

文章编号 1006-8147(2023)02-0137-06

论著

hnRNPU 过表达抑制 PIM1 诱导的细胞衰老的机制研究

肖雅雯, 阳检明

(天津医科大学基础医学院免疫学系, 天津 300070)

摘要 目的:探讨人前病毒整合位点1(PIM1)诱导细胞衰老的分子机制。方法:构建过表达PIM1的2BS细胞系,通过Western印迹法和衰老相关 β -半乳糖苷酶染色实验测定过表达PIM1是否诱导细胞衰老。免疫沉淀联合质谱分析测定PIM1是否能有效免疫沉淀核异质核糖核蛋白U(hnRNPU)蛋白。运用Real-time PCR和Western印迹法测定PIM1是否影响hnRNPU mRNA和蛋白表达水平。构建同时过表达PIM1和hnRNPU的2BS细胞系,运用Western印迹法和衰老相关 β -半乳糖苷酶染色实验检测hnRNPU过表达对PIM1诱导的细胞衰老的影响。结果:与空载对照组相比,过表达PIM1组中衰老信号通路关键基因p53、p21和p16的表达显著增加(p53, $t=4.36, P<0.05$; p21, $t=3.814, P<0.05$; p16, $t=4.72, P<0.01$),衰老细胞的比例增加($t=6.831, P<0.01$)。免疫沉淀联合质谱分析结果显示PIM1能有效免疫沉淀hnRNPU蛋白。PIM1过表达对hnRNPU的mRNA表达水平没有影响($t=0.295, P=0.783$),但是能抑制hnRNPU蛋白的表达($t=33.85, P<0.001$)。与只过表达PIM1细胞相比,同时过表达PIM1和hnRNPU细胞,衰老信号通路关键基因p53、p21和p16的表达下降(p53, $t=15.317, P<0.001$; p21, $t=8.012, P<0.01$; p16, $t=14.08, P<0.001$),衰老细胞的比例降低($t=10.38, P<0.01$)。结论:hnRNPU过表达抑制PIM1诱导的细胞衰老。

关键词 人前病毒整合位点1;核异质核糖核蛋白U;细胞衰老

中图分类号 [R34]

文献标志码 A

Study of the mechanism of hnRNPU overexpression inhibiting PIM1-induced cellular senescence

XIAO Ya-wen, YANG Jian-ming

(Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the molecular mechanism of proviral integration site 1 (PIM1)-induced cellular senescence.

Methods: The human embryonic lung fibroblasts 2BS cell overexpressing PIM1 was constructed. Western blotting and senescence-related β -galactosidase staining experiments was used to determine whether overexpression of PIM1 induced cellular senescence. Immunoprecipitation combined with mass spectrometry was used to determine whether PIM1 could effectively immunoprecipitate nuclear heterogeneous ribonucleoprotein U (hnRNPU) protein. The hnRNPU mRNA and protein levels were evaluated by real-time PCR and Western blotting. The 2BS cell overexpressing PIM1 and hnRNPU was constructed and the effect of hnRNPU overexpression on PIM1-induced cellular senescence was detected by Western blotting and senescence-related β -galactosidase staining assay. **Results:** Compared with the control group, the expression of p53, p21, and p16, key genes in regulating cellular senescence were significantly increased (p53, $t=4.36, P<0.05$; p21, $t=3.814, P<0.05$; p16, $t=4.72, P<0.01$) and the proportion of senescent cells increased ($t=6.831, P<0.01$) in the PIM1 overexpression group. Immunoprecipitation combined with mass spectrometry showed that PIM1 could effectively immunoprecipitate hnRNPU protein. PIM1 overexpression had no effect on hnRNPU mRNA expression ($t=0.295, P=0.783$), but downregulated the hnRNPU protein expression ($t=33.85, P<0.001$). Compared with PIM1 group, the expression of p53, p21, and p16, key genes in regulating cellular senescence, were decreased in the overexpression of hnRNPU and PIM1 group (p53, $t=15.317, P<0.001$; p21, $t=8.012, P<0.01$; p16, $t=14.08, P<0.001$). Compared with PIM1 group, the overexpression of hnRNPU and PIM1 group showed lower proportion of senescent cells ($t=10.38, P<0.01$). **Conclusion:** Overexpression of hnRNPU inhibits PIM1-induced cellular senescence.

Key words proviral integration site 1; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U; cell senescence

原癌基因诱导的衰老发生在肿瘤形成的早期,能够限制癌基因突变所导致的细胞增殖,使肿瘤维持在非侵袭性的癌前病变状态,被认为是一种肿瘤抑制机制。原癌基因人前病毒整合位点1(proviral

integration site 1, PIM1)最早是作为小鼠白血病病毒的前病毒插入点而被发现的^[1],它能编码一个组成激活型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。PIM1通过磷酸化多种底物起到调节细胞增殖、生存、分化、凋亡和耐药的作用^[2-3]。有研究表明,在衰老细胞中,PIM1的表达显著升高,衰老细胞中白细胞介素(IL)-6/信号转导与转录因子3(STAT3)通路能够直接上调PIM1

基金项目 天津市教委科研计划(2018KJ079)

作者简介 肖雅雯(1998-),女,博士在读,研究方向:免疫学;通信作者:阳检明, E-mail: jianmingyang@tmu.edu.cn。

的表达^[4]。PIM1 诱导的细胞衰老限制了 PIM1 在非肿瘤细胞中的原癌基因特性,但当细胞绕过衰老程序后,PIM1 又呈现出促肿瘤的特性。虽然笔者前期文章发现 UHRF1 的下调是 PIM1 诱导细胞衰老的一个重要机制,但是过表达 UHRF1 并不能完全拯救 PIM1 诱导的细胞衰老,表明 PIM1 诱导细胞衰老存在其他机制^[4-5]。

核异质核糖核蛋白 U(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U, hnRNPU)又名脚手架附着因子 A,是 hnRNPs 蛋白成员之一。hnRNPU 与许多水平的基因调控有关,包括维持核内染色体构象、转录、RNA 剪接和 DNA 修复等。hnRNPU 通常在胎儿大脑、成人心脏、肾脏、肝脏、大脑和小脑中表达,主要与活性染色质结合,在有丝分裂中发挥着重要作用。hnRNPU 蛋白能够促进稳健的 DNA 复制来确保持续的细胞增殖,hnRNPU 磷酸化和去磷酸化的任何异常都可能导致不正常的有丝分裂从而致病^[6-7]。hnRNPs 的家族成员也在 RNA 的增强或剪接抑制以及在生理和病理生理条件下维持细胞稳态方面发挥着关键作用^[8-9]。最近的多项研究都证实其能够影响肿瘤或神经退行性疾病的发生、发展^[10-11],可能具有成为相关疾病的治疗靶点。有研究证明, hnRNPU 能够与长非编码核糖核酸 PANDA 相互作用,在细胞进入和退出衰老过程中起到关键作用^[12]。本研究发现 hnRNPU 过表达抑制 PIM1 诱导的细胞衰老,进一步阐释了 PIM1 诱导细胞衰老的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及细胞培养 人胚肺成纤维细胞 2BS 细胞和人胚肾细胞 293T 细胞均购自中国典型培养物保藏中心细胞库。2BS 和 293T 细胞复苏后,用含有 10%FBS 的 DMEM 培养基在 37℃恒温,5%CO₂ 培养箱里培养,48 h 传代 1 次。

1.1.2 试剂及试剂盒 FBS 胎牛血清和 DMEM 培养基购自 Gibco 公司;0.25%的胰蛋白酶购自凯基生物公司;Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;HiFiScript cDNA Synthesis Kit 和 ultraSYBR Mixture 试剂购自北京康为世纪公司;罗氏无 EDTA 蛋白酶抑制剂购自瑞士罗氏公司;RIPA 裂解液、RNA 提取试剂盒和衰老相关 β-半乳糖苷酶染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;转染试剂 VigoFect 购自维格拉斯生物技术(北京)公司;银染试剂盒购自 Thermo 公司;β-Actin 抗体购自 Sigma-Aldrich 公司;p53、p21 和 p16 抗体购自 Santa 公司;hnRNPU 抗体购自 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 构建 PIM1 过表达质粒 pITA-PIM1 和 hnNRPU 过表达质粒 pITA-hnNRPU,对照质粒为 pITA 空载。构建质粒的引物见表 1。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequences

引物名称	引物序列(5'→3')
pITA-PIM1-Forward	AAGCGCCGCATGGATTACAAGGATGAC
pITA-PIM1-Reverse	AATACCTAGGAGGACCTGCCAGAAA
pITA-hnNRPU-Forward	AAGCGCCGCATGAGTTCTCGCCTGTTAATG
pITA-hnNRPU-Reverse	AAGGATCCTCAATAATATCCTTGGTGATAA

1.2.2 细胞转染及病毒稳转 2BS 细胞 293T 细胞生长密度达 40%~60%时,转染前 1 h,更换新鲜培养基,取 20 μg DNA [(psPAX2:pMD2G:pITA)或者 (psPAX2:pMD2G:pITA-PIM1=4:3:2)或者 (psPAX2:pMD2G:pITA-hnNRPU=4:3:2)] 加入空白培养基稀释至 500 μL,取 10 μL VigoFect 加入空白培养基稀释至 500 μL,室温放置 5 min。将稀释好的 DNA 逐滴加入至稀释后的 VigoFect,混匀,室温放置 15 min,逐滴加入至 293T 细胞中培养。转染 48 h 和 72 h 后,取培养上清感染 2BS 细胞,48 h 后用嘌呤霉素筛选。

1.2.3 细胞分组 按上述病毒稳转 2BS 细胞后,将细胞分为空载对照组(转入空载对照的 2BS 细胞组)、PIM1 组(过表达 PIM1 的 2BS 细胞组)和 PIM1+hnRNPU 组(同时过表达 hnRNPU 和 PIM1 的 2BS 细胞组)。

1.2.4 Western 印迹检测衰老相关蛋白 p53、p21 和 p16 以及 hnRNPU 表达水平 相应的细胞经预冷的 PBS 洗 3 遍后,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,将细胞转移至 EP 管中,4℃,14 000 r/min,离心 20 min 后取 10 μL 上清按照 BCA 试剂盒说明书进行蛋白定量;剩余的上清加入 5×loading buffer,混匀,99℃金属浴,10 min,各组取 30 μg 蛋白经 10%SDS-PAGE 电泳(压缩胶 70 V,分离胶 110 V),使目的蛋白充分分离,结束电泳,将其转膜至 PVDF 膜上(湿转法,恒压 110 V,70 min),用 5%BSA 或者脱脂牛奶封闭 1 h 后,孵育相应的一抗(稀释比例均为 1:1 000),4℃过夜,用 TBST 洗涤 3 次,每次 15 min,室温孵育相应的二抗(稀释比例均为 1:10 000)1 h,用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,进行化学发光成像。

1.2.5 衰老相关 β-半乳糖苷酶染色实验检测细胞衰老水平 将 1×10⁴ 相应的细胞提前 24 h 接种至 6 孔板中,用 PBS 洗涤 1 次,加入固定液,室温固定 15 min,弃掉固定液后按照试剂盒说明书进行染色,

在光学显微镜下拍照,衰老相关 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞即为衰老细胞,每孔至少拍取 5 个随机视野进行统计。

1.2.6 免疫沉淀联合质谱分析实验检测 PIM1 有效免疫沉淀 hnRNPU 蛋白 PIM1 组和空载 Control 组细胞经预冷的 PBS 洗 3 遍后,每 10 cm 细胞培养皿中加入 1 mL 含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解液,用细胞刮将细胞刮下转移至 EP 管中,4℃裂解 30 min;4℃,14 000 r/min,离心 20 min 后取上清,加入 2 μ g PIM1 抗体和 30 μ L G-Sepharose 珠子进行免疫沉淀,4℃孵育过夜;用 1 mL 洗涤缓冲液清洗 5 次,加入 30 μ L 5 \times loading,99℃,金属浴 10 min;4℃,500 g 离心 5 min 后各组取 30 μ L 进行 10% SDS-PAGE 电泳(压缩胶 70 V,分离胶 110 V),并按照银染试剂盒说明书进行银染,将差异条带送至公司进行质谱分析。

1.2.7 Real-time PCR 实验检测 hnRNPU mRNA 表达水平 提前 24 h 将 PIM1 组和空载 Control 组细胞铺至 6 孔板中,待细胞密度生长至 80%~90%,加入 1 mL Trizol,裂解 5 min,按照试剂盒提取总 RNA 并用 Nanodrop 2000 分光光度计检测总 RNA 浓度,取 1 μ g RNA 逆转录成 cDNA,进行实时荧光定量 PCR。20 μ L 反应总体积,包含 10 μ mol 上游引物,10 μ mol 下游引物,UltraSYBR Mixture,40 ng cDNA 模板,ddH₂O 补齐至 20 μ L;使用 Light Cycler 96 Real-Time PCR System 进行检测,PCR 程序为:95℃ 5 min,40 个循环(95℃孵育 20 s,60℃孵育 20 s,72℃孵育 20 s),95℃延伸 5 min;数据用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算,以内源性管家基因 β -actin 为内参。PT-qPCR 所用引物如表 2。

表 2 PCR 扩增目的片段引物序列

Tab 2 Primer sequences of PCR amplification target fragments

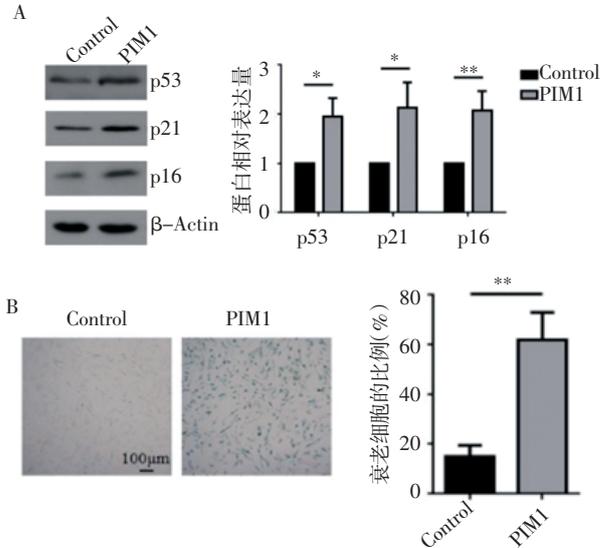
引物名称	引物序列(5'→3')
h-hnRNPU-Forward	TGGGGAGAGCTGCCTAATG
h-hnRNPU-Reverse	AGTCCAGGAGCCTAATGACGC
h- β -actin-Forward	CATGTACGTTGCTATCCAGGC
h- β -actin-Reverse	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

1.3 统计学处理 应用 Prism 软件进行数据分析,所有实验都重复 3 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间相互比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PIM1 过表达促进细胞衰老 Western 印迹实验结果显示,与空载对照组相比,PIM1 组细胞衰老相关蛋白 p53、p21 和 p16 的表达量显著上调

(图 1A, p53, $t=4.360, P<0.05$; p21, $t=3.814, P<0.05$; p16, $t=4.720, P<0.01$)。衰老相关 β -半乳糖苷酶染色实验结果显示,与空载对照组相比,PIM1 组衰老细胞增加(图 1B, $t=6.831, P<0.01$)。

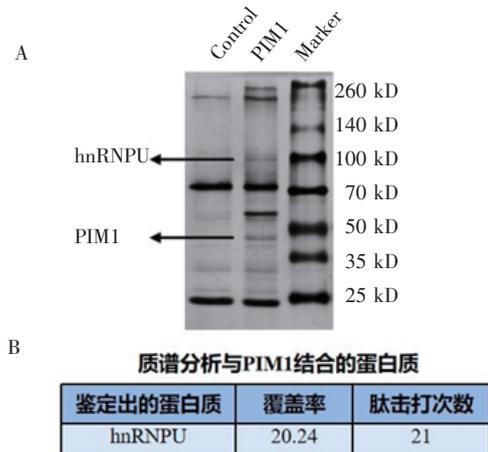


注:A:Western 印迹实验检测过表达 PIM1 对细胞衰老相关蛋白表达的影响,与空载对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01, n=3$;B:衰老相关 β -半乳糖苷酶染色实验检测衰老细胞的比例,与空载对照组相比,** $P<0.01, n=3$;Control:空载对照组细胞;PIM1:过表达 PIM1 的 2BS 细胞

图 1 PIM1 过表达促进细胞衰老

Fig 1 PIM1 overexpression promoted cellular senescence

2.2 PIM1 能有效免疫沉淀 hnRNPU 蛋白 免疫沉淀实验结果显示,与空载 Control 组相比,PIM1 组在分子量 100 kD 的位置存在差异条带(图 2A)。将差异条带进行质谱鉴定,结果显示,免疫沉淀物检测到 hnRNPU(图 2B)。



注:A:免疫沉淀实验检测 PIM1 能有效免疫沉淀hnRNPU 蛋白;B:质谱分析技术检测 PIM1 能有效免疫沉淀 hnRNPU 蛋白;Control:空载对照组细胞;PIM1:过表达 PIM1 的 2BS 细胞;Marker:蛋白标准品

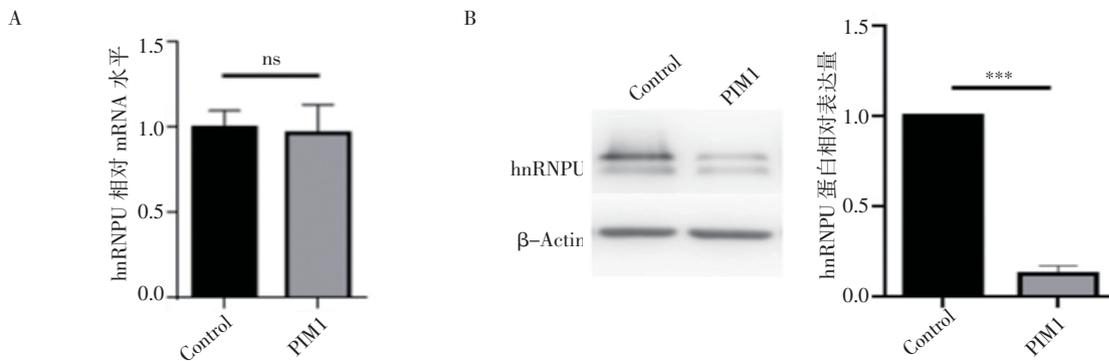
图 2 PIM1 能有效免疫沉淀 hnRNPU

Fig 2 PIM1 effectively immunoprecipitated hnRNPU

2.3 PIM1 过表达下调 hnRNPU 蛋白表达 Real-time PCR 实验结果如图 3A 所示,与空载对照组相比,PIM1 组 hnRNPU mRNA 水平不发生变化(图 3A, $t=0.295, P=0.783$)。Western 印迹实验结果如图 3B 所示,与空载对照组相比,PIM1 组 hnRNPU 蛋白水平显著下降(图 3B, $t=33.85, P<0.001$)。

2.4 过表达 hnRNPU 抑制 PIM1 诱导的细胞衰

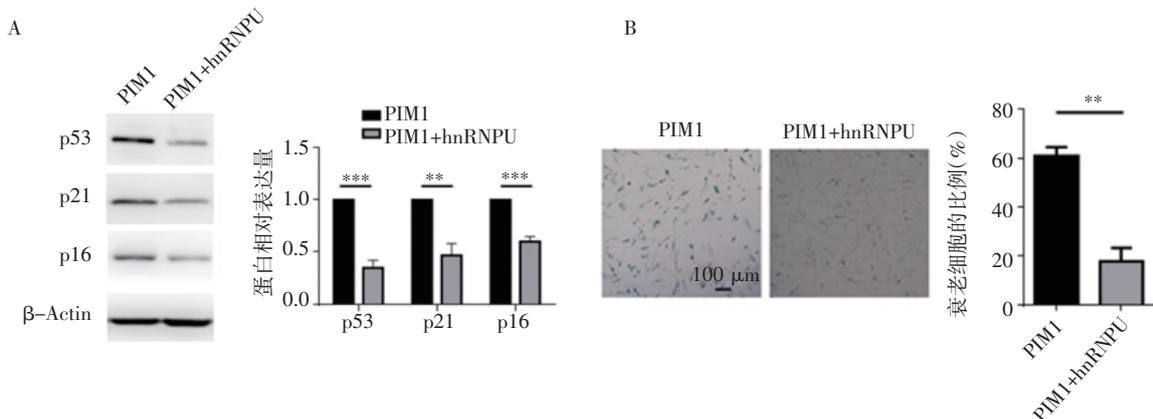
老 与 PIM1 组相比,PIM1+hnRNPU 组衰老相关蛋白 p53、p21 和 p16 的表达均明显下降(图 4A, p53, $t=15.317, P<0.001$; p21, $t=8.012, P<0.01$; p16, $t=14.080, P<0.001$)。衰老相关 β -半乳糖苷酶染色实验结果如图 4B 所示,与 PIM1 组相比,PIM1+hnRNPU 组衰老细胞减少(图 4B, $t=10.38, P<0.01$)。



注:A:Real-time PCR 实验检测 PIM1 对 hnRNPU mRNA 表达水平的影响,与空载 Control 组相比,ns:无显著性差异, $n=3$;B:Western 印迹检测 PIM1 对 hnRNPU 水平的影响,与空载 Control 组相比,*** $P<0.001, n=3$;Control:空载对照组细胞;PIM1:过表达 PIM1 的 2BS 细胞

图 3 PIM1 过表达下调 hnRNPU 表达

Fig 3 PIM1 overexpression down-regulated hnRNPU expression



注:A:Western 印迹实验检测 hnRNPU 对 PIM1 诱导的衰老相关蛋白表达的影响,与 PIM1 组相比,*** $P<0.01, n=3$;B:衰老相关 β -半乳糖苷酶染色实验检测衰老细胞的比例,与 PIM1 组相比,*** $P<0.001, n=3$;PIM1:过表达 PIM1 的 2BS 细胞;PIM1+hnRNPU:同时过表达 hnRNPU 和 PIM1 的 2BS 细胞

图 4 过表达 hnRNPU 抑制 PIM1 诱导的细胞衰老

Fig 4 Overexpression of hnRNPU inhibited cellular senescence induced by PIM1

3 讨论

细胞衰老是指细胞脱离细胞周期并不可逆地丧失增殖能力后进入的一种相对稳定的状态。已有研究表明,遗传因素、DNA 损伤、端粒功能异常和癌基因的激活等多种内外刺激都能诱导细胞衰老^[13]。衰老细胞的最基本特征是衰老相关 β -半乳糖苷酶的表达增加。目前已知与细胞衰老相关的信号通路主要有 p16-Rb 通路和 p53-p21 通路,其中 p21 和 p16 是诱导细胞衰老和细胞周期停滞的肿瘤抑制因子^[14-15]。细胞衰老可阻止致癌基因激活、遗传不稳定和受损细胞的增殖,是一种重要的肿瘤抑制机制^[16]。

此外,原癌基因的激活是肿瘤发生、发展的一个关键因素。尽管原癌基因的激活可以刺激细胞增殖,然而原癌基因的激活可诱导细胞发生衰老^[7]。原癌基因诱导的细胞衰老使肿瘤停滞在癌前病变的状态,是一种潜在的肿瘤抑制机制。因此,揭示原癌基因诱导衰老的分子机制,有助于人们更加深入了解肿瘤发生的本质,并且在研究过程中可能会发现新靶点,为相关肿瘤的治疗提供新方法。

PIM1 作为一个原癌基因在多种肿瘤中高表达,通过磷酸化多种底物在肿瘤生长、发展中起重要作用。然而,原癌基因 PIM1 在细胞衰老的作用有诸多

研究报道。研究者发现在细胞复制性衰老和原癌基因诱导的细胞衰老中,IL-6/STAT3 信号通路的激活导致 PIM1 的表达显著增加^[4]。有研究发现,PIM1 可通过磷酸化异染色质蛋白 1(HP1)和高迁移率族盒转录因子 1(HBP1),导致基因组不稳定性抑制衰老相关基因表达发生变化,进而促进细胞衰老^[17-18]。此外,笔者前期的文章也发现 PIM1 通过磷酸化泛素样含 PHD 和环指域 1(UHRF1)使其稳定性减弱,导致全基因组 DNA 低甲基化,引起基因组不稳定和 p16 表达量增加,从而诱发细胞衰老。然而,笔者发现过表达 UHRF1 并不能完全消除 PIM1 诱导的细胞衰老,说明 PIM1 还可以通过其他机制诱导细胞衰老^[5]。

在本研究中,笔者通过衰老相关蛋白的 Western 印迹和衰老相关 β -半乳糖苷酶染色实验证实原癌基因 PIM1 能促进人胚肺成纤维细胞发生衰老。为了进一步阐明 PIM1 诱导细胞衰老的分子机制,笔者寻找能与 PIM1 结合的新蛋白,免疫沉淀联合质谱技术结果证实 hnRNPU 是 PIM1 新的结合蛋白。本研究还发现 PIM1 能抑制 hnRNPU 蛋白水平表达,而不影响其 mRNA 表达水平。这些实验结果提示 hnRNPU 可能在 PIM1 诱导的细胞衰老中发挥重要作用。

hnRNPU 是一个多功能结构域的核蛋白,可以结合 DNA 和 RNA,参与多种基因的转录和转录后水平的调控^[19]。hnRNPU 功能研究多集中于肿瘤的研究,如 hnRNPU 能够促进肝癌的发展,被认为可能是 c-Myc 的一个新的转录靶点^[20-22]。然而,hnRNPU 与细胞衰老的研究甚少,近年来仅有一项研究发现,hnRNPU 和长链非编码 RNA PANDA 与多梳蛋白抑制复合体(PRC1 和 PRC2)或者转录因子 NF- κ B 相互作用促进或者抑制细胞衰老^[2]。因此,hnRNPU 与细胞衰老的关系还需要研究者进一步探索。

本实验中,笔者通过衰老相关蛋白的 Western 印迹和衰老相关 β -半乳糖苷酶染色实验发现过表达 hnRNPU 能抑制 PIM1 诱导的细胞衰老,证实 hnRNPU 在 PIM1 诱导的细胞衰老中发挥抑制作用。笔者猜测过表达 hnRNPU 可能导致其与抑制衰老相关基因的 DNA 或 RNA 的结合增加,从而改变抑制衰老相关基因的转录表达,进而抑制 PIM1 诱导的细胞衰老,但是这种假设需要实验进一步验证。本研究明确了 hnRNPU 在细胞衰老过程中起抑制作用,hnRNPU 的过表达可能使肿瘤细胞出现衰老障碍,进而增加肿瘤的发生风险。因此,针对 hnRNPU 的进一步研究可能为肿瘤治疗提供新线索。

综上,本研究发现过表达 hnRNPU 抑制原癌基

因 PIM1 诱导的细胞衰老,对探究原癌基因诱导细胞衰老的分子机制提供了一种新思路。hnRNPU 可能成为肿瘤治疗的潜在靶点。

参考文献:

- [1] CUYPERS H T, SELTEN G, QUINT W, et al. Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region[J]. *Cell*, 1984, 37(1): 141-150.
- [2] NARLIK-GRASSOW M, BLANCO-APARICIO C, CARNERO A. The PIM family of serine/threonine kinases in cancer[J]. *Med Res Rev*, 2014, 34(1): 136-159.
- [3] BRASO-MARISTANY F, FILOSTO S, CATCHPOLE S, et al. PIM1 kinase regulates cell death, tumor growth and chemotherapy response in triple-negative breast cancer[J]. *Nat Med*, 2016, 22(11): 1303-1313.
- [4] JIN B, WANG Y, WU C L, et al. PIM-1 modulates cellular senescence and links IL-6 signaling to heterochromatin formation[J]. *Ageing Cell*, 2014, 13(5): 879-889.
- [5] YANG J, LIU K, YANG J, et al. PIM1 induces cellular senescence through phosphorylation of UHRF1 at Ser311[J]. *Oncogene*, 2017, 36(34): 4828-4842.
- [6] DOUGLAS P, YE R, MORRICE N, et al. Phosphorylation of SAF-A/hnRNPU serine 59 by Polo-Like kinase 1 is required for mitosis[J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(15): 2699-2713.
- [7] CONNOLLY C, TAKAHASHI S, MIURA H, et al. SAF-A promotes origin licensing and replication fork progression to ensure robust DNA replication[J]. *J Cell Sci*, 2022, 135(2): 1-6.
- [8] FU X D, ARES M. Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(10): 689-701.
- [9] LI W J, HE Y H, YANG J J, et al. Profiling PRMT methylome reveals roles of hnRNPA1 arginine methylation in RNA splicing and cell growth[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1-20.
- [10] PAN L, HUANG X, LIU Z X, et al. Inflammatory cytokine-regulated tRNA-derived fragment tRF-21 suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma progression[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(22): e148130.
- [11] NIU Z, WANG F, LV S, et al. HNRNPU-AS1 regulates cell proliferation and apoptosis via the microRNA 205-5p/AXIN2 axis and Wnt/beta-catenin signaling pathway in cervical cancer[J]. *Mol Cell Biol*, 2021, 41(10): e0011521.
- [12] PUVVULA P K, DESETTY R D, PINEAU P, et al. Long noncoding RNA PANDA and scaffold-attachment-factor SAFA control senescence entry and exit[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 1-16.
- [13] HERRANZ N, GIL J. Mechanisms and functions of cellular senescence[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(4): 1238-1246.
- [14] KIRKLAND J L, TCHKONIA T. Cellular senescence: a translational perspective[J]. *EBioMedicine*, 2017, 21: 21-28.
- [15] BAI T, LIU F, ZOU F, et al. Epidermal growth factor induces proliferation of hair follicle-derived mesenchymal stem cells through epidermal growth factor receptor-mediated activation of ERK and Akt signaling pathways associated with upregulation of cyclin D1 and downregulation of p16[J]. *Stem Cells Dev*, 2017, 26(2): 113-122.
- [16] MCHUGH D, GIL J. Senescence and aging: causes, consequences,

- J Eur Acad Dermatol Venerol, 2020, 34(3):542-548.
- [6] 中华医学会儿科学分会呼吸学组.《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016年版)[J].中华儿科杂志, 2016, 54(3):167181.
- [7] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会鼻科组, 中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组、小儿学组. 儿童变应性鼻炎诊断和治疗指南(2022年,修订版)[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2022, 57(4):392-404.
- [8] 周薇,赵京,车会莲,等. 中国儿童食物过敏循证指南[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2022, 37(8):572-583.
- [9] 中华医学会皮肤性病学分会儿童皮肤病学组. 中国儿童特应性皮炎诊疗共识(2017版)[J]. 中华皮肤科杂志, 2017, 50(11):784-789.
- [10] WEIDINGER S, NOVAK N. Atopic dermatitis[J]. Lancet, 2016, 387(10023):1109-1122.
- [11] SLATTERY M J, ESSEX M J, PALETZ E M, et al. Depression, anxiety, and dermatologic quality of life in adolescents with atopic dermatitis[J]. J Allergy Clin Immunol, 2011, 128(3):668-671.
- [12] 中华医学会皮肤性病学分会特应性皮炎研究中心, 中华医学会皮肤性病学分会儿童学组. 度普利尤单抗治疗特应性皮炎专家共识[J]. 中华皮肤科杂志, 2022, 55(6):465-470.
- [13] WOLLENBERG A, MARCOUX D, SILVERBERG J I, et al. Dupilumab provides rapid and sustained improvement in scoring atopic dermatitis outcomes in paediatric patients with atopic dermatitis[J]. Acta Derm Venerol, 2022, 102:adv00726.
- [14] ZHAO Y, WU L, LU Q, et al. The efficacy and safety of dupilumab in chinese patients with moderate-to-severe atopic dermatitis:a randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. Br J Dermatol, 2022, 186(4):633-641.
- [15] PALLER A S, SIEGFRIED E C, THACI D, et al. Efficacy and safety of dupilumab with concomitant topical corticosteroids in children 6 to 11 years old with severe atopic dermatitis:a randomized, double-blinded, placebo-controlled phase 3 trial[J]. J Am Acad Dermatol, 2020, 83(5):1282-1293.
- [16] SIMPSON E L, PALLER A S, SIEGFRIED E C, et al. Efficacy and safety of dupilumab in adolescents with uncontrolled moderate to severe atopic dermatitis:aphase 3 randomized clinical trial[J]. JAMA Dermatol, 2020, 156(1):44-56.
- [17] HAMILTON J D, HAREL S, SWANSON B N, et al. Dupilumab suppresses type 2 inflammatory biomarkers across multiple atopic, allergic diseases[J]. Clin Exp Allergy, 2021, 51(7):915-931.
- [18] BACHARIER L B, MASPERO J F, KATELARIS C H, et al. Dupilumab in children with uncontrolled moderate-to-severe asthma[J]. N Engl J Med, 2021, 385(24):2230-2240.
- [19] RIAL M J, BARROSO B, SASTRE J. Dupilumab for treatment of food allergy[J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2019, 7(2):673-674.
- [20] BAKKER D S, ARIENS LFM, VAN LUIJK C, et al. Goblet cell scarcity and conjunctival inflammation during treatment with dupilumab in patients with atopic dermatitis [J]. Br J Dermatol, 2019, 180(5):1248-1249.
- [21] TOSUJI E, INABA Y, MURAOKA K, et al. The clinical significance of dupilumab-induced blood eosinophil elevation in Japanese patients with atopic dermatitis [J]. Drug Discov Ther, 2022, 16(4):164-168.
- [22] KATSUTA M, ISHUIJI Y, MATSUZAKI H, et al. Transient increase in circulating basophils and eosinophils in dupilumab-associated conjunctivitis in patients with atopic dermatitis [J]. Acta Derm Venerol, 2021, 101(6):adv00483.
- [23] GIPSON I K. Goblet cells of the conjunctiva:a review of recent findings[J]. Prog Retin Eye Res, 2016, 54:49-63.

(2022-10-10 收稿)

(上接第 141 页)

- and therapeutic avenues[J]. J Cell Biol, 2018, 217(1):65-77.
- [17] RATHI A, KUMAR D, HASAN G M, et al. Therapeutic targeting of PIM KINASE signaling in cancer therapy:structural and clinical prospects[J]. Biochim Biophys Acta Gen Sub, 2021, 1865(11):129995.
- [18] WANG S, CAO Z, XUE J, et al. A positive feedback loop between Pim-1 kinase and HBP1 transcription factor contributes to hydrogen peroxide-induced premature senescence and apoptosis[J]. J Biol Chem, 2017, 292(20):8207-8222.
- [19] PODGORNAYA O I. Nuclear organization by satellite DNA, SAF-A/hnRNPU and matrix attachment regions[J]. Semin Cell Dev Biol, 2022, 128:61-68.
- [20] ZHANG B, WANG H Y, ZHAO D X, et al. The splicing regulatory factor hnRNPU is a novel transcriptional target of c-Myc in hepatocellular carcinoma[J]. FEBS Lett, 2021, 595(1):68-84.
- [21] XIONG J, LIU T, MI L, et al. hnRNPU/TrkB defines a chromatin accessibility checkpoint for liver injury and nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis[J]. Hepatology, 2020, 71(4):1228-1246.
- [22] LIANG Y, FAN Y, LIU Y, et al. HNRNPU promotes the progression of hepatocellular carcinoma by enhancing CDK2 transcription [J]. Exp Cell Res, 2021, 409(1):112898.

(2022-06-26 收稿)