文章编号：1004-0374(2002)03-0150-03

mRNA 前体选择性剪接的研究进展

延锦春，陈誉华，宋今丹，陈 澄

（中国医科大学发育生物学研究室 卫生部细胞生物学重点实验室，沈阳 110001）

摘 要：mRNA 前体的选择性剪接（又称可变剪 / 拼接）是真核生物的一种基本而又重要的调控机制，它精细协调基因的功能，高效调节基因的定量表达以及蛋白功能的多样化，影响主要发育方向的决定，对细胞的分化、发育、生理功能和病理状态都有重要意义。选择性剪接与许多人类疾病密切相关。目前在生物信息学领域已有选择性剪接数据库的构建，用于选择性剪接的信息存储和处理。

关键词：mRNA 前体；选择性剪接；发育

中图分类号：Q75 **文献标识码**：A

Progress in the study of alternative splicing of pre-mRNA

YAN Jin-Chun, CHEN Yu-Hua, SONG Jin-Dan, CHEN Cheng

(Department of Developmental Biology, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health of China, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Alternative splicing of pre-mRNA is a powerful and versatile regulatory mechanism used in the eukaryotes that can effect quantitative control of gene expression and functional diversification of proteins. It contributes to major developmental decisions and also to fine tuning of gene function. Often regulated in specific spatial/temporal patterns , it plays a major role in the physiology and pathology of a major cellular events in those developmental stage specific processes. Alternative splicing is closely connected with many human diseases.The Alternative Splicing database (ASDB) has been established with the intention of assembling in a central, publicly accessible site information about alternatively spliced genes, their products and expression patterns.

Key words: pre-mRNA; alternative splicing; development

现有资料表明，可能 42% 或更大比例的人类基因，存在选择性剪接的形式。通过选择性剪接，一个 mRNA 前体被加工成多种不同类型的 mRNA，翻译成不同的蛋白异构体 (isoform)。

美国 UCLA 的一个研究中心 [1] 利用 210 万人类 mRNA 和 EST 序列，将 EST 序列标记到人类基因组序列草图上，在人类基因组中检测出 6 201 种选择性剪接关系。他们的统计结果分析表明：在人类，选择性剪接主要存在于一定类型的分子 (如细胞表面受体) 和系统 (尤其是免疫系统和神经系统) 中。这些结果为我们理解人类基因组的选择性剪接积累了丰富的数据。目前在生物信息学领域已有选择性剪接数据库 ASDB(Alternative Splicing Database) 的构建 [2]，如美国冷泉港实验室的 http://cgsigma.cshl.org/new_alt_exon_db2/ 和美国劳伦斯伯克利国家实验室的 http://devnull.lbl.gov:8888/alt/index.html，用于存储、处理选择性剪接的巨量信息。

对选择性剪接的深化研究将有助于深入理解不同的细胞、组织和发育的不同阶段基因表达的调节

收稿日期：2001-12-17；**修回日期**：2002-02-25

基金项目：国家自然科学基金资助项目 (30170053, 30170833)

作者简介：延锦春 (1979—)，女，七年制大学生。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

机制，有助于揭示遗传、发育和进化的联系。

1　选择性剪接的机制

已知选择性剪接的第一种方法是选用不同的剪接位点：如腺病毒 *E1A* mRNA 前体用靠近 5′ 端的 5′ 剪接位点，得 12S 、13S mRNA ，用距 5′ 端稍远的 5′ 剪接位点，得 9S mRNA 。第二种方法是交替选用外显子：如肌钙蛋白 (troponin)T 基因在分化的骨骼中有 32 种不同的表达形式，其原因在于外显子 4~8 的选用不同。

目前的研究表明：mRNA 前体的选择性剪接与不均一核糖核蛋白颗粒 hnRNP(heterogeneous nuclear ribonucleo-protein particle) 和 SR 蛋白家族成员所识别的 RNA 正性和负性调节信号的联合作用密切相关。可能存在蛋白 - 蛋白，蛋白 -RNA ，RNA-RNA 相互作用的调控网络 [3] ，通过复杂的相互作用调控 mRNA 前体的选择性剪接。

2　选择性剪接与发育

选择性剪接后表达的功能不同的蛋白质可以具有组织特异性、性别特异性与发育阶段特异性，因而选择性剪接可以调节发育过程相关基因的表达。

纤连蛋白 FN(fibronectin) 是一种存在于细胞外基质 (ECM) 中的二聚体糖蛋白。多种 FN 异构体在胚胎发育和组织重构中起重要作用。在心血管系统的发育过程中，FN 在心血管形成早期表达水平高，胎儿阶段开始后逐渐减少。但当出现病理状态，如高血压、心肌缺血时，心肌和主动脉中可见不同程度的 FN 异构体再表达，这说明 FN mRNA 前体的选择性剪接受发育情况、病理状况和细胞类型等的影响。

性别决定 (sex-determining) 是一个包括选择性剪接转录调控、细胞间信号转导等多种调节机制的复杂过程。对果蝇发育过程中的性别决定进行研究，发现果蝇 XX 个体的 *sxl* (sex lethal)mRNA 前体含有雄性特异的外显子 3 ：若 *sxl* mRNA 前体剪接后保留外显子 1 、2 、4 、5 、6 、7 、8 ，即不含外显子 3 ，以后发育为雌蝇；若 *sxl* mRNA 前体剪接后保留外显子 1 、2 、3 、4 、5 、6 、7 ，因外显子 3 中有终止密码子，翻译会提前终止，引起以后一系列反应，发育为有雄性性征的果蝇。果蝇 XY 个体基因 *sxl* 不表达，决定果蝇性别的初始原因是 X 染色体数与常染色体倍数的比。X:A=1/2 为雄，X:A=1 为雌。X 染色体的数目如何决定 *sxl* 基因的表达，如何决定 *sxl* mRNA 前体的剪接方式，迄今尚无明确答案。

3　选择性剪接与疾病

已发现许多疾病与 mRNA 前体选择性剪接有关。

3.1　选择性剪接与肿瘤

3.1.1　CD44 分子与膀胱癌　对 CD44 异构体表达的研究对于理解肿瘤转化的分子机制、预测肿瘤行为有重要意义。许多人类肿瘤性疾病，如胃癌、非何杰金氏淋巴瘤、肾癌、结肠癌、乳腺癌、胆囊癌和神经胶质瘤都与 CD44 异构体的表达密切相关。

Sugino 等 [4] 报道了侵袭性膀胱癌中 CD44 基因表达的丢失现象。免疫组化结果显示与异构体 CD44s 和 CD44v2 、-5 和 -6 相对应的免疫染色抗体在表皮细胞，尤其是基底层靠近基质处的肿瘤细胞中有强烈的信号，但是在侵袭性肿瘤细胞特别是侵袭性深部肿瘤的细胞中缺少了 CD44 蛋白。RT-PCR 、Southern 杂交结果显示，CD44s 和 CD44v 基因转录产物的丢失与肿瘤深度成正比。原位杂交结果显示大量的 CD44v mRNA 存在于乳头瘤的尿路上皮细胞中，但在深层组织中却缺乏。以上结果表明，CD44 基因在早期膀胱肿瘤中表达增多，而在肿瘤变为侵袭性后逐渐消失。这对膀胱肿瘤的早期诊断有重要意义。

3.1.2　*mdm2* 基因与侵袭性乳腺癌　*mdm2* (murine double-minute 2) 基因是一种原癌基因，它可以调节一些肿瘤抑制基因，如 *p53* 、*Rb* 、$p19^{ARF}$ 等的表达。*mdm2* 基因通过选择性剪接表达不同的 MDM2 异构体。目前研究表明，p53/MDM2 途径失调是许多肿瘤性疾病的一种重要致病机制。

Lukas 等 [5] 对选用的 38 例侵袭性乳腺癌和 9 例正常人乳腺标本进行 RT-PCR 分析，得到了 5 种长度不同的转录本：全长 *mdm2* 转录本 (1 526 bp) 和短链 *mdm2* 转录本 (653 、281 、254 和 219 bp) 。序列分析结果显示：653-bp 转录本是选择性剪接的产物 (剪接位点在外显子 / 内含子分界顺序处)，21% 的乳腺癌中有 653-bp *mdm2* 转录本的表达；281 、254 和 219 bp 转录本是异常剪接的产物 (剪接位点不在外显子 / 内含子分界顺序处)，16% 的乳腺癌中有 281 、254 和 219 bp *mdm2* 转录本的表达。两种剪接的共同点是选择性剪接和异常剪接所得的蛋白产物都失去了全部或主要 p53 蛋白结合域。以上结果表明，侵袭性乳腺癌与 *mdm2* 选择性剪接和异常表达密切相关。

3.1.3　雌激素受体 (ER) 与人乳腺癌　人乳腺癌是一种雌激素依赖性的肿瘤。雌激素受体 (ER) 基

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

因 mRNA 前体的选择性剪接，可产生外显子 3, 5 或 7 缺失的 mRNA 转录本 [6]。由它们表达的较低分子量 ER 蛋白可能通过对正常 ER 蛋白的负显性效应，以改变 ER 蛋白的生化活性和对雌激素的反应性，从而抑制正常 ER 蛋白的功能。因此，对雌激素受体基因选择性剪接的进一步研究，对于乳腺癌的内分泌治疗有重要意义。

3.2 选择性剪接与神经系统疾病

mRNA 前体选择性剪接对神经组织的生长、发育和神经系统疾病的发生有重要影响。

3.2.1 *tau* 基因与神经细胞变性 *tau* 基因位于人 17 号染色体，其第 10 外显子可编码 31- 氨基酸重复单位。*tau* 基因经历复杂的选择性剪接表达人脑中的 6 种 tau 蛋白异构体，其中 3 种异构体含 4 个微管结合重复单位 (含有第 10 外显子编码的 31- 氨基酸重复单位)，另 3 种异构体只含 3 个微管结合重复单位 (不含第 10 外显子编码的 31- 氨基酸重复单位)。这种选择性剪接受 *tau* 基因在神经细胞内表达量的调节 [7]。若调节失调，含 4 个微管结合重复单位的 tau 蛋白异构体会大量表达并使大量的 tau 蛋白磷酸化失去结合微管的功能。这种高度磷酸化的 tau 蛋白，称为神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles，NFT)-tau 蛋白，是螺旋形细丝 (PHF) 的主要成分。

Alzheimer's 病 (AD) 是发生于老年和老年前期最常见的以进行性痴呆为特征的中枢神经系统变性性疾病。AD 患者的神经细胞内可见神经原纤维缠结，正是由上述配对的螺旋形细丝相互缠结而成。因此，AD 与神经细胞骨架重构、微管丢失由 NFT-tau 蛋白组成的 PHF 代替有关。NFT-tau 蛋白在 AD 早期阶段已出现，且新皮质中 NFT-tau 蛋白与 AD 患者的痴呆程度正相关 [8]。载脂蛋白 $ApoE_2$、$ApoE_3$ 能与 tau 蛋白结合，防止 tau 蛋白过磷酸化，抑制老年斑 (SP) 和 NFT 的形成，对 AD 的发病有保护作用。

Spillantini 等 [9] 报道了人 17 号染色体连锁的前颞叶痴呆和帕金森氏病 " frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 " (FTDP-17) 与 *tau* 基因突变有关，为 tau 蛋白功能失调可导致神经细胞变性的理论提供了遗传学证据。他们的研究表明：发生在 *tau* 基因内含子和许多编码区的至少 15 种突变可引起其第 10 外显子的剪接保留，从而导致含 4 个微管结合重复单位的 tau 蛋白异构体过度表达。因此，不含第 10 外显子编码的 31- 氨基酸重复单位的 tau 蛋白异构体与含第 10 外显子编码的 31- 氨基酸重复单位的 tau 蛋白异构体在人神经细胞中的正常比例，对于防止 tau 蛋白病理变性进而导致神经细胞变性有重要意义。

NFT 是 AD 和进行性核上瘫 (PSP) 的组织病理标志之一，Pick 体是 Pick's 病 (PiD) 的病理标志。AD 和 PSP 的 NFT 与 PiD 的 Pick 体均由 tau 蛋白组成。美国 Mayo 病理中心对 *tau* 基因第 10 外显子在 AD、PSP 和 PiD 的双标免疫组化研究，结果表明：*tau* 基因第 10 外显子是以一种疾病特异性方式被选择性剪接，表达在特定的细胞域 [10]。

3.2.2 髓蛋白与脱髓鞘疾病 (demyelination) 和多发性硬化 (multiple sclerosis,MS) 在髓鞘发育过程中，髓蛋白和酶经过特异性的生化改变，合成髓鞘并由松绕的双层转为坚实的多层。

髓鞘蛋白脂质蛋白 PLP(proteolipid protein) 基因有 7 个外显子，通过选择性剪接表达 PLP 蛋白和其小分子量异构体 DM-20。有研究表明 PLP 基因第 5 外显子跳跃 (skipping) 与脱髓鞘疾病有关 [11]。

在髓鞘发育过程中，髓鞘基础蛋白 MBP (myelin basic protein) 基因主要表达 21.5kD 和 20.2kD MBP。而在正常成人中枢神经系统中 21.5kD 和 20.2kD MBP 下调，第 2 外显子缺失的选择性剪接异构体 18.5kD 和 17.2kD MBP 成为 MBP 的主要形式。多发性硬化的病理特征是过度髓鞘再生 (remyelination)。因此，用免疫组化或原位杂交方法可在 MS 患者的中枢神经系统中检测到含第 2 外显子编码的 21.5kD 和 20.2kD MBP 的过度表达 [12]。

3.2.3 AMPA 受体与癫痫 AMPA(α-Amino-3-hydroxy—5-metyl—4isoxazo—lepropionicacid) 受体在癫痫的形成和发展过程中起重要作用。AMPA 受体亚单位表达的不同及包括选择性剪接在内的转录后加工过程的不同 [13]，引起了 AMPA 受体在分布区域、发育过程及与疾病相关性等方面的差异。预想未来也许可以根据对 AMPA 受体表达情况的详细研究，设计出 AMPA 受体拮抗剂，用于癫痫的治疗。

4 展 望

内含子 (intron) 剪切 (cleavage) 和剪接是 mRNA 转录后加工中最为复杂的一环，也是近些年来发展最快的研究领域之一。而选择性剪接对真核

(下转第 185 页)

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

主细胞内存活需要降解脂类。MTB 的细胞被是由丰富的蜡质包裹，大量结构各异的成分使细菌十分疏水。这些包裹分子实质上是一系列具有不同活性的分子，调控与宿主的相互作用。脂类不仅仅是作为惰性的蜡质层成分，因此不同突变菌株 (PDIM 、mma4 、pcaA) 的表型差异很大。MTB 基因组中的 mmpL 家族参与运输脂类到细胞被或胞外，PDIM 被 mmpL7 运输到胞外是细菌在体外生存所必需。在宿主细胞浆内发现了分支菌的脂类，提示 MTB 的脂类能够被运输到细菌细胞外。这和格兰氏阴性细菌经过 III 型分泌系统效应分子释放到宿主细胞胞浆或表面的机理不同。分子的作用因致病菌种类而异：抑制吞噬、干扰信号传导、细胞骨架重排、将细菌受体插入到宿主细胞膜。MTB 基因组中未发现毒力岛 (Pathogenicity islands) 或 III 型分泌系统。现在比较确信的是：分枝杆菌细胞被的丰富脂类、糖脂介导了与宿主配体或细胞膜专一性的相互作用，而不仅仅是与细菌细胞被的疏水性、刚性有关。今后研究的重点是：被运输出去的脂的种类；脂类在宿主细胞中的亚细胞定位；具体的脂类与宿主细胞靶子的相互作用。

8　MTB 感染中的宿主因子

MTB 感染所致的宿主临床症状和组织破坏往往是宿主免疫反应导致，基因剔除小鼠等实验动物研究结果部分揭示了抗 MTB 免疫的基础。小鼠控制 MTB 感染需要 γ-IFN 、IL-12[16] 和 CD4 T 细胞。小鼠与易感性有关的多态性决定簇还有：Nramp1 和 Sst1 。人的 γ-IFN 途径多态性与对分枝杆菌的易感性有关 [17] 。但是具体有哪些因素影响人的易感性还不清楚，比如为何多数感染者能够成功地控制住入侵的 MTB，而少数人却发病呢？人类基因组序列可能有助于研究对 MTB 感染易感的复杂的非孟德尔遗传因素 [18] 。有关知识将有助于识别容易从潜伏态发展为活动性结核病的人群，开发靶向潜伏感染人群的疫苗和药物。

结核病的研究进入了新的阶段。以前阻碍研究 MTB 的技术难题基本克服。MTB 致病的策略不同于其他胞内致病菌，脂类在致病中具有重要的作用。对致病有关基因的多学科协同研究将为认识巨噬细胞新的防御机制，开发药物作用靶子、新的药物和疫苗奠定基础。

[参　考　文　献]

[1] Cole S T, Brosch R, Parkhill J, *et al. Nature*, 1998; **393**: 537—544.
[2] Ramakrishnan L, Federspiel N A, Falkow S, *et al. Science*, 2000; **288**: 1436—1439.
[3] Barry C E, *et al. Prog Lipid res*, 1998; **37**: 143—179.
[4] Camacho L R, Ensergueix D, Perez E, *et al. Mol Microbial*, 1999; **34**: 257—267.
[5] Cox J S, Chen B, McNeil, *et al. Nature*, 1999; **402**: 79—83.
[6] Dubnau E, Chan J, Raynaud C, *et al. Mol Microbial*, 2000; **36**: 630—637.
[7] Berthet F X, Iagranderic M, Gounon P, *et al. Science*, 1998; **282**: 759—762.
[8] Aderem A, Underhill D M. *Annu Rev Immunol*, 1999; **17**: 593—623.
[9] Ernst J D. *Infect Immun*, 1998; **66**: 1277—1281.
[10] Clemens D L, Lee B Y, Horwitz M A. *Infect Immun*, 2000; **68**: 2671—2684.
[11]—[18] 略

(上接第 152 页)

生物而言是一种基本而又重要的机制，它可增强基因所包含的结构信息的范围、多态性 (polymorphism) 和可塑性 (plasticity)，增加蛋白质功能的多样性，控制基因产物的净产量。

随着人类基因组计划 (HGP) 的顺利实施，对属于后基因组计划 (post-genome project) 或称功能基因组学 (functional genomics) 一部分的 mRNA 选择性剪接的深入研究将有助于读懂基因组信息结构的复杂性及遗传语言的根本规律，破译遗传密码，揭示生命本质，推动生命科学的发展。

[参　考　文　献]

[1] Modrek B, Resch A, Grasso C, *et al. Nucleic Acids Research*, 2001; **29**(13): 2850—2859.
[2] Dralyuk I, Brudno M, Gelfand M S, *et al. Nucleic Acids Research*, 2000; **28**(1): 296—297.
[3] van der Houven van Oordt W, Diaz-Meco M T, Lozano J, *et al. J Cell Biol*, 1999; **149**: 307—316.
[4] Sugino T, Goaham H, Yoshida K, *et al. Am J Pathol*, 1996; **149**(3): 873—882.
[5] Lukas J, Gao D Q, Keshmeshian M, *et al. Cancer Res*, 2001; **61**(7): 3212—3219.
[6] Iwase H, Omoto Y, Iwata H, *et al. Oncology*, 1998; **55**(1): 11—16.
[7] Goedert M, Ghetti B, Spillantini M G. *Ann N Y Acad Sci*, 2000; **920**: 74—83.
[8] Tapiola T. *Neurology*, 1998; **50**: 169—184.
[9] Spillantini M G, Van Swieten J C, Goedert M. *Neurogenetics*, 2000; **2**(4): 193—205.
[10] Ishizawa K, Ksiezak-Reding H, Davies P, *et al. Acta Neuropathol* (Berl), 2000; **100**(3): 235—244.
[11] Aoyagi Y, Kobayashi H, Tanaka K, *et al. Ann Neurol*, 1999; **46**(1): 112—115.
[12] Capello E, Voskuhl R R, McFarland H F, *et al. Ann Neurol*, 1997; **41**(6): 797—805.
[13] Rogawski M A, Donevan S D. *Adv Neurol*, 1999; **79**: 947—963.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net