

RNA干扰技术与消化系肿瘤的基因治疗

陆嵘, 房静远

陆嵘, 房静远, 上海第二医科大学附属仁济医院 上海市消化疾病研究所 上海市 200001
项目负责人: 房静远, 200001, 上海市山东中路 145 号, 上海第二医科大学附属仁济医院消化疾病研究所. jingyuanfang@yahoo.com
电话: 021-62360930
收稿日期: 2003-10-30 接受日期: 2003-12-08

摘要

将靶基因序列同源的双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)导入细胞可以抑制某些基因的表达, 即 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi). RNAi 是机体中普遍存在的机制, 起到负责基因的表达和调控的作用. 由于 RNAi 能够高效特异地抑制基因表达, RNAi 技术在研究基因功能、遗传规律、信号转导机制等多个领域迅速展开. 作为一项崭新的技术, RNAi 在肿瘤的基因治疗方面具有非常广阔的前景. 本文就近年来 RNAi 技术在消化系肿瘤的基因治疗中的运用作一综述.

陆嵘, 房静远. RNA 干扰技术与消化系肿瘤的基因治疗. 世界华人消化杂志 2004;12(4):959-961

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/959.asp>

0 引言

RNAi 现象最早在 1998 年由 Fire et al^[1]首次发现并命名, 是通过导入特异序列的 dsRNA 引起基因沉默方法. 由于 RNAi 抑制基因表达具有特异性和高效性, 同时伴随近年来合成 dsRNA 技术上的改进, RNAi 已成为研究基因功能、肿瘤基因治疗、病毒感染基因治疗的新方法. 目前已发现通过 RNAi 抑制 K-ras, Bcl-2, CDK-2, PLK-1, p53 等肿瘤相关基因, 能够使胰腺癌、肝癌等多种消化系肿瘤细胞增生速度减慢, 恶性程度降低, 凋亡加快^[2-3]. 目前有关 RNAi 的研究已经成为分子生物学的热点. 预测 RNAi 将是未来 10 a 间最有可能产生重大成果的领域之一, 并被美国《Science》杂志评选为 2002 年度世界十大科学成就之首.

1 RNAi 的作用机制

RNAi 属于转录后基因沉默机制(post transcriptional gene silencing, PTGS), 其本质是小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)高效、特异地阻断体内同源基因表达, 致使 mRNA 降解和基因表达受抑. 研究表明, RNAi 广泛存在于各种生物体, 植物、真菌、锥虫、果蝇和哺乳动物中都发现了 RNAi 现象^[4]. 自然界中, RNAi 可能是动植物体内的一种保护机制, 主要作用在于防御病毒感染, 维持基因组中转座子的稳

定, 参与胚胎发育等^[5]. RNAi 的具体机制和过程尚未十分清楚, 可能的作用机制是, 外源导入或者由转基因、病毒感染等各种方式引入的 dsRNA, 在 Dicer 酶(特异识别 dsRNA 的 RNaseIII 家族中的一员)的作用下, 以一种 ATP 依赖的方式逐步切割 RNA, 降解成 21-23 个核苷酸的 siRNA. siRNA 双链同其他一些蛋白和酶结合成 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC). 随后在 siRNA 的引导下, RISC 识别与反义链互补的 mRNA, 在结合部位切割 mRNA, mRNA 与小片段的正义链置换, 切割后断裂的 mRNA 随之降解, 从而使该基因的表达受抑, 而 RISC 复合物又可以参加下一个 RNAi 作用循环^[6]. 目前已发现多种基因参与 RNAi 的作用过程, 例如 rde-1 和 rde-4 基因被认为参与了 RNAi 的启动步骤, 而 rde-1 家族中的一个成员是翻译起始因子, rde-2 和 mut-7 基因是 PTGS 效应阶段的重要基因^[7].

近来的研究还表明 RNAi 可能还牵涉到其他更加复杂的机制, 如 RNAi 可以通过基因组区域的重新甲基化而抑制基因表达^[8-9]. Wassenegger et al^[8]发现外源的 dsRNA 可以导致基因组上的 DNA 序列甲基化. 如果甲基化出现在编码区, 则转录照常进行, 但基因表现 PTGS, 如果甲基化出现在启动子区域, 则转录不能进行, 从而表现为转录水平的沉默现象(TGS). TGS 不及 PTGS 稳定, 也不具备可遗传性. 研究还发现 RNAi 与染色体重排和异染色质形成有关, 通过改变染色质的结构可以影响基因的表达^[10-11]. 此外, 在线虫上还发现, 内源编码的 RNAi 诱导物, 如 lin-4 基因的产物, 也会在转译水平上抑制基因的表达^[12].

2 RNAi 技术的运用

依据 RNAi 现象, 科学家建立了 RNAi 技术, 即人为设计合成针对某特定基因序列的 dsRNA 来关闭或抑制该基因的表达. dsRNA 的合成包括化学合成法、体外转录法、转录载体体内转录法等. 其中, 以 DNA 为模板体内合成 siRNA 载体的成功应用, 为 RNAi 的研究提供了更为简便和实用的方法, 使 RNAi 技术真正成为了可被广泛采用的有力工具^[13].

RNAi 技术在基因功能的研究中具有许多传统方法无法比拟的特点和优势. 首先, RNAi 具有较高的特异性, 只引起与 dsRNA 同源的 mRNA 降解. RNAi 技术中 siRNA 序列选择余地大, 21-23 个核苷酸中只要改变一个核苷酸, 就可以使该 siRNA 序列不对靶向 mRNA 起作用, 因此 RNAi 可用来抑制单个核苷酸突变基因

的表达. 例如血管内皮生长因子(VEGF)在肿瘤生长过程中具有重要作用, 至少存在5个亚型, 其功能和临床作用各不相同. 通过抑制VEGF的表达可以达到治疗肿瘤的目的, 然而至今尚缺乏抑制特定VEGF亚型的有效手段. Zhang et al^[14]成功利用RNAi技术抑制了VEGF188亚型的表达, 结果使该亚型的表达下降42.7%, 而其他亚型的表达未受影响. 其次, RNAi抑制基因表达具有很高的效率, 仅需少量的dsRNA就能有效抑制靶基因表达. Verma et al^[15]研究发现要达到相同的抑制 β -连环蛋白基因的目的, 反义寡核苷酸技术所需浓度为2 $\mu\text{mol/L}$, 而siRNA则仅需要20 nmol/L . Aoki et al^[16]比较了反义RNA技术和RNAi对人癌细胞的影响, 作者将正义和反义RNA表达质粒转染肝癌细胞和胰腺癌细胞, 以往的观点认为如果同时转染正义和反义RNA, 反义转染的作用可能会被正义转染消除, 但是研究结果却发现同时转染正义和反义RNA质粒对目的基因的抑制作用明显高于单一的反义RNA转染, 而单一的正义转染则不能抑制基因表达. 作者提出通过RNAi来抑制靶基因的表达, 其效果优于反义RNA技术. 并且RNAi技术在转染细胞48 h后即可了解抑制靶基因表达后的生物学现象, 若使用基因敲除等其他技术, 往往需要较长的时间. 此外, RNAi具有可传播性, 即siRNA可以在RNA依赖性RNA聚合酶的作用下进行大量扩增, 并转运出细胞, 使RNAi扩散到整个机体并可以传代^[17].

RNAi技术正改变着功能基因组学领域的研究步伐. 由于RNAi能够特异、高效、经济地抑制基因表达, 可以作为代替基因敲除的遗传工具, 因此迅速发展的RNAi技术已经成为一种功能强大的研究哺乳动物中选择性抑制特异性基因表达和研究基因功能的重要方法. 此外, RNAi还为某些疾病的基因治疗提供了新途径, 尤其是针对某个基因表达异常增高引起的疾病, 如病毒感染、肿瘤等^[18]. RNAi有望治疗艾滋病和丙型肝炎等病毒感染性疾病, 并降低某些病毒相关性肿瘤的发生率, 如宫颈癌、肝癌等^[19-22]. Wilson et al^[23]设计针对HCV基因组的siRNA以电穿孔方式导入人肝癌细胞(Huh-7), 病毒特异蛋白的表达水平可降低90%, 从而有效减少病毒复制, 并且siRNA的干扰作用的持续时间超过3 wk. 动物体内实验也发现siRNA能保护小鼠抵御HCV病毒的感染^[24].

3 RNAi与消化系统肿瘤

肿瘤的形成是一个多步骤的过程, 其中原癌基因的异常激活和过度表达是重要因素之一. 通过RNAi技术抑制肿瘤细胞中这些过度表达的基因, 将有利于肿瘤的治疗. 例如在人类常见的肿瘤中约30%存在活化的ras癌基因, 胰腺癌中更是高达85%. Brummelkamp et al^[2]建立了K-ras的siRNA表达系统, 并转染人胰腺癌细胞系CAPAN-1, 发现能够显著降低K-ras的mRNA表达水平, 并可明显抑制细胞克隆的生长以及阻止裸鼠

肿瘤的形成.

β -连环蛋白和APC基因是WNT信号传导途径的关键成分. 这些基因的突变可引起 β -连环蛋白表达水平增加, 导致细胞过度增生, 促进结肠息肉和结肠癌的发展. 有学者^[15]构建了 β -连环蛋白基因的siRNA并转染结肠癌细胞系SW480和HCT116, 这2种细胞分别存在APC和 β -连环蛋白基因突变, 因此 β -连环蛋白水平升高. 结果发现转染siRNA后能显著降低 β -连环蛋白基因的表达, 并抑制癌细胞的增生. siRNA可以针对 β -连环蛋白基因的多个靶区域, 使得蛋白表达量降低90%, 反义寡核苷酸技术虽然也能用于抑制 β -连环蛋白基因的表达, 但其抑制效果明显低于RNAi. 作者进一步用转染 β -连环蛋白基因siRNA的HCT116细胞注射裸鼠, 4/8存活超过70 d, 而对照组则全部死亡.

端粒酶的活化使细胞具有无限增生的能力, 是恶性肿瘤的普遍现象. 正常细胞不表达端粒酶, 而大多数肿瘤细胞中有端粒酶的表达^[25]. Kosciolk et al^[26]构建了端粒酶逆转录酶(hTERT)和端粒酶RNA(hTR)的同源序列dsRNA, 并转染各种肿瘤细胞系, 结果发现这2种dsRNA都能使肿瘤细胞内的端粒酶活性有所降低, 并且RNAi对端粒酶表达的抑制作用具有浓度和时间的双重依赖性. 作者认为端粒酶可作为肿瘤分子治疗的靶基因, 通过siRNA抑制端粒酶活性是非常具有潜力的方法.

肿瘤细胞接触某种治疗药物后可获得对其他非相关药物的广泛耐药性, 这种现象称为多药耐药(multidrug resistance, MDR). MDR是肿瘤化疗的主要障碍之一, 而MDR1基因的过度表达及基因产物P糖蛋白增加是MDR的重要原因. Nieth et al^[27]通过RNAi技术, 设计了特异的siRNA处理胰腺癌和胃癌细胞来抑制MDR1的表达. 结果发现这2种细胞的MDR1的mRNA和蛋白表达量可降低90%以上. 细胞对柔红霉素的耐药作用分别下降了89%和58%. 结论提示RNAi技术可作为一种特殊的方法运用于肿瘤患者, 提高肿瘤细胞对药物的敏感性.

目前认为正确维持甲基化状态是生长发育过程中所必需的, 而肿瘤发生过程中普遍存在甲基化失衡的情况^[28]. DNA甲基化酶(DNA methyltransferase, Dnmt)活性升高是癌细胞的一个具有特征的早期分子改变, 可引起DNA发生异常甲基化, 基因活性改变和染色体不稳定. Matsukura et al^[29]建立了Dnmt1的siRNA的表达质粒转染结肠癌细胞系HCT116, 结果可以使Dnmt1的表达显著降低, 并可引起肿瘤细胞的生长停止.

Williams et al^[30]通过cDNA微阵列分析发现结肠癌细胞HCT116中c-myc和survivin表达明显升高, 于是分别构建c-myc和survivin的siRNA转染HCT116细胞, 结果2种基因的蛋白表达量显著下降, 并且细胞增生也受到抑制. 将转染survivin siRNA的细胞注射裸鼠, 与对照组相比可使肿瘤直径减小为原来的1/7. 而将转染c-myc siRNA细胞注射裸鼠, 肿瘤直径减少26%. 由于这2个基因都与细胞增生有关, 因此相对c-myc而言,

survivin 更有可能成为肿瘤治疗的靶基因. 作者提出 RNAi 可作为一种新型的抗癌治疗手段, 并且 RNAi 结合 cDNA 微阵列分析是探索过度表达的肿瘤相关基因的有力工具.

目前使用 RNAi 技术应用于人类疾病的预防和治疗尚在起步之中, 需要更加广泛和细致的研究. 仍有许多问题需要解决, 比如提高 RNAi 的转染效率, 避免 RNAi 转染后在细胞内的降解等. 但是现有的研究成果已经使人们认识到 RNAi 对肿瘤基因研究的巨大潜力, 也为肿瘤的基因治疗带来了新的希望^[31].

4 参考文献

- 1 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811
- 2 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2002;2:243-247
- 3 McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002;418:38-39
- 4 Brantl S. Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta* 2002;1575:15-25
- 5 Agami R. RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6:829-834
- 6 Shi Y. Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet* 2003;19:9-12
- 7 Sijen T, Plasterk RH. Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature* 2003;426:310-314
- 8 Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 1994;76:567-576
- 9 Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 2000;19:5194-5201
- 10 Mochizuki K, Fine NA, Fujisawa T, Gorovsky MA. Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena. *Cell* 2002;110:689-699
- 11 Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 2002;297:1833-1837
- 12 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418:244-251
- 13 Miyagishi M, Taira K. Development and application of siRNA expression vector. *Nucleic Acids Res Suppl* 2002;2:113-114
- 14 Zhang L, Yang N, Mohamed-Hadley A, Rubin SC, Coukos G. Vector-based RNAi, a novel tool for isoform-specific knock-down of VEGF and anti-angiogenesis gene therapy of cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:1169-1178
- 15 Verma UN, Surabhi RM, Schmaltieg A, Becerra C, Gaynor RB. Small interfering RNAs directed against beta-Catenin inhibit the *in vitro* and *in vivo* growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003;9:1291-1300
- 16 Aoki Y, Cioca DP, Oidaira H, Kamiya J, Kiyosawa K. RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:96-102
- 17 Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 2000;101:543-553
- 18 Lieberman J, Song E, Lee SK, Shankar P. Interfering with disease: opportunities and roadblocks to harnessing RNA interference. *Trends Mol Med* 2003;9:397-403
- 19 Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, Collman RG, Lieberman J, Shankar P, Sharp PA. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 2002; 8:681-686
- 20 Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 2002; 418:430-434
- 21 Jacques JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002;418:435-438
- 22 Milner J. RNA interference for treating cancers caused by viral infection. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:459-467
- 23 Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatino S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, Sarangi F, Harris-Brandts M, Beaulieu S, Richardson CD. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2783-2788
- 24 McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002;418:38-39
- 25 Horikawa I, Cable PL, Mazur SJ, Appella E, Afshari CA, Barrett JC. Downstream E-box-mediated regulation of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene transcription: evidence for an endogenous mechanism of transcriptional repression. *Mol Biol Cell* 2002;13:2585-2597
- 26 Kosciulek BA, Kalantidis K, Tabler M, Rowley PT. Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference. *Mol Cancer Ther* 2003;2:209-216
- 27 Nieth C, Priebsch A, Stege A, Lage H. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett* 2003;545:144-150
- 28 Nephew KP, Huang TH. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Lett* 2003;190:125-133
- 29 Matsukura S, Jones PA, Takai D. Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. *Nucleic Acids Res* 2003;31:77
- 30 Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, Verma U, Gokaslan T, Simmang C, Fleming J, Tavana D, Frenkel E, Becerra C. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res* 2003;9:931-946
- 31 Borkhardt A. Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference-new hope for a highly specific cancer treatment. *Cancer Cell* 2002;2:167-168