

下调表达SND1通过调控衰老相关分泌表型 促进人二倍体成纤维细胞衰老的研究

孙 曼, 杨晓文, 曹 锋, 柯 娜

十堰市太和医院 检验医学部(十堰 442000)

【摘要】目的 研究下调表达葡萄球菌核酸酶和tudor结构域1(staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1, SND1) 对人二倍体成纤维细胞衰老的影响,并探讨其相关机制。**方法** Western blot和免疫组化分别检测SND1在年轻及衰老2BS细胞(博来霉素诱导2BS细胞老化)和老年组织(人结肠腺瘤组织)中的表达情况;免疫荧光检测SND1在年轻2BS细胞中的定位;CCK8和EDU分析检测2BS的增殖能力;集落形成分析评价2BS集落形成能力;表达芯片和RT-qPCR分析衰老相关分泌表型(SASP)表达改变; β 半乳糖苷酶染色用于显示衰老的2BS细胞。**结果** SND1在衰老2BS细胞中的表达较年轻2BS细胞显著下调,且在结肠腺瘤组织中的表达较非病变结肠组织明显下调。在年轻的2BS中,敲低SND1抑制2BS增殖和克隆形成,并出现增强的衰老相关 β 半乳糖苷酶染色($P<0.05$)。表达芯片检测结果和RT-qPCR分析表明敲低SND1上调了SASP成分($P<0.05$)。**结论** 本研究结果表明下调的SND1通过上调SASP表达来调控人二倍体细胞衰老。

【关键词】 细胞衰老 SND1 衰老相关分泌表型 衰老

Downregulation of SND1 Expression Accelerates Cell Senescence of Human Diploid Fibroblasts 2BS via Modulating the SASP SUN Man, YANG Xiao-wen, CAO Feng, KE Na. Department of Laboratory Medicine, Taihe Hospital, Shiyan 442000, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of down-regulation of SND1 expression on senescence of human diploid fibroblasts. **Methods** Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression of SND1 in young or senescent 2BS cells and aged tissues. Immunofluorescence was conducted to detect the localization of SND1 in young 2BS cells. CCK8 and EDU were performed to detect the proliferation of 2BS. Colony formation analysis was used to evaluate the capacity of colony formation of 2BS. Expression chip and RT-qPCR analysis were performed to detect the change of SASP expression level. β -galactosidase staining was employed to indicate the senescent 2BS cells. **Results** The expression of SND1 in the senescent 2BS cells was significantly down-regulated compared with in the younger 2BS cells, and in human colon adenomas, its expression was also significantly down-regulated compared with in non-lesion colon tissues. In young 2BS, knockdown of SND1 inhibited the proliferation and colony formation of 2BS, and led to stronger senescence-associated beta-galactosidase staining (SA- β -gal). Expression chip and RT-qPCR analysis indicated that knockdown of SND1 up-regulated the expression of senescence-associated secretory phenotype components (SASP). **Conclusions** Our data indicated that down-regulation of SND1 regulated human diploid cell senescence by up-regulating the expression of SASP components.

【Key words】 Cellular senescent SND1 Senescence-associated-secretory-phenotype Aging

细胞衰老是二倍体细胞中发生的细胞生长的永久停滞,这种现象首先由HAYFLICK描述,称为“HAYFLICK极限”,这种细胞衰老由端粒耗损引起,称之为复制性衰老^[1]。然而,二倍体细胞在某些刺激(例如癌基因过度表达、电离辐射、氧化应激)下也会经历加速的衰老反应,而不受端粒耗损的影响,称之为早衰^[2-3]。目前,已建立了一系列细胞衰老的鉴定标志物^[4-6]。首先,通过不可逆的生长停滞和扩大的扁平细胞形态来鉴定衰老细胞;其次,衰老细胞的特征在于衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)的活性更高,并且获得衰老相关的异染色质灶形成(SAHF),即衰老相关的分泌表型(SASP);最后,衰老细胞通常表达增加的细胞周期抑制剂,包括p16^{INK4a}、p21^{CIP1}和TP53。葡萄球菌核酸酶和tudor结构域1(staphylococcal nuclease and

tudor domain containing 1, SND1) 是一个多功能蛋白,且在乳腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肝细胞癌和恶性胶质瘤中过表达^[7-8]。分子研究揭示了SND1参与调节基因表达在转录和转录后水平^[9-10]。目前,SND1在细胞衰老和老年组织中的调控作用还未曾报道。本研究旨在研究转录共激活因子SND1在衰老细胞和老年组织中的表达情况,明确SND1对细胞衰老的调控机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人胚肺二倍体成纤维细胞2BS购自中国北京国家生物制品研究所。HEK293T细胞来自本实验室,用于质粒系统慢病毒的包装。结肠腺瘤组织和正常结肠组织来源

于十堰市太和医院病理科。Trizol试剂和胎牛血清购自Invitrogen公司; DMEM购自Sigma公司; 逆转录试剂盒购自天根生化科技有限公司; β 半乳糖苷酶染色试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司; CCK8试剂盒购自日本同仁公司; EDU试剂盒购自广州锐博; 生物安全柜和细胞培养箱购自Thermo scientific公司; 凝胶成像系统购自Bio-rad公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 所有细胞使用DMEM培养基培养, 并加入10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素, 置于37 ℃、体积分数为5%CO₂的加湿培养箱中培养。

1.2.2 诱导2BS细胞衰老和Western blot分析 诱导2BS细胞衰老方法: 将博来霉素(购买自Selleck公司)粉末配制成1 mg/mL质量浓度溶液。将1 mg/mL博来霉素溶液加入到提前换好新鲜培养基的2BS细胞培养皿中, 摇晃均匀, 随后将培养皿放置培养箱中, 24 h后更换新鲜培养基, 随后培养至第7天, 2BS细胞形状发生改变并停止生长, 表明其进入衰老状态。Western blot分析: 将正常2BS细胞(代表年轻细胞)和经博来霉素诱导老化(经典的诱导细胞衰老方法)后的2BS细胞置于含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解buffer中进行裂解, 得到的上层清液进行10%SDS-PAGE分离, 然后电转移到PVDF膜。5%脱脂奶粉封闭非特异位点, 用 β -actin(货号M177-3, MBL公司)、SND1(货号ab225620, Abcam公司)、P53(货号sc-126, Santa Cruz公司)和P16(货号ab51243, Abcam公司)一抗进行4 ℃过夜孵育(稀释比例均为1:1 000)。TBST洗3次后, 用辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下孵育1 h(二抗稀释比例为1:10 000), 最后用增强的化学发光仪进行显像。

1.2.3 免疫荧光染色 在培养板中将已爬好正常2BS细胞的玻片用PBS浸洗3次, 每次3 min; 用体积分数为4%的多聚甲醛固定爬片15 min, PBS浸洗玻片3次, 每次3 min; 0.5% TritonX-100(PBS配制)室温通透20 min; PBS浸洗玻片3次, 每次3 min, 吸水纸吸干PBS, 在玻片上滴加正常山羊血清, 室温封闭30 min; 吸水纸吸掉封闭液, 不洗, 每张玻片滴加足够量的稀释好的SND1一抗, 并放入湿盒, 4 ℃孵育过夜; PBST浸洗爬片3次, 每次3 min, 吸水纸吸干爬片上多余液体后滴加稀释好的荧光(FITC)标记羊抗兔标记羊抗兔IgG, 湿盒中20~37 ℃孵育1 h, PBST浸洗切片3次, 每次3 min; 注意从加荧光二抗起, 后面所有操作步骤都尽量在较暗处进行; 滴加DAPI避光孵育5 min, 对本进行染核, PBST 5 min×4次洗去多余的DAPI; 用吸水纸吸干爬片上的液体, 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 然

后在荧光显微镜下观察。

1.2.4 免疫组化染色分析 本研究用人结肠腺瘤组织作为衰老模型^[1], 正常结肠组织作为正常对照。免疫组化(IHC)分析按文献方法进行^[12]。将甲醛溶液固定的结肠腺瘤组织和正常结肠组织石蜡切片脱蜡、复水, 3% H₂O₂预处理20 min, 阻断内源性过氧化物酶。98 ℃微波处理10 min, 提取抗原的抗体结合表位, 切片与10%山羊血清预孵育, 阻断非特异性结合, 随后加入SND1一抗在4 ℃孵育过夜, 加入鼠兔通用型二抗(稀释倍数1:1 000, 货号PV-6000, 中杉金桥公司), 最后用DAB试剂盒进行显色, 苏木精进行中和染色。

1.2.5 shRNA质粒构建和转染 合成针对SND1的shRNA和阴性对照的shRNA(sh-ctrl)序列, 由北京迈津生物科技有限公司合成, 随后将其连接到Plent-U6-GFP-Puro载体上。为了保证shSND敲低效果, 我们针对SND1 mRNA区域分别设计了3个shRNA靶点, 即shSND1-1、shSND1-2和shSND1-3, 这样能保证敲低的特异性和可靠性。shSND1-1序列: GTGTGGCTCCCACAGCTAA TTT, shSND1-2序列: GAAGGCATGAGAGCTAAT AA, shSND1-3序列: GCTGATGATGCAGACGAATT, sh-ctrl: GTTCTCCGAACGTGTCACGT。将携带shSND1-1、shSND1-2和sh-ctrl序列的Plent-U6-GFP-Puro质粒(购自北京迈津生物科技有限公司)与慢病毒包装质粒PMD2G和PSPAX2(本实验保存)在HEK293T细胞中包装成慢病毒, 将收集的慢病毒感染2BS细胞, 感染48 h后, 通过Western blot检测各组细胞中SND1的表达水平。

1.2.6 CCK8和EDU分析 分别用CCK8细胞计数盒和EDU DNA细胞增殖试剂盒检测shSND1-1组、shSND1-2组和sh-ctrl组2BS细胞的增殖能力, 操作方法依据试剂盒说明进行。

1.2.7 克隆形成分析 将上述每组1 000个细胞接种到3.5 cm培养皿中, 然后在37 ℃下孵育14 d, 期间每隔2 d更换一次培养基。14 d后, 用体积分数为4%多聚甲醛固定细胞集落, 随后用0.1%结晶紫染色20 min, PBS清洗3遍后, 用显微镜成像并计数。

1.2.8 SASP表达芯片检测 为了研究敲低SND1对SASP的影响, 本研究将对照组(sh-ctrl)和SND1敲低组(shSND1)2BS细胞进行SASP表达芯片检测, 表达芯片检测由上海美吉生物完成。

1.2.9 RT-qPCR 使用Trizol试剂提取对照组和SND1敲低组细胞总RNA, 取2 μ g RNA用逆转录试剂盒ReverTra Ace[®] qPCR RT进行逆转录得到cDNA, 随后采用SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix以cDNA为模板进行扩

增。反应条件为: 95 ℃预变性2 min, 95 ℃变性30 s, 60 ℃退火30 s, 72 ℃延伸30 s, 循环40次。目的基因相对内参的表达丰度通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。引物序列见表1。

1.2.10 β 半乳糖苷酶染色 依据文献方法^[13-14]进行操作, 检测shSND1-1组、shSND1-2组和sh-ctrl组细胞的衰老细胞比例。

表 1 各引物序列
Table 1 Sequence of prime

Prime	Sequence (5'-3')	
	F	R
SND1	GAGTATGGCATGATCTACCTTGG	GCCGGTTCTGCTCAGGATT
IL-8	ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC	AACCCTCTGCACCCAGTTTTC
HGF	GCTATCGGGGTAAGACCTACA	CGTAGCGTACCTCTGGATTGC
AREG	GAGCCGACTATGACTACTCAGA	TCACTTTCCTCTTGTTTTGGG
EREG	GGACAGTGCATCTATCTGGTGG	TTGGTGGACGGTTAAAAAGAAGT
IL-6	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTCAAGTTG
MMP1	GGGGCTTTGATGTACCTTAGC	TGTCACACGCTTTTGGGGTTT
MMP3	CTGGACTCCGACACTCTGGA	CAGGAAAGGTTCTGAAGTGACC
CXCL1	CACAGCTGCAGAGGCCACCTG	GGACAGTGTGCAGGTAGAG
CXCL2	GGTGGCTGTTCTGAAGGAGG	GCAAGTAGATTCAATCATAACC

SND1: Staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1; IL-8: Interleukin-8; HGF: Hepatocyte growth factor; AREG: Amphiregulin; EREG: Epregulin; IL-6: Interleukin-6; MMP1: Matrix metalloproteinase 1; MMP3: Matrix metalloproteinase 3; CXCL1: C-X-C motif chemokine ligand 1; CXCL2: C-X-C motif chemokine ligand 2

1.2.11 统计学方法 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 描述。采用t检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 衰老细胞和老年组织中的SND1表达下调

Western blot检测结果(图1)表明, SND1在衰老细胞中的表达较年轻细胞显著下调, 细胞衰老的标志分子P16和P53在衰老细胞中上调表达。细胞免疫荧光表明, SND1主要定位在年轻2BS细胞胞浆(图2)。免疫组化染色结果(图3)表明, SND1在人结肠腺瘤组织中的表达较正常结肠组织降低。

2.2 sh-SND1抑制了2BS细胞的增殖和克隆形成能力

Western blot检测结果(图4A)发现, 转染了shSND1的shSND1组2BS细胞中SND1蛋白相对表达水平明显低于

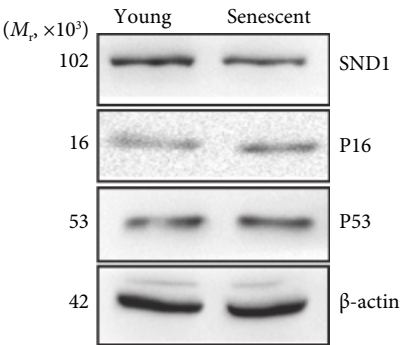


图 1 衰老和年轻2BS细胞中SND1、P16和P53蛋白的表达
Fig 1 Western blot detected the expression of SND1, P16 and P53 in senescent and young 2BS cells

sh-ctrl组细胞。CCK8、EDU和克隆形成分析结果(图4B ~ 4D)表明, 相对于sh-ctrl组2BS细胞, shSND1组2BS细胞增

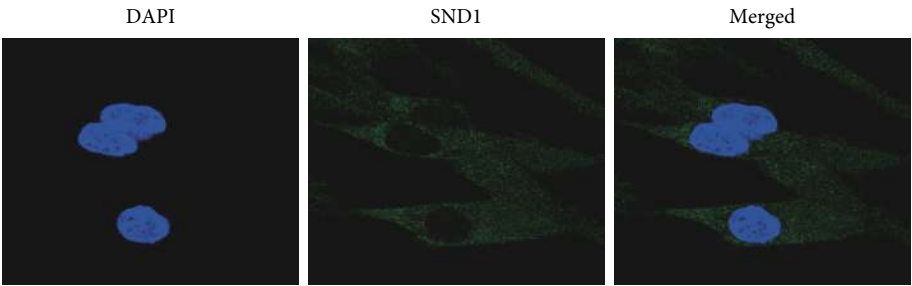


图 2 SND1蛋白在年轻2BS细胞中的定位。免疫荧光染色 ×100
Fig 2 The location of SND1 in young 2BS cells. Immunofluorescence ×100

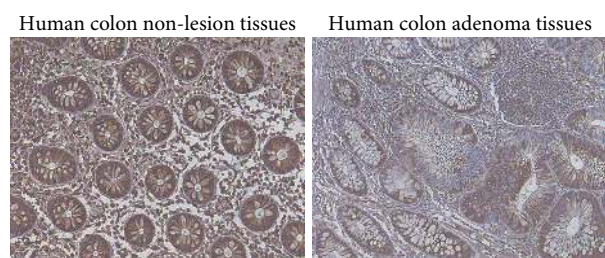


图3 SND1在老年组织中的表达下调。IHC ×20

Fig 3 The expression of SND1 in human colon non-lesion tissues and human colon adenoma tissues. IHC ×20

殖能力和克隆形成能力出现减弱($P < 0.01$)。

2.3 敲低SND1上调SASP而促进2BS细胞衰老

SASP表达芯片检测结果表明, 敲低SND1上调了IL-6、MMP1和MMP3的表达(同时出现了衰老标志的表达改变, 如增加的P16和P53表达, 减少的Lamb1表达), 且KEGG分析显著富集于细胞周期和DNA复制等信号通路上(图5)。

RT-qPCR结果(图6)表明, shSND1组白细胞介素(IL)-8、趋化因子CXCL-2、肝细胞生长因子(HGF)、IL-6、基质金属蛋白酶(MMP)1和MMP3的表达较sh-ctrl组

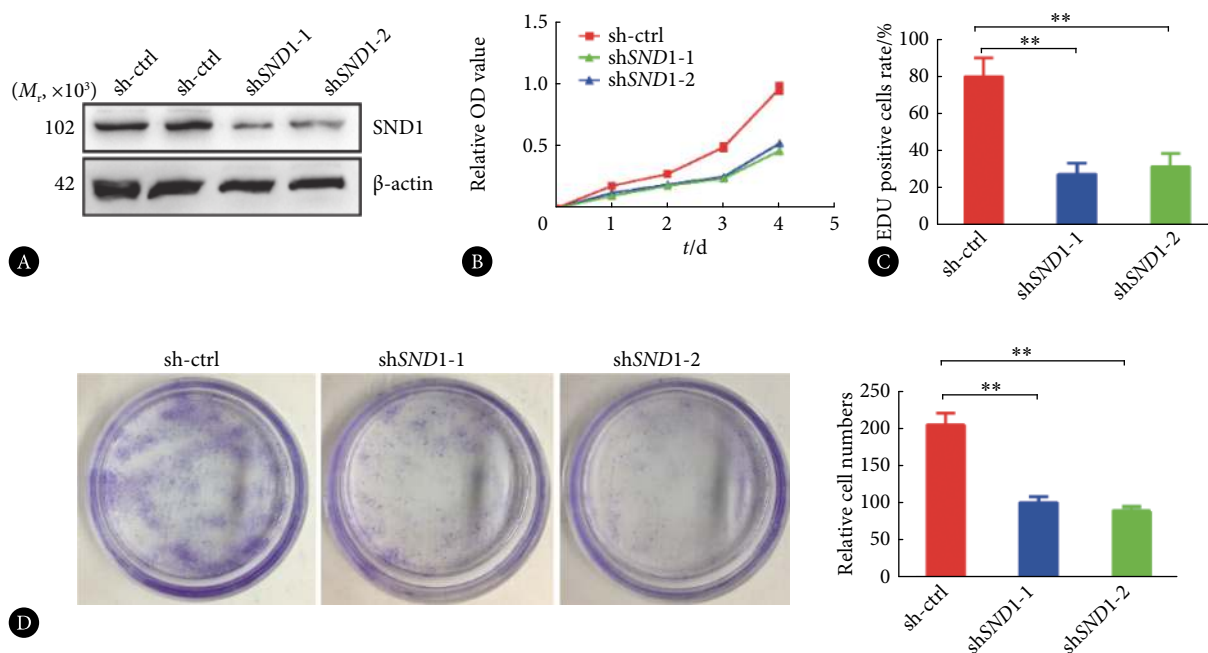


图4 敲低SND1抑制了2BS细胞的增殖和克隆形成能力

Fig 4 Knockdown of SND1 inhibits proliferation and colony formation of 2BS cells

A: Western blot detected the knockdown efficacy of SND1 in young 2BS cells; B: CCK8 measured the proliferative ability of 2BS cells; C: EDU measured the proliferative ability of 2BS cells (** $P < 0.01$); D: Colony formation assay evaluated the capacity of colony formation (** $P < 0.01$)

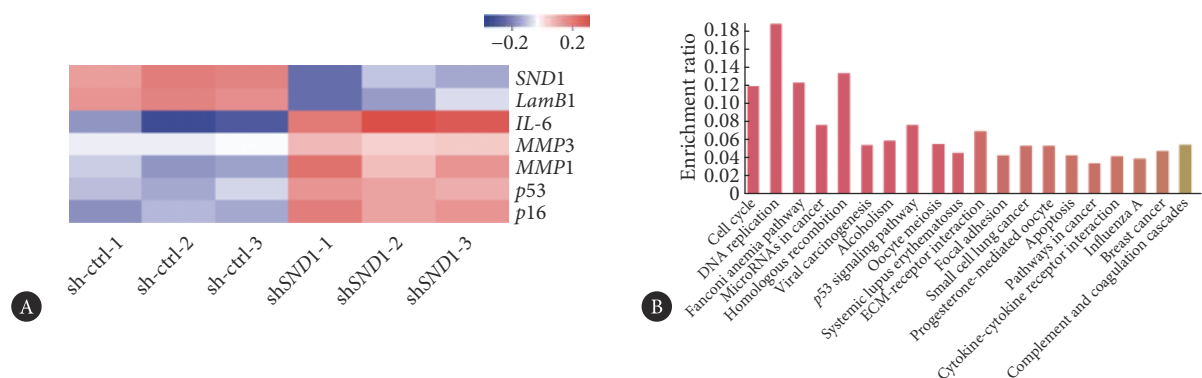


图5 3组2BS细胞的RNA测序分析

Fig 5 RNA sequencing analysis of 2BS cells transfected with sh-ctrl and shSND1 plasmids

A: Results of SASP represents chip detection; B: KEGG enrichment based on RNA sequencing analysis (sh-ctrl vs. shSND1)

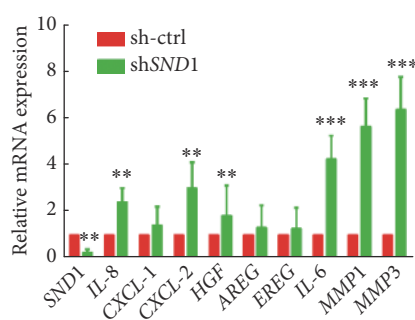


图6 RT-qPCR检测SASP组分表达改变(n=3)

Fig 6 RT-qPCR detected the altered expression of SASP components (n=3)

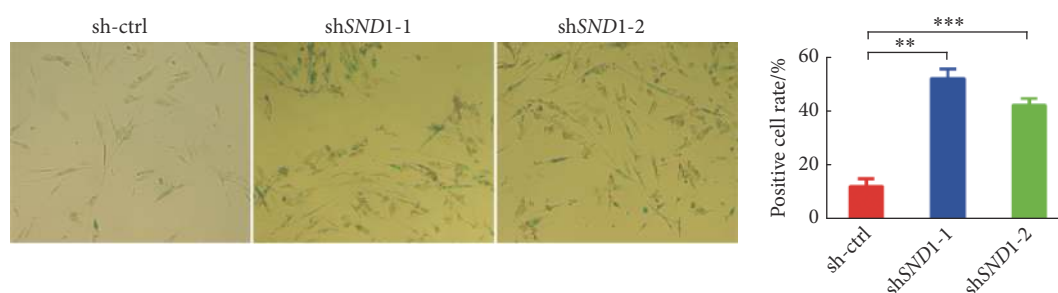
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. sh-ctrl

图7 SA-β-gal染色检测3组2BS细胞增殖能力(n=3)。×10

Fig 7 SA-β-gal staining evaluated the senescent 2BS cells (n=3). ×10

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

SND1是一个转录共激活因子,在基因表达调控方面起着重要作用,如RNA剪接、RNA干扰、RNA稳定性和RNA编辑^[19]。已发表的研究证明了SND1在许多肿瘤中发挥了癌基因的作用,进而促进肿瘤的发生和转移^[19,19-20]。此外,已证实一些microRNA参与调控SND1而调节肿瘤的发生和转移。EMDAD等^[21]揭示了SND1是miR-184的一个直接靶点,抑制miR-184导致SND1上调表达,进而促进恶性胶质瘤的发展。然而,目前SND1在衰老细胞和老年组织中的调控作用报道甚少。

在此,我们首先通过Western blot和免疫组化揭示了SND1在衰老的2BS细胞和人结肠腺瘤组织中表达下调,此结果与SND1在癌组织的表达模式是一致的,表明SND1高表达可驱使细胞绕过衰老阶段而进入癌变时期。随后,我们采用shRNA敲低SND1,结果发现敲低SND1抑制了2BS细胞的增殖和克隆形成能力,表明SND1对一些细胞周期调控基因具有转录激活作用,敲低SND1可减弱细胞周期调控基因的转录,进而抑制细胞增殖。我们通过转录组测序和RT-qPCR分析进一步研究发现敲低SND1上调了IL-8、CXCL-2、HGF、IL-6、MMP1和MMP3等SASP成分,下调的SND1通过改变SASP表达谱进而调控人二倍体细胞衰老。

上调($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。衰老相关SA-β-gal染色(图7)揭示了shSND1组较sh-ctrl组衰老细胞比例增加($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

3 讨论

细胞衰老是一种肿瘤抑制机制,可永久地阻止细胞处于恶变的风险中^[15-16]。然而,许多证据表明,衰老细胞对组织微环境产生有害影响。这些影响中最重要的是衰老的成纤维细胞获得SASP进而转变为促炎性细胞而促进肿瘤发展^[17-18]。因此,鉴定SASP的上游调节分子可为干预细胞衰老和肿瘤提供新的靶点。

总之,转录共激活因子SND1在衰老的2BS细胞和衰老组织人结肠腺瘤组织中的表达降低,SND1通过调控SASP进而调节人二倍体成纤维细胞衰老。

参 考 文 献

- [1] HAYFLICK L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 1965, 37: 614-636.
- [2] KUILMAN T, MICHALOGLOU C, MOOI W J, *et al*. The essence of senescence. *Genes Dev*, 2010, 24(22): 2463-2479.
- [3] CALCINOTTO A, KOHLI J, ZAGATO E, *et al*. Cellular senescence: aging, cancer, and injury. *Physiol Rev*, 2019, 99(2): 1047-1078.
- [4] CHILDS B G, GLUSCEVIC M, BAKER D J, *et al*. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(10): 718-735.
- [5] HERNANDEZ-SEGURA A, NEHME J, DEMARIA M. Hallmarks of cellular senescence. *Trends Cell Biol*, 2018, 28(6): 436-453.
- [6] YU A Q, WANG Z X, WU W, *et al*. Circular RNA CircCCNB1 sponges micro RNA-449a to inhibit cellular senescence by targeting CCNE2. *Aging*, 2019, 11(22): 10220-10241.
- [7] YU L, LIU X, CUI K, *et al*. SND1 acts downstream of TGFβ1 and upstream of smurf1 to promote breast cancer Metastasis. *Cancer Res*, 2015, 75(7): 1275-1286.
- [8] JARIWALA N, RAJASEKARAN D, MENDOZA R G, *et al*. Oncogenic

- role of SND1 in development and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2017, 77(12): 3306–3316.
- [9] JARIWALA N, RAJASEKARAN D, SRIVASTAVA J, *et al*. Role of the staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1 in oncogenesis (review). *Int J Oncol*, 2015, 46(2): 465–473.
- [10] YU L, DI Y, XIN L, *et al*. SND1 acts as a novel gene transcription activator recognizing the conserved Motif domains of Smad promoters, inducing TGF β 1 response and breast cancer metastasis. *Oncogene*, 2017, 36(27): 3903–3914.
- [11] JIN B, WANG Y, WU C L, *et al*. PIM-1 modulates cellular senescence and links IL-6 signaling to heterochromatin formation. *Aging Cell*, 2014, 13(5): 879–889.
- [12] LI L, LIANG Y, KANG L, *et al*. Transcriptional regulation of the warburg effect in cancer by SIX1. *Cancer Cell*, 2018, 33(3): 368–385.
- [13] ZHUO DE X, NIU X H, CHEN Y C, *et al*. Vitamin D3 up-regulated protein 1(VDUP1) is regulated by FOXO3A and miR-17-5p at the transcriptional and post-transcriptional levels, respectively, in senescent fibroblasts. *J Biol Chem*, 2010, 285(41): 31491–31501.
- [14] YANG J, LIU K, YANG J, *et al*. PIM1 induces cellular senescence through phosphorylation of UHRF1 at Ser311. *Oncogene*, 2017, 36(34): 4828–4842.
- [15] SUN Y, COPPE J P, LAM E W. Cellular senescence: the sought or the unwanted? *Trends Mol Med*, 2018, 24(10): 871–885.
- [16] RAO S G, JACKSON J G. SASP: tumor suppressor or promoter? Yes! *Trends Cancer*, 2016, 2(11): 676–687.
- [17] COPPE J P, DESPREZ P Y, KRTOLICA A, *et al*. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*, 2010, 5: 99–118.
- [18] RODIER F, CAMPISI J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*, 2011, 192(4): 547–556.
- [19] OCHOA B, CHICO Y, MARTINEZ M J. Insights into SND1 oncogene promoter regulation. *Front Oncol*, 2018, 8: 606.
- [20] GU X, XUE J, AI L, *et al*. SND1 expression in breast cancer tumors is associated with poor prognosis. *Ann N Y Acad Sci*, 2018, 1433(1): 53–60.
- [21] EMDAD L, JANJIC A, ALZUBI M A, *et al*. Suppression of miR-184 in malignant gliomas upregulates SND1 and promotes tumor aggressiveness. *Neuro Oncol*, 2015, 17(3): 419–421.

(2019 – 11 – 13收稿, 2020 – 02 – 10修回)

编辑 汤 洁