

DOI:10.16305/j.1007-1334.2025.z20250312003

胃肠安调控分化抑制因子 1 的选择性剪接抑制胃癌细胞恶性进展的机制

朱江川¹, 曹妮达¹, 马芳琪^{1,2}, 陈 彬^{1,3}, 孙晓宇¹, 董家欢¹, 张光涛^{1,4}, 王 怡¹, 沈雨苗¹, 赵爱光¹

1. 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤一科(上海 200032); 2. 中国科学技术大学附属第一医院中医科(安徽 合肥 230001); 3. 上海中医药大学附属普陀医院中医肿瘤科(上海 200062); 4. 上海中医药大学附属第七人民医院肿瘤介入科(上海 200137)

【摘要】 目的 探讨健脾中药复方胃肠安(WCA)通过多聚嘧啶结合蛋白 3(PTBP3)调控分化抑制因子 1(*Id1*) mRNA 选择性剪接抑制胃癌细胞恶性进展的作用机制。**方法** 利用 *PTBP3* 基因被稳定沉默的人胃癌细胞 MKN45, 建立相应的裸小鼠皮下移植瘤模型。模型裸小鼠随机分为 MKN45 细胞 0.9% 氯化钠溶液组(NC 组, 作为对照), MKN45 细胞 WCA 组(NC-WCA 组), 沉默 *PTBP3* MKN45 细胞 0.9% 氯化钠溶液组(shPTBP3 组), 沉默 *PTBP3* MKN45 细胞 WCA 组(shPTBP3-WCA 组), 每组 6 只。每日灌胃给予相应干预, 共 28 d。考察 WCA 对移植瘤生长、PTBP3 及 *Id1* 异构体表达的影响。采用苏木精-伊红(HE)染色法和 Ki67 染色法分别观察肿瘤组织形态和肿瘤细胞比例。采用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)法和 Western blot 法检测移植瘤细胞内 PTBP3、*Id1a*、*Id1b* 蛋白和 mRNA 表达。**结果** 与 NC 组相比, NC-WCA 组、shPTBP3 组、shPTBP3-WCA 组小鼠瘤体质量均减轻, 差异有统计学意义($P<0.05$)。HE 和 Ki67 染色提示沉默 *PTBP3* 和 WCA 干预均可抑制小鼠 MKN45 肿瘤细胞增殖能力。RT-qPCR 和 Western blot 结果显示, 与 NC 组相比, 沉默 *PTBP3* 和 WCA 干预均能使 *Id1a* mRNA 表达减少, *Id1b* mRNA 表达增加, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 在沉默 *PTBP3* 的模型裸小鼠中, WCA 干预后 *Id1a* mRNA 表达减少, *Id1b* mRNA 表达增加, 差异均有统计学意义($P<0.001$); 与 NC 组相比, 沉默 *PTBP3* 和 WCA 干预均能下调 *Id1a* 表达($P<0.05$), 并上调 *Id1b* 表达($P<0.001$), 其蛋白表达变化与 mRNA 表达变化一致。**结论** PTBP3 能调控 *Id1* 异构体的选择性剪接, 中药复方 WCA 通过 PTBP3 调控 *Id1* 的选择性剪接, 使 *Id1a* 表达下调、*Id1b* 表达上调, 从而抑制胃癌细胞恶性进展。

【关键词】 胃癌; 胃肠安; 肿瘤; 选择性剪接; 健脾; 裸小鼠; 中药研究

Mechanism of Weichang'an in inhibiting malignant progression of gastric cancer cells through alternative splicing of inhibitor of differentiation 1

ZHU Jiangchuan¹, CAO Nida¹, MA Fangqi^{1,2}, CHEN Bin^{1,3}, SUN Xiaoyu¹, DONG Jiahuan¹, ZHANG Guangtao^{1,4}, WANG Yi¹, SHEN Yumiao¹, ZHAO Aiguang¹

1. First Department of Oncology Department, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, First Affiliated Hospital of University of Science and Technology, Hefei, Anhui 230001, China; 3. Department of Traditional Chinese Medicine Oncology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 4. Department of Interventional Oncology, Seventh People's Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200137, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of strengthening spleen traditional Chinese medicine compound Weichang'an (WCA) in inhibiting malignant progression of gastric cancer cells through polypyrimidine tract-binding protein 3 (PTBP3) regulating alternative splicing of inhibitor of

differentiation 1 (*Id1*) mRNA. **Methods** Using the human gastric cell line MKN45 that has been stably silenced for the *PTBP3* gene, a corresponding nude mouse subcutaneous tumor transplantation model was established. The model nude mice were randomly divided into the MKN45 cell 0.9% sodium chloride solution group (NC group, as control), the MKN45 cell WCA group (NC-WCA group), the *PTBP3* silenced MKN45 cell 0.9% sodium chloride solution group (shPTBP3

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82004133); 上海市卫健委名老中医学术经验研究工作室建设项目(SHGZS-202216)

[作者简介] 朱江川, 女, 硕士研究生, 主要从事中西医结合治疗消化系统恶性肿瘤研究工作

[通信作者] 赵爱光, 主任医师, 博士研究生导师;

E-mail: aiguang@qq.com

group), and the *PTBP3* silenced MKN45 cell WCA group (shPTBP3-WCA group), with 6 mice in each group. The corresponding interventions were administered by intragastric administration daily for a total of 28 d. The effects of WCA on the growth of transplanted tumors, expressions of *PTBP3* and *Id1* isomers were investigated. The morphology of the tumor tissue and the proportion of tumor cells were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and Ki67 staining, respectively. Fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot were used to detect the protein and mRNA expression of *PTBP3*, *Id1a* and *Id1b* in transplanted tumor cells. **Results** Compared with the NC group, the tumor weights of mice in the NC-WCA group, the shPTBP3 group, and the shPTBP3-WCA group all decreased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The HE and Ki67 staining results indicated that both silencing *PTBP3* and WCA intervention could inhibit the proliferation ability of mouse MKN45 tumor cells. The results of RT-qPCR and Western blot showed that compared with the NC group, both silencing *PTBP3* and WCA intervention could reduce the expression of *Id1a* mRNA and increase the expression of *Id1b* mRNA, and the differences were statistically significant ($P<0.05$); in the model nude mice with silenced *PTBP3*, after WCA intervention, the expression of *Id1a* mRNA decreased and the expression of *Id1b* mRNA increased, and the differences were statistically significant ($P<0.001$); compared with the NC group, both silencing *PTBP3* and WCA intervention could down-regulate the expression of *Id1a* ($P<0.05$) and up-regulate the expression of *Id1b* ($P<0.001$), and the protein expression changes were consistent with the mRNA expression changes. **Conclusions** *PTBP3* can regulate the alternative splicing of *Id1* isomers, and the traditional Chinese medicine compound WCA could regulate the alternative splicing of *Id1* through *PTBP3*, which could down-regulate the expression of *Id1a* and up-regulate the expression of *Id1b*, thereby inhibit the malignant progression of gastric cancer cells.

Keywords: gastric cancer; Weichang'an; tumor; alternative splicing; invigorating-spleen; nude mouse; Chinese materia medica research

胃癌是我国高发的恶性肿瘤,发病率和病死率分别位居第五和第三^[1]。全国名老中医药专家传承工作室导师、上海市名中医邱佳信教授指出胃癌的“脾虚”核心病机,进而以健脾法为治则立法组方,创立了中药复方胃肠安(WCA)。作为上海中医药大学附属龙华医院的院内制剂,WCA已在临床上应用30多年,其在改善胃癌患者脾虚症状、延长生存期方面疗效确切^[2-4]。本课题组前期研究^[5-7]发现,健脾复方WCA能抑制胃癌细胞增殖并诱导其凋亡,从而抑制人胃癌裸小鼠原位移植瘤转移,并能下调信号转导和转录激活因子3(STAT3)通路下游多个靶基因mRNA和蛋白表达水平;进一步通过组织芯片筛选等实验发现,WCA抑制胃癌细胞生长的作用与选择性剪接(alternative splicing,AS)因子多聚嘧啶结合蛋白3(*PTBP3*)调控B细胞淋巴瘤(*Bcl-2*)、*STAT3*等多种基因的表达相关^[8]。以上研究结果提示WCA通过多环节、多靶点协同抑制肿瘤细胞增殖并调控微环境,这构成了其发挥整体疗效的分子基础。

分化抑制因子1(inhibitor of differentiation 1, *Id1*)

在胃癌组织和细胞系普遍存在且高表达,并与胃癌的恶性程度相关^[9]。其剪接异构体 *Id1a* 能促进细胞增殖、侵袭和转移;*Id1b* 则具有抑制肿瘤血管生成的作用。^[10]研究^[9]表明,*Id1* 基因转录后的 mRNA 能与 *PTBP3* 蛋白结合,提示 *Id1* 的转录后调控可能与 *PTBP3* 的选择性剪接有关,*PTBP3* 通过连接 *Id1* 内含子中的 CU 富集区以上调 *Id1a* 表达并下调 *Id1b* 表达。

本研究针对胃癌细胞增殖、侵袭作用的一个重要靶点——*Id1*,利用 *PTBP3* 稳定沉默的 MKN45 细胞构建裸小鼠皮下移植瘤模型,探讨健脾中药复方 WCA 通过 *PTBP3* 调控 *Id1* 选择性剪接抑制胃癌细胞的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与质粒 人胃癌细胞株 MKN45 细胞由华东理工大学药学院提供,其 *PTBP3* 基因稳定沉默细胞模型则由上海吉凯基因科技有限公司完成构建。*PTBP3* 沉默 RNA 和发夹 RNA 序列见表 1。

表 1 *PTBP3* 沉默 RNA 和发夹 RNA 序列

名称	RNA 序列	序列长度/bp
<i>PTBP3</i> 沉默 RNA	GAGUGAAGAUUAUGUUUAATT UUAACAUAUUCUUCACUCGA	21
<i>PTBP3</i> 发夹 RNA	上游:5'-GATCCGAGTGAAGATTATGTTTAATTCAAGAGATTAAACATAATCTTCACTCTTTTTTGAAAA-3' 下游:3'-GCTCACTTCTAATACAAATTAAGTTCTCTAATTTGTATTAGAAGTGAGAAAAAACCTTTTCGA-5'	63

注:*PTBP3* 为多聚嘧啶结合蛋白 3 基因。

1.1.2 动物 本研究使用 24 只雄性 BALB/c-nu/nu 裸小鼠,SPF 级,均为 6 周龄,体质量(20±2)g。实验动物由上海斯莱克实验动物公司供应。动物生产许可证编号:SCXK(沪)2022-0004;动物使用许可证编号:SCXK

(沪)2020-0009。动物饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级饲养室,饲养温度控制在(25±2)℃,相对湿度(50±10)%,12 h 明/暗循环光照,实验开始前正常饲养 1 周。所有实验流程均遵循动物福利与伦理规范,并

已通过上海中医药大学实验动物伦理委员会审批(审批号:PZSHUTCM2211100002)。

1.1.3 药物与试剂 WCA 由以下药物组成:太子参 12 g、茯苓 30 g、炒白术 12 g、白扁豆 30 g、陈皮 4.5 g、青皮 4.5 g、大血藤 30 g、菝葜 30 g、姜半夏 9 g、夏枯草 12 g、牡蛎 30 g。本研究所用中药饮片均由上海中医药大学附属龙华医院中药房提供,采用常规水煎剂,调节浓度为生药 240 g/L,高温灭菌后冷藏备用。高效液相色谱(HPLC)法监测 WCA 的制备工艺,以 WCA 煎剂中橙皮苷含量为指标成分,保证研究制剂的稳定性。

FastPure Cell/Tissue 总 RNA 提取试剂盒(批号:RC112),南京诺唯赞生物科技股份有限公司;化学发光(ECL)显色液(批号:SQ101),上海雅酶生物医药科技有限公司;PTBP3 抗体、Id1 抗体(批号分别为 PA5-69084、PA5-47617),美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.1.4 主要仪器 实时荧光定量 PCR 仪(型号:Quantstudio 3),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;化学发光图像分析系统(型号:Tanon 4600),上海天能科技有限公司。

1.2 肿瘤细胞悬液的制备 将 MKN45 细胞株和 PTBP3 沉默的 MKN45 稳转细胞株常规培养后,以 1×10^7 个/mL 的浓度混悬于无血清培养液(0.2 mL)。

1.3 造模方法 将“1.2”项的两种细胞悬液分别注射于裸小鼠右侧腋下,以此构建 MKN45 细胞移植瘤模型和沉默 PTBP3 MKN45 细胞移植瘤模型,每个模型各 12 只,共 24 只。

1.4 分组与干预 造模第 7 天,将“1.3”项的两种模型裸小鼠随机分为 0.9% 氯化钠溶液组和 WCA 组,共 4 组,即 MKN45 细胞 0.9% 氯化钠溶液组(NC 组,作为对照),MKN45 细胞 WCA 组(NC-WCA 组),沉默 PTBP3 MKN45 细胞 0.9% 氯化钠溶液组(shPTBP3 组),沉默 PTBP3 MKN45 细胞 WCA 组(shPTBP3-WCA 组),每组各 6 只。按人与裸小鼠药物等效剂量计算用药剂量^[11]。各 WCA 组以 WCA 2.9 g/kg(0.5 mL/只)灌胃,每日 1 次;各 0.9% 氯化钠溶液组以 0.9% 氯化钠溶液 0.5 mL/只灌胃,每日 1 次。共干预 28 d。

1.5 检测指标与方法

1.5.1 肿瘤生长情况 给药后第 28 天,所有动物取肿瘤组织,称取瘤体质量,并将瘤块放入液氮中冻存;抑瘤率按以下公式计算:抑瘤率(%)=(模型对照组平均瘤质量-实验组平均瘤质量)/模型对照组平均瘤质量 $\times 100\%$ 。

1.5.2 苏木精-伊红染色(HE)法观察肿瘤组织形态

将肿瘤组织置于 10% 甲醛溶液中固定 24 h,随后依次进行脱水、石蜡包埋并制备切片。切片经干燥、脱蜡及水化后,进行 HE 染色。染色完成后,对切片进行脱水、二甲苯透明,并以中性树胶封固。最后,在光学显

微镜下观察并采集图像。

1.5.3 Ki67 染色法观察肿瘤细胞比例 将组织样本在 4% 甲醛溶液中固定 24~48 h,经石蜡包埋、切片,依次脱蜡、复水、抗原修复、封闭、孵育。进行显色试剂显影,复染细胞核后用中性树胶封片,显微镜下随机拍摄 3 个视野。

1.5.4 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测肿瘤组织中 Id1 mRNA 的表达 使用 1 μ g 总 RNA,按照逆转录试剂盒操作流程合成第一链 cDNA。所有 PCR 引物均由上海尚亚生物科技有限公司合成,具体序列见表 2。以 cDNA 为模板,采用 SYBR Green 法在实时荧光定量 PCR 仪上对 Id1a 和 Id1b 进行扩增,并以甘油醛-3 磷酸脱氢酶基因(GAPDH)作为内参基因对目标基因的表达进行定量分析。反应程序设置:预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 12 s,62 $^{\circ}$ C 40 s,共进行 40 个循环。目的基因的表达水平以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法进行分析^[4]。

表 2 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
Id1a	上游:5'-TCAACGGCGAGATCAGC-3'	17
	下游:5'-TCGGTCTTGTTCTCCCTCA-3'	19
Id1b	上游:5'-TGCCTAAGGAGCCTGGAA-3'	18
	下游:5'-CCGCCTGTGAAAACGAGA-3'	18
GAPDH	上游:5'-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'	21
	下游:5'-GCTCGGAGTCAACGGATTG-3'	20

注:Id1a 为分化抑制因子 1a 基因,Id1b 为分化抑制因子 1b 基因,GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因。

1.5.5 Western blot 法检测肿瘤组织中 Id1 蛋白表达

肿瘤组织样本经机械匀浆后,加入预冷的放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解液,于冰上裂解 20 min,随后在 4 $^{\circ}$ C 条件下以 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,总蛋白从细胞上清中提取,蛋白浓度通过二辛可酸(BCA)法进行测定。等量蛋白(10 μ g)经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,湿转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。膜在含 5% 脱脂牛奶的含吐温-20 的 Tris 缓冲盐溶液(TBST)中室温封闭 1 h,随后与相应的一抗(1:200 稀释)在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。次日,膜经 TBST 洗涤后,与辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:1 000 稀释)室温孵育 1 h, β -肌动蛋白(β -actin)作为上样内参。目标条带使用化学发光试剂进行显影,并通过成像系统采集。

1.6 统计学方法 实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析进行检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对裸小鼠皮下移植瘤模型肿瘤生长的影响 与

NC 组相比, NC-WCA 组、shPTBP3 组、shPTBP3-WCA 组小鼠瘤体质量均减轻 ($P<0.05$), 抑瘤率分别为 31.66%、46.59% 和 53.38%; 与 NC 组相比, WCA 组、shPTBP3 组、shPTBP3-WCA 组小鼠瘤体体积均减小, 其中 shPTBP3 组、shPTBP3-WCA 组差异有统计学意义 ($P<0.05$)。上述结果提示, 沉默 *PTBP3* 和 WCA 干预均可抑制裸小鼠皮下移植瘤生长。见表 3, 图 1A、B。

HE 染色显示, 各组肿瘤组织细胞质染色淡, 结构松散, 可见空泡化、异形细胞增多等表现。Ki67 染色显示, 与 NC 组相比, 其余各组阳性细胞数较少, 提示 WCA 干预和沉默 *PTBP3* 使小鼠肿瘤细胞增殖受到抑制。见图 1C。

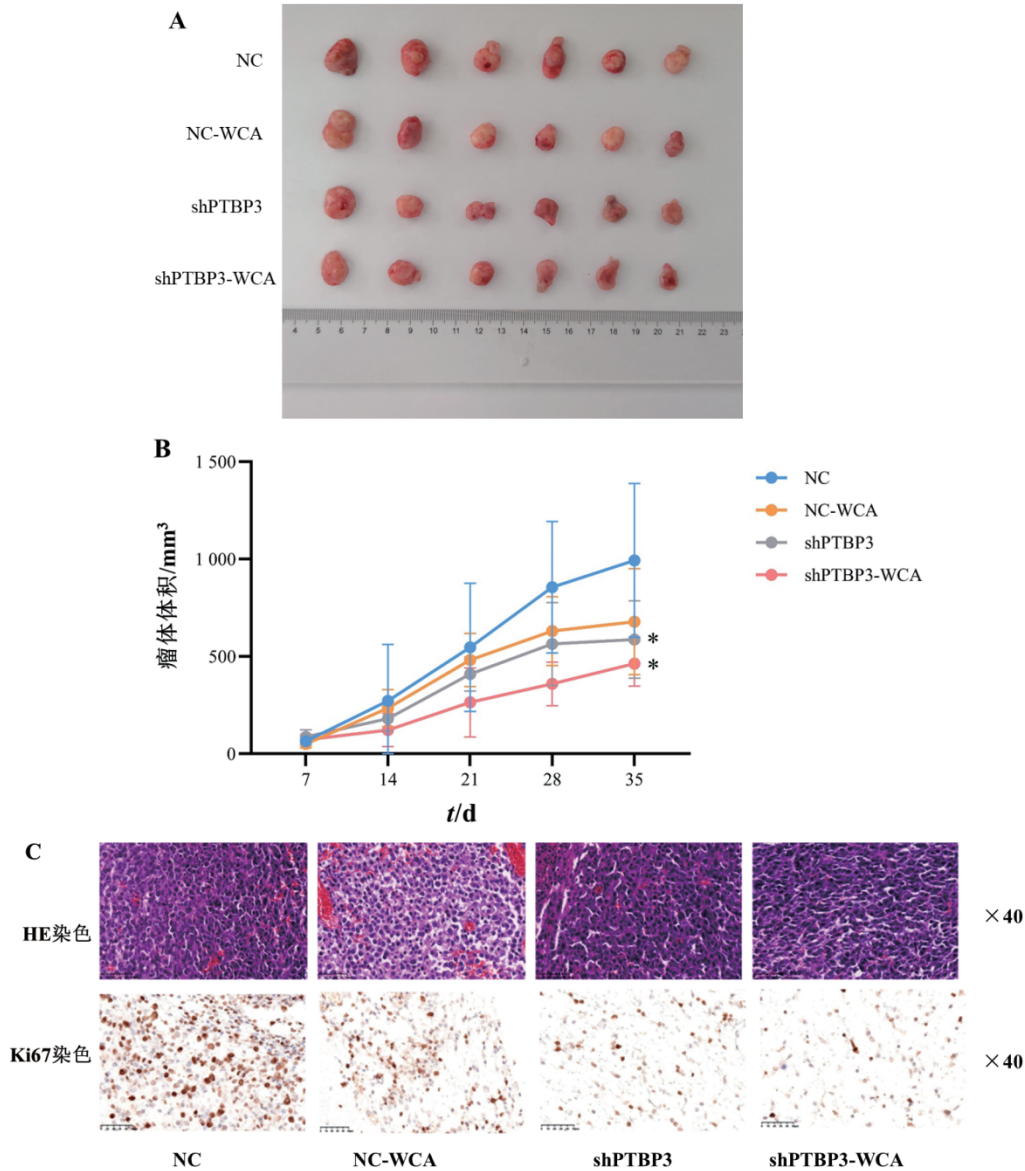
2.2 对肿瘤组织中 *Id1* 选择性剪接的影响 Western

表 3 各组裸小鼠瘤体体积、瘤体质量、抑瘤率比较
($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	瘤体体积/ mm^3	瘤体质量/g	抑瘤率/%
NC	992.94 $\pm$ 395.20	19.92 $\pm$ 1.84	—
NC-WCA	678.60 $\pm$ 272.02	15.78 $\pm$ 3.44*	31.66
shPTBP3	530.30 $\pm$ 234.81*	14.88 $\pm$ 3.94*	46.59
shPTBP3-WCA	462.92 $\pm$ 115.23*	13.37 $\pm$ 3.72*	53.38

注: NC 为 MKN45 细胞 0.9% 氯化钠溶液组, NC-WCA 为 MKN45 细胞胃肠安组, shPTBP3 为沉默多聚嘧啶结合蛋白 3 基因 (*PTBP3*) MKN45 细胞 0.9% 氯化钠溶液组, shPTBP3-WCA 为沉默 *PTBP3* MKN45 细胞 WCA 组。“—”表示无。与 NC 组比较, * $P<0.05$ 。

blot 结果显示, 稳定转染沉默 *PTBP3* 后, 其蛋白表达下降, 表明转染成功, 见图 2A。RT-qPCR 结果显示, 与 NC

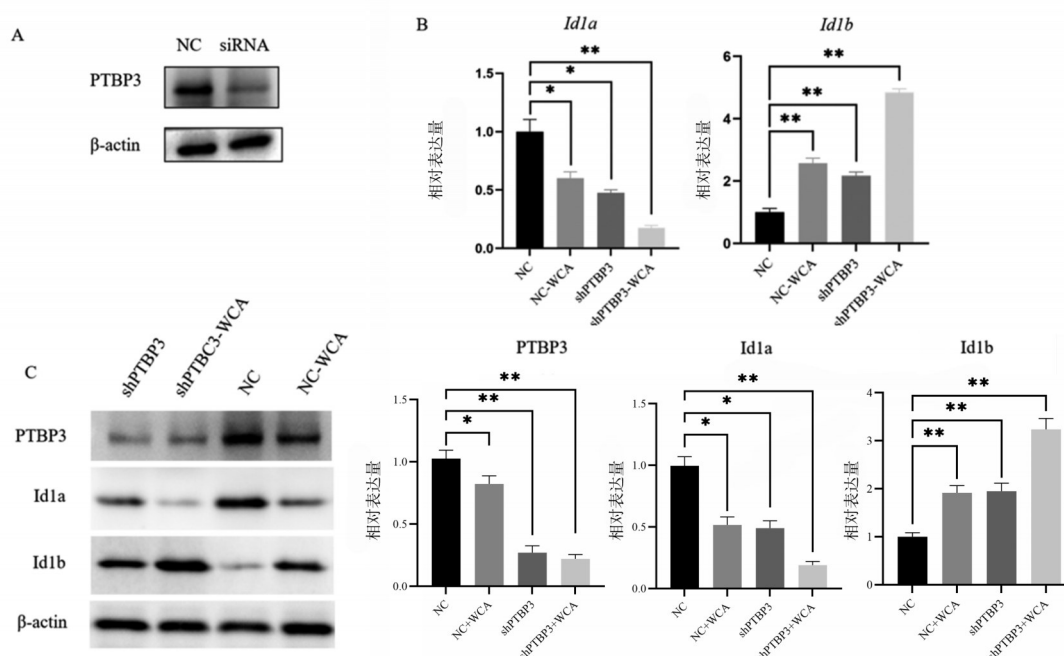


注: NC 为 MKN45 细胞 0.9% 氯化钠溶液组, NC-WCA 为 MKN45 细胞胃肠安 (WCA) 组, shPTBP3 为沉默多聚嘧啶结合蛋白 3 基因 (*PTBP3*) MKN45 细胞 0.9% 氯化钠溶液组, shPTBP3-WCA 为沉默 *PTBP3* MKN45 细胞 WCA 组。A 为各组裸小鼠皮下移植瘤, B 为各组裸小鼠皮下移植瘤生长曲线, C 为苏木精-伊红染色 (HE) 及 Ki67 染色检测移植瘤组织形态。

图 1 各组裸小鼠皮下移植瘤生长情况

组相比,沉默 *PTBP3* 和 WCA 均能使 *Id1a* mRNA 表达减少, *Id1b* mRNA 表达增加,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$);在沉默 *PTBP3* 模型裸小鼠中, WCA 干预后 *Id1a* mRNA 表达减少, *Id1b* mRNA 表达增多,差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。见图 2B。Western blot 结果显示,

各组 *Id1a*、*Id1b* 的蛋白表达变化与 mRNA 表达变化一致,即与 NC 组相比,沉默 *PTBP3* 和 WCA 干预均能下调 *Id1a* 表达 ($P < 0.05$),并上调 *Id1b* 表达 ($P < 0.001$),见图 2C。



注: *PTBP3* 为多聚嘧啶结合蛋白 3, *Id1a* 为分化抑制因子 1a, *Id1b* 为分化抑制因子 1b, β -actin 为 β -肌动蛋白, NC 为 MKN45 细胞 0.9% 氯化钠溶液组, NC-WCA 为 MKN45 细胞胃脘安(WCA)组, sh*PTBP3* 为沉默 *PTBP3* MKN45 细胞 0.9% 氯化钠溶液组, sh*PTBP3*-WCA 为沉默 *PTBP3* MKN45 细胞 WCA 组。A 为 Western blot 法验证稳定转染沉默 *PTBP3*, B 为 mRNA 表达统计图, C 为各目标蛋白表达的 Western blot 检测和统计图。与 NC 组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.001$ 。

图 2 各组裸小鼠肿瘤组织中 *Id1a*、*Id1b* 蛋白和 mRNA 表达比较

3 讨论

胃癌肿瘤异质性高、复发转移率高,晚期胃癌患者的生存期改善仍不理想,中西医结合治疗能改善胃癌预后。中药复方 WCA 遵循健脾理气、清热解毒、软坚化痰的治则^[12]。方中太子参、白术、茯苓、白扁豆,旨在补益脾胃,针对“脾胃虚弱”之核心病机;大血藤、菝葜、牡蛎、夏枯草,佐以姜半夏、青皮、陈皮和胃理气;诸药合用,以健脾理气为主,同时兼顾清热解毒、软坚化痰之功效。课题组前期临床研究^[2-4]证实,在规范西医系统治疗基础上联合 WCA 治疗,根治术后、晚期胃癌等不同人群均能得到生存获益。本研究在前期发现 WCA 能下调 *PTBP3*、*Bcl-2* 等基因表达的基础上,采用野生型 MKN45 细胞株和稳转沉默 *PTBP3* 基因的 MKN45 细胞株构建裸小鼠皮下移植瘤模型,进一步研究 WCA 通过 *PTBP3* 调控 *Id1* 的选择性剪接抑制胃癌细胞生长的作用。

在本研究中, WCA 组、sh*PTBP3* 组和 sh*PTBP3*-WCA 组裸小鼠瘤体质量均显著低于 NC 组,提示沉默 *PTBP3* 基因和 WCA 干预均可抑制 MKN45 细胞裸小鼠

皮下移植瘤生长。沉默 *PTBP3* 基因可显著抑制移植瘤的生长,表明 *PTBP3* 在体内具有促进肿瘤生长的作用。该结果与既往研究结论一致^[13]。

PTBP3 是一种 RNA 结合蛋白,是不均一核糖核蛋白(hnRNP)家族中的一员,通过抑制前体 mRNA 的选择性剪接来实现其调控功能^[14],在胃癌细胞增殖、细胞凋亡及化疗药物耐药等方面具有调控作用^[15]。选择性剪接是一种重要的基因表达调控机制,选择性剪接调控的异常可以引起剪接异构体之间相对表达的变化,导致多种遗传病及肿瘤发生。选择性剪接通过对癌基因、抑癌基因和肿瘤转移抑制基因的调控,深刻影响着肿瘤的恶性表型,是介导肿瘤发生发展的关键生物学过程^[16-18]。

PTBP3 被证实是一种具有 RNA 结合能力的蛋白,通过高通量 RNA 免疫沉淀测序(RIP-seq)技术进一步鉴定其下游靶标,其中包括 *Id1* 等多个基因的转录产物^[9,19],提示胃癌中 *Id1* 的转录后调控可能与 *PTBP3* 的选择性剪接相关。*Id1* 属于螺旋-环-螺旋结构蛋白(HLH)家族的成员,可阻碍碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)

和 DNA 的结合,调控转录因子的活性^[19],上调基质金属蛋白酶(MMPs)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达,在肿瘤发生发展中具有多重促癌作用^[20-22]。Id1 在胃癌组织中高表达,通过选择性剪接产生两种具有不同生物学功能的剪接异构体:Id1a 有促进细胞增殖、侵袭转移的作用,Id1b 使肿瘤细胞处于静止状态,抑制肿瘤血管生成^[10];两种异构体与 bHLH 类蛋白的结合活性可能存在一定差异。与正常组织相比,肿瘤组织中 Id1a/Id1b 比例明显升高^[9],表明肿瘤细胞内存在 *Id1* 基因选择性剪接的异常。

前期研究^[9]表明,健脾为主复方 WCA 能下调 PTBP3 表达,而 PTBP3 通过连接 *Id1* 内含子中 CU 富集区以上调 Id1a 表达并下调 Id1b 表达。本研究发现沉默 *PTBP3* 能使 Id1a 蛋白和 mRNA 表达减少,并使 Id1b 蛋白和 mRNA 表达增加,表明 PTBP3 可调控 *Id1* 的选择性剪接。在 *PTBP3* 基因未沉默模型中, WCA 干预组的 Id1a 蛋白和 mRNA 表达减少, Id1b 蛋白和 mRNA 表达增加,结合前期研究^[13]已证实 WCA 可下调 PTBP3 表达,本研究结果表明,沉默 *PTBP3* 可下调 Id1 的剪接异构体 Id1a,并上调 Id1b,提示 WCA 通过 PTBP3 选择性剪接 *Id1* 产生不同剪接异构体,从而抑制胃癌细胞的恶性进展。

综上所述,PTBP3 能调控 Id1 异构体的选择性剪接,中药复方 WCA 通过 PTBP3 调控 *Id1* 的选择性剪接,使 Id1a 表达下调、Id1b 表达上调,从而发挥抑制胃癌细胞恶性进展的作用。

参考文献:

- [1] HAN B, ZHENG R, ZENG H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1): 47-53.
- [2] 李朝燕,赵爱光,竹永宝,等.基于健脾法探讨中药胃肠安对晚期胃癌的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(5):2012-2017.
- [3] 朱晓虹,许雯,赵秋枫,等.健脾为主中药复方联合化疗延长晚期胃癌复发患者生存期的前瞻性同期对照研究[J].中华中医药学刊,2018,36(8):1844-1848.
- [4] ZHAO L, ZHAO A G, ZHAO G, et al. Survival benefit of traditional Chinese herbal medicine (a herbal formula for invigorating spleen) in gastric cancer patients with peritoneal metastasis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 625493.
- [5] 陈伟霞,牛垚飞,邹煜明,等.胃肠安对人胃癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(1):91-95.
- [6] 赵爱光,杨金坤,尤圣富,等.中药胃肠安诱导裸鼠胃癌移植瘤细胞凋亡的途径及基因调控的研究[J].中西医结合学报,2007,5(3):287-297.
- [7] 赵爱光,杨金坤,赵海磊.健脾中药诱导人胃癌细胞裸小鼠移植瘤细胞凋亡的实验研究[J].世界华人消化杂志,2000,8(7):737-740.
- [8] CHEN B, ZHAO A G, SHAO J, et al. The effects of *PTBP3* silencing on the proliferation and differentiation of MKN45 human gastric cancer cells[J]. Life Sci, 2014, 114(1): 29-35.
- [9] CHEN B, CHEN W X, MU X Y, et al. PTBP3 induced inhibition of differentiation of gastric cancer cells through alternative splicing of Id1 [J]. Front Oncol, 2020, 10: 1477.
- [10] ZHENG Y F, ZHONG G Q, HE C C, et al. Targeted splicing therapy: New strategies for colorectal cancer[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1222932.
- [11] 魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2010:1698.
- [12] 潘传芳,梁未末,顾贤,等.基于 MMP-2、MMP-9 探讨胃肠安方及其拆方抑制人胃癌裸鼠原位移植瘤生长及转移的部分配伍机制[J].上海中医药杂志,2020,54(9):81-87.
- [13] 陈彬,慕晓艳,赵爱光.胃肠安调控 PTBP3 对胃癌细胞中多基因表达的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2014,19(5):481-487.
- [14] MONZON-CASANOVA E, BATES K J, SMITH C W J, et al. Essential requirement for polypyrimidine tract binding proteins 1 and 3 in the maturation and maintenance of mature B cells in mice[J]. Eur J Immunol, 2021, 51(9): 2266-2273.
- [15] LIANG X, SHI H Y, YANG L, et al. Inhibition of polypyrimidine tract-binding protein 3 induces apoptosis and cell cycle arrest, and enhances the cytotoxicity of 5- fluorouracil in gastric cancer cells[J]. Br J Cancer, 2017, 116(7): 903-911.
- [16] HA S Y, WANG B D. Molecular insight into drug resistance mechanism conferred by aberrant *PIK3CD* splice variant in African American prostate cancer[J]. Cancers (Basel), 2023, 15(4): 1337.
- [17] LIN T, DENG L Y, LIU S Y, et al. Identification of RNA processing factor LSM5 as a new adverse biomarker in nasopharyngeal carcinoma [J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 9901.
- [18] CHOI S K, CHO N J, KIM E M, et al. The role of alternative pre-mRNA splicing in cancer progression [J]. Cancer Cell Int, 2023, 23(1): 249.
- [19] HOU P F, LI L, CHEN F, et al. PTBP3-mediated regulation of *ZEB1* mRNA stability promotes epithelial-mesenchymal transition in breast cancer[J]. Cancer Res, 2018, 78(2): 387-398.
- [20] LIU W T, GAO L, HOU X J, et al. TWEAK signaling-induced Id1 expression drives malignant transformation of hepatic progenitor cells during hepatocarcinogenesis [J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 18: e2300350.
- [21] ZHAO Z X, BO Z Y, GONG W Y, et al. Inhibitor of differentiation 1 (Id1) in cancer and cancer therapy [J]. Int J Med Sci, 2020, 17(8): 995-1005.
- [22] QIU J, LI Y H, WANG B Y, et al. The role and research progress of inhibitor of differentiation 1 in atherosclerosis [J]. DNA Cell Biol, 2022, 41(2): 71-79.

编辑:杨轶舜

收稿日期:2025-03-12