激活 JNK 信号通路放大纤维化信号,提示 SESN2/ULK1 激活 JNK 信号通路的活化程度可反映肝纤维化的进展阶段。同时,该通路可调控 Coll1a1、N-cadherin、炎症反应(JNK 介导的细胞因子释放)等多个纤维化核心环节,推测其是肝纤维化病理生理网络中的关键调控节点。然而,关于 SESN2/ULK1 如何具体调控 JNK 信号通路以及这种调控在纤维化进程中的详细作用机制,尚需进一步深入研究。本研究主要依据通路上下游基因表达的关联性,缺乏直接的分子相互作用和激酶活性证据,未进行 JNK 通路的功能获得/失活实验,缺少体内动物实验数据。后续我们拟计划使用 SESN2 与 ULK1 抗体进行免疫共沉淀以验证其互作机制;加入 JNK 特异性抑制剂或转染 JNK siRNA 验证 JNK 是否为 SESN2/ULK1 下游关键效应分子的必要条件;计划在小鼠模型中通过腺相关病毒或慢病毒载体过表达 SESN2 的实验方案。

综上所述,SESN2 通过激活 ULK1,促进 JS-1 细胞活化,促进细胞增殖和侵袭,调控细胞稳态,可能是通过激活 JNK 信号通路实现的。

参考文献:

- [1] 徐文施,蒋式骊,张华. 黄芪汤治疗肝硬化及其相关并发症研究进展[J]. 世界中医药,2024,19(13):2018—2022,+2029.
- [2] 封文斌,杨建钦,李丽媚,等. 他达拉非新型片剂通过抑制肝星状细胞活化改善小鼠肝纤维化[J]. 中国药理学通报,2025,41(2):290—297.
- [3] 王联,谢娜,赵珮伶,等. 大麻二酚对转化生长因子 β 1 诱导肝星状细胞活化和肝纤维化的作用[J]. 中国组织工程研究,2025,29(23):4965—4974.
- [4] 肖政华,李婷婷,石以石则,等. 基于 JNK 信号通路探讨扶肝化纤汤对肝星状细胞活化增殖的影响[J]. 中草药,2023,54(16):5283—5288.
- [5] LILI L, JINLIN W, LINA Q, et al. Sestrin 2 attenuates sepsis-associated encephalopathy through the promotion of autophagy in hippocampal neurons [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(12):6634—6643.
- [6] 梁耀丹,井洁,张泰程,等. 白藜芦醇通过巨噬细胞源性外泌体

- 调节肝星状细胞活化对肝纤维化的影响[J]. 广西医科大学学报, 2023, 40(12): 1949—1955.
- [7] 贾琳, 孙峰, 董琪琪, 等. YTHDF1 调控 Fis1 对肝星状细胞活化、增殖及迁移能力的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2025, 60(1): 49—58.
- [8] 蔡浚哲, 刘松柏, 费晓斌, 等. 锚蛋白重复序列 22 (ANKRD22) 对人肝癌细胞的影响及其机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(5): 989—996.
- [9] 宋安宁, 张甜甜, 郑珊珊, 等. 香紫苏醇通过调控 TGF- β /Smad 信号通路抑制肝星状细胞活化及肝纤维化[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2024, 26(12): 3136—3144.
- [10] SONG S, SHI C, BIAN Y, *et al.* Sestrin2 remedies podocyte injury via orchestrating TSP-1/TGF- β 1/Smad3 axis in diabetic kidney disease[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7): 663.
- [11] 韩志强, 安达, 巴图德力根. 木犀草素对 TGF- β 1 诱导 HSC-T6 增殖凋亡及分泌 α -SMA、Collagen I 影响[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(16): 3929—3932.
- [12] 郝玉梅, 谢安, 李鹤, 等. 活化肝星状细胞生物标志物与靶向递送系统研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(7): 517—525.
- [13] 侯洪涛, 裴艳梅, 李苹苹, 等. 姜黄素通过激活 Sesn2/AMPK 信号通路改善高脂喂养大鼠肝脏脂肪代谢[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(16): 3992—3995.
- [14] 郝礼森, 宋小杰, 章广玲, 等. 腺病毒介导的 shRNA 下调 PTEN 表达对活化肝星状细胞骨架蛋白 F-actin 的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(3): 557—561, 566.
- [15] 高合, 许小凡, 段丽芳, 等. 细胞自噬在胰腺炎症及纤维化中的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(10): 2229—2235.
- [16] 王存凯, 王一军, 王丹丹, 等. 奥沙利铂对肝星状细胞活化的影响及机制探讨[J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(6): 1142—1148.
- [17] 杨欢, 李三强, 程维刚, 等. miR-21 对肝星状细胞的增殖和成纤维化的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2022, 31(1): 75—78.
- [18] 戴鸿志, 安祯祥, 黄丹, 等. 黄芩甲苷对肝纤维化模型大鼠的改善作用机制研究[J]. 中国现代应用药理学, 2022, 39(10): 1268—1274.
- [19] 陈文灿, 周倜. N-钙黏蛋白功能研究进展[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2024, 45(6): 866—875.
- [20] 蔡秀华, 董岸莺, 张荣华, 等. 沉默 CTGF 对肝星状细胞凋亡及胞外基质表达的影响[J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(2): 147—154.
- [21] 王磊, 金香淑, 董慧君, 等. 基于 COL1A1 启动子和增强型绿色荧光蛋白基因建立人肝星状细胞活化的细胞模型[J]. 北京大学学报(医学版), 2023, 55(5): 876—885.
- [22] 关海梅, 张衍, 陈玮钰, 等. IRE1 α /TRAF2/JNK 信号通路在急性肝衰竭发展中的作用机制及潜在价值[J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(6): 1281—1288.
- [23] 孙武燕, 张娟, 张炫, 等. 基于 JNK 信号通路和线粒体氧化应激研究儿茶素拮抗对乙酰氨基酚诱导肝损伤的作用机制[J]. 中草药, 2024, 55(8): 2589—2600.

(收稿日期 2025-08-29)

· 科学文摘 ·

一种新型靶向溶酶体的抗癌药物

引自: ZHAO S, *et al.* A small-molecule anti-cancer drug for long-acting lysosomal damage [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2025, 15(11): 5867—5879.

山东第一医科大学牟艳玲团队及河南中医药大学支燕乐、张志强团队合作设计了一种新型靶向溶酶体的药物(long-term lysosome-targeting anticancer drug, LLAD)。该药物含有一个能与 SLC38A9 共价结合的基团和碱性基团,既能延长 SLC38A9 在溶酶体中的抑制作用,又能使溶酶体碱化。用 LLAD 对第 0 代 HeLa 细胞进行短期低剂量处理后,溶酶体迅速碱化,且在第 15 代细胞中仍可检测到 LLAD 的存在。研究表明,LLAD 通过促进溶酶体内容物释放、细胞内 ROS 升高以及 Ca^{2+} 水平升高等诱导 HeLa 细胞凋亡,并在体内表现出比顺铂更好的长期抗癌效果。