

本文引文格式:彭彬,邓益斌.锁核酸技术在肿瘤的基因诊断与治疗研究新进展[J].

右江民族医学院学报,2020,42(4):500-503.

【综述与讲座】

锁核酸技术在肿瘤的基因诊断与治疗研究新进展

彭彬¹,邓益斌^{1,2}

(1. 右江民族医学院附属医院检验科,广西 百色 533000;

2. 广西肝胆疾病临床医学研究中心,广西 百色 533000)

摘要: 锁核酸(locked nucleic acid,LNA)作为一种新颖的核苷酸衍生物在分子生物学研究领域引起了人们的广泛关注,有希望成为在分子水平上治疗各种疾病的新突破口。LNA 具有极强的抗核酸酶能力、反义活性、水溶性好及体内无毒性等优秀特点而倍受人们关注。然而,LNA 技术在肿瘤及抗病毒的基因诊断与治疗研究领域仍然处于探索阶段,因此,本文旨在综述近期国内外有关 LNA 技术在肿瘤及抗病毒的基因诊断与治疗研究领域的应用及其进展,探讨 LNA 技术在基因诊断与治疗研究领域的应用现状、存在的问题及前景,为进一步深入研究 LNA 技术在其他领域的应用提供参考。

关键词: LNA;LNA 技术;基因研究领域;应用;进展

中图分类号: R446.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2020)04-0500-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.04.022

锁核酸的产生给基因领域及相关领域带来了新的突破和尝试,更便于人们研究各种由于基因问题导致的疾病,对研究各种先天性疾病或癌症也有重要的意义,并且使某些无法攻破的疾病在基因水平治愈的梦想逐步走向现实。因此,本文对 LNA 在肿瘤及抗病毒的基因诊断与治疗研究中的应用新进展进行综述,以期 LNA 技术应用研究提供参考。

1 锁核酸理化性质

LNA 是一种特殊的双环状核苷酸衍生物,结构中含有一个或多个 2'-O,4'-C-亚甲基-β-D-呋喃核糖核酸单体,核糖中的 2'-O 位和 4'-C 位通过不同的缩水作用形成氧亚甲基桥、硫亚甲基桥或胺亚甲基桥,并连接成环形,这个环形桥锁定了呋喃糖 C3'-内型的 N 构型,降低了核糖结构的柔韧性,并增加了磷酸盐骨架局部结构的稳定性。人们发现,在与其他物质组合时,LNA 可以增加其稳定性,如 Pabon-Martinez YV 等^[1]研究了 LNA 取代 c-myc 基因或共济蛋白(Frataxin)序列时的位置和数目所起的作用,他们发现在三链形成的 3'末端的连续位置处,随着 LNA 含量的降低,三链体结构逐渐不稳定,而在三链形成的 3'末端的 LNA 的增加,三链体形成速率和延伸得到提升,并且特异性嵌入苯并醌喹啉(BQQ)化合物,所形成的含 LNA

的三链结构高度稳定。此外,LNA 取代的双链嘧啶链中改变了双螺旋结构,而增强的三链通过主沟槽调节影响了组合体 x-位移的滑动和扭曲,有利于形成三角形结构,从而更加稳定。

在 20 世纪 90 年代末,用三唑键取代磷酸键的寡核苷酸就被人们所熟知,但是这种寡核苷酸抗核酸酶能力还不是非常理想,与其他寡核苷酸类似物相比,由于 LNA 与 DNA、RNA 在结构上具有相同的磷酸盐骨架,故其对 DNA、RNA 有很好的识别能力和强大的亲和力。因此,有人尝试将两者组合在一起,创造出一个更好的寡核苷酸。Kumar P 等^[2]通过将三唑键和 LNA 组合在一个单元内,并与 RNA、DNA 结合,发现比未修饰的寡核苷酸具有更高的特异性和更高的亲和力,并且明显优于仅含有三唑键的寡核苷酸,这可能是三唑键与 LNA 的组合能够降低 DNA 和 RNA 的阴离子,使得 LNA 与 DNA、RNA 结合更具有亲和力;而与单独的 LNA 相比,三唑-LNA 对酶促降解具有巨大抗性,并已证实 LNA 和三唑键的结合对 30 种核酸外切酶有很强的抗性,因此多重添加此组合物可以大大提高治疗药物的体内稳定性^[3]。与此同时,Sharma VK 等^[4]合成并研究了三唑键连接的、LNA 修饰的二核苷酸特性,并将它们结合到反义寡核苷酸和双链的 siR-

基金项目:国家自然科学基金项目(81460123);广西科技计划项目基地与人才专项(AD17129025);广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA281187);广西肝胆疾病临床医学研究中心研究课题(AD17129025)

第一作者简介:彭彬(1993-),男,在读硕士研究生,研究方向:基因诊断与治疗,E-mail:512505521@qq.com

通讯作者简介:邓益斌(1975-),男,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:基因诊断与治疗,E-mail:dengyb75@163.com

NA中,他们发现此二核苷酸在寡核苷酸的3'或5'末端掺入时产生高结合亲和力,具有高活性和核酸酶抗性,其中已知的螺旋结构更具有灵活性,并且令人惊讶的是,含有三唑二聚体修饰的siRNA是该系列中最活跃的siRNA。

值得一提的是,经过科研工作者多年的努力,在分子生物学技术等方面取得重大的发展与进步,不断有人报道基于LNA更加好的寡核苷酸,如Morita K等^[5]提出,与LNA相比,在核糖的2'-O和4'-C之间具有乙烯桥的2'-O,4'-C-乙烯桥联核酸(ENA)除了具备有LNA一样高的互补DNA、RNA结合力之外,还具有更高的核酸酶抗性,说明了这是一个具有良好前景的反义治疗物,具有重大的研究价值。

2 LNA在肿瘤基因的诊断与治疗中的应用

基因诊断与治疗是近年来倍受关注的人类疾病预防与治疗方法,是指通过实验室的基因诊断和基因分析等技术以确认基因组是否发生有害改变,进而将外源正常基因导入已确认发生有害改变基因组的靶细胞,以纠正、补偿因基因缺陷或异常引起的疾病,以达到治疗目的。LNA是以寡核苷酸为基础的基因治疗新型核酸药物,国内外对锁核酸基因治疗的研究已受到关注并取得一定进展。据中国肿瘤登记中心数据显示,2014年中国恶性肿瘤新发病例数380.4万例,其中男性为211.4万例,女性169.0万例,平均每天约有10400人被诊断为癌症,发病前四位的恶性肿瘤依次是肺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌^[6]。由此可知,肿瘤已然成为威胁人类生命健康的重大疾病之一。

2.1 LNA与肺癌的基因诊断与治疗 肺癌是对人类生命健康和生存质量威胁最大的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率增长最为迅速,许多国家在近50年来都报道肺癌的发病率和致死率均逐年上升,中国肺癌发病例数为73.3万,是恶性肿瘤发病率和致死率的第一位^[7]。关于肺癌的具体发病机制尚未清楚,但关于肺癌的LNA基因诊断与治疗的报道逐年上升。

在肺癌的基因诊断方面,Ito K等^[8]通过采用改良的PNA-LNA PCR clamp方法对诊断为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的患者进行常规液体活检,结果发现,在晚期NSCLC组中,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变的敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值分别为72.7%、100%、100%和93.7%,而T790M的阳性预测值和阴性预测值分别为33.3%和55.6%。这种方法体现了良好的敏感性和非常高的特异性,可以为中晚期NSCLC患者提供检测,但早期的NSCLC患者不适用。Nakamura H等^[9]也通过测定一致率和 κ 系数来评估EGFR基因突变检测性能,研究发现

EGFR的一致率和 κ 系数分别为96.0%和0.921%,而PNA-LNA PCR clamp测定分别为94.0%和0.881%,因而PNA-LNA PCR clamp法可为监测NSCLC患者提供新的方法。

在肺癌的基因治疗方面,Huber-Ruano I等^[10]研究了原发性肿瘤(乳腺和肾脏肿瘤)和转移性肺癌对ISTH0047的抗癌反应。ISTH0047是最近开发的LNA修饰的靶向TGF- β 2的反义寡核苷酸。他们观察到ISTH0047能够显著降低TGF- β 2 mRNA和蛋白质水平而不改变TGF- β 1和TGF- β 3的水平。此外,在主要表达TGF- β 2的肺癌细胞系(CRL5807)的原位异种移植模型中,观察到ISTH0047对抑制肺损伤生长的肺微环境具有重要作用。

2.2 LNA与胃癌的基因诊断与治疗 中国胃癌发病例数仅次于肺癌,约为67.9万,因胃癌死亡的总例数约为49.8万,位居肿瘤死亡率排行的第2位,其中男性新发病例数47.8万,约占70%^[11]。尽管胃癌在全球范围的发病率和死亡率整体处于下降的趋势,但是我国仍然处于较高的水平,因此,胃癌在我国仍然是一个需要解决的重大的恶性肿瘤之一。

在基因诊断方面,Ren C等^[12-13]使用LNA修饰的原位杂交技术检测MiR-92a、MiR-16、MiR-451的表达,分析其与胃癌总体存活的相关性。研究发现,与邻近正常组织相比,MiR-92a高表达的总生存期较短,而MiR-16和MiR-451高表达的总生存期较长,特别是MiR-16和MiR-451两者同时高表达的患者总生存期更长。Ogino S等^[14]设计内含子引物以检测内含子融合断裂点,并通过PCR和直接测序证实在SYT的内含子10和SSX2的内含子5中胃滑膜肉瘤(synovial sarcoma of stomach, SS)的融合基因序列,随后使用特异于融合序列的LNA探针检测该融合序列。结果表明,在术前血浆循环DNA(cfDNA)中检测到融合序列,而在术后血浆cfDNA中未检测到,因此,该技术可用于监测SS等疾病。

在基因治疗方面,Lima JF等^[15]设计了与miRNA-9序列互补的、具有抗miRNA的寡核苷酸LNA,通过检测miRNA的表达水平以测试其特性。miRNA-9上调可以影响E-钙黏蛋白编码基因的表达,引发胃癌细胞运动和侵袭性。研究结果发现,即使在低剂量下使用抗miRNA序列的LNA,也可以快速抑制靶miRNA,并可以通过显著增加LNA水平来影响E-钙黏蛋白的表达。

2.3 LNA与结直肠癌的基因诊断与治疗 结肠直肠癌是胃肠道中常见的恶性肿瘤之一。据统计,2014年我国结直肠癌新发病例为79180例,发病率为27.47/10万,占全部恶性肿瘤新发病例的9.60%,其发病率

和病死率在消化系统恶性肿瘤中仅次于胃癌、食管癌和肝癌^[16]。

在基因诊断方面, Peng J 等^[17]基于锁核酸修饰探针的方法, 通过内部竞争野生抑制型(WTB)探针的扩增片段, 阻断 EGFR 在 DNA 模板中的扩增。结果表明, 在 50 例疑似结直肠癌患者的结直肠组织活检中, 18 例患者含有 EGFR 突变基因, 突变 DNA 的数量占总 DNA 的 18.6%~64.2%, 大大增加结直肠癌的检测率, 有助于在单一分子水平上检测突变的等位基因。Xu Y 等^[18]开发了一种新的实验方法, 它使用 LNA 作为亲和探针来富集完整细胞中特定 microRNA 的靶基因。他们通过这种方法在人结肠直肠癌细胞中鉴定了 miR-21 的 12 个靶基因, 靶标验证证实 miR-21 抑制了鉴定靶标的表达和靶转录物易受 microRNA 的调节。Lee KS 等^[19]通过使用 LNA 修饰的荧光原位杂交研究 miR-21 在 170 例晚期结直肠癌患者的细胞中心和外周的表达, 结果发现, 在癌基质的中心和外周均观察到 miR-21 表达, 并且 miR-21 在癌基质中心与外周之间表达的不一性分别为 31.7% 和 44.7%。

在基因治疗方面, Ahmadi S 等^[20]使用 LNA 修饰探针以抑制人结直肠癌细胞系的 SW48 细胞中的 miR-92a-3p 基因。结果显示, miR-92a-3p 的表达显著降低, 而 SW48 细胞的增殖明显降少, 因此, 通过 LNA 抑制 miR-92a-3p 可抑制结直肠癌细胞增殖, 进一步诱导结直肠癌坏死。Nedaeinia R 等^[21]通过用 LNA 处理 LS174T 细胞 24 h、48 h 和 72 h, 以研究锁核酸抑制 LS174T 细胞系的 miR-21 的功能作用。研究结果证明, 与未处理的细胞相比, LNA 具有显著抑制 miR-21 表达的作用, 这种效果在 72 h 后更为明显。Karimi MM 等^[22]把 LNA 分别转染 HCT-116 和 SW-48 细胞中以抑制 miR-200c, 研究发现 miR-200c 在结直肠癌组织中显著下调, 而与正常结肠组织相比, 结直肠癌组织中 BMI1 的蛋白质表达上调。在结肠癌细胞系中, LNA 的转染增加了 BMI1 基因及蛋白质表达, 对 miR-200c 的抑制使两者细胞株死亡大大增加。由此可知, miR-200c 可能通过抑制 BMI1 表达而具有抗肿瘤作用。

2.4 LNA 与肝癌的基因诊断与治疗 肝癌分为原发性肝癌和继发性肝癌两大类, 原发性肝癌是指起源于肝脏的上皮组织或间叶组织的恶性肿瘤, 我国主要以原发性肝癌为主, 对我国居民生命健康危害极大; 继发性肝癌是指其他器官起源的恶性肿瘤转移或侵犯至肝脏所引发的癌症。一般以胃、胆道、胰腺、结直肠、卵巢、子宫、肺、乳腺等器官恶性肿瘤的肝转移多见。每年全球肝癌发病率在 100 万以上, 其中我国占多数, 为 42.5%。2015 年, 我国肝癌发病 466 100 例, 列所有恶

性肿瘤的第 4 位, 死亡率为 20.4/10 万, 占全部恶性肿瘤死亡的 18.8%, 列所有恶性肿瘤的第 3 位^[23]。

在基因诊断方面, Nishida N 等^[24]分析 16 例肝细胞癌患者血清的 microRNA, 通过使用 LNA 修饰的探针在 179 种已知的分泌性 microRNA 中分析有没有表达差异, 并使用包括 53 例接受索拉非尼治疗的肝细胞癌患者和 8 例健康对照受试者的验证队列的进一步分析。结果发现 miR-181a-5p 和 miR-339-5p 在部分反应患者中显示血清水平的显著差异, 其中部分反应患者显示差异最高水平, 进行性疾病患者显示最低水平。因此, miR-181a-5p 水平可能是影响总体存活的一独立因素。

在基因治疗方面, Delgado E 等^[25]研究了 LNA 对 β -连环蛋白抑制的影响。结果表明, 与对照组相比, 在每 48 h 用 LNA 对小鼠肿瘤模型的 β -连环蛋白进行 10 次治疗后, 观察到肝细胞癌被完全治愈。在 β -连环蛋白抑制后, β -连环蛋白活性显著降低, 细胞增殖和细胞死亡增加明显。因此, LNA 可以通过抑制肝细胞癌中 β -连环蛋白以达到治疗目的。Gougelet A 等^[26]发现在小鼠肿瘤和肝细胞癌患者中, miR-34a 受 β -连环蛋白调节, 由 β -连环蛋白信号传导过度活化而显著诱导 miR-34a 的表达。LNA 通过抑制 miR-34a 可降低肝细胞的原代培养物增殖活性。这种增殖抑制与细胞周期蛋白 D1 水平的降低有关, 主要由 HNF-4 α 协调。HNF-4 α 是被认为在肝脏中起肿瘤抑制剂作用的 miR-34a 的靶标。因此, miR-34a 在具有 β -连环蛋白基因突变的肝脏肿瘤中起到关键致癌作用。因此, 被诊断患有 β -连环蛋白突变的肝细胞癌的患者可以用 LNA 抑制 miR-34a 治疗。

3 不足与展望

目前锁核酸技术用于分子生物学领域已经较为成熟, 但是在基因诊断与治疗领域还处于实验探索阶段, 离真正的应用还有一段距离。LNA 作为一种新颖的核苷酸衍生物, 具有抗核酸酶能力强、水溶性好、与 DNA 和 RNA 亲和力高等诸多特点被研究人员所喜爱, 在分子水平上改善甚至治愈各种人类以前无法攻克性疾病, 如艾滋病、病毒感染、癌症、各种原因引起的炎症反应、心血管疾病以及其他疾病, 使其成为一种具有很大发展潜力的反义治疗药物。尽管如此, 锁核酸技术在基因诊断与治疗领域应用尚存在一些问题: ① LNA 在基因的诊断方法中表现出高特异性、敏感性相对较低的问题, 这可能与 LNA 的设计与结构有关。② 在 LNA 治疗肿瘤与抗病毒的报道中, 多数研究通过某蛋白或因子的降低以证明 LNA 的治疗作用, 尚不能有直接证据证明 LNA 通过何种机制抑制肿瘤、病毒的发展。③ 单纯使用 LNA 在基因的诊断与治疗中尚存在

许多局限性。因此,寻求其它物质与 LNA 的联合应用可能提供更好的基因诊断与治疗方法。

我们相信,随着对 LNA 研究的深入和技术水平的不断提高,LNA 的特点会应用到更多领域中,例如,成为食品、药品的检测工具、某种传染病的监测,甚至为目前某些无法治愈的疾病带来新的希望。

参考文献:

- [1] Pabon-Martinez YV, Xu Y, Villa A, et al. LNA effects on DNA binding and conformation: from single strand to duplex and triplex structures [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 11043.
- [2] Kumar P, Truong L, Baker YR, et al. Synthesis, Affinity for Complementary RNA and DNA, and Enzymatic Stability of Triazole-Linked Locked Nucleic Acids (t-LNAs) [J]. *ACS Omega*, 2018, 3(6): 6976-6987.
- [3] Kumar P, El-Sagheer AH, Truong L, et al. Locked nucleic acid (LNA) enhances binding affinity of triazole-linked DNA towards RNA [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53 (63): 8910-8913.
- [4] Sharma VK, Singh SK, Krishnamurthy PM, et al. Synthesis and biological properties of triazole-linked locked nucleic acid [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53 (63): 8910-8913.
- [5] Morita K, Koizumi M. Synthesis of ENA Nucleotides and ENA Oligonucleotides [J]. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*, 2018, 72(1): 4. 79. 1-4. 79. 21.
- [6] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [7] 姚晓军, 刘伦旭. 肺癌的流行病学及治疗现状 [J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(8): 1982-1986.
- [8] Ito K, Suzuki Y, Saiki H, et al. Utility of Liquid Biopsy by Improved PNA-LNA PCR Clamp Method for Detecting EGFR Mutation at Initial Diagnosis of Non-Small-Cell Lung Cancer: Observational Study of 190 Consecutive Cases in Clinical Practice [J]. *Clin Lung Cancer*, 2018, 19(2): 181-190.
- [9] Nakamura H, Koizumi H, Sakai H, et al. Accuracy of the cobas EGFR Mutation Assay in Non-small-cell Lung Cancer Compared With Three Laboratory-developed Tests [J]. *Clin Lung Cancer*, 2018, 19(2): 170-174.
- [10] Huber-Ruano I, Raventós C, Cuartas I, et al. An antisense oligonucleotide targeting TGF- β 2 inhibits lung metastasis and induces CD86 expression in tumor-associated macrophages [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(9): 2278-2285.
- [11] 左婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国胃癌流行病学现状 [J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(1): 52-58.
- [12] Ren C, Chen H, Han C, et al. High expression of miR-16 and miR-451 predicating better prognosis in patients with gastric cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(12): 2489-2496.
- [13] Ren C, Wang W, Han C, et al. Expression and prognostic value of miR-92a in patients with gastric cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7): 9483-9491.
- [14] Ogino S, Konishi H, Ichikawa D, et al. Detection of fusion gene in cell-free DNA of a gastric synovial sarcoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(8): 949-956.
- [15] Lima JF, Carvalho J, Pinto-Ribeiro I, et al. Targeting miR-9 in gastric cancer cells using locked nucleic acid oligonucleotides [J]. *BMC Mol Biol*, 2018, 19(1): 6.
- [16] 李道娟, 李倩, 贺宇彤. 结直肠癌流行病学趋势 [J]. *肿瘤防治研究*, 2015, 42(3): 305-310.
- [17] Peng J, Wei K, Zhao X, et al. Wild-type blocking PCR coupled with internal competitive amplified fragment improved the detection of rare mutation of KRAS [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 2726-2732.
- [18] Xu Y, Chen Y, Li D, et al. TargetLink, a new method for identifying the endogenous target set of a specific microRNA in intact living cells [J]. *RNA Biol*, 2017, 14(2): 259-274.
- [19] Lee KS, Nam SK, Koh J, et al. Stromal Expression of MicroRNA-21 in Advanced Colorectal Cancer Patients with Distant Metastases [J]. *J Pathol Transl Med*, 2016, 50(4): 270-277.
- [20] Ahmadi S, Sharifi M, Salehi R. Locked nucleic acid inhibits miR-92a-3p in human colorectal cancer, induces apoptosis and inhibits cell proliferation [J]. *Cancer Gene Ther*, 2016, 23(7): 199-205.
- [21] Nedaenia R, Sharifi M, Avan A, et al. Inhibition of microRNA-21 via locked nucleic acid-anti-miR suppressed metastatic features of colorectal cancer cells through modulation of programmed cell death 4 [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(3): 1010428317692261.
- [22] Karimi MM, Tavangar SM, Saidijam M, et al. Anticancer effects of miR-200c in colorectal cancer through BMI1 [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(12): 10005-10012.
- [23] 吕桂帅, 陈磊, 王红阳. 我国肝癌研究的现状与前景 [J]. *生命科学*, 2015, 27(3): 237-248.
- [24] Nishida N, Arizumi T, Hagiwara S, et al. MicroRNAs for the Prediction of Early Response to Sorafenib Treatment in Human Hepatocellular Carcinoma [J]. *Liver Cancer*, 2017, 6(2): 113-125.
- [25] Delgado E, Okabe H, Preziosi M, et al. Complete response of Ctnnb1-mutated tumours to β -catenin suppression by locked nucleic acid antisense in a mouse hepatocarcinogenesis model [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(2): 380-387.
- [26] Gougelet A, Sartor C, Bachelot L, et al. Antitumour activity of an inhibitor of miR-34a in liver cancer with β -catenin-mutations [J]. *Gut*, 2016, 65(6): 1024-1034.

收稿日期: 2019-10-08; 修回日期: 2019-11-01