

## • 综述 •

# MicroRNA在人类疾病中的作用及其作为靶点的小分子药物设计

张 勇, 吕延杰, 杨宝峰\*

(哈尔滨医科大学 药理学教研室 部 省共建生物医药国家重点实验室培育基地, 黑龙江 哈尔滨 150081)

**摘要:** 微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类含有约 22 个核苷酸的内源性非编码 RNA, 通过与靶 mRNA 的 3' 非翻译区 (3' UTR) 不完全性互补配对, 介导转录后基因调控。人类疾病的发生和发展过程都有 miRNA 参与, 其表达方式与疾病的诊断、分期、进展、预后及对治疗的反应程度密切相关。最近的研究表明 miRNA 可能成为大部分疾病的治疗靶点, 随之产生基于 miRNA 的实验技术, 结果表明这些技术不仅可以通过基因特异性方式干扰 miRNA 的作用, 还可能为今后进一步探索其功能提供良好的研究工具。另外, 新技术的应用还为以 miRNA 为靶点设计小分子药物应用于人类疾病的基因治疗迈出重要的一步。本篇综述首先总结 miRNA 与肿瘤、心律失常、心力衰竭和高血压等人类疾病发病的关系, 并进而探讨其为靶点进行小分子药物设计的可行性。

**关键词:** 微小 RNA; 心律失常; 心力衰竭; 高血压; 肿瘤; 药物设计

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)11 - 1115 - 07

## Potential role of microRNAs in human diseases and the exploration on design of small molecule agents

ZHANG Yong, LÜ Yan-jie, YANG Bao-feng\*

(Department of Pharmacology, Incubator of State-Province Key Laboratories of Biomedicine-Pharmaceutics of China, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

**Abstract:** MicroRNAs (miRNAs) are endogenous noncoding RNAs, about 22 nucleotides in length, that mediate post-transcriptional gene modulation by annealing to inexact complementary sequences in the 3'-untranslated regions of target mRNAs. miRNA alterations are involved in the initiation and progression of human diseases. miRNA-expression profiling of human diseases has identified signatures associated with diagnosis, staging, progression, prognosis and response to treatment. Recent evidence has suggested miRNAs as viable therapeutic targets for a wide range of human diseases. Several approaches were performed, the experimental examination of these techniques and the resultant findings not only indicate feasibility of interfering miRNA action in a gene-specific fashion but also may provide a new research tool for studying function of miRNAs. The new approaches also have the potential of becoming alternative gene therapy strategies.

**Key words:** microRNAs; arrhythmia; heart failure; hypertension; neoplasm; drug design

对人类健康造成极大危害的各种疾病,如肿瘤、

心律失常、心力衰竭及高血压等,其发病与基因异常有密切关系。虽然 miRNA 在 1993 年即被发现<sup>[1]</sup>, 但时隔 7 年人们才真正认识到其重要性,在生物界相关领域的研究也取得了重要进展。2006 年末,科学家开始注意到 miRNA 在心脏疾病发生发展过程中所起的重要作用<sup>[2]</sup>,并在心律失常、心力衰竭等疾病的研究中取得了一系列重要进展,使

收稿日期: 2007-04-09.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (2007CB512000, 2007CB512006); 国家自然科学基金重点资助项目 (30430780); 国家自然科学基金资助项目 (30672644).

\* 通讯作者 Tel: 86 - 451 - 86671354, Fax: 86 - 451 - 86675769, E-mail: yangbf@ems.hrbmu.edu.cn

miRNA成为国际心血管研究领域的热点。miRNA是一类具有21~25个核苷酸的单链小RNA,由具有发夹结构的约70~90个碱基大小的单链RNA前体经过酶加工后生成,是一些非编码小分子,通过调控基因表达来参与生命过程中的一系列重要进程,包括早期发育、细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化以及细胞死亡。有研究表明miRNA可能与疾病发生有密切的关系,在不同类型疾病的发生过程中,miRNA的水平及其调节作用是不同的。鉴于miRNA的重要性,作者归纳了近年来在该领域研究中的关键问题,总结了miRNA的作用机制及其作为小分子药物作用靶点研究的主要进展,重点讨论其在心血管疾病发生发展过程中的重要性及潜在应用前景,以此为线索,对设计合成新一类基因治疗药物的研究前景进行了展望。

### 1 miRNA的作用机制及功能

在细胞核内编码miRNA的基因首先转录成pri-miRNA,即miRNA的前体形式。Pri-miRNA在双链RNA特异的核酸酶Drosha RNase<sup>[3]</sup>的作用下,剪切为约70个核苷酸长度、具有发夹结构的pre-miRNA,然后在转运蛋白Exportin5的作用下,从核内运输到胞质中<sup>[4]</sup>。在另一个双链RNA特异性核酸酶Dicer酶<sup>[5]</sup>的作用下,pre-miRNA被剪切成21~25个核苷酸长度的双链miRNA<sup>[6]</sup>。双螺旋解旋后,其中一条链与RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)相结合<sup>[7]</sup>,发挥miRNA的功能,另一条立即被降解。miRNA与靶mRNA结合可介导RISC降解目的片段或是阻碍其翻译过程,这取决于miRNA与靶mRNA的错配程度,若完全或近乎完全匹配则可诱发RNA干扰(RNAi)通路,mRNA将被降解;而多数miRNA与靶mRNA并不完全互补,只起到封闭靶mRNA的作用,从而抑制其翻译过程。

miRNA的发现改变了我们对调节基因表达机制的理解。miRNA在基因组中的数量(预计在人类基因中含量>1%,调节约10%的基因)和表达水平(一些miRNA在每个细胞中的拷贝数>1000)表明miRNA是含量丰富的RNA种类之一,而且每个miRNA具有调节数百甚至数千个mRNA的潜能,因此miRNA在细胞中可能有广泛的功能。miRNA通过转录后调节作用使目的基因沉默,例如, Lee等<sup>[1]</sup>发现的第1个miRNA——lin-4可在秀丽隐杆线虫发育过程中下调lin-14和lin-28的表达,而7年后Reinhart等<sup>[8]</sup>报道了第2个miRNA——let-7可下调

lin-41蛋白的表达。

内含子中编码的miRNA是一种细胞内资源的高效利用,虽然在不同的时空发育阶段miRNA的表达量不同,但是多种miRNA在同一个细胞中的表达使得细胞处在一个受内源性miRNA调节的环境中,这个环境控制着成千上万蛋白质编码基因的mRNA水平,使得各种蛋白的表达处在一个合适的水平。但是,由于每个miRNA具有调节数百甚至数千mRNA的能力,导致miRNA作用缺乏基因特异性,这在一定程度上阻碍了其作为基因诊断和治疗靶点的应用。

有趣的是,在心脏、脑、肝脏等不同的组织中,都有特异性miRNA占主导地位,提示其在组织分化过程中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。目前已有证据提示在包括癌症在内的一系列人类疾病中miRNA可能是新的治疗靶点。

### 2 miRNA与肿瘤

miRNA在肿瘤发生过程中的作用已有诸多研究,且相关综述较多,这里不再赘述,此处主要探讨基于miRNA作用机制设计前瞻性肿瘤治疗方案。由于最近提出的原癌miRNA组学(Oncomirs)<sup>[10]</sup>这一崭新概念,将调节miRNA的小分子物质应用于肿瘤细胞的研究具有很大潜力,这一理论假设具有一定的事实基础,因为miRNA可调节很多与真核生物生存和增殖密切相关的基因,且miRNA是完全天然的内源性反义调节因子。另外, Meng等<sup>[11]</sup>首次报道了应用化疗药物作用于人类癌细胞可影响miRNA的表达,该研究发现给予gemcitabine(2,2-二氟脱氧胞嘧啶核苷)可改变miRNA的表达,体外调节某些miRNA(例如上调miR-21)还可增加胆管癌细胞对该化疗药物的敏感性。以上结论为miRNA作为肿瘤治疗靶点提供了实验基础。最近还有研究表明miRNA具有肿瘤抑制因子和原癌基因的功能。与应用可编码蛋白质的基因作为癌症分型方法相比,应用miRNA更加精确,不同肿瘤细胞表达的某一特定miRNA,其不同的表现形式可能成为诊断和治疗肿瘤的有利工具。基于miRNA的基因治疗可能成为抑制肿瘤恶化的有效途径。例如let-7,在肺癌<sup>[12]</sup>及结肠癌<sup>[13]</sup>细胞中其表达量降低,研究表明其可下调Ras和c-Myc蛋白表达,因此可转染let-7从而抑制上述两种肿瘤细胞的生长;但在胆管癌细胞中, Meng等<sup>[14]</sup>通过转染技术使白细胞介素-6(IL-6)过表达,则let-7a表达水平也相应升高,已知IL-6可促进肿瘤细胞生长并抵抗化疗药物作用,该研究组发

现 let-7a 的靶基因是 neurofibromatosis 2, 而该基因的表达产物可调节信号传导与转录活化因子-3 (signal transducers and activators of transcription, Stat3) 的磷酸化过程, 即 IL-6 表达水平持续增高并维持肿瘤细胞生长的过程中, let-7a 抑制抑癌基因 neurofibromatosis 2 的表达, 导致 Stat3 磷酸化作用增强并启动肿瘤细胞生存通路, 因此, 在这类肿瘤细胞中应抑制 let-7a 的表达。而 miR-15 和 miR-16 对 BCL-2 具有负性调节作用并诱导白血病细胞凋亡<sup>[15]</sup>, 它们都可能成为肿瘤治疗的候选分子。

### 3 miRNA 与心脏疾病

有关心肌 miRNA 的研究起步较晚, 且大多数研究是建立在以往骨骼肌的一些研究基础之上。2002 年, Lagos-Quintana 等<sup>[9]</sup>克隆了成年小鼠不同组织的 miRNA, 其中 miR-1 和 miR-133 在心肌组织表达量最为丰富, 且具有一定组织特异性, 说明两者在原始细胞向心肌细胞发育的过程中发挥重要作用。Chen 等<sup>[16]</sup>验证了 miR-1 和 miR-133 在心肌和骨骼肌的表达, 并研究了两者在肌细胞增殖和分化过程中发挥的功能。miR-1 和 miR-133 在小鼠 2 号染色体和 18 号染色体均成簇表达, 且同时转录。研究人员检测了胚胎鼠、新生鼠和成年鼠骨骼肌 miR-1 和 miR-133 的表达, 发现伴随发育进程, 两者的表达量逐渐增多。进一步研究发现两者发挥的功能却截然不同, miR-1 促进肌原细胞分化, 而 miR-133 可刺激肌原细胞增殖, 说明两者在骨骼肌和心肌表达的时间性和数量, 对于骨骼肌和心肌的不同时期发育过程具有重要作用。

从蠕虫到哺乳动物, miR-1 的序列都高度保守, 并大量表达于骨骼肌和心肌。敲除果蝇的 miR-1 并不影响幼虫肌序的形成和生理功能, 但随喂养和生长, 逐渐出现肌肉畸形和死亡<sup>[17]</sup>, 因此, 某些 miRNA 可能并不参与组织的形成, 但却是组织生长和维持所必须的。在骨骼肌的研究表明, miR-1 的靶基因是组蛋白脱乙酰基酶 4 (HDAC4), 该基因的表达产物通过下调肌细胞强化因子 MEF2C, 抑制肌原细胞的分化和骨骼肌的基因表达。若促进 miR-1 的表达, 则可在翻译前阻断 HDAC4 基因的作用, 并促进肌原细胞分化<sup>[16]</sup>。另有研究表明, HDAC4 在成骨细胞分化和骨骼肌形成中还可能是 miR-140 的靶基因<sup>[18]</sup>, 说明两种不同的 miRNA 可调节同一基因的表达。而在小鼠心肌, miR-1 受血清应答因子 (SRF)、肌原性分化因子 (MyoD) 和 Mef 2 等肌细胞分化因子调节, 其靶基因是 Hand2<sup>[19]</sup>。miR-1 过表达可导

致肌细胞过早停止增殖, 引起发育停止, 薄壁心室以及心衰。miR-133 的靶基因是 SRF, 该基因的表达产物对于维持肌细胞增殖和分化的平衡具有重要作用, 若增加 miR-133 的表达, 则可通过阻断 SRF, 抑制肌原细胞分化, 促进其增殖, 从而负向调节心肌过度发育, 并预防心衰<sup>[16]</sup>。因此 miR-1 和 miR-133 的表达存在一定辩证关系, 可通过调节它们的平衡产生对疾病的治疗作用。尽管 miR-181 很难在骨骼肌检测到, 但在肌原细胞分化过程, 其表达量明显升高, 并可下调分化抑制因子 Hox-A11 的表达<sup>[20]</sup>。miR-181 可能决定肌肉表现型, 而 miR-1 和 miR-133 可能与肌肉正常功能的维持有关。另外, miR-181 还可诱导造血干细胞分化为 B 型血细胞, 提示某些 miRNA 可能在不同细胞亚型扮演多重角色<sup>[21]</sup>。

近年来, 对不同病理条件下心肌 miRNA 的研究逐渐增多。Zhao 等<sup>[22]</sup>应用基因敲除技术研究 miR-1-2 在小鼠心脏发育过程中的作用, 发现敲除 miR-1-2 基因的小鼠死于先天性室间隔缺损的几率大大增加, 可能与调节心脏发育的转录因子 Hand2 过表达有关; 另一些存活的小鼠则由于出生后心肌细胞持续分裂而导致心肌肥大并伴有心律失常, miR-1-2 的靶基因 Irf5 表达异常增高, 而 Irf5 可抑制 Kcnd2 基因, 使 K<sup>+</sup>通道亚单位 Kv 4.2 表达减少, 心肌细胞复极异常。

心肌肥大是一种多基因遗传病, 但其发病机制尚不明了。Van Rooij 等<sup>[2]</sup>应用转基因动物和离体心肌细胞两种心肌肥大模型, 发现并验证了 7 种上调的 miRNA (miR-21、miR-23、miR-24、miR-125b、miR-195、miR-199 及 miR-214) 和 4 种下调的 miRNA (miR-29c、miR-93、miR-150 以及 miR-181b)。对于心肌肥大引起的心衰, 上调的 miRNA 与心肌肥大相似, 提示它们可能参与调控心肌组织的病理性重塑过程。进一步研究证实, 过表达 miR-195 不但可以使体外培养的心肌细胞肥大, 还可使转基因动物产生心肌肥大, 表现为左心室壁薄, 左心室内径增大以及心功能降低, 并最终导致心衰。

Sayed 等<sup>[23]</sup>同样研究了 miRNA 与容量负荷所致心肌肥大的关系。在众多 miRNA 中, miR-1 表达量下降。与在骨骼肌中的作用相似, miR-1 受 SRF 调节, 随年龄增长, 其表达增多, 心脏不再生长, 但当其受多种因素影响而下调时, 则可导致心脏的肥大, 推测其作用靶点可能是 Ras GTP 酶活化蛋白 (Ras GTPase-activating protein, RasGAP)、周期素依赖性蛋白激酶 9 (cyclin-dependent kinase 9, Cdk9)、脑内

Ras同系物 ( Ras homolog enriched in brain, Rheb)以及纤维结合蛋白 ( fibronectin)。伴随心肌肥大过程, m iR-21 上调,该 m iRNA具有抗凋亡活性,是肿瘤发生发展过程中的活跃分子。心脏负荷过大可导致凋亡,初期,心脏可通过使心肌细胞变肥大和激活抗凋亡通路产生补偿机制, m iR-21 的上调可产生强大的抗凋亡作用,因为其可同时调节多种凋亡基因,预测其作用位点为 Fas配体 ( Fas ligand)和转化生长因子- $\beta$ 受体 ( transforming growth factor- $\beta$  receptor, TGF- $\beta$  receptor)。

以上两项研究应用了不同的实验模型研究心肌肥大过程中 m iRNA发生的变化,说明 m iR-195 和 m iR-1 都是心肌组织生理功能的重要调控因子,但 m iR-195 与 m iR-1 的不同之处在于: m iR-1 主要存在并作用于成年心脏,维持心肌组织的正常生长,而 m iR-195 主要在心脏发育期发挥功能。

在应激状态或受甲状腺激素 T<sub>3</sub> 刺激时,心肌  $\alpha$  肌球蛋白重链 (  $\alpha$ -myosin heavy chain,  $\alpha$ MHC) 表达量下降,而  $\beta$ MHC 表达量增高,心肌发生纤维化和肥大反应。 m iR-208 由  $\alpha$ MHC 基因的内含子编码,若将 m iR-208 敲除,则小鼠心肌在应激状态下不发生肥大和纤维化,  $\beta$ MHC 表达量也不增加。研究表明, m iR-208 的靶基因是甲状腺激素受体相关蛋白 1 ( TR-associated protein 1, THRAP1) 基因,该基因表达产物可调节甲状腺激素受体 ( thyroid hormone receptor, TR),在 m iR-208 被敲除的情况下, THRAP1 表达量升高并增强 TR 对  $\beta$ MHC 的抑制作用,调节心肌的应激反应<sup>[24]</sup>。

作者最近研究发现, m iR-1 和 m iR-133 的结合位点在超极化激活的环状核苷酸门控通道基因 HCN2 和 HCN4 的 3' 不翻译区,并且证实 HCN2 可被 m iR-1 和 m iR-133 所抑制,而 HCN4 是 m iR-1 的调节靶点之一。由于 HCN2 和 HCN4 是起搏电流 ( $I_f$ ) 基因的重要亚单位,因此, m iR-1 和 m iR-133 抑制 HCN2 和 HCN4 转录的作用,也可导致起搏点活动性 ( $I_f$  电流密度及节律活动) 降低<sup>[25]</sup>。

作者还研究了心肌缺血和糖尿病性心脏病中 m iR-1 和 m iR-133 表达量的变化。在冠心病患者心肌组织中, m iR-1 表达水平比正常人高 2.8 倍。为研究 m iR-1 升高对于缺血心肌起保护作用还是有害因素,应用大鼠实验性心肌缺血模型,12 h 后缺血区 m iR-1 表达量比正常对照组高 2.6 倍,而非缺血区却没有变化。应用在体转基因技术将 m iR-1 特异性反义寡聚(脱氧)核苷酸 ( AMO-1) 导入缺血心肌时,

心律失常发生率明显降低。根据 m iR-1 的 5' 末端核苷酸序列推测出其两个靶基因 GJA1 和 KCNJ2, 它们分别编码间隙连接蛋白 43 ( Connexin43, 形成细胞间缝隙连接通道,与细胞间电导有关) 和 K<sup>+</sup> 通道亚单位 Kir2.1 (介导  $I_{K1}$  电流,调节心肌细胞静息膜电位)。进一步研究发现缺血过程中 m iR-1 可在不影响 GJA1 和 KCNJ2 的 mRNA 表达量的基础上,通过抑制两者的翻译影响传导和细胞膜电位。而作者以往的研究结果表明, Connexin43 与心律失常靶点 M<sub>3</sub> 受体 /  $I_{K_{M3}}$  存在功能性整合关系<sup>[26,27]</sup>, 综上所述可知 m iR-1 通过引起心肌缺血时离子通道失衡而达到其致心律失常作用<sup>[28]</sup>。 Nature Medicine 杂志对以上研究成果进行了专门评述,认为该发现为研究心律失常和猝死相关的新分子信号通路迈出了令人兴奋的一步<sup>[29]</sup>。另外,在缺血性心肌病<sup>[30]</sup>和糖尿病性心肌病<sup>[31]</sup>中 m iR-133 表达量显著增高,进而抑制 etheragogo related gene ( ERG) 的表达,表现为  $I_{K_r}$  电流下降,引起 QT 间期延长并发生心律失常。另一方面, m iR-133 还可抑制 KCNQ1<sup>[32]</sup>, 该基因编码的通道蛋白与  $I_{K_s}$  电流相关,但  $I_{K_s}$  在糖尿病性 QT 间期延长发病过程中所起的作用似乎不大<sup>[33]</sup>。作者最近的研究还发现 m iR-1 和 m iR-133 调节心肌细胞凋亡的作用截然相反, m iR-1 通过抑制 HSP60 与 HSP70 而具有促凋亡的作用,而 m iR-133 通过抑制 caspase-9 而具有抗凋亡的作用<sup>[34]</sup>。以上研究首次发现 m iR-1 和 m iR-133 是诱发心律失常的新靶点,是抗心律失常药物作用的新靶标,进一步揭示了缺血性心律失常发生发展的分子机制,完善了抗心律失常药物作用最佳靶点学说<sup>[35]</sup>,解释了抗心律失常药物远期疗效不佳的原因,即长期心肌缺血时 m iRNA 在调节心律失常过程中起了重要作用,而现有抗心律失常药物对 m iRNA 缺乏明显作用。

#### 4 m iRNA 与高血压

高血压的发病机制众多,其中包括 mRNA 的改变<sup>[36]</sup>, 因此不难推测 m iRNA 也可能参与了该调节过程。但 Hiroaki 和 Naoharu 的研究<sup>[37]</sup>并未检测到高血压与 m iRNA 的关系,他们观察了 Dahl 盐敏感鼠诱发高血压模型与正常鼠肾脏和心室 m iRNA 的区别,结果并无显著性差异,可能是由于某些病变不发生细胞的增殖或分化等调节过程,则 m iRNA 表达不发生变化。另外由于肾脏内细胞种类较多,某些细胞特异性 m iRNA 可能被稀释或表达量很低而不易被检测到。但高血压可引起心肌肥大,而最近的研究<sup>[2,23]</sup>都表明有 m iRNA 参与心肌肥大过程,这一

矛盾可能与该实验用的模型鼠有关。最近有报道证实了 m iRNA 直接参与高血压的发生过程, Sethupathy 等<sup>[38]</sup>观察了高血压相关单核苷酸多态性 ( SNP) 与 m iRNA 的关系, 发现 m iR-155 的靶基因是血管紧张素 II-1 型受体 ( angiotensin II type 1 receptor, AGTR1) 基因, 该基因 3' UTR 含有 SNP 位点 rs5186, 与高血压发生密切相关, 当该等位基因表现为 1166A 时, m iR-155 可与 AGTR1 的 3' UTR 结合并抑制该基因翻译, 此类人群不易患高血压; 若该等位基因表现为 1166C, 则 m iR-155 不能抑制 AGTR1 的翻译, 此类人群为高血压易感人群。该报道同时指出, 由于 m iR-155 定位于 21 号染色体, 在 21 三体综合征患者观察到的低血压现象可能与 m iR-155 过表达, 并对 AGTR1 基因抑制作用过强有关。

### 5 基于 m iRNA 的分子药物设计

长期以来, 人们认为 RNA 只是起到传递遗传信息的媒介作用, 在转录过程中从 DNA 获得遗传信息, 再翻译成蛋白质, 以往所谓的基因调控也是指对转录或翻译过程的调控。近年来的研究表明, m iRNA 在基因表达调控过程中发挥极其重要的作用, m iRNA 序列、结构、表达量和表达方式的多样性, 及其对靶 mRNA 作用强度的不同 (降解或封闭), 使其可能作为 mRNA 强有力的调节因子。另外, 由于 m iRNA 的作用发生于翻译之前, 对其进行调节比从蛋白水平进行调节更节约能量, 且相对于转录调节, m iRNA 的效果更快而且可逆, 对于一些只需微量蛋白改变而调节细胞功能的过程, 可以通过 m iRNA 来达到, 并产生强大的效能。基于以上特点, 探索基于内源性 m iRNA 作用原理的新技术平台, 并进行分子药物设计应用于疾病的基因诊断和治疗是本领域的研究方向, 其意义巨大并有广泛的应用前景。潜在的 m iRNA 靶标见表 1。

目前, 基于 m iRNA 的分子药物设计尚处于起步阶段, 研究主要集中于模拟 m iRNA, 增强其对靶基因的作用效能, 或以 m iRNA 为靶点设计小分子物质拮抗 m iRNA 的作用, 如 m iRNA 反义寡聚 (脱氧) 核苷酸 ( anti-m iRNA oligonucleotides, AMOs)<sup>[39]</sup>、锁定核酸修饰的寡核苷酸 [ locked nucleic acid ( LNA)-modified oligonucleotides]<sup>[40]</sup> 以及 m iRNA 拮抗分子 ( antagonists)<sup>[41]</sup> 等。

单纯模拟某些特定 m iRNA 仍然存在一定弊端, 因为每个内源性 m iRNA 可调控上千个靶点<sup>[42]</sup>, 这样势必会引起某些副作用。因此, 作者人工合成了基因特异性 m iRNA ( m iRNA mimics, 拟 m iRNA)<sup>[25]</sup>,

表 1 潜在的 m iRNA 靶标

m iRNA 靶标	靶基因 (蛋白质)	病理生理功能
Let-7	Ras <sup>[12,13]</sup>	肿瘤细胞生长
	c-Myc <sup>[13]</sup>	肿瘤细胞生长
Let-7a	Neurofibromatosis 2 <sup>[14]</sup>	Stat3 磷酸化生存通路
m iR-15 / m iR-16	BCL-2 <sup>[15]</sup>	肿瘤细胞凋亡
m iR-1	HDAC4 <sup>[16]</sup>	肌原细胞分化
	Hand2 <sup>[19]</sup>	肌细胞增殖、发育、心衰
	Irf5 <sup>[22]</sup>	心肌细胞复极异常
	HCN2 <sup>[25]</sup>	心脏起搏点活动性
	HCN4 <sup>[25]</sup>	心脏起搏点活动性
	GJA1 ( Connexin43) <sup>[28]</sup>	心肌细胞间电信号传导
	KCNJ2 ( Kir2.1) <sup>[28]</sup>	心肌细胞静息膜电位
	HSP60, HSP70 <sup>[34]</sup>	促进心肌细胞凋亡
	RasGAP <sup>[23]</sup>	容量负荷所致心肌肥大
	Cdk9 <sup>[23]</sup>	容量负荷所致心肌肥大
m iR-133	Rheb <sup>[23]</sup>	容量负荷所致心肌肥大
	Fibronectin <sup>[23]</sup>	容量负荷所致心肌肥大
	SR <sup>[16]</sup>	肌细胞增殖、发育、心衰
	HCN2 <sup>[25]</sup>	心脏起搏点活动性
	ERG <sup>[31]</sup>	心律失常
	KCNQ1 ( I <sub>Ks</sub> ) <sup>[32]</sup>	QT 间期改变
	Caspase-9 <sup>[34]</sup>	抗心肌细胞凋亡
	THRAP1 <sup>[24]</sup>	心肌应激反应
m iR-208	Fas ligand <sup>[23]</sup>	容量负荷所致心肌肥大
	TGF- $\beta$ receptor <sup>[23]</sup>	容量负荷所致心肌肥大
m iR-21		
m iR-140	HDAC4 <sup>[18]</sup>	成骨细胞分化、骨骼肌形成
m iR-181	Hox-A11 <sup>[20]</sup>	肌原细胞分化
m iR-155	AGTR1 <sup>[38]</sup>	血压调节

它是根据特定靶基因的 3' UTR 末端设计的一小段寡核苷酸链, 大小也是 22nt 左右, 其 5' 末端和 3' 末端分别有大约 6 个核苷酸序列与靶基因的 3' UTR 末端互补, 模拟体内 m iRNA 的作用方式, 对目的基因进行封闭, 具有较高特异性。基于 HCN2 和 HCN4 设计的拟 m iRNA 可抑制该两种基因的表达。前面提到 m iR-1 和 m iR-133 也能够抑制 HCN2 / HCN4 的翻译并降低起搏点活性, 但 m iR-1 或 m iR-133 还可影响其他多种基因<sup>[16,19,23]</sup>。因此作者合成的拟 m iRNA 与内源性 m iRNA 相比具有如下优点: 拟 m iRNA 是根据目的基因的序列设计而成的, 基因作用具有特异性, 下游调控靶点单一且特异; 而内源性 m iRNA 的作用缺乏选择性, 一个 m iRNA 可以作用于多个基因, 产生多重后续效应。另外, 体外合成拟 m iRNA 导入与传统的外源性小分子干扰 RNA ( siRNA) 导入技术相比, 具有以下区别及优势: ①虽然两种技术都是外源性合成双链 RNA, 但 siRNA 必须与靶基因序列完全配对才能起到基因沉默的作用。而拟 m iRNA 只需与靶基因序列配对 6 个核苷酸便可起到基因沉默的作用。显然, 设计一段拟 m iRNA 比设计一段 siRNA 要容易得多, 因为在靶基

因上寻找到一段较短的基因特异性序列显然比寻找到一段较长的基因特异性序列的几率要高得多；②在作用位置上,拟 miRNA与内源性 miRNA一致,主要作用于靶基因的 3' UTR 区,而 siRNA 可作用于 mRNA 的任何部位；③在作用方式上,miRNA 主要抑制靶基因的翻译(但在某些条件下亦可导致靶基因 mRNA 降解),即在转录后起作用,而 siRNA 通过降解靶基因 mRNA 而起到基因沉默的作用,不直接影响靶基因的翻译过程。因此一旦消除了拟 miRNA,完整的靶基因 mRNA 即可恢复翻译过程而合成蛋白。相比之下,siRNA 消除之后,蛋白翻译过程需待新的靶基因 mRNA 完成转录后才能重新启动。

单纯对内源性 miRNA 进行基因打靶或拮抗其效果也不理想,因为敲除某个 miRNA 会影响被该 miRNA 调节的多基因的表达<sup>[42]</sup>。为避免这一缺陷,作者采用了基因特异性靶向技术,即 miRNA 屏障技术(miRNA-masking antisense oligodeoxynucleotides)<sup>[25]</sup>。该技术具有以下特点:① miRNA 屏障技术中反义寡聚(脱氧)核苷酸与 miRNA 反义寡聚(脱氧)核苷酸(AMO)不同,前者是基于目标 mRNA 的 3' UTR 的 miRNA 结合位点序列设计的,而后者基于目标 miRNA 序列设计。前者通过去除 miRNA 对目标 mRNA 的蛋白翻译的特异性抑制效应,从而导致靶基因表达的增加,而后者则通过抑制目标 miRNA 从而导致所有受该目标 miRNA 抑制的基因表达增加;② miRNA 屏障技术中反义寡聚(脱氧)核苷酸与其靶 mRNA 相互作用(相结合)并不会导致该 miRNA 降解,这样该 miRNA 在其他基因上的功能是完整的。相反,miRNA 反义寡聚(脱氧)核苷酸与其靶 miRNA 相互作用(相结合)并导致该 miRNA 降解;③ miRNA 屏障技术中反义寡聚(脱氧)核苷酸是基因特异性的,因为它与靶 mRNA 序列完全互补,它也是 miRNA 特异性的,因为它是针对目标 mRNA 序列中 miRNA 的结合位点而设计的。相比之下,miRNA 反义寡聚(脱氧)核苷酸仅仅是 miRNA 特异性的而非基因特异性的。

现在作者还在探索对 miRNA 反义寡聚(脱氧)核苷酸(AMO)技术进行改进,将多个反义基因设计到一个可能同时沉默多个靶 miRNAs 的单个基因中,命名为多靶点 miRNA 反义核苷酸技术(Complex AMO, CAMO)。这种 CAMO 的“单试剂多靶点”方法的优点是它可以是携带多种同一反义单元的同型体或者是携带多种靶向不同 miRNA 的反义单元的

异型体。由于一个特定的 mRNA 被多种 miRNA 调节,为了获得基因的最佳干扰效果需要同时靶向多种 miRNA,这可能就是 CAMO 优于 AMO 之所在。

尽管越来越多的 miRNA 作为人类疾病的生物标志物,决定因素和治疗靶点被发现,但其靶基因的寻找以及所发挥的功能仍是制约该领域发展的瓶颈之一。此外,发展具有更长体内半衰期和更高效能的改良拟 miRNA 分子和反义分子,都是将基础研究进展应用于临床迈出的重要一步。今后开展基于 miRNA 的转基因和基因敲除在体实验,将为该类药物研发的安全性及有效性提供更多有价值的信息。

## References

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75: 843 - 854.
- [2] Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *PNAS*, 2006, 103:18255 - 18260.
- [3] Lee Y, Ahn C, Han, J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing [J]. *Nature*, 2003, 425: 415 - 419.
- [4] Lund E, Guttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors [J]. *Science*, 2004, 303: 95 - 98.
- [5] Bstein E, Caudy AA, Hammond S, et al. Role for abundant ribonuclease in the initiation step of RNA interference [J]. *Nature*, 2001, 409: 363 - 366.
- [6] Lee Y, Jeon K, Lee JT, et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization [J]. *EMBO J*, 2002, 21: 4663 - 4670.
- [7] Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias [J]. *Cell*, 2003, 115: 209 - 216.
- [8] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403: 901 - 906.
- [9] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse [J]. *Curr Biol*, 2002, 12: 735 - 739.
- [10] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomir-microRNAs with a role in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 259 - 269.
- [11] Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human microRNAs in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130: 2113 - 2129.
- [12] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the *let-7* microRNA family [J]. *Cell*, 2005, 120: 635 - 647.
- [13] Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. *let-7* microRNA functions

- as a potential growth suppressor in human colon cancer cells [ J ]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29: 903 - 906.
- [ 14 ] Meng FY, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes [ J ]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 8256 - 8264.
- [ 15 ] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 13944 - 13949.
- [ 16 ] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation [ J ]. *Nat Genet*, 2006, 38: 228 - 233.
- [ 17 ] Sokol NS, Ambros V. Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth [ J ]. *Genes Dev*, 2005, 19: 2343 - 2354.
- [ 18 ] Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, et al. The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells [ J ]. *FEBS Lett*, 2006, 580: 4214 - 4217.
- [ 19 ] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis [ J ]. *Nature*, 2005, 436: 214 - 220.
- [ 20 ] Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Poleskaya A, et al. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation [ J ]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8: 278 - 284.
- [ 21 ] Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation [ J ]. *Science*, 2004, 303: 83 - 86.
- [ 22 ] Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2 [ J ]. *Cell*, 2007, 129: 303 - 317.
- [ 23 ] Sayed D, Hong C, Chen IY, et al. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy [ J ]. *Circ Res*, 2007, 100: 416 - 424.
- [ 24 ] Van Rooij E, Sutherland LB, Qi XX, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA [ J ]. *Science*, 2007, 316: 575 - 579.
- [ 25 ] Xiao J, Yang BF, Lin HX, et al. Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 [ J ]. *J Cell Physiol*, 2007, 212: 285 - 292.
- [ 26 ] Zhang Y, Yue P, Xiao J, et al. Integration between M3 muscarinic acetylcholine receptor and connexin 43 as antiarrhythmic targets in rat ventricular myocardium [ J ]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 395 - 400.
- [ 27 ] Yue P, Zhang Y, Du ZM, et al. Ischemia impairs the association between connexin 43 and M3 subtype of acetylcholine muscarinic receptor (M3-mAChR) in ventricle myocytes [ J ]. *Cell Physiol Biochem*, 2006, 17: 129 - 136.
- [ 28 ] Yang BF, Lin HX, Xiao JN, et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2 [ J ]. *Nat Med*, 2007, 13: 486 - 491.
- [ 29 ] Anderson ME, Mohler PJ. MicroRNA may have macro effect on sudden death [ J ]. *Nat Med*, 2007, 13: 410 - 411.
- [ 30 ] Bai YL, Lu YJ, Shan HL, et al. Novel regulatory mechanism of the best antiarrhythmic target:  $I_{Kr}$ /HERG [ J ]. *Chin J Endemiol (中国地方病学杂志)*, 2007, 26: 36 - 38.
- [ 31 ] Xiao JN, Luo XB, Lin HX, et al. The muscle-specific microRNA miR-133 plays a significant role in the abnormal QT prolongation in diabetic hearts via repressing HERG  $K^+$  channel expression [ J ]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 12363 - 12367.
- [ 32 ] Luo X, Lin H, Lu Y, et al. Transcriptional activation by stimulating protein 1 and post-transcriptional repression by muscle-specific microRNAs of  $I_{Ks}$ -encoding genes and potential implications in regional heterogeneity of their expressions [ J ]. *J Cell Physiol*, 2007, 212: 358 - 367.
- [ 33 ] Zhang Y, Lin H, Xiao J, et al. Ionic mechanisms underlying abnormal QT prolongation and the associated arrhythmias in diabetic rabbits: a role of rapid delayed rectifier  $K^+$  current [ J ]. *Cell Physiol Biochem*, 2007, 19: 225 - 238.
- [ 34 ] Xu CQ, Lu YJ, Pan ZW, et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes [ J ]. *J Cell Sci*, 2007, 120: 3045 - 3052.
- [ 35 ] Yang BF, Shan HL, Gong DM, et al. Study on the best targets of antiarrhythmic drugs [ J ]. *J Harbin Univ Commer (Nat Sci) (哈尔滨商业大学学报 自然科学版)*, 2002, 18: 1 - 5.
- [ 36 ] Durand JB. Genetic basis of cardiomyopathy [ J ]. *Curr Opin Cardiol*, 1999, 14: 225 - 229.
- [ 37 ] Naraba H, Iwai N. Assessment of the microRNA system in salt-sensitive hypertension [ J ]. *Hypertens Res*, 2005, 28: 819 - 826.
- [ 38 ] Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, et al. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes [ J ]. *Am J Hum Genet*, 2007, 81: 405 - 413.
- [ 39 ] Weiler J, Hunziker J, Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease [ J ]. *Gene Ther*, 2005, 13: 496 - 502.
- [ 40 ] Orom UA, Kauppinen S, Lund AH. LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function [ J ]. *Gene*, 2006, 372: 137 - 141.
- [ 41 ] Knutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs *in vivo* with "antagomirs" [ J ]. *Nature*, 2005, 438: 685 - 689.
- [ 42 ] Miranda KC, Huynh T, Tay Y, et al. A pattern-based method for the identification of microRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes [ J ]. *Cell*, 2006, 126: 1203 - 1217.