

RNA 可变剪接在肿瘤耐药中的作用与机制

苏文媚 (广东医科大学附属医院, 广东湛江 524001)



专家简介: 苏文媚, 博士, 美国密歇根大学博士后, 主任医师/研究员, 博士后合作导师/博导/硕导, 广东省自然科学杰出青年人才, 现任广东医科大学附属医院科研部部长, 研究方向主要为细胞自噬介导肺癌耐药的机制。主持国家自然科学基金项目 2 项、广东省杰出青年基金项目 1 项、广东省科研项目 3 项、广东医科大学附属医院博士启动基金 1 项、广东医科大学附属医院登峰计划项目 1 项及学校青年基金项目 1 项等重要课题, 以第一作者或通信作者身份在《Cancer Research》《Aging-us》《Autophagy》等知名期刊发表论文 20 多篇, 总影响因子达 200 多分。2014 年获亚太地区 IASLC Asia Pacific Lung Cancer Conference (APLCC) “青年科学家”奖; 2015 年获百人计划“雏鹰”项目; 2015 及 2018 年获广东医科大学附属医院“优秀员工”称号; 2016 及 2018 年获 GASTO “优秀论文”奖; 2018 年被推荐为“省级学科学术带头人”及“广东医科大学高层次人才培养对象”; 2020 年获广东医科大学附属医院“十佳青年”

称号; 2020 年获广东医科大学附属医院“德技拔萃”医师奖; 2021 年获广东医科大学附属医院“科研之星”奖与“十佳员工”奖; 2021 年获“湛江市好医生”称号; 2022 年获“广东省自然科学基金杰出青年人才项目”。E-mail: suwenmei123@hotmail.com

摘要: 肿瘤的耐药性是当前癌症治疗的主要挑战之一。RNA 可变剪接在肿瘤耐药性的形成中起到重要作用。该文对这一领域的研究成果进行概述, 旨在为探索更多创新的肿瘤治疗策略提供参考依据。

关键词: 可变剪接; 肿瘤耐药性; 自噬; 分子机制; 治疗策略

中图分类号: R 730

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2023) 03-0247-08

The role and mechanism of RNA alternative splicing in tumor drug resistance

SU Wen-mei (Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, Guangdong)

Abstract: Drug resistance in tumors represents one of the primary challenges in current cancer treatment. RNA alternative splicing plays a crucial role in the formation of tumor drug resistance. This paper provides a detailed overview of the research findings in this field, aiming to provide a reference basis for the exploration of more innovative tumor treatment strategies.

Key words: alternative splicing; tumor drug resistance; autophagy; molecular mechanism; treatment strategies

在肿瘤治疗中, 耐药性是最主要的挑战之一。这种耐药性会导致肿瘤细胞对药物产生抵抗能力, 从而削弱治疗效果, 甚至导致治疗失败。这个过程涉及基因突变、表观遗传学改变、信号通路异常以及肿瘤微环境等多种因素^[1]。虽然肿瘤耐药的具体分子机制尚未被完全阐明, 但已有研究显示肿瘤细胞可利用多种策略逃避药物的杀伤, 其中一种重要的机制是RNA的可变剪接。

在过去十年中, 大量的RNA 测序研究揭示了人类转录组的复杂性, 据统计, 目前已经发现了超过 20

万种不同的mRNA 剪接变体^[2-6]。RNA 剪接是指前体mRNA 经历转录后, 在核内发生的一种后转录修饰过程。它涉及基因的非编码区段(内含子) 被移除, 而编码区段(外显子) 则被连接起来。这个过程生成了成熟的mRNA, 这些mRNA 在随后将被运输到胞质中进行蛋白质翻译^[7]。RNA 剪接可以发生在同一个基因上的不同外显子之间, 从而产生不同组合方式的mRNA 分子。这种选择性地包含或排除特定外显子的现象称为可变剪接。可变剪接是一种重要的基因表达调控机制, 它极大地增加了转录组和蛋白质组的复杂性和多

收稿日期: 2023-06-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82073388), 国家自然科学基金青年项目(81702270)

样性^[8]。在这个过程中,通过在成熟的mRNA中包含或排除特定的外显子,实现了单个基因的多种转录变体的表达。据估计,超过95%的人类基因会受到AS的影响,这可能会导致产生具有不同结构、功能或相互作用模式的蛋白质^[9]。

近期研究发现,在化疗药物耐药的肿瘤中存在广泛而特异的RNA剪接异常。这些异常可能导致肿瘤细胞对药物的反应发生改变。同时,利用剪接调节剂干预可变剪接过程,与常规抗肿瘤药物联合使用,可以提高肿瘤对药物的敏感性^[10-11]。这表明, RNA剪接失调可能是导致肿瘤药物耐药性形成和维持的重要因素之一,也是一个潜在的治疗靶点^[12-13]。RNA的可变剪接可以通过多种途径或机制影响肿瘤的耐药性,如在乳腺癌中,可变剪接可以导致ERBB2受体蛋白质产生具有不同长度和功能的变体,从而影响曲妥珠单抗等靶向药物对其的结合和抑制^[14-15]。其中一个重要的途径是通过调节自噬过程影响肿瘤对化疗药物的耐受。自噬是指细胞将自身的组分或有害物质降解回收利用的过程,是维持细胞内环境稳定和适应外界压力的一种机制。在肿瘤中,自噬可以在不同情况下发挥促进或抑制肿瘤生长和耐药性的作用^[16]。可变剪接可以通过影响自噬相关基因或信号通路的表达或功能来调控自噬水平和状态,从而影响肿瘤对药物的反应^[17-19]。本文将首先回顾RNA剪接在肿瘤耐药性中发挥作用的机制和途径,然后重点讨论自噬如何介导RNA剪接对肿瘤耐药性的影响,最后探讨针对这些机制的潜在治疗策略,以及其在未来临床应用的可能性和挑战。

1 RNA剪接的调控

RNA剪接是一个高度调控的过程,由剪接体和其他调节剪接因子蛋白共同完成。剪接体是一个由RNA和蛋白质组成的大型复合物,能够识别并剪切前体mRNA中的核心调节序列,如5'和3'剪接位点、分支点位点和多嘧啶链。有两种类型的剪接体,即U2型和U12型,它们在识别的剪接位点序列和使用的RNA成分上有所区别^[20]。U2型剪接体是主要的剪接体,负责去除约99%的内含子,而U12型剪接体是次要的剪接体,负责去除少于1%的内含子,并调节一些特殊的剪接事件。两种类型的剪接体都包含多个小核糖核酸(snRNA)分子和小核糖核蛋白(snRNP)颗粒,以及其他蛋白质成分^[20]。在人类肿瘤中,一些剪接体成分发生了突变,影响了它们在剪接过程中的功能。

除了位于5'和3'剪接位点附近的核苷酸配对区

域外,人类前体mRNA中的其他核心调控序列具有很高的变异性,使得剪接体对它们的识别可以受到其他因素的影响^[21]。这些因素包括顺式作用的调节元件和反式作用的剪接因子蛋白,它们可以结合到前体mRNA上,增强或减弱相应外显子被包含到成熟mRNA中的可能性。这些顺式调控因素和反式作用的剪接因子共同调节可变剪接进程,使得单个基因可以产生多种不同的RNA表达产物,进而翻译成不同的、通常具有不同生物学功能的蛋白质异构体。可变剪接异构体在编码能力、稳定性、定位、翻译效率等方面有所差异。例如,可变外显子的选择性包含或排除通常会导致蛋白质相互作用能力的变化^[22]。目前估计,每个人类编码蛋白质的基因平均产生7.4个RNA异构体^[23]。

反式作用的剪接因子是一类能够调节可变剪接的RNA结合蛋白(RBP),这些反式作用的剪接因子能够识别并特异性结合至前体mRNA序列上包含的顺式作用调控元件,如外显子或内含子的剪接增强子或沉默子。丝氨酸/精氨酸富含(SR)蛋白和异质核糖核蛋白(hnRNP)是两个最常见的剪接因子家族,它们通过结合前体mRNA中的调节元件以浓度依赖的方式影响可变剪接^[24-25]。SR蛋白具有一个与RNA结合的RNA识别基序(RRM)结构域和一个介导蛋白质-蛋白质和蛋白质-RNA相互作用的精氨酸/丝氨酸富含(RS)结构域。hnRNP通常具有一个或多个RRM,以及一个富含甘氨酸和/或富含精氨酸/甘氨酸的区域,和/或一个K同源(KH)结构域18。hnRNP家族成员蛋白在调控可变剪接、前体mRNA的运输以及成熟mRNA的翻译过程中发挥重要而又广泛的作用,并且通常与SR蛋白调节的可变剪接事件相对立^[25]。SR蛋白和hnRNP的不同RNA结合基序表明这些剪接因子可以协同或拮抗工作,而这些调节剪接因子之间的复杂相互作用才刚刚开始被揭示。

2 RNA剪接在肿瘤耐药中的作用

RNA剪接失调在肿瘤耐药性中的重要作用已受到广泛的关注。抗癌疗法,包括化学疗法、放射疗法、激素疗法和免疫疗法等,都旨在抑制肿瘤的增长或根除癌细胞。然而,所有这些治疗方法都可能导致肿瘤对药物产生耐药性。RNA测序研究揭示了癌症中与药物或治疗耐药性相关的异常剪接事件^[26-27],表明RNA剪接失调和肿瘤的药物耐药性之间存在着密切的联系。RNA剪接调控异常可以通过多种机制促进肿瘤细胞对各种治疗手段产生耐药性,其主要机制包

括以下几个方面。

2.1 药物代谢的改变

无论是传统化疗药物还是靶向药物,肿瘤细胞产生耐药常通过改变药物的代谢过程,如吸收、分布和转化等实现^[28-36]。RNA 剪接在这些过程中发挥了核心作用。许多耐药机制实际上是通过相关基因的剪接来实现的。如在黑色素瘤和前列腺癌中,我们发现直接药物靶点的异常剪接;在黑色素瘤中,超过一半的患者携带有BRAF 丝氨酸/苏氨酸激酶的V600E 突变^[37-38];一种缺失 4-8 号外显子的BRAF V600E 突变剪接变体在约30% 维莫非尼耐药的黑色素瘤患者中被发现^[37]。这种剪接的改变导致了RAS 结合域的缺失,该结合域参与BRAF 的二聚化和激活,使得细胞对RAF 抑制剂产生了耐药性^[39]。类似地,前列腺癌细胞也利用异常剪接来逃避常用的抗雄激素策略,即阻断雄激素受体(AR)的活性^[40-41]。恩沙鲁胺(拮抗雄激素与AR 的相互作用)和阿比特龙(一种雄激素生物合成的抑制剂)是两种最常用的抗雄激素药物。然而,一种名为ARv7 的AR 剪接变体缺少了配体结合域(LBD) – 这是所有抗雄激素的结合位点,使得细胞对抗雄激素产生了耐药性^[42-43]。另外,HNRNPA1 被证明能促进ARv7 变体的剪接。

2.2 细胞死亡调节的改变

细胞死亡途径的调整,包括细胞凋亡、坏死性凋亡、自噬、铁死亡、细胞焦亡和坏死等,已被许多研究证明是肿瘤细胞增强耐药性的关键方式之一^[44]。通过剪接过程,MCL1 和BCL-X 能够产生具有不同功能的变体:一些变体具有抗凋亡的功能,例如MCL1L 和BCL-XL;另一些变体则具有促凋亡的功能,如MCL1S 和BCL-XS^[45-46]。这两个剪接过程都受到SF3B1 和SRSF1 剪接因子的部分调控^[47]。BCL-XL 和其他抗凋亡因子在许多癌症组织中高度表达,并常导致对各种化疗药物的抵抗^[48-51]。此外,也有研究发现Bcl-xL 能与PIK3C3 结合,降低Beclin1-PIK3C3 复合体的形成,从而抑制自噬启动,增加肺腺癌细胞对EGFR-TKI 的耐药性^[52]。

2.3 细胞间通讯在诱导药物耐受性中的作用

过去的研究发现剪接因子可被癌细胞分泌^[53-55]。结直肠癌细胞的分泌物中富含剪接因子,如SF3B3 和HNRNPA3^[53]。卵巢癌患者的腹水中剪接体蛋白以及snRNA 的含量较高,这些剪接调节因子被认为能促进上皮间质转化(EMT)并增加肿瘤侵袭性^[55]。此外,癌细胞分泌的外泌体中也包含剪接调节因子,可能引发肿瘤耐药性^[56]。凋亡抵抗的原发性AML 细胞在共培养环境中能够上调凋亡敏感AML 细胞中的BCL-2 表

达^[57],这些细胞分泌的外泌体富含参与基因表达调控的蛋白质,包括剪接因子。这些含有剪接因子的外泌体易被HeLa 细胞和凋亡敏感AML 细胞摄取,并影响摄取细胞的RNA 剪接,促进摄取癌细胞的增殖和治疗耐受性。研究表明,隧道纳米管(TNTs)能介导骨髓基质细胞和CML 细胞之间的囊泡和蛋白质转运^[58]。其中通过 TNTs 转移的含有剪接因子的物质能保护CML 细胞免受伊马替尼诱导的凋亡。

2.4 治疗靶点的改变

选择性剪接的改变可以导致靶标或信号转导途径的异常,从而使肿瘤细胞对靶向治疗产生抗性。例如,BRCA1 Δ 11q 异构体,一种缺少大部分外显子 11 的变体,可以促进肿瘤细胞对聚ADP-核糖聚合酶(PARP)抑制剂和顺铂的抗性^[59]。此外,一些BRCA1 野生型的结肠癌细胞对PARP 抑制剂具有抗性,这与它们表达BARD1 β 有关。BARD1 β 对BRCA1 的肿瘤抑制活性是必需的^[60]。BARD1 β 的表达降低了同源重组的效率,并且其外源性表达增加了对PARP 抑制剂的抗性。同样,SRSF1 调控的BH3-only 促凋亡蛋白BIM 的可变剪接也与肿瘤细胞对多种靶向酪氨酸激酶的酪氨酸激酶抑制剂(TKI)的治疗反应性及耐药性密切相关^[61-62]。最后,HER2 (也称为ERBB2)的选择性剪接,包括外显子 16 的跳跃,产生了 Δ 16 HER2 这一种在细胞外结构域中缺少 16 个氨基酸的组成型活化蛋白^[63-64]。这种选择性剪接降低了肿瘤细胞对HER2 靶向抗体曲妥珠单抗的敏感性。

激素受体信号传导是一些表达雄激素受体(AR)或雌激素受体- α (ER α)的肿瘤(如前列腺癌或乳腺癌)生长和存活所必需的。抑制激素受体信号传导的药物通常被用作这些肿瘤的一线治疗。然而,患者经常对这些治疗产生耐药性,并且剪接改变可能是导致耐药性发生的原因之一。例如,一些前列腺癌细胞表达了激活AR 信号传导的AR 异构体,尽管它们缺少激素和抗雄激素拮抗剂作用的配体结合结构域(如AR-V7 和AR-v567es)^[65-67]。这些AR 异构体与前列腺癌细胞对抗雄激素治疗的耐药性和转移相关。同样,与肿瘤表达其他ER α 亚型的患者相比,表达ER α 36[一种缺乏组成性激活功能(AF-1)结构域和部分激素依赖性激活功能(AF-2)结构域的亚型]的乳腺癌对他莫昔芬治疗的反应不佳^[68]。

2.5 免疫治疗的耐受

靶向CD19 的免疫治疗方法,如基于CD19 嵌合抗原受体(CAR)的CAR-T 细胞疗法,在B 细胞性急性淋巴

细胞白血病(B-ALL)的治疗中取得重大突破。然而,由于免疫排斥、T细胞耗竭或目标抗原位点的丢失,50%患者会复发。CD19的选择性剪接可以导致抗原位点丢失,产生缺乏第二外显子的剪接异构体,这些异构体不能被CAR T细胞识别,从而导致治疗耐药性。CD22的选择性剪接也是导致CAR T细胞治疗耐药的另一个例子。当跳过第5和第6个外显子,这会导致CAR T细胞无法靶向CD22的第三免疫球蛋白样结构域,而跳过包含起始密码子的第2个外显子则会阻止CD22蛋白的生成,从而减少可供抗原呈现的蛋白水平^[69]。

3 自噬在RNA剪接调控肿瘤耐药中的作用

如前所述, RNA剪接对肿瘤耐药性的调控部分源于对细胞死亡机制的影响,其中自噬信号是其中最重要的调节途径之一。自噬已被证明可以促进肿瘤细胞存活并有助于治疗耐药性^[70-72]。例如,在雌激素受体阳性乳腺癌中,抑制自噬使耐药肿瘤对他莫昔芬诱导的杀伤致敏^[73-74]。同样,在前列腺癌中,自噬抑制克服了对恩杂鲁胺^[75]的耐药性。研究表明,自噬不仅被许多治疗药物诱导,而且也是治疗产生耐药性的原因,这种现象在不同的癌症类型和治疗中都有发现^[72]。

自噬是由一组高度保守的基因有序激活的过程,受到两个主要信号通路-mTOR和AMPK的调控。在正常营养供给的情况下, mTOR通路通过磷酸化自噬相关蛋白ATG13,从而导致ULK复合体(由ULK1、ATG13和FAK家族激酶互作蛋白200 kDa(FIP200)组成的解聚。由于ULK1是形成自噬体的必需成分,所以其解聚可以阻止自噬过程。在细胞饥饿的条件下, mTOR的磷酸化被抑制,使ULK1复合体保持完整,从而能够启动自噬体的形成。在细胞应激条件下,肝激酶B1(LKB1)激活AMPK通路,后者在两个方面起作用:(1)通过去磷酸化和抑制mTORC1,刺激自噬过程;(2)磷酸化和激活ULK1复合体,启动下游的自噬核心过程,自噬核心过程涉及许多蛋白,如Beclin1-PIK3C3复合体、ATG5-ATG12-ATG16复合体、LC3/ATG8、p62/SQSTM1等。

RNA的剪接可以使得上述的某些基因产生不同的蛋白质亚型,这种替代剪接的变化可以对自噬过程产生差异性影响^[76]。已有研究表明RNA剪接对自噬的影响在肿瘤对化疗药物耐药中起着重要作用。这种影响可以是直接的,也可以是间接的。在多重耐药的三阴乳腺癌细胞中,剪接因子SRSF3能直接促进自噬基因BECN1、ATG5和Bcl2生成促自噬变体,从而激

活AMPK信号通路并促进自噬,导致乳腺癌细胞的耐药^[77]。在肺腺癌奥西替尼耐药细胞中,剪接因子SRSF1会促进Bcl-x基因剪接生成异构体Bcl-xL,而Bcl-xL可以与Beclin1相互作用从而解离Beclin1-PIK3C3复合物以抑制自噬起始,从而导致肿瘤细胞对奥希替尼耐药^[78]。

4 靶向RNA剪接对肿瘤耐药的治疗潜力

RNA剪接调节剂和抗癌药物的联合使用有抵抗或延缓肿瘤耐药的潜力。剪接体调节剂苏德霉素与Btk抑制剂伊布替尼在慢性淋巴细胞白血病(CLL)的治疗中被证明具有协同效应^[79]。苏德霉素能够提升CLL对伊布替尼的敏感性,这种协同作用被认为与伊布替尼Btk基因抑制剂(IBTK)中外显子25的跳跃剪接诱导有关。事实上,IBTK作为Btk的重要负调节因子,其与Btk的PH结构域结合可以导致Btk在残基Y223上的自磷酸化效率降低,从而抑制Btk的活性。通过苏德霉素的IBTK替代剪接调节,可以使该蛋白失去对Btk的负调控功能,进而增加磷酸化Btk的水平,提高CLL对伊布替尼的敏感性^[80]。除此之外, SF3B1抑制剂剪接抑素A(SSA)和BCL2/BCLXL抑制剂的联合使用,也被证实可以减轻微环境介导的伊布替尼耐药性^[81]。而meayamycin能够与SRSF3b复合物结合并抑制前体mRNA剪接,它与乳腺癌靶向药物联用能够有效治疗多重耐药乳腺癌^[82]。

目前从抑制关键剪接体蛋白或调节剪接因子到调节特异性可变剪接事件的各种方法正在研发中。isoginkgetin,一种广谱剪接体抑制剂,它阻止了U4/U5/U6 snRNP的招募,并导致在预剪接体A复合物上停滞^[83]。在临床前的实验模型中, isoginkgetin治疗影响了许多与癌症相关的途径,包括细胞死亡^[84]、侵袭^[85]和免疫反应^[86]。特异性剪接因子的过表达和低表达可以促进肿瘤耐药的发生,开发校正剪接因子表达的方法对肿瘤的治疗具有较大的价值。目前还没有通用方法靶向个别剪接因子,但未来的研究似可从以下几个方面进行:通过反义寡核苷酸或小分子促进或抑制剪接因子内含子中的NMD外显子的包含(NMD外显子是一种特殊的外显子,当它们被包含在mRNA中时,会导致mRNA被降解),从而降低或增强剪接因子蛋白水平;靶向剪接因子活性或表达的上游调节因子,它们比许多剪接因子本身更容易被药物靶向^[87]。

5 研究的挑战和展望

假如要将肿瘤可变剪接的机制性发现转化为临

床应用,则还需解决以下问题:

5.1 可变剪接的识别

迄今为止,大多数研究都依赖于短读长RNA-seq来表征人类肿瘤中的可变剪接谱,但这种方法不能可靠地检测复杂和/或全长的新异构体^[88]。最近的一项长读长RNA-seq(LR-seq)研究发现,新的剪接异构体可以占乳腺肿瘤转录组的30%以上^[89]。随着LR-seq方法变得更加经济可靠,预计它将取代短读长RNA-seq,揭示肿瘤和正常组织的可变剪接构成。此外肿瘤内的不同细胞类型是否表现出可变剪接的差异尚不清楚,部分原因是目前大多数单细胞研究都基于短读长RNA-seq,不能可靠地检测可变剪接。最近,结合LR-seq的单细胞转录组学方法已被证实可以在不同类型的脑细胞发育过程检测全长转录本剪接异构体^[90-92]。这种方法可以用于探索可变剪接如何影响肿瘤的发生、发展以及对药物的反应,并识别出与药物耐受相关的肿瘤群体。最后,单细胞LR-seq与空间转录组学结合可揭示可变剪接促进组织发育和疾病发生的机制^[93]。这种方法对于研究与可变剪接改变相关肿瘤的发生、发展和对药物的反应具有潜在的应用价值。

5.2 探索可变剪接开关的功能意义

可变剪接开关是指同一基因的不同转录本异构体,在不同的生理或病理条件下,或不同的细胞类型中,相互转换并改变其表达水平的现象。可变剪接开关可以影响蛋白质的结构和功能,从而调节细胞的生理和病理过程。目前已经发现了数千个癌症相关的可变剪接异构体,但缺乏高通量方法来探索它们的功能,这阻碍了发现具有临床意义和可操作性的可变剪接开关。测试单个异构体的功能并不容易,通常需要过表达或敲低每个目标。因此,需有可以同时研究数千个可变剪接异构体的功能筛选方法。最近,基于CRISPR的方法已经证明,可以使用成对的gRNAs删除数百个外显子,并筛选它们对肿瘤细胞生长的影响^[94]。然而,这个方法是针对DNA序列的,因此可能会影响基因组和染色质结构、基因转录和其他调控元件。未来需要开发更多的方法来模拟不仅仅是外显子跳跃的其他可变剪接事件(例如内含子保留、可变剪接位点、互斥外显子),从而可以研究任何感兴趣的可变剪接事件(或组合)的功能。值得注意的是,许多研究都倾向于研究诱导NMD的事件,因为它们更容易模拟,而且与其他可变剪接事件相比,这种可以导致基因失活的剪接事件在功能上更容易解释。最后,更加准确和可靠的模型系统是开展这一研究领域的基础,它们有助于研究

可变剪接异常在恶性肿瘤发生、发展中的功能影响,并有利于对靶向RNA剪接的新型治疗方法进行临床前评价。例如类器官和共培养模型的体外模型、具有剪接因子突变的同系小鼠模型等^[87]。

总之,RNA可变剪接失调在肿瘤耐药发生过程中起重要的作用。我们期待未来的研究发现RNA可变剪接与肿瘤耐药之间的新联系,并能够开发出针对RNA剪接的新型癌症治疗策略。

参考文献:

- [1] CABANOS H F, HATA A N. Emerging insights into targeted therapy-tolerant persister cells in cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(11):2666.
- [2] BARALLE F E, GIUDICE J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(7): 437-451.
- [3] CLIMENTE-GONZÁLEZ H, PORTA-PARDO E, GODZIK A, et al. The functional impact of alternative splicing in cancer[J]. *Cell Rep*, 2017, 19(7): 1518-1526.
- [4] KAHLES A, LEHMANN K V, TOUSSAINT N C, et al. Computational methods for single-cell RNA-seq analysis[J]. *Nat Methods*, 2018, 15(3): 213-222.
- [5] RAHMAN S, SAMPLE A, BARALLE D, et al. Functional splicing regulatory elements: A review of conserved sequence cis-motifs that regulate exon definition and alternative splicing within higher eukaryotes[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(8):1515-1535.
- [6] TIAN K, WYSOCKI J M, BARASH I. Alternative splicing and drug resistance in breast cancer and melanoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(8):1080.
- [7] KELEMEN O, CONVERTINI P, ZHANG Z, et al. Function of alternative splicing[J]. *Gene*, 2013, 514(1):1-30.
- [8] NILSEN T W, GRAVELEY B R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing[J]. *Nature*, 2010, 463(7280): 457-463.
- [9] PAN Q, SHAI O, LEE L J, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(12):1413-1415.
- [10] GAO Y, KOIDE K. Chemical perturbation of Mcl-1 pre-mRNA splicing to induce apoptosis in cancer cells[J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(5):895-900.
- [11] XARGAY-TORRENT S, LÓPEZ-GUERRA M, ROSICH L, et al. The splicing modulator sudemycin induces a specific antitumor response and cooperates with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(26):22734-22749.
- [12] MARTÍNEZ-REYES I, CHANDEL N S. Cancer metabolism: Looking forward[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(10):669-680.
- [13] HOLOHAN C, VAN SCHAEYBROECK S, LONGLEY D B,

- et al. Cancer drug resistance: An evolving paradigm[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(10):714-726.
- [14] CASTIGLIONI F, TAGLIABUE E, CAMPIGLIO M, et al. The role of exon 16 deleted HER2 in breast cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13(3):221-232.
- [15] ALAJATI A. HER2 splicing variants drive breast tumor formation and metastasis[J]. *PNAS*, 2013, 110(39):15310-15315.
- [16] SCIARRILLO R, WOJTUSZKIEWICZ A, ASSARAF Y G, et al. The role of alternative splicing in cancer: From oncogenesis to drug resistance[J]. *Drug Resist Updat*, 2020, 53:100728.
- [17] GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ P, KLIONSKY D J, JOSEPH B. Autophagy regulation by RNA alternative splicing and implications in human diseases[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):2735.
- [18] KONDO Y, KANZAWA T, SAWAYA R, et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 726-734.
- [19] LEVY J M M, TOWERS C G, THORBURN A. Targeting autophagy in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17: 528-542.
- [20] WILKINSON M E, CHARI N, NAGAI K. RNA splicing by the spliceosome[J]. *Annu Rev Biochem*, 2020, 89:359-388.
- [21] LEE Y, RIO D C. Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing[J]. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84:291-323.
- [22] ELLIS J D, BARRIOS-RODILES M, COLAK R, et al. Tissue-specific alternative splicing remodels protein-protein interaction networks[J]. *Mol Cell*, 2012, 46(5):884-892.
- [23] TUNG K F, PILE-JUAREZ M, BARRAZA T, et al. Studying top expressed transcript variants of human protein-coding genes using the GTEx dataset[J]. *Sci Rep*, 2020, 17, 10(1):5245.
- [24] HOWARD J M, SANFORD J R. The hnRNP family: Insights into their role in gene expression[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2015, 6(2):93-110.
- [25] GEUENS T, BOUHY D, TIMMERMAN V. The hnRNP family: Insights into their role in health and disease[J]. *Hum Genet*, 2016, 135(8):851-867.
- [26] WU Q, FENG L, WANG Y, et al. Multi-omics analysis reveals RNA splicing alterations and their biological and clinical implications in lung adenocarcinoma[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 22, 7(1):270.
- [27] CLIMENTE-GONZÁLEZ H, PORTA-PARDO E, GODZIK A, et al. The functional impact of alternative splicing in cancer[J]. *Cell Rep*, 2017, 20(9):2215-2226.
- [28] ASSARAF Y G, LEAMON C P, AZAB A K. Active transport of antineoplastic agents: From inclusions to multidrug resistance[J]. *Drug Resist Updat*, 2019, 44:100613.
- [29] LI X T, LING X L, LI M L, et al. MiR-770 suppresses the chemoresistance of ovarian cancer cells to cisplatin by targeting ABCB1[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(2):BSR20192918.
- [30] LEPELTIER E, MA Y, PERVAIZ B, et al. Multidrug resistance paradigm revisited: Tunneling nanotubes provide an escape route for drug efflux[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(3):180.
- [31] BAR-ZEEV M, AVISHAI G, ELAD N, et al. Exploration of the potential tumour uptake of [(18)F]FDG via ABCB1 using positron emission tomography (PET) in vivo[J]. *EJNMMI Res*, 2017, 7(1):75.
- [32] LI W, DAI Z, WANG X, et al. Linc00511 acts as a competing endogenous RNA to regulate VEGFA expression through sponging hsa-miR-29b-3p in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2016, 380(1):230-238.
- [33] ZHITOMIRSKY B, ASSARAF Y G. Lysosomes as mediators of drug resistance in cancer[J]. *Drug Resist Updat*, 2016, 26:23-33.
- [34] LIVNEY Y D, ASSARAF Y G. Rationale for the selection of nanovehicle-based mTHPC delivery system to overcome Pgp-mediated resistance in epithelial cancers[J]. *Drug Resist Updat*, 2013, 16(1-2):38-49.
- [35] GONEN N, ASSARAF Y G. Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance[J]. *Drug Resist Updat*, 2012, 15(4):183-210.
- [36] ASSARAF Y G. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis[J]. *Drug Resist Updat*, 2007, 10(4-5):176-186.
- [37] POULIKAKOS P I, PERSAUD Y, JANAKIRAMAN M, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E) [J]. *Nature*, 2011, 480(7377):387-390.
- [38] HAUGH I M, JOHNSON J L. Turning on and tuning out: Regulation of cell fate through FGFR-mediated signaling[J]. *Dev Dyn*, 2019, 48(1):80-103.
- [39] SCIARRILLO R, WOJTUSZKIEWICZ A, ASSARAF Y G, et al. The role of alternative splicing in cancer: From oncogenesis to drug resistance[J]. *Drug Resist Updat*, 2020, 53:100728.
- [40] CAO L, QUAN L, ZHAO L, et al. Emodin enhances cisplatin-induced cytotoxicity via down-regulation of ERCC1 and inactivation of ERK1/2[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e83903.
- [41] MUNKLEY J, OLTEAN S, VODÁK D, et al. The androgen receptor controls expression of the cancer-associated sTn antigen and cell adhesion through induction of ST6GalNAc1 in prostate cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15):25006-25022.
- [42] ANTONARAKIS E S, HEATH E I, POSADAS E M, et al. Prevention and management of toxicities related to immune checkpoint blockade: JAVA - Clinician's reference on immune-based toxicities and patient management[J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2017, 37:436-451.

- [43]SEITZ S, STRAND S, VERMEHREN J, et al. CTLA-4 blockade by tremelimumab: A systematic literature review of safety in patients with advanced melanoma[J]. Immunotherapy, 2017, 9(3):237-252.
- [44]NADIMINTY N, ZENG H, CHEN S, et al. Effects of nucleolin targeting nuclease Sn38P on multiple myeloma cell proliferation and angiogenesis[J]. J Hematol Oncol, 2015, 8:46.
- [45]TYSON-CAPPER A J, GAUTREY H E. Regulation of hedgehog signaling in prostate cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1095: 219-235.
- [46]WARREN G T, BONELLI C, SHIH S C, et al. Loss of Hedgehog signaling in stromal fibroblasts promotes intestinal fibrosis[J]. Cell Rep, 2019, 26(9):2332-2343.
- [47]MOORE A E, HAYS S M, GONZALEZ M M, et al. Proteomic analysis of water column particulate organic matter in a eutrophic lake reveals major differences between free-floating and colonial algae[J]. Freshwater Biol, 2010, 55(10):2129-2140.
- [48]AKGUL G, DERACINOIS B, LI L, et al. Increased sensitivity of antioxidants upon UVB irradiation of mouse embryonic fibroblasts[J]. Toxicol In Vitro, 2004, 18(3):285-292.
- [49]DE NECOCHEA-CAMPION R, KIM C S, DAWSON G. Aberrant redox homeostasis and ER stress in alcoholic liver disease[J]. Crit Rev Biomed Eng, 2016, 44(2):83-102.
- [50]WANG B D, LEE N H. Aberrant RNA splicing in cancer and drug resistance[J]. Cancers (Basel), 2018, 10(11):458.
- [51]ZHANG Y, SUN L, WANG M, et al. The role of exercise and physical activity in breast cancer treatment-related side effects and quality of life[J]. Curr Treat Options Oncol, 2020, 21(6):50.
- [52]LV Y, ZHANG W, ZHAO J, et al. SRSF1 inhibits autophagy through regulating Bcl-x splicing and interacting with PIK3C3 in lung cancer[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1):108.
- [53]DE WIT N M, SNIJDERS S V, DE GRAAF P W, et al. Prescription of respiratory medication and quality of life in GOLD stages II to IV chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in primary care[J]. Eur J Gen Pract, 2014, 20(3):161-170.
- [54]SCHAAIJ-VISSER T B, BRAKENHOFF L K, MACHIELS M, et al. The impact of immunotherapy on health-related quality of life in cancer patients: A systematic literature review of randomized controlled trials[J]. Oncoimmunology, 2013, 2(11):e26679.
- [55]TAURO S, LYNCH T L, QUINLAN-HICKEY B, et al. Quality of life outcomes in the treatment of HPV-associated oropharyngeal cancer: A systematic review[J]. Oral Oncol, 2013, 49(7):669-677.
- [56]ASSARAF Y G, LEAMON C P, REDDY J A. Folate-targeted chemotherapy[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2019, 139:14-38.
- [57]WOJTUSZKIEWICZ A, SCHUETZ J, MUELLER V, et al. EAO guidelines for the management of cellulitis and erysipelas[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2016, 30(12):2032-2046.
- [58]KOLBA M D, DUDKA W, ZARĘBA-KOZIOŁ M, et al. Tunneling nanotube-mediated intercellular vesicle and protein transfer in the stroma-provided imatinib resistance in chronic myeloid leukemia cells[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(11):817.
- [59]WANG Y F, BERNHARDY A J, CRUZ C, et al. The BRCA1-Δ11q splice variant bypasses germline mutations and promotes therapeutic resistance to PARP inhibition and cisplatin[J]. Cancer Res, 2016, 76(8):2778-2790.
- [60]OZDEN O, BISHEHSARI F, BAUER J, et al. Expression of an oncogenic BARD1 splice variant impairs homologous recombination and predicts response to PARP-1 inhibitor therapy in colon cancer[J]. Sci Rep, 2016, 6:26273.
- [61]ANCZUKOW O, ROSENBERG A Z, AKERMAN M, et al. The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation[J]. Nat Struct Mol Biol, 2012, 19:220-228.
- [62]NG K P, HILLMER A M, CHUAH C T, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer[J]. Nat Med, 2012, 18(4): 521-528.
- [63]CASTIGLIONI F, TAGLIABUE E, CAMPIGLIO M, et al. Role of exon-16-deleted HER2 in breast carcinomas[J]. Endocr Relat Cancer, 2016, 13(1):221-232.
- [64]ALAJATI A, SAUSGRUBER N, ACETO N, et al. Mammary tumor formation and metastasis evoked by a HER2 splice variant[J]. Cancer Res, 2013, 73(17):5320-5327.
- [65]DEHM S M., SCHMIDT L J, HEEMERS H V, et al. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance[J]. Cancer Res, 2008, 68(13):5469-5477.
- [66]ANTONARAKIS E S, LU C, WANG H, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer[J]. N Engl J Med, 2014, 371(11):1028-1038.
- [67]SUN S, SPRENGER C C T, VESSELLA R L, et al. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant[J]. J Clin Invest, 2010, 120(8): 2715-2730.
- [68]THIEBAUT C, KONAN H P, GUERQUIN M J, et al. The role of ERα36 in development and tumor malignancy[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 4116.
- [69]SOTILLO E, SCHVARTZMAN J M, SOCCI N D, et al. Mad2-induced chromosome instability leads to lung tumour relapse after oncogene withdrawal[J]. Nature,

- 2010,467(7313):436-440.
- [70] KONDO Y, KANZAWA T, SAWAYA R, et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005,5(9): 726-734.
- [71] AMARAVADI R K, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, YIN X M, et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment[J]. *Clin Cancer Res*, 2011,17(4): 654-666.
- [72] LEVY J M M, TOWERS C G, THORBURN A. Targeting autophagy in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017,17(9): 528-542.
- [73] QADIR M A, KWOK B, DRAGOWSKA W H, et al. Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008,112(3): 389-403.
- [74] SAMADDAR J S, GADDY V T, DUPLANTIER J, et al. A role for macroautophagy in protection against 4-hydroxytamoxifen-induced cell death and the development of antiestrogen resistance[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008,7(9): 2977-2987.
- [75] NGUYEN H G, YANG J C, KUNG H J, et al. Targeting autophagy overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cells and improves therapeutic response in a xenograft model[J]. *Oncogene*, 2014,33(36): 4521-4530.
- [76] GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ P, KLIONSKY D J, JOSEPH B. Autophagy regulation by RNA alternative splicing and implications in human diseases[J]. *Nat Commun*, 2022,13(1):2735.
- [77] DAS C K, LINDER B, BONN F, et al. BAG3 overexpression and cytoprotective autophagy mediate apoptosis resistance in chemoresistant breast cancer cells[J]. *Neoplasia*, 2018, 20(3):263-279.
- [78] LV Y, ZHANG W, ZHAO J, et al. SRSF1 inhibits autophagy through regulating Bcl-x splicing and interacting with PIK3C3 in lung cancer[J]. *Signal transduct Target Ther*, 2021,6(1):108.
- [79] ARGAY-TORRENT S, LÓPEZ-GUERRA M, ROSICH L, et al. The splicing modulator sudemycin induces a specific antitumor response and cooperates with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(26): 22734-22749.
- [80] LIU W, QUINTO I, CHEN X, et al. Direct inhibition of Bruton's tyrosine kinase by IBtk, a Btk-binding protein[J]. *Nat Immunol*, 2001,2(10):939-946.
- [81] LARRAYOZ M, BLAKEMORE S J, DOBSON R C, et al. The SF3B1 inhibitor spliceostatin A (SSA) elicits apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells through downregulation of Mcl-1[J]. *Leukemia*, 2016,30(2):351-360.
- [82] ALBERT B, MCPHERSON P, O' BRIEN K, et al. Meayamycin inhibits pre-messenger RNA splicing and exhibits picomolar activity against multidrug-resistant cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009,8(8): 2308-2318.
- [83] O' BRIEN K, MATLIN A J, LOWELL A M, et al. The biflavonoid isoginkgetin is a general inhibitor of pre-mRNA splicing[J]. *J Biol Chem*, 2008,283(48):33147-33154.
- [84] VANZYL E J, SAYED H, BLACKMORE A B, et al. The spliceosome inhibitors isoginkgetin and pladienolide B induce ATF3-dependent cell death[J]. *PLoS ONE*, 2020,15(12):e0224953.
- [85] YOON S O, SHIN S, LEE H J, et al. Isoginkgetin inhibits tumor cell invasion by regulating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent matrix metalloproteinase-9 expression[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006,5(11): 2666-2675.
- [86] DARRIGRAND R, PIERSON A, ROUILLON M, et al. Isoginkgetin derivative IP2 enhances the adaptive immune response against tumor antigens[J]. *Commun Biol*, 2021,4(1): 269.
- [87] BRADLEY R K, ANCZUKÓW O. RNA splicing dysregulation and the hallmarks of cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2023,23(3):135-155.
- [88] DE PAOLI-ISEPPI R, GLEESON J, CLARK M B. Isoform age-splice isoform profiling using long-read technologies[J]. *Front Mol Biosci*, 2021,8: 711733.
- [89] VEIGA D F T, NESTA A, ZHAO Y, et al. A comprehensive long-read isoform analysis platform and sequencing resource for breast cancer[J]. *Sci Adv*, 2022,8(3): eabg6711.
- [90] TIAN L, JABBARI J S, THIJSEN R, et al. Comprehensive characterization of single-cell full-length isoforms in human and mouse with long-read sequencing[J]. *Genome Biol*, 2021,22(1):310.
- [91] GUPTA I, COLLIER P G, HAASE B, et al. Single-cell isoform RNA sequencing characterizes isoforms in thousands of cerebellar cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2018,36:1197-1202.
- [92] HARDWICK S A, HU W, JOGLEKAR A, et al. Single-nuclei isoform RNA sequencing unlocks barcoded exon connectivity in frozen brain tissue[J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(7): 1082-1092.
- [93] JOGLEKAR A, PRJIBELSKI A, MAHFOUZ A, et al. A spatially resolved brain region- and cell type-specific isoform atlas of the postnatal mouse brain[J]. *Nat Commun*, 2021,12(1):463.
- [94] THOMAS J D, POLASKI J T, FENG Q, et al. RNA isoform screens uncover the essentiality and tumor-suppressor activity of ultraconserved poison exons[J]. *Nat Genet*, 2020,52(1):84-94.