

核纤层蛋白 B1 通过影响端粒酶活性调控肝癌细胞生长

王瑞官^{1,2}, 陈思³, 孙志佳⁴, 王诗昆⁵, 王杰⁶, 秦玲玫^{7*}, 李江波^{7*}

1 中国人民解放军总医院 肝胆胰腺外科医学部, 北京 100853

2 中国人民解放军总医院 第八医学中心 肝胆外科, 北京 100091

3 湖南省职业病防治院 妇产科, 湖南 长沙 410021

4 中国人民解放军空军特色医学中心 放疗科, 北京 100142

5 新疆军区信息通信旅, 西藏 阿里 859499

6 石河子大学医学院, 新疆 石河子 832000

7 军事科学院军事医学研究院 生物工程研究所, 北京 100089

王瑞官, 陈思, 孙志佳, 王诗昆, 王杰, 秦玲玫, 李江波. 核纤层蛋白 B1 通过影响端粒酶活性调控肝癌细胞生长[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1609-1620.

WANG Ruiguan, CHEN Si, SUN Zhijia, WANG Shikun, WANG Jie, QIN Lingmei, LI Jiangbo. Lamin B1 regulates the growth of hepatocellular carcinoma cells by influencing telomerase activity[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1609-1620.

摘要: 核纤层蛋白 B1 (nuclear lamina protein B1, LMNB1)高表达于肝癌组织中, 通过敲低 LMNB1 探讨其对肝癌细胞增殖的影响及其机制。利用 siRNA 在肝癌细胞中敲低 LMNB1, Western blotting 检测敲低效果, 使用端粒重复序列扩增法(telomeric repeat amplification protocol assay, TRAP)检测其端粒酶活性变化。利用实时定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)检测其端粒长度变化。并通过 CCK-8、克隆形成、Transwell、划痕实验检测其生长、侵袭和迁移能力变化。利用慢病毒系统构建稳定敲低 LMNB1 的 HepG2 细胞, 检测其端粒长度及端粒酶活性变化, 采用 SA- β -gal 衰老染色检测细胞衰老情况, 通过裸鼠皮下成瘤实验及对肿瘤后续的组化染色, SA- β -gal 衰老染色, 端粒荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)检测其对成瘤性的影响。最后利用生物信息分析的方法寻找 LMNB1 在临床肝癌组织中的表达情况, 及其与临床分期、病人生存期的关系。HepG2 和 Hep3B 中敲低 LMNB1 后端粒酶活性显著降低, 细胞增殖、迁移和侵袭能力显著降低, 细胞和裸鼠成瘤实验证明稳定敲低 LMNB1 后端粒酶活性降低的同时端粒长度缩短, 细胞发生衰老, 此外细胞成瘤性降低, Ki-67 表达降低, 生物信息分析结果显示, LMNB1 高表达于肝癌组织, 且与肿瘤分期和患者生存相关。LMNB1 在肝癌细胞中过表达, 其有望成为评估肝癌患者临床预后的指标和精准治疗的靶点。

资助项目: 解放军总医院第八医学中心课题(2021MS003)

This work was supported by the Project of the Eighth Medical Center of People's Liberation Army General Hospital (2021MS003).

*Corresponding authors. E-mail: LI Jiangbo, ljb412bio@outlook.com; QIN Lingmei, qlm1846632889@outlook.com

Received: 2022-08-06; Accepted: 2022-10-20; Published online: 2022-10-24

关键词：核纤层蛋白 B1；肝癌；端粒酶；端粒；细胞衰老

Lamin B1 regulates the growth of hepatocellular carcinoma cells by influencing telomerase activity

WANG Ruiguan^{1,2}, CHEN Si³, SUN Zhijia⁴, WANG Shikun⁵, WANG Jie⁶, QIN Lingmei^{7*}, LI Jiangbo^{7*}

1 Faculty of Hepato-Pancreato-Biliary Surgery, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China

2 Department of Hepatobiliary Surgery, the Eighth Medical Center, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100091, China

3 Department of Obstetrics and Gynecology, Hunan Prevention and Treatment Institute for Occupational Diseases, Changsha 410021, Hunan, China

4 Radiotherapy Department, People's Liberation Army Air Force Characteristic Medical Center, Beijing 100142, China

5 Physician of Information and Communication Brigade of Xinjiang Military Prefecture, Ngari Prefecture 859499, Tibet, China

6 School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang, China

7 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100089, China

Abstract: Lamin B1 (LMNB1) is highly expressed in liver cancer tissues, and its influence and mechanism on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells were explored by knocking down the expression of the protein. In liver cancer cells, siRNAs were used to knock down LMNB1. Knockdown effects were detected by Western blotting. Changes in telomerase activity were detected by telomeric repeat amplification protocol assay (TRAP) experiments. Telomere length changes were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). CCK8, cloning formation, transwell and wound healing were performed to detect changes in its growth, invasion and migration capabilities. The lentiviral system was used to construct HepG2 cells that steadily knocked down LMNB1. Then the changes of telomere length and telomerase activity were detected, and the cell aging status was detected by SA- β -gal senescence staining. The effects of tumorigenesis were detected by nude mouse subcutaneous tumorigenesis experiments, subsequent histification staining of tumors, SA- β -gal senescence staining, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for telomere analysis and other experiments. Finally, the method of biogenesis analysis was used to find the expression of LMNB1 in clinical liver cancer tissues, and its relationship with clinical stages and patient survival. Knockdown of LMNB1 in HepG2 and Hep3B cells significantly reduced telomerase activity, cell proliferation, migration and invasion abilities. Experiments in cells and tumor formation in nude mice had demonstrated that stable knockdown of LMNB1 reduced telomerase activity, shortened telomere length, senesced cells, reduced cell tumorigenicity and KI-67 expression. Bioinformatics analysis showed that LMNB1 was highly expressed in liver cancer tissues and correlated with tumor stage and patient survival. In conclusion, LMNB1 is overexpressed in

liver cancer cells, and it is expected to become an indicator for evaluating the clinical prognosis of liver cancer patients and a target for precise treatment.

Keywords: nuclear lamina protein B1 (LMNB1); hepatocellular carcinoma; telomerase; telomere; cell senescence

肝癌是一种起病隐匿、恶性程度高、预后较差的恶性肿瘤,易发生肝内和肝外转移^[1-2]。肝癌按发生部位(肝细胞或肝内胆管上皮细胞)的不同,研究者将其分为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)、肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)和混合型肝细胞-胆管癌(combined hepatocellular cholangiocarcinoma, cHCC-CCA),其中肝细胞癌最为常见^[3],据最新数据统计,其可占到肝癌的80%左右。随着人们的生活习惯和工作环境的变化,并且医疗卫生检测水平的提高,肝癌的确诊人数在逐年增加。2020年全球的肝癌确诊患者超过了90万,在我国,原发性肝癌是排在第4位的常见恶性肿瘤。由于肝癌多于晚期才被诊断,导致其在肿瘤致死病因中排第2位^[3]。肝癌发生发展机制仍不清楚,目前只能通过手术、放化疗和肝移植等手段治疗,但预后仍较差且易复发,有研究表明其5年生存率仅为12.1%^[4-5]。

细胞核被认为是真核细胞中最重要的细胞器之一,它包含了整个细胞遗传图谱^[6]。核纤层位于核膜的内层,是由许多蛋白质组成的蛋白质网络,包括核纤层蛋白(lamins),其主要的一个是维持细胞的生理平衡^[7-8]。核纤层蛋白有A型和B型两种类型,A型核纤层蛋白在力传递过程中占据重要位置^[9-10],LMNB1、LMNB2、LMNB3构成B型核纤层蛋白,LMNB1基因编码核纤层蛋白B1(nuclear lamina protein B1, LMNB1)。LMNB1是一个重要的核骨架组成蛋白^[11],近年来,对B型核纤层蛋白尤其是LMNB1蛋白的研究越来越受到关注,尤其是在肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD)中^[12-13]。最

新生物信息学方面的研究报道,LMNB1是肝细胞癌潜在的治疗靶点和预后的生物标志物^[14],且循环血中LMNB1生物标志物可检测早期肝癌^[15],但具体调控机制仍不清楚。本研究首次揭示了核纤层蛋白B1在肝细胞癌的生长、侵袭和转移中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

293T细胞、HepG2细胞、Hep3B细胞、shLMNB1慢病毒质粒系统由本实验室保存。DMEM细胞培养基、PBS缓冲液、FBS、胰酶购于中科迈晨科技有限公司,RIPA裂解液、12%电泳胶、电泳缓冲液、TBST缓冲液购于翌圣生物科技(上海)股份有限公司,端粒探针购自PANAGENE,siRNAs和RNAiMAX购自Invitrogen公司,Anti-Lamin B1(66095)和 β -actin(01003)购自Proteintech公司。TRAPeze[®] Telomerase Detection kit购自Millipore公司,SA- β -gal衰老染色试剂盒购自Beyotime公司,CCK-8试剂盒购自同仁化学公司,DNA提取试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

293T细胞、HepG2细胞、Hep3B细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中,根据细胞生长情况和密度进行换液和传代。

1.2.2 Western blotting 分析

处理后的细胞加入RIPA裂解液进行总蛋白提取,蛋白定量后使用自制12%电泳胶进

行 SDS-PAGE, 冰浴转膜 2 h, 5%脱脂牛奶常温封闭 1 h, 一抗 Anti-Lamin B1 (1:4 000)、 β -actin (1:5 000)常温孵育 2 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次/5 min, 二抗(1:5 000)常温 1 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次/5 min, 使用化学发光显色法显影并保存。

1.2.3 RNA 干扰和 shRNA 系统

siRNAmix 冰上解冻, 200 μ L 无血清、无双抗 DMEM 中加入 6 μ L 20 μ mol/L siRNAmix、5 μ L RNAiMax 试剂后混匀, 在生物安全柜内室温静置 20 min。均匀加入悬浮的细胞中, 做好标记, 摇晃混匀, 6 h 后换液, 72 h 进行后续实验。

取病毒包装质粒 PLP1 (0.84 μ g)+PLP2 (0.4 μ g)+VSVG (0.56 μ g)及目的质粒 1 μ g, 加至 200 μ L 无血清无双抗的培养基中, 充分混匀。加入 8.4 μ L PEI, 吹吸混匀, 室温静置 20 min。把混合液均匀逐滴加入提前铺好的 293T 细胞中, 摇匀; 4 h 后换液。48 h 后收集 293T 细胞中形成的病毒液并过滤, 随后以 500 μ L/孔的量加入 6 孔板的 HepG2 细胞中(密度约为 60%)。加病毒液后 48 h 按 1 μ g/mL 加入嘌呤霉素 (puromycin), 连续加抗生素 3 d 后, 剩下的细胞都是低表达 LMNB1 的稳定克隆细胞。

1.2.4 CCK8 和划痕实验

将 LMNB1 敲低后的 HepG2 细胞接种于 96 孔板上(3×10^3 个细胞/孔板)。CCK8 按照制造商的建议检测细胞增殖。

在超净工作台上, 用笔在 6 孔板背面画一条水平线, 每条水平线与板孔之间的间距为 1 cm。将转染了 siLMNB1 的 HepG2 细胞和阴性对照组铺于 6 孔板上。每个孔加 2 mL 培养基培养 20 h, 使其生长成单层细胞。用 10 μ L 的移液器画垂直线、水平线。在每个孔细胞沿孔板壁上缓慢加入 PBS 洗涤 2 次, 以清除受损细胞。沿孔壁缓慢加入 2 mL 无血清培养基, 避

免冲散单层贴壁细胞。将 6 孔板移至培养箱继续培养, 分别于 0、6、12 h 用显微镜连续拍照。

1.2.5 Transwell 和克隆形成

将敲低 LMNB1 后的 HepG2 细胞消化并悬浮于无血清培养基中。在 24 孔板上加入含 20% 胎牛血清的培养基 600 μ L, 上腔基质胶室加入约 200 μ L 细胞悬液, 培养 16 h。4%多聚甲醛固定腔室 30 min, PBS 洗涤 2 次, 0.1%结晶紫溶液分别染色 30 min。用棉签将上室面的细胞和基质清除。显微镜下观察穿过上室面细胞图像, 利用 Image J 软件计算细胞侵袭数。

收集处理后在对数阶段生长的细胞, 在六孔板中以每孔 500、1 000 或 1 500 个细胞的密度种植。培养两周后, 细胞用 4%多聚甲醛固定, 并用结晶紫(Solarbio, C8470)染色并拍照观察。

1.2.6 实时定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) 平均端粒长度测定

使用 KingFisher Flex DNA 提取仪(Thermo Fisher), MagMAX™ DNA Multi-Sample Ultra 2.0 试剂盒从细胞中分离基因组 DNA。端粒及内参 PCR 的扩增引物见表 1, 以 500 nmol/L 的终浓度使用。使用美国 Bio-Rad 公司 CFX-96 qPCR 仪上进行 qPCR 检测。端粒(T) PCR 程序设置为 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 20 个循环, 4 $^{\circ}$ C 保存。36B4 (S) PCR 程序设置为 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 4 $^{\circ}$ C 保存。每个样本测量 2 次, 用各组 Tel 引物和 36b4 引物扩增的 C_t 值计算出 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 来计算各个样本的相对端粒长度。

表 1 PCR 扩增的引物序列

Table 1 Primers sequences of PCR amplification	
Primer name	Sequence (5'→3')
tel1b	CGGTTT(GTTGG) ₅ GTT
tel2b	GGCTTG(CCTTAC) ₅ CCT
36B4u	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC
36B4d	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

1.2.7 端粒重复序列扩增法(telomeric repeat amplification protocol assay, TRAP)

TRAP 检测使用 TRAPeZe[®]端粒酶检测试剂盒进行。即培养的细胞在冰上用 1×CHAPS 裂解缓冲液(1:200 加入 RNase inhibitor)裂解 30 min。在 12 000 r/min 离心 30 min 后,使用 Bio-Rad 蛋白分析试剂盒测量总蛋白浓度。样品稀释成为 25 ng/μL,一般每个样品取 25 ng 即 1 μL 进行 PCR 反应。反应体系按每个样品 2 μL 10×TRAP 缓冲液,0.4 μL TS 引物,0.4 μL 引物混合物,0.4 μL dNTPs (50 μmol/L),0.2 μL RNA 酶抑制剂,0.2 μL *Taq* DNA 聚合酶,15.4 μL 水 (DEPC 处理),1 μL 样品,设置测序 37 °C 30 min; 90 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 25 个循环, 72 °C 5 min, 4 °C 保存。最终反应化合物与 GelRed 上样缓冲液(generay biotech)混合,在 0.5×Tris-borate-EDTA (TBE)的 10%聚丙烯酰胺凝胶(29:1 丙烯/双丙烯)跑胶分离,200 V 跑胶 50 min。使用 ChemiDoc[™] 成像系统(Bio-Rad)对凝胶进行拍照。

1.2.8 SA-β-gal 衰老染色

细胞用 1 mL β-半乳糖苷酶染色固定液,室温固定 15min。弃掉细胞固定液,用 1 mL PBS 洗 3 次,每次静置 3 min,弃 PBS。加入 1 mL 染色工作液,具体染色工作液量可以按细胞量调整,染色工作液配制为(β-半乳糖苷酶染色液 A: 10 μL/每个样本,β-半乳糖苷酶染色液 B: 10 μL/每个样本,β-半乳糖苷酶染色液 C: 930 μL/每个样本,X-Gal 溶液:50 μL/每个样本),37 °C 孵育过夜(染色时常在显微镜下观察,控制染色时间)。弃染色液,用 1 mL PBS 洗 2 次,每次静置 3 min,弃 PBS。最后加入 500 μL PBS,在光学显微镜下使用低倍镜观察,每个实验组取 5 个视野,衰老染色阳性细胞(面积)百分比=染成深蓝色的衰老细胞(面积)/视野中全部细胞(面积)。

1.2.9 荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH)

含组织的石蜡载玻片在 10 mmol/L 柠檬酸钠(pH 6.5)中 88 °C 孵育 10 min,室温下用 PBS(pH 7.2)冲洗 1 min,在玻片染色缸中用 25%、50%和 95%乙醇脱水,在玻片染色缸中 37 °C 用 1%胃蛋白酶溶液处理 2 min。每张载玻片用 80 μL 10 mg/mL RnaseA 溶液(NanoMagBio)孵育,盖上盖玻片,置于 37 °C 加热块中 2 h,去掉盖玻片,PBS 冲洗 1 min。然后将载玻片浸入 25%、50%和 95%的乙醇中,风干。然后,每个样品用 100 μL 端粒探针(TelC-Alexa594, PANAGENE)杂交,先 80 °C 变性 20 min,室温避光过夜(至少 16 h)。杂交后,载玻片置于 70%甲酰胺缓冲液中,冲洗 15 min。用新鲜甲酰胺缓冲液冲洗载玻片 4 次,每次 15 min,在室温下用 Tween 20 缓冲液冲洗 4 次,每次 5 min。室温下用 80 μL DAPI (稀释溶剂为 PBS 缓冲液,稀释比为 1:1 000)复染细胞核 5 min。载玻片滴加 20-25 μL PBS 后封片,尽快在荧光显微镜下观察或置于-20 °C 封闭箱中保存。利用 Image J 程序评估端粒的荧光强度。

1.2.10 动物实验

动物实验设计符合动物实验相关伦理规定,并获得解放军总医院第四医学中心医学伦理委员会审批(2020KY007-KS002)。将 12 只 4 周龄雌性 BALB/c 裸鼠随机分为 2 组,每组 6 只。一组注射稳定敲低 LMNB1 的 HepG2 细胞,另一组注射对照 HepG2 细胞。将细胞悬浮液 100 μL (含 5×10^6 个细胞)和基质胶 100 μL 混合注入裸鼠背部皮下。7 d 后用游标卡尺测量肿瘤生长情况,计算肿瘤体积: 体积=(最长直径×最短直径²)/2。植入后第 30 天处死小鼠。测量裸鼠体重,解剖分离皮下肿瘤。测量肿瘤大小。肿瘤组织分为 4 部分。采用 SA-β-gal 检测组织衰老情况。其

次, 切片石蜡包埋组织。免疫组化石蜡切片检测 LMNB1 和 Ki-67 的表达。FISH 检测端粒长度。最后用 TRAP 检测肿瘤组织端粒酶活性。

1.2.11 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, GraphPad Prism 9.0 作图和数据统计分析, 利用 GraphPad Prism 9.0 自带的分析功能计算, 两组之间的比较采用非配对 t 检验, 如果 $P < 0.05$ 时则认为差异具有统计学差异, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ns: $P > 0.05$

即差异无统计学意义。

2 结果与分析

2.1 敲低 LMNB1 降低端粒酶活性并显著抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭

使用 siRNA 在 HepG2 细胞和 Hep3B 细胞中敲低 LMNB1 基因, 通过 Western blotting (WB) 检测两种细胞中 LMNB1 表达被成功敲低(图 1A、1B), 利用 TRAP 实验发现敲低 LMNB1 后

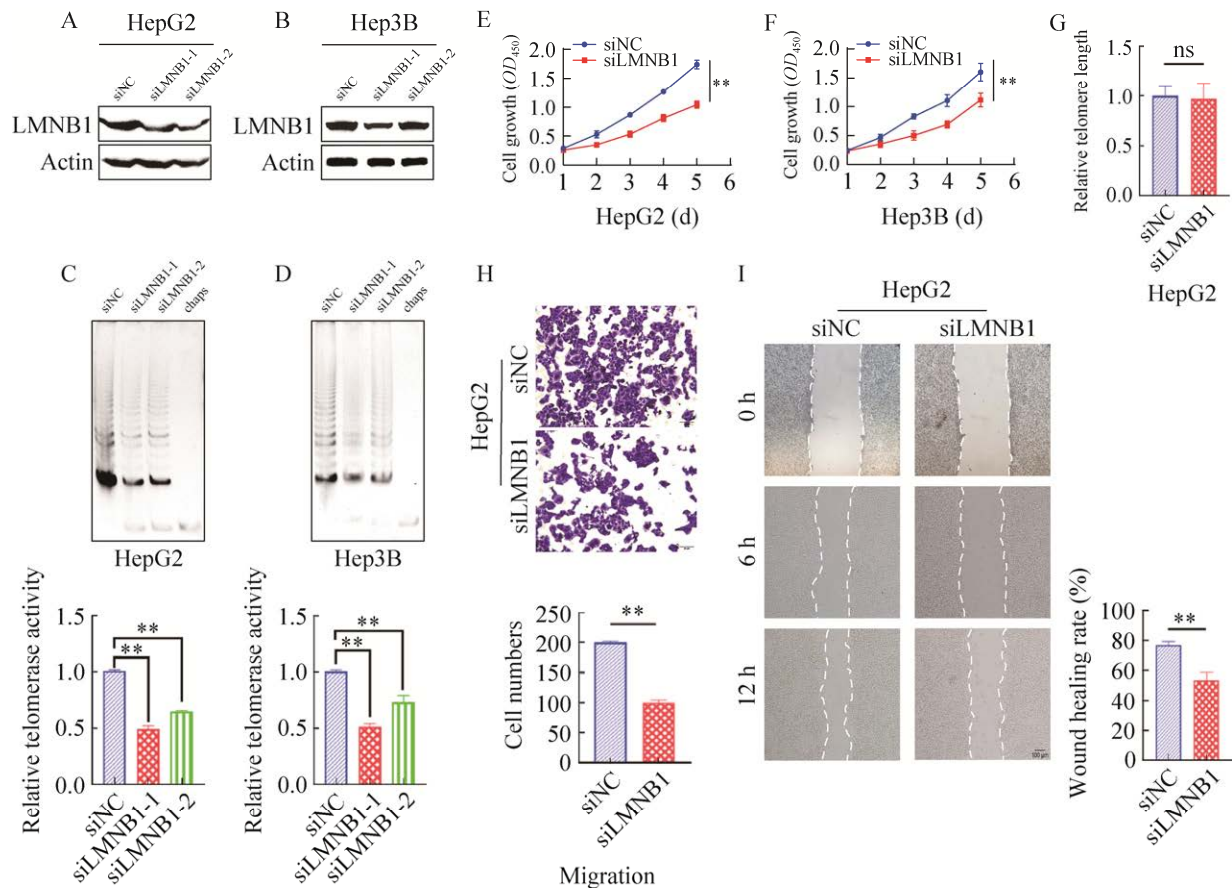


图 1 敲低 LMNB1 降低端粒酶活性并显著抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭

Figure 1 Knockdown of LMNB1 reduced telomerase activity and significantly inhibited hepatoma cell proliferation, migration and invasion. The effect of knockdown of LMNB1 using siRNAs in HepG2 cells (A) and in Hep3B cells (B) were examined by Western blotting. Telomerase activity after knockdown of LMNB1 in HepG2 cells (C) and in Hep3B cells (D) were detected by TRAP assay (**: $P < 0.01$). E: Cell growth after knockdown of LMNB1 in HepG2 cells (E) and in Hep3B cells (F) were examined by CCK8 assay (**: $P < 0.01$). G: Telomere length after knockdown of LMNB1 in HepG2 cells was detected by qPCR (ns: $P > 0.05$). H: The invasive ability after knockdown of LMNB1 in HepG2 cells was detected by transwell assay (**: $P < 0.01$), scale bar=20 μm . I: Healing ability was tested by scratch test (**: $P < 0.01$), scale bar=100 μm .

两种细胞的端粒酶活性都显著降低(图 1C、1D), CCK-8 实验显示细胞增殖被显著抑制(图 1E、1F)。端粒是生物染色体末端的一个非常重要的保护性结构, 其长度的稳定是肿瘤细胞维持自身永生化的重要前提, 而端粒酶是维持端粒长度的重要途径。通过对敲低 LMNB1 的 HepG2 细胞进行 qPCR 检测端粒长度发现, 其端粒并没有因为端粒酶活性的降低而缩短(图 1G), 为了继续研究端粒酶活性降低对细胞增殖方面的影响, 我们进行了克隆形成实验和划痕实验, 结果显示 HepG2 细胞敲低 LMNB1 后侵袭和迁移能力显著降低(图 1H、1I)。

2.2 长时间敲低 LMNB1 会使肝癌细胞端粒磨损并发生细胞衰老

利用慢病毒系统构建稳定敲低 LMNB1 的 HepG2 细胞, WB 检测 shLMNB1 HepG2 细胞构建成功(图 2A), 长时间敲低 LMNB1 后端粒酶活性也显著降低(图 2B), 此外与瞬时敲低不同, qPCR 结果显示端粒出现了缩短(图 2C)。SA- β -gal 细胞衰老染色结果显示, HepG2 shLMNB1 组衰老染色阳性细胞比例显著增加(图 2E)。说明长时间敲低 LMNB1 会使得端粒酶活性持续降低, 不足以维持肿瘤细胞的端粒长度, 使其端粒出现缩短并诱导细胞衰老的发生。

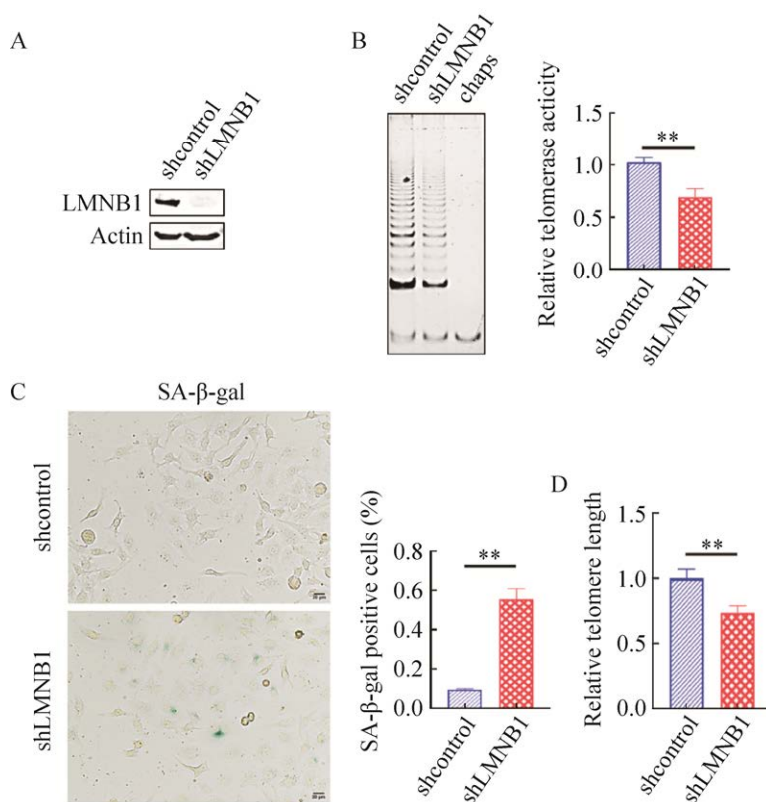


图 2 长时间敲低 LMNB1 会使肝癌细胞端粒磨损, 发生细胞衰老

Figure 2 The continuous knocking down of LMNB1 causes the telomeres of liver cancer cells to erode, causing them to undergo cellular senescence. A: The effect of HepG2 cell stable knockdown LMNB1 was detected by Western blotting. B: Telomerase activity after stable knockdown of LMNB1 was detected by TRAP assay (**: $P < 0.01$). C: Cellular senescence after stable knockdown of LMNB1 was detected by SA- β -gal experiments (**: $P < 0.01$), scale bar=20 μ m. D: Telomere length after stable knockdown of LMNB1 in HepG2 cells was detected by qPCR (**: $P < 0.01$).

2.3 敲低 LMNB1 抑制肝癌细胞裸鼠皮下成瘤

在 shLMNB1 HepG2 细胞裸鼠皮下成瘤实验中, 两组裸鼠的体重无明显差异, 说明两组的营养状况相似。shLMNB1 HepG2 组的小鼠肿瘤体积明显小于对照组(图 3A), 肿瘤组织取出后进行 TRAP 实验显示, 敲低组的端粒酶活性显著弱于对照组(图 3B), 免疫组化显示敲低组的肿瘤组织 LMNB1 蛋白和恶性程度标记物 KI-67 的表达都显著低于对照组(图 3C), 在对肿瘤组织进行 FISH 端粒原位杂交结果显示, 敲

低组的端粒荧光强度显著弱于对照组(图 3D), SA- β -gal 实验结果显示敲低组的衰老细胞明显增加(图 3E)。shLMNB1 HepG2 细胞长期缺少端粒酶活性, 使得端粒缩短, 细胞发生衰老, 从而表达出细胞生长抑制, 肿瘤体积显著小于对照组。

2.4 LMNB1 高表达于肝癌组织中且与患者预后相关

利用 GEPIA 网站(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)从 GTEx 和 TCGA 数据库中获得肝癌组织和癌旁正常组织中 LMNB1 mRNA 的转录数据, 分析纳入 369 个肿瘤组织和 160 个正常组织, 结

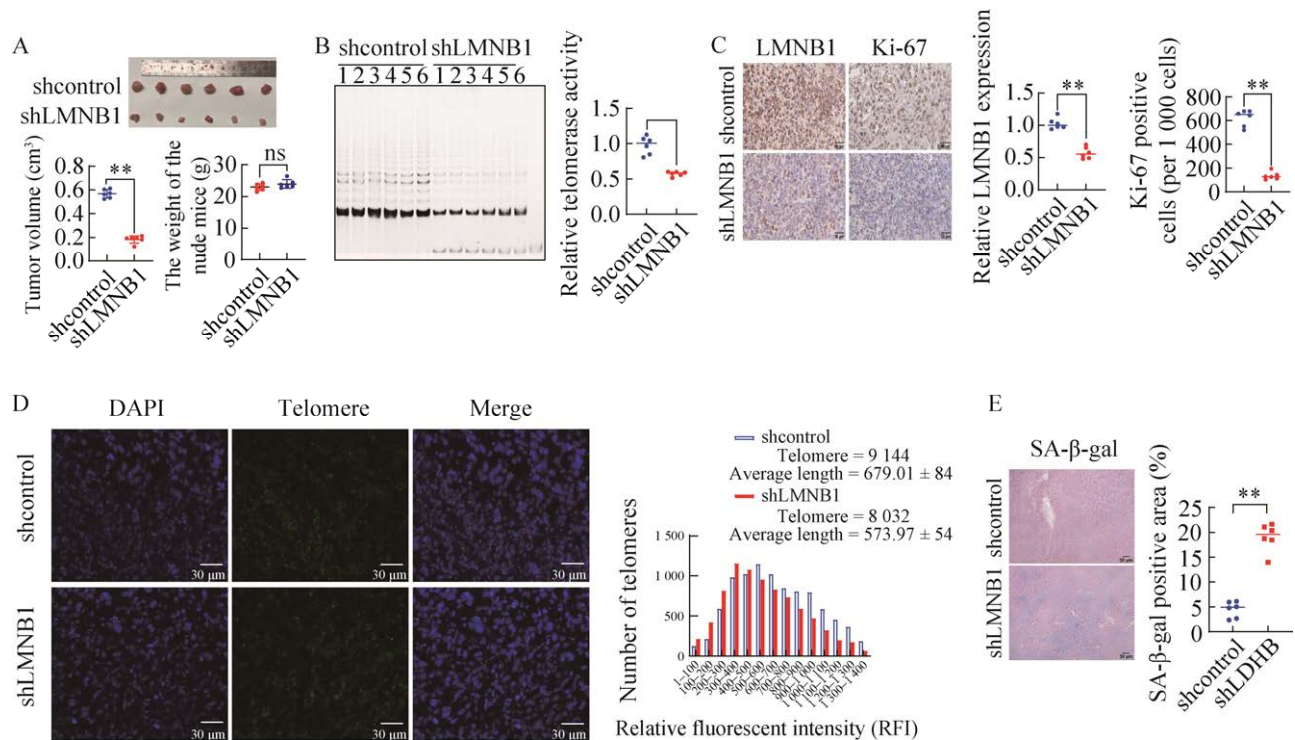


图 3 敲低 LMNB1 抑制肝癌细胞裸鼠皮下成瘤

Figure 3 Knocking down LMNB1 inhibits the subcutaneous tumorigenesis capacity of hepatic cancer cells in nude mice. A: HepG2 cells stably expressing shcontrol or shLMNB1 were injected subcutaneously in nude mice ($n=6$ for each group) (**: $P<0.01$). Tumor value and mice bodyweight were measured 1 month later (ns: $P>0.05$). B: Telomerase activity in tumors of each mice was detected by TRAP (**: $P<0.01$). C: The expression of LMNB1 and Ki-67 in tumors of two groups were detected by immunohistochemistry (**: $P<0.01$), scale bar=50 μ m. D: Telomere length was evaluated in paraffin embedded sections of tumor tissue using Q-FISH, scale bar=50 μ m. The Image J software was used to analyze the telomere length of tumor sections, as indicated by fluorescence intensity. E: Cellular senescence of two groups were detected by SA- β -gal experiments (**: $P<0.01$), scale bar=50 μ m.

果显示 LMNB1 高表达于肝癌组织(图 4A), 在肿瘤早期分期上(I、II、III期), LMNB1 表达与肿瘤分期呈现正相关关系, 即临床分期晚的病人其 LMNB1 有更高的表达(图 4B), 患者的总体生存期(OS)和无病生存期(DFS)分析结果显示, 肝癌患者 LMNB1 高表达与总生存期和无病生存期均呈现负相关关系(图 4C、4D)。

3 讨论

鉴于肝癌在全球范围内的高发病率和致死率, 且早期隐匿, 预后不佳, 迫切需要寻找和研究有效的肝癌治疗及预后预测的生物标

志物^[16]。有研究整合了 TCGA-LIHC、GSE14520 和 TIMER2 等数据库来探索肝细胞癌中的关键基因, 发现 LMNB1 高表达于肝细胞癌。在我们的研究中, 使用 GEPIA 确定了 LMNB1 高表达于肝癌组织, 于是我们使用 siRNA 和 shRNA 瞬时和稳定长时间敲低 LMNB1, 探究其对肝癌细胞生长的影响及其潜在机制。

端粒位于真核生物染色体末端, 由端粒 DNA 和 Shelterin 复合体组成^[17]。Shelterin 由 TRF1、TRF2、TIN2、RAP1、TPP1 以及 POT1 组成^[18]。它能与端粒 DNA 特异性结合形成“帽子”结构, 防止染色体暴露的末端诱发 DNA 损

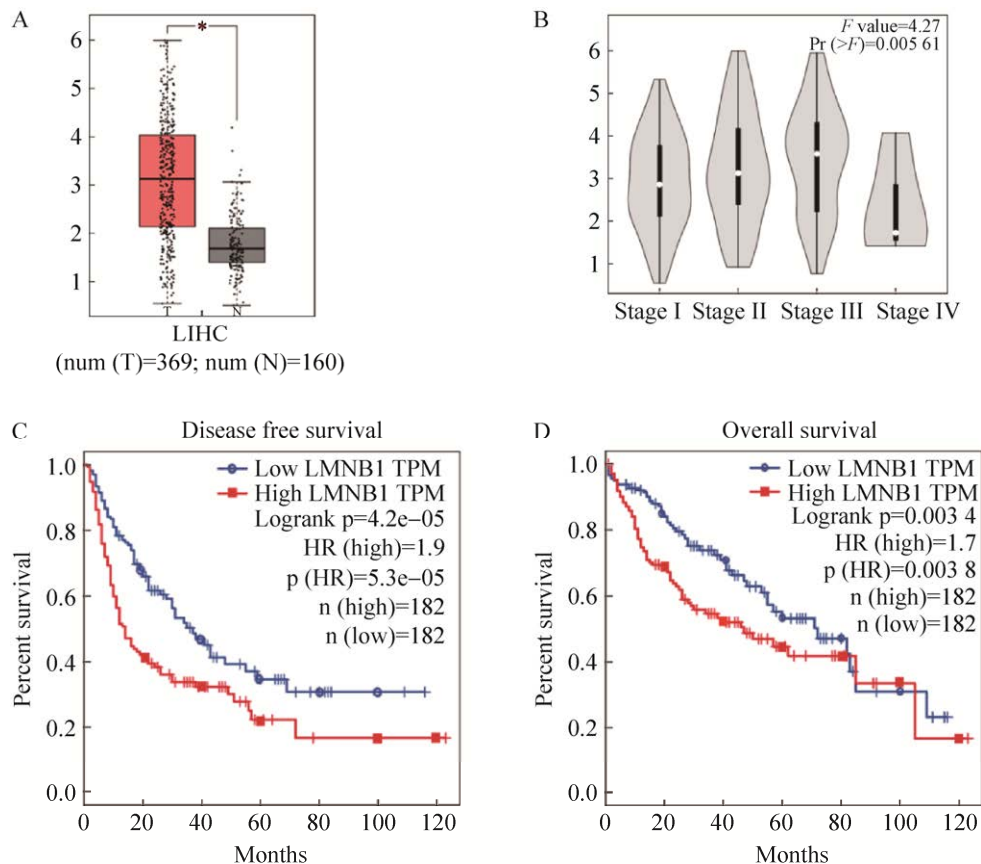


图 4 LMNB1 高表达于肝癌组织中且与患者预后相关

Figure 4 LMNB1 is highly expressed in liver cancer tissues and is associated with patient prognosis. A: The expression of LMNB1 at mRNA level in LIHC patients from TCGA and GTEx dataset by using bioinformatics' analyses (*: $P < 0.05$). B: The expression of LMNB1 in the different pathological stages of LIHC patients. C: Disease free survival analysis of LIHC patients. D: Overall survival analysis of LIHC patients.

伤修复机制而发生降解^[19], 端粒的不稳定在衰老性疾病和肿瘤的发生发展过程中都起着非常重要的作用。由于末端复制问题的存在, 大多数人体细胞端粒会随着细胞的复制而逐渐缩短, 但肿瘤细胞可实现永生化, 一方面是因为约 85%–90%的肿瘤细胞激活了端粒酶表达, 它们以自身端粒酶 RNA 组分(telomerase RNA component, TERC)为模板, 在端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)亚基的催化作用下, 合成端粒序列, 以限制端粒在增殖细胞中的快速损耗^[20], 另一方面约 10%–15%的肿瘤细胞没有端粒酶活性, 利用同源重组的方式来维持端粒长度, 实现自身的永生化, 叫作端粒延长替代机制(alterative lengthening of telomere, ALT)^[21]。但是, 末端复制问题、辐射、氧化应激等会造成端粒磨损, 当端粒缩短达到一定临界值, DNA 损伤反应机制(DNA damage response mechanism, DDR)被激活, 触发一系列事件(ATM, ATR-p53-p21CIP1 等), 细胞周期不可逆阻滞, 发生细胞衰老, 因此端粒也被誉为“生命的时钟”^[22], 在我们的实验中, 短期敲低 LMNB1 会出现端粒酶活性的降低, 端粒长度没有发生变化, 但在长期敲低 LMNB1 以后, 端粒酶活性持续降低, 使得其不足以抵抗细胞的复制性衰老引起的端粒缩短, 于是 qPCR 结果显示端粒显著缩短, 后续可能诱发 DDR 的激活, 触发一系列事件使细胞周期不可逆阻滞, 细胞衰老阳性比例增加, 肿瘤生长受到抑制。

核纤层蛋白分为 A 型和 B 型两类。A 型和 B 型层膜在蛋白质结构、表达、定位方式、生物化学等方面存在差异^[23]。研究发现, LMNB1 在细胞衰老和增殖、DNA 复制和基因表达、染色体分散和聚集、DNA 片段和端粒稳定等方面发挥着关键作用, 同时还能保持细胞

核的完整和形态。已有研究证明 LMNB1 表达异常与神经系统疾病和肿瘤相关^[24–27]。鉴于 LMNB1 在其他肿瘤细胞中具有不同而复杂的生物学功能, 深入研究将为研究各种疾病的病理机制, 探索癌症治疗的创新生物标志物和靶点奠定基础。

在本研究中, 使用了 siRNA 敲低肝癌细胞的 LMNB1 表达, 发现其端粒酶活性显著降低, 细胞生长、迁移和侵袭能力被显著抑制, 但端粒长度却没有发生缩短, 可能由于端粒位于异染色质区, 一方面其长度的改变需要时间的积累, 另一方面可能机体从端粒酶途径以外的机制来进行了端粒长度的代偿。于是我们使用了慢病毒系统, 在 HepG2 细胞中稳定敲低了 LMNB1 的表达, 发现其端粒酶活性也降低了, 且伴随着端粒长度显著地缩短。端粒长度的缩短, 诱发了细胞的衰老, 并在后续的裸鼠成瘤实验中得到了进一步证实。通过对数据库的整理, 我们发现肝癌患者癌组织 LMNB1 的表达水平与肿瘤的临床分期呈现正相关关系, 与病人的总生存期和无病生存期均呈现负相关关系。这些结果表明 LMNB1 通过影响端粒酶活性调控肝癌细胞生长, 敲低 LMNB1 会降低端粒酶活性, 使端粒缩短诱发细胞衰老来抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭。LMNB1 是核纤层蛋白的重要组成成分, 参与细胞力学传导的同时也参与构成纤层相关结构域(lamina-associated domains, LADs)。端粒为异染色质附着在 LADs 区, 富含高度的表观遗传修饰。首先, LMNB1 蛋白的表达减少, 可能会改变端粒区染色体的可及性, 使得端粒酶募集到端粒区的能力发生变化, 从而影响端粒长度。此外, 端粒酶启动子区也富含甲基化修饰, LMNB1 蛋白表达的降低, 可能通过改变端粒酶启动子区甲基化的状态, 从而影响了端粒酶的活性。最后, 端粒酶

需要 TERT 亚基与 TERC 亚基的结合而发挥作用, LMNB1 是否也会影响端粒酶的装配, 也需要更多的实验来证明。鉴于 LMNB1 在肿瘤细胞中的多种功能, LMNB1 如何影响肝癌细胞中的端粒酶活性, 是否存在 LMNB1 影响肝癌细胞生长的其他机制等还需进一步实验研究。

综上所述, 本研究证明敲低 LMNB1 能通过抑制端粒酶活性使端粒缩短, 从而诱发细胞衰老, 抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭。使得 LMNB1 有望成为肝癌治疗的一个新的靶点及新的预后评估生物标记物。

REFERENCES

- [1] MIETHE C, TORRES L, ZAMORA M, PRICE RS. Inhibition of PI3K/Akt and ERK signaling decreases visfatin-induced invasion in liver cancer cells[J]. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 2021, 42(4): 357-366.
- [2] 田志宏. Hpa 和 b-FGF 在原发性肝细胞肝癌中的表达及临床意义[D]. 石家庄: 河北医科大学硕士学位论文, 2005. TIAN ZH. Expression and clinical significance of Hpa and b-FGF in human PHCC[D]. Shijiazhuang: Master's Thesis of Hebei Medical University, 2005 (in Chinese).
- [3] 原发性肝癌诊疗指南(2022 年版)[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2022, 8(2): 16-53. Guidelines for the diagnosis and treatment of primary hepatic carcinoma (2022edition)[J]. *Journal of Multidisciplinary Cancer Management (electronic version)*, 2022, 8(2): 16-53 (in Chinese).
- [4] 祝珊珊, 秦飞, 陈仲巍, 毕丽伟, 陈丹, 许莉, 郑晓辉. 索拉菲尼对肝癌 HepG2 细胞凋亡、耐药及 PTEN 蛋白表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(11): 1532-1536. ZHU SS, QIN F, CHEN ZW, BI LW, CHEN D, XU L, ZHENG XH. Sorafenib induces apoptosis and drug resistance of HCC cells and regulates PTEN expression[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2020, 36(11): 1532-1536 (in Chinese).
- [5] 徐妙, 张莉. 原发性肝癌介入治疗术后并发症预防实施循证护理的效果观察[J]. *实用临床护理学电子杂志*, 2017, 2(31): 138-139. XU M, ZHANG L. Observation of the effect of evidence-based nursing on prevention of complications after interventional therapy for primary liver cancer[J]. *Electronic Journal of Practical Clinical Nursing Science*, 2017, 2(31): 138-139 (in Chinese).
- [6] AARTS DG, SCHMIDT M, LEKKERKERKER HN. Direct visual observation of thermal capillary waves[J]. *Science*, 2004, 304(5672): 847-850.
- [7] CREMER T, CREMER M. Chromosome territories[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010, 2(3): a003889.
- [8] 胡雪峰, 徐柳. 细胞骨架与有丝分裂[J]. *生物学通报*, 2017, 52(01): 12-13. HU XF, XU L. Cytoskeleton and mitosis[J]. *Bulletin of Biology*, 2017, 52(01): 12-13 (in Chinese).
- [9] LAMMERDING J, SCHULZE PC, TAKAHASHI T, KOZLOV S, SULLIVAN T, KAMM RD, STEWART CL, LEE RT. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2004, 113(3): 370-378.
- [10] LAMMERDING J, FONG LG, JI JY, REUE K, STEWART CL, YOUNG SG, LEE RT. Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(35): 25768-25780.
- [11] VAHABIKASHI A, ADAM SA, MEDALIA O, GOLDMAN RD. Nuclear lamins: structure and function in mechanobiology[J]. *APL Bioengineering*, 2022, 6(1): 011503.
- [12] LI W, LI XQ, LI XP, LI MJ, YANG P, WANG XH, LI L, YANG B. Lamin B1 Overexpresses in lung adenocarcinoma and promotes proliferation in lung cancer cells via AKT pathway[J]. *Onco Targets and Therapy*, 2020, 13: 3129-3139.
- [13] TANG D, LUO HH, XIE A, HE ZC, ZOU B, XU F, ZHANG W, XU XP. Silencing LMNB1 contributes to the suppression of lung adenocarcinoma development[J]. *Cancer Management and Research*, 2021, 13: 2633-2642.
- [14] YANG YY, GAO L, CHEN JZ, XIAO W, LIU RQ, KAN HP. Lamin B1 is a potential therapeutic target and prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 9211-9231.
- [15] SUN S, XU MZ, POON RT, DAY PJ, LUK JM. Circulating lamin B1 (LMNB1) biomarker detects early stages of liver cancer in patients[J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(1): 70-78.
- [16] BRUIX J, HAN KH, GORES G, LLOVET JM,

- MAZZAFERRO V. Liver cancer: approaching a personalized care[J]. *Journal of Hepatology*, 2015, 62(1 suppl): S144-S156.
- [17] 林坚, 黄君健, 黄翠芬. 端粒维持研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2000(4): 286-291.
- LIN J, HUANG JJ, HUANG CF. Progress on mechanism of telomeres maintaining[J]. *Letters in Biotechnology*, 2000(4): 286-291 (in Chinese).
- [18] 吴晓明, 唐文如, 罗瑛. ALT——端粒延长替代机制[J]. *遗传*, 2009, 31(12): 1185-1191.
- WU XM, TANG WR, LUO Y. ALT——alternative lengthening of telomere[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2009, 31(12): 1185-1191 (in Chinese).
- [19] SMITH EM, PENDLEBURY DF, NANDAKUMAR J. Structural biology of telomeres and telomerase[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020, 77(1): 61-79.
- [20] VERTECCHI E, RIZZO A, SALVATI E. Telomere targeting approaches in cancer: beyond length maintenance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(7): 3784.
- [21] LAWLOR RT, VERONESE N, PEA A, NOTTEGAR A, SMITH L, PILATI C, DEMURTAS J, FASSAN M, CHENG L, LUCHINI C. Alternative lengthening of telomeres (ALT) influences survival in soft tissue sarcomas: a systematic review with meta-analysis[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 232.
- [22] SHAY JW. Telomeres and aging[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2018, 52: 1-7.
- [23] DITTMER TA, MISTELI T. The lamin protein family[J]. *Genome Biology*, 2011, 12(5): 222.
- [24] LUKASOVA E, KOVARIK A, KOZUBEK S. Consequences of lamin B1 and lamin B receptor downregulation in senescence[J]. *Cells*, 2018, 7(2): 11.
- [25] GIGANTE CM, DIBATTISTA M, DONG FN, ZHENG X, YUE S, YOUNG SG, REISERT J, ZHENG Y, ZHAO H. Lamin B1 is required for mature neuron-specific gene expression during olfactory sensory neuron differentiation[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15098.
- [26] RADSPIELER MM, SCHINDELDECKER M, STENZEL P, FÖRSCH S, TAGSCHERER KE, HERPEL E, HOHENFELLNER M, HATIBOGLU G, ROTH W, MACHER-GOEPFINGER S. Lamin-B1 is a senescence-associated biomarker in clear-cell renal cell carcinoma[J]. *Oncology Letters*, 2019, 18(3): 2654-2660.
- [27] CAMPS J, ERDOS MR, RIED T. The role of lamin B1 for the maintenance of nuclear structure and function[J]. *Nucleus*, 2015, 6(1): 8-14.

(本文责编 陈宏宇)