

泛素结合酶E2 变体蛋白对MEFs 细胞衰老的影响

徐 舜^{1,2}, 骆诗凌^{1,2}, 谢健鸿^{1,2}, 刘新光^{1,2,3}, 袁 源^{1,2*} (1. 广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808; 2. 广东医科大学衰老研究所, 广东东莞 523808; 3. 广东医科大学生物化学与分子生物学研究所, 广东东莞 523808)

摘 要: **目的** 探讨泛素结合酶E2 变体蛋白(*UBE2V1*)对MEFs 细胞衰老的影响。**方法** Western blot 检测*UBE2V1* 在年轻(2月龄)和年老小鼠(24月龄)各组织中的表达差异,以荧光定量PCR及Western blot 检测*UBE2V1* 在年轻和衰老MEFs 细胞中表达的差异,荧光定量PCR和Western blot 验证*Ube2v1* 基因的siRNA 沉默效果,β-半乳糖苷酶染色检测*Ube2v1* 表达下调对MEFs 细胞衰老的影响,Edu 和Alamar Blue 检测*Ube2v1* 基因沉默后MEFs 细胞增殖能力的变化。**结果** *UBE2V1* 在衰老小鼠的心脏、肝脏、肾脏和脑组织中表达下调,同时在衰老的MEFs 细胞中也明显表达下调,在年轻细胞中沉默*Ube2v1* 基因后β-半乳糖苷酶染色结果显示衰老的细胞数量明显增加,且Edu 和Alamar Blue 检测发现*Ube2v1* 基因沉默后MEFs 细胞增殖能力显著下降。**结论** 沉默*Ube2v1* 可通过抑制MEFs 细胞增殖,从而促进细胞衰老。

关键词: *UBE2V1*; MEFs; 衰老

中图分类号: Q 291

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2023) 03-0255-04

Effect of ubiquitin-binding enzyme E2 variant on cellular senescence of MEFs

XU Shun^{1,2}, LUO Shi-ling^{1,2}, XIE Jian-hong^{1,2}, LIU Xin-guang^{1,2,3}, YUAN Yuan^{1,2*} (1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 2. Institute of Aging Research, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 3. Institute of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of ubiquitin-binding enzyme E2 variant (*UBE2V1*) on cellular senescence of MEFs. **Methods** Western blot was used to detect the difference of *UBE2V1* expression in the tissues of young (2 months of age) and old (24 months of age) mice. Quantitative PCR and Western blot were used to detect the difference of *UBE2V1* expression in young and senile MEFs cells. Quantitative PCR and Western blot were used to verify the siRNA silencing effect of *Ube2v1* gene. β-galactosidase staining was used to detect the influence of downregulation of *Ube2v1* expression on aging of MEFs cells. Edu and Alamar Blue were used to detect the changes of proliferation ability of MEFs cells after *Ube2v1* gene silencing. **Results** *Ube2v1* was down-regulated in the heart, liver, kidney and brain tissues of aging mice, and also down-regulated in aging MEFs cells. β-galactosidase staining results showed that the number of aging cells increased significantly after *Ube2v1* gene was silenced in young cells. Edu and Alamar Blue tests showed that the proliferation ability of MEFs cells decreased significantly after *Ube2v1* gene silencing. **Conclusion** Silencing *Ube2v1* inhibits MEFs cell proliferation and thus promote cell senescence.

Key words: *UBE2V1*; MEFs; senescence

衰老是指人体在其生长发育达到成熟期以后,随着年龄的增长,在形态、结构和生理功能方面必然出现的一系列全身性、多方面的退行性变化,如皮肤萎缩、骨

质丢失等^[1-2]。细胞衰老是指细胞生理功能的衰减,包括增殖能力下降、细胞周期停滞、对促凋亡应激原不敏感、衰老相关基因和蛋白表达增加,并伴有形态学的

收稿日期: 2023-03-09

基金项目: 国家自然科学基金(81671399),广东省医学科研基金(A2020173),广东医科大学科研基金面上培育项目(GDMUM201803),广东省大学生创新创业训练计划项目(201810571105, S202110571102, S202210571066),广东医科大学大学生创新实验项目(2020ZYDB002, 2020ZZDB003),广东医科大学科研基金自然科学基金类重点培育项目(GDMUZ2020003)

作者简介: 徐 舜(1984-),男,博士,副研究员, E-mail: xushun@gdmu.edu.cn

通信作者: 袁 源(1986-),男,博士,讲师, E-mail: yuanyuan@gdmu.edu.cn

衰老改变,且渐趋于死亡的现象^[3-5]。在细胞培养过程中,野生型(wild type, WT) MEFs 在传代过程中刚开始生长相对缓慢,到第3代开始经历生长旺盛期,一般经过连续传代至第8代左右才进入细胞衰老状态^[6],MEFs 细胞作为经典的复制性衰老细胞,可作为本研究良好的细胞模型。已有研究表明,在HT-29-M6细胞中过表达*UBE2V1*可抑制细胞的分化^[7]。但至目前为止,泛素结合酶E2变体蛋白(ubiquitin conjugating enzyme E2 V1, *UBE2V1*)在衰老方面的研究还处于探索阶段。本研究旨在探讨*UBE2V1*在细胞衰老进程中的作用,通过在MEFs中沉默*UBE2V1*观察细胞衰老情况,检测细胞增殖变化,初步揭示*UBE2V1*参与细胞衰老的进程,提示其影响细胞衰老的潜在作用。

1 材料和方法

1.1 材料

MEFs 细胞为本实验室自制; siRNA 购自锐博生物技术有限公司; DMEM、胎牛血清、胰酶等购自Life Technologies 公司; TEMED、过硫酸铵、SDS 购自Sigma 公司; ECL 底物显色试剂盒购自Thermo 公司; DAPI 染液购自Gibco 公司; Lipofectamine RNAi MAX 为Invitrogen 公司产品; *UBE2V1* 抗体(sc-390047) 购自 Santa-Cruz 公司; 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒、二抗购自碧云天公司,其余为国产分析纯试剂。

1.2 细胞培养

MEFs 细胞复苏后,采用含15%胎牛血清的DMEM培养基于37℃、5% CO₂ 培养箱培养,待细胞长到80%~90%融合度时,按照1:2的比例传代培养。

1.3 细胞转染

使用胰蛋白酶消化MEFs 细胞后,接种至12孔板和24孔板。置于细胞培养箱继续培养24 h,待细胞长到30%~50%融合度时,将siRNA充分溶解于不含血清的转染专用培养基Opti-MEM中。RNAiMAX用Opti-MEM稀释后,与siRNA溶液混合,轻轻振荡后,置于室温5 min,加入细胞培养板,放入细胞培养箱中。转染48 h后,收集细胞。

1.4 β -半乳糖苷酶染色

细胞接种于12孔板,采用 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(碧云天)对细胞进行固定和染色,普通光学显微镜下观察染色结果并拍照,衰老细胞镜下呈深蓝色着染。

1.5 细胞增殖的检测

细胞接种于24孔板,待细胞长到约80%融合度时依次进行Edu标记、细胞固定化、Apollo染色、

DNA染色。在荧光显微镜下观察染色结果并拍照。

1.6 Western blot

取12孔板中的细胞样品,胰酶消化收集细胞悬液,1 000 g离心5 min,去上清,加入100 μ L配制好的细胞裂解液,冰上充分裂解15 min后,加入80 μ L 2 $\times$ SDS Loading Buffer,沸水煮10 min使蛋白样品变性。将蛋白样品加入提前制好的蛋白胶孔中,每孔10 μ L经SDS-PAGE分离,随后在转膜槽中经300 mA、1 h转移至PVDF膜上,用含3% BSA的TBST室温封闭1 h,分别加入相应蛋白抗体(1:1 000稀释)于4℃孵育过夜。第2天用TBST漂洗10 min,洗3次,加1:5 000稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育1 h,用TBST漂洗10 min,洗3次,加入ECL化学发光液,于Azure Biosystems C400凝胶成像系统曝光拍照。

1.7 统计学处理

使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学处理,所有实验均重复3次,计量资料采用配对*t*检验或单因素方差分析,*P*<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *UBE2V1*在衰老小鼠组织中表达显著下调

利用Western blot检测*UBE2V1*在年轻(2月龄)和年老小鼠(24月龄)各组织中的表达差异,发现*UBE2V1*在年老小鼠的心脏、肝脏、肾脏和脑组织中表达显著下调(图1)。

2.2 *UBE2V1*在衰老的MEFs细胞中表达显著下调

利用荧光定量PCR及Western blot检测*UBE2V1*在年轻和衰老MEFs细胞中的表达差异,发现在衰老的MEFs细胞中*UBE2V1*表达也显著下调(图2)。

2.3 siRNA沉默*UBE2V1*的表达促进MEFs衰老

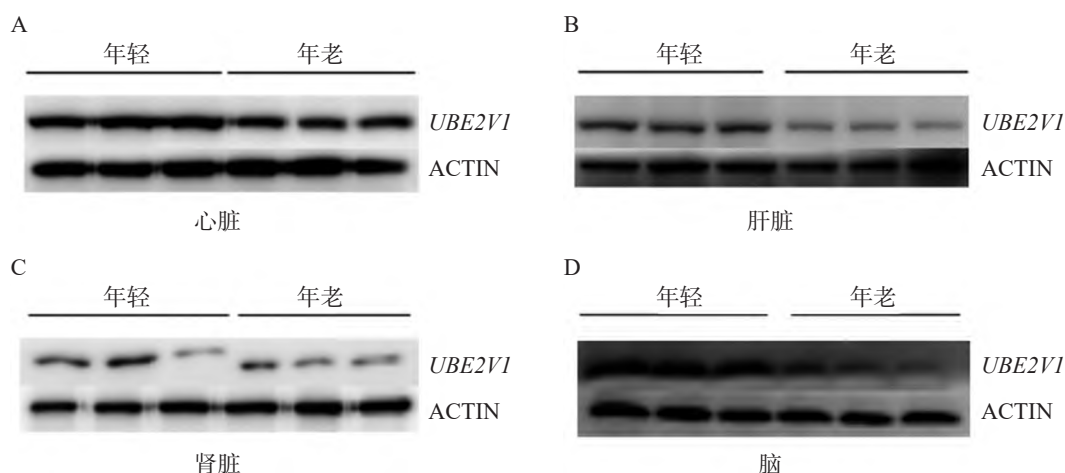
利用荧光定量PCR和Western blot验证*UBE2V1*基因的siRNA沉默效果,如图3A、B所示,siRNA-1、siRNA-2和siRNA-3都能较好沉默*UBE2V1*基因的表达,而*UBE2V1*基因下调能显著促进MEFs的衰老(图3C)。

2.4 沉默*UBE2V1*显著抑制MEFs细胞增殖

通过转染siRNA,待细胞密度长到80%时,采用EdU标记MEFs细胞的增殖能力。EdU检测发现,MEFs细胞中*UBE2V1*基因沉默后,与对照组比较,细胞增殖能力降低(图4A)。同时,通过Alamar Blue检测,MEFs细胞中沉默*UBE2V1*同样抑制其细胞增殖能力(图4B)。

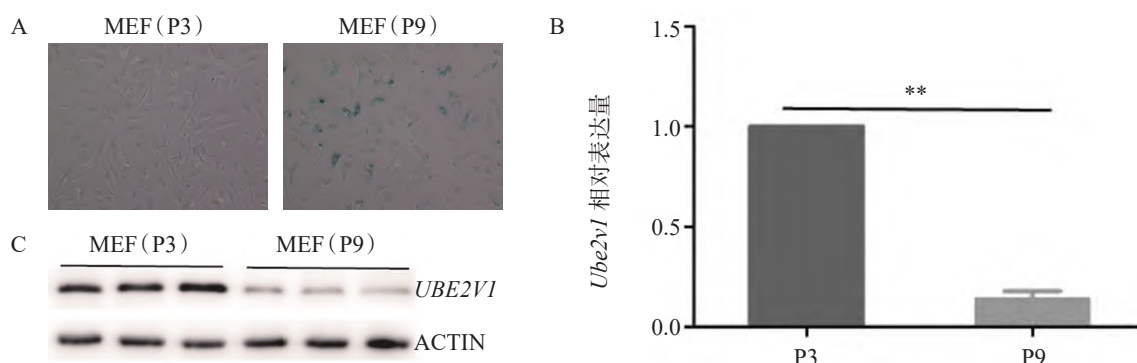
3 讨论

泛素结合酶E2V1(*UBE2V1*),又名CROC1、Uev1A,



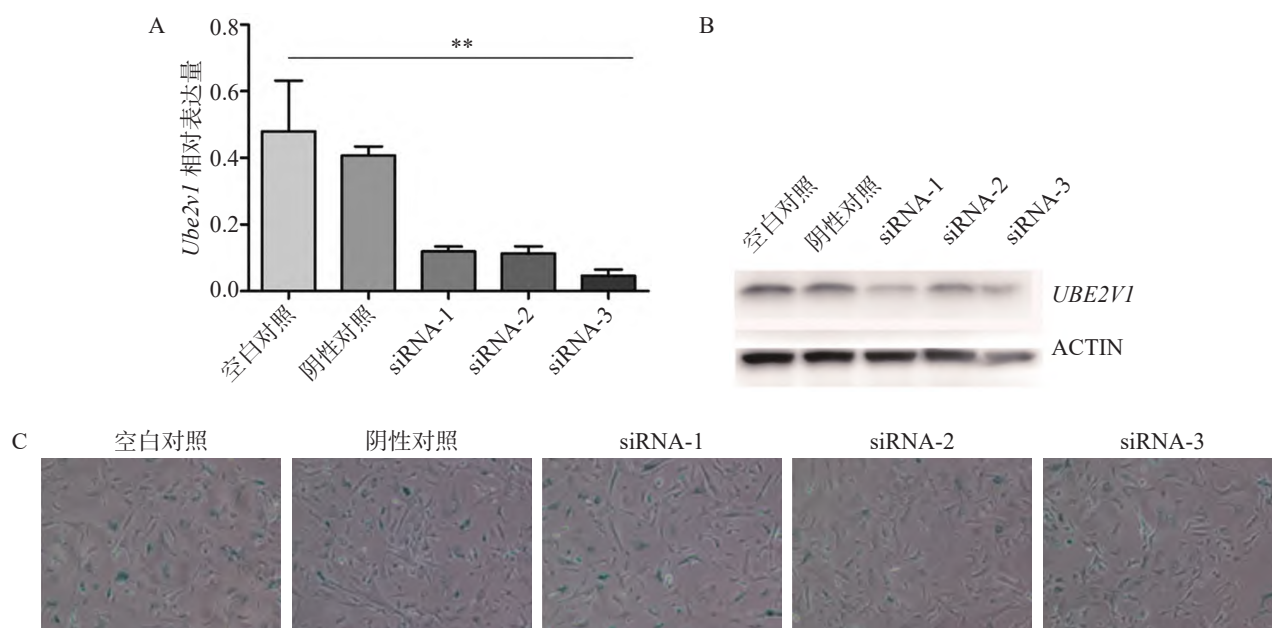
A、B、C、D 分别表示Western blot 检测*UBE2V1* 在年轻和年老小鼠心脏、肝脏、肾脏和脑组织中的表达

图1 *UBE2V1* 在年轻和年老小鼠各组织中的表达检测



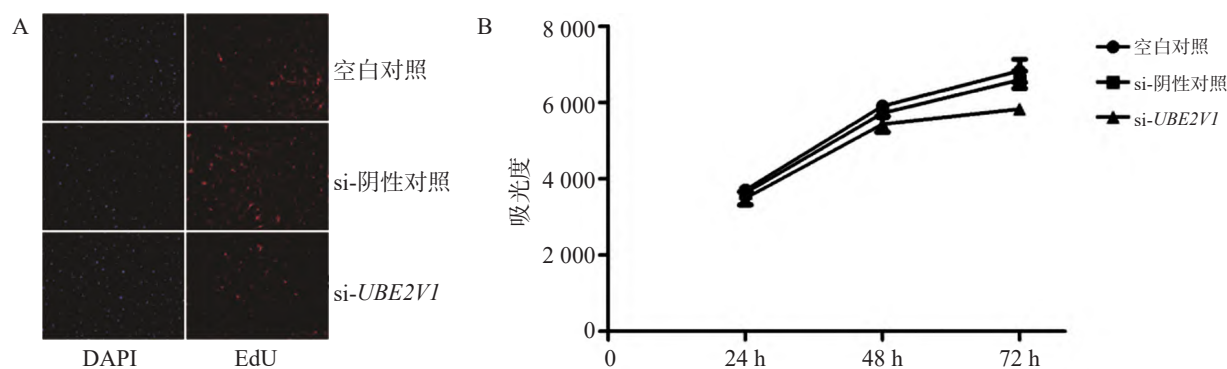
A. 相差显微镜下观察年轻和年老MEFs 中 β -半乳糖苷酶染色情况(400 $\times$); B. 荧光定量PCR 检测*UBE2V1* 在年轻和衰老MEFs 细胞中的表达; C. Western blot 检测*UBE2V1* 在年轻和衰老MEFs 细胞中的表达; ** $P < 0.05$

图2 *UBE2V1* 在年轻和衰老(3, 9代) MEFs 细胞中的差异表达检测



A. 荧光定量PCR 检测*UBE2V1* 基因的siRNA 沉默效果; B. Western blot 检测*UBE2V1* 基因的siRNA 沉默效果; C. β -半乳糖苷酶染色检测*UBE2V1* 基因的表达下调对MEFs 细胞衰老的影响(400 $\times$); ** $P < 0.05$

图3 *UBE2V1* 基因的表达下调能够促进MEFs 细胞的衰老



A. EdU 检测 *UBE2V1* 基因沉默后 MEFs 细胞的增殖能力 (100×); B. Alamar Blue 检测 *UBE2V1* 基因沉默后 MEFs 细胞的增殖能力

图4 *UBE2V1* 基因的表达下调能够降低MEFs 细胞增殖能力

位于染色体 20q13.2, 在体内至少表达 4 种不同的剪接体^[8]。已有研究表明, *Uev1A* 是 NF- κ B 信号通路中响应环境压力的关键调控成分, 并将 *UEV1A* 鉴定为潜在的原癌基因^[9], *UEV1A* 在 HCT116 细胞中的过表达可激活 NF- κ B, 且会上调 CXCL1 表达以增强结肠癌细胞的转移^[10], 此外在结直肠癌细胞株 SW480、DLD-1 中过表达 *Ube2v1* 可促进 Ubc13 介导的 Sirt1 的泛素化和降解, 并抑制组蛋白 H4 在赖氨酸 16 的乙酰化, 并最终在表观遗传学上抑制 CRC 中的自噬基因表达, 从而抑制自噬通路。另外, 有研究发现 *UBE2v1* 可促进 Lys63 的多泛素化, 产生多种 Lys63 泛素化蛋白, 其可维持包括 β -肌动蛋白在内的细胞骨架结构, 并且沉默 *UBE2v1* 可使 HK2 细胞中高葡萄糖诱导的 α -SMA 表达逆转^[11]。 *UBE2V1* 中 5' UTR 变异与 HIV-1 获得风险增加相关。

以上研究表明 *Ube2v1* 可激活 NF- κ B 信号通路, 而 NF- κ B 可调节细胞的衰老, 与其它衰老相关的信号通路如 IGF-1、mTOR、SIRT 和 DNA 损伤修复等相互关联^[12]。最近研究表明, *UBE2V1* 促进乳腺癌细胞迁、增殖^[13]。同时, 虽然 *UBE2V1* 在多种细胞类型中普遍表达, 但 *UBE2V1* 缺失会显著损害人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 的增殖和活力, 而不影响其他细胞类型, 这表明 *UBE2V1* 可能在内皮细胞中具有非常重要的功能。本研究发现 *UBE2V1* 在衰老小鼠心脏、肝脏、肾脏和脑等多种组织中表达下调, 同时其在衰老的 MEFs 细胞中同样表达下调, 且沉默 *Ube2v1* 可显著促进 MEF 细胞衰老和降低细胞增殖能力, 这证明 *UBE2V1* 在细胞衰老进程过程中起着极其重要的作用, 但其调节细胞衰老进程的具体分子机制尚待更进一步的研究。

参考文献:

- [1] 王佳琪, 胡加亮, 徐寒梅. 衰老机制及抗衰老药物的研究进展[J]. 药学进展, 2023, 47(2): 154-160.
- [2] 杨倩, 孙圣荣. 细胞衰老与肿瘤生物学行为关系的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(7): 1359-1361.
- [3] 骆诗凌, 袁源, 刘新光. 蛋白酶体与衰老的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2023, 45(2): 258-265.
- [4] 王学, 任丽君, 张英为, 等. 细胞衰老分子机制的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(1): 250-253.
- [5] 徐舜, 崔红晶, 赵炜, 等. 细胞衰老分子机制的研究进展[J]. 广东医科大学学报, 2020, 38(1): 1-10.
- [6] 张春龙. miR-342-5p 在 Zmpste24 缺失小鼠胚胎成纤维细胞衰老及 DNA 损伤反应中的作用[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2017.
- [7] SANCHEZ E, VILA M R, SANCHEZ-PULIDO L, et al. Role of UEV-1, an inactive variant of the E2 ubiquitin-conjugating enzymes, in vitro differentiation and cell cycle behavior of HT-29-M6 intestinal mucosecretory cells[J]. Mol Cell Biol, 1998, 18(1): 576-589.
- [8] 牛文博. *UBE2V1* 及 *UBE2V2* 调节肝癌细胞生长转移及其分子机制的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2016.
- [9] SYED N A, ANDERSEN P L, WARRINGTON R C, et al. *Uev1A*, a ubiquitin conjugating enzyme variant, inhibits stress-induced apoptosis through NF- κ B activation[J]. Apoptosis, 2006, 11(12): 2147-2157.
- [10] WU Z, NEUFELD H, TORLAKOVIC E, et al. *Uev1A*-Ubc13 promotes colorectal cancer metastasis through regulating CXCL1 expression via NF- κ B, C/EBP β activation[J]. Oncotarget, 2018, 9(22): 15952-15967.
- [11] PONTRELLI P, CONSERVA F, PAPALE M, et al. Lysine 63 ubiquitination is involved in the progression of tubular damage in diabetic nephropathy[J]. FASEB J, 2017, 31(1): 308-319.
- [12] 邓韵婷, 熊兴东, 孙雪荣, 等. NF- κ B 信号通路与细胞衰老[J]. 生命的化学, 2013, 33(4): 401-406.
- [13] NIU T, WU Z, XIAO W. *Uev1A* promotes breast cancer cell migration by up-regulating CT45A expression via the AKT pathway[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 1012.