

RNA 可变剪接调控因子核不均一核糖核蛋白 F 在头颈鳞状细胞癌中的表达和功能

熊英杰 贾荣*

武汉大学口腔医学院,湖北省口腔基础医学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地
口腔生物医学教育部重点实验室(武汉大学) 湖北 武汉 430079

[摘要] **目的:**研究 RNA 可变剪接调控因子核不均一核糖核蛋白 F(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, hnRNP F) 在头颈鳞状细胞癌中的表达和功能。**方法:**分析 TCGA 数据库和 Oncomine 数据库头颈鳞状细胞癌中 hnRNP F 的表达数据。用在线 cbiportal 数据库分析 hnRNP F 表达与头颈鳞状细胞癌患者无病生存率的关系。用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 抑制 CAL-27 细胞的 hnRNP F 的表达,分析细胞生长。**结果:**TCGA 和 Oncomine 数据分析结果显示 hnRNP F 在头颈鳞状细胞癌中表达水平显著升高, hnRNP F 表达水平高的头颈鳞状细胞癌患者的无病生存率显著低于 hnRNP F 表达水平低的患者。沉默 hnRNP F 的表达显著抑制了 CAL-27 细胞的生长。**结论:**hnRNP F 在头颈鳞状细胞癌的发生发展中可能有重要作用。

[关键词] 头颈鳞状细胞癌 核不均一核糖核蛋白 F RNA 剪接

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2019)12—1129—03

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.12.007

Expression and Function of Splicing Factor hnRNP F in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. XIONG Yingjie, JIA Rong*. *Hubei-MOST KLOS & KLOBME, School and Hospital of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China.*

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and function of hnRNP F in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Methods:** The expression of hnRNP F in head and neck squamous cell carcinoma was analyzed in TCGA and Oncomine database. The relationship between hnRNP F expression and disease-free survival in HNSCC was analyzed in cbiportal database. CAL-27 cells were transfected with anti-hnRNP F siRNA or non-specific siRNA. The growth curve of cells was analyzed by cell counting. **Results:** hnRNP F was overexpressed in HNSCC patients. Patients with high expression of hnRNP F showed significantly poorer disease-free survival than those with low expression of hnRNP F. Knockdown of hnRNP F significantly inhibited CAL-27 cell growth. **Conclusion:** hnRNP F may play important roles in the development of HNSCC.

[Key words] head and neck squamous cell carcinoma hnRNP F RNA splicing

头颈鳞状细胞癌(head and neck cell carcinoma, HNSCC)是一种常见的癌症。口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是 HNSCC 的一个主要类型。核不均一核糖核蛋白 F(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, hnRNP F) 蛋白是 RNA 可变剪接调控因子,属于核不均一核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP)家族中的 hnRNP F/H 亚类。hnRNP F/H

蛋白包括 hnRNP F、hnRNP H、hnRNP H' 和 GRSF1。这些蛋白都可以结合在 RNA 的 G 区(G-tract, 包含 3 个或更多的连续的鸟嘌呤)。有研究表明, hnRNP F 在结肠癌中表达增高并与癌症的发展有关^[1], 但 hnRNP F 在 HNSCC 中的表达与功能尚未明确。既往研究结果显示, hnRNP 家族成员在口腔癌中表达增高, 并与口腔癌的发生密切相关^[2,3]。因此本研究的主要目的是探讨 hnRNP F 在 HNSCC 中的表达和功能。

1 材料与方法

1.1 数据分析方法 The Cancer Genome Atlas Program(TCGA) 数据库包含转录组测序的结果,

基金项目 国家自然科学基金(编号:81470741)

作者简介 熊英杰(1994~), 女, 重庆人, 硕士在读, 主要从事口腔癌前病变和牙体牙髓病学相关基础研究和临床工作。

* 通信作者 贾荣, E-mail: jiarongwh@whu.edu.cn

以转录本的数量代表相应的基因表达水平。TCGA 数据库中 HNSCC 的 hnRNP F 的表达水平数据从在线 TSVdb 数据库获得。总共有 44 例正常组织和 520 例肿瘤组织样本,其中有生存资料的肿瘤样本 392 例。用 Oncomine 数据库对 9 项研究(Cromer Head-Neck、Estilo Head-Neck、BMC Cancer、Ginos Head-Neck、Kuriakose Head-Neck、Peng Head-Neck、Pyeon Multi-cancer、Talbot Lung、Toruner Head-Neck、Ye Head-Neck)的 hnRNP F 的表达水平进行 Meta 分析。

1.2 细胞培养和小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 转染 CAL-27 细胞是 OSCC 细胞系,用含 5% 胎牛血清(Gibco 公司)的 DMEM 培养基(Hyclone 公司)培养。针对 hnRNP F 的 siRNA,即 siRNA-1 和 siRNA-2 的序列分别是:GCGAC-CGAGAACGACAUUU 和 GGAAUGUAUGAC-CACAGAUAC。非特异性 siRNA 由吉玛公司提供。按照 Thermo Fisher Scientific 公司的说明,用 Lipofectamine 3000 将 20 nmol/L 的 siRNA 转染 CAL-27 细胞。以 48 h 的间隔给细胞转染 2 次 siRNA,并在第 1 次转染后的 48 h 和 96 h 进行细胞计数,收集总蛋白。

1.3 Western blot 将细胞总蛋白样本在 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离,转印到硝酸纤维素膜上,与特异性抗体杂交检测蛋白表达。所用抗体有:小鼠抗 hnRNP F 抗体(Santa Cruz 公司)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的小鼠 IgG 结合蛋白(Santa Cruz 公司)和 HRP 标记的抗肌动蛋白(actin)抗体(Sigma 公司)。

1.4 统计学分析 hnRNP F 在 TCGA 数据中的 HNSCC 组织和正常对照组织中的表达水平分析和细胞生长组间比较采用 *t* 检验。无病生存期的数据来源于 cbiportal 在线数据库,采用 Kaplan-Meier 法分析 hnRNP F 高表达和低表达患者的无病生存率的差异。

2 结果

2.1 hnRNP F 在 HNSCC 中的表达 首先我们比较了 TCGA 数据库中 HNSCC 和正常对照组织中 hnRNP F 表达水平差异。结果显示肿瘤组织中 hnRNP F 的相对表达水平为(4994±194),正常组织中 hnRNP F 的表达水平为(5502±66)。肿瘤中 hnRNP F 的表达水平显著高于正常组织($P <$

0.05),提示 hnRNP F 可能与 HNSCC 相关,并发挥促进作用。

本文在 Oncomine 数据库中分析了 9 项研究的 12 个关于 HNSCC 和正常对照组织中 hnRNP F 的表达水平的分析,发现有 8 项分析研究的 hnRNP F 的表达水平显著升高($P < 0.05$,大于 1.2 倍),综合 13 个分析数据得出 HNSCC 组织的 hnRNP F 表达水平高于正常对照组织的概率是 0.003,证实了 hnRNP F 在 HNSCC 中呈高表达。

本文应用在线 cbiportal 数据库分析了 hnRNP F 的表达与 TCGA 数据库中 HNSCC 患者的生存时间的关系,结果发现 hnRNP F 表达水平低的患者($n=69$)的无病生存率显著高于 hnRNP F 高表达患者($n=323$, $P=0.0336$,图 1),提示 hnRNP F 的高表达可能与患者的不良预后相关,并进一步说明 hnRNP F 可能在 HNSCC 的发展中发挥促进作用。

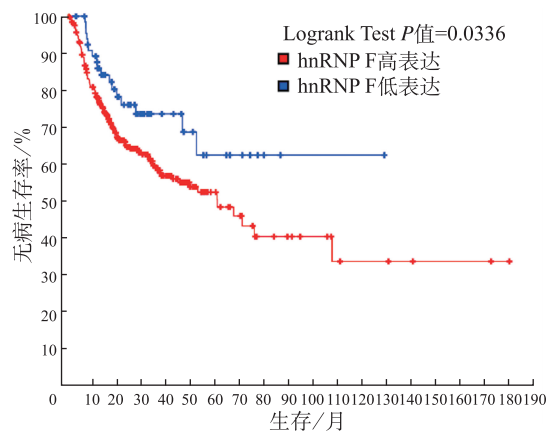


图 1 hnRNP F 表达水平与 TCGA 数据库 HNSCC 患者的无病生存率的关系

Fig. 1 The relationship between the expression of hnRNP F and disease free survival in TCGA head and neck carcinoma dataset.

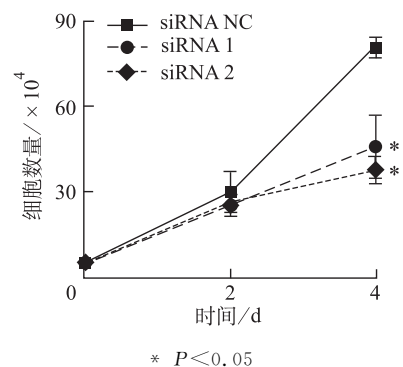


图 2 沉默 hnRNP F 的表达对 CAL-27 细胞生长的影响

Fig. 2 The effect of hnRNP F knockdown on the growth of CAL-27 cells.

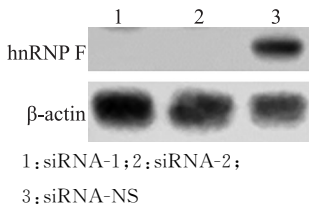


图 3 Western blot 检测 siRNA 抑制 hnRNP F 表达的效果

Fig. 3 The knockdown efficiency of hnRNP F was analyzed by western blotting.

2.2 hnRNP F 在 OSCC 细胞中的功能 在 OSCC 细胞系 CAL-27 中,用 siRNA 抑制 hnRNP F 的表达,然后检测细胞的生长,结果发现与对照 siRNA 相比,经过 hnRNP F-siRNA 处理的 CAL-27 细胞生长明显减慢 ($P < 0.05$,图 2)。Western blot

检测结果显示 2 个 hnRNP F 的特异性 siRNA 都可以显著降低 CAL-27 细胞中的 hnRNP F 的蛋白表达水平(图 3)。以上结果提示 hnRNP F 在 OSCC 细胞的生长中具有重要作用。

3 讨论

真核生物的基因包含外显子和内含子。基因转录后产生的前体 mRNA 要将内含子剪除才能形成能编码蛋白的成熟 mRNA。但有些基因的 RNA 有多种剪接方式,从而可以编码多种功能不同的蛋白。很多研究都表明癌症的产生和发展与 RNA 的可变剪接密切相关^[4]。RNA 的可变剪接主要是由可变剪接调控因子调控。前期我们对剪接调控因子富丝氨酸/精氨酸剪接因子 3 (serine and arginine rich splicing factor 3, SRSF3) 对精子相关抗原 5 (sperm-associated antigen 5, SPAG5) 外显子 3 和 hnRNP L 对 CD55 内含子 7 的可变剪接的调控作用进行研究^[5,6],并发现 hnRNP L、hnRNP A1 和 SRSF3 等基因在 OSCC 中呈显著高表达,并有促进癌症发生发展的作用。hnRNP F 是重要的可变剪接调控因子。Tyson-Capper 等^[7]发现在乳腺癌细胞中 hnRNP F 可以和其它剪接调控因子一起促进髓样细胞白血病-1 (myeloid cell leukemia-1, Mcl-1) 外显子 2 的剪接,并利于产生抗凋亡的 Mcl-1L 亚型的表达, hnRNP F 也可以结合 DNA。Ghosh 等^[8]发现 hnRNP F 结合到 Bcl-2 修饰因子 (Bcl-2-modifying factor, Bmf) 基因的启动子区,抑制 Bmf 基因的转录,从而抑制糖尿病患者肾近端管状细胞的凋亡。这些研究结果提示 hnRNP F 与抗凋亡作用有关。还有研究结果提示 hnRNP F 蛋白在结肠癌中呈显著高表达^[9]。但有关 hnRNP F 在癌症中的功能研究还较少。有研究发现膀胱癌患者的 hnRNP F 的表达水平显著升高,并与患者的预后呈负相关,而且抑制 hnRNP F 的表达显著抑制了膀

胱癌细胞的增殖^[10]。Goh 等^[11]发现在人胚胎肾细胞中过表达 hnRNP F 可以促进细胞的增殖。本研究发现 hnRNP F 在 HNSCC 组织中呈显著高表达,并与患者的无病生存率呈负相关;抑制 OSCC 细胞表达 hnRNP F 后细胞的生长受到了明显的抑制,提示 hnRNP F 与 HNSCC 的发生发展密切相关,提示 hnRNP F 具有重要的功能。

参考文献

- [1] Balasubramani M, Day BW, Schoen RE, et al. Altered expression and localization of creatine kinase B, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, and high mobility group box 1 protein in the nuclear matrix associated with colon cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 763-769.
- [2] Yu C, Guo J, Liu Y, et al. Oral squamous cancer cell exploits hnRNP A1 to regulate cell cycle and proliferation [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(9): 2252-2261.
- [3] Jia R, Zhang S, Liu M, et al. HnRNP L is important for the expression of oncogene SRSF3 and oncogenic potential of oral squamous cell carcinoma cells [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35976.
- [4] Radhakrishnan A, Nanjappa V, Raja R, et al. Dysregulation of splicing proteins in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(2): 219-229.
- [5] 刘佩琦,石黎明,贾荣. SRSF3 调控口腔癌细胞中 SPAG5 外显子 3 的可变剪接的研究[J]. *口腔医学研究*, 2016, 32(1): 8-11.
- [6] 张德,刘苗苗,刘佩琦,等. HnRNP L 调控口腔癌细胞中 CD55 内含子 7 的可变剪接的研究[J]. *口腔医学研究*, 2016, 32(10): 1006-1009.
- [7] Tyson-Capper A, Gautrey H. Regulation of Mcl-1 alternative splicing by hnRNP F, H1 and K in breast cancer cells [J]. *RNA Biol*, 2018, 15(12): 1448-1457.
- [8] Ghosh A, Zhao S, Lo CS, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F mediates insulin inhibition of bcl2-modifying factor expression and tubulopathy in diabetic kidney [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6687.
- [9] Nibbe RK, Markowitz S, Myeroff L, et al. Discovery and scoring of protein interaction subnetworks discriminative of late stage human colon cancer [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(4): 827-845.
- [10] Li F, Zhao H, Su M, et al. HnRNP-F regulates EMT in bladder cancer by mediating the stabilization of Snail1 mRNA by binding to its 3' UTR [J]. *EBioMedicine*, 2019, 45: 208-219.
- [11] Goh ET, Pardo OE, Michael N, et al. Involvement of heterogeneous ribonucleoprotein F in the regulation of cell proliferation via the mammalian target of rapamycin/S6 kinase 2 pathway [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(22): 17065-17076.

[收稿日期:2019-06-05]

(本文编辑 关隽)