



河北大学
HEBEI UNIVERSITY

密 级：

分 类 号：

学校代码：10075

学 号：20181657

硕士学位论文

TFEB 在心肌细胞炎症损伤中的作用 机制研究

学位申请人：赵倩倩

指导教师：钟理 教授

郭蕊 教授

学位类别：理学 硕士

学科专业：细胞生物学

院系名称：生命科学学院

答辩日期：二〇二一年六月

Classified Index:

CODE: 10075

U.D.C.:

No. 20181657

Thesis for the Degree of Master

The mechanism of TFEB in myocardial inflammatory injury

Candidate: Qianqian Zhao

Supervisor: Prof. Li Zhong

Prof. Rui Guo

Category of Academic Degree : Master of Science

Specialty: Cell Biology

College: College of Life Sciences

Date of Oral Defense: June, 2021

保护知识产权声明

本人为申请河北大学学位所提交的题目为《~~河北细胞免疫学研究中心的干细胞研究~~》的学位论文，是我个人在导师（**钟理 邵蕊**）指导并与导师合作下取得的研究成果，研究工作及取得的研究成果是在河北大学所提供的研究经费及导师的研究经费资助下完成的。本人完全了解并严格遵守中华人民共和国为保护知识产权所制定的各项法律、行政法规以及河北大学的相关规定。

本人声明如下：本论文的成果归河北大学所有，未经征得指导教师和河北大学的书面同意和授权，本人保证不以任何形式公开和传播科研成果和科研工作内容。如果违反本声明，本人愿意承担相应法律责任。

声明人：**赵清**

日期：2021 年 6 月 15 日

摘要

背景: 心肌炎症损伤是脓毒症常见的并发症, 发病率高达 50%, 并最终导致器官功能障碍。心肌炎主要特征表现为炎症失调、低代谢和免疫功能障碍等。细胞因子靶向治疗心肌炎, 抑制其发展成为临床治疗的重要手段。转录因子 EB (Transcription factor EB, TFEB) 是自噬和溶酶体生物发生的主调控因子, 在促进血管生成和心脏功能恢复方面发挥重要作用。此外, TFEB 参与了线粒体内稳态调控, 在维持线粒体自噬和线粒体生物发生之间的平衡起到了重要作用。本研究通过探索 TFEB 对脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 诱导的人 AC16 心肌细胞炎症损伤的调控作用, 深入研究 TFEB 调控自噬溶酶体途径对 LPS 诱导的细胞炎症损伤产生的影响, 为治疗相关心脏炎症性疾病提供一种新的思路。

方法: (1) LPS 是诱导体外炎症模型的常用方法, 利用不同浓度的 LPS 处理人 AC16 心肌细胞, 实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR) 检测炎症因子和细胞黏附分子, DCFH-DA 检测活性氧 (Reactive oxygen species, ROS), JC-1 检测线粒体膜电位 (Mitochondrial membrane potential, MMP), 基于以上结果选择合适的处理时间及浓度。(2) 使用筛选的 LPS 浓度处理人 AC16 心肌细胞, 蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 检测内源性 TFEB 蛋白表达量; 构建 TFEB 沉默模型, 检测对 LPS 诱导的人 AC16 心肌细胞的影响。(3) 构建 TFEB 过表达模型, 检测对 LPS 诱导的细胞炎症损伤的影响: qPCR 检测细胞炎症因子和自噬溶酶体相关基因的表达水平; WB 检测细胞黏附分子、凋亡和自噬标志物 LC3B 蛋白的表达水平; DCFH-DA 检测细胞内 ROS 水平。(4) 自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-Methyladenine, 3-MA) 和氯喹 (Chloroquine, CQ) 抑制自噬, 利用 WB 和 qPCR 技术分别检测自噬标记物 LC3B、细胞黏附分子、促凋亡蛋白 BAX 和抗炎因子 IL-10 的蛋白与基因表达水平, DCFH-DA 探针检测细胞内 ROS 水平。

结果: (1) LPS 可诱导人 AC16 心肌细胞发生炎症反应、ROS 积累和凋亡, 基于以上结果 LPS 诱导人 AC16 心肌细胞炎症损伤最佳处理时间及浓度分别为 24 h 及 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。(2) 与 AC16 组相比, 在 LPS 组诱导的人 AC16 心肌细胞内源性 TFEB 表达增加; 与 LPS 组相比, 沉默 TFEB 组炎症因子、细胞黏附分子和凋亡表达增加。(3) 与

LPS 组相比, TFEB-OE 组炎症因子和细胞黏附分子表达量显著降低, BAX 蛋白表达量降低, ROS 水平显著降低。(4) 与 LPS+TFEB-OE 组相比, 抑制自噬后, LPS+TFEB-OE+3-MA 和 LPS+TFEB-OE+CQ 组细胞黏附分子、ROS 积累和凋亡水平均升高, 抗炎因子表达降低。

结论: (1) 在细胞炎症损伤中内源性 TFEB 表达上调, 但沉默其表达加重炎症反应和凋亡。(2) 外源性 TFEB 过表达可通过调节自噬对人 AC16 心肌细胞中 LPS 引起的炎症反应、线粒体 ROS 积累和凋亡起到抑制作用。综上所述, TFEB 可能是通过激活自噬溶酶体途径对心肌炎症损伤发挥保护作用。因此, 靶向 TFEB 和自噬可能是治疗或预防心脏炎症损伤的一个可行性策略。

关键词 炎症 TFEB 自噬 ROS 凋亡

Abstract

Background: Myocardial inflammatory injury is a common complication of sepsis, with the morbidity of up to 50%, and ultimately leads to organ dysfunction. The main features of septic myocarditis are inflammatory disorder, low metabolism and immune dysfunction. Cytokine targeting therapy of septic myocarditis, inhibition of its development has become an important means of clinical treatment. Transcription factor EB (TFEB) is a major regulator of autophagy and lysosomal biogenesis, which plays an important role in promoting angiogenesis and recovery of cardiac function. In addition, TFEB is involved in the regulation of mitochondrial homeostasis and plays an important role in maintaining the balance between mitochondrial autophagy and mitochondrial biogenesis. In this study, the effect of TFEB regulation on the lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory injury of human AC16 cardiomyocytes was investigated, and the effect of TFEB regulation on the LPS-induced inflammatory injury of human AC16 cardiomyocytes was further investigated. Our findings indicate a new potential therapeutic strategy for the cardiac inflammatory related diseases.

Methods: (1) LPS is a useful method of inducing inflammation model in vitro, using different concentrations of LPS processing AC16 myocardial cell, quantitative real-time PCR (qPCR) was used to check the relative expression of inflammatory factors and cell adhesion molecules, DCFH-DA was applied to determine the intracellular reactive oxygen species (ROS) accumulation levels, and JC-1 was used to detect the mitochondrial membrane potential (MMP), the appropriate processing time and concentration of LPS were determined based on the above results. (2) Human AC16 cardiomyocytes were treated with the selected LPS concentration, and the endogenous TFEB protein expression was detected by western blot (WB).TFEB silencing model was established to detect the effect on LPS-induced human AC16 cardiomyocytes. (3) TFEB overexpression model was constructed to detect the effect of LPS-induced cell inflammatory injury: qPCR was used to detect the expression levels of cell inflammatory factors and autophagosomal-related genes; WB detected the expression levels of cell adhesion molecules; apoptosis and autophagy marker LC3B protein; DCFH-DA was

used to detect intracellular ROS levels. (4) Autophagy was inhibited by 3-methyladenine (3-MA) and chloroquine (CQ). WB and qPCR were used to detect the autophagy marker LC3B, cell adhesion molecule, apoptosis protein Bax, anti-inflammatory factor IL-10 and DCFH-DA used to detect ROS expression levels.

Results: (1) LPS can induce the inflammatory response, ROS accumulation and apoptosis of human AC16 cardiomyocytes. Based on the above results, the optimal treatment time and concentration of LPS induced the inflammatory injury of human AC16 cardiomyocytes is 24 h and 0.1 μ g/mL, respectively. (2) Compared with AC16 group, endogenous TFEB expression in human AC16 cardiomyocytes induced by LPS group was increased. The expressions of inflammatory factors, cell adhesion molecules and apoptosis were increased in the silenced TFEB group compared with the LPS group. (3) Compared with the LPS group, the expressions of inflammatory factors and cell adhesion molecules in TFEB-OE group were significantly decreased, the expression of Bax protein was decreased, and the ROS level was significantly decreased. (4) Compared with LPS+TFEB-OE group, the levels of cell adhesion molecules, ROS accumulation and apoptosis were increased in LPS+TFEB-OE+3-MA and LPS+TFEB-OE+CQ groups, while the expression of anti-inflammatory factors was decreased.

Conclusions: (1) The expression of endogenous TFEB was up-regulated in the inflammatory injury of cells, but the silencing of its expression aggravated the inflammatory response and apoptosis. (2) Exogenous TFEB overexpression can inhibit LPS-induced inflammatory response, mitochondrial ROS accumulation and apoptosis in human AC16 cardiomyocytes by regulating autophagy. In conclusion, TFEB may play a protective role against myocardial inflammatory injury by activating autophagosomal pathway. Therefore, targeting TFEB and autophagy may be a viable strategy for the treatment or prevention of cardiac inflammatory injury.

Keywords Inflammatory TFEB Autophagy ROS Apoptosis

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 心肌炎概述.....	1
1.1.1 心肌炎危害.....	1
1.1.2 心肌炎病因.....	1
1.1.3 心肌炎治疗方法.....	1
1.2 MiTF/TFE 家族概述.....	2
1.2.1 MiTF/TFE 家族.....	2
1.2.2 TFEB 简述.....	3
1.2.3 TFEB 与自噬.....	4
1.2.4 TFEB 与溶酶体.....	4
1.2.5 TFEB 与线粒体.....	5
1.2.6 TFEB 与炎症.....	7
1.2.7 TFEB 其他生物学功能.....	7
1.3 研究目的和意义.....	8
第二章 实验材料、仪器和方法.....	9
2.1 材料.....	9
2.1.1 细胞株及质粒.....	9
2.1.2 试验药物.....	9
2.1.3 主要试剂.....	9
2.2 实验仪器.....	12
2.3 实验方法.....	13
2.3.1 细胞培养实验.....	13
2.3.2 提取总 RNA 实验.....	14
2.3.3 SBP-TFEB 载体构建实验.....	14
2.3.4 cDNA 合成实验.....	18
2.3.5 实时荧光定量 PCR 实验.....	18

2.3.6	细胞转染实验.....	19
2.3.7	蛋白提取实验.....	20
2.3.8	BCA 蛋白定量实验.....	20
2.3.9	蛋白免疫印迹实验.....	21
2.3.10	ROS 检测实验.....	21
2.3.11	线粒体膜电位检测实验.....	22
2.3.12	统计分析.....	22
第三章	实验结果与讨论.....	23
3.1	不同浓度 LPS 对人心肌细胞 AC16 的影响.....	23
3.2	在 LPS 诱导的心肌细胞炎症损伤中内源性 TFEB 的表达.....	26
3.3	TFEB 沉默模型构建.....	26
3.4	沉默 TFEB 对 LPS 诱导的心肌细胞炎症损伤的影响.....	28
3.5	TFEB 过表达模型构建.....	29
3.5.1	SBP-TFEB 重组质粒的菌液 PCR 鉴定.....	29
3.5.2	SBP-TFEB 的测序鉴定.....	29
3.5.3	SBP-TFEB 重组质粒转染效率鉴定.....	30
3.6	过表达 TFEB 对 LPS 诱导的心肌细胞炎症损伤的影响.....	31
3.6.1	过表达 TFEB 对自噬的影响.....	31
3.6.2	过表达 TFEB 对炎症反应的影响.....	33
3.6.3	过表达 TFEB 对 ROS 积累的影响.....	34
3.6.4	过表达 TFEB 对凋亡的影响.....	35
3.7	抑制自噬对 LPS 诱导心肌细胞炎症损伤的影响.....	35
3.8	讨论.....	38
第四章	结 论.....	41
	参考文献.....	42
	致 谢.....	50

第一章 绪论

1.1 心肌炎概述

1.1.1 心肌炎危害

心肌炎症损伤是脓毒症常见的并发症，发病率高达 50%。脓毒症是宿主对感染引起的炎症反应综合征，可发展为严重脓毒症和脓毒性休克，伴有多器官功能障碍，致死率高。导致脓毒症死亡率高的原因很多，心功能障碍是重要原因之一。脓毒症的发病率和死亡率在不同地区有很大差异，在撒哈拉以南非洲、大洋洲、南亚、东亚和东南亚等预防、识别或治疗条件与设施落后的地区，脓毒症发病率和死亡率最高^[1]。50%的严重脓毒症患者会出现不同程度的心肌损伤，脓毒症合并心功能障碍患者死亡率高达 70%-90%。除老年人为多发群体外，脓毒症的发病率呈现越来越年轻化的趋势，婴幼儿和青年发病率也在逐年升高。最新统计数据得出，在 2017 年全球超过一半的脓毒症病例发生在儿童中，其中许多是新生儿。

1.1.2 心肌炎病因

心肌炎是脓毒症患者死亡的主要原因^[2]，其复杂发病机制包括炎症失调、凝血病、线粒体功能障碍、氧化应激、钙调节紊乱和内皮功能障碍等，并导致器官功能障碍^[3-5]。引起心肌炎的病因包括：感染性因素、自身免疫性疾病、物理因素和化学因素等。革兰氏阴性细菌是造成患者感染的主要原因，多数革兰氏阴性细菌细胞壁都具有脂多糖（Lipopolysaccharides, LPS），LPS 可诱导体外炎症模型^[6]。

1.1.3 心肌炎治疗方法

随着对心肌炎认识的加深，其治疗研究也不断涌现，但很遗憾的是在临床上目前尚无特异的、有效的、针对性的治疗药物，诊断方面也缺乏有效和快速的诊断工具。目前药物开发主要集中在调节全身炎症反应、凝血功能障碍、免疫功能障碍和靶向生物标志物治疗相结合，恢复机体抗炎和促炎稳态，改善患者预后^[5]。虽然在中药治疗、 β -肾上腺素受体拮抗剂、红细胞生成素（EPO）和 microRNA 等治疗方面取得了很大进展，但

心肌炎患者仍没有有效的治疗方法^[4]。本世纪初, 细胞因子作为可能抑制心肌炎的介质受到了广泛的关注。建立细胞因子受体阻断或者靶向策略, 以确定特定的细胞因子级联作用, 使其发挥治疗作用从而治疗患者^[7]。心肌炎发病机制涉及多种信号通路, 针对信号通路的治疗一直是当前研究热点。

1.2 MiTF/TFE 家族概述

1.2.1 MiTF/TFE 家族

转录因子 TFEB (transcription factor EB) 是 MiTF/TFE (microphthalmia-associated transcription factor/transcription factor E) 家族成员之一, 属于碱性螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链 (basic helix-loop-helix leucine zipper, b HLH-LZ) 类转录因子。该家族成员还包括 MiTF、TFEC 和 TFE3, 具有同源的 b HLH-LZ 结构域, 可通过这一保守结构域相互作用形成同源或异源二聚体, 还具有与 DNA 结合的活性, 因此该家族成员被归类为一个亚家族。转录因子结合 DNA 需要 b HLH-LZ 结构域介导的二聚体参与, 形成的同源或者异源二聚体与基因启动子 E-box (CANNTG) 结合, 来行使激活转录或者抑制转录的功能^[8]。该家族成员有许多共同的结构和功能特征, 被相同的信号通路靶向, 但也存在多种异构体, 被多种信号通路调控。

MiTF/TFE 家族作为一个被广泛研究的 b HLH-LZ 蛋白亚家族, 该家族成员在生理病理相关方面的功能研究越来越多。最初, 在自发或者诱导小鼠基因突变实验中发现, MiTF 突变小鼠具有以下部分或全部缺陷: 色素缺失, 眼睛变小, 继发性骨吸收失败, 肥大细胞数量减少, 耳聋^[9]。越来越多研究表明, MiTF 对黑素细胞的发育和分化至关重要, 在黑色素瘤中被称为谱系特异性癌基因^[10]。此外, MiTF 突变与结肠癌密切相关。在 MiTF/TFEC 纯合子突变情况下, 视网膜色素上皮细胞色素沉着存在短暂延迟, 并且在 MiTF^{-/-}和 TFEC^{-/-}突变体中, 颅神经嵴细胞在眼周间质的定位存在显著缺陷, 野生颅神经嵴细胞中 MiTF 家族的功能逆转了 MiTF^{-/-}与 TFEC^{-/-}突变体的脉络膜裂关闭失败, 眼睛发育中脉络膜裂闭合失败会导致结肠癌^[11]。不仅如此, MiTF 在破骨细胞发育中也发挥了重要作用。在破骨细胞中只有 MiTF 和 TFE3 共同缺失的小鼠会导致严重的骨硬化^[8]。TFE3 和 MiTF 任意一种单独缺失的小鼠, 破骨细胞均正常。在一定的细胞条件下, TFE3 过表达可促进细胞存活, 但活化 TFE3 也可能会增加促凋亡因子的表达, 从而导

致细胞死亡。使用环境污染物镉处理间充质干细胞 (MSCs) 之前, 用 TFE3 特异性 siRNA 抑制 TFE3, TFE3 活性的抑制降低了镉诱导的 TFE3 应答基因的表达, 并降低了自噬标记物 LC3BII/LC3BI 的蛋白表达水平, 同时抑制镉诱导的 MSCs 死亡^[12]。TFE3 在氧化应激、溶酶体稳态和自噬中具有重要作用。脊髓损伤自噬通量的缺陷引起内质网应激, 导致神经元死亡, 且 ROS 的产生, 进一步加剧了溶酶体功能障碍, 从而削弱自噬通量, 但是 TFE3 的激活可以改善预后^[13]。

TFEC 与 TFE3 和 TFEB 密切相关, 但与二者蛋白质结构不同的是, TFEC 不包含酸性结构域^[14]。TFEC 不是普遍表达的, 造血干细胞定植在尾端造血组织中时高度富集于尾部内皮细胞中。它能够通过调节多种细胞因子以非细胞自主的方式扩大造血干细胞来源的造血功能^[15]。除此之外, 最新研究发现 TFEC 参与了早期神经嵴细胞基因调控网络形成和维持。TFEC 功能的丧失会影响所有胚胎色素细胞的发育, 但并不影响非色素神经嵴干细胞来源的发育, 如神经嵴来源的肠神经元和肠交感祖细胞, 以及中枢神经系统发育中的少突胶质细胞在数量和分布上也不受影响^[16]。

1.2.2 TFEB 简述

TFEB 蛋白分子包括 476 氨基酸残基, 由酸性激活域 (acidic activation domain, ADD)、螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH)、亮氨酸拉链 (leucine zipper domain, LZ)、富谷氨酸活化域 (proline-rich activation domain, Pro-AD) 和富丝氨酸域 (serine-rich domain, Ser) 等结构组成^[17, 18]。TFEB 通过识别 E-box、M-box 序列, 进行磷酸化修饰, 主要的磷酸化位点有 211 位丝氨酸、142 位丝氨酸及末端富含丝氨酸的结构域^[19]。TFEB 调控了一个高效的转录程序, 上调了负责自噬早期 (自噬体形成) 和晚期 (溶酶体生物发生) 阶段的基因。TFEB 主要通过特定氨基酸残基磷酸化在翻译后水平进行调控。mTOR (哺乳动物雷帕霉素靶蛋白) 和 MAPK1/ERK2 (丝裂原活化蛋白激酶 1) 在 Ser142 和 Ser211 磷酸化 TFEB, 以增强其与细胞质伴侣 YWHA/14-3-3 (酪氨酸 3-单加氧酶/色氨酸 5-单加氧酶活化蛋白) 的结合, 导致 TFEB 在细胞质中被隔离, 降低了 TFEB 的转录活性^[20]。与之相反, 溶酶体 Ca^{2+} 释放激活钙调磷酸酶, 在 Ser142 和 Ser211 去磷酸化 TFEB, 促进 TFEB 核易位, 激活下游基因转录^[21]。

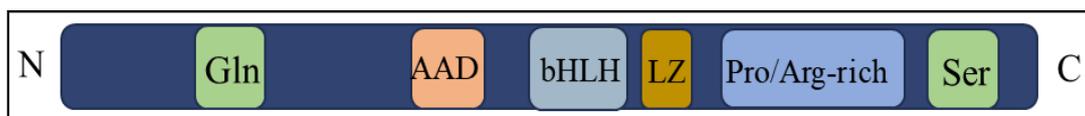


图 1-1 TFEB 结构示意图

(修改自 <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/TFEBID531.html#LINKS>)

Fig. 1-1 Schematic diagram of TFEB structure

1.2.3 TFEB 与自噬

自噬是一种自我保护机制，可以降解和清除体内受损的细胞器或者异常的蛋白质和脂质等物质。自噬失调与各种疾病密不可分，包括癌症、神经退行性疾病以及感染^[22]。TFEB 是自噬过程中关键的转录因子，可直接调控自噬相关基因，如 LC3、Beclin1 等^[23, 24]。在哺乳动物体内，TFEB 去磷酸化后，核易位激活自噬信号通路，包括自噬体形成，随后自噬体与溶酶体融合，从而发挥降解作用。降解后所产生的大分子被释放到细胞质中重新利用，使细胞不断适应不同的营养环境和维持细胞内环境的稳定^[25]。TFEB 及其调控的下游通路的最新发现，在细胞代谢中发挥着越来越重要的作用。TFEB 核易位激活脂代谢^[26]。饥饿环境下，TFEB 可促进脂肪酸分解代谢、脂肪酸氧化和生酮作用，同时抑制高脂饮食喂养小鼠肥胖和代谢综合征的发生^[27]。之前已有报道，TFEB 是卵巢癌细胞产生耐药性的常见上游调控因子^[28, 29]。TFEB 核易位通过激活自噬，在一定程度上降低了癌细胞对阿霉素的敏感性^[30]。此外，TFEB 通过单点突变引起肾细胞癌，其表达上调已经被证实与非小细胞肺癌患者预后不良有关。肾细胞癌中通过 mTORi 处理后，TFEB 介导 PD-L1 的上调，通过肿瘤相关的免疫抑制减弱 mTORi 的治疗效果^[31]。研究发现在恶性胶质瘤细胞中抑制 TFEB 表达显著降低了胶质瘤干细胞 (GSCs) 肿瘤球的形成和大小，更重要的是增加了对药物的敏感性，使其药物治疗变得更有效^[32]。也有一些研究认为 TFEB 介导的肿瘤耐药性可能与调节线粒体功能相关。

1.2.4 TFEB 与溶酶体

TFEB 是溶酶体通路的主调节因子，可直接调控溶酶体功能和结构相关蛋白的转录表达，如溶酶体膜蛋白、水解酶和 V-ATP 酶复合体等^[24]。溶酶体是主要参与降解和回收过程的细胞器，TFEB 通过激活溶酶体 Ca^{2+} 离子通道，诱导溶酶体胞吐^[33]。研究表明 TFEB 促进胞吐基因的表达^[34]，在饥饿条件下增加细胞内吞率，促进自噬溶酶体的形成，诱导胞吐作用，促进细胞清除^[35, 36]。TFEB 也是治疗代谢性累积性疾病的关键因子，TFEB

核易位后可增强自噬活性，上调溶酶体途径相关蛋白的表达，促进溶酶体释放^[37]。海藻糖应用于一种典型的以溶酶体内储存为表现的神经退行性疾病，通过抑制 AKT 活性来激活 TFEB，从而增强了对聚集蛋白脂质的清除，延长了患病小鼠的生存时间^[38]。在阿尔茨海默病扩散小鼠模型中，诱导星形胶质细胞表达 TFEB 可减少小鼠病理变化，并显著减弱海马同侧至对侧的扩散^[39]。除此之外，TFEB 可促进自噬体-溶酶体融合，具有解决自噬积累和维持降解途径的重要作用^[40, 41]。研究表明氢盐水(HRS)可通过抑制 mTOR 和促进 TFEB 核易位来激活自噬，TEEB 的激活可以增强溶酶体功能，从而促进自噬体与溶酶体的融合，加速自噬体降解^[37]。

1.2.5 TFEB 与线粒体

线粒体形态与功能紧密联系在一起^[42]。线粒体网络的结构由线粒体分裂和融合来平衡，互相调节一个灵活的和适应性的细胞压力和代谢环境^[43]。溶酶体是自噬晚期终末降解区。研究证实溶酶体与线粒体存在相互作用，共同维持细胞内环境的稳态^[44]。TFEB/HLH-30 向细胞核的转运激活溶酶体的生物发生，通过同时改变线粒体网络和线粒体翻译而引起的线粒体应激，主要起维持细胞内环境平衡和延长寿命的作用^[45]。TFEB 不仅在溶酶体和自噬体生物发生发挥了重要作用^[40]，同时参与了线粒体内稳态调控。越来越多证据表明 TFEB 还可以维持线粒体自噬和线粒体生物发生之间的平衡^[46]。

1.2.4.1 TFEB 与线粒体自噬

自噬是细胞生存和稳态的重要调节因子，缺乏自噬会促进炎症反应和氧化应激，最终导致不同组织的各种病理疾病^[47, 48]。线粒体作为 ATP 的主要来源，在多种细胞内起着重要作用，尤其是在启动程序性细胞死亡级联反应^[49]。线粒体对氧化应激非常敏感，易受到损伤。当线粒体被破坏时，释放大量的氧化酶^[50]，导致更严重的氧化应激和线粒体损伤。线粒体自噬在正常的细胞器更替、细胞成熟和线粒体损伤清除过程中起作用，也是一种自我保护机制^[51, 52]。脂多糖诱导的急性肺损伤模型中，TFEB 上调自噬相关蛋白的表达来激活线粒体自噬，可以减少 LPS 诱导的炎症和线粒体损伤^[53]。线粒体受损的同时会释放 ROS, ROS 通过瞬时受体电位阳离子通道(mucolipin subfamily, TRPML1) 释放钙介导 TFEB 的核定位从而促进自噬^[46, 54]，减少氧化应激对线粒体的破坏。线粒体损伤的积累与炎症小体的激活有关。以脓毒症为例，为了进一步清除受损的线粒体并阻

止后续的器官功能障碍，线粒体自噬会被广泛激活，而受损的线粒体自噬导致 NLRP3（NLR 家族含有 3 个 pyrin 结构域的炎症小体）的过度激活，并增加脓毒症动物的死亡率^[55]。最近研究表明锰会导致 TFEB 的核定位下降，导致小鼠纹状体星形胶质细胞自噬功能障碍，抑制线粒体的自噬溶酶体降解，使线粒体损伤积累^[56]。研究表明，线粒体损伤相关的机制很可能都与线粒体 ROS 过量产生有关，因为线粒体 ROS 通过直接氧化导致线粒体功能缺陷和结构破裂^[57]，从而将线粒体分子释放到细胞质或循环系统中。而这些分子在细胞死亡和器官损伤的时候，就会从破裂的线粒体中释放出来，进而可通过多种因子不同途径引发机体炎症反应。然而 TFEB 过表达逆转自噬功能障碍和线粒体损伤积累。TFEB 过表达可减轻心衰中自噬体积累、线粒体分裂和心肌细胞死亡^[58]。最近发现木犀草素（luteolin）通过上调 TFEB 的表达和促进线粒体自噬来减轻阿霉素诱导的心脏毒性^[59]。因此 TFEB 介导的自噬和溶酶体生物发生的调控可能对治疗炎症疾病有益。此外，TFEB 在协调线粒体自噬和生物发生以恢复正常极化的线粒体中发挥重要作用^[60]。进一步研究发现，TFEB 促进自噬完成线粒体清除后，促进了线粒体生物发生来合成新的线粒体抵抗 LPS/D-galactosamine (D-GalN)诱导的肝炎^[46]。

1.2.4.2 TFEB 与线粒体生物发生

线粒体生物发生是脓毒症心肌损伤患者的一种保护反应，受几个关键转录因子的严格调控。过氧化物酶体增殖激活受体- γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α) 通过控制能量代谢调控线粒体生物发生^[61]。Sirtuin 蛋白 1 (SIRT1) 是一种 NAD⁺依赖的去乙酰化酶，属于 Sirtuin 家族，同时三羧酸循环的中间产物 NAD⁺可以激活 SIRT1^[62]。NAD⁺激活 SIRT1，降低氧化应激，提高脱乙酰作用，增加 PGC-1 α 表达水平和线粒体生物起源^[63]。最近研究表明，运动通过 AMPK（腺苷酸激活蛋白激酶）-SIRT1-TFEB 通路激活自噬溶酶体功能。已经证实 TFEB 直接调节 PGC-1 α 表达，进而调节线粒体发生^[27]。在肝损伤模型中 TFEB 激活溶酶体生物发生完成线粒体清除后，直接调节 PGC-1 α 诱导线粒体生物发生来合成新的线粒体^[46]。但是也有研究表明，TFEB 可以独立于 PGC-1 α 调控骨骼肌线粒体的生物发生和葡萄糖摄取^[64]，并且这一过程没有激活自噬通量。这些发现表明，TFEB 诱导线粒体生物发生可能并不依赖于 PGC-1 α 的存在，在不同的组织、细胞内 TFEB 激活通路也是有差异的。NFE2L2/NRF2（核因子/类红血球 2），一种核转录因子，通过抗

氧化反应元件控制多种解毒酶的表达，是 TFEB 的靶基因^[65]。p62 促进 AMPK 和 ULK1（Unc-51 样自噬激活激酶）之间的相互作用，诱导 ULK1 磷酸化，导致巨噬细胞自噬/自噬诱导，随后 NFE2L2 被活化^[66]。最新研究发现 AMPK-SIRT1-PGC-1 α -NFE2L2 信号通路介导了烧伤诱导的心脏功能障碍和心脏线粒体损伤发生。

1.2.6 TFEB 与炎症

TFEB 可通过直接机制调节先天免疫和炎症，控制炎症介质的转录，并间接控制影响微生物感染、机体代谢和系统炎症信号的细胞过程。研究表明，小鼠膀胱内注入针对三种不同蛋白酶激活受体（parrs）的肽激活剂，作为膀胱炎模型，利用 345 个一致结合序列的蛋白质 DNA 微阵列技术，从膀胱粘膜核提取物中鉴定出唯一激活的转录因子是 TFEB，首次提出 TFEB 表达与炎症的相关性^[67]。自噬溶酶体途径与胰腺炎的直接联系是通过缺失溶酶体和必需的自噬相关基因(ATG)来证实的，这导致自发性胰腺炎^[68]。最近有报道称，TFEB 下调使溶酶体生物发生减少，导致自噬不足和随后的胰腺损伤，加重了球蛋白诱导的实验性胰腺炎发生^[69]。TFEB 上调降低 IL-1、IL-6 等炎症因子的表达，上调自噬相关基因表达，促进线粒体自噬，从而减少 LPS 诱导的肺组织和肺泡上皮细胞的炎症和线粒体损伤^[53]。研究证明 Lamtor5 直接与 TLR4 相互作用，促进它们在自噬溶酶体上的共定位，阻止 mTORC1 向溶酶体募集，促进 TFEB 的核易位，对炎症小鼠模型有保护作用^[70]。而肝细胞自噬通过 Ca²⁺/TFEB 途径保护 LPS 诱导的肝损伤^[71]。已有研究表明 TFEB 通过增强溶酶体功能和减少促炎细胞因子分泌（如白细胞介素-1 β ）抗动脉粥样硬化^[72]。同样在心血管疾病中，TFEB 可保护内皮细胞免受炎症，治疗动脉粥样硬化血脑屏障^[41]。TFEB 增加自噬相关基因在内皮细胞中的表达，促进血管生成和心肌梗死后心脏功能恢复^[73]。矛盾的是 TFEB 可以根据组织和环境发挥促炎或抗炎作用。TFEB 是一种进化保守的宿主防御转录因子，直接控制 IL-6 和 TNF- α 分泌以抵抗感染^[74-76]。TFEB 和 TFE3 与在巨噬细胞可激活先天免疫系统，提高他们的杀菌功能，产生各种细胞因子和趋化因子^[74]。TFEB 和 TFE3 可能通过调节溶酶体和自噬在炎症信号通路中发挥更广泛的作用，存在多种活化模式^[77]。

1.2.7 TFEB 其他生物学功能

TFEB 调控除自噬溶酶体相关基因外的其他基因，发挥不同作用。p21 是肿瘤抑制

基因 p53 的重要效应因子。TFEB 的激活可以直接上调 p21, 促进肿瘤细胞的 G1 期阻滞, 延缓 G2/M 期阻滞, 提高肿瘤细胞化疗后的存活率, 在应激反应中调节细胞周期^[78]。

1.3 研究目的和意义

本研究通过蛋白免疫印迹技术(Western blot, WB)和实时荧光定量 PCR(Quantitative real-time PCR, qPCR) 技术检测 LPS 诱导的人 AC16 心肌细胞中 TFEB 表达水平, 体外构建 TFEB 过表达和沉默模型, 研究 TFEB 表达水平的改变对 LPS 诱导的人 AC16 心肌细胞的炎症反应、ROS 积累和凋亡的影响, 检测自噬溶酶体信号通路表达水平。探索 TFEB 在 LPS 诱导的人 AC16 心肌细胞炎症中发挥作用的可能机制, 以期为 TFEB 的深入研究提供理论依据。

脓毒性心肌炎是一种严重危及生命感染, 它启动了宿主促炎和抗炎过程的复杂相互作用。脓毒症可以被认为是病原体和宿主免疫系统之间的一场死亡竞赛, 而正是这种通常相互竞争的促炎和抗炎通路之间的适当平衡决定了个体的命运。尽管心肌炎领域的研究已经见证了许多备受推崇的临床试验的失败, 但可以更好地理解这种疾病的病理生理学基础以及相关的促炎和抗炎反应的机制, 为治疗这种高度致命的疾病提供了一种新的方法。在脓毒性心肌炎患者适当的免疫阶段给予生物标志物介导的免疫治疗是心肌炎治疗和感染性疾病领域的一个潜在的重大进展。在本实验中, 针对 TFEB 和自噬的研究, 可能是治疗或预防心肌炎症损伤的一个可行性的策略。

第二章 实验材料、仪器和方法

2.1 材料

2.1.1 细胞株及质粒

人心肌细胞 (AC16) 购自北京北纳创联生物技术研究院细胞中心。pIRES-EGFP-edit (SBP) 质粒为本实验室所保存。细胞培养基为 DMEM basic (高糖), 含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素“双抗”。细胞在培养条件为 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中培养。pcDNA3.1(+)-TFEB 质粒购自苏州金唯智生物公司, 该质粒上连接有 Human TFEB cDNA 序列 (序列号: NM-001167827)。

2.1.2 试验药物

脂多糖 (LPS, Sigma 公司): 使用 PBS 缓冲液将其配置为 1 mg/mL 母液, 0.22 μm 滤膜过滤, 防止细菌污染, 分装到 1.5 mL 离心管。氯喹 (Chloroquine, CQ): 使用 DMSO 将其配置为 100 μM 母液, 分装到 200 μL 离心管, 低温保存避免反复冻融。3-甲基腺嘌呤 (3-Methyladenine, 3-MA): 使用基础培养基将其配置为 5 mM 稀释液, 0.22 μm 滤膜过滤, 防止细菌污染, 现配现用。CQ 和 3-MA 均购自 MedChem Express (MCE) 公司。

2.1.3 主要试剂

2.1.3.1 实验试剂

实验所用主要试剂见表2-1。

表2-1 实验试剂
Tab. 2-1 Test reagents

试剂	生产厂家
DMEM 高糖培养基	生工生物工程股份有限公司
胎牛血清	依科赛生物科技有限公司
青霉素-链霉素“双抗”	北京博奥龙
PBS 细胞缓冲液	生工生物工程股份有限公司
0.25% 胰蛋白酶	生工生物工程股份有限公司
RNAiso Plus	天根生化
氯仿	天津市北辰方正试剂厂
异丙醇	天津市北辰方正试剂厂

表2-1 实验试剂 (续)

Tab. 2-1 Test reagents

试剂	生产厂家
DNA Marker	TaKaRa公司
6×Super GelRed Prestain Loading Buffer	US EVERBRIGHT公司
琼脂糖	Vivantis
FastQuant RT Kit第一链合成试剂盒	天根生化
RNase Free Water	TaKaRa公司
SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)	北京春雷杰创生物科技有限公司
Trans5α Chemically Competent Cell	北京全式金生物技术有限公司
引物	生工生物工程股份有限公司
氨苄霉素	北京博奥龙
卡那霉素	北京博奥龙
<i>EcoR</i> I	TaKaRa公司
<i>Bam</i> H I	TaKaRa公司
K×Buffer	TaKaRa公司
丙三醇	天津市北辰方正试剂厂
酵母粉	Amresco公司
蛋白胨	Amresco公司
NaCl	Amresco公司
NaOH	Amresco公司
Tris碱	Amresco公司
EDTA	Amresco公司
SDS	Amresco公司
5×Loading Buffer	北京雷根生物技术有限公司
Endo-free Plasmid Mini Kit	Omega公司
Lipofectamine TM 3000 Reagent	Invitrogen公司
RIPA裂解液	康为世纪
BCA蛋白定量试剂盒	索莱宝生物科技有限公司
DMSO	索莱宝生物科技有限公司
ECL超敏发光液	索莱宝生物科技有限公司
Tween 20	索莱宝生物科技有限公司
TEMED	索莱宝生物科技有限公司
JC-1荧光探针	索莱宝生物科技有限公司
二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯	索莱宝生物科技有限公司
HRP-羊抗兔二抗	Cell Signaling Technology公司
TFEB抗体	Cell Signaling Technology公司
VCAM-1抗体	Abcam公司
ICAM-1抗体	Abcam公司
BAX抗体	Cell Signaling Technology公司
GAPDH抗体	Cell Signaling Technology公司

2.1.3.2 实验所用试剂的配方

表2-2 试剂配方

Tab. 2-2 Reagent formulation

名称	配方组分	储存条件
LB/Kana 液体培养基 (无菌)	蛋白胨 1.0 g	4°C
	酵母粉 0.5 g	
	NaCl 1.0 g	
	卡那霉素 (100 mg/mL) 0.1 mL	
	ddH ₂ O 100 mL	
LB 液体培养基 (无菌)	蛋白胨 1.0 g	4°C
	酵母粉 0.5 g	
	NaCl 1.0 g	
	ddH ₂ O 100 mL	
LB/Kana 固体培养基 (无菌)	蛋白胨 1.0 g	室温凝固
	琼脂糖 1.5 g	
	NaCl 1.0 g	
	酵母粉 0.5 g	
	卡那霉素 (100 mg/mL) 0.1 mL	
	ddH ₂ O 100 mL	
0.5 mol EDTA (pH 8.0)	Na ₂ EDTA · H ₂ O 9.306 g	室温
	ddH ₂ O 50 mL	
50×TAE (pH 8.5)	Tris 242 g	室温
	Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O 37.2 g	
	ddH ₂ O 1 L	
1 % 琼脂糖凝胶	琼脂 0.15 g	室温凝固
	1×TAE 溶液 10 mL	
10 W/V 过硫酸铵	过硫酸铵 1 g	4°C
	ddH ₂ O 10 mL	
30 W/V Acrylamide (过滤除菌)	Acrylamide 290 g	4°C棕色瓶
	BIS 10 g	
	ddH ₂ O 1 L	
1 M Tris HCL (pH 8.0 无菌)	Tris 121.7 g	室温
	ddH ₂ O 1 L	
1.5 M Tris HCL (pH 6.8 无菌)	Tris 121.7 g	室温
	ddH ₂ O 1 L	
1.5 M Tris HCL (pH 8.8 无菌)	Tris 121.7 g	室温
	ddH ₂ O 1 L	
10 % SDS (pH 7.2)	SDS 10 g	室温
	ddH ₂ O 100 mL	

表2-2 试剂配方 (续)

Tab. 2-2 Reagent formulation

名称	配方组分	储存条件
10×Transfer Buffer	Glycine 144 g Tris base 30.3 g ddH ₂ O 1 L	4°C
1×Transfer Buffer	10×膜转移缓冲液 100 mL 95 %无水乙醇 200 mL ddH ₂ O 700 mL	室温
5×Running Buffer	Glycine 72 g SDS 5g Tris base 15 g ddH ₂ O 1 L	室温
1×Running Buffer	5×Running Buffer 200 mL ddH ₂ O 800 mL	室温
TBST Buffer	NaCl 17.6g 1 M Tris HCl (pH 8.0) 40 mL Tween 20 1mL ddH ₂ O 2 L	4°C
封闭缓冲液	脱脂奶粉 0.5 g TBST Buffer 10 mL	4°C
5% BSA solution	BSA 0.5 g TBST Buffer 10 mL	4°C

2.2 实验仪器

表2-3 实验仪器

Tab. 2-3 Test instrument

仪器	生产厂家
超净工作台	Airtech公司
凝胶成像仪、电泳相关设备	Bio-Rad公司
PCR仪	Applied Biosystems公司
荧光定量PCR仪	Bio-Rad公司
酶标仪	MOLECULAR公司
涡旋震荡仪	杭州米欧仪器有限公司
瞬时离心机	Andy Bio公司
金属浴	BIOER公司
恒温摇床	哈尔滨市东联电子有限公司
CO ₂ 恒温培养箱	YAMATO
倒置显微镜	奥林巴斯公司
高速离心机	贝克曼库尔特公司

表2-3 实验仪器（续）

Tab. 2-3 Test instrument

仪器	生产厂家
高压蒸汽灭菌锅	TOMY公司
干燥箱	上海飞越科学仪器有限公司
分析天平	奥豪斯公司
冰箱	Haier有限公司
制冰机	北京长流科学仪器有限公司
超纯水机	Heal Force有限公司

2.3 实验方法

2.3.1 细胞培养实验

(1)超净工作台提前紫外照射消毒 30 min; 水浴锅预热; 配制完全培养基(10% FBS, 1%青霉素-链霉素“双抗”), 取出 5 mL 完全培养基加入到 15 mL 离心管中, 将 15 mL 离心管放入 37°C水浴锅中预热。

(2)从液氮罐中取出一支 AC16 细胞, 迅速放入 37°C水浴锅中不停摇晃 1min 左右, 使其快速融化。

(3)喷洒 75%酒精进行消毒, 放入超净台中, 开盖, 轻轻吹打混匀, 防止细胞堆积在管底。

(4)将细胞转移至步骤(1)提前预热的 15mL 离心管, 悬滴加入, 轻轻吹打混匀后封口, 800 rpm 离心 1 min, 弃去上清。

(5)向离心管中加入 1 mL 完全培养基使细胞重悬, 将其转移到含 4 mL 完全培养基的 25T 细胞培养瓶中, 上下左右晃动培养瓶, 使细胞均匀分布, 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养细胞。

(6)细胞长至对数生长期(铺满培养瓶 80%)时, 进行细胞传代; 吸出旧培养基, PBS 洗涤两次去掉残留的血清, 避免血清影响消化效果, 吸取 0.25% EDTA 胰蛋白酶液 500 μL 加入培养瓶, 轻轻摇匀。在倒置显微镜下观察细胞形态, 紧密相连的细胞变圆并开始分离, 可敲打瓶身, 使其脱落, 待细胞悬浮 60%~70%时, 加入完全培养基终止消化。

(7)使用移液枪轻轻吹打培养瓶底面, 使细胞完全悬浮, 转移至 15 mL 离心管中,

800 rpm 离心 1 min，弃上清。

(8) 向离心管中加入 1.5 mL 完全培养基使细胞重悬，轻吹混匀呈单细胞状态，分别取 500 μ L 细胞悬浮液加入到 3 个含 4 mL 完全培养基的培养瓶中，上下左右晃动摇匀，使细胞均匀分布于培养瓶底部。

(9) 将扩大培养后的细胞冻存备用：细胞长至对数生长期（铺满培养瓶 80%）时，进行细胞冻存，弃去旧培养基，PBS 洗涤两次，胰酶消化，将细胞转移至 15 mL 离心管中离心，弃上清。

(10) 使用提前配制好的冻存液（92%完全培养基+8%DMSO）重悬细胞，吹打混匀，按照 1 mL/支分装至 2 mL 冻存管中，放入冻存盒-80 $^{\circ}$ C 过夜，转移到液氮罐中长期保存。

2.3.2 提取总 RNA 实验

(1) 取出 37 $^{\circ}$ C 培养箱中的细胞，弃去旧培养基，PBS 洗涤 2 次。

(2) 加入 1 mL RNAiso Plus 试剂，室温下孵育 5 min；吹打混匀将其转移至 1.5 mL 离心管中，室温静置 5 min。

(3) 加入 200 μ L 氯仿，剧烈震荡混匀，液体出现乳白色后，室温静置 5 min。

(4) 4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 15 min；液体分层，取上层水相转移至新离心管中。

(5) 加入 0.5~1 倍 RNAiso Plus 试剂体积的异丙醇，缓慢上下翻转混匀后，室温静置 10 min。

(6) 4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 10 min，弃上清。

(7) 加入 1 mL 预冷的 75%乙醇，上下翻转离心管洗涤 RNA。

(8) 4 $^{\circ}$ C，7500 rpm 离心 5 min，弃上清，室温放置使乙醇挥发。

(9) 加无酶水溶解 RNA；使用 Nanodrop 检测 RNA 浓度及质量；琼脂糖凝胶检测 RNA 完整度。

2.3.3 SBP-TFEB 载体构建实验

2.3.3.1 引物设计

在 GeneBank 中检索 TFEB 编码基因序列（序列号：NM-001167827），明确扩增区域，设计引物并引入酶切位点及保护碱基。引物序列如下表 2-4 所示：

表2-4 TFEB引物序列

Tab. 2-4 The sequences of TFEB primers

基因 (hum)	引物序列 (5'-3')
TFEB-F	CCGGAATTCATGACAGCAAGCTCAGG
TFEB-R	CGCGGATCCTCACAGCACATCGCCCT

2.3.3.2 PCR 扩增 TFEB mRNA 片段

以 pcDNA3.1(+)-TFEB 质粒作为模板, 使用 TFEB-F/ TFEB-R 作为引物进行 PCR 扩增, 扩增体系如表 2-5。

表2-5 PCR的反应体系

Tab. 2-5 The reaction system of PCR

组成成分	使用量
TakaLa Ex Taq (5 U/μL)	0.5 μL
10×Ex Taq Buffer (Mg ²⁺ Plus) (20 mM)	5 μL
dNTP Mixture (各2.5 mM)	4 μL
Template	1 μL
引物F/R (各10 μM)	2 μL
无菌水	补足至50 μL

根据以上 PCR 反应体系将各个组分加入 200 μL 的 EP 管中, 涡旋震荡, 混匀, 瞬时离心将液体离心到管底, 设置 PCR 反应程序, 具体的 PCR 反应扩增反应程序如下表 2-6 所示:

表2-6 PCR反应条件

Tab. 2-6 The reaction conditions of PCR

	温度	时间	
Step 1	94°C	5 min	
Step 2	94°C	30 s	} 35 cycles
	60°C	30 s	
	72°C	2 min	
Step 3	72°C	10 min	

待 PCR 扩增结束后, 随即进行琼脂糖凝胶电泳鉴定或者将 PCR 产物放置于-20°C保存备用。

2.3.3.3 PCR 产物胶回收

(1) 配置 1% 琼脂糖的凝胶, 微波炉加热 1~2 min, 加热煮沸溶解琼脂糖, 待温度降到 60°C 左右时, 将其倒入胶板, 插上梳子, 注意以免气泡产生, 待其凝固后上样。

(2) 将 PCR 产物与 6×Super GelRed Prestain loading Buffer 按照 5: 1 的比例混匀,

将 50 μL 混合液加入胶孔中，100 V 电压下跑胶 30 min 左右。

(3) 切胶仪开启紫外灯，将目的基因所在的条带切下来，装入 1.5 mL 的离心管中，然后按照普通琼脂糖凝胶 DNA 回收纯化试剂盒的说明书进行 PCR 产物的回收纯化，将纯化后的产物进行下一步实验或者 -20°C 保存备用。

2.3.3.4 质粒小提

(1) 在超净工作台取 5 mL 含 LB 液体培养基（含卡那霉素抗性），加入 5 μL 转化了重组质粒的 DH5 α 菌液， 37°C 恒温摇床 180 rpm 活菌 6~8 h。

(2) 取菌液，室温下 12000 rpm 离心 1 min，弃上清收集菌体，可多次离心。

(3) 依照质粒小提试剂盒说明书进行质粒提取，提取的质粒进行下一步实验或储存于 -20°C 备用。

2.3.3.5 双酶切

(1) 以 BamH I 和 EcoR I 为酶切位点进行双酶切，双酶切体系如表 2-7 和表 2-8 所示：

表2-7 SBP酶切反应体系

Tab. 2-7 The reaction system of SBP enzyme digestion

试剂	体积
SBP质粒	1 μg
<i>BamH</i> I	1 μL
<i>EcoR</i> I	1 μL
10 \times K buffer	5 μL
无菌水	补充至50 μL

SBP 质粒酶切体系，金属浴 37°C ，6 h。

表2-8 DNA酶切反应体系

Tab. 2-8 The reaction system of DNA enzyme digestion

试剂	体积
DNA	30 μL
<i>BamH</i> I	1 μL
<i>EcoR</i> I	1 μL
10 \times K buffer	5 μL
无菌水	12 μL

目的基因酶切体系，金属浴 37°C ，6 h。

(2) 取一支 1.5 mL 离心管，按照上述双酶切反应体系配置混合液，涡旋震荡，摇

匀，瞬时离心于管底，37°C金属浴 6 h，离心管加入 5 μL 的 10 \times loading buffer，终止双酶切反应。

2.3.3.6 酶切产物回收

按照 2.3.3.3 的实验步骤将酶切产物进行回收纯化，纯化后的产物进行下一步连接反应或者-20°C保存备用。

2.3.3.7 连接

(1) 取 200 μL 离心管，配置连接反应体系见表 2-9。

表2-9 连接反应体系

Tab. 2-9 The reaction system of ligation

试剂	体积
SBP质粒	3 μL
外源DNA	9 μL
T4 DNA Ligase	1 μL
10 \times T4 DNA Ligase buffer	补足到50 μL

(2) 震荡混匀后，瞬时离心至管底，16°C过夜连接，连接产物进行下一步实验或者-20°C保存备用。

2.3.3.8 转化

(1) 从-80°C超低温保存箱中取出 Trans5 α 化学感受态细胞，放置在冰上融化，取 50 μL 于一个新的 1.5 mL 离心管中。

(2) 取 5 μL 连接产物加入上述离心管中，轻轻吹打混匀，冰浴 30 min。

(3) 金属浴 42°C热激 90 s，迅速将离心管转移至冰上冷却 2~3 min，每管加入 200 μL 不含抗生素的 LB 培养基，混匀，37°C 180 rpm 摇床摇菌 40 min 左右。

(4) 将菌液用已经冷却的涂布棒均匀涂布于含卡那霉素抗性的 LB 固体培养基上，待液体被培养基完全吸收后倒置平板，37°C培养 12~16 h。

(5) 将培养好的平板从 37°C培养箱中取出，在超净台中挑取不同的单菌落分别转移到装有含卡那霉素的液体 LB 培养基的 1.5 mL 离心管中，在 37°C的恒温摇床上以 180 rpm 摇菌 6 h 左右。

(6) 菌液吸取 700 μL ，加入 300 μL 丙三醇，吹打混匀后放于-80°C超低温保存箱进行保种。

2.3.3.9 菌液 PCR 鉴定

- (1) 以保存的菌种为模板，具体实验步骤参照 2.3.3.2 进行 PCR 反应。
- (2) 配制 1.5% 的琼脂糖凝胶，对菌液 PCR 产物进行凝胶电泳鉴定，电泳结束后，凝胶成像仪照胶。
- (3) 菌液 PCR 条带与目的基因条带比对正确，活化 1 mL 菌液测序鉴定。
- (4) 待测序结果比对正确，提取相应的质粒，可用于细胞转染实验或储存于 -20°C 备用。

2.3.4 cDNA 合成实验

- (1) 取出 FastQuant RT Kit 第一链合成试剂盒中的试剂与 RNA 样本放在冰上解冻，涡旋震荡，瞬时离心备用。
- (2) 按照 2-10 制备去除 gDNA 体系 1，涡旋振荡及瞬时离心，42°C 孵育 3 min。

表2-10 gDNA去除反应体系

Tab. 2-10 The reaction system of gDNA removal

组成成分	使用量
5×gDNA Buffer	2 μL
Total RNA	2 μg
RNase-Free ddH ₂ O	补足到10 μL

- (3) 在去除 gDNA 体系孵育同时，依照表 2-11 配置反转录反应体系 2。

表2-11 反转录反应体系

Tab. 2-11 The reaction system of reverse transcription

组成成分	使用量
10×Fast RT Buffer	2 μL
RT Enzyme Mix	1 μL
RQ-RT Primer Mix	2 μL
RNase-Free ddH ₂ O	5 μL

- (4) 按照用量加样后，反转录体系 2 涡旋震荡，瞬时离心；将反转录体系 2 加入到去除 gDNA 体系 1 中，涡旋震荡，瞬时离心。
- (5) 将上述混合体系放置到 42°C，孵育 15 min；95°C 孵育 3 min，所获得的产物可进行后续实验或者 -20°C 保存备用。

2.3.5 实时荧光定量 PCR 实验

- (1) 使用 Primer Premier 5 软件，根据引物设计原则设计引物；制备实时荧光定量

PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR) 反应体系, 按照 2-12 上样。

表2-12 qPCR反应体系

Tab. 2-12 The reaction system of qPCR

试剂	体积
DNA模板	1 μ L
2 \times SYBR PCR Master Mix	10 μ L
正向引物 (10 μ M)	0.5 μ L
反向引物 (10 μ M)	0.5 μ L
RNase-Free ddH ₂ O	8 μ L
总体系	20 μ L

(2) 按照表 2-13 设置反应条件。

表 2-13 qPCR反应条件

Tab. 2-13 The reaction conditions of qPCR

阶段	循环	温度	时间
预变性	1 \times	95 $^{\circ}$ C	
		95 $^{\circ}$ C	5 s
RCR反应	40 \times	60 $^{\circ}$ C	30 s
		72 $^{\circ}$ C	

Merting Curve

2.3.6 细胞转染实验

本实验采用脂质体转染法。脂质体带正电, 重组质粒带负电, 二者相互结合并将脂质体包裹后与细胞膜融合, 将真核表达载体内吞进入胞浆中。本实验构建 SBP-TFEB 质粒转染到 AC16 细胞中, 具体实验步骤如下:

(1) 取对数期生长的细胞, PBS 洗两遍, 0.25%胰酶消化, 完全培养基终止后轻轻吹打, 将细胞转移至 15 mL 离心管内, 800 rpm 离心 2 min, 弃上清。

(2) 完全培养基使细胞重悬, 进行计数后, 将细胞接种到 6 孔板, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱过夜培养。

(3) 配制转染体系: ①含重组质粒的培养基 125 μ L (A 液): 取 2.5 μ g 重组质粒以及 5 μ L p3000TM Reagent 加 1.5 mL 离心管中, 基础培养基补充到 125 μ L; ②含 LipofectamineTM 3000 的培养基 125 μ L (B 液): 取 3.75 μ L LipofectamineTM 3000, 基础培养基补足到 125 μ L; ③将 A 液转移到 B 液中, 室温孵育 15~20 min。

(4) 孵育期间, 6 孔板弃去旧培养基, PBS 洗两次, 每孔加入 2 mL 基础培养基。

(5) 将含转染试剂与质粒混合液，加入 6 孔板，每孔 250 μL ，垂直不同位置均匀滴加，轻轻晃动 6 孔板，使转染试剂均匀分布各孔，37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱中孵育 6 h，将基础培养基更换为无双抗的完全培养基。

(6) 培养 24 h 后，提取总 RNA 检测 RNA 水平的表达效率；培养 48 h 后，提取总蛋白检测蛋白水平的表达效率。

2.3.7 蛋白提取实验

将转染好的 AC16 细胞，PBS 洗涤 2 遍；PMSF（蛋白酶抑制剂）解冻后加入到 RIPA 裂解液中（1: 100），可根据细胞量加入适量裂解液；4 $^{\circ}\text{C}$ ，20 rpm 水平摇床孵育 15 min，确保裂解液可以均匀覆盖到细胞表面；使用细胞刮将孵育后的细胞刮下来，收集裂解液至 1.5 mL 离心管中，超声破碎仪破碎 5 min，使细胞充分裂解；4 $^{\circ}\text{C}$ ，15000 $\times g$ 离心 5 min，取上清，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.3.8 BCA 蛋白定量实验

本实验选用成品 BCA 试剂盒，BCA 又称聚氰基丙烯酸正丁酯，是一种状态稳定、高度溶于水的复合物。在实验中，蛋白将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ ， Cu^+ 与 BCA 试剂形成蓝紫色的络合物。蛋白浓度越大，蓝紫色则越深。通过测定标样和样品 562 nm 处吸收值，通过拟合曲线计算样品蛋白浓度。

具体实验步骤如下：

(1) 计算标准品和样品数量，配制 BCA 工作液（BCA 试剂：Cu 试剂= 50: 1），混匀备用。

(2) BSA 标准品稀释十倍，取 10 μL BSA 标准品，加 90 μL PBS 稀释；按照 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的浓度配制标准样品，加入到 96 孔板中。

(3) 样品稀释十倍，涡旋混匀后，设置 3 个复孔，20 μL /孔加到 96 孔板中。

(4) 各孔添加 200 μL 提前配制好的 BCA 工作液，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

(5) 酶标仪测定各孔 A562 nm 处的吸光度，根据拟合曲线，计算蛋白浓度。

2.3.9 蛋白免疫印迹实验

(1) 安装胶板，试漏；按配方配制 12%分离胶，灌胶后立即缓慢加入无水乙醇液封，排出气泡，使胶面平齐；室温静置 30 min，期间配好 5%浓缩胶；倒出上层无水乙醇，用二次水轻轻冲洗 2 遍，滤纸吸干残余水分，加入浓缩胶；尽快插入梳子，切勿产生气泡，凝固备用。

(2) 根据蛋白浓度计算每组蛋白取用量，PBS 稀释后加入 5×Loading Buffer 混匀，金属浴 100°C变性 10 min，冷却备用。

(3) 将配好的胶板安装至电泳槽内，试漏；用力均匀拔出梳子；蛋白样品涡旋混匀，按照上样量缓慢加入胶孔。

(4) 上样完成后，100 V 恒压电泳 2 h。

(5) 湿法转膜：PVDF 膜用甲醇激活 15 s，在转膜夹依次放入网格垫、滤纸、蛋白凝胶、PVDF 膜、滤纸和网格垫，放入转膜槽，倒入现配 1×Transfer Buffer，开始转膜。12%分离胶用 100 V 恒压电泳 75 min。

(6) TBST 清洗 3 次 PVDF 膜，每次 5 min。

(7) 封闭：5%脱脂奶粉于摇床上室温孵育 1 h，进行封闭；弃去封闭液，TBST 洗涤 3 次，每次 5 min。

(8) 孵育一抗：按照说明书用 5% BSA TBST 稀释一抗，4°C过夜孵育；TBST 洗涤三次，每次 5 min。

(9) 孵育二抗：5%脱脂奶粉 TBST 稀释 HRP 标记的二抗，室温摇床孵育 1 h。TBST 清洗 3 次，每次 5 min。

(10) 显影：ECL 显影液按照 1: 1 混合，现配现用。孵育 PVDF 膜 1 min，凝胶成像仪中显影成像。

2.3.10 ROS 检测实验

活性氧检测是一种利用荧光探针二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯 (DCFH-DA) 进行活性氧检测。具体实验步骤为：

(1) 细胞生长至对数期时，实验前 24 h 于 96 孔板每孔均匀铺板细胞。

(2) 提前配置 DCFH-DA 工作液，加入 7 μ L 100 mM 原液至 0.7 mL 完全培养基中，

使其浓度为 1 mM。

(3) 每孔加入 10 μ L DCFH-DA 工作液，终浓度为 100 μ M，37°C，5% CO₂ 孵育 30 min，避光。

(4) 孵育期间，配置处理药物浓度。

(5) 孵育结束后，PBS 洗涤细胞两次。加入药物刺激细胞后，使用酶标仪在 485 nm 激发光和 530 nm 放射波长下检测细胞荧光强度。

2.3.11 线粒体膜电位检测实验

线粒体膜电位检测是一种以 JC-1 为荧光探针，快速灵敏地检测细胞内线粒体膜电位变化，具体实验步骤为：

(1) 细胞生长至对数期时，实验前 24 h 于 96 孔板每孔均匀铺板细胞。

(2) 加入药物刺激细胞后，PBS 洗涤细胞两次。

(3) 提前配置 JC-1 染色工作液，充分混匀。加入细胞中，培养箱中 37°C 孵育 20 min。

(4) 37°C 孵育结束后，吸除上清，用预冷的 PBS 洗涤 2 次。加入完全培养基，JC-1 探针装载完并洗涤后尽量在 30 min 内完成后续检测。

(5) 使用酶标仪在 490 nm 激发光和 530 nm 放射波长下检测单体的绿色荧光强度；在 525 nm 激发光和 590 nm 放射波长下检测聚合物的红色荧光强度。

2.3.12 统计分析

实验结果数据汇总，利用 GraphPad Prism 7 软件进行统计分析，实验所得数据均以平均数 \pm 标准误 (Mean \pm SEM) 的形式表示。设定 $p < 0.05$ 具有统计学差异； $p < 0.01$ 具有显著统计学差异； $p < 0.001$ 具有极显著统计学差异。

第三章 实验结果与讨论

3.1 不同浓度 LPS 对人心肌细胞 AC16 的影响

脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 是革兰氏阴性细菌外壁层中特有的一种化学成分, 是内毒素和重要群特异性抗原 (O 抗原), 常用来构建体外炎症模型。本研究使用 LPS 诱导心肌细胞炎症损伤, 我们在实验中选择了不同浓度的 LPS, 以模拟不同水平的细菌感染。实验过程中分别设置 LPS 处理浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.01 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 $\mu\text{g/mL}$, 其中 0 $\mu\text{g/mL}$ 作为空白对照组。设置 LPS 处理时间为 24 h。

本实验利用 qPCR 技术检测细胞炎性因子 *IL-6*、*IL-8* 和 *IL-1 β* mRNA 表达水平。白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 是细胞因子网络中的重要成员, 在急性炎症反应中处于中心地位, 与炎症性疾病及感染程度直接相关。研究发现 IL-6 能更快的诊断早期炎症及预警脓毒症的发生。如图 3-1 所示, 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, LPS 浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 实验组 *IL-6* mRNA 水平均极显著增加 ($p < 0.001$)。白细胞介素-8 (Interleukin-8, IL-8) 是由多种细胞合成表达, 如 T 淋巴细胞, 中性粒细胞, 内皮细胞等都可产生, 对多种白细胞均表现出趋化活性。IL-8 可促进超氧离子的释放, 在多种感染性疾病中升高, IL-8 升高与病原菌、刺激因子的刺激有关。如图 3-1 所示, 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, LPS 浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 实验组 *IL-8* mRNA 水平均极显著增加 ($p < 0.001$)。细胞因子白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 也被认为是一种致炎细胞因子, 广泛参与了多种病理损伤过程, 如人体组织破坏、水肿形成等。如图 3-1 所示, 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, LPS 浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 实验组 *IL-1 β* mRNA 水平均极显著增加 ($p < 0.001$)。

细胞粘附分子, 如 ICAM-1/CD54 (Intercellular cell adhesion molecule-1 即细胞间黏附分子-1) 和 VCAM-1/CD106 (Vascular adhesion molecule-1 即血管细胞黏附分子-1) 是一类细胞表面跨膜糖蛋白, 均属于黏附分子中免疫球蛋白超家族 (IGSF) 中的成员。在感染和炎症疾病期间, 多种炎症因子会诱导 VCAM-1 和 ICAM-1 表达上调, 并促进淋巴细胞的募集, 加重炎症反应。ICAM-1/VCAM-1 在脓毒症所致多器官功能衰竭患儿血浆中持续增加^[79]; 同样, 小鼠给予 LPS 在心肌中表达也增加^[80]。本研究利用 qPCR 技术检测 *VCAM-1* 和 *ICAM-1* mRNA 表达水平。如图 3-2, 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, LPS 浓度为

0.1 $\mu\text{g/mL}$ 实验组 *VCAM-1* mRNA 表达显著增加 ($p < 0.01$), LPS 浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 实验组 *VCAM-1* mRNA 表达增加, 具有统计学意义 ($p < 0.05$)。与之相似, 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, LPS 浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 实验组 *ICAM-1* mRNA 表达显著增加 ($p < 0.01$), LPS 浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 实验组 *ICAM-1* mRNA 表达显著增加 ($p < 0.01$)。

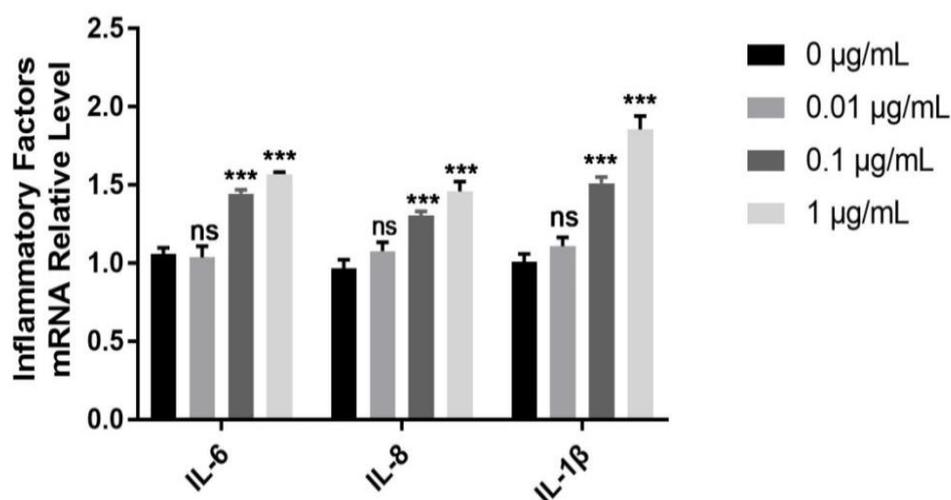


图3-1 AC16细胞中*IL-6*、*IL-8*和*IL-1 β* mRNA表达

Fig. 3-1 The expression of *IL-6*, *IL-8* and *IL-1 β* at mRNA level in AC16 (Mean \pm SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

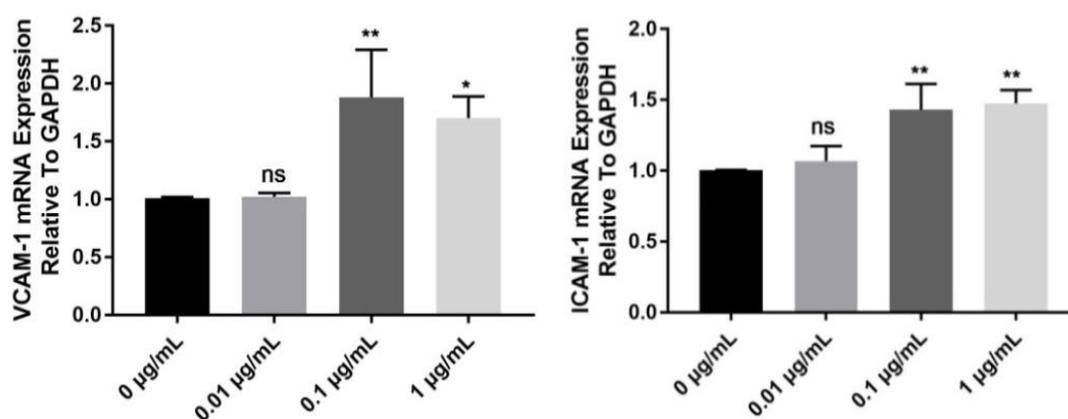


图3-2 AC16细胞中*VCAM-1*、*ICAM-1* mRNA表达

Fig. 3-2 The expression of *VCAM-1* and *ICAM-1* at mRNA level in AC16 (Mean \pm SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

线粒体是 ATP 的主要来源, 在呼吸氧化过程中, 将产生的能量以电化学势能储存于线粒体内膜, 在内膜两侧造成质子及其他离子浓度的不对称分布而形成线粒体膜电位 (Mitochondrial membrane potential, MMP)。膜电位的下降即去极化, 在细胞凋亡级联反应过程中最早发生。本实验选用 JC-1 荧光探针, 检测细胞线粒体膜电位, 线粒体膜

电位较高时, JC-1 聚集在线粒体的基质中, 形成聚合物, 产生红色荧光; 在线粒体膜电位较低时, JC-1 不能聚集在线粒体的基质中, 表现为单体, 产生绿色荧光。常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。结果如图 3-3, 细胞线粒体膜电位变化水平与 LPS 浓度呈反比。与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, LPS 浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 实验组线粒体膜电位下降, 具有统计学意义 ($p < 0.05$), LPS 浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 实验组线粒体膜电位显著降低 ($p < 0.01$)。

ROS 主要来源是线粒体, 当线粒体功能障碍会释放大量 ROS, 而 ROS 积累会损伤生物内离子稳态, 从而导致细胞和机体的能量代谢障碍。此外, ROS 积累也会加速炎症反应。利用 DCFH-DA 染色细胞进行 ROS 检测。DCFH-DA 本身虽然没有荧光, 但可穿过细胞膜, 进入细胞内后, 被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能通透细胞膜, 从而使探针很容易被装载到细胞内。细胞内无荧光的 DCFH 被 ROS 氧化, 生成有荧光的 DCF, 使用酶标仪检测细胞荧光强度。结果如图 3-4 所示, 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, LPS 浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 实验组 ROS 水平显著升高 ($p < 0.01$), LPS 浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 实验组 ROS 水平显著升高 ($p < 0.01$)。基于以上结果后续诱导心肌细胞炎症损伤实验选择 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 为药物最佳处理浓度, 处理时间为 24 h。

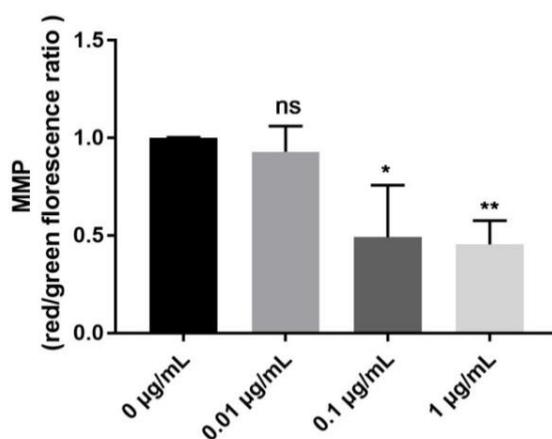


图3-3 AC16细胞中MMP变化

Fig. 3-3 The changes of MMP in AC16

(Mean \pm SEM, $n = 3$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

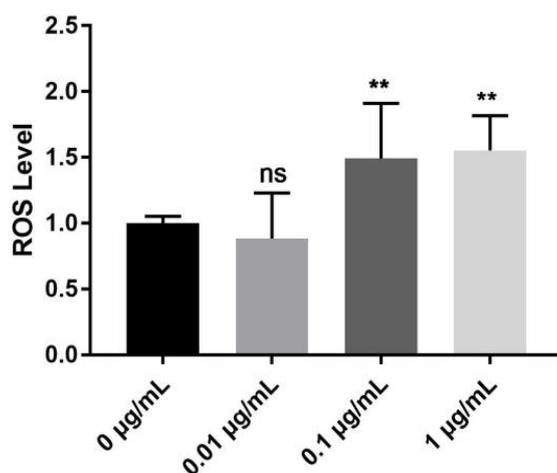


图3-4 AC16细胞中ROS的表达

Fig. 3-4 The expression of ROS in AC16

(Mean ± SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.2 在 LPS 诱导的心肌细胞炎症损伤中内源性 TFEB 的表达

为探索 LPS 处理人 AC16 心肌细胞内源性 TFEB 的表达变化。实验组细胞经 LPS 刺激 24 h 后，RIPA 裂解液提取总蛋白，BCA 法测定各组总蛋白浓度，WB 检测 TFEB 蛋白表达，如图 3-5，相比于 AC16 组，LPS 组 TFEB 蛋白表达量增加，具有统计学差异 ($p < 0.05$)。

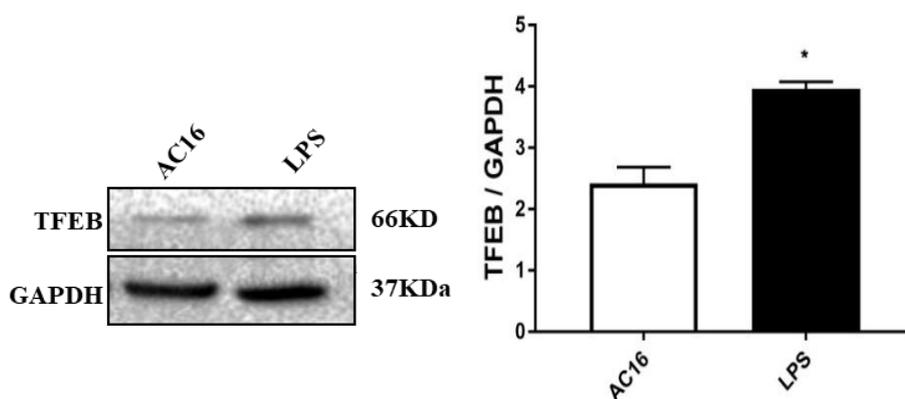


图3-5 AC16细胞中TFEB蛋白表达

Fig. 3-5 The expression of TFEB at protein level in AC16

(Mean ± SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.3 TFEB 沉默模型构建

将 3 条不同 TFEB-siRNA 序列转染到人 AC16 心肌细胞中。转染 48 h 后，利用 Trizol 法提取总 RNA，反转录后在相同条件下对目的基因 *TFEB* 和内参基因 *GAPDH* 分别进行

SYBR Green 染色法的 qPCR 实验，对得到的实验结果进行 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析。如图 3-6 所示，与 AC16 组相比，在转染 TFEB-siRNA 2#序列后 *TFEB* mRNA 的表达量降低，具有统计学差异 ($p < 0.05$)，1#序列 *TFEB* mRNA 表达量显著降低 ($p < 0.01$)。

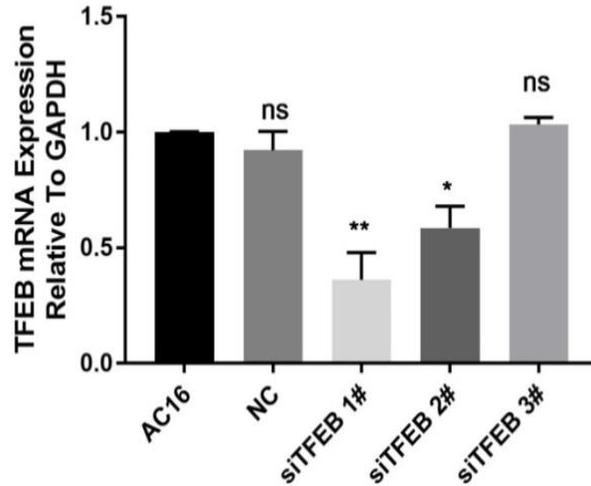


图3-6 AC16细胞中*TFEB* mRNA表达

Fig. 3-6 The expression of *TFEB* at mRNA level in AC16 (Mean \pm SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

转染 3 条 *TFEB*-siRNA 48 h 后，RIPA 裂解液提取总蛋白，进行 WB 实验，分析灰度值，检测沉默 *TFEB* 的蛋白表达。如图 3-7 所示，转染 *TFEB*-siRNA 1#序列 *TFEB* 的蛋白表达量降低，具有统计学差异 ($p < 0.05$)，基于 mRNA 水平和蛋白水平 *TFEB* 的抑制效果，选用 1#序列进行后续实验。

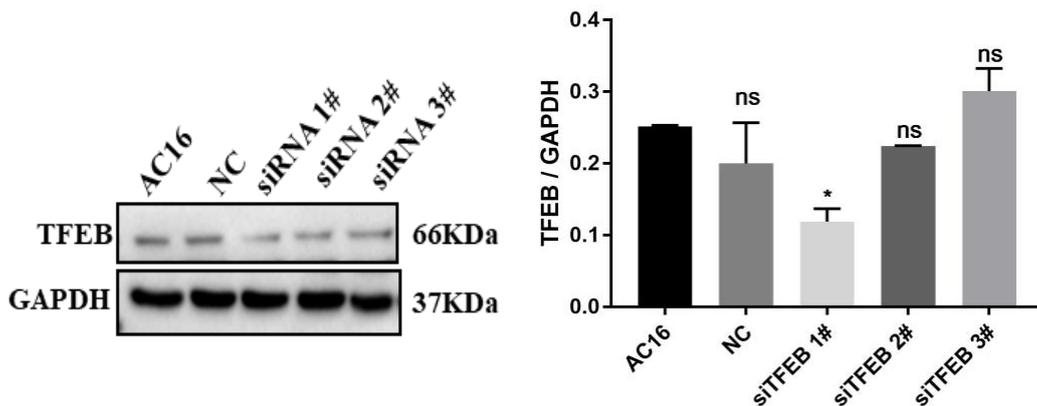


图3-7 AC16细胞中*TFEB*蛋白表达

Fig. 3-7 The expression of *TFEB* at protein level in AC16 (Mean \pm SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.4 沉默TFEB对LPS诱导的心肌细胞炎症损伤的影响

为探究沉默TFEB对LPS诱导的人AC16心肌细胞炎症反应的影响，分组为LPS组、LPS+NC组和LPS+siTFEB组。结果如图3-8，相比于LPS+NC组和LPS组，LPS+siTFEB组IL-6 mRNA表达量显著增加 ($p < 0.01$)，IL-8 mRNA表达量增加，具有统计学差异 ($p < 0.05$)。WB检测沉默TFEB的人AC16心肌细胞中黏附分子ICAM-1和VCAM-1及凋亡蛋白BAX的表达。如图3-9所示，转染siTFEB 48 h后，相比于LPS组，LPS+siTFEB组ICAM-1和VCAM-1蛋白表达量增加 ($p < 0.05$)，BAX蛋白表达量增加，具有统计学差异 ($p < 0.05$)。

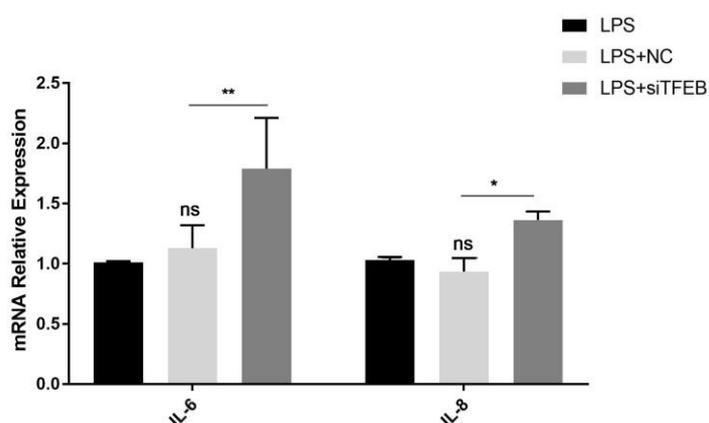


图3-8 AC16细胞IL-6和IL-8 mRNA表达

Fig. 3-8 The expression of IL-6 and IL-8 at mRNA level in AC16 (Mean \pm SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

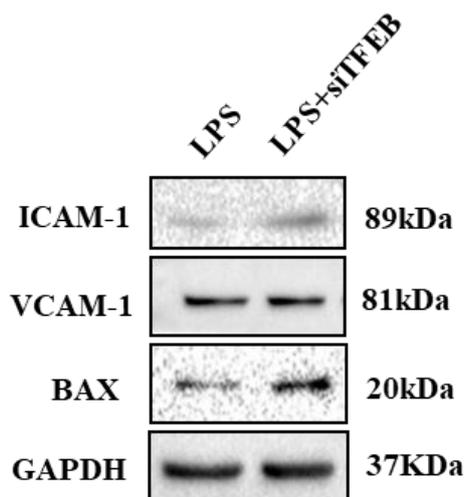


图3-9 AC16细胞中VCAM-1、ICAM-1和BAX表达的蛋白水平

Fig. 3-9 The expression of VCAM-1, ICAM-1 and BAX at protein level in AC16 (Mean \pm SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.5 TFEB 过表达模型构建

3.5.1 SBP-TFEB 重组质粒的菌液 PCR 鉴定

以 pDNA3.1(+)-TFEB 质粒为模板，以 TFEB-F/TFEB-R 为引物进行 PCR 扩增，扩增产物 1473 bp 的 TFEB cDNA。将扩增产物进行琼脂糖凝胶回收纯化，以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 为酶切位点进行双酶切将 TFEB 连接到 pIRES-EGFP 载体上。SBP-TFEB 重组质粒转化到感受态 DH5 α 菌种中，进行菌液 PCR 鉴定，如图 3-10 所示，从图中可以看出，扩增产物大小为 1473 bp 基因片段，这与 TFEB 基因序列大小相符。300 μ L 左右菌液送公司测序，其余菌液甘油保种。

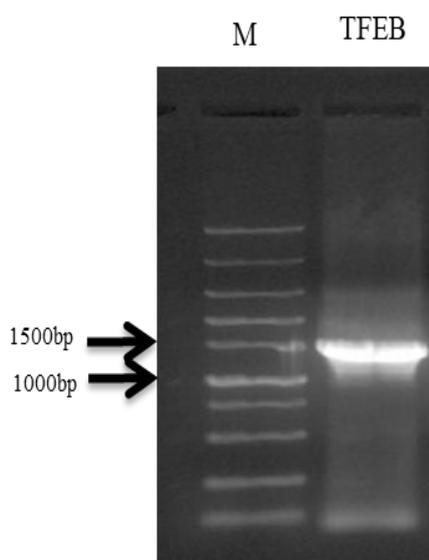


图3-10 菌液PCR电泳胶图

Fig. 3-10 Agarose gel electrophoresis of bacterial solution PCR

3.5.2 SBP-TFEB 的测序鉴定

经菌液 PCR 鉴定正确后测序，利用 DNAMAN 软件进行测序序列比对，结果如图 3-11 所示，TFEB 序列与重组质粒上的序列完全吻合，提示 SBP-TFEB 质粒构建成功，可进行后续实验。

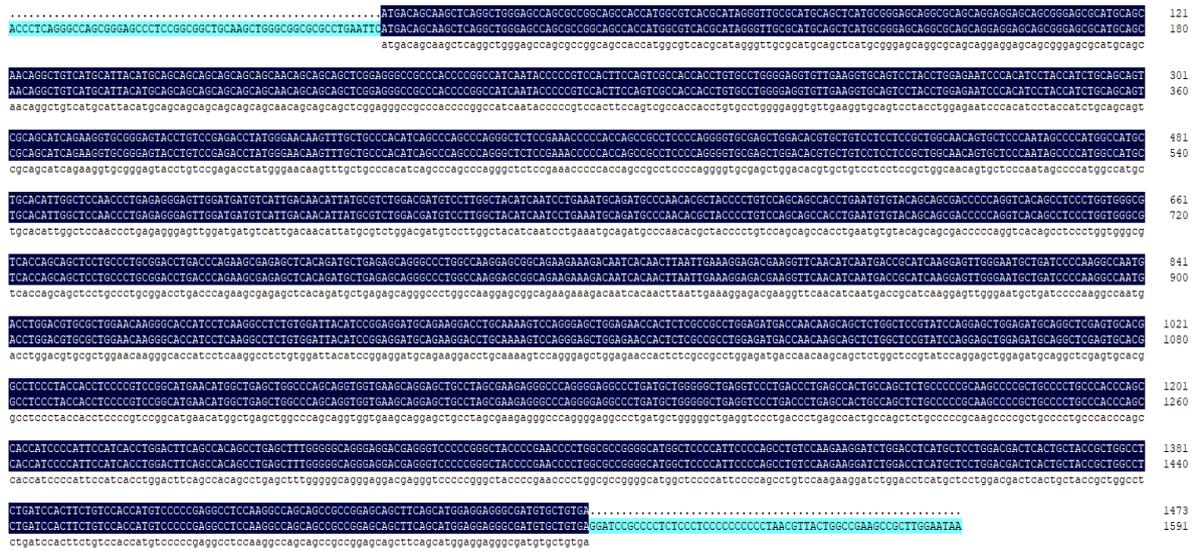


图3-11 序列结果比对图

Fig. 3-11 Gene sequence comparison diagram

3.5.3 SBP-TFEB 重组质粒转染效率鉴定

此次实验设置三个分组，分别为 AC16 组、Vector（空载）组、SBP+TFEB 组，使用 Lipofectamine™ 3000 Reagent 进行细胞转染。转染 48 h 后，Trizol 法提取总 RNA，反转录后在相同条件下对目的基因 *TFEB* 和内参基因 *GAPDH* 分别进行 SYBR Green 染色法的 qPCR 反应，检测 *TFEB* mRNA 水平的转染效率，得到的实验结果进行 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析。如图 3-12 所示，*TFEB* mRNA 相对表达量与其他两个实验组相比，极显著增加 ($p < 0.001$)。

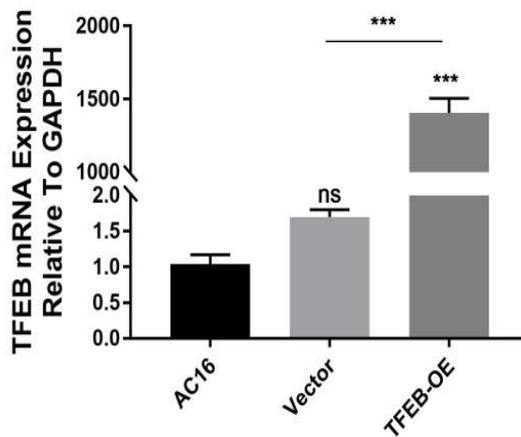


图 3-12 AC16 细胞中 *TFEB* mRNA 水平

Fig. 3-12 The expression of *TFEB* at mRNA level in AC16

(Mean \pm SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

利用脂质体转染技术转染 SBP-TFEB 重组质粒 48 h 后, RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法测定各组总蛋白浓度, WB 检测 TFEB 蛋白水平的转染效率, 如图 3-13 所示, TFEB-OE 组出现了明显的条带。利用 Image Lab 软件分析灰度值, 以检测 TFEB 过表达的蛋白水平, 得到图 3-13, 从图中可直观看转染 SBP-TFEB 重组质粒后, 与其他两个实验组对比, TFEB 蛋白相对表达量显著增加 ($p < 0.01$)。

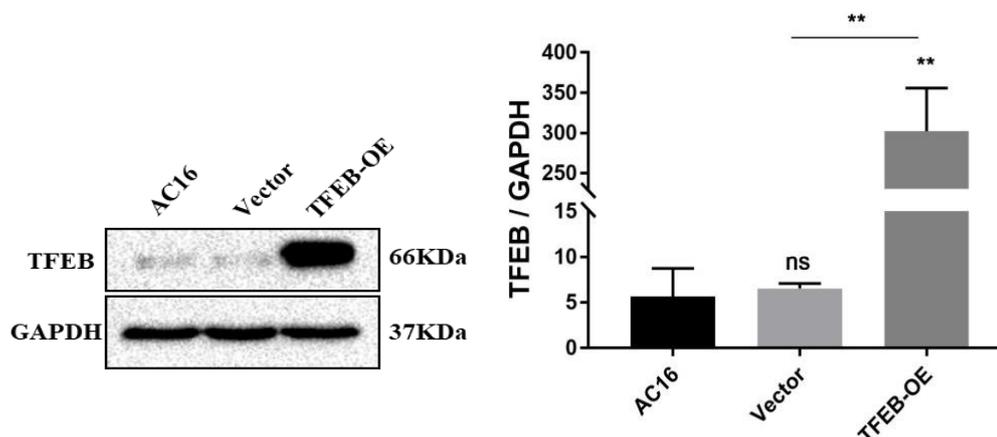


图 3-13 AC16 细胞中 TFEB 蛋白表达水平

Fig. 3-13 The expression of TFEB at protein level in AC16

(Mean ± SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.6 过表达 TFEB 对 LPS 诱导的心肌细胞炎症损伤的影响

3.6.1 过表达 TFEB 对自噬的影响

自噬是细胞生存和稳态的重要调节因子, 缺乏自噬会促进炎症反应和氧化应激, 导致不同组织的各种病理疾病。自噬的整个过程中, 时刻都受到不同的自噬相关基因 (Autophagy-related gene, ATG) 的调控。ATG3/5/7 参与自噬泡的延伸与自噬体的成熟; Beclin1 (BECN1) 是 PI3K 复合物的整体支架, 促进自噬蛋白定位到自噬泡。转染 SBP-TFEB 重组质粒 48 h 后, qPCR 检测自噬溶酶体途径相关基因 mRNA 表达水平, 包括自噬相关的基因 *ATG3*、*ATG5*、*ATG7* 和 *Beclin1*。结果如图 3-14, 相比于 AC16 组, LPS 组 *ATG7* mRNA 表达显著增加 ($p < 0.01$); 相比于 LPS 组, LPS+TFEB-OE 组 *ATG3* mRNA 表达增加, 具有统计学差异 ($p < 0.05$), *ATG5*、*ATG7* mRNA 表达均极显著增加 ($p < 0.01$), *Beclin1* mRNA 表达显著增加 ($p < 0.01$)。在自噬过程中, LC3II 定位到自噬小体, 参与自噬体膜形成。因此, LC3II 被当做细胞发生自噬的分子标志, LC3II 的含量和发生自噬的程度成正比。LC3B 作为 LC3 的一种, 同样可用作自噬的分子标志。

在人 AC16 心肌细胞中,使用终浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 刺激细胞 24 h,转染 SBP-TFEB 重组质粒 48 h 后, WB 检测自噬标记物 LC3B 蛋白表达。如图 3-15, 相比于 AC16 组, LPS 组 LC3BII 蛋白表达增加,具有统计学差异($p < 0.05$);相比于 LPS 组,LPS+TFEB-OE 组 LC3BII 蛋白水平显著增加($p < 0.01$)。自噬体与溶酶体融合是自噬途径的倒数第二步。溶酶体膜标记物 (Recombinant Lysosomal Associated Membrane Protein 1/2, LAMP1/2) 和 (Cathepsin D, CTSD) 可作为在自噬性溶酶体内含物降解前追踪自噬性溶酶体融合的有效工具。结果如图 3-14 所示,相比于 AC16 组, LPS 组 *LAMP1* mRNA 表达极显著增加 ($p < 0.001$), *LAMP2* mRNA 表达增加,具有统计学差异 ($p < 0.05$), *CTSD* mRNA 表达极显著降低 ($p < 0.001$); 相比于 LPS 组, LPS+TFEB-OE 组 *LAMP1* mRNA 表达显著增加 ($p < 0.01$), *LAMP2* 和 *CTSD* mRNA 表达均极显著增加 ($p < 0.001$)。

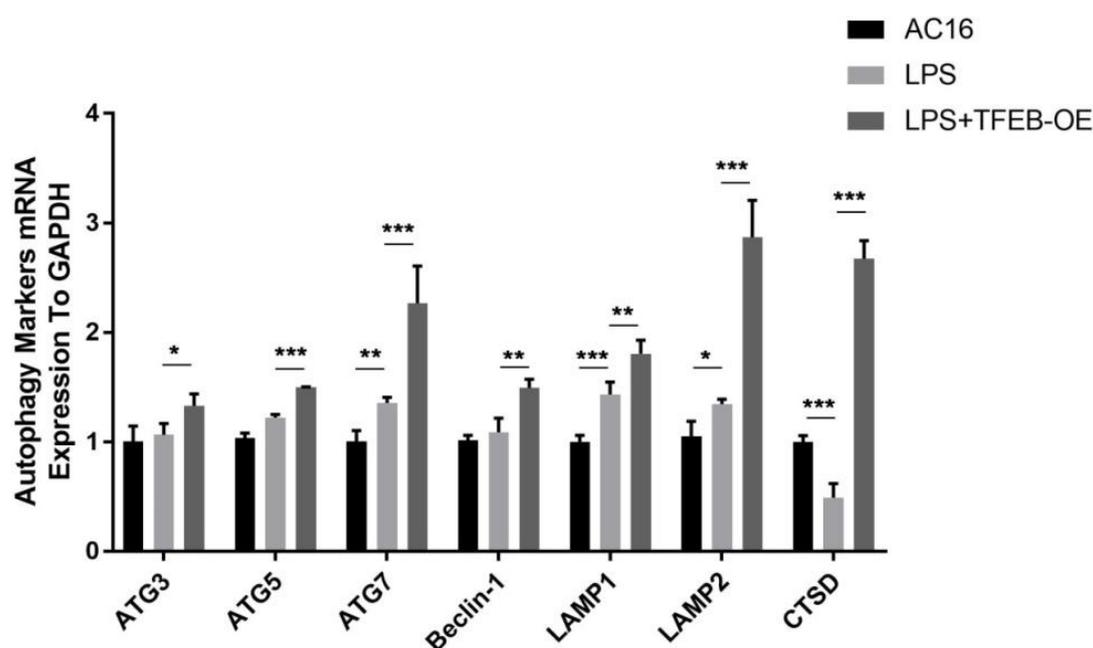


图3-14 AC16细胞中自噬相关基因表达

Fig. 3-14 The expression of autophagy markers at mRNA level in AC16
(Mean \pm SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

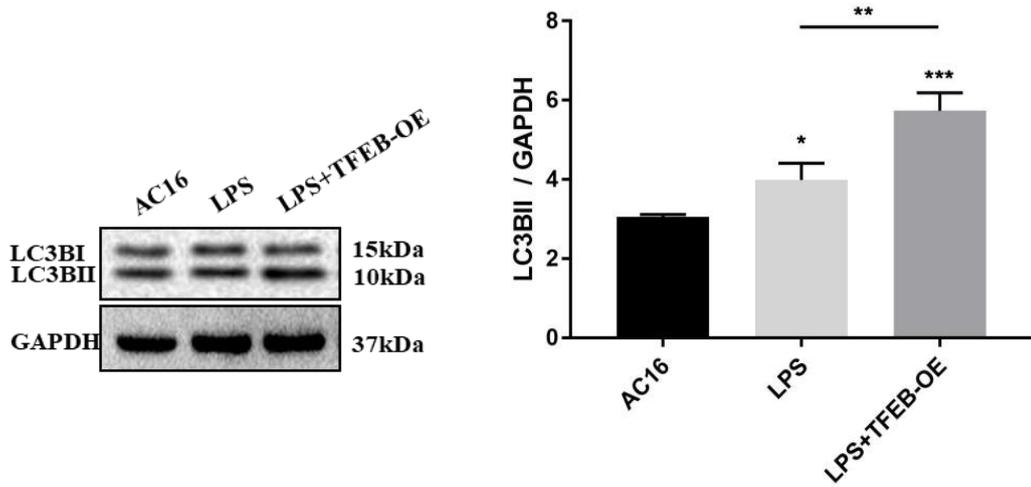


图3-15 AC16细胞中LC3B蛋白表达

Fig. 3-15 The expression of LC3B at protein level in AC16
(Mean \pm SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.6.2 过表达 TFEB 对炎症反应的影响

在人 AC16 心肌细胞中,使用终浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 刺激细胞 24 h, SBP-TFEB 重组质粒 48 h 后,qPCR 技术检测结果如图 3-16 所示,与 AC16 组相比,LPS 实验组 *IL-1 β* mRNA 表达显著增加 ($p < 0.01$); 与 LPS 组, LPS+TFEB-OE 组 *IL-1 β* mRNA 水平显著降低 ($p < 0.01$)。与之相似,与 AC16 组相比, LPS 实验组 *IL-8* mRNA 表达极显著增加 ($p < 0.001$); 与 LPS 组相比, LPS+TFEB-OE 组 *IL-8* mRNA 水平极显著降低 ($p < 0.01$)。

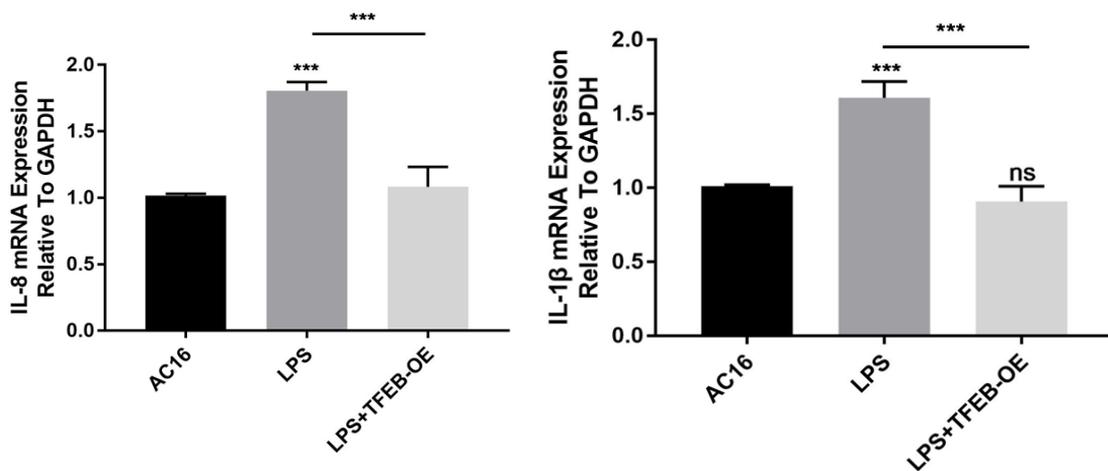


图 3-16 AC16 细胞中 *IL-8* 和 *IL-1 β* mRNA 的表达

Fig. 3-16 The expression of *IL-8* and *IL-1 β* at mRNA level in AC16
(Mean \pm SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

利用脂质体转染技术转染 SBP-TFEB 重组质粒 48 h 后, WB 检测细胞黏附分子蛋白表达。结果如图 3-17 所示, 与 AC16 组相比, LPS 组 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达升高, 具有统计学意义 ($p < 0.05$); 与 LPS 组相比, LPS+TFEB-OE 组 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达均降低, 具有统计学意义 ($p < 0.05$)。

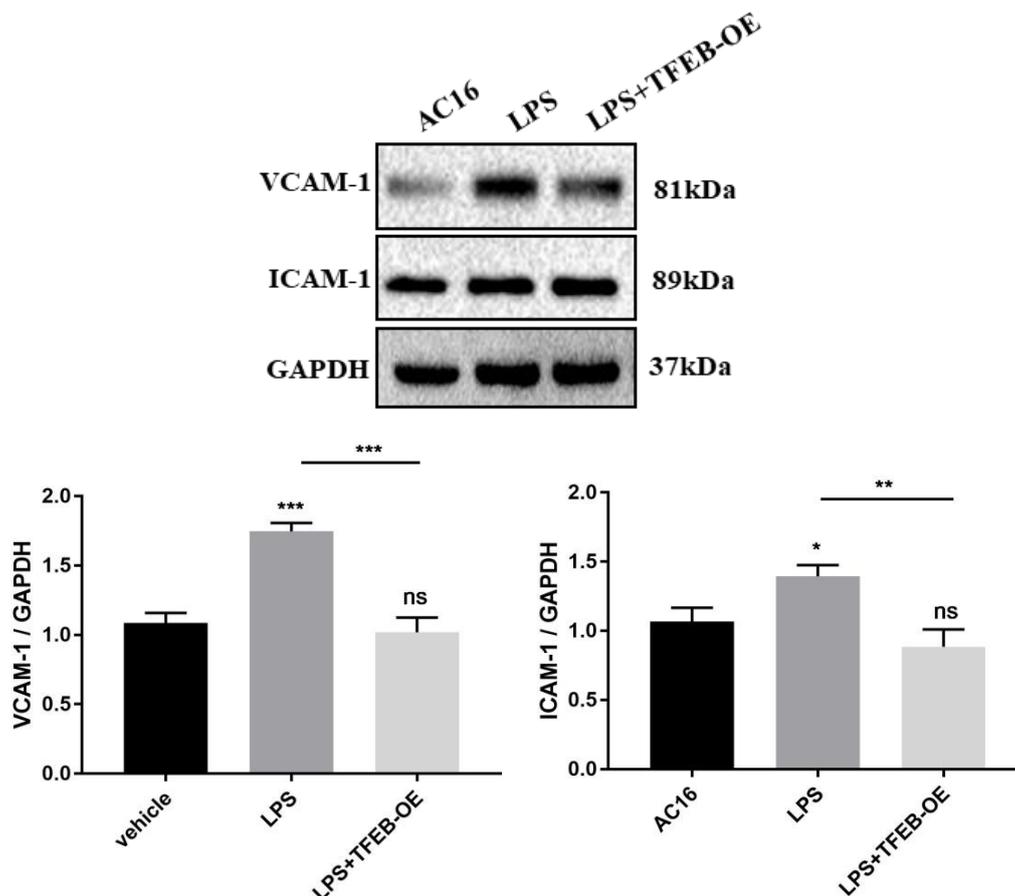


图3-17 AC16细胞中VCAM-1与ICAM-1蛋白表达

Fig. 3-17 The expression of VCAM-1 and ICAM-1 at protein level in AC16
(Mean ± SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.6.3 过表达 TFEB 对 ROS 积累的影响

本实验利用 LPS 浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 刺激人 AC16 心肌细胞 24 h, 转染 Vector (空载体) 和 SBP-TFEB 重组质粒 48 h 后, DCFH-DA 染色细胞, 37°C 避光孵育 30 min, 酶标仪检测细胞荧光强度。结果如图 3-18, 与 AC16 组相比, LPS 组细胞 ROS 水平显著升高 ($p < 0.01$); 与 LPS 组相比, LPS+TFEB-OE 组细胞 ROS 水平显著降低 ($p < 0.01$)。

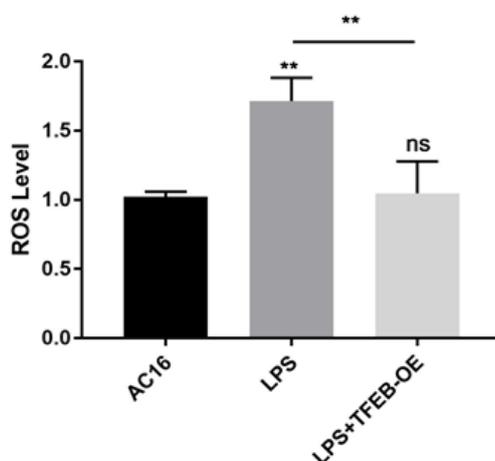


图3-18 AC16细胞中ROS表达水平

Fig. 3-18 The expression of ROS in AC16

(Mean ± SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.6.4 过表达 TFEB 对凋亡的影响

BAX 是极重要的促细胞凋亡基因之一，它的上调会使细胞趋于死亡。利用脂质体技术转染 SBP-TFEB 重组质粒 48 h 后，WB 检测细胞促细胞凋亡 BAX 蛋白表达。如图 3-19 所示，与 AC16 组相比，LPS 组 BAX 蛋白表达增加，具有统计学意义 ($p < 0.05$)；与 LPS 组相比，LPS+TFEB-OE 组 BAX 蛋白表达显著降低 ($p < 0.01$)。

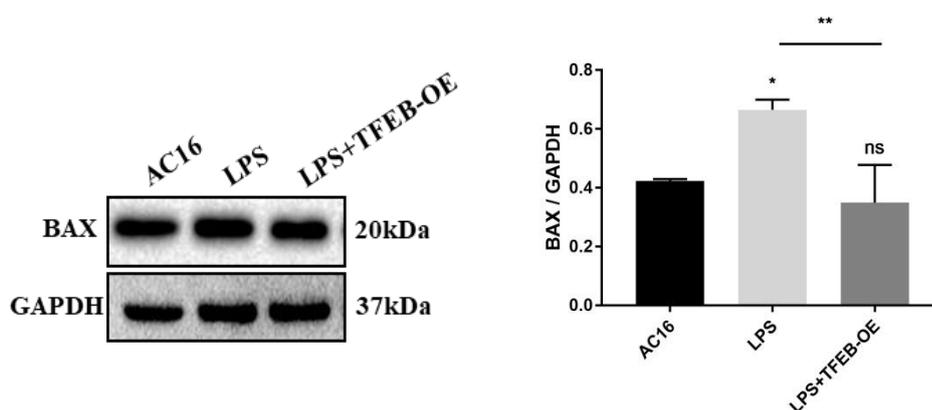


图3-19 AC16细胞中BAX蛋白的表达

Fig. 3-19 The expression of BAX at protein level in AC16

(Mean ± SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.7 抑制自噬对 LPS 诱导心肌细胞炎症损伤的影响

为了探索外源性 TFEB 过表达后对心肌炎症损伤的保护作用是否依赖于自噬溶酶体信号通路，利用抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-Methyladenine, 3-MA) 和氯喹 (Chloroquine,

CQ) 抑制自噬。脂溶性自噬抑制剂 CQ 提前利用 DMSO 配置为 100 μM 母液, 稀释为终浓度为 20 μM 预处理人 AC16 心肌细胞 16 h; 水溶性自噬抑制剂 3-MA 终浓度为 5 mM 预处理人 AC16 心肌细胞 3 h。实验设置四个分组, 分别为 TFEB-OE+LPS 组、TFEB-OE+LPS+3-MA 组、TFEB-OE+LPS+CQ 组和 TFEB-OE+LPS+DMSO 组。白细胞介素-10 (Interleukin-10, IL-10) 是一种抗炎细胞因子, 也被称为人类细胞因子合成抑制因子 (CSIF)。利用 qPCR 技术检测细胞抗炎因子 *IL-10* mRNA 表达, 如图 3-20, 与 TFEB-OE+LPS 组相比, TFEB-OE+LPS+3-MA 组 *IL-10* mRNA 表达降低, 具有统计学差异 ($p < 0.05$), TFEB-OE+LPS+CQ 组 *IL-10* mRNA 表达显著降低 ($p < 0.01$)。结果如图 3-21, 与 TFEB-OE+LPS 组相比, TFEB-OE+LPS+3-MA 组抑制自噬体的形成, LC3BII 蛋白表达降低 ($p < 0.05$), TFEB-OE+LPS+CQ 组抑制自噬体与溶酶体融合, 自噬体积累, LC3BII 蛋白表达增加 ($p < 0.05$)。WB 同时检测了细胞黏附分子 (VCAM-1 和 ICAM-1) 和促凋亡蛋白 (BAX) 的蛋白表达, 与 TFEB-OE+LPS 组相比, TFEB-OE+LPS+3-MA 组和 TFEB-OE+LPS+CQ 组 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达均增加 ($p < 0.05$), 与 BAX 蛋白表达相同 ($p < 0.05$)。DCFH-DA 染色细胞, 37°C 避光孵育 30 min, 酶标仪检测细胞荧光强度。结果如图 3-22, 与 TFEB-OE+LPS 组相比, TFEB-OE+LPS+3-MA 组细胞 ROS 相对荧光强度显著增加 ($p < 0.01$), TFEB-OE+LPS+CQ 组细胞 ROS 相对荧光强度极显著增加 ($p < 0.001$)。

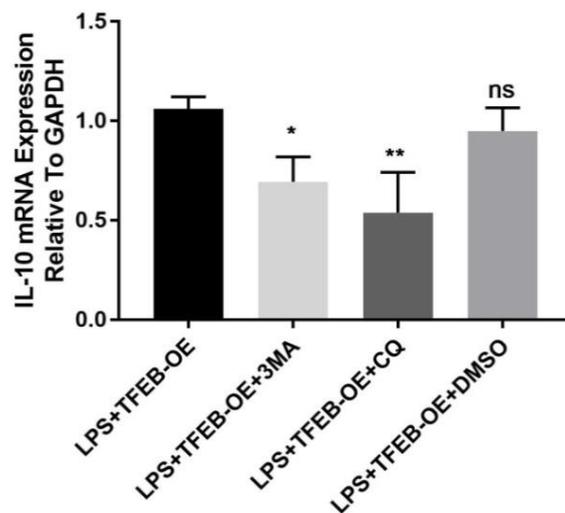


图3-20 AC16细胞中*IL-10* mRNA表达

Fig. 3-20 The expression of *IL-10* at mRNA level in AC16 (Mean \pm SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

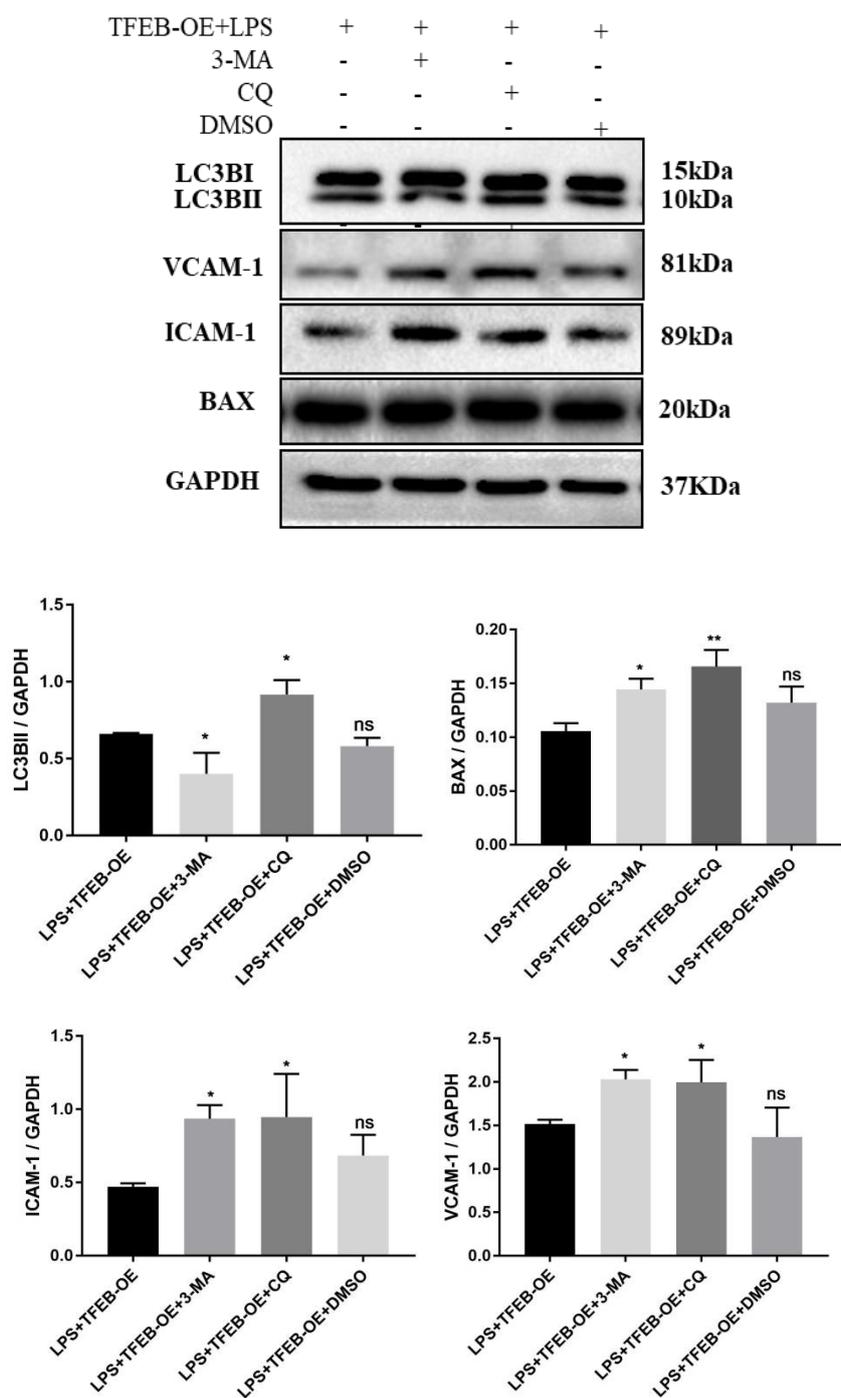


图3-21 AC16细胞中LC3B、VCAM-1、ICAM-1和BAX蛋白的表达

Fig. 3-21 The expression of LC3B,VCAM-1,ICAM-1 and BAX at protein level in AC16 (Mean ± SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

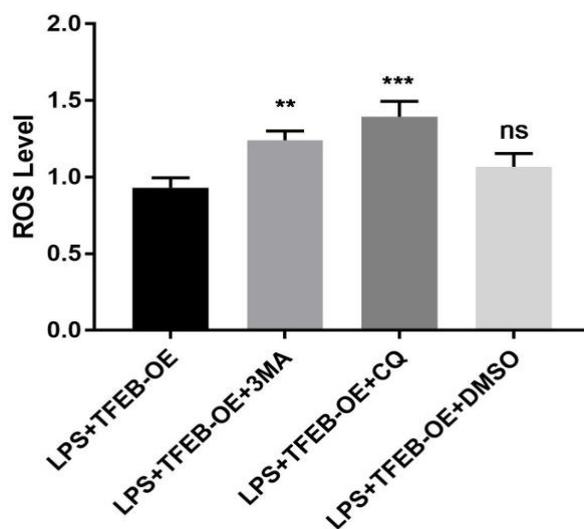


图3-22 AC16细胞中ROS表达水平

Fig. 3-22 The expression of ROS in AC16

(Mean ± SEM, n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

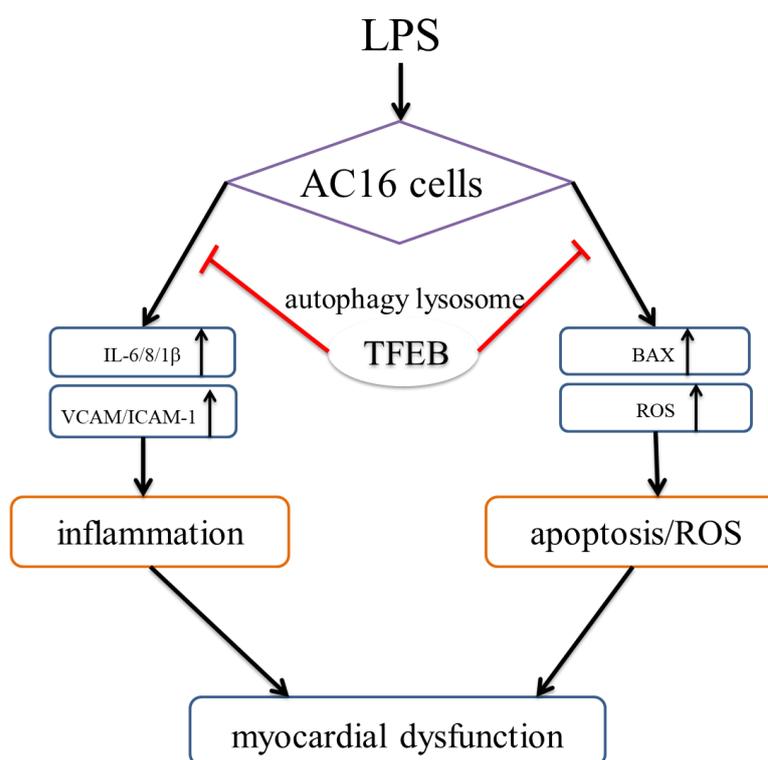
3.8 讨论

心肌炎是脓毒症患者死亡率高的主要原因之一，炎症期间会发生生物能量改变，包括低代谢和自噬受损^[81]。研究发现，上调自噬可减少线粒体损伤和炎症反应^[82]。TFEB是第一个被鉴定的 MiTF/TFE 家族成员，该家族包括 TFEB、TFE3、MiTF 和 TFEC，在调控溶酶体生物发生和自噬中发挥关键作用^[83, 84]。研究表明，LPS 可诱导肺组织和内皮细胞发生自噬，诱导的自噬可能存在缺陷，导致自噬体积累^[12]。在这种情况下自噬似乎是有利的。同样的，我们研究发现 LPS 处理心肌细胞后，LC3BII 表达上调，自噬体增多，可能是因为降解不完全。TFEB 可以促进自噬体-溶酶体融合，它具有解决自噬积累和维持降解途径的重要作用^[40]。在本研究中我们发现，TFEB 可上调细胞自噬溶酶体相关蛋白的表达，激活自噬和增强溶酶体功能。TFEB 过表达可减轻 LPS 处理心肌细胞引起自噬体积累，激活心肌炎细胞模型的自噬，促进自噬体的清除。在这种情况下自噬的激活似乎是有益的。除此之外，我们发现 LPS 处理人 AC16 心肌细胞后内源性 TFEB 表达上调。之前研究已经证明，LPS 处理巨噬细胞后导致细胞能量水平急性降低、诱导 TFEB/TFE3 核易位和炎症细胞因子上调^[85]。与我们研究结果一致。为了进一步研究内源性 TFEB 上调的机制，我们用 si-RNA 沉默 TFEB。沉默 TFEB 以后，发现细胞炎症因子以及细胞黏附分子表达上调，同时也发现促凋亡蛋白表达上调。因此，我们推测 TFEB 的上调可能是一种代偿效应。

线粒体在心肌炎症中起着重要作用^[86, 87]。线粒体是含有 DNA 的细胞器, 因此对氧化应激非常敏感, 容易受到损伤^[88]。临床上研究表明, 线粒体功能障碍的程度与心肌炎的预后密切相关^[89]。此外, 脓毒性心肌炎引发的线粒体损伤发生在心肌炎症反应之前, 如细胞因子产生和 NF- κ B 激活。我们发现 LPS 诱导人 AC16 心肌细胞线粒体膜电位下降, 即去极化, 细胞活力下降。这与我们检测到 LPS 组 BAX 蛋白升高, 与线粒体去极化整体细胞活力下降相对应, 但在 TFEB-OE 组中 BAX 表达降低。细胞死亡的增加导致炎症的增加, 这与氧化应激的增加有关。在大鼠肺炎相关性脓毒症模型中, 实验证明脓毒症会损伤心脏线粒体, 导致细胞膜完整性受损, 增加了氧化应激, 而抗氧化防御降低^[90]。当线粒体受损时, 如代谢受损, 能量产生改变, 大量的氧化酶释放^[50]; 过量的氧化酶释放会导致更严重的氧化应激和线粒体损伤, 形成恶性循环, 导致脓毒症性心力衰竭。ROS 可激活多种肥大信号激酶和转录因子, 介导细胞凋亡^[91]。这一过程是循环的, 从而增强了内毒素的破坏作用。脓毒症期间的心脏炎症可能适用于上述调节机制。在脓毒症模型中, 特异性抑制线粒体 ROS 可以保护心脏线粒体, 减轻炎症, 改善心脏功能^[87]。在本研究中, 我们发现 LPS 组的 ROS 水平显著升高, 而 LPS+TFEB-OE 组显著降低。我们推测 TFEB 过表达抑制了线粒体损伤, 改善 LPS 诱导的细胞炎症损伤中 ROS 积累。LPS 诱导的线粒体 ROS 和心肌炎症二者紧密相连。线粒体 ROS 参与刺激炎症反应, 会触发线粒体损伤, 导致炎症反应的下游恶化加剧。另一些研究报道称, 炎症介质参与心肌线粒体 ROS 积累和线粒体损伤^[92]。过度炎症是脓毒性心肌炎患者的特征反应之一, 也是心脏衰竭的主要原因。脓毒症心肌病的主要治疗手段包括抗炎、抗氧化和间充质干细胞干预治疗。在本研究中, 过表达 TFEB 降低炎症反应, 而抑制 TFEB 的表达则相反。综上所述, 我们推测 TFEB 通过激活自噬, 减轻 LPS 诱导的细胞炎症反应、ROS 积累和细胞凋亡。这些结果证实了 TFEB 对 LPS 诱导的心肌炎症损伤具有保护作用。但是我们的研究尚有一些局限性, 其调节炎症反应的具体机制尚未深入探讨。

上述结果证明了 TFEB 对 LPS 诱导的心肌炎症损伤的保护作用, 又鉴于 TFEB 与自噬密切相关, 因此本实验对自噬与 TFEB 治疗心肌炎症损伤的关系进行深入探讨, 研究抑制自噬对 TFEB 对 LPS 诱导的心肌炎症损伤保护作用的影响。自噬过程包括激活自噬上游信号、自噬体形成以及自噬体-溶酶体融合。本研究采用自噬抑制剂 CQ 和 3-MA 处理人 AC16 心肌细胞, 分别抑制上游自噬体的形成以及下游自噬体与溶酶体融合的过程。

本实验中加入两种自噬抑制剂以后，细胞黏附分子 VCAM-1 和 ICAM-1、凋亡蛋白 BAX 和细胞 ROS 表达均上调，并且抑制了抗炎因子 IL-10 的表达。以上结果都证实抑制自噬逆转了 TFEB 过表达对 LPS 诱导的心肌细胞损伤的保护作用，因此我们推测 TFEB 可以通过激活自噬溶酶体途径对 LPS 诱导的心肌炎症损伤起到保护作用。也就是说，TFEB 对 LPS 诱导的心肌炎起到的保护作用是依赖于自噬溶酶体途径的。总之，我们发现 LPS 诱导的内源性 TFEB 增加可能是代偿性的，而外源性 TFEB 过表达可通过调节自噬对人 AC16 心肌细胞中 LPS 引起的炎症反应、线粒体 ROS 积累和凋亡起到保护作用。因此 TFEB 可能是心肌炎症损伤的潜在治疗靶点。本实验计划在下一步实验中运用流式细胞术检测 TFEB 过表达对人 AC16 细胞凋亡细胞所占比例，进一步验证 TFEB 与心肌炎症损伤的关系。由于体外实验所模拟的免疫环境比较单一，与体内环境具有很大差别，这一定程度上影响了本课题的实验结果的准确性，因此下一步需要进行动物实验模拟体内环境进行本实验的补充论证。



第四章 结 论

(1) 在心肌细胞炎症损伤中内源性 TFEB 表达上调，但沉默其表达加重炎症反应和凋亡。

(2) 外源性 TFEB 过表达可通过调节自噬对人 AC16 心肌细胞中 LPS 引起的炎症反应、线粒体 ROS 积累和凋亡起到抑制作用。综上所述，TFEB 是通过激活自噬溶酶体途径对心肌炎症损伤发挥保护作用。因此，靶向 TFEB 和自噬可能是治疗或预防心脏炎症损伤的一个可行性策略。

参考文献

- [1] Rudd, K.E., Johnson, S. C., Agesa, K. M., et al., Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the global burden of disease study[J]. *Lancet*, 2020. 395(10219): 200-211.
- [2] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D., Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013. 13(12): 862-874.
- [3] Flynn A, Chokkalingam Mani B., Mather P.J., Mather, Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms[J]. *Heart Fail Rev*, 2010. 15(6): 605-611.
- [4] Liu Y.C., Yu, M.M., Shou S.T., et al., Sepsis-induced cardiomyopathy: mechanisms and treatments. *Front Immunol*, 2017. 8:1021.
- [5] Huang, M., Cai, S., Su, J., The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets[J]. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(21) : 5376.
- [6] Wilson, J.W., Schurr, M.J., LeBlanc, C.L., et al., Mechanisms of bacterial pathogenicity[J]. *Postgrad Med J*, 2002. 78(918): 216-224.
- [7] Raeburn, C.D., Sheppard, F., Barsness, K.A., et al., Cytokines for surgeons[J]. *Am J Surg*, 2002. 183(3): 268-273.
- [8] Steingrimsson, E., Tessarollo, L., Pathak, B., et al., Mitf and Tfe3, two members of the Mitf-Tfe family of bHLH-Zip transcription factors, have important but functionally redundant roles in osteoclast development[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(7): 4477-4482.
- [9] Hodgkinson, C.A., Moore, K. J., Nakayama, A., et al., Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein[J]. *Cell*, 1993. 74(2): 395-404.
- [10] Ballesteros-Álvarez, J., Dilshat, R., Fock, V., et al., MITF and TFEB cross-regulation in melanoma cells[J]. *PLoS One*, 2020. 15(9): e0238546.
- [11] Sinagoga, K.L., Larimer-Picciani, A.M., George, S.M., et al., Mitf-family transcription factor function is required within cranial neural crest cells to promote choroid fissure closure[J]. *Development*, 2020. 147(21) :dev187047.

- [12] Pi, H., Li, M., Zou, L., et al., AKT inhibition-mediated dephosphorylation of TFE3 promotes overactive autophagy independent of MTORC1 in cadmium-exposed bone mesenchymal stem cells[J]. *Autophagy*, 2019. 15(4): 565-582.
- [13] Zhou, K., Zheng, Z., Li, Y., et al., TFE3, a potential therapeutic target for spinal cord injury via augmenting autophagy flux and alleviating ER stress[J]. *Theranostics*, 2020. 10(20): 9280-9302.
- [14] Zhao, G.Q., Zhao, Q., Zhou, X., et al., TFEC, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation[J]. *Mol Cell Biol*, 1993. 13(8): 4505-4512.
- [15] Mahony, C.B., Fish, R.J., Pasche, C., et al., Tfec controls the hematopoietic stem cell vascular niche during zebrafish embryogenesis[J]. *Blood*, 2016. 128(10): 1336-1345.
- [16] Petratou, K., Spencer, S.A., Kelsh, R.N., et al., The MITF paralog tfec is required in neural crest development for fate specification of the iridophore lineage from a multipotent pigment cell progenitor[J]. *PLoS One*, 2021. 16(1): e0244794.
- [17] Medendorp, K., van Groningen, J.J., Schepens, M., et al., Molecular mechanisms underlying the Mit translocation subgroup of renal cell carcinomas[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2007. 118(2-4): 157-165.
- [18] Rehli, M., Den Elzen, N., Cassady, A.I., et al., Cloning and characterization of the murine genes for bHLH-ZIP transcription factors TFEC and TFEB reveal a common gene organization for all Mit subfamily members[J]. *Genomics*, 1999. 56(1): 111-120.
- [19] Martini-Stoica, H., Xu, Y., Ballabio, A., et al., The Autophagy-lysosomal pathway in neurodegeneration: a TFEB perspective[J]. *Trends Neurosci*, 2016. 39(4): 221-234.
- [20] Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., et al., Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. 14(5): 283-296.
- [21] Medina, D.L., Di Paola, S., Peluso, I., et al., Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB[J]. *Nature Cell Biology*, 2015;17(3):288-299.
- [22] Zhao, Y.G., Zhang, H., Core autophagy genes and human diseases[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2019. 61: 117-125.
- [23] Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., et al., Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways[J]. *Hum Mol Genet*, 2011. 20(19): 3852-3866.

- [24] Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., et al., TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis[J]. *Science*, 2011. 332(6036): 1429-1433.
- [25] Feng, Y., He, D., Yao, Z., et al., The machinery of macroautophagy[J]. *Cell Res*, 2014. 24(1): 24-41.
- [26] Ji, Y.J., Ugolino, J., Zhang, T., et al., C9orf72/ALFA-1 controls TFEB/HLH-30-dependent metabolism through dynamic regulation of rag GTPases[J]. *PLoS Genet*, 2020. 16(4): e1008738.
- [27] Settembre, C., De Cegli, R., Mansueto, G., et al., TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop[J]. *Nat Cell Biol*, 2013. 15(6): 647-658.
- [28] Kim, Y.R., Park, M.S., Eum, K.H., et al., Transcriptome analysis indicates TFEB1 and YEATS4 as regulatory transcription factors for drug resistance of ovarian cancer[J]. *Oncotarget*, 2015. 6(31): 31030-31038.
- [29] Perera, R., Stoykova, S., Nicolay, B.N., et al., Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism[J]. *Nature*, 2015. 524(7565): U251-361.
- [30] Fang, L.M., Li, B., Guan, J.J., et al., Transcription factor EB is involved in autophagy-mediated chemoresistance to doxorubicin in human cancer cells[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2017. 38(9): 1305-1316.
- [31] Zhang, C., Duan, Y., Xia, M., et al., TFEB mediates immune evasion and resistance to mTOR inhibition of renal cell carcinoma via induction of PD-L1[J]. *Clin Cancer Res*, 2019. 25(22): 6827-6838.
- [32] Sung, G.J., Kim, S.H., Kwak, S., et al., Inhibition of TFEB oligomerization by co-treatment of melatonin with vorinostat promotes the therapeutic sensitivity in glioblastoma and glioma stem cells[J]. *Journal of Pineal Research*, 2019;66(3):e12556.
- [33] Medina, D.L., Fraldi, A., Bouche, V., et al., Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance[J]. *Dev Cell*, 2011. 21(3): 421-430.
- [34] Di Paola, S., Medina, D.L., TRPML1-/TFEB-dependent regulation of lysosomal exocytosis[J]. *Methods Mol Biol*, 2019. 1925: 143-144.
- [35] Spampinato, C., Feeney, E., Li, L., et al., Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for pompe disease[J]. *EMBO Mol Med*, 2013. 5(5): 691-706.
- [36] Nnah, I.C., Wang, B., Saqcena, C., et al., TFEB-driven endocytosis coordinates MTORC1 signaling

- and autophagy[J]. *Autophagy*, 2019. 15(1): 151-164.
- [37] Fu, Z., Zhang, Z., Wu, X., et al., Hydrogen-rich saline inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury and endothelial dysfunction by regulating autophagy through mTOR/TFEB signaling pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2020. 2020: 9121894.
- [38] Palmieri, M., Pal, R., Nelvagal, HR., et al., mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases[J]. *Nat Commun*, 2017. 8: 14338.
- [39] Martini-Stoica, H., Cole, AL., Swartzlander, DB., et al., TFEB enhances astroglial uptake of extracellular tau species and reduces tau spreading[J]. *J Exp Med*, 2018. 215(9): 2355-2377.
- [40] Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., et al., A gene network regulating lysosomal biogenesis and function[J]. *Science*, 2009. 325(5939): 473-477.
- [41] Lu, H., Fan, Y., Qiao, C., et al., TFEB inhibits endothelial cell inflammation and reduces atherosclerosis[J]. *Sci Signal*, 2017;10(464):eaah4214.
- [42] Palikaras, K., Lionaki, E., Tavernarakis, N., Mitophagy: in sickness and in health[J]. *Mol Cell Oncol*, 2016. 3(1): e1056332.
- [43] Ferree, A., Shirihai, O., Mitochondrial dynamics: the intersection of form and function[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012. 748: 13-40.
- [44] Soto-Herederó, G., Baixauli, F., Mittelbrunn, M., Interorganelle communication between mitochondria and the endolysosomal system[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2017. 5: 95.
- [45] Liu, Y.J., McIntyre, R.L., Janssens, G.E., et al., Mitochondrial translation and dynamics synergistically extend lifespan in *C. elegans* through HLH-30[J]. *J Cell Biol*, 2020;219(6):e201907067.
- [46] Kim, H.J., Joe, Y., Rah, S.Y., et al., Carbon monoxide-induced TFEB nuclear translocation enhances mitophagy/mitochondrial biogenesis in hepatocytes and ameliorates inflammatory liver injury[J]. *Cell Death Dis*, 2018. 9(11): 1060.
- [47] Swanson, M.S., Molofsky, A.B., Autophagy and inflammatory cell death, partners of innate immunity[J]. *Autophagy*, 2005. 1(3): 174-176.
- [48] Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., et al., Reactive oxygen species are essential for autophagy

- and specifically regulate the activity of Atg4[J]. *Embo j*, 2007;26(7):1749-1760.
- [49] Green, D.R., Kroemer, G., The pathophysiology of mitochondrial cell death[J]. *Science*, 2004. 305(5684): 626-629.
- [50] Yu, J., Shi, J., Wang, D., et al., Heme oxygenase-1/carbon monoxide-regulated mitochondrial dynamic equilibrium contributes to the attenuation of endotoxin-induced acute lung injury in rats and in lipopolysaccharide-activated macrophages[J]. *Anesthesiology*, 2016. 125(6): 1190-1201.
- [51] Van Houten, B., Hunter, S.E., J.N. Meyer, Mitochondrial DNA damage induced autophagy, cell death, and disease[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2016. 21: 42-54.
- [52] Yao, R.Q., Ren, C, Xia, Z.F., et al., Organelle-specific autophagy in inflammatory diseases: a potential therapeutic target underlying the quality control of multiple organelles[J]. *Autophagy*, 2021;17(2):385-401.
- [53] Liu, W., Li, C.C., Lu, X., et al., Overexpression of transcription factor EB regulates mitochondrial autophagy to protect lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2019. 132(11): 1298-1304.
- [54] Zhang, X., Cheng, X., Yu, L., et al., MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy[J]. *Nat Commun*, 2016. 7: 12109.
- [55] Kim, M.J., Bae, S.H., Ryu, J.C., et al., SESN2/sestrin2 suppresses sepsis by inducing mitophagy and inhibiting NLRP3 activation in macrophages[J]. *Autophagy*, 2016. 12(8): 1272-1291.
- [56] Zhang, Z., Yan, J., Bowman, A.B., et al., Dysregulation of TFEB contributes to manganese-induced autophagic failure and mitochondrial dysfunction in astrocytes[J]. *Autophagy*, 2020;16(8):1506-1523.
- [57] Tsutsui, H., Kinugawa, S., Matsushima, S., Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure[J]. *Circ J*, 2008;72 Suppl A:A31-A37.
- [58] Santin, Y., Sicard, P., Vigneron, F., et al., Oxidative stress by monoamine oxidase-a impairs transcription factor EB activation and autophagosome clearance, leading to cardiomyocyte necrosis and heart failure[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016. 25(1): 10-27.
- [59] Xu, H., Yu, W., Sun, S., et al., Luteolin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity through promoting mitochondrial autophagy[J]. *Front Physiol*, 2020. 11: 113.
- [60] Ma, X., Liu H., Murphy J.T., et al., Regulation of the transcription factor EB-PGC1alpha axis by

- beclin-1 controls mitochondrial quality and cardiomyocyte death under stress[J]. *Mol Cell Biol*, 2015. 35(6): 956-976.
- [61] Austin, S., St-Pierre, J., PGC1alpha and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders[J]. *J Cell Sci*, 2012. 125(Pt 21): 4963-4971.
- [62] Mills, E., L.A. O'Neill, Succinate: a metabolic signal in inflammation[J]. *Trends Cell Biol*, 2014. 24(5): 313-320.
- [63] Wang, S., Wan T., Ye M., et al., Nicotinamide riboside attenuates alcohol induced liver injuries via activation of SirT1/PGC-1alpha/mitochondrial biosynthesis pathway[J]. *Redox Biol*, 2018. 17: 89-98.
- [64] Mansueto, G., Armani A., Viscomi C., et al., Transcription factor EB controls metabolic flexibility during exercise[J]. *Cell Metab*, 2017. 25(1): 182-196.
- [65] Li, D., Shao R., Wang N., et al., Sulforaphane Activates a lysosome-dependent transcriptional program to mitigate oxidative stress[J]. *Autophagy*, 2020: 1-16.
- [66] Lee, D.H., Park J.S., Lee Y.S., et al., SQSTM1/p62 activates NFE2L2/NRF2 via ULK1-mediated autophagic KEAP1 degradation and protects mouse liver from lipotoxicity[J]. *Autophagy*, 2020;16(11):1949-1973.
- [67] Saban, R., Simpson C., Davis C.A., et al., Transcription factor network downstream of protease activated receptors (PARs) modulating mouse bladder inflammation[J]. *BMC Immunol*, 2007. 8: 17.
- [68] Mareninova, O.A., Sandler, M., Malla, SR., et al., Lysosome associated membrane proteins maintain pancreatic acinar cell homeostasis: LAMP-2 deficient mice develop pancreatitis[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2015. 1(6): 678-694.
- [69] Wang, S., Ni, HM., Chao, X., et al., Impaired TFEB-mediated lysosomal biogenesis promotes the development of pancreatitis in mice and is associated with human pancreatitis[J]. *Autophagy*, 2019;15(11):1954-1969.
- [70] Zhang, W., Zhuang, N., Liu, X., et al., The metabolic regulator Lamtor5 suppresses inflammatory signaling via regulating mTOR-mediated TLR4 degradation[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020; 17(10):1063-1076.
- [71] Rah, S.Y., Lee, Y.H., Kim, U.H., NAADP-mediated Ca⁽²⁺⁾ signaling promotes autophagy and protects against LPS-induced liver injury[J]. *Faseb j*, 2017. 31(7): 3126-3137.

- [72] Emanuel, R., Sergin, I., Bhattacharya, S., et al., Induction of lysosomal biogenesis in atherosclerotic macrophages can rescue lipid-induced lysosomal dysfunction and downstream sequelae[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. 34(9): 1942-1952.
- [73] Liu, H., Liu, S., Qiu, X., et al., Donor MSCs release apoptotic bodies to improve myocardial infarction via autophagy regulation in recipient cells[J]. *Autophagy*, 2020;16(12):2140-2155.
- [74] Chen, H.D., Kao, C.Y., Liu, B.Y., et al., HLH-30/TFEB-mediated autophagy functions in a cell-autonomous manner for epithelium intrinsic cellular defense against bacterial pore-forming toxin in *C. elegans*[J]. *Autophagy*, 2017. 13(2): 371-385.
- [75] Visvikis, O., Ihuegbu, N., Labed, S.A., et al., Innate host defense requires TFEB-mediated transcription of cytoprotective and antimicrobial genes[J]. *Immunity*, 2014. 40(6): 896-909.
- [76] Hayama, Y., Kimura, T., Takeda, Y., et al., Lysosomal protein lamtor1 controls innate immune responses via nuclear translocation of transcription factor EB[J]. *J Immunol*, 2018. 200(11): 3790-3800.
- [77] Brady, O.A., Martina, J.A., Puertollano, R., Emerging roles for TFEB in the immune response and inflammation[J]. *Autophagy*, 2018. 14(2): 181-189.
- [78] Pisonero-Vaquero, S., Soldati, C., Cesana, M., et al., TFEB modulates p21/WAF1/CIP1 during the DNA damage response[J]. *Cells*, 2020. 9(5) :1186
- [79] Whalen, M.J., Doughty, L.A., Carlos, T.M., et al., Intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 are increased in the plasma of children with sepsis-induced multiple organ failure[J]. *Crit Care Med*, 2000. 28(7): 2600-2607.
- [80] Raeburn, C.D., Calkins, C.M., Zimmerman, M.A., et al., ICAM-1 and VCAM-1 mediate endotoxemic myocardial dysfunction independent of neutrophil accumulation[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002;283(2):R477-R486.
- [81] Lewis, A.J., Billiar, T.R., Rosengart, M.R., Biology and metabolism of sepsis: innate immunity, bioenergetics, and autophagy[J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2016. 17(3): 286-293.
- [82] Jurkuvenaite, A., Benavides, G.A., Komarova, S., et al., Upregulation of autophagy decreases chlorine-induced mitochondrial injury and lung inflammation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015. 85: 83-94.

- [83] Raben, N., Puertollano, R., TFEB and TFE3: linking lysosomes to cellular adaptation to stress[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2016. 32: 255-278.
- [84] Napolitano, G., Ballabio, A., TFEB at a glance[J]. *J Cell Sci*, 2016. 129(13): 2475-2481.
- [85] El-Houjeiri, L., Possik, E., Vijayaraghavan, T., et al., The transcription factors TFEB and TFE3 link the FLCN-AMPK signaling axis to innate immune response and pathogen resistance[J]. *Cell Rep*, 2019. 26(13): 3613-3628.e6.
- [86] Oka, T., Hikoso, S., Yamaguchi, O., et al., Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure[J]. *Nature*, 2012. 485(7397): 251-255.
- [87] Zang, Q.S., Sadek, H., Maass, D.L., et al., Specific inhibition of mitochondrial oxidative stress suppresses inflammation and improves cardiac function in a rat pneumonia-related sepsis model[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012;302(9):H1847-H1859.
- [88] Mishra, P., Chan, D.C., Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014;15(10):634-646.
- [89] Brealey, D., Brand, M., Hargreaves, I., et al., Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*, 2002. 360(9328): 319-322.
- [90] Zang, Q., Maass, D.L., Tsai, S.J., et al., Cardiac mitochondrial damage and inflammation responses in sepsis[J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2007. 8(1): 41-54.
- [91] Tsutsui, H., Kinugawa, S., Matsushima, S., Oxidative stress and heart failure[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011;301(6):H2181-H2190.
- [92] Reynolds, C.M., Suliman, H.B., Hollingsworth, J.W., et al., Nitric oxide synthase-2 induction optimizes cardiac mitochondrial biogenesis after endotoxemia[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009. 46(5): 564-572.

致 谢

时光如白驹过隙，转眼间三年的研究生生涯马上就要结束。三年前初进实验室的情景。犹如昨日呈现于眼前。三年前对实验生活的懵懵懂懂，怀着对科研生活的期待让我走进了河北大学。三年的时光让我领略了不同于以往的生活，充实而忙碌，有挫折和磨砺，更有收获和成长。所有的成长与进步，首先特别感谢我的指导老师钟理教授和郭蕊教授的悉心关怀和耐心指导。在本文的撰写过程中，我自始至终得到老师们的悉心指导，从本文的选题，到论文思路的引导、文字的组织、结构的安排、资料的收集和整理，再到论文的修改，老师都倾注了大量的心血，才得以使我顺利地完成本文的写作。

感谢实验室的梁胜贤老师，梁老师勤奋认真，积极进取，为人谦虚，爱护学生。不仅为我们的实验答疑解惑，在生活中也提供无私的帮助，是学生的良师益友。

在毕业之际，我真诚地感谢给我无私帮助的细胞生物学的全体老师，他们的教诲为本文的论述提供了理论基础，并创造了许多必要条件与学习机会。还有朝夕相处的 18 级细胞生物学班的同学们，与我度过了三年的大学美好时光，在此我也一并深深的感谢你们！

感谢实验室所有师兄姐妹们在我的实验和开展的工作中提供相应的支持和帮助。感谢我的吴雨思师姐、宋睿睿师姐、杨辉师姐和赵慧师姐从我刚进实验室，就教我各种实验技术，引导我如何科学思考问题，怎样高效解决问题。实验技能的掌握与熟练，对实验问题的分析与解决都有赖于师姐的耐心指导。感谢同年进入实验的张秀芳同学、孙锦秋同学和梁国强同学在实验操作、论文写作以及日常生活中所提供的热心帮助。

感谢我的舍友向英、赵会敏和张雪芳在我平时学习和生活中提供的帮助和支持！

感谢所有关心、支持、帮助过我的良师益友。

感谢我的家人，谢谢他们一直以来对我学习的理解、支持和关心！

最后，向在百忙中抽出时间对本文进行评审并提出宝贵意见的各位专家表示衷心地感谢！