

小鼠 STEAP4 对 HepG2 细胞自噬的调控机制

朱琳 陈小冬

华中农业大学动物医学院/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070

摘要 为研究机体内稳态调节机制,经筛选高脂小鼠转录组数据得到特异上调的 *Steap4* 基因,对其进行不同物种间基因多态性比较,并在 HepG2 细胞中异源超表达该基因 24 h 后检测自噬相关基因在转录和翻译水平的变化。结果显示,STEAP4 基因在不同物种间较保守,其基因多态性主要在翻译水平产生变化,小鼠 *Steap4* 基因与人源 STEAP4 基因相似性最高。荧光定量 PCR 的结果表明 mSTEAP4 对 HepG2 自噬关键基因无显著性影响,但 Western blot 结果显示 mSTEAP4 能够下调自噬相关蛋白的表达量,即 mSTEAP4 从蛋白水平抑制 HepG2 细胞自噬水平。STEAP4 在细胞处于内稳态时会抑制自噬,降低细胞中的物质能量代谢,使细胞处于静息状态。

关键词 mSTEAP4; 自噬; 内稳态; 蛋白翻译水平; HepG2 细胞

中图分类号 Q 493.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)04-0085-08

前列腺六次跨膜的上皮抗原 4(six-transmembrane epithelial antigen of prostate 4,STEAP4)属于 STEAP 家族成员,又名 STAMP2、TIARP、TN-FAIP9、SchLAH 等^[1]。STEAP4 属于一种铁铜氧化还原酶,能利用 NADPH 提供的还原力,经由黄素和亚铁红素将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} 、将 Cu^{2+} 还原成 Cu^{+} ^[2]。地球上存在 2 万亿多种的需氧生物,每天都需要摄取一定量的铁离子以维持供能^[3]。STEAP4 作为一个六次跨膜蛋白,已经被证实位于细胞膜、核内体膜、高尔基体膜^[4]和线粒体膜(结肠癌细胞)^[5]上。荷兰科学家利用冷冻电镜技术将人源 STEAP4 蛋白发挥正常生理功能时的三聚体形式解析出来^[3]。研究发现,STEAP4 在细胞中具有调控细胞炎症反应和代谢活动的双重作用^[6],并与肥胖、胰岛素抵抗、炎症和癌症等一系列疾病相关,其表达还受激素(固醇类雄性激素)调节^[7]。STEAP4 对需氧生物机体中的多种代谢都有非常重要的调节作用^[8],尤其是在机体内稳态调节方面作用突出。

自噬是真核细胞生物在进化过程中获得的一种高度保守的保护机制,是细胞响应内外信号的一种自我调节方式,可以清除衰老或者受损细胞器,降解糖原、脂类、蛋白质等生物大分子物质以供细胞循环利用,维持细胞内稳态,以适应不良的环境^[9-10]。自噬根据底物到溶酶体消化方式的不同可以分为 3 类:大自噬(macroautophagy)、小自噬(microautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy,CMA)^[11]。本文中自噬都是代表大自噬。自噬能够降解受损的线粒体,阻止线粒体紊乱引起的胰岛素抵抗和 β 细胞损伤,同时,自噬能够促进葡萄糖的吸收,促进脂肪细胞分化,增加机体脂质储存^[12]。

肝脏是机体最大的代谢器官,对机体糖脂代谢有重要的调控作用^[13]。同时肝脏也参与饮食中脂质的消化吸收^[14],具有解毒功能^[15],代谢机体产生的和饮食摄取的有毒物质^[16]。肝脏对于机体内稳态的维持同样有着重要的作用^[17]。

STEAP4 对于代谢炎症和细胞内稳态的调节有重要的作用,同时自噬对于代谢、营养物质、炎症等细胞代谢平衡的维持有重要作用,两者在对细胞内稳态的调节上具有共性^[4]。因此,本研究探究 STEAP4 是否对肝脏细胞自噬具有调节作用,旨在

收稿日期: 2019-04-03
基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31572382)
朱琳,硕士研究生. 研究方向: 动物脂质代谢. E-mail: L-Zhu@webmail.hzau.edu.cn
通信作者: 陈小冬,博士,副教授. 研究方向: 动物脂质代谢. E-mail: chenxd@mail.hzau.edu.cn

进一步了解 STEAP4 在维持细胞内稳态平衡方面的作用机制,为 STEAP4 成为新的临床疾病治疗靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验细胞:人肝癌细胞系 HepG2;试验菌株:大肠杆菌 DH-5 α ;试验质粒:载体质粒 pcDNA3.1 (+)、pcDNA-*mSteap4*。以上试验材料均为笔者所在实验室保存。

1.2 细胞培养及转染

1)细胞培养。人肝脏细胞系 HepG2 接种于 24 孔板中,每孔加 500 μ L 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养至细胞密度达到 80%时,进行细胞转染,培养时间根据细胞状态不同而定,以细胞密度为准。

2)转染。取 2 个盛有 50 μ L Opti-MEM 培养基的 EP 管,分别加入 1 μ g 质粒和 1 μ L 脂质体,使之混匀,室温静置孵育 5 min 后,将 2 个 EP 管中的液体混合,吹匀后室温静置孵育 20 min。质粒-脂质体

复合物混合好并补加 400 μ L Opti-MEM 培养基后加入 24 孔板中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱培养。转染 6 h 后,更换成细胞生长培养基继续培养 24 h 后收集样品。

1.3 转录水平基因鉴定

将本文“1.2”处理好的样品收集后,用 Trizol 法提取细胞总 RNA,取 0.5 μ L RNA 用 SMA 4000 测定 RNA 浓度。根据 TAKARA M-MuLV 逆转录酶配置说明书配置 30 μ L 反应体系逆转录生成 cDNA;根据测定的 RNA 浓度使得每管中总 RNA 量达 3 000 ng,用 DEPC 水补齐体系至 17 μ L,加入 3 μ L T18 后 72 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,冰浴 5 min。在冰上依次向管中加入 5 μ L 的逆转录酶 buffer、3 μ L 的 dNTPs、0.5 μ L 的 M-MuLV 逆转录酶、0.5 μ L 的 RNase inhibitor。42 $^{\circ}$ C 反应 1 h,90 $^{\circ}$ C 灭活 10 min。选择 *STEAP4* 和自噬相关基因,设计定量引物(表 1)。配置包含 0.5 μ L 的 cDNA 模板、0.5 μ mol/L 的上下游引物、4 μ L 的 ddH₂O 和 5 μ L 的 TaKaRa 定量 PCR Mix 的 10 μ L 反应体系。采用 CFX 96 TM Real-time System(Bio-Rad, USA)进

表 1 相关定量引物

Table 1 The primers for real-time PCR

引物名(人种) Primer name (<i>Homo</i>)	片段大小/bp Size	前引物和后引物序列 (5'-3') Forward andreverse primer(5'-3') sequence	GenBank 序列号 Accession number
ATG5	133	F:GGCTTGAGTGAACCTCTG R:CATTGTAGGCTTGACTTACC	NM_004849
ATG7	240	F:CCAGGAGATTCAACCAGAG R:CGGGAAGGACATTATCAAAC	NM_006395
BCN-1	215	F:TACCGACTTGTCCTTACG R:CTCCACATCCATCCTGTAG	NM_003766
AMPK α 1	171	F:CCGAGAAGCAGAAACACGACG R:CTACCACATCAAGGCTCCGAATC	NM_006251
AMPK α 2	151	F:CAATCGTTTCTGTCGCCACTCTC R:GACGTTAGCATCATAGGAAGGGTCT	NM_006252
AKT	279	F:GTGGAGGACCAGATGATGC R:TGCCCCTGCTATGTGTAAG	NM_001014431
β -ACTIN	153	F:GGCTGTATTCCCCTCCATCG R:CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	NM_007393
STEAP4	153	F:GCAATGCAGTCAACTGGAGAGA R:AAGGAATGATAAGCCCTAACACG	NM_001205315.1

行 real time-PCR 检测,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 3 min 预变性后,按照 95 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 10 s、72 $^{\circ}$ C 10 s 共进行 45 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min。

1.4 翻译水平基因表达变化检测

收集细胞样品后,加入 5 $\times$ loading buffer,沸水浴 20 min。制备 SDS-PAGE 凝胶(浓缩胶 5%,分离胶 12%),根据蛋白表达量确定点样量。浓缩胶

阶段用 80 V 恒压,分离胶阶段用 120 V。电泳后,根据相对分子质量大小切取凝胶条带。根据凝胶条带大小,剪出 2 张滤纸和 1 张 PVDF 膜(需甲醇浸泡 15 s);其次,按滤纸、胶、PVDF 膜、滤纸的顺序放置于转移装置。恒流 200 mA,根据蛋白大小调整转膜时间。转膜后用 5%脱脂奶粉封闭 2 h,用 TBST 清洗 PVDF 膜。一抗孵育 PVDF 膜,4 $^{\circ}$ C,水

平摇床过夜,用 TBST 洗 5 次,每次 6 min。二抗室温孵育 PVDF 膜,水平摇床 2 h。最后,取出 PVDF 膜,用 TBST 洗 5 次,每次 6 min。将 PVDF 膜放于显色液中,避光反应 2 min。最后,将 PVDF 膜放于蛋白显像仪中调整相应参数,显色。

1.5 高脂小鼠饲养及转录组测序

自湖北省武汉市疾病控制中心购买昆明白鼠进行繁殖,从繁殖后代中选取 6 只性别一致且体质量相近的小鼠,随机分成 2 组。对照组小鼠为普通日粮饲养,高脂组小鼠饲喂 D12492 高脂鼠粮(60% 脂肪含量),自由采食,饲养 1 a。饲养期结束后,将对照和处理组小鼠禁食 12 h 后解剖,将新鲜的脂肪组织用液氮速冻后交付百迈克生物科技有限公司进行转录组测序及数据分析。

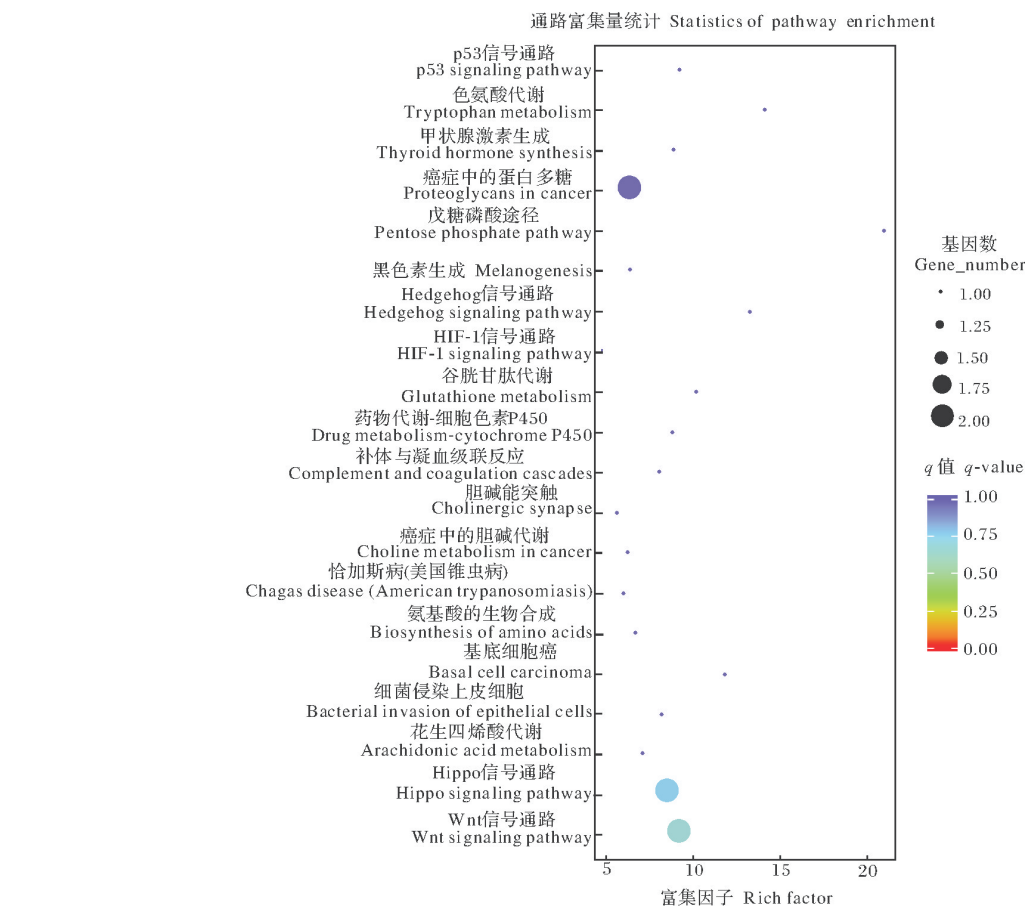
1.6 数据统计与分析

试验重复 3 次,试验数据以“平均值±标准差”表示,采用 MEGA、Origin 软件分析,对照组和处理组之间的差异采用 *t* 检验分析,* 代表 $P<0.05$,** 代表 $P<0.01$,*** 代表 $P<0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 STEAP4 响应高脂饮食引起的机体代谢紊乱

经 D12492 高脂鼠粮喂养昆明白鼠 1 a 后,小鼠质量显著增加并且取样时附睾脂肪差异明显,形态上也有明显的肥胖现象。对其进行转录组测序,测序结果进行通路富集分析,如图 1 所示。长期高脂喂养使得小鼠机体中脂质大量积累,脂质过氧化、线粒体损伤等多种内源性损伤使得机体中代谢发生了



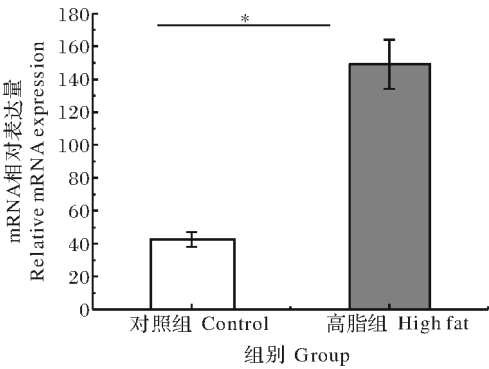
每个圆点表示一个 KEGG 通路,纵坐标表示通路名称,横坐标表示富集因子,富集因子越大,表示差异表达基因在该通路中的富集水平越显著。圆点颜色表示 *q*-value,*q*-value 越小表示差异表达基因在该通路中的富集显著性越可靠,圆点大小表示该通路中富集的基因数,圆点越大,表示基因越多。Each dot represents a KEGG pathway.The longitudinal coordinate shows the name of the pathway,and the horizontal coordinate represents the enrichment factor.The greater enrichment factor indicates the more significant enrichment level of the differential expression genes in that pathway.Dot color indicates the *q*-value.And the smaller *q*-value,the more reliable.The dot size means the number of genes enriched in the pathway.The larger the dot,the more genes.

图 1 差异表达基因 KEGG 通路富集散点图

Fig.1 Plot KEGG enrichment of differentiation expressed genes

复杂的变化,甚至诱导大量癌症相关基因如 Hippo 信号通路和 Wnt 信号通路上基因的表达显著上调,即机体内稳态严重失衡。

高脂饲养 1 a 的小鼠脂肪组织转录组测序结果显示,*Steap4* 基因响应长期高脂喂养诱导的机体紊乱,其表达量在转录水平显著上调(图 2)。STEAP4 在机体中对炎症的代谢都有重要的调节作用,已有文献中对于 STEAP4 的表达量并没有统一的结论,本试验背景下 STEAP4 表达量显著上调。



* 代表 $P<0.05$ 。* $P<0.05$ 。

图 2 小鼠高脂喂养对 *Steap4* 转录水平的影响
Fig.2 The effect of high fat diet on the transcriptional expression of mSTEAP4 *in vivo*

2.2 STEAP4 基因物种间相似性比较

1)不同物种 STEAP4 从中心法则的 3 个层面进行比较。选取人、鼠和几种代表性的家畜(牛、羊、猪)从基因序列(图 3 A)、cDNA 序列(图 3 B)和蛋白质序列(图 3 C)3 个层面进行对比,以邻接法构建系统发育树(MEGA5.05 Neighbor joining bootstrap method 1000)。从图 3 可以看出,在这 3 个层面上 5 个物种的 STEAP4 相似性没有变化,牛羊相似性最近,人和鼠同源性相近。小鼠和人在基因层面上的相似性高于转录水平和蛋白水平的相似性,说明在基因水平上两物种进化上保守性较高,转录和翻译水平的多变性产生了更显著的物种间差异。猪源的 STEAP4 序列相似性介于两支之间。

2)从多种角度对不同种属肝脏 STEAP4 进行比较。如表 2 所示,本研究从 NCBI 数据库获得不同种属间成年个体肝脏 mRNA 相对表达量、STEAP4 基因在染色体上的位置、基因的外显子数和最终表达蛋白的大小等全部数据。人、鼠、羊和猪

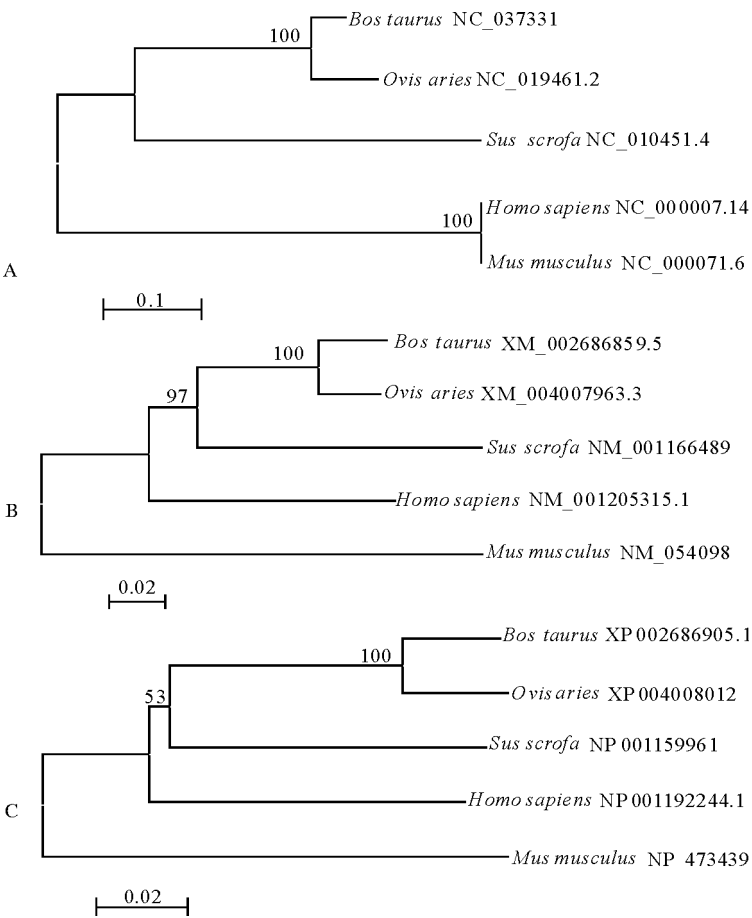
成年个体的肝脏 STEAP4 mRNA 相对表达量都在 10 左右(牛这部分数据尚未载入,小鼠肝脏表达量检测样本量为 1,没有标准差)。有趣的是,在几个物种中 STEAP1、STEAP2 和 STEAP4 至少存在 1 个拷贝在染色体上三者紧邻,但是 STEAP3 单独在另外一条染色体上。人源 STEAP4 在进化上可能出现了特别的变化,其外显子数和 STEAP4 蛋白大小与其他物种有所不同,这也就验证了图 3 中鼠源和人源虽然在基因水平相似性高但是在翻译水平差异性增大。

2.3 小鼠 *Steap4* 基因在 HepG2 细胞中超表达模型建立

试验采用细胞水平异源超表达的方法,在 HepG2 细胞中转染 pcDNA-mSTEAP4 后,检测细胞中 STEAP4 转录水平和翻译水平的表达情况。异源表达 *Steap4* 的 HepG2 细胞组在转录水平相较于对照组有极显著的增加(图 4A);同样,STEAP4 蛋白表达水平也有显著增长(图 4B)。结果表明 mSTEAP4 超表达细胞模型构建成功。

2.4 小鼠 STEAP4 超表达对 HepG2 细胞自噬的影响

经实时定量 PCR 方式检测自噬通路上游相关基因(*AKT*、*Beclin 1*、*AMPK1*、*AMPK2*、*PI3K* 和 *ULK1*) cDNA 表达和自噬下游基因(*ATG7* 和 *ATG5*)的转录水平表达情况,结果如图 5 A 所示, mSTEAP4 对自噬上游相关基因的 cDNA 表达没有显著影响,即 mSTEAP4 不能从促进自噬相关基因转录或抑制其分解 2 个方面对细胞产生影响。从翻译水平检测 mSTEAP4 对细胞自噬相关蛋白表达的调节,结果可以看出(图 5 B),自噬相关蛋白在蛋白水平有较明显的变化。*AMPK* 和 *Beclin1* 在自噬调节通路上促进自噬水平,而超表达 STEAP4 后 *AMPK* 不论是磷酸化水平还是总蛋白水平都表达下调,尤其是磷酸化水平下调非常显著,*Beclin1* 基因在蛋白水平表达量下调的情况也很明显。在超表达 mSTEAP4 的 HepG2 细胞中,*LC3* 作为自噬水平的一个标志性基因,其蛋白表达水平被明显下调(图 5B)。以上结果表明 mSTEAP4 在人源肝脏细胞中能够抑制 HepG2 的自噬水平,并且主要在翻译水平发挥作用。



A:不同物种间的 DNA 序列的比较;B:不同物种间的 cDNA 序列的比较;C:不同物种间的蛋白序列的比较。A:The comparison of STEAP4 DNA sequences in different species;B:The comparison of STEAP4 cDNA sequences in different species;C:The comparison of STEAP4 protein sequences in different species.

图 3 从 DNA、cDNA、蛋白质序列 3 个不同水平对比 STEAP4 基因

Fig.3 The comparison of the STEAP4 genes among different species

表 2 不同种属的 STEAP4 基因信息的比较

Table 2 Comparison of STEAP4 gene information in different species

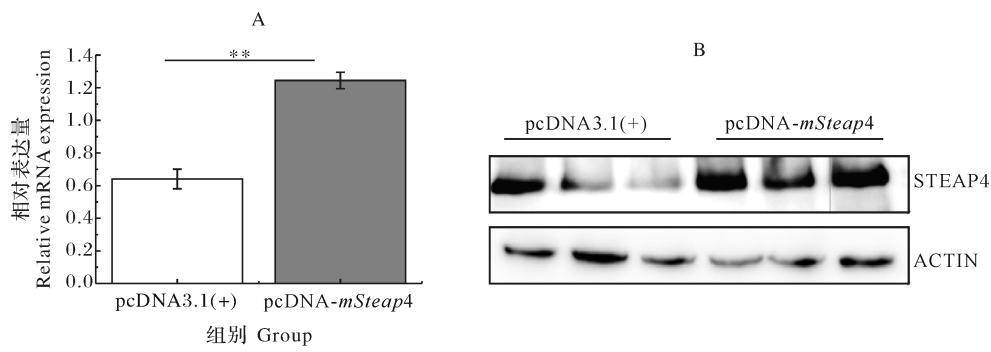
种属 Species	mRNA 表达量(肝脏) mRNA level (liver)	染色体位置 Location	外显子数 Exon count	蛋白大小/aa Protein size
人 <i>Homo sapiens</i>	7.612 ± 2.418	chr7q21.12 (88 273 380~88 309 962)	6	459
小鼠 <i>Mus musculus</i>	15.948	chr5qA1 (7 958 298~7 984 387)	5	470
猪 <i>Sus scrofa</i>	7.938 ± 2.066	chr9(68 547 021~68 572 471)	5	470
牛 <i>Bos taurus</i>	—	chr4(72 372 488~72 410 442)	5	470
羊 <i>Ovis aries</i>	13.258 ± 3.959	chr4(72 358 147~72 383 841)	5	470

3 讨 论

STEAP4 作为炎症和代谢通路十字路口的一个关键调节因子,对于维持细胞内稳态平衡有重要的意义^[4]。在探究 STEAP4 功能的过程中,发现 STEAP4 对于细胞代谢调节的很多方面与自噬对

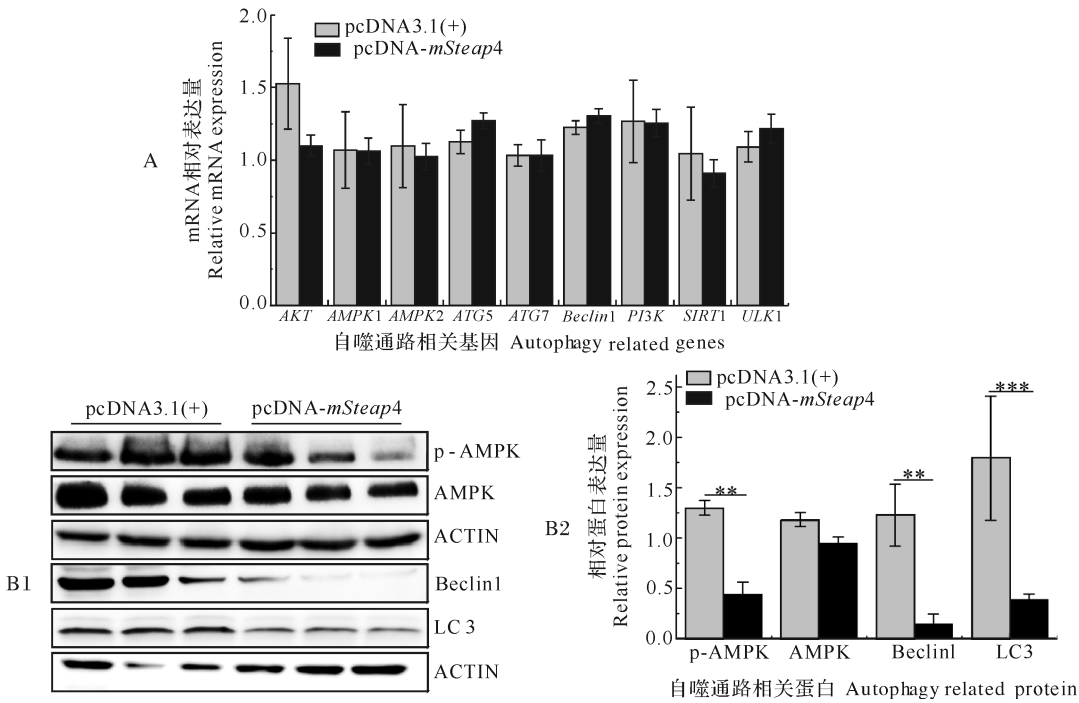
于细胞内稳态的调节^[18]有交叉之处,故本研究进行了 STEAP4 对自噬调节作用的探究。

已有研究报道中 STEAP4 在肥胖病人脂肪组织和 ApoE^{-/-} / LDLR^{-/-} 糖尿病小鼠中表达显著下调,也有报道显示在小鼠皮下和内脏脂肪组织中其表达量上调^[1]。本研究在高脂饲养 1 a 的昆明白



A:细胞转染后 24 h 检测,转录水平 *STEAP4* 表达情况。B:细胞转染后 24 h 翻译水平 *STEAP4* 表达情况。试验重复 3 次, * * 代表 $P<0.01$ 。A:Expression of *STEAP4* was detected at transcribed level 24 h after transfection.B:Expression of *STEAP4* was checked at the level of translation 24 h after transfection.All experiments results were from at least three separate experiments.Data were represented as mean $\pm$ SEM($n=3$). * * $P<0.01$.

图 4 小鼠 *Steap4* 基因在 HepG2 细胞中的超表达
Fig.4 The overexpression of *mSteap4* gene in HepG2 cells



A:HepG2 细胞中超表达 mSTEAP4 24 h 后,检测自噬相关基因转录水平表达情况; B: HepG2 细胞超表达 mSTEAP4 24 h 后,检测自噬相关基因的翻译水平表达变化(B1),及蛋白条带对应灰度量化图(B2)。试验重复 3 次, * * 代表 $P<0.01$, * * * 代表 $P<0.001$ 。A:After overexpression of mSTEAP4 in HepG2 cells for 24 h,the expression of autophagy genes was detected at transcribed level.B:The expression of autophagy-related genes was checked at the level of translation after transfection,and the corresponding gray scale quantization map.All experiments results were from at least three separate experiments.Data were represented as mean $\pm$ SEM ($n=3$). * * $P<0.01$, * * * $P<0.001$.

图 5 mSTEAP4 对 HepG2 细胞自噬相关通路的调节作用

Fig.5 The regulation of mSTEAP4 overexpression on autophagy related pathway in HepG2 cells

鼠脂肪组织转录组测序中发现 *Steap4* 会发生特异性上调。同时转录组测序结果显示,Hippo、Wnt 等多条致癌信号通路被诱导(图 1)。昆明白鼠存活周期大约 2 a,在其生命半期都进行高脂饮食,会使其代谢极度紊乱。过度脂质积累会引起机体线粒体紊乱、内质网应激、脂质过氧化等多方面的损伤^[19-22]。*STEAP4* 响应高脂喂养,表达量会发生显著变化(图 2)。因此,*STEAP4* 可能对机体内内环境稳态

有重要调节作用。

通过从 NCBI 数据库中获取 STEAP4 大量信息进行对比发现,在进化上 STEAP4 基因是相对保守的基因,从亲缘关系上人源的 STEAP4 与鼠源 *Steap4* 更相近(图 3)。这几个物种中 STEAP4 都与 STEAP1 和 STEAP2 的至少 1 个拷贝在同一条染色体上,基因空间定位的结果表明其时空表达可能具有同步性。而该家族中的 STEAP3 在不同染色体上。STEAP3 是机体中调节铁离子代谢的主要氧化还原酶,STEAP2 是线粒体外膜上的氧化还原酶,STEAP1 在进化过程中丢失了氧化还原酶的活性^[23-25]。STEAPs 家族成员在染色体上的定位规律标志着进化过程中,STEAP1、STEAP2 和 STEAP4 的功能与调控机制有别于 STEAP3,这一结论需要进一步验证。本研究所关注的 STEAP4 在进化过程中的定位、结构与功能的变化也需要进一步的研究。

通过序列信息对比还有一点值得探讨之处是,人源的 STEAP4 在基因层面上序列变化相对其他物种的 STEAP4 更复杂。其他 4 个物种外显子数为 5,但是人源外显子数为 6。人源蛋白更加精简,其他 4 个物种的 STEAP4 蛋白都是由 470 aa 组成,人源 STEAP4 蛋白只有 459 aa。人源的 STEAP4 蛋白与炎症^[26]、营养物质代谢^[27]、胰岛素^[28]、癌症^[5]等多方面相关,甚至受到雄性激素调节^[7],可能相对于其他的物种在机体调节中发挥更多功能。

目前已有报道中人源 STEAP4 蛋白的结构用冷冻电镜法解析出来,该蛋白发挥功能时以三聚体的形式存在。鼠源的也是三聚体的形式发挥功能,而兔源 STEAP4 是二聚体的形式起作用^[3]。这一结果从生理功能角度说明鼠源 STEAP4 与人源 STEAP4 的相似性。

本研究通过异源表达的方式在 HepG2 细胞中超表达 *mSteap4* 基因,证实小鼠 *Steap4* 基因能够调节 HepG2 细胞自噬(图 5)。其对自噬的调节主要发生在翻译水平,p-AMPK、Beclin1、LC3 等自噬相关蛋白都受到显著抑制(图 5B),而在转录水平并没有显著性(图 5A)。同时也证实 mSTEAP4 可以通过经典的 AMPK 和 AKT 途径调控 HepG2 肝细胞自噬,但具体的调节机制还需要进一步研究,如从促进蛋白生成角度还是抑制蛋白分解角度深入探究 mSTEAP4 的作用。

总之,本研究证明了 mSTEAP4 在抑制 HepG2

肝细胞自噬,维持细胞内稳态平衡方面具有重要作用。后续工作需要在不同环境中进一步探索 STEAP4 与自噬之间的关系,更好地了解 STEAP4 在细胞中的定位,探究 STEAP4 与自噬体形成的关系,为 STEAP4 作为新的临床治疗靶点和动物饲养中代谢调控靶点提供更多的试验依据。

参 考 文 献

- [1] CHEN X, HUANG Z, ZHOU B, et al. STEAP4 and insulin resistance[J]. *Endocrine*, 2014, 47(2): 372-379.
- [2] 秦大妮, 季晨博, 张春梅, 等. STEAP4 基因蛋白铁氧化还原酶活性分析[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2011, 26(7): 485-486.
- [3] OOSTERHEERT W, VAN BEZOUWEN L S, RODENBURG R N P, et al. Cryo-EM structures of human STEAP4 reveal mechanism of iron(III) reduction[J/OL]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 4337 [2019-04-03]. <http://doi.org/10.1038/s41467-018-06817-7>.
- [4] WELLEN K E, FUCHO R, GREGOR M F, et al. Coordinated regulation of nutrient and inflammatory responses by STAMP2 is essential for metabolic homeostasis[J]. *Cell*, 2007, 129(3): 537-548.
- [5] XUE X, BREDELL B X, ANDERSON E R, et al. Quantitative proteomics identifies STEAP4 as a critical regulator of mitochondrial dysfunction linking inflammation and colon cancer[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2017, 114(45): E9608-E9617.
- [6] GORDON H M, MAJITHIA N, MACDONALD P E, et al. STEAP4 expression in human islets is associated with differences in body mass index, sex, HbA1c, and inflammation[J]. *Endocrine*, 2017, 56(3): 1-10.
- [7] JIN Y, WANG L, QU S, et al. STAMP2 increases oxidative stress and is critical for prostate cancer[J]. *Embo molecular medicine*, 2015, 7(3): 315-331.
- [8] 秦大妮, 季晨博, 朱春, 等. STEAP4 抗体干预对人前体脂肪细胞内活性氧、线粒体膜电位的影响[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2010, 25(19): 1461-1463.
- [9] LEVINE B, KROEMER G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42.
- [10] 邱冬梅, 陈莉. 细胞自噬: 病理学研究的新热点[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(3): 309-313.
- [11] JACOB J A, SALMANI J M M, JIANG Z Y, et al. Autophagy: an overview and its roles in cancer and obesity[J]. *Clinica chimica acta*, 2017, 468: 85-89.
- [12] SARPARANTA J, GARCIA MACIA M, SINGH R. Autophagy and mitochondria in obesity and type 2 diabetes[J/OL]. *Curr diabetes rev*, 2017, 13(4): 352 [2019-04-03]. <https://doi.org/10.2174/1573399812666160217122530>.
- [13] ZWIGHAFT Z, REINKE H, ASHER G. The liver in the eyes of a chronobiologist[J]. *J Biol Rhythms*, 2016, 31(2): 115-124.
- [14] PONZIANI F R, PECERE S, GASBARRINI A, et al. Physiolo-

gy and pathophysiology of liver lipid metabolism[J].Expert review of gastroenterology & hepatology,2015,9(8):1-13.

[15] 朱钦士.我们的机体是如何解毒的[J].生物学通报,2013,48(7):13-19.

[16] REINKE H,ASHER G.Circadian clock control of liver metabolic functions[J].Gastroenterology,2016,150(3):574-580.

[17] KANDILIS A N,PAPADOPOULOU I P,KOSKINAS J,et al. Liver innervation and hepatic function:new insights[J].Journal of surgical research,2015,194(2):511-519.

[18] 张媛媛,李健,孙新宇,等.自噬在糖尿病肾病发病机制中的作用[J].糖尿病新世界,2016,19(16):197-198.

[19] WIRES E S,TRYCHTA K A,BACK S,et al.High fat diet disrupts endoplasmic reticulum calcium homeostasis in the rat liver[J].Journal of hepatology,2017,67(5):1009-1017.

[20] CORDNER Z A,TAMASHIRO K L.Effects of high-fat diet exposure on learning & memory[J].Physiology & behavior,2015,152(Pt B):363-371.

[21] MATHEUS V A,MONTEIRO L,OLIVEIRA R B,et al.Butyrate reduces high-fat diet-induced metabolic alterations,hepatic steatosis and pancreatic beta cell and intestinal barrier dysfunctions in prediabetic mice[J].Experimental biology & medicine,2017,242(12):1214-1226.

[22] ZHANG M J,YANG X J.Effects of a high fat diet on intestinal microbiota and gastrointestinal diseases[J].World journal of gastroenterology,2016,22(40):8905-8909.

[23] GOMES I M,MAIA C J,SANTOS C R.STEAP proteins:from structure to applications in cancer therapy[J].Molecular cancer research,2012,10(5):573-587.

[24] KNUTSON M D.Steap proteins:implications for iron and copper metabolism[J].Nutrition reviews,2010,65(7):335-340.

[25] SIKKELAND J,SHENG X,JIN Y,et al.STAMPing at the crossroads of normal physiology and disease states[J].Molecular & cellular endocrinology,2016,425:26-36.

[26] EBE H,MATSUMOTO I,KAWAGUCHI H,et al.Clinical and functional significance of STEAP4-splice variant in CD14(+) monocytes in patients with rheumatoid arthritis[J].Clinical & experimental immunology,2017,191(3):338-348.

[27] 郭艳英,李南方,王昌敏,等.新疆维吾尔族人 STEAP4 基因遗传变异的分布及其与代谢综合征的关联[J].中华医学遗传学杂志,2011,28(1):78-82.

[28] CHEN X L,HUANG Z Q,ZHOU B,et al.STEAP4 and insulin resistance[J].Endocrine,2014,47(2):372-379.

Impact of mice STEAP4 on autophagy in HepG2 cells

ZHU Lin CHEN Xiaodong

College of Veterinary Medicine/Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics ,
Breeding and Reproduction ,Ministry of Education ,Huazhong Agricultural University ,
Wuhan 430070,China

Abstract In order to study the regulation mechanism of homeostasis *in vivo*, *Steap4* gene, which was upregulated specifically, was obtained by screening the transcriptome data of high-fat-feeding mice. Polymorphism of *STEAP4* among different species was compared, and the changes of autophagy related genes at transcription and translation levels were detected 24 hours after transfection in HepG2 cells. The results showed that *STEAP4* was conservative among different species, their gene polymorphism mainly changed at the protein level, and the similarity of *STEAP4* between mouse and human was the highest. The results of fluorescence quantitative PCR showed that mSTEAP4 had no significant effect on autophagy genes in HepG2 cells, and the results of Western blot showed that mSTEAP4 could reduce the expression of autophagy related proteins, suggesting that mSTEAP4 inhibits the autophagy at the protein level in HepG2 cells. STEAP4 could inhibit autophagy in homeostasis, reduce material and energy metabolism, and keep cells in the resting state.

Keywords mSTEAP4; autophagy; homeostasis; protein translation level; HepG2 cells

(责任编辑:边书京)