

·综述·

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2018.02.02

长链非编码 RNA 的功能与疾病治疗的潜力

隗思媛, 孟 畅, 李淑艳*

(北京大学基础医学院 生物化学与分子生物学系, 北京市蛋白质翻译后修饰和细胞功能重点实验室, 北京 100191)

摘要 人类基因组转录本长度 >200 nt(核苷酸)、不编码蛋白质的 RNA 分子为长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)。lncRNA 可在多个层面调节基因表达, 其功能失调与包括肿瘤在内的很多人类疾病密切相关。本文概述 lncRNA 的种类、功能与疾病的关系, 讨论基于 lncRNA 基因编辑、干细胞修饰及其与 miRNA、蛋白质相互作用等的治疗潜能。

关键词 长链非编码 RNA; 表观调控; 功能; 治疗策略; 肿瘤

中图分类号 Q75

Function of Long Non-Coding RNA and Its Potentials for Clinical Therapy

KUI Si-Yuan, MENG Chang, LI Shu-Yan*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Key Laboratory of Protein Posttranslational Modifications and Cell Function, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract Long non-coding RNAs (lncRNAs) are a class of noncoding transcripts with lengths longer than 200 nucleotides lacking of protein-coding capability in human genome. lncRNAs can regulate gene expression at multiple levels, including chromosome remodeling, transcription and post-transcriptional processing. In addition, dysregulation of lncRNAs plays an important role in many human diseases, including cancer. Here, we reviewed the categories, functions of lncRNAs and the relation with diseases, and discussed the therapeutic strategy of lncRNA in clinic application based on gene editing, stem cell modification and the interaction between lncRNA, miRNA and protein.

Key words long non-coding RNA; epigenetic regulation; function; therapeutic strategy; tumor

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类非编码 RNA, 通过染色质、基因转录及转录后调控、核结构调控、信号转导及酶活性调节等机制广泛参与细胞的发育、分化、生长及凋亡等生物学过程。lncRNA 异常表达或基因突变引起包括出生缺陷、肿瘤等在内的人类多种疾病^[1], 成为某些重大疾病治疗的潜在靶点^[1,2]。

1 lncRNA 的种类

lncRNA 是指长度 >200 nt(核苷酸)而无蛋白质编码功能的一类非编码 RNA, 序列保守性较低。lncRNA 种类很多, 有多种分类方式。当前流行的 lncRNA 分类法包括根据其分子结构特性、序列性质或起源、相互作用分子、细胞内功能定位、顺/反式功能、是否影响染色质的修饰或结构等进行分类。按序列性质/起源, lncRNA 通常分为正义(sense)、反义(antisense)、基因间(intergenic)、内含子

(intronic)、正义重叠 lncRNA, 以及增强子 RNA (enhancer RNAs, eRNAs)。增强子 RNA 由增强子序列衍生而来, 长度在 2 kb 以内^[3]。根据作用方式, lncRNA 可分为顺式作用 lncRNA 和反式作用 lncRNA。前者沉默或激活同一染色体的基因表达; 后者对另一染色体的基因产生激活或抑制作用^[4]。某些 lncRNA 可作为竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 发挥作用, 即众所周知的

收稿日期: 2017-09-22; 修回日期: 2017-10-25; 接受日期: 2017-12-11
国家基础科学人才培养基金(No. J1030831/J0108)资助项目

* 通讯作者 Tel: 010-82801622; E-mail: shuyanli@bjmu.edu.cn.

Received: September 22, 2017; Revised: October 25, 2017; December 11, 2017

Supported by National Fund for Forstering Talents of Basic Science (No. J1030831/J0108)

* Corresponding author Tel: 010-82801622;

E-mail: shuyanli@bjmu.edu.cn

“miRNA 海绵”作用,靶向隔绝 miRNA 作用,保护基因免受 miRNA 作用而降解,促进靶基因 mRNA 翻译上调。还可依据形状将 lncRNA 分为线性 (linear RNA, lincRNA) 和环状 RNA (circular RNA, circRNA)。lincRNA 包括核糖体 RNA 和核糖核酸酶 P。内源性 circRNA 最早于 1979 年在 HeLa 细胞中发现,但在当时被认为是隐蔽性病毒 RNA^[5]。lncRNA 结构研究尚处于起步阶段,解析 lncRNA 结构框架将能更好地理解 lncRNA 的作用机制。

2 lncRNA 的功能

尽管有按功能将 lncRNA 分类,但绝大多数 lncRNA 的功能和作用机制尚待揭示。就目前所知, lncRNA 的功能主要有如下几个方面。

2.1 lncRNA 调控染色质状态和基因活性

lncRNA 通过 RNA-蛋白质相互作用,使所在染色质发生组蛋白、DNA 修饰和核小体定位改变,以及组蛋白变异体的置换,参与染色质重塑,调节基因活性。例如, lncRNA HOTAIR 可结合组蛋白甲基转移酶的复合物——多梳蛋白阻遏复合体 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2),使处于 *HOXD* 基因位点的组蛋白 H3K27 发生三甲基化 (H3K27me3),沉默 *HOXD* 基因表达^[6]。由 *Xist* 基因编码的 lncRNA RepA 也可结合 PRC2,使 X 染色体的组蛋白 H3K27 发生三甲基化,使 X 染色体失活;维持 H3K27me3 附着于失活的染色体还需要其他额外的 lncRNA^[7]。现已证明,在很多情况下,一些特定的 lncRNA 可结合各种具有甲基转移酶或脱甲基酶活性的染色质调节因子,调节染色质状态,阻遏或促进所在染色质基因的表达。例如, lncRNA *Airn* 可结合甲基转移酶 EHMT2/G9A,催化 H3K9 甲基化,抑制 *SLC22 A3* 基因启动子的转录激活^[8]。lncRNA *Kcnq1ot1* 在结合 EHMT2/G9A 的同时,还与 PRC2 结合,通过组蛋白甲基化修饰调控染色质状态,阻遏基因表达^[9]。lncRNA 通过染色质重塑激活基因表达的例子是 HOTTIP。lncRNA HOTTIP 是 *HOXA* 基因远端转录本的反义 RNA,通过弯曲、成环而靠近远离 *HOXA* 基因簇的其他位点,招募 KMT2A/MLL (histone-lysine N-methyltransferase 2 A/mixed-lineage leukemia) 复合体,促进 H3K4me3 在 *HOXA* 基因簇定位,活化染色质,促进同源异形基因的表达^[10]。

lncRNA 还可通过顺式作用方式为 DNA 甲基化提供信号。在核糖体 DNA (rDNA) 基因簇,与启动

子反义的 lncRNA 形成 R-环,与双链 DNA 杂交并结合,形成三链结构;这种三链杂交体可招募甲基转移酶 DNMT3B (DNA methyltransferase 3B),催化局部 rDNA 甲基化,导致 rDNA 沉默^[11]。在印记基因——*RASGRF1* (Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1) 基因座,一种跨越甲基化印记的 lncRNA 与 piRNA (Piwi-interacting RNA) 相互作用,维持 *RASGRF1* 基因甲基化^[12]。在 rDNA 甲基化过程中,这类 piRNA 的靶 RNA (lncRNA) 也是通过顺式作用方式发挥功能^[13]。此外,某些 lncRNA 还能以 R-环形式与某些启动子的 CpG 岛杂交,防止甲基化的发生,执行这类功能的 lncRNA 大多是一些无多聚 A 序列的额外编码 RNA [poly(A)⁻ extra-coding RNA],它们可扣留 DNMT1 (DNA methyltransferase 1),防止 DNA 甲基化^[14]。

lncRNA 还可调控 DNA 的乙酰化修饰。在出芽酿酒酵母细胞中, *IME1* (inducer of meiosis 1) 基因始终被阻遏子 RME1 (regulator of meiosis 1) 阻遏转录而沉默,这是因为 RME1 诱导了 lncRNA IRT1 (*IME1* regulatory transcript) 表达,而 IRT1 覆盖整个 *IME1* 启动子,以顺式作用方式占据局部核小体,并招募脱乙酰化酶 Set3,导致启动子脱乙酰基,使 *IME1* 靶基因延迟激活或沉默^[15];在此过程中, ncRNA 诱导的 H3K4me2 也参与招募 Set3^[15]。

2.2 lncRNA 在转录和翻译水平调控基因表达

lncRNA 在细胞内分布和定位不同,其功能也不尽相同。细胞核 lncRNA 既可通过调节局部染色质活化状态影响基因表达,又可通过非染色质途径直接调节基因表达。例如, lncRNA *GAS5* (growth arrest-specific 5) 和 *PANDA* (promoter of *CDKN1A* antisense) 可直接与转录因子结合,限制后者与 DNA 靶序列结合^[16]。p53 诱导的 lncRNA *PANDA* 作为一种“诱饵”结合转录因子 NF-YA,阻碍 NF-YA 对细胞死亡蛋白编码基因的转录激活^[16]。此外, lncRNA *Airn* 也可通过直接干扰转录激活,沉默印迹基因 *IGF2R* 表达^[17]。一般认为,细胞核 lncRNA 直接干扰转录,可完全并有效地控制局部基因的表达。

细胞质 lncRNA 可直接影响 mRNA 剪接、降解、稳定性及翻译过程,也可通过与 miRNA 相互作用,正性或负性调节 mRNA 翻译。lncRNA *MALAT1* 可与一类丝氨酸-精氨酸剪接因子 (serine-arginine splicing factors, SRSFs) 结合,将其定位在特异的核域,同时, *MALAT1* 还可与前体 mRNA 结合,调控前体 mRNA 的剪接^[18]。某些参与剪接调控的 lncRNA

由内含子编码,其转录后加工依赖核仁小 RNA (snoRNA)。由 FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2) 基因座产生的反义 lncRNA 可通过影响局部组蛋白的甲基化状态,控制前体 mRNA 局部可变剪接位点的选择性^[19]。反义 lncRNA 调节翻译过程的另一例子是由 UCHL1 (ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1) 编码基因对应的反义 lncRNA,它可通过与 SINEB2 (short interspersed nuclear element B2) 类似的重复序列调控 UCHL1 的翻译^[20]。基因间 lncRNA Linc-p21 也是通过与靶基因(如 CTNNB1 和 JUNB)的 mRNA、翻译阻遏子 Rck 直接结合,阻遏靶基因翻译^[21]。

除上述作用机制,lncRNA 还可通过与其他 ncRNA 相互作用,调控基因表达。例如,lncRNA 作为一种竞争性内源 RNA 结合和扣留 miRNA,限制后者对靶基因翻译的调节作用。关于这方面的认识国内已有较多综述,这里不再赘述。

2.3 lncRNA 调控和维持细胞核域结构

lncRNA 还有很多其他功能,包括染色体之间的相互作用和高级结构的维系。这里集中介绍其在维持和调节细胞核结构中的作用。细胞核结构具有为分子的“住址”编码的作用,有人称其为住址密码(address code)(类似邮政编码)。lncRNA 就是这种编码的关键组分,在细胞核内形成与各种基因活化状态有关的结构域或功能域,调节蛋白质复合体、基因和染色体活动^[2]。lncRNA 为基因招募蛋白质因子,使基因活动,形成特异的细胞核局部定位,即细胞核域(nuclear domain),与执行特殊功能相关。与其他亚细胞器不同,核域结构没有膜包裹,而是通过相关分子-分子相互作用联系在一起。核域结构常常围绕基因转录位点形成,发挥分子锚的作用。目前认识比较清楚的核域结构是 Paraspeckle(副斑纹)域结构,它是以 lncRNA NEAT1 作为基本结构组分,有蛋白质参与,在细胞核局部聚集形成的核体(nuclear body)^[2]。核域结构以 RNA 依赖的方式呈动态变化。甲基化的多梳蛋白阻遏复合体 2 (PRC2/Pc2) 与 lncRNA TUG1 结合,形成多梳蛋白体(polycomb body),阻遏其内的基因表达;相反,脱甲基的 PRC2 与 lncRNA MALAT1/NEAT2 结合,形成间染色质颗粒(interchromatin granule),激活基因表达。在血清刺激引起的反应中,脱甲基酶 KDM4C 被招募到 E2F 靶基因启动子,使相邻的 PRC2 脱甲基,这可以解释(血清内的)生长因子为何能以细胞周期特异的方式激活 E2F 依赖的基因的表达,促进

细胞增殖。上述例子说明,依赖 lncRNA 调节的 PRC2 甲基化状态决定基因的表达;而多梳蛋白(复合)体和间染色质颗粒就是以 lncRNA 为基础形成的细胞核域结构。

3 lncRNA 与疾病的关系

前面概述了 lncRNA 在染色体、基因转录和核域编码中的调控作用。此外,lncRNA 作为细胞信号应答产物,影响细胞内信号级联反应。所有上述 lncRNA 的作用无不与细胞发育、分化、凋亡及代谢等调节密切相关。当有染色体缺失和转位时,可引起 lncRNA 功能失调,并导致其参与了很多生理和病理过程^[2,22]。

3.1 lncRNA 与干细胞调控及遗传病

lncRNA 是胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)增殖、存活或死亡和分化的重要调节子。例如,lncRNA GAS5 (growth-arrest-specific transcript 5) 通过抑制 miRNA 介导的 NODAL 降解,维持人 ESC 的多能性^[23]。转录调节因子 NRF2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor) 可阻遏 lncRNA ROR 的表达,二者协同调节乳腺干细胞的自我更新和存活^[24]。就机制而言,lncRNA 常与 miRNA 和 mRNA 相互作用,组成复杂的网络调控机制,维持正常 ESC 的自我更新和分化;一旦 lncRNA 功能失调则引起细胞发育异常和疾病。

目前,已发现几种 lncRNA 功能失调与孟德尔遗传病有关。面肩胛臂肌萎缩营养不良(facioscapulohumeral muscular dystrophy, FSHD)系因位于 4q35 的 D4Z4 重复序列拷贝数减少,引起 lncRNA “启动子突变”,扰乱了 lncRNA DBE-T 对位于 4q35 的基因调节而引起^[25]。尽管导致 HELLP 综合征(溶血、肝内酶活性升高及血小板减少)的准确机制尚不清楚,但现已知其发生与位于 12q23.2 的 C12 或 f48 与 IGF1 之间的基因转录生成的 HELLP lncRNA 有关^[26]。染色体转位引起可遗传的结构和基因改变。lncRNA (DA125942) 以顺式方式与 PTHLH 相互作用,以反式与 SOX9 相互作用,促进两基因的表达。最近发现,E 型短指(趾)(brachydactyly type E, BDE)患者 lncRNA (DA125942) 与 2 个基因的相互作用减弱^[27],提示 BDE 与 lncRNA (DA125942) 功能失调有关。此外,很多遗传性畸形综合症,与从亲代继承的甲基化沉默的 lncRNA H19 等位基因拷贝以及 IGF2 表达有关^[22]。

3.2 lncRNA 与生殖系统疾病

lncRNA 失调与各种生殖系统疾患有关^[22]。在多囊卵巢综合症(血清雄激素水平升高、停经或月经失调及不育)中,常有 lncRNA SRAP/SRA1 和 CTBP1-AS1 (carboxy-terminal binding protein 1, antisense transcript 1) 过表达。与健康人相比,在不能减数分裂的原发不育男性,有 lncRNA LOC100507205 在内的 3 个基因拷贝数变异。在胎盘膜早熟破裂的患者,大约有 10 多种 lncRNA 表达水平与常人比较存在明显差异。此外,许多 lncRNA 与前列腺疾病有关,如 PCGEM1 和 PCNR1 常在浸润性前列腺腺癌过表达;而 lncRNA NEAT1 则与雄激素不敏感前列腺癌(即雄激素非依赖型)的恶性进展有关。

3.3 lncRNA 与心血管系统疾病

很多 lncRNA 与心血管发育和疾病有关。Braveheart 是最早被鉴定出的心脏发育所必需的一种 lncRNA^[26]。lncRNA Fendrr、PRC2 和 TrxG/MLL (trithorax group/myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia) 相互作用参与心脏发育调控^[27]。其他参与心脏发育调控的 lncRNA 还有 TERMINATOR、ALIEN 和 PUNISHER^[28]等。

此外,lncRNA 还与心血管平滑肌的命运相关。例如,lncRNA ANRIL 基因变异增加心血管病发生的危险性^[29];lncRNA-RNCR3 则与动脉粥样硬化相关的血管功能失调相关^[30]。最新研究发现,lncRNA 可能在 miRNA 转录过程中发挥“宿主”样作用,如 lncRNA H19^[31] 和 lnc-Ang362^[32] 可分别促进 miR-675 或 miR-222、miR-221 的表达和细胞增殖。lncRNA SENCER 与平滑肌和内皮细胞迁移以及分化有关^[33];其功能失调可能涉及动脉血管瘤的发生。研究证明,血清反应因子 MYOCD 和 TGF- β /SMAD 途径的靶标——lncRNA MYOSLID 通过改变血管平滑肌细胞表型和 TGF- β 参与动脉血管瘤的发生^[34]。另外,lncRNA GAS5 通过改变内皮细胞的激活、增殖和平滑肌细胞表型,以及血管内皮细胞-平滑肌细胞通讯等参与高血压相关的血管重塑^[35]。

鉴于在心血管发育和心血管病发生中的作用,某些 lncRNA 可作为心肌和血管细胞功能检测的标志物或调节子。例如,线粒体 lncRNA uc022bqs.1 (LIPCAR) 可作为心脏重塑、预测未来心力衰竭预后的标志物^[36,37]。Novlnc6 在扩张性心肌病表达发生异常^[38]。lncRNA H1A1A-AS2、KCNQ1OT1 (potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1

opposite strand/antisense transcript 1)、心肌梗塞相关转录本 (myocardial infarction-associated transcript, MIAT) 和 MALAT1 的表达水平,可作为预测心肌梗塞患者预后的标志物^[39]。其中,ANRIL 参与葡萄糖和脂肪酸代谢相关基因的调节,是冠状动脉疾病的遗传风险因子。KCNQ1OT1 通过表观遗传调控,促进阻遏性染色质结构形成^[9],调节 KCNQ1 表达,参与心脏发育调控。全基因组关联分析显示,MIAT 基因变异可能与个体对心肌梗死的敏感性相关。MALAT1 对糖尿病伴有心血管并发症患者,有调节内皮细胞和血管炎症的功能^[40]。

3.4 lncRNA 与糖尿病性视网膜病变

糖尿病性视网膜病变通常伴有炎症反应、新生血管的增殖和动脉瘤形成。MIAT 在中枢及外周神经系统中选择性表达,调控视网膜细胞生长分化。高糖能显著上调 lncRNA-MIAT 的表达水平^[41];而 MIAT 下调可减轻糖尿病诱导的视网膜新生血管增殖、血管渗漏和炎症反应。前已述及,MALAT1 参与内皮细胞增殖和血管炎症反应,下调 MALAT1 可降低血管内皮细胞增殖、迁移和管腔形成^[40]。lncRNA MEG3 可介导 p53 表达,抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡^[42]。在链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠视网膜细胞、高糖和氧化损伤处理的内皮细胞中,MEG3 表达显著下调。上述发现提示,长链非编码基因 MIAT、MALAT1 和 MEG3 参与了糖尿病视网膜微血管病变,因此,可能成为糖尿病视网膜微血管病变治疗和干预的新靶点^[43]。

3.5 lncRNA 与肿瘤

癌基因组突变分析提示,在非编码基因组存在很多与人类疾病相关的突变,导致 lncRNA 表达失调和“功能突变”。随之,lncRNA 转录调节失常为恶性转化提供信号,通过与 DNA、蛋白质及其他 RNA 等相互作用,赋予肿瘤恶性表型。240 例肝细胞癌的基因表达、预后和转归分析证明,8 种 lncRNA 在肝癌的高表达促进肝癌组织血管新生,它们的表达水平是与肝癌总生存率和无病生存期关联的可信因素;其中,lncRNA H19 和 MEG3 与高甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 水平一致,是高危因素^[44]。此外,与传统的肝癌标志物 AFP 相比,3 条 lncRNA (RP11-160H22.5, XLOC_014172 和 LOC149086) 可能是预测肿瘤发生的潜在标志物,而 XLOC_014172 和 LOC149086 是预测肿瘤转移的潜在标志物^[45]。另外,SPRY4-IT1 是膀胱尿路上皮癌患者总生存率的独立预后因素^[46]。在预测乳腺

癌患者的预后方面,评估 lncRNA 与转移的关系,其敏感性超过 90%,特异性达 64%~65%^[47,48]。

众所周知,TP53 在超过半数的肿瘤发生突变。最近有研究比较分析了活化和阻遏组蛋白的人胚胎干细胞(hESCs)的差异表达谱,发现在 ESC 分化过程有 40 个依赖 p53 的 lncRNA 基因被激活或阻遏,提示它们的表达状态可能与 ESC 的自我更新或分化有关;其中有 1 个被 p53 阻遏的全能性特异的 lncRNA,它通过与 SIRT6 相互作用,阻滞后者在染色质定位,维持 H3K56 和 H3K9 高乙酰化状态,从而利于全能性相关基因的表达,保护 ESC 全能性^[49]。该结果提示,通常被 p53 阻遏的 lncRNA 可能在 TP53 突变的肿瘤发生强劲表达;换言之,通常表达水平极低的 lncRNA 在肿瘤高表达,可能在诊断、治疗中具有较大参考价值。

4 lncRNA 与疾病治疗策略

鉴于人类基因组仅有 2%~3% 的基因编码蛋白质,因此,针对蛋白质上游的 DNA 和 mRNA,发展特异靶标的基因编辑技术及 RNA 药物近些年正在兴起。目前探索 RNA 药物的注意力集中在 mRNA(补偿缺陷蛋白质)、siRNA(small interfering RNA)、miRNA 和反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASOs)(下调蛋白质)方面,但伴随对 lncRNA 认识的逐渐深入,以 lncRNA 为基础的诊断、治疗将逐渐成为分子治疗的主角。

4.1 基于 lncRNA 的治疗潜力

lncRNA 对表达调节更精细,与 mRNA 比较, lncRNA 表达的细胞或组织特异性会更高^[51]。绝大多数 lncRNA 平时表达水平极低;但在病理条件下却表达上调,大量 lncRNA 在不同的组织均以这种模式表达,尤其是在特异类型的肿瘤极具特异性^[2,50],因此,测定 lncRNA 可以追踪肿瘤的转移或循环系统肿瘤细胞的来源。随着研究的深入,特别是对 lncRNA 的结构、功能和作用机制的揭示,利用 lncRNA 的治疗策略逐步清晰。相关策略可以针对 lncRNA 基因、基因位点的表观遗传状态以及 lncRNA 转录表达和功能等。

4.2 针对 lncRNA 突变相关疾病的基因编辑

编辑 lncRNA 基因包括干扰 lncRNA 的调节、结构或功能基序再编辑。基因编辑技术指能够让人类对目标基因进行“编辑”,实现对特定 DNA 片段的敲除、加入等。主要有同源重组介导的基因敲入(knock-in, KI)和敲除(knock-out, KO)、小分子 RNA

介导的基因敲减(knock-down, KD)和核酸酶介导的基因编辑。

其中基因敲减可采用特定设计的 siRNA 来实现。siRNA 与核酸内切酶 AGO2(Argonaute 2)结合形成 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC), siRNA 一条链特定结合靶序列,诱导 AGO2-RISC 协同降解特定靶 RNA,成功实现 lncRNA 的敲减^[51]。许多基于 siRNA 的治疗正进行临床试验。初始研究显示,运用 MALAT1 siRNA 可以抑制前列腺癌细胞的迁移、生长和侵袭,而针对 HOTAIR 的 siRNA 已被证实能减少乳腺癌细胞的基质侵袭能力^[52]。

利用寡核苷酸的方法也被广泛使用,包括催化寡核苷酸和反义寡核苷酸(ASO),前者包括 DNA 酶和 RNA 酶。具有 RNA 识别和 RNA 切割结构域的催化寡核苷酸,可以有效地作为催化抑制剂,借以研究非编码 RNA 的体外和体内效应。ASO 的化学修饰包括骨架、戊糖和碱基的各种修饰的改进,以提高稳定性、亲和力、特异性和组织或细胞摄取效果,降低脱靶效应从而达到治疗的目的。靶向反义 lncRNA 的 antagoNAT 修饰寡核苷酸技术,即含 5'和 3'端 2'-O-甲基修饰 RNA 或 LNA 修饰的寡核苷酸,可防止核酸酶降解和保护硫代磷酸酯骨架。靶向抑制天然反义 lncRNA 寡核苷酸,可上调相应的蛋白质编码基因。例如,靶向 BDNF(brain-derived neurotrophic factor)反义 lncRNA 的 antagoNAT,可导致神经元细胞中 BDNF 蛋白水平增加^[53]。

针对 lncRNA 突变引起的疾病,可利用锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应核酸酶(TALENs)和规律性间隔短回文重复序列簇/Cas 核酸酶(CRISPR/Cas)介导的基因修饰,定向基因改造,是目前靶向 lncRNA 的基因治疗常用技术。据文献报道,通过人工设计的 ZFN,可将 RNA 去稳定元件插入 lncRNA 双链的基因座中,可有效沉默 NEAT2 lncRNA 在人体细胞中的表达,虽然这仅是初步的体外试验,但是基于 ZFN 的治疗已经进入神经系统疾病临床试验阶段,包括用过继性 T 细胞疗法来治疗胶质母细胞瘤(NCT01082926)。该方法将会进一步得到发展,尤其在细胞治疗方面,除了整合去稳定元件,其他序列包括转录后调节元件(如 miRNA 结合位点和三螺旋稳定基序)、转运信号和微泡运输的邮编样序列也可以被编辑^[54]。

4.3 基于 LncRNA 与干细胞修饰的治疗潜力/策略

前已述及, lncRNA GAS5 (growth-arrest-specific transcript 5)通过抑制 miRNA 介导的 NODAL 降解, 促进人 ESC 自我更新,维持 ESC 的多能性^[23]。这提示了通过干预 lncRNA GAS5 水平的策略,能调控 miRNA 表达,维持 NODAL 水平,从而恢复或维持人 ESC 的多能性。

在人肝癌干细胞 (hLCSC) 中, HOTAIR 可抑制 SET 结构域蛋白 2 (SETD2, 组蛋白 H3K36 的特异性甲基转移酶) 磷酸化及其表达, 促进 hLCSC 的恶性转化。SETD2 与基质蛋白质结合能力下降, 引发组蛋白 H3K36me3 减少, 老化组蛋白 H3 的 S 期激酶相关蛋白 2 (s phase kinase associated protein2, Skp2) 降解能力减弱的同时, 老化的组蛋白修复被延迟。损伤 DNA 逃脱修复可导致微卫星不稳定 (MSI), 并促进肝癌发生的细胞周期相关基因异常表达。敲除 HOTAIR 与阻断 DNA 损伤试剂的结合, 可能是靶向治疗具有 HOTAIR 过度活化肿瘤的新策略^[55]。

4.4 基于 miRNA 与 LncRNA 相互作用的治疗策略

近年来具有癌基因作用的 miRNA 在不同肿瘤中被发现, 例如肾癌、肝癌和乳腺癌中的 miR-21、肺癌中的 miR-574-5p 和 miR-135b^[56] 等。这些致癌 miRNA 在肿瘤中过表达, 通过靶向抑制具有抑癌作用的 mRNA, 促进癌症发生。lncRNA 可与 miRNA 相互作用, 参与靶基因的表达调控, 从而在恶性肿瘤的细胞增殖、凋亡、侵袭与转移等过程中发挥重要作用。

miRNA-21 在肾母细胞瘤中过表达, 通过抑制 PTEN 表达从而促进肿瘤细胞的生长。长链非编码基因 PTENP1 (phosphatase and tensin homolog pseudogene 1) 和 PTEN (phosphatase and tensin homolog) mRNA 的 3' 非翻译区都有与 miR-21 结合的位点。PTENP1 可与 PTEN 竞争结合 miRNA-21, 从而调控 PTEN 表达水平。研究证明, 在高表达 miR-21 的肾透明细胞癌细胞系中, PTENP1 过表达可降低 miR-21 的浓度, 从而抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭^[57]。因此, 通过上调 PTENP1 抑制 miR-21 的表达, 为肾透明细胞癌的治疗提供了新的可能。

4.5 基于 LncRNA 与蛋白质相互作用治疗策略

小分子抑制剂或互补的寡核苷酸能遮蔽 lncRNA 上的蛋白质结合位点, 从而干扰 lncRNA-蛋白质相互作用。研究发现靶向抑制 lncRNA 和染色

质重塑复合物之间的相互作用, 能够激活 PRC2 调节基因。例如, 阻断 HOTAIR 与 PRC2 相互作用可降低乳腺癌转移^[52]。表观遗传修饰酶通常需要 lncRNA 与其他效应蛋白形成复合物, 专一性地针对特定的基因座进行修饰。因此, 利用小分子靶向抑制 lncRNA 与蛋白质的相互作用, 既可提高特异性又可解决难以渗透进入组织细胞的问题。lncRNA 与酶的相互作用可修饰基因表达, 但不改变蛋白质在细胞中的其他作用。

5 问题与展望

基于 lncRNA 与肿瘤、心血管疾病和遗传病等存在密切联系, 以 lncRNA 为基础的诊断、治疗将提供分子治疗的新方法。随着寡核苷酸疗法不断开展而获得经验的积累, 将有助于逐渐解决非编码 RNA 治疗面对的困难。开发潜在治疗药物的筛选系统和模型, 并将非编码 RNA 靶向递送到目的细胞或组织, 将促进基于 lncRNA 临床应用的发展。迄今为止, 人们对 lncRNA 的认识还十分有限, 对于大多数 lncRNA 来讲, 其功能和作用机制仍不完全清楚。lncRNA 从实验室研究走向临床应用仍需要经历一段探索过程, 了解其详细的生物学功能及机制至关重要, 将为发现新的疾病治疗靶点和治疗策略奠定基础。

参考文献 (References)

[1] Ling H. Non-coding RNAs; Therapeutic strategies and delivery systems [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, **937**:229-237

[2] Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease [J]. Cell, 2013, **152** (6) : 1298-1307

[3] Kim TK, Hemberg M, Gray JM, *et al.* Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers [J]. Nature, 2010, **465** (7297) : 182-187

[4] Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs [J]. Nature, 2012, **482** (7385) : 339-346

[5] Hsu MT, Coca-Prados M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells [J]. Nature, 1979, **280** (5720) : 339-340

[6] Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, *et al.* Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs [J]. Cell, 2007, **129** (7) : 1311-1323

[7] Zhao J, Sun BK, Erwin JA, *et al.* Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome [J]. Science, 2008, **322** (5902) : 750-756

[8] Nagano T, Mitchell JA, Sanz LA, *et al.* The air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin [J]. Science, 2008, **322** (5908) : 1717-1720

[9] Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, *et al.* Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation [J]. Mol Cell, 2008, **32** (2) : 232-246

[10] Wang KC, Yang YW, Liu B, *et al.* A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression

- [J]. *Nature*, 2011, **472**(7341):120-124
- [11] Schmitz KM, Mayer C, Postepska A, *et al.* Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes [J]. *Genes Dev*, 2010, **24**(20):2264-2269
- [12] Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, *et al.* Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrfl* locus [J]. *Science*, 2011, **332**(6031): 848-852
- [13] Park YJ, Herman H, Gao Y, *et al.* Sequences sufficient for programming imprinted germline DNA methylation defined [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(3):e33024
- [14] Di Ruscio A, Ebrilidze AK, Benoukraf T, *et al.* DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation [J]. *Nature*, 2013, **503**(7476):371-376
- [15] Kim T, Xu Z, Clauder-Münster S, *et al.* Set3 HDAC mediates effects of overlapping noncoding transcription on gene induction kinetics [J]. *Cell*, 2012, **150**(6):1158-1169
- [16] Hung T, Wang Y, Lin MF, *et al.* Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters [J]. *Nat Genet*, 2011, **43**(7): 621-629
- [17] Latos PA, Pauler FM, Koerner MV, *et al.* Airn transcriptional overlap, but not its lncRNA products, induces imprinted *Igf2r* silencing [J]. *Science*, 2012, **338**(6113):1469-1472
- [18] Engreitz JM, Sirokman K, McDonel P, *et al.* RNA-RNA interactions enable specific targeting of noncoding RNAs to nascent pre-mRNAs and chromatin sites [J]. *Cell*, 2014, **159**(1):188-199
- [19] Gonzalez I, Munita R, Agirre E, *et al.* A lncRNA regulates alternative splicing via establishment of a splicing-specific chromatin signature [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, **22**(5): 370-376
- [20] Carrieri C, Cimatti L, Biagioli M, *et al.* Long non-coding antisense RNA controls *Uchl1* translation through an embedded SINEB2 repeat [J]. *Nature*, 2012, **491**(7424):454-457
- [21] Yoon JH, Abdelmohsen K, Srikantan S, *et al.* LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation [J]. *Mol Cell*, 2012, **47**(4): 648-655
- [22] Taylor DH, Chu ET, Spektor R, *et al.* Long non-coding RNA regulation of reproduction and development [J]. *Mol Reprod Dev*, 2015, **82**(12):932-956
- [23] Xu C, Zhang Y, Wang Q, *et al.* Long non-coding RNA GAS5 controls human embryonic stem cell self-renewal by maintaining NODAL signaling [J]. *Nat Commun*, 2016, **7**:13287
- [24] Zhang Y, Xia J, Li Q, *et al.* NRF2/long noncoding RNA ROR signaling regulates mammary stem cell expansion and protects against estrogen genotoxicity [J]. *J Biol Chem*, 2014, **289**(45): 31310-31318
- [25] Cabiocan DS, Casa V, Bodega B, *et al.* A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy [J]. *Cell*, 2012, **149**(4): 819-831
- [26] Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, *et al.* Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment [J]. *Cell*, 2013, **152**(3):570-583
- [27] Grote P, Wittler L, Hendrix D, *et al.* The tissue-specific lncRNA *Fendrr* is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse [J]. *Dev Cell*, 2013, **24**(2):206-214
- [28] Kurian L, Aguirre A, Sancho-Martinez I, *et al.* Identification of novel long non-coding RNAs underlying vertebrate cardiovascular development [J]. *Circulation*, 2015, **131**(14):1278-1290
- [29] Broadbent HM, Peden JF, Lorkowski S, *et al.* Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p [J]. *Hum Mol Genet*, 2008, **17**(6):806-814
- [30] Shan K, Jiang Q, Wang XQ, *et al.* Role of long non-coding RNA-RNCR3 in atherosclerosis-related vascular dysfunction [J]. *Cell Death Dis*, 2016, **7**(6): e2248
- [31] Lv J, Wang L, Zhang J, *et al.* Long noncoding RNA H19-derived miR-675 aggravates restenosis by targeting PTEN [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, pii: S0006-291X(17): 30011-30016
- [32] Leung A, Stapleton K, Natarajan R. Functional long non-coding RNAs in vascular smooth muscle cells [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2016, **394**:127-141
- [33] Bell RD, Long X, Lin M, *et al.* Identification and initial functional characterization of a human vascular cell-enriched long noncoding RNA [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, **34**(6): 1249-1259
- [34] Zhao J, Zhang W, Lin M, *et al.* MYOSLID is a novel serum response factor-dependent long noncoding RNA that amplifies the vascular smooth muscle differentiation program [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, **36**(10):2088-2099
- [35] Wang YN, Shan K, Yao MD, *et al.* Long noncoding RNA-GAS5, a novel regulator of hypertension-induced vascular remodeling [J]. *Hypertension*, 2016, **68**(3): 736-748
- [36] Kumarswamy R, Bauters C, Volkman I, *et al.* Circulating long noncoding RNA, LIPCARN, predicts survival in patients with heart failure [J]. *Circ Res*, 2014, **114**(10): 1569-1575
- [37] 魏思媛,周雪宏,李淑艳. 线粒体 lncRNA. *中国生物化学与分子生物学报* (Kui SY, Zhou XH, Li SY. Mitochondrial lncRNAs [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2016, **32**(12): 1303-1307
- [38] Ounzain S, Micheletti R, Beckmann T, *et al.* Genome-wide profiling of the cardiac transcriptome after myocardial infarction identifies novel heart-specific long non-coding RNAs [J]. *Eur Heart J*, 2015, **36**(6): 353-368a
- [39] Vausort M, Wagner DR, Devaux Y. Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2014, **115**(7): 668-677
- [40] Michalik KM, You X, Manavski Y, *et al.* Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth [J]. *Circ Res*, 2014, **114**(9):1389-1397
- [41] Yan B, Yao J, Liu JY, *et al.* lncRNA-MIAT regulates microvascular dysfunction by functioning as a competing endogenous RNA [J]. *Circ Res*, 2015, **116**(7):1143-1156
- [42] Lu KH, Li W, Liu XH, *et al.* Long non-coding RNA MEG3 inhibits NSCLC cells proliferation and induces apoptosis by affecting p53 expression [J]. *BMC Cancer*, 2013, **13**: 461
- [43] Qiu GZ, Tian W, Fu HT, *et al.* Long noncoding RNA-MEG3 is involved in diabetes mellitus-related microvascular dysfunction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, **471**(1):135-141
- [44] Yang Z, Lu Y, Xu Q, *et al.* HULC and H19 played different roles in overall and disease-free survival from hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy: a preliminary analysis from gene expression omnibus [J]. *Dis Markers*, 2015, **2015**:191029
- [45] Tang J, Jiang R, Deng L, *et al.* Circulation long non-coding RNAs act as biomarkers for predicting tumorigenesis and metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, **6**(6): 4505-4515
- [46] Zhao XL, Zhao ZH, Xu WC, *et al.* Increased expression of SPRY4-IT1 predicts poor prognosis and promotes tumor growth and metastasis in bladder cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, **8**(2): 1954-1960
- [47] Sørensen KP, Thomassen M, Tan Q, *et al.* Long non-coding RNA expression profiles predict metastasis in lymph node-negative breast cancer independently of traditional prognostic markers [J]. *Breast Cancer Res*, 2015, **17**:55
- [48] Wu T, Du Y. LncRNAs: from basic research to medical application [J]. *Int J Biol Sci*, 2017, **13**(3):295-307
- [49] Jain AK, Akdemir KC, Xi Y, *et al.* Characterization of a novel p53-regulated embryonic stem cell-specific lncRNA that safeguards pluripotency [J]. *Cancer Res*, 2016, **76** (Sup 6): A06
- [50] Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, *et al.* The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome [J]. *Nat Genet*, 2015, **47**(3): 199-208
- [51] Chery J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and

clinical applications[J]. Postdoc J, 2016, **4**(7):35-50

[52] Leti F, DiStefano JK. Long noncoding RNAs as diagnostic and therapeutic targets in type 2 diabetes and related complications [J]. Genes (Basel), 2017, **8**(8). pii: E207

[53] Modarresi F, Faghihi MA, Lopez-Toledano MA, *et al.* Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene-specific transcriptional upregulation[J]. Nat Biotechnol, 2012, **30**(5): 453-459

[54] Shi X, Sun M, Liu H, *et al.* Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases[J]. Cancer Lett, 2013, **339**(2):159-166

[55] Haiyan Li, Jiahui An. LncRNA HOTAIR promotes human liver cancer stem cell malignant growth through downregulation of SETD2[J]. Oncotarget, 2015, **6** (29): 27847-27864

[56] Lin CW, Chang YL, Chang YC, *et al.* MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1 [J]. Nat Commun, 2013, **4**: 1877

[57] Yu G, Yao W, Gumireddy K, *et al.* Pseudogene PTENP1 functions as a competing endogenous RNA to suppress clear-cell renal cell carcinoma progression[J]. Mol Cancer Ther, 2014, **13** (12):3086-3097