

## TFRC 参与调控血管和神经元相关基因表达

韩 君<sup>①</sup>

(北京康仁堂药业有限公司,北京 101301)

**摘要** 目的:探讨 TFRC 对肝癌 HepG2 细胞转录组水平的影响,解读其潜在的功能。方法:根据癌症基因组图谱(TCGA)数据分析,发现 TFRC 与肝癌患者的预后密切相关,采用 TFRC 敲低的肝癌 HepG2 细胞和阴性对照肝癌 HepG2 细胞进行转录组 RNA 测序,筛选差异表达基因并进行 GO 注释分析,KEGG 富集分析和蛋白互作网络分析。结果:两种 HepG2 细胞转录组中筛选出 869 个差异表达基因(DEGs),功能分析发现多个 DEGs 与血管和神经元调节有关;依据血管和神经元相关的 DEGs,构建调控网络,发现 TFRC 是该网络的节点基因。结论:TFRC 是血管和神经元调控的重要基因。

**关键词:** TFRC;RNA-seq;差异表达基因;血管调节;神经元调控

中图分类号:R735.7

文献标志码:A

文章编号:1008-2409(2022)05-0017-06

### Involvement of TFRC in the regulation of vascular and neuronal related gene expression

HAN Jun<sup>①</sup>.(Beijing Tcmages Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 101301, China)

**Abstract** Objective: To investigate the effect of TFRC on the transcriptome level of hepatocellular carcinoma HepG2 cells and to decipher its potential function. Methods: TFRC was closely associated with the prognosis of hepatocellular carcinoma patients as determined by the Cancer Genome Atlas (TCGA) database. TFRC knockdown hepatocellular carcinoma HepG2 cells and negative control hepatocellular carcinoma cells were selected for transcriptome RNA sequencing and screening of differentially expressed genes to have GO annotation analysis, KEGG enrichment analysis and protein interaction network analysis. Results: A total of 869 differentially expressed genes (DEGs) were screened from the transcriptomes of the two HepG2 cells, and functional analysis revealed that several DEGs were associated with vascular regulation and neurons. Functional analysis revealed that several DEGs were related to vascular regulation and neurons. In addition, TFRC was found to be a node gene in the regulatory network constructed according to vascular regulation and neuron-related DEGs. Conclusion: TFRC expression is important for vascular and neuronal regulation.

**Keywords:** TFRC; RNA-seq; differentially expressed genes (DEGs); vascular regulation; neuronal regulation

① 作者简介:韩君(1988—),男,满族,黑龙江哈尔滨人,2017年佳木斯大学药物分析专业硕士研究生毕业,现任北京康仁堂药业有限公司研究员,工程师。研究方向:生物信息学和多组学数据分析。

转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TfR1) 由 TFRC 基因编码, 是一种 II 型跨膜蛋白, 与转铁蛋白相互作用介导铁的吸收, 正常生理条件下, 与转铁蛋白结合的铁是血液中铁存在的主要形式<sup>[1]</sup>。广泛调控与离子运输和免疫有关的基因表达, 通过影响 HeLa 细胞的基因表达和替代剪接参与宫颈癌的进展<sup>[2-3]</sup>, 表明 TFRC 可能具有广泛的调节功能。

查阅 TCGA 数据库发现, TFRC 基因在肝癌患者中高表达, 并且在不同的肿瘤阶段和分化等级中存在差异; 进一步分析发现 TFRC 高表达的肝癌患者预后不佳。为探究 TFRC 的调控机制, 使用 shRNA 靶向干扰肝癌 HepG2 细胞中的 TFRC, 对敲除细胞和对照细胞进行转录组测序, 基于基因本体论 (GO), 京都基因和基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genome, KEGG) 以及蛋白互作网络对 DEGs 进行分析。结果表明, 多个 DEGs 与血管调节和神经元的调控有关, TFRC 的异常表达可能会影响细胞的生理结构。这些数据为今后探索 TFRC 的分子调控机制提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人肝癌 HepG2 细胞、293T 人胚肾细胞均购自中国科学院细胞库; 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; Lipofectamine 3000 试剂盒 (货号: L3000015), TRIzol 试剂 (货号: 15596018) 购自美国 Invitrogen 公司; DMEM 培养基 (货号: 11960044), RPMI-1640 培养基 (货号: 11875119), 逆转录试剂盒 PrimeScript RT Reagent Kit (货号: RR037B), 荧光定量 PCR 试剂盒 TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq II (货号: RR82WR) 购自北京宝日医生物技术有限公司; RIPA 裂解液 (货号: 89901) 购自美国 Thermo Fisher 公司; PVDF 膜 (货号: ISEQ00010) 购自美国 Millipore 公司; 兔抗人 TFRC 单克隆抗体 (货号: ab214039), 兔抗人  $\beta$ -actin 多克隆抗体 (货号: ab8227), HRP 标记的山羊抗兔二抗 (货号: ab205718) 购自美国 Abcam 公司。

### 1.2 TFRC shRNA 质粒的构建

TFRC shRNA 质粒及阴性对照 shRNA (NC shRNA) 序列信息见表 1。选择 pGFP-B-RS 作为质粒的克隆载体, shRNA 干扰 TFRC 载体的克隆切入位点为 BamH I/Hind III, 成功构建后经测序进行序列鉴定。

表 1 目的基因的 shRNA 序列

shRNA 名称	序列
TFRC shRNA Forward	5'—GCCCAGAUUGUCAGAUATT—3'
Reverse	5'—UAUCUGAGAACAUCUGGGCTT—3'
NC shRNA Forward	5'—UUCUCCGAACGUGUCACGUTT—3'
Reverse	5'—ACGUGACACGUUCGGAGAATT—3'

### 1.3 细胞培养、分组和转染

293T 细胞培养于含有 10% 的胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基, HepG2 肝癌细胞培养于含有 1% 双抗的 RPMI-1640 培养基, 培养环境为 37 °C、饱和湿度 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱。

将 HepG2 细胞分成两组: NC shRNA 组和 TFRC shRNA 组。根据 Lipofectamine 3000 试剂盒说明书, 分别转染 NC shRNA、TFRC shRNA 表达载体, 48 h 后收集病毒上清并进行过滤浓缩。取对数生长期的 HepG2 细胞, 当细胞密度达到 70%~80%, 使用 10  $\mu$ l TFRC shRNA 或 NC shRNA 病毒原液 (病毒滴度为  $1 \times 10^{11}$  TU/L) 感染细胞, 常规培养 10 h 后, 更换新鲜培养基, 继续培养 24~96 h, 观察细胞状态, 采用嘌呤霉素 (1 mg/L) 筛选稳定转染 shRNA 的 HepG2 细胞。

### 1.4 RNA 提取和测序

收集各组细胞, 使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 经分光光度计检测 RNA 浓度与纯度, 随后将提取的 RNA 送钱塘生物科技 (苏州) 有限公司进行转录组测序 (RNA-seq)。

### 1.5 生物信息学分析

利用 R 软件 edge R 筛选倍数变化  $FC \geq 2$  且  $P < 0.05$  的 DEGs。使用 UALCAN 数据库分析癌症基因

组图谱(TCGA)中 TFRC 在正常人和肝癌患者中的表达水平。

### 1.6 反转录-定量聚合酶链反应(RT-qPCR)

根据 PrimeScript RT Reagent Kit 逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,通过荧光定量 PCR 试剂盒进行扩增,引物序列见表 2。以  $\beta$ -actin 为内参,通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 TFRC 的相对表达水平。

表 2 目的基因引物序列

引物名称	序列
TFRC	Forward5'—GGCTACTTGGGCTATTGTAAAGG—3' Reverse5'—CAGTTTCTCCGACAACCTTCTCT—3'
$\beta$ -actin	Forward5'—CCTGGCACCCAGCACAAT—3' Reverse5'—GGGCCGACTCGTCATAC—3'

### 1.7 Western Blot 检测蛋白表达

收集各组细胞,使用 RIPA 裂解液(加入蛋白酶抑制剂)提取蛋白,BCA 法则定蛋白浓度。取 50  $\mu$ g 待测蛋白,按照体积比 1 : 1 加入 2 $\times$ 上样缓冲液,100  $^{\circ}$ C 热变性 10 min,离心后取上清。通过 SDS-PAGE 电泳分离蛋白后湿转至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶室温封闭 1.5 h,分别加入 TFRC 一抗(1 : 1 000)、 $\beta$ -actin 一抗(1 : 1 000)于 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,TBST 洗膜 3 次,10 min/次,加入 HRP 标记的二抗(1 : 10 000)室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,10 min/次;加入 ECL 超敏化学发光液于凝胶成像分析系统中进行曝光显影。

### 1.8 统计分析

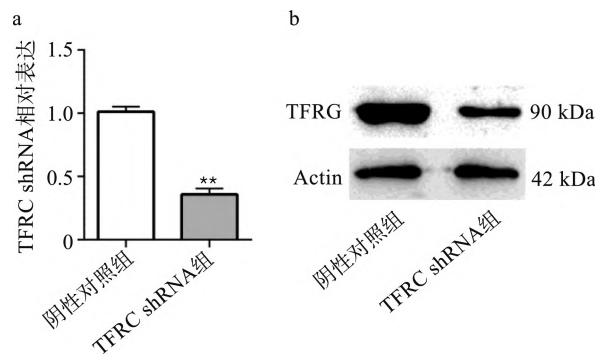
采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析,计量数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 shRNA 干扰 TFRC 表达

TFRC shRNA 组 TFRC 的 mRNA 表达水平为 ( $0.359\pm 0.046$ ) 低于阴性对照组 ( $1.012\pm 0.040$ ),差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),见图 1a。TFRC

shRNA 组 TFRC 的蛋白表达水平也低于阴性对照组,见图 1b。



与阴性对照组比较,\*\* $P < 0.01$ , a: TFRC mRNA 表达分析图;b: TFRC 蛋白表达分析图

图 1 转染 shRNA 对 TFRCmRNA 和蛋白表达的影响

### 2.2 DEGs 的筛选

分析 RNA-seq 数据,MA 图展示与沉默 TFRC 相关的 DEGs 比较 TFRC shRNA 与 NC shRNA 组,共发现 869 个 DEGs,其中 CKLF、KLRC<sub>4</sub> 等 392 个基因上调和 PARL、LINC01629 等 477 个基因下调,见图 2。其中 CKLF、KLRC<sub>4</sub> 等 10 个基因显著上调,PARL、LINC01629 等 10 个基因显著下调,见表 3。

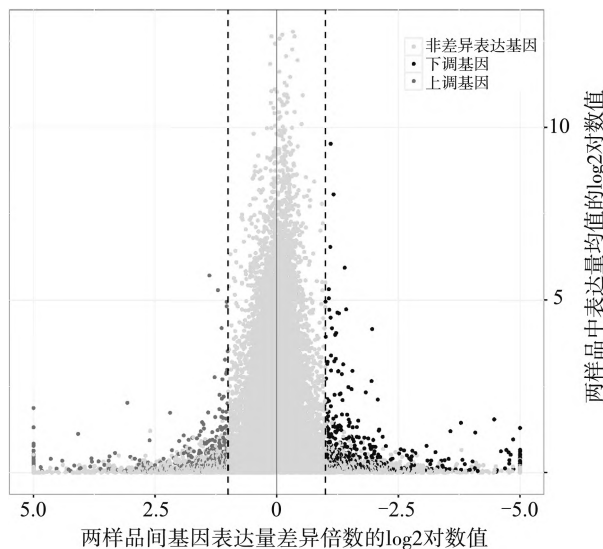


图 2 差异表达基因 MA plot 图

表 3 上调和下调表达的 10 个基因

基因	差异倍数 (log2)	表达水平	基因	差异倍数 (log2)	表达水平
CKLF	20.0328	上调	PARL	-22.2518	下调
KLRC4	19.1972	上调	LINC01629	-19.2448	下调
PALM2	19.1422	上调	SEPT5	-19.0417	下调
SLCO1B7	18.4586	上调	GAGE12H	-18.7180	下调
LOC105372833	18.0205	上调	LINC00680	-18.5985	下调
ARMCX5	17.6883	上调	LINC01771	-18.1323	下调
SPEGNB	17.3661	上调	CHURC1	-18.1165	下调
ADNP	17.3467	上调	DHRS4L1	-17.7906	下调
LOC101928059	17.0174	上调	GRAP	-17.6774	下调
GHET1	16.9157	上调	LRP4	-17.6311	下调

### 2.3 TFRC 敲除影响血管调节相关基因表达

为确定 DEGs 参与的主要功能,进行了 GO 富集分析,见图 3。发现 DEGs 与血管调节有关,主要富集于血管发育调节 (GO:1901342)、血管生成调节 (GO:0045765) 和血管内皮生长因子调节 (GO:0010573) 等基因。

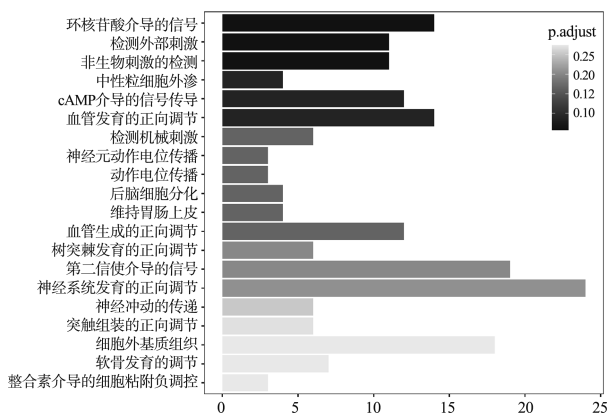


图 3 富集显著性 Top 20 的 GO 富集分析条形图

### 2.4 TFRC 敲除影响与神经元相关的基因表达

除参与血管调节外,DEGs 还与神经元相关的基因表达有关,富集于神经元分化正向调节 (GO:0045666)、神经元动作电位 (GO:0019228)、神经元细胞-细胞黏附 (GO:0007158)、神经元成熟 (GO:0042551)、神经元重塑 (GO:0016322) 和神经元分化

负调控 (GO:0045665)。

此外,对 DEGs 进行 KEGG 富集分析,见图 4。发现存在路径与血管调节和神经元有关,包括扩张型心肌病 (ID: hsa05414)、肥厚性心肌病 (ID: hsa05410)、心肌收缩 (ID: hsa04260)、血管平滑肌收缩 (ID: hsa04270) 和 cGMP-PKG 信号通路 (ID: hsa04022),阿尔茨海默病 (ID: hsa05010)、肌萎缩侧索硬化 (ID: hsa05014) 和帕金森综合征 (ID: hsa05012) 等。

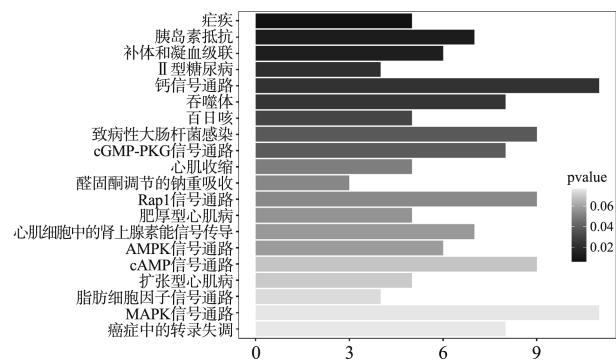


图 4 富集显著性 Top 20 的 Pathway 富集分析条形图

### 2.5 与血管调节和神经元有关的 DEGs 网络分析

选择与血管调节和神经元有关的 51 个 DEGs 进行层次聚类热图分析,结果显示两组数据中 3 个生物重复具有高度的一致性,生物途径富集分析显示差异

基因富集于血管发育和神经元分化调节等,并且22个差异表达基因 C3、APOE、SCARF1、SEMA6B、SEMA3D、SPHK1、STAB1、SOX9、PTPRB、TRPV2、ITGB8、NRXN3、MDK、LPAR1、PGF、FGF1、GPRC5B、BAL2、GPC2、CXCL8、PECAM1、THBS1 之间相互联系。此外,本研究还发现 TFRC 是该网络的节点基因,进一步表明 TFRC 的异常表达可在血管调节和神经元的调控中发挥重要作用。

### 3 讨论

铁蛋白和转铁蛋白能够降低细胞内铁水平,位于细胞膜上的 TFRC 能够与携带游离铁的转铁蛋白结合,将细胞外铁转运到细胞内,提高细胞内铁水平<sup>[4]</sup>,对细胞铁稳态起重要作用<sup>[5]</sup>。铁死亡依赖于铁和活性氧,主要特征为脂质过氧化物的积累。

研究表明 FTH1 和/或 TFRC 的沉默抑制了 HepG2 细胞的增殖和迁移能力<sup>[6]</sup>,提示 TFRC 相关通路在癌症进展中发挥重要作用;也有研究发现在肝细胞癌(HCC)中观察到转铁蛋白受体 1(TFRC1)的过度表达<sup>[7]</sup>。研究发现 TFRC 基因可以作为预测和诊断急性髓系白血病(AML)的生物标志物<sup>[8]</sup>,TFRC 在胰腺癌中表达显著增加,并且与预后不良有关<sup>[9]</sup>,提示在癌症进展中,TFRC 可能参与调控。

帕金森病的发病机制主要是氧化应激、 $\alpha$ 突触核蛋白聚集、神经炎症及线粒体功能障碍等导致的中脑黑质区 DA 能神经元的丢失、死亡,进而诱导出帕金森病表型<sup>[10-11]</sup>。随着年龄的增长,铁在大脑中逐渐蓄积,铁蓄积与阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化等神经退行性疾病有关<sup>[12-13]</sup>。研究表明,在神经退行性疾病中使用铁死亡抑制剂可延缓疾病进展<sup>[14-15]</sup>。

血管功能变化是心血管疾病产生的关键环节之一,调节血管功能是治疗心血管疾病的重要途径。血管新生是影响血管功能的重要因素,在动脉粥样硬化性疾病发生的不同阶段发挥着生理和病理双重作用<sup>[16]</sup>。非转铁蛋白结合铁损害了内皮细胞和平

滑肌细胞的活力和功能,使动脉粥样硬化疾病进一步恶化<sup>[17-18]</sup>。铁死亡模式的启动可加剧血管损伤<sup>[19-20]</sup>。本研究中发现差异表达基因主要涉及流体剪切应力、动脉粥样硬化和 TGF- $\beta$  信号通路。DEGs 富集于血管调节和神经元的调控,表明 TFRC 的异常表达可能在血管调节和神经元调控中发挥重要作用。

### 参考文献:

- [1] WANG S J, GAO C, CHEN B A. Advancement of the study on iron metabolism and regulation in tumor cells[J]. Chin J Cancer, 2010, 29(4): 451-455.
- [2] HUANG N, ZHAN L L, CHENG Y, et al. TfR1 extensively regulates the expression of genes associated with ion transport and immunity[J]. Curr Med Sci, 2020, 40(3): 493-501.
- [3] HUANG N, WEI Y, CHENG Y, et al. Iron metabolism protein transferrin receptor 1 involves in cervical cancer progression by affecting gene expression and alternative splicing in HeLa cells[J]. Genes Genomics, 2022, 44(6): 637-650.
- [4] 尹智平,赵树铭.红细胞系造血调控的研究进展[J].国际检验医学杂志, 2011, 32(10): 1075-1078.
- [5] JIANG L, WANG J, WANG K, et al. RNF217 regulates iron homeostasis through its E3 ubiquitin ligase activity by modulating ferroportin degradation [J]. Blood, 2021, 138(8): 689-705.
- [6] MUHAMMAD J S, BAJBOUJ K, SHAFARIN J, et al. Estrogen-induced epigenetic silencing of FTH1 and TFRC genes reduces liver cancer cell growth and survival[J]. Epigenetics, 2020, 15(12): 1302-1318.
- [7] KINDRAT I, TRYNDYAK V, DE CONTI A, et al. MicroRNA-152-mediated dysregulation of hepatic transferrin receptor 1 in liver carcinogenesis[J]. Oncotarget, 2016, 7(2): 1276-1287.
- [8] WEI J, NAI G Y, DAI Y, et al. Dipetidyl peptidase-4 and transferrin receptor serve as prognostic biomarkers for acute myeloid leukemia[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(17): 1381.

- [9] YANG C, LI J, GUO Y, et al. Role of TFRC as a novel prognostic biomarker and in immunotherapy for pancreatic carcinoma[J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9:756895.
- [10] 林彦瑜.通督针法结合颤三针治疗帕金森病的临床研究[D].广东:广州中医药大学,2018.
- [11] 徐敏.星形胶质细胞对额叶损伤致抑郁症大鼠模型的神经修复作用[D].江苏:苏州大学,2018.
- [12] BELAIDI A A, BUSH A I. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics[J]. *J Neurochem*, 2016, 139 Suppl 1:179-197.
- [13] 陈峻逸,杨翔,方学贤,等.铁死亡与重大慢性疾病[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2020, 49(1):44-57.
- [14] 张钰涵,苏凯奇,刘昊,等.铁死亡机制及其在血管性认知障碍中的作用[J]. *医学研究生学报*, 2022, 35(2):190-195.
- [15] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: process and function[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3):369-379.
- [16] 张选明.芳香新塔花总黄酮保护内皮细胞、抑制炎症反应的抗动脉粥样硬化作用及机制研究[D].新疆维吾尔自治区:新疆医科大学,2018.
- [17] VINCHI F, PORTO G, SIMMELBAUER A, et al. Atherosclerosis is aggravated by iron overload and ameliorated by dietary and pharmacological iron restriction[J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(28):2681-2695.
- [18] 王曼,丁家望,汪心安,等.铁死亡与动脉粥样硬化[J]. *生命的化学*, 2022, 42(2):259-266.
- [19] 付长龙,梅阳阳,李西海,等.H型血管铁死亡对骨质疏松性关节炎的影响及调节机制研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(1):139-142.
- [20] XIAO F J, ZHANG D, WU Y, et al. miRNA-17-92 protects endothelial cells from erastin-induced ferroptosis through targeting the A20-ACSL4 axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 515(3):448-454.

[收稿日期:2022-06-13]

[责任编辑:向秋 英文编辑:阳雨君]