

2.3 阳离子类脂(脂质体)

脂质体目前已成为研究最多的非病毒基因载体之一。它包含一组生理 pH 值下带正电的类脂,能与负电 DNA 通过静电力结合。阳离子类脂多以脂质体形式应用。不过,近来阳离子类脂乳剂作为非病毒基因载体也有研究。

阳离子类脂是由一条或两条脂肪酸(酰基)或烷基侧链,一个连接键和一个亲水氨基构成的两性分子。脂质体/DNA 复合物被称作脂复合物(lipoplex)。冰冻蚀刻电镜和 X 射线衍射实验表明,DNA 是夹在多个脂质体粒子中间的。由于稳定性差,脂复合物通常制备后应立即使用。脂复合物的粒径、zeta 电位、DNA/脂质体比例等许多物理因素都会影响复合物的形成、稳定性及转染效率。

阳离子类脂的构效关系主要来源于实践经验。加入中性类脂(共脂质)能提高脂复合物的体内外转染能力。最常用的共脂质是胆固醇和二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE),前者在体内更有效,后者可增强体外转染。

鱼精蛋白是一种富含精氨酸的多肽,能在与阳离子类脂形成复合物之前与负电的 DNA 缩合。脂

质体与缩合 DNA 作用能使脂质重排并形成紧密的脂质体/DNA 复合物(LPD)。LPD 的粒径分布为 100~250 nm,为传统脂复合物的 1/5~1/3。LPD 冻干后 4℃或室温放置 4 个月可保持稳定,并且不影响转染能力。体内外研究结果表明,LPD 介导的基因传递效力强于传统脂质体,小的粒径还可促进细胞内吞,延长体内循环半衰期。

对癌症动物模型静注携带肿瘤抑制基因 Rb 或 E1A 的 DOTAP:Chol-LPD,可诱导凋亡、缩小肿瘤体积、延长生存时间。最近,通过电荷间作用将 LPD 以肝靶向配体无涎胎球蛋白(asialofetuin)包裹,明显增加了 HepG2 肝癌细胞对包裹 DNA 的摄取。DC-Chol/DOPE 组成的 LPD 用于 2 例大脑皮层内 ASPA 基因处理的儿童 Canavan 病,已显示出临床效果。

3 结语

癌基因治疗中优良的基因传递制剂要能包裹和保护核酸物质,避免内涵体降解,并专一靶向肿瘤部位。预计随着一些突破性的治疗发现和数十亿美元市场潜力的激发,基因治疗领域会得到很快发展和加强。

治疗性 siRNA 的研究进展

刘丽萍编译

(中国人民解放军总医院心脏外科研究所;北京 100027)

摘要:具有干扰作用的小分子 RNA(siRNA)能使哺乳动物体细胞的基因表达停止,因此,如果知道了引起某种疾病的基因的 mRNA 序列,则可以使用 siRNA 来阻止其表达。目前,siRNA 的转入方式主要有两种,即外源性方式和内源性方式。实验表明,siRNA 可以使多种细胞内的基因表达沉默,因此除了用于分析基因功能、确定靶标的有效性外,它在基因治疗方面也有很大的应用价值。

关键词:小分子 RNA; 基因; 治疗

中图分类号: Q527 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2004)05-0269-04

RNA 干扰(RNAi)最初是在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)体内发现的一种现象,后来人们发现在植物体内也存在同样现象,并称之为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS),目前被认为是一种监视系统,主要用于阻断有潜在危害的 RNA 的产生或表达。RNAi 和 PTGS 的启动是由双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)

引起的。对 *C. elegans* 中 dsRNA 的功能进行定量分析表明,在每一个细胞中仅有一部分分子能够激活这种特定的沉默作用。虽然,由于干扰子反应通路的激活,通过长链 dsRNA(38 个碱基对以上)研究哺乳动物细胞中的 RNAi 比较困难,但是研究表明,小分子 RNA(siRNA, 含 21 个核苷酸)可以成功阻断 RNA 的表达。随后许多体内、体外实验均表明 siRNA 具有潜在的治疗作用。从理论上来说, mRNA

编码的与疾病有关的任何蛋白都可以被 siRNA 选择性清除。但是,目前体内实验的最大挑战仍是 siRNA 的有效传输问题。本文旨在就靶标的特异性、传输问题及临床应用等方面的新研究作一叙述。

1 RNAi 的作用机制

在多种细胞中,长链 dsRNA 通过 RNase III (剪切子)催化生成含有 21 ~ 23 个核苷酸的 siRNA。剪切子催化生成的 siRNA 和合成的 siRNA 在与蛋白结合形成大分子复合物 RISC 之前均要经历 ATP 依赖的解旋步骤。但是,解旋步骤的发生是在复合物形成之前,还是在形成之后,目前尚不清楚。随后, RISC 重新形成其活性形式 RISC*, 它含有清除导向反义 siRNA 结合部位的靶 mRNA 所必需的蛋白。RISC* 被释放后可以继续切除其他 mRNA,而被切除的 mRNA 通过胞内核酶降解。因此, siRNA 对于沉默特定基因来说是一种引导工具,并激发了人们研究开发 siRNA 作为治疗性药物的兴趣。

2 siRNA 的序列特异性

siRNA 成为治疗药物的关键在于使靶基因沉默的同时不引起其他副作用。虽然单个 siRNA 的底物特异性在理论上非常高,但是研究表明, siRNA 能够容忍位于分子中心的单个变异,而且对于完全沉默来说,至少需要 4 个变异。因此,某些错误适配能够被容忍,特别是双链微小分子 RNA (miRNA) 前体中经常发现的非经典的碱基对。为了检测 siRNA 的特异性,人们使用微分析技术研究了全部基因表达,以及在转录水平上 siRNA 对全部细胞的影响。研究发现,当 siRNA 的浓度在 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时可以非特异性地诱导基因表达,其中许多表达参与了凋亡和压力反应。但是,当浓度为 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可以消除这种非特异性反应。另外, siRNA 能与细胞内蛋白结合,诱导基因表达的非特异性变化。例如,很多 siRNA 序列可以激活新分离的人单核细胞的免疫反应,导致 TNF- α 的生成。该机制涉及 NF- κ B 的激活和促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 激酶激酶 (MKKK) 信号转导通路。因此,任何治疗性的 siRNA 都必须在分离的单核细胞中进行非特异性作用试验,特别是随着临床试验的到来,这种研究将会更加重要。

3 siRNA 的传输方法

目前, siRNA 的传输方法主要有两种:一种是合

成的 siRNA 所使用的外源性方法;另一种基因治疗方法,即通过质粒或病毒载体把 siRNA 转入细胞,然后进行表达。

3.1 外源性传输方法

最初人们使用的研究方法是通过化学合成相应的靶基因的 siRNA,然后采用流式技术将其转入细胞。这种研究方法对于开发具有速效或短效的 siRNA 来说是可能的。另外,当体外合成 siRNA 时,通过 2' 位的改变及骨架的化学修饰可以延长其半衰期,特别是核酸化学的进步,促进了 RNA 合成的发展,进一步提高了核苷类似物对核酶的抗性。

一般情况下,合成的 siRNA 都是通过脂质体转染的方式进行传输。目前,阳离子脂质载体在治疗方面已成为最流行的核酸转运方法。但是体内实验表明,仅有少部分脂质载体能够促进核酸的摄取。对于 siRNA 外源性传输方式来说,目前面临的最大问题就是普通组织的摄取及可能的副作用。因此,为了增强 siRNA 的临床效果,必须研究开发细胞或组织特异性的传输系统。

3.2 内源性传输方法

合成的 siRNA 的缺陷之一就是抑制时间较短,而慢性疾病需要长期治疗,因此,对于合成 siRNA 来说就需要重复给药,从而带来一系列问题,如费用、给药途径等。为了克服这些问题,人们进一步研究发现,通过含有依赖于 RNA 聚合酶 II 或聚合酶 III 启动子的表达质粒可以产生发卡样 siRNA。聚合酶 III 启动子用得最多,因为它可以表达具有 siRNA 结构特征的小分子 RNA。目前,主要有两种策略:一种是正义链和反义链作为两个独立的转录进行表达,然后在细胞内杂合形成有功能的 siRNA 二聚体;另一种是正义链和反义链作为一个转录进行表达,但是它们被一个短环序列分开,这个转录能形成一种发卡样结构,被剪切之后形成有功能的 siRNA。另外,人工设计的基本序列与靶基因互补的 miRNA 在细胞内也已表达成功,而且能够诱导 mRNA 切除。值得注意的是,由基因组编码的含 70 个核苷的发卡样先导子 RNA 经过剪切子处理后,可以形成含 21 个核苷的单链成熟 miRNA,也能够激活 mRNA 降解或使转录停止。

除了质粒外,其他载体如腺病毒和慢病毒载体也被开发成功。虽然病毒载体在体外实验中有很高的转染率而被广泛用于基因传输,但是对于人体来说,其安全性问题仍难以克服。因此在基于 RNAi

的治疗方法真正运用到临床之前,还应重视提高病毒载体的安全性,以及向特定靶组织传输基因的效率。

4 siRNA对培养细胞的作用

4.1 对癌细胞的作用

siRNA技术可以广泛地应用于各种癌症及其他因基因表达异常所致的增生性疾病。癌基因与突变肿瘤抑制基因都是 RNAi 治疗的潜在靶基因。例如,在 50% 的人恶性肿瘤中存在 p53 突变蛋白,大多数情况下,这种突变可以使 p53 功能丧失,而且还能极大地损害野生型 p53 的功能。研究表明,通过使用 siRNA 特异性清除 p53 突变蛋白可以恢复野生型 p53 蛋白的功能。针对其他一些靶标的研究,如 Ras 癌基因、BCR-ABL 和血管内皮生长因子(VEGF)等也都获得了一定的成功。

从理论上来说, RNAi 技术可以单独使用,也可以与其他治疗方法联合使用。研究表明,采用化疗方法治疗后,大约有三分之一的肿瘤患者对抗肿瘤药物产生了耐药性,其机制之一就是 ABCB1 基因产物过表达,从而导致细胞内药物浓度过低。研究证实,通过 siRNA 抑制 ABCB1 基因的表达可以提高各种化疗药物的细胞内浓度,从而选择性地恢复化疗敏感性。

另外,凋亡对于人类其他疾病(如癌症)也有一定的影响。Bcl-2 及相关蛋白是一个不断增加的可以调节细胞凋亡的蛋白家族。研究发现,在许多癌细胞中 Bcl-2 均高表达,而且介导了肿瘤对化疗药物的耐药性,因此,通过 siRNA 阻断 Bcl-2 及相关分子(如 Bcl-X_L)的表达将可以恢复肿瘤细胞的凋亡过程或增加其对化疗、放疗的敏感性。

4.2 对病毒性感染的作用

除了肿瘤之外, RNAi 对病毒感染性疾病也有潜在的治疗作用。许多研究表明,靶向 HIV-1 主要调节基因,如 tat, rev, nef 和 vif 的 siRNA 可以降低病毒复制。而且, HIV 感染必需的基因,如编码 CD4 和趋化因子受体 CCR5 和 CXCR4 的基因也均是 siRNA 的靶标。因此, RNAi 能够保护细胞抵抗病毒感染和阻止病毒扩散。另外, siRNA 靶向其他病毒如人丙型肝炎病毒和人乳头瘤病毒也已取得成功,为进一步开发抗病毒 siRNA 提供了基础。但是在任何情况下, siRNA 抗性的出现都是一个值得关注的问题,特别是对于编码容易出错的聚合酶的病毒来说,如 HIV-1。

但是,同时靶向几个保守病毒序列有可能解决这个问题。

5 siRNA对啮齿类动物模型的作用

为了证实 RNAi 技术的效果,必须经过活体动物实验。在 siRNA 技术出现后不久,许多研究人员便相继对其进行了整体动物实验。研究表明, siRNA 可以使肝、肾、脾、肺、膀胱等多种组织内的基因表达沉默,从而进一步奠定了其临床治疗基础。

5.1 急性肝功能衰竭模型

对于由病毒或移植排斥所造成的肝损伤来说, Fas 诱导的凋亡是一个重要因素。例如,向小鼠体内注射 Fas 抗体可以引起急性肝功能衰竭(ALF),并在几小时内死亡。使用 siRNA 治疗后则可以使小鼠避免出现 ALF,而且抑制肝 Fas 表达的时间可以长达 10 d,说明未经修饰的 siRNA 在体内比较稳定,但是不同的 siRNA 分子在体内可能具有不同的稳定性及组织分布。最近研究表明,抗半胱天冬酶-8 的 siRNA 能减少抗 Fas 抗体形成或腺病毒表达 Fas 配体引起的肝损伤。而半胱天冬酶-8 对于 Fas 及其他凋亡诱导子如 TNF- α 来说是必需的,因此它有可能成为 ALF 中的一个通用靶标。但是,目前动物模型实验所使用的流式转染方法可能不适用于临床。

5.2 感染性休克及炎症疾病模型

在各种炎症及免疫性疾病中, TNF- α 扮演了重要角色。TNF- α 与其受体结合后,可以引起转录因子 NF- κ B 的激活,促进多种炎性因子的生成,因此 TNF- α 被认为是药物调节的关键靶标。研究表明,用脂质体传输的靶向编码 TNF- α 基因的 siRNA 能有效抑制 TNF- α 的表达。

另外,风湿性患者关节损伤的一个主要影响因素就是炎性因子的过表达,包括 TNF- α , 因此,研究开发能靶向表达这些因子基因的 siRNA 有可能成为一种基于 RNAi 的新疗法。

5.3 造血干细胞疗法

目前,利用基因修饰的干细胞来矫正遗传性疾病或提高免疫反应的想法十分诱人,但是,实践起来可能比较困难。最近研究结果表明, siRNA 能非常容易在重新植入的干细胞中表达,因此,可以利用来自具有抗 HIV siRNA 片段的 HIV 阳性患者的干细胞转染其他患者,从而达到治疗的目的。大多数慢性粒细胞白血病及很大一部分急性粒细胞白血病患者体内编码癌基因蛋白的转录有 1/3 存在融合失常,所

以,这些患者可以从siRNA修饰的造血干细胞治疗中受益。

目前,肿瘤免疫疗法主要强调的是利用免疫反应来消除癌细胞,但是除了免疫刺激之外,自体耐受也是一个不得不考虑的问题,因此可以使用siRNA来抑制那些能够下调免疫功能,促进肿瘤逃逸的可溶性因子,如 TGF- β 等。通过向骨髓细胞或肿瘤细胞从活体内转移抗 TGF- β siRNA,然后再移植到患者体内有可能增强免疫反应。

6 结语

各种体内、体外实验研究表明,siRNA的确可以有效沉默疾病相关基因。尽管目前临床前研究资料已十分丰富,但是 RNAi 用于治疗人类疾病的临床试验尚存在两个关键问题待解决:(1)合适的传输方式问题;(2)siRNA的特异性及其对人体的安全性问题。虽然目前有关反义寡核苷酸及核酶的临床试验结果令人失望,但是由于 RNAi 的作用比这两种方法更强,因此有理由相信其临床疗效可能会更好。

重组人促红细胞生成素倍他依泊汀在治疗癌症贫血中的应用

黄世杰编译

(军事医学科学院毒物药物研究所,北京 100850)

摘要:重组人促红细胞生成素倍他依泊汀可增加网织红细胞数、血红蛋白水平和红细胞容积。倍他依泊汀在实体瘤化疗和血癌引起的贫血治疗中已显示疗效。每周1次给药方式既便利病人,又较经济。癌症病人对此药耐受良好,皮下给药注射部位疼痛轻微。为确保疗效,用该药预防化疗引起的贫血是重要选择。这对癌症或化疗引起的贫血的输血治疗是有效而有价值的替代。

关键词:贫血;癌症;重组人促红细胞生成素;倍他依泊汀

中图分类号: R979.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2004)05-0272-03

1 概述

许多癌症病人会发生贫血,其发生率随恶性肿瘤的种类而不同。发生严重贫血(血红蛋白 $< 80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)的结直肠癌或乳腺癌病人中占10%~20%,在卵巢癌、肺癌、非何杰金淋巴瘤及多发性骨髓瘤病人中占50%~60%。癌症引起的贫血特点是不能恰当利用贮存的铁,红细胞活存时间缩短及各种细胞因子的过量释放而使促红细胞生成素分泌不足。然而,贫血也可能是失血,这是由于肿瘤细胞入侵骨髓,发生溶血和营养不良的结果。此外,也因化疗对骨髓的直接抑制和肾损伤而引发和加重贫血。

癌症病人贫血的临床表现是各个器官系统缺氧损害所引起。其症状有疲乏、嗜睡、头晕、注意力难以集中、抑郁、呼吸困难、心跳加快、眩晕、厌食和对冷过敏等。此外,贫血使生活质量下降。这些效应使病人的耐受性和治疗反应发生变化。

传统输血方法能最快改变癌症或化疗引起的贫血症状。然而,输血对病人和医疗提供者均不方便。另外还带来众多危险,例如传播炎症、改变免疫状态

(如刺激肿瘤生长)等。最近,重组人促红细胞生成素给癌症病人提供治疗贫血的另一种选择;从克隆人促红细胞生成素基因于中国仓鼠卵细胞中表达得到重组人红细胞生成素倍他依泊汀(epoetin β),已确定为慢性肾衰竭病人贫血的治疗药。本文评价了倍他依泊汀用于癌症或化疗引起的贫血的疗效和耐受性。

2 药效学特点

倍他依泊汀与内源性促红细胞生成素的作用机制相同,它防止祖细胞凋亡,使其增殖、分化和成熟为正常成红细胞。12名实体瘤贫血患者中10名每周皮下注射倍他依泊汀 $75 \sim 150 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$ 次,血红蛋白水平 $> 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,在第15天平均网织红细胞从1.1%升至2.4%。同样,对健康成年志愿者或慢性肾衰竭病人12个月皮下或静脉用药,网织红细胞数也明显增加。16名健康志愿者静脉给单剂 $10 \sim 1000 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$,与安慰剂比较,显示效果与剂量成正比。网织红细胞增长的同时,血红蛋白和红细胞容积的增加均与剂量成正比。22~262名癌症贫血病