杜利莉,马钰,柏文清, 等. SMA 小鼠中相关剪接因子表达与 *SMN*2 外显子 7 列入比率关系研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 54-63.
Du LL, Ma Y, Bai WQ, et al. Expression and relationship between splicing factors and the full-length ratio of *SMN*2 in SMA mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(5): 54-63.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.05.009

SMA 小鼠中相关剪接因子表达与 *SMN*2 外显子 7 列入比率关系研究

杜利莉[1,2],马 钰[3],柏文清[3],吴刘成[2],邵义祥[1,2*]

(1.南通大学神经再生重点实验室,江苏 南通 226001; 2.南通大学实验动物中心,江苏 南通 226001;
3.南通大学杏林学院,江苏 南通 226001)

【摘要】 目的 研究 *SMN*2 外显子 7 在 SMA 小鼠不同组织的列入,筛选与其相关的剪接因子。**方法** 通过 RT-PCR 和非变性 PAGE 电泳分析在神经及非神经组织中 *SMN*2 外显子 7 列入比例,通过 QPCR 筛选分析剪接因子在大脑和脊髓与非神经组织中的 mRNA 水平。**结果** *SMN*2 外显子 7 在大脑和脊髓组织中列入比例显著高于非神经组织,QPCR 筛选显示 *Nova*1/2 在大脑和脊髓中的表达显著高于大部分非神经组织。通过差异分析显示,*Srsf*7/9 及 *Nova*2 在 SMA Ⅰ型小鼠脊髓中的表达显著高于对照小鼠。**结论** 神经组织中,*Srsf*7/9 和 *Nova*1/2 基因高表达与 *SMN*2 外显子 7 列入比例显著提高呈正相关,剪接因子 SRSF7/9 及 NOVA1/2 可能参与 *SMN*2 基因的剪接调控。

【关键词】 SMA 小鼠;剪接因子;表达;*SMN*2;外显子列入
【中图分类号】R-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2020) 05-0054-10

Expression and relationship between splicing factors and the full-length ratio of *SMN*2 in SMA mice

DU Lili[1,2], MA Yu[3], BAI Wenqing[3], WU Liucheng[2], SHAO Yixiang[1,2*]

(1. Key Laboratory of Neuroregeneration, Nantong University, Nantong 226001, China.
2. Laboratory Animals Center, Nantong University, Nantong 226001. 3. Xinglin College, Nantong University, Nantong 226001)

【Abstract】 Objective We examined the inclusion ratio of *SMN*2 exon 7 in different tissues from SMA mice and screened related splicing factors. **Methods** Ratios of *SMN*2 exon 7 inclusion in neural and non-neural tissues were analyzed by RT-PCR and non-denaturing PAGE electrophoresis. The expression levels of splicing factors in the brain, spinal cord, and non-neural tissues were analyzed by QPCR. **Results** The inclusion ratio of *SMN*2 exon 7 in brain and spinal cord tissues was significantly higher than that in non-neural tissues. The QPCR screening result showed that the expression of *Nova*1/2 was significantly higher in the brain and spinal cord than in most non-neural tissues. The difference analysis showed that the mRNA levels of *Srsf*7/9 and *Nova*2 in the spinal cord of SMA type I mice were significantly higher than those in control mice. **Conclusions** The high expression of *Srsf*7/9 and *Nova*1/2 is positively correlated with significant increases in the inclusion ratio of *SMN*2 exon 7 in neural tissues, indicating that SRSF7/9 and NOVA1/2 may be involved in the splicing regulation of *SMN*2.

【Keywords】 SMA mice; splicing factor; expression; *SMN*2; exon inclusion

---

[**基金项目**]江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX18-2415);南通市自然基金项目(JC2018090);南通大学大型仪器设备开放基金(KBJN1901)。
[**作者简介**]杜利莉(1994—),女,硕士研究生,研究方向:疾病动物模型。E-mail:2414293431@qq.com
[**通信作者**]邵义祥(1956—),男,教授,研究方向:疾病动物模型。E-mail:shaoyx@ntu.edu.cn

脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy,SMA)是由运动神经元生存 1(survival of motor neuron1,*SMN*1)基因遗传缺陷引起,*SMN*1 基因编码 SMN 蛋白,广泛表达于所有真核细胞,为运动神经元存活所必需。较低水平的蛋白质导致脊髓前角运动神经元细胞功能丧失,随后全身骨骼肌萎缩,其他身体系统也可能受到影响,特别是早期发病的患者。SMA 是婴儿死亡最常见的遗传原因[1-2]。

SMA 的致病基因 *SMN*1 是位于 5q13 的基因,患者常因其外显子 7 和 8 或仅外显子 7 同源缺失,从而导致不能表达有功能的全长 SMN 蛋白[3]。而人类的 *SMN*1 基因在这个重复片段区域还存在唯一与之高度同源的 *SMN*2 基因,两者的关键不同之处在于外显子 7 第 6 位核苷酸由 *SMN*1 中的 C 转变为 *SMN*2 中的 T,虽然没有造成翻译中氨基酸的改变,却严重影响了该外显子列入(exon inclusion)[4]。*SMN*2 的成熟转录产物约 90%不包含外显子 7,而没有外显子 7 的蛋白(称作 SMNΔ7)基本没有功能且极不稳定[5]。是否能够通过增强 *SMN*2 外显子 7 的保留来获得全长(full-length,FL)的 SMN,从而有效降低 SMA 患者的临床症状? 这个问题为研究者所关注,有望使 *SMN*2 成为治疗 SMA 的理想靶点[6]。仅含有 *Smn* 基因一个拷贝的小鼠,由于转入人的 *SMN*2 基因能够挽救其 *Smn* 纯合子敲除的胚胎致死性并延迟至出生后 10 d 左右死亡,且症状与人类Ⅰ型的 SMA 相似[7],从而使得 SMA 小鼠成为目前国际相关领域公认的良好模型。故在 SMA 小鼠中,通过研究 *SMN*2 剪接来获得全长 SMN 蛋白,从而观察 SMA 小鼠的病情及寿命是否有所改善,探讨脊髓性肌萎缩症有效的临床治疗方案,是当前国际 SMA 研究关注的焦点。本实验通过研究 SMA Ⅰ型小鼠不同组织中 *SMN*2 外显子 7 列入与相关剪接因子的表达差异,筛选与 *SMN*2 外显子 7 列入具有密切关系的剪接因子,以期待发现可能参与 SMA 相关基因 *SMN*2 剪接的新调控因子,为 SMA 疾病的治疗提供新思路。

1　材料和方法

1.1　实验动物

2 只雌性 SMA Ⅲ型小鼠(基因型 $Smn^{-/-}$ $SMN2^{2tg/2tg}$),1 只雄性杂合子 *Smn* 敲除小鼠(基因型 $Smn^{+/-}$),6 周龄,体重 18~22 g,用以交配繁殖。SMA Ⅰ型小鼠(基因型 $Smn^{-/-}SMN2^{2tg/0}$)、SMA Ⅰ型对照小鼠(基因型 $Smn^{+/-}SMN2^{2tg/0}$),4 d 龄,体重 1~4 g,雌雄不限,各 4 只,用以进行实验。小鼠背景品系均为 SPF 级 FVB 近交系小鼠,均来源于南通大学实验动物中心[SCXK(苏)2014-0001]并在南通大学实验动物中心 SPF 级屏障环境饲养繁殖。动物实验在南通大学实验动物中心比较医学实验室进行[SYXK(苏)2017-0046]。实验动物的使用坚持 3R 原则,且所有动物实验均经南通大学实验动物伦理管理委员会审查(伦理审批号:20180822-002)。

1.2　主要试剂与仪器

小鼠基因型快速鉴定试剂盒(PD101-01)、TRIzol 总 RNA 抽提试剂(R401-01)、反转录酶试剂盒(R021-01)、2×Taq master mix(P111),SYBR Green 荧光 PCR 试剂盒(Q711-02)购自南京诺唯赞生物科技公司;Veriti 96-well PCR 扩增仪购自美国 Applied Biosystems 公司;MICROCL 21R 台式冷冻离心机购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;EPS-300 数显稳压温流电泳仪、HE-120 多功能水平电泳槽购自中国上海天能科技;Native-PAGE 垂直电泳系统购自美国 Apogee 公司;BIO-RAD Gel Doc XR + 凝胶成像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司;G:box Chemi XL 1.4 成像系统购自英国 Syngene 公司;Light cycler 96 荧光定量 PCR 仪购自瑞士 ROCHE 公司。

1.3　实验方法

1.3.1　小鼠繁殖与取材

雄性杂合子 *Smn* 敲除小鼠和雌性 SMA Ⅲ型小鼠交配,取同窝出生 4 d 龄的后代,通过基因型鉴定,区分 SMA Ⅰ型及对照小鼠,并分别取 4 只 SMA Ⅰ型小鼠($Smn^{-/-}$ $SMN2^{2tg/0}$)和 4 只对照小鼠($Smn^{+/-}$ $SMN2^{2tg/0}$)心脏、肝、脾、肺、肾、脑、脊髓、肌肉组织。

1.3.2　RT-PCR

按照 TRIzol 试剂盒及反转录试剂盒提取总 RNA 并合成 cDNA,采用 Cy5 标记的引物进行 RT-PCR,94°C 30 s,55°C 30 s,72°C 25 s,28 个循环,取 8 μL 扩增样品,用 2%琼脂糖凝胶电泳检验扩增结果,剩余样品用于非变性 PAGE 定量分析,引物信息为:E6-F:5'-ATAATTCCCCCACCACCTCCC-3',E8-467R:5'-TTGCCACATACGCCTCACATAC-3'。

1.3.3　非变性 PAGE 及 *SMN*2 外显子 7 列入

6%非变性 PAGE 胶 110 V 电压下进行电泳,3 h 后结束电泳。G:BOX 系统显影,用 Image J 分析条

带灰度值,并计算 *SMN*2 基因外显子 7 列入(Inc%),公式如下:

$$\text{Exon 7 inclusion\%} = \frac{\text{Exon 7(+) transcript}}{\text{Exon 7(+) transcript+Exon 7(−) transcript}} \times 100\%$$

1.3.4 实时荧光定量 PCR

反应体系:SYBR Green Master Mix 10 μL,上游引物 1 μL,下游引物 1 μL,cDNA 1 μL,补灭菌双蒸水 7 μL 至 20 μL 体系,每个样品设置 3 个重复。反应条件:95℃预变性 4 min,94℃下变性 15 s,60℃下退火 20 s,72℃延伸 20 s 并读取荧光值,45 次循环,循环后设置 55℃~90℃,每隔 0.3℃读荧光值生成熔解曲线。所有设定保存后运行程序。反应完成后,选择 PCR base line subtracted 模式进行数据分析和修正。在调整 baseline cycles 和计算 threshold value(阈值)后,得出 cycle threshold(Ct 值),ΔΔCt 法计算出样本的相对表达量(RQ 值)。在 gene bank 中查找并下载相关基因的 mRNA 序列及相关信息,实时荧光定量 PCR 引物采用 Primer premier 5.0 软件,严格按照相关原则设计。引物信息见表 1。

1.4 统计学方法

本实验数据采用 STATA 7.0 和 GraphPad Prism 5.0 进行数据处理和统计学分析。计量数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,$P<0.05$ 表示两组间差异显著,$P<0.01$ 表示两组间差异极显著。

2 结果

2.1 *SMN*2 外显子 7 列入在脑和脊髓中与肝、肾和肌肉相比显著增加

通过 RT-PCR 和非变性 PAGE 凝胶电泳分析,在出生后第 4 天(P4)的 SMA Ⅰ型小鼠大脑和脊髓中,*SMN*2 表达全长的有功能 RNA 比例显著高于其它三个非神经组织(图 1)。表明 SMA Ⅰ型小鼠中,*SMN*2 mRNA 在神经与非神经组织中的剪接差异机制与其体内可能差异表达剪接因子密切相关。

2.2 HNRNP 剪接因子基因家族在 SMA Ⅰ型和对照小鼠神经与非神经组织中的 mRNA 水平

核内不均一核糖核蛋白(HNRNPs)是主要存在于细胞核中的由多个蛋白组成的复合体,其主要功能是结合 RNA 参与转录后修饰,在新合成的 RNA(pre-mRNA)过程中不可缺少,是成熟 mRNA 形成的重要剪接因子[8]。如图 1 所示,本实验检测了出生后第 4 天 SMA Ⅰ型和对照小鼠的神经与非神经组织中 HNRNP 家族中的 *Hnrnpk*、*Hnrnpl*、*Hnrnpll*、*Hnrnpu*、*Hnrnpd*、*Hnrnph*3、*Hnrnpm*、*Hnrnpf* 以及

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	正向引物(5′→3′) Forward primer	反向引物(5′→3′) Reverse primer
mGapdh	CCGTAGACAAAATGGTGAAGGT	CGTGAGTGGAGTCATACTGGAA
mHnrnpk	AGAAGAAACCTTCCCCAACACC	TGCGCAATTCAACCATCTCATC
mHnrnpl	AGTGGAAGCTGACCTTGTGGAAG	AGCACGTCTTCAAACTCTACCAG
mHnrnpll	AGCTGACCTTGTGGAGGCAC	AGGCACATCTGCAGCAAATG
mHnrnpu	AGTCTCCTCAGCCACCTGTTG	AGCACTCAGACGGTCTCTCG
mHnrnpd	ATCGACGCCAGTAAGAACGAG	TGTGGTGTCCCAGCTAAGG
*mHnrnph*3	TGCCATTTGGTTGCAGCAAAG	AGGCCTCCCCTGTGCTTC
mHnrnpm	ACCTTTTGATGTGAAATGGCAGTC	AGAGCTCCACGTATGTTACCTC
*mHnrnph*2	AGCCGTTTGAGGGAAGAAGAAG	ACCCTGTTAGAGTTTCTTCCAGG
mHnrnpf	TCGGGTGGAGTTTGAGTTCGTAAG	ACCACCACAGATGCCTTCTG
m*Srsf*10	ACGTCTCTGTTCGTCAGGAACG	ACCATAACGACCAAATTCCCG
m*Srsf*1	TTCGCCTTCGTTGAGTTCGAG	CGGTAGCCGTCGTAGTCGTAG
mSrpk1	TCTAGGGTCTGACGATGACGAG	AGTGTCCCCAGCCCAATTTTC
m*Srsf*3	ATTTGAGGATCCCCGAGATGC	TCTTTTCACCATTCGACAGTTCC
m*Srsf*6	TGCCGTGTACGAGCTCAACAG	AGTTCTCCGACTGCTGTATCC
m*Srsf*2	AGCCCACCCAAGTCTCCAGAAG	ATGGACCGATGGACTGAGTTTG
m*Srsf*4	ATCCTGGAGGTGGATCTGAAG	ACACAGGTCTTTGCCGTTCAG
m*Srsf*5	ACTCAGAGAGCGCAGTTGATTTG	TCTCCCTCGCTGCTGGATTTAG
m*Srsf*7	ATTCCAAGCTAGAGCCGAGTAC	ACTCTCCTTTACCAGCACCAG
m*Srsf*9	AGATCGAGCTCAAGAACCGG	ACACTGGCCATAATCGTAACCG
m*Nova*1	ACTGGAGCCACTATCAAGCTG	ATCCATGAACTGCGTTCAGCG
m*Nova*2	AGACAGGAGCCACCATCAAG	AAGCTGTGGACAGCATTCAAG

*Hnrnph*2 基因的 mRNA 水平。以心脏作为对照,这些剪接因子在心脏、肝及肌肉组织中表达相对较低,在脾、肺和肾中表达最高,在神经组织即大脑和脊髓中表达相对较高。

2.3　SR 剪接因子基因家族在 SMA Ⅰ型和对照小鼠神经与非神经组织中的 mRNA 水平

富含丝氨酸和精氨酸剪接因子(serine/arginine-rich splicing factor,SRSF),常被简称为 SR 蛋白,是一种涉及 RNA 剪接的保守蛋白家族[9]。如图 3 所示,本实验检测了 SR 家族中的 *Srsf*10、*Srsf*1、*Srpk*1、*Srsf*3、*Srsf*6、*Srsf*2、*Srsf*4、*Srsf*5、*Srsf*7 以及 *Srsf*9 基因在出生后第 4 天的 SMA Ⅰ型和对照小鼠神经与非神经组织中的 mRNA 水平。以心脏作为对照,这些剪接因子基因在心脏、肝及肌肉中表达相对较低,在脾、肺和肾中表达最高,在神经组织即大脑和脊髓中表达相对较高。

2.4　NOVA 剪接因子基因家族在 SMA Ⅰ型和对照小鼠神经与非神经组织中的 mRNA 水平

神经肿瘤腹侧抗原(neuro-oncological ventral antigen,NOVA)家族,有 NOVA1 和 NOVA2 两个成员,其作为神经元特异性剪接因子,在运动神经元中表达丰富[10]。本实验检测了 NOVA 家族中的 *Nova*1 和 *Nova*2 基因在出生后第 4 天的 SMA Ⅰ型和对照小鼠神经与非神经组织中的 mRNA 水平。以心脏作为对照,这些剪接因子基因在心脏、肝、脾、肾及肌肉中表达相对较低,在大脑和脊髓中表达最高,在肺中表达相对较高(见图 4)。

2.5　HNRNP 剪接因子基因家族在 SMA Ⅰ型和对照小鼠神经与非神经组织中的 mRNA 水平差异化比较

通过比较 HNRNP 剪接因子在出生后第 4 天的 SMA Ⅰ型和对照小鼠中的 mRNA 差异水平,如图 5 可知,与对照小鼠相比,HNRNP 家族不同基因分别在 SMA Ⅰ型小鼠不同组织中均有显著性差异。其中,与对照小鼠相比,*Hnrnph*2 在 SMA Ⅰ型小鼠脊髓中显著下调。

2.6　SR 剪接因子基因家族在 SMA Ⅰ型和对照小鼠神经与非神经组织中 mRNA 水平差异化比较

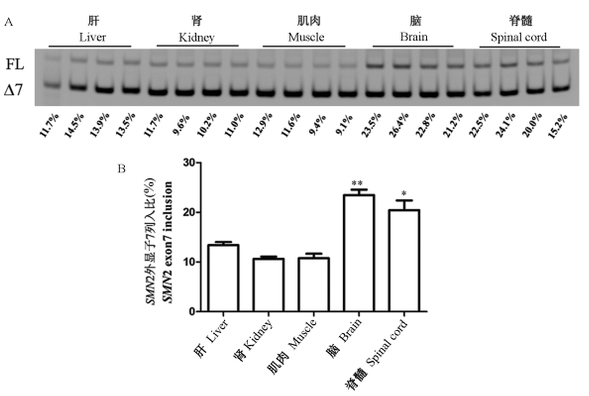
通过比较 SR 剪接因子基因在出生后第 4 天的 SMA Ⅰ型和对照小鼠中的 mRNA 差异水平,如图 6 可知,SMA Ⅰ型小鼠中,SR 家族不同基因分别在不同组织中与对照小鼠比较,均有显著性差异,其中,与对照小鼠相比,*Srsf*7 和 *Srsf*9 在 SMA Ⅰ型小鼠脊髓中显著上调,*Srsf*4 和 *Srsf*10 在大脑中显著下调。

2.7　NOVA 剪接因子基因家族在 SMA Ⅰ型和对照小鼠神经与非神经组织中 mRNA 水平差异化比较

通过比较 NOVA 剪接因子基因在出生后第 4 天的 SMA Ⅰ型和对照小鼠中的 mRNA 差异水平,如图 7 可知,*Nova*1 和 *Nova*2 基因分别在 SMA 小鼠的不同组织中和对照小鼠比较,有显著性差异。其中,与对照小鼠相比,在 SMA Ⅰ型小鼠中,*Nova*2 在脊髓中显著上调。

3　讨论

脊髓性肌萎缩症是由于 *SMN*1 基因功能丧失而引起的一种神经退行性疾病,表现为脊髓 α 运动神经元坏死,导致进行性肌肉萎缩、瘫痪甚至死亡[11]。而与 *SMN*1 序列主要有 10 个碱基差异的高度同源的 *SMN*2 基因,由于其可被调控的特殊选择性剪接即外显子 7 跳跃模式,并能翻译出全长的 SMN 蛋白,使得其成为治疗 SMA 疾病的“靶基因”[12]。尽管已经研发出有效治疗 SMA 的药物并获批上市[13],但在病变累及多系统[14]的 SMA 中,其仅针对特定组织且不能起到彻底治愈的效果,同时关于

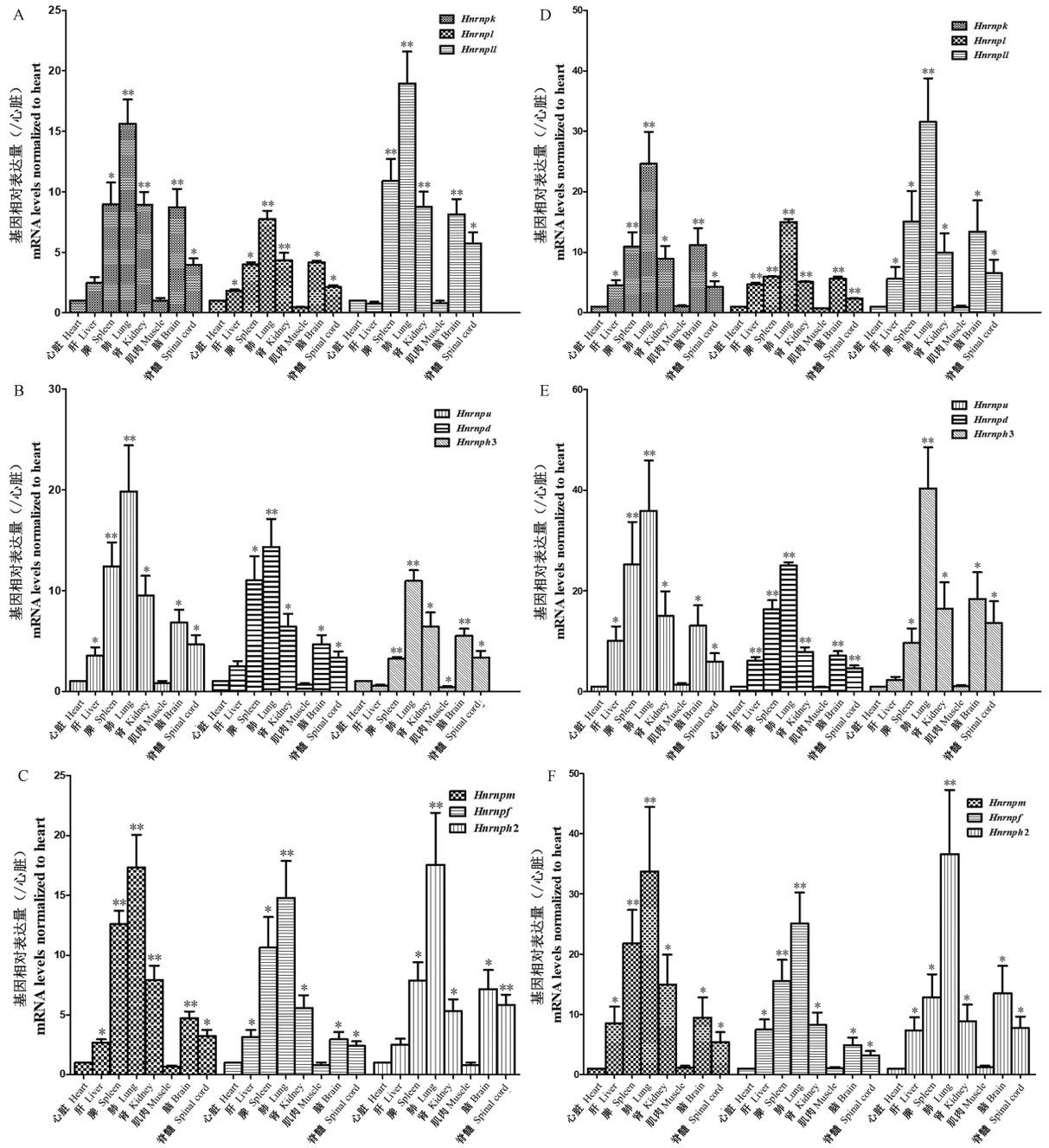


注:A:非变性 PAGE 电泳检测 *SMN*2 在神经与非神经组织中外显子 7 列入比;B:柱状图显示外显子 7 列入比的灰度值统计学结果。与肝组织比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

图 1　*SMN*2 外显子 7 在第 4 天 SMA Ⅰ型小鼠大脑和脊髓的列入比显著高于肝、肾和肌肉组织

Note. A, Non-denaturing PAGE electrophoresis showing the inclusion ratio of *SMN*2 exon 7 in central and peripheral tissues. B, Bar chart showing the inclusion ratio of *SMN*2 exon 7 based on gray level statistics. Compared with the liver, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Figure 1　The inclusion ratio of *SMN*2 exon 7 in brain and spinal cord tissues was significantly higher than that in liver, kidney, and muscle tissue from SMA type I mice at postnatal day 4

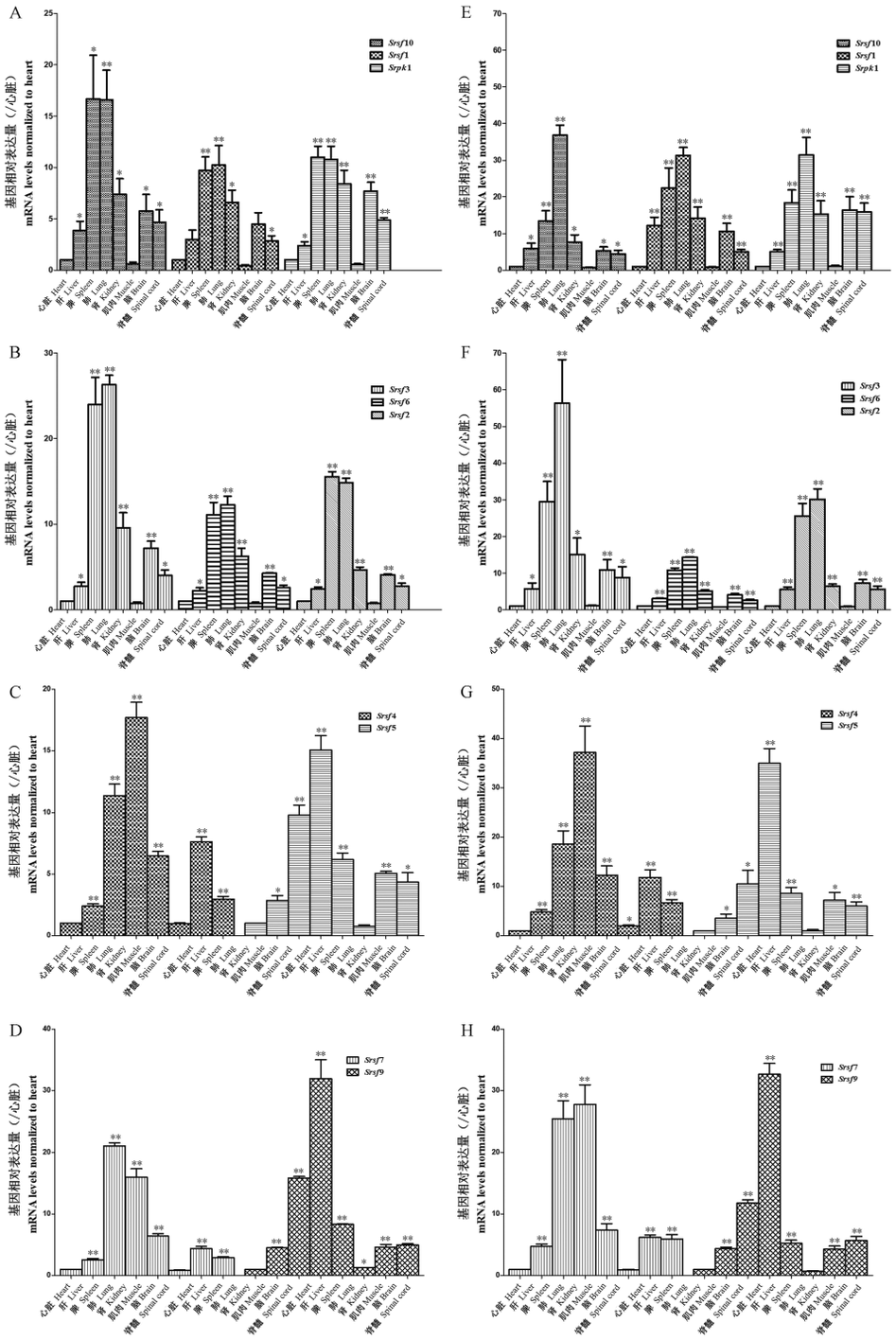


注：A、B、C：SMA Ⅰ型对照小鼠不同组织中 *Hnrnpk*、*Hnrnpl*、*Hnrnpll*、*Hnrnpu*、*Hnrnpd*、*Hnrnph3*、*Hnrnpm*、*Hnrnpf*、*Hnrnph2* 基因表达的 QPCR 分析结果；D、E、F：SMA Ⅰ型小鼠不同组织中 *Hnrnpk*、*Hnrnpl*、*Hnrnpll*、*Hnrnpu*、*Hnrnpd*、*Hnrnph3*、*Hnrnpm*、*Hnrnpf*、*Hnrnph2* 基因表达的 QPCR 分析结果。与心脏组织比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，对照组表达水平为 1。

图 2 HNRNP 剪接因子基因家族在出生后第 4 天的 SMA Ⅰ型和对照小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾、肌肉、大脑和脊髓中的 mRNA 水平

Note. A, B, and C, QPCR analysis results of *Hnrnpk*, *Hnrnpl*, *Hnrnpll*, *Hnrnpu*, *Hnrnpd*, *Hnrnph3*, *Hnrnpm*, *Hnrnpf*, and *Hnrnph2* gene expression in different tissues from SMA type I control mice at postnatal day 4. D, E, and F, QPCR analysis results of *Hnrnpk*, *Hnrnpl*, *Hnrnpll*, *Hnrnpu*, *Hnrnpd*, *Hnrnph3*, *Hnrnpm*, *Hnrnpf*, and *Hnrnph2* gene expression in different tissues from SMA type I mice at postnatal day 4. Compared with the heart, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. The mRNA level of the control group was 1.

Figure 2 mRNA expression levels of HNRNPs in the heart, liver, spleen, lung, kidney, muscle, brain, and spinal cord of type I and control SMA mice at postnatal day 4

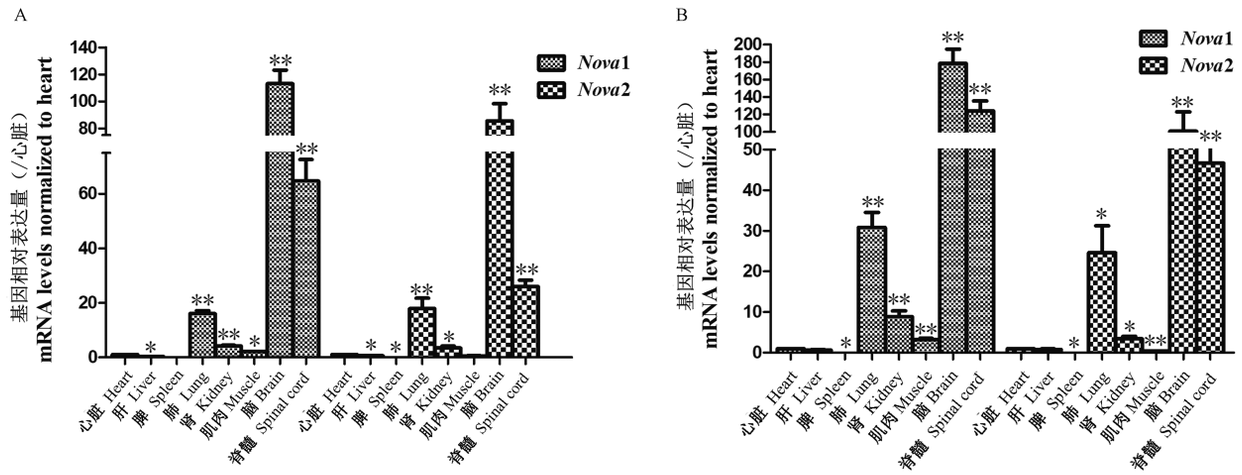


注：A、B、C、D：SMA Ⅰ型对照小鼠不同组织中 *Srsf*10、*Srsf*1、*Srpk*1、*Srsf*3、*Srsf*6、*Srsf*2、*Srsf*4、*Srsf*5、*Srsf*7、*Srsf*9 基因表达的 QPCR 分析结果；E、F、G、H：SMA Ⅰ型小鼠不同组织中 *Srsf*10、*Srsf*1、*Srpk*1、*Srsf*3、*Srsf*6、*Srsf*2、*Srsf*4、*Srsf*5、*Srsf*7、*Srsf*9 基因表达的 QPCR 分析结果。与相应心脏组织比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，对照组表达水平为 1。

图 3　SR 剪接因子基因家族在出生后第 4 天的 SMA Ⅰ型和对照小鼠的心、肝、脾、肺、肾、肌肉、大脑和脊髓中的 mRNA 水平

Note. A, B, C, and D, QPCR analysis results of *Srsf*10, *Srsf*1, *Srpk*1, *Srsf*3, *Srsf*6, *Srsf*2, *Srsf*4, *Srsf*5, *Srsf*7, and *Srsf*9 gene expression in different tissues from SMA type I control mice at postnatal day 4. E, F, G, and H, QPCR analysis results of *Srsf*10, *Srsf*1, *Srpk*1, *Srsf*3, *Srsf*6, *Srsf*2, *Srsf*4, *Srsf*5, *Srsf*7, and *Srsf*9 gene expression in different tissues from SMA type I mice at postnatal day 4. Compared with the heart, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. The mRNA level of the control group was 1.

Figure 3　mRNA expression levels of SRs in the heart, liver, spleen, lung, kidney, muscle, brain, and spinal cord from type I and control SMA mice at postnatal day 4

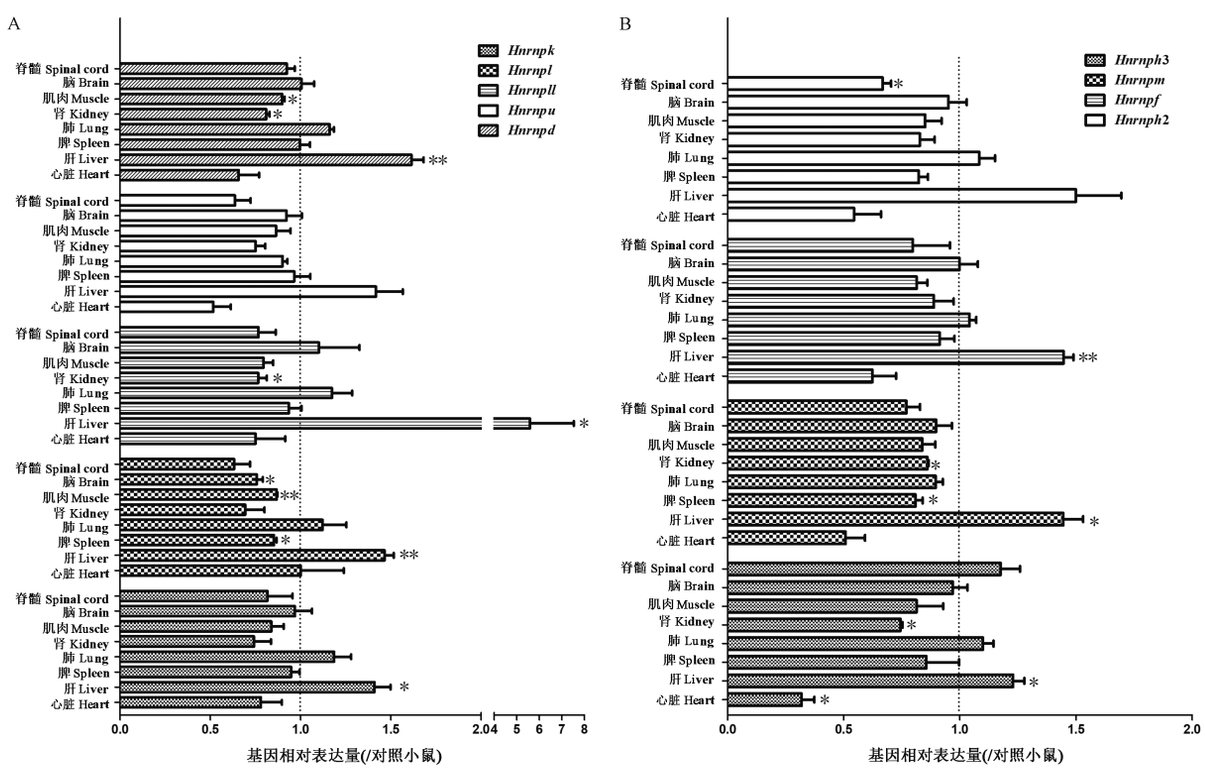


注：A：SMA Ⅰ型对照小鼠不同组织中 *Nova*1、*Nova*2 基因表达的 QPCR 分析结果；B：SMA Ⅰ型小鼠不同组织中 *Nova*1、*Nova*2 基因表达的 QPCR 分析结果。与相应心脏组织比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，对照组表达水平为 1。

图 4 NOVA 剪接因子基因家族在出生后第 4 天的 SMA Ⅰ型和对照小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾、肌肉、大脑和脊髓中的 mRNA 水平

Note. A, QPCR analysis results of *Nova*1 and *Nova*2 gene expression in different tissues from SMA type I control mice at postnatal day 4. B, QPCR analysis results of *Nova*1 and *Nova*2 gene expression in different tissues from SMA type I mice at postnatal day 4. Compared with the heart, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. The mRNA level of the control group was 1.

Figure 4 mRNA expression levels of NOVAs in the heart, liver, spleen, lung, kidney, muscle, brain, and spinal cord from type I and control SMA mice at postnatal day 4

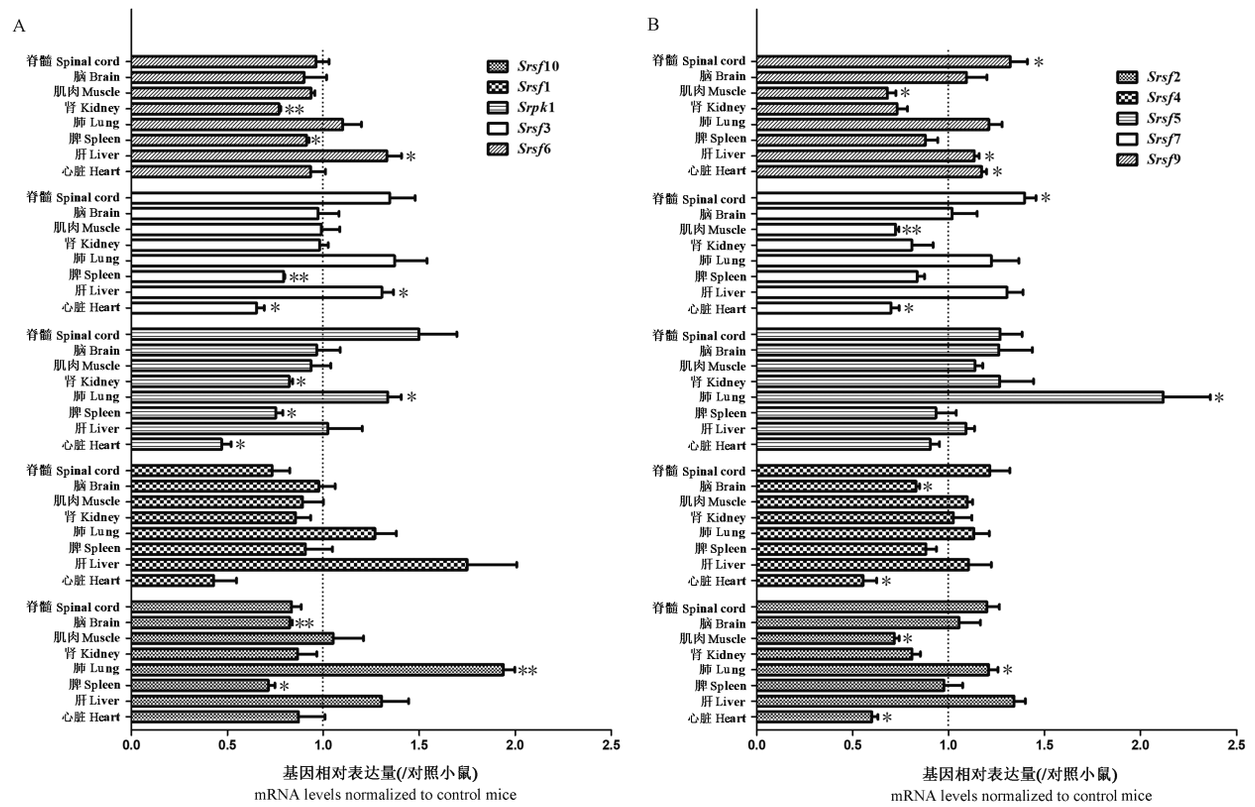


注：A：不同组织中 *Hnrnpk*、*Hnrnpl*、*Hnrnpll*、*Hnrnpu*、*Hnrnpd* 基因表达差异的 QPCR 分析结果；B：不同组织中 *Hnrnph*3、*Hnrnpm*、*Hnrnpf*、*Hnrnph*2 基因表达差异的 QPCR 分析结果。与对照小鼠相应组织比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，对照组表达水平为 1。

图 5 HNRNP 剪接因子基因家族在出生后第 4 天的 SMA Ⅰ型和对照小鼠心脏、肝、脾、肺、肾、肌肉、大脑和脊髓中的 mRNA 水平差异化比较

Note. A, QPCR analysis results of the differences in *Hnrnpk*, *Hnrnpl*, *Hnrnpll*, *Hnrnpu*, and *Hnrnpd* gene expression in different tissues. B, QPCR analysis results of the difference between *Hnrnph*3, *Hnrnpm*, *Hnrnpf*, and *Hnrnph*2 gene expression in different tissues. Compared with the corresponding organization in control mice, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. The mRNA level of the control group was 1.

Figure 5 Comparison of differences in HNRNP mRNA levels in the heart, liver, spleen, lung, kidney, muscle, brain, and spinal cord from type I and control SMA mice at postnatal day 4



注：A：不同组织中 *Srsf*10、*Srsf*1、*Srpk*1、*Srsf*3、*Srsf*6 基因表达差异的 QPCR 分析结果；B：不同组织中 *Srsf*2、*Srsf*4、*Srsf*5、*Srsf*7、*Srsf*9 基因表达差异的 QPCR 分析结果。与对照小鼠相应组织比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，对照组表达水平为 1。

图 6　SR 剪接因子基因家族在出生后第 4 天的 SMA Ⅰ型和对照小鼠心脏、肝、脾、肺、肾、肌肉、大脑和脊髓中的 mRNA 水平差异化比较

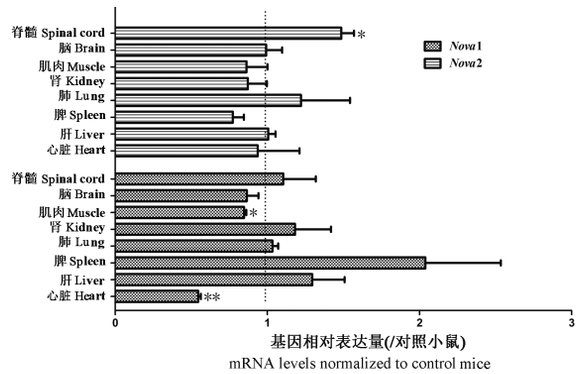
Note. A, QPCR analysis results of the differences in *Srsf*10, *Srsf*1, *Srpk*1, *Srsf*3, and *Srsf*6 gene expression in different tissues. B, QPCR analysis results of the differences in *Srsf*2, *Srsf*4, *Srsf*5, *Srsf*7, and *Srsf*9 gene expression in different tissues. Compared with the corresponding organization in control mice, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. The mRNA level of the control group was 1.

Figure 6　Comparison of differences in SRs mRNA levels in the heart, liver, spleen, lung, kidney, muscle, brain, and spinal cord from type I and control SMA mice at postnatal day 4

*SMN*2 外显子 7 列入是否具有组织间差异及其是否是导致 SMA 多系统病变的原因等相关问题是未知的。

本研究发现，在 SMA Ⅰ型小鼠中，*SMN*2 外显子 7 的列入具有组织间差异，且在神经组织中的列入显著高于非神经组织。而外显子是否列入是由剪接因子所调控的选择性剪接来决定的，因此，有必要筛选在神经组织与非神经组织存在的差异表达剪接因子，寻找促进 *SMN*2 外显子 7 在神经组织中列入的剪接因子，为 SMA 疾病提供新的治疗方法。而本实验重点检测了 SMA Ⅰ型小鼠 8 个组织中 HNRNP、SR 及 NOVA 三类经典剪接因子的 mRNA 水平，发现这 21 个剪接因子的 mRNA 水平均具有组织间差异，其中 HNRNP 家族 9 个成员及 SR 家族 10 个成员均在非神经组织中表达最高，而 NOVA 家族 2 个成员均在神经组织大脑及脊髓中表达最高，与 *SMN*2 外显子 7 在神经组织中高列入呈正相关。

而在 SMA Ⅰ型对照小鼠中，我们发现剪接因子表达与 SMA Ⅰ型小鼠中检测到的表达变化相似，表明无论是在 SMA Ⅰ型还是对照小鼠中，这些剪接因子基因水平表达均具有组织间差异，尤其是 NOVA 家族成员均在神经组织中高表达，再次证明了 NOVA 是神经特异性表达的剪接因子[15]。进一步对剪接因子的表达差异进行研究，发现与对照小鼠相比，SMA Ⅰ型小鼠脊髓组织中，*Srsf*7、*Srsf*9 及 *Nova*2 显著上调，与 *SMN*2 外显子 7 在脊髓中高列入呈正相关，SRSF7、SRSF9 及 NOVA2 极有可能参与 *SMN*2 的剪接调控。而在其它特定组织中，某些剪接因子显著变化，如心脏组织中 HNRNPH3、



注:不同组织中 *Nova*1、*Nova*2 基因表达差异的 QPCR 分析结果。与对照小鼠相应组织比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,对照组表达水平为 1。

图 7 NOVA 剪接因子基因家族在 SMA Ⅰ型和对照小鼠出生后第 4 天心、肝、脾、肺、肾、肌肉、大脑和脊髓中的 mRNA 水平差异化比较

Note. QPCR analysis results of the differences in *Nova*1 and *Nova*2 gene expression in different tissues. Compared with the corresponding organization in control mice, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. The mRNA level of the control group was 1.

Figure 7 Comparison of differences in NOVAs mRNA levels in the heart, liver, spleen, lung, kidney, muscle, brain, and spinal cord from type I and control SMA mice at postnatal day 4

SRSF3 显著下调,可能是引起 SMA 疾病多系统病变的原因之一。

导致 SMA 疾病的最直接原因是运动神经元存活蛋白(SMN)合成减少,功能丧失。而 SMN 是一种以其在 SMN-Gemin 多蛋白复合物中的管家作用而闻名的蛋白,其参与了小核蛋白(SnRNP)的组装[16],调控前体 mRNA 剪接,同时还参与机体多种生理功能,包括应激反应、轴突运输、细胞骨架动力学、线粒体和生物能量途径以及泛素途径等[17]。Groen EJN 等[18]在严重型 SMA 小鼠模型中发现 SMN 蛋白的表达具有组织间差异,且在神经组织中表达最高,与本实验中 *SMN*2 外显子 7 列入的组织间差异相一致,SMN 可能是调控 *SMN*2 外显子 7 组织特异性列入的因子之一。与此同时,HNRNP 家族成员 HNRNPR,已被证明能够与 SMN 蛋白在运动神经元中直接相互作用[19]。同时,由 RNA 识别基序(RRM)区和由丝氨酸和精氨酸的重复序列组成的 RS 区两个结构域组成[8]的 SR 蛋白,已发现其在不同组织中差异表达[20],且能够调控 SMN 蛋白的表达[21]。而本实验在研究时,发现 *Hnrnph*2 显著下调,*Srsf*7、*Srsf*9 及 *Nova*2 表达显著上调,这可能是因为受到 SMN 蛋白的调控,从而表达发生上调或下调。

除此之外,神经特异性表达的剪接因子 NOVA1 或 NOVA2 与多种神经系统疾病有密切关系[22],本研究发现 SMA 小鼠中 *Nova*1 及 *Nova*2 表达与 SMA 相关基因 *SMN*2 外显子 7 列入呈正相关,表明 NOVA 家族与 SMA 疾病之间存在着某种联系。同时,NOVA 与 HNRNPK、MER1 等蛋白均具有 KH 结构域[23],且具有调控剪接的作用,而其调控剪接的作用是与靶 mRNA YCAY[24-25]元件结合来实现的,通过序列分析,发现在 *SMN*2 外显子 7 内有该序列,提示 NOVA1 或 NOVA2 可能结合该序列直接调控 SMA 相关基因 *SMN*2 剪接。而有关 SRSF7/9 和 NOVA 剪接因子对 *SMN*2 外显子 7 列入的具体调控机制有待深入研究。

综上所述,SMA Ⅰ型小鼠中,*SMN*2 外显子 7 列入及相关剪接因子的表达变化具有组织间差异,且神经组织中,*Srsf*7/9 和 *Nova*1/2 高表达与 *SMN*2 外显子 7 列入显著提高呈正相关,剪接因子 SRSF7/9 及 NOVA1/2 可能参与 *SMN*2 基因的剪接调控。

参考文献:

[1] Pearn J. Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy [J]. J Med Genet, 1978, 15(6): 409-413.

[2] Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: a timely review [J]. Arch Neurol, 2011, 68(8): 979-984.

[3] Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3 [J]. Nature, 1990, 344(6266): 540-541.

[4] Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene [J]. Cell, 1995, 80(1): 155-165.

[5] Anderton RS, Meloni BP, Mastaglia FL, et al. Spinal muscular atrophy and the antiapoptotic role of survival of motor neuron (SMN) protein [J]. Mol Neurobiol, 2013, 47(2): 821-832.

[6] Hua Y, Sahashi K, Rigo F, et al. Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model [J]. Nature, 2011, 478(7367): 123-126.

[7] Monani UR, Sendtner M, Coovert DD, et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in $Smn^{-/-}$ mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy [J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(3): 333-339.

[8] Lee YJ, Wang Q, Rio DC. Coordinate regulation of alternative pre-mRNA splicing events by the human RNA chaperone proteins HnrnpA1 and DDX5 [J]. Genes Dev, 2018, 32(15-16): 1060-1074.

[9] Long JC, Caceres JF. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression [J]. Biochem J, 2009, 417(1): 15-27.

[10] Buckanovich RJ, Posner JB, Darnell RB. Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system [J]. Neuron, 1993, 11(4): 657-672.

[11] Lunn MR, Wang CH. Spinal muscular atrophy [J]. Lancet, 2008, 371(9630): 2120-2133.

[12] Wu X, Wang SH, Sun J, et al. A-44G transition in SMN2 intron 6 protects patients with spinal muscular atrophy [J]. Hum Mol Genet, 2017, 26(14): 2768-2780.

[13] Hoy SM. Nusinersen: First global approval [J]. Drugs, 2017, 77(4): 473-479.

[14] Farrar MA, Park SB, Vucic S, et al. Emerging therapies and challenges in spinal muscular atrophy [J]. Ann Neurol, 2017, 81(3): 355-368.

[15] Buckanovich RJ, Yang YY, Darnell RB. The onconeural antigen Nova-1 is a neuron-specific RNA-binding protein, the activity of which is inhibited by paraneoplastic antibodies [J]. J Neurosci, 1996, 16(3): 1114-1122.

[16] Borg RM, Bordonne R, Vassallo N, et al. Genetic interactions between the members of the SMN-gemins complex in drosophila [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0130974.

[17] Chaytow H, Huang YT, Gillingwater TH, et al. The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(21): 3877-3894.

[18] Groen EJN, Perenthaler E, Courtney NL, et al. Temporal and tissue-specific variability of SMN protein levels in mouse models of spinal muscular atrophy [J]. Hum Mol Genet, 2018, 27(16): 2851-2862.

[19] Dombert B, Sivadasan R, Simon CM, et al. Presynaptic localization of Smn and Hnrnp R in axon terminals of embryonic and postnatal mouse motoneurons [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110846.

[20] 杨红, 李晓宾, 李婷, 等. 丝氨酸/精氨酸蛋白特异激酶 SRPK2 在小鼠睾丸组织中的表达及意义 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(2): 171-177.

[21] Wee CD, Havens MA, Jodelka FM, et al. Targeting SR proteins improves SMN expression in spinal muscular atrophy cells [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e115205.

[22] Zhou H, Mangelsdorf M, Liu J, et al. RNA-binding proteins in neurological diseases [J]. Sci China Life Sci, 2014, 57(4): 432-444.

[23] Yang YY, Yin GL, Darnell RB. The neuronal RNA-binding protein NovA-2 is implicated as the autoantigen targeted in POMA patients with dementia [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(22): 13254-13259.

[24] Ule J, Jensen KB, Ruggiu M, et al. CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain [J]. Science, 2003, 302(5648): 1212-1215.

[25] Ule J, Stefani G, Mele A, et al. An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation [J]. Nature, 2006, 444(7119): 580-586.

〔收稿日期〕2019-10-22