

梯度浓度顺铂处理对 6 种肿瘤细胞中 CASP9 的 mRNA 选择性剪接的影响*

杨勤兴,马春霞,陆成龙,杨艳波,杨梦莉,刘舒媛,李明阳,杨 渊,史 荔,俞建昆**
(中国医学科学院北京协和医学院 医学生物学研究所,云南 昆明 650118)

[摘 要] 目的: 分析顺铂处理后多种肿瘤细胞中 CASP9 基因 mRNA 选择性剪接异构体的表达及其变化规律。方法:用梯度浓度的顺铂处理肺癌细胞(A549、H1299)、人胚肾细胞(293FT)、宫颈癌细胞(SiHa、CaSki、C33A)6 种细胞,提取各细胞的总 RNA,用半定量 RT-PCR 和琼脂糖凝胶电泳及胶图像分析软件检测分析 CASP9 基因 mRNA 异构体的组成及其比例和相对表达水平的变化。结果:6 种细胞中,CASP9f: r1 引物检测到的 CASP9a 和 c(NR-102732)两种异构体,但随着顺铂浓度的增加,两种异构体的比例在 6 种细胞中均无变化;而 CASP9f: r2 引物可检测到的异构体 CASP9a 和 b,a/b 比例在 A549、H1299、SiHa、C33A、CaSki 中呈逐渐增加趋势,而在 293FT 细胞中则呈相反趋势;在 A549 顺铂抗性株中,顺铂处理前后 CASP9a/b 的比例显著差异变化明显减弱。结论: 在顺铂处理下,检测的 5 种细胞中的 Casp9 是通过增加 casp9a/b 的比例来应对,仅 293FT 例外;顺铂抗性 A549 细胞株在顺铂处理后 casp9a/b 的比例比例与细胞凋亡和抗性有关,提示调节 casp9a/b 的比例是治疗癌症的可能有效途径之一。

[关键词] 顺铂; CASP9; mRNA 选择性剪接; mRNA 异构体; 细胞凋亡

[中图分类号] R73-3 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2017)09-1003-07

DOI:10. 19367/j. cnki. 1000-2707. 2017. 09. 003

Effect of Gradient Concentration of Cisplatin on Alternative Splicing of CASP9 mRNA in 6 Tumor Cells and Its Mechanism

YANG Qinxing , MA Chunxia, LU Chenglong, YANG yanbo, YANG Mengli, LIU Shuyuan, LI Mingyang,
YANG Yuan, SHI Li, YU Jiankun
(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College,
Kunming 650118, Yunnan, China)

[Abstract] Objective: To explore the expression of alternative splicing isoforms of CASP9 mRNA in 6 tumor cells treated with gradient concentration of cisplatin. Methods: Lung cancer (A549 and H1299) and cervical cancer (SiHa, CaSki and C33A) and 293FT cell lines were treated by gradient dose of cisplatin. Total RNAs of the control cells and the treated cells were extracted 24 h after the treatment. The composition, proportion and relative level of mRNA isoforms in CASP9 gene were detected by semiquantitative RT-PCR, agarose gel electrophoresis and image analysis software. Results: In 6 cell lines, mRNA isoforms CASP9 a and c(NR-102732) were detected by using primers CASP9f: r1, but their ratio didn't changed when the concentration of cisplatin increased. When using primers CASP9f: r2, mRNA isoforms CASP9 a and b could be detected. Except 293FT, in other 5 cell lines, the ratio of CASP9a/b increased with rise of cisplatin concentration. In 293FT, the ratio of CASP9a/b decreased. In cisplatin resistant cell line, A549-CIS-R, the obvious increase of CASP9a/b ratio was a-

*[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31570918),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(2016-12M-2-001)
** 通信作者 E-mail:yjk@imbcams.com.cn
网络出版时间:2017-09-17 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170917.0003.022.html>

bated markedly after cisplatin treatment compared with normal cell line. **Conclusion:** Except 293FT, in other 5 cell lines, cell regulated pre-mRNA alternative splicing of CASP9 in response to DNA damage induced by cisplatin through up-regulating the ratio of CASP9 a/b, but not down-regulating mRNA isoforms c, d. Combined with the result from cisplatin resistant cell line, A549-CIS-R, it is suggested that the ratio of CASP9 a/b can influence cell apoptosis and cisplatin resistance, and regulating ratio of CASP9 a/b is a considerable way for cancer treatment.

[**Key words**] cisplatin; CASP9; mRNA alternative splicing; mRNA isoform; cell apoptosis

凋亡是多细胞生物在发育过程或者某些生理情况下有控制地去除受损的或不需要的细胞过程,在动物的发育和维持机体内稳态中起着重要的作用^[1]。在癌细胞中,细胞的质量和数量的凋亡管控是有缺陷甚至是缺失的,因此这些细胞就会无控制地生长繁殖而不被凋亡所除去,并且会导致细胞的恶性转化。凋亡的减弱也会引起肿瘤细胞对治疗的抗性,许多抗癌治疗策略就是引发足够的DNA损伤来突破这些抗凋亡的壁垒,从而引起细胞死亡。引起凋亡的途径中,一种是由细胞膜上死亡受体介导的(外源性)途径,另一种是由线粒体介导的(内源性)途径^[2]。一般临床上常用的引起DNA损伤的放化疗治疗主要是通过内源性途径来引起肿瘤细胞的凋亡,Bcl2和Caspase两个家族中的许多蛋白参与了该途径的信号转导,而CASP9则是主要参与形成凋亡复合体的重要蛋白之一。有研究发现,在DNA损伤情况下细胞会重新编排多个与细胞命运相关基因的pre-mRNA的选择性剪接,其中也包括多个与细胞凋亡的基因^[3-6]。从NCBI数据库中可以查到CASP9存在多种pre-mRNA剪接异构体,那么在常用化疗药物顺铂(CDDP)处理情况下,肿瘤细胞中的CASP9的mRNA剪接会发生怎样的变化及规律的研究未见报道,本研究选取有代表性的肺癌细胞(A549、H1299)、宫颈癌细胞(C33A、SiHa、CaSki)和人胚肾细胞(293FT)用CDDP进行处理,然后检测各细胞中CASP9 mRNA剪接变化,报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与处理

A549 购自中国科学院昆明动物所细胞中心,NCI-H1299、C33A、SiHa、CaSki及293FT购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心),NCI-H1299细胞使用Hyclone改良型RPMI-1640培养

基,其余细胞均使用Hyclone DMEM/HIGHGLUCOSE培养液(GE Healthcare Life Sciences),两种培养液均含10% FBS(certified foetal serum,biological industries),青霉素和链霉素浓度分别为100 000 U/L和100 mg /L,培养条件为37℃、5% CO₂。CDDP购自Sigma Aldrich公司,用DMSO溶解后使用。顺铂处理组的各组细胞处于对数增长期,在培养皿表面覆盖率为70%~90%,各对照细胞加入各CDDP处理浓度最高组等体积的DMSO进行处理,各类实验细胞顺铂处理组浓度见表1。

表1 各实验细胞中顺铂处理浓度
Tab.1 The concentration of cisplatin for different cell lines

细胞名称	顺铂处理浓度(μmol/L)						
	1组	2组	3组	4组	5组	6组	7组
A549	8	18	24	32	40	48	56
H1299	12	24	36	48	60	72	84
293FT	9	18	27	36	45	54	63
CaSki	6	12	18	24	30	36	42
SiHa	8	16	24	32	40	48	56
C33A	9	18	27	36	45	54	63

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取及mRNA异构体检测 各组细胞在顺铂或DMSO处理24 h,倾倒除去培养液,用预冷的PBS冲洗1次,彻底除去PBS后,加入RNAiso Plus(TaKaRa公司),按照试剂说明书提取总RNA。使用oligo(dT)18引物用PrimeScript II逆转录酶(TaKaRa公司)进行逆转录反应得到cDNA第1链,再用PCR引物进行PCR扩增检测。a与c异构体检测:上游引物(CASP9f)5'-GACATGCTGGCTTCGTTTCTG-3',下游引物(CASP9r1)5'-GGCTCCATGCTCAGGATGTAAG-3',产物大小为230 bp和288 bp。a与b异构体检测:上游引物(CASP9f)5'-GACATGCTGGCTTCGTTTCTG-3',下游引物(CASP9r2)5'-AGAGTAGGACACAAAGATGTCCTG-3',产物大小为790 bp和342 bp。引物

位置和 mRNA 剪接异构体结构如图 1 所示。PCR 总体积 20 μ L,循环条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、60 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 25 s (f: r1)或 60 s(f: r2),35 次循环,最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 A549 顺铂耐受株的驯化 以顺铂为诱导物,采用间歇逐步增加剂量的方法建立人肺腺癌多药耐药细胞系 A549-CIS-R,该细胞能在 20 μ mol/L 的培养基中生长,只是生长变得缓慢。实验中 CD-DP 的处理浓度为 50 μ mol/L,用同体积的 DMSO 处理相应细胞作为对照。

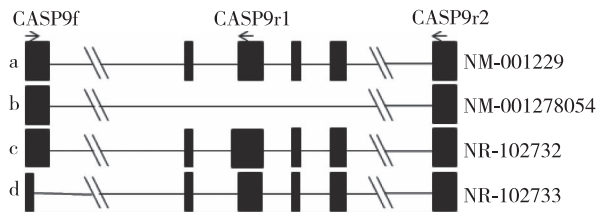


图 1 CASP9 选择性剪接基因结构示意图
Fig. 1 Structure of the mRNA alternative splicing isoforms of CASP9 gene

1.3 数据分析

PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,电泳的结果利用 BIO-RAD 凝胶成像仪(型号 ChemiDoc MP)进行图像采集,并用其分析软件(Image Lab)的定量分析功能对目标条带进行定量分析,然后通过 GraphPad Prism 7 软件对所得数据再进行统计学分析,异构体剪接百分比是各异构体 mRNA 水平所占对应浓度下总异构体 mRNA 水平的比值,所有结果均为 3 次试验结果的统计分析值。

2 结果

2.1 CASP9 (f: r1)检测到的 mRNA 异构体变化

CASP9f: r1引物主要是检测这两个引物所在外显子的剪接变化,即用来检测两种 mRNA 异构体 c (NR-102732)和 d (NR-102733)在顺铂处理下的变化,它们由于阅读框改变而提前出现了终止密码子,会被 NMD(nonsense-mediated mRNA decay)机制降解掉,它们的减少意味着编码蛋白的 mRNA 异构体比例增加。在 6 种细胞中,只检测到 CASP9a 和 c 两种异构体(c 异构体经 TA 克隆验证),而没有检测到 d 异构体,且 c 异构体所占比例并没有发生变化(如图 2)。

2.2 CASP9 (f: r2)检测到的 mRNA 异构体变化

CASP9f: r2 时用来检测异构体 b (NM_001278054,即文献报道中的 CASP9b 或 CASP9s)的变化。在 A549、H1299、SiHa、C33A 及 CaSki 细胞中,与对照组细胞比较,实验组细胞随着 CDDP 浓度的增加,a 异构体比例(文献报道中的 CASP9a)呈逐渐增加趋势,而 b 异构体比例逐渐降低;在 293FT 细胞中,随着 CDDP 浓度的增加,则是 a 异构体比例呈现降低趋势,b 异构体呈现增加的趋势(如图 3)。

2.3 A549CDDP 耐受株中 CASP9a/b 异构体变化

在同代次的 A549 正常细胞对照组,在 CDDP 处理后,a、b 异构体表达比例发生明显变化,a 的比例明显增加,而 b 异构体明显下降(如图 4 左图 1~2 泳道,右图中 1~2 组的深色柱子);在 CDDP 耐受的 A549 细胞中,CDDP 处理后这种变化明显地减弱了,处理与未处理对照之间没有了显著变化(如图 4 左图 3~4 泳道,右图中 3~4 组的深色柱子)。正常细胞和抗性细胞在处理前后 CASP9 的 mRNA 总量均无变化(如图 4 右图中 1~4 组的浅色柱子)。

3 讨论

细胞凋亡在人类发育、组织内稳态、疾病及药物反应都起着重要的作用,细胞的这一关键过程被 pre-mRNA 选择性剪接所影响,许多调控凋亡的基因都会产生不同剪接异构体,它们在维持细胞生存上有相反的功能,例如 Bcl-X 会通过选择性剪接产生 Bcl-XL 和 Bcl-XS 两种异构体,在对凋亡调控方面它们功能截然相反。同样 CASP9 也能通过 mRNA 剪接产生 2 种功能不同异构体: CASP9a 和 CASP9b,分别起促进或抑制凋亡的作用。CASP9a (NM_001229)的 mRNA 是一个完整全长的异构体,共有 9 个外显子,依据结构功能分为连接头结构域(adaptor domain)、大亚基催化结构域(the large subunit catalytic domain, LSCD)和小亚基催化结构域(the small subunit catalytic domain, SSCD)。CASP9b (NM_001278054. 1)则是通过剪接缺失了外显子 3~6,缺失了整个 LSCD,但由于其仍有连接头结构域和 SSCD,所以可以与 CASP9a 竞争招募结合 APAF-1,并与细胞色素 c 形成凋亡体(apoptosome),但由于 CASP9b 没有 LSCD 结构域,因此不能引发下游 Caspase 酶激活和信号级联放大

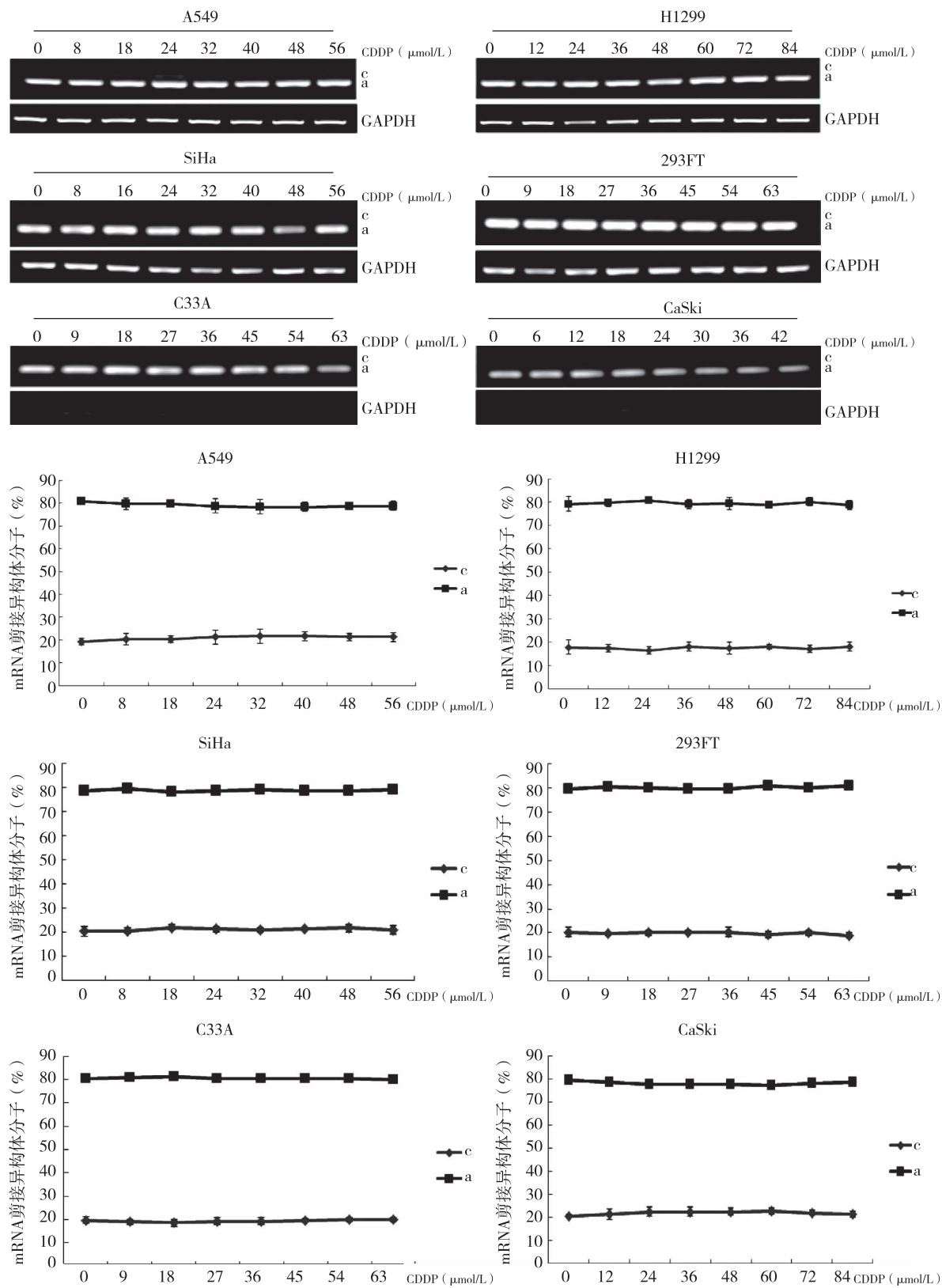


图2 肿瘤细胞中检测到的 CASP9 (f: r1)-mRNA 异构体的变化

Fig.2 Change of alternative splicing isoforms of CASP9 (f: r1) -mRNA in tumor cells after cisplatin treatment

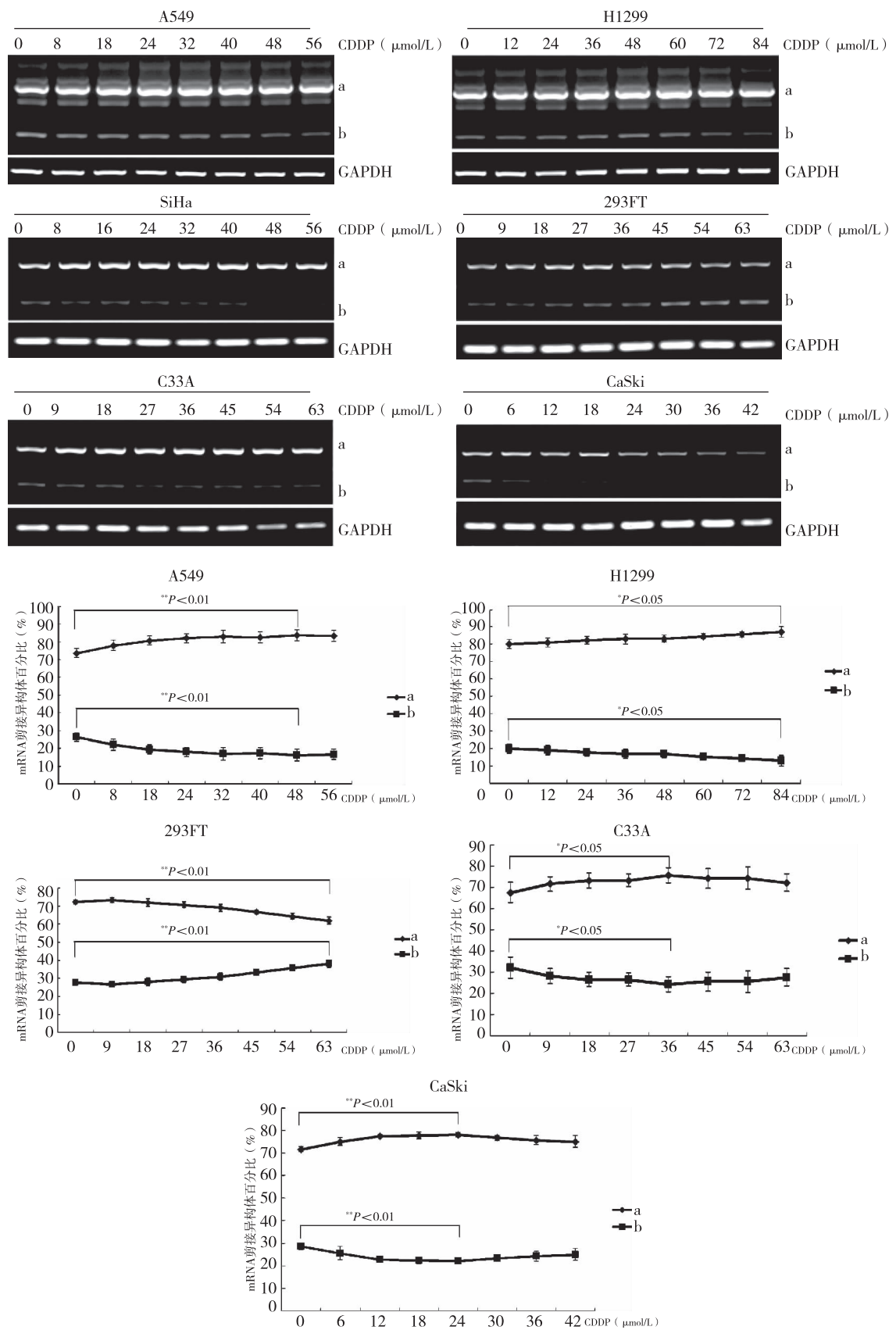
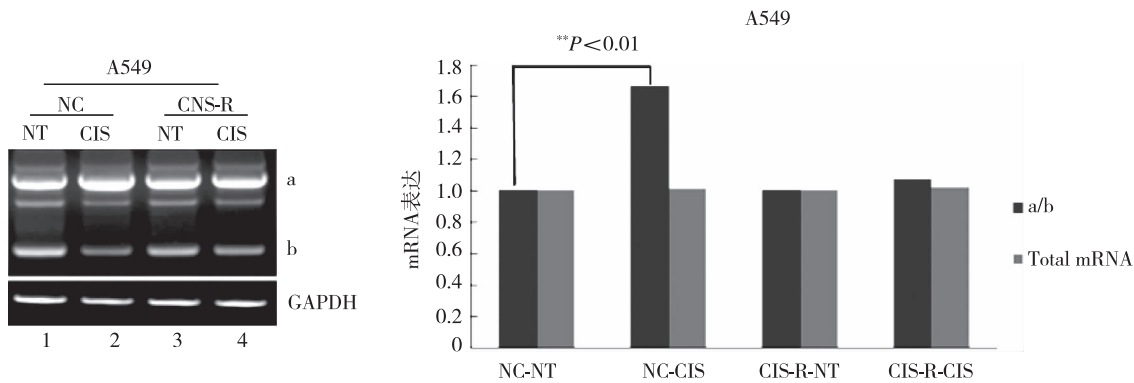


图 3 肿瘤细胞中检测到的 CASP9 (f: r2)-mRNA 异构体的变化

Fig.3 Change of alternative splicing isoforms of CASP9 (f: r2) -mRNA in tumor cells after cisplatin treatment



注:NC-NT、NC-CIS 为 A549 正常细胞对照组 (NC 组),NC-NT 为 DMSO 处理对照,NC-CIS 用顺铂处理 (50 $\mu\text{mol/L}$); CIS-R-NT、CIS-R-CIS 为同代次 A549 顺铂抗性株细胞组,NT 和 CIS 分别代表 DMSO 或顺铂顺铂处理;a/b 为 CASP9a 与 b 的比值 (NC-NT、CIS-R-NT 分别为 1.0)

图 4 A549 顺铂抗性细胞中 CASP9 (f: r2)-mRNA 异构体及总 RNA 表达量的变化

Fig. 4 Change of alternative splicing isoforms of CASP9 (f: r2) mRNA and expression levels of total RNA in A549 after cisplatin treatment

反应,并且推测 CASP9b 能与 CASP9a 形成二聚体致使 CASP9a 失去蛋白酶切自我激活的能力,从而表现为抑制凋亡的功能作用^[7-9]。Chalfant 及其同事的研究也发现,在非小细胞肺癌中,大部分病例的癌细胞在 mRNA 层面上都显示 CASP9a/b 的值都很低,这可能是非小细胞肺癌细胞癌化所需要的,并与细胞的抗凋亡表型密切相关^[10-11]。而本研究结果也显示:除 293FT 细胞外,其它细胞在顺铂处理下,CASP9a/CASP9b 的比值都是升高的,只是变化的幅度没有 Bim 基因那么的显著^[12]。而在用顺铂处理 A549 顺铂抗性株细胞 (A549-CIS-R) 时,在对照细胞中可以看到处理前后 CASP9a/b 的变化显著,但是用同样浓度的顺铂处理抗性株时,CASP9a/b 的变化几乎消失,说明 CASP9a/b 的比例变化与细胞对化疗药物顺铂的耐受性有关,这与抑制 CASP9 的活性可以使癌细胞获得化疗抗性的报道相一致^[13-15]。至于 293FT 细胞在顺铂处理下,CASP9a/CASP9b 的比例下降的原因可能与该细胞的异质性有关,目前未有相关报道,暂不能进行分析。

用引物 CASP9f: r1 虽然检测到了非编码蛋白的异构体 c (NR-102732),但是其在细胞中表达低,且在顺铂处理中没有变化,说明细胞对 CASP9 基因 3-6 外显子的剪接调节 (产生 CASP9a/b) 是其应对 DAN 损伤的主要应变反应之一。已经有报道 SRSF1、hnRNP L 和 hnRNP U 这 3 个剪接因子和内源性的神经酰胺都能调控非小细胞肺癌中的

CASP9 的 pre-mRNA 的选择性剪接^[9-11, 16-17]。SRSF1 能通过 CASP9 第 6 个内含子中调控元件上调 CASP9a 的 mRNA 水平从而提高 CASP9a/b 的比例^[17];并且该研究组也发现 PIK3/Akt 信号途径在许多癌症中被上调,该途径导致 SRSF1 的 199、201、227 和 234 的丝氨酸被磷酸化,有利于 pre-mRNA 剪接产生 CASP9b 异构体,造成癌变的发生和对凋亡的抗性^[11]。另一个调节机制是 hnRNP U 和 hnRNP L 竞争结合 CASP9 外显子 3 上一个调控元件,hnRNP U 下调会导致 CASP9a/b 的比例下降。PIK3/Akt 信号途径可以磷酸化 hnRNP L,磷酸化的 hnRNP L 可以干扰 hnRNP U 与 CASP9 外显子 3 上的调控元件结合,从而下调 CASP9a/b 的比例^[9]。

如同本课题组前面报道的 Bim 基因一样,最近 CASP9 被发现在自噬和凋亡这两个相互交错的细胞生理过程中充当了一定角色^[12]。CASP9 能与自噬相关蛋白 7 (autophagy related 7, Atg7) 结合形成复合物,结合后 Atg7 能够抑制 CASP9 的凋亡活性,但 CASP9 对 Atg7 的自噬活性却没有影响,还能帮助 Atg7 形成自噬体 LC3-II (自噬标志蛋白)。作者推测 CASP9 与 Atg7 形成复合物可能实现这样一个生理功能:既把 CASP9 引入到了自噬过程中促进自噬,同时也控制了 CASP9 的凋亡活性,从而调节细胞对抗压力的能力和存亡。但是此文揭示 Atg7 与 CASP9 的结合位点位于大亚基催化结构域的 C 端,因此提示只有 CASP9a 能与 Atg7 结

合形成复合物,而 CASP9b 则不能通过此途径参与自噬的调节。另外该研究组还发现,CASP9 有促细胞生存的活性,当把 CASP9 用 siRNA 下调后,惊奇地发现细胞对凋亡变得更敏感了^[18],这也许是本研究检测到的 CASP9 pre-mRNA 选择性剪接变化不大的原因。

mRNA 剪接异构体既可以作为诊断的分子标记,也可以作为治疗的靶点。Chalfant CE 的研究组的一系列研究结果提示:CASP9b 的表达量明显地影响了化疗药物的疗效,下调 CASP9b 能增加化疗药物的疗效,提示调节 CASP9 的 mRNA 剪接是肺癌细胞产生抗性的重要机制,调节 CASP9 的 mRNA 剪接,降低 CASP9b 的比例能明显增加肺癌细胞对化疗药物的敏感性^[10-11,19]。化疗药物加上调节 CASP9 mRNA 选择性剪接的方法可能是治疗 NSCLC 的新途径,例如抑制 PI3K-Akt 信号通路阻止其磷酸化 hnRNPL,或者下调肺癌细胞中的 hnRNPL 都是探索治疗 NSCLC 可探索的思路。

4 参考文献

[1] Kdzierska H, Piekieko-Witkowska A. Splicing factors of SR and hnRNP families as regulators of apoptosis in cancer[J]. *Cancer Letters*, 2017(396):53-65.

[2] Li P, Zhou LB, Zhao T, et al. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application [J]. *Oncotarget*, 2017 (14):23996-24008.

[3] Shkreta. SRSF10 Connects DNA damage to the alternative splicing of transcripts encoding apoptosis, Cell-Cycle control, and DNA Repair Factors [J]. *Cell Reports*, 2016 (17):1990-2003.

[4] Dutertre M, Lambert S, Carreira A, et al. DNA damage: RNA-binding proteins protect from near and far [J]. *Trends Biochem Sci*, 2014(39):141-149.

[5] Naro C, Bielli P, Pagliarini V, et al. The interplay between DNA damage response and RNA processing: the unexpected role of splicing factors as gatekeepers of genome stability[J]. *Front Genet*, 2015(6):142.

[6] Shkreta L, Chabot B. The RNA splicing response to DNA damage[J]. *Biomolecules*, 2015 (5):2935-2977.

[7] Seol DW, Billiar TR. A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 1999 (4):2072-2076.

[8] Fujita E, Jinbo A, Matuzaki H, et al. Akt phosphorylation site found in human Caspase-9 is absent in mouse Caspase-9. biochemical and biophysical research commu-

nications[J]. 1999(264):550-555.

[9] Vu NT, Park MA, Shultz JC, et al. hnRNP U enhances Caspase-9 splicing and is modulated by AKT-dependent phosphorylation of hnRNP L [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013(288):8575-8584.

[10] Goehe RW, Shultz JC, Murudkar C, et al. hnRNP L regulates the tumorigenic capacity of lung cancer xenografts in mice via caspase-9 pre-mRNA processing[J]. *J Clin. Investig*, 2010 (11):3923-3939.

[11] J Shultz JC, Goehe RW, Wijesinghe DS, et al. Alternative splicing of caspase 9 is modulated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway via phosphorylation of SRp30a[J]. *Cancer Res*, 2010 (22):9185-9196.

[12] 王玺,马春霞,陆成龙,等. 顺铂处理后几种癌细胞中 Bim 基因 mRNA 异构体的变化[J]. *贵州医科大学学报*, 2017(8):885-891.

[13] Kuwahara D, Tsutsumi K, Oyake D, et al. Inhibition of caspase-9 activity and Apaf-1 expression in cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma cells[J]. *Auris Nasus Larynx*, 2003(30):85-88.

[14] Mueller T, Voigt W, Simon H, et al. Failure of activation of Caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular Cancer[J]. *Cancer Research*, 2003(63):513-521.

[15] Oudejans JJ, Muris JFF, Meijer CJ. Inhibition of Caspase 9 and not Caspase 8 mediated apoptosis may determine clinical response to chemotherapy in primary nodal diffuse large B-Cell lymphomas[J]. *Cell Cycle*, 2005(4):526-528.

[16] Massiello A, Chalfant CE. SRp30a (ASF/SF2) regulates the alternative splicing of caspase-9 pre-mRNA and is required for ceramide-responsiveness [J]. *Journal of Lipid Research*, 2006(47):892-897.

[17] Shultz JC, Goehe RW, Murudkar CS, et al. SRSF1 regulates the alternative splicing of Caspase 9 via a novel intronic splicing enhancer affecting the chemotherapeutic sensitivity of non-small cell lung cancer cells[J]. *Molecular Cancer Research*, 2011 (7):889-900.

[18] Jie H, Wen H, Leslie A, et al. Watkins and hannah rabinowich1 A . complex between Atg7 and Caspase-9: a novel mechanism of cross-regulation between autophagy and apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2014 (10):6485-6497.

[19] Jacqueline CS, Charles EC. Caspase 9b: a new target for therapy in non-small-cell lung cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011 (4):499-502.

(2017-08-01 收稿,2017-09-01 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周 凌