

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.03.034

# Hela 细胞中突变 PSF 蛋白对细胞增殖 迁移及可变剪接的影响

李 骞, 安婷婷, 吴传芳

(四川大学生命科学学院功能基因组实验室, 成都 610065)

**摘要:** PSF 作为真核细胞中的抑癌蛋白, 在 HeLa 细胞发生基因突变导致其蛋白功能改变。为了阐明突变体 PSF 蛋白在肿瘤细胞的作用, 本文分别采用 siRNA 干扰、细胞生长曲线、细胞划痕等实验检测 muPSF 对 HeLa 细胞增殖及迁移的影响, 半定量 PCR 实验分析 PSF 调控的下游靶基因的可变剪切情况。研究结果显示, 当通过 siRNA 干扰 muPSF 的表达后 HeLa 细胞的增殖迁移能力下降, 高表达突变体 PSF 可增强 HeLa 细胞的增殖与迁移, 半定量 PCR 实验分析 PSF 下游调控基因显示 muPSF 可以改变增殖和迁移相关基因的可变剪接形式。因此, 我们的实验证明, HeLa 细胞中 muPSF 通过调控下游靶基因的可变剪切影响 HeLa 细胞的增殖和迁移能力。

**关键词:** HeLa 细胞; PSF 蛋白; 可变剪接; 增殖与迁移; RNA 干扰

**中图分类号:** Q291      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2018)03-0619-06

## Mutant of PSF effects on the proliferation, migration and alternative splicing in HeLa

LI Qian, AN Ting-Ting, WU Chuan-Fang

(Department of Functional genome, College of Life Sciences, Sichuan university, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** PSF is an important tumor-suppressor protein in eukaryotic cells. In HeLa cells, PSF gene is mutant and leads to transform of its function. In order to clarify the function of PSF mutant (muPSF) in HeLa cells, muPSF was knocked down by designed siRNA. Through the cell growth, wound scratch assay and detecting alternative splicing (AS) of downstream genes by semiquantitative PCR. The results showed that RNAi of muPSF expression could down regulate migration and proliferation of HeLa cells, and rescue of muPSF had its ability to enhance the migration and proliferation. The study confirmed that muPSF, in HeLa cells, regulated the migration and proliferation by AS of downstream genes.

**Keywords:** HeLa cell; PSF; Alternative splicing; Proliferation and migration; RNA interference

## 1 引言

可变剪接(alternative splicing, AS)是广泛存在于真核生物中的一种 RNA 转录后加工过程。在 RNA 剪接过程中,对于 mRNA 前体核内不均一

RNA (heterogeneous nuclear RNA, hnRNA) 外显子的缺失或插入,可以产生不同碱基序列的成熟 mRNA,从而进一步表达形成不同的蛋白质<sup>[1]</sup>。可变剪接作为一种有效的转录后水平调控形式,影响着真核细胞中众多基因的表达。在真核细胞中,近

收稿日期: 2017-03-28

基金项目: 国家自然科学基金(31300674)

作者简介: 李骞(1992-), 男, 贵州贵定人, 硕士研究生, 研究方向为细胞的分子生物学。E-mail: liqianhello@foxmail.com

通讯作者: 吴传芳。E-mail: wuchuanfang@gmail.com

95%的多外显子基因参与了可变剪接过程<sup>[2]</sup>。

多聚嘧啶束结合蛋白剪接相关因子(polyypyrimidine tractbinding protein-associated splicing factor, PSF)在真核细胞中广泛存在,是第一个发现与 mRNA 前体剪接相关的蛋白<sup>[3]</sup>。在真核细胞中,PSF 与多种生命活动相关,例如 RNA 的剪接,病毒复制,基因重组及肿瘤发生等等。在正常细胞中 PSF 蛋白含有 1 个 DNA 结合域及 2 个 RNA 结合域,PSF 通过其 DNA 结合域与 GAGE6 启动子结合并抑制 GAGE6 的转录,发挥肿瘤抑制蛋白的功能。在恶性肿瘤细胞中,PSF 通常由两种方式失去功能。一方面,PSF 低表达导致功能的丧失,如在 MCF7 等肿瘤细胞中<sup>[4]</sup>。另一方面,在多种肿瘤细胞中,PSF 通过与长非编码 RNA MALAT1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1)结合,导致结构发生改变,从而不能结合 GAGE6 基因启动子区域,使得原癌基因大量转录,促进肿瘤形成<sup>[5]</sup>。本实验室前期研究发现在宫颈癌细胞系 HeLa 中,PSF 基因发生突变丧失了 DNA 结合域,该结合域的丢失导致 PSF 蛋白与下游转录调节区域的分离<sup>[4]</sup>。为了研究 HeLa 细胞的恶变是否与 PSF 突变相关以及 PSF 突变体在 HeLa 细胞的作用,本文利用 RNA 干扰技术,在 HeLa 细胞中特异性地敲低 muPSF 的表达量,检测 HeLa 细胞的增殖与迁移能力;同时本研究探讨了 HeLa 细胞中 muPSF 对于下游转录产物可变剪接形式的影响,进一步解释 muPSF 在 HeLa 细胞中的调控作用。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

2.1.1 实验菌株、质粒及细胞株 大肠杆菌 *E. coli* 菌株 DH5 $\alpha$  用于重组质粒筛选与扩大;质粒 pcDNA3.1+ cloning vector 用于构建 PSF 蛋白表达载体;人宫颈癌细胞系 HeLa 用于转染 siRNA 及 PSF 蛋白表达载体;人胚肾细胞 293T 用于克隆正常 PSF 蛋白序列。上述材料均由本实验室保存。

2.1.2 主要试剂 siRNA oligo 购于上海吉玛制药技术有限公司。Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000、Trizol、ECL 试剂盒、T4 DNA ligase、restriction endonuclease、RNase Inhibitor、reverse transcription kit、dNTPs、细胞培养基 MEM-high glucose、胎牛血清均购自 Thermo 公司;质粒纯化提取试剂盒、2 $\times$

PCR mix、2 $\times$ qPCR mix、DNA marker 购于 Foregene 公司;PSF 蛋白抗体购于 Santa 公司; $\beta$ -actin 蛋白抗体购于 Proteintech 公司;蛋白预染 marker 购于 Bio-Rad 公司。

### 2.2 实验方法

2.2.1 HeLa 细胞培养及 siRNA 干扰 HeLa 细胞使用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基进行培养,细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱内培养。siRNA 的转染参照 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染试剂说明书进行转染,终浓度为 100nM,并于转染后 48h 收集细胞。siRNA 序列如下: siRNA 正义链: 5'-TATGGAGAACCAGGAGAAGdTdT-3'; siRNA 反义链: 5'-CTTCTCCTGGTTCTCCAT-AdTdT-3'。

2.2.2 定量 RT-PCR 检测 muPSF 转录水平 当 HeLa 细胞生长密度达到 80% 左右时,Trizol 收集提取细胞总 RNA。通过定量 RT-PCR 检测 muPSF 蛋白的转录水平,内参基因选用  $\beta$ -actin。反应条件如下:体系 20 $\mu\text{L}$ ,94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3min,94 $^{\circ}\text{C}$  30s,55 $^{\circ}\text{C}$  30s,72 $^{\circ}\text{C}$  15s(共 35 个循环)。检测引物如表 1。PSF 检测产物长度 216bp; $\beta$ -actin 检测产物长度 240bp。引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

表 1 PSF 转录水平检测引物

Tab. 1 Primers for PSF transcription level

Name	primer sequences(5'-3')
PSF-detect sense	AGCGATGTCGGTTGTTTGTGGG
PSF-detect antisense	CAAAGCGAACTCGAAGCTGTCTA
$\beta$ -actin-detect sense	CACGCATGGAGGGCCGGACT-CATC
$\beta$ -actin-detect antisense	TAAAGACCTCTATGCCAACA-CAGT

2.2.3 正常 PSF(normal PSF, nPSF)及突变型 PSF(mutant PSF, muPSF)同义突变表达质粒的构建 当 293T 细胞在六孔板中生长密度达到 80% 左右时,Trizol 收集提取细胞总 RNA 并利用随机引物逆转录为 cDNA。根据 NCBI 数据库中 nPSF 蛋白 CDS 序列设计引物并构建同义突变 nPSF 表达载体,以避免 siRNA 对外源蛋白 mRNA 的干扰,引物如表 2 所示。在 nPSF 的 N 端加入了 Flag 标签,便于外源表达蛋白的检测。命名为 Flag-nPSF 质粒。由北京擎科新业生物技术有限公司进行测序。

表 2 PSF 表达载体构建引物  
Tab. 2 Primers for PSF expression

Name	primer sequences(5'-3')
PSF sense	TAAGCTAGCGCCACCATGTCTCGG GATCGGTTCCGAGT
PSF antisense	TATCTCGAGCTAAAATCGGGGTT TTTTG
Bridge forward	TACGGTGAGCCTGGTGAGGTTTT TATCAACAAAGGC
Bridge reverse	CTCACCAGGCTCACCGTATTTAGC AAATAGTCTTTTGAATTC

利用 nPSF 相同引物, 将同义突变引入 muPSF 表达序列中. 在 muPSF 的 N 端加入了 Flag 标签. 获取的质粒命名为 Flag-muPSF 质粒. 由北京擎科新业生物技术有限公司进行测序.

2.2.4 western-blotting 检测 muPSF 及 nPSF 表达水平 Flag-muPSF 及 Flag-nPSF 的转染参照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书进行转染, 终浓度为 1250ng/mL, 并于转染后 48h 收集细胞. 当 HeLa 细胞生长密度达到 80% 左右时, 将细胞收集裂解获得 100 $\mu$ L 蛋白溶液. 利用 8% SDS-PAGE 对蛋白进行电泳分离后进 western-blotting 定量检测, 内参基因选用  $\beta$ -actin.

2.2.5 HeLa 细胞生长曲线绘制 在 12 孔板内接种  $1 \times 10^5$  的 HeLa 细胞, 12h 后进行转染, 并分别于转染后 0h、6h、12h、24h、48h 进行细胞计数. 每个时间点、每个组别进行三个重复副孔计数. 细胞计数方法: 利用 0.25% 胰酶消化, 将细胞用 MEM 培养基重悬为单细胞悬液. 利用血球计数法, 绘制细胞生长曲线, 绘制平均抑制率. 平均抑制率 = [(对照组 - 实验组) / 对照组]  $\times 100\%$ .

各组根据转染的内容分为:

对照组: siRNA-NC;

muPSF 敲低组: siRNA-muPSF;

muPSF 回复组: siRNA-muPSF + Flag-muPSF;

nPSF 作为对照的回复对照组: siRNA-muPSF + Flag-nPSF;

nPSF 高表达组: Flag-nPSF.

2.2.6 细胞划痕实验 在 6 孔板中接种  $1 \times 10^5$  的 HeLa 细胞, 12h 后进行转染, 分别为: siRNA-NC、siRNA-muPSF、siRNA-muPSF + Flag -muPSF、siRNA-muPSF + Flag-nPSF、Flag -nPSF. 在转染后 24h, 细胞汇合度达到 80% 左右, 利用 200 $\mu$ L 无

菌枪头在 6 孔板底面按直线在细胞层进行划痕, 用 PBS 清洗三次, 加入无血清 MEM 培养基继续培养, 在 0h 至 24h 照相记录划痕情况. 细胞迁移率 = (24h 划痕宽度 / 0h 划痕宽度)  $\times 100\%$ .

2.2.7 RNA 可变剪接形式的检测 当 HeLa 细胞生长密度达到 80% 左右利用 Trizol 收集总 RNA 并利用随机引物逆转录为 cDNA. 根据相关文献报道设计下游可变剪接检测引物, 如表 3 所示. 利用 rPCR 对可变剪接形式的改变进行检测, 选用  $\beta$ -actin 作为内参基因. 反应条件如下: 体系 10 $\mu$ L, 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s (共 30 个循环). 检测基因包括: CCR6、MCL1、WDHD1 及 CASPASE2.

表 3 可变剪接形式检测引物

Tab. 3 Primers for alternative splicing detection

Name	primer sequences(5'-3')
CCR6 sense	CCAAAGTCACCAGAGGGAAA
CCR6 antisense	CTGGCTTAGGAATGGGATCA
MCL1 sense	AGACCTTACGACGGGTTGG
MCL1 antisense	ACATTCCTGATGCCACCTTC
WDHD1 sense	TCTTGTTGGATCCTCAGTGGC
WDHD antisense	CATCATCATCCAAGTCTTCCC
CASPASE2 sense	TTGCACAGTTACCTGCACACC
CASPASE2 antisense	GGTCTTTCCATCTTGTGGTC

### 3 实验结果

#### 3.1 muPSF 基因水平及表达水平的鉴定

以 HeLa 细胞 cDNA 文库作为模板, 通过 PCR 获取并测序鉴定, HeLa 细胞中的 muPSF 编码阅读框序列 685bp-861bp 缺失 (图 1. A). western-blotting 检测 muPSF 表达量, muPSF 在 HeLa 细胞中具有较高的表达水平 (图 1. B).

#### 3.2 siRNA 对 muPSF 转录水平的影响

siRNA-muPSF 转染干扰了 HeLa 细胞中 muPSF 的转录水平. siRNA-NC 作为负对照. 结果显示 (图 2), 在第一次 RNA 干扰后 48h, siRNA-muPSF 组与 siRNA-NC 组相比, muPSF 转录水平下调 81.9%, 证明 siRNA-muPSF 有效降低了 muPSF 的表达.

#### 3.3 muPSF 对 HeLa 细胞增殖及迁移能力的影响

利用 siRNA-muPSF 下调 muPSF 的表达水平 (图 3. A). 结果中显示, siRNA-muPSF 组与 siRNA-NC 组相比, 细胞增殖能力下降, 在 48h 的抑制率为

31.6%(图 3. B). 细胞迁移能力下降,24h 时由公式计算,siRNA-NC 组细胞迁移率为 44.4%,siRNA-

muPSF 为 15.0%(图 3. C). muPSF 的下调导致 HeLa 细胞生长速度放缓,细胞迁移能力下降.

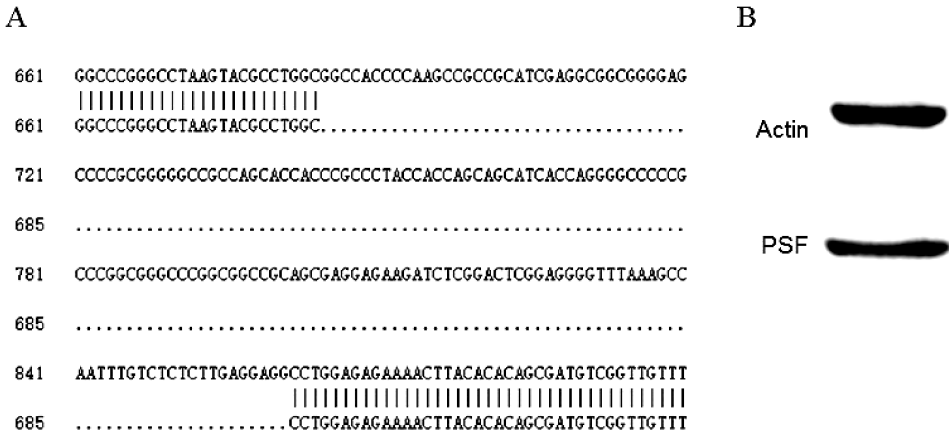


图 1 HeLa 细胞中 muPSF 基因水平及表达水平的鉴定

A. 编码框缺失比对;B. muPSF 表达量检测

Fig. 1 muPSF in HeLa cells

A. Deletion of reading frame; B. Detection of muPSF by western blotting

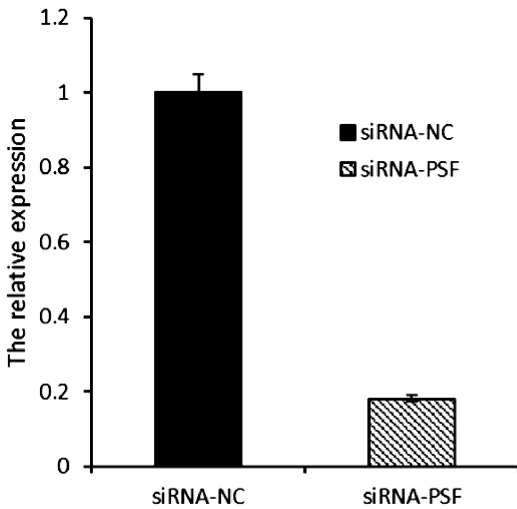


图 2 定量 PCR 检测 HeLa 细胞中 muPSF 的转录水平

Fig. 2 Transcription level of muPSF mRNA in HeLa cells by qRT-PCR

### 3.4 muPSF 回复实验

在 muPSF 敲低的 HeLa 细胞中高表达 muPSF,观察细胞功能的回复情况,以 nPSF 作为对照.muPSF 的回复使得 HeLa 细胞生长速度加快,细胞迁移能力上升.nPSF 在敲低细胞中的高表达对细胞功能没有明显影响,但在普通 HeLa 细胞中可以导致细胞增殖与迁移的下降(图 4,5).可能由于 muPSF 的敲低导致细胞恶变程度的降低,nPSF 的高表达对于低恶变程度的细胞效果不明显.

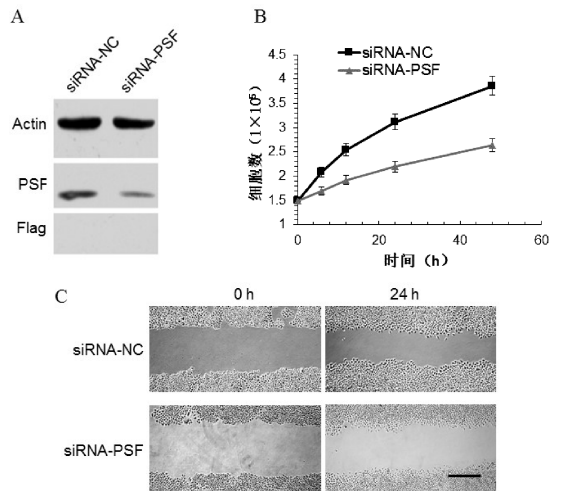


图 3 muPSF 对 HeLa 细胞增殖及迁移能力的影响.A. muPSF 敲低蛋白水平检测;B. 细胞生长曲线;C. 细胞划痕分析

Fig. 3 muPSF effects on migration and proliferation of HeLa cells. A. Detection of muPSF down-regulation; B. Cell growth curve. C. Cell scratch assay. The scale is 0.2μm

### 3.5 muPSF 对 HeLa 细胞生长及迁移相关基因可变剪接形式的调控

利用半定量 PCR 检测各组细胞生长及迁移相关基因可变剪接形式的改变(图 6).muPSF 的敲低使得下游基因的可变剪接发生改变,这种改变随着 muPSF 的回复而回复.nPSF 在敲低细胞中没有明显作用,在普通 HeLa 细胞中,并不一定导致可变剪接形式的改变,这可能是由于 nPSF 与 muPSF 的竞争导致的.

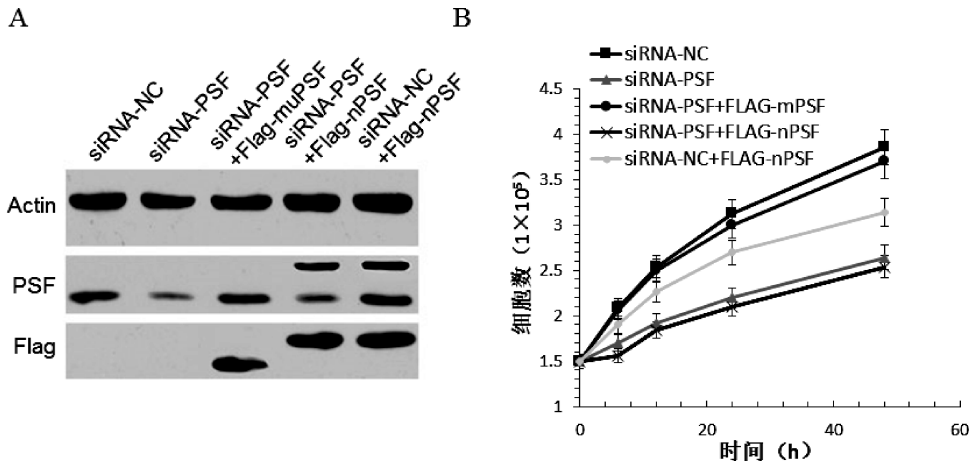


图 4 muPSF 回复实验对细胞增殖能力的影响

A. muPSF 回复蛋白水平检测 B. 细胞生长曲线

Fig. 4 Rescue of muPSF effects on proliferation of HeLa cells

A. Detection of muPSF rescue; B. Cell growth curve

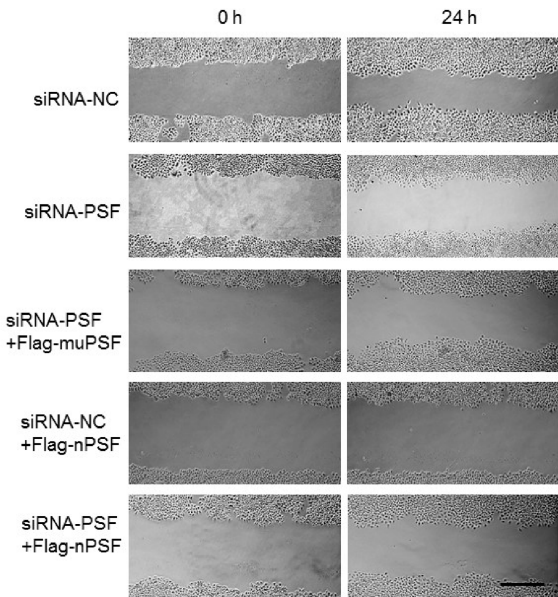


图 5 muPSF 回复实验对细胞迁移能力的影响

Fig. 5 Rescue of muPSF effects on migration of HeLa cells

The scale is 0.2μm

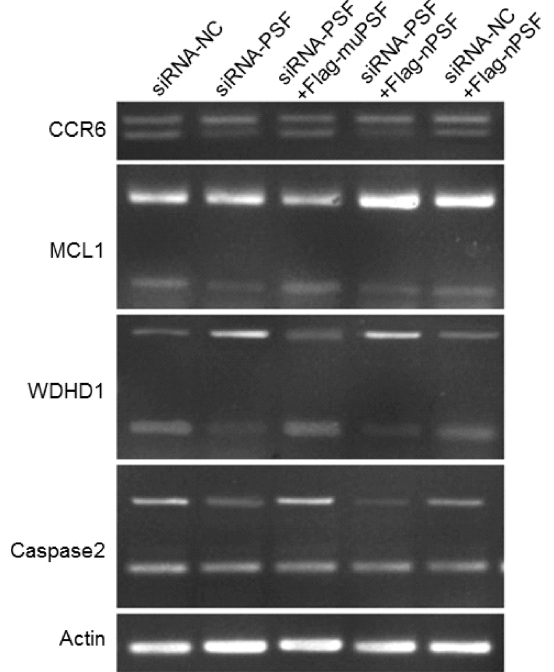


图 6 HeLa 细胞中基因可变剪接形式的改变

Fig. 6 Alternative splicing detection in HeLa cells

被检基因中,CCR6 与细胞迁移相关,WDHD1 与细胞 DNA 复制相关,MCL2 及 CASPASE2 与细胞凋亡相关.其中 CASPASE2 基因具有凋亡活性的剪接型出现降低,与之前相关文献一致<sup>[6]</sup>.因此证明 muPSF 在 HeLa 细胞中,与多种恶性肿瘤细胞增殖、迁移及其他特性相关的基因的可变剪接调控相关.

### 4 讨论

细胞的分裂失控导致其无限增殖及细胞迁移能力的上升,这是恶性肿瘤细胞的两个主要特征,也是恶性肿瘤细胞损害正常生物体机能的重要途

径.肿瘤细胞的恶化是多基因突变及多种调控方式共同作用的结果,可变剪接就是其中一种重要的形式.恶性肿瘤细胞与正常细胞相比,其可变剪接形式的改变通常体现在基因组层面上,所涉及的基因通常包括各种原癌基因及抑癌基因.因此可变剪接的研究对于肿瘤细胞有着重要的意义.

在 A549 细胞中,通过高表达 RBM5,导致 caspase2 及 c-FLIP 等凋亡相关基因的可变剪接形式改变,对肿瘤细胞的迁移增殖能力有着一定的抑制作用<sup>[6,7]</sup>.MCF7 细胞中,利用转录组测序分析,发现了 12 个与细胞黏着及细胞运动相关的基因发

生了可变剪接<sup>[8]</sup>. 因此,可变剪接被研究者当做肿瘤检测的标志物,建立了可变剪接与癌症诊断相关的数据库<sup>[9]</sup>.

PSF 作为一个重要的剪接元件,除了本身可以与 RNA 相互结合外,还与许多剪接相关因子相互作用. PTB 是这些相关蛋白中重要的一种,在 293T 细胞中,PTB 在全基因组水平上参与了可变剪接的调控<sup>[10]</sup>. PSF 还与剪接体之间具有相互作用,在剪接体复合物中 PSF 主要与 snRNP U5 结合,可能参与到 snRNP U5 形成套索的过程中.<sup>[11]</sup> PSF 还与参与可变剪接的长非编码 RNA 相互作用. MALAT1 作为分子海绵吸附 SR 蛋白剪接因子参与到可变剪接中<sup>[5]</sup>,同时也有研究证明 MALAT1 对 HeLa 细胞的增殖及迁移能力有着明显的影响<sup>[12]</sup>. 因此,突变的 PSF 在 HeLa 细胞中的作用具有重要的研究的意义.

本研究中探讨了在 HeLa 细胞突变的 PSF 蛋白具有对恶性肿瘤细胞的促进作用. 通过降低 muPSF 在 HeLa 细胞中的表达可以抑制细胞的增殖和迁移作用,这一功能与正常的 PSF 蛋白之间是相反的. HeLa 细胞中的 PSF 蛋白 DNA 结合域的缺失,导致 PSF 蛋白对于可变剪接的调控出现异常,由原有的抑癌基因转变成原癌基因;当 muPSF 表达降低时, caspase2 的可变剪接形式与张磊等人在 A549 细胞中高表达 RBM5 导致肿瘤增殖与迁移能力受到抑制时的表型相同<sup>[6]</sup>,具有重要的研究前景. 本研究一方面为 PSF 各结构域的功能的研究提供了一条新的思路,为进一步研究 PSF 参与可变剪接过程的机制奠定了基础;另一方面,针对 HeLa 细胞中突变的 PSF,可以为宫颈癌的治疗提供新的途径.

#### 参考文献:

[1] Black D L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing [J]. *Annu Rev Biochem*, 2003, 72: 291.

- [2] Pan Q, Shai O, Lee L J, *et al.* Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing [J]. *Nat Genet*, 2008, 40: 1413.
- [3] Patton J G, Porro E B, Galceran J, *et al.* Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor[J]. *Genes Dev*, 1993, 7: 393.
- [4] Song X, Sun Y, Garen A. Roles of PSF protein and VL30 RNA in reversible gene regulation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 12189.
- [5] Li L, Feng T, Lian Y, *et al.* Role of human non-coding RNAs in the control of tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 12956.
- [6] Zhang L, Zhang Q, Yang Y, *et al.* The RNA recognition motif domains of RBM5 are required for RNA binding and cancer cell proliferation inhibition [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 444:445.
- [7] 张磊, 季雯娟, 柏庆然, 等. RBM5 蛋白调控 c-FLIP 差异性剪切及其抑制 A549 增殖的研究 [J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2010, 47: 911.
- [8] Aversa R, Sorrentino A, Esposito R, *et al.* Alternative Splicing in Adhesion and Motility-Related Genes in Breast Cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17:121.
- [9] Feng H, Qin Z, Zhang X. Opportunities and methods for studying alternative splicing in cancer with RNA-Seq [J]. *Cancer Lett*, 2013,340:179.
- [10] Xue Y, Zhou Y, Wu T, *et al.* Genome-wide analysis of PTB-RNA interactions reveals a strategy used by the general splicing repressor to modulate exon inclusion or skipping [J]. *Mol Cell*, 2009,36:996.
- [11] Peng R, Dye B T, Perez I, *et al.* PSF and p54nrb bind a conserved stem in U5 snRNA [J]. *RNA*, 2002,8:1334.
- [12] 齐文川, 李骞, 吴传芳. 低表达长非编码 RNA MALAT1 对人宫颈癌 HeLa 细胞体外生长和迁移的影响 [J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2015, 52: 901.