

剪接激酶介导肿瘤细胞内mRNA可变剪接失调：机遇与挑战

安文哲¹, 李雪冰^{2*}, 周雪霞^{1*}

(¹天津医科大学总医院, 天津市神经病学研究所, 天津市神经损伤变异与再生重点实验室, 教育部中枢创伤修复与再生重点实验室, 天津 300052; ²天津医科大学总医院, 天津市肺癌研究所, 肺部肿瘤外科, 天津市肺癌转移与肿瘤微环境重点实验室, 天津 300052)

摘要: 可变剪接是前体mRNA加工过程中的一个关键步骤, 其主要作用是确保基因的精确表达以及人类转录组的多样性。剪接调控网络的失常可导致多种疾病发生并促进肿瘤发生发展。调控可变剪接的剪接因子可受到多种激酶(即剪接激酶)的磷酸化修饰, 这些剪接激酶主要包括SR蛋白激酶(SR-protein kinases, SRPKs)和CDC2样激酶(CDC2-like kinases, CLKs)。经磷酸化修饰后, 剪接因子可能会改变自身的亚细胞定位及其自身与靶标转录本、蛋白因子之间的相互作用, 从而对剪接反应的最终结果输出产生重要影响。本综述主要总结了剪接激酶在肿瘤中的现有研究进展, 并讨论了以剪接激酶为靶标的肿瘤新治疗途径面临的机遇与挑战。

关键词: 剪接激酶; SR蛋白激酶; CDC2样激酶; 肿瘤

Dysregulation of mRNA alternative splicing guided by splicing kinases in cancer cells: opportunities and challenges

AN Wenzhe¹, LI Xuebing^{2*}, ZHOU Xuexia^{1*}

(¹Tianjin Key Laboratory of Injuries, Variations and Regeneration of the Nervous System, Key Laboratory of Post-trauma Neuro-repair and Regeneration in Central Nervous System of Education Ministry, Tianjin Neurological Institute, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China; ²Tianjin Key Laboratory of Lung Cancer Metastasis and Tumor Microenvironment, Department of Lung Cancer Surgery, Tianjin Lung Cancer Institute, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China)

Abstract: Alternative splicing represents a vital step in pre-mRNA processing, which ensure precise gene expression and diversification of human transcriptome. Disruptions to splicing regulatory network underlie a host of human diseases and contribute to cancer development and progression. Splicing factors that control alternative splicing are phosphorylated by multiple kinases (named splicing kinases), which mainly include SR-protein kinases (SRPKs) and CDC2-like kinases (CLKs). Phosphorylation of splicing factors might alter their subcellular localization and interactions with target transcripts and proteins, thus significantly contributing to the final outcome of splicing reactions. In this review we aim to summarize the current knowledge on the roles of splicing kinases in cancer, and discuss opportunities and challenges of developing

收稿日期: 2022-06-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(81972354, 82172901, 82273019); 天津市自然科学基金多元投入基金项目青年项目(21JCQNJC01440); 天津市自然科学基金项目(18JCYBJC92100); 中国抗癌协会基金项目(CFC2020kyxm003); 天津市医学重点学科(专科)建设项目(TJYXZDXK-061B); 天津市肺癌研究所面上项目(TJLCMS2021-03)

第一作者: E-mail: anwenzhe2021@163.com

*通信作者: 周雪霞, E-mail: xxzhou@tmu.edu.cn; 李雪冰, E-mail: xbli@tmu.edu.cn

novel therapeutic approaches targeting splicing kinases.

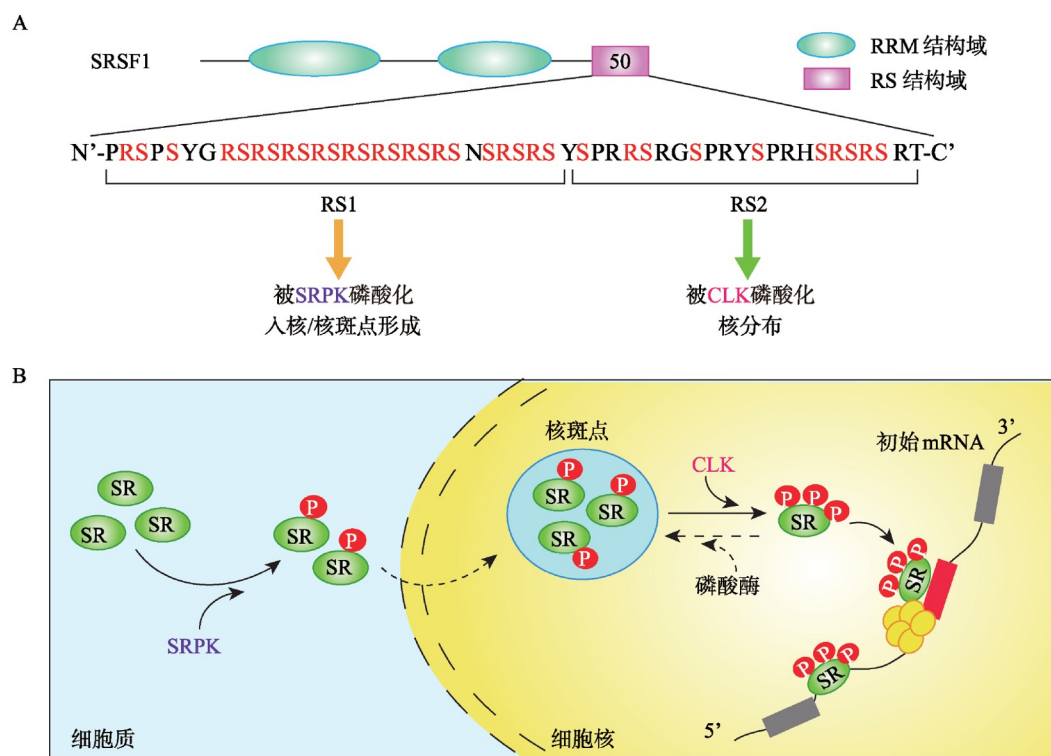
Key Words: splicing kinase; SR-protein kinases; CDC2-like kinases; cancer

在高等真核生物中,可变剪接是继基因转录后通过改变mRNA外显子/内含子构成,进而决定基因表达最终产物和蛋白质多样性的重要机制。得益于高通量测序技术的发展,目前研究发现,超过95%的人类多外显子基因经历了可变剪接的调控^[1],其中约有75%的可变剪接发生在蛋白编码区,导致生成结构或功能迥异的蛋白异构体。可变剪接一方面丰富了蛋白质的多样性,另一方面增强了机体对基因表达在时间和空间上的精确调控,异常或错误的可变剪接发生可导致多种疾病甚至肿瘤的发生发展^[2]。

mRNA可变剪接受到顺式作用因子和反式作用元件的调控,其中富含丝氨酸和精氨酸的SR (serine/arginine-rich)蛋白是反式作用因子的一类,该蛋白家族作为重要的剪接因子在可变剪接过程中发挥着重要作用。近年来,有关剪接因子,特

别是SR蛋白异常表达的报道在肿瘤研究领域屡见不鲜^[3]。通过可变剪接调控生成有利于肿瘤发生发展的剪接异构体,是肿瘤细胞获得无限增殖、凋亡抵抗、侵袭浸润和异常代谢等能力的重要途径。

剪接因子受到多种激酶的磷酸化修饰,包括那些特异性磷酸化SR蛋白的激酶如SR蛋白激酶(SR-protein kinases, SRPKs)、CDC2样激酶(CDC2-like kinases, CLKs)、拓扑异构酶1(topoisomerase 1, TOP1)和mRNA前体加工因子4B(pre-mRNA processing factor 4B, PRPF4B)等。SR蛋白的结构域中存在许多丝氨酸/精氨酸残基,这些残基是多种剪接激酶的作用底物,从而发生多位点磷酸化修饰(图1A),最终影响SR蛋白的亚细胞定位和活化状态^[4]。过度高磷酸化和低磷酸化都会干扰剪接反应。例如,重要的SR蛋白之一——富含丝氨酸和



A: SRSF1蛋白包含RRM(RNA recognition motif)和RS结构域,其中RS结构域的RS1片段可被SRPK激酶磷酸化,控制SRSF1入核及核“斑点”形成;RS2片段可被CLK激酶磷酸化,调控SRSF1在核内的重新分布;B: SRPK磷酸化SR蛋白后使之入核形成核“斑点”,受到CLK进一步磷酸化的SR蛋白从核“斑点”释放,与初始mRNA结合参与剪接反应

图1 SRPK与CLK共同调控SR蛋白磷酸化示意图

精氨酸剪接因子1(*serine and arginine rich splicing factor 1*, *SRSF1*)翻译成成熟后, 其RS结构域N末端的丝氨酸/精氨酸被磷酸化, 随后磷酸化的*SRSF1*蛋白被转运到细胞核内并储存于染色质间颗粒簇内, 即核“斑点”结构域。RS结构域内残基位点的进一步磷酸化将导致*SRSF1*蛋白从核“斑点”结构域中释放出来从而参与剪接过程(图1B)。在剪接过程中, SR蛋白不仅会受到剪接激酶磷酸化修饰, 还会受到磷酸酶的去磷酸化调节^[5]。剪接完成后, 一些SR蛋白依然与相应的转录本结合, 随后通过部分去磷酸化将这些SR蛋白释放到细胞质中, 等待再一次被磷酸化并穿梭回到细胞核中参与剪接。

本文总结了近年来有关剪接激酶SRPK蛋白家族和CLK蛋白家族在肿瘤中的研究进展, 并对靶向这些剪接激酶的临床治疗进行了展望。

1 SRPKs蛋白家族

SRPKs蛋白家族包含三个成员: SRPK1、SRPK2、SRPK3。其中, SRPK1在人体各组织和器官广泛表达, 而SRPK2和SRPK3主要分布于神经系统和肌肉组织^[6]。目前, 研究人员已证实, SRPK1和SRPK2在肿瘤发生发展中扮演着重要角色^[6], 但对SRPK3在肿瘤发生中的作用却知之甚少。

SRPK1是目前研究最全面的剪接激酶之一。在细胞质中, SRPK1与热休克蛋白70/热休克蛋白90分子伴侣复合物结合以确保自身正确折叠维持活性状态^[7]。SRPK1介导的SR蛋白磷酸化是SR蛋白入核的先决条件。在渗透胁迫等应激条件下, SRPK1可从分子伴侣复合物中解离出来入核, 随后进行SR蛋白的进一步磷酸化^[7]。SRPK1对SR蛋白的磷酸化修饰是一种双轨机制: SRPK1首先将RS结构域中的8个丝氨酸/精氨酸残基磷酸化, 且连续磷酸化过程均保持与SR蛋白的紧密结合; 随后, 剩余的丝氨酸/精氨酸残基依次被磷酸化, 且每次磷酸基团转移后SRPK1会从SR蛋白上解离出来。SRPK1催化的SR蛋白磷酸化从其RS结构域中心开始, 高度有序, 随后向N端结构域进行持续的磷酸化反应^[8]。

1.1 SRPKs在肿瘤中的表达与功能

*Srpkl*基因敲除可引发小鼠胚胎致死, 表明SRPK活性破坏将导致细胞功能出现严重失常^[9]。已有研究报道, SRPKs常在不同类型的恶性肿瘤中发生异常表达(表1), 调控其异常表达最为常见的机制是实体瘤内的乏氧微环境(由缺氧诱导因子HIF1- α 主导)诱导SRPKs转录水平升高^[10]。SRPK1高表达通常与肿瘤恶性进展密切相关。例如, 在乳腺癌和胶质瘤组织中SRPK1异常高表达, 且其高表达与病人较差的预后相关^[11,12]。相反, SRPK1在视网膜母细胞瘤和对治疗耐药的男性生殖细胞肿瘤中表达量下降^[13,14]。有研究发现, 在结肠癌中, SRPK1的表达量既可上调又可下调^[9]。目前, 有关SRPK2、SRPK3在肿瘤中的研究尚不完善, 仅在肺癌、结肠癌、前列腺癌、胰腺癌及髓系白血病患者中观察到SRPK2异常高表达^[15-19], 仅在横纹肌肉瘤中观察到SRPK3表达下降^[20]。

表1 SRPKs在肿瘤中的表达与功能总结

SRPKs	在肿瘤中的表达	在肿瘤中的功能	参考文献
SRPK1	在乳腺癌、食管癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃癌、肝癌、肾癌、胶质瘤、黑色素瘤中上调	(+)增殖 (+)迁移、侵袭 (+)转移 (+)上皮间质转化 (+)血管新生 (+)干细胞特性 (+)移植瘤生长 (-)化疗敏感性 (-)凋亡	[11,12] [21-24] [26-33]
	在视网膜母细胞瘤、耐药的男性生殖细胞肿瘤中下调	(+)化疗敏感性	[13,14]
	在结肠癌中既可上调也可下调	(+)增殖 (-)癌变转化	[9]
SRPK2	在肺癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌和白血病中上调	(+)增殖 (+)迁移、侵袭 (+)移植瘤生长 (-)化疗敏感性 (-)凋亡	[15-19]
SRPK3	在横纹肌肉瘤中下调	(+)分化 (-)增殖	[20]

(+): 促进; (-): 抑制

现有的研究均表明, SRPK1的异常表达可能导致癌变, 在SRPK1高表达的肿瘤细胞中沉默*SRPK1*可抑制肿瘤发生发展。例如, 利用小干扰RNA技术下调胶质瘤细胞SRPK1的表达可诱导细

胞凋亡,减少迁移和侵袭,并抑制裸鼠移植瘤的血管生成及瘤体生长^[21]。在前列腺癌中的研究也得到类似结论,即沉默*SRPK1*可抑制皮下接种的移植瘤血管生成及其生长^[22]。*SRPK1*的致癌功能在肝细胞癌中也得到了一致的结论,过表达野生型*SRPK1*可促进细胞增殖,但过表达激酶失活型*SRPK1*可抑制移植瘤生长^[23]。此外,研究人员在乳腺癌、结肠癌及胰腺癌细胞中也观察到相似的效应,表现为沉默*SRPK1*可诱导自发凋亡,并提高细胞对吉西他滨和顺铂药物的敏感性^[24,25]。另有研究发现,*SRPK1*也可作为一种肿瘤抑制因子,条件性敲除*Srpkl*可诱导鼠胚胎成纤维细胞转化,将其接种于裸鼠皮下后将发展为肿瘤^[9]。因此,*SRPK1*无论异常高表达还是低表达均可促进癌变转化。换言之,*SRPK1*具有促进或抑制肿瘤的双重功能,其内在机制可能涉及*SRPK1*与AKT丝氨酸/苏氨酸激酶信号通路的相互作用^[9]。

对于*SRPK2*而言,减少其在白血病细胞中的表达可引起细胞周期阻滞并抑制细胞增殖^[19]。同样地,沉默*SRPK2*可抑制结肠癌细胞的生长及迁移^[16]。这些研究表明,*SRPK2*与*SRPK1*相似,也具有促进癌变转化的特性。与*SRPK1*和*SRPK2*相比,目前有关*SRPK3*在肿瘤中发挥作用的报道十分罕见,仅在横纹肌肉瘤细胞中发现*SRPK3*表达下降,恢复其表达可抑制细胞增殖及黏附非依赖性生长^[20]。

1.2 SRPKs在肿瘤中的可变剪接作用靶点

1.2.1 SRPK1-SRSF1-RAC1

Rac家族小GTP酶1(Rac family small GTPase 1, RAC1)主要通过核因子κB(nuclear factor-kappa B, NF-κB)信号通路加速细胞周期进程并促进细胞存活^[34],而*SRPK1*可参与调控*RAC1*可变剪接。在结肠癌中,RAC1异构体之一*Rac1b*表达上调,并与病人较差的预后相关^[34]。*SRPK1*通过磷酸化SRSF1诱导其入核、促进*RAC1*外显子3接入从而提高*Rac1b*表达水平。值得注意的是,在结肠癌细胞中敲除*SRPK1*不仅可抑制SRSF1入核,还会诱导其发生蛋白质降解,进一步限制其调控*RAC1*可变剪接的能力^[35]。

1.2.2 SRPK1/2-SRSF1-VEGF

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth

factor, VEGF)是调节血管生成的关键因子之一,其表达改变可导致肿瘤血管生成异常及其他病理变化。*VEGF*基因经过可变剪接调控可生成多种具有促进或抑制血管生成的异构体,例如,选择近端剪接位点并包含外显子8a可导致生成促血管生成异构体VEGF_{xxx};相反,选择远端剪接位点并包含外显子8b可导致生成抗血管生成异构体VEGF_{xxxb}^[36]。*VEGF*可变剪接受到多种剪接因子调控,包括SRSF1、SRSF2、SRSF5和SRSF6^[36,37]。研究发现,抑制*SRPK1/2*介导的SRSF1磷酸化修饰可干扰胰岛素生长因子依赖的促血管生成异构体VEGF₁₆₅的合成,最终抑制体内血管生成^[38,39]。在结肠癌中,*VEGF*可变剪接主要产生VEGF₁₆₅,提示抑制*SRPK1/2*可能将成为一种新的治疗途径用以干预*VEGF*可变剪接^[40]。事实与预想一致,在结直肠癌和前列腺癌细胞中沉默*SRPK1*可抑制小鼠移植瘤内的血管生成和瘤体生长^[22,39]。

1.2.3 SRPK1-SRSF3/4/6-MAP2K2

在乳腺癌、结肠癌及胰腺癌细胞中,研究显示,沉默*SRPK1*可下调SR蛋白如SRSF3、SRSF4和SRSF6的磷酸化水平,从而改变丝裂原活化蛋白激酶的激酶2(mitogen-activated protein kinase kinase 2, MAP2K2)基因可变剪接模式、降低其靶标丝裂原活化蛋白激酶1(mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)和MAPK3的磷酸化水平,最终诱导细胞凋亡^[24]。

1.2.4 SRPK1-RBM4-IR/MCL-1

*SRPK1*也可催化非SR蛋白剪接因子如RNA结合基序蛋白4(RNA binding motif protein 4, RBM4)发生磷酸化,该蛋白质是一种肿瘤抑制因子,其本身可调控胰岛素受体(insulin receptor, IR)和髓系细胞白血病因子1(myeloid cell leukemia 1, MCL-1)基因的可变剪接,从而产生具有促凋亡特性的异构体。在乳腺癌细胞中,上调*SRPK1*可诱导RBM4磷酸化,使其积累于细胞质中从而抑制促凋亡IR-B和MCL-1S异构体的生成。相反,敲低*SRPK1*可促进RBM4的核分布,增加IR-B和MCL-1S异构体表达,并促进亚砷酸盐诱导的细胞凋亡^[41]。

1.2.5 SRPK2-DDX23

*SRPK2*活性异常改变可能对肿瘤转化产生深远的影响。肿瘤发生和进展的关键特征之一是基

基因组具有不稳定性。研究发现, 在骨肉瘤和宫颈癌细胞中, 沉默*SRPK2*可导致DNA损伤和核质R环积累, 其中R环是一种在RNA聚合酶Ⅱ转录过程中形成的DNA-RNA杂合物。R环积累可导致基因组不稳定, 而*SRPK2*通过磷酸化修饰具有RS结构域的DEAD盒式解旋酶23(DEAD-box helicase 23, DDX23)防止R环积累及DNA损伤^[42]。因此, *SRPK2*在维持基因组稳定性中具有重要作用。然而, DNA损伤可反过来影响*SRPK2*的功能。用诱导基因毒性应激的因子治疗神经母细胞瘤, 如顺铂、 γ 照射或百草枯等可触发*SRPK2*的核定位从而改变涉及DNA损伤反应相关基因的可变剪接模式^[43]。

1.2.6 *SRPK2*-*SRSF2*-*CASP8*

有研究报道, *SRPK1*和*SRPK2*在应对基因毒性应激中发挥不同的作用^[44]。具体来讲, 研究发现, 经过顺铂治疗后*SRPK2*可促进肿瘤细胞凋亡, 而*SRPK1*却不具有此种特性, 这一作用是由*SRPK2*磷酸化*SRSF2*继而引起半胱天冬酶8(caspase-8, *CASP8*)可变剪接模式转化介导的。

1.3 *SRPKs*的可变剪接非依赖性机制

1.3.1 *SRPK1*-细胞内信号通路

在乳腺癌的一项研究中, 分析并筛选出了可影响肿瘤细胞活性及转移扩散的1 500多种激酶和磷酸酶, 进一步支持了*SRPK1*在乳腺癌进程中的重要性^[45]。在乳腺癌中, 高表达*SRPK1*的患者具有较差的预后, 并且肿瘤会优先转移至肺部和脑组织。沉默*SRPK1*可抑制乳腺癌细胞迁移, 降低裸鼠移植瘤生长和肺转移, 然而这些效应并非由可变剪接改变引起, 而是NF- κ B信号通路相关的200多种基因表达改变导致的^[45]。除此之外, *SRPK1*也可影响其他关键的细胞信号通路。例如在肺癌中, *SRPK1*过表达可引起 β 连环蛋白(β -catenin)核转运, 从而激活T细胞因子/淋巴增强因子(T-cell factor/lymphoid enhancing factor, TCF/LEF)转录因子, 活化该信号通路促进肺癌发生发展^[28]。

1.3.2 *SRPK2*-细胞内信号通路

凋亡染色质凝聚诱导因子1(apoptotic chromatin condensation inducer 1, *ACIN1*)是一种参与凋亡调节的剪接因子, *SRPK2*通过靶向该因子促进白血病细胞增殖。经过*SRPK2*磷酸化修饰后, *ACIN1*离

开核“斑点”结构重新分布于细胞质中从而激活细胞周期素A1(cyclin A1, *CCNA1*)基因启动子, 最终促进*CCNA1*表达并使细胞周期进程进入G₂/M期。沉默*SRPK2*或*ACIN1*均可引起细胞周期阻滞并抑制细胞增殖^[19]。此外, 研究表明, 在结肠癌中*SRPK2*过表达可激活MAPK信号通路, 从而促进肿瘤细胞生长及迁移。相反, 敲除*SRPK2*可抑制小鼠结肠癌移植瘤的生长, 进一步说明*SRPK2*的致瘤特性^[16]。

综合上述有关*SRPKs*在肿瘤中的功能及分子机制研究, 证实了*SRPKs*在多种类型肿瘤中存在异常表达, 其经由可变剪接途径、非可变剪接途径的作用机制不断被揭示, 也表明未来针对*SRPKs*表达或活性的靶向干预措施具有良好的抗肿瘤应用价值。

2 *CLKs*蛋白家族

*CLKs*蛋白家族包含四个成员: *CLK1*、*CLK2*、*CLK3*和*CLK4*, 其主要作用是磷酸化丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸残基。典型的*CLK1*激酶主要有两个结构域, 即位于C末端的催化结构域和位于N末端的介导底物-蛋白相互作用的丝氨酸/苏氨酸重复序列结构域。*CLK1*与SR蛋白共同定位于核“斑点”结构域, 并且参与催化SR蛋白的磷酸化过程。

与*SRPK1*相比, *CLK1*不仅磷酸化丝氨酸及其邻近的精氨酸残基(丝氨酸-精氨酸二肽), 还磷酸化丝氨酸-脯氨酸和丝氨酸-赖氨酸位点。*CLK1*介导的丝氨酸-脯氨酸残基磷酸化可引起*SRSF1*构象改变, 从而使*SRSF1*从核“斑点”结构域中释放出来并增强其与初始转录本的结合^[46]。*SRSF1*中丝氨酸-脯氨酸残基去磷酸化可导致100多种基因可变剪接发生改变, 由此可见*CLK1*/*SRSF1*在调控基因表达中的重要性^[47]。

在整个细胞周期中, *CLK1*蛋白水平受到泛素化和蛋白酶体降解机制的严格调控^[48]。*CLK1*表达水平发生周期性改变, 于G₂/M期达高峰, 并可同步介导超过600个基因的可变剪接发生改变, 从而影响细胞周期、核分裂及胞质分离等过程。因此, *CLK1*的表达对于精确的细胞周期进程必不可少。沉默*CLK1*或抑制其活性可导致S和G₂细胞周

期阻滞^[48]。

2.1 CLKs在肿瘤中的表达与功能

不同类型的肿瘤中, CLKs的表达量存在差异且功能也不尽相同(表2)。研究发现, 在胰腺癌细胞中CLK1存在过表达, 其作为剪接因子SRSF5的上游调控者在肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭方面发挥着重要作用^[49]。通过使用CLK1抑制剂TG003和CLK1小干扰RNA靶向CLK1可抑制胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移^[46]。CLK2在乳腺癌、肺癌、胶质瘤等恶性肿瘤中高表达, 敲低CLK2通常可抑制细胞增殖、迁移、侵袭等^[50-52]。在消化系统肿瘤如胆管癌、肝癌中也观察到CLK3的异常高表达, 其同样发挥促癌作用^[53,54]。目前, 对CLK4的研究甚少, 与其他CLKs相比, CLK4在肿瘤发生发展方面具有不同的作用。研究发现, 在食管鳞状细胞癌中通过影响CLK4启动子甲基化而使其表达下调可促进肿瘤的发展^[55]。

表2 CLKs在肿瘤中的表达与功能总结

CLKs	在肿瘤中的表达	在肿瘤中的功能	参考文献
CLK1	在胃癌、胰腺癌、前列腺癌、胶质瘤中上调	(+)增殖 (+)迁移、侵袭 (+)转移 (+)移植瘤生长 (-)凋亡	[46,49,56]
CLK2	在肺癌、乳腺癌、结直肠癌、胶质瘤中上调	(+)增殖 (+)迁移、侵袭 (+)移植瘤生长	[50-52,57]
CLK3	在肝癌、胆管癌中上调	(+)增殖 (+)迁移、侵袭 (+)转移 (+)移植瘤生长	[53,54]
CLK4	在食管癌中下调	(-)增殖 (-)迁移、侵袭 (-)上皮间质转化 (-)移植瘤生长	[55]
	在乳腺癌中上调	(+)迁移、侵袭 (+)上皮间质转化 (+)转移 (+)干细胞特性	[58]

(+): 促进; (-): 抑制

肿瘤中存在高水平的CLKs, 提示可能存在一种诱导其表达的共同机制。事实上, 与SRPKs相似, CLK1和CLK4的表达可由低氧诱导, 而低氧在实体瘤中是一种因供氧不足而产生的常见状态。CLK1基因是缺氧诱导因子HIF1- α 的直接靶点, 该因子以缺氧依赖方式与CLK1启动子结合^[10,56]。

2.2 CLKs在肿瘤中的可变剪接作用靶点

2.2.1 CLK1/4-TP53

在乳腺癌细胞中, CLK1/4激酶参与调控肿瘤蛋白TP53(tumor protein p53, TP53)基因的可变剪接。TP53基因经可变剪接可产生多种蛋白异构体, 包括典型的p53 α 和非典型的p53 β 、p53 γ 亚型, 其中 β 和 γ 亚型在60%以上的乳腺癌样本中表达缺失, 而诱导其表达可抑制乳腺癌细胞的生长, 促使其凋亡^[59]。通过特异性苯并噻唑抑制剂TG003抑制CLKs活性可增加p53 β 和p53 γ 亚型的表达, 但不影响典型的p53 α 蛋白表达。在乳腺癌细胞中, 上调p53 β 和 γ 亚型可使细胞对TG003治疗产生耐药性并解除细胞生长抑制^[59]。

2.2.2 CLK1/4-TF/VEGF

CLKs参与肿瘤细胞对低氧的应答反应。在肺癌细胞中, 抑制CLK1/4可削弱其在缺氧条件下血管生成的能力, 而该效应可能由凝血因子Ⅲ/组织因子(coagulation factor Ⅲ/tissue factor, TF)的剪接异构体asTF(alternative spliced TF)表达减少介导, asTF可诱导促血管生成基因如半胱氨酸富含61(Cysteine-rich 61, CYR61)、单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)和VEGF的表达^[60]。相反, 在非肿瘤细胞中抑制CLK1可阻止转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF β 1)介导的远端剪接位点的选择, 以及随后的抗血管生成VEGF_{165b}亚型的合成^[61]。

2.2.3 CLK2-ENAH

CLK2是一个典型的致癌因子, 其表达下调可导致一些与上皮间质转化相关的基因可变剪接发生改变, 包括涉及乳腺癌侵袭和转移的ENAH肌动蛋白调节因子(ENAH actin regulator, ENAH)。此外, 沉默CLK2可抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭, 并抑制小鼠移植瘤的生长^[50]。

2.2.4 CLK1-SRSF5-METTL14/CCNL2

在胰腺癌组织中CLK1表达较正常组织显著增加, 其过表达可促进胰腺癌细胞在体外和体内的生长和转移, 其机制是CLK1介导SRSF5磷酸化继而调控甲基转移酶样14(methyltransferase-like 14, METTL14)和细胞周期素L2(cyclin L2, CCNL2)基因发生异常可变剪接, 产生有利于增殖/转移的METTL14和CCNL2可变剪接异构体^[49]。

目前, 有关CLKs在肿瘤中的功能及机制研究表明, CLKs在多种类型肿瘤中存在异常高表达, 且其促瘤作用主要经由可变剪接途径实现, 预示深入研究肿瘤中CLKs的表达、功能和分子机制对于肿瘤的临床诊断和治疗都非常重要。

3 剪接激酶作为抗肿瘤靶点的探索

上述有关SRPKs/CLKs促瘤作用的发现促使人们寻找相关的靶向抑制剂, 这些抑制剂的陆续探索和应用也取得了十分可喜的结果, 可为抗肿瘤临床治疗提供新思路。本文总结了部分靶向SRPKs/CLKs抑制剂的抗肿瘤作用(表3)。

3.1 SRPKs抑制剂

SRPIN340是一种选择性抑制SRPK1和SRPK2的异烟酰胺。利用SRPIN340治疗白血病细胞可导致其生存能力下降并诱导细胞凋亡, 同时也会改变MAPK、VEGF等基因的可变剪接^[62]。更重要的是, 在体内SRPIN340可抑制肿瘤发生, 其局部注射可减弱人黑色素瘤移植瘤在小鼠体内的生长^[33]。有研究发现了两种更加有效的SRPK1抑制剂, 其中, SPHINX对SRPK1表现出较高的选择性和倾向性, 腹腔注射SPHINX可以显著抑制小鼠体内原位前列腺癌移植瘤的生长^[63]。此外, 研究人员对70 000多种复合物进行筛选, 最终发现了一种靶向SRPK1活性的抑制剂SRPIN803^[64], SRPIN803可抑制小鼠黄斑变性的血管生成, 表明其可能也具有抑制肿瘤血管生成的作用, 这一猜想还有待进一步的实验验证。关于SRPKs在基因毒性应激中作用的研究表明, SRPKs的表达和亚细胞定位可影响其对化疗药物的治疗反应。事实上, 研究发现, SRPK2在顺铂诱导的细胞凋亡中是必不可少的, DNA损伤可诱导SRPK2在细胞核内累积, 并

改变DNA损伤反应相关基因的剪接^[43]。这些现象提供了一种可能的研究思路, 即SRPKs抑制剂和常规化疗药物的联用为肿瘤患者提供了新的治疗选择。

3.2 CLKs抑制剂

CLKs抑制剂包括一大类化合物, 如海绵体衍生的2-氨基咪唑啉酮生物碱家族、苯并噻唑、芳基取代的氨基嘧啶、羟基苯并噻吩酮等。首先发现的抑制CLKs活性的化合物为苯并噻唑TG003^[68], 虽然其是迄今为止研究最彻底的CLK1抑制剂, 但是大多数研究都将之应用于非肿瘤领域。据现有文献报道, 在胃癌、前列腺癌中, TG003处理可抑制肿瘤进展^[46,65]。

另一类高效的CLK抑制剂是最初由蓝绿藻水蓼马中分离出的b-卡波林生物碱bauerine C合成的^[66]。具有代表性的二氯吡啶基烯腈KH-CB19是一种CLK1和CLK4强效(IC₅₀ = 20 nmol/L)高度选择性抑制剂, 其对CLK2和CLK3的亲合力较弱。以浓度为10 μmol/L的KH-CB19处理微血管内皮细胞可抑制SRSF3、SRSF4和SRSF6, 并影响组织因子TF的可变剪接, 而TF对肿瘤血管生成和转移至关重要^[66]。研究发现, 利用KH-CB19处理肺癌细胞可减弱其缺氧条件下的血管生成能力^[60,66]。应用针对SRPK1、CLK1和CLK2的小分子抑制剂如Cpd-1、Cpd-2和Cpd-3也取得了一定的疗效, 用这些化合物治疗乳腺癌细胞可减弱SR蛋白磷酸化并抑制细胞生长^[67]。由此可见, 靶向SRPK/CLK的抑制剂具有较好的抗肿瘤疗效, 未来针对剪接激酶的药物研发对于临床治疗具有重要意义。

4 结语

肿瘤中剪接激酶功能异常可导致细胞内关键

表3 靶向剪接激酶SRPKs/CLKs抑制剂的抗肿瘤作用总结

抑制剂名称	靶点	肿瘤类型	抗肿瘤作用/机制	参考文献
SRPIN340	SRPK1/SRPK2	白血病	抑制细胞生长、诱导凋亡, 改变MAPK、VEGF等基因的可变剪接	[62]
		黑色素瘤	抑制移植瘤生长	[33]
SPHINX	SRPK1	前列腺癌	抑制移植瘤生长	[63]
SRPIN803	SRPK1	—	抑制小鼠黄斑变性的血管生成	[64]
TG003	CLK1	胃癌、前列腺癌	抑制肿瘤进展	[46,65]
KH-CB19	CLK1/CLK4	肺癌	抑制缺氧条件下的血管生成	[60,66]
Cpd-1/2/3	SRPK1/CLK1/CLK2	乳腺癌	抑制SR蛋白磷酸化, 抑制细胞生长	[67]

信号通路的失调, 从而引起细胞增殖失控、凋亡调控缺失以及病理性迁移和侵袭。肿瘤中高活性的剪接激酶通常与剪接因子(如SRSF1)高表达相关, 后者还会导致细胞内可变剪接调控失衡。SRPK1和AKT之间的相互作用表明, 剪接激酶可能具有肿瘤抑制因子和致癌因子的双重角色。综上所述, 任何偏离正常活动或表达水平的情况均可破坏细胞内调控机制的精确平衡, 从而导致细胞恶性转化。剪接激酶参与应对基因毒性应激和化疗反应的事实进一步强调了其在肿瘤治疗中的重要性。未来研究应集中于详细阐述肿瘤中剪接激酶与关键信号通路之间相互作用及其涉及的机制。为此, 我们需要更特异、高效的剪接激酶小分子抑制剂。同时, 体内外抑制剪接激酶活性的研究也为其临床应用提供更多的可能性。但剪接激酶具备促瘤和抑瘤双重功能, 距离真正实现该靶向性抗肿瘤治疗还充满着未知和挑战, 需要进行更加完善充分的基础和临床研究。综上, 聚焦剪接激酶在恶性肿瘤中的功能与作用机制可为探索肿瘤临床诊疗新策略开辟新的视野。

参考文献

- [1] Pan Q, Shai O, Lee LJ, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*, 2008, 40(12): 1413-1415
- [2] Bonnal SC, López-Oreja I, Valcárcel J. Roles and mechanisms of alternative splicing in cancer—implications for care. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(8): 457-474
- [3] Zheng X, Peng Q, Wang L, et al. Serine/arginine-rich splicing factors: the bridge linking alternative splicing and cancer. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(13): 2442-2453
- [4] Naro C, Bielli P, Sette C. Oncogenic dysregulation of pre-mRNA processing by protein kinases: challenges and therapeutic opportunities. *FEBS J*, 2021, 288(21): 6250-6272
- [5] Zhou Z, Fu XD. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma*, 2013, 122(3): 191-207
- [6] Czuby A, Piekieko-Witkowska A. Protein kinases that phosphorylate splicing factors: roles in cancer development, progression and possible therapeutic options. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 91: 102-115
- [7] Zhong XY, Ding JH, Adams JA, et al. Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. *Genes Dev*, 2009, 23(4): 482-495
- [8] Ghosh G, Adams JA. Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. *FEBS J*, 2011, 278(4): 587-597
- [9] Wang P, Zhou Z, Hu A, et al. Both decreased and increased SRPK1 levels promote cancer by interfering with PHLPP-mediated dephosphorylation of Akt. *Mol Cell*, 2014, 54(3): 378-391
- [10] Jakubauskiene E, Vilys L, Makino Y, et al. Increased serine-arginine (SR) protein phosphorylation changes pre-mRNA splicing in hypoxia. *J Biol Chem*, 2015, 290(29): 18079-18089
- [11] Li X, Song J, Liu J, et al. Serine-arginine protein kinase 1 is associated with breast cancer progression and poor patient survival. *Med Oncol*, 2014, 31(8): 83
- [12] Sigala I, Tsamis KI, Gousia A, et al. Expression of SRPK1 in gliomas and its role in glioma cell lines viability. *Tumour Biol*, 2016, 37(7): 8699-8707
- [13] Krishnakumar S, Mohan A, Kandam M, et al. SRPK1: a cisplatin sensitive protein expressed in retinoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, 2008, 50(2): 402-406
- [14] Schenk PW, Stoop H, Bokemeyer C, et al. Resistance to platinum-containing chemotherapy in testicular germ cell tumors is associated with downregulation of the protein kinase SRPK1. *Neoplasia*, 2004, 6(4): 297-301
- [15] Li X, Yang S, Zhang M, et al. Downregulation of SRPK2 promotes cell cycle arrest though E2F1 in non-small cell lung cancer. *Eur J Histochem*, 2019, 63(4):
- [16] Wang J, Wu HF, Shen W, et al. SRPK2 promotes the growth and migration of the colon cancer cells. *Gene*, 2016, 586(1): 41-47
- [17] Zhuo YJ, Liu ZZ, Wan S, et al. Enhanced expression of SRPK2 contributes to aggressive progression and metastasis in prostate cancer. *Biomed pharmacother*, 2018, 102: 531-538
- [18] Wang G, Sheng W, Shi X, et al. Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes the development and progression of pancreatic cancer by downregulating Numb and p53. *FEBS J*, 2019, 286(9): 1668-1682
- [19] Jang SW, Yang SJ, Ehlén A, et al. Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes leukemia cell proliferation by phosphorylating acinus and regulating cyclin A1. *Cancer Res*, 2008, 68(12): 4559-4570
- [20] Zhang M, Zhu B, Davie J. Alternative splicing of MEF2C pre-mRNA controls its activity in normal myogenesis and promotes tumorigenicity in rhabdomyosarcoma cells. *J Biol Chem*, 2015, 290(1): 310-324
- [21] Chang Y, Wu Q, Tian T, et al. The influence of SRPK1 on glioma apoptosis, metastasis, and angiogenesis through

- the PI3K/Akt signaling pathway under normoxia. *Tumour Biol*, 2015, 36(8): 6083-6093
- [22] 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. *Oncogene*, 2015, 34(33): 4311-4319
- [23] Zhou B, Li Y, Deng Q, et al. SRPK1 contributes to malignancy of hepatocellular carcinoma through a possible mechanism involving PI3K/Akt. *Mol Cell Biochem*, 2013, 379(1-2): 191-199
- [24] Hayes GM, Carrigan PE, Miller LJ. Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas. *Cancer Res*, 2007, 67(5): 2072-2080
- [25] Hayes GM, Carrigan PE, Beck AM, et al. Targeting the RNA splicing machinery as a novel treatment strategy for pancreatic carcinoma. *Cancer Res*, 2006, 66(7): 3819-3827
- [26] Ren G, Sheng L, Liu H, et al. The crucial role of SRPK1 in TGF- β -induced proliferation and apoptosis in the esophageal squamous cell carcinomas. *Med Oncol*, 2015, 32(7): 209
- [27] Liu H, Hu X, Zhu Y, et al. Up-regulation of SRPK1 in non-small cell lung cancer promotes the growth and migration of cancer cells. *Tumour Biol*, 2016, 37(6): 7287-7293
- [28] 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 signalling in NSCLC. *J Pathol*, 2016, 240(2): 184-196
- [29] Odunsi K, Mhawech-Fauceglia P, Andrews C, et al. Elevated expression of the serine-arginine protein kinase 1 gene in ovarian cancer and its role in cisplatin cytotoxicity *in vitro*. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51030
- [30] Dong Z, Chang X, Xie L, et al. Increased expression of SRPK1 (serine/arginine-rich protein-specific kinase 1) is associated with progression and unfavorable prognosis in cervical squamous cell carcinoma. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 6100-6112
- [31] Xu X, Wei Y, Wang S, et al. Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) is elevated in gastric cancer and plays oncogenic functions. *Oncotarget*, 2017, 8(37): 61944-61957
- [32] Han X, Yang J, Jia Z, et al. Knockdown of serine-arginine protein kinase 1 inhibits the growth and migration in renal cell carcinoma cells. *Oncol Res*, 2017, 25(3): 389-395
- [33] Gammons MV, Lucas R, Dean R, et al. Targeting SRPK1 to control VEGF-mediated tumour angiogenesis in metastatic melanoma. *Br J Cancer*, 2014, 111(3): 477-485
- [34] Matos P, Gonçalves V, Jordan P. Targeting the serrated pathway of colorectal cancer with mutation in BRAF. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1866(1): 51-63
- [35] Gonçalves V, Henriques AFA, Henriques A, et al. Phosphorylation of SRSF1 by SRPK1 regulates alternative splicing of tumor-related Rac1b in colorectal cells. *RNA*, 2014, 20(4): 474-482
- [36] Guyot M, Pagès G. VEGF splicing and the role of VEGF splice variants: from physiological-pathological conditions to specific pre-mRNA splicing. *Methods Mol Biol*, 2015, 1332: 3-23
- [37] Merdzhanova G, Gout S, Keramidas M, et al. The transcription factor E2F1 and the SR protein SC35 control the ratio of pro-angiogenic versus antiangiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor-A to inhibit neovascularization *in vivo*. *Oncogene*, 2010, 29(39): 5392-5403
- [38] Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis. *J Biol Chem*, 2010, 285(8): 5532-5540
- [39] Amin EM, Oltean S, Hua J, et al. WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing. *Cancer Cell*, 2011, 20(6): 768-780
- [40] Varey AHR, Rennel ES, Qiu Y, et al. VEGF165b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer*, 2008, 98(8): 1366-1379
- [41] Lin JC, Lin CY, Tarn WY, et al. Elevated SRPK1 lessens apoptosis in breast cancer cells through RBM4-regulated splicing events. *RNA*, 2014, 20(10): 1621-1631
- [42] Sridhara SC, Carvalho S, Grosso AR, et al. Transcription dynamics prevent RNA-mediated genomic instability through SRPK2-dependent DDX23 phosphorylation. *Cell Rep*, 2017, 18(2): 334-343
- [43] Vivarelli S, Lenzken SC, Ruepp MD, et al. Paraquat modulates alternative pre-mRNA splicing by modifying the intracellular distribution of SRPK2. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61980
- [44] Edmond V, Moysan E, Khochbin S, et al. Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin. *EMBO J*, 2011, 30(3): 510-523
- [45] van Roosmalen W, Le Dévédec SE, Golani O, et al. Tumor cell migration screen identifies SRPK1 as breast cancer metastasis determinant. *J Clin Invest*, 2015, 125(4): 1648-1664
- [46] Babu N, Pinto SM, Biswas M, et al. Phosphoproteomic

- analysis identifies CLK1 as a novel therapeutic target in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 2020, 23(5): 796-810
- [47] Keshwani MM, Aubol BE, Fattet L, et al. Conserved proline-directed phosphorylation regulates SR protein conformation and splicing function. *Biochem J*, 2015, 466(2): 311-322
- [48] Dominguez D, Tsai YH, Weatheritt R, et al. An extensive program of periodic alternative splicing linked to cell cycle progression. *ELife*, 2016, 5: e10288
- [49] Chen S, Yang C, Wang ZW, et al. CLK1/SRSF5 pathway induces aberrant exon skipping of METTL14 and cyclin L2 and promotes growth and metastasis of pancreatic cancer. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 60
- [50] Yoshida T, Kim JH, Carver K, et al. CLK2 is an oncogenic kinase and splicing regulator in breast cancer. *Cancer Res*, 2015, 75(7): 1516-1526
- [51] Liu B, Kong X, Wang R, et al. CLK2 promotes occurrence and development of non-small cell lung cancer. *J BUON*, 2021, 26(1): 58-64
- [52] Park SY, Piao Y, Thomas C, et al. Cdc2-like kinase 2 is a key regulator of the cell cycle via FOXO3a/p27 in glioblastoma. *Oncotarget*, 2016, 7(18): 26793-26805
- [53] Zhou Q, Lin M, Feng X, et al. Targeting CLK3 inhibits the progression of cholangiocarcinoma by reprogramming nucleotide metabolism. *J Exp Med*, 2020, 217(8): e20191779
- [54] Li H, Cui X, Hu Q, et al. CLK3 is a direct target of miR-144 and contributes to aggressive progression in hepatocellular carcinoma. *Onco Targets Ther*, 2019, Volume 12: 9201-9213
- [55] Shen Y, Zhang H, Yao S, et al. Methionine oxidation of CLK4 promotes the metabolic switch and redox homeostasis in esophageal carcinoma via inhibiting MITF selective autophagy. *Clin Transl Med*, 2022, 12(1): e719
- [56] Bowler E, Porazinski S, Uzor S, et al. Hypoxia leads to significant changes in alternative splicing and elevated expression of CLK splice factor kinases in PC3 prostate cancer cells. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 355
- [57] Zhou HB, Yang L, Liu SF, et al. CDC like kinase 2 plays an oncogenic role in colorectal cancer via modulating the Wnt/ β -catenin signaling. *Neoplasma*, 2022, 69(3): 657-669
- [58] Kang E, Kim K, Jeon SY, et al. Targeting CLK4 inhibits the metastasis and progression of breast cancer by inactivating TGF- β pathway. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29(8-9): 1168-1180
- [59] Marcel V, Fernandes K, Terrier O, et al. Modulation of p53 β and p53 γ expression by regulating the alternative splicing of TP53 gene modifies cellular response. *Cell Death Differ*, 2014, 21(9): 1377-1387
- [60] Eisenreich A, Zakrzewicz A, Huber K, et al. Regulation of pro-angiogenic tissue factor expression in hypoxia-induced human lung cancer cells. *Oncol Rep*, 2013, 30(1): 462-470
- [61] Nowak DG, Woolard J, Amin EM, et al. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci*, 2008, 121(20): 3487-3495
- [62] Siqueira RP, Barbosa ÉAA, Polêto MD, et al. Potential antileukemia effect and structural analyses of SRPK inhibition by N-(2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl)isonicotinamide (SRPIN340). *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134882
- [63] Mavrou A, Oltean S. SRPK1 inhibition in prostate cancer: A novel anti-angiogenic treatment through modulation of VEGF alternative splicing. *Pharmacol Res*, 2016, 107: 276-281
- [64] Morooka S, Hoshina M, Kii I, et al. Identification of a dual inhibitor of SRPK1 and CK2 that attenuates pathological angiogenesis of macular degeneration in mice. *Mol Pharmacol*, 2015, 88(2): 316-325
- [65] Uzor S, Porazinski SR, Li L, et al. CDC2-like (CLK) protein kinase inhibition as a novel targeted therapeutic strategy in prostate cancer. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 7963
- [66] Fedorov O, Huber K, Eisenreich A, et al. Specific CLK inhibitors from a novel chemotype for regulation of alternative splicing. *Chem Biol*, 2011, 18(1): 67-76
- [67] Araki S, Dairiki R, Nakayama Y, et al. Inhibitors of CLK protein kinases suppress cell growth and induce apoptosis by modulating Pre-mRNA splicing. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0116929
- [68] Muraki M, Ohkawara B, Hosoya T, et al. Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J Biol Chem*, 2004, 279(23): 24246-24254