

RNA聚合酶 II 启动子调控 RNA 干扰 在肿瘤治疗中的应用前景*

陈青 潘秋卫 蔡荣** 钱程**

(浙江理工大学生命科学院, 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

摘要 RNA 干扰是双链 RNA 介导的特异性转录后基因表达沉默现象. 由于双链小干扰 RNA 介导的 RNA 干扰技术设计简便、作用迅速、效果明显, 目前已被广泛应用于基因功能和重大疾病治疗的研究, 尤其为肿瘤治疗提供了一条新途径. 利用 RNA 干扰技术通过调节肿瘤发生发展相关基因的表达可制定出一系列有效的抗癌策略. 然而在现行大多数策略中往往采用不可调控的 RNA 聚合酶 III 启动子(H1, U6)表达经典的发夹结构 RNA, 经由 Dicer 酶切割成功能性 siRNA, 因此缺乏组织细胞靶向性和抗癌效率. 最新研究表明, 采用 RNA 聚合酶 II 启动子可弥补由 RNA 聚合酶 III 启动子调控 RNA 干扰缺陷和不足. 此外, 运用病毒载体特别是具有靶向和溶瘤效应的肿瘤特异性复制腺病毒, 介导 RNA 聚合酶 II 启动子调控表达 siRNA 有望成为更有效的治疗手段.

关键词 RNA 干扰, RNA 聚合酶 II 启动子, 肿瘤治疗

学科分类号 Q789

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)最早是由 Mello 和 Fire 等^[1]1998 年在线虫体内发现. 作为高效特异的新型基因阻断技术, RNAi 已被广泛应用于基因功能、病毒性感染、恶性肿瘤、遗传性疾病等重大人类疾病的研究治疗领域, Mello 和 Fire 也因此荣获 2006 年诺贝尔生理和医学奖. 目前在肿瘤基因治疗中, 运用 RNAi 技术通过加强对关键基因的干扰作用即可发挥沉默癌基因、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成、调控细胞周期以及提高传统放疗的疗效等作用, 由此该技术已为肿瘤研究者所青睐. 然而, 在现行大多数肿瘤治疗策略中 RNAi 均由 RNA 聚合酶 III (RNA polymerase III, Pol III)启动子(H1, U6, tRNA 启动子)调控, 虽然可以有效沉默基因, 但对靶基因的抑制缺乏组织特异性, 可能导致动物或人体正常组织和器官的损伤. 因此, 如何开发组织细胞特异性调控表达小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)将是 RNAi 技术在重大疾病治疗领域成功应用的关键所在.

研究表明, 体内大量内源性的与 siRNA 类似的 microRNA(miRNA)由具有组织特异性的 Pol II 启动子调控^[2], 模拟这一机制设计 Pol II 启动子调控的 siRNA 即可靶向特异性的组织介导基因沉

默^[3,4]. 目前, 虽然这一 siRNA 设计策略已应用于转基因动物模型的建立^[5], 以及肿瘤^[6]、病毒性疾病^[6]和遗传疾病^[7]治疗的研究探索中, 但是各类载体携带 RNA 聚合酶 II 启动子调控 siRNA 靶向沉默基因的效果不一^[8,9], 因此该类载体的构建仍需深入探究.

为了进一步提高安全性, 选择理想的 RNAi 载体也同样至关重要. 多数载体运载的 siRNA 在体内可与体内正常 miRNA 产生竞争性抑制, 过量或持久的 siRNA 体内注射很容易诱发体内沉默机制饱和和现象, 从而引发肝损伤及动物死亡^[10], 但实验已经证明, 小鼠体内静脉注射运载 siRNA 腺病毒不会引起体内沉默机制的饱和和现象^[11], 因此腺病毒是一种较为安全的 RNAi 载体. 在肿瘤治疗中, 溶瘤腺病毒被认为是一种有效的肿瘤靶向载体, 但是单一的靶向性往往造成部分与肿瘤相似的正常细胞依

*国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2006AA02Z126)和国家重点基础研究发展计划(973)(2004CB518804)资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 0571-86843182, Fax: 0571-86843185

蔡荣. E-mail: Cairong801@hotmail.com

钱程. E-mail: cqian@unav.es

收稿日期: 2007-01-01, 接受日期: 2007-05-21

然受到损害. 应用溶瘤腺病毒装载 Pol II 启动子调控 siRNA 可获得载体与治疗性 siRNA 的双重靶向性, 增强肿瘤治疗安全性. 本文将对近期 Pol II 启动子调控 siRNA 载体构建及其在肿瘤治疗中的应用作一详细阐述.

1 Pol III 启动子调控 siRNA

Tuschl 等^[12]于 1999 年首次利用人工设计的双链 RNA 在果蝇胚胎提取物中诱发 RNAi 后, 化学合成的双链 siRNA 广泛用于介导体内外的基因沉默. 但是由于人工合成的双链 siRNA 只能引起瞬时的基因敲除而无法实现稳定可遗传的基因沉默, Paddison 等^[13]模拟线虫体内 miRNA, 被称为 *let-7* 和 *lin-4* 的发卡结构设计了体内合成的小发夹结构 RNA (short hairpin, shRNA), 实现了人工设计 siRNA 在体内的自发表达. 但是由于当时对 miRNA 体内详细作用机制不甚明确, Paddison 等认为 siRNA 由 Pol III 转录较由 Pol II 转录能更有效地抑制基因沉默.

多数研究表明, Pol III 转录表达的 siRNA 可以在体内实现高效而稳定的基因沉默, 因此现行许多的 RNAi 策略均采取这种方案^[14-16]. 但是在大多数基因沉默的研究中需要使基因在特定的组织中沉默或对基因沉默进行严格时间控制, 而 Pol III 启动子没有组织和时序特异性, 无法特异性调控表达 siRNA 实现这一目的. 因此, 具有组织特异性 Pol II 启动子再度引起人们的重视. 然而现行大多数 Pol II 启动子调控的 siRNA 对基因的抑制效果仍不如 Pol III 启动子^[18, 9], 因此需要模拟 Pol II 调控的内源性 miRNA 以实现高效的 RNAi.

2 Pol II 启动子调控的 miRNA

miRNA 是细胞内源非编码 RNA 转录体经剪切后产生的 19~25 个核苷酸(nt)的单链 RNA, 通过与靶 mRNA 完全或不完全配对有效降解或抑制基因的表达^[17]. miRNA 的成熟可分为四步. 第一步, 修剪(cropping). 动物体内 miRNA 转录体被 Pol II 转录后, 形成带有 5' cap 和 3' PolyA 尾的前转录体, pri-miRNA 形成发卡结构. 核内 Drosha-DGCR8 复合体将 pri-mRNA 剪切为大约 60~80 nt, 有 21 nt 左右的互补链形成茎环(stem-loop)结构(或称发卡结构), 3'末端突出 2 nt. 第二步, 运出核外(export). pri-miRNA 的 3'末端 2 nt 被核输出因子 Exportin-5 识别. 由 Exportin-5-Ran-GTP 复合体通

过核孔复合体运送到细胞质内. 第三步, 切丁(dicing). pri-miRNA 在 Dicer(RNase III)的作用下被切割成 22 bp 的 RNA 双链. 第四步, 选择性降解. RNA 介导的基因沉默复合体(RNA induced gene silencing complex, RISC)中的 RNA 靶向 mRNA 配对后使其中一条链被降解, 剩下 22 nt 的单链进一步诱导 mRNA 的降解.

miRNA 占哺乳动物整个基因组的 1%左右, 近年来研究证明许多 miRNA 都具有组织特异性和时序性^[18, 19], 体内几乎所有 miRNA 为 Pol II 启动子所调控. 在果蝇 miRNA 所在的 *Bantem* 表达框内插入 Pol II 增强子即可诱导 miRNA 的产生^[20], Lee 等^[2]也证实, 前体 miRNA (polycistronic primary transcripts, pri-miRNAs)带有 5'端 cap 结构和 3'端 Poly A 序列, 哺乳动物细胞用 Pol II 特异性抑制剂 α -鹅膏蕈碱处理后, pri-miRNA 的生成量大幅度下降.

非编码小 RNA 结构和功能研究所取得的成果大大拓宽了科学工作者对基因概念的理解, miRNA 在基因组中的分布现象使人们感到意外. 一半以上的 miRNA 分布于基因非编码区, 转录后形成茎环结构, 多为成簇分布^[2], 例如 mir-155 位于 bic RNA 的第三外显子的非编码区; mir-30c 位于转录因子 Y γ 亚基基因的第五内含子, 有 6 个 mir-30c 相连. Rodriguez 等^[21]测定的 161 种基因编码区中的 pri-mRNA, 有 90 种 pri-miRNA 位于宿主基因蛋白质编码的内含子中, 27 种 pri-mRNA 位于宿主基因非蛋白质编码区的内含子中, 14 种 pri-miRNA 与宿主基因的外显子和内含子共同重叠, 其表达与内含子的选择性拼接有关, 还有 30 种 pri-miRNA 与宿主基因的外显子重叠. 模拟 miRNA 的分布规律有可能设计出高效的 siRNA.

3 Pol II 启动子调控 siRNA

由 Pol II 启动子调控的内源性 miRNA 多分布于基因编码区, 这一特征用于 siRNA 的设计不但使 RNA 干扰可以实现组织细胞特异性, 还为实现单一表达框内多个 siRNA 的共表达或 siRNA-蛋白基因的共表达提供了依据, 从而极大地方便了对基因功能的研究并拓展了肿瘤治疗的策略.

3.1 构建 shRNA 骨架

shRNA 是表达发夹结构的 RNA, shRNA 在 Dicer 酶的催化下切割成功能性 siRNA. 早期第一代 shRNA 的 DNA 序列通常长度为 60~70 bp, 由 2

段为 19 bp 间隔 10~20 bp 的互补链构成, 转录成 RNA 后即形成典型的茎环结构. 近来开发的第二代 shRNA 是模拟内源性 pri-miRNA 结构而设计的, 通常在经典发夹结构的基础上还带有两臂, 因此序列一般大于 90 bp. 最初由 Paddison 等^[13]设计的 shRNA 仿照线虫体内 *lin-4*, *let-7* 的发夹模型, 但出人意料的是他们发现最接近于 *let-7* 发卡结构的 shRNA 对基因的抑制效率最低. 在对 shRNA 设计的探求中, Zeng 的研究小组^[22]模拟人体内发现的不同 miRNA 骨架, 例如 mir-30 和 mir-21, 而设计出一种高效 shRNA. mir-30 首次在人类子宫癌细胞系 HeLa 中分离出. Zeng 等^[22]将人工设计的 71 nt 的 mir-30 前体克隆至细胞巨化病毒早期启动子调控的表达框内, 实现了有效的基因沉默, Elledge 等^[14]建立的 shRNA 文库即采用这种骨架结构, mir-30 已成为现行使用最为广泛的 shRNA 骨架之一. 但是核内 pri-miRNA 需要 Drosha 酶的修剪(cropping)作用, 单一的发卡结构会降低 siRNA 的基因沉默效果. 因此 Chung 等^[9]仿照小鼠 *bic* 基因第三外显子非编码区上的 mir-155 结构设计出 150 nt 的基于非编

码 RNA BIC 的 siRNA (siRNA based upon the non-coding RNA BIC, SIBR)框架, 不但能够高效抑制内源基因表达, 而且数个 SIBR 相连可以沉默多个基因.

3.2 shRNA 文库及 shRNA 的有效选择

为了实现 siRNA 对靶基因的高效沉默, 首要问题需要解决如何选择靶向基因的有效序列即靶向序列, shRNA 文库的构建和公示加速了 RNAi 技术的发展. 近年来, 数个 shRNA 文库已构建并成功应用, 如 Hannon-Elledge 文库^[14](基于 mir-30 骨架), NKI shRNA 文库^[23](荷兰肿瘤研究所构建)等. 部分网站公布的 shRNA 文库如表 1 所示, 此类文库包含数以千计针对人类和多种模式动物基因设计的 shRNA, 大多基于优化完善的运算法则, 并通过条码(bar-code)技术筛选出靶向基因抑制率大于 70% 的 shRNA^[23]. 但是有效 shRNA 的选择仍需注意以下几点: a. shRNA 针对靶向基因编码区或 3' 非编码区. b. 与任何其他基因应有大于 3 个碱基的错配. c. 反义链的 5' 端不稳定以利于反义链与蛋白质结合形成 RISC.

Table 1 shRNA search web

表 1 shRNA 搜索网站

网站	网址	参考文献或公司
BLOCK-iT RNAi Designer	http://rnaidesigner.invitrogen.com/	Invitrogen
The Expression Arrest™ microRNA-adapted shRNA (shRNAmir) libraries	http://www.openbiosystems.com/RNAi/shRNAmirLibraries/	open biosystems
RNAi Central	http://katahdin.cshl.org:9331/RNAi web/	Hannon Lab
RNAi Design	http://www.idtdna.com/Scitools/SciTools.aspx	Integrated DNA Technologies
NKI shRNA library	http://www.screeninc.nl/gene/index.php	[23]
MISSION™ shRNA Libraries	http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Functional_Genomics_and_RNAi/Product_Lines/shRNA_Library.html	Sigma-Aldrich
The RNAi Consortium shRNA Library	http://www.broad.mit.edu/genome_bio/trc/rnai.html	Broad Institute
Hannon-Elledge library	http://rna1.genome.duke.edu/shRNAFolder	[14]
RNAi Codex	http://codex.cshl.edu/scripts/newmain.pl	[24]

3.3 3 种 Pol II 启动子调控的 siRNA 表达框

现阶段人们普遍认为肿瘤治疗药物应具有较强的靶向性和高效性, 而 Pol II 启动子使 siRNA 在特异组织细胞内的表达成为现实. 近年来科学工作者对模拟 miRNA 的 siRNA 表达框的构建进行了探索, 实现了单一表达框内的双基因抑制或单一表达

框内的基因抑制、表达共存的设计方法, 从而可显著增强肿瘤生物治疗效果. 现共有 3 种人工设计的 Pol II 启动子调控的 siRNA 表达框可供参考. 图 1 显示 3 种人工设计的 Pol II 启动子调控的表达框, 图 2 显示其相关的成熟机制.

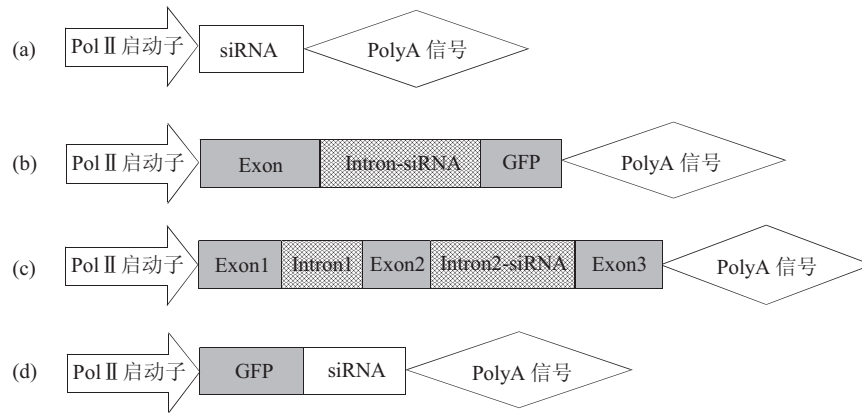


Fig. 1 Designs of Pol II expressed siRNA

图 1 Pol II 表达的 siRNA 设计

(a) Pol II 启动子调控的表达框 I, siRNA 序列直接插入启动子和 polyA 加尾信号中间. (b) Pol II 启动子调控的表达框 II, siRNA 插入报告基因 5'非编码区的内含子内. (c) Pol II 启动子调控的表达框 II, siRNA 插入蛋白质基因内部的内含子内. (d) Pol II 型启动子调控的表达框 III, siRNA 序列插入报告基因的 3'非编码区.

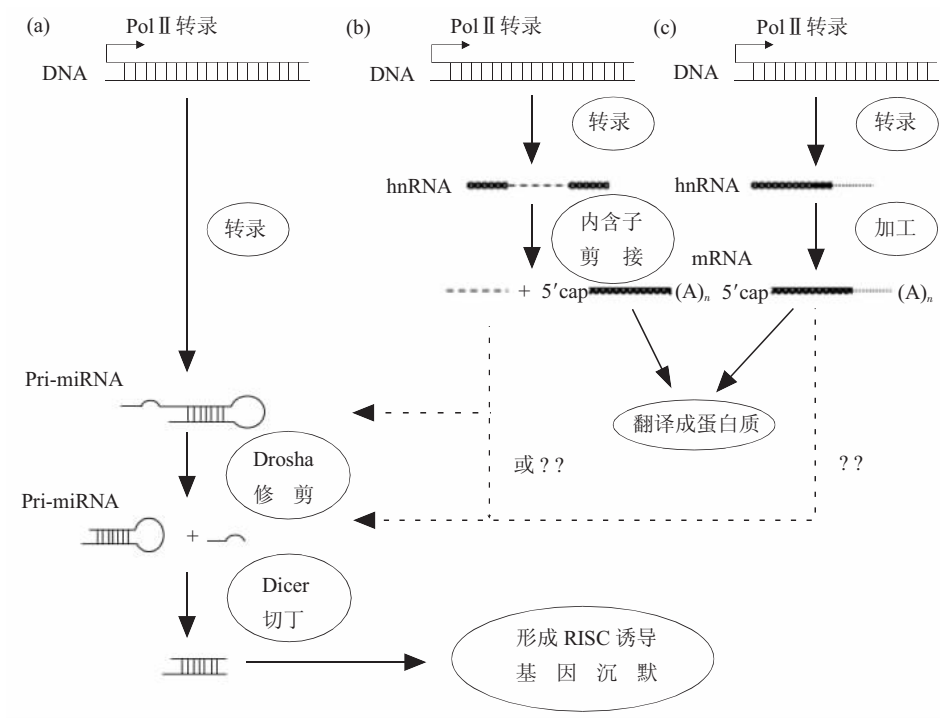


Fig. 2 Biogenesis of Pol II expressing miRNA/siRNA

图 2 Pol II 启动子调控的 miRNA, siRNA 的成熟机制

(a) Pol II 启动子直接调控 miRNA/siRNA. (b) 内含子型 miRNA/siRNA, hnRNA 转录后经过 mRNA 拼接, 含有 miRNA/siRNA 的内含子被剪切, 一同被运出核外, mRNA 被翻译成蛋白质, 内含子进一步加工形成 RISC 诱导基因沉默. (c) 3' UTR 型 miRNA/siRNA, hnRNA 转录加工成 mRNA, 其 3' UTR 含有 miRNA/siRNA, 而编码区翻译成蛋白质, miRNA/siRNA 经 Dicer 加工及未知的途径形成 RISC 诱导基因沉默. - - - ► 表示未知的途径, ■■■■ 表示外显子, --- 表示内含子, — 表示 3' UTR.

表达框 I (图 1a): 最早且应用最为广泛的 Pol II 启动子调控的 shRNA 表达框由 Zeng 等^[22]设计构建, 策略是直接

将 shRNA 放置于 Pol II 启动子下游, 可有效实现组织特异性和时序性. Huang 等^[4]应用此表达框成功构建出人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 启

动子调控的肿瘤靶向性 RNAi 载体, 特异性地降低了已产生耐药的 HeLa 细胞株中 Bcl-2 的含量, 使之对抗癌药 5- 氟脲嘧啶再次敏感. Shin 等^[25]利用此表达框构建四环素诱导抑制基因平台, 并应用单一表达框内可同时抑制 G α 12 和 G α 13 两种蛋白质表达. 但是这种构建方式对基因沉默效果大大低于 Pol III 调控的 siRNA^[8,9], 所以在肿瘤治疗中没有优势.

表达框 II: 哺乳动物细胞内大约 30% 的 pri-miRNA 位于基因内含子区, Lin 等^[26]首次模拟这一框架结构构建了内含子型表达框(图 1b). Zhou 等^[8,9]以人遍在蛋白 C(ubiquitin C, UbC) 启动子调控整个表达框, 在 GFP 编码序列前加上基因外显子 - 内含子剪接体, 基于 mir-30 骨架构建的 shRNA 插入到 UbC 的第一个内含子中, GFP 初期转录产物经过拼接后去除含有 shRNA 的内含子形成成熟的 mRNA, 成功实现报告基因和 siRNA 的单启动子共同高效表达. 但将 2 个相同的 shRNA 插入内含子中, shRNA 的表达受到了抑制. 与 Zhou 等的实验结果不同, Chung 等^[9]则利用 mir-155 骨架构建的 SIBR 表达框将 shRNA 插入 UbC 第一内含子中, 在单启动子调控下 SIBR 可以互不干扰地有效共表达 2 个以上 siRNA, 报告基因的表达同时不受到影响. 此种表达框在低浓度脂质体转染条件下可同时高效表达 siRNA, 但是此种表达框能否在病毒载体上成功表达等仍然存在疑问.

在此基础上, Samakoglu 等^[7]利用慢病毒为载体采用 γ 球蛋白天然的外显子 - 内含子结构使蛋白质和 siRNA 同时高效表达(图 1c). Samakoglu 等将针对 β (S) 球蛋白的 shRNA 插入 γ 球蛋白第二个内含子内. 带有此表达框的慢病毒转染镰刀贫血病人 CD34⁺ 细胞可以特异性表达 γ 球蛋白并抑制 β (S) 球蛋白. Samakoglu 等还对 siRNA 表达框在内含子内的相对位置进行了探究, 发现 siRNA 位于内含子近 3' 端的分支点序列区不影响 siRNA 和蛋白基因的共表达. 此设计在病毒载体上使单一特异性启动子调控下的基因沉默和基因表达同时实现, 通过对比, Pol II 启动子调控的较 Pol III 启动子调控的 RNAi 效果没有显著差异, 由此可为肿瘤治疗提供一种新策略.

为了阐明内含子型 siRNA 的成熟机制(图 2b), Lin 等^[26, 27]设计了一个人工内含子, 内插 pri-siRNA 包装在反转录病毒载体 pLNCX2 内, 转染鼠神经干细胞和人前列腺癌细胞 LNCaP, DNA 印迹可检测出成熟的 mRNA、siRNA 和未被剪切的内含子.

当内含子去除 5' 端剪接位点或完全除去内含子时则没有成熟的 siRNA 及内含子被检测出, 实验表明: 内含子型 siRNA 的成熟先经过剪切 hnRNA, 在剪切出完整的内含子之后成熟转变为有功能的 siRNA. Lin 等还将 pLNCX2 转染入斑马鱼体内, 证明了 pri-siRNA(miRNA) 的茎环结构在斑马鱼体内对形成 miRISC 起到了至关重要的作用.

表达框 III(图 1d): 哺乳动物细胞内大约 9% 的 pri-miRNA 位于基因 3' 端的非编码区^[21], 故 Ling 等^[28]构建的 shRNA 直接位于蛋白基因的 3' 端非编码区下游. Stegmeier 等^[29]应用表达框 II 构建了 pPRIME 质粒, shRNA 与筛选基因同时表达, 方便与快捷地应用于 shRNA 文库的构建, 以此为基础成功构建了第二代 siRNA 文库. pPRIME 质粒以慢病毒为载体, 采用细胞巨化病毒(cytomegalovirus, CMV) 启动子, 在 GFP 编码序列后直接插入 shRNA, 病毒感染率(multiplicity of infection, MOI) 小于 0.3 时靶向基因 Rb 被高效抑制, 同等条件下采用 U6 启动子调控的 shRNA 在 MOI 为 2 时才可观察到 Rb 抑制现象. 即使用 IRES 连接 2 种报告基因, 2 种报告蛋白有效表达的同时 shRNA 仍然可高效抑制靶向基因. 然而免疫印迹结果显示, pPRIME 质粒表达蛋白量较对照组有所下降. Yuan 等^[30]缩减表达框内 GFP 和 shRNA 的距离, RT-PCR 证实, GFP 和 siRNA 的表达量相对对照组没有降低. Harper 等^[31]则以猫科动物免疫缺陷病毒(feline immunodeficiency virus, FIV) 为载体共表达报告基因和 siRNA, 虽然 siRNA 插入报告基因的 3' UTR 的结构内可以达到报告基因和 siRNA 共表达的目的, 但 siRNA 表达框的位置与 FIV Rev 应答元件、报告基因的相对位置密切相关. 因此此种 siRNA 表达框构建的具体生物机制并不清楚, Yuan 等^[30]认为, 3' UTR 的 shRNA 与 mRNA 共同被运输出胞核, 在细胞质中受 Dicer 酶剪切形成成熟的 siRNA, mRNA 的翻译不受影响(图 2c). pPRIME 质粒的构建使 Pol II 启动子调控的 RNAi 效果可高出由 Pol III 启动子调控的 RNA 沉默 5 倍以上, 尽管相关机制还需进一步阐明, 但这将为 RNAi 在肿瘤治疗上的应用提供更为有效的手段.

4 Pol II 启动子调控的 RNAi 与肿瘤治疗

在现行肿瘤临床治疗中, 许多基因治疗药物因无法维持其在体内有效、持续、稳定的表达而对肿瘤没有杀伤作用^[32]. 而 RNAi 技术采用较小治疗剂

量即可实现较理想的抗肿瘤作用. Zimmermann 等^[33]将 2.5 mg/kg siRNA 静脉注射灵长类动物猕猴 48 h 后, 即可在肝脏内发现 90% 以上被靶向的基因处于抑制状态且有效期持续达 11 天. Bartlett 等^[34]将 2.5 mg/kg siRNA 静脉注射小鼠体内发现有效地沉默 A/J 小鼠皮下肿瘤的某些基因持续 10 天以上, 而在 BALB/c 小鼠的非分裂肝细胞内持续达 3~4 周. 合理设计 Pol II 启动子调控 siRNA 沉默基因效率是 Pol III 启动子调控 siRNA 沉默基因效率的 5 倍以上^[29], 因此 Pol II 调控的 RNAi 是一种高效的抗肿瘤治疗方法和手段.

在肿瘤治疗方案中均要求对肿瘤组织细胞具有较强杀伤作用而尽量使正常组织不受伤害. 目前肿

瘤基因治疗中, 采用肿瘤细胞或组织特异性的 Pol II 启动子调控治疗基因是一种可行有效的方法. 这类启动子主要包括以下几种: a. 针对所有肿瘤特征的启动子, 如存活素(survivin)启动子; b. 针对个别肿瘤特征的启动子, 如肝癌的甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)启动子; c. 针对某一类组织特异性启动子, 如前列腺细胞特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA)启动子. 表 2 为肿瘤治疗中常用调控治疗基因的部分肿瘤细胞或组织特异性启动子. 已有许多采用肿瘤或组织特异性启动子调控 RNAi 进行肿瘤治疗的研究报告, 预示 Pol II 启动子将有较好的发展应用前景.

Table 2 Targeting promoters in cancer therapy

表 2 肿瘤治疗靶向启动子

类型	启动子
肿瘤特异性启动子	HIF-1, hTERT, E2F, p53, B-Myb, Tcf4, survivin
个别肿瘤特异性启动子	AFP, Albumin, CEA, DF3/MUC-1, Tyrosinase, SPB
组织特异性启动子	PSA, TTR

PSA 是前列腺组织应答雄激素而分泌的组织特异性蛋白. Song 等^[35]利用 PSA 启动子调控 siRNA 构建了分别抑制外源蛋白 GFP 和内源蛋白 JNK 的质粒: PSARNAi-GFP 和 PSARNAi-JNK. 此 2 种质粒只在雄激素刺激后的前列腺癌细胞系 LNCaP 中诱发 RNAi, 而对正常细胞系 293 和人子宫癌细胞系 HeLa 均没有作用. 因为即使是扩散的肿瘤细胞也总是带有原始组织的某种基本特征, PSA 启动子调控的肿瘤治疗 siRNA 可以杀伤所有原发性前列腺癌细胞, 可以克服肿瘤细胞特异性带来的问题.

抗凋亡蛋白 (inhibitor of apoptosis proteins, IAP) 家族成员 survivin 在 90% 以上的肿瘤组织内表达, 而在正常细胞内几乎没有表达. Huynh 等^[36]构建了长度为 600 bp 的 survivin 启动子调控 RNAi 载体 pGSU-ST2, 对靶向 GFP 的抑制率为 89%. 相比之下, 同剂量 Pol III 启动子 U6 调控的 RNAi 对 GFP 的抑制率为 84%. 但是 pGSU-ST2 只诱导癌细胞系 MCF7 和 HeLa 产生 RNAi, 而对正常细胞系 293 不起作用. hTERT 是维持端粒酶活性所必需的催化亚单位, 在 85%~90% 的肿瘤中高表达, 而在正常细胞中低表达或几乎不表达. Huang 等^[4]利用 hTERT 启动子特性构建调控靶向肿瘤 RNAi 载体

pBlock-TRTP-shRNA-mpA, 只在具有端粒酶活性的 HeLa 细胞系和 HepG2 细胞系抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 活性, 而对正常细胞不产生影响. 由于 survivin、hTERT 在几乎所有的癌细胞中均有表达, 故 pGSU-ST 和 pBlock-TRTP-shRNA-mpA 的成功构建预示着 Pol II 调控的 RNAi 在肿瘤治疗中应用的广泛性.

5 Pol II 启动子调控的 siRNA 治疗肿瘤的新型载体——溶瘤腺病毒载体

最早设计的 siRNA 通常直接通过氯化钙或脂染法将带有 siRNA 的质粒导入细胞^[3], 但非病毒载体基因转染效率较低, 难以到达特定组织, Zimmermann 等^[33]发现静脉注射猕猴携带 siRNA 的脂质体只能在肝脏中发挥作用而无法到达大肠上皮组织. 非病毒载体在生物治疗中的应用还有很多问题需待解决.

病毒是常用的 siRNA 载体, 事实上大多数动物病毒自身编码 miRNA, 而 pri-miRNA 需要在核内经 Drosha 酶的剪切作用, 只有核内复制型 DNA 病毒才能编码 miRNA^[37], 尽管慢病毒是最常用的 siRNA 载体, 但由于形成的 RNA 发卡结构可能在

胞质内就被 Dicer 酶识别剪切, 野生型慢病毒迄今为止仍没有发现编码 miRNA 的序列, 因此利用慢病毒载体构建的 siRNA- 蛋白质共表达体系并不稳定^[31]. 腺病毒属于核内复制型病毒, 且可编码类似于 miRNA 的病毒相关 RNA(virus-associated RNA, VA1)介导基因沉默^[38], 因此作为编码人工设计的 siRNA 的载体, 腺病毒不但能够高效靶向基因抑制达 85%以上, 而且还可以实现病毒自身的稳定^[6, 39]. 另一方面, Narvaiza 等^[11]已经证明, 小鼠体内静脉注射运载 siRNA 腺病毒不会引起体内沉默机制的饱和等副作用, 因此腺病毒是 Pol II 启动子调控的 siRNA 最理想的载体.

然而单一启动子对肿瘤的靶向无法使 RNAi 完全不影响正常组织, 例如抗凋亡蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族成员 survivin 在 90%以上的肿瘤组织内表达, 睾丸和脑组织内也有少量表达, survivin 启动子调控的 RNAi 很可能影响睾丸和脑功能. 溶瘤腺病毒载体对野生型腺病毒进行改造, 使其只能在肿瘤细胞内特异性增殖. 利用溶瘤腺病毒运载 Pol II 启动子调控的 siRNA 可以实现 RNAi 对肿瘤组织的双重靶向性, 增强 RNAi 治疗肿瘤的安全性. 例如野生腺病毒存在抑制正常细胞 p53 激活的蛋白质, E1B55Da 蛋白使病毒感染后的细胞不凋亡而利于病毒繁殖. 我们自行构建的溶瘤腺病毒载体 ZD55 将野生型腺病毒的 E1B55Da 蛋白缺失, 使之只在 p53 基因异常的癌细胞内大量增殖并杀死绝大部分体内肿瘤细胞^[40], 然而 ZD55 对正常细胞仍有不同程度的损伤. 利用 ZD55 运载 survivin 调控的 siRNA 可尽量避免 RNAi 对睾丸、脑等正常组织的损伤. 利用这一载体表达 Pol III 启动子调控的 shRNA-XIAP 已证实对肿瘤细胞有较强的杀伤作用. 有研究表明, 细胞系转染带有 Pol III 启动子调控 shRNA 的溶瘤腺病毒于 48 h 后对靶向基因的抑制率可以达到 90%^[41], 而且对病毒自身的复制并不产生任何影响. 因此溶瘤腺病毒是肿瘤基因治疗中最有吸引力的 RNAi 载体.

临床试验表明, 静脉注射溶瘤腺病毒可能激发人体免疫应答产生中和抗体, 以致肿瘤组织内治疗基因表达量不足而大大降低基因治疗的抗肿瘤效果^[42]. 但是肿瘤特异性启动子往往难以产生较高的基因表达. 为此我们构建了一个含有 Semliki Forest Virus (SFV)复制子的无肠腺病毒融合病毒^[43]. 无肠(Gutless, GL)腺病毒载体是第三代腺病毒载体, 腺病毒内部基因绝大部分被删除, 只保留两端的 ITR

和包装信号 ψ , 故其没有免疫原性, 能长期使用而不致失效, 而且可装载较大的外源基因, 是最有前途的腺病毒基因治疗载体. SFV 复制子受到肿瘤特异性 AFP 启动子调控, 在肝癌细胞内可转录出 SFV 亚基因组. SFV 的复制关键蛋白 Rep 被首先翻译出来, 辅助 SFV 亚基因组转录增殖. SFV 的增殖诱导被感染癌细胞凋亡, 释放肿瘤抗原以激发机体抗肿瘤免疫. 同时 SFV 亚基因组内插入有 SFV 内源性启动子调控治疗基因 IL-12. 由于 SFV 是 RNA 病毒可以自身增殖, 融合病毒感染肝癌细胞后, IL-12 表达量是 AFP 直接调控表达的 2~6 倍, IL-12 分泌出胞外即可诱发多种细胞的 IFN- γ 反应, 引起免疫和非免疫性抗肿瘤反应. Pol II 启动子调控的治疗性 siRNA 可以简单方便地插入 IL-12 基因的 3'UTR, 在不影响 IL-12 基因表达的前提下沉默对 IL-12 有干扰作用的基因, 以强化肿瘤治疗效果. Stegmeier 等^[29, 30]已证明, 位于蛋白基因 3'UTR 的 pri-siRNA 对靶向基因抑制率与 Pol III 启动子调控的 siRNA 抑制率相同甚至高出 5 倍以上, 同时还可将 IL-12 替换成其他治疗基因与 siRNA 共同治疗肿瘤. SFV-GL 溶瘤腺病毒作为 Pol II 启动子调控的 siRNA 载体有着巨大的潜力.

6 问题与展望

Pol II 启动子调控的 RNAi 使 siRNA 在特异组织细胞中表达^[3, 4], 使肿瘤 RNAi 治疗更为安全有效. 溶瘤腺病毒载体是利用基因工程手段在野生型腺病毒基础上研究开发出来的病毒载体, 只在肿瘤细胞内特异性复制并裂解肿瘤细胞, 将 Pol II 启动子调控 siRNA 载体可使 RNAi 更为精确地靶向肿瘤细胞的同时加强 siRNA 抗肿瘤的疗效.

但是 Pol II 启动子调控的 RNA 干扰在抗肿瘤治疗的领域仍然存在很多疑问. 例如 siRNA 直接置于蛋白基因的 3'UTR 不会影响 siRNA 或蛋白质的表达, 其具体机制尚未阐明, 肿瘤特异性启动子调控的 siRNA 靶向基因抑制率仍有待提高, 尚缺乏实验数据证实 Pol II 调控的 RNAi 在哺乳动物体内的长效性. 由于增加细胞核输出因子 Exportin5 表达量可增强 siRNA 靶向基因抑制^[44], 因此可以这样设想, 将 ZD55 运载 survivin 启动子调控 siRNA 并表达 Exportin5, 可能使 RNAi 更为安全、高效地用于肿瘤治疗.

早期研究证实, RNAi 可以在酵母、植物、线虫、果蝇细胞质内产生高效基因沉默的同时还可在

细胞核内的转录水平上调节基因的表达, 近年研究表明类似的途径也可发生在哺乳动物体内. Morris 等^[45]设计 21 nt 的 siRNA 靶向 EF-1 启动子的 CpG 岛区, 可以在人组织细胞内诱导延长因子 EF-1 启动子甲基化, 从而可同时抑制内源 EF-1 和外源 EF-1 启动子调控的 EGFP 表达. Li 等^[46]设计 21 nt 的 dsRNA 靶向 E-cadherin、p21^{waf1/cip1} 和 VEGF 基因启动子的非 CpG 岛区, 激活了原本在肿瘤细胞内启动子被甲基化的 E-cadherin、p21^{waf1/cip1} 和 VEGF. Robb 等^[47]则发现 siRNA/miRNA 介导的基因沉默可以发生在人子宫癌细胞 HeLa 的细胞核内, 裂解核内 7SK 和 U6 snRNA. 同时 Robb 等还在 HeLa 细胞核内发现 RISC 的重要组成蛋白 Ago1 和 Ago2, 进一步证实 RNAi 可以在人细胞核内发生作用. 尽管 RNAi 的核内作用在人类所有细胞内是否具有普遍性还值得商榷, Pol II 调控的 siRNA 在核内的作用还有待证实, 但是这些发现为在分子水平上调控肿瘤基因的表达, 治疗肿瘤开拓了一条新的途径. 我们相信, 将在已构建的溶瘤腺病毒载体基础上设计以 Pol II 启动子调控 siRNA 表达, 将为肿瘤治疗提供高效安全的治疗手段.

参 考 文 献

- 1 Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, **391** (6669): 806~811
- 2 Lee Y, Kim M, Han J, *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J*, 2004, **23** (20): 4051~4060
- 3 Xia X G, Zhou H, Samper E, *et al.* Pol II -expressed shRNA knocks down Sod2 gene expression and causes phenotypes of the gene knockout in mice. *PLoS Genet*, 2006, **2** (1): e10
- 4 Huang S L, Wu Y, Yu H, *et al.* Inhibition of Bcl-2 expression by a novel tumor-specific RNA interference system increases chemosensitivity to 5-fluorouracil in HeLa cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, **27** (2): 242~248
- 5 Lin S L, Chang S J, Ying S Y. Transgene-like animal models using intronic microRNAs. *Methods Mol Biol*, 2006, **342** (4): 321~334
- 6 Chen W, Liu M, Jiao Y, *et al.* Adenovirus-mediated RNA interference against foot-and-mouth disease virus infection both *in vitro* and *in vivo*. *J Virol*, 2006, **80** (7): 3559~3566
- 7 Samakoglu S, Lisowski L, Budak-Alpdogan T, *et al.* A genetic strategy to treat sickle cell anemia by coregulating globin transgene expression and RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2006, **24** (1): 89~94
- 8 Zhou H, Xia X G, Xu Z. An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33** (6): e62
- 9 Chung K H, Hart C C, Al-Bassam S, *et al.* Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34** (7): e53
- 10 Grimm D, Streetz K L, Jopling C L, *et al.* Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, 2006, **441** (7092): 537~541
- 11 Narvaiza I, Aparicio O, Vera M, *et al.* Effect of adenovirus-mediated RNA interference on endogenous micro-RNAs in a mouse model of multidrug resistance protein-2 gene silencing. *J Virol*, 2006, **80**(24): 12236~12247
- 12 Tuschl T, Zamore P D, Lehmann R, *et al.* Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev*, 1999, **13** (24): 3191~3197
- 13 Paddison P J, Caudy A A, Bernstein E, *et al.* Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 2002, **16** (8): 948~958
- 14 Chang K, Elledge S J, Hannon G J. Lessons from nature: microRNA-based shRNA libraries. *Nat Methods*, 2006, **3** (9): 707~714
- 15 Ngo V N, Davis R E, Lamy L, *et al.* A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature*, 2006, **441** (7089): 106~110
- 16 Schulze-Bergkamen H, Fleischer B, Schuchmann M, *et al.* Suppression of Mcl-1 via RNA interference sensitizes human hepatocellular carcinoma cells towards apoptosis induction. *BMC Cancer*, 2006, **6** (10): 232
- 17 Kim V N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6** (5): 376~385
- 18 Calin G A, Croce C M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6** (11): 857~866
- 19 Lu J, Getz G, Miska E A, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005, **435** (7043): 834~838
- 20 Brennecke J, Hipfner D R, Stark A, *et al.* Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*, 2003, **113** (1): 25~36
- 21 Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst J L, *et al.* Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, 2004, **14** (10A): 1902~1910
- 22 Zeng Y, Wagner E J, Cullen B R. Both natural and designed microRNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell*, 2002, **9** (6): 1327~1333
- 23 Bernards R, Brummelkamp T R, Beijersbergen R L. shRNA libraries and their use in cancer genetics. *Nat Methods*, 2006, **3**(9):701~706
- 24 Olson A, Sheth N, Lee J S, *et al.* RNAi Codex: a portal/database for short-hairpin RNA (shRNA) gene-silencing constructs. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34** (Database issue): D153~D157
- 25 Shin K J, Wall E A, Zavzavadjian J R, *et al.* A single lentiviral vector platform for microRNA-based conditional RNA interference and coordinated transgene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103** (37): 13759~13764
- 26 Lin S L, Chang D, Wu D Y, *et al.* A novel RNA splicing-mediated

- gene silencing mechanism potential for genome evolution. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **310** (3):754~760
- 27 Lin S L, Chang D, Ying S Y. Asymmetry of intronic pre-miRNA structures in functional RISC assembly. *Gene*, 2005, **356**: 32~38
- 28 Ling X, Li F. Silencing of antiapoptotic survivin gene by multiple approaches of RNA interference technology. *Biotechniques*, 2004, **36** (3): 450~454, 456~460
- 29 Stegmeier F, Hu G, Rickles R J, *et al.* A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II -regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (37): 13212~13217
- 30 Yuan J, Wang X, Zhang Y, *et al.* shRNA transcribed by RNA Pol II promoter induce RNA interference in mammalian cell. *Mol Biol Rep*, 2006, **33** (1): 43~49
- 31 Harper S Q, Staber P D, Beck C R, *et al.* Optimization of feline immunodeficiency virus vectors for RNA interference. *J Virol*, 2006, **80** (19): 9371~9380
- 32 Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, *et al.* Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *J Clin Oncol*, 2004, **22** (8):1389~1397
- 33 Zimmermann T S, Lee A C, Akinc A, *et al.* RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 2006, **441**(7089): 111~114
- 34 Bartlett D W, Davis M E. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34** (1): 322~333
- 35 Song J, Pang S, Lu Y, *et al.* Gene silencing in androgen-responsive prostate cancer cells from the tissue-specific prostate-specific antigen promoter. *Cancer Res*, 2004, **64** (21): 7661~7663
- 36 Huynh T, Walchli S, Sioud M. Transcriptional targeting of small interfering RNAs into cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **350** (4): 854~859
- 37 Cullen B R. Viruses and microRNAs. *Nat Genet*, 2006, **38** (Suppl): S25~S30
- 38 Sano M, Kato Y, Taira K. Sequence-specific interference by small RNAs derived from adenovirus VAI RNA. *FEBS Lett*, 2006, **580** (6): 1553~1564
- 39 McManus D C, Lefebvre C A, Cherton-Horvat G, *et al.* Loss of XIAP protein expression by RNAi and antisense approaches sensitizes cancer cells to functionally diverse chemotherapeutics. *Oncogene*, 2004, **23** (49): 8105~8117
- 40 Pei Z, Chu L, Zou W, *et al.* An oncolytic adenoviral vector of Smac increases antitumor activity of TRAIL against HCC in human cells and in mice. *Hepatology*, 2004, **39** (5): 1371~1381
- 41 Carette J E, Overmeer R M, Schagen F H, *et al.* Conditionally replicating adenoviruses expressing short hairpin RNAs silence the expression of a target gene in cancer cells. *Cancer Res*, 2004, **64** (8): 2663~2667
- 42 Parato K A, Senger D, Forsyth P A, *et al.* Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer*, 2005, **5** (12): 965~976
- 43 Guan M, Rodriguez-Madoz J R, Alzuguren P, *et al.* Increased efficacy and safety in the treatment of experimental liver cancer with a novel adenovirus-alphavirus hybrid vector. *Cancer Res*, 2006, **66** (3): 1620~1629
- 44 Yi R, Doehle B P, Qin Y, *et al.* Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *Rna*, 2005, **11** (2): 220~226
- 45 Morris K V, Chan S W, Jacobsen S E, *et al.* Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*, 2004, **305** (5688): 1289~1292
- 46 Li L C, Okino S T, Zhao H, *et al.* Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103** (46): 17337~17342
- 47 Robb G B, Brown K M, Khurana J, *et al.* Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, **12**(2): 133~137

Prospects of RNA Interference Induced by RNA Pol II Promoter in Cancer Therapy*

CHEN Qing, PAN Qiu-Wei, CAI Rong**, QIAN Cheng**

(Xin Yuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract RNA interference (RNAi) is a gene-silencing process induced by double stranded RNA at a level of posttranscription. At present, RNAi has been extensively applied to the research domain of gene functions and disease therapies, especially for the therapy of malignant tumours due to its simple designs, immediate effects and obvious efficiency. Up to now, a number of novel strategies have been engineered to effectively fight against malignancies through RNAi technology in the regulation of the tumorigenesis-and-progression-associated genes. Presently, uncontrolled RNA Pol III promoter expressing classical small hairpin RNA which can be processed into siRNA by Dicer enzyme is extensively applied. However, most of the current methods lack of tumor targeting and high efficiency in cancer therapy. The latest studies have demonstrated that RNAi induced by the tissue specific RNA Pol II promoter could compensate for a deficiency of RNAi mediated by RNA Pol III promoter. Moreover, virus vectors, especially cancer-specific replicable adenovirus targeting to cancer cells and oncolysing, which can express siRNA controlled by RNA Pol II promoter, is expected to be a more effective therapy strategy.

Key words RNA interference, RNA Pol II promoter, cancer therapy

*This work was supported by grants from Hi-tech Research and Development Program of China (2006AA02Z126) and National Basic Research Program of China (2004CB518804).

**Corresponding author. Tel: 86-571-86843181, Fax: 86-571-86843185

CAI Rong. E-mail: Cairong801@hotmail.com

QIAN Cheng. E-mail: cqian@unav.es

Received: January 1, 2007 Accepted: May 21, 2007