

阿司咪唑对宫颈癌细胞HeLa自噬的影响

赵菲 徐广 陈佳意 李婷 韩秋影 张学敏 潘欣*

(国家生物医学分析中心, 北京 100850)

摘要 该研究利用蛋白质免疫印迹法(Western blot)、稳定表达mCherry-EGFP-LC3B(microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, LC3)自噬双标荧光细胞、mt-Keima荧光探针活细胞扫描技术在人宫颈癌细胞HeLa中检测了多种自噬相关标志物, 探究了阿司咪唑(astemizole, AST)对HeLa细胞自噬的影响。结果表明, 阿司咪唑在HeLa细胞中引起自噬标志蛋白质LC3-II与SQSTM1/p62的显著累积, 并存在剂量和时间依赖性效应; 阿司咪唑导致HeLa细胞存活率显著降低; 用自噬抑制剂Bafilomycin A1(Baf-A1)阻断自噬流(autophagic flux)后, 再加入阿司咪唑不能促进LC3-II进一步累积; 阿司咪唑处理细胞后自噬体与自噬溶酶体的数量均显著增加; 此外, 阿司咪唑显著抑制了线粒体氧化磷酸化解偶联剂羰基氰化物间氯苯腙(carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, CCCP)导致的线粒体标志蛋白质TOMM20(translocase of outer mitochondrial membrane 20)的降解, 其线粒体自噬水平显著低于对照组。以上结果证明了阿司咪唑有抑制自噬流的作用, 导致损伤的线粒体不能被顺利降解, 并且提示该作用可能是通过抑制溶酶体功能实现的。

关键词 自噬; 阿司咪唑; mt-Keima; 线粒体

The Effect of Astemizole on Autophagy of HeLa Cells

Zhao Fei, Xu Guang, Chen Jiayi, Li Ting, Han Qiuying, Zhang Xuemin, Pan Xin*

(National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China)

Abstract To investigate the effects of Astemizole (AST) on regulating autophagy in HeLa cells, we used Western blot, mCherry-EGFP tandem fluorescent-tagged LC3B (microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, LC3) stable expression system, mt-Keima based living cell fluorescence imaging method in this study. The results of Western blot showed that AST resulted in dose- and time-dependent accumulation of LC3-II and SQSTM1/p62 in HeLa cells. And AST could not facilitate the further accumulation of LC3-II in combination with Bafilomycin A1 (Baf-A1), a blocker of autophagic flux. MTS assay presented that AST promoted cell death. The mCherry-EGFP-LC3B fluorescence system indicated that HeLa cells exposed to AST displayed greatly accumulation of autophagosomes as well as autolysosomes. Furthermore, the generic mitochondrial uncoupling agent CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) could induce mitochondrial autophagy, or mitophagy, which accompanied by the rapid degradation of mitochondrial outer membrane marker TOMM20 (translocase of outer mitochondrial membrane 20). Western blot showed that AST inhibited CCCP-induced TOMM20 degradation as chloroquine (CQ) and Baf-A1 did. In addition, the mitochondrial autophagy was obviously reduced in cells

收稿日期: 2017-12-28

接受日期: 2018-01-24

国家重大科学研究计划(批准号: 2014CB910603)和北京市科技专项(批准号: Z151100000315085)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-66931441, E-mail: xpan@ncba.ac.cn

Received: December 28, 2017

Accepted: January 24, 2018

This work was supported by the National Basic Research Program of China (Grant No.2014CB910603) and Beijing Science and Technology Projects (Grant No. Z151100000315085)

*Corresponding author. Tel: +86-10-66931441, E-mail: xpan@ncba.ac.cn

网络出版时间: 2018-04-16 11:56:37

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180416.1156.012.html>

treated with AST detected by mt-Keima. These results implied that AST could significantly inhibit autophagic flux and the clearance of damaged mitochondria in HeLa cells.

Keywords autophagy; Astemizole; mt-Keima; mitochondria

自噬是一个基本的代谢机制,是广泛存在的细胞内降解途径之一,主要参与受损细胞器和大分子量蛋白质的清理和回收过程^[1]。自噬(本文指巨自噬)过程连续有序,当自噬开始时,首先形成双层的隔离膜,进而底物被膜包裹成为自噬体,然后再与溶酶体融合成为自噬溶酶体进行底物的降解作用^[2]。大多数观点认为,自噬是一种防御和保护性机制,参与多种疾病的调控,如肿瘤、代谢疾病及神经退行性疾病等^[3-4]。适度的自噬可以确保细胞各组分的循环利用,维持细胞稳态与生存,保证机体健康^[5]。随着自噬在生物体内的重要性被逐渐揭示,调控自噬的化合物在疾病药物治疗方面的研究更是日益增多,老药新用的研究也在持续进行,如经典的抗疟疾药物氯喹(chloroquine, CQ)和大环内酯类免疫抑制药物雷帕霉素(rapamycin, RAPA)^[6-7],由于它们对于自噬的特殊调控作用而拓展了新的治疗用途。

阿司咪唑(astemizole, AST)是一种长效的组胺H1受体拮抗剂,作为第2代抗组胺类药物,经过美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准上市,具有能够被机体快速吸收并且无中枢镇静作用的优点,临床上被广泛用于过敏性鼻炎等各种过敏性症状与疾病的治疗^[8-9]。但是由于随后发现阿司咪唑可能致死的严重副作用,如引起心脏毒性反应等^[10-12],目前已经在美国等大多数国家撤市。

虽然阿司咪唑在抗过敏药的道路上停滞,但是仍不断有更多研究发现了阿司咪唑新的疾病治疗作用。在2006年就有针对于疟疾的药物筛选研究发现阿司咪唑可能具有类似于氯喹的抗疟疾作用^[9]。在朊病毒(prion)感染的小鼠模型中,阿司咪唑能够抑制朊病毒的复制,显著提高小鼠的存活率,这说明阿司咪唑可能是具有治疗朊病毒感染作用的潜在药物^[13]。而在果蝇模型中,阿司咪唑还有治疗帕金森疾病的作用^[14]。还有许多研究发现了阿司咪唑可能的抗肿瘤作用,其对于多种肿瘤都有显著的杀伤作用^[15-18]。如在人肺癌细胞系中,联合应用阿司咪唑与吉非替尼(gefitinib)可以提升吉非替尼的药效,显著抑制肺癌细胞的增殖,降低细胞生存率^[19];在

大鼠肝癌模型中,应用阿司咪唑能够显著抑制肝癌进展^[20]。多数研究认为,阿司咪唑的抗肿瘤作用是通过其靶点蛋白Eag1和hERG实现的, Eag1和hERG蛋白在多种肿瘤细胞中高表达,是肿瘤治疗潜在的新靶标^[21],阿司咪唑可以抑制Eag1和hERG蛋白活性,并且在体外和体内实验中应用阿司咪唑可以抑制Eag1和hERG蛋白高表达肿瘤的增殖^[16, 22-23]。但是在大部分研究中,阿司咪唑有效杀伤肿瘤的具体机制还尚未明确。

此外,有研究发现,阿司咪唑能够引起自噬的发生,表现在阿司咪唑处理后能够看到细胞内LC3的点状聚集以及II型LC3蛋白质累积^[24]。随后,更多研究确认了阿司咪唑能够导致LC3的变化^[13, 25],2016年, Jakhar等^[26]发现,阿司咪唑与组胺联用能够促进p53的磷酸化,并且诱导自噬,促进肿瘤细胞发生凋亡。但是,阿司咪唑对自噬进程即自噬流是否有影响,目前还尚未明确。为了进一步探讨阿司咪唑在肿瘤细胞自噬中的作用,本文研究了阿司咪唑对于宫颈癌细胞HeLa自噬流(autophagic flux)的影响,并且发现了阿司咪唑能抑制细胞内损伤线粒体的降解。

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈癌HeLa细胞购自中国科学院上海细胞库,阿司咪唑粉末购自Sigma-Aldrich公司,由二甲基亚砜(DMSO)溶解并配置成储液。

1.2 试剂及仪器

线粒体解偶联剂CCCP、TRITON X-100、蛋白酶抑制剂cocktail、LC3B、 α -tubulin、GAPDH蛋白质抗体等购自Sigma-Aldrich公司; mCherry-EGFP-LC3B(Human)慢病毒滴度液由PPL质粒与蛋白共享库提供; MTS细胞增殖检测试剂盒CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay购自Promega公司; DMEM培养基购自迈宸科技有限公司; 胎牛血清和胰蛋白酶购自Gibco公司; TOMM20蛋白质抗体购自Santa Cruz公司; SQSTM1/p62蛋白质抗体购自MBL公司; 0.45 μ mol/L聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购自GE Healthcare公司; Hoechst 33342染

液购自Invitrogen公司;其他试剂均为国产分析纯。

所有设备包括:恒温培养箱(Thermo Fisher Scientific公司),水浴锅(北京市长风仪器仪表公司),金属浴(金银杏生物科技有限公司),移液枪、低温高速离心机、常温高速离心机(Eppendorf公司),Western blot电泳槽、电泳仪(Bio-Rad公司),倒置显微镜(Olympus公司),荧光共聚焦显微成像系统LSM 510/880 Confocal Microscope (德国蔡司光学仪器公司),流式细胞分选仪(Beckman Coulter公司)。

1.3 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测蛋白质水平

收集细胞样品:细胞加药处理至预定时间后,加入RIPA细胞裂解液,收集至EP管,冰上裂解30 min。4 °C、12 000 r/min离心后收集上清,Bradford法检测蛋白质浓度。确定浓度与上样量后,取出合适体积的裂解液上清加入5×SDS上样缓冲液混匀,100 °C金属浴煮沸。Western blot:将等量的蛋白质样品上样到SDS-PAGE凝胶孔中进行电泳,转印至PVDF膜上,得到的膜利用5%脱脂牛奶封闭后分别孵育一抗、二抗还有ECL化学发光试剂,最后利用暗室显影技术获得原始胶片。

1.4 MTS法检测细胞存活率

5×10^3 个/孔HeLa细胞接种于96孔板中,待细胞贴壁后每孔换液加入配好的带阿司咪唑等化合物的DMEM培养基。在细胞培养箱中培养72 h后,每孔换液0.1 mL,加含有10 μ L MTS试剂的培养基,置细胞培养箱避光孵育2 h,在490 nm检测吸光度值。

1.5 病毒感染构建稳定表达mCherry-EGFP-LC3B的HeLa细胞系

将 2.5×10^5 个HeLa细胞接种于6孔板中,每孔加入2 mL含10% FBS的DMEM培养基,再加入50 μ L浓缩病毒液与终浓度为8 μ g/mL的多聚赖氨酸,置于细胞培养箱中培养,16 h后更换新鲜培养基,继续培养与传代扩增。

1.6 流式细胞术分选HeLa-mCherry-EGFP-LC3B细胞

将贴壁的HeLa细胞用胰蛋白酶消化收集至离心管,1×PBS清洗2次,离心后重悬至1×PBS中,吸取细胞悬液过流式管筛至流式管中,上机分选出mCherry与GFP荧光通道光强一致且发光较强的细

胞,回收至收集管中,离心重悬至大小合适的培养皿于培养箱中培养扩增。

1.7 HeLa-mCherry-EGFP-LC3B细胞荧光检测

种在玻片上的细胞用4%多聚甲醛于37 °C固定10~15 min,用1×PBS清洗后加入含0.3% Triton X-100与3% BSA的1×PBS处理10 min,再用1×PBS配置的Hoechst 33342(1:10 000)避光染核5~10 min,1×PBS避光清洗后用封片剂封片,室温避光晾干,4 °C保存或马上用于荧光共聚焦显微成像系统扫描。

1.8 mt-Keima探针的活细胞检测

将实验室保存的稳定表达有mt-Keima与GFP-Parkin的HeLa细胞种于8腔室细胞培养玻片上,待细胞贴壁后换液加入配好的含阿司咪唑等化合物的培养基,预处理2 h后同时再加入解偶联剂CCCP处理:以DMSO为对照,将CCCP由10 mmol/L的储备液稀释为终浓度10 μ mol/L,待处理的细胞同时换入含阿司咪唑等化合物与DMSO或CCCP的无酚红培养基。CCCP刺激6 h后利用荧光共聚焦显微成像系统直接进行活细胞扫描。

1.9 数据处理与统计

利用ImageJ与Volocity软件对图像进行后期处理及分析,使用Excel与GraphPad Prism软件进行数据分析和作图。数据统计结果以算术平均数与标准误(mean±S.E.M.)展示,多组独立样本平均数差异显著性的比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 视为存在显著性差异。

2 结果

2.1 阿司咪唑促进HeLa细胞的自噬体累积

评价自噬发生最经典的标志蛋白质是LC3。pro-LC3经过剪切后形成的LC3通常有LC3-I和LC3-II两种形式,LC3-I在自噬发生时会被磷脂酰乙醇胺(PE)酯化,转变为LC3-II,LC3-II再结合到自噬体前体吞噬泡(phagophore)的膜结构上,成为自噬体的标志物^[27-28]。所以,为了检测HeLa细胞中自噬发生情况随加入不同剂量阿司咪唑的变化,可以利用Western blot技术检测加药12 h后LC3-II蛋白质量的累积,以 α -tubulin作为内参以校正总上样量。图1A的结果显示,在未加阿司咪唑时LC3-II的累积很少,说明自噬未发生。随着阿司咪唑加药剂量的逐渐上升,LC3-II的累积也逐渐增加,至5.0 μ mol/L时LC3-II的累积已非常显著,证明此时细胞内有大量的自噬

体或自噬溶酶体存在。

同时, 为了检测HeLa细胞加入阿司咪唑不同时间长度后自噬发生情况的变化, 同样利用Western blot技术检测加入10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的阿司咪唑后LC3-II蛋白质质量的累积, 以 α -tubulin作为内参。根据图1B的结果来看, 首先加药0 h组的LC3-II较少, 此时细胞中仅有少量的自噬体。在加入阿司咪唑3 h后即观察到了LC3-II的显著累积。随着阿司咪唑加药时间逐渐延长, LC3-II的累积增加, 12 h之后LC3-II的累积变化进入平台期, 证明HeLa细胞在加入阿司咪唑后细胞内很快就累积了大量的自噬体或自噬溶酶体。

另一方面, 在哺乳动物中, SQSTM1/p62作为LC3与泛素化底物的连接蛋白, 可以用来评价自噬流, SQSTM1/p62的累积往往提示了自噬流可能被抑制^[29]。由图1结果显示, 在HeLa细胞中加入阿司咪唑能导致SQSTM1/p62的蛋白质水平呈剂量依赖性与时间依赖性增加, 提示阿司咪唑可能具有抑制自

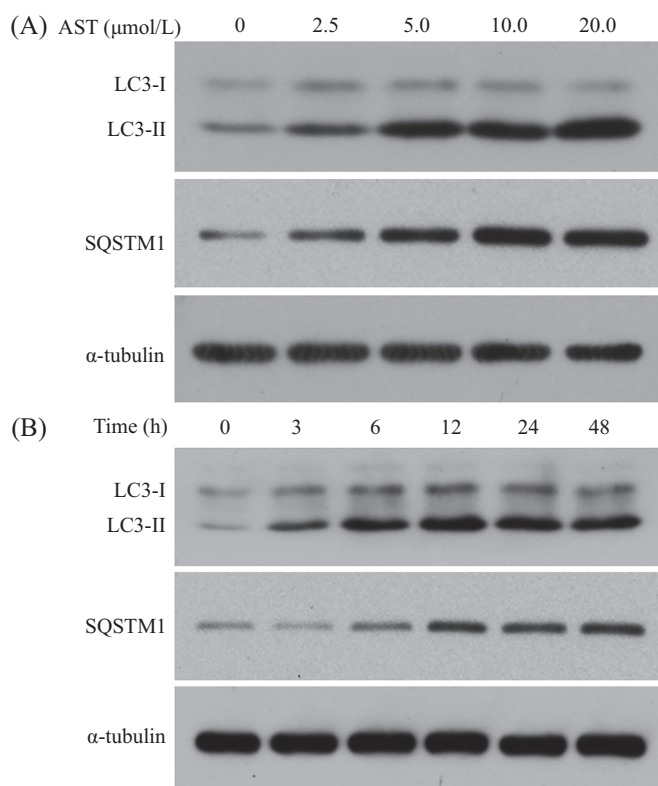
噬流的作用。

2.2 阿司咪唑促进HeLa细胞死亡

根据文献中的描述, 阿司咪唑能够促进肿瘤细胞的死亡^[15-16], 在HeLa细胞中也发现了阿司咪唑抑制增殖与促进凋亡的作用^[22]。为了在本研究体系中验证阿司咪唑的作用, 利用MTS法分别检测了HeLa细胞在加入DMSO、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿司咪唑、20.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿司咪唑、25.0 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹72 h之后细胞的存活情况。根据图2的结果, 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿司咪唑与25.0 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹能导致HeLa细胞10%~20%的死亡率, 而加入20.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿司咪唑后, HeLa细胞几乎完全不能存活, 死亡率为97%~98%。该结果验证了阿司咪唑具有促进HeLa细胞死亡的作用。

2.3 阿司咪唑抑制HeLa细胞的自噬流

细胞中自噬体数量增多有两种可能的原因: 一是自噬被诱导发生, 二是自噬体的降解被抑制, 即自噬流被抑制。为了明确阿司咪唑导致自噬体数量增多的机制, 通过加入100 nmol/L自噬抑制剂Baf-

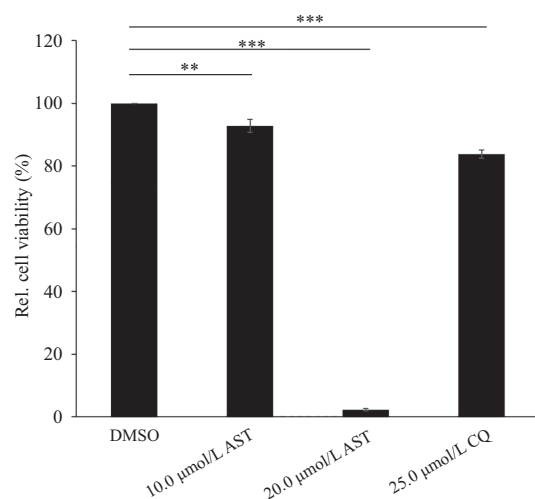


A: Western blot分析不同剂量阿司咪唑处理12 h后对自噬相关蛋白质(LC3B-I/LC3B-II、SQSTM1)水平影响; B: Western blot分析10.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿司咪唑不同时长处理对LC3-II蛋白质水平影响。

A: HeLa cells were exposed to various concentrations of AST for 12 h. The levels of autophagy-related proteins (LC3B-I/LC3B-II, SQSTM1) were detected by Western blot analysis; B: 10.0 $\mu\text{mol/L}$ AST affected the protein level of LC3-II at different time points.

图1 阿司咪唑使HeLa细胞的LC3-II与SQSTM1呈剂量与时间依赖性增加

Fig.1 Astemizole increased the protein levels of LC3-II and SQSTM1 in HeLa cells in a dose- and time-dependent manner

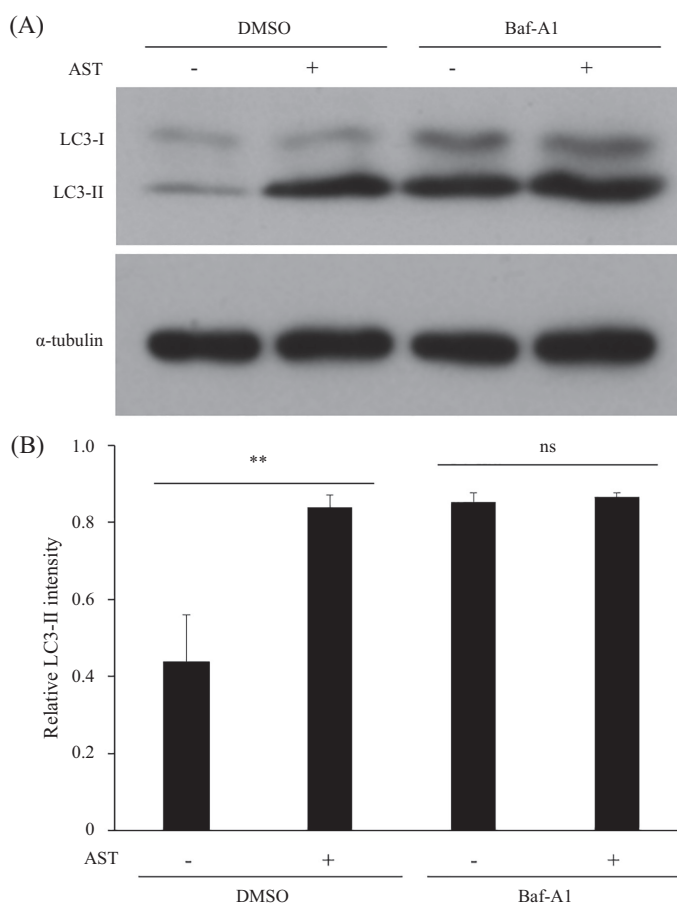


MTS法检测不同剂量阿司咪唑处理72 h对HeLa细胞存活的影响。实验独立重复3次, 每次实验DMSO组的值标准化为100%, One-Way ANOVA。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

HeLa cells were treated with various concentrations of AST or chloroquine for 72 h. MTS assays were performed to assess cell survive. The experiment was repeated three times independently, the value of DMSO group was normalized to 100%, One-Way ANOVA. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图2 阿司咪唑促进HeLa细胞死亡

Fig.2 Astemizole promotes cell death in HeLa cells



A: Western blot分析细胞加入10.0 μmol/L阿司咪唑与100 nmol/L Baf-A1 12 h后LC3-II蛋白质水平; B: 4次独立重复实验的半定量结果统计, One-Way ANOVA。 ** $P < 0.01$; ns: 无显著差异。

A: HeLa cells were treated with 10.0 μmol/L AST and 100 nmol/L Baf-A1 for 12 h as indicated, the lysate was analyzed by Western blot; B: the semi-quantitative results of LC3-II proteins in four independent experiments, One-Way ANOVA. ** $P < 0.01$; ns: not significant.

图3 阿司咪唑在HeLa细胞中抑制自噬流

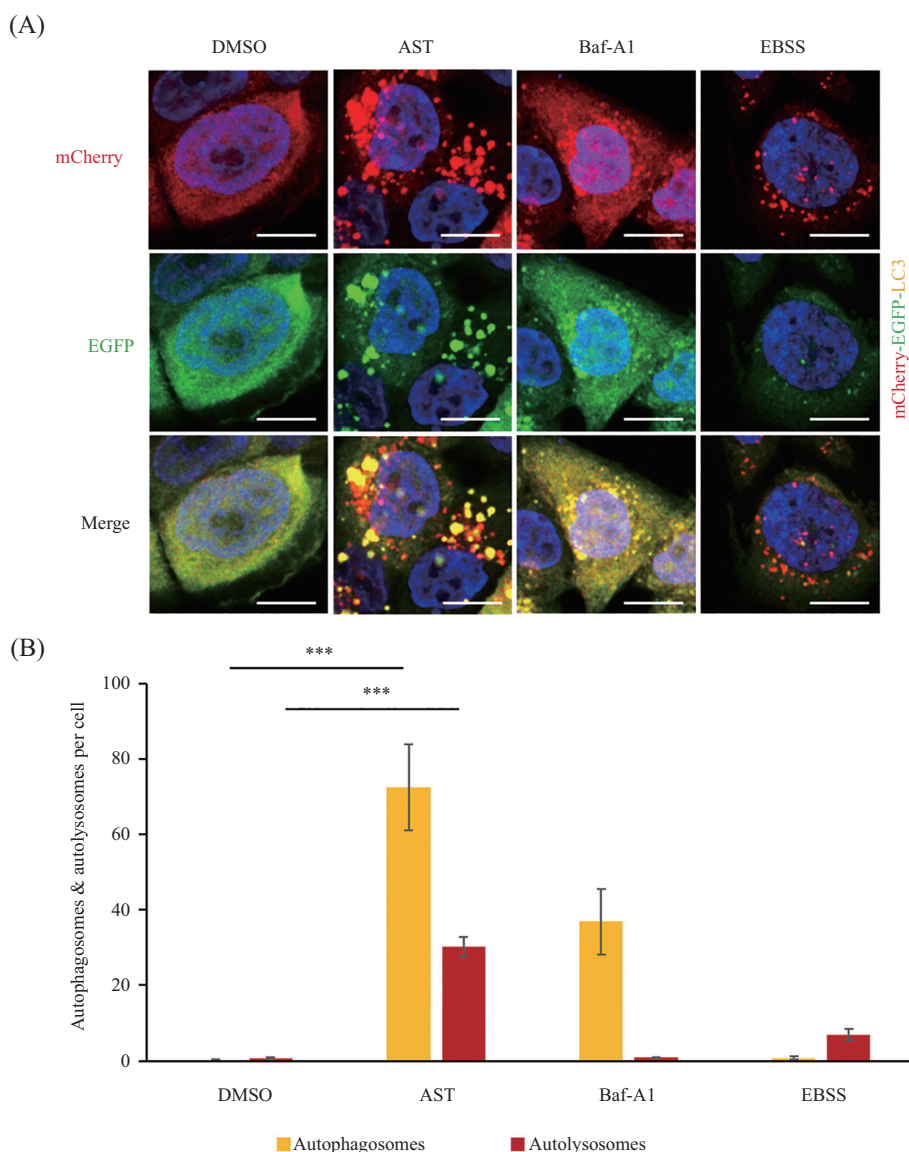
Fig.3 Astemizole inhibits autophagic flux in HeLa cells

A1(Bafilomycin A1)阻断自噬流, 抑制自噬体的降解, 同时再加入10.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿司咪唑, 12 h后检测自噬体标志蛋白质LC3-II是否进一步累积来判断阿司咪唑对于自噬体形成或降解的作用。根据图3的结果分析, DMSO对照组LC3-II的累积较少, 不影响自噬; 单加阿司咪唑或Baf-A1组的LC3-II都发生了累积, 说明它们都能影响自噬进程。最后一组在加入Baf-A1后, 阻断了自噬体降解, 再加入阿司咪唑, LC3-II并没有发生进一步累积, 说明阿司咪唑并不

促进自噬体形成, 而是与Baf-A1的功能类似, 抑制了自噬流。

2.4 阿司咪唑使HeLa细胞内的自噬体与自噬溶酶体累积

为了更进一步揭示阿司咪唑对于宫颈癌细胞HeLa自噬流的影响, 利用mCherry-EGFP-LC3B串联荧光蛋白自噬双标系统检测自噬体与自噬溶酶体的数量变化(图4)。用mCherry-EGFP-LC3B(Human)慢病毒滴度液构建稳定表达mCherry-EGFP-LC3B的



A: 细胞加入10.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿司咪唑或100 nmol/L Baf-A1或饥饿处理(EBSS) 9 h后, mCherry-EGFP-LC3B荧光表示的自噬流变化情况, 标尺=10 μm ; B: 根据A图图像的定量统计结果, 统计每个细胞LC3强光点的面积总和, 以0.05 μm^2 计为一个LC3 puncta, 每组统计细胞数 $n>50$, One-Way ANOVA. *** $P<0.001$ 。

A: HeLa cells were exposed to 10.0 $\mu\text{mol/L}$ AST, 100 nmol/L Baf-A1 and EBSS for 9 h as indicated. Autophagic flux indicated by mCherry-EGFP-LC3B fluorescence, Scale bars=10 μm ; B: the number of LC3 puncta per cell in each group, $n>50$. One-Way ANOVA. *** $P<0.001$.

图4 阿司咪唑使HeLa细胞的自噬体与自噬溶酶体显著增多

Fig.4 Astemizole resulted in the accumulation of autophagosomes and autolysosomes in HeLa cells

HeLa细胞, 荧光显微镜观察细胞可以分别看到红色荧光与绿色荧光, 说明稳定表达细胞构建成功。由于mCherry与GFP共同表达, 自噬体上的LC3呈现黄色荧光(红光和绿光同时存在)。酸敏感的GFP荧光在进入酸性的溶酶体环境后会发生淬灭, mCherry继续发光, 所以自噬体与功能正常溶酶体融合形成的自噬溶酶体上的LC3点发红光。自噬发生后, 通过统计红点和黄点个数可以指示自噬体与自噬溶酶体的数量, 自噬溶酶体比自噬体数量的比值越高, 说明自噬流越顺畅, 反之表示自噬流受阻^[30-31]。为便于统计, 利用软件分别计算出mCherry或GFP荧光通道下每个细胞的LC3强光点的面积总和, 以 $0.05\ \mu\text{m}^2$ 计为一个LC3 puncta。

根据图4的结果, 在处理9 h后, DMSO对照组细胞不发生自噬, 呈现均匀的黄光; 以Baf-A1作为抑制自噬流的对照, 细胞中出现了大量的黄色自噬体, 红色的自噬溶酶体偏少; 以饥饿处理(EBSS)作为促进自噬且自噬流顺畅的对照, 细胞的黄色自噬体很少, 而红色的自噬溶酶体较多; 加入阿司咪唑的实验组出现了大量的黄色自噬体, 也有大量红色的自噬溶酶体, 且自噬体与自噬溶酶体在该焦面的面积较大。对于大量红色的自噬溶酶体的出现有两种解释: 一是阿司咪唑促进了自噬的发生, 二是阿司咪唑可能抑制了自噬流过程中自噬体和溶酶体融合之后的阶段, 即抑制了溶酶体的降解功能, 造成了自噬溶酶体大量累积^[32]。结合图3的结果, 自噬流被Baf-A1阻断后加入AST并不能使LC3-II指示的自噬体累积有进一步的增加, 并且大量黄色自噬体的累积说明自噬体的降解确实出现了障碍, 所以第二种解释较为合理。最终, 该现象证明了阿司咪唑抑制了自噬流, 并且很可能是通过抑制溶酶体的功能而抑制自噬溶酶体对于其内容物的有效降解。

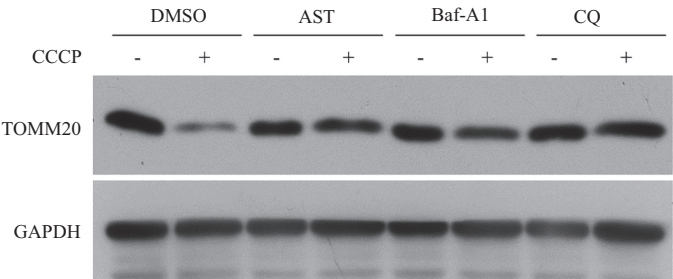
2.5 阿司咪唑抑制HeLa细胞受损线粒体的清除

自噬是肿瘤细胞抵抗外界恶劣环境从而存活的机制。目前已有大量自噬流抑制剂被报道具有促进肿瘤细胞死亡、促进化疗效果的作用^[33], 而线粒体在该过程中扮演着十分重要的角色^[34-35]。若自噬被抑制, 细胞内受损的线粒体无法及时被清除, 会释放凋亡因子, 从而促进细胞凋亡过程激活^[36]。而阿司咪唑抑制自噬流的作用很有可能是其促进肿瘤细胞凋亡的主要原因之一。为了确认阿司咪唑对于宫颈癌细胞HeLa受损线粒体降解过程的影响, 利用线

粒体解偶联剂CCCP模拟线粒体损伤, 诱导线粒体自噬的发生, 根据线粒体外膜标志蛋白质TOMM20的降解情况指示受损线粒体的降解。图5的Western blot结果显示, DMSO组的自噬流顺畅, TOMM20能够顺利发生降解; 作为抑制线粒体降解的对照, 自噬抑制剂Baf-A1与氯喹显著抑制了CCCP刺激下TOMM20的降解。阿司咪唑与Baf-A1和氯喹的作用相同, 显著抑制了TOMM20的降解, 证明了其具有抑制受损线粒体降解的作用。

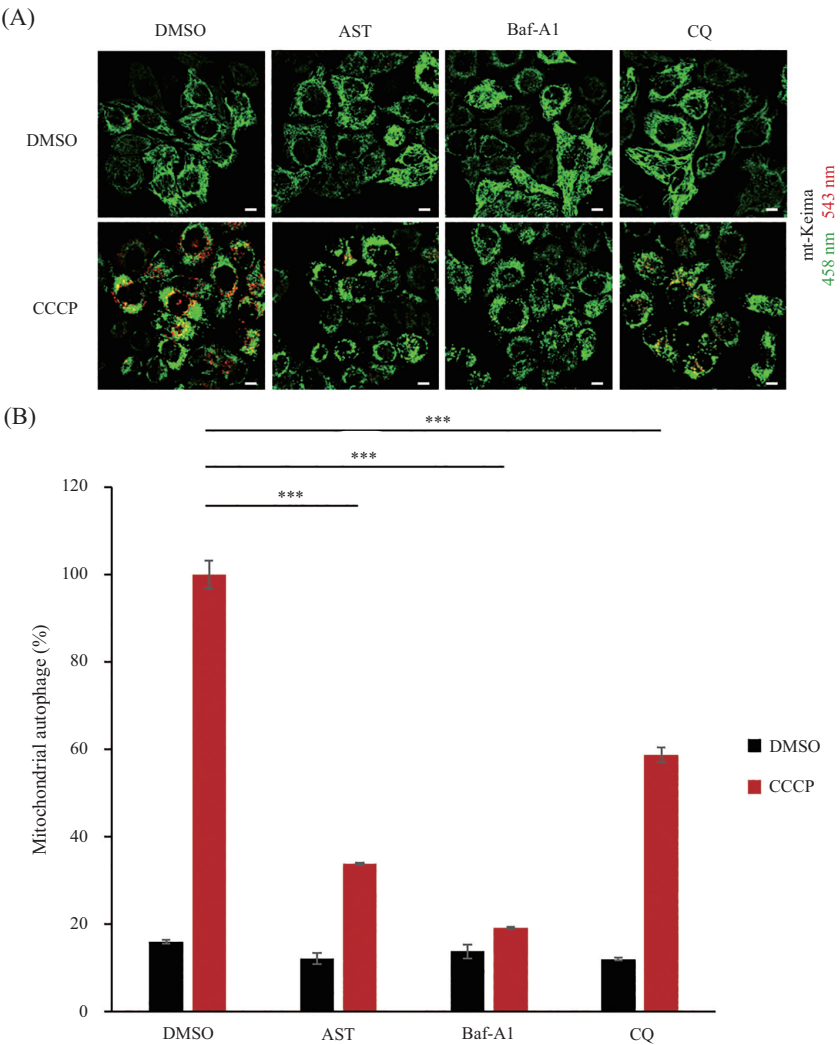
Keima是一种来源于珊瑚虫的荧光蛋白, 能在进入溶酶体后不被降解, 是近年来兴起的用于检测自噬的一项新技术。Keima的发射峰在620 nm, 双激发峰为440和586 nm, 当Keima蛋白质存在于pH值较高的胞质中时中性状态占主导地位, 激发峰主要在440 nm, 图中标记为绿光; 当自噬发生后, 胞质中的Keima随自噬体进入溶酶体, 在酸性溶酶体环境中, pH值较低, Keima发生电离, 激发峰变为以586 nm为主, 图中标记为红光。Keima的双激发峰随自噬进程发生动态变化, 因此, Keima能够在活细胞中实时动态地指示自噬流进程^[37-38]。为了更好地观察线粒体自噬的情况, 2011年的另一项研究将COXVIII的线粒体定位序列与Keima进行融合表达, 得到了线粒体定位的mt-Keima, 可以指示线粒体的降解过程^[39]。

为了验证阿司咪唑对受损线粒体清除的抑制作用, 利用CCCP刺激稳定表达mt-Keima与Parkin的HeLa细胞模拟线粒体损伤的发生, 根据mt-Keima荧光由绿转红的情况来指示受损线粒体是否进入功能正常的溶酶体中, 根据图6的活细胞荧光扫描结果, DMSO组在未加刺激的情况下, mt-Keima显示绿光并且有良好的线粒体定位, 加入CCCP后mt-Keima标记的丝状线粒体变成了大量点状聚集, 并且许多点状聚集显示红光, 说明线粒体受损后能很快形成自噬体并且运输进入酸化的溶酶体进行降解。抑制自噬流的对照Baf-A1组在加入CCCP后mt-Keima标记的线粒体出现大量点状聚集, 但是未有红光出现, 说明受损线粒体可能进入自噬体, 但是自噬体不能正常与溶酶体融合或者溶酶体功能受到了抑制。抑制溶酶体功能的对照氯喹组在加入CCCP后mt-Keima标记的线粒体也呈现大量点状聚集, 并且只有些许红光出现, 说明受损线粒体发生自噬进入了溶酶体, 但是大部分溶酶体的功能都受到了抑制。在阿司咪唑组, 可以看到与氯喹组类似的现象, 并且CCCP刺



HeLa细胞用10.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿司咪唑、100 nmol/L Baf-A1或25 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹预处理2 h后再加入10 $\mu\text{mol/L}$ CCCP处理18 h, Western blot检测TOMM20蛋白质水平变化情况。
HeLa cells were pretreated with AST (10.0 $\mu\text{mol/L}$), or Baf-A1 (100 nmol/L), or CQ (25 $\mu\text{mol/L}$) for 2 h, then exposed to CCCP (10 $\mu\text{mol/L}$) for 18 h. The protein level of TOMM20 was detected by Western blot.

图5 阿司咪唑抑制HeLa细胞受损线粒体的清除
Fig.5 Astemizole inhibits clearance of damaged mitochondria through autophagy



A: HeLa细胞用10.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿司咪唑、100 nmol/L Baf-A1或25 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹预处理2 h再加入10 $\mu\text{mol/L}$ CCCP处理6 h后, mt-Keima荧光表示的线粒体自噬情况, 标尺=10 μm ; B: 根据A图图像的荧光定量统计结果(543 nm/458 nm), DMSO加CCCP刺激组的值标准化为100%, 每组统计细胞数 $n>50$, One-Way ANOVA. *** $P<0.001$ 。
A: HeLa cells were pretreated with AST (10.0 $\mu\text{mol/L}$), or Baf-A1 (100 nmol/L), or CQ (25 $\mu\text{mol/L}$) for 2 h, then exposed to CCCP (10 $\mu\text{mol/L}$) for 6 h. Mitochondria autophagy indicated by mt-Keima fluorescence, Scale bars=10 μm ; B: fluorescence quantitative results of mt-Keima per cells in each group (543 nm/458 nm), the value of DMSO group with CCCP was normalized to 100%, $n>50$, One-Way ANOVA. *** $P<0.001$.

图6 mt-Keima验证阿司咪唑抑制HeLa细胞受损线粒体的清除
Fig.6 Astemizole inhibits clearance of damaged mitochondria through autophagy detected by mt-Keima fluorescence

激后出现的mt-Keima红点较氯喹组更少,证明阿司咪唑能显著抑制受损线粒体的降解。

3 讨论

自噬作为一种进化上高度保守的细胞内物质清理和更新的机制,能够维持细胞能量与物质的稳态,多数观点认为,抑制自噬流的正常进程会导致细胞内稳态的破坏,从而使机体发生异常,如在衰老个体以及神经退行性疾病中常能观察到受损细胞成分的累积^[40-41]。此外,自噬在肿瘤细胞的生存中也起着至关重要的作用,肿瘤细胞通过激活自噬可以耐受营养及能量的缺乏、抵抗放化疗治疗,在恶劣的生存环境中更好地存活并增殖扩散^[42],抑制自噬流能够促进肿瘤细胞凋亡,所以抑制自噬流已经成为目前抗肿瘤以及肿瘤治疗联合用药的研究热点,如经典的自噬流抑制剂氯喹就被发现能够逆转乳腺癌对他莫昔芬的耐药^[43-44]。

线粒体作为细胞能量代谢的中心站点,在细胞自噬与凋亡的交互作用中也占据着相当重要的地位。一方面,线粒体容易受到多种外界因素的影响而发生损伤,损伤的线粒体能够进行分裂融合以及诱导自噬发生从而维持细胞内线粒体的平衡与稳态,而且损伤线粒体释放的细胞色素c能够在促进细胞发生凋亡的同时促进细胞启动保护性的自噬,保护细胞抵抗凋亡^[45-46]。另一方面,如果细胞自噬流被异常阻断,会导致损伤的线粒体不能被正常清除而发生大量累积,线粒体功能障碍以及损伤线粒体的外膜通透性发生改变,释放促凋亡蛋白质细胞色素c,能够促进线粒体相关的凋亡发生^[36,47]。许多化疗药可以导致肿瘤细胞的线粒体损伤,同时联用抑制自噬流的药物能够进一步促进肿瘤细胞的死亡,从而达到更好的肿瘤治疗效果^[34]。

目前,越来越多类似氯喹的阳离子双亲化合物被报道具有影响溶酶体功能而抑制自噬流的作用,如siramesine^[48-49]。2016年,据文献报导,阿司咪唑即属于该类化合物中的一种,高剂量的阿司咪唑可能导致溶酶体膜不稳定的细胞死亡,其与化疗药联用时可以增强肿瘤细胞对化疗的敏感性,进一步促进肿瘤细胞的死亡,从而可以起到治疗肿瘤的作用^[50]。根据我们研究中的发现可以解释阿司咪唑对宫颈癌细胞HeLa的杀伤作用,阿司咪唑可能通过对溶酶体的影响抑制了自噬流,并且通过抑制受损线粒体的

降解促进了宫颈癌细胞HeLa凋亡。有研究在大鼠的肝细胞中发现,阿司咪唑更倾向于分布在膜结构上,还有一部分聚集在溶酶体中^[51]。所以,对于阿司咪唑通过影响溶酶体的功能来影响自噬体的正常清除的推测也有了空间分布上的基础。当然,这些假设还有待进一步通过实验来验证。

综上所述,阿司咪唑在宫颈癌细胞HeLa中抑制自噬流与抑制损伤线粒体正常清除的功能可能在肿瘤细胞中具有普遍性,并且可能是其能够杀伤肿瘤细胞并且促进化疗药物杀伤肿瘤细胞的原因之一。作为一个曾经上市的FDA药物,人们对其安全性的研究也较其他新开发的化合物透彻,阿司咪唑虽然有潜在的副作用,但是其在治疗致死率高的癌症中仍可能发挥作用,这也为肿瘤的治疗提供了一个新的思路与手段。

参考文献 (References)

- 1 Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J* 2017; 36(13): 1811-36.
- 2 Nixon RA, Yang DS. Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; doi: 10.1101/cshperspect.a008839.
- 3 Ulamek-Kozioł M, Furmaga-Jablonska W, Januszewski S, Brzozowska J, Scisłowska M, Jablonski M, *et al.* Neuronal autophagy: self-eating or self-cannibalism in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2013; 38(9): 1769-73.
- 4 Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11(9): 709-30.
- 5 Ho TT, Warr MR, Adelman ER, Lansinger OM, Flach J, Verovskaya EV, *et al.* Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature* 2017; 543(7644): 205-10.
- 6 Graziotto JJ, Cao K, Collins FS, Kraine D. Rapamycin activates autophagy in Hutchinson-Gilford progeria syndrome: implications for normal aging and age-dependent neurodegenerative disorders. *Autophagy* 2012; 8(1): 147-51.
- 7 Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Isaka Y. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res* 2013; 73(1): 3-7.
- 8 Wang X, Hockerman GH, Green HW 3rd, Babbs CF, Mohammad SI, Gerrard D, *et al.* Mergla K⁺ channel induces skeletal muscle atrophy by activating the ubiquitin proteasome pathway. *FASEB J* 2006; 20(9): 1531-3.
- 9 Chong CR, Chen X, Shi L, Liu JO, Sullivan DJ Jr. A clinical drug library screen identifies astemizole as an antimalarial agent. *Nat Chem Biol* 2006; 2(8): 415-6.
- 10 Paakkari I. Cardiotoxicity of new antihistamines and cispripide. *Toxicol Lett* 2002; 127(1/2/3): 279-84.
- 11 Zhou Z, Vorperian VR, Gong Q, Zhang S, January CT. Block

- of HERG potassium channels by the antihistamine astemizole and its metabolites desmethylastemizole and norastemizole. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999; 10(6): 836-43.
- 12 Lee EH, Oh JH, Park HJ, Kim DG, Lee JH, Kim CY, *et al.* Simultaneous gene expression signature of heart and peripheral blood mononuclear cells in astemizole-treated rats. *Arch Toxicol* 2010; 84(8): 609-18.
- 13 Karapetyan YE, Sferrazza GF, Zhou M, Ottenberg G, Spicer T, Chase P, *et al.* Unique drug screening approach for prion diseases identifies tacrolimus and astemizole as antiprion agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(17): 7044-9.
- 14 Styczynska-Soczka K, Zechini L, Zografos L. Validating the predicted effect of astemizole and ketoconazole using a drosophila model of Parkinson's disease. *Assay Drug Dev Technol* 2017; 15(3): 106-12.
- 15 Jangi SM, Diaz-Perez JL, Ochoa-Lizarralde B, Martin-Ruiz I, Asumendi A, Perez-Yarza G, *et al.* H1 histamine receptor antagonists induce genotoxic and caspase-2-dependent apoptosis in human melanoma cells. *Carcinogenesis* 2006; 27(9): 1787-96.
- 16 Garcia-Quiroz J, Camacho J. Astemizole: an old anti-histamine as a new promising anti-cancer drug. *Anticancer Agents Med Chem* 2011; 11(3): 307-14.
- 17 Khalife R, El-Hayek S, Tarras O, Hodroj MH, Rizk S. Antiproliferative and proapoptotic effects of topotecan in combination with thymoquinone on acute myelogenous leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014; 14 Suppl: S46-55.
- 18 Peng X, Wang F, Li L, Bum-Erdene K, Xu D, Wang B, *et al.* Exploring a structural protein-drug interactome for new therapeutics in lung cancer. *Mol Biosyst* 2014; 10(3): 581-91.
- 19 Chavez-Lopez MG, Zuniga-Garcia V, Hernandez-Gallegos E, Vera E, Chasiquiza-Anchatuna CA, Viteri-Yanez M, *et al.* The combination astemizole-gefitinib as a potential therapy for human lung cancer. *Onco Targets Ther* 2017; 10: 5795-803.
- 20 de Guadalupe Chavez-Lopez M, Perez-Carreón JI, Zuniga-Garcia V, Diaz-Chavez J, Herrera LA, Caro-Sanchez CH, *et al.* Astemizole-based anticancer therapy for hepatocellular carcinoma (HCC), and Eag1 channels as potential early-stage markers of HCC. *Tumour Biol* 2015; 36(8): 6149-58.
- 21 Asher V, Sowter H, Shaw R, Bali A, Khan R. Eag and HERG potassium channels as novel therapeutic targets in cancer. *World J Surg Oncol* 2010; 8: 113.
- 22 de Guadalupe Chavez-Lopez M, Hernandez-Gallegos E, Vazquez-Sanchez AY, Gariglio P, Camacho J. Antiproliferative and proapoptotic effects of astemizole on cervical cancer cells. *Int J Gynecol Cancer* 2014; 24(5): 824-8.
- 23 Garcia-Quiroz J, Garcia-Becerra R, Santos-Martinez N, Barrera D, Ordaz-Rosado D, Avila E, *et al.* *In vivo* dual targeting of the oncogenic Ether-a-go-go-1 potassium channel by calcitriol and astemizole results in enhanced antineoplastic effects in breast tumors. *BMC Cancer* 2014; 14: 745.
- 24 Morissette G, Lodge R, Bouthillier J, Marceau F. Receptor-independent, vacuolar ATPase-mediated cellular uptake of histamine receptor-1 ligands: possible origin of pharmacological distortions and side effects. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 229(3): 320-31.
- 25 Hu WW, Yang Y, Wang Z, Shen Z, Zhang XN, Wang GH, *et al.* H1-antihistamines induce vacuolation in astrocytes through macroautophagy. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 260(2): 115-23.
- 26 Jakhar R, Paul S, Bhardwaj M, Kang SC. Astemizole-Histamine induces Beclin-1-independent autophagy by targeting p53-dependent crosstalk between autophagy and apoptosis. *Cancer Lett* 2016; 372(1): 89-100.
- 27 Green DR, Levine B. To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell* 2014; 157(1): 65-75.
- 28 Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol* 2008; 445: 77-88.
- 29 Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016; 12(1): 1-222.
- 30 N'Diaye EN, Kajihara KK, Hsieh I, Morisaki H, Debnath J, Brown EJ. PLIC proteins or ubiquilins regulate autophagy-dependent cell survival during nutrient starvation. *EMBO Rep* 2009; 10(2): 173-9.
- 31 Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140(3): 313-26.
- 32 Li DL, Wang ZV, Ding G, Tan W, Luo X, Criollo A, *et al.* Doxorubicin blocks cardiomyocyte autophagic flux by inhibiting lysosome acidification. *Circulation* 2016; 133(17): 1668-87.
- 33 Zhao X, Fang Y, Yang Y, Qin Y, Wu P, Wang T, *et al.* Elaiophyllin, a novel autophagy inhibitor, exerts antitumor activity as a single agent in ovarian cancer cells. *Autophagy* 2015; 11(10): 1849-63.
- 34 Zhou J, Li G, Zheng Y, Shen HM, Hu X, Ming QL, *et al.* A novel autophagy/mitophagy inhibitor liensinine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy through DNM1L-mediated mitochondrial fission. *Autophagy* 2015; 11(8): 1259-79.
- 35 Qu X, Sheng J, Shen L, Su J, Xu Y, Xie Q, *et al.* Autophagy inhibitor chloroquine increases sensitivity to cisplatin in QBC939 cholangiocarcinoma cells by mitochondrial ROS. *PLoS One* 2017; 12(3): e0173712.
- 36 Wang Y, Xia C, Lv Y, Li C, Mei Q, Li H, *et al.* Crosstalk influence between P38MAPK and autophagy on mitochondria-mediated apoptosis induced by anti-Fas antibody/actinomycin D in human hepatoma Bel-7402 cells. *Molecules* 2017; 22(10): 55.
- 37 Proikas-Cezanne T, Codogno P. A new fluorescence-based assay for autophagy. *Chem Biol* 2011; 18(8): 940-1.
- 38 Violot S, Carpentier P, Blanchoin L, Bourgeois D. Reverse pH-dependence of chromophore protonation explains the large Stokes shift of the red fluorescent protein mKeima. *J Am Chem Soc* 2009; 131(30): 10356-7.
- 39 Katayama H, Kogure T, Mizushima N, Yoshimori T, Miyawaki A. A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic events based on lysosomal delivery. *Chem Biol* 2011; 18(8): 1042-52.
- 40 Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell* 2011; 146(5): 682-95.
- 41 Orr ME, Oddo S. Autophagic/lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2013; 5(5): 53.
- 42 Thorburn A, Thamm DH, Gustafson DL. Autophagy and cancer therapy. *Mol Pharmacol* 2014; 85(6): 830-8.
- 43 Zamudio-Vazquez R, Ivanova S, Moreno M, Hernandez-Alvarez MI, Giralte E, Bidon-Chanal A, *et al.* A new quinoxaline-containing peptide induces apoptosis in cancer cells by autophagy

- modulation. *Chem Sci* 2015; 6(8): 4537-49.
- 44 Cook KL, Warri A, Soto-Pantoja DR, Clarke PA, Cruz MI, Zwart A, *et al.* Hydroxychloroquine inhibits autophagy to potentiate antiestrogen responsiveness in ER+ breast cancer. *Clin Cancer Res* 2014; 20(12): 3222-32.
- 45 Colell A, Ricci JE, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, *et al.* GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* 2007; 129(5): 983-97.
- 46 Herman-Antosiewicz A, Johnson DE, Singh SV. Sulforaphane causes autophagy to inhibit release of cytochrome C and apoptosis in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66(11): 5828-35.
- 47 de la Mata M, Cotan D, Villanueva-Paz M, de Laveria I, Alvarez-Cordoba M, Luzon-Hidalgo R, *et al.* Mitochondrial dysfunction in lysosomal storage disorders. *Diseases* 2016; 4(4): 55-9.
- 48 Petersen NH, Olsen OD, Groth-Pedersen L, Ellegaard AM, Bilgin M, Redmer S, *et al.* Transformation-associated changes in sphingolipid metabolism sensitize cells to lysosomal cell death induced by inhibitors of acid sphingomyelinase. *Cancer Cell* 2013; 24(3): 379-93.
- 49 Ostefeld MS, Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Fehrenbacher N, Olsen OD, Groth-Pedersen L, *et al.* Anti-cancer agent siramesine is a lysosomotropic detergent that induces cytoprotective autophagosome accumulation. *Autophagy* 2008; 4(4): 487-99.
- 50 Ellegaard AM, Dehlendorff C, Vind AC, Anand A, Cedervist L, Petersen NHT, *et al.* Repurposing Cationic Amphiphilic Antihistamines for Cancer Treatment. *EBio Medicine* 2016; 9: 130-9.
- 51 Waterkeyn C, Laduron P, Meuldermans W, Trouet A, Schneider YJ. Uptake, subcellular distribution and biotransformation of 3H-labelled astemizole in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1987; 36(23): 4129-36.