

靶向pre-mRNA的选择性剪接过程的疾病治疗策略研究概述

郭欣茹, 张翔*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 活性物质发现与适药化研究北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 前体信使RNA (pre-mRNA) 的选择性剪接是人类转录组和蛋白质组多样性的关键机制。选择性剪接是复杂的基因调控过程, 全转录组分析表明95%的人外显子基因是选择性剪接的, 涉及多种顺式作用元件和反式作用因子。其中, 任一环节或组分发生改变都可能引起错误剪接事件, 进而导致多种相关疾病的发生。除直接改变剪接结果的基因替代治疗外, RNA剪接修饰有望成为一种新的治疗策略, 通过靶向并纠正异常pre-mRNA剪接来达到缓解或治疗疾病的目的。目前所开发的剪接修饰工具有RNA反式剪接、反义寡核苷酸、小干扰RNA和小分子药物等, 它们可通过不同的方式纠正异常剪接。本文综述了近年来对pre-mRNA选择性剪接的表观遗传调控研究进展, 探讨了选择性剪接的发生与调节、相关的剪接缺陷导致的疾病种类以及当前用于靶向和改变剪接的工具, 展望了剪接修饰策略在未来人类疾病治疗中的重要作用。

关键词: 前体信使RNA; 选择性剪接; 剪接修饰; 遗传代谢疾病; 癌症

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)12-3557-15

An overview of disease treatment strategies targeting the alternative splicing of pre-mRNA

GUO Xin-ru, ZHANG Xiang*

(Beijing Key Laboratory of Active Substance Discovery and Druggability Evaluation, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Alternative splicing of pre-messenger RNA (pre-mRNA) is a crucial mechanism for the diversity of the human transcriptome and proteome. Alternative splicing is a complex gene regulation process. Whole-transcriptome analysis shows that 95% of human exonic genes are alternatively spliced, involving various *cis*-acting elements and *trans*-acting factors. Any changes in any component or step may cause erroneous splicing events and lead to the occurrence of various related diseases. In addition to gene replacement therapy that directly changes the splicing results, RNA splicing modification is expected to become a new therapeutic strategy to alleviate or treat diseases by targeting and correcting abnormal pre-mRNA splicing. Splicing modification tools currently developed including RNA *trans*-splicing, antisense oligonucleotides, small interfering RNA, and small molecule drugs can correct abnormal splicing through different ways. This article reviews the recent progress of epigenetic regulation of pre-mRNA alternative splicing in recent years, and discusses the occurrence and regulation of alternative splicing, the types of diseases caused by related splicing defects, and the current-used tools for targeting and altering splicing. The importance of splicing modification strategies in the future treatment of human diseases is envisioned.

Key words: pre-mRNA; alternative splicing; splicing modification; genetic metabolic disease; cancer

收稿日期: 2023-05-08; 修回日期: 2023-06-02.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (82103979); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-12M-1-028).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165248, E-mail: simon@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0586

人类基因组从一个包含2万多个不同基因的遗传密码中产生了多达100万种不同的蛋白质^[1],蛋白质组的多样性提示了遗传信息的流动不是传统上所认为的DNA转录成RNA并翻译成蛋白质的简单过程,基因表达的控制网络是极为复杂的。随着对基因表达调控研究的深入, RNA的重要作用逐渐凸显,对RNA加工的控制是基因调控的关键组成部分。

基因由内含子和外显子组成,但只有外显子含有合成蛋白质所必需的信息,蛋白质编码基因的初始转录产物,即前体信使RNA (pre-mRNA),需要通过加工去除内含子并连接外显子,才能形成成熟的mRNA作为翻译模板,这一过程称为剪接(splicing)。人类基因组学的研究显示人类基因平均含有8.8个外显子,平均大小为145个核苷酸(nucleotide, nt)。内含子平均长度为3 365 nt, 5'和3'非翻译区分别为770 nt和300 nt。因此,一个“标准基因”的长度约27千碱基对(kilobase, kb)。在pre-mRNA加工后,输出到胞质溶胶中的mRNA平均由1 340 nt的编码序列、1 070 nt的非翻译区和poly(A)尾巴组成^[2]。这表明pre-mRNA上超过90%的部分作为内含子被除去。

大量的研究发现,一种pre-mRNA可在不同组合的剪接位点被识别,以不同的剪接方式进行剪接,准确地切除内含子序列,将不同的外显子序列拼接到一起,从而产生多种成熟mRNA,编码结构和功能多样的蛋白质,这一现象定义为选择性剪接(alternative splicing, AS)。选择性剪接是真核生物基因表达中的一种高效、精准的调控机制,广泛存在于超过95%的人类基因表达过程中^[3,4],在细胞内环境稳定、细胞分化和组织器官发育等多个生理过程中发挥关键作用^[5]。选择性剪接过程的任一环节、任一组分发生突变都有可能疾病的发生。本文概述了多种基因序列和蛋白质因子参与选择性剪接的复杂过程,分析了选择性剪接过程中导致疾病的相关突变,旨在通过在RNA层面对选择性剪接相关疾病的机制进行阐述,探寻靶向RNA剪接的剪接修饰工具对选择性剪接所致疾病的积极影响,展望了RNA剪接修饰策略在疾病治疗中的前景。

1 选择性剪接

1.1 选择性剪接的发生

识别外显子和内含子边界,以通过剪接机制正确去除内含子的过程需要pre-mRNA上4个核心剪接位点元件:5'剪接位点(5' splice site, 5' SS)、分支点序列(branch point sequence, BPS)、多嘧啶束(polypyrimidine, Py)和3'剪接位点(3' splice site, 3' SS)^[6]。核pre-mRNA内含子通过两个连续的酯交换反应去除(图1A^[7])。首

先,内含子分支点腺苷的2' OH基团对5'外显子和内含子之间的磷酸基团进行亲核攻击,形成2'-5'磷酸二酯键和套索结构。其次,3'外显子和内含子间的磷酸基团被5'外显子的3' OH基团攻击,随后5'和3'外显子连接形成mRNA,并释放内含子套索^[8]。

1.1.1 剪接体 上述的剪接过程由称为剪接体的大型核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)机器催化^[9],该机器由5种富含尿苷的小核RNA (small nuclear RNA, snRNA;包括U1、U2、U4、U5和U6)和200种其他蛋白质组成^[10]。对pre-mRNA剪接位点的识别随着剪接体的组装和拆分高度动态化进行,提高了剪接过程的效率和灵活性。体外分离出选择性剪接过程中的几种中间体,按时间顺序分别为复合体E、A、B和B*。如图1B^[11-16]所示,在小核核糖核蛋白(small nuclear ribonucleoprotein, snRNP)和剪接因子结合之前,pre-mRNA被异质核糖核蛋白(heterogeneous ribonucleoprotein particle, hnRNP)蛋白结合,形成复合物H。U1 snRNA和pre-mRNA通过碱基互补配对而结合,U1 snRNP与5' SS (GU)以非ATP依赖的相互作用启动剪接体组装,此过程中,U2 snRNP也松散地结合在pre-mRNA上^[17],剪接因子SF1/BBP (splicing factor 1/branchpoint binding protein)和U2AF (U2 auxiliary factor)协同识别BPS、Py和3' SS (AG)以组装复合物E。在后续依赖ATP的步骤中,U2 snRNA通过碱基互补与BPS配对,使U2 snRNP稳定结合并形成复合体A(也称为预剪接体)。在剪接体组装的过程中所产生的snRNA或其他蛋白质和pre-mRNA之间的相互作用对剪接位点的识别和选择具有重要意义。因此,选择性剪接的pre-mRNA的调节通常是通过在复合体E和A形成过程中调节剪接体成分的结合来实现的。接下来,预先装配好的U4/U6.U5三元-snRNP与复合体A结合,复合体B形成^[18,19]。复合体B经过重排,U1和U4 snRNP去稳定化或丢失,活化剪接体复合物B*形成,它催化两个剪接步骤中的第一步。随后产生复合体C,催化第二步^[20]。然后mRNA和切除的内含子被释放,剪接体解离,经过重塑后,释放的snRNPs参与到另外的剪接过程中去^[21,22]。

1.1.2 顺式作用元件和反式作用因子 剪接需要极高的精确度,因为即使在外显子连接位点的单个核苷酸添加或缺失也会改变阅读框,对蛋白质编码产生不利后果。剪接位点在体内的准确识别是各种调节机制共同作用的结果。剪接的分子基础研究揭示了外显子和内含子顺式作用调控序列的存在,它们结合反式作用因子[通常是被称为剪接因子(splicing factor, SF)的蛋白质]共同影响剪接位点的选择。这些顺式作用元

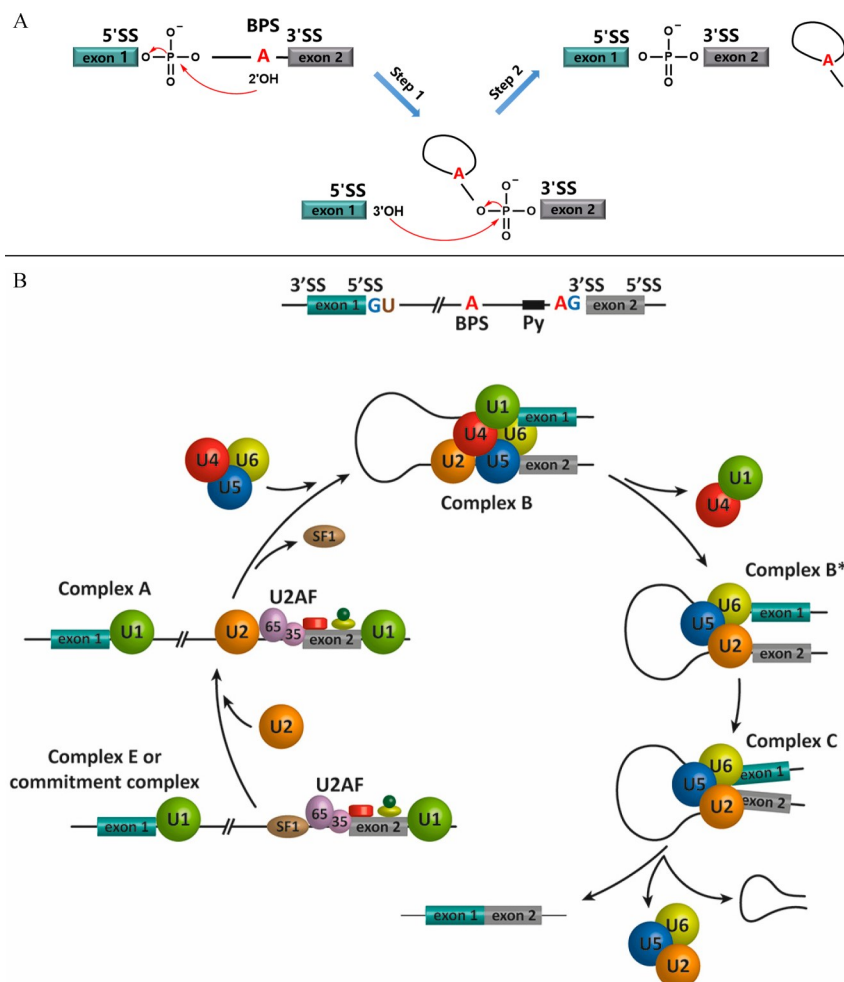


Figure 1 Schematic representation of the pre-mRNA splicing and spliceosome assembly. A: Boxes and solid lines represent the exons and the intron, respectively. The branch site adenosine is indicated by the letter A and the phosphate groups at the 5' and 3' splice sites, which are conserved in the splicing products, are also shown^[7]; B: In the first step of the splicing process, the 5' splice site (GU, 5' SS) is bound by the U1 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP), and the splicing factors SF1/BBP and U2AF cooperatively recognize the BPS, the Py tract, and the 3' SS (AG) to assemble complex E^[11,12]. The binding of the U2 snRNP to the BPS results in the pre-spliceosomal complex A^[13]. Subsequent steps lead to the binding of the U4/U5.U6 tri-snRNP and the formation of complex B^[14]. Complex C is assembled after rearrangements that detach the U1 and U4 snRNPs^[15] to generate complex B*. Complex C is responsible for the two *trans*-esterification reactions at the SS. Additional rearrangements result in the excision of the intron, which is removed as a lariat RNA, and ligation of the exons. The U2, U5, and U6 snRNPs are then released from the complex and recycled for subsequent rounds of splicing^[16]. pre-mRNA: Pre-messenger RNA; SF1/BBP: Splicing factor 1/branchpoint binding protein; U2AF: U2 auxiliary factor; BPS: Branch point sequence; Py: Polypyrimidine

件相对较短,通常为4~18 nt,分为外显子剪接增强子(exonic splicing enhancer, ESE)、外显子剪接沉默子(exonic splicing silencer, ESS)、内含子剪接增强子(intronic splicing enhancer, ISE)和内含子剪接沉默子(intronic splicing silencer, ISS)^[23]。反式作用因子,即一些可以调节剪接的蛋白质,可分为富含丝氨酸-精氨酸的蛋白 [serine and arginine-rich (SR) proteins] 和 hnRNP, SR 蛋白在 N 端具有一个或两个 RNA 识别基序 (RNA recognition motif, RRM), 在 C 端具有富含精

氨酸和丝氨酸的结构域 (RS 结构域), 其介导多种蛋白质-蛋白质和蛋白质-RNA 相互作用^[24,25]。这些蛋白质通过其 RRM 结合 pre-mRNA 内的顺式调节元件、募集剪接体和相关蛋白质以及调节剪接位点选择来发挥作用。典型的 hnRNP 包含 RRM 结构域、RGG 盒和通过促进多种蛋白质-蛋白质相互作用来促进功能多样性的附加结构域。SR 蛋白通常结合剪接增强子促进外显子识别, 而 hnRNP 通常结合剪接沉默子并抑制外显子识别。然而最近的研究显示, 剪接因子作为激活剂

或者阻遏剂的功能并不固定,通常取决于它们结合 pre-mRNA 的位置^[26,27]。剪接调节蛋白与这些剪接调节元件的特异性结合有助于将剪接体置于适当的剪接位点从而调控剪接过程。

1.2 选择性剪接的分类

选择性剪接主要存在5种模式(图2^[28]): ① 外显子跳跃(exon skipping, 又称盒式外显子),指外显子可以与其侧翼内含子一起从转录本中剪接出来,占人类和小鼠基因组保守选择性剪接事件的38%; ② 5' SS的选择(alternative 5' SS usage)和 ③ 3' SS的选择(alternative 3' SS usage),指外显子一端有两个或多个剪接位点可供识别,是否识别该剪接位点取决于该位点的强弱,分别占人类和小鼠基因组保守选择性剪接事件的18%和8%; ④ 内含子保留(intron retention),指内含子可以保留在成熟 mRNA 分子中,占人类和小鼠基因组保守选择性剪接事件的3%; ⑤ 互斥外显子(mutually exclusive exons),指两个外显子可以交替包含或跳过^[29]。此外,还有其他一些不太常见的复杂类型,包括选择性转录起始位点和多聚腺苷酸化位点,可产生选择性转录变体,这些类型和互斥外显子占选择性剪接事件剩余的33%^[30]。上述这些重排可能发生在 mRNA 的编码区或非编码区,当出现在编码区时,可能导致剪接转录本产生具有广泛不同功能的蛋白质亚型,包括亚细胞定位、蛋白质-蛋白质相互作用和翻译后修饰的

变化;出现在非编码区时,不影响蛋白质序列,但可调节 mRNA 的稳定性及蛋白质的表达。

2 选择性剪接和人类疾病

随着对人类遗传学和全基因组研究的深入,越来越多的研究揭示了选择性剪接与诸多疾病的密切关系,特别是神经退行性疾病、神经肌肉疾病和癌症。选择性剪接的失调通常发生在开放阅读框内,可导致异常蛋白质亚型的产生。这些异常功能蛋白影响神经肌肉的正常功能,从而导致相关疾病。例如 3R/4R tau 蛋白(microtubule-associated protein tau)亚型比例异常在阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)中普遍存在;运动神经元生存基因2(survival motor neuron gene 2, SMN2)突变导致约90%的无功能蛋白产生从而引起脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)^[31]。此外,这些异常亚型还与癌症的进展和转移密切相关。随着细胞获得增殖能力,并在上皮-间充质和间充质-上皮移动的致癌过程,许多基因的特异性剪接模式被改变,使其获得血管生成、侵入性、抗细胞凋亡和存活特性,摆脱生长因子依赖和生长抑制,改变自身新陈代谢以应对缺氧,从而获得免疫逃逸机制。每个“癌症标志”都与选择性剪接有关,向更具侵袭性的癌症表型转变。

相关疾病机制的阐明揭示了剪接在机体生理病理状态中的关键作用。据估计,破坏正常剪接的突变约

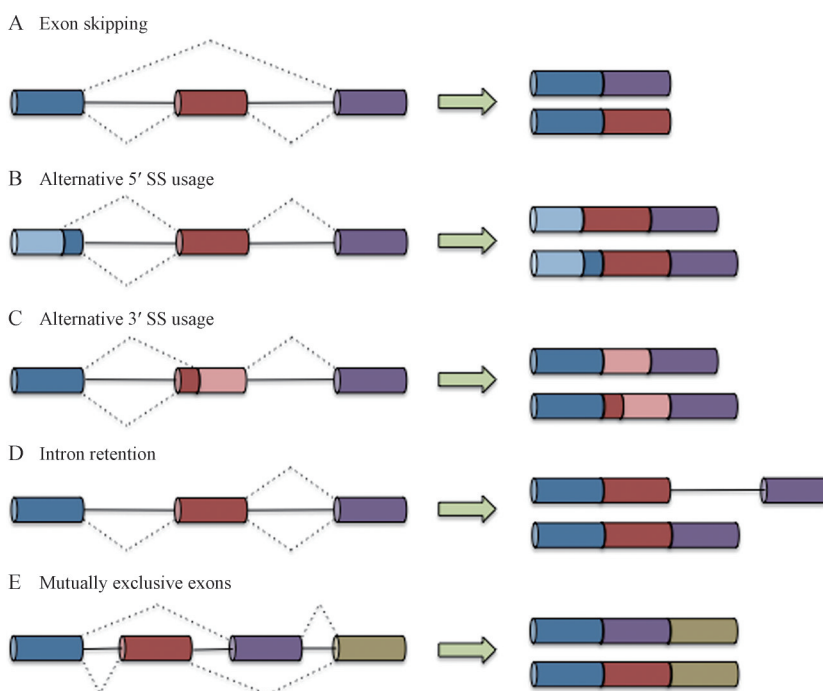


Figure 2 Types of alternative splicing (AS). In the graphs, exons are represented by boxes, and introns are represented by lines. Dashed lines indicate AS events. The five main types of AS are illustrated: exon skipping (A), alternative 5' SS usage (B), alternative 3' SS usage (C), intron retention (D), and mutually exclusive exons (E)^[28]

占所有致病突变的 1/3^[32]。选择性剪接主要在 3 个方面影响多种病理过程: ① 通过降低剪接位点选择的特异性、保真度或激活不常使用的隐秘剪接位点来影响顺式作用元件序列的突变或遗传变异, 这些改变会影响单个基因; ② 反式作用剪接因子的功能改变, 包括核心剪接体成分和调节因子, 这种变化可能会改变多个 RNA 靶标的表达; ③ 剪接因子在核苷酸重复扩增序列中的调节失衡, 这种抑制机制广泛影响基因表达^[28]。

2.1 顺式作用元件突变: 改变剪接模板

剪接位点和调控序列等顺式作用元件对剪接的控制是至关重要的。其中, 最常见的突变是 5' SS 或 3' SS 的单核苷酸替换, 可导致外显子跳跃、隐蔽剪接位点激活或较小程度的内含子保留。类似地, 内含子和外显子突变 (如错义、无义或其他沉默突变) 通常可以通过增强子/沉默子的获得或缺失来影响剪接。

外显子跳跃是常见的致病突变, 特定外显子是否包含在成熟 mRNA 中主要取决于剪接机制对侧翼剪接位点的识别和使用, 研究显示这可能由 ESE/ISE/ESS/ISS 序列控制^[33]。如 SMA 是一种常染色体隐性神经肌肉疾病, SMA 患者中染色体 5q13 位点上的运动神经元生存基因 1 (survival motor neuron gene 1, *SMN1*) 的缺失或突变, 导致其编码的 SMN 蛋白水平降低, 引起 α 神经元的缺失和进行性肌肉萎缩。人类还同时存在 *SMN2* 基因, 该基因除外显子 7 第 6 位发生 C→T 的替换外与 *SMN1* 序列完全相同, 但该突变导致剪接过程中外显子 7 的 5' 端与 U1 snRNP 的结合变弱, 从而引起外显子 7 的跳跃, 使得 90% 的 *SMN2* 基因产生的 mRNA 转录本编码产生缺乏外显子 7 的蛋白, 此蛋白是无功能的, 并被迅速降解。此外, 有研究显示 C→T 的替换导致了 SR 蛋白 SRSF1 识别的 ESE 的损失以及 hnRNP A1 识别的 ESS 的增益^[34,35]。

隐蔽剪接位点的激活可能导致如 Hutchinson-Gilford 早衰症 (Hutchinson-Gilford progeria syndrome, HGPS) 的发生。HGPS 是一种表现在儿童早期的引起过早死亡的加速衰老障碍, 临床表现为出生后生长迟缓、面中部发育不全、小颌畸形、过早动脉粥样硬化、皮下脂肪缺失和全身性骨发育不良等多种早衰特征。HGPS 的突变发生在核纤层蛋白 A (lamin A, *LMNA*) 基因中。核纤层蛋白分布在整个核质中, 并参与包括 DNA 复制、转录、染色质组织、核定位和形状, 以及细胞分裂期间核的组装/拆卸在内的许多功能。大多数典型的 Hutchinson-Gilford 早衰患者是由于 *LMNA* mRNA 外显子 11 中携带单个 C→T 沉默突变。该突变激活隐蔽的 5' SS, 导致 mRNA 编码显性失活的

LMNA, 导致核基因组不稳定^[36]。

信号传导及转录激活蛋白 2 (signal transducer and activator of transcription 2, STAT2) 是一种转录因子, 是 Janus 活化激酶 (Janus kinase, JAK) /STAT 信号通路的主要成分^[37]。在干扰素 (interferon, IFN) 刺激下, STAT2 与 STAT1 形成异二聚体进入细胞核并激活 IFN 应答基因的转录。通过该途径, IFN 诱导癌细胞凋亡^[37]。IFN 已被证明可用于治疗多种癌症, 对血液系统恶性肿瘤最有效^[38]。但是, 癌细胞经常表现出对 IFN 的耐药性限制了其使用。Du 等^[39]发现 IFN 抵抗细胞产生含有内含子 19 的 STAT 2 剪接变体。内含子 19 的保留导致在 Src 同源 2 结构域 (Src homology 2 domain, SH2) 之前引入终止密码子, 使得 STAT 无法二聚化, 破坏了细胞间的信号传递, 从而导致 IFN 诱导癌细胞凋亡失调。

2.2 反式作用因子突变: 改变剪接模式

2.2.1 突变影响 snRNP

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种大脑和脊髓运动神经元的缺失引起的神经退行性疾病。肉瘤融合蛋白 (fused in sarcoma protein, *FUS*) 基因突变和 TAR-DNA 结合蛋白 43 (TAR-DNA binding protein 43, TDP-43) 免疫阳性包涵体缺失与 ALS 有关。*FUS* 是一种 hnRNP 样蛋白, 与 U1 和 U2 snRNA 相互作用^[40-42]。*FUS* 突变蛋白也与这些 snRNA 结合并留在细胞质中, 导致细胞核中的 U1 和 U2 snRNP 减少。TDP-43 与 *FUS* 相互作用, 其失调也影响 snRNA 的丰度。最近的结果表明, TDP-43 抑制了隐秘外显子的剪接, 并且在 TDP-43 缺陷的胚胎干细胞中激活这些外显子诱导细胞死亡^[43]。

2.2.2 核心剪接蛋白突变

骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndromes, MDS) 是一组异质性血液系统癌症。2011 年, Yoshida 及其同事^[44]报告了 MDS 中 RNA 剪接机制编码基因的复发性体细胞突变, 其中, 编码剪接因子 *SF3B1* (splicing factor 3b subunit 1)、*U2AF1* (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1)、*SRSF2* (serine/arginine rich splicing factor 2) 和 *ZRSR2* (zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2) 的基因突变最频繁。*SF3B1* 突变频率最高, 其作为一种剪接因子在剪接位点识别中起着关键作用, 它与 *U2AF* 和 pre-mRNA 的相互作用有助于 U2 snRNP 募集, 其磷酸化与剪接催化相结合影响剪接结果。在对 *SF3B1* 的基因测序中发现, 20% 的 MDS 患者中存在 *SF3B1* 突变。其中, 对于难治性贫血伴环形铁粒幼细胞亚型和难治性血细胞减少伴多系异型增生和环形铁粒幼细胞亚型, 分别有 68% 和 57% 的患者对

SF3B1 突变呈阳性。*SF3B1* 突变在其他骨髓增生异常综合征亚型中发生率较低,一般不超过10%。此外,*SF3B1* 突变也见于其他髓系癌症,包括急性髓系白血病(5%)、原发性骨髓纤维化(4%)、原发性血小板增多症(3%)和慢性粒单核细胞白血病(5%)。*SF3B1* 突变还见于1%~5%的其他类型的肿瘤患者:乳腺癌(1%)、肾癌(3%)、慢性淋巴细胞白血病(5%)、多发性骨髓瘤(3%)和腺样囊性癌(4%)^[45]。

2.2.3 剪接调节因子突变 Ron是巨噬细胞刺激蛋白(macrophage stimulating protein, MSP)的酪氨酸激酶受体,可以促进细胞生长和抑制细胞凋亡,还参与控制细胞解离、运动和细胞外基质的侵袭。 Δ Ron是外显子11跳跃产生的突变亚型,外显子11的跳跃导致具有影响蛋白水解成熟功能的胞外结构域缺失,并增加癌症侵袭性^[46]。 Δ Ron mRNA的异常积累发生在乳腺和结肠肿瘤中。外显子12中的增强子和沉默子在外显子11的剪接程序中起着关键作用,其活性与外显子跳跃和外显子包合物之间的比率相似。剪接增强子的活性关键取决于剪接因子SF2/ASF(也称SRSF1,最常见的SR蛋白之一)直接结合的序列基序。因此,高水平的SF2/ASF增加增强子的活性,引起外显子11的跳跃,并促进 Δ Ron亚型的产生。SF2/ASF已被证明是一种原癌基因^[47],能够调节剪接与细胞运动之间的直接联系,影响胚胎发生、组织形成和肿瘤转移^[33]。

2.3 核苷酸重复扩增

微卫星重复扩增(microsatellite expansion)是指染色质基因组内小片段DNA重复序列异常扩增,这些扩增的重复序列经常折叠成发夹结构,干扰正常的RNA加工。据研究,这类突变与30多种人类疾病相关,其中绝大多数是神经退行性疾病和神经肌肉疾病,包括亨廷顿舞蹈病(Huntington's disease, HD)、ALS、脆性X染色体相关震颤/共济失调综合征(fragile X-associated tremor/ataxia syndrome, FXTAS)及1型和2型杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)。如DMD是一种常染色体显性遗传的多系统疾病,主要特征为肌强直和进行性肌无力。大约60%~70%的患者存在DMD基因内一个或多个外显子的缺失。其他不太常见的突变包括基因内核苷酸重复扩增、单核苷酸变异、剪接位点改变及少数核苷酸的缺失和插入,以下仅以核苷酸重复扩增引起DMD为例。两个位点中的不同微卫星扩增导致具有相似特征的不同形式的疾病:DM1型(DM1)是由位于染色体19q13.3位点上的营养不良肌紧张蛋白激酶(DM1 protein kinase, DMPK)基因3'-非翻译区(3'-untranslated regions, 3'-UTR)的三(CTG)核苷酸扩增引起的,疾病严重程度和发病年

龄与重复长度相关,重复长度范围为80至数千个重复,而未感染个体的重复数少于40;DM2型(DM2)是由染色体3q21位上锌指蛋白9(zinc finger protein 9, ZNF9)基因内含子1内的四(CCTG)核苷酸扩增引起的。这些基因的pre-mRNA中扩展的CUG和CCUG重复序列可以自身折叠,形成相对较长的双链RNA,通过与RNA结合蛋白的相互作用引起疾病。对与CUG重复序列结合的能力进行鉴定,筛选出两种重要的蛋白质:肌盲样蛋白1(muscle blind-like protein 1, MBNL1)和CUG结合蛋白1(CUG binding protein 1, CUGBP1)。MBNL1和CUGBP1都是重要的选择性剪接调节器。剪接过程中,MBNL1被隔离到由CUG重复序列形成的双链发夹结构中,将其从核质中耗尽。另一方面,CUG重复通过PKC活化诱导CUGBP1过度磷酸化和稳定。两种蛋白在选择性剪接调控中出现拮抗反应^[45],这说明降低MBNL1活性和增加CUGBP1活性的综合作用共同调节选择性剪接的变化。

3 靶向AS的治疗工具

设计安全有效的治疗策略来克服异常剪接事件所导致的疾病以达到精准治疗的目的仍然是一项巨大挑战。目前已经开发了如下几种治疗工具来影响选择性剪接过程从而改变剪接结果,长期研究显示这些可以通过纠正或诱导RNA异常剪接、靶向外显子连接突变、靶向增强子和沉默子等作用于选择性剪接多个环节的剪接工具具有强大的治疗潜力,为新的靶点治疗方法开发指明了方向。

3.1 基因替代疗法

基因替代疗法为治疗遗传性的神经肌肉疾病提供了新的途径,有可能实现一次性治愈性修复或改变个体受影响的基因,最大限度地减少甚至消除患者生命周期的疾病症状^[48]。对于由基因表达缺失或减少引起的单基因疾病,如SMA和DMD,该基因疗法使用基因替代策略将被破坏基因的完整拷贝(称为转基因)传递给细胞,使它们能够表达正常的功能性蛋白来缓解疾病。基因替代治疗能够直接纠正疾病相关的剪接变异而不影响基因组。

Onasemnogene abeparvovec是一种复制、重组、自我互补、基于腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体的用于治疗SMA的新型基因替代疗法。它使用腺相关病毒血清型9(adeno-associated virus serotype 9, AAV9),在巨细胞病毒增强子/鸡- β -肌动蛋白杂交启动子的控制下,将功能性*SMN1*基因递送到运动神经元^[49]。AAV可以穿过血脑屏障,并通过神经元启动子驱动其在运动神经元中的活动。2019年1月,Onasemnogene abeparvovec获得FDA批准,其已被证

明可改善重度I型SMA婴儿的运动功能。

Mendell等^[50]在2010年首次将AAV介导的DMD基因转移至人体中进行试验,结果显示,该疗法具有较好的安全性,但并未显著增加微肌营养不良蛋白的表达。随后,为了确保转导效率和组织靶向,该团队选用腺相关病毒血清型74 (adeno-associated virus serotype 74, AAVrh74) 载体和杂合 α -肌球蛋白重链增强子/MCK增强子(MHCK7)启动子对4名DMD患儿进行全身性微肌营养不良蛋白的开放标签I/IIa期试验,结果显示该疗法能够将AAVrh74-MHCK7-微肌营养不良蛋白成功地送至骨骼肌,增加微肌营养不良蛋白表达并促进肌营养不良蛋白相关蛋白复合物的恢复和重建^[51]。

基因替代疗法还应用在ALS^[52]、X连锁肌管性肌病(X-linked myotubular myopathy, XLMTM)^[53-55]、包括AD^[56,57]、帕金森病(Parkinson's disease, PD)^[58,59]、卡

纳万病(Canavan disease, CD)^[57]等在内的中枢神经系统疾病和包括血友病^[60-62]、溶酶体贮积症(lysosomal storage diseases, LSD)^[63-65]等在内的出血性疾病等(表1列举了部分基因替代疗法药物)。

基因疗法相较于其他治疗策略,其免疫原性、稳定性较差、所递送的基因在人体内的可控性难以预测及载体的安全性和转移效率低等问题更加突出,并且这些问题一旦出现对患者所造成的影响是致命性的。此外,基因治疗的价格极其昂贵,这也是限制其临床应用最主要的原因之一。但是基因替代治疗可能带来的独特的一次可治愈性仍使其成为极具吸引力的治疗手段。

3.2 剪接体介导的反式剪接(spliceosome-mediated RNA trans-splicing, SMaRT)

剪接体介导的RNA反式剪接是基于反式剪接过程的基因重编码技术,其通过设计用于替换靶剪接位

Table 1 Examples of drugs for gene replacement therapy and SMaRT strategies. SMaRT: Spliceosome-mediated RNA trans-splicing; LPLD: Familial lipoprotein lipase deficiency; NPC: Nasopharyngeal carcinoma; ADA-SCID: Adenosine deaminase (ADA) deficiency-severe combined immunodeficiency; BP-ALL: B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia; DLBCL: Diffuse large B-cell lymphoma; IRD: Inherited retinal dystrophy; OA: Knee osteoarthritis; HCC: Hepatocellular carcinoma; hTERT: Human telomerase reverse transcriptase; mTERT: Mouse telomerase reverse transcriptase; RHO: Rhodopsin; AAV: Adeno-associated virus; DENV: Dengue viruses; rAAV: Recombination adeno-associated virus

Name	Proper name/target	Indication	Vector	Organization	Stage
Genedine TM	Recombinant human p53 adenovirus particle	Head and neck cancer	Adenovirus type 5-p53	Shenzhen SiBiono GeneTech	Launched
Glybera TM	Alipogene Tiparovec	LPLD	rAAV1-LPL	UniQure	Withdrawn
Strimvelis TM	Autologous CD34 ⁺ cells transduced to express ADA	ADA-SCID	Retroviral-ADA	Orchard Therapeutics	Launched
Luxturna TM	Voretigene Neparovec-rzl	IRD	rAAV2-PRE65	Spark Therapeutics	Launched
Zolgensma TM	Onasemnogene Apeparovec-xioi	SMA	rAAV9-SMN1	AveXis	Launched
Zynteglo TM	Autologous CD34 ⁺ cells encoding $\beta^{\Delta-T87Q}$ -globin gene	B-thalassemia	Lentiviral- β -globin	Bluebird Bio	Launched
Invossa TM	TissueGene-C	OA	Retroviral-TGF- β 1	Kolon Life Science	Launched
RZ-001	hTERT mRNA	HCC	Adenovirus	Rznomics	Phase I/II
PRT-mir122aT	mTERT mRNA	HCC	Adenovirus	Dong-A University	Preclinical
Ad.CMV.Rz.p53	mTERT mRNA	HCC	Adenovirus	Gyeongsang National University	Biological testing
Ad5mTR	mTERT mRNA	Head and neck cancer	Adenovirus type 5	National Cancer Center of Korea	Preclinical
Ad5CMV.Rz.	mTERT mRNA	Brain cancer	Adenovirus type 5	National Cancer Center of Korea	Preclinical
HSVtk.miR-145	mTERT mRNA	Colorectal cancer, non-Hodgkin's lymphoma	Adenovirus type 5	National Cancer Center of Korea	Biological testing
Ad5CMV.mTR.	mTERT mRNA	Colorectal cancer, non-Hodgkin's lymphoma	Adenovirus type 5	National Cancer Center of Korea	Biological testing
sPD1	mTERT mRNA	Colorectal cancer, non-Hodgkin's lymphoma	Adenovirus type 5	National Cancer Center of Korea	Biological testing
pRib100AS-HSVtk	AIMP2-DX2 pre-mRNA	Lung cancer	DNA plasmids	Dankook University	Biological testing
Ad-3R1-TK/GCV	KRAS G12V pre-mRNA	Cancer	Adenovirus	Dankook University	Preclinical
AAV2/8-bRho-PTM20	RHO pre-mRNA	Autosomal dominant retinitis pigmentosa	AAV	INSERM	Preclinical
pA5c-9v1	DENV mRNA	Viral	pA5c	University of Notre Dame	Biological testing
pMU2-tsRNAHA	SMN pre-mRNA	SMA	rAAV	Boston University School of Medicine	Biological testing

点上游或下游的整个编码序列来校正异常 mRNA, 从而实现相关疾病的治疗。该方法涉及 3 个不同的组成部分: 靶 mRNA、剪接体机器和前反式剪接分子 (pre-trans-splicing molecule, PTM)。前两种成分存在于细胞中, 而第 3 种由外源提供引入靶细胞内, 诱导外源 RNA 和内源 pre-mRNA 之间的反式剪接, 产生具有野生型序列 (无突变) 的嵌合 RNA^[16]。经典的 PTM 由以下部分组成: ① 能够通过碱基配对识别内源性 pre-mRNA 上靶内含子的结合结构域; ② 催化剪接反应的人工内含子; ③ 包含取代编码序列的 cDNA^[66]。根据 pre-mRNA 的靶向区域, SMaRT 可分为 ① 5'-反式剪接, 其靶向 5' 部分; ② 3'-反式剪接, 其靶向 3' 部分; ③ 内部外显子置换 (IER), 其靶向 pre-mRNA 的内部。

SMaRT 方法已经用于多种疾病治疗。Coady 等^[67]开发了一种靶向 *SMN2* 治疗 SMA 的反式剪接因子, 该因子包括包含大约 130 nt 的 *SMN* 内含子 6 退火序列、优化的异源剪接位点、*SMN1* 外显子 7 序列以及 *SMN* 外显子 7 下游血凝素 (hemagglutinin, HA) 基序的两个串联拷贝, 以 AAV 为载体输送至 SMA 患者成纤维细胞内。研究结果显示, *SMN* 外显子 7 适合反式剪接替换策略, 内源性 *SMN2* 转录本可以作为靶靶进行反式剪接, 从而使 *SMN2* 基因产生全长 *SMN*。此外, 反式剪接不仅可以增加来自内源性 *SMN2* 基因的 *SMN* 蛋白水平, 而且经反式剪接产生的蛋白质可以恢复患者成纤维细胞中的关键 *SMN* 功能。

SMaRT 策略还用于其他疾病的治疗, 例如囊性纤维化 (cystic fibrosis, CF)^[68-70]、DMD^[71,72]、血友病 A (hemophilia A)^[73]、SMA^[67,74]、色素性视网膜炎 (retinitis pigmentosa, RP)^[75]、X 连锁高 IgM 综合征^[76]、额颞叶痴呆伴帕金森综合征-17 (frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17, FTDP-17)^[77,78]、严重联合免疫缺陷 (severe combined immunodeficiency disease, SCID)^[79] 和大疱性表皮松解症 (epidermolysis bullosa, EB)^[80-82] 等疾病 (表 1 列举了部分 SMaRT 治疗药物)。

虽然 PTM 合成和效率评估技术繁琐, 并且由于病毒表达和递送的限制, 反式剪接的特异性和效率可能偏离预期。但是对于 5' SS 或 3' SS 突变, 特别是突变位于内含子的第一个或最后一个核苷酸中时, 反式剪接是纠正该类突变最简单有效的方法。在反式剪接过程中, PTM 仅取代基因的一部分, 由内源性启动子控制 pre-mRNA 的转录^[83], 因此靶基因 pre-mRNA 的表达仍处于内源性控制之下。并且反式剪接分子只能与现有的 pre-mRNA 相互作用, 因此基因的组织特异性、时间特异性和数量特异性表达不会改变。此外, 一个

PTM 分子在单个反应中同时具有减少突变蛋白合成和促进正常蛋白质合成的双重能力^[66]。

3.3 反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASOs)

ASOs 通常为 15~25 nt 的短 DNA 或 RNA 序列, 以 Watson-Crick 碱基配对与特定 pre-mRNA 序列直接结合, 通过 RNase H 介导的靶 RNA 降解^[84]、在空间上干扰转录本 RNA-RNA 和/或 RNA-蛋白质相互作用^[85,86]或者改变剪接调节转录本的稳定性^[87]等途径来改变剪接过程。ASOs 可被设计成靶向 ① 5' SS 或 3' SS, 空间上阻断剪接因子进入剪接位点, 将剪接重定向到相邻位点来促进剪接; ② 增强子或沉默子元件, 防止反式作用调节剪接因子在靶位点的结合以阻断或促进剪接; ③ RNA 茎环, 稳定或去稳定调节其结构并修饰剪接结果^[16,83]。

未经修饰的寡核苷酸对循环核酸酶高度敏感, 可使其降解并通过肾脏排泄, 因此 ASOs 的化学修饰是非常关键的, 它们可以在体内稳定 ASOs 防止细胞降解并改善其细胞摄取、释放, 还能调节其与靶 RNA 序列的结合亲和力^[88]。常见的化学修饰包括寡核苷酸的磷酸骨架和/或糖组分的改变。如 ① 第一代 ASOs 使用硫代磷酸 (phosphorothioate, PS) 骨架, 是通过用硫原子替换主链中的一个非桥接氧原子来实现的。这种修饰的 ASOs 更稳定并且能够激活 RNase H 以下调靶 RNA 水平, 但也破坏了双链的稳定性, 导致熔化温度降低, 高浓度的 PS 还会产生细胞毒性; ② 第二代 ASOs 对核糖糖环 2' 位置进行修饰, 与 PS 骨架结合能更好地发挥作用。2'-O-甲基 (2-OMe) 和 2'-O-甲氧基乙基 (2'-MOE) 被认为是最成功的糖基修饰, 与未经修饰的硫代磷酸盐相比, 这些修饰增加了其与靶 RNA 的结合力, 并且能减少 PS 主链产生的序列无关毒性, 但是这种方式修饰的 ASOs 不能诱导 RNase H 介导的靶 RNA 下调; ③ 其他 ASOs 有用聚酰胺键取代整个糖磷酸骨架而产生的肽核酸 (PNA); 具有吗啉环而不是核糖环, 并且具有磷酸胺亚基间连接的二氨基磷酸吗啉基低聚物 (PMO) 等。由于可能存在细胞摄取不良、水不溶性、在体内被迅速清除或在高剂量下毒性严重等问题应用受到限制^[89]。

2005 年, Scaffidi 等^[36]报道了一种 25 聚体的吗啉代寡核苷酸, 用于纠正 HGPS 中 *LMNA* 基因的异常剪接。该 ASO 能与 pre-mRNA 外显子 11 中产生 HGPS 突变的区域互补, 在空间上阻断隐蔽剪接位点的激活, 从而防止剪接机制进入异常的剪接位点, 有效阻断了内源性 *LMNA* mRNA 的异常剪接, 增加了功能性 *LMNA* 的水平。

Nusinersen 于 2016 年 12 月由 FDA 批准上市, 是首

个获批用于治疗 SMA 的药物^[90]。Nusinersen 是一种 2-OMe 硫代磷酸酯 ASO, 靶向位于外显子 7 的 5' SS 下游 15 nt 的抑制性 RNA 调控元件 ISS-N1, 阻断 hnRNP A1/A2 与该区域两个基序的结合, 并破坏促进外显子 7 跳跃的抑制性二级结构末端茎环 2 (terminal stem-loop 2, TSL2), 隔离外显子 7 的 5' SS, 诱导外显子 7 包含并产生全长的功能性 SMN 蛋白^[91]。值得注意的是, 由于 ASOs 通常不会穿过血脑屏障, 因此 Nusinersen 需要重复鞘内给药。

ASOs 靶向异常剪接的治疗策略不仅被用于 CF^[92]、营养不良性大疱性表皮松解症 (dystrophic epidermolysis bullosa, DEB)^[93]、DMD^[94,95]、FTDP-17^[96] 等遗传代谢性疾病, 而且也适用于许多癌症的治疗。如 Dewaele 等^[97]使用 ASOs 介导的外显子跳跃来降低 MDM4 的表达, MDM4 是癌细胞中产生的剪接亚型。类似地, Hong 等^[98]临床前和临床评价了一种化学修饰的 ASO, 称为 AZD9150, 其靶向 *STAT3* 编码基因, *STAT3* 是 JAK-STAT 信号通路的转录激活因子和致癌

介导体。Ross 等^[99]使用一种含乙基的 ASO (AZD4785) 下调了 *KRAS* mRNA, 其在大约 20% 的人类癌症中发生突变 (表 2 列举了部分 ASO 药物)。

ASOs 的序列特异性使它们能够精确地与内源性 RNA 结合, 并且其高保真度允许靶向不同的 RNA 亚型。虽然 ASOs 存在摄取较差、无法透过血脑屏障^[100], 具有一定的免疫原性以及通常采用周期性注射给药、患者依从性差等问题^[101]。但是易于递送的特点、良好的毒性特征和持久的效果正使其成为理想的疾病治疗工具^[102,103]。

3.4 小干扰 RNA (small interfering RNAs, siRNAs)

1998 年, 随着 siRNA 通路的发现出现了 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术, 它使用 21~25 nt 的双链 (ds) RNA 通过 RNA 诱导沉默复合物 (RISC) 降解靶 pre-mRNA, 从而抑制内源和异源基因的表达^[104]。siRNA 是 RNAi 的一种模式, 靶向外显子、内含子和外显子/内含子连接序列的 siRNAs 可以诱导选择性剪接和异常 mRNA 的降解, 而不影响正常 mRNA 的表达。

Table 2 Examples of ASO and siRNA drugs. ASO: Antisense oligonucleotides; ATTR: Transthyretin-related amyloidosis; ALAS1: 5'-Aminolevulinic synthase 1; PH: Primary hyperoxaluria; HAO1: Hydroxyacid oxidase 1; PCSK9: Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; SERPINC1: Serpin family C member 1; FD: Familial dysautonomia

Name	Sequence (sense/anti-sense strand)/vector	Indication	Target	Organization	Stage
Patisiran (Onpattro TM)	5'-GUAACCAAGAGUAUCCAUTT-3'/ 5'-AUGGAAUACUCUUGGUUACTT-3'	FAP	<i>TTR</i> mRNA	Alnylam Pharma	Launched
Vutrisiran (Amvuttra TM)	5'-UCUUGGUUACAUGUAACCAAGA-3'/ 5'-UGGGAUUUCUUGUAACCAAGA-3'	ATTR	<i>TTR</i> mRNA	Alnylam Pharma	Launched
Givosiran (Givlaari TM)	5'-UGGUCUUUCUCACAGAGUAGAA-3'/ 5'-AUUCUACUCUCUGAGAAAGAC-3'	AHP	<i>ALAS1</i> mRNA	Alnylam Pharma	Launched
Lumasiran (Oxlumo TM)	GACUUUCAUCCUGGAAUAUA/ ACCUGAAAAGUAGGACCUUUUAU	PH	<i>HAO1</i> mRNA	Alnylam Pharma	Launched
Inclisiran (Leqvio TM)	5'-CUAGACUGUTUUGCUUUUGU-3'/ 5'-ACAAAAGCAAAAACAGGUCUAGAA-3'	Atherosclerosis	<i>PCSK9</i> mRNA	Novartis	Launched
Fitusiran	5'-GGUUAACACCAUUUACUCAA-3'/ 5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAG-3'	Hemophilia A/B	<i>SERPINC1</i> mRNA	Sanofi Genzyme	Phase III
Nusinersen (Spinraza TM)	5'-TCACTTTCATAATGCTGG-3'	SMA	<i>SMN2</i> Ex7	Ionis Pharma, Biogen	Launched
E1 ^{MOV11}	5'-CUAUUAUAGUUAUUAACA-3'	SMA	<i>SMN2</i> E1	Shift Pharma	Preclinical
MO HSMN2-Ex7D	5'-GTAAGATTCACTTTCATAATGCTGG-3'	SMA	<i>SMN2</i> Ex7	IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico	Preclinical
E1.4	CTGAAAGgtagtgacagccatgc	FTDP-17	<i>MAPT</i> Ex1	University of Pennsylvania	Preclinical
E5.3	GCCAAAGtaagctgacgatccacagg	FTDP-17	<i>MAPT</i> Ex5	University of Pennsylvania	Preclinical
7-26S	GTCGCAAACAGTACAATGGC	FD	<i>IKBKAP</i> Ex20	Cold Spring Harbor Laboratory	Preclinical
Eteplirsen (Exondys 51 TM)	5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'	DMD	<i>Dystrophin</i> Ex51	Sarepta Therapeutics	Launched
Drisapersen	5'-UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU-3'	DMD	<i>Dystrophin</i> Ex51	BioMarin Pharma Inc	Phase III (discontinued)
Golodirsen (Vyondys 53 TM)	5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3'	DMD	<i>Dystrophin</i> Ex53	Sarepta Therapeutics	Launched
Viltolarsen (Viltepso TM)	5'-CCUCCGGUUCUGAAGGUGUUC-3'	DMD	<i>Dystrophin</i> Ex53	National Center of Neurology and Psychiatry	Launched
Casimersen	5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3'	DMD	<i>Dystrophin</i> Ex45	Sarepta Therapeutics	Launched
DS-5141	5'-CCUACCGUAACCCGUCGC-3'	DMD	<i>Dystrophin</i> Ex45	Daiichi Sankyo Co Ltd	Phase I/II

这种靶向方法已经用于如 Ullrich 先天性肌营养不良 (Ullrich congenital muscular dystrophy, UCMD)、生长激素缺乏症 (growth hormone deficiency, GHD) II 型和几种癌症的治疗。Bolduc 等^[105]设计了不同的 siRNAs, 靶向导致 COL6A3 基因外显子 16 跳跃的最常见突变, 并在 UCMD 衍生的真皮成纤维细胞中体外检测了 siRNAs。这些 siRNAs 可以作为有效的等位基因特异性探针, 导致突变等位基因特异性敲除, 从而增加胶原 VI 基质产生的丰度和质量。类似地, Ryther 等^[106]使用 siRNA 策略, 以外显子 2~4 为靶标, 特异性降解 II 型 GHD 中外显子 3 跳过的转录物。结果显示, 即使将少量 siRNAs 递送到垂体也可能恢复 II 型 GHD 患者 GH 的正常分泌。Hayes 等^[107]已经表明, siRNA 介导的 SR 蛋白激酶 1 (serine/arginine-rich splicing factor protein kinase-1, SRPK1) 的下调 (其在胰腺、乳腺和结肠肿瘤中显著上调) 导致细胞增殖剂量依赖性降低和凋亡潜力增加。此外, SRPK1 表达的破坏导致肿瘤细胞对化疗剂如吉西他滨和顺铂的敏感性增加。

基于 siRNA 策略还开发了家族性淀粉样变性多发性神经病 (familial amyloid polyneuropathy, FAP) 治疗药物 patisiran^[108], 成人急性肝卟啉病 (acute hepatic porphyria, AHP) 治疗药物 givosiran^[109,110] 和高胆固醇血症治疗药物 inclisiran^[111] 等 (表 2 列举了部分 siRNA 药物)。

从理论上讲, 任何目的基因都可以被 siRNA 靶向, 这一优势使 siRNA 具有比小分子或抗体药物更短的研发时间和更广泛的治疗领域。尽管 siRNA 在药物开发中具有广阔的前景, 但稳定性不理想、药代动力学差、可能出现脱靶效应等仍是该技术未来发展中需要重点关注的问题。

3.5 小分子药物

小分子化合物也可用于调节 RNA 表达, 其可在剪接位点或调控序列 (ESE、ESS、ISE、ISS) 通过直接干扰三级 RNA 结构或阻碍蛋白质-RNA 相互作用来抑制或激活某个剪接位点的使用, 从而促进或抑制选择性剪接。

一些小分子剪接调节剂已经在治疗遗传代谢性疾病和癌症的临床试验中进行了评估。如普拉地内酯 B 的抗肿瘤活性已在体内和体外以及在源自胃癌、宫颈癌及红白血病的多种癌细胞系中得到证实^[112,113]。普拉地内酯 B 可影响参与细胞凋亡的基因如 p73, 通过增加和减少促细胞凋亡和抗细胞凋亡的异构体 Tap73 和 DNp73 来纠正异常剪接^[114]。此外, 普拉地内酯 B 已被证明可导致细胞周期停滞^[115]。普拉地内酯类似物 E7107 是靶向剪接体的新型抗癌剂的第一个化合物,

其靶向 U2 snRNP 复合体的 SF3B, 与 SF3B 的亚基 1 相互作用以阻断癌基因的正常剪接。尽管 E7107 在临床前研究中展现出良好的效力, 但由于 I 期临床试验中患者出现腹泻、呕吐、脱水 and 心肌梗塞等不良反应而导致试验停止^[116]。Herboxidiene、剪接抑素 A、美亚霉素 B 和舒地霉素 D6/K 也已显示出通过靶向剪接体的 SF3B 亚基而表现出体内抗肿瘤活性^[117]。

Risdiplam 是诺华公司开发的一种治疗 SMA 的脑渗透性口服液。目前, 该药物被批准用于所有年龄范围的 1 型、2 型和 3 型 SMA 患者。在 SMN2 pre-mRNA 的剪接过程中, 外显子 7 的 5' SS 的特殊替换导致其与 U1 snRNP 的结合减弱, 直接导致剪接跳过。Risdiplam 作为一种剪接修饰剂能够特异性地稳定由 5' SS 和 U1 snRNP 复合物组成的瞬时双链 RNA 结构, 将 SMN2 外显子 7 的弱 5' SS 转化为强 5' SS, 有利于剪接的进行, 从而增加 SMN2 mRNA 中外显子 7 的含量和整个生物体中功能性 SMN 蛋白的水平。同时, 它还可以选择性地与 SMN2 外显子 7 中的外显子剪接增强子 ESE2 结合, 以增强靶向 SMN2 的特异性。

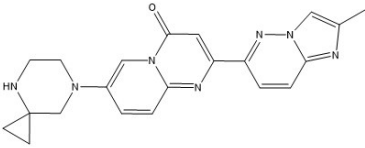
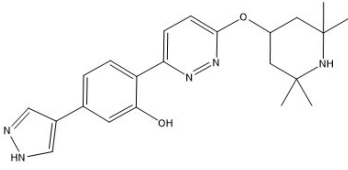
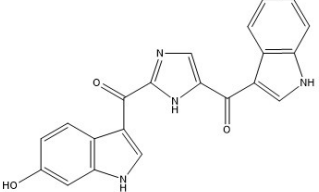
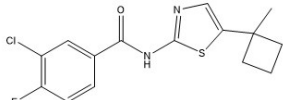
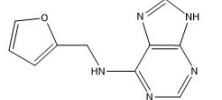
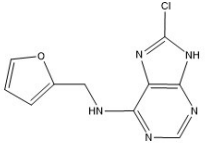
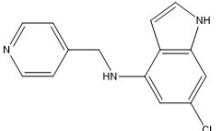
其他小分子药物包括恢复 CF 中囊性纤维化跨膜电导调节剂 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) 基因突变、挽救功能性 CFTR 表达的 DYRK/CLK 双重激酶抑制剂 CaNDY^[118], 在剪接失调的非小细胞肺癌 (non-small cell lung carcinoma, NSCLC) 细胞中表现出抗增殖作用的 PRMT5 抑制剂 PF06939999^[119], 促进 CRL4-DCAF15 泛素连接酶复合物对剪接因子 RBM3 的识别和降解而具有抗癌活性的 indisulam^[120] 以及诱导 HTT pre-mRNA 的内含子 49 中包含含有终止密码子的假外显子, 从而降低致病性蛋白质水平的 HTT-C1 和 HTT-D1^[121] 等 (表 3 列举了部分小分子药物)。

与上述治疗手段相比, 小分子化合物发挥作用的机制通常不够明确, 并且靶向特异性相对较低, 可能出现更多的非特异性和脱靶效应。但是小分子药物合成可及性较好、更容易递送至靶位点、药效良好并且通常毒性较低, 若通过口服给药, 还可以增加患者的依从性和便利性。具有小分子固有优势的化学药物的开发为操纵剪接提供了更为简便的治疗工具, 具有广阔的发展前景。

4 总结与展望

Pre-mRNA 的选择性剪接是基因表达调控的重要组成部分, 不同模式替代外显子的组合显著扩展了蛋白质组的多样性, 并对细胞、组织、器官的分化、发育和多样性具有重要影响。选择性剪接是复杂的生理过程, 由多种顺式作用元件和反式作用因子共同参与, 通

Table 3 Examples of small molecule drugs. *IKBKAP*: I- κ -B kinase complex-associated protein

Name	Structure	Indication	Target	Organization	Stage
Risdiplam (Evrysdi™)		SMA	<i>SMN2</i> Ex7	PTC Therapeutics, Roche, SMA Foundation	Approved
Branaplam		SMA/HD	<i>SMN2</i> Ex7/HTT pre-mRNA	Novartis	Phase II/III (discontinued)
PK4C9		SMA	<i>SMN2</i> TSL2	Roche	Preclinical
LDN-2014		SMA	<i>SMN2</i> pre-mRNA	Brigham and Women's Hospital, Indiana University Research Technology, University of Massachusetts	Preclinical
Kinetin		FD	<i>IKBKAP</i> pre-mRNA	New York University	Phase I (discontinued)
RECTAS		FD	<i>IKBKAP</i> Ex20	Kyoto University	Preclinical
BPN-15477		FD/FTDP-17	<i>IKBKAP</i> Ex20/ <i>MAPT</i> Ex10	PTC Therapeutics	Preclinical

过多样的RNA-蛋白质相互作用驱动, 调节机体的各项生理活动。越来越多的研究关注于选择性剪接与疾病之间的联系, 近年来, 与人类疾病相关的分子机制的研究为靶向剪接过程的治疗提供了可能性。正如文章中所概述的, 研究者们已经设计了多种工具来改变剪接反应的结果, 以治疗由剪接异常引起的疾病。该领域的广泛研究和一系列药物的上市已经证实了这种剪接修饰的策略对疾病治疗产生的现实可行性。然而, 这些工具在不同程度上以不同方式靶向体内的基因序列或蛋白结构, 因此其免疫原性、脱靶效应等所体现出的安全性问题是其走向临床必须深入细致研究的重要因素。此外, 剪接效率、靶向特异性和作用的持久性同样也是开发此类工具必须考虑的方面。因此, 更有效更安全的RNA剪接修饰的工具的开发仍任重道远, 也必将是该领域研究的热点和重点。

作者贡献: 郭欣茹检索文献、撰写文章、修改文章; 张翔指导撰写思路和文章修改。

利益冲突: 本文作者无利益冲突。

References

- [1] Bates DO, Morris JC, Oltean S, et al. Pharmacology of modulators of alternative splicing [J]. *Pharm Rev*, 2017, 69: 63-79.
- [2] Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome [J]. *Nature*, 2001, 409: 860-921.
- [3] Pan Q, Shai O, Lee LJ, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing [J]. *Nat Genet*, 2008, 40: 1413-1415.
- [4] Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes [J]. *Nature*, 2008, 456: 470-476.
- [5] Baralle FE, Giudice J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,

- 2017, 18: 437-451.
- [6] van der Feltz C, Anthony K, Brilot A, et al. Architecture of the spliceosome [J]. *Biochemistry*, 2012, 51: 3321-3333.
- [7] Will CL, Lüthmann R. Spliceosome structure and function [J]. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, 2011, 3: a003707.
- [8] Papasaikas P, Valcárcel J. The spliceosome: the ultimate RNA chaperone and sculptor [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41: 33-45.
- [9] Lamond AI. The spliceosome [J]. *Bioessays*, 1993, 15: 595-603.
- [10] Burge CB, Tuschl T, Sharp PA. Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes [M] // Gesteland RF, Cech TR, Atkins JF. *The RNA World* (Second Ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999: 525-560.
- [11] Berglund JA, Abovich N, Rosbash M. A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition [J]. *Genes Dev*, 1998, 12: 858-867.
- [12] Berglund JA, Chua K, Abovich N, et al. The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC [J]. *Cell*, 1997, 89: 781-787.
- [13] MacMillan AM, Query CC, Allerson CR, et al. Dynamic association of proteins with the pre-mRNA branch region [J]. *Genes Dev*, 1994, 8: 3008-3020.
- [14] Sun JS, Manley JL. A novel U2-U6 snRNA structure is necessary for mammalian mRNA splicing [J]. *Genes Dev*, 1995, 9: 843-854.
- [15] Raghunathan PL, Guthrie C. RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2 [J]. *Curr Biol*, 1998, 8: 847-855.
- [16] Suñé-Pou M, Prieto-Sánchez S, Boyero-Corral S, et al. Targeting splicing in the treatment of human disease [J]. *Genes*, 2017, 8: 87.
- [17] Das R, Zhou Z, Reed R. Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex E [J]. *Mol Cell*, 2000, 5: 779-787.
- [18] Boesler C, Rigo N, Anokhina MM, et al. A spliceosome intermediate with loosely associated tri-snRNP accumulates in the absence of Prp28 ATPase activity [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11997.
- [19] Kelemen O, Convertini P, Zhang Z, et al. Function of alternative splicing [J]. *Gene*, 2013, 514: 1-30.
- [20] Bessonov S, Anokhina M, Will CL, et al. Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core [J]. *Nature*, 2008, 452: 846-850.
- [21] Schwer B, Gross CH. Prp22, a DExH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mRNA splicing [J]. *EMBO J*, 1998, 17: 2086-2094.
- [22] Fourmann JB, Schmitzová J, Christian H, et al. Dissection of the factor requirements for spliceosome disassembly and the elucidation of its dissociation products using a purified splicing system [J]. *Genes Dev*, 2013, 27: 413-428.
- [23] Buratti E, Baralle FE. Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 10505-10514.
- [24] Long JC, Caceres JF. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression [J]. *Biochem J*, 2009, 417: 15-27.
- [25] Jeong S. SR proteins: binders, regulators, and connectors of RNA [J]. *Mol Cells*, 2017, 40: 1.
- [26] Zhou Z, Fu XD. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases [J]. *Chromosoma*, 2013, 122: 191-207.
- [27] Martinez-Contreras R, Cloutier P, Shkreta L, et al. hnRNP proteins and splicing control [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 623: 123.
- [28] Suñé-Pou M, Limeres MJ, Moreno-Castro C, et al. Innovative therapeutic and delivery approaches using nanotechnology to correct splicing defects underlying disease [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 731.
- [29] Kim E, Goren A, Ast G. Alternative splicing: current perspectives [J]. *Bioessays*, 2008, 30: 38-47.
- [30] Ast G. How did alternative splicing evolve? [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5: 773-782.
- [31] He ZH, Zhang X. Advances in drugs on targeting SMN2 for the treatment of spinal muscular atrophy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1301-1311.
- [32] Lim KH, Ferraris L, Filloux ME, et al. Using positional distribution to identify splicing elements and predict pre-mRNA processing defects in human genes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 11093-11098.
- [33] Ghigna C, Giordano S, Shen H, et al. Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene [J]. *Mol Cell*, 2005, 20: 881-890.
- [34] Cartegni L, Krainer AR. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1 [J]. *Nat Genet*, 2002, 30: 377-384.
- [35] Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy [J]. *Nat Genet*, 2003, 34: 460-463.
- [36] Scaffidi P, Misteli T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome [J]. *Nat Med*, 2005, 11: 440-445.
- [37] Gough DJ, Levy DE, Johnstone RW, et al. IFN γ signaling—does it mean JAK-STAT? [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008, 19: 383-394.
- [38] Goldstein D, Laszlo J. The role of interferon in cancer therapy: a current perspective [J]. *CA Cancer J Clin*, 1988, 38: 258-277.
- [39] Du Z, Fan M, Kim JG, et al. Interferon-resistant Daudi cell line with a STAT2 defect is resistant to apoptosis induced by chemotherapeutic agents [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 27808-27815.
- [40] Gerbino V, Carri MT, Cozzolino M, et al. Mislocalised FUS

- mutants stall spliceosomal snRNPs in the cytoplasm [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 55: 120-128.
- [41] Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6 [J]. *Science*, 2009, 323: 1208-1211.
- [42] Kwiatkowski T Jr, Bosco D, Leclerc A, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Science*, 2009, 323: 1205-1208.
- [43] Ling JP, Pletnikova O, Troncoso JC, et al. TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD [J]. *Science*, 2015, 349: 650-655.
- [44] Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia [J]. *Nature*, 2011, 478: 64-69.
- [45] Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365: 1384-1395.
- [46] Maggiora P, Marchio S, Stella MC, et al. Overexpression of the RON gene in human breast carcinoma [J]. *Oncogene*, 1998, 16: 2927-2933.
- [47] Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, et al. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14: 185-193.
- [48] Mendell JR, Al-Zaidy SA, Rodino-Klapac LR, et al. Current clinical applications of *in vivo* gene therapy with AAVs [J]. *Mol Ther*, 2021, 29: 464-488.
- [49] Stevens D, Claborn MK, Gildon BL, et al. Onasemnogene abeparvovec-xioi: gene therapy for spinal muscular atrophy [J]. *Ann Pharmacother*, 2020, 54: 1001-1009.
- [50] Mendell JR, Campbell K, Rodino-Klapac L, et al. Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363: 1429-1437.
- [51] Mendell JR, Sahenk Z, Lehman K, et al. Assessment of systemic delivery of rAAVrh74. MHCK7. micro-dystrophin in children with Duchenne muscular dystrophy: a nonrandomized controlled trial [J]. *JAMA Neurol*, 2020, 77: 1122-1131.
- [52] Lejman J, Panuciak K, Nowicka E, et al. Gene therapy in ALS and SMA: advances, challenges and perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 1130.
- [53] Buj-Bello A, Fougerousse F, Schwab Y, et al. AAV-mediated intramuscular delivery of myotubularin corrects the myotubular myopathy phenotype in targeted murine muscle and suggests a function in plasma membrane homeostasis [J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17: 2132-2143.
- [54] Childers MK, Joubert R, Poulard K, et al. Gene therapy prolongs survival and restores function in murine and canine models of myotubular myopathy [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6: 220ra210.
- [55] Mack DL, Poulard K, Goddard MA, et al. Systemic AAV8-mediated gene therapy drives whole-body correction of myotubular myopathy in dogs [J]. *Mol Ther*, 2017, 25: 839-854.
- [56] Koliatsos VE, Nauta H, Clatterbuck RE, et al. Mouse nerve growth factor prevents degeneration of axotomized basal forebrain cholinergic neurons in the monkey [J]. *J Neurosci*, 1990, 10: 3801-3813.
- [57] Fischer W, Victorin K, Björklund A, et al. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor [J]. *Nature*, 1987, 329: 65-68.
- [58] Niethammer M, Tang CC, Vo A, et al. Gene therapy reduces Parkinson's disease symptoms by reorganizing functional brain connectivity [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10: eaau0713.
- [59] Christine C, Starr P, Larson P, et al. Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease [J]. *Neurology*, 2009, 73: 1662-1669.
- [60] George LA. Hemophilia gene therapy comes of age [J]. *Blood Adv*, 2017, 1: 2591-2599.
- [61] Cantore A, Nair N, Della Valle P, et al. Hyperfunctional coagulation factor IX improves the efficacy of gene therapy in hemophilic mice [J]. *Blood*, 2012, 120: 4517-4520.
- [62] Du LM, Nurden P, Nurden AT, et al. Platelet-targeted gene therapy with human factor VIII establishes haemostasis in dogs with haemophilia A [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2773.
- [63] Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, et al. Lysosomal storage diseases [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 27.
- [64] Sands MS, Davidson BL. Gene therapy for lysosomal storage diseases [J]. *Mol Ther*, 2006, 13: 839-849.
- [65] Parenti G, Andria G, Ballabio A. Lysosomal storage diseases: from pathophysiology to therapy [J]. *Annu Rev Med*, 2015, 66: 471-486.
- [66] Berger A, Maire S, Gaillard MC, et al. mRNA *trans*-splicing in gene therapy for genetic diseases [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2016, 7: 487-498.
- [67] Coady TH, Shababi M, Tullis GE, et al. Restoration of SMN function: delivery of a *trans*-splicing RNA re-directs SMN2 pre-mRNA splicing [J]. *Mol Ther*, 2007, 15: 1471-1478.
- [68] Liu X, Jiang Q, Mansfield SG, et al. Partial correction of endogenous $\Delta F508$ CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 47-52.
- [69] Liu X, Luo M, Zhang LN, et al. Spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing with recombinant adeno-associated virus partially restores cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function to polarized human cystic fibrosis airway epithelial cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16: 1116-1123.
- [70] Mansfield S, Kole J, Puttaraju M, et al. Repair of CFTR mRNA by spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing [J]. *Gene Ther*, 2000, 7: 1885-1895.
- [71] Lorain S, Peccate C, Le Hir M, et al. Dystrophin rescue by *trans*-splicing: a strategy for DMD genotypes not eligible for exon skipping approaches [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 8391-8402.
- [72] Lorain S, Peccate C, Le Hir M, et al. Exon exchange approach to

- repair Duchenne dystrophin transcripts [J]. PLoS One, 2010, 5: e10894.
- [73] Chao H, Mansfield SG, Bartel RC, et al. Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing [J]. Nat Med, 2003, 9: 1015-1019.
- [74] Coady TH, Lorson CL. *Trans*-splicing-mediated improvement in a severe mouse model of spinal muscular atrophy [J]. J Neurosci, 2010, 30: 126-130.
- [75] Berger A, Lorain S, Joséphine C, et al. Repair of rhodopsin mRNA by spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing: a new approach for autosomal dominant retinitis pigmentosa [J]. Mol Ther, 2015, 23: 918-930.
- [76] Tahara M, Pergolizzi RG, Kobayashi H, et al. *Trans*-splicing repair of CD40 ligand deficiency results in naturally regulated correction of a mouse model of hyper-IgM X-linked immunodeficiency [J]. Nat Med, 2004, 10: 835-841.
- [77] Rodriguez-Martin T, Garcia-Blanco MA, Mansfield SG, et al. Reprogramming of tau alternative splicing by spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing: implications for tauopathies [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102: 15659-15664.
- [78] Rodriguez-Martin T, Anthony K, Garcia-Blanco MA, et al. Correction of tau mis-splicing caused by FTDP-17 MAPT mutations by spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing [J]. Hum Mol Genet, 2009, 18: 3266-3273.
- [79] Zayed H, Xia L, Yerich A, et al. Correction of DNA protein kinase deficiency by spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing and sleeping beauty transposon delivery [J]. Mol Ther, 2007, 15: 1273-1279.
- [80] Wally V, Brunner M, Lettner T, et al. K14 mRNA reprogramming for dominant epidermolysis bullosa simplex [J]. Hum Mol Genet, 2010, 19: 4715-4725.
- [81] Wally V, Klausegger A, Koller U, et al. 5' *Trans*-splicing repair of the PLEC1 gene [J]. J Invest Dermatol, 2008, 128: 568-574.
- [82] Muraier EM, Gache Y, Gratz IK, et al. Functional correction of type VII collagen expression in dystrophic epidermolysis bullosa [J]. J Invest Dermatol, 2011, 131: 74-83.
- [83] Havens MA, Duelli DM, Hastings ML. Targeting RNA splicing for disease therapy [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2013, 4: 247-266.
- [84] Wu H, Lima WF, Zhang H, et al. Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs [J]. J Biol Chem, 2004, 279: 17181-17189.
- [85] Dominski Z, Kole R. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90: 8673-8677.
- [86] Singh RN, Singh NN. Mechanism of splicing regulation of spinal muscular atrophy genes [J]. Adv Neurobiol, 2018, 20: 31-61.
- [87] Vickers TA, Wyatt JR, Burckin T, et al. Fully modified 2' MOE oligonucleotides redirect polyadenylation [J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29: 1293-1299.
- [88] Tang XG, Guan XD, Chen R, et al. Progress in clinical pharmacology of oligonucleotides [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 218-225.
- [89] Evers MM, Toonen LJ, van Roon-Mom WM. Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders [J]. Adv Drug Delivery Rev, 2015, 87: 90-103.
- [90] Goodkey K, Aslesh T, Maruyama R, et al. Nusinersen in the treatment of spinal muscular atrophy [M] // Yokota T, Maruyama R. Exon Skipping and Inclusion Therapies. Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press, 2018, 1828: 69-76.
- [91] Singh NN, Howell MD, Androphy EJ, et al. How the discovery of ISS-N1 led to the first medical therapy for spinal muscular atrophy [J]. Gene Ther, 2017, 24: 520-526.
- [92] Igreja S, Clarke LA, Botelho HM, et al. Correction of a cystic fibrosis splicing mutation by antisense oligonucleotides [J]. Hum Mutat, 2016, 37: 209-215.
- [93] Goto M, Sawamura D, Nishie W, et al. Targeted skipping of a single exon harboring a premature termination codon mutation: implications and potential for gene correction therapy for selective dystrophic epidermolysis bullosa patients [J]. J Invest Dermatol, 2006, 126: 2614-2620.
- [94] Anthony K, Feng L, Arechavala-Gomez V, et al. Exon skipping quantification by qRT-PCR in Duchenne muscular dystrophy patients treated with the antisense oligomer eteplirsen [J]. Human Gene Ther Methods, 2012, 23: 336-345.
- [95] Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study [J]. Lancet, 2011, 378: 595-605.
- [96] Kalbfuss B, Mabon SA, Misteli T. Correction of alternative splicing of tau in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 42986-42993.
- [97] Dewaele M, Tabaglio T, Willekens K, et al. Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth [J]. J Clin Invest, 2016, 126: 68-84.
- [98] 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]. Sci Transl Med, 2015, 7: 314ra185.
- [99] Ross SJ, Revenko AS, Hanson LL, et al. Targeting KRAS-dependent tumors with AZD4785, a high-affinity therapeutic antisense oligonucleotide inhibitor of KRAS [J]. Sci Transl Med, 2017, 9: eaal5253.
- [100] Geary RS, Norris D, Yu R, et al. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 87: 46-51.
- [101] Roberts TC, Langer R, Wood MJ. Advances in oligonucleotide drug delivery [J]. Nat Rev Drug Discov, 2020, 19: 673-694.

- [102] Bennett CF, Swazey EE. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010, 50: 259-293.
- [103] Porensky PN, Mitrpant C, McGovern VL, et al. A single administration of morpholino antisense oligomer rescues spinal muscular atrophy in mouse [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21: 1625-1638.
- [104] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
- [105] Bolduc V, Zou Y, Ko D, et al. siRNA-mediated allele-specific silencing of a COL6A3 mutation in a cellular model of dominant ullrich muscular dystrophy [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3: e147.
- [106] Ryther RC, Flynt AS, Harris BD, et al. GH1 splicing is regulated by multiple enhancers whose mutation produces a dominant-negative GH isoform that can be degraded by allele-specific small interfering RNA (siRNA) [J]. *Endocrinology*, 2004, 145: 2988-2996.
- [107] Hayes GM, Carrigan PE, Beck AM, et al. Targeting the RNA splicing machinery as a novel treatment strategy for pancreatic carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 3819-3827.
- [108] Weng Y, Xiao H, Zhang J, et al. RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution [J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37: 801-825.
- [109] de Paula Brandão PR, Titze-de-Almeida SS, Titze-de-Almeida R. Leading RNA interference therapeutics part 2: silencing delta-aminolevulinic acid synthase 1, with a focus on givosiran [J]. *Mol Diagn Ther*, 2020, 24: 61-68.
- [110] Agarwal S, Simon AR, Goel V, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the small interfering ribonucleic acid, givosiran, in patients with acute hepatic porphyria [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2020, 108: 63-72.
- [111] Khvorova A. Oligonucleotide therapeutics—a new class of cholesterol-lowering drugs [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376: 4-7.
- [112] Sato M, Muguruma N, Nakagawa T, et al. High antitumor activity of pladienolide B and its derivative in gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2014, 105: 110-116.
- [113] Kashyap MK, Kumar D, Villa R, et al. Targeting the spliceosome in chronic lymphocytic leukemia with the macrolides FD-895 and pladienolide-B [J]. *Haematologica*, 2015, 100: 945.
- [114] Zhang Q, Di C, Yan J, et al. Inhibition of SF3b1 by pladienolide B evokes cycle arrest, apoptosis induction and p73 splicing in human cervical carcinoma cells [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47: 1273-1280.
- [115] Jorge J, Petronilho S, Alves R, et al. Apoptosis induction and cell cycle arrest of pladienolide B in erythroleukemia cell lines [J]. *Invest New Drugs*, 2020, 38: 369-377.
- [116] Eskens FA, Ramos FJ, Burger H, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the first-in-class spliceosome inhibitor E7107 in patients with advanced solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 6296-6304.
- [117] Lin JC. Therapeutic applications of targeted alternative splicing to cancer treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 19: 75.
- [118] Shi Y, Bray W, Smith AJ, et al. An exon skipping screen identifies antitumor drugs that are potent modulators of pre-mRNA splicing, suggesting new therapeutic applications [J]. *PLoS One*, 2020, 15: e0233672.
- [119] Jensen-Pergakes K, Tatlock J, Maegley KA, et al. SAM-competitive PRMT5 inhibitor PF-06939999 demonstrates antitumor activity in splicing dysregulated NSCLC with decreased liability of drug resistance discovery of SAM-competitive PRMT5 inhibitor PF-06939999 [J]. *Mol Cancer Ther*, 2022, 21: 3-15.
- [120] Ting TC, Goralski M, Klein K, et al. Aryl sulfonamides degrade RBM39 and RBM23 by recruitment to CRL4-DCAF15 [J]. *Cell Rep*, 2019, 29: 1499-1510.e6.
- [121] Bhattacharyya A, Trotta CR, Narasimhan J, et al. Small molecule splicing modifiers with systemic HTT-lowering activity [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 7299.