

• 综 述 •

## 可变剪接及其生物学意义\*

富显果 综述, 兰风华<sup>△</sup> 审校

(中国人民解放军南京军区福州总医院临床遗传与实验医学科, 福州 350025)

关键词: RNA, 信使; 可变剪接; 剪接体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.024

文献标识码: A

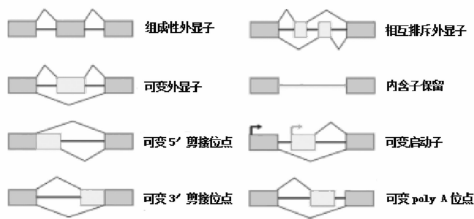
文章编号: 1673-4130(2012)11-1333-04

mRNA 可变剪接在脊椎动物中尤其普遍。Johnson 等<sup>[1]</sup>利用芯片杂交技术检测了人类基因组 10 000 多个外显子基因在不同组织和细胞中的可变剪接产物, 结果表明至少 74% 的基因可发生可变剪接。而 Wang 等<sup>[2]</sup>研究表明, 此比例可达到 92%~94%。mRNA 可变剪接极大地增加了真核生物基因表达的复杂程度和蛋白质功能的多样性, 并且与人类疾病的发生存在密切联系。近来的研究多致力于可变剪接的调控机制、功能相关性可变剪接体数据库的建立及可变剪接产物的生理与病理功能。本文就可变剪接有关进展进行综述。

## 1 可变剪接的常见模式

目前已发现了多种 mRNA 的可变剪接形式, 主要包括:

(1) 外显子选择性保留或切除; (2) 外显子 3' 端或 5' 端可变剪接, 大概 30% 的人类基因中 3' 端包含 NAGNAG 序列, 可作为潜在串联剪接受体位点<sup>[3]</sup>; (3) 内含子保留; (4) 相互排斥选择性外显子; (5) 不同转录起始或终止位点的可变选择。见图 1。

图 1 基本的可变剪接类型<sup>[4]</sup>

## 2 可变剪接的机制

人类基因组外显子的平均长度约 150 bp, 内含子平均长度约 3 500 bp。真核生物基因组中有七种不同类型内含子, 其中蛋白质编码基因只有两种内含子类型, 即 GT-AG 和 AT-AC。比较大量的真核生物 mRNA 内含子发现, 它们的两侧边界均有一对保守序列, 即 5' 端为 GT, 3' 端为 AG, 这类 GT-AG 的内含子均以相同方式剪切。这类 mRNA 剪接的基本过程是通过切除内含子把外显子按一定的顺序拼接起来, 形成成熟的 mRNA。在这一过程中, 首先是基本的剪接组分结合到经典的剪接位点序列上, 然后启动由多种组分构成的剪接体的组装。剪接体履行两项主要的剪接功能: 一是识别内含子与外显子的交界处, 二是催化内含子的切除与外显子的拼接反应<sup>[5]</sup>。剪接体由 U1、U2、U4、U5、U6 五种核内小核糖核蛋白 (snRNP) 及近 300 种蛋白质组成<sup>[6]</sup>。剪接体的组装过程大致如下<sup>[7]</sup>: 首先是定型复合物 (E complex) 的形成, U1 snRNP 通 RNA-RNP 间的碱基配对与 5' 剪接位点结合, 剪接因子 SF1 或分支点结合蛋白 (BBP) 附着于分支点, U2 snRNP 辅助因子 (U2AF) 小

亚基 35 (U2AF35) 和 U2AF65 分别与 3' 剪接位点和多嘧啶序列结合。富含丝氨酸精氨酸蛋白 (SRp) 结合到外显子剪接增强子 (ESE) 并与 U2AF35、U1 snRNP 和分支点序列相结合; 其次是 U2 snRNP 与分支点序列结合形成前剪接复合物 (A complex); 最后募集 U5 snRNP 和 U4/U6 snRNP, 通过 snRNP 间重排形成有催化活性的复合物, 完成内含子的切除与外显子的连接, 形成剪接体 (B complex)。同时, 在真核生物中, 少数 mRNA 内含子并不归属 GT-AG 范畴, 而有不同的剪接位置, 即 AT-AC 内含子。这类内含子的剪接路线与 GT-AG 相同, 但涉及不同的剪接因子<sup>[8]</sup>。

## 3 可变剪接的调控

3.1 剪接增强子与沉默子 剪接体组装过程首先必须识别内含子边界序列, 而内含子的 5' 和 3' 边界序列保守性较差, 在其内部常常存在许多类似的隐秘的边界序列, 因而细胞内有一套机制来防范不正确的 mRNA 剪接。目前已发现, 在许多基因外显子与内含子的近边界位置含有顺式作用序列元件辅助真假剪接位点的识别<sup>[9-10]</sup>。这些顺式作用元件包括 ESE、外显子剪接沉默子 (ESS)、内含子剪接增强子 (ISE)、内含子剪接沉默子 (ISS)。外显子的保留和跳过由这些竞争性剪接调控元件的相对平衡来实现。而这些调控元件活性又由相应的剪接调控因子的结合来决定。

许多 ESEs 包含 SRp 家族成员的结合位点。SRp 家族成员具有 1~2 个结合 RNA 的 N 末端 RNA 识别基序类型的结构域和 C 末端富含丝氨酸精氨酸蛋白残基 (RS) 的结构域。在剪接体组装过程, SRp 作为必要的剪接因子和调控因子发挥作用。ESE 依赖性 3' 或 5' 剪接位点的激活是通过 SRp 募集 U2AF65 到多嘧啶序列结合位点而实现。果蝇 dsx 基因第 4 外显子存在 1 个雌性特异性 ESE, 通过结合 1 个保守的 SRp 和 2 个含有 RS 结构域的调控因子——TRA 和 TRA2, 从而促进 U2AF35 和 U2AF65 分别与 3' 剪接位点和弱的多嘧啶序列结合, 完成对第 4 外显子上游内含子的剪接。而雄性个体中缺乏 TRA 的表达, 第 4 外显子被跳过<sup>[6]</sup>。

ESSs 和 ISSs 分布于序列中, 与反式作用因子核内不均一核糖核蛋白 (hnRNP) 家族成员结合抑制剪接的发生。hnRNPs 作为剪接抑制因子, 包含 hnRNPA1、多聚嘧啶序列结合蛋白 (PTB/hnRNPI)、果蝇 sxl 基因等<sup>[11]</sup>。反式作用因子通过与 ESSs 和 ISSs 的结合, 抵抗剪接因子 (如 snRNPs) 结合到剪接识别位点, 或者导致外显子环出, 从而抑制剪接<sup>[7]</sup>。以果蝇 tra mRNA 前体的可变剪接为例, 雌性个体 SXL 蛋白结合到上游 3' 剪接位点的多聚嘧啶结合位点阻止了 U2AF 的结合, 抑制了该位点的剪接, 而其下游的 3' 剪接位点结合 U2AF

而非 SXL, 所以该位点发生剪接。PTB/hnRNPI 的剪接抑制作用则是通过与正向调控因子竞争 U2AF65 结合点而实现<sup>[12]</sup>。hnRNPA1 的可变剪接调控作用是通过抑制 SRp 与剪接识别位点结合。

**3.2 RNA 二级结构** 剪接位点的识别、剪接增强子与沉默子作用一般都依赖于蛋白质因子的相互作用, 并与 mRNA 前体的单链状态保持有关。局部 RNA 结构能够通过形成稳定的环状结构隐藏剪接位点或者增强子结合位点抑制剪接体的组装, 或封闭剪接抑制因子结合位点促进剪接体的组装<sup>[13]</sup>。例如, 果蝇唐氏综合征细胞黏附分子基因(Dscam)外显子 6 簇包含 48 个选择性外显子, Graveley 等<sup>[14]</sup>在其中发现两类保守的 RNA 元件, 位于组成性外显子 5 下游的对接位点和位于外显子剪接产物上游的选择器序列。每个选择器序列与对接位点形成二级结构, 从而激活并指导相互排斥外显子与上游组成性外显子 5 的连接。另外, Singh 等<sup>[15]</sup>报道, 在 SMN2 外显子 7 剪接位点的识别中, 其 5' 剪接位点附近形成 1 个 RNA 发卡结构干扰 5' 剪接位点与 U1 snRNP 的结合, 参与外显子 7 的剪接的调控。其他分析结果也显示, 5% 的剪接事件的发生与稳定的 RNA 二级结构的存在密切相关<sup>[1]</sup>。

**3.3 mRNA 前体的加工与转录过程偶联** mRNA 前体的修饰与加工并非发生在转录完成之后, 而是与转录过程相偶联。RNA 聚合酶 II 中的羧基端结构域(CTD)在 mRNA 的加工中起重要作用, 转录的各个时期 CTD 可为不同的加工复合物提供组装的平台, 在转录的同时完成 mRNA 的加工。Kornblihtt<sup>[16]</sup>的研究提出, 不同的启动子选择可产生不同的剪接产物, 不同结构的启动子也可以导致发生不同的剪接过程, 产生不同的剪接产物。同时, 转录因子在转录的起始和延伸过程影响剪接位点的选择, 并且影响 RNA 聚合酶 II 延伸速率降低或暂停的因素也可增强选择性外显子的保留<sup>[17]</sup>。Zhou 等<sup>[18]</sup>的研究表明, 剪接调节因子 Hu 蛋白可以通过影响目的基因所在核小体的组蛋白乙酰化, 转而影响目的基因转录物的可变剪接。

**3.4 其他调控机制** 可变剪接的调控过程是正向和负向调控因子相互作用的复杂的整体过程, 除了相关的正、负向调控因子外, 还有许多蛋白质因子参与其中<sup>[19]</sup>。也有研究表明, 可逆的蛋白质磷酸化可以通过影响蛋白质与蛋白质、蛋白质与 RNA 相互作用, 调控剪接体的组装, 进而影响 mRNA 前体的可变剪接<sup>[20]</sup>。另外, 外显子或内含子的结构影响外显子的剪接位点的选择, 通过内含子界定或外显子界定复合物的形成的机制, 促进外显子的识别<sup>[13]</sup>。

#### 4 可变剪接的生物学意义

mRNA 可变剪接反映了遗传信息的动态变化与遗传信息在更高层次的重新组合, 它在不改变基因组 DNA 序列的前提下使编码序列的利用效率成几何级数增加, 极大丰富了蛋白质表达的复杂程度。许多可变剪接产物都是低丰度的, 特别是那些非保守的剪接产物<sup>[19]</sup>。比较大量人类与大鼠的直系同源基因已知序列的转录物, 结果显示两个种属之间只有 10%~20% 剪接产物是保守的, 其余部分为人类或大鼠的种属特异性剪接产物<sup>[21]</sup>。这种高频率、低丰度的种属特异性剪接产物, 可能对功能不会产生很大的影响, 而更可能是保持特异基因的活性。同时测序和微阵列分析的结果显示, 在具有不同细胞类型的功能复杂的组织, 如大脑、睾丸, 或者在经过选择的压力需提供不同功能的个体细胞, 如在免疫系统中, 这些组织和细胞上的基因更易发生可变剪接, 从而能利用有限的基因, 满足机体

功能多样性的需求<sup>[1, 22]</sup>。例如, 果蝇免疫活性细胞能够发生可变剪接, 表达超过 18 000 种免疫球蛋白超基因家族受体——唐氏综合征细胞黏附分子(DSCAM), 参与其吞噬功能<sup>[22]</sup>。

虽然高等生物中 mRNA 可变剪接是一种十分普遍的现象, 但并非所有可变剪接的 mRNA 都具有编码功能或者其他生物学功能。在人类和大鼠已知序列的转录物中, 大约三分之一的剪接产物引入前移的终止密码子(PTCs), 通过无义密码介导的 mRNA 降解(NMD), 从而导致转录物的降解<sup>[23]</sup>。NMD 可能是一种监控可变剪接错误的机制。

#### 5 可变剪接与疾病

早期认为引起疾病发生的点突变只有 15% 是通过干扰了 mRNA 正常剪接而致病的。但近来的研究表明, 50% 致病突变都此有关, 而且这个比例可能更大<sup>[24-25]</sup>。mRNA 可变剪接受到剪接位点一致性保守序列、顺式作用元件、反式作用因子等多种因素的影响, 任何一个条件的改变均可能导致异常的剪接, 从而引起疾病的发生<sup>[26]</sup>。

**5.1 共有剪接位点突变** 大多数的致病剪接位点突变涉及的 5' 和 3' 剪接位点, 其中最常见的是外显子的侧翼内含子序列 GT-AG, 这些位点的突变常导致临近外显子的异常剪接, 诸如外显子跳跃、隐秘剪接点的激活和内含子的保留等<sup>[3]</sup>。例如, 家族性自主神经失凋症又称赖利-戴综合征(FD), 是少见的家族性常染色体隐性遗传病, 是由 I- $\kappa$ B 激酶复合物相关蛋白(IKAP)的功能丧失造成。95% 以上的 FD 患者 IKAP 基因外显子 20 的 5' 剪接位点 T>C, 导致外显子 20 的跳过, 形成框移突变, 引入 PTC, 并可能通过 NMD 途径导致功能性 IKAP 表达减少<sup>[27]</sup>。该突变位于内含子 20 第 6 个碱基, 削弱了该剪接位点的内含子部分, 干扰了其 U1 snRNA 的碱基配对, 从而导致了外显子跳跃<sup>[28]</sup>。而 DNA 错配修复基因 MLH1 外显子 3' 端位点突变, 引起异常剪接, 如 MLH1 第 8 外显子最后一个核苷酸的 667G>A, 第 14 外显子最后一个碱基 1667G>T, 但这两突变导致不同的效果。667G>A 引起 89 bp 的第 8 外显子的跳过, 形成一个框移突变, 其剪接产物可能通过 NMD 导致该基因的表达缺失; 而 1667G>T, 利用一个隐藏的剪接位点, 形成一个包含 88 bp 第 14 内含子的转录物, 该内含子中有一框内终止密码子, 从而使这个异常的剪接产物可能经 NMD 途径处理<sup>[29]</sup>。

**5.2 顺式作用元件突变** 顺式作用元件突变会对可变剪接产生影响, 现在了解比较多的是 ESEs 突变。这些序列相关位点突变, 影响 SR 蛋白的识别和结合, 导致外显子的剪接体机制障碍。在 I 型神经纤维瘤(NF1)中, NF1 基因 174 bp 的第 7 外显子中间双位点突变, SRp 的 SC35 和 SF2/ASF 结合位点序列受到影响, 引起该外显子的缺失<sup>[30]</sup>。BRCA1 基因有一部分突变被证实是 ESE 基序异常引起剪接异常<sup>[31]</sup>。

**5.3 剪接因子表达失调** 目前许多研究结果显示, 个体 SRp 表达水平在肿瘤组织和正常组织存在差别。一个卵巢癌研究发现, SRp 表达水平的改变与已知卵巢癌中 CD44 的可变剪接密切相关<sup>[32]</sup>。另外, Ron 是一种巨噬细胞刺激蛋白酪氨酸激酶受体, 其基因 Ron 的剪接产物  $\Delta$ Ron, 147 bp 外显子 11 跳过, 导致阅读框内 49 个核苷酸缺失, 该剪接产物可以增强表达细胞的细胞运动性。Ghigna 等<sup>[33]</sup>研究表明,  $\Delta$ Ron 在 75% 的乳腺癌中上调表达, 增强了肿瘤细胞的转移性能, 而  $\Delta$ Ron 的表达与剪接因子 SF/ASF 的表达水平密切相关。

**5.4 剪接产物表达失调** 肿瘤中内源性可变剪接模式的改变, 使某一剪接产物在特定的组织或细胞内特异性表达, 其所

翻译的蛋白可能发挥显性负相作用于其全长序列编码的蛋白质,影响疾病的发展。Pettigrew 等<sup>[34]</sup>概述了多种剪接产物在肿瘤组织中过量表达,这些剪接产物与其全长序列编码产物相比,具有不同的功能特性并影响疾病的发生和发展。例如 CHK2 是 DNA 损伤检查点激酶。在某些肿瘤细胞中,CHK2 发生异常可变剪接。在一组 53 个乳腺癌的样本中检测到除全长序列编码的单体外,存在 90 多个剪接产物。在正常乳房组织中平均检测到 4 个剪接产物,而在乳腺癌中为 6 个剪接产物。研究结果显示超过一半的剪接产物检测到 PTCs,通过 NDM 途径,而其他产物被异常地定位于细胞质。通过这两种机制,可能显著地降低这些肿瘤组织中功能性 CHK2 的表达量<sup>[35]</sup>。肾胚细胞瘤起因于肿瘤抑制基因 WT1 的突变,人类 WT1 基因至少有 24 种不同的蛋白质产物,它们与睾丸、卵巢、心脏和其他器官的发育至关重要,但不知道细胞如何控制这些不同 WT1 产物之间的数量平衡。有些患者的病因是因为 WT1 基因转录产物中两种可变剪接的比例失调,而并非缺少正常 WT1 蛋白<sup>[36]</sup>。

### 6 剪接产物的临床应用

有些剪接产物特异性表达于癌性组织,可以作为疾病的生物标记,也可以作为疾病治疗的靶目标。以 Ron 基因为例,其剪接产物 Ron- $\Delta$ 11 mRNA 在乳腺癌和结肠癌细胞中积聚,因此可以作为乳腺癌和结肠癌诊断的潜在生物学标记<sup>[33]</sup>。AR- $\Delta$ 3 和 osteopontin-c,均可作为乳腺癌的潜在生物学标记<sup>[34]</sup>。随着对剪接位点、顺式作用元件的突变引起的或由反式作用因子的平衡失调引起的剪接异常机制的认识的深入,剪接产物的特异性表达为疾病的治疗干预提供了新的作用的靶点<sup>[37]</sup>。Wang 等<sup>[38]</sup>首次报道人工剪接因子可改变肿瘤细胞一个促凋亡剪接异构体的数量,从而诱导其凋亡。这为基于可变剪接的基因治疗开辟了道路。

### 7 小 结

仅仅在一二十年前,可变剪接还被认为只见于少数基因。现在已认识到,绝大多数人类基因都可发生可变剪接。随着生物芯片技术与测序技术的发展和计算机工具的应用,同时交联免疫沉淀技术(CLIP)、染色质免疫沉淀技术(ChIP)和 RNA 干涉技术(RNAi)等应用于可变剪接调控相关蛋白质的研究<sup>[1,7]</sup>,并建立了多种可变剪接相关的数据库<sup>[39-41]</sup>,使人们对可变剪接的机制和其复杂性有了更详细了解。但是,相对于庞大的基因组,所检测到剪接产物可能只是冰山一角,还须在更大范围的组织和细胞中检测剪接产物类型,丰富剪接产物的数据库。另外 mRNA 前体的可变剪接产物并非都有确定的生物学功能,其中有不少是因为剪接错误造成的,因而有关 mRNA 的可变剪接在多大程度上影响蛋白质的复杂性还是个有待深入探讨的问题。随着剪接产物检测技术的发展及对剪接产物机制与功能的深入研究,将有助于找到可变剪接的剪接密码<sup>[42]</sup>,从而为疾病的诊断及治疗提供新的方向。

### 参考文献

[1] Johnson JM, Castle J, Garrett-Engle P, et al. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays[J]. *Science*, 2003, 302(5653): 2141-2144.  
 [2] Wang ET, Sandberg R, Luo SJ, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes[J]. *Nature*, 2008, 456(7221): 470-476.  
 [3] Hiller M, Huse K, Szafranski K, et al. Widespread occurrence of

alternative splicing at NAGNAG acceptors contributes to proteome plasticity[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(12): 1255-1257.  
 [4] Ward AJ, Cooper TA. The pathobiology of splicing[J]. *J Pathol*, 2010, 220(2): 152-163.  
 [5] Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease [J]. *Genes Dev*, 2003, 17(4): 419-437.  
 [6] Hoskins AA, Friedman LJ, Gallagher SS, et al. Ordered and dynamic assembly of single spliceosomes [J]. *Science*, 2011, 331(6022): 1289-1295.  
 [7] Matlin AJ, Clark F, Smith CW. Understanding alternative splicing: towards a cellular code[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(5): 386-398.  
 [8] Chang WC, Chen YC, Lee KM, et al. Alternative splicing and bioinformatic analysis of human U12-type introns [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(6): 1833-1841.  
 [9] Wang Z, Xiao X, Van Nostrand E, et al. General and specific functions of exonic splicing silencers in splicing control[J]. *Mol Cell*, 2006, 23(1): 61-70.  
 [10] Zhang XH, Chasin LA. Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(11): 1241-1250.  
 [11] Martinez-Contreras R, Fiset JF, Nasim FU, et al. Intronic binding sites for hnRNPA/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing[J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(2): e21.  
 [12] Gromak N, Rideau A, Southby J, et al. The PTB interacting protein raver1 regulates alpha-tropomyosin alternative splicing[J]. *EMBO J*, 2003, 22(23): 6356-6364.  
 [13] Hertel KJ. Combinatorial control of exon recognition[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(3): 1211-1215.  
 [14] Graveley BR. Mutually exclusive splicing of the insect Dscam pre-mRNA directed by competing intronic RNA secondary structures [J]. *Cell*, 2005, 123(1): 65-73.  
 [15] Singh NN, Singh RN, Androphy EJ. Modulating role of RNA structure in alternative splicing of a critical exon in the spinal muscular atrophy genes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(2): 371-389.  
 [16] Kornbliht AR. Promoter usage and alternative splicing[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(3): 262-268.  
 [17] Kornbliht AR. Chromatin, transcript elongation and alternative splicing[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(1): 5-7.  
 [18] Zhou HL, Hinman MN, Barron VA, et al. Hu proteins regulate alternative splicing by inducing localized histone hyperacetylation in an RNA-dependent manner[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(36): 627-635.  
 [19] Blencowe BJ. Alternative splicing: new insights from global analyses[J]. *Cell*, 2006, 126(1): 37-47.  
 [20] Stamm S. Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(3): 1223-1227.  
 [21] Pan Q, Bakowski MA, Morris Q, et al. Alternative splicing of conserved exons is frequently species-specific in human and mouse [J]. *Trends Genet*, 2005, 21(2): 73-77.  
 [22] Watson FL, Puttmann-Holgado R, Thomas F, et al. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects [J]. *Science*, 2005, 309(5742): 1874-1878.  
 [23] Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing[J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(4): 285-298.  
 [24] Lopez-Bigas N, Audit B, Ouzounis C, et al. Are splicing mutations

- the most frequent cause of hereditary disease? [J]. FEBS Lett, 2005, 579(9):1900-1903.
- [25] Pan Q, Shai O, Lee LJ, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing[J]. Nat Genet, 2008, 40(12):1413-1415.
- [26] Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery[J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(10):749-761.
- [27] Cuajungco MP, Leyne M, Mull J, et al. Tissue-specific reduction in splicing efficiency of IKBKAP due to the major mutation associated with familial dysautonomia [J]. Am J Hum Genet, 2003, 72(3):749-758.
- [28] Carmel I, Tal S, Vig I, et al. Comparative analysis detects dependencies among the 5' splice-site positions[J]. RNA, 2004, 10(5):828-840.
- [29] Sharp A, Pichert G, Lucassen A, et al. RNA analysis reveals splicing mutations and loss of expression defects in MLH1 and BRCA1[J]. Hum Mutat, 2004, 24(3):272.
- [30] 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 [J]. Hum Genet, 2003, 113(6):551-554.
- [31] Liu HX, Cartegni L, Zhang MQ, et al. A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes[J]. Nat Genet, 2001, 27(1):55-58.
- [32] Fischer DC, Noack K, Runnebaum IB, et al. Expression of splicing factors in human ovarian cancer [J]. Oncol Rep, 2004, 11(5):1085-1090.
- [33] Ghigna C, Giordano S, Shen H, et al. Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene [J]. Mol Cell, 2005, 20(6):881-890.
- [34] Pettigrew CA, Brown MA. Pre-mRNA splicing aberrations and cancer [J]. Front Biosci, 2008, 13:1090-1105.
- [35] Staalesen V, Falck J, Geisler S, et al. Alternative splicing and mutation status of CHEK2 in stage III breast cancer [J]. Oncogene, 2004, 23(52):8535-8544.
- [36] Powlledge TM. Bear market slashes at human genome. The dropping guesses about the number of human genes challenges researchers to explain human complexity with so few genes [J]. EMBO Rep, 2000, 1(3):212-214.
- [37] Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth [J]. Nature, 2008, 452(7184):230-233.
- [38] Wang Y, Cheong CG, Hall TM, et al. Engineering splicing factors with designed specificities [J]. Nat Methods, 2009, 6(11):825-830.
- [39] Durgaprasad Bollina, Lee Bernett TK, Tan TW, et al. ASGS: an alternative splicing graph web service [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34:444-447.
- [40] Birzele F, Küffner R, Meier F, et al. ProSAS: a database for analyzing alternative splicing in the context of protein structures [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36:63-68.
- [41] Stamm S, Riethoven JJ, Texier VL, et al. ASD: a bioinformatics resource on alternative splicing [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34:46-55.
- [42] Barash Y, Calarco JA, Gao W, et al. Deciphering the splicing code [J]. Nature, 2010, 465(7294):53-59.

(收稿日期:2012-01-31)

## • 综 述 •

## 浓度梯度微流控芯片技术研究进展\*

蒋丽莉, 邓 均, 方立超, 李 艳, 贺 娟 综述, 郑峻松<sup>△</sup>, 黄 辉 审校  
(第三军医大学医学检验系临床检验学教研室, 重庆 400038)

关键词: 微流控芯片; 浓度梯度; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.025

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)11-1336-03

微流控芯片技术是由瑞士科学家 Manz 等<sup>[1]</sup>在 20 世纪 90 年代提出, 该技术通过运用微机械加工 (MEMS) 技术将生物学和分析化学等领域中所涉及的样品制备、分离、反应、检测等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米的芯片上, 通过微通道形成网络, 可控流体贯穿整个系统, 用以取代常规生物或化学实验室的各种功能, 以其微型化、集成化、高通量、高精度的特征在众多生命科学领域显示出巨大的发展潜力和应用价值<sup>[2]</sup>。近年来, 浓度梯度微流控芯片越来越受到大家的关注。它通过建立内部可控的稳定的浓度梯度, 微流控技术和细胞培养、药物筛选等其他技术有机结合起来, 广泛地应用于多种细胞生物学研究<sup>[3-4]</sup>。本文将从浓度梯度微流控芯片的特点, 浓度梯度微流控芯片的设计和制作, 浓度梯度微流控芯片的应用三个方面进行综述, 最后对浓度梯度微流控芯片在神经微环境中的应用进行展望。

## 1 浓度梯度微流控芯片的特点

浓度梯度微流控芯片与其他体外研究体系相比有许多独特的优势。首先浓度梯度微流控芯片可以形成精确的浓度梯度, 且通过改变网络通道的构型设计及初始液流的浓度和组合顺序, 可获得一系列复杂的浓度梯度<sup>[5-6]</sup>。这是其他系统难以达到的。其次, 与传统的研究体系相比, 浓度梯度微流控芯片具有与体内微血管尺寸相近的微通道且采用灌流培养方式, 更接近于体内复杂的微环境, 能够进行细胞的生长和分化、细胞趋化和胞内物质分析等<sup>[7-9]</sup>, 且在此微小尺寸通道中的流体具有层流特性, 当两种或更多种不同试剂流入同一通道时, 各试剂流能够保持自身的流型不变, 而只在相与相的接触界面上发生反应或分子扩散现象, 具有较高的稳定性和重现性。最后根据浓度梯度微流控芯片设计加工灵活的特点, 可以实现多种单元操作技术在整体可控的微小平台上灵活组合、规模集成。如