

SRSF1调控人胚胎干细胞向造血分化

黄鑫 王鼎 佟静媛 高洁 刘金花 李亚朴* 石莉红*

(中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 北京协和医学院, 实验血液学国家重点实验室, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 天津 300020)

摘要 可变剪接属于转录后调控, 通过调控细胞增殖、分化等生物学过程影响细胞的命运决定与谱系分化。现有研究表明, 剪接相关因子在造血发育过程中发挥重要作用, 但剪接因子 *SRSF1* 在早期造血分化过程中是否有功能仍然未有报道。早期的研究证实, 剪接因子 *SRSF2* 可通过调控 *NUMB* 的可变剪接影响生血内皮细胞产生。在人胚胎干细胞造血分化模型不同阶段细胞的RNA-seq以及RT-qPCR数据均表明, *SRSF2* 与 *SRSF1* 在造血分化过程中的表达模式相似, 在生血内皮产生阶段表达变化最显著。为了探究 *SRSF1* 在造血分化过程中是否影响生血内皮细胞的产生, 该研究构建了诱导性过表达 *SRSF1* 的人胚胎干细胞稳定株, 发现过表达 *SRSF1* 促进生血内皮细胞的产生; 并且通过RNA干扰技术在生血内皮细胞产生阶段敲低剪接因子 *SRSF1*, 发现敲低 *SRSF1* 能抑制生血内皮细胞的产生。通过可变剪接体外报告系统证实剪接因子 *SRSF1* 能够结合到 *NUMB* exon 9 上的相关位点并且促进 *NUMB* 短转录本的产生。该研究证实, *SRSF1* 能够影响生血内皮阶段, 这可能是通过调控 *NUMB* 的可变剪接完成的, 为生血内皮的产生提供了另一项理论依据。

关键词 *SRSF1*; *NUMB*; 生血内皮细胞; 可变剪接

SRSF1 Regulates Hematopoietic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells

HUANG Xin, WANG Ding, TONG Jingyuan, GAO Jie, LIU Jinhua, LI Yapu*, SHI Lihong*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract Alternative splicing is a post-transcriptional process which impacts cell fate decision and lineage differentiation via regulating cell proliferation and differentiation. The prior study revealed splicing factor *SRSF2* modulated the generation of HE (hemogenic endothelial cells) mainly through alternative splicing of *NUMB* transcripts during inducing hematopoietic differentiation from hESCs (human embryonic stem cells). Despite *SRSF1* shared the similar expression pattern as *SRSF2*, its role in early hematopoietic differentiation is still largely unknown. In order to explore whether *SRSF1* affects the production of HE during hematopoietic differentiation, this study constructed an inducible stable cell line of hESCs with overexpressed *SRSF1* and found that overexpression of *SRSF1* promoted the production of HE. In addition, knockdown of *SRSF1* during the generation of HE by RNA interference technology can inhibit the production of HE. *SRSF1* can bind to *NUMB* exon 9 and promote the pro-

收稿日期: 2021-02-19

接受日期: 2021-04-22

国家重点研发计划“干细胞与转化研究”(批准号: 2017YFA0103100、2017YFA0103102)和国家自然科学基金(批准号: 81870089、81890990)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23909448, E-mail: liyapu@ihcams.ac.cn; shilihongxys@ihcams.ac.cn

Received: February 19, 2021

Accepted: April 22, 2021

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China Stem Cell and Translational Research (Grant No.2017YFA0103100, 2017YFA0103102), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81870089, 81890990)

*Corresponding authors. Tel: +86-22-23909448, E-mail: liyapu@ihcams.ac.cn; shilihongxys@ihcams.ac.cn

duction of *NUMB* short isoform, which were confirmed by the vitro alternative splicing reporter system. This study confirmed that *SRSF1* could affect the production of hemogenic endothelial cells, possibly by regulating the alternative splicing of *NUMB*.

Keywords *SRSF1*; *NUMB*; hemogenic endothelial cells; alternative splicing

人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)能够自我更新并且产生几乎所有的细胞和组织类型^[1-3],是体外研究早期造血发育的有效细胞模型^[4]。在个体生长发育过程中,造血干细胞的发育及成熟是一个连续且又具有阶段性特征的过程,具有严格的阶段特异性。胚胎干细胞分化形成侧板中胚层(lateral plate mesoderm, LPM),进而继续分化形成具有造血潜能的生血内皮细胞(hemogenic endothelial, HE),并通过内皮-造血转化(endothelial-to-hematopoietic transition, EHT)生成造血干/祖细胞(hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs)^[5],HSPCs通过自我更新与分化形成血液系统各谱系以维持个体生长发育过程中的成体造血系统^[6-7]。体外造血分化体系不仅为体外诱导具有生理功能的血细胞提供了可能,也为研究胚胎早期发育过程中造血调控机制提供了良好的基础^[8]。

RNA剪接是将pre-mRNA转化为成熟RNA的过程,很多pre-mRNA不只存在一种剪接形式,可以通过除去不同组合的内含子从而产生不同的mRNA,这一过程叫做可变剪接(alternative splicing, AS),约95%的人类多外显子基因能够发生可变剪接^[9]。可变剪接的产物被称为亚型,不同剪接亚型能够发挥不同的功能,如转录因子RUNX1的不同转录剪接体在造血过程中发挥不同作用,RUNX1a对于造血有正向调控作用^[10],RUNX1b能抑制造血细胞过度增殖从而将造血控制在合理水平^[11],而RUNX1c的表达下调却对HSPCs的产生几乎无影响^[12];并且越来越多的研究表明,参与可变剪接的组分在调控造血方面发挥重要作用。剪接体核心蛋白PRPF8突变会促进造血相关基因发生外显子跳跃事件,造血调节因子发生异位表达,并影响造血发育过程中的髓系分化^[13];剪接因子U2AF1与SRSF2的突变均能显著影响造血分化,U2AF1突变能明显增强HSPCs的红系命运选择,而SRSF2突变则能促使HSPCs向巨核细胞方向分化^[14]。在单层造血分化过程中,我们之前研究已表明,SRSF2通过调控NUMB的exon 9剪接实现对NOTCH信号通路的精准调控从而影响HE的产生^[15];另有研究表明,剪接因子SRSF1可以通

过激活ERK信号引起NUMB的exon 9剪接的变化,影响肺癌细胞的发生发展^[16]。SRSF1与SRSF2同属于SR蛋白家族,它是否与SRSF2有相似的功能不得而知。

剪接因子SRSF1通过调节基因的可变剪接参与肿瘤的发生发展已有诸多报道。ANCZUKOW等^[17]发现,SRSF1在乳腺肿瘤中表达上调,并且过表达SRSF1可以促进乳腺细胞的转化并影响肿瘤的发生。ZHOU等^[18]发现,剪接因子SRSF1通过PDK1/AKT和PAK/LIMK通路调控MYO1B基因的可变剪接增加了胶质瘤细胞的致瘤潜能。ZOU等发现^[19],在急性淋巴细胞白血病患者中SRSF1在初诊患者样品中表达上调,暗示SRSF1有可能在造血过程中发挥重要功能,而剪接因子SRSF1在早期造血发育过程中的作用尚不明确。

本研究基于人胚胎干细胞单层造血分化模型,通过RNA-seq数据分析发现,剪接因子SRSF1在生血内皮发生阶段表达显著变化。通过建立诱导型SRSF1稳定过表达人胚胎干细胞株证实,过表达SRSF1能够促进侧板中胚层向生血内皮细胞分化;利用RNA干扰技术对SRSF1进行阶段特异性敲低,结果表明,SRSF1的敲低在一定程度上抑制了生血内皮细胞的产生,提示SRSF1是调控生血内皮细胞产生的重要因子,并且证实SRSF1通过结合TGC CCC TGA TGC TGC T位点影响NUMB exon 9的剪接而促进NUMB产生短的亚型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 胚胎干细胞(H1)以及HEK293T细胞均购买于美国ATCC,并由本实验室保存。

1.1.2 实验材料 mTESR1细胞培养基以及无选择因子的mTESR1培养基购自STEMCELL Technologies公司;Y27632购自Calbiochem公司;细胞因子激活素A(Activin A)、骨形态发生蛋白4(bone morphogenetic protein, BMP4)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞

生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)均购自Peprotech公司; Matrigel基质胶、growth factors reduced(GFR) Matrigel基质胶均购自Corning公司; FBS、DMEM/F12、消化酶Accutase购自Gibco公司; Dispase购自BD公司; 抗体CD31、CD34购自eBioscience公司; 抗体FLAG购自Sigma公司; 抗体GAPDH购自Bioworld公司; 反转录试剂盒购自TransGen公司; 实时荧光定量PCR预混液PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix购自Thermo Fisher Scientific公司; Trizol、Lipofectamine Stem试剂、DTT均购自Invitrogen公司; SDS-PAGE上样缓冲液购自CWBio公司; TBE缓冲液购自Solarbio公司; 转染试剂Lipofectamine 3000、P3000购自Invitrogen公司; Opti-MEM购自Gibco公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人胚胎干细胞培养 把Matrigel基质胶提前包被至细胞培养板中, 将人胚胎干细胞接种至培养板, 培养条件为37 °C、5% CO₂, 培养基为mTESR1, 每24 h更换一次培养液。胚胎干细胞单细胞与克隆传代交替培养, 克隆传代有利于维持干细胞的干性, 单细胞传代有利于克隆均匀分布。克隆传代: 向细胞克隆中添加Dispase蛋白水解酶, 置于37 °C孵箱消化5 min左右, 待克隆边缘出现明亮卷边后, 用DMEM/F12洗去水解酶, 将1 mL枪尖剪掉尖锐部分防止对细胞物理损伤过大, 用已剪头枪尖刮下消化完毕的细胞克隆, 离心后用mTESR1重悬细胞, 根据所需密度种于培养板中。单细胞传代: 向细胞克隆中添加Accutase消化酶, 置于37 °C消化5 min左右, 待细胞呈现单个状态, 用DMEM/F12稀释酶, 将细胞悬液离心后用mTESR1重悬细胞, 并加入Y27632(10 μmol/L)促进细胞贴壁, 根据所需密度种于培养板中。

1.2.2 流式细胞术分析 弃细胞培养基后, 用Accutase酶(以覆盖培养板底部的量为标准)将细胞置37 °C消化成单细胞, 用PBS稀释酶, 300 ×g离心5 min后吸弃上清, 将细胞沉淀轻弹以分散悬起, 每1×10⁵个细胞用100 μL含2% FBS的PBS重悬, 再加入对应阶段的流式抗体, 置于4 °C避光标记30 min左右, 用1 mL PBS洗去抗体去除非特异性标记, 最后用200 μL左右PBS重悬细胞并将其转移至流式管中, 上机前5 min左右用DAPI标记死细胞。利用FACS Canto II flow cytometer进行分析检测。

1.2.3 Real-time quantitative PCR(RT-qPCR) 收集

细胞, 离心后用1 mL Trizol重悬细胞沉淀并使其裂解, 通过Trizol法提取总RNA, 不能及时提取RNA的样品应保存于-80 °C。RNA提取完成后运用Nano-drop测量浓度, 通过反转录试剂盒进行反转录, 随后进行RT-qPCR。选用β-actin为内参进行计算, 仪器选用QuantStudio5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), 所用引物见表1。

1.2.4 构建可诱导型过表达*SRSF1*人胚胎干细胞株 *SRSF1*的cDNA购于BGI公司, 并将其克隆至Tet-on诱导型Transposase PiggyBac转座子系统。利用Lipofectamine Stem转染试剂将*SRSF1*过表达质粒与转座子质粒Transposase共转染H1细胞, 转染24 h后用1 μg/mL的嘌呤霉素(puromycin)进行筛选, 之后每隔24 h更换一次培养基并持续药筛, 待细胞几乎不再死亡后进行实验, 大约需筛选10天左右。添加1 μg/mL DOX诱导细胞2.5天后检测GFP表达, GFP⁺达到90%的细胞为稳定细胞系, 用Western blot验证*SRSF1*过表达情况。

1.2.5 RNA干扰技术敲低*SRSF1*效率验证 *SRSF1*的siRNA购于苏州吉玛基因股份有限公司(siRNA序列见表2)。运用脂质体包裹的原理将siRNA转染进入H1细胞中, 12孔板每孔接种3×10⁴个细胞, 24 h后进行转染, 60 h后收样。转染体系如下: 混合液A为2 μL Lipofectamine 3000、37.5 μL Opti-MEM; 混合液B为37.5 μL Opti-MEM、1.25 μL P3000、2.5 μL siRNA。将A液加入B液, 充分混匀后静置5 min。将细胞培养基弃去80.8 μL保证siRNA的浓度, 均匀滴加80.8 μL混合溶液至孔中, 轻晃摇匀置于孵箱。

1.2.6 Western blot 将细胞用Accutase酶消化成单个细胞, 按照每1×10⁵个细胞用100 μL包含蛋白酶抑制剂以及含1 mmol/L DTT的NP40缓冲液裂解细胞, 置冰上裂解30 min左右, 4 °C条件下, 12 000 r/min离心10 min后留取蛋白质上清, 根据上清体积按照比例加入5× SDS-PAGE上样缓冲液, 100 °C煮10 min使蛋白变性, 待样品降至室温即可上样, 多余样品可保存至-80 °C。跑胶结束后, 将胶上蛋白转移至硝酸纤维素膜(NC膜)或者PVDF膜上, 转膜结束后用5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 随后孵育抗体。一抗用FLAG抗体, 摇床上室温孵育1 h后, 洗去一抗, 再用二抗(1:3 000)孵育1 h, 洗去抗体, 内参用GAPDH抗体。用化学发光成像仪(Bio-Rad)进行显影。

1.2.7 可变剪接报告系统 将*NUMB* exon 9的片段

(包括上游540个核苷酸到下游507个核苷酸的基因组片段)克隆至Exon Trap pET01 vector(由中国科学院的惠静毅老师惠赠),通过删除预测结合位点构建突变型(Mutant)。293T细胞以 3×10^5 个/孔的密度铺种于12孔板中,经24 h之后,将携带*NUMB* exon 9的野生型、对照组、突变型与*SRSF1*过表达质粒或对应的空载质粒共转染至293T细胞中,12~16 h后,加入1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的DOX,诱导*SRSF1*过表达36 h之后提取细胞总RNA,并用pET01 vector特异性引物反转录得到cDNA,通过pET01 vector特异性引物进行PCR扩增,用2%的TBE核酸胶进行跑胶,用凝胶成像分析仪进行拍照,并运用ImageJ软件对胶图各条带进行定量。所用引物序列见表3。

1.2.8 统计学分析 RNA-seq数据来源于GSE134907。本研究流式数据用FlowJo version 10进行处理,实验数据的统计分析以及作图利用 Graph-

Pad Prism 6.0完成,以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,采用*t*检验进行差异比较, $P < 0.05$ 界定为具有统计学意义。

2 结果

2.1 *SRSF1*在生血内皮产生阶段表达显著变化

诱导人胚胎干细胞进行单层造血分化具有阶段特异性,整个分化过程包括胚胎干细胞在day 0时退出多能状态,随后通过添加生长因子BMP4、Activin A在day 2时诱导产生以APLNR⁺为特征的侧板中胚层细胞;继续添加VEGF、bFGF在day 5时分化形成以CD31⁺CD34⁺为特征的生血内皮细胞,在day 8时分化形成CD31⁺CD43⁺造血干/祖细胞(图1A)。为探究*SRSF1*对造血分化的影响,本研究分析了单层造血分化过程中hESCs、APLNR⁺细胞、CD31⁺CD34⁺细胞、CD31⁺CD43⁺细胞的RNA-seq数

表1 RT-qPCR引物序列
Table 1 RT-qPCR primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>SRSF1</i> -F	CCG CAG GGA ACA ACG ATT G
<i>SRSF1</i> -R	GCC GTA TTT GTA GAA CAC GTC CT
<i>NUMB</i> -F	TCA GCA GAT GGA CTC AGA GTT
<i>NUMB</i> -R	AGG CTC TAT CAA AGT TCC TGT CT

表2 siRNA-*SRSF1*序列
Table 2 siRNA-*SRSF1* sequence

名称 Name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
si-Scramble-sense	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT
si-Scramble-antisense	ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT
si <i>SRSF1</i> #1-sense	CGG AAA GAA GAU AUG ACG U
si <i>SRSF1</i> #1-antisense	ACG UCA UAU CUU CUU UCC GTT
si <i>SRSF1</i> #2-sense	UAU CUG AAG AGA UGG AUU A
si <i>SRSF1</i> #2-antisense	UAA UCC AUC UCU UCA GAU ATT

表3 pET01-*NUMB*报告系统相关序列
Table 3 pET01-*NUMB* reporter system sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
ConstEx (pET01) F	GAT CCG CTT CCT GCC CCT G
ConstEx (pET01) R	TGC CGG GCC ACC TCC AGT G
pET01 cDNA primer	GAT CCA CGA TGC
pET01 <i>NUMB</i> exon 9 <i>Bam</i> H I-F	ATC GGG ATC CGG CTG GTC TCG AAC TCC TGA CCT C
pET01 <i>NUMB</i> exon 9 <i>Spe</i> I-R	ATC GAC TAG TCT GGA GTG CAG TGG CGC AAT CTT GGC TC

据, 分析显示, 与未分化细胞相比, *SRSF1* 在整个分化阶段动态表达, 并且在生血内皮阶段下降最为明显(图1B)。基于此结果, 本研究收集了分化过程中 day 0、day 2、day 5、day 8 各阶段细胞的RNA进行 RT-qPCR, 结果显示, *SRSF1* 基因的表达与RNA-seq 数据一致, 呈现动态变化, 整体呈下降趋势, 且在 day 5 的 $CD31^+CD34^+$ 生血内皮细胞生成阶段变化最显著(图1C)。以上结果提示, *SRSF1* 可能参与生血内皮细胞的调控。

2.2 *SRSF1* 在生血内皮产生阶段特异性过表达促进生血内皮细胞产生

RNA-seq 以及 RT-qPCR 结果表明, *SRSF1* 在生血内皮阶段表达显著下调。为了进一步探索剪接因子 *SRSF1* 对生血内皮细胞产生的作用, 我们采用基于 DOX 的 Tet-on 诱导过表达系统, 以 GFP 为指标, 建立了稳定过表达剪接因子 *SRSF1* 的 hESC 系(图 2A 和图 2B), 并且通过 Western blot 验证了 SRSF1 蛋白成功过表达(图 2C)。对过表达 *SRSF1* 的细胞株以及相应的空载细胞株诱导造血分化, 在分化的 day 2.5-5 添加 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ DOX 诱导 *SRSF1* 过表达(图 3A)。分化到 day 5 时, 检测 $CD31^+CD34^+$ 生血内皮细胞, 结果显示, 过表达 *SRSF1* 促进了生血内皮细胞的产生(图 3B 和图 3C)。

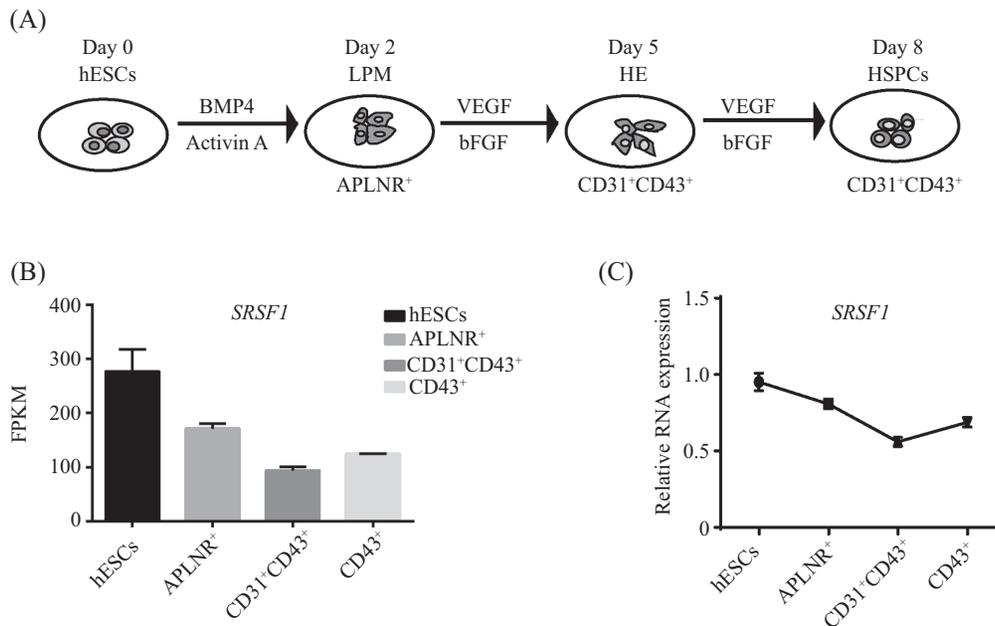
综上, *SRSF1* 在生血内皮阶段特异性过表达促进生血内皮产生, 证实 *SRSF1* 在生血内皮产生阶段确实发挥功能。

2.3 在生血内皮产生阶段敲低 *SRSF1* 抑制生血内皮细胞产生

为了研究 *SRSF1* 的缺失是否会影响生血内皮细胞的产生, 在单层造血分化进程的生血内皮产生起始阶段 day 2.5 进行 siRNA 转染, 使 *SRSF1* 在侧板中胚层分化形成生血内皮阶段特异性敲低(图 4A)。为了保证 siRNA 敲低效率, 我们首先在 H1 细胞中转染 *SRSF1* 的 siRNA, 收集转染 siRNA 60 h 后的蛋白, 通过 Western blot 验证了 SRSF1 蛋白成功敲低(图 4B)。检测在单层造血分化进程的 day 2.5 转入 siRNA 后, 分化到 day 5 时, $CD31^+CD34^+$ 生血内皮细胞的比例。结果表明, 敲低 *SRSF1* 抑制了生血内皮细胞的产生(图 4C 和图 4D)。综上, 剪接因子 *SRSF1* 敲低会抑制生血内皮的产生, 提示 *SRSF1* 是调控生血内皮细胞产生的重要因子。

2.4 *SRSF1* 调控 *NUMB* 可变剪接

我们之前的研究表明, *SRSF2* 通过调控 *NUMB* 可变剪接影响生血内皮细胞的生成^[15], 为探究 *SRSF1* 在造血分化过程中是否调控 *NUMB* 的可变剪

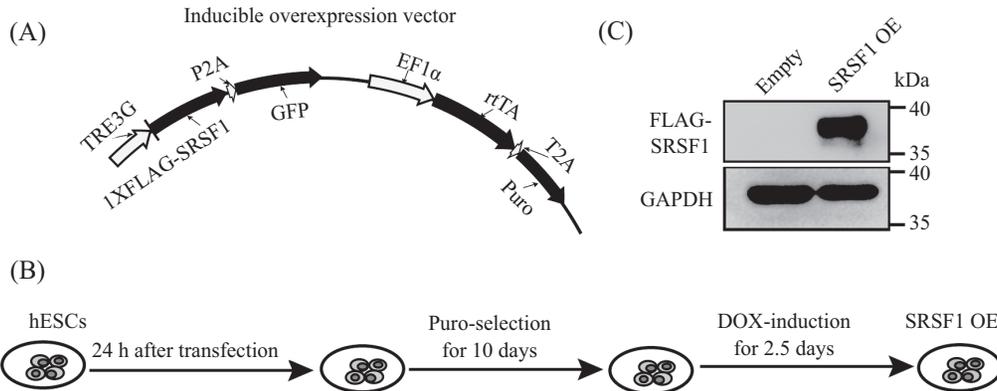


A: 人胚胎干细胞单层造血分化示意图; B: RNA-seq 分析 *SRSF1* 的 FPKM 值, $n=3$; C: RT-qPCR 检测 *SRSF1* 在单层造血分化过程中的表达情况, $n=3$ 。

A: schematic diagram of induced monolayer hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells; B: RNA-seq data showing FPKM value of *SRSF1*, $n=3$; C: the mRNA expression of *SRSF1* measured by RT-qPCR during monolayer hematopoietic differentiation process. $n=3$.

图1 *SRSF1* 在造血干/祖细胞产生过程中的表达变化

Fig.1 Changes in the expression of *SRSF1* during the production of hematopoietic stem progenitor cells



A: DOX诱导性*SRSF1*过表达系统; B: *SRSF1*过表达细胞株的构建与筛选; C: Western blot通过FLAG抗体验证*SRSF1*过表达, GAPDH抗体用作内参。
A: the *SRSF1* DOX-inducible overexpression system; B: construction and screening of *SRSF1* overexpression cell line; C: Western blot confirmed the *SRSF1* overexpression upon DOX induction with anti-FLAG antibody. The loading control was GAPDH.

图2 剪接因子*SRSF1*的诱导型过表达稳定细胞株的构建

Fig.2 Construction of splicing factor *SRSF1* inducing overexpression stable cell line

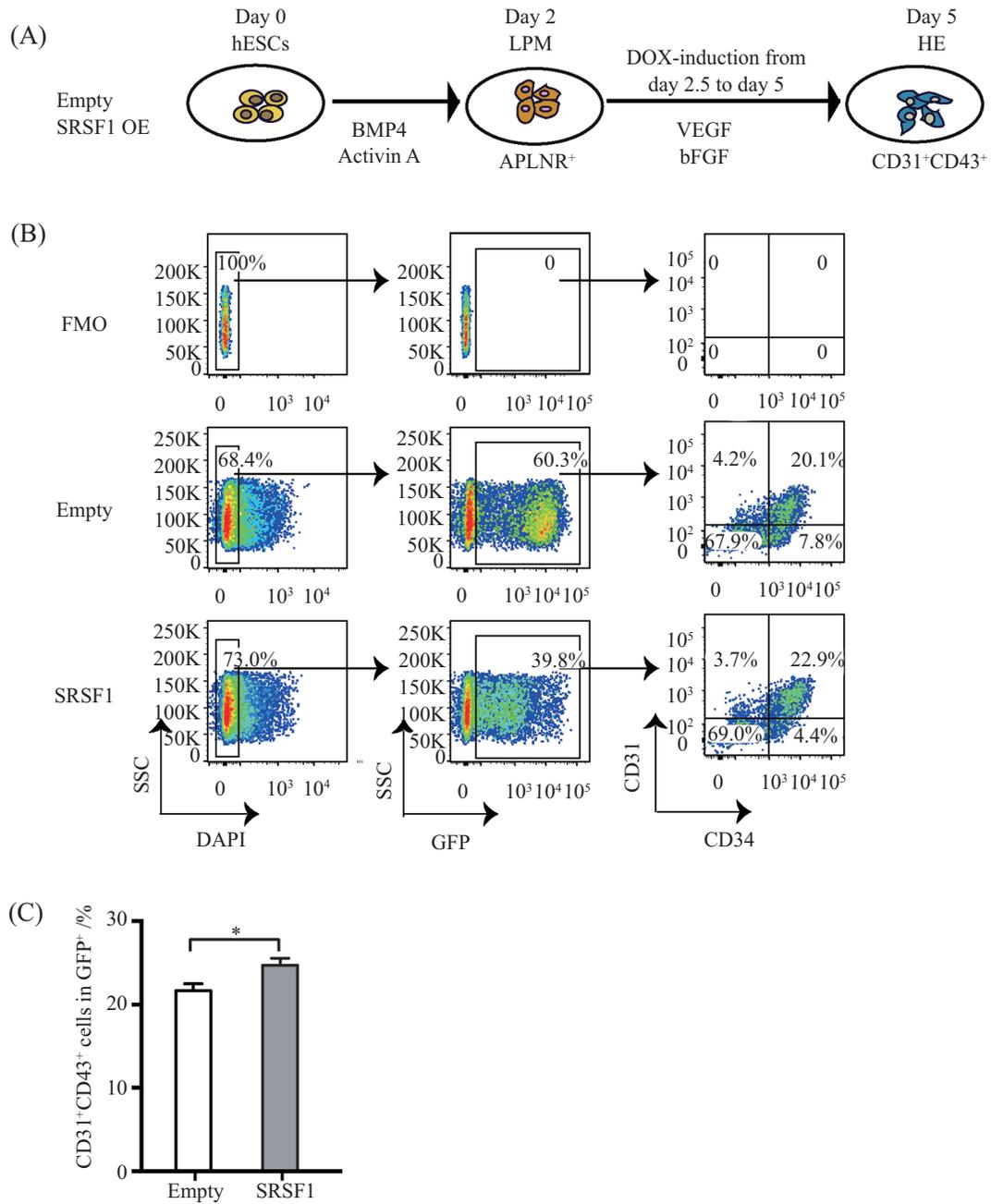
接,本研究使用RBPmap对*NUMB* exon 9进行剪接基序预测,基序分析结果显示,*NUMB* exon 9存在可能的*SRSF1*结合位点(图5A,标记为Mut)。本研究采用可变剪接报告系统验证*SRSF1*是否通过预测的基序调控*NUMB* exon 9。首先,我们将*NUMB*的报告质粒WT(野生型)、Control(对照组)和Mutant(片段缺失组)分别克隆至报告载体;之后,再将*SRSF1*过表达质粒分别与*NUMB*的报告质粒共转染进入293T细胞。Western blot实验结果证实,*SRSF1*在293T细胞中成功过表达(图5B)。过表达*SRSF1*后*NUMB*短的转录本明显增多,敲除预测的结合位点则促进效应消失,证实*SRSF1*通过结合*NUMB* exon 9,促进exon 9的剪接,最终促进*NUMB*短的转录本的产生(图5C和图5D);并且我们之前的研究^[15]已证明,*NUMB*短的转录本促进生血内皮的产生。暗示*SRSF1*可通过促进*NUMB*短的转录本的产生来促进生血内皮的发生。

3 讨论

胚胎干细胞是用于研究早期胚胎发育的理想模型,可以通过外界的信号刺激与基因调控网络的共同作用将胚胎干细胞诱导成造血干/祖细胞。不仅为研究动物早期造血提供模型,而且可以增加造血干细胞的来源以解决造血干细胞移植排斥等问题。但胚胎干细胞目前仍存在分化方向以及分化效率难以控制等难题,限制了其研究以及应用价值。因此,对人胚胎干细胞造血分化调控的相关机制仍有待深入探讨。

本研究旨在探索剪接因子*SRSF1*对造血分化的影响。基于人胚胎干细胞单层造血分化模型结合已发表的RNA-seq转录组测序数据,发现*SRSF1*在生血内皮产生阶段表达显著变化,RT-qPCR结果也证实了造血分化过程中*SRSF1*在生血内皮阶段变化最明显。为了探究*SRSF1*在生血内皮细胞产生过程中的功能,本研究利用基于DOX的Tet-on诱导过表达系统建立诱导型*SRSF1*稳定过表达的人胚胎干细胞株,经流式细胞术分析表明,过表达*SRSF1*能在一定程度上促进生血内皮细胞的发生;进一步利用RNA干扰技术对*SRSF1*进行阶段特异性敲低,发现敲低*SRSF1*抑制生血内皮的产生,提示*SRSF1*是调控生血内皮细胞产生的重要因子。

*NUMB*是NOTCH信号通路的负调控因子^[20],含有磷酸酪氨酸结合结构域(phosphotyrosine binding domain, PTB)和富脯氨酸结构域(proline rich region, PRR),根据这两种功能结构域长度的不同表现出多种可变剪接亚型^[21],对于决定细胞命运扮演着重要角色^[22]。根据*NUMB*的亚型是否包含PRR部分结构域(编码48个氨基酸的9号外显子),将其定义为目前研究最为广泛的两种长短不同的亚型^[22]。CHENG等^[23]证实,*NUMB*通过调控经典的Wnt以及Notch信号通路的相互作用影响原始红细胞的发育;并且之前我们的研究表明,在造血分化过程中,剪接因子*SRSF2*可以结合于*NUMB* exon 9上的TACTGCT位点从而促进*NUMB* exon 9的保留,形成长的*NUMB*亚型,最终调控生血内皮的发生^[15]。本研究利用可变剪接报告系统证实了*SRSF1*可以通过结合*NUMB*



A: 过表达*SRSF1*调控生血内皮细胞的实验设计示意图; B: 流式检测过表达*SRSF1*后单层造血分化day 5时CD31⁺CD34⁺细胞比例的代表性结果; C: 流式检测(B图) CD31⁺CD34⁺细胞比例的统计结果, $n=3$ 。* $P<0.05$ 。

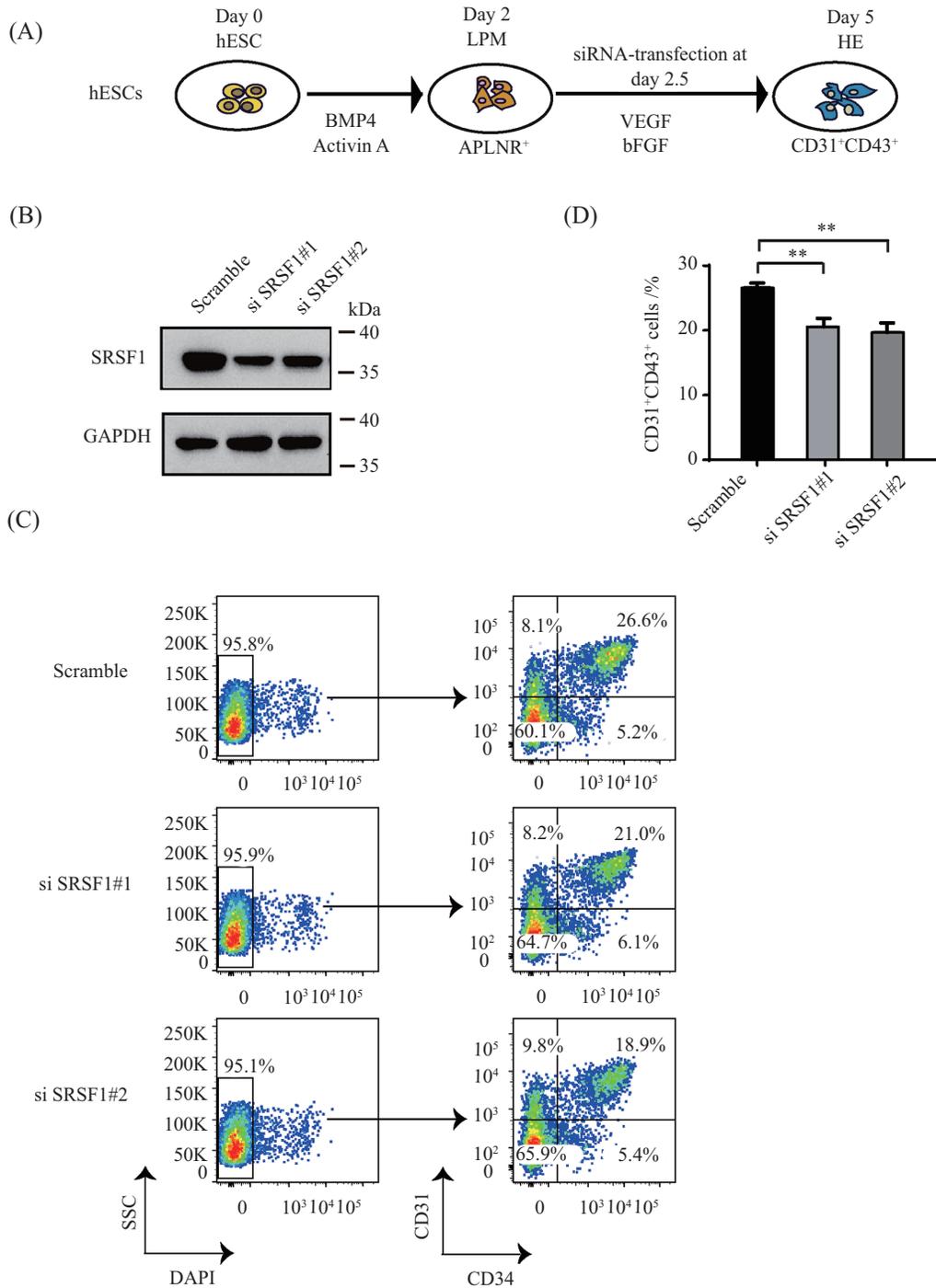
A: schematic diagram of experimental design to verify the regulation of *SRSF1* overexpression in hemogenic endothelial cells; B: the representative FACS plots show the frequency of CD31⁺CD34⁺ cells at day 5 hematopoietic differentiation with *SRSF1* overexpression; C: the bar graph representing the percentage of CD31⁺CD34⁺ cells from figure B. $n=3$. * $P<0.05$.

图3 过表达剪接因子*SRSF1*促进生血内皮细胞的产生

Fig.3 Overexpression of the splicing factor *SRSF1* promotes HE specification

exon 9上的TGC CCC TGA TGC TGC T位点促进 exon 9的剪接, 形成短的*NUMB*亚型。暗示SR家族的成员可能发挥不同的功能。除此之外, 在造血分化过程中, 剪接因子*SRSF1*除了能够通过调控*NUMB*的可变剪接影响生血内皮产生外, 是否还可以通过调控其他基因来发挥功能仍需要更加深入的研究。

综上所述, 本研究证实*SRSF1*是人胚胎干细胞单层造血分化过程中生血内皮阶段的重要调控因子, 增强了目前对于剪接因子*SRSF1*相关调控的认识, 为探索*SRSF1*促进hESCs造血分化的分子机制提供了参考, 也为优化诱导hESCs定向造血分化提供了依据, 由于SR家族有许多成员, 其他成员是否同



A: 阶段特异性敲低*SRSF1*实验设计示意图; B: Western blot验证*SRSF1*蛋白敲低, GAPDH作为内参; C: 流式检测阶段特异性敲低*SRSF1*后单层造血分化day 5时CD31⁺CD34⁺细胞比例的代表性结果; D: 流式检测(C图)CD31⁺CD34⁺细胞比例的统计结果, $n=3$. ** $P<0.01$ 。

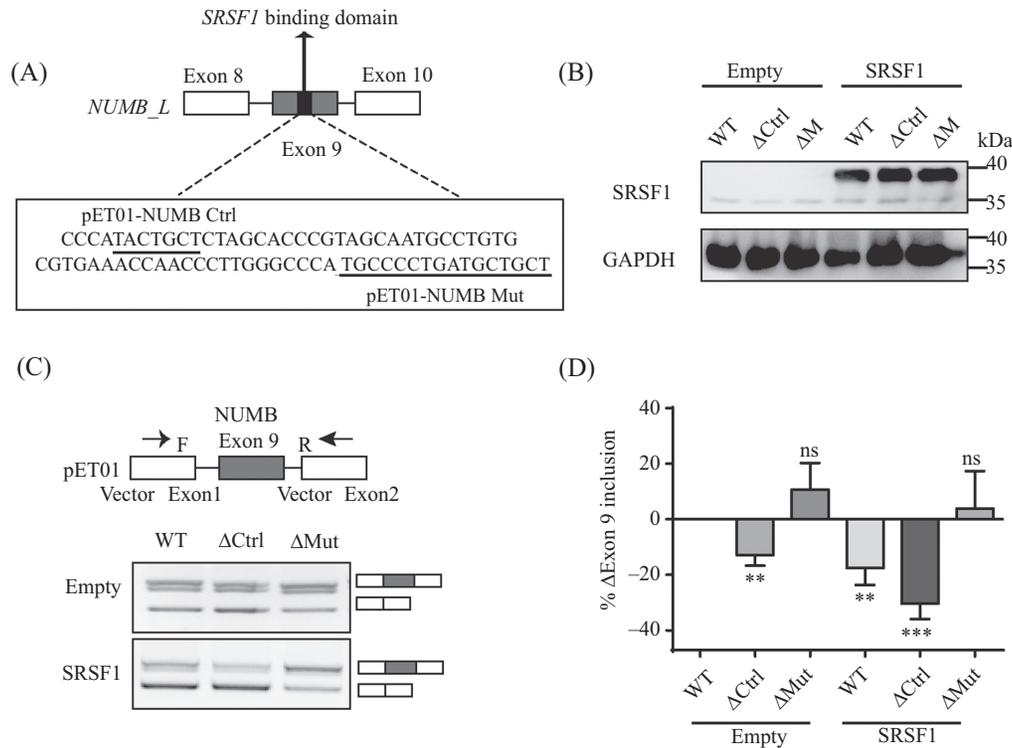
A: schematic diagram of stage specific knockdown of *SRSF1*; B: the Western blot shows the depletion of *SRSF1* by siRNA. GAPDH acts as the loading control. C: the representative FACS plots show the frequency of CD31⁺CD34⁺ cells at day 5 hematopoietic differentiation with *SRSF1* stage specific knockdown; D: the bar graph representing the percentage of CD31⁺CD34⁺ cells from figure C. $n=3$. ** $P<0.01$.

图4 阶段特异性地敲低剪接因子*SRSF1*抑制生血内皮细胞的产生

Fig.4 Stage-specific knockdown of splicing factor *SRSF1* inhibited HEPs generation

样在造血发育早期发挥重要功能有待进一步研究。另外, *SRSF1*能够促进生血内皮细胞产生, 但是其表达却是下调的, 暗示了在体外培养条件下, 存在某些

抑制因子阻碍了*SRSF1*表达。将来如果能够找到相关靶点, 从而实现在生血内皮产生阶段调控*SRSF1*的表达, 则有可能大大提高体外获得生血内皮细胞



A: RBPmap预测*NUMB* exon 9上*SRSF1*的基序结合位点(标记为Mut, Ctrl为对照); B: *SRSF1*与*NUMB*报告质粒(WT、Control、Mutant)在293T细胞中共转染后, Western blot验证*SRSF1*的过表达情况(*NUMB_L*代表包含exon 9的转录本); C: 可变剪接报告基因分析表明*SRSF1*促进*NUMB*短的亚型的产生。上图显示了包含两个基础性外显子的pET01载体。下图代表共转染*SRSF1*与*NUMB*报告质粒后*NUMB* exon 9经PCR扩增后的代表性电泳图, 显示了*NUMB*两种亚型的表达; D: 图C中电泳图示意的*NUMB* exon 9的保留的统计结果, $n=3$ 。ns代表无显著性差异, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: RBPmap predicts the motif binding sites of *SRSF1* on *NUMB* exon 9 (labeled as Mut, Ctrl means control); B: *SRSF1* and *NUMB* report plasmid (WT, Control, Mutant) were co-transfected with 293T cells, and the overexpression of *SRSF1* was verified by Western blot; C: a splicing reporter assay showing *SRSF1* promoted the production of *NUMB* short isotype. The upper panel showing the pET01 vector containing two basic exons. The representative PCR electropherogram showing the expression of two *NUMB* isoforms after *NUMB* reporter plasmids co-transfected with or without *SRSF2* overexpression; D: the bar graph showing the normalized exon 9 inclusion indicated by electrophoresis in figure C. $n=3$. ns represents no statistical difference, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图5 剪接因子*SRSF1*调节*NUMB* exon 9的剪接
Fig.5 Splicing factor *SRSF1* modulates *NUMB* exon 9 splicing

的效率, 为将来临床研究提供足够的材料。

参考文献 (References)

- [1] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-7.
- [2] REUBINOFF B E, PERA M F, FONG C Y, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(4): 399-404.
- [3] YOUNG R A. Control of the embryonic stem cell state [J]. *Cell*, 2011, 144(6): 940-54.
- [4] CHOI K D, VODYANIK M A, TOGARRATI P P, et al. Identification of the hemogenic endothelial progenitor and its direct precursor in human pluripotent stem cell differentiation cultures [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(3): 553-67.
- [5] SLUKVIN I I. Hematopoietic specification from human pluripotent stem cells: current advances and challenges toward de novo generation of hematopoietic stem cells [J]. *Blood*, 2013, 122(25): 4035-46.
- [6] SWIERS G, BAUMANN C, O'ROURKE J, et al. Early dynamic fate changes in haemogenic endothelium characterized at the single-cell level [J]. *Nat Commun*, 2013, 4(1): 2924.
- [7] CUMANO A, GODIN I. Ontogeny of the hematopoietic system [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141538.
- [8] TRACEY W D, J R, PEPLING M E, HORB M E, et al. A Xenopus homologue of aml-1 reveals unexpected patterning mechanisms leading to the formation of embryonic blood [J]. *Development*, 1998, 125(8): 1371-80.
- [9] PAN Q, SHAI O, LEE L J, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(12): 1413-5.
- [10] BOISSET J C, ROBIN C. Imaging the founder of adult hematopoiesis in the mouse embryo aorta [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(13): 2489-90.
- [11] LAM E Y, HALL C J, CROSIER P S, et al. Live imaging of Runx1 expression in the dorsal aorta tracks the emergence of

- blood progenitors from endothelial cells [J]. *Blood*, 2010, 116(6): 909-14.
- [12] HUBER T L, KOUSKOFF V, FEHLING H J, et al. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo [J]. *Nature*, 2004, 432(7017): 625-30.
- [13] KEIGHTLEY M C, CROWHURST M O, LAYTON J E, et al. *In vivo* mutation of pre-mRNA processing factor 8 (Prpf8) affects transcript splicing, cell survival and myeloid differentiation [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(14): 2150-7.
- [14] BAPAT A, KEITA N, MARTELLY W, et al. Myeloid disease mutations of splicing factor SRSF2 cause G2-M arrest and Skewed differentiation of human hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Stem Cells*, 2018, 36(11): 1663-75.
- [15] LI Y, WANG D, WANG H, et al. A splicing factor switch controls hematopoietic lineage specification of pluripotent stem cells [J]. *EMBO Rep*, 2020, doi: 10.15252/embr.202050535.
- [16] RAJENDRAN D, ZHANG Y, BERRY D M, et al. Regulation of Numb isoform expression by activated ERK signaling [J]. *Oncogene*, 2016, 35(39): 5202-13.
- [17] ANCZUKOW O, AKERMAN M, CLERY A, et al. SRSF1-regulated alternative splicing in breast cancer [J]. *Mol Cell*, 2015, 60(1): 105-17.
- [18] ZHOU X, WANG R, LI X, et al. Splicing factor SRSF1 promotes gliomagenesis via oncogenic splice-switching of MYO1B [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(2): 676-93.
- [19] ZOU L, ZHANG H, DU C, et al. Correlation of SRSF1 and PRMT1 expression with clinical status of pediatric acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2012, 5(1): 42.
- [20] MCGILL M A, DHO S E, WEINMASTER G, et al. Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1 [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(39): 26427-38.
- [21] VERDI J M, BASHIRULLAH A, GOLDHAWK D E, et al. Distinct human NUMB isoforms regulate differentiation vs. proliferation in the neuronal lineage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(18): 10472-6.
- [22] YAN B. Numb—from flies to humans [J]. *Brain Dev*, 2010, 32(4): 293-8.
- [23] CHENG X, HUBER T L, CHEN V C, et al. Numb mediates the interaction between Wnt and Notch to modulate primitive erythropoietic specification from the hemangioblast [J]. *Development*, 2008, 135(20): 3447-58.