

李梦媛,杨星九,张文龙,等. DOX 调控 HNRNPk 稳定下调的 H1299 细胞株的构建与研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 59-65.

Li MY, Yang XJ, Zhang WL, et al. Establishment and analysis of the H1299 cell line for HNRNPk downregulated by DOX [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 59-65.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.01.009

DOX 调控 HNRNPk 稳定下调的 H1299 细胞株的构建与研究

李梦媛,杨星九,张文龙,李维莎,曹琳,刘宏飞,高 苒*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京 100121)

【摘要】 目的 构建 DOX 调控 HNRNPk 稳定下调的 H1299 细胞株,并研究 HNRNPk 下调对细胞增殖与凋亡的影响。**方法** 用包装好的慢病毒感染 H1299 细胞,感染 72 h 后利用嘌呤霉素筛选阳性细胞并扩大培养获得稳转株,通过定量 PCR 与 Western blot 检测 HNRNPk 表达效率,并研究 HNRNPk 下调对细胞增殖与凋亡的影响。**结果** 成功构建了 DOX 调控 HNRNPk 稳定下调的 H1299 细胞株,HNRNPk 的下调抑制了 H1299 细胞的增殖,但对其凋亡没有明显影响。**结论** HNRNPk 下调抑制了 H1299 细胞的增殖。

【关键词】 HNRNPk; DOX; 细胞增殖; 细胞凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0059-07

Establishment and analysis of the H1299 cell line for HNRNPk downregulated by DOX

LI Mengyuan, YANG Xingjiu, ZHANG Wenlong, LI Weisha, CAO Lin, LIU Hongfei, GAO Ran*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College; NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine Beijing; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish the H1299 cell line with HNRNPk downregulated by DOX and study the effect of HNRNPk downregulation on cell proliferation and apoptosis. **Methods** H1299 cells were infected with a packaged lentivirus. After 72 h, positive cells were selected by puromycin and expanded to a stable transgenic cell line. The expression efficiency of HNRNPk was detected by qPCR and Western blot. The effects of HNRNPk downregulation on cell proliferation and apoptosis were analyzed. **Results** The H1299 cell line with HNRNPk downregulated by DOX was established successfully. Downregulation of HNRNPk inhibited the proliferation of H1299 cells but did not affect apoptosis. **Conclusions** Downregulation of HNRNPk inhibits the proliferation of H1299 cells.

【Keywords】 HNRNPk; DOX; cell proliferation; apoptosis

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程-重大协同创新项目-协同创新团队资助(2016-I2M-3-019)。

【作者简介】 李梦媛(1988—),女,主管技师,研究方向:肿瘤学。E-mail:limengyuan767@126.com

【通信作者】 高苒(1980—),女,副研究员,硕士生导师,研究方向:肿瘤学。E-mail:gaoran26@hotmail.com

核不均一核糖核蛋白 K (heterogeneous nuclearrbonucleoprotein K, HNRNPK) 是 hnRNPs 家族成员之一,其基因位于人第 9 号染色体 q21.32~q21.33,序列高度保守,含有 3 个 K 同源区(K homologue, KH),每个 K 同源区由 65~70 个氨基酸组成,该区域能够与 RNA 和 DNA 结合并相互作用^[1-2]。HNRNPK 还含有一个核定位信号(nuclear localization signals, NLS)以及一个核穿梭结构域(nuclear shuttling domain, KNS)^[3];NLS 调节 HNRNPK 从胞浆到核的转运,KNS 则通过核孔复合物调节双向穿梭^[4]。HNRNPK 特殊的分子结构使其能够参与转录调控、RNA 加工与翻译以及转录后修饰等多种细胞进程^[5]。大量研究显示 HNRNPK 与目前威胁人类生命的肿瘤疾病密切相关,多种肿瘤的形成和发展都与该家族蛋白有关^[1]。

HNRNPK 在原发性和转移性肺癌中高表达^[6],而其在多种肿瘤中的高表达通常与不良预后相关^[7-8]。然而 HNRNPK 在肺癌中的具体作用机制仍然未知,需要进一步研究。本实验构建了荧光素酶标记的由强力霉素(doxycycline, DOX)调控 HNRNPK 稳定下调的 H1299 细胞株,旨在为进一步研究 HNRNPK 在肺癌发生发展中的作用机制提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

H1299 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所。

1.2 主要试剂与仪器

PBS、RPMI 1640 培养基、0.25%胰蛋白酶、胎牛血清等购自美国 Gibco 公司;D-Luciferin 购自北京泛博生物化学有限公司;TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司;反转录试剂盒、购蛋白预染 Marker 自 Thermo Fisher 公司;SYBR green 荧光染料购自日本 Toyobo 公司;定量 PCR 专用 96 孔板购自 ABI 公司;HNRNPK 抗体购自 Abcam 公司;p53、p21、CCND1 抗体购自 CST 公司;Rb、磷酸化 Rb、CDK4、Cyclin-D1 等抗体购自 Santa Cruz 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自中杉金桥生物公司;CCK-8 细胞活性检测试剂盒、Annexin V (633) 凋亡检测试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司;嘌呤霉素购自 Merk 公司;DOX 由上海吉凯基因科技有限公司提供。

实时荧光定量 PCR 仪为 BIO-RADCFX Connect

Real-Time PCR System;酶标仪为 BIO-RADiMarkMicroplate Reader;流式细胞仪为 BD FACSAria II Cell Sorter;活体光学成像系统为 IVIS-Lumina II。

引物合成与 DNA 测序服务由英潍捷基(上海)公司提供。HNRNPK 的 siRNA 由本实验室设计,序列如表 1 所示,带有 DOX 识别位点的干扰慢病毒载体由上海吉凯基因科技有限公司构建。

1.3 实验方法

1.3.1 病毒感染与稳转株的筛选

慢病毒的转染严格按照吉凯基因慢病毒使用操作手册进行。复苏并培养 H1299 细胞,调整细胞状态。将其制备成每毫升 5×10^4 个细胞浓度的悬液,接种于 6 孔细胞培养板。37℃ 培养 18 h 后,稀释病毒至 MOI=10,感染细胞,继续培养 8 h,观察细胞状态并更换培养基。感染病毒 72 h 后,用 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素筛选细胞 48 h,在显微镜下观察细胞生长状态,将阳性细胞进行扩大培养,并用 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素维持培养。

1.3.2 DOX 诱导后 H1299 细胞的生长状态

将筛选后的细胞制备成每毫升 5×10^4 个细胞浓度的悬液,每孔 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板。继续培养 6~8 h,待细胞贴壁后用工作浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DOX 诱导细胞,37℃ 继续培养 48 h。在显微镜下观察 DOX 诱导前后细胞的生长状态。

1.3.3 稳转株荧光素酶活性的检测

慢病毒载体带有荧光素酶表达序列,检测稳转株中荧光素酶的活性。用无菌 ddH₂O 溶解 D-Luciferin 干粉,并用 0.22 μm 滤膜过滤除去杂质,储备液浓度为 30 mg/mL ,分装后于 -20℃ 冰箱保存。用 37℃ 预热好的完全培养基按体积比 1:200 稀释 D-Luciferin 储备液,配制成终浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的工作液。去除步骤 1.3.2 中细胞的培养上清,按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入 D-Luciferin 工作液,避光孵育 10 min 后,进行图像分析。

1.3.4 Real-time PCR 检测稳转株 HNRNPK 的表达效率

将细胞制备成每毫升 5×10^4 个细胞浓度的悬液,每孔 1 mL 接种于 12 孔细胞培养板,继续培养 6~8 h,待细胞贴壁后用 0~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同浓度的 DOX 诱导细胞,37℃ 继续培养 48 h。

依据 TRIzol 试剂与反转录试剂盒说明书操作步骤收集各孔细胞并提取获得细胞的总 RNA,进行

反转录得到 cDNA。应用 Real-time PCR 进行检测,并通过阈值循环数计算各组细胞中 HNRNPK 的相对表达量。实验中,GAPDH 与 HNRNPK 基因的上下游引物序列如表 2 所示,反应体系的成分配制如表 3 所示,设定反应程序:95℃ 3 min;95℃ 10 s,60℃ 30 s,扩增 40 个循环;熔解曲线为 60℃~95℃ 升温。实验结束后通过 HNRNPK 的相对表达量找出 DOX 诱导稳转细胞株稳定下调 HNRNPK 的最佳浓度。

1.3.5 Western blot 检测稳转株 HNRNPK 的表达水平

将细胞制备成每毫升 5×10^4 个细胞浓度的悬液,每孔 1 mL 接种于 12 孔细胞培养板,继续培养 6~8 h,待细胞贴壁后用工作浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DOX 诱导细胞,37℃ 继续培养 48 h。

收集培养板中各孔的细胞,通过 RIPA 裂解液裂解细胞提取蛋白,检测并调整各组细胞的蛋白浓度。配制浓度为 12% 的分离胶,进行 SDS-PAGE 电泳。然后,按 300 mA 电流强度进行转膜,将蛋白条带转至 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂奶粉的封闭液于室温封闭 PVDF 膜 1 h,以减少非特异性结合。随后按 1:1000 的比例稀释 HNRNPK 抗体,于 4℃ 孵育 PVDF 膜。次日,用 0.1% 的 PBST 洗膜 3 次,加入稀释比例为 1:10000 的 HRP 标记的 IgG,于室温孵育 1 h。再次洗膜 3 次后加显影液,观测各组蛋白条带的大小与位置。

1.3.6 HNRNPK 下调对 H1299 细胞增殖的影响

制备细胞悬液并计数,按 3×10^3 个/孔将细胞接种于 96 孔细胞培养板,37℃ 培养 6~8 h,待细胞贴壁后用工作浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DOX 溶液持续诱导培养细胞。接种当天待细胞贴壁后,取一组细胞培养上清,按 CCK-8:培养上清体积比为 1:100 的比例加入 CCK-8,在 CO_2 培养箱中继续培养 2 h,观察显色程度,用酶标仪测定其在 450 nm 波长处的吸光度,其后每隔 24 h 检测一次培养上清的 OD_{450} ,直至第 96 h。

1.3.7 HNRNPK 下调对 H1299 细胞凋亡的影响

将细胞制备成每毫升 5×10^4 个细胞浓度的悬液,每孔 2 mL 接种于 6 孔细胞培养板,继续培养 6~8 h,待细胞贴壁后用工作浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DOX 诱导细胞,37℃ 继续培养 48 h。

细胞凋亡的检测严格按照 AnnexinV(633)凋亡检测试剂盒说明书进行。收集 6 孔板中的细胞,用

适量的培养基将细胞悬液转移至离心管中,1000 r/min 离心 3 min,弃去上清。加入 PBS 溶液离心洗涤细胞两次,用 100 μL 稀释好的 1 \times Annexin V Binding Solution 重悬细胞,分别向细胞悬液中加入 5 μL Annexin V(APC)结合物与 5 μL PI Solution(PE),室温下避光孵育 15 min。加入 400 μL 1 \times Annexin V Binding Solution,通过流式细胞仪对细胞的凋亡情况进行检测。

1.3.8 HNRNPK 下调对 H1299 细胞周期的影响

培养、收集细胞步骤同 1.3.7。用预冷的 PBS 洗涤细胞两次,然后用 70% 的乙醇固定细胞。加入 PBS 离心洗涤除去乙醇后,加入含 0.1% RNaseA 的 PI 染液,室温避光染色 30 min,通过流式细胞仪检测细胞周期。

1.3.9 HNRNPK 下调对 H1299 细胞增殖相关的信号通路的影响

步骤同 1.3.5,检测 p53、p21、CCND1、Rb、p-Rb、Cyclin-D1、CDK4 等蛋白的表达水平。

1.4 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism V.5.0 软件,计量资料以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对数据进行 *t* 检验以及统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DOX 诱导 HNRNPK 下调后 H1299 细胞的生长状态

细胞状态如图 1 所示,感染病毒的 H1299 细胞与对照组细胞在大小、形态上并无明显差异。但 DOX 诱导 48 h 后二者的生长密度明显不同,可能在 HNRNPK 下调后,H1299 细胞的增殖速度受到了影响。

2.2 稳转株荧光素酶活性的检测

实验结果如图 2 所示,与未感染慢病毒的 H1299 细胞对比,空白对照病毒组与 HNRNPK 干扰病毒组的细胞均具备荧光素酶活性,能够发出明显的荧光。

2.3 H1299 稳转株 HNRNPK 的表达效率

定量 PCR 结果如图 3A 所示,经不同浓度的 DOX 诱导 48 h 后,H1299 稳转株中 HNRNPK 的 mRNA 表达水平明显下调。在 DOX 浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 与 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,HNRNPK 的 mRNA 表达水平能够下调约 65%~70%,且在这两个浓度下 HNRNPK

的相对表达量并无显著差异,表明 DOX 诱导稳转细胞株中 HNRNPK 下调的最佳浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Western blot 结果如图 3B 所示,在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DOX 诱导 48 h 后,H1299 稳转株中 HNRNPK 的蛋白表达也被下调。

2.4 HNRNPK 下调对 H1299 细胞增殖的影响

通过 CCK-8 细胞活性检测试剂盒检测细胞增殖,结果如图 4 所示,在 DOX 的诱导下,HNRNPK 稳定下调的 H1299 细胞增殖速度明显减慢,与对照组比较,二者有显著差异,表明 HNRNPK 下调能够抑制 H1299 细胞的增殖。

2.5 HNRNPK 下调对 H1299 细胞凋亡的影响

经 DOX 诱导细胞 48 h 后,通过 Annexin V (633) 凋亡检测试剂盒检测凋亡细胞数量。结果如图 5 所示,HNRNPK 稳定下调的 H1299 细胞的凋亡数量与对照组比较,并无显著差异,表明 HNRNPK 下调对 H1299 细胞的凋亡没有明显影响。

2.6 HNRNPK 下调对 H1299 细胞周期的影响

通过 PI 染色检测细胞周期,结果如图 6 所示,HNRNPK 下调后, G_0/G_1 期细胞的百分比明显高于对照组,S 期细胞的百分比则明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$); G_2/M 期细胞的百分比差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明 HNRNPK 的下调抑制了 H1299 细胞从 G_0/G_1 期向 S 期发展的周期

进程。

2.7 HNRNPK 下调对 H1299 细胞增殖相关的信号通路的影响

经 DOX 诱导细胞 48 h 后,通过 Western blot 检测细胞中 p53、p21 等蛋白的表达水平。结果如图 7 所示,H1299 作为 p53 缺失的细胞株,细胞中检测不到 p53 表达;而在 HNRNPK 表达下调后,p21 的表达水平上调,CCND1 与 Cyclin-D1 的表达水平下调;CDK4 与 Rb 蛋白的表达水平没有明显变化,但 Rb 蛋白的磷酸化水平下调。

表 1 siRNA

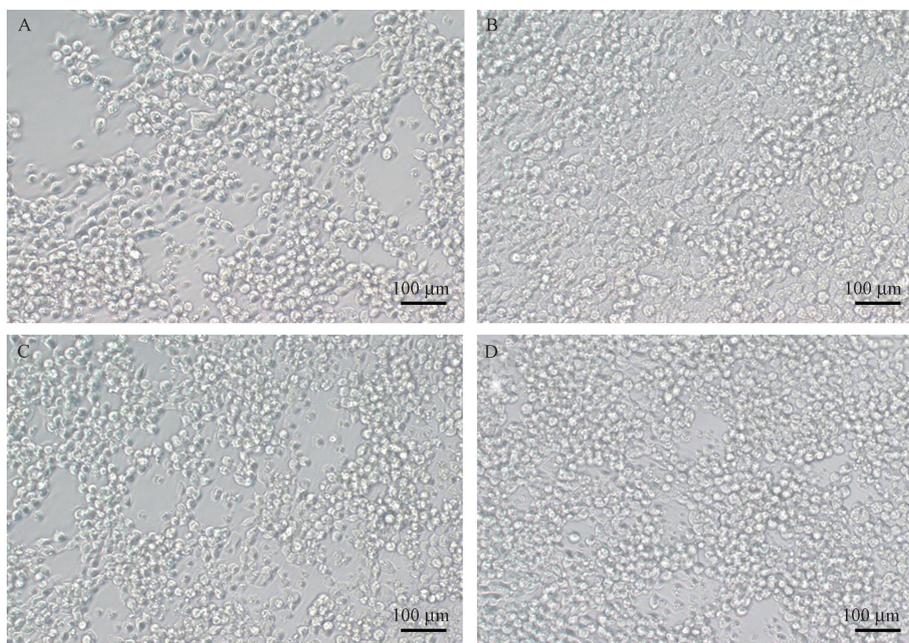
Table 1 siRNA

名称 Name	靶点序列(5'-3') Target Sequence
HNRNPK	GAGCTTCGATCAAAATTGA

表 2 Real-time PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences for the Real-time PCR assay

引物名称 Names	引物序列(5'-3') Sequence
hnRNPK-F	AGGTCGGTGTGAACGGATTG
hnRNPK-R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
GAPDH-F	AGACCTGGAGACCGTTAC
GAPDH-R	ATAAGCCATCTGCCATTC



注:A:对照病毒组;B:HNRNPK 干扰病毒组;C:DOX 诱导 48 h 后的对照病毒组;D:DOX 诱导 48 h 后的 HNRNPK 干扰病毒组。

图 1 DOX 诱导后 H1299 细胞的生长状态

Note. A, Group of LV-NC-RNAi. B, Group of LV-HNRNPK-RNAi. C, Group of LV-NC-RNAi after 48 h. D, Group of LV-HNRNPK-RNAi after 48 h.

Figure 1 Cellular states of H1299 cells after DOX induction

表 3 Real-time PCR 反应体系
Table 3 Real-time PCR reaction components

组分 Components	体积(μL) Volume
基因组 DNA Genomic DNA	2.0
上游引物 Forward primer	1.0 (10 μmol/L)
下游引物 Reverse primer	1.0 (10 μmol/L)
SYBR Green	10.0
ddH ₂ O	6.0
总体积 Total volume	20.0

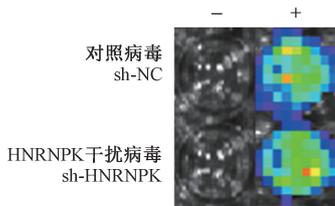
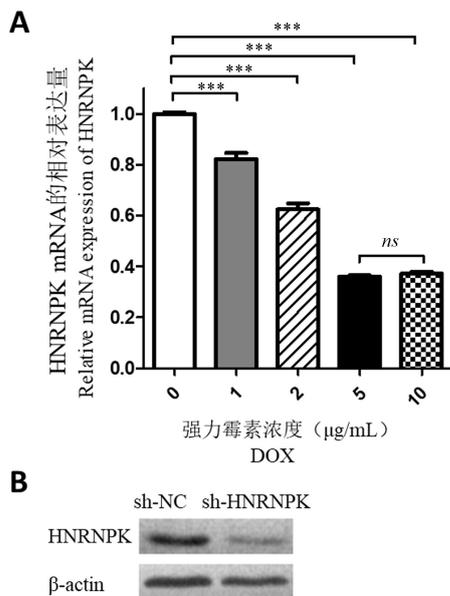


图 2 稳转株荧光素酶活性的检测

Figure 2 Detection of luciferase in stable transgenic cell line



注: A: 定量 PCR; B: Western blot; 与对照组比较, *** $P < 0.001$ 。

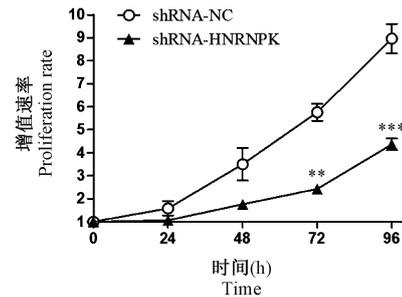
图 3 不同剂量 DOX 诱导 HNRNPK 下调的表达效率 ($n = 3$)

Note. A, qPCR. B, Western blot. Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

Figure 3 HNRNPK downregulated by different doses of DOX

3 讨论

目前,大量研究已证实 HNRNPK 在各种肿瘤组织中高表达,且与口腔鳞状细胞癌、前列腺癌、胃癌、结直肠癌、膀胱癌、鼻咽癌及黑色素瘤等的预后呈负相关,但其对于肺癌与肝癌的预后情况仍然未



注:与对照组比较, $n = 3$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

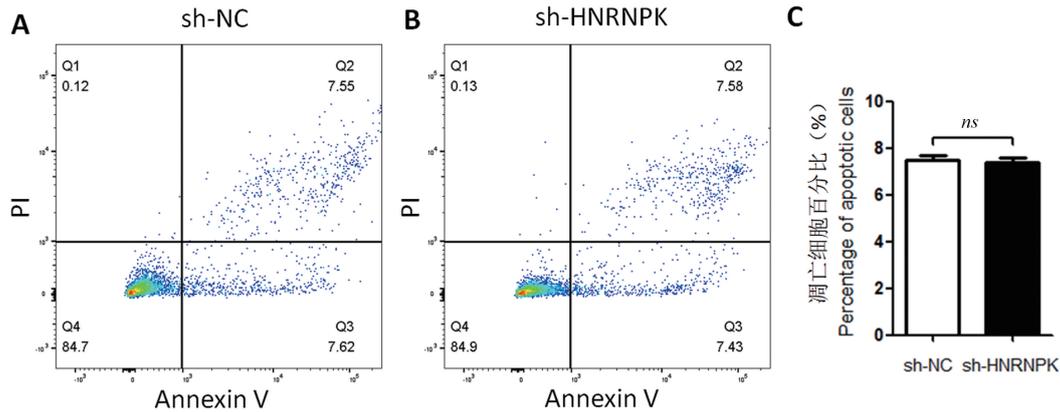
图 4 HNRNPK 下调对 H1299 细胞增殖的影响

Note. Compared with the control group, $n = 3$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 4 Effects on H1299 cells proliferation of HNRNPK downregulation

知^[9-10]。HNRNPK 的异常表达在不同肿瘤中发挥的功能也各不相同。Gallardo 等^[11]通过构建 HNRNPK 基因敲除杂合子 ($Hnrnpk^{+/-}$) 小鼠,证实 HNRNPK 在血液系统恶性肿瘤中发挥抑癌基因的作用。Huang 等^[12]发现过表达的 HNRNPK 能够通过调节 p53 相关信号通路抑制胃癌。Li 等^[13]研究发现 HNRNPK 在神经母细胞瘤患者的肿瘤中高表达并伴有不良预后。非小细胞肺癌 (non-small-cell lung carcinom, NSCLC) 是最常见的肺癌类型,是我国城市人口恶性肿瘤死亡的主要原因^[14]。陈燕等^[6]发现 HNRNPK 在肺癌原发灶及支气管切缘组肺癌组织中高表达,而在正常组织及炎性对照组中的表达率则相对较低。同时, HNRNPK 在肺癌转移及浸润组织中高阳性表达,提示 HNRNPK 的高表达可能与肺癌的转移有关。然而, HNRNPK 在肺癌发生发展中的具体作用机制尚不完全清楚。

HNRNPK 在多种肿瘤的发生发展中参与调控癌基因与抑癌基因的表达,并参与调控肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移与侵袭等多种生物学过程^[9]。Huang 等^[12]研究发现过表达的 HNRNPK 能够通过调控细胞周期相关蛋白 p53/p21/Cyclin-D1 抑制胃癌细胞增殖与肿瘤生长。Chen 等^[15]研究显示 HNRNPK 能够通过调控 Cyclin-D1 与细胞周期 G_0/G_1 期开关蛋白 2 等促进膀胱癌细胞的增殖。HNRNPK 作为转录因子能够与 eIF4E 的启动子结合,同时与 p21 mRNA 的 3'端非翻译区域结合,以此抑制 p21 翻译,进而促进翻译起始、细胞分裂和肿瘤形成^[7,16]。此外,在多种肿瘤组织中, HNRNPK 的高表达通常伴随着高水平的 c-myc, HNRNPK 能够

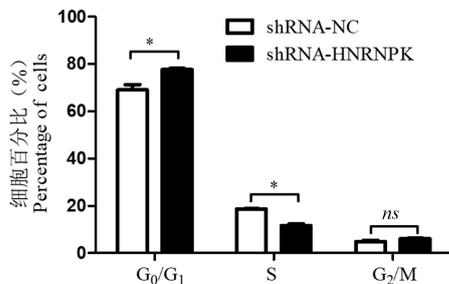


注: A: 对照病毒组; B: HNRNPK 干扰病毒组; C: 凋亡细胞的百分比; 与对照组比较, $n=3$ 。

图 5 HNRNPK 下调对 H1299 细胞凋亡的影响

Note. A, Group of LV-NC-RNAi. B, Group of LV-HNRNPK-RNAi. C, Percent of apoptotic cells. Compared with the control group, $n=3$.

Figure 5 Effects on H1299 cells apoptosis of HNRNPK down regulation



注: 与对照组比较, $*P<0.05$ 。

图 6 HNRNPK 下调对 H1299 细胞周期的影响 ($n=3$)

Note. Compared with the control group, $*P<0.05$.

Figure 6 Effects on cell cycle of HNRNPK downregulation in H1299 cells

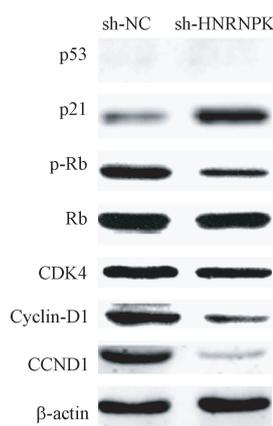


图 7 HNRNPK 下调对 H1299 细胞增殖相关的信号通路的影响

Figure 7 Effects on proliferation related signaling pathways of HNRNPK downregulation in H1299 cells

通过与 c-myc 启动子的 poly(C) 结合促进 c-myc 转

录,参与肿瘤细胞的增殖调控^[5]。因此, HNRNPK 能够通过多种途径参与肿瘤细胞的增殖调控。HNRNPK 也能够通过多种途径参与肿瘤细胞的凋亡调控。Chen 等^[17]的研究中发现 HNRNPK 能够通过调节下游的抗凋亡基因发挥抗凋亡活性, HNRNPK 在鼻咽癌细胞中能够与抗凋亡基因 FLIP 的启动子结合并导致其转录激活。Yang 等^[18]的研究发现 HNRNPK 第 296 与 299 位精氨酸的甲基化能够抑制促凋亡激酶 PKC δ 介导的第 302 位丝氨酸磷酸化,进而抑制 DNA 损伤诱导的凋亡。HNRNPK 作为 p53 的共激活因子对调节 DNA 损伤修复起重要作用, DNA 损伤促使 HNRNPK 被募集到 p53 下游基因的启动子,促使 p21、HDM2、C/EBP α 和 C/EBP β 表达; HNRNPK 的下调减少 p53 转录,从而导致 DNA 损伤诱导的细胞周期停滞^[19]。

本实验中成功构建了荧光素酶标记的由 DOX 调控 HNRNPK 稳定下调的 H1299 细胞株,能够通过 DOX 选择性地诱导细胞在特定时间点下调 HNRNPK 表达。人非小细胞肺癌细胞 H1299 来源于淋巴结转移,其均一性地缺失 p53 蛋白表达^[20]。已有研究证实 HNRNPK 能够与 p21 mRNA 的 3' 端非翻译区域结合,抑制 p21 翻译,从而促进肿瘤发生^[7]。癌基因 CCND1 能够编码 G₁/S-特异性周期蛋白 Cyclin-D1,其能够通过 p21 相互作用使细胞周期进程从 G₁ 期向 S 期发展。Cyclin-D1 的主要功能是促进细胞增殖,其过度表达可能导致细胞失控或癌变。Cyclin-D1 能够结合并激活 G₁ 期特有的周期蛋白依赖性激酶 CDK4, CDK4 能够磷酸化 G₁ 期

周期抑制蛋白 Rb,使其从所结合的 E2F1 转录因子上解离,释放 E2F1,推动细胞周期由 G₁ 期进入 S 期,促进细胞增殖^[21]。本实验中,HNRNPK 的下调使得 p21 的表达升高,CCND1 与 Cyclin-D1 的表达降低,从而使 Rb 蛋白的磷酸化受到抑制,进一步抑制细胞周期进程从 G₁ 期向 S 期发展。因此,通过 DOX 诱导 HNRNPK 表达水平下调,可能通过调控 p21 及其相关细胞周期调节蛋白的信号通路,从而抑制了 H1299 细胞的增殖。本实验中,HNRNPK 的下调对 H1299 细胞的凋亡没有明显影响,可能是由于 H1299 细胞本身缺失 p53 蛋白表达,导致 HNRNPK 表达下调后无法通过 p53 及其下游信号通路参与细胞周期调控,因而不能引发细胞凋亡。综上所述,本实验中 HNRNPK 的下调抑制了肺癌细胞的增殖,结合以往的研究^[6,11-13],证实 HNRNPK 在肺癌中的高表达可能发挥着促进肺癌发展的作用,并进一步说明 HNRNPK 的异常表达可能有着双重功能,其在不同种类的肿瘤中能够产生不同的影响。此外,H1299 细胞中插入了荧光素酶表达序列,使其能够在生物体内标记并跟踪肿瘤细胞的成瘤部位、肿瘤大小与转移情况,通过活体成像实时观测肿瘤在生物体内的发展,一方面为研究 HNRNPK 在肺癌发生发展中的功能与机制提供了更便利的条件,同时也为抗肿瘤相关的基础研究与临床研究提供了理论基础和实验依据。

参考文献:

- [1] Chen Y, Zeng Y, Xiao Z, et al. Role of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in tumor development [J]. J Cell Biochem, 2019, 120 (9): 14296-14305.
- [2] 张国新, 张文龙, 李梦媛, 等. hnRNPs 家族参与调控肿瘤免疫微环境的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28 (2): 273-277.
- [3] Siomi H, Matunis MJ, Michael WM, et al. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif [J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21 (5): 1193-1198.
- [4] Chkheidze AN, Liebhaber SA. A novel set of nuclear localization signals determine distributions of the α CP RNA-binding proteins [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23 (23): 8405-8415.
- [5] Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Cans C, et al. e-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22 (13): 4535-4543.
- [6] 陈燕, 李为民, 张尚福. hnRNP K 在肺癌组织中的表达 [J]. 中国肺癌杂志, 2008, 11 (2): 241-245.
- [7] Lynch M, Chen L, Ravitz MJ, et al. hnRNP K binds a core polypyrimidine element in the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) promoter, and its regulation of eIF4E contributes to neoplastic transformation [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25 (15): 6436-6453.
- [8] Notari M, Neviani P, Santhanam R, et al. A MAPK/HNRNPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation [J]. Blood, 2006, 107 (6): 2507-2516.
- [9] 杨明, 聂国辉, 柯朝阳. hnRNP K 蛋白功能与肿瘤的研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25 (18): 3605-3610.
- [10] 黄昊, 杨星九, 李梦媛, 等. 异质性胞核糖核蛋白 K 与肿瘤研究的最新进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27 (11): 100-105.
- [11] Gallardo M, Lee H, Zhang X, et al. hnRNPK is a haploinsufficient tumor suppressor that regulates proliferation and differentiation programs in hematologic malignancies [J]. Cancer Cell, 2015, 28 (4): 486-499.
- [12] Huang H, Han Y, Yang X, et al. HNRNPK inhibits gastric cancer cell proliferation through p53/p21/CCND1 pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8 (61): 103364-103374.
- [13] Li D, Wang X, Mei H, et al. Long noncoding RNA pancEts-1 promotes neuroblastoma progression through hnRNPK-mediated b-Catenin stabilization [J]. Cancer Res, 2018, 78 (5): 1169-1183.
- [14] 宋慧华, 付秀华. 非小细胞肺癌常见驱动基因及相应靶向药物的研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26 (8): 1531-1536.
- [15] Chen X, Gu P, Xie R, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is associated with poor prognosis and regulates proliferation and apoptosis in bladder cancer [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21 (7): 1266-1279.
- [16] Bomsztyk K, van Seuning I, Suzuki H, et al. Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein [J]. FEBS Lett, 1997, 403 (2): 113-115.
- [17] Chen LC, Chung IC, Hsueh C, et al. The antiapoptotic protein, FLIP, is regulated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and correlates with poor overall survival of nasopharyngeal carcinoma patients [J]. Cell Death Differ, 2010, 17 (9): 1463-1473.
- [18] Yang JH, Chiou YY, Fu SL, et al. Arginine methylation of hnRNP K negatively modulates apoptosis upon DNA damage through local regulation of phosphorylation [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42 (15): 9908-9924.
- [19] Moumen A, Masterson P, O'Connor MJ, et al. hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage [J]. Cell, 2005, 123 (6): 1065-1078.
- [20] 卞春安, 蒋琰华, 陆世民, 等. p53 和 p16 基因过表达对人肺腺癌细胞株 H1299 生物学功能影响实验研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 5 (5): 307-314.
- [21] John RR, Malathi N, Ravindran C, et al. Mini review: Multifaceted role played by cyclin D1 in tumor behavior [J]. Indian J Dent Res, 2017, 28: 187-192.

[收稿日期] 2020-05-12