

网络出版时间:2022-12-26 17:01:31 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.R.20221226.1521.001.html

◇基础医学研究◇

高尔基体蛋白 GOLPH3 通过 mTORC1 信号通路调控溶酶体发生的分子机制

孙源,邱荣,曹新旺

摘要 目的 探究哺乳动物细胞中高尔基体磷酸化蛋白 3 (GOLPH3)通过 mTORC1 信号通路调控溶酶体发生的分子机制。方法 利用 CRISPR Cas9 建立 GOLPH3 敲除稳定细胞株。通过 Western blot 分析比较对照细胞与 GOLPH3 敲除细胞的 mTORC1 活性、TFEB(转录因子 EB)以及 pTFEB 水平,进一步用免疫荧光方法标记溶酶体联系膜蛋白 LAMP1,比较两种细胞中溶酶体数量的差别。结果 细胞中敲除 GOLPH3 将显著抑制 mTORC1 活性,减少细胞质中 pTFEB 水平,增加活化 TFEB 的细胞核定位,促进溶酶体的生物发生。结论 高尔基体蛋白 GOLPH3 通过 mTORC1 信号通路调控溶酶体发生。

关键词 GOLPH3;mTORC1;高尔基体;溶酶体发生

中图分类号 Q 256

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0001-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.001

高尔基体蛋白质 GOLPH3 (Golgi phosphoprotein 3)又名 GPP34、GMx33 或 MIDAS,通过与富集于反式高尔基体网络的磷酸肌醇-4-磷酸 (phosphatidylinositol-4-phosphate, PI4P) 相互作用,定位于反式高尔基体网络及其周围囊泡,在囊泡运输和维持高尔基体形态过程中具有重要作用^[1]。此外,GOLPH3 是首个被发现定位在高尔基体的原癌基因,可通过激活 mTOR 信号通路促进肿瘤发生^[2]。mTOR 信号通路在哺乳动物细胞中执行着多种重要生理功能,在细胞内形成 mTORC1 (mTOR Complex 1) 和 mTORC2 (mTOR Complex 2) 两种复合物。mTORC1 除了分布于溶酶体,还分布于质膜、高尔基体、内吞体、线粒体、过氧化物酶体等细胞内位点,感知细胞中生长因子信号、营养和能量状态等^[3]。

溶酶体生物发生与维持细胞稳态密切相关,溶

酶体发生出现异常将导致肿瘤等多种疾病^[4]。mTORC1 可通过其激酶活性磷酸化细胞内与溶酶体生物发生相关的转录因子 TFEB,从而调控细胞中溶酶体数量^[5]。该实验通过构建 GOLPH3 敲除稳定细胞株研究 GOLPH3 在溶酶体发生过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料 HeLa 细胞、293T 细胞和 HEK293 细胞均购自中国科学院细胞库(上海);胎牛血清、DMEM 培养基、青链霉素、胰蛋白酶-EDTA、嘌呤霉素以及 Lipofectamin 2000 购自 ThermoFisher (上海);限制性内切酶 BsmB1 购自 NEB 公司(美国);GOLPH3、 β -Actin 以及 H3 一抗购自 Proteintech 公司(武汉);S6K、pS6K、TFEB、pTFEB、GM130、Golgin97 以及 Giantin 一抗购自美国 CST 公司;化学发光成像系统购自上海天能公司;激光扫描共聚焦显微镜 (LSM800)购自德国蔡司公司。

1.2 细胞培养 HeLa、293T 和 HEK293 细胞均培养于含 10% FBS 和 100 μ g/ml 的青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中。

1.3 构建 GOLPH3 敲除稳定细胞株 在网站 <http://zlab.bio/guide-design-resources> 上设计 GOLPH3 的 sgRNA 序列,得到正反向 gRNA 寡核苷酸序列 CACCGtgatatcatctggattacg 和 AAACcgtaatccagatgatatacaC。然后按照标准的分子克隆方法,将寡核苷酸退火后克隆到载体 lentiCRISPR V2 (Addgene# 52961)。进一步将测序正确的质粒与慢病毒包装质粒 pMD2.G (Addgene# 122259) 以及 psPax2 (Addgene# 12260) 一起共转到 HEK293 细胞,48 h 后收集病毒上清液,并用来感染密度为 30% ~ 50% 的 HeLa 或 HEK293 细胞,感染 48 h 后用浓度为 0.5 μ g/ml 的嘌呤霉素进行筛选,最终得到 GOLPH3 敲除的稳定细胞株。

1.4 Western blot 将培养的细胞用预冷的 PBS 洗 2 次,然后加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液

2022-08-04 接收

基金项目:国家自然科学基金重大研究计划培育项目(编号:91854120)

作者单位:安徽医科大学生命科学院细胞生物学系,合肥 230032

作者简介:孙源,男,硕士研究生;

曹新旺,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:

caoxw@ahmu.edu.cn

RIPA (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS) 在冰上裂解 30 min, 加入 Sample buffer 后在 100 °C 条件下煮样 10 min。接着进行 SDS-PAGE 电泳, 并将印迹转移到 PVDF 膜上, 用相应的一抗和二抗进行孵育后, 将 PVDF 膜放在化学发光成像系统中成像, 检测目的蛋白信号。

1.5 免疫荧光 将生长状态良好的细胞铺在放置盖玻片的 24 孔培养板中。收集载有细胞的盖玻片, 用 PBS 洗涤 2 次, 然后用 4% 的多聚甲醛在室温固定 10 min, 接着依次用 0.5% 的 saponin 打孔 10 min, 用封闭液 (PBS + 5% 羊血清 + 0.3% TritonX-100) 封闭 1 h, 然后用稀释在 1% BSA 中的一抗 4 °C 孵育过夜。第 2 天用 PBST 洗 3 次, 每次 5 min, 接着用荧光标记的二抗在室温孵育 1 h, 然后用 DAPI 染色细胞核, 封片, 最后在共聚焦显微镜下进行观察。

1.6 核质分离 收集细胞, 加入添加蛋白酶抑制剂的细胞裂解液 (50 mmol/L Hepes, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100), 在冰上裂解 20 min, 然后在 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 收集得到的上清液即为细胞质成分, 得到的沉淀用细胞裂解液洗涤 3 次后, 用细胞核裂解

液 (50 mmol/L Hepes, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% SDS) 裂解 30 min, 即可得到细胞核成分。

1.7 LAMP1 标记的荧光点的定量 细胞中 LAMP1 标记的荧光点用 ImageJ 进行统计, 每组至少统计 3 次不同实验, 每次实验至少统计 20 个细胞。

1.8 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 8.0 进行独立样本 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 GOLPH3 敲除稳定细胞株 Western blot 分析表明, 与对照组细胞相比, GOLPH3 敲除组细胞中 GOLPH3 的表达水平几乎检测不到。免疫荧光实验显示, 与对照组细胞相比, GOLPH3 敲除组细胞中整个高尔基体形态 (用 Giantin 抗体进行荧光标记), 包括顺式高尔基体 (用 GM130 抗体进行荧光标记) 和反式高尔基体 (用 Golgin97 抗体进行荧光标记) 所占体积均明显减小。GOLPH3 具有维持高尔基体形态的功能。因此, 通过比较 GOLPH3 表达水平以及高尔基体形态分析, 证实已经成功构建 GOLPH3 敲除稳定细胞株。见图 1。

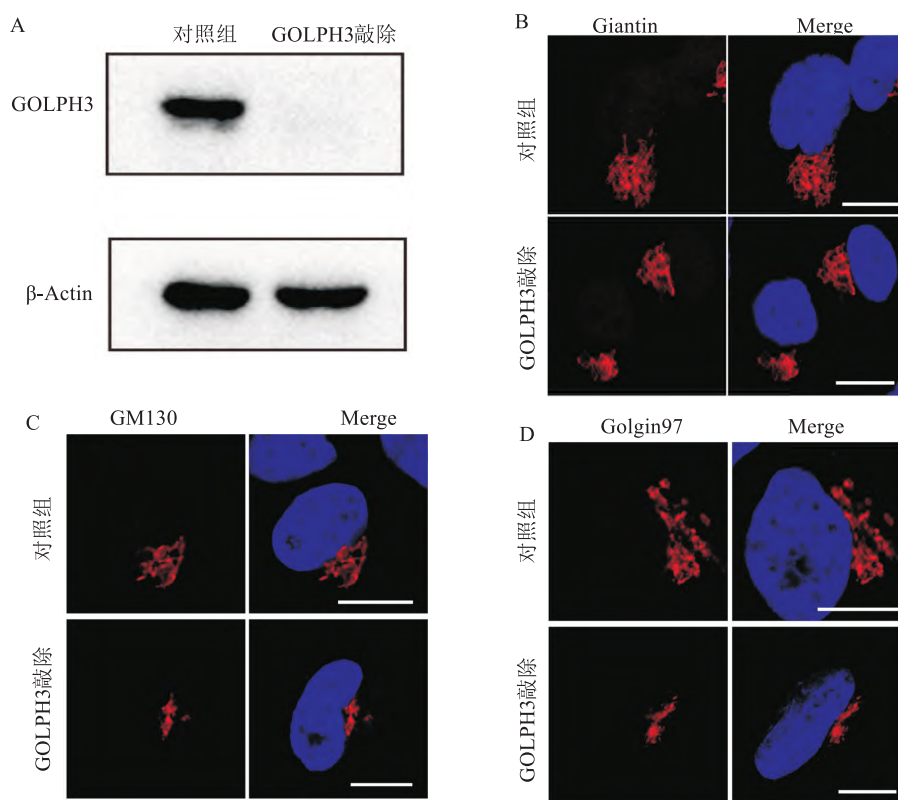


图 1 成功构建 GOLPH3 敲除稳定细胞株 ×63

A: Western blot 检测对照组和 GOLPH3 敲除组细胞中 GOLPH3 的表达水平; B: 对照组和 GOLPH3 敲除组细胞中高尔基体形态; C: 对照组和 GOLPH3 敲除组细胞中顺式高尔基体形态; D: 对照组和 GOLPH3 敲除组细胞中反式高尔基体形态

2.2 检测 GOLPH3 敲除对 mTORC1 信号通路的影响 分别收集对照组和 GOLPH3 敲除组细胞,制备细胞裂解液,然后进行 Western blot 分析。结果显示,与对照组细胞相比,GOLPH3 敲除组细胞 GOLPH3 表达水平显著下降,同时,GOLPH3 敲除明显抑制了 mTORC1 的 p70 S6 激酶(S6K)的磷酸化,差异有统计学意义($F = 34.7, P < 0.01$)。见图 2。

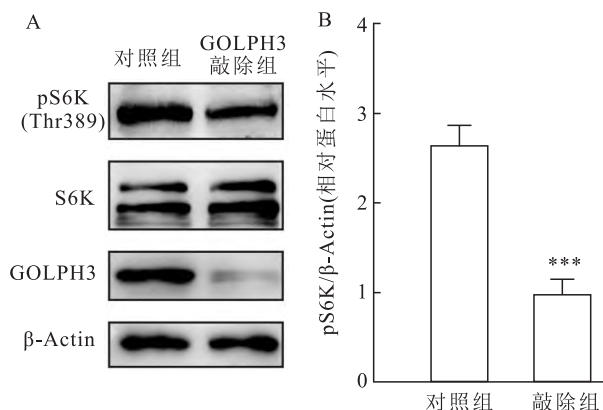


图2 GOLPH3 敲除对细胞中 mTORC1 信号通路的影响

A: Western blot 分析对照组和 GOLPH3 敲除组细胞的 mTORC1 活性;B: 对照组和 GOLPH3 敲除组 pS6K 磷酸化水平归一化统计分析;与对照组比较:*** $P < 0.001$

2.3 GOLPH3 敲除对 TFEB 的细胞分布的影响 将对照组和 GOLPH3 敲除组细胞的细胞核和细胞质分离,然后用 Western blot 分析 GOLPH3 敲除对转

录因子 TFEB 磷酸化以及核转位的影响。Western blot 实验结果表明,GOLPH3 敲除增加了细胞核中 TFEB 蛋白水平,同时抑制了细胞质中 TFEB 的磷酸化水平。分别在对照细胞和 GOLPH3 敲除细胞中应用免疫荧光标记内源性 TFEB,显示 GOLPH3 敲除明显增加了红色荧光标记的 TFEB 的细胞核定位。见图 3。

2.4 GOLPH3 敲除对溶酶体生物发生的影响 用溶酶体膜联系蛋白 LAMP1 抗体免疫荧光标记对照组细胞和 GOLPH3 敲除组细胞,共聚焦成像结果显示, GOLPH3 敲除细胞中 LAMP1 免疫标记的荧光点数量比对照组细胞中 LAMP1 免疫标记的荧光点数量明显增多 ($F = 32.55, P < 0.001$),表明 GOLPH3 敲除促进了溶酶体的生物发生。见图 4。

3 讨论

GOLPH3 是定位在反式高尔基体及外周囊泡的外周膜蛋白,通过与微丝马达蛋白 MYO18A 相互作用,从而将高尔基体与 F-肌动蛋白连接起来,参与高尔基体的囊泡形成,维持高尔基体形态。敲低 GOLPH3 (GOLPH3 KD) 将抑制从高尔基体到质膜的囊泡运输,同时,抑制形成伸展的彩带样高尔基体形态^[1]。本实验构建的 GOLPH3 敲除稳定细胞株, GOLPH3 表达量显著降低,高尔基体形态明显减小,成功构建了 GOLPH3 敲除稳定细胞株。

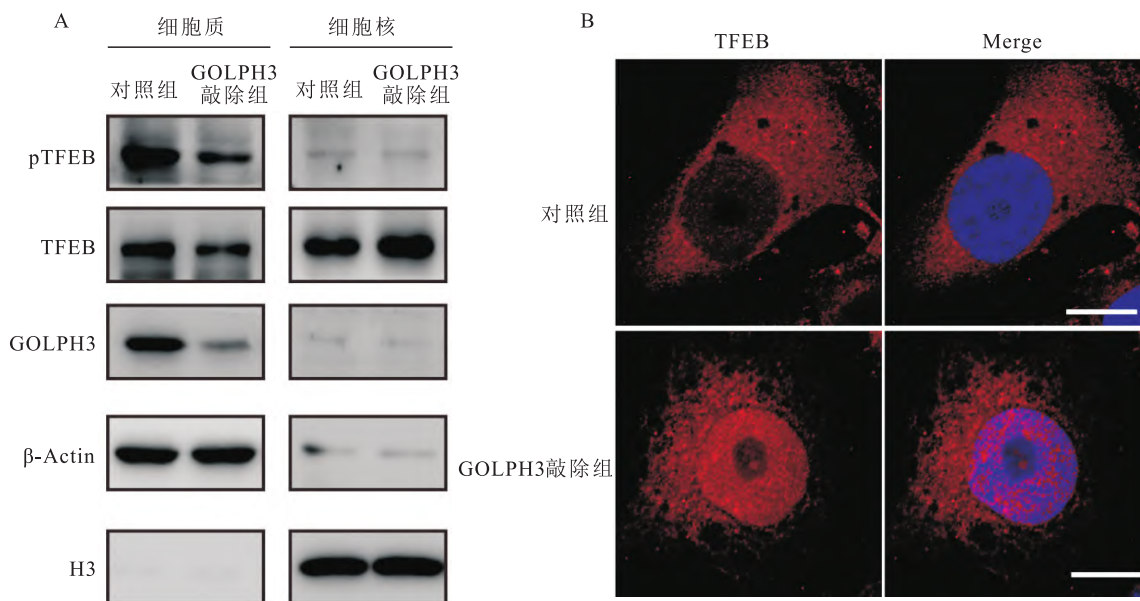


图3 GOLPH3 敲除对 TFEB 的细胞分布的影响

A: Western blot 分析 GOLPH3 敲除对 TFEB 的细胞分布和磷酸化水平的影响;B: 共聚焦显微镜成像分析 GOLPH3 敲除对 GFP-TFEB 在细胞中分布的影响 ×63

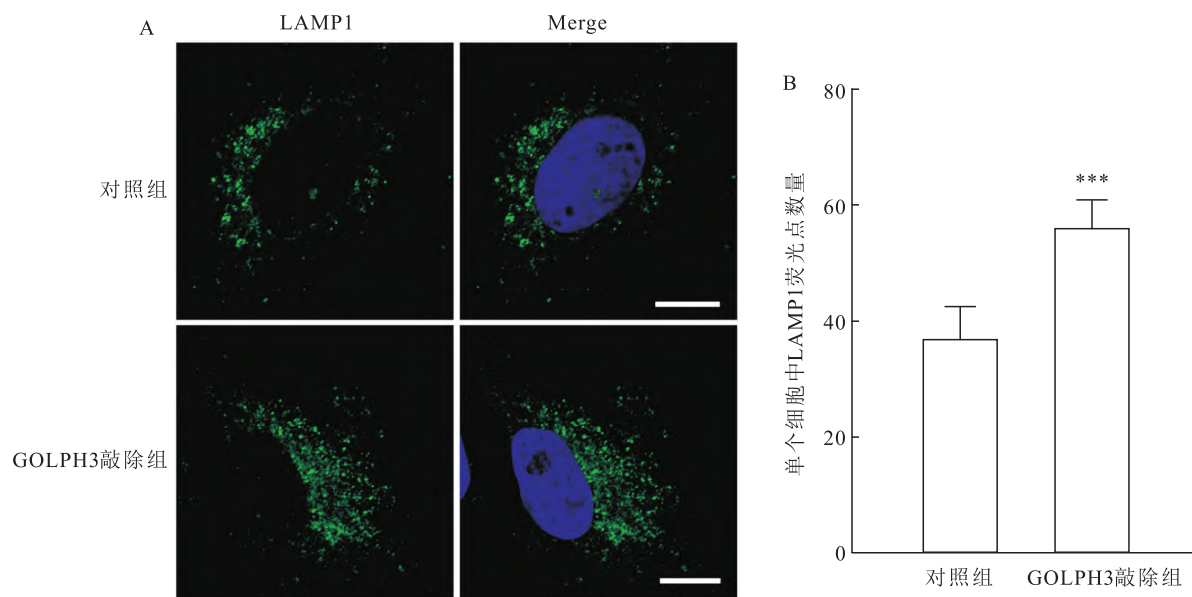


图4 GOLPH3 敲除对溶酶体生物发生的影响

A: 对照组和 GOLPH3 敲除组 LAMP1 共聚焦成像结果 $\times 63$; B: 两个不同处理组单个细胞中 LAMP1 荧光点数量统计学分析; 与对照组比较: *** $P < 0.001$

GOLPH3 是首个被发现定位在高尔基体的原癌基因, 可通过激活 mTOR 信号通路促进肿瘤发生^[6], 因此, GOLPH3 与 mTOR 信号通路有密切联系。mTORC1 可感知细胞中生长因子信号、营养状况和能量状态, 通过其激酶活性磷酸化靶标底物以启动多种下游反应。mTORC1 的底物 S6K (p70 S6 kinase) 是一种有丝分裂原激活的 Ser/Thr 蛋白激酶。活化的 mTORC1 磷酸化 S6K 形成 p-S6K, p-S6K 水平可以用来衡量 mTORC1 的活性^[7]。本实验显示 GOLPH3 敲除细胞中 mTORC1 活性显著下降。

溶酶体可以感受细胞能量和氨基酸水平, 介导细胞内的信号转导^[8-9]。此外, 作为一个经典的具有降解功能的细胞器, 溶酶体不仅可以降解细胞内物质, 还可降解通过胞吞和自噬等途径进入细胞的胞外物质, 因此, 溶酶体在免疫反应、质膜修补以及细胞死亡等多种细胞生理过程中具有重要作用^[10-11]。基于溶酶体在维持细胞稳态过程中的重要作用, 细胞内溶酶体的生物发生受到严格调控。TFEB 可通过活性改变而影响其亚细胞定位进而调控溶酶体生物发生的一个重要转录因子^[12]。mTORC1 可磷酸化 TFEB, 使其失活并定位于胞质, 而 TFEB 去磷酸化可导致其进入细胞核, 恢复活性, 从而促进与溶酶体生物发生相关基因的转录, 促进溶酶体数量增加^[5, 13]。在 GOLPH3 敲除细胞中, mTORC1 部分失活, TFEB 的细胞核定位增加, 因此促进了溶酶体的生物发生。

参考文献

- [1] Kuna R S, Field S J. GOLPH3: a Golgi phosphatidylinositol(4) phosphate effector that directs vesicle trafficking and drives cancer [J]. J Lipid Res, 2019, 60(2): 269-75.
- [2] Zhan W, Zhang J, Luo Y, et al. GOLPH3 silencing inhibits adhesion of glioma U251 cells by regulating ITGB1 degradation under serum starvation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 532(2): 195-9.
- [3] Saxton R A, Sabatini D M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease[J]. Cell, 2017, 168(6): 960-76.
- [4] Ballabio A, Bonifacio J S. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(2): 101-18.
- [5] Medina D L, Di Paola S, Peluso I, et al. Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB[J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(3): 288-99.
- [6] Song J W, Zhu J, Wu X X, et al. GOLPH3/CKAP4 promotes metastasis and tumorigenicity by enhancing the secretion of exosomal WNT3A in non-small-cell lung cancer[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(11): 976.
- [7] Uchiyama Y, Permata T B M, Sato H, et al. DNA damage promotes HLA class I presentation by stimulating a pioneer round of translation-associated antigen production[J]. Mol Cell, 2022, 82(14): 2557-70.
- [8] Ferguson S M. Beyond indigestion: emerging roles for lysosome-based signaling in human disease[J]. Curr Opin Cell Biol, 2015, 35: 59-68.
- [9] Efeyan A, Comb W C, Sabatini D M. Nutrient-sensing mechanisms and pathways[J]. Nature, 2015, 517(7534): 302-10.

网络出版时间:2022-12-26 17:39:58 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.R.20221226.1521.002.html

三卤甲烷对秀丽隐杆线虫生殖细胞及子代数影响

吴佳洁^{1,2}, 周童^{1,2}, 曹振霄^{1,2}, 凤玉^{1,2}, 许安^{1,2}, 杜华^{1,2}

摘要 目的 探讨3种三卤甲烷类饮用水消毒副产物对秀丽隐杆线虫生殖细胞发育与繁殖能力的影响。**方法** 以3种三卤甲烷(三溴甲烷、三氯甲烷、三碘甲烷)为研究对象,在秀丽隐杆线虫模型中检测不同浓度三卤甲烷暴露后生殖腺细胞凋亡和卵母细胞数,及最终产生的子代数。结果 生殖腺细胞凋亡结果显示,50 $\mu\text{mol/L}$ 处理组中三氯甲烷和三碘甲烷的暴露造成线虫生殖腺凋亡水平升高,且存在一定剂量依赖效应。卵母细胞数结果显示,在50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度暴露下,3种THMs的暴露均显著降低了线虫体内的卵母细胞数。子代数结果显示,仅有50 $\mu\text{mol/L}$ 处理组的三碘甲烷暴

露会显著降低线虫的子代数。**结论** THMs会造成秀丽隐杆线虫的生殖毒性,且毒性与其携带的卤族元素有关。

关键词 三卤甲烷;秀丽隐杆线虫;生殖腺细胞凋亡;卵母细胞数;子代数

中图分类号 R 123.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0005-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.002

饮用水安全与我国乃至全球公共健康息息相关。为去除自然水体中存在的有害病原体,消毒处理是饮用水净化过程中必不可少的一环。然而,消毒剂同时也会和水体中的有机物反应,生成消毒副产物(disinfection by-products, DBPs)^[1]。一系列研究^[2]表明消毒副产物对生殖系统、神经系统和消化系统存在诸多不利影响。目前已有14种消毒副产物被纳入我国《生活饮用水卫生标准》的监测目录中,但大多数消毒副产物产生的健康风险仍不明确。

2022-09-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:22006149)

作者单位:¹中国科学院合肥物质科学强磁场科学中心,合肥 230031

²中国科学技术大学研究生院科学岛分院,合肥 230026

作者简介:吴佳洁,女,硕士研究生;

杜华,男,副研究员,硕士生导师,责任作者,E-mail: huadu@ipp.ac.cn

[10] Xu H, Ren D. Lysosomal physiology [J]. Annu Rev Physiol, 2015, 77: 57-80.

[11] Yang C, Wang X. Cell biology in China: Focusing on the lysosome [J]. Traffic, 2017, 18(6): 348-57.

[12] Raben N, Puertollano R. TFEB and TFE3: Linking lysosomes to cellular adaptation to stress [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2016,

32: 255-78.

[13] Wang W, Gao Q, Yang M, et al. Up-regulation of lysosomal TRPML1 channels is essential for lysosomal adaptation to nutrient starvation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(11): E1373-81.

Golgi protein GOLPH3 regulates lysosomal biogenesis through mTORC1 signaling

Sun Yuan, Qiu Rong, Cao Xinwang

(Dept of Cellular Biology, School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the mechanism of Golgi phosphoprotein 3 (GOLPH3) regulating lysosomal biogenesis via mTORC1 signaling. **Methods** GOLPH3 knock-out (GOLPH3 KO) stable cell line was constructed by CRISPR Cas9. mTORC1 activity and the levels of TFEB and p-TFEB in the control cells and GOLPH3 KO cells were compared through Western blot. Further, lysosome-associated membrane protein LAMP1 was labelled by the means of immunofluorescence and the number of lysosomes in the control cells and GOLPH3 KO cells was compared. **Results** GOLPH3 KO suppressed mTORC1 activity significantly, decreased the cytoplasm level of p-TFEB, increased the nuclear localization of active TFEB, and promoted the lysosome biogenesis. **Conclusion** Golgi protein GOLPH3 regulates lysosome biogenesis through mTORC1 signaling.

Key words GOLPH3; mTORC1; Golgi apparatus; lysosome biogenesis