

· 综述 ·

RNA 干扰技术在乳腺癌治疗中的研究进展

胡小辉 李建文

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是通过导入双链 RNA (double strands RNA, dsRNA) 分子高效、特异的阻断体内某些基因, 致使靶基因的 mRNA 降解, 诱使细胞目的基因功能丧失或表现出特定基因缺乏的表型, 达到转录后水平的基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS) 的过程。这一自然科学界的重要发现, 目前已广泛用于基因功能及基因治疗的研究^[1]。乳腺癌的发生是多个基因改变的结果, 是 RNAi 技术应用的最佳的适应证之一。近年来, 随着 RNAi 技术的不断完善, 针对乳腺癌的各种癌基因的 RNAi 已经取得了确定的效果并有望取得突破性的进展。本文拟对 RNAi 技术及其在乳腺癌诊治中的相关研究和最新进展作一综述。

1 RNAi 机制及生物学特性

RNAi 技术也被称为 RNA 沉默 (RNA silencing) 或 PTGS。1990 年, Napoli 等^[2] 在植物中“偶然”发现基因沉默现象; 1998 年, Fire 等^[3] 发现 dsRNA 能在秀丽隐杆线虫中高效抑制基因表达, 并第一次命名为 PTGS; 现已证实几乎所有多细胞真核生物中都广泛存在 RNAi 现象。RNAi 在生物学的各个领域取得了令人瞩目的成就, 在医学上被用来作为研究基因功能和基因治疗的最具潜力的工具之一。

RNAi 是抵御转基因或外来病毒侵犯的防御机制, 是真核生物一种高度保守并具有特异序列的 RNA 降解系统, 由 21 ~ 23 bp 的内源或外源性双链 RNA 在细胞内特异性诱导降解其互补序列 mRNA, 从而特异性致使靶基因转录后沉默的过程^[4]。RNAi 的作用机制尚不十分清楚, 但其可

能的机制为: (1) 起始阶段: dsRNA 进入细胞的方式可以是外源性导入或者转基因、病毒感染等。目的细胞胞质中的核酸内切酶 Dicer 以一种 ATP 依赖的方式逐步切割 dsRNA 成长约 21 ~ 23 bp 具有特定结构由正反链组成的双链小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 小片段的 siRNA 的 5' 端被内源性激酶快速磷酸化后, siRNA 的双链被依赖 ATP 的 RNA 解旋酶解开, 释放出正、反义单链。(2) 效应阶段: 反义 siRNA 再与体内一些酶 (包括内切酶、外切酶、解旋酶等) 结合一个核酶复合物, 形成所谓的 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)。反义 RNA 单链引导 RISC 遵循碱基互补原则寻找互补的 mRNA, 在核酸内切酶的作用下降解靶 mRNA, 切下的靶 mRNA 片段由 RNA 酶作用清除, 这一过程是高度特异的。同时 siRNA 的反义链亦可作为靶 mRNA 的引物并与其结合, 在 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) 作用下合成更多新的 dsRNA, 新合成的 dsRNA 再由 Dicer 酶切割产生大量的次级 siRNA, 从而使 RNAi 的作用进一步放大, 最终将靶 mRNA 完全降解。siRNA 还能以甲基化等方式引起 mRNA 转录关闭, 即所谓转录水平基因沉默 (transcriptional gene silencing, TGS)^[5-9]。

RNAi 技术具有以下重要特征^[10]: (1) 高效性: 少量的 dsRNA 就使表型达到缺失突变体的程度, 实现相应基因的表达抑制; (2) 特异性: dsRNA 只对同源基因的表达产生抑制作用, 非同源基因不受影响; (3) ATP 依赖性: 发生效应整个过程必须依赖 ATP 的参与; (4) 浓度依赖性: RNAi 作用在一定范围内与 dsRNA 的浓度呈正比; (5) 沉默水平: 沉默作用发生在转录后水平; (6) 遗传、传递性: 经过 dsRNA 处理后的子代仍然发生与亲代相同的 RNAi 现象, 并能在不同细胞甚至生物体间长距离的传递和维持。

2 RNAi 在乳腺癌诊治中的应用研究

2.1 RNAi 与乳腺癌细胞增殖

乳腺癌细胞在体内具有不受控增殖性, Jiang 等^[11]通过构建靶向 MTA1 (metastasis associate d-1) 的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 并导入 ER(+) MCF-7 和 ER(-) MDA-MB-231 乳腺癌细胞。MTA1 下调后 ER(-) MDA-MB-231 细胞重新表达 ER α , 增加了内分泌治疗的敏感性。同时降低基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 和 cyclin D1 的蛋白表达水平, 使 MDA-MB-231 细胞阻滞在 G₀/G₁ 期, 但对 MCF-7 细胞的细胞周期无明显影响。靶向 MTA1 沉默能明显引起两种乳腺癌细胞增殖和转移抑制, RNA 靶向干扰 MTA1 基因可能具有乳腺癌治疗效用。Li 等^[12]采用 RNAi 技术沉默乳腺癌细胞株 MCF-7 和 T-47D 中的 FANCF (fanconi anemia complementation group-F) 基因, 使 FA/BRCA 途径(一种 DNA 修复途径)阻滞, 导致两种癌细胞增殖抑制、凋亡激活。同时由 p38 和 JNK MAPK 信号途径激活导致的米托蒽醌 (Mitoxantrone, MX) 的堆积, 增强了 MX 对乳腺癌治疗的敏感性。FANCF 可能是潜在的乳腺癌治疗靶点。Pax 6 作为 PAX 家族成员, 它潜在的治疗价值在多种肿瘤中得到证实。Zong 等^[13]使用 shRNA 沉默 PAX6 观察 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中 PAX6 的表达和癌细胞增殖, 并将转染后的癌细胞移植到裸鼠体内观察其生长情况, 得出 shRNA 组 PAX6 表达下降、细胞生长和生存能力下降, 裸鼠体内后生长明显受到抑制。这提示 PAX6 在乳腺癌细胞增殖和肿瘤进展中发挥着重要作用, 可以作为一种临床诊断标志物。

2.2 RNAi 与乳腺癌细胞的凋亡

乳腺癌细胞的“永生性”即无限传代而不凋亡。Fang 等^[14]成功构建了肿瘤特异性靶向 UHRF1 (ubiquitin-like containing PHD and RING finger domains 1) 的 shRNA, 并转染乳腺癌细胞 MCF-7 和正常乳腺细胞, 结果明显抑制了 UHRF1 基因的表达, 诱导了癌细胞凋亡, 同时增强了癌细胞对铂类化疗药物的敏感性, 但是正常乳腺细胞却不受影响。因此, RNAi-UHRF1 提供了一个特异、高效的乳腺癌治疗方法。Li 等^[15]构建了靶向 CD59 的逆转录病毒载体转染到 MCF-7 细胞, 成功降低了 CD59 的表达, 消除了 CD59 抑制的补体

介导的细胞溶解效应, 上调了 FAS/FASL 凋亡诱导途径的凋亡蛋白, 又称凋亡蛋白-1 (apoptosis-1) 和 caspase-3 的表达, 这些都诱导了乳腺癌细胞的凋亡, 相反 CD59 的上调将抑制 BCL-2, 促进细胞增殖。总之 CD59 很有希望成为乳腺癌治疗的靶点。徐滨等^[16]合成靶向 COX-2 的小 RNA 干扰质粒转染 MDA-MB-231 细胞株, 并且用 AnnexinV-FITC/PI 法检测癌细胞凋亡情况, 结果显示癌细胞早期凋亡率升高, 再次确认了 COX-2 蛋白是一种抗凋亡分子。之前他们采用 siRNA 技术降低高度恶性 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株 COX-2 的表达能明显抑制肿瘤细胞的侵袭和转移, 为乳腺癌治疗和靶向 Cox-2 抑制剂的临床应用提供有力的实验依据。c-Myb 这一癌基因在 60% ~ 80% 的乳腺癌中均有表达。Thorner 等^[17]分析了 c-Myb 的表达与乳腺癌亚型、患者预后之间的关系, 并利用 RNAi 技术沉默 MCF-7 细胞的内源性 c-Myb 的表达来观察癌细胞在体内、体外的生长情况。结果 c-Myb 与管腔/ER(+) 型乳腺癌密切相关且预后良好, 基因沉默组癌细胞在体内、体外生长能力加强, 说明 c-Myb 可能是一个乳腺癌抑制因子。

2.3 RNAi 与乳腺癌细胞周期

肿瘤发生的根本原因是细胞不停地进入细胞周期从而导致细胞的恶性增殖。Han 等^[18]采用 RNAi 技术成功沉默了癌细胞内源性 NANOG 基因, 功能分析显示 NANOG 的下调降低了 MCF-7 细胞的增殖、集落形成、转移能力。同时发现沉默 NANOG 后 cyclin D1 和 c-myc 基因的表达水平显著下降, 细胞周期受阻于 G₀/G₁ 期, 而 STAT3 和 cyclin E 的表达却不受影响。NANOG 沉默可以被导入的 pcDNA3.1 (-)-NANOG 表达载体逆转, 染色质免疫沉淀显示 NANOG 蛋白与 cyclin D1 一起参与细胞周期的调控。他们不仅揭示了 NANOG 调控细胞周期的分子基础, 而且为乳腺癌的治疗提供了一个可能的靶点。大部分的癌细胞都是非整倍体染色质并且具有稳定性, 而这在正常细胞中是不可能出现的, Daniel 等^[19]通过 RNAi 技术减少乳腺癌细胞中 MPS1 的表达水平来验证是否是 MPS1 让癌细胞具有了这种能力。研究显示: 下调 MPS1 后乳腺癌细胞内存在异常有丝分裂, 诱导细胞凋亡, 降低了异体移植癌细胞在裸鼠体内生长的能力, 很明显 MPS1 在非整倍体癌细胞

的有丝分裂中发挥了稳定和保护作用。靶向沉默细胞周期检查点 *MPS1* 和其他药物联用破坏有丝分裂纺锤体可能成为乳腺癌一个治疗策略。刘志祥等^[20]采用 RNAi 技术将乳腺癌细胞 MCF-7 中 *CHK1* 基因沉默细胞周期检测点,结果 shRNA 转染 48 h 的 MCF-7 细胞增殖活性明显下降,且其抑制增殖作用与减弱 G_2/M 期阻滞有关。使肿瘤细胞不能及时停留于 G_2/M 期,也不利于自我修复,从而抑制了肿瘤细胞增殖。

2.4 RNAi 与乳腺癌细胞信号通路

长链多胺类似物影响着生长相关基因的表达和活性。Zhu 等^[21]通过 ODC-siRNA 的构建和导入 MCF-7 细胞并观察癌细胞生长和 $ER\alpha$ 的表达情况。结果癌细胞生长明显受到抑制且不能被外源性亚精胺或抗酶蛋白抑制剂所逆转,提示鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)对细胞增殖调控的信号通路独立于聚胺代谢。而 ODC KD (ODC knockdown) 但不进行 α -二氟基鸟氨酸(DFMO)处理, $ER\alpha$ 仍然表达下调,说明 ODC 在 $ER\alpha$ 的表达调控中起着重要作用,而 $ER\alpha$ 的下调引起了其下游一系列基因的改变,这提示了乳腺癌中一个新型的多胺合成酶抗雌激素机制。钙感受体(calcium sensing receptor, CaSR)主要功能为维持钙离子的平衡,并且参与细胞间信号的传导,控制基因的表达、细胞凋亡、细胞的增殖与分化并肿瘤转移侵袭性有关。黄昱阳等^[22]运用 RNAi 技术,观察 siRNA 表达载体转染高表达 CaSR 基因的乳腺癌细胞 MDA-MB-231 后对 CaSR 基因表达的影响。试验表明此干扰质粒可有效地抑制 CaSR 基因的表达,有望通过进一步实验实现其对乳腺癌的治疗效果。STAT3 是一种双重功能蛋白偶联于酪氨酸磷酸化信号途径,也是 JAK-STAT 信号途径中重要的成分。Yang 等^[23]构建 STAT3-siRNA 转染 MCF-7 细胞观察 STAT3 mRNA 和蛋白的表达、细胞生长和细胞凋亡,并观察移植到裸鼠中癌细胞的生长情况。STAT3 的 siRNA 能够有效地在体外和体内的沉默 STAT3 基因,增加细胞凋亡率和显著减少细胞增殖,体外同样抑制癌细胞生长(siRNA 组异种移植肿瘤在小鼠体内的生长明显受抑制)。RNAi-STAT3 是一种具有临床应用价值的乳腺癌治疗方法。

2.5 RNAi 与乳腺癌细胞耐药性

耐药性的产生已经成为乳腺癌治疗的严重障

碍,研究表明:基底样乳腺癌细胞与高度甲基化缺陷所致的化疗药物反应不佳密切相关,基底样乳腺癌高度甲基化缺陷与 DNMT3b 过度表达导致的一系列基因沉默相关。Sandhu 等^[24]运用 RNAi 技术构建靶向 DNMT3b 基因的 siRNA 转染高甲基化 MDA-MB-453 乳腺癌细胞,然后测试对盐酸阿霉素的敏感性,结果显示 RNAi 联合化疗组的疗效最为理想。这提示:DNMT3b 是一个乳腺癌治疗的靶点,其与药物联合使基底样乳腺癌治疗成为可能。Wang 等^[25]成功设计靶向 ICBP90 的 siRNA 并转染 MCF-7 乳腺癌细胞并观察其药物敏感性。药物抵抗的细胞中发现 ICBP90 和拓扑异构酶 II α 表达下降,在 ICBP90-siRNA 细胞中细胞生长不受阿霉素影响,而毛喉素刺激试验后,拓扑异构酶 II α 表达上调使细胞生长重新受到阿霉素的抑制。表明蒽环类药物的耐药性与 ICBP90 的下调有关,适当控制 ICBP90 的活性是一个潜在的防止耐药性产生的乳腺癌治疗方略。

2.6 RNAi 与乳腺癌细胞的侵袭、转移

侵袭和转移是乳腺癌扩张性增殖的表现。赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX)在细胞外基质中连接胶原蛋白和弹性蛋白,控制着细胞外基质的结构和弹性。Liu 等^[26]构建慢病毒 LOX-RNAi 载体来减少 LOX 在 MDA-MB-231 细胞中的表达,观察 MDA-MB-231 细胞的增殖和侵袭能力。研究表明靶向 LOX 干扰的癌细胞运动和侵袭能力明显下降,同时 MMP-2、MMP-9 基因表达水平明显下降,表明 LOX 和 MMPs 基因存在紧密的关系,LOX 可以作为抑制乳腺癌转移的靶点。乳腺癌 50% 的首发性和 80% 的复发性转移发生在骨骼中,Guo 等^[27]构建靶向 BMP4 的 siRNA 导入 MCF-7 和 MBA-MD-231 细胞中,抑制了癌细胞的侵袭和转移,证明了 BMP4 在乳腺癌细胞中的作用;同时发现 MMP-1 和 CXCR4 的表达在 BMP4 过表达的细胞中激增。靶向 BMP4 信号通路将成为乳腺癌治疗的新手段。乙酰肝素酶(heparanase, Hap)是一种能够裂解细胞基底膜和细胞外基质中硫酸乙酰肝素侧链的葡萄糖苷酸内切酶,与肿瘤的浸润、转移和血管生成有关。熊向阳等^[28]设计合成 HAP 的 siRNA 转染 MCF-7 乳腺癌细胞,有效的抑制了 HAP 的表达,肿瘤侵袭实验证明 siRNA 组癌细胞的侵袭能力明显受到抑制,为研

发抗肿瘤侵袭转移药物提供理论依据。

3 问题与应用前景

尽管 RNAi 已经成为阻断或抑制基因表达的首选工具,但其非特异性反应和 RNA 传递效率阻碍了 RNAi 作为成熟的乳腺癌治疗手段应用于临床。非特异性反应主要包括脱靶效应和免疫副反应^[29-32]。脱靶沉默效应主要是因为 dsRNA 分解的 siRNA 与胞内其他非靶正常基因存在部分序列同源;免疫副反应主要是激活天然免疫系统,诱导炎症因子如 IFN2 α 、TNF2 α 、TNF2 β 、IL26 等的产生,引起细胞的生长抑制等毒性作用。RNA 传递效率:细胞对裸露的 RNA 吸收效率低而且容易在血液中被酶降解。

siRNA 的这种非特异性反应和 RNA 传递效率极大地影响着它的体内应用,但进一步合理设计高效 siRNA 序列、开发在体内具有长效功能的载体、完善更为特异性的体内输送途径等将成为进一步促进 RNAi 作为乳腺癌治疗策略的研究热点。随着 RNAi 机理的进一步阐明, RNAi 技术将以惊人的速度向前发展,不断取得突破,联合多基因 RNAi 治疗肿瘤将为乳腺癌的基因治疗开辟更广阔的前景。

【关键词】 乳腺肿瘤;基因疗法;RNA 干扰;siRNA

【中图分类号】 R737.9 【文献标志码】 A

参考文献

- [1] Downward J. RNA interference[J]. BMJ, 2004,328(7450): 1245-1248.
- [2] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans [J]. Plant Cell, 1990,2(4):279-289.
- [3] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998,391(6669):806-811.
- [4] Steiner FA, Hoogstrate SW, Okihara KL, et al. Structural features of small RNA precursors determine Argonaute loading in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14(10): 927-933.
- [5] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs [J]. Cell, 2009,136(4):642-655.
- [6] Masiero M, Nardo G, Indraccolo S, et al. RNA interference: implications for cancer treatment [J]. Mol Aspects Med, 2007,28(1):143-166.
- [7] Zhou D, He QS, Wang C, et al. RNA interference and potential applications [J]. Curr Top Med Chem, 2006,6(9): 901-911.
- [8] Rual JF, Klitgord N, Achaz G. Novel insights into RNAi off-target effects using *C. elegans* paralogs [J]. BMC Genomics, 2007,8:106.
- [9] Manjunath N, Dykxhoorn DM. Advances in synthetic siRNA delivery [J]. Discov Med, 2010,9(48):418-430.
- [10] Hannon GJ. RNA interference [J]. Nature, 2002,418(6894): 244-251.
- [11] Jiang Q, Zhang H, Zhang P. ShRNA-mediated gene silencing of MTA1 influenced on protein expression of ER α , MMP-9, CyclinD1 and invasiveness, proliferation in breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 in vitro [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011,30:60.
- [12] Li Y, Zhao L, Sun H, et al. Gene silencing of FANCF potentiates the sensitivity to mitoxantrone through activation of JNK and p38 signal pathways in breast cancer cells [J]. PLoS One, 2012,7(8):e44254.
- [13] Zong X, Yang H, Yu Y, et al. Possible role of Pax-6 in promoting breast cancer cell proliferation and tumorigenesis [J]. BMB Rep, 2011,44(9):595-600.
- [14] Fang L, Shanqu L, Ping G, et al. Gene therapy with RNAi targeting UHRF1 driven by tumor-specific promoter inhibits tumor growth and enhances the sensitivity of chemotherapeutic drug in breast cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2012,69(4):1079-1087.
- [15] Li B, Chu X, Gao M, et al. The effects of CD59 gene as a target gene on breast cancer cells [J]. Cell Immunol, 2011, 272(1):61-70.
- [16] 徐滨,李媛媛,张宝刚,等.小RNA干扰降低COX-2表达对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J].实用医学杂志,2011,27(22):4018-1019.
- [17] Thorner AR, Parker JS, Hoadley KA, et al. Potential tumor suppressor role for the c-Myb oncogene in luminal breast cancer [J]. PLoS One, 2010,5(10):e13073.
- [18] Han J, Zhang F, Yu M, et al. RNA interference-mediated silencing of NANOG reduces cell proliferation and induces G0/G1 cell cycle arrest in breast cancer cells [J]. Cancer Lett, 2012,321(1):80-88.
- [19] Daniel J, Coulter J, Woo JH, et al. High levels of the Mps1 checkpoint protein are protective of aneuploidy in breast cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011,108(13):5384-5389.
- [20] 刘志祥,朱圣明,李瑞明,等. siRNA 沉默 Chk1 基因对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响及其作用机制的探讨 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2012,17(6): 498-500.
- [21] Zhu Q, Jin L, Casero RA, et al. Role of ornithine decarboxylase in regulation of estrogen receptor α expression and growth in human breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 136(1):57-66.
- [22] 黄昱阳,曹以诚,祖冬梅. RNA 干扰对 MDA-MB-231 细胞中 CaSR 基因表达的影响 [J]. 生物技术, 2012,22(3): 51-55.

- [23] Yang Z, Cai JH, Xie SJ, et al. Therapeutic effects of signal transducer and activator of transcription 3 siRNA on human breast cancer in xenograft mice [J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(12):1854-1861.
- [24] Sandhu R, Rivenbark AG, Coleman WB. Enhancement of chemotherapeutic efficacy in hypermethylator breast cancer cells through targeted and pharmacologic inhibition of DNMT3b [J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 131(2):385-399.
- [25] Wang J, Song Y, Xu S, et al. Down-regulation of ICBP90 contributes to doxorubicin resistance [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 656(1/3):33-38.
- [26] Liu JL, Wei W, Tang W, et al. Silencing of lysyl oxidase gene expression by RNA interference suppresses metastasis of breast cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(7):3507-3511.
- [27] Guo D, Huang J, Gong J. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is required for migration and invasion of breast cancer [J]. Mol Cell Biochem, 2012, 363(1-2):179-190.
- [28] 熊向阳, 何宏银, 余乐涵, 等. RNA 干扰抑制乙酰肝素酶的表达对乳腺癌细胞侵袭转移的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(16):15-18.
- [29] Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2007, 59(2/3):75-86.
- [30] Lambeth LS, Van Hateren NJ, Wilson SA, et al. A direct comparison of strategies for combinatorial RNA interference [J]. BMC Mol Biol, 2010, 11:77.
- [31] Tschuch C, Schulz A, Pscherer A, et al. Off-target effects of siRNA specific for GFP [J]. BMC Mol Biol, 2008, 9:60.
- [32] Martinez de Alba AE, Jauvion V, Mallory AC, et al. The miRNA pathway limits AGO1 availability during siRNA-mediated PTGS defense against exogenous RNA [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(21):9339-9344.

(收稿日期:2012-10-16)

(本文编辑:刘军兰)

胡小辉, 李建文. RNA 干扰技术在乳腺癌治疗中的研究进展 [J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2013, 7(1):52-56.