

◇基础医学研究◇

LONP1 在肝细胞癌中的表达及其对肝细胞癌发生发展的影响

白一鹏^{1,2,3},徐登球^{2,3},孙倍成^{1,2,3,4}

(¹ 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科,南京 210008;² 安徽医科大学第一附属医院肝胆胰及移植外科;³ 肿瘤免疫医药基础研究创新中心;⁴ 肿瘤免疫微环境研究及治疗安徽省重点实验室,合肥 230022)

摘要 **目的** 探究线粒体 Lon 蛋白酶 1 (LONP1) 在肝细胞癌 (HCC) 中的表达水平及其对 HCC 发生发展的影响。**方法** 利用实时定量 PCR (qPCR) 和免疫印迹实验检测人体肝癌组织中 LONP1 表达情况。构建 LONP1 稳定敲降 Hep3B 和 HCCLM3 细胞系,通过 CCK-8、EdU 实验和平板克隆实验探究 LONP1 对肝癌细胞系细胞增殖的影响。通过细胞划痕和细胞迁移实验探究 LONP1 对肝癌细胞系迁移的影响。利用 Cre-Loxp 系统构建肝细胞 LONP1 条件敲除小鼠,小鼠肝脏组织送转录组测序探究 LONP1 缺失对肝细胞的影响。利用 Tunel 染色以及 Annexin V-FITC/PI 流式分析探究 LONP1 对肝癌细胞系细胞凋亡的影响。**结果** 人肝脏组织的免疫印迹和 qPCR 实验验证了 LONP1 在肝癌组织中高表达。平板克隆实验结果显示,LONP1 敲降的细胞克隆形成数目较对照组明显减少 ($P < 0.01$)。CCK-8 和 EdU 染色实验结果显示,LONP1 敲降的细胞增殖速度低于对照组 ($P < 0.01$)。细胞划痕实验和细胞侵袭实验结果显示,LONP1 敲降的肝癌细胞系细胞迁移能力明显小于对照组细胞 ($P < 0.01$)。LONP1 条件敲除小鼠肝脏组织转录组结果提示 LONP1 会影响肝细胞凋亡通路。Tunel 染色以及 Annexin V-FITC/PI 流式分析结果显示 LONP1 敲降肝癌细胞发生更多细胞凋亡。**结论** LONP1 在肝细胞癌组织中高表达,在肝癌细胞系中敲降 LONP1 会促进细胞凋亡,并对细胞增殖和迁移能力有抑制作用。

关键词 LONP1;肝细胞癌;凋亡;线粒体;转录组测序;慢病毒感染

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A

肝细胞癌 (HCC, hepatocellular carcinoma) 是导致癌症相关死亡的第三大原因^[1],由于起病隐秘,患者早期临床表现较少,大多数患者在发病时病情已进展到晚期。手术切除癌组织是 HCC 的有效治疗方法,但 5 年内复发率高达 70%,5 年生存率仅为 50%^[2]。索拉非尼^[3]、瑞戈非尼^[4] 和乐伐替尼^[5] 等临床药物只能将 HCC 患者中位生存期延长仅 2~3 个月,因此探索 HCC 发病机制和治疗策略非常重要。

线粒体 Lon 蛋白酶 1 (lon peptidase 1, LONP1) 是一种线粒体蛋白酶,驻留在线粒体基质中,通过降解蛋白功能维持线粒体蛋白更新来控制线粒体蛋白

质的质量,对于线粒体稳态起着重要作用^[6-7]。除了降解错误折叠或受损蛋白质的主要功能外, LONP1 蛋白酶还通过受控的蛋白水解过程在精细调节线粒体活性方面发挥着关键作用^[8],这意味着 LONP1 作为一种线粒体蛋白酶可能调节人体多种生理过程。此前已有一些报道表明 LONP1 在肿瘤发生发展中的作用,如线粒体 LONP1 可诱导线粒体 DNA 泄露促进 PD-L1 介导的免疫逃逸^[9]; LONP1-PYCR1 轴引起的线粒体氧化应激维持免疫抑制肿瘤微环境,促进癌症进展和转移^[10]。这些结果都表明 LONP1 过表达对肿瘤有促进作用,但是 LONP1 在 HCC 中的作用仍待探索。该研究旨在探讨 LONP1 在肝癌细胞增殖和迁移中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 动物实验均按照相关指南和伦理规定进行,并获得中国科学院合肥肿瘤医院实验动物中心机构动物关怀与使用委员会 (IACUC) 的批准 (批准号:DWLLPF-2024010407)。3 只 6 周龄雄性体质量为 18~20 g 的 LONP1-deficient C57BL/

2025-02-18 接收

基金项目:国家自然科学基金项目 (编号:82120108012,81930086);
安徽省临床医学研究转化专项立项项目 (编号:
202204295107020008);安徽省高校科研项目 (编号:
2022AH010070);安徽省优秀青年基金项目 (编号:
2408085Y041)

作者简介:白一鹏,男,硕士研究生;

徐登球,男,博士,副研究员,硕士生导师,通信作者,E-mail: xudengqiu@163.com.

孙倍成,男,教授,博士生导师,通信作者,E-mail: sunbc@nju.edu.cn

6 小鼠和 3 只 6 周龄雄性体质量为 18 ~ 20 g 的 *LONPI-Flox* C57BL/6 小鼠饲养于中国科学院合肥肿瘤医院实验动物中心的特定病原体无感染设施中。小鼠被饲养在塑料笼中,自由获取颗粒食物和水,环境温度维持在 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$,并接受 12 h 的光暗循环。用于繁育的 *LONPI-flox* 小鼠、*Alb-cre* 小鼠来自南京集萃药康公司。

1.1.2 主要试剂和仪器 人肝癌细胞系 Hep3B、HCCLM3 以及 293T 细胞购自中国科学院细胞库。DMEM 培养基、青-链霉素双抗、PBS、胎牛血清、胰酶(货号:319-005-CL、450-201-EL、311-011、085-150、325-043)均购自南京维森特生物技术公司;PEI(货号:HY-K2014)购自美国 MCE 公司;RNA 提取、Annexin V-FITC/PI、qPCR Master Mix、BCA 试剂盒(货号:RC201、A211-01、R223-01、E112-01)均购自南京诺唯赞公司;LONPI 抗体、GADPH 抗体、兔二抗、小鼠二抗(货号:15440-1-AP、60004-1-Ig、SA00001-2、RGAM001)均购自武汉三鹰生物公司;免疫染色封闭液、polybrene、RIPA 裂解液、PMSF、CCK-8、细胞凋亡 Tunel 试剂盒、Edu 细胞增殖试剂盒、结晶紫染液(货号:P0260、C0351-1ml、P0013B、ST505、C0037、C1086、C0078S、C0121-100ml)均购自上海碧云天生物技术公司。流式细胞仪(型号:DXP Athena,美国 Cytek 公司),倒置显微镜(型号:DMI8,德国 Leica 公司),实时荧光定量 PCR 系统(型号:Quantstudio5,美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 方法

1.2.1 病例资料收集 本项课题研究中所使用的临床样本均收集自南京大学医学院附属鼓楼医院 HCC 和肝血管瘤(正常肝组织)患者的手术标本。组织离体后对 HCC 组织、正常肝组织液氮冻存,用于组织 RNA 及蛋白的提取。该研究通过南京大学医学院附属鼓楼医院伦理委员会批准(批号:2018-099-02),所有的人体组织样本使用均获得手术患者的知情同意。

1.2.2 蛋白提取及免疫印迹实验 从液氮中取出冻存组织样本,置于冰上剪碎并加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液和研磨珠放入研磨机研磨,收集样本到 1.5 ml 离心管中,冰上裂解 30 min 后,12 000 r/min、4 $^\circ\text{C}$ 离心 10 min 后收集上清液,使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,制取可用于实验的样本,95 $^\circ\text{C}$ 金属浴 7 min,用于免疫印迹实验蛋白上样;对于细胞,弃去培养基并用 PBS 洗涤 2 遍,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min,

收集样本后同上处理。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳对样品中的不同分子量蛋白质进行分离。随后,将分离的蛋白质转移至醋酸纤维素薄膜上。为了封闭非特异性结合位点,使用 5% 脱脂牛奶溶液在室温下封闭薄膜 1 h。接着,加入按 1:2 000 稀释的 LONPI 抗体或 GADPH 抗体,在 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中孵育过夜。第 2 天,使用 TBST 缓冲液洗涤薄膜 3 次,以去除未结合的抗体。接下来,加入与目标抗体相对应的种属来源的按 1:5 000 稀释的兔抗体或鼠抗体,在室温下通过摇床轻轻孵育 1 h。最后,使用 TBST 洗涤 3 次,随后进行显影处理以检测目标蛋白的表达情况。

1.2.3 RNA 提取及实时定量 PCR(real time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 将冻存的 HCC 患者癌组织和正常肝脏组织冰上剪碎、加入研磨珠研磨,按照总 RNA 提取试剂盒说明书来提取总 RNA。将总 RNA 逆转录成 cDNA 后,使用 qPCR Master Mix 进行 qPCR 实验。PCR 扩增所使用的引物序列如下: LONPI,(正义链)5'-AGCCTTATGTCG-GCGTCTTTC-3';(反义链)5'-CGTCCCCGTGTGG-TAGATTTC-3'; Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, BAX),(正义链)5'-CCCGAGAGGTCTTTTTC-CGAG-3';(反义链)5'-CCAGCCCATGATGTTCT-GAT-3';凋亡蛋白酶激活因子 1(apoptotic peptidase activating factor 1, APAF1),(正义链)5'-AAGGTG-GAGTACCACAGAGG-3';(反义链)5'-TCCATGTATG-GTGACCCATCC-3';细胞色素 c(cytochrome c, CYCS),(正义链)5'-CTTTGGGCGGAAGACAGGTC-3';(反义链)5'-TTATTGGCGGCTGTGTAAGAG-3';半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9(Caspase 9, CYCS),(正义链)5'-CTTCGTTTCTGCCAACTAACAGG-3';(反义链)5'-GCACCACTGGGGTAAGGTTT-3'。

1.2.4 细胞增殖实验 首先,使用胰蛋白酶对细胞进行消化处理,随后 1 000 r/min 离心 3 min 收集细胞。将收集到的细胞重新悬浮于适当的培养基中,并进行细胞计数。根据需要将细胞悬液稀释至浓度为 2×10^4 个细胞/ml。接着,将每孔 100 μl 的细胞悬液加入至 96 孔板中,每个孔中大约有 2 000 个细胞。接下来,连续 2 天进行实验,每天都重复以下步骤:首先,每孔加入 10 μl CCK-8 试剂,确保混合均匀后将 96 孔板放入 37 $^\circ\text{C}$ 孵育箱中,孵育 1.5 h。然后,使用酶标仪在 450 nm 波长处测量各孔的吸光度,以评估细胞的增殖和活性情况。

1.2.5 平板克隆实验 首先,选择对数生长期的细胞,使用胰蛋白酶进行消化,随后 1 000 r/min 离心 3

min 收集细胞。将细胞重悬并计数后,按照梯度稀释方法将细胞悬液稀释至浓度为 0.5×10^4 个细胞/ml。接着,将每个 6 孔板的孔中加入 2 ml 的细胞悬液。将培养板置于细胞培养箱中培养,持续两周。培养结束后,用 4% 的多聚甲醛溶液对细胞进行固定。然后,使用结晶紫染色法对细胞进行染色,染色完成后拍摄显微镜图像,并手动计数每孔中的细胞数量。

1.2.6 细胞划痕实验 在 6 孔板中铺设细胞,待细胞生长至汇合度达到 100% 时,用 200 μ l 移液枪的尖端垂直于细胞培养板表面轻轻划出一道划痕。此时拍摄初始(0 h)的划痕图像。接着,将培养板放入 37 $^{\circ}$ C 的培养箱中继续培养 24 h。24 h 后,再次对相同位置进行拍照,观察并记录划痕宽度的变化,并进行统计学分析,以评估细胞迁移的情况。

1.2.7 细胞侵袭实验 首先,选择对数生长期的细胞,使用胰蛋白酶进行消化,随后 1 000 r/min 离心 3 min 收集细胞。将细胞重悬并计数后,使用无血清培养基将细胞悬液调整至浓度 5×10^4 个/ml。然后,取 200 μ l 细胞悬液加入 Transwell 小室的上室,而在下室中加入 600 μ l 含 10% 胎牛血清的培养基。经过 24 h 的培养后,取出上室,丢弃其中的培养基,并使用棉签轻轻擦去滤膜表面未能穿透的细胞,将小室背面的细胞用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min。随后进行结晶紫染色,最后使用显微镜观察染色后的细胞,拍照并进行细胞计数与统计分析。

1.2.8 EdU 染色检测细胞增殖率 用胰酶消化细胞,1 000 r/min 离心 3 min 收集细胞,重悬计数后稀释至浓度 8×10^4 个/ml,取 1 ml 加入 12 孔板中,细胞培养箱培养至细胞汇合度 50% 时,按照 EdU 细胞增殖检测试剂盒说明书,加入 EdU 工作液,37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 3 h 后,弃去培养液,4% 多聚甲醛固定细胞 20 min,用免疫染色封闭液洗涤细胞 2 遍,强力通透液室温孵育 10 min。接着加入 100 μ l Click 反应液室温避光孵育 30 min,封闭液洗涤 3 次后,每孔加入 0.5 μ g/ml 的 DAPI 室温避光孵育 20 min,洗涤 3 次,倒置荧光显微镜下拍照。

1.2.9 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测 用胰酶消化细胞,1 000 r/min 离心 3 min 收集细胞,重悬计数后梯度稀释至浓度 8×10^4 个/ml,取 2 ml 加入 6 孔板,细胞培养箱培养至细胞汇合度 70% 时,加入胰酶收集细胞,按照诺唯赞 A211-01 说明书进行染色,流式上机检测细胞凋亡数量。

1.2.10 TUNEL 染色 用胰酶消化细胞,1 000 r/min 离心 3 min 收集细胞,重悬计数后梯度稀释至浓度 8

$\times 10^4$ 个/ml,取 1 ml 加入 12 孔板,细胞培养箱培养至细胞汇合度 50% 时,按照说明书进行染色,最后使用徕卡倒置显微镜进行拍摄。

1.2.11 质粒构建及细胞转染 用于敲降 *LONP1* 的质粒由实验员设计引物合成,将短发卡序列插入 pLVX-IRES-Puro 载体中,首先,从感受态细胞中提取质粒,并通过测序确认其序列的正确性。在确认无误后,使用 PEI 试剂对 293T 细胞进行转染。转染后,分别在 24 h 和 48 h 收集病毒液,随后用该病毒液感染 Hep3B 和 HCCLM3 细胞。在感染过程中,加入促感染试剂 polybrene 以提高转染效率。接着,通过使用嘌呤霉素进行筛选,成功获得稳定转染的细胞株。

1.2.12 肝细胞 *LONP1* 敲除小鼠构建和肝脏转录组测序 将 *LONP1*-flox 小鼠与 Alb-Cre 小鼠交配,最终可得到 flox/flox 带 Alb-cre 小鼠,即得到肝细胞 *LONP1* 敲除的小鼠。将 6 周龄的雄鼠取脏组织提取 RNA 送北京百迈克生物公司进行转录组测序。

1.2.13 统计学处理 使用 Graphpad Prism9 软件进行统计学分析,实验至少重复进行 3 次。正态分布且方差齐的组间两两均值比较使用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *LONP1* 在 HCC 中高表达 本研究提取了 20 例正常人的肝组织和 HCC 病人的肝癌组织 RNA, qPCR 结果显示 HCC 组织的 *LONP1* 相对于正常肝脏组织有更高的表达水平($t = 2.91, P < 0.05$) (图 1A)。免疫印迹检测了 12 个正常肝组织和 HCC 组织 *LONP1* 蛋白水平,结果显示 HCC 组织 *LONP1* 表达水平更高($t = 7.82, P < 0.05$) (图 1B)。

2.2 敲降 *LONP1* 对 HCC 细胞增殖的影响 为了探究 *LONP1* 对肝癌细胞增殖的影响,本研究用短发卡 RNA 慢病毒感染 HEP3B 和 HCCLM3 肝癌细胞系来构建 *LONP1* 敲降稳转细胞系,通过免疫印迹验和 qPCR 验证了 *LONP1* 敲降效率(图 2A、2B)。CCK-8 实验结果显示,相对于对照组,HEP3B 和 HCCLM3 细胞 *LONP1* 敲降组的细胞活力在 24 ~ 96 h 均降低($t_{\text{HEP3B}} = 5.366, 7.142, 10.78, 18.72, t_{\text{HCCLM3}} = 5.020, 13.44, 13.22, 17.54$, 均 $P < 0.05$) (图 2C)。平板克隆实验结果表明,HEP3B 以及 HCCLM3 细胞 *LONP1* 敲降后细胞克隆形成数目明显减少($t = 27.91, 20.68$, 均 $P < 0.05$) (图 2D - 2E)。EdU 染色实验结果提示, *LONP1* 敲降后细胞增殖率低于对照组($t = 26.76, P < 0.05$) (图 2F)。

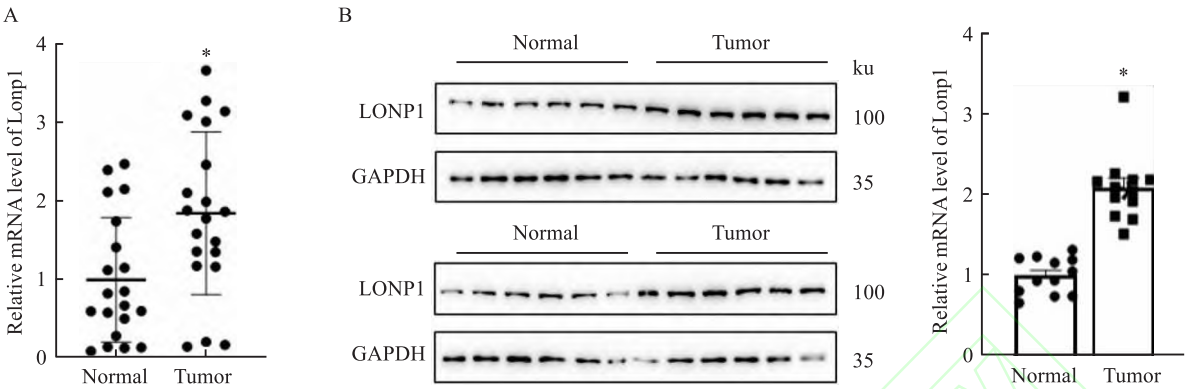


图1 LONP1 在 HCC 中高表达
Fig.1 LONP1 was highly expressed in HCC

A: The relative mRNA levels of LONP1 extracted from normal liver tissue and HCC tissue ($n=20$); B: LONP1 protein levels extracted from normal liver tissue and HCC tissue ($n=12$); * $P<0.05$ vs normal group.

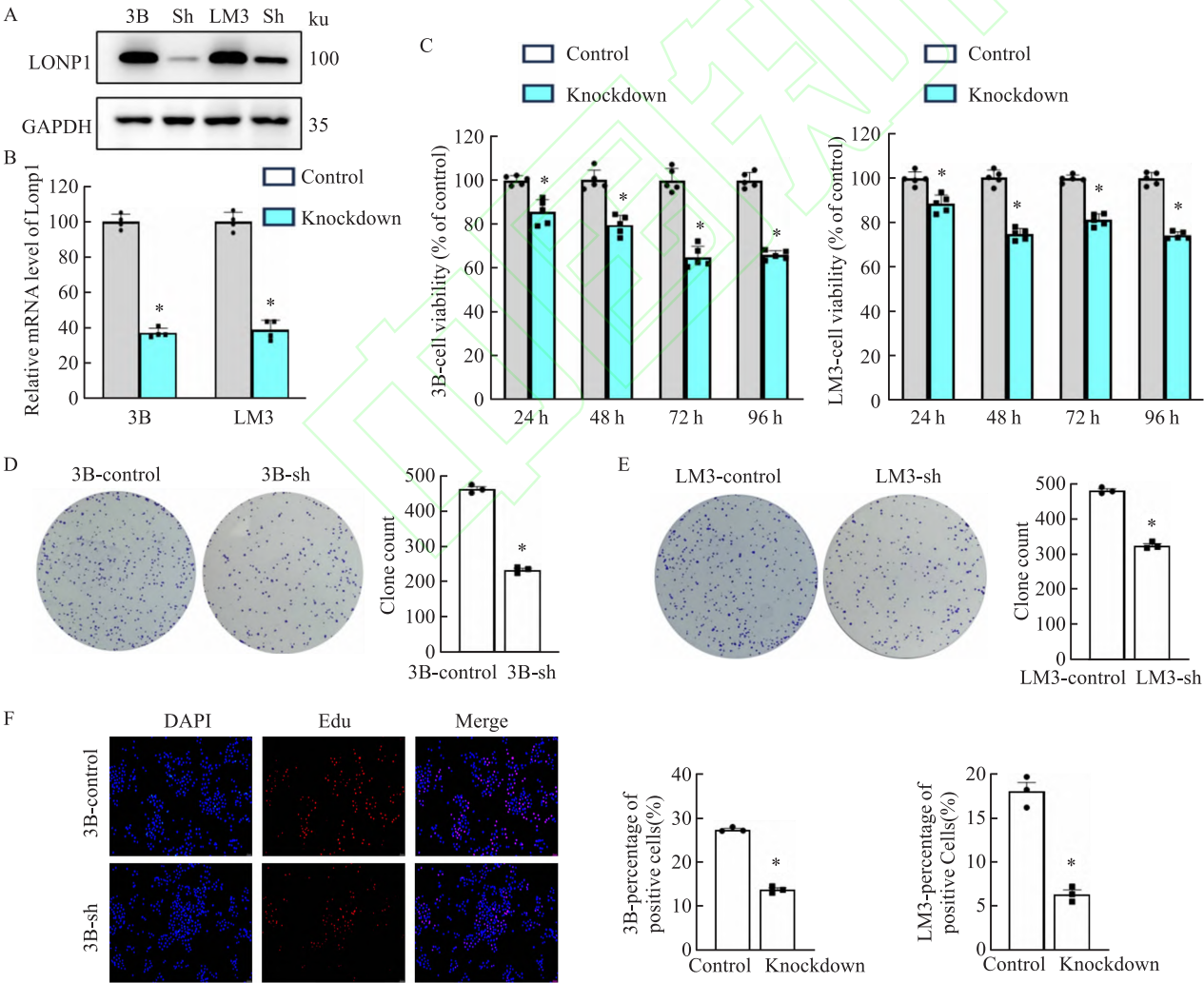


图2 LONP1 敲降对肝癌细胞系增殖的影响

Fig.2 The effect of LONP1 knockdown on the proliferation of liver cancer cell lines

A: Western blot validation of LONP1 knockdown cell lines; B: qPCR validation of LONP1 knockdown cell lines ($n=5$); C: CCK-8 assay for cell viability in 3B and LM3 knockdown cell lines ($n=5$); D: Cell colony formation assay in 3B knockdown cell lines ($n=3$); D: Cell colony formation assay in LM3 knockdown cell lines ($n=3$); F: EdU assay for cell proliferation in 3B and LM3 knockdown cell lines ($\times 4$, $n=3$); 3B: HEP3B cells; LM3: HCCLM3 cells; * $P<0.05$ compared between two groups.

2.3 *LONP1* 敲降对 HCC 细胞迁移的影响 为了探究 *LONP1* 对肝癌细胞迁移的影响,本研究用构建好的 *LONP1* 敲降的 HCCLM3 和进行细胞划痕实验和 Transwell 实验。细胞划痕实验结果显示,*LONP1* 敲降的 HCCLM3 细胞后划痕愈合速度慢于对照组 ($t = 3.64, P < 0.05$) (图 3A)。Transwell 实验结果显示 *LONP1* 敲降的 HCCLM3 细胞相同时间内穿过 Transwell 小室的数量低于对照组 ($t = 13.74, P < 0.05$) (图 3B)。

2.4 *LONP1* 缺失导致细胞凋亡通路增强 为了进一步探究 *LONP1* 如何影响肝细胞,本研究利用 Cre-Loxp 系统构建了肝细胞 *LONP1* 条件敲除性小鼠

(图 4A)。随后收取 6 周龄 *LONP1* 敲除雄鼠和 6 周龄野生型对照小鼠的肝脏组织提取 RNA 送 RNA 测序。主成分分析显示对照组和敲除组有显著差异 (图 4B)。敲除小鼠组相对于对照组小鼠有 1 177 个基因下调,1 610 个基因上调 (图 4C)。差异表达分析显示凋亡通路基因在 *LONP1* 敲除小鼠中上调 (图 4D)。这些结果提示 *LONP1* 表达降低可能会导致细胞凋亡增强。

2.5 *LONP1* 敲降导致肝癌细胞凋亡增强 为了验证 *LONP1* 敲降后细胞凋亡是否增强,本研究采用 qPCR 验证 HEP3B 和 HCCLM3 细胞 RNA 中凋亡相关基因。qPCR 结果显示 HCC3 B 的 *LONP1* 敲降细

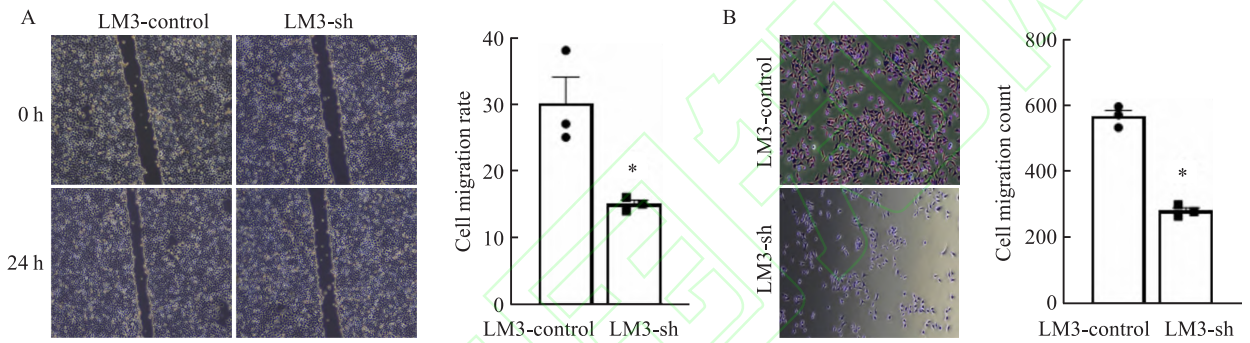


图 3 *LONP1* 敲降对肝癌细胞系迁移的影响 ($n = 3$)

Fig. 3 The effect of *LONP1* knockdown on the migration of hepatocellular carcinoma cell lines ($n = 3$)

A: A wound healing assay was performed to validate the effect of *LONP1* on the migration ability of LM3 cells $\times 10$; B: A Transwell assay was performed to validate the effect of *LONP1* on the migration ability of LM3 cells $\times 10$; * $P < 0.05$ compared between two groups.

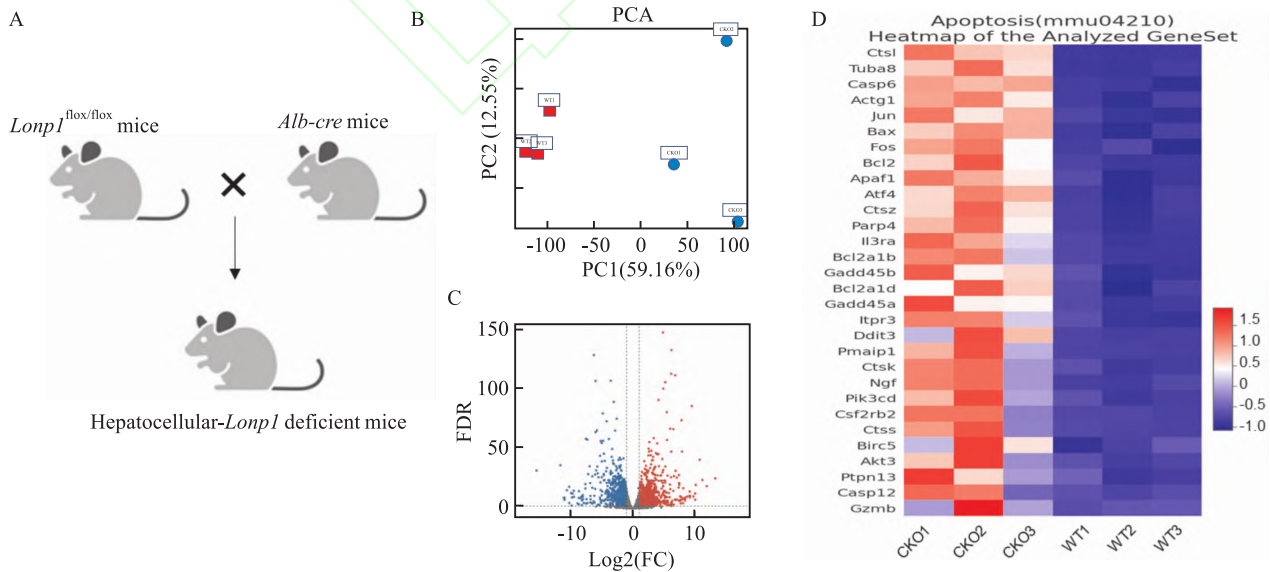


图 4 肝细胞 *LONP1* 条件敲除鼠肝脏组织转录组测序结果 ($n = 3$)

Fig. 4 Transcriptome sequencing results of liver tissue from hepatocyte-specific *LONP1* conditional knockout mice ($n = 3$)

A: Schematic diagram of hepatocyte-specific *LONP1* conditional knockout mice; B: Principal component analysis of transcriptome sequencing results from liver tissue of hepatocyte-specific *LONP1* conditional knockout mice; C: Volcano plot of differential gene expression from transcriptome sequencing; D: Heatmap of gene expression in the KEGG apoptosis pathway (mmu04210) from transcriptome sequencing; WT: wild-type mice; CKO: *LONP1* conditional knockout mice.

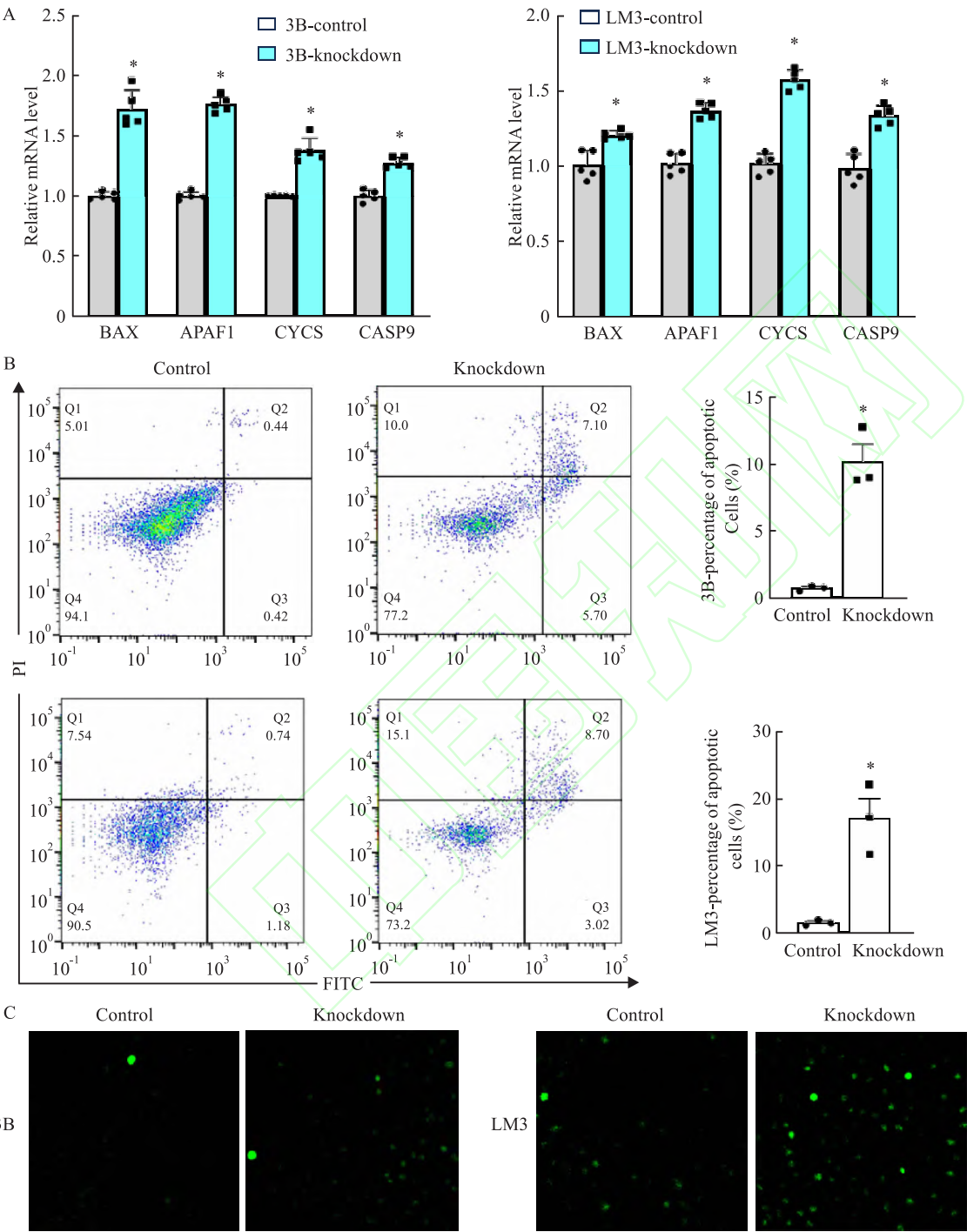


图5 *LONPI* 敲降的肝癌细胞系凋亡增强

Fig. 5 Enhanced apoptosis in liver cancer cell lines with *LONPI* knockdown

A: qPCR of apoptosis-related genes in liver cancer cell lines with *LONPI* knockdown ($n=5$); B: Annexin V-FITC/PI flow cytometry detection of liver cancer cell lines with *LONPI* knockdown ($n=3$); C: TUNEL staining of liver cancer cell lines with *LONPI* knockdown; 3B: HEP3B cells; LM3: HCCLM3 cells; * $P<0.05$ compared between two groups.

细胞的凋亡相关基因 *BAX*、*APAF1*、*CYCS*、*CASP9* ($t=10.18$ 、 22.71 、 8.47 、 9.33 , 均 $P<0.05$) 以及 HCC3B 的 *LONPI* 敲降细胞的凋亡相关基因 *BAX*、*APAF1*、*CYCS*、*CASP9* ($t=4.58$ 、 8.99 、 12.89 、 6.54 , 均 $P<0.05$) 表达增强 (图 5A)。Annexin V-FITC/PI 流式

分析同样显示 *LONPI* 敲降的细胞表现出更高的细胞凋亡率 ($t=7.28$ 、 5.13 , 均 $P<0.05$) (图 5B)。TUNEL 染色显示 *LONPI* 敲降细胞的凋亡增强 (图 5C)。

3 讨论

作为癌症相关死亡的第三大原因,HCC 已成为全球严重的健康威胁因素,预计其发病率将在未来继续增加^[1]。尽管近年来医学的发展在一定程度上延长了 HCC 患者的总体生存期,但 HCC 的发病率和病死率仍然居高不下,临床上仍缺乏疗效好、副作用小的治疗药物。因此,探索 HCC 的发病机制和新的治疗策略对临床 HCC 患者的生存和预后具有重要意义。

肝脏是人体的最大的代谢器官,线粒体是细胞的能量工厂,而驻留在线粒体基质中的线粒体蛋白酶 LONP1 是线粒体的重要成分,缺乏 LONP1 会导致以中枢神经系统、眼部、牙齿、耳部和骨骼多系统发育障碍为特征的 CODAS 综合征^[11];LONP1 除了发挥蛋白酶的作用之外,LONP1 也被证实是伴侣蛋白^[12-14]。总之,LONP1 对于线粒体、细胞、肝脏、肝脏疾病扮演着重要的角色,仍有巨大的探索空间。本研究实验结果显示,LONP1 在肝癌组织的表达水平显著高于癌旁组织。另一从 Pride 数据库(PXD006512)的蛋白质组数据中提取 101 例 HCC 癌组织和 98 例 HCC 癌旁组织的 LONP1 蛋白定量值的研究分析发现,LONP1 在 HCC 癌组织中高表达($P < 0.05$)^[15]。张岩等人^[16]的研究也显示,LONP1 蛋白在 HCC 癌组织中的阳性表达率显著高于癌旁组织。这些研究结果与本研究结果一致。此外,酪蛋白水解肽酶 P(caseinolytic peptidase P, CLPP)也是一种线粒体蛋白酶,CLPP 和 LONP1 组成了线粒体蛋白酶系统。根据 Ishizawa et al^[17]的研究显示,选择性激活 CLPP 会诱导癌细胞凋亡。而 LONP1 与 CLPP 有很多相似性,本研究在肝癌细胞系中敲降 LONP1 后促进肝癌细胞系的细胞凋亡,并且细胞增殖和迁移能力受到抑制,提示通过调控线粒体蛋白酶系统来治疗癌症是一个潜在的研究方向。

总之,本研究发现 LONP1 在肝细胞癌中存在过量表达的情况;在体外构建 LONP1 敲降细胞系会降低肝癌细胞系的增殖和迁移能力;肝细胞 LONP1 敲除小鼠肝脏组织转录组测序结果显示 LONP1 敲除的肝脏凋亡通路表达增强,提示 LONP1 可能通过促进细胞的凋亡来抑制肝癌细胞的增殖和迁移。

本项研究尚且存在些许的不足:一方面,LONP1 对肝细胞癌的肿瘤生物学特性的研究局限于细胞水平,未开展动物肿瘤模型实验的研究,后续将构建动

物肿瘤模型,在体内进一步探究 LONP1 对肿瘤的抑制作用;另一方面,LONP1 如何导致肝癌细胞凋亡没有深入探究,后续将进一步通过新实验来探究 LONP1 低表达如何促进肝癌细胞的凋亡。

参考文献

- [1] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301–14. doi: 10.1016/s0140-6736(18)30010-2.
- [2] Liu Y, Wang Z X, Cao Y, et al. Preoperative inflammation-based markers predict early and late recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2016, 15(3): 266–74. doi: 10.1016/s1499-3872(16)60094-2.
- [3] Gounder M M, Mahoney M R, Van Tine B A, et al. Sorafenib for advanced and refractory desmoid tumors[J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(25): 2417–28. doi: 10.1056/NEJMoa1805052.
- [4] Bruix J, Qin S, Merle P, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2017, 389(10064): 56–66. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32453-9.
- [5] Kudo M, Finn R S, Qin S, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial[J]. *Lancet*, 2018, 391(10126): 1163–73. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30207-1.
- [6] Quirós P M, Langer T, López-Otín C. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(6): 345–59. doi: 10.1038/nrm3984.
- [7] Gan Z, Fu T, Kelly D P, et al. Skeletal muscle mitochondrial remodeling in exercise and diseases[J]. *Cell Res*, 2018, 28(10): 969–80. doi: 10.1038/s41422-018-0078-7.
- [8] Deshwal S, Fiedler K U, Langer T. Mitochondrial proteases: multifaceted regulators of mitochondrial plasticity[J]. *Annu Rev Biochem*, 2020, 89: 501–28. doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-012739.
- [9] Cheng A N, Cheng L C, Kuo C L, et al. Mitochondrial Lon-induced mtDNA leakage contributes to PD-L1-mediated immunoevasion via STING-IFN signaling and extracellular vesicles[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e001372. doi: 10.1136/jitc-2020-001372.
- [10] Kuo C L, Chou H Y, Chiu Y C, et al. Mitochondrial oxidative stress by Lon-PYCR1 maintains an immunosuppressive tumor microenvironment that promotes cancer progression and metastasis[J]. *Cancer Lett*, 2020, 474: 138–50. doi: 10.1016/j.canlet.2020.01.019.
- [11] Strauss K A, Jinks R N, Puffenberger E G, et al. CODAS syndrome is associated with mutations of LONP1, encoding mitochondrial AAA + Lon protease[J]. *Am J Hum Genet*, 2015, 96(1): 121–35. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.12.003.

- [12] Yang Q, Liu P, Anderson N S, et al. LONP-1 and ATFS-1 sustain deleterious heteroplasmy by promoting mtDNA replication in dysfunctional mitochondria[J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(2): 181–93. doi: 10.1038/s41556-021-00840-5.
- [13] Shin C S, Meng S, Garbis S D, et al. LONP1 and mtHSP70 cooperate to promote mitochondrial protein folding[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 265. doi: 10.1038/s41467-020-20597-z.
- [14] Gibellini L, De Gaetano A, Mandrioli M, et al. The biology of Lonp1: more than a mitochondrial protease[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2020, 354: 1–61. doi: 10.1016/bs.ircmb.2020.02.005.
- [15] Jiang Y, Sun A, Zhao Y, et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma[J]. *Nature*, 2019, 567(7747): 257–61. doi: 10.1038/s41586-019-0987-8.
- [16] 张 岩, 向晓星, 王翠梅. LONP1 基因在肝细胞癌中的表达及意义[J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(11): 2513–6.
- [16] Zhang Y, Xiang X X, Wang C M. Expression and significance of the LONP1 gene in hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Hepatol*, 2019, 35(11): 2513–6.
- [17] Ishizawa J, Zarabi S F, Eric Davis R, et al. Mitochondrial ClpP-mediated proteolysis induces selective cancer cell lethality[J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(5): 721–37.e9. doi: 10.1016/j.ccell.2019.03.014.

The expression of LONP1 in hepatocellular carcinoma and its effects on the occurrence and development of hepatocellular carcinoma

Bai Yipeng^{1,2,3}, Xu Dengqiu^{2,3}, Sun Beicheng^{1,2,3,4}

(¹Dept of Hepatobiliary Surgery, The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008; ²Dept of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University; ³MOE Innovation Center for Basic Research in Tumor Immunotherapy;

⁴Anhui Province Key Laboratory of Tumor Immune Microenvironment and Immunotherapy, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression level of LONP1 in hepatocellular carcinoma (HCC) and its impact on the occurrence and progression of HCC. **Methods** The expression of LONP1 in human liver cancer tissues was verified by real-time quantitative PCR (qPCR) and Western blot. *LONP1* stable knockdown Hep3B and HCCLM3 cell lines were established, and the effects of LONP1 on cell proliferation were explored through Cell Counting Kit-8 (CCK-8), EdU incorporation assays, and colony formation assays. The effects of LONP1 on cell migration were assessed using scratch and Transwell migration assays. A Cre-Loxp system was employed to generate *LONP1* conditional knockout mice, and transcriptomic sequencing of liver tissues was performed to explore the impact of *LONP1* deficiency on liver cells. The effects of *LONP1* on apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines were explored using Tunel staining and flow cytometry with Annexin V-FITC/PI. **Results** Western blot and qPCR experiments confirmed the high expression of LONP1 in human liver cancer tissues. Colony formation assays revealed that the number of cell clones in *LONP1* knockdown groups was significantly reduced compared to the control ($P < 0.01$). CCK-8 and EdU assays demonstrated that *LONP1* knockdown cells had a significantly lower proliferation rate than control cells ($P < 0.01$). Scratch and migration assays showed that *LONP1* knockdown liver cancer cells exhibited impaired migration compared to controls ($P < 0.01$). Transcriptomic analysis of liver tissues from *LONP1* conditional knockout mice indicated that LONP1 might affect apoptosis pathways in liver cells. Tunel staining and Annexin V-FITC/PI flow cytometry showed that *LONP1* knockdown increased apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. **Conclusion** LONP1 is highly expressed in liver cancer tissues. The knockdown of *LONP1* in liver cancer cell lines promotes cell apoptosis and inhibits cell proliferation and migration.

Key words LONP1; hepatocellular carcinoma; apoptosis; mitochondria; RNA sequencing; lentivirus infection

Fund programs National Natural Science Foundation of China (Nos. 82120108012, 81930086); Clinical Medical Research Translational Project of Anhui Province (No. 202204295107020008); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2022AH010070); Outstanding Young Talents Support Project of Anhui Province (No. 2408085Y041)

Corresponding authors Xu Dengqiu, E-mail: xudengqiu@163.com; Sun Beicheng, E-mail: sunbc@nju.edu.cn.