

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.04.0349

论著

VCY 通过液-液相分离参与 mRNA 剪接增强 NCCIT 细胞迁移和侵袭能力的研究

高帆, 田爽, 王琬瑶, 熊昌欢, 刘小萌, 周一平, 李鲲鹏, 时文涛
(天津医科大学基础医学院遗传学系, 天津 300070)

摘要 目的:探究可变电荷 Y(VCY)的液-液相分离特性及其对畸胎瘤细胞系 NCCIT 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响,并探索其发挥作用的分子机制。方法:应用原核表达系统表达 VCY 蛋白,蛋白纯化后在缓冲液中检测其相分离特性。在 NCCIT 细胞中外源性表达 VCY(记作 NCCIT VCY 组),并设 NCCIT Vector 组和 NCCIT 组为对照组。通过免疫荧光技术检测细胞内 VCY 定位及相分离能力。应用基因本体(GO)功能分析、京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路分析 VCY 对 NCCIT 细胞转录组的影响;通过 CCK8 实验和 Transwell 实验检测 VCY 对细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。应用 rMATS 软件分析转录组测序数据,探索 VCY 对选择性剪接的调控;设计外显子特异性引物,通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)验证 VCY 对 *STMN2* pre-mRNA 选择性剪接的具体影响。结果:VCY 的氨基酸序列中包含固有无序区域,在缓冲液和 NCCIT 细胞中均可发生液-液相分离;外源性 VCY 表达在转录组水平引起 NCCIT 细胞的 38 个基因表达上调($\log_2FC|>1, q<0.05$),50 个基因表达下调($\log_2FC|>1, q<0.05$);GO 和 KEGG 富集分析发现 VCY 主要参与调控细胞增殖、细胞黏附等信号通路($q<0.01$);与 NCCIT 组和 NCCIT Vector 组细胞相比,NCCIT VCY 组细胞增殖($F=92.79, P<0.0001$)、迁移($F=42.57, P<0.001$)和侵袭($F=206.10, P<0.0001$)能力显著提高。VCY 参与 *STMN2* 基因的选择性剪接过程,使细胞中 *STMN2-001* 转录本水平提高,对 *STMN2-007* 和 *STMN2-008* 转录本无影响。结论:VCY 作为一种癌-睾丸抗原,通过液-液相分离参与 *STMN2* 等基因的选择性剪接,促进 NCCIT 细胞的增殖、迁移和侵袭。

关键词 癌-睾丸抗原;VCY;液-液相分离;畸胎瘤;选择性剪接

中图分类号 R394

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)04-0349-09

VCY enhances the migration and invasion capabilities of NCCIT cells by participating in mRNA splicing through liquid-liquid phase separation

GAO Fan, TIAN Shuang, WANG Wanyao, XIONG Changhuan, LIU Xiaomeng, ZHOU Yiping, LI Kunpeng, SHI Wentao
(Department of Genetics, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the liquid-liquid phase separation characteristics of variable charge Y-lined(VCY) and its effects on the proliferation, migration, and invasion capabilities of NCCIT cells, as well as to explore the underlying molecular mechanisms. **Methods:** The VCY protein was expressed using a prokaryotic expression system, and its phase separation properties were assessed in a buffered solution following purification. Exogenous expression of VCY was introduced in NCCIT cells (denoted as the NCCIT VCY group), with the NCCIT Vector group and NCCIT group serving as control groups. The localization and phase separation ability of intracellular VCY were detected using immunofluorescence technology. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses were conducted to evaluate the impact of VCY on the transcriptome of NCCIT cells; the effects of VCY on cell proliferation, migration, and invasion were assessed through CCK8 assays and Transwell experiments. The rMATS software was utilized to analyze transcriptome sequencing data to explore the regulation of alternative splicing by VCY; exon-specific primers were designed to validate the specific effects of VCY on the alternative splicing of *STMN2* pre-mRNA via reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results:** The amino acid sequence of VCY contained an intrinsically disordered region, which was capable of undergoing liquid-liquid phase separation in both buffered solutions and NCCIT cells. Exogenous expression of VCY resulted in the upregulation of 38 genes ($\log_2FC|>1, q<0.05$) and downregulation of 50 genes ($\log_2FC|>1, q<0.05$) at the transcriptome level in NCCIT cells. GO and KEGG enrichment analyses revealed that VCY primarily participated in the regulation of signaling pathways related to cell proliferation and adhesion($q<0.01$). Compared with the NCCIT group and NCCIT Vector group, cells proliferation ($F=92.79, P<0.0001$), migration ($F=42.57, P<0.001$), and invasion ($F=206.10, P<0.0001$) capabilities significantly enhanced in the NCCIT VCY group. VCY was involved in the alternative splicing process of the *STMN2* gene, leading to an increase in the *STMN2-001* transcript level, with no effect on the *STMN2-007* and *STMN2-008* transcripts. **Conclusion:** VCY, as a cancer-

基金项目 国家自然科学基金项目(32170649)

作者简介 高帆(1998-),女,硕士在读,研究方向:医学遗传学;通信作者:时文涛,E-mail:shiwentao@tmu.edu.cn。

testis antigen, participates in the alternative splicing of genes such as *STMN2* through liquid-liquid phase separation, thereby promoting the proliferation, migration, and invasion of NCCIT cells.

Key words cancer-testis antigen; VCY; liquid-liquid separation; embryonal carcinoma; alternative splicing

细胞内部是一个液体环境,在多元的液体环境中各物质会倾向于弥散混合状态^[1],不利于生化反应的高效进行。在细胞内,一些大分子可以通过多价相互作用在局部富集,形成微液滴样的无膜细胞器,更高效地启动和终止生化反应,这种现象被称为液-液相分离(LLPS)^[2-5]。RNA结合蛋白(RBP)中的固有无序区域(IDRs)驱动LLPS的发生^[6-7]。RBP在无膜细胞器中参与多种RNA的转录后调控,如RNA加工、翻译、定位和稳定性的维持等^[8-9]。

可变电荷 X/Y (VCX/VCY) 基因家族位于人性染色体上,在 X 染色体上有 VCX、VCX2、VCX3A 和 VCX3B 4 个家族成员,在 Y 染色体上有两拷贝 VCY。VCY 基因定位于 Yq11.22,是该基因家族中最早被鉴定出的成员^[10]。在成人体内,VCX 和 VCY 蛋白主要在睾丸组织中特异性表达,由于富含碱性氨基酸,Lahn 和 Page^[11]推断其能与核酸结合,后续研究提示 VCX3A 和 VCY 均可能是 RBP^[12-13]。VCY 在精子发生过程中发挥重要的作用^[13-14],部分非梗阻性无精症患者存在 VCX3A 基因的微缺失^[15]。另外,VCX/VCY 基因在一些肿瘤组织中异常高表达,被预测为癌-睾丸抗原(CTAs)^[16-17]。CTAs 是一类在除睾丸外正常组织中不表达或低表达,但在肿瘤组织中高表达的蛋白质。很多 CTAs 的编码基因位于性染色体,如最早发现的黑色素瘤相关抗原 MAGE 家族^[18-19]。这种组织特异的表达模式及潜在的免疫原性,使 CTAs 逐渐被应用于肿瘤诊断和免疫治疗等领域。然而,VCX/VCY 基因在肿瘤发生、发展过程中的生物学功能尚不明确。

本研究选取男性生殖细胞来源的畸胎瘤细胞系 NCCIT,该细胞系的 Y 染色体丢失,但大部分常染色体和 X 染色体上的睾丸组织特异性基因正常表达^[20-21]。本研究通过外源性表达 VCY 基因,鉴定 VCY 蛋白对 NCCIT 细胞表型的影响,并初步探索其在肿瘤细胞中发挥作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 原核表达载体 pGEX-GST-VCY (表达 GST-VCY)、对应空载体 pGEX-GST-NC (表达 GST-NC) 及 BL21(DE3) 感受态大肠杆菌细胞均购自北京擎科生物科技股份有限公司;10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)购自上海碧云天生物科技股份有限公司;真核表达载体 pLVX-

Flag-VCY (表达 Flag-VCY) 及对应空载体 pLVX-vector 购自上海吉凯基因科技有限公司;改良型考马斯亮蓝法蛋白浓度测定试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;亲和层析柱购自北京索莱宝科技有限公司;Glutathione Sepharose 4B 购自美国 Cytiva 公司;睾丸来源的 NCCIT 细胞(人畸胎瘤细胞)、RPMI-1640 完全培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司;长核酸转染试剂购自北京英格恩生物科技有限公司;兔源 Flag 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;异硫氰酸荧光素酯(FITC)标记山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;高速低温离心机购自德国 Eppendorf 公司;激光扫描共聚焦显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 IDRs 序列预测 蛋白质通过 IDRs 间相互作用驱动相分离的发生^[7]。应用 IUPred3 (<https://iupred.elte.hu/>)、PONDR (<http://pondr.com/>) 网站预测蛋白质氨基酸序列中的 IDRs。

1.2.2 蛋白表达与纯化 选用谷胱甘肽-S 转移酶(GST)作为标签,构建融合蛋白表达载体。将原核表达载体 pGEX-GST-VCY (表达 GST-VCY 融合蛋白)和 pGEX-GST-NC (仅表达 GST 标签肽链)分别转入 BL21(DE3)感受态菌株中,并进行扩大培养。离心收集细菌,并用裂解液重悬,裂解液包含 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、500 mmol/L 氯化钠、1 mmol/L 苯甲磺酰氟(PMSF)、1 mmol/L 溶菌酶,置于冰上裂解。4℃、8 000 r/min 离心 30 min,收集裂解菌液上清并与 Glutathione Sepharose 4B 填料在层析柱中混匀。用裂解液充分洗去杂质。随后向层析柱中加入包含 50 mmol/L Tris、500 mmol/L 氯化钠、10 mmol/L 谷胱甘肽(GSH)的洗脱液,洗脱并收集目的蛋白:GST-VCY 及相应对照组 GST 标签蛋白。将 40 μL 蛋白与 10 μL 5×上样缓冲溶液混匀后置于 95℃处理 5 min,将处理后的蛋白样品通过移液枪添加到 10%SDS-PAGE 的上样孔中,设置电压恒定为 80 V 电泳 2 h。SDS-PAGE 电泳后将 SDS-PAGE 凝胶置于 1%考马斯亮蓝染色液中染色 6 h,随后置于 40%乙醇中脱色 4 h,从而验证蛋白纯度,并通过考马斯亮蓝法测定蛋白浓度:将 1 mg/mL、500 μg/mL、250 μg/mL 和 125 μg/mL 牛血清白蛋白(BSA)以及纯化得到的 GST、GST-VCY 蛋白溶液分

别取 10 与 100 μL 0.01% 考马斯亮蓝溶液混合均匀, 随后分别检测各混合溶液在 595 nm 处的吸光值; 以 BSA 浓度为横坐标, 以对应吸光值为纵坐标绘制标准曲线; 将 GST、GST-VCY 混合溶液对应的吸光值代入标准曲线即得到其蛋白浓度。

1.2.3 在缓冲液中诱导 LLPS 将相同浓度的 GST-VCY 和对照组 GST-NC 以及不同浓度 GST-VCY 蛋白溶液分别与 LLPS 低盐缓冲溶液混匀, LLPS 低盐缓冲溶液含 20 mmol/L Tris、50% 聚乙二醇 8000 (PEG8000)、1 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 使用正置显微镜摄影。应用 Image J 软件进行图像分析。

1.2.4 细胞培养及分组 RPMI-1640 完全培养基 (含 10% 胎牛血清) 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 5% CO_2 环境中培养 NCCIT 细胞。选用 Flag 短肽作为标签, 构建融合蛋白表达载体。在后续实验中将细胞分为 3 组: (1) NCCIT 组 (即未转染任何载体的原始 NCCIT 细胞)。(2) NCCIT Vector 组 (即转染空载体的对照组)。(3) NCCIT VCY 组 (即转染真核表达载体 pLVX-Flag-VCY 的实验组, 细胞中可稳定表达 Flag-VCY 融合蛋白)。

1.2.5 细胞内 LLPS 检测 将上述转染后的细胞铺至细胞爬片, 6 h 后取出细胞爬片顺序进行: 4% 多聚甲醛固定 15 min、5% TritonX-100 通透 20 min、5% BSA 封闭 30 min、Flag 一抗 (1:200 稀释) 过夜孵育、含 0.1% 吐温-20 的磷酸盐缓冲溶液 (PBST) 浸洗、罗丹明标记山羊抗兔二抗 (1:400) 孵育 1 h、4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 对核染色后封片, 用共聚焦显微镜进行摄影观察, 应用 Image J 软件进行图像分析。

1.2.6 细胞 DNA、RNA 的抽提 将步骤 1.2.4 中所述 3 组细胞收集至离心管中后顺序进行: Trizol 裂解细胞后加入氯仿并混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 15 min, 溶液分为上层水相及下层有机相。取水相用异丙醇沉淀 RNA 并用无水乙醇清洗, DEPC 水溶解沉淀后即为细胞总 RNA 溶液。取有机相用无水乙醇沉淀 DNA 并用 0.1 mol/L 柠檬酸钠溶液清洗, DEPC 水溶解沉淀后即为细胞 DNA 溶液。酶标仪测定 DNA/RNA 溶液浓度与纯度后进行后续实验。

1.2.7 转录组测序及分析 对上述步骤中得到的 RNA 顺序进行以下步骤: oligo(dT) 磁珠特异捕获 mRNA, 镁离子打断试剂盒片段化 mRNA, 逆转录酶、*E. coli* DNA polymerase I 和 M 合成 cDNA, 将双链 cDNA 末端补齐为平末端并继续在两端添加 A 碱基, 连接末端为 T 碱基的接头, 磁珠筛选 cDNA 片段大小后添加 UDG 酶用于消化第二链。PCR 扩增构

建好的链特异性文库 (300 bp \pm 50 bp), 使用 illumina NovaseqTM 6000 进行 PE150 双端测序。

数据预处理: 使用 Cutadapt 过滤测序数据中不合格的序列, 去除测序接头、含 5% 以上不确定碱基 (N) 的序列并使用 FastQC 进行质量控制; 使用 Hisat2 算法与人参考基因组比对; 使用 StringTie 算法重构转录本并计算 FPKM 值以对转录本表达水平进行定量。

分析: 某一基因的差异倍数 (FC) 为 NCCIT VCY 组表达量平均值和 NCCIT Vector 组表达量平均值相除 ($n=3$), 使用基于负二项分布的 DESeq2 进行差异分析, 并进行 P 值校正, 得到 q 值, 以差异倍数 $\text{FC} \geq 2$ 或 $\text{FC} \leq 0.5$ 且 $q < 0.05$ (即 $|\log_2 \text{FC}| \geq 1$, $q < 0.05$) 作为阈值标准进行差异表达基因筛选。对差异表达基因进行基因本体 (GO) 功能分析 (<http://geneontology.org>)、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路分析 (<http://www.kegg.jp/org>) 和选择性剪接分析 (rMATS 软件^[22-24])。

1.2.8 细胞增殖能力检测 将 NCCIT VCY 组、NCCIT Vector 组及 NCCIT 组细胞分别用胰酶消化并制成细胞悬液, 使用细胞计数板计数。将各组细胞分别接种于 96 孔板中, 每组设置 3 个复孔, 每孔约含 8 000 个细胞及 100 μL 培养基。在接种后 0、24、48、72 h, 向每孔加入 100 μL 含 10% Cell Counting Kit-8 (CCK8) 试剂的完全培养基。将 96 孔板置入细胞培养箱 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2) 中避光培养 30 min, 使用全波长读数仪检测 450 nm 波长的吸光度, 并记录读数为 OD450, 细胞增殖能力与该读数呈正相关。

1.2.9 细胞迁移与侵袭 将上述各组细胞悬液接种于 Corning 小室以进行 Transwell 迁移实验: 在 Transwell 迁移实验中向每个小室上层加入约 7 万个细胞及 200 μL 无血清培养基, 下层加入含 20% 血清培养基, 每组设置 3 个复孔。接种 24 h 后取出小室, 依次进行: 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 0.1% 草酸铵结晶紫室温染色 10 min, PBS 冲洗并用棉签清除多余染料, 室温充分干燥后至于显微镜下拍照, 每孔随机摄影 3 张。应用 Image J 软件进行图像分析。Transwell 侵袭实验则需要提前 1 h 用 50 μL 基质胶稀释液 (基质胶: 无血清培养基 = 1:9) 浸润 Corning 小室, 其余操作同 Transwell 迁移实验。

1.2.10 PCR/qRT-PCR 基因组 DNA 的 PCR 扩增 向细胞基因组 DNA 加入目的基因特异性引物和包含 Taq 酶的反应缓冲液进行扩增, 扩增程序设定为先于 95 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 2 min, 随后在 95 $^{\circ}\text{C}$ (15 s)、60 $^{\circ}\text{C}$ (30 s) 和 72 $^{\circ}\text{C}$ (60 s) 下进行 30 个循环, 对扩增产

进行琼脂糖电泳并使用凝胶成像系统采集图像。
qRT-PCR: 逆转录酶合成 cDNA 第一链, 加入目标基因特异性引物、Taq 酶、缓冲液以及 SYBRGreen 染料进行扩增, 扩增程序设定为先于 95℃ 下进行 30 s, 随后在 95℃ (15 s)、60℃ (30 s) 和 72℃ (60 s) 下进行 40 个循环, 使用 Applied Biosystems™ 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 系统检测 Ct 值。相对 mRNAs 水平 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{各组}) - \Delta Ct(\text{NCCIT 组})$, $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{管家基因})$, 本研究所用引物序列参见表 1。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

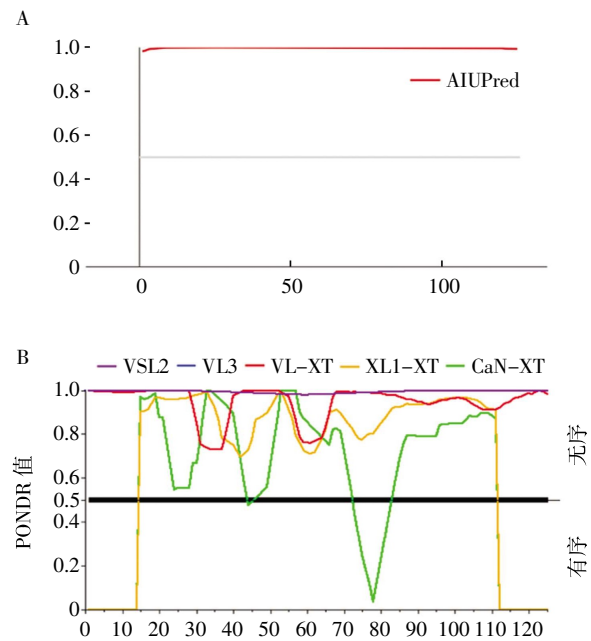
引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度
<i>pSRY</i>	F: GCGTATTCAACAGCGATGATTAC	121 bp
	R: TCTCCCGTTTCACACTGATACTT	
<i>pGAPDH</i>	F: CTGGGCTACACTGAGCACC	101 bp
	R: AAGTGGTCTGTTGAGGGCAATG	
<i>pVCY-qPCR</i>	F: AGTCCTCTCTCAGCCGAG	111 bp
	R: TTGTCGCAGCCCTTCTCTC	
<i>pSTMN2</i>	F: GCTCTTGCTTTTACCCGGAAC	84 bp
	R: AGGCACGTTTGTGATTTGCT	
<i>pQRICH2</i>	F: CTTTGCCAGGTA CTTTACAGC	76 bp
	R: TAGTTCAGGAATTGCTCCCG	
<i>pVCX/Y</i>	F: ATGAGTCCAAAGCCGAGAGCCTC	316 bp
	R: GACTCAGGGGCTGCTGCT	
<i>pVCY-RT-PCR</i>	F: GAAGAAAGGGCTGCGACAAA	245 bp
	R: GCCTAACTTAGTTGCTGCTCAGG	
<i>pSTMN2-007</i>	F: AAGAAACCGCTAGTCTGGG	116 bp
	R: TGTGATGTTGCGAGGTTCC	
<i>pSTMN2-008</i>	F: CAAGATGGCGGAGGAAAAGC	241 bp/ 323 bp
	R: TTCCCATCCTGATATCGCA	
<i>pSTMN2-001</i>	F: TTCGAATGTTCAAGCAGCC	216 bp
	R: ATGCAACAACCAGCTCACAG	

注: *SRY*: 男性性别决定基因; *GAPDH*: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因; *VCY*: 可变电荷 Y 基因; *STMN2*: 微管解聚蛋白 2 基因; *QRICH2*: 富含谷氨酰胺 2 基因; *VCX/Y*: 可变电荷 X/Y

1.3 统计学处理 数据统计学分析使用 GraphPad Prism9.5.1 软件完成。符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用完全随机设计的单因素方差分析(*one-way ANOVA*)及双因素方差分析(*two-way ANOVA*)比较组间差异。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *VCY* 的氨基酸序列中包含驱动 LLPS 的 IDRs 应用 IUPred3、PONDR 对 *VCY* 的氨基酸序列分析发现, 超过 90% 的 *VCY* 氨基酸序列评分大于 0.5, 被预测为 IDRs (图 1)。



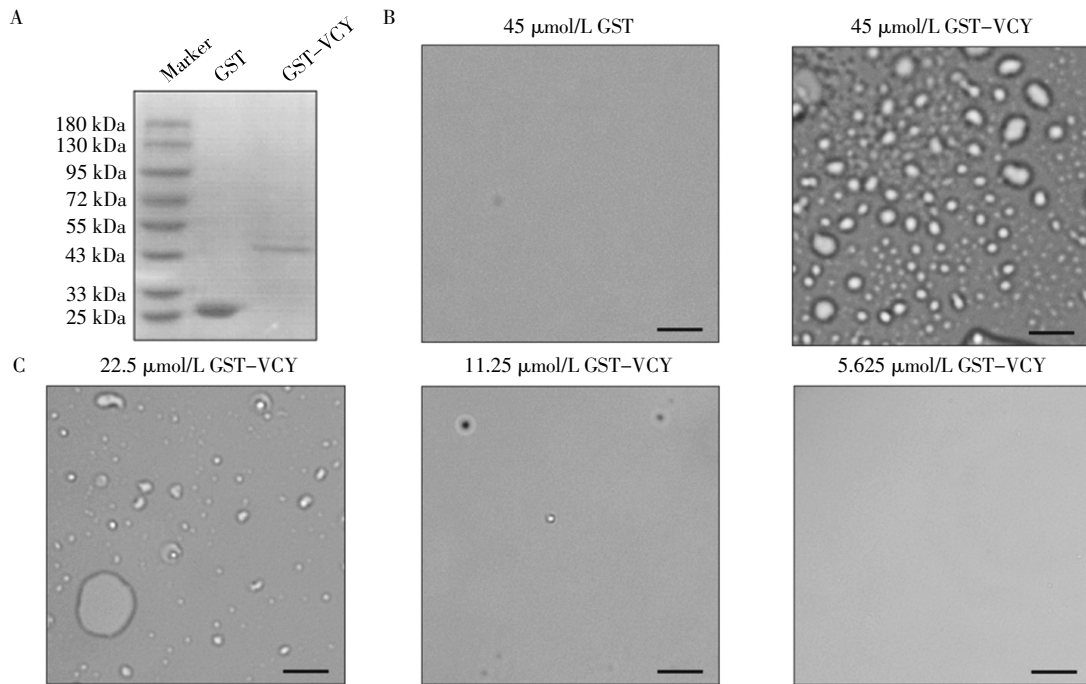
注: A: IUPred3 网站预测 *VCY* 蛋白 IDRs 区域; B: PONDR 网站预测 *VCY* 蛋白 IDRs 区域(彩色折线代表使用不同算法的预测结果); IDRs: 固有无序区域

图 1 IUPred3 和 PONDR 网站预测 *VCY* 蛋白 IDRs 区域
Fig.1 The IDR region of *VCY* protein predicted by IUPred3 and PONDR website

2.2 *VCY* 可在缓冲液中发生 LLPS 应用原核表达系统表达融合蛋白 GST-*VCY* 及相应对照质粒 GST-NC, 蛋白纯化后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳及考马斯亮蓝染色, GST 标签蛋白分子量约 26 kD, 融合蛋白分子量约 43 kD (图 2A), 得到了浓度和纯度均相对较高的蛋白质溶液。通过考马斯亮蓝法测定 GST-*VCY* 融合蛋白的浓度为 157 $\mu\text{mol/L}$, GST 标签蛋白的浓度为 1 217 $\mu\text{mol/L}$ 。

在 LLPS 低盐缓冲溶液中加入终浓度约 45 $\mu\text{mol/L}$ 的 GST-NC 和 GST-*VCY* 蛋白。微分干涉显微镜下可见相较于单独的 GST 蛋白, GST-*VCY* 融合蛋白形成了较为明显的液滴 (图 2B), 提示 *VCY* 蛋白可发生 LLPS。*VCY* 的相分离行为与蛋白浓度相关, 随着蛋白浓度从 45 $\mu\text{mol/L}$ 降低到 5.265 $\mu\text{mol/L}$, *VCY* 形成的液滴随着蛋白浓度的降低而逐渐减少 (图 2B、2C)。

2.3 *VCY* 在 NCCIT 细胞内可发生 LLPS 通过 RT-PCR 实验对 NCCIT 细胞 DNA 中 *SRY* 基因的基因组序列进行扩增, 结果提示 NCCIT 细胞中不存在 Y 染色体 (图 3A)。通过 RT-PCR 实验对 NCCIT 中内源性 *VCX/VCY* 基因家族成员的表达情况进行检测, 当使用 *VCY* 特异性引物对 NCCIT 细胞 cDNA 进行扩增, 对产物进行琼脂糖电泳后结果显示无扩增条



注:A:SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后考马斯亮蓝染色检测纯化的 GST-NC 和 GST-VCY 蛋白;B:微分干涉显微镜下 GST 蛋白不形成液滴,相同浓度的 GST-VCY 融合蛋白形成液滴;C:液滴数量随 VCY 蛋白浓度的降低而逐渐减少;放大倍数:1 000×,标尺 10 μm;Marker:蛋白质分子量标准;VCY:可变电荷 Y 蛋白;GST:谷胱甘肽转移酶;LLPS:液-液相分离;SDS:十二烷基硫酸钠

图 2 纯化后的 VCY 蛋白可在缓冲液中发生 LLPS

Fig.2 The purification of VCY underwent LLPS in the buffered solution

带;使用 *VCX/Y* 基因家族通用引物对 NCCIT 细胞 cDNA 进行扩增,产物电泳后显示有大小符合预期的特异性条带。提示 NCCIT 不表达 *VCY*,但可表达 X 染色体上的家族成员(图 3B)。

在 NCCIT 细胞中转入 VCY 真核表达质粒以及相应的空载质粒。结果显示,与 NCCIT Vector 组相比,VCY 的表达量显著提升 ($F=25.92, P<0.01$,图 3C),表明 NCCIT VCY 稳转细胞株构建成功。通过免疫荧光实验可见 VCY 蛋白主要定位在 NCCIT 细胞的细胞核中,并形成微液滴(图 3D)。

2.4 外源性 VCY 表达影响细胞黏附和细胞增殖相关通路 由于 VCY 主要定位在细胞核中,为了解 VCY 对转录组的影响,对 NCCIT Vector 组和 NCCIT VCY 组细胞进行了转录组测序并进行差异分析 ($n=3$)。转录组分析结果显示测序样品组间差异显著,重复性良好,差异基因富集结果显示 VCY 在转录组水平引起 NCCIT 细胞 38 个基因表达上调 ($|\log_2FC|>1, q<0.05$),50 个基因表达下调 ($|\log_2FC|>1, q<0.05$,图 4A)。差异基因 GO 富集分析结果显示,VCY 组富集到信号转导、细胞黏附和细胞增殖等生物学进程,影响了细胞外基质和细胞膜等细胞组分以及蛋白结合等分子功能 ($q<0.01$,图 4C)。上述差异基因经过 KEGG 富集后结果显示,VCY 同样主要影响细胞黏附等信号通路 ($q<0.01$,图 4B)。

2.5 VCY 增强 NCCIT 细胞的增殖、迁移和侵袭 通过 CCK8 实验发现,在细胞接种后 0 h,NCCIT 组 NCCIT Vector 组和 NCCIT VCY 组细胞数量一致,随着培养时间延长到 24、48 和 72 h,与 NCCIT 组和 NCCIT Vector 组相比,NCCIT VCY 组细胞数量显著增加 ($F=92.79, P<0.000 1$,图 5A),提示 VCY 增强了 NCCIT 细胞的增殖能力。Transwell 实验发现,与 NCCIT 组及 NCCIT Vector 组相比,NCCIT VCY 组的迁移能力 ($F=42.57, P<0.001$,图 5B、5C)和侵袭能力 ($F=206.10, P<0.000 1$)均显著提高,见图 5B、5D。

2.6 VCY 上调与细胞运动相关的 *STMN2* 和 *QRICH2* 的转录水平 在转录组测序差异表达分析结果中,有多个基因的功能与细胞运动能力相关,从中筛选 *STMN2* 和 *QRICH2* 两个基因,应用荧光定量 PCR 进行验证。结果显示,过表达 VCY 显著提高了 NCCIT 细胞中 *STMN2* ($F=1 476.00, P<0.0001$)和 *QRICH2* ($F=27.89, P<0.01$)转录水平(图 6)。

2.7 VCY 特异性上调 *STMN2*-001 转录本转录水平 应用 rMATS 软件分析 RNA-seq 数据发现 VCY 参与调控多种选择性剪接 (AS) 事件,以外显子跳跃(阶段 SE)事件为主(图 7A、7B)。在 Ensembl 数据库中,*STMN2* 基因存在 001、007 和 008 3 个编码蛋白质的转录本。针对各外显子序列设计特异性引物(图 7C),通过 RT-PCR 发现:*STMN2*-007 转录本的

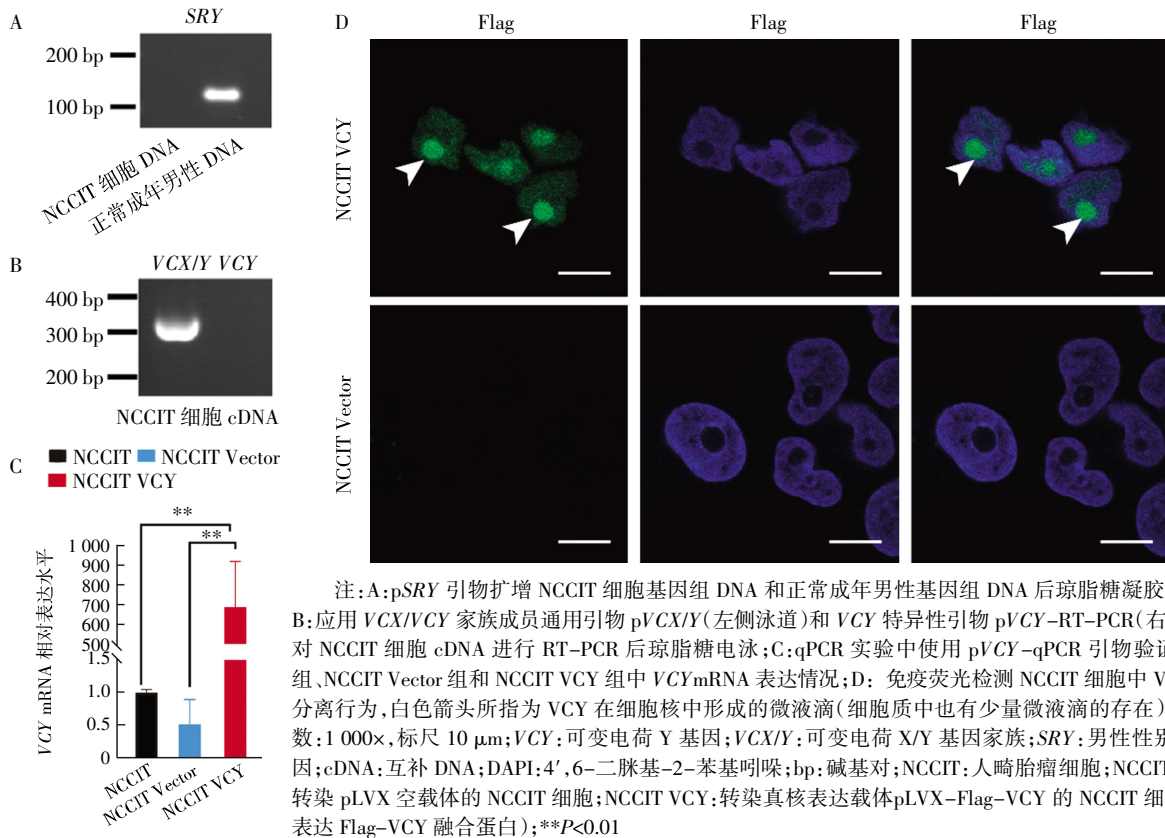


图 3 VCY 蛋白在 NCCIT 细胞核中通过 LLPS 形成无膜细胞器

Fig.3 The VCY protein formed membraneless organelles through LLPS in the nucleus of NCCIT cells

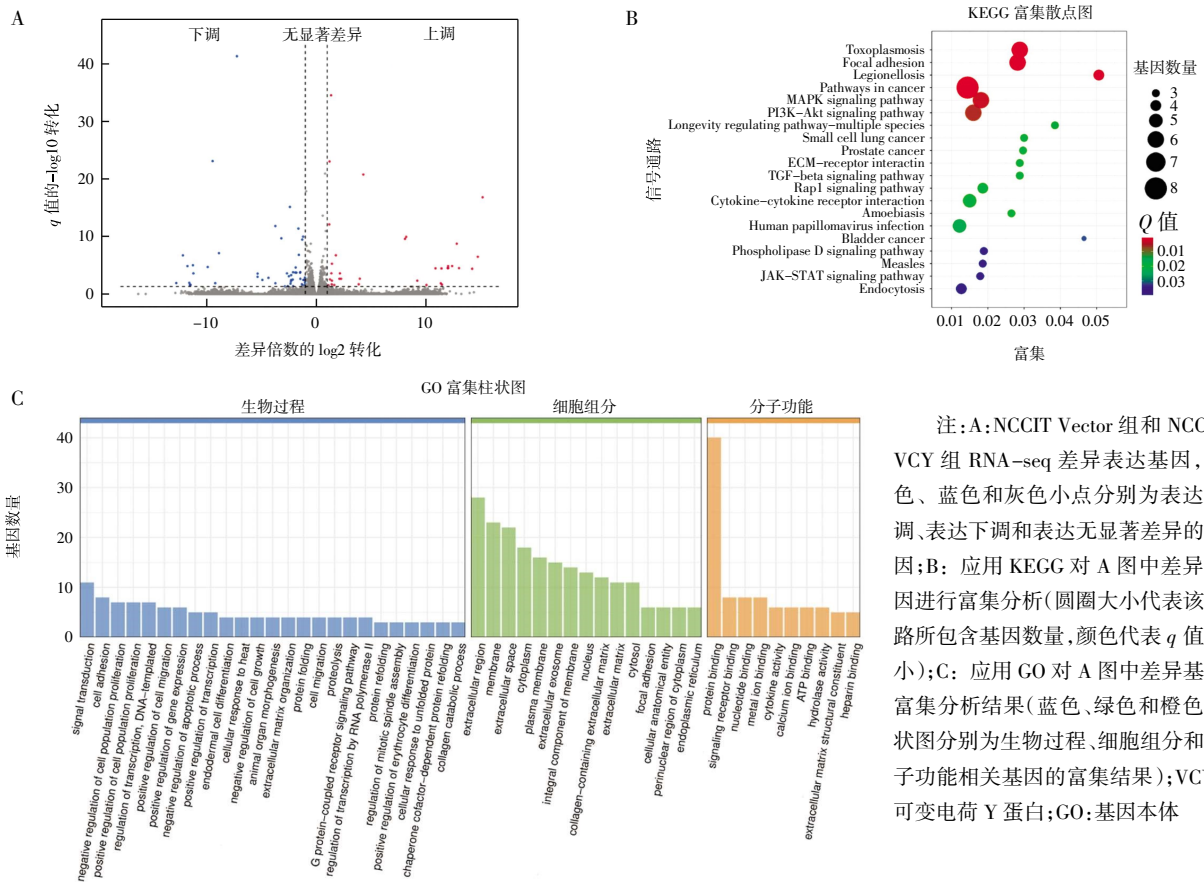
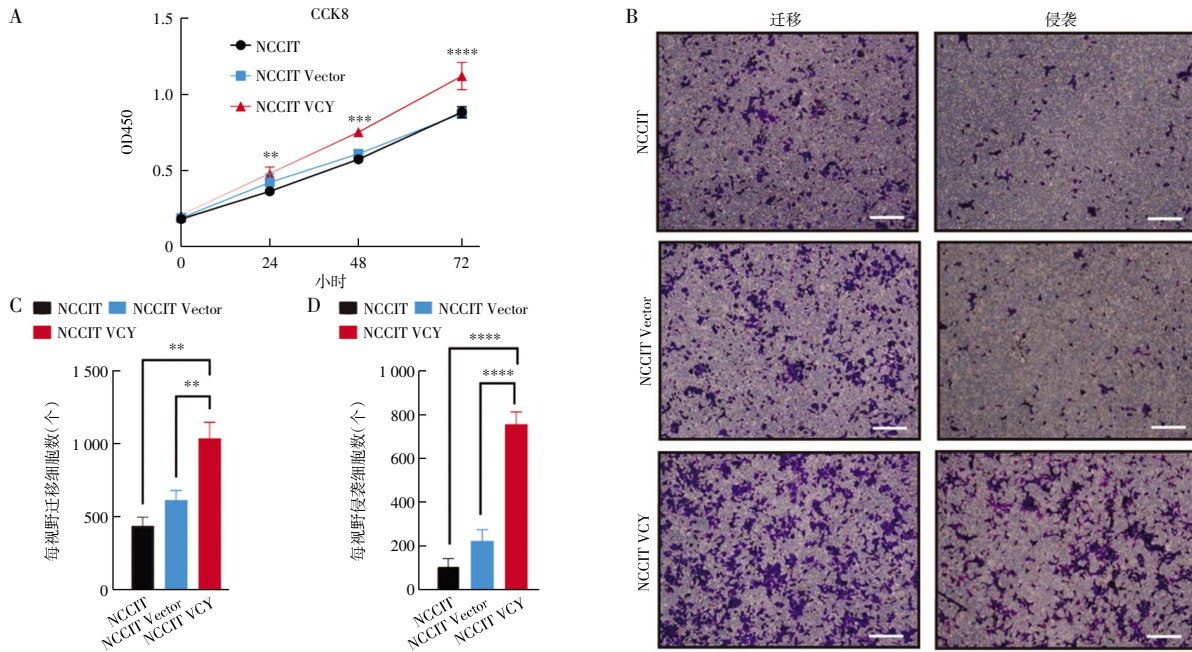


图 4 过表达 VCY 对 NCCIT 细胞转录组的影响

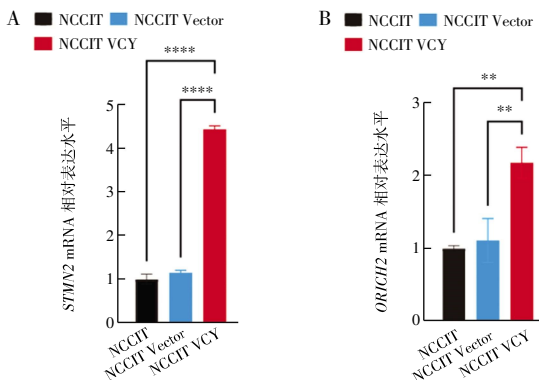
Fig.4 Effects of overexpression of VCY on NCCIT cells at transcriptome level



注: A: CCK8 实验检测各细胞培养 0、24、48 和 72 h 后在 450 nm 处的吸光值并使用 *two-way ANOVA* 对各组吸光值进行统计分析; B: Transwell 迁移和侵袭实验比较各组细胞的迁移和侵袭能力; C、D: Transwell 迁移、侵袭细胞计数(3 个复孔, 每孔 3 个视野), 并进行 *one-way ANOVA* 统计分析; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 放大倍数: 200 \times , 标尺 20 μm ; VCY: 可变电荷 Y 蛋白; OD: 吸光度; CCK8: 细胞增殖/毒性检测试剂盒; NCCIT: 人畸胎瘤细胞; NCCIT Vector: 转染 pLVX 空载体的 NCCIT 细胞; NCCIT VCY: 转染真核表达载体 pLVX-Flag-VCY 的 NCCIT 细胞(稳定表达 Flag-VCY 融合蛋白)

图 5 VCY 增强 NCCIT 细胞的增殖、迁移和侵袭能力

Fig.5 VCY improved the proliferation, migration and invasion of NCCIT cells

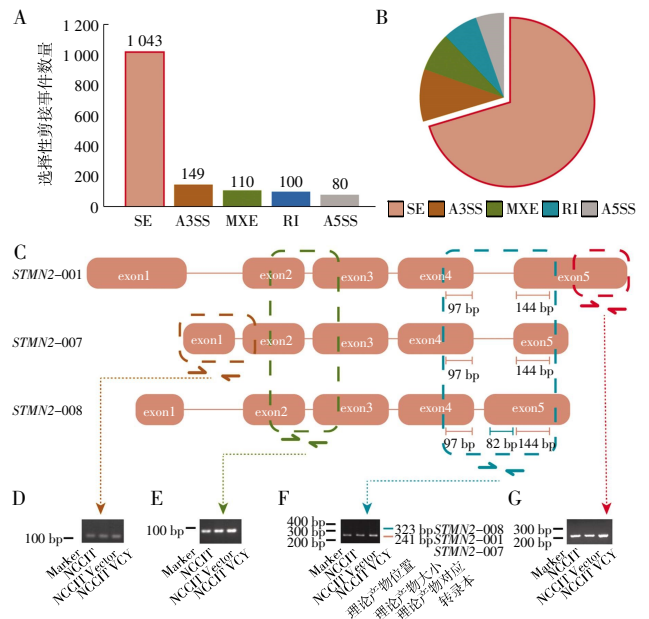


注: A: 通过 qPCR 实验比较 NCCIT 组、NCCIT Vector 组及 NCCIT VCY 组 *STMN2*(引物: p*STMN2*) 表达水平; B: 通过 qPCR 实验比较 NCCIT 组、NCCIT Vector 组及 NCCIT VCY 组 *QRICH2*(引物: p*QRICH2*) 表达水平; VCY: 可变电荷 Y 蛋白; *STMN2*: 微管解聚蛋白 2 基因; *QRICH2*: 富含谷氨酰胺 2 基因; NCCIT: 人畸胎瘤细胞; NCCIT Vector: 转染 pLVX 空载体的 NCCIT 细胞; NCCIT VCY: 转染真核表达载体 pLVX-Flag-VCY 的 NCCIT 细胞(稳定表达 Flag-VCY 融合蛋白); ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

图 6 VCY 上调 *STMN2* 和 *QRICH2* 的转录水平

Fig.6 VCY upregulated the transcriptional levels of *STMN2* and *QRICH2*

表达水平并无明显变化(图 7D); *STMN2* 全部转录本的总体表达水平增加(图 7E), 且对照组和 NCCIT VCY 组细胞只存在对应 *STMN2*-001 和 *STMN2*-007 转录本长度为 241 bp 的扩增产物, 并不存在对应 *STMN2*-008 转录本长度为 323 bp 的扩增产物(图 7F); *STMN2*-001 转录本的表达水平增加(图 7G)。



注: A: 相较 NCCIT Vector 组, NCCIT VCY 组差异表达基因中发生的可选择性剪接事件种类及数量; B: 相较 NCCIT Vector 组, NCCIT VCY 组差异表达基因中发生的各类可选择性剪接事件占比; C: *STMN2* 基因的 3 种转录本外显子组成图示; D-G: 分别使用引物 p*STMN2*-007(D)、p*STMN2*(E)、p*STMN2*-008(F) 和引物 p*STMN2*-001(G) 通过 RT-PCR 实验分析过表达 VCY 对 NCCIT 细胞 *STMN2* 各转录本的表达水平的影响情况; AS: 选择性剪接; SE: 外显子跳跃; A5SS: 可变 5' 端剪接位点; A3SS: 可变 3' 端剪接位点; MXE: 外显子互斥; RI: 内含子保留; *STMN2*: 微管解聚蛋白 2 基因; exon: 外显子; bp: 碱基对; Marker: DNA 分子量标准; NCCIT: 人畸胎瘤细胞; NCCIT Vector: 转染 pLVX 空载体的 NCCIT 细胞; NCCIT VCY: 转染真核表达载体 pLVX-Flag-VCY 的 NCCIT 细胞(稳定表达 Flag-VCY 融合蛋白)

图 7 VCY 特异性上调 *STMN2*-001 转录本的转录水平

Fig.7 VCY specifically upregulated transcript levels of *STMN2*-001 transcripts

3 讨论

肿瘤细胞的形成与配子发生之间存在诸多相似之处^[19],当那些在配子发生特异性表达的基因在体细胞中被异常重新激活时,原本已终末分化的正常细胞可能会重获增殖和迁移能力。因此,深入探究 CTAs 在肿瘤发生、发展中的作用机制,有望为肿瘤治疗提供新的靶点。以往研究显示在约 30% 的肝癌组织中检测到 VCX/VCY 表达升高^[25]。在前列腺癌、肺癌、精原细胞瘤、畸胎瘤和多种肿瘤细胞系中也检测到了 VCX/VCY 的表达^[17, 26-27],提示 VCX/VCY 基因家族的表达产物很可能是一类重要的 CTAs。

VCX 的几个拷贝与 VCY 在序列上虽具有较高的相似度,但二者编码区存在的 13 个碱基差异均导致了氨基酸的改变(即非同义突变);另外,该基因家族成员表达蛋白的羧基端存在由 10 个氨基酸组成的重复单元,不同成员间该重复单元的重复次数不同,从而导致所带电荷和等电点的差异。因此,基因家族不同成员间的功能也可能存在一定差异。本研究聚焦于 VCY 家族,旨在探讨其在畸胎瘤细胞系 NCCIT 中的具体作用及潜在分子机制。

自 1995 年 MAGEA1 作为首个 CTAs 在黑色素瘤中被鉴定以来,已有数十个家族成员被相继发现。这些成员在细胞内的定位各不相同,如 MAGEA1 定位于细胞质和细胞膜上,而 MAGEA10 则定位于细胞核中^[28]。以往研究发现,超过 90% 的 CTAs 中存在 IDRs,当 CTAs 浓度增加时,这些 IDRs 之间会产生相互作用^[6, 29],进而引起剂量依赖性的聚集^[5, 30-32]。VCY 的氨基酸序列中包括两个核定位信号(NLS)^[13],本研究发现 VCY 蛋白在 NCCIT 细胞中定位于细胞核,并能通过 IDRs 间的相互作用发生 LLPS。NCCIT 细胞核内 VCY 的相分离现象一方面进一步验证了体外实验的结果,另一方面提示作为 RBP 的 VCY,能够在液滴中富集相关的蛋白质和 RNA,从而介导特定的生物学过程。VCY 的这种相分离能力与 MAGEA3、TDRD1 等多种 CTAs 存在相似之处^[33-34]。

在本研究中,转录组差异表达基因富集结果提示 VCY 的外源性表达可能会影响细胞的增殖、黏附和运动能力,并进一步通过 CCK8 实验和 Transwell 实验进行验证。在受 VCY 调控并与细胞运动能力相关的靶基因中,选择 *STMN2* 基因和 *QRICH2* 基因进行 qPCR 验证,发现二者的表达水平均显著上升。*STMN2* 在正常睾丸组织中表达量很低,但在多种肿瘤组织中呈现高表达状态,并与肿瘤细胞运动能力相关^[35-36]。*QRICH2* 是一个在成人睾丸中特异性表达的基因^[37],在精子发育过程中通过调节微管组装相关基因的泛素化水平促进鞭毛形成^[38]。另有研究发

现 *STMN2* 蛋白可与微管结合抑制微管组装,并可诱导微管解聚^[39]。但 *STMN2* 蛋白与 *QRICH2* 蛋白是否存在功能上的协同作用尚不明确。

在正常生理状态下,单个基因能够通过选择性剪接产生不同的转录本,以适应不同的细胞状态和外部环境^[40];在另一方面,选择性剪接的异常也与很多病理过程间存在密切联系^[41]。例如,选择性剪接在肿瘤的发生和发展中发挥重要作用,与肿瘤细胞的增殖、转移、凋亡和免疫逃逸等生物学过程相关^[42]。在 Ensembl 数据库中,*STMN2* 基因存在 001、007 和 008 3 个编码蛋白质的转录本,这 3 个转录本的第 2、第 3 和第 4 外显子高度重合,001 转录本拥有与另外两个转录本不同的第 1 外显子,且与 008 转录本在第 5 外显子上存在序列差异。本研究发现 VCY 可以使 NCCIT 细胞中 *STMN2*-001 转录本的表达特异性上调(其独有的第 1 和第 5 外显子更多的被保留下来),而对 *STMN2*-007 和 *STMN2*-008 转录本不产生影响。说明 VCY 参与了 *STMN2* 转录后的选择性剪接过程,增加了转录本 *STMN2*-001 的剪接产物。研究者在阿尔茨海默病等神经退行性疾病中发现, RBPTDP-43 聚集在细胞质而不进入细胞核发挥作用,这导致 *STMN2* pre-mRNA 的剪接异常,*STMN2*-001 转录本的表达降低,异常截短转录本的表达升高^[43]。由此可以推断,相较于其他转录本,*STMN2*-001 转录本翻译出的蛋白产物具有更重要的生物学功能。

总之,VCY 作为一种 RBP,可以通过 LLPS 参与特定 pre-mRNA 的选择性剪接过程,从而影响 NCCIT 细胞的运动和侵袭能力,这一发现进一步证实了 VCX/VCY 基因家族成员的表达产物确实可被定义为 CTAs。在未来的研究中,本课题组将进一步鉴定该基因家族成员在其他类型肿瘤中所发挥的作用,并探索其作为潜在肿瘤治疗靶点的可能性。

参考文献:

- [1] HYMAN A A, WEBER C A, JÜLICHER F. Liquid-liquid phase separation in biology[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30(1): 39-58.
- [2] WANG B, ZHANG L, DAI T, et al. Liquid-liquid phase separation in human health and diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 290.
- [3] BANANI S F, LEE H O, HYMAN A A, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(5): 285-298.
- [4] WANG J, CHOI J M, HOLEHOUSE A S, et al. A molecular grammar governing the driving forces for phase separation of prion-like RNA binding proteins[J]. *Cell*, 2018, 174(3): 688-699.
- [5] VAVOURI T, SEMPLE J I, GARCIA-VERDUGO R, et al. Intrinsic protein disorder and interaction promiscuity are widely associated with dosage sensitivity[J]. *Cell*, 2009, 138(1): 198-208.
- [6] WHEELER J R, MATHENY T, JAIN S, et al. Distinct stages in

- stress granule assembly and disassembly[J]. *Elife*, 2016, 5: e18413.
- [7] ALBERTI S, GLADFELTER A, MITTAG T. Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates[J]. *Cell*, 2019, 176(3): 419-434.
- [8] HUBSTENBERGER A, COUREL M, BÉNARD M, et al. P-body purification reveals the condensation of repressed mRNA regulons[J]. *Mol Cell*, 2017, 68(1): 144-157.
- [9] HUAI Y, MAO W, WANG X, et al. How do RNA binding proteins trigger liquid-liquid phase separation in human health and diseases? [J]. *Biosci Trends*, 2022, 16(6): 389-404.
- [10] LAHN B T, PAGE D C. Functional coherence of the human Y chromosome[J]. *Science*, 1997, 278(5338): 675-680.
- [11] LAHN B T, PAGE D C. A human sex-chromosomal gene family expressed in male germ cells and encoding variably charged proteins [J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(2): 311-319.
- [12] JIAO X, WANG Z, KILEDJIAN M. Identification of an mRNA-decapping regulator implicated in X-linked mental retardation[J]. *Mol Cell*, 2006, 24(5): 713-722.
- [13] ZOU S W, ZHANG J C, ZHANG X D, et al. Expression and localization of VCX/Y proteins and their possible involvement in regulation of ribosome assembly during spermatogenesis[J]. *Cell Res*, 2003, 13(3): 171-177.
- [14] CAO P R, WANG L, JIANG Y C, et al. De novo origin of VCY2 from autosome to Y-transposed amplicon[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): 1-23.
- [15] XIN X, XU P, WANG N, et al. Copy number variations (CNVs) and karyotyping analysis in males with azoospermia and oligospermia[J]. *BMC Med Genomics*, 2023, 16(1): 213.
- [16] DJUREINOVIC D, HALLSTRÖM B M, HORIE M, et al. Profiling cancer testis antigens in non-small-cell lung cancer[J]. *JCI Insight*, 2016, 1(10): e86837.
- [17] TAGUCHI A, TAYLOR A D, RODRIGUEZ J, et al. A search for novel cancer/testis antigens in lung cancer identifies VCX/Y genes, expanding the repertoire of potential immunotherapeutic targets[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(17): 4694-4705.
- [18] SCANLAN M J, SIMPSON A J, OLD L J. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary[J]. *Cancer Immun*, 2004, 4: 1.
- [19] SIMPSON A J, CABALLERO O L, JUNGBLUTH A, et al. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(8): 615-625.
- [20] TESHIMA S, SHIMOSATO Y, HIROHASHI S, et al. Four new human germ cell tumor cell lines[J]. *Lab Invest*, 1988, 59(3): 328-336.
- [21] DAMJANOV I, HORVAT B, GIBAS Z. Retinoic acid-induced differentiation of the developmentally pluripotent human germ cell tumor-derived cell line, NCCIT[J]. *Lab Invest*, 1993, 68(2): 220-232.
- [22] SHEN S, PARK J W, LU Z X, 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(51): E5593-5601.
- [23] PARK J W, TOKHEIM C, SHEN S, et al. Identifying differential alternative splicing events from RNA sequencing data using RNASEq-MATS[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1038: 171-179.
- [24] SHEN S, PARK J W, HUANG J, et al. MATS: a Bayesian framework for flexible detection of differential alternative splicing from RNA-Seq data[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(8): e61.
- [25] KIDO T, LAU Y F. Roles of the Y chromosome genes in human cancers[J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(3): 373-380.
- [26] PERINCHERY G, SASAKI M, ANGAN A, et al. Deletion of Y-chromosome specific genes in human prostate cancer[J]. *J Urol*, 2000, 163(4): 1339-1342.
- [27] DASARI V K, GOHARDERAKHSHAN R Z, PERINCHERY G, et al. Expression analysis of Y chromosome genes in human prostate cancer[J]. *J Urol*, 2001, 165(4): 1335-1341.
- [28] SAMEL A, VÄÄRTNÖU F, VERK L, et al. How the intrinsically disordered N-terminus of cancer/testis antigen MAGEA10 is responsible for its expression, nuclear localisation and aberrant migration[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(12): 1740.
- [29] KULKARNI P, UVERSKY V N. Cancer/testis antigens: "Smart" biomarkers for diagnosis and prognosis of prostate and other cancers [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4): 740.
- [30] WU Q, ZHANG W, WANG Y, et al. MAGE-C3 promotes cancer metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition and immunosuppression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2021, 41(12): 1354-1372.
- [31] BARAN C A, AGAIMY A, WEHRHAN F, et al. MAGE-A expression in oral and laryngeal leukoplakia predicts malignant transformation[J]. *Mod Pathol*, 2019, 32(8): 1068-1081.
- [32] JANIC A, MENDIZABAL L, LLAMAZARES S, et al. Ectopic expression of germline genes drives malignant brain tumor growth in *Drosophila*[J]. *Science*, 2010, 330(6012): 1824-1827.
- [33] KIM H, BARUA A, HUANG L, et al. The cancer testis antigen TDRD1 regulates prostate cancer proliferation by associating with the snRNP biogenesis machinery[J]. *Oncogene*, 2023, 42(22): 1821-1831.
- [34] RAJAGOPALAN K, MOONEY S M, PAREKH N, et al. A majority of the cancer/testis antigens are intrinsically disordered proteins[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(11): 3256-3267.
- [35] GUO Q, SU N, ZHANG J, et al. PAK4 kinase-mediated SCG10 phosphorylation involved in gastric cancer metastasis[J]. *Oncogene*, 2014, 33(25): 3277-3287.
- [36] SHAO M, WANG L, ZHANG Q, et al. STMN2 overexpression promotes cell proliferation and EMT in pancreatic cancer mediated by WNT/ β -catenin signaling[J]. *Cancer Gene Ther*, 2023, 30(3): 472-480.
- [37] ALMEIDA L G, SAKABE N J, DEOLIVEIRA A R, et al. CT-database: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(database issue): D816-D819.
- [38] FANG C, PAN X, LI D, et al. Distinct roles of Kif6 and Kif9 in mammalian ciliary trafficking and motility[J]. *J Cell Biol*, 2024, 223(11): e202312060.
- [39] RIEDERER B M, PELLIER V, ANTONSSON B, et al. Regulation of microtubule dynamics by the neuronal growth-associated protein SCG10[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(2): 741-745.
- [40] SMITH C W, PATTON J G, NADAL-GINARD B. Alternative splicing in the control of gene expression[J]. *Annu Rev Genet*, 1989, 23: 527-577.
- [41] TAO Y, ZHANG Q, WANG H, et al. Alternative splicing and related RNA binding proteins in human health and disease[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 26.
- [42] OLTEAN S, BATES D O. Hallmarks of alternative splicing in cancer[J]. *Oncogene*, 2014, 33(46): 5311-5318.
- [43] AGRA ALMEIDA QUADROS A R, LI Z, WANG X, et al. Cryptic splicing of stathmin-2 and UNC13A mRNAs is a pathological hallmark of TDP-43-associated Alzheimer's disease[J]. *Acta Neuropathol*, 2024, 147(1): 9.