

蛋白酶体抑制剂 Epoxomicin 对视网膜色素上皮细胞自噬-溶酶体途径的影响

詹 姣, 何洁儿, 商 福, 吴明星, 张新愉

(中山大学中山眼科中心//眼科学国家重点实验室, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】研究抑制泛素-蛋白酶体途径(UPP)对自噬-溶酶体途径(ALP)的影响及相关作用机制。【方法】人视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19 共分为 3 组, 分别为 DMEM 空白对照组、DMEM+DMSO 阴性对照组、DMEM+Epoxomicin 实验组。应用蛋白免疫印迹法和细胞免疫荧光法检测泛素化蛋白的表达, 观察 UPP 功能的改变情况; 观察 LC3、LAMP1、LAMP2 的表达, 评价自噬作用和溶酶体的功能变化情况; 观察 HDAC6、p62 的表达, 初步探索 UPP 抑制对 ALP 改变的分子机制。【结果】采用蛋白酶体抑制剂 Epoxomicin 抑制泛素-蛋白酶体途径后, 细胞内泛素化蛋白质聚集物增多; 自噬溶酶体途径被激活, 自噬标志物 LC3 表达增高, 溶酶体膜相关蛋白 LAMP1、LAMP2 蛋白水平表达亦增高; 抑制 UPP 后 HDAC6 和 p62 表达升高, 可能参与 ALP 的激活过程。【结论】泛素-蛋白酶体途径抑制后, 自噬溶酶体途径被激活且参与蛋白质聚集物的降解。

关键词:泛素; 蛋白酶体; 自噬; 溶酶体; 蛋白质聚集物

中图分类号: R77

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2016)04-0508-06

Study on Influence of Autophagy-lysosome Pathway in ARPE-19 Cells by an Ubiquitin-proteasome Pathway Inhibitor Epoxomicin

ZHAN Jiao, HE Jie-er, SHANG Fu, WU Ming-xing, ZHANG Xin-yu

(The State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Corresponding to: ZHANG Xin-yu, E-mail: zhangxinyu0294@163.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the influence and mechanism upon inhibition of ubiquitin-proteasome pathway on autophagy-lysosome pathway. 【Methods】 Human retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 cells were divided into three groups according to the culture medium: DMEM group, DMEM+DMSO group, DMEM+Epoxomicin group. The expression levels of ubiquitinated proteins were analyzed by western blot and immunofluorescence to determine the UPP activity. The activity of the ALP was determined by LC3-Ⅱ, LAMP1 and LAMP2 expression, which was utilized to assess the functions of autophagy and lysosome. Meanwhile, the expression of HDAC6 and p62 were evaluated to elucidate the mechanism of the influence on ALP upon UPP inhibition. 【Results】 Inhibition of the UPP by epoxomicin resulted in aggregates of ubiquitinated proteins and protein aggregates marker γ -tubulin. The ALP was activated with the elevated level of LC3, LAMP1 and LAMP2. Levels of HDAC6 and p62 increased upon UPP inhibition, suggesting they may be involved in the activation of ALP when UPP was inhibited. 【Conclusions】 The ALP was activated and played a role in the degradation of protein aggregates as a consequence of UPP inhibition.

Key words: ubiquitin; proteasome; autophagy; lysosome; aggregates

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(4):508-513]

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 主要分为干性和湿性两种, 目前大多数研究主要集中于湿性 AMD, 且已有如雷珠单抗等抗新生血管有效治疗药物, 但对于干性

AMD 尚无有效预防和治疗措施^[1]。目前的研究多认为, 光照、年龄等因素引起视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelial, RPE) 氧化应激、免疫和炎症等反应造成脂褐素沉积, 是干性 AMD 发病

收稿日期: 2016-03-16

基金项目: 卫生部部属(管)医院 2013-2015 年度国家自然科学基金青年基金项目 (81200670)

作者简介: 詹姣, 硕士, 住院医师, E-mail: zhanjiao7013@163.com; 张新愉, 通信作者, 副教授, 研究方向: 白内障防治, E-mail: zhangxinyu0294@163.com

的始动因素;而脂褐素多为 RPE 细胞吞噬不断脱落的光感受器外节膜盘过氧化所产生的蛋白质与脂质产物聚合形成^[2]。因此从细胞内蛋白质降解途径角度研究 AMD,可能为 AMD 治疗提供新的思路。泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin proteasome pathway, UPP)和自噬-溶酶体途径(autophagy lysosome pathway, ALP)是真核细胞内的两大蛋白质降解系统,近几年研究发现这两条途径在蛋白质降解方面并非完全独立,可能存在互相一定的协同或互补的关系。但 UPP 和 ALP 之间的相互关联在 RPE 中尚待研究。Epoxomicin 是一种具有高度选择性抑制蛋白酶体的天然环氧酮肽,本研究利用 Epoxomicin 抑制人视网膜色素上皮细胞中 UPP 功能,观察其对细胞中 ALP 的影响,探讨 ALP 对 UPP 的弥补作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM(Dulbecco modified Eagle medium)培养基(低糖),Gibco 胎牛血清,Tween-20、十二烷基硫酸钠(SDS)、牛血清白蛋白(BSA)、丙烯酰胺、BCA 蛋白定量试剂盒(广州化学试剂厂);PVDF 膜(美国 Milipore 公司);抗荧光淬灭封片剂(北京普利莱基因技术有限公司);40 g/L 多聚甲醛溶液(博士德生物工程有限公司);激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司);HRP-羊抗鼠二抗、HRP-羊抗兔二抗、兔抗人 p62、兔抗人 LAMP1、兔抗人 LAMP2、AlexaFluor® 488 羊抗兔二抗、AlexaFluor® 555 羊抗鼠二抗(美国 Cell Signaling Technology 公司);鼠抗人 ubiquitin、鼠抗人 β -actin、鼠抗人 HDAC6、兔抗人 γ -tubulin(美国 Abcam 公司);兔抗人 LC3(美国 Novus Biologicals 公司)。

1.2 细胞培养及干预

人视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19 置于 37℃,体积分数 5%的 CO₂ 的培养箱中培养,待细胞生长至 80%~90%融合时进行传代,取对数生长期的细胞用于实验。使用体积分数 10%的胎牛血清及 1%抗生素(青霉素+链霉素)的 DMEM 培养液。将 Epoxomicin 溶解于 DMSO,浓度为 5 μ mol/L,本实验分组共分为 3 组,分别为 DMEM 空白对照组、DMEM+ DMSO 阴性对照组、DMEM+ Epoxomicin 实验组。

1.3 Western Blot 免疫印迹

收集各组 RPE 细胞,用十二烷基硫酸钠(SDS)细胞裂解液提取蛋白质,并用 BCA 法进行定量,行 10%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),然后 250 mA 电转 1.5 h 至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温摇床封闭 1 h,分别加兔抗人 p62 IgG(1:2 000)、鼠抗人 HDAC6 IgG(1:500)、兔抗人 LC3 IgG(1:4 000)、兔抗人 LAMP1 IgG(1:2 000)、兔抗人 LAMP2 IgG(1:2 000),4℃过夜;洗涤后加 HRP 标记羊抗兔 IgG(1:2 000)或 HRP 标记羊抗鼠(1:2 000),同时以 β -肌动蛋白(1:4 000)作为内参,室温孵育 1 h,最后用 HRP 底物试剂盒检测信号,显影。

1.4 免疫荧光

将细胞接种于涂有多聚-L-赖氨酸的玻片上,细胞爬片后,40 g/L 多聚甲醛溶液 PFA(PBS 稀释)室温下固定 20 min、渗透剂 50 μ L 透化 30 min、3% BSA 50 μ L 室温下封闭 45 min,加含 0.3% Tween 20 的 3% BSA 稀释的一抗 50 μ L 置于湿盒,4℃过夜,洗涤后加入 3% BSA 稀释的荧光二抗 50 μ L,0.1 μ g/mL DAPI 50 μ L 染核,室温下 5 min;封片剂封片后激光共聚焦显微镜下拍照。

1.5 统计学分析

数字化结果应用 SPSS 16.0 进行统计学分析,以平均值 $\pm$ 标准差表示,两组之间比较采用 *t*-test, *P* < 0.05 为具有统计学差异。

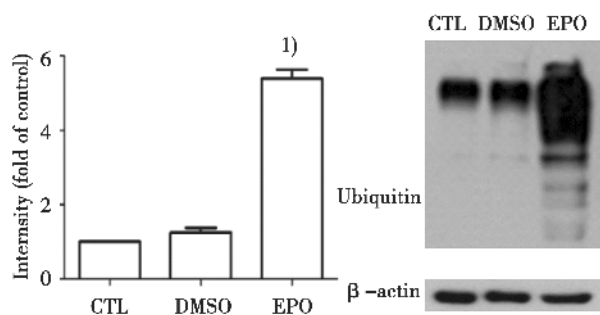
2 结果

2.1 Epoxomicin 抑制泛素-蛋白酶体途径

ARPE-19 细胞培养液中加入 Epoxomicin (5 μ mol/L)12 h 后细胞中高分子量泛素化蛋白质较空白对照组和阴性对照组水平显著升高(图 1),提示 UPP 作用被抑制;免疫荧光检测显示未经 Epoxomicin 处理时细胞中泛素化蛋白质在细胞核和细胞质中表达水平较低,而经 Epoxomicin 处理 12h 后泛素化蛋白质在细胞核与细胞质中形成大量颗粒状聚集物沉积(图 2)。

2.2 Epoxomicin 对自噬-溶酶体途径的诱导作用

为了检测 Epoxomicin 处理后细胞中 ALP 的活性,利用免疫印迹方法检测自噬体相关蛋白 LC3 以及溶酶体膜相关蛋白 LAMP1、LAMP2,结果显示该蛋白水平平均显著升高(图 3),且 LC3-II 水



Western blot results show that inhibition of the proteasome by Epoxomicin resulted in increased level of ubiquitinated proteins for 12 h. 1) indicates $P < 0.05$ as compared to cells that were not treated with Epoxomicin.

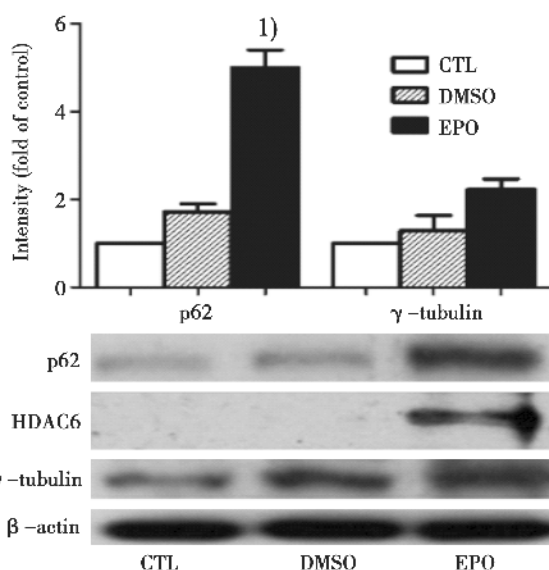
图 1 Epoxomicin 对泛素-蛋白酶体途径的抑制作用

Fig.1 Western blotting analysis of ubiquitinated proteins upon inhibition of proteasome by Epoxomicin

平较 LC3-I 水平升高更为明显,提示细胞自噬作用活性增强。免疫荧光技术检测结果显示对照组 RPE 细胞中 LC3 成细小颗粒状分布于细胞核和细胞质中,而经 Epoxomicin 处理 12 h 后则在细胞内形成大量粗大颗粒状聚集物(图 2),且与泛素化蛋白质聚集物在细胞中的分布出现共定位现象,共定位区域荧光为黄色,提示增强的自噬作用参与到 UPP 抑制后泛素化蛋白质的降解过程。

2.3 UPP 与 ALP 相互作用因子 p62、HDAC6 的检测

上述结果提示 UPP 被抑制后可诱导 ALP 活性提高,为进一步了解两大系统之间的关联机制,研究检测 UPP 与 ALP 之间相互作用因子的变化情况。通过免疫印迹检测 p62、HDAC6 两种蛋白质

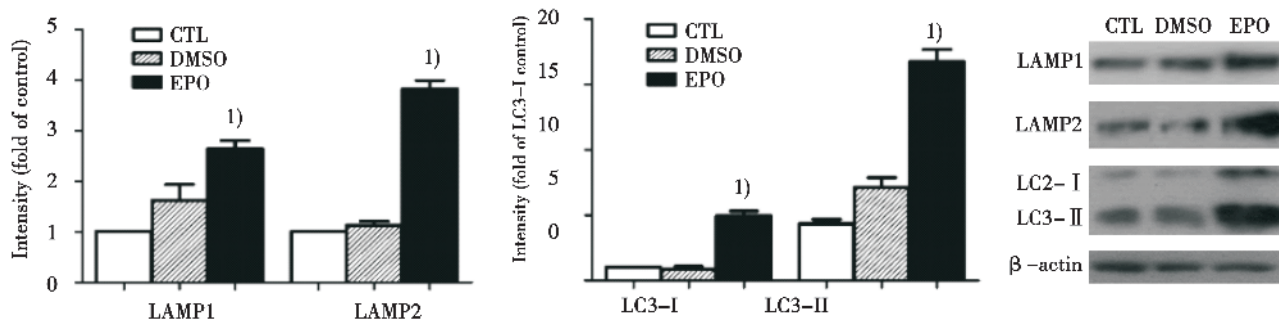


The Western blot data indicate that proteasome inhibition resulted in increased levels of p62 and HDAC6. 1) indicates $P < 0.05$ as compared to cells that were not treated with Epoxomicin.

图 4 Epoxomicin 对 UPP 与 ALP 相互作用因子 p62 和 HDAC6 的诱导作用

Fig.4 Proteasome inhibition resulted in increased levels of p62 and HDAC6

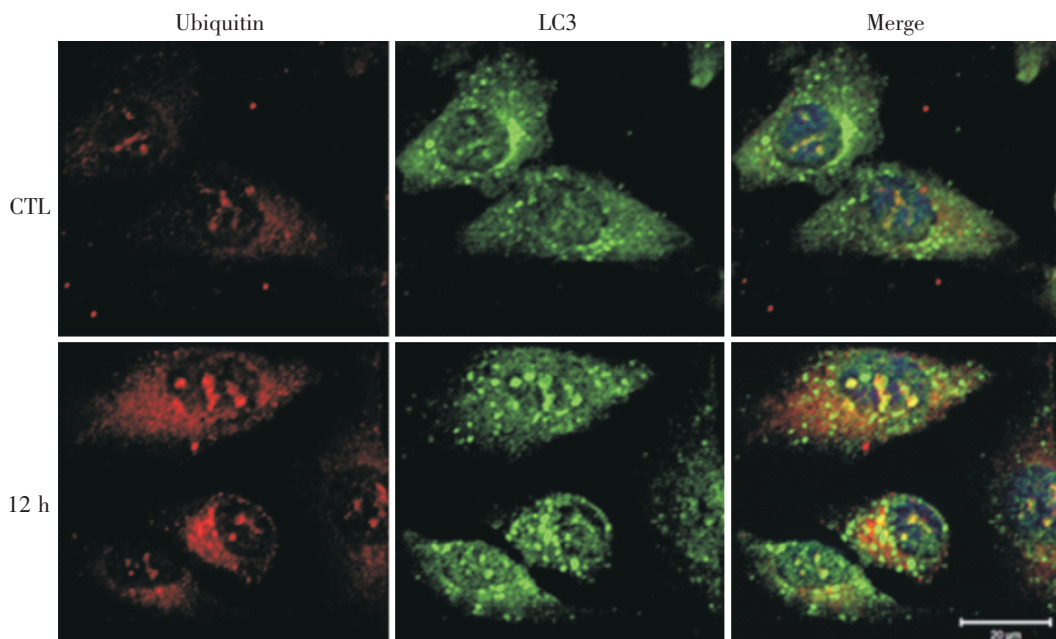
水平均较对照组显著升高(图 4);免疫荧光结果显示未经 Epoxomicin 处理时 HDAC6 和 γ-tubulin 在细胞内的分布并未出现共定位,而经 Epoxomicin 处理 12 h 后 HDAC6 水平升高,且与 γ-tubulin 在细胞中的分布出现明显共定位现象,共定位区域荧光为黄色(图 5),提示 HDAC6 参与到 UPP 被抑制后 ALP 的激活和泛素化蛋白质聚集物的降解过程中。



Western blotting analysis show that levels of LC3-I, LC3-II, LAMP1 and LAMP2 all increased in response to proteasome inhibition for 12 hours. 1) indicates $P < 0.05$ as compared to cells that were not treated with Epoxomicin.

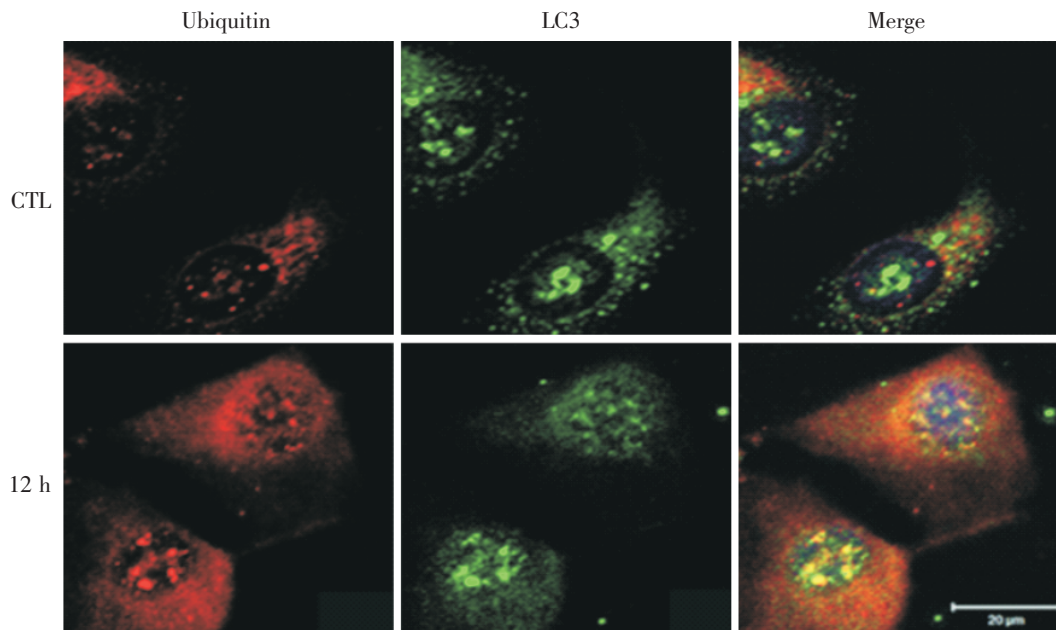
图 3 Epoxomicin 对自噬-溶酶体途径的诱导作用

Fig.3 Inhibition of the proteasome by Epoxomicin resulted in activation of ALP



ARPE-19 cells were exposed to 5 $\mu\text{mol/L}$ of Epoxomicin for 12 h and the cells were fixed for immunofluorescent detection of cellular distribution of ubiquitinated proteins and LC3. Scale bar: 20 μm .

图 2 Epoxomicin 处理组和对照组泛素化蛋白和 LC3 免疫荧光结果
Fig.2 Ubiquitinated protein aggregates and LC3 were colocalized in response to proteasome inhibition



ARPE-19 cells were exposed to 5 $\mu\text{mol/L}$ of Epoxomicin for 12 hours and the cells were fixed for immunofluorescent detection of cellular distribution of HDAC6 and γ -tubulin. Scale bar: 20 μm .

图 5 Epoxomicin 处理组和对照组 HDAC6 和 γ -tubulin 免疫荧光结果
Fig.5 HDAC6 and γ -tubulin were colocalized in response to proteasome inhibition

3 讨 论

随着年龄、氧化应激、炎症、免疫等因素,细胞

内错误折叠蛋白质增多导致蛋白质降解系统超负荷从而形成不溶性高分子质量蛋白质聚合物沉积,与众多神经退行性疾病发病机制有关,如帕金森病 (Parkinson's disease, PD) α -突触共核蛋白异常沉

积所引起的路易小体形成^[3],阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD) β -淀粉样蛋白的聚集和异常沉积等^[4],亨廷顿舞蹈病(Huntington's disease, HD)患者大脑病变区域的神经细胞核内发现的亨廷顿蛋白聚合体和包涵体^[5]等。干性AMD的发生发展被认为与RPE细胞中自噬活性及溶酶体水解酶活性下降导致ALP对光感受器外节膜盘、损伤的线粒体以及蛋白质聚集物的吞噬、降解减少从而导致脂褐素沉积有关^[6]。UPP和ALP是细胞内两大主要蛋白质降解途径,UPP能选择性地降解细胞内的异常蛋白质,及时对错误折叠的蛋白质进行清除;ALP则是膜包裹部分胞质和细胞内需降解的细胞器、蛋白质等形成自噬体,并与溶酶体融合形成自噬-溶酶体,利用溶酶体中的水解酶降解其所包裹的内容物。以往蛋白酶体抑制剤的研究主要应用在肿瘤细胞,发现抑制蛋白酶体功能可以诱导肿瘤细胞发生I型程序性死亡即凋亡^[7-8],而在RPE细胞中研究甚少。本研究通过抑制UPP探讨ALP对UPP的代偿作用以及ALP的激活途径,为AMD的治疗提供新的研究思路。

Epoxomicin为从放线菌中提取的天然产物,是一种有效且不可逆的蛋白酶体抑制剤^[9]。本研究通过使用Epoxomicin阻断UPP,观察ALP活性及相关因子的变化。细胞免疫印迹和免疫荧光检测显示RPE细胞内高分子质量泛素化蛋白质的增多聚集提示UPP功能被抑制。微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain3, LC3)是酵母自噬基因Atg8在哺乳动物中的同源体,分为LC3-I、LC3-II两型,LC3-II由LC3-I在自噬激活时修饰加工而来,位于自噬体膜上,为自噬活性标志物^[10]。实验结果显示LC3-I、LC3-II与溶酶体膜相关蛋白LAMP1、LAMP2水平均升高,且LC3-II较LC3-I水平升高更为明显,提示自噬作用被激活;荧光共聚焦显微镜观察显示LC3与泛素化蛋白质聚集物在细胞核与细胞质中分布出现共定位现象,提示增强的自噬作用参与到细胞中蛋白质聚集物的降解过程中,表明ALP在UPP功能被抑制后作为补偿机制调控细胞内蛋白质的降解。

根据文献报道,p62/SQSTM1由于其分子结构中含有多个重要的结构域从而在细胞内众多信号通路中起着关键作用^[11-12],其UBA结构

域(Ubiquitin Associated Domain)能与多聚泛素链结合,LIR结构域(LC3 Interaction Domain)可与LC3结合,而PB1结构域(Phox and Bem1p Domain)则可通过与NBR1(Neighbor of BRCA1 gene 1)结合将多聚泛素化蛋白质和损伤的线粒体传递给自噬体进行降解,在两大蛋白质降解系统之间发挥着重要的桥梁作用^[13]。组蛋白脱乙酰基酶6(histone deacetylase 6, HDAC6)在哺乳动物细胞内可通过去乙酰基作用激动皮层肌动蛋白将泛素化的蛋白质聚集物通过微管蛋白和细胞骨架蛋白运送到细胞核周围的MTOC(Microtubule organizing center)区域,由聚集在这里的ALP进行降解^[14-15],同时在控制自噬体与溶酶体的融合过程中发挥着重要的作用^[16],此外还可与分子伴侣如HSP90等及热休克转录因子等结合参与蛋白质修复折叠过程^[17-18]。本研究我们初步探讨了RPE细胞中UPP被抑制后p62和HDAC6的变化情况。免疫印迹结果显示实验组细胞内p62和HDAC6蛋白水平升高,荧光共聚焦显微镜显示HDAC6在细胞核及细胞核周围聚集成团状,且与蛋白质聚集物的标志之一 γ -tubulin在细胞内的分布出现共定位现象,提示HDAC6在UPP被抑制后参与到蛋白质聚集物的降解过程中。

近几年在阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病方面的研究发现UPP和ALP两条途径在蛋白质降解方面并非完全独立,而是存在着一定的相互关联^[19-20]。但UPP和ALP在RPE中的相互作用所知甚少。本研究发现在RPE中抑制UPP也会激活ALP,与以往研究利用神经细胞所得结果相符。我们同时发现抑制UPP增加p62和HDAC6的表达,提示p62和HDAC6可能参与ALP的激活和泛素化蛋白质聚集物的降解,为探讨如何激活ALP提供新的思路。也有研究报道抑制ALP同样会激活UPP,提示UPP可能代偿部分ALP功能^[21]。

综上所述,UPP被蛋白酶体抑制剤Epoxomicin抑制后,ALP被激活且相关因子如p62、HDAC6参与到ALP的激活和蛋白质聚集物的降解过程中。目前UPP与ALP之间的相互作用机制尚未完全明确,通过研究RPE细胞内UPP对ALP活性调控作用,为探讨如何激活ALP提供新的思路,将会在对AMD的预防和治疗领域具有深远的意义。

参考文献

- [1] 张古沐阳, 陈有信. 干性年龄相关性黄斑变性的发病机制研究进展[J]. 中华眼科杂志, 2014, 50(6): 464-470.
ZHANG-GU MY, CHEN YX. Pathogenesis of dry age-related macular degeneration: updates [J]. Chin J Ophthalmol, 2014, 50(6): 464-470.
- [2] 闫泉. 自噬在干性年龄相关性黄斑变性中的作用研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(10): 949-952.
YAN Q, SUN XD. Research progress in autophagy on dry age-related macular degeneration [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(10): 949-952.
- [3] 汪锡金, 张煜, 陈生弟. 帕金森病发病机制与治疗研究十年进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2010, 10(1): 36-42.
WANG XJ, ZHANG Y, CHEN SD. Ten-year pathogenesis and treatment updates of Parkinson's disease [J]. Chin J Contemp Neurol Neurosurg, 2010, 10(1): 36-42.
- [4] 张静爽, 王蓉. 阿尔茨海默病发生机制的研究进展[J]. 首都医科大学学报, 2014, 35(6): 721-724.
ZHANG JS, WANG R. Research progress in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. J Cap Med Univ, 2014, 35(6): 721-724.
- [5] 秦正红, 王顾振纶, 林芳. 亨廷顿舞蹈病的分子病理研究进展[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(4): 378-382.
QIN ZH, GU ZL, LIN F. Research progress in molecular pathology of Huntington's disease [J]. Chin Pharmacol Bulletin, 2004, 20(4): 378-382.
- [6] FERRINGTON DA, SINHA D, KAARNIRANTA K. Defects in retinal pigment epithelial cell proteolysis and the pathology associated with age-related macular degeneration [J]. Progr in Retin Eye Res, 2016, 51: 69-89.
- [7] 葛鹏飞, 于天浩, 付双林, 等. MG-132 激活 SHG-44 细胞株自噬途径的体外实验 [J]. 中华神经外科杂志, 2008, 24(11): 834-837.
GE PF, YU TH, FU SL, et al. In vitro study on activating autophagy pathway of SHG-44 glioma cells by MG-132 [J]. Chin J Neurosurg, 2008, 24(11): 834-837.
- [8] WOJCIK S. Crosstalk between autophagy and proteasome protein degradation systems: possible implications for cancer therapy [J]. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2013, 51(4): 249-264.
- [9] KIM KB, CREWS CM. From epoxomicin to carfilzomib: chemistry, biology, and medical outcomes [J]. Nat Product Rep, 2013, 30(5): 600-604.
- [10] TANIDA I, UENO T, KOMINAMI E. LC3 and autophagy [J]. Methods in Molec Biol, 2008, 445: 77-88.
- [11] MOSCAT J, DIAZ-MECO MT. P62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer [J]. Cell, 2009, 137(6): 1001-1004.
- [12] KOMATSU M, WAGURI S, KOIKE M, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice [J]. Cell, 2007, 131(6): 1149-1163.
- [13] SU H, WANG X. P62 stages an interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in the heart of defense against proteotoxic stress [J]. Trends in Cardiovasc Med, 2011, 21(8): 224-228.
- [14] HAO R, NANDURI P, RAO Y, et al. Proteasomes activate aggresome disassembly and clearance by producing unanchored ubiquitin chains [J]. Mol cell, 2013, 51(6): 819-828.
- [15] IWATA A, RILEY BE, JOHNSTON JA, et al. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin [J]. J Biol Chem, 2005, 280(48): 40282-40292.
- [16] LEE JY, KOGA H, KAWAGUCHI Y, et al. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy [J]. EMBO J, 2010, 29(5): 969-980.
- [17] BOYAULT C, ZHANG Y, FRITAH S, et al. HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates [J]. Genes Devel, 2007, 21(17): 2172-2181.
- [18] LAMARK T, JOHANSEN T. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy [J]. Int J Cell Biol, 2012, 2012: 736905.
- [19] YANG F, YANG YP, MAO CJ, et al. Crosstalk between the proteasome system and autophagy in the clearance of alpha-synuclein [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2013, 34(5): 674-680.
- [20] CECARINI V, BONFILI L, CUCCIOLONI M, et al. Crosstalk between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in a human cellular model of Alzheimer's disease [J]. Biochimica et biophysica acta, 2012, 1822(11): 1741-1751.
- [21] WANG XJ, YU J, WONG SH, et al. A novel crosstalk between two major protein degradation systems regulation of proteasomal activity by autophagy [J]. Autophagy, 2013, 9(10): 1500-1508.

(编辑 刘清海)