

RNA干扰技术与结肠癌

靳西凤, 冉志华

靳西凤, 冉志华, 上海交通大学医学院附属仁济医院 上海市
消化疾病研究所 上海市 200001

通讯作者: 冉志华, 200001, 上海市, 上海交通大学医学院附属仁
济医院, 上海市消化疾病研究所. violetmooded1210@126.com
电话: 021-63260930

收稿日期: 2006-04-13 接受日期: 2006-05-24

摘要

RNAi技术具有特异性和高效性, 已经成为研究基因功能的重要工具, 在肿瘤的治疗中发挥重要作用, 但同时也存在其不足. 现就近年来RNAi在结肠癌的基因治疗中的运用作一综述.

关键词: RNA干扰; PTGS; siRNA; shRNA

靳西凤, 冉志华. RNA干扰技术与结肠癌. 世界华人消化杂志
2006;14(20):2003-2008

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2003.asp>

0 引言

RNA干扰技术RNAi曾几度被评为世界科技热点新闻, 自从RNA干扰技术被《Science》杂志评选为2002年度世界十大科学成就之首以来, RNA干扰在结肠癌的应用方面有了长足的进步. 针对细胞信号转导、细胞凋亡、细胞周期调控分子、端粒酶、细胞因子及其受体基因等不同位点而设计的小干扰RNA对结肠癌细胞均有明显的阻抑作用.

1 RNA干扰现象及其机制

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是正常生物体内抑制特定基因表达的一种现象, 他是指当细胞中导入与内源性mRNA编码区同源的双链RNA(double stranded RNA, dsRNA)时, 该mRNA发生降解而导致基因表达沉默的现象, 这种现象发生在转录后水平, 又称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS). 这种现象在线虫秀丽隐杆线虫首次被发现^[1], 很多有机体中普遍存在. 外源dsRNA进入细胞后, 就被切割成大约22核苷酸长的小分子干扰RNA(small interfering RNA, siRNA), siRNA的

反义链和多种核酸酶形成了沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC), RISC具有结合和切割mRNA的作用而介导RNA干扰的过程.

依据RNA干扰现象, 科学家建立了RNA干扰技术, 即人为设计合成针对某特定基因序列的dsRNA来关闭或抑制该基因的表达. 科学家通常使用2个方法来引发RNAi. (1)创造化学上修饰过的短链siRNA, 这些siRNA带有药物的特性; (2)创造带有发夹结构的shRNA. siRNA发挥作用的时间较短, shRNA则作用时间较为持久^[1]. RNA干扰已被证实是一种特异、高效、经济的使基因表达受抑的技术手段. 科学家也证实了RNAi的其他机制: siRNA的一股链与靶mRNA分子退火时, 使得RdRP(RNA指导的RNA聚合酶)利用靶mRNA作为模板, siRNA作为引物来产生新的双链mRNA, 这能够被Dicer所切割, 因此促成了siRNA库. 这种正反馈对于RNAi作用的高效性有深远的意义^[2].

随着RNAi现象的发现, 科学家很快意识到内源性基因也能产生双链发夹结构, 干扰特异基因的功能. 这些内源性的siRNAs, 称作微RNA或小调节RNA或异染色质RNA^[4-6], 主要影响翻译的效率而不是mRNA的稳定性. miRNA长度上有70 nt, 以自身的编码基因通过自身互补配对结合形成双链茎环发夹结构分子来转录^[7]. miRNA的发夹结构经Dicer加工, 被置入RISC^[8]. 大多数哺乳动物miRNA通过结合到靶转录本的3'未翻译区域(UTR)抑制蛋白的合成, 造成翻译终止^[9]. 单独一个碱基的错配可能完全阻止siRNA沉默^[10], 但miRNA引起的翻译抑制可允许与mRNA靶序列的一个错配^[11]. 因此, 单独一个miRNA能够调节许多不同的基因, 这可能促进siRNA的非靶向作用^[12]. Kawasaki *et al*^[13]指出: siRNA能够通过直接的DNA甲基化降低靶基因的转录. dsRNA参与了RNA合成、降解和蛋白质合成的主要过程.

2 RNAi的递送途径

科学家将siRNA导入细胞的方法有直接法和

■背景资料

RNA干扰技术RNAi曾几度被评为世界科技热点新闻, 因其作用的特异性及高效性, 已成为研究基因功能的重要的工具. 在肿瘤(结肠癌)的治疗及药物开发中也发挥着重要的作用. 《科学》杂志预测RNA干扰技术仍将是2006年世界科研热点之一, 而且RNAi治疗技术正在快速进入人体试验阶段.

■ 研发前沿

针对细胞信号转导、细胞凋亡、细胞周期调控分子、端粒酶、细胞因子及其受体基因等不同位点而设计的小干扰RNA,对结肠癌细胞的阻抑作用是目前的研究重点,而且大多提倡多种siRNA/shRNA的联合应用或联合其他药物治疗的方法。

间接法。目前用于临床的有直接注射和反复注射^[2]。使用这种方法必须保证所用的siRNA、shRNA能够识别特异的组织信息以进入细胞质,同时保证不被血液中的各种酶所分解。此方法可降低潜在的超剂量风险,也可避免非靶向作用。间接法则是通过各种不同的载体将siRNA、shRNA导入细胞^[2]。如:通过秀丽隐杆线虫、双链RNA、质粒和病毒^[14-20]等。质粒转染和病毒转导作用类似,但是慢病毒亚科介导的基因沉默较稳定^[21]。最近有人运用了抗体的靶向运输方法^[22-24],即通过抗体介导的胞吞作用来传递siRNA到特异的靶细胞群^[25]。有学者设计了一个与单一融合蛋白结合的抗体,来递送siRNA到特异的细胞群体。通过一个抗-gp120的抗体来递送针对不同基因的siRNA只能沉默表达gp120的细胞的基因。通过鱼精蛋白Fab抗体同时来传送针对c-myc,mdm2和VEGF的siRNA时,能够抑制小鼠肿瘤的生长。使用此方法的优点是:有较高的靶向特异性,同时也无感染风险^[22]。

3 RNAi在结肠癌中的应用

3.1 肿瘤相关基因 在很多肿瘤的发展和演进中,癌基因的过表达是一个很普遍的现象。因此癌基因可为肿瘤治疗的潜在靶分子。结肠腺瘤性息肉病基因(adenomatous polyposis coli, APC)在大多数结肠癌细胞中处于截短状态,可导致 β -连环蛋白稳定以及Wnt信号的组成性活化状态。通过RNAi敲除APC可减弱细胞增殖和DNA复制^[26]。癌基因mdm2在人类多种肿瘤中过表达。MDM2的特异性敲除可能是结肠癌靶向治疗的潜在策略。针对mdm2 mRNA的全长反义mRNA和寡核苷酸体外可抑制癌细胞的增殖。然而这些技术成功的机率较少,且难于普及。最近RNAi介导的基因敲除引发了体细胞遗传学的革命,使得经济的、迅速分析基因功能成为可能。作者发现将mdm2 siRNA转染入LoVo细胞5 d后,mdm2的表达水平被抑制80%,且这种抑制作用具有特异性。因此,以载体为基础的RNAi能够有效抑制mdm2的过表达,且可使siRNA分子在细胞内稳定持久表达^[27]。Evi1在肠上皮细胞和结肠癌中作为一个生存基因发挥作用,可活化PI3K/AKT,对生理性和治疗性凋亡刺激有不同程度的抵抗性。Evi1在人结肠癌细胞中过表达,这种过表达与其扩增有关。在结肠癌HT-29中,siRNA敲除后,Evi1可抑制Akt磷酸化,增加其对紫杉酚介导的凋亡的易感性^[28]。其他学者利用RNAi技

术证实了ID(抑制DNA结合和分化的基因)基因在肿瘤的血行转移中起着作用。RNAi敲除此基因后,肿瘤细胞增殖延迟,活力下降,整联蛋白 $\alpha 6$ 的表达降低,随后降低其黏附到肺脏微血管系统^[29]。因此RNAi在肿瘤基因筛选和治疗上均有重要的作用。

3.2 凋亡相关基因 在结肠癌细胞中,bcl-X(L),survivin等抗凋亡基因往往过度表达。利用RNAi技术阻抑这些基因的表达将是结肠直肠癌基因治疗的一个潜在策略。survivin位于中心体,在有丝分裂时可调节中心体复制。利用RNAi将survivin敲除后,则使细胞增殖降低35%。但若将c-myc、survivin同时敲除后,则HCT116细胞的增殖降低65%。因此针对survivin的siRNA明显降低进入S期的细胞的数量^[30],c-myc siRNA和survivin siRNA有协同发挥抗肿瘤细胞增殖的作用。Bcl-X(L)是一个抗凋亡蛋白,针对bcl-X(L)的siRNA可抑制结肠癌细胞增殖,使获得性和先天性的肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)抵抗性结肠癌对于TRAIL诱导的凋亡更为敏感^[31-32]。联合使用bcl-X1 siRNA和TRAIL蛋白干预结肠癌细胞后,则凋亡细胞百分比增加,caspase-8, caspase-9, caspase-3和PARP的分裂也增加。同时,联合治疗比单独的bcl-X1 siRNA干预的情况下,细胞色素c释放增加。因此,同时诱发死亡受体和线粒体凋亡通路则增强凋亡诱导作用。RNAi治疗耐药性肿瘤有潜在的作用^[31]。同时有学者证实,使用Bcl-XL siRNA敲除Bcl-XL后能够更有效的抑制5-FU抵抗性肿瘤。联合利用Bcl-XL siRNA和5-FU干预结肠癌细胞,则对于5-FU抵抗性肿瘤细胞的抑制作用有累加效应。由此我们可知利用RNAi下调Bcl-X1可为结肠癌治疗的一个新的策略^[33]。此外, RNAi可敲除具有抗凋亡活性的蛋白,即RNAi可在mRNA水平和蛋白水平同时发挥其作用。

3.3 信号分子 信号转导治疗是近年来出现的一种新的抗肿瘤方法。针对不同的信号转导的不同分子而设计的小干扰RNAi将会是肿瘤治疗的一个策略。目前利用RNAi来阻抑STAT3, STAT6, PI3K/AKT, NF- κ B等的表达可对结肠癌发挥不同程度的抑制作用。STAT3是信号转导和转录激活家族的一个成员,是一个重要的信号转导蛋白,介导由细胞因子和癌蛋白引发的信号,在肿瘤中常处于活化状态。在HCT8/S11-siRNA STAT3细胞内,siRNA STAT3阻断血管内皮(细胞)生长因子(VEGF)诱导的侵袭作用^[34]。STAT6

信号通路在调节结肠癌细胞增殖和凋亡方面起着重要的作用, 不同的短链发夹结构(shRNAs)能够特异性的敲除STAT6的转录, 抑制细胞增殖, G1/S期静止, 凋亡细胞死亡^[35-36]. PI3K/AKT信号通路在许多肿瘤中失调. 使用针对PI3K p85 α 调节亚单位Akt1的siRNA和TRAIL联合治疗结肠癌后, 凋亡细胞的数量明显多于单独应用TRAIL时. 而且Akt1 siRNA介导的PI3K通路的抑制导致TRAIL死亡受体4和5增加. RNAi在抑制PI3K/Akt同时可通过诱导TRAIL受体使得抵抗性结肠癌细胞对TRAIL诱导的细胞死亡更加敏感^[38]. PI3K特异性的siRNA也可降低结肠癌细胞活力, 抑制转移性结肠癌的生长^[37]. 这为联合使用siRNA和其他化学治疗药物提供了新的策略^[38].

针对NF- κ B p65 siRNA可增强肿瘤细胞对于化学治疗药物的敏感性^[39]. 在临床肿瘤模型中, 抑制NF- κ B同增加对化学治疗药物如依立替康(CPT-116)的敏感性相关. 这是因为依立替康活化NF- κ B进而导致c-IAP1, c-IAP2基因的表达, 而这两个基因抑制依立替康诱导的肿瘤细胞凋亡. 针对NF- κ B的p65亚单位的siRNA可明显削弱依立替康介导的NF- κ B的活性, 体内给予 p65 siRNA后, 亦可抑制HCT116肿瘤的形成.

3.4 细胞周期分子 Polo-like激酶1(Pik1)是存在于哺乳动物细胞中的丝/苏氨酸蛋白激酶, 是参与细胞周期运行的重要分子, 在有丝分裂的进入、中心体的成熟、纺锤体的组装和胞质分裂中发挥重要作用; Pik1亦是周期检测点信号转导中的重要分子. 研究显示在许多人类肿瘤中Pik1均呈高表达状态, 并与肿瘤的分期和预后相关联. 针对Pik1的siRNA可明显降低Pik1蛋白及其mRNA水平^[40]. 将其导入SW480细胞后, 则细胞处于有丝分裂静止期, 他们的中心体失去了形成有核的微管的能力. 总之, 针对Polo-like激酶1的siRNA是肿瘤靶向基因治疗的工具^[41].

3.5 耐药基因 肿瘤细胞中多药耐药基因产物P-糖蛋白(MDR1基因产物)是成功化疗的主要障碍. 针对MDR1的shRNA对P-糖蛋白表达的抑制可达90%以上, 使用逆转录病毒介导的shRNAi转染结肠癌细胞敲除P-糖蛋白后, 可增加MDR1-shRNAi细胞对细胞毒类药物(长春新碱、紫杉醇、阿霉素)的敏感性^[42-44]. 因此, RNAi和化疗药物的联合疗法对于耐药性结肠癌将会是一个新的治疗策略.

3.6 抑制端粒酶活性 癌细胞中存在的端粒酶

可赋予细胞疯狂分裂、永不死亡的致命能力. RNAi已成为攻击端粒酶的途径是一个研究热点. 将21 nt双链RNA同源物转染人结肠癌细胞, 则其或转移到端粒酶的催化亚单位, 或转移到他的模板RNA [human telomerase RNA(hTR)]. 这两种转染均可降低肿瘤细胞的端粒酶活性, 而且对端粒酶的抑制呈现剂量依赖性^[45]. 但当其到达一定的浓度时, siRNA浓度的增加并不增加对端粒酶抑制作用. RNA上的确切靶位点可能是一个关键的因素.

3.7 细胞因子及其受体 巨噬细胞抑制因子(MIF)是重要的抗炎性介质因子, 在免疫反应中有着重要的作用, 同时在肿瘤形成中也有重要的作用. 我们发现MIF siRNA明显降低结肠癌细胞侵袭过程. 溶血磷脂酸(LPA)诱导的Rho-依赖性信号通路被MIF siRNA所抑制, 而且, FAK的酪氨酸磷酸化和LPA诱导的整联蛋白的表达被MIF siRNA所抑制. 在活体内, 肿瘤的肝转移也被预先用MIF siRNA处理所抑制^[46]. VEGF在肿瘤内皮细胞的增殖、迁移和血管构建中起着重要的作用, 其表达水平与肿瘤组织的血管化程度及恶性程度呈现明显的正相关. 将VEGF siRNA转染入结肠癌细胞后, 则使VEGF表达敲除94%, 细胞增殖减少67%^[47]. 另有学者证实, siRNA与Chol-R9的非共价键结合形成复合体后则更有效增加递送VEGF siRNA效率, 且使结肠癌明显消退^[48]. 因此, VEGF siRNA可作为结肠癌基因治疗的有效方法^[47-49]. 此外, RNAi敲除VEGFR也可减少结肠直肠癌细胞转移, 诱导其凋亡^[50].

3.8 COX-2 NSAIDs的服用可减少家族性多发性腺癌中的息肉体积和息肉数量, 进而降低结肠直肠癌发病危险. 但NSAIDs可增加心血管的风险, 此作用可能由于COX-依赖性或非依赖性机制导致. 有人使用RNAi敲除HT-29细胞内源性COX-2后, 发现明显敲除了57%的蛋白(与对照组相比), 且逆转录病毒介导的COX-2 shRNA基因敲除效率较高^[52]. 特异性的COX-2 siRNA可抑制癌增生, 并诱导其凋亡, 且COX-2蛋白水平的降低与其mRNA水平的降低一致^[51]. 由此我们可知: 利用RNAi可下调内源性COX-2水平, 这对于揭示COX-2在肿瘤发生、发展方面将会是一个有效的工具^[51].

3.9 连环蛋白P120和 β -连环蛋白 连环蛋白P120在癌细胞黏附、迁移和增殖等细胞生物学行为中有重要的作用, 利用免疫组织化学方法在557个原发性肿瘤患者中检测连环蛋白P120的表达,

■应用要点

RNAi作为一种高效的序列特异性基因敲除技术在结肠癌等的基因治疗中发展较为迅速, 为耐药性结肠癌的治疗提供了新的治疗策略.

■名词解释

RNA干扰(RNA interference, RNAi): 是正常生物体内抑制特定基因表达的一种现象, 他是指当细胞中导入与内源性mRNA编码区同源的双链RNA(double stranded RNA, dsRNA)时, 该mRNA发生降解而导致基因表达沉默的现象, 这种现象发生在转录后水平, 又称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS).

结果是53%的肿瘤显示出胞质染色. 连环蛋白P120定位与患者预后有关, 显著降低患者5 a和10 a生存期, 且有很大的淋巴结转移倾向. 同时, P120连环蛋白的转位同上皮细胞钙黏蛋白的消失或其胞质定位有关. 利用RNA干扰敲除P120连环蛋白后, 导致RhoA活性降低, 继而导致间质转移活性明显降低^[53]. 因此, RNA干扰可抑制肿瘤的转移及侵袭. β -连环蛋白是一个具多重功能的蛋白, 既可以作为细胞黏附的结构元件又可作为Wnt信号通路的元件, 调节胚胎发育和肿瘤发生的过程. β -连环蛋白通路的组成性活化在结肠直肠癌发生过程中起着重要的作用. 在HCT116中, 利用RNAi敲除 β -连环蛋白后, 可阻断LPA-诱导的肿瘤细胞增生. 因为LPA活化 β -连环蛋白通路中主要的信号事件: 糖原合成酶3 β 的磷酸化、 β -连环蛋白核转位、T-细胞因子/淋巴样强化因子的转录激活及靶基因的表达^[54]. 针对 β -连环蛋白的siRNA也明显减少 β -连环蛋白依赖性基因的表达, 抑制结肠癌细胞增殖^[55]. 因此可通过RNAi来抑制 β -连环蛋白的表达进而抑制结肠癌细胞增生. 最近有学者证实, 编码 β 1-连环蛋白shRNA的*E. coli*明显诱导结肠癌基因沉默. 因此, 细菌介导的RNAi将会为功能基因组学及肿瘤靶向治疗提供依据^[56].

3.10 甲基化作用 DNA甲基化抑制剂的研究是肿瘤治疗新的方向, CpG岛通常是未甲基化. 当肿瘤抑制基因发生高甲基化, 造成相关基因表达沉默, 并可出现细胞以缺失或者突变的形式恶性生长. DNMT1对于维持肿瘤细胞整体的和异常的CpG岛的甲基化是必要的. 使用反义或siRNA选择性敲除DNMT1, 导致肿瘤细胞甲基转移酶活性降低, 也使整个基因发生独特性的脱甲基作用, 同时引起肿瘤抑制基因的重新表达^[57]. 正是基于基因敲除和RNAi介导的敲除所产生的差异, 人们对DNMT1在维持CpG岛的甲基化提出了疑问^[58].

4 RNA干扰应用前景

RNAi仍是确定单个基因的工具, 且以siRNA为基础的基因治疗必定不会太远, 现在人类依据RNA干扰技术已建立起即用性siRNA文库和表达性siRNA文库, 使得利用RNAi技术进行高通量筛选基因成为可能. 我们希望能够扩展现在的文库以靶向作用于更多的未知和非编码的转录本, 以建立起低重复性、高效率性、低非靶向作用的文库^[59]. RNAi作为一种高效的序列

特异性基因敲除技术在传染性疾病和恶性肿瘤基因治疗领域发展必定更加迅速. 如今RNA干扰已经成为药物开发的一种关键技术. 2004年, RNAi首次作为评估药物靶标的一种技术进入应用, RNAi开发药物也将会进入临床试验. siRNA技术对于药物的发展的一个主要的优点是: 可以在最短的时间, 以相对较小的经济发展代价来为任何一个目的基因设计一个特异siRNA复合物, 同其他传统的小分子为基础的治疗相比有明显的灵活性^[12].

尽管RNAi在探索基因功能和基因治疗领域发展极为迅速, 并取得极大的进步, 但其也存在自身的不足. 目前大家一致认为: RNAi的靶向特异性和靶向作用不足是其问题所在^[60]. 而且siRNA, shRNA转染的细胞可引起各种假象, 在分子肿瘤学上可能引起误导^[59], 如: 传递系统如转染和病毒转导, 可能引起细胞状态的暂时性改变; 导入细胞内的寡核苷酸, 由于其序列或其二级结构能够与特异蛋白形成复合体, 因此也可产生假象等.

5 参考文献

- 1 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- 2 Lenz G. The RNA interference revolution. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 1749-1757
- 3 Wilson JF. Gene therapy yields to RNA interference. *Ann Intern Med* 2005; 143: 161-164
- 4 Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 2002; 297: 1833-1837
- 5 Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 862-864
- 6 Kuwabara T, Hsieh J, Nakashima K, Taira K, Gage FH. A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells. *Cell* 2004; 116: 779-793
- 7 Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431: 350-355
- 8 Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 2004; 16: 861-865
- 9 Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 2002; 30: 363-364
- 10 Du Q, Thonberg H, Wang J, Wahlestedt C, Liang Z. A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 1671-1677
- 11 Saxena S, Jonsson ZO, Dutta A. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 44312-44319
- 12 Cejka D, Losert D, Wacheck V. Short interfering

- RNA (siRNA): tool or therapeutic? *Clin Sci (Lond)* 2006; 110: 47-58
- 13 Kawasaki H, Taira K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* 2004; 431: 211-217
- 14 Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 1998; 395: 854
- 15 Kennedy S, Wang D, Ruvkun G. A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 2004; 427: 645-649
- 16 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 17 Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliensky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004; 432: 173-178
- 18 Myslinski E, Ame JC, Krol A, Carbon P. An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 2502-2509
- 19 Tuschl T, Borkhardt A. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv* 2002; 2: 158-167
- 20 Hemann MT, Fridman JS, Zilfou JT, Hernando E, Paddison PJ, Cordon-Cardo C, Hannon GJ, Lowe SW. An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes *in vivo*. *Nat Genet* 2003; 33: 396-400
- 21 Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 2003; 33: 401-406
- 22 Sioud M. Antibodies guide the way. *Gene Therapy* 2006; 13: 194-195
- 23 Vornlocher HP. Antibody-directed cell-type-specific delivery of siRNA. *Trends Mol Med* 2006; 12: 1-3
- 24 Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA, Lieberman J. Antibody mediated *in vivo* delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 709-717
- 25 Zenke M, Steinlein P, Wagner E, Cotten M, Beug H, Birnstiel ML. Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3655-3659
- 26 Schneikert J, Behrens J. Truncated APC is required for cell proliferation and DNA replication. *Int J Cancer* 2006; 119: 74-79
- 27 Yu Y, Sun P, Sun LC, Liu GY, Chen GH, Shang LH, Wu HB, Hu J, Li Y, Mao YL, Sui GJ, Sun XW. Downregulation of MDM2 expression by RNAi inhibits LoVo human colorectal adenocarcinoma cells growth and the treatment of LoVo cells with mdm2siRNA3 enhances the sensitivity to cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339: 71-78
- 28 Liu Y, Chen L, Ko TC, Fields AP, Thompson EA. Evil is a survival factor which conveys resistance to both TGFbeta- and taxol-mediated cell death via PI3K/AKT. *Oncogene* 2006; 25: 3565-3575
- 29 Okaji Y, Tsuno NH, Kitayama J, Sakurai D, Tsuchiya N, Saito S, Takegami K, Tsuchiya T, Kawai K, Yazawa K, Asakage M, Yoneyama S, Yamada J, Tokunaga K, Takahashi K, Nagawa H. Effects of down-regulating the Id genes in human colorectal cancer cells on early steps of haematogenous metastasis. *Eur J Cancer* 2006; 42: 668-673
- 30 Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, Verma U, Gokaslan T, Simmang C, Fleming J, Tavana D, Frenkel E, Becerra C. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 931-946
- 31 Zhu H, Guo W, Zhang L, Davis JJ, Wu S, Teraishi F, Cao X, Smythe WR, Fang B. Enhancing TRAIL-induced apoptosis by Bcl-X(L) siRNA. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 393-397
- 32 Kim K, Fisher MJ, Xu SQ, el-Deiry WS. Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 335-346
- 33 Zhu H, Guo W, Zhang L, Davis JJ, Teraishi F, Wu S, Cao X, Daniel J, Smythe WR, Fang B. Bcl-XL small interfering RNA suppresses the proliferation of 5-fluorouracil-resistant human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 451-456
- 34 Rivat C, Rodrigues S, Bruyneel E, Pietu G, Robert A, Redeuilh G, Bracke M, Gespach C, Attoub S. Implication of STAT3 signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor 3 (TFF3) - and vascular endothelial growth factor-mediated cellular invasion and tumor growth. *Cancer Res* 2005; 65: 195-202
- 35 Zhang M, Zhou Y, Xie C, Zhou F, Chen Y, Han G, Zhang WJ. STAT6 specific shRNA inhibits proliferation and induces apoptosis in colon cancer HT-29 cells. *Cancer Lett* 2005
- 36 Zhang MS, Zhou YF, Zhang WJ, Zhang XL, Pan Q, Ji XM, Luo ZG, Wu JP. Apoptosis induced by short hairpin RNA-mediated STAT6 gene silencing in human colon cancer cells. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 801-808
- 37 Rychahou PG, Jackson LN, Silva SR, Rajaraman S, Evers BM. Targeted molecular therapy of the PI3K pathway: therapeutic significance of PI3K subunit targeting in colorectal carcinoma. *Ann Surg* 2006; 243: 833-842
- 38 Rychahou PG, Murillo CA, Evers BM. Targeted RNA interference of PI3K pathway components sensitizes colon cancer cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Surgery* 2005; 138: 391-397
- 39 Guo J, Verma UN, Gaynor RB, Frenkel EP, Becerra CR. Enhanced chemosensitivity to irinotecan by RNA interference-mediated down-regulation of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3333-3341
- 40 Chen GX, Dong QH, Zhang JW, Fu FF, Xu ZF, Liang QY, Zheng S, Ding JY. Knockdown of PLK1 mRNA by special siRNA. *Yichuan* 2006; 28: 21-25
- 41 Spankuch-Schmitt B, Bereiter-Hahn J, Kaufmann M, Strebhardt K. Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:

■同行评价

本文较全面综述了RNA干扰技术原理与进展及其在结肠癌研究的概况,条理清晰,层次分明,逻辑性强,有一定可读性。

- 1863-1877
- 42 Pichler A, Zelcer N, Prior JL, Kuil AJ, Piwnica-Worms D. *In vivo* RNA interference-mediated ablation of MDR1 P-glycoprotein. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4487-4494
- 43 Matsui Y, Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y. Sequence-specific suppression of *mdr1a/1b* expression in mice via RNA interference. *Pharm Res* 2005; 22: 2091-2098
- 44 Celius T, Garberg P, Lundgren B. Stable suppression of MDR1 gene expression and function by RNAi in Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 365-371
- 45 Kosciolk BA, Kalantidis K, Tabler M, Rowley PT. Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 209-216
- 46 Sun B, Nishihira J, Yoshiki T, Kondo M, Sato Y, Sasaki F, Todo S. Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor invasion and metastasis via the Rho-dependent pathway. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1050-1058
- 47 Mulkeen AL, Silva T, Yoo PS, Schmitz JC, Uchio E, Chu E, Cha C. Short interfering RNA-mediated gene silencing of vascular endothelial growth factor: effects on cellular proliferation in colon cancer cells. *Arch Surg* 2006; 141: 367-374
- 48 Kim WJ, Christensen LV, Jo S, Yockman JW, Jeong JH, Kim YH, Kim SW. Cholesteryl oligoarginine delivering vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma. *Mol Ther* 2006
- 49 吕伟, 张超, 郭红, 刘伟, 郝迎学. 应用RNA干扰沉默血管内皮生长因子基因抑制HCT116细胞增殖的实验研究. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2870-2873
- 50 Ochiuni T, Kitadai Y, Tanaka S, Akagi M, Yoshihara M, Chayama K. Neuropilin-1 is involved in regulation of apoptosis and migration of human colon cancer. *Int J Oncol* 2006; 29: 105-116
- 51 Charames GS, Bapat B. Cyclooxygenase-2 knockdown by RNA interference in colon cancer. *Int J Oncol* 2006; 28: 543-549
- 52 Strillacci A, Griffoni C, Spisni E, Manara MC, Tomasi V. RNA interference as a key to knockdown overexpressed cyclooxygenase-2 gene in tumour cells. *Br J Cancer* 2006; 94: 1300-1310
- 53 Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, Rimm DL, Mercurio AM. Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer Res* 2005; 65: 10938-10945
- 54 Yang M, Zhong WW, Srivastava N, Slavin A, Yang J, Hoey T, An S. G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors stimulate proliferation of colon cancer cells through the {beta}-catenin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 6027-6032
- 55 Verma UN, Surabhi RM, Schmaltieg A, Becerra C, Gaynor RB. Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the *in vitro* and *in vivo* growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1291-1300
- 56 Xiang S, Fruehauf J, Li CJ. Short hairpin RNA-expressing bacteria elicit RNA interference in mammals. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 697-702
- 57 Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet* 2003; 33: 61-65
- 58 Ting AH, Jair KW, Suzuki H, Yen RW, Baylin SB, Schuebel KE. CpG island hypermethylation is maintained in human colorectal cancer cells after RNAi-mediated depletion of DNMT1. *Nat Genet* 2004; 36: 582-584
- 59 Gartel AL, Kandel ES. RNA interference in cancer. *Biomol Eng* 2006; 23: 17-34
- 60 Persengiev SP, Zhu X, Green MR. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* 2004; 10: 12-18

电编 张敏 编辑 潘伯荣