

水牛 *NONO* 和 *PSPC1* 基因对成纤维细胞抗衰老的作用研究

全毅, 刘晨, 原茜, 任宣, 李湘萍

广西大学 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530004

摘要: 旁粒相关基因 *NONO* 和 *PSPC1* 在 DNA 损伤修复、转录调控、细胞增殖等方面发挥重要作用。该研究旨在克隆水牛 *NONO*, *PSPC1* 基因并对其进行序列分析, 探讨其对水牛胎儿成纤维细胞增殖及衰老的影响。首先扩增水牛 *NONO*, *PSPC1* 编码区序列并构建其过表达载体, 对不同代数水牛胎儿成纤维细胞中旁粒相关基因的表达进行检测。构建细胞衰老模型, 将过表达 *NONO*, *PSPC1* 载体转染第 10 代成纤维细胞, 培养至 15 代进行细胞增殖、 β -半乳糖苷酶、细胞衰老和凋亡相关基因表达分析。分别得到 1 424 bp 和 1 574 bp 的水牛 *NONO* 和 *PSPC1* 编码区序列, 生物信息学分析发现水牛 *NONO* 基因与黄牛和人的序列相似度分别为 98.9% 和 91.2%; 水牛 *PSPC1* 基因与黄牛、绵羊、山羊和人序列相似度分别为 99.5%, 86.0%, 98.8%, 89.3%。随着细胞培养代数增加, 旁粒相关基因表达降低。过表达转染试验结果发现: 与空白组和阴性对照组相比, 2 个试验组细胞增殖速度变快, β -Gal 细胞阳性率和 *P21*, *P16*, *Bax* 表达均显著下降 ($p < 0.05$); 2 个试验组间相比, 上调 *PSPC1* 表达后细胞增殖速度更快, β -Gal 细胞阳性率和 *P21*, *P16*, *Bax* 表达均显著降低 ($p < 0.05$)。上调 *NONO* 和 *PSPC1* 基因表达能够促进细胞增殖, 降低凋亡相关基因的表达进而延缓细胞衰老。

关键词: 水牛; *NONO* 基因; *PSPC1* 基因; 细胞衰老

中图分类号: S823.8⁺3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)03-0110-12

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



A Preliminary Study of the Role of Buffalo *NONO* and *PSPC1* Genes on Fibroblast Anti-Aging

TONG Yi, LIU Chen, YUAN Xi, REN Xuan, LI Xiangping

State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources,
Guangxi University, Nanning 530004, China

Abstract: The paraganules-related genes *NONO* and *PSPC1* play important roles in DNA damage repair, transcriptional regulation, and cell proliferation. This study aimed to clone and sequence the buffalo

收稿日期: 2022-07-15

基金项目: 广西自然科学基金项目(2020GXNSFAA238039); 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室自主研究课题(SKLCUSA-a202204); 巴马县人才科技计划项目(202101262, 22020030)。

作者简介: 全毅, 硕士研究生, 主要从事核移植供体细胞研究。

通信作者: 李湘萍, 教授。

NONO and *PSPC1* genes, and explore their effects on the proliferation and aging of buffalo fetal fibroblasts. Firstly, the coding region sequences of buffalo *NONO* and *PSPC1* were amplified and their overexpression vectors were constructed. The expressions of paraganules-related genes in fetal fibroblasts of buffalo of different generations were detected. A cell senescence model was constructed. The *NONO* and *PSPC1* overexpression vectors were transfected into 10th generation fibroblasts, and cultured to 15 passages for analyzing cell proliferation, β -galactosidase, cell senescence and apoptosis-related gene expressions. The results showed that the 1 424 bp and 1 574 bp of buffalo *NONO* and *PSPC1* coding region sequences were obtained, respectively. Bioinformatic analysis showed that the sequence similarities of buffalo *NONO* gene with cattle and humans were 98.9% and 91.2%, respectively. The similarities of *PSPC1* gene with cattle, sheep, goats and humans were 96%, 98%, 82.8% and 68.5%, respectively. With the increase of cell culture generations, paraganule-associated gene expression was decreased. The results of overexpression transfection experiments showed that compared with the blank and the negative control groups, the cell proliferation rates of the two experimental groups were faster, and the positive rate of β -Gal cells and the expressions of *P21*, *P16* and Bax decreased significantly ($p < 0.05$). Compared between two experimental groups, the cell proliferation rate was faster after upregulating the *PSPC1* expression, and the positive rate of β -Gal cells and the expressions of *P21*, *P16* and Bax were significantly reduced ($p < 0.05$). These results reveal that upregulation of *NONO* and *PSPC1* genes expression can promote cell proliferation, reduce the expression of apoptosis-related genes and delay cell aging.

Key words: buffalo; *NONO* gene; *PSPC1* gene; cell senescence

旁粒是在哺乳动物染色质区域新发现的一类核内亚细胞器,大多分布在核散斑附近的染色质间区,由属于非编码 RNA 的 *NEAT1* (*Nuclear Enriched Autosomal Transcript 1*) 和 *DBHS* (*Drosophila Behavior Human Splicing*) 蛋白家族中的 *P54NRB/NONO* (*on-POU domain-containing octamer-binding protein*)、*PSPC1* (*Paraspeckle component 1*)、*SFPQ/PSF* (*PTB-associated splicing factor*) 相互作用共同形成^[1-2]. *NEAT1* 是旁粒的基本组成结构,可以与 *NONO* 和 *PSPC1* 直接结合,并促使它们定位在旁粒上^[3].

旁粒能够参与 DNA 损伤修复、转录调控、细胞增殖等一系列细胞生长活动,其在细胞生长过程中发挥着重要作用.细胞在生长发育的过程中会不断面临外源性或内源性应激,可能会诱发 DNA 损伤最终导致基因组不稳定和细胞死亡^[4].为了维持稳定,细胞进化出了复杂且相互作用的 DNA 损伤反应(DNA Damage Repair, DDR)应答网络.研究表明,敲低 *NONO* 基因表达会引起 DNA 双链断裂(Double Strand Breaks, DSB)修复的延迟, *NONO* 有助于快速准确地修复人体细胞内产生的 DSB^[5]. Gao 等^[6]发现敲低 *PSPC1* 会使 G2/M 期细胞增多,抑制细胞增殖;在 HeLa 细胞中敲低 *PSPC1* 会导致细胞中 γ H2AX 蛋白水平增加,过表达 *PSPC1* 抑制 γ H2AX 蛋白水平增加,由此推测 *PSPC1* 可能参与 DDR.另有研究发现, *SFPQ* 和 *NONO* 形成复合物共同促进 DNA 底物序列独立配对,有助于在复杂的细胞环境中进行 DNA 损伤修复^[7];并且能够促进 γ H2AX 人胰岛素生长因子结合蛋白 3(IGFBP-3)中的 DSB 修复^[8]; *NONO* 和 *SFPQ* 还可以作为一种与 RNA : DNA 混合相关的新型端粒稳定调节剂,抑制端粒的退化和同源重组,确保端粒的完整性^[9]. *NONO*, *PSPC1* 与细胞的增殖也息息相关.在甲基甲烷硫酸盐(MMS)引起的 DDR 中,敲低 *PSPC1* 会导致 HeLa 细胞凋亡水平显著增加,使大量细胞进入 G2/M 期,而过表达 *PSPC1* 细胞则会减少细胞凋亡数量,使得更多细胞在 G1/S 期积累^[10]. *NONO* 既能促进细胞增殖,也能抑制细胞增殖.在食管鳞状细胞癌(ESCC)细胞模型中, *NONO* 沉默可以显著抑制 ESCC 增殖^[11];在 HeLa 细胞中,缺少 *NONO* 会降低细胞生长速度^[12],表明 *NONO* 的表达与细胞增殖呈正相关.在体外, *NONO* 被敲低会引起小鼠心脏成纤维细胞过度增殖^[13];在人外周血的单核细胞(THP1)中,抑制 *NONO* 表达会促进 THP1 细胞增殖^[14];在结肠直肠癌(CRC)细胞中,胃腺癌预测基因(*GAPLINC*)的表达会促进 CRC 细胞

增殖, *SFPQ* 和 *NONO* 被发现可以结合 *GAPLINC* 最终抑制细胞增殖^[15].

目前, 旁粒相关研究多集中在人和小鼠, 对其在其他物种上的作用尚不清楚. 本研究首先克隆水牛 *NONO*, *PSPC1* 编码区序列, 分析水牛胎儿成纤维细胞中旁粒相关基因的表达水平; 构建细胞衰老模型, 通过上调 *NONO*, *PSPC1* 表达, 阐述 *NONO*, *PSPC1* 在水牛细胞增殖及抗衰老方面的作用.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品

水牛胎儿来自广西南宁屠宰场, 取耳部部分皮肤组织用于细胞原代分离培养, 肌肉、心、肝、脾、肺、肾、胃、卵巢和睾丸组织浸润液氮后, 储存到-80 ℃用于 RNA 提取.

1.1.2 质粒

pEGFP-N1 质粒由本实验室提供.

1.1.3 试剂

胎牛血清、高糖 DMEM 粉末、0.25% EDTA 胰蛋白酶、青链霉素来自 GIBCO 公司; 二甲基亚砜(DMSO)、各类无机盐药品、抗生素氨苄(Amp)来自 Sigma 公司; Trizol Reagent 来自 Thermo Fisher 公司; DL5000 DNA Marker、DNA Marker VII、Supercoiled DNA Ladder Marker、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶来自 TaKaRa 公司; Mix(green)Golden Star T6 Super PCR Mix 来自北京擎科新业生物公司; HiScript © III RT SuperMix for qPCR、qRT-PCR 荧光染料(2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix)来自南京诺唯赞生物科技股份有限公司.

1.1.4 引物设计与合成

根据美国国家生物技术中心(NCBI)公布预测的水牛 *NONO* (XM_006079429.2) 和 *PSPC1* (XM_025262782.1) 基因 mRNA 序列, 应用 Oligo 7.0 软件设计适用于基因克隆和 qRT-PCR 的特异性引物, 送至上海生工公司合成. 基因克隆引物在 *NONO*, *PSPC1* 的上下游分别引入 *Xho*I, *Pst*I 和 *Xho*I, *Kpn*I 酶切位点序列, 引物序列见表 1. 水牛 *SFPQ* (XM_025289121.1) 和 β -actin 的 qRT-PCR 特异性引物设计同上, qRT-PCR 引物亦见表 1.

表 1 *NONO* 和 *PSPC1* 基因编码区克隆引物序列(1-2)及旁粒相关基因 qRT-PCR 引物(3-6)

基因名称	序列(5'-3')
<i>NONO</i> (1)	F: CTCGAGATGCAGAGCAATAAACTTTTAAC R: AACTGCAGGTATCGGCGACGTTTGTTTG
<i>PSPC1</i> (2)	F: CTCGAGATGATGCTGAGAGGAAACCTC R: GGTACCGGGTATCTACGACGCTTGTTAGG
<i>NONO</i> (3)	F: ACCGCCTCCACCAATACCT R: TCAGGAGGAAGATTGCCCAC
<i>PSPC1</i> (4)	F: AGATGTGGTGATGGGGCGTT R: GGCTGCTCTCTTTCCTTATG
<i>SFPQ</i> (5)	F: AGATGAGACGCCAAAGAGAG R: TCCTCCACCACCCATTCTC
β -actin(6)	F: ACCGCAAATGCTTCTAGG R: ATCCAACCGACTGCTGTC

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

参考邢青华等^[16]的方法进行水牛胎儿成纤维细胞分离培养.

1.2.2 克隆与测序

将 PCR 产物目的片段进行胶回收, 并将目的片段连接至 pEASY-Blunt-Simple 克隆载体, 挑选阳性质粒进行测序.

1.2.3 重组质粒构建及细胞转染

利用 DNA 胶回收试剂盒将线性载体片段和目的片段回收, 进行连接反应, 构建 pEGFP-N1-*NONO* 和 pEGFP-N1-*PSPC1* 真核表达载体, 分别用 *Xho*I, *Pst*I 和 *Xho*I, *Kpn*I 进行双酶切鉴定. 将 TurboFect 转染试剂(μ L)与质粒质量(ng)按照 4 : 1 的比例, 在 200 μ L DMEM 培养液(无双抗、无血清)中加入 4 μ L 转染试剂和 1 ng 质粒, 孵育 15~20 min 后加入细胞培养皿中.

1.2.4 生长曲线测定

将细胞以 10^4 个/mL, 每孔 100 μ L 细胞培养液, 接种于 96 孔板中, 每个试验组设置 3~5 个重复, 同时设置空对照组, 放置到细胞恒温培养箱中培养. 24 h 后, 避光操作, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂. 避光孵育 1.5 h 后, 酶标仪设置 450 nm 吸光度后进行检测记录. 每 2 d 换 1 次细胞培养液, 保持每次处理时间相同、孵育时间相同. 连续 7~8 d 统计数据, 以培养天数为横坐标, 450 nm 吸光度为纵坐标绘制细胞生长曲线.

1.2.5 qRT-PCR 检测

收集 P0, P5, P10, P15 代细胞, 利用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 利用诺唯赞 HiScript © III RT SuperMix for qPCR 试剂反转录成 cDNA. 以稀释的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增, 反应体系为 2 $\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 8.2 μ L. 反应程序: 预变性 95 $^{\circ}$ C 2 min; 变性 95 $^{\circ}$ C 10 s, 退火 60 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 37 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 熔解曲线 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s. 样本重复 3 次, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析结果.

1.2.6 β -半乳糖苷酶染色

弃除细胞培养液, 用 PBS 缓冲液清洗细胞 1~2 遍, 加入 β -半乳然后糖苷酶染色固定液 1 mL, 室温固定 15 min. 弃固定液, PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次, 每次 3 min. 加入用聚丙烯容器配置好的 1 mL β -半乳糖苷酶染色工作液(A 液 10 μ L, B 液 10 μ L, C 液 930 μ L, X-Gal 液 50 μ L). 避光 37 $^{\circ}$ C 孵育 8 h, 普通光学显微镜下观察计数. 显微镜下每皿随机抽取 5 个视野, 记录阳性细胞与总细胞个数, 5 个视野的总阳性细胞数与总细胞数的比值为 β -Gal 细胞阳性率.

1.2.7 免疫荧光

待细胞汇合度在 80 % 左右时, 用 4 % 多聚甲醛室温固定 30 min, 0.5 % Triton X-100 透化 30 min, 5% BSA 封闭液封闭 30 min, 再用 1% BSA 分别稀释抗体, 一抗 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育 8 h(其中阴性对照孔不需加入一抗, 只加 1% BSA). 第 2 d 用二抗室温避光孵育 2 h, Hoechst 染色 15 min, 染色结束加入适量 PBS, 荧光显微镜拍照记录, 每组试验重复 3 次. 试验过程中每次处理之后都用 PBS 清洗细胞 3 次.

1.2.8 数据统计与分析

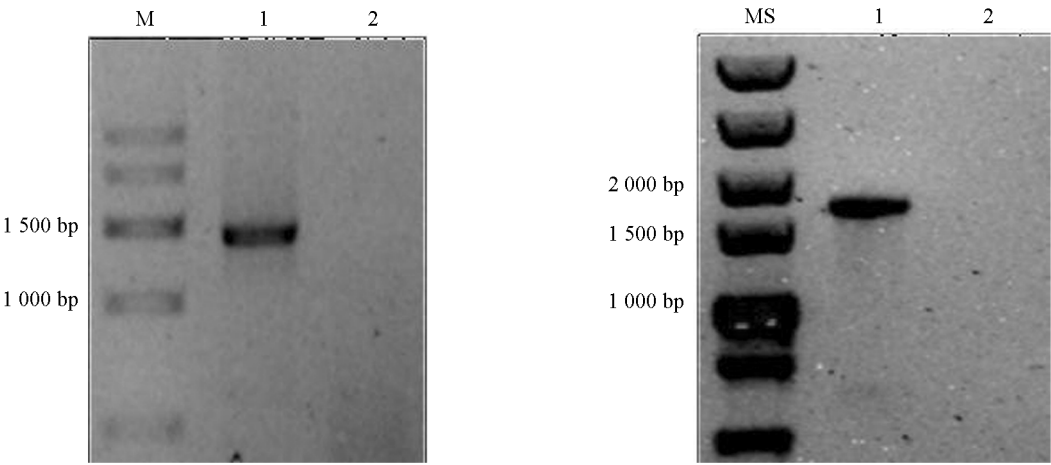
实验数据显著性差异分析参考统计软件 SPSS 19.0. 基因序列参考 NCBI 已公布的不同物种的 *NONO* 和 *PSPC1* 基因序列, 利用 SnapGene 软件对测序结果进行比对, 并根据 MegAlign 软件进行同源性比对和同源进化树构建.

2 结果与分析

2.1 水牛 *NONO* 和 *PSPC1* 基因编码区的克隆及序列分析

采用广西本地水牛卵巢组织提取的总 RNA 进行反转录, 以 cDNA 为模板进行 PCR, 分别扩增出大

小约为 1 500 bp 的 *NONO*(图 1a)和 *PSPC1* 特异性条带(图 1b). 将目的片段连接至 pEASY-Blunt-Simple 克隆载体, 挑选阳性质粒进行测序. 结果分别得到 1 424 bp 和 1 574 bp 的水牛 *NONO* 和 *PSPC1* 基因编码区序列, 与 Genbank 预测序列(*NONO*: XM_006079429.2; *PSPC1*: XM_025262782.1)一致. 将 *NONO* 和 *PSPC1* 基因编码区序列连接到 pEGFP-N1 载体中, 并分别用 *Xho*I, *Pst*I 和 *Xho*I, *Kpn*I 对 pEGFP-N1-*NONO* 和 pEGFP-N1-*PSPC1* 进行双酶切鉴定, 结果显示酶切片段大小与预期一致(图 2).



a: M. DNA Marker; 1. *NONO* 基因; 2. 阴性对照; b: MS. DL 5 000 DNA Marker ; 1. *PSPC1* 基因; 2. 阴性对照.

图 1 *NONO* 和 *PSPC1* 基因 PCR 扩增结果

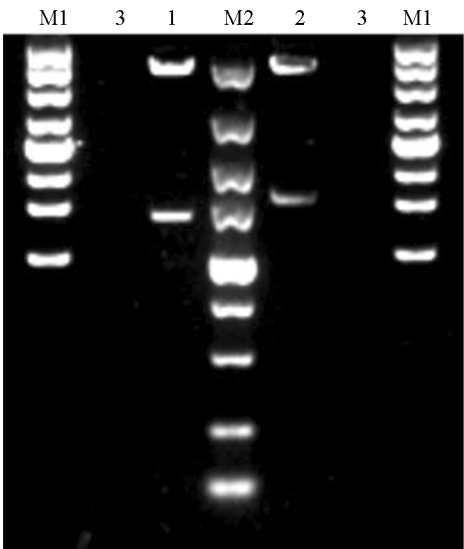
采用 Jotun Hein 法进行同源性比对和进化树构建(图 3). 结果发现, *NONO* 基因在本地水牛与印度水牛、牛、绵羊、人、小家鼠、黑猩猩、斑马鱼氨基酸序列相似性分别为 99.9%, 98.9%, 95.0%, 91.6%, 95%, 94.5% 和 65.3%. *PSPC1* 基因在本地水牛与印度水牛、牛、绵羊、山羊、人、野猪、小家鼠、穴兔氨基酸序列相似性分别为 99.7%, 99.5%, 86.0%, 98.8%, 89.3%, 70.9%, 70.1% 和 89.9%.

2.2 旁粒相关基因在不同代数水牛胎儿成纤维细胞中的表达

qRT-PCR 结果显示, 随着细胞培养代数增加, *PSPC1* 表达显著降低($p<0.05$); *NONO* 和 *SFPQ* 表达水平整体呈现出下降趋势, 在 5, 10, 15 代细胞中的表达差异不具有统计学意义($p>0.05$)(图 4).

2.3 不同代数水牛胎儿成纤维细胞衰老及相关基因的表达分析

对培养的 5, 10, 15 代水牛成纤维细胞进行 β -半乳糖苷酶染色, 结果显示随着细胞代数增加, β -Gal 细胞阳性率升高, 不同代数之间差异具有统计学意义($p<0.05$), 其中 15 代细胞的衰老程度最严重(图 5). qRT-PCR 结果显示, 与衰老相关的 *P16* 基因表达随细胞代数增加逐渐升高, 不同代数间差异具有统计学意义($p<0.05$); *P21* 基因表达水平从 5 代开始逐渐升高, 并且 5, 10, 15 代之间差异具有统计学意义($p<0.05$); 与 0 代相比, 5, 10, 15 代 *P53* 基因的表达均显著降低($p<0.05$), 但 5, 10, 15 代之间差异不具有统计学意义($p>0.05$)(图 6).



M2. Supercoiled DNA Ladder Marker; M1. DL 15 000 DNA Marker; 1. pEGFP-N1-*NONO* 双酶切产物; 2. pEGFP-N1-*PSPC1* 双酶切产物; 3. 阴性对照.

图 2 pEGFP-N1-*NONO* 和 pEGFP-N1-*PSPC1* 质粒双酶切鉴定

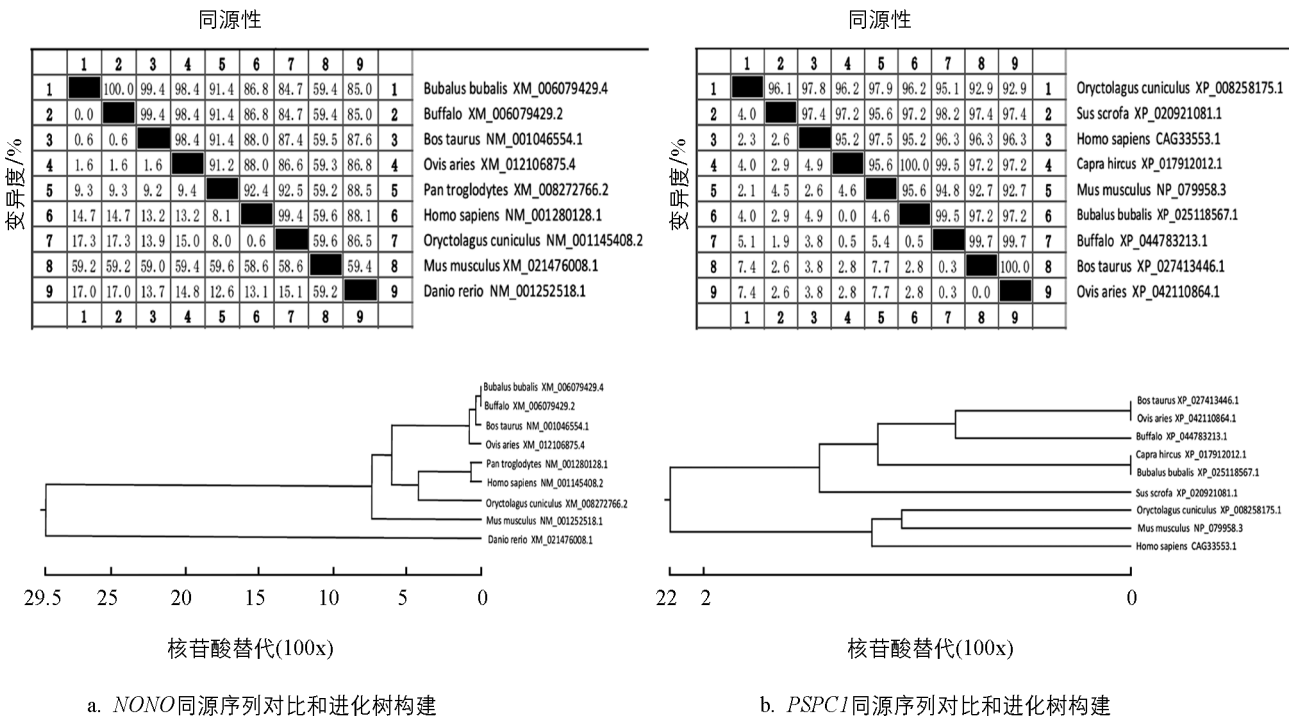


图 3 *NONO* 和 *PSPC1* 序列同源性比对 (a) 和系统进化树 (b)

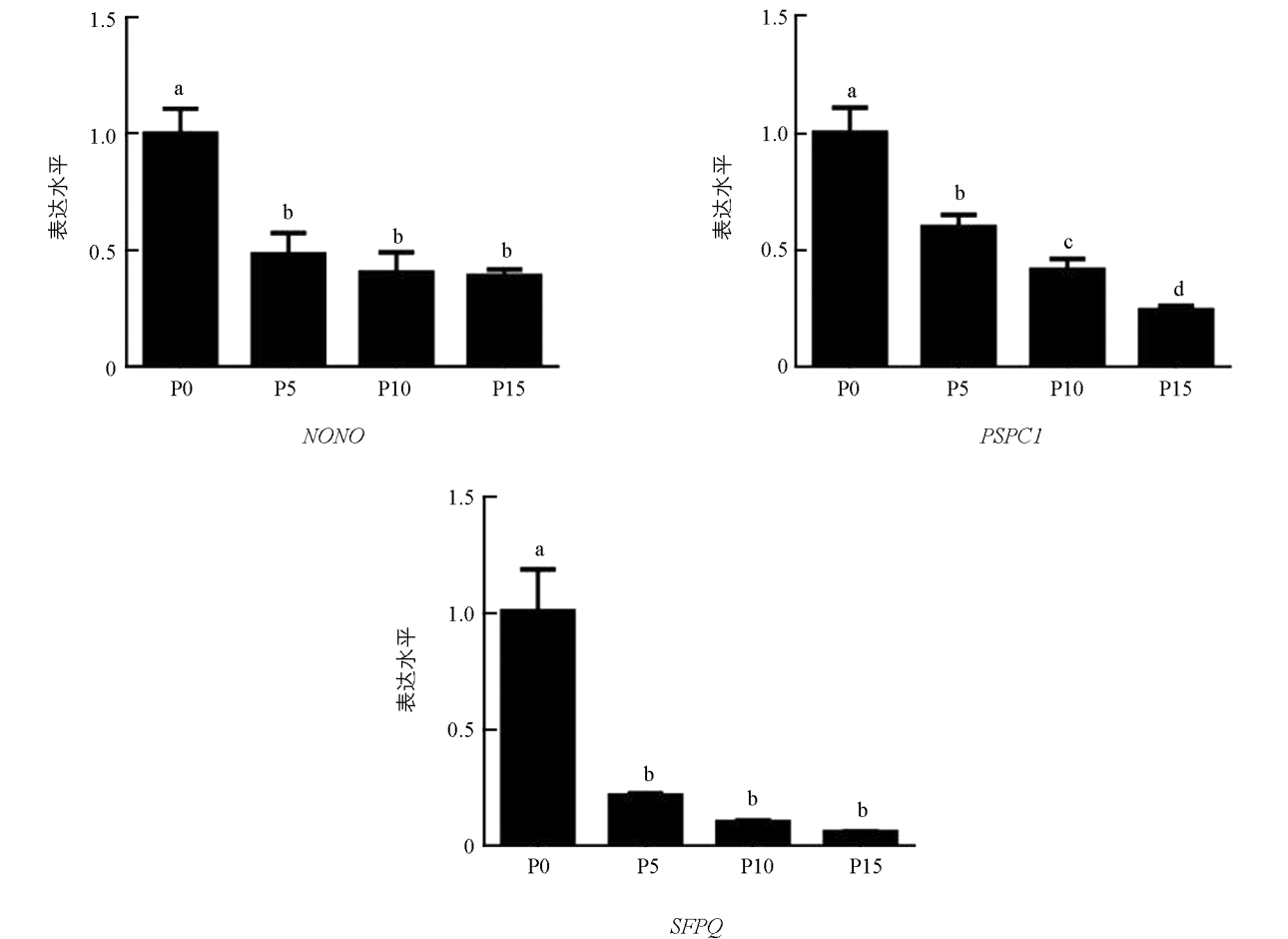


图 4 不同代数水牛胎儿成纤维细胞中旁粒相关基因表达水平

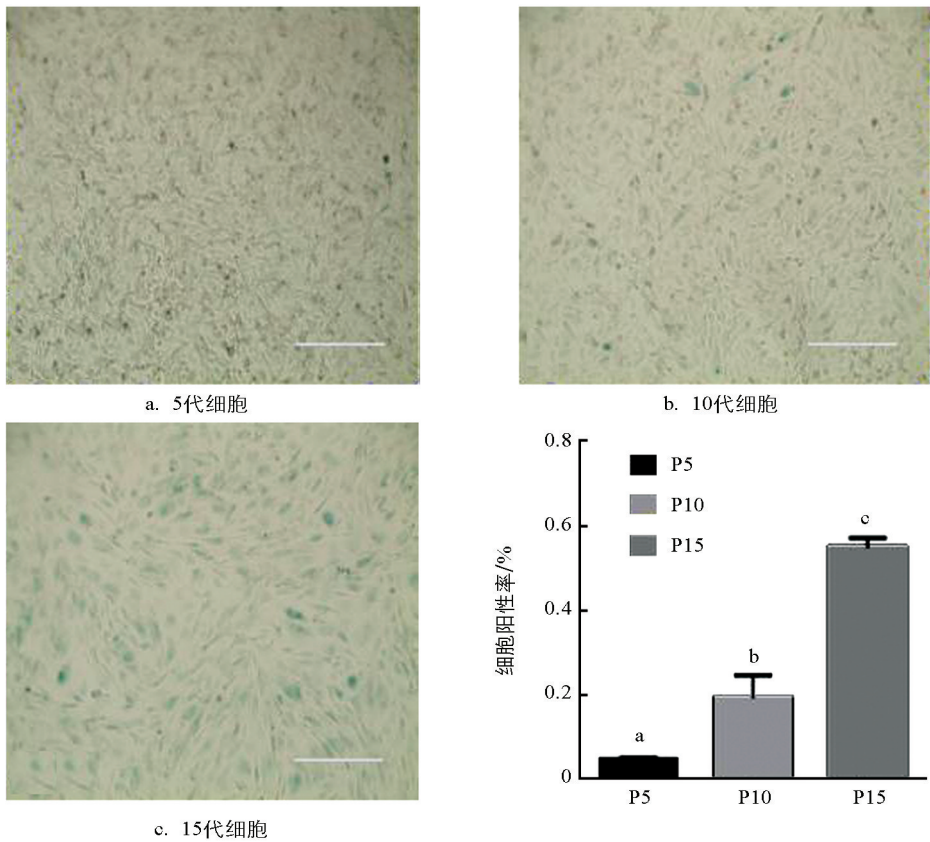


图 5 不同代数水牛胎儿成纤维细胞 β -半乳糖苷酶染色及 β -Gal 细胞阳性率 (10X)

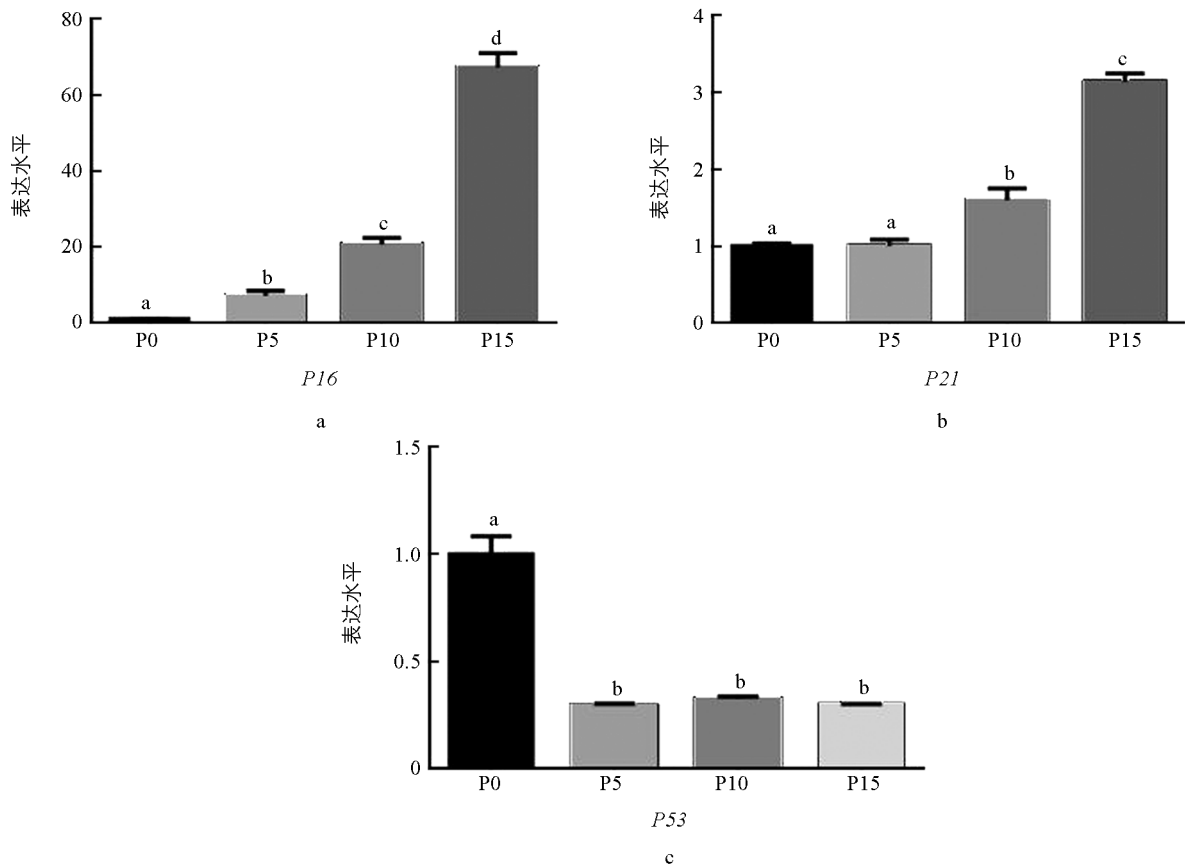


图 6 不同代数水牛胎儿成纤维细胞中 $P16$ (a), $P21$ (b), $P53$ (c) 基因表达水平

2.4 过表达 *NONO* 和 *PSPC1* 对水牛胎儿成纤维细胞增殖及衰老的影响

2.4.1 过表达 *NONO* 和 *PSPC1* 效果检测

将 pEGFP-N1-*NONO* 和 pEGFP-N1-*PSPC1* 质粒分别转染第 10 代水牛胎儿成纤维细胞, 48 h 后在荧光显微镜下观察转染效果(图 7)。收集 P15 代细胞, 利用 qRT-PCR 技术检测 *NONO* 和 *PSPC1* 表达水平(图 7)。结果显示, 空白组细胞没有绿色荧光, pEGFP-N1 空载组、pEGFP-N1-*NONO* 和 pEGFP-N1-*PSPC1* 试验组都可以观察到绿色荧光。与空白对照组和阴性对照组相比, *NONO* 和 *PSPC1* 在试验组细胞中的表达差异具有统计学意义($p < 0.001$)。

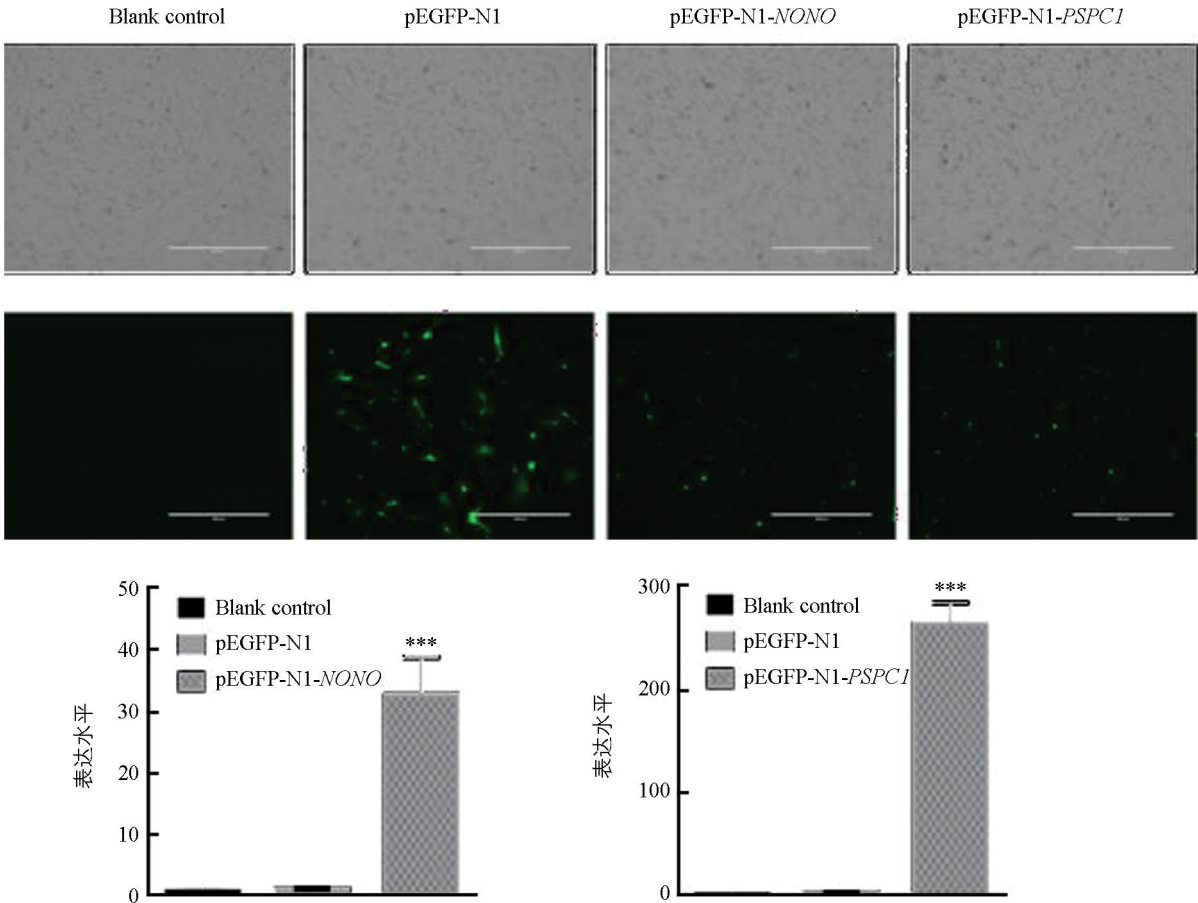


图 7 转染质粒 pEGFP 表达(48 h 10X)

2.4.2 过表达 *NONO* 和 *PSPC1* 对水牛胎儿成纤维细胞增殖的影响

上述转染试验后, 绘制 15 代水牛胎儿成纤维细胞生长曲线(图 8)。与空白对照组和阴性对照组相比, 两个试验组细胞增殖速度均加快; 与 *NONO* 试验组相比, *PSPC1* 试验组细胞的增殖速度更快。qRT-PCR 结果显示, 凋亡相关基因在空白对照组与阴性对照组中的表达差异不具有统计学意义($p > 0.05$)。与对照组相比, *Bax* 在两个试验组的表达显著降低($p < 0.05$); *Bcl-2* 在两个试验组的表达差异不具有统计学意义($p > 0.05$); *Bax* 在 *PSPC1* 试验组细胞中的表达显著低于 *NONO* 试验组($p < 0.05$)(图 9)。

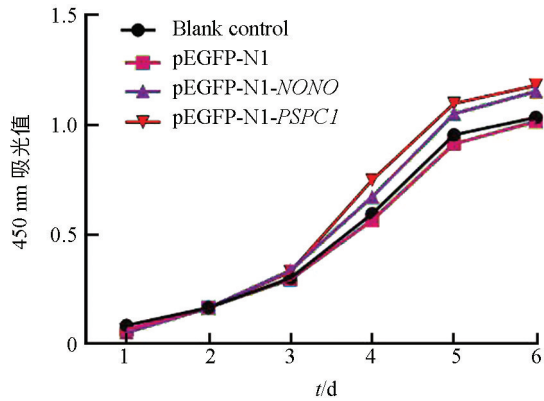


图 8 不同处理组水牛胎儿成纤维细胞生长曲线

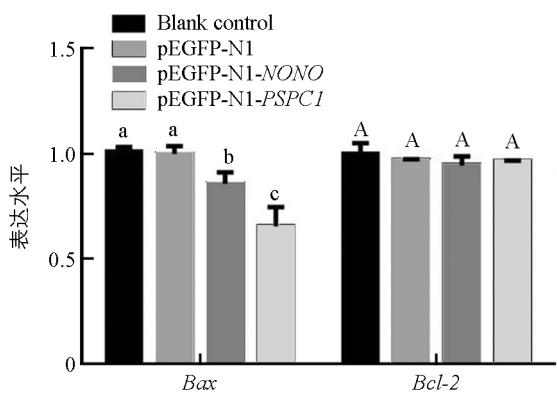


图 9 凋亡相关基因表达水平

2. 4. 3 过表达 *NONO*, *PSPC1* 对水牛胎儿成纤维细胞衰老及相关基因表达的影响

对转染的 15 代水牛胎儿成纤维细胞进行 β -半乳糖苷酶染色. 结果显示, 空白对照组与阴性对照组差异不具有统计学意义($p>0.05$); 与对照组相比, 2 个试验组 β -Gal 细胞阳性率显著降低, 其中 *PSPC1* 试验组显著低于 *NONO* 试验组($p<0.05$)(图 10). qRT-PCR 结果显示, *P16* 在空白对照组与阴性对照组细胞中的表达差异不具有统计学意义($p>0.05$); 与对照组相比, 两个试验组细胞中 *P16* 表达显著降低, 其在 *PSPC1* 试验组的表达显著低于 *NONO* 试验组($p<0.05$)(图 11).

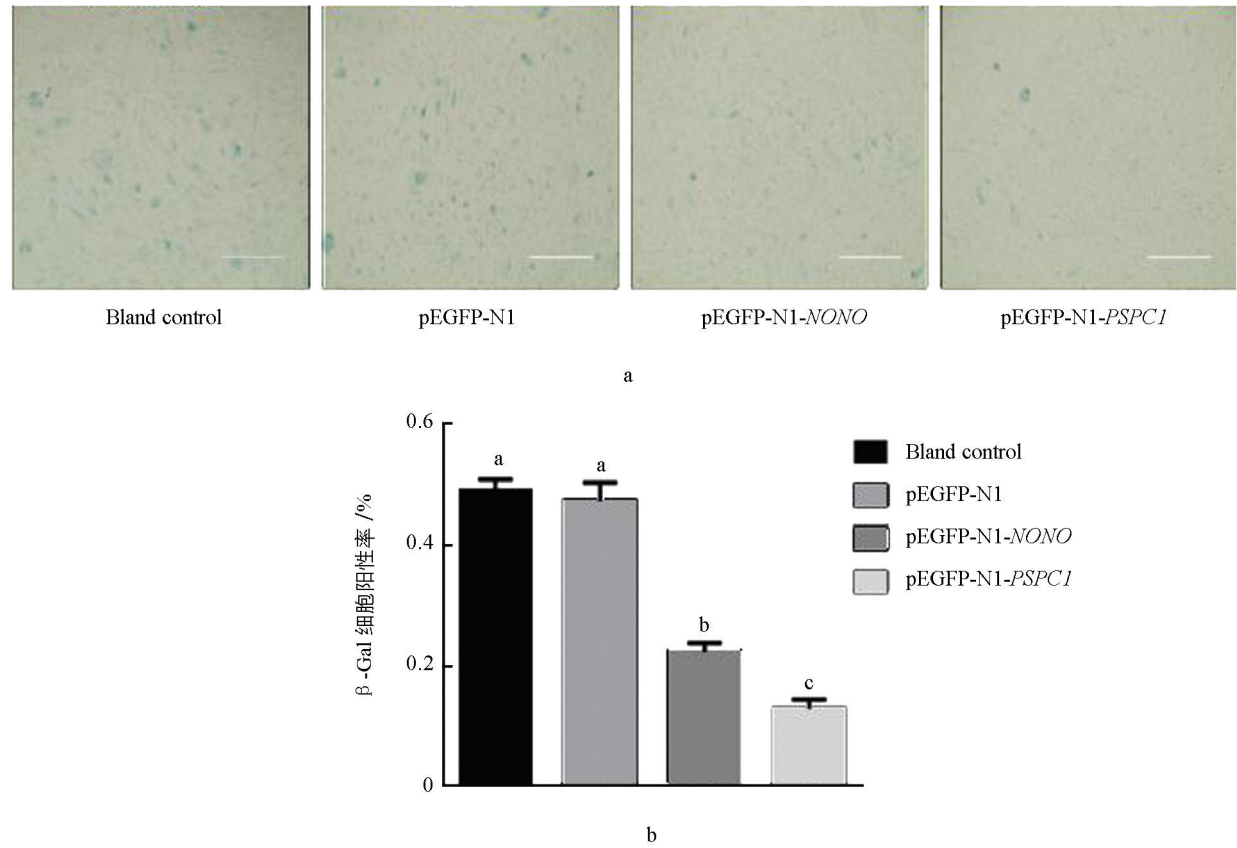


图 10 P15 代水牛胎儿成纤维细胞 β -半乳糖苷酶染色分析

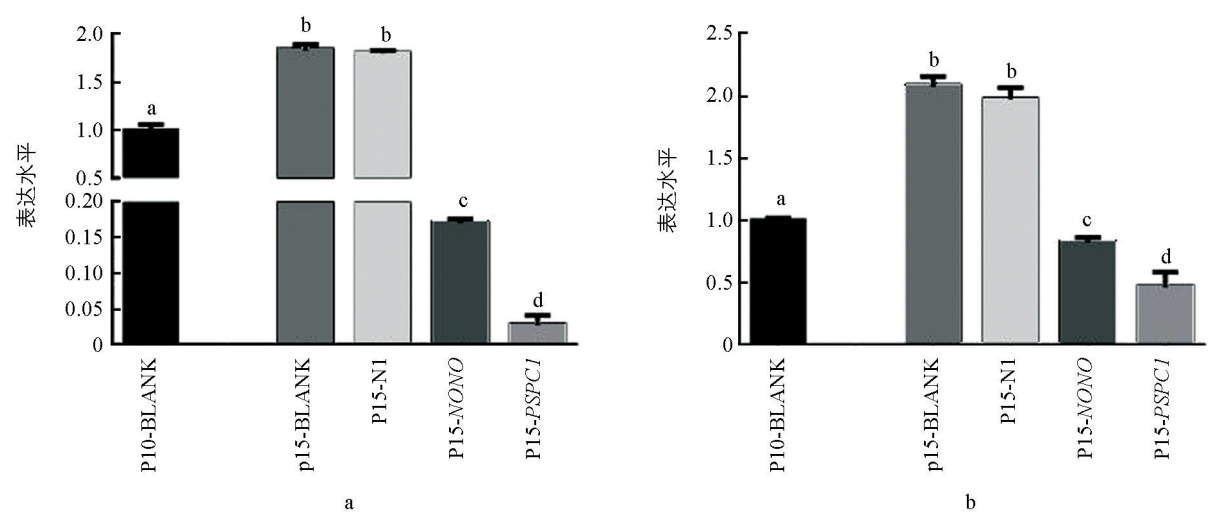


图 11 水牛胎儿成纤维细胞中 *P21* (a), *P16* (b) 的表达差异

3 讨论

以往的研究表明, 旁粒相关基因 *NONO* 和 *PSPC1* 在 DNA 损伤修复、细胞凋亡、细胞增殖等方面均发挥相关作用, 其在细胞增殖方面的作用与细胞种类有关. 本研究首次从旁粒角度研究其在体外培养的水牛成纤维细胞的增殖及抗衰老作用, 发现旁粒相关基因 *NONO* 和 *PSPC1* 可以提高水牛体细胞增殖能力, 延缓衰老. 本研究结果为调节水牛供体细胞生理状态, 进一步提高水牛体细胞克隆效率奠定了基础.

一般体细胞克隆供体细胞的代数会控制在 10 代以内, 最好不超过 15 代^[17]. 本研究在细胞衰老模型构建时, 选择 5 代、10 代和 15 代水牛胎儿成纤维细胞进行筛选. 结果发现, 随着细胞代数增长, 细胞生长活力逐渐减弱, β -Gal 细胞阳性率显著上升, 衰老细胞占总细胞数增加, 细胞整体趋向于衰老. 结合文献和试验结果, 选择 10 代作为细胞衰老的处理点用于后续试验^[18-20]. *P16*, *P21*, *P53* 是常见的用于检测细胞衰老指标^[21-25], *P16* 在人和小鼠中属于较为可信的体内衰老标记物^[26], 而 *P21* 基因和 *P53* 基因表达的增加不能具体区分诱导原因是衰老还是凋亡, 所以必须对水牛胎儿成纤维细胞衰老标记物的选择进行筛选. 选择 0 代、5 代、10 代和 15 代水牛胎儿成纤维细胞进行基因表达分析, 结果显示随着细胞代数增加, *P16* 基因和 *P21* 基因的表达呈现出上升趋势; *P53* 在 0 代的表达显著高于其他代数, 5 代到 15 代差异不具有统计学意义. 因此, 选择 *P16* 和 *P21* 作为水牛胎儿成纤维细胞衰老标记物进行分析.

选择 10 代水牛胎儿成纤维细胞, 利用基因过表达技术及后续检测来验证本文的推论. 对 15 代细胞进行 β -半乳糖苷酶染色, 发现 2 个试验组 β -Gal 细胞阳性率显著降低, 其中 *PSPC1* 试验组显著低于 *NONO* 试验组. Gao 等^[10]发现敲低 *PSPC1* 会导致更多细胞进入 G2/M 期, 而过表达 *PSPC1* 则会使细胞聚集在 G1/S 期, 本文在绘制 15 代细胞生长曲线时, 也发现在第 3~5 d 时 *PSPC1* 试验组的细胞增殖速度高于其他组. 分析 15 代细胞的凋亡相关基因, 结果显示与对照组相比, 试验组的 *Bax* 表达显著降低, 其中 *PSPC1* 试验组 *Bax* 表达显著低于 *NONO* 试验组. 本文推测, *NONO* 和 *PSPC1* 表达与细胞增殖呈正相关, 这与 Cheng 等^[11]在食管鳞状细胞癌细胞、Alfano 等^[12]和 Gao 等^[10]在 HeLa 细胞上的研究结果一致. *P16* 和 *P21* 表达检测结果显示, 两个实验组 β -Gal 细胞阳性率都显著降低, 其中 *PSPC1* 实验组显著低于 *NONO* 实验组; 两个实验组中 *P16*, *P21* 的表达水平也都降低, 并且 *PSPC1* 实验组的表达水平显著低于

NONO 实验组,可见过表达 *NONO* 和 *PSPC1* 基因能够缓解细胞衰老.

4 结论

本研究克隆得到了水牛 *NONO* 和 *PSPC1* 基因编码序列. 上调 *NONO* 和 *PSPC1* 基因表达能够促进水牛胎儿成纤维细胞增殖并且延缓细胞衰老,其中 *PSPC1* 比 *NONO* 基因的作用更加明显.

参考文献:

- [1] ANDERSEN J S, LYON C E, FOX A H, et al. Directed Proteomic Analysis of the Human Nucleolus [J]. *Current Biology*, 2002, 12(1): 1-11.
- [2] CLEMONSON C M, HUTCHINSON J N, SARA S A, et al. An Architectural Role for a Nuclear Noncoding RNA: NEAT1 RNA is Essential for the Structure of Paraspeckles [J]. *Molecular Cell*, 2009, 33(6): 717-726.
- [3] SUNWOO H, DINGER M E, WILUSZ J E, et al. MEN Epsilon/Beta Nuclear-Retained Non-Coding RNAs are Up-Regulated Upon Muscle Differentiation and are Essential Components of Paraspeckles [J]. *Genome Research*, 2009, 19(3): 347-359.
- [4] YU Y, ZHU W, DIAO H, et al. A Comparative Study of Using Comet Assay and γ H2AX Foci Formation in the Detection of N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine-Induced DNA Damage [J]. *Toxicology in Vitro*, 2006, 20(6): 959-965.
- [5] LI S Y, KUHNE W W, KULHARYA A, et al. Involvement of P54(Nrb), a PSF Partner Protein, in DNA Double-Strand Break Repair and Radioresistance [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(20): 6746-6753.
- [6] GAO X J, KONG L Y, LU X H, et al. Paraspeckle Protein 1 (PSPC1) is Involved in the Cisplatin Induced DNA Damage Response-Role in G1/S Checkpoint [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97174.
- [7] JAAFAR L, LI Z T, LI S Y, et al. SFPQ • NONO and XLF Function Separately and Together to Promote DNA Double-Strand Break Repair via Canonical Nonhomologous End Joining [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 45(4): 1848-1859.
- [8] DE SILVA H C, LIN M Z, PHILLIPS L, et al. IGFBP-3 Interacts with NONO and SFPQ in PARP-Dependent DNA Damage Repair in Triple-Negative Breast Cancer [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2019, 76(10): 2015-2030.
- [9] PETTI E, BUEMI V, ZAPPONE A, et al. SFPQ and NONO Suppress RNA: DNA-Hybrid-Related Telomere Instability [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1001.
- [10] GAO X J, ZHANG G L, SHAN S G, et al. Depletion of Paraspeckle Protein 1 Enhances Methyl Methanesulfonate-Induced Apoptosis through Mitotic Catastrophe [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146952.
- [11] CHENG R, ZHU S T, GUO S L, et al. Downregulation of NONO Induces Apoptosis, Suppressing Growth and Invasion in Esophageal Squamous Cell Carcinoma [J]. *Oncology Reports*, 2018, 39(6): 2575-2583.
- [12] ALFANO L, COSTA C, CAPORASO A, et al. NONO Regulates the Intra-S-Phase Checkpoint in Response to UV Radiation [J]. *Oncogene*, 2016, 35(5): 567-576.
- [13] XU X, JIANG H, LU Y, et al. Deficiency of NONO is Associated with Impaired Cardiac Function and Fibrosis in Mice [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2019, 137: 46-58.

[14] ZHANG X J, WU C L, XIONG W, et al. Knockdown of P54nrb Inhibits Migration, Invasion and TNF- α Release of Human Acute Monocytic Leukemia THP1 Cells [J]. *Oncology Reports*, 2016, 35(6): 3742-3748.

[15] YANG P, CHEN T, XU Z P, et al. Long Noncoding RNA GAPLINC Promotes Invasion in Colorectal Cancer by Targeting SNAI2 through Binding with PSF and NONO [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(27): 42183-42194.

[16] 邢青华, 邹超霞, 魏耀昶, 等. 不同年龄水牛成纤维细胞 DNA 甲基化与组蛋白乙酰化水平分析 [J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(8): 102-106.

[17] FULKA J J, LANGEROVA A, LOI P, et al. The Ups and Downs of Somatic Cell Nucleus Transfer (SCNT) in Humans [J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2013, 30(8): 1055-1058.

[18] 汤玉燕, 姚顺, 濮黎平, 等. 水牛热休克蛋白 70 基因克隆及其表达分析 [J]. *南方农业学报*, 2021, 52(9): 2599-2607.

[19] 陈东荣, 黄显晨, 张俊, 等. 水牛 TLe6 基因表达模式分析及其多克隆抗体制备 [J]. *南方农业学报*, 2021, 52(6): 1692-1700.

[20] 蔡小艳, 李雅辉, 鲍正潘, 等. 水牛 Novel-miR-57 对 Bcap-37 和 BMECs 细胞 DOK4 基因的调控作用 [J]. *南方农业学报*, 2021, 52(2): 269-279.

[21] 李炳旻, 唐浩文, 马奎, 等. 不同浓度葡萄糖诱导皮肤成纤维细胞老化的实验观察 [J]. *解放军医学院学报*, 2021, 42(1): 94-98.

[22] 周茂强, 况杰, 胡翰林, 等. 欧亚旋覆花总黄酮对衰老人皮肤成纤维细胞 lncRNA TERRA 的影响及其机制 [J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(11): 1117-1124.

[23] 姜筱唐. 低氧预处理人脂肪来源干细胞对皮肤成纤维细胞衰老作用影响的研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2019.

[24] 冯凡超. 陈皮碱性提取物通过抑制肺成纤维细胞衰老抗肺纤维化作用机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.

[25] 王梅. Bach2 通过自噬调控成纤维细胞光老化的作用机制研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2019.

[26] 张译元, 肖芳. 几种常见细胞衰老检测指标的比较 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2017, 31(4): 352-357.

责任编辑 夏娟