

• 论著 •

SRPK1 激活 Wnt/ β -catenin 通路促进 肝癌细胞上皮间充质转化*

石永杰¹ 陈旂鹏² 黄思聪¹ 嘉红云¹ 周强¹ 魏洁¹ 肖绮雯¹ 康嘉乐¹

(广州医科大学附属第二医院 1. 检验科; 2. 健康体检部, 广东 广州 510260)

【摘要】 目的 探讨丝氨酸精氨酸蛋白激酶 1(SRPK1)对肝癌细胞株 HepG2 上皮间充质转化(EMT)的作用。方法 通过 Ualcan 及 TIMER 2.0 数据库分析 SRPK1 mRNA 在肝细胞癌(LIHC)与正常样本、配对癌旁样本之间的表达差异,与生存时间、临床分期、病理分期、TP53 变异、人种、性别、年龄、体重等临床资料的关系。用 HPA 数据库的免疫组化数据验证 SRPK1 蛋白在 LIHC 组织及正常对照间的表达差异。构建 SRPK1 过表达及抑表达的 HepG2 细胞,并根据 SRPK1 表达差异分为 SRPK1 组及对照的 Vector 组,shRNA 组及对照的 Scramble 组。Western blot 检测 4 组细胞株 SRPK1 的蛋白水平。Western Blot、免疫荧光检测 EMT 分子标记物 E-cadherin、Vimentin 蛋白表达差异。核浆蛋白分离比较细胞 β -catenin 入核程度的变化。GEPIA2 数据库分析在 LIHC 组织中 SRPK1 与 Wnt/ β -catenin 通路下游基因 *Twist*、*MYC*、*MMP9* 的相关性,Real-time PCR 验证 SRPK1 对 *Twist*、*MYC*、*MMP9* 表达的影响。结果 SRPK1 表达在 LIHC 组织中表达显著高于正常对照及配对癌旁样本($P < 0.05$),随疾病分期及病理分级增加而增加($P < 0.05$),高表达 SRPK1 组总生存期低于低表达组($P = 0.035$),LIHC 患者 TP53 突变组 SRPK1 表达高于非突变组($P < 0.05$),在不同种族、性别、年龄、体重间无差别($P > 0.05$)。SRPK1 过表达 HepG2 细胞 E-cadherin 表达下降,Vimentin 表达增加($P < 0.05$);抑表达细胞 E-cadherin 增加,Vimentin 下降($P < 0.05$)。SRPK1 在 LIHC 组织中分别与 *Twist*、*MYC*、*MMP9* 表达呈正相关性($P < 0.05$);SRPK1 过表达细胞 β -catenin 蛋白在细胞核中表达增加($P < 0.05$),*Twist*、*MYC*、*MMP9* 表达增加($P < 0.05$);反之,抑表达细胞 β -catenin 在细胞核中表达下降($P < 0.05$),*Twist*、*MYC*、*MMP9* 表达减少($P < 0.05$)。结论 SRPK1 可能通过 Wnt/ β -catenin 通路促进 HepG2 细胞 EMT 活化。

【关键词】 丝氨酸精氨酸蛋白激酶 1;肝细胞癌;HepG2 细胞;上皮间充质转化;Wnt/ β -catenin 通路

【中图分类号】 R735.7 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 07. 003

Serine arginine protein kinase 1 promotes epithelial mesenchymal transformation in hepatoma cells through Wnt/ β -catenin pathway activation

SHI Yongjie¹, CHEN Yimei², HUANG Sicong¹, JIA Hongyun¹, ZHOU Qiang¹, WEI Jie¹, XIAO Qiwen¹, KANG Jiale¹

(1. Department of Clinical Examination, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China;

2. Department of Health And Physical Examination, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of serine-Arginine protein kinase 1 (SRPK1) on Epithelial mesenchymal transformation (EMT) in HepG2 cell line. **Methods** The differential expression of SRPK1 mRNA among liver hepatocellular carcinoma (LIHC) and normal samples and paired adjacent tissues were compared, and the relationship between the expression of SRPK1 and the clinicopathological characteristics of liver cancer including overall survival, clinical stage, pathological stage, TP53 mutant, race, sex, age, weight were analyzed by Ualcan and TIMER database. Immunohistochemical data from HPA database were used to verify the difference of SRPK1 protein expression between LIHC tissues and normal controls. HepG2 cells with SRPK1 overexpression and inhibition were constructed and divided

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(A2021053;A2019189);广州市卫生健康科技项目(20211A011079)

通讯作者:陈旂鹏,E-mail:512350401@qq.com

引用本文:石永杰,陈旂鹏,黄思聪,等. SRPK1 激活 Wnt/ β -catenin 通路促进肝癌细胞上皮间充质转化[J]. 西部医学,2023,35(7):951-958.

DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 07. 003

into the SRPK1 group, Vector group, shRNA group, and Scramble group. The protein level of SRPK1 was detected by Western blot. The differential protein expressions of EMT molecular markers E-cadherin and Vimentin were detected by Western Blot and immunofluorescence. Nucleoplasmic protein isolation was used to compare the degree of β -catenin protein transport from Cytoplasm to Nucleus. GEPIA2 database was used to analyze the correlation between SRPK1 and Wnt/ β -catenin pathway downstream genes including Twist, MYC and MMP9 in LIHC. Real-time PCR was used to verify the effect of SRPK1 on Twist, MYC and MMP9 expressions. **Results** The expression of SRPK1 in LIHC tissues was significantly higher than that in normal control and paired paracancer samples ($P < 0.05$), and increased with worse stage and grade ($P < 0.05$). The overall survival of high SRPK1 expression was lower than that of low SRPK1 expression ($P = 0.035$), and the expression of SRPK1 in TP53 mutant group was higher than that in the TP53 non-mutant group ($P < 0.05$). There was no difference among different races, genders, ages and weights ($P > 0.05$). SRPK1 overexpressed HepG2 cells showed decreased E-cadherin and increased Vimentin ($P < 0.05$). Consistently, E-cadherin increased and Vimentin decreased in SRPK1 inhibited cells ($P < 0.05$). SRPK1 was positively correlated with Twist, MYC and MMP9 expression in LIHC ($P < 0.05$). The level of β -catenin protein in nucleus and the expression of Twist, MYC and MMP9 increased in SRPK1 overexpressed cells ($P < 0.05$), and which were decreased in SRPK1 inhibited cells inversely ($P < 0.05$). **Conclusion** SRPK1 may promote EMT activation in HepG2 cells through Wnt/ β -catenin pathway activation.

【Key words】 Serine arginine protein kinase 1; Liver hepatocellular carcinoma; HCC cells; Epithelial mesenchymal transformation; Wnt/ β -catenin pathway

肝细胞癌 (Liver hepatocellular carcinoma, LIHC) 是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其高复发特性已经成为影响患者预后的主要障碍^[1]。上皮间充质转化 (Epithelial mesenchymal transformation, EMT) 的过度激活推动肿瘤异质性^[2], 诱导肿瘤干细胞的产生^[3], 是癌症转移形成和化疗耐药的决定性特征, 因此成为了肿瘤治疗中一个极具吸引力的作用靶点^[4]。在 LIHC 中, EMT 活化是预后不良的独立风险因子, 是 LIHC 细胞获得高侵袭力的关键^[5]。丝氨酸精氨酸蛋白激酶 1 (Serine arginine protein kinase 1, SRPK1) 是一种 mRNA 前体的剪接因子, 既往研究发现高表达 SRPK1 与 LIHC 患者不良预后相关^[6], 且促进 LIHC 细胞的增殖^[7]、侵袭和迁移^[8], 并通过 SRPK1/AKT 轴调控肝癌细胞 Hep3B 的 EMT 过程, 但 SRPK1 在 LIHC 中对 EMT 影响的相关机制仍未完全阐明。本研究拟通过对 Ualcan、TIMER、HPA 等数据库的分析, 验证 SRPK1 对 LIHC 的诊疗价值, 并以 HepG2 细胞作为体外实验模型, 探讨 SRPK1 对 EMT 的作用及可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析 使用 Ualcan (<http://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>) 及 TIMER (<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>) 数据库分析 SRPK1 mRNA 在不同肿瘤中的表达水平, 及在 LIHC 与正常样本、50 例配对 LIHC 及对应癌旁样本间表达差异, 分析 SRPK1 mRNA 与病人生存时间、临床分期、病理分期、TP53 变异、人种、性别、年龄、体重等临床资料的关系。通过 HPA 数据库 (<https://www.proteinatlas.org/>) 中抗体染色细胞比例和染色强度的综合评

估, 验证 SRPK1 蛋白在 LIHC 组织及癌旁组织中的表达差异。应用 GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) 中基因相关分析, 观察 LIHC 组织中 SRPK1 与各个目标基因的相关性。

1.2 主要材料及试剂 肝癌细胞株 HepG2 细胞于广州医科大学附属第二医院中心实验室冻存。胎牛血清、DMEM 培养基、胰蛋白酶、青霉素-链霉素混合液 (美国 Gibco 公司), TBST 缓冲液 (美国 Thermo Fisher 公司), 十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, SDS)、反转录试剂盒、SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒、Trizol、嘌呤霉素、聚凝胺、DAPI 和抗淬灭封片剂 (美国 Invitrogen 公司), 苄青霉素、核浆蛋白抽提试剂盒 (中国生工生物公司), 兔抗人 SRPK1 (美国 Abcam 公司), 兔抗人 GAPDH/兔抗人 P84、荧光标记兔二抗 (美国 Proteintech 公司), HRP-鼠二抗/HRP-兔二抗、细胞裂解液 (美国 Merck 公司), 鼠抗人 β -catenin、兔抗人 E-cadherin、兔抗人 Vimentin (美国 Cell signaling Technology 公司), 化学发光增强剂 (Enhanced chemiluminescence, ECL)、0.22 μ m 聚偏氟乙烯 (Polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜 (美国 Millipore 公司), ABI7500 PCR 仪 (美国 Applied biosystems 公司), 引物合成 (中国睿博兴科生物公司)。调节 SRPK1 表达相关质粒由广州艾基生物技术有限公司提供, 重组基因质粒、干扰片段引物设计、合成和测序由广州艾基生物技术完成。

1.3 构建过表达及抑制表达 SRPK1 的 HepG2 细胞 常规方法复苏冻存的 HepG2 细胞, 含体积分数 5% 胎牛血清、100 U/mL 链霉素、0.1 mg/mL 青霉素的

DMEM 培养液, 37 °C、5% CO₂ 培养, 取对数生长期细胞用于实验。采用磷酸钙法制备逆转录病毒, 使用的是 psPAX, pMD2. G 慢病毒包装系统, 或者 PIK 逆转录病毒包装系统。转染的总质粒量为 40 g, 质粒的比例为 pcDNA3. 1:psPAX:pMD2. G=20:12:8, 或者 pMSCV:PIK=1:1。慢病毒每隔 24 h 收取一次, 逆转录病毒每隔 6 h 收取一次, 病毒液连续收取两天。制备病毒后, 将需要感染的 HepG2 细胞按 40% 细胞密度 (2×10^5) 铺到培养瓶中。加入混匀的病毒培养液连续感染 3 d, 每天上下午各 1 次, 共 6 次。SRPK1 cDNA 上游序列为 5'-GGATCCGCCACCATGGAGCG-GAAAGTGCTTGCGC-3', 下游序列为 5'-GAAT-TCTTAGGAGTTAAGCCAAGGGTGC-3', shRNA 序列为 CAAGAAGATCCTAATGATTA。感染结束后 (第 4 天) 用 0.5 μg/mL 嘌呤霉素筛选细胞, 待生长稳定时收获细胞, 提取细胞总蛋白检测 SRPK1 的蛋白表达情况。过表达 SRPK1 细胞株为 SRPK1 组, Vector 空白转染细胞为 Vector 组; 抑制 SRPK1 表达细胞株为 shRNA 组, Scramble 空白转染细胞为 Scramble 组。

1.4 Western blot 检测 HepG2 细胞目标蛋白水平 蛋白裂解液裂解转染后的各组细胞, 提取总蛋白。BCA 法蛋白定量, 按 30 μg/孔蛋白进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 湿转 PVDF 膜后 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 一抗 4 °C 封闭过夜, 然后 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 二抗室温孵育 2 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 最后 ECL 曝光, 结果用 ImageJ 1.35V 软件进行分析。

1.5 细胞核浆蛋白分离及检测 收集细胞于 1.5 mL EP 管, 1 000 rpm 5 min; 按每 1×10^6 个细胞加 100 μL 浆蛋白抽提剂 A, 充分震荡后重悬细胞, 冰浴 15 min; 加 10 μL 浆蛋白抽提剂 B, 震荡后冰浴 1 min, 4 °C 12 000 rpm 5 min; 上清液即为细胞浆蛋白。吸尽上清液至 EP 管后, 往沉淀加入 50 μL 核蛋白抽提试剂, 充分震荡 30 s 后冰浴 2 min, 重复震荡冰浴过程持续 30 min; 4 °C 12 000 rpm 10 min, 上清液即为核蛋白, 吸至 EP 管完成提取。以 GAPDH 为浆蛋白内参, P84 为核蛋白内参, Western blot 检测各组 HepG2 细胞核蛋白和浆蛋白的 β-catenin 蛋白表达。

1.6 细胞免疫荧光 按 4×10^4 个/孔接种 HepG2 细胞到 24 孔培养板中培养 24 h, 细胞汇合度达 80% 时 PBS 洗 2 次; 4% 多聚甲醛室温固定 15 min 后 PBS 洗 3 次; 加入一抗 (E-cadherin、vimentin, 1% 牛血清白蛋白稀释, 比例 1:200) 使其完全覆盖, 置摇床上孵育 2 h。PBS 漂洗 3 次, 加入荧光标记二抗 (FITC, 1% 牛血清白蛋白稀释, 比例 1:200) 后置摇床避光孵育 1 h。

PBS 漂洗 3 次, 加入 DAPI (PBS 稀释, 比例 1:10 000) 避光染色 2 min, PBS 漂洗 3 次; 避光晾干, 加入抗淬灭封片剂封片, 荧光显微镜下拍照。

1.7 Real-time PCR 检测 Wnt/β-catenin 下游基因表达 用 TRizol 提取各组 HepG2 细胞总 RNA, 按试剂盒说明书用反转录试剂盒反转录合成 cDNA。SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒进行 Real-time PCR: 上游引物 (20 μmol/L) 0.25 μL, 下游引物 (20 μmol/L) 0.25 μL, 2×SYBRGreenmix 5 μL, cDNA 0.2 μL, 去离子水 4.3 μL; 反应体系共 10 μL。反应条件: 95 °C 60 s; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 45 s, 40 个循环; 72 °C 10 min。以 GAPDH 为内参, 检测 Twist、MYC、MMP9 相对表达量, 结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。引物序列见表 1。

表 1 Real-PCR 引物序列表
Table 1 Primers of Real-time PCR

基因	引物序列
GAPDH	F: 5'-GACTCATGACCACAGTCCATGC-3' R: 5'-AGAGGCAGGGATGATGTTCTG-3'
Twist	F: 5'-GGAGTCCGAGTCTI ACGAG-3' R: 5'-TCTGGAGGACCTGGTAGAGG-3'
MYC	F: 5'-CTTTCATTGTCTTTTCCGCC-3' R: 5'-CACCGAGTCGTAGTCGAGGT-3'
MMP9	F: 5'-AGTACCACGGCCAACACTACGA-3' R: 5'-GATTGGCCTTGAAGATGAA-3'

1.8 统计学分析 应用 Graphpad-Prism-6.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较采用独立样本 *t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SRPK1 在 LIHC 中高表达 SRPK1 在多种肿瘤中高表达 (图 1A、1C), 其中对 LIHC 库纳入 371 例 LIHC 组织及 50 例正常组织, SRPK1 mRNA 在 LIHC 组织表达显著高于正常组织, 50 例配对样本的 LIHC 组织中的表达高于对应的癌旁组织 ($P < 0.001$) (图 1B)。HPA 数据库显示: SRPK1 在肝组织中主要在细胞质中表达, 在 2 个肝脏正常样本中 SRPK1 均为低表达, 而在 12 个肝癌样本中有 10 个样本为中等表达, 2 个样本为强表达, 见图 1D。

2.2 SRPK1 高表达与 LIHC 不良预后相关 TIMER 数据库分析结果显示, 高表达 SRPK1 的 LIHC 患者生存率显著低于低表达 SRPK1 患者 ($P = 0.035$) (图 2A)。Ualcan 数据库分析显示, 随 LIHC 疾病分级 (图 2B) 及病理分级 (图 2C) 的递增, SRPK1 表达显著升高 ($P < 0.05$); 同时, 发生 TP53 突变的 LIHC 患者 SRPK1 表达显著高于非突变患者及正常对照组 (图 2D)。

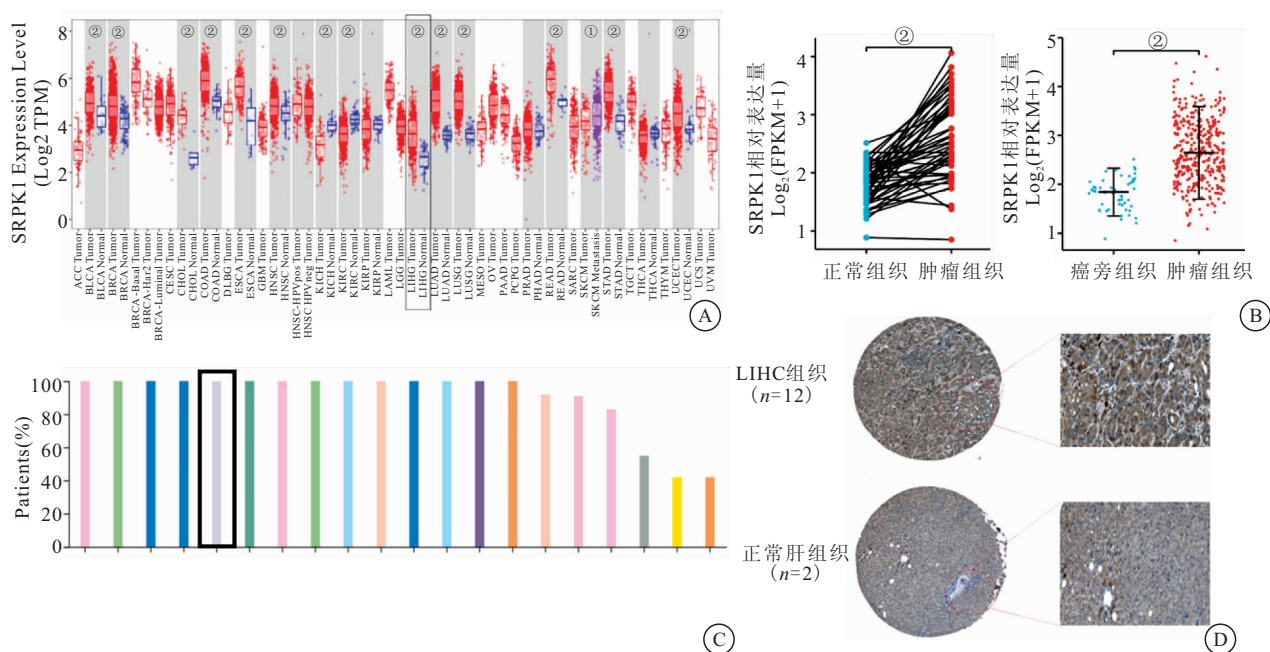


图 1 SRPK1 在 LIHC 中高表达

Figure 1 SRPK1 is highly expressed in LIHC

注: A. TIMER 数据库中 SRPK1 mRNA 在不同肿瘤组织和正常对照中的表达; B. SRPK1 mRNA 表达在 LIHC 组织 vs 配对癌旁组织、正常对照间的差异; C. SRPK1 蛋白在不同肿瘤中的表达水平; D. SRPK1 蛋白在正常肝组织中和 LIHC 组织中的免疫组化染色。两组比较, ① $P < 0.01$; ② $P < 0.001$ 。

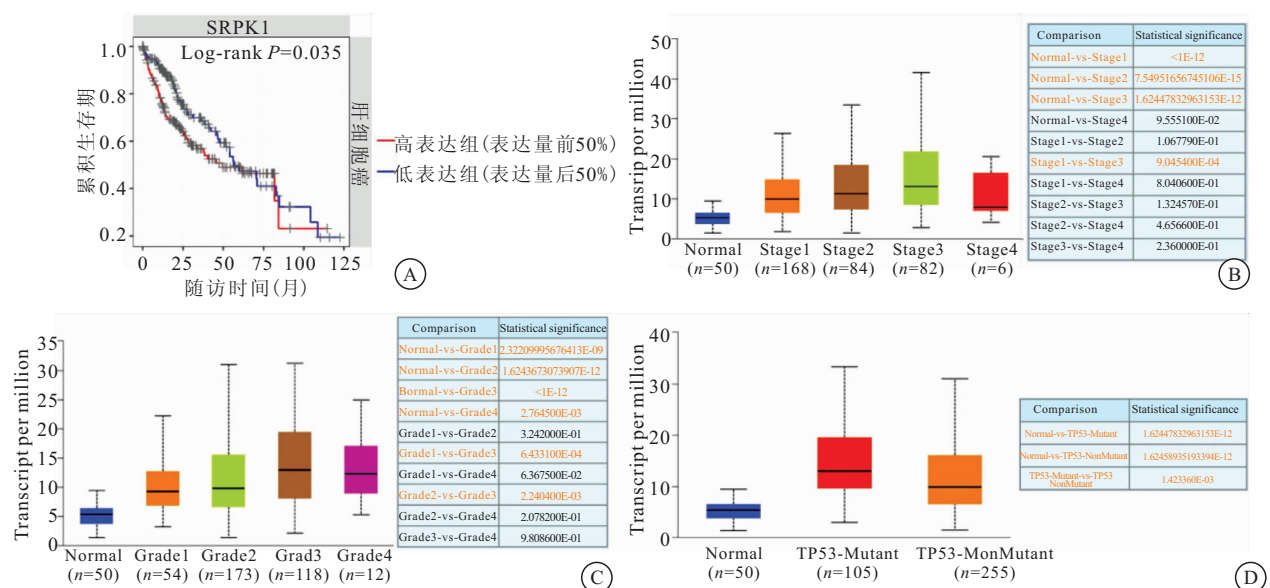


图 2 SRPK1 高表达与 LIHC 不良预后相关

Figure 2 High SRPK1 expression is associated with poor prognosis of LIHC

注: A. TIMER 数据库中不同 SRPK1 表达 LIHC 患者的生存曲线; B. SRPK1 在 LIHC 患者不同临床分期的表达差异; C. SRPK1 在 LIHC 患者不同病理分期的表达差异; D. SRPK1 在 LIHC 患者 TP53 突变及非突变间的表达差异。

2.3 SRPK1 表达不受个体差异影响 Ualcan 数据库分析结果显示, 在不同的种族(图 3A)、性别(图 3B)、年龄(图 3C)及重量范围(图 3D)之间, SRPK1 表达无显著性差异($P > 0.05$), 提示患者个体差异并没有导致 SRPK1 表达发生明显变化。

2.4 SRPK1 对 HepG2 细胞 EMT 标志物表达的影响 分别用含人 SRPK1 cDNA 及 shRNA 质粒转染

HepG2 细胞后, Western blot 结果(图 4A)显示, SRPK1 组 SRPK1 蛋白相对表达量高于对照组($t = 6.43, P = 0.02$), shRNA 组 SRPK1 蛋白相对表达量低于对照组($t = 10.44, P = 0.01$)。SRPK1 组 E-cadherin 蛋白相对表达量低于 Vector 组($t = 19.75, P < 0.05$), shRNA 组高于 Scramble 组($t = 4.50, P = 0.01$)。SRPK1 组 Vimentin 蛋白相对表达量高于 Vector 组

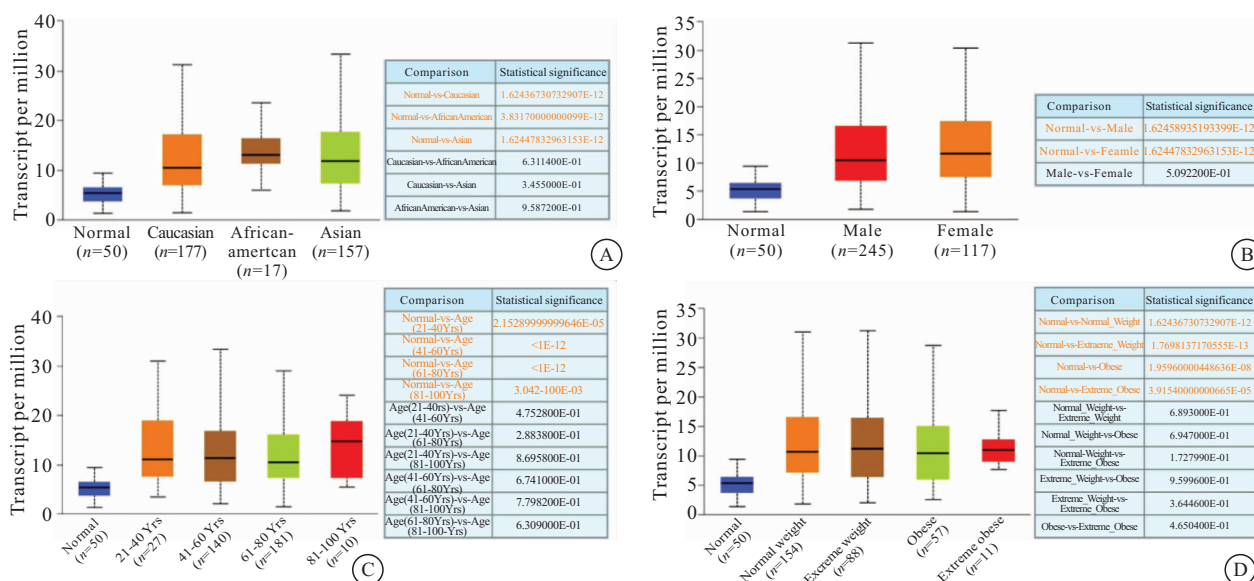


图 3 SRPK1 表达与 LIHC 患者种族、性别、年龄及体重的关系

Figure 3 Relationship between SRPK1 expression and race, sex, age and body weight in LIHC patients

注:A. SRPK1 在 LIHC 患者不同的种族间的表达差异;B. SRPK1 在 LIHC 患者不同性别间的表达差异;C. SRPK1 在 LIHC 患者不同年龄间的表达差异;D. SRPK1 在 LIHC 患者不同体重范围间的表达差异。

($t=23.63, P<0.01$), shRNA 组低于 Scramble 组($t=22.46, P<0.01$)。免疫荧光实验结果(图 4B)显示, E-cadherin 荧光信号主要表达在细胞膜上, SRPK1 组

低于 Vector 组, shRNA 组高于 Scramble 组; Vimentin 荧光信号主要表达在细胞质中, SRPK1 组高于 Vector 组, shRNA 组低于 Scramble 组。

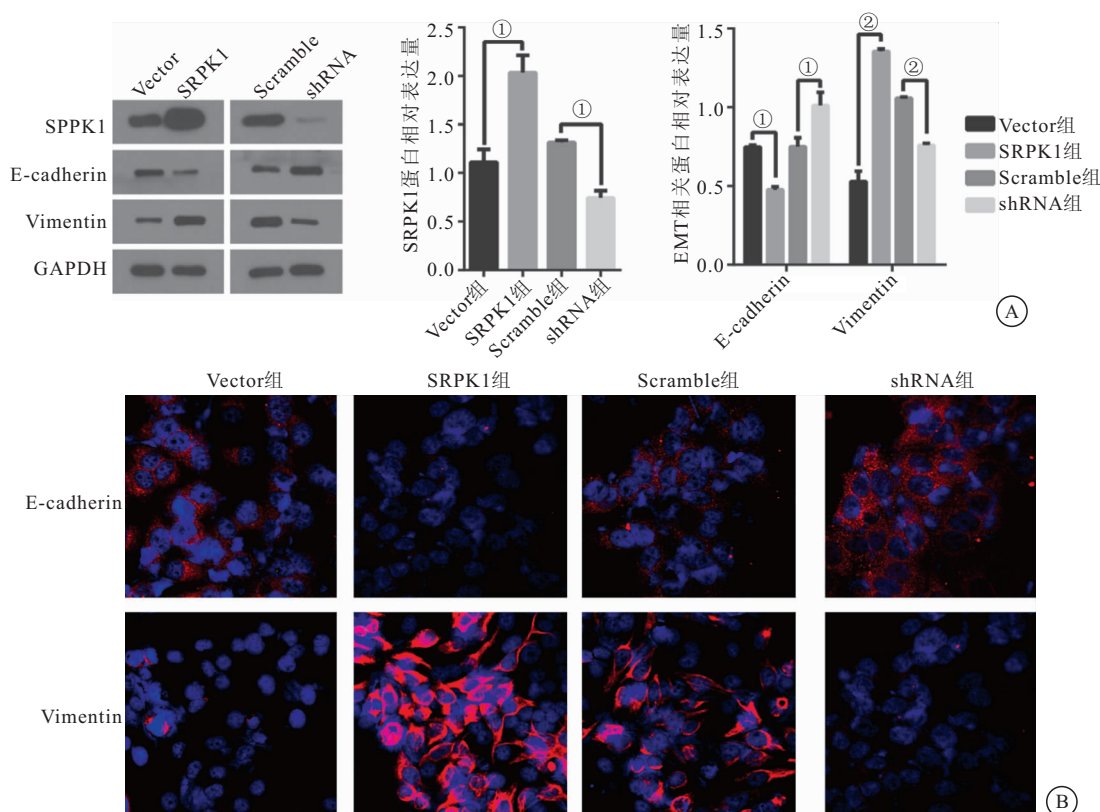


图 4 调节 SRPK1 表达后肝癌细胞 EMT 相关分子标志物的变化

Figure 4 Changes of EMT-related markers in hepatoma cells after SRPK1 regulation

注:A. Western Blot 检测过表达和干扰 SRPK1 表达后, HepG2 细胞 EMT 相关分子 E-cadherin 和 Vimentin 的蛋白水平表达量的变化, GAPDH 为内参;B. 免疫荧光显示 SRPK1 过表达或抑表达后细胞 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白的表达及定位。两组比较, ① $P<0.05$; ② $P<0.01$ 。

2.5 SRPK1 激活 HepG2 细胞 Wnt/ β -catenin 通路

核浆蛋白分析结果(图 5A)显示,SRPK1 组浆蛋白 β -catenin 表达低于 Vector 组($t=8.413, P<0.01$), shRNA 组高于 Scramble 组($t=14.96, P<0.01$);SRPK1 组核蛋白 β -catenin 表达高于 Vector 组($t=29.69, P<0.001$), shRNA 组低于 Scramble 组($t=6.723, P<0.01$)。GEPIA2 数据库基因相关分析结果(图 5B)显示,SRPK1 在 LIHC 组织中与 Twist($r=$

$0.26, P<0.001$)、MYC($r=0.32, P<0.001$)、MMP9($r=0.14, P=0.009$)正相关。Real-time PCR 结果(图 5C)显示,SRPK1 组 Twist、MYC、MMP9 mRNA 均高于 Vector 组($t=9.734, P<0.01$; $t=4.946, P<0.01$; $t=11.23, P<0.01$), shRNA 组 Twist、MYC、MMP9 mRNA 相对表达量均低于 Scramble 组($t=4.068, P=0.02$; $t=3.982, P=0.02$; $t=3.293, P=0.03$)。

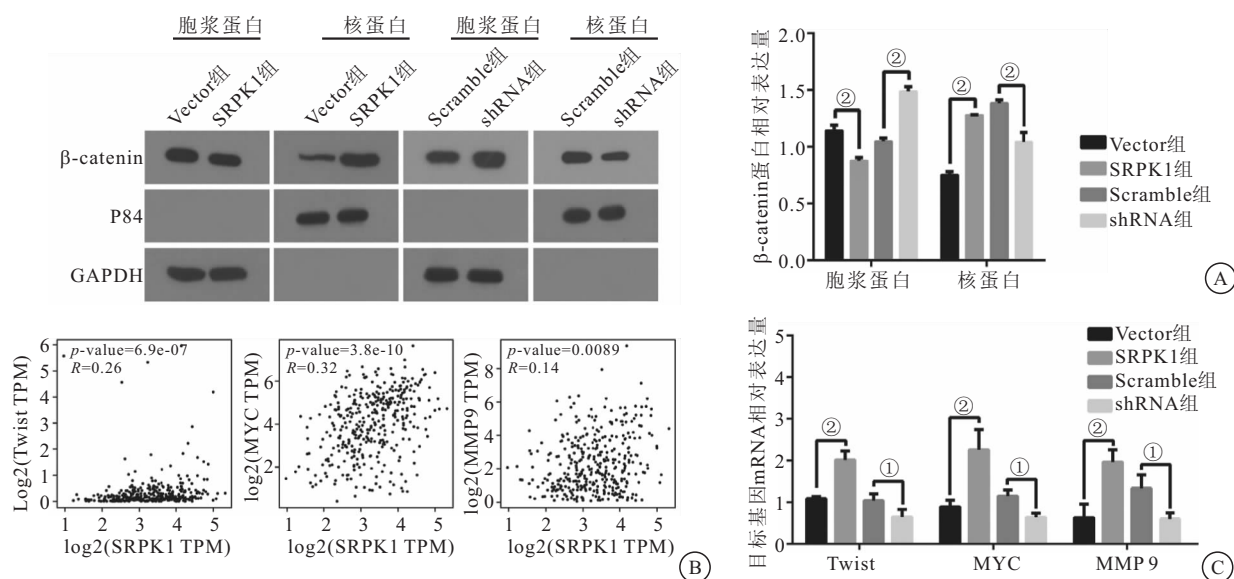


图 5 SRPK1 激活 HepG2 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路

Figure 5 SRPK1 activated Wnt/ β -catenin signaling pathway in HepG2 cells

注:A. Western Blot 检测各组细胞中的 β -catenin 的核蛋白和浆蛋白表达水平, P84 为核蛋白的内参, GAPDH 为浆蛋白的内参; B~C. SRPK1 对 HepG2 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路下游基因表达的影响。两组比较, ① $P<0.05$; ② $P<0.01$ 。

3 讨论

根据 GLOBOCAN 2020 数据,原发性肝癌以 LIHC 为主,在全球发病率中排名第五,在男性死亡率中排名第二^[9],LIHC 的高复发率和高转移率是 LIHC 治疗的重大挑战^[10]。选择性剪接是指去除内含子并以各种组合添加外显子的过程,产生多种 mRNA 产物,从而产生蛋白质转录物。因此,它维持了蛋白质多样性和细胞稳态^[11]。越来越多的证据表明,可变剪接的异常功能是致癌的关键机制。单个前 mRNA 的剪接异构体可以以彼此相反的方式发挥作用,增强或抑制一种或多种致癌过程,例如血管生成、侵袭、转移和细胞凋亡。靶向选择性剪接可能成为各种癌症的一种有吸引力的治疗策略^[12]。SRPK1 是一种磷酸化富含丝氨酸/精氨酸结构域(SR 蛋白)的剪接因子的酶,位于 6 号染色体上,SRPK1 与 SR 蛋白(例如 SRSF1)相互作用并调节几种正常的细胞过程,包括 RNA 成熟、染色体重组、细胞周期进程和免疫反应的各个步骤,剪接机制的失调会导致癌症等疾病的发

病^[13],特异性抑制 SRPK1 抗癌药物的开发成为了近年抗肿瘤治疗讨论热点^[14]。而对大部分消化道肿瘤,SRPK1 同样是一个致癌基因和潜在的治疗靶点^[15]。既往研究发现,SRPK1 高表达与 LIHC 患者的疾病进程有关^[6]。在本研究中进一步通过各个数据库(包括:GEPIA2、UALCAN、TIMER、HPA 等)对 LIHC 样本分析发现,SRPK1 的 mRNA 及蛋白均在 LIHC 组织中高表达,并与 LIHC 患者的不良预后和低生存率相关。有研究显示,TP53 突变 LIHC 患者预后明显较差,与其他临床病理变量相比,TP53 突变被确定为 LIHC 生存率的独立预测因子^[16]。本研究结果显示,发生 TP53 突变 LIHC 患者 SRPK1 表达明显更高;同时,LIHC 患者的个体差异(包括性别、种族、年龄、体重等)对 SRPK1 表达的影响较小,提示 SRPK1 对 LIHC 是一个有价值的标志物。

既往研究发现 SRPK1 介导胃癌^[17]、皮肤癌^[18]等多种肿瘤 EMT 过程。EMT 指的是上皮细胞获得间质表型的重编程过程,在伤口愈合和肿瘤恶性进展中

发挥着积极的作用^[19-20]。在 EMT 发生过程中,除了发生细胞形态改变、细胞粘附和迁移能力的改变外,还伴随着上皮标志物 E-cadherin 的下调,间质标志物如 Vimentin 的表达上调^[21]。细胞膜 E-cadherin 的缺失是肿瘤细胞启动 EMT 的关键标志,E-cadherin 的减少或缺失与肿瘤的分级、侵袭转移和预后明显相关^[22]。Xu^[8]等提出,SRPK1 是 miR-1296 的直接下游靶标,通过 PI3K/AKT 通路介导了 miR-1296 在 HCC 中的生物学功能,其中包括了对肝癌细胞株 EMT 过程的促进作用。本研究通过 Western blot 确证了 SRPK1 可以增强 LIHC 细胞系间质标志物 Vimentin 表达以及抑制上皮标志物 E-cadherin 的表达。为了进一步验证 EMT 表型的变化,本研究用免疫荧光实验检测 E-cadherin 和 Vimentin 的表达和定位。结果显示 E-cadherin 的荧光信号在 SRPK1 过表达细胞上较对照组弱,而 Vimentin 的荧光信号较对照组强;在抑制 SRPK1 表达的细胞中则观察到相反的结果,基本明确 SRPK1 能促进 LIHC 细胞 EMT 的发生。Wnt/ β -catenin 信号通路在维持上皮细胞表型、适当的细胞间连接和组织稳态方面具有重要意义,过度激活是 LIHC^[23]、胃癌^[24]、非小细胞肺癌^[25]等多种肿瘤恶化的重要表征。该通路成员的失调参与了 EMT 的发展,E-cadherin 缺失很大程度上受到 Wnt/ β -catenin 信号转导的影响^[26]。E-cadherin/ β -catenin 复合物维持上皮细胞完整性,但 Wnt/ β -catenin 通路激活可通过 β -catenin 入核,提高 Twist^[27]、MYC^[28]等 EMT 主要转录因子的表达,导致癌细胞膜 E-cadherin 水平的降低。据报道,SRPK1 可促进 Wnt/ β -catenin 通路的活化^[29]。本研究通过细胞核浆 β -catenin 表达差异分析及 Real-time PCR 检测发现,过表达 SRPK1 的 HepG2 细胞 β -catenin 入核程度及 Wnt/ β -catenin 通路各个下游基因表达量均高于对照组和抑表达细胞,证实 SRPK1 可活化 HepG2 细胞 Wnt/ β -catenin 通路,促进细胞 β -catenin 核积聚,并提高靶基因 *Twist*、*MYC*、*MMP9* 等表达,有助于 HepG2 细胞 EMT 的发生。

本研究不足之处在于,仅采用一种细胞株作为研究对象,SRPK1 调控作用是否广泛用于各种肝癌类型仍待进一步体内实验验证;此外,SRPK1 如何通过 Wnt/ β -catenin 通路调控 LIHC 细胞 EMT 进程的详细机制尚待进一步研究。

4 结论

SRPK1 在体外可活化 HepG2 细胞 Wnt/ β -catenin 通路,促进 EMT 的发生,研究结果为以 SRPK1 作为 LIHC 的治疗靶点提供了新的理论依据。

【参考文献】

- [1] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, *et al.* Hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers 2021, 7(1): 6.
- [2] ASHRAFIZADEH M, ZARRABI A, HUSHMANDI K, *et al.* Association of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) with Cisplatin Resistance [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 4002.
- [3] WILSON M M, WEINBERG R A, LEES J A, *et al.* Emerging Mechanisms by which EMT Programs Control Stemness[J]. Trends Cancer, 2020, 6(9): 775-780.
- [4] RAMESH V, BRABLETZ T, CEPPI P. Targeting EMT in Cancer with Repurposed Metabolic Inhibitors[J]. Trends cancer, 2020, 6(11): 942-950.
- [5] GIANNELLI G, KOUDELKOVA P, DITURI F, *et al.* Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2016, 65(4): 798-808.
- [6] ZHANG J, JIANG H, XIA W, *et al.* Serine-arginine protein kinase 1 is associated with hepatocellular carcinoma progression and poor patient survival [J]. Tumour Biol, 2016, 37(1): 283-290.
- [7] ZHOU B, LI Y, DENG Q, *et al.* SRPK1 contributes to malignancy of hepatocellular carcinoma through a possible mechanism involving PI3K/Akt[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 379(1-2): 191-199.
- [8] XU Q, LIU X, LIU Z, *et al.* MicroRNA-1296 inhibits metastasis and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma by targeting SRPK1-mediated PI3K/AKT pathway[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 103.
- [9] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global Cancer Statistics 2020; GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [10] XU X F, XING H, HAN J, *et al.* Risk Factors, Patterns, and Outcomes of Late Recurrence After Liver Resection for Hepatocellular Carcinoma: A Multicenter Study From China[J]. JAMA Surg, 2019, 154(3): 209-217.
- [11] SCIARRILLO R, WOJTUSZKIEWICZ A, ASSARAF Y G, *et al.* The role of alternative splicing in cancer: From oncogenesis to drug resistance[J]. Drug Resist Updat, 2020, 53: 100728.
- [12] BOWLER E, OLTEAN S. Alternative Splicing in Angiogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2067.
- [13] PATEL M, SACHIDANANDAN M, ADNAN M. Serine arginine protein kinase 1 (SRPK1): a moonlighting protein with theranostic ability in cancer prevention[J]. Mol Biol Rep, 2019, 46(1): 1487-1497.
- [14] 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 (Albany NY), 2020, 13(1): 163-180.
- [15] NIKAS I P, THEMISTOCLEOUS S C, PASCHOU S A, *et al.* Serine-Arginine Protein Kinase 1 (SRPK1) as a Prognostic Factor and Potential Therapeutic Target in Cancer: Current Evidence and Future Perspectives[J]. Cells, 2019, 9(1): 19.

- [16] VILLANUEVA A, HOSHIDA Y. Depicting the role of TP53 in hepatocellular carcinoma progression[J]. J Hepatol, 2011, 55(3): 724-725.
- [17] WANG H, WANG C, TIAN W, *et al.* The crucial role of SRPK1 in IGF-1-induced EMT of human gastric cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(42): 72157-72166.
- [18] LI Z R, JIANG Y, HU J Z, *et al.* SOX2 knockdown inhibits the migration and invasion of basal cell carcinoma cells by targeting the SRPK1-mediated PI3K/AKT signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2019, 17(2): 1617-1625.
- [19] 彭娜, 卢美君, 康马飞, 等. rhIL-11 通过激活 JAK/STAT3/HIF-1 α /EMT 通路促进肺腺癌 A549 细胞转移机制[J]. 西部医学, 2020, 32(1): 24-28, 32.
- [20] 徐辉聪, 林振群, 林智, 等. 下调 LncRNA KCNQ1OT1 对喉癌 Hep-2 细胞增殖, 侵袭和上皮间质转化的影响[J]. 西部医学, 2021, 33(10): 1428-1435.
- [21] ZHANG N, NG A S, CAI S, *et al.* Novel therapeutic strategies: targeting epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. Lancet Oncol, 2021, 22(8): e358-e368.
- [22] BRABLETZ S, SCHUHWERK H, BRABLETZ T, *et al.* Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression[J]. EMBO J, 2021, 40(18): e108647.
- [23] 李杰, 马莉, 贾丽君, 等. 人肝癌 HepG2 细胞 miR-26a 对其活性和 Wnt 信号通路的作用机制[J]. 西部医学, 2020, 32(9): 1254-1258.
- [24] 李丽萍, 贾筠, 蔡永昌, 等. SOX21 在胃癌中的表达和甲基化状态及对体外胃癌细胞的作用[J]. 西部医学, 2021, 33(9): 1284-1289, 1295.
- [25] 董岩, 阿米娜曲海, 蒋小君, 等. TRIP13 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进非小细胞肺癌细胞的增殖与侵袭[J]. 西部医学, 2020, 32(12): 1728-1733.
- [26] LEI Y, CHEN L, ZHANG G, *et al.* MicroRNAs target the Wnt/ β -catenin signaling pathway to regulate epithelial-mesenchymal transition in cancer(Review)[J]. Oncol Rep, 2020, 44(4): 1299-1313.
- [27] 吕男男, 高芸, 单忠艳. TNF- α 对 AKT-TWIST1 信号通路诱导乳头状甲状腺癌细胞株上皮间质转化的影响[J]. 西部医学, 2019, 31(10): 1533-1537.
- [28] LI Z, LIU J, CHEN T, *et al.* HMGA1-TRIP13 axis promotes stemness and epithelial mesenchymal transition of perihilar cholangiocarcinoma in a positive feedback loop dependent on c-Myc[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 86.
- [29] GONG L, SONG J, LIN X, *et al.* Serine-arginine protein kinase 1 promotes a cancer stem cell-like phenotype through activation of Wnt/ β -catenin signaling in NSCLC[J]. J Pathol 2016, 240(2): 184-196.

(收稿日期: 2022-08-04; 修回日期: 2023-04-17; 编辑: 刘灵敏)

(上接第 950 页)

- [8] 郭依宁, 方崇锴, 王俊岩, 等. 黄芩甲苷通过 AMPK/ACSS2/PPAR α 信号通路改善心肌细胞能量代谢的机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(8): 4389-4393.
- [9] GIAKOUNTIS A, MOULOS P, ZARKOU V, *et al.* A Positive Regulatory Loop between a Wnt-Regulated Non-coding RNA and ASCL2 Controls Intestinal Stem Cell Fate[J]. Cell Rep, 2016, 15(12): 2588-2596.
- [10] ZHU R, YANG Y, TIAN Y, *et al.* Ascl2 knockdown results in tumor growth arrest by miRNA-302b-related inhibition of colon cancer progenitor cells[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e32170.
- [11] 武赞, 胡文静, 尚杨杨, 等. 结直肠癌 miRNA 相关的 Ascl2 靶基因中的预后标志物[J]. 西南国防医药, 2021, 31(4): 286-291.
- [12] VARBERG K M, IQBAL K, MUTO M, *et al.* ASCL2 reciprocally controls key trophoblast lineage decisions during hemochoial placenta development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118(10): e2016517118.
- [13] SHANG Y, CHEN H, YE J, *et al.* HIF-1 α /Ascl2/miR-200b regulatory feedback circuit modulated the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in colorectal cancer cells[J]. Exp Cell Res, 2017, 360(2): 243-256.
- [14] SHANG Y, PAN Q, CHEN L, *et al.* Achaete scute-like 2 suppresses CDX2 expression and inhibits intestinal neoplastic epithelial cell differentiation[J]. Oncotarget, 2015, 6(31): 30993-31006.
- [15] PAVLOVA N N, THOMPSON C B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism[J]. Cell Metab, 2016, 23(1): 27-47.
- [16] 曾凯, 刘继红, 李强, 等. 脂代谢重编程在前列腺癌中的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2022, 49(8): 774-779.
- [17] 白日兰, 崔久崧. 肿瘤脂代谢重编程及其对肿瘤和免疫的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(5): 511-517.
- [18] 胡琳, 吴鑫, 田明妹, 等. 肿瘤与糖代谢的相互关系研究进展[J]. 西部医学, 2013, 25(9): 1426-1428.
- [19] XU H, ZHAO X L, LIU X, *et al.* Elevated ASCL2 expression in breast cancer is associated with the poor prognosis of patients[J]. Am J Cancer Res, 2017, 7(4): 955-961.
- [20] LIU M H, CUI Y H, GUO Q N, *et al.* Elevated ASCL2 expression is associated with metastasis of osteosarcoma and predicts poor prognosis of the patients[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(6): 1431-1440.
- [21] HU X G, CHEN L, WANG Q L, *et al.* Elevated expression of ASCL2 is an independent prognostic indicator in lung squamous cell carcinoma[J]. J Clin Pathol, 2016, 69(4): 313-318.

(收稿日期: 2022-07-12; 修回日期: 2023-03-28; 编辑: 刘灵敏)