

文章编号: 1001-098X(2004)04-0169-04

·放射医学·

siRNA与肿瘤放射治疗

刘光伟 龚守良

摘要 近年来,放射肿瘤学研究者致力于采用特异性阻断剂阻断DNA修复过程中关键调控基因,并通过有效抑制DNA损伤修复,促进肿瘤细胞死亡,收到较好的肿瘤放疗效果。但是同时发现,阻断剂技术本身存在诸多缺陷,这极大地限制其尽快应用于临床肿瘤治疗。自小片段干扰核糖核酸(small interference RNA, siRNA)干涉技术发现以来,其强大的阻断真核细胞中特异表达蛋白的能力为众多研究者所关注。更重要的是,它较好地解决了应用阻断剂带来的上述问题,从而为肿瘤放射基因治疗研究提供了新途径。

关键词 RNA干涉; 肿瘤; 放射治疗; 基因

中图分类号 R730.55; Q691.9 文献标识码 A

siRNA and tumor radiotherapy

LIU Guang-wei, GONG Shou-liang

(MH Radiobiology Research Unit, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract Recently, many radiooncology researchers had gained some good curative effects on DNA damage repair inhibited and tumor cell death increased by blocking key control genes in the course of DNA repair with specific blocking agents. Otherwise, the blocking agents have many defects, which extremely limited its application on curing tumor. Since small interference RNA (siRNA) technology was discovered, its powerful function of blocking expressible specific protein in eukaryocytes was attended by many researchers. Meanwhile, this technology admirably resolved mentioned above problems caused by using the blocking agents, which provided a new way for tumor radiogene therapy.

Key words RNA interference; tumor; radiotherapy; gene

近年来研究表明,通过特异性基因阻断剂等手段抑制DNA损伤修复过程中关键调控基因功能,可以有效提高肿瘤对放射线的敏感性,在常规甚至低于常规放射治疗剂量条件下即可促进肿瘤细胞凋亡(死亡),提高肿瘤治疗效果^[1]。但是,研究者同时发现,寻找目的基因特异性阻断剂难度较大,具有盲目性,而且已知阻断剂也可能存在许多未知的较强毒副作用;为达到较好的阻断效果,还常需较大剂量,并持续给药^[2],因此限制了阻断剂治疗手段的临床应用,并曾一度对该类研究的临床应用可能性提出挑战和质疑^[3,4]。自Fire A于1998年首先发现并命名为RNA干涉(RNA interference, RNAi)后,使抑制基因表达技术研究有了突破性进展,从而也为这一理想治疗技术用于临床肿瘤治疗提供了极好的先决条件^[5,6]。

作者单位: 130021 长春,吉林大学卫生部放射生物学重点实验室

1 RNAi 和 siRNA 干涉技术

RNAi是由靶基因序列同源的双链RNA(double strand RNA, dsRNA)而引发的序列特异性基因转录后沉默过程。果蝇中一种称为Dicer的酶(属RNA酶家族成员)可以特异识别dsRNA,并将其切割成为21~23个核苷酸组成的小片段干扰核糖核酸(small interference RNA, siRNA),作为效应介导子,与一个核酶复合物形成RNA诱导沉默复合体(RNA inducing silence complex),后者激活可引起相同序列特异性的mRNA降解。RNAi现象是细胞中消除异常mRNA和抵御病毒、转座子等侵袭的有利防御反应,而迅速发展的siRNAi技术已使其成为一种强大的研究哺乳动物中选择性抑制特异基因表达和研究基因功能的工具^[7]。

siRNA干涉技术是利用强大的阻断真核细胞中特异表达基因的功能,采用转录后剪切的机制将

靶基因所对应的 dsRNA 导入生物体内, 导致相应的靶基因 mRNA 降解^[8]。其最重要的特征之一是少量局部放大效应, 即少量的 dsRNA 能够使大量的靶 RNA 沉默^[9]。同时, 还具有其他重要特征^[7-13]: ① RNAi 是转录后基因水平的沉默机制, 注射靶基因的内含子或者启动子顺序的 dsRNA 均无干涉效应, 翻译抑制剂对 RNAi 不产生影响; ② RNAi 具有较高特异性, 能够非常特异地降解与之序列相应的单个内源基因的 mRNA; ③ RNAi 抑制基因表达具有很高的效率, 相对少量的 dsRNA 就可以使其表型达到缺失突变的程度; ④ RNAi 有浓度、时间双重依赖性, 干涉效应通常出现在注射 dsRNA 后 6 h, 可持续 72 h 以上; ⑤ RNAi 基因表达效应可以突破单个细胞界限, 在不同细胞甚至生物体间长距离传递和维持, 并可传递给下一代。

RNAi 技术问世之后, 相应的技术随之问世。众多研究者认为, 通过质粒表达 siRNA 效果更佳, 而且一些 siRNA 质粒表达载体 pSilence 2.0 U6 和 pSilence 3.0 H1 等均已商品化生产^[14]。虽然载体形式多样, 但主要均由 RNA 聚合酶 III 启动子启动编码小发夹 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 的序列。选用 RNA 聚合酶 III 启动子主要是其总在一个固定距离的位置开始转录合成 RNA, 遇到 4~5 个连续的 U 即终止, 非常精确。当这种带有 RNA 聚合酶 III 启动子和 shRNA 编码序列的质粒转染哺乳动物细胞时, 该质粒即可发挥封闭特定基因效应作用。而且, 通过 siRNA 表达质粒选择标记证实, 其质粒可以更长时间抑制目的基因表达, 并由于质粒可以复制扩增, 相比化学合成, 可以显著降低 siRNA 成本, 经济且高效。还有, 在基因表达恢复之前, RNAi 现象将持续多个细胞分裂周期。这就有效地解决了靶基因特异性阻断剂寻找难度大, 用药剂量及毒副反应较大, 疗效不完全, 单个基因特异性相对较差, 作用时间不持久, 难于合成及价格昂贵等问题。另外, RNAi 也不同于传统 DNA 水平的基因剔除技术, 而是在 RNA 水平上去除 RNA, 并拓展了反义寡核苷酸技术。所以, RNAi 是一项理想阻断特异基因表达的技术, 如将其应用于肿瘤细胞 DNA 修复途径关键调控基因的阻断, 将收到比特异性阻断剂更理想的肿瘤放射治疗效果^[15]。

2 DNA 损伤修复抑制与肿瘤放射治疗

电离辐射诱导细胞 DNA 损伤修复机制的研究表明, 各种内源性或外源性 (包括 X 或 γ 射线等) 损伤因子可以诱导不同类型 DNA 损伤, 并主要通过 4 条途径进行 DNA 损伤修复: 对于大量 DNA 螺旋扭曲损伤或单链断裂常激活核酸切除修复或碱基切除修复途径; 当 DNA 损伤较重, 引起 DNA 双链断裂则可激活非同源末端连接途径和 (或) 同源重组途径。研究表明, 抑制 DNA 修复任一途径, 均可提高放射治疗效果。例如, 在较低水平, 电离辐射诱导 DNA 损伤大多可以修复, 但如抑制其 DNA 修复过程, 则这些可修复损伤将转变为不可修复损伤, 诱发更多细胞凋亡。所以, 抑制 DNA 损伤修复是提高目前放射治疗疗效的主要途径之一^[16]。

2.1 阻断剂抑制 DNA 修复基因与肿瘤放射治疗

在核酸切除修复和碱基切除修复途径中, 肿瘤生物学研究者的兴趣主要集中在多聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP) 及其相关蛋白研究。通过各种基因剔除的动物或细胞实验证明, PARP 在核酸切除修复和碱基切除修复途径中起关键性调控作用。PARP^{-/-}小鼠和细胞株对 γ 射线照射更为敏感^[17]。通过 PARP-1 抑制剂 3-氨基苯甲酰胺证实, PARP-1 活性抑制是辐射敏感性增高的主要原因。采用 PARP-1 抑制剂可增强几种抗肿瘤因子杀伤肿瘤细胞的效能^[18,19]。例如, 3-氨基苯甲酰胺可以增加肿瘤细胞株对化疗药争光霉素等和 X 或 γ 射线等的敏感性。同时, 也证明各种 PARP-1 抑制剂有明显的肿瘤细胞种类特异性。体外实验获得的研究结果与体内实验相似^[20]。不过, 目前 PARP 特异性阻断剂还处于实验阶段, 毒副作用还不清楚。而且, PARP-1 抑制剂对其他 PARP 家族成员是否发挥作用, 仍不确定^[21]。

电离辐射等因素诱发 DNA 双链断裂, 可导致细胞死亡。DNA 双链断裂主要涉及非同源末端连接和同源重组两条途径, 通过信号转导级联反应调控细胞周期, 促进 DNA 修复^[2,3,21]。目前多数研究者认为, 非同源末端连接是哺乳动物细胞 DNA 双链断裂修复的主要机制。根据啮齿类动物细胞涉及非同源末端连接途径的几种基因 (Ku70、Ku80、DNA-Pkcs、Ligase 4 和 XRCC4) 突变研究证实, 其突变细胞均对电离辐射敏感性增强, 明显提高放射治疗效果^[21]。非同源末端连接途径主要涉及大量磷脂酰肌醇-3 激酶类激酶 (phosphatidylinositol3-ki-

nase like kinase, PIKK) 家族成员, 这些丝/苏氨酸激酶包括共济失调性毛细血管扩张突变 (ataxia telangiectasia mutated, ATM) 激酶、ATM 相关激酶及 DNA 依赖蛋白激酶催化亚单位 (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs) 等。这些酶可以通过结合在双链断裂的 DNA 末端而激活和诱发 DNA 修复。在此途径中, ATM 是“中心”调控分子, 可通过磷酸分解作用调控下游系列基因如 p53、brac1、mdm2 和细胞周期调控检查点 Chk1 和 Chk2 [21,22]。研究表明, 缺失 ATM 基因的患者和 ATM^{-/-}小鼠显示出对电离辐射的高敏感性和染色体不稳定性及 G₁/S 和 G₂/M 检查点缺失。DNA-PKcs 及其 DNA 结合成分 Ku70 和 Ku80 也在 DNA 双链断裂修复中起重要调控作用。实验表明, 严重免疫缺陷的小鼠具有截短的 DNA-PKcs 多肽, 这种多肽缺乏激酶活性, 不能有效修复电离辐射诱导的双链断裂。采用 PIKK 家族 (ATM 激酶、ATM 相关激酶及 DNA-PKcs 等) 抑制剂 wortmannin 与肿瘤细胞共同孵育, 则电离辐射等因素通过诱导 DNA 双链断裂显著提高杀伤肿瘤细胞能力 [23]。另有实验 [24] 证明, 咖啡因是 ATM 激酶和 ATM 相关激酶阻断剂, 而低分子质量的 LY 294002 也可以部分抑制 DNA-PKcs 活性, 均可提高肿瘤放射治疗疗效。

除此之外, 在肿瘤治疗中具有研究潜力的是抑制细胞周期调控检查点基因。电离辐射诱导 DNA 损伤信号转导途径使 G₁/S 和 G₂/M 检查点激活, 延迟细胞周期进程, 为 DNA 修复争取时间。目前认为, 检查点关键调控基因是 Chk1 和 Chk2, 分别在 G₂/M 和 G₁/S 时相调控下游信号转导途径中发挥重要作用 [25,26]。用 Chk1 阻断剂 7-羟基十字孢碱阻断 Chk1 功能, 可以有效去除细胞周期 G₂/M 调控点, 从而导致缺失调控点 p53 依赖调控途径的细胞对放射治疗比正常细胞更为敏感 [27]。但是, 更具阻断能力的 Chk1 和 Chk2 阻断剂仍需进一步寻找和证实其毒副作用。

2.2 siRNA 干涉 DNA 修复基因与肿瘤放射治疗

通过特异性阻断剂阻断 DNA 损伤修复关键调控基因功能以提高肿瘤细胞辐射敏感性已获得许多令人振奋的实验结果, 但由于阻断剂技术本身的局限性和缺陷, 极大限制其在肿瘤放射治疗方面的应用 [2-4,26], 而 RNAi 技术的问世将会成功地解决这一问题, 为这一技术应用于临床肿瘤治疗提供

了条件 [5,6]。

最近, Collis S 等 [28] 已采用 siRNA 干涉技术针对 DNA 修复过程关键调控基因 ATM、ATR 和 DNA-PKcs 构建 siRNA 干涉质粒, 对人前列腺细胞株 DU145 和 PC-3 进行 3~6 Gy 的放射治疗, 结果表明, 特异靶基因 siRNA 干涉联合放射治疗组比单纯相同剂量放射治疗组提高肿瘤细胞株辐射敏感性 3 倍以上, 而且该方法明显好于应用高浓度特异阻断剂 wortmannin 或 LY 294002 增强肿瘤细胞株辐射敏感性效果。Xu M 等 [29] 也采用 DNA 修复蛋白 Mre-11 的 siRNA 干涉质粒转染人大肠癌细胞株, 结果表明, 转染后 24 h 与未转染组比较, Mre-11 蛋白降低约 70%, 48 h 后才逐渐恢复; 而转染后 24 h 与未转染组比较, 辐射敏感性明显增强, 48 h 后与未转染组无差异。

以上结果均提示, 采用 siRNA 干涉技术特异阻断 DNA 修复过程关键调控基因, 使其发挥转录后功能沉默, 从而提高放射治疗肿瘤敏感性, 促进肿瘤细胞死亡, 有可能成为临床肿瘤放射-基因治疗的新途径。

参 考 文 献

- 1 Ferber D. A new way to combat therapy side effects [J]. *Science*, 1999, 285 (5434): 1651-1653.
- 2 Ponder BA. Cancer genetics [J]. *Nature*, 2001, 411 (6835): 336-341.
- 3 Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer [J]. *Nature*, 2001, 411 (6835): 366-374.
- 4 Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing [J]. *Science*, 2002, 296 (5571): 1270-1273.
- 5 Cullen BR. RNA interference: the new somatic cell genetics? [J]. *Cancer Cell*, 2002, 29 (1): 17-23.
- 6 Ardelit B, Ardelit W, Darzynkiewicz Z. Cytotoxic ribonucleases and RNA interference (RNAi) [J]. *Cell Cycle*, 2003, 2 (1): 22-24.
- 7 McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNA [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3 (10): 737-747.
- 8 Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells [J]. *Nature*, 2002, 418 (6896): 430-434.
- 9 Vanitharani R, Chellappan P, Fauquet CM. Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (16): 9632-9636.
- 10 Thijn R, Brummelkamp P, Rene B, et al. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. *Science*, 2002, 296: 550-553.
- 11 Kiang A, Famar EJ, Kenna PF, et al. Use of RNA interference to knockdown expression of mouse rhodopsin in Cos-7 cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 2335-2337.
- 12 Vargason JM, Szitya G, Burgyan J, et al. Size selective recognition

- of siRNA by an DNA silencing suppressor[J]. *Cell*, 2003, 115 (7): 799-813.
- 13 Cmkovic F, Hoppeseyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumour cells by siRNA - mediated silencing of the livin/M L-IAP/K IAP gene [J]. *Oncogene*, 2003, 22 (5): 8330-8336.
 - 14 Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 497-500.
 - 15 Spencer JC, Michael JS, William GN, et al. Enhanced radiation and chemotherapy mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors [J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 1550-1554.
 - 16 Parik SS, Mol CD, Tainer JA. Base excision repair enzymes faithfully portait integrating the structure and chemistry of an entire DNA repair pathway[J]. *Structure*, 1997, 12: 1543-1550.
 - 17 Herceg Z, Wang ZQ. Functions of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death[J]. *Mutat Res*, 2000, 477: 97-110.
 - 18 Masutani M, Nozaki T, Nishiyama E, et al. Function of poly (ADP-ribose) polymerase in response to DNA damage: gene-disruption study in mice[J]. *Mol Cell Biochem*, 1999, 193 (1-2): 149-152.
 - 19 Curtin NJ, Golding BT, Griffin TJ, et al. New poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors for chem- and radiotherapy of cancer [J]. Oxford University Press, 2000, 99: 177-198.
 - 20 Perkin S, Sun D, Nguyen A, et al. Novel Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase PARP1 and PARP2 identified using a cell-based screen in yeast[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 4175-4183.
 - 21 Khanna KK, Jackson SP. DNA double strand breaks: signaling, repair and the cancer connection [J]. *Nature Genetic*, 2001, 27: 247-254.
 - 22 Durocher D, Jackson SP. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13: 225-231.
 - 23 Boulton S, Kyle S, Yalcintepe L, et al. Wortmannin is a potent inhibitor of DNA double strand break but not signal strand break repair in Chinese hamster ovary cells [J]. *Carcinogenesis (Lond)*, 1997, 17: 2285-2290.
 - 24 Sarkaria JN, Busby EC, Tibbets RS, et al. Inhibition of ATM and ATR kinase activity by the radiosensitizing agent caffeine[J]. *Cancer Res*, 1999, 59 (17): 4375-4382.
 - 25 Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective[J]. *Nature*, 2000, 408 (6811): 433-439.
 - 26 Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer[J]. *Science*, 1994, 266 (5192): 1821-1828.
 - 27 Busby EC, Leistritz DF, Abraham RT, et al. The radiosensitizing agent 7-hydroxy staurosporine (UCN-01) inhibits the DNA damage checkpoint Chk1[J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (8): 2108-2112.
 - 28 Collis S, Swartz M, Deweese T. siRNA silencing of DNA repair factors results in enhanced radiation and chemotherapy mediated killing of human cancer cells [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, 57 (2): S144.
 - 29 Xu M, Myerson R, Hunt C, et al. Treatment of cells with M cell siRNA increases radiation sensitivity and reduces heat induced radiosensitization [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, 57 (2): S144-145.

(收稿日期: 2004-01-17)

《中国介入影像与治疗学》杂志征订启事

《中国介入影像与治疗学》杂志是经国家新闻出版署批准, 由中国科学院主管, 中国科学院声学研究所主办, 中国工程院医药卫生工程学部协办的国家级学术期刊, 本刊主编为张金山教授、蒋学祥教授、李彦豪教授。《中国介入影像与治疗学》杂志 (ISSN1672-8475, CN11-5213/R, 邮发代号: 80-220) 将于2004年9月创刊。

本刊将以报道介入影像与治疗学、介入超声学、介入材料学、药物学与护理学等方面的临床研究、基础研究以及医、工、理结合的成果与新进展为主, 在学术上追求高起点、创新性; 在技术上追求先进性、实用性和规范化; 信息报导上追求真实性、时效性、可读性。

本刊为双月刊, 80页, 大16开本, 铜版纸, 彩色印刷。每册定价16元, 2004年全年共2期, 定价32元; 2005年全年6期, 定价96元。订户目前可随时向邮局订阅或向本刊编辑部订购, 邮编100088, 地址: 北京市海淀区罗庄南里宏嘉丽园1-301中国介入影像与治疗学编辑部, 由邮局汇款。汇款时请注明“杂志订费, 年期至年期, 每份”。

编辑部联系电话: 010-82050374 传真: 010-82050373 E-mail: ciiat@ciiat.com.cn