



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20180170

数字出版日期: 2019-03-28; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20190328.1522.004.html>

稳定表达 TFEB-GFP 细胞系的构建及 促 TFEB 入核药物筛选

李 薇^{1,2}, 刘振兴¹, 杨 萌¹, 赵 爽¹, 刁爱坡¹

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 内蒙古医科大学基础医学院, 呼和浩特 010110)

摘要: 本研究旨在构建稳定表达 TFEB-GFP 的 HeLa 细胞系, 并利用其筛选促进转录因子 EB (TFEB) 入核药物. 利用分子生物学技术成功构建了重组表达载体 pLVX-AcGFP1-N1-TFEB, 并进行慢病毒包装, 进而感染 HeLa 细胞, 通过嘌呤霉素筛选阳性单克隆细胞株. 采用荧光显微镜技术及免疫印迹技术 (Western blot) 证实稳定表达 TFEB-GFP 细胞株构建成功. 利用该细胞模型筛选得到促 TFEB 入核药物盐酸舍曲林 (Sertraline HCl), 此药物能够促进转录因子 TFEB 靶基因的表达, 并促进细胞自噬. MTT 实验表明 Sertraline HCl 抑制肿瘤细胞活力, 其对肿瘤细胞的杀伤作用可能是通过其激活自噬引起的.

关键词: 转录因子 EB; 核转位; 盐酸舍曲林; 细胞自噬

中图分类号: Q291

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2019)05-0021-08

Construction of Stably Expressed TFEB-GFP Cell Line and Screening of Drugs Promoting TFEB Nuclear Translocation

LI Wei^{1,2}, LIU Zhenxing¹, YANG Meng¹, ZHAO Shuang¹, DIAO Aipo¹

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. College of Basic Medical, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

Abstract: The purpose of this study is to construct a HeLa cell line which can stably express TFEB-GFP and be used to screen drugs so as to promote TFEB nuclear translocation. The recombinant expression vector, pLVX-AcGFP1-N1-TFEB, was successfully constructed using molecular biology techniques. Encapsulated-lentiviruses were prepared and used to infect HeLa cells. Positive monoclonal cell lines expressing TFEB-GFP were generated after puromycin screening and verified with fluorescence microscopy technique and Western blot. Sertraline HCl, a drug promoting TFEB into nuclei, was screened using this cell model. Sertraline HCl increased the expression of the transcription factor TFEB target genes and promoted cell autophagy. MTT assay showed that Sertraline HCl inhibited cancer cell viability, and this inhibiting effect might be caused by its activation of autophagy.

Key words: TFEB; nuclear translocation; Sertraline HCl; autophagy

转录因子 EB (Transcription Factor EB, TFEB) 是第一个鉴定出的 MiTF/TFE 家族的基本螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链 (basic-helix-loop-helix leucine zipper, bHLH-Zip) 类转录因子^[1]. TFEB 的细胞定位和活性调节与其磷酸化修饰状态相关. TFEB 蛋白至少可以在 20 个位点被磷酸化^[2-3], 其中的 Ser142 和 Ser211

这两个丝氨酸残基对其亚细胞的定位具有关键作用^[4-7]. 当这两个丝氨酸残基都被磷酸化时, TFEB 定位在细胞质中且无转录活性. TFEB 的活性严格地受到翻译后修饰、蛋白质间相互作用和空间组织的调控. 在营养丰富的条件下, TFEB 主要以无活性状态存在于细胞质, 但在饥饿或溶酶体功能发生障碍的条

收稿日期: 2018-05-31; 修回日期: 2018-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31471335)

作者简介: 李 薇 (1981—), 女 (蒙古族), 内蒙古自治区人, 博士研究生; 通信作者: 刁爱坡, 教授, diaoaiipo@tust.edu.cn

件下,TFEB 迅速转位至细胞核并激活其靶基因的转录^[4,8]. 研究^[9]表明,很多构成溶酶体的蛋白表达由TFEB 调控. 溶酶体功能正常是维持细胞稳态的必要条件^[10],参与内吞作用、自噬和溶酶体胞吐作用等许多基本的细胞过程^[11]. 表达溶酶体蛋白增强溶酶体活性,如增强细胞自噬功能,可以防止溶酶体相关疾病的发生. TFEB 的失调会导致多种类型的癌症,肿瘤细胞依赖于有效的溶酶体功能,并且在致癌过程期间发生溶酶体组成和数量的多种改变. 肾细胞癌(RCC)是由肾小管上皮产生的异质性肿瘤,其中的易位 RCC(t-RCC)就是由 MiTF/TFE 家族成员 TFE3 和低频率的 TFEB 有关的基因融合引起的^[12-13]. 在人类胰腺癌细胞(PANC1)中发现了 TFEB 的非典型核定位^[14]. 最近在非整倍体细胞的研究中发现,TFEB 激活是对未降解的自噬物的溶酶体积累后的溶酶体应激的细胞应答^[15].

TFEB 在对细胞应激反应中起作用,在细胞适应各种内部压力和环境波动中的作用与其全面调节自噬/溶酶体系统的独特能力密切相关. TFEB 控制参与调节自噬、线粒体功能、代谢、未折叠蛋白反应(UPR)、凋亡和炎症反应关键基因的表达,具有广泛的功能^[16]. 此外,TFEB 的功能可能具有细胞类型的特异性,它的激活对于肝细胞中的脂质分解代谢、巨噬细胞中的免疫应答以及肌肉中有效的线粒体功能发挥重要作用.

但到目前为止,发现的具有诱导 TFEB 发挥功能的化学药物数量较少,而对于可以利用 TFEB 作为靶点的治疗肿瘤疾病和神经退行性疾病等顽疾的药物鲜有报道. 本研究的目的在于构建稳定表达 TFEB-GFP 的人子宫颈癌细胞 HeLa,采用该细胞模型筛选新的促进 TFEB 入核并发挥其转录功能的小分子化合物,并研究其对 TFEB 的诱导作用及对细胞生长的影响. 本研究将为以 TFEB 为靶点调控溶酶体功能的药物发现与应用提供理论和实物基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、细胞及质粒

大肠杆菌 (*E. coli*) STBL3、人胚肾细胞 HEK293T、人子宫颈癌细胞 HeLa、人乳腺癌细胞 MDA-MB231、稳定表达 EGFP-LC3 的 HeLa 细胞,慢病毒表达载体系统包括 pLVX-AcGFP1-N1、pMD2.G 和 psPAX2 质粒均为本实验室保存.

1.1.2 主要试剂

Pfu DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I、DNA marker、蛋白预染 marker、TurboFect™, Thermo 公司;PCR 产物纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量抽提试剂盒,上海生工生物工程有限公司;胎牛血清(FBS),浙江天杭生物科技有限公司;胰酶、DMEM 高糖培养基、嘌呤霉素、DAPI、LC3 抗体,美国 Sigma 公司;Opti-MEM 培养基,美国 Gibco 公司;噻唑蓝(MTT),北京索莱宝生物科技有限公司; β -actin 抗体、TFEB 抗体, Santa 公司;p62 抗体, CST 公司;Cathepsin B 抗体, Abcam 公司;Histone 抗体、GFP 抗体、HRP 标记的鼠二抗、兔二抗,天津三箭生物技术有限公司. 引物合成和基因测序由北京华大基因公司完成.

1.2 方法

1.2.1 pLVX-AcGFP1-N1-TFEB 表达载体的构建

应用 Primer 5.0 软件,根据 NCBI 数据库中的 *TFEB* 基因序列设计引物. 通过比对序列,选择两端加上 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切位点(下划线部分)及保护碱基. 引物序列上游为 5'-CGGAATTCTGATG GCGTCACGCATAGGGTTGC-3', 下游为 5'-CGGG ATCCCGCAGCACATCGCCCTCCTCCATG-3'. 以本实验室保存的 pcDNA3.1⁺-flag-TFEB-HA 重组质粒为模板,PCR 反应体系:上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L、模板 cDNA 1 μ L、10 \times *Pfu* Buffer(with MgSO₄) 10 μ L、dNTP Mix (10 mmol/L) 2 μ L、*Pfu* DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L) 1 μ L、ddH₂O 82 μ L. 反应条件:95 $^{\circ}$ C 2 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 3 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min. 扩增得到 *TFEB* 基因片段. 将纯化后的目的基因片段与 pLVX-AcGFP1-N1 载体采用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切后纯化回收,T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜. 连接产物转化 STBL3 感受态细胞. 随机挑取大肠杆菌转化子,接种到 5 mL 含有 200 μ g/mL 氨苄霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床振荡培养 12~16 h. 提质粒后采用 *Taq* DNA 聚合酶系统进行 PCR 验证. 同时采用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 进行双酶切验证. 分别取 5 μ L PCR 产物和酶切产物进行琼脂糖凝胶(0.8%)电泳检测. 选取经酶切和 PCR 验证都正确的重组质粒进行测序鉴定.

1.2.2 细胞培养

HEK293T、HeLa、MDA-MB231 细胞均用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养,定期换液传代.

1.2.3 慢病毒包装

在60 mm培养皿中接种适量HEK293T细胞,细胞生长24 h融合度达70%~80%时进行转染.用Turbofect™将pLVX-AcGFP1-N1-TFEB重组质粒及pLVX-AcGFP1-N1质粒分别与psPAX2、pMD2.G两个包装质粒按照4:3:1的比例(共加入6 μg)转染HEK293T细胞.转染12 h更换新鲜培养基,再分别于24 h和48 h吸取上清液,将两次收集液合并,分别为实验组病毒收集液及对照组病毒收集液,1 500 r/min离心15 min,小管分装,每管500 μL, -80 °C避光保存.

1.2.4 HeLa细胞最佳嘌呤霉素筛选浓度的确定

在96孔板中接种适量HeLa细胞,常规培养24 h细胞长至70%~80%融合度时,更换含有不同浓度嘌呤霉素的培养基,设置嘌呤霉素终质量浓度为0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 μg/mL,每天镜下观察,并隔天更换含有不同浓度嘌呤霉素的新鲜培养基.3~5 d后,导致细胞全部死亡的嘌呤霉素最低浓度即为最低致死浓度(一般以4 d完全致死为准).

1.2.5 构建稳定表达TFEB-GFP的HeLa细胞系

在35 mm培养皿中接种适量HeLa细胞,常规培养24 h细胞长至70%~80%融合度时,更换含有8 μg/mL聚凝胺(polybrene)的新鲜培养基;再分别加入500 μL实验组病毒收集液和对照组病毒收集液,温和地混匀,37 °C、5% CO₂条件下避光侵染24 h;更换含有最佳嘌呤霉素筛选浓度(终质量浓度1 μg/mL)的新鲜培养基,筛选培养5 d后,计数并重新铺细胞至60 mm培养皿,一般每个培养皿700~800个细胞,一直用含有1 μg/mL嘌呤霉素的培养基进行培养.待单克隆长至肉眼可见时,将单克隆挑起并转移至新的培养皿扩大培养获得稳定细胞系.荧光显微镜下拍照观察,同时收集细胞,蛋白免疫印迹技术检测成功表达TFEB-GFP的细胞系.

1.2.6 免疫印迹实验(Western blot)

收集对数生长期的细胞,加入适量RIPA细胞裂解液(50 mmol/L Tris-Cl(pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA(pH 8.0), 1% TritonX-100, 0.1% SDS)(含蛋白酶抑制剂)在冰上裂解30 min,4 °C离心收集上清液并按比例加入SDS上样缓冲液,经10% SDS-PAGE分离后转至PVDF膜上,用含有5%脱脂奶粉的PBST缓冲液(膜封闭液)室温封闭1 h,于4 °C条件下进行一抗(稀释比例分别为TFEB 1:200、β-actin 1:5 000、Histone 1:1 000、p62 1:1 000、Cathepsin B 1:2 000、LC3 1:5 000、GFP 1:

1 000)孵育过夜,PBST洗膜后再与二抗孵育2 h,PVDF膜在MiniChem™迷你型化学发光成像仪下曝光成像.

1.2.7 药物筛选

待60 mm培养皿中TFEB-GFP稳定细胞系长至所需密度时即可进行96孔板铺板.收集细胞,血球计数板计数,调整细胞悬液的浓度,铺板使待测细胞密度8 000个/孔,常规培养24 h后加入终浓度为5 μmol/L的药物处理,24 h时用荧光显微镜拍照观察.

1.2.8 MTT法检测细胞活力

收集对数期HeLa、MDA-MB231细胞接种于96孔板中,血球计数板计数,调整细胞悬液的浓度,铺板使待测细胞密度5 000个/孔,设复孔3个.常规培养24 h后加入不同浓度的药物处理(1、2.5、5、10、15、20 μmol/L),DMSO为对照组.分别检测24、48、72 h的细胞活力.每孔加入20 μL 5 mg/mL MTT溶液,继续培养4 h后,小心吸去孔内培养基,每孔加入200 μL DMSO溶解沉淀,置水平摇床上振荡10 min,使结晶充分溶解.利用酶标仪检测490 nm波长下各孔的吸光度.

1.3 统计学处理

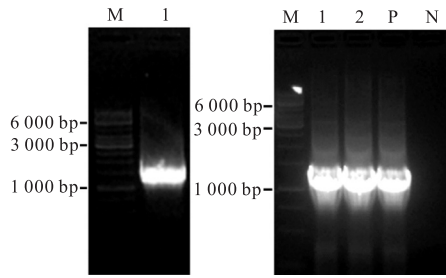
应用SPSS 18.0软件进行统计分析,采用 t 检验进行组间比较,*、**和***分别表示 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 和 $P<0.001$.

2 结果与分析

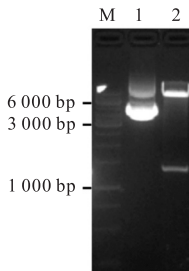
2.1 pLVX-AcGFP1-N1-TFEB表达载体的构建

pLVX-AcGFP1-N1-TFEB表达载体的构建如图1所示.对以pcDNA3.1⁺-flag-TFEB-HA质粒为模板的PCR产物进行0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定,可见大小约为1.5 kbp的特异性PCR扩增条带,与预期一致(图1(a)).将纯化后的目的片段与载体pLVX-AcGFP1-N1进行双酶切纯化后连接,转化*E. coli* STBL3宿主菌,挑取阳性转化子培养,提质粒后进行PCR及双酶切验证,PCR产物和酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳检测.实验结果显示:PCR扩增出目的条带大小与TFEB基因(1.5 kbp)相符(图1(b));双酶切重组质粒2出现的两条带的大小分别与TFEB基因(1.5 kbp)和pLVX-AcGFP1-N1载体(8.8 kbp)大小相符(图1(c)).选取电泳条带位置正确的重组质粒2进行测序,验证载体上插入的TFEB cDNA序列方向、位置及大小均正确,表明pLVX-AcGFP1-N1-

TFEB 重组表达质粒构建成功。



(a) TFEB 基因的 PCR 扩增 (b) PCR 验证



(c) 双酶切验证

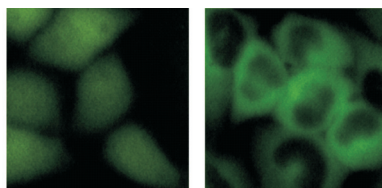
(a) 中 M. DNA marker; 1. PCR 产物. (b) 中 M. DNA marker; 1—2. 重组质粒 PCR 产物; P. 阳性对照; N. 阴性对照. (c) 中 M. DNA marker; 1—2. 重组质粒双酶切产物

图 1 pLVX-AcGFP1-N1-TFEB 表达载体的构建

Fig. 1 Construction of pLVX-AcGFP1-N1-TFEB expression vector

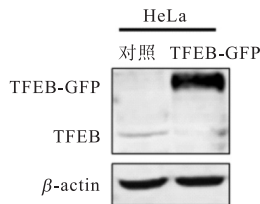
2.2 稳定表达 TFEB-GFP HeLa 细胞系的构建

用嘌呤霉素筛选出稳定表达 TFEB-GFP 的 HeLa 细胞株 (TFEB-GFP). 对照组病毒收集液侵染的 HeLa 细胞作为对照, 通过荧光显微镜拍照观察, 结果如图 2(a) 所示, 稳定表达 TFEB-GFP 的 HeLa 细胞的细胞质中有绿色荧光。



对照 TFEB-GFP

(a) 荧光显微镜技术检测稳定细胞株 TFEB-GFP 的表达



(b) Western blot 检测稳定细胞株 TFEB-GFP 蛋白的表达

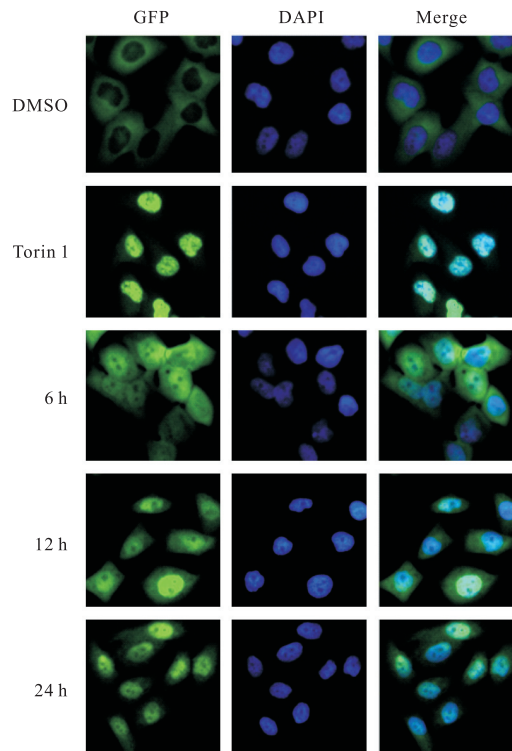
图 2 稳定表达 TFEB-GFP HeLa 细胞系的鉴定

Fig. 2 Identification of the expression of TFEB-GFP in the HeLa stable cell lines

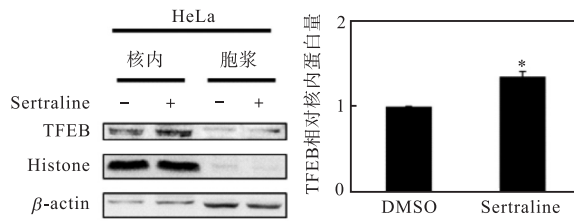
收集细胞制成蛋白样品, 通过 Western blot 证实实验组 TFEB-GFP 蛋白表达明显增高(图 2(b)). 结果表明稳定表达 TFEB-GFP 的 HeLa 细胞系构建成功。

2.3 Sertraline HCl 促进 TFEB 入核

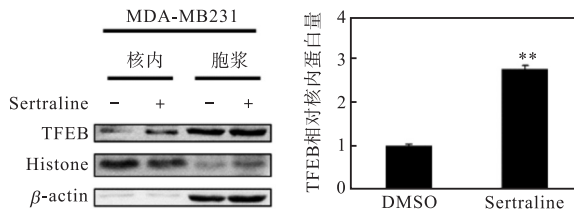
利用稳定表达 TFEB-GFP 的 HeLa 细胞模型, 对来自 Selleck 的小分子化合物库中的药物进行筛选. DMSO 为阴性对照, Torin 1 (终浓度 250 nmol/L) 为阳性对照, 荧光显微镜下拍照观察 TFEB-GFP 的定位, 确定 Sertraline HCl 能够促进 TFEB-GFP 入核, 并且以时间 (6、12、24 h) 依赖性方式诱导 TFEB-GFP 核聚集(图 3(a)). 进一步通过核质分离方法研究 Sertraline HCl 对内源性 TFEB 细胞定位的影响. 6 孔板中接种适宜密度的 HeLa、MDA-MB231 细胞, 24 h 后分别换成加了 Sertraline HCl (终浓度 5 μmol/L) 的培养基处理 24 h, DMSO 为阴性对照, 核质分离以后, 以核内 TFEB 蛋白量比核内参 (Histone) 蛋白量统计 Sertraline HCl 处理后 TFEB 相对核内蛋白量, Western blot 检测结果如图 3(b, c) 所示, Sertraline HCl 处理后, HeLa、MDA-MB231 细胞核中 TFEB 蛋白表达量明显比对照组增多, 差异有统计学意义, 进一步确定 Sertraline HCl 促进 TFEB 入核。



(a) Sertraline HCl 对稳定表达 TFEB-GFP 的 HeLa 细胞中 TFEB-GFP 定位的影响



(b) Sertraline HCl 对 HeLa 细胞中 TFEB 定位的影响



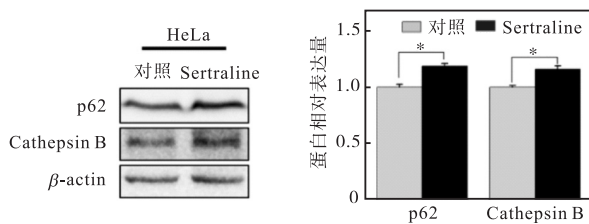
(c) Sertraline HCl 对 MDA-MB231 细胞中 TFEB 定位的影响

图 3 Sertraline HCl 促进 TFEB 入核

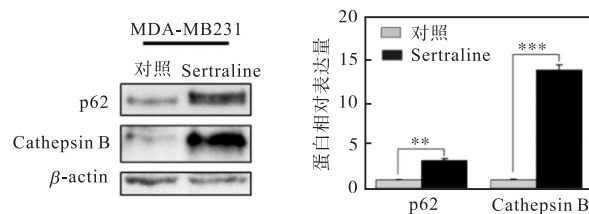
Fig. 3 Sertraline HCl promoting TFEB nuclear translocation

2.4 Sertraline HCl 促进 TFEB 靶基因表达

为了研究 Sertraline HCl 对 HeLa、MDA-MB231 细胞中 TFEB 靶基因表达的影响,以 DMSO 作为对照,用 10 μmol/L Sertraline HCl 处理 HeLa、MDA-MB231 细胞 48 h 后,收集并裂解细胞,蛋白免疫印迹技术检测结果如图 4 所示. Sertraline HCl 处理后,HeLa、MDA-MB231 细胞中 p62、组织蛋白酶 B (Cathepsin B) 表达均比对照组增加,差异有统计学意义. 这表明 Sertraline HCl 促进 TFEB 靶基因 *p62*、*Cathepsin B* 的表达.



(a) HeLa 细胞



(b) MDA-MB231 细胞

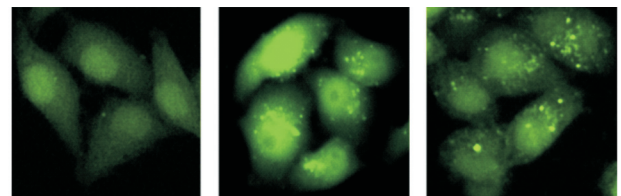
图 4 Sertraline HCl 促进 TFEB 靶基因的表达

Fig. 4 Sertraline HCl promoting the expression of TFEB target genes

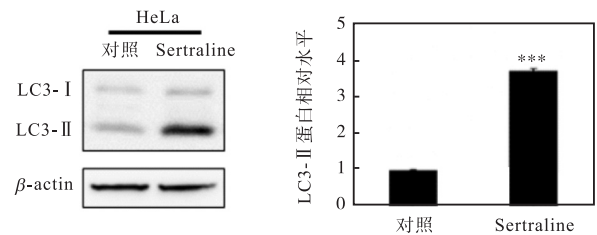
2.5 Sertraline HCl 促进细胞自噬

以上实验结果表明, Sertraline HCl 促进 TFEB 入核并增强 TFEB 的转录活性,而 TFEB 调控很多溶酶体蛋白的表达. 因此,进一步研究 Sertraline HCl 对细胞自噬的作用. LC3 在自噬形成过程中发生聚集的原理为:无自噬时,EGFP-LC3 融合蛋白弥散在胞浆中;自噬形成时,EGFP-LC3 融合蛋白转位至自噬体膜,在荧光显微镜下可以观察到形成多个明亮的 EGFP-LC3 绿色荧光斑点,通过计数评价自噬活性的高低.

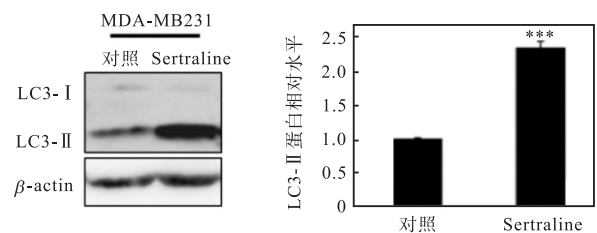
将稳定表达 EGFP-LC3 的 HeLa 细胞培养于 96 孔板中,常规培养 24 h 后加入 Sertraline HCl (终浓度 5 μmol/L),DMSO 为阴性对照,雷帕霉素 (Rapamycin) (终浓度 500 nmol/L) 为阳性对照. 继续培养 6 h,用 4% PFA 室温固定 15 ~ 20 min,弃去 PFA, PBS 洗 3 次,荧光显微镜下拍照观察 EGFP-LC3 点状分布. 图 5(a) 结果显示, Sertraline HCl 处理后,EGFP-LC3 绿色亮点聚集,而且数量比阴性对照增多,说明 Sertraline HCl 能够增加 LC3-II 蛋白的聚集程度,由此表明 Sertraline HCl 促进 HeLa 细胞自噬体的形成.



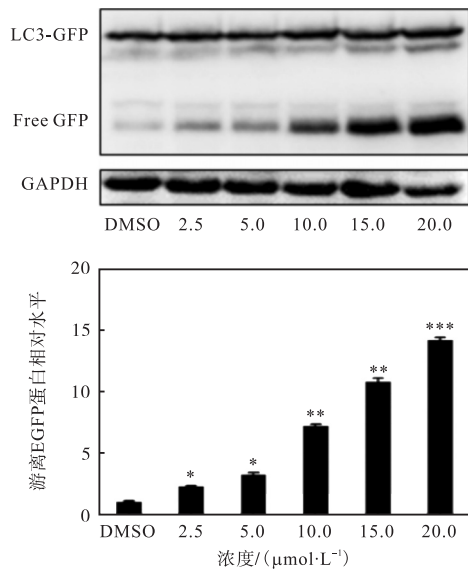
(a) Sertraline HCl 促进 HeLa 细胞自噬体的形成



(b) Sertraline HCl 促进 HeLa 细胞中 LC3-II 蛋白增加



(c) Sertraline HCl 促进 MDA-MB231 细胞中 LC3-II 蛋白增加



(d) Sertraline HCl 促进游离 EGFP 蛋白增加

图 5 Sertraline HCl 促进细胞自噬

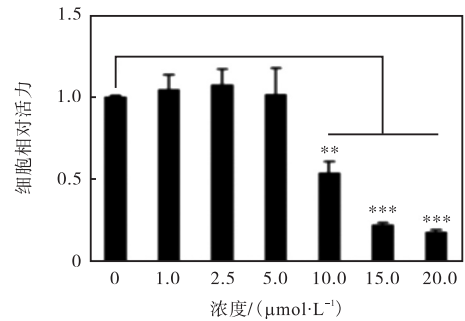
Fig. 5 Sertraline HCl promoting autophagy

在自噬过程中, LC3 在相关蛋白酶的作用下转变为具有活性的 LC3- II 并结合到自噬体膜上, 因此, LC3- II 蛋白水平直接反映自噬体数量. LC3- II 的含量或 LC3- II/LC3- I 或 LC3- II/ β -actin 的比例与自噬体的数量呈正相关, 在某种程度上反映了细胞的自噬活性^[17-18]. 因此, 进一步研究了 Sertraline HCl 对 LC3- II 蛋白表达的影响. 将 HeLa、MDA-MB231 细胞培养于 6 孔板中, 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ Sertraline HCl 常规培养 48 h, DMSO 作为对照, 通过蛋白免疫印迹技术检测自噬标志物 LC3 的表达情况. 结果如图 5(b, c) 所示, Sertraline HCl 处理的 HeLa、MDA-MB231 细胞中 LC3- II 蛋白水平明显高于对照组, 表明 Sertraline HCl 能够上调 HeLa、MDA-MB231 细胞内自噬体数量.

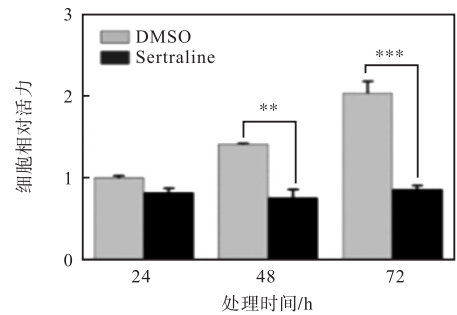
自噬体形成后会运送到溶酶体, 与其融合形成自噬溶酶体, 在自噬发生时, EGFP-LC3 连同自噬体内膜和内容物一起被降解; 但与 LC3 易被降解不同的是, EGFP 在溶酶体中仅表现荧光信号淬灭, 本身并不被降解, 在自噬溶酶体降解后会释放出游离的 EGFP^[19-20]. 因此, 游离 EGFP 也可以作为检测自噬流降解是否发生的依据. 通过蛋白免疫印迹技术检测不同终浓度的 Sertraline HCl 处理稳定表达 EGFP-LC3 的 HeLa 细胞 12 h 后细胞中 EGFP 蛋白的变化, 结果如图 5(d) 所示, 随着药物浓度的增加, 游离 EGFP 蛋白的数量增加, 表明 Sertraline HCl 能够促进自噬流.

2.6 Sertraline HCl 抑制肿瘤细胞生长

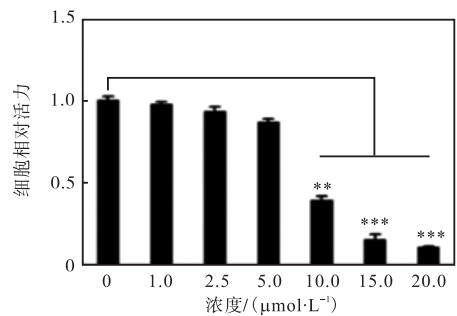
为了研究 Sertraline HCl 是否具有抗肿瘤活性, 通过 MTT 法检测 Sertraline HCl 对肿瘤细胞活力的影响, 结果如图 6 所示.



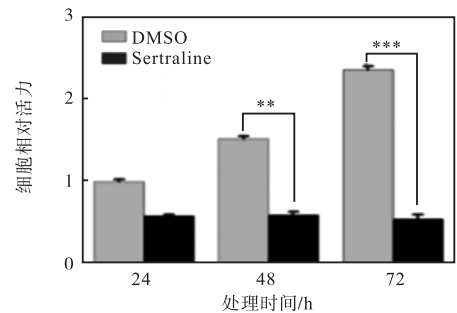
(a) 不同浓度 Sertraline HCl 处理 48 h 后 HeLa 细胞的活力



(b) 10 $\mu\text{mol/L}$ Sertraline HCl 不同处理时间 HeLa 细胞的活力



(c) 不同浓度 Sertraline HCl 处理 48 h 后 MDA-MB231 细胞的活力



(d) 10 $\mu\text{mol/L}$ Sertraline HCl 不同处理时间 MDA-MB231 细胞的活力

图 6 Sertraline HCl 对肿瘤细胞活力的影响

Fig. 6 Effect of Sertraline HCl on cancer cells viability

Sertraline HCl 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 以上浓度时, HeLa、MDA-MB231 细胞的活力均受到抑制, 并呈浓度梯度依赖性; 10 $\mu\text{mol/L}$ Sertraline HCl 处理 HeLa、MDA-MB231 细胞 48 h 时, 细胞活力均出现了明显降低 ($P < 0.01$), 72 h 更明显 ($P < 0.001$), 并呈时间梯度依赖性, 表明 Sertraline HCl 抑制肿瘤细胞的活力。

3 讨 论

TFEB 与人类疾病的发生存在相关性, 它的激活对许多神经系统疾病和溶酶体疾病的治疗有潜在的作用。因此, 以精确的时间和组织特异性方式调节 TFEB 活性的小分子化合物的开发具有很好的前景。这些小分子有潜力用于众多的人类疾病的治疗, 包括肝细胞代谢调节、巨噬细胞炎症反应、肌肉线粒体功能以及神经元细胞清除等方面。

TFEB 参与细胞内清除的多个途径, TFEB 可以作为治疗靶点用于治疗许多与自噬或溶酶体功能障碍有关的疾病和与有毒聚集物累积相关的疾病。研究证明调节 TFEB 的活性具有作为溶酶体疾病治疗策略的潜力, 因为自噬/溶酶体途径的缺陷是这类疾病发病机制的重要原因^[21-23]。

因此, 构建稳定表达 TFEB-GFP 的 HeLa 细胞系用于筛选和研究激活 TFEB 活性小分子化合物具有重要意义。本研究筛选到 Sertraline HCl 具有促进 TFEB 转录活性的作用。Sertraline HCl 是选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂 (SSRIs) 类的抗抑郁药^[24], 主要用于治疗抑郁症、焦虑症、强迫症、恐慌症和创伤后应激障碍, 还可用于早洩^[25-26]、神经源性晕厥^[2]等疾病的治疗。Sertraline HCl 也适合治疗包括患阿尔茨海默氏病 (AD) 在内的老年患者的抑郁症状^[27], 控制 AD 患者出现的其他可能由血清素能系统介导的行为问题, 如焦虑、易怒和攻击性等^[28]。能够改善伴有抑郁症的稳定型慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 患者生活质量的疗效^[29], 在治疗脑卒中后抑郁症^[30]、糖尿病抑郁症^[31]、冠心病介入术后抑郁症^[32]、帕金森病后抑郁症^[33]也显示了良好的临床效果。Sertraline HCl 对脑结构的改善与强迫症患者的症状改善有关, Tang 等^[34]研究了 Sertraline HCl 对强迫症患者脑结构的影响, 结果显示, 用 Sertraline HCl 进行药物治疗 12 周后, 有 11 例强迫症患者的灰质体积显著增加, 小脑活化增加。目前, Sertraline HCl 的抗抑郁疗效明显, 但对肿瘤细胞的作用鲜有报道。

本次实验利用高效且能稳定整合于宿主基因组的慢病毒载体构建了稳定表达 TFEB-GFP 的 HeLa 细胞系, 为研究 TFEB 在 HeLa 细胞中的功能及作用机制奠定了基础, 该细胞系还为针对 TFEB 的靶向性研究提供了一种切实可行的细胞模型; 同时利用该细胞模型筛选出了促 TFEB 入核药物 Sertraline HCl, 该药物能够促进 TFEB 靶基因的表达, 并促进细胞自噬, 具有抗肿瘤活性。自噬在肿瘤细胞中起着抵抗肿瘤组织微环境压力的作用, 从而促进肿瘤细胞的生长。当细胞自噬处于一定的水平内, 主要体现为促进肿瘤细胞存活的作用, 但是也存在过度激活的自噬导致肿瘤细胞死亡的现象, 这也是一个可能的抑瘤机制^[35]。因此, 可以推测 Sertraline HCl 可能通过过度激活细胞自噬引起肿瘤细胞的死亡。

参考文献:

- [1] Steingrímsson E, Copeland N G, Jenkins N A. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network[J]. Annual Review of Genetics, 2004, 38: 365-411.
- [2] Mayya V, Lundgren D H, Hwang S I, et al. Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions[J]. Science Signaling, 2009, 2(84): ra46.
- [3] Olsen J V, Vermeulen M, Santamaria A, et al. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis[J]. Science Signaling, 2010, 3(104): ra3.
- [4] Settembre C, Di Malta C, Polito V A, et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis[J]. Science, 2011, 332(6036): 1429-1433.
- [5] Martina J A, Chen Y, Gucek M, et al. mTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB[J]. Autophagy, 2012, 8(6): 903-914.
- [6] Settembre C, Zoncu R, Medina D L, et al. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB[J]. EMBO Journal, 2012, 31(5): 1095-1108.
- [7] Rocznik-Ferguson A, Petit C S, Froehlich F, et al. The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis[J]. Science Signaling, 2012, 5(228): ra42.
- [8] Sardiello M, Palmieri M, Ronza A D, et al. A gene

- network regulating lysosomal biogenesis and function[J]. *Science*, 2009, 325(5939): 473–477.
- [9] Quidville V, Alsafadi S, Goubar A, et al. Targeting the deregulated spliceosome core machinery in cancer cells triggers mTOR blockade and autophagy[J]. *Cancer Research*, 2013, 73(7): 2247–2258.
- [10] Ballabio A. The awesome lysosome[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2016, 8(2): 73–76.
- [11] Settembre C, Fraldi A, Medina D L, et al. Signals from the lysosome: A control centre for cellular clearance and energy metabolism[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013, 14(5): 283–296.
- [12] 蔡习强. TFEB 介导的自噬在胃癌耐药中的作用及其机制研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2015.
- [13] Argani P, Reuter V E, Zhang L, et al. TFEB-amplified renal cell carcinomas: An aggressive molecular subset demonstrating variable melanocytic marker expression and morphologic heterogeneity[J]. *American Journal of Surgical Pathology*, 2016, 40(11): 1484–1495.
- [14] Seo J W, Choi J, Lee S Y, et al. Autophagy is required for PDAC glutamine metabolism[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37594.
- [15] Santaguida S, Amon A. Aneuploidy triggers a TFEB-mediated lysosomal stress response[J]. *Autophagy*, 2015, 11(12): 2383–2384.
- [16] Martina J A, Diab H I, Brady O A, et al. TFEB and TFE3 are novel components of the integrated stress response [J]. *EMBO Journal*, 2016, 35(5): 479–495.
- [17] Chauhan S, Ahmed Z, Bradfute S B, et al. Pharmaceutical screen identifies novel target processes for activation of autophagy with a broad translational potential[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8620.
- [18] 朱琪, 林芳. 自噬的分子标志物[J]. *药学学报*, 2016, 51(1): 33–38.
- [19] Hosokawa N, Hara Y, Mizushima N. Generation of cell lines with tetracycline-regulated autophagy and a role for autophagy in controlling cell size. (short talk-5) [J]. *Autophagy*, 2006, 2(4): 356.
- [20] Ni H M, Bockus A, Wozniak A L, et al. Dissecting the dynamic turnover of GFP-LC3 in the autolysosome[J]. *Autophagy*, 2011, 7(2): 188–204.
- [21] Damme M, Suntio T, Saftig P, et al. Autophagy in neuronal cells: General principles and physiological and pathological functions[J]. *Acta Neuropathologica*, 2015, 129(3): 337–362.
- [22] Menzies F M, Fleming A, Rubinsztein D C. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2015, 16(6): 345–357.
- [23] 仲昭宇, 田野, 杨力明, 等. TFEB 调控脂质代谢稳定动脉粥样硬化斑块的新机制[J]. *基础医学与临床*, 2016, 36(1): 116–120.
- [24] Bondre N, Pradhan N, Telange V, et al. Synthesis, characterization and identification of sertraline hydrochloride related impurities[J]. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 5(1): 54–57.
- [25] McMahon C G. Treatment of premature ejaculation with sertraline hydrochloride[J]. *International Journal of Impotence Research*, 1998, 10(3): 181–184.
- [26] Arafa M, Shamloul R. Efficacy of sertraline hydrochloride in treatment of premature ejaculation: A placebo-controlled study using a validated questionnaire[J]. *International Journal of Impotence Research*, 2006, 18(6): 534–538.
- [27] Lyketsos C G, Sheppard J M, Steele C D, et al. Randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of sertraline in the treatment of depression complicating Alzheimer's disease: Initial results from the Depression in Alzheimer's disease study[J]. *American Journal of Geriatric psychiatry*, 2000, 157(10): 1686–1689.
- [28] Farran C J, Fogg L G, McCann J J, et al. Assessing family caregiver skill in managing behavioral symptoms of Alzheimer's disease[J]. *Aging & Mental Health*, 2011, 15(4): 510–521.
- [29] He Y, Zheng Y, Xu C, et al. Sertraline hydrochloride treatment for patients with stable chronic obstructive pulmonary disease complicated with depression: A randomized controlled trial[J]. *Clinical Respiratory Journal*, 2016, 10(3): 318–325.
- [30] 李小明, 胡爱虹, 顾群. 帕罗西汀和盐酸舍曲林治疗脑卒中后抑郁的临床疗效及安全性评价[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(10): 815–817.
- [31] 郑景涛, 郑玲蓉, 郑颖. 心理干预、盐酸舍曲林联合治疗糖尿病抑郁症患者对其 HAMD 评分、不良反应的影响[J]. *糖尿病新世界*, 2016, 19(20): 101–102.
- [32] 宋会颖. 盐酸舍曲林治疗冠心病介入术后抑郁症疗效观察[J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2015, 3(14): 84–85.
- [33] 陈丽, 李万奎. 盐酸舍曲林与阿米替林治疗帕金森病

高,中性油脂和金藻昆布多糖含量增加,说明过表达 GK 基因可以增强甘油激酶的活性,导致细胞内 G3P 的积累;G3P 被 G3P 酰基转移酶酰化生成溶血磷脂酸(LPA);再通过 LPA 酰基转移酶将其酰化形成磷脂酸(PA);然后 PA 被 PA 磷酸水解酶去磷酸化,释放甘油二酯;最后甘油二酯被酰化产生甘油三酯(TAGs),从而导致 TAGs 含量增加.因此,三角褐指藻中,甘油激酶基因对脂质代谢起促进作用,可通过调控该基因的表达而调控油脂含量,这为通过基因工程的手段获得产油率高的微藻提供了参考.

参考文献:

- [1] Demirbas A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods[J]. *Progress in Energy Combustion Science*, 2005, 31(5): 466–487.
- [2] Nagle N, Lemke P. Production of methyl ester fuel from microalgae[J]. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 1990, 24(1): 355–361.
- [3] 陈波,黄龙,郭婷,等.三角褐指藻甘油兼养条件下甘油激酶的功能研究[J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2015, 52(1): 144–148.
- [4] Bowler C, Allen A, Badger J, et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes[J]. *Nature*, 2008, 456(7219): 239–244.
- [5] Zwaig N, Kistler W S, Lin E C. Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1970, 102(3): 753–759.
- [6] Hayashi S L, Lin E C. Purification and properties of glycerol kinase from *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1967, 242(5): 1030–1035.
- [7] Lin E C. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1976, 30(1): 535–538.
- [8] Muto M, Tanaka M, Liang Y, et al. Enhancement of glycerol metabolism in the oleaginous marine diatom *Fistulifera solaris* JPCD DA0580 to improve triacylglycerol productivity[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 4.
- [9] Yu K O, Ju J, Ramzi A B, et al. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain for increasing the accumulation of triacylglycerol as a microbial oil feedstock for biodiesel production using glycerol as a substrate[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2013, 110(1): 343–347.
- [10] 樊改丽,赵敖,陈理彬,等.稻瘟病菌中甘油激酶基因在碳源代谢途径中的功能分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(10): 2716–2723.
- [11] 张文源,高保燕,李爱芬,等.不同培养条件对三角褐指藻生长及其生物活性成分积累的影响[J]. *海洋科学*, 2016, 40(5): 57–65.
- [12] Lin H Y, Yen S C, Kuo P C, et al. Alkaline phosphatase promoter as an efficient driving element for exogenic recombinant in the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum*[J]. *Algal Research*, 2017, 23: 59–65.
- [13] Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 1969, 22(2): 158–161.
- [14] Liu Z Y, Wang G C, Zhou B C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(11): 4717–4722.
- [15] Granum E, Myklestad S M. A simple combined method for determination of β -1,3-glucan and cell wall polysaccharides in diatoms[J]. *Hydrobiologia*, 2002, 477(1/2/3): 155–161.
- [16] Osborne D R, Voogt P. Análisis de los nutrientes de los alimentos[J]. *Reproduction Nutrition Developmen*, 1985, 43(5): 136–153.

责任编辑:郎婧

(上接第 28 页)

- 后抑郁症的比较研究[J]. *实用医药杂志*, 2015, 32(12): 1069–1071.
- [34] Tang W, Zhu Q, Gong X, et al. Cortico-striato-thalamo-cortical circuit abnormalities in obsessive-compulsive disorder: A voxel-based morphometric and fMRI study of the whole brain[J]. *Behavioural Brain Research*, 2016, 313: 17–22.
- [35] White E, Dipaola R S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer[J]. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15(17): 5308–5316.

责任编辑:郎婧