

长链非编码 RNA-蛋白质相互作用在肿瘤研究与治疗中的新进展

Emerging roles of long non-coding RNA and protein interactions in cancer research and therapy

李梦轩,薛逸荃 综述;曹雪涛 审阅(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)

[摘要] 肿瘤的发生、发展涉及细胞内众多基因表达异常和分子间相互作用的改变。其中,异常表达的长链非编码 RNA (long non-coding RNA) 通过与蛋白质相互作用,在信号转导、基因表达、蛋白功能等各个层面调控癌基因、抑癌基因的表达与功能,进而影响肿瘤的发生和发展。本文将围绕着肿瘤细胞中 lncRNA-蛋白质相互作用的最新研究进展,结合相关技术,阐明其分子机制,并结合临床研究前沿热点,讨论如何阻断肿瘤中 lncRNA-蛋白质相互作用,及在肿瘤治疗中的应用。

[关键词] RNA;长链非编码 RNA;蛋白质;肿瘤

[中图分类号] R730.2; R730.5; R730.43

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)04-0429-07

与其他非编码 RNA 相比,lncRNA 长度较长(大于 200 bp),具有复杂的二级或高级结构^[1],并且其基因往往具有启动子、增强子等独立的调控元件^[2],组织、器官表达差异大,肿瘤特异性的 lncRNA 及其与其他分子间相互作用成为近几年肿瘤学研究的热点。在肿瘤细胞中,lncRNA 分子可以通过多种分子间相互作用发挥功能:如通过结合染色质构象蛋白调控染色质结构;通过结合表观修饰酶调节表观修饰状态;通过结合信号蛋白调控信号转导;通过与 mRNA、miRNA 等分子结合影响这些 RNA 分子活性等。其中,lncRNA 以多种形式与蛋白质发生相互作用,分别发挥蛋白诱饵、蛋白支架、引导蛋白靶向和胞内信号^[3]的功能,参与肿瘤发生、进展、转移等各个过程,起到了广泛和重要的调节作用。

RNA 与蛋白质的相互作用是普遍存在的。除了经典的 RNA 结合蛋白(RNA binding protein, RBP)之外,很多信号通路蛋白,转录/翻译调控蛋白,染色质调控蛋白等也可以与 lncRNA 结合。并且除了经典的 RBP 中的 RNA 结合模体(RNA binding motif)之外,蛋白质的其他功能结构域也可以与 RNA 相结合;另一方面,RNA 研究技术体系的革新,使得 RNA-蛋白质的相互作用研究更加方便有效。各种 RNA 结合蛋白免疫沉淀技术(RNA immunoprecipitation, RIP)、紫外交联免疫沉淀技术(UV cross-linking and immunoprecipitation, CLIP)、RNA 原位成像技术(RNA fluorescence in situ hybridization, RNA-FISH)的出现和发展,使原本不可能或者难以观测到的高精度 RNA 蛋白质相互作用成为可能。

RIP 技术揭示了许多经典的 lncRNA-蛋白质相互作用^[4-5],但是 RIP 技术无法更加精确地观察到与蛋白质结合的 lncRNA 位点,CLIP 技术应运而生,

它利用 256 nm 紫外光对 lncRNA 和蛋白质交联,并用核酸酶降解部分 RNA,以获得与蛋白质结合的 RNA 片段^[6]。CLIP 联合高通量测序技术(CLIP-seq)更是在全基因组水平上观察到与蛋白质相互作用的 RNA 结合位点,带来了更多的研究成果^[7]。而 RNA-FISH 技术则能提供 lncRNA 与蛋白质的空间位置关系及在细胞中的精确定位,为解析 lncRNA 的功能提供有力依据,如 lncRNA MALAT1 精确定位于核内的核斑^[8]。此外,用于研究 RNA 高级结构的相关技术 DMS、SHAPE 等^[9],则让人们利用 lncRNA 高级结构预测 lncRNA-蛋白质作用位点成为可能。

1 肿瘤中的 lncRNA-蛋白质相互作用

细胞中 lncRNA 与蛋白质相互依赖于不同的机制:其一,蛋白质的 RNA 结合结构域(RNA binding domain, RBD)识别并结合具有特定二级结构的 lncRNA^[10];其二、有些蛋白质结合 lncRNA 不仅依赖高级结构,还具有序列特异性^[11];其三,不具有 RBD 的蛋白质通过其他方式结合 RNA,如 lncRNA Gas5 结合类固醇受体的 DNA 结合结构域^[12],而 PRC 复

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No. 2015CB964403, No. 2013CB530502)。Project supported by the National Key Basic Research Program of China (No. 2015CB964403, No. 2013CB530502)

[作者简介] 李梦轩(1989-),男,硕士生,主要从事 RNA 在天然免疫中调控作用的基础研究,E-mail: limengxuan009@sina.com

[通信作者] 曹雪涛(CAO Xuetao, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事天然免疫与炎症基础、临床疾病免疫治疗研究,E-mail: caoxt@immunol.org

[优先发表]

合物不具有 RBD, 却可与众多 lncRNA 相互作用, 而其机制尚不明确^[9]。

根据 lncRNA 在与蛋白质相互作用中扮演的不同角色, 可将其归纳为 4 种作用机制: 蛋白诱饵、蛋白支架、引导蛋白靶向和胞内信号。这些形式多样的作用机制共同构成了 lncRNA 特殊的生物学特性。

1.1 蛋白诱饵

这一类 lncRNA 在结合蛋白质后, 通过阻断蛋白与其靶标分子的相互作用, 起到调节基因转录、影响染色质稳定性、改变染色质局部构象等作用。

第一, lncRNA 可以结合转录因子, 发挥蛋白诱饵的作用, 以阻止信号通路相关基因的转录和炎症因子的活化。p53 和 DNA 损伤介导产生的 lncRNA PANDA, 可以结合转录因子 NF- κ B 并阻断其向凋亡相关基因募集, 从而阻止 DNA 损伤诱导的凋亡发生^[13]。此外, 细胞饥饿或缺少生长因子刺激时, 诱导产生的 lncRNA Gas5 也扮演“诱饵”的作用, 封闭糖皮质激素受体上的 DNA 结合位点, 阻断糖皮质激素应答基因的表达^[12, 14], 从而介导正常细胞在饥饿时发生凋亡。然而, 乳腺癌细胞中 Gas5 低表达, 从而增强了癌细胞在饥饿环境下的存活能力^[15]。另外, 在正常乳腺上皮细胞的细胞质中, lncRNA NKILA 直接覆盖 I κ B 的磷酸化位点, 以阻断其磷酸化和 NF- κ B 的活化, 防止 NF- κ B 信号通路的过度活跃, 而在乳腺癌组织中 NKILA 低表达则提示肿瘤转移风险增大及预后不良^[16]。相反, lncRNA 也可以直接结合蛋白以促进其磷酸化, 如 lnc-DC 与 STAT3 直接结合, 阻断 SHP1 对其去磷酸化作用, 达到促进 STAT3 磷酸化、调控树突状细胞分化的功能^[17], 然而功能类似的 lncRNA 在肿瘤中尚未见报道。

第二, lncRNA 能够结合染色质相关蛋白(chromatin-related protein), 维持染色体稳定性。肿瘤细胞的一个典型特征是染色体畸变现象, 这使得肿瘤细胞成为非整倍体细胞。PUMILIO 蛋白具有降低有丝分裂、降低 DNA 修复相关 mRNA 的稳定性的功能, 并影响这些 mRNA 的翻译, 而在正常细胞中, 大量表达的 lncRNA NORAD 阻断了 PUMILIO 蛋白。细胞敲除 NORAD 后则导致基因组不稳定和非整倍体的产生^[18]。目前, NORAD 在肿瘤组织中是否表达异常还未见报道, 如能得到证实, NORAD 则可能成为肿瘤发生发展的标志物, 甚至可以作为治疗的靶标投入临床应用。

第三, lncRNA 结合染色质重构复合物, 调控局部核小体定位。如在正常心肌细胞中, lncRNA Myheart 直接结合 SWI/SNF 复合物的 Brg1 亚基, 以阻

断其对基因组的异常识别, 保护心脏以防止发生心肌肥厚^[19]。相似地, 在前列腺癌中, lncRNA SchLAPI 通过干扰 SWI/SNF 复合物的 SNF5 亚基, 影响目的基因的核小体定位, 增强前列腺癌的侵袭与转移能力^[20-21], 但 SchLAPI 是否与 SNF5 直接结合尚不清楚。

1.2 蛋白支架

lncRNA 可以行使接头分子的功能, 使两个或数个蛋白分子形成复合物, 从而共同发挥生物学功能。

lncRNA 可以作为蛋白的支架构成核体(nuclear body)。最具代表性是 lncRNA NEAT1^[22]和 MALAT1^[23]作为支架分别形成旁斑(paraspeckle)和核斑(nuclear speckle)。NEAT1 结合 SFPQ、NONO 和 PSPC1 等多种蛋白形成旁斑并维持其稳定, 进而使具有 A-to-I 修饰的 RNA 滞留核内, 以进行进一步的翻译后调控^[24]。在乳腺癌样本中, 低氧的肿瘤微环境可以诱导 NEAT1 表达异常升高, 旁斑的形成也随之升高, 使细胞连接相关基因 *F11R* mRNA 滞留核中, 并增强了肿瘤细胞的存活能力, 但 *F11R* mRNA 滞留核中产生何种作用尚未阐明^[25]。也有研究证实, 乳腺癌细胞中 p53 可以诱导产生 NEAT1, 并促进旁斑的形成, 负反馈抑制 p53 介导的细胞凋亡^[26], 但是旁斑中的蛋白是否参与这个过程仍未阐明。类似地, MALAT1 结合多种蛋白形成核斑, 参与可变剪接及表观修饰等^[23]。在肺癌中, MALAT1 的异常表达得到了广泛关注。流行病学调查显示, 在早期非小细胞肺癌患者的肿瘤细胞中, MALAT1 的过量表达提示肿瘤具有高度的转移风险^[27]。小鼠实验证实, 肺癌细胞中高表达的 MALAT1 并不参与选择性剪切, 而是促进多种肿瘤转移相关的基因表达, 在敲除 MALAT1 后, 其远处转移能力得到削弱^[28]。也有研究^[29-30]表明, MALAT1 并非是分化发育或成年后维持组织的必需基因。MALAT1 在肿瘤中的调控作用是否有核斑参与、其具体机制如何, 这些问题值得进一步探讨。

lncRNA 还能结合多种表观修饰复合物, 协同发挥修饰作用。lncRNA HOTAIR 可以结合 PRC2 复合物和 LSD1/CoREST/REST 复合物, 分别介导 H3K27me3 修饰和 H3K4me2 去甲基化修饰, 进而抑制 *Hox* 基因簇的表达^[31-32]。在前列腺癌组织中, lncRNA ANRIL 表达增强, 且能同时结合 PRC1 和 PRC2 复合物, 对抑癌基因位点 INK4b/ARF/INK4a 进行修饰以抑制其表达^[33]。

1.3 引导蛋白靶向

许多蛋白和蛋白复合物行使其功能依赖于特异

性 lncRNA 的引导, lncRNA 可以同时结合蛋白复合物与特异性的 DNA 位点, 发挥引导功能。

lncRNA 通过引导表观修饰复合物对目的基因进行修饰, 调控目的基因的转录, 是 lncRNA 发挥表观修饰功能的重要途径。最具代表性的复合物当属 PRC2 和 MLL, 其分别可以介导核小体 H3K27me3 和 H3K4me3 修饰, 调控基因表达的抑制和活化状态。其他的表观修饰酶如 DNA 甲基化酶 DNMT、DNA 去甲基化酶 TET 等, 也可以直接或间接地与 lncRNA 结合, 对目的基因进行修饰。乳腺癌中 HOTAIR 能够招募 PRC2 对 PRG1、JAM216 等抑癌基因进行修饰, 强化乳腺癌细胞的间叶表型, 进而促进其发生转移^[34], HOTAIR 也通过同样的方式促进结直肠癌转移, 并且其高表达提示预后不良^[35]。在正常细胞中, lncRNA MIR31HG 招募 PRC2 到抑癌基因 INK4A 位点并抑制其表达, 而在细胞衰老过程中, MIR31HG 则从 INK4A 位点解离, 抑制作用随之消失^[36]。相反, lncRNA 也可以招募 DNA 去甲基化酶, 促进抑癌基因的表达, 如反义链 RNA TARID 通过介导抑癌基因 TCF21 启动子区的去甲基化作用, 促进其表达^[37]。一个经典例子是 Xist, 它可以同时结合多种表观修饰蛋白和染色质构象蛋白作用于目的位点, 介导 X 染色体失活和基因沉默, 将小鼠的造血干细胞 Xist 敲除后, 小鼠发生侵袭性骨髓增生障碍^[38], 说明 Xist 可能通过改变 X 染色体的状态参与肿瘤的发生过程。

lncRNA 可以直接引导信号蛋白参与信号通路的调控。前列腺癌特异性的 lncRNA PCGEM1 可以直接结合 c-myc 蛋白, 定位到目的基因的启动子区, 活化前列腺癌增殖与代谢途径的相关基因^[39]。lncRNA MEG3 能够与 p53 相互作用, 活化 p21CIP1 等 p53 下游基因的转录, 并且 MEG3 与 p53 的相互作用依赖于其二级结构^[40], 进一步的实验证实, MEG3 可以结合 p53 的 DNA 结合结构域^[41]。

1.4 胞内信号

面对不同的生命过程和外界刺激, lncRNA 的表达具有高度的时空特异性和组织特异性, 因此 lncRNA 可以作为特定的信号, 招募不同的作用蛋白, 精确调控特定条件下的基因表达。

lncRNA 作为调控信号调节染色质局部构象, 调控基因表达。有研究表明, p53 促进其目的基因转录时, 结合在目的基因的增强子区并促进其转录出增强子 RNA (enhancer RNA, eRNA), 这些 eRNA 作为活化信号招募 RNA 聚合酶 II 结合到启动子区, 拉近了增强子与启动子间的空间距离, 直接促进了这

些基因的活化^[42]。进而有全基因组筛选实验证实, 在正常细胞中, lncRNA LED 可以通过对 p53 目的基因增强子区的 H3K9ac 修饰, 促进抑癌基因 eRNA 的转录, 进而促进抑癌基因的正常表达, 而在一些白血病细胞中, LED 表达沉默^[43]。同样, 人类结肠癌特异性的 lncRNA CCAT1-L 通过结合构象蛋白 CTCF, 拉近 MYC 基因的启动子和增强子, 促进 MYC 的表达^[44]。类似的还有急性 T 淋巴细胞白血病中的 lncRNA LUNARI^[45]、前列腺癌中的 lncRNA PRNCR1、PCGEM1^[46]等。

lncRNA 作为 DNA 损伤信号的一环, 调控基因表达。DNA 损伤信号可以通过 p53 诱导出 lincRNA-p21, 其可以结合 hnRNPK 作用于 p21 基因的启动子区, 促进其转录, 进而强化 G1/S 检查点的作用, 而 lincRNA-p21 的缺失则能影响数百个 p53 目的基因的表达^[47-48]。

通过梳理 lncRNA-蛋白质相互作用的调控模式, 一些作用规律不难被发现: 一是重要的信号通路蛋白、癌基因、抑癌基因本身的表达受到 lncRNA 的调控; 二是 lncRNA 受到信号分子的调控, 对其目的基因产生进一步的调节作用。由此可见, lncRNA-蛋白质相互作用在各个层面上影响肿瘤的进程。

此外, 还有一些未知的领域有待探索。细胞中存在三大系统: 遗传信息表达系统、生物膜结构系统和细胞骨架结构系统。当前的 lncRNA 研究集中于遗传信息表达结构系统中, 研究 lncRNA 与某个或某几个蛋白的相互作用, 在更大的尺度上, lncRNA 是否可以与细胞骨架(如参与蛋白质入核、亚细胞器定位等过程)或者膜结构(如细胞器等)相互作用? 已有研究表明, lncRNA 在调控染色质构象的作用中, 与细胞骨架存在相互作用, 如 lncRNA Xist 在介导 X 染色体失活过程中, 核纤层蛋白可以直接结合 Xist, 将 X 染色体拉近核纤层, 确保 PRC2 等修饰复合物对其进行修饰^[49]。在肿瘤细胞中是否也存在类似现象? 在肿瘤中染色质结构的突变、染色质之间复杂的动态相互作用, 是否也有 lncRNA 在其中发挥功能? lncRNA 是否可以改变蛋白质的细胞定位, 并借助蛋白质在细胞中迁移? 同一蛋白是否可以在不同的细胞定位结合不同的 lncRNA 从而发挥不同的功能? 这些假说有待进一步研究证实。

2 阻断 lncRNA-蛋白质相互作用在肿瘤治疗中的应用

传统的肿瘤治疗手段如放疗、化疗等, 多以直接杀伤肿瘤细胞为目的, 其疗效虽确切但副作用大。

随后发展起来的靶向药物如单抗及小分子化合物等,取得良好的治疗效果,但同时也不可避免地存在原发性或获得性耐药,限制了其临床应用。肿瘤中 lncRNA-蛋白质相互作用的基础研究为临床应用提供了众多潜在靶点,以肿瘤中异常表达的 lncRNA 为靶标的治疗方法获得广泛关注。目前,针对 lncRNA 的治疗手段主要基于两个原则:一是调控表达水平,即沉默肿瘤细胞中明显高表达的 lncRNA,以抑制其通过异常结合蛋白发挥作用;二是消除分子功能,即改变 lncRNA 的序列或二级结构,以阻断其与蛋白分子之间的相互作用。

2.1 干扰 lncRNA 的表达水平

RNA 干扰技术是一种重要的沉默 lncRNA 手段。然而,不同的 RNA 干扰技术对不同细胞定位的 lncRNA 干扰效率不同^[50],这就要求针对不同的 lncRNA,慎重选择 RNA 干扰手段。针对细胞质中的 lncRNA 分子,小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 技术可以取得较好的干扰效率,对一些核内的分子也有不同的干扰作用;而反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASOs) 是一种 RNA/DNA 混合寡核苷酸,可以特异性结合 lncRNA 并招募 RNA 酶 H 进行切割,因而对不同细胞定位的 lncRNA 均具有较高的干扰效率^[51]。以编码蛋白基因为靶标,ASO 技术已经成功应用于一些良性疾病、淋巴瘤和实体瘤^[52-55],近两年,ASO 在 lncRNA 的相关治疗中的应用也得到了开展^[56]。已有临床前研究证实,ASO 技术针对肿瘤相关的 lncRNA 具有疗效,例如,在 MMTV-PyMT 小鼠乳腺癌转移模型中, MALAT1 推动肿瘤的增殖和转移,用 ASO 干扰 MALAT1 后,通过促进细胞囊性分化、增强细胞黏附性并且降低细胞迁移,取得了良好效果^[57]。

2.2 调控 lncRNA 的可变剪切

目前已有两种策略:一方面,剪接转换寡核苷酸 (splice-switching oligonucleotides, SSO) 可以与 RNA 前体上的剪接增强子或剪接沉默子结合,阻止剪接复合体发挥正常功能,因此,SSO 可以用来干扰 lncRNA 转录后的选择性剪切,阻断其形成正常外显子^[58],进而阻断 lncRNA 与目的蛋白相互作用,达到治疗的目的,这一技术在乳腺癌细胞系中针对 HER2 pre-mRNA 得到实现^[59];另一方面,通过小分子化合物作用于 RNA 剪切复合物,达到获得正确 RNA 剪接产物的目的,已有此类的小分子化合物进入临床试验阶段^[60]。但直到目前,以上两种可能的治疗手段在针对 lncRNA 研究中尚未见报道。相信在不久的将来,将会有更多的研究关注到这一领域。

2.3 利用 CRISPR/Cas9 技术改造基因

经历了从 ZFNs、TALENs 到如今 CRISPR/Cas9 的数代更迭^[61-64],基因编辑技术日趋成熟。CRISPR/Cas9 技术仅仅通过转染质粒就能够实现对细胞进行精确的基因编辑,大大缩短了操作时间并节约了成本,使基因编辑技术在基础研究及临床治疗等各领域中大放异彩。当前,CRISPR/Cas9 技术可以很方便地对胚胎干细胞进行编辑,从而仅用一代小鼠就能制备出转基因动物模型,甚至可以实现对多基因同时突变^[65],这给肿瘤治疗临床前研究极大地节约了时间和成本。该技术已经成功制备肝脏、造血干细胞中癌基因和抑癌基因突变的小鼠模型^[66-67],并且在小鼠模型中实现了对突变基因的纠正^[66],在 Burkitt 淋巴瘤中也能够用来减少 EB 病毒感染和阻止肿瘤细胞增殖^[68]。在一些肿瘤中发生突变及异常表达的 lncRNA 有望成为 CRISPR/Cas9 治疗肿瘤的靶点,例如在前列腺癌中发生点突变的 lncRNA PCAT-1^[69-70];结直肠癌中的 lncRNA CCAT2^[71];在肺癌中异常表达的 MALAT1 等。目前,寻找合适的药物递送系统将 CRISPR/Cas9 导入在体细胞一直是一个难题,当前的研究结果集中在三种手段:一是通过静脉注射直接将质粒导入体内^[66];二是利用病毒将表达体系带入细胞^[72-76];三是直接将 Cas9 mRNA 和 sgRNA 注射入体内^[65, 77]。但是,由于这些方法存在不同的安全性问题,因此限制了其投入临床试验。此外,还有 CRISPR/Cas9 技术本身的脱靶效应和其他可能的副作用同样亟待解决。作为一项新技术,尽管 CRISPR/Cas9 作为治疗手段仍存在局限性,但其迅猛发展的势头使人们相信,越来越多的成果将会转化到临床应用,为肿瘤的治疗开拓新的天地。

与此同时,针对 lncRNA 的治疗也面临着一些问题和挑战。其一,虽然各种 lncRNA 调控技术在体外观察到了很好的效果,但在体内实现精确调控 lncRNA 并不容易;其二,因为 lncRNA 的保守性问题,在小鼠模型中证实有效的治疗手段,转化到临床中时可能并不显效。由此可见,调控体内 lncRNA 的治疗方法离临床应用还有距离,选择合适的 lncRNA 靶点及合适的治疗手段,并将其应用到临床治疗中去,还有许多问题亟待解决。

3 展望

随着各种技术的发展,越来越多 lncRNA 分子与蛋白质分子结合并发挥功能的研究出现,让人们认识到了一种普遍的作用模式:即 lncRNA 通过与

蛋白质结合发挥调控蛋白质的功能。这一模式的建立,为肿瘤中 lncRNA 的研究指明了方向:在肿瘤中发现了异常表达的 lncRNA 之后,通过交联免疫沉淀的方法找寻其结合的蛋白质成为了目前 lncRNA 研究领域的思路。然而值得注意的是,lncRNA 分子并不一定仅仅通过调控蛋白质分子,起到“配角”功能,在 X 染色体剂量补偿、核体形成等过程中,lncRNA 分子还可以发挥核心的“主角”功能。这使得 lncRNA 分子除了作为肿瘤标志物外,也有可能成为肿瘤治疗的关键靶点。目前肿瘤中 lncRNA 的研究还处于起步阶段,很多关键性的问题亟待解决:如癌基因、抑癌基因与 lncRNA 的相互作用、肿瘤中 lncRNA 修饰的功能、找寻新的关键 lncRNA 分子等。这些相互作用、修饰是否会随着肿瘤的发生发展而动态变化?肿瘤中是否会存在不同于正常组织的新的 lncRNA-蛋白质结合?新技术的出现和发展为人们解决这些问题提供了一把钥匙,相信肿瘤 lncRNA 领域会给肿瘤的研究、诊断和治疗带来新的突破。

[参考文献]

- [1] BEERMANN J, PICCOLI M T, VIREECK J, et al. Non-coding RNAs in development and disease: background, mechanisms, and therapeutic approaches[J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(4): 1297-1325. DOI: 10.1152/physrev.00041.2015.
- [2] ULITSKY I, BARTEL D P. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms[J]. *Cell*, 2013, 154(1): 26-46. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.020.
- [3] WANG K C, CHANG H Y. Molecular mechanisms of long non-coding RNAs[J]. *Mol Cell*, 2011, 43(6): 904-914. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.08.018.
- [4] ZHAO J, SUN B K, ERWIN J A, et al. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome[J]. *Science*, 2008, 322(5902): 750-756. DOI: 10.1126/science.1163045.
- [5] PANDEY R R, 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. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.08.022.
- [6] ULE J, JENSEN K, MELE A, et al. CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells[J]. *Methods*, 2005, 37(4): 376-386. DOI: 10.1016/j.ymeth.2005.07.018.
- [7] DARNELL R B. HITS-CLIP: panoramic views of protein-RNA regulation in living cells[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2010, 1(2): 266-286. DOI: 10.1002/wrna.31.
- [8] TRIPATHI V, ELLIS J D, SHEN Z, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation[J]. *Mol Cell*, 2010, 39(6): 925-938. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.08.011.
- [9] BLYTHE A J, FOX A H, BOND C S. The ins and outs of lncRNA structure: How, why and what comes next? [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859(1): 46-58. DOI: 10.1016/j.bbapbm.2015.08.009.
- [10] HUDSON W H, ORTLUND E A. The structure, function and evolution of proteins that bind DNA and RNA[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(11): 749-760. DOI: 10.1038/nrm3884.
- [11] MASLIAH G, BARRAUD P, ALLAIN F H. RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(11): 1875-1895. DOI: 10.1007/s00018-012-1119-x.
- [12] HUDSON W H, PICKARD M R, DE VERA I M, et al. Conserved sequence-specific lincRNA-steroid receptor interactions drive transcriptional repression and direct cell fate[J/OL]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5395[2017-01-30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4280027/>. DOI: 10.1038/ncomms6395.
- [13] HUNG T, WANG Y, LIN M F, et al. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(7): 621-629. DOI: 10.1038/ng.848.
- [14] KINO T, HURT D E, ICHIJO T, et al. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor[J/OL]. *Sci Signal*, 2010, 3(107): ra8[2017-01-30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC289218/>. DOI: 10.1126/scisignal.2000568.
- [15] MOURTADA-MAARABOUNI M, PICKARD M R, HEDGE V L, et al. GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2009, 28(2): 195-208. DOI: 10.1038/onc.2008.373.
- [16] LIU B, SUN L, LIU Q, et al. A cytoplasmic NF-kappaB interacting long noncoding RNA blocks IkappaB phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(3): 370-381. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.02.004.
- [17] WANG P, XUE Y, HAN Y, et al. The STAT3-binding long non-coding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation [J]. *Science*, 2014, 344(6181): 310-313. DOI: 10.1126/science.1251456.
- [18] LEE S, KOPP F, CHANG T C, et al. Noncoding RNA NORAD regulates genomic stability by sequestering PUMILIO proteins[J]. *Cell*, 2016, 164(1/2): 69-80. DOI: 10.1016/j.cell.2015.12.017.
- [19] HAN P, LI W, LIN C H, et al. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy[J]. *Nature*, 2014, 514(7520): 102-106. DOI: 10.1038/nature13596.
- [20] PRENSNER J R, IYER M K, SAHU A, et al. The long noncoding RNA SchLAPI promotes aggressive prostate cancer and antagonizes the SWI/SNF complex[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(11): 1392-1398. DOI: 10.1038/ng.2771.
- [21] PRENSNER J R, ZHAO S, ERHO N, et al. RNA biomarkers associated with metastatic progression in prostate cancer: a multi-institutional high-throughput analysis of SchLAPI[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(13): 1469-1480. DOI: 10.1016/S1470-2045(14) 71113-1.
- [22] MAO Y S, SUNWOO H, ZHANG B, et al. Direct visualization of the co-transcriptional assembly of a nuclear body by noncoding RNAs[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(1): 95-101. DOI: 10.1038/ncb2140.

- [23] HUTCHINSON J N, ENSMINGER A W, CLEMSON C M, et al. A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains [J/OL]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 39. [2016-09-30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC800850/>. DOI: 10.1186/1471-2164-8-39.
- [24] BOND C S, FOX A H. Paraspeckles: nuclear bodies built on long noncoding RNA [J]. *J Cell Biol*, 2009, 186(5): 637-644. DOI: 10.1083/jcb.200906113.
- [25] CHOUDHRY H, ALBUKHARI A, MOROTTI M, et al. Tumor hypoxia induces nuclear paraspeckle formation through HIF-2alpha dependent transcriptional activation of NEAT1 leading to cancer cell survival [J]. *Oncogene*, 2015, 34(34): 4482-4490. DOI: 10.1038/nc.2014.378.
- [26] ADRIAENS C, STANDAERT L, BARRA J, et al. p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity [J]. *Nat Med*, 2016, 22(8): 861-868. DOI: 10.1038/nm.4135.
- [27] JI P, DIEDERICH S, WANG W, et al. MALAT-1, a novel non-coding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer [J]. *Oncogene*, 2003, 22(39): 8031-8041. DOI: 10.1038/sj.onc.1206928.
- [28] GUTSCHNER T, HAMMERLE M, EISSMANN M, et al. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(3): 1180-1189. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2850.
- [29] NAKAGAWA S, IP J Y, SHIOI G, et al. Malat1 is not an essential component of nuclear speckles in mice [J]. *RNA*, 2012, 18(8): 1487-1499. DOI: 10.1261/rna.033217.112.
- [30] ZHANG B, ARUN G, MAO Y S, et al. The lncRNA Malat1 is dispensable for mouse development but its transcription plays a cis-regulatory role in the adult [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(1): 111-123. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.06.003.
- [31] RINN J L, KERTESZ M, WANG J K, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs [J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1311-1323. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.022.
- [32] TSAI M C, MANOR O, WAN Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes [J]. *Science*, 2010, 329(5992): 689-693. DOI: 10.1126/science.1192002.
- [33] YAP K L, LI S, MUNOZ-CABELLO A M, et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a [J]. *Mol Cell*, 2010, 38(5): 662-674. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.03.021.
- [34] GUPTA R A, SHAH N, WANG K C, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis [J]. *Nature*, 2010, 464(7291): 1071-1076. DOI: 10.1038/nature08975.
- [35] 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. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1021.
- [36] MONTES M, NIELSEN M M, MAGLIERI G, et al. The lncRNA MIR31HG regulates p16(INK4A) expression to modulate senescence [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6967. DOI: 10.1038/ncomms7967.
- [37] ARAB K, PARK Y J, LINDROTH A M, et al. Long noncoding RNA TARID directs demethylation and activation of the tumor suppressor TCF21 via GADD45A [J]. *Mol Cell*, 2014, 55(4): 604-614. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.06.031.
- [38] YILDIRIM E, KIRBY J E, BROWN D E, et al. Xist RNA is a potent suppressor of hematologic cancer in mice [J]. *Cell*, 2013, 152(4): 727-742. DOI: 10.1016/j.cell.2013.01.034.
- [39] HUNG C L, WANG L Y, YU Y L, et al. A long noncoding RNA connects c-Myc to tumor metabolism [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(52): 18697-18702. DOI: 10.1073/pnas.1415669112.
- [40] ZHOU Y, ZHONG Y, WANG Y, et al. Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(34): 24731-24742. DOI: 10.1074/jbc.M702029200.
- [41] ZHU J, LIU S, YE F, et al. Long noncoding RNA MEG3 interacts with p53 protein and regulates partial p53 target genes in hepatoma cells [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139790 [2016-09-30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4596861/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0139790.
- [42] MELO C A, DROST J, WIJCHERS P J, et al. eRNAs are required for p53-dependent enhancer activity and gene transcription [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(3): 524-535. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.11.021.
- [43] LEVEILLE N, MELO C A, ROOIJERS K, et al. Genome-wide profiling of p53-regulated enhancer RNAs uncovers a subset of enhancers controlled by a lncRNA [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6520-6531 [2016-09-30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4389233/>. DOI: 10.1038/ncomms7520.
- [44] XIANG J F, YIN Q F, CHEN T, et al. Human colorectal cancer-specific CCAT1-L lncRNA regulates long-range chromatin interactions at the MYC locus [J]. *Cell Res*, 2014, 24(5): 513-531. DOI: 10.1038/cr.2014.35.
- [45] TRIMARCHI T, BILAL E, NTZIACHRISTOS P, et al. Genome-wide mapping and characterization of Notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia [J]. *Cell*, 2014, 158(3): 593-606. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.049.
- [46] YANG L, LIN C, JIN C, et al. lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs [J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 598-602. DOI: 10.1038/nature12451.
- [47] HUARTE M, GUTTMAN M, FELDSEER D, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response [J]. *Cell*, 2010, 142(3): 409-419. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.040.
- [48] DIMITROVA N, ZAMUDIO J R, JONG R M, et al. LincRNA-p21 activates p21 in cis to promote Polycomb target gene expression and to enforce the G1/S checkpoint [J]. *Mol Cell*, 2014, 54(5): 777-790. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.04.025.
- [49] CHEN C K, BLANCO M, JACKSON C, et al. Xist recruits the X chromosome to the nuclear lamina to enable chromosome-wide silencing [J]. *Science*, 2016, 354(6311): 468-472. DOI: 10.1126/science.aac0047.
- [50] LENNOX K A, BEHLKE M A. Cellular localization of long non-

- coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(2): 863-877. DOI: 10.1093/nar/gkv1206.
- [51] IDEUE T, HINO K, KITAO S, et al. Efficient oligonucleotide-mediated degradation of nuclear noncoding RNAs in mammalian cultured cells[J]. *RNA*, 2009, 15(8): 1578-1587. DOI: 10.1261/rna.1657609.
- [52] BULLER H R, BETHUNE C, BHANOT S, et al. Factor XI antisense oligonucleotide for prevention of venous thrombosis[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(3): 232-240. DOI: 10.1056/NEJMoa1405760.
- [53] GAUDET D, BRISSON D, TREMBLAY K, et al. Targeting APOC3 in the familial chylomicronemia syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(23): 2200-2206. DOI: 10.1056/NEJMoa1400284.
- [54] HONG D, KURZROCK R, KIM Y, et al. AZD9150, a next-generation antisense oligonucleotide inhibitor of STAT3 with early evidence of clinical activity in lymphoma and lung cancer[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(314): 314ra185. [2017-01-30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5279222/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac5272.
- [55] MENG L, WARD A J, CHUN S, et al. Towards a therapy for Angelman syndrome by targeting a long non-coding RNA[J]. *Nature*, 2015, 518(7539): 409-412. DOI: 10.1038/nature13975.
- [56] LING H, FABBRI M, CALIN G A. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(11): 847-865. DOI: 10.1038/nrd4140.
- [57] ARUN G, DIERMEIER S, AKERMAN M, et al. Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 lncRNA loss[J]. *Genes Dev*, 2016, 30(1): 34-51. DOI: 10.1101/gad.270959.115.
- [58] KOLE R, KRAINER A R, ALTMAN S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(2): 125-140. DOI: 10.1038/nrd3625.
- [59] WAN J. Antisense-mediated exon skipping to shift alternative splicing to treat cancer[J/OL]. *Methods Mol Biol*, 2012, 867: 201-208[2017-01-30]. <http://link.springer.com/bookseries/7651/>. DOI: 10.1007/978-1-61779-767-5_13.
- [60] KAIDA D, SCHNEIDER-POETSCH T, YOSHIDA M. Splicing in oncogenesis and tumor suppression[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(9): 1611-1616. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02356.x.
- [61] BIBIKOVA M, GOLIC M, GOLIC K G, et al. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases[J]. *Genetics*, 2002, 161(3): 1169-1175.
- [62] BIBIKOVA M, BEUMER K, TRAUTMAN J K, et al. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases[J]. *Science*, 2003, 300(5620): 764. DOI: 10.1126/science.1079512.
- [63] LI T, HUANG S, JIANG W Z, et al. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(1): 359-372. DOI: 10.1093/nar/gkq704.
- [64] LI T, HUANG S, ZHAO X, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(14): 6315-6325. DOI: 10.1093/nar/gkr188.
- [65] WANG H, YANG H, SHIVALILA C S, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering[J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910-918. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.025.
- [66] XUE W, CHEN S, YIN H, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver[J]. *Nature*, 2014, 514(7522): 380-384. DOI: 10.1038/nature13589.
- [67] HECKL D, KOWALCZYK M S, YUDOVICH D, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(9): 941-946. DOI: 10.1038/nbt.2951.
- [68] WANG J, QUAKE S R. RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(36): 13157-13162. DOI: 10.1073/pnas.1410785111.
- [69] PRENSNER J R, IYER M K, BALBIN O A, 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. DOI: 10.1038/nbt.1914.
- [70] EELES R A, KOTE-JARAI Z, GILES G G, et al. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(3): 316-321. DOI: 10.1038/ng.90.
- [71] LING H, SPIZZO R, ATLASI Y, et al. CCAT2, a novel noncoding RNA mapping to 8q24, underlies metastatic progression and chromosomal instability in colon cancer[J]. *Genome Res*, 2013, 23(9): 1446-1461. DOI: 10.1101/gr.152942.112.
- [72] SANCHEZ-RIVERA F J, PAPAGIANNAKOPOULOS T, ROMERO R, et al. Rapid modelling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing[J]. *Nature*, 2014, 516(7531): 428-431. DOI: 10.1038/nature13906.
- [73] MADDALO D, MANCHADO E, CONCEPCION C P, et al. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system[J]. *Nature*, 2014, 516(7531): 423-427. DOI: 10.1038/nature13902.
- [74] DING Q, STRONG A, PATEL K M, et al. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing[J]. *Circ Res*, 2014, 115(5): 488-492. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304351.
- [75] CHENG R, PENG J, YAN Y, et al. Efficient gene editing in adult mouse livers via adenoviral delivery of CRISPR/Cas9[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(21): 3954-3958. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.09.008.
- [76] WANG D, MOU H, LI S, et al. Adenovirus-mediated somatic genome editing of pten by CRISPR/Cas9 in mouse liver in spite of Cas9-specific immune responses[J]. *Hum Gene Ther*, 2015, 26(7): 432-442. DOI: 10.1089/hum.2015.087.
- [77] LI D, QIU Z, SHAO Y, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 681-683. DOI: 10.1038/nbt.2661.

[收稿日期] 2016 - 10 - 02

[修回日期] 2017 - 03 - 22

[本文编辑] 韩丹