

肿瘤基因治疗新策略——RNA 干扰

潘秋卫^① 蔡荣^① 刘新垣^{①②} 钱程^{①③*}

(^① 浙江理工大学生命科学院, 新元医学生物与技术研究所, 杭州 310018; ^② 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031; ^③ Division of Gene Therapy and Hepatology, CIMA, University of Navarra, Pamplona 31008, Spain. * 联系人, E-mail: cqian@unav.es)

摘要 RNA 干扰(RNAi)是一种由双链 RNA 介导的基因沉默现象。目前介导 RNAi 的方法很多, 包括采用非病毒性和病毒性载体介导。最近研究发现, 以病毒为载体介导 RNAi 具有显著的优越性。病毒载体通过表达 70 bp 左右的发夹结构 RNA (shRNA), 在 Dicer 酶的催化作用下, 切割成 21 bp 左右的双链小分子干扰 RNA (siRNA), 从而有效沉默靶向基因。运用 RNAi 技术可设计一系列有效的抗癌策略, 如沉默癌基因、促进凋亡、调控细胞周期、抗血管生成以及提高传统化疗、放疗的疗效等。这一技术开辟了肿瘤基因治疗的新途径。本文就 RNAi 技术在肿瘤基因治疗中的应用与研究作一评述。

关键词 RNAi 肿瘤基因治疗 策略

RNA 干扰(RNAi)是由双链 RNA 分子介导, 在 mRNA 水平上的序列特异性转录后基因沉默过程。与常用的反义技术相比, RNAi 抑制基因的表达不但高效特异, 而且效应持久、操作简便。RNAi 现象最早在植物研究中发现, 由 Fire 等人^[1]在 1998 年研究线虫基因功能时正式提出。2001 年, Elbashir 等人^[2]首次发现了哺乳动物细胞也存在 RNA 干扰现象。这一发现极大地推动了 RNAi 技术在疾病治疗领域的研究和应用, 同时也为 RNAi 技术广泛应用于基因治疗奠定了基础。然而, 化学合成的双链 siRNA 很容易诱发动植物细胞产生干扰素, 从而导致 RNA 的非特异性降解以及某些蛋白质合成受阻。因此, Kim 等人^[3]改用 T7 噬菌体 RNA 合成酶体外转录 siRNA, 虽然去除了 5' 端三磷酸基团, 一定程度上避免了干扰素的干扰作用, 但如果剂量过大仍可诱发产生干扰素。此后, 多个实验室又构建了以 Pol III 启动子(如 H1 和 U6)表达发夹结构 RNA (shRNA) 的 DNA 质粒, 这类 shRNA 质粒虽然弥补了化学合成 siRNA 的缺陷, 但仍存在很多其他问题, 如转染效率低、难以整合到宿主 DNA 及表达不稳定等缺陷^[4,5]。因此在基因治疗的研究中, 病毒是最为有效的 siRNA 表达载体之一。病毒载体通常在 Pol III 启动子驱动下表达 shRNA, 然后经核酸酶 Rnase III 家族中的 Dicer 酶切割成长约 21 bp 的双链 siRNA, 最终特异性切割 mRNA。

目前在基因治疗研究方案中最主要的是肿瘤的基因治疗, 来自 Wiley Database (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>)2006 年 2 月份的数据表明, 1145 个临

床基因治疗方案中有 762 个针对恶性肿瘤, 约占基因治疗的 66.6%。运用 RNAi 技术可以有效沉默癌基因, 促进凋亡, 调控细胞周期, 抗血管生成, 而且 RNAi 与传统的化疗、放疗相结合, 更具抗癌潜力。同时以病毒载体介导 RNAi 的肿瘤基因治疗疗效更为明显, 尤其采用溶瘤腺病毒作载体, 不但病毒载体本身可以杀灭肿瘤细胞, 而且 siRNA 表达量较高, 基因沉默效应持久。

1 RNAi 载体的类型

1.1 RNAi 非病毒性载体

最早 RNAi 技术通常采用体外化学合成的双链 siRNA, 因此非病毒类载体是较理想的运载工具。脂质体、高分子载体、纳米基因转运体等均为常用的 siRNA 载体, 如 Elbashir 等人^[2]使用阳离子脂质体携带化学合成的双链 siRNA 转染动物细胞; Bologna 等人^[6]采用聚乙烯亚胺(PEI)携带 siRNA 转染细胞; Schiffelers 等人^[7]设计了配体靶向的复合纳米颗粒基因传递载体, 可有效运载 siRNA 靶向肿瘤细胞。尽管非病毒型载体具有安全、易于制备等优点, 但同病毒载体相比, 非病毒载体转移效率不高, 进入临床还需要更深入的基础研究。

1.2 常见 RNAi 病毒性载体

目前, 已有多种病毒载体开发为 RNAi 载体。以鼠莫洛尼氏白血病毒为代表的逆转录病毒宿主范围广, 而且肿瘤特异性好, 但病毒滴度较低, 一般纯化后病毒滴度为 10^6 pfu/mL。Devroe 和 Silver^[8]最早构建

了逆转录病毒运载体携带siRNA抑制NDR激酶的表达。Abbas-Terki等人^[9]采用慢病毒运载体表达沉默绿色荧光蛋白的shRNA,在细胞内72 h即可以观察到荧光强度变弱,并且可持续达25 d以上。Tomar等人^[10]利用腺相关病毒介导RNAi抑制HeLa细胞中p53和caspase8的表达。然而慢病毒和腺相关病毒不能识别分裂期细胞与非分裂期细胞^[11]。腺相关病毒还需要腺病毒或疱疹病毒辅助包装,而且这两类载体滴度都较低^[12],因此要成为RNAi的运载工具应用于基因治疗领域,还需做更进一步的深入研究。杆状病毒载体表达系统一直是用于在昆虫细胞中大量表达外源蛋白的载体系统。最近,Nicholson等人^[13]选用重组杆状病毒作RNAi载体,感染人的Saos2, HepG2, Huh7等细胞株,研究发现,这种表达载体还可用来介导外源基因至多种哺乳动物细胞,在肝组织细胞中感染效率最高表达效果最好,而且杆状病毒自身基因组并不复制和表达,因此安全性很好,但杆状病毒载体仍然存在着很多缺陷,如感染的细胞种类有局限性、可诱发干扰素反应和RNA干扰的效果欠佳等。相比而言,腺病毒是较为理想的表达载体,通常载体的包装产量可达 10^{12} pfu/mL,而且可克隆较大的基因片段、转染细胞种类范围广、转染率较高和安全性好等特点。目前绝大多数是采用复制缺陷型腺病毒作为RNAi载体,在理论上,该病毒感染效率很高。然而临床试验表明,通过瘤体内多次注射携带p53基因的复制缺陷型腺病毒很容易产生耐受性,在25个非小细胞肺癌受试病例中只有2例患者症状有所好转,这很大程度上是由于在临床治疗中很难做到腺病毒100%的感染率^[14]。

1.3 新型 RNAi 病毒性载体——溶瘤腺病毒载体

Carette 等人^[15]运用肿瘤特异性复制腺病毒(Ad5- Δ 24E3)构建的RNAi载体引起了人们的广泛关注和浓厚的兴趣,这类载体是通过修饰腺病毒,使其只在肿瘤细胞内特异性复制,在产生溶瘤效应的同时又可在肿瘤细胞大量表达shRNA。

目前,国际上采用有关溶瘤腺病毒作RNAi载体的研究报道较少,对该领域的研究工作刚刚起步。但研究结果^[15,16]初步显示,溶瘤腺病毒具有独特的优势,具有广阔的发展前景,是最具有吸引力的RNAi载体之一。

溶瘤腺病毒载体主要通过以下3种方式构建所获得:(i)修改病毒自身基因,使其只在肿瘤细胞内复制,在正常细胞内不复制;(ii)采用组织或肿瘤特异性启动子控制病毒复制相关的基因;(iii)改造病毒的外壳蛋白。目前常用的溶瘤腺病毒见表1^[17]。

腺病毒E1B 55 kD蛋白能够与细胞中的p53蛋白结合,抑制其功能。如果将腺病毒中E1B 55 kD蛋白缺失或突变,病毒就不能抑制P53的激活,细胞将很快凋亡,以限制病毒的复制,从而使感染终止;但当此病毒感染P53突变或失活的肿瘤细胞后,由于P53功能异常而不能促使细胞凋亡。因此缺失E1B 55 kD的腺病毒仍能在肿瘤细胞内大量增殖,最终导致肿瘤细胞溶解死亡,ZD55就是基于这一机理而构建的溶瘤腺病毒载体^[18,19]。最近,我们采用自己构建的ZD55载体携带H1启动子的shRNA表达框,靶向沉默XIAP抗凋亡基因,Western杂交实验表明,携带XIAP-shRNA表达框的ZD55重组溶瘤腺病毒感染肝癌细胞,72 h后XIAP蛋白的表达量可降到10%左右,抑制基因表达的效果非常明显。

hTERT为人类染色体端粒酶的逆转录酶,是维持端粒酶活性所必需的催化亚单位,它在85%~90%的肿瘤中都高表达,而在正常细胞中低表达或几乎不表达。E1A是调控腺病毒复制的关键性蛋白分子,因此用hTERT启动子调控E1A,可使腺病毒只能在肿瘤中复制并杀死肿瘤细胞,起到靶向杀伤肿瘤细胞的作用,我们构建的Ad-TERT溶瘤腺病毒载体就是基于以上原理^[20]。还有很多载体利用肿瘤特异性启动子控制病毒复制相关的基因,如利用缺氧诱导因子1(HIF-1)启动子、人的端粒酶(hTERT)启动子或肝癌的甲胎蛋白(AFP)启动子等调控病毒复制相关基

表1 常见溶瘤腺病毒

类型	溶瘤腺病毒
修改基因	ZD55, dl1520, Δ 24, dl922-947, AxdAdB-3, dl1331, Ad1118
替换后启动子	Ad-TERT, Ad5TRE-E1A, Adv-TERTp-E1A, TEhRT-Ad, HYPR-Ad, Ad9xHRE1A, Ar6pAE2fE3F, ONYX-411, AdE2F-1 ^{RC} , 01/PEME, AdEHT2, AdEHE2F, Ad. DF3-E1, AdhOC-E1, CV787, CV764, CN706, AvE1a04i, CV890, AdTyrwt, AdTyr Δ 24, AdTyr Δ 24 Δ 24, KD1-SPB, vCF11, AdMKE1, AdE3-1A1. 3B
改造外壳	Ad5/3 Δ 24

因, 以达到载体肿瘤特异性增殖的目的. 因此这类溶瘤腺病毒也可研究开发为有效的 RNAi 载体.

基因治疗中绝大部分是采用血清型 5 型腺病毒 (Ad5) 作为载体. Ad5 的黏附和内化过程主要依赖于细胞表面的柯萨奇-腺病毒受体 (CAR), 不同类型的肿瘤细胞表达 CAR 有所区别, 卵巢癌细胞 CAR 低表达, 而血清型 3 型腺病毒受体表达相对较高. 因此用 Ad3 的纤维蛋白头部 (knob) 替换 Ad5 的 knob 可以显著提高载体对卵巢癌细胞的感染效率. Ad5/3Δ24 就是用 Ad3 knob 替换 Ad5 的 knob, 同时删除 E1A 的 CR2 区 24 bp 碱基序列构建而成的. 由于删除了 CR2 区 24 bp 序列, 该载体只能在 pRb 功能异常的细胞系复制, 与 p53 途径一样, 大多数的人类肿瘤细胞有 pRb 功能丢失的现象, 因此该载体仅能在 pRb 功能缺陷的肿瘤细胞特异性增殖^[21]. 这类载体更适合介导 RNAi 治疗 Ad5 受体低表达而 Ad3 受体高表达的癌症.

2 RNAi 治疗恶性肿瘤的策略

2.1 沉默癌基因

癌基因的过度活化和异常表达在细胞癌变过程中起着重要作用. *ras* 和 *myc* 是最常见的癌基因, 在 30% 的癌症中可检测到 *ras* 突变为癌基因形式, Brummelkamp 等人^[22]采用病毒载体介导 RNAi, 特异性降低 *K-ras* 的表达, 从而抑制肿瘤生长. Fleming 等人^[23]运用 RNAi 靶向沉默前列腺癌细胞中突变的 *K-ras* 基因体内实验显示: *K-ras* 蛋白的低表达可以显著减缓癌细胞在荷瘤小鼠体内的生长、转移及癌组织血管生成.

c-myc 基因是 *myc* 基因家族的重要成员之一, *c-myc* 基因与多种肿瘤发生发展相关, 在 80% 的乳房癌、70% 的结肠癌、90% 的妇科癌和 50% 的肝癌中 *c-myc* 蛋白过量表达. *c-myc* 基因既是一种可易位基因, 又是一种受多种物质调节的可调节基因, 同时也是一种可使细胞无限增殖, 获永生功能, 促进细胞分裂的基因. Wang 等人^[24]采用 RNAi 技术使 MCF-7 细胞 *c-myc* 蛋白的表达量降低 80%, 从而显著抑制乳房癌细胞的生长.

2.2 促进癌细胞凋亡

细胞凋亡就是程序性细胞死亡, 它不仅与胚胎发生、器官发育、变态发育及保持机体平衡等过程息息相关, 而且在调控细胞增殖, 肿瘤的发生和生长中起重要作用. 细胞凋亡主要受到促凋亡因素和抗凋

亡因素的双重调控, 线粒体在凋亡过程中扮演着十分重要的角色. Bcl-2 家族的抗凋亡蛋白, 如 Bcl-2, Bcl-xL 和 Mcl-1 等可以阻止线粒体融合, IAP (抗凋亡蛋白) 家族, 如 NAIP, c-IAP1, c-IAP2, XIAP, Survivin 和 BRUCE 等也可强烈抑制凋亡. 而 TRAIL, Fas, Fasl 等蛋白可以促进凋亡, 运用 RNAi 抑制抗凋亡蛋白的表达, 可以显著提高这些蛋白的诱导凋亡效应. 因此, 设想在肿瘤基因治疗中, 采用病毒载体介导 RNAi 沉默抗凋亡基因的同时可表达促进细胞凋亡的蛋白分子, 如沉默 XIAP 的同时促进 TRAIL 蛋白的表达; 沉默 Bcl-2 的同时促进 Bax 蛋白分子的表达等, 使两者产生协同效应. 另外还可以在沉默多个抗凋亡基因的同时表达促凋亡蛋白.

2.3 调控细胞周期

目前认为细胞周期紊乱是肿瘤最主要的发病机制之一, 真核生物的细胞增殖是由一系列调控因子有序的聚合和激活来调节控制细胞周期的. 细胞的生长与繁殖依赖于细胞周期中各种调节因子的相互平衡调节. 参与细胞周期调控的主要因子有: 细胞周期蛋白 (cyclin), 细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDKs) 和 CDK 抑制蛋白 (CKIs). Cyclin E 是一种细胞周期蛋白, 在细胞由 G1 期向 S 期的过渡时期高表达, 调控细胞进入 S 期, 随后 Cyclin E 被泛肽介导的蛋白酶解途径降解. 如果 Cyclin E 的降解途径缺陷, 细胞进入 S 期加速, 细胞产生不稳定的遗传, 以致发生癌变. Li 等人^[25]设计 siRNA 直接沉默肝癌细胞 Cyclin E 的表达, 抑制了癌细胞的增殖, 促进了凋亡. 细胞增殖还依赖于细胞分裂前染色体的复制及随后的姐妹染色单体分离到达细胞两极. 纺锤体组装检查点具有确保染色体信息传递保真性的作用, 检查点的缺失可能导致染色体的分离异常和肿瘤形成. 癌症高表达蛋白 (Hec1) 通过与调控 G2/M 期的蛋白间的相互作用而在染色体的分离中发挥重要作用, 因此它也是理想的 RNAi 作用靶位点^[26].

2.4 抗血管生成

肿瘤的生长和转移依赖于血管的生成, 这一过程主要依赖于肿瘤血管生成因子和抗肿瘤血管生成因子相互调节的平衡, 目前已发现有 20 多种正负调节因子, 如 VEGF, TGF, bFGF, Angiogenin, PDGF 等促进血管生成因子; Angiostatin, Endostatin, Vasostatin, Tumorstatin, IL-12 等抑制血管生成因子. 因此运用

RNAi技术抑制正调控因子的表达是非常有效的抗血管治疗策略。Chen等人^[27]设计siRNA抑制VEGF-C的表达,显著降低了肿瘤淋巴管和淋巴结的生成,从而抑制了肺癌的转移。同样,Shen等人^[28]采用RNAi技术沉默VEGF受体也取得了理想的治疗效果,并认为,单一地下调正调节因子还不够完美,如果在RNAi抑制正调节因子表达的同时,再运用病毒载体表达负调节因子应取得更理想的协同抗血管生成效应。

2.5 结合传统的化疗和放疗

传统的治疗手段放化疗是除手术之外治疗恶性肿瘤的主要手段。恶性肿瘤化疗失败的主要原因是肿瘤细胞容易产生耐药性,表现为原药耐药和多药耐药(MDR)两种形式。因此采用RNAi技术抑制耐药性相关的基因表达,可以显著提高肿瘤对相关化疗药物的敏感性。如抑制XIAP基因的表达可以提高前列腺癌细胞对DDP的敏感性^[29]。MDR表型的肿瘤细胞常有*mdr1*基因过度表达,许多实验室已成功地设计抑制*mdr1*基因表达的siRNA,从而抑制耐药基因表达,恢复肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[30,31]。

放疗失败的主要原因也是产生耐受性。放射治疗可能导致凋亡抑制蛋白高表达,这些高表达的抗凋亡蛋白为肿瘤细胞提供了保护作用,因此利用RNAi抑制这类蛋白的表达,也可以显著提高放疗敏感性。最近已有一些科学工作者开始从事这方面的研究探索,如Kami等人^[32]利用RNAi抑制survivin蛋白的表达,显著提高前列腺癌细胞对放疗的敏感性。

3 问题与展望

病毒载体介导的RNAi技术作为肿瘤基因治疗的新型工具仍然存在着很多急待解决的问题。其中提高肿瘤细胞的靶向性是最为关键的问题之一。一方面,可以通过不断改进现有病毒载体,提高载体肿瘤靶向性。另一方面, RNAi自身就是序列特异性基因沉默的过程,因此针对肿瘤突变的碱基而设计siRNA就不会影响正常细胞的功能。例如, Martinez等人^[33]根据p53突变碱基设计的siRNA成功抑制了突变型p53的表达,而不影响野生型p53的表达。随着对microRNA的不断深入研究,目前已发现了很多microRNA受pol II启动子的调控^[34]。Stegmeier等人^[35]以慢病毒为载体,成功构建了pol II启动子调控microRNA为骨架的shRNA表达系统,这为筛选肿瘤特异性启动子调控shRNA提供了可能性。

目前基因治疗所选用的腺病毒载体大都是第1代腺病毒,缺失了腺病毒基因组的E1区和部分E3区;第2代腺病毒载体缺失了E1区及部分的E2、E3和E4区,但两者都仍有免疫原性,在体内易被抗体清除而不能维持长期疗效。第3代腺病毒载体——无肠(gutless, GL)腺病毒载体,即腺病毒基因全部被删除,只保留两端的ITR和包装信号,因此基本没有免疫原性,不易被抗体清除,是目前最好的基因治疗载体之一。我们在Gutless的基础上,添加合适的肿瘤靶向性调控元件,构建可调控的肿瘤靶向性载体^[36],这类新型的Gutless可以进一步开发为更完美的RNAi载体。

以病毒为载体的肿瘤基因治疗的另一缺陷是绝大多数病毒载体只能采用瘤体内注射的给药方式,而绝大多数中晚期的恶性肿瘤往往会发生远处转移,有些恶性肿瘤甚至弥散全身。由于病毒载体靶向性差且容易被机体清除,系统给药往往不能达到有效的治疗部位,导致了疗效差且副作用大。因此寻求有效的具有靶向性的系统给药途径是基因治疗从实验走向临床成功与否的关键因素之一。某些细胞(如巨噬细胞、T细胞、NK细胞、嗜伊红白细胞、间充质干细胞等)具有靶向肿瘤部位的特性,利用机体自身的这类细胞可以携带病毒载体进行系统给药。Cole等人^[37]巧妙地利用逆转录病毒“搭乘”T细胞进行系统给药,但是效果还是略有欠佳,因为逆转录病毒为非肿瘤特异性复制载体。为此我们设计了一种更为有效的研究方案:构建既可在某些正常细胞又可在肿瘤细胞特异复制的溶瘤腺病毒载体介导RNAi。因为少数正常细胞也可表达hTERT,首先从体内分离可表达hTERT的正常细胞,用重组Ad-TERT体外感染这些分离的细胞,然后通过血液系统重新输回这些感染后的细胞,这些细胞到达肿瘤组织后裂解释放病毒载体,从而感染肿瘤细胞,这些设想有待于更进一步的证实。

征服人类恶性肿瘤固然是一个漫长的过程,但是随着科学工作者对RNAi研究的不断深入,相信RNAi技术必将从实验阶段走向临床,预期将有美好的发展前景。

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号:2004CB518804)。

参 考 文 献

- 1 Timmons L and Fire A, Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 1998, 395: 854^[DOI]

- 2 Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411: 494—498[DOI]
- 3 Kim D H, Longo M, Han Y, et al. Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 321—325[DOI]
- 4 Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, 296: 550—553[DOI]
- 5 Sui G, Soohoo C, Affar E, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 5515—5520[DOI]
- 6 Bologna J C, Dorn G, Natt F, et al. Linear polyethylenimine as a tool for comparative studies of antisense and short double-stranded RNA oligonucleotides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2003, 22(5—8): 1729—1731[DOI]
- 7 Schiffelers R M, Ansari A, Xu J, et al. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(19): e149[DOI]
- 8 Devroe E, Silver PA. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol*, 2002, 28, 2: 15
- 9 Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Deglon N. Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(18): 2197—2201[DOI]
- 10 Tomar R S, Matta H, Chaudhary P M. Use of adeno-associated viral vector for delivery of small interfering RNA. *Oncogene*, 2003, 22(36): 5712—5715[DOI]
- 11 Rubinson D A, Dillon C P, Kwiatkowski A V, et al. 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[DOI]
- 12 Hommel J D, Sears R M, Georgescu D, et al. Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med*, 2003, 9: 1539—1544[DOI]
- 13 Nicholson L J, Philippe M, Paine A J, et al. RNA interference mediated in human primary cells via recombinant baculoviral vectors. *Mol Ther*, 2005, 11(4): 638—644[DOI]
- 14 Swisher SG, Roth J A, Nemunaitis J, et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91(9): 763—771[DOI]
- 15 Carette J E, Overmeer R M, Schagen FHE, et al. Conditionally replicating adenoviruses expressing short hairpin RNAs silence the expression of a target gene in cancer cells. *Cancer Res*, 2004, 64: 2663—2667[DOI]
- 16 Ko D, Hawkins L, Yu D C. Development of transcriptionally regulated oncolytic adenoviruses. *Oncogene*, 2005, 24(52): 7763—7774[DOI]
- 17 Chu R L, Post D E, Khuri F R, et al. Use of replicating oncolytic adenoviruses in combination therapy for cancer. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(16): 5299—5312[DOI]
- 18 Liu X Y, Gu J F, Shi W F. Targeting gene-virotherapy for cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, 37(9): 581—587[DOI]
- 19 Pei Z, Chun L, Zou W, et al. An oncolytic adenoviral vector of Smac increases antitumor activity of TRAIL against HCC in human cells and in mice. *Hepatology*, 2004, 39(5): 1371—1381[DOI]
- 20 Zou W, Luo C, Zhang Z. Novel oncolytic adenovirus targeting to telomerase activity in tumor cells with potent. *Oncogene*, 2004, 23(2): 457—464[DOI]
- 21 Kanerva A, Zinn K R, Chaudhuri T R, et al. Enhanced therapeutic efficacy for ovarian cancer with a serotype 3 receptor-targeted oncolytic adenovirus. *Mol Ther*, 2003, 8: 449—558[DOI]
- 22 Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, 2002, 2: 243—247[DOI]
- 23 Fleming J B, Shen G L, Holloway S E, et al. Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: justification for K-ras-directed therapy. *Mol Cancer Res*, 2005, 3(7): 413—423[DOI]
- 24 Wang Y H, Liu S, Zhang G, et al. Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(2): R220—228[DOI]
- 25 Li K, Lin S, Brunicardi F C, et al. Use of RNA interference to target cyclin E-overexpressing hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2003, 63: 3593—3597
- 26 Martin-Lluesma S, Stucke V M, Nigg E A. Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2. *Science*, 2002, 297: 2267—2270[DOI]
- 27 Chen Z, Varney M L, Backora M W, et al. Down-regulation of vascular endothelial cell growth factor-C expression using small interfering RNA vectors in mammary tumors inhibits tumor lymphangiogenesis and spontaneous metastasis and enhances survival. *Cancer Res*, 2005, 65(19): 9004—9011[DOI]
- 28 Shen J, Samul R, Silva R L, et al. Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther*, 2006, 13(3): 225—234[DOI]
- 29 Amantana A, London C A, Iversen P L, et al. X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibition induces apoptosis and enhances chemotherapy sensitivity in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(6): 699—707
- 30 Stierle V, Laigle A, Jolles B. Modulation of MDR1 gene expression in multidrug resistant MCF7 cells by low concentrations of small interfering RNAs. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70(10): 1424—1430
- 31 Pichler A, Zelcer N, Prior J L. *In vivo* RNA interference-mediated ablation of MDR1 P-glycoprotein. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(12): 4487—4494[DOI]
- 32 Kami k, Doi R, Koizumi M, et al. Downregulation of surviving by siRNA diminishes radioresistance of pancreatic cancer cells. *Surgery*, 2005, 138(2): 299—305[DOI]
- 33 Martinez L A, Naguibneva I, Lehmann H, et al. Synthetic small inhibiting RNAs: Efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(23): 14849—14854[DOI]
- 34 Yoon Tae L, Minju K, Jinju H, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 2004, 23(20): 4051—4060[DOI]
- 35 Stegmeier F, Hu G, Rickles R J, et al. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(37): 13212—13217[DOI]
- 36 Wang L, Hernandez-Alcoceba R, Shankar V. Prolonged and inducible transgene expression in the liver using gutless adenovirus: A potential therapy for liver cancer. *Gastroenterology*, 2004, 126(1): 278—289[DOI]
- 37 Cole C, Qiao J, Kottke T, et al. Tumor-targeted, systemic delivery of therapeutic viral vectors using hitchhiking on antigen-specific T cells. *Nat Med*, 2005, 11(10): 1073—1081[DOI]

(2005-12-13 收稿, 2006-03-01 接受)