

RNA 干涉治疗脑胶质瘤的研究进展

李峰生 陈肖华

【摘要】 RNA 干涉(RNAi)是由双链 RNA 引导序列特异性的转录后基因沉默。RNA 干涉(RNAi)技术的出现为胶质瘤基因治疗的研究提供了新的策略。在研究过程中,不断有新的可能用于 RNAi 治疗脑胶质瘤的靶基因被发现,其治疗脑胶质瘤作用主要通过抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、导致肿瘤细胞周期阻滞或增加肿瘤细胞化疗敏感性的机制来实现。

【关键词】 脑胶质瘤; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞周期; 辐射耐受性; RNA 干涉

【中图分类号】 Q506, R730.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2007)05-0300-03

Research progress on treatment of glioma with RNA interference

Li Feng-sheng, CHEN Xiao-hua

(Department of Acute Radiation Sickness, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

【Abstract】 RNA interference (RNAi) is a post-transcriptional gene silencing induced by introduction of double-stranded RNA (dsRNA). The emerging of RNAi provided a new method for glioma gene therapy. During the research, many new potential genes are continually finding out. And the glioma-treating mechanism include inhibiting cell proliferation, inducing cell apoptosis, blocking cell cycle and enhancing cell sensitivity of chemical.

【Key words】 Glioma; Cell proliferation; Cell apoptosis; Cell cycle; Radiosensitivity; RNA interference

肿瘤是细胞增殖、分化和凋亡异常引起的疾病。同样,脑肿瘤也源于细胞增殖、分化和调控失常以及细胞间周围组织关系的紊乱,主要涉及抑癌基因的失活或突变,癌基因的激活或过度表达产生一些促进肿瘤生长的因子。RNA 干涉(RNA interference, RNAi)是在动物和植物中由双链 RNA 引导序列特异性的转录后基因沉默。其不仅是基因功能分析的重要手段,而且可用于疾病的治疗。因此,通过 RNAi 抑制促进细胞增殖的基因或原癌基因的表达可以直接治疗脑肿瘤;也可以通过 RNAi 抑制生长因子的产生、RNAi 后产生凋亡、RNAi 周期相关基因引起周期阻滞以及 RNAi 增加化疗的敏感性达到治疗脑肿瘤的目的。

1 RNAi 抑制细胞增殖治疗脑胶质瘤

端粒酶在肿瘤细胞中高表达,它能促进细胞的生长和存活,使细胞具有长期增殖潜能,因而促使

肿瘤不断生长。人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是端粒酶的限制亚单位。人多形性成胶质细胞瘤中,由于 hTERT 超表达,使得端粒酶表达及活性都升高。Falchetti 等^[1]在体外实验中用小干涉 RNA 降低 hTERT 的表达和端粒酶活性后发现,干涉后对细胞端粒长度的维持、细胞增殖和细胞活力基本无影响,但在体内皮下及颅内 U87MG 和 TB10 细胞移植肿瘤模型实验中,干涉 hTERT 后能显著抑制肿瘤生长。

蛋白酪氨酸磷酸酶 ζ (protein tyrosine phosphatase ζ , PTP ζ) / 受体型酪氨酸磷酸酶 β (receptor-type protein tyrosine phosphatase β , RPTP β), 该受体分子以及它的配体——多效蛋白(pleiotrophin, PTN)在人胶质瘤细胞中高表达。这两个分子与神经系统发育过程中的细胞迁移相关。Ulbricht 等^[2]用 RNAi 沉默 U251 细胞中的 PTP ζ / RPTP β , 体内实验表明,表达正常水平 PTP ζ / RPTP β 的克隆株能形成指数生长的肿瘤,而表达低水平 PTP ζ 或 RPTP β 的细胞株肿瘤基本上不生长;体外实验显示,PTP ζ / RPTP β 表达降低后,细胞的增殖能力也显著降低,PTN 刺激的细胞增殖及其诱导的趋

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30770640)

作者单位:100850 北京,军事医学科学院放射与辐射医学研究所急性放射病损伤治疗研究室

通讯作者:陈肖华(E-mail: chenxh@nic.bmi.ac.cn)

向性迁移也消失。

2 RNAi 促进细胞凋亡治疗脑胶质瘤

Bcl2 样蛋白 12 基因在所有的人原发性恶性胶质瘤中高表达, Bcl2 样蛋白 12 基因的高表达使细胞具有显著的凋亡抗性。Stegh 等^[9]报道, 在体外运用 RNAi 剔除该基因后, 细胞凋亡敏感性增强; 同样, 体内实验时 RNAi 剔除该基因能增强瘤内细胞的凋亡, 使肿瘤的生长受到抑制。

神经胶质细胞的侵袭性依赖于细胞外基质的溶蛋白性裂解, 已知组织蛋白酶 B 和尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂受体(urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR) 在神经胶质瘤细胞中高表达, 因此被用来作为胶质瘤基因治疗的靶标。Gondi 等^[4]运用 RNAi 下调了人胶质瘤细胞株 SNB19 中组织蛋白酶 B 和 uPAR 基因的表达, 二者表达的降低可以引发一系列效应, 包括促凋亡基因表达上调、线粒体膜电位降低、活性的 caspase-8 升高等, 都促进细胞凋亡, 因此, RNAi 介导的 uPAR 和组织蛋白酶 B 下调可诱导细胞外凋亡级联反应。

Zhao 等^[9]实验数据显示, 脂肪酸合酶在人胶质瘤细胞及胶质瘤组织中高表达, 将脂肪酸合酶抑制剂浅蓝菌素加入到培养的胶质瘤细胞中, 可将内源性脂肪酸合成降低 50%, 在 U251 和 SNB-19 细胞中加入浅蓝菌素后, 非受体依赖性的凋亡和聚二磷酸腺苷核糖多聚酶降解升高; 而人 Bcl-2 基因超表达能抑制浅蓝菌素诱导的凋亡; 正常的鼠星形胶质细胞不受浅蓝菌素影响; 运用 RNAi 技术降低脂肪酸合酶表达和活性后, 细胞活力也降低。

Raf-1 激酶激活 MEK-ERK/MAPK 通路的作用已明确, 但是包括 Raf-1 缺失小鼠的表型研究等越来越多的证据显示, Raf-1 还有作为 MEK 激活剂以外的功能, 尤其是其具有抗凋亡的保护功能。O'Neill 等^[9]最近证实了 Raf-1 具有控制促凋亡激酶 MST2 (一种人促凋亡激酶) /Hippo (一种果蝇促凋亡激酶) 的功能: 在哺乳动物细胞中, MST2 被应激信号激活并且超表达时引起细胞凋亡, 该蛋白的果蝇同族体 Hippo 在分化过程中具有调节凋亡和细胞周期阻滞的功能, Raf-1 通过抑制 MST2 二聚体的形成和磷酸化激活来抑制 MST2 的功能, 在此过程中需要 Raf-1 与 MST2 结合, 但是与 Raf-1 的激酶活性和 ERK 途径无关; RNAi 降低 MST2 的表

达后能逆转 Raf-1 (-/-) 鼠成纤维细胞凋亡的敏感, 相反, 降低 Raf-1 (+/+) 细胞及肿瘤细胞的 Raf-1 表达, 能使 Fas 诱导凋亡的敏感性增强。

3 RNAi 使细胞周期阻滞治疗脑胶质瘤

细胞周期调控主要通过生长因子、生长因子受体、细胞内信号转导系统来源基因、转录因子及细胞周期来源基因来实现。

细胞周期蛋白 E1 在细胞 G₁ 期末表达, 它通过激活细胞周期蛋白依赖性激酶 2 来调节 DNA 复制的启动。异常高表达的细胞周期蛋白 E1 在肿瘤细胞中多见。Gurzov 等^[7]用逆转录病毒干涉载体剔除恶性胶质瘤细胞 U-373-MG 以及胶质瘤患者来源细胞的细胞周期蛋白 E1 基因后, 细胞周期蛋白 E1 的表达降低超过 80%, 细胞出现明显凋亡 (50%~70%); 细胞周期蛋白 E1 剔除后, U-373-MG 在裸鼠体内的成瘤能力消失。

高表达的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)及突变的 EGFR 在原发性恶性胶质瘤的发生和发展中起重要作用。外显子 2-7 的缺失是 EGFR 最常发生的突变形式(δ EGFR), 它能在没有配体的情况下持续被激活。 δ EGFR 只存在于肿瘤组织中, 正常组织中并不存在, 因此是一个肿瘤特异的靶标。Fan 等^[8]利用针对 δ EGFR 外显子 1/外显子 8 连接序列的小干涉 RNA 沉默恶性胶质瘤细胞 U87 和 U373 δ EGFR 的表达后发现, 两种细胞株出现明显的 G₂/M 期阻滞。Zhao 等^[9]在实验中也发现, 在抑制脂肪酸合酶 24 h 后, 出现时间和剂量依赖性的 S 期阻滞和细胞活力降低。

转录因子 E2F 家族成员 E2F1 和 E2F4 在细胞周期中有相反的作用, E2F1 促进细胞周期的进程, 而 E2F4 则抑制细胞周期的进程。Crosby 等^[9]研究发现, E2F1 的超表达能促进细胞凋亡, 而 RNAi 后的 E2F4 低表达也能促进凋亡, 相反 E2F4 表达升高后能抑制凋亡, 二者的平衡在肿瘤细胞中很重要, 因此应用 RNAi 技术定向改变 E2F1 和 E2F4 的水平可应用于肿瘤的治疗。

细胞周期蛋白依赖性激酶的细胞周期蛋白依赖性激酶 1 在细胞周期调节中起作用。Tsai 等^[10]将肿瘤组织来源肿瘤细胞的细胞周期蛋白依赖性激酶 1 干涉后引起 G₂/M 期阻滞、caspase 激活和细胞凋亡, 而对正常细胞无影响。

4 RNAi 增加细胞化疗敏感性治疗脑胶质瘤

缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 是机体细胞在低氧环境中产生的一种转录因子, 参与对低氧反应基因的调控, 从而使机体对低氧刺激产生复杂的病理生理反应, HIF-1 α 是决定 HIF-1 活性的亚单位。杨卫忠等^[11]研究利用 HIF-1 α 反义寡核苷酸对胶质瘤细胞化疗敏感性的影响, 发现抑制 U251 细胞中 HIF-1 α 的表达可增加化疗药物对 U251 细胞的毒性作用以抑制细胞的增殖、促使细胞凋亡。

神经胶质瘤细胞的内在性多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 是化疗失败的最主要原因, 其中 MDR1 基因产物 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 的过度表达是分子生物学研究的热点之一。赵澎等^[12]利用 RNAi 技术下调人神经胶质瘤 BT325 细胞株 MDR1 基因表达后发现, 该细胞对化疗药物阿霉素及长春新碱的敏感性显著增加。

O-6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶是一种 DNA 修复蛋白, 其作用是在 DNA 损伤的修复过程中, 催化 DNA 分子鸟嘌呤 6-邻位上的烷基从鸟嘌呤碱基转移至 O-6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶蛋白的半胱氨酸残基上, 而使 DNA 分子鸟嘌呤复原。在 40%~50% 恶性胶质瘤患者中, 存在甲基鸟嘌呤甲基转移酶基因启动子的甲基化, 使该基因沉默, 这些患者的替莫唑胺化疗效果理想, 而没有甲基化的患者则容易产生替莫唑胺耐药性^[13]。因此, 可以考虑对产生耐药性患者进行 O-6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶干涉的剔除, 以增强放疗敏感性。

RNAi 是近几年来发展起来的一项新技术, RNAi 的发现为特异性阻断基因表达提供了新的策略, 也为肿瘤治疗提供了新的手段, 特别是脑胶质瘤这种手术及放疗等常规治疗手段治疗效果不理想的恶性肿瘤。目前, RNAi 技术在应用上的发展还处在早期阶段, RNAi 对脑胶质瘤的治疗还处在实验研究阶段, 但是随着分子生物学技术的发展和

RNAi 技术的成熟, RNAi 一定会为脑胶质瘤及其他一些肿瘤的治疗做出应有的贡献。

参 考 文 献

- 1 Falchetti ML, Fiorenzo P, Mongiardini MP, et al. Telomerase inhibition impairs tumor growth in glioblastoma xenografts. *Neurol Res*, 2006, 28(5): 532-537.
- 2 Ulbricht U, Eckerich C, Fillbrandt R, et al. RNA interference targeting protein tyrosine phosphatase zeta/receptor-type protein tyrosine phosphatase beta suppresses glioblastoma growth in vitro and in vivo. *J Neurochem*, 2006, 98(5): 1497-1506.
- 3 Stegh AH, Kim H, Bachoo RM, et al. Bcl2L12 inhibits post-mitochondrial apoptosis signaling in glioblastoma. *Genes Dev*, 2007, 21(1): 98-111.
- 4 Condi CS, Kandhukuri N, Kondraganti S, et al. RNA interference-mediated simultaneous down-regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor and cathepsin B induces caspase-8-mediated apoptosis in SNB19 human glioma cells. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(12): 3197-3208.
- 5 Zhao W, Kridel S, Thorburn A, et al. Fatty acid synthase: a novel target for antiglioma therapy. *Br J Cancer*, 2006, 95(7): 869-878.
- 6 O'Neill F, Kolch W. Taming the Hippo: Raf-1 controls apoptosis by suppressing MST2/Hippo. *Cell Cycle*, 2005, 4(3): 365-367.
- 7 Curzov EN, Izquierdo M. Cyclin E1 knockdown induces apoptosis in cancer cells. *Neurol Res*, 2006, 28(5): 493-499.
- 8 Fan QW, Weiss WA. RNA interference against a glioma-derived allele of EGFR induces blockade at G2/M. *Oncogene*, 2005, 24(5): 829-837.
- 9 Crosby ME, Almasan A. Opposing roles of E2Fs in cell proliferation and death. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3(12): 1208-1211.
- 10 Tsai YS, Chang HC, Chuang LY, et al. RNA silencing of Cks1 induced G2/M arrest and apoptosis in human lung cancer cells. *IUBMB Life*, 2005, 57(8): 583-589.
- 11 杨卫忠, 杨贤义, 石松生, 等. 缺氧诱导因子 1 α 反义寡核苷酸对胶质瘤细胞化疗敏感性的影响. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(9): 1105-1106.
- 12 赵澎, 胡微, 张亚卓, 等. RNA 干扰技术逆转神经胶质瘤细胞多药耐药性. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(3): 183-187.
- 13 Blough MD, Zlatescu MC, Cairncross JC. O6-methylguanine-DNA methyltransferase regulation by p53 in astrocytic cells. *Cancer Res*, 2007, 67(2): 580-584.

(收稿日期: 2007-03-16)