

肿瘤中可变剪接事件与靶向治疗

于海洋¹, 李自祥², 刘 博^{2*}

(1. 天津中医药大学中医药研究院, 组分中药国家重点实验室, 天津 301617; 2. 四川大学生物治疗国家重点实验室, 四川 成都 610041)

摘要: 可变剪接 (alternative splicing) 是人类基因表达调节的关键途径, 它在扩大功能蛋白的多样性方面起着决定性作用。可变剪接事件是肿瘤进展中的一个重要生物标志物, 它与肿瘤的发展密切相关。肿瘤细胞倾向于产生有利于其进展的可变剪接体, 因此, 针对肿瘤特异性可变剪接体进行靶向调控是肿瘤治疗的一个潜在策略。在此, 本文对可变剪接和肿瘤之间的复杂关系做了一个简要回顾。可变剪接通过去除前体 mRNA (pre-mRNA) 的非编码序列, 并将蛋白质编码片段以不同的组合方式进行组装, 最终产生具有不同甚至相反功能的蛋白质。可变剪接事件可以通过凋亡、侵袭和转移、血管生成和代谢, 促进正常细胞向肿瘤细胞的转变; 也可通过影响免疫通路中起关键作用的基因, 从而影响癌症治疗的有效性。通过直接或间接靶向可变剪接因子以及基于寡核苷酸的疗法是目前逆转肿瘤可变剪接事件的主要策略。这些发现将有助于研究者更好地了解与肿瘤相关的可变剪接, 并为肿瘤的治疗开发新的策略。

关键词: 可变剪接; 前体 mRNA; 剪接因子; 肿瘤治疗; 靶向治疗

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)08-2098-13

Alternative splicing events in tumors and targeted therapy

YU Hai-yang¹, LI Zi-xiang², LIU Bo^{2*}

(1. State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2. State Key Laboratory of Biotherapy and Cancer Center, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Alternative splicing is the key to human gene expression regulation and plays a decisive role in enlarging the diversity of functional proteins. Alternative splicing is an important biomarker in tumor progression, which is closely related to the development of tumors. Tumor cells tend to produce alternative spliceosome that are conducive to their progression. Therefore, targeting regulation of tumor-specific alternative spliceosomes is a potential strategy for tumor therapy. Herein, we provide a brief review of the complex relationship between alternative splicing and tumors. Alternative splicing works by removing non-coding sequences of pre-mRNA and assembling protein-coding fragments in different combinations, ultimately producing proteins with different or even opposite functions. Alternative splicing events can promote the transformation of tumor cells through apoptosis, invasion, metastasis, angiogenesis, and metabolism; they can also influence the effectiveness of cancer immunotherapy by affecting genes that play a key role in the immune pathway. We proposed that direct or indirect targeting of alternative splicing factors and oligonucleotide-based therapies are the main strategies to reverse tumor alternative splicing events. These findings will help us to better understand tumor-related alternative splicing and to develop new strategies for tumor treatment.

收稿日期: 2022-12-21; 修回日期: 2023-03-21.

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFE0203100); 现代中医药海河实验室科技项目 (HH2022X1008).

*通讯作者 Tel: 15708469925, E-mail: liubo2400@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1400

Key words: alternative splicing; pre-mRNA; splicing factor; tumor therapy; targeted therapy

在真核生物中, mRNA 是指导蛋白质生物合成的分子模板, 主要的基因转录物前体 mRNA (pre-mRNA) 通常不具有蛋白质合成的功能, 直到非编码序列 (内含子) 被移除, 编码序列 (外显子) 被拼接在一起生成成熟的 mRNA^[1]。可变剪接 (alternative splicing) 是通过去除 pre-mRNA 的非编码序列, 并将蛋白质编码片段以不同的组合方式组装, 最终产生具有不同甚至相反功能的蛋白质^[2]。因此, 单一基因通过可变剪接可以合成功能不同的成熟 mRNA, 增加了 mRNA 的复杂性, 以满足蛋白质功能的多样性^[3]。事实上, 可变剪接是一种广泛存在的事件, 对于 90%~95% 的人类基因的正常表达是必不可少的^[4], 这种复杂而严格调控的机制在不同的组织和发育阶段广泛存在。然而, 在剪接过程中容易发生失调, 基因组突变、调控蛋白因子的缺陷或失衡都可能引起 mRNA 可变剪接失调^[5]。肿瘤中广泛存在异常的可变剪接事件, 其与剪接机制组成部分的突变和/或表达改变相关^[6]。有研究通过对 8 705 名肿瘤患者的可变剪接事件分析发现肿瘤中的可变剪接事件比正常组织多出 30%^[7]。此外, 剪接失调的基因产物参与了肿瘤的生成和进展, 包括细胞凋亡、侵袭、肿瘤转移、血管生成和化疗/放疗抗性^[8]。可变剪接事件已成为人类癌症的重要分子标志物之一, 也是开发新癌症疗法的潜在策略^[9]。因此, 识别肿瘤相关的剪接异构体, 并在肿瘤背景下阐明异常可变剪接背后的机制, 对开发肿瘤全新的诊断标志物和治疗策略具有极其重要的意义^[5]。

因此, 本文介绍了可变剪接的机制和类型, 总结了异常的可变剪接在肿瘤发生和发展中的作用以及靶向异常可变剪接的研究进展。此外, 本文还讨论了目前基于可变剪接事件在癌症治疗中的治疗前景。

1 可变剪接的机制与类型

在真核生物中, 编码蛋白的基因在其最初的转录产物 pre-mRNA 中含有大量的内含子, 在变成蛋白质合成模板之前需要去除内含子, 并将外显子重新拼接。Pre-mRNA 在核内加工时形成大小不等的中间物, 称为核内不均一 RNA (heterogeneous nuclear RNA, hnRNA), 通过对其加工可产生不同的 mRNA。因此, 可变剪接是改变 pre-mRNA 结构的一种分子机制, 这一过程是将剪接的编码序列 (外显子) 排列成不同的组合而产生多种 mRNA。可变剪接机制在基因表达中扮演重要角色, 因为它们具有时空特异性。具体而言, 在不同发育阶段、组织部位和细胞类型中, 在相同蛋白的表达模

式下也可以得到不同的 mRNA 和翻译产物^[10]。

Pre-mRNA 的剪接过程由多个 RNA 和 RNA 结合蛋白协同参与。在细胞核内存在许多大小在 100~300 个核苷酸的小分子 RNA, 称为核内小 RNA (small nuclear RNAs, snRNAs)。snRNAs 与多肽和蛋白质相互结合形成核糖核蛋白 (ribonucleoproteins, RNP)。一个 snRNA 能与多个蛋白质相结合, 称为 snRNP, snRNP 包含 U1、U2、U4、U5 和 U6, 是剪接体 (spliceosome) 的核心成分。剪接体是能够识别被剪接 pre-mRNA 上的剪接位点并催化剪接反应的核糖核蛋白复合体。它由 5 个 snRNP 和其他蛋白质组成 (剪接因子和调节因子) 组成。每个 snRNPs 都包含自己的 snRNAs, 并与一组 300 个相关蛋白复合, 形成复合体^[11]。一旦剪接体 snRNAs 识别到 pre-mRNA 结构中的剪接位点, 这个复合体中的剪接蛋白就能相应地交替使用外显子并去除内含子^[12]。U1 snRNP 与 5' 端剪接位点 (5' splice site, 5' SS) 结合, U2 与 3' SS 和嘧啶区 (py) 结合。接下来, 招募 U5、U4 和 U6, 并通过 snRNP 之间的重排形成催化活性复合物, 以完成内含子切除和外显子连接 (图 1)。剪接位点受到顺式作用的剪接调节元件的调控, 这些元件通过招募反式作用的剪接因子来促进或抑制邻近剪接位点的使用^[13]。根据顺式作用元件的位置和功能, 它们被分为外显子剪接增强子、内含子剪接增强子、外显子剪接沉默子和内含子剪接沉默子。增强子被反式作用因子识别, 属于富含丝氨酸/精氨酸 (serine/arginine-rich, SR) 蛋白家族, 从而促进剪接位点识别^[14]。而沉默子通常与其他类型的反式作用因子, 如核不均一核糖核蛋白 (hnRNPs) 相互作用, 从而抑制剪接位点识别并促进外显子跳跃^[13]。

根据成熟转录本的差异类型可以将可变剪接分为: 外显子跳跃 (exon skip)、5'剪接位点改变 (alternative 5' splice site)、3'剪接位点改变 (alternative 3' splice site)、内含子保留 (intron retention) 和外显子互斥 (mutually exclusive exons)^[3] (图 2)。外显子跳跃, 即串联的 3 个外显子中, 居中的外显子经剪接过程后被去除; 而 5'剪接位点改变和 3'剪接位点改变主要是指 5'剪接位点和 3'剪接位点的位置发生了变化, 出现在了外显子内部; 内含子保留主要指剪接后内含子没有被去除; 而外显子互斥则是指一些外显子存在互斥效应, 无法同时存在于一个转录本内^[15]。人类的主要可变剪接形式是外显子跳跃, 占有可变剪接事件的 40%, 由于功能域/位点的丢失或开放阅读框 (open reading

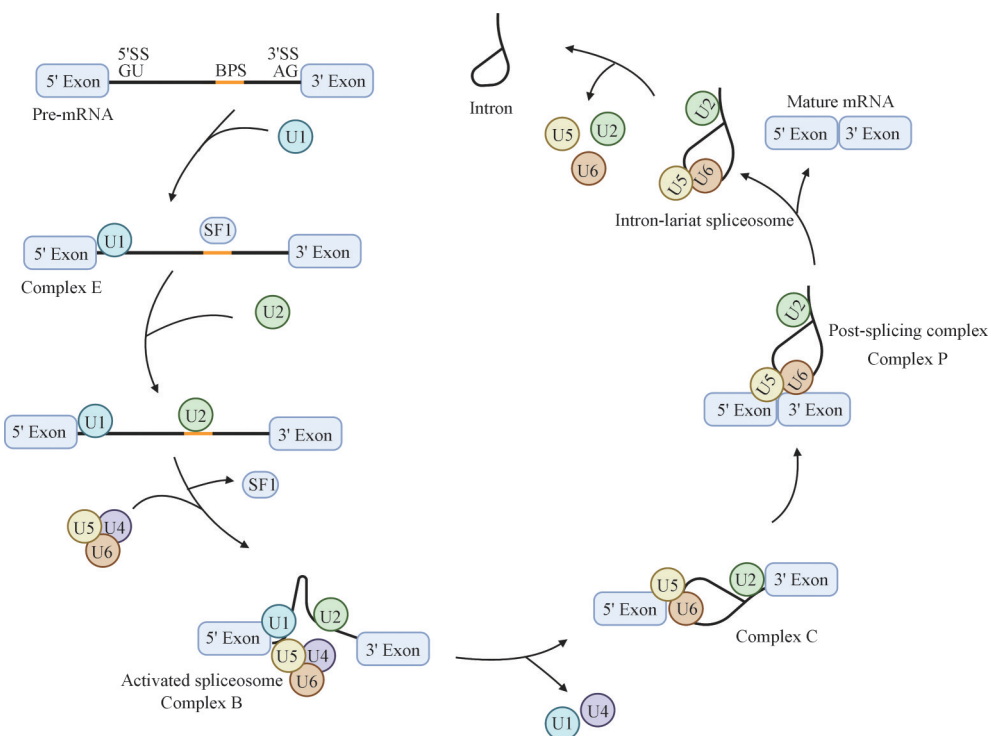


Figure 1 A general schematic of pre-mRNA splicing by the major spliceosome. Stepwise assembly of spliceosomal complexes on a pre-mRNA molecule and catalysis of the splicing reaction to generate mature spliced mRNA. The array of spliceosome components assembles in distinct manners throughout the splicing process; termed complexes E, A, B, C, P, and intron-lariat spliceosome (ILS). BPS: Branch point sequences; SS: Splice site

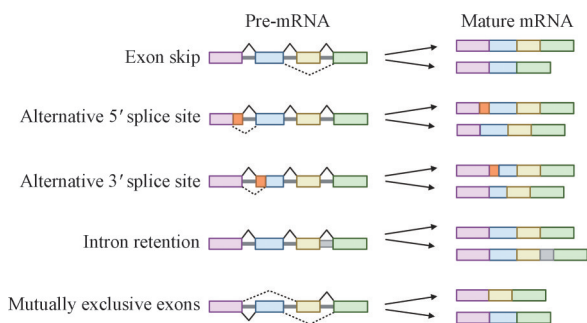


Figure 2 According to the different types of alternative splicing transcripts, alternative splicing can be divided into: exon skip, alternative 5' splice site, alternative 3' splice site, intron retention, and mutually exclusive exons

frame) 的转移, 导致了各种人类疾病, 因此被认为是重要的治疗目标^[16]。

2 肿瘤中的可变剪接失调

越来越多的证据证明了异常的可变剪接在肿瘤发生和发展中的重要作用^[17], 一方面, 有许多可变剪接事件在肿瘤组织和正常组织中发生的频率是不同的, 此前已有研究人员在 32 个不同癌种中发现了上千起不同的剪接事件, 它们在正常组织与肿瘤组织之间存在差异^[7]; 另一方面, 一些异常的可变剪接产物, 可能在

肿瘤的发生和发展中发挥重要作用, 直接影响着肿瘤的进展和治疗^[18]。还有一些基因的可变剪接可以对肿瘤相关的通路起到调控作用, 从而影响到肿瘤的进展^[19]。可变剪接通过控制 RNA 异构体的表达来提供转录可塑性, 肿瘤细胞颠覆了这一过程, 产生了有利于细胞增殖和迁移, 或可以逃脱细胞死亡的亚型。肿瘤的发生发展是渐进化、多步骤的。在正常细胞转变为肿瘤细胞的过程中, 它们会逐步获得一些标志性功能, 并最终发展成恶性病变。可变剪接事件可以通过增殖和凋亡、侵袭和转移、血管生成和代谢促进正常细胞向肿瘤细胞的转变, 也可通过影响免疫通路中起关键作用的基因, 从而影响肿瘤治疗的有效性。因此, 可变剪接事件已成为人类肿瘤的重要分子标记之一和开发新的肿瘤治疗方法的潜在靶点。

2.1 破坏增殖和凋亡平衡 肿瘤细胞最基本的特征是它们维持持续增殖的能力。正常组织能控制促生长信号和凋亡信号的产生和释放, 这些信号能确保细胞数量的稳态, 从而维持正常组织结构的功能。而肿瘤细胞通过解除对这些信号的管制, 进而获得持续增殖的能力^[20]。可变剪接通过调节许多致癌或抑癌基因及剪接因子的选择性表达, 参与细胞的增殖、分化和凋亡过程^[17,21]。

B淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白家族通过形成异二聚体和同二聚体调节细胞凋亡。Bcl-2 蛋白通过控制线粒体膜的通透性来调节细胞色素 C (cytochrome C) 释放^[22]。Bcl-2 家族的抗凋亡成员也通过与 BH3-only 蛋白结合并在内源性途径中激活 BAX 和 BAK 来抑制细胞死亡^[23]。Bcl-x 是由 Bcl-2 样蛋白 1 (BCL2L1) 基因编码的凋亡调节因子, 通过调节线粒体膜上的电压依赖性阴离子受体来控制线粒体膜电位, 从而控制细胞死亡。Bcl-2 pre-mRNA 被剪接成两种 mRNA 亚型, 它们编码的蛋白质具有不同的生理特性。一种为抗凋亡亚型, 称为 Bcl-xL, 另一种为促凋亡亚型, 称为 Bcl-xS。Bcl-2 剪接模式在其促凋亡亚型和抗凋亡亚型之间的变化在肺癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤和前列腺癌等疾病的进展中起关键作用^[24-28] (图 3A)。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 相互作用丝氨酸/苏氨酸激酶 2 (MAPK interacting serine/threonine kinase 2, MNK2) 可以被精氨酸/丝氨酸丰富剪接因子 1 (serine/arginine-rich splicing factor 1, SRSF1) 剪接产生两种亚型: MNK2a 和 MNK2b。MNK2a 包含外显子 14a, 而 MNK2b 缺乏外显子 14a。如在结直肠癌细胞中, 两种亚型之间存在失衡, 由于 SRSF1 表达升高, MNK2b 占主导地位, 而具有 MAPK 结合域的 MNK2a 亚型被下调, 从而通过抑制 p38a-MAPK 信号通路促进细胞生长并减少细胞凋亡^[29]。

2.2 促进侵袭和转移 侵袭和转移是肿瘤治疗亟待解决的难题。上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 在癌症的转移和复发过程中被异常激活, 这取决于肿瘤细胞与微环境之间的相互作用^[30]。

可变剪接与 EMT 和肿瘤转移的功能联系是通过 CD44 基因的研究建立起来的。CD44 基因被可变剪接成两个蛋白质家族, 称为 CD44v 和 CD44s。前期研究发现, CD44 亚型转换对 EMT 的发生是必不可少^[31], 其他研究还报道, 主要表达 CD44v 的上皮细胞需要亚型转换为 CD44s, 以促进细胞的 EMT 和肿瘤细胞转移^[32,33]。在 CD44 可变剪接的情况下, hnRNP M 通过与 CD44 内含子剪接基序结合来促进 CD44s 的产生, 从而导致转移的增强^[34]。

在肿瘤细胞中, 有丝分裂信号的增强使转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 激活的 SMAD3 与多聚 C 结合蛋白 1 [poly (rC)-binding protein 1, PCBP1] 相互作用, 并共同调节许多可变剪接事件, 从而有利于 EMT、细胞骨架重排和黏附连接信号传导所必需的蛋白亚型的表达^[35,36]。有研究表明, 缺失

TGF- β 激活激酶 1 (transforming growth factor-beta-activated kinase 1, TAK1) 的可变外显子 12 (TAK1 Δ E12) 具有组成型活性并支持 TGF- β 诱导的 EMT 和核因子 kappa B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 信号, 而全长 TAK1FL 则促进 TGF- β 诱导的细胞凋亡^[37]。因此, TAK1 激酶经过可变剪接, 可通过 TGF- β 产生细胞存活和细胞凋亡的两种相反作用 (图 3B)。

多聚嘧啶区结合蛋白 1 (polypyrimidine tract-binding protein 1, PTBP1) 促进体外膀胱癌细胞的迁移、侵袭和增殖, 以及体内淋巴结转移和肿瘤生长。PTBP1 通过可变剪接机制诱导膀胱癌淋巴结的转移和增殖。有研究报道, PTBP1 通过上调 Meis homeobox 2-L (MEIS2-L) 变异体促进转移, 并通过调节可变剪接增加丙酮酸激酶 M2 (pyruvate kinase M 2, PKM2) 表达来诱导增殖^[38]。

2.3 诱导血管生成 肿瘤生长需要以营养物和氧气形式存在的营养, 以及排出代谢废物和二氧化碳的能力, 而血管生成过程产生的肿瘤相关新血管系统满足了这些需求^[39]。在肿瘤进展过程中血管生成总是被激活, 许多蛋白质充当血管化激活剂, 包括血管内皮生长因子 (vascular endothelial-derived growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、血管生成素等^[40,41]。在控制血管生成的生长因子、受体、细胞因子和酶中, VEGF-A 是主要的促血管生成细胞因子。外显子 8 中近端和远端 3' 剪接位点的差异使用会产生具有不同 C 末端结构域并具有相反特性的亚型, 分别是促血管生成 (VEGF-A xxx a) 和抗血管生成 (VEGF-A xxx b)^[42]。泛素特异性肽酶 39 (ubiquitin specific peptidase 39, USP39) 在许多肿瘤中充当促癌因子^[43-46]。USP39 可能通过抑制 VEGF-A165b 可变剪接和调节 SRSF1 和丝氨酸精氨酸蛋白激酶 1 (serine/arginine protein kinase 1, SRPK1) 来激活肾细胞癌的恶性生物学过程, 从而作为促肿瘤因子发挥作用^[47]。SRPK1 介导的 SRSF1 过度磷酸化导致抗血管生成 VEGF-A165b 向促血管生成 VEGF-A165a 亚型转变 (图 3C)。

大量临床前和临床证据表明, 特定 VEGF-A 亚型的表达代表了主要的促血管生成因子, 这与结直肠癌患者的转移形成和不良预后有关^[48]。科学家认为最有效但也是最具挑战性的方法可能是让肿瘤中 VEGF-A 的转录不受阻碍地进行, 但要控制剪接, 使剪接体选择外显子 8 远端剪接位点代替外显子 8 近端剪接位点, 这将有效地促进肿瘤关闭其自身的营养供应。由于 VEGF 在结直肠癌中存在从抗血管生成亚型到促血管生成亚型的转换, 因此相信通过调控 VEGF 的促血管

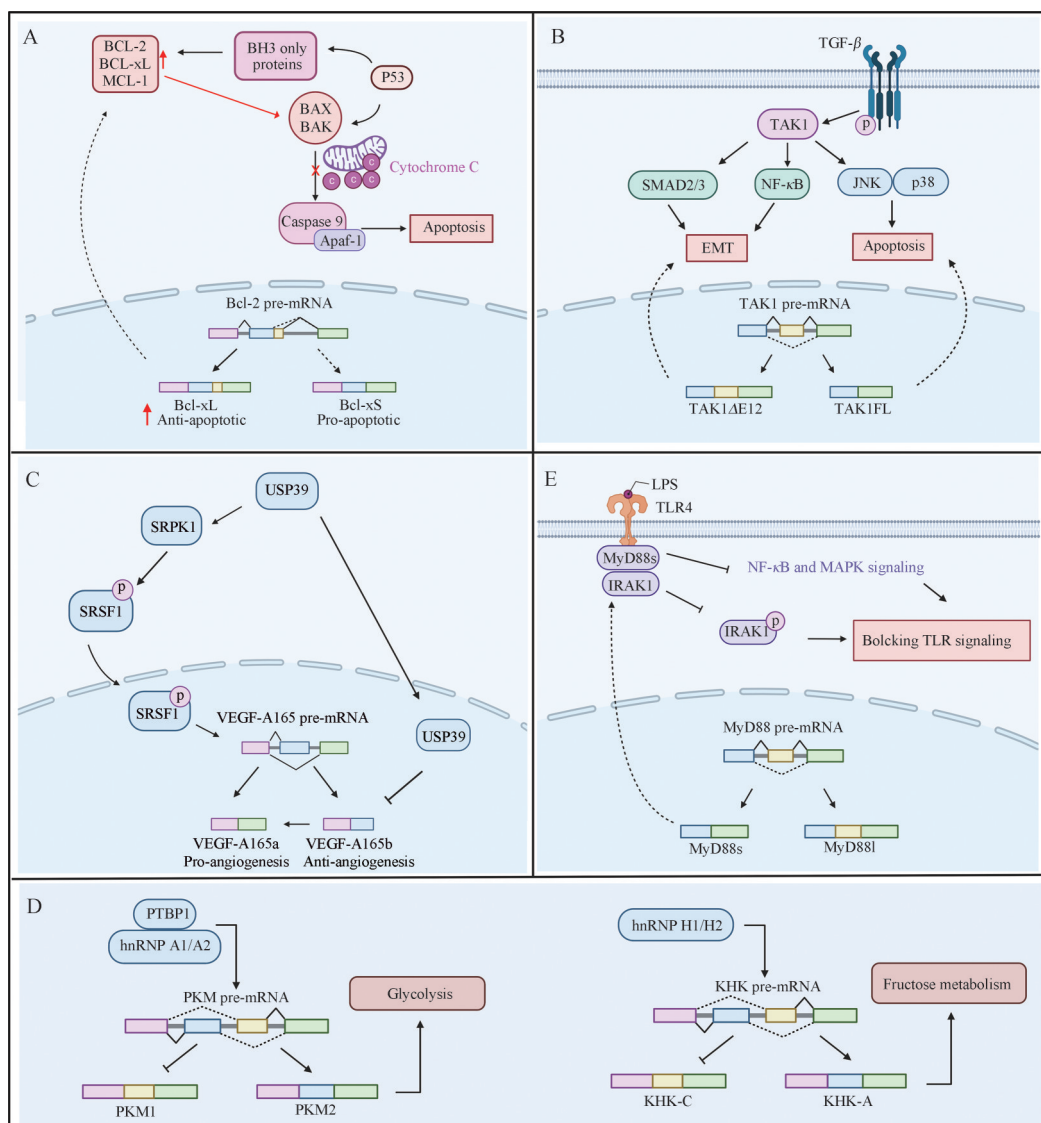


Figure 3 Alternative splicing events can affect the effectiveness of cancer therapy by promoting the transition from normal cells to tumor cells through apoptosis, invasion and metastasis, angiogenesis, metabolism, and avoiding immune destruction. A: Alternative splicing event of Bcl-2. Bcl-2 pre-mRNA is spliced into two mRNA isoforms, an anti-apoptotic subtype called Bcl-xL and a pro-apoptotic subtype called Bcl-xS. In tumors, anti-apoptotic members of the Bcl-2 family inhibit cell death by binding to BH3-only proteins and activating BAX and BAK in endogenous pathways; B: Alternative splicing event of TAK1. TAK1 pre-mRNA can be spliced into TAK1ΔE12 and the full-length isoform TAK1FL. TAK1ΔE12 is constitutively active and supports TGF-β-induced EMT and NF-κB signaling, whereas the full-length isoform TAK1FL promotes TGF-β-induced apoptosis; C: Alternative splicing event of VEGF-A 165. USP39 acts as a tumor promoter by activating malignant biological processes by inhibiting VEGF-A 165b alternative splicing and regulating SRSF1 and SRPK1. SRPK1 mediated hyperphosphorylation of SRSF1 leads to a shift from anti-angiogenesis VEGF-A165b to pro-angiogenesis VEGF-A165a isoform; D: Pyruvate kinase muscle isozyme PKM produces PKM1 and PKM2 splice isoforms. PKM1 is expressed in most normal cells and promotes oxidative phosphorylation, while PKM2 is up-regulated in tumor cells and promotes aerobic glycolysis. Fructose metabolism begins when it is phosphorylated by KHK, which exists as two alternative splicing isoforms KHK-A and KHK-C. KHK-C is tissue specific and mainly expressed in the liver, intestine and kidney, while the KHK-A isoform is associated with the development of cancer; E: Alternative splicing event of MyD88. MyD88s isoform is a mechanism for blocking TLR signaling. MyD88 can produce a positive regulator of TLR signaling. However, the MyD88 gene also encodes MyD88s that bind TLR and IRAK1 but not IRAK4 kinase, thereby inhibiting IRAK1 phosphorylation and NF-κB signaling

生成亚型与抗血管生成亚型的比率,可能将影响肿瘤和其他血管生成相关疾病的治疗,将是未来研究的

重点^[48]。

为了促进细胞反应, VEGF-A 二聚体与配对的酪

氨酸激酶受体结合,称为血管内皮生长因子受体(VEGFR), VEGFRs分为3种类型: VEGFR1、VEGFR2和VEGFR3,其中VEGFR1和VEGFR2具有相似的结构^[49]。VEGF-A亚型家族与VEGFR1和VEGFR2结合以促进血管生成,而VEGF-C/D亚型与VEGFR3结合以驱动淋巴管生成以形成淋巴管^[50]。尽管与VEGFR2相比,VEGFR1对VEGF-A的结合具有更高的亲和力,然而VEGFR1的激酶活性低,因此被认为是一种诱饵受体^[51]。迄今为止,研究发现VEGFR1有4种可变剪接亚型,分别是sVEGFR1-i13、sVEGFR1-i14、sVEGFR1-e15a和sVEGFR1-e15b^[52-54]。在这些剪接变体中,sVEGFR1-i13源于内含子13保留和提前多聚腺苷酸化^[55]。在功能上,sVEGFR1-i13主要被视为一种天然的VEGF-A拮抗剂,抑制这种生长因子的促有丝分裂作用。因此,sVEGFR1-i13被认为是新生血管生成抑制剂,可在小鼠模型中预防肿瘤生长和转移^[56]。最近在肺鳞癌细胞中进行的一项研究发现,VEGF-A₁₆₅促进SOX2的表达,SOX2直接与SRSF2的启动子结合并诱导转录。SRSF2剪接因子促进VEGFR1剪接到sVEGFR1-i13亚型^[52]。

2.4 促进肿瘤代谢重编程 肿瘤的发生和发展还需要肿瘤细胞的代谢重编程。肿瘤细胞通过各种代谢途径自主改变它们的通量,以满足增加的生物能量和生物合成需求,并减轻肿瘤细胞增殖和存活所需的氧化应激^[57]。

在肿瘤细胞中,Warburg效应被证明是由可变剪接调节^[58]。丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)是催化糖酵解的限速酶,通过将磷酸基团转移给ADP生成丙酮酸和ATP^[59]。此外,缺氧诱导的可变剪接也是肿瘤发生和发展的重要因素^[60]。丙酮酸激酶同工酶(pyruvate kinase muscle isozyme, PKM)分别使用互斥的外显子9和外显子10产生PKM1和PKM2剪接异构体。PKM1在大多数正常细胞中表达并促进氧化磷酸化,而PKM2在肿瘤细胞中表达上调并促进有氧糖酵解^[61,62]。研究证明,用PKM1替代肿瘤细胞中的PKM2可以显著减少乳酸的产生和肿瘤的大小,这表明肿瘤细胞中PKM1或PKM2的存在可以直接影响肿瘤的代谢表型^[61]。通过调控PKM基因的表达(抑制PKM2的表达,促进PKM1的产生)对抑制肿瘤进展具有重要意义。研究表明,PKM的可变剪接是由剪接调控因子hnRNPA1、hnRNPA2、SRSF3等决定的。这表明剪接因子参与了可变剪接在肿瘤代谢中的作用^[63](图3D)。

除了有氧糖酵解,增强的谷氨酰胺代谢是肿瘤细胞的另一个重要特征^[64]。谷氨酰胺是生物合成反应的重要前提,补充三羧酸循环的碳源,并能产生谷胱甘肽

调节氧化还原稳态。一些肿瘤细胞依赖谷氨酰胺,一旦被剥夺就会发生死亡^[64]。谷氨酰胺代谢的第一步,即谷氨酰胺水解为谷氨酸,由谷氨酰胺酶催化,谷氨酰胺酶以两种可变剪接的亚型存在:谷氨酰胺酶C(glutaminase C, GAC)和肾型谷氨酰胺酶(kidney-type glutaminase, KGA)。在神经胶质瘤、结直肠癌和腺瘤以及乳腺癌细胞系中,与正常组织相比,GAC亚型占优势^[65],且通过小分子抑制剂特异性抑制GAC亚型可抑制肿瘤进展^[66,67]。

3-磷酸甘油和3-磷酸甘油醛在肿瘤细胞内被果糖代谢,可为肿瘤细胞合成磷脂和甘油三酯提供物质基础。此外,果糖代谢的中间产物可进入非氧化性磷酸戊糖途径,为肿瘤细胞合成核糖提供5-磷酸核糖,并产生大量NAPDH。果糖代谢始于其被酮己糖激酶(ketohexokinase, KHK)磷酸化,该酶以两种可变剪接变体存在(KHK-C和KHK-A)。KHK-C和KHK-A是分别通过特异性切除相邻外显子3A和3C产生的。其中,KHK-C具有组织特异性,主要在肝、肠和肾中表达;而KHK-A亚型与肿瘤等疾病的发展有关^[68,69](图3D)。

2.5 抑制免疫反应 免疫疗法正在为一些以前无法治愈的肿瘤提供有效的治疗方法。有研究表明,肿瘤中的可变剪接异常直接影响在免疫通路中起关键作用的基因,从而影响肿瘤免疫治疗的有效性^[15]。因此,鉴定不同剪接异构体在特定肿瘤中的作用以及剪接因子的调控作用,对于揭示肿瘤逃避免疫应答的机制和肿瘤的免疫机制具有重要意义。肿瘤相关巨噬细胞在肿瘤的发展、新血管生成的调节、免疫抑制和转移中发挥重要作用。巨噬细胞在肿瘤中的高度浸润也与几种癌症类型的不良预后相关^[70]。

先天免疫信号转导中可变剪接的一个突出例子是MyD88。典型的MyD88 mRNA可产生toll样受体(toll-like receptors, TLR)信号的正调节因子。然而,MyD88基因还编码另一种较短的mRNA(MyD88s),其中跳过了135-bp外显子2,它可以结合TLR和白细胞介素受体相关激酶1(IL-1R-associated kinase 1, IRAK1),但不能结合IRAK4激酶,从而导致IRAK1磷酸化和NF- κ B激活相关的显性负抑制(dominant-negative inhibition)。因此,这种负作用亚型的产生可能是终止TLR信号传导的通用机制。MyD88s的产生可由脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导,表明MyD88s的产生可能代表终止炎症的关键负反馈回路^[71](图3E)。

树突状细胞的成熟是诱导适应性免疫反应的关键步骤,树突状细胞中剪接因子PTBP1的缺失可以通过

调节PKM可变剪接来增强抗肿瘤免疫力,PKM2的降低导致内源性逆转录病毒元件的表达和增强的免疫应答^[72]。CD19是包括B细胞前体急性淋巴细胞白血病在内的B细胞表达的常见抗原,并构成基于嵌合抗原受体修饰T细胞(chimeric antigen receptor-modified T, CAR-T)的免疫疗法的靶标。然而,接受这种疗法的患者有大约10%~20%复发,这与细胞表面的CD19表位丢失有关。SRSF3下调诱导CD19外显子2的跳跃产生截短的蛋白质亚型,导致其未能触发CAR-T细胞的杀伤^[18]。

3 肿瘤中可变剪接的靶向治疗

肿瘤特异性可变剪接变异的发现为肿瘤学提供新的治疗靶点。越来越多的证据表明,一些调控可变剪接事件的化合物可以通过恢复异常的可变剪接程序有效地控制肿瘤。可变剪接的调控可通过靶向调控剪接因子或剪接体,直接影响肿瘤中可变剪接过程;也可以通过寡核苷酸精准地针对肿瘤细胞内的单个剪接异构体进行调控。因此,靶向剪接核心元件以及基于寡核苷酸的治疗是目前逆转肿瘤可变剪接事件的主要策略。这些基于肿瘤特异性可变剪接的治疗策略有望为肿瘤治疗提供新的治疗靶点(图4)。

3.1 靶向核心剪接体的小分子化合物 剪接体是由

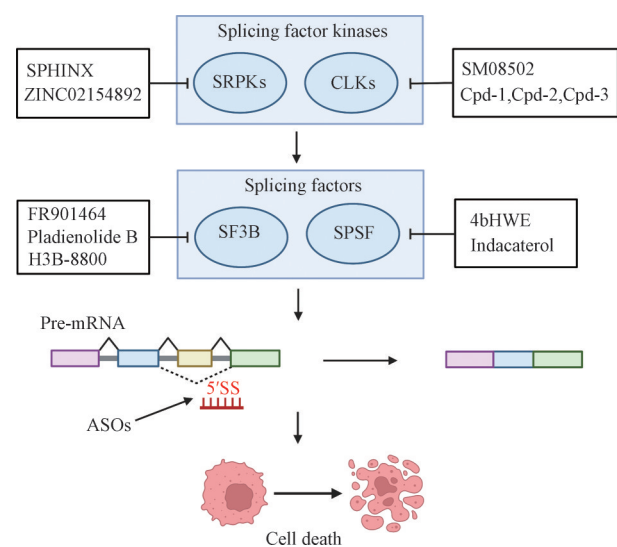


Figure 4 Targeted therapies for alternative splicing. Small molecule inhibitors (SPHINX, ZINC02154892, SM08502, Cpd-1, Cpd-2, and Cpd-3) can block the activity of splicing factor kinases (CLKs and SRPKs), thereby reversing aberrant mRNA splicing. Small-molecule inhibitors of splicing factors (FR901464, pladienolide B, H3B-8800, 4bHWE, indacaterol) can reverse abnormal splicing by blocking spliceosomal assembly or directly targeting splicing factors. ASO can affect mRNA maturation by entering the nucleus and acting on the precursor mRNA, inhibiting the formation of the 5' end cap or blocking the polyadenylation of the 3' end

5 个小核糖核蛋白 (small nuclear ribonucleoproteins, snRNP) 和负责从 pre-mRNA 中去除内含子的其他蛋白质组成的多组分复合物。剪接体是可变剪接的核心元件,其中 pre-mRNA 可以剪接形成不同的蛋白质亚型。U2 snRNP 与 pre-mRNA 的分支点序列结合,由多个剪接因子组成,包括剪接因子 3B (splicing factor 3B, SF3B)^[73]。剪接体的小分子调节剂在许多癌症中表现出有效的抗肿瘤活性,在 MYC 癌基因 (myelocytomatosis oncogene, MYC) 驱动的三阴性乳腺癌中,剪接体靶向疗法导致错误拼接的 mRNA 在细胞质中广泛积累,其中许多形成双链结构。双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 结合蛋白识别这些内源性 dsRNA,引发抗病毒信号和外源性凋亡。在免疫能力强的乳腺癌模型中,剪接体靶向疗法导致肿瘤细胞内产生抗病毒信号、下游适应性免疫信号及肿瘤细胞死亡^[74]。靶向剪接体元件的小分子,通过阻止功能剪接体与 pre-mRNA 结合,阻断其活性,从而完全抑制剪接。另外,广泛的剪接抑制可以通过靶向调节剪接调节因子活性的酶来实现,如 CDC 样激酶 (CDC-like kinase, CLKs) 或 SRPKs 的小分子抑制剂。影响剪接因子多聚泛素化和蛋白体降解的化合物 (如磺胺类药物) 也能诱发剪接谱的广泛变化^[75]。

研究表明,最早发现的剪接调节剂 FR901464 是一种有效的剪接体抑制剂,它靶向剪接体的 SF3B1,导致剪接模式发生变化。在 HeLa 细胞中,FR901464 抑制 pre-mRNA 剪接,作用于 SF3B 的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 为 $0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[76]。FR901464 对多种人类癌细胞系具有有效的抗增殖作用,如乳腺癌 MCF7、肺腺癌 A549、结肠癌 HCT116、SW480 及小鼠白血病 P388 细胞系,其 IC_{50} 值分别为 1.8、1.3、0.61、1.0 和 $3.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[77]。Pladienolide B 是一种大环内酯,对多种细胞系具有抗增殖活性^[78]。Pladienolide B 及其衍生物能够直接结合 SF3B 并抑制肿瘤细胞中的剪接过程^[73]。Pladienolide B 在抑制胃癌细胞系中的细胞生长方面非常有效,在 6 种胃癌细胞系中 pladienolide B 的平均 IC_{50} 为 $1.6 \pm 1.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,证明其对胃癌有很强的抗肿瘤活性^[79]。H3B-8800 是另一种口服靶向 SF3B1 的剪接调节剂,以剂量依赖性方式抑制异常剪接变异体 MAP3K7 的表达,并优先杀死表达突变剪接体的上皮和血液系统恶性肿瘤,每天口服 2 或 $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 可减缓 SF3B1^{K700E} 异种移植小鼠肿瘤的生长^[80]。

3.2 靶向调控剪接因子的小分子化合物 SR 蛋白作为参与可变剪接的主要蛋白质之一,主要依靠 SR 蛋白相关激酶来调整其在亚细胞器中的定位,并与转录靶

标和其他蛋白质伴侣相互作用,从而显著影响可变剪接的最终结果^[81]。4bHWE 是一种从 *Physalis peruviana* 中分离出来的化合物,具有作为抗癌药物的潜在作用,它通过减少剪接因子 SRSF1 磷酸化,同时增加 H3K36me3 的水平,并改变染色质凝聚,显示出对可变剪接的影响^[82]。在结直肠癌中, SRSF6 经常上调,并且与预后不良相关。最近的一项研究确定了 SRSF6 调控的可变剪接靶标, SRSF6 通过直接结合其在外显子 23 中的基序来调节 ZO-1 异常剪接以发挥癌基因的作用。此外,研究还发现 indacaterol 通过靶向 SRSF6 具有良好的抗结直肠癌的作用^[83]。

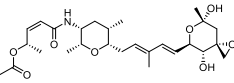
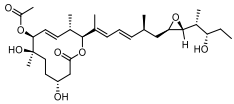
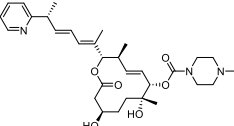
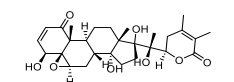
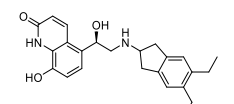
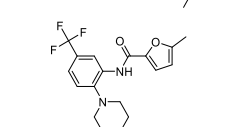
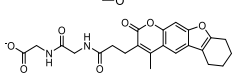
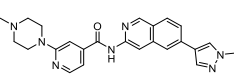
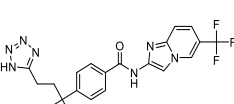
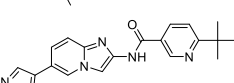
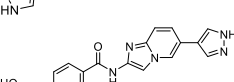
SRPK1 是一种磷酸化 SR 家族蛋白的激酶。SRPK1 抑制剂 SPHINX 可促进 VEGFA165 向 VEGFA165b 的剪接转换,以抑制体内肿瘤生长^[84]。据报道,化合物 ZINC02154892 是最有效的 SRPK1 抑制剂。体外分子和细胞生物学研究表明, ZINC02154892 是白血病细胞系中 ASF/SF2 磷酸化和细胞存活的有效和特异性抑制剂。ZINC02154892 通过靶向 ATP 结合位点,同时抑制 SRPK1 对 ASF/SF2 的募集^[85]。SM08502 是一种用于实体瘤研究的新小分子,可通过有效抑制 CLK 活性来减少 Wnt 通路信号和基因表达。SM08502 抑制 SRSF 磷酸化并破坏剪接体活性,这与抑制 Wnt 通路相关基因和蛋白质表达有关。SM08502 还可诱导 Wnt 通路基因剪接变体的产生,表明其抑制基因表达的机制包括对可变剪接的影响。在异种移植小鼠模型中,口服 SM08502 显著抑制胃肠道肿瘤的生长并降低 SRSF 磷酸化水平和 Wnt 通路基因表达^[86]。其他 CLK 小分子抑制剂如 Cpd-1、Cpd-2 和 Cpd-3 可显著抑制剪接因子 SRSF1、SRSF4 和 SRSF6 的磷酸化,从而改变 S6K pre-mRNA 的剪接模式,减少细胞增殖并促进细胞凋亡^[87] (表 1)^[76,77,79,80,82-87]。

3.3 基于寡核苷酸的疗法 此外,基于寡核苷酸的疗法已被证明是靶向具有特异性的野生型或异常剪接变异的有效策略。反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO) 是强大的治疗工具,通过 Watson-Crick 碱基配对结合特定的 RNA 靶序列发挥作用。ASO 靶向 RNA 的应用范围很广,包括 RNA 降解、RNA 剪接改变、翻译抑制、RNA 结构修饰和 RNA-蛋白质相互作用的破坏等^[88]。剪接转换因子 ASOs 是经过化学修饰的 RNA 分子,由 15~30 个核苷酸组成,可以重定向特定的剪接事件,以防止产生截短或突变的蛋白质,或产生特定的蛋白质异构体^[89]。ASO 介导的肿瘤相关剪接异构体的修饰可以在体内外实现。有研究团队筛选出一种 ASOs,能在胶质母细胞瘤和 HEK293 细胞中将 PKM 剪接从 PKM2 切换到 PKM1。这种亚型改变由 ASOs

的脂质修饰引起,导致培养的胶质母细胞瘤细胞以剂量依赖的方式发生凋亡^[90]。另外,该团队最近的研究发现一种 ASOs, ASO1-cEt/DNA 能够诱导 PKM 剪接切换,抑制肝细胞癌细胞的生长。这种 PKM 异构体开关增加了丙酮酸激酶活性并改变了葡萄糖代谢,并在原位肝癌异种移植小鼠模型中,抑制肿瘤的发生^[91]。另一项研究验证 ASOs 可以有效地诱导外显子跳跃,破坏非小细胞肺癌相关代谢酶 GLDC 转录本的 ORF,阻止 A549 细胞和富含 TIC 的非小细胞肺癌肿瘤球体细胞 TS32 中的集落形成^[92],这表明这些 ASO 在癌症治疗中具有广泛的潜力。此外,一种名为 oligoAB 的剪接切换寡核苷酸 (splice switching oligonucleotides, SSO) 已被设计为靶向 BRCA1 的剪接位点序列,它能够刺激 BRCA1 第 11 外显子的跳跃,同时减少 BRCA1-FL 和 BRCA1-Δ11Q 的表达来改变 BRCA1 pre-mRNA 的剪接^[93]。

3.4 调控可变剪接的生物大分子 除了小分子化合物和寡核苷酸,还有一些生物大分子能与可变剪接元件相互作用,从而调控可变剪接的过程。有研究表明,长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) CRNDE 与临床样本和患者来源的异种移植 (patient-derived xenograft, PDX) 模型中胃癌的化疗敏感性有关。CRNDE 减少并抑制化疗耐药胃癌细胞中的自噬通量。CRNDE 能直接与剪接蛋白 SRSF6 结合,降低其蛋白稳定性,从而调节可变剪接事件。研究表明, SRSF6 调节 PICALM 外显子 14 跳跃剪接变体并触发 S 到 L 亚型转换,这有助于 PICALM 长亚型 (编码 PICALML) 的表达。因此,CRNDE 作为潜在的预后标志物,是化疗耐药胃癌新的治疗靶点^[94]。研究表明,环状 RNA (circular RNA, circRNA) 在人类肿瘤发生过程中对基因调控发挥重要的作用。如与胃癌癌旁样本相比, circURI1 在胃癌中的表达水平显著增加,并且 circURI1 可直接与 hnRNPM 相互作用,调节基因的可变剪接,参与细胞迁移过程,从而抑制胃癌转移^[95]。发生淋巴结转移的膀胱癌患者预后极差,目前尚无有效治疗方法。有研究表明,一种不含 POU 结构域 (Pit-Oct-Unc) 的八聚体结合蛋白 (NONO),在膀胱癌组织中显著下调,并与淋巴结转移状态、肿瘤分期和预后相关。在功能上, NONO 显著抑制体外膀胱癌细胞迁移和侵袭以及体内淋巴结转移。NONO 通过与富含脯氨酸/谷氨酰胺的剪接因子 (SFPQ) 相互作用来调节 Su(var)3-9/enhancer-of-zeste/trithorax domain and mariner transposase fusion gene (SETMAR) 的可变剪接,最终导致 H3K27me3 的上调并诱导膀胱癌细胞的转移抑制^[96]。因此, NONO 通过 SETMAR 可变剪接抑制膀胱

Table 1 Small molecule compounds that regulate alternative splicing

Compound	Structure	Target	Mechanism	IC ₅₀	Ref.
FR901464		SF3B1	Targeting SF3B1 to exert the antiproliferative effect	IC ₅₀ values of 0.05 μmol·L ⁻¹ for SF3B1	[76,77]
Pladienolide B		SF3B1	Targeting SF3B1 to induce apoptosis	The average IC ₅₀ in 6 gastric cancer cell lines was 1.6 ± 1.2 nmol·L ⁻¹	[79]
H3B-8800		SF3B1	Inhibiting expression of the aberrant splice variant MAP3K7	–	[80]
4bHWE		SRSF1, SRSF6, SRSF3	Reducing phosphorylation of the SRSF1, and increasing the levels of H3K36me3	The IC ₅₀ in Huh-7 cells and human fibroblasts were 8.32 and 26.42 μmol·L ⁻¹ , respectively	[82]
Indacaterol		SRSF6	Targeting SRSF6 to inhibit CRC progression	–	[83]
SPHINX		SRPK1	Promoting the splicing switch of VEGFA165 to VEGFA165b to inhibit tumor growth <i>in vivo</i>	–	[84]
ZINC02154892		SRPK1	Inhibiting ASF/SF2 phosphorylation and cell survival in leukemia cell lines	The IC ₅₀ in Jurkat, A549, K562, HeLa cell lines were 9.51, 29.76, 25.81, 34.53 μmol·L ⁻¹ , respectively	[85]
SM08502		CLKs	Reducing SRSF phosphorylation and Wnt pathway gene expression to inhibit tumor growth	IC ₅₀ values of 0.002 μmol·L ⁻¹ for CLK2 and 0.022 μmol·L ⁻¹ for CLK3	[86]
Cpd-1		CLKs	Reducing the phosphorylation of SRSF1, SRSF4 and SRSF6 to inhibit cell proliferation and promote apoptosis	IC ₅₀ values of 16 nmol·L ⁻¹ for CLK1 and 45 nmol·L ⁻¹ for CLK2	[87]
Cpd-2				IC ₅₀ values of 1.1 nmol·L ⁻¹ for CLK1 and 2.4 nmol·L ⁻¹ for CLK2	
Cpd-3				IC ₅₀ values of 1.1 nmol·L ⁻¹ for CLK1 and 2.1 nmol·L ⁻¹ for CLK2	

癌淋巴转移, 可能为淋巴结转移性膀胱癌提供新的临床标志物和治疗策略。

4 结论与展望

近年来, 随着组学技术及分析方法的进步, 肿瘤中越来越多的可变剪接的改变被发现, 这有助于研究者了解肿瘤的发生和发展机制。癌症筛查组目前包括血液恶性肿瘤中突变基因之间的剪接因子突变。剪接因子水平的改变和下游剪接靶标的失调是许多癌症共有的肿瘤特征。可变剪接改变代表了一种新颖而丰富的潜在治疗靶点来源, 基于RNA疗法的进步可能会加速剪接调节化合物作为癌症疗法的发展。

此外, 其他领域的进步可用于解决当前在基于RNA疗法的递送和功效方面的挑战。如可以通过将

siRNA 加载到涂有抗 CD38 单克隆抗体的脂质纳米颗粒上来实现对白细胞的特异性递送。这种方法被证明可有效抑制体内细胞周期蛋白 D1、抑制肿瘤生长并延长移植有人类淋巴瘤细胞的小鼠的存活时间^[97], 从而为血液恶性肿瘤的治疗开辟了一条新途径。类似的靶向策略可用于将剪接转换 ASO 递送至治疗目标细胞并提高其在肿瘤中的疗效。

肿瘤耐药性已成为肿瘤治疗的主要挑战之一, 这导致肿瘤治疗的低效或失败。可变剪接不仅可以显著影响癌症药物靶点的表达水平和功能, 还能促进肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性^[98]。因此可通过寻找可变剪接肿瘤耐药的作用, 寻找解决各类肿瘤耐药的新方法。引人注目的是, STF-080310, 一种新型 IRE1α/

XBP1 抑制剂, 可以通过特异性破坏 XBP1 的剪接和降低 XBP1s 的表达水平, 使耐药 MCF7 癌细胞对他莫昔芬敏感^[99]。剪接调节剂如剪接抑制素 A (SSA) 或其类似物美亚霉素 B (MAMB), 可以靶向 SF3B1 以抑制 BRAF 的剪接, 从而使耐药黑色素瘤对威罗非尼敏感^[100]。长期暴露于吉西他滨会导致胰腺导管腺癌细胞中 PTBP1 的上调和 PKM 可变剪接的调节, 从而对该药物产生抗性^[101]。

成簇规则间隔短回文重复序列 (CRISPR) 和 CRISPR 相关蛋白 (Cas) 系统已成为基因编辑技术的前沿, 其临床应用已在许多疾病中得到研究^[102]。CRISPR/Cas 系统可以设计成使用单个向导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 来破坏或编辑特定的剪接位点, 使用一对 sgRNA 来去除特定的外显子或调节顺式元件, 或者使用模板介导的同源重组来纠正剪接基因突变引起的异常^[103]。基于 CRISPR/Cas 的创新敲入系统已被用于探索 SF3B1 突变导致癌细胞系中可变剪接事件的功能^[104]。因此, 基于 CRISPR/Cas 系统的基因编辑用于纠正肿瘤中异常的可变剪接事件具有重要意义。

越来越多的证据表明, 可变剪接对许多癌症的发生和发展有重大影响。因此, 靶向异常可变剪接可能为癌症治疗提供一条新的途径, 包括小分子、ASO、生物大分子、基于 CRISPR/Cas 编辑技术, 以及调节剪接的免疫疗法。尽管该领域取得了令人振奋的进展, 一些针对剪接的药物或抑制剂正在进行肿瘤的临床试验, 但这些基于可变剪接的抗肿瘤疗法距离临床应用还很遥远。所以, 未来的努力需要揭示现有的剪接调节, 特别是致癌或抑制肿瘤的可变剪接事件和剪接因子的研究。这将有助于研究者更好地了解与肿瘤相关的可变剪接, 并为肿瘤的治疗开发新的策略。

作者贡献: 于海洋负责综述撰写工作; 李自祥完成文献查阅工作和作图; 刘博完成文章修改、校对和审核。

利益冲突: 作者声明本文不存在任何利益冲突。

References

- [1] Boer RE, Torrey ZR, Schneekloth JS Jr. Chemical modulation of pre-mRNA splicing in mammalian systems [J]. *ACS Chem Biol*, 2020, 15: 808-818.
- [2] Chen Y, Huang M, Liu X, et al. Alternative splicing of mRNA in colorectal cancer: new strategies for tumor diagnosis and treatment [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12: 752.
- [3] Zhang Y, Qian J, Gu C, et al. Alternative splicing and cancer: a systematic review [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6: 78.
- [4] Baralle FE, Giudice J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 437-451.
- [5] Zhao S. Alternative splicing, RNA-seq and drug discovery [J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24: 1258-1267.
- [6] Bonnal SC, López-Oreja I, Valcárcel J. Roles and mechanisms of alternative splicing in cancer-implications for care [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17: 457-474.
- [7] Kahles A, Lehmann KV, Toussaint NC, et al. Comprehensive analysis of alternative splicing across tumors from 8 705 patients [J]. *Cancer Cell*, 2018, 34: 211-224.e6.
- [8] Sebestyén E, Zawisza M, Eyra E. Detection of recurrent alternative splicing switches in tumor samples reveals novel signatures of cancer [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 1345-1356.
- [9] Sveen A, Kilpinen S, Ruusulehto A, et al. Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes [J]. *Oncogene*, 2016, 35: 2413-2427.
- [10] Mochle EA, Braberg H, Krogan NJ, et al. Adventures in time and space: splicing efficiency and RNA polymerase II elongation rate [J]. *RNA Biol*, 2014, 11: 313-319.
- [11] Hoskins AA, Friedman LJ, Gallagher SS, et al. Ordered and dynamic assembly of single spliceosomes [J]. *Science*, 2011, 331: 1289-1295.
- [12] Suñé-Pou M, Prieto-Sánchez S, Boyero-Corral S, et al. Targeting splicing in the treatment of human disease [J]. *Genes*, 2017, 8: 87.
- [13] Bessa C, Matos P, Jordan P, et al. Alternative splicing: expanding the landscape of cancer biomarkers and therapeutics [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 9032.
- [14] Lee Y, Rio DC. Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing [J]. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84: 291-323.
- [15] Frankiw L, Baltimore D, Li G. Alternative mRNA splicing in cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19: 675-687.
- [16] Kim P, Yang M, Yiya K, et al. ExonSkipDB: functional annotation of exon skipping event in human [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: D896-D907.
- [17] Oltean S, Bates DO. Hallmarks of alternative splicing in cancer [J]. *Oncogene*, 2014, 33: 5311-5318.
- [18] Sciarillo R, Wojtuszkiewicz A, Assaraf YG, et al. The role of alternative splicing in cancer: from oncogenesis to drug resistance [J]. *Drug Resist Updat*, 2020, 53: 100728.
- [19] Sumithra B, Saxena U, Das AB. Alternative splicing within the Wnt signaling pathway: role in cancer development [J]. *Cell Oncol*, 2016, 39: 1-13.
- [20] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144: 646-674.
- [21] Belluti S, Rigillo G, Imbriano C. Transcription factors in cancer: when alternative splicing determines opposite cell fates [J]. *Cells*, 2020, 9: 760.
- [22] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death [J].

- Toxicol Pathol, 2007, 35: 495-516.
- [23] Ichim G, Tait SW. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16: 539-548.
- [24] Reeve JG, Xiong J, Morgan J, et al. Expression of apoptosis-regulatory genes in lung tumour cell lines: relationship to p53 expression and relevance to acquired drug resistance [J]. *Br J Cancer*, 1996, 73: 1193-1200.
- [25] Kędzierska H, Piekietko-Witkowska A. Splicing factors of SR and hnRNP families as regulators of apoptosis in cancer [J]. *Cancer Lett*, 2017, 396: 53-65.
- [26] Tu Y, Renner S, Xu F, et al. Bcl-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance [J]. *Cancer Res*, 1998, 58: 256-262.
- [27] Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, et al. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax, Bcl-X, and Mcl-1 expression in prostate cancers [J]. *Am J Pathol*, 1996, 148: 1567-1576.
- [28] Krajewski S, Krajewska M, Turner BC, et al. Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer [J]. *Endocr Relat Cancer*, 1999, 6: 29-40.
- [29] Maimon A, Mogilevsky M, Shilo A, et al. Mnk2 alternative splicing modulates the p38-MAPK pathway and impacts Ras-induced transformation [J]. *Cell Rep*, 2014, 7: 501-513.
- [30] Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR, et al. EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30: 764-776.
- [31] Brown RL, Reinke LM, Damerow MS, et al. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121: 1064-1074.
- [32] Bhattacharya R, Mitra T, Ray Chaudhuri S, et al. Mesenchymal splice isoform of CD44 (CD44s) promotes EMT/invasion and imparts stem-like properties to ovarian cancer cells [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119: 3373-3383.
- [33] Zhao P, Xu Y, Wei Y, et al. The CD44s splice isoform is a central mediator for invadopodia activity [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129: 1355-1365.
- [34] Xu Y, Gao XD, Lee JH, et al. Cell type-restricted activity of hnRNPM promotes breast cancer metastasis *via* regulating alternative splicing [J]. *Genes Dev*, 2014, 28: 1191-1203.
- [35] Seoane J, Gomis RR. TGF- β family signaling in tumor suppression and cancer progression [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9: a022277.
- [36] Derynck R, Muthusamy BP, Saetern KY. Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 31: 56-66.
- [37] Tripathi V, Shin JH, Stuelten CH, et al. TGF- β -induced alternative splicing of TAK1 promotes EMT and drug resistance [J]. *Oncogene*, 2019, 38: 3185-3200.
- [38] Xie R, Chen X, Chen Z, et al. Polypyrimidine tract binding protein 1 promotes lymphatic metastasis and proliferation of bladder cancer *via* alternative splicing of MEIS2 and PKM [J]. *Cancer Lett*, 2019, 449: 31-44.
- [39] Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions [J]. *Cancer Discov*, 2022, 12: 31-46.
- [40] Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 880-887.
- [41] Bowler E, Oltean S. Alternative splicing in angiogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 2067.
- [42] Di Matteo A, Belloni E, Pradella D, et al. Alternative splicing in endothelial cells: novel therapeutic opportunities in cancer angiogenesis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39: 275.
- [43] Wang X, Yu Q, Huang L, et al. Lentivirus-mediated inhibition of USP39 suppresses the growth of gastric cancer cells *via* PARP activation [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14: 301-306.
- [44] Gan Z, Han K, Lin S, et al. Knockdown of ubiquitin-specific peptidase 39 inhibited the growth of osteosarcoma cells and induced apoptosis *in vitro* [J]. *Biol Res*, 2017, 50: 15.
- [45] Lin Z, Xiong L, Lin Q. Ubiquitin-specific protease 39 is overexpressed in human lung cancer and promotes tumor cell proliferation *in vitro* [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 422: 97-107.
- [46] Ding K, Ji J, Zhang X, et al. RNA splicing factor USP39 promotes glioma progression by inducing TAZ mRNA maturation [J]. *Oncogene*, 2019, 38: 6414-6428.
- [47] Pan XW, Xu D, Chen WJ, et al. USP39 promotes malignant proliferation and angiogenesis of renal cell carcinoma by inhibiting VEGF-A (165b) alternative splicing *via* regulating SRSF1 and SRPK1 [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21: 486.
- [48] Canavese M, Ngo DT, Maddern GJ, et al. Biology and therapeutic implications of VEGF-A splice isoforms and single-nucleotide polymorphisms in colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2017, 140: 2183-2191.
- [49] Koch S, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2: a006502.
- [50] Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17: 611-625.
- [51] Meyer RD, Mohammadi M, Rahimi N. A single amino acid substitution in the activation loop defines the decoy characteristic of VEGFR-1/FLT-1 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 867-875.
- [52] Abou Faycal C, Gazzeri S, Eymin B. A VEGF-A/SOX2/SRSF2 network controls VEGFR1 pre-mRNA alternative splicing in lung carcinoma cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 336.
- [53] Heydarian M, Mcaffrey T, Florea L, et al. Novel splice variants of sFlt1 are upregulated in preeclampsia [J]. *Placenta*, 2009, 30: 250-255.
- [54] Wu FT, Stefanini MO, Mac Gabhann F, et al. A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14: 528-552.
- [55] Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble

- receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90: 10705-10709.
- [56] Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G, et al. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 8795-8800.
- [57] Martínez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21: 669-680.
- [58] Roy Burman D, Das S, Das C, et al. Alternative splicing modulates cancer aggressiveness: role in EMT/metastasis and chemoresistance [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48: 897-914.
- [59] Li T, Han J, Jia L, et al. PKM2 coordinates glycolysis with mitochondrial fusion and oxidative phosphorylation [J]. *Protein Cell*, 2019, 10: 583-594.
- [60] Farina AR, Cappabianca L, Sebastiano M, et al. Hypoxia-induced alternative splicing: the 11th hallmark of cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39: 110.
- [61] Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth [J]. *Nature*, 2008, 452: 230-233.
- [62] Chen M, Zhang J, Manley JL. Turning on a fuel switch of cancer: hnRNP proteins regulate alternative splicing of pyruvate kinase mRNA [J]. *Cancer Res*, 2010, 70: 8977-8980.
- [63] Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43: 969-980.
- [64] Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. From krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16: 619-634.
- [65] Kozlovski I, Siegfried Z, Amar-Schwartz A, et al. The role of RNA alternative splicing in regulating cancer metabolism [J]. *Hum Genet*, 2017, 136: 1113-1127.
- [66] Wang JB, Erickson JW, Fuji R, et al. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation [J]. *Cancer Cell*, 2010, 18: 207-219.
- [67] Szeliga M, Matyja E, Obara M, et al. Relative expression of mRNAs coding for glutaminase isoforms in CNS tissues and CNS tumors [J]. *Neurochem Res*, 2008, 33: 808-813.
- [68] Diggle CP, Shires M, Leitch D, et al. Ketohexokinase: expression and localization of the principal fructose-metabolizing enzyme [J]. *J Histochem Cytochem*, 2009, 57: 763-774.
- [69] Eberhart T, Schönenberger MJ, Walter KM, et al. Peroxisome-deficiency and HIF-2 α signaling are negative regulators of ketohexokinase expression [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 566.
- [70] Cendrowicz E, Sas Z, Bremer E, et al. The role of macrophages in cancer development and therapy [J]. *Cancers*, 2021, 13: 1946.
- [71] Lee FF, Davidson K, Harris C, et al. NF- κ B mediates lipopolysaccharide-induced alternative pre-mRNA splicing of MyD88 in mouse macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295: 6236-6248.
- [72] Geng G, Xu C, Peng N, et al. PTBP1 is necessary for dendritic cells to regulate T-cell homeostasis and antitumor immunity [J]. *Immunology*, 2021, 16: 74-85.
- [73] Pham D, Koide K. Discoveries, target identifications, and biological applications of natural products that inhibit splicing factor 3B subunit 1 [J]. *Nat Prod Rep*, 2016, 33: 637-647.
- [74] Bowling EA, Wang JH, Gong F, et al. Spliceosome-targeted therapies trigger an antiviral immune response in triple-negative breast cancer [J]. *Cell*, 2021, 184: 384-403.e21.
- [75] Urbanski LM, Leclair N, Anczuków O. Alternative-splicing defects in cancer: splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018, 9: e1476.
- [76] Kaida D, Motoyoshi H, Tashiro E, et al. Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA [J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 576-583.
- [77] Martinez-Montiel N, Rosas-Murrieta NH, Anaya Ruiz M, et al. Alternative splicing as a target for cancer treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 545.
- [78] Mizui Y, Sakai T, Iwata M, et al. Pladienolides, new substances from culture of streptomyces platensis Mer-11107. III. *In vitro* and *in vivo* antitumor activities [J]. *J Antibiot*, 2004, 57: 188-196.
- [79] Sato M, Muguruma N, Nakagawa T, et al. High antitumor activity of pladienolide B and its derivative in gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2014, 105: 110-116.
- [80] Seiler M, Yoshimi A, Darman R, et al. H3B-8800, an orally available small-molecule splicing modulator, induces lethality in spliceosome-mutant cancers [J]. *Nat Med*, 2018, 24: 497-504.
- [81] Zhou Z, Fu XD. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases [J]. *Chromosoma*, 2013, 122: 191-207.
- [82] Lee CC, Chang WH, Chang YS, et al. 4 β -Hydroxywithanolide E modulates alternative splicing of apoptotic genes in human hepatocellular carcinoma huh-7 cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 7290.
- [83] Wan L, Yu W, Shen E, et al. SRSF6-regulated alternative splicing that promotes tumour progression offers a therapy target for colorectal cancer [J]. *Gut*, 2019, 68: 118-129.
- [84] Mavrou A, Brakspear K, Hamdollah-Zadeh M, et al. Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) inhibition as a potential novel targeted therapeutic strategy in prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2015, 34: 4311-4319.
- [85] Chandra A, Ananda H, Singh N, et al. Identification of a novel and potent small molecule inhibitor of SRPK1: mechanism of dual inhibition of SRPK1 for the inhibition of cancer progression [J]. *Aging*, 2020, 13: 163-180.
- [86] Tam BY, Chiu K, Chung H, et al. The CLK inhibitor SM08502 induces anti-tumor activity and reduces Wnt pathway gene expression in gastrointestinal cancer models [J]. *Cancer Lett*, 2020, 473: 186-197.
- [87] Araki S, Dairiki R, Nakayama Y, et al. Inhibitors of CLK protein kinases suppress cell growth and induce apoptosis by modulating pre-mRNA splicing [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0116929.

- [88] Nomakuchi TT, Rigo F, Aznarez I, et al. Antisense oligonucleotide-directed inhibition of nonsense-mediated mRNA decay [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 164-166.
- [89] Wan L, Dreyfuss G. Splicing-correcting therapy for SMA [J]. *Cell*, 2017, 170: 5.
- [90] Wang Z, Jeon HY, Rigo F, et al. Manipulation of PK-M mutually exclusive alternative splicing by antisense oligonucleotides [J]. *Open Biol*, 2012, 2: 120133.
- [91] Ma WK, Voss DM, Schamer J, et al. ASO-based PKM splice-switching therapy inhibits hepatocellular carcinoma growth [J]. *Cancer Res*, 2022, 82: 900-915.
- [92] Lin J, Lee JH, Paramasivam K, et al. Induced-decay of glycine decarboxylase transcripts as an anticancer therapeutic strategy for non-small-cell lung carcinoma [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 9: 263-273.
- [93] Wang Y, Bernhardt AJ, Cruz C, et al. The BRCA1- $\Delta 11q$ alternative splice isoform bypasses germline mutations and promotes therapeutic resistance to parp inhibition and cisplatin [J]. *Cancer Res*, 2016, 76: 2778-2790.
- [94] Zhang F, Wang H, Yu J, et al. LncRNA CRNDE attenuates chemoresistance in gastric cancer *via* SRSF6-regulated alternative splicing of PICALM [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20: 6.
- [95] Wang X, Li J, Bian X, et al. CircURI1 interacts with hnRNPM to inhibit metastasis by modulating alternative splicing in gastric cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118: e2012881118.
- [96] Xie R, Chen X, Cheng L, et al. NONO inhibits lymphatic metastasis of bladder cancer *via* alternative splicing of SETMAR [J]. *Mol Ther*, 2021, 29: 291-307.
- [97] Weinstein S, Tokar IA, Emmanuel R, et al. Harnessing RNAi-based nanomedicines for therapeutic gene silencing in B-cell malignancies [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: E16-E22.
- [98] Lee SC, Abdel-Wahab O. Therapeutic targeting of splicing in cancer [J]. *Nat Med*, 2016, 22: 976-986.
- [99] Ming J, Ruan S, Wang M, et al. A novel chemical, STF-083010, reverses tamoxifen-related drug resistance in breast cancer by inhibiting IRE1/XBP1 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 40692-40703.
- [100] Salton M, Kasprzak WK, Voss T, et al. Inhibition of vemurafenib-resistant melanoma by interference with pre-mRNA splicing [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7103.
- [101] Calabretta S, Bielli P, Passacantilli I, et al. Modulation of PKM alternative splicing by PTBP1 promotes gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells [J]. *Oncogene*, 2016, 35: 2031-2039.
- [102] Wang JY, Doudna JA. CRISPR technology: a decade of genome editing is only the beginning [J]. *Science*, 2023, 379: eadd8643.
- [103] Gapinske M, Luu A, Winter J, et al. CRISPR-SKIP: programmable gene splicing with single base editors [J]. *Genome Biol*, 2018, 19: 107.
- [104] Zhou Q, Derti A, Ruddy D, et al. A chemical genetics approach for the functional assessment of novel cancer genes [J]. *Cancer Res*, 2015, 75: 1949-1958.