

RNA 激活在恶性肿瘤中的研究进展

梁承潇¹, 沈 钢²

(1. 浙江医院, 浙江 杭州 310013;

2. 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009)

摘要:小激活 RNAs(saRNA)是一类非编码 RNA,具有与小干扰 RNA(siRNA)相同的结构和化学组分。尽管它们具有完全相反的生物学功能,但是 saRNA 能介导细胞中相应靶基因的转录激活。最近的一系列研究为 RNAa 提供了明确的证据,而开展的第一个 RNAa I 期临床试验表明,运用特殊介质传递 saRNA 药物能实现对患者疾病的稳定或肿瘤消退,并具有良好的耐受性。因此,借助于 saRNAs 特殊的作用机制和特征, RNAa 可能成为一些疾病的全新治疗方法。

关键词:小激活 RNAs;基因激活;恶性肿瘤

中图分类号:R730.2 文献标识码:A 文章编号:1671-170X(2019)09-0822-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2019.09.B012

Research Progress on Activating RNAs in Tumor

LIANG Cheng-xiao¹, SHEN Gang²

(1. Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, China; 2. The Second Affiliated Hospital Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China)

Abstract: In recent years, small RNA-mediated gene regulation in the treatment of various diseases has attracted widespread attention. Small activating RNAs (saRNAs) are non-coding RNAs that share the same structural and chemical components as small interfering RNAs (siRNAs). Although they have different biological functions, saRNAs can activate the transcriptional expression of sequence-specific mRNA of the corresponding target gene in cells. Recent studies have provided clear evidence for RNAa, and the first phase I clinical trials of RNAa have shown that the use of specific mediators to deliver saRNA drugs can achieve disease stable or tumor regression, and the patients are well tolerated. Therefore, with the special mechanism and characteristics of saRNAs, saRNAs may become a new approach of treatment for some diseases. This article reviews the recent advances in the basic and clinical research of saRNAs in tumors.

Subject words: small activating RNAs; gene activation; malignant neoplasms

近年来以小 RNA 介导的基因调控在许多疾病治疗中的应用引起广泛关注。RNA 干扰(RNAi)能特异性下调靶基因的表达,许多恶性肿瘤是由于某些抑癌基因的表达缺失或过低表达引起,此时 RNA 干扰技术无能为力。Li 等设计与 Ecadherin, p21 和 VEGF 的启动子区域互补的序列小 RNA,介导哺乳动物细胞中相应靶基因的序列特异性 mRNA 转录激活,并将此现象称为 RNA 诱导的基因激活(RNAa),称这样的 dsRNA 为小激活 RNAs(saRNAs)^[1-2]。随后 Janowski 等^[3]也报道了序列特异性靶向孕激素受体(PR)、MVP 等基因启动子区的 dsRNAs 能上调靶基

因的表达。此外,其他研究者也报道了类似发现,通过序列特异性靶向 WT1、HIC-1 和 NKX3-1 等基因启动子区的双链小 RNA 能上调相应靶基因的表达^[4-7]。与 RNAi 不同, RNAa 不需要高表达的癌基因作为靶基因;相反,能激活功能性失活的抑癌基因或增加活性较低基因的表达量。许多已知或假定的抑癌基因,包括细胞周期负调节基因、抑制肿瘤侵袭转移的基因和促细胞死亡的基因均是 RNAa 理想的靶基因。最近的一系列研究为 RNAa 提供了明确的证据^[8-10],而最近开展的第一个 RNAa I 期临床试验表明,运用特殊介质传递 saRNA 药物能实现对患者疾病稳定或肿瘤消退,并具有良好的耐受性^[10-11]。由此可见,借助于 saRNAs 特殊的作用机制和特征,使得 RNAa 可能成为一些疾病的全新治疗方法。

基金项目:浙江省自然科学基金(LY15H160035)

通信作者:沈钢,主任医师,硕士;浙江大学医学院附属第二医院胸外科,浙江省杭州市解放路 88 号(310009);E-mail:zycszju@yahoo.com

收稿日期:2019-04-21;修回日期:2019-05-05

1 saRNA 基因激活的关键机制

saRNA 是一类非编码 RNA, 由 21 个核苷酸的 dsRNA 组成, 具有与小干扰 RNA (siRNA) 相同的结构和化学组分, 尽管它们具有完全相反的生物学功能^[12]。研究初期对于 Ago 家族蛋白是否参与 RNAa 过程尚不明确。最新研究提示细胞内 saRNA 可特异性地与 AGO2 蛋白结合, 不像 siRNA 可以结合 AGO1-4 的活性^[13]。当敲除 AGO1、3 和 4 并不影响 saRNA 介导的基因激活, 但是 AGO2 沉默后基因上调现象消失^[14]。为了触发基因激活, RNA-AGO2 复合物可能通过 Importin-8 转运到细胞核中发挥作用, 而在 siRNA 介导的基因沉默中, RNA 诱导的沉默复合物可以在细胞质和细胞核中介导基因沉默^[15]。进入细胞核内的 AGO2-RNA 复合物直接靶向基因启动子或 RNA 来诱导 RNAa, 通过在靶向启动子位点募集转录起始的关键蛋白, 如 RNA 解旋酶 A (RHA)、RNA 聚合酶相关蛋白 CTR9 同源物 (CTR9) 和 RNA 聚合酶 II 相关因子 1 同源物 (PAF1)。RHA 参与募集启动子的转录机制并修饰染色质结构以启动转录激活^[13]。CTR9 和 PAF1 是 PAF1 复合物的成分, 它介导转录起始和延伸。PAF1 复合物通过将关键的组蛋白修饰因子募集到 RNA 聚合酶 II 复合物中来启动相关的组蛋白修饰^[16]。这些研究都强调了 saRNA-AGO2 复合物与转录起始的其他关键蛋白的关联, 但是目前仍然需要进一步研究来阐明 saRNA 介导的 RNAa 整个机制。

研究发现 RNAa 还可以由其他类型 RNA 介导, 例如 siRNA、miRNA、增强子 RNA (eRNA) 和具有不同机制的长链非编码 RNA。siRNA 和 miRNA 可以通过天然反义转录物 (NATs) 诱导基因活化。NAT 序列通常与正义链的启动子或其他调节区域互补。研究证实通过 siRNA 沉默与 PTEN 相关的 NAT 可增加 PTEN 转录^[17]。其他研究还表明, miRNA 和 Gapmer 可通过抑制 NAT 来介导基因激活^[18]; 但是通过去抑制介导基因激活, 必须存在基因靶标的 NAT。研究观察到 mir-373 靶向 E-钙黏蛋白和 CSDC2 启动子以增加基因表达^[19]。eRNA 和 lncRNA 是另外两类可以介导基因激活的 RNA^[20]。这些 RNA 从远离靶向启动子的区域转录, 并通过表观遗传介导内源性的基因激活。这些研究强调了内源性小 RNA 在控制细胞生理、生长和发育中的关键作用, 并且可以设计 saRNA 通过

严格调节的基因激活机制诱导特定的基因上调。

2 saRNA 特征与设计

关键蛋白质的表达减少通常是许多恶性肿瘤发生发展的主要机制, 在细胞内恢复这些蛋白质表达的新技术对于更好的治疗这些恶性肿瘤具有重要意义。为了过表达目的基因, 可以使用 mRNA、Crispr 活化、反义寡核苷酸和 saRNA。尽管 mRNA 可以通过化学方法合成, 但很难产生长度超过 150 个核苷酸的 mRNA, 并且随着 mRNA 长度的增加, mRNA 量呈指数下降。虽然可通过使用聚合酶如 T7 RNA 聚合酶产生更长的 mRNA, 然而 T7 RNA 聚合酶可产生各种异常副产物, 且副产物比例可达 70%。目前通过酶法制备工业规模的 mRNA 仍然存在挑战, 从而限制了 mRNA 作为过表达基因靶标的治疗剂^[21]。Crispr 技术已被用于基因激活, 有报道证明, 通过向细胞中提供指导 RNA 和修饰 Cas9 酶, 可提高特异性基因的表达^[22]。虽然这项技术在未来可能会产生巨大影响, 但在临床应用之前, 对 Crispr 的理解和潜在的下游副作用仍需要改进。另外, Crispr 系统的关键问题之一是将指导 RNA 和 Cas9 传递到目标细胞, 这对于目前仅有的传送系统提出了巨大的挑战。

RNAa 是由 dsRNA 介导的基因表达增强的过程, 该途径受到高度调节^[9,23]。由于 saRNA 高效诱导靶向基因上调, 这种基因激活机制用于治疗恶性肿瘤具有巨大的潜力。作为一种小 RNA, saRNA 可以很容易且高产率的化学合成, 并可借助于生物信息学工具来预测 saRNA 序列, 并能通过体外实验鉴定 saRNA 激活特定基因的效应^[24]。但是将 saRNA 用作药物仍需要克服几个挑战, 例如潜在的免疫应答激活、脱靶效应和 RNA 不稳定性。

小 dsRNA 在血清中并不稳定, 受核酸酶攻击, dsRNA 在 50% 血清中半衰期小于 4 小时, 90% 血清条件下半衰期为 5 分钟^[25]。研究发现在 RNA 中加入 2-O-甲基和 2-氟修饰可增加小 dsRNA 核酸酶抗性。这种修饰同时也可增加其效力, 可能通过增强引导链和靶核酸之间的相互作用^[26]。但是当 2-氟修饰 saRNA 的正义链和反义链时, 基因活化效力降低, 但是当仅限于引导链的修饰并不影响基因活化功效, 而且这种修饰也改善了 saRNA 的稳定性。研究提示

锁核苷酸修饰能增加 saRNA 稳定性,也可以增强 saRNA 效力^[27]。这些研究表明对 saRNA 化学修饰可以增加稳定性,并且在某些情况下还可提高其效力。

作为 dsRNA, saRNA 可存在免疫原性。许多研究致力于通过化学修饰使 dsRNA 免疫静默。对引导链中胞嘧啶和尿嘧啶的 2-氟修饰,可抑制 saRNA 的免疫激活^[28]。另外,由于 saRNA 具有与 siRNA 相同的结构,因此 saRNA 可能产生脱靶效应,可通过生物信息学分析预测 saRNA 的种子序列。

RNAa 与 RNAi 类似,存在严格的序列特异性,但是区别于 siRNA, saRNA 的序列设计算法仍需进一步研究。目前认为 saRNA 分子的设计需要遵循如下原则:①选择正义 DNA 序列作为模板,将互补的 RNA 单链序列为引导链;② saRNA 靶点选择应该在距离基因启动子转录起始点上游-1200~-200bp 的区间;③靶标 DNA 的 3'端要与 RNA 引导链的 5'端一致;④ saRNA 与 DNA 对应的碱基对应该为 19 对,因此 dsRNA 的每条单链的 3'端需分别悬挂 dTdT 或 UU 两个碱基对;⑤ saRNA 中的 GC 碱基对含有量大约为 40%~65%;⑥避免出现 4 个以上的连续相同核酸碱基对;⑦模板的 3'端热力学稳定性低于 5'端,第 20 至 23 个核酸最好是多聚“A”或“T”;⑧模板选择应该避开 CpG 位点或 GC 富集区^[23,29-31]。

3 saRNA 传递系统

尽管 saRNA 可以成为针对目前无法治愈的疾病工具,但是需要将 saRNA 递送至靶细胞以实现其作为治疗剂的全部潜力。由于 dsRNA 很容易被核酸酶降解,因此很难在体内提供裸露的 saRNA。为了改善药代动力学并将 saRNA 递送至靶组织,已经开发了不同的传递策略以增加体内递送功效。这些策略包括使用脂质、树枝状大分子、脂质和聚合物杂交体等。

已有研究运用基于脂质的系统有效地在体内递送 siRNA/寡核苷酸货物用于运甲状腺素蛋白介导的淀粉样变性和癌症治疗。Place 等^[28]在前列腺癌异种移植小鼠模型的肿瘤内注射基于类脂质的制剂,结果表明类脂质 RNA 复合物能够介导肿瘤消退, p21 蛋白在肿瘤组织中表达明显。Kang 等通过在原位小鼠模型中应用类脂质-saRNA 增加 p21 水平来

抑制膀胱癌生长,导致 40%肿瘤消退,肿瘤组织中 p21 表达和细胞凋亡增加^[32]。另一种脂质体平台系统 Smarticles 也可以传递核酸。Smarticles 主要特点是在血清中非常稳定,可有效地将核酸输送到肝脏、单核细胞/巨噬细胞和骨髓树突状细胞。研究评估 Smarticles 在各种肝病模型中提供 saRNA 上调 Cebpa 的功效,并证明 Smarticles 能够有效地在肝脏中传递 saRNA 以达到治疗效果^[32]。研究表明基于脂质系统可以有效地进行 saRNA 递送,但是目前研究仅局限于肝脏或者肿瘤内靶向,仍需要更多的研究来评估该系统是否可以递送至不同的组织途径。

Lipopolyplex 是一种广泛用于将核酸递送至细胞的系统。该系统由三部分组成:脂质、聚合物和核酸。脂质关键作用是增强膜转移,聚合物对核酸的有效负载至关重要。根据核酸大小和结构,使用不同类型的聚合物可有效地装载核酸。Wang 等^[33]运用由聚乙烯亚胺作为聚合物组成的脂质复合物与用透明质酸调节的脂质壳靶向递送 saRNA,在原位鼠模型中直肠给药从而上调直肠癌细胞中的肿瘤抑制因子 p21。saRNA 递送的研究仅限于局部递送,该系统是否可用于其他递送途径仍有待进一步研究。

4 saRNA 临床试验

目前已开发出几种用于临床的寡核苷酸治疗药物,包括 Vitravene (fomivirsen), Kynamro R (mipomirsen), Spinraza R (nusinersen) 和 OnpattroTM (patisiran), 它们是美国 FDA 批准的 siRNA 药物。2016 年,第一个基于 saRNA 的药物即 MTL-CEBPA 用于介导转录因子 CEBPA 上调,已经在晚期肝癌患者 I 期临床试验中进行。CEBPA 是调节肝脏中细胞生长和分化平衡的转录因子,并参与能量稳态、代谢过程和肝细胞成熟的各种基因表达,对正常肝细胞功能至关重要^[34]。在肝细胞癌中 CEBPA mRNA 和蛋白水平降低,并且 CEBPA 敲除的小鼠肝细胞表现出快速生长,染色体异常积累并且具有在裸鼠中形成结节的能力。研究发现 CEBPA 表达水平与肿瘤大小和临床分期呈负相关,并且 CEBPA 下调通常与不良预后相关^[35]。目前尚未报道 HCC 存在功能性 CEBPA 突变,提示其他机制如启动子甲基化或其他表观遗传改变导致 CEBPA 表达降低。临床前研究表明 CEBPA 上调可

减少体内肿瘤负荷,恢复 HCC 患者 CEBPA 表达可能是改善患者生存率的关键^[10]。

MTL-CEBPA 由靶向 CEBPA 上调的 saRNA 组成,经化学修饰以增加稳定性并避免先天免疫的激活,并借助于 SMARTICLES 以改善 saRNA 递送。I 期临床试验的初步结果表明,MTL-CEBPA 在各种剂量的患者中都具有良好的耐受性,并且未发现最大耐受剂量^[10-11];治疗的副作用严重程度为轻度至中度。MTL-CEBPA 治疗的患者白细胞中 CEBPA 表达增加。多数患者病情稳定,且肿瘤消退率超过 70%。这些初步数据证明了使用 saRNA 增加靶向基因表达,并因此改善患者预后。除 HCC 外,CEBPA 水平降低与其他实体癌症如肺癌、皮肤癌、颈椎癌和头颈部鳞状细胞癌以及糖尿病、子宫内膜异位症、哮喘和慢性阻塞性肺病等疾病有关。尽管 MTL-CEBPA 在肝癌中最初有希望的结果,但目前药物的递送主要限于肝脏。针对受 CEBPA 下调影响的其他组织靶向 CEBPA saRNA 的新型靶向递送策略的开发可以为其他疾病开辟新的治疗途径。

利用 RNAa 对于治疗不可治愈疾病具有重要价值。saRNA 设计和修饰并体内应用的主要问题包括脱靶效应、免疫激活、saRNA 效力、稳定性和递送。对 saRNA 进行化学修饰可以提高稳定性、效力和免疫反应特征,目前的生物信息学工具结合实验验证可以最大限度地降低脱靶效应。saRNA 传递策略可以使用脂质纳米粒、树枝状大分子和脂多糖。尽管这些系统有效,但体内 saRNA 递送主要限于肝脏以及局部组织注射。因此,需要更好的传递系统来靶向治疗其他组织。第一个 RNAa I 期临床试验表明脂质纳米颗粒包裹的 saRNA 药物 MTL-CEBPA 对患者实现了疾病稳定或肿瘤消退,并具有良好的耐受性,可以预见 RNAa 将在未来医学中发挥更重要的作用。

参考文献:

- [1] Li LC, Okino ST, Zhao H, et al. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells [J]. PNAS, 2006, 103(46): 17337-17342.
- [2] Chen Z, Place RF, Jia ZJ, et al. Antitumor effect of dsRNA-induced p21 (WAF1/CIP1) gene activation in human bladder cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(3): 698-703.
- [3] Janowski BA, Younger ST, Hardy DB, et al. Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted

- duplex RNAs[J]. Nat Chem Biol, 2007, 3(3): 166-173.
- [4] Qin Q, Lin YW, Zheng XY, et al. RNAa-mediated overexpression of WT1 induces apoptosis in HepG2 cells [J]. World J Surg Oncol, 2012, 10: 11.
- [5] Zhao F, Pan S, Gu Y, et al. Reactivation of HIC-1 gene by saRNA inhibits clonogenicity and invasiveness in breast cancer cells[J]. Oncol Lett, 2015, 9(1): 159-164.
- [6] Zhao F, Pan S, Gu Y, et al. Small activating RNA restores the activity of the tumor suppressor HIC-1 on breast cancer [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e86486.
- [7] Ren S, Kang MR, Wang J, et al. Targeted induction of endogenous NKX3-1 by small activating RNA inhibits prostate tumor growth[J]. Prostate, 2013, 73(14): 1591-1601.
- [8] Zhao X, Reebye V, Hitchen P, et al. Mechanisms involved in the activation of C/EBPalpha by small activating RNA in hepatocellular carcinoma [J]. Oncogene, 2019, 38(18): 3446-3457.
- [9] Kwok A, Raulf N, Habib N. Developing small activating RNA as a therapeutic: current challenges and promises[J]. Ther Deliv, 2019, 10(3): 151-164.
- [10] Reebye V, Huang KW, Lin V, et al. Gene activation of CEBPA using saRNA: preclinical studies of the first in human saRNA drug candidate for liver cancer[J]. Oncogene, 2018, 37(24): 3216-3228.
- [11] Setten RL, Lightfoot HL, Habib NA, et al. Development of MTL-CEBPA: small activating rna drug for hepatocellular carcinoma[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2018, 19(8): 611-621.
- [12] Li LC. The multifaceted small RNAs[J]. RNA Biol, 2008, 5(2): 61-64.
- [13] Portnoy V, Lin SH, Li KH, et al. saRNA-guided Ago2 targets the RITA complex to promoters to stimulate transcription[J]. Cell Res, 2016, 26(3): 320-335.
- [14] Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, et al. Human argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs[J]. Mol Cell, 2004, 15(2): 185-197.
- [15] Weinmann L, Hock J, Ivacevic T, et al. Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs[J]. Cell, 2009, 136(3): 496-507.
- [16] Jaehning JA. The Paf1 complex: platform or player in RNA polymerase II transcription? [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1799(5-6): 379-388.
- [17] 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.
- [18] Wanowska E, Kubiak MR, Rosikiewicz W, et al. Natural an-

- tisense transcripts in diseases: from modes of action to targeted therapies[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018, 9(2).
- [19] Place RF, Li LC, Pookot D, et al. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(5): 1608–1613.
- [20] Melo CA, Drost J, Wijchers PJ, et al. eRNAs are required for p53-dependent enhancer activity and gene transcription [J]. Mol Cell, 2013, 49(3): 524–535.
- [21] Mu X, Greenwald E, Ahmad S, et al. An origin of the immunogenicity of in vitro transcribed RNA[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(10): 5239–5249.
- [22] Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes[J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 977–979.
- [23] Guo D, Barry L, Lin SS, et al. RNAa in action: from the exception to the norm[J]. RNA Biol, 2014, 11(10): 1221–1225.
- [24] Voutilainen J, Reebye V, Roberts TC, et al. Development and mechanism of small activating RNA targeting CEBPA, a novel therapeutic in clinical trials for liver cancer [J]. Mol Ther, 2017, 25(12): 2705–2714.
- [25] Jafari M, Xu W, Pan R, et al. Serum stability and physicochemical characterization of a novel amphipathic peptide C6M1 for siRNA delivery[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97779.
- [26] Allerson CR, Sioufi N, Jarres R, et al. Fully 2'-modified oligonucleotide duplexes with improved in vitro potency and stability compared to unmodified small interfering RNA[J]. J Med Chem, 2005, 48(4): 901–904.
- [27] Watts JK, Yu D, Charisse K, et al. Effect of chemical modifications on modulation of gene expression by duplex anti-gene RNAs that are complementary to non-coding transcripts at gene promoters [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(15): 5242–5259.
- [28] Place RF, Wang J, Noonan EJ, et al. Formulation of small activating rna into lipidoid nanoparticles inhibits xenograft prostate tumor growth by inducing p21 expression[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2012, 1: e15.
- [29] Pelechano V, Steinmetz LM. Gene regulation by antisense transcription[J]. Nat Rev Genet, 2013, 14(12): 880–893.
- [30] Huang V, Qin Y, Wang J, et al. RNAa is conserved in mammalian cells[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8848.
- [31] Pushparaj PN, Aarthi JJ, Kumar SD, et al. RNAi and RNAa—the yin and yang of RNAome[J]. Bioinformation, 2008, 2(6): 235–237.
- [32] Kang MR, Yang G, Place RF, et al. Intravesical delivery of small activating RNA formulated into lipid nanoparticles inhibits orthotopic bladder tumor growth [J]. Cancer Res, 2012, 72(19): 5069–5079.
- [33] Wang LL, Feng CL, Zheng WS, et al. Tumor-selective lipopolyplex encapsulated small active RNA hampers colorectal cancer growth in vitro and in orthotopic murine[J]. Biomaterials, 2017, 141: 13–28.
- [34] Lourenco AR, Coffey PJ. A tumor suppressor role for C/EBPalpha in solid tumors: more than fat and blood [J]. Oncogene, 2017, 36(37): 5221–5230.
- [35] Tomizawa M, Watanabe K, Saisho H, et al. Down-regulated expression of the CCAAT/enhancer binding protein alpha and beta genes in human hepatocellular carcinoma: a possible prognostic marker [J]. Anticancer Res, 2003, 23(1A): 351–354.