

RNAi 及其在肿瘤研究中的应用*

石 智 符立梧**

(中山大学肿瘤防治中心, 广州 510060)

摘要 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指在生物体细胞内, 外源性或内源性的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 引起与其同源 mRNA 特异性的降解, 因而抑制其相应的基因表达过程. 由于它能够高度特异性、高效性地抑制基因的表达, 因此在研究基因功能及表达调控、信号传导通路、药物靶点的鉴定和基因药物开发等方面具有良好的应用前景. 主要介绍 RNAi 可能的分子机制、分子生物学特性、产生方法及其在肿瘤研究中的应用.

关键词 RNAi, siRNA, 基因抑制, 肿瘤

学科分类号 R73

肿瘤是多种基因突变累积以及相互作用形成的基因网络调控的结果, 而这些突变基因的差异表达是决定肿瘤恶性表型多样性的分子基础, 对这些基因进行功能研究是了解肿瘤发生发展过程的重要策略, 不仅可以探究造成基因表型差异的遗传原因或外界原因, 而且对肿瘤的诊断及治疗具有非常重要的意义. 一般认为, 目前对某个基因的功能进行研究最有效的办法有两种: 一是观察该基因突变个体的表型改变, 这类突变可通过同源重组方式直接诱导产生, 也可经研究某随机突变生物体中该基因损害而得到认识; 另一种是利用反义核酸技术特异性抑制该基因的表达, 从而研究该基因的功能, 但反义核酸技术存在特异性不强、效率不高等缺点. 自 1998 年以来, RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术已成功应用于线虫、果蝇、斑马鱼、真菌、植物以及哺乳动物等生物的基因功能研究, 并且应用范围不断被拓宽, 它的出现为基因功能研究提供了一种新的具有高效性和高度特异性的功能基因组研究策略, 并且可望为基因治疗开发出新的药物. 本文就其可能的分子机制、分子生物学特性、产生方法及其在肿瘤研究中的应用做简要综述.

1 RNAi 可能的分子机制

RNAi 是指在生物体细胞内, 外源性或内源性的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 引起与其同源 mRNA 的特异性降解, 因而抑制其相应基因表达的过程^[1]. RNAi 与植物中的共抑制 (cosuppression) 或转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)、真菌中的基

因压制 (quelling) 之间存在密切的联系, 均是生物体内普遍存在于在 RNA 水平上调节基因表达的方式, 对细胞防御病毒的感染、修复遗传损伤及调节正常的基因功能具有重要作用. 由于 RNAi 是在线虫中首先被发现的, 其可能的分子机制主要是在对线虫研究中得出的, 尽管目前已发现 RNAi 过程中所涉及的部分基因及蛋白质, 如 ago-2、der-1、ego-1、mut-7、rde-1、rde-4、rrf-1 和 smg-2 等^[2], 但它们的作用仍然没有完全确定, 而且虽然 RNAi 与共抑制、基因压制存在某些共同的特性, 但仍不清楚它们是否有相同的分子机制.

目前的研究认为, RNAi 可能的分子机制^[3,4]可分为两个阶段: a. 起始阶段. 由于 RNA 病毒感染、转座子转录和外源导入基因表达等原因, 生物体细胞内出现双链 RNA (dsRNA), dsRNA 在一种具有 RNase III 样活性的 dsRNA 特异性核酸内切酶 (dsRNA specific endonuclease, Dicer) 作用下, 被裂解成由正义和反义链组成的 21 ~ 23 nt 的干扰性小 RNA (small interfering RNA, 或 short interfering RNAs, siRNA). b. 效应阶段. 目前认为该阶段存在两种假说模式, 一种假说模式是认为 siRNA 作为向导序列, 与 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA induced silencing complex, RISC) 的无活性前体结合, 在 ATP 参与下 siRNA 双链结构解旋诱导形成有活性的 RISC, 活性 RISC 随即与同源性靶向

* 国家自然科学基金资助项目 (30371659).

** 通讯联系人.

Tel: 020-87343164, E-mail: Fulw@gzsums.edu.cn

收稿日期: 2003-11-03, 接受日期: 2004-01-19

mRNA 结合, 在与 siRNA 反义链配对区域的中部切断同源性靶向 mRNA, 使其降解, 从而干扰基因表达, 这称为内源性核苷酸裂解 (endonucleolytic cleavage); 另一种假说模式为随机降解性多聚酶链反应 (random degradative PCR), 即 siRNA 作为针对靶向 mRNA 特殊引物, 在 RNA 依赖性 RNA 多聚酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) 的作用下以靶向 mRNA 为模板合成靶向 mRNA 的互补链, 使单链 mRNA 成为 dsRNA, 然后在 Dicer 酶的作用下被降解形成新的 siRNA, 新的 siRNA 又进入上述过程, 反复循环 (图 1)。

2 RNAi 的分子生物学特性

RNAi 具有重要的分子生物学特性^[1,5]:

- RNAi 是 siRNA 介导的转录后水平的基因沉默, 这种作用是针对靶向基因的外显子序列, 而对其启动子或内含子序列却没有效应;
- 高特异性, siRNA 只高度特异地降解同源靶向 mRNA, 并不影响其他基因 mRNA 表达, 而且 siRNA 正义链序列中任何配对碱基的改变都会使 RNAi 的作用完全失效或严重降低, 只有与靶向 mRNA 完全同源的 siRNA 才能发挥最佳效应;
- 高效性, siRNA 在比同源靶向基因 mRNA 低几个数量级的浓度就可以抑制其表达;
- 高稳定性, siRNA 分子是 3' 端有突出的非配对碱基的双链分子, 在细胞内可稳定存在 3~4 天, 半衰期远长于反义寡聚核苷酸;
- 可传播性和可遗传性, RNAi 的效应不仅仅局限于单个细胞内, 还可在细胞之间相互传递和维持效应, 甚至可以传递给子一代。siRNA 作为 RNAi 过程中关键的效应分子, 其分子结构具有一定的特征性^[6]: 由正义链和反义链组成的特殊 dsRNA 分子, 长约 21~23 nt; 正义链序列与所作用的靶向 mRNA 序列具有同源性; 正义链和反义链末端均为 5' 端磷酸和 3' 端羟基, 而且 3' 端均有 2~3 个突出的非配对碱基。这些特征性结构为人为地产生 siRNA 以及应用 RNAi 技术进行研究提供了理论基础。另外, RNAi 与反义核酸技术相比, 两者之间存在明显的不同^[7]。首先, 尽管两者均是在转录后水平上抑制靶向基因的表达, 但反义核酸是在核内与前体 mRNA 结合而发挥作用, 而 siRNA 是胞内与成熟 mRNA 结合而使其降解, 而且适合于反义核酸的靶 mRNA 序列并不一定是 siRNA 的靶序列, 这与两者靶序列的二级结构有关; 其次, 两者的产生和转染入细胞原则上是相似的, 但是反义核

酸技术明显比 RNAi 更成熟、更容易控制; 再次, 两者均是特异性地抑制靶基因的表达, 但是 RNAi 具有放大效应, 其抑制效率远高于反义核酸技术。目前普遍认为 RNAi 比反义核酸技术抑制基因表达更胜一筹, 但有研究指出^[8], 经 2'-O-甲氧乙基修饰的反义核酸与 siRNA 在抑制基因表达上具有相同的能力。然而需引起注意的是, 在哺乳动物细胞内大于 30nt 的 dsRNA 可引起非特异性的干扰反应, 其一方面通过激活 dsRNA 依赖的 PKR, 使翻译起始因子 2 的 α 亚基 (eIF2 α) 被磷酸化而失活, 从而阻断翻译过程, 抑制蛋白质合成, 另一方面促进 2', 5' 多聚腺苷酸合成酶 (2', 5'-AS) 合成而激活非特异性 RNA 酶 L (Rnase L), 非特异性地降解 mRNA, 因此诱发细胞凋亡^[9] (图 1)。然而最近有研究^[10]发现, siRNA 在特定的条件下也可引起哺乳动物细胞内的非特异性的干扰反应, 这意味着应谨慎判断应用 RNAi 技术得出的研究结果。

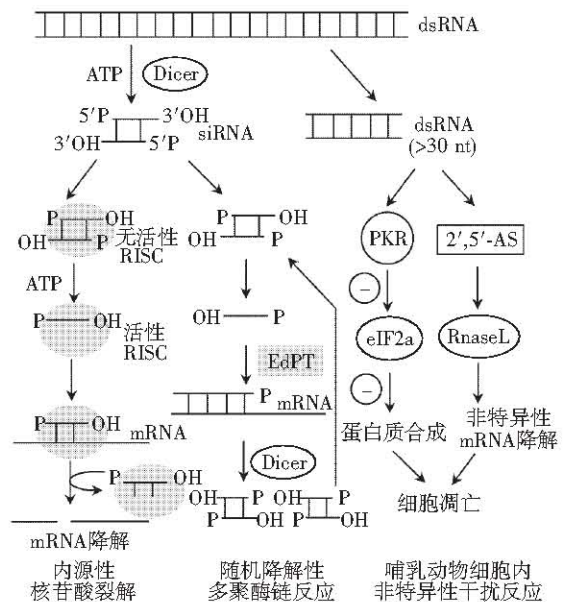


Fig. 1 The possible molecular mechanism of RNAi and the non-specific interfering response in mammalian cells

图 1 RNAi 的可能分子机制和哺乳动物细胞内非特异性干扰反应

尽管 RNAi 技术有如此明显的优点, 但也存在一些限制因素, 如 RNAi 并不是对所有的靶向基因都有作用, 而是有选择性的, 它对某些靶向基因可能表现出较强干扰作用, 但对其他靶向基因却表现出较弱的效应甚至无效应; 对同一靶向基因 mRNA

而言,可能某些 siRNA 对其有较强的抑制作用,而另一些 siRNA 却只有较弱的抑制作用或没有作用等等.

3 产生 RNAi 的方法

由于 RNAi 的关键效应分子就是 siRNA,因此要产生有效的 RNAi 效应关键是针对靶向基因如何设计及制备 siRNA. 目前关于设计 siRNA 的原则可概括为以下 4 点: a. 从起始密码子 ATG 后 75 ~ 100 个碱基开始,扫描靶向基因 mRNA 的外显子编码区寻找以 AA 开始的长 21 ~ 23 bp 的序列; b. GC 的含量通常在 35% ~ 50% 之间最佳,最多不要超过 55%; c. 进行 BLAST 分析,排除与其他基因有明显同源性的序列; d. 对选择的序列进行二级结构分析,去除有复杂结构的序列. 但也有不少 siRNA 并不是完全按照上述原则设计,却发现也有较强的干扰效应,因此有必要进一步研究确定有关设计 siRNA 的确切原则. 而实际应用中一般是对靶向基因设计 3 ~ 4 条 siRNA,先筛选出最有效的 siRNA,然后再用其进行以后的实验.

目前较为常用制备 siRNA 的方法包括下列 5 种: a. 化学合成 siRNA^[1]. 直接通过化学方法合成两条互补的长 21 ~ 23 bp 的 RNA 单链,然后退火形成双链 siRNA. 这是最早应用的也是最经典的,但它明显的缺点是价格昂贵,并且定制周期长,特别是针对有特殊需求的 siRNA,因此最适用于已经找到最有效的 siRNA 的情况下,需要大量 siRNA 进行研究,而不适用于筛选最有效的 siRNA 等长时间的研究. b. 体外转录合成 siRNA^[11]. 通过 RNA 聚合酶 II 启动子 T3 或 T7 体外转录合成两条互补的长 21 ~ 23 bp 的 RNA 单链,然后退火形成双链 siRNA. 这是一种性价比较高的筛选 siRNA 的方法,但是实验的规模和量始终有限制,因此适用于筛选最有效的 siRNA,特别是需要制备多个 siRNA 而化学合成的价格成为障碍时,而不适用于需要大量的某个特定的 siRNA 进行长期的研究. c. 用 RNase III 消化长片段 dsRNA 得到 siRNA^[12]. 用体外转录的方法制备长 200 ~ 1 000 bp 的双链 dsRNA,然后用 RNase III (or Dicer) 在体外消化,得到各种不同的 siRNA 的混合物. 该方法主要的优点是可以跳过筛选有效的 siRNA 序列而省时省力,但其缺点也很明显,就是有可能引发非特异的基因沉默,特别是同源或密切相关的基因,因此适用于快速而经济地研究某个基因功能缺失的表型,

而不适用于稳定转染表达或需要某个特定的 siRNA 的研究. d. 利用质粒或病毒载体表达 siRNA^[11,13]. 通过转染含有 RNA 聚合酶 III 启动子 U6 或 H1,及其下游一小段特殊结构的质粒或病毒载体到宿主细胞体内,转录出短发夹状 RNA (short hairpin RNA, shRNA), shRNA 在胞内被 Dicer 酶剪切成 siRNA 而发挥作用. 该方法的优点是转染筛选后可以稳定表达,并且解决转染效率低的问题,因此适用于长时间的干扰研究,而不适用于筛选最有效的 siRNA 序列. e. PCR 方法制备 siRNA 表达框架^[14]. 利用引物延伸法进行 PCR,产生包含一个 RNA pol III 启动子 U6 或 H1、一小段编码 shRNA 的 DNA 模板和一个 RNA pol III 终止位点的表达框架,然后直接转染到细胞内表达 shRNA 而发挥作用. 该方法方便快捷,是筛选 siRNA 最有效的方法,并可用来筛选在特定的体系中启动子和 siRNA 的最适搭配,还可以通过在 PCR 产物两端添加酶切位点而直接克隆到载体中构建 siRNA 表达载体,但其主要缺点是很难转染到细胞中.

4 RNAi 在肿瘤研究中的应用

自首次报道以来, RNAi 技术由于其特有的优越性,被迅速应用于功能基因组学、药物靶点筛选和细胞信号传导通路分析等方面,已发表相关文章上千篇. 该技术在肿瘤研究的应用主要集中在肿瘤相关基因的功能研究上,共发表近百篇文章,内容涉及肿瘤发生发展、侵袭与转移、信号传导、细胞周期调控、凋亡和治疗等多方面. 并且, RNAi 技术还可与其他分子生物学技术,如 DNA 芯片技术相结合,对许多肿瘤相关基因进行研究.

4.1 肿瘤的发生发展

利用 RNAi 技术,对肿瘤细胞内的癌基因和抑癌基因进行抑制其功能表达,分析其表型发生的变化,有利于揭示肿瘤发生发展的分子机制,从而为肿瘤的诊断和治疗提供标记物和治疗靶点. Bcr-Abl 是首先发现的嵌合型癌基因,它的表达可引发慢性粒细胞白血病,最近有 3 篇报道^[15~17],均是利用以其融合位点不同序列为靶点的 siRNA,在不同的白血病细胞株沉默其表达,结果 Bcr-Abl 的 mRNA 和蛋白质水平均明显降低,而 c-Bcr 和 c-Abl 的 mRNA 水平均不受影响,同时各细胞株凋亡显著增多,对 γ 射线和 STI571 的敏感性均增强,并且在 STI571 有抗性的细胞内沉默 Bcr-Abl 的表达后,也恢复了其对 STI571 的敏感性 (图 2). Eμ-

Myc 转基因小鼠具有 Myc 癌基因表达并在 4 ~ 6 月大时会形成 B 细胞淋巴瘤, Hemann 等^[18]用逆转录病毒介导的 shRNA 干扰技术沉默其造血干细胞的 Trp53 抑癌基因, 结果显示不同的 shRNA 在体外使细胞产生不同的生长表型, 把转染后的细胞导回体内后形成不同的淋巴瘤类型, 其中被沉默最严重的组别在体内产生的淋巴瘤与 Trp53 (- / -) 淋巴瘤的病理类型一致, 而无 Trp53 等位基因杂合性缺失但含有表达 p53 shRNA 载体的 Trp53 (+ / -) 细胞能快速地形成肿瘤, 这说明通过稳定的 RNAi 技术可建立基因功能缺失表型的动物模型, 并且由于 shRNA 的差异而引起的 Trp53 功能缺失程度不一致与淋巴瘤类型有关。

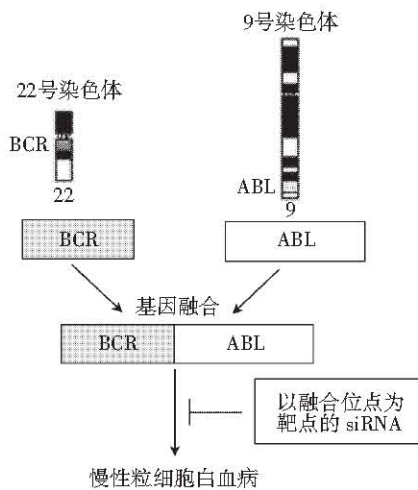


Fig. 2 Scheme of siRNA interfering Bcr-Abl oncogene

图2 siRNA 干扰 Bcr-Abl 癌基因示意图

在肿瘤的发生发展过程中, 除机体的内在因素外, 外界环境因素的作用也非常重要。为研究石棉诱发恶性间皮瘤的分子机制, Ramos-Nino 等^[19]先应用 DNA 芯片技术分析用石棉刺激正常胸膜上皮细胞前后基因的改变, 发现刺激后 fra-1 基因高表达, 而其在恶性间皮瘤细胞也有高表达, 然后通过 RNAi 技术沉默被石棉刺激后的正常胸膜上皮细胞 fra-1 基因, 结果显示 fra-1 的 mRNA 与蛋白质水平均下降。另外, 病毒感染与肿瘤的发生关系密切, 如宫颈癌的发生与 HPV16 的癌基因 E6 和 E7 的表达息息相关, Jiang 等^[20]用化学合成的 siRNA 在 HPV 阳性的宫颈癌 CaSki 细胞和 SiHa 细胞中干扰这两个基因, 结果显示 E6 和 E7 的 mRNA 及蛋白质均选择性下降, 这种效应至少持续 4 天, 并且

E6 被沉默后导致 p53 蛋白的增加, 激活细胞周期调控基因 p21, 细胞生长受抑制, 而沉默 E7 后细胞集聚并且凋亡。

4.2 肿瘤的侵袭与转移

恶性肿瘤的侵袭与转移是临床上绝大多数肿瘤患者的致死原因, 应用 RNAi 技术对肿瘤侵袭与转移的发生机制及有关基因的改变进行研究, 有助于加深理解恶性肿瘤的生物学本质, 为从不同水平阻断肿瘤的侵袭与转移提供理论依据和方法。肿瘤细胞的锚定粘附过程受中介素 $\alpha 6 \beta 4$ 的调节, Lipscomb 等^[21]在研究中介素 $\alpha 6 \beta 4$ 是否能成为一个抑制肿瘤侵袭与转移的靶点时, 采用化学合成的 siRNA 在具有高度侵袭性的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞内, 分别沉默中介素 $\alpha 6 \beta 4$ 的亚基 $\alpha 6$ 和 $\beta 4$ 基因, 结果显示两者基因的表达抑制均能引起细胞表面中介素 $\alpha 6 \beta 4$ 水平的降低, 并且细胞的恶性侵袭性与非依赖于配体的转移性均明显减弱。在多种肿瘤的转移灶中均发现有 CXCR4 高表达, 为研究其在乳腺癌转移过程中的作用, Chen 等^[22]通过建立一种可调控靶向基因表达水平的四环素诱导的 RNAi 系统, 也在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞干扰内源性 CXCR4 基因的表达, 结果发现 CXCR4 的 mRNA 和蛋白质水平均明显下降, 同时细胞侵袭性显著减弱。

肿瘤的原发灶和转移灶在生长扩散过程中都依赖血管生成, 而且肿瘤实体内微血管的数量与肿瘤转移的潜能呈正相关。组蛋白去乙酰基酶 (HDAC) 抑制剂在体内外均有抗肿瘤转移及血管生成的活性, RECK 基因编码的蛋白质通过负性调节基质金属蛋白酶 (MMPs) 而抑制肿瘤转移及血管生成, 为探讨两者之间是否存在联系, Li 等^[23]在用一种 HDAC 抑制剂 trichostatin A (TSA) 处理肺癌 CL-1 细胞后发现 RECK 蛋白表达增强, MMPs 活性降低, 同时细胞的侵袭性减弱, 然后通过化学合成的 siRNA 干扰 RECK 基因表达, 结果显示 siRNA 抑制了 TSA 引起的 RECK 蛋白表达增强, 并抵消了 TSA 诱导的 MMPs 活性降低, 由此证实了 HDAC 抑制剂是通过促进 RECK 蛋白表达抑制 MMPs 活性而发挥抗侵袭性作用。

4.3 肿瘤的细胞周期调控

几乎所有的癌基因、抑癌基因都直接或间接地参与细胞周期的调控, 或者其本身就是细胞周期调控机制的主要成分, 它们的突变导致了细胞周期的失控, 包括细胞周期的启动、运行和终止的异常,

从而使细胞获得以增殖过多、凋亡过少为主要形式的失控性生长. Ahn 等^[24]将针对细胞周期检测点激酶 1 (Chk1) 与激酶 2 (Chk2) 的 siRNA 转染入 4 株癌细胞, 结果显示 Chk1 和 Chk2 蛋白质水平均显著下降, 而 p53 蛋白水平在 DNA 损伤后仍然稳定并具有活性, 这说明在这些癌细胞中 Chk1 和 Chk2 不是 p53 的调控子. Ohtsuka 等^[25]研究显示, 在含有野生型 p53 基因的乳腺癌 MCF-7 细胞内, 细胞周期素 G (cyclin G) 的表达引起 p53 蛋白在 DNA 损伤后显著下降, 并且消除了放射损伤引起的 G1 期阻滞与 S 期延长, 通过 RNAi 沉默 cyclin G 的表达后, p53 蛋白水平在 DNA 损伤后增加, 由此可知 p53 转录激活 cyclin G, 而 cyclin G 反过来又负性调节 p53 蛋白水平的稳定性. 为探讨 Krüppel 类似因子 4 (KLF4) 在 DNA 损伤后 p53 依赖的细胞周期阻滞过程中的作用, Yoon 等^[26]研究表明, 在 γ 射线处理后 p53 (-/-) 结肠癌 HCT116 细胞比 p53 (+/+) 细胞在 G1 期的数量明显减少, 而通过转染腺病毒使 KLF4 在 p53 (-/-) 细胞内表达可恢复 G1 期细胞数量到相当于 p53 (+/+) 细胞的水平, 并且利用 RNAi 技术抑制 γ 射线处理后 p53 (+/+) 细胞内的 KLF4 基因表达, 可显著减少其 G1 期细胞数量至对照组水平, 同时发现 KLF4 蛋白表达增多或减少始终伴随着 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白水平的升高或降低, 这说明 KLF4 是 DNA 损伤后 p53 控制 G1/S 期进程的一个必需的调控因子. 53BP1 是与 DNA 损伤后反应有关的一个核蛋白, Wang 等^[27]通过转染化学合成的 siRNA 干扰 53BP1, 结果发现 53BP1 在放射损伤后的 p53 蛋白水平升高、G2/M 期过渡阻滞等过程是必需的, 而且 53BP1 也影响下游检测点分子 Brca1 和 Chk2 的磷酸化, 同时参与 DNA 损伤后修复信号传导通路中 Brca1 集聚的形成.

细胞周期调控机制的核心是细胞周期依赖性蛋白激酶 (CDK) 的时相性激活, 而这又主要依赖于 cyclin 的细胞周期特异性或时相性表达、积累与分解, 以及细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制物 (CKI) 的负调控. 为阐明 CKI 家族成员之一 p27^{KIP1} 的作用机制, Boehm 等^[28]发现了使 p27^{KIP1} 在 10 位丝氨酸残基磷酸化的激酶——核蛋白 hKIS, hKIS 通过与 p27^{KIP1} 的 C' 端结合而磷酸化 10 位丝氨酸残基并使 p27^{KIP1} 从核内移到胞内, 在 G0/G1 过渡期有丝分裂原激活 hKIS, hKIS 的表达可消除 p27^{KIP1} 抑制细胞周期持续进行的作用, 通过

化学合成的 siRNA 沉默 hKIS 后, p27^{KIP1} 在 10 位丝氨酸残基磷酸化被抑制, 并且 G1 期运行受阻, 而 p27 (-/-) 细胞的细胞周期不受影响, 这说明 hKIS 被有丝分裂原激活后通过磷酸化 p27^{KIP1} 的 10 位丝氨酸残基而发挥作用. Porter 等^[29]发现一个新的细胞周期调控基因 Spy1, 该基因仅在 G1/S 过渡期表达, 通过结合并激活 CDK2 而促进细胞生长, 同时 G1 期细胞数量减少, 运用针对 Spy1 的 siRNA 干扰其表达后, 细胞分裂减少生长受抑, 由此可知, Spy1 是通过结合并激活 CDK2 而在细胞周期调控中发挥重要作用.

4.4 肿瘤的信号传导通路

肿瘤的信号传导通路是一个非常复杂的网络系统, 在肿瘤的发生发展过程中, 由于各种基因水平的变化, 使某些通路处于异常活跃的状态, 另一些则传递受阻, 但其机制尚待进一步阐明. 例如各种生长因子的激活与过度表达对促进肿瘤细胞分裂增殖起着重要作用. Shu 等^[30]发现血管内皮生长因子 (VEGF) 刺激膀胱癌 T24 细胞后鞘氨醇激酶 (SPK) 呈现时间剂量依赖性地被激活, 并且 SPK 介导 VEGF 引起的 Ras-GTP 和磷酸化的 ERK1/2 积累, 通过化学合成的 siRNA 抑制 SPK 表达后, VEGF 引起 Ras-GTP 和磷酸化的 ERK1/2 积累的过程被阻滞. 此外, Lu 等^[31]通过将针对人 VEGF 与鼠 VEGFR2 的 siRNA 分别导入乳腺癌 MDA-MB-435 和 MCF-7 细胞移植瘤的裸鼠体内, 结果发现裸鼠体内的肿瘤生长显著受抑制, 并且肿瘤组织内 VEGF 表达下降, 毛细血管生成减少, 这是首次应用 RNAi 技术在体内抑制肿瘤形成的报道. Wnt 传导通路与多种肿瘤的发生有关, 为研究非小细胞癌中 Wnt 传导通路 with Dvl 的关系, Uematsu 等^[32]分别将针对 Dvl-1、-2 和 -3 的 siRNA 转染入有 Dvl-3 高度表达的非小细胞肺癌 H1703 细胞, 结果只有 Dvl-3 的表达被抑制, 同时 β -catenin 表达下降并且伴随 Tcf 依赖的转录活性降低, 细胞生长受抑, 而在低表达 Dvl 的肺癌 A549 细胞和由于 APC 突变引起异常 Wnt 信号通路的结肠癌 SW48 细胞, 两者生长均不受 Dvl-siRNA 的影响, 这说明 Dvl 过度表达使非小细胞肺癌 Wnt 信号通路持续激活.

各种细胞外因子与膜受体或核受体结合后, 在胞内产生第二信使, 然后激活胞浆内的一些蛋白激酶将信号继续传递下去, 因此这些蛋白激酶起着控制信号传导通路开关的重要作用. 为分析蛋白激酶 C (PKC) 亚型的功能, Irie 等^[33]分别利用针对

人 α PKC 与 δ PKC 的 siRNA 抑制它们的表达, 结果显示 α PKC 与 δ PKC 表达的抑制仅发生在人源细胞, 而鼠源细胞却没有, 这说明 RNAi 降低内源性或外源性 PKC 的表达水平是亚型及种属特异性的. Spankuch-Schmitt 等^[34]在分析 Polo 样激酶 1 (PLK1) 在癌细胞增殖过程中的作用时, 用针对 PLK1 的 siRNA 转染癌细胞, 结果显示 PLK1 的 mRNA 和蛋白质水平均显著下降, 细胞增殖减慢, 凋亡增加, 另外其中的结肠癌细胞 SW-480 有丝分裂停止并且中心体不能形成微管, 这说明 PLK1 对有丝分裂过程中微管和纺锤体的形成是必需的. Czauderna 等^[35]用 RNAi 技术研究磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 信号传导通路, 将以 PI3K 催化亚基 p110 β 为靶点的化学合成的 siRNA 及由质粒介导的 shRNA 分别转入 HeLa 细胞, 结果两者均使 p110 β 的 mRNA 水平明显降低, 并且细胞生长受抑, 同时将转染后的细胞移植入裸鼠体内后移植瘤生长也较对照组慢, 这与 RNase H 依赖型的反义核酸和 PI3K 抑制剂 LY294002 处理后的结果一致.

4.5 肿瘤的凋亡

越来越多的研究资料表明细胞凋亡过程的异常在大多数恶性肿瘤的发病学上占有重要地位, 因此探讨清楚其机制可望使恶性肿瘤在治疗学上取得重大突破. 目前已有不少研究将 RNAi 技术拓宽到此领域的研究. 为研究 Caspase 2 在凋亡过程中的作用, Lassus 等^[36]用 RNAi 技术分别沉默 Caspase 1、Caspase 2 和 Apaf-1 的表达后发现, Caspase 2 和 Apaf-1 蛋白水平降低后均可阻止 DNA 损伤药物诱导的凋亡, Caspase 1 的表达抑制后对此却没有影响, 而 Caspase 2 表达降低不影响 TNF- α 诱导的凋亡, 并且当缺乏 Caspase 2 的细胞被 DNA 损伤的药物诱导凋亡后线粒体内的细胞色素 c 和 Smac 并没有被释放, 而且 Caspase 2 是在 DNA 损伤的早期被激活且不依赖于 Caspase 3、Caspase 7 和 Caspase 9, 这说明 Caspase 2 通过调控线粒体膜的通透性而在凋亡过程中发挥作用. 抗凋亡蛋白骨髓白血病细胞蛋白 1 (MCL1) 在结构上与 Bcl-2 类似, 其具体的抗凋亡机制不清, Zhang 等^[37]鉴定出一个新的蛋白 fortilin 并证实它可特异性与 MCL1 相互作用, 通过针对 fortilin 的 siRNA 抑制其表达后, MCL1 的表达并未受影响, 然而用针对 MCL1 的 siRNA 后, fortilin 的 mRNA 水平没有变化但蛋白质降解增多, 水平显著降低, 因此推测 MCL1 可能是 fortilin 的分子伴侣, 并在体内维持其稳定性. 为分析结肠癌细

胞的凋亡相关基因, Jiang 等^[38]运用 RNAi 沉默 Bcl-2 和 Bcl-x_L 基因, 发现沉默 Bcl-2 的表达引起 p53 依赖性的凋亡, 并且这个新发现的 Bcl-2/p53 凋亡途径需要 Bax 和 Caspase 2 的参与.

4.6 肿瘤的治疗

RNAi 由于其特有的优势而成为肿瘤基因治疗的新策略, 针对肿瘤细胞特定靶基因的 siRNA 可抑制肿瘤细胞生长、诱导凋亡、增强化疗或放疗的敏感性而发挥抗癌作用, 有望开发为新的肿瘤治疗药物. Cioca 等^[39]分别转染针对 c-Raf 和 Bcl-2 的 siRNA 进入多株人白血病细胞后, 两者的蛋白质水平显著降低, 沉默 c-Raf 表达后抑制了 TPA 诱导 HL-60 细胞发生单核细胞样分化, 同时沉默两者表达后诱导 HL-60、U927 和 THP-1 细胞凋亡, 并增强鬼臼乙叉甙和柔红霉素对这些细胞的细胞毒作用. MDR 是肿瘤化疗失败的主要原因, 形成 MDR 的最常见的因素是肿瘤细胞 MDR1 基因编码的 p-gp 糖蛋白过度表达, 为寻找克服 MDR 的新方法, Wu 等^[40]使用化学合成的 siRNA 在乳腺癌具有 MDR 表型的 MCF-7/Adr 和 MCF-7/BC-19 细胞干扰 MDR1 的表达后, MDR1 的 mRNA 和 p-gp 水平显著下降, 细胞内紫杉醇和阿霉素积累增多, 并且长春花碱、紫杉醇以及阿霉素对细胞的细胞毒性作用也大大增强, 而细胞对羟基尿的敏感性没有变化. Collis 等^[41]为抑制修复 DNA 损伤的酶 (如 ATM、ATR 与 DNA-PKcs) 以增强放射和化疗对癌细胞的杀伤作用, 通过使用质粒介导的 shRNA 在前列腺癌 DU145 和 PC-3 细胞分别沉默这三种酶的表达, 结果细胞内 ATM、ATR 与 DNA-PKcs 的蛋白质水平均显著下降, 并且在抑制 ATM 与 DNA-PKcs 的表达后细胞对放射的敏感性明显增强, 这种增敏效应等于或略强于高浓度的 PI3K 抑制剂 Wortmannin 和 DNA-PKcs 选择性抑制剂 LY294002 引起的细胞放射敏感性增强, 另外在抑制 ATR 的表达后烷化剂 MMS 对 DU145 细胞的细胞毒性作用增强.

5 意义和展望

RNAi 现象的发现及其分子生物学机制和功能初步阐明, 为成功地应用 RNAi 研究与治疗遗传性疾病、病毒感染、免疫缺陷疾病和肿瘤等重大疾病提供了理论基础, 而且目前已取得重大进展, 尤其是在肿瘤、艾滋病和肝炎等方面. 然而, 用 RNAi 对肿瘤进行研究与治疗还存在许多问题, 如: 是否所有的肿瘤细胞都有内在的 RNAi 现象存在、

肿瘤细胞是否会对这种 RNAi 介导的序列特异性 mRNA 降解快速产生抵抗性、在人体内 RNAi 是否与在体外以及动物模型中有相似的研究结果、如何改善现有的 RNAi 生成和运输体系以及增强 RNAi 的效果等等,最近就有研究发现了一种拮抗 RNAi 的现象^[42],人腺苷脱氨酶(ADAR2)可使 dsRNA 分子脱去氨基,阻止 RNAi 的发生,因此可以想象肿瘤细胞也可能通过这种防御机制或者产生新的酶来拮抗 RNAi 的发生,这些问题的解决将会使 RNAi 能够被更广泛地应用于肿瘤的研究,而且还会促使成功地开发 siRNA 作为肿瘤治疗的药物早日成为现实。

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 Hutvagner G, Zamore P D. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Gene Devel*, 2002, **12** (2): 225 ~ 232
- 3 Ramaswamy G, Slack F J. SiRNA: A guide for RNA silencing. *Chem Biol*, 2002, **9** (10): 1053 ~ 1055
- 4 Hannon G J. RNA interference. *Nature*, 2002, **418** (6894): 244 ~ 251
- 5 Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, **411** (6836): 494 ~ 498
- 6 MucManus M T, Sharp P A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature Reviews Genetics*, 2002, **3** (10): 737 ~ 746
- 7 Thompson J D. Applications of antisense and siRNAs during preclinical drug development. *Drugdiscovery Today*, 2002, **7** (17): 912 ~ 917
- 8 Vickers T A, Koo S, Frank Bennett C, *et al.* Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. *J Biol Chem*, 2003, **278** (9): 7108 ~ 7118
- 9 Shuey D J, McCallus D E, Giordano T. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. *Drugdiscovery Today*, 2002, **7** (20): 1040 ~ 1046
- 10 Bridge A J, Pebernard S, Ducraux A, *et al.* Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature Genetics*, 2003, **34** (7): 263 ~ 264
- 11 Yu J Y, DeRuiter S L, Turner D L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (9): 6047 ~ 6052
- 12 Yang D, Buchholz F, Huang Z, *et al.* Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (15): 9942 ~ 9947
- 13 Sui G, Soohoo C, Affar E B, *et al.* A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (8): 5515 ~ 5520
- 14 Castanotto D, Li H, Rossi J J. Functional siRNA expression from transfected PCR products. *RNA*, 2002, **8** (11): 1454 ~ 1460
- 15 Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, *et al.* Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene*, 2002, **21** (37): 5716 ~ 5724
- 16 Scherr M, Battmer K, Winkler T, *et al.* Specific inhibition of *bcr-abl* gene expression by small interfering RNA. *Blood*, 2003, **101** (4): 1566 ~ 1569
- 17 Wohlbold L, Kuip H, Miething C, *et al.* Inhibition of *bcr-abl* gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (ST1571). *Blood*, 2003, **102** (6): 2236 ~ 2239
- 18 Hemann M T, Fridman J S, Zilfou J T, *et al.* An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes *in vivo*. *Nat Genetics*, 2003, **33** (3): 396 ~ 400
- 19 Ramos-Nino M E, Scapoli L, Martinelli M, *et al.* Microarray analysis and RNA silencing link *fra-1* to *cd44* and *c-met* expression in mesothelioma. *Cancer Res*, 2003, **63** (13): 3539 ~ 3545
- 20 Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive humane cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene*, 2002, **21** (39): 6041 ~ 6048
- 21 Lipscomb E A, Dugan A S, Rabinovitz I, *et al.* Use of RNA interference to inhibit integrin ($\alpha 6 \beta 4$) -mediated invasion and migration of breast carcinoma cells. *Clinical Experimental Metastasis*, 2003, **20** (3): 569 ~ 576
- 22 Chen Y C, Stamatoyannopoulos G, Song C Z. Down-regulation of CXCR4 by inducible small interfering RNA inhibits breast cancer cell invasion *in vitro*. *Cancer Res*, 2003, **63** (7): 4801 ~ 4804
- 23 Li T L, Hui C C, Lien C C, *et al.* Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion. *Cancer Res*, 2003, **63** (6): 3069 ~ 3072
- 24 Ahn J, Urist M, Prives C. Questioning the role of checkpoint kinase 2 in the p53 DNA damage response. *J Biol Chem*, 2003, **278** (23): 20480 ~ 20489
- 25 Ohtsuka T, Ryu H, Minamishima Y A, *et al.* Modulation of p53 and p73 levels by cyclin G: implication of a negative feedback regulation. *Oncogene*, 2003, **22** (11): 1678 ~ 1687
- 26 Yoon H S, Chen X M, Yang V W. Kruppel-like factor 4 mediates p53-dependent G1/S cell cycle arrest in response to DNA damage. *J Biol Chem*, 2003, **278** (4): 2101 ~ 2105
- 27 Wang B, Matsuoka S, Carpenter P B, *et al.* 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science*, 2002, **298** (5597): 1435 ~ 1438
- 28 Boehm M, Yoshimoto T, Crook M F, *et al.* A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27^{Kip1} and regulates cell cycle progression. *EMBO J*, 2002, **21** (13): 3390 ~ 3401
- 29 Porter L A, Dellinger R W, Tynan J A, *et al.* Human Speedy: a novel cell cycle regulator that enhances proliferation through activation of Cdk2. *J Cell Biol*, 2002, **157** (3): 357 ~ 366
- 30 Shu X, Wu W, Mosteller R D, *et al.* Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol*, 2002, **22** (22): 7758 ~ 7768
- 31 Lu P Y, Xie F Y, Woodle M C, *et al.* siRNA-mediated antitumorigenesis for drug target validation and therapeutics. *Curr Opin Mol Ther*, 2003, **5** (3): 225 ~ 234
- 32 Uematsu K, He B, You L, *et al.* Activation of the Wnt pathway in non-small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression. *Oncogene*, 2003, **22** (46): 7218 ~ 7221
- 33 Irie N, Sakai N, Ueyama T, *et al.* Subtype- and species-specific knockdown of PKC using short interfering RNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **298** (5): 738 ~ 743
- 34 Spankuch-Schmitt B, Bereniter-Hahn J, Kaufmann M, *et al.* Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, 2002, **94** (24): 1863 ~ 1877
- 35 Czauderna F, Fechtner M, Aygun H, *et al.* Functional studies of

- the PI (3) -kinase signaling pathway employing synthetic and expressed siRNA. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31** (2): 670 ~ 682
- 36 Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science*, 2002, **279** (5585): 1352 ~ 1354
- 37 Zhang D, Li F, Weidner D, *et al.* Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and fortilin, the potential role of MCL as a fortilin chaperone. *J Biol Chem*, 2002, **277** (40): 37430 ~ 37438
- 38 Jiang M, Milner J. Bcl-2 constitutively suppresses p53-dependent apoptosis in colorectal cancer cells. *Genes Dev*, 2003, **17** (7): 832 ~ 837
- 39 Cioca D P, Aoki Y, Kiyosawa K. RNA interfering is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines. *Cancer Gene Therapy*, 2003, **10** (3): 125 ~ 133
- 40 Wu H, Hait W N, Yang J M. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res*, 2003, **63** (7): 1515 ~ 1519
- 41 Collis S J, Swartz M J, Nelson W J, *et al.* Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. *Cancer Res*, 2003, **63** (7): 1550 ~ 1554
- 42 Scadden A D, Smith C W. RNAi is antagonized by A→I hyper-editing. *EMBO Rep*, 2001, **2** (12): 1107 ~ 1111

RNAi and Its Application in Tumor Study*

SHI Zhi, FU Li-Wu**

(Cancer Center, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract RNA interference (RNAi) is the process that the introduction of exogenous or endogenous double-stranded RNA (dsRNA) into a cell leads to special degradation of homogenous mRNA and suppression of relative gene expression. Because of being able to highly specially and efficiently silence gene expression, RNAi has the potent application in the study of gene function and regulation, signaling pathway, drug target validation and gene drug development. RNAi possible molecular mechanism, molecular biological characteristics, productive ways and its application in studying tumor are summarized.

Key words RNAi, siRNA, gene silence, tumor

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30371659).

** Corresponding author. Tel: 86-20-87343164, E-mail: Fulw@gzsums.edu.cn

Received: November 3, 2003 Accepted: January 19, 2004