

# 过表达ESCRT系统成员提升细胞应对U18666A 诱发胆固醇积聚的能力

贾志娟 谭伟 王亚茹 蔡莹 陈澄\*

(中国医科大学生命科学院发育细胞生物学教研室, 教育部医学细胞生物学重点实验室, 沈阳 110122)

**摘要** U18666A是一种细胞通透性的两亲性氨基类固醇, 能够抑制胆固醇的转运与多泡体的生成, 导致细胞内胆固醇的积聚, 造成细胞凋亡。该研究发现, U18666A处理MLE12细胞后转运必需的内体分选复合体(endosomal sorting complexes required for transport, ESCRT)系统相关蛋白表达降低。该实验构建了过表达ESCRT-III系统成员Vps24以及Chmp1b的转基因细胞系, 发现与转空载体的细胞相比, 转基因细胞对抗U18666A引发的胆固醇积聚以及后续生理效应的能力有所增强。以上结果提示U18666A可以干扰ESCRT系统的一部分功能诱发细胞内胆固醇积聚, 为人类与胆固醇积聚相关疾病的防治提供了新的思路。

**关键词** U18666A; ESCRT系统; 胆固醇积聚

## Overexpression of ESCRT System Members Enhances Cells' Ability to Cope with U18666A-Induced Cholesterol Accumulation

Jia Zhijuan, Tan Wei, Wang Yaru, Cai Ying, Chen Cheng\*

(Department of Developmental Cell Biology, School of Life Sciences, China Medical University,  
Key Laboratory of Medical Cell Biology, Ministry of Education of the PRC, Shenyang 110122, China)

**Abstract** U18666A is a cell-permeable amphiphilic aminosteroid that inhibits the transport of cholesterol and the formation of multivesicular bodies, promotes the accumulation of intracellular cholesterol, and causes apoptosis. We found that endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) system-related protein expression decreased in MLE12 cells treated by U18666A. Transgenic cell lines that overexpressed ESCRT-III system members Vps24 or Chmp1b were constructed. Compared with cells which transfected empty vector, Vps24 or Chmp1b over expression transgenic cells have an increased ability to counteract the accumulation of cholesterol and subsequent physiological effects induced by U18666A. These results suggest that U18666A may interfere with some functions of ESCRT system and provide a new approach to the prevention and treatment of cholesterol accumulation related diseases.

**Keywords** U18666A; ESCRT system; cholesterol accumulation

转运必需的内体分选复合体(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)是一个广泛存在于酵母与真核动植物细胞中的高度保守的多功能

系统, 包括ESCRT-0、I、II、III复合体和Vps4-Vtal辅助因子家族<sup>[1]</sup>。ESCRT系统在内体和多泡体形成<sup>[2-3]</sup>、胞质分裂时的膜切割<sup>[4]</sup>等一系列膜重构过程中起关

收稿日期: 2018-11-15 接受日期: 2019-03-11

国家自然科学基金(批准号: 31271231)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13386881932, E-mail: chchen@cmu.edu.cn

Received: November 15, 2018 Accepted: March 11, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31271231)

\*Corresponding author. Tel: +86-13386881932, E-mail: chchen@cmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-06-13 17:45:24

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190613.1745.016.html>

键作用,同时在miRNA的活性调控<sup>[5]</sup>等方面具有重要的作用。ESCRT系统参与受体信号通路调控<sup>[6]</sup>、上皮细胞极性维持<sup>[7]</sup>、细胞膜及内体溶酶体膜损伤修复<sup>[8-9]</sup>、核膜重建<sup>[10]</sup>、细胞坏死<sup>[11]</sup>、病毒出芽<sup>[12]</sup>等多种重要细胞生命活动调控。

多泡体的形成与病毒出芽分泌、外泌体分泌、特定细胞内板层小体的形成等多种细胞生理活动相关。在多泡体形成过程中ESCRT-0结合泛素化蛋白作为多泡体腔内囊泡负载物,ESCRT-I、II在ESCRT-0蛋白负载物分选区引发膜的内陷。ESCRT-III包括CHMP1~7,ESCRT-III复合体在内体向腔内突出形成的囊泡锥形颈部组装,募集酶对负载物去泛素化,随后进行膜切割,将小泡释放到内体腔内<sup>[3]</sup>。此过程中Chmp1b募集AAA型ATP酶Vps4,通过水解ATP为上述活动提供能量并使ESCRT-III复合体解聚以重新利用<sup>[13]</sup>。Vps24即Chmp3,和其他复合体成员一起在多泡体腔内囊泡形成过程中的膜的内陷与囊泡的切除过程中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。

U18666A是一种细胞通透性的两亲性氨基类固醇,最初作为抑制胆固醇合成治疗药物上市,后因产生严重副作用退市。早期研究显示,U18666A可以影响多种与胆固醇代谢相关的合成酶、还原酶等的功能<sup>[15]</sup>。目前研究发现,U18666A是细胞内胆固醇转运的抑制剂,能够抑制胆固醇由溶酶体向晚期内体以及反面高尔基网的转运,造成细胞溶酶体内胆固醇积聚,细胞的病理改变与NPC-1突变导致的C型尼曼匹克病(Niemann-Pick disease)相似<sup>[16]</sup>。在二型肺泡上皮细胞中,U18666A还促进胆固醇在的标志细胞器板层小体(lamellar body)积聚,这是和NPC-1相关的<sup>[17]</sup>。U18666A能够干扰细胞内多泡体的形成,抑制HIV、丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV)等病毒以出芽方式释放出细胞<sup>[18-19]</sup>。U18666A所参与调控的多泡体相关的功能与ESCRT系统有所重叠。U18666A所引发的细胞生理现象与ESCRT系统的关系是一个值得深思的问题。

本研究使用分别过表达ESCRT-III复合体成员Chmp1b和Vps24的转基因MLE12细胞系作为材料,对比正常MLE12细胞以及转空载体的细胞,检查了U18666A诱发转基因细胞胆固醇积聚能力的变化,分析了U18666A对转基因细胞生存能力的影响,对U18666A和ESCRT系统的调控关系作了初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

小鼠肺上皮细胞株MLE12细胞为美国南加州大学医学院史伟博士惠赠。Hites培养液: RPMI 1640培养基(GIBCO, 430-1800EA)含有5 µg/mL Insulin(Sigma-Aldrich, I2643)、10 µg/mL Transferrin(Sigma-Aldrich, T2036-100MG)、10 mmol/L HEPES(Sigma-Aldrich, H-0887)、10 nmol/L Hydrocortisone(Sigma-Aldrich, H-0888)、10 nmol/L β-Estradiol(Sigma-Aldrich, E-2758-250MG)、2 mmol/L Penicillin/streptomycin(Sigma, P-0781)、L-Glutamine(sigma-Aldrich, G-7513)、2%胎牛血清(Hyclone, SH30084.03)、亚硒酸钠(生工生物工程股份(上海)有限公司, S0321) 30 nmol/L; 实验试剂包括: U18666A(Sigma-Aldrich, U3633)、Vps24抗体(Abcam, ab175930)、Chmp1b抗体(Genetex, GTX32520)、β-tubulin抗体(Santa Cruz, SC-5274)、Vps4抗体(Santa Cruz, SC-32922)、C-myc抗体(Santa Cruz, SC-40)、羊抗小鼠IgG-HRP(凯基生物, KGAA37)、Rabbit IgG anti-body(HRP)(Genetex, GTX213110-01)、Alexa Flour™ 488 donkey anti-rabbit IgG(H+L)(Invitrogen, A21206)、lipofectamine 2000 Transfection Reagent(Invitrogen, 11668-027)、G418 sulfate(生工生物工程股份(上海)有限公司, A100859-0001)、菲律宾菌素Filipin(大连美仑生物技术有限公司, MB1848)。

### 1.2 仪器与设备

实验器材包括: 二氧化碳培养箱(德国Heraeus, cell 150)、共聚焦荧光显微镜Nikon ECLIPSE Ti2(日本 Nikon公司)、电泳仪、蛋白湿转装置、化学发光成像系统(上海天能科技有限公司)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 MLE12细胞培养于Hites培养液中,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中培养。

1.3.2 Western blot检测U18666A干预MLE12细胞后ESCRT系统成员的表达 取对数生长期的MLE12细胞,以2×10<sup>5</sup>/孔的密度接种于6孔板,置于培养箱中培养24 h后加入药物U18666A,药物终浓度分别为0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 µg/mL,对照组加入等体积的DMSO。收集U18666A诱导48 h后的细胞,提取细胞总蛋白,BCA法蛋白定量后加入SDS上样缓冲液,煮沸5 min使其充分变性。SDS-PAGE电泳后,90 V×40 min转移至PVDF膜。5%脱脂牛奶封闭1 h,加

一抗4 °C摇床孵育过夜, PBST洗膜后加入相应HRP二抗, 室温孵育1 h, PBST清洗后采用化学发光成像系统检测。以 $\beta$ -tubulin为内参, 计算各组蛋白相对表达量, 实验重复3次。

**1.3.2 间接免疫荧光法检测U18666A对细胞的影响** 取对数生长期的MLE12细胞, 分别以 $5 \times 10^5$ /孔的密度接种于放置有爬片的35 mm的细胞培养皿中, 实验组加入终浓度为2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的U18666A, 对照组加入相同体积的DMSO。处理48 h后弃掉原培养液, PBS洗3次, 用多聚甲醛固定10 min后吸掉固定液, PBS洗3次, 之后室温下封闭60 min(封闭缓冲液: 5%山羊血清、0.3% Triton X-100的PBS液); 吸出封闭液加一抗置于4 °C冰箱孵育过夜; PBS洗3次后避光加二抗孵育1 h; 最后PBS洗3次, 用带有DAPI的封片剂封片, 然后在共聚焦荧光显微镜下观察实验结果。

**1.3.3 过表达Vps24、Chmp1b、Vector的MLE12稳转细胞系的构建** 取对数生长期的MLE12细胞, 以 $6 \times 10^5$ /孔的密度接种于6孔板, 培养24 h, 待细胞汇合度达到80%时, 更换无血清培养液进行转染, 转染MLE12细胞6 h更换正常培养液继续培养。换液培养24 h后做10倍以上稀释培养。稀释培养24 h, 使用100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 筛选剂量G418筛选细胞, 每3天换液1次, 持续筛选15天直至形成肉眼可见的清晰的单克隆细胞团。将具有抗性的阳性克隆挑取后转入96孔板培养, 逐级放大培养, 最终Western blot检测转基因产物的表达并保存阳性克隆, 即得到过表达Vps24、Chmp1b、Vector的MLE12细胞系, 分别命名为MLE12-VPS24、MLE12-CHMP1B、MLE12-VECTOR。

**1.3.4 Filipin染色法检测U18666A诱导细胞胆固醇积聚** 取对数生长期的MLE12细胞、MLE12-VPS24细胞、MLE12-CHMP1B细胞、MLE12-VECTOR细胞。浓度效应: 各细胞系以 $4 \times 10^4$ /孔的密度接种于24孔板内, 培养24 h后。每一种细胞系的实验组加入终浓度为0.1、0.2、0.4、0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的U18666A, 对照组加入相同体积的DMSO。诱导24 h后, 对以上细胞用1 $\times$ PBS洗3次, 4%多聚甲醛固定20 min, 1 $\times$ PBS洗3次, 1.5 mg/mL甘氨酸室温孵育10 min, 1 $\times$ PBS简单漂洗1次, 用Filipin染色液室温染色1 h后, 弃去染色液, 1 $\times$ PBS漂洗3次, 荧光显微镜镜检(340/430 nm), 对以上细胞计数胆固醇明显积聚的细胞与总细胞的

比值。时间效应: 各细胞系以 $8 \times 10^4$ 孔的密度接种于24孔板内, 培养24 h后, 加入终浓度为0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的U18666A, 于药物诱导4、8、16 h后按上述方法进行细胞Filipin染色, 荧光显微镜镜检(340/430 nm)并计数胆固醇明显积聚的细胞与总细胞的比值。

**1.3.5 生长曲线显示U18666A干预细胞后细胞的生长情况** 取对数生长期的MLE12细胞、MLE12-VECTOR细胞、MLE12-VPS24细胞和MLE12-CHMP1B细胞, 分别以 $2 \times 10^4$ /孔的密度接种于24孔板内, 培养24 h后, 分别回收然后消化、收集以上四种细胞加入0.4%的锥虫蓝(Trypan Blue)溶液, 直接用细胞计数仪TC20计数, 每种细胞重复3次收集计数, 此时计数值设为原点。在余下孔中加入0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的U18666A, 于24、48、72 h分别回收然后消化、收集以上四种细胞加入0.4% Trypan Blue溶液直接细胞计数仪TC20计数, 每种细胞重复3次收集计数。分别计算各时间点, 四种细胞的活细胞数与总细胞数的比值, 计算各细胞的存活率。比较各细胞在各时间点的细胞存活率的差异。

**1.3.6 统计学分析** Western blot结果采用ImageJ软件处理。数据处理均采用GraphPad Prism 6.0软件对数据进行统计分析, 结果以means $\pm$ S.E.M.表示, 组间差异比较采用t检验, \* $P < 0.05$ 为差异具有显著性, \*\* $P < 0.01$ 为差异具有极显著性。

## 2 结果

### 2.1 U18666A干预MLE12细胞后多个ESCRT系统成员的表达降低

通过终浓度为0.5、1.0、2.0、4.0、6.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的U18666A处理MLE12细胞48 h后收集蛋白做Western blot可以观察到, 随着U18666A浓度的升高, ESCRT系统成员中的Vps4、Vps24、Chmp1b相对 $\beta$ -tubulin的总体趋势是降低的(图1)。

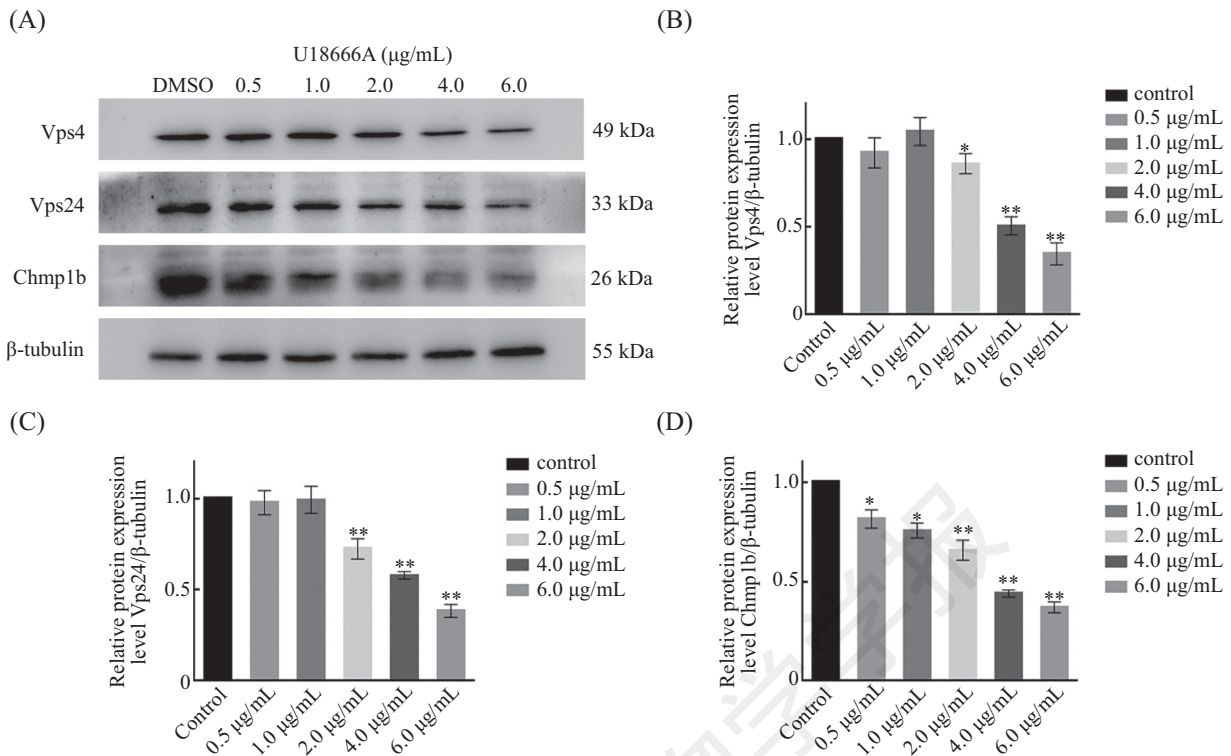
### 2.2 免疫荧光检测U18666A干扰后Chmp1b蛋白的分布情况

我们对2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  U18666A干扰48 h后MLE12细胞进行了免疫细胞荧光染色。与对照组相比, U18666A诱导组细胞Chmp1b在细胞核和胞质中都有分布(图2)。

### 2.3 成功构建过表达Chmp1b、Vps24的MLE12的稳转细胞系

我们分别将pcDNA3.1/myc-his-B-chmp1b、



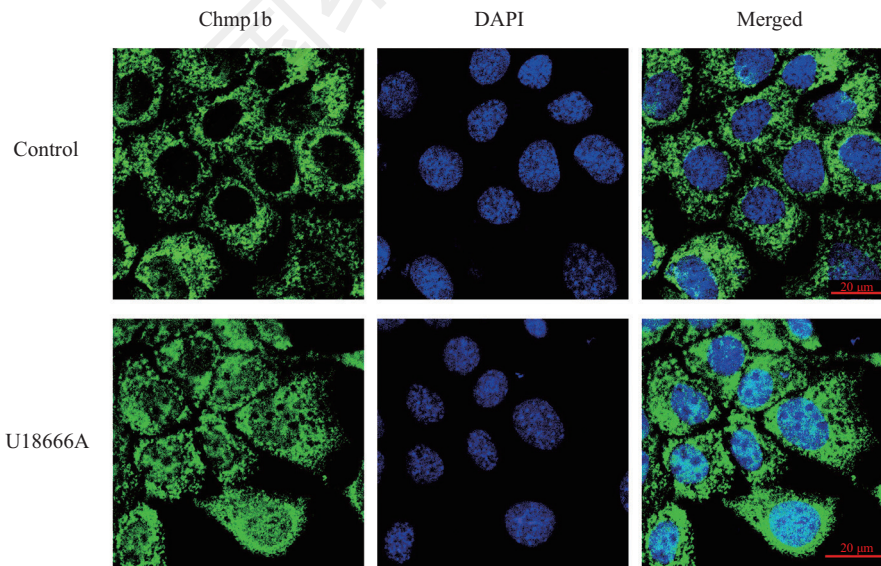


A: Western blot检测不同剂量的U18666A干预MLE12细胞ESCRT系统成员Vps4、Vps24和Chmp1b蛋白表达量,电泳图为3次实验选出的代表性图; B~D: Vps4、Vps24和Chmp1b条带的半定量分析,各蛋白与其对应的对照组相比。柱条代表means±S.E.M., *t*检验, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较,  $n = 3$ 。

A: Western blot was used to detect the expression of Vps4, Vps24 and Chmp1b in different doses of U18666A in ESCRT system of MLE12 cells. Representative picture from 3 independent experiments was shown; B-D: semi-quantitative analysis of Vps4, Vps24 and Chmp1b bands, each protein compared with its corresponding control group. The bar represents mean±S.E.M., *t* test, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group,  $n = 3$ .

图1 Western blot检测U18666A干预MLE12细胞后ESCRT系统成员的表达

Fig.1 Western blot analysis of the expression of ESCRT system members after U18666A intervention in MLE12 cells



免疫细胞荧光染色观察对照组和U18666A(2 μg/mL)干预组MLE12细胞Chmp1b蛋白的分布。绿色Chmp1b(Alexa Flour™ 488), 蓝色DAPI, 标尺=20 μm。Immunofluorescence observation of Chmp1b protein distribution in MLE12 cells of control group and U18666A (2 μg/mL) intervention group. Green is Chmp1b(Alexa Flour™ 488), Blue is DAPI. Scale bars=20 μm.

图2 间接免疫荧光法检测U18666A对细胞的影响

Fig.2 Indirect immunofluorescence assay for the effect of U18666A on cells

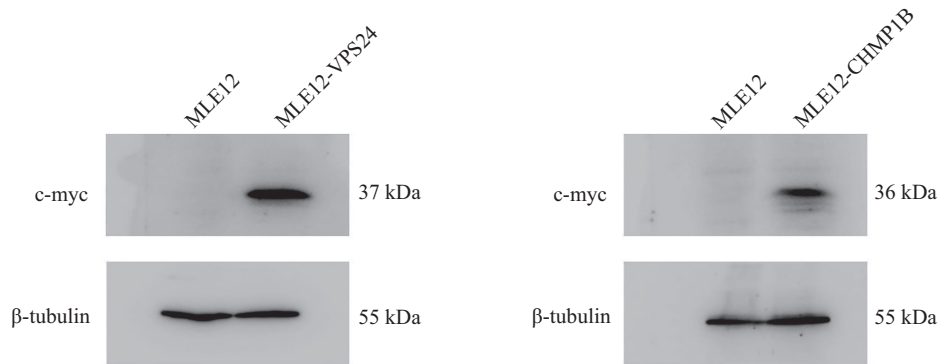


图3 Western blot鉴定过表达Vps24、Chmp1b的转基因细胞系

Fig.3 Western blot analysis of transgenic cell lines overexpressing Vps24 and Chmp1b

pcDNA3.1/myc-his-B-vps24质粒转染到MLE12细胞, 经过G418稳定筛选后扩大培养, 应用Western blot技术检测myc-tag蛋白表达情况, 筛选得到稳转细胞系MLE12-VPS24、MLE12-CHMP1B, 成功构建两种分别过表达Chmp1b和Vps24的MLE12的稳转细胞系(图3)。

#### 2.4 浓度效应上过表达Vps24或Chmp1b提升了细胞抵抗U18666A引发胆固醇积聚的能力

采用终浓度为0.1、0.2、0.4、0.8  $\mu\text{g/mL}$ 的U18666A分别处理MLE12、MLE12-VECTOR、MLE12-VPS24、MLE12-CHMP1B细胞系。结果显示, MLE12细胞和MLE12-VECTOR在U18666A浓度为0.2  $\mu\text{g/mL}$ 时已经出现明显的胆固醇积聚, 而MLE12-VPS24和MLE12-CHMP1B在U18666A浓度为0.4  $\mu\text{g/mL}$ , 才有明显积聚(图4)。

#### 2.5 时间效应上过表达Vps24或chmp1b提升了细胞抵抗U18666A引发胆固醇积聚的能力

采用终浓度为0.5  $\mu\text{g/mL}$ 的U18666A分别处理MLE12、MLE12-VECTOR、MLE12-VPS24、MLE12-CHMP1B细胞系。结果显示, MLE12细胞和MLE12-VECTOR在U18666A干扰第8 h时即可出现胆固醇的积聚, 而MLE12-VPS24和MLE12-CHMP1B在U18666A干扰8 h时, 很少有胆固醇的积聚。16 h后才有胆固醇的积聚(图5)。

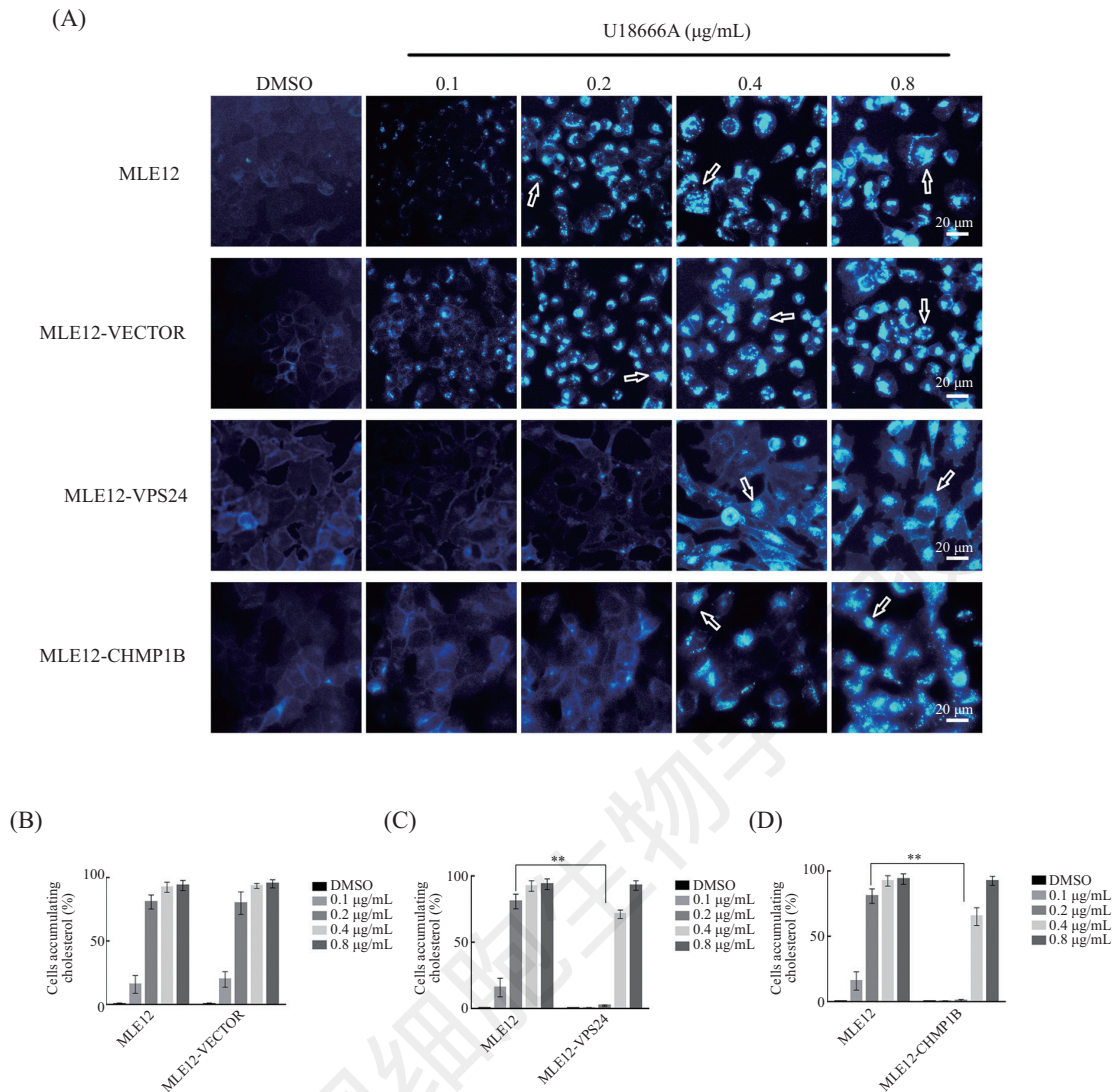
#### 2.6 U18666A对各细胞存活率的影响

分别于24、48、72 h回收计数各组细胞, 每点重复3次。分析显示, 各细胞系在U18666A处理后, 存活率都会下降。但在72 h时MLE12-VPS24和MLE12-CHMP1B细胞系存活率比MLE12、MLE12-VECTOR细胞系高, 且有统计学意义(图6)。

### 3 讨论

真核细胞的内膜系统将真核细胞分隔形成不同的功能区室。而以内体、多泡体、溶酶体为代表的囊泡转运系统负担细胞各个功能区室之间以及细胞之间的物质输送、信息传递、胞内物质的降解、重复利用及排放。任何基因突变或化学物质造成的囊泡结构破坏或囊泡内化学环境(如pH值、 $\text{Ca}^{2+}$ 等关键离子、脂质成分等)改变, 均会导致囊泡转运系统的异常, 对细胞正常生命活动会造成严重干扰甚至导致细胞死亡。U18666A是一种细胞通透性的两性亲性氨基类固醇, 是一种溶酶体趋向性化合物。溶酶体趋向性化合物进入细胞内的溶酶体源囊泡后, 受囊泡内酸性环境的影响造成自身带电荷情况等的改变, 导致其难以扩散出溶酶体源囊泡, 从而富集于溶酶体源囊泡, 进而改变了其所富集的囊泡内的化学环境<sup>[20-21]</sup>。U18666A是二类溶酶体趋向性化合物, 通常在微摩尔每升浓度水平即可产生致死效应。我们可以通过改变U18666A的浓度, 不同程度地干扰细胞囊泡转运系统的功能。

我们的实验结果说明, ESCRT系统与U18666A发挥生物学作用密切相关。文献证实了ESCRT系统在多泡体形成中起重要作用<sup>[2-3]</sup>, ESCRT-III和Vps4在HCV、HIV和HBV病毒经由多泡体途径出芽方面具有重要的作用<sup>[22-25]</sup>, 而如影随形, U18666A也能干扰多泡体形成以及阻止相同的病毒经由多泡体的出芽<sup>[19,25-26]</sup>。这提示, ESCRT-III和U18666A这二者之间可能存在某种联系。我们发现高浓度U18666A处理导致的细胞死亡同时有多种ESCRT成员表达降低, 而细胞过表达ESCRT-III复合体成员Chmp1b或Vps24(即Chmp3)能够提升细胞对U18666A诱发的



A: Filipin染色检测在不同浓度的U18666A干预下胆固醇的积聚情况, DAPI通道(340/430 nm)观察, 标尺=20  $\mu\text{m}$ , 空心箭头: 胆固醇积聚的细胞。B~D: 不同浓度U18666A处理的各细胞系染色拍照后随机选取3个不同的区域, 计数Filipin染色明显阳性的细胞所占总细胞的百分比, 柱条代表  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ ,  $t$ 检验,  $**P < 0.01$ 。

A: Filipin staining detected cholesterol accumulation under different concentrations of U18666A intervention, DAPI channel (340/430 nm) observation, scale bars=20  $\mu\text{m}$ , open arrows: cells accumulating cholesterol, B~D: randomly selected 3 different regions in each cell lines treated by different concentrations of U18666A, the percentage of cells that were significantly positive for Filipin staining was counted. The bars represent  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ ,  $t$ -test,  $**P < 0.01$ .

图4 Filipin染色检测不同剂量的U18666A干预细胞后胆固醇积聚情况

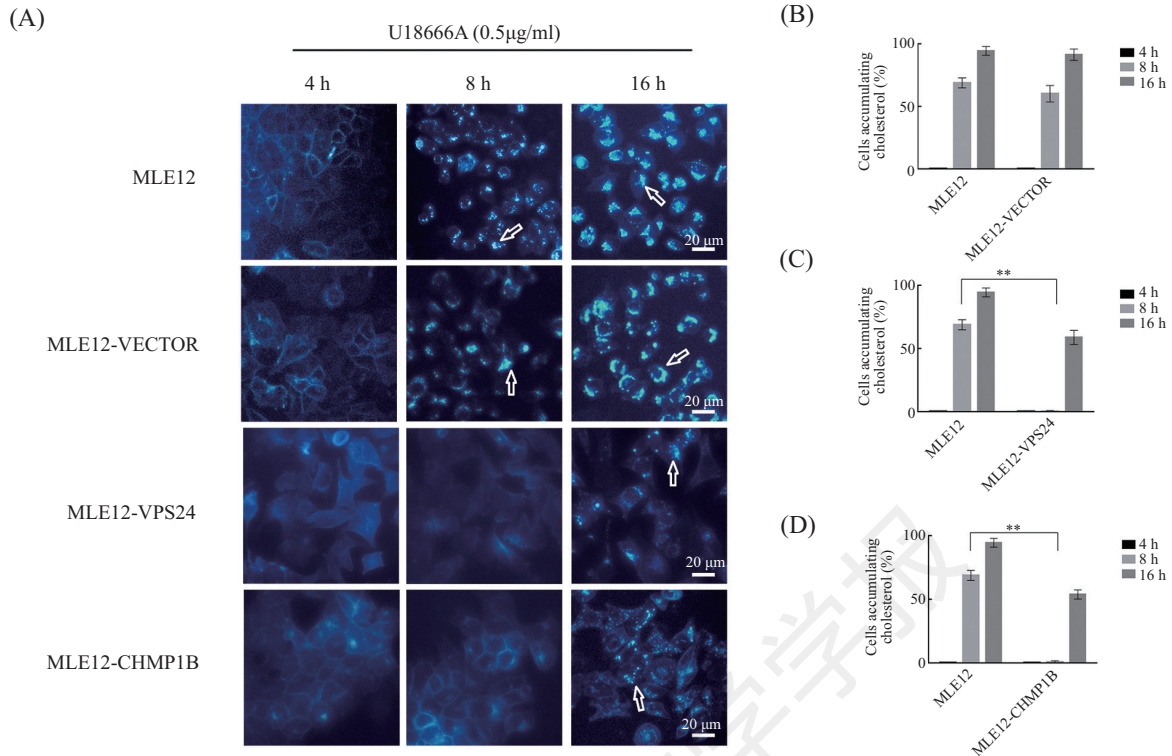
Fig.4 Filipin staining to detect cholesterol accumulation after different doses of U18666A intervention cells

胆固醇积聚的抵抗性, 在一定程度上缓解U18666A处理导致的细胞死亡。这说明, ESCRT-III复合体可能是U18666A发挥生物学作用的重要靶点。

U18666A影响ESCRT系统功能的机制仍不清楚。ESCRT系统行使功能时需要多种蛋白质分子的有序参与, 一个相对稳定的微环境对ESCRT系统的逐步组装十分重要。微量的二类溶酶体趋向性化合物U18666A进入细胞后首先向溶酶体源囊泡富集, 导致囊泡内的鞘氨醇浓度升高,  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度下降<sup>[27]</sup>, 有研

究表明,  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度会影响ESCRT系统的组装<sup>[9,28]</sup>。因此U18666A改变了引发ESCRT系统组装所必须的微环境, 可能影响了ESCRT系统组装, 进而导致功能异常。而转基因细胞过表达的Chmp1b或Vps24提升了待组装的相应的ESCRT-III复合体成员单体的浓度, 可能通过促进ESCRT系统组装, 在一定程度上纠正了U18666A富集改变溶酶体源囊泡微环境的不利影响, 使得诱发转基因细胞胆固醇积聚所需U18666A浓度上升, 或者需要更多的时间富集更多



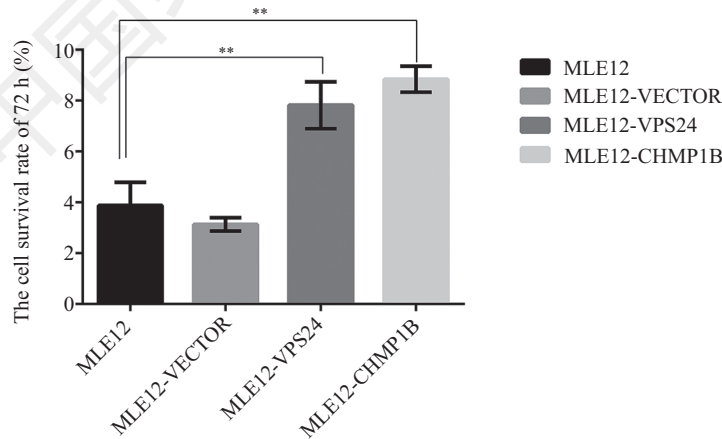


A: Filipin染色检测在不同时间点的U18666A干预下胆固醇的积聚情况, DAPI通道(340/430 nm)观察, 标尺=20 μm, 空心箭头: 胆固醇积聚的细胞。B~D: 各细胞系U18666A处理后不同时间点, 染色, 拍照, 随机选取3个不同的区域, 计数Filipin染色明显阳性的细胞所占总细胞的百分比, 柱条代表mean±S.E.M., *t*检验, \*\**P*<0.01。

A: Filipin staining was used to detect the accumulation of cholesterol under the intervention of U18666A at different time points. DAPI channel (340/430 nm) observation, scale bars=20 μm, open arrows: cells with cholesterol accumulation, B-D: each cell lines treated by U18666A in different time points were stained and take picture. Randomly selected 3 different regions to count significantly positive cells for Filipin staining. The bar represents mean±S.E.M, *t* test, \*\**P*<0.01.

图5 Filipin染色检测U18666A干预细胞后不同时间点的胆固醇积聚情况

Fig.5 Filipin staining to detect cholesterol accumulation at different time points after U18666A intervention in cells



细胞计数法检测72 h活细胞数, 计算活细胞数所占总细胞数的百分比, 柱条代表means±S.E.M., *t*检验, \*\**P*<0.01。

The number of viable cells in 72 h was measured by cytometry, and the percentage of the total number of viable cells was counted. The bar represents mean±S.E.M., *t* test, \*\**P*<0.01.

图6 72 h时各细胞的存活率

Fig.6 Survival rate of each cell at 72 h

的U18666A才能诱发转基因细胞胆固醇积聚。另外高浓度U18666A处理MLE12细胞时观察到有部分

细胞ESCRT-III复合体成员Chmp1b分布在细胞核中, 说明U18666A有可能会对Chmp1b的分布产生干扰。

理清U18666A和ESCRT系统互作的机制将是未来工作的重要方向。

我们的实验结果还从一个新的角度说明了ESCRT系统参与了细胞内胆固醇的转运。此前有研究探讨了ESCRT系统和胆固醇转运的关系,发现同时敲减Vps4A和Vps4B的表达影响胆固醇转运造成类似C型尼曼匹克病的胆固醇积聚,可是单独抑制CHMP3、CHMP4B、CHMP4C和CHMP6并未造成胆固醇积聚,但却影响了ESCRT系统功能,表现为抑制EGF诱发的EGFR降解<sup>[29]</sup>。还有研究证实,敲减ESCRT-0成员Hrs/Vps27表达造成胆固醇积聚,但未改变NPC-1和NPC-2表达模式,单独敲减ESCRT系统其他成员Tsg101、Eap20、Chmp6也未造成胆固醇积聚<sup>[30]</sup>,因此,ESCRT系统与胆固醇转运的关系仍存争议。我们认为,ESCRT各成员间可能有一些功能上的重叠或互补,同时敲减Vps4A和Vps4B的表达对胆固醇转运影响大于单独敲减任何一个就是一个证明<sup>[29]</sup>。ESCRT还是一个多功能系统,现在没有能全面说明ESCRT系统功能的金标准,多是根据ESCRT系统具体的某项功能开展工作,而ESCRT系统某一项功能的状况不一定能说明另一项功能状况。考虑到同时敲减多个ESCRT成员可能对细胞产生其他不利影响,我们从过表达ESCRT系统成员的角度开展工作,观察到新的结果,说明ESCRT系统的对胆固醇转运是有影响的。但是ESCRT系统化解胆固醇积聚促进胆固醇转运的机制仍然不清楚,ESCRT系统既有可能募集一些蛋白促进胆固醇向内质网的转运,也可能通过促进内体溶酶体腔内囊泡形成,将多余的胆固醇包装,进而以外泌体的形式排出胞外,这还需要更多的工作。从ESCRT系统入手,可以为研究C型尼曼匹克病病变机制提供新的思路。

### 参考文献 (References)

- Hurley JH. ESCRTs are everywhere. *EMBO J* 2015; 34(19): 2398-407.
- Frankel EB, Audhya A. ESCRT-dependent cargo sorting at multivesicular endosomes. *Semin Cell Dev Biol* 2018; 74: 4-10.
- Wollert T, Hurley JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 2010; 464(7290): 864-9.
- Sadler JBA, Wenzel DM, Williams LK, Guindo-Martinez M, Alam SL, Mercader JM, *et al.* A cancer-associated polymorphism in ESCRT-III disrupts the abscission checkpoint and promotes genome instability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115(38): E8900-8.
- Lee YS, Pressman S, Andress AP, Kim K, White JL, Cassidy JJ, *et al.* Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nat Cell Biol* 2009; 11(9): 1150-6.
- Wegner CS, Rodahl LM, Stenmark H. ESCRT proteins and cell signalling. *Traffic* 2011; 12(10): 1291-7.
- Dukes JD, Fish L, Richardson JD, Blaikley E, Burns S, Caunt CJ, *et al.* Functional ESCRT machinery is required for constitutive recycling of claudin-1 and maintenance of polarity in vertebrate epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2011; 22(17): 3192-205.
- Jimenez AJ, Maiuri P, Lafaurie-Janvore J, Divoux S, Piel M, Perez F. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science* 2014; 343(6174): 1247136.
- Skowyra ML, Schlesinger PH, Naismith TV, Hanson PI. Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair. *Science* 2018; 360(6384): eaar5078.
- Olmos Y, Hodgson L, Mantell J, Verkade P, Carlton JG. ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. *Nature* 2015; 522(7555): 236-9.
- Gong YN, Guy C, Olauson H, Becker JU, Yang M, Fitzgerald P, *et al.* ESCRT-III acts downstream of MLKL to regulate necroptotic cell death and its consequences. *Cell* 2017; 169(2): 286-300 e16.
- Morita E, Sandrin V, McCullough J, Katsuyama A, Baci Hamilton I, Sundquist WI. ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe* 2011; 9(3): 235-42.
- Liu Z, Wang L, Tan H, Zhou S, Fu T, Xia Y, *et al.* Synthesis of 1H-indazoles from N-tosylhydrazones and nitroaromatic compounds. *Chem Commun (Camb)* 2014; 50(39): 5061-3.
- Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 2009; 458(7235): 172-7.
- Koh CH, Cheung NS. Cellular mechanism of U18666A-mediated apoptosis in cultured murine cortical neurons: bridging Niemann-Pick disease type C and Alzheimer's disease. *Cell Signal* 2006; 18(11): 1844-53.
- Higgins ME, Davies JP, Chen FW, Ioannou YA. Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Mol Genet Metab* 1999; 68(1): 1-13.
- Roszell BR, Tao JQ, Yu KJ, Huang S, Bates SR. Characterization of the Niemann-Pick C pathway in alveolar type II cells and lamellar bodies of the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 302(9): L919-32.
- Chapuy-Regaud S, Subra C, Requena M, de Medina P, Amara S, Delton-Vandenbroucke I, *et al.* Progesterone and a phospholipase inhibitor increase the endosomal bis(monoacylglycero)phosphate content and block HIV viral particle intercellular transmission. *Biochimie* 2013; 95(9): 1677-88.
- Elgner F, Ren H, Medvedev R, Ploen D, Himmelsbach K, Boller K, *et al.* The intracellular cholesterol transport inhibitor U18666A inhibits the exosome-dependent release of mature hepatitis C virus. *J Virol* 2016; 90(24): 11181-96.
- de Duve C, de Barsey T, Poole B, Trouet A, Tulkens P, Van Hoof F. Commentary lysosomotropic agents. *Biochem Pharmacol* 1974; 23(18): 2495-531.
- Marceau F, Bawolak MT, Lodge R, Bouthillier J, Gagne-Henley A, Gaudreault RC, *et al.* Cation trapping by cellular acidic



- compartments: beyond the concept of lysosomotropic drugs. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 259(1): 1-12.
- 22 Corless L, Crump CM, Griffin SD, Harris M. Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles. *J Gen Virol* 2010; 91(Pt 2): 362-72.
- 23 Barouch-Bentov R, Neveu G, Xiao F, Beer M, Bekerman E, Schor S, *et al.* Hepatitis C virus proteins interact with the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery via ubiquitination to facilitate viral envelopment. *MBio.* 2016; 7(6): e01456-16.
- 24 Johnson DS, Bleck M, Simon SM. Timing of ESCRT-III protein recruitment and membrane scission during HIV-1 assembly. *Elife* 2018; 7: e36221.
- 25 Jiang B, Himmelsbach K, Ren H, Boller K, Hildt E. Subviral hepatitis B virus filaments, like infectious viral particles, are released via multivesicular bodies. *J Virol* 2015; 90(7): 3330-41.
- 26 Tang Y, Leao IC, Coleman EM, Broughton RS, Hildreth JE. Deficiency of niemann-pick type C-1 protein impairs release of human immunodeficiency virus type 1 and results in Gag accumulation in late endosomal/lysosomal compartments. *J Virol* 2009; 83(16): 7982-95.
- 27 Lloyd-Evans E, Morgan AJ, He X, Smith DA, Elliot-Smith E, Sillence DJ, *et al.* Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med* 2008; 14(11): 1247-55.
- 28 Scheffer LL, Sreetama SC, Sharma N, Medikayala S, Brown KJ, Defour A, *et al.* Mechanism of Ca<sup>2+</sup>-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nat Commun* 2014; 5: 5646.
- 29 Du X, Kazim AS, Dawes IW, Brown AJ, Yang H. The AAA ATPase VPS4/SKD1 regulates endosomal cholesterol trafficking independently of ESCRT-III. *Traffic* 2013; 14(1): 107-19.
- 30 Du X, Kazim AS, Brown AJ, Yang H. An essential role of Hrs/Vps27 in endosomal cholesterol trafficking. *Cell Rep* 2012; 1(1): 29-35.