

• 综述 •

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、病毒性疾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($34\sim45\times10^3$)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±9.3)% , 而阴性对照组和空白对照组分别为(71.3±5.2)%、(68.5±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 ± 17.33) mm³] 明显小于对照组 [(301.62 ± 21.30) mm³], $P < 0.001$ 。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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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)