

CPE对成纤维细胞衰老的影响及其分子机制研究

刘宇佳¹, 晏玲英¹, 安 静¹, 阚宇航¹, 周晓佳¹, 谌 霞^{2*}, 卢星军^{1*}

¹湖南医药学院医学检验学院, 湖南 怀化

²湖南医药学院第一附属医院, 湖南 怀化

收稿日期: 2024年12月14日; 录用日期: 2025年1月14日; 发布日期: 2025年1月21日

摘 要

目的: 探讨CPE的表达与细胞衰老的相关性。方法: 选取接受手术清创的健康人供体(5~20岁)分离的人包皮的成纤维细胞(NHSF细胞)将其进行传代, 在此我们定义“小于15代的NHSFs为N1组、15~25代的NHSFs为N2组、大于45代的NHSF为N3组”。随后用UVA和H₂O₂分别处理细胞使其衰老, 建立早衰模型。此后进行CPE的慢病毒转染, 获得CPE稳定敲除的细胞株。通过qRT-PCR和WB技术, 检测CPE和衰老标志物蛋白及mRNA的表达。分别采用cck8和SA- β -gal染色检测CPE敲降后NHSFs的增殖和衰老程度。最后采用qRT-PCR检测CPE敲降后NHSFs促炎症因子的表达水平。结果: N1组CPE蛋白和mRNA表达最高, 其次是N2组, N3组最少, 早衰细胞模型中CPE蛋白和mRNA的表达减低, CPE敲降后NHSFs蛋白和mRNA的表达均升高、细胞活性降低、细胞衰老程度明显加快和促炎症因子mRNA表达升高。结论: CPE可作为潜在衰老标志物且其高表达可延缓衰老。

关键词

CPE, 细胞衰老, 成纤维细胞, 衰老标志物, 延缓衰老

Study on Effect of CPE on Fibroblast Senescence and Its Molecular Mechanism

Yujia Liu¹, Lingying Yan¹, Jing An¹, Yuhang Kan¹, Xiaojia Zhou¹, Xia Chen^{2*}, Xingjun Lu^{1*}

¹College of Laboratory Medicine, Hunan University of Medicine, Huaihua Hunan

²The First Affiliated Hospital of Hunan University of Medicine, Huaihua Hunan

Received: Dec. 14th, 2024; accepted: Jan. 14th, 2025; published: Jan. 21st, 2025

*通讯作者。

文章引用: 刘宇佳, 晏玲英, 安静, 阚宇航, 周晓佳, 谌霞, 卢星军. CPE 对成纤维细胞衰老的影响及其分子机制研究[J]. 药物资讯, 2025, 14(1): 52-57. DOI: 10.12677/pi.2025.141005

Abstract

Objective: To explore the correlation between the expression of CPE and cellular senescence. **Methods:** Human foreskin fibroblasts (NHSF cells) isolated from healthy human donors (5~20 years old) who underwent surgical defibrillation were selected for passage. Here, we defined "NHSFs of less than 15 generations as group N1, NHSFs of 15~25 generations as group N2, and NHSF of more than 45 generations as group N3". Then the cells were treated with UVA and H₂O₂ respectively to make them senescent, and the premature aging model was established. Then lentiviral transfection of CPE was performed to obtain stable CPE knockout cell lines. The expression of CPE and aging marker protein and mRNA were detected by qRT-PCR and WB. The proliferation and senescence of NHSFs after CPE knockdown were detected by cck8 and SA- β -gal staining, respectively. Finally, the expression level of NHSFs proinflammatory factors after CPE knock-down was detected by qRT-PCR. **Results:** The expressions of CPE protein and mRNA were the highest in N1 group, followed by N2 group and N3 group, and the expressions of CPE protein and mRNA were decreased in the progeria cell model. After CPE knockdown, the expressions of NHSFs protein and mRNA were both increased, the cell activity was decreased, the degree of cell senility was significantly accelerated, and the mRNA expression of proinflammatory factors was increased. **Conclusion:** CPE can be used as a potential senescence marker and its high expression can delay senescence.

Keywords

CPE, Cellular Senescence, Fibroblast, Senescence Marker, Delaying Senescence

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

人口老龄化问题日益凸显,关于衰老的相关研究越来越备受重视。衰老是随年龄增长而产生的一系列生理学和形态学方面的变化,是一个复杂的生理退化过程。随着个体年龄的增长,细胞、组织和器官会发生退行性变化,从而引起退行性疾病的发生,最终导致衰老相关疾病的发展和生命的终结[1]。如何延缓衰老是当代面临的一大挑战。在临床上,主要采取药物抗衰老,因为长期给药会引起副作用。因此,亟需寻找更安全、更有效的延缓衰老新方法。随着科学技术的发展,分子靶向干扰可能成为延缓衰老的热点。

近年来,相关研究阐明了 CPE 在神经系统中的重要性[2]。阿尔兹海默病(AD)就是一种与衰老相关的神经退行性疾病,也是老年人痴呆的主要原因[3]。既往研究表明,CPE 与 AD 之间存在联系,它显示了 CPE 在不同大脑区域(包括新皮层和海马体)的人类 AD 斑块中的异常积累;在此基础上发现,阿尔茨海默病患者的 CPE 基因发生了新的突变,且这种突变与阿尔茨海默病相关的神经变性、记忆缺陷和抑郁症有关[4]。此外,CPE 还保护 CA3 海马神经元免受压力引起的死亡和认知功能障碍[5]。目前国内外关于 CPE 的研究大多数局限于神经肽和肽激素的生物合成相关研究领域,而 CPE 抗衰老相关研究报道较少。

在本研究中,我们通过慢病毒转染 shRNA 建立 CPE 敲低模型,检测敲降 CPE 年轻(Y)细胞和过表达 CPE 衰老(O)细胞的衰老标志物蛋白和 mRNA 表达水平、细胞衰老水平和细胞活性。本项目的开展有助于更深入地了解 CPE 与细胞衰老的相关,明确 CPE 的抗衰老作用,为研究 CPE 作为潜在衰老标志物和抗衰老靶点提供理论基础。

2. 材料和方法

2.1. 细胞培养和处理

2.1.1. 细胞培养

293T 细胞购自 ATCC (Manassas, VA, USA)。在 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)中 (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA)添加 10%胎牛血清(Thermo Fisher scientific)和青霉素($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)-链霉素($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 细胞在 37°C 的 5% CO_2 培养箱中培养。原代正常人皮肤成纤维细胞(NHSF)来源于接受手术清创的健康人供体(5~20 岁)分离的人包皮。连续传代 NHSF, 将的 NHSFs < 10 代的定义为年轻(N1)细胞, 将 15 代 < NHSFs < 25 代的定义为中间(N2)细胞, 将 NHSFs > 40 代的定义为衰老(N3)细胞。为了建立早衰模型, 我们分别用 UVA 和 H_2O_2 处理细胞使其衰老。为了防止 UVA 被培养基中的因子吸收, 在 UVA 照射前, 将培养基完全抽吸, 将 NHSF 浸入一层磷酸盐缓冲盐水中。然后, UVA 治疗仪采用 LK20W/09 管(发射光谱 320~400 nm); 采用 Sigma-Aldrich 法照射细胞 3 次, 剂量为 $10 \text{ jcm}^{-2}/\text{天}$, 连续 3 天。距离源管 300 毫米的距离用于校准能量产量。NHSF 在添加 $200 \mu\text{M}$ H_2O_2 的 DMEM 中培养 2 h (37°C , 5% CO_2)。细胞用无血清培养基洗涤两次后, 在 DMEM 中培养 4 天。

2.1.2. CPE 的慢病毒转染

293T 细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种于 6 孔板。pGL4.1-CPE 载体 2 ml, pGL4.1 空载体, CPE-shRNA (shRNA#1: F: CCGGCTCCAGGCTATCTGGCAATAACTCGAGTTATTGCCAGATAGCCTGGAGTTTTTG, R: AATTCAAAAACCTCCAGGCTATCTGGCAATAACTCGAGTTATTGCCAGATAGCCTGGAG or shRNA#2: F: CCGGATGCAATATTCCTGGTATTATCTCGAGATAATACCAGGAATATTGCATTTTTG, R: AATTCAAAAATGCAATATTCCTGGTATTATCTCGAGATAATACCAGGAATATTGCAT)。

将 control-shRNA (终浓度均为 20 nM, GeneChem Company, China)加入 293T 细胞中, 构建 CPE-shRNA 慢病毒。48 h 后, 离心收集上清, 继续感染 NHSF 2 天。用 $400 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ puromycin 筛选 NHSF 2 周, 获得 CPE 稳定敲除的细胞株。

2.2. 定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)

TRIzol 试剂(Ambion, USA)提取总 RNA。使用 RevertAid™ 第一链 cDNA 合成试剂盒(加拿大 Fermentas 公司)将 RNA 反向转化为 cDNA, 并使用 Real-Time PCR Assay Kit (Thermo Scientific 公司, 美国)和 CFX96 Touch 实时系统(Bio-Rad 公司, 美国)进行定量。以 GAPDH 作为内参对照基因, 检测 IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 和 TGF- β 的基因表达(引物列表见表 1)。

Table 1. The primers were sequenced by Real-Time PCR

表 1. 引物序列采用 Real-Time PCR

基因名称	正向引物	反向引物
IL-1	TGGTAGTAGCAACCAACGGGA	ACTTTGATTGAGGGCGTCATTC
IL-6	GGCCCTTGCTTTCTCTTCG	ATAATAAAGTTTTGATTATGT
IL-8	TTTTGCCAAGGAGTGCTAAAGA	AACCTCTGCACCCAGTTTTTC
TNF- α	CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG	ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC
TGF- β	CTAATGGTGGAAACCCACAACG	TATCGCCAGGAATTGTTGCTG
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

2.3. 免疫印迹

蛋白质印迹处理过的细胞在含有 1%蛋白酶抑制剂鸡尾酒(Sigma-Aldric, USA)的 RIPA 裂解缓冲液(Beyotime, 中国)中于 4℃裂解 30 min。用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离总蛋白, 并转移到 PVDF 膜(Millipore, MA, USA)上。PVDF 膜用补充有 5%脱脂牛奶的 TBST 溶液封闭, 然后与 Anti-p53 抗体、Anti-p21 抗体(Abcam, Cam, UK)、Anti-p16 抗体(SAB, USA)过夜培养-CPE 抗体(Invitrogen, USA), 抗-GAPDH 抗体(Invitrogen, USA)。然后将膜与第二抗体(Cell Signaling Technology, USA)孵育。利用 Image J 软件查看和分析蛋白质印迹图像。

2.4. 衰老 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)

具体方法参照 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)说明书。显微镜拍照, 重复 3 次以上实验。

2.5. CCK-8 检测细胞增殖能力

具体方法参照 CCK-8 试剂盒(Invitrogen, USA)说明书。按试剂盒说明书测得各孔吸光度值并计算细胞活性, 重复 3 次以上实验。

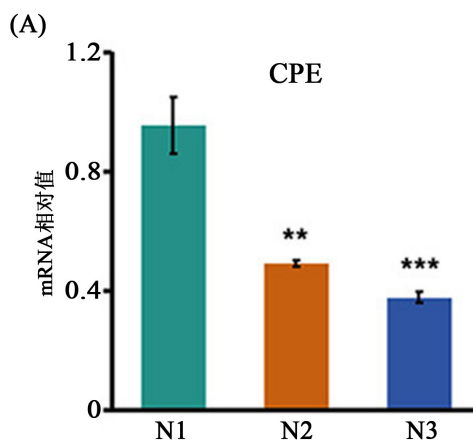
2.6. 数据统计

使用 wilcox.test 对细胞转录组数据进行差异表达分析。体外实验采用 graphpad prism version 8.0.0 进行统计分析。所有数据显示为三个独立实验的平均值 \pm SEM。两组间比较采用 Student's t-test 检验, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义的水平。

3. 结果

3.1. CPE 的表达

为验证 CPE 的表达与衰老的相关性, 我们检测了年轻、中等和衰老 NHSFs 中 CPE 的表达水平。图 1(A)显示衰老 NHSFs 中 CPE 的 mRNA 水平显著降低。随后, 我们通过 UVA 照射和过氧化氢刺激建立了细胞衰老模型。结果显示, 与对照组相比, UVA 照射和过氧化氢诱导的 NHSFs 中 CPE 的 mRNA 水平显著降低(图 1(B), 图 1(C))。结果表明, CPE 在年轻代 NHSFs 表达高, 提示 CPE 是一个潜在是衰老标志物。



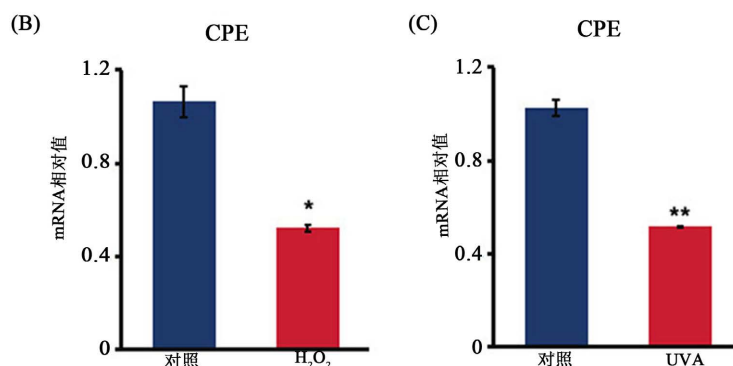


Figure 1. Expression levels of CPE mRNA in different passage cells (A), H₂O₂ (B) and UVA (C). Control group vs Experimental group, * $p < 0.05$, $0.01 < **p < 0.05$, *** $p < 0.01$

图 1. CPE mRNA 在不同传代细胞(A)、H₂O₂ (B)和 UVA (C)处理下的表达水平。对照组 vs 实验组, * $p < 0.05$, $0.01 < **p < 0.05$, *** $p < 0.01$

3.2. CPE 敲低与 NHSFs 衰老的相关性

为了评估 CPE 敲低对 NHSFs 的影响, 我们通过 shRNA 建立了 CPE 敲低模型。如图 2(A)和图 2(B)所示, 我们通过 qRT-PCR 和 western blotting 检测 CPE 敲低效率的质量。结果表明, CPE 敲低模型构建成功。然后, 我们检测 NHSFs 的增殖和 SA- β -gal 染色。与对照组细胞系相比, CPE 敲低细胞系的细胞活性显著降低(图 2(C)), 而 CPE 敲低细胞系的 SA- β -gal 细胞活性显著升高(图 2(D))。

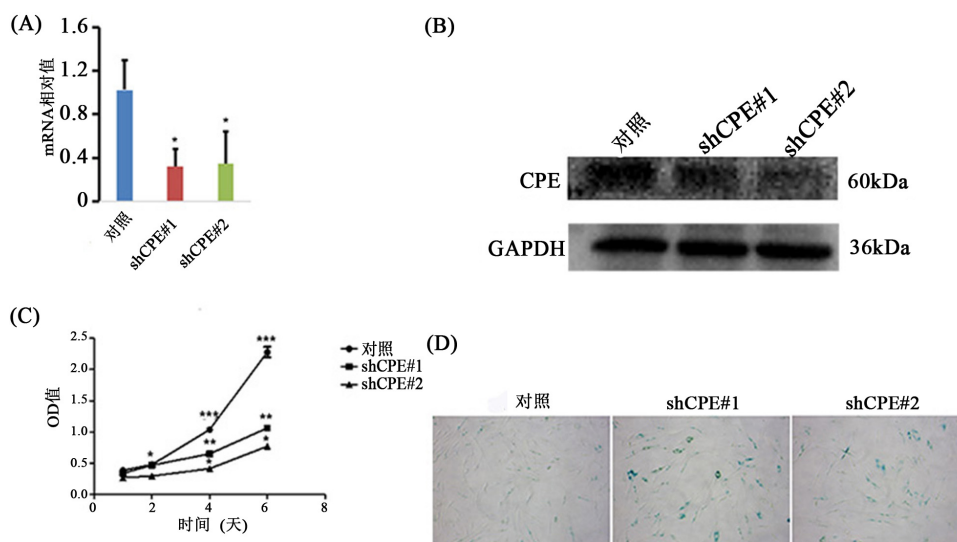


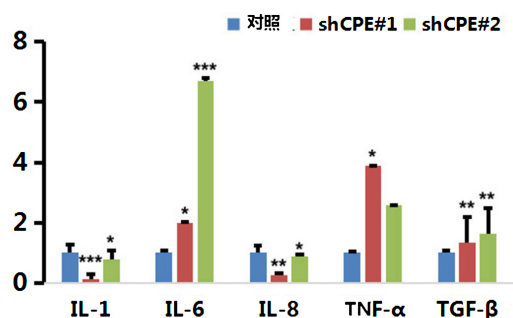
Figure 2. Senescence of NHSFs induced by CPE silencing. mRNA expression level (A) and protein level (B) of CPE gene knockout in NHSFs; CCK-8 assay revealed the effect of silenced CPE on cell proliferation (C); SA- β -gal staining (D). Control group vs Experimental group, * $p < 0.05$, $0.01 < **p < 0.05$, *** $p < 0.01$

图 2. CPE 沉默诱导 NHSFs 的衰老。NHSFs 中敲除 CPE 基因中 CPE 的 mRNA 表达水平(A)和蛋白水平(B); CCK-8 测定揭示了沉默的 CPE 对细胞增殖的影响(C); SA- β -gal 染色(D)。对照组 vs 实验组, * $p < 0.05$, $0.01 < **p < 0.05$, *** $p < 0.01$

3.3. CPE 敲低与炎症的相关性

此外, 我们采用 qRT-PCR 方法检测炎症因子 mRNA (IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 和 TGF- β)的表达。结果显示, 在 CPE 敲低组中, 这些炎症相关基因的表达均增加(图 3)。提示 CPE 基因敲低可引起细胞衰

老和炎症反应。



4. 结论与展望

本研究在敲降 CPE 分子后利用 WB、qRT-PCR、衰老 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal), CCK8 等实验测定细胞衰老程度,结果表明,敲降 CPE 分子后,NHSF 细胞炎症因子 IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 和 TGF- β mRNA 表达程度发生改变,细胞衰老程度加深,细胞活性减弱,由此我们得出结论,CPE 分子作为潜在的细胞衰老标志物可以抑制细胞的衰老。但本实验只局限于验证了 CPE 分子对于细胞衰老的作用,后期我们将开展细胞生物学,分子生物学,生物信息学,基因组学等方面的研究,更加系统地深入探究 CPE 分子的抗衰老及相关疾病治疗的分子机制。为 CPE 分子的开发提供科学的理论帮助。

基金项目

2023 年度湖南省大学生创新训练计划(4350); 2024 年度湖南省大学生创新训练计划(5921)湖南省教育厅自然科学基金项目(23A0727)湖南省自然科学基金区域联合基金项目(2024JJ7337)。

参考文献

- [1] Yang, J.J., Zhao, S.L., Zhang, X., et al. (2023) *Polygonatum kingianum* Saponins Delay Cellular Senescence through SASP Down-Regulation and Prolong the Healthy Lifespan of *Caenorhabditis elegans* by Activating sir-2.1/Autophagy. *Industrial Crops & Products*, **201**, Article ID: 116903. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116903>
- [2] Liang, C. Carrel, D., Omelchenko, A., et al. (2019) Cortical Neuron Migration and Dendrite Morphology Are Regulated by Carboxypeptidase E. *Cerebral Cortex*, **29**, 2890-2903. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy155>
- [3] Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., et al. (2019) Ageing as a Risk Factor for Neurodegenerative Disease. *Nature Reviews Neurology*, **15**, 565-581. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>
- [4] Cheng, Y., Cawley, N.X., Yanik, T., et al. (2016) A Human Carboxypeptidase E/NF- α 1 Gene Mutation in an Alzheimer's Disease Patient Leads to Dementia and Depression in Mice. *Translational Psychiatry*, **6**, e973. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.237>
- [5] Xiao, L., Sharma, V., Toulabi, L., et al. (2020) SUN-260 Dual Role of Carboxypeptidase E in Prohormone Processing and a Novel Neurotrophic Factor Mediating Neuroprotection and Cognitive Functions in Hippocampal CA3 Neurons in Mice. *Journal of the Endocrine Society*, **4**, Sun-260. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvaa046.100>