

过表达 NOLC1 诱导人非小细胞肺癌细胞凋亡

杜亚兰¹, 张茂盛², 王旌羽¹, 张璐燕¹, 周常博¹, 余晓双³, 郑方亮¹, 朱春玉^{1*}

(1. 辽宁大学 生命科学学院, 辽宁 沈阳 110000; 2. 秦皇岛市海港医院, 河北 秦皇岛 066000;

3. 宁阳县第一人民医院, 山东 泰安 271000)

摘要 人核仁磷酸化蛋白 1 (Nucleolar and coiledbody phosphoprotein 1, NOLC1) 在癌症的发生发展过程中起着至关重要的调控作用, 为探讨 NOLC1 对肺癌细胞的作用, 本研究通过 Gateway 系统构建重组 NOLC1 腺病毒载体, 成功包装 NOLC1 腺病毒后, 分别感染正常人类胚胎肺细胞 (HEL) 和非小细胞肺癌细胞 (A549 细胞), 过表达 NOLC1。通过 MTT 实验、AnnexinV-APC/PI 双染法和线粒体膜电位实验, 证明与 HEL 细胞相比, NOLC1 的过表达对 A549 细胞的活性降低、凋亡增加、线粒体膜电位下降影响较为显著; 通过 Real-time PCR 检测 Caspase 家族、TNF 与受体家族和 BCL2 家族基因的表达, 发现过表达 NOLC1 明显上调了 A549 细胞中促凋亡基因的表达, 下调了抗凋亡基因的表达, 其中两种重要的促凋亡蛋白 CASP8 和 BAX 均显著上调, 但是在 HEL 细胞中这种影响不明显。研究结果表明过表达 NOLC1 蛋白通过对线粒体通路和死亡受体通路的共同作用, 对非小细胞癌具有显著的抗肿瘤活性。

关键词 NOLC1 (Nucleolar and coiledbody phosphoprotein 1); 肺癌细胞; 腺病毒载体; 过表达; 细胞凋亡

中图分类号 Q939.93 **文献标识码** A **文章编号** 1005-7021(2024)02-0087-10

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2024.02.009

Overexpression of NOLC1 Induced Apoptosis in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells

DU Ya-lan¹, ZHANG Mao-sheng², WANG Jing-yu¹, ZHANG Lu-yan¹,
ZHOU Chang-bo¹, SHE Xiao-shuang³, ZHENG Fang-liang¹, ZHU Chun-yu^{1*}

(1. Acad. of Life Sci., Liaoning Uni., Shenyang 110000;

2. Qinhuangdao Haigang Hosp., Qinhuangdao 066000; 3. Ningyang First Peoples Hosp., Tai'an 271000)

Abstract Human NOLC1 (nucleolar and coiledbody phosphoprotein 1) play an imperative regulation role in the onset and progression of cancer. A recombinant NOLC1 adenovirus vector using the Gateway system was established in order to study the impact of NOLC1 on lung cancer cells. After successfully packaging the NOLC1 adenovirus, and respectively infected normal human embryonic lung cells (HEL) and non-small cell lung cancer cells (A549 cells), to overexpress the NOLC1. The overexpression of NOLC1 had more significant impact on reduction activity, apoptosis increment, and decrement of mitochondrial membrane potential in A549 cells. Adoption of MTT assay, AnnexinV-APC/PI double-staining assay, and mitochondrial membrane potential assay; it was proved as compared with HEL cells the expression of Caspase family, TNF and receptor family, and BCL2 family genes were detected by Real-time PCR. Real-time PCR was used to measure the expression of genes from the Caspase family, TNF and receptor family, and BCL2 family. It was discovered that, in A549 cells, overexpression of NOLC1 significantly increased the expression of pro-apoptotic genes and decreased the expression of anti-apoptotic genes, among them two key pro-apoptotic proteins, CASP8 and BAX, being significantly up-regulated. However, this effect was not evident in HEL cells. The study re-

基金项目: 辽宁省教育厅一般项目 (LJC201910); 辽宁省教育厅服务地方项目 (LJKFZ20220179)

作者简介: 杜亚兰 女, 硕士研究生。主要研究病原微生物。E-mail: 1324349797@qq.com

* 通讯作者。女, 教授, 博士。主要研究禽流感病毒感染机制。E-mail: zhuchunyu@lnu.edu.cn

收稿日期: 2023-12-14

sults suggested that the overexpression of NOLC1 protein has significant anti-tumor activity against non-small cell carcinoma through a combined effect on the mitochondrial pathway and death receptor pathway.

Keywords NOLC1; lung cancer cells; adenovirus; overexpression; apoptosis

近年来,肺癌的死亡率逐年上升,尤其在我国的沿海城市,肺癌在男性中已占据癌症的首位,女性中占第2位^[1]。传统治疗手段如化疗、放疗、手术治疗等挽救或延长了很多肿瘤病人的生命,但这些手段存在损伤机体免疫力、特异性差、损伤健康细胞等弊端,因此近年来以基因治疗为技术核心的特异性靶向治疗手段不断出现。基因治疗(gene therapy)是指将正常的外源基因导入靶细胞纠正或替补引起疾病的缺陷基因,以达到治疗疾病目的的手段^[2]。基因治疗于1990年被Rosenberg等人首次用于治疗晚期黑色素瘤病人^[3]。此后随着人们对肿瘤免疫、肿瘤病因及分子机制等研究的深入,肿瘤的基因治疗获得突飞猛进的发展,并逐渐走向成熟。其中,重组腺病毒载体因其转基因效率高、可转导不同类型人组织细胞、容易制得高滴度病毒及不整合到宿主细胞基因组等特点,作为基因治疗的生物载体被广泛应用和关注^[4-5]。2003年,抗肿瘤基因治疗药物rAd-p53(重组人p53腺病毒)被中国食品药品监督管理局(CFDA)首次批准用于头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)联合治疗^[6];2018年,Liu等^[7]利用重组腺病毒KGV500的结合治疗为结直肠癌提供了一种新的治疗策略;2020年,Cui等^[8]发现重组腺病毒Ad-apoptin-hTERTp-E1a(Ad-VT)在卵巢癌治疗中有较好的抗癌潜力。随着人们对肺癌癌变分子机理认识的深入,研究人员正尝试探寻肺癌基因治疗的新方法和新途径。人核仁磷酸化蛋白1(Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1, NOLC1)是一种高度磷酸化的哺乳动物蛋白,最早在大鼠肝细胞核中发现并鉴定为一种核定位信号NLS结合蛋白^[9],具有在细胞质与细胞核中穿梭的能力^[10]。NOLC1可以与RNA聚合酶I相互结合,调节核糖体DNA的转录,参与核仁的组装、裂解和维持^[11-12]。He等^[13]研究发现果蝇NOLC1基因的缺失诱导了亚细胞核糖体病变;Lee等^[14]研究证实新杆状线虫的DAO-5基因是NOLC1家族成员之一,DAO-5基因突变能够诱导核糖体病变,从而引起生殖细

胞系的凋亡。一系列研究表明,NOLC1参与了炎症发生、细胞生长、凋亡等相关信号通路的调控^[15-17]。研究发现,NOLC1下调能够促进前列腺癌的进展^[18],过表达NOLC1抑制肝癌细胞增殖^[19]。但是,NOLC1在肺癌细胞中的作用还未见报道。本研究基于NOLC1腺病毒载体,通过体外实验研究,观察其对肿瘤细胞的抗肿瘤效果,为临床肺癌基因治疗的新方法和新途径提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 引物设计 所有引物均由武汉擎科生物有限公司合成。

1.1.2 载体、菌株 pCMV-flag-NOLC1载体由辽宁大学微生物学实验室(本实验室)保存,腺病毒载体pAd-CMV-V5-DEST购自Invitrogen公司。人胚肾细胞293A、人胚肺细胞HEL、人肺腺癌细胞株A549均由武汉病毒研究所提供。

1.1.3 主要试剂与仪器设备 Trans 2K plus DNA Marker、DNA Polymerase、dNTP、Trans 15K DNA Marker购自北京全式金生物技术有限公司;TOYOBO KOD高保真酶购自上海根生生物科技有限公司;OMEGA质粒(小量)抽提试剂盒、PCR产物纯化试剂盒购自武汉科昊佳生物科技有限公司;PENTR/D-TOPO CLONING KIT、脂质体(Lipofectamine™ 2000)、Trizol购自Invitrogen公司;FastQuant RT kit(with gDNase)、SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)均购自TIANGEN;PVDF膜购自MILLIPORE;Anti-NOLC1-antibody购自Santa Cruz;Anti-V5-antibody购自SAB;Western blotting ECL发光试剂购自Beyotime公司;辣根过氧化物酶标记的二抗购自武汉三鹰技术有限公司;牛血清白蛋白BSA、PMSF(蛋白酶抑制剂)均购自武汉博士德生物工程有限公司;Opti-MEM培养基、细胞培养基DMEM、MEM培养基、D-Hanks均购自吉诺生物医药技术有限公司;FBS购自GIBICO公司;Pac I酶购自NEB公司;MTT Cell Counting Kit

购自 Vazyme; Annexin V Apoptosis Detection Kit APC 购自 eBioscience; 线粒体膜电位试剂盒购自碧云天公司。超速冷冻离心机 (CT15RE, Hitachi); 紫外成像 (GenoSens 2100, 上海勤翔科学仪器有限公司); 电热恒温培养箱 (DNP-9082, 上海精宏实验设备有限公司); 蛋白质印迹成像和定量分析系统 (ChemiScope 6100, 上海勤翔科学仪器有限公司); Real-time PCR Detection System (PQD-96C, 博日); 酶标仪 (Molecular devices, spectra MAX ABS Plus); 倒置荧光显微镜 (IX73, OLYMPUS); 超净工作台 (SW-CJ-2FD, 安泰空气技术有限公司); 电子天平 (BT25S, 赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 pENTR/D-TOPO-NOLC1 重组质粒的构建

以本实验室前期构建并保存的 pCMV-flag-NOLC1 载体为模板, 使用高保真酶 KOD 扩增 NOLC1 序列。pENTR/D-TOPO F: 5'-CACCATGCGGACGCCGCGCATTC-3'; pENTR/D-TOPO R: 5'-TCACTCGCTGTCAAACCTTAATAG-3'。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s, 57 °C 退火 1 min, 68 °C 延伸 5 min, 35 个循环; 68 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶进行电泳并回收后送测序验证, 证实序列正确。构建 pENTR/D-TOPO-NOLC1 重组载体: 纯化的 NOLC1 PCR 产物 1 μL, 盐溶液 1 μL, TOPOR 载体 1 μL, 无菌水 3 μL, 充分混匀, 室温 (22~23 °C) 孵育 5 min。重组质粒电转化感受态细胞 DH5α, 接种至含有 Amp 的 LB 平板上, 37 °C 过夜培养, 次日挑取单克隆菌落, 过夜培养并提取质粒, 使用 *Not* I 进行单酶切验证, 阳性克隆质粒 DNA 送检测序。

1.2.2 pAd-CMV-V5-NOLC1 重组腺病毒载体的构建

LR 重组反应体系及条件: pENTR/D-TOPO-NOLC1 重组质粒 0.7 μL, TE 5.3 μL, 重组酶 II 2 μL, pAd-CMV-V5-DEST 2 μL; 25 °C 60 min; 加入蛋白酶 k 1 μL, 37 °C, 10 min, 终止 LR 反应。pAd-CMV-V5-NOLC1 质粒电转化感受态细胞 DH5α, 接种至含有 Amp 的 LB 平板上, 37 °C 过夜培养, 因 pAd-CMV-V5-DEST 全长为 36.7 kb, 次日挑取单克隆菌落进行菌落 PCR, 使用质粒通用引物: T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'; V5: 5'-ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3'。阳性克隆提取质

粒 DNA 并送检测序, 测序使用通用引物。

1.2.3 细胞培养、转染 收集生长状态良好的 293A 细胞, 以 $(3\sim4)\times10^5$ 个/孔接种至 35 mm 培养皿中, 每孔体积 2 mL, 37 °C 培养, 待细胞密度达到 80%~90% 时转染 6 μg 质粒 (Lipofectamine™ 2 000)。4~6 h 后, 弃尽含转染试剂的培养基, 更换含有血清的完全培养基, 待用。

1.2.4 腺病毒包装和 TCID50 测定 将 pAd-CMV-V5-DEST、pAd-CMV-V5-NOLC1 质粒 37 °C *Pac* I 酶单酶切过夜, 次日, 乙醇沉淀法回收质粒, 用于转染实验。待转染质粒 DNA 使用 lipofectamine 2 000 说明进行转染, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 7~14 d, 观察细胞病变情况。收集细胞病变达 90% 左右的细胞及上清液, -80 °C/37 °C 反复冻融 2~3 次, 20~30 min/次; 10 000 r/min 离心 10 min, 此上清即原始病毒液, -80 °C 保存。重复步骤扩增三代腺病毒。使用倍比稀释法 TCID50 检测, 不定期观察细胞, 补加完全培养基, 第 7 天取出 96 孔板, 荧光倒置显微镜下观察细胞病变情况。测得第三代 Ad-V5 病毒滴度为 1.0×10^9 pfu/mL, Ad-V5-NOLC1 滴度为 2.0×10^9 pfu/mL。第三代重组腺病毒用于后续实验。

1.2.5 Real-time PCR 检测 Trizol 法提取细胞 RNA, 使用 FastQuant RT kit 试剂盒反转录成 cDNA。将 cDNA 稀释 2 倍, 整个实验过程避光操作。Real-time PCR 反应体系: 2×SuperReal premix plus (12.5 μL), NOLC1 上游引物 (0.75 μL), NOLC1 下游引物 (0.75 μL), cDNA (1 μL, RNase-free ddH₂O (10 μL)。反应条件: 第一阶段: 95 °C 3 min; 第二阶段: 95 °C 10 s; 第三阶段: 55 °C 30 s, 第二阶段到第三阶段 39 个循环。凋亡基因 PCR 引物见表 1。

1.2.6 Western blot 检测 待 HEL、A549 细胞密度达到 80%~90% 时, 分别加入包装好的 100 MOI (病毒感染复数) pAd-CMV-V5-DEST 腺病毒和 pAd-CMV-V5-NOLC1 腺病毒, 每孔各加入 200 μL 无血清培养基, 感染 1.5 h 后, 加入新鲜完全培养基, 置于 5% CO₂, 37 °C 培养箱中培养细胞。48 h 和 96 h 后收集六孔板的细胞于 EP 管中, 与适量 SDS 混合后, 100 °C 煮沸 15 min, 进行 SDS-PAGE 电泳。先 10 mA 电流 30 min, 换 15 mA 电泳约 1.5 h。使用滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸的三明治夹心

结构进行转膜, 180 mA, 2.5 h。用含 5% BSA 的 TBST 溶液浸泡膜室温 2 h, anti-NOLC1 一抗 4 ℃ 过夜孵育, TBST 清洗后, 二抗 IgG 孵育膜 1 h, TBST 清洗后检测发光反应^[20]。蛋白条带的灰度分析采用 Image J 进行。

表 1 凋亡基因 qRT-PCR 引物汇总

Table 1 Summary of apoptotic gene qRT-PCR primers

基因	引物序列
CASP3	5'-AGAACTGGACTGTGGCATTGAG-3' 5'-GCTTGTGCGGCATACTGTTTCAG-3'
CASP6	5'-GATGCAGCCTCCGTTTAC-3' 5'-CAGTTTCCCGGTGAGAATAA-3'
CASP7	5'-AGTGACAGGTATGGCGTTCG-3' 5'-GCATCTATCCCCCTAAAGTGG-3'
CASP8	5'-CCTGGGTGCGTCCACTTT-3' 5'-CAAGGTTCAAGTGACCAACTCAAG-3'
TNF	5'-TGGCCCAGGCAGTCAGA-3' 5'-GGTTTGCTACAACATGGGCTACA-3'
TNFRSF10B	5'-TCTAGATATAGGGCTCTCTATGTT-3' 5'-CGCCTCTAATTCCACCGCTTTG-3'
BAX	5'-CTGAAGCGCATTGGAGATGAATTG-3' 5'-AACCCGGCCCCAGTTGAA-3'
BCL2L11	5'-GTGCCTTGACAACCTCTCCCTATG-3' 5'-AAGGGCATCTGAAGAATCACTCAT-3'
BAG1	5'-AAGCCACAATAGAGCAGTTTATGA-3' 5'-TGTCACACTCGGCTAGGAAT-3'
BCL2A1	5'-CAGTGCGTCTACAGATAC-3' 5'-CTACGGACACAACATTAACAT-3'
GAPDH	5'-TGCACCACTGCTTACG-3' 5'-GGCATGGACTGTGTCATGAG-3'

1.2.7 MTT 法检测细胞增殖 100 MOI 的腺病毒感染细胞。48 h 和 96 h 后, 每孔加入 10 μL MTT solution (5 mg/mL), 37 ℃, 5% CO₂ 孵育 3~4 h。小心吸掉上清, 每孔加入 100 μL DMSO 震荡混匀至沉淀完全溶解。测定 570 nm 各孔的吸光值。细胞存活率 (%) = ((OD 加病毒细胞 - OD 空白) / (OD 对照细胞 - OD 空白)) × 100%。

1.2.8 Annexin V-APC/PI 双染法定量检测细胞凋亡 100 MOI 的 pAd-CMV-V5-DEST 和 pAd-CMV-V5-NOLC1 腺病毒感染 HEL 和 A549 细胞 1.5 h 后, 加入完全培养基, 置于 37 ℃, 5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育。将细胞培养基吸出至 2 mL EP 管内, PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 200 μL 胰酶将贴

壁细胞吹打下来, 吸出消化液, 加入收集的细胞培养基, 4 ℃, 1 000 r/min 离心 10 min, 用 PBS 冲洗细胞沉淀 2 次, 200 μL 1×Binding Buffer 重悬细胞, 加入 5 μL Annexin V-FITC, 室温孵育 10 min, 1×Binding Buffer 洗 1 次, 1 mL 1×Binding Buffer 重悬细胞, 加入 5 μL PI 进行流式细胞仪检测。Q2 象限表示晚期凋亡和坏死细胞 (Annexin V+/PI+)、Q3 象限表示正常细胞即未发生凋亡的细胞 (Annexin V-/PI-)、Q4 象限表示发生早期凋亡的细胞 (Annexin V/PI-)。

1.2.9 线粒体膜电位 (JC-1) 法检测细胞凋亡 吸除细胞培养液, PBS 洗涤贴壁细胞 1 次, 加入 200 μL 胰酶消化细胞。吸出胰酶后, 加入细胞培养基, 吹打收集细胞, 4 ℃, 1 000 r/min 离心 10 min。将收集的细胞重悬于 500 μL 细胞培养基中。加入 500 μL 的 JC-1 染色液, 上下混匀数次。于 37 ℃ 细胞培养箱中孵育 20 min。4 ℃, 600 g 离心 3~4 min, 弃去上清。用 JC-1 染色缓冲液 (1×) 洗涤 2 次。用 (1×) JC-1 染色缓冲液重悬细胞后, 进行流式分析。Q2 象限表示正常细胞, 膜电位较高, 大部分以聚合体形式存在; Q4 象限表示早期凋亡细胞, 膜电位降低部分以单体的形式存在发绿色荧光。

1.2.10 数据统计分析 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAPP26.0 进行统计学处理, 多组之间比较采用均值方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 pAd-CMV-V5-NOLC1 重组腺病毒质粒鉴定

以稀释 10 倍的 pCMV-flag-NOLC1 为模板, PCR 扩增 *nolc1*, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 在 2 100 bp 处出现特异条带。胶回收后送擎科生物科技有限公司测序, 测序结果在 NCBI 官网 BIAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对, 结果与预计结果一致。使用 *Not I* 对 pENTR/D-TOPO、pENTR/D-TOPO-NOLC1 进行单酶切验证, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 在 2 580 bp 及 4 680 bp 处出现目的条带 (图 1A), 说明克隆成功。使用质粒通用引物对 pAd-CMV-V5-DEST、pAd-CMV-V5-NOLC1 进行 PCR 验证, 在 2 369 bp 及 2 233 bp 处出现特异条带 (图 1B), 将

pAd-CMV-V5-NOLC1 重组质粒送擎科生物科技有限公司测序,结果与预计结果一致。证明 pAd-CMV-V5-NOLC1 重组质粒构建成功。

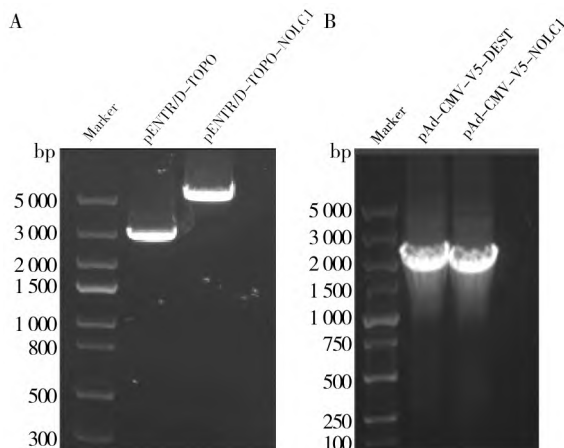


图 1 重组质粒的鉴定结果

Fig.1 Identification of recombinant plasmid

A: Not I 对 pENTR/D-TOPO、pENTR/D-TOPO-NOLC1 单酶切验证后琼脂糖凝胶电泳; B: pAd-CMV-V5-DEST、pAd-CMV-V5-NOLC1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

A: Not I Agar-gel electrophoresis of pENTR/D-TOPO and pENTR/D-TOPO-NOLC1 after single enzyme digestion verification; B: Agar-gel electrophoresis of PCR products from pAd-CMV-V5-DEST and pAd-CMV-V5-NOLC1

2.2 重组腺病毒的 Western blot 验证

使用包装好的 Ad-V5、Ad-V5-NOLC1 病毒感染 293A 细胞,24 h 后收集细胞,通过 Western blot 检测,可见 130 kDa(NOLC1)和 42 kDa(β -actin)大小的蛋白条带,Ad-V5-NOLC1 病毒感染组 NOLC1 蛋白表达量明显高于 Ad-V5 病毒感染组及空白细胞对照,说明重组 NOLC1 蛋白成功过表达(图 2)。

2.3 HEL、A549 细胞中 nolc1 转录检测

分别以 5、10、50、100 MOI(病毒感染复数)的 Ad-V5-NOLC1 腺病毒感染 HEL 和 A549 细胞,48 h 后收集细胞,提取 RNA 进行 realtime PCR 检测,随 MOI 的增加,mRNA 转录逐级升高(图 3)。后续病毒感染实验均采用 100 MOI。

2.4 MTT 法检测细胞增殖

Ad-V5、Ad-V5-NOLC1 腺病毒分别感染 A549、HEL 细胞,48、96 h 后用 MTT 法检测细胞存活率。过表达 NOLC1 的 A549 细胞活性显著降低($*P<0.05$, $**P<0.01$),但是过表达 NOLC1 对 HEL 细胞影响很小(图 4)。

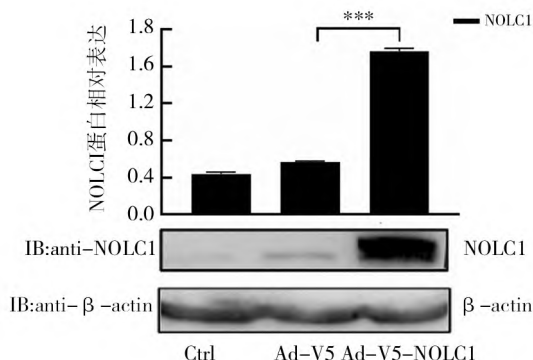


图 2 Western blotting 检测 NOLC1 蛋白过表达结果

Fig.2 Overexpression of NOLC1 protein

detected by Western blotting

Ad-V5、Ad-V5-NOLC1 腺病毒感染 293A 细胞检测 NOLC1 蛋白表达, $***P<0.001$

The expression of NOLC1 protein was detected in 293A cells infected with Ad-V5 and AD-V5-NOLC1 virus, $***P<0.001$

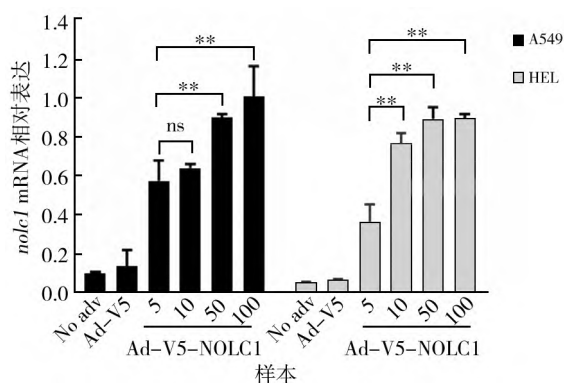


图 3 qRT-PCR 检测细胞中 nolc1 mRNA 的表达量

Fig.3 Expression of nolc1 mRNA in HEL and

A549 cells detected by qRT-PCR

No adv: 空白对照; Ad-V5: 阴性对照; MOI 为 5、10、50、100 Ad-V5-NOLC1 腺病毒分别感染 A549 及 HEL 细胞, ns $P>0.05$, $**P<0.01$

No adv: blank control; Ad-V5: negative control; The MOI was 5, 10, 50, 100 Ad-V5-NOLC1 adenovirus infected A549 and HEL cells, respectively, ns $P>0.05$, $**P<0.01$

2.5 Annexin V-APC/PI 双染法检测细胞凋亡

流式细胞术 Annexin V-APC/PI 双染法检测细胞的凋亡指数变化。结果显示,针对 HEL 细胞,未处理细胞(图中未显示)感染 Ad-V5、Ad-V5-NOLC1 腺病毒 48 h 后,细胞凋亡指数分别为 $(1.4\pm 1.2)\%$ 、 $(1.6\pm 1.3)\%$ 、 $(2.2\pm 1.5)\%$;96 h 后,细胞凋亡指数分别为 $(3.8\pm 2.6)\%$ 、 $(4.5\pm 3.7)\%$ 、 $(15.7\pm 3.0)\%$ 。而对于 A549 细胞,未处理细胞(图中未显示)感

染 Ad-V5、Ad-V5-NOLC1 腺病毒 48 h 后,细胞凋亡指数分别为 $(7.2 \pm 2.8)\%$ 、 $(8.6 \pm 2.7)\%$ 、 $(25.4 \pm 4.2)\%$;96 h 后,细胞凋亡指数分别为 $(10.6 \pm 3.2)\%$ 、 $(13.4 \pm 2.9)\%$ 、 $(49.3 \pm 4.3)\%$ 。结果表明,过表达 NOLC1 蛋白对 HEL 细胞凋亡影响较小,而使 A549 细胞凋亡指数增高,且随感染时间的增加,96 h 凋亡指数最高 $(49.3 \pm 4.3)\%$ (图 5)。与空载对照相比,过表达 NOLC1 的细胞凋亡率显著性增高 (* * $P < 0.01$) (图 6)。

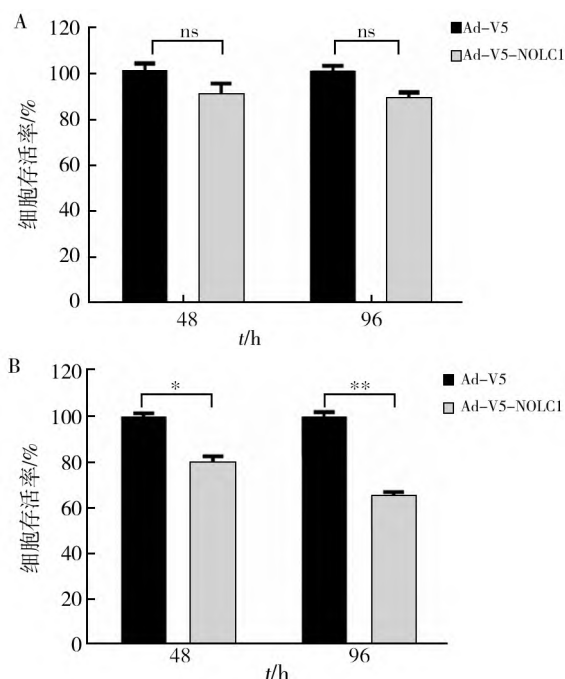


图 4 HEL 和 A549 细胞 NOLC1 过表达细胞活性比较

Fig.4 Comparison of the activity of NOLC1 overexpressed cells in HEL and A549 cells

A: Ad-V5 及 Ad-V5-NOLC1 腺病毒感染 HEL 细胞; B: Ad-V5 及 Ad-V5-NOLC1 腺病毒感染 A549 细胞; ns $P > 0.05$, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$

A: Ad-V5, AD-V5-NOLC1 adenovirus infected HEL cells; B: Ad-V5, AD-V5-NOLC1 adenovirus infected A549 cells; ns $P > 0.05$, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$

2.6 线粒体膜电位 (JC-1) 法检测细胞凋亡

线粒体膜电位 (JC-1) 法检测细胞早期凋亡指数。HEL 细胞未处理、感染 Ad-V5、Ad-V5-NOLC1 48 h 后,细胞凋亡指数分别为 $(1.9 \pm 1.2)\%$ 、 $(2.3 \pm 1.5)\%$ 、 $(5.2 \pm 2.2)\%$;96 h 后,细胞凋亡指数分别为 $(18.6 \pm 2.1)\%$ 、 $(20.8 \pm 2.5)\%$ 、 $(22.8 \pm 2.3)\%$; A549 细胞未处理,感染 Ad-V5、Ad-V5-NOLC1 48 h 后,细胞凋亡指数分别为 $(1.3 \pm 2.1)\%$ 、 $(2.1 \pm 1.2)\%$ 、 $(7.1 \pm 3.5)\%$;96 h 后,细胞凋亡指数分别为

$(10.0 \pm 2.2)\%$ 、 $(11.4 \pm 2.9)\%$ 、 $(27.3 \pm 3.5)\%$ (图 7)。A549 细

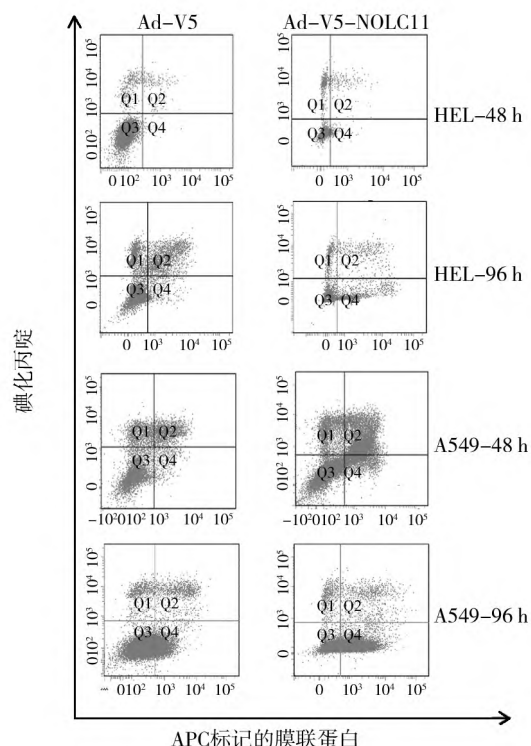


图 5 Annexin V-APC/PI 双染法检测细胞凋亡

Fig.5 Annexin V-APC/PI double staining for the detection of cell vitiation

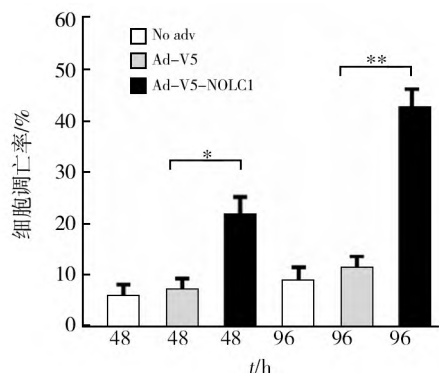


图 6 Annexin V-APC/PI 双染法流式细胞术检测细胞凋亡率柱形图

Fig.6 Annexin V-APC/PI flow cytometry column of cell apoptosis rate

空白对照 (No adv)、阴性对照 (Ad-V5)、实验组 (Ad-V5-NOLC1) 感染 A549 细胞 48 h 及 96 h 细胞凋亡率, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$

The apoptosis rate of A549 cells infected with No adv, negative control (Ad-V5) and experimental group (AD-V5-NOLC1) for 48 h and 96 h, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$

胞感染 Ad-V5-NOLC1 48、96 h 后,细胞凋亡指

数和对照 (Ad-V5) 相比, 显著增高 ($P < 0.05$) (图 8)。说明 NOLC1 过表达造成 A549 线粒体膜电位下降。推测可能线粒体膜电位下降导致

促凋亡物质释放, 继而激活 caspase, 最终促进细胞凋亡。

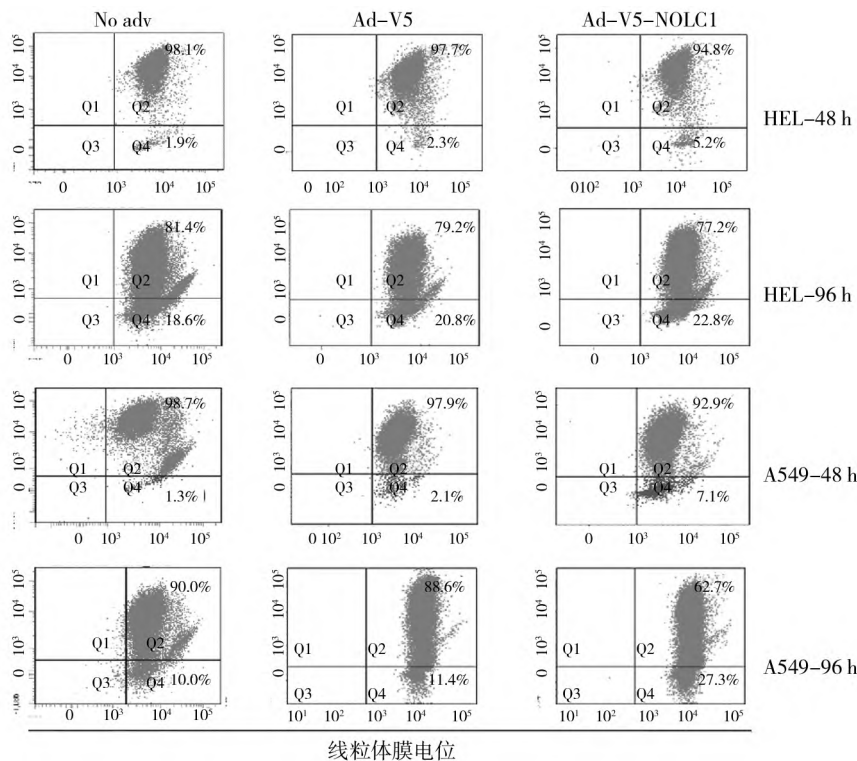


图 7 线粒体膜电位 (JC-1 法) 流式细胞术检测细胞凋亡

Fig.7 Mitochondrial membrane potential (JC-1 method) was used to detect cell apoptosis by flow cytometry

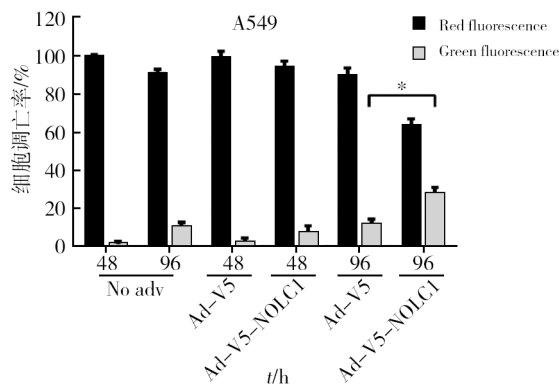


图 8 线粒体膜电位 (JC-1 法) 流式细胞术检测细胞凋亡率柱形图

Fig.8 Mitochondrial membrane potential (JC-1 method) was used to detect cell apoptosis rate by flow cytometry
空白对照、Ad-V5 及 Ad-V5-NOLC1 感染 A549 细胞 48 h 及 96 h 细胞凋亡率, 黑色表示正常细胞, 灰色表示早期凋亡细胞, $*P < 0.05$

Apoptosis rates of A549 cells infected by blank control, Ad-V5, AD-V5-NOLC1 for 48 h and 96 h, Normal cells are shown in black and early apoptotic cells are shown in grey, $*P < 0.05$

2.7 NOLC1 过表达对细胞凋亡因子的影响

为确定由 NOLC1 引起的细胞凋亡是否与凋亡信号通路相关基因有关联, 通过 realtime PCR 实验对 Caspase 家族的 *CASP3*、*CASP6*、*CASP7*、*CASP8* 基因, TNF 与 TNF 受体家族的 TNF、TNFRSF10B 基因及 BCL2 家族的 *BCL2L11*、*BAX*、*BAG1*、*BCL2A1* 基因转录变化进行检验。结果显示, 在 A549 细胞中, Ad-V5-NOLC1 腺病毒感染组与对照组相比, Caspase 家族中的 *CASP8* (7.5 ± 0.2) 变化量最高; TNF 及其受体家族中的 *TNFRSF10B* (7.8 ± 0.2) 表达量最高; BCL2 家族的 *BCL2L11* (4.5 ± 0.4) 表达量最高, 两个抗凋亡基因 *BAG1* (-3.2 ± 0.5) 和 *BCL2A1* (-3.0 ± 0.4) 均下调 (图 9)。对两种重要的促凋亡蛋白 *CASP8* 和 *BAX* 进行蛋白质水平检测, 与对照组相比, Ad-V5-NOLC1 腺病毒感染组两蛋白均显著上调 (图 10)。说明 NOLC1 过表达诱导 A549 细胞凋亡是线粒体通路和死亡受体通路共同作用的结果。

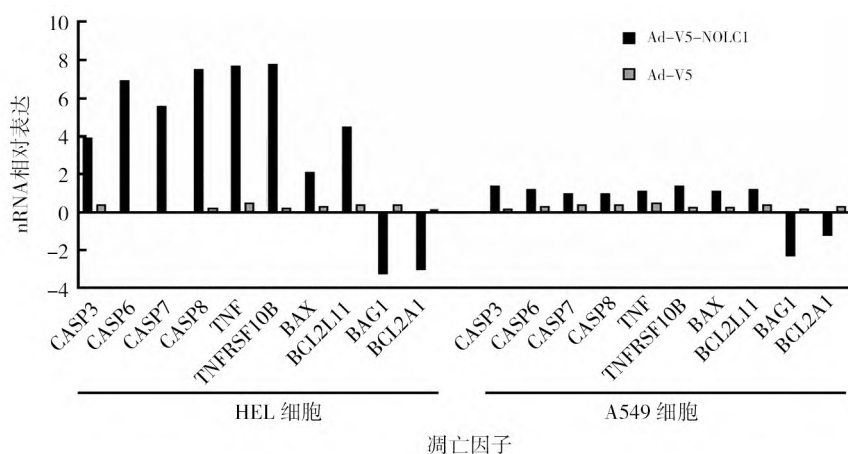


图9 Ad-V5-NOLC1 和 Ad-V5 感染细胞凋亡相关基因转录差异比较

Fig.9 Comparison of apoptosis-related gene transcription differences in AD-V5-NOLC1 & Ad-V5 infected cells

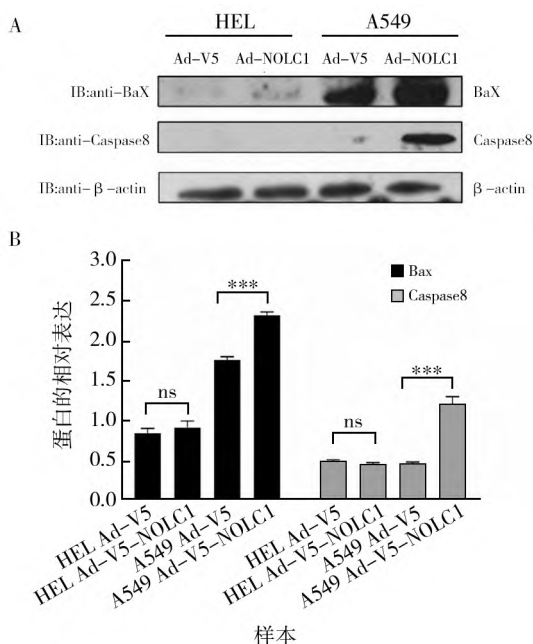


图10 Ad-V5-NOLC1 和 Ad-V5 感染细胞凋亡蛋白表达差异比较

Fig.10 Comparison of apoptosis protein expression in Ad-V5-NOLC1 & Ad-V5 infected cells

A: Ad-V5 及 Ad-V5-NOLC1 腺病毒感染 HEL、A549 后 Bax 及 Caspase8 蛋白的检测; B: 图 A 蛋白的量化, ns $P > 0.05$, * * * $P < 0.001$

A: Bax and Caspase8 proteins were detected after transfection of HEL and A549 with Ad-V5 and AD-V5-NOLC1; B: Quantization of protein in Figure A, ns $P > 0.05$, * * * $P < 0.001$

3 讨论

随着现代分子生物学技术的高速发展,特别

是转基因技术所取得的巨大进步,在基因导入、基因治疗方面,腺病毒载体相对于传统技术的有效性、实用性和安全性,以及在开发速度和商业应用等方面的优势得到了广泛关注^[21]。以重组腺病毒为载体的基因治疗在膀胱癌^[22]、黑色素瘤^[23]、肝细胞癌^[24]等癌症治疗中展现了较好的治疗效果。

人核仁磷酸化蛋白 NOLC1,是 Meier 等^[9]首次在大鼠的肝细胞核中发现的一种核定位信号结合蛋白,作为蛋白伴侣具有在细胞核与细胞质中穿梭的功能,参与细胞生长、细胞凋亡、肿瘤发生等相关信号通路的调控。研究发现,增强 NOLC1 的表达可以抑制肝癌和透明细胞肾细胞癌细胞的增殖,促进细胞的凋亡^[19,25]。另一方面, NOLC1 过表达可以加速食管癌细胞增殖、迁移、侵袭和 cyclin B1 表达,并通过激活 PI3K/AKT 通路抑制食管癌细胞凋亡和 caspase-3 的表达^[26]。这些差异提示 NOLC1 在肿瘤发生中的功能作用可能取决于细胞环境和癌症类型^[17]。

本研究为了阐明 NOLC1 对肺癌细胞的生物学作用,构建过表达 NOLC1 的重组腺病毒,分别感染 HEL 和 A549 细胞。通过 MTT 法和流式细胞术检测发现, NOLC1 的过表达降低了肺癌细胞 A549 细胞的活性,促进了细胞凋亡,且随着感染时间的增加,细胞凋亡水平加剧。然而 NOLC1 的过表达对 HEL 细胞凋亡没有显著影响。 NOLC1 在 HEL 细胞中过表达 96 h 后细胞有少量凋亡,可能原因是 NOLC1 过表达促进 TRF2 的核仁积

累,增强 53BP1 的活性和端粒结合能力。结果导致端粒显性丧失、端粒 DNA 损伤反应、细胞周期阻滞和细胞凋亡^[27],具体原因还有待进一步研究。用线粒体膜电位(JC-1)法检测早期细胞凋亡,结果显示过表达 NOLC1 的 A549 细胞线粒体膜电位下降。细胞凋亡有两条经典的信号通路,即“外在”死亡受体途径和“内在”线粒体途径。死亡受体途径主要由 TNF α 、FasL 或 TRAIL 激活促凋亡死亡受体,诱导形成凋亡复合物促进细胞凋亡^[28-29];线粒体途径主要由 BCL-2 家族的促凋亡蛋白如 BAX、BAK 等诱导线粒体膜外渗透,促进细胞色素 c 释放到细胞质中,诱导凋亡小体和 Caspase3 激活,从而促进细胞凋亡^[30],P53 作为一种促凋亡调节剂可靶向调控 BCL2 家族蛋白的表达^[31]。为确定细胞凋亡是否与 Caspase 家族、TNF 与其受体家族及 BCL2 家族有关,本研究通过 realtime PCR 检测了过表达 NOLC1 蛋白后 Caspase 家族的 *CASP3*、*CASP6*、*CASP7*、*CASP8* 基因,TNF 与其受体家族的 *TNF*、*TNFRSF10B* 基因以及 BCL2 家族的 *BCL2L11*、*BAX*、*BAG1*、*BCL2A1* 基因的转录变化。结果表明,*TNF*、*TNFRSF10B*、*BCL2L11* 表达量上调,*BAG1* 和 *BCL2A1* 下调。蛋白水平检测发现两种重要的促凋亡蛋白 CASP8 和 BAX 均显著上调。综合以上结果说明过表达 NOLC1 蛋白系通过线粒体通路和死亡受体通路的共同作用促进 A549 细胞凋亡,而 NOCL1 调节两条凋亡信号途径的具体分子机制还有待进一步研究。该研究结果进一步解析了肺癌发生的分子机制,为开发肺癌的基因治疗提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 钟润波,王奕洋,韩宝惠,等.《中华医学会肺癌临床诊疗指南(2022 版)》解读[J].中国胸心血管外科临床杂志,2022,29(11):1402-1406.
- [2] Anguela XM, High KA. Entering the modern era of gene therapy[J]. Annual Review of Medicine, 2019, 70: 273-288.
- [3] Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, et al. Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction[J]. The New England journal of medicine, 1990, 323(9):570-578.
- [4] Su W, Patrício MI, Duffy MR, et al. Self-attenuating adenovirus enables production of recombinant adeno-associated virus for high manufacturing yield without contamination[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 1182.
- [5] Syayam A, Nawaz A, Ijaz A, et al. Adenovirus vector system: construction, history and therapeutic applications[J]. Biotechniques, 2022, 3(6):297-305.
- [6] Muruve DA. The innate immune response to adenovirus vectors[J]. Human Gene Therapy, 2004, 15(12): 1157-1166.
- [7] Liu FR, Bai S, Feng Q, et al. Anti-colorectal cancer effects of anti-p21Ras scFv delivered by the recombinant adenovirus KGHV500 and cytokine-induced killer cells[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 1-10.
- [8] Cui Y, Li Y, Li S, et al. Anti-tumor effect of a dual cancer-specific recombinant adenovirus on ovarian cancer cells[J]. Experimental Cell Research, 2020, 396(1): 112185.
- [9] Meier UT, Blobel G. A nuclear localization signal binding protein in the nucleolus[J]. Cell Biology, 1990, 111(6 Pt 1): 2235-2245.
- [10] Li D, Meier UT, Dobrowolska G, et al. Specific interaction between casein kinase 2 and the nucleolar protein Nopp140[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(6): 3773-3779.
- [11] Gao XS, Wang Q, Li W, et al. Identification of nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 (NOLC1) minimal promoter regulated by NF- κ B and CREB[J]. BMB Reports, 2011, 44(1): 70-75.
- [12] Meier UT, Blobel G. A nuclear localization signal binding protein in the nucleolus[J]. Journal of Cell Biology, 1990, 111(6 Pt 1): 2235-2245.
- [13] He F, James A, Raje H, et al. Deletion of drosophila nopp140 induces subcellular ribosomopathies[J]. Chromosoma, 2015, 124(2): 191-208.
- [14] Lee CC, Tsai YT, Kao CW, et al. Mutation of a Nopp140 gene dao-5 alters rDNA transcription and increases germ cell apoptosis in *C.elegans*[J]. Cell Death and Disease, 2014, 5(4): e1158.
- [15] Hwang YC, Lu TY, Huang DY, et al. NOLC1, an enhancer of nasopharyngeal carcinoma progression, is essential for TP53 to regulate MDM2 expression[J]. The American Journal of Pathology, 2009, 175(1): 342-354.
- [16] 朱春玉,赵莹,易文富,等.人核仁磷酸化蛋白 1 (NOLC1) 影响禽流感病毒感染过程研究进展[J].微生物学杂志,2019,39(3):1-6.
- [17] Zhai F, Wang J, Luo X, et al. Roles of NOLC1 in cancers and viral infection[J]. Cancer Res Clin Oncol, 2023, 149(12): 10593-10608.
- [18] Kim W, Yeo DY, Choi SK, et al. NOLC1 knockdown suppresses prostate cancer progressions by reducing AKT phosphorylation and β -catenin accumulation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2022, 635: 99-107.
- [19] Yuan F, Zhang Y, Ma L, et al. Enhanced NOLC1 promotes cell senescence and represses hepatocellular carcinoma cell proliferation by disturbing the organization of nucleolus[J]. Aging

- Cell, 2017, 16(4): 726-737.
- [20] Marchetto A, Romero-Pérez L. Western blot analysis in ewing sarcoma[J]. Ewing Sarcoma: Methods and Protocols, 2021, 2226: 15-25.
- [21] Watanabe M, Nishikawaji Y, Kawakami H, et al. Adenovirus biology, recombinant adenovirus, and adenovirus usage in gene therapy[J]. Viruses, 2021, 13(12): 2502.
- [22] Boorjian SA, Alemozaffar M, Konety BR, et al. Intravesical nadofaragene firadenovec gene therapy for BCG-unresponsive non-muscle-invasive bladder cancer: a single-arm, open-label, repeat-dose clinical trial[J]. The Lancet Oncology, 2021, 22(1): 107-117.
- [23] Shi SW, Li B, Dong Y, et al. *In vitro* and clinical studies of gene therapy with recombinant human adenovirus-p53 injection for malignant melanoma[J]. Human Gene Therapy Clinical Development, 2019, 30(1): 7-18.
- [24] Sun Y, Wu H, Chen G, et al. Genetically engineered recombinant adenovirus expressing interleukin 2 for hepatocellular carcinoma therapy[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(1): 300-306.
- [25] Wu CY, Li L, Chen SL, et al. A Zic2/Runx2/NOLC1 signaling axis mediates tumor growth and metastasis in clear cell renal cell carcinoma[J]. Cell Death Discovery, 2021, 12(4): 319.
- [26] Berghe TV, Van Loo G, Saelens X, et al. Differential signaling to apoptotic and necrotic cell death by Fas-associated death domain protein FADD[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(9): 7925-7933.
- [27] Yuan F, Li G, Tong T. Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 (NOLC1) regulates the nucleolar retention of TRF2[J]. Cell Death Discovery, 2017, 3: 17043.
- [28] Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes[J]. Cell, 2003, 114(2): 181-190.
- [29] Boldin MP, Goncharov TM, Goltseve YV, et al. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor-induced cell death[J]. Cell, 1996, 85(6): 803-815.
- [30] Liu X, Kim CN, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c[J]. Cell, 1996, 86(1): 147-157.
- [31] Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(5): 1106-1121.