

RNAi 抑制 VEGF 表达在肿瘤治疗中的研究进展

刘津杉 综述, 朱明才 审校

(重庆医科大学附属第一医院胃肠外科 400016)

关键词: 血管内皮生长因子 A; RNA, 小分子干扰; 基因; 治疗; 肿瘤**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.029**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2011)01-0060-03

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 又名血管通透因子(vascular permeability factor, VPF), 是重要的血管生成正性调节因子, 在肿瘤及其他一些疾病的发生、发展过程中均具有重要作用, 是目前许多疾病治疗的研究靶点之一。随着 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术的不断成熟, 越来越多的学者将其应用到 VEGF 的研究中, 为其提供了一个高效、可靠的研究工具, 也为疾病的治疗带来了新的希望。本文就近年来肿瘤领域关于 VEGF 方面的 RNAi 研究作一综述。

1 RNAi 技术概述

RNAi 是由双链 RNA(double stranded RNA, dsRNA)分子在 RNA 水平关闭相应序列基因的表达或使其沉默的过程。由于 dsRNA 可以抑制不同类型的靶向基因表达, 因此 RNAi 技术也被形象地称为基因敲除(knock out)或基因沉默(gene silencing)。dsRNA 在体内引起 RNA 干扰的过程大致可以分为以下 2 个阶段: 长链的 dsRNA 被 Dicer(1 种 RNase III 酶)识别并加工成具有 21~23 个核苷酸的小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA), 随后这些双链 siRNA 结合到 1 种蛋白复合物中形成 RNA 介导的沉默复合体(RNA-induced silencing protein complex, RISC); RISC 中的螺旋酶解开双链 siRNA, 后者通过解开的反义链与和 siRNA 具有高度互补序列的 mRNA 结合, 并引导 RISC 结合 mRNA。随后 siRNA 与 mRNA 在复合体中换位, 核酸酶 Dicer 将 mRNA 切割成 21~23 个核苷酸的片段, 特异性地抑制靶基因的表达。而新产生的双链 RNA 片段可再次形成 RISC 复合物, 继续降解 mRNA, 从而产生级联放大效应, 因此, 每个细胞只需要几个 siRNA 分子就可以引起强烈的 RNAi 效应。

2002 年美国《Science》杂志将 RNAi 技术评为世界十大科技突破第 1 名, 之后, 掀起了一股 RNAi 应用热潮, 尤其对医学生物学的发展产生了深远的影响, 在功能基因组学和遗传学、基因治疗、病毒性传染病和肿瘤性疾病的研究中被广泛应用。

2 血管内皮生长因子概述

血管内皮生长因子(VEGF)为相对分子质量 $(34\sim 45)\times 10^3$ 的同源二聚体糖蛋白, 通过转录基因的剪接可以产生 5 种变异体, 即 VEGF206、VEGF189、VEGF165、VEGF145、VEGF121。VEGF 在健康人和动物的组织中表达较少, 而在新生血管生成的组织中高度表达, 主要具有促进血管内皮细胞增殖、增加血管通透性、促进血管支持物的形成、抑制肿瘤细胞凋亡等生物学功能, 其中以 VEGF165 作用最为强烈。研究表明, VEGF 在多种肿瘤如肺癌、胃癌、大肠癌、乳腺癌中均过度表达。近年陆续发现其他一些与 VEGF 结构同源、功能相似的多肽因子, 分别命名为 VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 和 PIGF, 其中 VEGF-C 和 VEGF-D 既可诱导血管生成, 又可诱导淋巴管生成, 在肿瘤的生长以及浸润转移中发挥重要作用。

3 RNAi 作用于 VEGF 对血管及肿瘤的影响

2003 年, Reich 等^[1]率先将 RNAi 技术引入 VEGF 的研究中, 他们用 RNAi 技术干扰 VEGF 的表达, 从而使小鼠眼部血管生成减少。此后, 学者们纷纷利用 RNAi 来进行 VEGF 的研究, 在抑制血管生长、肿瘤生长、肿瘤转移等方面取得了重大突破, 给肿瘤的治疗提供了 1 个新的手段。

3.1 抑制血管生成 血管生成在多种疾病的发生、发展过程中发挥重要作用, 尤其是肿瘤性疾病, 因此, 抗血管生成相应地成为疾病治疗的重要手段。针对具有强促血管生成作用的 VEGF, 先后有人研究 VEGF 受体的小分子抑制剂、显性失活 VEGF、VEGF 人化抗体、溶解 VEGF 受体以及反义核苷酸技术等, 除了反义核苷酸技术, 上述的治疗策略均不能特异性地抑制 VEGF 亚型, 而反义核苷酸的效率同样很低, 于是人们积极探索能高效、特异抑制 VEGF 的方法。Shen 等^[2]用 siRNA 转染白血病细胞, 分别收集转染和非转染的细胞培养基上清液, 将人微血管内皮细胞加入上清液中培养, 发现转染组上清液中的内皮细胞迁移程度明显低于非转染组。Raskopf 等^[3]培养鼠内皮细胞, 并转染抗 VEGF 的 siRNA, 结果转染组的细胞生存数较非转染组少 23% ($P<0.01$), 而内皮细胞聚集成血管能力方面, 转染组比非转染组降低 38%。上述实验结果表明, 体外抑制 VEGF 的表达能成功地抑制内皮细胞生长, 并且对其聚集能力有明显影响。为了证实 siRNA 在体内对 VEGF 的影响, Singh 等^[4]作了进一步的研究, 该实验组应用丙美卡因和氢氧化钠制造出小鼠角膜损伤模型, 然后用 siRNA 重组质粒直接注入角膜基质内, 注射 2 周后收集角膜, 观察其血管生长情况, 发现治疗组血管新生化区域为 $(19.04\pm 9.3)\%$, 而阴性对照组和空白对照组分别为 $(71.3\pm 5.2)\%$ 、 $(68.5\pm 7.5)\%$ 。周金子等^[5]制备健康家兔角膜碱损伤模型, 设立实验组、对照组和空白对照组, 将重组 siRNA 和空载体分别注入实验组和对照组的球结膜下, 检测角膜基质层、血管内皮细胞中 VEGF 的表达情况和血管生成情况, 结果表明, 实验组中上述指标均低于对照组和空白对照组 ($P<0.05$)。

上述研究结果表明, 在非肿瘤疾病中用 RNAi 技术干扰 VEGF 的表达后, 能抑制血管内皮细胞的生长、抑制其聚集能力, 在体内也能有效地抑制血管的生成。

3.2 抑制肿瘤的生长 肿瘤的生长包括无血管期和血管期, 一旦肿瘤的直径超过 2 mm, 即需产生新生毛细血管以维持肿瘤的生长, 肿瘤细胞亦可由此进入血液循环发生血行转移, 否则肿瘤将发生退行性坏死。肿瘤血管生成的调节涉及肿瘤实质、间质、血管内皮细胞、成纤维细胞与细胞外基质之间的复杂作用, 在此过程中, VEGF 起到了关键作用, 其主要生物学功能如下: 高度特异地选择性诱导血管内皮细胞有丝分裂, 刺激内皮细胞增殖并促进血管生成; 增加血管尤其是小血管的通透性, 使血浆纤维蛋白外渗沉积在血管外的基质中, 为肿瘤细胞

的生长和新生血管网的建立提供营养。研究表明,在大多数肿瘤中 VEGF 均过度表达,但不确定抑制 VEGF 的表达是否有利于减缓肿瘤的生长甚至使这个过程停止。

Wang 等^[6]用慢病毒包装 siRNA 作用于胰腺癌后,治疗组的肿瘤体积 $[(188.33 \pm 17.33) \text{ mm}^3]$ 明显小于对照组 $[(301.62 \pm 21.30) \text{ mm}^3]$, $P < 0.001$ 。Wang 等^[7]报道, siRNA 治疗肿瘤可以明显缩小肿瘤体积,并降低肿瘤的浸润侵袭能力,同时,用免疫组化法测定肿瘤的微血管密度(MVD),治疗组、空白对照组、阴性对照组分别为 (7 ± 2) 、 (17 ± 2) 、 (15 ± 3) 。另外,Wang 等^[8]研究表明,抑制 VEGF 的表达,可以使肿瘤的形态学发生改变,如细胞表面变得粗糙、形状不规则、肿瘤坏死增多等。

可见,用 RNAi 技术抑制 VEGF 表达后,能对肿瘤的生长产生抑制作用,并可引起肿瘤的形态学改变,但亦有报道显示某些肿瘤细胞系的体外培养并应用 RNAi 时,不能使肿瘤细胞的增殖受阻。Mulkeen 等^[9]用 1 种肿瘤细胞存在的由 VEGF 介导的自分泌环来解释这种现象,并指出,针对这个自分泌环设计的 siRNA 也许能更有效地阻碍肿瘤细胞的增殖以及肿瘤的生长。

3.3 抑制肿瘤的淋巴转移 进展期肿瘤的浸润转移是肿瘤的主要生物学行为,给肿瘤的治疗带来了巨大困难,很大程度上影响了患者的生存率。在恶性肿瘤中,VEGF-C 和 VEGF-D 均过度表达,而 VEGF-C 是影响肿瘤预后的 1 个重要指标,可以作为 1 个独立的参数和第三死亡风险因子,不少学者通过抑制 VEGF-C 的表达来抑制肿瘤淋巴管的生长,从而减少肿瘤的局部浸润和远处转移。Sun 等^[10]用迁移法测定经 siRNA 转染后人淋巴管内皮细胞(HLEC)的迁移能力,发现转染组 HLEC 的迁移能力明显低于非转染组,且其增殖亦受阻。He 等^[11]用 siRNA 质粒注射结肠癌模型后,肿瘤的生长明显减缓,治疗组和对照组淋巴管生成率分别为 30% 和 70%。Bock 等^[12]用半透膜法证明,运用 RNAi 抑制 VEGF-C 表达后,肿瘤细胞的侵袭能力大大降低。为了研究 RNAi 对肿瘤的远距转移抑制作用,Gao 等^[13]将 siRNA 注入骨肉瘤中,结果显示在不同时间段,治疗组骨肉瘤的肺转移都明显低于阴性对照组和空白对照组。

4 结语及展望

因人类平均寿命延长,恶性肿瘤对人类的威胁日益突出,随着疾病谱的改变,肿瘤已成为目前人类死亡常见原因之一。肿瘤的发生、发展是 1 个多因素、多水平的复杂过程,就其生长和转移方面,肿瘤细胞本身和浸润到肿瘤组织内及其周围的炎细胞均能分泌 VEGF。VEGF 能诱导肿瘤周围的血管生成和淋巴管生成,新生的血管和淋巴管一方面为肿瘤生长提供营养,另一方面也为肿瘤的转移提供 1 个有利条件。上述研究表明,在细胞系及动物模型中,通过 RNAi 技术抑制 VEGF 的表达,能使血管及淋巴管的生长受到明显抑制,由此产生明显肿瘤抑制效应,包括肿瘤体积的缩小、形态学改变、远距转移减少等。

综上所述,将 RNAi 技术应用于 VEGF 在肿瘤的研究中取得了不少积极的效果,但是作为 1 项新兴的技术,尚存在许多不足之处,比如:如何寻找高效的 siRNA 靶序列。Guan 等^[14]在研究中针对 VEGF 家族中作用最强的 VEGF165 设计出 1 条高效序列:GAT AGA GCA AGA CAA GAA A。Xia 等^[15]直接引用该序列抑制 VEGF 表达,在实验中取得良好效果,但该序列只针对 VEGF165,而不能抑制其他 VEGF 亚型。

其应用范围相对较窄,亟需寻找到 1 条能普遍针对 VEGF 的高效序列,以提高抑制效率;同时,由于疾病往往是在多基因共同作用下发生和发展的,那么只着眼于 VEGF 单个基因进行治疗势必不能取得满意效果。由此推测,在今后的研究中,会有越来越多的学者将重点研究多基因联合治疗的有效性及其可行性;张雯婷和江忠清^[16]通过总结提出,在 siRNA 靶向输送、给药方式、毒性及稳定性等方面均存在较多疑问,尤其是 siRNA 载体问题一直伴随 RNAi 技术研究,至今尚未找到 1 种安全、有效的载体系统,为进一步的研究带来了困难。只有上述问题得以解决,临床实验才会成为可能,届时,定会为肿瘤疾病的基因治疗开创 1 个新的局面。

参考文献

- [1] Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, et al. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model[J]. Mol Vis, 2003, 9: 210-216.
- [2] Shen HL, Xu WL, Wu ZY, et al. Vector-based RNAi approach to isoform-specific downregulation of vascular endothelial growth factor(VEGF)165 expression in human leukemia cells[J]. Leuk Res, 2007, 31: 515-521.
- [3] Raskopf E, Vogt A, Sauerbruch T, et al. siRNA targeting VEGF inhibits hepatocellular carcinoma growth and tumor angiogenesis in vivo[J]. J Hepatol, 2008, 49(6): 977-984.
- [4] Singh N, Higgins E, Amin S, et al. Unique Homologous siRNA Blocks Hypoxia-Induced VEGF Upregulation in Human Corneal Cells and Inhibits and Regresses Murine Corneal Neovascularization[J]. Cornea, 2007, 26(1): 65-72.
- [5] 周金子, 夏晓波, 熊思齐, 等. VEGF siRNA 对兔眼碱烧伤后角膜 VEGF 表达的作用[J]. 眼科研究, 2008, 26(4): 245-248.
- [6] Wang J, Shi YQ, Yi J, et al. Suppression of growth of pancreatic cancer cell and expression of vascular endothelial growth factor by gene silencing with RNA interference[J]. J Dig Dis, 2008, 9: 228-237.
- [7] Wang SH, Liu H, Ren LF, et al. Inhibiting Colorectal Carcinoma Growth and Metastasis By Blocking the Expression of VEGF Using RNA Interference[J]. Neoplasia, 2008, 10(4): 399-407.
- [8] Wang JQ, Gao YS, Mei J, et al. morphological changes in osteosarcoma xenografts in nude mice after inhibiting angiogenesis by Ad-VEGF-siRNA[J]. Chin J Cancer, 2009, 28(6): 581-586.
- [9] Mulkeen AL, Silva T, Yoo PS, et al. Short Interfering RNA-Mediated Gene Silencing of Vascular Endothelial Growth Factor; Effects on Cellular Proliferation in Colon cancer Cells[J]. Arch Surg, 2006, 141: 367-374.
- [10] Sun P, Gao J, Liu YL, et al. RNA interference(RNAi)-mediated vascular endothelial growth factor-C(VEGF-C) reduction interferes with lymphangiogenesis and enhances Epirubicin sensitivity of breast cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2008, 308: 161-168.

- [11] He XW, Yu X, Liu T, et al. Vector-based RNA interference against vascular endothelial growth factor-C inhibits tumor lymphangiogenesis and growth of colorectal cancer in vivo in mice[J]. Clin Med J, 2008, 121(5): 439-444.
- [12] Bock JM, Sinclair LL, Bedford NS, et al. Modulation of Cellular Invasion by VEGF-C Expression in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2008, 134(4): 355-362.
- [13] Gao YS, Mei J, Tong TL, et al. Inhibitory Effects of VEGF-siRNA Mediated by Adenovirus on Osteosarcoma-Bearing Nude Mice[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2009, 24(2): 243-247.
- [14] Guan H, Zhou ZC, Wang H, et al. A Small Interfering RNA Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Inhibits Ewing's Sarcoma Growth in a Xenograft Mouse Model[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(7): 2662-2669.
- [15] Xia XB, Xiong SQ, Song WT, et al. Inhibition of retinal neovascularization by siRNA targeting VEGF165[J]. Mol Vis, 2008, 14: 1965-1973.
- [16] 张雯婷, 江忠清. RNA 干扰治疗 HBV 的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(3): 222-224.

(收稿日期: 2010-09-03)