

• 论 著 •

# A 型核纤层蛋白编码基因 LMNA 调控 IOP1 表达机制的初步研究<sup>\*</sup>

孔令粤<sup>1,2</sup>, 刘佳鑫<sup>1,2</sup>, 郭放<sup>1,2</sup>, 郭涛<sup>3</sup>, 冯安妮<sup>4</sup>,

赵仕滔<sup>4</sup>, 黄浚炜<sup>5</sup>, 刘新光<sup>1,2</sup>, 赵炜<sup>1,2,△</sup>

1. 广东医科大学衰老研究所, 广东东莞 523808; 2. 广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808; 3. 广东医科大学第二临床医学院, 广东东莞 523808; 4. 广东医科大学医学技术学院, 广东东莞 523808; 5. 广东医科大学基础医学院, 广东东莞 523808

**摘要:**目的 探讨 A 型核纤层蛋白编码基因(LMNA)与唯铁脱氢酶编码基因 1(IOP1)在细胞自噬中潜在的调控关系。方法 在人胚胎肾细胞(HEK293T)中分别转染靶向 LMNA 基因和 IOP1 基因的 siRNA, 首先通过 RT-PCR 和 Western Blotting 检测 LMNA 基因和 IOP1 基因的表达水平, 进而检测自噬相关标志物的表达水平, 包括 LC3B II /LC3B I 蛋白比值、p62 蛋白、ATG5-ATG12 复合体、ATG5、ATG12 和 FOXO3a。结果 在 HEK293T 中干扰 LMNA 基因的表达, IOP1 基因的 mRNA 和蛋白水平表达水平下降, 自噬标志物 LC3B II /LC3B I 蛋白比值上调; 在 HEK293T 中下调 IOP1 的表达, 不影响 LMNA 基因的表达水平, 自噬标志物 LC3B II /LC3B I 蛋白比值、FOXO3a、ATG5、ATG12、ATG5-ATG12 复合体水平升高, p62 蛋白水平略有降低。结论 LMNA 基因可以调控 IOP1 基因的表达, 进而参与调控细胞自噬过程。

**关键词:** A 型核纤层蛋白编码基因; 唯铁脱氢酶编码基因 1; 调控

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2021.14.005 **中图法分类号:**Q291

**文章编号:**1673-4130(2021)14-1683-04 **文献标志码:**A

## Preliminary study on the mechanism of A-type lamin gene

### LMNA regulates the expression of IOP1<sup>\*</sup>

KONG Lingyue<sup>1,2</sup>, LIU Jiaxin<sup>1,2</sup>, GUO Fang<sup>1,2</sup>, GUO Tao<sup>3</sup>, FENG Anni<sup>4</sup>,

ZHAO Shitao<sup>4</sup>, HUANG Junwei<sup>5</sup>, LIU Xinguang<sup>1,2</sup>, ZHAO Wei<sup>1,2,△</sup>

1. Institute of Aging Research, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Dongguan, Guangdong 523808, China; 3. the Second Clinical Medical College of Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China; 4. the Medical Technology College of Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China; 5. the Basic Medicine College of Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China

**Abstract: Objective** To explore the potential mechanism of A-type lamin gene (LMNA) regulates the expression of iron-only hydrogenase-like protein 1(IOP1) in autophagy. **Methods** Transfected the LMNA specific or IOP1 specific siRNA into human embryonic kidney 293T cells (HEK293T cells). Analyze the expression level of LMNA and IOP1 by RT-PCR and Western Blotting, then, analyze the expression level of the marker genes of autophagy, including LC3B II /LC3B I, p62, ATG5-ATG12 complex, ATG5, ATG12 and FOXO3a. **Results** Both mRNA and protein level of IOP1 were down-regulated in LMNA specific siRNA transfected HEK293T cells, LC3B II /LC3B I was also up-regulated. LC3B II /LC3B I, FOXO3a, ATG5, ATG12 and ATG5-ATG12 complex were up-regulated, p62 was slightly down-regulated in IOP1 specific siRNA transfected HEK293T cells. **Conclusion** LMNA gene can regulate the expression of IOP1 gene, and then

<sup>\*</sup> 基金项目: 广东省自然科学基金项目(2018A0303070020)。

作者简介: 孔令粤, 男, 副研究员, 主要从事细胞增殖与衰老的分子机制方面的研究。△ 通信作者, E-mail: davidzhao1999@foxmail.com。

本文引用格式: 孔令粤, 刘佳鑫, 郭放, 等. A 型核纤层蛋白编码基因 LMNA 调控 IOP1 表达机制的初步研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(14): 1683-1686.

participate in the regulation of autophagy.

**Key words:** A-type lamin gene; iron-only hydrogenase-like protein 1; regulation

早老症(HGPS)是由于 A 型核纤层蛋白的编码基因(LMNA)发生突变<sup>[1-3]</sup>,产生异常剪接的蛋白(早老素),在细胞核内堆积引发的具有早老特征的疾病<sup>[4]</sup>。研究发现,使用自噬诱导剂蛋白酶体抑制剂(MG132)处理 HGPS 患者的成纤维细胞,可以有效改善细胞的早老表型<sup>[5]</sup>,暗示 LMNA 基因和细胞自噬之间存在一定的联系,但是具体调控机制尚不清楚。人的唯铁脱氢酶编码基因 1(IOP1)是一种铁硫蛋白,主要参与细胞质和细胞核中铁硫蛋白的合成<sup>[6]</sup>。本课题组在前期研究中发现 LMNA 和 IOP1 之间可能存在相互调控关系,本研究着重探讨两者之间,特别是它们在细胞自噬中潜在的调控机制,希望为 HGPS 的治疗提供借鉴。现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** 人胚胎肾细胞(HEK293T)为本实验室保存。胎牛血清(FBS)、高糖 DMEM 培养基、Lipofectamine RNAiMAX、IOP1-siRNA (ID: HSS148890)、LMNA-siRNA (ID: HSS106094)及 50 nmol/L 阴性对照 NC-siRNA (12935400)均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。cDNA 合成试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)购自日本 Takara 公司。RIPA 裂解液、PMSF、5×Loading Buffer 均购自中国碧云天生物技术有限公司。TGX Stain-Free FastCast Acrylamide 试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司,0.2 μmol/L PVDF 膜购自德国 Merck Millipore 公司,牛血清清蛋白(BSA)购自生工生物工程(上海)股份有限公司,AP 标记二抗购自美国 Proteintech 公司,NBT/BCIP 购自美国 Sigma 公司。IOP1 抗体、Lamin A/C 抗体、LC3B I 抗体、LC3B II 抗体、FOXO3a 抗体、p62 抗体、ATG5、ATG12 抗体、GAPDH 抗体均购自美国 CST 公司。荧光定量 PCR 仪型号为 LightCycler 480,购自瑞士罗氏公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** HEK293T 在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基培养。

**1.2.2 siRNA 干扰实验** 将 HEK293T 接种于 6 孔板中,当细胞密度达到 30%~50%时进行转染。用 Lipofectamine RNAiMAX 转染终浓度为 50 nmol/L 的 IOP1-siRNA、LMNA-siRNA 及 50 nmol/L 阴性对照 NC-siRNA。用于提取总 RNA 的细胞在转染后 48 h 收集,用于提取总蛋白的细胞在转染后 96 h 收集。

**1.2.3 荧光定量 PCR** 采用两步法进行荧光定量 PCR,先使用 Trizol 法提取细胞总 RNA,按照 cDNA

合成试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)的操作说明,取 1 μg RNA 用于反转录合成 cDNA,然后采用 SYBR Green 法在 LightCycler 480 仪器上进行荧光定量 PCR。IOP1 基因的定量引物序列为 5'-GAA AAA AGG GCG GGA AGT GPC R-3'和 5'-GCT CCC GTC ATC TTC AAT GC-3',LMNA 基因的定量引物序列为 5'-TGG ACG AGT ACC AGG AGC TT-3'和 5'-ACT CCA GTT TGC GCT TTT TG-3',内参基因 GAPDH 的定量引物序列为 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'和 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'。反应条件为:95℃ 1 min 预变性;95℃ 5 s 变性,55℃ 30 s 退火,72℃ 30 s 延伸;循环数 40 次。

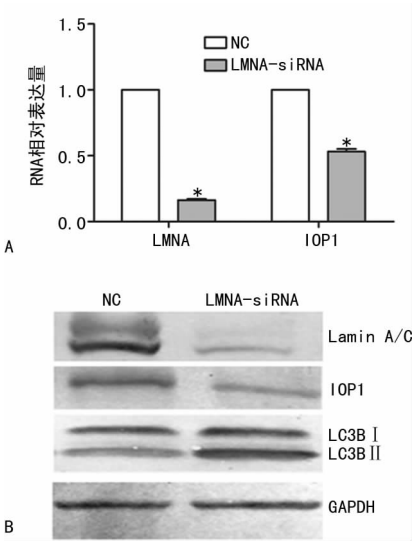
**1.2.4 Western Blotting** 收集细胞后,加入 RIPA 裂解液及 PMSF,冰上裂解 30 min,加入 5×Loading Buffer,100℃ 水浴 10 min。使用 TGX Stain-Free FastCast Acrylamide 试剂盒配制 12% PAGE 胶,电泳后将蛋白质转移到 0.2 μmol/L PVDF 膜,3% BSA 室温封闭 1 h 后,加入一抗,4℃ 孵育过夜,1×TBST 漂洗 3 次后,加入 AP 标记的对应二抗,室温孵育 1 h。通过 NBT/BCIP 法显色。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。两组间比较采用 *t* 检验进行分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 在 HEK293T 中干扰 LMNA 的表达对 IOP1 和细胞自噬的影响** 有文献报道在小鼠中敲除 LMNA 基因后,细胞自噬的标志物之一 LC3B II/LC3B I 的比例上调<sup>[7]</sup>。为了在细胞水平研究 LMNA 与自噬的关系,本文在 HEK293T 中转染靶向 LMNA 基因的 siRNA,进而检测 LC3B II/LC3B I 的表达水平。荧光定量 PCR 分析结果见图 1A,与 NC 对照组相比,在转染了靶向 LMNA 基因 siRNA 的实验组中,LMNA 的 mRNA 干扰效率达到 85%。LMNA 蛋白水平明显下调,见图 1B。

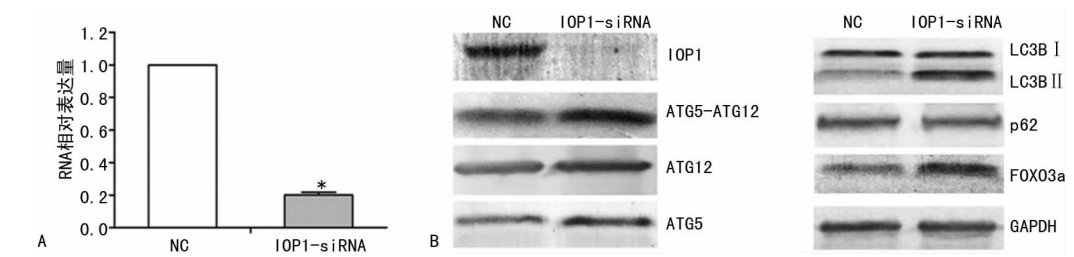
本文进一步通过 Western Blotting 检测 LC3B II/LC3B I 的相对比例(图 1B),结果显示,与 NC 对照组相比,LC3B II/LC3B I 的比例上调,表明在 HEK293T 中下调 LMNA 基因的表达水平,可以上调细胞的自噬水平。转染了靶向 LMNA 基因的 siRNA 的 HEK293T 中,IOP1 的 mRNA 转录水平和蛋白水平都明显下调,这表明 LMNA 基因、IOP1 基因和自噬之间可能存在调控关系。



注:与 NC 对照组比较, \*  $P<0.05$ 。

图 1 在 HEK293T 中干扰 LMNA 基因的表达

**2.2 在 HEK293T 中干扰 IOP1 的表达对 LMNA 基因的影响** 鉴于在 HEK293T 中干扰 LMNA 基因的表达, IOP1 基因的 mRNA 转录水平和蛋白水平都明显下调, 本文在 HEK293T 中转染靶向 IOP1 基因的 siRNA, 进而检测 LMNA 基因的表达水平。与 NC 对照组相比, 在转染了靶向 IOP1 的 siRNA 的实验组中, IOP1 基因的 mRNA (图 2A) 和蛋白水平明显下调, 见图 2B。然而, LMNA 基因的 mRNA 和蛋白水平都没有明显改变。结果表明, 在 HEK293T 中干扰 IOP1 基因的表达不影响 LMNA 基因的表达水平。



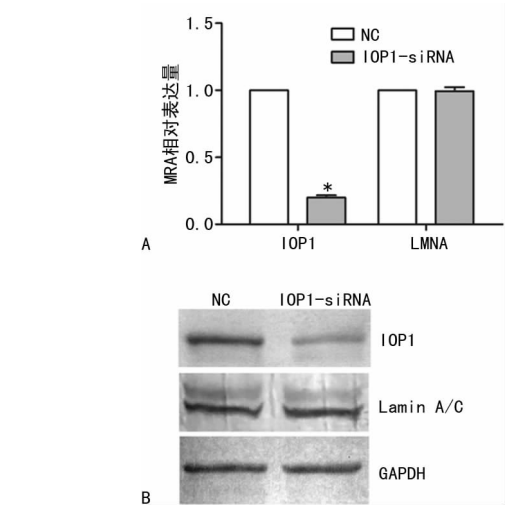
注:与 NC 对照组比较, \*  $P<0.05$ 。

图 3 在 HEK293T 中干扰 IOP1 基因的表达后细胞自噬标志物表达情况

### 3 讨 论

铁硫蛋白是以铁原子和硫原子组成的铁硫簇为辅基的一大类蛋白, 参与众多生理过程, 如细胞代谢、呼吸链电子传递、DNA 合成修复以及基因表达调控等<sup>[8]</sup>。有研究报道, 在人乳腺癌细胞和小鼠细胞中沉默铁硫蛋白 NAF-1 的表达, 可以激活自噬<sup>[9]</sup>; 铁硫蛋白 NEET 蛋白参与信号传导、凋亡、自噬等多种细胞活动<sup>[10]</sup>。这些研究提示, 铁硫蛋白很可能在细胞自噬中起着重要作用。但是, IOP1 基因作为铁硫蛋白家族中的一员, 是否参与调控细胞自噬, 鲜见相关报道。

有研究报道, 在二倍体酿酒酵母中缺失 NAR1 基



注:与 NC 对照组比较, \*  $P<0.05$ 。

图 2 在 HEK293T 中干扰 IOP1 基因的表达

**2.3 在 HEK293T 中干扰 IOP1 基因的表达对细胞自噬的影响** 为了进一步研究 LMNA 基因、IOP1 基因和自噬之间潜在的调控关系, 本文在转染了靶向 IOP1 基因 siRNA 的 HEK293T 中 (IOP1 基因的表达水平被证实下调, 图 3A), 通过 Western Blotting 检测多个细胞自噬的标志物: LC3B II / LC3B I、p62、ATG5-ATG12 复合体、ATG5 和 ATG12。结果显示 (图 3B), LC3B II / LC3B I 蛋白比值升高, FOXO3a、ATG5、ATG12、ATG5-ATG12 复合体蛋白水平升高, p62 蛋白水平略有降低, 暗示细胞的自噬水平上升。

因 (人类 IOP1 基因在酵母中的同源基因) 的一个拷贝, 会明显缩短酵母的复制性寿命, 表明 NAR1 及其人类同源基因 IOP1 基因很可能在细胞衰老中起重要作用<sup>[11]</sup>。另外, IOP1 基因的另一人类同源基因 IOP2 (也叫 NARF) 能与 A 型核纤层蛋白前体相互结合<sup>[12]</sup>, LMNA 基因突变会导致以 HGPS 为代表的一系列核纤层蛋白疾病。研究发现, 核纤层蛋白病的细胞样本中都存在细胞自噬受损现象, 使用 mTOR 药物抑制剂 (可以激活自噬) 处理后可以有效缓解细胞病理的相关表型<sup>[5]</sup>。

本文在 HEK293T 中转染靶向 LMNA 基因的 siRNA 之后, 细胞自噬的标志物之一 LC3B II / LC3B

I 蛋白比值上调,同时,IOP1 的 mRNA 转录水平和蛋白水平都明显下调,这表明下调 LMNA 基因的表达,可以有效降低 IOP1 基因的表达水平,反之,下调 IOP1 基因的表达,不会影响 LMNA 基因的表达水平。这表明 LMNA 基因对 IOP1 基因存在单向的调控关系。

为了进一步探讨 IOP1 基因是否也参与调控细胞自噬,本研究在 HEK293T 中转染靶向 IOP1 基因的 siRNA,直接降低 IOP1 基因的表达水平,进而检测自噬标志物的表达情况。结果显示,LC3BⅡ/LC3BⅠ蛋白比值、FOXO3a、ATG5、ATG12、ATG5-ATG12 复合体蛋白水平升高,p62 蛋白水平略有降低。

在哺乳动物细胞中,LC3 蛋白可以被 ATG4 剪切形成 LC3-Ⅰ,诱导自噬后,LC3-Ⅰ通过 ATG7、ATG3 和 ATG12-ATG5-ATG16L 多聚体与高亲脂性磷脂酰乙醇胺(PE)部分结合,转变为(自噬体)膜型 LC3(即 LC3-Ⅱ)。因此,LC3BⅡ/LC3BⅠ蛋白比值越大,提示自噬水平越高。p62 是 LC3-Ⅱ的自噬底物蛋白,与 LC3Ⅱ呈负相关关系<sup>[13]</sup>。

FOXO3a 是 FOXO 转录因子家族成员之一,在细胞衰老、凋亡、自噬中起着重要作用。研究发现,FOXO3A 可以直接与自噬相关基因的启动子,例如 LC3B、ATG12 结合,进而激活细胞自噬,减缓环境压力对细胞的毒害作用<sup>[14-16]</sup>。

综合这些细胞自噬标志物的检测结果,本文推测在 HEK293T 中干扰 LMNA 基因的表达后,可能通过下调 IOP1 基因的表达,进而上调转录因子 FOXO3a 的表达水平,最终导致自噬相关基因的表达。

综上所述,在 HEK293T 中 LMNA 基因可以调控 IOP1 基因的表达,进而参与调控细胞自噬过程。而 LMNA 基因通过何种途径调控 IOP1 基因的表达,是直接调控,还是通过其他信号通路间接调控,相关的分子机制尚需要更深入的研究。

参考文献

[1] REDDY S,COMAI L. Recent advances in understanding the role of lamins in health and disease[J]. F1000Res, 2016,5(1):1-10.

[2] DE LEEUW R,GRUENBAUM Y,MEDALIA O. Nuclear lamins;thin filaments with major functions[J]. Trends Cell Biol,2018,28(1):34-45.

[3] KHADIJA S,CHEN F,HADDEN T. Biology and regulatory roles of nuclear lamins in cellular function and dysfunction[J]. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Dis-

cov,2015,9(2):110-120.

[4] WORMAN H. Nuclear lamins and laminopathies[J]. J Pathol,2012,226(2):316-325.

[5] HARHOURI K,NAVARRO C,DEPETRIS D, et al. MG132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation[J]. EMBO Mol Med,2017,9(9):1294-1313.

[6] SHARMA A,PALLESEN L,SPANG R, et al. Cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA) system: factors, mechanism, and relevance to cellular iron regulation[J]. J Bio Chem,2010,285(35):26745-26751.

[7] RAMOS F,CHEN S,GARELICK M, et al. Rapamycin reverses elevated mTORC1 signaling in lamin A/C-deficient mice, rescues cardiac and skeletal muscle function, and extends survival[J]. Sci Transl Med,2012,4(144):1-25.

[8] ZHANG C. Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair and cell cycle control[J]. Protein Cell,2014,5(10):750-760.

[9] BAI F,MORCOS F,SOHN Y, et al. The Fe-S cluster-containing NEET proteins mitoNEET and NAF-1 as chemotherapeutic targets in breast cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2015,112(12):3698-3703.

[10] NECHUSHTAI R,KARMI O,ZUO K, et al. The balancing act of NEET proteins: iron, ROS, calcium and metabolism[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res,2020,1867(11):1-17.

[11] ZHAO W,FANG B,NIU Y, et al. Nar1 deficiency results in shortened lifespan and sensitivity to paraquat that is rescued by increased expression of mitochondrial superoxide dismutase[J]. Mech Ageing Dev,2014,138(7):53-58.

[12] BARTON R, WORMAN H. Prenylated prelamin A interacts with Narf, a novel nuclear protein[J]. J Biol Chem,1999,274(42):30008-30018.

[13] BARTH S, GLICK D, MACLEOD K. Autophagy: assays and artifacts[J]. J Pathol,2010,221(2):117-124.

[14] ZHAO J, BRAULT J, SCHILD A, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells[J]. Cell Metab,2007,6(6):472-483.

[15] WARR M,BINNEWIES M,FLACH J, et al. FoxO3a directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells[J]. Nature,2013,494(7437):323-327.

[16] LI Y,WANG H,PEI F, et al. FoxO3a regulates inflammation-induced autophagy in odontoblasts[J]. J Endod, 2018,44(5):786-791.