评述

microRNA 化学小分子抑制剂的研究进展

黄益^{①②†}, 王江煌^{①†}, 于晓辰^①, 高晓霞^{③*}, 袁洁^{①*}

① 中山大学中山医学院, 广州 510080;

② 广东药科大学中药学院, 广州 510006;

③ 广东药科大学药科学院, 广州 510006

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: gaioxia91@163.com; yuanjie@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2016-05-03; 接受日期: 2016-05-31; 网络版发表日期: 2016-11-14

国家海洋局海洋公益性行业科研专项(批准号: 201305017)和广东省海洋经济创新发展区域示范专项(批准号: GD2012-D01-001)资助

摘要 药物靶点的研究一直是新药研发中最重要的内容之一, microRNA(miRNA)作为调节基因与蛋白之间相互关系的纽带无疑是药物靶点研究的重要对象, 以它们作为靶点的药物设计和药物研发工作也在不断深入, 并获得了一系列新发现. 其中, 对细胞内 miRNA 的表达或者功能具有调控活性的化学小分子的研究很值得关注. 这些化学小分子不但可以用于研究细胞内 miRNA 的调控网络, 而且基于其对重大疾病, 如肿瘤、心脏疾病、神经性疾病等相关的 miRNA 的调控, 可能在将来的疾病治疗方面有着潜在的重要作用. 本文围绕 miRNA 化学小分子抑制剂及其筛选方法进行综述, 通过总结归纳现有的研究进展, 希望对今后的 miRNA 特异性小分子抑制剂的发现和研究提供借鉴.

关键词 microRNA, 化学小分子抑制剂, 荧光素酶报告系统, 分子信标, 计算机辅助药物设计, 二维组合筛选

MicroRNA(miRNA)广泛分布于人体各种组织器官, 是人类基因组中最大的基因家族之一^[1], 它们对人类的正常生理活动和病理过程都有着精细的网络调节作用^[2,3]. 以 miRNA 作为目标靶点寻找和发现特异性抑制剂, 逐渐成为 miRNA 研究的重要组成部分. 目前广泛使用的 miRNA 抑制剂主要为经过特殊修饰的核苷酸寡聚物, 而针对 miRNA 的化学小分子抑制剂的筛选研究还处在起步阶段. 对已有的研究进展进行回顾, 对主要的筛选方法进行总结, 将有利于推进本领域的研究, 并为将来的临床药物开发提供有益的思考和帮助.

1 miRNA 作为药物靶点的研究日趋成熟

1.1 miRNA 的表达成熟过程已基本明确

MiRNA 是在真核生物中发现的一类内源性的长约 22 aa 的非编码 RNA, 能够在转录后水平调控基因的表达^[2,4,5]. 从 1993 年在线虫(*Caenorhabditis elegans*)中首次发现第一个 miRNA 以来^[6], 已有 3000 多个 miRNA 被鉴定出来. 大部分 miRNA 的表达成熟过程包括 3 个主要阶段: (i) miRNA 基因由 RNA 聚合酶 II (RNA pol II) 转录为初级转录产物(primary miRNA, pri-miRNA)^[7]. (ii) pri-miRNA 在核酸酶

引用格式: 黄益, 王江煌, 于晓辰, 等. microRNA 化学小分子抑制剂的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 1354–1369

Huang Y, Wang J H, Yu J C, et al. Small molecule inhibitors of microRNA. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 1354–1369, doi: 10.1360/N052016-00069

Drosha 和其辅助因子 Pasha 的共同作用下被剪切约为 70 aa 组成的具有茎环结构的 pre-miRNA^[8,9], 并在转运蛋白 Exportin 5 的作用下被输送到细胞质中. (iii) 另一个核酸酶 Dicer 将其剪切产生约为 22 aa 长度的双链 miRNA, 其中一条结合到 RNA 诱导的基因沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)中, 形成非对称 RISC 复合体(asymmetric RISC assembly)^[10]. 该复合体通过碱基互补配对的方式识别靶 mRNA, 并根据互补程度的不同指导沉默复合体降解靶 mRNA 或者抑制靶 mRNA 的翻译以此调节相关蛋白的表达^[11].

1.2 miRNA 对靶基因的调节机制越来越清晰

在 miRNA 调控网络中, miRNA 对基因表达的调控既宏观又精细. 单个 miRNA 可以调控多个靶基因^[12]; 另一方面, 几个 miRNA 可协同调控同一靶基因. 许多生理病理特征都是与 miRNA 介导的调控有关^[3]. 例如, Let-7 在大多数肿瘤组织中呈现低表达状态, 是一种抑制肿瘤的 miRNA, 它能够通过下调一些致癌基因如 *Ras*, *HMGA*, *Myc*, *NIRF* 等的表达来抑制肿瘤的发生、发展或恶化^[13]. 正常的 miR-1 和 miR-133 的表达能够促进骨骼肌正常增殖与分化^[14]. miR-15 和 miR-16 在胚胎早期发育的不同阶段做出相应表达能够促进胚胎的正常发育^[15]. miR-124 在神经元的特异表达可以使神经细胞获得和维持神经的特性^[16]. miR-181 在淋巴发育过程中对淋巴细胞的阳性与阴性选择起到重要的作用, 能够保护机体避免自身免疫疾病^[17].

1.3 miRNA 逐渐成为引人注目的药物靶点

药物靶点的研究一直是新药研发中最重要的内容之一, miRNA 作为广泛参与基因表达调控的分子^[18], 无疑是药物靶点研究的重要对象. 例如, 针对癌症中的单一蛋白的抗癌药物在临床使用中具有一定局限性, 尽管联合治疗可弥补其不足, 但这常会涉及药物之间的相互作用所带来的副作用, 并导致治疗方案复杂化. 与之相比, miRNA 具备调控多个靶基因的天然特性, 处于多靶点调控网络的中心^[19-21]. 总体而言, miRNA 调控基因方式是多对多的, 一个 mRNA 可以被多个 miRNA 调控; 一个 miRNA 分子也可以有多个调控靶点. 同一个 miRNA 可以在一个细胞里同时调控多个靶基因来影响该细胞的生长发

育, 也可以通过对不同细胞中不同的靶基因的调控使得不同的细胞行使不同的功能, 如 miR-221, 不仅具有调节人血液系统^[22]、血管生成^[23]、乳腺发育^[24]等相关功能, 还与肝癌^[25]、乳腺癌^[26]、甲状腺癌^[27]等癌症相关. 因此多靶点调控分子 miRNA 作为药物靶点, 在新药研发中越来越受到关注.

2 目前主要的 miRNA 的生物大分子抑制剂

目前 miRNA 的抑制剂主要是序列互补的经过特殊修饰的核苷酸寡聚物, 如 AMOs(anti miRNA oligonucleotides), LNA(locked nucleic acid)-AMOs, antagomirs 和 miRNA sponge 等.

最早利用与靶 miRNA 序列互补的原理抵消 miRNA 功能的是 AMOs, 它以 DNA 寡核苷酸短链的形式, 特异地与其互补的内源 miRNA 或其前体分子发生碱基互补配对结合, 形成稳定的 DNA:RNA 双链, 从而被 AMO 占据的内源 miRNA 就不能与其靶 mRNA 结合发挥作用, 最终导致 miRNA 被核酸酶降解, 进而达到抑制 miRNA 的效果^[28].

后续的研究中出现了一系列的修饰 AMOs, 如 2'-O-methyl AMOs, 2'-O-methoxyethyl AMOs 和 LNA-AMOs. LNA-AMOs 是在 AMOs 结构上进行修饰, 把其中多个核苷酸的 2'氧与 4'位置通过一个亚甲基相连形成一个刚性的环, 嵌入糖基的 C3 位置. LNA-AMOs 比 AMOs 更稳定, 且具有更高的选择性和灵敏度^[29].

Antagomirs 是经过特殊修饰的寡核苷酸 miRNA 拮抗剂, 常以硫代磷酸酯代替磷酸酯, 在寡聚物的 3'端与胆固醇共价结合^[30]. Antagomirs 通过与体内的成熟 miRNA 竞争性结合, 阻止 miRNA 与其靶基因 mRNA 的互补配对, 抑制 miRNA 发挥作用. 与前述序列互补的寡聚物相比, Antagomirs 在动物体内外具有更高的稳定性和抑制效果.

miRNA sponge 技术最初是 2007 年由 Sharp 研究组^[31]开发出一种长效抑制 miRNA 基因的方法. miRNA sponge 是一种竞争性的长链 RNA, 序列中包含若干个 miRNA 靶位点. miRNA sponge 与其靶向 miRNA 结合后因其在 RISC 切割位点有一些碱基错配, 从而不会被切割, 并形成稳定的复合物, 最终达到降低靶 miRNA 的丰度, 失去对其天然的靶 mRNA 的负调控作用.

除了以上这些寡核苷酸类似物作为 miRNA 分子的特异性抑制剂以外,近年来,以化学小分子为目标的新 miRNA 抑制剂的发现、筛选策略和筛选模型的研究,也逐渐成为 miRNA 研究领域备受关注热点。

3 microRNA 的化学小分子特异性抑制剂

目前已有报道的 miRNA 特异性的化学小分子抑制剂种类繁多(表 1),机制也各有不同,抑制和干扰的靶位点遍布于整个 miRNA 基因表达、加工、成熟与行使功能的全过程(图 1)。本文对直接靶向 miRNA 的化学小分子抑制剂和通过调节 miRNA 基因表达、加工、成熟等过程进而干扰靶位点的负调控 miRNA 表达的化学小分子抑制剂进行总结归纳,希望对今后的 miRNA 特异性小分子抑制剂的发现和研究提供借鉴。

3.1 直接靶向抑制 miRNAs 的化学小分子抑制剂

(1) miR-21 的抑制剂. miR-21 是较早被发现和公认的肿瘤相关 microRNA(OncomiR)之一,已被证实多种肿瘤细胞中,包括乳腺癌、卵巢癌^[46]、结肠癌^[47]、胰腺癌^[48]、甲状腺癌^[49]等,均存在高表达现象,与肿瘤的发生、发展密切相关。目前对其化学小分子抑制剂研究的文献资料也特别丰富。

丫啶黄(trypaflavine, TPF). Jeang 研究组^[32]于 2010 年报道了一种小分子化合物丫啶黄(trypaflavine, TPF),可以明显下调 miR-21 的表达水平。进一步的实验表明,TPF 主要通过阻碍 miR-21 与 argonaute 2(AGO2)蛋白的组装,抑制 RNA 诱导的 RISC 的形成,从而下调 miR-21 的表达水平。

链霉素(streptomycin). 2012 年 Maiti 研究组^[33]从 15 种氨基糖苷类抗生素中筛选出了链霉素,可以特异性地抑制 miR-21 的表达。进一步研究证实,该化合物能够通过氢键作用与 miR-21 前体的凸起部分结

图 1 miRNA 特异性小分子抑制剂抑制靶点分布示意图

图中(2)(4)(7)为直接靶向 miRNA 的化学小分子抑制剂; (1)(3)(5)(6)为负调控 miRNA 表达的化学小分子抑制剂

表 1 miRNA 小分子抑制剂信息表

miRNA	抑制剂名称	结构式	作用机制/靶点	活性	参考文献
miR-21	γ 吡黄 (tryptaflavine, TPF)		通过阻碍 miR-21 与 AGO2(argonaute 2)蛋白的组装, 抑制 RNA 诱导的基因沉默复合体(RISC)的形成	体外实验表明, TPF 可明显抑制人乳腺癌的发生发展, 且 TPF 无明显细胞毒性	[32]
	链霉素 (streptomycin)		通过氢键作用与 pre-miR-21 的凸起部分结合, 由于位阻效应阻碍了 Dicer 酶对 miRNA 前体的切割	可以明显上调 miR-21 的功能性靶点 PDCD4 的表达水平	[33]
	AC1MMYR2		通过与 Dicer 酶竞争性结合 pre-miR-21 茎环结合位点, 抑制了 pre-miR-21 剪切生成成熟 miR-21	miR-21 的抑制效果具有浓度依赖性及时间依赖性, 并可以上调 miR-21 的功能性靶点 PTEN, PDCD4 及 RECK 的表达水平	[34]
let-7	卡那霉素 A		与 pre-let-7 结合干扰 Dicer 酶的作用	-	[35]
	2-DOS(2-deoxystreptamine)		与 pre-let-7 结合, 干扰 Dicer 酶的作用	对 let-7 表达水平的抑制作用具有剂量依赖性, 在一定浓度范围内, 抑制效果与剂量成正比	[35]

直接靶向
miRNA 的
化学小分
子抑制剂

参考文献		活性		作用机制/靶点		结构式		抑制剂名称		miRNA	
续表

续表 1

miRNA	抑制剂名称	结构式	作用机制/靶点	活性	参考文献
miR-21	重氮苯 (diazobenzene)和 偶氮苯 (azobenzene)		抑制 miR-21 基因的转录	-	[36]
	雌二醇 (estradiol)		抑制 miR-21 基因的转录	可明显上调 miR-21 的靶点蛋白 PDCD4, Bel-2, PTEN 的表达水平	[37]
	多熔素 (polylysine, PLL)		通过抑制 Dicer 酶的活性, 阻碍了 pre-miR-21 的成熟;	体外实验表明, PLL 可明显抑制人乳腺癌的发生发展, 且 PLL 无明显细胞毒性	[32]
	4-benzoylamino-N-(prop-2-yn-1-yl)benzamides		-	可以上调 miR-21 的功能性靶点 PDCD4 的表达水平; 可明显抑制肿瘤细胞的增殖和促进凋亡	[38]
	芳香酰胺(aryl amide)衍生物		对 miR-21 基因的转录没有影响; 可能影响 miR-21 的成熟过程或与 miR-21 直接反应	-	[39]
miR-122	compound 1		可能是抑制 miR-122 基因的转录	可明显抑制丙型肝炎病毒(HCV)在肝细胞中的复制	[40]

续表 1

miRNA	抑制剂名称	结构式	作用机制/靶点	活性	参考文献
	compound 2		同上	同上	[40]
miR-96	苯并咪唑 (benzimidazole)		-	可上调 miR-96 靶点蛋白 FOXO1 的表达, 并可促进肿瘤细胞的凋亡	[41]
miR-1	compound 14		-	对 miR-1 表达水平的抑制作用具有剂量依赖, 在一定浓度范围内, 抑制效果与剂量成正比	[42]
负调控 miRNA 表达的化学 小分子抑 制剂	三氧化二砷 (arsenic trioxide, ATO)		-	ATO 可明显抑制乳腺癌细胞的生长、迁移和侵袭, 并可促进细胞凋亡	[43]
	新霉素		抑制 Dicer 酶催化的 miR-27a 的成熟	-	[44]
	miR-27a				
	阿米卡霉素		抑制 Dicer 酶催化的 miR-27a 的成熟	-	[44]

续表 1		miRNA	抑制剂名称	结构式	作用机制/靶点	活性	参考文献
负调控 miRNA 表 达的化学 小分子抑 制剂			妥布霉素		抑制 Dicer 酶催化的 miR-27a 的成熟	-	[44]
		miR-27a	链霉素		抑制 Dicer 酶催化的 miR-27a 的成熟	-	[44]
			卡那霉素		抑制 Dicer 酶催化的 miR-27a 的成熟	-	[44]
		miR-525	氨基糖苷类衍生物 5''-azido-neomycin B (Neo-N3)		结合 Drosha 酶的加工位点 (processing site), 阻碍 pre-miR-525 的生成	可上调 ZNF395 的表达水平, 且对肝细胞性肝癌的侵袭性有明显抑制作用	[45]

合, 由于位阻作用阻止了 Dicer 酶对 miRNA 前体的切割。

AC1MMYR2. 天津医科大学的 Kang 研究组^[34]在 2014 年通过高通量分子筛选和分子对接的方法, 得到了 miR-21 的小分子抑制剂 AC1MMYR2. AC1MMYR2 对 miR-21 的抑制效果具有浓度依赖性及时空依赖性, 并可以上调 miR-21 的功能性靶点 PTEN, PDCD4 及 RECK 的表达水平. 进一步研究证明了 AC1MMYR2 在 pre-miR-21 到成熟 miR-21 的加工过程中发挥作用, 它通过与 Dicer 竞争性结合 pre-miR-21 茎环结合位点, 抑制了 pre-miR-21 剪切生成成熟 miR-21.

(2) 对 bantam, let-7, miR-142, miR-19b-2 都有作用的抑制剂. Hergenrother 团队在 2004 年发现, 2-DOS(2-deoxystreptamine)是一种能与 RNA 结合的氨基糖苷类衍生物^[50]. 2008 年 Davies^[35]发现, 该类化合物对具有发卡结构的 RNA 具有选择性和高亲和性, 其中在 100 $\mu\text{mol/L}$ 的工作浓度下, compound 23, 24, 29 对 pre-bantam, pre-let-7, pre-miR-142, pre-miR-19b-2 达到 100% 的抑制, compound 26, 28 对 pre-bantam, pre-let-7 也具有强抑制效果, 而 compound 25 对 pre-bantam, pre-miR-19b-2 抑制效果更明显; compound 26, 27 对 pre-bantam, pre-let-7 具有较强的选择抑制效果. 在 25 $\mu\text{mol/L}$ 的工作浓度下, compound 24, 29 对 pre-bantam, pre-let-7, pre-miR-142, pre-miR-19b-2 仍达到 100% 的抑制率, 而 compound 23 对 pre-miR-19b-2 的抑制效果具有较强的选择性.

(3) let-7 的抑制剂. 卡那霉素 A. 2008 年 Davies 等人发现卡那霉素 A(kanamycin A)可以通过与 pre-let-7 结合, 干扰 Dicer 的作用, 达到降低 let-7 表达的作用. 此外, 实验表明, 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 的工作浓度下, 2 h 后抑制率达到 $69\% \pm 3\%$ ^[35].

2-DOS 和新霉胺. 2009 年, Klemm 等人^[51]为寻找更高效、更具特异性的 miRNA 的化学小分子抑制剂, 共轭合成了新霉胺(neamine)和 2-DOS(2-deoxystreptamine)一系列衍生物, 发现通过共轭结合后的 6 种 2-DOS 和新霉胺衍生物对 let-7 的抑制效果比卡那霉素 A 更佳.

3.2 负调控 miRNAs 表达的化学小分子抑制剂

(1) miR-21 的抑制剂. 重氮苯(diazobenzene)和

偶氮苯(azobenzene)类化合物. Deiters 研究组^[36]在 2008 年用荧光素酶报告基因的方法从 1000 余种化学小分子中筛选出了一种对 miR-21 具有选择性抑制活性的重氮苯(diazobenzene)类小分子化合物 1. 此外, 还通过对偶氮苯衍生物广泛的筛选获得了更高活性的化合物 2. 进一步研究表明, 上述小分子化合物主要通过抑制 miR-21 前体 pri-miR-21 的生成进而抑制 miR-21 的表达, 但具体作用机制有待阐明.

雌二醇(estradiol). Klinge 研究组^[37]在 2009 年发表的一篇文章中指出, 雌二醇可以作为 miR-21 的特异性小分子抑制剂. 细胞实验证实了雌二醇可以明显降低成熟 miR-21 的表达水平, 且能够上调 miR-21 的靶蛋白 PDCD4, Bcl-2, PTEN 的表达. 进一步的研究证实, 雌二醇通过抑制 miR-21 基因的转录水平来下调成熟 miR-21 的表达.

多聚赖氨酸(polylysine, PLL). Jeang 研究组^[32]于 2010 年报道了一种小分子化合物 PLL 可以明显下调 miR-21 的表达水平. 进一步的实验表明, PLL 主要通过抑制 Dicer 酶的活性, 阻碍了 pre-miR-21 的成熟, 从而下调了成熟 miR-21 的表达水平, 但 PLL 与 Dicer 酶的具体作用机制则有待研究.

4-benzoylamino-N-(prop-2-yn-1-yl)benzamides. 西安交通大学的 Lu 研究组^[38]在 2015 年设计并合成出一系列苯甲酰胺类化合物, 其中化合物 1j 能够特异地抑制 miR-21 的表达, 而对多种其他 miRNA 的表达水平没有明显影响. 并且可以上调 miR-21 功能性靶点 PDCD4 的表达水平. 通过细胞实验, 他们证实了该小分子化合物可以明显地促进细胞凋亡和抑制细胞增殖.

芳香酰胺(aryl amide)衍生物. Deiters 研究组^[39]在 2015 年报道了一系列 miR-21 特异性小分子抑制剂——4 种芳香酰胺(aryl amide)衍生物(3, 9, 23, 28). 通过检测 HeLa 细胞内各种 miRNA 的表达水平, 证实了这 4 种小分子抑制剂对 miR-21 的特异性. 但其作用机制尚待进一步研究.

(2) miR-122 的抑制剂. miR-122 是肝脏特异性 miRNA, 在肝脏中高表达, 大约占成年人个体肝脏总 miRNA 的 72%, 是最早发现的具组织特异性、高丰度表达的 miRNA 之一^[52]. 目前已发现 miR-122 对肝细胞的生长周期、脂肪代谢^[53]等肝脏生理功能具有重要的调节作用, 对肝脏急性慢性损伤、肝硬化、酒精性肝炎、肝脏肿瘤和丙肝病毒(viral hepatitis C, HCV)

感染^[54]等肝脏疾病的发生发展亦起关键作用^[55]。

Deiters 研究组^[40]在 2010 年报道了关于小分子调控 miR-122 的研究工作, 同时筛选到了 miR-122 特异性的小分子抑制剂化合物 1, 2, 其作用靶点可能是 miR-122 基因到 pri-miR-122 的转录过程。

(3) miR-96 的抑制剂. miR-96 在多种肿瘤中表达量升高, 包括乳腺癌^[56]、前列腺癌^[57]、膀胱癌^[58]、肝癌^[59]和甲状腺乳头状癌^[60]等。

2014 年 Disney 研究组^[41]发现了一种对 miR-96 生物合成有选择性抑制作用的小分子化合物苯并咪唑(benzimidazole), 细胞学和分子生物学实验表明, 苯并咪唑可选择性地阻断 miR-96 的内源性生物合成, 抑制 miR-96 的生物学功能, 促进 miR-96 靶点蛋白 FOXO1 的表达, 进而促进肿瘤细胞的凋亡。

(4) miR-27a 的抑制剂. miR-27a 是一种肿瘤相关 miRNA, 已被确认在前列腺癌^[61]、乳腺癌^[62]中高度表达, 研究表明, 下调 miR-27a 在肿瘤细胞中的表达水平可明显抑制相关肿瘤的发展^[61,62]。

安徽蚌埠医学院的 Xia 研究组^[43]在 2015 年的一篇文章中指出, 三氧化二砷(arsenic trioxide, ATO)在人类乳腺癌细胞的抗癌活性主要是由于 ATO 可特异性地明显下调 miR-27a 的表达水平, 导致 miR-27a 的靶基因 *Fbw7* 的表达水平明显上调。但 ATO 抑制 miR-27a 表达的具体作用机制尚未阐明。另外, Bose 等人^[44]发现, 阿米卡霉素和新霉素可降低 miR-27a 表达量达 25%~30%, 妥布霉素、链霉素、卡那霉素可降低 miR-27a 表达量达 10%~20%。

(5) miR-1 的抑制剂. miR-1 在骨骼肌细胞中表达丰富, 已被证实可调节骨骼肌细胞的生成与肌肉的发育^[63], 且与心脏的发育密切相关^[64]。此外, miR-1 作为冠心病的生物标志物具有良好前景^[65]。

2013 年南京大学的 Zhang 研究组^[42]以萘醌类化合物 2-methoxy-1,4-naphthalenequinone 为基本骨架, 利用光环化加成修饰, 得到数十种衍生物, 并从中筛选出对 miR-1 有特异性抑制作用的化合物 14(compound 14)。而后在细胞水平上证实了化合物 14 可以明显地下调细胞内成熟 miR-1 的表达水平, 但该化合物的具体作用机制仍有待进一步的研究。

(6) miR-525 的抑制剂. miR-525-3p 被证实实在肝癌组织中高表达, 可通过下调其直接功能性靶基因 锌指蛋白 395(ZNF395)的表达, 从而促进肝癌细胞的

发展、迁移和侵袭^[66]。

Disney 研究组于 2015 年报道了一种氨基糖苷类衍生物 5'-azido-neomycin B(Neo-N3)可明显下调肝癌细胞中 miR-525 的表达水平。进一步实验证实, Neo-N3 可通过结合 Drosha 酶的加工位点阻碍 pre-miR-525 的生成过程, 从而抑制 mature-miR-525 的生成。经 Neo-N3 处理后的细胞中 miRNAs 表达谱显示, Neo-N3 对 miR-525 的抑制作用具有选择性^[45]。

4 目前 miRNA 的化学小分子抑制剂研究方法

4.1 荧光素酶报告分析系统

荧光素酶报告分析系统(luciferase reporter assay)是以荧光素为底物来检测萤火虫荧光素酶活性的一种报告系统。通过该方法筛选 miRNA 的小分子抑制剂原理是: 首先将荧光素酶报告基因的 3'UTR 替换为目标 miRNA 的靶基因的 3'UTR, 转染到细胞中构建稳定表达细胞系, 再加入小分子抑制剂, 一定时间后将细胞裂解, 加入底物荧光素, 以荧光强度定量荧光素酶的表达量, 从而检测小分子化合物对目标 miRNA 功能的影响。若 miRNA 小分子抑制剂可以干扰 miRNA 与荧光素酶 mRNA 的 3'UTR 靶位点的结合, 使 miRNA 丧失了抑制荧光素酶表达的功能, 则说明该小分子化合物能够抑制目标 miRNA 的功能; 反之, miRNA 将抑制荧光素酶的表达, 使荧光信号下降, 因此 miRNA 小分子抑制剂的抑制效率与荧光强度成反比(图 2)。

该方法很好地综合了报告基因技术在药物筛选应用中的高灵敏度、检测方便的特点以及荧光素酶在药物筛选中特异靶点、高敏感性、高通量^[67]等特点。

图 2 利用荧光素酶报告基因筛选体系筛选 miRNA 小分子抑制剂

目前发现的小分子调控剂绝大部分都是用该体系筛选得到的, 但该方法也有其缺点, 细胞系的选择和细胞状态对结果都有一定的影响, 然而不可否认的是该筛选体系对开发以 miRNA 为靶点的药物具有深远的、不可忽视的意义^[68].

Deiters 研究组^[35]在 2008 年首次提出利用荧光素酶报告基因来筛选 miRNA 的化学小分子抑制剂和激活剂, 通过对 1000 多种化合物的筛选, 获得了两种能够特异性抑制 miR-21 功能的化合物 diazobenzene 和 azobenzene, 其中后者对 miR-21 在多种细胞中的表达具有更为显著的抑制作用. 该研究组之后又在 2010 年利用同样的技术, 基于 psiCHECK-2(Promega, 美国)报告质粒构建了 psiCHECK-miR122 荧光素酶报告筛选系统, 对来自美国国家癌症研究所发展治疗计划(Developmental Therapeutics Program, DTP)的 1364 个小分子化合物进行筛选, 得到了与丙肝病毒关系密切的 miR-122 的特异性小分子抑制剂 2 种和激活剂 1 种^[40]. 针对 miR-21 特异性小分子抑制剂, 该研究组在 2015 年 7 月通过对 333519 个化合物的高通量筛, 又获得了 4 种芳香酰胺(aryl amide)衍生物(3, 9, 23, 28)^[39].

此外, Jeang 研究组^[32]于 2010 年利用类似方法在细胞水平上对 530 个化学小分子初步筛选, 也得到 miR-21 的特异性小分子抑制剂多熔素和丫啶黄. 南京大学的 Zhang 研究组^[42]也是用了这种方法对萘醌类小分子化合物进行筛选, 发现了一种 miR-1 的小分子抑制剂.

4.2 基于分子信标方法进行 miRNAs 小分子抑制剂的筛选

1996 年, Tyagi 和 Kramer^[69]首次设计并使用了带

有荧光基团和淬灭基团的寡核苷酸作为分子信标(molecular-beacon), 利用其特殊的构象改变在 PCR 中对目标核酸分子进行特异性的识别和定量检测. 分子信标是一个具有茎-环结构的寡核苷酸探针, 通常有 25~35 个核苷酸, 两端分别标记了荧光基团和淬灭基团. 在这种技术应用到 miRNAs 小分子抑制剂筛选过程的时候, 有两种策略并行出现, 现将这两种策略介绍如下.

(i) 分子信标中包含与 miRNA 互补的靶序列. 如图 3 所示, 分子信标的茎环序列可以与靶 miRNA 杂交, 从而使得分子信标成线性结构, 并将荧光基团和淬灭基团分开, 荧光基团发出荧光. 在靶 miRNAs 被小分子抑制剂抑制的情况下, 分子信标呈夹型结构, 荧光基团和淬灭基团靠近, 荧光淬灭. 这种方法与荧光素酶报告基因相比, 在研究化学小分子的作用靶点方面有一定的优势. 因为可以通过调节 Dicer 酶与小分子抑制剂的反应顺序, 确定小分子抑制剂的作用靶点是 Dicer 酶还是 Pre-miR 或者 Dicer 酶与 Pre-miR 的结合.

Bose 等人^[33]利用这一方法从 15 种氨基糖苷类化合物中筛选出链霉素, 通过信标-Pre-miR-21、信标-Dicer、信标-Pre-miR-21-Dicer 的分组实验检测到只有信标-Pre-miR-21-Dicer 有荧光信号的减少, 从而确定抑制剂链霉素通过特异性结合到 Pre-miR-21 的茎环上, 干扰 Dicer 酶的作用, 达到降低 miR-21 表达的作用. 此外该研究组还利用同样的技术从 14 种氨基糖苷类化合物筛选出降低 miR-27a 表达的小分子抑制剂阿米卡霉素、新霉素、妥布霉素、链霉素、卡那霉素^[44].

(ii) 分子信标中包含 miRNA 序列. 2006 年,

图 3 利用含 miRNA 互补的靶序列的分子信标筛选 miRNA 小分子抑制剂

Arenz 研究组^[70]首次提出利用化学小分子对 miRNA 进行调控, 并设计了一种通过检测 Dicer 酶活性来筛选小分子调控剂的方法. 该方法直接在目标 miRNA 的 pre-miRNA 上 5'和 3'端分别连上荧光基团与淬灭基团, 作为分子信标. 当小分子化合物抑制 Dicer 酶对 pre-miRNA 的剪切时, pre-miRNA 保持发卡结构, 5'和 3'荧光基团与淬灭基团相互靠近, 荧光淬灭; 相反, 若小分子化合物不影响 Dicer 对 pre-miRNA 的剪切时, pre-miRNA 被剪切, 5'和 3'荧光基团与淬灭基团分散开来, 发出荧光, 且荧光信号强弱与小分子化合物抑制效率成反比(图 4)^[71].

2008 年 Davies^[35]利用该方法通过构建 pre-bantam, pre-let-7, pre-miR-142, pre-miR-19b-2 等分子信标, 设计了 3 个实验组(Pre-miR 信标-Dicer, Pre-miR 信标-小分子抑制剂-Dicer 和 Dicer-小分子抑制剂), 检测到 Pre-miR 信标-小分子抑制剂-Dicer 组与 Pre-miR 信标-Dicer 相比, 荧光信号的减少明显, 继而表明该小分子抑制剂能够干扰 Pre-miR 与 Dicer 的结合, 从而减少成熟 miRNA 的产生. 该研究组通过这一方法发现了 2-DOS 衍生物对 bantam, let-7, miR-142, miR-19b-2 具有选择性抑制作用, 同时发现卡那霉素 A 对 Pre-miR-27 也具有明显的抑制效果.

图4 利用含 miRNA 序列的分子信标筛选体系筛选 miRNA 小分子抑制剂

4.3 计算机辅助药物设计

计算机辅助药物设计 (computer-aided drug design, CADD) 是以计算机为工具, 充分利用已有的药物及其生物大分子靶标的知识, 通过理论模拟、计算和预测, 来指导和辅助新型药物分子的设计和开发. 通过计算机辅助药物设计可以一定程度上避免盲目性, 缩短药物开发的周期^[72]. 近年来, 生物技术和计算机技术的不断革新大大促进了 CADD 方法和软件的发展, 使其在药物研发领域运用越来越多, 并渗透到新药研发的各个阶段, 为新药研发提供了一种新的思维模式^[73].

Kang 研究组^[34]通过程序 MC-Fold/MC-Sym 对 Pri-miRNA-21 的茎环结构进行 3D 模拟, 选择适宜的小分子数据库利用 AutoDock 软件与 3D 茎环模型对接, 并进行可视化的高通量筛选及完整的体内外功能实验验证, 发现了具有临床应用前景的 miR-21 小分子抑制剂 AC1MMYR2.

4.4 二维组合筛选

2DCS 是 Childs-Disney 等人^[74]于 2008 年提出的方法, 其核心是基于同时对化学小分子与 pre-miRNA 空间结构的亲和度进行计算, 从而达到最佳筛选组合的结果. 该技术从两方面进行筛选, 对 pre-miRNA 最佳配体的筛选和对配体的最适 pre-miRNA 二级结构的筛选. 由于 RNA 与配体的结合位点常位于其二级结构的凸起、环、发卡这种典型的位点上, 那么将这些 pre-miRNA 的二级结构构建成靶点数据库, 利用化学微阵列的方法, 对能够结合 RNA 的特定靶标的小分子进行平行筛选^[75]. 利用二维组合筛选 (two-dimensional combinatorial screening, 2DCS), 该研究组证实了卡那霉素 A 更易于与 pre-miRNA 环上的 AC 部分结合. 2014 年, 该研究组又利用 2DCS 和序列构效关系分析 (structure-activity relationships through sequencing, StARTS), 在 miRNA 的数据库中将人的 pre-miRNA 的二级结构中特定的靶点提取出来, 与化学小分子结构进行 2DCS 的交互计算, 从而寻找到了 27 个潜在的 pre-RNA 与小分子化合物的结合体, 其中最佳的 3 个组合分别包括 miR-96, miR-210 和 miR-182 与其各自对应的小分子化合物. 并进一步通过分子生物学和细胞学实验证实了苯并

咪唑可选择性地阻断 miR-96 的内源性生物合成,抑制 miR-96 的生物学功能^[41]。同时,又用上述方法筛选获得了 microRNA-10b 的小分子抑制剂^[76]。

5 总结与展望

对于两类化学结构截然不同的 miRNA 抑制剂,在实验室研究和临床应用前景方面的优劣各有不同。以寡核苷酸类似物为骨架的 miRNA 生物大分子抑制剂具有高选择性、高效性和重复作用、可用生化方法大量生产等优点。但是也有一系列缺点:(i) 靶向选择性低,导致严重的副反应;(ii) 存在一定免疫原性,可引发宿主免疫系统的过敏反应;(iii) 与化学小分子相比,生物大分子的形态学复杂,具有多晶型、多构象和多尺度,且不同尺度的晶体、准晶的不同形态结构对将来成药后的治疗效果及给药途径的选择

有着极重要的影响;(iv) 生物大分子的结构多依靠次级键维系,稳定性低,且易形成超分子聚合体,增加纯化、分离与复制的困难^[77]。

与之相比,化学小分子抑制剂则具有自身的优势:(i) 化学小分子体积小,细胞膜穿透性强;(ii) 稳定性高,不容易被细胞内的酶降解;(iii) 可大规模合成,且成本要比核酸合成低;(iv) 容易被修饰和优化;(v) 在实验室研究中,可发展成专一性的 miRNA 抑制剂从而对细胞内的信号通路进行干预研究;(vi) 可作为疾病治疗的先导化合物。但同时,化学小分子也具有特异性不强、化学稳定差等缺点。总之,把 miRNA 作为靶点,利用化学小分子抑制剂研究对 miRNA 功能进行调控,进而对化学小分子进行筛选和结构优化,是化学小分子抑制剂研究领域的新疆土,而且对其深入的研究有望开拓另一种新的 miRNA 靶向药物。

参考文献

- Lai E C. microRNAs: runts of the genome assert themselves. *Curr Biol*, 2003, 3: R925–R936
- Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116: 281–297
- 郑永霞, 焦炳华. miRNA 的生物形成及调控基因表达机制. *生命的化学*, 2010, 6: 821–826
- Zamore P D, Haley B, Benjamin H. Ribosome: the big world of small RNAs. *Science*, 2005, 309: 1519–1524
- Ambros V. The evolution of our thinking about microRNAs. *Nat Med*, 2008, 14: 1036–1040
- Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75: 843–854
- Yan Z, Cullen B R. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA*, 2003, 9: 112–123
- Gregory R I, Yan K P, Amuthan G, et al. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 2004, 432: 235–240
- Han J, Lee Y, Yeom K H, et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, 2004, 18: 3016–3027
- Lee Y, Ahn C, Han J J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003, 425: 415–419
- Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, et al. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med*, 2006, 12: 580–587
- Song X W, Shan D K, Chen J, et al. miRNAs and lncRNAs in vascular injury and remodeling. *Sci China Life Sci*, 2014, 57: 826–835
- Wang X, Cao L, Wang Y, et al. Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review). *Oncol Lett*, 2012, 3: 955–960
- Chen J F, Mandel E M, Thomson J M, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*, 2006, 38: 228–233
- Martello G, Zacchigna L, Inui M, et al. MicroRNA control of Nodal signalling. *Nature*, 2007, 449: 183–188
- Sempere L F, Freemantle S, Pitha R I, et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol*, 2004, 5: R13
- Li Q J, Chau J, Ebert P J, et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*, 2007, 129: 147–161
- Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Bartel conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, 120: 15–20
- Ciafrè S A, Galardi S, Mangiola A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334: 1351–1358
- Iorio M V, Ferracin M, Liu C G, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005, 65: 7065–7070
- Pichiorri F, Suh S S, Ladetto M, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 12885–12890
- Felli N, Fontana L, Pelosi E, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit

- receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 18081–18086
- 23 Suárez Y, Fernández H C, Pober J S, et al. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res*, 2007, 100: 1164–1173
 - 24 Wang C, Li Q. Identification of differentially expressed microRNAs during the development of Chinese murine mammary gland. *J Genet Genomics*, 2007, 34: 966–973
 - 25 Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, et al. MiR-221 controls CD-KN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2008, 27: 5651–5661
 - 26 Zhao J J, Lin J, Yang H, et al. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem*, 2008, 283: 31079–31086
 - 27 Pallante P, Visone R, Ferracin M, et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13: 497–508
 - 28 Garbett K A, Horváth S, Ebert P J, et al. Novel animal models for studying complex brain disorders: BAC-driven miRNA-mediated *in vivo* silencing of gene expression. *Mol Psychiatry*, 2010, 15: 987–995
 - 29 Weiler J, Hunziker J, Hall J. Anti-mirNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target mirNAs implicated in human disease? *Gene Ther*, 2006, 13: 496–502
 - 30 Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R. Silencing of microRNAs *in vivo* with ‘antagomirs’. *Nature*, 2005, 438: 685–689
 - 31 Ebert M S, Neilson J R, Sharp P A. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods*, 2007, 4: 721–726
 - 32 Koichi W, Lung Y M, Starost M F, et al. Identification of small molecules that suppress microRNA function and reverse tumorigenesis. *J Biol Chem*, 2010, 285: 24707–24716
 - 33 Bose D, Jayaraj G G, Suryawanshi H, et al. The tuberculosis drug streptomycin as a potential cancer therapeutic: inhibition of miR-21 function by directly targeting its precursor. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51: 1019–1023
 - 34 Shi Z, Zhang J, Qian X, et al. AC1MMYR2, an inhibitor of dicer-mediated biogenesis of Oncomir miR-21, reverses epithelial-mesenchymal transition and suppresses tumor growth and progression. *Cancer Res*, 2013, 73: 5519–5531
 - 35 Davies B P. A Homogenous Fluorescence Assay of MicroRNA Maturation. Berlin: Humboldt-Universität zu, 2008
 - 36 Gumireddy K, Young D D, Xiong X, et al. Small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47: 7482–7484
 - 37 Wickramasinghe N S, Manavalan T T, Dougherty S M, et al. Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: 2584–2595
 - 38 Jiang C S, Wang X M, Zhang S Q, et al. Discovery of 4-benzoylamino-N-(Prop-2-yn-1-yl) benzamides as novel microRNA-21 inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23: 6510–6519
 - 39 Naro Y, Thomas M, Stephens M D, et al. Aryl amide small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25: 4793–4796
 - 40 Young D D, Connelly C M, Grohmann C, et al. Small molecule modifiers of microRNA miR-122 function for the treatment of hepatitis C virus infection and hepatocellular carcinoma. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 7976–7981
 - 41 Velagapudi S P, Gallo S M, Disney M D. Sequence-based design of bioactive small molecules that target precursor microRNAs. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 291–297
 - 42 Tan S B, Huang C, Chen X, et al. Small molecular inhibitors of miR-1 identified from photocycloadducts of acetylenes with 2-methoxy-1,4-naphthalenequinone. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21: 6124–6131
 - 43 Zhang S, Ma C, Pang H, et al. Arsenic trioxide suppresses cell growth and migration via inhibition of miR-27a in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469: 55–61
 - 44 Bose D, Jayaraj G G, Kumar S, et al. A molecular-beacon-based screen for small molecule inhibitors of miRNA maturation. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 930–938
 - 45 Childs-Disney J L, Disney M D. Small molecule targeting of a microRNA associated with hepatocellular carcinoma. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 375–380
 - 46 Pan X, Wang Z X, Wang R. MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer. *Cancer Biol Therapy*, 2010, 10: 1224–1232
 - 47 Asangani I A, Rasheed S A, Nikolova D A, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor PDCD4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 2008, 27: 2128–2136
 - 48 Volinia S, Calin G A, Liu C G, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl*

- Acad Sci USA, 2006, 103: 2257–2261
- 49 Tetzlaff M T, Liu A, Xu X, et al. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. *Endocr Pathol*, 2007, 18: 163–173
- 50 Liu X, Thomas J R, Hergenrother P J. Deoxystreptamine dimers bind to RNA hairpin loops. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 9196–9197
- 51 Klemm C M, Berthelmann A, Neubacher S, et al. Short and efficient synthesis of alkyne-modified amino glycoside building blocks. *European J Org Chem*, 2009, 17: 2788–2794
- 52 Girard M, Jacquemin E, Munnich A, et al. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol*, 2008, 48: 648–656
- 53 Esau C, Davis S, Murray S F, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting. *Cell Metab*, 2006, 3: 87–98
- 54 Jopling C L, Yi M, Lancaster A M, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science*, 2005, 309: 1577–1581
- 55 Tsai W C, Hsu S D, Hsu C S, et al. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest*, 2012, 122: 2884–2897
- 56 Zhang J, Kong X, Li J, et al. miR-96 promotes tumor proliferation and invasion by targeting RECK in breast cancer. *Oncol Rep*, 2014, 31: 1357–1363
- 57 Hafliðadóttir B S, Larne O, Martin M, et al. Upregulation of miR-96 enhances cellular proliferation of prostate cancer cells through FOXO1. *PLoS One*, 2013, 8: e72400–e72400
- 58 Guo Y, Liu H, Zhang H, et al. miR-96 regulates FOXO1-mediated cell apoptosis in bladder cancer. *Oncol Lett*, 2012, 4: 561–565
- 59 Xu D, He X, Chang Y, et al. Inhibition of miR-96 expression reduces cell proliferation and clonogenicity of HepG2 hepatoma cells. *Oncol Rep*, 2013, 29: 653–661
- 60 Song H M, Luo Y, Li D F, et al. MicroRNA-96 plays an oncogenic role by targeting FOXO1 and regulating AKT/FOXO1/Bim pathway in papillary thyroid carcinoma cells. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8: 9889–9900
- 61 Fletcher C E, Dart D A, Sita-Lumsden A, et al. Androgen-regulated processing of the oncomir miR-27a, which targets prohibitin in prostate cancer. *Hum Mol Genet*, 2012, 21: 3112–3127
- 62 Tang W, Zhu J, Su S, et al. MiR-27 as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival. *PLoS One*, 2012, 7: e51702
- 63 Wystub K, Besser J, Bachmann A, et al. miR-1/133a clusters cooperatively specify the cardiomyogenic lineage by adjustment of myocardin levels during embryonic heart development. *PLoS Genetics*, 2013, 9: e1003793–e1003793
- 64 Thum T, Catalucci D, Bauersachs J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res*, 2008, 79: 562–570
- 65 廖江铨, 刘咏梅, 王阶. miRNA 在冠心病诊断和治疗中的研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2015, 8: 748–754
- 66 Pang F, Zha R, Zhao Y, et al. MiR-525-3p enhances the migration and invasion of liver cancer cells by downregulating ZNF395. *PLoS One*, 2014, 9: e90867
- 67 Suto C M, Ignar D M. Selection of an optimal reporter gene for cell-based high throughput screening assays. *J Biomol Screen*, 1997, 2: 7–9
- 68 陈雪姣. 调控 miRNA 的活性小分子的发现和作用机制研究. 博士学位论文. 南京: 南京大学, 2013
- 69 Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 303–308
- 70 Davies B P, Christoph A. Ein homogener assay der microRNA-Reifung. *Angew Chem*, 2006, 118: 5676–5679
- 71 Deiters A. Small molecule modifiers of the microRNA and RNA interference pathway. *AAPS J*, 2010, 12: 51–60
- 72 Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature*, 1995, 373: 573–580
- 73 高丽, 刘艾林, 杜冠华. 计算机辅助药物设计在新药研发中的应用进展. *中国药学杂志*, 2011, 9: 641–645
- 74 Childs-Disney J L, Wu M, Pushechnikov A, et al. A small molecule microarray platform to select RNA internal loop-ligand interactions. *ACS Chem Biol*, 2007, 2: 745–754
- 75 Disney M D, Labuda L P, Paul D J, et al. Two-dimensional combinatorial screening identifies specific aminoglycoside-RNA internal loop partners. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 11185–11194
- 76 Velagapudi S P, Disney M D. Two-dimensional combinatorial screening enables the bottom-up design of a microRNA-10b inhibitor. *Chem Commun (Camb)*, 2014, 50: 3027–3029
- 77 任国宾, 董伟兵, 张志荣, 等. 生物大分子药物传送系统及功能高效化的研究进展. *华西药学杂志*, 2008, 3: 363–364

Small Molecule Inhibitors of MicroRNA

HUANG Yi^{1,2}, WANG JiangHuang¹, YU JianChen¹, GAO XiaoXia³ & YUAN Jie¹

1 Sun-Yat Sen University, Zhongshan School of Medicine, Guangzhou 510080, China;

2 College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

3 College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

MicroRNAs (miRNAs) are a type of non-coding RNA (ncRNA) transcripts and regarded as potential targets for the development of novel drugs, because they are critical regulators of gene expression by hindering translation in pathological conditions. Development of efficient miRNA-inhibiting strategies has become a promising challenge and significant advances has been made in this decade. Among these achievements, small molecule inhibitors of miRNAs are the noteworthy findings, which contribute to the studies of modulation of miRNAs regulatory networks and therapeutic strategies for serious diseases, such as cancer, angiocardopathy and neurologic disease. In this review, we present the development of research on small molecule inhibitors of miRNAs and screening strategies for novel small molecule inhibitors. We hope it will improve the discovery of small molecule inhibitors of miRNAs and facilitate their clinical translation into disease therapeutics.

microRNA, small molecule inhibitors, luciferase reporter assay, molecular-beacon-based screening, computer-aided drug design, two-dimensional combinatorial screening

doi: 10.1360/N052016-00069