

[27] Yang ZZ, Li J, Li SX, et al. Effect of ginkgolide B on striatal extracellular amino acids in middle cerebral artery occluded rats. *J Ethnopharmacol*, 2011, 136(1): 117-122.

[28] 王晓东, 曾耀英, 宋兵. 银杏内酯 B 对小鼠腹膜巨噬细胞体外增殖、吞噬及产生 NO 和 ROS 的影响. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(1): 4-7.

RNA 干扰技术原理及其在脑胶质瘤治疗中的应用

汪超甲 综述 王辉 审校

湖北医药学院附属太和医院神外三科 湖北 十堰 442000

摘要: RNA 干扰是 dsRNA 在转录后水平特异性降解目的基因 mRNA, 导致该基因沉默的现象。脑胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤, 传统的手术、放、化疗均不能达到彻底治愈的目的。RNA 干扰在脑胶质瘤治疗中的应用, 可能会取得更好的效果。本文就 RNA 干扰技术原理及其在脑胶质瘤治疗中的研究进展作一综述。

关键词: RNA 干扰; 脑胶质瘤; 原理; 应用

脑胶质瘤是中枢神经系统中最常见的恶性肿瘤, 其发病率高达 50% ~ 60%。由于其恶性程度高, 易复发, 侵袭性强, 因此, 针对胶质瘤的治疗一直是神经外科领域的难题。目前临床上以手术治疗为主, 随着显微技术及定位系统的发展, 手术切除率大大提高, 患者的生存时间得以延长, 生存质量得以大幅提高^[1]。放、化疗或者是术后辅以放、化疗进一步提高的病人的生存时间和生活质量, 但是仍不能达到根治的目的。随着基因治疗, 特别是靶向分子治疗, 如 RNA 干扰技术的出现, 使得我们看到了彻底治愈脑胶质瘤的曙光, 为临床治疗提供了一条崭新的治疗途径^[2]。

1 RNA 干扰技术的发现

1990 年, Fire 试图在矮牵牛花中插入一种能够催生红色素的基因, 使花朵的色彩变得变得更加艳丽, 结果转基因的植株不仅没有新的基因表达, 原有的色素基因反而受到抑制, 花朵变为白色, 当时他把这一现象称为共抑制 (consuppression)^[3]。1994 年 Cogoni 在真菌中发现同种现象, 被其称为基因压制 (quelling)^[4]。1995 年 Guo 和 Kemphues 试图利用反义 RNA 阻止秀丽线虫的一些基因表达, 用正义 RNA 作对照组时发现不但不增加该基

因的表达, 反而产生与实验组相同的结果, 证明该基因被特异性阻断, 从而证实了 RNA 干扰现象的存在^[5]。1998 年 Fire 等在将混合的正、反义链 RNA 同时注入秀丽线虫时, 观察到更强的基因表达的抑制, 并首次提出了 RNA interference 的概念^[6]。2001 年 Elbashir 在《Nature》上首次报道利用 21 个核苷酸的 siRNA 成功的在哺乳动物培养的细胞中诱导特异性基因沉默^[7]。2002 年, Brummelkamp 等利用小鼠 H1 启动子首次成功构建了小发夹 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 表达载体, 并发现转染该载体可特异性、有效地降低目的基因的表达, 为 RNAi 技术在基因治疗中的应用研究奠定了基础^[8]。

2 RNA 干扰技术原理及特点

内源性基因或者外源性基因整合到宿主细胞基因组并转录时, 常产生一些 dsRNA。宿主细胞胞质中的核酸内切酶 Dicer 将这些 dsRNA 切割成多个具有特定长度和结构的带有 3' 端单链尾巴及磷酸化 5' 端的短链 dsRNA (大约 21 ~ 23 bp), 即 siRNA。由 siRNA 中的反义链指导形成一种核蛋白体, 即 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC), RISC 中的 siRNA 随后变成单链, 并识别同源靶 mRNA, 引导

基金项目: 湖北省教育厅中青年项目 (Q20112103)

收稿日期: 2014-08-19; 修回日期: 2014-11-21

作者简介: 汪超甲 (1981-), 男, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 胶质瘤的临床及基础研究。

通讯作者: 王辉 (1971-), 男, 博士, 主任医师, 主要研究方向: 颅内肿瘤的临床基础研究。

RISC 复合体结合 mRNA;接着 siRNA 与 mRNA 在复合体中换位,内切核酸酶将 mRNA 切割成 21~23 nt 的片段,离开的 siRNA 单链可能被降解。此后可出现两种情况:① siRNA 继续延伸,产生的 dsRNA 再次进入 RNAi 途径;② 带切口的 mRNA 被进一步降解,mRNA 产生切口后,RISC 复合体可能再进入循环,进行新一轮 mRNA 降解^[5]。

RNAi 具有的特征① RNAi 发挥基因沉默是在转录后水平;② 特异性高:只降解相应的单个内源基因的 mRNA;③ 效率高:很少量的 dsRNA 分子就能完全抑制相应基因的表达,具有催化放大特效;④ 传播性:抑制效应可以穿过细胞界限,在不同细胞间长距离传递和维持信号甚至传播至整个有机体且可遗传;⑤ dsRNA 不得短于 21 个碱基,而且大于 30 bp 不能在哺乳动物中诱导特异的 RNA 干扰,而是非特异性和全面的基因表达受抑和凋亡;⑥ ATP 依赖性:可能是 Dicer 和 RISC 的酶切反应必须由 ATP 提供能量。

3 RNA 干扰技术的应用

3.1 RNA 干扰在基因功能研究的应用

随着人类基因组测序计划的完成,研究者们获得了大量的基因信息,对研究疾病与基因的关系提供了很大帮助,但由于疾病种类多及基因信息量大,尚不能完全弄清基因与疾病以及基因之间的直接联系。很多基因的功能仍不清楚,为此,许多生物工作者共同参与以高通量的方法借组 RNAi 技术对人类基因组进行逐一的“敲除”,并将细胞或者组织的表现记录下来,建立一个人类 RNAi 文库,为后续研究提供基础^[9]。

3.2 抗病毒治疗

RNA 技术能有效抑制目的基因的表达,作为一种有效的工具,被广泛应用于抗病毒病治疗中。Leen 等依据 RNA 作用机理,把 HIV21 末端重复序列、nef 和 vif 附件基因的部分序列设计成干扰片段,结果显示其有效的抑制了病毒 AIDS 基因的表达,为 AIDS 基因治疗提供了一条新的治疗途径^[10]。另外, RNA 干扰技术在乙型肝炎病(HBV)、疱疹病毒、流感病毒、SARS、脊髓灰质炎病毒等基因治疗中的应用也取得了不错的效果。

3.3 抗肿瘤治疗的应用

大量研究表明:肿瘤的发生、发展是多基因共同作用的结果,是癌基因与抑癌基因平衡被打破的结果。利用 RNA 干扰可特异性的抑制基因的表达

达到预防肿瘤发生、防止复发的目的。RNA 干扰还可以抑制原癌基因、病毒癌基因的表达、研究肿瘤相关基因的功能从而达到治疗肿瘤性疾病的目的。Brumelkamp 等将 siRNA 转染至肿瘤细胞,抑制 K-ras 的表达用于急性髓性白血病治疗。Survivin 基因是一种抗凋亡分子在很多恶性肿瘤中高表达,利用 RNA 技术沉默 Survivin 基因,结果发现肿瘤细胞发生了凋亡。此外 RNAi 技术还在肺癌、肝癌、乳腺癌、黑色素瘤等肿瘤细胞的体外抑制实验中获得了成功^[11]。

3.3.1 在遗传疾病治疗的应用 日本研究者 Ishizuka 等研究 RNAi 在脆性 X 染色体综合征发生中的作用是发现:RNAi 相关机制的缺陷可能是导致人类遗传疾病的病理机制。选择靶基因进行干扰可以治疗 HD 和 ALS 等遗传性疾病。RNA 干扰技术的出现无疑为遗传性疾病的治疗开辟了新的思路和途径^[12]。RNA 干扰在信号通路、肿瘤耐药性、临床新药的开发等方面同样得到广泛的应用,并取得不错的效果。

4 RNA 干扰技术在脑胶质瘤中的应用

随着 RNA 干扰技术的成熟及发展,其在脑胶质瘤的应用的研究也越来越多。徐松柏等研究者利用 RNA 干扰技术对 PTTG 基因的研究发现沉默 PTTG 基因可以高效地抑制胶质瘤 U251 细胞 PTTG 基因的表达,从而调控肿瘤细胞周期,抑制肿瘤细胞增殖^[13]。袁先厚等在研究 RNA 干扰 Cyr61 基因时同样发现其可抑制 Cyr61 在人脑胶质瘤细胞中的表达,促进细胞凋亡并能抑制细胞的增殖和侵袭^[14]。晋雯等在实验中利用小干扰 RNA 抑制骨桥蛋白发现 U251 的表达、生长及侵袭能力得到很好的抑制^[15]。饶海承等同时干扰 Survivin 和 FoxM1B 发现较单独干扰单个基因可得到更明显的抑制效果^[16]。

通过慢病毒或者是真核表达载体构建目的基因的 RNA 干扰重组载体并将其转染至脑胶质瘤细胞中研究其对细胞凋亡、增殖及侵袭能力的影响是目前普遍采用的方法,取得了不错的效果,为临床治疗脑胶质瘤提供了一条新的治疗途径^[17]。

5 问题与挑战

脑胶质瘤尤其是胶质母细胞瘤由于其恶性程度高、易复发、手术切除不完全生存率仍较低(平均尚不到 1 年),术后多数生存质量明显下降。RNA 干扰技术从基因水平探讨该基因在脑胶质瘤

中的作用并通过抑制肿瘤细胞的生长、凋亡、侵袭及转移,有望达到彻底治愈的目的。然而,目前的研究尚处于细胞水平,要想将其应用于脑胶质瘤的临床治疗尚需要更多的努力。脑胶质瘤的发生、发展是多基因、多因素共同参与的结果,也受肿瘤微环境的影响,要从根本上治愈胶质瘤,需从多方面综合考虑,结合患者的具体情况,可能会取得更好的疗效。

6 展望

肿瘤干细胞的发现及其研究可能找到胶质瘤发生的根源,针对胶质瘤干细胞的研究有望达到斩草除根的作用^[18]。肿瘤疫苗的出现可能早期预防性的防止胶质瘤的发生^[19],免疫治疗同样可以从基因水平提高胶质瘤的治疗效果^[20]。基因敲除技术 TALENs, TFNs, 特别是 CRISPR-Cas 设计更简单且可以同时两个或者以上的基因进行编辑、修饰,可以敲除通路蛋白,从而更好地了解肿瘤发病机制,找到各基因之间的联系,从多基因治疗出发,希望能为彻底治愈脑胶质瘤提供更优的治疗途径^[21]。

参 考 文 献

- [1] 罗江兵,赵鹏洲,欧英雄,等. 手术辅助局部热化疗治疗脑胶质瘤的疗效分析. 当代医学, 2012, 18(12): 20-21.
- [2] Jidong L, MicheUe A, Camell FV, et al. Harmon Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. Science 2004, 305(7): 1437-1441.
- [3] Fire A, Xu S, Montgomery M, et al. Potent and genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998, 391: 806-811.
- [4] Cogoni C, Romano N, Macino G, et al. Suppression of gene expression by homologous transgenes. Antonie Van Leeuwenhoek, 1994, 65(3): 205-209.
- [5] Guo S, Kempthues KJ, Par L, et al. A gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos. encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell, 1995, 81(4): 611-620.
- [6] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.
- [7] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel M, et al. Duplexes of 21 nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature, 2001, 411(4): 494-498.
- [8] Brummelkamp T, Bernards R, Agami R, et al. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science, 2002, 296(5567): 550.
- [9] Matheis F, Besch R. Bifunctional siRNAs for tumor therapy. Methods molbiol, 2014, 1169(1): 181-192.
- [10] Gao S, Yang C, Jiang S, et al. Applications of RNA interference high throughput screening technology in cancer biology and virology. Protein & Cell, 2014, 5(4): 1-11.
- [11] Ren YJ, Zhang Y. An update on RNA interference-mediated gene silencing in cancer therapy. Expert Opin Biol Ther, 2014, 6(10): 10-12.
- [12] Takahashi M, Hohjoh H. A novel measurement of allele discrimination for assessment of allele-specific silencing by RNA interference. mol biol rep, 2014, 12(6): 125-131.
- [13] 徐松柏,赵红光,赵刚,等. RNAi 沉默 PTTG 基因对恶性胶质瘤 U251 细胞的影响. 中国老年学杂志 2008, 28(7): 645-647.
- [14] 付锴,袁先厚,江普查,等. RNA 干扰抑制 Cyr61 表达对人脑胶质瘤细胞生物学行为的影响. 中华实验外科杂志, 2008, 25(4): 477-479.
- [15] 晋雯,李赞,黄智勇,等. 小 RNA 干扰骨桥蛋白抑制人 U251 细胞的体外生长与侵袭. 解剖学杂志, 2011, 34(1): 23-26.
- [16] 于如同,饶海承,石琼,等. 靶向 Survivin 和 FoxM1B 的 shRNA 对人脑胶质瘤干细胞生长和凋亡的影响. 中华实验外科杂志, 2008, 25(1): 107-110.
- [17] Hendrusch S, Wiedemuth R, Aigne A, et al. RNA interference targeting survivin exerts antitumoral effects in vitro and in established glioma xenografts in vivo. Neuro Oncol. 2011, 13(10): 1074-1089.
- [18] 徐国政. 脑胶质瘤靶向治疗新进展. 中国临床神经外科杂志, 2011, 16(9): 568-572.
- [19] 冀保卫,陈谦学,田道锋,等. 胶质瘤干细胞疫苗治疗恶性脑胶质瘤. 中华实验外科杂志, 2011, 28(4): 638.
- [20] 孙广卫,张少军,李建,等. 脑胶质瘤免疫之治疗的进展. 蚌埠医学院报, 2012, 37(2): 244-247.
- [21] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nature Protocols, 2013, 8(11): 2281-2308.