

RNA干扰Survivin基因治疗大肠癌作用机制的研究进展

张志宏, 韩盛玺

张志宏, 韩盛玺, 四川省医学科学院, 四川省人民医院消化内科 四川省成都市 610041

通讯作者: 张志宏, 610041, 四川省成都市西一环32号, 四川省医学科学院, 四川省人民医院消化内科. zhang-821@21cn.com
电话: 028-66304892

收稿日期: 2006-09-10 接受日期: 2006-10-09

摘要

Survivin(生存素)作为IAP家族成员之一, 被认为是迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子. 以siRNA干扰Survivin的表达靶向观察其对大肠癌细胞基因的表达及对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响及其可能的作用机制.

关键词: Survivin; siRNA干扰; COX-2抑制剂

张志宏, 韩盛玺. RNA干扰Survivin基因治疗大肠癌作用机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3215-3218

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3215.asp>

0 引言

小干扰RNA片段(small interfering RNA, siRNA)对目的基因Survivin的干扰是否对相应的基因和蛋白质的表达产生影响, 从而干扰细胞的增殖和凋亡.

1 RNA干扰及其作用机制

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是指由小片段的双链RNA分子介导的生物细胞内同源基因的特异性转录后基因静默现象(post-transcriptional gene silencing). 最早报道见于1990年, 但直至1998年, Fire *et al*^[1]首次将正义链和反义链的RNA混合物-双链RNA(double stranded RNA, dsRNA)注入线虫, 结果诱发出比单独注射正/反义链强10倍以上的基因静默现象, 而且在其后代亦可产生同样应答^[2], 自此激励许多实验室从事大规模的基因组筛选研究以阐明基因功能. 其作用机制分为如下二个阶段: (1)长链的双链RNA进入细胞; 在细胞胞质内的核酸酶-Dicer的作用下, dsDNA被切割成21-23 bp的siRNA; 后者(包括外源性合成的和内源性表达的siRNA)均可与一些功能蛋白结合,

形成RNA介导的基因沉默复合物(RNA-induced silencing complexes, RISC); (2)RISC中螺旋酶解开双链siRNA, 后者通过解开的反义链与siRNA具有高度互补序列的靶信使RNA(messenger RNA)结合, RISC切割降解与siRNA序列互补的mRNA, 从而引起特定基因的沉默. 其主要特点包括: (1)高特异性: siRNA只能特异性的降解同源性mRNA, 对siRNA其他种类基因的表达不受影响. Wohlbald *et al*^[3]证明用siRNA能有效沉默异常BCR-ABL融合基因表达, 而不影响正常c-BCR和c-ABL的转录; (2)高效性: 少量dsRNA可促进大量同源mRNA的降解, 与寡脱氧核苷酸(oligodeoxyribonucleic acids, ODNs)比较其最大抑制浓度(IC₅₀)低100-1000倍^[4-5], 并且作用时间延长^[6], 同时有研究证明通过电穿孔、局部注射或静脉注射^[7]的方法已经成功将化学合成的siRNA、表达siRNA的质粒以及病毒等导入哺乳动物, 并不引起全身非特异性反应^[4,8-9]. 2004年美国FDA已经批准将经过修饰的siRNA进行临床新药实验, 用于治疗与年龄相关的黄斑退化性改变的患者^[8]. 总之, RNAi作为研究基因功能的一种重要和常用的技术, 已经广泛用于基因组的研究和临床疾病包括病毒感染、显性遗传疾病, 尤其是肿瘤的治疗研究, 有着广阔的前景和应用潜力.

2 Wnt信号传导通路的作用机制

目前在我国, 大肠癌作为一种常见的恶性肿瘤, 其发病率呈现出逐年增加的趋势, 但是由于其治疗效果不尽如人意, 使人们对其病因、发病机制的研究兴趣日益增加. 而防治肿瘤的关键在于诱导肿瘤细胞的凋亡和抑制其无限增殖. 目前认为在结肠癌变发生、发展的多个环节中, Wnt信号传导通路发挥着决定性的作用. 其通路中的多个成员如APC, β -catenin, cyclinD, c-myc, Survivin, PTEN等在结肠癌变的过程中均出现异常改变. APC(adenomatous polyposis coli)属于抑癌基因的一种. 生理环境中的APC基因既可以自身聚合(即同源寡聚体化), 也可与 β -catenin等蛋

■背景资料

RNA干扰是由小片段的双链RNA分子介导细胞内同源基因的静默. 其可产生的效果较单独注射正/反义链强10倍以上. Fire *et al*的研究结果激励许多实验室从事大规模的基因组筛选研究以阐明基因功能.

■应用要点

了解APC(COX-2), Survivin及PTEN之间表达的相关性, 以及用NSAIDs制剂及特异性RNAi干扰Survivin的表达, 了解其可能对大肠癌细胞增殖和凋亡的影响, 为进一步阐明其作用机制和为防治大肠癌提供理想的方法和途径有着十分重要的理论和实践意义。

白结合, 从而参与调节细胞的黏附、细胞周期进程和细胞的凋亡等过程。病理条件下, 发生突变的APC基因一方面可以干扰细胞与细胞间以及细胞与间质组织间的相互作用, 从而导致细胞的异常增生; 另一方面可导致APC与 β -catenin复合物的解体, 游离的 β -catenin可以结合于转录因子TCF/LEF-1, 引起靶基因c-myc的激活, 使细胞无序分裂而不死亡, 从而造成细胞的无序增生, 最终导致肿瘤的形成^[10-11], 这也提示APC基因的失活是大肠肿瘤发生、发展过程中的一个关键的分子^[12]。此外, 研究证实腺瘤向腺癌进展的各个阶段, APC基因的失活率相似, 均大于80%, 这说明APC基因失活发生在癌变的初始阶段^[13]。进一步的研究发现一些独立的修饰基因(指能够修饰一个突变基因的表现形式, 而对正常状态无明显影响的一些基因位点)能够在很大程度上影响APC基因的突变后果, 而COX-2正是作为APC的一个修饰基因位点对后者的表达发挥着重要的作用。而Kim *et al*^[14]证实Survivin是APC/TCF-4/ β -catenin的下一个靶点, 由于TCF-4的结合位点是在Survivin转录增强子区域中, TCF-4/ β -catenin信号通路的激活会导致Survivin的表达显著上升。与Survivin相反, 作为抑癌基因的PTEN与Survivin均参与细胞周期的调控和细胞凋亡的发生, 作用环节一致, 而生物学效应相反, 在肿瘤中的表达常常减少或缺失^[15]。总而言之, Wnt信号传导通路在大肠癌变的过程中可能发挥着决定性的作用。

3 Survivin的作用机制

Survivin是近来发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族成员之一, 被认为是迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子。于1997年由Ambrosini *et al*经效应细胞蛋白酶受体-1(effector cell protease receptor-1, EPR-1) cDNA在人类基因组库的杂交筛首先分离出来。Survivin位于染色体17q25的同一基因族, 长度范围在75-130 kb, 包括4个外显子和3个内含子mRNA编码的一个由142个氨基酸组成的相对分子质量约17 kDa的胞质蛋白。目前发现3个剪切体: Survivin- Δ Ex3, Survivin-2B, Survivin-3B。不同于其他IAP家族成员主要分布于正常终末分化组织中, 由Survivin基因编码产生的蛋白可以在胚胎发育过程中和绝大多数肿瘤组织中表达, 在正常组织中则不表达。研究发现, Survivin在结肠癌组织及癌旁的正常组织中表达阳性率

分别为63.05%和29.1%, 有着显著差异。同时发现在Dukes分期II期的患者中, Survivin阳性的患者5 a存活期为44.8%, 而阴性者则为94.4%, 提示其阳性表达对疾病的预后有着重要影响^[16]。同样在其他肿瘤如宫颈癌^[17]和乳腺癌^[18]中的高阳性率的表达也认为与肿瘤细胞的低分化呈正相关, 而与预后呈负相关。其主要作用机制可能与以下几点相关: (1)凋亡途径的上游启动酶有内源性caspase-9和外源性caspase-8, 下游的执行酶有caspase-3和caspase-7等。Survivin可直接与激活的caspase-3和caspase-7结合而抑制其活性, 阻止由caspase激活剂或凋亡诱导剂诱导的细胞DEVD-cleaving自杀酶的累积, 从而起到抑制细胞凋亡的作用^[19-20]; (2)也有研究认为, Survivin通过与线粒体释放的凋亡前蛋白, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶二级活化物(second mitochondria-derived activator of caspase, SMAC)结合, 间接抑制caspase-9依赖的细胞凋亡信号传导或通过Survivin的Thr34磷酸化后直接与caspase-9结合抑制其活性, 阻断caspase-9依赖的细胞凋亡信号传导^[21-22]; (3)通过竞争性与CDK4/P21结合, 激活cdk2/cyclin E, 介导pkb磷酸化, 促进S期进程, 同时从CDK中释放出P21, 与procaspase-3形成复合物, 抑制caspase-3的活性^[23]; (4)通过其细胞周期调节作用, 使肿瘤细胞逃避细胞周期G2/M期检测点的监测, 抵抗因DNA损伤或突变自身诱导的细胞凋亡, 从而导致肿瘤细胞异常分裂增殖^[24]。另外, Survivin的表达受到信号通路的调控: (1)Survivin作为APC/TCF-4/ β -catenin下游的一个靶点受到Wnt通路的调控; (2)磷酸酰肌醇-3激酶(PI3K)/AKT通路中, PI3K是T淋巴细胞内重要的信号转导分子, 通过催化底物磷酸酰肌醇发生磷酸化而将活化信号传入细胞内, 进而激活PKB等信号参与细胞活化和细胞毒效应。而PKB/AKT的主要作用是作为PI3K的下游底物。PI3K磷酸化后, 可导致Survivin的上升^[25], 相反PI3K途径受抑制会导致其表达式的下调^[26]。Fornaro *et al*^[27]认为, 抑制AKT的表达可以阻断整联蛋白所介导的Survivin的表达; (3)有研究认为, 存在JAKs-STAT3-Survivin信号传导通路。活化的STATs将直接导致Survivin的表达上调^[20]。正是由于其所具有的在肿瘤组织中高选择性的表达和独特的抗凋亡的作用机制, Survivin作为一种新的凋亡抑制因子, 因而有可能作为肿瘤治疗的一个特异的攻击靶点, 从而为肿瘤治疗提供新的思

路. 因此, 越来越受到国内外学者们的广泛关注. 与Survivin相反, 作为抑癌基因的PTEN定位于10q23, 与Survivin均参与细胞周期的调控和细胞凋亡的发生, 作用环节一致, 而生物学效应相反. PTEN作为目前发现的唯一具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因在维持正常细胞的稳定性中发挥重要作用^[28]. 此外因其具有对PI3K-PKB/AKT信号传导通路的负调控作用而备受关注, 甚至有学者称为其为PTEN-PI3K-PKB/AKT通路. 其主要机制为: PTEN蛋白可依赖其脂质磷酸酶活性, 使磷脂酰肌醇PIP3的D3位去磷酸化, 使焦点黏附蛋白(focal adhesion kinase, FAK)和AKT的磷酸化受抑, 导致PI3K/Akt信号转导途径受阻, 从而抑制Survivin的表达, 启动细胞周期、促进细胞分裂. 当组织恶变时, PTEN基因常发生突变, 其表达出现下调或缺失, 对PI3K/AKT通路的抑制作用减弱, 则抑制肿瘤细胞增殖分化能力减弱, 而Survivin的表达上调, 一方面启动细胞周期, 促进分裂; 另一方面进入细胞核与CDK4结合, 抑制凋亡, 促使肿瘤细胞的恶性增殖能力增强^[29]. 而应用PTEN基因转染神经胶质瘤和卵巢癌可使肿瘤细胞周期阻滞, 诱导细胞凋亡^[30-32]. 可能存在通路APC(COX-2)/TCF-4/ β -catenin/Survivin(PTEN). 有实验认为, 在结肠隐窝轴系统中, 由基底部至隐窝顶部APC的表达由弱至强. 而Survivin则相反, 在底部表达阳性, 中部以上则缺失. 由此提示, APC可能起着调节Survivin表达的作用^[33]. 而在一项肺癌研究中认为APC的修饰基因COX-2与Survivin的表达呈协同上升趋势^[34]. 另有研究报道, 通过转染外源性 β -catenin和TCF-4可使Survivin上升^[35], 而用Survivin反义寡核苷酸^[36]及非甾体抗炎药(NSAIDs试剂)则均可诱导肿瘤细胞Survivin的表达下调, 并且诱导细胞的凋亡^[37-38].

总之, 进一步了解APC(COX-2), Survivin及PTEN之间表达的相关性, 以及用NSAIDs制剂及特异性RNAi干扰Survivin的表达, 了解其可能对大肠癌细胞增殖和凋亡的影响, 以期为进一步阐明其作用机制和为防治大肠癌提供理想的方法和途径, 有着十分重要的理论和实践意义.

4 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 Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested

- dsRNA. *Nature* 1998; 395: 854
- 3 Wohlbold L, van der Kuip H, Miething C, Vornlocher HP, Knabbe C, Duyster J, Aulitzky WE. Inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (STI571). *Blood* 2003; 102: 2236-2239
- 4 Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6347-6352
- 5 McCarthy BA, Mansour A, Lin YC, Kotenko S, Raveche E. RNA interference of IL-10 in leukemic B-1 cells. *Cancer Immunol* 2004; 4: 6
- 6 Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 1000-1004
- 7 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
- 8 Karagiannis TC, El-Osta A. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 787-795
- 9 Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001; 20: 6877-6888
- 10 Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275: 1787-1790
- 11 He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281: 1509-1512
- 12 Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170
- 13 Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359: 235-237
- 14 Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet* 2003; 362: 205-209
- 15 Li YL, Tian Z, Wu DY, Fu BY, Xin Y. Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of tumor suppressor gene PTEN in gastric cancer and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 285-288
- 16 Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; 46: 645-650
- 17 Singh A, Sharma H, Salhan S, Gupta SD, Bhatla N, Jain SK, Singh N. Evaluation of expression of apoptosis-related proteins and their correlation with HPV, telomerase activity, and apoptotic index in cervical cancer. *Pathobiology* 2004; 71: 314-322
- 18 Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ET, Tjan-Heijnen

■同行评价

本文旨在通过用siRNA干扰Survivin的表达, 观察其对大肠癌细胞基因的表达及Survivin与COX-2/PTEN及APC之间的关系, 本文主题明确, 层次分明, 有参考价值.

- VC, Manders P, Beex LV, de Kok JB. Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin Chem* 2004; 50: 1986-1993
- 19 Hay BA. Understanding IAP function and regulation: a view from *Drosophila*. *Cell Death Differ* 2000; 7: 1045-1056
- 20 Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol* 2002; 21: 315-320
- 21 Mesri M, Wall NR, Li J, Kim RW, Altieri DC. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest* 2001; 108: 981-990
- 22 Verhagen AM, Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* 2002; 7: 163-166
- 23 Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, Akahane K, Shiraki K. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* 2000; 19: 3225-3234
- 24 Chandele A, Prasad V, Jagtap JC, Shukla R, Shastry PR. Upregulation of survivin in G2/M cells and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis. *Neoplasia* 2004; 6: 29-40
- 25 Yang D, Zhu YQ, Qi J. Expression and clinical significance of survivin gene and PTEN protein in colorectal adenocarcinoma. *Ai Zheng* 2004; 23: 306-309
- 26 Kim S, Kang J, Qiao J, Thomas RP, Evers BM, Chung DH. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition down-regulates survivin and facilitates TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastomas. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 516-521
- 27 Fornaro M, Plescia J, Chheang S, Tallini G, Zhu YM, King M, Altieri DC, Languino LR. Fibronectin protects prostate cancer cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis via the AKT/survivin pathway. *J Biol Chem* 2003; 278: 50402-50411
- 28 Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Milaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943-1947
- 29 Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH, Parsons R, Tonks NK. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9052-9057
- 30 Davies MA, Lu Y, Sano T, Fang X, Tang P, LaPushin R, Koul D, Bookstein R, Stokoe D, Yung WK, Mills GB, Steck PA. Adenoviral transgene expression of MMAC/PTEN in human glioma cells inhibits Akt activation and induces anoikis. *Cancer Res* 1998; 58: 5285-5290
- 31 Minaguchi T, Mori T, Kanamori Y, Matsushima M, Yoshikawa H, Taketani Y, Nakamura Y. Growth suppression of human ovarian cancer cells by adenovirus-mediated transfer of the PTEN gene. *Cancer Res* 1999; 59: 6063-6067
- 32 Hang Y, Zheng YC, Cao Y, Li QS, Sui YJ. Suppression of gastric cancer growth by adenovirus-mediated transfer of the PTEN gene. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2224-2229
- 33 Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ, Boman BM. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8664-8667
- 34 Krysan K, Merchant FH, Zhu L, Dohadwala M, Luo J, Lin Y, Heuze-Vourc'h N, Pold M, Seligson D, Chia D, Goodglick L, Wang H, Strieter R, Sharma S, Dubinett S. COX-2-dependent stabilization of survivin in non-small cell lung cancer. *FASEB J* 2004; 18: 206-208
- 35 Zhu HX, Zhang G, Wang YH, Zhou CQ, Bai JF, Xu NZ. Indomethacin induces apoptosis through inhibition of survivin regulated by beta-catenin/TCF4 in human colorectal cancer cells. *Ai Zheng* 2004; 23: 737-741
- 36 Dai DJ, Lu CD, Lai RY, Guo JM, Meng H, Chen WS, Gu J. Survivin antisense compound inhibits proliferation and promotes apoptosis in liver cancer cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 193-199
- 37 Zhang T, Fields JZ, Ehrlich SM, Boman BM. The chemopreventive agent sulindac attenuates expression of the antiapoptotic protein survivin in colorectal carcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 434-437
- 38 Krysan K, Dalwadi H, Sharma S, Pold M, Dubinett S. Cyclooxygenase 2-dependent expression of survivin is critical for apoptosis resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 6359-6362

电编 张敏 编辑 王晓瑜