

神经胶质瘤中前体 mRNA 可变剪接研究进展*

彭正羽¹⁾ 张薇²⁾ 陈献华¹⁾ 徐平^{1)**}

¹⁾复旦大学医学院医学神经生物学国家重点实验室, 上海 200032;

²⁾浙江大学城市学院药系, 杭州 310015)

摘要 胶质瘤是最常见的脑肿瘤, 前体 mRNA 可变剪接可能在不同类型胶质瘤的发生、恶化以及侵入中发挥作用. 参与调控胶质瘤中前体 mRNA 可变剪接的因素包括顺式元件如内含子剪接抑制序列(ISS)、外显子剪接抑制序列(ESS)等, 反式因子包括 SRp55、SC35、SF2/ASF、PTB 等剪接调节因子. 近期的研究进展发现, 有多种与胶质瘤相关的基因受到可变剪接的调控, 包括肿瘤抑制因子、肿瘤促进因子、酶、受体、离子通道等. 因此, 研究胶质瘤中的前体 mRNA 可变剪接将有利于深入了解胶质瘤发生的分子机制、有利于为胶质瘤的早期诊断和治疗提供新的潜在靶点.

关键词 胶质瘤, 前体 mRNA, 可变剪接, 顺式元件, 反式因子

学科分类号 Q7, R73

随着对人类全基因组研究的深入, 现已发现约 70% 的人类基因都存在前体 mRNA 可变剪接亚型, 所以目前普遍认为前体 mRNA 可变剪接在基因组及蛋白质组功能多样性中发挥重要作用^[1]. 在正常生理条件下, 可变剪接位点的选择在发育过程中以及组织特异性表达中受到严格调控, 在正常细胞中几乎不会发生错误的可变剪接. 然而, 在肿瘤细胞中却有着大量的异常可变剪接存在. 目前已经发现, 在多种肿瘤 (如乳腺癌、结肠癌、前列腺癌以及神经胶质瘤等) 的发生过程中, 一些与肿瘤发生密切相关的基因, 如 CD44、MDM2、FHIT 等, 均有不同变异剪接的发生^[2]. 这些变异剪接的发生可以使肿瘤抑制基因失活, 或者使具有诱发肿瘤发生作用的蛋白质亚型增多^[3]. 在另一些情况下, 可变剪接异常并不直接或立即诱发肿瘤, 但它们的出现标志着肿瘤发生前细胞状态的异常变化. 因此, 研究肿瘤中的前体 mRNA 可变剪接在肿瘤的及时诊断及治疗中都非常重要. 人类神经胶质瘤作为最常见的脑肿瘤, 组织类型复杂, 且不同类型胶质瘤具有不同的生物学特性, 早期难以诊断, 治疗难度也大. 目前, 一些散在性的研究结果已初步发现, 在胶质瘤中多种与肿瘤相关的基因存在异常的可变剪接, 提示变异的前体 mRNA 可变剪接可能在胶质瘤发生中扮演重要角色^[4]. 因此, 前体 mRNA 可变剪接

在胶质瘤的分子发病机制以及临床治疗中的重要意义已经开始受人关注. 据此, 本文旨在对神经胶质瘤中前体 mRNA 可变剪接的研究进展作一简单综述.

1 前体 mRNA 可变剪接机制介绍

每个基因含有多个大小不一的内含子和外显子, 经过转录后生成前体 mRNA. 前体 mRNA 通过可变剪接过程, 其所含的外显子被选择性地组合、联接在一起. 单个基因可以通过前体 mRNA 所含外显子的不同组合最终表达出功能各异的、甚至完全相反的蛋白质亚型. 可变剪接可以插入或删除氨基酸片段, 改变读码框甚至导入终止密码子, 也可以通过去掉或插入调节元件来控制翻译、mRNA 的稳定性以及定位^[5~7]. 前体 mRNA 的剪接是在“剪接小体”中进行的, 剪接小体包含 snRNPs、hnRNPs 和 SR 蛋白及其相关蛋白, 它能够识别内含子和外显子之间不同的剪接位点, 然后进行剪接-连接反应以去除内含子并使外显子连接起来. 剪接过程中, 剪接小体始终处于动态之中, 在不同

* 上海市卫生局科研基金资助项目(2006003).

** 通讯联系人. Tel: 021-54237075, E-mail: matibuck@yahoo.com

收稿日期: 2007-01-12, 接受日期: 2007-04-28

的时期吸纳不同的组分进行 RNA-RNA、RNA-蛋白质、蛋白质-蛋白质之间的作用^[8,9]. 调节可变剪接的因素大致可分为 2 类即顺式元件和反式调节因子. 顺式元件指前体 mRNA 上特定的序列, 包括剪接增强子和抑制子. 这些元件提供与某些 RNA 结合蛋白的结合位点, 通过 RNA-蛋白质的相互作用来调节附近剪接位点的使用. 反式调节因子是指与前体 mRNA 结合(特别是与顺式元件结合)从而调节前体 mRNA 剪接方式的蛋白质, 主要包括 HnRNP 蛋白家族, SR 蛋白和 SR 相关蛋白家族^[10]. 正向或反向的反式调节因子分别可以结合前体 mRNA 上的剪接增强子和抑制子, 然后影响 snRNP 和其他剪接因子与 RNA 的结合, 从而促进/抑制剪接位点的使用, 并最终产生不同的 mRNA 亚型以及蛋白亚型^[11].

2 肿瘤与前体 mRNA 可变剪接

许多基因的选择性剪接与肿瘤相关, Wang 等^[12]用约 347 万条 EST 对 RefSeq 数据库的 11 014 条 mRNA 进行了比对分析, 发现在可能的 26 258 个可变剪接亚型中, 有 845 个与肿瘤有明显的关联. Xu 等^[13]通过用 200 万条 EST 对基因组的比对分析也发现了 316 个肿瘤特异性的剪接亚型. 这些与肿瘤有关联的基因亚型的产生, 既与调节前体 mRNA 可变剪接相关的顺式元件的突变有关, 也与可变剪接位点识别与利用相关的反式因子的变异相关. 如 CD44 分子, 它具有细胞粘附、迁移以及细胞与基质之间相互作用的功能, 通过对其基因内 10 个外显子的选择性剪接(外显子 6~15)可以表达一系列细胞表面的糖蛋白. 多种 CD44 的选择性剪接亚型已经证明与乳腺癌、结肠癌等肿瘤细胞的入侵以及转移等相关联^[14]. 肿瘤中前体 mRNA 的可变剪接受顺式元件和反式调节因子的调控, 如在 CD44 的前体 mRNA 的可变剪接调节中, 其 v4 外显子序列上含有几个作为增强子的 C/A-rich 序列, 该 C/A-rich 序列能够与 SR 蛋白 Tra2-B1 以及 YB-1(一种 DNA-结合蛋白)作用, 从而促进成熟 mRNA 中 v4 和 v5 外显子的掺入, 另外一种 SR 蛋白 SC35 则可以拮抗 Tra2-B1 以及 YB-1 的作用^[15,16]. 另外, 与乳腺癌发生相关的 BRCA1 可变剪接也同时受反式因子和顺式元件的作用, 比如在其第 18 号外显子中的一个突变, 影响了可与 SR 蛋白 SF2/ASF 结合的其外显子剪接增强子序列, 从而造成第 18 号外显子被略读^[17]. 与肿瘤相关的前体

mRNA 可变剪接研究目前在不断进展中, 有越来越多的肿瘤被证实与前体 mRNA 可变剪接的异常有关, 并且其可变剪接的异常在临床诊断以及治疗中意义重大. 但总的来说, 目前还只有少数几种可变剪接亚型被确认为肿瘤的生物标志分子, 对剪接突变的产生是如何导致癌症的分子机制还很不清楚, 与肿瘤相关的新的亚型还有待发现, 各剪接亚型的病理意义以及可变剪接的调控在肿瘤治疗中的价值等方面, 尚有待于研究的进一步深入和积累.

3 胶质瘤中的前体 mRNA 可变剪接

目前在胶质瘤中发现, 存在前体 mRNA 可变剪接的基因较多, 其中包括细胞凋亡相关基因、细胞周期调控蛋白、肿瘤抑制基因、各种酶、离子通道、细胞表面受体等等, 这也进一步印证了胶质瘤生物学发生的复杂性. 根据基因在胶质瘤细胞中发挥的作用, 为了便于讨论, 将这些基因大致分为 3 类: 第一类为肿瘤抑制基因及相关基因, 第二类为酶、受体以及离子通道基因, 第三类为其他肿瘤相关基因.

3.1 胶质瘤中肿瘤抑制基因及相关基因的前体 mRNA 可变剪接

Zatcowa 等^[18,19]发现了 7 个导致外显子略读的 NF-1 突变并用预测软件对野生型和突变的 NF-1 的 ESE 进行了分析, 发现 7 个突变中有 6 个改变了 ESE 的结构域, 7 个突变的 ESE 与野生型比其对外显子的剪接增强作用减弱. Baralle 等^[20]对调控 NF1 基因可变剪接的顺式剪接元件进行了研究, 发现其 36 与 37 号外显子不仅需要 37 号外显子内的外显子剪接增强序列(ESE)参与, 同时还需从 31 到 38 号外显子的基因组延展区的存在, 而 ESE 的突变会导致 36 与 37 号外显子的略读. 他们接着通过构建一个包含 NF-1 的 3 号外显子以及一部分内含子序列的小基因, 研究了 ESE 对 NF-1 的 3 号外显子剪接的调节作用, 发现当 3 号外显子下游+5 处发生一个 G-C 的转换后, 3 号外显子的转录就被略读, 加入野生型的 U1snRNA 不能恢复该反应, 而如果加入 C-G 突变的 U1snRNA, 则可以恢复 3 号外显子的插入^[21]. Colapietro 等^[22]也发现, NF1 基因 7 号外显子处有一个高度保护的由 7 个核苷酸构成的 ESE 特殊共有序列, 该序列正常情况下可以与 SC35 以及 SF2/ASF 等 SR 蛋白相互作用, 如果其外显子 7 的 57~58 核苷酸处发生 GC→AA 突变, 则会降低 SC35 和 SF2/ASF 与 ESE 的结合, 从而

导致了其 7 号外显子被略读. 以上的研究证实, NF1 的异常可变剪接与胶质瘤的发生之间存在相关性, 且在 NF1 可变剪接的调控中, 顺式元件以及反式因子均参与相关外显子的可变剪接. 在胶质瘤细胞中, 进一步明确相关的顺式元件和反式因子以及研究通过外部调节其顺式元件以及反式因子来纠正 NF1 的异常可变剪接, 通过 RAS 信号转导通路调控肿瘤细胞的增殖, 进而降低肿瘤细胞的恶性程度和转移能力, 将是研究者接下来面临的问题.

Ras 的抑制基因 RSU-1 的表达可以抑制成胶质瘤细胞的肿瘤发生, 在高级别的胶质瘤中该基因功能经常发生缺失. Chunduru 等^[23,24]发现, RSU-1 在人类胶质瘤细胞中除了 858 bp 的野生型外, 还出现了一个缺失了长 133 bp 外显子的亚型, 该外显子缺失的产物在 30% 的高级别胶质瘤以及 2/3 的少突胶质瘤中表达, 在其他中枢神经肿瘤以及膀胱、结肠癌和正常组织中没有表达, 该蛋白质的半衰期少于 1 h, 极不稳定, 说明它的出现可能会导致正常 RSU-1 的功能丧失减少, 因为 RSU-1 可以限制肿瘤细胞的恶性增殖, 肿瘤细胞通过表达异常剪接的 RSU-1, 可以解除对肿瘤生长的限制.

Mdm2 基因作为一个 P53 抑癌基因的负调节蛋白, 在细胞周期调控、细胞凋亡以及致癌等方面均有重要作用, 它可以通过与 P53 特异的结合并通过泛素化靶向 P53 使其水解失活^[25]. 研究发现, 在胶质母细胞瘤和间变性星形细胞瘤中 Mdm2 的扩增与过表达占约 10%, Matsumoto 等^[26]通过对 66 例不同级别星形细胞瘤的研究发现, 在胶质母细胞瘤中 Mdm2 的表达比低级别的胶质瘤要高, 在 33 例胶质瘤中有 22 例出现 Mdm2 的变异剪接亚型, 而在 12 例星形细胞瘤中则没有, 同时, 在胶质瘤中检验出的 5 种变异剪接亚型中, Mdm2-b 的出现频率最高. 该剪接亚型不含第 4 到 12 号外显子. 进一步的研究还发现, Mdm2-b 可以促进非 P53 依赖的细胞生长, 限制细胞凋亡以及上调 NF- κ B 基因 RelA 亚基的表达^[27]. 在转基因鼠中, Mdm2-b 过表达可以诱导肿瘤的形成及生长, 另外几种剪接亚型在 E-myc 转基因鼠中也可以增加肿瘤的生成^[28], 提示 Mdm2 基因的变异剪接亚型在胶质瘤的生物发生中可能发挥作用, 但其机理还有待进一步研究证实.

Cdk 抑制基因 P16 通过可变剪接可以表达一种亚型即 P14(ARF), P14(ARF)蛋白亚型与 P16 和与 P16 高度同源的 P15 都可以作为细胞周期的负调节蛋白参与细胞周期的调控. Simon 等^[29]发现, 在 9

种不同的胶质瘤细胞中, 有 7 种细胞中 P16、P15 以及 P14(ARF)均失活. 在无内源 P16、P15 的细胞中转染这 2 种基因可以明显地抑制其向肿瘤方向转化, 在生长旺盛的肿瘤细胞中 P16、P15 的表达受抑制. P16、P15 以及 P14(ARF)在野生型 P53 存在时功能相似, 都是潜在的肿瘤抑制因子, 而突变的 P53 则会降低它们的作用^[30]. Inoue 等^[31]发现, 细菌人工染色体可以传递并在胶质瘤细胞中正确表达 P16、P14(ARF)以及 P15, 其生理水平及引起的细胞反应与 P53 的状态有关. 通过细菌人工染色体或者其他的载体在肿瘤细胞内导入 P16、P14(ARF)以及 P15, 是否可以在抑制胶质瘤细胞的增殖以及转移等方面发挥作用, 还有待进一步研究.

3.2 胶质瘤中酶、受体以及离子通道基因的前体 mRNA 可变剪接

在肿瘤发生过程中, 除了肿瘤抑制基因失活可以导致肿瘤发生以外, 还有相当多的原因是肿瘤促进基因的激活, 这些基因包括各种受体、信号通路、离子通道、酶等等, 其中对胶质瘤中的成纤维细胞生长因子受体 (FGFR1) 基因的前体 mRNA 可变剪接及其调节研究最多、也最为清楚, 其余多为仅观察到各基因可变剪接亚型在胶质瘤中的特异表达与分布, 可变剪接的调控机制以及病理意义等尚有待进一步研究.

多位作者证实成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 信号转导途径可能在星形胶质瘤的恶化过程中发挥重要作用, 研究发现 FGF-R 在人星形细胞瘤由良性向恶性转变的过程中有明显变化. FGFR1 的 α 外显子经过可变剪接可以产生 2 种亚型, 即包含 α 外显子的 FGFR1 α 以及不含 α 外显子的 FGFR1 β . FGFR1 在正常的胶质细胞以及低级别的星形细胞瘤中表达很少或无表达, 但在恶性胶质瘤中的表达较高且表达一个可变剪接亚型 FGFR1 β . 中间程度的胶质瘤 FGFR1 的表达则是由 FGFR1 α 到 FGFR1 β 变化. FGFR1 β 具有 2 个免疫球蛋白样的二硫键构成的环状结构, 而 FGFR1 α 则具有 3 个同样的环状结构^[32,33]. 参与调节 FGFR1 α 可变剪接的顺式元件既有内含子剪接抑制序列 (ISS) 也有外显子剪接抑制序列 (ESS). Jin 等^[34,35]研究发现了一个含 69 个核苷酸的外显子剪接增强子, 它是由 3 个独立的元件构成的, 包括 2 个小的剪接增强子以及一个抑制子, 通过紫外交联及免疫沉淀发现, 该区域可以同 SRp55 结合, 而去除 SRp55 后其 α 外显子的插入降低了 90% 左右. 在 SNB19

成胶质瘤细胞中, 正常情况下 α 外显子不能掺入, 而加入 SRp55 可以促进该外显子的掺入, ISS 和 ESS 则可以调控外源 SRp55 作用的发挥. Jin 等^[36]进一步研究发现, 在与 FGFR1 小基因共转染时, 剪接因子 PTB 可以与这些顺式元件结合并且促进对该外显子的略读. 另外, 在恶性胶质细胞瘤中, PTB 的表达比在胶质细胞中为高, 提示 PTB 在恶性胶质细胞瘤中可能与 FGFR1 β 亚型的高表达相关. 在人类成胶质瘤细胞中转染针对 FGFR1 可变剪接的 α 外显子附近(上游或下游)ISS 的寡核苷酸, 可以有效地增加 FGFR1 基因 α 外显子的插入, 其增加的量可以多达 70%, 但如同时用寡核苷酸封闭上游以及下游的 ISS 则不能增加其外显子的插入效果, 说明这种调节作用是通过同一个机制进行的. 在胶质瘤细胞中即使 FGFR1 的 α 外显子的插入增加了 90%, 也不会影响培养细胞的生长情况, 但细胞内 Caspase3 和 Caspase7 的活性却有所增加^[37]. 胶质瘤中 FGFR1 的可变剪接及其调控的分子机制还有待进一步研究, 但是 P53 的失常可以影响 bFGF 以及 FGFR1 表达, 提示其作用的发挥可能要通过 P53 信号途径进行.

对于各种离子通道在肿瘤发生中所扮演角色, 目前已经发现, 大电导钙激活钾离子(BK)通道以及 T 类钙通道的可变剪接亚型与胶质瘤的发生相关, 其中, BK 通道在细胞的生长控制中发挥作用主要归功于其 α 亚基的可变剪接, 在胶质瘤病人的组织活检中发现了 BK 通道各个亚型的高表达, 且其表达与肿瘤的恶性程度呈正相关, 在胶质瘤细胞中, BK 通道对钙离子的敏感性提高且该通道的抑制剂 Iberitoxin 可以抑制胶质瘤细胞的生长^[38, 39]. 其中一个剪接亚型 gBK 含有一个额外的位于 BK 通道 C 末端的第二个剪接位点的外显子, 可编码 34 个氨基酸. 在爪蟾卵细胞中表达 gBK 可以增加 Iberitoxin 敏感的电流. 该剪接亚型在多种正常组织以及新生肿瘤中存在, 提示它在调节 BK 通道的功能方面有重要作用^[40]. 另外, 人类的 T 类钙通道 Ca(v)3.1 在胶质瘤中也存在可变剪接, 其 $\alpha(1)$ 亚基可以通过 25 和 26 外显子的可变剪接产生 3 个不同的亚型(Ca(v)3.1a, Ca(v)3.1b, Ca(v)3.1bc), 正常的脑组织中主要是 Ca(v)3.1a 表达, 而在胶质瘤中 Ca(v)3.1bc 占多数^[41, 42], Latour 等^[41]发现了一个胶质瘤特异的亚型 Ca(v)3.1ac, 在细胞中瞬时转染 Ca(v)3.1ac 可以得到与 Ca(v)3.1b 相似的电流电压特性以及稳态失活特性, 但是其失活后的恢复较

慢. 已发现的这 2 种离子通道的异常可变剪接在胶质瘤的发生以及转移中扮演何种角色还有待进一步研究.

多种酶在胶质瘤中也存在可变剪接的变化, 人类端粒转移酶催化亚基(hTERT)可变剪接的各亚型(relhTERT) A+B+、Adel 以及 Bdel 在低级别和高级别的胶质瘤中的表达存在明显差别, 其中 A+B+在低级别的胶质瘤中, 只有 1/7 的有表达, 而在高级别中的表达占 96.3%, 且在 59.3%的高级别胶质瘤为主要的剪接亚型. 低级别的肿瘤主要表达 Adel 和 Bdel, 说明 hTERT 不同亚型的表达在胶质瘤发生的过程中同其恶化的潜能有关^[43], Shervington 等^[44]的研究进一步证实 hTERT 及其各亚型可以作为胶质瘤诊断的分子标志. 乙酰胆碱脂酶的 3'可变剪接亚型 AChE-S 和 AChE-R mRNA 在星形细胞瘤中的积累同肿瘤的侵袭性相关, IHC 显示只有 AChE-S 在星形瘤细胞中存在^[45]. 凋亡相关基因 Caspase 9 的可变剪接亚型 Caspase 9S 因为缺少催化功能域, 从而可以抑制内源 Caspase 9 的作用, 在星形细胞瘤以及成神经细胞瘤细胞中显著地表达 Caspase 9S mRNA, 而在非新生的人星形细胞中只有极少的表达, 瞬时过表达 Caspase 9S 可以保护 LN-229 星形细胞瘤细胞不受 CD95 配体介导的凋亡. 但是稳定表达 Caspase 9 或 Caspase 9S 却不能改变 LN-18 和 LN-229 星形细胞瘤细胞对 CD95L 或细胞毒药物的敏感性, 提示 Caspase 9 以及 Caspase 9S 在决定人星形细胞瘤细胞凋亡中可能不是主要的因素^[46], 但相关的研究还有待进一步深入.

3.3 其他肿瘤相关基因的前体 mRNA 可变剪接

其他的存在前体 mRNA 可变剪接的胶质瘤相关基因还包括神经细胞黏附分子(NCAML1)、入侵限制蛋白(Irp45)、人类跨膜糖蛋白非转移性黑素瘤蛋白(GPNMB)、黑素瘤活性抑制蛋白(melanoma inhibiting activity protein, MIA)、调节因子 4(RFX4)、微管相关蛋白 2(MAP-2)、突触融合蛋白(syntaxin 1C)、粘蛋白 C(tenascin C)以及酪氨酸酶相关蛋白(TRP-2)等. 这些基因的可变剪接亚型有的可以表达与野生型功能相近的蛋白质, 而有的则在转录后很快被降解, 不能被正常翻译, 提示在胶质瘤的生物学特性中基因表达调控的多样性与复杂性, 它们的调控机制以及在胶质瘤的诊断以及治疗中的意义还有待进一步阐明.

神经细胞黏附分子(NCAML1)是一类在神经系统中表达的免疫球蛋白超家族的成员, 可能在大脑

神经胶质瘤的发生中发挥作用. Izumoto 等^[47]在其检测的所有的胶质瘤以及胶质细胞中都检测到 NCAML1 的剪接亚型 NCAML1cs mRNA 的表达, 转移试验显示, C6 胶质瘤细胞可以被成纤维细胞表达的可溶的野生型和剪接亚型蛋白刺激而转移, 而这种转移可以被识别野生型 NCAML1 的 C2 免疫球蛋白样结构域的抗体所阻断. 体内转移实验显示, 转染 NCAML1 的 C6 胶质瘤细胞在大鼠的脑中可以促进转移, 提示 L1cs 可能通过同类分子间结合在胶质瘤细胞的黏附以及迁移中发挥重要作用, 并能通过神经纤维参与肿瘤的入侵.

入侵限制蛋白(Iip45)可以通过激活入侵增强基因增强成胶质瘤细胞的入侵, 也可以通过同 IGFBP-2 相互结合从而限制胶质瘤细胞的入侵^[48, 49], Song 等^[50]发现, Iip45 在多形性恶性胶质瘤中低表达,但其可变剪接亚型 Iip45S 的 mRNA 在胶质瘤特别是多形性恶性胶质瘤中表达增高. 该亚型缺少外显子 7 从而编码一个羧基端与 Iip45 不同的亚型, 虽然其 mRNA 的含量较高, 但在胶质瘤中却检测不到该蛋白的表达. 进一步的研究发现, 该亚型在翻译后可以通过泛素-蛋白酶作用迅速降解, 从而导致 Iip45 失活. 该剪接亚型可能是通过影响野生型 Iip45 蛋白的功能从而在调节胶质瘤的入侵中发挥作用.

人类跨膜糖蛋白非转移性黑素瘤蛋白 B (GPNMB)的可变剪接亚型 GPNMB(sv)在胞外域插入了一个 12 个氨基酸的外显子. 在正常的组织中没有或极少有 GPNMB mRNA 的表达, 而在多形性恶性胶质瘤的样品中, 有 70%发现了 GPNMB(wt+sv) mRNA, 30%的样品中只有 GPNMB(sv) mRNA 的表达. GPNMB 及其蛋白亚型主要分布在胶质瘤细胞的细胞质以及细胞膜上, GPNMB 的蛋白质增加与死亡率的增加有相关性, 提示 GPNMB 及其亚型与胶质瘤的恶性程度有关^[51].

黑素瘤活性抑制蛋白(MIA)在黑素瘤以及胶质瘤的入侵、转移以及免疫调节等方面发挥作用, Hau 等^[52, 53]发现, MIA 的可变剪接蛋白质亚型(缺少外显子 2)在 71%的高等级的胶质瘤中有分布, 且早期的胶质瘤其 MIA 亚型表达比晚期的要低, MIA 亚型因为移码突变导致其蛋白 C 端发生变化. 在培养的胶质瘤细胞中, 加入转化生长因子可以调控 MIA 及其亚型 mRNA 的表达. MIA 可变剪接亚型在胶质瘤的入侵、转移中的作用还有待深入研究.

还有几种基因可变剪接亚型在胶质瘤中有表达, 如调节因子 4(RFX4)有多个可被可变剪接的亚型, 在正常脑组织中只表达 RFX4-D mRNA 而于胶质瘤中表达 RFX4-D、E、F 的 mRNA, 但是只有 RFX4-E、F 蛋白的表达^[54]. Suzuki 等^[55]通过对 122 个石蜡包埋的儿童肿瘤的研究发现, 微管相关蛋白 2(MAP-2)的剪接亚型 MAP-2e 在所有的少突胶质瘤都表达, 在成胶质细胞瘤, 不同的恶性胶质瘤中, 以及神经上皮瘤中也有表达, 而在非中枢神经肿瘤及成神经细胞瘤中无表达, 免疫组化显示, MAP-2e 的表达可以很好地显示肿瘤的浸润情况, 可以作为一个反映肿瘤浸润的标记. 突触融合蛋白(syntaxin 1C)为 HPC-1/syntaxin 1A 的剪接突变体, 与 Williams' 综合症的发生有关, 在胶质瘤细胞 T98G 以及 U87MG 中表达一可溶的蛋白质组分, 用 PMA 处理细胞可以上调 syntaxin 1C 的表达, 而添加 PKC 抑制因子可以抑制这种上调作用, 说明 syntaxin 1C 的表达是通过 PKC 信号通路进行^[56].

4 针对神经胶质瘤前体 mRNA 剪接异常的治疗

目前, 针对剪接异常的治疗手段正不断涌现, 包括制备针对错误剪接蛋白亚型的单抗, 过表达影响外显子剪接的蛋白质, 使用寡核苷酸探针阻断错误位点或者强制利用正确位点, 应用能够影响剪接因子磷酸化状态或者稳定二级结构的化合物, 利用野生型外显子替代突变外显子顺式途径等等. 在胶质瘤的治疗中也有研究者开始进行这方面的研究, 如 Brack 等^[57, 58]制备了针对粘蛋白 C(tenascin C)基因可变剪接亚型 A1 和 D 的重组抗体 F16 和 P12, 发现 F16 可以选择性地在恶性胶质瘤模型中积累, 在其他组织中则被清除, 而 P12 则在胶质瘤中积累较少, 说明 F16 具有一定的药用价值. 酪氨酸酶相关蛋白(TRP)-2 在多形性成胶质细胞瘤来源的原发性肿瘤细胞中表达 TRP-2-6b、TRP- 2-INT2、TRP-2-LT、TRP-2-8b 等亚型的 mRNA 及蛋白质, Liu 等^[59]用 TRP-2 的部分肽段(180 ~188, SVYDFFVWL)刺激 HLA-A2 受限的细胞毒 T 细胞克隆, 发现细胞毒 T 细胞能够特异地裂解 TRP-2 阳性的多形性成胶质细胞瘤细胞, 而将一个健康的体内外周血细胞用自身的树突细胞预处理后用胶质瘤细胞刺激, 发现外周血细胞可以定向地裂解 TRP-2 阳性的胶质瘤细胞, 结果提示 TRP-2 及其亚型可以作为监视或免疫治疗的靶点. Yamada, Saiki

等^[60, 61]发现, 用腺病毒介导等方法在胶质瘤细胞中转入 FGFR 及其截短型可以抑制胶质瘤细胞的生长^[60, 61], Bruno 等^[62]通过应用靶向性的寡核苷酸同 FGFR-1 的内含子剪接沉默子序列结合, 阻断了反式作用因子同该序列的作用, 从而促进了胶质瘤细胞中包含 FGFR1 α 外显子的剪接亚型的增加, 提示靶向性的寡核苷酸技术可能在胶质瘤的治疗中发挥作用。

总的来说, 目前相关的针对胶质瘤可变剪接的治疗研究还刚开始, 同时这些治疗手段还存在一定的局限性如矫正可变剪接异常的效率、对于非靶标 mRNA 及蛋白质的副作用以及对目标细胞作用的有效性和持续性等等。随着研究的不断深入, 相信针对胶质瘤剪接异常的治疗手段将越来越引起重视并在临床中发挥重要作用。

5 总 结

胶质瘤是一种极具异质性的疾病, 其性质根据肿瘤的种类和发生部位不同而不同, 癌细胞可以在失去一些特性的同时又获得一些特性, 而这些特性与肿瘤形成和肿瘤转移又密切相关。胶质瘤细胞的这些特性在很大程度上与前体 mRNA 可变剪接有关, 鉴于胶质瘤中受可变剪接的基因数量很多以及调控机制的复杂性, 目前要从不同的类型胶质瘤发生过程, 甚至是同一种肿瘤的原发瘤和继发瘤发生过程中总结出前体 mRNA 可变剪接的一般性结论还较为困难。因此, 在对胶质瘤的分析中, 需要获得高度准确的细胞组织, 并将可变剪接分析与定量分析结合起来以筛选在肿瘤形成中可变剪接的变化。随着更多相关基因剪接亚型的发现以及调控机制研究的深入, 我们对各类型胶质瘤的发生以及转移的分子机制将得到深层次的了解, 为胶质瘤的诊断治疗提供更好的依据。

参 考 文 献

- Black D L. Mechanism of alternative pre_messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*, 2003, **72**: 291~336
- Faustino N A, Cooper T A. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes*, 2003, **17** (4): 419~437
- Brinkman B M. Splice variants as cancer biomarkers. *Clinical Biochemistry*, 2004, **37** (7): 584~594
- Zhang W, Fuller G N. *Genomic and Molecular Neuro-Oncology*. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 2004. 474~481
- Baralle D, Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet*, 2005, **42** (10): 737~748
- Yeo G W, Nostrand E V, Holste D, *et al.* Identification and analysis of alternative splicing events conserved in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (8): 2850~2855
- Wu Q, Krainer A R. AT-AC pre-mRNA splicing mechanisms and conservation of minor introns in voltage-gated ion channel genes. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (5): 3225~3236
- Nilsen T W. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell?. *Bioessays*, 2003, **25** (8): 1147~1149
- Jurica M S, Moore M J. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell*, 2003, **12** (1): 5~14
- GarciaBlanco M A. Messenger RNA reprogramming by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *J Clin Invest*, 2003, **112** (4): 474~480
- Graveley B R. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet*, 2001, **17** (2): 100~107
- Wang Z, Lo H S, Yang H, *et al.* Computational analysis and experimental validation of tumor-associated alternative splicing in human cancer. *Cancer Res*, 2003, **63** (3): 655~657
- Xu Q, Lee C. Discovery of novel splice forms and functional analysis of cancer-specific alternative splicing in human expressed sequences. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31** (19): 5635~5643
- Marhaba R, Zöller M. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *Journal of Molecular Histology*, 2004, **35** (3): 211~231
- Watermann D O, Tang Y. Splicing factor Tra2- β 1 is specifically induced in breast cancer and regulates alternative splicing of the CD44. *Gene Cancer Research*, 2006, **66** (9): 4774~4780
- Stickeler E, Fraser S D, Honig A. The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4. *EMBO J*, 2001, **20**: 3821~3830
- Orban T I, Olah E. Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *Mol Pathol*, 2003, **56** (4): 191~197
- Mochizuki H, Nishi T, Bruner J M, *et al.* Alternative splicing of neurofibromatosis type 1 gene transcript in malignant brain tumors: PCR analysis of frozen-section mRNA. *Molecular Carcinogenesis*, 1992, **6** (22): 83~87
- Zatkova A, Messiaen L, Vandenbroucke I, *et al.* Disruption of exonic splicing enhancer elements is the principal cause of exon skipping associated with seven nonsense or missense alleles of NF1. *Hum Mutat*, 2004, **24** (6): 491~501
- Baralle M, Skoko N, Knezevich A, *et al.* NF1 mRNA biogenesis: effect of the genomic milieu in splicing regulation of the NF1 exon 37 region. *FEBS Lett*, 2006, **580** (18): 4449~4456
- Baralle M, Baralle D, De Conti L, *et al.* Identification of a mutation that perturbs NF1 gene splicing using genomic DNA samples and a minigene assay. *J Med Genet*, 2003, **40** (3): 220~222
- Colapietro P, Gervasini C, Natacci F, *et al.* NF1 exon 7 skipping and sequence alterations in exonic splice enhancers (ESEs) in a neurofibromatosis 1 patient. *Hum Genet*, 2003, **113** (6): 551~554
- Chunduru S, Kawami H, Gullick R, *et al.* Identification of an alternatively spliced RNA for the Ras suppressor RSU-1 in human gliomas. *J Neurooncol*, 2002, **60** (3): 201~211
- Tsuda T, Marinetti M R, Masuelli L, *et al.* The Ras suppressor

- RSU-1 localizes to 10p13 and its expression in the U251 glioblastoma cell line correlates with a decrease in growth rate and tumorigenic potential. *Oncogene*, 1995, **11** (2): 397~403
- 25 Cui W, Wu R, Cao H, *et al.* P53 gene mutation and expression of MDM2, P53, P16 protein and their relationship in human glioma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2005, **25** (6): 622~635
 - 26 Matsumoto R, Tada M, Nozaki M, *et al.* Short alternative splice transcripts of the MDM2 oncogene correlate to malignancy in human astrocytic neoplasms. *Cancer Res*, 1998, **58** (4): 609
 - 27 Steinman H A, Burstein E, Lengner C, *et al.* An alternative splice form of Mdm2 induces p53-independent cell growth and tumorigenesis. *J Biol Chem*, 2004, **279** (6): 4877~4886
 - 28 Harris L C. MDM2 splice variants and their therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005, **5** (1): 21~26
 - 29 Simon M, Koster G, Menon A G, *et al.* Functional evidence for a role of combined CDKN2A (p16-p14(ARF))/CDKN2B (p15) gene inactivation in malignant gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1999, **98** (5): 444~452
 - 30 Labuhn M, Jones G, Speel E J, *et al.* Quantitative real-time PCR does not show selective targeting of p14 (ARF) but concomitant inactivation of both p16 (INK4A) and p14 (ARF) in 105 human primary gliomas. *Oncogene*, 2001, **20** (9): 1103~1109
 - 31 Inoue R, Moghaddam K A, Ranasinghe M, *et al.* Infectious delivery of the 132 kb CDKN2A/CDKN2B genomic DNA region results in correctly spliced gene expression and growth suppression in glioma cells. *Gene Therapy*, 2004, **11** (15): 1195~1204
 - 32 Yamaguchi F, Saya H, Bruner J M, *et al.* Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (4): 484~488
 - 33 Morrison R S, Yamaguchi F, Saya H, *et al.* Basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor I are implicated in the growth of human astrocytomas. *J Neurooncol*, 1994, **18** (3): 207~216
 - 34 Jin W, Huang E S, Bi W, *et al.* Exon sequence is required for regulated RNA splicing of the human fibroblast growth factor receptor-1 alpha-exon. *J Biol Chem*, 1998, **273** (26): 16170~16176
 - 35 Jin W, Cote G J. Enhancer-dependent splicing of FGFR1 alpha-exon is repressed by RNA interference-mediated down-regulation of SRp55. *Cancer Res*, 2004, **64** (24): 8901~8905
 - 36 Jin W, McCutcheon I E, Fuller G N, *et al.* Fibroblast growth factor receptor-1 α -exon exclusion and polypyrimidine tract-binding protein in glioblastoma multiforme tumors. *Cancer Res*, 2000, **60**: 1221~1224
 - 37 Bruno I G, Jin W, Cote G J. Correction of aberrant FGFR1 alternative RNA splicing through targeting of intronic regulatory elements. *Hum Mol Genet*, 2004, **13** (20): 2409~2420
 - 38 Ransom C B, Liu X, Sontheimer H. BK channels in human glioma cells have enhanced calcium sensitivity. *Glia*, 2002, **38** (4): 281~291
 - 39 Weaver A K, Liu X, Sontheimer H. Role for calcium-activated potassium channels (BK) in growth control of human malignant glioma cells. *J Neurosci Res*, 2004, **78** (2): 224~234
 - 40 Liu X, Chang Y, Reinhart P H, *et al.* Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells. *J Neurosci*, 2002, **22** (5): 1840~1849
 - 41 Latour I, Louw D F, Beedle A M, *et al.* Expression of T-type calcium channel splice variants in human glioma. *Glia*, 2004, **48** (2): 112~119
 - 42 Chemin J, Monteil A, Dubel S, *et al.* The alpha1I T-type calcium channel exhibits faster gating properties when overexpressed in neuroblastoma/glioma NG 108-15 cells. *Eur J Neurosci*, 2001, **14** (10): 1678~1686
 - 43 Kotoula V, Barbanis S, Nikolakaki E, *et al.* Relative expression of human telomerase catalytic subunit (hTERT) transcripts in astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, 2004, **107** (5): 443~451
 - 44 Shervington A, Patel R, Lu C, *et al.* Telomerase subunits expression variation between biopsy samples and cell lines derived from malignant glioma. *Brain Res*, 2007, **1134** (1): 45~52
 - 45 Perry C, Soreq H. ACHE gene expression in human brain tumors involves alternative splicing and CREB-induced proliferative signals. *Isr Med Assoc J*, 2006, **8** (5): 364~365
 - 46 Waltereit R, Weller M. The role of caspases 9 and 9-short (9S) in death ligand- and drug-induced apoptosis in human astrocytoma cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 2002, **106** (1~2): 42~49
 - 47 Izumoto S, Yoshimine T. Role of neural cell adhesion molecule L1 in glioma invasion. *Nippon Rinsho*, 2005, **63** (Suppl 9): 74~78
 - 48 Song S W, Fuller G N, Khan A, *et al.* Iip45, an insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) binding protein, antagonizes IGFBP-2 stimulation of glioma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (24): 13970~13975
 - 49 Wang H, Wang H, Shen W P, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. *Cancer Res*, 2003, **63** (15): 4315~4321
 - 50 Song S W, Zhang W. Inactivation of the invasion inhibitory gene Iip45 by alternative splicing in gliomas. *Cancer Res*, 2005, **65** (9): 3562~3567
 - 51 Kuan C T, Wakiya K, Dowell J M, *et al.* Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B, a potential molecular therapeutic target in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*, 2006, **12** (7 Pt 1): 1970~1982
 - 52 Hau P, Wise P, Bosserhoff A K, *et al.* Cloning and characterization of the expression pattern of a novel splice product MIA (splice) of malignant melanoma-derived growth-inhibiting activity (MIA/CD-RAP). *J Invest Dermatol*, 2002, **119** (3): 562~569
 - 53 Hau P, Ruemmele P, Kunz-Schughart L A, *et al.* Expression levels of melanoma inhibitory activity correlate with time to progression in patients with high-grade glioma. *Oncol Rep*, 2004, **12** (6): 1355~1364
 - 54 Matsushita H, Uenaka A, Ono T. Identification of glioma-specific RFX4-E and -F isoforms and humoral immune response in patients. *Cancer Sci*, 2005, **96** (11): 801~809
 - 55 Suzuki S O, Kitai R, Llena J, *et al.* MAP-2e, a novel MAP-2 isoform,

- is expressed in gliomas and delineates tumor architecture and patterns of infiltration. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002, **61**(5):403~412
- 56 Nakayama T, Mikoshiba K, Yamamori T, *et al.* Expression of syntaxin 1C, an alternative splice variant of HPC-1/syntaxin 1A, is enhanced by phorbol-ester stimulation in astrogloma: participation of the PKC signaling pathway. *FEBS Letters*, 2003, **536** (13): 209~214
- 57 Carnemolla B, Castellani P, Ponassi M, *et al.* Identification of a glioblastoma-associated tenascin-C isoform by a high affinity recombinant antibody. *Am J Pathol*, 1999, **154** (5): 1345~1352
- 58 Brack S S, Silacci M, Birchler M, *et al.* Tumor-targeting properties of novel antibodies specific to the large isoform of tenascin-C. *Clin Cancer Res*, 2006, **12** (10): 3200~3208
- 59 Liu G, Khong H T, Wheeler C J, *et al.* Molecular and functional analysis of tyrosinase-related protein (TRP)-2 as a cytotoxic T lymphocyte target in patients with malignant glioma. *J Immunother*, 2003, **26** (4): 301~312
- 60 Yamada S M, Yamaguchi F, Morrison R S, *et al.* Inhibition of fibroblast growth factor receptor 1 expression in human glioblastoma cell contributes to the cell growth suppression. *No To Shinkei*, 1998, **50** (12): 1101~1105
- 61 Saiki M, Mima T, Takahashi J C, *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer of a truncated form of fibroblast growth factor receptor inhibits growth of glioma cells both *in vitro* and *in vivo*. *J Neurooncol*, 1999, **44** (3): 195~203
- 62 Bruno I G, Jin W, Cote G J. Correction of aberrant FGFR1 alternative RNA splicing through targeting of intronic regulatory elements. *Hum Mol Genet*, 2004, **13** (20): 2409~2420

Progress in Pre-mRNA Alternative Splicing in Gliomas*

PENG Zheng-Yu¹⁾, ZHANG Wei²⁾, CHEN Xian-Hua¹⁾, XU Ping^{1)**}

¹⁾ State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²⁾ Department of Pharmaceutic, City College of Zhejiang University, Hangzhou 310015, China)

Abstract Gliomas constitute the most common type of primary brain tumor. Alternative pre-mRNA splicing may play roles in the carcinogenesis, cell growth and invasion in various types of gliomas. Factors regulating the alternative splicing in gliomas include *cis*-regulatory element (for example, ESE, ISS and ESS) and *trans*-regulatory factors (such as SRp55, SC35, SF2/ASF and PTB). Recent progresses demonstrate that many genes associated with gliomas, including those encoding tumor suppressors or promoters, enzymes, receptors and ion channels are subject to regulation by alternative pre-mRNA splicing. Therefore, studying the alternative pre-mRNA splicing in gliomas will be of benefit to understanding the molecular basis of gliomas and identifying new targets potentially useful for early diagnose as well as therapy of gliomas.

Key words glioma, pre-mRNA alternative splicing, *cis*-regulatory element, *trans*-regulatory factors

*This work was supported by a grant from Research Program of Shanghai Sanitary Bureau (2006003).

**Corresponding author. Tel: 86-21-54237075, E-mail: matibuck@yahoo.com

Received: January 12, 2007 Accepted: April 28, 2007