

可变剪接在胃癌中的作用

李洁 王欢 王斌 湛先保*

(海军军医大学附属长海医院肿瘤科, 上海 200433)

摘要 可变剪接是mRNA经过不同的剪接方式产生不同的mRNA剪接异构体的过程, 最终的蛋白产物会表现出不同或者相互拮抗的功能和结构特性。已有大量研究揭示了剪接因子突变与人类多种癌症发生发展密切相关, 并通过对不同RNA剪接模式和剪接调控的研究, 为肿瘤的治疗提供了大量的候选生物标记物和潜在靶点。最新的mRNA测序技术可检测到大约95%的人类基因与多个外显子进行可变剪接, 异常可变剪接可能导致肿瘤的发生。虽然可变剪接在肿瘤中的研究进行的如火如荼, 但是其在胃癌发生、发展中的研究目前还较少, 该文主要针对可变剪接在胃癌中的研究进展作一综述。

关键词 可变剪接; 胃癌; 耐药; 精准治疗

The Roles of Alternative Splicing in Gastric Cancer

LI Jie, WANG Huan, WANG Bin, ZHAN Xianbao*

(Department of Oncology, Changhai Hospital, Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Alternative splicing is the process by which mRNA splices in different ways to produce different mRNA splicing isomers. The final protein products will show different or antagonistic functional and structural characteristics. A large number of studies have revealed that splicing factor mutations are closely related to the occurrence and development of various human cancers. Through the study of different RNA splicing patterns and splicing regulation, a large number of candidate biomarkers and potential targets have been provided for tumor treatment. The latest mRNA sequencing technology can detect that about 95% of human genes have alternative splicing with multiple exons, and abnormal alternative splicing may lead to tumorigenesis. Although the study of alternative splicing in cancer is in full swing, there are few studies on the occurrence and development of gastric cancer. This article reviews the research progress of alternative splicing in gastric cancer.

Keywords alternative splicing; gastric cancer; drug resistance; precision medicine

可变剪接(alternative splicing, AS), 也被称为选择性剪接, 是指一个mRNA经过不同的剪接方式(选择不同的剪接位点)产生不同的mRNA剪接异构体的过程。它是调控基因表达与产生蛋白质多样性的重要机制, 同时, RNA剪接异常也是引起各类疾病, 尤其是肿瘤的重要因素。RNA剪接与人类多种癌症

的发生发展密切相关, 但是其具体机制目前还不清楚, 因此, 研究RNA剪接功能对于探索肿瘤病因以及癌症的预防和治疗具有重要意义。

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率均高居全球恶性肿瘤前4位^[2]。晚期胃癌患者预后较差, 目前的治疗手段仍以药物为主。

收稿日期: 2020-04-25

接受日期: 2020-07-09

国家自然科学基金(批准号: 81672892、82072707)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13501850100, E-mail: zhanxianbao@126.com

Received: April 25, 2020

Accepted: July 9, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81672892, 82072707)

*Corresponding author. Tel: +86-13501850100, E-mail: zhanxianbao@126.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5387>

如何更精准地选择药物, 在胃癌个体化治疗的基础上探索其发生发展机制, 是改善胃癌治疗现状的关键^[1]。DNA序列的改变、表观遗传改变等作为胃癌发病的主要因素被广泛研究, 包括DNA甲基化、长链非编码RNA、组蛋白修饰(乙酰化、甲基化等)。然而, 对可变剪接参与胃癌发生、发展机制的研究相对较少。本文主要针对近年来可变剪接在胃癌中的研究进展作一综述。

1 可变剪接与胃癌的发生

人类约95%的多外显子基因在mRNA前体成熟过程中存在可变剪接机制, 极大地丰富了下游蛋白的多样性^[4], 而包括胃癌在内的多种癌症的发生都与RNA剪接因子的突变有关。剪接因子3b亚基1(splicing factor 3b subunit 1, *SF3B1*)是一种常见的RNA剪接因子, 其突变参与了多种癌症的发生^[5]。INOUE等^[6]通过CRISPR筛选结合泛癌症剪接分析, 发现*SF3B1*突变会诱导*BRD9*异常剪接, 导致*BRD9*毒性外显子形成。进一步研究发现敲低*BRD9*后, 肿瘤的生长显著加快; 而使用CRISPR修复*BRD9*错误剪接时, 肿瘤的生长减缓^[6]。这表明, *SF3B1*突变会诱导*BRD9*错误剪接, 导致*BRD9*毒性外显子产生, 扰乱BAF复合体形成, 促进肿瘤发生。

ING4是肿瘤抑制基因家族ING(生长抑制因子)的一个新成员, 它参与细胞凋亡、细胞周期阻滞、基因转录、DNA修复等生物学事件^[7]。有研究报道, 肿瘤抑制因子ING4在胶质瘤、乳腺肿瘤和头颈部鳞状细胞癌中缺失或下调^[8]。例如, 在头颈部鳞癌中, 原发性肿瘤中有76%的*ING4* mRNA表达降低。在胶质母细胞瘤中, *ING4*水平比正常脑组织低6倍^[9]。LI等^[10]在研究中发现, 胃腺癌组织中的*ING4* mRNA水平也明显低于正常胃组织, 并且*ING4* mRNA表达的减少与肿瘤的分期有关。为进一步研究*ING4*的转录表达和选择性剪接是否参与胃癌的发生和发展, 研究者们进行了序列分析, 发现了新的异常剪接形式*ING4v1*和*INGv2*。这些变异导致密码子移位, 引起NLS域(靶向p53)或PHD域(靶向HAT/HDAC复合物参与调控基因转录)缺失^[11], 最终导致p53和/或HAT/HDAC复合物的错误定位, 引起胃腺癌基因表达。结果表明, 由于插入和/或缺失而导致的*ING4*表达减少和*ING4*功能减弱促进了胃癌的发生和发展。原癌基因*WNT*编码具有24个半胱氨酸残基的分泌型保守

糖蛋白, 在胚胎发育和肿瘤形成过程中起关键作用。研究表明, *WNT2*在原发性胃癌中的表达通常是上调的^[12], 该基因通过可变剪接产生*WNT2B1*和*WNT2B2* mRNAs, 其中*WNT2B2* mRNA普遍存在于胃癌细胞中, 可能通过激活 β -catenin-TCF信号通路而导致胃癌的发生^[13]。

2 可变剪接与胃癌分子分型

2014年, 肿瘤基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)项目报道了胃癌新的分子分型, 将其分为四种亚型: EBV(Epstein-Barr virus)感染型、微卫星不稳定型(microsatellite instability, MSI)、基因组稳定型(genomically stable, GS)和染色体不稳定型(chromosomal instability, CIN)(图1)^[14]。其中, EBV相关性胃癌(Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma, EBVaGC)的分子生物学特征表明, 其具有特异的临床病理特征、新的基因组和表观遗传学异常, 其蛋白表达谱明显高于EBV阴性胃腺癌^[15]。ARMERO等^[16]在EBV相关性胃癌的背景下研究了细胞基因的RNA剪接整体景观的改变, 利用高通量RNA测序对295例原发性胃腺癌细胞基因的RNA剪接图谱进行了大规模筛选, 并通过qRT-PCR、质谱分析、免疫共沉淀等方法进行验证, 最终得到900个可变剪接相关基因, 如肿瘤抑制基因、转录因子、剪接因子、激酶等。通过研究鉴定出了在EBV阴性胃癌和EBV相关胃癌中可变剪接被错误调节的基因特征。此外, 研究还发现, 在EBV相关性胃癌中20个癌症相关基因的可变剪接因子在病毒EBNA1表达上也发生了显著的改变, 表明病毒的存在可以改变细胞可变剪接模式, 这些发现揭示了不同类型胃癌之间的分子差异。

3 可变剪接与胃癌的增殖转移

可变剪接出现异常与肿瘤的侵袭、转移也有密切的关系。RON是属于MET原癌基因家族的一种酪氨酸激酶受体, 在肿瘤侵袭转移的过程中起到重要作用。丝氨酸/精氨酸富集剪接因子1(serine/arginine-rich splicing factor 1, SRSF1)的表达增加可以促进RON的产生, 影响肿瘤的进展^[17]。PTBP3是一种重要的RNA结合蛋白, 在RNA剪接、3'端处理和蛋白翻译中发挥重要作用^[18], 它可以通过调节基因表达来影响肿瘤的生物行为^[19]。通过研究PTBP3在胃癌

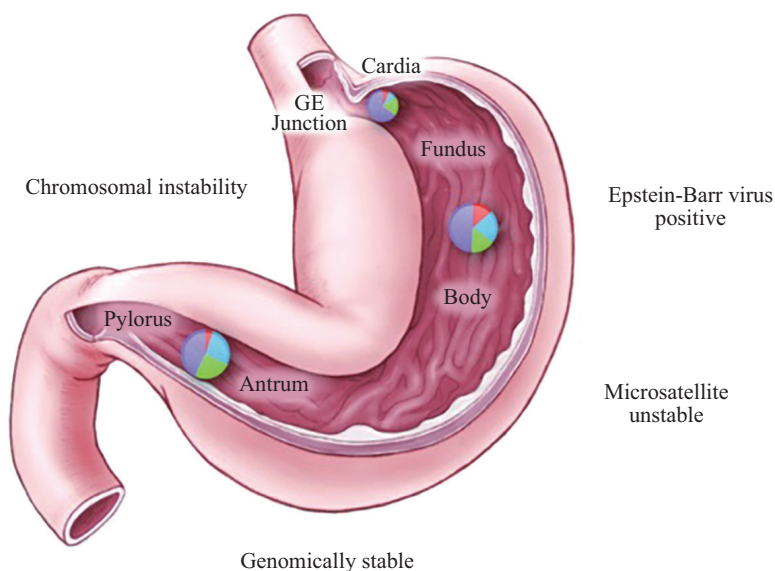


图1 胃癌TCGA分型(根据参考文献[14]修改)

Fig.1 TCGA typing of gastric cancer (modified from the reference [14])

中的作用, LIANG等^[20]发现淋巴结转移患者胃癌组织中PTBP3表达明显上调,且PTBP3高表达患者的生存期明显短于PTBP3低表达的患者。研究中还发现,CAV1为PTBP3的下游靶点,随着PTBP3表达的降低,CAV1 α 的表达增加,进而抑制整合素结合以及类固醇受体辅活化子(steroid receptor coactivator, Src)和局灶性黏附激酶(focal adhesion kinase, FAK)蛋白的表达。基因敲除PTBP3后上调的CAV1 α 和整合素/Src/FAK途径抑制了胃癌的转移和侵袭^[20]。LI等^[21]利用体内外实验研究发现, RNA结合蛋白QKI5通过可变剪接增加macroH2A1.1生成,从而抑制cyclin L1的表达,最终抑制胃癌细胞增殖、转移和侵袭,为胃癌的治疗提供了新的治疗靶点。

4 可变剪接与胃癌的治疗

化疗是晚期胃癌患者综合治疗中的重要手段,然而一直以来胃癌化疗遇到的最大瓶颈在于耐药。MRPL33是线粒体核糖体大亚基蛋白的编码基因,经可变剪接可产生两种剪接体MRPL33-L和MRPL33-S。它们编码的蛋白序列不同,在肿瘤细胞增殖、凋亡过程中也发挥着不同的作用^[22]。有研究发现,MRPL33-L在胃癌组织中的含量明显高于MRPL33-S亚型,并且MRPL33-S通过抑制PI3K/AKT/CREB信号和诱导细胞凋亡从而促进表阿霉素的化疗作用;但是MRPL33-L则抑制胃癌对表阿霉素的敏感性^[23]。可变剪接在化疗耐药性中的研究可

能有助于改善胃癌的治疗策略。

精准用药是基于患者多层面病理学特征设计个性化用药方案的治疗方式,可以改善患者的生存状况,提高生存率。美国国家癌症研究所利用微阵列和测序技术,对295名胃癌患者的肿瘤组织样本进行了综合分析^[24],验证了TP53、ARID1A、KRAS、PIK3CA、BCOR、RHOA、APC、CTNBN1、SMAD4、SMAD2、RASAI、RAS、ERBB2等基因的显著突变,以及致癌基因、抑癌基因、基因拷贝数变异(copy number variations, CNVs)等。基于患者肿瘤的个性化胃癌相关基因,可利用已有的精准用药数据库(如PCM Wiki6、CELLX7),有针对性地使用更适合患者特性的化疗方案,也可以预测可能产生的毒副作用^[24]。

5 可变剪接与胃癌预后

影响胃癌发生、侵袭、转移的基因均可能与胃癌的预后相关,越来越多的证据表明,可变剪接事件可作为胃癌预后的有效标志物。早在1998年, YAMAMICHI等^[25]对73名胃癌患者进行临床研究,并报道了CD44经可变剪接得到CD44v6和CD44v9,研究发现,CD44v6在胃癌肝转移患者中的表达显著增高,此外,CD44v6的表达与患者术后复发具有相关性,CD44v6表达越低,患者预后越好,因此, YAMAMICHI推断CD44v6的表达可以作为胃癌复发转移的潜在预测因子。组织因子(tissue factor, TF)也存

在选择性剪接转录, WU等^[26]检测了人胃癌组织中两种 *TF* 亚型 *fTF* 和 *asTF* 的转录本, 并分析了其表达与患者临床病理特征的关系。结果表明, 胃癌组织中 *fTF* 和 *asTF* 的相对 mRNA 表达水平显著高于正常组织, 并与患者的性别、TNM 分期、病理分级、肿瘤大小、组织学类型、化疗敏感性等相关。单因素分析显示, 低表达 *fTF* 或 *asTF* 的胃癌患者总生存率高于高表达者, 多变量 COX 模型分析也显示, *fTF* 表达 ($P=0.048$) 或 *asTF* 表达 ($P=0.002$) 在人胃癌中可作为独立的预后预测因子。因此, *fTF* 和 *asTF* mRNAs 在胃癌组织中的表达水平可作为评估胃癌患者预后的危险因素。SHI 等^[27] 利用 TCGA 数据库研究了 452 个胃腺癌组织细胞基因的 mRNA 剪接图谱的改变, 在 10 611 个基因中共检测到 60 754 个可变剪接事件, 其中一半以上是外显子跳跃事件, 通过对 373 例胃腺癌患者可变剪接事件与总生存率的关系进行分析, 发现基于可变剪接事件和临床参数的预后预测模型可以有效地预测胃腺癌患者的生存率。

6 小结与展望

基因突变体和 CNVs 影响的基因大部分都存在可变剪接。相比于基因序列的改变, 某些基因的可变剪接 mRNA 产物更能显著地标志恶性肿瘤, 如 *TACCI-D*、*CDHI* 于胃癌^[28], *p53*、*BRCA1*、*PTEN* 于乳腺癌^[29], *TIMPI* 于结肠癌^[30] 等。目前, 国内外对可变剪接在胃癌中的临床研究方兴未艾, 但对可变剪接在胃癌的发生发展、增殖、转移中的研究尚处于起步阶段。综上所述, 胃癌特异性的可变剪接具有显著的诊断价值, 也为胃癌的治疗提供了大量的候选生物标记物和潜在靶点。我们希望通过通过对胃癌可变剪接的研究揭示胃癌基因表达调控的机制, 并为胃癌的诊断、治疗提供重要依据, 为胃癌精准医疗奠定坚实的基础。

参考文献 (References)

- [1] WANG E T, SANDBERG R, LUO S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes [J]. *Nature*, 2008, 456(7221): 470-6.
- [2] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA: Cancer J Clin*, 2015, 65: 87-108.
- [3] CHOI Y Y, NOH S H, CHEONG J H. Evolution of gastric cancer treatment: from the golden age of surgery to an era of precision medicine [J]. *Yonsei Med J*, 2015, 56: 1177-85.
- [4] PAN Q, SHAI O, LEE L, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing [J]. *Nature Genet*, 2008, 40: 1413-5.
- [5] SEILER M, PENG S Y, AGRAWAL A A, et al. Somatic mutational landscape of splicing factor genes and their functional consequences across 33 cancer types [J]. *Cell Rep*, 2018, 23(1): 282-96.
- [6] INOUE D, CHEW G L, LIU B, et al. Spliceosomal disruption of the non-canonical BAF complex in cancer [J]. *Nature*, 2019, 574(7778): 1-5.
- [7] RUSSELL M, BERARDI P, GONG W, et al. Grow-ING, Age-ING and Die-ING: ING proteins link cancer, senescence and apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(7): 951-61.
- [8] GUNDUZ M, NAGATSUKA H, DEMIRCAN K, et al. Frequent deletion and down-regulation of ING4, a candidate tumor suppressor gene at 12p13, in head and neck squamous cell carcinomas [J]. *Gene*, 2005, 356: 109-17.
- [9] GARKAVTSEV I, KOZIN S V, CHERNOVA O, et al. The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis [J]. *Nature*, 2004, 428(6980): 328-32.
- [10] LI M, JIN Y, SUN W J, et al. Reduced expression and novel splice variants of ING4 in human gastric adenocarcinoma [J]. *J Pathol*, 2009, 219(1): 87-95.
- [11] DOYON Y, CAYROU C, ULLAH M, et al. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation [J]. *Mol Cell*, 2006, 21(1): 51-64.
- [12] KATO M. Frequent up-regulation of WNT2 in primary gastric cancer and colorectal cancer [J]. *Int J Oncol*, 2001, 19(5): 1003-8.
- [13] KATO M, KIRIKOSHI H, TERASAKI H, et al. WNT2B2 mRNA, up-regulated in primary gastric cancer, is a positive regulator of the WNT- β -catenin-TCF signaling pathway [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2001, 289(5): 1093-8.
- [14] The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma [J]. *Nature*, 2014, 513(7517): 202-9.
- [15] SHINOZAKI-USHIKU A, KUNITA A, FUKAYAMA M. Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(4): 1421-34.
- [16] ARMERO V E S, TREMBLAY M P, ALLAIRE A, et al. Transcriptome-wide analysis of alternative RNA splicing events in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (5): e0176880.
- [17] UPHEBER S, KARLE A, MILLER J, et al. Alternative splicing of KAI1 abrogates its tumor-suppressive effects on integrin $\alpha\beta3$ -mediated ovarian cancer biology [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(3): 652-62.
- [18] SUCKALE J, WENDLING O, MASJKUR J, et al. PTBP1 is required for embryonic development before gastrulation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16992.
- [19] BRAZÃO T F, DEMMERS J, VANIJCKEN W, et al. A new function of ROD1 in nonsense-mediated mRNA decay [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(8): 1101-10.
- [20] LIANG X, CHEN W X, SHI H Y, et al. PTBP3 contributes to the metastasis of gastric cancer by mediating CAV1 alternative splicing [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 569-81.
- [21] LI F, YI P, PI J, et al. QKI5-mediated alternative splicing of the

- histone variant macroH2A1 regulates gastric carcinogenesis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 32821.
- [22] LIU L, LUO C, LUO Y, et al. MRPL33 and its splicing regulator hnRNPk are required for mitochondria function and implicated in tumor progression [J]. *Oncogene*, 2018, 37(1): 86-94.
- [23] LI J, FENG D, GAO C X, et al. Isoforms S and L of MRPL33 from alternative splicing have isoform-specific roles in the chemoresponse to epirubicin in gastric cancer cells via the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(5): 1591-600.
- [24] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma [J]. *Nature*, 2014, 513(7517): 202-9.
- [25] YAMAMICHI K, UEHARA Y, KITAMURA N, et al. Increased expression of CD44v6 mRNA significantly correlates with distant metastasis and poor prognosis in gastric cancer [J]. *Int J Cancer*, 1998, 79: 256-62.
- [26] WU M, CHEN L J, XU T, et al. Prognostic values of tissue factor and its alternatively splice transcripts in human gastric cancer tissues [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (32): 53137-45.
- [27] SHI Y, CHEN Z H, GAO J, et al. Transcriptome-wide analysis of alternative mRNA splicing signature in the diagnosis and prognosis of stomach adenocarcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40: 2014-22.
- [28] LI X, GAO Y, PAN Y, et al. Mutation screen and RNA analysis disclose the changed splicing of the E-cadherin transcription in gastric cancer [J]. *Familial Cancer*, 2013, 12 (3): 547-54.
- [29] OKUMURA N, YOSHIDA H, KITAGISHI Y, et al. Alternative splicings on p53, BRCA1 and PTEN genes involved in breast cancer [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2011, 413: 395-9.
- [30] USHER P A, SIEUWERTS A M, BARTELS A, et al. Identification of alternatively spliced TIMP-1 mRNA in cancer cell lines and colon cancer tissue [J]. *Mol Oncol*, 2007, 1(2): 205-15.