

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.12.006

## 小核核糖核蛋白多肽 A 对肝细胞癌细胞恶性生物学行为的影响及其机制

姚梦琳, 王如画, 崔小萌, 陈映菲, 郭丹, 和水祥, 李雅睿(西安交通大学第一附属医院 消化内科, 陕西 西安 710061)

**[摘要]** **目的:** 探究小核核糖核蛋白多肽 A (SNRPA) 在肝细胞癌 (HCC) 组织和细胞中的表达及其调控 HCC 细胞 HepG2 和 Hep3B 恶性生物学行为的作用及其机制。**方法:** 数据库分析 SNRPA 在泛癌组织中的表达及其与病理分期、HCC 患者预后的相关性。常规培养 HepG2 和 Hep3B 细胞, 将 si-NC, si-SNRPA#1、si-SNRPA#2 转染 HepG2 和 Hep3B 细胞, 实验分为 si-NC 组、si-SNRPA#1 组和 si-SNRPA#2 组; 将 SNRPA-vector 和 SNRPA-oe 载体转染 LO2 细胞, 分为 SNRPA-vector 组和 SNRPA-oe 组。qPCR 法检测正常肝细胞和肝癌细胞以及转染各组 HepG2 和 Hep3B 细胞中 SNRPA mRNA 的表达, MTT 法、Transwell 法和 WB 法分别检测转染后各组 HepG2 和 Hep3B 细胞的增殖、迁移和侵袭能力以及 EMT 相关蛋白表达的变化。**结果:** 数据库分析显示, SNRPA mRNA 在多数肿瘤组织中均呈高表达 (均  $P < 0.001$ ) 且与病理分期有关联 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。SNRPA 在 HCC 组织和细胞中均呈高表达 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且与 HCC 患者的预后有关联 ( $P < 0.01$ )。敲减 SNRPA 表达明显抑制 HepG2 和 Hep3B 细胞增殖 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) 而过表达 SNRPA 则能促进 LO2 细胞增殖 ( $P < 0.01$ ), 敲减 SNRPA 表达明显抑制 HepG2 和 Hep3B 细胞的迁移和侵袭能力 (均  $P < 0.01$ ), 明显促进 E-cadherin 的表达上调 ( $P < 0.01$ ), 而抑制 N-cadherin、vimentin 的表达 ( $P < 0.01$ )。**结论:** SNRPA 在 HCC 组织及细胞中呈明显高表达, 其可能通过调控上皮间质转化 (EMT) 进程进而促进 HepG2 和 Hep3B 细胞的增殖、迁移和侵袭。

**[关键词]** 肝细胞癌; HepG2 细胞; Hep3B 细胞; 小核核糖核蛋白多肽 A; 增殖; 迁移; 侵袭; 上皮间质转化

**[中图分类号]** R735.7; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)12-1074-08

## Effect of small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A on the malignant biological behavior of hepatocellular carcinoma cells and its mechanism

YAO Menglin, WANG Ruhua, CUI Xiaomeng, CHEN Yifei, GUO Dan, HE Shuixiang, LI Yarui (Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of SNRPA in hepatocellular carcinoma (HCC) and cells and the role and mechanism of small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A (SNRPA) in regulating the malignant biological behaviors of HCC HepG2 and Hep3B cells. **Methods:** The database was used to analyze the expression of SNRPA in pan-cancer tissues and its correlation with the pathological stage and the prognosis of HCC patients. HepG2 and Hep3B cells were routinely cultured. si-NC, si-SNRPA#1, si-SNRPA#2 were transfected into HepG2 and Hep3B cells and recorded as si-NC, si-SNRPA#1 and si-SNRPA#2 group. SNRPA-vectors and SNRPA-oe vectors were transfected into LO2 cells and recorded as SNRP-vector and SNRPA-oe group. qPCR was used to detect the expression of SNRPA mRNA in normal hepatocytes and HCC cells, as well as HepG2 and Hep3B cells transfected with each group. MTT, Transwell and WB assays were used to respectively investigate the changes in the proliferation, migration and invasion abilities as well as the expression of EMT-related proteins in the transfected HepG2 and Hep3B cells in each group. **Results:** Database analysis showed that SNRPA mRNA was highly expressed in the majority of tumors (all  $P < 0.001$ ) and correlated with their pathological stages ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). SNRPA was highly expressed in both HCC tissues and HCC cells ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ) and was correlated with the prognosis of HCC patients ( $P < 0.01$ ). Knockdown of SNRPA expression significantly inhibited the proliferation of HepG2 and Hep3B cells ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ) while overexpression of SNRPA promoted the proliferation of LO2 cells ( $P < 0.01$ ). Knockdown of SNRPA expression significantly inhibited the migration and invasion abilities of HepG2 and Hep3B cells (both  $P < 0.01$ ) and promoted a marked up-regulation of the expression of E-cadherin ( $P < 0.01$ ) and suppressed the expression of N-cadherin and vimentin ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The expression of SNRPA was significantly elevated in HCC tissues and cells, and it may promote the proliferation,

**[基金项目]** 西安交通大学第一附属医院科研发展基金 (No. 2020QN-12)

**[作者简介]** 姚梦琳 (1991—), 女, 硕士, 住院医师, 主要从事消化系统肿瘤发病机制与防治的研究。E-mail: yao\_menglin@126.com

**[通信作者]** 李雅睿, E-mail: liyarui0529@163.com

migration and invasion of HepG2 and Hep3B cells by regulating the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process.

**[Key words]** hepatocellular carcinoma (HCC); HepG2 cell; Hep3B cell; small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A (SNRPA); proliferation; migration; invasion; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(12):1074-1081. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.12.006]

原发性肝癌是全球第六大常见恶性肿瘤,在癌相关死亡原因中居第三位,肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是其最常见的病理类型<sup>[1]</sup>。中国作为肝癌高发地区之一,尽管近年来在肝癌的诊断技术及诊治方法上有了很大提高,但由于 HCC 发病隐匿且治疗方法有限,大多患者发现时多处于中晚期,预后较差,5 年生存率仅为 14.1%<sup>[2]</sup>。因此,探索新的发生发展机制,寻找治疗的潜在分子靶点仍然是改善目前 HCC 诊治现状的关键。小核糖核蛋白多肽 A (small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A, SNRPA) 是一种含 282 个氨基酸的蛋白质,其通过 N 端的 RNA 结合结构域与 U1 小核糖核蛋白 (U1 small nuclear ribonucleoprotein, U1snRNP) 结合,参与 U1snRNA 复合物的组装及剪接体的装配,在形成剪接体和促进 mRNA 的剪接过程有着重要作用<sup>[3]</sup>。有研究表明,SNRPA 在结肠癌<sup>[4]</sup>、胃癌<sup>[5]</sup>、肺癌<sup>[6]</sup>等肿瘤中异常表达,但对其在 HCC 中的表达和作用机制知之甚少。本研究旨在探讨 SNRPA 在 HCC 组织及细胞中的表达,并分析下调 SNRPA 表达对 HCC 细胞体外增殖与转移能力的影响及其潜在的调控机制,为 HCC 的诊断和治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本、细胞和主要试剂

采集 2017 年 1 月至 2018 年 6 月间在西安交通大学第一附属医院接受手术切除的 HCC 组织及相应的癌旁组织,患者既往接受化疗或放疗者均未入选;患者年龄在 42~67 岁之间,中位数年龄为 55 岁,患者平均年龄 (54.75±4.67) 岁。本研究方案由西安交通大学第一附属医院伦理审查委员会审批通过(批准号

为 2016-132),所有患者均充分知情并签署书面知情同意书。

人 HCC 细胞 HepG2、Hep3B、MHCC-97L、MHCC-97H、Huh7、SMCC-7721 及正常人肝细胞 LO2 均购自中国科学院细胞库,DMEM 高糖细胞培养基、胰酶消化液、青霉素-链霉素双抗均购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自中国浙江天杭生物科技股份有限公司,Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司,TRIzol 试剂购自天根生化科技股份有限公司,RNA 逆转录试剂盒购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司,qPCR 引物(表 1)由北京擎科生物科技有限公司设计并合成,siRNA(表 2)由上海吉玛制药技术有限公司设计并合成,SNRPA-vector(空载体)和 SNRPA-oe(过表达载体)由上海吉玛制药技术有限公司设计并构建,Transwell 小室购于 Millipore 公司,Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司,兔抗人 SNRPA 多克隆抗体购自中国 Proteintech 公司,兔抗人 E-cadherin、N-cadherin 及 vimentin 单克隆抗体均购自中国 Abcam 公司,GAPDH 兔多克隆抗体以及辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(H+L)二抗购自西安壮志生物科技有限公司,辣根过氧化物酶标记链霉素卵白素工作液购自上海碧云天生物科技股份有限公司。

表 1 目的基因的引物序列

基因	引物序列(5'~3')
SNRPA	正向: GAATCCACCGAATCACATCTTG
	反向: ACTGATTGAAAAGCATGGACAG
β-actin	正向: CCTTCCTGGGCATGGAGTC
	反向: TGATCTTCATTGTGCTGGGTG

表 2 siRNA 序列

基因	序列(5'~3')
siRNA-negative (si-NC)	正义 UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	反义 ACGUGACACGUUCGGAGAATT
si-SNRPA#1	正义 GGCCAGGCCUUUGUCAUCUTT
	反义 AGAUGACAAAGGCCUGGCCTT
si-SNRPA#2	正义 GCCAAGACCGACUCAGAUATT
	反义 UAUCUGAGUCGGUCUUGGCTT

1.2 数据库分析 SNRPA 在泛癌中的表达及其与 HCC 病理分期、患者预后的相关性

利用 TIMER 2.0(<http://TIMER.cistrome.org/>)数据库的 Gene\_DE 模块分析比较 SNRPA 在不同肿瘤类型

和相应正常组织中的转录表达。通过 GEPIA2(<http://GEPIA2.cancer-pku.cn>)从 TCGA 数据库中检测 SNRPA 在不同病理分期的肿瘤中的表达情况。利用 StarBase3.0(<http://starbase.sysu.edu.cn>)分析 SNRPA 在 HCC 组织和正常肝脏组织中的表达。通过 Kaplan-Meier Plotter(<http://kmplot.com/analysis/index.php>)分析 SNRPA 的表达对 HCC 患者预后的影响。

### 1.3 细胞培养、转染和分组

将 HepG2 和 Hep3B 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。细胞汇合度达到 70%~80% 时,按 Lipofectamine 2000 实验说明书步骤用转染试剂将 si-NC、si-SNRPA#1、si-SNRPA#2 转染 HepG2 和 Hep3B 细胞,记为 si-NC 组、si-SNRPA#1 和 si-SNRPA#2 组;将 SNRPA-vector 和 SNRPA-oe 载体转染 LO2 细胞,记为 SNRPA-vector 组和 SNRPA-oe 组。

### 1.4 qPCR 法检测 HepG2 和 Hep3B 细胞中 SNRPA mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂抽提各组转染后细胞中的总 RNA,通过紫外分光光度计检测其浓度及纯度。采用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,qPCR 采用两步法,反应条件:95 °C 10 min,95 °C 15 s、60 °C 1 min,扩增 35~40 个循环。以  $\beta$ -actin 为内参基因,用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算目的基因的相对表达量。

### 1.5 MTT 法检测各组 HepG2 和 Hep3B 细胞的增殖能力

取转染后处于对数生长期的 HepG2 和 Hep3B 细胞,常规消化、离心细胞后重悬成单细胞悬液,将其接种于 (5×10<sup>3</sup> 个/孔)96 孔板中,分别于 1、2、3、4 d 后在避光条件下向每孔加入 5 mg/mL MTT 10  $\mu$ L,继续培养 4 h,取出培养板,弃上清液,每孔中加入 150  $\mu$ L DMSO,用酶标仪检测 490 nm 处各孔的光密度(D)值,以 D 值表示细胞的增殖能力。

### 1.6 Transwell 实验检测各组细胞的迁移及侵袭能力

侵袭实验:将 Matrigel 基质胶与无血清培养基按照 1:8 的比例混合,每个小室上室内加入 60  $\mu$ L,置于培养箱风干。每孔加入 50  $\mu$ L 无血清培养基以水化基底膜。取转染后处于对数生长期细胞用无血清培养基重悬成单细胞悬液并计数,在 Transwell 上室中加入 200  $\mu$ L 细胞悬液(约 2×10<sup>4</sup> 个细胞),下室加入 600  $\mu$ L 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,常规培养 36 h 后,弃去上室培养液,PBS 小心淋洗,用湿润棉签轻轻擦拭小室上层未穿过微孔膜的细胞,95% 的酒精固定 15 min,结晶紫染色 20 min,于倒置相差显微镜(×400)下计数膜下层的细胞。迁移实验不需要 Matrigel 胶包被基底膜,其余步骤同侵袭实验。

### 1.7 WB 法检测各组细胞中 SNRPA 及 EMT 相关蛋白的表达

用 RIPA 裂解液提取各组转染后细胞的总蛋白质,BCA 法浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度。制备 SDS-PAGE 凝胶,加入待测蛋白样品和蛋白 Marker 进行垂直电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜,5% 的脱脂牛奶室温下处理 1 h,兔抗 SNRPA 和 EMT 相关蛋白的一抗(稀释比例均为 1:1 000)4 °C 下处理过夜,加入 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗,常温下处理 1 h,ECL 显影,以 GAPDH 为内参,用 ImageJ 软件分析各条带的灰度值。

### 1.8 免疫组化染色检测 HCC 组织中 SNRPA 蛋白的表达

HCC 组织及癌旁组织经 4% 多聚甲醛固定,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后行 4  $\mu$ m 连续切片。免疫组化实验步骤按照 ZSGB-BIO 说明书操作。切片 60 °C 烘烤过夜后置于二甲苯中脱蜡,常规梯度乙醇水化。采用高温高压抗原修复,山羊血清工作液封闭后,滴加 1:1 000 稀释的 SNRPA 抗体 4 °C 下处理过夜,加入生物素标记山羊抗兔 IgG 工作液室温处理 1 h,加入辣根过氧化物酶标记链霉素卵白素工作液室温处理 30 min,DAB 显色,苏木精复染,常规梯度乙醇脱水,中性树胶封片后在显微镜下观察拍照。用 ImageJ 软件分析免疫组化染色的 SNRPA 阳性细胞面积比。

### 1.9 统计学处理

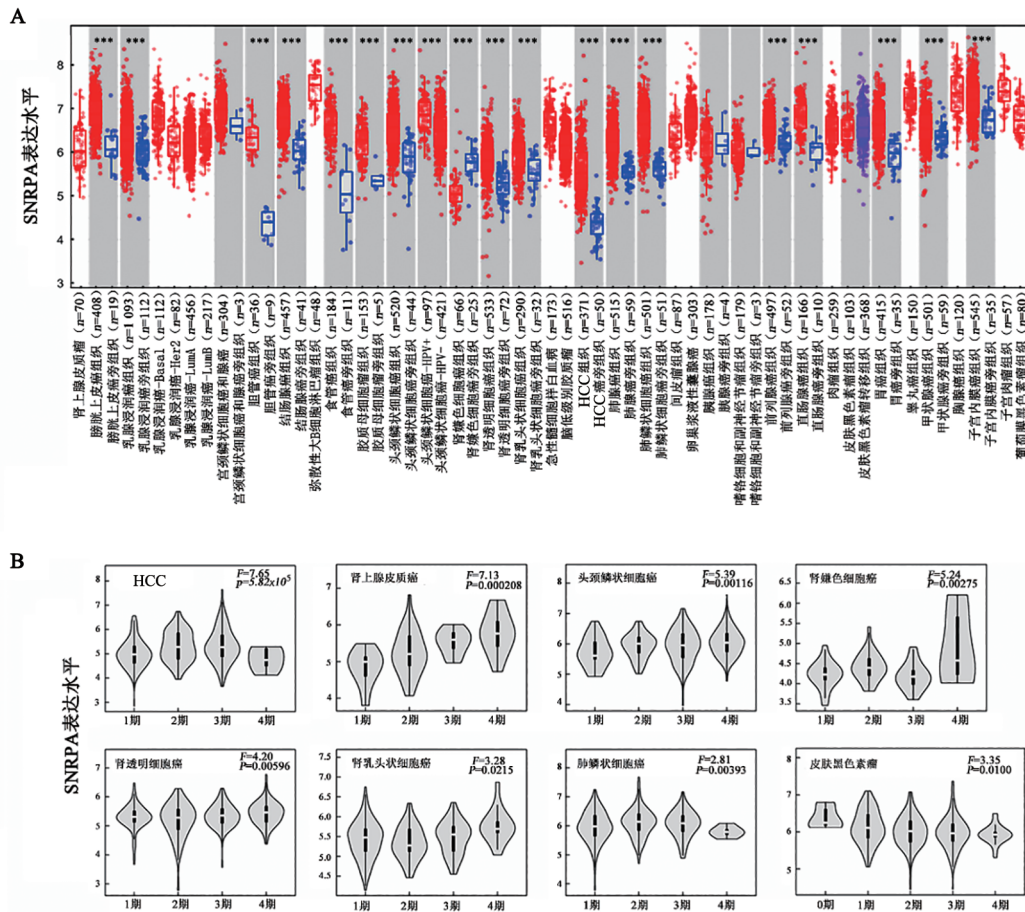
采用 SPSS23.0 及 GraphPrism8.0 软件对数据进行相关统计学分析。符合正态分布的计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示。两组数据组间差异对比采用 *t* 检验,单因素方差分析用于两组以上数据间的比较。以  $P<0.05$  或  $P<0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 数据库分析显示 SNRPA mRNA 在多数肿瘤中呈高表达且与其病理分期相关

利用 TIMER2.0 数据库分析 SNRPA 在人类泛癌中的表达,分析结果(图 1A)显示,与癌旁组织比较,SNRPA mRNA 在大多数肿瘤组织中均呈高表达(均  $P<0.001$ ),而在肾嫌色细胞癌组织中 SNRPA mRNA 呈低表达( $P<0.001$ )。通过 GEPIA2 分析 SNRPA mRNA 表达与肿瘤病理分期的相关性,结果(图 1B)显示,在 HCC、肾上腺皮质癌、头颈鳞状细胞癌、肾嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、肺鳞癌和皮肤黑色素瘤中 SNRPA 的表达与其肿瘤病理分期均有关联( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。





A: TIMER2.0数据库分析 SNRPA mRNA 在人类泛癌组织中的表达; B: GEPIA2数据库分析 SNRPA mRNA 表达与人类泛癌病理分期的相关性。与癌旁组织比较, \*\*\* $P < 0.001$ 。

图1 SNRPA mRNA 在人类泛癌组织中的表达及其与病理分期关系的分析

### 2.2 SNRPA mRNA 在 HCC 组织中呈高表达且与患者的预后相关

StarBase3.0数据库分析表明, SNRPA mRNA 在 HCC 组织中呈高表达(图 2A,  $P < 0.05$ )。Kaplan-Meier Plotter 数据库分析显示, 与低表达 SNRPA mRNA 的肝癌患者比较, SNRPA mRNA 高表达的患者其总生存期(OS)明显缩短(图 2B,  $P < 0.01$ )。用免疫组织化学染色检测中国人 HCC 组织和相应癌旁组织的结果(图 2C)显示, SNRPA 蛋白在 HCC 组织中的表达较对应癌旁组织显著升高, 且低分化 HCC 组织中 SNRPA 蛋白的表达较高分化者高( $P < 0.01$ )。

### 2.3 SNRPA mRNA 和蛋白在 HCC 细胞中呈高表达

用 qPCR 和 WB 法检测在 LO2、HepG2、Hep3B、MHCC-97L、MHCC-97H、Huh7、SMCC-7721 细胞中 SNRPA mRNA 及蛋白的表达, 结果(图 3)显示, 与 LO2 细胞比较, SNRPA 在 HCC 细胞中均呈明显的高表达( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。由于 HepG2 和 Hep3B 细胞中 SNRPA mRNA 的表达水平较高, 所以选取其进行后续研究。

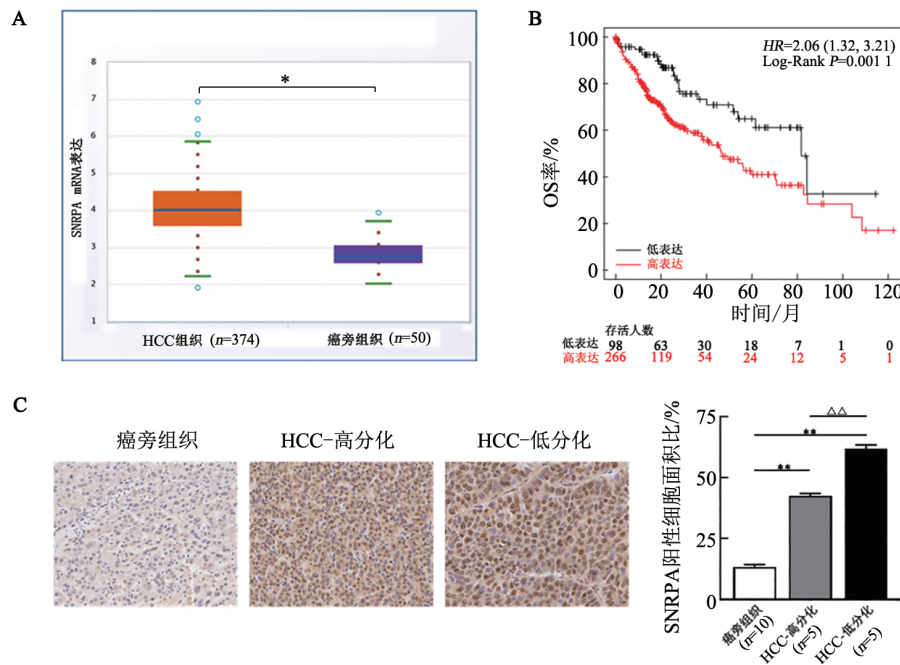
### 2.4 成功建立敲减 SNRPA 表达的 HepG2 和 Hep3B

### 细胞模型和过表达 SNRPA 的 LO2 细胞模型

qPCR 和 WB 法检测转染各组 HepG2 和 Hep3B 细胞中 SNRPA mRNA 和蛋白的表达水平, 结果(图 4)显示, 与 si-NC 组比较, 在 si-SNRPA#1 和 si-SNRPA#2 组细胞中 SNRPA mRNA 及蛋白表达均明显降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。实验结果说明, 在 HepG2 和 Hep3B 细胞中成功地敲减了 SNRPA 的表达。与 SNRPA-vector 组比较, SNRPA-oe 组 LO2 细胞中 SNRPA mRNA 表达明显升高( $P < 0.01$ )。实验结果说明, SNRPA-oe 组 LO2 细胞中确实过表达了 SNRPA。

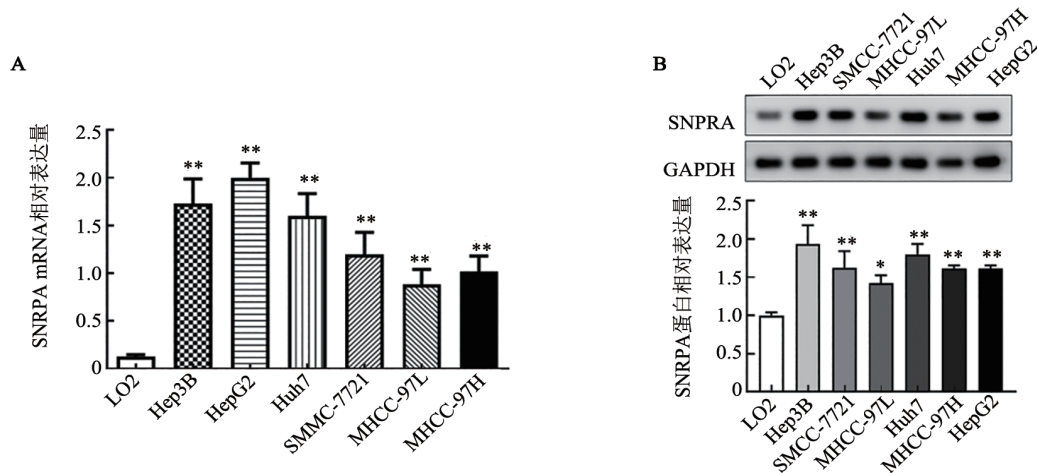
### 2.5 敲减 SNRPA 明显抑制 HepG2 和 Hep3B 细胞增殖而过表达 SNRPA 则能促进 LO2 细胞增殖

MTT 法检测结果(图 5A、B)显示, 与 si-NC 组比较, 随着转染时间的延长, si-SNRPA#1 和 si-SNRPA#2 组细胞增殖能力逐渐降低, 其中转染后第 3 天降低最为显著( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。实验结果说明, 敲减 SNRPA 表达能显著抑制 HepG2 和 Hep3B 细胞的增殖能力。与 SNRPA-vector 组比较, SNRPA-oe 组 LO2 细胞的增殖能力明显增强(图 5C,  $P < 0.01$ )。实验结果说明, 过表达 SNRPA 可促进 LO2 细胞的增殖能力。



A: StarBase3.0数据库分析SNRPA mRNA在HCC组织中的表达; B: Kaplan-Meier Plotter数据库分析SNRPA mRNA表达与HCC患者预后的关系; C: 免疫组织化学染色分析SNRPA蛋白在中国人HCC组织及对应癌旁组织中的表达(癌旁组织、HCC-高分化图片为×100, 肝癌-低分化图片为×200)。\* $P < 0.005$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $\Delta P < 0.01$ 。

图2 SNRPA在HCC组织中的表达及其与患者的预后相关性



A、B: qPCR法(A)和WB法(B)检测正常肝细胞及HCC细胞中SNRPA mRNA和蛋白表达。与LO2细胞比较,\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图3 SNRPA在LO2和HCC细胞中的表达

### 2.6 敲减SNRPA表达明显抑制HepG2和Hep3B细胞的迁移和侵袭能力

Transwell实验检测结果(图6)显示,与si-NC组比较,si-SNRPA#1和si-SNRPA#2组HepG2和Hep3B细胞的迁移与侵袭的细胞数目均明显减少(均 $P < 0.01$ )。实验结果说明,敲减SNRPA表达可显著抑制HepG2和Hep3B细胞的迁移和侵袭能力。

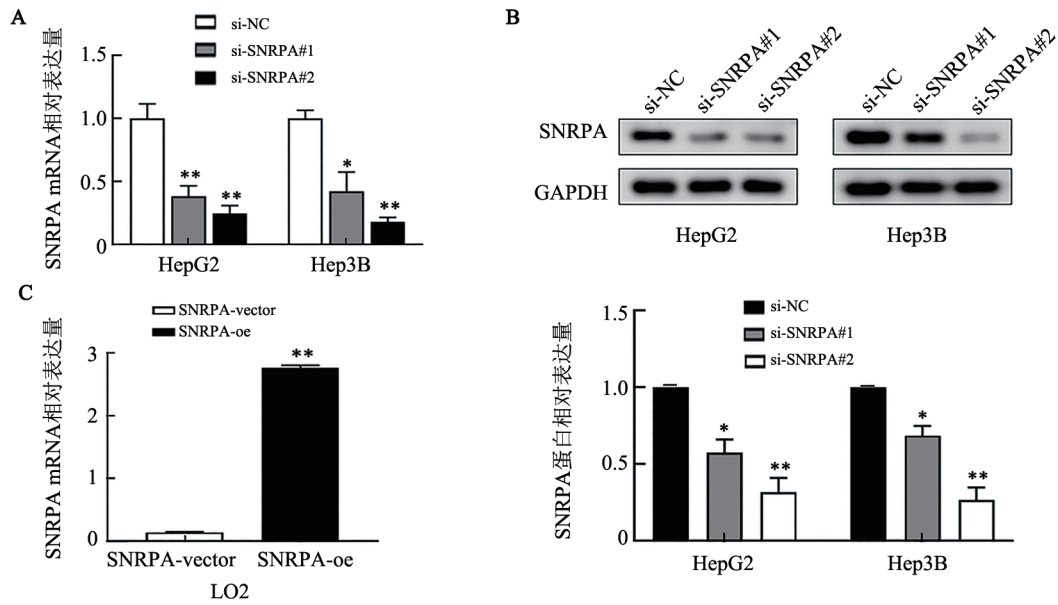
### 2.7 敲减SNRPA明显抑制HepG2和Hep3B细胞的EMT进程

WB法检测结果(图7)显示,与si-NC组比较,si-SNRPA#1和si-SNRPA#2组HepG2和Hep3B细胞中

上皮属性标记物E-cadherin的表达明显上调( $P < 0.05$ ),而间质属性标记物N-cadherin、vimentin的表达显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。实验结果说明,敲减SNRPA表达可明显抑制HepG2和Hep3B细胞的EMT进程。

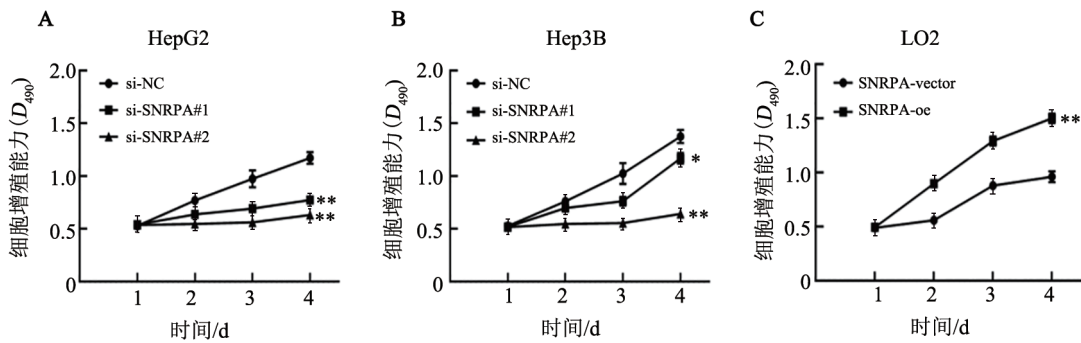
## 3 讨论

切除前信使RNA(pre-message RNA, pre-mRNA)中的内含子是真核细胞基因表达的必要步骤<sup>[7]</sup>。大多数pre-mRNA经剪接体去除内含子,连接外显子转变为成熟的信使RNA,剪接体由U1、U2、U4、U5和U6五种小核核糖核蛋白(small nuclear ribonucleoprotein,



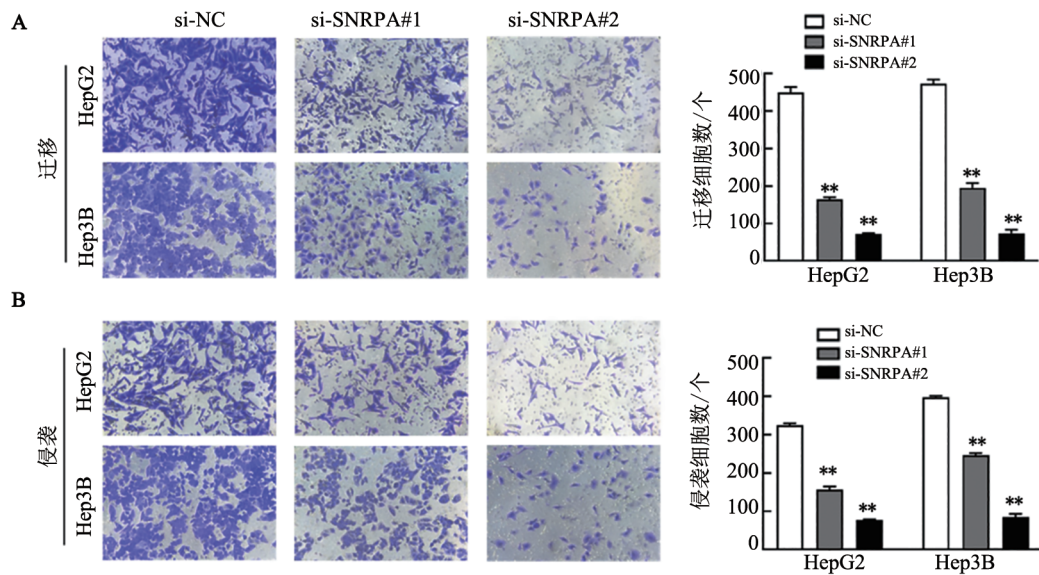
A、B: qPCR法(A)和WB法(B)检测转染各组 HepG2 和 Hep3B 细胞中 SNRPA mRNA 和蛋白表达情况; C: qPCR 法检测 LO2 细胞中 SNRPA mRNA 的表达情况。与 si-NC 组或 SNRPA-vector 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图4 敲减 SNRPA 的 HepG2、Hep3B 细胞和过表达 SNRPA 的 LO2 细胞模型的建立



A、B: 敲减 SNRPA 表达对 HepG2 细胞(A)和 Hep3B 细胞(B)的增殖能力的影响; C: 过表达 SNRPA 对 LO2 细胞增殖能力的影响。与 si-NC 组或 SNRPA-vector 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

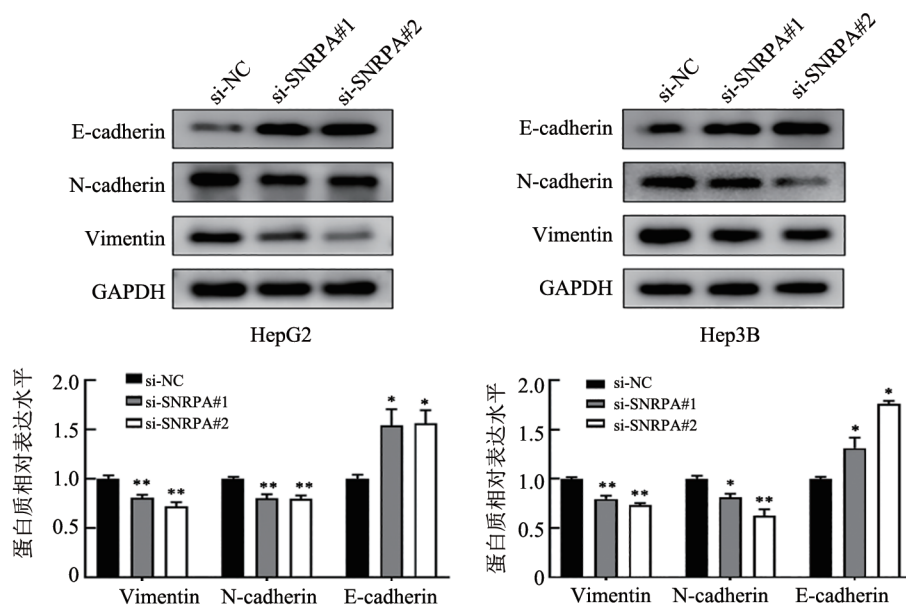
图5 敲减或过表达 SNRPA 对 HepG2 和 Hep3B 细胞或 LO2 细胞增殖能力的影响



A、B: 敲减 SNRPA 表达对 HepG2 和 Hep3B 细胞的迁移(A,  $\times 400$ )和侵袭(B,  $\times 400$ )能力的影响。与 si-NC 组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

图6 敲减 SNRPA 表达对 HepG2 和 Hep3B 细胞迁移和侵袭能力的影响





与 si-NC 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图7 敲减 SNRPA 表达对 HepG2 和 Hep3B 细胞中 EMT 相关蛋白表达的影响

SNRNP) 及多种非 snRNP 蛋白质组成<sup>[8]</sup>。研究<sup>[9-12]</sup>表明, 编码剪接体的基因异常表达或剪接因子的错误调控可能导致癌症发生、发展、转移或耐药。SNRPA 基因位于染色体 19q13.2 上, 是剪接体的重要组成部分, 参与 U1snRNP 复合物的组装、剪接体的形成和 pre-mRNA 剪接过程。研究<sup>[5]</sup>发现, SNRPA 在胃癌组织中高表达并可通过调控神经生长因子促进胃癌细胞的增殖与迁移。此外, SNRPA 通过 G 四联体直接与 BAG-1 mRNA 结合以调节后者的表达水平或上调 NRP1、PIK3R1 和下调 E2FZ、VEGFC、MKI67、CDK1 等基因, 在结直肠癌的发生发展中发挥重要作用<sup>[13-14]</sup>。SNRPA 基因被鉴定为肺癌<sup>[6]</sup>、卵巢癌<sup>[15]</sup>、肾透明细胞癌<sup>[16]</sup>的潜在预后生物标志物, 但其在 HCC 中的作用及机制鲜有报道。

本研究通过生物信息学分析发现, SNRPA 在包括 HCC 在内的多种人类肿瘤中显著高表达, 且与 HCC 患者不良预后相关。为进一步研究其对 HCC 发生发展的影响, 本研究通过敲减 HepG2 和 Hep3B 细胞中 SNRPA 的表达, 探究 SNRPA 在体外对 HCC 细胞增殖及转移等恶性生物学表型的影响。实验发现, 敲减 SNRPA 表达可明显抑制 HepG2 和 Hep3B 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 提示 SNRPA 可能在 HCC 发生发展中发挥促癌作用。同时, 还发现过表达 SNRPA 可促进 LO2 细胞的增殖能力, 在一定程度上进一步证实了 SNRPA 与肝细胞的生长增殖相关, SNRPA 或许是 HCC 治疗的一个潜在靶点。

EMT 是指上皮细胞逐渐失去细胞极性 & 细胞黏附能力, 通过特定程序从黏附细胞形态转

化为具有间质表型游离细胞形态, 并获得侵入细胞外基质能力的一系列转化过程<sup>[17-18]</sup>。其主要特征是细胞黏附分子如 E-cadherin 和某些细胞角蛋白的表达丧失, 而与间充质状态相关的标记物如 N-cadherin、vimentin 的表达被激活<sup>[19]</sup>。在生物体中, EMT 参与胚胎发生、炎症、伤口愈合等生理过程<sup>[20]</sup>。然而, EMT 在癌症发生发展等病理过程中也具有重要作用, 上皮至间质形态的肿瘤细胞同时具有上皮和间质特性, 可以更好地存活、转移和定植于远端器官, 赋予肿瘤细胞转移及侵袭特性<sup>[21]</sup>。近年来多项研究已证实, EMT 在包括前列腺癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌和乳腺癌在内的不同癌症的肿瘤发生发展中起着重要作用<sup>[22-24]</sup>。因此, 本研究通过 WB 法检测了 EMT 相关分子标志物的改变情况, 结果显示, 敲减 SNRPA 后 E-cadherin 的表达明显上调, 而 N-cadherin、vimentin 的表达明显下调, 提示 SNRPA 参与 HCC 细胞的 EMT 进程, SNRPA 可能通过调控 EMT 进程而促进 HCC 的转移。

综上所述, SNRPA 在 HCC 组织与细胞中呈高表达并与 HCC 患者的不良预后有关, 敲减 SNRPA 能显著抑制 HepG2 和 Hep3B 细胞的增殖与迁移、侵袭等恶性生物学表型, 其机制可能与 SNRPA 参与 EMT 进程有关。本研究着重探讨了 SNRPA 在肝癌中的表达及其对 HCC 细胞恶性生物学行为的影响, 为剪接体复合物成分与肿瘤发生之间的关联提供了新的线索, 也为其成为 HCC 有效分子治疗靶点提供了一定的实验依据, 但 SNRPA 调控 HCC 发生发展的具体分子机制有待进一步深入探究。

## [参 考 文 献]

- [1] 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. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] ALLEMANI C, MATSUDA T, DI CARLO V, *et al.* Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries[J]. *Lancet*, 2018, 391(10125): 1023-1075. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3.
- [3] DOU N, YANG D, YU S J, *et al.* SNRPA enhances tumour cell growth in gastric cancer through modulating NGF expression [J/OL]. *Cell Prolif*, 2018, 51(5): e12484[2023-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30039889/>. DOI: 10.1111/cpr.12484.
- [4] 黄荔丰, 曾渊君, 刘慧丽, 等. SNRPA1 在肠癌中的表达及对于辛伐他汀抗肿瘤活性的影响[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2023, 44(13): 1201-1206. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1256.2023.13.001
- [5] LIU J, LI J Y, SU Y, *et al.* Circ\_0009910 serves as miR-361-3p sponge to promote the proliferation, metastasis, and glycolysis of gastric cancer *via* regulating SNRPA[J]. *Biochem Genet*, 2022, 60(5): 1809-1824. DOI: 10.1007/s10528-021-10168-2.
- [6] YUAN M X, YU C M, CHEN X, *et al.* Investigation on potential correlation between small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A and lung cancer[J/OL]. *Front Genet*, 2021, 11: 610704[2023-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33552128/>. DOI: 10.3389/fgene.2020.610704.
- [7] KRAUSOVÁ M, STANĚK D. snRNP proteins in health and disease [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 79: 92-102. DOI: 10.1016/j.semdb.2017.10.011.
- [8] POMERANZ KRUMMEL D A, OUBRIDGE C, LEUNG A K W, *et al.* Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution[J]. *Nature*, 2009, 458(7237): 475-480. DOI: 10.1038/nature07851.
- [9] KIM S Y, KIM K, HWANG B, *et al.* The high frequency of the U2AF1 S34Y mutation and its association with isolated trisomy 8 in myelodysplastic syndrome in Asians, but not in Caucasians[J]. *Leuk Res*, 2017, 61: 96-103. DOI: 10.1016/j.leukres.2017.09.001.
- [10] ZHANG J, LIEU Y K, ALI A M, *et al.* Disease-associated mutation in SRSF2 misregulates splicing by altering RNA-binding affinities [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(34): E4726-E4734 [2023-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26261309/>. DOI: 10.1073/pnas.1514105112.
- [11] JIN S L, SU H R, TRAN N T, *et al.* Splicing factor SF3B1K700E mutant dysregulates erythroid differentiation *via* aberrant alternative splicing of transcription factor TAL1[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0175523[2023-08-10]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175523>. DOI: 10.1371/journal.pone.0175523.
- [12] PROCHAZKA L, TESARIK R, TURANEK J. Regulation of alternative splicing of CD44 in cancer[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(10): 2234-2239. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.07.011.
- [13] BOLDUC F, TURCOTTE M A, PERREAULT J P. The small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A (SNRPA) binds to the G-quadruplex of the BAG-1 5' UTR[J]. *Biochimie*, 2020, 176: 122-127. DOI: 10.1016/j.biochi.2020.06.013.
- [14] ZENG Q M, LEI F M, CHANG Y G, *et al.* An oncogenic gene, SNRPA1, regulates PIK3R1, VEGFC, MKI67, CDK1 and other genes in colorectal cancer[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109076[2023-08-10]. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109076>. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109076.
- [15] YIN F Q, YI S, WEI L W, *et al.* Microarray-based identification of genes associated with prognosis and drug resistance in ovarian cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 6057-6070. DOI: 10.1002/jcb.27892.
- [16] JIANG A M, MENG J L, GONG W L, *et al.* Elevated SNRPA1, as a promising predictor reflecting severe clinical outcome *via* effecting tumor immunity for ccRCC, is related to cell invasion, metastasis, and sunitinib sensitivity[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 842069 [2023-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35281041/>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.842069.
- [17] RIBATTI D, TAMMA R, ANNESE T. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: a historical overview[J/OL]. *Transl Oncol*, 2020, 13(6): 100773[2023-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7182759/>. DOI: 10.1016/j.tranon.2020.100773.
- [18] ANG H L, MOHAN C D, SHANMUGAM M K, *et al.* Mechanism of epithelial-mesenchymal transition in cancer and its regulation by natural compounds[J]. *Med Res Rev*, 2023, 43(4): 1141-1200. DOI: 10.1002/med.21948.
- [19] DONGRE A, WEINBERG R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2): 69-84. DOI: 10.1038/s41580-018-0080-4.
- [20] JAYACHANDRAN J, SRINIVASAN H, MANI K P. Molecular mechanism involved in epithelial to mesenchymal transition[J/OL]. *Arch Biochem Biophys*, 2021, 710: 108984[2023-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34252392/>. DOI: 10.1016/j.abb.2021.108984.
- [21] HUANG Y H, HONG W Q, WEI X W. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 1-27. DOI: 10.1186/s13045-022-01347-8.
- [22] YÜREGİR Y, KAÇAROĞLU D, YAYLACI S. Regulation of hepatocellular carcinoma epithelial-mesenchymal transition mechanism and targeted therapeutic approaches[M/OL]//*Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham: Springer International Publishing, 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37452258/>. DOI: 10.1007/5584\_2023\_781. Online ahead of print.
- [23] ZHANG N, NG A S, CAI S J, *et al.* Novel therapeutic strategies: targeting epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(8): e358-e368[2023-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34339656/>. DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00343-0.
- [24] HASHEMI M, ARANI H Z, OROUEI S, *et al.* EMT mechanism in breast cancer metastasis and drug resistance: Revisiting molecular interactions and biological functions[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155: 113774[2023-08-10]. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113774>. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113774.

[收稿日期] 2023-08-11

[修回日期] 2023-11-18

[本文编辑] 向正华, 沈志超