

HnRNP 在肿瘤中的研究及进展

陈 卓,徐海帆*

(南华大学附属第一医院乳甲外科,湖南 衡阳 421001)

摘 要: 核内不均一核糖核蛋白(hnRNP)是一类 RNA 结合蛋白,它们至少含有一个 RNA 结合区域。大量的研究表明 hnRNP 在 DNA 修复、RNA 剪接、端粒延长、细胞信号转导、基因表达调控等许多方面都起到重要的作用。而一旦 hnRNP 的正常生理功能发生异常,在遗传、环境等因素作用下将导致许多疾病的发生,其中 hnRNP 与肿瘤的发生及发展之间的关系的的研究最为广泛。hnRNP 可调节基因表达、抑制细胞凋亡、促血管生成和增强肿瘤细胞的侵袭转移能力,在肿瘤的发生和发展中发挥着重要的作用。本文将从 hnRNP 的结构、功能及其与肿瘤发生发展关系的研究进展作一综述。

关键词: hnRNP; 细胞周期; 染色体重塑; 细胞凋亡; 肿瘤发生

中图分类号: R730 **文献标识码:** A

肿瘤作为难以攻克的课题,一直影响人类的健康。近年来,肿瘤的发病率有所上升,临床普遍应用的肿瘤标志物往往特异性不高,仅仅作为辅助诊断参考。

核内不均一性核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP)与肿瘤的发生、发展密切相关, hnRNP 可调节基因表达、抑制细胞凋亡、促血管生成和增强肿瘤细胞的侵袭转移能力,在肿瘤的发生和发展中发挥着重要的作用。本文旨在阐述 hnRNP 与肿瘤的关系,为寻找新的肿瘤标志物提供思路。

1 HnRNP 概述

HnRNP 是一类 RNA 结合蛋白。前体 mRNA 的加工过程需要多种蛋白质的参与,在加工过程的不同阶段,许多蛋白质与 RNA 构成核糖核蛋白复合体(ribonucleoprotein complex, RNP complex)。按照所结合 RNA 类型的不同, RNP 复合体可分为核内不均一性核糖核蛋白复合体(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex, hnRNP complex),小核核糖核蛋白复合体(small nuclear ribonucleoprotein complex, snRNP complex)以及 mRNA-蛋白复合体(mRNA-protein complex, mRNP complex)3 类^[1]。其中 RNA 结合蛋白是组成这

些复合体的最主要的蛋白质,它们具有类似的结构特征和分布位置,但又同其他类别核蛋白复合体(如 snRNP)不同。HnRNP 复合体由至少 20 个 hnRNP 蛋白组成,分子量 32 ~ 120 kDa,依据其分子量的大小将其命名为 hnRNP A1-U^[2]。HnRNP 蛋白的功能复杂多样,而与其关系最为密切的就是肿瘤方面的疾病,各种不同的 hnRNP 与肿瘤的发生发展密切相关,即使不同的 hnRNP 蛋白,在同一种肿瘤中的作用也是不同的。hnRNP 导致肿瘤发生的机制主要是调节众多肿瘤相关基因的表达。

2 hnRNP 的结构和生理功能

研究者已对 hnRNP 蛋白的序列进行分析,发现其至少拥有一个或者多个 RNA 结合区域,有很多还有一个辅助区域。hnRNP 的 RNA 结合区域常见的有两种: RNP-CS-RBD 区域(RNP-conserved sequence-RNA binding domain, RNP-CS-RBD)和 KH 区(K-homology domain, KH domain)^[2]。这两种结合区域的三维晶体结构是有差异的,这就说明它们所识别的 RNA 结合特征序列也是有差异的。

RNP-CS-RBD 区域又称 RRM 区(RNA-recognition motif, RRM),是一段由约 80 个氨基酸组成的序列,中间加插着两段高度保守的 RNP1 八聚体序列和 RNP2 六聚体序列, RNP1 和 RNP2 并列位于 $\beta 3$ 和 $\beta 1$ 的中央,分别和 RNA 直接相连。RNA 结合蛋白一般含有 1 ~ 4 个 RRM。KH 区首先在 hnRNP K

中被发现,其最主要的功能是识别 RNA 和单链 DNA。根据 N 端和 C 端的延长 KH 区可分成两个亚型即 KH1 和 KH2^[2]。目前发现 RNA 结合蛋白最多含有 15 个 KH 域。hnRNP 比较常见的辅助区域是 RGG 区。它首先是在 hnRNP U 蛋白中发现的,是一段重复出现的 Arg-Gly-Gly 顺序。RGG 区介导蛋白质—蛋白质相互作用,从而影响 RNA 与蛋白质结合活性。而在其他的 hnRNP 蛋白如 hnRNP A1 和 hnRNP A2/B1 中发现 RGG 区是与 RBD 元件结合的。这表明 RGG 区除了可以结合 RNA 之外还可以结合其他元件。

3 HnRNP 在肿瘤中的应用

3.1 HnRNP 在肿瘤中的表达 近年来越来越多的研究发现 hnRNP 蛋白在许多肿瘤中高表达。已有报道发现在非小细胞肺癌中可以监测到 hnRNP A2/B1 单抗,大部分肺癌细胞系中高表达 hnRNP A2/B1,且在肺癌早期表达高于晚期,因此有学者推测它可以用作监测肺癌早期发生的血清肿瘤标志物,表示它还可以用来判断肺鳞癌的预后情况^[3],至于 hnRNP A2/B1 是否可以作为判断肺癌预后情况有待进一步研究。最近有研究者发现 hnRNPA2/B1 还可以激活 Snail 诱导 EMT,从而促进肝癌转移,当用小干扰 RNA 沉默 EMT 因子 Snail 后,过表达 hnRNP 促进肝癌肺转移的能力就明显减弱^[4]。表 1^[5-7]提供了以往和近几年发现的在不同的肿瘤中各种 hnRNP 蛋白的表达的详细情况,其中有些只能作为初步的研究结果,因为许多实验所涉及的样本量有限,仍需要进一步研究,但从表中可以得出 hnRNP 在肿瘤组织中的表达是明显有差异的,而且在大部分的肿瘤中是上调的。hnRNP 作为肿瘤标志物亦有不错的前景。

3.2 HnRNP 参与肿瘤发生发展过程中的可能分子机制

3.2.1 HnRNP 影响 DNA 修复促进肿瘤形成 DNA 经常受电离辐射、化疗药物等外界刺激的破坏,如果没有得到及时修复则会导致染色体重塑、基因信息的丢失、染色体不稳定,从而促进肿瘤的发生与发展。研究发现 hnRNP B1 不利于 DNA 损伤修复,用 siRNA 干扰 hnRNP B1 后,其在被辐射的支气管上皮细胞中表达降低了,并发现断裂的 DNA 链修复得到了加强。蛋白质组学分析 hnRNPC1/C2 可

表 1 不同肿瘤中 hnRNP 的表达

类型	肿瘤组织中的表达情况	实验方法
HnRNP A1	Lung ↑ and Liver ↑	IH/WB/mRNA
HnRNP A1	Colon ↑	mRNA
HnRNPA2/B1	Breast ↑	IH
HnRNPA2/B1	Pancreatic ↑	mRNA
HnRNPA2/B1	Stomach ↑	WB
HnRNPA2/B2	Thyroid ↓	IH
HnRNP B1/L	Lung ↑	IH
HnRNPB1	Esophagus ↑	IH/WB
HnRNPB1	Leukemia and lymphoma ↑	IH/WB
HnRNPB1/G	Oral ↑	IH/WB
HnRNPC1/C2	Lung ↑ and Liver ↑	IH/WB/mRNA
HnRNPE1	Cervical ↓	IH
HnRNPF	Liver ↓ and Stomach ↑	IH
HnRNP H	Head and neck ↑	IH
HnRNPH/H'	Liver, pancreas and stomach ↑	IH
HnRNP I	Brain ↑	WB
HnRNP K	Prostate, liver and Melanom ↑	IH/WB/mRNA
HnRNP M	Lung ↓ and Colorectal ↑	IH

注: ↑ 代表上调, ↓ 代表下调(肿瘤组织和正常的组织相比); WB = Western blotting, mRNA = RT-PCR, IH = Immunohistochemistry

以反映染色体 DNA 双链是否断裂,当 HeLa 细胞的 DNA 被 r 射线损伤后 hnRNP C1/C2 与染色质结合^[8]。

3.2.2 HnRNP 对端粒的延长作用 细胞凋亡失调是肿瘤发生的重要机制,而端粒是控制细胞凋亡的重要因素。端粒位于染色体末端,对染色体具有稳定作用,并参与真核细胞的有丝分裂。染色体复制时端粒不断缩短,从而使染色体稳定性变差并加速细胞衰老过程。端粒通过与特定蛋白结合,加上端粒酶对端粒起到修复作用,这两者共同作用使肿瘤细胞出现永生化生长。一系列体外实验证实了 hnRNP D、hnRNP A2/B1 和 hnRNP A1 都可以与人端粒 DNA 序列相结合。此外, hnRNP D 和 hnRNP A1^[9]基因编码的蛋白亚型 UP1 直接作用于端粒酶。不表达 hnRNP A1 的细胞系(鼠红白血病细胞株 CB3)的端粒的长度比表达 hnRNP A1 的细胞系(CB7)中端粒的长度要短很多,突变细胞系中过表达 hnRNP A1 将会明显延长端粒的长度。如果用 siRNA 干扰降低 hnRNP A1/A2/B1 在 HeLa 细胞中的表达,就会导致端粒 G 尾长度发生变化。

3.2.3 HnRNP 参与肿瘤相关基因转录调控 促进癌基因的表达及抑制抑癌基因表达可以促进肿瘤形

成。因此,调节基因表达对肿瘤发生发展至关重要。研究发现 hnRNP K 以序列特异性方式结合 DNA;以单链或双链的形式结合 TC 束(一种位于人原癌基因 c-Src 和 c-myc^[10]启动子上的作用元件)。此外,在体外 hnRNP K 能够激活转录并可以与 TATA 结合蛋白(TBP)相互作用。细胞中如果同时过表达 TBP 和 hnRNP K,就可以激活一种富含 CT 原件的报道基因^[10]。

mRNA 剪接异常可以促进肿瘤发生与发展,Pre-mRNA 的剪接加工过程受 hnRNP 等多种蛋白(复合体)的调控。在前体 mRNA 选择性剪接调控过程中,hnRNP 可直接拮抗剪接体识别 pre-mRNA 剪接位点或阻碍其他剪接因子与剪接位点、剪接增强子结合等途径发挥作用。有研究表明 hnRNP A1、H、F 可以结合部分 5'c-Src N1 外显子^[11]。在体外 hnRNP A1 可以抑制 cSrc 的剪接,而 SR 家族蛋白成员 SF2/ASF 则可以激活 cSrc 的剪接。肺癌中高表达 hnRNP A1 比表达 SF2/ASF 更能促进肿瘤生长。这些发现将肿瘤与 hnRNP 的表达及 mRNA 的剪接三者之间相互联系起来。

3.2.4 HnRNP 调节 mRNA 核-质穿梭 成熟的 mRNA 经核孔复合体移出胞核的过程需要 hnRNP 蛋白协助完成。hnRNP 包含两种蛋白复合体:穿梭于核质之间的蛋白复合体和核定位蛋白复合体。HnRNP A1、A2/B1、D、E、I、K 等可以在核质之间进行穿梭,这些穿梭蛋白复合体可以识别出核信号(NES),参与成熟 mRNA 的转运和定位^[11];核定位蛋白复合体可以识别 hnRNP C 的核滞留信号(NRS),与 pre-mRNA 的 3'端下游区域具有高度亲和性,可以防止 pre-mRNA 输出到核外。有研究发现 hnRNP A1 的核-质穿梭运动对 BCR/ABL 白血病的形成很重要^[12],这表明 hnRNP 各种功能与肿瘤发生之间联系紧密。

3.2.5 HnRNP 影响肿瘤相关 mRNA 翻译 mRNA 翻译成蛋白的过程受 mRNA 链自身元件内部核糖体进入位点(IRES)的控制。IRES 可以将核糖体募集给特异性 RNA。有研究表明人 c-myc mRNA 链的 5'非翻译区就存在结合 hnRNP C 的 IRES。研究者还发现 hnRNP C 在细胞中的定位随着细胞周期的不同而改变,G2M 期部分 hnRNP C 从细胞核转移到细胞质,与此相应的是 IRES 在 G2M 期增强了 c-myc mRNA 的翻译^[13],这表明 IRES 与 hnRNP C 相互关联。后来的研究证明其他 hnRNP 蛋白也可以

调节 c-myc mRNA 的翻译,如 hnRNP K、E1 及 E2 可以激活 IRES-3 折叠,并且在多发性骨髓瘤病人体内可以普遍发现一种变异的 c-myc IRES,这表明 hnRNP K 与突变的 mRNA 链结合后可以促进多发性骨髓瘤的发生和增加癌基因 c-myc 的翻译^[14]。hnRNP I 和 hnRNP E1 可以激活 Bcl-2 相关 athano-基因的翻译。mRNA 的翻译还可以产生多个亚型,人成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)mRNA 含有 5 个翻译起始密码子,可以生成 N 末端不同的 5 个 FGF-2 亚型,不同的亚型在亚细胞中的定位和功能也各不相同。FGF-2 对肿瘤发生起着重要作用,它可以促进肿瘤细胞的生长、增殖及血管生成。

3.2.6 HnRNP 调节肿瘤细胞周期 hnRNP P2 是一种与转录、mRNA 剪接及 mRNA 出核运动有关的一种多功能蛋白,hnRNP P2 就可以发挥类似癌基因的作用来促进肿瘤发生。有研究者报道 hnRNP P2 可以与髓性白血病 ERG 基因融合,从而促进染色体 t(16;21)的易形及急性髓性白血病的发生^[14]。细胞增殖是肿瘤发生发展中的另一个重要过程。已发现 c-myc 可以调节细胞周期,其表达随着细胞周期的不同而变化。随后有研究者观察到在结肠-16-鳞状细胞癌和 HaCaT 永生化的 keratinocytes 中 hnRNP A1 和 hnRNP A2/B1 的表达同样随着细胞周期阶段的不同而改变^[15]。S 期 hnRNP 的表达增高,G2 和 M 期表达降低,G1 晚期表达又重新上调^[15]。用 RNA 干扰 hnRNP,hnRNP A1 和 A2 表达降低,这可以明显降低 Colo 16 细胞的增殖率。Sadri 等^[16]生产出一种普遍过表达 hnRNP D p37 亚型的转基因小鼠,发现 c-myc、c-fos 和 c-jun 靶向 mRNAs 均出现上调。他们证明高表达 p37 的转基因小鼠可以导致食道、肺、尿道及头颈部软组织等部位肿瘤的发生。以上发现均表明 hnRNP 可以发挥类似癌基因的作用促进肿瘤发生与发展。目前为止发现只有 hnRNP E4 具有类似抑癌基因的作用。抑癌基因 p53 可以上调 hnRNP E4,高表达 hnRNP E4 可以诱导细胞凋亡,并使细胞周期停滞在 G2-M 期^[17]。后来,Wang 等^[18]在肺癌相关研究中也证明了 hnRNP E4 可以作为肿瘤抑制基因,并发现低表达 hnRNP E4 可以促进肿瘤细胞高度增殖。因此 hnRNP E4 是一种很有希望的潜在性的抑癌基因。

3.2.7 HnRNP 可抗细胞凋亡、促血管生成和肿瘤转移 程序性细胞死亡(细胞凋亡)的缺失是导致肿瘤发生的另一个重要机制。正常细胞中凋亡抑制可

以通过促凋亡因子和抗凋亡因子相互作用来达到平衡。已发现 Bcl-x 蛋白可以调节细胞凋亡, HnRNP F 和 H 加强对 Bcl-x 前体 mRNA 的选择性剪接, 从而产生 Bcl-xs 和 Bcl-xl, 前者可以促进凋亡, Bcl-xl 则可抑制凋亡^[19]。因此, hnRNP 蛋白既可以抑制凋亡, 也可以促进凋亡。肿瘤转移的方式常见的有直接转移、血道和淋巴道转移以及种植转移。黏着斑复合物前体是肿瘤细胞早期扩散形式, 有研究发现在细胞黏着斑复合物前体中有 hnRNP K 的表达。当 hnRNP K 的合成受到干扰时, 肿瘤细胞的转移就会增加, 这说明 hnRNP K 在肿瘤细胞扩散过程中起的是限速作用^[20]。新生血管生成成为肿瘤生长提供营养, 如果没有血液供应肿瘤范围就不会超过 2~3 mm, 血管内皮生长因子(VEGF)和成纤维细胞生长因子(FGF)是重要的促血管生成因子。已有研究表明 hnRNP 蛋白可以调节促血管生成因子, 在缺氧条件下 HnRNP L 能特异性结合 VEGF mRNA 的 3' UTR。这均表明 hnRNP 蛋白可以促进肿瘤内血管生成, 从而使肿瘤得以不断生长、侵袭和转移。

4 结语和展望

HnRNP 通过多种方式调节基因的表达, 在生理和病理状态下均发挥重要作用, 特别是与肿瘤的关系备受关注。肿瘤作为一种以基因表达异常为本质的重大疾病, hnRNP 在其发生发展中的作用无疑是巨大的。目前, hnRNP 蛋白家族中, 重点研究的有 10 余种, 这些 hnRNP 蛋白在肿瘤中表达存在差异, 主要是通过调节肿瘤相关基因发挥重要作用, 扮演重要角色。这些研究结果对解释肿瘤机制、发现肿瘤标志物具有重要意义。由于 hnRNP 蛋白对基因表达的调控是通过多种不同的方式, 其机制存在复杂性, 进一步明确其深入的机制是今后研究的主要目标。此外, hnRNP 对相关基因产物核质穿梭的影响, 可能不改变目的基因的表达量, 但改变其细胞定位, 其意义不可小视, 但这种作用容易在一般的表达量研究中忽视, 研究者需要谨慎对待。总之, 大量文献已证实 hnRNP 与肿瘤关系紧密, 有些甚至有望作为早期检测相关肿瘤的很有希望的标志物, 这也将为肿瘤提供一个新的治疗靶点, 这些都表明 hnRNP 与肿瘤之间关系研究前景广泛。目前这一领域的研究尚处初始阶段, 许多关键问题有待进一步解决。

参考文献:

- [1] Ostareck-Lederer A, Ostareck DH. Precision mechanics with multifunctional tools: how hnRNP K and hnRNPs E1/E2 contribute to posttranscriptional control of gene expression in hematopoiesis[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2012, 13: 391-400.
- [2] Kruger AC, Raarup MK, Nielsen MM, et al. Interaction of hnRNP A1 with telomere DNA G-quadruplex structures studied at the single molecule level[J]. *Eur Biophys J*, 2010, 39(9): 1343-1350.
- [3] Guo R, Li Y, Ning J, et al. HnRNP A1/A2 and SF2/ASF regulate alternative splicing of interferon regulatory factor-3 and affect immunomodulatory functions in human non-small cell lung cancer cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62729.
- [4] Zhou ZJ, Dai Z, Zhou SL, et al. HNRNPAB induces epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis of hepatocellular carcinoma by transcriptionally activating SNAIL[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(10): 2750-2762.
- [5] Gu W, Liu W, Shen X, et al. Emergence of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 vs loss of E-cadherin: their reciprocal immunoexpression profiles in human pancreatic cancer[J]. *Ann Diagn Pathol*, 2013, 17(1): 14-17.
- [6] Ma WL, Li CC, Yu SC, et al. Adult T-cell lymphoma/leukemia presenting as isolated central nervous system T-cell lymphoma[J]. *Case Rep Hematol*, 2014: 917369.
- [7] Yang M1, Li L, Wang J, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) and human transformer-2-beta1 (hTra2-beta1)-regulated estrogen receptor-alpha improves prognosis of endometrial cancer[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2014, 35(6): 701-707.
- [8] Lisse TS, Vadivel K, Bajaj SP, et al. The heterodimeric structure of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 dictates 1, 25-dihydroxyvitamin D-directed transcriptional events in osteoblasts[J]. *Bone Res*, 2014: 2.
- [9] El-Mazny A, Sayed M, Sharaf S. Human telomerase reverse transcriptase messenger RNA (TERT mRNA) as a tumour marker for early detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Arab J Gastroenterol*, 2014, 15(2): 68-71.
- [10] Mikula M, Bomszyk K, Goryca K, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (HnRNP) K genome-wide binding survey reveals its role in regulating 3'-end RNA processing and transcription termination at the early growth response 1 (EGR1) gene through XRN2 exonuclease[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(34): 24788-24798.

- [11] Yeap WC, Namasivayam P, Ho CL. HnRNP-like proteins as post-transcriptional regulators [J]. *Plant Sci*, 2014, 227:90-100.
- [12] Song C, Wang Q, Song C, et al. Nucleocytoplasmic shuttling of valosin-containing protein (VCP/p97) regulated by its N domain and C-terminal region [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(1):222-232.
- [13] van Domselaar R, Quadir R, van der Made AM, et al. 2012. All human granzymes target hnRNP K that is essential for tumor cell viability [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(27):22854-22864.
- [14] Chen M, Zhang J, Manley JL. Turning on a fuel switch of cancer: hnRNP proteins regulate alternative splicing of pyruvate kinase mRNA [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(22):8977-8980.
- [15] Maeto CA, Knott ME, Linero FN, et al. Differential effect of acute and persistent Junin virus infections on the nucleocytoplasmic trafficking and expression of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins type A and B [J]. *Gen Virol*, 2011, 92(Pt 9):2181-2190.
- [16] Sadri N, Schneider RJ. *Aufl/Hnmpd*-deficient mice develop pruritic inflammatory skin disease [J]. *Invest Dermatol*, 2009, 129(3):657-670.
- [17] Chen T, Cui P, Chen H, et al. A KH-domain RNA-binding protein interacts with FIERY2/CTD phosphatase-like 1 and splicing factors and is important for pre-mRNA splicing in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(10):e1003875.
- [18] Wang K, Ling T, Wu H, et al. Screening of candidate tumor-suppressor genes in 3p21.3 and investigation of the methylation of gene promoters in oral squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(3):1175-1182.
- [19] Garneau D, Revil T, Fisette JF, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator *Bcl-x* [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(24):22641-22650.
- [20] de Hoog CL, Foster LJ, Mann M. RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers [J]. *Cell*, 2004, 117(5):649-662.