

• 基础研究 •

## F9 基因剪接位点共识区域中内含子突变造成的异常剪接模式研究

马金<sup>1,2</sup>, 沈滢<sup>1,2</sup>, 沈国民<sup>2,3\*</sup>, 高蒙<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>河南科技大学基础医学与法医学院, 河南 洛阳 471023; <sup>2</sup>河南省血栓与止血国际联合实验室, 河南 洛阳 471023; <sup>3</sup>哈尔滨医科大学细胞生物学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150081

**[摘要]** 目的: 确定B型血友病致病基因F9的剪接位点共识序列, 并筛选序列相关致病突变, 以确定F9基因内含子中主要剪接调控位点。方法: 从凝血因子IX(coagulation factor IX, FIX)突变数据库(Factor IX Variant Database)中收集内含子突变, 依据F9基因剪接位点保守性分析筛选可能影响剪接的致病突变, 重点关注患病人数多且致病效应强的突变位点所在区域, 结合3种RNA剪接预测软件对突变导致的剪接效应进行预测。之后, 采用微型基因剪接检测体系, 对所选突变的剪接效应进行体外检测并通过变性毛细管电泳检测不同转录本所占比例, 以明确各突变剪接效应的差异, 进而确定F9基因剪接共识序列中影响剪接的关键位点。针对具有蛋白编码能力的异常剪接体, 构建体外表达体系, 通过Western blot及活化部分凝血活酶时间综合评价异常剪接体的胞内表达、胞外分泌及凝血活性状态。结果: 序列与突变分析确定F9基因外显子4剪接位点附近的15个突变为靶突变, 微型基因剪接实验证实其中14个突变可导致异常剪接, 对比软件预测结果, 进一步证实计算机预测具有局限性, 不能准确预测具体剪接模式及其比例。证实了内含子上经典位点GT-AG的保守性, 同时发现供体端+5G同样有利于剪接位点的正确识别, 而相对保守的+7A则未对剪接位点识别产生重要作用, 此外, 模拟经典“AG”序列的深层内含子突变会造成剪接识别错位, 显著提高异常剪接比例。蛋白表达与活性分析结果显示, p.D93-G125delinsG和p.G94-D131del两种异常剪接突变体的抗原合成及活性状态与野生型相比差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论: GT-AG是影响剪接调控的主要位点, F9基因内含子4剪接供体端非保守位点的+5G同样对剪接有调控作用。对不同突变造成剪接调控模式差异进行总结分析, 可为大数据分析提供理论依据, 并提高生物信息学预测的准确性。

**[关键词]** F9基因; 内含子突变; 剪接异常; B型血友病; 致病机制

**[中图分类号]** R554.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2026)01-55-13

**doi:** 10.7655/NYDXBNSN250277

### Mechanistic dissection of aberrant splicing patterns induced by intronic variants in consensus regions of the F9 gene splice sites

MA Jin<sup>1,2</sup>, SHEN Yan<sup>1,2</sup>, SHEN Guomin<sup>2,3\*</sup>, GAO Meng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Basic Medicine and Forensic Medicine, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023;

<sup>2</sup>Henan International Joint Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, Luoyang 471023; <sup>3</sup>Department of Cell Biology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China

**[Abstract]** **Objective:** To identify key splicing regulatory sites within introns of the F9 gene (the causative gene for hemophilia B) through the characterization of splice site consensus motifs and systematic screening for pathogenic variants in these regions. **Methods:** Based on the variations documented in the Factor IX Variant Database, we primarily focused on intronic variations that may influence pre-mRNA splicing. These variations were filtered through a comparative analysis based on sequence conservation and were associated with the severity of the disease. Variations located within highly conserved loci that were linked to severe hemophilia were selected as target variations and subjected to subsequent splicing predictions using three independent tools separately. The prediction results were

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31900412, 82170133)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: mengmeng1988@126.com(ORCID: 0000-0002-8792-1093); shenba433@163.com(ORCID: 0000-0002-5006-2790)

then validated through minigene splicing assays, and specific splicing patterns were further investigated using denaturing capillary electrophoresis. For those in-frame aberrant splicing products, we assessed protein expression, protein secretion, and *in vitro* coagulation activity by Western blot and activated partial thromboplastin time. **Results:** We identified 15 variants located near the splicing site of exon 4 in the F9 gene as target variants through sequence and variant analysis. Minigene splicing assay confirmed that 14 of these variants could lead to abnormal splicing. In comparison with the bioinformatic prediction results, we further established that computational predictions exhibited limitations and could not accurately predict specific splicing patterns or their proportions. The classic GT-AG splice site on the intron was confirmed to be conserved. Additionally, we observed that +5G at the donor end facilitated correct recognition of the splicing site, whereas the relatively conserved +7A did not play a significant regulatory role in this recognition process. Furthermore, deep intronic variants mimicking the classic splice donor “AG” motif caused misalignment of splice site recognition, significantly increasing the proportion of abnormal splicing. Results from protein expression and activity analyses indicated notable differences in antigen synthesis and *in vitro* coagulation activity status between the two abnormal splicing variants of p.D93-G125delinsG and p.G94-D131del and those of the wild-type F IX ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The splice site (GT-AG) is pivotal in determining precise splicing. The less conserved +5G at the consensus region of the splice donor site in the intron 4 of the F9 gene also has a regulatory effect on splicing. Summarizing the differences in splice patterns caused by diverse variations can provide a solid theoretical basis for big data analysis and improve the accuracy of bioinformatics predictions.

[Key words] F9 gene; intronic variants; aberrant splicing; hemophilia B; pathogenic mechanisms

[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(01): 55-67]

B型血友病(hemophilia B, HB)是X染色体连锁隐性遗传病<sup>[1]</sup>,主要临床表现是凝血功能障碍及由此引发的出血现象<sup>[2]</sup>。遗传分析证实其致病基因为F9(OMIM: 300746),位于X染色体长臂(Xq27.1),全长33.5 kb,由8个外显子和7个内含子构成,转录形成2.8 kb的mRNA(NM\_000133),编码461个氨基酸残基的凝血因子IX(coagulation factor IX, F IX)前体蛋白<sup>[3-6]</sup>。F9基因突变造成F IX蛋白分泌不足或功能异常是导致HB的主要原因<sup>[7-10]</sup>。目前F IX突变数据库(Factor IX Variant Database)中共收录了1 692种F9基因相关突变,其中10.28%为内含子突变,提示内含子突变是导致HB的主要原因之一<sup>[9]</sup>。因此,阐明内含子突变的致病机制有助于加深对HB复杂致病机制的认识。

以往关于内含子突变致病机制的探索阐明了内含子剪接供体端(donor site)+1G、+2T和剪接受体端(acceptor site)-2A、-1G的广泛致病性<sup>[11-12]</sup>。因此,长久以来遗传学分析以编码区突变和内含子剪接位点突变作为解析基因突变致病机制的重点。然而随着测序技术的发展,大量内含子突变先后被鉴定出来<sup>[13-16]</sup>,引发了对内含子突变致病机制的进一步探索。虽然剪接调控因子与剪接调控元件的准确识别与结合是保证RNA精确剪接的前提条件<sup>[17-20]</sup>,但研究表明除内含子经典剪接位点GT-AG外,其他相关剪接调控元件的序列保守性并不强,这是可变剪

接产生的基础,同时也是内含子突变致病的主要原因之一。目前认为内含子和外显子交界处的多个碱基共同定义了经典剪接调控元件中的供体和受体位点。其中,供体位点的共识序列通常跨越10 bp,从外显子的-3位到内含子的+7位,而受体位点的共识序列则涵盖28 bp,从内含子的-26位延伸到外显子的+2位<sup>[21]</sup>,表明内含子上的碱基同样参与剪接调控,Vaz-Drago等<sup>[13]</sup>通过分析mRNA和全基因组测序的证据,表明超过75种疾病的致病突变与内含子相关,强调了内含子突变的不可忽视性。基于此,本研究通过分析内含子上多个位点对剪接调控的影响,拓展内含子突变的研究范围,以期掌握剪接调控中的关键位点。

本研究通过整合临床数据与生物信息学分析结果,筛选出F9基因内含子剪接位点共识区域内的15个致病突变。通过微型基因剪接实验结合Sanger测序与变性毛细管电泳解析突变特异性的剪接模式及调控机制,证实除GT-AG核心序列外,内含子上还存在一些非保守位点对剪接调控产生影响。此外,本研究还利用剪接突变体抗原水平检测和凝血功能实验阐明了异常剪接体的致病机制,为血友病的精准诊断和治疗提供理论依据。同时,本研究对剪接共识区域内突变剪接模式的分析可作为理论依据促进剪接预测算法的改进,提高生物信息学预测的准确性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验所用人胚肾细胞 HEK-293T 由本实验室保存,细胞培养使用 DMEM 培养基(Corning 公司,美国)和 Optimal-MEM 培养基(Gibco 公司,美国),并添加 10%胎牛血清(上海 ABW 公司)及 1%青霉素-链霉素溶液(北京 Coolaber 公司);细胞消化采用 0.25%胰酶-EDTA(北京 Coolaber 公司)。质粒提取使用小提中量质粒提取试剂盒、DNA 纯化采用 DNA 纯化试剂盒(北京天根生物公司)。细胞转染采用 PEI 转染试剂(Polyscience 公司,美国),RNA 提取使用 RNA 提取试剂盒、cDNA 合成采用 Hiscript III RT SuperMix 试剂盒、PCR 扩增使用 2× Taq Master Mix(南京诺唯赞公司)。克隆实验采用 pMD18-T 载体试剂盒(Takara 公司,日本)。蛋白印迹实验使用 0.2 μm PVDF 膜(Millipore 公司,美国),一抗为羊抗人 FIX 单克隆抗体(Affinity Biologicals 公司,加拿大),二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG 抗体(Proteintech 公司,美国),内参采用 β-actin-HRP(Santa Cruz 公司,美国)。凝血功能检测使用活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)试剂和 FIX 缺陷血浆(西门子公司,德国),并以质控血浆(Hyphen BioMed 公司,法国)作为对照。实验所需引物及 Sanger 测序由天津金唯智生物公司完成,毛细管电泳委托上海生工生物工程有限公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 计算机预测分析

本研究采用多种生物信息学工具对 F9 基因的剪接位点进行系统性分析。首先,利用 WebLogo 对 F9 基因供体端和受体端的序列进行可视化分析,以评估其保守性特征。随后,使用 Human Splicing Finder(HSF)和 MaxEntScan(MES)两种不同的算法工具对外显子 4 的经典剪接位点及潜在隐性剪接位点进行评分。为全面评估突变对剪接模式的影响,研究进一步整合了罕见病数据中心(rare disease data center, RDDC)数据库的预测结果。本研究涉及的致病突变及临床相关信息均来源于 FIX 突变数据库,确保了数据的可靠性和准确性。

#### 1.2.2 细胞培养

含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养基对 HEK-293T 细胞进行培养,恒温培养箱设置温度和 CO<sub>2</sub> 浓度分别为 37 °C、5%。细胞汇合度达到 90%及以上时,进行细胞传代,传代时细胞接

种密度维持在 1×10<sup>5</sup> 个/mL。

#### 1.2.3 质粒构建

微型基因剪接实验载体构建方法如下:通过 FastCloning 技术将 F9 基因外显子 4 及其两端侧翼序列(约 450 bp)克隆至 pSPL3 载体的多克隆位点内(Xho I 和 BamH I)构建野生型(wild type, WT)剪接报告载体。随后,针对不同突变位点设计相应引物(表 1),构建突变型剪接报告载体。体外表达载体以 pBudCE4.1 载体为骨架,将 F9 基因 cDNA 序列插入到载体的多克隆位点内构建 WT FIX 表达载体。分析异常剪接突变体的编码序列,针对具有编码功能的突变体,设计相应引物(表 2),以 WT 表达载体为模板通过 FastCloning 技术构建异常剪接突变体的体外表达载体。所有载体均经过 Sanger 测序验证。

#### 1.2.4 细胞转染

将处于对数生长期的 HEK-293T 细胞接种于 6 孔板中,待细胞汇合度达 70%时,采用聚乙烯亚胺(polyetherimide, PEI)转染试剂进行瞬时转染。转染体系如下:6 孔板每孔转染 DNA 量为 4 μg, DNA 与 PEI 的比例为 1:3, DNA 与 PEI 稀释采用优化的无血清培养基(Optimal-MEM),转染 4~6 h 后用含有 10 μmol/L 维生素 K 的完全细胞培养液继续培养 36~48 h。

#### 1.2.5 样品制备

细胞培养完成后收集细胞样品用于细胞总 RNA 和蛋白提取。根据试剂生产商提供的操作指南进行细胞总 RNA 抽提,抽提完毕后利用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度,确保抽提样本无基因组 DNA 和有机试剂污染,以保证后续实验效果。胞内蛋白提取前先用 PBS 缓冲液洗涤细胞,后加入细胞裂解液,待其充分裂解后离心收集上清液作为胞内蛋白样本待用。分泌蛋白样品提取时收集细胞培养液,若样本用于 Western blot 分析,采用三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)沉淀法提取;若分泌蛋白样品用于体外凝血活性检测,则采用超滤管进行浓缩法收集(注意:为避免细胞培养液中血清的影响,收集分泌蛋白样本时需要用 Optimal-MEM 进行细胞培养)。

#### 1.2.6 剪接模式分析

采用 Hiscript III RT SuperMix kit 将 1 μg 总 RNA 反转录为 cDNA,随后使用 2×Taq Master Mix 进行 PCR 扩增。反应条件为:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 15 s、57 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min,共 25 个循环;72 °C 终延伸 5 min。2%琼脂糖凝胶电泳观察条

表1 微型基因剪接载体的特异性引物序列

Table 1 Specific primer sequences of minigene splicing vector

Variant		Primer sequence(5'→3')
I3-c.278-1G>T	Forward	TCTCAAATATG GAGATCAGTG TGAG
	Reverse	ATCTCCATAT TTGAGATAGG TTAAG
I3-c.278-1G>C	Forward	TCTCAAACATG GAGATCAGTG TGAG
	Reverse	ATCTCCATGT TTGAGATAGG TTAAG
I3-c.278-1G>A	Forward	TCTCAAAAATG GAGATCAGTG TGAG
	Reverse	ATCTCCATTT TTGAGATAGG TTAAG
I3-c.278-2A>T	Forward	ATCTCAATGATG GAGATCAGTG TGA
	Reverse	TCTCCATCAT TGAGATAGGT TAAGA
I3-c.278-3A>G	Forward	TATCTCAGAGATG GAGATCAGTG TG
	Reverse	CTCCATCTCT GAGATAGGTT AAGAA
I4-c.391+1G>C	Forward	GAATTA GCTAAGTAACTATTTTTTG
	Reverse	GTTACTTAGC TAATTCACAG TTCTT
I4-c.391+1G>A	Forward	GAATTA GATAAGTAACTATTTTTTG
	Reverse	GTTACTTATC TAATTCACAG TTCTT
I4-c.391+1G>T	Forward	GAATTA GTTAAGTAACTATTTTTTG
	Reverse	GTTACTTAAC TAATTCACAG TTCTT
I4-c.391+7A>G	Forward	GGTAAAGTACTATTTTTGAATACT
	Reverse	AAAATAGTCA CTTACCTAAT TCACA
E4-c.391delG	Forward	GTGAATTAGTAAGTAACTATTTTTTT
	Reverse	TTACTTACTAATTCACAGTTCTTTC
I4-C.391+1insT	Forward	GAATTAGTGTAAGTAACTATTTTTTT
	Reverse	TTACTTACACTAATTCACAGTTCTT
I4-C.391+2T>A	Forward	AATTAGGAAAGTAACTATTTTTTTGA
	Reverse	AGTTACTTTCCTAATTCACAGTTCT
I4-C.391+2T>C	Forward	AATTAGGCAAGTAACTATTTTTTTGA
	Reverse	AGTTACTTGCCTAATTCACAGTTCT
I4-C.391+5delG	Forward	TTAGGTAATAACTATTTTTTTGAATA
	Reverse	AATAGTTATTACCTAATTCACAGTT
I4-C.391+5G>A	Forward	TAGGTAATAACTATTTTTTTGAATA
	Reverse	AATAGTTATTTACCTAATTCACAGT

表2 表达载体的特异性引物序列

Table 2 Specific primer sequences of expression vector

Vector		Primer sequence(5'→3')
F9-E4-del96bp	Forward	GTATGTTGAAAGAAGTGAATTAGATGTAAC
	Reverse	GTTCTTTCCAACATACTGCTTCCAAAATTCAGTT
F9-E4-skipping	Forward	GTATGTTGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGC
	Reverse	TGTTACATCAACATACTGCTTCCAAAATTCAGT

带的位置,随后将cDNA产物连接至pMD18-T载体,转入感受态细胞,挑取单克隆菌落经PCR验证后进行Sanger测序。使用DNAMAN软件将测序结果与野生型序列进行比对分析,同时,采用荧光标记引物(SD6: 5'-TCTGAGTCACCTGGACAACC-3'; SA2: 5'-

ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC-3')对cDNA产物进行毛细管电泳分离,根据不同剪接产物的片段大小及峰面积,定量计算各剪接产物的比例。

1.2.7 Western blot

将瞬时转染后收集的胞内和上清蛋白样品与

5×上样缓冲液(含β-巯基乙醇)按适当比例混合, 100 °C煮沸5 min后上样。使用10% SDS-PAGE凝胶进行蛋白分离, 随后采用湿转法将蛋白转移至0.2 μm硝酸纤维素膜上, 用5%脱脂牛奶室温封闭2 h, 分别加入1:10 000稀释的羊抗人FIX单克隆抗体或1:20 000稀释的β-actin-HRP, 4 °C孵育过夜。次日, 用TBST缓冲液(0.1% Tween-20)洗涤3次, 每次15 min; 随后加入1:10 000稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG二抗, 室温孵育50 min。TBST再次洗涤后, 使用ECL化学发光试剂在化学发光成像系统上进行显影。采用Image J软件对蛋白条带进行灰度值分析, 所有实验均独立重复3次以确保结果的可重复性。

### 1.2.8 FIX凝血活性测定

采用凝固法测定FIX凝血活性(FIX:C)。首先, 将标准血浆按1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320的梯度比例进行稀释, 制备标准曲线。实验样本按体积比1:5或1:10用缓冲液稀释, 必要时根据样本活性调整稀释比例。使用半自动凝血分析仪进行检测, 以APTT试剂和FIX缺陷血浆作为检测体系, 记录血浆凝固时间。将待测样本的凝固时间代入标准曲线, 计算FIX:C活性。每个样本平行测定3次, 取平均值作为最终结果, 以确保数据的准确

性和可靠性。

### 1.3 统计学方法

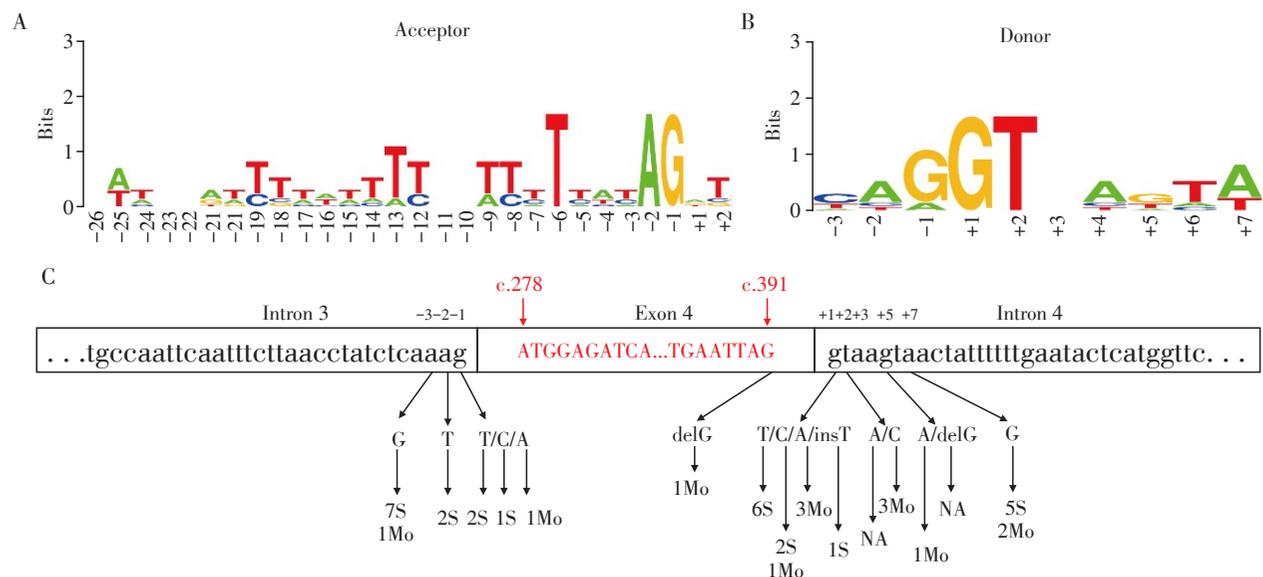
采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析及绘图。所有实验均独立重复3次。组间数据比较采用独立样本t检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 F9基因剪接位点保守序列的特征分析

F9基因全长33.5 kb, 由8个外显子和7个内含子组成。利用WebLogo在线生物信息学工具对其供体和受体端进行保守性分析(图1A、B), 结果显示除了高度保守的GT-AG剪接位点外, 剪接供体位点的-1位G和+7位A以及剪接受体位点的-6位T也呈现显著保守特征, 两侧其他序列保守性相对较低。这一发现提示, 剪接位点核心区域以外的突变也可能干扰pre-mRNA的正常剪接。

本研究通过收集FIX突变数据库中所有内含子区突变信息, 通过统计发现, 可能影响外显子4精确剪接的突变在发生频率和临床关联性上均占主导地位。因此, 本研究以外显子4的剪接调控为范例, 重点分析内含子3剪接受体位点上的5个突变、内含子4剪接供体位点上的10个突变, 图1C展示了15个靶突变的信息、患者的表型和数量。



A, B: Conservative analysis of acceptor(A) and donor(B) sequences of F9 gene. The horizontal axis represents the base position, and the vertical axis represents the information entropy. The height of each letter represents the conservatism and variability of the base at that position. The higher the information entropy (lower conservation), the smaller the symbol height; the lower the information entropy (high conservatism), the greater the symbol height. C: Schematic diagram of base variants distribution and patient information. Intronic and exonic sequences are represented by lowercase and uppercase letters, respectively. S: severe; Mo: moderate; NA: no available data.

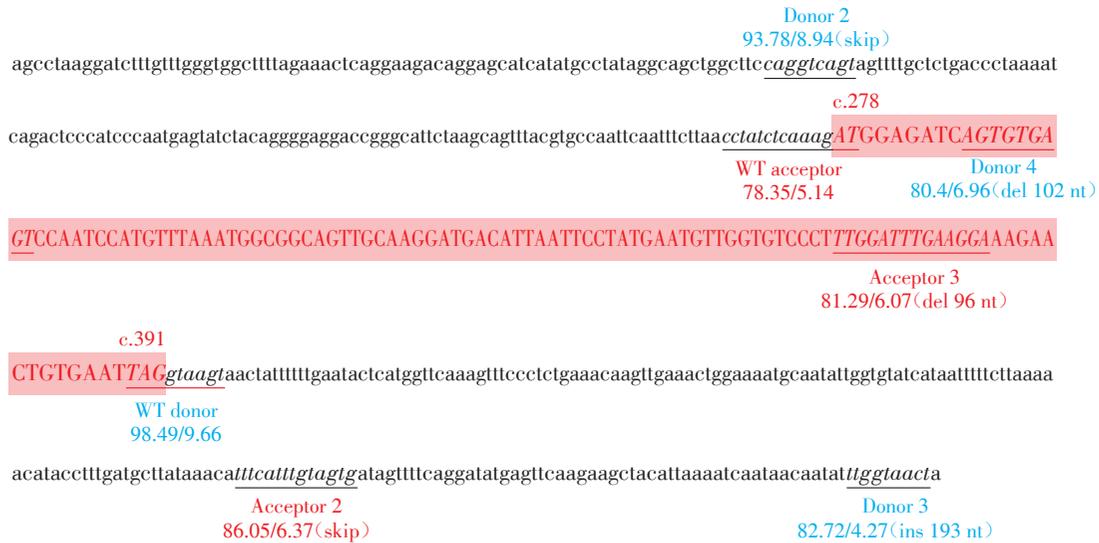
图1 基于F9基因剪接位点序列保守性筛选的15个目标突变

Figure 1 Fifteen target variants were screened based on sequence conservation of F9 splice sites

### 2.2 基于生物信息学评估突变对 pre-mRNA 剪接的影响

随着生物信息学算法的不断发展,本研究采用两种不同算法工具(HSF和MES)对外显子4及其侧翼序列潜在的剪接位点进行系统评估,其中预测的各

剪接位点在基因上的位置信息如图2所示。评分结果显示,WT剪接受体序列的评分分别为78.35(HSF)和5.14(MES),显著低于其他两个隐性剪接受体,而WT剪接供体序列的评分分别为98.49(HSF)和9.66(MES),明显高于隐性剪接供体(表3)。这一发



The picture shows exon 4 and the sequences of the intron upstream and downstream of it. Capital letters represent exon, and lowercase letters represent intron. Predicted splice site sequences are shown in italics, with splice donors in blue and splice acceptors in red.

图2 生物信息学工具预测的剪接位点分布

Figure 2 Splice site distribution predicted by bioinformatics tools

表3 生物信息学工具预测的剪接位点评分

Table 3 Splice site score predicted by bioinformatics tools

Site	Splice site sequence	HSF	MES
Acceptor WT	cctatctcaagAT	78.35	5.14
Acceptor 1	tttcattttagTG	86.05	6.37
Acceptor 2	ttgatttgaagGA	81.29	6.07
Donor WT	TAGgtaagt	98.49	9.66
Donor 1	CAGgtcagt	93.78	8.94
Donor 2	TTGgtaact	82.72	4.27
Donor 3	AGTgtgagt	80.4	6.96

The scoring range for HSF is zero to 100, The scoring range for MES is zero to 10.

现提示,内含子3的剪接受体可能存在选择性剪接倾向,核苷酸替换可能通过改变剪接调控元件的结合特性而影响剪接模式。本研究中15个致病突变均位于剪接位点共识区域内,其中13个突变(86.7%)与中度、重度HB相关,3个突变(20.0%)呈现显著的表型异质性。通过整合HSF、MES和RDDC这3种工具对临床15个突变的剪接预测结果,发现除c.391+7A>G外,其余14个变异(93.3%)均被预测

会影响 pre-mRNA 剪接。进一步分析表明,这些突变可能通过以下机制导致剪接异常:破坏经典剪接位点;激活隐性剪接位点;创建新的剪接位点。具体预测结果详见表4。

### 2.3 微型基因检测载体的构建及剪接分析

为验证计算机预测结果真实性,本研究建立了微型基因剪接报告载体。首先,将外显子4及其侧翼序列(内含子3和内含子4,各约450 bp)克隆至pSPL3载体中,Sanger测序验证WT载体构建的正确性(图3A)。随后,利用特异性引物和FastCloning技术构建15个突变型载体。将构建成功的载体分别转染293T细胞中,培养48 h后提取总RNA,经反转录后进行PCR扩增,最后通过2%琼脂糖凝胶电泳分析剪接产物。实验设置pSPL3载体作为阴性对照,其剪接产物不包含外显子4,为258 bp,WT载体作为阳性对照,其成熟转录本中包含外显子4,预期为372 bp。

剪接分析结果显示,c.278-3A>G和c.391+7A>G突变产生的剪接产物与WT大小相似(372 bp),提示这两个突变可能不影响pre-mRNA的正常剪接。然

表4 突变对应的临床患者信息及生物信息学预测和微型基因剪接实验结果

Table 4 Clinical patient information and bioinformatics prediction as well as minigene splicing assay results corresponding to variations

Mutation	FIX variant database					In silico analysis			Minigene assay	
	Domain	Case	Severity	FIX:C	FIX:Ag	HSF(%)	MES(%)	RDDC	Transcript	Protein change
c.278-1G>T	Intron 3	2	2S	<1	NA	SA broken (-35.57)	SA broken (-167.32)	Insert 168 nt intron 3 Exon skipping	Exon skipping 96 nt deletion of exon 4	p.G94-D131del p.D93- G125delinsG
c.278-1G>C	Intron 3	1	1S	<1	<1	SA broken (-35.57)	SA broken (-157)	Insert 168 nt intron 3 Exon skipping	Exon skipping 96 nt deletion of exon 4	p.G94-D131del p.D93- G125delinsG
c.278-1G>A	Intron 3	2	1Mo	-3-	NA	SA broken (-35.57)	SA broken (-170.23)	Insert 168 nt intron 3 Exon skipping	Exon skipping 96 nt deletion of exon 4	p.G94-D131del p.D93- G125delinsG
c.278-2A>T	Intron 3	2	2S	<1	NA	SA broken (-35.57)	SA broken (-162.84)	Insert 6 nt intron 3 Exon skipping	Exon skipping 96 nt deletion of exon 4	p.G94-D131del p.D93- G125delinsG
c.278-3A>G	Intron 3	8	7S, 1Mo	<1	NA	New SA (+55.07) No SA broken (-147.08)	New SA (+227.53) SA broken (-147.08)	Insert 2 nt intron 3 Exon skipping	2 nt retention of intron 3	p.D93fsTer12
c.391delG	Exon 4	1	1Mo	2.04	NA	New SA (+122.42) New SA (+67.78) SA broken (-74.9)	New SA (+131.98) No SA broken (-241.51)	WT premature Exon skipping	WT premature Exon skipping	p.D131MfsTer2 p.G94-D131del
c.391+1G>T	Intron 4	6	6S	<0-1	NA	SD broken (-27.56)	SD broken (-85.61)	NT	Exon skipping	p.G94-D131del
c.391+1G>A	Intron 4	3	3Mo	1-1.2	<1	SD broken (-27.56)	SD broken (-87.99)	Insert 4 nt intron 4 Exon skipping NT	Exon skipping	p.G94-D131del
c.391+1G>C	Intron 4	4	2S, 1Mo	-0.8-	27	SD broken (-27.56)	SD broken (-84.68)	Insert 4 nt intron 4 Exon skipping NT	Exon skipping	p.G94-D131del
c.391+1insT	Intron 4	1	1S	<1	NA	SD broken (-318.13)	SD broken (-154.06)	No	WT premature Exon skipping	p.D131VfsTer5 p.G94-D131del
c.391+2T>A	Intron 4	1	NA	NA	NA	SD broken (-27.56)	SD broken (-84.68)	Insert 4 nt intron 4 Exon skipping NT	Exon skipping	p.G94-D131del
c.391+2T>C	Intron 4	4	3Mo	8-20	NA	SD broken (-27.56)	SD broken (-80.23)	NT	Exon skipping	p.G94-D131del
c.391+5G>A	Intron 4	3	1Mo	-5-	NA	No	SD broken (-31.47)	NT	Exon skipping NT	p.G94-D131del WT
c.391+5delG	Intron 4	1	NA	NA	NA	SD broken (-12.56)	No	NT	Exon skipping	p.G94-D131del
c.391+7A>G	Intron 4	7	5S, 2Mo	<1-4	<1-3	No	No	NT	Exon skipping NT	p.G94-D131del WT

S indicates severe; Mo indicates moderate; NA indicates no available data; SA indicates splice acceptor; SD indicates splice donor. Numbers represent changes relative to the original score; “-” denotes a decrease and “+” denotes an increase. NT indicates normal transcript; WT indicates wild-type; del indicates deletion; fs indicates frameshift; “No” indicates no effect on splicing.

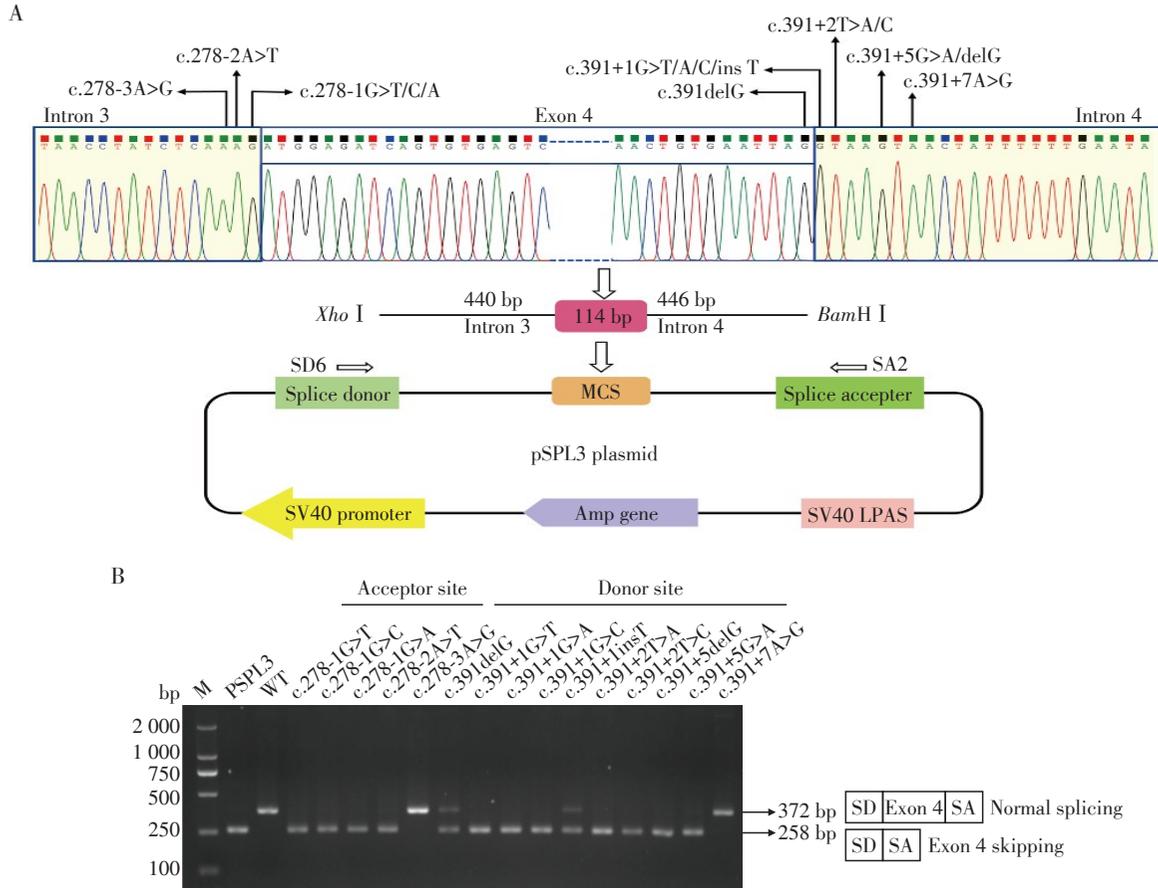
而, c.391delG 和 c.391+1insT 突变产生了两种转录本: 一种与 WT 大小相似(372 bp), 另一种提示可能

存在外显子跳跃(258 bp)现象。值得注意的是, 其余 11 个突变(73.3%)均产生了单一的异常剪接产

物,电泳图上显示这些突变可能完全导致外显子4的跳跃(258 bp),证实了剪接位点突变对 pre-mRNA 剪接模式的显著影响(图3B)。

### 2.4 Sanger测序揭示特异性剪接模式

为精确解析突变诱导的异常剪接模式,本研究对PCR扩增产物进行纯化并克隆至pMD18-T载体,



A: Schematic diagram of minigene splicing detection vector and target variants. SD6 and SA2 are amplification primers, and arrows indicate PCR amplification directions. The position of the site-directed variant is shown above. B: Agarose gel electrophoresis of *in vitro* splicing assays for exon 4. The pSPL3 vector was used as a negative control, and its splicing product did not contain exon 4. The WT vector served as a positive control, and its mature transcript contained exon 4, showing normal splicing.

图3 突变对 pre-mRNA 剪接的影响

Figure 3 Effects of variants on pre-mRNA splicing

经转化、菌落PCR筛选后进行Sanger测序检验。结果显示,除外显子4跳跃外,还鉴定出另外两种异常剪接转录本:①外显子4末端缺失96 nt的异常剪接转录本;②内含子3受体端2 nt保留的异常剪接转录本(图4A)。深入分析表明,c.278-1G>T、c.278-1G>C、c.278-1G>A和c.278-2A>T突变通过破坏经典剪接供体位点导致外显子4跳跃,同时激活外显子4内的隐性剪接供体位点,产生部分外显子4末端缺失96 nt的转录本。值得注意的是,c.278-3A>G突变导致内含子3受体端2 nt的保留,形成移码突变,其机制可能与c.278-3A>G突变后与-4位A组成受体端高保守性“AG”序列有关。对于供体端突变,

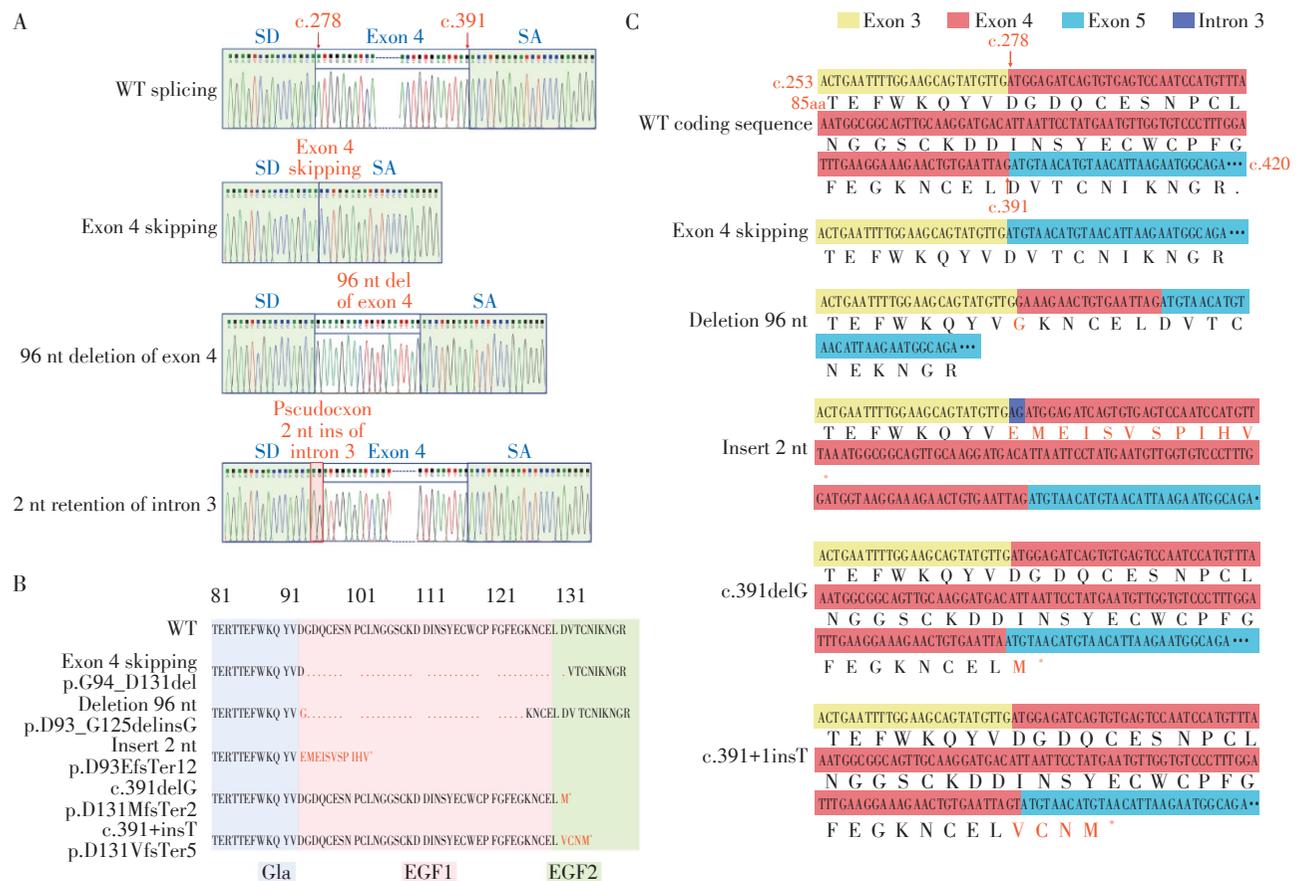
c.391delG和c.391+1insT虽然破坏了经典剪接位点,但是相对内含子来说仍然遵从原有切割位点,提示-1G在剪接调控中的作用有限,剪接体主要识别供体位点的内含子序列。c.391+5G>A和c.391+5delG作为内含子低保守性位点突变,同样导致外显子跳跃,证明了非保守位点的突变对剪接调控的重要影响。其余5个突变(c.391+1G>T、c.391+1G>A、c.391+1G>C、c.391+2T>A、c.391+2T>C)均通过破坏内含子保守位点导致外显子4跳跃。值得注意的是,c.391+7A>G是唯一未影响剪接的突变,提示该位点相对较高的保守性可能与其功能冗余有关。通过对比这些突变的体外剪接模式与预测结果(表4),发

现生物信息学软件能从一定程度上反映突变对剪接的影响,但是不同算法的结果跟实际情况仍存有一定偏差,说明这些预测软件在实际运用中有局限性。

另外,通过分析3种异常剪接转录本及两种移码突变对蛋白编码和结构域的影响(图4B、C),发现:①外显子4跳跃导致FIX蛋白缺失38个氨基酸(EGF1结构域缺失37个氨基酸,EGF2结构域缺失1个氨基酸);②外显子4供体端缺失96 nt导致EGF1结构域缺失32个氨基酸,并使93位氨基酸发生替换;③内含子3受体端保留2 nt在EGF1结构域引入提前终止密码子,导致蛋白质截短。特别值得注意的是,c.391delG和c.391+1insT突变具有双重剪接模式,提示其致病机制可能涉及多种因素。这些发现强调了定量分析不同转录本比例对阐明致病机制的重要性。

### 2.5 变性毛细管电泳定量分析异常剪接转录本比例为精确量化各突变诱导的不同转录本比例,本

研究在Sanger测序基础上,采用荧光标记引物结合变性毛细管电泳技术进行高灵敏度检测。每个样本均进行3次独立重复实验以确保结果的可靠性。毛细管电泳结果证实Sanger测序的发现,且未检测到其他异常产物峰。定量分析显示,WT样本中存在少量(3.82%)外显子4跳跃的异常剪接转录本,提示该位点可能存在基础水平的异常剪接。值得注意的是,c.391+7A>G突变的剪接模式与WT相似,进一步证实该突变不影响pre-mRNA的正常加工。相比之下,受体端突变(c.278-1G>T、c.278-1G>C、c.278-1G>A、c.278-2A>T)和供体端突变(c.391+1G>T、c.391+1G>A、c.391+1G>C、c.391+2T>A、c.391+2T>C、c.391+5G>A和c.391+5delG)导致异常剪接的比例高达100%(表5)。c.278-3A>G突变通过模拟新的保守序列,导致97.4%的转录本受体端保留2 nt的内含子3。对于c.391delG和c.391+1insT突变,分别检测到35.80%和17.73%的移码突变转录本,其余均为外显子4跳跃(表5、图5)。这些发现不仅证实了



A: Comparison of wild-type splicing patterns with three aberrant splicing transcripts. B: Impact of aberrant splicing transcripts on protein-coding. C: Damage to protein functional domains by coding sequence changes.

图4 异常剪接转录本的检测和编码能力分析

Figure 4 Detection and coding ability analysis of abnormal splicing transcripts

表5 不同剪接模式的比例  
Table 5 Proportion of different splicing patterns (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

Variant	WT	Exon 4 skipping	96 nt deletion	2 nt insert	Frame shift
Exon 4	96.18 ± 2.90	3.82 ± 2.90	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
c.278-1G>T	0.00 ± 0.00	97.09 ± 2.61	2.91 ± 2.61	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
c.278-1G>C	0.00 ± 0.00	97.69 ± 2.05	2.31 ± 2.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
c.278-1G>A	0.00 ± 0.00	96.56 ± 0.47	3.44 ± 0.47	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
c.278-2A>T	0.00 ± 0.00	92.63 ± 1.28	7.37 ± 1.28	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
c.278-3A>G	2.60 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	97.40 ± 0.12	0.00 ± 0.00
c.391delG	0.00 ± 0.00	64.20 ± 5.43	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	35.80 ± 5.43
c.391+1G>T	0.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
c.391+1G>A	0.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
c.391+1G>C	0.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
c.391+1insT	0.00 ± 0.00	82.27 ± 6.72	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	17.73 ± 6.72
c.391+2T>A	0.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
c.391+2T>C	0.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
c.391+5G>A	0.78 ± 1.35	99.22 ± 1.35	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
c.391+5delG	0.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
c.391+7A>G	98.38 ± 0.54	1.62 ± 0.54	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

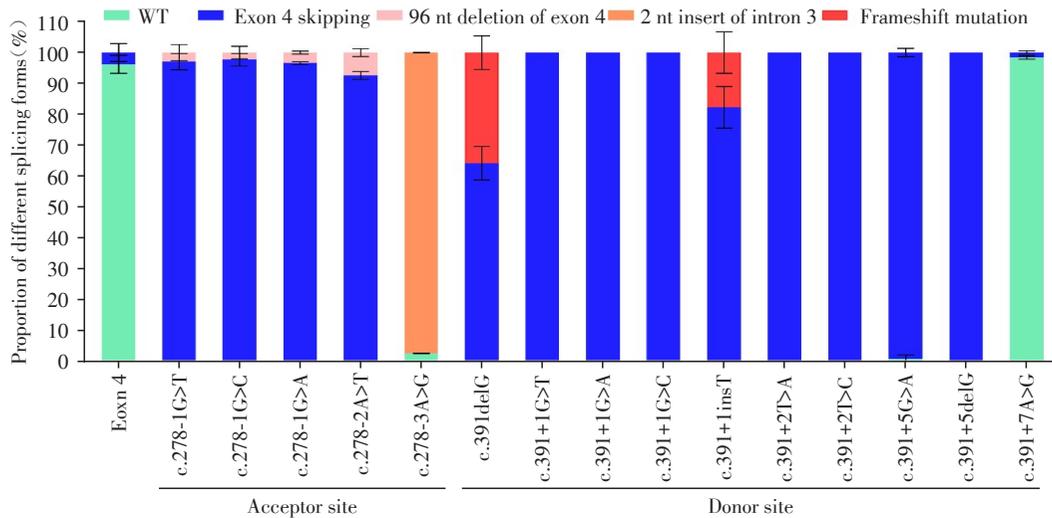


图5 转录本中不同剪接模式的定量分析(n=3)

Figure 5 Quantification of different splicing patterns in transcripts(n=3)

剪接位点突变对 pre-mRNA 加工的显著影响,还揭示了不同突变诱导异常剪接的效率差异,为理解 HB 发病的分子机制提供了重要依据。

### 2.6 异常剪接转录本的体外表达特征及功能分析

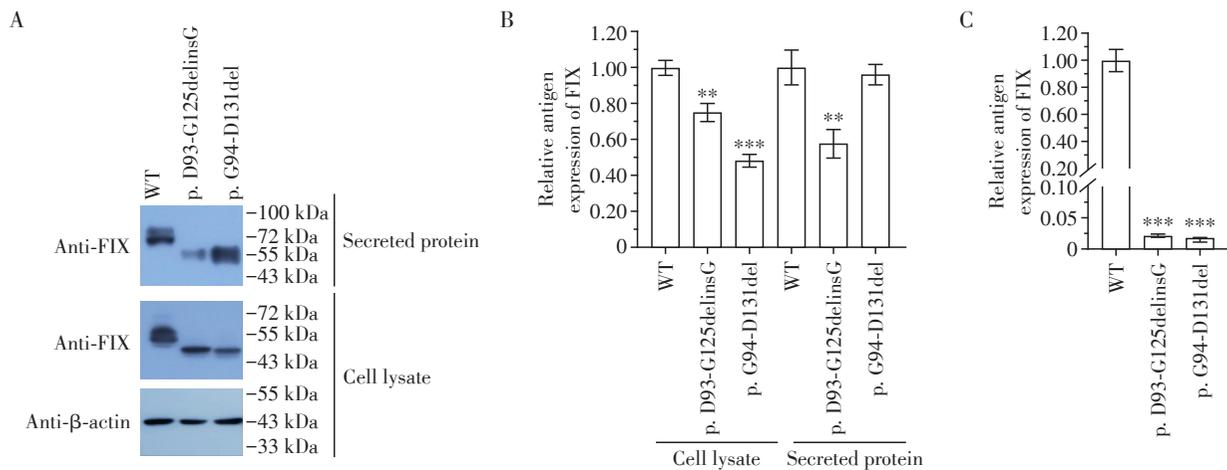
为系统阐明异常转录本对 FIX 蛋白表达和功能的影响,本研究构建了 FIX WT 和两种框内异常剪接转录本(外显子 4 供体端缺失 96 nt 和外显子 4 跳跃)的外源表达载体。将成功构建的载体瞬时转染 293T 细胞,培养 48 h 后收集细胞裂解物和上清液,分别用于检测 FIX 的合成和分泌。Western blot 结果显

示,细胞内 WT FIX 在 55 kDa 呈现特征性双条带,提示可能存在蛋白翻译后修饰机制(图 6A)。与此形成对比的是,突变型 FIX 仅检测到单一蛋白条带,且分子量明显低于野生型 FIX,这与截断转录本编码的缺陷蛋白分子量减小相吻合。另外,值得注意的是,分泌的 WT FIX 在 72 kDa 处出现明显条带,显著大于细胞内 FIX,推测其源于分泌过程中的各种修饰。经 3 次独立实验的统计分析表明,两种突变型 FIX 蛋白:p.D93-G125delinsG 和 p.G94-D131del 与 WT FIX 相比,胞内蛋白表达水平显著降低( $P <$

0.01)。在分泌水平上, p.D93-G125delinsG显著降低 ( $P < 0.001$ ), 而 p.G94-D131del 无明显变化(图6B)。为进一步评估突变型FIX的功能, 采用超滤浓缩管浓缩上清液蛋白样本, 按照标准操作流程测定凝血活性。结果显示, 两种突变型FIX的体外凝血活性均显著低于WT FIX ( $P < 0.001$ , 图6C)。这些发现不仅证实了剪接位点突变对FIX蛋白表达和功能的显著影响, 也为理解HB发病机制提供了重要的实验依据。

### 3 讨论

近年来, 随着HB诊疗水平的提高, 大量致病突变被相继发现<sup>[9]</sup>。这些致病突变是研究蛋白功能、探究疾病发病机制的重要工具。编码区突变作为疾病产生的主要原因之一, 已被广泛研究<sup>[8, 22]</sup>。然而, 除编码区之外, 非编码区的突变同样可导致疾病产生<sup>[13]</sup>。目前, 针对突变效应, 多采用生物信息学预测其对pre-mRNA剪接的影响<sup>[23-26]</sup>, 但是现阶段



A, B: Relative expression and secretion of FIX antigen from two aberrant splicing expression vectors (p.D93-G125delinsG and p.G94-D131del) in 293T cells. C: Relative coagulation activity of aberrant splicing expression vector antigens. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

图6 异常剪接转录本的体外FIX抗原表达及活性分析

Figure 6 *In vitro* analysis of FIX antigen expression and activity for aberrant splicing transcripts

生物信息学预测结果的可靠性仍有待验证。因此对内含子中突变的确切剪接模式进行研究不仅有利于分析不同突变确切的致病机制, 更为生物信息学预测提供理论依据以提高预测的准确性。据此, 本研究通过序列分析确认F9基因剪接位点的保守序列特征, 认为剪接位点及其侧翼序列的突变可能通过影响剪接调控而干扰pre-mRNA的正常加工过程。随后, 通过查找内含子中致病突变的定位, 一共筛选了15个可能影响F9基因外显子4正常剪接的靶突变, 并联合微型基因剪接和变性毛细管电泳等方法对上述突变的具体剪接模式进行分析。

通过比对分析不同突变位点保守性及引起的剪接模式差异, 本研究发现内含子中剪接共识区间内的核苷酸突变可通过多种机制影响pre-mRNA剪接: ①削弱经典剪接位点识别; ②增强隐性剪接位点的利用; ③创建新的剪接位点。部分突变(如c.391+1G>T, c.391+1G>A, c.391+1G>C, c.391+2T>A、

c.391+2T>C等)通过削弱经典剪接位点识别导致外显子跳跃, 其他突变(如c.278-1G>T, c.278-1G>C, c.278-1G>A等)通过增强隐性剪接位点利用, 引起部分外显子4末端96 nt的缺失, c.278-3A>G通过创建新的剪接位点造成内含子3受体端2 nt保留, 值得关注的是, 单纯基于GT-AG序列保守性无法准确预测具体剪接模式。例如: 低保守核苷酸位点突变(如c.391+5G>A和c.391+5delG)显著破坏经典剪接位点, 导致外显子4跳跃, 而高保守剪接位点突变(如c.391+1insT和c.391delG)相对内含子来说是正常剪接, 这一发现挑战了传统的剪接调控认知, 丰富了对剪接调控复杂性的认识。

目前, 剪接位点选择的分子机制尚未完全阐明, 实际剪接序列的多样性源于多种蛋白质(如SR、hnRNP等)的协同作用来实现对剪接事件的精细调控<sup>[27-29]</sup>, 这种复杂性使得特定剪接模式的精准预测极具挑战。本研究还强调了拓展致病突变分类框架的重要性, 传统观点认为遗传信息遵循中心法

则,即DNA→RNA→蛋白质的传递路径,将遗传变异归类为错义、无义、移码等类型。然而需要特别指出的是,基因转录和RNA加工过程先于翻译。如被归类为移码突变的c.391delG,实际上64.2%的转录本表现为剪接异常而非直接改变编码序列,强调了阐明RNA加工和拓展致病分类的重要性。

HB作为一种高度异质性的疾病<sup>[30]</sup>,其基因型和表型关系的复杂性一直是研究难点。尤其是部分携带相同突变的患者可能表现出不同的出血倾向,这进一步凸显阐明每个致病突变机制的重要性。针对内含子突变,虽然当前大数据和计算机算法模型可对其剪接效应进行预测分析,但其结果的准确性尚不足以作为疾病精准诊疗的依据。本研究通过综合评估突变位点、疾病严重程度及生物信息学预测结果,优先选择位于剪接位点保守区域(特别是经预测可能破坏正常pre-mRNA剪接且导致中度或重度HB)的突变作为研究对象,采用3种不同算法的预测工具进行交叉验证,发现这些工具的预测结果存在差异,且与剪接实验结果并不完全一致。尽管微型基因剪接实验存在局限,如截短的DNA片段可能无法涵盖所有潜在剪接位点,细胞水平的观察可能无法完全反映患者生理状态,但结合Sanger测序,该方法仍是研究基因剪接的“金标准”。

综上所述,本研究证实剪接位点共识区突变易导致pre-mRNA剪接缺陷,在鉴定这些突变的致病机制时,必须系统评估其对pre-mRNA剪接的潜在影响。这一发现为精准医疗时代的遗传咨询和个体化治疗提供了重要理论依据,同时也为其他遗传性疾病的分子诊断提供了可借鉴的研究范式。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明没有利益冲突。

#### Conflict of Interests:

The authors declare that they have no conflict of interests.

#### 作者贡献声明:

高蒙、沈滢设计研究方案;马金实施研究方案和分析数据;马金、高蒙和沈国民撰写和修改论文。

#### Author's Contributions:

GAO Meng and SHEN Yan designed the research plan; MA Jin conducted the research and analyzed the data; MA Jin, GAO Meng, and SHEN Guomin wrote and revised the manuscript.

#### [参考文献]

[1] BERNTORP E, FISCHER K, HART D P, et al. Haemo-

- philia[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7: 45
- [2] PACHECO L D, SAADE G R, JAMES A H. Von willebrand disease, hemophilia, and other inherited bleeding disorders in pregnancy [J]. *Obstet Gynecol*, 2023, 141(3): 493-504
- [3] SHARMA A, EASOW M M, SRIGANESH V, et al. Gene therapy for haemophilia[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020, 2020(4): CD010822
- [4] MILLER C H. The clinical genetics of hemophilia B (factor IX deficiency) [J]. *Appl Clin Genet*, 2021, 14: 445-454
- [5] KATNENI U K, ALEXAKI A, HUNT R C, et al. Structural, functional, and immunogenicity implications of F9 gene recoding[J]. *Blood Adv*, 2022, 6(13): 3932-3944
- [6] SHEN G M, GAO M, CAO Q, et al. The molecular basis of FIX deficiency in hemophilia B [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2762
- [7] KROOSS S, WERWITZKE S, KOPP J, et al. Correction: Pathological mechanism and antisense oligonucleotide-mediated rescue of a non-coding variant suppressing factor 9 RNA biogenesis leading to hemophilia B [J]. *PLoS Genet*, 2021, 17(1): e1009345
- [8] ZHANG H Y, CHEN C M, WU X, et al. Effects of 14 F9 synonymous codon variants on hemophilia B expression: Alteration of splicing along with protein expression [J]. *Hum Mutat*, 2022, 43(7): 928-939
- [9] XU Z Q, SPENCER H J, HARRIS V A, et al. An updated interactive database for 1 692 genetic variants in coagulation factor IX provides detailed insights into hemophilia B [J]. *J Thromb Haemost*, 2023, 21(5): 1164-1176
- [10] ANGUELA X M, HIGH K A. Hemophilia B and gene therapy: a new chapter with etranacogene dezaparvovec [J]. *Blood Adv*, 2024, 8(7): 1796-1803
- [11] BURATTI E, CHIVERS M, KRÁLOVICOVÁ J, et al. Aberrant 5' splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(13): 4250-4263
- [12] ANNA A, MONIKA G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation [J]. *J Appl Genet*, 2018, 59(3): 253-268
- [13] VAZ-DRAGO R, CUSTÓDIO N, CARMO-FONSECA M. Deep intronic mutations and human disease [J]. *Hum Genet*, 2017, 136(9): 1093-1111
- [14] ODAIRA K, KAWASHIMA F, TAMURA S, et al. F9 mRNA splicing aberration due to a deep intronic structural variation in a patient with moderate hemophilia B [J]. *Thromb Res*, 2022, 213: 91-96
- [15] WALDROP M A, MOORE S A, MATHEWS K D, et al. In-

- tron mutations and early transcription termination in Duchenne and Becker muscular dystrophy [J]. *Hum Mutat*, 2022, 43(4): 511-528
- [16] XU X W, ZHANG X J, ZHANG M Y, et al. A rare ACAN non-canonical splicing-site intron variant results in familial short stature [J]. *Gene*, 2024, 925: 148602
- [17] LEE Y, RIO D C. Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing [J]. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84: 291-323
- [18] BRADLEY R K, ANZUKÓW O. RNA splicing dysregulation and the hallmarks of cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(3): 135-155
- [19] ROGALSKA M E, VIVORI C, VALCÁRCEL J. Regulation of pre-mRNA splicing: roles in physiology and disease, and therapeutic prospects [J]. *Nat Rev Genet*, 2023, 24(4): 251-269
- [20] SHENASA H, BENTLEY D L. Pre-mRNA splicing and its cotranscriptional connections [J]. *Trends Genet*, 2023, 39(9): 672-685
- [21] CAMINSKY N, MUCAKI E J, ROGAN P K. Interpretation of mRNA splicing mutations in genetic disease: review of the literature and guidelines for information-theoretical analysis [J]. *F1000Res*, 2014, 3: 282
- [22] ZHANG H Y, XIN M, LIN L Y, et al. Pleiotropic effects of different exonic nucleotide changes at the same position contribute to hemophilia B phenotypic variation [J]. *J Thromb Haemost*, 2024, 22(4): 975-989
- [23] FRAILE-BETHENCOURT E, VALENZUELA-PALOMO A, DÍEZ-GÓMEZ B, et al. Mis-splicing in breast cancer: identification of pathogenic BRCA2 variants by systematic minigene assays [J]. *J Pathol*, 2019, 248(4): 409-420
- [24] MEIRELES M R, BRAGATTE M A S, BANDINELLI E, et al. A new in silico approach to investigate molecular aspects of factor IX missense causative mutations and their impact on the hemophilia B severity [J]. *Hum Mutat*, 2019, 40(6): 706-715
- [25] CHEN P H, WANG L H, CHAI Y C, et al. Detection and functional verification of noncanonical splice site mutations in hereditary deafness [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 773922
- [26] DE SAINTE AGATHE J M, FILSER M, ISIDOR B, et al. SpliceAI-visual: a free online tool to improve SpliceAI splicing variant interpretation [J]. *Hum Genomics*, 2023, 17(1): 7
- [27] HOLMES M E, HERTEL K J. Interdependent regulation of alternative splicing by SR and hnRNP proteins [J/OL]. *bioRxiv*, 2024 [2024-08-19]. DOI: 10.1101/2024.08.19.608666
- [28] TAO Y N, ZHANG Q, WANG H Y, et al. Alternative splicing and related RNA binding proteins in human health and disease [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9: 26
- [29] ZHANG Q, AI Y X, ABDEL-WAHAB O. Molecular impact of mutations in RNA splicing factors in cancer [J]. *Mol Cell*, 2024, 84(19): 3667-3680
- [30] GOODEVE A C. Hemophilia B: molecular pathogenesis and mutation analysis [J]. *J Thromb Haemost*, 2015, 13(7): 1184-1195
- (收稿: 2025-03-10; 修回: 2025-05-06; 录用: 2025-06-01)  
(本文编辑: 陈汐敏)

(上接第54页)

- Microbiol*, 2025, 51(2): 246-263
- [22] SEN S, BAL S K, YADAV S, et al. Intracellular pathogen *Leishmania* intervenes in iron loading into ferritin by cleaving chaperones in host macrophages as an iron acquisition strategy [J]. *J Biol Chem*, 2022, 298(12): 102646
- [23] JIANG L, ZHENG H, ISHIDA M, et al. Elaborate cooperation of poly (rC)-binding proteins 1/2 and glutathione in ferroptosis induced by plasma-activated Ringer's lactate [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 214: 28-41
- [24] GUO F, WU Y Z, WANG G J, et al. Role of PCBP2 in regulating nanovesicles loaded with curcumin to mitigate neuroferroptosis in neural damage caused by heat stroke [J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 800
- [25] JIA K X, ZHANG Y H, LI F H, et al. Acteoside ameliorates hepatocyte ferroptosis and hepatic ischemia-reperfusion injury *via* targeting PCBP2 [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2025, 15(4): 2077-2094
- [26] YUE L, LUO Y G, JIANG L, et al. PCBP2 knockdown promotes ferroptosis in malignant mesothelioma [J]. *Pathol Int*, 2022, 72(4): 242-251
- [27] CHENG J H, TAO J, LI B Q, et al. Swine influenza virus triggers ferroptosis in A549 cells to enhance virus replication [J]. *Virol J*, 2022, 19(1): 104
- (收稿: 2025-08-15; 修回: 2025-09-18; 录用: 2025-10-18)  
(本文编辑: 陈汐敏)