

hnRNP U 在急性髓系白血病中临床意义及致病机制研究

徐春丽¹ 陈珣² 朱婷婷¹ 孙振江¹ 储剑虹¹

¹苏州大学医学部造血干细胞移植研究所、苏州大学附属第一医院、江苏省血液研究所、血液学协同创新中心, 苏州 215000; ²皖南医学院第二附属医院血液科, 芜湖 241000

通信作者: 储剑虹, chujianhong@hotmail.com

【摘要】 目的 研究 RNA 结合蛋白核不均一核糖核蛋白 U(hnRNP U)在急性髓系白血病(AML)中临床意义及致病机制。**方法** 基于数据库(GEPIA)和本中心数据比较 hnRNP U 在 AML 患者及健康对照者中表达情况;通过 Cbioportal 数据库下载 Beat AML 数据集(158 例),按照 hnRNP U 表达水平分为高表达组(89 例)和低表达组(69 例)并对两组临床特征进行比较;选择 hnRNP U 高表达的 Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞系,敲低 hnRNP U 后通过 CCK-8 检测细胞增殖能力,利用 Annexin V-APC/7-AAD 抗体检测细胞凋亡情况,通过定量分析 DNA 含量(PI 染色)检测细胞周期变化及克隆形成实验检测细胞集落形成能力等方面研究 hnRNP U 对人 AML 细胞系生物学行为的影响;利用 Western blot 法研究敲低 hnRNP U 后对 DDR(DNA Damage Response)通路蛋白 cleaved-PARP、p-H2A.X 表达的影响。**结果** ①泛癌分析发现 hnRNP U 在 AML 中高表达,AML 患者外周血单个核细胞中 hnRNP U mRNA 表达水平显著高于健康对照者(0.0315 ± 0.0042 对 0.0195 ± 0.0006 , $P < 0.01$);②hnRNP U 高表达组中位发病年龄为 56(2~87)岁, hnRNP U 低表达组中位发病年龄为 65(8~85)岁, hnRNP U 高表达组较低表达组发病年龄更早($t = -2.681$, $P = 0.007$),且合并 FLT3 突变比例更高($\chi^2 = 4.069$, $P = 0.044$);③敲低 hnRNP U 后 Kasumi-1、MOLM-13 细胞增殖受抑,细胞凋亡率增高,集落形成能力减弱,细胞周期阻滞在 G₂/M 期,与对照组比较,差异均有统计学意义(P 值均 < 0.05);④敲低 hnRNP U 可引起 DDR 通路上 cleaved-PARP、p-H2A.X 蛋白表达上调。**结论** hnRNP U 在 AML 中高表达,敲低 hnRNP U 后可抑制 AML 的发生发展,其可能是通过激活 DDR 通路发挥作用。

【关键词】 hnRNP U; 白血病,髓系,急性; DDR 通路

基金项目:国家自然科学基金(81770216)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2022.09.006

Clinical significance and pathogenesis analysis of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U in acute myeloid leukemia

Xu Chunli¹, Chen Yu², Zhu Tingting¹, Sun Zhenjiang¹, Chu Jianhong¹

¹Institute of Blood and Marrow Transplantation, Medical College of Soochow University, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Institute of Hematology, Collaborative Innovation Center of Hematology, Suzhou 215000, China; ²Department of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000, China

Corresponding author: Chu Jianhong, Email: chujianhong@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the clinical significance and pathogenesis of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U) in acute myeloid leukemia (AML). **Methods** The expression of hnRNP U, an RNA binding protein, in patients with AML and healthy controls was compared based on the Gene Expression Profiling Interactive Analysis database and the data of the center. The Beat AML Dataset ($n = 158$) was downloaded from the cBioPortal database. The hnRNP U expression level was divided into the high-expression group ($n = 89$) and low-expression group ($n = 69$), and patients' clinical characteristics were compared. The effect of hnRNP U on the biological behavior of human AML cell lines was studied by Cell Counting Kit-8 assay to detect cell proliferation. Annexin V-APC/7-AAD antibodies were used to detect cell apoptosis. DNA content (PI staining) was quantitatively analyzed to detect cell cycle changes, and colony formation experiments were performed to detect cell cloning formation ability after hnRNP U

knockdown in Kasumi-1 and MOLM-13 cells. To study the effect of hnRNP U knockdown on the DNA damage response (DDR) pathway proteins of cleaved-PARP, immunoblot analysis using p-H2A.X was conducted. **Results** ①Pan-cancer analysis showed that hnRNP U was highly expressed in patients with AML, and the expression level of hnRNP U mRNA in peripheral blood mononuclear cells was significantly higher in patients with AML than in healthy controls (0.0315 ± 0.0042 vs 0.0195 ± 0.0006 , respectively, $P < 0.01$). ②The age of onset was 56(2–87) years in the high-expression group and 65(8–85) years in the low-expression group ($t = -2.681$, $P = 0.007$). Moreover, the high-expression group had a higher proportion of combined FLT3 mutations than the low-expression group ($\chi^2 = 4.069$, $P = 0.044$). ③Compared with the negative control, hnRNP U knockdown inhibited the proliferation ($P < 0.001$ and $P < 0.001$), promoted the apoptosis ($P < 0.01$ and $P < 0.001$), decreased the colony formation ability ($P < 0.001$ and $P < 0.001$), and arrested the cell cycles in the G₂/M phase ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) of Kasumi-1 and MOLM-13 cells, respectively. ④hnRNP U knockdown could increase the protein expression of cleaved-PARP and p-H2A.X on the DDR pathway. **Conclusion** hnRNP U is highly expressed in AML, and hnRNP U knockdown can inhibit the occurrence and development of AML possibly through the activation of the DDR pathway.

【Key words】 hnRNP U; Leukemia, myeloid, acute; DDR pathway

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81770216)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2022.09.006

急性髓系白血病(AML)是一种由造血干祖细胞恶性增殖而来的血液系统肿瘤,中位发病年龄在 60~70 岁^[1]。随着新型药物制剂的开发应用及异基因造血干细胞移植技术的发展,AML 的诊断和治疗都取得了重大进展,但其预后仍然很差,5 年平均生存率为 30%^[2]。AML 分子机制复杂,不同亚型之间异质性大^[3-4],因此,寻找 AML 靶点并研究其作用机制,对于开发新的靶向药物具有重要的指导价值。本课题组前期研究发现,核不均一核糖核蛋白 U (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U, hnRNP U)在 AML 中高表达,本研究拟探讨 hnRNP U 在 AML 中的临床意义及致病机制,为 AML 分子生物学发病机制的研究及靶向治疗提供理论基础。

材料与方 法

1. 试剂与仪器:ABI 7300 型实时定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司,Tanon 5200 全自动化学发光成像分析系统和 ECL 化学发光试剂盒均购自中国上海天能科技有限公司,流式细胞仪 (ACEA NovoCyte) 购自艾森生物(杭州)有限公司,Allegra X-15R 台式冷冻离心机购自美国贝克曼库尔特有限公司,RIPA 蛋白裂解液购自碧云天生物技术有限公司,细胞凋亡试剂盒、细胞周期检测试剂盒均购自杭州联科技术股份有限公司,TRIzol 总 RNA 抽提试剂、HiScript[®] III 1st Strand cDNA Synthesis Kit 和 NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒均购自诺唯赞生物科技有限公司,CCK-8 试剂盒购自美国 APEX BIO 公司,RPMI 1640 培养基购自美国

Gibco 公司。兔抗人 hnRNP U(16365-1-AP)抗体购自美国 Proteintech 公司,兔抗人 PARP(9542S)抗体以及兔抗人 p-H2A.X (9718S)抗体购自美国 CST 公司,鼠抗人 β -actin(ab008-040)以及辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔、鼠抗体均购自杭州联科技术股份有限公司,实验相关引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

2. 细胞培养:人 AML 细胞系 U937、OCI-AML3、THP-1、MV4-11、MOLM-13、Kasumi-1 由苏州大学附属第一医院陈苏宁教授惠赠,培养于含有 10% 胎牛血清、100 μ g/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95% 湿度培养箱中培养,平均每 2 d 换液 1 次,由本实验室对细胞进行传代培养。

3. 使用慢病毒构建敲低 hnRNP U 的细胞株:选择的敲低载体为 pLKO.1-TRC-GFP,酶切位点选择 Xba I 和 Age I,shhnRNP U#1、shhnRNP U#2 的敲低引物序列如表 1 所示,将 shRNA 引物退火处理,将退火产物与经 Xba I 和 Age I 酶切后的载体进行连接反应,构建相应干扰质粒,选择状态良好的 293T 细胞包装慢病毒,48 h 后收集病毒上清感染 Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞株,感染 72 h 后使用流式细胞仪检测慢病毒的感染效率,使用荧光定量 PCR 技术和 Western blot 法分别在 mRNA 和蛋白水平上鉴定敲低 hnRNP U 的效率。

4. 实时荧光定量 PCR 检测 hnRNP U mRNA 表达水平:使用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,并用 HiScript[®] III 1st Strand cDNA Synthesis Kit 将 RNA 反转录成 cDNA,使用 NovoStart[®] SYBR qPCR

SuperMix Plus 试剂盒进行相对定量检测,以 β -actin 为内参,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算出 hnRNP U 基因的相对表达量,定量 PCR 引物序列如表 2 所示。

5. Western blot 法检测 hnRNP U、PARP、p-H2A.X 蛋白表达水平:使用 RIPA 蛋白裂解液制备细胞总蛋白并使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。每孔使用等量蛋白(30 μ g)进行 SDS-PAGE,然后将分离的蛋白条带转移至 0.45 μ m 的 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭后,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h。使用 ECL 化学发光试剂盒处理 PVDF 膜, Tanon 全自动化学发光成像分析系统成像。

6. CCK-8 法检测细胞增殖能力:以转染后第 5 天为时间起点,将 Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞密度调整为 5×10^3 /ml,接种于 96 孔板,每孔 100 μ l,利用 CCK-8 试剂检测第 1、3、5、7 天 4 个时间点的细胞增殖能力,对应时间段每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂,以每个时间点在 450 nm 处的吸光度(A_{450})表示细胞的增殖能力。

7. Annexin V-APC/7-AAD 双染色法检测细胞凋亡水平:收集对照组(shscramble)、shhnRNP U#1、shhnRNP U#2 组的 Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞,1 300 r/min 离心 5 min(离心机半径为 207.8 mm),弃上清,按细胞凋亡试剂盒说明书操作加入 Annexin V-APC/7-AAD 抗体双标记,避光染色后上流式细胞仪检测细胞凋亡。以早期和晚期凋亡细胞占总细胞数的百分比计算细胞凋亡率。

8. PI 染色法检测细胞周期:收集 shscramble、shhnRNP U#1、shhnRNP U#2 组的 Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞,1300 r/min 离心 5 min(离心机半径为 207.8 mm),弃上清。上流式细胞仪检测细胞周期,用 FlowJo 分析软件进行细胞 DNA 含量分析。

9. 集落形成实验:将 0.66% 的琼脂糖液和 $2\times$

RPMI 1640(加入 $2\times$ 抗生素和 20% 的胎牛血清)等比例混合,轻柔混匀后,取 3 ml 加入 6 孔板中。细胞离心计数,每孔接种 3 000 个细胞,培养箱中培养 2 周后,结晶紫染色,计数集落形成数量。

10. 统计学处理:使用 SPSS 25.0、GraphPad Prism 9.0 分析软件进行统计学分析和制图。实验重复 3 次,计量资料使用均数 \pm 标准差表示,计量资料符合正态分布的采用 t 检验,不符合正态分布的采用秩和检验,率的比较采用卡方检验,相关性采用 Pearson 相关系数表示, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、hnRNP U 在 AML 患者中表达情况分析

1. hnRNP U 表达水平泛癌分析:利用 GEPIA 在线数据库(<http://gepia2.cancer-pku.cn>)分析收录的 33 种肿瘤组织与癌旁正常组织的 hnRNP U mRNA 表达水平,如图 1 所示,结果显示 hnRNP U 在 AML 中表达高于其他肿瘤以及正常组织。

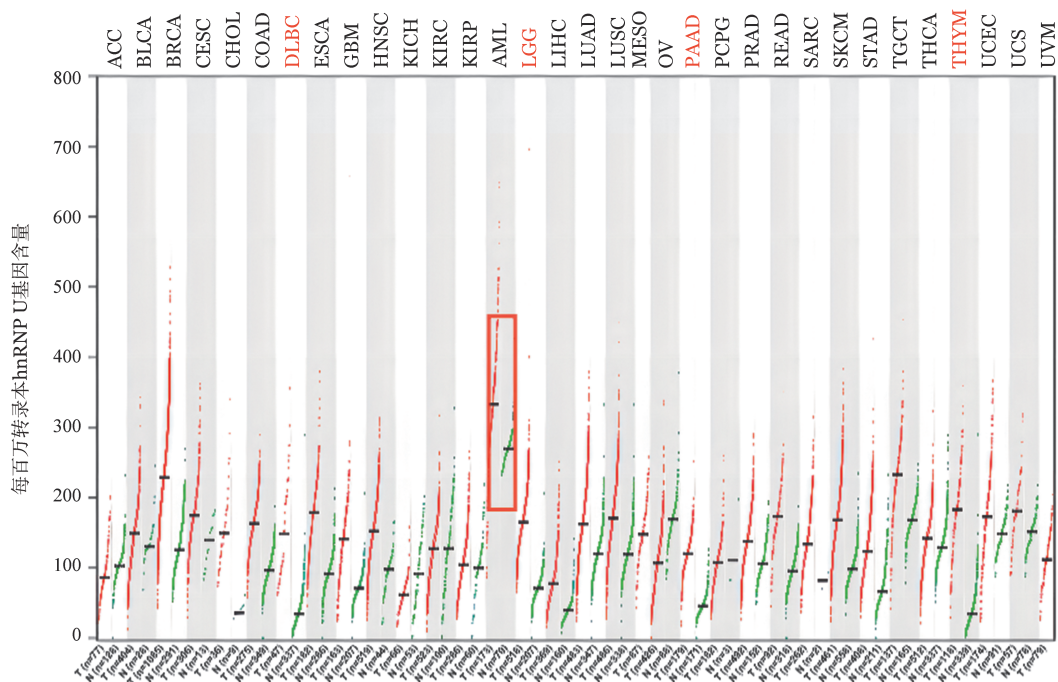
2. hnRNP U 在 AML 患者中表达:为研究 hnRNP U 在 AML 患者中的表达情况,收集苏州大学附属第一医院血液科及皖南医学院第二附属医院血液科 2021 年 11 月 1 日至 2022 年 2 月 11 日收治的 26 例 AML 患者血液样本,27 名健康对照者血液样本,分离出外周血单个核细胞(PBMC)后提取 RNA,检测 hnRNP U 的表达水平,结果如图 2 所示, hnRNP U 在 AML 患者中的 mRNA 表达水平显著高于健康对照者(0.0315 ± 0.0042 对 0.0195 ± 0.0006 , $P<0.01$)。另取其中 3 例 AML 患者及 1 名健康对照者的 PBMC 收集蛋白,通过 Western blot 法检测 hnRNP U 的蛋白表达,结果显示 hnRNP U 在 AML 患者中的蛋白表达水平高于健康对照者(图 2)。

表 1 hnRNP U 的 shRNA 干扰序列

引物名称	引物序列(5'→3')
shhnRNP U#1 正向引物	CCGGCAGTGCTTCTCCCTTACAATCTCGAGATTGTAAGGGAAGAAGCACTGTTTTTG
shhnRNP U#1 反向引物	AATTCAAAAACAGTGCTTCTCCCTTACAATCTCGAGATTGTAAGGGAAGAAGCACTG
shhnRNP U#2 正向引物	CCGGGCAACTGTGAGACTGAAGATTCTCGAGAATCTTCAGTCTCACAGTTGCTTTTTG
shhnRNP U#2 反向引物	AATTCAAAAAGCAACTGTGAGACTGAAGATTCTCGAGAATCTTCAGTCTCACAGTTGC

表 2 实时荧光定量 PCR 检测 hnRNP U 表达引物序列

基因	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
hnRNP U	AAGTATAGCAGAGCCAAATCTCC	CATTGTAAGGGAAGAAGCACTG
β -actin	CCATCATGAAGTGTGACGTGG	GTCCGCCTAGAAGCATTTCGC



绿色代表 hnRNP U 在正常组织中的表达,红色代表 hnRNP U 在肿瘤组织中的表达。ACC:肾上腺皮质癌;BLCA:膀胱尿路上皮癌;BRCA:乳腺癌浸润癌;CESC:宫颈鳞癌;CHOL:胆管癌;COAD:结肠癌;DLBC:弥漫性大 B 细胞淋巴瘤;ESCA:食管癌;GBM:多形性胶质细胞瘤;HNSC:头颈鳞状细胞癌;KICH:肾嫌色细胞癌;KIRC:肾透明细胞癌;KIRP:肾乳头状细胞癌;AML:急性髓系白血病;LGG:低级别脑胶质瘤;LIHC:肝癌;LUAD:肺腺癌;LUSC:肺鳞癌;MESO:间皮瘤;OV:卵巢浆液性囊腺癌;PAAD:胰腺癌;PCPG:嗜铬细胞瘤和副神经节瘤;PRAD:前列腺癌;READ:直肠癌;SARC:肉瘤;SKCM:皮肤黑色素瘤;STAD:胃癌;TGCT:睾丸癌;THCA:甲状腺癌;THYM:胸腺癌;UCEC:子宫内膜癌;UCS:子宫肉瘤;UVM:葡萄膜黑色素瘤

图 1 GEPIA 数据库中 hnRNP U 基因在不同肿瘤类型中的表达

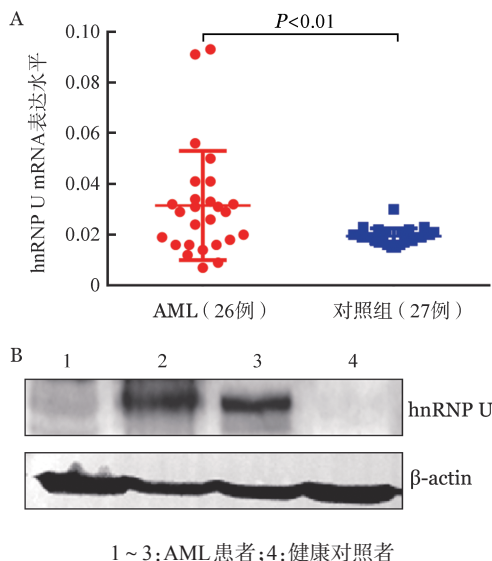


图 2 急性髓系白血病(AML)患者与健康对照者外周血单个核细胞中 hnRNP U mRNA 表达(A)和蛋白表达(B)

二、hnRNP U 与 AML 临床特征的相关性

通过 cBioPortal 数据库 (<http://www.cbioportal.org>) 下载 Beat AML 数据集临床信息及转录组数据,并进行数据清洗,剔除非 AML、无 RNA 测序数据病

例以及无药物敏感性数据后得到 158 例 AML 患者数据,按照 hnRNP U 表达水平分为高表达组(89 例)和低表达组(69 例),通过比较 hnRNP U 高表达组和低表达组的临床特征,发现 hnRNP U 高表达组较 hnRNP U 低表达组发病年龄更早,且合并 FLT3 突变比例更高,差异均有统计学意义(P 值均 < 0.05) (表 3)。

三、hnRNP U 对 AML 细胞系生物学行为的影响

1. hnRNP U 在 AML 细胞系中表达情况:检测 AML 细胞系 U937、OCI-AML3、THP-1、MV4-11、MOLM-13、Kasumi-1 中 hnRNP U 蛋白表达水平,其中 Kasumi-1、MOLM-13 细胞的 hnRNP U 蛋白水平偏高,U937 和 OCI-AML3 细胞的 hnRNP U 蛋白表达水平偏低(图 3),因此选取 Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞作为研究 hnRNP U 在 AML 中致病机制的工具细胞。

2. 成功构建敲低 hnRNP U 的细胞系:感染 72 h 后 GFP 蛋白可在转染成功的细胞中表达,用流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞占全部细胞的比例即为感染效率。感染后 72 h,从转录水平出发,与 shscramble 组相比,Kasumi-1 细胞的 shhnRNP U#1、shhnRNP U#2 组敲低效率分别为 89.95% 和

91.14%, MOLM-13 细胞的 shhnRNP U#1、shhnRNP U#2 组敲低效率分别为 86.25% 和 68.91%; 从蛋白水平出发, 与 shscramble 组相比, Kasumi-1 细胞和 MOLM-13 细胞的 hnRNP U 蛋白水平均显著下调(图 4)。

表 3 hnRNP U 表达与急性髓系白血病(AML)患者临床特征相关性分析

临床特征	hnRNP U 高表达组(89 例)	hnRNP U 低表达组(69 例)	统计量	P 值
性别(例,男/女)	41/48	42/29	3.415	0.065
年龄[岁, <i>M</i> (范围)]	56(2~87)	65(8~85)	-2.681	0.007
WBC[$\times 10^9/L$, <i>M</i> (范围)]	45(2~427)	29(2~250)	-1.595	0.111
HGB[g/L, <i>M</i> (范围)]	10(5~15)	8.5(5~15)	-0.236	0.813
PLT[$\times 10^9/L$, <i>M</i> (范围)]	39(6~228)	46(4~916)	-1.017	0.309
ELN2017 危险度分层[例(%)]			1.566	0.457
低危	34(38.2)	21(30.4)		
中危	28(31.5)	21(30.4)		
高危	27(30.3)	27(39.2)		
诱导化疗反应[例(%)] ^a			2.211	0.137
CR	57(77.0)	29(64.4)		
NR	17(22.0)	16(35.6)		
FLT3 突变[例(%)]			4.069	0.044
阳性	28(31.5)	12(17.4)		
阴性	61(68.5)	57(82.6)		
NPM1 突变[例(%)]			1.389	0.239
阳性	31(34.8)	18(26.1)		
阴性	58(65.2)	51(73.9)		

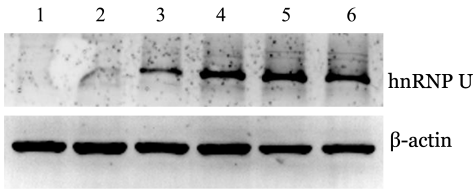
注: CR: 完全缓解; NR: 未缓解。^ahnRNP U 高、低表达组分别有 74 和 45 例评估诱导化疗反应

3. 敲低 hnRNP U 后对细胞增殖能力影响: 细胞增殖反应曲线见图 5。敲低 hnRNP U 后 Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞的增殖能力显著减弱。

4. 敲低 hnRNP U 对细胞凋亡影响: Annexin V-

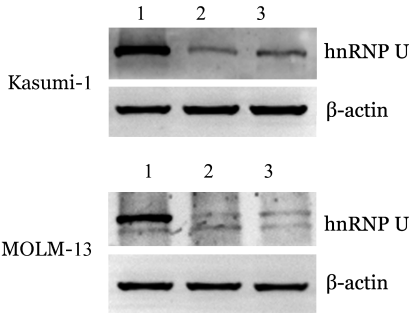
APC 阳性细胞和 7-AAD 阳性细胞占总细胞数的比例即为细胞凋亡率。如图 6 所示, 敲低 hnRNP U 后 Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞的凋亡率显著升高。

5. 敲低 hnRNP U 对细胞周期影响: 转染后第 5 天细胞周期各阶段细胞比例见图 7。与 shscramble 组相比, Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞敲低 hnRNP U 后 G₂/M 期的细胞比例增高, 表明敲低 hnRNP U 可使 AML 细胞阻滞于 G₂/M 期。



1: U937 细胞; 2: OCI-AML3 细胞; 3: THP-1 细胞; 4: MV4-11 细胞; 5: MOLM-13 细胞; 6: Kasumi-1 细胞

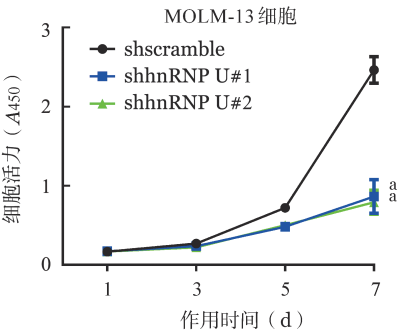
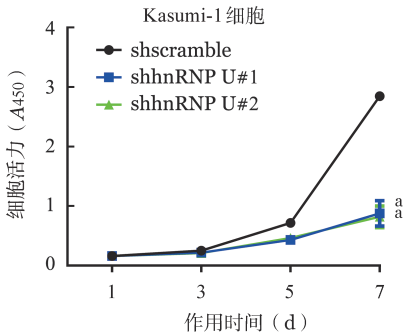
图 3 Western blot 法检测急性髓系白血病细胞系中 hnRNP U 蛋白表达水平



1: 对照组; 2, 3: 分别为 shhnRNP U#1、shhnRNP U#2 组

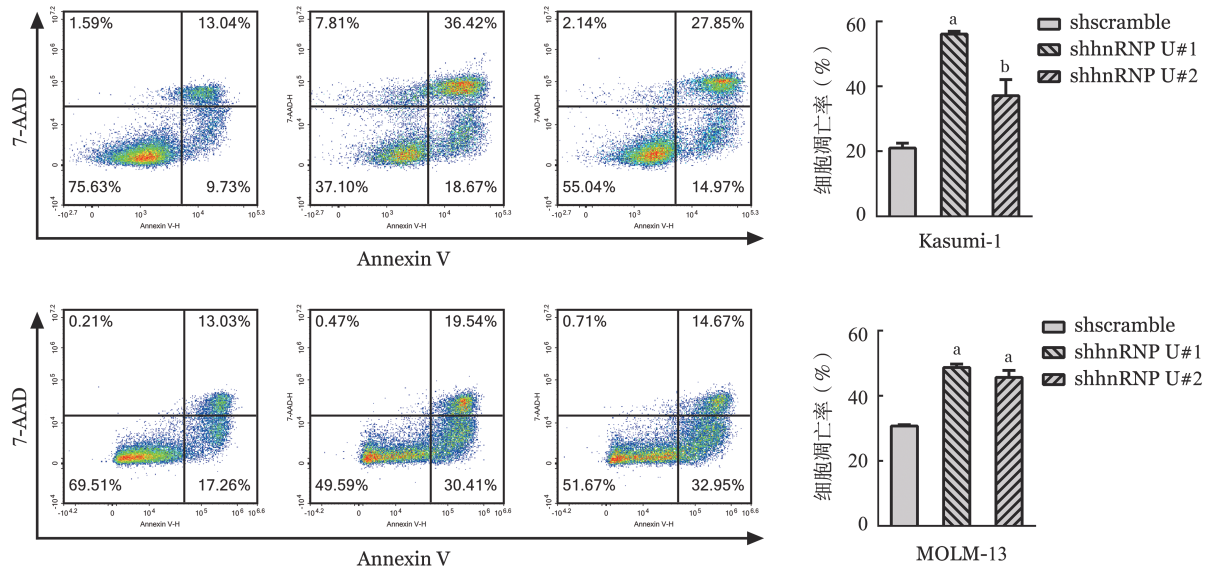
图 4 Western blot 法检测在 Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞中敲低 hnRNP U 后 hnRNP U 表达水平的变化

6. 敲低 hnRNP U 对细胞集落形成能力影响: 与 shscramble 组相比, 敲低 hnRNP U 后 Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞的集落形成能力明显减弱(图 8)。



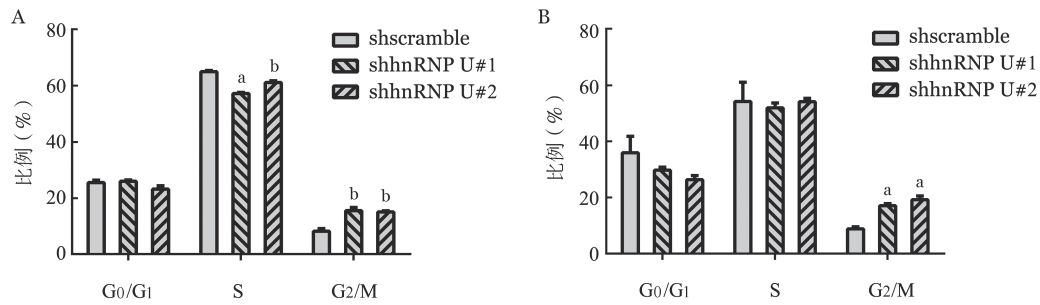
与对照组(shscramble)比较,^a*P* < 0.001

图 5 CCK-8 检测在 Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞中敲低 hnRNP U 对细胞增殖能力的影响(实验重复 3 次)



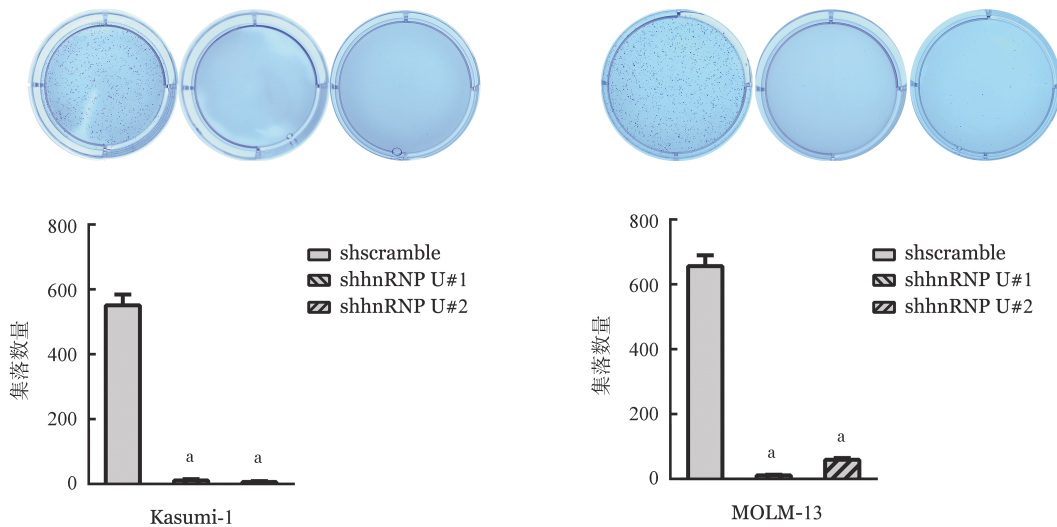
与对照组 (shscramble) 比较, ^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.01$

图6 Annexin V-APC/7-AAD 双染色流式细胞术分析 Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞敲低 hnRNP U 后的细胞凋亡率 (实验重复 3 次)



与对照组 (shscramble) 比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$

图7 流式细胞术检测在 Kasumi-1 (A) 和 MOLM-13 细胞中 (B) 敲低 hnRNP U 对细胞周期的影响 (实验重复 3 次)



与对照组 (shscramble) 比较, ^a $P < 0.001$

图8 软琼脂集落形成实验检测在 Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞中敲低 hnRNP U 后细胞集落形成能力变化 (实验重复 3 次)

7. 敲低 hnRNP U 对细胞 DNA 损伤应答(DDR)通路影响:利用 Western blot 法检测发现,Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞敲低 hnRNP U 后 PARP 剪切体形式增加,同时 p-H2A.X 蛋白表达量升高(图9)。

讨 论

AML 是成人中常见的血液系统恶性疾病,好发于中老年,具有高度分子学及临床异质性^[5-7]。目前人类对 AML 的发病机制尚不完全清楚,现认为是由多种因素相互作用而导致的,因而积极探索 AML 发生发展的分子机制,寻找新的诊断标志物和治疗靶点具有重要的临床意义。

hnRNP U 是近几年备受关注的肿瘤相关基因,定位于人类染色体 1q44 位点,含有 14 个外显子,最早在 HeLa 细胞中发现,该基因编码的蛋白可以与支架附着区(Scaffold attachment region, SAR) DNA 分子结合,因此也被称为支架附着因子 A(Scaffold attachment factor A, SAF-A)^[8]。hnRNP U 属于核不均一核糖核蛋白家族的重要一员,是染色体结构重塑及维持染色质 3D 结构所必须的一个蛋白分子^[9-10],还可以与端粒特异性结合,维持端粒的“酶活性”^[11],hnRNP U 能够与 Xist 蛋白稳定结合,协助 Xist 蛋白附着在 X 染色体上,致使 X 染色体失活^[12-13]。因此,hnRNP U 对维持细胞内生命活动的进行有着不可替代的作用。在病毒 RNA 侵入宿主后,hnRNP U 识别病毒 RNA,调节染色质重构以及基因增强子活性来提高细胞抗感染基因的表达^[14],同时 hnRNP U 在调节 RNA 稳定性^[15]、参与前体 mRNA 选择性剪切^[16]、细胞有丝分裂过程^[17]、RNA 加工修饰运输、与 RNA 聚合酶 II 结合从而调控转录翻译^[18]生物学过程中也发挥了重要的作用。hnRNP U 的异常表达与多种癌症的发生发展及患者的不良预后相关,据文献报道,在肝癌细胞中,

DIS3L2 通过 CSD 结构域招募 HNRNP U,介导其与前 Rac1 产生相互作用,从而产生 Rac1b 剪接异构体,促进肝癌进展^[19];在胃癌中 hnRNP U 通过与 HPSE 的 RNA 结合促进其与组蛋白乙酰化酶 p300 在增强子上的相互作用,导致 p300 介导的 EGR1 反式激活,促进靶基因表达从而促进胃癌的恶性病程^[20];在神经母细胞瘤中,hnRNP U 促进细胞核因子 HNF4A-AS1 与 CCCTC 结合因子 CTCF 结合,从而促进神经母细胞瘤细胞的生长和侵袭^[21]。迄今为止,在血液系统肿瘤,尤其在 AML 中,hnRNP U 调控的生物学过程报道较少。本课题组通过探讨 hnRNP U 在 AML 中的临床意义发现 hnRNP U 高表达组较 hnRNP U 低表达组发病年龄更早($P=0.007$),且更容易合并 FLT3 突变($P=0.044$)。其中,FLT3 突变是 AML 高危的指标,这提示我们 hnRNP U 高表达与 AML 发生发展相关联,但两者相关性仍需要进一步的机制研究。

本研究通过体外功能实验,发现敲低 hnRNP U 的表达会抑制 AML 细胞增殖,促进其凋亡,阻止细胞周期的正常进行,提示 hnRNP U 高表达可通过促进 AML 细胞增殖从而促进疾病侵袭性增加、耐药等恶性病程。Western blot 检测发现敲低 hnRNP U 后可引起 PARP 剪切体形式增加,p-H2A.X 蛋白表达量升高,DDR^[22]是指因诱导和检测 DNA 损伤而导致的细胞内和细胞间不同信号转导事件和酶的激活,Cleaved-PARP 和 p-H2A.X 蛋白是 DDR 通路上的关键蛋白^[23],其表达量增加可反映复制叉压力增加和 DNA 损伤程度增加,这提示我们对于 hnRNP U 高表达的 AML 可通过给予拓扑异构酶抑制剂等化疗药物引起 hnRNP U 表达下调,进而引起 DNA 损伤程度增加,诱导 AML 细胞凋亡的发生。

综上所述,hnRNP U 在 AML 中高表达且与 AML 的发生发展相关,这对于 AML 的早期诊断、治

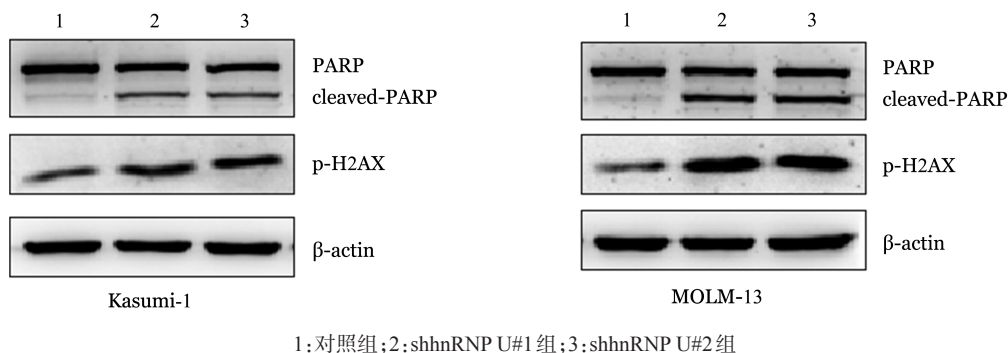


图9 Western blot法检测在 Kasumi-1 和 MOLM-13 细胞中敲低 hnRNP U 后 DDR 通路蛋白表达变化

疗以及提高患者生存质量具有重要意义。但对于 hnRNP U 在 AML 中诱导 DDR 反应的具体机制, 仍有待进一步研究。相信随着对 AML 发生机制研究的不断深入, AML 的靶向治疗将会迎来新的突破。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 徐春丽: 起草文章、采集数据、分析/解释数据、统计学分析; 陈珂: 采集数据、支持性贡献; 朱婷婷、孙振江: 对文章的知识性内容作批评性审阅; 储剑虹: 分析/解释数据、获取研究经费、指导

参考文献

- [1] Fleischmann M, Schnetzke U, Hochhaus A, et al. Management of Acute Myeloid Leukemia: Current Treatment Options and Future Perspectives [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13 (22): DOI: 10.3390/cancers13225722.
- [2] Kaleka G, Schiller G. Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia: Allogeneic hematopoietic cell transplantation is here to stay [J]. *Leuk Res*, 2022, 112: 106732. DOI: 10.1016/j.leukres.2021.106732.
- [3] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374 (23):2209-2221. DOI: 10.1056/NEJMoa1516192.
- [4] Li Y, Lv X, Ge X, et al. Mutational spectrum and associations with clinical features in patients with acute myeloid leukaemia based on nextgeneration sequencing [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19 (5):4147-4158. DOI:10.3892/mmr.2019.10081.
- [5] Short NJ, Rytting ME, Cortes JE. Acute myeloid leukaemia [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10147):593-606. DOI:10.1016/S0140-6736(18)31041-9.
- [6] Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology [J]. *Cancer*, 2006, 107 (9):2099-2107. DOI: 10.1002/cncr.22233.
- [7] Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373 (12):1136-1152. DOI:10.1056/NEJMra1406184.
- [8] Romig H, Fackelmayer FO, Renz A, et al. Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements [J]. *EMBO J*, 1992, 11 (9):3431-3440. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05422.x.
- [9] Nozawa RS, Boteva L, Soares DC, et al. SAF-A Regulates Interphase Chromosome Structure through Oligomerization with Chromatin-Associated RNAs [J]. *Cell*, 2017, 169 (7):1214-1227. e18. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.029.
- [10] Zhang L, Song D, Zhu B, et al. The role of nuclear matrix protein HNRNPU in maintaining the architecture of 3D genome [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 90:161-167. DOI: 10.1016/j.semdb.2018.07.006.
- [11] Izumi H, Funa K. Telomere Function and the G-Quadruplex Formation are Regulated by hnRNP U [J]. *Cells*, 2019, 8 (5): 390. DOI: 10.3390/cells8050390.
- [12] Pullirsch D, Härtel R, Kishimoto H, et al. The Trithorax group protein Ash2l and Saf-A are recruited to the inactive X chromosome at the onset of stable X inactivation [J]. *Development*, 2010, 137 (6):935-943. DOI: 10.1242/dev.035956.
- [13] Hasegawa Y, Brockdorff N, Kawano S, et al. The matrix protein hnRNP U is required for chromosomal localization of Xist RNA [J]. *Dev Cell*, 2010, 19 (3):469-476. DOI: 10.1016/j.devcel.2010.08.006.
- [14] Cao L, Liu S, Li Y, et al. The Nuclear Matrix Protein SAFA Surveils Viral RNA and Facilitates Immunity by Activating Antiviral Enhancers and Super-enhancers [J]. *Cell Host Microbe*, 2019, 26 (3): 369-384.e8. DOI: 10.1016/j.chom.2019.08.010.
- [15] Weidensdorfer D, Stöhr N, Baude A, et al. Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs [J]. *RNA*, 2009, 15 (1):104-115. DOI: 10.1261/rna.1175909.
- [16] Xiao R, Tang P, Yang B, et al. Nuclear matrix factor hnRNP U/SAF-A exerts a global control of alternative splicing by regulating U2 snRNP maturation [J]. *Mol Cell*, 2012, 45 (5):656-668. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.01.009.
- [17] Douglas P, Ye R, Morrice N, et al. Phosphorylation of SAF-A/hnRNP-U Serine 59 by Polo-Like Kinase 1 Is Required for Mitosis [J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35 (15):2699-2713. DOI: 10.1128/MCB.01312-14.
- [18] Kim MK, Nikodem VM. hnRNP U inhibits carboxy-terminal domain phosphorylation by TFIIF and represses RNA polymerase II elongation [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19 (10):6833-6844. DOI: 10.1128/MCB.19.10.6833.
- [19] Xing S, Li Z, Ma W, et al. DIS3L2 Promotes Progression of Hepatocellular Carcinoma via hnRNP U-Mediated Alternative Splicing [J]. *Cancer Res*, 2019, 79 (19):4923-4936. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0376.
- [20] Jiao W, Chen Y, Song H, et al. HPSE enhancer RNA promotes cancer progression through driving chromatin looping and regulating hnRNPU/p300/EGR1/HPSE axis [J]. *Oncogene*, 2018, 37 (20):2728-2745. DOI: 10.1038/s41388-018-0128-0.
- [21] Song H, Li D, Wang X, et al. HNF4A-AS1/hnRNPU/CTCF axis as a therapeutic target for aerobic glycolysis and neuroblastoma progression [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13 (1):24. DOI: 10.1186/s13045-020-00857-7.
- [22] Huang R, Zhou PK. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6 (1): 254. DOI: 10.1038/s41392-021-00648-7.
- [23] Ray U, Raghavan SC. Understanding the DNA double-strand break repair and its therapeutic implications [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2021, 106: 103177. DOI: 10.1016/j.dnarep.2021.103177.

(收稿日期:2022-01-16)

(本文编辑:王叶青)