

小干扰 RNA 介导的多靶点肿瘤治疗

邵荣光*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 在各种不同的肿瘤中估计有多达数百个基因失调, 但大多数肿瘤治疗是针对单癌基因。近来, 肿瘤治疗模式发生了变化, 已开始思考从单靶点治疗向多靶点治疗转变。有相当多的证据表明, 多靶点治疗比单靶点治疗有较高的成功可能性, 多靶点治疗将是今后最有吸引力的肿瘤治疗策略。本文综述了小干扰 RNA 在多靶点肿瘤治疗中的作用。

关键词: 小干扰 RNA; 基因沉默; 多靶点; 增效作用; 肿瘤治疗

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 03-0219-07

Small interfering RNA mediated multi-target therapy of cancer

SHAO Rong-guang*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and
Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: It has been reviewed that as many as hundreds genes are dysregulated in various kinds of cancers, yet most therapies are targeted toward a single gene. Recently, the mode of cancer treatment has been changed by a shift in thinking from mono-target to multi-target therapies. There is considerable evidence that these have a higher possibility of success than mono-target therapy, and multi-target therapy should remain the most attractive avenue for future treatment strategies. In this article, we attempt to provide evidence for the role of small interfering RNA in multi-target therapy of cancer.

Key words: siRNA; gene silencing; multi-target; synergic action; cancer therapy

1 引言

人们曾一度认为抑制单一分子靶点肿瘤细胞就会受到致命的攻击, 但后来的研究发现这样的结论并不圆满。就实体肿瘤而言, 现在普遍认为针对单一靶点并不足以遏制肿瘤的进展。临床治疗试验显示多靶点抑制优于单靶点抑制, 如在阻断新生血管生成的同时直接抑制肿瘤细胞生长, 不仅能减少传统治疗的毒副作用, 还能摆脱单靶点治疗可能带来的耐药性, 多靶点抑制已成为肿瘤治疗的发展方向。多靶点抑制在癌症治疗中已经得到益处, 传统的化疗药物经常被

作为常规的联合治疗药物。例如, 辅助治疗剂可以增强癌细胞对 DNA 损伤药物的敏感性, 较新的联合疗法包括 5-氟尿嘧啶、叶酸和奥沙利铂, 用于大肠癌治疗。目前, 分子靶向药物如赫赛汀 (herceptin) 和爱必妥 (erbitux) 单抗正在用于与传统抗肿瘤药物、雌激素阻断剂以及其他靶向剂的联合治疗。如靶向 ErbB2 (HER-2/neu) 的赫赛汀与抗血管内皮生长因子抗体阿瓦斯汀 (avastin) 联合治疗乳腺癌, 爱必妥 (靶向 ErbB1) 与依立替康组合用于治疗结肠直肠癌。正处于临床开发阶段的新型受体酪氨酸激酶抑制剂是拥有多靶点功能作用的单一化学实体, 其中 lapatinib 和 canertinib 是这类新的泛 ErbB 抑制剂, 这些具有多靶点作用的新型抑制剂一旦进入市场必将与其他分子靶向或传统化疗药物联合用于肿瘤治疗^[1]。

收稿日期: 2009-01-05.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (2009CB521807); 国家自然科学基金资助项目 (30772583); 教育部博士点基金资助项目 (20070023017).

*通讯作者 Tel: 86-10-63026956, E-mail: shaor@public3.bta.net.cn

RNA 干扰技术是重要的生物学研究工具,在基因功能和生物信号途径等研究中发挥重要作用,在基因治疗方面也显示出巨大的潜力^[2]。RNA 干扰技术在肿瘤研究中的应用主要包括以下几个方面。① 基因功能研究:由于 RNA 干扰能高效特异地阻断基因表达,因而成为研究基因功能很好的工具。② 基因敲除:RNA 干扰能高效特异地阻断基因的表达,在体外培养细胞中研究靶基因的功能。③ 基因表达调控:在细胞发育过程中通过 RNA 干扰关闭或开放基因表达,引导细胞的分化。④ 肿瘤发生机制研究:设计多种小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA),可以产生多基因沉默的效果,用于细胞信号传导通路的研究。⑤ 抗肿瘤新药研发:以癌基因为靶点的 RNA 干扰剂与靶 mRNA 的特异性区域相互作用,抑制肿瘤的生长。本文着重介绍 siRNA 在多靶点肿瘤治疗中的研究进展。

2 RNA 干扰机制

RNA 是生物体内最重要的物质基础之一,它与 DNA 和蛋白质一起构成生命的框架。越来越多的证据清楚地表明, RNA 在生命的进程中扮演的角色远比我们早前设想的更为重要。RNA 干扰在细胞分裂过程中发挥了至关重要的控制作用,对引导细胞形成某种特定类型的组织产生深远的影响。RNA 干扰的发现使得人们对 RNA 调控基因表达的功能有了全新的认识。RNA 干扰技术是一种强大的生物实验工具,其原理是通过利用具有同源性的双链 RNA 诱导序列特异的目标基因的沉默,迅速阻断基因活性。其中 siRNA 和微小 RNA (miRNA) 是两种序列特异性地转录后基因表达的调节因子,它们的相关性密切,既具有相似性,又具有差异性。siRNA 是在 RNA 干扰过程中双链 RNA 转变或人工体外合成的小片段 RNA,由约 21 个碱基对组成。siRNA 在 RNA 沉默通道中起中心作用,对特定 mRNA 进行降解。在哺乳动物中利用 siRNA 和短发夹 RNA (short hairpin RNAs, shRNA) 进行 RNA 干扰以使基因沉默已经成为强大而有力的生物工具。RNA 干扰能在极低浓度 siRNA 存在下显示出特殊有效性。

肿瘤细胞中调节细胞增殖、凋亡、细胞周期和信号转导等的肿瘤相关基因都可作为肿瘤治疗药物的靶分子。具有抗肿瘤作用的 RNA 干扰剂的靶基因大致包括:① 原癌基因,如 ras、raf、bcr-abl、c-myc、bcl-2 等;② 生长因子受体,如 EGFR、PDGF、VEGFR 和 TGF- β 等;③ 蛋白激酶,如 PKC、IP-3K 和蛋白激酶 A (PKA) 等;④ 蛋白酶和蛋白酶受体,如基质

金属蛋白酶、尿激酶血纤蛋白溶酶原激活因子等;⑤ 细胞周期调控因子,如 p21、p16、cdk 和 chk 等;⑥ 耐药基因,如 MDR-1、DHFR 和 MGMT 等;⑦ 其他,如端粒酶以及其他肿瘤相关基因等。常见的 RNA 干扰靶点也可以按照其功能进行分类,如基因稳定性、肿瘤发生发展、肿瘤侵袭与转移等(表 1)。

表 1 部分常见的 RNA 干扰靶基因

类别	靶基因	细胞系
基因稳定性	RAD51、ERCC1	卵母细胞、COS-7、果蝇
	ERCC2、ATR	S2、NBS1、FA 细胞
肿瘤发生与发展	K-RAS、EGFR	XAPAN-1、A431、COS-1、
	C-MYC、HBV mRNA、HuH-7、SiHa、SL2、E6、Rb、INK4A、Mdm-2	MCF-7、HeLa、HCT116
肿瘤侵袭与转移	CXCR-4、FOS	MDA-MB-231、HCT116、MMP-9、EphA2
肿瘤血管形成	RECK、Tie-2	SNB16、PANC1
肿瘤细胞凋亡	CL-1、内皮细胞	
肿瘤免疫	Livin、Bcl-2、XIAP	HeLa、MeWo、H1299、MCF-7
	PKB、IL-6	Hep3B、动物细胞

(自: Frontiers in Bioscience 2005,10)

用 RNA 干扰技术研究出来的基因治疗药物与其他基因治疗药物和生物治疗药物不同,具有治疗理论新颖,作用机制独特,基因水平治疗,是内源性活性物质,用药安全,可根据不同病情设计个体化治疗方案等特点。

3 不同 siRNA 之间的增效作用

由于肿瘤是一种多基因调控的疾病,采用 RNA 干扰技术对肿瘤相关基因进行多重抑制会产生更好的疗效。作者针对不同的肿瘤相关基因,设计合成了靶向 bcl-2、cdk-2、mdm-2、H-ras、pkc- α 的 siRNA,这些 siRNA 各自都能抑制黑色素瘤细胞的增殖,其抑制率分别为 68%、64%、72%、74% 和 53%。当 5 种 siRNA 联合应用时,能显著提高复合 siRNA 对黑色素瘤细胞的抑制作用^[3]。

转化生长因子 β (TGF- β) 是一种多功能细胞因子,它传递许多抑制细胞生长的信号。在许多细胞中,由 TGFBR2、TGFBR1 和 Smad 转录因子受体复合的 TGF- β 信号介导 TGF- β 的生长抑制效应。TGF- β 的细胞生长抑制效应在肿瘤发展过程中丢失, TGF- β -Smad 途径信号分子基因与表型的变化已经在许多肿瘤中被证实。Jazag 等^[4]用一种简单的、限制性内切酶产生的稳定 RNA 干扰技术,通过单一的 RNA 干扰表达载体有效地沉默 TGF- β 通路相关的多种 Smad 靶分子。细胞转染该表达载体后,同时引起 Smad2、

Smad3 和 Smad4 蛋白水平的稳定下调, 可见 TGF- β 依赖性细胞功能不同表型的改变, 如侵袭、划痕愈合和细胞凋亡等。该方法最适合分析复杂信号转导通路中沉默单一基因无法解释的整体过程。

信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) 在细胞的生长、凋亡和转化中发挥重要作用。STAT3 在多种癌细胞 (包括小鼠黑色素瘤 B16 细胞) 中高度活化, 并提高 c-myc 基因的表达, 因此 STAT3 是一个有希望的肿瘤治疗分子靶点。Hong 等^[5]用大肠杆菌表达和酶降解的方法, 制备了靶向 c-myc 和 STAT3 的 siRNA, 即 esiC-MYC 和 esiSTAT3。这些 siRNA 单独或联合处理小鼠黑色素瘤 B16 细胞, 显示 esiC-MYC 和 esiSTAT3 都能抑制 B16 细胞的生长, 抑制率大约为 34% 和 36%, 在相同剂量下, 二者联合应用的抑制率显著提高至 62%。体内实验表明, esiC-MYC 或 esiSTAT3 对小鼠黑色素瘤生长的抑制率分别为 62% 和 51%, esiC-MYC/esistat3 联合治疗比单一治疗有更好的抑制效果, 其抑制率可高达 81%。

由 siRNA 下敲 XIAP、Bcl-2 和 Bcl-x1 蛋白是一个有前途的膀胱癌治疗方法, 因为过度表达的抗凋亡基因往往与肿瘤进展和治疗的抗药性有关。Kunze 等^[6]用靶向 XIAP、Bcl-2 和 Bcl-x1 的 siRNAs 转染膀胱癌 EJ28 细胞, 无论是单独或联合处理, siRNA 介导的这些靶点的抑制能降低靶蛋白的表达、减少细胞的生长和增强细胞对化疗药物的敏感性。肿瘤细胞通过改变他们的表达谱可能会绕过单一基因的抑制, 因此联合下敲信号途径相同的多个基因可能更有效地杀死癌细胞。

靶向人端粒酶逆转录酶 (hTERT) mRNA 的 shRNA 表达质粒在体内对肿瘤细胞的生长抑制率可以达到 76.5%。为了最大限度地发挥 shRNA 干扰效率, Chen 等^[7]构建了多基因 shRNA 表达载体, 在癌细胞中同时表达针对 VEGF、hTERT 和 Bcl-x1 三种不同基因的 shRNA, 然后直接注射到裸鼠异种移植 Hep-2 肿瘤体内, 结果发现多基因 shRNA 表达载体显著降低 VEGF、hTERT 及 Bcl-x1 mRNA 和蛋白表达。肿瘤生长曲线显示 shRNAs 对肿瘤治疗效果明显好于对照组和非转染组。处理 14 d 后, shRNAs 对肿瘤的生长抑制率为 91.2%。研究结果表明, 基于 RNA 干扰技术的多靶点肿瘤治疗将是一个大有可为的肿瘤基因治疗方案。

4 siRNA 对靶分子药物的增效作用

尽管表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂埃罗替尼 (erlotinib) 被批准在临床上应用, 但大多数晚期

肺癌患者不应答, 早期肺癌患者总是发展为耐药性, 占一半的复发患者 T790M-EGFR 基因发生了突变。研究发现, 肝细胞生长因子受体 (MET) 在肺癌细胞 (包括 H1975 细胞) 中高表达, 往往同时伴随 EGFR 的高表达。埃罗替尼耐药的肺癌 H1975 细胞表达顺式 L858R/T790M-EGFR, 而常规的 H1975 细胞表达野生型 MET。小分子 MET 抑制剂 SU11274 有显著的体外促埃罗替尼耐药的 H1975 细胞凋亡作用, 比埃罗替尼高 3.9 倍, 但不影响 MET 和 EGFR 阴性的 H520 细胞。生物分子成像检测显示, 在体内 SU11274 也显著抑制小鼠移植肿瘤 H1975 的生长。SU11274 增强埃罗替尼对下游细胞增殖生存信号 MET 的抑制作用。采用 RNA 干扰技术, 在 H1975 细胞中下敲 MET 或/和 EGFR, 结果显示共同下敲 MET 和 EGFR 可以加强 MET/EGFR 双信号通路的下游抑制作用。这种基于 MET 的靶向抑制作用可能是一个潜在的 T790M-EGFR 介导埃罗替尼耐药的肺非小细胞肺癌治疗手段^[8]。

血管生成在多发性骨髓瘤 (MM) 的发生和发展过程中发挥重要作用, MM 细胞分泌血管内皮生长因子 VEGF, 从而进一步促进肿瘤细胞的增殖。Koldehoff 等^[9]利用 siRNA 干扰 VEGF, 并评价 VEGF 下敲后是否能够提高 26S 蛋白酶体抑制剂硼替佐米 (bortezomib) 的作用。转染 VEGF siRNA 后, 可见 OPM-2、RPMI-8226、INA-6、Jurkat、Raji、Karpas-299 和 MM 细胞中 VEGF 的表达都有下降。VEGF siRNA 显著诱导 OPM-2、RPMI-8226 和 INA-6 细胞凋亡。VEGF siRNA 和硼替佐米联合处理 MM 细胞, 结果协同抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡, 明显强于 VEGF siRNA 或硼替佐米单独处理。此外, VEGF siRNA 和硼替佐米联合处理能逆转 MDR-1 基因依赖性 MM 细胞耐药。结果表明小分子蛋白酶抑制剂与 VEGF siRNA 联合应用可提高抗肿瘤活性, VEGF 可能是多发性骨髓瘤治疗的一个分子靶点。

抗凋亡蛋白 Survivin 在不同肿瘤细胞中广泛表达, 包括肝癌细胞, 结果导致这些肿瘤细胞对不同的凋亡刺激产生耐受。TRAIL 能够诱导肿瘤细胞凋亡, 但是肝癌细胞对 TRAIL 诱导的凋亡具有耐受性。Nakao 等^[10]研究 siRNA 下调 Survivin 后是否能够促进人肝癌 Huh-7 细胞自发凋亡或 TRAIL 诱导的凋亡。Survivin siRNA 转染 Huh-7 细胞的 Survivin 表达下调, 并通过诱导自发凋亡使细胞的成活率下降到 20%。1~2 ng·mL⁻¹ TRAIL 仅微弱诱导 Huh-7 细胞凋亡, 而 Survivin siRNA 转染能显著提高 TRAIL 诱导

的细胞凋亡。该结果提示 Survivin 水平直接与 Huh-7 细胞对 TRAIL 的易感性相关, Survivin siRNA 与 TRAIL 联合可能是肝癌治疗的新策略。

抗肿瘤药物紫杉醇结合 β -微管蛋白防止肿瘤的增殖和促进细胞死亡。然而, 高剂量的紫杉醇也能导致正常细胞的死亡。此外, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 在许多肿瘤中高表达, 保护肿瘤细胞免受凋亡。因此, George 等^[11]用同源 siRNA 下敲 Bcl-2, 并与低剂量 (100 nmol·L⁻¹) 紫杉醇联合处理人成胶质细胞瘤 U138MG 和 U251MG 细胞。免疫荧光染色显示, calpain 和活化 caspase-3 表达增加, 并在凋亡细胞中共定位。在细胞凋亡期间, Bax、Bak、tBid、活化 caspases、DFF40, 以及 lamin、fodrin 和 PARP 的断裂片段水平增加。与单独处理比较, 联合治疗显示更显著的增加细胞凋亡作用, 说明 Bcl-2 siRNA 通过诱导 calpain 和 caspase 水解活化显著增强紫杉醇介导不同人成胶质细胞瘤凋亡。因此, 紫杉醇和 Bcl-2 siRNA 联合应用为控制成胶质细胞瘤的恶性增长提供了新的治疗策略。

溶瘤腺病毒载体介导的 RNA 干扰具备有限伤害正常细胞的潜在优势, 因为溶瘤腺病毒载体在肿瘤细胞微环境中产生 siRNA, 通过病毒溶瘤作用加强抗肿瘤效果。肝癌对 TRAIL 介导细胞死亡显示高度的耐受性, 其部分原因是肝癌细胞高表达 X 关联凋亡蛋白抑制因子 XIAP。Pan 等^[12]用溶瘤腺病毒 (ZD55) 表达 shRNA, 下敲 XIAP, 同时用 ZD55 递送 XIAP-shRNA 和 TRAIL 进入肝癌细胞, 体外细胞和体内动物模型研究结果显示, ZD55-XIAP-shRNA 和 ZD55-TRAIL 联合应用能导致 XIAP 表达显著下调, 并呈现强烈的抗肿瘤活性。该研究提示可以采用 ZD55 递送 siRNA 靶向过表达癌基因, 并通过调节凋亡和抗凋亡因子的平衡新策略用于治疗肿瘤。

5 siRNA 对 DNA 损伤剂的增效作用

为探讨化疗药物对 siRNA 表达载体转染细胞的敏感性, Lei 等^[13]构建了 Bcl-2 和 Bcl-xl siRNA 表达载体, 并稳定转染肝癌细胞。Bcl-2/Bcl-xl siRNA 转染细胞中的 Bcl-2 和 Bcl-xl 基因和蛋白表达水平明显下降, Bax 蛋白的水平仍然不变, 但 caspase-3 的水平提高。MTT 结果表明, Bcl-2/Bcl-xl siRNA 转染细胞对 5-FU (5-氟尿嘧啶) 或羟基喜树碱表现出更高的敏感性。流式细胞仪检测表明, Bcl-2/Bcl-xl siRNA 共同转染细胞的 G1 期细胞增加, 加入 5-FU 或羟基喜树碱后 G1 阻断趋势进一步加强。结果提示 Bcl-2/Bcl-xl siRNA 介导的基因沉默结合化疗药物可

能是潜在的人肝癌治疗策略。

Mdm2 是 p53 的结合蛋白, 并抑制其生物活性, 它在多种肿瘤中高表达, 促进细胞生长。作者制备了靶向 mdm2 mRNA 的 siRNA, 进行抗肿瘤作用机制和疗效研究。体内外研究结果提示, mdm2-siRNA 通过对靶基因 mdm2 的特异性干扰, 阻断 mdm2 介导的 p53 泛素化降解途径, 提高 p53 的水平, 进一步导致细胞周期阻断和诱导细胞凋亡。体内研究显示, mdm2-siRNA 对移植于裸小鼠的人乳腺癌 MCF-7 有显著的生长抑制作用, 同时对化疗药物丝裂霉素 C 有明显的增效作用^[14]。

Ito 等^[15]用合成的 Rad51 siRNA 处理 HeLa 细胞, 2 d 后 Rad51 的转录检测不到, 4 d 后 Rad51 蛋白完全消失。Rad51 siRNA 转染后的 HeLa 细胞经 0.02 g·mL⁻¹ 顺铂处理 3 h 后, 该转染细胞的克隆形成能力下降了大约 10%。此外, 多种人类癌细胞在转染 Rad51 siRNA 后, 对顺铂的敏感性增强, 但不影响正常的人成纤维细胞。体内结果显示, Rad51 siRNA 处理后的肿瘤, Rad51 转录水平下降了大约 25%。与 Rad51 siRNA 或顺铂单独比较, Rad51 siRNA 联合顺铂治疗显著抑制肿瘤生长。体内外结果说明, Rad51 siRNA 可增强顺铂对肿瘤细胞的敏感性。

融合蛋白 NPM-ALK 来自于 t(2;5)(p23;q25) 染色体易位, 在 50%~70% 的退行发育大细胞淋巴瘤 (ALCL) 中高表达。NPM-ALK 是一种构成性活化的蛋白激酶, 通过刺激几个细胞分裂信号通路变换细胞。为了检测 NPM-ALK 是一种潜在的淋巴瘤治疗靶点, Hsu 等^[16]使用 siRNA 特异性下调 NPM-ALK 在 ALCL 细胞中的表达。研究表明, t(2;5) 阳性的 ALCL、SUDHL-1 和 Karpas 299 细胞活力丢失, 但不发生在染色体易位的 Jurkat 和 Granta 519 细胞中。进一步研究表明, 下调 NPM-ALK, 结果导致细胞增殖下降和细胞凋亡增加。当结合使用化疗药物, 如阿霉素, 抑制 NPM-ALK 能增强肿瘤细胞对化疗的敏感性, 表明持续性表达 NPM-ALK 对保持 ALCL 细胞的生长是重要的, 提示抑制该融合基因可能是 NPM-ALK 阳性 ALCL 肿瘤潜在的新治疗策略。

孕烷 X 受体 (PXR) 可以作为主要调节因子控制药物代谢酶、细胞色素 P450 3A (CYP3A) 和药物转运蛋白家族成员的表达, 包括多药耐药蛋白 1 (MDR1)。最近的研究表明, 通过 PXR-CYP3A 途径的类固醇/外源物代谢作用可能在子宫内膜癌中发挥重要作用, 此外 PXR 配体能增强 PXR 介导的配体和启动子依赖性的转录, 从而导致 PXR 靶分子 (特别

是 CYP3A4 和 MDR1) 的差异调节。Masuyama 等^[17] 研究 RNA 干扰下调 PXR 增强药物敏感性和克服抗药性的潜在作用。与对照 siRNA 转染细胞相比, PXR 配体、紫杉醇、顺铂、雌二醇或甲孕酮不会使 PXR siRNA 转染细胞的 CYP3A4 和 MDR1 蛋白质水平增加。配体存在时, 也未见 PXR 介导的转录激活或共活化因子的转录增加。进一步研究发现, PXR 下调造成细胞生长抑制显著增加, 并增强抗癌药物紫杉醇、顺铂和甲孕酮诱导的细胞凋亡。PXR 过度表达引起紫杉醇或顺铂介导的细胞生长抑制和细胞凋亡明显的下跌。表明 PXR 下调可能是一个新的子宫内膜癌治疗方法, 可以克服细胞的耐药性, 增强抗癌药物的敏感性。

6 siRNA 的放疗增敏作用

MDM2 蛋白被证明在辐射应答和肿瘤放射敏感性方面发挥关键作用, 是一个有吸引力的临床药物靶标, 抑制 MDM2 可以加强肿瘤对放射治疗的敏感性。Guo 等^[18] 设计了针对人 MDM2 mRNA 的两个 siRNA 片段, 并检测了它们对非小细胞肺癌 A549 细胞的作用。转染 siRNA1 或 siRNA2 片段表达载体 pUR/U6 后, A549 细胞 MDM2 mRNA 表达水平分别减少了 72% 和 31%, MDM2 蛋白表达水平同样受到抑制。A549 细胞转染与表达载体后增殖能力显著降低, 细胞对电离辐射 (IR) 更敏感。IR 诱导 A549 细胞 2.6% 的凋亡和 14.4% 的坏死, MDM2 siRNA 诱导 30.1% 的凋亡和 12.7% 的坏死, 而 MDM2 siRNA 和 IR 联合治疗后细胞凋亡增加到 45.9% 和坏死为 15.2%, 数据表明 MDM2 siRNA 能够提高肺癌的放射敏感性。

脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 (APE1) 是一种双功能 AP 内切酶/氧化还原因子, 在 DNA 修复和还原信号中起重要作用。Xiang 等^[19] 研究了靶向抑制 APE1 对肿瘤放射治疗的体内外增敏作用。携带人 APE1 siRNA 的 Ad5/F35 腺病毒载体感染大肠结肠癌细胞。在 LoVo 细胞中, APE1 强烈表达, APE1 下游抗辐射因子 NF- κ B 被激活。LoVo 细胞转染 Ad5/F35-APE1 siRNA 后, 导致剂量依赖性减少 APE1 蛋白和 AP 内切酶活动的影响。Ad5/F35-APE1 siRNA 显著增强 LoVo 细胞对辐射的敏感性, 并增加细胞凋亡。在 LoVo 细胞中, 照射诱导的 APE1 表达呈剂量依赖性, 伴随着增强 NF- κ B 的 DNA 结合活性, Ad5/F35-APE1 siRNA 能有效地抑制辐射诱导的 APE1 表达和 NF- κ B 的激活。在裸鼠皮下结肠癌模型中, Ad5/F35-APE1 siRNA 抑制移植结肠癌 APE1 蛋白的表达, 并显著提高照射对肿瘤生长的抑制作用。研究结果提示 APE1

可能是一个抗辐射因子, 针对性抑制 APE1 表达是一种提高肿瘤放射治疗敏感性的有效手段。

XIAP 是一种 caspase-3 抑制因子, Ohnishi 等^[20] 采用两种转化的 p53 野生型人非小细胞肺癌 H1299/wtp53 细胞和 p53 突变型 H1299/mp53 细胞, 当 XIAP-siRNA 转染这些细胞后, XIAP 蛋白表达明显被抑制。XIAP-siRNA 可以提高 H1299/wtp53 和 H1299/mp53 细胞对放疗的敏感性, 但对 H1299/mp53 细胞更有效。XIAP-siRNA 对放射诱导的凋亡作用和 caspase-3 活化作用的提高在 H1299/mp53 细胞中要比在 H1299/wtp53 细胞中更明显。结果提示 XIAP-siRNA 是肿瘤放射治疗的可能增敏剂, 特别是 p53 突变型肿瘤的放射治疗。

过表达 Aurora-A 激酶与多种人肿瘤的敏感性和不良预后有关联。Tao 等^[21] 评估了 IR 后 Aurora-A 激酶对细胞周期和肿瘤细胞生存抑制的影响。IR 与 Aurora-A siRNA 或 PHA680632 (选择性 Aurora 激酶抑制剂) 联合, 结果显示 Aurora-A 激酶活性的抑制, 加强了 IR 诱导的细胞凋亡、微核形成和 BRCA1 聚集位点的形成, 该现象只发生在 p53 基因缺失的肿瘤细胞。小鼠体内异种移植瘤 (p53-/-HCT116) 的研究结果显示, Aurora-A 激酶抑制剂与 IR 联合治疗能明显延缓肿瘤生长时间。这些结果表明抑制 Aurora-A 激酶活性能够增强肿瘤细胞对放射治疗的敏感性, 特别是 p53 基因缺陷的细胞。

过氧化物还原酶 Peroxiredoxin I (Prx-1) 是 Prx 家族的关键成员之一, 它通过硫氧还蛋白系统减少过氧化物和平衡。研究结果显示, IR 下 Prx 在哺乳动物细胞中表达增加, 抑制 Prx 的表达可以增强辐射诱导的细胞死亡, 这表明抑制 Prx 表达可能是一个重要的肿瘤放射治疗预处理。为了检验这一假设, Zhang 等^[22] 用腺病毒介导的 siRNA 抑制 Prx-1 在人肠道癌 SW480 细胞中的表达, 结果显示重组 Ad-SiPrxI 明显减少 Prx-1 在 SW480 细胞中的表达, 从而减少细胞的生长和增加 IR 诱导的细胞死亡。值得注意的是流式细胞仪检测分析细胞凋亡时, 下敲 Prx-1 基因的表达。为了评价重组 Ad-SiPrxI 的体内效应, 在 IR 前用重组腺病毒预处理小鼠移植性肿瘤, 结果肿瘤在小鼠体内的生长被抑制, 预处理重组腺病毒抑制 Prx-1 的表达可提高肿瘤细胞放射治疗的敏感性, 因此可能是一个潜在的临床治疗应用方法。

上调整合素 $\alpha\beta 3$ 已被证明在肿瘤血管生成和转移中发挥了关键作用。Cao 等^[23] 评价了整合素 $\alpha\beta 3$ 在乳腺癌放疗耐受中的作用, 检测了 $\alpha\beta 3$ siRNA 与

放疗的联合抗肿瘤作用。克隆形成测定显示, $\alpha\beta3$ 阴性的 MCF-7 细胞与 $\alpha\beta3$ 阳性的 MB-435 细胞比较对放疗更敏感。放疗能上调 MB-435 细胞 $\alpha\beta3$ 的表达, 而 $\alpha\beta3$ siRNA 能有效地降低细胞中 $\alpha\beta3$ 的表达, 从而导致放射敏感性的增加。 $\alpha\beta3$ siRNA 也促进放射诱导的细胞凋亡和增强放射诱导的细胞周期 G2/M 期阻滞。

在动物细胞中, NBS1 是必不可少的辐射诱发 DNA 双链断裂修复因子之一。Ohnishi 等^[24]用人非小细胞肺癌细胞中不同的 p53 基因形态 (H1299/wtp53 细胞为 p53 野生型, H1299/mp53 细胞为 p53 突变型), 用 DNA 盒式表达针将 NBS1 基因的 siRNA 转入这些细胞中, 结果发现, siRNA 的转染能够提高 H1299/wtp53 和 H1299/mp53 细胞对辐射的敏感性。在 NBS1-siRNA 转染细胞中, 可见 NBS1 的蛋白质表达下降和辐射诱导 NBS1 蛋白磷酸化的积累降低。此外, NBS1-siRNA 能够抑制辐射诱导转录因子 NF- κ B 和 XIAP 蛋白的表达。转染 NBS1-siRNA 后, 肿瘤细胞对 X-射线的敏感性增强, 与 p53 野生型细胞比较, NBS1-siRNA 对 p53 突变型细胞的增敏作用更明显。转染针对 XIAP 蛋白的 siRNA 也能加强肿瘤细胞对 X-射线的敏感性, 同样 p53 突变型细胞的增敏作用更明显。研究结果提示, 靶向 NBS1 和 XIAP 的 siRNA 是一类新的肿瘤放射治疗增敏剂, 特别针对 p53 突变的肿瘤细胞更为有效。

7 小结

综上所述, RNA 干扰介导的多靶点肿瘤治疗可以获得更好的疗效。随着各种抗癌药物的不断出现, 多靶点肿瘤治疗需要提出合理和安全的联合治疗方案, 其目的是为了克服临床治疗的肿瘤耐药问题。新型药物联合治疗策略可能的优化方案基本准则包括: ① 阐明药物组合的基本原理, ② 临床前实验数据对原理的验证, ③ 临床前评估原理的可行性, ④ 在多个肿瘤模型中协同作用的临床前数据, ⑤ 每一种联合治疗剂的临床药理学和毒理学^[25]。

RNA 干扰药物正由基础研究进入实际应用阶段, 眼下迫切需要解决的问题是药物的给药方式, 以及药物在体内的稳定性^[26]。最近报道, 可以用纳米微粒来包裹小分子 RNA, 在其外包裹一层传递蛋白, 以帮助其顺利进入人体细胞, 蛋白质外壳会在细胞内环境下自行溶解, 释放出携带抗肿瘤 RNA 的纳米微粒, 有效地抑制肿瘤细胞的生长。随着 RNA 干扰机制研究的深入和 RNA 干扰技术日趋完善, siRNA 作为一种便捷实用的基因治疗药物, 将可能成为有效的

多靶点联合治疗药物之一。

References

- [1] Zimmermann GR, Lehár J, Keith CT. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts [J]. *Drug Discov Today*, 2007, 12: 34–42.
- [2] Ren K, Jin H, Bian C, et al. MR-1 modulates proliferation and migration of human hepatoma HepG2 cells through MLC2/FAK/Akt signaling pathway [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 35598–35605.
- [3] Yin JQ, Gao J, Shao R, et al. siRNA agents inhibit oncogene expression and attenuate human tumor cell growth [J]. *J Exp Ther Oncol*, 2003, 3: 194–204.
- [4] Jazag A, Kanai F, Ijichi H, et al. Single small-interfering RNA expression vector for silencing multiple transforming growth factor-beta pathway components [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: e131.
- [5] Hong J, Zhao Y, Huang W. Blocking c-myc and stat3 by E coli expressed and enzyme digested siRNA in mouse melanoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348: 600–605.
- [6] Kunze D, Wuttig D, Fuessel S, et al. Multitarget siRNA inhibition of antiapoptotic genes (XIAP, BCL2, BCL-X(L)) in bladder cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28: 2259–2263.
- [7] Chen SM, Wang Y, Xiao BK, et al. Effect of blocking VEGF, hTERT and Bcl-x1 by multiple shRNA expression vectors on the human laryngeal squamous carcinoma xenograft in nude mice [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7: 734–739.
- [8] Tang Z, Du R, Jiang S, et al. Dual MET-EGFR combinatorial inhibition against T790M-EGFR-mediated erlotinib-resistant lung cancer [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99: 911–922.
- [9] Koldehoff M, Beelen DW, Elmaagacli AH. Small-molecule inhibition of proteasome and silencing by vascular endothelial cell growth factor-specific siRNA induce additive antitumor activity in multiple myeloma [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 84: 561–576.
- [10] Nakao K, Hamasaki K, Ichikawa T, et al. Survivin down-regulation by siRNA sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis [J]. *Oncol Rep*, 2006, 16: 389–392.
- [11] George J, Banik NL, Ray SK. Bcl-2 siRNA augments Taxol mediated apoptotic death in human glioblastoma U138MG and U251MG cells [J]. *Neurochem Res*, 2009, 34: 66–78.
- [12] Pan Q, Liu B, Liu J, et al. Synergistic antitumor activity of XIAP-shRNA and TRAIL expressed by oncolytic adenoviruses in experimental HCC [J]. *Acta Oncol*, 2008, 47: 135–144.

- [13] Lei XY, Zhong M, Feng LF, et al. siRNA-mediated Bcl-2 and Bcl-xl gene silencing sensitizes human hepatoblastoma cells to chemotherapeutic drugs [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007, 34: 450–456.
- [14] Liu TG, Yin JQ, Shang BY, et al. Silencing of hdm2 oncogene by siRNA inhibits p53-dependent human breast cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11: 748–756.
- [15] Ito M, Yamamoto S, Nimura K, et al. Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin [J]. *J Gene Med*, 2005, 7: 1044–1052.
- [16] Hsu FY, Zhao Y, Anderson WF, et al. Downregulation of NPM-ALK by siRNA causes anaplastic large cell lymphoma cell growth inhibition and augments the anti-cancer effects of chemotherapy *in vitro* [J]. *Cancer Invest*, 2007, 25: 240–248.
- [17] Masuyama H, Nakatsukasa H, Takamoto N, et al. Downregulation of pregnane X receptor contributes to cell growth inhibition and apoptosis by anticancer agents in endometrial cancer cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 72: 1045–1053.
- [18] Guo W, Ahmed KM, Hui Y, et al. siRNA-mediated MDM2 inhibition sensitizes human lung cancer A549 cells to radiation [J]. *Int J Oncol*, 2007, 30: 1447–1452.
- [19] Xiang DB, Chen ZT, Wang D, et al. Chimeric adenoviral vector Ad5/F35-mediated APE1 siRNA enhances sensitivity of human colorectal cancer cells to radiotherapy *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Gene Ther*, 2008, 15: 625–635.
- [20] Ohnishi K, Nagata Y, Takahashi A, et al. Effective enhancement of X-ray-induced apoptosis in human cancer cells with mutated p53 by siRNA targeting XIAP [J]. *Oncol Rep*, 2008, 20: 57–61.
- [21] Tao Y, Zhang P, Frascogna V, et al. Enhancement of radiation response by inhibition of Aurora-A kinase using siRNA or a selective Aurora kinase inhibitor PHA680632 in p53-deficient cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2007, 97: 1664–1672.
- [22] Zhang B, Wang Y, Liu K, et al. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against peroxiredoxin I enhances the radiosensitivity of human intestinal cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75: 660–667.
- [23] Cao Q, Cai W, Li T, et al. Combination of integrin siRNA and irradiation for breast cancer therapy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351: 726–732.
- [24] Ohnishi K, Scric Z, Schiestl RH, et al. siRNA targeting NBS1 or XIAP increases radiation sensitivity of human cancer cells independent of TP53 status [J]. *Radiat Res*, 2006, 166: 454–462.
- [25] Broxterman HJ, Georgopapadakou NH. Anticancer therapeutics: “Addictive” targets, multi-targeted drugs, new drug combinations [J]. *Drug Resist Update*, 2005, 8: 183–197.
- [26] Li B, He H, Shao RG. Target delivery of siRNA [J]. *J Int Pharm Res (国际药学研究杂志)*, 2008, 35: 205–208.