

# RNAi 在肿瘤基因治疗药物研究中的应用

张新国, 曾艳龙, 陈文洁, 李坤(兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050)

**摘要:** 肿瘤是多种基因突变的累积以及这些基因相互作用形成的基因网络调控的结果, 目前 RNA 干扰技术越来越多地拓宽到肿瘤医学的研究领域。本文就 RNA 干扰技术在肿瘤基因治疗、在候选基因的发现和筛选中的应用以及临床研究进展方面做一综述。

**关键词:** RNA 干扰; 肿瘤; 基因治疗; 癌症

中图分类号: R979.19

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)09-0809-08

## Study for RNAi in Tumor Gene Therapy Drugs

ZHANG Xinguo, ZENG Yanlong, CHEN Wenjie, LI Kun(*School of Life Science and Technology, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China*)

**ABSTRACT:** The occurrence of tumor is the results of accumulation of multiple gene mutations, as well as network of gene controlling and regulation arising from the interaction of these genes. At present, more and more RNA interference(RNAi) technology was broadened to the field of tumor medicine. The review is focused on the application of RNAi technology in tumor gene therapy and the discovery and filter of its candidate gene as well as current clinical trials of RNAi-based drugs.

**KEY WORDS:** RNAi; tumor; gene therapy; cancer

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的常见病和多发病。根据世界卫生组织报告, 全世界近 70 亿人口中, 每年新发病例约 1 200 万例, 因肿瘤而死亡者可达 800 万人, 且该数字每年还呈增加的趋势, 肿瘤的治疗一直是个世界性的医学难题。RNA 干

扰(RNA interference, RNAi)是由双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA)介导的序列特异性转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)过程, 其通过双链 RNA 分子在 mRNA 水平上关闭相关基因的表达<sup>[1]</sup>。因此, 干扰 RNA 不仅是基

---

**基金项目:** 兰州理工大学科研发展基金资助项目(0908ZXC126)

**作者简介:** 张新国, 男, 博士, 副教授, 硕导 Tel: (0931)2976703

E-mail: biodrug@163.com

因功能研究的一种工具, 同时也可成为一种通过特异调控基因达到减轻病理的重要手段。肿瘤是个多因素多步骤的病变过程, 涉及多种基因的不恰当表达或功能异常<sup>[2]</sup>, 在某种意义上, 恶性肿瘤也可以被视为基因疾病, 因此, 通过基因手段来治疗恶性肿瘤将是根治癌症的希望。RNAi 作为一种新兴的生物技术, 其最主要的特点就在于它能针对特异基因起作用, 因此 RNAi 技术有望突破现有的肿瘤治疗方法中存在的诸多问题, 从而成为从根本上治疗肿瘤的新方法。

## 1 RNAi 在肿瘤基因治疗药物研究中的应用

### 1.1 基于肿瘤信号传导途径的 RNAi 治疗药物研究

肿瘤细胞起源于正常细胞, 肿瘤发生的过程与细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡等生命活动息息相关。在肿瘤的发生发展过程中, 由于各种基因水平的变化, 使某些信号通路, 如与细胞生长、分裂和增殖有关的信号通路处于异常活跃的状态, 而另一些, 如细胞凋亡通路则传递信号受阻。癌基因和抑癌基因往往和细胞信号传递异常密切相关<sup>[2]</sup>。因此通过信号传导途径进行 RNAi 药物的相关研究是非常重要的一个方面。

Fukumoto 等<sup>[3]</sup>选择了 Gab1(一种广泛分布的接头蛋白)蛋白作为干扰抑制位点, 设计合成了 siRNA 并转染人类红白血病 F-36P 细胞, 结果显示该肿瘤细胞生长受到抑制, 而且相关的分析显示, 肿瘤细胞的抑制与 Gab1 参与完成的 Erk1/2 激活途径和 JAK(蛋白酪氨酸激酶)有关。胆囊收缩素 CCK 及其类似物通过网状的信号转导途径产生类似促进肿瘤细胞生长的作用, 在小细胞肺癌及胃肠道胰腺癌的发生发展中起重要作用, 抑制 CCK 基因表达及利用其受体拮抗剂有望成为胰腺癌、结肠癌等癌症治疗的新手段。Zhou 等<sup>[4]</sup>设计利用靶向 CCK-B 受体的 siRNA 阻断人胃癌 SGC-7901 细胞系 CCK-B 受体表达, 同时用特异中和抗体阻断胃泌素-CCB 受体, 证实 SGC-7901 细胞增殖受到明显抑制, 处于 S 期细胞比例减小, 处在信号通路中的 caspase-3 表达量显著增加, MMP-2 的表达量下降。转录因子是细胞分化与细胞周期的调节基因, 与凋亡调节基因一样, 在细胞信号转导中发挥重要作用。因此有研究人员<sup>[5]</sup>将 CUX1(转录因子)特异性的 siRNA 纳米粒复合物作用于胰腺癌模型小鼠, 结果显示下调 CUX1 表达显著增强 TRAIL(肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体)

和药物诱导细胞凋亡作用, 同时增强 PARP(多聚 ADP-核糖聚合酶)的分解和 caspase 活性。反之, CUX1 的表达则诱导 Akt/蛋白激酶 B 信号激活, 并且通过上调 BCL2 表达和下调肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达起到抗凋亡作用。同时, 有研究<sup>[6]</sup>显示一种参与细胞凋亡调节的丝氨酸/苏氨酸激酶 DAPK(死亡相关蛋白激酶)基因被 siRNA 封闭后, 具有 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 的激活特点, 依赖半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶诱导细胞凋亡, 并且上调肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)、DR4 和 DR5 的表达。AGR2 基因是一种与人类早期阶段前后位分化相关的基因, 也是肿瘤分化相关基因, 在细胞信号转导中发挥着重要作用, AGR2 基因的异常表达与乳腺癌的发生发展密切相关。因此有学者<sup>[7]</sup>利用 AGR2 特异性 siRNA 将其表达抑制, 结果显示 AGR2 的下调引起 Cyclin D1(细胞周期蛋白 D1)、survivin 和 c-Myc 的表达水平下调, 诱导乳腺癌 ZR-75-1 和 T47D 细胞凋亡。NF-kappa B 是一种重要的转录因子, 调控细胞因子、生长因子及细胞粘附分子等的基因表达, 与细胞信号转导密切相关。靶向 kappa B P65 的 RNAi 研究<sup>[8]</sup>显示, kappa B P65 表达的下调引起胰腺癌 BxPC-3 和 PANC-1 细胞中 Bcl-2 及 procaspase-3 蛋白表达下调, Bax 蛋白表达上调, 明显降低细胞活力, 增大细胞凋亡率。体内抗肿瘤实验中同样能抑制裸鼠移植模型的肿瘤细胞增殖。

### 1.2 基于肿瘤血管形成的 RNAi 治疗药物研究

肿瘤血管生成在恶性肿瘤的发生、发展、侵袭和转移中起重要作用。研究发现与肿瘤血管生成有关的因子有 30 余种, 如血管内皮生长因子、血管抑素、内皮抑素、纤维蛋白生长因子等, 其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 及其受体(VEGFR)能特异地促进细胞分裂、增殖及迁移, 在肿瘤新生血管生成过程中起着至关重要的作用<sup>[9]</sup>。

Zhou 等<sup>[10]</sup>将 VEGF 特异性 siRNA 转染人类卵巢癌 CaoV3 细胞系, 结果显示 VEGF 在 mRNA 和蛋白质水平表达均受到明显抑制, Caspase-3 活性增强, 侵入相关蛋白 MMP-9 和 MMP-2 表达显著下降, 细胞增殖及侵袭能力明显下降。同时也有研究<sup>[11]</sup>表明 VEGF 编码基因 VEGF-C 基因的表达也同样能被其特异性 siRNA 表达质粒所显著抑制。在人类结肠癌 HCT116 细胞系中, VEGF-

siRNA 显著下调 VEGF 蛋白表达, 抑制细胞增殖及转移, 诱导细胞凋亡<sup>[12]</sup>。另外靶向 VEGF 的 shRNA 在体内和体外实验中均表现出良好的 VEGF 表达抑制活性, 抑制肿瘤血管生成<sup>[13]</sup>。Tang 等<sup>[14]</sup>的研究表明 VEGF 特异性 siRNA 能够同时抑制 VEGF 和 HIF-1 $\alpha$ (乏氧诱导因子-1 $\alpha$ )的表达水平, 阻断肿瘤血管的生成。血管内皮生长因子受体(VEGFR)也在细胞分裂、增殖及迁移和肿瘤新生血管生成过程中起着重要的作用。Wang 等<sup>[15]</sup>的研究表明利用靶向 VEGFR-2 的 siRNA 将 VEGFR-2 基因沉默后, 能够降低 SKOV3 细胞中 LPA's 的入侵促进作用, 同时降低 DOV13 中基底水平细胞侵袭和 LPA 水平的入侵促进作用。Zhang 等<sup>[16]</sup>的研究表明 VEGFR 的 RNAi 重组腺病毒转染人肺腺癌细胞株 A549 后, VEGFR 表达水平显著降低, 细胞生长明显减缓, 肿瘤细胞生长受到明显抑制。

### 1.3 基于肿瘤细胞侵袭、浸润、转移的 RNAi 治疗药物研究

侵袭和转移是恶性肿瘤的本质特征, 也是导致治疗失败的主要原因。现代分子生物学研究揭示, 恶性肿瘤的侵袭和转移是一个多阶段多步骤的复杂过程, 有赖于肿瘤细胞的移动能力和它与宿主微环境之间的相互作用<sup>[17]</sup>。设计针对参与肿瘤细胞移动和转移等重要分子的 siRNA 将有望成为肿瘤的一种治疗手段。

粘蛋白 5AC(MUC5AC)分泌粘液, 通常在胃及支气管表面细胞表达, 在浸润性导管癌和胰腺上皮肿瘤高表达, 因此可能与肿瘤细胞粘附和侵袭相关。因此有学者<sup>[18]</sup>将靶向 MUC5AC 特异性 siRNA 转染人类胰腺癌 SW1990 和 BxPC3 细胞系, 实验结果表明细胞的黏附和侵袭能力显著下降, 并且侵袭相关基因 MMP-3 和 VEGF 的表达也显著下调。结果提示下调粘蛋白 5AC 的表达可降低胰腺癌细胞粘附和侵袭的能力。细胞运动能力增强与肿瘤转移相关, 埃兹蛋白(Ezrin)属于 ERM(ezrin/radixin/moe-sin)蛋白家族, 是一种细胞膜细胞骨架联接蛋白, 既能参与细胞的生长, 又可增加细胞运动能力, 导致肿瘤转移。研究<sup>[19]</sup>显示将 Ezrin 特异性重组 shRNA 表达载体转染入骨肉瘤 MG-63 细胞系后, Ezrin 在基因和蛋白水平表达均显著下调, 骨肉瘤细胞生长速度减慢, 处于分裂期的细胞比例明显下降。CD147 是免疫球蛋白超家族(IgSF)成员, 已有报道 CD147 在多种肿瘤细胞

和组织中高表达, 通过诱导基质金属蛋白酶(MMP)的分泌在肿瘤细胞的侵袭、浸润及转移中发挥重要作用<sup>[20]</sup>。相关研究<sup>[21-23]</sup>表明通过下调 CD147 的表达可降低细胞的侵袭、浸润及转移能力。在恶性黑色素瘤 A375 细胞株中, CD147 特异性 siRNA 能够明显下调其 mRNA 及蛋白质水平的表达, 同时降低肿瘤细胞的侵袭和转移能力。在卵巢癌 HO-8910 pm 细胞株中, 靶向 CD147 的 shRNA 表达质粒高效抑制 CD147 的表达, 降低肿瘤细胞侵袭和转移能力。在膀胱癌 T24 细胞中, 腺病毒介导的 CD147 特异性 siRNA 有效抑制 CD147mRNA 和蛋白的表达, 并且下调 MMP-2 和 MMP-9 和 VEGF 的表达, 降低细胞在体外的迁移, 侵袭能力。另外还有一些基因的高表达与肿瘤细胞的浸润、侵袭和转移相关。Pang 等<sup>[24]</sup>利用在大肠癌中高表达的 Bcl-xL 基因的特异性 siRNA 转染人大肠癌 HT29 细胞, 结果显示该基因在 mRNA 和蛋白水平表达被显著抑制后, 细胞 uPA 蛋白水平也明显下降, 大肠癌细胞恶性侵袭能力明显下降。同时, 有研究人员<sup>[25]</sup>利用趋化性细胞因子受体 CXCR4 的特异性 siRNA 下调 CXCR4 mRNA 及蛋白质水平的表达后, 细胞的体外侵袭力减弱, 增殖活性降低。另外, 有些基因可能共同在细胞侵袭与转移中起作用。Nalla 等<sup>[26]</sup>将靶向 MMP-9、uPAR(尿激酶型纤溶酶原激活剂受体)和 cathepsin B(组织蛋白酶 B) siRNA 干扰序列转染人类前列腺癌 PC3 和 DU145 细胞系, 结果显示 MMP-9、uPAR 和 CB 的表达下调, 细胞血管生成和侵袭受到明显抑制, 细胞凋亡。

### 1.4 基于肿瘤细胞凋亡的 RNAi 治疗药物研究

多细胞生物体的细胞数量恒定, 取决于细胞增殖和细胞凋亡之间的动态平衡, 肿瘤的发生和发展是这种平衡破坏的结果。肿瘤细胞常常是由于凋亡抑制基因的高表达和(或)凋亡活化基因的失活, 细胞凋亡受阻而形成。

死亡相关蛋白激酶 DAPK 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 参与调节细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞增殖。因此 Bai 等<sup>[6]</sup>将 DAPK 的特异性 siRNA 转染人类子宫内膜腺癌 HHUA 细胞, 结果显示肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)的分泌量显著增加, 肿瘤细胞活力被剂量依赖性抑制, 细胞凋亡。端粒是染色质的末端结构, 对维持染色质的长度和防止细胞衰老起保护作用, 而端粒酶, 可使不

断缩短的端粒恢复正常。在正常细胞中,端粒酶存在很少且活力较低,在增殖比较活跃的细胞中,端粒酶的活性会升高,因此可通过抑制端粒酶来诱导细胞凋亡。有研究<sup>[27]</sup>表明用端粒酶特异性 siRNA 表达载体抑制端粒酶基因表达后,细胞和动物肿瘤模型实验均显示肿瘤细胞凋亡显著增加。survivin 是凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis protein, IAPs)成员,参与了人类多种肿瘤的发生。研究<sup>[28-30]</sup>表明,survivin 基因的下调能够明显抑制多种肿瘤细胞增殖,诱导细胞凋亡。在膀胱癌细胞中,survivin 基因特异性 siRNA 有效下调 survivin 基因表达水平,显著的抑制了细胞增殖。在舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞中,靶向 survivin 基因的 shRNA 明显抑制 survivin mRNA 和蛋白质表达水平,显著抑制细胞增殖,并且增强细胞对顺铂的敏感性。同样,在肝癌 SMMC-7721 细胞中,靶向 survivin 的 shRNA 明显下调 survivin 基因 mRNA 和蛋白质表达水平,细胞阻滞在 G2/M 期,提高细胞凋亡率,增强细胞放射敏感性。Livin 基因是最新发现的凋亡蛋白(IAP)抑制物,对细胞生长,增殖和凋亡起着重要作用。因此,Yang 等<sup>[31]</sup>利用 Livin 基因的特异性 siRNA 下调 Livin 基因表达后,人类膀胱癌 T24 细胞的增殖和集落形成能力显著降低,T24 细胞凋亡。另外,与肿瘤发生发展密切相关的 COX-2 基因也是主要通过抑制细胞凋亡及机体抗肿瘤免疫等发挥作用,Zhang 等<sup>[32]</sup>的研究显示 COX-2 基因特异性的 siRNA 能够显著降低食管癌 EC109 细胞中 COX-2 蛋白表达,抑制细胞生长,诱导细胞凋亡。

### 1.5 基于肿瘤细胞耐药性的 RNAi 治疗药物研究

多药耐药机制 MDR(Multidrug resistance, MDR)是肿瘤化疗失败的主要原因。例如,编码一种跨膜药物泵蛋白的 MDR1 基因的高水平表达使癌细胞能够将各种结构不相关的化疗药物排出到细胞外,从而使细胞内的化疗药物浓度大大降低到亚毒性水平,因此有效抑制 MDR 相关基因的表达将能够大大提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。

为扭转肿瘤细胞的多药耐药,提高细胞对化疗药物的敏感性,Patutina 等<sup>[33]</sup>利用靶向 *mdr1b*、*mdr1a* 的特异性 siRNA 降低 *mdr1b*、*mdr1a* 的表达水平,在体内和体外实验中均能提高细胞对化疗药物的敏感性,明显减小肿瘤块体积。Lou 等<sup>[34]</sup>利用 MDR1 特异性 siRNA 降低人卵巢癌泰素耐药

细胞株 OVCAR8/TRMDR1 的表达,明显提高了细胞对泰素和阿霉素的敏感性。另外,有研究<sup>[35-36]</sup>表明靶向 MDR 的 siRNA 真核表达载体能够下调多药耐药骨肉瘤 KHOS(R2)、U-2OS(R2)细胞的 MDR 表达水平,和胃癌细胞的乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)的表达水平,逆转耐药表型,通过增加药物积累量来扭转细胞多药耐药能力,增强细胞对药物的敏感性。同样的,其他途径上的一些基因的异常表达也会导致细胞的多药耐药。有研究<sup>[37]</sup>利用 CD147 的特异性 shRNA 下调人类胃癌 SGC7901 细胞株 CD147 表达,能够有效抑制细胞增殖,并且提高细胞对顺铂的敏感性。同时,靶向 bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)siRNA 干扰序列下调 bFGF 的表达后,脑胶质瘤 U251、A172 和 LN229 细胞增殖能力降低,而对化疗药物的敏感性得以显著提高<sup>[38]</sup>。

RNAi 技术也可应用于一些抗肿瘤药理活性的研究中。有学者<sup>[39]</sup>利用 siRNA 技术获精脒/精胺乙酰转移酶(spermidine/spermine N1-acetyl transferase, SSAT)基因表达沉默的人 A549 肺癌细胞株,然后观察 SSAT 表达抑制后细胞对多胺类似物 CPENSpm(N1-cyclopropylmethyl-N11-ethyl norspermine)药物敏感性的改变,结果表明 SSAT 表达沉默的细胞对 CPENSpm(0~20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的药物敏感性显著低于对照细胞。提示 CPENSpm 诱导肿瘤细胞内 SSAT 高表达可能是其抗癌药理活性的分子基础之一。

为了解抗凋亡基因的表达与细胞耐药机制是否相关,Pang 等<sup>[40]</sup>利用靶向 KIAA0495/PDAM (P53 依赖凋亡因子)的 siRNA 沉默 PDAM 基因,结果显示胶质瘤细胞对长春新碱、洛莫司汀、替莫唑胺和紫杉醇的敏感性并无影响,但可诱导野生型 p53 神经胶质瘤细胞对顺铂耐药,提示抗凋亡基因的下调可能诱导顺铂耐药。

## 2 RNAi 在肿瘤基因治疗药物候选基因的发现和筛选中的应用

肿瘤基因治疗中,候选基因的确定过程是一个寻找候选基因,确认候选基因是否对疾病负责以及改变这个基因的表达是否能产生治疗效果的过程。随着 RNAi 相关知识和应用的积累, RNAi 技术已经得到越来越广泛的应用,作为一个高效的靶点搜寻和验证工具,将有望解决肿瘤基因治疗中的一些瓶颈问题<sup>[41]</sup>。

Stat3 基因是一种重要的核转录因子, 在多种肿瘤细胞中高表达, 参与细胞增殖、存活、转化、迁移等多个过程。因此可作为一些肿瘤基因治疗的潜在靶点。Verma 等<sup>[42]</sup>利用 RNAi 技术敲低人皮肤 T 细胞淋巴瘤(CTCLs)Hut78 细胞系 Stat3 的表达后, 发现细胞形态和化学改变, 细胞凋亡。此外, STAT3 蛋白的表达下调抑制 Bcl2 家族中抗凋亡基因 Bcl-xL 的表达。提示 STAT3 是人皮肤 T 细胞淋巴瘤(CTCLs)的基因治疗的一个潜在的理想靶向基因。而在人类慢性骨髓性白血病 K562 细胞中, 靶向 STAT3 慢病毒介导的 siRNA 下调 STAT3 蛋白表达水平后, 细胞生长和增殖受到抑制, 细胞周期阻滞, 形态学改变, 细胞凋亡<sup>[43]</sup>。提示 Stat3 是慢性骨髓性白血病基因治疗潜在的靶向基因。同样, 在人类脑胶质瘤干细胞(GSCs)中, 利用 RNAi 技术下调 STAT3 蛋白的表达后, GSCs 生长和增殖受到明显抑制, 人原发性 GSCs 中 Bcl-2 和 cyclin-D 的表达降低, CD133<sup>+</sup>细胞比例减少, 增加 GFAP 和 MBP 增加, 而且初级的 GSCs 形成肿瘤的能力降低<sup>[44]</sup>。实验数据显示 STAT3 在 GSCs 生长、细胞凋亡、分化和肿瘤发生中发挥重要作用, 由此提示 STAT3 是 GSCs 基因治疗的重要候选基因。

机体肿瘤的形成, 往往可能是由多种基因共同表达异常而致, 这就提示了某一种肿瘤的基因治疗可能存在两个以上的潜在靶点。例如, 乳腺癌的发生发展与催乳素受体(receptor of hPRL, hPRLR)表达上调所致错误的信号传导从而诱导乳腺上皮细胞的异常增殖相关。Mei 等<sup>[45]</sup>利用 RNAi 技术抑制了人类乳腺癌 MCF-7 细胞系中 hPRLR 基因及 PRLR 基因表达后, 肿瘤细胞扩散受到明显抑制。该结果提示 hPRLR 基因可能作为乳腺癌基因治疗的一个潜在的重要候选基因。另有研究<sup>[46]</sup>显示腺嘌呤核苷酸转运体 ANT2 在增殖细胞中高表达, 与癌细胞糖酵解代谢和癌变有关, 利用 RNAi 干扰技术抑制 ANT2 在乳腺癌细胞株 MDAMB-231 中的过度表达后细胞生长及扩散受到明显抑制, 细胞周期被阻滞。由此提示 ANT2 是乳腺癌基因治疗的另一个潜在靶向基因。雌激素应答基因(Efp)与细胞周期调节、基因转录、细胞分化及肿瘤生成等多种细胞功能调节有关, 与乳腺癌的形成密切相关。相关研究<sup>[47]</sup>显示 DNA 修饰的靶向 Efp 的 siRNA(嵌合 siEfp), 在体内和

体外均能显著抑制 MCF-7 细胞增殖, 阻滞细胞周期, 并且能够增加 14-3-3sigma 的表达。提示 Efp 是乳腺癌基因治疗的又一分子靶点。

RNAi 技术也为胶质瘤的基因治疗候选基因的筛选提供了强大武器。EphB4 是蛋白酪氨酸激酶受体家族中的成员, 与肿瘤的发生和进展关系密切。利用 RNAi 技术封闭人恶性胶质瘤 U251 细胞系中 EphB4 基因后, 细胞增殖受到严重影响, 迁移和侵袭能力被不同程度的抑制<sup>[48]</sup>。该结果提示 EphB4 蛋白可作为脑胶质瘤的分子水平治疗新的靶向基因。另有研究<sup>[49]</sup>表明 CypA(亲环素)特异性 siRNA 敲低 U87vIII 细胞系中 CypA 的表达后, 细胞的扩散, 渗透, 迁移及生长能力显著降低, 瘤细胞在裸鼠体内生长受到抑制, 白细胞介素 IL-8 的表达下调。该结果提示 CypA 是胶质母细胞瘤基因治疗的又一个有效作用靶位点。

### 3 RNAi 肿瘤治疗药物临床研究进展

RNAi 具有强大的抑制基因表达的效应和高度的特异性, 而引起生物学界几乎所有研究者的广泛兴趣。RNAi 技术迅速从实验室推进到临床。首先, 人基因组项目的完成使得有可能设计能沉默任何基因的 iRNA。其次, 笔者认识到许多新的靶标对小分子药物或生物药物是难以接近的。因此, 设想出一种在 mRNA 水平上影响这些靶标的方法就具有极大的吸引力。

RNAi 技术在很短的时间内迅速从体外细胞、动物试验发展到临床试验, 第 1 个临床试验是由 Acuity Pharmaceuticals 公司于 2004 年底开发的靶向 VEGF 的 siRNA 用于治疗老年性黄斑变性(AMD), 并且发展迅速。siRNA 作用于癌症的首例临床研究是 Calando 公司的用于治疗实体肿瘤的 CALAA01, 已于 2008 年 5 月获 FDA 批准进入 I 期临床。CALAA01 是包被在环糊精-转铁蛋白-AD-PEG 纳米颗粒中的靶向核糖核苷酸还原酶 M2 亚基的 siRNA, 通过降低核糖核苷酸还原酶 M2 亚基的表达从而起到抑制肿瘤生长, 缩小肿瘤体积的作用<sup>[50]</sup>。啮齿类及灵长类动物的研究显示, CALAA01 具有抗肿瘤活性且安全性良好, I 期临床试验中 36 例实体瘤患者接受为期 21 d 的静脉注射循环治疗<sup>[51]</sup>。2009 年 3 月, Alnylam 公司也开展了用于治疗肝癌的 RNA 干扰药物 ALN-VSP02 的 I 期临床试验<sup>[52]</sup>。该药物是包被在脂质体中靶向 KSP(纺锤体驱动蛋白)和 VEGF(血管内皮生长

因子)的 siRNA, 通过阻滞细胞周期和抑制肿瘤血管生成以达到抑制肿瘤生长增殖的目的。I 期临床试验中 58 例肝癌患者接受每两周一次的静脉注射治疗。

#### 4 RNAi 作为基因治疗药物存在的问题及展望

RNAi 作为一门新兴技术正显示着强大的生命力。众多基础和临床研究表明, 此类药物开发潜力巨大。RNAi 药物在基因疾病、肿瘤等人类束手无策的疾病上显现出极大的应用前景, 但目前 RNAi 的治疗途径还不成熟, 仍然有许多问题需要克服。siRNA 作为药物的主要障碍在于药物运送系统及给药方式、siRNA 靶向性和脱靶效应、体内不稳定状态及干扰素效应以及药物安全性等问题。因此提高 siRNA 转染效率, 维持在体内的有效浓度及稳定状态, 开发一个安全高效的运载系统成为科研工作者和临床医师迫切关注的问题。

药物投递方式是 RNAi 技术最大的技术瓶颈。各种新型投递系统层出不穷, Creusat 等<sup>[53]</sup>研究了聚乙烯亚胺载体的运送机制和运送效率的影响因素, 有助于聚乙烯亚胺运送系统更有效地传递 siRNA。研究<sup>[54-56]</sup>报道了脂质修饰的葡聚糖聚合物纳米粒子、聚乙二醇修饰的葡聚糖纳米粒子、多壳磷酸钙- shRNA 的聚电解质多层膜纳米粒子及介孔硅微粒等都可以作为 siRNA 的有效运送系统。另有研究<sup>[57]</sup>显示微泡与超声辐照联合可以有效地抑制卵巢癌 SKOV-3 细胞 survivin 表达并诱导细胞凋亡, 为 siRNA 体内传送提供了一个新的有前景的运送方式。虽然投递系统是 RNAi 药物目前面临的主要挑战, 却绝不是唯一一个必须解决的问题<sup>[41]</sup>。由于小 RNAs 是细胞内部天然存在的基因调控元件, 因此使用 RNAi 技术进行治疗很容易扰乱目前尚不明晰的细胞信号通路构成的网络。更严重的问题在于 RNA 病毒与真核细胞之间存在漫长的共同进化史, 所以人体具有一套顽强的抵抗外源性 RNA 侵入的免疫反应机制, 特别是针对小分子的双链 RNA。RNAi 能够刺激 Toll 样受体, 引发干扰素反应, 导致出现混乱的临床试验结果, 甚至对易感体制的患者产生不良反应。其次, siRNA 因其相对分子质量小, 容易被肾透析并很快清除, 也容易被内源性的血浆 RNA 酶降解而在体内极不稳定。一般需要对 RNA 干扰分子进行一些化学修饰或是将其包裹于保护微粒中以提高其稳定性。另外, 安全性也是 RNAi 药物临床应用的

难题。

RNAi 理论的提出和 RNAi 技术的建立为肿瘤的反向性基因治疗提供了强大的武器, 尽管目前还存在上述尚未解决的问题, 限制了 RNAi 的治疗应用, 但笔者认为随着各种技术的完善, 解决好 siRNA 的有效性、稳定性及安全性问题, 同时创建一种安全、有效的导入模式, RNAi 将有望更广泛地应用于基因功能研究、基因治疗及新药开发等领域。RNAi 的研究与应用具有极其重要的理论和实际意义, 将对医学生物学的发展产生深远的影响。

#### REFERENCES

- [1] SCHWARZ D S, DING H, KENNINGTON L, et al. Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide diance [J]. PLoS Genetics, 2006, 2(9): 1307-1318.
- [2] SONG E W. The Biological Principles and Application of RNA Interferences(RNA干扰的生物学原理与应用) [M]. Vol 1. Beijing: Higher Education Press, 2005: 66-72.
- [3] FUKUMOTO T, KUBOTA Y, KITANAKA A, et al. Gab1 transduces PI3K-mediated erythropoietin signals to the Erk pathway and regulates erythropoietin-dependent proliferation and survival of erythroid cells [J]. Cell Signal, 2009, 21(12): 1775-1783.
- [4] ZHOU J J, CHEN M L, ZHANG Q Z. Blocking gastrin and CCK-B autocrine loop affects cell proliferation and apoptosis *in vitro* [J]. Mol Cell Biochem, 2010, 343(1/2):133-141.
- [5] RIPKA S, NEESSE A, RIEDEL J, et al. CUX1: target of Akt signalling and mediator of resistance to apoptosis in pancreatic cancer [J]. Gut, 2010, 59(8): 1101-1110.
- [6] BAI T, TANAKA T, YUKAWA K. Targeted knockdown of death-associated protein kinase expression induces TRAIL-mediated apoptosis in human endometrial adenocarcinoma cells [J]. Int J Oncol, 2010, 37(1): 203-213.
- [7] VANDERLAAG K E, HUDAK S, BALD L. Anterior gradient-2 plays a critical role in breast cancer cell growth and survival by modulating cyclin D1, estrogen receptor-alpha and surviving [J]. Breast Cancer Res, 2010, 12(3): 32-37.
- [8] KONG R, SUN B, WANG S J, et al. An experiment I study of gemcitabine inducing pancreatic cancer cell apoptosis potentiated by nuclear factor-kappa B P65 siRNA [J]. Chin J Surg(中华外科杂志), 2010, 48(2): 128-133.
- [9] MEDINGER M, FISCHER N, TZANKOV A. Vascular endothelial growth factor-related pathways in hemato-lymphoid malignancies [J]. J Oncol, 2010, 10(15): 725-729.
- [10] ZHOU J, GAN N, ZHANG W, et al. Proliferation suppression and apoptosis of ovarian carcinoma cells induced by small interfering RNA against vascular endothelial growth factor [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2010, 36(2): 232-238.
- [11] GU F, ZOU Q, NI Q X. VEGF-C siRNA induces apoptosis and inhibits growth of human breast cancer cell line MDA-MB-435 [J]. J Surg Concept Pract(外科理论与实践), 2008, 13(2): 133-136.
- [12] YIN Y, CAO L Y, WU W Q, et al. Blocking effects of siRNA on VEGF expression in human colorectal cancer cells [J].

- World J Gastroenterol, 2010, 16(9): 1086-1092.
- [13] YOO J Y, KIM J H, KWON Y G, et al. VEGF-specific short hairpinRNA expressing oncolytic Aden ovirns elicits potent inhibition of angiogenesis and tumor growth [J]. Mol Ther, 2007, 15(2): 295-302.
- [14] TANG X, ZHANG Q, NISHITANI J, et al. Overexpression of human papilloma virus type 16 oncoproteins enhance shpwnda-inducible factor1 alpha protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(9): 2568-2576.
- [15] WANG F Q, BARFIELD E, DUTTA S, et al. VEGFR-2 silencing by small interference RNA (siRNA) suppresses LPA-induced epithelial ovarian cancer (EOC) invasion [J]. Gynecol Oncol, 2009, 115(3): 414-423.
- [16] ZHANG G X, HOU X L, LI BAI L, et al. Vascular endothelial growth factor receptor targeted RNA interference inhibits growth of human lung adenocarcinoma cells [J]. Acad J Second Mil Med Univ(第二军医大学学报), 2008, 29(10): 1153-1156.
- [17] RUFFINIPA, MORANDIP, CABIOGLUN. Manipulating the chemokine-chemokine receptor network to treat cancer [J]. Cancer, 2007, 109(12): 2392-2404.
- [18] YAMAZOE S, TANAKA H, SAWADA T, et al. RNA interference suppression of mucin 5AC (MUC5AC) reduces the adhesive and invasive capacity of human pancreatic cancer cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29(1): 53-58.
- [19] XIE B Z, CHEN A M, GUO F J, et al. The influence of down-regulation of Ezrin expression by short hairpin RNA on the proliferation and invasion of osteosarcoma [J]. China Oncol(中国癌症杂志), 2008, 18(2): 81-85.
- [20] MOONSOM S, TAYAPIWATANA C, WONGKHAM S, et al. A competitive ELISA for quantifying serum CD147: reduction of soluble CD147 levels in cancer patient sera [J]. Hybridoma (Larchmt), 2010, 29(1): 45-52.
- [21] CHEN X, LIN J, KANEKURA T, et al. A small interfering CD147-targeting RNA inhibited the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of malignant melanoma [J]. Cancer Res, 2006, 66(23): 11323-11330.
- [22] ZOU W, YANG H, HOU X, et al. Inhibition of CD147 gene expression via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumorigenicity and increases chemosensitivity to paclitaxel in HO-8910pm cells [J]. Cancer Letters, 2007, 248(2): 211-218.
- [23] XUE Y J, LU Q, SUN Z X. CD147 overexpression is a prognostic factor and a potential therapeutic target in bladder cancer [J]. Med Oncol, 2010, May 28(Epub ahead of print).
- [24] PANG L Q, FAN Y, JIANG P C. Effects of RNA interference Bcl-xL gene on invasion of human colon cancer cell [J]. J Fudan Univ Med Sci(复旦学报 医学版), 2009, 36(1): 74-78.
- [25] ZHANG M X, HAN N, YU S Y. Effect of siRNA to inhibit chemokine receptor CXCR4 expression on invasion capability of human lung cancer cells *in vitro* [J]. Tumor(肿瘤), 2008, 28(5): 378-381.
- [26] NALLA A K, GORANTLA B, GONDI C S, et al. Targeting MMP-9, uPAR, and cathepsin B inhibits invasion, migration and activates apoptosis in prostate cancer cells [J]. Cancer Gene Ther, 2010, 17(9): 599-613.
- [27] ZAFFARONI N, PENNATI M, FOLINI M. Validation of telomerase and survivin as anticancer therapeutic targets using ribozymes and small-interfering RNAs [J]. Methods Mol Biol, 2007(361): 239-263.
- [28] WANG X L, HOU J Q, WEN D G, et al. Effects of survivin small interfering RNA on biological behaviors of bladder cancer T24 Cells [J]. Chin J Cancer(癌症), 2008, 27(3): 253-257.
- [29] XU J H, WANG A X, HUANG H Z, et al. Survivin shRNA induces caspase-3-dependent apoptosis and enhances cisplatin sensitivity in squamous cell carcinoma of the tongue [J]. Oncol Res, 2010, 18(8): 377-385.
- [30] YANG W, SUN T, CAO J, et al. Survivin downregulation by siRNA/cationic liposome complex radiosensitizes human hepatoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Radiat Biol, 2010, 86(6): 445-457.
- [31] YANG D, SONG X, ZHANG J, et al. Suppression of livin gene expression by siRNA leads to growth inhibition and apoptosis induction in human bladder cancer T24 cells [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(5): 1039-1044.
- [32] ZHANG L, ZHANG S T, YU Z L, et al. The effect of RNA interference silencing cyclooxygenase-2 gene on proliferation and apoptosis of esophageal squamous carcinomas EC109 cell [J]. J Cap Inst Med(首都医科大学学报), 2008, 29(3): 295-299.
- [33] PATUTINA O, MIRONOVA N, POPOVA N, et al. The siRNA targeted to mdr1b and mdr1a mRNAs *in vivo* sensitizes murine lymphosarcoma to chemotherapy [J]. BMC Cancer, 2010, 10(1): 204-207.
- [34] LOU J Y, PENG Z L, ZHENG Y, et al. Improve the chemo sensitivity of resistant ovarian cancer cell by small RNA interference [J]. Acta Acad Med Sichuan(四川医科大学学报), 2008, 39(3): 388-390.
- [35] PRIEBSCH A, ROMPE F, TONNIES H, et al. Complete reversal of ABGC2-dependending atypical multidrug resistance by RNA interference in human carcinoma cells [J]. Oligonucleotides, 2006, 16(3): 263-274.
- [36] SUSA M, IYER A K, RYU K, et al. Inhibition of ABCB1 (MDR1) expression by an siRNA nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in osteosarcoma [J]. PLoS One, 2010, 5(5): 764-769.
- [37] WANG B, XU Y F, HE B S, et al. RNAi-mediated silencing of CD147 inhibits tumor cell proliferation, invasion and increases chemosensitivity to cisplatin in SGC7901 cells *in vitro* [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29(1): 61-66.
- [38] FENG X, ZHANG B, WANG J, et al. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against basic fibroblast growth factor mRNA enhances the sensitivity of glioblastoma cells to chemotherapy [J]. Med Oncol, 2011, 28(1): 24-30.
- [39] HAN Y, REN Y S, CAO C Y, et al. Silence of spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase expression by siRNA decreases sensitivity of human A549 lung cancer line to antitumor polyamine analogue CPENSp<sub>m</sub> [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(1): 5-10.
- [40] PANG J C, LI K K, LAU K M, et al. KIAA0495/PDAM Is frequently downregulated in oligodendroglial tumors and its knockdown by siRNA induces cisplatin resistance in Glioma Cells [J]. Brain Pathol, 2010, 20(6): 1021-1032.
- [41] KRISHNARAO A. RNA Interference Technology [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2005: 301-329.
- [42] VERMA N K, DAVIES A M, LONG A, et al. STAT3 knockdown by siRNA induces apoptosis in human cutaneous T-cell lymphoma line Hut78 via downregulation of Bcl-XL [J]. Cell Mol Biol Lett, 2010, 15(2): 342-355.
- [43] MA L D, ZHOU M, WEN S H, et al. Effects of STAT3 silencing on fate of chronic myelogenous leukemia K562 cells [J]. Leuk Lymphoma, 2010, 51(7): 1326-1336.
- [44] LI G H, WEI H, LV S Q, et al. Knockdown of STAT3 expression by RNAi suppresses growth and induces apoptosis and differentiation in glioblastoma stem cells [J]. Int J Oncol,

- 2010, 37(1): 103-112.
- [45] MEI P, QIN J W. Inhibition of cell proliferation by siRNA targeting hPRLR in breast cancer MCF-7 cell line [J]. J Nanjing Med Univ(南京医科大学学报), 2007, 21(6): 372-376.
- [46] JANG J Y, CHOI Y, JEON Y K, et al. Suppression of adenine nucleotide translocase-2 by vector-based siRNA in human breast cancer cells induces apoptosis and inhibits tumor growth *in vitro* and *in vivo* [J] Breast Cancer Res, 2008, 10(1): 526-533.
- [47] UEYAMA K, IKEDA K, SATO W, et al. Knockdown of Efp by DNA-modified small interfering RNA inhibits breast cancer cell proliferation and *in vivo* tumor growth [J]. Cancer Gene Ther, 2010, 17(9): 624-632.
- [48] ZHANG Y R, DONG W L, HU J, et al. The effect of RNA interference-mediated down-regulation of EphB4 on the growth of malignant glioma cell line U251 [J]. Tumor, 2008, 28(12): 1042-1046.
- [49] SUN S, WANG Q, GIANG A, et al. Knockdown of CypA inhibits interleukin-8 (IL-8) and IL-8-mediated proliferation and tumor growth of glioblastoma cells through down-regulated NF-kappaB [J]. J Neurooncol, 2011, 101(1): 1-14.
- [50] CASTANOTTO D, ROSSI J J. The promises and pitfalls of RNA interference-based therapeutics [J]. Nature, 2009, 457(7228): 426-433.
- [51] EIFLER A C, THAXTON C S. Nanoparticle therapeutics: FDA approval, clinical trials, regulatory pathways, and case study [J]. Methods Mol Biol, 2011, (726): 325-338.
- [52] Alnylam Pharmaceuticals. Does Escalation trial to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous ALN-VSPO2 in patients with advanced solid tumors with liver involvement [R/OL]. First Received on April 15, 2009. <http://www.clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00882180>.
- [53] CREUSAT G, RINALDI A S, WEISS E, et al. Proton sponge trick for pH-sensitive disassembly of polyethylenimine-based siRNA delivery systems [J]. Bioconjug Chem, 2010, 21(5): 994-1002.
- [54] NAEYE B, RAEMDONCK K, REMAUT K, et al. PEGylation of biodegradable dextran nanogels for siRNA delivery[J]. Eur J Pharm Sci, 2010, 40(4): 342-351.
- [55] ZHANG X, KOVTUN A, MENDOZA-PALOMARES C, et al. SiRNA-loaded multi-shell nanoparticles incorporated into a multilayered film as a reservoir for gene silencing [J]. Biomaterials, 2010, 31(23): 6013-6018.
- [56] TANAKA T, MANGALA L S, VIVAS-MEJIA P E, et al. Sustained small interfering RNA delivery by mesoporous silicon particles [J]. Cancer Res, 2010, 70(9): 3687-3696.
- [57] WANG J J, ZHENG Y, YANG F, et al. Survivin small interfering RNA transfected with a microbubble and ultrasound exposure inducing apoptosis in ovarian carcinoma cells [J]. Int J Gynecol Cancer, 2010, 20(4): 500-506.

收稿日期: 2010-11-16