

SNRPA1对肝癌的成瘤性的调控机制

冯璟^{1,2} 王俊平² 柴宝峰^{1*}

(¹山西大学黄土高原研究所, 太原 030006; ²山西医科大学附属人民医院消化科, 山西省消化病研究所, 太原 030012)

摘要 小核核糖核蛋白(small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A, SNRPA1)参与mRNA加工剪接体(spliceosome)的组装,与多种肿瘤的发生有关,但在肝癌发生发展过程中的分子机制尚不明确。该研究利用基因芯片技术探究SNRPA1敲减后肝癌细胞信号通路关键基因的表达动态,及其在裸鼠肿瘤发生发展中的分子机制。研究结果显示,与对照组相比,SNRPA1基因敲减后的低表达组裸鼠的荷瘤细胞的生长受到显著抑制;基因芯片分析表明,SNRPA1的敲低导致462个基因的表达下调,262个基因的表达上调。qRT-PCR分析表明,FSTL1、FGF2、JAK2、WNT5A和PPM1A基因表达均有所降低,而Western blot分析进一步证实FSTL1、JAK2、WNT5A蛋白质表达的下调。以上结果可知,SNRPA1作为促癌基因,可能通过调控多种基因的表达及信号通路对肝细胞肝癌的发生和发展进行调控。

关键词 小核核糖核蛋白;肝细胞肝癌;成瘤性;基因芯片;信号通路

Regulation Mechanism of SNRPA1 on the Tumorigenicity of Hepatocellular Carcinoma

FENG Jing^{1,2}, WANG Junping², CHAI Baofeng^{1*}

(¹Institute of Loess Plateau, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; ²Department of Gastroenterology, Affiliated People's Hospital of Shanxi Medical University; Shanxi Institute of Gastroenterology, Taiyuan 030012, China)

Abstract SNRPA1 (small nuclear ribonucleoprotein A) is involved in assembly of mRNA-processed spliceosome and associated with tumorigenesis of many tumors. However, its function in the molecular mechanism for tumorigenicity of HCC (hepatocellular carcinoma) remains unclear. In this study, gene chip technology was used to explore the expression dynamics of key genes in HCC cell signaling pathway after SNRPA1 knockdown, and its molecular mechanism for regulating the development of HCC in nude mice. The results of optical *in vivo* imaging showed that the growth of SNRPA1 deleted HCC in nude mice was significantly inhibited compared with the control group. Gene chip analysis showed that knockdown of SNRPA1 led to 462 genes down-regulation and 262 genes up-regulation. qRT-PCR analysis showed that the expression of FSTL1, FGF2, JAK2, WNT5A and PPM1A were all decreased, while Western blot analysis further confirmed that the expression of FSTL1, JAK2, WNT5A were down-regulated. The above results show that SNRPA1, as a pro-oncogene, may be involved in the tumorigenicity and development of hepatocellular carcinoma through regulating multiple genes and signal pathways.

Keywords SNRPA1; hepatocellular carcinoma; tumorigenicity; gene chip; signal pathways

收稿时间: 2020-02-12 接受日期: 2020-03-02

国家自然科学基金(批准号: 31772450)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0351-7010700, E-mail: bfchai@sxu.edu.cn

Received: February 12, 2020 Accepted: March 2, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31772450)

*Corresponding author. Tel: +86-351-7010700, E-mail: bfchai@sxu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5247>

肝癌是全球第六大常见癌症,也是第四大死因,且患者以男性居多。在全球男性癌症中,发病率位列第五,死亡率位列第二。肝癌已经成为全球主要的健康问题,而其发病率以东亚及东南亚地区最高^[1]。肝癌的治疗手段目前还十分有限,预后不良,寻找肝癌治疗的新靶点具有重要意义和价值^[2]。肝细胞性肝癌的发生发展机制较为复杂,涉及多种信号转导通路,如经典的Wnt信号通路^[3]、核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路^[4]以及PTEN-PI3K/AKT信号通路^[5]。而非经典途径中,AKT-mTOR信号通路在肝癌发生、发展过程中发挥重要的调控作用^[6]。因此,研究这些信号途径在肝癌发生发展过程中的调控机制,有助于深入了解肝癌发生的分子机制。

SNRPA1(U2 small nuclear ribonucleoprotein A)参与了细胞核内前体mRNA加工过程中特异性剪接体(spliceosome)的组装、获取和维持^[12]。近年来多项研究表明,剪接体与癌症发展有关。在癌基因和肿瘤抑制基因的剪接位点,剪接体编码相关因子的突变或表达异常,可能导致癌症的发展、转移或耐药。这些已知的剪接相关基因包括U2小核RNA辅助因子1(U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1, *U2AF1*)^[7]、精氨酸/丝氨酸丰富剪接因子(serine/arginine-rich splicing factor, *SRSF*)^[8]、剪切因子3B亚基1(subunit 1 of splicing factor 3b, *SF3B1*)^[9]、跨膜糖蛋白(transmembrane glycoprotein)、*CD44*^[10]、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, *VEGF*)^[11]等。*SNRPA1*是U2 snRNPs的一个成员,与多种疾病和肿瘤的发生发展密切相关。*SNRPA1*在多种癌症中高表达,如在结直肠癌中可通过调控磷脂酰肌醇-3-激酶调节亚基(phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1, *PIK3R1*)、*VEGFC*、*MKI67*(marker of proliferation *Ki-67*)、周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, *CDKI*)等基因的表达促进肿瘤细胞的增殖^[11]。*SNRPA1*还通过调节神经生长因子(nerve growth factor, *NGF*)表达促进胃癌肿瘤细胞生长^[12]。本研究旨在通过基因芯片技术研究*SNRPA1*参与肝癌细胞发生发展过程中的信号通路的调控机制,为肝癌预防和临床治疗靶位的选择提供支持。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养与慢病毒感染

人正常肝细胞LO2和HCC细胞系BEL-7404(购

于美国Sigma公司,传代后冻存于液氮中),在含10%的胎牛血清(Gibco)和1%的青霉素-链霉素溶液的DEME培养基(Invitrogen)中培养。细胞在37 °C、5% CO₂培养箱培养,取对数生长期细胞进行实验。按5×10⁴个/孔接种于24孔板中,用含10% FBS的DMEM完全培养基培养。加入pGCSIL-GFP或Control-GFP组慢病毒进行感染。pGCSIL-GFP慢病毒用于敲减*SNRPA1*基因,Control-GFP组慢病毒作为对照。目标基因序列分别为shSNRPA1: 5'-TAC GTT AGA CCA GTT TGA T-3'和shCtrl: 5'-TTC TCC GAA CGT GTC ACG T-3'。轻轻混匀,感染12 h,然后换回常规培养基后继续培养。感染72 h后,荧光显微镜观察感染效果。

1.2 qRT-PCR检测*SNRPA1*基因敲低效率

取经过感染的细胞,用无菌PBS缓冲液冲洗3次,加入含10%胎牛血清的完全培养基终止消化。按照RNA提取试剂盒说明书提取shSNRPA1敲减组及shCtrl组细胞的总RNA。以总RNA为模板,参照反转录试剂盒(Promega M-MLV)说明书合成cDNA链。以cDNA为模板,进行qRT-PCR检测两组细胞*SNRPA1*基因及内参基因*GAPDH*的表达。其中,*SNRPA1*与*GAPDH*基因扩增的上游引物序列分别为:5'-TGA CTT CAA CAG CGA CAC CCA -3'和5'-AAA GTT CCG CAA GTC AGA GTA C-3';下游引物分别为5'-CAC CCT GTT GCT GTA GCC AAA-3'和5'-ACC AGC ACC TGG ATT AAA AGT-3'。PCR反应程序为:95 °C 5 s,60 °C 30 s,进行40个循环,分析结果以2^{-ΔΔCt}反映各样品相对shCtrl组样品*SNRPA1*基因的相对表达水平。

1.3 实验动物

一级4周龄BALB/c-nu雌性裸鼠20只,体质量(18.0±3.6) g,购自北京斯贝福生物技术有限公司(动物许可证号91110229567461772F)。动物实验得到山西省人民医院伦理委员会批准。

1.4 裸鼠皮下成瘤观察敲低*SNRPA1*对肿瘤生长的影响

取对数期携带Luciferase载体的shSNRPA1或shCtrl组BEL-7404细胞,以4×10⁶个细胞/只在裸鼠右侧背部皮下注射接种,建立裸鼠异位移植瘤模型,每组10只。7天后观察成瘤情况,并用游标卡尺测量肿瘤长径(A)及其最大垂直正交径(B),每周测量1次,共测量5次,并计算肿瘤大小,肿瘤体积=π/6×A×B²。

1.5 小动物活体成像检测

造模后4周后对动物进行活体成像,每只裸鼠

腹腔注射15 mg/mL *D*-荧光素(*D*-Luciferin)溶液, 20 min后使用活体成像仪自带气体麻醉系统对裸鼠进行异氟烷气体麻醉, 将昏迷动物放入小动物活体成像仪的暗室中进行扫描成像, 观察荧光。实验结束后对实验动物注射过量2%戊巴比妥钠安乐死, 并颈椎脱臼确认死亡, 取出两组裸鼠肿瘤, 并分别称重。

1.6 基因芯片分析

按前述方法提取*SNRPA1*基因敲减的BEL-7404细胞, 以及阴性对照细胞株的总RNA, 送上海吉凯生物有限公司进行基因芯片检测, $P < 0.05$ 及FC(fold change) > 1.5 , 表示差异具有统计学意义。

1.7 qRT-PCR检测下游基因表达

根据芯片分析结果, 挑选表达差异最显著、表达丰度高的基因, 进行qRT-PCR验证, 检测两组细胞卵抑素样蛋白1(follistatin like protein 1, *FSTL1*)、*FGF2*、*JAK2*(Janus kinase 2)、*WNT5A*和*PPM1A*基因的表达差异。其中, *FSTL1*、*FGF2*、*JAK2*、*WNT5A*和*PPM1A*的上游引物序列分别为: 5'-TCA ACC CAT CTT TCA ACC CTC-3', 5'-GTC TAT CAA AGG AGT GTG TGC-3', 5'-ATC CAC CCA ACC ATG TCT TCC-3', 5'-TCG ACT ATG GCT ACC GCT TTG-3', 5'-GCA GGT GGC TCT GTA ATG ATT C-3'; 下游引物分别为: 5'-CCC TTC TGA TTC TTT CCG TCA-3', 5'-TGC CCA GTT CGT TTC AGT G-3', 5'-ATT CCA TGC CGA TAG GC TCTG-3', 5'-CAC TCT CGT AGG AGC CCT TG-3', 5'-TTC AGG CTC TGG

TGA GAC AAG-3'。PCR反应程序为: 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 进行40个循环, 分析结果, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 反映各*SNRPA1*基因敲减样品相对shCtrl组样品各基因的相对表达水平。

1.8 细胞蛋白提取及Western blot检测相关蛋白表达

使用裂解缓冲液(Beyotime)裂解细胞, 并测量蛋白质浓度, 使用BCA蛋白测定试剂盒(Beyotime)。取40 μ g蛋白样品经12% SDS-PAGE进行蛋白分离, 转移至PVDF膜(美国Millipore)。用5%脱脂奶粉在室温下封闭1 h, 一抗4 °C孵育过夜。FSTL1、FGF2、JAK2、WNT5A、PPM1A、GAPDH抗体和二抗体均购自Santa Cruze公司。

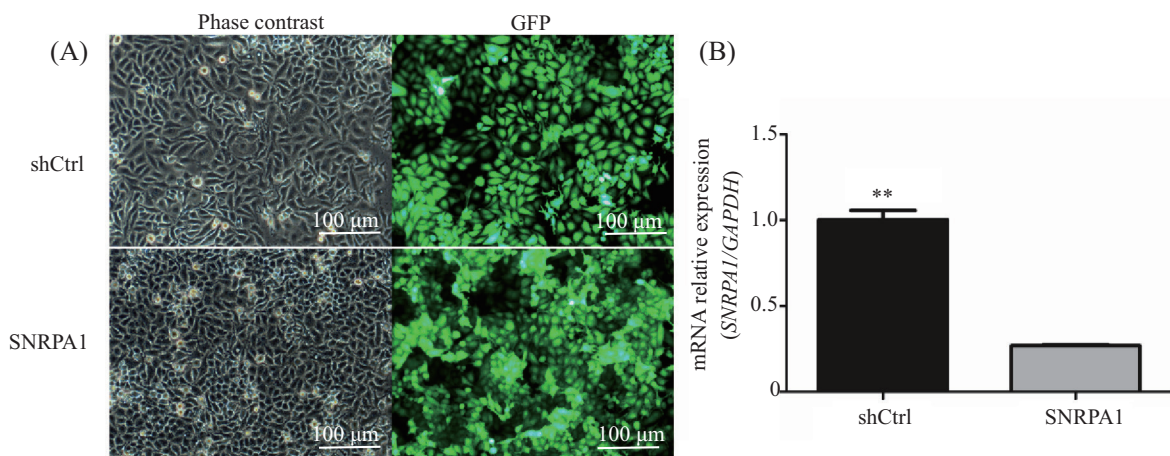
1.9 统计学方法

采用Graph Pad Prism 7绘制肿瘤体积变化曲线图及相关柱状图, 计数资料以例数(*n*)进行描述, 数据表示为平均值 \pm 标准误, 采用Student's *t*检验分析组间差异, 两组以上检验采用单向方差分析进行描述。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒感染肝癌细胞敲减*SNRPA1*表达

通过慢病毒感染敲低*SNRPA1*在BEL-7404细胞中的表达, shCtrl作为对照组, 荧光显微镜下观察GFP荧光, 发现两组细胞荧光表达率均超过90%, 表明实验中肝癌细胞的慢病毒转染成功(图1A)。qRT-



A: 慢病毒转染后两组荧光表达效率; B: 慢病毒转染后两组*SNRPA1*表达情况。** $P < 0.01$, 与shCtrl相比。

A: luciferase expressing efficiency after transfected with lentivirus shSNRPA1 or shCtrl; B: expression of *SNRPA1* gene after transfected with lentivirus shSNRPA1 or shCtrl. ** $P < 0.01$ vs shCtrl.

图1 用含有shSNRPA1的慢病毒转染敲减*SNRPA1*基因表达

Fig.1 Analysis of *SNRPA1* gene expression in BEL-7404 cells transfected with lentivirus shSNRPA1

PCR检测两组细胞中*SNRPA1*及内参*GAPDH*基因转录水平mRNA表达量的差异,结果显示,慢病毒感染后*SNRPA1*基因表达敲减效率达到72.9%($n=3$, $**P<0.01$)(图1B)。结果表明,慢病毒*SNRPA1*敲减方法能够显著降低*SNRPA1*基因在肝癌细胞中的表达。

2.2 敲低*SNRPA1*抑制体内肿瘤生长

为了研究*SNRPA1*的致癌性,我们采用了裸鼠异种种植模型,20只裸鼠均造模成功,实验过程中无一例动物死亡(图2A)。两组裸鼠均于造模后一周触及肿块,且肿瘤体积随时间延长逐渐增大。统计分析结果显示,*SNRPA1*敲低显著抑制了BEL-7404细胞的增殖,*SNRPA1*组瘤体体积及重量均显著小于对照组($n=10$, $*P<0.05$)(图2B和图2C)。这表明,*SNRPA1*与体内肝癌细胞的增殖能力密切相关。

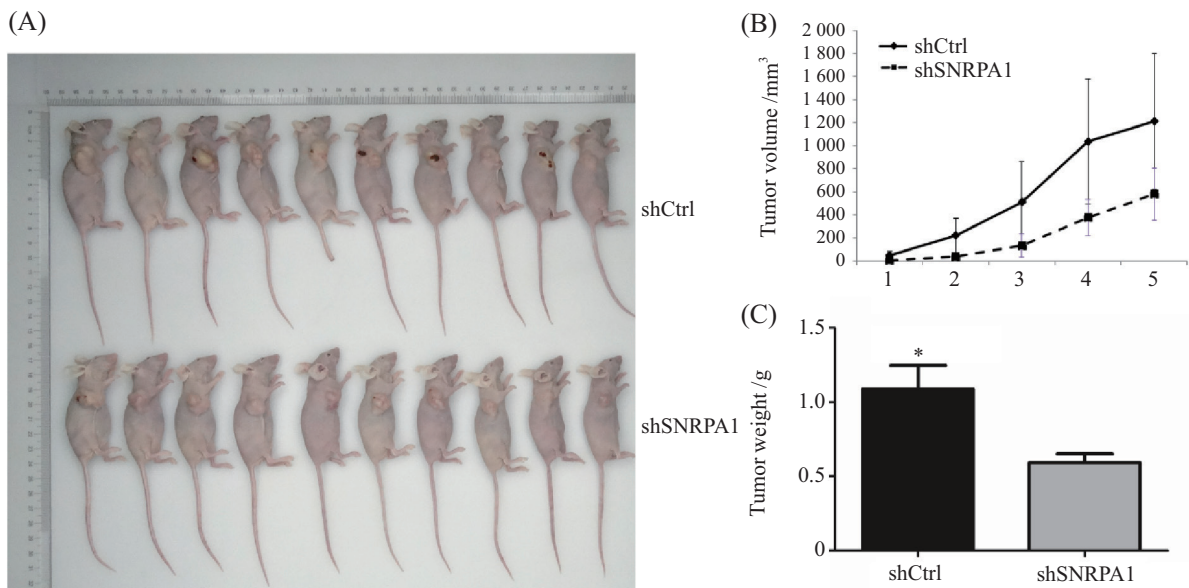
造模4周后对两组裸鼠进行动物活体成像检测,比较两组裸鼠体内荧光信号表达的强弱。结果显示,与shCtrl组相比,*SNRPA1*敲减组裸鼠体内荧光表达量显著降低($n=10$, $**P<0.01$)(图3和图4)。表明肿瘤细胞在裸鼠体内的生长受到显著抑制。

2.3 *SNRPA1*敲减可能通过多种途径调控肝细胞肝癌的发生发展

本研究用基因芯片技术探讨*SNRPA1*基因在肝癌发生发展过程中基因表达的调控机制。分析结果显示,与对照组相比,慢病毒感染致细胞中*SNRPA1*基因低表达后,实验组BEL-7404细胞中有262个基因表达上调,同时有462个基因表达下调,其中碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, *FGF2*)基因下调最为显著($P<0.05$, $FC>1.5$)(图5)。本文通过构建重要肿瘤致癌或抑制基因的IPA网络分析图(图6),展示了*SNRPA1*调控的基因相互调控关系,包括40个下调基因,16上调基因。由图中可以看出,敲低*SNRPA1*可能通过与*WNT5A*和*JAK2*基因相互作用而抑制细胞增殖,从而影响其调控的下游靶基因。

2.4 qRT-PCR检测下游基因mRNA表达水平

为了验证*SNRPA1*在调节上述生物信息学分析预测的基因中的作用,我们利用qRT-PCR分析这些基因在mRNA水平的表达量。分析结果如图7所示,*SNRPA1*敲减组细胞与shCtrl组相比,选定的5个目的



A: *SNRPA1*基因敲减前后的BEL-7404细胞在裸鼠体内的生长情况; B: 两组裸鼠体内肿瘤体积变化曲线; C: 两组裸鼠体内瘤体重量的差异。 $*P<0.05$,与shCtrl相比。

A: observation of the growth of the BEL-7404 tumor cells in nude mice; B: growth dynamics of the tumor volume in experiment group and control group; C: statistics analysis of the weight of the tumors in experiment group and control group. $**P<0.01$ vs shCtrl.

图2 *SNRPA1*基因敲减的BEL-7404肿瘤细胞在裸鼠体内的生长情况分析

Fig.2 Observation of tumors growth in nude mice injected with BEL-7404 cells transfected with shSNRPA1 or shCtrl by *in vivo* imaging

基因*FSTL1*、*FGF2*、*JAK2*、*WNT5A*和镁依赖性蛋白磷酸酶1A(protein phosphatase magnesium-dependent 1A, *PPM1A*)的表达水平均有所降低,表达丰度分别为shCtrl组的0.434倍($n=3$, $**P<0.01$)、0.347倍($n=3$, $**P<0.01$)、0.748倍($n=3$, $*P<0.05$)、0.074倍($n=3$, $**P<0.01$)和0.647倍($n=3$, $*P<0.05$)。qRT-PCR分析结果与基因芯片分析结果基本一致。这些因子通过不同的途径和信号通路参与肿瘤的形成和发展,如*FSTL1*可通过PI3K-Akt-mTOR信号通路来调控细胞凋亡;*JAK2*通过诱导JAK-STAT信号路

径促进肿瘤细胞的形成、增殖和侵袭;*WNT5A*是Wnt信号通路中的关键蛋白,被激活后可引起多种肿瘤的发生等。这些因子的变化与肿瘤的发生发展密切相关。

2.5 Western blot检测下游基因蛋白表达

进一步利用Western blot检测分析*FSTL1*、*FGF2*、*JAK2*、*WNT5A*和*PPM1A*的蛋白质表达水平。结果显示,与shCtrl组比较,SNRPA1敲减组的*FSTL1*、*JAK2*和*WNT5A*的表达显著下调($**P<0.01$),而*FGF2*及*PPM1A*蛋白质水平的表达量

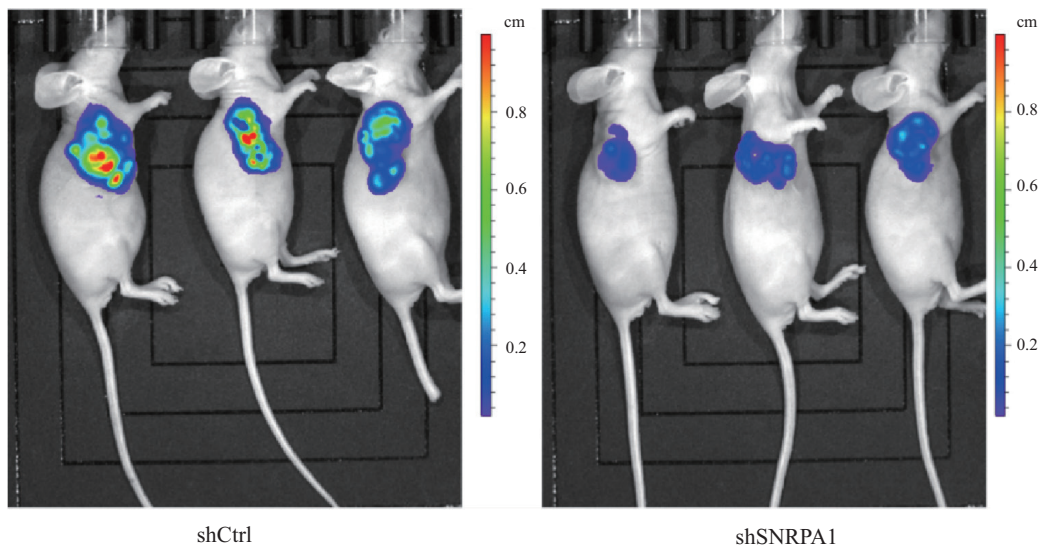
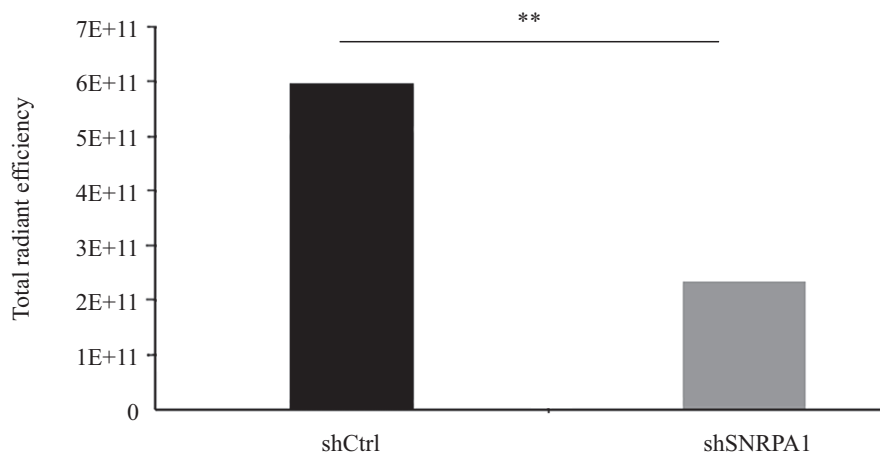


图3 肿瘤细胞的两组小鼠的活体成像观测

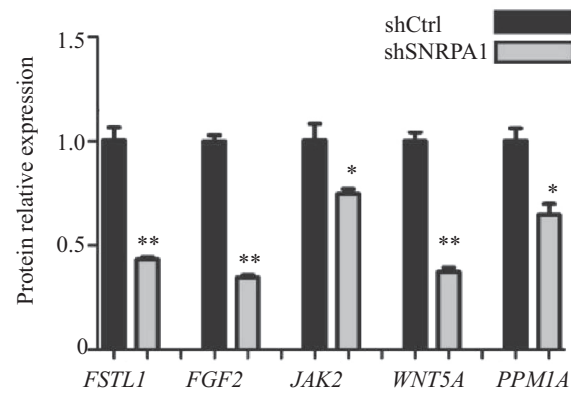
Fig.3 Observation of the tumors growth in nude mice by *in vivo* imaging



$**P<0.01$.

图4 活体成像统计分析SNRPA1基因对BEL-7404肿瘤细胞在小鼠体内的生长的影响

Fig.4 The effect of *SNRPA1* gene on the growth of BEL-7404 cells in nude mice by statistics analysis of the optical *in vivo* imaging

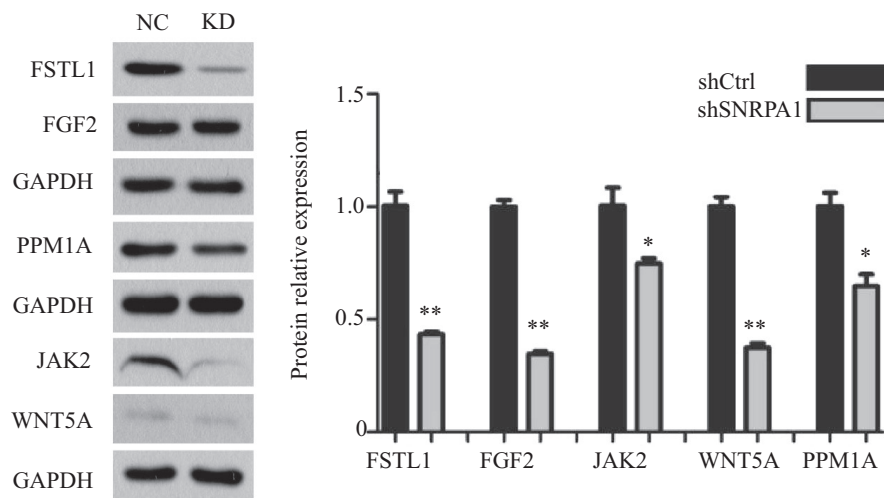


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与shCtrl相比。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs shCtrl.

图7 qRT-PCR检测两组细胞相关的下游基因*FSTL1*、*FGF2*、*JAK2*、*WNT5A*、*PPM1A* mRNA的表达

Fig.7 qRT-PCR analysis of selected genes *FSTL1*, *FGF2*, *JAK2*, *WNT5A*, *PPM1A* in shSNRPA1 and shCtrl groups



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与shCtrl相比。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs shCtrl.

图8 Western blot分析两组细胞相关的下游基因*FSTL1*、*FGF2*、*JAK2*、*WNT5A*和*PPM1A*蛋白质表达水平

Fig.8 Western blot analysis of selected genes *FSTL1*, *FGF2*, *JAK2*, *WNT5A*, *PPM1A* in shSNRPA1 and shCtrl groups

无显著变化(图8)。

2.6 信号通路分析

以上初步分析了*SNRPA1*基因对下游基因的调控作用,为进一步明确介导调控过程的信号通路,本研究使用IPA软件对差异基因所调控的800条经典通路进行分析。结果发现, BEL-7404细胞中的*SNRPA1*基因敲低,显著抑制了iNOS途径($-\log P = 1.36$, $Z\text{-core} = -2$)(图9),因此,认为iNOS通路可能介导了*SNRPA1*基因对肝癌发生发展的调控。

3 讨论

*SNRPA1*是一种U2 snRNP,属于剪接体家族成员,负责调节将前体mRNA剪接。尽管一些证据表明剪接体可能参与癌症发展,但关于*SNRPA1*在HCC中的功能知之甚少。本研究通过慢病毒感染BEL-7404细胞敲低*SNRPA1*,验证*SNRPA1*在肝细胞肝癌中的相关作用。体内实验结果提示,*SNRPA1*敲低能够有效抑制肿瘤的生长,初步证实了*SNRPA1*在肿瘤增殖方面的重要作用。基因芯片分析显示,*SNRPA1*

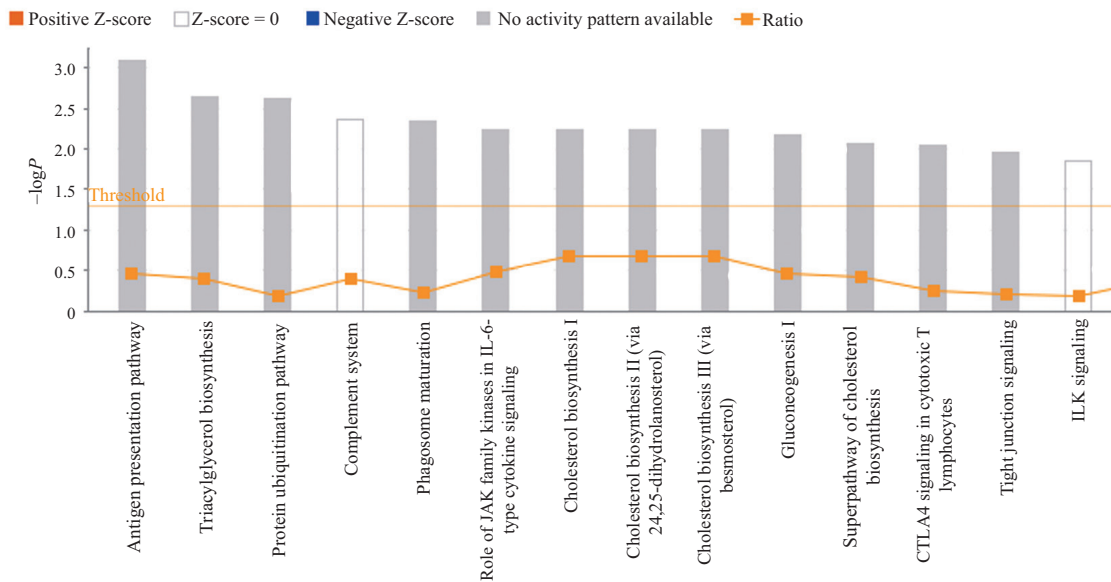


图9 使用IPA软件分析的途径富集表明*SNRPA1*敲低后iNOS信号被显著抑制
 Fig.9 Pathway enrichment analyzed using IPA software showed that iNOS signaling was significantly suppressed after *SNRPA1* knockdown

敲减后的肝癌细胞中有262个基因被上调, 462个基因被下调, 其中*FGF2*基因下调最为明显, 说明*SNRPA1*基因可以被上游基因调控, 也可以调控下游基因, 表明肝癌是一种多基因参与, 多步骤发生的疾病。为进一步明确其下游基因的表达情况, 筛选了表达丰度最高和差异最显著的基因进行了qRT-PCR及Western blot分析。结果显示, 敲低*SNRPA1*基因可抑制*FSTL1*、*FGF2*、*JAK2*、*WNT5A*和*PPM1A*在mRNA水平的表达, 同时降低*FSTL1*、*JAK2*及*WNT5A*的蛋白表达水平, 进一步表明*FSTL1*、*JAK2*、*WNT5A*可能是*SNRPA1*在肝癌发生中发挥主要作用的下游基因。通过IPA信号通路分析提示iNOS信号通路被显著抑制, 提示*SNRPA1*基因表达可能通过iNOS信号通路对肝细胞肝癌的发生和发展进行调控。而在各种癌症(包括卵巢癌)中都发现了iNOS的过度表达^[13], 如肺癌^[14]和骨肉瘤^[15]。因此, iNOS途径很可能是*SNRPA1*介导的HCC的信号通路。

*FSTL1*是一个具有多种生物学调节功能的糖蛋白, 属胞外基质蛋白家族的一员^[16], 可参与调节胚胎器官组织形成^[17], 具有调控细胞增殖、分化、凋亡^[18]、改善缺血再灌注损伤^[19]等功能。*FSTL1*过表达可通过PI3K-Akt-mTOR信号通路来调控细胞凋亡^[16]。本研究中*SNRPA1*敲减导致的*FSTL1*表达降低或与BEL-7404细胞凋亡减少有关。*FGF2*是促进

伤口修复的促血管生成因子, 被发现在许多肿瘤包括黑色素瘤^[20]、卵巢癌^[21]、非小细胞肺癌^[22]等中发挥了重要的致癌作用。研究证明, *FGF2*刺激HCC增殖, 侵袭并诱导血管生成^[23]。谷依学等^[24]研究发现, *FGF2*可通过FGF2-FGFR-Akt-mTOR信号通路促进乳腺癌对化疗药物的抵抗作用, 而其在肝细胞性肝癌中也发挥了促进其癌细胞的增殖、侵袭和血管形成的作用^[25]。本研究中发现, *SNRPA1*敲减导致*FGF2*在mRNA水平表达降低, 与以上文献研究一致。*JAK2*是Janus家族的非受体蛋白酪氨酸激酶成员, 其通过诱导JAK-STAT信号路径促进肿瘤细胞的形成、增殖和侵袭等^[25]。*Wnt*信号通路的异常与肿瘤的发生及侵袭转移密切相关^[26], *WNT5A*是*Wnt*信号通路中的关键蛋白, 被激活后可引起多种肿瘤的发生^[27]。*WEERARATNA*等^[28]研究表明, *Wnt*信号通路可直接影响黑色素瘤细胞并促进其迁移、侵袭和转移。*PPM1A*是PP2C家族最具特征性的成员^[29], 近年来的研究结果表明, *PPM1A*可与多种蛋白结合使其去磷酸化, 广泛调控如细胞生长、细胞应激、免疫反应和肿瘤形成等众多生命活动。本研究也证实, 敲减*SNRPA1*可以导致肝癌细胞BEL-7404的*JAK2*、*WNT5A*的mRNA及蛋白水平的表达降低, 说明*JAK2*、*WNT5A*可能是*SNRPA1*促进肝癌发生的信号通路, 但需进一步实验论证。在实验中发现,

*FGF2*及*PPM1A*在mRNA水平表达下降,但其蛋白水平表达无明显差异,可能与其mRNA翻译及蛋白质分子发生去磷酸化等因素有关,以及通路间相互作用的结果。阻断以上因子的表达或可抑制肝细胞肝癌细胞增生、侵袭转移及自我更新的进程,从而促进肝癌细胞的凋亡。

本研究在体外验证了*SNRPA1*基因能够影响*FSTL1*、*FGF2*、*JAK2*、*WNT5A*和*PPM1A* mRNA水平,以及*FSTL1*、*JAK2*和*WNT5A*蛋白水平的表达,表明*SNRPA1*基因对肝癌的发生发展是基于对这些下游基因的表达调控的结果。*SNRPA1*基因有望成为治疗肝细胞肝癌新的靶点,但是本研究还存在许多局限性,如样本量小、缺乏细胞功能学实验及*SNRPA1*基因高表达对该结论的验证,未来期待进行更多大样本实验进行研究,为基于*SNRPA1*基因的肝细胞肝癌诊断与治疗提供理论依据。

参考文献 (References)

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] EL-SERAG HB. Hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365: 1118-27.
- [3] BRUIX J, SHERMAN M. Management of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2014, 10(5): 761-80.
- [4] ZHAO N, WANG R, ZHOU L, et al. MicroRNA-26b suppresses the NF- κ B signaling and enhances the chemosensitivity of hepatocellular carcinoma cells by targeting TAK1 and TAB3 [J]. *Mol Cancer* 2014, 13(1): 35.
- [5] YAN S Y, CHEN M M, LI G M, et al. MiR-32 induces cell proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting PTEN [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(6): 4747-55.
- [6] ZHANG Y, GUO X, XIONG L, et al. Comprehensive analysis of microRNA-regulated protein interaction network reveals the tumor suppressive role of microRNA-149 in human hepatocellular carcinoma via targeting AKT-mTOR pathway [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13(1): 253.
- [7] KIM S Y, KIM K, WANG B, et al. The high frequency of the U2AF1 S34Y mutation and its association with isolated trisomy 8 in myelodysplastic syndrome in Asians, but not in Caucasians [J]. *Leukemia Eukemia Res*, 2017, 61: 96-103.
- [8] ZHANG J, LIEU Y K, ALI A M, et al. Disease-associated mutation in SRSF2 misregulates splicing by altering RNA-binding affinities [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(34): E4726-34.
- [9] JIN S, SU H, TRAN N T, et al. Splicing factor SF3B1K700E mutant dysregulates erythroid differentiation via aberrant alternative splicing of transcription factor TAL1 [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0175523.
- [10] PROCHAZKA L, TESARIK R, TURANEK J. Regulation of alternative splicing of CD44 in cancer [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(10): 2234-9.
- [11] ZENG Q M, LEI F M, CHANG Y G, et al. An oncogenic gene, SNRPA1, regulates PIK3R1, VEGFC, MKI67, CDK1 and other genes in colorectal cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117:109076.
- [12] DOU N, YANG D, YU S J, et al. SNRPA enhances tumour cell growth in gastric cancer through modulating NGF expression [J]. *Cell Proliferat*, 2018, 51: e12484.
- [13] QIU H, ORR F W, JENSEN D, et al. Arrest of B16 melanoma cells in the mouse pulmonary microcirculation induces endothelial nitric oxide synthase-dependent nitric oxide release that is cytotoxic to the tumor cells [J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(2): 403-12.
- [14] ZHANG L, LIU J, WANG X, et al. Upregulation of cytoskeleton protein and extracellular matrix protein induced by stromal-derived nitric oxide promotes lung cancer invasion and metastasis [J]. *Curr Mol Med*, 2014, 14(6): 762-71.
- [15] KLOTZ T, BLOCH W, VOLBERG C, et al. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma [J]. *Cancer*, 1998, 82(10): 1897-903.
- [16] 谷川莎. *FSTL1*对结直肠癌侵袭转移过程的影响及其分子机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [17] CHALY Y, HOSTAGER B, SMITH S, et al. Follistatin-like protein 1 and its role in inflammation and inflammatory diseases [J]. *Immunol Res*, 2014, 266 (59): 1-3.
- [18] OUCHI N, OSHIMA Y, OHASHI K, et al. Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric-oxide synthase-dependent mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(47): 32802-11.
- [19] WIDERA C, HORN-WICHMANN R, KEMPF T, et al. Circulating concentrations of follistatin-like 1 in healthy individuals and patients with acute coronary syndrome as assessed by an immunoluminometric sandwich assay [J]. *Clin Chem* 2009, 55(10): 1794-800.
- [20] BIRRER M J, JOHNSON M E, HAO K, et al. Whole genome oligonucleotide-based array comparative genomic hybridization analysis identified fibroblast growth factor 1 as a prognostic marker for advanced-stage serous ovarian adenocarcinomas [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(16): 2281-7.
- [21] MAREK L, WARE K E, FRITZSCHE A, et al. Fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor-mediated autocrine signaling in non-small-cell lung cancer cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75(1): 196-207.
- [22] PRESTA M, DELL'ERA P, MITOLA S, et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16(2): 159-78.
- [23] KIN M, SATA M, UENO T, et al. Basic fibroblast growth factor regulates proliferation and motility of human hepatoma cells by an autocrine mechanism [J]. *J Hepatol*, 1997, 27: 677-87.
- [24] 谷依学, 贾小婷, 罗利云, 等. *FGF2*通过活化Akt-mTOR信号促进乳腺癌细胞化疗耐受[J]. *实用医学杂志*(GU Y X, JIA X T, LUO L Y, et al. *FGF2* confer chemo-resistance of breast cancer cells by activating Akt-mTOR signal [J]. *Journa Practical Medicine*, 2017, 33(1): 36-40.
- [25] MUMIN N H, DROBNITZKY N, PATEI A, et al. Overcoming

- acquired resistance to HSP90 inhibition by targeting JAK-STAT signalling in triple-negative breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 102.
- [26] POLAKIS P. WNT signaling and cancer [J]. *Gene Dev*, 2000, 14(15): 1837-51.
- [27] 陈亮, 冀宏, 石东亮, 等. Wnt5a对甲状腺乳头状癌细胞增殖及侵袭能力的影响[J]. *中华实验外科杂志*(CHEN L, JI H, SHI D L, et al. The effect of wnt5a on proliferation and invasion of papillary thyroid carcinoma cells [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*), 2018, 35(12): 2222-5.
- [28] WEERARATNA A T, JIANG Y, HOSTETTER G K, et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma [J]. *Cancer Cell*, 2002,1(3): 279-88.
- [29] 周亚莉, 胡文君, 高尧颖, 等. 蛋白磷酸酶PPM1A的研究进展[J]. *生理科学进展*(ZHOU Y L, HU W J, GAO Y Y, et al. Research progress of protein phosphatase PPM1A [J]. *Progress in Physiological Sciences*), 2018, 49(5): 45-8.