

# 鼠源 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 真核表达质粒的构建及其部分功能研究

姚燕<sup>1</sup>,王淑贤<sup>1</sup>,吴银翠<sup>1</sup>,胡爽<sup>1</sup>,胡颖<sup>1</sup>,潘林鑫<sup>2</sup>,徐涛<sup>1</sup>

**摘要** 目的 构建鼠源 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 真核表达质粒,并观察其对脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 细胞中炎症相关因子分泌的影响及对 RAW264.7 细胞增殖和凋亡的影响。方法 通过 PCR 扩增 NUP85 基因,构建 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 真核表达质粒。将 pcDNA3.1-3 × Flag-c 载体进行酶切。纯化的 PCR 产物与载体连接,将连接产物转化细菌感受态细胞。酶切鉴定后,再进行测序和比对分析。然后将其转染至 RAW264.7 细胞中,通过 CCK-8 实验和流式细胞术检测其对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞增殖和凋亡的影响,并通过 Western blot 技术和 ELISA 法检测 RAW264.7 细胞中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)的表达情况。结果 酶切鉴定和 Western blot 结果显示 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 真核表达质粒成功构建和表达。CCK-8 实验结果显示:24 h 后过表达 NUP85 组细胞的存活率显著低于对照组[(0.55 ± 0.03) vs (0.67 ± 0.05)],  $F = 30.98, P < 0.05$ 。流式细胞术结果显示:过表达 NUP85 组细胞的凋亡率高于对照组[(15.78 ± 1.05)% vs (13.40 ± 0.47)%],  $F = 75.38, P < 0.05$ 。Western blot 和 ELISA 结果显示:转染 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 质粒后,RAW264.7 细胞中的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达较对照组升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 NUP85 能够抑制 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞的增殖并促进其凋亡,并且 NUP85 促进 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达。**关键词** NUP85; RAW264.7 细胞;增殖;凋亡;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;白细胞介素-6

**中图分类号** R 364.5

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0794-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.015

核孔蛋白 85(Nucleoporin 85, NUP85)是核孔复合体(Nuclear pore complex, NPC)中 NUP107 ~ 160

亚复合体(同义 Y 复合体)的 9 个成员之一<sup>[1]</sup>。NPC 是指镶嵌在核孔上的一种复杂结构,主要调节大分子跨核膜的运输。单个核孔蛋白具有基因表达调控、DNA 修复、调控细胞凋亡等作用<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>表明,NUP85 可与巨噬细胞上表达的 C-C-趋化因子受体(C-C-chemokine receptor 2, CCR)2 和 CCR5 相互作用,促进趋化信号传导。此外,NUP85 还可以通过调节肿瘤相关巨噬细胞调节肿瘤进展,并对炎症具有一定作用<sup>[4]</sup>,但具体调控作用及机制尚不清楚。而炎症是肿瘤进展的关键因素,对调节免疫细胞进出肿瘤微环境具有重要作用。肿瘤细胞产生各种细胞因子和趋化因子,吸引白细胞,包括肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等<sup>[4]</sup>。为进一步研究 NUP85 的功能,该研究通过构建 NUP85 的真核质粒,首次探讨 NUP85 在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 RAW264.7 细胞中对炎症因子(TNF- $\alpha$ 、IL-6)的表达及其对细胞增殖和凋亡的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** RAW264.7 细胞株(安徽医科大学药学院保存);DMEM 培养基(美国 Thermo Scientific 公司);NUP85 抗体(美国 Santacruz 公司);IL-6 抗体(沈阳万类生物科技有限公司);TNF- $\alpha$  抗体(南京巴傲得生物科技有限公司);ECL 化学发光试剂盒(苏州新赛美生物科技有限公司);Lipofectamine 2000 和 Trizol(美国 Invitrogen 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);PVDF 膜(北京索莱宝科技有限公司);Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博生物有限公司);质粒抽提试剂盒、BamH I、XhoI 内切酶(美国 Axygen 公司);脱脂奶粉(内蒙古伊利实业集团股份有限公司);细胞培养瓶、细胞培养板(无锡耐思生命科技股份有限公司);山羊抗鼠 IgG/辣根酶标记、山羊抗兔 IgG/辣根酶标记(北京中杉金桥生物技术有限公司);ELISA(IL-6、TNF- $\alpha$ )试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司)。

## 1.2 方法

2022-11-23 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1808085MH235、2208085MH203)

作者单位:安徽医科大学<sup>1</sup>药学院、<sup>2</sup>生命科学学院,合肥 230032

作者简介:姚燕,女,硕士研究生;

潘林鑫,男,助理实验员,责任作者, E-mail: panlinxin@126.com;

徐涛,男,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: xutao@ahmu.edu.cn

**1.2.1 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 质粒的构建** 通过 PCR 扩增 NUP85 基因, 构建 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 真核表达质粒。酶切鉴定无误后, 由上海吉玛制药技术有限公司进行测序鉴定。

**1.2.2 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 质粒的转染与实验分组** 将细胞按  $1 \times 10^6$  个/孔的密度均匀种入 6 孔板内继续培养。将 A 液 (250  $\mu$ l 的 Opti-MEM 及 2  $\mu$ g pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 质粒) 与 B 液 (250  $\mu$ l 的 Opti-MEM 及 5  $\mu$ l Lipofectamine 2000 脂质体) 分别置于 1.5 ml 无酶 EP 管中静置 5 min 后, 将 A 液和 B 液混匀, 静置 20 min 后, 将其置于 6 孔板中再补齐 Opti-MEM 培养基至 2 ml。6 h 后换液, 培养 24 h 后进行后续实验。

实验分为正常组: 未进行任何处理; LPS 组: 加 100 ng/ml LPS 刺激; 对照组 (LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c 组): 转染空载体质粒并加 100 ng/ml LPS 刺激; NUP85 过表达组 (LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 组): 转染 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 质粒并加 100 ng/ml LPS 刺激。

**1.2.3 Western blot 实验** 弃去 6 孔板中的培养基, PBS 洗 3 遍, 在蛋白裂解液 (RIPA 裂解液: PMSF = 100 : 1) 中裂解细胞, 提出总蛋白。用 BCA 蛋白质检测试剂盒检测蛋白质浓度。取等量的蛋白加入上样孔, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。在恒流 200 mA 条件下湿转 60 min, 使蛋白转至 PVDF 膜上, 在脱脂奶粉 (50 g/L) 中封闭 2 h 后, 用 TBST 缓冲液清洗, 并在相应的一级抗体中孵育 12 h, 一抗稀释度分别为 NUP85 (1 : 500), TNF- $\alpha$  (1 : 1 000), IL-6 (1 : 1 000)。TBST 洗 3 遍后, 室温孵育二抗 1 h, TBST 清洗后用 ECL 化学发光试剂盒进行显影并拍照。

**1.2.4 CCK-8 实验** 将 RAW264.7 细胞按 5 000 个/孔的密度接种到 96 孔板中, 每组设 6 个复孔, 再向每孔转染约 70 ng pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 质粒, 6 h 后更换为含 100 ng/ml LPS 的培养基, 再培养 24 h 后每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 溶液, 正常培养 2 h, 在避光条件下检测每孔在 450 nm 处的吸光度, 计算细胞存活率。

**1.2.5 流式细胞术** 将 RAW264.7 细胞按  $1 \times 10^6$  个/孔的密度均匀种入 6 孔板内, 转染 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 质粒, 6 h 后更换为含有 100 ng/ml LPS 的培养基, 继续培养 24 h。然后用 PBS 清洗 3 遍, 收集所有细胞于 15 ml 离心管中, 用 400  $\mu$ l Annexin V 结合液重悬细胞, 再加入 5  $\mu$ l FITC 避光孵育 10 ~ 15 min, 再加入 10  $\mu$ l PI, 避光孵育 5 min 后,

使用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 并记录。

**1.2.6 ELISA 检测炎症因子的分泌** 将 RAW264.7 细胞按  $1 \times 10^6$  个/孔的密度均匀种入 6 孔板内, 转染对照组空载体质粒和 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 质粒, 6 h 后更换为含有 100 ng/ml LPS 的培养基, 继续培养 24 h。24 h 后收集细胞上清液, 使用 ELISA 方法检测细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的分泌情况, 步骤完全按照 ELISA (TNF- $\alpha$ 、IL-6) 检测试剂盒说明书进行。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析, 实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两独立样本均数比较采用 *t* 检验, 采用 One-way ANOVA 检验进行多组比较,  $P < 0.05$  示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 真核表达质粒的构建** 通过 PCR 方法扩增目的基因, 利用 Bam H I、Xho I 双酶切扩增产物和 pcDNA3.1-3 × Flag-c 载体, 并用 T4 DNA 连接酶连接两产物, 将连接产物转化细菌感受态细胞, 用抽提试剂盒提取质粒。酶切鉴定结果显示: pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 质粒成功构建, 即阳性克隆显示在目的条带大小对应的区域有酶切得到的条带对应的克隆, 如图 1 所示。将阳性克隆送至上海吉玛制药技术有限公司进行测序

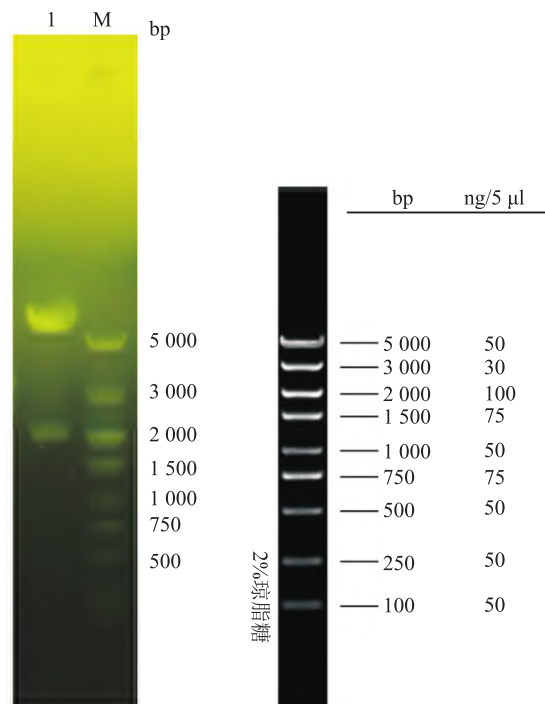


图1 重组质粒 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 的酶切鉴定  
1: pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 的酶切鉴定; M: DNA Marker

鉴定。

**2.2 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 真核表达质粒的表达** 用 Western blot 技术检测将 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 质粒转染至 RAW264.7 细胞后的 NUP85 蛋白表达情况。结果显示:LPS 组的 NUP85 的蛋白表达量高于正常组 ( $t = 7.650, P < 0.01$ );过表达组的 NUP85 的蛋白表达量高于转染空载体的对照组 ( $t = 10.28, P < 0.01$ ),表明 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 质粒成功表达,见图 2。

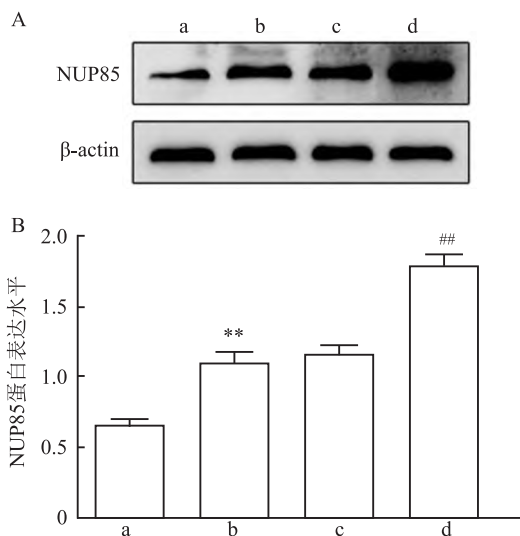


图2 重组质粒 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 的蛋白表达

A: Western blot 检测质粒 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 的蛋白表达;B: NUP85 蛋白表达柱状图;a: 正常组;b: LPS 组;c: LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c 组;d: LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 组;与正常组比较:\*\*  $P < 0.01$ ;与 LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c 组比较:##  $P < 0.01$

**2.3 NUP85 对 RAW264.7 细胞增殖的影响** 将 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 质粒转染至 RAW264.7 细胞中,用 CCK-8 法检测细胞的增殖情况。结果显示:24 h 后 LPS 组和转染空载体对照组的细胞存活率分别为 ( $0.74 \pm 0.08$ ) 和 ( $0.67 \pm 0.05$ ),过表达 NUP85 组的细胞存活率为 ( $0.55 \pm 0.03$ ),低于 LPS 组和转染空载体对照组的细胞存活率 ( $F = 30.98, P < 0.05$ ),表明在 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中,过表达 NUP85 能够抑制细胞的增殖,见图 3。

**2.4 NUP85 对 RAW264.7 细胞凋亡的影响** 用细胞凋亡检测试剂盒和流式仪检测将 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 过表达质粒转染至 RAW264.7 细胞 24 h 后的细胞凋亡率。结果显示:24 h 后正常组的细胞凋亡率为 ( $6.74 \pm 0.46$ )%,LPS 组及转染空载体对照组的细胞凋亡率分别为 ( $13.13 \pm 0.21$ )%

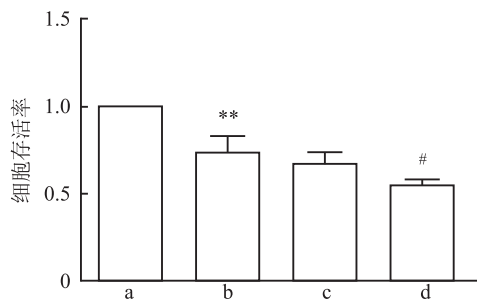


图3 CCK-8 检测细胞增殖

a: 正常组;b: LPS 组;c: LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c 组;d: LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 组;与正常组比较:\*\*  $P < 0.01$ ;与 LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c 组比较:#  $P < 0.05$

和 ( $13.40 \pm 0.47$ )%,而 NUP85 过表达组的细胞凋亡率为 ( $15.78 \pm 1.05$ )%,高于对照组 ( $F = 75.38, P < 0.05$ ),表明在 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中,过表达 NUP85 能够促进细胞的凋亡,见图 4。

**2.5 NUP85 在 RAW264.7 细胞中对炎症因子表达的影响** 用 Western blot 技术检测将 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 质粒转染至 RAW264.7 细胞后的 IL-6 和 TNF- $\alpha$  蛋白表达情况。结果显示:过表达组中的 TNF- $\alpha$  表达较转染空载体对照组升高 ( $F = 174.4, P < 0.01$ );IL-6 的表达较转染空载体对照组升高 ( $F = 105.3, P < 0.01$ ),表明在 RAW264.7 细胞中,过表达 NUP85 促进炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达,见图 5。

**2.6 NUP85 在 RAW264.7 细胞中对炎症因子分泌的影响** 使用 ELISA 方法检测将 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 质粒转染至 RAW264.7 细胞后的 IL-6 和 TNF- $\alpha$  蛋白分泌情况。结果显示:过表达 NUP85 组中的 TNF- $\alpha$  表达较转染空载体对照组升高 ( $F = 479.8, P < 0.001$ );IL-6 的表达较转染空载体对照组升高 ( $F = 216.5, P < 0.001$ ),表明在 RAW264.7 细胞中,过表达 NUP85 促进炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌,见图 6。

### 3 讨论

NUP85 作为 NUP107 ~ 160 复合体的一部分,构成了 NPC 的外环,参与 NPC 的组装和维护<sup>[5]</sup>。NUP85 是一种细胞质蛋白,在巨噬细胞中高度表达,参与炎症,并通过调节肿瘤相关巨噬细胞影响肿瘤进展<sup>[3]</sup>。而炎症是肿瘤的基础过程,缓解炎症反应对肿瘤的治疗十分重要。巨噬细胞通过清除细胞碎片、缓解炎症,在炎症和肿瘤中发挥关键作



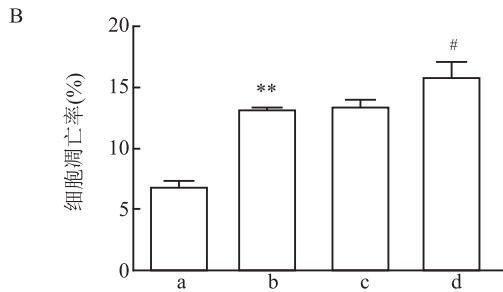
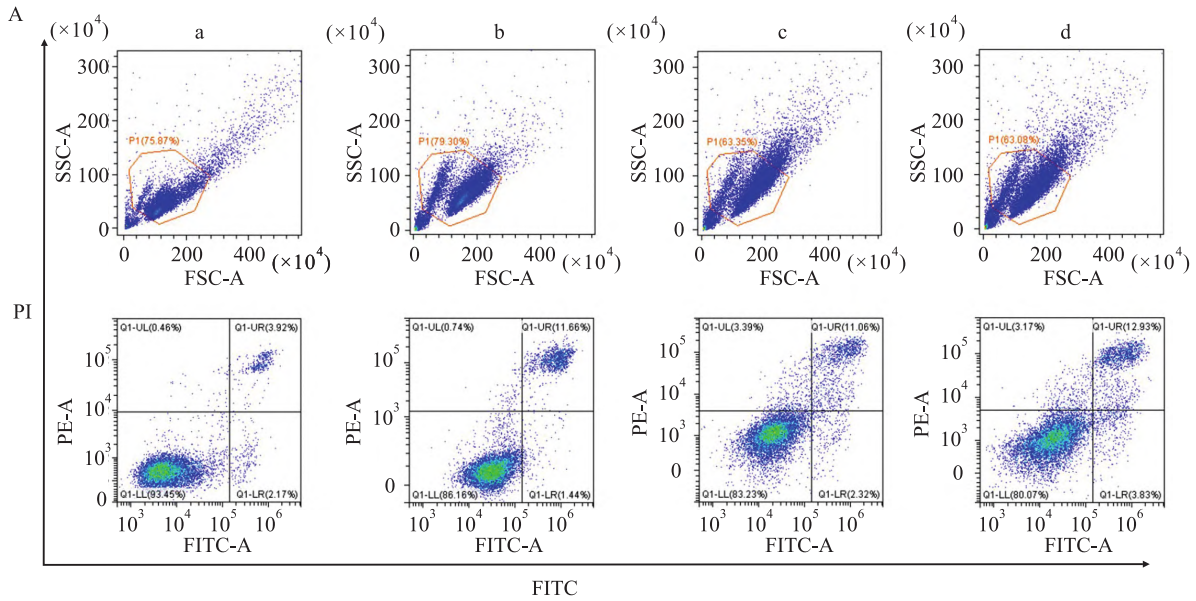


图4 重组质粒 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 对 RAW264.7 细胞凋亡的影响

A: 各组流式细胞术检测结果; B: 细胞凋亡率; a: 正常组; b: LPS 组; c: LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 组; d: LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 组 + pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 组; 与正常组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 组比较: #  $P < 0.05$

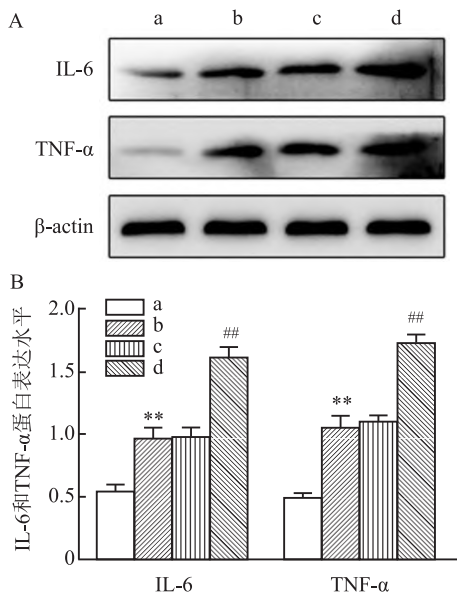


图5 重组质粒 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 转染后 Western blot 检测炎症因子 IL-6 和 TNF-α 的表达

A: Western blot 检测 IL-6 和 TNF-α 的蛋白表达; B: IL-6 和 TNF-α 蛋白表达柱状图; a: 正常组; b: LPS 组; c: LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 组; d: LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 组 + pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 组; 与正常组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 组比较: ##  $P < 0.01$

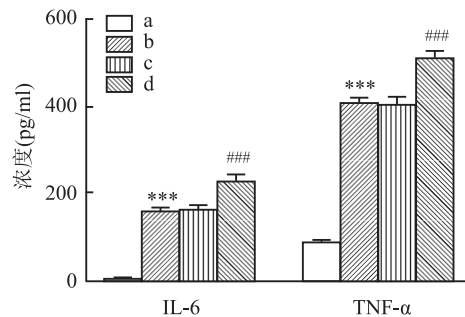


图6 重组质粒 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 转染后 ELISA 检测炎症因子 IL-6 和 TNF-α 的分泌

a: 正常组; b: LPS 组; c: LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 组; d: LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 组 + pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 组; 与正常组比较: \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 LPS + pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 组比较: ###  $P < 0.001$

用<sup>[6]</sup>。作为人体内最重要的吞噬细胞之一, RAW264.7 细胞负责摄取和消化许多微生物和组织中衰老、死亡和受损的细胞,还可以释放一系列炎症介质,例如 TNF-α、IL-6 等<sup>[7]</sup>。这些炎症因子表达水平的变化在炎症反应中起着重要作用,抑制这些炎症因子的分泌有助于炎症的治疗。在体外实验中,常选用 LPS 诱导 RAW264.7 细胞作为炎症细胞模

型<sup>[6]</sup>。因此,本研究在用 LPS 诱导 RAW264.7 细胞后,探讨 NUP85 对炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达的影响。此外,细胞凋亡是细胞程序性死亡的一种形式,细胞内信号或外源信号均可触发凋亡,细胞凋亡的改变与肿瘤的发生和发展有关<sup>[8]</sup>。而 NUP85 是否对 RAW264.7 细胞凋亡产生作用,国内外尚未有文献报道。因此,本实验也研究了 NUP85 对 RAW264.7 细胞凋亡的影响。虽然 NUP85 在人类细胞中的确切分子功能仍不清楚,但已知其能与趋化因子受体 CCR2 和 CCR5 结合调节趋化信号传导,在一些动物模型中,CCR2 和 CCR5 的阻断已被证明可以抑制肿瘤的进展,这使得 NUP85 成为一个有吸引力的治疗靶点<sup>[9]</sup>。因此,本研究通过构建鼠源 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 过表达质粒,初步了解 NUP85 的功能。酶切鉴定显示质粒成功构建,并将质粒转染至 RAW264.7 细胞,Western blot 结果进一步证明质粒成功表达。CCK-8 结果显示 NUP85 过表达后能够抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的增殖。另流式细胞术检测 NUP85 对 RAW264.7 细胞凋亡的调节作用,结果显示,NUP85 过表达后能够促进 RAW264.7 细胞的凋亡。此外,通过向 RAW264.7 细胞转染 pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 质粒建立 NUP85 过表达模型,研究 NUP85 对炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  分泌的调节作用。Western blot 结果显示,过表达 NUP85 后,IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达水平上调,ELISA 结果进一步表明过表达 NUP85 能够促进炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的分泌。这些实验结果表明 NUP85 能够抑制 RAW264.7 细胞的增殖并促进其凋亡,并能促进炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌。这为今后炎症相关疾病的治疗打下了坚实的基础。另有研究<sup>[10]</sup>表明,mTOR 信号通路在炎症性疾病中对炎症具有调节作用,并能抑制部分白细胞介素炎症因子的产生<sup>[11]</sup>。基于以上文献和相关实验结果,猜测 NUP85 可能通过 mTOR 信号通路影响

炎症因子的分泌。然而,NUP85 与凋亡和炎症之间的具体作用机制有待进一步研究。接下来课题组将对 NUP85 在动物模型和临床样本中的潜在应用进行深入研究。

### 参考文献

- [1] Beck M, Hurt E. The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(2):73-89.
- [2] Burdine R D, Preston C C, Leonard R J, et al. Nucleoporins in cardiovascular disease[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 141:43-52.
- [3] Terashima Y, Toda E, Itakura M, et al. Targeting front with disulfiram suppresses macrophage accumulation and its tumor-promoting properties[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):609.
- [4] 李良云,潘林鑫,杨俊发,等.鼠源 pEGFP-C1-TMEM88 真核表达质粒的构建及其功能研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(12):1865-70.
- [5] Rodriguez-Bravo V, Pippa R, Song W M, et al. Nuclear pores promote lethal prostate cancer by increasing pom121-driven e2f1, myc, and ar nuclear import[J]. *Cell*, 2018, 174(5):1200-15.
- [6] 张一凡,刘萍.丹酚酸 B 通过 STAT3/NF- $\kappa$ B 信号通路改善动脉粥样硬化小鼠及 RAW264.7 细胞炎症反应[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(1):141-7.
- [7] Zhang T, Guo J, Gu J, et al. Protective role of mtor in liver ischemia/reperfusion injury: involvement of inflammation and autophagy[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:7861290.
- [8] Ucker D S, Levine J S. Exploitation of apoptotic regulation in cancer[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:241.
- [9] Li B H, Garstka M A, Li Z F. Chemokines and their receptors promoting the recruitment of myeloid-derived suppressor cells into the tumor[J]. *Mol Immunol*, 2020, 117:201-15.
- [10] Zhou M, Xu W, Wang J, et al. Boosting mtor-dependent autophagy via upstream thr4-myd88-mapk signalling and downstream nf- $\kappa$ b pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury[J]. *Ebio Medicine*, 2018, 35:345-60.
- [11] Li W, Wu Y, Zhao Y, et al. Mtor suppresses autophagy-mediated production of il25 in allergic airway inflammation[J]. *Thorax*, 2020, 75(12):1047-57.

## Construction of eukaryotic expression of mouse derived pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 plasmid and its partial function research

Yao Yan<sup>1</sup>, Wang Shuxian<sup>1</sup>, Wu Yincui<sup>1</sup>, Hu Shuang<sup>1</sup>, Hu Ying<sup>1</sup>, Pan Linxin<sup>2</sup>, Xu Tao<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>School of Pharmacy, <sup>2</sup>School of Life Science, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To construct a mouse derived pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 expression plasmid and observe

## eIF2B1 在肝细胞癌中的表达及意义

齐文月<sup>1</sup>, 周大臣<sup>2</sup>, 张振华<sup>1</sup>, 夏国美<sup>1</sup>, 陈伟<sup>2</sup>, 邹桂舟<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探究真核细胞翻译起始因子 2B1 (eIF2B1) 在肝细胞癌 (HCC) 中的表达与其临床预后的相关性。方法 通过对标本库中 743 例 HCC 患者的临床数据进行随访, 筛选出 91 例具有完整随访信息的与乙型肝炎病毒 (HBV) 相关的 HCC 患者, 选择其术后肿瘤组织, 同时留取距肿物边缘 > 2 cm 的癌旁组织, 制作为组织芯片, 进行 Western blot 和免疫组化实验, 使用 Image J 分析组织芯片染色的阳性细胞比例及 Western blot 结果的灰度值, 通过 R4.0.5 软件对纳入患者的临床数据和随访数据进行统计学分析。结果 免疫组化结果提示相对于癌旁组织中的表达, eIF2B1 在肿瘤组织中的表达效果更强。Western blot 结果显示, 与 HepG2 细胞比较, eIF2B1 在 HepG2.2.15 细胞中表达更强, HCC 组织中 eIF2B1 的表达与肿瘤数目相关 ( $P < 0.05$ )。Cox 多因素回归

分析结果显示, eIF2B1 的表达是 HBV-DNA 阳性患者总体临床预后的独立危险因素 ( $HR = 4.28, P = 0.018$ )。结论 在 HBV 相关的 HCC 组织中, eIF2B1 的表达显著增强且与 HBV DNA 阳性的患者的整体生存显著相关。

**关键词** 肝细胞癌; 乙型肝炎病毒; eIF2B1; eIF2 $\alpha$ ; 蛋白质翻译; 预后

**中图分类号** R 735.7

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0799-07  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.016

原发性肝癌是全球第六大癌症, 居全世界癌症相关病死率的第三位<sup>[1]</sup>。在我国, 肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的肝癌类型, 占总病例的 85% ~ 90%<sup>[2]</sup>。肝癌由于其起病隐匿, 早期易漏诊, 大多数患者确诊时已处于疾病的中晚阶段, 预后不佳, 发现并研究新的分子靶点, 是当前 HCC 的研究热点内容之一。近年来的研究<sup>[3]</sup>发现, 蛋白质翻译的调控在肿瘤的发生发展过程中发挥着重要的作用, 但是在 HCC 中, 目前还缺少足够的研

2023-01-04 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1608085MH162)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院<sup>1</sup> 肝病科、<sup>2</sup> 肝胆外科, 合肥 230601

作者简介: 齐文月, 女, 硕士研究生;

邹桂舟, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ayzou-guizhou@sina.com

its effect on expression of inflammation factors in LPS-induced RAW264.7 cells, as well as on the proliferation and apoptosis of RAW264.7 cells. **Methods** The NUP85 gene was amplified by PCR to construct pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 eukaryotic expression plasmid. The pcDNA3.1-3 × Flag-c vector was divided with enzymes. The purified PCR product was ligated with the vector, and the ligated product was transformed into bacterial competent cells. After identification by enzyme digestion, sequencing and analysis were performed. Then, it was transfected into RAW264.7 cells, and the blank plasmid without NUP85 gene was set as the control group. The effect on cell proliferation and apoptosis were detected by CCK-8 assay and flow cytometry, and the expression of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in LPS-induced RAW264.7 cells was detected by Western blot and ELISA. **Results** Enzyme digestion identification and Western blot results showed that pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85 eukaryotic expression plasmid was successfully constructed and expressed. The results of CCK-8 assay showed that the cell survival rate of NUP85 overexpression group was significantly lower than that of control group after 24 h [ (0.55 ± 0.03) vs (0.67 ± 0.05),  $F = 30.98, P < 0.05$  ]. The results of flow cytometry showed that the cell apoptosis rate of NUP85 overexpression group was higher than that of control group [ (15.78 ± 1.05)% vs (13.40 ± 0.47)% ,  $F = 75.38, P < 0.05$  ]. The results of Western blot and ELISA showed that after transfection of pcDNA3.1-3 × Flag-c-NUP85, the expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in RAW264.7 cells were higher than those in the control group, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** NUP85 can inhibit the proliferation and promote apoptosis in LPS-stimulated RAW264.7 cells, and NUP85 can promote the expression of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

**Key words** NUP85; RAW264.7 cells; proliferation; apoptosis; TNF- $\alpha$ ; IL-6