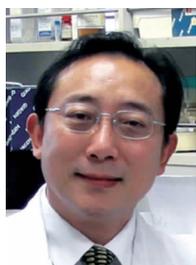


doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.01.001

· 述 评 ·

RNA 异常与肿瘤调控研究进展

薛逸荃, 曹雪涛(第二军医大学免疫学研究所暨医学免疫学国家重点实验室, 上海 200433)



曹雪涛, 教授, 博士生导师, 中国工程院院士。现任中国医学科学院院长, 第二军医大学免疫学研究所所长, 医学免疫学国家重点实验室主任; 中国免疫学会理事长, 国家 863 计划医药生物技术领域专家, 973 计划免疫学项目首席科学家, 国务院学位评议委员会学科评议组和基础医学组召集人; 亚太地区免疫学联盟主席, 国际免疫学联盟委员会委员; 《中国肿瘤生物治疗杂志》主编, *Cell Mol Immunol* 共同主编, *Annu Rev Immunol*、*Sci Transl Med*、*J Immunol* 等杂志编委。

主要从事固有免疫识别与免疫调节的基础研究、疾病免疫治疗与基因治疗的应用研究。以通讯作者在 *Nat Immunol*、*Immunity*、*Cancer Cell*、*Blood*、*J Immunol*、*Cancer Res*、*J Biol Chem* 等杂志上发表 SCI 论文 212 篇, 与国内外学者合作在 *Nat Med*、*PNAS* 等杂志上发表 SCI 论文 20 余篇; 论文被 SCI 他引 4 000 余次。主编和共同主编学术专著 5 部, 参编 11 部。获得国家发明专利 16 项。先后有 10 名培养的博士学位论文被评为全国百篇优秀博士论文。



薛逸荃, 本科毕业于第二军医大学生物技术专业, 主要从事抗原提呈细胞分化发育与炎性细胞分子调控的研究, 主要研究方向为非编码 RNA, 特别是长链非编码 RNA 与固有免疫调节。E-mail: smmuim@me.com

[摘要] 肿瘤的发生是一个多因素、多步骤的过程, 其根本原因是细胞稳态的失衡。近年研究发现, 在肿瘤的发生、发展中除了蛋白质功能紊乱、DNA 突变之外, 还存在着大量 RNA 的异常, 包括异常的 microRNA (miRNA)、长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)、循环 RNA 等; 此外, 肿瘤细胞中还存在 RNA 转录、加工及调控功能的异常, 如 RNA 选择性剪接、RNA 编辑、竞争性内源 RNA 调控等。这些非编码 RNA 可以在转录后水平及表观遗传学水平调控癌基因和抑癌基因的功能, 影响肿瘤的发生和发展, 是肿瘤诊断、治疗及预后判断的潜在靶标。竞争性内源 RNA 使得 lncRNA 与 mRNA 通过 miRNA 相互调控, 以“miRNA 结合位点”为媒介, 形成 RNA 调控网络。RNA 选择性剪接使得癌基因或抑癌基因产生功能异常的转录本, 进而影响其生物学功能。肿瘤中究竟哪些机制导致这些 RNA 表达及功能的异常, RNA 表达及功能的异常又如何影响肿瘤的发生和发展, 有哪些表

达或功能异常的 RNA 可以作为肿瘤诊断及预后判断的标志物, 又有哪些 RNA 可以作为肿瘤靶向治疗的靶标? 等等问题亟待深入探讨, RNA 异常与肿瘤调控已成为肿瘤研究的前沿热点领域。

[关键词] 肿瘤; microRNA; 长链非编码 RNA; RNA 选择性剪接; RNA 编辑; 生物标志物; 靶向治疗

[中图分类号] R730.2; R730.5 **[文献标志码]** A

[文章编号] 1007-385X(2013)01-0001-12

Dysregulation of RNA in cancer

Xue Yiquan, Cao Xuetao (National Key Laboratory of Medical Immunology & Institute of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] The development of cancer is a complex multistage process, which is primarily due to the unbalance of cellular homeostasis. In addition to the well-characterized protein coding dysfunction and DNA mutation, dysregulation of non-coding RNAs including microRNA (miRNA), long non-coding RNA (lncRNA) and circulating miRNA was found in the initiation and progression of cancer. Moreover, aberrant RNA transcription, processing and regulation, such as RNA alternative splicing, RNA editing and competing endogenous RNA regulation, have emerged as important regulatory molecules or mechanisms in cancer cells. These non-coding RNAs may play vital roles in tumorigenesis by regulating oncogene and tumor suppressor gene at either post-transcriptional level or epigenetic level, and act as potential targets for tumor diagnosis, prognosis and cancer therapy. Through competing endogenous RNA, the lncRNA cross-talk with mRNA in a miRNA-dependent manner, and thus form a regulatory network. Via RNA alternative splicing, oncogene and tumor-suppressor gene could generate tumor-spe-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81230074)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81230074)

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130118.1611.001.html>

cific alternative-splicing transcripts, and therefore affect their biological functions. However, several questions remain to be elucidated: What are the underlying mechanisms of abnormal expression pattern and dysregulation of RNA in cancer? How do the aberrant expression and function of RNAs affect tumorigenesis and progression? Which abnormal RNA can be used as a biomarker for tumor diagnosis, prognosis, as well as the therapeutic target for cancers? Taken together, RNA dysregulation in cancer has become a new research frontier in cancer research.

[**Key words**] neoplasms; microRNA; long non-coding RNA; RNA alternative splicing; RNA editing; biomarker; targeted therapy

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(1): 1-12]

肿瘤作为复杂疾病,其发生和发展是一个多因素、多步骤的过程,涉及多种分子和信号通路。2011年, Hanahan 和 Weinberg^[1]将肿瘤细胞的6大基本特征增加到了10个,并总结归纳了参与调控这些基本特征的多个关键蛋白分子。这些关键蛋白分子的功能异常导致了细胞稳态的紊乱,包括细胞信号调控网络的紊乱和基因表达调控网络的紊乱。2001年人类基因组精细图谱公布以来,肿瘤的研究进入后基因组时代。十多年来,通过基因组测序发现的基因突变、染色体变异,成功地解释了大量蛋白分子功能紊乱的原因;不过,仍有大量蛋白分子并不能单纯地通过其编码基因的突变来解释其功能紊乱。RNA作为中心法则的核心,是遗传信息由DNA传输到蛋白质的媒介,其功能的重要性不言而喻。近年研究发现,在肿瘤中存在着大量表达或功能异常的RNA,这些异常RNA的发现,使人们对于肿瘤分子调控机制又有了新的认识。

肿瘤相关RNA的异常包括:RNA非编码调控功能的异常和RNA编码蛋白功能的异常。RNA非编码调控功能的异常在转录及表观遗传学水平调控着肿瘤的发生、发展,如调控性RNA[包括microRNA(miRNA)、核仁小RNA(small nucleolar RNA, snoRNA)等]的表达及功能的异常,在基因转录后水平调控癌基因或者抑癌基因mRNA的表达及功能,从而影响癌基因和抑癌基因的功能;长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)的功能异常,使肿瘤相关基因表观遗传修饰发生改变,进而促进肿瘤的发生。RNA编码蛋白功能的异常则主要包括RNA选择性剪接的异常和RNA编辑的异常。RNA选择性剪接的异常通过读码框移突变、结构域缺

失或活性改变,导致癌基因或抑癌基因编码蛋白过度活化或者失活;RNA编辑的异常影响RNA二级结构、转录活性和tRNA对密码子识别的精确性,调控蛋白质的功能。这些新发现的肿瘤相关RNA的异常及其生物学作用给肿瘤研究带来了新的机遇与挑战,也成为肿瘤临床诊断和治疗面临的新课题。本文就近几年研究中发现的对肿瘤起重要调控作用的RNA异常以及肿瘤细胞中RNA生成、加工、成熟及功能异常的机制作一讨论。

1 miRNA 与肿瘤调控

miRNA的研究在肿瘤RNA研究领域最为广泛与深入,通过近些年的研究,对于miRNA在肿瘤中所起的调控作用、作用机制以及临床应用已经有了较为全面的认识。

miRNA是一类长度在约22个核苷酸的单链RNA,其功能主要是调控基因的表达,人类大约30%的基因受到miRNA的调控^[2]。miRNA可以调控细胞生命活动诸多过程,如细胞分化、细胞周期及细胞代谢等,也影响肿瘤的发生和发展。近年来,包括笔者实验室在内的许多国内、国外实验室通过对比肿瘤组织、癌旁组织及正常组织miRNA的表达谱,发现了许多可以区分肿瘤(包括血液系统恶性肿瘤和实体瘤)细胞和正常细胞的miRNA指纹(miRNA signature)^[3-5]。明确这些miRNA指纹在肿瘤调控中的作用,使得miRNA指纹成为肿瘤诊断、治疗及预后判断的潜在靶标。

1.1 miRNA 调控肿瘤的基本方式

根据肿瘤miRNA作用靶基因的不同,可以将肿瘤miRNA大致分为具有抑癌基因样功能的抑癌miRNA(tumor suppressor miRNA)和具有癌基因样功能的促癌miRNA(oncogene miRNA)。抑癌miRNA大都靶向癌基因,抑制癌基因的表达,在肿瘤组织中往往低表达;而促癌miRNA则靶向抑癌基因,抑制抑癌基因的表达,在肿瘤中表达往往升高。

1.1.1 抑癌miRNA 抑癌miRNA在肿瘤的发生、发展过程中起到抑制肿瘤的作用。同抑癌基因一样,这些抑癌miRNA功能性缺失,可以导致或加剧正常细胞的癌变。现已发现多种可以导致抑癌miRNA功能性缺失的机制,包括基因组缺失、突变、表观沉默以及miRNA加工成熟过程异常等。

miR-15a/16-1簇(miR-15a/16-1 cluster)在慢性淋巴细胞性白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)中可以起到抑制肿瘤生长的作用。最初发现,超过50%的CLL患者13号染色体q14.3区域存在

纯合或杂合性缺失^[6-7]。然而进一步研究发现,在这一染色体区域内没有任何可以解释 CLL 病因的抑癌基因,这一反常现象引起了肿瘤学家的关注。随后发现了一段位于 *Leu2* 基因第 2 与第 5 外显子之间的一段 30 000 bp 的编码 miR-15a、miR-16-1 的区域,miR-15a、miR-16-1 可作为抑癌基因影响肿瘤的发生才使这一反常现象得到了解释^[8]。miR-15a/16-1 簇同抑癌基因一样,在肿瘤中表达水平降低;这些 CLL 患者 CD5⁺ 细胞中 miR-15a/16-1 簇表达缺失或下调^[8]。后续的动物实验^[9]发现,miR-16a 在新西兰黑小鼠自发迟发性 CLL 模型中表达也下调。在机制研究方面也发现,miR-15a/16-1 簇可以靶向抗凋亡基因 *Bcl-2*,该基因在 CLL 中往往高表达^[10]。综合这些研究结果,可以归纳出 miRNA 作为抑癌基因的作用模式:基因组缺失导致 miR-15a/16-1 簇低表达,进而癌细胞中 *Bcl-2* 基因的表达失去抑制,最终引发了 CLL。相关临床资料^[10]也证实了这一机制,miR-15a/16-1 簇与 *Bcl-2* 的表达呈负相关关系。

除了 miR-15a/16-1 簇之外,包括 let-7 家族^[11-12]、miR-29 家族^[13]在内的许多 miRNA 都被证实具有抑癌功能。笔者实验室^[5]通过对大量肝癌样本的筛查发现了一系列肝癌相关的 miRNA,其中的 miR-199a/b-3p 具有明确的抑癌功能;肝癌细胞中 miR-199a/b-3p 的表达普遍降低,其表达水平与肝癌不良预后呈正相关关系;作用机制方面,发现 miR-199a/b-3p 可以靶向 *PAK4*,通过抑制 *PAK4/Raf/MEK/ERK* 信号通路影响肝癌细胞的生长。这些明确的抑癌功能特性使得 miR-199a/b-3p 成为了肝癌治疗的理想靶点。

另一个值得注意的现象就是这些具有抑癌功能的 miRNA 簇在基因组上的定位一般都不止一个,虽然不同的定位会产生不同的 miRNA 前体,但最终的成熟产物却完全相同。不同基因组位点的 miRNA 簇往往不会同时表达,如在 HeLa 细胞中 miR-29b 倾向于由位于 7q32 区域的 miR-29b-1/miR-29a 基因座编码,而位于 1q23 区域的 miR-29b-2/miR-29c 则被沉默^[14]。这种进化上保守的、miRNA 编码基因的多基因组定位现象反映了抑癌 miRNA 功能的重要性,即使一个等位基因失活,其抑癌功能也不会受到影响。不过,由于 miRNA 的多靶点效应,也可能预示着不同基因组定位的同一 miRNA 可以在细胞不同状态下差异表达,进而对不同靶标发挥不同的生物学功能。相信随着研究的深入,会有越来越多的抑癌 miRNA 被陆续发现,并且能更加详尽地认识 miRNA 在抑制肿瘤发生与发展中所发挥的作用。

1.1.2 促癌 miRNA 相对于已发现的大量抑癌 miRNA,促癌 miRNA 则相对较少,这也与 miRNA 的生理功能主要在于参与调节细胞稳态而非诱使细胞恶性转变有关。尽管如此,近几年的研究还是发现了一些功能强大的促癌 miRNA,其过度表达直接影响着肿瘤的发生、发展。

miR-155 是第一个被发现的有促癌作用的 miRNA,其编码基因位于 B 细胞整合簇(B cell integration cluster, BIC)非编码 RNA 内,染色体定位于 21q23^[15]。已有数个研究小组^[4,16]报道了 miR-155 在 Burkitt 淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、原发性纵隔非霍奇金淋巴瘤、CLL、急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)、肺癌及乳腺癌中表达增高。关于肿瘤细胞高表达 miR-155/BIC 的分子机制及其功能已有较为深入的研究,业已证实,miR-155 调控的靶基因有 147 个^[17],这些基因的功能涵盖细胞凋亡、细胞分化、血管生成、上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等。靶基因生物学功能的多样性使得 miR-155 可以通过多种途径发挥促癌作用。在 AML 中,miR-155/BIC 与白细胞数量的上升及 FLT3 内部串联重复突变(in tandem duplication, ITD)的出现呈正相关关系^[18-19]。在人白血病细胞中阻断 FLT3-ITD 信号通路并不影响 miR-155/BIC 的表达水平,提示 miR-155/BIC 的表达不依赖 FLT3-ITD^[20]。miR-155/BIC 在早期白血病中的作用已经被体内实验所证实,在 B 细胞特异性 miR-155 高表达转基因小鼠模型中,发现了白血病前期的前 B 细胞多克隆增殖以及随后全面暴发的 B 细胞癌变的现象^[21]。然而,miR-155 在血液系统恶性肿瘤中的促癌作用也不是绝对的。近期研究^[22]发现,在慢性髓系白血病(chronic myeloid leukemia, CML)细胞系及 CML 患者中,miR-155 表达反而降低,同时 *MAPK*、*ErbB*、*mTOR* 和 *VEGF* 异常活化,miR-155 展现出部分抑癌基因的特征。这个反常现象结合 miR-155 靶基因的多样性,提示包括 miRNA-155 在内的促癌 miRNA 在肿瘤发展的不同阶段以及不同类型肿瘤中可能发挥不同的功能。

除了 miR-155 之外,现已证实包括 miR-17-92 簇^[23-24]、miR-21^[25-26]在内的多个 miRNA 有明确的促癌功能,抑制这些 miRNA 的表达从而抑制肿瘤的发生,成为肿瘤治疗的新思路。

1.2 肿瘤中 miRNA 表达的调控

miRNA 在肿瘤中的表达异常主要是由基因组缺失、突变或扩增所引起;此外,肿瘤中 miRNA 的表达异常也受到转录水平的调控^[27-29];不仅如此,表

观遗传调控(如启动子区 DNA 的甲基化)也参与其中。在膀胱癌中首先发现了由于启动子区 DNA 甲基化所引起的 miR-127 沉默^[30]。有趣的是, miRNA 不仅受到 DNA 甲基化的调节, 还可以通过影响调控 DNA 甲基化的相关蛋白来改变肿瘤的整体 DNA 甲基化水平, 例如 miR-29 家族可以靶向 DNMT3A/3B, 通过降低肺癌细胞甲基化水平使抑癌基因重新表达^[18]。另有研究^[31-32]发现, 肺癌患者 miR-29 表达下调, 并且 miR-29b 与 DNMT3B 的表达呈负相关, 提示 miR-29b 表达的下调可能是肿瘤基因组高甲基化以及抑癌基因沉默的机制之一。

1.3 miRNA 是潜在的肿瘤分子标志物

miRNA 在肿瘤组织、正常组织以及不同阶段肿瘤组织之间有着不同的表达谱, 通过检测肿瘤转移灶中 miRNA 的表达谱, 可以判断肿瘤转移灶的组织来源、恶化程度, 并对转移瘤进行分子分型。研究^[3]表明, 只需分析肿瘤中有限的几个 miRNA 表达谱就可以准确地预测出肿瘤的来源。肿瘤特异性 miRNA 表达谱成为肿瘤分子分型新的研究方向。此外, miRNA 表达谱可以用于预测实体瘤及恶性淋巴瘤的转归。一份包含 9 个 miRNA 的表达谱(包括 miR-155、miR-221、miR-222 的高表达及 miR-29c 的低表达)首次评估了 CLL 的进展程度^[33]; let-7 的低表达在肺癌中被认为与术后较短的生存期相关^[32]; 在胰腺癌中, 一组由 6 个 miRNA 组成的表达谱被证实可用于预测有淋巴结转移的胰腺癌患者的生存期^[34]; 在大肠癌中, miR-21 的高表达被证实为预测患者较短生存期的独立评价指标^[35]。越来越多的研究表明, miRNA 表达谱是一种有效的肿瘤患者预后的评价手段, 也有人认为 miRNA 可用于预测肿瘤的侵袭及转移, 但此观点需进一步验证。

1.4 miRNA 与肿瘤治疗

miRNA 在临床治疗上的应用走在了所有肿瘤 RNA 生物靶向治疗的前列, 由于 miRNA 本身的特性使得 miRNA 应用于肿瘤靶向治疗有着天然的优势。首先, 单一 miRNA 可以作用于多个靶标, 进而同时对多条癌基因通路进行调控。例如抑癌 miRNA 中的 miR-29b, 不仅可以靶向凋亡通路(如 MCL-1), 还可以靶向甲基化通路(如 DNMT3A 和 DNMT3B)^[13, 31]。其次, 由于一些 miRNA, 如 miR-155、let-7a、miR-21、miR-17-92 簇, 在多种实体瘤及血液系统恶性肿瘤中表达异常, 使得人为恢复或干扰这些 miRNA 的功能成为治疗多种肿瘤的手段之一。

miRNA 用于肿瘤治疗与一般药物的研发有着

相似的策略^[36], 即恢复或干扰肿瘤中异常表达的 miRNA。就恢复肿瘤细胞内抑癌 miRNA 表达的治疗策略而言, 最直接的方法是注射成熟的 miRNA 分子, 即 miRNA 模拟物(miRNA mimics)。然而受 miRNA 模拟物分子某些内在理化特性的影响, 如 miRNA 模拟物分子无法以被动扩散方式进入细胞, 以及体内环境中存在着大量的 RNA 酶使得 miRNA 模拟物稳定性较低, miRNA 模拟物必须经过适当改造后才能用于临床治疗。近几年的研究^[37-38]提出了许多化学修饰 miRNA 模拟物的方案, 经过化学修饰的 miRNA 模拟物与无抗原性的去端肽胶原(atelocollagen)结合, 可以极大地提高其稳定性。之后将结合了去端肽胶原的 miRNA 模拟物用脂质纳米粒包裹, 体内注射, 可有效地将其运输至细胞内, 发挥 miRNA 的抑癌功能^[39]。另一种恢复肿瘤组织特定 miRNA 表达的方法是通过病毒载体将 miRNA 输送入肿瘤细胞内, 若进一步结合组织特异性启动子还可实现 miRNA 的时空特异性表达^[40-41]。

就干扰肿瘤细胞内促癌 miRNA 表达或功能的治疗策略而言, 最简单的干扰 miRNA 功能的方法就是 miRNA 反义寡聚核苷酸(anti-miRNA antisense oligomer, AMO 或 antagomir), AMO 通过互补结合靶 miRNA, 抑制靶 miRNA 的生物学功能。AMO 与 miRNA 模拟物同样存在体内稳定性较差的问题, 不过, 现已有许多化学修饰方法可以增强 AMO 在体内的稳定性^[42-43]。此外, 锁核酸(locked nucleic acid, LNA)^[44]和肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)^[45]技术也被用于提高 AMO 的稳定性。另一种干扰肿瘤细胞内促癌 miRNA 表达的治疗策略则是通过竞争或封闭内源 miRNA 靶标来干扰 miRNA 的功能。miRNA 海绵(miRNA sponge)的序列包含多个成熟 miRNA 结合位点, 通过吸附结合成熟 miRNA, 抑制 miRNA 的功能^[46]。而 miRNA 隐蔽(miRNA masking)则通过设计能够互补结合 mRNA 非编码区 miRNA 结合位点的寡聚核苷酸, 封闭 miRNA 的靶标, 使 miRNA 无法与靶标结合, 从而抑制 miRNA 的功能^[47]。

同所有治疗方式一样, 靶向 miRNA 的治疗也有其缺点, 这主要体现在其脱靶效应上, 不过, 由于缺少体内实验的证据, 现在还无法评价 miRNA 可能的脱靶效应会产生怎样的不良反应; 然而, 基于生理条件下 miRNA 作用的多靶点特性, 从理论上说, 治疗性 miRNA 多靶点结合也是其本身生物学效应的一部分, 脱靶效应也许不会引起严重的毒性作用, 不过一切还都有待于进一步的体内及临床试验证实。令

人鼓舞的是,靶向 miRNA 的抗 HCV 药物 SPC3649 (LNA-antimiRTM-122) 已经进入 II 期临床试验阶段,现已初步显示出了良好效果,并且并没有发现明显的不良反应^[48]。该研究为靶向 miRNA 的肿瘤治疗呈现了美好的前景。

2 lncRNA 与肿瘤调控

2.1 lncRNA 的基本概念

过去数十年的研究证实,细胞内存在大量非编码 RNA^[49-50]。目前,应用 RNA 测序及生物芯片已经可以快速经济地得到基因组的全部转录本。大量细胞转录组研究发现,基因组的全部转录本中包含着数量惊人的非编码转录本。随着研究的深入,人们逐渐认识到这些非编码转录本的转录产物既不是转录的噪声或者副产物,也不是细胞冗余的转录垃圾,而是生命活动中发挥重要作用的关键调控分子。

基因组除了 1% 的蛋白编码序列可转录出 mRNA 外,其余绝大部分序列也转录出非编码产物^[51]。lncRNA 被定义为长度在 200 bp 以上,没有明显的蛋白编码潜能的 RNA。lncRNA 的定义只局限于近年来新发现的非编码转录本。尽管很多已有功能定义的 snoRNA 的长度也大于 200 bp,但却不属于 lncRNA 的范畴。近年来,lncRNA 在细胞生命活动各个方面的功能逐渐被揭示出来:lncRNA 在胚胎干细胞干性的维持、细胞周期调控,以及肿瘤的发生、发展中发挥着重要的作用。lncRNA 在细胞生理过程及众多信号转导通路中发挥作用的常见模式是:(1)lncRNA 与蛋白形成核蛋白复合物,通过影响基因表观遗传进而发挥基因调控的功能;(2)lncRNA 与 mRNA 竞争性结合 miRNA,从而使 miRNA 无法有效沉默靶 mRNA(竞争性内源 RNA 的功能)。

lncRNA 为肿瘤生物学领域中近年出现的一颗新星,相对于 miRNA 在肿瘤领域中较为深入全面的研究而言,其与肿瘤关系的研究还处于起步阶段,lncRNA 在肿瘤中的作用模式、调控机制,以及对肿瘤发生、发展的调控作用还不是十分清楚,这一领域还有许多空白亟待填补。

2.2 lncRNA 调控肿瘤表观遗传的作用模式

根据已有对 lncRNA 有限的了解,lncRNA 在肿瘤中的作用机制与 miRNA 分子有着显著的区别。正如前文所述,miRNA 主要作用于转录后水平,miRNA 在肿瘤中的功能取决于其靶分子的癌基因或抑癌基因特性。然而,肿瘤的发生除了抑癌基因或癌基因的突变外,表观遗传学的改变也起举足轻重的作用。lncRNA 是表观遗传学调控网络的重要

组成部分,调控肿瘤表观遗传学是目前所发现的 lncRNA 对肿瘤调控的主要作用模式^[52]。

lncRNA 对于表观遗传学的影响与其基因组定位密切相关。lncRNA 的基因组定位一般而言有以下 4 种^[53]:第一,反义 lncRNA(antisense lncRNA),其编码序列位于蛋白编码基因的反义链上,并且至少与一个编码蛋白基因的外显子重合;第二,内含子 lncRNA(intronic lncRNA),其编码序列起始于蛋白编码基因内含子中,并且不与任何外显子重合;第三,双向 lncRNA(bidirectional lncRNA),其编码序列起始点位于蛋白编码基因的启动子区,向上游及下游两个方向延伸,编码两个独立 lncRNA;第四,基因间 lncRNA(intergenic lncRNA, lincRNA),其编码序列位于不同蛋白编码基因间,有独立的转录调控元件。在肿瘤中,前 3 种 lncRNA 通常与其附近的基因一同被调控表达,通过调控其附近的编码基因发挥作用,而 lincRNA 存在独立的转录调控元件,故能更为广泛地影响多个肿瘤相关基因的功能。

lncRNA 调控肿瘤相关基因的表观遗传可能通过以下 3 种方式^[54]:

(1)蛋白诱饵:lncRNA 与蛋白相互作用最简单的模型,即 lncRNA 作为蛋白诱饵,通过封闭蛋白质的 DNA 结合位点,阻断蛋白的功能。例如 lncRNA Gas5(growth arrest-specific 5)可以形成类似于糖皮质激素受体 DNA 结合位点的发卡序列基序^[55],在细胞饥饿时,Gas5 被诱导表达并与受体结合,通过促进受体从 DNA 上解离,阻止代谢基因的转录。另一个关于 lncRNA 作为蛋白诱饵的例子是最近发现的 PANDA^[56]。NF-YA 是 P53 介导的细胞凋亡通路中重要的转录因子,可以转录激活数个凋亡相关基因,而 PANDA 可以与 NF-YA 结合,使其从靶基因染色质上解离,阻断 P53 介导的细胞凋亡。

(2)蛋白支架:lncRNA 与蛋白相互作用的另一种方式是通过行使接头分子的功能,使两个或数个蛋白分子形成离散复合物,从而共同发挥生物学功能^[57]。最近发现的 lncRNA 分子 HOTAIR^[57],同组成端粒酶复合物的端粒酶 RNA TERC^[58]一样,可以充当蛋白支架来发挥其生物学功能。HOTAIR 通过其特殊的 RNA 结构域同时结合多梳抑制复合物 2(polycomb repressive complex 2, PRC2)和 LSD1-CoREST 复合物,进而通过调控靶基因组蛋白 H3K27 甲基化和组蛋白 H3K4me2 去甲基化,沉默靶基因的表达^[59]。通过此种方式行使功能的 lncRNA 还有 ANRIL 和 Kcnq1ot 1。ANRIL 可以同时结合 PRC2 与 PRC1 发挥生物学功能^[60],而

Kcnq1ot1可以同PRC2与G9a结合,进而促进抑制性组蛋白修饰——H3K27me3和H3K9me3的产生^[61]。更为重要的是,通过核蛋白分析已发现了上百个与不同蛋白相结合的lncRNA^[62-63],提示lncRNA的蛋白支架功能很可能广泛存在。

(3)引导蛋白靶向:许多蛋白复合物的功能依赖于特异性lncRNA的引导。lncRNA可以同时结合蛋白复合物与特异性的靶分子,使蛋白复合物与特异性靶分子结合,发挥生物学功能。lncRNA发挥引导功能最为经典的例子是lncRNA分子Xist、Kcnq1ot1、Air在剂量补偿及基因组印记中参与靶基因特异性的沉默。在肿瘤中,HOTAIR通过引导PRC2蛋白靶向,调控肿瘤相关基因的表达^[64];lincRNA-P21可在DNA损伤后被P53直接诱导表达,通过引导核蛋白hnRNP-k靶向调控下游基因的表达,影响P53的功能^[65]。综上所述,lncRNA发挥引导作用必须具有两种基本的分子功能:结合蛋白的功能以及与基因组特定区域作用的功能。

2.3 lncRNA调控肿瘤的途径

分析lncRNA调控肿瘤细胞表观遗传学的基本作用模式,不难发现lncRNA与肿瘤的发生、发展有着密不可分的联系^[66]。已发现数个lncRNA在肿瘤中表达异常,有些lncRNA受到癌基因或抑癌基因(如P53、MYC及NF- κ B等)的调控^[53, 56, 65],提示这些lncRNA参与肿瘤相关信号通路;有些lncRNA在细胞周期中周期性表达^[56],可能参与肿瘤细胞细胞周期的调控。根据已有的研究资料,异常表达的lncRNA通过调控表观遗传学的各个层面影响肿瘤的发生和发展。

2.3.1 影响肿瘤细胞整体表观修饰(epigenetic landscape) 非编码RNA中的HOTAIR及PANDA是最经典的影响肿瘤细胞整体表观修饰的lncRNA。HOTAIR在近25%的乳腺癌患者肿瘤组织中高表达,其表达水平可以有效地预测乳腺癌转移及患者预后^[64];体内实验证实,过表达HOTAIR可以促进乳腺癌转移,其部分作用机制为改变肿瘤细胞中多梳蛋白的靶向基因。此外,HOTAIR表达下调也是大肠癌及肝癌细胞转移及疾病进展的指征,显示出其癌基因的特性^[67-68],因而是潜在的肿瘤标志物。

除了像HOTAIR这样的大型lincRNA之外,反义lncRNA也可以发挥调控肿瘤的作用。人源lncRNA ANRIL就属于这类反义链转录产物,ANRIL基因组定位于CDKN2A抑癌基因座上游的反义链,在前列腺癌中过表达ANRIL可促使异染色质的形成,导致抑癌基因P15/CDKN2B等表达;在肝癌中,

H19可以通过表观修饰激活miR-200家族的转录,进而抑制肿瘤细胞发生EMT^[69]。这些研究结果提示,lncRNA不仅可以通过表观遗传修饰影响癌基因或抑癌基因的表达,还可以通过影响miRNA的表达,宏观调控肿瘤表观遗传,使得lncRNA协同miRNA成为肿瘤治疗的新途径。

2.3.2 影响信号转导通路 另一些lncRNA则可通过增强抑癌基因信号通路来行使抑癌功能;当其功能受阻时,会使细胞产生癌变倾向。lncRNA所影响的抑癌信号通路中较为明确的是P53信号通路,上文已提及lincRNA-P21和PANDA可通过调控P53信号通路调节细胞凋亡。

2.3.3 影响RNA剪接 除了上述调控转录水平的lncRNA,另一些反义链lncRNA也可以在转录后水平调控靶基因的表达。E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达与多种上皮细胞来源的肿瘤相关,其表达下调可以提高肿瘤细胞增殖、侵袭能力,促进肿瘤转移。E盒锌指结合蛋白(zinc finger E-box binding homeobox, Zeb)家族及Zeb2的天然反义链转录本(natural antisense transcript, NAT)与肿瘤中E-钙黏蛋白低表达相关,进一步机制研究发现,Zeb2的NAT通过与Zeb2内含子的5'剪接位点互补性结合,影响Zeb2的正常剪接,Zeb2选择性剪接体翻译活性增加,促进Zeb2蛋白的表达,并最终抑制E-钙黏蛋白的表达,促进肿瘤的进展^[70]。

2.4 lncRNA具有肿瘤分子标志物的潜能

lncRNA作为肿瘤标志物的潜能已经得到证实。lncRNA在前列腺癌、大肠癌、乳腺癌、肝癌、胆管癌、肺癌中表达降低,这些在正常与肿瘤组织中差异表达的lncRNA是潜在的肿瘤标志物^[71]。另有研究^[72]发现,在肺癌中,MALAT-1的表达水平可以用于鳞状细胞肺癌患者预后的预测。虽然其对于非鳞状细胞肺癌患者的预测没有明显的指导意义,但是这项研究提示,不同的lncRNA可通过对肿瘤进行精细的分型,提高其预测预后的精确性。此外,基于lncRNA特殊的二级结构,lncRNA可以在体液中稳定存在,这一性质使得lncRNA成为了理想的无创肿瘤诊断标志物。通过对前列腺癌的RNA测序,发现了大量未知的肿瘤相关lncRNA,其中PCAT-1分子通过参与基因阻遏表现出明显的促癌作用^[73]。因此有学者^[74]指出,可通过检测肿瘤患者尿液中PCAT-1表达水平来评价患者预后,使lncRNA分子成为肿瘤无创诊断的新指标。

3 肿瘤中RNA自身调控的异常

近几年的研究除了发现以上两大类非编码

RNA 对肿瘤的调控,参与肿瘤的发生、发展之外,还发现了许多肿瘤 RNA 在转录、加工、成熟及功能方面的异常。肿瘤中 RNA 调控机制的异常,产生许多肿瘤细胞特有的 RNA 转录本及 RNA 表达谱,这些异常的 RNA 在肿瘤的诊断、治疗方面展示了巨大的应用前景。

3.1 循环 miRNA

循环 miRNA 是近几年肿瘤研究的一个新领域,为 RNA 在肿瘤诊断中的应用提出了新的思路。2008 年,美国的 Mitchell 课题组^[75]及我国南京大学的张辰宇课题组^[76]分别报道了 miRNA 在血浆及血清中的存在,首次证实了 miRNA 可以在细胞外液中稳定存在。之后在多种其他体液如血液、尿液、唾液、精液中也发现了 miRNA^[77-80]。一般认为由于体液中存在 RNA 酶,绝大部分游离的 RNA 不可能在体液环境中稳定地存在,而循环 miRNA 的发现对此提出了挑战。后续研究^[76, 81]发现,这些在体液中存在的 miRNA 对 RNA 酶及极端条件的 pH 或温度的处理不敏感。该现象唯一可能的解释是,循环系统中存在一种保护 miRNA 不受 RNA 酶降解的机制。首先提出的是微泡(microvesicle, MV)包裹 miRNA 的模式:由于血液中存在大量的双层或单层膜结构的 MV, MV 保护 miRNA 使其稳定存在于血液循环中。研究^[82]发现,血浆中 MV 包裹的 miRNA 具有细胞间通信的功能;某些细胞可以通过分泌 MV 将 miRNA 定向输送到靶细胞内,进而调控靶细胞的功能^[83]。基于这一模式,对不同类型肿瘤患者的血液 miRNA 表达谱进行分析,发现了许多可以作为潜在肿瘤标志物的血清 miRNA,目前已报道的可以用于诊断实体瘤及血液系统恶性肿瘤的 miRNA 多达 79 个^[84],几乎包括了所有已知肿瘤^[85-89]。

但是,也有人对循环 miRNA 的 MV 包裹模式提出了质疑。Turchinovich 等^[90]认为,血液中 miRNA 绝大部分定位于 MV 之外,主要通过和 Ago2 蛋白(RNA 诱导沉默复合体的组成部分)结合,从而避免被 RNA 酶消化。这不难让人想到,肿瘤相关的循环 miRNA 可能只是肿瘤细胞凋亡或坏死后释放出的 RISC 复合物的一部分,其表达谱有很大的随机性和不稳定性。该观点给循环 miRNA 的研究蒙上了一层阴影。不过,张辰宇课题组^[91]随后发表论文反驳了这一观点:通过对 HeLa 细胞培养上清及健康人群血浆中 miRNA 的分析,发现大部分 miRNA 分布于 MV 中,将 MV 裂解后,内含的 miRNA 仍十分稳定,无法被 RNA 酶所消化;这些 miRNA 与 Ago2 蛋白结合,其对 RNA 酶的抗性依赖于 Ago2 蛋白;并且

在不同的细胞状态下,细胞分泌的 MV 中 miRNA 分子与 Ago2 分子结合的比例有所不同,这种 miRNA 结合 Ago2 蛋白的异质性,提示 MV 中 miRNA 分子的功能可能有所差异。Ago2 蛋白所结合的 miRNA 是细胞主动分泌的且具有细胞间通信作用的 miRNA 分子;非 Ago2 结合的 miRNA 在受体细胞中可能很快被降解而没有任何生物学功能。该研究提示,通过进一步细分 Ago2 结合和非结合的 miRNA 可以更确切地描述肿瘤相关循环 miRNA 的功能。

总而言之,关于体液特别是血液中 miRNA 的研究虽然处于起步阶段,但是却展现出诱人的前景。一方面,循环 miRNA 可能是肿瘤诊断的理想标志物,可以通过非创伤性手段快速、高效地诊断肿瘤。但就目前的研究水平而言,作为诊断指标,循环 miRNA 的特异性远未达到令人满意的程度,并且缺少标准化的分离、纯化手段及鉴定标准。目前的研究大多关注血液中单一 miRNA 的表达情况,笔者认为,联合多个循环 miRNA 的表达谱作为诊断指标,不仅可以提高精确性还可以提高指标的稳定性,这是未来的发展方向。另一方面,循环 miRNA 可能存在细胞间的调控功能,但是 miRNA 是怎样被分泌到血液中的,含有 miRNA 的 MV 如何实现定向识别靶细胞的,miRNA 是否可以在不同 MV 中穿梭及相互作用,接受了 miRNA 的靶细胞是否可以分泌 MV 进而将信号放大或反馈到分泌 MV 的源细胞?对这些问题人们还知之甚少,相信这些问题都将随着研究的深入得到解答。

3.2 竞争性内源 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)

在 RNA 非编码功能的研究中,最近提出并证实了 ceRNA 假说^[92]。ceRNA 假说认为,胞内所有含有相同 miRNA 反应元件(miRNA response element, MRE)的 RNA,包括 mRNA 及 lncRNA 在内,存在着一种以 miRNA 作为媒介的相互调控机制。miRNA 在胞内参与组成 RISC,通过特异性靶向目标 RNA 的 MRE,降解目标 RNA 或抑制其翻译活性^[93]。然而,单一基因的 mRNA 往往含有多个 MRE,因而可被多个不同的 miRNA 调控;单一 miRNA 可以调控多个含有相同 MRE 的不同转录本^[94]。通过直接竞争性结合 miRNA、mRNA 或 lncRNA 反向作用于 miRNA,这样,miRNA 便成为了 mRNA 及 lncRNA 相互“交流”的“语言”^[92]。在这一假说提出后不久,一系列研究^[95-99]证实了这种 RNA 之间相互调控的机制,并且在肿瘤中已经发现了数个 ceRNA 调控紊乱的现象。值得关注的是,在肿瘤发生、发展过程

中, mRNA 通过 ceRNA 调控其他基因表达时, 可以显现出与 mRNA 编码蛋白截然相反的功能。例如 2.3.3 中所提到的癌基因 *Zeb2*, 在黑素瘤的发生过程中, 可以竞争性结合 miR-181、miR-200b、miR-25 和 miR-92a, 从而去除这些 miRNA 对抑癌基因 *PTEN* 的抑制, 促进 *PTEN* 的表达, 抑制肿瘤的发生和发展^[83]。在上皮来源的肿瘤中, 癌基因 *Zeb2* 可以通过诱导 EMT 促进肿瘤的转移; 而在非上皮来源肿瘤如黑素瘤中, *Zeb2* 通过 ceRNA 途径发挥抑癌基因的作用。通过生物信息学对 ceRNA 的研究结果进行整合, 建立了 ceRNA 数据库^[100], 通过查询数据库, 可以十分方便地获得目的 mRNA 或 lncRNA 的 ceRNA 活性。

ceRNA 功能的发现为肿瘤的研究提出了新的机遇与挑战。对于肿瘤细胞而言, 没有绝对的癌基因与抑癌基因, 单一分子的紊乱可能导致一系列继发性的细胞代偿。并且, RNA 之间通过 miRNA 进行相互调控, 这可能是很多 miRNA 在肿瘤中发挥多种截然不同功能的原因。许多肿瘤相关 miRNA 敲除的小鼠并没有出现预期的功能表型也可能与此有关。肿瘤的发生、发展是一系列动态调控的结果, 可谓牵一发而动全身, 以往仅针对单一分子进行肿瘤研究的思路已经不再适用于现今的肿瘤研究, 只有对肿瘤 RNA 信号调控网络有更加全面的了解, 能够在肿瘤研究中做出突破性的进展。

3.3 RNA 选择性剪接

RNA 剪接是真核细胞中普遍存在的转录后修饰机制。新转录的 mRNA 前体的蛋白编码区包含有外显子序列、插入序列及内含子序列, 通过 RNA 剪接及选择性剪接过程, 使得同一 mRNA 前体可以被加工成为不同的转录本, 进而产生多种蛋白产物。研究^[101]表明, 超过 95% 的人类基因存在选择性剪接现象。对于肿瘤细胞的选择性剪接已经有了较为深入的认识, RNA 选择性剪接的异常是肿瘤细胞的特性之一。肿瘤细胞中许多重要的癌基因及抑癌基因都可以通过选择性剪接改变其活性。选择性剪接的蛋白产物在肿瘤发生、发展的多个方面, 如细胞增殖、侵袭、甲基化缺陷及化疗耐受等方面起到重要的作用^[102]。

RNA 剪接主要由剪接复合物完成, 而其选择性剪接主要由丝氨酸/精氨酸丰富 (serine/arginine-rich, SR) 蛋白家族与核内不均一核糖核蛋白 (heterogeneous nuclear RNP, hnRNP) 家族的蛋白所调控。SR 蛋白通过结合剪接增强子并招募剪接复合物, 促进剪接, 使最终转录本包含所调控的外显子^[103];

hnRNP 通过结合剪接沉默子抑制剪接, 使最终转录本不包含所调控的外显子^[104]。根据 RNA 选择性剪接的机制, 现已提出两种通过作用于 RNA 选择性剪接而治疗肿瘤的策略: 第一, 通过小分子化合物作用于 RNA 剪接复合物抑制 RNA 剪接, 进而抑制肿瘤细胞所必须的某些选择性剪接产物的生成, 发挥抗肿瘤作用。数个该类小分子化合物现已进入 I 期临床试验阶段^[105]。第二, 通过合成剪接转换反义寡核苷酸 (splice-switching oligonucleotides, SSO), 并与 RNA 前体上的剪接增强子或剪接沉默子结合, 阻止剪接复合体或者调节因子与剪接增强子或沉默子的结合, 从而恢复正常的剪接^[106-107]。

RNA 选择性剪接是肿瘤 RNA 靶向治疗的又一个较为热门的研究领域, 随着在肿瘤中发挥重要作用的选择性剪接现象不断地发现, 靶向选择性剪接的 SSO 将给人们带来更多的惊喜。

3.4 RNA 编辑

RNA 编辑是一种基因 RNA 层面的加工与修饰现象, 包括 DNA 转录成 RNA 后所发生的除了加帽、剪接、多聚腺苷酸化外的任何形式的 RNA 位点特异性变异。已经发现的 RNA 编辑现象中, 大多可归类为两种 RNA 核苷酸碱基的转变, 即由胞嘧啶核苷酸 (C) 到尿嘧啶核苷酸的转变 (U) (C-to-U) 以及由腺嘌呤核苷酸 (A) 到次黄嘌呤核苷酸 (I) 的转变 (A-to-I), 其中 A-to-I 编辑为高等真核生物 RNA 编辑的主要形式。尽管目前缺乏 A-to-I 编辑参与肿瘤发生的直接实验证据, 但是已有的几个生物信息学分析及实验结果提示, A-to-I 编辑在肿瘤发生中起到一定的作用^[108]。

A-to-I 编辑主要由 RNA 编辑酶 ADAR 家族 (adenosine deaminase acting on RNA family) 介导, ADAR 家族可以催化双链 RNA 中的 A 脱氨生成 I。高通量测序结合生物信息学研究^[109-110]发现, 这一现象大量发生于基因的非编码区域, 且 RNA 编辑影响 miRNA 的生成及功能^[111-113]、RNA 剪接^[114]及干细胞的存活^[115]。已有研究^[116-117]提示, A-to-I 编辑可能影响癌基因或抑癌基因的表达; 在颅内肿瘤^[108, 118]及儿童急性白血病^[119]中也发现了 ADAR 家族蛋白的表达异常。这些发现间接证明了 RNA 编辑在肿瘤发生、发展中的作用。

目前 RNA 编辑还是肿瘤研究中的一块处女地, 但是可以预见, 随着 RNA 编辑相关研究技术的发展和精确 RNA 编辑位点的获得, 越来越多的 RNA 编辑现象将会被发现^[120]。在调控选择性剪接、miRNA 调控、肿瘤干细胞及肿瘤微环境形成等领域,

RNA 编辑可能起到重要的作用, RNA 编辑很可能成为下一个肿瘤诊断、治疗及预后判断的新领域。

4 结 语

RNA 的研究是近几年肿瘤研究的新方向, 肿瘤中众多异常的非编码 RNA 分子如 miRNA、lncRNA 的发现, 以及众多 RNA 转录、加工、成熟(如 RNA 编辑、RNA 选择性剪接)、功能调控(如循环 RNA 表达谱的调控、胞内 ceRNA 的调控)的异常, 不仅深化了人们对于肿瘤发生、发展的认识, 也为临床上治愈肿瘤带来了新的希望。然而值得注意的是, RNA 的研究与传统的蛋白质研究有着极大的不同, 如照搬蛋白质研究方法去研究肿瘤中 RNA 的异常, 不仅无法完整地揭示 RNA 在肿瘤中的作用, 反而会对某些 RNA 分子的功能产生错误的认识。现今的肿瘤 RNA 研究存在着许多亟待解决的问题, 如 miRNA 治疗肿瘤的安全性和有效性评估、lncRNA 调控肿瘤分子机制、RNA 在表达谱层面如何对肿瘤进行整体调控、循环 miRNA 的生物学功能、ceRNA 如何将肿瘤细胞 RNA 调控整合成为一个调控网络、有哪些肿瘤 RNA 选择性剪接可以成为肿瘤治疗的靶点、RNA 编辑在肿瘤中的作用? 诸如此类的问题, 只有从 RNA 自身独特的属性出发, 通过研究其独特的基于核苷酸碱基序列互补所产生的靶向性, 以及基于二级及空间结构所产生的蛋白结合特异性等方面入手, 从 RNA 层面上拓展对肿瘤的认识, 这些问题才能得到圆满解答。随着肿瘤 RNA 研究相关领域的发展, 有理由相信肿瘤相关 RNA 的研究将加深人们对肿瘤的认识, 并为肿瘤的诊断和治疗带来革命性的突破。

[参 考 文 献]

- [1] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [2] Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [3] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. Nature, 2005, 435(7043): 834-838.
- [4] Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in cancer [J]. Annu Rev Med, 2009, 60: 167-179.
- [5] Hou J, Lin L, Zhou W, et al. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Cell, 2011, 19(2): 232-243.
- [6] Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia [J]. N Engl J Med, 2000, 343(26): 1910-1916.
- [7] Bullrich F, Fujii H, Calin G, et al. Characterization of the 13q14 tumor suppressor locus in CLL: Identification of ALTI, an alternative splice variant of the LEU2 gene [J]. Cancer Res, 2001, 61(18): 6640-6648.
- [8] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(24): 15524-15529.
- [9] Raveche ES, Salerno E, Scaglione BJ, et al. Abnormal micro-RNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice [J]. Blood, 2007, 109(12): 5079-5086.
- [10] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(39): 13944-13949.
- [11] Sampson VB, Rong NH, Han J, et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells [J]. Cancer Res, 2007, 67(20): 9762-9770.
- [12] Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene [J]. Genes Dev, 2007, 21(9): 1025-1030.
- [13] Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, et al. miR-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis [J]. Oncogene, 2007, 26(42): 6133-6140.
- [14] Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import [J]. Science, 2007, 315(5808): 97-100.
- [15] Tam W, Hughes SH, Hayward WS, et al. Avian bic, a gene isolated from a common retroviral site in avian leukosis virus-induced lymphomas that encodes a noncoding RNA, cooperates with c-myc in lymphomagenesis and erythroleukemogenesis [J]. J Virol, 2002, 76(9): 4275-4286.
- [16] Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2011, 51: 25-43.
- [17] Matiske S, Suetani RJ, Neilsen PM, et al. The oncogenic role of miR-155 in breast cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012, 21(8): 1236-1243.
- [18] Garzon R, Volinia S, Liu CG, et al. microRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2008, 111(6): 3183-3189.
- [19] Faraoni I, Laterza S, Ardiri D, et al. miR-424 and miR-155 deregulated expression in cytogenetically normal acute myeloid leukaemia: Correlation with NPM1 and FLT3 mutation status [J]. J Hematol Oncol, 2012, 5: 26.
- [20] Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, et al. Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(10): 3945-3950.
- [21] Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(18): 7024-7029.

- [22] Rokah OH, Granot G, Ovcharenko A, et al. Downregulation of miR-31, miR-155, and miR-564 in chronic myeloid leukemia cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35501.
- [23] Inomata M, Tagawa H, Guo YM, et al. MicroRNA-17-92 downregulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes [J]. *Blood*, 2009, 113(2): 396-402.
- [24] Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(21): 9628-9632.
- [25] Zhu S, Wu H, Wu F, et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis [J]. *Cell Res*, 2008, 18(3): 350-359.
- [26] Garzon R, Heaphy CE, Havelange V, et al. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2009, 114(26): 5331-5341.
- [27] He L, He X, Lim LP, et al. A microRNA component of the P53 tumour suppressor network [J]. *Nature*, 2007, 447(7148): 1130-1134.
- [28] Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to P53-mediated apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2007, 26(5): 731-743.
- [29] Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, et al. Transactivation of miR-34a by P53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2007, 26(5): 745-752.
- [30] Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells [J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(6): 435-443.
- [31] Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(40): 15805-15810.
- [32] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis [J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(3): 189-198.
- [33] Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(17): 1793-1801.
- [34] Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis [J]. *JAMA*, 2007, 297(17): 1901-1908.
- [35] Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma [J]. *JAMA*, 2008, 299(4): 425-436.
- [36] McDermott AM, Heneghan HM, Miller N, et al. The therapeutic potential of microRNAs: Disease modulators and drug targets [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(12): 3016-3029.
- [37] Bader AG, Brown D, Stoudemire J, et al. Developing therapeutic microRNAs for cancer [J]. *Gene Ther*, 2011, 18(12): 1121-1126.
- [38] Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, et al. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(34): 12177-12182.
- [39] Trang P, Wiggins JF, Daige CL, et al. Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(6): 1116-1122.
- [40] Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, et al. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2 [J]. *Nat Med*, 2012, 18(7): 1136-1141.
- [41] Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1005-1017.
- [42] Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs' [J]. *Nature*, 2005, 438(7068): 685-689.
- [43] Davis S, Propp S, Freier SM, et al. Potent inhibition of microRNA *in vivo* without degradation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(1): 70-77.
- [44] Elmen J, Lindow M, Schutz S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates [J]. *Nature*, 2008, 452(7189): 896-899.
- [45] Fabiani MM, Abreu-Goodger C, Williams D, et al. Efficient inhibition of miR-155 function *in vivo* by peptide nucleic acids [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(13): 4466-4475.
- [46] Ebert MS, Sharp PA, MicroRNA sponges: Progress and possibilities [J]. *RNA*, 2010, 16(11): 2043-2050.
- [47] Wang Z, The principles of miRNA-masking antisense oligonucleotides technology [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 676: 43-49.
- [48] US National Institutes of Health. Multiple ascending dose study of miravirsin in treatment-naïve chronic hepatitis C subjects [EB/OL]. (2010-09-09) [2012-01-26]. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01200420>.
- [49] Salditt-Georgieff M, Darnell JE Jr. Further evidence that the majority of primary nuclear RNA transcripts in mammalian cells do not contribute to mRNA [J]. *Mol Cell Biol*, 1982, 2(6): 701-707.
- [50] Salditt-Georgieff M, Harpold MM, Wilson MC, et al. Large heterogeneous nuclear ribonucleic acid has three times as many 5' caps as polyadenylic acid segments, and most caps do not enter polyribosomes [J]. *Mol Cell Biol*, 1981, 1(2): 179-187.
- [51] Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project [J]. *Nature*, 2007, 447(7146): 799-816.
- [52] Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer [J]. *Cell*, 2007, 128(4): 683-692.
- [53] Guttman M, Amit I, Garber M, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals [J]. *Nature*, 2009, 458(7235): 223-227.
- [54] Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs [J]. *Mol Cell*, 2011, 43(6): 904-914.
- [55] Kino T, Hurt DE, Ichijo T, et al. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor [J]. *Sci Signal*, 2010, 3(107): ra8.

- [56] 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.
- [57] Spitale RC, Tsai MC, Chang HY. RNA templating the epigenome: Long non-coding RNAs as molecular scaffolds [J]. *Epigenetics*, 2011, 6(5): 539-543.
- [58] Zappulla DC, Cech TR. RNA as a flexible scaffold for proteins: Yeast telomerase and beyond [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006, 71: 217-224.
- [59] Tsai MC, Manor O, Wan Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes [J]. *Science*, 2010, 329(5992): 689-693.
- [60] Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, et al. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15 (INK4B) tumor suppressor gene [J]. *Oncogene*, 2011, 30(16): 1956-1962.
- [61] 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.
- [62] Guttman M, Donaghey J, Carey BW, et al. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation [J]. *Nature*, 2011, 477(7364): 295-300.
- [63] Khalil AM, Guttman M, Huarte M, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(28): 11667-11672.
- [64] Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis [J]. *Nature*, 2010, 464(7291): 1071-1076.
- [65] Huarte M, Guttman M, Feldser D, et al. A large intergenic non-coding RNA induced by P53 mediates global gene repression in the P53 response [J]. *Cell*, 2010, 142(3): 409-419.
- [66] Tsai MC, Spitale RC, Chang HY. Long intergenic noncoding RNAs: New links in cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(1): 3-7.
- [67] Kogo R, Shimamura T, Mimori K, et al. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(20): 6320-6326.
- [68] Yang Z, Zhou L, Wu LM, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation [J]. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18(5): 1243-1250.
- [69] Zhang L, Yang F, Yuan JH, et al. Epigenetic activation of the MiR-200 family contributes to H19 mediated metastasis suppression in hepatocellular carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2013 [Epub ahead of print].
- [70] Beltran M, Puig I, Pena C, et al. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(6): 756-769.
- [71] Qi P, Du X. The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine [J]. *Mod Pathol*, 2012 [Epub ahead of print].
- [72] Schmidt LH, Spieker T, Koschmieder S, et al. The long noncoding MALAT-1 RNA indicates a poor prognosis in non-small cell lung cancer and induces migration and tumor growth [J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(12): 1984-1992.
- [73] Prensner JR, Iyer MK, Balbin OA, et al. Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 742-749.
- [74] Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs [J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 145-166.
- [75] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(30): 10513-10518.
- [76] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases [J]. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997-1006.
- [77] Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9798-9807.
- [78] Hanke M, Hoefig K, Merz H, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: MicroRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer [J]. *Urol Oncol*, 2010, 28(6): 655-661.
- [79] Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: Discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17): 5473-5477.
- [80] Zubakov D, Boersma AW, Choi Y, et al. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation [J]. *Int J Legal Med*, 2010, 124(3): 217-226.
- [81] Zen K, Zhang CY. Circulating microRNAs: A novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers [J]. *Med Res Rev*, 2012, 32(2): 326-348.
- [82] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654-659.
- [83] Zhang Y, Liu D, Chen X, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration [J]. *Mol Cell*, 2010, 39(1): 133-144.
- [84] Allegra A, Alonci A, Campo S, et al. Circulating microRNAs: New biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(6): 1897-1912.
- [85] Shen J, Liu Z, Todd NW, et al. Diagnosis of lung cancer in individuals with solitary pulmonary nodules by plasma microRNA biomarkers [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 374-382.
- [86] Roth C, Rack B, Muller V, et al. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12(6): R90- R97.
- [87] Xu J, Wu C, Che X, et al. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis [J]. *Mol Carcinog*, 2011, 50(2): 136-142.

- [88] Cheng H, Zhang L, Cogdell DE, et al. Circulating plasma miR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17745-e17752.
- [89] Moussay E, Wang K, Cho JH, et al. MicroRNA as biomarkers and regulators in B-cell chronic lymphocytic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(16): 6573-6578.
- [90] Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, et al. Characterization of extracellular circulating microRNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(16): 7223-7233.
- [91] Li L, Zhu D, Huang L, et al. Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46957-e46965.
- [92] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, et al. A ceRNA hypothesis: The rosetta stone of a hidden RNA language? [J]. *Cell*, 2011, 146(3): 353-358.
- [93] Bartel DP. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- [94] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J]. *Genome Res*, 2009, 19(1): 92-105.
- [95] Tay Y, Kats L, Salmena L, et al. Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs [J]. *Cell*, 2011, 147(2): 344-357.
- [96] Karreth FA, Tay Y, Perna D, et al. *In vivo* identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma [J]. *Cell*, 2011, 147(2): 382-395.
- [97] Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, et al. A long non-coding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA [J]. *Cell*, 2011, 147(2): 358-369.
- [98] Sumazin P, Yang X, Chiu HS, et al. An extensive microRNA-mediated network of RNA-RNA interactions regulates established oncogenic pathways in glioblastoma [J]. *Cell*, 2011, 147(2): 370-381.
- [99] Fang L, Du WW, Yang X, et al. Versican 3'-untranslated region (3'-UTR) functions as a ceRNA in inducing the development of hepatocellular carcinoma by regulating miRNA activity [J]. *FASEB J*, 2012 [Epub ahead of print].
- [100] Sarver AL, Subramanian S. Competing endogenous RNA database [J]. *Bioinformatics*, 2012, 8(15): 731-733.
- [101] Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes [J]. *Nature*, 2008, 456(7221): 470-476.
- [102] Kelemen O, Convertini P, Zhang Z, et al. Function of alternative splicing [J]. *Gene*, 2013, 514(1): 1-30.
- [103] Long JC, Caceres JF. The SR protein family of splicing factors: Master regulators of gene expression [J]. *Biochem J*, 2009, 417(1): 15-27.
- [104] Martinez-Contreras R, Cloutier P, Shkreta L, et al. hnRNP proteins and splicing control [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 623: 123-147.
- [105] Kaida D, Schneider-Poetsch T, Yoshida M. Splicing in oncogenesis and tumor suppression [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(9): 1611-1616.
- [106] Bauman J, Jearawiriyapaisarn N, Kole R. Therapeutic potential of splice-switching oligonucleotides [J]. *Oligonucleotides*, 2009, 19(1): 1-13.
- [107] Wan J. Antisense-mediated exon skipping to shift alternative splicing to treat cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 867: 201-208.
- [108] Paz N, Levanon EY, Amariglio N, et al. Altered adenosine-to-inosine RNA editing in human cancer [J]. *Genome Res*, 2007, 17(11): 1586-1595.
- [109] Levanon EY, Eisenberg E, Yelin R, et al. Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(8): 1001-1005.
- [110] Bahn JH, Lee JH, Li G, et al. Accurate identification of A-to-I RNA editing in human by transcriptome sequencing [J]. *Genome Res*, 2012, 22(1): 142-150.
- [111] Yang W, Chendrimada TP, Wang Q, et al. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(1): 13-21.
- [112] Kawahara Y, Zinshteyn B, Sethupathy P, et al. Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs [J]. *Science*, 2007, 315(5815): 1137-1140.
- [113] Borchert GM, Gilmore BL, Spengler RM, et al. Adenosine deamination in human transcripts generates novel microRNA binding sites [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(24): 4801-4807.
- [114] Rueter SM, Dawson TR, Emeson RB. Regulation of alternative splicing by RNA editing [J]. *Nature*, 1999, 399(6731): 75-80.
- [115] Xu FR, Boyer MJ, Shen H, et al. ADAR1 is required for hematopoietic progenitor cell survival via RNA editing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(42): 17763-17768.
- [116] Kiran A, Baranov PV. DARNED: A database of RNA editing in humans [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(14): 1772-1776.
- [117] Picardi E, D'Antonio M, Carrabino D, et al. ExpEdit: A web-server to explore human RNA editing in RNA-Seq experiments [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(9): 1311-1312.
- [118] Cenci C, Barzotti R, Galeano F, et al. Down-regulation of RNA editing in pediatric astrocytomas: ADAR2 editing activity inhibits cell migration and proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(11): 7251-7260.
- [119] Ma CH, Chong JH, Guo Y, et al. Abnormal expression of ADAR1 isoforms in Chinese pediatric acute leukemias [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(2): 245-251.
- [120] Tseng CN, Chang HW, Stocker J, et al. A method to identify RNA A-to-I editing targets using I-specific cleavage and exon array analysis [J]. *Mol Cell Probes*, 2013, 27(1): 38-45.

[收稿日期] 2012 - 12 - 28

[修回日期] 2013 - 01 - 10

[本文编辑] 周玲琳