

非典型溶血尿毒综合征致病基因CFI突变位点的RNA剪接分析

徐宁¹, 王至², 张译尹¹, 张艳³, 张然¹, 张炳莹², 尤青青⁴,
刘绪言¹, 刘晓森¹, 邵乐平⁵

¹青岛大学青岛医学院, 山东 青岛

²山东第二医科大学临床医学院, 山东 青岛

³北大医疗鲁中医院肾内科, 山东 淄博

⁴青岛市市立医院肾内科, 山东 青岛

⁵厦门大学附属第一医院肾内科, 福建 厦门

收稿日期: 2025年4月16日; 录用日期: 2025年5月9日; 发布日期: 2025年5月20日

摘要

目的: CFI基因编码的补体因子I (FI)是补体系统调节过程中重要的丝氨酸蛋白酶, 其功能缺陷与多种疾病相关, 然而许多突变的致病机制并未完全阐明。本实验旨在通过迷你基因实验验证CFI基因突变对mRNA剪接的影响, 为解释致病机制、发现治疗靶点提供新思路。方法: 本研究首先通过生物信息学软件, 从人类基因数据库中筛选出目标突变, 并将包含该突变位点的基因片段导入载体中。随后将构建好的含有野生型和突变型的质粒分别转染至人胚肾细胞(HEK293T)中, 并利用RT-PCR和测序技术分析其mRNA产物的变化。结果: 与野生型5号外显子相比, c.772G>A突变导致外显子完全跳变, 产生了异常剪接产物。这一异常剪接可能导致产生的FI蛋白功能域缺陷, 从而影响其蛋白酶活性或与其他补体因子的结合。结论: 本研究成功构建了CFI基因的迷你基因实验体系, 证实了c.772G>A突变可导致mRNA剪接异常。这为深入理解CFI基因突变的致病机制提供了重要的实验依据, 也为aHUS疾病的基因诊断和治疗提供了新的靶点。

关键词

补体因子I, CFI, 基因突变, 迷你基因, mRNA剪接

RNA Splicing Analysis of the CFI Mutation Site in the Causative Gene for Atypical Hemolytic Uremic Syndrome

Ning Xu¹, Zhi Wang², Yiyin Zhang¹, Yan Zhang³, Ran Zhang¹, Bingying Zhang²,

文章引用: 徐宁, 王至, 张译尹, 张艳, 张然, 张炳莹, 尤青青, 刘绪言, 刘晓森, 邵乐平. 非典型溶血尿毒综合征致病基因 CFI 突变位点的 RNA 剪接分析[J]. 临床医学进展, 2025, 15(5): 1109-1120. DOI: 10.12677/acm.2025.1551472

Qingqing You⁴, Xuyan Liu¹, Xiaomiao Liu¹, Leping Shao⁵

¹Qingdao Medical College of Qingdao University, Qingdao Shandong

²Clinical Medical College of Shandong Second Medical University, Qingdao Shandong

³Department of Nephrology, Peking University Care Luzhong Hospital, Zibo Shandong

⁴Department of Nephrology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao Shandong

⁵Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen Fujian

Received: Apr. 16th, 2025; accepted: May 9th, 2025; published: May 20th, 2025

Abstract

Objective: Complement factor I (FI), encoded by the CFI gene, is an important serine protease regulating the complement system, and its functional defects have been associated with a wide range of diseases. However, the pathogenic mechanisms of many mutations have not been fully elucidated. This experiment aims to verify the effect of CFI gene mutation on mRNA splicing through minigene experiments, which will provide new ideas to explain the pathogenic mechanism and discover therapeutic targets. **Methods:** In this study, the target mutation was first screened out from the human gene database by bioinformatics software, and the gene fragment containing the mutation site was introduced into the vector. Subsequently, the constructed plasmids containing wild-type and mutant were transfected into human embryonic kidney cells (HEK293T) respectively, and the changes in their mRNA products were analyzed by RT-PCR and sequencing. **Results:** Compared with wild-type exon 5, the c.772G>A mutation resulted in a complete exon skipping, producing an aberrant splicing product. This aberrant splicing may lead to defects in the functional domains of the resulting FI proteins, thus affecting their protease activity or binding to other complement factors. **Conclusion:** In this study, we successfully constructed a minigene experimental system for the CFI gene and confirmed that the c.772G>A mutation could lead to abnormal mRNA splicing. This provides an essential experimental basis for the in-depth understanding of the pathogenic mechanism of CFI gene mutation and also provides a new target for the genetic diagnosis and treatment of aHUS disease.

Keywords

Complement Factor I, CFI, Gene Mutation, Minigene, mRNA Splicing

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

1.1. 研究背景

RNA 剪接是真核生物基因表达过程中的一个关键步骤，主要是转录后的前体 mRNA (pre-mRNA)通过内含子的切除和外显子的连接，最终生成成熟的信使 RNA (mRNA)。这一过程对于基因表达的精确调控至关重要，因为它不仅可以通过选择性剪接增加基因编码蛋白质的多样性，还在细胞分化和发育过程中发挥重要作用。近年来，随着分子生物学技术的进步，RNA 剪接的分子机制及其在疾病中的作用逐渐被揭露。

RNA 剪接的精确性和多样性受到多种因素的调控, 这些因素包括剪接位点的序列特异性、剪接体的组成与功能, 以及多种顺式作用元件和反式作用因子的协同作用。RNA 剪接主要由剪接体催化完成, 剪接体是一个复杂的分子机器, 由多种小核糖核蛋白颗粒(snRNPs)和辅助蛋白组成。它通过识别 pre-mRNA 的剪接位点(5'剪接位点的 GT 序列、3'剪接位点的 AG 序列和分支点), 催化两个转酯反应, 将内含子切除并将外显子连接起来[1]。外显子剪接增强子(ESE)和外显子剪接沉默子(ESS)等顺式作用元件也通过与剪接体相关蛋白的相互作用, 调节剪接的效率和选择性。反式作用因子, 包括剪接因子(如 SF1、U1 snRNP 等)和 RNA 结合蛋白(如 SR 蛋白家族和 hnRNP 蛋白家族), 通过与顺式作用元件结合, 调节剪接位点的选择和剪接反应的进程。

剪接相关基因突变可以通过影响剪接位点和/或剪接调控元件从而导致异常剪接, 产生截短蛋白或功能异常的蛋白质, 从而引发遗传性疾病。近年来, 随着基因测序技术的发展, 越来越多的剪接相关突变被鉴定出来, 为疾病的诊断和治疗提供了新的靶点。

aHUS, 又称非典型溶血尿毒综合征, 其临床特征包括微血管性溶血性贫血, 血小板减少以及急性肾损伤[2]。临床上主要表现为贫血、血小板减少、LDH 升高、间接胆红素升高、肾功能异常(血尿、蛋白尿、肌酐升高等), 当疾病累及其他器官时可以出现对应症状, 如累及胃肠道时出现腹痛、恶心、呕吐, 累及神经系统时出现意识障碍、感觉异常, 累及心血管系统时出现心肌缺血等。目前这一疾病的诊断需排除 TTP 及其他继发因素[2]。

aHUS 的发病机制与补体系统的异常激活有关, 约有 50%的患者存在补体相关基因的突变。目前已知与 aHUS 的发生有关的基因包括 CFH、CFI、CD46、CFB、C3、THBD、DGKE、CFHR 基因。其中 CFI 基因突变约占所有 aHUS 患者的 5%~10%。CFI 介导的 aHUS 的发生率为百万分之 1 [3]。

CFI 基因位于染色体 4q25 上, 全长 61 kb, 由 13 个外显子组成, 编码一种含有 583 个氨基酸的丝氨酸蛋白酶[3][4]。FI 主要由肝细胞合成和分泌, 在多种细胞中表达, 包括肝细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、内皮细胞和成纤维细胞, 参与补体级联反应[5][6]。它的前蛋白被切割成分子量为 38 kDa 和 50 kDa 的轻链和重链, 其中轻链在与辅因子-底物结合之前, 其活性位点被重链抑制[7]。只有在辅因子、底物共同存在的情况下, 这两条链通过二硫键结合形成异二聚体糖蛋白。它通过切割补体 C3b 和 C4b, 使其失活, 进而影响 C3 和 C5 转化酶的形成, 从而调节补体经典、凝集素和替代途径[4]。FI 及其液相和膜结合辅因子共同控制循环及细胞表面的补体, 保护自身细胞和细胞外膜免受补体激活的影响[3]。

aHUS 患者很容易进展至终末期肾病, 严重时危及生命。研究表明有 65%的患者出现肾脏损伤, 并进展成为晚期肾病, 或在诊断后 1 年内死亡[2]。目前的治疗方案主要是血浆置换和依库珠单抗, 但研究表明接受血浆置换治疗的患者, 其进展成 ESRD 和死亡的风险并未减少。在携带 CFI 突变的患者中, 血浆置换的治疗成功率更是低至 25% [8][9]。aHUS 患者的肾移植结果较差, 40%至 70%的患者接受肾移植后发生 aHUS 复发[3]。因此开发基于补体基因突变的新型治疗方案是未来的研究方向。我们的研究目的是通过生物信息学工具筛选 CFI 基因突变, 通过迷你基因验证其是否影响 pre-mRNA 的剪接过程, 为未来的基因治疗提供新的研究靶点。

1.2. 实验方法

1.2.1. 基因突变的筛选与预测

在人类基因突变数据库(HGMD)和 Clinvar 数据库(于 2024 年 6 月访问)中描述的所有 aHUS 相关变异中, 有 207 个错义突变或无义突变, 12 个剪接位点突变, 10 个小缺失, 6 个小插入, 6 个严重缺失。我们注意到错义突变和无义突变占有所有突变的 86% (207/241)。在本次实验中, 我们对 HGMD 和 Clinvar 数据库中报告的变异进行了生物信息学分析, 并选择了其中 7 个变异进行迷你基因检测和初步的功能预测。

根据以下标准选择可能的有害变异:

1. 突变位于外显子的 5'端或 3'端附近。内含子的位置(不包括第一个和最后一个内含子)位于相邻外显子的 20 bp 范围内, 除外 GT/AG 经典剪接位点。
2. 突变可能导致形成一个新的剪接位点或激活一个隐性剪接位点。
3. 经典剪接位点的预测值发生显著变化。(BDGP 评分下降 > 0.2 或 Mobidetail 评分 > 0.2)

对基因突变的命名方式遵循了人类基因组变异学会(<http://varnomen.hgvs.org>)的标准。根据 CFI (NC_000004.12)的 cDNA 序列进行 DNA 突变编号。为了评估错义变体对剪接位点的潜在影响, 我们采用了由在线生物信息学工具分析的预测软件, 以评估它们对前 mRNA 处理的影响。预测结果见表 1。

- Human Splicing Finder (HSF): 用于确定剪接调控序列的存在, 并评估剪接调控基序(ESAs/ESSs)变异的潜在影响。

- BDGP 和 Mobidetails: 用于预测突变对经典剪接位点的影响以及新剪接位点的产生或激活, 尤其是外显子 5'或 3'端附近的突变。

- SnapGene: 对于经实验验证可改变外显子剪接的位点, 我们利用该软件对阅读框变化和随后的蛋白质缺陷进行预测分析。

- VulExMap: 用于生成 CFI 基因的外显子图谱, 评估容易发生剪接突变的替代外显子。

- DEEPCLIP: 用于预测 RNA 与剪接相关的 RNA 结合蛋白(如 hnRNPA1 和 SRSF1)的结合情况。

1.2.2. 迷你基因的构建与定点诱变

本研究通过 PCR 扩增技术, 利用特异性寡核苷酸引物, 扩增出包含目标外显子的 DNA 片段, 其两侧分别带有约 50-200 个碱基的不完整的内含子序列。这些引物设计时引入了 XhoI 和 NheI 限制性酶切位点(XhoI: CCGCCTCGAG; NheI: CTAG^{*}CTAGC), 以便将 DNA 片段克隆至剪接载体 pSPL3, 见图 1。引物序列通过 Primer BLAST 程序设计, 具体序列详见附表 1。

随后, 使用 1 μ L T4 DNA 连接酶(Takara, Japan), 在 16 $^{\circ}$ C 条件下将空载体与 DNA 片段连接, 并转化至 DH5 α 感受态大肠杆菌细胞。将 200 μ L 转化后的细菌悬浮液均匀涂布于含有氨苄青霉素的 Luria-Bertani 固体琼脂平板上, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 14 小时。通过正向和反向引物对阳性克隆进行测序, 并利用 SnapGene 软件进行序列比对分析。最终, 采用 Pure Plasmid Mini Kit (Cwbio, China)提取单克隆菌落中的质粒。

1.2.3. HEK 293T 细胞的转染

随后将人胚肾 293T (HEK 293T)细胞在含有 DMEM 培养基、10%胎牛血清(FBS)、100 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的培养液中培养, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中。随后将细胞转移至 12 孔培养板, 当细胞在无抗生素培养基中生长至 70%~80%后, 使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)按照说明书进行转染, 分别转染空载体(pSPL3-control, EV)、野生型(pSPL3-WT)和突变型(pSPL3-Mutation)迷你基因。转染 48 小时后, 使用 TRIzol 试剂(Invitrogen, USA)提取总 RNA, 并利用 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Japan)进行逆转录 PCR(RT-PCR)以合成 cDNA。用引物 SD6 (正向引物 5'-TCTGAGTCACCTGGACAACC-3')和 SA2(反向引物 5'-ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC-3')对 cDNA 序列进行扩增。最终, 通过琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物并测序, 并使用 ImageJ 软件对各条带进行定量分析。异常剪接百分率通过公式(下带密度/(下带密度 + 上带密度)) $\times 100\%$ 计算得出。

利用 SnapGene 软件将实验中获得的基因序列与 GenBank 数据库中公布的参考序列进行比对分析。若 HEK 293T 和 Hela 细胞中的剪接模式与野生型迷你基因存在差异, 则认为该变异对剪接过程产生了影响。

将目的外显子的野生型和突变型片段通过 PspI3 载体的 XhoI 和 NheI 位点连接到载体上, 形成野生型和突变型 PspI3 质粒。

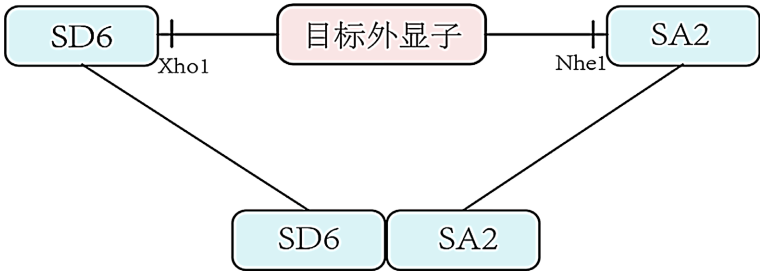


Figure 1. Mechanism of mini-gene construction plasmid
图 1. 迷你基因构建质粒的机制

2. 结果

2.1. 迷你基因实验结果

我们通过计算机软件对 Clinvar 数据库中 CFI 的基因突变进行了分析，以预测它们对剪接的可能影响，具体数据如表 1。值得注意的是，我们筛选出的 7 个突变中，只有一个(c.772G>A)具有致病性。一个突变(c.804G>A)的预测结果相互矛盾，它被证实为同义突变，BDGP 和 HSF 都认为该突变可能影响剪接，然而 Clinvar 数据库将其分类为良性的。

Table 1. Screened CFI gene mutations and their predicted results
表 1. 筛选出的 CFI 基因突变及其预测结果

突变	位置	蛋白改变	BDGP 评分	Mobi detail	HSF	Clinvar
c.482+6C>T	内含子 4	-	0.36 → 0.83	0.40DG	No significant impact on splicing signals	Benign
c.482+6C>A	内含子 4	-	0.36 → 0.15	0.25DL	New Acceptor splice site: Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (HSF)	Benign/Likely benign
c.482+8C>T	内含子 4	-	0.36 → 0.16	0.36DG	No significant impact on splicing signals	Benign
c.772G>A	外显子 5	(p.Ala258Thr)	0.72 → 0	0.81DL	Broken WT Donor Site; most probably affecting splicing	Pathogenic/Likely pathogenic
c.773-3C>T	内含子 6	-	0.43 → 0.49	0.27AL	No significant impact on splicing signals	Uncertain significance
c.804G>A	外显子 6	(p.Ser268=)	0.89 → 0.19	0.17AL	New Acceptor splice site: Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing	Benign
c.1534+5G>T	内含子 13	-	1 → 0.88 (0.9 新)	0.28DG	No significant impact on splicing signals	Benign/Likely benign

迷你基因实验结果显示野生型 3 号外显子的 PCR 显示有一个 154 bp 的条带，包括 SD6 和 SA2 和 3 号外显子的全部序列。位于 4 号内含子上的 c.482+6C>T 突变使得 5'剪接位点的 BDGP 评分从 0.36 上升至 0.83。HSF 则预测该突变对剪接并无影响。逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)显示该突变的迷你基因存在一个 154 bp 的条带。测序结果表明，其包括引物 SD6、SA2 和 3 号外显子的序列，与野生型的结果一致，这与 HSF 预测的剪接信号无变化相符。见图 2A。

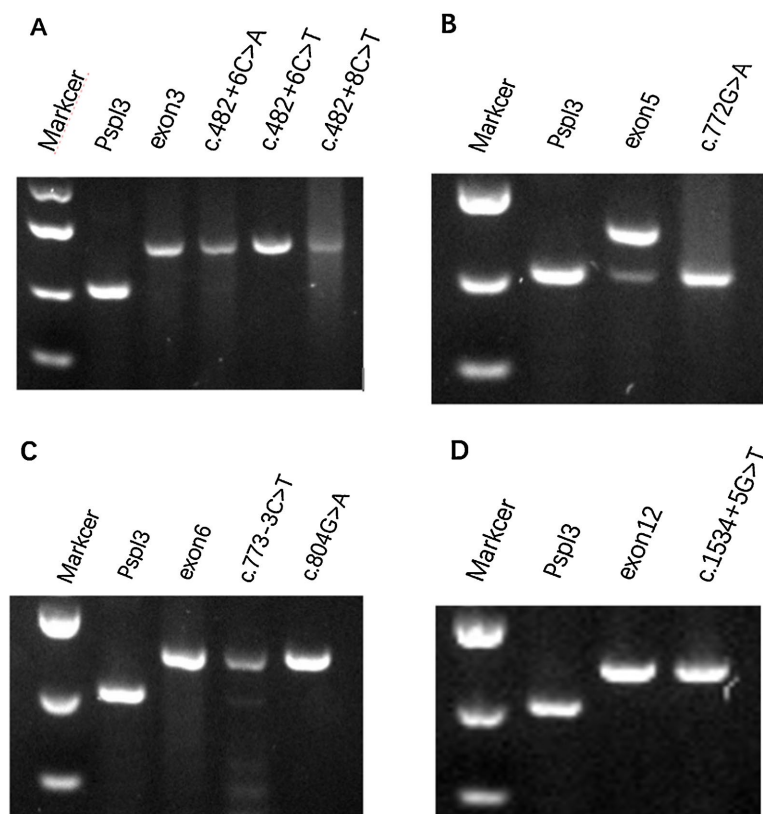


Figure 2. Gel electrophoresis results of CFI gene mutations

图 2. CFI 基因突变凝胶电泳结果

c.482+6C>A 同样是位于 4 号内含子上的突变,它使得 5'剪接位点的 BDGP 评分从 0.36 下降至 0.15。HSF 预测该突变可以导致新的受体剪接位点的激活,可能会影响剪接过程。测序结果显示该突变型与野生型产物没有差异,都是包含 SD6 和 SA2 和 3 号外显子的全部序列,长为 154 bp。见图 2A。

c.482+8C>T 也是位于 4 号内含子上的突变, BDGP 预测 5'剪接位点的评分从 0.36 下降至 0.16。然而 HSF 预测该突变对剪接并无影响。PCR 结果显示该突变型和野生型的条带分子量大致相同,测序结果显示该突变同野生型测序结果一致,为阴性结果。见图 2A。

5 号外显子的 PCR 结果显示有两个不同的电泳条带,表明存在成熟的 mRNA 和一个缺少第 5 号外显子的缺陷 mRNA,异常剪接百分率为 28.9% (96,328/333,564),如图 2B。c.772G>A 位于 5 号外显子上,该突变使得 5'剪接位点的 BDGP 评分从 0.72 下降至 0。HSF 预测该突变会破坏野生型的剪接供体位点,很大概率影响剪接过程。PCR 结果证实了这一点。野生型的 PCR 产物为长 114 bp 的条带,包含 SD6、SA2 和 5 号外显子序列。而突变型的 PCR 产物则显示存在单剪接异常产物,5 号外显子完全跳变。见图 2B。

位于 6 号内含子上的 c.773-3C>T 经 BDGP 预测可能会导致 3'剪接位点评分由 0.43 上升至 0.49。同时 6 号外显子上距离 3'剪接位点 67 bp 的位置其评分为 0.82。HSF 则预测该突变对剪接过程无影响,PCR 结果证实了 HSF 的预测结果。突变体同野生型产物相同,均包含 SD6、SA2 和 6 号外显子序列,这提示这一突变并未影响剪接过程,是阴性结果。见图 2C。

c.804G>A 是位于 6 号外显子上的同义突变,两种生物信息学工具均预测其具有致病性, BDGP 预测该突变使得 5'剪接位点评分从 0.89 下降至 0.19, HSF 预测该突变会导致潜在的受体位点的激活,可能对

剪接过程产生影响。然而 Clinvar 将该位点分类成良性突变。PCR 结果显示其突变型产物同野生型产物分子量一致，均为包含 SD6、SA2 和 6 号外显子的基因序列。见图 2C。

c.1534+5G>T 则是位于 13 号内含子上的突变，HSF 预测其对剪接过程并无显著影响。BDGP 预测典型 5'位点评分从 1 下降至 0.88，同时激活了一个新的剪接位点，位于，评分为 0.9。测序结果显示该突变产生的条带同野生型一致，均为包含 SD6、SA2 和 13 号外显子的长为 368bp 的序列。见图 2D。

2.2. VulexMap 软件预测结果

VulexMap 是一款专为基因组剪切调控研究设计的生物信息学可视化工具，该软件通过整合基因组坐标信息、剪接位点评分及表观遗传注释，生成基因图谱。该软件将外显子分为三种类型：脆弱外显子、弹性外显子、替代外显子。据该软件预测，CFI 基因的 3 号、5 号、6 号、12 号外显子均为脆弱外显子，这表明这些外显子上的基因变异对前 mRNA 剪接造成影响的可能性为中等。见图 3。

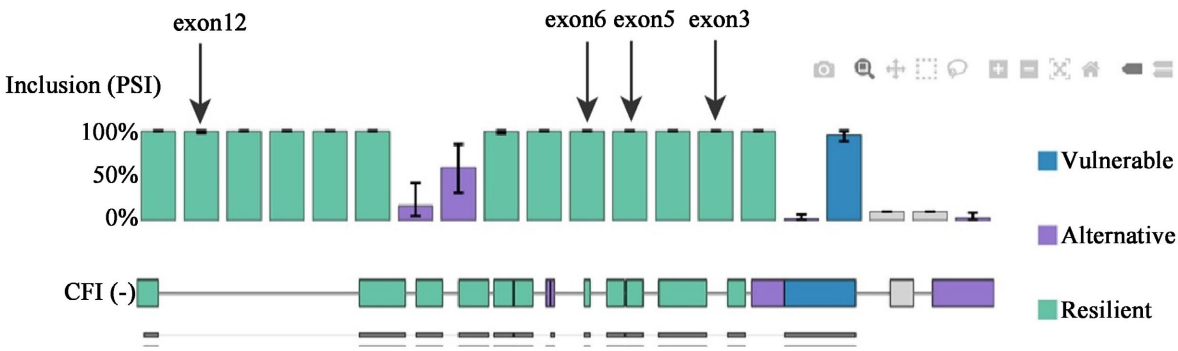


Figure 3. Exon map predicted by VulexMap
图 3. VulexMap 预测外显子图谱

2.3. DEEPCLIP 软件预测结果

DEEPCLIP 是一种解析 RNA 结合蛋白(RNA-binding proteins, RBPs)与 RNA 分子之间的相互作用位点及调控机制的生物信息学工具。本次研究中我们选择了目前公认剪接相关的 RNA 结合蛋白(SRSF1 和 hnRNP)两种模型，预测了筛选出的 7 个突变在剪接过程与这两种蛋白结合的可能性，见表 2。

Table 2. Prediction results from DEEPCLIP
表 2. DEEPCLIP 预测结果

突变	SRSF1	hnRNP
c.482+6C>T	0.516	0.391
c.482+6C>A	0.516	0.391
c.482+8C>T	0.516	0.391
c.772G>A	0.194	0.559
c.773-3C>T	0.128	0.081
c.804G>A	0.172	0.064
c.1534+5G>T	0.699	0.215

A 第一条泳道为 marker；第二条为 HEK293T 细胞空载质粒结果；第三条为 HEK293T 细胞 CFI 基因

的 3 号外显子；第四、五、六条分别为 HEK293T 细胞中 c.482+6C>A、c.482+6C>T、c.482+8C>T 的结果。B 第一条泳道为 marker；第二条为 HEK293T 细胞空载质粒结果；第三条为 HEK293T 细胞 CFI 基因的 5 号外显子；第四条为 HEK293T 细胞中 c.772G>A 的结果。C 第一条泳道为 marker；第二条为 HEK293T 细胞空载质粒结果；第三条为 HEK293T 细胞 CFI 基因的 6 号外显子；第四、五条分别为 HEK293T 细胞中 c.773-3C>T、c.804G>A 的结果。D 第一条泳道为 marker；第二条为 HEK293T 细胞空载质粒结果；第三条为 HEK293T 细胞 CFI 基因的 12 号外显子；第四条为 HEK293T 细胞中 c.1534+5G>T 的结果。

3. 讨论

3.1. 选择性剪接

前体 mRNA 的选择性剪接在基因表达和编码蛋白质的多样性中起着关键作用，而人类具有最大程度的选择性剪接[10][11]。至少 70% 的基因通过外显子的选择性剪接表达多种 mRNA，这极大地扩展了转录组的信息量[12][13]。通过选择性剪接，可以产生外显子跳跃、内含子保留等剪接异常事件。目前研究表明约有三分之一的选择性剪接引入了过早终止密码子(PTC)，从而通过无义介导的衰变(NMD)使 mRNA 降解。这种错误可能会导致疾病发生[10]。然而大多数基因仅表达一种转录本，这说明相当一部分选择性剪接产物只是发生了剪接水平上的改变，而并没有影响蛋白质的编码[14]。

目前研究表明发生选择性剪接的外显子长度多为 3n，这导致剪接过程中跳过或包含此外显子不会导致阅读框偏移[15]。同时外显子的跳跃还与较弱的 5'和 3'剪接位点显著相关[15]。本实验中发生选择性剪接的 5 号外显子，长度为 114 bp，为 3 的倍数，其跳跃不会引起转录过程移码突变，这与上述结论相符合。其 3'剪接位点的 BDGP 评分为 0.94，评分较高，而 5'剪接位点的评分为 0.74，评分较低。这些特点表明 CFI 基因的 5 号外显子已发生剪接突变。

VulexMap 预测 CFI 基因 3、5、6、12 号外显子均为脆弱外显子，其上发生的突变较易对剪接过程产生影响。而 7 号外显子被预测为替代外显子，极易发生剪接突变。研究表明外显子的脆弱性由许多因素决定，例如 ESE 数量少、GC 含量低以及外显子两侧的内含子较长，会使外显子更容易发生剪接突变[16]。目前研究表明内含子平均长度约 3365 bp，而外显子的 GC 含量平均约 41% [17]。我们发现 CFI 基因的 7 号外显子的 GC 含量为 48%。其上游内含子长度 2486 bp，下游内含子 5259 bp。这一外显子的 GC 含量偏高，下游内含子长度偏大，均为较易发生剪接突变的影响因素。可惜的是，我们的实验并未筛选出 7 号外显子上的基因突变，没有通过实验验证这一基因是否容易发生剪接突变。

3.2. 外显子突变

外显子上的突变通常被认为对开放阅读框和蛋白质功能造成影响，然而越来越多的研究发现，外显子基因突变也可影响剪接过程。本实验中研究了两个外显子突变，其中 c.772G>A 使得对应的编码氨基酸的密码子由 GCA 变成 ACA，对应编码的氨基酸由丙氨酸变成苏氨酸。而我们的迷你基因实验显示该突变导致 5 号外显子的全部跳跃，这导致 114 bp 的碱基缺失，不造成移码突变，但对蛋白质结构有显著影响。这可能是由于该突变位于 5 号外显子的最后一个碱基，该位置的突变很大可能影响典型剪接位点，从而导致剪接过程的变化。生物信息学软件的预测结果证实了这一可能。HSF 预测该突变会导致野生型供体位点(Donor Site)的破坏。BDGP 预测该位点会导致 5'剪接位点评分显著下降，从 0.72 下降至 0，这一评分的改变也暗示了该突变可能使剪接体对典型剪接位点的识别降低，从而导致外显子剪接跳跃。

c.804G>A 突变是使得密码子由 AGC 变成 AGU，这两种密码子对应编码的氨基酸均为丝氨酸，这证明该突变是同义突变。同义突变虽然不造成氨基酸的变化，但其可能通过影响密码子最优性而改变翻译延伸率和对应的 mRNA 的稳定性[12][18]。同时研究证明，密码子周围环境对局部翻译速率同样有影响

[19]。同时外显子剪接增强子和沉默子位于外显子上,负责调控剪接体对剪接位点的识别,当其发生同义突变时,将会影响剪接位点的识别[20] [21]。因此同义突变虽不改变氨基酸序列,但其对 mRNA 的稳定性及剪接位点识别的潜在影响仍能影响剪接过程。本实验中 c.804G>A 突变位于 6 号外显子上距离 3'剪接位点 32 bp、距 5'剪接位点 79 bp 的位置上,BDGP 分析该突变使得典型的 5'剪接位点评分从 0.89 下降至 0.19。而 HSF 预测该突变会导致一个潜在的受体位点的激活,改变剪接体对剪接位点的识别。而本次实验证实该突变产生的条带与野生型条带分子量基本一致,测序结果显示该突变为阴性结果,并未产生外显子突变。这也意味着该突变所在的位置并不是剪接调节因子如 ESE、ESS 等的位置。而 HSF 预测结果证实了该突变并未造成 ESS 和 ESE 的改变。

3.3. 剪接调控元件

前体 mRNA 生成成熟 mRNA 的过程十分复杂,涉及对内含子和外显子边界的精准识别与结合,这一过程需要许多剪接调控元件的参与。剪接调控元件包括顺式作用元件和反式作用因子,如外显子剪接增强子/沉默子、内含子剪接增强子/沉默子[22]。其中 ESE 和 ISE,富含嘌呤序列,可以通过招募 SR 蛋白促进剪接体识别外显子,而 ESS 和 ISS 则富含嘧啶或特定序列(如 UAGG),可以通过与 hnRNP 蛋白结合抑制非经典剪接位点的识别[23]-[27]。而分支位点和多嘧啶区在内含子 3'端剪接中起到关键作用,其中分支位点一般位于内含子 3'端上游 20~50 bp [28]。这些序列的变异可能破坏了剪接因子结合或改变了 RNA 的二级结构,从而导致异常剪接事件的发生,进而导致蛋白质功能缺陷。

DEEPCLIP 是一种解析 RNA 结合蛋白(RNA-binding proteins, RBPs)与 RNA 分子之间的相互作用位点及调控机制的生物信息学工具[16] [29]。我们应用目前公认与剪接相关的 RNA 结合蛋白(SRSF1 和 hnRNP)两种模型预测了筛选出的 CFI 基因突变,其中 c.772G>A 这一突变的 hnRNPA1 模型的评分是 0.559,这表明该突变很大概率影响 hnRNPA1 和 ESS 的结合,从而阻止剪接体与剪接位点的结合。迷你基因实验结果显示该突变会导致剪接体对外显子经典剪接位点识别能力下降,外显子完全跳跃,同样支持这一观点。

3.4. 迷你基因实验的优缺点

随着高通量测序技术的发展,单核苷酸变异对前 mRNA 剪接的影响日益受到关注,这类变异可能通过破坏剪接调控元件(如外显子剪接增强子/沉默子)或形成隐秘剪接位点,导致遗传性疾病的发生。准确区分基因突变的致病机制,对解析蛋白质结构-功能关系及制定精准治疗策略至关重要。尽管直接分析患者 RNA 被视为评估剪接异常的“金标准”[30] [31],但其临床应用常受限于样本可及性以及野生型等位基因的共表达干扰(尤其在杂合突变中)。

在此背景下,迷你基因系统成为体外研究剪接突变的重要替代方案。其核心优势体现在三个方面:(1) 无需依赖患者生物样本,通过体外合成目标基因片段即可模拟突变效应;(2) 通过设计仅携带突变等位基因的质粒,可完全规避野生型等位基因的转录干扰;(3) 允许在多种细胞系中验证剪接模式的细胞类型依赖性[32]。

然而,该技术的局限性需谨慎考量。首先,体外转录环境可能无法完全模拟体内 mRNA 的复杂调控机制:一方面,mRNA 二级结构(如 G 四链体)对剪接因子结合的影响在迷你基因模型中难以重现;另一方面,无义介导衰变(NMD)通路在异常转录本降解中的作用可能被低估,导致对截短蛋白的致病风险预测出现偏差[33]。同时迷你基因构建的内含子可能丢失部分调控序列,从而导致错误的外显子跳跃或内含子保留。本研究中,尽管通过 RT-PCR 鉴定了异常剪接事件,但未进一步检测补体因子 I (CFI)的蛋白表达水平及功能活性。目前研究表明,超过 50%的 CFI 基因突变会分泌异常的蛋白质,但仅有部分会表现

出疾病表型[3]。这一数据表明这些剪接突变可能通过剂量效应或显性负效应驱动非典型溶血性尿毒症(aHUS)的发生。后续研究需结合蛋白质印迹实验与补体功能活性检测,以完善病理机制解析。

3.5. 基因治疗

近年来,针对遗传性疾病已经开发出了基因治疗这种新型治疗方法。其中一种方式是,通过合成的反义寡核苷酸(ASOs)与前mRNA的特定序列结合,阻断剪接信号,使剪接机制包含原本被跳过的外显子,从而恢复蛋白质正常的阅读框架。目前反义寡核苷酸药物已被广泛应用于改变体内剪接模式。CRISPR可用于治疗遗传疾病的方式有很多,包括同源定向修复(HDR)介导的基因校正、单碱基对校正、外显子缺失和通过插入和缺失(INDEL)突变的框架校正[34]-[36]。对于引起外显子跳跃的基因突变,Cas9可以引入破坏剪接位点的小插入或缺失突变(indels),导致外显子包含,恢复正常的剪接模式。

目前,基于外显子包含的基因治疗在多种遗传性疾病中取得了显著进展。例如,Zorevunersen是一款设计用以治疗Dravet综合征的反义寡核苷酸药物,它靶向SCN1A基因。目前研究证明接受Zorevunersen治疗的患者在抽搐性癫痫发作频率上有显著降低[37]。因此针对造成外显子跳跃的基因突变研究新型基因治疗药物是可行的。

尽管基因治疗在遗传性疾病治疗中展现出巨大潜力,但仍面临一些挑战。对于反义寡核苷酸介导的外显子包含,如何提高ASOs的递送效率和特异性,以及如何降低其潜在的免疫原性,是需要解决的问题。对于CRISPR-Cas9介导的基因组编辑,体内递送和非特异性脱靶效应仍然是技术瓶颈[11][37]。

基因治疗作为一种新兴的治疗策略,在遗传性疾病领域具有广阔的应用前景。通过不断优化治疗技术和深入研究其机制,有望为患者提供更有效的治疗方案,改善其生活质量和预后。

4. 总结

随着单细胞测序技术的发展,未来有望在单细胞水平上解析不同细胞类型和发育阶段的剪接模式,揭示剪接在细胞命运中的作用。同时,开发更高效的剪接调控工具,如基于CRISPR的剪接编辑技术,将为研究RNA剪接的功能和治疗相关疾病提供新的手段。

参考文献

- [1] Will, C.L. and Lührmann, R. (2011) Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **3**, a003707.
- [2] Che, M., Moran, S.M., Smith, R.J., Ren, K.Y.M., Smith, G.N., Shamseddin, M.K., *et al.* (2024) A Case-Based Narrative Review of Pregnancy-Associated Atypical Hemolytic Uremic Syndrome/Complement-Mediated Thrombotic Microangiopathy. *Kidney International*, **105**, 960-970. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2023.12.021>
- [3] Hallam, T.M., Sharp, S.J., Andreadi, A. and Kavanagh, D. (2023) Complement Factor I: Regulatory Nexus, Driver of Immunopathology, and Therapeutic. *Immunobiology*, **228**, Article ID: 152410. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2023.152410>
- [4] Yu, Q., Zhu, J., Yao, Y. and Sun, C. (2020) Complement Family Member CFI Polymorphisms and AMD Susceptibility from a Comprehensive Analysis. *Bioscience Reports*, **40**, BSR20200406. <https://doi.org/10.1042/bsr20200406>
- [5] Khandhadia, S., Cipriani, V., Yates, J.R.W. and Lotery, A.J. (2012) Age-Related Macular Degeneration and the Complement System. *Immunobiology*, **217**, 127-146. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.019>
- [6] Fraczek, L.A. and Martin, B.K. (2010) Transcriptional Control of Genes for Soluble Complement Cascade Regulatory Proteins. *Molecular Immunology*, **48**, 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.08.016>
- [7] Xue, X., Wu, J., Ricklin, D., Forneris, F., Di Crescenzo, P., Schmidt, C.Q., *et al.* (2017) Regulator-Dependent Mechanisms of C3b Processing by Factor I Allow Differentiation of Immune Responses. *Nature Structural & Molecular Biology*, **24**, 643-651. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3427>
- [8] Nester, C.M., Barbour, T., de Cordoba, S.R., Dragon-Durey, M.A., Fremeaux-Bacchi, V., Goodship, T.H.J., *et al.* (2015) Atypical Ahus: State of the Art. *Molecular Immunology*, **67**, 31-42. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.246>

- [9] Bresin, E., Rurali, E., Caprioli, J., Sanchez-Corral, P., Fremeaux-Bacchi, V., Rodriguez de Cordoba, S., *et al.* (2013) Combined Complement Gene Mutations in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Influence Clinical Phenotype. *Journal of the American Society of Nephrology*, **24**, 475-486. <https://doi.org/10.1681/asn.2012090884>
- [10] Lee, Y. and Rio, D.C. (2015) Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*, **84**, 291-323. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034316>
- [11] Hwang, J. and Yokota, T. (2019) Recent Advancements in Exon-Skipping Therapies Using Antisense Oligonucleotides and Genome Editing for the Treatment of Various Muscular Dystrophies. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, **21**, e5. <https://doi.org/10.1017/erm.2019.5>
- [12] Wang, G. and Cooper, T.A. (2007) Splicing in Disease: Disruption of the Splicing Code and the Decoding Machinery. *Nature Reviews Genetics*, **8**, 749-761. <https://doi.org/10.1038/nrg2164>
- [13] Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J. and Blencowe, B.J. (2008) Deep Surveying of Alternative Splicing Complexity in the Human Transcriptome by High-Throughput Sequencing. *Nature Genetics*, **40**, 1413-1415. <https://doi.org/10.1038/ng.259>
- [14] Bitton, D.A., Atkinson, S.R., Rallis, C., Smith, G.C., Ellis, D.A., Chen, Y.Y.C., *et al.* (2015) Widespread Exon Skipping Triggers Degradation by Nuclear RNA Surveillance in Fission Yeast. *Genome Research*, **25**, 884-896. <https://doi.org/10.1101/gr.185371.114>
- [15] Patthy, L. (1987) Intron-dependent Evolution: Preferred Types of Exons and Introns. *FEBS Letters*, **214**, 1-7. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80002-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80002-9)
- [16] Andresen, B.S., Baumbach, J., Hartung, A.M., Hansen, M.B., Bruun, G.H., Holm, L.L., *et al.* (2020) DeepCLIP: Predicting the Effect of Mutations on Protein-RNA Binding with Deep Learning. *Nucleic Acids Research*, **48**, 7099-7118.
- [17] Qiu, Y., Kang, Y.M., Korfmann, C., Pouyet, F., Eckford, A. and Palazzo, A.F. (2024) The Gc-Content at the 5' Ends of Human Protein-Coding Genes Is Undergoing Mutational Decay. *Genome Biology*, **25**, Article No. 219. <https://doi.org/10.1186/s13059-024-03364-x>
- [18] Rudolf, S., Thommen, M., Rodnina, M.V. and Lipowsky, R. (2014) Deducing the Kinetics of Protein Synthesis *in Vivo* from the Transition Rates Measured *in Vitro*. *PLOS Computational Biology*, **10**, e1003909. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003909>
- [19] Hanson, G. and Collier, J. (2017) Codon Optimality, Bias and Usage in Translation and mRNA Decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **19**, 20-30. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.91>
- [20] Fairbrother, W.G., Yeh, R., Sharp, P.A. and Burge, C.B. (2002) Predictive Identification of Exonic Splicing Enhancers in Human Genes. *Science*, **297**, 1007-1013. <https://doi.org/10.1126/science.1073774>
- [21] Wang, Z., Rolish, M.E., Yeo, G., Tung, V., Mawson, M. and Burge, C.B. (2004) Systematic Identification and Analysis of Exonic Splicing Silencers. *Cell*, **119**, 831-845. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.010>
- [22] Sarkar, A., Panati, K. and Narala, V.R. (2022) Code Inside the Codon: The Role of Synonymous Mutations in Regulating Splicing Machinery and Its Impact on Disease. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **790**, Article ID: 108444. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2022.108444>
- [23] Dreyfuss, G., Kim, V.N. and Kataoka, N. (2002) Messenger-RNA-Binding Proteins and the Messages They Carry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **3**, 195-205. <https://doi.org/10.1038/nrm760>
- [24] Pozzoli, U. and Sironi, M. (2005) Silencers Regulate Both Constitutive and Alternative Splicing Events in Mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **62**, 1579-1604. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5030-6>
- [25] Shen, H. and Green, M.R. (2004) A Pathway of Sequential Arginine-Serine-Rich Domain-Splicing Signal Interactions during Mammalian Spliceosome Assembly. *Molecular Cell*, **16**, 363-373. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.021>
- [26] Zhu, Y., Deng, H., Chen, X., Li, H., Yang, C., Li, S., *et al.* (2019) Skipping of an Exon with a Nonsense Mutation in the DMD Gene Is Induced by the Conversion of a Splicing Enhancer to a Splicing Silencer. *Human Genetics*, **138**, 771-785. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02036-2>
- [27] Shao, L., Cui, L., Lu, J., Lang, Y., Bottillo, I. and Zhao, X. (2018) A Novel Mutation in Exon 9 of Cullin 3 Gene Contributes to Aberrant Splicing in Pseudohypoaldosteronism Type II. *FEBS Open Bio*, **8**, 461-469. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12389>
- [28] Pérez-Valle, J. and Vilardell, J. (2012) Intronic Features That Determine the Selection of the 3' Splice Site. *WIREs RNA*, **3**, 707-717. <https://doi.org/10.1002/wrna.1131>
- [29] Liu, H., Zhang, M. and Krainer, A.R. (1998) Identification of Functional Exonic Splicing Enhancer Motifs Recognized by Individual SR Proteins. *Genes & Development*, **12**, 1998-2012. <https://doi.org/10.1101/gad.12.13.1998>
- [30] Whiley, P.J., de la Hoya, M., Thomassen, M., Becker, A., Brandão, R., Pedersen, I.S., *et al.* (2014) Comparison of mRNA Splicing Assay Protocols across Multiple Laboratories: Recommendations for Best Practice in Standardized Clinical Testing. *Clinical Chemistry*, **60**, 341-352. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.210658>

- [31] Baralle, D., Lucassen, A. and Buratti, E. (2009) Missed Threads. The Impact of Pre-mRNA Splicing Defects on Clinical Practice. *EMBO reports*, **10**, 810-816. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.170>
- [32] Pérez-Morga, D. and Guarneros, G. (1990) A Short DNA Sequence from λ Phage Inhibits Protein Synthesis in *Escherichia Coli* Rap. *Journal of Molecular Biology*, **216**, 243-250. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80316-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80316-x)
- [33] Shi, X., Wang, H., Zhang, R., Liu, Z., Guo, W., Wang, S., *et al.* (2023) Minigene Splicing Assays Reveal New Insights into Exonic Variants of the SLC12A3 Gene in Gitelman Syndrome. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, **11**, e2128. <https://doi.org/10.1002/mgg3.2128>
- [34] Bengtsson, N.E., Hall, J.K., Odom, G.L., Phelps, M.P., Andrus, C.R., Hawkins, R.D., *et al.* (2017) Muscle-Specific CRISPR/Cas9 Dystrophin Gene Editing Ameliorates Pathophysiology in a Mouse Model for Duchenne Muscular Dystrophy. *Nature Communications*, **8**, Article No. 14454. <https://doi.org/10.1038/ncomms14454>
- [35] Long, C., Li, H., Tiburcy, M., Rodriguez-Caycedo, C., Kyrychenko, V., Zhou, H., *et al.* (2018) Correction of Diverse Muscular Dystrophy Mutations in Human Engineered Heart Muscle by Single-Site Genome Editing. *Science Advances*, **4**, eaap9004. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aap9004>
- [36] Gapinske, M., Luu, A., Winter, J., Woods, W.S., Kostan, K.A., Shiva, N., *et al.* (2018) CRISPR-SKIP: Programmable Gene Splicing with Single Base Editors. *Genome Biology*, **19**, Article No. 107. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1482-5>
- [37] Liao, H., Hatanaka, F., Araoka, T., Reddy, P., Wu, M., Sui, Y., *et al.* (2017) *In Vivo* Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-Epigenetic Modulation. *Cell*, **171**, 1495-1507.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.025>

附表 1

野生型	上游引物 下游引物	突变型	上游引物 下游引物
exon3	ccgctcgagatagcactgccgtgaca ctagctagcatccagatacttcaacagac	c.482+6C>A	caacagtgaagctgtgtatc gatacaagctctcactgttg
exon3	ccgctcgagatagcactgccgtgaca ctagctagcatccagatacttcaacagac	c.482+6C>T	caacagtgaagctgtgtatc gatacaagcactcactgttg
exon3	ccgctcgagatagcactgccgtgaca ctagctagcatccagatacttcaacagac	c.482+8C>T	caacagtgaagctgtgtatcag ctgatacaaacgctcactgttg
exon5	ccgctcgagctctcccatctcagcaa ctagctagcgaacataagcaggaga	c.772G>A	ctgtgtgtataaagtagacata tatgtctacttttacaacacag
exon6	ccgctcgagtagcctctaaatcctcta ctagctagcgcaggtggaaatgggta	c.773-3C>T	tgtttgcatagcatgccaaag ctggcatgctatgcaaca
exon6	ccgctcgagtagcctctaaatcctcta ctagctagcgcaggtggaaatgggta	c.804G>A	cattgcaaatcaggtgtttgc gcaaacacctgattgcaatg
exon12	ccgctcgagcccttgactatccatcca ctagctagcaccttgctgtgctctat	c.1534+5G>T	gcaggtaattgccaagtgt accacttgcaattacctgc