

PML2过表达促进*Zmpste24*^{-/-}早衰小鼠 胚胎成纤维细胞衰老

王明 刘宝华*

(深圳大学医学部基础医学院, 深圳市系统衰老与主动健康重点实验室, 深圳 518055)

摘要 该研究以*Zmpste24*基因缺陷早衰小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)为模型, 探索细胞核内亚结构PML NBs(promyelocytic leukemia nuclear bodies)与细胞衰老之间的关联。在*Zmpste24*野生型(+/+)和缺陷型(-/-) MEF细胞中过表达GFP-PML1和GFP-PML2及对照GFP, 通过传代计数监测细胞增殖, β -gal染色检测细胞衰老, 免疫荧光观察PML NBs结构形态、增殖标志物Ki-67和DNA损伤应答信号 γ H2AX。结果显示, 过表达PML2而非PML1显著抑制*Zmpste24*^{+/+}和*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞的增殖, 降低Ki-67阳性细胞比例, 削弱DNA损伤修复能力, 加速细胞衰老。而且, 过表达PML2促进*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞衰老的效应比在*Zmpste24*^{+/+}细胞中更为显著。此外, 对比*Zmpste24*^{+/+}, 在*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞中过表达PML2可诱导更高比例的细胞产生线性PML NBs结构, 且实验证明这种异常结构与细胞衰老紧密关联。

关键词 PML2; 线性 PML NBs; *Zmpste24*; 细胞衰老

PML2 Overexpression Promotes Cellular Senescence in *Zmpste24*^{-/-} MEFs

WANG Ming, LIU Baohua*

(Shenzhen Key Laboratory for Systemic Aging & Intervention, School of Basic Medical Science, Shenzhen University, Shenzhen 518055, China)

Abstract The paper explored the role of the promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML NBs) in the senescence of *Zmpste24*^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs). *Zmpste24*^{+/+} and *Zmpste24*^{-/-} MEFs overexpressing GFP, GFP-PML1 and GFP-PML2 were performed with replicative lifespan analysis, senescence-associated (SA)- β -gal staining, and the immunofluorescence detection of PML NBs morphology, proliferation marker Ki-67 and γ H2AX-labeled DNA damage foci. The results showed that PML2 overexpression notably inhibited cell proliferation and promoted cellular senescence in *Zmpste24*^{+/+} and *Zmpste24*^{-/-} MEFs, while PML1 had negligible impacts. The percentage of Ki-67-positive cells decreased, and DNA damage repair ability was compromised in PML2-expressing MEFs, and PML2 overexpression exerted more profound effects in inducing senescence of *Zmpste24*^{-/-} MEFs than that of *Zmpste24*^{+/+} MEFs. Moreover, PML2 overexpression induces the formation of thread-like PML NBs in a much higher percentage of *Zmpste24*^{-/-} MEFs rather than in *Zmpste24*^{+/+} MEFs, and these abnormal PML NBs are closely associated with cell senescence.

Keywords PML2; thread-like PML NBs; *Zmpste24*; cell senescence

收稿日期: 2020-02-13 接受日期: 2020-04-13

国家自然科学基金(批准号: 91849208、81972602、81702909)、国家重点研发计划(批准号: 2017YFA0503900)和深圳市科创委项目基金(批准号: ZD-SYS20190902093401689、KQJSCX20180328093403969、JCYJ20180507182044945)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0755-86674609, E-mail: ppliew@szu.edu.cn

Received: February 13, 2020 Accepted: April 13, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.91849208, 81972602, 81702909), the National Key R&D Program of China (Grant No.2017YFA0503900) and Shenzhen Municipal Commission of Science and Technology Innovation (Grant No.ZD-SYS20190902093401689, KQJSCX20180328093403969, JCYJ20180507182044945)

*Corresponding author. Tel: +86-755-86674609, E-mail: ppliew@szu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5264>

PML(promyelocytic leukemia)是因为染色体易位形成PML-RAR α 融合癌蛋白诱发急性早幼粒细胞白血病而得名^[1]。在哺乳动物细胞中, PML蛋白在细胞核内集聚形成圆点状的亚结构(PML nuclear bodies, PML NBs), 直径一般为0.2~1.0 μm ^[1]。在人类细胞中, PML基因由于选择性剪接产生定位于细胞核内的6种异构体, 这些异构体对PML NBs的形成、动态性以及功能有着不同的调控作用^[2-4]。研究报道, 多种蛋白能与PML作用或定位于PML NBs, 进而参与调控多种生物学功能, 如细胞衰老、节律、DNA损伤修复以及基因转录等^[5-7]。PML NBs一般均匀分布在细胞核内, 呈现为圆点状, 其数目和大小会在氧化应激、DNA损伤等应激条件下发生变化^[8], 但PML NBs形态结构的变化鲜有报道。

核纤层蛋白Lamin A是构成细胞核膜的主要成份之一, 参与维持细胞核骨架及染色体结构, 调节基因表达以及维护基因组稳定^[9]。人类有多种疾病发生与LMNA基因的突变有关, 如HGPS(Hutchinson-Gilford progeria syndrome)早衰症^[10-11]。ZMPSTE24是细胞内加工产生成熟Lamin A蛋白的关键酶, 其突变失活造成具有早衰表征的RD(Restrictive Dermopathy)疾病^[12]。研究表明, ZMPSTE24突变导致Prelamin A前体蛋白的积累是诱发早衰疾病的主要原因。Prelamin A的积累破坏细胞核膜的完整性, 进而影响了核骨架和染色体结构, 导致基因组不稳定以及基因表达紊乱, 最终诱发早衰^[13-14]。Zmpste24基因缺陷(Zmpste24^{-/-})小鼠表现出生长缓慢、骨质疏松等类似人类HGPS的早衰症状, 因而被广泛用于探讨早衰机制^[15-16]。然而, Zmpste24^{-/-}导致的早衰以及HGPS病人早衰的分子机制仍需更多研究。

Zmpste24^{-/-}小鼠胚胎成纤维细胞(Zmpste24^{-/-} mouse embryonic fibroblast, Zmpste24^{-/-} MEF)表观上最显著的特征是核骨架形态异常, 但细胞核内其他亚结构如PML NBs的变化以及这些亚结构在细胞衰老进程中的作用鲜有报道。我们利用Zmpste24^{-/-} MEF细胞, 过表达人源PML1和PML2异构体, 探讨PML NBs结构形态在细胞衰老中的作用, 为进一步阐明早衰的分子机理提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞培养试剂如DMEM、FBS、GlutaMax、

NEAA、penicillin/streptomycin等购于Hyclone公司; γ H2AX抗体购于Millipore公司; Actin抗体购于Sigma公司; PML和Ki-67抗体购于Abcam公司; GFP和Lamin A/C抗体购于Santa cruz公司; SA- β -gal细胞染色试剂盒购于Cell Signaling公司; HRP或荧光素标记的二抗购于Invitrogen公司。

1.2 MEF细胞的分离和培养

选择适龄的Zmpste24杂合子(Zmpste24^{+/-})小鼠配对合笼, 怀孕13.5天时, 在无菌条件下取出胚胎进行MEF细胞分离。MEF细胞培养于含有10% FBS、GlutaMax、NEAA、penicillin/streptomycin的DMEM培养基, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂的细胞培养箱中进行培养。每3天进行细胞传代, 细胞增殖倍数(population doubling, PD)按 $\log_2(A/B)$ 公式计算, A表示增殖后的细胞数, B表示接种的细胞数。

1.3 慢病毒包装及感染表达

将pLVX-GFP慢病毒载体或插入有PML1、PML2基因的质粒与包装质粒psPAX2和pMD2.G一起共转染293T细胞, 48 h后收集病毒, 用0.22 μm 滤膜过滤后分装, 存储于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。感染细胞时, 将病毒与加有8 mg/L polybrene的新鲜培养基按1:1的体积比混合, 加入MEF细胞中培养10 h后换液, 感染后24~36 h在显微镜下可见荧光蛋白表达。

1.4 Western blot检测蛋白表达

在裂解过表达GFP、GFP-PML1、GFP-PML2的MEF细胞后, 测定总蛋白量, 取等量的蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳(电压为150 V)。电泳结束后, 用湿转法将蛋白转移到被甲醇活化过的PVDF膜上, 电压100 V转膜1 h。而后用5%脱脂牛奶于室温封闭1 h, 一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 二抗室温孵育1 h。用ECL发光液进行化学发光以检测目的蛋白表达。

1.5 免疫荧光

细胞培养在铺有玻璃小圆片(coverlip)的24孔板中。用4%多聚甲醛固定3 min, PBS洗3次, 0.2% Triton X-100穿孔5 min, PBS洗3次, 3% BSA(配制在含有0.05% Tween20的TBS溶液中)室温封闭1 h, 一抗室温孵育1.5 h, TBST洗3次, 荧光二抗室温孵育1 h, TBST洗3次后加抗淬灭剂封片。用Axio Vert.A1蔡司荧光显微镜观察拍照。

1.6 SA- β -gal衰老细胞染色

SA- β -gal染色根据试剂盒步骤进行操作。培养在12孔板中的细胞用PBS洗1次以去除培养基和杂质, 用

固定液固定10~15 min, PBS洗2次, 每孔加入800 μ L新鲜配制的染色液, 在37 $^{\circ}$ C干燥培养箱中避光孵育16 h。1 mL染色工作液包括930 μ L染色液、10 μ L solution A、10 μ L solution B、50 μ L X-gal(20 mg/mL)。染色结束后, PBS洗2次, 在显微镜下观察及拍照。

1.7 X射线电离辐射损伤

X射线辐照仪(X-ray Biological Irradiator)购自Rad Source Technologies公司, 型号为RS 2000。对细胞进行总剂量为2 Gy的X射线辐射后继续培养24 h, 4%多聚甲醛固定细胞, 以用于后续免疫荧光实验。

1.8 统计学分析

数据分析及相关作图均用GraphPad Prism 5软件完成。数据对比分析用Two-Tailed *t* test, 数值展现为 $\bar{x}\pm s$ 。图中n.s.表示差异不显著; * $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 表示差异具有显著性。

2 结果

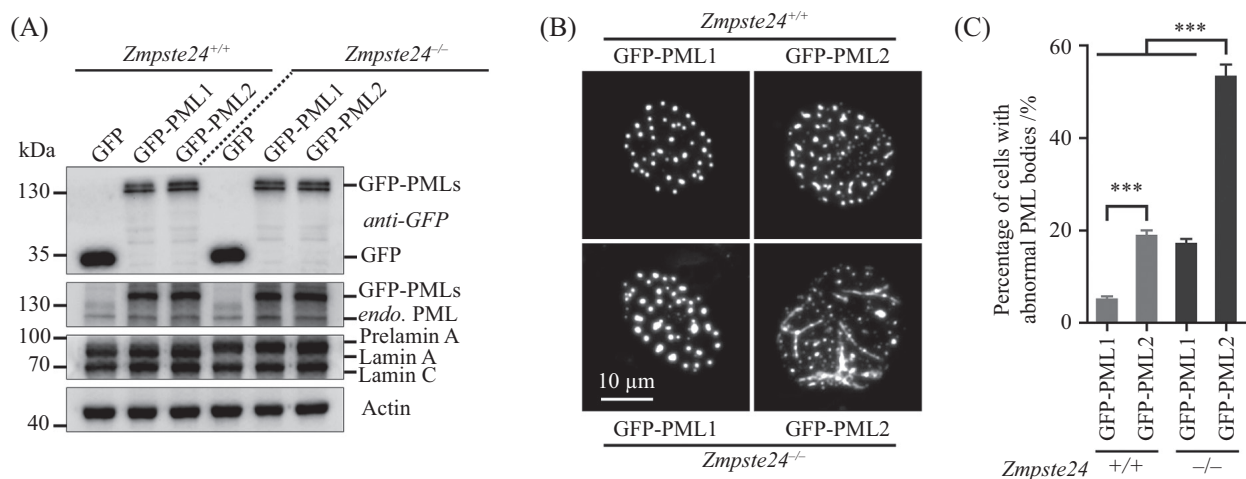
2.1 过表达PML2诱导Zmpste24^{-/-} MEF细胞产生线性PML NBs

在Zmpste24基因野生型(Zmpste24^{+/+})和缺陷型(Zmpste24^{-/-}) MEF细胞中过表达GFP、GFP-PML1或GFP-PML2, 蛋白表达水平如图1A所示。Lamin A/C抗体检测结果进一步证实了细胞基因型, 即Zmpste24^{+/+}中为Lamin A表达, 而Zmpste24^{-/-}中为分子量

稍大些的Prelamin A表达(图1A)。荧光显微镜观察发现, GFP-PML1在Zmpste24^{+/+}和Zmpste24^{-/-} MEF细胞中呈现为经典的圆点状结构, 而在GFP-PML2过表达的Zmpste24^{-/-} MEF细胞中出现线状(thread-like)等异常结构的NBs(图1B)。在GFP-PML2过表达的Zmpste24^{+/+} MEF细胞中, NBs结构异常的细胞比例为18.8%, 显著高于GFP-PML1过表达组。有趣的是, 在GFP-PML2过表达的Zmpste24^{-/-} MEF细胞中, NBs结构异常的细胞比例高达53.2%(图1C)。结果说明, PML2过表达影响PML NBs的形态, 尤其在Zmpste24^{-/-} MEF细胞中。

2.2 过表达PML2抑制Zmpste24^{-/-} MEF细胞增殖

对过表达GFP、GFP-PML1或GFP-PML2的Zmpste24^{+/+}和Zmpste24^{-/-} MEF细胞进行传代计数实验。如图2A所示, Zmpste24^{-/-}早衰细胞的增殖速率明显慢于Zmpste24^{+/+}细胞。对比GFP过表达的Zmpste24^{+/+}或Zmpste24^{-/-}细胞, GFP-PML1过表达对细胞的增殖速率无明显影响。而与GFP-PML1相比, 过表达GFP-PML2可显著抑制Zmpste24^{+/+}和Zmpste24^{-/-} MEF细胞的增殖, 并且对Zmpste24^{-/-}细胞的增殖抑制作用更为显著(图2A)。Ki-67蛋白是细胞增殖的标志物, 免疫荧光及统计结果显示, 对比GFP组, GFP-PML1过表达对Zmpste24^{+/+}和Zmpste24^{-/-} MEF细胞中Ki-67阳性比例无显著影响(图2B和图2C)。GFP-PML2过表达的Zmp-



A: 在Zmpste24^{+/+}和Zmpste24^{-/-} MEF细胞中过表达GFP、GFP-PML1或GFP-PML2, Western blot检测GFP、PML、Lamin A/C与Actin蛋白表达; B: 在Zmpste24^{+/+}和Zmpste24^{-/-} MEF细胞中过表达GFP-PML1或GFP-PML2, 荧光显微镜拍照观察PML NBs的形态; C: 统计分析出现异常PML NBs结构的细胞比例, *** $P<0.001$ 。

A: Western blot analysis of protein levels of GFP, PML, Lamin A/C and Actin in Zmpste24^{+/+} and Zmpste24^{-/-} MEFs; B: immunofluorescence microscopy analysis of PML NBs in Zmpste24^{+/+} and Zmpste24^{-/-} MEFs overexpressing GFP-PML1 or GFP-PML2; C: quantification of cells with abnormal PML NBs, *** $P<0.001$ 。

图1 过表达PML2诱导产生线性PML NBs结构

Fig.1 PML2 overexpression induces the formation of thread-like PML NBs

ste24^{+/+}细胞中Ki-67阳性细胞比例对比GFP和GFP-PML1有所降低,但无统计学差异,而GFP-PML2显著降低了*Zmpste24*^{-/-}细胞中Ki-67阳性细胞比例(图2B和图2C)。结果说明,PML2过表达显著抑制*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞的增殖。

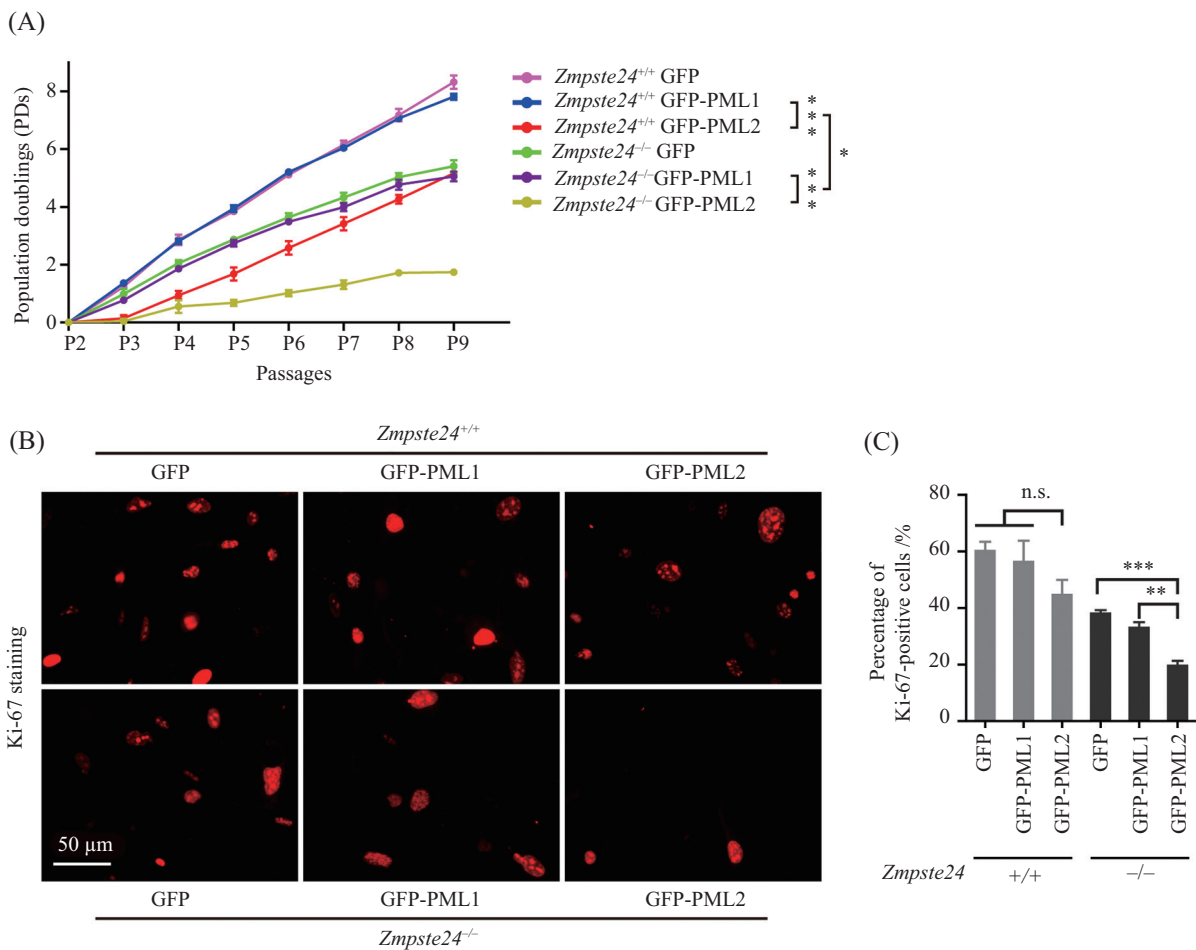
2.3 过表达PML2促进*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞衰老

PML2过表达抑制细胞增殖,促使我们进一步探讨PML2对细胞衰老的作用。SA-β-gal染色实验结果显示,对比GFP组,GFP-PML1过表达对*Zmpste24*^{+/+}和*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞β-gal染色阳性比例无明显影响(图3A和图3B)。而GFP-PML2过表达的*Zmpste24*^{+/+}和*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞中,染色阳性的细胞比例显著上升,并且*Zmpste24*^{-/-}细胞中的染色

阳性比例上升更为显著(图3A和图3B)。结果表明,PML2过表达加速*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞衰老。

2.4 PML2过表达削弱*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞的DNA修复能力

DNA损伤积累诱发细胞衰老。为探讨PML2过表达促进细胞衰老的机制,我们运用免疫荧光染色的方法检测DNA损伤标志物γH2AX foci。对比GFP组,过表达GFP-PML1的*Zmpste24*^{+/+}和*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞中γH2AX foci数目无明显差别(图4A和图4B)。在GFP-PML2过表达的*Zmpste24*^{+/+}细胞中,γH2AX foci数目有所上升,但无显著差异,而GFP-PML2过表达的*Zmpste24*^{-/-}细胞中γH2AX foci数目显著多于其他组(图4A和图4B)。结果提示,GFP-

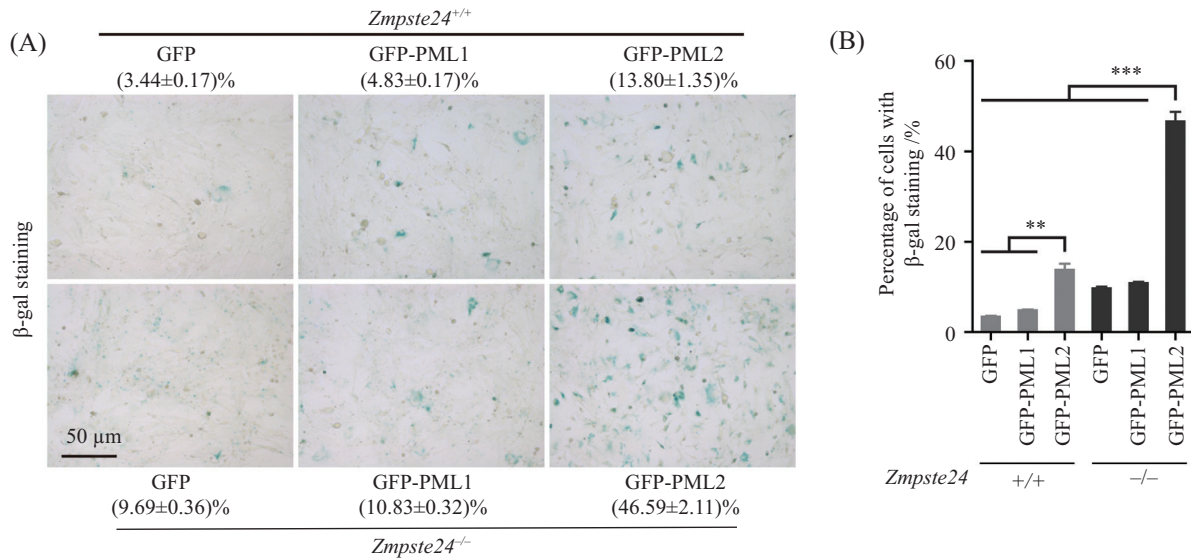


A: 在*Zmpste24*^{+/+}和*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞中过表达GFP、GFP-PML1或GFP-PML2,细胞进行传代计数,在P9代数时分析增殖倍数(PDs); B: 过表达GFP、GFP-PML1或GFP-PML2的*Zmpste24*^{+/+}和*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞在P9代数时进行免疫荧光染色分析Ki-67表达; C: 统计分析Ki-67染色阳性的细胞比例,n.s.表示无显著性差异,**P*<0.05,***P*<0.01,****P*<0.001。

A: growth curve of *Zmpste24*^{+/+} and *Zmpste24*^{-/-} MEFs overexpressing GFP, GFP-PML1 or GFP-PML2. PDs at passage 9 were analyzed; B: immunofluorescent staining of Ki-67 in *Zmpste24*^{+/+} and *Zmpste24*^{-/-} MEFs (at passage 9) overexpressing GFP, GFP-PML1 or GFP-PML2; C: quantification of Ki-67-positive cells, n.s.: no significance, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001.

图2 *Zmpste24*^{-/-} MEF细胞中过表达PML2抑制细胞增殖

Fig.2 PML2 overexpression inhibits the proliferation of *Zmpste24*^{-/-} MEF cells



A: 过表达GFP、GFP-PML1或GFP-PML2的*Zmpste24*^{+/+}和*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞在P9代数时进行SA-β-gal染色分析; B: 统计分析SA-β-gal染色阳性的细胞比例, ***P*<0.01, ****P*<0.001。

A: SA-β-gal staining of *Zmpste24*^{+/+} or *Zmpste24*^{-/-} MEFs (at passage 9) overexpressing GFP, GFP-PML1 and GFP-PML2; B: quantification of cells with positive SA-β-gal staining, ***P*<0.01, ****P*<0.001.

图3 *Zmpste24*^{-/-} MEF细胞中过表达PML2促进细胞衰老

Fig.3 PML2 overexpression promotes the senescence of *Zmpste24*^{-/-} MEFs

PML2过表达的*Zmpste24*^{-/-}细胞中DNA损伤修复能力存在缺陷。为进一步探讨PML2对DNA损伤修复能力的影响,我们对细胞进行X射线辐射诱导DNA损伤,24 h后检测分析各组细胞中γH2AX foci数目。结果显示,24 h后各组细胞中仍存在较多未修复的DNA损伤位点,对比GFP组,过表达GFP-PML1的*Zmpste24*^{+/+}和*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞中γH2AX foci数目无明显差异(图4C和图4D)。在GFP-PML2过表达的*Zmpste24*^{+/+}细胞中,γH2AX foci数目稍多,但无显著差异,而GFP-PML2过表达的*Zmpste24*^{-/-}细胞中γH2AX foci数目显著多于GFP-PML1组(图4C和图4D)。结果表明,过表达PML2而非PML1干扰了*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞的DNA修复能力。

2.5 线性PML NBs促进*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞衰老

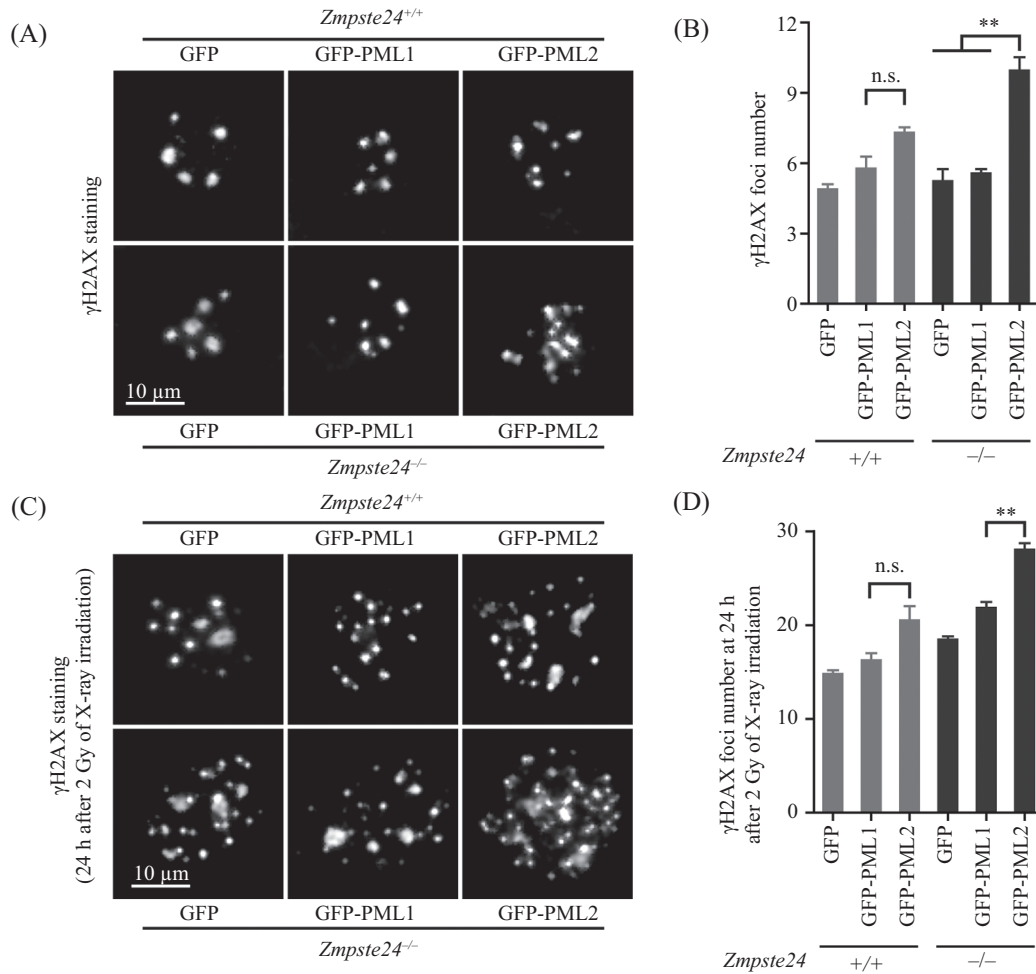
为进一步弄清PML2介导的线性PML NBs结构在细胞衰老中的作用,我们将过表达GFP-PML2的*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞中携带正常与异常NBs结构的细胞,进行对比分析。结果发现,对比正常PML NBs结构的细胞,线性NBs结构的细胞中Ki-67阳性的比例显著减少(图5A),β-gal染色阳性比例显著增多(图5B),本底γH2AX foci数目(图5C)以及X射线辐射损伤后未修复的γH2AX foci数目(图5D)都明显增多。结果表明,PML2介导形成的异常线性结构可抑制

Zmpste24^{-/-} MEF细胞增殖,干扰其DNA修复能力,促进细胞衰老。

3 讨论

MEF细胞在体外培养时由于氧化应激等因素容易快速衰老^[17],而*Zmpste24*^{-/-}引起的Prelamin A积累导致细胞核骨架异常,诱导产生DNA损伤,进而加速MEF细胞早衰^[18]。在本研究中,过表达PML1对MEF细胞的增殖及衰老无明显影响,而过表达PML2显著抑制*Zmpste24*^{+/+}和*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞的增殖,加速细胞衰老,且过表达PML2促进*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞衰老的效应比在*Zmpste24*^{+/+}细胞中更为显著。过表达PML2诱导高比例的*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞产生线性PML NBs结构,且实验证明这种异常结构与细胞衰老紧密关联,提示PML2诱导产生的异常线性PML NBs结构促进了*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞衰老。

近期一项研究在HGPS早衰病人皮肤组织细胞中观察到较高比例的异常、线性PML NBs结构^[19],而我们在*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞中极少看到线性PML NBs结构。这说明HGPS病人早衰的机制与小鼠模型不同,或许更为复杂,而异常PML NBs结构可能在HGPS早衰症中有一定的作用。研究报道,人源PML1~6中,PML2的表达呈现线性异常结构,在



A: 过表达GFP、GFP-PML1或GFP-PML2的Zmpste24^{+/+}和Zmpste24^{-/-} MEF细胞在P9代数时进行γH2AX染色分析; B: 统计分析细胞中γH2AX foci的数量; C: 过表达GFP、GFP-PML1或GFP-PML2的Zmpste24^{+/+}和Zmpste24^{-/-} MEF细胞在P9代数时进行2 Gy X-ray照射损伤, 24 h后收细胞进行γH2AX染色分析; D: 统计分析2 Gy X-ray照射损伤后24 h的细胞中γH2AX foci的数量, n.s.表示无显著性差异, **P<0.01。

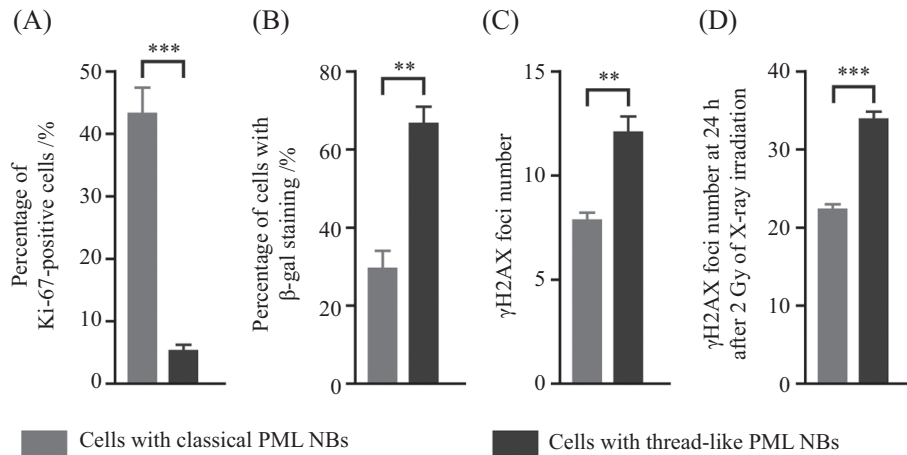
A: immunofluorescence staining of γH2AX foci in Zmpste24^{+/+} and Zmpste24^{-/-} MEFs (at passage 9) overexpressing GFP, GFP-PML1 or GFP-PML2; B: quantification of γH2AX foci number; C: Zmpste24^{+/+} and Zmpste24^{-/-} MEFs (at passage 9) overexpressing GFP, GFP-PML1 or GFP-PML2 were exposed to 2 Gy X-ray and cells were harvested for immunofluorescence staining of γH2AX foci 24 h later; D: quantification of γH2AX foci number in cells, n.s.: no significance, **P<0.01.

图4 Zmpste24^{-/-} MEF细胞中过表达PML2抑制DNA修复能力

Fig.4 PML2 overexpression impedes DNA repair in Zmpste24^{-/-} MEFs

U2OS等细胞中外源过表达的PML2可定位到细胞核膜上^[3,20-21], 提示PML2调控PML NBs的形态及定位, 介导PML NBs与细胞核膜之间的作用。与此一致, 本研究发现, 外源过表达的PML2而非PML1在核膜异常的Zmpste24^{-/-} MEF细胞中能诱导PML NBs形成线性异常结构。值得注意的是, PML在进化上并不保守, 小鼠中有人源异构体PML1但没有PML2的同源物表达^[20]。上述这些证据提示, PML2可能介导了HGPS细胞中线性NBs结构的形成。鉴于本研究发现, PML2介导的异常NBs结构促进了Zmpste24^{-/-} MEF细胞衰老, 我们认为, HGPS病人细胞中的异常PML NBs结构可能也参与调控细胞衰老。

本研究发现, 在PML2介导形成线性NBs结构的Zmpste24^{-/-} MEF细胞中, 自发的DNA损伤位点和X射线辐射损伤后未修复的损伤位点显著增多, 表明这些细胞中DNA修复存在缺陷。已有研究证实, PML NBs在DNA损伤修复过程中发挥重要作用, PML NBs能定位到DNA损伤位点与一些DNA修复因子作用或共定位。主流观点认为, PML NBs作为一个“蛋白池”协调多种修复因子有序高效地促进DNA修复^[22]。由此, 我们认为, PML2诱导形成的线性NBs结构可能干扰了PML NBs介导的DNA修复。研究报道, HGPS早衰病人细胞中的DNA修复功能存在缺陷^[23], 而线性PML NBs结构也存在于HGPS细



A~C: 过表达GFP-PML2的*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞在P9代数时,分析PML NBs形态正常(点状)和异常(线性)的细胞中,Ki-67染色阳性比例、SA-β-gal染色阳性比例以及γH2AX foci数目;D: 过表达GFP-PML2的*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞在P9代数时经2 Gy X-ray照射损伤后24 h收细胞进行γH2AX染色,统计分析PML NBs形态正常和异常的细胞中γH2AX foci数目。***P*<0.01,****P*<0.001。

A-C: the percentage of Ki-67-positive cells, β-gal-positive cells and γH2AX foci number in cells with normal or thread-like PML NBs in *Zmpste24*^{-/-} MEFs (at passage 9) overexpressing GFP-PML2; D: *Zmpste24*^{-/-} MEFs (at passage 9) overexpressing GFP-PML2 were exposed to 2 Gy X-ray, and γH2AX foci number were analyzed in cells with normal or thread-like PML NBs 24 h later. ***P*<0.01, ****P*<0.001.

图5 PML2介导的线性NBs结构促进*Zmpste24*^{-/-} MEF细胞衰老

Fig.5 PML2-mediated thread-like NBs promote the senescence of *Zmpste24*^{-/-} MEFs

胞中。结合本研究的实验证据,我们推测,HGPS细胞中的线性PML NBs可能干扰了DNA修复而促进细胞衰老,这值得我们在未来的工作中继续探讨和验证。在*PML*^{-/-}细胞与无法形成NBs的*PML*^{C52A/C65A}突变体细胞中姐妹染色单体互换频率显著增加^[24-25],表明PML NBs的完整性对维持基因组稳定性很重要,而本研究的结果指出,PML NBs的正常结构形态对维持基因组的稳定性也很重要。

本研究以*Zmpste24*基因缺陷早衰小鼠MEF细胞为模型,初步揭示了PML2介导的线性NBs干扰DNA修复,促进细胞衰老,这为探讨PML NBs异常结构在HGPS早衰症中的作用及相关分子机制提供了实验及理论基础。

致谢

感谢香港大学周中军教授惠赠*Zmpste24*^{-/-}小鼠;感谢中国农业大学唐军教授惠赠*PML*基因相关质粒。

参考文献 (References)

- [1] LALLEMAND-BREITENBACH V, DE THE H. PML nuclear bodies [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2(5): a000661.
- [2] GENG Y, MONAJEMBASHI S, SHAO A, et al. Contribution of the C-terminal regions of promyelocytic leukemia protein (PML) isoforms II and V to PML nuclear body formation [J]. J Biol Chem, 2012, 287(36): 30729-42.
- [3] NISOLE S, MAROUI M A, MASCLE X H, et al. Differential roles of PML isoforms [J]. Front Oncol, 2013, 3: 125.
- [4] LI C, PENG Q, WAN X, et al. C-terminal motifs in promyelocytic leukemia protein isoforms critically regulate PML nuclear body formation [J]. J Cell Sci, 2017, 130(20): 3496-506.
- [5] VAN DAMME E, LAUKENS K, DANG T H, et al. A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics [J]. Int J Biol Sci, 2010, 6(1): 51-67.
- [6] HSU K S, KAO H Y. PML: Regulation and multifaceted function beyond tumor suppression [J]. Cell Biosci, 2018, 8: 5.
- [7] LALLEMAND-BREITENBACH V, DE THE H. PML nuclear bodies: from architecture to function [J]. Curr Opin Cell Biol, 2018, 52: 154-61.
- [8] DELLAIRE G, BAZETT-JONES D P. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress [J]. Bioessays, 2004, 26(9): 963-77.
- [9] LIU B, ZHOU Z. Lamin A/C, laminopathies and premature ageing [J]. Histo Histopathol, 2008, 23(6): 747-63.
- [10] GONZALO S, KREIENKAMP R, ASKJAER P. Hutchinson-gilford progeria syndrome: a premature aging disease caused by LMNA gene mutations [J]. Ageing Res Rev, 2017, 33: 18-29.
- [11] HO R, HEGELE R A. Complex effects of laminopathy mutations on nuclear structure and function [J]. Clin Genet, 2019, 95(2): 199-209.
- [12] QUIGLEY A, DONG Y Y, PIKE A C, et al. The structural basis of ZMPSTE24-dependent laminopathies [J]. Science, 2013, 339(6127): 1604-7.
- [13] GONZALO S, KREIENKAMP R. DNA repair defects and genome instability in Hutchinson-gilford progeria Syndrome [J]. Curr Opin Cell Biol, 2015, 34: 75-83.
- [14] HAMCZYK M R, DEL CAMPO L, ANDRES V. Aging in the

- cardiovascular system: lessons from Hutchinson-gilford progeria syndrome [J]. *Annu Rev Physiol*, 2018, 80: 27-48.
- [15] BERGO M O, GAVINO B, ROSS J, et al. *Zmpste24* deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 13049-54.
- [16] PENDAS A M, ZHOU Z, CADINANOS J, et al. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in *Zmpste24* metalloproteinase-deficient mice [J]. *Nat Genet*, 2002, 31(1): 94-9.
- [17] PARRINELLO S, SAMPER E, KRTOLICA A, et al. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(8): 741-7.
- [18] AO Y, ZHANG J, LIU Z, et al. Lamin A buffers CK2 kinase activity to modulate aging in a progeria mouse model [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(3): eaav5078.
- [19] HARHOURI K, NAVARRO C, DEPETRIS D, et al. MG132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation [J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(9): 1294-313.
- [20] CONDEMINE W, TAKAHASHI Y, ZHU J, et al. Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(12): 6192-8.
- [21] JUL-LARSEN A, GRUDIC A, BJERKVIG R, et al. Subcellular distribution of nuclear import-defective isoforms of the promyelocytic leukemia protein [J]. *BMC Mol Biol*, 2010, 11: 89.
- [22] CHANG H R, MUNKHJARGAL A, KIM M J, et al. The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance [J]. *Mutat Res*, 2018, 809: 99-107.
- [23] LIU B, WANG J, CHAN K M, et al. Genomic instability in laminopathy-based premature aging [J]. *Nat Med*, 2005, 11(7): 780-5.
- [24] ZHONG S, HU P, YE T Z, et al. A role for PML and the nuclear body in genomic stability [J]. *Oncogene*, 1999, 18(56): 7941-7.
- [25] VOISSET E, MORAVCSIK E, STRATFORD E W, et al. Pml nuclear body disruption cooperates in APL pathogenesis and impairs DNA damage repair pathways in mice [J]. *Blood*, 2018, 131(6): 636-48.