

可变剪接在心血管疾病中的研究进展

徐强 涂丁元 赵仙先

【摘要】 前体 mRNA 的可变剪接是一种重要的转录后调控机制,普遍存在于真核生物体内。心血管系统的发育过程和功能维持受多种基因调控,这些基因转录本的异常剪接与心血管疾病的发生和发展有密切联系。该文介绍了可变剪接在心脏发育、心肌病、心律失常、血管疾病中的作用机制,以及可变剪接的临床应用。

【关键词】 可变剪接;测序;心血管疾病

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2020.03.004

真核生物编码基因中包含外显子和内含子,在基因表达的过程中,细胞核转录生成的前体 mRNA 在剪接复合体的作用下,以不同的剪接方式对外显子和内含子进行组合,产生不同 mRNA 剪接异构体的过程叫可变剪接。高通量测序研究发现,人类基因中 95% 以上的多外显子基因存在可变剪接^[1]。在转录后调控的网络中,可变剪接极大地拓展了转录组和蛋白质组的复杂性和多样性,对真核生物的基因表达具有重要意义,而异常的可变剪接也与多种心血管疾病有关。

1 可变剪接与心脏发育

可变剪接参与调控心脏生长发育^[2]。心脏中的可变剪接模式在围产期和成年期有较大差异。L-型钙通道广泛调节组织和细胞的各种功能,Cav1.2 蛋白是心肌细胞 L-型钙通道大分子蛋白混合物中的一员。编码 Cav1.2 蛋白的 CACNA1C 基因可通过互斥外显子的可变剪接形式生成 Cav1.2 的剪接异构体 Cav1.2e21+22。这种剪接异构体在新生儿心脏中高表达,而在成年人心脏中含量很少。Hu 等^[3]研究发现,在大鼠心肌缺血模型和心力衰竭(心衰)患者中 Cav1.2e21+22 表达水平升高,导致 Cav1.2 蛋白生成减少及钙离子内流障碍,最终引起心衰。Giudice 等^[4]利用高通量测序技术在全转录组水平上研究小鼠出生后心脏中剪接模式的变化,发现剪接调控因子 CELF1 和 MBNL1 通过影响心肌细胞的囊泡运输和内膜动态流动过程参与可变剪接的调控。在这一过程中,CELF1 的表达上调,

而 MBNL1 的表达下调。在成年小鼠心脏中复制 CELF1 的胚胎表达模式会导致心肌细胞横小管组织破坏及钙离子释放障碍。Wang 等^[5]首次利用高通量测序数据对胎儿和成年心脏进行了全基因组分析,发现可变剪接事件的差异主要存在于外显子中。与成年心脏相比,胎儿心脏中的内含子保留较多,提示内含子保留可能与人类心脏发育有关。进一步分析表明胎儿心脏中的特异性可变剪接事件主要集中于细胞增殖过程中,而成人主要集中于能量代谢过程中。

2 可变剪接与心肌病

心肌病是一组由不同原因引起的异质性心肌疾病,多表现为心室肥厚或扩张,可变剪接是心肌细胞病理变化过程中重要的调控形式。

富含丝氨酸和精氨酸 (serine/arginine-rich, SR) 蛋白家族是一类 RNA 结合蛋白,参与剪接体的组装和可变剪接的调控过程。既往大量研究表明 SR 蛋白家族成员如丝氨酸/精氨酸富集剪接因子 (SRSF)1、SRSF2、SRSF3 和 SRSF10 等在心肌肥厚和心脏扩大的病理过程中发挥重要作用。剪接因子 SRSF3 介导 mTOR 基因前体 mRNA 的剪接过程。特异性敲除小鼠心肌细胞中的 SRSF3 会导致 mTOR 基因生成较短的剪接异构体,造成下游分子真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 磷酸化减少和心脏收缩相关基因如 TNNT2、MYH6、RYSR2 等表达降低,最终引起小鼠心室容积扩大、心脏射血分数下降和心衰^[6]。

互斥外显子是一种常见的可变剪接类型,通过互斥外显子,MEF2a 基因可产生两种不同的转录本,包含外显子 $\alpha 1$ 的转录本和包含外显子 $\alpha 2$ 的转录本。Gao 等^[7]发现在心肌细胞中,剪接因子

RBFox1 调控基因 MEF2a 外显子 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 的互斥剪接过程。在心衰小鼠模型中增加 RBFox1 的表达会引起 MEF2a 基因剪接模式变化,表现为包含外显子 $\alpha 1$ 的转录本生成增加,减轻心衰小鼠心肌肥厚程度,延缓心衰进程。

在可变剪接的调控过程中,除了剪接体的成分发生变化外,剪接位点的突变同样可引起心肌细胞病理变化。Groeneweg 等^[8]使用 Sanger 测序法分析 9 个致心律失常性右室心肌病患者的剪接位点变异情况,发现 DSG2、PKP2 和 JUP 等基因发生剪接位点的突变,造成外显子跳跃等异常可变剪接事件的发生,引起心肌细胞间桥粒功能障碍,最终导致致心律失常性右室心肌病。TTN 是编码肌节中肌联蛋白的基因,约 25% 的特发性家族性扩张型心肌病患者中存在 TTN 基因的无义突变。Herman 等^[9]使用高通量测序技术发现了 TTN 无义突变导致特发性家族性扩张型心肌病的机制。约 30% 的 TTN 无义突变发生在剪接位点上,这些突变改变了 TTN 基因转录本的长度,从而影响了心肌的顺应性,导致特发性家族性扩张型心肌病。

3 可变剪接与心律失常

可变剪接与长 QT 综合征、Brugada 综合征等心律失常疾病的发生有一定关联。在心肌细胞中, KCNQ1 基因编码延迟整流钾通道,其 7 号外显子 5'端剪接位点的突变可产生外显子跳跃的可变剪接类型。这种剪接位点突变生成的剪接异构体中不含 7 号外显子,导致钾通道功能丧失和电流减少,最终引起长 QT 综合征^[10]。编码心肌细胞钾通道的另一种基因 KCNH2 也可通过 10 号外显子 5'端剪接位点的突变产生保留 10 号内含子的剪接异构体,这也是长 QT 综合征的病因之一^[11]。心肌细胞中的 CAMK2D 基因编码调节兴奋-收缩偶联的钙调蛋白激酶,其可变剪接过程受剪接因子 RBM20 调控。CaMK2D 功能失调引起的经肌浆网钙离子释放增多及细胞内钙超载是室性心律失常的主要病理改变之一^[12]。研究发现在心肌细胞特异性敲除 RBM20 的小鼠中, CAMK2D 基因产生异常的剪接异构体,引起钙离子经 L 型钙通道内流增加和肌浆网钙浓度升高,最终导致室性心律失常^[13]。

4 可变剪接和血管疾病

可变剪接可通过影响脂质代谢、改变离子通道通透性等机制参与血管疾病的进程。

既往大量研究表明氧化低密度脂蛋白

(oxLDL)可通过参与泡沫细胞形成、促进平滑肌细胞增殖和引起动脉内膜损伤等机制,在动脉粥样硬化的进程中发挥作用。表达于血管内皮细胞的 OLR1 基因编码的低密度脂蛋白受体可特异性结合、吞噬和降解 oxLDL。Tejedor 等^[14]发现 OLR1 基因 5 号外显子剪接位点的突变可通过外显子跳跃的方式产生包含 5 号外显子的剪接异构体,抑制 oxLDL 降解,从而导致冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)。CACNA1C 基因的可变剪接不仅与心脏发育有关,而且参与高血压的病理过程。在血管平滑肌细胞中, CACNA1C 基因转录生成的前体 mRNA 中包含两个重要的外显子 exon9* 和 exon33,可影响钙离子通道的电生理特征,其中 exon9* 是由 Tang 等^[15]通过转录组测序发现的新的外显子,尚未收录于 Cav1.2 蛋白的转录组文库中,因其位置位于外显子 exon9 和 exon10 之间,所以命名为 exon9*。Zhou 等^[16]证明了在血管平滑肌中敲低剪接因子 Rbfox2 会改变 exon9* 与 exon33 的比值,进而导致钙离子通道功能障碍,最终引起血管肌张力增高和高血压。

5 可变剪接的临床应用

异常可变剪接能作为临床上的治疗靶点,提供精准的靶向治疗方案。反义寡核苷酸(ANOs)是一段经过化学修饰的单链寡核苷酸,可通过碱基互补配对与前体 mRNA 上各种剪接调控元件结合,从而在空间上阻断 RNA 结合蛋白作用于相应的剪接调控元件,使特定的外显子在拼接过程中与内含子一起被忽略,达到调控可变剪接的目的^[17]。已经应用这种方法治疗如杜氏肌营养不良(DMD)^[18]、脊髓性肌肉萎缩症^[19]以及强直性肌营养不良^[20]等。DMD 是由编码抗肌萎缩蛋白的基因发生突变而导致的一种遗传性神经肌肉疾病, DMD 基因突变使蛋白质翻译过程提前终止,患者缺乏抗肌萎缩蛋白,表现为严重的肌无力,最终死于呼吸衰竭或心衰。AONs 可通过外显子跳跃的方式跳过特定的基因位点,避免抗肌萎缩蛋白发生截断突变,进而恢复其功能^[21]。美国 FDA 于 2016 年批准 Exondys 51 (eteplirsen)注射剂用于治疗 DMD, eteplirsen 适用于抗肌萎缩蛋白基因 51 号外显子突变的患者,这类人群约占 DMD 患者总数的 13%。取得了良好的临床疗效^[22]。

反式剪接是指不同的前体 mRNA 分子经过剪接形成成熟 mRNA 分子的过程,已成为基因治疗的手段之一。针对突变靶点设计的前体 mRNA 通过

病毒载体导入细胞后与突变基因转录生成的前体 mRNA 发生反式剪接,最终整合修复为一条结构正常的成熟 mRNA,这种技术称为剪接体介导的 RNA 反式剪接,已应用于 DMD 患者治疗^[23]。

未来的研究应将从系统层面阐明可变剪接在心血管系统发育的各个阶段及疾病进程中的作用,并探索非编码 RNA 的可变剪接对心血管疾病的影响。这些研究将加深我们对可变剪接在心血管疾病中作用的认识,为精准医学和个体化治疗的发展提供帮助。

参 考 文 献

- [1] Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing [J]. *Nature*, 2010, 463 (7280):457-463.
- [2] Martínez-Campos E, Hernández-SanMiguel E, López-Sánchez C, et al. Alternative splicing variants of proinsulin mRNA and the effects of excess proinsulin on cardiac morphogenesis [J]. *FEBS Letters*, 2013, 587 (14): 2272-2277.
- [3] Hu Z, Wang JW, Yu D, et al. Aberrant splicing promotes proteasomal degradation of L-type *cav1.2* calcium channels by competitive binding for *cavβ* subunits in cardiac hypertrophy [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1):1-12.
- [4] Giudice J, Xia Z, Wang ET, et al. Alternative splicing regulates vesicular trafficking genes in cardiomyocytes during postnatal heart development[J]. *Nat Commun*, 2014, 5(1): 1-15.
- [5] Wang H, Chen Y, Li X, et al. Genome-wide analysis of alternative splicing during human heart development [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1):1-13.
- [6] Ortiz-Sánchez P, Villalba-Orero M, López-Olañeta M M, et al. Loss of SRSF3 in cardiomyocytes leads to decapping of contraction-related mRNAs and severe systolic dysfunction [J]. *Circ Res*, 2019, 125(2):170-183.
- [7] Gao C, Ren S, Lee JH, et al. RBFOX1-mediated RNA splicing regulates cardiac hypertrophy and heart failure[J]. *J Clin Invest*, 2015, 126(1):195-206.
- [8] Groeneweg JA, Ummels A, Mulder M, et al. Functional assessment of potential splice site variants in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy [J]. *Heart Rhythm*, 2014, 11(11):2010-2017.
- [9] Herman DS, Lam L, Taylor MR, et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(7):619-628.
- [10] Tsuji-Wakisaka K, Akao M, Ishii TM, et al. Identification and functional characterization of KCNQ1 mutations around the exon 7-intron 7 junction affecting the splicing process[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(11):1452-1459.
- [11] Stump MR, Gong Q, Zhou Z. Multiple splicing defects caused by *hERG* splice site mutation 2592+1G>A associated with long QT syndrome [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(1):H312-H318.
- [12] Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure[J]. *Circ Heart Fail*, 2009, 2(6):664-675.
- [13] van den Hoogenhof MMG, Beqqali A, Amin AS, et al. RBM20 mutations induce an arrhythmogenic dilated cardiomyopathy related to disturbed calcium handling [J]. *Circulation*, 2018, 138(13):1330-1342.
- [14] Tejedor JR, Tilgner H, Iannone C, et al. Role of six single nucleotide polymorphisms, risk factors in coronary disease, in *OLR1* alternative splicing [J]. *RNA*, 2015, 21 (6): 1187-1202.
- [15] Tang ZZ, Liang MC, Lu S, et al. Transcript scanning reveals novel and extensive splice variations in human L-type voltage-gated calcium channel, *Cav1.2 α1* subunit[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(43):44335-44343.
- [16] Zhou Y, Fan J, Zhu H, et al. Aberrant splicing induced by dysregulated *Rbfox2* produces enhanced function of *cav1.2* calcium channel and vascular myogenic tone in hypertension [J]. *Hypertension*, 2017, 70(6):1183-1192.
- [17] Bennett CF. Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age[J]. *Annu Rev Med*, 2019, 70(1):307-321.
- [18] Charleston JS, Schnell FJ, Dworzak J, et al. Eteplirsen treatment for Duchenne muscular dystrophy: exon skipping and dystrophin production[J]. *Neurology*, 2018, 90 (24): e2146-e2154.
- [19] Chiriboga CA. Nusinersen for the treatment of spinal muscular atrophy[J]. *Expert Rev Neurother*, 2017, 17(10): 955-962.
- [20] Stepniak-Konieczna E, Konieczny P, Cywoniuk P, et al. AON-induced splice-switching and DMPK pre-mRNA degradation as potential therapeutic approaches for myotonic dystrophy type 1[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(5):2531-2543.
- [21] Echigoya Y, Lim KRQ, Trieu N, et al. Quantitative antisense screening and optimization for exon 51 skipping in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(11): 2561-2572.
- [22] Mendell JR, Goemans N, Lowes LP, et al. Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Ann Neurol*, 2016, 79 (2):257-271.
- [23] Lorain S, Peccate C, Le Hir M, et al. Dystrophin rescue by trans-splicing: a strategy for DMD genotypes not eligible for exon skipping approaches[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41 (17):8391-8402.

(收稿:2020-02-15 修回:2020-03-23)

(本文编辑:丁媛媛)