

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.14.003

Srsf1 敲低对 GT1-7 细胞基因表达谱的影响 *

朱豆豆¹ 陈 利² 徐 园² 李 凯² 周宇荀² 肖君华^{1,2Δ}

(东华大学化学化工与生物工程学院 上海 201620)

摘要 目的:本研究通过 RNA-seq 技术分析 Srsf1 基因表达敲低的 GT1-7 细胞(knock down, KD)和野生型 GT1-7 细胞(wide type, WT)的表达谱和可变剪接事件,研究 Srsf1 敲低对 GT1-7 细胞基因表达谱的影响。**方法:**利用实验室现有的 Srsf1 基因表达敲低的 GT1-7 细胞(SRSF1-KD)和野生型 GT1-7 细胞分别抽提 RNA,做 RNA-seq 数据分析,利用 rMATS 软件分析两株细胞内可变剪接事件的变化,确定 Srsf1 调控的下游关键基因。**结果:**结果显示共有 875 个基因表达存在显著性差异,对这些基因进行 KEGG 通路分析,发现 γ -氨基丁酸能突触、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路等与性发育相关的通路均受到影响。此外,P53 通路也受到 Srsf1 敲低的影响。利用 rMATS 软件进行可变剪接事件分析,显示共发生 839 个可变剪接事件,涉及 719 个基因,进行 KEGG 通路分析发现与性发育相关的 MAPK 信号通路受到影响。**结论:**成功检测了 GT1-7 细胞和 Srsf1 基因敲低的 GT1-7 细胞表达谱,通过分析基因表达差异以及可变剪接事件,证明了 Srsf1 对于 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、 γ -氨基丁酸能突触信号通路、p53 通路的调控作用,并且这些信号通路提示我们 Srsf1 可能更多的通过非可变剪接方式影响性发育相关基因的表达,而非可变剪接方式,从而为更深入的性发育研究提供了理论基础。

关键词:精氨酸 / 丝氨酸富集的剪接因子 1; GT1-7 细胞; 转录组测序**中图分类号:**R-33; Q75; Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)14-2614-06

Effect on Gene Expression Profile of Srsf1 Knockdown in GT1-7 Cells*

ZHU Dou-dou¹, CHEN Li², XU Yuan², LI Kai², ZHOU Yu-xun², XIAO Jun-hua^{1,2Δ}

(Institute of Chemical and Biological Engineering, Donghua University, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT Objective: In this paper, we analyzed the expression profiles and alternative splicing events of GT1-7 cells with knock-down of Srsf1 (knock down, KD) and wild type GT1-7 cells (wide type, WT) by RNA-seq technology, to research the effect of the Srsf1 knockdown on gene expression profiles in GT1-7 cells. **Methods:** RNA was extracted from GT1-7 cells with knockdown of Srsf1 (knock down, KD) and wild type GT1-7 cells (wide type, WT) saved in the laboratory for RNA-seq program. Differentially expressed genes were analyzed after processing RNA-seq raw data by bioinformatics methods. Changes in alternative splicing events of two cells were analyzed by rMATS software to identify downstream key genes regulated by Srsf1. **Results:** The results showed that there were significant differences in the expression level of 875 genes. The KEGG pathway analysis of these differentially expressed genes revealed that several known sexual development related pathways including γ -aminobutyric acid synaptic signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, MAPK signaling pathway were all affected. In addition, the P53 signaling pathway was also affected by the knockdown of Srsf1. Analysis of alternative splicing events using rMATS software revealed 839 alternative splicing events involving 719 genes. The KEGG pathway analysis of these genes revealed that MAPK signaling pathways associated with sexual development were affected. **Conclusion:** The expression profiles of GT1-7 cells and Srsf1 knockdown GT1-7 cells were successfully detected by means of RNA-seq technology. By using bioinformatics methods to analyze gene expression differences and alternative splicing events, it was demonstrated that Srsf1 is involved in PI3K-Akt signaling pathway, MAPK signaling pathway and γ -amino Butyric acid signaling pathway and p53 signaling pathway, and these signaling pathways suggest that Srsf1 may affect the expression of sexual development-related genes more by non-alternative splicing, rather than alternative splicing, thus our results provide a theoretical basis for deepening study on sexual development.

Key words: Srsf1; GT1-7; RNA-Seq**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; Q75; Q78 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2019)14-2614-06

前言

Srsf1 是剪接调控因子 SR 蛋白家族的代表性成员,在小鼠

中位于染色体 Chr 11: 88.05-88.05 Mb,蛋白长度约为 33KD,位于 N 末端的是一个标准的 RNA 结合结构域 1(RRM1),接着是 RRM2,RS 结构域位于 C 末端^[1]。在体内,RRM2 在决定底物

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31772550);上海市科委基金资助项目(14140900502)

作者简介:朱豆豆,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学,电话:18817830355, E-mail: 18817830355@163.com

Δ 通讯作者:肖君华,教授,研究方向:医学分子遗传学, E-mail: xiaojunhua@dhu.edu.cn

(收稿日期:2018-12-07 接受日期:2018-12-30)

特异性中发挥主要作用^[3],RRM2 特异性结合富含 GA 的外显子增强(Exonic splicing enhancers,ESEs)序列,并且能够改变 SRSF1 靶基因的可变剪接^[3]。RS 结构域的磷酸化状态和甲基化决定了 Srsf1 在细胞中的分布^[4],而且在 Srsf1 蛋白酶体泛素化降解中发挥重要作用^[5]。Srsf1 能够调控自身表达以维持在细胞中的稳态水平,以蛋白磷酸化、甲基化修饰状态决定核质分布,通过剪接依赖和非依赖功能调控靶基因表达。

可变剪接是 mRNA 前体通过不同的剪接方式产生剪接异构体,极大地增加了真核基因表达的复杂程度,同时也是产生蛋白质多样性的原因之一^[6]。目前已经发现了多种 mRNA 的可变剪接形式,主要包括:外显子跳跃、可变 3' 或 5' 剪接位点、互斥外显子和内含子保留。对于基因组中的可变剪接事件研究现在大多使用基因芯片以及转录组测序(RNA-Seq)技术。例如在肺癌细胞中鉴定 SRSF1 调控的可变剪接事件,通过外显子连接芯片结合适当的算法,鉴定了 SRSF1 的靶基因 PRRC2C 在肺癌细胞中的差异表达,并发现了 PRRC2C 的一个新剪接体^[7]。RNA-Seq 是近几年发展迅速的一种高通量测序技术,因为检测成本较芯片而言更低,分析方法更加简便,也越来越多的用于可变剪接事件的研究。例如对于 Fkbp51 基因敲除的小鼠肝脏转录组进行可变剪接的研究正是使用的 RNA-Seq 技术,通过 TopHat 对测序结果进行分析,就能够得到差异表达基因以及产生的可变剪接事件^[8]。虽然基因芯片技术以及 RNA-Seq 技术在研究基因可变剪接事件时具有非常高的可信度,但是并不能达到百分百的正确,必须结合 PCR、实时荧光定量 PCR 或者一代测序技术对分析结果进行进一步的验证。

GT1-7 细胞是通过转基因技术分离小鼠下丘脑 GnRH 神经元得到的,能够以高频度、高幅度的脉冲形式释放 GnRH,成为研究性发育相关机制的理想离体细胞模型^[9]。本文利用实验室现有的 Srsf1 基因表达敲低的 GT1-7 细胞(SRSF1-KD)和野生型 GT1-7 细胞分别抽提 RNA,做 RNA-seq 数据分析,利用 rMATS 软件^[10]分析两株细胞内可变剪接事件的变化,确定 Srsf1 调控的下游关键基因,为解析 SRSF1 调控性发育相关机制的研究提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

Srsf1 基因表达敲低的 GT1-7 细胞(SRSF1-KD)和野生型 GT1-7 细胞由本实验室保存。

胎牛血清(Gibco,美国);PBS 缓冲液(南京凯基生物科技发展有限公司);DMEM 高糖培养基(Hyclone,美国);RNAiso Plus (Takara);逆转录试剂盒(Thermo Scientific);SuperReal PreMix SYBR Green(TIANGEN);RIPA lysis buffer 等蛋白相关试剂(碧云天公司);引物合成(苏州泓迅生物科技有限公司)。实时荧光定量 PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司、Nanodrop 分光光度计购自 Thermo 公司。

PCR 仪、二氧化碳恒温培养箱 BBI5 型(Thermo,美国);NanoDrop 微量紫外分光光度计 2000 型(Thermo,美国);Real-Time PCR 仪 7500 型(Applied Biosystems Inc.,美国);倒置相差显微镜 I×70 型(OLYMPUS,日本);台式高速冷冻离心机(Thermo,美国)。

1.2 Real-time PCR 检测 Srsf1 和相关基因的 mRNA 表达水平

细胞按 1×10^6 (个/孔)密度接种于六孔板培养,待细胞长满后吸去上清,用预冷的 PBS 洗 3 次后,每孔加入 1 mL Trizol,抽提细胞总 RNA。取 2 μ L 至分光光度计用 Trizol 法分别提取总细胞 RNA,使用 Nanodrop 分光光度计对 RNA 定量。检测纯度和浓度,1:1 进行琼脂糖电泳检测其完整性,余下部分立即保存于 -80℃ 超低温冰箱中,或立即用于反转录反应。取 1 μ g RNA 经过 Dnase I 处理后,用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA,稀释 5 倍后作为荧光定量 PCR 的模板进行 Real-time PCR。相关的引物序列见表 1。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法进行分析, $P < 0.05$ 作为显著性差异标准。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Table 1 primers used for Real-time PCR

Gene	Sequences(5'→3')
β -actin-F	GCATGGGTGAGAAGGATTCC
β -actin-R	TGCTCGATGGGGTACTTCAG
Srsf1-F	GGAAGCTGGCAGGACTTAAA
Srsf1-R	CGGTAAACATCAGCGTAACAT
Col4a5-F	GTCGATGTGCAGTGTGTGAG
Col4a5-R	AGCCAATCCACAGAGAGTCC
Fas-F	TCTACTGCGATTCTCCTGGC
Fas-R	GGCTCAAGGGTTCCATGTTC
Gnb4-F	TGTCCTGCTGCCGATTCTTA
Gnb4-R	AAGGTCGTAGTCTGCTGTCC
Mapk13-F	GCAACCTGGCTGTGAATGAA
Mapk13-R	TAGCCCGTCATCTCAGTGTC
Dusp7-F	CTCTCAGTTCTTCCCCGAGG
Dusp7-R	GCACCAAGACACCACACTTC

1.3 RNA-seq

将敲低 Srsf1 的 GT1-7 细胞株和野生型 GT1-7 细胞抽提 RNA 进行转录组测序,即 RNA-seq。本实验委托无锡翼和应用生物技术有限公司进行,使用 Illumina HiSeq2500 平台。

1.4 RNA-seq 数据处理

测序得到的原始数据经过筛选,去除接头和低质量数据后,使用 TopHat 将测得的短序列比对到基因组上,利用 Cufflinks 组装成完整的转录本,进行转录本注释,以及 Cuffdiff 量化每个条件下的转录本,基因表达量的计算使用 RPKM(Fragments Per Kilobase of Transcript per Million Mapped Reads)的方法。

1.5 差异表达基因和差异可变剪接基因分析

数据经过归一化和对数转化后,以 $q < 0.01$ 和 $\log_2(\text{fold change}) > 2$ 作为基因表达具有显著性差异的标准,筛选样本间具有显著差异表达的基因,分析 KEGG 代谢通路。

同时使用剪接分析软件 rMATS 处理数据,按照 $\text{FDR} < 0.05$ 以及 $|\text{IncLevelDifference}| \geq 5\%$ 的标准进行筛选,得到差异可变剪接事件及差异可变剪接基因,将差异可变剪接基因使用 KEGG 数据库进行通路分析。

1.6 统计学方法与作图

实验结果采用 GraphPad Prism 软件进行统计分析,采用 GraphPad Prism 和 Adobe Illustrator 作图。各组间比较采用 t-检验,数值显示 SEM 平均值, $P<0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 Real-time PCR 检测 Srsf1 的 mRNA 表达水平

Real-time PCR 检测 Srsf1 的表达水平如图 1 所示, SRSF1-KD 细胞中 Srsf1 基因表达量相对野生型 GT1-7 的表达量显著降低 40.2% ($P<0.01$)。

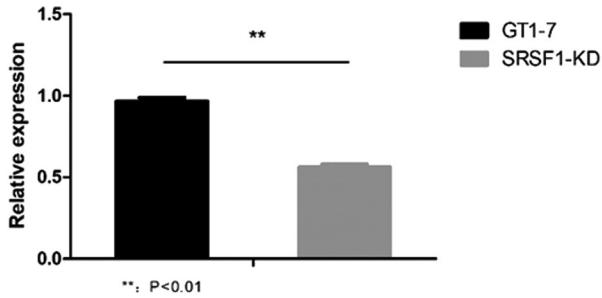


图 1 GT1-7 和 SRSF1-KD 细胞中 Srsf1 mRNA 表达

Fig.1 mRNA expression of Srsf1 in GT1-7 cells and SRSF1-KD cells

Note: Bars are means and vertical bars represent SEM (**: $P<0.01$).

2.2 差异表达基因分析

通过对 GT1-7 细胞和 Srsf1-KD 细胞进行 RNA-seq 分析,共检测 10354 个基因,我们确定了 875 个发生显著差异表达的基因,其中 523 个基因上调,352 个基因下调。上调倍数较大的基因 Uaca、Kcnk2、Dbx2 和 Rassf4,分别上调 8.5、6.8、6.8 和 6.3 倍;下调倍数较大的基因有 Cdh8、Stl8、Cd55 和 Slc16a7,分别下调 6.2、6.1、5.8 和 5.3 倍;其他大多数基因的表达量变化在 2~3 倍。

使用 KEGG 数据库进行代谢通路分析(图 2),结果显示,显著性最高的前 20 个通路中,已知与性发育相关的通路有 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、 γ -氨基丁酸能突触通路。此外,P53 通路也受到影响。参与 PI3K-Akt 信号通路的基因中表达量变化较大的基因有 Col4a5、Kdr、Pdgfb,分别下调 3.4 倍、3.0 倍和上调 2.6 倍。参与 MAPK 信号通路的基因中表达量变化较大的基因有 Fos、Pdgfb、Fas,分别下调 2.8 倍和上调 2.6 倍、2.0 倍。参与 γ -氨基丁酸能突触的基因中表达量变化较大的基因有 Gabrg1、Adcy8、Gnb4,分别下调 3.6 倍、上调 3.1 倍和 2.2 倍。另外,P53 通路也受到 SRSF1 敲低的影响,其中表达量变化较大的基因有 Steap3、Fas,分别上调 5.1 倍、2.0 倍。基因 Pdgfb 同时参与 PI3K-Akt 信号通路和 MAPK 信号通路,基因 Fas 同时参与 MAPK 信号通路和 P53 通路,而且两个表达量变化幅度较大。

2.3 Real-time PCR 验证 RNA-Seq 结果

随机选择富集到 PI3K-Akt 信号通路和 MAPK 信号通路中的五个基因 Col4a5、Fas、Gnb4、Mapk13 和 Dusp7,对 RNA-Seq 结果进行验证。这 5 个基因在两种细胞中均稳定表达,且表达量均有显著性变化(图 3A)。Real-time PCR 检测显示这 5 个基因的变化趋势与 RNA-Seq 结果是一致的(图 3B)。

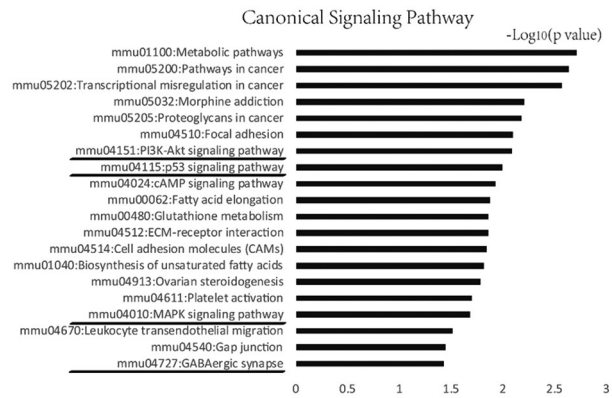


图 2 显著差异表达基因的 KEGG 通路分析。纵坐标代表代谢通路类别,横坐标代表 P 值($P<0.05$, 5% FDR)

Fig.2 The significant signaling pathways of the differentially expressed genes. The vertical axis is the pathway category and the horizontal axis is the P-value($P<0.05$, 5% FDR).

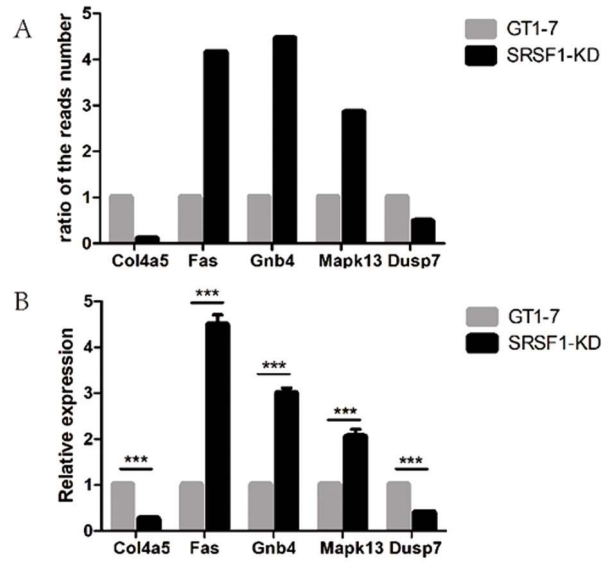


图 3A RNA-Seq 中差异基因的 reads 数比值

Fig.3A The ratio of the reads of differentially expressed genes in RNA-Seq

图 3B Real-time PCR 验证差异基因的表达

Fig.3B The expression of differentially expressed genes was validated by Real-time PCR(***: $P<0.001$)

2.4 差异可变剪接基因分析

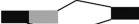
使用剪接分析软件 rMATS 处理 RNA-seq 数据,得到两个样本间存在显著差异的可变剪接事件共 839 个,发生显著差异可变剪接的基因共 719 个,绝大多数基因发生外显子跳跃类型的可变剪接(表 2)。对所有显著差异可变剪接基因进行 KEGG 通路分析(图 4),结果显示共富集到 12 个信号通路,其中已知与性发育相关的通路只有 MAPK 信号通路,共 14 个基因富集到该通路,其中 13 个基因发生的可变剪接事件类型是外显子跳跃(SE),1 个基因发生的可变剪接事件类型是可变 3' 剪接位点。

3 讨论

GnRH 神经元脉冲释放 GnRH 激素是性发育启动的标志事件,GT1-7 细胞作为 GnRH 神经元的离体细胞模型,是研究

表 2 Srsf1 敲低导致的显著可变剪接事件和显著差异基因

Table 2 Significant alternative splicing events and significantly different genes which induced by Srsf1 knock down

Alternative	Splicing events	The number of significantly different events	The number of significantly different genes
Skipped exon(SE)		648	538
Alternative 3' splice site(A3ss)		48	45
Alternative 3' splice site(A3ss)		45	45
Mutually exclusive exons(MXE)		38	33
Retained intron(RI)		60	58

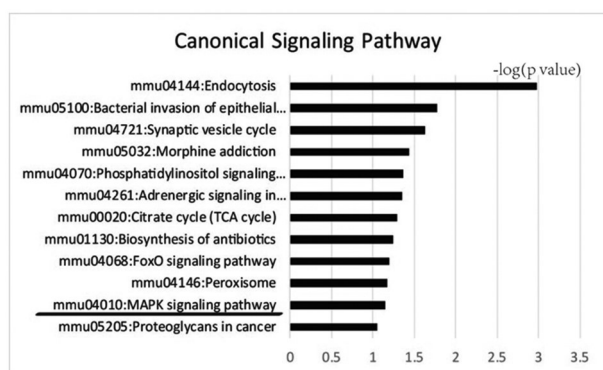


图 4 显著差异可变剪接基因的 KEGG 通路分析

Fig.4 The significant signaling pathways of the differentially alternative splicing genes. The vertical axis is the pathway category and the horizontal axis is the P-value($P < 0.05$, 5% FDR).

性发育相关机制的良好材料。本实验室前期工作发现 Srsf1 能够影响性发育相关基因 GnRH、Kiss1 的表达,首次将剪接因子 Srsf1 与性发育相关基因联系起来,对性发育机制相关研究给出重要的提示^[11]。在之前的报道中,已经发现 SR 蛋白家族成员 Srsf4 能够通过可变剪接调控基因的表达,进而影响 PI3K-Akt 信号通路改变疾病发展^[12];Srsf3 也能够通过调控 p53 通路的激活,影响细胞周期^[13]。与之吻合,我们的研究结果显示 srsf1 蛋白同样能够通过调控基因的可变剪接,参与细胞内重要信号通路的调节。

Srsf1-KD 细胞和野生型 GT1-7 细胞的 RNA-Seq 检测结果经软件分析得出,显著差异表达基因的 KEGG 代谢通路显著富集到 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、 γ -氨基丁酸能突触信号通路,并且这些信号通路已经被报道参与性发育调节。PI3K-Akt 能够使 mTOR 磷酸化并激活,同时对 mTOR 的抑制剂蛋白进行抑制,通过 p70S6 激酶的信号转导和抑制 4E-BP1,这些作用共同促进细胞生长、细胞周期进程,而且 mTORC1 能够促进 Kiss1 基因表达从而促进性发育启动^[14]。在我们之前的实验中检测 GT1-7 细胞敲低 Srsf1 后,引起 GnRH 和 Kiss1 表达水平均显著降低^[11],也说明了 PI3K-Akt 通路对性发育调节的重要作用。此外,Srsf1 还通过激活磷酸酶 PP2A 来促进翻译起始,PP2A 可以抑制 4E-BP 和腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK, mTORC1 的上游抑制剂)^[15-17]。AMPK 是一种细胞内传感器,由能量缺乏激活,参与细胞和全身能量稳态的调节,在 GT1-7 细胞中,已经证明 AMPK 能够通过接受上游信号调控来影响 GnRH(gonadotropin-releasing hormone)分泌^[18]。哺乳动物细胞中的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通过顺序磷酸化和激活其

激酶组分起作用的,MAPK 易位至细胞核并激活转录因子,同时也可以存在与细胞质中发挥作用,参与 GnRH 诱导的促性腺激素亚基和 GnRHR 基因的转录调控^[19]。我们的分析数据中显示,共有 17 个表达差异显著的基因富集到 MAPK 通路,而且可变剪接的差异基因也富集到该通路,说明 Srsf1 作为可变剪接因子的作用对该通路影响较大。 γ -氨基丁酸(GABA)是一种中枢神经系统中主要的抑制性神经递质,通过介导下游的离子型通道受体和代谢型受体,增加神经细胞膜内外离子的流动,发挥生理功能。GABA 受体的激活,能够介导 PI3K-Akt 信号通路,有效阻止细胞凋亡,发挥神经保护作用。在 GnRH 神经元和 GT1-7 细胞系中,GABA 及其受体通过直接或间接的方式调节 GnRH 分泌^[20]。在 GT1-7 细胞研究中,GABAA 受体的激活会引起 GnRH 分泌的增加,而在雌性小鼠的体内实验中也发现 GABA 通过 GABAA 受体介导,在排卵前对 LH 的脉冲式分泌发挥抑制作用^[21]。在我们的 Srsf1-KD 细胞中,GABAA 受体基因 Gabrg1、Gabra1 均发生显著下调,与之相反,GABAB 受体基因 Gabbr1、Gabbr2 则发生显著上调,这种变化也在一定程度上解释了我们之前所观察到的细胞 GnRH 表达降低的现象。

除了性发育相关的信号通路,两种差异基因都富集到了癌症相关的通路,这与小肠、结肠、肺癌等肿瘤细胞中都观察到 SRSF1 的表达异常现象一致,而且,许多性发育相关基因也都与癌症的进程有密切的联系,例如 KISS1 能够对某些癌细胞的转移进行抑制^[22]。对 Dickkopf 4 过表达的胰腺癌细胞进行 RNA-Seq 分析后,鉴定了 MAPK 信号传导途径是核心信号转导途径^[23]。表达差异基因富集到的通路中也出现了 p53 信号通路,最近有研究发现 p53 通路的激活与 SRSF1 相关。p53 通路具有阻滞细胞周期/诱导细胞凋亡、促进 DNA 修复的作用。在正常细胞中,p53 能够诱导 MDM2(E3 泛素连接酶)高表达,促进 MDM2 直接结合 p53,抑制其转录活性,从而形成负反馈调节环路,严格调控 p53 蛋白水平^[24]。细胞衰老是一种稳定的细胞周期停滞,最初是由正常成纤维细胞有限的增殖能力观察到的^[25],因其永久性的生长停滞而被广泛认为是癌症的屏障。在整合了公开可用的不同人类衰老样本的 RNA 测序数据后,科学家发现细胞衰老中的下调基因显著富含 RBP(RNA binding protein)基因,尤其是与 mRNA 剪接相关的生物过程中的主要调节因子,在鉴定了细胞衰老中的常见差异剪接事件并进一步研究后,发现了 8 个主要的剪接调节性 RBP,其中包括了 Srsf1 和 Srsf7 这两个 SR 蛋白^[26]。相对的,在原代人成纤维细胞中,Srsf1 能够参与致癌基因引发的衰老(oncogene-induced senescence,OIS)的抗肿瘤生成通路^[27],即 Srsf1 过表达引起

Srsf1-Rpl5-MDM2 复合体的形成,抑制 MDM2(E3 泛素连接酶)与肿瘤抑制蛋白 p53 的结合,消除 p53 的 MDM2 依赖性蛋白酶降解,促进 p53 的稳定,从而降低细胞增殖,并最终触发致癌基因诱导的衰老(OIS),研究结果显示 Srsf1 是在 p53 依赖性核糖体-应激检查点途径中起作用。

可变剪接差异基因富集富集到的通路中与性发育相关的只有 MAPK 信号通路,已被证实 MAPK 通路中的 MKNK2 受到 Srsf1 的可变剪接调控,Srsf1 上调会导致 Mnk2a 剪接体表达的下调,而 Mnk2b 剪接体则激活 eIF4E 非依赖的 MAPK 信号通路^[28]。而这种可变剪接体表达水平的转换已被证明可以调节前列腺癌细胞化疗的耐药性^[29]。最近更多的人使用 RNA-Seq 技术对可变剪接事件进行研究,比如 SRSF1 在胶质瘤细胞中表达增加,通过 RNA-Seq 全面筛选并鉴定了胶质瘤细胞中受到 SRSF1 调控的可变剪接事件,进行 Motif 分析揭示 SRSF1 对可变剪接的位置依赖性调节,证实 SRSF1 促进细胞增殖、存活和侵袭^[30]。在照射治疗的肺癌细胞中发现了 SRSF1 的水平升高,而 SRSF1 的敲低使癌细胞对辐射敏感,利用 RNA-Seq 分析证明了 SRSF1 调节相关的剪接事件,特别是 PTPMT1 (PTEN 样线粒体磷酸酶)的剪接,促进 AMPK 的磷酸化,从而诱导 DNA 双链断裂以使癌细胞对辐射敏感^[31]。基因表达谱芯片最初广泛用于基因差异表达的分析,后来也同样用于分析可变剪接事件,但是正确率相对较差。近来为了解决这个问题,已经开发了外显子连接芯片。为了了解连接芯片检测可变剪接事件的正确率,对使用严重影响可变剪接的药物处理过的乳腺癌细胞系同时进行 RNA-Seq 检测和连接芯片检测,对两者获得的结果比较发现,RNA-Seq 在发现超出探针范围的新可变剪接时更有优势,而对于探针覆盖的区域,两者呈现高度的一致性,这表明外显子连接芯片可以在某些程度上成为 RNA-Seq 的可行替代方案,用于研究可变剪接事件^[32]。虽然本研究的结果中显示可变剪接差异基因与表达差异基因数目相差不多,但代谢通路富集的结果却差异巨大,这可能与 Srsf1 调控靶基因表达方式的多样性有关,即除了可变剪接的方式以外,还有参与无义介导的 mRNA 衰变(NMD)^[33]、作为衔接蛋白促进 mRNA 的核输出^[34]、阻止诱变型 R 环结构的形成以维持基因稳定性^[35]等。

4 结论

本研究利用 RNA-Seq 技术,成功检测了 GT1-7 细胞和 Srsf1 基因敲低的 GT1-7 细胞表达谱,通过分析基因表达差异以及可变剪接事件,证明了 Srsf1 对于 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、 γ -氨基酸能突触信号通路、p53 通路的调控作用,并且这些信号通路提示我们 Srsf1 可能更多的通过非可变剪接方式影响性发育相关基因的表达,而非可变剪接方式,给后续更深入的性发育研究提供了理论基础。

参考文献(References)

- [1] Das, Krainer. Emerging functions of SRSF1, splicing factor and oncoprotein, in RNA metabolism and cancer [J]. Mol Cancer Res, 2014, 12: 1195-1204
- [2] Mayeda, Screaton, Chandler, et al. Substrate specificities of SR proteins in constitutive splicing are determined by their RNA recognition motifs and composite pre-mRNA exonic elements [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19: 1853-1863
- [3] Stankovic, Schloesser, Joris, et al. Dynamic Distribution and Interaction of the Arabidopsis SRSF1 Subfamily Splicing Factors [J]. Plant Physiol, 2016, 170: 1000-1013
- [4] Aubol, Serrano, Fattet, et al. Molecular interactions connecting the function of the serine-arginine-rich protein SRSF1 to protein phosphatase 1[J]. J Biol Chem, 2018, 293: 16751-16760
- [5] Breig, Baklouti. Proteasome-mediated proteolysis of SRSF5 splicing factor intriguingly co-occurs with SRSF5 mRNA upregulation during late erythroid differentiation[J]. PLoS One, 2013, 8: e59137
- [6] Anczuków, Akerman, Cléry, et al. SRSF1-Regulated Alternative Splicing in Breast Cancer[J]. Molecular cell, 2015, 60: 105-117
- [7] Miguel, Sharma, Pajares, et al. Identification of alternative splicing events regulated by the oncogenic factor SRSF1 in lung cancer[J]. Cancer Research, 2014, 74: 1105
- [8] 周志强, 杨志伟, 雍伟东. Fkbp51 基因敲除对小鼠肝脏转录组基因可变剪接的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27: 31-36
- [9] 冯涛, 吴晓敏, 许晓玲, 等. GT1-7 细胞及其在生殖相关研究中的应用[J]. 东北农业大学学报, 2016, 47: 102-108
- [10] Shihao, Juw Won, Zhi-Xiang, et al. rMATS: robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111: 5593-5601
- [11] Tong, Wang, Zhou, et al. MiR-505-3p, a New Repressor of Puberty Onset in Female Mice[J]. bioRxiv, 2018: 271718
- [12] Tan, Wang, Ma. Physiological and Pathological Function of Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 4 and Related Diseases[J]. BioMed Research International, 2018, (2018-2-12), 2018, 2018: 1-6
- [13] Chang, Hsu, Chen, et al. Theophylline exhibits anti-cancer activity by suppressing SRSF3 in cervical and breast cancer cell lines[J]. Oncotarget, 2017, 8: 101461-101474
- [14] Roa, Tena-Sempere. Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTOR signaling [J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2010, 21: 519-528
- [15] Maslon, Heras, Bellora, et al. The translational landscape of the splicing factor SRSF1 and its role in mitosis[J]. Elife, 2014, 3: e02028
- [16] Ting, Qiujing, Juan, et al. PP2A mediated AMPK inhibition promotes HSP70 expression in heat shock response [J]. PLoS One, 2010, 5: 422-433
- [17] Zeng, Han, Yu, et al. Effect of nourishing "yin" removing "fire" Chinese herbal mixture on hypothalamic mammalian target of rapamycin expression during onset of puberty in female rats [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, 2015[Epub ahead of print]
- [18] Barroso, Franssen, Ruiz-Pino, et al. Reproductive and metabolic consequences of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) ablation in GnRH neurons[C]. 2018, BioScientifica; City
- [19] Rahamim-Ben Navi, Tsukerman, Feldman, et al. GnRH in duces ERK-dependent bleb formation in gonadotrope cells, involving recruitment of members of a GnRH receptor-associated signalosome to the Blebs[J]. Frontiers in endocrinology, 2017, 8: 113
- [20] Berg, Silveira, Moenter. Prepubertal development of GABAergic Transmission to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and postsynaptic response are altered by prenatal androgenization[J].

- Journal of Neuroscience, 2018: 2304-2317
- [21] Herbison, Moenter. Depolarising and hyperpolarising actions of GA-BA(A) receptor activation on gonadotrophin-releasing hormone neurones: towards an emerging consensus [J]. Journal of Neuroendocrinology, 2011, 23: 557-569
- [22] Tian, Al-Odaini, Wang, et al. KiSS1 gene as a novel mediator of TGFbeta-mediated cell invasion in triple negative breast cancer [J]. Cell Signal, 2018, 42: 1-10
- [23] Ouyang, Pan, Tai, et al. Transcriptomic changes associated with DKK4 overexpression in pancreatic cancer cells detected by RNA-Seq[J]. Tumour Biol, 2016, 37: 10827-10838
- [24] Chen, Weiss. Alternative splicing in cancer: implications for biology and therapy[J]. Oncogene, 2015, 34: 1
- [25] Hayflick, Moorhead. The serial cultivation of human diploid cell strains[J]. Exp Cell Res, 1961, 25: 585-621
- [26] Dong, Wei, Zhang, et al. Regulatory RNA binding proteins contribute to the transcriptome-wide splicing alterations in human cellular senescence[J]. Aging (Albany NY), 2018, 10: 1489-1505
- [27] Luo, Fan. Insight into the regulatory mechanism of VEGFA isoforms in p53 mutant breast cancer: can it be substantiated with solely in vitro studies?[J]. Journal of thoracic disease, 2018, 10: 567
- [28] Siegfried, Bonomi, Ghigna, et al. Regulation of the Ras-MAPK and PI3K-mTOR Signalling Pathways by Alternative Splicing in Cancer [J]. International Journal of Cell Biology, 2013, (2013-9-3), 2013, 2013: 568931
- [29] Adesso, Calabretta, Barbagallo, et al. Gemcitabine triggers a pro-survival response in pancreatic cancer cells through activation of the MNK2/eIF4E pathway[J]. Oncogene, 2013, 32: 2848-2857
- [30] Zhou, Wang, Li, et al. Splicing factor SRSF1 promotes gliomagenesis via oncogenic splice-switching of MYO1B [J]. J Clin Invest, 2018 [Epub ahead of print]
- [31] Sheng, Zhao, Zhao, et al. SRSF1 modulates PTPMT1 alternative splicing to regulate lung cancer cell radioresistance[J]. EBioMedicine, 2018[Epub ahead of print]
- [32] Romero, Ortiz-Estevéz, Muniategui, et al. Comparison of RNA-seq and microarray platforms for splice event detection using a cross-platform algorithm[J]. BMC Genomics, 2018, 19: 703
- [33] Aznarez, Nomakuchi, Tetenbaum-Novatt, et al. Mechanism of Non-sense-Mediated mRNA Decay Stimulation by Splicing Factor SRSF1 [J]. Cell reports, 2018, 23: 2186-2198
- [34] Gonçalves, Jordan. Posttranscriptional Regulation of Splicing Factor SRSF1 and Its Role in Cancer Cell Biology[J]. BioMed research international, 2015, 2015[Epub ahead of print]
- [35] Sollier, Stork, García-Rubio, et al. Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability[J]. Molecular cell, 2014, 56: 777-785
-
- (上接第 2666 页)
- [11] Nesi-Reis V, Lera-Nonose DSSL, Oyama J, et al. Contribution of photodynamic therapy in wound healing: A systematic review [J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2018, 21: 294-305
- [12] Li Y, Wang B, Xiao Y, et al. Photodynamic therapy in the treatment of oral leukoplakia: A systematic review[J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2019, 25: 17-22
- [13] Schultz E W, Krueger, Pillich J, et al. (1928). Inactivation of Staphylococcus bacteriophage by methylene blue [J]. Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 1928: 100-101
- [14] Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, et al. Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils[J]. Photochem Photobiol, 2012, 88(1): 227-32
- [15] Tanaka M1, Mroz P, Dai T, et al. Linezolid and vancomycin decrease the therapeutic effect of methylene blue-photodynamic therapy in a mouse model of MRSA bacterial arthritis [J]. Photochem Photobiol, 2013, 89(3): 679-82
- [16] Y Chiu, T Huang, C Chiu, et al. Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract from plectranthus amboinicus (Lour.) spreng both in vitro and In vivo [J]. Evidence-Based Complementary Altern, 2012, 2012: 508137
- [17] JK Kundu, Y Surh. Emerging avenues linking in inflammation and cancer[J]. Free Radical Biol Med, 2012, 52 (9): 2013-2037
- [18] R Medzhitov. Overview Essay Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame[J]. Cell, 2010, 140(6): 771-776
- [19] F Anzengruber, P Avci, LF De Freitas, et al. T-cell mediated anti-tumor immunity after photodynamic therapy: why does it not always work and how can we improve it?[J]. Photochem Photobiol Sci, 2015, 14(8):1492-1509
- [20] A Bennewitz, M Prinz, U Wollina, et al. Photodynamic therapy to improve wound healing in acute and chronic wounds: tricyclic dye combined with low level 810 nm diode laser irradiation[J]. Kosmet. Medizin, 2013, 34 (5): 208-215
- [21] Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes [J]. Curr Opin Microbiol, 2016, 33: 67-73
- [22] Jing Wang, Mokarram Hossain, Ajitha Thanabalasuriar, et al. Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair [J]. Science, 2017, 358(6359): 111-116