



同濟大學

TONGJI UNIVERSITY

## 博士学位论文

(专业学位)

# PTBP3 介导 TGF- $\beta$ 诱导的肺腺癌上皮间质转化的机制研究

姓名：董成来

学号：1911650

学院：医学院

专业学位类别：临床医学

专业领域：外科学（胸外科）

指导教师：周永新 教授

二〇二二年四月



同濟大學  
TONGJI UNIVERSITY

A dissertation submitted to

Tongji University in conformity with the requirements for  
the degree of Doctor of Clinical Medicine

**The mechanism study of PTBP3 mediated  
TGF- $\beta$ -induced epithelial mesenchymal  
transition in lung adenocarcinoma**

Candidate: Dong Chenglai

Student Number: 1911650

School/Department: Medicine

Discipline: Clinical Medicine

Major: Surgery (Thoracic surgery)

Supervisor: Prof. Yongxin Zhou

April, 2022

## 摘要

### 目的

肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD) 是非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 最主要的病理亚型。由于早期易发生远处脏器转移, 多数患者临床确诊时已进展至疾病中晚期。随着手术技术的提高、放化疗和免疫治疗的联合应用, 患者生存率得到提高, 但肿瘤复发和远处转移仍然是影响预后的主要原因。上皮间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 是上皮细胞转化为间质细胞的分子重塑和表型转换, 可导致细胞移动能力增加, 是肿瘤转移和耐药发生的重要原因。转化生长因  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 可通过经典 Smad 信号通路诱导肿瘤 EMT 和转移, 而其中的牵涉分子机制尚不明确。多嘧啶序列结合蛋白 (polypyrimidine tract-binding protein 3, PTBP3) 是一类 RNA 结合蛋白, 在 RNA 剪切和转录调控中起关键作用。越来越多的研究表明, 异常表达的 PTBP3 与多种肿瘤的恶性生长和转移密切相关。而 PTBP3 是否通过介导 TGF- $\beta$  诱导的 EMT 促进肺腺癌的转移尚不清楚。因此, 本研究旨在揭示 PTBP3 介导 TGF- $\beta$  诱导的 EMT 促进肺腺癌转移的作用和分子机制。

### 方法

通过检索 GEO、TCGA 公共数据库里的肺腺癌数据集以及对肺腺癌组织芯片进行免疫组化染色, 分析 PTBP3 在肺腺癌中的表达水平及预后价值。siRNA 和慢病毒载体转染 LUAD 细胞系, 构建瞬时敲减或稳定过表达 PTBP3 的细胞系。通过 Transwell 迁移和侵袭实验分析这些细胞系在体外的迁移和侵袭能力变化。Western-blot, qRT-PCR, 荧光素酶报告基因以及染色质免疫沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 用于明确 PTBP3 介导 TGF- $\beta$  诱导 EMT 的分子机制。同时, 通过经裸鼠尾静脉注射 A549 细胞系构建了体内转移模型, 分析 PTBP3 在体内对肺腺癌转移能力的影响。

### 结果

我们发现 PTBP3 在肺腺癌组织中表达量明显高于癌旁组织, 且 PTBP3 高表达的肺腺癌患者总生存时间和无复发生存期更短。单因素和多因素 Cox 分析显示 PTBP3 是预测肺腺癌预后的独立危险因素。TGF- $\beta$  诱导 p-Smad2/3 复合物促进肺腺癌细胞系里 PTBP3 的转录和表达。反过来, 沉默或过表达 PTBP3 显著抑制或促进 Smad2/3 表达, 进而调节 TGF- $\beta$  诱导的细胞迁移、侵袭以及 EMT。此外, 动物转移模型显示 PTBP3 过表达显著增加了裸鼠肺转移和肝转移。

### 结论

在本研究中，我们发现 PTBP3 对于 TGF- $\beta$  诱导的肺腺癌 EMT 和转移是不可少的。PTBP3-Smad2/3 形成的正反馈环是调节 TGF- $\beta$  诱导肺腺癌 EMT 的关键因素。因此，我们明确 PTBP3 可作为治疗肺腺癌的潜在治疗靶点。

**关键词：**肺腺癌，PTBP3，TGF- $\beta$ /Smad 信号，EMT，肿瘤转移

## ABSTRACT

### Objective

Lung adenocarcinoma (LUAD) is the major pathological subtype of non-small cell lung cancer (NSCLC). Most patients have advanced to the middle and late stage of the disease by the time of clinical diagnosis due to early metastasis to distant organs. With the improvement of surgical techniques, combined application of chemoradiotherapy and immunotherapy, the survival of patients with LUAD has improved. However, tumor recurrence and distant metastasis are major causes of affecting prognosis. Epithelial mesenchymal transition (EMT) is a molecular remodeling and phenotypic transition from epithelial cells to mesenchymal cells, which can lead to increased cell mobility and is a major cause of tumor metastasis and drug resistance. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) has been demonstrated to be a potent promoter of EMT and tumor metastasis through activation of the canonical Smad signaling pathway. However, the mechanisms underlying this alteration are largely unknown. Polypyrimidine tract-binding protein 3 (PTBP3) is a RNA binding protein that plays a critical role in RNA splicing and transcriptional regulation. More and more studies show that dysregulation of PTBP3 closely correlates with malignant growth and metastasis in many types of cancers. Whether PTBP3 mediates TGF- $\beta$ -induced EMT and metastasis in LUAD remains unknown. Therefore, we investigate the function and molecular mechanism that PTBP3 mediates TGF- $\beta$ -induced EMT and metastasis of LUAD.

### Methods

The expression levels and prognostic value of PTBP3 were analyzed by searching public LUAD databases, including GEO and TCGA, and performing IHC analysis in LUAD tissue microarray. To construct cell lines with transient knockdown or stable overexpression of PTBP3, siRNA and lentivirus-mediated vectors were used to transfect LUAD cell lines. We analyzed the invasion and migration of these cells in vitro by performing Transwell assays. Western-blot, qRT-PCR, a luciferase reporter assay and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay were used to determine the molecular mechanism which PTBP3 mediates TGF- $\beta$ -induced EMT. Meanwhile, in vivo metastasis model was established by injecting A549 cells into the tail vein of nude mice to analyze the effect of PTBP3 on LUAD cell metastasis in vivo.

## **Results**

PTBP3 was markedly upregulated in LUAD tissues compared with para-carcinoma tissues and patients with high expression of PTBP3 had shorter overall survival and recurrence-free survival. Univariate and multivariate Cox analysis showed that PTBP3 was an independent risk factor for patient survival. TGF- $\beta$ -induced p-Smad2/3 complex activated PTBP3 gene transcription and promoted PTBP3 expression. In turn, PTBP3 knockdown and overexpression significantly suppressed and increased Smad2/3 expression, and then regulated TGF- $\beta$ -induced migration, invasion and EMT. In addition, the in vivo metastasis assays show that PTBP3 overexpression strikingly increased the number of lung and liver metastatic nodules in nude mice.

## **Conclusion**

In this study, we determined that PTBP3 is indispensable to TGF- $\beta$ -induced EMT and metastasis of LUAD cells and identified a critical positive feedback loop between PTBP3 and Smad2/3 driving TGF- $\beta$ -induced EMT. Thus, we determined that PTBP3 is a novel potential therapeutic target for the treatment of LUAD.

**Key Words:** LUAD, PTBP3, TGF- $\beta$ /Smad signaling, EMT, tumor metastasis

# 目 录

|   |    |
|---|----|
| 第 1 章 引言.....                                   | 1  |
| 第 2 章 PTBP3 在肺腺癌中的表达及临床意义.....                  | 3  |
| 2.1 材料.....                                     | 3  |
| 2.1.1 实验细胞.....                                 | 3  |
| 2.1.2 组织标本.....                                 | 3  |
| 2.1.3 实验试剂.....                                 | 3  |
| 2.1.4 实验仪器.....                                 | 4  |
| 2.2 方法.....                                     | 5  |
| 2.2.1 细胞培养、冻存与复苏.....                           | 5  |
| 2.2.2 组织芯片的制作.....                              | 5  |
| 2.2.3 免疫组化染色.....                               | 6  |
| 2.2.4 免疫组化结果的判定.....                            | 7  |
| 2.2.5 Western-blot 实验.....                      | 7  |
| 2.2.6 生物信息数据.....                               | 8  |
| 2.2.7 统计学分析.....                                | 9  |
| 2.3 结果.....                                     | 9  |
| 2.3.1 数据库分析 PTBP3 在肺腺癌中表达水平及与预后的关系.....         | 9  |
| 2.3.2 PTBP3 在肺腺癌细胞系及组织表达情况.....                 | 10 |
| 2.3.3 PTBP3 表达水平与临床病理特征之间的关系.....               | 11 |
| 2.3.4 PTBP3 表达水平与肺腺癌患者预后和复发之间的关系.....           | 12 |
| 2.4 讨论.....                                     | 13 |
| 第 3 章 PTBP3 介导 TGF- $\beta$ 诱导的肺腺癌 EMT 的发生..... | 15 |
| 3.1 材料.....                                     | 15 |
| 3.1.1 实验细胞.....                                 | 15 |
| 3.1.2 组织标本.....                                 | 15 |
| 3.1.3 实验试剂.....                                 | 15 |
| 3.1.4 实验仪器.....                                 | 18 |
| 3.2 方法.....                                     | 19 |
| 3.2.1 Real-time PCR 定量.....                     | 19 |
| 3.2.2 Western-blot 实验.....                      | 21 |
| 3.2.3 细胞免疫荧光.....                               | 21 |
| 3.2.4 Transwell 实验.....                         | 21 |
| 3.2.5 CCK-8 实验.....                             | 22 |
| 3.2.6 siRNA 转染.....                             | 22 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.7 荧光素酶载体的构建.....                                 | 23 |
| 3.2.8 质粒转染.....                                      | 27 |
| 3.2.9 双荧光素酶报告基因实验.....                               | 27 |
| 3.2.10 ChIP 实验.....                                  | 28 |
| 3.2.11 Western-blot 及免疫组化染色.....                     | 30 |
| 3.2.12 生物信息数据.....                                   | 30 |
| 3.2.13 统计学分析.....                                    | 30 |
| 3.3 结果.....  | 30 |
| 3.3.1 TGF- $\beta$ 诱导肺腺癌细胞系中 PTBP3 的表达.....          | 30 |
| 3.3.2 沉默 PTBP3 抑制 TGF- $\beta$ 诱导的肺腺癌 EMT、迁移和侵袭..... | 33 |
| 3.3.3 PTBP3 通过激活 Smad2/3 的表达促进肺腺癌 EMT.....           | 36 |
| 3.3.4 PTBP3 在肺腺癌组织中与 Smad2/3 表达呈明显正相关.....           | 38 |
| 3.4 讨论.....  | 39 |
| 第 4 章 PTBP3 在 小鼠体内促进肺腺癌的转移.....                      | 42 |
| 4.1 材料.....  | 42 |
| 4.1.1 实验动物.....                                      | 42 |
| 4.1.2 实验细胞.....                                      | 42 |
| 4.1.3 实验试剂.....                                      | 42 |
| 4.1.4 实验仪器.....                                      | 43 |
| 4.2 方法.....  | 43 |
| 4.2.1 慢病毒转染构建稳转细胞系.....                              | 43 |
| 4.2.2 构建 BALB/c 小鼠肺癌转移模型.....                        | 43 |
| 4.2.3 HE 染色.....                                     | 44 |
| 4.2.4 Western-blot 实验.....                           | 45 |
| 4.2.5 Real-time PCR 定量.....                          | 45 |
| 4.2.6 统计学分析.....                                     | 45 |
| 4.3 结果.....  | 45 |
| 4.3.1 PTBP3 在 小鼠体内促进肺腺癌的转移.....                      | 45 |
| 4.3.2 PTBP3 在 小鼠体内促进 TGF- $\beta$ /Smad 诱导的 EMT..... | 47 |
| 4.4 讨论.....  | 48 |
| 第 5 章 结论与展望.....                                     | 50 |
| 5.1 结论.....  | 50 |
| 5.2 进一步工作的方向.....                                    | 50 |
| 参考文献.....  | 51 |
| 附录 文献综述.....   | 55 |
| 参考文献.....  | 70 |

## 第1章 引言

原发性支气管肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,在我国约占所有癌症死亡人数的四分之一[1]。肺腺癌是原发性支气管肺癌中主要的病理亚型,具有高度异质性和侵袭性[2]。多数病人临床确诊时已进展至疾病中晚期,5年生存率低于20%[1]。随着手术技术的提高,以及放疗、化疗、免疫治疗等联合治疗手段的应用,可提升肺腺癌患者5年生存率至57%以上[3]。但多数病人治疗后仍出现疾病局部复发和转移,严重影响肺腺癌患者的生存。因此,寻找新的精准治疗的靶点,是目前临床亟待解决的重要科学问题。

目前普遍认为肿瘤的侵袭转移是由多基因参与的多阶段生物学过程,上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)被认为是肿瘤发生转移的起始步骤。EMT是指有极性的上皮细胞由上皮特性向间质特性转化的独特过程[4]。发生EMT的细胞极性丧失,相邻细胞之间以及细胞与基质之间的接触减少,粘附性降低,导致细胞移动能力增加同时并伴有分子重塑和表型改变。EMT过程中通常伴有细胞黏连蛋白E-cadherin的下调,同时伴有间质标志物如N-cadherin、Vimentin等的上调。EMT在胚胎发育、器官生成、炎症与伤口愈合及肿瘤侵袭转移等生物学过程中发挥重要作用[5,6]。发生EMT的肿瘤细胞从原发灶中分离出来,侵入循环系统并在远处形成转移灶,从而促使肿瘤转移。多种信号通路参与调节肿瘤EMT过程,如TGF- $\beta$ 信号通路,WNT信号通路,Hedgehog信号通路,Notch信号通路,uPAR信号通路等[7]。其中TGF- $\beta$ 信号通路是诱导肿瘤EMT的关键信号转导通路。转化生长因 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )作为诱导EMT主要信号分子,主要通过经典Smad信号通路诱导EMT的发生。TGF- $\beta$ 与TGF- $\beta$ 受体II(TGF- $\beta$  receptor II, T $\beta$ RII)结合,然后磷酸化TGF- $\beta$ 受体I(TGF- $\beta$  receptor I, T $\beta$ RI),活化的T $\beta$ RI募集和磷酸化Smad2和Smad3,紧接着与Smad4形成异源三聚体复合物,随后该复合物转运到细胞核内,调节TGF- $\beta$ 相关靶基因的表达[8-10]。除此之外,TGF- $\beta$ 还可以通过其他非Smad信号通路如PI3K/AKT, NF- $\kappa$ B, Erk, JNK和p38/MARK来介导EMT的发生[11,12]。由于TGF- $\beta$ 在诱导EMT,促进肿瘤侵袭和转移中发挥的关键作用,临床上已研发一系列TGF- $\beta$ 通路的抑制剂用于肿瘤的治疗[13,14],但是目前用于靶向TGF- $\beta$ 通路的肿瘤药物临床试验大多数以失败告终,原因在于TGF- $\beta$ 促进肿瘤转移的机制非常复杂。多数研究表明,TGF- $\beta$ 具有抑制肿瘤生长和促进肿瘤转移的双重作用,TGF- $\beta$ 在肿瘤形成的早期阶段,表现为典型的抑癌分子;随着

肿瘤的进展, 肿瘤细胞本身或者肿瘤微环境中基质细胞分泌的 TGF- $\beta$  则表现为促进肿瘤侵袭和转移的作用[15-17]。且根据细胞环境的不同, TGF- $\beta$  调节作用具有高度特异性[18]。因此, 更加深入明确 TGF- $\beta$  的促转移分子机制有助于开发有针对性的抗肿瘤药物。

多聚嘧啶序列结合蛋白 (polypyrimidine tract binding proteins, PTBPs) 是一种 RNA 结合蛋白, 属于核不均一核糖核蛋白家族 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNPs), 作为一种 RNA 剪接因子, 多参与基因的选择性剪切过程, 从而在转录后水平调控基因的表达[19]。其家族成员主要包括 PTBP1、PTBP2 和 PTBP3。PTBP1 在几乎所有细胞内均表达, 可结合 PKM 前体 RNA, 促进 PKM1 向 PKM2 转化, 影响乳腺癌、胰腺癌、急性髓系白血病的能量代谢而发挥促癌作用[20-22]。PTBP2 与 PTBP3 是 PTBP1 的同源蛋白, 有超过 75% 的相似氨基酸序列。其中 PTBP2 主要在神经元和男性生殖细胞内表达, 是神经系统和精子发育的重要剪切因子[23-25]。PTBP3 作为 hnRNPs 蛋白家属中的成员, 具有 4 个 RNA 结合区域, 最初研究发现其参与白血病细胞的诱导分化, 不影响细胞增殖, 故又将其命名为分化调节因子 ROD1[26]。随着研究的深入, 人们发现 PTBP3 不同于其同源蛋白 PTBP1, 其在体内主要发挥抑制选择性剪切的功能[27], 同时参与无义介导的 mRNA 降解[28]。近年来, 越来越多的研究表明 PTBP3 与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关。比如, PTBP3 通过结合并稳定 ZEB1 mRNA, 促进其翻译, 诱导乳腺癌 EMT 的发生[29]。PTBP3 在结直肠癌可通过结合 HIF-1 $\alpha$  的前体 RNA, 激活 HIF-1 $\alpha$  的表达, 促进肿瘤细胞增殖、侵袭和转移[30]。在肝癌中, PTBP3 可通过选择性剪切 NEAT1 和 miR-612 前体 RNA, 调控两者的表达水平, 促进肿瘤的恶性进展[31]。相比之下, PTBP3 在肺癌中的研究相对较少, 之前有学者发现沉默 PTBP3 的表达可以明显抑制肺腺癌细胞迁移与运动能力[32], 因此认为 PTBP3 是与细胞运动能力相关的基因。而后研究表明 PTBP3 可通过调控 E-cadherin 的表达促进非小细胞肺癌的 EMT 和侵袭[33]。然而目前关于 PTBP3 在肺腺癌中的表达情况及其促进肺腺癌侵袭和转移的具体分子机制并不清楚, 还有待进一步研究。

在本研究中, 我们旨在探究 PTBP3 在 TGF- $\beta$  诱导肺腺癌 EMT 中发挥的作用, 明确 PTBP3 促进肺腺癌侵袭和转移的具体分子机制, 为肿瘤精准治疗提供新的思路和策略。

## 第 2 章 PTBP3 在肺腺癌中的表达及临床意义

### 2.1 材料

#### 2.1.1 实验细胞

本研究所用 A549, H1299, H1792, H1975, PC9, H838, HCC829 (肺腺癌细胞株)、BEAS-2B (永生化支气管上皮细胞株) 以及 L132 (人胚肺上皮细胞株) 均购于上海中科院细胞所。所有细胞经检测均无支原体感染。细胞培养条件: DM/EM 培养基, 10% 胎牛血清, 100 $\mu$ g/ml 青-链霉素。37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养。

#### 2.1.2 组织标本

本研究收集 98 例肺腺癌组织及 82 例对应的癌旁组织标本, 所有标本均来自同济大学附属同济医院胸外科 2011 年 10 月至 2012 年 6 月收治的行根治性手术切除的原发性肺腺癌患者, 其中男性 54 例, 女性 44 例, 年龄 35~76 岁, 平均 59.7 岁。I~II 期为 62 例, III~IV 期 36 例。患者在手术切除前未曾接受过针对肿瘤的辅助治疗, 如放化疗或吉非替尼等靶向药物治疗, 无远处脏器转移, 不合并其他恶性肿瘤。术后病理均证实为肺腺癌, CT 影像学表现为磨玻璃样结节的患者不包括在本研究中。术后由病理科医生通过常规的组织病理学手段评估肿瘤大小、组织学分级、淋巴结转移。根据第八版 NCCN 肺癌分期标准进行 TNM 分期。手术标本离体后, 切开瘤体, 避开出血及坏死区域进行取材, 对应癌旁组织取材至少在瘤体边缘 3cm 处, 标本取材后置于 4% 多聚甲醛中保存。患者的临床信息如年龄、性别、手术方式、主要临床症状、肿瘤位置大小、病理学资料均保存完整。采用门诊或者电话随访方式对患者进行定期、规律的随访, 98 例患者的随访时间为 10~108 个月, 中位随访时间 63 个月。研究通过同济大学医学院伦理委员会的批准。

#### 2.1.3 实验试剂

##### 2.1.3.1 细胞培养相关试剂

|           |       |
|-----------|-------|
| DM/EM 培养基 | GIBCO |
| 胎牛血清      | GIBCO |

|            |         |
|------------|---------|
| 0.25%胰蛋白酶  | 索莱宝生物科技 |
| PBS 缓冲液    | 索莱宝生物科技 |
| 青-链霉素混合液   | 索莱宝生物科技 |
| 无血清快速细胞冻存液 | 新赛美生物科技 |

### 2. 1. 3. 2 免疫组化相关试剂

|   |            |
|---|------------|
| GTVisionIII <sup>TM</sup> 鼠/兔通用型免疫组化试剂盒 | 基因科技       |
| 柠檬酸三钠                                   | 索莱宝生物科技    |
| 柠檬酸                                     | 索莱宝生物科技    |
| 苏木素                                     | 索莱宝生物科技    |
| PBS 缓冲液干粉                               | 索莱宝生物科技    |
| PTBP3 抗体                                | Santa cruz |
| 通用抗体稀释液                                 | 雅酶生物科技     |

### 2. 1. 3. 3 Western-blot 相关试剂

|                                 |                   |
|---------------------------------|-------------------|
| PTBP3 抗体                        | Santa cruz        |
| GAPDH 抗体                        | Abcam             |
| 通用抗体稀释液                         | 雅酶生物科技            |
| 5 $\times$ loading 蛋白上样缓冲液      | 雅酶生物科技            |
| 蛋白酶抑制剂混合液 (100 $\times$ )       | 雅酶生物科技            |
| 磷酸酶抑制剂混合液 (100 $\times$ )       | 雅酶生物科技            |
| RIPA 裂解缓冲液 (强效)                 | Thermo Scientific |
| 双色预染蛋白 marker                   | 雅酶生物科技            |
| Tris-Glycine 电泳缓冲液 (粉剂)         | 新赛美生物科技           |
| 快速转膜液 (20 $\times$ )            | 新赛美生物科技           |
| Millipore PVDF 膜 (0.22 $\mu$ m) | 默克                |
| 丽春红染液                           | 雅酶生物科技            |
| 脱脂奶粉                            | 索莱宝生物科技           |
| 10 $\times$ TBST 缓冲液            | 索莱宝生物科技           |
| 超敏 ECL 化学发光试剂盒                  | 新赛美生物科技           |

### 2. 1. 4 实验仪器

|                     |                   |
|---------------------|-------------------|
| 恒温水浴箱               | 上海医疗设备厂           |
| 超净工作台               | 苏州苏洁医疗器械公司        |
| 涡旋混匀器               | 上海达姆实业有限公司        |
| 摇床                  | 上海知楚仪器有限公司        |
| 紫外分光光度计             | 上海精密仪器有限公司        |
| 发光成像系统 Fluor Chem M | Protein Simple    |
| 电泳槽                 | BIO-RAD           |
| 移液器                 | Eppendorf         |
| 低温离心机               | Eppendorf         |
| 细胞培养箱               | Thermo Scientific |

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Mini Trans-Blot 转印槽 | BIO-RAD |
| 电泳仪                 | BIO-RAD |
| 倒置显微镜               | Olympus |

## 2.2 方法

### 2.2.1 细胞培养、冻存与复苏

#### 2.2.1.1 细胞的复苏

细胞实验开始前，提前将胎牛血清及细胞培养基放置 37°C 水浴锅预热，将细胞操作所用耗材和试剂，提前放置在超净台中，打开紫外灯照射超净台至少 30 分钟。从液氮罐中取出冻存管，迅速置于 37°C 水浴锅中不停晃动。待细胞完全溶解后，取出冻存管用酒精充分擦拭，更换手套后，置冻存管于超净台上，小心将细胞悬液转移至 15ml 离心管中，并加入 5 倍以上的完全培养基稀释，吹打均匀后，1000rpm 离心 5 分钟，弃去上清，加入 1ml 完全培养基吹打细胞，使细胞分散均匀后，接种于培养瓶或培养皿中，置入 37°C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

#### 2.2.1.2 细胞的培养和传代

每天观察细胞状态，细胞培养基变黄或者细胞汇合度达 80%~90%时，更换培养基或者进行细胞传代。37°C 水浴锅预热血清和培养基。无菌吸管吸去旧培养基，无菌 PBS 漂洗细胞两次，然后加入适量 0.25%胰蛋白酶，晃动培养瓶或培养皿使胰酶完全浸润细胞，正置显微镜下观察细胞形态，当细胞变圆，开始成流沙样脱落时，立即加入 3 倍以上的完全培养基，并轻轻吹打细胞使细胞从培养皿中脱落，终止消化。将细胞悬液转移至 15ml 离心管内，1000rpm 离心 5 分钟。弃去上清，用适量完全培养充分重悬细胞沉淀，使细胞呈单细胞悬液，然后按照 1:3 的比例接种于培养瓶或培养皿中，置于 37°C、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

#### 2.2.1.3 细胞的冻存

细胞冻存时保证细胞处于对于生长期，冻存前一天进行细胞换液。次日细胞汇合度达 70%~80%时，按照贴壁细胞的消化方法将细胞进行消化离心，加入适量新赛美无血清快速冻存液，使细胞的密度为  $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ /ml，轻轻吹打使细胞均匀，移入到冻存管中，标记细胞系名称及冻存时间，最后放入液氮中保存。

### 2.2.2 组织芯片的制作

将收集到的组织蜡块预先编号，包括肿瘤组织及相应的癌旁组织，根据标本数量制备受体空白蜡块，组织四周预留 0.5cm 空间。将受体蜡块置于组织芯片机上进行打孔，孔径 1mm。接着在组织蜡块的对应部位用 1mm 的穿刺针打孔，取出组织芯，然后将组织芯有序的转移到受体蜡块上，相邻组织芯之间的距离在 0.2mm 左右。将制备好的组织芯片蜡块固定好后放入 56°C 恒温箱 10 分钟，使受体蜡块与新插入的组织芯融合，取出蜡块，置于 4°C 冰箱备用。切片前，将蜡块置于 4°C 冰箱中预冷 4 小时，随后将蜡块置于切片机上修整，直至全部组织芯露出为止，随后对蜡块进行常规切片，附在载玻片上，60°C 烘箱中烤片 3 分钟左右，58°C 烘箱中继续烤片 18 小时后，置入 4°C 冰箱保存，组织芯片制作完毕。

### 2.2.3 免疫组化染色

① 脱蜡和水化：脱蜡前将组织蜡块切片放置于 60°C 烘箱中，烘烤 60 分钟；将烘烤后的切片立即浸入二甲苯 I、II、III 各 10 分钟，随后依次浸入 100% 乙醇，95% 乙醇，80% 乙醇，70% 乙醇各 5 分钟；蒸馏水浸泡 5 分钟，而后将切片放置 PBS 中，摇床冲洗 3 次，每次 5 分钟。

② 抗原修复：1) 抗原修复液配制：称取柠檬酸三钠 3g，柠檬酸 0.4g，加入蒸馏水至 1000ml，充分溶解后备用。2) 电磁炉煮沸修复液，放入切片，保证切片完全被浸入，持续煮沸 15~20 分钟。自然冷却至室温。将切片置入 PBS 中，摇床冲洗 3 次，每次 5 分钟。

③ 内源性过氧化物酶的灭活：取出切片，弃去组织周围液体，将切片平行放置于避光孵育盒中，滴加 3%  $H_2O_2$  与组织切片表面，孵育 15 分钟。将切片置于 PBS 中，摇床冲洗 3 次，每次 5 分钟。

④ 非特异性抗原封闭：取出切片，弃去组织周围液体，将切片平行放置于湿盒内，滴加 10% 山羊血清于组织表面，室温下封闭 1 小时。

⑤ 一抗孵育：弃去切片表面山羊血清，将切片平行放置于湿盒内，阻水笔在组织片周围画圈。将已配制好的一抗 100 $\mu$ l 滴加在组织表面，保证所有组织均被覆盖。4°C 孵育过夜。

⑥ 二抗孵育：次日室温复温 1 小时后，将组织切片取出，吸去一抗，PBS 中摇床冲洗 3 次，每次 5 分钟。取出切片，弃去组织周围液体，滴加配制好的二抗至组织表面，保证所有组织均被覆盖，室温下孵育 1 小时。吸去切片上二抗，将切片放置于 PBS 中，摇床冲洗 3 次，每次 5 分钟。

⑦ DAB 显色：取出切片，弃去组织周围液体，滴加 100 $\mu$ l DAB 显色剂工作液于组织表面，显微镜下控制显色，PBS 冲洗终止显色。

⑧ 苏木素复染：滴加苏木素染液至组织表面，显微镜下观察，大约 1 分钟后，水洗终止染色。

⑨ 脱水：将切片依次浸入 70% 乙醇，80% 乙醇，95% 乙醇，100% 乙醇，二甲苯 I，二甲苯 II，二甲苯 III 各 5 分钟。

⑩ 封片和显微镜观察：取出切片，待切片晾干前，中性树胶封片，保证无气泡，后行显微镜观察。

## 2.2.4 免疫组化结果的判定

采用光学显微镜，在不同放大倍数下进行免疫组化结果的观察，每张切片随机选取 5 个光镜下视野进行评分。染色阳性细胞的频率定义为： $<5\%$ ，0 分； $6\sim 25\%$ ，1 分； $26\sim 50\%$ ，2 分； $51\sim 75\%$ ，3 分； $>75\%$ ，4 分。染色强度定义为：阴性 0 分；弱阳性 1 分；中等阳性 2 分；强阳性 3 分。染色评分定义为染色细胞频率和染色强度的乘积。根据染色指数的评分进行高低表达的判定， $\leq 7$  分被认为是低表达， $8\sim 12$  分被认为是高表达。每张切片均由来自不同医院的 2 位病理科医生在双盲下进行观察和评分，结果取其平均值。

## 2.2.5 Western-blot 实验

① 细胞蛋白提取：待细胞培养瓶（皿）内细胞密度 90% 左右时，弃培养上清，采用提前预冷的 PBS 清洗 2 遍，加入 RIPA 细胞裂解液（ $100\mu\text{l}/60\text{mm}$  皿），蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂，置摇床上冰上裂解 30 分钟；将裂解液移入 1ml EP 管内， $4^{\circ}\text{C}$ 、12000rpm 下离心 15 分钟，而后将上清液转移至新的 EP 管内，弃去沉淀。置于冰上备用，若短期储存，将蛋白放至  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

② BCA 蛋白浓度测定：1) 取  $20\mu\text{l}$   $25\text{mg}/\text{ml}$  蛋白标准品，加入  $980\mu\text{l}$  RIPA 稀释成  $0.5\text{mg}/\text{ml}$  蛋白标品；配制适量 BCA 工作液（BCA 试剂 A: B=50:1），充分混匀后备用；2) 在 96 孔板的标准品孔中依次加入蛋白标准品 0、1、2、4、8、12、16、 $20\mu\text{l}$ ，加入 RIPA 补足到  $20\mu\text{l}$ ；而后在 96 孔板的样品孔中加入适当体积的蛋白样品，加 RIPA 补足到  $20\mu\text{l}$ ；3) 将  $200\mu\text{l}$  BCA 工作液依次加入标准孔及样品孔中， $37^{\circ}\text{C}$  温箱中孵育 30 分钟；4) 用酶标仪测定每个样品及蛋白标准品的  $562\text{nm}$  处的吸光度，绘制标准曲线，计算样品的蛋白浓度。

③ 蛋白变性：根据计算得出的蛋白浓度，调整蛋白浓度至同一浓度，加入  $5\times$ loading，提前预热加热板至  $100^{\circ}\text{C}$ ，将蛋白样品放置加热板上加热 10 分钟。放置冰上备用。

④ 上样电泳：依据中国雅酶公司配胶说明书，配制下层分离胶，将下层分

离胶注入玻璃板中，液面大约至 2/3 处停止，然后加入 1ml 异丙醇压胶，水平静置 15 分钟后，异丙醇与凝胶之间形成折线时，表明下层胶已凝固。弃去异丙醇，吸水纸吸去多余异丙醇，配制 10% 上层浓缩胶，将浓缩胶缓慢加入玻璃板，小心插入梳子，避免产生气泡，静置 15 分钟，待胶凝固后，将凝胶板从制胶架上取出。配制 1 $\times$ 电泳缓冲液，凝胶装板后放置于电泳槽内，随后将配制好的电泳缓冲液加入至电泳槽内，保证电泳液在两块玻璃板之间的液面高于上样孔，同时要确保在电泳过程中玻璃板内侧液始终高于外侧。缓慢拔出梳子，按照蛋白上样顺序依次加入蛋白样品及 marker，空白孔用 1 $\times$ loading 补齐，盖好电泳槽的盖子，先采用 90V 电压电泳 30 分钟，压缩样品使样品进入分离胶时在同一水平线上，而后调整电压至 120V，电泳至溴酚蓝在凝胶末端上 1cm 处停止。

⑤ 转膜：按照中国新赛美公司的说明书，配制快速转膜液。电泳结束后根据目的蛋白条带范围切割凝胶，将凝胶置于转膜液中。打开电转印夹，按照“三明治”铺胶，顺序依次为：海绵+3 层滤纸+胶+PVDF 膜+三层滤纸+海绵，PVDF 膜之前在无水甲醇中浸泡 30 秒以上，在放置每一层时均需用滚动棒去除气泡，夹紧电转印夹。将配制好的转膜缓冲液加入到转印槽中，确认正负极后，插入电转印夹，盖好电泳槽的盖子，设定恒流 400mA，转膜 40 分钟。

⑥ 丽春红染色：转膜结束后，先用笔标记 marker，再将 PVDF 膜置于丽春红染色液 1 分钟红后，即可见红色蛋白条带，而后将膜放置于 TBST 中，摇床冲洗 3 次，每次 5 分钟，直至红色条带消失。

⑦ 封闭：用 5% 的脱脂牛奶（5g 脱脂奶粉溶解于 100ml 新鲜配制的 TBST 中），磷酸化蛋白由 5%BSA 替代，室温摇床封闭 1 小时。

⑧ 一抗孵育：去除脱脂牛奶，加入 TBST 漂洗一遍后加入稀释好的一抗，4 $^{\circ}$ C 过夜。

⑨ 二抗孵育：次日取出一抗孵育的条带，回收一抗，加入 TBST，摇床冲洗 3 次，每次 10 分钟。加入稀释好的二抗，摇床孵育 1 小时。

⑩ 显影：回收二抗，加入 TBST，摇床冲洗 3 次，每次 10 分钟。等体积混匀超敏 ECL 显影液 A 液和 B 液，稍沥干 PVDF 膜上的 TBST 后，将 PVDF 膜平铺于显影板上，在膜上均匀滴加显影液，避光进行 ECL 显影。

## 2.2.6 生物信息数据

通过检索 GEO 及 TCGA 公共数据集，下载 GSE7670、GSE10072、GSE18842 和 TCGA 中肺腺癌的表达谱芯片数据；下载 GSE30219、GSE50081、GSE31210、GSE37745 和 TCGA 中肺腺癌表达谱芯片数据以及生存数据，分析 PTBP3 在肺

腺癌及正常肺组织中的表达水平以及其与肺腺癌患者预后之间的关系。

## 2.2.7 统计学分析

采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 8 进行统计学分析。Chi-square 检验或 Fisher 精确检验分析 PTBP3 与临床病理特征之间的关系；Student's t 检验用于比较两组独立的数据；采用单因素和多因素 Cox 回归模型进行单变量和多变量分析；通过 Log-rank 法进行生存分析； $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

## 2.3 结果

### 2.3.1 数据库分析 PTBP3 在肺腺癌中表达水平及与预后的关系

通过检索 GEO 与 TCGA 数据库，下载肺腺癌相关数据 GSE7670, GSE10072, GSE18842 和 TCGA-LUAD 中的表达谱芯片数据，标准化转录组表达数据，提取 PTBP3 在癌组织及癌旁组织中的表达数据，对比分析 PTBP3 mRNA 在 GSE7670, GSE10072, GSE18842 和 TCGA-LUAD 中的表达情况，结果显示 PTBP3 mRNA 在肺腺癌组织中表达量明显高于正常肺组织，表达具有显著性差异（图 2.1）。

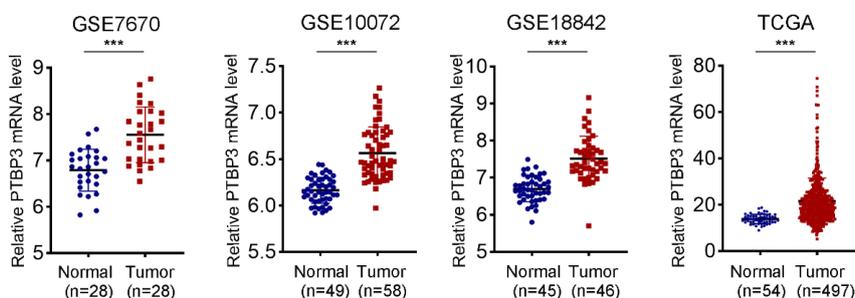


图 2.1 公共数据库显示 PTBP3 在肺腺癌组织及正常组织中表达情况。\*\*\* $P < 0.001$ , t 检验。

检索同时具备肺腺癌表达和生存数据的表达谱芯片数据集，我们发现，GSE30219、GSE50081、GSE31210、GSE37745、TCGA-LUAD 数据集符合我们的检索要求，下载上述数据集的表达谱芯片数据和生存数据，标准化转录组数据，删除失访数据，根据 PTBP3 中位表达值将各个数据集中肺腺癌组织分为高 PTBP3 表达组和低 PTBP3 表达组，Log-rank 法分析两组之间的生存差异，Kaplan-Meier 绘制生存曲线，结果显示 PTBP3 高表达的肺腺癌患者其总体存活时间明显短于 PTBP3 低表达的肺腺癌患者（图 2.2）。以上发现提示我们异常表

达的 PTBP3 在肺腺癌的发生发展中扮演促癌角色。

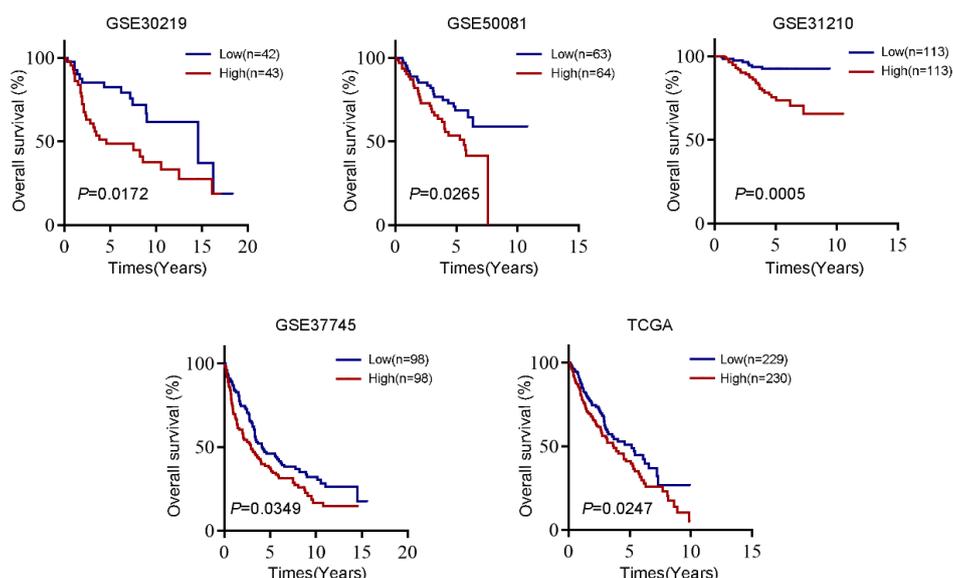


图 2.2 在公共数据库中，采用 Log-rank 法统计分析肺腺癌中 PTBP3 表达与患者预后之间的关系。Kaplan-Meier 绘制生存曲线。

### 2.3.2 PTBP3 在肺腺癌细胞系及组织表达情况

为了明确 PTBP3 蛋白在正常肺上皮细胞系和肺腺癌细胞系中的表达情况，我们提取正常支气管上皮细胞系（BEAS-2B）、人胚肺泡上皮细胞（L132）和多种肺腺癌细胞系（A549、H1299、H1792、H1975、PC9、H838、HCC827）的蛋白，行 Western-blot 检测，我们发现，相比于正常支气管肺泡上皮细胞系，PTBP3 蛋白在肺腺癌细胞系中的表达明显升高，差异具有统计学意义（图 2.3）。

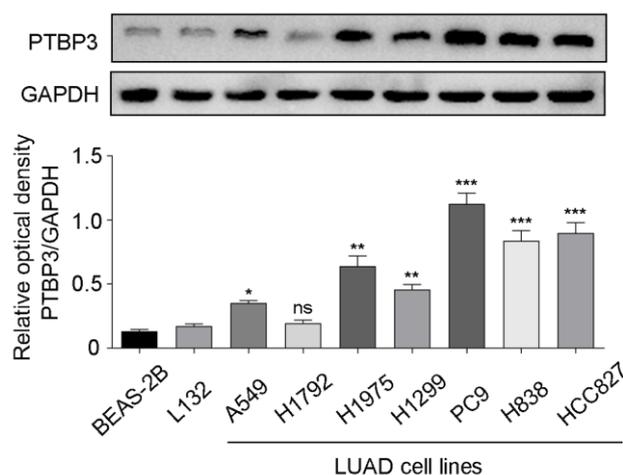


图 2.3 Western-blot 检测正常肺细胞系和肺腺癌细胞系中 PTBP3 的表达水平。\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ，t 检验。

为了进一步评估 PTBP3 在肺腺癌组织中的表达情况，我们采用免疫组化染色方法在 98 例肺腺癌组织和对应的 82 例癌旁组织中检测 PTBP3 的表达水平。通过计算染色评分，我们发现 PTBP3 蛋白在肺腺癌组织中呈明显高表达，并且主要定位于肿瘤细胞的细胞核（图 2.4A）。统计学分析显示，肿瘤组织中 PTBP3 蛋白表达显著高于相应的癌旁组织，具有统计学意义 ( $P < 0.001$ ，图 2.4B)。

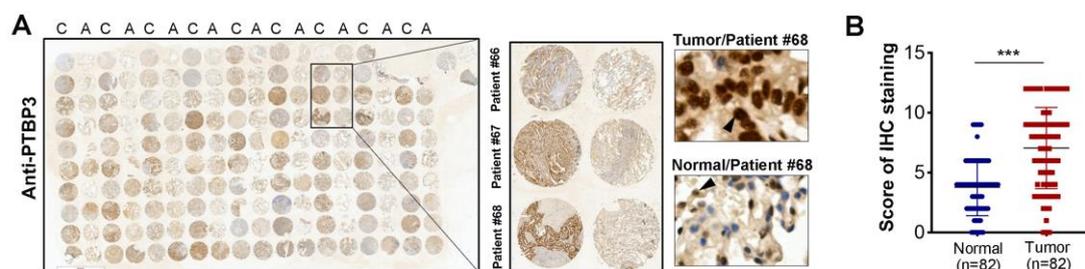


图 2.4 免疫组化检测 PTBP3 在肺腺癌组织芯片中的表达水平。(A) 免疫组化显示 PTBP3 在肺腺癌组织中主要定位于细胞核。(B) 统计分析结果显示，肺腺癌组织中 PTBP3 表达水平显著高于对应的癌旁组织。\*\*\* $P < 0.001$ ，t 检验。

### 2.3.3 PTBP3 表达水平与临床病理特征之间的关系

为了明确 PTBP3 蛋白表达在肺腺癌组织中与临床病理特征之间的相关性，根据免疫组化评分，我们将 98 例肺腺癌患者分为 52 例 PTBP3 高表达和 46 例 PTBP3 低表达，统计这两组数据，我们发现 PTBP3 高表达与肺腺癌患者年龄 ( $P = 0.849$ )、性别 ( $P = 0.28$ )、肿瘤大小 ( $P = 0.856$ )、分化级别 ( $P = 0.393$ ) 不存在相关性；而与患者淋巴结转移 ( $P < 0.001$ ) 以及 TNM 分期 ( $P < 0.001$ ) 存在明显相关性（表 2.1）。

表 2.1 肺腺癌患者肿瘤组织 PTBP3 表达与临床病理特征之间的关系

| characteristic     |           | No of patients<br>(n=98) | PTBP3 expression |            | P value     |
|--------------------|-----------|--------------------------|------------------|------------|-------------|
|                    |           |                          | High (n=52)      | Low (n=46) |             |
| Gender             | Male      | 54                       | 26               | 28         | 0.28        |
|                    | Female    | 44                       | 26               | 18         |             |
| Age (years)        | $\leq 60$ | 50                       | 27               | 23         | 0.849       |
|                    | $> 60$    | 48                       | 25               | 23         |             |
| Tumor size (cm)    | $\leq 3$  | 35                       | 19               | 16         | 0.856       |
|                    | $> 3$     | 63                       | 33               | 30         |             |
| Histological grade | I-II      | 66                       | 37               | 29         | 0.393       |
|                    | III       | 32                       | 15               | 17         |             |
| TNM stage          | I-II      | 62                       | 23               | 39         | $< 0.001^*$ |
|                    | III-IV    | 36                       | 29               | 7          |             |

续表 2.1 肺腺癌患者肿瘤组织 PTBP3 表达与临床病理特征之间的关系

|                      |       |    |    |    |          |
|----------------------|-------|----|----|----|----------|
| Lymphatic metastasis | N0-N1 | 73 | 30 | 43 | < 0.001* |
|                      | N2-N3 | 25 | 22 | 3  |          |

\* 具有统计学意义;

接下来, 我们采用单因素和多因素 Cox 回归分析评估 PTBP3 表达与患者生存时间之间的关系, 结果显示, PTBP3 高表达 ( $P=0.018$ ) 和肺腺癌临床分期 ( $P=0.001$ ) 可作为判断肺腺癌患者预后的独立危险因素 (表 2.2)。

表 2.2 单因素和多因素 Cox 回归分析统计 PTBP3 表达量和临床病理特征与生存时间的关系

| Molecular and Clinical Variables               | Hazard Ratio (95% CI) | P-value         |
|--|-----------------------|-----------------|
| <b>Univariate Analysis (Cox: Enter)</b>        |                       |                 |
| PTBP3 expression                               | 2.206 (1.337-3.638)   | <b>0.002*</b>   |
| Gender   | 0.998 (0.617-1.614)   | 0.993           |
| Age  | 1.568 (0.967-2.543)   | 0.068           |
| Tumor size                                     | 1.484 (0.885-2.488)   | 0.135           |
| Histological grade                             | 0.840 (0.501-1.409)   | 0.508           |
| TNM stage                                      | 2.657 (1.634-4.323)   | < <b>0.001*</b> |
| Lymphatic metastasis                           | 3.744 (2.215-6.326)   | < <b>0.001*</b> |
| <b>Multivariate Analysis (Cox: Forward LR)</b> |                       |                 |
| PTBP3 expression                               | 1.864 (1.114-3.120)   | <b>0.018*</b>   |
| TNM stage                                      | 2.333 (1.415-3.844)   | <b>0.001*</b>   |

\*具有统计学意义; 单因素 (上图) 和多因素 (下图) Cox 回归分析显示 PTBP3 表达量和临床因素与肺腺癌患者预后的相关性。

#### 2.3.4 PTBP3 表达水平与肺腺癌患者预后和复发之间的关系

由于单因素和多因素 Cox 回归分析显示 PTBP3 表达与肺腺癌患者生存之间存在明显相关性, 因此, 接下来, 我们通过 Log-rank 法统计分析 PTBP3 高表达组 (52 例) 和 PTBP3 低表达组 (46 例) 与患者总体生存期和无复发生存期之间的关系, 采用 Kaplan-Meier 绘制生存曲线, 结果显示, PTBP3 高表达组患者总体生存时间 ( $P=0.0013$ , 图 2.5A) 及无复发生存期 ( $P=0.028$ , 图 2.5B) 更短。

以上实验结果提示我们 PTBP3 在肺腺癌中作为一种癌基因, 但其在肺腺癌中发挥的作用以及促进肺腺癌发展的机制并不清楚。

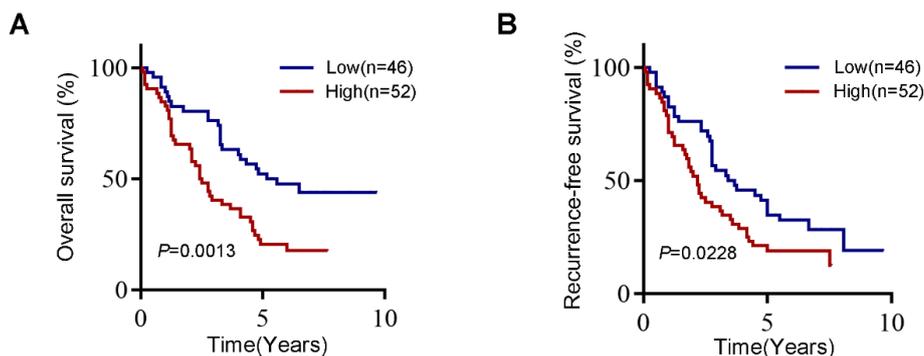


图 2.5 肺腺癌组织芯片中 PTBP3 表达水平与肺腺癌患者预后和复发之间的关系。PTBP3 高表达组的肺腺癌患者总体生存时间 (A) 以及无复发生存期 (B) 明显短于 PTBP3 低表达组患者。

## 2.4 讨论

近年来,肺腺癌在全世界范围内发病率逐渐上升,目前已取代鳞癌,成为肺癌中最常见的组织病理类型,约占肺癌的 50%。肺腺癌发病隐匿,多数患者就诊时已进展至中晚期。针对转移性肺腺癌的患者,如若驱动基因阳性,可采用分子靶向治疗;对于驱动基因阴性的患者,可采用单独放化疗或者联合免疫治疗。但由于肺腺癌的高度异质性,多数治疗手段的应答率低,或治疗过程中出现不同程度的耐药,严重影响肺腺癌患者的预后。因此,揭示肺腺癌发生、发展的分子机制,寻找新的精准治疗的靶点,是目前临床亟待解决的重要科学问题。

PTBP3 作为一种关键的 RNA 结合蛋白,通过一个或者多个 RNA 结合区域与 RNA 相互结合,调控 mRNA 剪接、成熟、定位和翻译[19, 34]。PTBP3 的细胞功能和生理作用已经得到广泛的研究,目前的研究多认为 PTBP3 参与前体 RNA 的选择性剪切,并起到剪接抑制因子的作用[27]。近年来研究发现,PTBP3 与肿瘤的发生发展密切相关,其异常表达可导致肿瘤发生、增殖和转移。研究发现 PTBP3 在多种恶性肿瘤如乳腺癌、胃癌、肝癌、胰腺癌中呈高表达,并且与患者不良预后密切相关[29, 31, 35, 36]。相比之下,PTBP3 在肺腺癌中表达情况及其与预后的关系尚不清楚。

在本研究中,我们在 GEO 及 TCGA 公共数据库里检索肺腺癌相关的数据集,分析 PTBP3 在肺腺癌组织中的表达情况以及其与患者预后的关系,发现 PTBP3 在肺腺癌组织中呈高表达,并且高表达 PTBP3 的患者具有更短的总生存期,提示 PTBP3 与肺腺癌的发生发展密切相关。为进一步验证上述数据库的结论,我们通过检测 98 例肺腺癌组织和 82 例对应的癌旁组织中 PTBP3 的表达,结果显示 PTBP3 在肺腺癌组织中呈明显高表达,且主要定位在细胞核内。统计分析患

者的临床病理特征,发现 PTBP3 高表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、组织分化程度无相关性,但是与患者淋巴结转移和 TNM 分期密切相关。单因素和多因素 Cox 回归分析显示 PTBP3 和 TNM 分期可作为预测肺腺癌患者生存的独立预后因素。鉴于单因素和多因素 Cox 回归分析的结论,我们进一步评估 PTBP3 表达与患者生存与复发之间的关系,通过 Log-rank 法比较 PTBP3 低表达组和 PTBP3 高表达组的生存和复发时间,结果显示高表达 PTBP3 的肺腺癌患者具有更短的总生存时间和无复发生存期。

综上所述,本研究提示 PTBP3 在肺腺癌中扮演着致癌基因的角色,但其具体生物学功能需要进一步的研究。

## 第3章 PTBP3 介导 TGF- $\beta$ 诱导的肺腺癌 EMT 的发生

### 3.1 材料

#### 3.1.1 实验细胞

同正文第二章。

#### 3.1.2 组织标本

本部分收集的 30 例新鲜肺腺癌组织标本均为同济大学附属同济医院胸外科 2021 年 9 月至 2021 年 11 月手术切除的患者肺组织。术后病理诊断均为肺腺癌，术前均未接受针对肿瘤的任何治疗。组织标本离体后置于 4% 多聚甲醛中保存，常规制备石蜡块，4°C 冰箱保存。

#### 3.1.3 实验试剂

##### 3.1.3.1 质粒与慢病毒

双荧光报告基因载体 pGL3-vector 和 pRL-TK 由上海柯雷生物科技有限公司提供。

pGL3-basic-PTBP3-promoter-WT 和 pGL3-basic-PTBP3-promoter-MUT 荧光素酶报告基因载体构建所需的相关的实验试剂如下：

|  |                     |
|--|---------------------|
| 琼脂粉                                    | 上海生工生物              |
| LB 培养基                                 | 上海柯雷生物              |
| 质粒小提试剂盒                                | YEASEN 生物           |
| I-5™ 2×High-Fidelity Master Mix        | 北京擎科新业生物            |
| 快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒                      | 康为世纪生物              |
| KpnI 和 HindIII 限制性内切酶                  | New England Biolabs |
| ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit | 南京诺唯赞生物             |

慢病毒过表达载体 pSLenti-EF1-F2A-Puro-CMV-3×FLAG-WPRE 由上海和元

生物科技公司提供。PTBP3 过表达质粒的构建、抽提、慢病毒的包装由上海和元生物科技有限公司完成。

### 3. 1. 3. 2 siRNA 转染

本研究所用的 siRNA 均有上海吉玛生物有限公司设计和合成。

| Gene Symbol | Direction | Sequences                    |
|-------------|-----------|------------------------------|
| si-PTBP3-1  | Forward   | 5'-CCAAUCACAGAGAACUUAATT-3'  |
|             | Reverse   | 5'-UUAAGUUCUCUGUGAUUGGTT-3'  |
| si-PTBP3-2  | Forward   | 5'-CCCUGUUACCCUGGAAGUUTT-3'  |
|             | Reverse   | 5'-AACUCCAGGGUAAACAGGGTT-3'  |
| si-Smad4-1  | Forward   | 5'-UACUUACCAUCAUAACAUTT-3'   |
|             | Reverse   | 5'-AAUGUUAUGAUGGUAAGUAGC -3' |
| si-Smad4-2  | Forward   | 5'-UCCAUUGCUUACUUUGAUUTT-3'  |
|             | Reverse   | 5'-AAUCAAGUAAGCAAUGGAAC -3'  |

### 3. 1. 3. 3 引物设计和合成

本研究中所用的引物有上海吉玛生物有限公司设计和合成。

| Gene Symbol | Direction | Primer Sequences               |
|-------------|-----------|--------------------------------|
| PTBP3       | Forward   | 5'-GCTGTCAGTGCCGTCCAAT-3'      |
|             | Reverse   | 5'-AGGGTAACAGGGTAAAAGAGGT -3'  |
| GAPDH       | Forward   | 5'-GGAGCGACATCCCTCCAAAAT-3'    |
|             | Reverse   | 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG -3' |
| PAI-1       | Forward   | 5'-GGCTGACTTCACGAGTCTTTCA-3'   |
|             | Reverse   | 5'-ATGCGGGCTGAGACTATGACA-3'    |
| Snail       | Forward   | 5'-GGTTCTTCTGCGCTACTGCT-3'     |
|             | Reverse   | 5'-TAGGGCTGCTGGAAGGTAAA-3'     |
| Slug        | Forward   | 5'-TGGTTGCTTCAAGGACACAT-3'     |
|             | Reverse   | 5'-GTTGCAGTGAGGGCAAGAA-3'      |
| Smad1       | Forward   | 5'-CTACCCTCACTCTCCCACCA-3'     |
|             | Reverse   | 5'-CTACCCTCACTCTCCCACCA-3'     |
| Smad2       | Forward   | 5'-GTTCTGCCTTTGCTGAGAC-3'      |
|             | Reverse   | 5'-TCTCTTTGCCAGGAATGCTT-3'     |
| Smad3       | Forward   | 5'-CCCCAGAGCAATATTCCAGA-3'     |
|             | Reverse   | 5'-GGCTCGCAGTAGGTAAGTGG-3'     |

| Gene Symbol | Direction | Primer Sequences             |
|-------------|-----------|------------------------------|
| Smad4       | Forward   | 5'-TGTGCCTGGTTTGATGGTAA-3'   |
|             | Reverse   | 5'-GCCATTTTCCCAATCTGCTA-3'   |
| Smad5       | Forward   | 5'-AACCTGAGCCACAATGAACC-3'   |
|             | Reverse   | 5'-GTGGCATATAGGCAGGAGGA-3'   |
| Smad7       | Forward   | 5'-TACCGTGCAGATCAGCTTTG-3'   |
|             | Reverse   | 5'-AGTTTGAAGTGTGGCCTGCT-3'   |
| SBE1        | Forward   | 5'-GGTGATCTGTGAGTTGAAAAG-3'  |
|             | Reverse   | 5'-GTACAAACATGGAATGGCTATA-3' |
| SBE2        | Forward   | 5'-TCCTTGTGGGACATTCCTTC-3'   |
|             | Reverse   | 5'-CTGTAAGACCCCGCCTCTC-3'    |

### 3.1.3.4 细胞培养及转染相关试剂

|                               |                   |
|-------------------------------|-------------------|
| Opti-MEM <sup>TM</sup> 减血清培养基 | GIBCO             |
| RFect 小核酸转染试剂                 | 常州百代生物            |
| Lipofectamine 2000            | Thermo Scientific |
| 重组人 TGF- $\beta$ 1 细胞因子       | Peprtech          |
| SB431542                      | Selleckchem       |
| 余细胞培养试剂同正文第二章                 |                   |

### 3.1.3.5 免疫荧光试剂

|                              |       |
|------------------------------|-------|
| Vimentin 抗体 (ab8069)         | Abcam |
| E-cadherin 抗体 (#14472)       | CST   |
| 抗鼠荧光二抗 (#5257)               | CST   |
| DAPI 溶液 (10 $\mu$ g/ml, 即用型) | 索莱宝   |
| 通透剂 (Triton X-100, 强)        | 索莱宝   |
| 5%BSA 封闭液                    | 索莱宝   |

### 3.1.3.6 Western-blot 实验抗体

|                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| PTBP3 抗体 (sc-100845)             | Santa Cruz |
| GAPDH 抗体 (ab181602)              | Abcam      |
| Tubulin 抗体 (ab179511)            | Abcam      |
| EMT Antibody Sampler Kit (#9782) | CST        |

|                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| Smad2/3 Antibody Sampler Kit (#12747) | CST        |
| PAI-1 抗体 (#11907)                     | CST        |
| Akt 抗体 (#4691)                        | CST        |
| p-Akt 抗体 (#4060)                      | CST        |
| MEK 抗体 (#4694)                        | CST        |
| p-MEK 抗体 (#9154)                      | CST        |
| Erk 抗体 (#12950)                       | CST        |
| p-Erk 抗体 (#4370)                      | CST        |
| T $\beta$ RI 抗体 (sc-101574)           | Santa Cruz |
| T $\beta$ RII 抗体 (sc-17791)           | Santa Cruz |
| 山羊抗兔 HRP 预吸附二抗 (#ab97080)             | Abcam      |
| 山羊抗小鼠 HRP 预吸附二抗 (#ab205719)           | Abcam      |

### 3. 1. 3. 7 qRT-PCR 试剂

|  |         |
|--|---------|
| DEPC 水   | 上海生工    |
| RNA <sup>fast200</sup> 极速抽提试剂盒                     | 飞捷生物科技  |
| Evo M-MLV RT Premix for qPCR                       | 艾克瑞生物科技 |
| SYBR <sup>®</sup> Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit | 艾克瑞生物科技 |

### 3. 1. 3. 8 ChIP 实验相关试剂

|   |           |
|---|-----------|
| EpQuik <sup>™</sup> Chromatin Immunoprecipitation Kit | Epigentek |
| Taq Plus DNA Polymerase (ET105-01)                    | TIANGEN   |
| dNTP (CD117)  | TIANGEN   |
| D2000 DNA Maker (MD114)                               | TIANGEN   |
| 1.25M 甘氨酸溶液 (公司配制)                                    | 国药        |
| 90%无水乙醇 (公司配制)  | 国药        |
| 70%无水乙醇 (公司配制)  | 国药        |
| 1 $\times$ TE buffer (PH 8.0) (公司配制)                  | 国药        |
| 甲醛  | 国药        |

### 3. 1. 3. 9 荧光素酶报告基因相关试剂

|  |         |
|--|---------|
| Dual-Luciferase <sup>®</sup> Reporte Assay Systems | Promega |
| 其它化学试剂   | 国产分析纯   |

### 3. 1. 4 实验仪器

|                        |               |
|------------------------|---------------|
| 水平电泳仪 (JY300)          | 北京君意东方        |
| 紫外分析仪 (JY02S)          | 北京君意东方        |
| 低温高速离心机 (H1650-W)      | 湖南湘仪          |
| 电热恒温水浴锅 (HW-SY11-K P2) | 北京市长风         |
| 电热恒温培养箱 (SKP-02.420)   | 黄石市恒丰医疗器械     |
| 超净工作台 (SW-CJ-1D)       | 苏州净化设备        |
| 气浴恒温振荡器 (SHZ-82A)      | 金坛市荣华仪器       |
| 超声破碎仪 (JY92-IIN)       | 宁波新芝生物        |
| 倒置显微镜 (IX51)           | Olympus       |
| Nanodrop               | Thermo Fisher |
| ProFlex™ PCR 仪         | Thermo Fisher |
| VARIOSKAN LUX 酶标仪      | Thermo Fisher |
| 低速离心机 (5702R)          | Eppendorf     |
| 化学发光免疫分析仪 (KPS-QQ80)   | 石家庄康普生科技      |
| 生物安全柜                  | 上海净信          |

## 3.2 方法

### 3.2.1 Real-time PCR 定量

#### 3.2.1.1 肺癌细胞总 RNA 提取

由于 RNA 极易被 RNase 降解, 而 RNase 广泛存在空气及周围环境, RNA 提取过程中应全称注意无酶操作, 在通风橱中操作, 戴口罩手套, 做好防护, 所有试剂及耗材均经辐射或者 DEPC 水处理, 保证无核酸酶污染。

① 待培养板内的细胞汇合度达 80%~90%时, 消化细胞, 离心后保留适量上清 (100 $\mu$ l/2 $\times$ 10<sup>6</sup>), 充分震荡直至没有细胞团块。取 100 $\mu$ l 放入 EP 管中。

② 将 500 $\mu$ l RA2 液加入到处理好的样本中, 上下颠倒混匀, 室温静置 1min。

③ 将细胞裂解物转移至内套管中, 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm, 离心 1min。

④ 弃去外套管中液体, 将 500 $\mu$ l 洗液加入到内套管中, 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm, 离心 1min。重复此步骤洗一次。

⑤ 弃去外套管中液体, 不加洗液, 将内套管重新套入外套管后, 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm, 离心 1min。

⑥ 将内套管套入 1.5ml EP 管中, 在其底部加入洗脱液 25~50 $\mu$ l, 室温静置

1min, 4°C, 12000rpm, 离心 1min, 取出内套管, EP 管底部的液体即为总 RNA。提取的 RNA 进行下一步实验或-80°C 保存。

### 3.2.1.2 反转录

整个操作过程均应保证无 RNase 污染, 冰上操作, 降低 RNase 酶活性, 实验耗材及试剂同样要保证无 RNase 污染, 按照 5×Evo M-MLV 反转录试剂说明书配制反转录反应液。

| 组分名称                  | 加入量              |
|-----------------------|------------------|
| 5×Evo M-MLV RT Premix | 2 $\mu$ l        |
| Total RNA             | *                |
| RNase free water      | up to 10 $\mu$ l |
| 反应条件如下: 37°C          | 15min            |
| 85°C                  | 5sec             |
| 4°C                   | 5min             |

\*: 10 $\mu$ l 的反应体系, 加入 500ng 的总 RNA, 根据测得的 RNA 浓度, 加入相应量的 RNA 体积。

### 3.2.1.3 PCR 扩增和定量分析

按照 SYBR® Green Premix Pro Taq HS qPCR 试剂盒说明书, 经上述反转录过程得到的 cDNA 直接进行 PCR 扩增和定量分析。每个样本设置三个重复孔。反应体系如下:

| 组分名称                  | 20 $\mu$ l 体系    |
|-----------------------|------------------|
| SYBR® Green Premix    | 10 $\mu$ l       |
| cDNA                  | 1 $\mu$ l        |
| Primer F (10 $\mu$ m) | 0.4 $\mu$ l      |
| Primer R (10 $\mu$ m) | 0.4 $\mu$ l      |
| RNase free water      | up to 20 $\mu$ l |

两步法 PCR 反应条件如下:

|                    |       |             |         |
|--------------------|-------|-------------|---------|
| 95°C               | 30sec | } 40 cycles | 1 cycle |
| 95°C               | 5sec  |             |         |
| 60°C               | 30sec |             |         |
| Dissociation stage |       |             |         |

### 3.2.2 Western-blot 实验

实验步骤同正文第二章部分 Western-blot 步骤。

### 3.2.3 细胞免疫荧光

① 细胞爬片：细胞铺板前先在六孔板内滴一滴培养基，再放入盖玻片，然后以合适的细胞密度进行铺板。

② 固定：待细胞汇合度达 70%~80%时，弃去培养基，预冷的 PBS 振荡洗涤 3 次，每次 5 分钟。将 500 $\mu$ l 预冷的 4%多聚甲醛加入六孔板，室温静置 15 分钟。

③ 封片：吸去多聚甲醛，PBS 振荡洗涤 3 次，每次 5 分钟。洗涤结束后将盖玻片用弯针取出（注射器针头折弯），擦干盖玻片背面，载玻片中间滴一滴中性树脂，盖玻片放于树脂上，微调将气泡赶出，放置室温晾干。

④ 通透：将预先配制好的 0.2%的 Triton X-100 100 $\mu$ l 滴于细胞表面，平放于湿盒内，摇床通透 10 分钟。

⑤ 封闭：弃去 Triton X-100，PBS 振荡洗涤 3 次，每次 5 分钟。在细胞表面加入 100 $\mu$ l 5%BSA，室温孵育 1 小时。

⑥ 一抗孵育：一抗（1:100）配于 5%BSA 中，取 100 $\mu$ l 于细胞表面，4 $^{\circ}$ C 过夜。

⑦ 二抗孵育：次日，将切片取出，回收一抗，PBS 摇床冲洗 3 次，每次 5 分钟。此时开始所有操作均需要避光，用 5%BSA 按合适比例稀释荧光二抗，取 100 $\mu$ l 荧光二抗滴加于细胞表面，平放于湿盒内，室温避光孵育 1 小时。

⑧ 染核：弃去二抗，PBS 摇床冲洗 3 次，每次 5 分钟。滴加 100 $\mu$ l DAPI 于细胞表面，室温避光孵育 5 分钟。

⑨ 拍照：染核结束，弃去 DAPI，滴加 30 $\mu$ l 抗猝灭剂于细胞表面。在暗室内，在荧光显微镜下观察并拍照。

### 3.2.4 Transwell 实验

#### 3.2.4.1 迁移实验

① 制备细胞悬液：本实验采用 A549 和 H1299 作为研究对象。前一天更换为无血清培养基，饥饿细胞 12 小时。次日，常规消化细胞、离心，用 PBS 洗 1 遍。用含 1%血清的培养基重悬细胞，调整细胞密度至  $5 \times 10^4$  个/ml。

② 接种细胞：取出 24 孔板小室，放入超净台，将 500 $\mu$ l 含 20% 血清的培养基加入到下室内。取上述准备好的细胞悬液 200 $\mu$ l 分散加入上室，镜下检查小室与下层培养基之间无气泡，放入培养箱，常规培养 24 小时。

③ 固定细胞、染色与拍照：细胞培养 24 小时后，取出 Transwell 小室，用移液枪吸去上室培养基，预冷 PBS 清洗 3 次。将 800 $\mu$ l 4% 多聚甲醛加入到 Transwell 孔板，固定细胞 20 分钟。然后吸去多聚甲醛，PBS 清洗 2 遍，待小室风干后，将 800 $\mu$ l 0.1% 结晶紫染液加入 Transwell 孔板内，染色 10 分钟，PBS 清洗 3 遍。用棉签小心擦去上室内的细胞。将小室风干后，将 Transwell 下室反过来底朝上，在正置显微镜下，随机选取 3~5 个视野进行观察和拍照。

④ 采用 Image J 软件统计细胞数目并计数 3 次，取 3 次结果的平均值来代表细胞的迁移和侵袭能力。

#### 3.2.4.2 侵袭能力

实验前一天将基质胶置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱融化。次日，用无血清培养基按 1:8 比例对基质胶进行稀释，将配制好的基质胶，加入到上室内，放置细胞培养箱 4 小时，后续实验步骤同迁移实验。

#### 3.2.5 CCK-8 实验

待培养细胞密度至 80%~90% 时，常规消化、离心、重悬细胞，细胞计数，调整细胞密度为  $2 \times 10^4$  个/ml。将 96 孔板放入超净台，先向孔内加入 50 $\mu$ l 培养基，再接种 50 $\mu$ l 制备好的细胞悬液，轻敲板底，使细胞分散均匀。将培养板放在培养箱中培养，待检测时间点，将待测孔中的旧培养基吸去，加入配制好的含 20% CCK-8 的新鲜培养基，待培养 4 小时后取出，设定酶标仪 OD 值为 450nm，测定 OD 值并根据绘制的增殖曲线，比较各组细胞的增殖情况。

#### 3.2.6 siRNA 转染

##### 3.2.6.1 细胞复苏

① 从液氮中取出冻存的 A549 或 H1299 细胞，快速放入 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中，轻摇冻存管使冻存液溶解。

② 酒精充分擦拭冻存管，置于超净台中，将细胞悬液移入 15ml 离心管中，加入 5ml 完全培养基稀释，1000rpm，离心 5 min，弃上清。

③ 将 1ml 完全培养基加入离心管中，轻轻吹打重悬细胞，接种到培养皿中，八字法摇匀细胞，置 37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

### 3.2.6.2 细胞传代

① 次日，观察细胞密度达到80%时，进行细胞传代，吸去旧培养基，PBS清洗一遍。

② 向培养皿中加1~2ml 0.25%胰酶，轻轻摇匀使胰酶完全浸润细胞，显微镜下观察，消化30~60s，看到细胞开始变圆并呈泥沙样脱落时，消化完成。

③ 细胞消化结束后，立即加入5ml完全培养基，常规离心，重悬细胞，按1:3的比例接种细胞，置37°C 5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中扩大培养。

### 3.2.6.3 siRNA转染

① 细胞接种：转染前一天观察A549和H1299细胞，保证细胞生长状态良好。常规消化离心后，将细胞以每孔 $2 \times 10^5$ 个接种于6孔板中，37°C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜。

② 用250 $\mu$ l无血清培养基稀释30pmol siRNA，轻轻混匀。

③ 10 $\mu$ l RFect用250 $\mu$ l无血清培养基稀释，轻轻混匀，室温孵育5分钟。

④ 孵育5分钟后，将siRNA稀释液与RFect稀释液混合（总体积500 $\mu$ l），轻轻混匀，室温孵育20分钟。

⑤ 将500 $\mu$ l混合物加入到各孔内，轻轻晃动培养板，混匀，放入培养箱，培养24小时后，重复上述转染步骤，进行再转染。

⑥ 重复转染24小时后，根据分组，在相应各组细胞内加入TGF- $\beta$ 1处理细胞24小时，提取细胞蛋白。

## 3.2.7 荧光素酶载体的构建

### 3.2.7.1 目的基因扩增

根据已知PTBP3的启动子序列，设计PCR引物，在上下游引物中导入限制性内切酶KpnI（GGTACC）和HindIII（AAGCTT）的酶切位点。加入相应的保护碱基，目的基因PTBP3启动子引物序列如下：

F: CATTTCTCTATCGATAGGTACCAGGTGTGAGCCACCATGCCCAG,

R: ACAGTACCGGAATGCCAAGCTTCCCGCCTTCCCCACCCCGCGAG;

下划线序列为同源臂，红色字体为酶切位点，上游为KpnI，下游为HindIII。

使用I-5™ 2 $\times$ High-Fidelity Master Mix高保真聚合酶进行PCR扩增，具体反应体系如下：

|                                 |              |
|---------------------------------|--------------|
| I-5™ 2×High-Fidelity Master Mix | 12.5 $\mu$ l |
| 引物 F                            | 1 $\mu$ l    |
| 引物 R                            | 1 $\mu$ l    |
| 质粒模板                            | 1 $\mu$ l    |
| ddH <sub>2</sub> O              | 9.5 $\mu$ l  |
| 总体积                             | 25 $\mu$ l   |

反应条件如下：

|     | 温度      | 时间       | Cycles |
|-----|---------|----------|--------|
| 预变性 | 98°C    | 2min     | 1      |
| 变性  | 98°C    | 10s      | } 40   |
| 退火  | 45~68°C | 10s      |        |
| 延伸  | 72°C    | 5~15s/Kb |        |
| 终延伸 | 72°C    | 5min     | 1      |
|     | 4°C     |          |        |

### 3. 2. 7. 2 PCR 产物凝胶回收

目的片段 PCR 扩增完成后，用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测，DNA marker 作为参照，判断目的基因的片段大小。将上述正确的目的条带分别切割回收至无菌的 1.5ml EP 管中，按照快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书回收 DNA 目的片段，具体步骤参考试剂盒说明书，即得到纯化的 PCR 产物 PTBP3 启动子片段。

### 3. 2. 7. 3 载体的酶切与回收

在无菌的 0.2ml EP 反应管里，用 KpnI+HindIII 双酶切 pGL3-Basic 载体，具体酶切体系如下：

|                    |             |
|--------------------|-------------|
| 10× Buffer         | 5 $\mu$ l   |
| vector             | 9 $\mu$ l   |
| KpnI               | 1.5 $\mu$ l |
| Hind III           | 1.5 $\mu$ l |
| ddH <sub>2</sub> O | 33 $\mu$ l  |
| 总体积                | 50 $\mu$ l  |

37°C 酶切 30min

载体酶切结果检测及回收同上。

## 3.2.7.4 多片段同源重组反应

检测上述 PTBP3 (human) 启动子基因和双酶切后载体的回收片段浓度, 分别为 56ng/ $\mu$ l、110ng/ $\mu$ l。准备无菌的 0.2ml EP 管, 根据多片段同源重组酶的说明书, 并结合实际浓度, 最终以载体片段: 目的片段=3:1 的反应体系进行连接:

|                         |             |
|-------------------------|-------------|
| Exnase II 酶             | 1 $\mu$ l   |
| 5 $\times$ CE II Buffer | 2 $\mu$ l   |
| 载体片段                    | 4.5 $\mu$ l |
| 基因片段                    | 1.5 $\mu$ l |
| ddH <sub>2</sub> O      | 1 $\mu$ l   |
| 总体积                     | 10 $\mu$ l  |

37 $^{\circ}$ C, 连接 30min

## 3.2.7.5 质粒转化

① 提前将 DH5 $\alpha$  感受态菌从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出, 置于冰上融化。质粒 DNA 于冰盒中融化。

② 将 1 $\mu$ l 质粒 DNA 加入到 50 $\mu$ l 感受态菌中 (此步在超净工作台上进行), 轻轻旋转混匀, 冰浴 30min。在 42 $^{\circ}$ C 水浴中热激 90s, 随后迅速插入冰盒中。

③ 向离心管中加入 450 $\mu$ l 无抗生素的 LB 液体培养基 (此步在超净工作台上进行), 37 $^{\circ}$ C, 180rpm 摇床上振荡孵育 1h。

④ 复苏完成后, 在超净台内取 100 $\mu$ l 上述转化菌液均匀涂抹于含 Amp 抗生素 (100 $\mu$ g/ml) 的 LB 固态平板培养皿上, 室温下放置, 直至液体吸收。

⑤ 将平板移入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱, 倒置, 过夜培养。16h 后观察菌落生长情况, 挑取孤立白色菌落加入 4ml 含 Amp 的 LB 液态培养基中摇菌。

## 3.2.7.6 质粒抽提

质粒抽提采用 YEASEN 公司的 MolPure<sup>®</sup> Endo-free Plasmid Mini Kit (#19021ES50) 无内毒素质粒小量提取试剂盒。试剂盒内组分如下:

| 组分名称                       |             |
|----------------------------|-------------|
| RNase A (10mg/ml)          | 125 $\mu$ l |
| 去内毒素溶液 ER (ER Solution E2) | 5ml         |
| 缓冲液 RS* (RS Buffer E2*)    | 12.5ml      |
| 缓冲液 AC (AC Buffer E2)      | 5ml         |

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| DNA 吸附柱 E2 (MolPure® DNA Column E2) | 50 个   |
| 2ml 收集管 (2ml Collection Tube E2)    | 50 个   |
| 裂解液 LB (LB Buffer E2)               | 12.5ml |
| 结合液 BD (BD Buffer E2)               | 12.5ml |
| 去蛋白液 PL* (PL Buffer E2*)            | 16ml   |
| 漂洗液 W* (Wash Buffer*)               | 13ml   |
| 洗脱液 (Elution Buffer)                | 10ml   |

详细的实验步骤如下：

### 一、样本预处理

- ① 取 1.5~4.5ml 过夜培养的菌液(可多次分装菌液至同一个 1.5ml 离心管), 10000rpm 离心 1min, 弃上清液, 收集菌体。
- ② 加入 250 $\mu$ l 缓冲液 RS\*, 吹打或涡旋重悬菌体沉淀。
- ③ 加入 250 $\mu$ l 裂解液 LB, 温和上下翻转 6~8 次以充分裂解菌体。室温放置 4min。
- ④ 加入 250 $\mu$ l 结合液 BD, 立即温和上下翻转 6~8 次充分混匀。12000rpm 离心 10~15min, 小心收集上清。
- ⑤ 加入 1/10 上清体积的去内毒素溶液 ER(约 80 $\mu$ l), 颠倒混匀, 冰浴 5 min 至溶液变清亮透明(或稍有浑浊)。冰浴过程中, 颠倒混匀 2~3 次。
- ⑥ 室温 (25 $^{\circ}$ C) 放置 5min, 待溶液恢复浑浊后, 颠倒混匀。
- ⑦ 室温 12000rpm 离心 10min 分层。上层水相为 DNA, 下层蓝色油状相为内毒素等物质。小心收集上层水相至新离心管。
- ⑧ 加入 0.5 倍体积的异丙醇(约 370 $\mu$ l, 自备), 充分颠倒混匀。

### 二、质粒 DNA 提取

- ① 将 DNA 吸附柱 E2 套入 2ml 收集管中, 备用。
- ② 向 DNA 吸附柱 E2 中加入 100 $\mu$ l 缓冲液 AC, 12000rpm 离心 1min, 弃掉废液。
- ③ 将上述预处理混合液加入到 DNA 吸附柱 E 中, 12000rpm 离心 1min, 弃掉废液。
- ④ 加入 500 $\mu$ l 去蛋白液 PL\*, 12000rpm 离心 1min, 弃废液。
- ⑤ 将 DNA 吸附柱 E2 放回收集管, 加入 600 $\mu$ l 漂洗液 W\*, 12000rpm 室温离心 1min, 弃废液。
- ⑥ 重复一遍步骤 5。

⑦ 将 DNA 吸附柱 E2 放回收集管，空柱 12000rpm 室温离心 3min，以除去残留的漂洗液 W\*。

⑧ 将 DNA 吸附柱 E2 放入新的 1.5ml 离心管中，在 DNA 吸附柱 E2 中央加入 50~100 $\mu$ l 洗脱液，室温放置 2min。然后 10000rpm 离心 2min。收集滤液，即为 DNA 溶液。

⑨ 质粒 DNA 溶液可置于-20 $^{\circ}$ C长期保存。

质粒提取后，进行电泳检测，随后将验证的阳性克隆质粒送上海柯雷生物有限公司测序。

PTBP3 基因启动子区 SBE 结合位点突变区段的合成，由上海柯雷生物有限公司完成，按照 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 试剂盒说明书，定点突变相关结合位点，合成并连接到 pGL3-basic-vector 中。

### 3.2.8 质粒转染

实验步骤同本章节双荧光素酶报告基因实验部分质粒转染操作。

### 3.2.9 双荧光素酶报告基因实验

#### 3.2.9.1 质粒转染

① 转染前一天，选取生长状态良好的 A549 细胞，消化离心后，将细胞以每孔  $5 \times 10^4$  个接种于 24 孔板中，37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜。

② 次日，观察细胞汇合度在 50%时，开始进行细胞转染。

③ 对于不同的细胞分组，均按照下面的方法准备转染：

a 在 200 $\mu$ l EP 管内加入 1 $\mu$ g 两种质粒(对应的荧光素酶载体质粒、pRL-TK)，用 50 $\mu$ l Opti-MEM 稀释，并用枪头轻轻混匀，室温静置 5 分钟。

b 使用前轻轻混匀 Lipofectamine 2000，在 200 $\mu$ l EP 管内加入 2 $\mu$ l 的 Lipofectamine 2000，同样用 50 $\mu$ l Opti-MEM 稀释，混匀，室温静置 5 分钟。

c 随后将上述两管 Lipofectamine 2000 和质粒的稀释液混合在一个 200 $\mu$ l EP 管内，总体积为 100 $\mu$ l，用枪头轻轻混匀，室温静置 20 分钟。

d 将 24 孔板内培养基更换为 Opti-MEM，20 分钟后向每个培养孔加入上述转染混合液 100 $\mu$ l；轻摇培养板后，置于培养箱中培养。6 小时后观察细胞状态，如漂浮细胞多，立即更换为完全培养基，否则 10 小时后再予以更换。24 小时后在相应分组孔内加入 TGF- $\beta$ 1，继续培养细胞 24 小时。

#### 3.2.9.2 细胞双荧光素酶检测

准备工作:

1 $\times$ PLB 制备: 将 5 $\times$ 的 Passive Lysis Buffer (PLB) 稀释成 1 $\times$ 的进行后续实验;

LAR II 的制备: 用 Luciferase Assay Buffer II 溶解粉剂的 Luciferase Assay Substrate;

1 $\times$ Stop & Glo<sup>®</sup> Reagent 的制备: 用 Stop & Glo<sup>®</sup> Buffer 将 50 $\times$ 的 Stop & Glo<sup>®</sup> Substrate 稀释成 1 $\times$ 的溶液备用。

① 裂解细胞: 除去每孔培养基, 用 1 $\times$ PBS 漂洗一次, 每孔加入 300 $\mu$ l 1 $\times$  PLB, 室温摇床孵育 15min, 待细胞充分裂解后, 将细胞裂解液移入 EP 管内, 10000~15000g 离心 3~5 分钟, 取上清用于测定。

② 按仪器操作说明书开启荧光测定仪, 测定时间设为 500ms。

③ 将上清转入 96 孔板中, 20 $\mu$ l/孔, 随后在每孔内加入 100 $\mu$ l LAR II, 检测萤火虫荧光素酶的活性。

④ 检测完成之后加入 100 $\mu$ l Stop & Glo<sup>®</sup> Reagent, 分别检测海肾和萤火虫荧光素酶的 RLU 值。以海肾荧光素酶为内参, 计算比值(萤火虫荧光素酶的 RLU 值/海肾荧光素酶的 RLU 值)。根据得到比值来比较不同样品间目的报告基因的激活程度。

### 3.2.10 ChIP 实验

本实验所用 EpQuik<sup>™</sup>Chromatin Immunoprecipitation Kit 主要组分如下:

---

|      |                      |
|------|----------------------|
| CP1  | Wash Buffer          |
| CP2  | Antibody Buffer      |
| CP3A | Lysis Buffer         |
| CP3B | Lysis Buffer         |
| CP4  | ChIP Dilution Buffer |
| CP5  | DNA Release Buffer   |
| CP6  | Reverse Buffer       |
| CP7  | Binding Buffer       |
| CP8  | Elution Buffer       |

---

除此之外, 试剂盒内还包括 Protease Inhibitor Cocktail (100 $\times$ ), Normal Mouse IgG (1mg/ml), Anti-RNA Polymerase II (1mg/ml), Proteinase K (10mg/ml), Control Primer (GAPDH), 8-Well Assay Strips (with Frame).

#### 3.2.10.1 抗体结合至酶连板

① 根据实验需要, 确定所需要的板条, 将其放置于酶联板中(将剩余板条放回袋中, 轻放于 4°C 保存)。150 $\mu$ l CP1 清洗反应孔一次。

② 每孔加入 100 $\mu$ l CP2, 分别加入以下抗体: 1 $\mu$ l 正常小鼠 IgG 作为阴性对照, 1 $\mu$ l Anti-RNA Polymerase 作为阳性对照, 2~4 $\mu$ g p-Smad3 抗体作为实验组。

③ 用封口膜覆盖反应孔, 室温孵育 60~90min。在此期间, 按照以下步骤准备细胞提取物。

### 3.2.10.2 细胞收集和体内交联

① 细胞(TGF- $\beta$ 1 处理或未处理)在 100mm 培养板上密度达 80%~90%, 胰酶消化后收集到 15ml 离心管中, 使用细胞计数仪计算细胞密度。

② 将细胞 1000rpm 离心 5min, 弃上清。用 10ml PBS 清洗一次, 1000rpm 离心 5min。弃上清。

③ 加入 9ml 含有终浓度为 1% 甲醛的新鲜培养基。于平板摇床(50~100rpm)上室温(20~25°C)孵育 10min。

### 3.2.10.3 细胞溶解和 DNA 酶切

① 在离心管内加入 1ml 1.25M 甘氨酸溶液终止交联, 混匀后 1000rpm 离心 5min。弃上清, 10ml 冰 PBS 清洗, 1000rpm 离心 5min, 弃上清。

② 加入 CP3A 重悬细胞团块(200 $\mu$ l/1 $\times$ 10<sup>6</sup>cells)。将细胞重悬液转移至一个 1.5ml EP 管, 冰浴 10min。涡旋 10s 后 5000rpm 离心 5min。

③ 小心丢弃上清。加入含有 protease inhibitor cocktail (PIC) 的 CP3B (每 1ml CP3B 加 10 $\mu$ l PIC) 重悬核团(50~100 $\mu$ l/1 $\times$ 10<sup>6</sup>cells, 每管最多 500 $\mu$ l)。将样品冰浴 10min, 间歇性震荡。

④ 超声剪切 DNA 后 14000rpm 离心 10min; 收集上清(含酶切后染色质片段)至新的 1.5ml EP 管内, -80°C 储存或进行下一步实验。

### 3.2.10.4 蛋白/DNA 免疫沉淀

① 按 1:1 比例加 CP4 稀释上清(100 $\mu$ l 上清加 100 $\mu$ l CP4)。

② 转移 5 $\mu$ l 稀释后的上清至一个新的 0.5ml 管, 标记为“Input DNA”, 放于冰上。

③ 去除已孵育的抗体溶液, 取 150 $\mu$ l CP2 将板条清洗 3 次。转移 100 $\mu$ l 已稀释的上清至每孔, 封膜后室温孵育 60~90min, 水平摇床(50~100rpm)。

④ 弃去上清, 用 150 $\mu$ l CP1 清洗板条 6 次, 每次洗涤时于水平摇床上摇晃 2min(100rpm), 150 $\mu$ l 1 $\times$ TE 清洗一次。

### 3.2.10.5 交联 DNA 反转及 DNA 纯化

① 加 1 $\mu$ l 蛋白酶 K 至 40 $\mu$ l CP5, 混匀, 加入含有蛋白酶 K 的 CP5 至样品中 (包括 “Input DNA”), 板条盖子盖上后 65 $^{\circ}$ C 水浴 15min。

② 样品 (包括 “Input DNA”) 中加入 40 $\mu$ l CP6, 混匀, 盖上班条盖子 65 $^{\circ}$ C 水浴 90min。

③ 将离心柱放入一个 2ml 的收集管中。向样品中加入 150 $\mu$ l CP7, 转移混合液至离心柱中, 12000rpm 离心 20s。

④ 加入 200 $\mu$ l 70% 无水乙醇, 12000rpm 离心 15s。取出离心柱, 弃废液。

⑤ 将离心柱放回收集管中, 加入 200 $\mu$ l 90% 无水乙醇, 12000rpm 离心 20s。

⑥ 弃废液, 将离心柱放回收集管中, 用 200 $\mu$ l 90% 无水乙醇清洗离心柱, 12000rpm 离心 35s。

⑦ 将离心柱放入一个新的 1.5ml EP 管中, 向吸附柱中央加入 10~20 $\mu$ l CP8, 12000rpm 离心 20s 洗脱 DNA。-20 $^{\circ}$ C 保存或进行下一步实验。

### 3.2.11 Western-blot 及免疫组化染色

实验步骤同正文第二章 Western-blot 和免疫组化染色步骤。

### 3.2.12 生物信息数据

使用在线数据库 GEPIA 检索不同肿瘤类型中 PTBP3 与 Smad2/3 的表达相关性。输入相关的检索词后, GEPIA 网站中自动分析计算 PTBP3 与 Smad2/3 的相关系数和  $P$  值, 下载相关的数据以便后续分析。

### 3.2.13 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 进行统计学分析。Student's  $t$  检验用于比较两组独立的数据。Pearson 和 Spearman 相关性分析分别计算数据库和组织切片中 PTBP3 与 Smad2/3 的相关系数和  $P$  值。 $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。计量数据表示为平均值  $\pm$  SD, 所有实验至少进行 3 次重复。

## 3.3 结果

### 3.3.1 TGF- $\beta$ 诱导肺腺癌细胞系中 PTBP3 的表达

为了研究 TGF- $\beta$ 1 是否可以诱导 PTBP3 在肺腺癌系中的表达, 我们选取 A549, H1299, H1792, H838 细胞系, 分别加入 5ng/ml 或 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 诱导培养, 分别选取 0d、2d、4d、6d 不同的诱导时间提取细胞蛋白行 Western-blot, 结果发现, 外源性 TGF- $\beta$ 1 刺激肺腺癌细胞后, 上皮细胞指标 E-cadherin 表达水平显著下降, 而间质细胞相关指标 N-cadherin 明显升高, 表明 TGF- $\beta$ 1 可成功诱导肺腺癌细胞系 EMT。同时我们发现伴随着 EMT 的指标的变化, TGF- $\beta$ 1 可显著提高细胞内 PTBP3 蛋白的表达, 并且随着 TGF- $\beta$ 1 刺激时间的延长, 这种变化愈加明显 (图 3.1)。

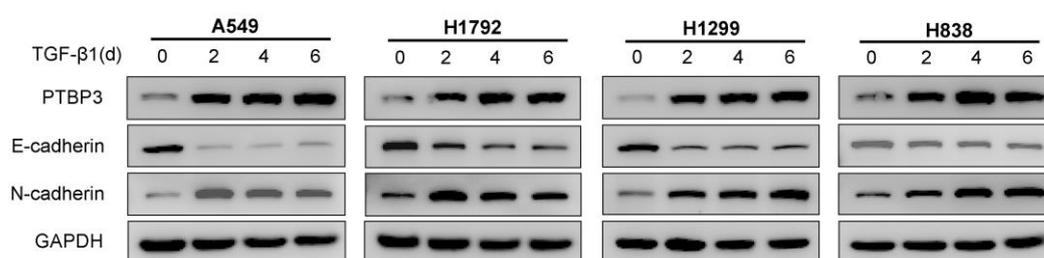


图 3.1 Western-blot 实验显示, 随着 TGF- $\beta$ 1 刺激时间 (天) 的增加, 可显著增加肺腺癌细胞系 (A549、H1792、H1299、H838) 中 PTBP3 的表达, 同时伴有 EMT 相关指标 E-cadherin、N-cadherin 的改变。

TGF- $\beta$  调控基因表达主要是通过 Smad 信号通路, TGF- $\beta$  与受体结合后, 磷酸化 Smad2/3, 随后与胞质内的 Smad4 结合, 形成三聚体入核后, 通过结合相关靶基因启动子区的 Smad 结合元件 (Smad binding element, SBE) 调控基因的表达。为了明确 TGF- $\beta$  是否通过经典的 Smad 信号通路诱导 PTBP3 表达, 我们通过 JASPAR 在线网站预测 PTBP3 启动子是否存在 SBE 结合位点, 结果发现在转录起始点上游 2000bp 内存在两个 SBE 结合位点, 因此我们推测 TGF- $\beta$  诱导的 p-Smad2/3 复合物结合在 PTBP3 的 SBE 位点, 促进 PTBP3 的表达。为此我们在 A549 细胞内采用 siRNA 介导的 Smad4 基因沉默, 进而行 Western-blot 检测, 分析沉默 Smad4 后 PTBP3 蛋白的变化情况。结果显示, 转染 Smad4 蛋白的 siRNA 后, Smad4 蛋白表达显著下降。TGF- $\beta$  诱导的 EMT 标志蛋白 E-cadherin 及 N-cadherin 的变化被抑制, 同时 TGF- $\beta$  诱导的 PTBP3 高表达也被抑制 (图 3.2A)。为进一步验证上述实验结果, 我们采用 TGF- $\beta$ /Smad 通路小分子抑制剂 SB431542 处理 A549 细胞以阻断 TGF- $\beta$ /Smad 通路, 结果发现, 随着 SB431542 浓度的增加, TGF- $\beta$  诱导的 PTBP3 表达升高完全被抑制 (图 3.2B)。综合以上发现, 说明 PTBP3 的表达受 TGF- $\beta$ /Smad 通路调控。

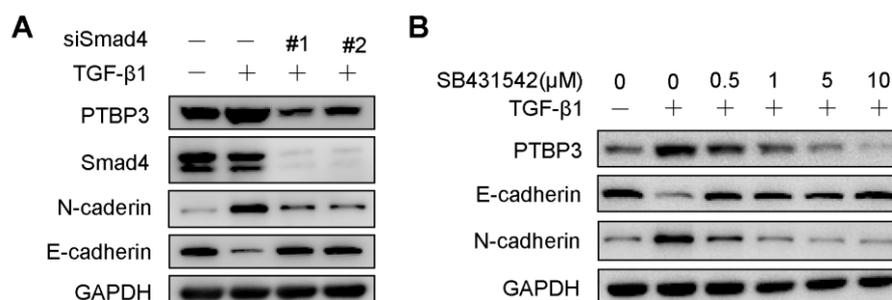


图 3.2 (A) A549 细胞转染 Smad4 基因的 siRNA 后行 Western-blot 检测 PTBP3、E-cadherin、N-cadherin 的表达变化。(B) A549 细胞加入不同浓度的 TGF- $\beta$ 1 通路小分子抑制剂 SB431542 后行 Western-blot 检测 PTBP3、E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达变化。

为进一步明确 Smad2/3/4 是否直接结合在 PTBP3 启动子区的 SBE，激活其转录和表达，我们接下来行双荧光素酶报告基因实验。我们将 PTBP3 启动子区长约 2000bp 的启动子序列插入到萤火虫荧光素酶报告基因的上游，同时点突变这两个 SBE 结合位点，分别构建 pGL3-basic-PTBP3-promoter-WT 和 pGL3-basic-PTBP3-promoter-MUT 荧光素酶报告基因质粒（图 3.3A）。根据分组，在 A549 细胞内转染构建的质粒和海肾荧光素酶报告质粒（pRL-TK），采用双荧光素酶报告基因系统检测插入的启动子的序列对下游荧光蛋白的影响，结果显示，WT 组的荧光信号较对照组显著增高（ $P < 0.001$ ），TGF- $\beta$  刺激后荧光信号明显增强；而 MUT 组的荧光信号不受 TGF- $\beta$ 1 的影响，并且较 WT 组明显减弱（ $P < 0.01$ ，图 3.3B），以上结果提示 TGF- $\beta$ 1 可通过 PTBP3 基因启动子区的 Smad2/3/4 结合位点调控下游基因的表达。

接下来，为了验证 p-Smad3 在细胞内是否与 PTBP3 启动子区 SBE 结合位点直接结合。我们进一步采用 p-Smad3 抗体进行染色质免疫共沉淀实验。随后通过分别设计跨越 SBE1、SBE2 的引物进行 qPCR，检测其富集程度。我们发现，在 A549 细胞内，TGF- $\beta$ 1 诱导的 p-Smad2/3 复合物能明显富集到 SBE1 和 SBE2 结合位点的序列（图 3.3C）。

综上所述，本研究发现 TGF- $\beta$ 1 可通过 Smad 信号通路促进肺腺癌细胞系中 PTBP3 的转录和表达（图 3.3D）。

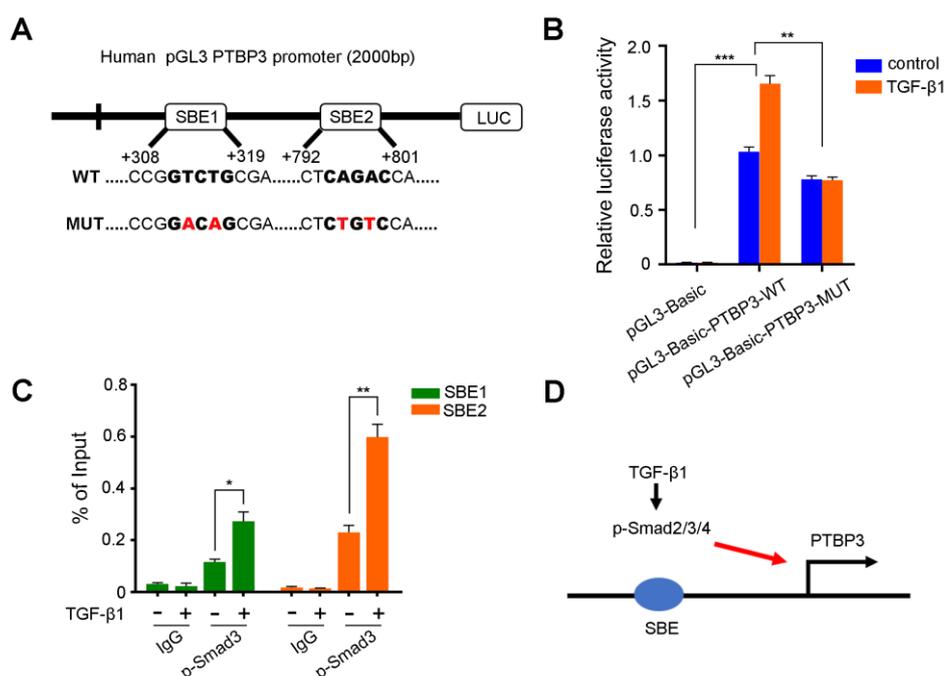


图 3.3 TGF-β1 通过 Smad 通路调控 A549 细胞中的 PTBP3 表达。(A) JASPAR 网站预测 PTBP3 基因启动子区存在两个 SBE 结合位点。包含 SBE1 与 SBE2 结合位点在内的大约 2000bp 的 PTBP3 启动子区及其突变序列被克隆到 pGL3-basic 载体。(B) 双荧光素酶报告基因分析 TGF-β1 可通过 PTBP3 启动子区的 SBE 结合位点调节下游基因的表达。转染质粒 24 小时后加入 TGF-β1, 刺激细胞 24 小时后收集细胞行荧光检测。(C) TGF-β1 刺激 A549 细胞 6 小时后, 收集细胞后行 ChIP-qPCR 检测 p-Smad3 富集到相应 DNA 片段的含量。(D) TGF-β1 通过 p-Smad2/3/4 转录因子促进 PTBP3 的转录和表达的示意图。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , t 检验。

### 3.3.2 沉默 PTBP3 抑制 TGF-β 诱导的肺腺癌 EMT、迁移和侵袭

由于我们发现 TGF-β 可明显促进肺腺癌中 PTBP3 蛋白的表达, 因此我们推测 PTBP3 是否在下游通路上介导 TGF-β 诱导的肺腺癌细胞 EMT、迁移和侵袭。因此, 我们在 A549 细胞内转染 PTBP3 的 siRNA, 瞬时沉默 PTBP3, 行 Western-blot 验证敲减效果 (图 3.4)。

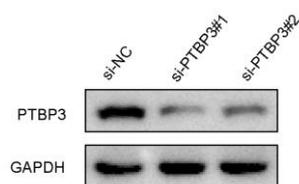


图 3.4 Western-blot 检测 A549 细胞转染 siPTBP3 后转染效率。

然后用 TGF- $\beta$ 1 分别处理对照组 A549 细胞和转染 siPTBP3 的 A549 细胞 24 小时，倒置显微镜下观察细胞形态，我们发现 TGF- $\beta$ 1 处理对照组 A549 细胞后，细胞形态发生明显变化，细胞由典型的鹅卵石样转变为细长的间充质形态，而沉默 PTBP3 后，TGF- $\beta$ 1 处理 A549 细胞，其形态未见明显改变（图 3.5），说明沉默 PTBP3 可抵消 TGF- $\beta$  引起的 A549 细胞形态学变化。

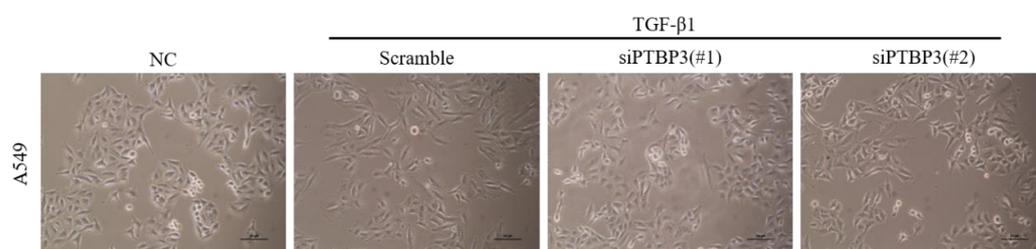


图 3.5 TGF- $\beta$ 1 分别处理对照组和转染 si-PTBP3 的 A549 细胞，倒置显微镜下显示 A549 细胞形态学变化。

EMT 转变过程中具有特征性改变的标志为上皮标志物 E-cadherin 水平的降低，同时伴有间质标志物 N-cadherin 和 Vimentin 的升高，因此我们提取对照组和实验组细胞蛋白，行 Western-blot 检测 EMT 相关标志物的变化，结果显示，TGF- $\beta$ 1 刺激 A549 和 H1299 细胞后，可显著下调 E-cadherin 表达，同时上调 N-cadherin、Vimentin 的表达。而沉默 PTBP3 后，抵消了 TGF- $\beta$ 1 诱导 EMT 相关标志物的改变（图 3.6A）。接下来，我们对不同处理的 A549 细胞行免疫荧光检测，发现在 A549 细胞中，沉默 PTBP3 可抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的上皮标志物 E-cadherin 和间质标志物 Vimentin 的改变（图 3.6B）。综合以上实验结果，我们证实沉默 PTBP3 可抵消 TGF- $\beta$  诱导的肺腺癌 EMT。

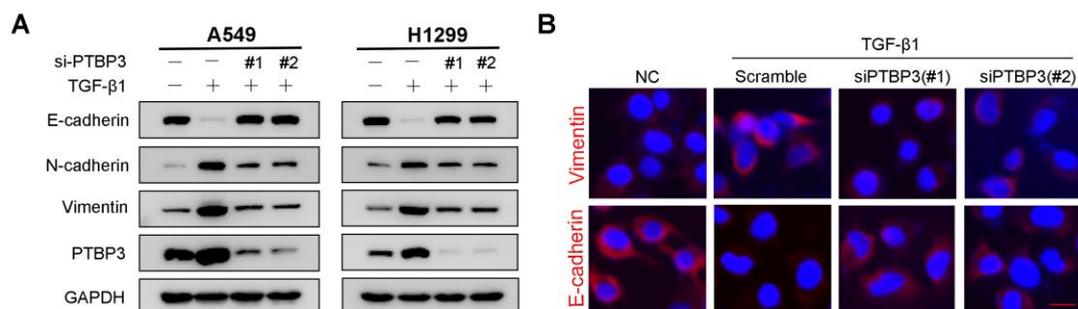


图 3.6 沉默 PTBP3 抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的肺腺癌 EMT。(A) A549 (左) 和 H1299 (右) 细胞转染 siNC 和 siPTBP3 24 小时后, 分别在相应分组内加入 TGF- $\beta$ 1, 处理 24 小时。Western-blot 显示 EMT 标志物 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 的变化。(B) A549 细胞组转染 siNC 和 siPTBP3 24 小时后, 加入 TGF- $\beta$ 1, 处理 24 小时, 细胞免疫荧光显示 EMT 标志物 E-cadherin、Vimentin 的变化。

TGF- $\beta$  与细胞表面受体结合后, 磷酸化胞质内 Smad2/3 蛋白, 随后与 Smad4 形成三聚体, 入核与相应靶基因启动子区的 SBE 位点结合, 继而引起 EMT 标志物蛋白的变化。这些靶基因主要是与 EMT 相关的一些转录因子如 Slug、Snail、PAI-1 等。因此, 接下来, 我们采用 qRT-PCR 和 Western-blot 检测这些靶基因的变化。结果显示, TGF- $\beta$ 1 可显著升高 Slug、Snail、PAI-1 mRNA 和蛋白的表达, 而与对照组相比, 沉默 PTBP3 可显著降低这些靶基因的表达, 证实敲减 PTBP3 可抑制 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路中相关靶基因表达, 继而抑制肺腺癌的 EMT (图 3.7)。

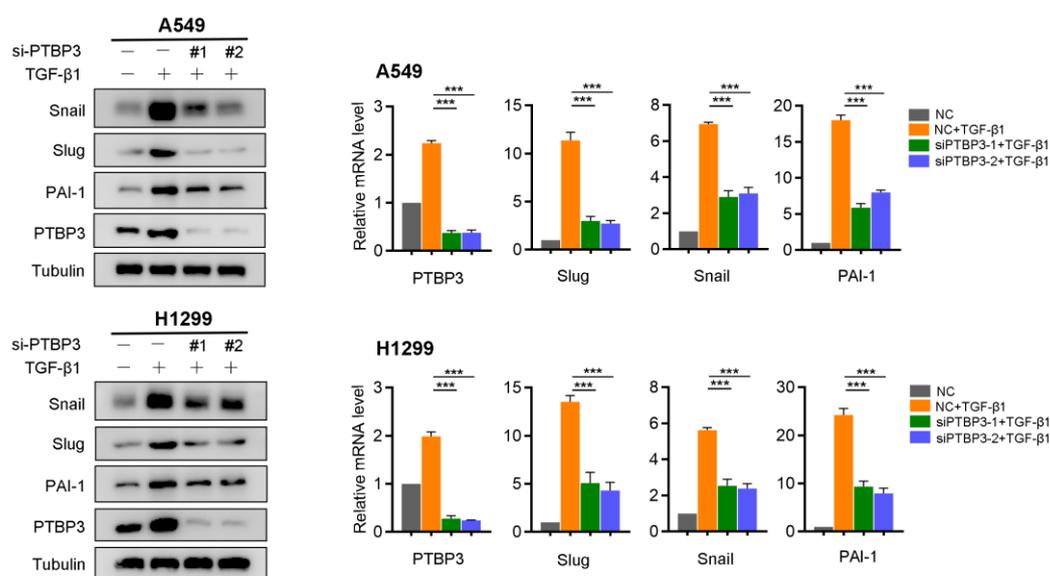


图 3.7 敲减 PTBP3 抑制 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路相关靶基因的表达。A549 和 H1299 转染 siPTBP3 和 siNC 48 小时后, 分别在相应分组内加入 TGF- $\beta$ 1, 处理 24 小时, 然后行 qRT-PCR (右) 和 Western-blot (左) 检测 Slug、Snail、PAI-1 指标的变化。

\*\*\* $P < 0.001$ , t 检验。

TGF- $\beta$  诱导 EMT 的发生, 随后引起细胞之间的粘附减少, 导致细胞迁移和侵袭能力增强。因此接下来, 我们通过 Transwell 实验明确沉默 PTBP3 后对肺腺癌细胞迁移和侵袭能力的变化。发现 TGF- $\beta$ 1 可显著增强对照组 A549 和 H1299 细胞的迁移和侵袭的能力, 但当 TGF- $\beta$ 1 处理用 siPTBP3 转染后的 A549 和 H1299 细胞后, 其增强细胞迁移和侵袭的能力显著减弱 (图 3.8)。

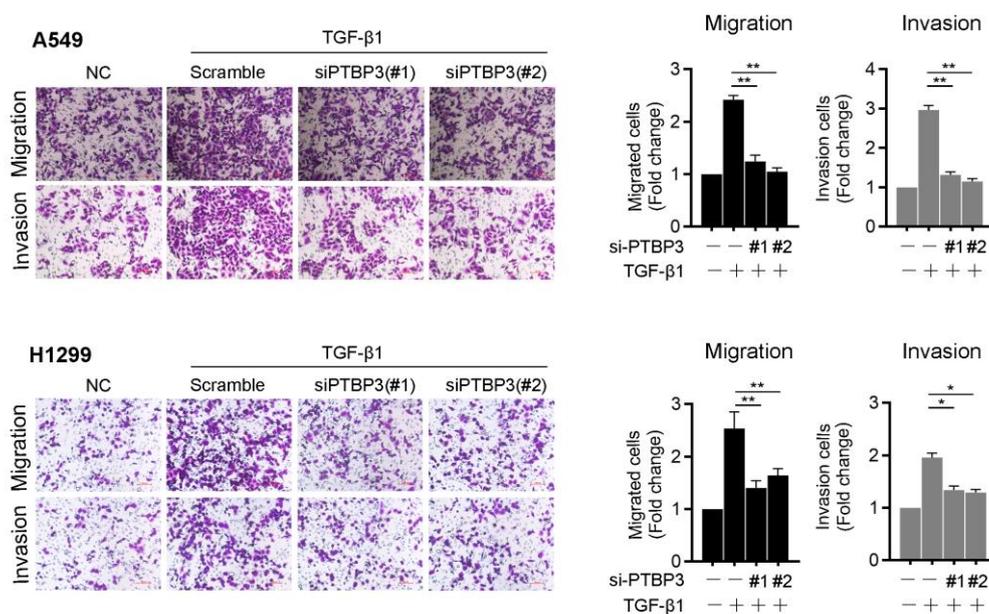


图 3.8 PTBP3 与细胞迁移和侵袭能力的关系。A549 和 H1299 细胞转染 siNC 和 siPTBP3 后，根据不同分组，加入 TGF- $\beta$ 1，Transwell 检测细胞迁移和侵袭能力的变化。 $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ，t 检验。

为了排除细胞增殖对迁移和侵袭的影响，我们采用 CCK-8 检测敲减 PTBP3 对 A549 和 H1299 细胞增殖能力的变化。发现与对照组相比，敲减 PTBP3 不影响 A549 和 H1299 的增殖能力（图 3.9）。

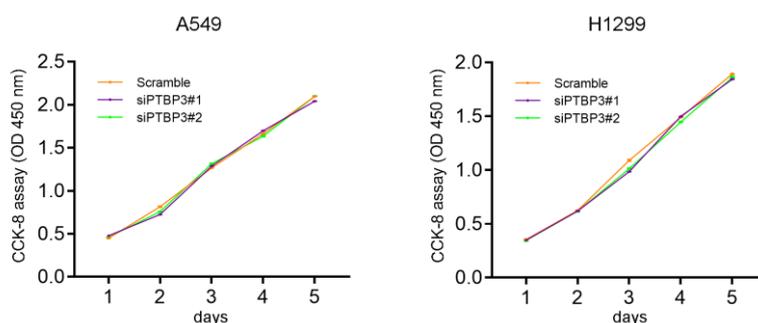


图 3.9 PTBP3 与细胞增殖的关系。A549 和 H1299 细胞转染 siNC 和 siPTBP3 后，在不同的时间点，采用 CCK-8 检测细胞增殖能力的变化。

### 3.3.3 PTBP3 通过激活 Smad2/3 的表达促进肺腺癌 EMT

为了探究 PTBP3 影响 TGF- $\beta$  诱导的肺腺癌 EMT、细胞迁移和侵袭的分子机制，我们进一步研究了 PTBP3 是否影响 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路中的关键分子。首先我们通过设计针对不同 Smad 基因的引物，在 A549 和 H1299 细胞内转染

PTBP3 的 siRNA 后行 qRT-PCR 检测这些蛋白转录本的表达变化，发现 Smad2、Smad3 转录本在 siPTBP3 组表达显著降低，而 Smad1、Smad4、Smad5、Smad7 表达无明显变化(图 3.10A)。为此，我们进一步在转染 siPTBP3 的 A549 和 H1299 细胞，通过 Western-blot 检测 Smad2、Smad3、Smad4 蛋白的变化，结果显示，PTBP3 的下调显著抑制了 Smad2、Smad3 蛋白的表达，却不影响 Smad4 蛋白的表达(图 3.10B)。

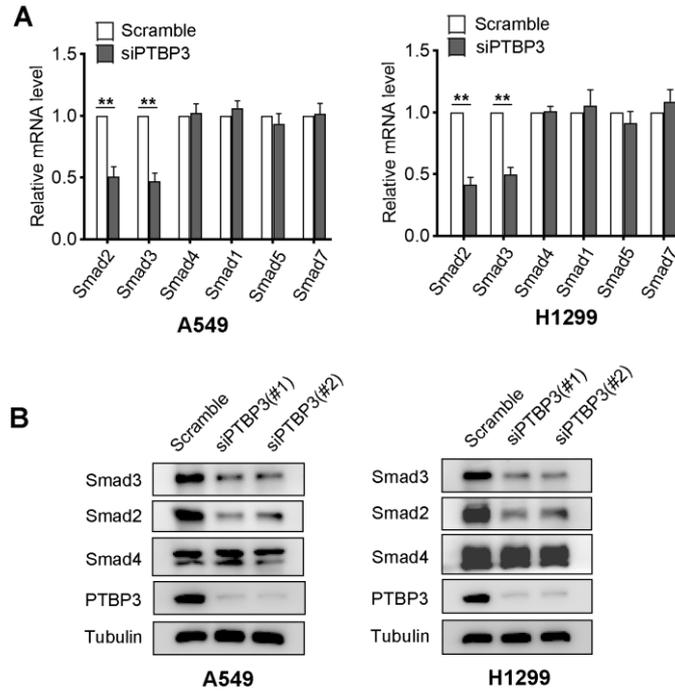


图 3.10 PTBP3 与 Smad2/3 蛋白表达之间的关系。(A)qRT-PCR 检测各组细胞 Smad1、Smad2、Smad3、Smad4、Smad5 及 Smad7 的表达变化。(B) Western-blot 检测各组细胞 Smad2、Smad3 及 Smad4 蛋白的表达变化。\* $P < 0.01$ , t 检验。

此外，我们进一步行 Western-blot 检测 PTBP3 对 p-Smad2/3 的影响。发现 PTBP3 的下调显著降低 A549 细胞内总 Smad2/3 以及 p-Smad2/3 的表达。相反，PTBP3 的过表达明显升高了细胞内总 Smad2/3 以及 p-Smad2/3 的表达(图 3.11)。

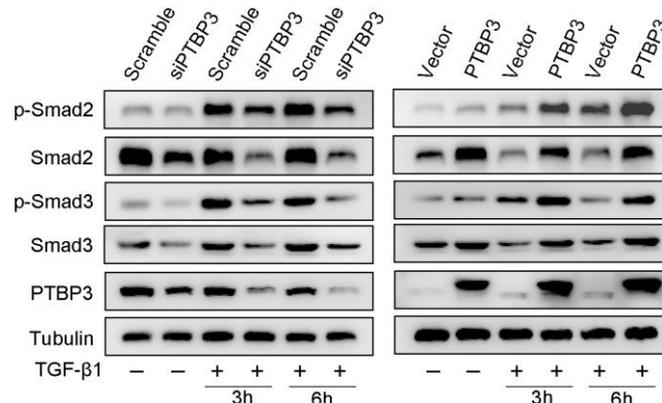


图 3.11 A549 细胞转染 siPTBP3 或过表达质粒后, TGF- $\beta$ 1 (5ng/ml) 分别刺激细胞 3 小时和 6 小时后, Western-blot 检测细胞内总 Smad2/3 以及 p-Smad2/3 的表达变化。

TGF- $\beta$  主要通过经典 Smad 信号通路诱导细胞的 EMT, 除此之外, TGF- $\beta$  还可以通过非 Smad 依赖的信号通路来介导 EMT 的发生。这些非 Smad 依赖的信号通路中, 主要包括 MEK/ERK 通路和 PI3K/AKT 通路。因此, 接下来我们通过 Western-blot 检测过表达 PTBP3 后是否影响上述通路关键蛋白的表达。结果显示, 在 A549 细胞中过表达 PTBP3 并不影响 MEK、Erk、Akt 蛋白和相应的磷酸化蛋白表达 (图 3.12A)。综合以上结果, 本研究证实 PTBP3 主要通过激活 Smad2/3 蛋白的表达及其磷酸化, 促进肺腺癌 EMT 的发生 (图 3.12B)。

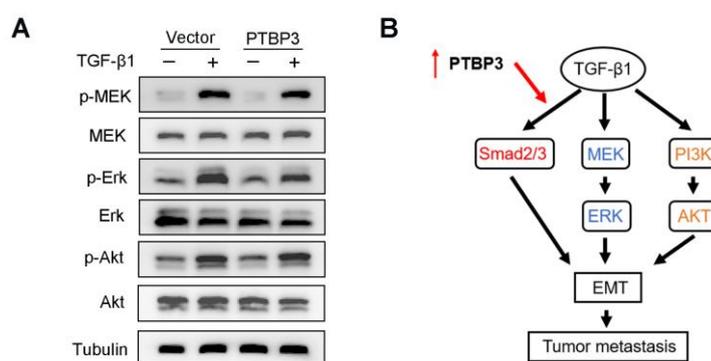


图 3.12 (A) A549 细胞转染过表达质粒后, TGF- $\beta$ 1 刺激细胞 24 小时后, Western-blot 检测细胞内 Akt、Erk、MEK 以及 p-Akt、p-Erk、p-MEK 蛋白的表达。(B) PTBP3 主要通过激活 Smad2/3 的表达来促进 TGF- $\beta$ 1 诱导的肺腺癌 EMT (示意图)。

### 3.3.4 PTBP3 在肺腺癌组织中与 Smad2/3 表达呈明显正相关。

为了明确 PTBP3 在肿瘤组织中与 Smad2、Smad3 表达的相关性, 我们通过检索 GEPIA 数据库, 发现在多种癌症中, PTBP3 mRNA 表达水平与 Smad2、Smad3 mRNA 呈明显正相关 (图 3.13)。证明 PTBP3 mRNA 在泛癌中均与 Smad2、Smad3 mRNA 的表达相关。

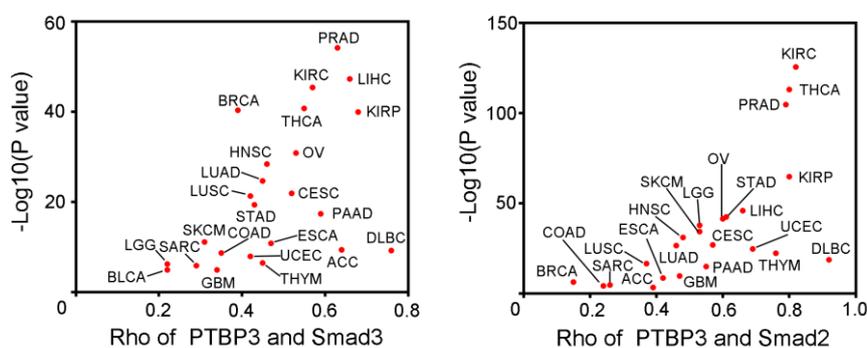


图 3.13 GEPIA 数据库分析在泛癌中 PTBP3 mRNA 与 Smad2、Smad3 mRNA 的相关性。Spearman 相关分析计算相关系数  $\rho$  和  $P$  值。红点表示  $P < 0.05$ 。

为了进一步探究肺腺癌中 PTBP3 与 Smad2/3 蛋白表达的相关性，我们对包括 30 例肺腺癌的组织芯片进行免疫组化分析，检测 PTBP3 和 Smad2/3 蛋白的表达。按照第二章免疫组化评分方法对结果进行染色评分。通过分析 PTBP3 和 Smad2/3 蛋白表达评分，发现在肺腺癌组织中 PTBP3 与 Smad2/3 蛋白表达水平存在显著正相关（图 3.14）。通过以上分析，证实在肺腺癌组织中 PTBP3 与 Smad2/3 表达呈正相关。

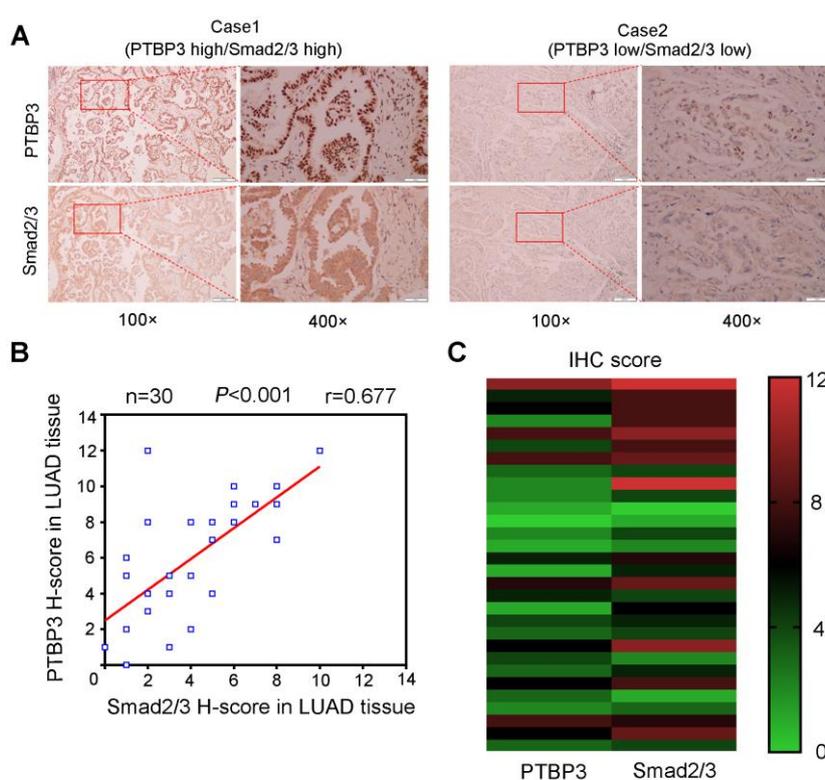


图 3.14 PTBP3 蛋白在肺腺癌组织中与 Smad2/3 蛋白表达呈正相关。(A) 免疫组化显示肺腺癌中 PTBP3 与 Smad2/3 表达的示意图。(B) 根据染色评分结果，Pearson 相关分析计算相关系数  $r$  和  $P$  值。(C) 热图显示肺腺癌中 PTBP3 与 Smad2/3 表达的相关性。

### 3.4 讨论

肺癌是世界范围内死亡率最高的恶性肿瘤之一。现阶段，肺癌的发病率仍在逐渐上升，全球每年新发肺癌患者约 210 万，约占总体新发恶性肿瘤病例的 12%。其死亡率接近 90%，每年约 180 万患者死于肺癌[1]。多数患者治疗失败，导致

肿瘤复发和转移，也是导致高死亡率的重要原因。对于驱动基因阳性的患者，多采用手术联合靶向治疗；驱动基因阴性的患者多采用放化疗联合免疫治疗。由于治疗差异和耐药，导致治疗效果不佳。因此寻找新的肺癌治疗靶点，具有重大的临床实践意义。

肿瘤转移是多阶段、多基因参与的复杂过程，EMT 被认为是恶性肿瘤侵袭和转移的起始步骤。TGF- $\beta$  作为 EMT 主要的诱导因子，在肺癌组织中呈高表达 [37, 38]。其主要通过经典的 Smad 通路诱导肺腺癌 EMT，在肺腺癌的侵袭和转移中发挥重要作用。PTBP3 作为一种 RNA 结合蛋白，既往被证实与肺腺癌细胞的迁移和运动有关 [33]，这促使我们进一步探索 PTBP3 在 TGF- $\beta$  诱导肺腺癌 EMT 中发挥的作用。在本研究中，我们的结果显示在肺腺癌细胞中，TGF- $\beta$ 1 能够显著上调 PTBP3 的蛋白表达。然而 TGF- $\beta$ 1 是如何调控 PTBP3 蛋白的表达，其潜在机制又是什么？既往研究显示，TGF- $\beta$ 1 通过激活下游 Smad2/3/4 转录复合体，该转录复合体直接结合在 DOCK4 基因启动子近端的内含子区域的 SBE 结合位点，促进该基因的表达，继而介导 TGF- $\beta$  的促转移作用 [39]。同样，TGF- $\beta$  诱导的 Smad2/3/4 复合体直接结合在 EPB41L5 启动子区域的 SBE 结合位点，激活其转录和表达，进而促进 TGF- $\beta$  驱动的转移作用 [40]。另外，TGF- $\beta$ 1 通过上调转录因子 c-Jun 的表达和活性，该转录因子结合在 HtrA3 的启动子区并抑制其转录过程，而 HtrA3 在下游通路上抑制 TGF- $\beta$ 1 介导的侵袭转移 [41]。在本研究中，我们通过检索 JASPAR 网站，在 PTBP3 启动子区域发现两个 SBE 结合位点，通过实验进一步证实，TGF- $\beta$ 1 激活的 Smad2/3/4 转录复合体能够直接靶向结合在 PTBP3 启动子区的 SBE 结合位点，促进 PTBP3 的转录和表达，这在一定程度上也解释了 PTBP3 在肺腺癌组织中呈高表达的原因。

那么既然 TGF- $\beta$ 1 上调 PTBP3 的表达，PTBP3 是否又会在下游调控 TGF- $\beta$  介导的肺腺癌侵袭和转移呢？通过在肺腺癌细胞中干扰 PTBP3 的表达，我们发现 PTBP3 的下调可显著抑制 TGF- $\beta$  诱导的肺腺癌 EMT、迁移和侵袭能力。同时我们还发现敲减 PTBP3 后可显著抑制 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路中 Slug、Snail、PAI-1 等与 EMT 相关的转录因子的表达。这些结果初步提示 PTBP3 可能是通过调控 TGF- $\beta$ /Smad 通路进而诱导肺腺癌的 EMT、迁移和侵袭。

TGF- $\beta$  家族成员、受体及其下游通路分子的变化在肿瘤侵袭和转移中扮演者重要的角色 [42]。多种分子参与调控 TGF- $\beta$ /Smad 通路中的关键分子，进而影响肺腺癌 EMT 的发生。目前研究多集中在对 TGF- $\beta$  受体和 Smad 蛋白的调控上。事实上，许多分子在转录或是转录后水平参与对 TGF- $\beta$  受体和 Smad 蛋白的调控 [43-46]。其中，作为通路中的关键蛋白，Smad2/3/4 受到多种因素的调节。例

如, Tang 等人的研究发现 Profilin-2 能够抑制组蛋白去乙酰化酶 HDAC1 的核转位,阻止 HDAC1 被招募到 Smad2 和 Smad3 的启动子,最终导致 Smad2 和 Smad3 的转录激活[43]。肌酸被报道能够通过 MPS1 激活 Smad2/3 的表达,进而促进直肠癌和乳腺癌的转移,缩短小鼠的生存期[47]。SIRT7 调控 Smad4 的去乙酰化抑制 TGF- $\beta$  通路,从而抑制乳腺癌肺转移[48]。这些研究结果促进我们去探索 PTBP3 是否影响 Smad 系列蛋白的表达,进而影响了 TGF- $\beta$  诱导的肺腺癌 EMT。通过在肺腺癌细胞中敲减 PTBP3 的表达后检测多种 Smad 基因的表达变化,我们发现沉默 PTBP3 后, Smad2 和 Smad3 的转录本表达显著降低,但对 Smad1、Smad4、Smad5、Smad7 的转录本表达却无明显影响,蛋白免疫印迹分析进一步显示沉默或过表达 PTBP3 明显减低或提高了细胞内总的 Smad2/3 蛋白及其磷酸化表达水平。同时,我们在组织样本里的研究也证实了我们的结论。我们发现,在肺腺癌组织中 PTBP3 蛋白表达与 Smad2/3 蛋白表达是呈显著正相关的。TGF- $\beta$  除了经典的 Smad 通路诱导肺腺癌 EMT,还可通过调节活化 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 在内的多种信号分子,介导肺腺癌 EMT[12]。因此,通过检测过表达 PTBP3 后上述信号分子的变化,发现 MEK、ERK、AKT 及其相应磷酸化蛋白表达水平并没有明显改变。这提示我们,在肺腺癌细胞中,PTBP3 可主要通过激活 Smad2/3 的表达及其磷酸化从而促进 TGF- $\beta$  诱导的 EMT、迁移和侵袭。

因此,我们研究首次证实了在肺腺癌细胞中,TGF- $\beta$ 1 可正向调控 PTBP3 基因的表达。更为重要的是我们发现 PTBP3 可通过激活 Smad2/3 的表达及磷酸化,增强 TGF- $\beta$  诱导的 EMT 并促进肺腺癌的迁移和侵袭。PTBP3-Smad2/3 形成的正反馈环可能是介导 TGF- $\beta$  诱导肺腺癌 EMT 的关键因素。事实上,也有相关研究显示在肺腺癌中,TGF- $\beta$ 1 通过诱导 PREP1 的表达,继而 PREP1 通过结合在 Smad3 基因第一个内含子区域 PREP 保守序列促进 Smad3 的转录和表达,介导 TGF- $\beta$  诱导的转移[49]。此外,TGF- $\beta$  诱导的 Smad3/4 转录复合体直接结合在 MYOCD 基因的启动子区 SBE 结合位点,促进其转录和表达,反过来,MYOCD 通过与 Smad3/4 复合物结合,促进 TGF- $\beta$  诱导的下游基因的表达[50]。除此之外,TGF- $\beta$  还可诱导多种非编码 RNA,进一步调控 TGF- $\beta$  诱导的肺癌侵袭和转移[51, 52]。这种 TGF- $\beta$  调控的编码基因和非编码基因,以及他们与下游通路广泛存在的相互作用方式增加了 TGF- $\beta$  信号通路的复杂性。

简而言之,我们的研究首次证实了在肺腺癌细胞中,TGF- $\beta$  可通过 Smad2/3 依赖的方式,调节 PTBP3 的转录和表达,反过来,PTBP3 通过促进 Smad2/3 的表达及磷酸化从而介导 TGF- $\beta$  诱导的 EMT 和肺腺癌侵袭。该研究揭示 PTBP3-Smad2/3 轴向调控 TGF- $\beta$  诱导 EMT 和肺腺癌侵袭转移的新机制。

## 第 4 章 PTBP3 在小鼠体内促进肺腺癌的转移

### 4.1 材料

#### 4.1.1 实验动物

本实验所用的 4~6 周龄的雌性 BALB/c 裸鼠 (SPF 级别) 购于上海市斯莱克实验动物有限公司。随机分为 2 组, 每组 10 只。实验动物饲养于上海市同济医院动物实验中心 (SPF 级)。本研究经上海市同济医院动物伦理委员会批准。

#### 4.1.2 实验细胞

同正文第二章。

#### 4.1.3 实验试剂

##### 4.1.3.1 细胞培养及转染试剂

同正文三章实验试剂部分。

##### 4.1.3.2 Western-blot 实验试剂

|                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| PTBP3 抗体 (sc-100845)             | Santa Cruz |
| EMT Antibody Sampler Kit (#9782) | CST        |
| GAPDH 抗体 (ab181602)              | Abcam      |
| 山羊抗兔 HRP 预吸附二抗 (#ab97080)        | Abcam      |
| 山羊抗小鼠 HRP 预吸附二抗 (#ab205719)      | Abcam      |

##### 4.1.3.3 qRT-PCR 试剂

|  |        |
|--|--------|
| RNA <sup>fast200</sup> 极速抽提试剂盒                     | 上海飞捷生物 |
| Evo M-MLV RT Premix for qPCR                       | 艾克瑞生物  |
| SYBR <sup>®</sup> Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit | 艾克瑞生物  |

##### 4.1.3.4 免疫组化及 HE 染色试剂

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Bouin 固定液 (100ml) | 上海科汇生物 |
| 苏木素伊红 (HE) 染色试剂盒  | 索莱宝    |

p-Smad3 (#9520)

CST

余免疫组化试剂同正文第一章部分

#### 4.1.4 实验仪器

|                    |               |
|--------------------|---------------|
| 烤片机 LEICA HI1220   | 德国 Leica 公司   |
| 石蜡切片机 LEICA RM2243 | 德国 Leica 公司   |
| 自动脱水机 LEICA TP1020 | 德国 Leica 公司   |
| 摊片机 LEICA HI1210   | 德国 Leica 公司   |
| 冰台 LEICA EG1150    | 德国 Leica 公司   |
| 正置显微镜              | 日本 Olympus 公司 |

## 4.2 方法

### 4.2.1 慢病毒转染构建稳转细胞系

① 细胞铺板：本研究选择 A549 细胞作为目的细胞，转染前，将细胞铺到六孔板中，使第二天，细胞密度在 50%~60% 左右。

② 病毒转染：次日，用含有 5 $\mu$ g/ml polybrene 的 2ml 培养基替换六孔板内的原有培养基，加入适量病毒悬液，放入培养箱继续培养 24 小时后，用新鲜培养基替换原培养基。

③ 阳性细胞筛选：继续培养细胞 48~72 小时，在培养基中加入 2 $\mu$ g/ml 的嘌呤霉素筛选，期间观察有无大量漂浮细胞，如有则及时进行换液。或者每 2 天进行细胞常规换液。

④ 验证感染效率：嘌呤霉素筛选后，无细胞死亡，细胞状态趋于稳定时，继续添加含有嘌呤霉素的培养基维持培养 1~2 周，提取细胞 RNA 和蛋白，行 PCR 和 Western-blot 检测目的基因的相对表达量，评估转染效率。

### 4.2.2 构建 BALB/c 小鼠肺癌转移模型

#### 4.2.2.1 实验动物饲养及分组

选自 4 周龄雌性 BALB/C 裸鼠 (SPF 级别) 20 只，于上海市同济医院动物实验中心 (SPF 级) 适应性饲养 1 周。1 周后，将裸鼠随机分为两组，每组 10 只，标记分组，实验分组分别为：对照组 (NC 组)、PTBP3 过表达组 (PTBP3 组)。每组分两笼内饲养，由专人管理，保证喂养环境的温度及湿度适宜，基础

饲料喂养，自由饮水。每周更换 2 次垫料。人员出入严格遵守无菌原则，保证小鼠饲养环境的无菌。

#### 4.2.2.2 动物模型的建立

① 细胞准备：分别取对数期生长的对照组和 PTBP3 过表达组 A549 细胞株，培养在 T75 培养瓶中，经传代、扩增细胞后，于收集细胞前一晚更换新鲜培养基。当细胞汇合度达 80%~90%时，经胰蛋白酶消化后，用 PBS 洗涤 2 次，1000rpm 离心 5 分钟，DM/EM 培养基重悬细胞，细胞计数，制备成  $2 \times 10^7$ /ml 单细胞悬液。

② 成瘤：将小鼠放入尾静脉注射固定器中，拇指及食指夹住鼠尾，碘伏消毒后，用胰岛素针吸取上述制备好的细胞悬液 200 $\mu$ l ( $4 \times 10^6$  细胞)。经尾静脉缓慢注射，注射速度不宜过快。退出进针口后迅速用海绵球压住进针口，防止漏液。

③ 腹腔给药：于尾静脉注射肿瘤细胞 5 天后，经小鼠腹腔注射重组 TGF- $\beta$ 1，按每只小鼠 4 $\mu$ g/kg 的剂量给药，以促进 A549 细胞的转移和定值。以后每隔 5 天给药一次，直至小鼠处死前。腹腔注射具体操作如下：左手固定小鼠于掌中，保持小鼠仰卧，腹部碘伏消毒后，抽取适量重组 TGF- $\beta$ 1，于小鼠右下肢靠内侧进针，有落空感后缓慢推药，操作轻柔，避免损伤小鼠。

④ 观察和记录：尾静脉注射肿瘤细胞后每隔 3 天，记录小鼠体重，体重下降超过 2g，需立即中止实验。给予小鼠注射 A549 细胞后 2 周，处死对照组和实验组老鼠各一只，解剖取出肺组织，大体观察小鼠肺部成瘤情况。以后每隔两周各处死一只小鼠，定期监测小鼠肺部成瘤情况，2 月后处死小鼠，结束实验。

⑤ 标本取材、固定和切片：裸鼠经腹腔注射水合氯醛麻醉后，左手拇指和食指固定住鼠头，右手抓住鼠尾，然后向后上方用力一拉，使小鼠颈椎脱臼死亡。将小鼠四肢固定，保持仰卧位，切开颈、胸、腹皮肤，先游离颈部气管，近端气管结扎后，经气管向肺部注射 PBS 溶液，使肺膨胀，便于分离，完整取出肺组织后再取出肝脏组织。将取出的肺和肝脏组织放入 Bouin 固定液，固定 1 小时后取出，大体观察肺部及肝脏表面转移结节，拍照后，继续于 Bouin 固定液中固定 24 小时，常规石蜡包埋，切片以及 HE 染色。

#### 4.2.3 HE 染色

① 取材组织块，经固定后，常规石蜡包埋，切片。

② 脱蜡前将组织蜡块切片放置于 60 $^{\circ}$ C 烘箱中，烘烤 60 分钟；将烘烤后的切片立即浸入二甲苯 I、II、III 各 10 分钟，随后依次浸入 100%乙醇，95%乙醇，80%乙醇，70%乙醇各 5 分钟；蒸馏水浸泡 5 分钟，而后将切片放置 PBS 中，摇

床冲洗 3 次，每次 5 分钟。

③ 将苏木素染液滴在组织切片上，染色 5 分钟后蒸馏水冲洗，洗去浮色。

④ 分化液分化 3 分钟，自来水冲洗 2 次，每次 2 分钟。

⑤ 将伊红染液滴在组织切片上，染色 1 分钟，蒸馏水冲洗数秒，快速脱水。

⑥ 将切片依次浸入低浓度至高浓度的梯度酒精以及二甲苯 I，二甲苯 II，二甲苯 III 各 5 分钟。中性树胶封片，镜下观察拍照。

#### 4.2.4 Western-blot 实验

组织裂解物蛋白提取：新鲜小鼠肺组织取出后，切取 100mg 的肿瘤组织，置入液氮中速冻，然后将速冻后的组织块置入研磨器中研磨成粉状。将粉状的组织移入 1.5ml EP 管内，加入 1ml 的含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液。用匀浆器每次 30s 低速匀浆，直至组织完全裂解，置入冰上裂解 1 小时。后于 4°C，12000g 离心 15 分钟，将上清液转移至新的 EP 管内，弃去沉淀，将样品保存在-80°C 冰箱或进行下一步实验。

余实验步骤同正文第二章 Western-blot 部分。

#### 4.2.5 Real-time PCR 定量

实验步骤同正文第三章 qRT-PCR 部分。

#### 4.2.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 进行统计学分析，Student's t 检验用于比较两组独立的数据。 $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

### 4.3 结果

#### 4.3.1 PTBP3 在小鼠体内促进肺腺癌的转移

为了构建稳定过表达 PTBP3 的 A549 细胞系，我们将人源 PTBP3 的全长的 cDNA 克隆至慢病毒载体质粒 pSLenti-EF1-F2A-Puro-CMV-3×FLAG-WPRE 中。将构建好的质粒转染到 HEK 293T 细胞中，收集病毒上清液，随后我们用收集包装好的慢病毒转染 A549 细胞 72 小时，经 2μg/ml 嘌呤霉素筛选，最终获得稳定过表达 PTBP3 的 A549 细胞系。提取细胞蛋白和 RNA，行 Western-blot 和 PCR 检

测 PTBP3 在稳定过表达 A549 系中的表达水平。结果显示成功构建了过表达 PTBP3 的 A549 细胞株 (图 4.1)。

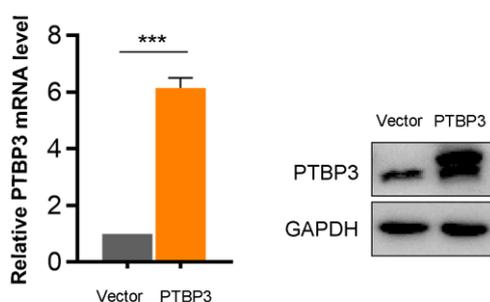


图 4.1 Western-blot 和 qRT-PCR 检测 A549 细胞转染 PTBP3 慢病毒效率。

由于我们已经在体外细胞系证实 PTBP3 介导 TGF- $\beta$  诱导的肺腺癌 EMT、迁移和侵袭。因此接下来, 我们进一步探究 PTBP3 在体内对肺腺癌转移和定植能力的影响。因此, 我们构建了经尾静脉注射 A549 细胞的肿瘤转移模型。分别经尾静脉注射对照组 A549 细胞 (A549<sup>NC</sup>) 和 PTBP3 稳定过表达的 A549 细胞 (A549<sup>PTBP3</sup>), 每隔 5 天经小鼠腹腔注射重组 TGF- $\beta$ 1 以促进肿瘤转移, 2 月后处死小鼠, 拍照并肉眼计数肺组织表面的转移结节。肉眼见, A549<sup>PTBP3</sup> 组小鼠肺部转移结节比 A549<sup>NC</sup> 组小鼠肺部转移结节数量显著增多 (图 4.2)。但无论是在 A549<sup>NC</sup> 组还是 A549<sup>PTBP3</sup> 组, 我们在小鼠肝脏表面均未发现肉眼可见的转移结节。

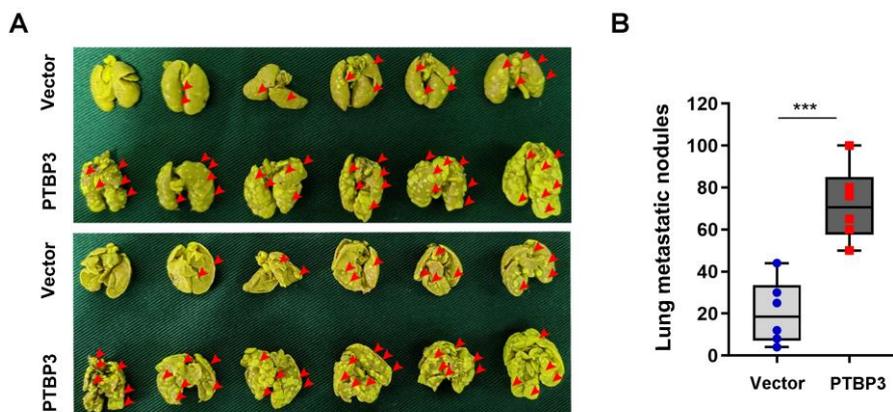


图 4.2 PTBP3 在小鼠体内对肺腺癌转移能力的影响。(A) Bouin 固定液固定小鼠肺组织 (n=6)。上图为前面观, 下图为后面观。红色箭头表示肺部转移结节。(B) A549<sup>NC</sup> 组和 A549<sup>PTBP3</sup> 组小鼠肺部转移结节数量统计分析; \*\*\* $P < 0.001$ , t 检验。

将以上两组小鼠肺组织和肝组织固定, 石蜡包埋, 切片和 HE 染色, 显微镜下比较各组肺和肝脏微转移结节的数量。HE 染色结果显示, A549<sup>PTBP3</sup> 组小鼠肺部微小转移灶较 A549<sup>NC</sup> 组显著增多 (图 4.3A)。我们在两组小鼠肝脏虽未发现任何肉眼可见的转移结节, 但 HE 染色结果显示, 相对于 A549<sup>NC</sup> 组, A549<sup>PTBP3</sup> 组小鼠肝脏微小转移结节明显增多 (图 4.3B)。

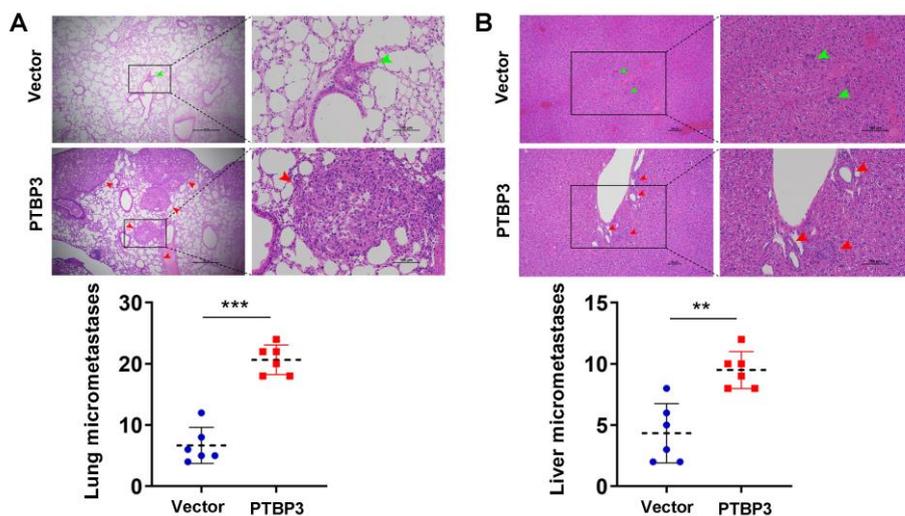


图 4.3 小鼠肺和肝脏组织 HE 染色。(A) 小鼠肺组织的 HE 染色代表图及统计分析。(B) 小鼠肝脏组织的 HE 染色代表图及统计分析。绿色箭头指示 A549<sup>NC</sup> 组转移结节灶，红色箭头指示 A549<sup>PTBP3</sup> 组转移结节灶。\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ，t 检验。

### 4.3.2 PTBP3 在 小 鼠 体 内 促 进 TGF- $\beta$ /Smad 诱 导 的 EMT

为进一步评估 PTBP3 在 小 鼠 体 内 对 TGF $\beta$ /Smad 诱 导 EMT 相 关 蛋 白 的 影 响，我们对两组小鼠肺组织切片采用 p-Smad3 抗体行免疫组化分析，发现 A549<sup>PTBP3</sup> 组小鼠肺部瘤体内 p-Smad3 蛋白表达明显升高（图 4.4A），这提示 PTBP3 在体内可明显激活 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路。因为 TGF- $\beta$ /Smad 通路，最终引起 EMT 的发生，使细胞之间粘附性减低，使肿瘤细胞侵袭和转移性增强。因此，我们进一步提取各组小鼠肺部瘤体组织蛋白，行 Western-blot 检测 EMT 相关指标，结果显示，A549<sup>PTBP3</sup> 组小鼠瘤体 E-cadherin 表达明显降低，而间质指标 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达明显升高（图 4.4B）。以上结果进一步证实 PTBP3 在 小 鼠 体 内 促 进 肺 腺 癌 的 远 处 转 移 和 定 植 能 力，与 我 们 体 外 的 研 究 结 论 一 致。

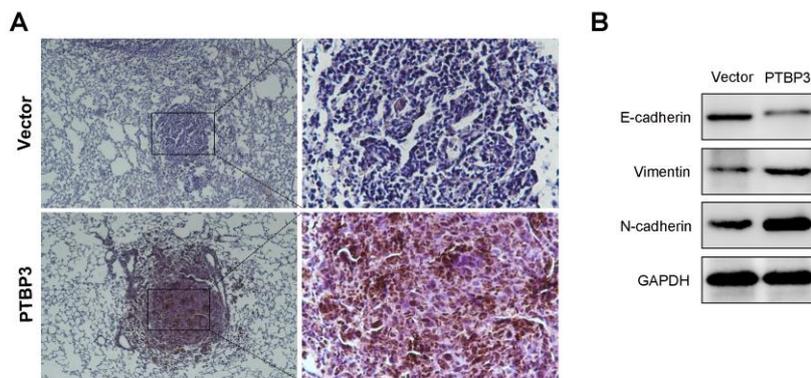


图 4.4 (A) 免疫组化检测 p-Smad3 在各组小鼠肺部瘤体组织中的表达水平。(B) Western-blot 检测 EMT 标志物 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 在各组小鼠肺部瘤体组织中的表达水平。

## 4.4 讨论

对于早期肺癌的诊治，目前是以手术治疗为主的综合治疗。对于晚期肺癌患者，仍采用放化疗为主的综合治疗。随着分子驱动基因及针对免疫抑制点的分子靶向治疗的发展，肺癌的治疗已取得长足的进步。

近年来，肿瘤的免疫疗法开始受到广泛的关注。越来越多的研究表明，免疫检查点在肿瘤进展过程中发挥了重要作用，其中程序性死亡因子（programmed cell death 1, PD-1）与其配体（PD-1 ligand, PD-L1）结合后通过免疫逃逸发挥免疫抑制作用，从而逃避免疫杀伤清除，减弱肿瘤微环境免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤能力[53]。PD-1 与配体结合后，下调 mTOR、AKT、ERK2 等相关信号通路的活化，同时上调 PTEN 等基因的表达，促进调节性 Treg 的产生，抑制干扰素- $\gamma$ （interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ）和肿瘤坏死因子- $\alpha$ （tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ）的分泌，最终抑制效应 T 细胞的增殖，发挥负向调控 T 细胞活性的作用[54]。因此靶向 PD-1/PD-L1 通路可显著增强肿瘤微环境中的免疫活性，恢复免疫细胞对肿瘤的杀伤作用，从而达到抑制肿瘤生长的目的。目前多项临床试验已证实 PD-1 单抗如 Pembrolizumab 在非小细胞肺癌、食管-胃交界处肿瘤、胃癌、胰腺癌等实体肿瘤中具有良好的抗肿瘤活性[55, 56]，尤其是免疫抑制剂在非小细胞肺癌中的应用更加普遍。但目前临床上仍有相当比例的肺癌患者对免疫抑制剂反应不佳或出现原发性及继发性耐药[57, 58]，晚期非小细胞肺癌患者的总体生存时间依然不理想。在精准治疗时代，彻底了解肺癌发生、发展的分子机制，系统确定异常表达基因在肺癌发展中的作用，为肺癌提供新的治疗靶点是目前亟待解决的重要科学问题。

在前文我们介绍到，PTBP3 此前被报道在多种肿瘤均发挥促癌作用。PTBP3 在乳腺癌、肝癌、胰腺癌、胃癌、结直肠癌等多种肿瘤的体内小鼠模型中具有促进肿瘤增殖和转移的作用[29-31, 35, 36]。然而既往缺乏 PTBP3 在肺癌中的动物实验研究。在上文中，我们通过体外细胞实验证实 PTBP3 可通过促进 TGF- $\beta$ /Smad 通路，增强肺腺癌细胞的侵袭和转移能力。因此，为了明确 PTBP3 在体内是否可促进肺腺癌细胞的远处转移和定植能力，本研究通过经裸鼠尾静脉注射 A549 细胞，构建动物转移模型，进一步证实 PTBP3 不仅可在体外肺腺癌系中通过调控 TGF- $\beta$ /Smad 通路介导肺腺癌 EMT 和侵袭，还可在体内促进小鼠的肺转移和

肝脏转移。综上所述，本研究证实 PTBP3 在肺腺癌的侵袭和转移中发挥重要作用，为未来采用 PTBP3 分子抑制剂靶向治疗中晚期肺癌提供理论基础。

## 第 5 章 结论与展望

### 5.1 结论

① PTBP3 在肺腺癌肿瘤组织高表达，PTBP3 高表达的患者生存期更短，PTBP3 可作为评估肺腺癌预后的独立危险因素。

② 研究揭示了 TGF- $\beta$ 1 可通过 Smad 依赖的方式促进 PTBP3 的转录和表达，这在一定程度上解释了 PTBP3 在肿瘤组织中高表达的原因。同时，我们还发现，PTBP3 作为调节 TGF- $\beta$ /Smad 通路不可或缺的重要分子，在下游通路上通过调节 Smad2/3 的表达及其磷酸化水平，介导 TGF- $\beta$  诱导的 EMT。PTBP3-Smad2/3 之间形成的正反馈通路，可能是肺腺癌侵袭和转移的关键分子通路。

③ 体内裸鼠转移模型进一步证实在体内 PTBP3 显著促进肺腺癌肺转移和肝转移。总之，本研究首次明确 PTBP3 介导 TGF- $\beta$  诱导肺腺癌 EMT 发生的分子机制，在肿瘤精准治疗时代，为肺腺癌的诊治提供新的潜在靶点。

### 5.2 进一步工作的方向

本文的研究虽然初步探明了 PTBP3 作为参与调节 TGF- $\beta$  通路的一个关键分子，但 PTBP3 如何调节 Smad2/3 的表达，是未来我们进一步的研究方向。PTBP3 作为一种 RNA 结合蛋白，主要参与 RNA 选择性剪切，在转录后调节方面发挥重要作用，既往研究也表明其在恶性肿瘤发挥的促癌作用多是通过选择性剪切肿瘤发生发展过程中的关键调控基因实现的。因此我们推测 PTBP3 极有可能通过直接选择选择性剪切 Smad2/3 前体 RNA 或者间接剪切调控 Smad2/3 的某些关键基因，从而实现对其在转录水平进行调控。本项研究发现也促进我们进一步探索其中更为详细的分子机制。

## 参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7~33.
- [2] Kuhn E, Morbini P, Cancellieri A et al. Adenocarcinoma classification: patterns and prognosis. *Pathologica*, 2018, 110(1): 5~11.
- [3] Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet*, 2017, 389(10066): 299~311.
- [4] Acloque H, Adams MS, Fishwick K et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1438~1449.
- [5] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1420~1428.
- [6] Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(3): 212~226.
- [7] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178~196.
- [8] Dennler S, Itoh S, Vivien D et al. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *Embo j*, 1998, 17(11): 3091~3100.
- [9] Moustakas A, Heldin CH. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development*, 2009, 136(22): 3699~3714.
- [10] Massagué J. TGFβ signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(10): 616~630.
- [11] Heldin CH, Landström M, Moustakas A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(2): 166~176.
- [12] Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2): 75~90.
- [13] Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS. Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3(12): 1011~1022.
- [14] Connolly EC, Freimuth J, Akhurst RJ. Complexities of TGF-β targeted cancer therapy. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(7): 964~978.
- [15] Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*, 2001, 29(2): 117~129.
- [16] Elliott RL, Blobel GC. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol*, 2005, 23(9): 2078~2093.
- [17] Padua D, Massagué J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res*, 2009, 19(1): 89~102.
- [18] Mullen AC, Orlando DA, Newman JJ et al. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF-β signaling. *Cell*, 2011, 147(3): 565~576.

- [19] Spellman R, Llorian M, Smith CW. Crossregulation and functional redundancy between the splicing regulator PTB and its paralogs nPTB and ROD1. *Mol Cell*, 2007, 27(3): 420~434.
- [20] He X, Arslan AD, Ho TT et al. Involvement of polypyrimidine tract-binding protein (PTBP1) in maintaining breast cancer cell growth and malignant properties. *Oncogenesis*, 2014, 3(1): e84.
- [21] Calabretta S, Bielli P, Passacantilli I et al. Modulation of PKM alternative splicing by PTBP1 promotes gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. *Oncogene*, 2016, 35(16): 2031~2039.
- [22] Wang L, Yang L, Yang Z et al. Glycolytic Enzyme PKM2 Mediates Autophagic Activation to Promote Cell Survival in NPM1-Mutated Leukemia. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(4): 882~894.
- [23] Li Q, Zheng S, Han A et al. The splicing regulator PTBP2 controls a program of embryonic splicing required for neuronal maturation. *Elife*, 2014, 3: e01201.
- [24] Zagore LL, Grabinski SE, Sweet TJ et al. RNA Binding Protein Ptbp2 Is Essential for Male Germ Cell Development. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(23): 4030~4042.
- [25] Licatalosi DD, Yano M, Fak JJ et al. Ptbp2 represses adult-specific splicing to regulate the generation of neuronal precursors in the embryonic brain. *Genes Dev*, 2012, 26(14): 1626~1642.
- [26] Yamamoto H, Tsukahara K, Kanaoka Y et al. Isolation of a mammalian homologue of a fission yeast differentiation regulator. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(5): 3829~3841.
- [27] Xue Y, Zhou Y, Wu T et al. Genome-wide analysis of PTB-RNA interactions reveals a strategy used by the general splicing repressor to modulate exon inclusion or skipping. *Mol Cell*, 2009, 36(6): 996~1006.
- [28] Brazão TF, Demmers J, van IW et al. A new function of ROD1 in nonsense-mediated mRNA decay. *FEBS Lett*, 2012, 586(8): 1101~1110.
- [29] Hou P, Li L, Chen F et al. PTBP3-Mediated Regulation of ZEB1 mRNA Stability Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *Cancer Res*, 2018, 78(2): 387~398.
- [30] Hou P, Chen F, Yong H et al. PTBP3 contributes to colorectal cancer growth and metastasis via translational activation of HIF-1 $\alpha$ . *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 301.
- [31] Yang X, Qu S, Wang L et al. PTBP3 splicing factor promotes hepatocellular carcinoma by destroying the splicing balance of NEAT1 and pre-miR-612. *Oncogene*, 2018, 37(50): 6399~6413.
- [32] Tano K, Mizuno R, Okada T et al. MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. *FEBS Lett*, 2010, 584(22): 4575~4580.
- [33] Wu Q, Zhang B, Li B et al. PTBP3 promotes migration of non-small cell lung cancer through regulating E-cadherin in EMT signaling pathway. *Cancer Cell Int*, 2020, 20:172.
- [34] Tan LY, Whitfield P, Llorian M et al. Generation of functionally distinct isoforms of PTBP3 by alternative splicing and translation initiation. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(11): 5586~5600.
- [35] Liang X, Chen W, Shi H et al. PTBP3 contributes to the metastasis of gastric cancer by mediating CAV1 alternative splicing. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 569.

- [36] Ma J, Weng L, Jia Y et al. PTBP3 promotes malignancy and hypoxia-induced chemoresistance in pancreatic cancer cells by ATG12 up-regulation. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(5): 2917~2930.
- [37] Asselin-Paturel C, Echchakir H, Carayol G et al. Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer*, 1998, 77(1): 7~12.
- [38] Saji H, Nakamura H, Awut I et al. Significance of expression of TGF-beta in pulmonary metastasis in non-small cell lung cancer tissues. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 9(5): 295~300.
- [39] Yu JR, Tai Y, Jin Y et al. TGF- $\beta$ /Smad signaling through DOCK4 facilitates lung adenocarcinoma metastasis. *Genes Dev*, 2015, 29(3): 250~261.
- [40] Jeong MH, Park SY, Lee SH et al. EPB41L5 Mediates TGF $\beta$ -Induced Metastasis of Gastric Cancer. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(12): 3617~3629.
- [41] Zhao J, Feng M, Liu D et al. Antagonism between HTRA3 and TGF $\beta$ 1 Contributes to Metastasis in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res*, 2019, 79(11): 2853~2864.
- [42] Levy L, Hill CS. Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17(1-2): 41~58.
- [43] Tang YN, Ding WQ, Guo XJ et al. Epigenetic regulation of Smad2 and Smad3 by profilin-2 promotes lung cancer growth and metastasis. *Nat Commun*, 2015, 6: 8230.
- [44] Lei B, Wang D, Zhang M et al. miR-615-3p promotes the epithelial-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer by targeting PICK1/TGFBRI axis. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 71.
- [45] Deng C, Lin YX, Qi XK et al. TNFRSF19 Inhibits TGF $\beta$  Signaling through Interaction with TGF $\beta$  Receptor Type I to Promote Tumorigenesis. *Cancer Res*, 2018, 78(13): 3469~3483.
- [46] Liao Z, Chen L, Zhang X et al. PTPRE Acts as a Metastatic Promoter in Hepatocellular Carcinoma by Facilitating Recruitment of SMAD3 to TGF- $\beta$  Receptor 1. *Hepatology*, 2020, 72(3): 997~1012.
- [47] Zhang L, Zhu Z, Yan H et al. Creatine promotes cancer metastasis through activation of Smad2/3. *Cell Metab*, 2021, 33(6): 1111~1123.
- [48] Tang X, Shi L, Xie N et al. SIRT7 antagonizes TGF- $\beta$  signaling and inhibits breast cancer metastasis. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 318.
- [49] Risolino M, Mandia N, Iavarone F et al. Transcription factor PREP1 induces EMT and metastasis by controlling the TGF- $\beta$ -SMAD3 pathway in non-small cell lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(36): E3775~3784.
- [50] Tong X, Wang S, Lei Z et al. MYOCD and SMAD3/SMAD4 form a positive feedback loop and drive TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 2020, 39(14): 2890~2904.
- [51] Lu Z, Li Y, Che Y et al. The TGF $\beta$ -induced lncRNA TBILA promotes non-small cell lung cancer progression in vitro and in vivo via cis-regulating HGAL and activating S100A7/JAB1 signaling. *Cancer Lett*, 2018, 432: 156~168.
- [52] Xu L, Liu W, Li T et al. Long non-coding RNA SMASR inhibits the EMT by negatively regulating TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway in lung cancer. *Oncogene*, 2021, 40(20): 3578~3592.

- [53] Konstantinidou M, Zarganes-Tzitzikas T, Magiera-Mularz K et al. Immune Checkpoint PD-1/PD-L1: Is There Life Beyond Antibodies? *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(18): 4840~4848.
- [54] Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity*, 2018, 48(3): 434~452.
- [55] Garon EB, Rizvi NA, Hui R et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 2015, 372(21): 2018~2028.
- [56] Doi T, Piha-Paul SA, Jalal SI et al. Safety and Antitumor Activity of the Anti-Programmed Death-1 Antibody Pembrolizumab in Patients With Advanced Esophageal Carcinoma. *J Clin Oncol*, 2018, 36(1): 61~67.
- [57] Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N Engl J Med*, 2017, 377(25): 2500~2501.
- [58] Pitt JM, Vétizou M, Daillère R et al. Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity*, 2016, 44(6): 1255~1269.

## 附录 文献综述

### 1. 肺癌的诊疗现状

#### 1.1 肺癌发病率和死亡率高

原发性支气管肺癌简称肺癌，其发病率和死亡率常年居于恶性肿瘤首位[1]。近年来，肺癌的发病率较前有所下降。根据最新癌症统计数据表明，在男性中每年肺癌新发病例约占所有恶性肿瘤的12%，仅次于前列腺癌的发病率；而在女性中，每年新发肺癌病例仅次于乳腺癌，约占新发恶性肿瘤的13%。但在全球范围内，肺癌仍然是恶性肿瘤导致患者死亡的最主要原因。尽管近几年来，随着手术技术的提高，放化疗、分子靶向以及免疫治疗的联合应用，肺癌的生存得到了一定程度的提高，但由于肺癌的高异质性、恶性增殖及远处转移，肺癌患者的总体5年总体生存率仍然不高，肺癌仍然居恶性肿瘤死亡原因第一位。

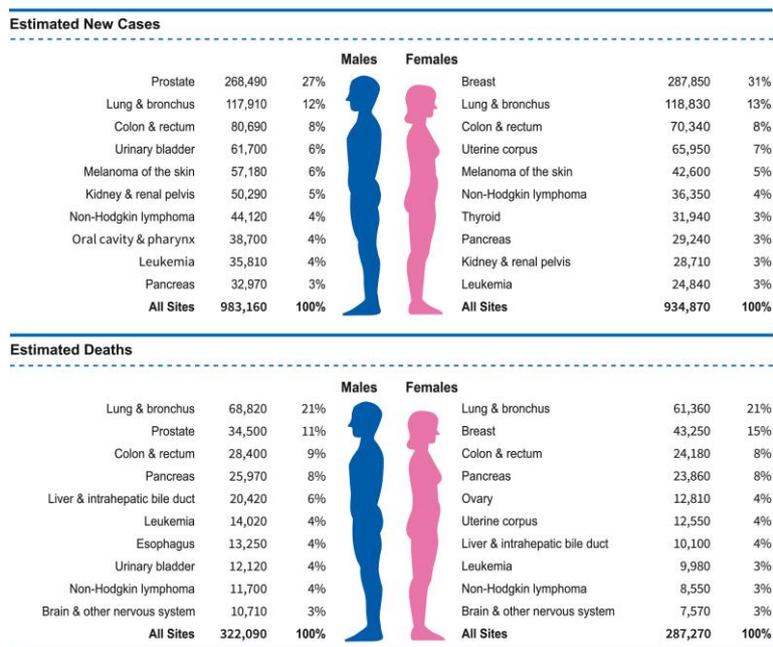


图 0-1 肺癌的流行病学

吸烟可显著增加肺癌的发病风险，也是目前国内外研究公认的肺癌高危因素。研究显示吸烟与肺癌发病及死亡风险均密切相关，既往吸烟者的肺癌发病率和死亡率较非吸烟者亦显著升高[2]。烟龄、每日吸烟量和肺癌发病率呈线性正

相关趋势[3]。同时，每日吸烟剂量越大、烟龄时间越长、起始吸烟年龄越小诱发肺癌的相对危险度越大[4]。除此之外，二手烟导致肺癌的风险同样不可小觑，研究显示，不吸烟者暴露于二手烟中，其肺癌风险较从不吸烟者增加了30%，且25岁之前就暴露于二手烟的人群中，其发病风险还会继续增加[5]。我国是烟草生产和消费大国。2019年统计我国约有3.5亿成年人正在使用任意形式的烟草制品，烟民占全球的三分之一，成为当之无愧的世界烟草消费第一大国，更为严峻的是我国约有50%的人群暴露在环境烟草烟雾下。2019年WHO在世界无烟日宣传中提到，每年大约有120万人死于吸烟所致的肺癌。因此，采用烟草防控的各项措施，对预防肺癌的发生有着重要意义。

吸烟、二手烟和环境烟草暴露是目前已知的比较明确的肺癌高危因素，慢性阻塞性肺疾病（chronic obstructive pulmonary disease, COPD）[6]、肺结核[7]及肺间质纤维化[8]等肺部相关疾病史、室内空气污染[9]、肿瘤家族史[10]、职业致癌物质长期暴露史[11-15]等也与肺癌的发生具有不同程度的相关性。COPD是细小支气管阻塞为特征的慢性支气管炎，而长期的炎症刺激有可能使支气管鳞状上皮化生或增生，进而导致肺癌的发生[16]。研究表明，COPD在肺癌发生发展中起着中介作用，COPD与肺癌实际上可能是同一疾病的不同过程。COPD是肺癌常见且重要的驱动因素，患COPD的患者较正常人群相比，可显著增加肺癌的发病率，并且肺癌合并COPD的人群相比单纯肺癌的人群，其总体存活期更短[17]。与多数癌种一样，肺癌的发生也具有明显的家族聚集现象，患者的一级亲属中有肺癌病史的个体，其直系亲属中肺癌的发病风险亦显著升高[10]。研究显示家族中有罹患肺癌的人群可能存在肺癌遗传易感位点[18]。除此之外，长期接触二氧化硅、石棉及煤烟等高致癌物质的人群其肺癌发病风险亦明显升高。但其中的牵涉的分子机制还有待进一步的研究证实。除上述危险因素外，我们必须明白的是，肺癌的发生绝不是单一的某一个因素引起的。多基因、多因素共同作用介导肺癌的发生发展，其病因极其复杂，未来阐明肺癌发病因素及机制仍需结合多基因组学、代谢组学、转录组学及深度测序等手段进行更加深入的探索。

总之，改变生活习惯，尽量避免肺癌的高危因素，可有效降低肺癌的发病率。同时，在肺癌高危人群中进行早期筛查，对肺癌的早期诊断具有重要意义。

## 1.2 肺癌诊断及研究进展

肺癌病程进展隐匿，早期诊断困难，多数患者临床就诊时，病情已进展至疾病中晚期，总体5年生存率低于20%。临床研究表明，肺癌的早诊早治可提升肺癌患者的5年生存率至57%以上[19]。因此，提高肺癌患者生存及改善预后的关

关键在于早期诊断以及尽早进行肺癌的干预。目前，临床上对于肺癌的诊断主要依靠胸部 CT 检查、血清肿瘤标志物检测和病理组织活检等手段，但均存在一定的局限性。胸部 CT 检查受肿瘤的类型、部位、大小以及组织内部结构的限制，同时受分辨率及诊断者经验影响，不易早期发现病灶[20, 21]。病理组织活检技术因无法早期定位及多次采样，不能应用于肺癌的早诊和动态监控。血清肿瘤标志物检测如癌胚抗原（CEA）、鳞状上皮细胞癌抗原（SCC-Ag）和细胞角蛋白 19 片段（CYFRA21-1）等在肺良、恶性肿瘤鉴别中缺乏特异性，难以满足当前精准诊疗的要求[22, 23]。

近年来，影像组学用于肺癌的早期诊断及治疗取得了长足的进步。影像组学方法是人工智能在医学领域应用的重要形式，其将影像定量分析与机器学习方法结合起来，采用高通量特征提取算法，对肿瘤感兴趣区域的影像学特征（如 MRI、CT、PET、超声等）进行定量分析和建模，从而实现肿瘤的早期诊断、肿瘤分期、病理分型、疗效检测和预后评价[24]。目前研究表明通过影像组学构建预测模型，可在一定程度上区分肺部良、恶性结节，其准确率可达 76%[25]。基于 CT 图像的影像组学特征，可以很好的对肺腺癌和肺鳞癌进行预测，其区分肺腺癌和肺鳞癌的 AUC 值能分别达到 0.905 和 0.893[26]。目前，影像组学用于肺癌的早期诊断尚处于起步阶段，随着新技术的逐渐发展和成熟，日后可为肺癌精准诊断及治疗提供新的思路，未来有可能成为肺癌诊断的重要手段。

液体活检是肿瘤检验领域极具发展前景的突破性技术，其特点是通过血液、唾液、尿液等体液样本进行肿瘤相关标志物检测。相比于传统的组织病理学活检，液体活检具有方便快捷，风险最小、无创等优势，同时可实现连续采样监控肿瘤治疗效果及复发等诊疗目的，且能克服组织样本检测的异质性问题[27]。通过检测和分析肿瘤患者血液中存在的标志物，如循环肿瘤细胞（circulating tumor cell, CTC）、外泌体（exosome）、循环肿瘤 DNA（circulating tumor DNA, ctDNA）以及循环肿瘤 RNA（circulating tumor RNA, ctRNA）等物质，实现对肺癌的早期诊断和动态检测。Exosome 是细胞外囊泡的一种，其是由细胞分泌的直径大约 30~100nm 的多囊泡体，广泛存在于血液、唾液、尿液及脑脊液等体液中，是细胞间信息传递的重要载体。研究证实，exosome 中含有丰富的蛋白质、DNA、mRNA 以及非编码 RNA 等可检测靶标，均可用于癌症的早期诊断、治疗监测、预后判断等[28]。多项研究表明，肺癌患者循环血液外泌体包裹的蛋白质和 miRNA，较正常人相比，常有不同程度的差异性表达。Niu 等[29]人发现在肺癌患者血清外泌体中  $\alpha$ -2-HS-糖蛋白和细胞外基质蛋白 1 特异性高表达，以上两者联合诊断肺癌的 AUC 值达 0.938。Zhou 等[30]筛选了肺癌患者外泌体中的 3 种 miRNA，

包括 miR-19-3p、miR-21-5p 和 miR-221-3p 与正常人相比表达水平明显上调，并具备诊断肺癌的潜在标志物。

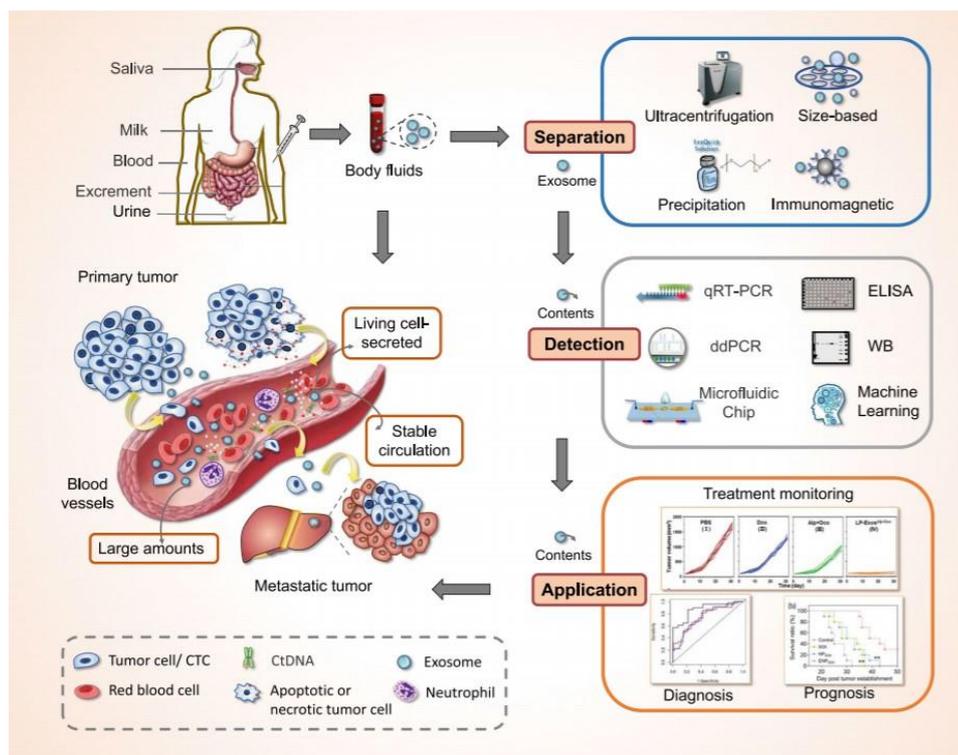


图 0-2 Exosome 作为液体活检的新靶点，其包裹的特异性分子可用于癌症的诊断、治疗检测及预后预测。

肺癌的发病率逐年上升，肺癌早期由于发病隐匿，发展较快，尤其是肺腺癌，早期即可出现远处转移，因此，通过一系列检测手段，实现对肺癌的早期诊断及治疗，有助于提高肺癌的诊治水平，降低死亡率。而随着未来高通量测序的开展，未来关于肺癌的早期诊断及治疗策略的选择，很大程度上将由异常表达的基因来决定。

### 1.3 肺癌的治疗手段

肺癌作为全球范围发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一，其治疗手段随着肿瘤分子生物学的深入，已经进入到精准分子化指导治疗的新时代。除了手术干预及经典放化疗外，可选择抗血管生成、靶向及免疫治疗。随着这些新手段的应用，晚期肺癌患者的总体生存率得到极大的提高，但肺癌仍然是中国最致命的癌症。

肺腺癌中最常见的驱动基因 KRAS (32%) 和 EGFR (11%) [31]。其中 EGFR 是一种跨膜蛋白，属于酪氨酸激酶型受体。肿瘤中 EGFR 常由于基因突变、易位

或过表达导致其下游关键致癌信号通路如 Ras-Raf-Mek、PI3K-Akt-mTOR 等过度激活，从而促进肿瘤的恶性增殖、转移和血管生成。吉非替尼作为推出的第一代 EGFR-TKIs 药物，其作用机制主要通过抑制上述致癌信号通路，继而发挥抗肿瘤作用[32]。一项大样本、随机对照临床试验（IPASS 试验）首次揭示了吉非替尼一线治疗 EGFR 基因突变晚期非小细胞肺癌的无进展生存期（progress free survival, PFS）、客观缓解率（objective response rate, ORR）和生活质量均优于标准化疗，并且具有良好的安全性[33]。自此后 10 多年来，EGFR-TKIs 已逐渐成为 EGFR 基因突变的晚期非小细胞肺癌的一线标准治疗。但由于一代及二代 EGFR-TKIs 治疗耐药的出现，近年来又推出第三代 EGFR-TKIs 药物奥西替尼。FLAURA 临床研究显示作为一线治疗，与第一代 EGFR-TKIs 药物相比，奥西替尼可显著延长 EGFR 突变晚期非小细胞肺癌的 PFS 和总生存期（overall survival, OS），奥西替尼组中位 PFS（mPFS）可达 18.9 个月，中位生存期（mOS）为 38.6 个月[34]。在二线治疗中，AURA3 临床研究显示奥西替尼对 EGFR-TKIs 治疗后进展的 T790M 突变非小细胞肺癌患者的 mPFS 显著优于含铂双药化疗（10.1 个月 vs 4.4 个月）[35]，虽然奥西替尼组有更高的应答率，但目前的临床试验并未显示患者 OS 获益。

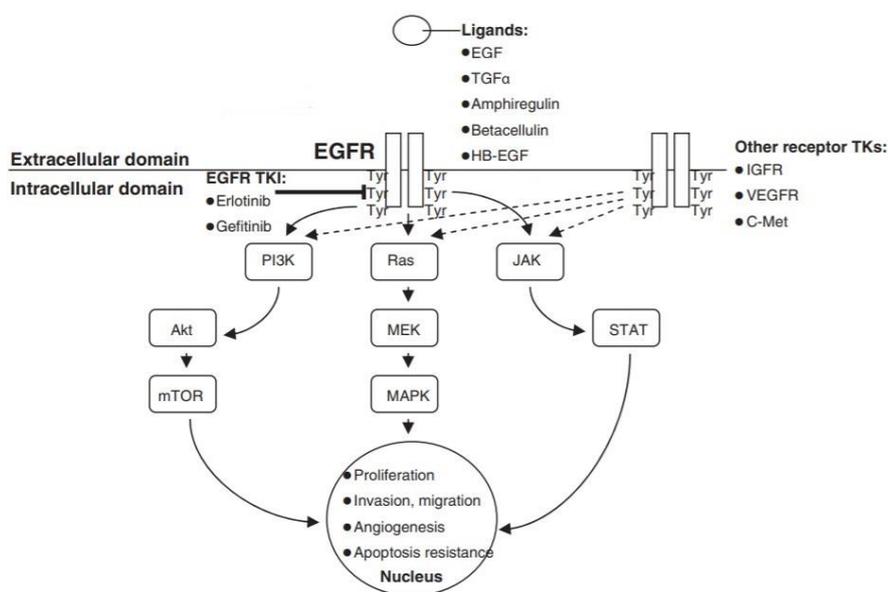


图 0-3 EGFR 信号通路

免疫检查点的负性调节在肿瘤进展过程中发挥重要作用。其中免疫细胞表面的程序性死亡因子-1（programmed cell death, PD-1）及肿瘤细胞表面的 PD-1 配体（PD-1 ligand, PD-L1）结合后，可抑制机体的免疫应答，使肿瘤细胞逃避肿

瘤微环境中免疫细胞的监视，进而逃避杀伤清除。PD-1 作为免疫球蛋白超家族 B7 的跨膜糖蛋白受体，主要是通过胞内尾部的免疫受体酪氨酸基抑制基序（immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM）和免疫受体酪氨酸基转换基序（immunoreceptor tyrosine-based switch motif, ITSM）发挥免疫抑制作用。PD-1 在肿瘤浸润淋巴细胞（tumor infiltrating lymphocytes, TILs）、自然杀伤细胞、B 细胞、单核细胞及树突状细胞中均有表达[36]。而 PD-L1 广泛表达于肿瘤细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、内皮细胞等多种细胞表面。由于肿瘤促癌基因激活或肿瘤抑制通路被破坏，肿瘤细胞可以内源性诱导 PD-L1 表达，此外，一些促炎症因子也能够使肿瘤表面 PD-L1 表达上调，如干扰素- $\gamma$ [37]。当激活的免疫细胞表面的 PD-1 与其配体 PD-L1 结合后，ITIM 和 ITSM 被磷酸化，然后招募含蛋白酪氨酸磷酸酶 2（SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase-2, SHP2），通过阻断 PI3K-AKT-mTOR、Ras-EMK-ERK 等信号通路，传递抑制信号，抑制细胞因子的产生，最终抑制 T 细胞的活化与增殖，发挥负向调控 T 细胞活性的作用[38]。

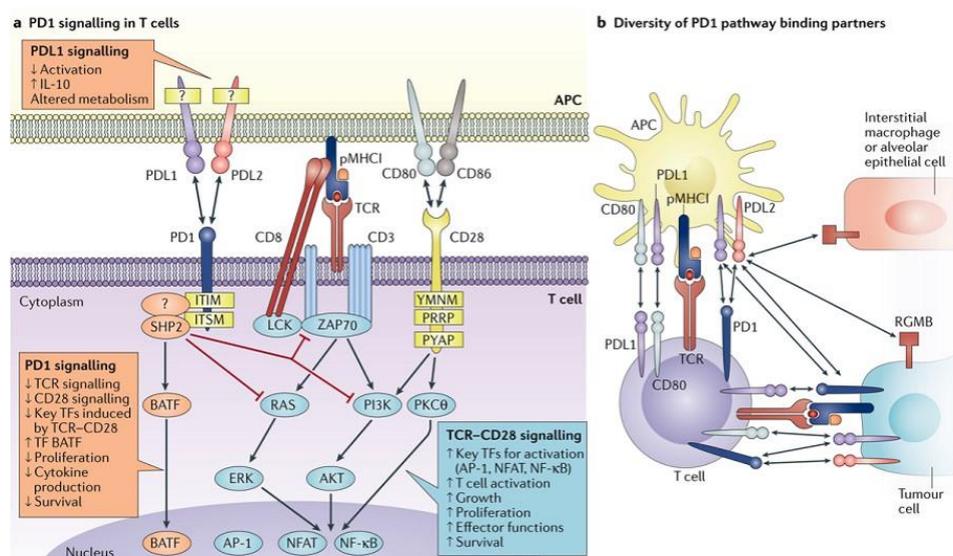


图 0-4 PD-1/PD-L1 信号通路

基于以上理论依据研制的 PD-L1/PD-1 抑制剂是近年来晚期肺癌治疗的一次革命。PD-L1/PD-1 抑制剂如纳武单抗（Nivolumab）和帕博利珠单抗（Pembrolizumab）可以阻断抑制信号，诱导 T 细胞激活和增殖，恢复晚期肿瘤患者对肿瘤细胞的免疫杀伤能力。临床试验显示 PD-1 或 PD-L1 抑制剂在多种恶性肿瘤中取得了良好的疗效。PD-1 或 PD-L1 抑制剂的应用，显著改善了晚期非小细胞肺癌的总生存时间[39]。但单药免疫治疗有效率低，在非选择性人群中

ORR 仅为 20%左右，即便联合了化疗后可将有效率提高至 54%~60%，但仍有相当比例的患者在随后的治疗过程中出现难以避免的耐药问题。同时，肿瘤细胞表面 PD-L1 的表达水平以及肿瘤突变负荷 (tumor mutational burden, TMB) 均被证实与免疫治疗的疗效相关。然而肿瘤细胞表面 PD-L1 的表达调控机制极其复杂，其表达水平具有空间异质性和时间特异性的特点。除此之外，目前还存在对 PD-L1 及肿瘤突变负荷检测的技术限制[40, 41]，因此，如何准确的筛选出获益人群也给临床医生带来了新的挑战。免疫治疗过程中出现的严重并发症同样不容忽视，尤其是免疫性相关性心肌炎，研究数据显示其死亡率高达 36%~67% [42]。因此，免疫治疗虽然使越来越多的晚期非小细胞肺癌患者受益，但目前仍存在着很诸多问题，如有效率不高，伴随免疫治疗的严重并发症以及免疫的原发性耐药和继发性耐药。

## 2. EMT 概述

上皮间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT)，是指具有极性的上皮细胞由上皮表型转变为间质表型的生物学过程。上皮细胞发生 EMT 后，细胞极性丧失，粘附性降低，同时细胞迁移侵袭能力、抗凋亡能力及降解细胞外基质的能力显著增强，从而实现上皮细胞的远处迁移和定植[43]。发生 EMT 的细胞迁徙到特定部位后同样可以通过特定的程序由间质表型重新恢复上皮表型，此过程称为间质上皮转化 (mesenchymal epithelial transition, MET)，是与 EMT 完全相反的过程[44]。研究表明，在体内细胞发生 EMT 后，细胞从原发部位分离，经不同趋化因子的作用，迁移至定植部位，而后通过 MET，实现在定植部分的增生和分化。EMT 和 MET 两者之间可以在特定的病理生理过程中相互转化，互相协调，从而维持机体的稳定[45-47]。

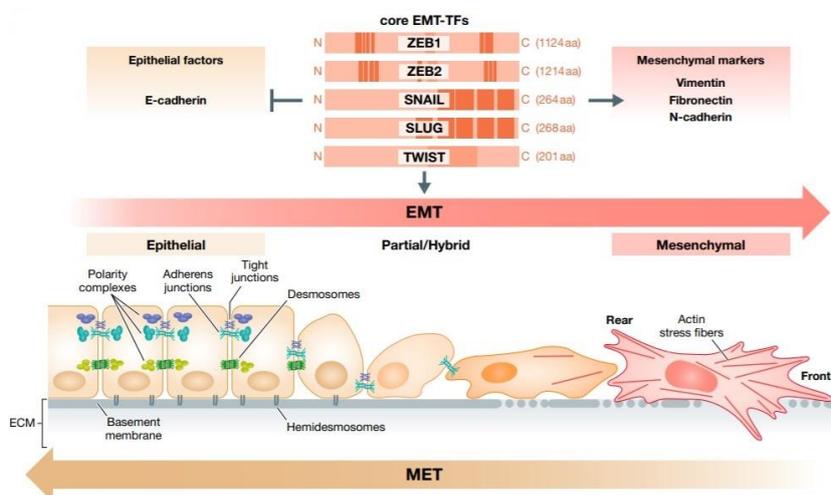


图 0-5 EMT 和 MET 的特点

EMT 主要参与组织胚胎发育[48, 49]、脏器纤维化或器官损伤修复[50, 51]和恶性肿瘤转移[43]等多个生物学过程,其发生和调节过程涉及复杂的信号通路网络。一般来说,发生 EMT 的细胞由于胞内肌动蛋白骨架的重塑,导致细胞由鹅卵石样形态转变为扁平细长的纺锤体样形态,同时伴有 E-cadherin、ZO-1、Cytokeratin 等上皮标志物的表达下调或缺失以及 N-cadherin、Vimentin、Fibronectin 等间质标志物表达上调[52]。EMT 发生的主要机制是 E-cadherin 的转录抑制。作为细胞间连接复合体的主要成分, E-cadherin 依靠钙依赖性的细胞间黏附维持细胞骨架的组织结构。当细胞表面的 E-cadherin 表达下调或功能丧失后,上皮细胞之间的粘附性明显降低,细胞之间相互分离,从而实现单个上皮细胞的运动和迁移。目前研究发现在机体内主要存在三种类型的 EMT: I 型 EMT 主要参与胚胎发育相关的过程,如原肠胚及神经嵴管的形成; II 型 EMT 主要与炎症与伤口愈合过程,发生后常导致组织或器官纤维化; III 型 EMT 则主要参与恶性肿瘤进展和转移,这也是目前研究最为广泛的一种 EMT[53]。

目前的普遍观点认为, EMT 的发生是为了机体能更好的适应外部的环境,以利于细胞的存活。当细胞外微环境改变后,诱发机体产生炎症介质或细胞趋化因子等,后者作用于细胞膜上的相应受体后,激活下游一系列信号通路,将胞外信号传递入胞内,诱发 EMT 的发生。研究表明多种分子信号通路参与 EMT 的调控,如 TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路、PI3K/AKT 信号通路、WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路、MAPK/ERK 信号通路、Hedgehog 信号通路、Notch 信号通路、GSK-3 $\beta$  信号通路、ILK 信号通路、uPAR 信号通路等[54]。且上述各通路之间并不是单独存在,各信号通路相互交叉,之间存在广泛的联系和调节,共同组成介导 EMT 发生复杂有序的调控网络[55]。诱导 EMT 发生的各信号网络虽复杂,但其共同点是它们最后均可以通过激活转录因子如 Snail、Slug、Twist1、Twist2、ZEB1、ZEB2 等的表达,以上转录因子可以通过直接结合在 E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin 等 EMT 标志物的启动子区发挥表达调控作用,继而诱导 EMT 的发生[56]。近年来,随着对 EMT 调控机制的不断深入研究,诸多分子在不同层面如转录水平、表观修饰水平、转录后水平、翻译及翻译后层面调控 EMT 转录因子和关键因子基因的表达,进而诱导或抑制 EMT[57, 58]。

肿瘤侵袭转移是多基因参与的多阶段生物学过程, EMT 被认为是恶性肿瘤侵袭转移起始的驱动因素。肿瘤细胞发生 EMT 后从原发灶中分离,分泌基质蛋白酶溶解基质膜,从而侵入微血管循环系统,到达定植部位后逆转为上皮表型,

从而在远处形成转移灶。此外研究还发现肿瘤细胞发生 EMT 后还可获得干细胞的特征,介导肿瘤的化疗抵抗和免疫逃避,是肿瘤治疗后耐药、复发和转移的关键原因[52, 56]。肺癌 EMT 的发生是其发生转移起始的关键因素,抑制肺癌细胞的 EMT 过程,可显著抑制肺癌的转移能力,改善患者的生存期[59, 60]。然而目前靶向 EMT 通路的相关药物的初期临床试验研究结果尚不能令人满意[61, 62]。原因可能在于调控 EMT 的通路极其复杂,许多潜在的机制尚未完全阐明。因此,深入探究 EMT 发生的分子机制,寻找其关键调控因子,为肺癌的侵袭和转移提供新的理论,为肺癌的治疗提供新的靶点。

### 3. TGF- $\beta$ /Smad 通路及其在 EMT 中的作用

转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 是 TGF- $\beta$  超家族的重要成员。TGF- $\beta$  超家族约由 33 个成员组成,包括骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs)、生长分化因子 (growth differentiation factors, GDFs)、激活素 (activins) 等。TGF- $\beta$  是一种分子量为 25KD 的二聚体蛋白,是功能最为多样的一类细胞因子,在胚胎发育过程中组织细胞形成及维持细胞稳态中发挥重要的调节功能。TGF- $\beta$  主要分为 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 3,彼此间有 70%~80% 的序列同源性,TGF- $\beta$ 1 几乎在所有细胞内表达,而 TGF- $\beta$ 2 主要在上皮细胞和神经细胞表达,TGF- $\beta$ 3 则主要表达于间充质细胞[63]。目前,对 TGF- $\beta$ 1 的研究最为广泛和深入,其与肿瘤的发生和发展高度相关。

研究发现,TGF- $\beta$  在肿瘤的发生发展中一把双刃剑,既可发挥抑癌作用,也可发挥促癌作用。同时根据细胞环境及遗传背景的不同,其影响肿瘤发生和发展的作用也不同[64, 65]。在肿瘤发生的早期,TGF- $\beta$  通过下游信号通路调节相关靶基因表达,抑制细胞增殖、促进细胞凋亡及抑制炎症和血管生成,从而在肿瘤早期阶段发挥一定的抑制作用。在肿瘤的中晚期,由于肿瘤中不断渗入和积累的基因突变和表观遗传学修饰的影响,原来本可抑制肿瘤生成和发展的 TGF- $\beta$  信号通路分子逐渐被肿瘤细胞利用,转变为促进肿瘤进展的作用。尤其是随着肿瘤的不断进展,肿瘤微环境中免疫细胞、间充质成纤维细胞以及肿瘤细胞本身分泌的 TGF- $\beta$  迅速增多,一方面,TGF- $\beta$  通过诱导肿瘤 EMT 的发生从而促进肿瘤的转移;另一方面,TGF- $\beta$  抑制肿瘤微环境中免疫细胞的活性从而使肿瘤细胞逃避免疫系统的杀伤作用,进一步促进肿瘤的恶性进展[66]。

TGF- $\beta$  通过下游传导通路,发挥生物学功能,这些通路包括经典的 Smad 依赖的信号通路和 Smad 非依赖的信号通路,其中 Smad 非依赖的信号通路主要是

由 Rho/GTPase[67]、p38/MAPK[68]、PI3K/AKT[69] 等下游效应分子介导。而在经典 Smad 信号通路中, Smads 蛋白是 TGF- $\beta$  信号转导的关键信号分子, 也被目前认为是 TGF- $\beta$  发挥作用最主要的下游信号分子。其家族成员 Smad1、Smad2、Smad3、Smad5、Smad8 称为受体调节型 Smads (R-Smads); Smad6 和 Smad7 称为受体抑制型 Smads (I-Smads), 可与活化的受体或 R-Smads 结合以抑制信号传导; 而家族成员中的 Smad4 又被称为辅助型 Smad (Co-Samd), 其可与上述 R-Smads 结合传递信号, 也可与 I-Smads 结合传递抑制信号[70]。TGF- $\beta$  经典 Smad 信号通路的传导途径如下: 细胞质外成熟的具有生物活性的 TGF- $\beta$  先与细胞膜上 TGF- $\beta$  受体 II (TGF- $\beta$  receptor II, T $\beta$ RII) 结合并磷酸化 T $\beta$ RII, 后者与 TGF- $\beta$  受体 I 结合 (TGF- $\beta$  receptor I, T $\beta$ RI) 同时磷酸化 T $\beta$ RI 的胞内结构域, 形成 T $\beta$ RII-TGF- $\beta$ -T $\beta$ RI 异源三聚体复合物, 该复合物随即募集并磷酸化胞质内的 Smad2 和 Smad3, 磷酸化的 Smad2/3 复合物再与 Smad4 相互作用形成三聚体复合物进入细胞核, 进而调节一系列 TGF- $\beta$  靶基因的表达[71]。在细胞核内, Smad2/3/4 复合物通常与其它一些转录共激活因子 (如 CBP/p300、Sp1、c-Jun/c-Fos 等) 或与一些转录共抑制因子 (如 E2F4/5-p107、ATF3、SKI、FoxG1、EVI1 和 CTBP 等) 结合, 发挥协同促进或抑制 TGF- $\beta$  靶基因表达的作用[72]。另一方面, I-Smads 作为 TGF- $\beta$  信号通路的关键负调控分子, 可通过多种机制, 包括将 E3 泛素化酶 SMURF2 或磷酸酶募集至活化的 TGF- $\beta$  受体, 促使活化的受体发生蛋白酶体和溶酶体降解, 从而抑制 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的激活[73]。

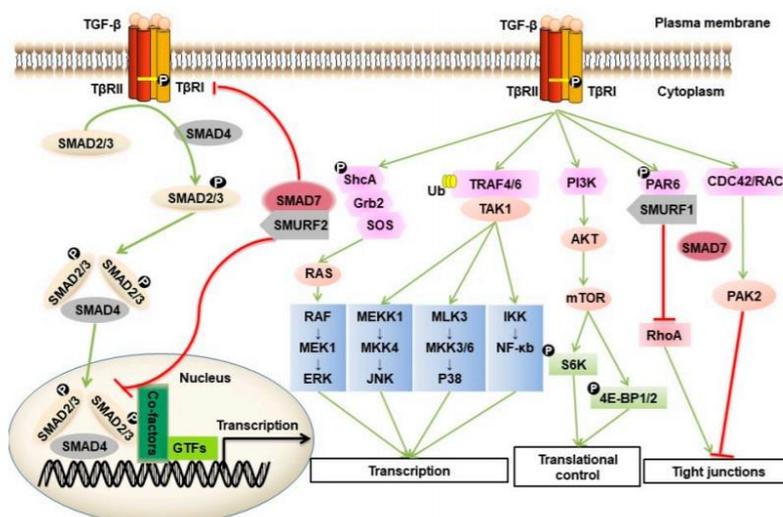


图 0-6 TGF- $\beta$  下游通路。包括 Smad 依赖的和 Smad 非依赖的通路

TGF- $\beta$ /Smad 信号通路在体内发挥一系列重要的生物学功能。尤其是 TGF- $\beta$  可通过 Smad 依赖的方式, 强力诱导恶性肿瘤的 EMT。事实上, TGF- $\beta$ /Smad3

作为诱导肿瘤 EMT 的经典信号通路,对于 TGF- $\beta$  在体内发挥促肿瘤转移作用至关重要。目前的研究认为, TGF- $\beta$ /Smad3 信号通路诱导肿瘤 EMT 发生的机制主要有以下几个方面。① TGF- $\beta$  诱导的 Smad 复合物入核后,可直接在转录水平调节 EMT 相关标志物的表达,如降低上皮标志物 E-cadherin 的表达,使上皮粘附性降低,同时也可直接上调间质标志物 N-cadherin 及 Vimentin 等的表达,使细胞获得间质干性,细胞运动能力增加。② 同时可诱导与 EMT 相关的转录因子,如 Snail、ZEB1、Slug、HMGA2、Ets1 等的表达,进而调控 EMT 标志物蛋白的表达,促进 EMT 的发生[74]。③ TGF- $\beta$ /Smad 信号通路与其他非 Smad 信号通路之间也存在相互联系,可间接激活其他非 Smad 依赖的信号分子促进肿瘤 EMT 的发生。例如: TGF- $\beta$  诱导的 p-Smad3 可以激活整合素连接激酶(ILK),进而磷酸化下游分子 GSK-3 $\beta$  和 AKT,导致转录因子  $\beta$ -catenin 发生核转位,最终导致上皮细胞发生 EMT[75]。④ 近年来,不少研究还表明, TGF- $\beta$ /Smad3 可以诱导 lncRNA 或 miRNA 的表达,从而抑制上皮标志物蛋白的表达,促进间质细胞标志物的表达,进一步介导肿瘤 EMT 的发生[76, 77]。⑤ 除此之外,研究还报道 TGF- $\beta$  诱导的 Smad 可以与 PCBP1 结合,选择性剪切 CD44 的前体 RNA,调控大量 EMT 相关蛋白的表达,进而促进 EMT 的发生和肿瘤的转移[78]。

#### 4. PTBP3 与恶性肿瘤发生与发展关系的研究

多嘧啶序列结合蛋白 3 (polypyrimidine tract-binding protein 3, PTBP3), 是一种 RNA 结合蛋白 (RNA-binding proteins, RBP) 且是选择性剪接调控蛋白核不均一核糖核蛋白家族 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNPs) 成员之一,可通过一个或多个 RNA 结构区域 (RNA recognition motif, RRM) 与 RNA 相互结合,参与基因的选择性剪接 (alternative splicing, AS),在转录后水平调节 RNA 的表达[79]。其家族成员还包括 PTBP1 和 PTBP2,彼此间有超过 70% 的序列同源性[80], PTBP1 几乎在所有细胞中表达,主要参与选择性剪接与肿瘤侵袭相关的基因,与胰腺癌、肺癌、膀胱癌及卵巢癌的形成和侵袭转移相关[81]。而 PTBP2 仅在神经系统中表达,是神经系统发育中至关重要的剪切因子[82]。相比之下, PTBP3 的功能长期以来未受到足够的重视。随着对 RNA 结合蛋白研究的深入, PTBP3 的功能才逐渐被发现。目前的研究表明 PTBP3 主要参与前体 mRNA 的选择性剪接过程,产生不同的剪接异构体,引起基因多样性,调控转录后基因的表达水平。尤其在肿瘤发生、发展过程中, PTBP3 主要通过选择性剪接与肿瘤发生、发展有关的基因,进而介导肿瘤的发生和发展。近年来研

研究表明，PTBP3 与多种恶性肿瘤的发生和发展密切相关。本部分内容就 PTBP3 与肿瘤发生、发展的关系做一个简要的阐述。

#### 4.1 PTBP3 与消化道肿瘤

肝细胞癌是我国常见的恶性肿瘤之一，是原发性肝癌中最常见的病理类型。肝癌发病隐匿，因其血供丰富，侵袭性强，早期即可出现远处转移，致死率高。研究表明，PTBP3 促进了肝细胞癌的恶性生长和转移。作者通过对 20 例肝癌组织及癌旁组织标本进行基因芯片检测，分析肝癌与癌旁组织细胞核中差异富集的 RNA 结合蛋白，发现 PTBP3 在肝癌组织细胞核呈显著高表达，与癌旁组织相比，其差异倍数最高。进一步行 RNA 免疫沉淀证实 PTBP3 通过剪切 NEAT1 和 miR-612 的前体 RNA，在转录水平充当调节 NEAT1 和 miR-612 平衡的关键因子，进而调控 p53/CCND1 和 AKT2/EMT，促进肝细胞癌的恶性增殖与转移[83]。

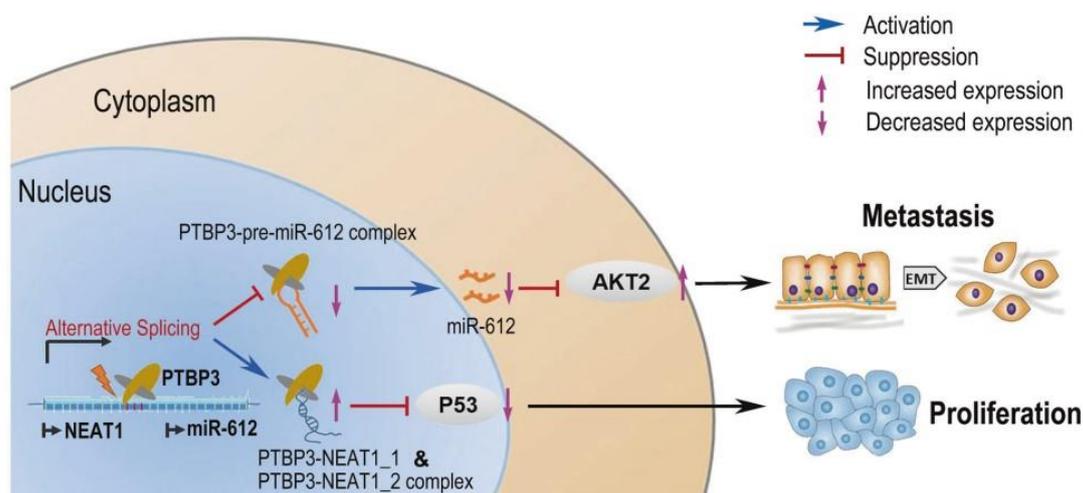


图 0-7 PTBP3 促进肝细胞癌进展的机制图

多篇文献报道，PTBP3 在胃癌中显著高表达，并且高表达 PTBP3 的患者具有更低分化程度，患者的总生存期明显缩短[84-86]。ID1 是与细胞分化有关的基因，其中剪接异构体 ID1b，相比于 ID1a，与 Hes1 具备更强的结合亲和力，结合后可显著抑制其生物活性，进而抑制胃癌细胞的分化，研究发现 PTBP3 通过结合并选择性剪接 ID1 的前体 RNA，调节 ID1a 与 ID1b 的表达水平，进而发挥抑制细胞分化的作用[85]。同样是参与 RNA 的选择性剪切过程，有研究表明发现 PTBP3 在胃癌中还通过募集并 CAV1 的前体 RNA，调节不同剪切异构体的产生，促进胃癌的转移。CAV1 蛋白存在 CAV1 $\alpha$  和 CAV1 $\beta$  两种变体，二者在癌症的进展中发挥不同的功能。PTBP3 在胃癌中主要是通过选择性剪接 CAV1，抑

制 CAV1 $\alpha$  及促进 CAV1 $\beta$  的表达, 继而激活下游 Integrin/Src/FAK 通路的信号分子, 促进胃癌细胞在裸鼠体内的淋巴结转移[86]。

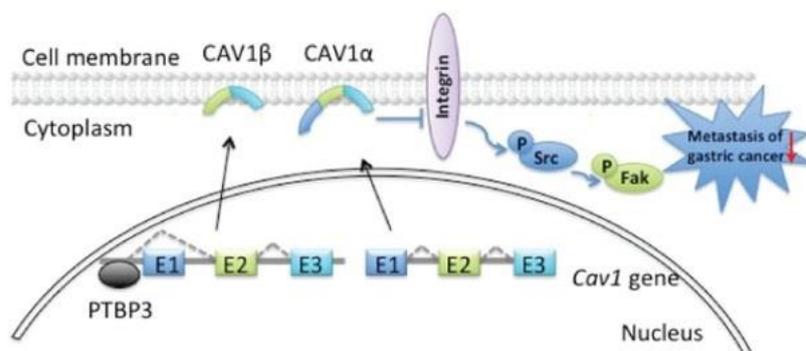


图 0-8 PTBP3 促进胃癌进展的机制图

由此可见, PTBP3 不仅与胃癌的预后密切相关, 且可显著抑制胃癌细胞的分化, 同时促进胃癌细胞的侵袭力。PTBP3 作为一种剪接调控因子, 主要还是通过选择性剪接基因表达, 导致胃癌的发生进展。

一项来自徐州医科大学的研究阐述了 PTBP3 通过调控低氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 的表达促进结直肠癌的生长和转移[87]。因肿瘤细胞的恶性生长, 其快速生长的代谢需求远超出血管供应的极限, 这种情况会在肿瘤细胞内及周围微环境产生缺氧的环境, 从而诱导 HIF-1 $\alpha$  的表达, HIF-1 $\alpha$  的激活可通过代谢重编程、抑制肿瘤免疫反应、调控血管内皮生长因子 (VEGF) 等, 促进肿瘤血管生成、生长和转移[88]。研究表明, PTBP3 可结合在 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的 5'UTR 上富含 CU 的序列, 增强 HIF-1 $\alpha$  蛋白的翻译和表达, 进而诱导 HIF-1 $\alpha$  下游靶分子的表达, 促进结肠癌的恶性生长、增殖、血管生成和转移[87]。

有学者还发现, PTBP3 通过结合 ATG12 mRNA 的 3'UTR, 在转录后水平促进 ATG12 的表达[89]。ATG12 是与自噬相关的基因。肿瘤细胞低氧的微环境, 通过诱导自噬产生过量的线粒体, 选择性清除活性氧 (ROS), 以减少氧化损伤。同时自噬降低肿瘤对微环境刺激的敏感性, 此外自噬也与肿瘤化疗药物的抵抗相关。由此, PTBP3 可通过促进 ATG12 的表达, 降低胰腺癌细胞对化疗药物吉西他滨的敏感性。此外, 作者还发现在胰腺癌临床组织中 PTBP3 与 ATG12 成显著正相关, PTBP3 有望成为改善胰腺癌中化疗抵抗的新靶点[89]。

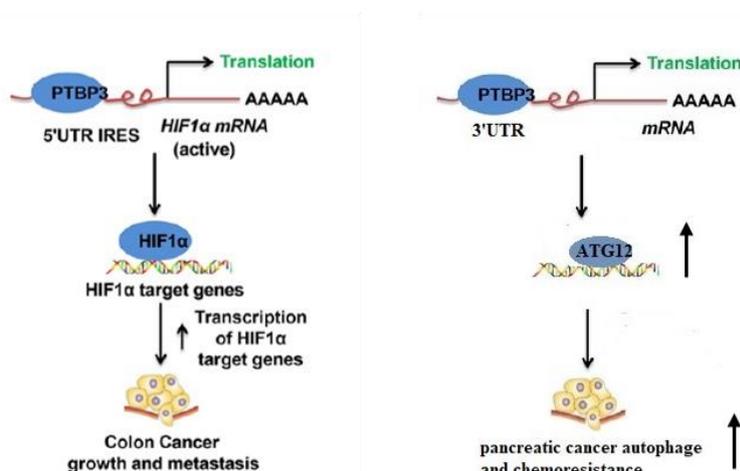


图 0-9 PTBP3 促进结直肠癌和胰腺癌进展的机制图

## 4.2 PTBP3 与乳腺癌

乳腺癌是影响国内外女性身体健康的恶性疾病且发病率呈增长趋势，根据最新的癌症统计数据表明其发病率已超越肺癌，成为目前全球范围内发病率第一的恶性肿瘤[19]。有研究者指出 PTBP3 在乳腺癌组织中呈高表达；而 PTBP3 的高表达水平与乳腺癌预后不良存在显著相关性[90]。沉默 PTBP3 能显著抑制乳腺癌细胞在裸鼠体内的生长和转移，进一步的机制研究发现 PTBP3 通过结合 ZEB1 mRNA 的 3'UTR，稳定 ZEB1 mRNA，防止其降解而激活 ZEB1 的表达。ZEB1 是乳腺癌干细胞的调节因子，也是 EMT 重要的激活因子。因此 PTBP3 可介导 ZEB1 的表达，促进乳腺癌细胞的恶性增殖、EMT 与转移[90]。另外有研究表明 HIF-1 $\alpha$ /lncRNA BCRT1/miR-1303/PTBP3 通路可以促进乳腺癌的增殖和转移[91]。低氧可通过 HIF1 $\alpha$  诱导乳腺癌中 PTBP3 的表达，而上文提及的 PTBP3 在结直肠癌中可以通过结合 HIF1 $\alpha$  mRNA，激活 HIF1 $\alpha$  的翻译和表达，因此，HIF1 $\alpha$ -PTBP3 之间有可能形成一正反馈环，该环路在促进恶性肿瘤增殖和侵袭中可能发挥重要的调节作用，有望成为治疗肿瘤的新靶点，但需要进一步的研究证实。

## 4.3 PTBP3 与非小细胞肺癌

非小细胞肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤，在我国约占所有癌症死亡人数的四分之一。非小细胞肺癌尤其是肺腺癌，早期易扩散和转移，是导致肺癌高死亡率的原因之一。研究发现 PTBP3 与肺腺癌细胞的迁移能力相关，沉

默 PTBP3 后显著损害肺腺癌细胞的迁移和运动能力[92]。进一步的研究表明 PTBP3 通过调控 E-cadherin 的表达介导肺腺癌 EMT 的发生，从而增强肺腺癌的侵袭能力[93]。但 PTBP3 在肺腺癌中的表达情况，以及其调控 EMT 发生的机制尚需进一步的探索。

## 参考文献

- [1]. Sung H, Ferlay J, Siegel RL et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209~249.
- [2]. Ordóñez-Mena JM, Schöttker B, Mons U et al. Quantification of the smoking-associated cancer risk with rate advancement periods: meta-analysis of individual participant data from cohorts of the CHANCES consortium. *BMC Med*, 2016, 14: 62.
- [3]. Chen ZM, Peto R, Iona A et al. Emerging tobacco-related cancer risks in China: A nationwide, prospective study of 0.5 million adults. *Cancer*, 2015, 121(Suppl 17): 3097~3106.
- [4]. Remen T, Pintos J, Abrahamowicz M, Siemiatycki J. Risk of lung cancer in relation to various metrics of smoking history: a case-control study in Montreal. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 1275.
- [5]. Varghese C, Troisi G, Schotte K et al. World No Tobacco Day 2019 puts the spotlight on lung health. *J Thorac Dis*, 2019, 11(6): 2639~2642.
- [6]. Tamura T, Miyazaki K, Satoh H. Features of COPD as Predictors of Lung Cancer. *Chest*, 2018, 154(3): 720~721.
- [7]. Hong S, Mok Y, Jeon C et al. Tuberculosis, smoking and risk for lung cancer incidence and mortality. *Int J Cancer*, 2016, 139(11): 2447~2455.
- [8]. JafariNezhad A, YektaKooshali MH. Lung cancer in idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202360.
- [9]. Kim C, Gao YT, Xiang YB et al. Home kitchen ventilation, cooking fuels, and lung cancer risk in a prospective cohort of never smoking women in Shanghai, China. *Int J Cancer*, 2015, 136(3): 632~638.
- [10]. Cannon-Albright LA, Carr SR, Akerley W. Population-Based Relative Risks for Lung Cancer Based on Complete Family History of Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, 2019, 14(7): 1184~1191.
- [11]. Darby S, Hill D, Auvinen A et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *Bmj*, 2005, 330(7485): 223.
- [12]. Lamm SH, Ferdosi H, Dissen EK et al. A Systematic Review and Meta-Regression Analysis of Lung Cancer Risk and Inorganic Arsenic in Drinking Water. *Int J Environ Res Public Health*, 2015, 12(12): 15498~15515.
- [13]. Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J et al. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *Lancet Oncol*, 2006, 7(2): 119~126.
- [14]. Ngamwong Y, Tangamornsuksan W, Lohitnavy O et al. Additive Synergism between Asbestos and Smoking in Lung Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135798.
- [15]. Poinen-Rughooputh S, Rughooputh MS, Guo Y et al. Occupational exposure to silica dust and risk of lung cancer: an updated meta-analysis of epidemiological studies. *BMC Public Health*, 2016, 16(1): 1137.

- [16].Giroux V, Rustgi AK. Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia-cancer sequence. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(10): 594~604.
- [17].Yang L, Lu X, Deng J et al. Risk factors shared by COPD and lung cancer and mediation effect of COPD: two center case-control studies. *Cancer Causes Control*, 2015, 26(1): 11~24.
- [18].Ang L, Chan CPY, Yau WP, Seow WJ. Association between family history of lung cancer and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Lung Cancer*, 2020, 148: 129~137.
- [19].Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. *Cancer Statistics, 2021*. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7~33.
- [20].Tang Y, Qiao G, Xu E et al. Biomarkers for early diagnosis, prognosis, prediction, and recurrence monitoring of non-small cell lung cancer. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 4527~4534.
- [21].Gesthalter YB, Vick J, Steiling K, Spira A. Translating the transcriptome into tools for the early detection and prevention of lung cancer. *Thorax*, 2015, 70(5): 476~481.
- [22].Holdenrieder S, Wehnl B, Hettwer K et al. Carcinoembryonic antigen and cytokeratin-19 fragments for assessment of therapy response in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*, 2017, 116(8): 1037~1045.
- [23].Mamdani H, Ahmed S, Armstrong S et al. Blood-based tumor biomarkers in lung cancer for detection and treatment. *Transl Lung Cancer Res*, 2017, 6(6): 648~660.
- [24].Lambin P, Leijenaar RTH, Deist TM et al. Radiomics: the bridge between medical imaging and personalized medicine. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(12): 749~762.
- [25].Hawkins S, Wang H, Liu Y et al. Predicting Malignant Nodules from Screening CT Scans. *J Thorac Oncol*, 2016, 11(12): 2120~2128.
- [26].Zhu X, Dong D, Chen Z et al. Radiomic signature as a diagnostic factor for histologic subtype classification of non-small cell lung cancer. *Eur Radiol*, 2018, 28(7): 2772~2778.
- [27].Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(9): 531~548.
- [28].Park J, Hwang M, Choi B et al. Exosome Classification by Pattern Analysis of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Data for Lung Cancer Diagnosis. *Anal Chem*, 2017, 89(12): 6695~6701.
- [29].Niu L, Song X, Wang N et al. Tumor-derived exosomal proteins as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*, 2019, 110(1): 433~442.
- [30].Zhou X, Wen W, Shan X et al. A six-microRNA panel in plasma was identified as a potential biomarker for lung adenocarcinoma diagnosis. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 6513~6525.
- [31].Díaz-Serrano A, Gella P, Jiménez E et al. Targeting EGFR in Lung Cancer: Current Standards and Developments. *Drugs*, 2018, 78(9): 893~911.
- [32].Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med*, 2008, 359(13): 1367~1380.
- [33].Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 2009, 361(10): 947~957.
- [34].Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D et al. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med*, 2020, 382(1): 41~50.

- [35].Mok TS, Wu YL, Ahn MJ et al. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*, 2017, 376(7): 629~640.
- [36].Kim KH, Choi KU, Kim A et al. PD-L1 expression on stromal tumor-infiltrating lymphocytes is a favorable prognostic factor in ovarian serous carcinoma. *J Ovarian Res*, 2019, 12(1): 56.
- [37].Chen S, Crabill GA, Pritchard TS et al. Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 305.
- [38].Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*, 2017, 168(4): 707~723.
- [39].Antonia SJ, Borghaei H, Ramalingam SS et al. Four-year survival with nivolumab in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer: a pooled analysis. *Lancet Oncol*, 2019, 20(10): 1395~1408.
- [40].McLaughlin J, Han G, Schalper KA et al. Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*, 2016, 2(1): 46~54.
- [41].Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nat Med*, 2018, 24(9): 1441~1448.
- [42].Brumbaugh AD, Narurkar R, Parikh K et al. Cardiac Immune-Related Adverse Events in Immune Checkpoint Inhibition Therapy. *Cardiol Rev*, 2019, 27(2): 97~107.
- [43].Heerboth S, Housman G, Leary M et al. EMT and tumor metastasis. *Clin Transl Med*, 2015, 4: 6.
- [44].Gao D, Vahdat LT, Wong S et al. Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer. *Cancer Res*, 2012, 72(19): 4883~4889.
- [45].Hugo H, Ackland ML, Blick T et al. Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol*, 2007, 213(2): 374~383.
- [46].Aokage K, Ishii G, Ohtaki Y et al. Dynamic molecular changes associated with epithelial-mesenchymal transition and subsequent mesenchymal-epithelial transition in the early phase of metastatic tumor formation. *Int J Cancer*, 2011, 128(7): 1585~1595.
- [47].Banyard J, Bielenberg DR. The role of EMT and MET in cancer dissemination. *Connect Tissue Res*, 2015, 56(5): 403~413.
- [48].Krainock M, Toubat O, Danopoulos S et al. Epicardial Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Heart Development and Disease. *J Clin Med*, 2016, 5(2).
- [49].Kalcheim C. Epithelial-Mesenchymal Transitions during Neural Crest and Somite Development. *J Clin Med*, 2015, 5(1).
- [50].Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med*, 2015, 21(9): 998~1009.
- [51].Tennakoon AH, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Pathogenesis of Type 2 Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in Renal and Hepatic Fibrosis. *J Clin Med*, 2015, 5(1).
- [52].Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2): 69~84.
- [53].Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009, 139(5): 871~890.

- [54]. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178~196.
- [55]. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(2): 131~142.
- [56]. Lu W, Kang Y. Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Dev Cell*, 2019, 49(3): 361~374.
- [57]. Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(2): 128~134.
- [58]. Derynck R, Weinberg RA. EMT and Cancer: More Than Meets the Eye. *Dev Cell*, 2019, 49(3): 313~316.
- [59]. Denlinger CE, Ikonomidis JS, Reed CE, Spinale FG. Epithelial to mesenchymal transition: the doorway to metastasis in human lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2010, 140(3): 505~513.
- [60]. Nurwidya F, Takahashi F, Murakami A, Takahashi K. Epithelial mesenchymal transition in drug resistance and metastasis of lung cancer. *Cancer Res Treat*, 2012, 44(3): 151~156.
- [61]. Feng YL, Chen DQ, Vaziri ND et al. Small molecule inhibitors of epithelial-mesenchymal transition for the treatment of cancer and fibrosis. *Med Res Rev*, 2020, 40(1): 54~78.
- [62]. Singh M, Yelle N, Venugopal C, Singh SK. EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacol Ther*, 2018, 182: 80~94.
- [63]. Monsivais D, Matzuk MM, Pangas SA. The TGF- $\beta$  Family in the Reproductive Tract. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(10).
- [64]. Tang B, Vu M, Booker T et al. TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest*, 2003, 112(7): 1116~1124.
- [65]. Wakefield LM, Roberts AB. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(1): 22~29.
- [66]. Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGF- $\beta$  in cancer. *J Pathol*, 2011, 223(2): 205~218.
- [67]. Zhang YE. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- $\beta$  Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(2).
- [68]. Yamashita M, Fatyol K, Jin C et al. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell*, 2008, 31(6): 918~924.
- [69]. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA et al. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem*, 2000, 275(47): 36803~36810.
- [70]. Derynck R, Budi EH. Specificity, versatility, and control of TGF- $\beta$  family signaling. *Sci Signal*, 2019, 12(570).
- [71]. Moustakas A, Heldin CH. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development*, 2009, 136(22): 3699~3714.
- [72]. Papageorgis P. TGF $\beta$  Signaling in Tumor Initiation, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, and Metastasis. *J Oncol*, 2015, 2015: 587193.
- [73]. Miyazawa K, Miyazono K. Regulation of TGF- $\beta$  Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(3).

- [74]. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*, 2009, 19(2): 156~172.
- [75]. Delcommenne M, Tan C, Gray V et al. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(19): 11211~11216.
- [76]. Lu Z, Li Y, Che Y et al. The TGFβ-induced lncRNA TBILA promotes non-small cell lung cancer progression in vitro and in vivo via cis-regulating HGAL and activating S100A7/JAB1 signaling. *Cancer Lett*, 2018, 432: 156~168.
- [77]. Lamouille S, Subramanyam D, Belloch R, Derynck R. Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, 25(2): 200~207.
- [78]. Tripathi V, Sixt KM, Gao S et al. Direct Regulation of Alternative Splicing by SMAD3 through PCBP1 Is Essential to the Tumor-Promoting Role of TGF-β. *Mol Cell*, 2016, 64(3): 549~564.
- [79]. Tan LY, Whitfield P, Llorian M et al. Generation of functionally distinct isoforms of PTBP3 by alternative splicing and translation initiation. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(11): 5586~5600.
- [80]. Spellman R, Llorian M, Smith CW. Crossregulation and functional redundancy between the splicing regulator PTB and its paralogs nPTB and ROD1. *Mol Cell*, 2007, 27(3): 420~434.
- [81]. Zhu W, Zhou BL, Rong LJ et al. Roles of PTBP1 in alternative splicing, glycolysis, and oncogenesis. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2020, 21(2): 122~136.
- [82]. Licatalosi DD, Yano M, Fak JJ et al. Ptbp2 represses adult-specific splicing to regulate the generation of neuronal precursors in the embryonic brain. *Genes Dev*, 2012, 26(14): 1626~1642.
- [83]. Yang X, Qu S, Wang L et al. PTBP3 splicing factor promotes hepatocellular carcinoma by destroying the splicing balance of NEAT1 and pre-miR-612. *Oncogene*, 2018, 37(50): 6399~6413.
- [84]. Chen B, Zhao AG, Shao J et al. The effects of PTBP3 silencing on the proliferation and differentiation of MKN45 human gastric cancer cells. *Life Sci*, 2014, 114(1): 29~35.
- [85]. Chen B, Chen W, Mu X et al. PTBP3 Induced Inhibition of Differentiation of Gastric Cancer Cells Through Alternative Splicing of Id1. *Front Oncol*, 2020, 10: 1477.
- [86]. Liang X, Chen W, Shi H et al. PTBP3 contributes to the metastasis of gastric cancer by mediating CAV1 alternative splicing. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 569.
- [87]. Hou P, Chen F, Yong H et al. PTBP3 contributes to colorectal cancer growth and metastasis via translational activation of HIF-1α. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 301.
- [88]. Rashid M, Zadeh LR, Baradaran B et al. Up-down regulation of HIF-1α in cancer progression. *Gene*, 2021, 798:145796.
- [89]. Ma J, Weng L, Jia Y et al. PTBP3 promotes malignancy and hypoxia-induced chemoresistance in pancreatic cancer cells by ATG12 up-regulation. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(5): 2917~2930.
- [90]. Hou P, Li L, Chen F et al. PTBP3-Mediated Regulation of ZEB1 mRNA Stability Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *Cancer Res*, 2018, 78(2): 387~398.

- [91].Liang Y, Song X, Li Y et al. LncRNA BCRT1 promotes breast cancer progression by targeting miR-1303/PTBP3 axis. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 85.
- [92].Tano K, Mizuno R, Okada T et al. MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. *FEBS Lett*, 2010, 584(22): 4575~4580.
- [93].Wu Q, Zhang B, Li B et al. PTBP3 promotes migration of non-small cell lung cancer through regulating E-cadherin in EMT signaling pathway. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 172.