

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.06.003

· 基础研究 ·

突变型 *K-ras* siRNA 抑制肺癌 A549 细胞的增殖和迁移并诱导细胞凋亡

王启钊^{1,2}, 刁勇^{1,2}, 吕颖慧^{1,2}, 李招发^{1,2}, 许瑞安^{1,2*} (1. 华侨大学分子药理学研究所, 福建泉州 362021; 2. 华侨大学教育部分子药物工程研究中心, 福建泉州 362021)

[摘要] 目的: 构建靶向 *K-ras* 的 siRNA, 研究 *K-ras* siRNA 对 *K-ras* 基因突变型肺癌细胞 A549 及 *K-ras* 野生型小细胞肺癌细胞 NCI-H446 生长和迁移的抑制作用。方法: 设计并人工合成 4 条 *K-ras* siRNA (针对野生型 *K-ras* 基因的 *K-ras* siRNA1 ~ *K-ras* siRNA3; 针对突变型 *K-ras* 基因的 *K-ras* siRNA4), 并分别转入 A549 和 NCI-H446 细胞。RT-PCR 和 Western blotting 检测不同 *K-ras* siRNA 对 *K-ras* mRNA 和蛋白表达的影响, MTT 法检测不同 *K-ras* siRNA 对 A549 和 NCI-H446 细胞增殖的抑制作用, Transwell 实验和 Hoechst 33258 染色检测 *K-ras* siRNA 对细胞迁移和凋亡的影响。结果: 靶向突变型 *K-ras* 的 *K-ras* siRNA4 能特异性抑制 A549 细胞中 *K-ras* 的表达, 但对 *N-ras* 和 *H-ras* 的表达没有影响。 *K-ras* siRNA4 抑制 A549 细胞的增殖, 但不影响含野生型 *K-ras* 基因的 NCI-H446 细胞的增殖。 *K-ras* siRNA4 还能诱导 A549 细胞凋亡、抑制 A549 细胞迁移。结论: 针对突变型 *K-ras* 基因的 siRNA 可特异性抑制 *K-ras* 突变型肺癌细胞的增殖和迁移, 并诱导该细胞凋亡, *K-ras* siRNA 可望用于 *K-ras* 突变型肿瘤特别是肺癌的个体化治疗。

[关键词] 肺肿瘤; RNAi; *K-ras*; A549 细胞; NCI-H446 细胞

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)06-0564-06

Mutant *K-ras*-specific siRNA inhibits proliferation, migration and induces apoptosis of lung cancer A549 cells

WANG Qi-zhao^{1,2}, DIAO Yong^{1,2}, LÜ Ying-hui^{1,2}, LI Zhao-fa^{1,2}, XU Rui-an^{1,2*} (1. Institute of Molecular Pharmacy, Huaqiao University, Quanzhou 362021, Fujian, China; 2. Research Center of Molecular Pharmacy of Education Ministry, Huaqiao University, Quanzhou 362021, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To construct *K-ras*-targeted siRNAs (*K-ras* siRNA) and to investigate the inhibitory effects of *K-ras* siRNAs on the growth and migration of lung cancer A549 cells (containing mutant *K-ras* gene) and NCI-H446 cells (containing wild-type *K-ras* gene). **Methods:** Four *K-ras* siRNAs (*K-ras* siRNA1 ~ *K-ras* siRNA3 targeting wild-type *K-ras* and *K-ras* siRNA4 targeting mutant *K-ras*) were designed and artificially synthesized; they were used to transfect A549 cells and NCI-H446 cells. The expressions of Ras mRNA and protein were examined by RT-PCR and Western blotting. The inhibitory effects of *K-ras* siRNAs on the proliferations of A549 and NCI-H446 cells were determined by MTT assay. The effects of *K-ras* siRNAs on the cell migration and apoptosis were observed by Transwell assay and Hoechst 33258 staining, respectively. **Results:** Mutant *K-ras*-targeted siRNA (*K-ras* siRNA4) specifically inhibited the *K-ras* expression but had no influence on *H-ras* and *N-ras* expression in A549 cells. *K-ras* siRNA4 inhibited the proliferation of A549 cells but did not inhibit that of NCI-H446 cells, which contained wild type *K-ras* gene. *K-ras* siRNA4 also induced apoptosis and inhibited migration of A549 cells. **Conclusion:** Mutant *K-ras*-targeted siRNA4 can inhibit the proliferation, migration and induce apoptosis of A549 cells. It may be a potential and personalized drug for the treatment against lung cancer containing mutant *K-ras* gene.

[Key words] lung neoplasms; RNA interference; *K-ras*; A549 cell; NCI-H446 cell

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(6): 564-569]

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划)课题资助项目(No. 2008AA02Z135);福建省发改委课题资助项目(2008第3批26号)。Supported by the National High-Technology Research and Development Program of China (No. 2008AA02Z135); the Development and Reform Commission Program of Fujian Province (2008, the Third Batch, No. 26)

[作者简介] 王启钊(1982-),男,浙江省台州市人,博士,讲师,主要从事癌症特别是肺癌的基因治疗研究。E-mail: lyh4444@hqu.edu.cn

*通信作者(Corresponding author)。E-mail: ruianxu@hqu.edu.cn

肺癌是目前世界范围内病死率增长最快、预后最差的恶性肿瘤之一^[1]。*K-ras* 是肺癌中较为常见的突变基因之一,其在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)尤其是肺腺癌中突变频率较高,并与吸烟相关^[2]。*K-ras* 突变主要集中在 1 号外显子第 12 位和 13 位密码子^[3,4]。*K-ras* 基因突变是肺癌发生的早期事件,并与肺癌临床、病理特征有密切关系,是预后不良的重要指标之一^[5]。最近发现,具有突变型 *K-ras* 基因的肺癌患者并不能从 EGFR 抑制剂如 erlotinib、gefitinib 的治疗中获益^[5,6]。*K-ras* 突变和 *EGFR* 突变在肺腺癌中的发生具有互斥性,即同一肺癌患者 *K-ras* 和 *EGFR* 两个基因不会同时发生突变^[7]。因此,对于肺癌患者需根据 *K-ras*、*EGFR* 及其他基因突变情况开展个体化治疗^[5,8]。针对 *EGFR* 基因突变的抑制剂已应用于临床,但针对突变型 *K-ras* 基因的药物还很少,主要原因是 *K-ras* 基因突变后失去正常酶活性区域,阻碍了针对突变型 *K-ras* 基因的抑制剂的研究和开发^[5]。RNAi 技术的出现为研发针对突变型 *K-ras* 基因的药物提供了可能。

本研究利用人工合成的靶向 *K-ras* 的 siRNA,探讨 *K-ras* siRNA 对含突变型 *K-ras* 基因肺癌细胞以及含野生型 *K-ras* 基因肺癌细胞的影响。研究结果显示,针对突变型 *K-ras* 的 siRNA 可特异性抑制 *K-ras* 突变型 A549 细胞增殖和迁移,并诱导 A549 细胞凋亡,研究为突变型 *K-ras* 特异性 siRNA 应用于含突变型 *K-ras* 基因的肿瘤特别是肺腺癌的个体化治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

含突变型 *K-ras* 基因的肺癌 A549 细胞由本实验室保存,含野生型 *K-ras* 基因的小细胞肺癌 NCI-H446 细胞购于上海细胞库。*K-ras* siRNAs 由上海吉玛制药有限公司合成,*K-ras* 相应引物由上海赛百盛公司合成。TRIzol、lipofectamine 2000、DMEM 培养基、OPTI-MEMI 培养基购自 Invitrogen 公司,细胞培养板、培养瓶、Transwell 小室购自 Corning 公司,*K-ras*、N-Ras、actin 抗体购自 Santa cruz 公司,Taq 酶、RT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司,Hochest 33258、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司,MTT 购自 Sigma 公司,AMP、青霉素、链霉素、FBS 购自 Hyclone 公司,其他常规化学试剂购自国药集团。

1.2 siRNA 的设计

采用 Clontech 公司软件设计靶向野生型 *K-ras* 基因(NMOL/L_004985)的 siRNA 序列,经 BLAST 分析确定无同源序列,分别命名为 *K-ras* siRNA1、*K-ras* siRNA2 和 *K-ras* siRNA3,另根据突变型 *K-ras* 第 12 密码子突变这一现象,设计针对突变 *K-ras* 基因的 *K-ras* siRNA4,其中 *K-ras* siRNA3 和 *K-ras* siRNA4 只有一个碱基差别(表 1)。

1.3 siRNA 转染肺癌细胞株

转染前 1 d,用无抗生素 DMEM 培养基接种肺癌细胞 A549 细胞和 NCI-H446 细胞,细胞汇合度在 30% ~ 50% 之间时进行 siRNA 转染。转染按说明书操作,转染时采用无血清、无抗生素的 OPTI-MEMI 培养基,转染后置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 ~ 96 h,然后进行分析。

表 1 *K-ras* siRNAs 序列及对照序列(S:有义链,A:反义链)

Tab.1 Sequences of *K-ras* siRNAs and control siRNA
(S: Sense sequence, A: Anti-sense sequence)

siRNA	S/A	Location	GC%	Sequence
<i>K-ras</i> siRNA1	S	86	42	5'-GGACGAAUAUGAUCCAACATT-3'
	A			5'-UGUUGGAUCAUAUUCGUCCTT-3'
<i>K-ras</i> siRNA2	S	89	31	5'-CGAAUAUGAUCCAACAUAATT-3'
	A			5'-UAUUGUUGGAUCAUAUUCGTT-3'
<i>K-ras</i> siRNA3	S	25	63	5'-GUUGGAGCUGGUGGCCGUAGTT-3'
	A			5'-CUACGCCACCAGCUCCAACCTT-3'
<i>K-ras</i> siRNA4	S	25	58	5'-GUUGGAGCUAGUGGCCGUAGTT-3'
	A			5'-CUACGCCAACAGCUCCAACCTT-3'
Ctrl-siRNA	S		53	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
	A			5'-ACGUGACACUGGCGGAGAATT-3'

1.4 MTT 法检测细胞的增殖

培养的 A549 细胞和 NCI-H446 细胞接种于 96 孔板, 转染 siRNA 后一段时间, 加入 MTT 至终质量浓度 0.5 mg/ml, 继续培养 4 h 后吸弃培养液, 每孔加入 100 μl DMSO, 震荡溶解后于酶标仪 490 nm 处测 D 值, 参考波长 630 nm, 按下列公式计算相对增殖率(RGR)。

$$\text{细胞相对增殖率(RGR, \%)} = \frac{\text{实验组 } D_{(490-630 \text{ nm})}}{\text{对照组 } D_{(490-630 \text{ nm})}} \times 100\%$$

1.5 BCA 法测定细胞总蛋白含量

细胞总蛋白可以间接表征细胞总数量^[9]。A549 细胞接种于 24 孔板, 每个样品 4 个复孔, 培养不同时间后, 加入适当裂解液, 采用 BCA 法测定细胞总蛋白含量, 按操作说明进行测定并做标准曲线, 测定 578nm 的 D 值。

1.6 Hoechst 染色检测细胞凋亡

肺癌细胞转染 siRNA 后, 用 4 % 多聚甲醛室温固定 20 min, PBS 洗 2 遍(每次 10 min)后, 加入质量浓度为 1 μg/ml 的 Hoechst 33258, 避光染色 30 min, 吸去染液, PBS 洗 2 遍(每次 10 min), 加入抗淬灭试剂后荧光显微镜下观察细胞凋亡。

1.7 Transwell 法检测细胞的迁移

肺癌细胞转染 siRNA 后, 将细胞消化离心, 用含 1% BSA 的 DMEM 培养基重悬, 接种 2 × 10⁴ 个/孔细胞于 Transwell 小室(孔径 8 μm), Transwell 下室加入 500 μl 含 5% FBS 的 DMEM 培养基, 常规培养 12 ~ 48 h 后, 用棉签擦去上室内的细胞, 0.1% 结晶紫染色, 拍照。

1.8 RT-PCR 检测肺癌细胞中 Ras mRNA 的表达

TRIzol 法提取肺癌细胞总 RNA, 以 Oligo dT 为引物进行逆转录, RT 条件为 30 °C 10 min, 42 °C 30 min, 95 °C 5 min。PCR 引物如下: *K-ras* 4a: F, 5'-GTAGGCAAGAGTGCCTTGACC-3'; R, 5'-CAGCCAGGAGTCTTTTCTTC-3'。 *K-ras* 4b: F, 5'-CGTAGGCAAGAGTGCCTTG-3'; R, 5'-CACACTTTGTCTTTGACTTC-3'。 *N-Ras*: F, 5'-CTGAGTACAACTGGTG-TGG-3'; R, 5'-CGGTACTGGCGTATTTCTC-3'。 *H-Ras*: F, 5'-GGAGGGCTTCCTGTGTGTG-3'; R, 5'-TGGGAGGGTCTGCAGTCAC-3'。 18S RNA: F, 5'-CTTAGCTGAGTGTCCC GCG-3'; R, 5'-GGCTGAACGC-CACTTGTCC-3'。 PCR: 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 72 °C 延伸 10 min。其中 18S RNA 为 22 个循环, 其他为 28 ~ 30 个循环。

1.9 Western blotting 检测肺癌细胞中 Ras 的表达

在 6 孔板中接种 1 × 10⁵ 个/孔 A549 细胞, 转染

siRNA 后 72 h, 每孔中加入 100 μl 裂解液, 离心收集上清后, BCA 法测定蛋白浓度。分离胶为 8%, 浓缩胶为 5%, 行 SDS-PAGE, 转膜后加入 1:1 000 稀释的一抗(anti-K-ras、anti-N-ras 和 anti-actin), 室温 1 ~ 2 h, 洗涤后加入 1:2 000 稀释的 HRP 标记二抗, 室温 1 ~ 2 h, 洗涤后 DAB 显色。

1.10 统计学处理

数据用均值 ± 标准差表示, 采用 SPSS12.0 软件对数据进行 t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 K-ras siRNA 对 A549 细胞 K-ras 表达的影响

A549 细胞中 *K-ras* 基因发生了突变, *K-ras* 第 12 密码子由甘氨酸(GGT)突变成丝氨酸(AGT)。为证明针对突变型 *K-ras* 基因的 siRNA(*K-ras* siRNA4)能否干扰 A549 细胞中的突变型 *K-ras* 基因表达, 本研究首先比较了不同 *K-ras* siRNA 对 *K-ras* 基因的沉默效果。RT-PCR 证实(图 1), *K-ras* siRNA4 能降低 A549 细胞中 *K-ras* 4a 和 *K-ras* 4b mRNA 的表达水平, 但是与 *K-ras* siRNA4 只有一个碱基差别的 *K-ras* siRNA3(靶向野生型 *K-ras* 基因)却没有沉默作用。实验中还发现, *K-ras* siRNA4 对同属 Ras 家族的 *H-ras* 和 *N-ras* 也无抑制作用(图 1)。在此基础上, 进一步研究 *K-ras* siRNA4 在蛋白水平上对 *K-ras* 基因表达的影响, 结果证实, *K-ras* siRNA4 能特异性地沉默 A549 细胞中突变型 *K-ras* 基因的表达, 其蛋白表达水平不到对照组的一半(图 2)。

2.2 K-ras siRNA 对 A549 细胞增殖的影响

实验利用 Lipofectamine 2000 转染试剂将不同 siRNA 分别导入细胞。从图 3 可以看出, 在前 3 d, Ctrl-siRNA 组和脂质体组(Lipo 组)光密度低于未转染组(Normal 组), 差异显著(P < 0.01); 而到第 4 天, Lipo 组已与 Normal 组无显著性差异(P > 0.05); 但 Ctrl-siRNA 组低于 Lipo 组以及 Normal 组, 且差别有统计学意义, 提示前 3 d, 细胞生长旺盛, 增殖较快, 而到第 4 天后细胞基本已经长满, 增殖也放缓。因此, 在后续实验中用 Ctrl-siRNA 组作对照。图 3 显示前 2 d 各 siRNA 对 A549 细胞增殖并无明显的抑制作用; 第 3 天开始, *K-ras* siRNA4 明显抑制 A549 细胞的增殖, 且随时间的延长, 抑制作用更加明显; 而针对野生型 *K-ras* 基因的 *K-ras* siRNA1、*K-ras* siRNA2、*K-ras* siRNA3 则不能抑制含突变型 *K-ras* 基因的 A549 细胞的增殖。细胞总蛋白含量测定同样表明, *K-ras* siRNA4 在 48 h 即可抑制 A549 细胞的增殖(图 4)。

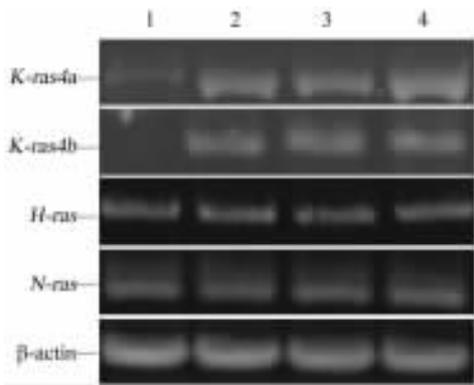


图1 K-ras siRNAs 对 A549 细胞中 Ras 家族成员 mRNA 表达水平的影响

Fig.1 Effects of different K-ras siRNAs on mRNA expression of different family members of Ras in A549 cells

1: K-ras siRNA4; 2: K-ras siRNA3;
3: K-ras siRNA2; 4: K-ras siRNA1

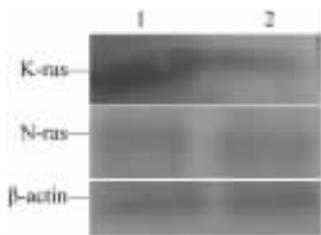


图2 K-ras siRNA4 对 A549 细胞中 Ras 家族成员蛋白水平的影响

Fig.2 Effects of K-ras siRNA4 on protein expression of different family members of Ras in A549 cells

1: Control; 2: K-ras siRNA4

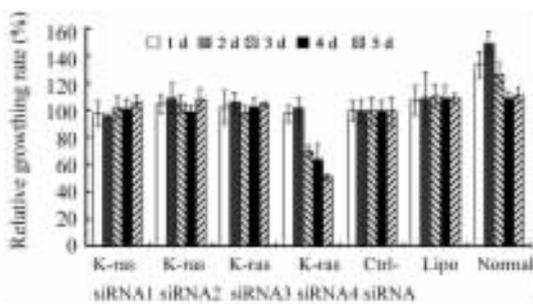


图3 不同 K-ras siRNA 对 A549 细胞增殖的影响

Fig.3 Effects of different K-ras siRNAs on proliferation of A549 cells

Ctrl-siRNA: Transfection with control siRNA;
Lipo: Lipofectamine 2000; Normal: Medium

2.3 K-ras siRNA4 剂量依赖性地抑制 A549 细胞的增殖

K-ras siRNA4 的转染浓度由 0.5 nmol/L 增加到

8 nmol/L 的过程中(图 5),对 A549 细胞增殖的抑制作用逐步增强,因此,K-ras siRNA4 剂量依赖性地抑制肺癌 A549 细胞的增殖。但到一定程度后再增加 K-ras siRNA4 浓度(从 16 nmol/L 到 128 nmol/L),不影响 A549 细胞的增殖(数据未列出)。

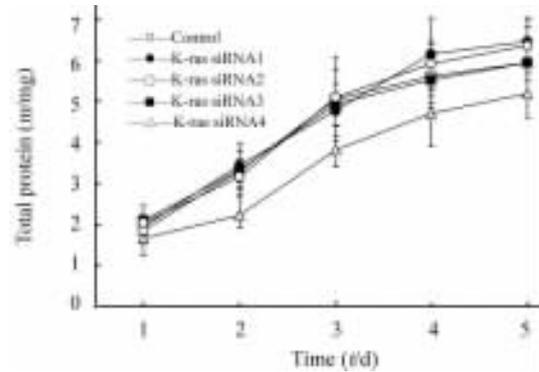


图4 不同的 K-ras siRNA 对 A549 细胞蛋白量的影响

Fig.4 Effects of different K-ras siRNAs on total protein content of A549 cells

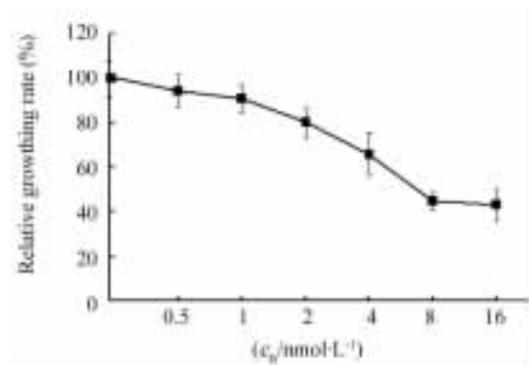


图5 K-ras siRNA4 剂量依赖性地抑制 A549 细胞的增殖

Fig.5 K-ras siRNA4 dose-dependently inhibited proliferation of A549 cells

2.4 K-ras siRNA4 不能抑制含野生型 K-ras 基因的 NCI-H446 细胞的增殖

K-ras 基因突变一般在 NSCLC 中较为常见,而在 SCLC 中的报道较少。从图 6 可知,K-ras siRNA4 能有效抑制含突变型 K-ras 基因的 A549 细胞的增殖,对含野生型 K-ras 基因的 NCI-H446 的增殖却没有抑制作用;而针对野生型 K-ras 基因的 K-ras siRNA3 虽与 K-ras siRNA4 只有一个碱基差别,但只能有效抑制 NCI-H446 细胞的增殖,对 A549 细胞的增殖没有抑制作用。由此证实,K-ras siRNA4 能特异性抑制具突变型 K-ras 基因的肺癌细胞株的增殖。

2.5 K-ras siRNA4 抑制 A549 细胞的迁移

本研究还检测了 K-ras siRNA4 对 A549 细胞迁

移能力的影响。从图 7 可以看出,只有 K-ras siRNA4 能抑制 A549 细胞的迁移,迁移率为对照组的 (69.21 ± 17.16)%($P < 0.01$);随着时间的延长,K-ras siRNA4 的抑制效应更加明显,48 h 后 A549 细胞穿过滤膜并进入下室的细胞数量只有对照的 (24.43 ± 5.63)%($P < 0.01$)。

2.6 K-ras siRNA4 诱导 A549 细胞凋亡

K-ras siRNA4 除了抑制 A549 细胞增殖和迁移之外,从图 8 可知,在转染 K-ras siRNA4 第 2 天时,A549 细胞凋亡增多, (18.92 ± 15.02)% 的细胞可见明显的凋亡;到第 3 天时更加明显,凋亡的细胞达到 (65.67 ± 25.53)%。未转染的对照组和 K-ras siRNA3 转染组则不能诱导 A549 细胞凋亡。

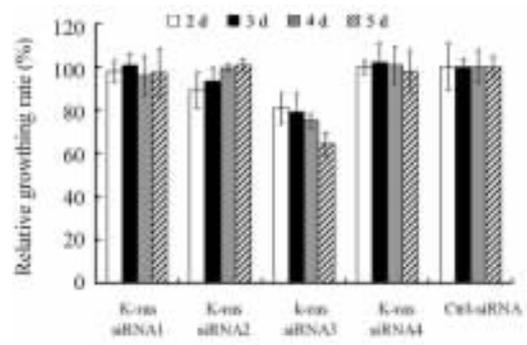


图 6 不同 k-ras siRNA 对 NCI-H446 细胞增殖的影响
Fig. 6 Effects of different K-ras siRNAs on proliferation of NCI-H446 cells

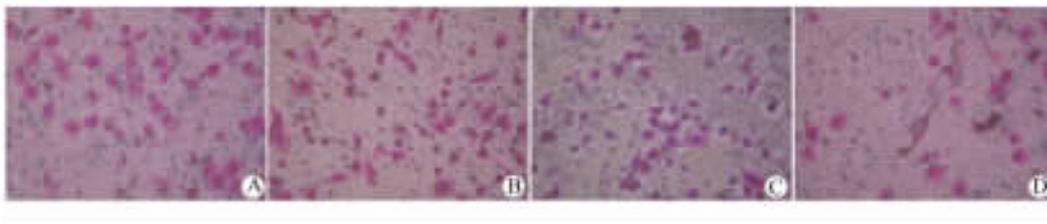


图 7 不同 K-ras siRNA 对 A549 细胞迁移能力的影响(× 200)
Fig. 7 Effects of different K-ras siRNAs on migration of A549 cells(× 200)
A: Ctrl-siRNA; B: K-ras siRNA1; C: K-ras siRNA3; D: K-ras siRNA4

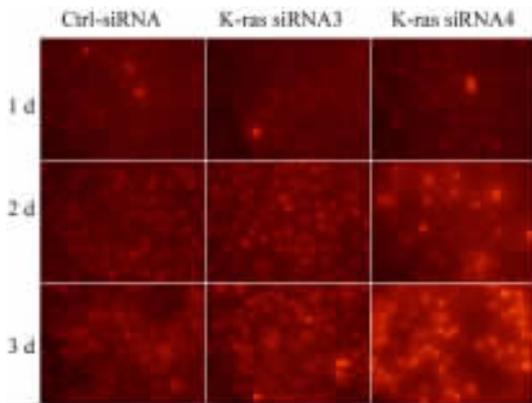


图 8 K-ras siRNA4 诱导 A549 细胞凋亡(× 400)
Fig. 8 K-ras siRNA4 induced apoptosis of A549 cells(× 400)

3 讨论

K-ras 基因突变一般在 NSCLC 中较为常见,而在 SCLC 中报道较少。在 NSCLC 的 A549 肺腺癌细胞中,K-ras 基因第 12 密码子由甘氨酸(GGT)突变成丝氨酸(AGT),使其对 GAP 诱导的 GTP 水解成 GDP 不敏感,Ras 蛋白一直处于活化状态,具有致癌活性^[4]。本研究表明,针对突变型 K-ras 基因的 K-

ras siRNA4 对 A549 细胞的增殖具有抑制作用,而靶向正常 K-ras 基因且与 K-ras siRNA4 只有一个碱基差别的 K-ras siRNA3 却没有抑制作用,证明 K-ras siRNA4 具有高度的序列特异性。本实验中采用的尚未见有 K-ras 基因突变报道的 NCI-H446 细胞这一 SCLC 细胞株进一步证实。K-ras siRNA4 对于无相应 K-ras 基因突变的肿瘤细胞没有任何抑制作用。因此,K-ras siRNA4 只特异性抑制含突变型 K-ras 基因的肺癌细胞株的增殖。这一结果为开发靶向突变型 K-ras 的特异性 siRNA 药物提供了实验基础。国内有学者对肺腺癌细胞株 H44 和胰腺癌细胞株 AsPC-1、MiaPaCa-2 的研究也同样证实了研究 siRNA 药物的可行性^[10-11]。

Hanahan 和 Weinberg^[12]曾对肿瘤细胞的基本特征描述如下:增殖加速、凋亡降低、迁移和转移能力加强、诱导血管生成能力提高等,故任何逆转这些肿瘤表现特征的手段都将有助于治疗肿瘤。K-ras 癌基因不但具有促使细胞发生恶性转化的作用,还能抑制肿瘤细胞的凋亡,促进细胞肿瘤迁移和侵袭^[13],甚至促进肿瘤细胞 VEGF 的表达而诱导肿瘤内的血管形成^[14-15],因此,K-ras 是 RNAi 技术的理想靶标之一^[13]。除利用 siRNA 干扰 K-ras 表达外,

利用 microRNA 诱导的转录后沉默是近几年研究的热点之一^[16-18]。microRNA, 如 Let-7, 不但能抑制突变型 *K-ras* 基因的表达, 也能抑制野生型 *K-ras* 基因的表达。相对于 siRNA, microRNA 具有多作用靶点的优点, 然而 microRNA 对各个基因的作用相对 siRNA 较弱^[19-20]。如能将 siRNA 的优点与 microRNA 的优点相结合, 也许能起到更好的抗肿瘤效果。

最近“癌基因依赖(oncogene addiction)”理论为 RNAi 在肿瘤基因治疗中的应用提供了理论基础^[21-22]。这一理论认为, 癌细胞依赖于突变的致癌基因, 肿瘤细胞的出现涉及到很多遗传和表型的异常, 这些异常虽然很复杂, 但有些异常的出现明显依赖于癌基因, 如特定癌基因的失活, 相关的异常就会引起细胞发生恶变。而 *K-ras* 基因在肺癌中也被认为是具有“癌基因依赖”这一特性的癌基因^[23], 因此针对突变型 *K-ras* 实施 RNAi, 将有可能诱导肿瘤细胞分化、甚至凋亡。本研究中发现, 针对突变型 *K-ras* 的 *K-ras* siRNA4 能特异性抑制 *K-ras* 突变型肿瘤细胞的增殖、诱导其凋亡并抑制细胞迁移。Fleming 等^[24]还报道, 针对突变型 *K-ras* 的 siRNA 能下调肿瘤细胞内的 VEGF 水平、调节细胞的新陈代谢。结合本实验结果可见, 干扰突变型 *K-ras* 基因的基因疗法可望用于含突变型 *K-ras* 的肿瘤, 特别是肺癌的个体化治疗。根据癌基因依赖理论, 如何克服实施 RNAi 之后可能引起的癌基因迁移、癌基因共依赖是今后急需考虑的问题。

[参 考 文 献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.
- [2] Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer [J]. N Engl J Med, 2008, 359(13): 1367-1380.
- [3] Clayton SJ, Scott FM, Walker J, *et al.* K-ras point mutation detection in lung cancer: comparison of two approaches to somatic mutation detection using ARMS allele-specific amplification [J]. Clin Chem, 2000, 46(12): 1929-1938.
- [4] 王启钊, 刁 勇, 许瑞安. 肺癌发生机理和分子疗法 [M]. 北京大学医学出版社, 2008: 433-525.
- [5] Riely GJ, Marks J, Pao W. K-ras mutations in non-small cell lung cancer [J]. Proc Am Thorac Soc, 2009, 6(2): 201-205.
- [6] Sartori G, Cavazza A, Sgambato A, *et al.* EGFR and K-ras mutations along the spectrum of pulmonary epithelial tumors of the lung and elaboration of a combined clinicopathologic and molecular scoring system to predict clinical responsiveness to EGFR inhibitors [J]. AM J Clin Pathol, 2009, 131(4): 478-489.
- [7] Ding Li, Getz G, Wheeler DA, *et al.* Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma [J]. Nature, 2008, 455(7216): 1069-1075.
- [8] Herbst RS, Lippman SM. Molecular signatures of lung cancer-toward personalized therapy [J]. N Engl J Med, 2007, 356(1): 76-78.
- [9] Jenkins N. Methods in biotechnology, Vol. 8 [M]. Totowa NJ, Humana Press Inc, 1999: 205-222.
- [10] 张志平, 姜冠潮, 杨 帆, 等. 突变 *K-ras* 基因 siRNA 腺病毒载体的构建及其对人肺癌细胞株 H441 的影响 [J]. 中国肿瘤临床, 2007, 34(9): 481-484.
- [11] 张 峰, 刘 晔, 刘三光, 等. 基因枪转导突变特异性 *K-ras* siRNA 对胰腺癌细胞生长的抑制作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(1): 28-30.
- [12] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer [J]. Cell, 2000, 100(1): 57-70.
- [13] Duursma AM, Agami A. Ras interference as cancer therapy [J]. Semin Cancer Biol, 2003, 13(4): 267-273.
- [14] Konishi T, Huang CL, Adachi M, *et al.* The K-ras gene regulates vascular endothelial growth factor gene expression in non-small cell lung cancers [J]. Int J Oncol, 2000, 16(3): 501-511.
- [15] Matsuo Y, Campbell PM, Brekken RA, *et al.* K-Ras promotes angiogenesis mediated by immortalized human pancreatic epithelial cells through mitogen-activated protein kinase signaling pathways [J]. Mol Cancer Res, 2009, 7(6): 799-808.
- [16] Wang Q, Xu W, Habib N, *et al.* Potential uses of miRNA in lung cancer diagnosis, prognosis, and therapy [J]. Curr Cancer Drug Target, 2009, 9(4): 572-594.
- [17] Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, *et al.* The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells [J]. Cancer Res, 2007, 67(16): 7713-7722.
- [18] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, *et al.* Ras is regulated by the let-7 microRNA family [J]. Cell, 2005, 120(5): 635-647.
- [19] Baek D, Villén J, Shin C, *et al.* The impact of microRNAs on protein output [J]. Nature, 2008, 455(7209): 64-71.
- [20] Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, *et al.* Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs [J]. Nature, 2008, 455(7209): 58-63.
- [21] Weinstein IB, Joe A, Felsher DW. Oncogene addiction [J]. Cancer Res, 2008, 68(9): 3077-3080.
- [22] Felsher DW, Weinstein IB, Joe A. Oncogene addiction versus oncogene amnesia: perhaps more than just a bad habit [J]. Cancer Res, 2008, 68(9): 3081-3086.
- [23] Sharma SV, Settleman J. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy [J]. Genes Dev, 2007, 21(24): 3214-3231.
- [24] Fleming JB, Shen GL, Holloway SE, *et al.* Molecular consequences of silencing mutant K-Ras in pancreatic cancer cells: justification for K-Ras-directed therapy [J]. Mol Cancer Res, 2005, 3(7): 413-423.

[收稿日期] 2009 - 09 - 19

[修回日期] 2009 - 10 - 18

[本文编辑] 徐红梅