

研究论文

热休克蛋白90对人肝癌细胞自噬相关转录因子EB的调控机制

汪梦楠, 刘利霞, 邓耀棠, 陈雪梅*

南方医科大学公共卫生学院职业卫生与职业医学系, 广州 510515

摘要: 本文旨在研究热休克蛋白90 (heat shock protein 90, Hsp90)对肝癌细胞自噬相关转录因子EB (transcription factor EB, TFEB)的调控机制。体外培养人肝癌细胞株HepG2, 分别用Hsp90的N端抑制剂STA9090和C端抑制剂Novobiocin处理, 用Western blot和RT-PCR检测TFEB和自噬相关蛋白的表达情况, 用染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)实验检测Hsp90与TFEB近启动子区的结合情况, 用双荧光素酶报告基因实验检测Hsp90对TFEB启动子活性的影响。结果显示, 低氧诱导HepG2细胞TFEB蛋白和mRNA表达水平上调。在常氧及低氧条件下, 用STA9090和Novobiocin分别处理HepG2细胞后, TFEB和LC3、P62蛋白表达水平均显著下降。转染Hsp90 α 表达质粒可上调野生型和Hsp90 α 敲除的HepG2细胞TFEB蛋白表达水平。Hsp90可结合于TFEB近启动子区, 参与调控其转录过程, 而STA9090和Novobiocin均可抑制Hsp90与TFEB近启动子区的结合能力, 降低TFEB启动子活性。以上结果提示, Hsp90通过与人肝癌细胞TFEB近启动子区的结合促进TFEB转录, 从而上调自噬相关蛋白LC3、P62表达水平。

关键词: 热休克蛋白90; 转录因子EB; 自噬; 原发性肝癌

中图分类号: R735.7

Regulatory mechanism of heat shock protein 90 on autophagy-related transcription factor EB in human hepatocellular carcinoma cells

WANG Meng-Nan, LIU Li-Xia, DENG Yao-Tang, CHEN Xue-Mei*

Department of Occupational Health and Medicine, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: This study was aimed to investigate the regulatory mechanism of heat shock protein 90 (Hsp90) on transcription factor EB (TFEB) during autophagy in liver cancer cells. Human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was treated with Hsp90 N- and C-terminal inhibitors (STA9090 and Novobiocin), respectively. Western blot and RT-PCR were used to detect the expression levels of TFEB and autophagy-related proteins. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay was used to observe the ability of Hsp90 α binding to the TFEB proximal promoter region. The double-luciferase gene reporter experiment was used to determine the activity of TFEB promoter. The results showed that hypoxia induced up-regulation of TFEB protein and mRNA expression levels in the HepG2 cells. The protein expression levels of TFEB, LC3 and P62 were down-regulated significantly by either STA9090 or Novobiocin, under both normoxic and hypoxic conditions. Transfection of Hsp90 α -overexpressing plasmids up-regulated TFEB protein levels in either wild-type or Hsp90 α knockout HepG2 cells. Hsp90 bound to the TFEB proximal promoter region and was involved in regulating TFEB transcriptional process. Whereas both STA9090 and Novobiocin inhibited Hsp90 to bind to the TFEB proximal promoter region, and decreased the activity of TFEB promoter. These results suggest that Hsp90 promotes TFEB transcription in human hepatocellular carcinoma cells by binding to the proximal promoter region, thereby up-regulating the expression levels of autophagy-related proteins.

Key words: heat shock protein 90; transcription factor EB; autophagy; hepatocellular carcinoma

Received 2019-08-25 Accepted 2020-02-13

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81673216).

*Corresponding author. Tel: +86-20-62789125; E-mail: cxmcsz@smu.edu.cn

肝细胞癌简称肝癌，是我国常见的恶性肿瘤。因肝癌细胞具有很强的侵袭与转移能力，多数肝癌患者确诊时已发生转移，严重影响其生存及预后^[1]。因此，亟需进一步阐明肝癌细胞侵袭与转移的机制，为肝癌防治工作提供理论依据。

热休克蛋白 (heat shock protein, Hsp) 家族是一类重要的分子伴侣，真核生物 Hsp 家族中的 Hsp90 是 ATP 依赖蛋白，Hsp90 的表达水平在多种肿瘤中均显著上调^[2]。肿瘤细胞利用 Hsp90 蛋白的分子伴侣功能维持与肿瘤生存、增殖、迁移密切相关的底物蛋白构象稳定，提高肿瘤细胞的生存机会，维持其恶性表型^[3]。Hsp90 α 在应激状态下及在肿瘤细胞中高表达且主要处于活化态，而在正常细胞中则处于静默态^[4, 5]。研究显示，多种 Hsp90 的底物蛋白质是肿瘤发病通路中的原癌基因表达产物或重要的信号转导因子，与肿瘤的发生、发展关系密切^[6]。Hsp90 在维持肝细胞癌稳定和致癌底物蛋白活化状态方面发挥着重要的作用^[7]。众多研究表明，Hsp90 抑制剂有可能成为一类杀伤多种肿瘤细胞的有效药物。特异性的 Hsp90 小分子抑制剂被证实具有抗肿瘤活性，如 STA9090、PF-4470296 和 PF-3823863 等^[8]。

肝脏是机体主要的代谢器官，由于其血流的特殊性，肝脏内氧分压明显低于标准大气压，且呈梯度代谢现象^[9, 10]，同时，肝癌作为实体肿瘤，瘤体内部亦存在低氧应激^[11]。已知低氧应激是细胞自噬诱导因素。自噬是进化过程中高度保守的分解代谢机制^[12]，发生在营养缺乏或者多种氧化应激（如环境毒物、高温、低氧、紫外线、电离辐射等）过程中^[13]。在肿瘤发生、发展过程中，自噬具有双重作用：一方面，自噬促进肿瘤细胞的清除；另一方面，自噬的激活为肿瘤细胞提供营养，同时通过提供代谢中间体维持线粒体代谢，促进细胞存活和肿瘤生长。此外，自噬在肿瘤发展过程中，还可通过改善受损蛋白质和细胞器的降解，减少活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生和基因组不稳定性^[14]。

转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB) 属于亮氨酸拉链类转录因子中的 MiTF/TFE (microphthalmia-transcription factor E) 家族成员，可正向调控溶酶体表达调控网络中的基因，进而调节细胞自噬和溶酶体功能。TFEB 通常定位于细胞质，但在饥饿条件下或溶酶体功能受损时会发生细胞核转位，发挥其调控因子功能，促进其下游自噬相关基因的转录反应^[15–18]。已有文献报道，Hsp90 通过调节信

号蛋白的稳定性和活性在自噬中发挥作用^[17]，但 Hsp90 是否通过调控 TFEB 发挥其对自噬通路的调节作用，值得进一步深入探究。

本研究以人肝细胞癌细胞株 HepG2 为研究对象，通过染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 及双荧光素酶报告基因实验，初步探讨了低氧情况下 Hsp90 对 TFEB 的转录以及自噬相关蛋白表达的作用，以期进一步阐明肝癌细胞侵袭与转移的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

HepG2 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心；DMEM 基础培养基购自 Thermo Scientific Forma 公司；胎牛血清购自 Gibco 公司；0.25% 胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液 /PBS 购自吉泰公司；Lipofectamine 3000 购自 Invitrogen 公司；G418 购自 MDBio 公司；MTT 试剂盒购自碧云天公司；羊抗 TFEB 抗体 (ab2636) 购自英国 Abcam 公司 (用于 ChIP 实验)；小鼠抗 Hsp90 α 抗体购自瑞士 Enzo Life Sciences 公司；兔抗 TFEB 抗体 (4240) 购自美国 Cell Signaling Technology 抗体公司 (用于 Western blot 实验)；兔抗 Hsp90 α 、兔抗 P62、LC3A/B 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 抗体公司；小鼠抗低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α) 抗体 (ab263460) 购自英国 Abcam 公司；抗 Akt 抗体 (60203-2-Ig) 购自 Proteintech 公司；小鼠抗 β -actin 抗体购自广州威佳科技有限公司；抗小鼠、抗兔荧光标记二抗购自美国 Odyssey 有限公司。全蛋白提取试剂盒购自凯基公司；PVDF 膜购自 Millipore 公司；Hsp90 的 N 端抑制剂 STA9090、蛋白酶体抑制剂 MG132 购自 Selleck 公司；Hsp90 的 C 端抑制剂 Novobiocin 购自 MCE 公司；放线菌酮 (cycloheximide, CHX) 购自 Sigma 公司。pGL4.10 (luc2) 和 pGL4.84 (hRluc) 购自 Promega 公司；双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自碧云天公司；限制性内切酶 *Kpn*I、*Hind*III 和 DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司；琼脂糖粉末购自 Biowest 公司；蛋白 A/G 琼脂糖珠购自 Millipore 公司；蛋白酶 K 购自 Merck 公司；Chelex100 购自 Bio-Rad 公司；Premix Taq PCR 反应试剂盒购自 TaKaRa 公司；蛋白酶和磷酸酶抑制剂购自 Merck 公司。

1.2 细胞培养

HepG2 细胞培养采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 基础培养基，在 37 °C、5% CO₂ 条

件下进行培养，待细胞覆盖率达到80%~90%时，用PBS清洗2遍后，加入0.25%胰蛋白酶消化，按1:3~1:5的比例传代。

1.3 MTT法检测细胞活力 取对数生长期的HepG2细胞，以每孔5 000个接种于96孔板，培养24 h。分别加入含有不同浓度STA9090和Novobiocin的培养液，同时每组设3个平行孔，并设不含细胞只加入培养液的空白组，继续培养24 h后，每孔加入10 μ L MTT溶液(5 mg/mL)，继续孵育4 h后终止培养。弃每孔上清，随后往每孔中滴加150 μ L DMSO，96孔板置振荡器上均匀、缓慢振荡10 min，酶标仪测定各孔波长490 nm处的吸光值(A_{490})。细胞存活率 = (实验组 A_{490} - 空白组 A_{490}) / (对照组 A_{490} - 空白组 A_{490})。

1.4 细胞低氧模型构建与分组 取处于对数生长期的HepG2细胞，以 3×10^6 个/皿接种于10 cm培养皿中，24 h细胞贴壁后进行处理。低氧模型构建：细胞置于低氧孵箱(94% N_2 , 5% CO_2)中培养24 h，细胞培养液均须事先于低氧培养箱内平衡30 min，低氧处理时迅速置换培养液。常氧处理的细胞置于常氧孵箱(21% O_2 , 5% CO_2)中培养。进行低氧或常氧孵育时，上述细胞用STA9090或Novobiocin孵育24 h，对照组不加抑制剂处理，仅加入等量DMSO，处理完毕后进行Western blot和RT-PCR检测。

1.5 Western blot检测蛋白水平 使用全蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白，用BCA法在酶标仪上测定蛋白质浓度。取约20 μ g蛋白样品进行SDS-PAGE电泳并转移至PVDF膜，5% BSA溶液室温摇床上封闭1.5 h，依次加入一抗(抗TFEB、LC3A/B、P62、HIF-1 α 抗体均1:1 000稀释，抗Akt抗体、抗 β -actin抗体1:2 000稀释)，4 $^{\circ}C$ 孵育过夜，TBST洗膜3次，每次5 min，荧光二抗用TBST稀释至1:20 000，室温避光孵育2 h，TBST洗膜3次，每次5 min，Odyssey红外荧光扫描系统进行扫膜。扫描后的结果保存到电脑，用Image J软件进行分析，以目标蛋白与内参 β -actin条带的灰度比值作为目标蛋白的相对表达水平。

1.6 RT-PCR检测mRNA水平 使用TRIzol(TaKaRa)提取试剂盒，根据说明书提取细胞的总RNA，取1 μ g总RNA进行逆转录，产物作为后续qPCR实验模板，反应参数为：37 $^{\circ}C$ ，15 min；85 $^{\circ}C$ ，5 s；4 $^{\circ}C$ ，3 min。取适量cDNA模板进行qPCR，反应

条件为：95 $^{\circ}C$ 预变性30 s；95 $^{\circ}C$ 变性5 s，55 $^{\circ}C$ 退火30 s，72 $^{\circ}C$ 延伸30 s，40个循环。TFEB引物：上游：5'-ATGACAGCAAGCTCAGGCTGG-3'，下游：5'-GGAAGTGGACGGGGTATTG-3'，产物长度为220 bp。内参 β -actin引物：上游：5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'，下游：5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'，产物长度为268 bp。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因转录的mRNA水平。

1.7 质粒瞬时转染 敲除Hsp90 α 基因的HepG2细胞(HepG2 KO)^[19]和野生型HepG2细胞(HepG2 WT)接种后，贴壁生长24 h后细胞融合度达到40%左右，用Lipofectamine 3000转染Flag-Hsp90 α 质粒(德国海德堡大学Matthias Mayer教授馈赠)，培养24 h，用Western blot检测TFEB蛋白表达水平。

1.8 ChIP实验 取处于对数生长期的HepG2细胞，以 3×10^6 个/皿接种于10 cm培养皿中，24 h细胞贴壁后，分别加入STA9090和Novobiocin处理，对照组为不加抑制剂处理、仅加入等量DMSO的HepG2细胞。处理24 h后在培养液中加入终浓度为1.42%的甲醛进行交联15 min，加入甘氨酸以终止交联。用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的IP缓冲液收集细胞，冰浴低温超声(250 W，15次，8个循环)剪切染色质DNA，纯化DNA后以琼脂糖凝胶电泳实验检测染色质DNA片段长度，主要分布在200~1 000 bp。取200 μ L纯化的染色质DNA，加入5 μ L抗Hsp90 α 抗体(1:40稀释)，4 $^{\circ}C$ 旋转摇床上孵育4 h。加入蛋白A/G琼脂糖珠和Chelex100分离并纯化与Hsp90结合的染色质DNA。TFEB近启动子区(-179~-57)引物序列为：上游引物：5'-AGGGAAGACAGTGGTAGCG-3'，下游引物：5'-CAGGGATGAAGTCCAAAGG-3'。使用Premix Taq PCR反应试剂盒进行PCR实验。将PCR反应产物在2%琼脂糖凝胶上行凝胶电泳，Bio-Rad凝胶成像仪器成像后，以input DNA作为参考，统计分析各组的灰度值。

1.9 TFEB启动子区荧光素酶报告基因质粒的构建

启动子区荧光素酶报告基因实验以带海肾荧光的pGL4.84(hRluc)质粒作为定量对照。实验所需质粒构建方法如下：选取TFEB转录起始位点(transcription start site, TSS)的-1500~0作为该基因的启动子区，使用KpnI和HindIII限制性内切酶暴露pGL4.10(luc2)质粒上的匹配位点，然后在DNA连接酶作用下把TFEB启动子区不同克隆片段(-1 500~0、

-1 500~-500、-1500~-1 000) 与质粒连接 (图 1A、B)。经纯化及克隆后, 使用 *KpnI* 和 *HindIII* 限制性内切酶把荧光素酶报告基因分成载体片段和克隆片段, 琼脂糖凝胶检测两片段的长度, 验证插入片段的纯度及准确性, 如图 1C 所示, 插入 -1 500~0 克隆片段的质粒酶解后的片段主要分布在 4 000 bp 和 1 500 bp; 插入 -1 500~-500 克隆片段的质粒酶解后的片段主要分布在 4 000 bp 和 1 000 bp; 插入 -1 500~-1000 克隆片段的质粒酶解后的片段主要分布在 4 000 bp 和 500 bp。酶解后片段长度与预期片段长度相符, 表明启动子区荧光素酶报告基因质粒构建成功。

1.10 双荧光素酶报告基因实验 取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 融合度为 80% 左右, 用 0.25% 胰蛋白酶消化 2 min 后, 用含 10% FBS 的培养基终

止消化、离心、去上清。重悬细胞后计数, 以 2×10^3 个 / 孔密度接种于 96 孔板, 每组均设 3 个复孔。对照组细胞转染插入 -1 500~0 克隆片段的萤火虫荧光质粒和海肾荧光质粒, 另取两组细胞转染插入 -1 500~0 克隆片段的萤火虫荧光质粒和海肾荧光质粒, 再分别用 0.1 $\mu\text{mol/L}$ STA9090 和 0.5 mmol/L Novobiocin 处理 24 h, 每组均设 3 个复孔。边缘孔用 PBS 填充以防止边缘效应。细胞处理后弃去培养液, PBS 清洗后, 加入 20 μL 报告基因裂解液室温振荡 20 min 以充分裂解细胞。收集裂解液, 10 000 g 离心 5 min, 取上清液检测萤火虫荧光值和海肾荧光值, 计算萤火虫荧光值 / 海肾荧光值比值, 以反映 *TFEB* 启动子活性。

1.11 统计分析方法 实验数据以 mean \pm SD 表示, 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。满足正

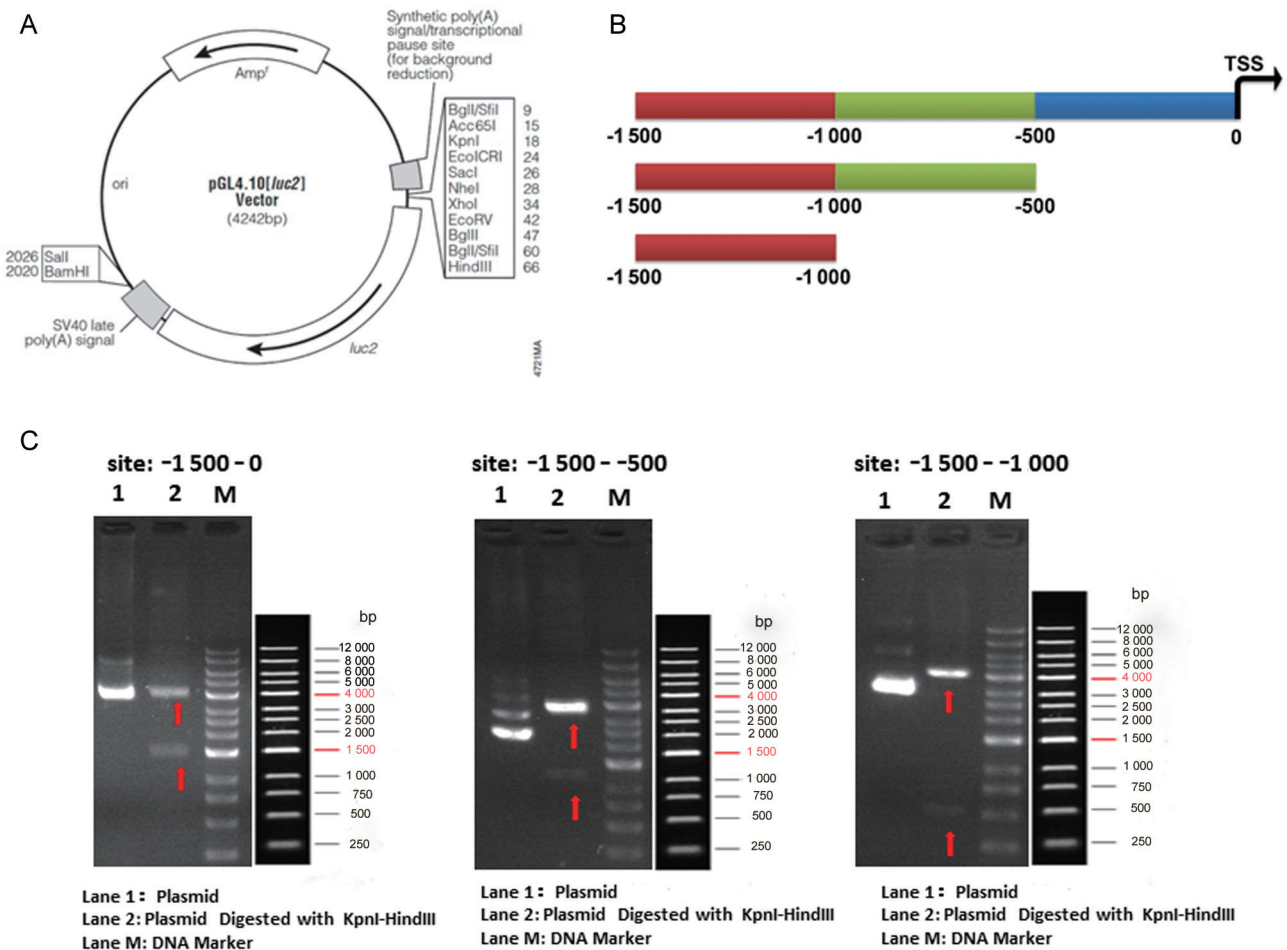


图 1. *TFEB* 启动子区荧光素酶报告基因质粒的构建及鉴定

Fig. 1. Construction and identification of luciferase reporter plasmid with *TFEB* promoter. A: Schematic diagram of pGL4.10[luc2] vector. B: Schematic diagram of three promoter DNA fragments. The numbers represent the length of the fragment from the transcription start site (TSS). C: Identification of luciferase reporter plasmid. The red arrows indicate the size of the fragments after DNA restriction digestion and agarose gel electrophoresis.

态分布且方差齐的两组间比较用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)，组间两两比较采用 Dunnett 法检验。所有统计分析均为双侧检验。 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Hsp90抑制剂对HepG2细胞活力的影响

MTT 法检测结果显示，与对照组相比，STA9090 和 Novobiocin 处理 24 h 的细胞活力显著下降 ($P < 0.05$)，且随着 STA9090 和 Novobiocin 剂量的增加，

细胞活力呈逐渐下降的趋势 (图 2)，二者的 IC_{50} 分别为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 和 0.5mmol/L 。

2.2 低氧模型建立及Hsp90抑制剂效果评价

Western blot 检测结果显示，和对照组相比，低氧处理的 HepG2 细胞中 Hsp90 α 、HIF-1 α 和 Akt (Hsp90 经典底物蛋白) 表达显著上调，而 Hsp90 抑制剂 STA9090、Novobiocin 均能显著抑制 Akt 蛋白和 HIF-1 α 的表达水平上调 ($P < 0.05$)，但对 Hsp90 α 蛋白有进一步上调作用 (图 3)。以上结果提示，已成功建立 HepG2 细胞低氧模型，Hsp90 抑制剂 STA9090

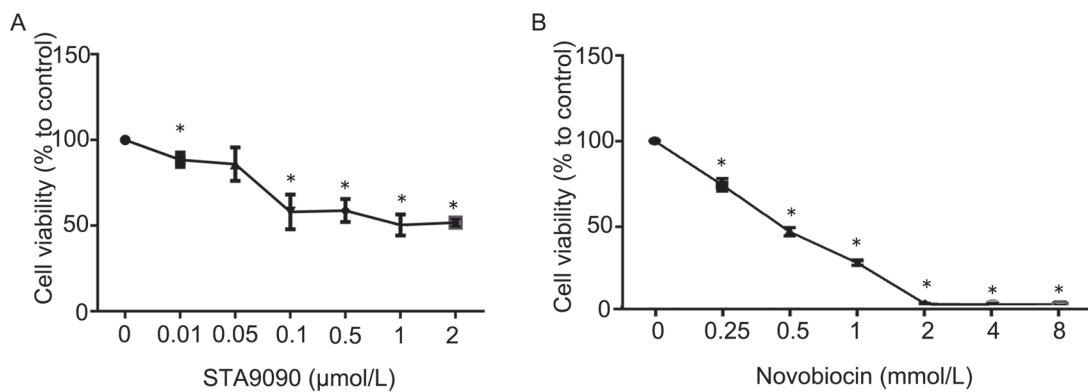


图 2. Hsp90抑制剂对HepG2细胞活力的影响

Fig. 2. The effects of Hsp90 inhibitors on HepG2 cell viability detected by MTT method. A: Effect of STA9090. B: Effect of Novobiocin. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group.

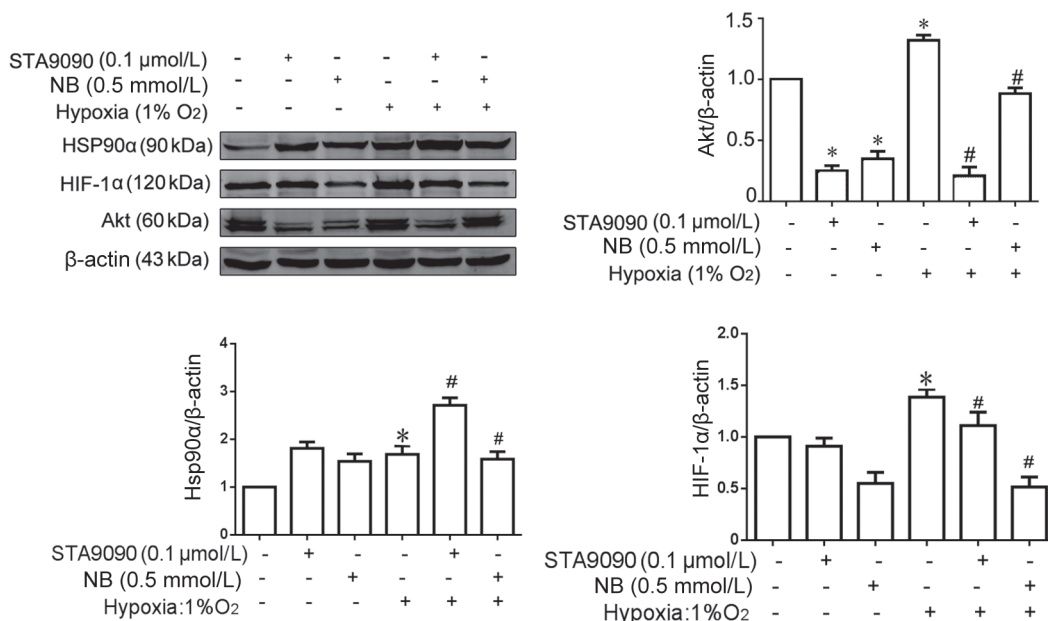


图 3. Hsp90抑制剂对HepG2细胞Hsp90 α 、HIF-1 α 和Akt蛋白表达的作用

Fig. 3. Effect of Hsp90 inhibitors on Hsp90 α , HIF-1 α and Akt protein expression levels detected by Western blot. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group, # $P < 0.05$ vs hypoxia group. NB, Novobiocin.

和 Novobiocin 作用良好。

2.3 低氧促进TFEB及自噬相关调控蛋白LC3、P62表达水平升高, Hsp90抑制剂下调TFEB及自噬相关调控蛋白LC3、P62表达水平

结果显示, 和对照组相比, 低氧组 TFEB 及自噬相关调控蛋白 LC3、P62 蛋白表达水平均显著上调 ($P < 0.05$); 在常氧和低氧下, 和对照组相比, Hsp90 抑制剂 STA9090 和 Novobiocin 均可显著下调 TFEB 及自噬相关调控蛋白 LC3、P62 表达水平 ($P < 0.05$)(图 4)。

2.4 Hsp90抑制剂STA9090下调TFEB蛋白水平

为确证 Hsp90 N 端抑制剂 STA9090 抑制 Hsp90 对 TFEB 蛋白稳定性的影响, 在常氧和低氧条件下, 用不同浓度 STA9090 处理 HepG2 细胞 24 h, Western

blot 结果显示, 无论是在常氧还是低氧条件下, 和对照组相比, STA9090 抑制剂处理的 HepG2 细胞 TFEB 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)(图 5)。

2.5 Hsp90正向调控TFEB转录

为证明 Hsp90 对 TFEB 水平的调控作用, 将 Flag-Hsp90 α 突变质粒瞬时转染入 HepG2 WT 和敲除 Hsp90 α 基因的 HepG2 KO 细胞, 仅转染脂质体的组为 NC 组。Western blot 结果显示, 和 NC 组相比, HepG2 WT 和 HepG2 KO 细胞中转染 Flag-Hsp90 α 质粒后, TFEB 蛋白表达水平均显著上调 ($P < 0.05$)(图 6)。

2.6 Hsp90 抑制剂 STA9090 导致 TFEB 合成减少

为探讨 Hsp90 抑制剂 STA9090 下调 TFEB 蛋白表达是因为 STA9090 抑制 TFEB 的合成途径, 还是促进泛素-蛋白酶体途径降解, 本研究进行了此部

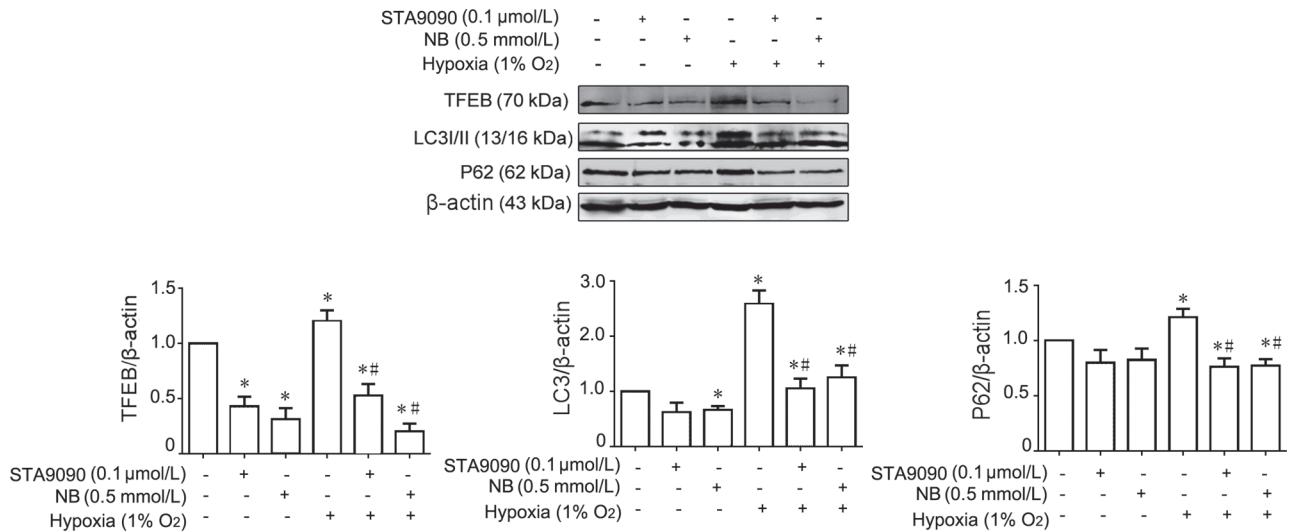


图 4. Hsp90抑制剂在低氧条件下下调转录因子EB (TFEB)及自噬相关调控蛋白LC3、P62水平

Fig. 4. Hsp90 inhibitor decreases the protein expression levels of transcription factor EB (TFEB), LC3 and P62 under hypoxia. The protein expression level was detected by Western blot. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group, # $P < 0.01$ vs hypoxia group. NB: Novobiocin.

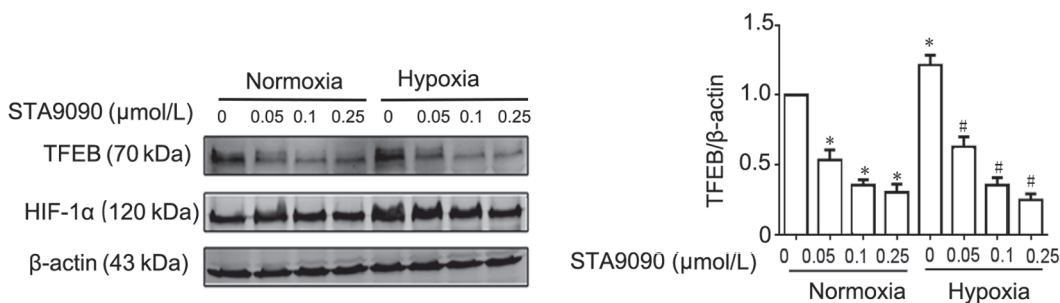


图 5. Hsp90抑制剂STA9090对转录因子EB (TFEB)蛋白水平的影响

Fig. 5. Effect of Hsp90 inhibitor STA9090 on transcription factor EB (TFEB) protein levels detected by Western blot. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs hypoxia group.

分的实验。CHX 是一种蛋白合成抑制剂, HepG2 细胞用 5 $\mu\text{mol/L}$ CHX 预处理 2 h 后, 再给予 0.1 $\mu\text{mol/L}$

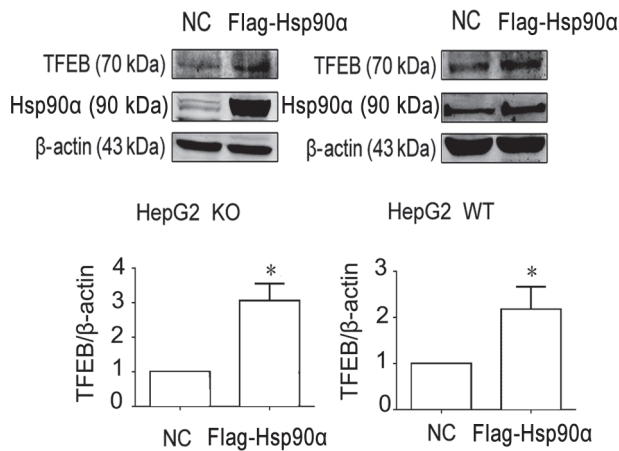


图 6. 转染Flag-Hsp90 α 质粒对转录因子EB (TFEB)蛋白表达水平的作用

Fig. 6. Effects of Flag-Hsp90 α vector transfection on transcription factor EB (TFEB) protein expression level in wild-type (WT) and Hsp90 α knockout (KO) HepG2 cells detected by Western blot. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs normal control (NC) group.

STA9090, 继续处理 24 h, 观察 TFEB 蛋白表达情况; MG132 是蛋白酶体的特异性抑制剂, HepG2 细胞用 0.1 $\mu\text{mol/L}$ STA9090 处理 20 h 后, 再给予 10 $\mu\text{mol/L}$ MG132, 继续处理 4 h, 观察 TFEB 蛋白表达情况。Western blot 结果显示, 和对照组相比, STA9090 下调 HepG2 细胞 TFEB 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), MG132 的加入不能逆转 Hsp90 抑制剂引起的 TFEB 蛋白减少, 而 CHX 的加入使 TFEB 蛋白水平进一步显著下降 ($P < 0.05$) (图 7), 上述结果提示 Hsp90 抑制剂导致的 TFEB 表达下调可能是由于合成过程被抑制, 而非促进 TFEB 蛋白降解过程。

2.7 Hsp90抑制剂STA9090对TFEB转录水平的影响

为确定 Hsp90 抑制剂 STA9090 下调 TFEB 蛋白表达水平是否由于 STA9090 影响 TFEB mRNA 表达水平, 本研究应用 RT-PCR 检测 TFEB mRNA 水平。结果显示, 无论是在常氧还是低氧条件下, 与对照组相比, 给予 0、0.05、0.1 和 0.25 $\mu\text{mol/L}$ STA9090 处理 HepG2 细胞 24 h, 各剂量组 TFEB mRNA 水平均显著下调 (均 $P < 0.05$) (图 8)。

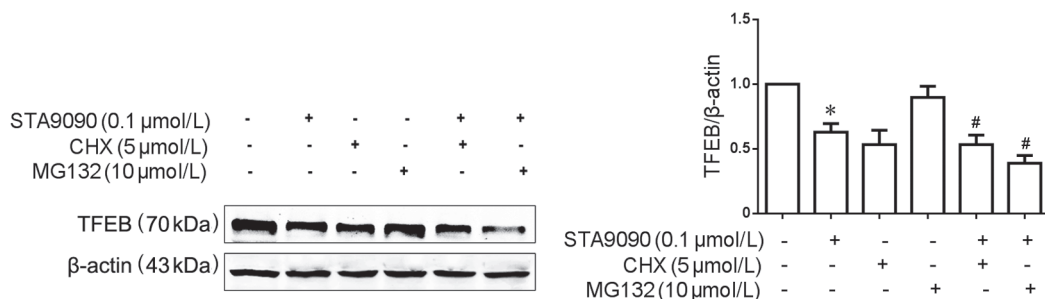


图 7. Hsp90抑制剂STA9090对转录因子EB (TFEB)蛋白合成的影响

Fig. 7. Effects of Hsp90 inhibitor STA9090 on the synthesis of transcription factor EB (TFEB). Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs STA9090 group. CHX: cycloheximide.

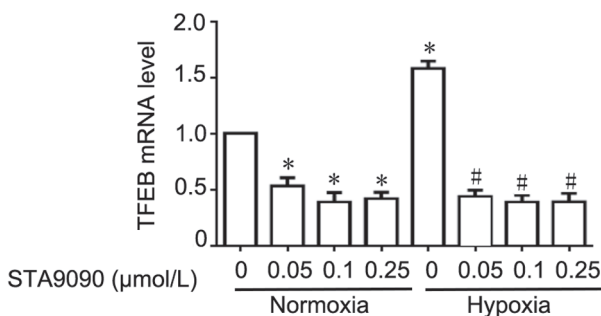


图 8. Hsp90抑制剂STA9090对转录因子EB (TFEB) mRNA水平的影响

Fig. 8. Effects of Hsp90 inhibitor STA9090 on transcription factor EB (TFEB) mRNA expression level. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group. # $P < 0.05$ vs hypoxia group.

2.8 Hsp90抑制剂降低Hsp90与TFEB近启动子区的结合能力

为了验证 Hsp90 参与 TFEB 的转录调控, 本研究取转录起始位点的 -179~-57 区域作为 TFEB 近启动子区 (图 9A), 用 ChIP 实验检测 Hsp90 能否作为转录辅助因子结合在该区域。结果显示, 和对照组相比, Hsp90 抑制剂 STA9090 (0.1 $\mu\text{mol/L}$) 或 Novobiocin (0.5 mmol/L) 处理使 DNA 条带灰度值显著下降 (图 9B), 表明与 Hsp90 结合在 TFEB 近启动子区上的能力下降。以上结果提示, Hsp90 可结合在 TFEB 近启动子区 (-179~-57 区域) 上, Hsp90 抑制剂降低其结合能力。

2.9 Hsp90抑制剂降低TFEB启动子活性

双荧光素酶报告基因实验结果显示, 以 pGL4.10 空载体作为参照 (Control), 转染含 -1 500~-0、-1 500~-500、-1 500~-1 000 启动子区 pGL4.10 质粒的细胞相对荧光值显著提高, 其中转染含 -1 500~-0 启动子区质粒的细胞相对荧光值提高最为明显 (图 10A)。

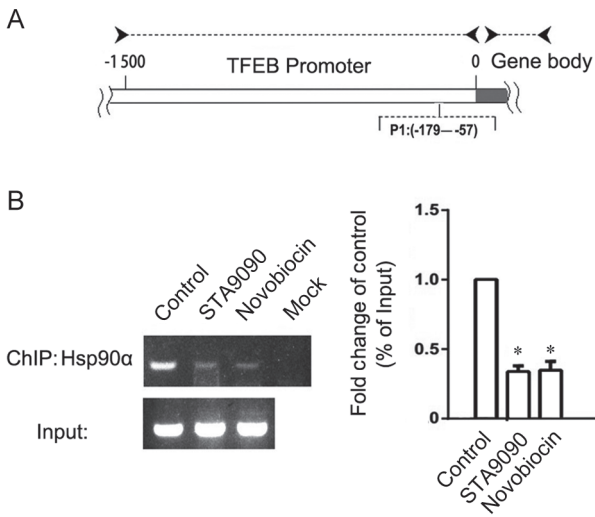


图 9. STA9090和Novobiocin对Hsp90在转录因子EB (TFEB) 近启动子区上结合能力的影响

Fig. 9. Effects of STA9090 and Novobiocin on the ability of Hsp90 binding to transcription factor EB (TFEB) proximal promoter region detected by ChIP assay. A: TFEB proximal promoter region. B: Result of ChIP assay. Data are presented as mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group.

和对照组相比, STA9090 和 Novobiocin 处理组细胞的相对荧光比值均显著降低 ($P < 0.05$) (图 10B), 表明 STA9090 和 Novobiocin 可下调 TFEB 启动子区报告基因的转录, 提示 Hsp90 可调控 TFEB 的启动子 -1 500~-0 区域活性。

3 讨论

Hsp90 单体由保守的 25 kDa 的 N 端和 55 kDa 的 C 端通过中间连接区相连而成, N 端附近存在高度保守的 ATPase 结构域, C 端是二聚体相互作用以及 Hsp90 与免疫亲和素和 p60Hop 相结合的主要区域, 中间连接区存在核定位信号和底物蛋白结合位点^[20]。Hsp90 抑制剂根据其于蛋白结合位点的不同主要分为 N 端抑制剂、C 端抑制剂和中间域抑制剂^[21]。STA9090 是 Hsp90 的 N 端抑制剂, 能阻断 N 端 ATP/ADP 结合位点与蛋白的相互作用, 从而导致底物蛋白降解^[22]。Novobiocin 可特异性地结合 C 端而抑制 Hsp90 的功能^[23]。本研究结果结果显示, STA9090、Novobiocin 处理后 HepG2 细胞活力下降。此外, STA9090 上调 Hsp90 蛋白表达水平, 这可能是由于 STA9090 激活热休克转录因子 1 (heat shock transcription factor 1, HSF1) 导致的。HSF1 可以被热应激、氧化应激、化学应激和生理应激等激活, 作为转录因子促进 Hsp 基因的转录和表达, 肿瘤细胞比其他细胞更依赖其功能^[24]。虽然本研究结果显示 Hsp90 抑制剂处理导致 Hsp90 蛋白表达水平

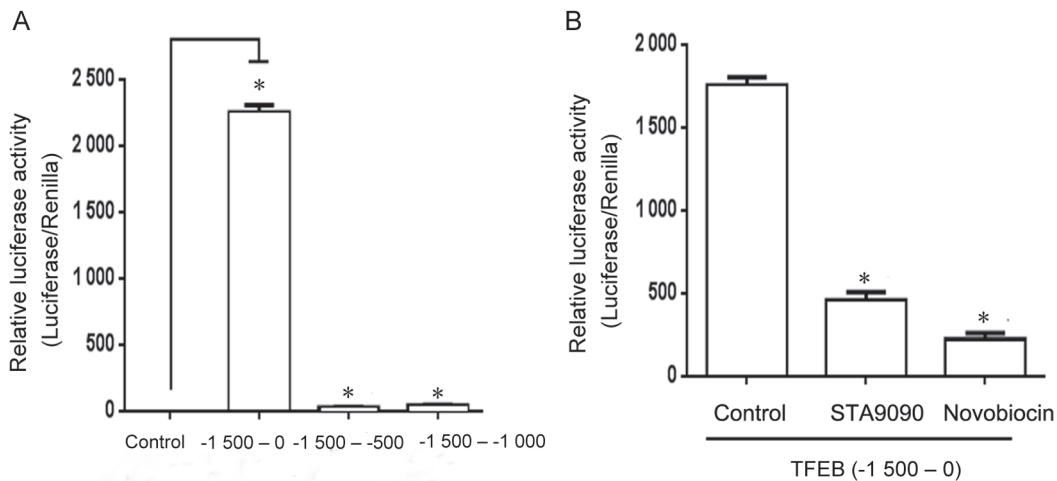


图 10. Hsp90抑制剂对转录因子EB (TFEB)启动子活性的作用

Fig. 10. Effects of Hsp90 inhibitors on the activity of transcription factor EB (TFEB) promoter detected by luciferase reporter assay. A: The luciferase activities of three plasmids group. pGL4.10 vector plasmid was used as a control. B: The luciferase activity of -1 500~-0 plasmid group treated by Hsp90 inhibitors. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group.

升高,但是由于 Hsp90 抑制剂抑制了 Hsp90 的功能,所以整体上表现为其底物蛋白 Akt、HIF-1 α 的蛋白水平下调。

Guévin 等研究显示,自噬基因 *Atg5* 的缺失可导致小鼠肝脏毒性、感染以及恶性肝肿瘤的生成^[25]。而肿瘤细胞可通过 TFEB 调控自噬因子和溶酶体的生成,进一步促进肿瘤进展。LC3 被 *Atg7* 激活断裂为 LC3-I, LC3-I 与磷脂酰乙醇胺通过酶的级联反应共轭连接形成 LC3-II, 并定位于隔离膜的内膜和外膜^[26], 而 LC3-II 常被用作自噬体的标记物和指示物^[27]。P62 作为自噬特异性反应底物,可被自噬-溶酶体通路降解,其降解是通过与 LC3 相互作用实现的。P62 与 LC3 的相互作用定位于自噬吞噬体,可不断地被自噬溶酶体系统降解,自噬功能的缺失会导致 P62 聚集,形成 P62 阳性包涵体^[28]。LC3 与 P62 均为 TFEB 的下游靶基因^[29]。本研究结果显示, Hsp90 抑制剂可下调 TFEB 及其下游自噬相关调控蛋白 LC3、P62 蛋白表达水平,提示 Hsp90 可通过调控转录因子 TFEB 调控自噬过程。

为阐明 Hsp90 对 TFEB 的调控机制,我们将 Flag-Hsp90 α 质粒转染入野生型 HepG2 细胞和敲除 Hsp90 α 基因的 HepG2 细胞,结果显示,转染 Flag-Hsp90 α 可显著上调 TFEB 蛋白表达水平,提示 Hsp90 可正向调控 TFEB 水平。另外,本研究结果显示, Hsp90 抑制剂可下调 TFEB 蛋白表达,但 Hsp90 抑制剂是如何影响 TFEB 蛋白表达? 是抑制蛋白合成过程,还是促进蛋白降解途径的发生? 本研究结果显示, Hsp90 抑制剂 STA9090 可下调 TFEB 蛋白水平,而蛋白酶体抑制剂 MG132 不能逆转 Hsp90 抑制剂引起的 TFEB 蛋白减少,但蛋白合成抑制剂 CHX 处理却进一步下调 TFEB 蛋白水平,提示 Hsp90 抑制剂对 TFEB 蛋白表达的下调可能是通过抑制蛋白合成过程,而非促进 TFEB 蛋白降解过程。

此外, Hsp90 抑制剂 STA9090 导致 TFEB mRNA 表达水平下降,提示 TFEB mRNA 表达水平可能受 Hsp90 的调控。因此,我们设计了 ChIP 实验,检测 Hsp90 抑制剂对 Hsp90 与 *TFEB* 近启动子区结合能力的影响,结果显示 Hsp90 抑制剂可降低 Hsp90 与 *TFEB* 近启动子区的结合能力。同时,为了进一步佐证 Hsp90 对 *TFEB* 近启动子区的活性调控,我们设计了双荧光素酶报告基因实验,构建三种包含不同位点 *TFEB* 启动子区的质粒,结果显示包含 *TFEB* 启动子区 -1 500~0 质粒的荧光素酶活性最强,

是其他质粒组的几千倍,说明转录因子与 *TFEB* 启动子的结合位点主要在 -1 500~0 区域,这一区域包含 -179~-57,与 ChIP 实验结果一致;而 Hsp90 抑制剂处理可显著降低 *TFEB* 启动子区 -1 500~0 活性,这也与 ChIP 实验结果一致。综上可以推断,*TFEB* 近启动子区 -179~-57 区域是 Hsp90 与 TFEB 的结合位点, Hsp90 抑制剂可抑制 Hsp90 与 *TFEB* 近启动子区的结合,降低 *TFEB* 启动子活性,下调自噬相关蛋白 LC3、P62 表达水平,提示 Hsp90 可通过与人肝癌细胞 *TFEB* 近启动子区的结合促进 TFEB 转录,从而上调自噬相关蛋白 LC3、P62 表达水平。但 Hsp90 对 *TFEB* 转录的调控是通过直接作用,还是通过中间蛋白质/蛋白质复合物的间接作用? Hsp90 是否会影响 TFEB 的磷酸化状态,改变 TFEB 核转位? 是否涉及自噬通路共调控分子的失活? 这些问题有待进一步探讨和阐明。

参考文献

- 1 Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol* 2019; 70(1): 151-171.
- 2 Ciocca DR, Arrigo AP, Calderwood SK. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol* 2013; 87(1): 19-48.
- 3 Haupt A, Joberty G, Bantscheff M, Frohlich H, Stehr H, Schweiger MR, Fischer A, Kerick M, Boerno ST, Dahl A, Lappe M, Lehrach H, Gonzalez C, Drewes G, Lange BM. Hsp90 inhibition differentially destabilises MAP kinase and TGF- β signalling components in cancer cells revealed by kinase-targeted chemoproteomics. *BMC Cancer* 2012; 12: 38.
- 4 Verba KA, Wang RY, Arakawa A, Liu Y, Shirouzu M, Yokoyama S, Agard DA. Atomic structure of Hsp90-Cdc37-Cdk4 reveals that Hsp90 traps and stabilizes an unfolded kinase. *Science* 2016; 352(6293): 1542-1547.
- 5 Rodina A, Wang T, Yan P, Gomes ED, Dunphy MP, Pillarsetty N, Koren J, Gerecitano JF, Taldone T, Zong H, Caldas-Lopes E, Alpaugh M, Corben A, Riolo M, Beattie B, Pressl C, Peter RI, Xu C, Trondl R, Patel HJ, Shimizu F, Bolaender A, Yang C, Panchal P, Farooq MF, Kishinevsky S, Modi S, Lin O, Chu F, Patil S, Erdjument-Bromage H, Zanzonico P, Hudis C, Studer L, Roboz GJ, Cesarman E, Cerchietti L, Levine R, Melnick A, Larson SM, Lewis JS, Guzman ML, Chiosis G. The epichaperome is an integrated chaperome network that facilitates tumour survival. *Nature* 2016; 538(7625): 397-401.
- 6 Condelli V, Crispo F, Pietrafesa M, Lettini G, Matassa DS,

- Esposito F, Landriscina M, Maddalena F. HSP90 molecular chaperones, metabolic rewiring, and epigenetics: Impact on tumor progression and perspective for anticancer therapy. *Cells* 2019; 8(6). pii: E532. doi: 10.3390/cells8060532.
- 7 Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; 18(6): 345–360.
- 8 Wang Y, Trepel JB, Neckers LM, Giaccone G. STA-9090, a small-molecule Hsp90 inhibitor for the potential treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; 11(12): 1466–1476.
- 9 Wilson GK, Tennant DA, Mckeating JA. Hypoxia inducible factors in liver disease and hepatocellular carcinoma: current understanding and future directions. *J Hepatol* 2014; 61(6): 1397–1406.
- 10 Kietzmann T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biol* 2017; 11: 622–630.
- 11 Mesarwi OA, Loomba R, Malhotra A. Obstructive sleep apnea, hypoxia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2019; 199(7): 830–841.
- 12 Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2679–2688.
- 13 Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 2005; 12 Suppl 2: 1509–1518.
- 14 Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gelinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006; 10(1): 51–64.
- 15 Medina DL, Di Paola S, Peluso I, Armani A, De Stefani D, Venditti R, Montefusco S, Scotto-Rosato A, Prezioso C, Forrester A, Settembre C, Wang W, Gao Q, Xu H, Sandri M, Rizzuto R, De Matteis MA, Ballabio A. Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nat Cell Biol* 2015; 17(3): 288–299.
- 16 Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 2009; 325(5939): 473–477.
- 17 Palmieri M, Impey S, Kang H, di Ronza A, Pelz C, Sardiello M, Ballabio A. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum Mol Genet* 2011; 20(19): 3852–3866.
- 18 Settembre C, Di Malta C, Polito V A, Garcia AM, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, Sardiello M, Rubinsztein DC, Ballabio A. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* 2011; 332(6036): 1429–1433.
- 19 Zhou X, Wen Y, Tian Y, He M, Ke X, Huang Z, He Y, Liu L, Scharf A, Lu M, Zhang G, Deng Y, Yan Y, Mayer MP, Chen X, Zou F. Heat shock protein 90 α -dependent B-cell-2-associated transcription factor 1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation by regulating MYC proto-oncogene c-MYC mRNA stability. *Hepatology* 2019; 69(4): 1564–1581.
- 20 Verma S, Goyal S, Jamal S, Singh A, Grover A. Hsp90: Friends, clients and natural foes. *Biochimie* 2016; 127: 227–240.
- 21 Neckers L, Blagg B, Haystead T, Trepel JB, Whitesell L, Picard D. Methods to validate Hsp90 inhibitor specificity, to identify off-target effects, and to rethink approaches for further clinical development. *Cell Stress Chaperones* 2018; 23(4): 467–482.
- 22 Hong DS, Banerji U, Tavana B, George GC, Aaron J, Kurzrock R. Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 (HSP90): lessons learned and future directions. *Cancer Treat Rev* 2013; 39(4): 375–387.
- 23 Dlugosz A, Janecka A. Novobiocin analogs as potential anti-cancer agents. *Mini Rev Med Chem* 2017; 17(9): 728–733.
- 24 Li J, Labbadia J, Morimoto RI. Rethinking HSF1 in stress, development, and organismal health. *Trends Cell Biol* 2017; 27(12): 895–905.
- 25 Guévin C, Manna D, Bélanger C, Konan KV, Mak P, Labonté P. Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B) early during infection. *Virology* 2010; 405(1): 1–7.
- 26 Rossiter H, König U, Barresi C, Buchberger M, Ghannadan M, Zhang C, Mlitz V, Gmeiner R, Sukseree S, Födinger D, Eckhart L, Tschachler E. Epidermal keratinocytes form a functional skin barrier in the absence of Atg7 dependent autophagy. *J Dermatol Sci* 2013; 71(1): 67–75.
- 27 Kwon DH, Kim L, Kim B, Kim JH, Roh K, Choi E, Song HK. A novel conformation of the LC3-interacting region motif revealed by the structure of a complex between LC3B and RavZ. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 490(3): 1093–1099.
- 28 Loos F, Xie W, Sica V, Bravo-San PJ, Souquere S, Pierron G, Lachkar S, Sauvat A, Petrazzuolo A, Jimenez AJ, Perez F, Maiuri MC, Kepp O, Kroemer G. Artificial tethering of LC3 or p62 to organelles is not sufficient to trigger autophagy. *Cell Death Dis* 2019; 10(10): 771.
- 29 Kim J, Hong S, Wu P, Richards AL, Jackson WT, Park J. Raf/MEK/ERK can regulate cellular levels of LC3B and SQSTM1/p62 at expression levels. *Exp Cell Res* 2014; 327(2): 340–352.