

# siRNA 诱导的 DNA 甲基化与肿瘤的发生

郭维锐<sup>1,2)</sup> 殷勤伟<sup>1)\*</sup>

(<sup>1)</sup>中国科学院生物物理研究所系统生物学研究中心, 北京 100101; <sup>2)</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要** siRNA 诱导的基因沉默最早只被认为是发生在细胞质内的转录后水平的调控过程, 随着 siRNA 指导 DNA 甲基化现象的发现, 已证实 siRNA 可以通过指导基因组表观修饰引起转录水平基因沉默. DNA 甲基化曾被预言是致癌作用的一种表观遗传学机制, 肿瘤发生过程中抑癌基因异常沉默涉及到基因启动子区域 DNA 的甲基化. 分析了这两个过程中内在的关系, 探索 siRNA 对肿瘤细胞中基因异常表达的影响和作用. 这将有助于肿瘤生物学和表观遗传学的研究, 也会为研发防治肿瘤的新方法和新途径提供新的思路.

**关键词** DNA 甲基化, 基因沉默, siRNA

**学科分类号** Q52

大多数已知的 siRNA 诱导的基因沉默发生在细胞质中, 如植物中的转录后基因沉默(PTGS), 动物中 RNA 干扰现象和粉色面包霉菌的静息作用(quelling) 协同共抑制现象等<sup>[1]</sup>. siRNA 引导 RISC (RNA 诱导的基因沉默复合体) 靶向同源的 mRNA 序列并使其降解, 从而阻断基因的表达. 人们最初认识的这些细胞质中发生转录后基因调控过程, 最主要的功能可能是防御外来入侵的基因序列, 但是主体防御作用不是 RNA 抑制现象唯一的功能<sup>[2]</sup>. 在细胞质中 siRNA 诱导的转录后水平特异性基因沉默是依靠 RNA-RNA 的序列识别, 但是 RNA-DNA 也可以相互识别产生生物学效应, 这就是 siRNA 指导基因组修饰和诱导转录水平基因沉默的分子基础. 事实上, 现有的大量实验证据也证明了这一点, siRNA 可以和一些蛋白质复合体结合指导它们作用于核内的基因组靶 DNA, 引起基因在转录水平发生沉默. 此外对内源小 RNA 群体的研究还发现, 这些小 RNA 在内源基因的调控过程中发挥着重要的作用<sup>[3,4]</sup>. siRNA 诱导的转录水平基因沉默是通过指导基因组表观修饰完成的, 包括指导基因组 DNA 甲基化和指导组蛋白修饰. DNA 的甲基化修饰是真核生物基因表达调控的重要方式, 基因启动子区域 DNA 的超甲基化能够使该基因表达沉默. 这种修饰具有可遗传性, 能够对发育、生理、环境、病理等不同的信号作出反映, 使遗传信息的表

达按一定程序发生变化, 参与完成细胞的时序调控和适应调控. 肿瘤发生过程中抑癌基因的异常沉默是肿瘤发生和肿瘤治疗领域所普遍关注的现象, 随着肿瘤细胞中抑癌基因启动子区域 DNA 异常超甲基化被检测到, 科学家们已经把这种异常沉默与基因启动子区域 DNA 重新甲基化联系起来. siRNA 指导的 DNA 甲基化具有精确特定的靶向性, 在某种程度上与肿瘤细胞中抑癌基因特定沉默过程有关. 研究 siRNA 对肿瘤细胞中基因异常表达的影响和作用, 将有助于我们阐明肿瘤发生机制, 寻找肿瘤治疗的新靶点, 并且也能够让我们进一步全面地揭开小 RNA 分子生物功能的神秘面纱.

## 1 siRNA 指导的 DNA 甲基化

细胞内的 siRNA 可由天然 dsRNA 形成, 也可以人工合成诱导产生. 我们熟知的大部分产生 siRNA 的 dsRNA 都是来源于转移元件、转基因连续反转 DNA 构成的 dsRNA 以及 dsRNA 病毒、ssRNA 病毒等. 然而, 最近利用改良的克隆技术已经在线虫内发现了大约 750 个内源性的 siRNA<sup>[5]</sup>, 这些 siRNA 能够与基因组中编码蛋白质的外显子

\* 通讯联系人.

Tel/Fax: 010-64888572, E-mail: jqwyin@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2005-07-15, 接受日期: 2005-08-29

区域相关序列完全互补. 在拟南芥中也克隆得到了一些内源性小 RNA, 但不具 miRNA 特点, 推测可能是靶向内源基因的 siRNA<sup>[6]</sup>. siRNA 是具有 5' 端的磷酸基, 3' 端羟基和 3' 端两个突出核苷酸的双链 RNA, 它有别于其他的 dsRNA. 不管是细胞内本身产生的还是外源诱导产生的 siRNA, 都需要通过 dsRNA 前体加工而产生<sup>[7]</sup>. dsRNA 前体与含有 RED4 蛋白质的 Dicer 复合物结合, 在 Dicer 酶的作用下, 产生成熟的 siRNA. siRNA 与 Argonaute 家族蛋白相结合形成 RISC, RISC 是多组分复合物, Argonaute 家族蛋白是 RISC 的核心成分, 它的 PAZ 片段能识别 siRNA 的 3' 端, PIWI 片段能识别 siRNA 的 5' 端并具有核酸酶的活性<sup>[8]</sup>. RISC 能够结合 siRNA 并完成目标 mRNA 的降解或抑制. 当然 siRNA 亦能与 RITS (RNA 诱导的转录基因沉默复合体) 结合指导基因组修饰, 诱导转录水平的基因沉默<sup>[9]</sup>.

siRNA 可以指导基因组的表观修饰, 而指导 DNA 甲基化是基因组表观修饰改变的重要形式, 这个过程也称作 RNA 诱导的 DNA 甲基化(RdDM). 该现象首次发现于植物系统中. 1994 年 Wassenegger 等<sup>[10]</sup>在被一种类病毒感染的植物中检测到 RdDM. 这种病毒 DNA 能整合到植物基因组中并被甲基化, 表明复制中的类病毒 RNA 对同源 DNA 进行了甲基化. 但如果 Dicer 酶变异, 这种甲基化会被阻断<sup>[11-13]</sup>. RdDM 是一个非常特殊的过程: 甲基化主要限制在 RNA-DNA 序列的识别区, 临近区域几乎没有甲基化分布. RdDM 引导的甲基化模式不仅包括传统的 CG 核苷, 其他相关序列的 C 核苷也被修饰<sup>[12,13]</sup>. 小 RNA 诱导的基因组甲基化, 不仅能始发 DNA 甲基化, 还能维持 DNA 甲基化水平, 这可能还需要其他组分的参与. 拟南芥中不同转基因系统的基因筛选, 为研究 RdDM 介导的转录水平基因沉默的整个通路提供了便利. 这个基本系统包括 2 个不相连的转基因区域: 使靶基因沉默的基因区域和靶基因区域. 使靶基因沉默的基因区域含有一段与靶基因启动子序列相反的 DNA 序列, 它将被另一个不相关的启动子转录. 这个区域转录成自身互补并折叠的 RNA, 为启动子 dsRNA 提供原料. Dicer 酶激活后将 dsRNA 切割成 21~24 nt 的小片段, 这些小 RNA 通过连接 1 个或多个 DNA 转甲基酶 (DMTases) 或染色质修饰因子, 被认为将触发甲基化和靶基因中同源启动子的转录沉默<sup>[12]</sup>. 这种转基因系统可以用来揭示 RNA 信号,

DNA 甲基化和染色质修饰之间的关系.

### 1.1 与 siRNA 指导的 DNA 甲基化有关的蛋白质组分

siRNAs 是 dsRNA 经 Dicer 酶切割产生的, Dicer-like 蛋白 (DCL) 在机体中具有多样性. 在哺乳动物、线虫和裂变酵母中有 1 种 Dicer 酶蛋白, 果蝇有 2 种, 拟南芥基因组编码 4 种 DCL 酶蛋白<sup>[14]</sup>. 虽然所有的 DCL 蛋白都含有 RNase III 和 DexH-box/RNA helicase 区域 (这可能是 Dicer 酶发挥功能的基本条件), 但是它们因结合域上 dsRNA 的数量、PAZ 区域、核内定位信号 (NLS) 的变化而不同<sup>[14,15]</sup>. AGO4 是一种核内蛋白, 在拟南芥中与 DCL3、RNA 依赖的 RNA 聚合酶 2 (RDR2) 和 SDE4 (一种未知功能蛋白质) 一起引起了一段编码 FWA (种子胚乳蛋白) 转基因的启动子甲基化. 此外, AGO4 对一些内生基因和转基因也起到维持 DNA 和 H3K9 甲基化的作用<sup>[16]</sup>. DRD1 是一种植物特有的、假定的 SNF2 样染色质改建的蛋白质<sup>[17,18]</sup>. 它是在对转基因拟南芥种子的特异启动子 RdDM 缺陷型的突变筛查中被鉴别出来的. DRD1 的出现提示, 在 RdDM 过程中为了使靶 DNA 序列更容易接近 RNA 信号, 染色质可能需要重新构建<sup>[19]</sup>. 而另一种 SNF2 样蛋白 DDM1 起到维持 RdDM 的作用, 它在哺乳动物中有一个同源体——淋巴特异的解链酶 (helicase)<sup>[20]</sup>.

DMTases 被认为是机体中的甲基化酶, 包括哺乳动物中的 Dnmt3a、Dnmt3b 和它的植物同源体 DRM1 和 DRM2<sup>[21]</sup>. 一旦一个特异的序列被甲基化, 通过 DNA 复制循环和维持甲基化酶的活性就有可能在 CGs (植物中也包括 CNGs) 上保持这种修饰. 这些酶可识别模板链上已经甲基化的 Cs, 并催化新合成链上相对位置的 C 甲基化. 哺乳动物中 CG 二核苷甲基化维持活性的酶是 Dnmt1<sup>[22]</sup>, 植物同源体是 MET1<sup>[23]</sup>. 植物中还有一种特殊类型的 DMTase (CMT3) 能保持 CNG 三核苷酸的甲基化作用<sup>[24]</sup>. 现在还没发现针对不对称的 CNN 核苷群的维持酶. 所以 CNN 上发生甲基化, 可作为甲基化正在进行的标志<sup>[25]</sup>. 一旦甲基化因某种原因停止, CNN 甲基化将快速丢失, 而动物中的 CG 甲基化, 植物中的 CG 和 CNG 甲基化可以坚持下来. 在许多真核细胞中, 还存在第三类 DMTases: Dnmt2 家族, 其家族成员存在于动物、植物及黑腹果蝇和线虫这 2 种被认为按非正常模式进行 DNA 甲基化的生物体中, 它的功能还不完全清楚. 果蝇的 dDnmt2 在早

期发育中有活性，催化较低水平的 non-CG 甲基化，但在线虫中编码 dDnmt2 同源体的基因发生变异不再编码具有催化活性的蛋白质<sup>[26]</sup>，其原因尚不清楚。

### 1.2 siRNA 指导 DNA 甲基化的途径

从拟南芥遗传证据中我们得到了 RdDM 机制的作用模式 (图 1)，在核内 dsRNA 可以由 RNA 依

赖的 RNA 聚合酶以单链 RNA 为模板产生，也可以由一种如同 RNA 聚合酶 2 的 DNA 指导的 RNA 聚合酶从 DNA 的反向重复序列中转录产生。当 dsRNA 被 DICER 样的酶家族 (例如：DCL3) 作用以后，指导 DNA 甲基化的 RNA 信号便出现了，这些 RNA 信号是靶向那些修饰特定位点的转甲基酶，通过与它们结合引导 DNA 的甲基化修饰。

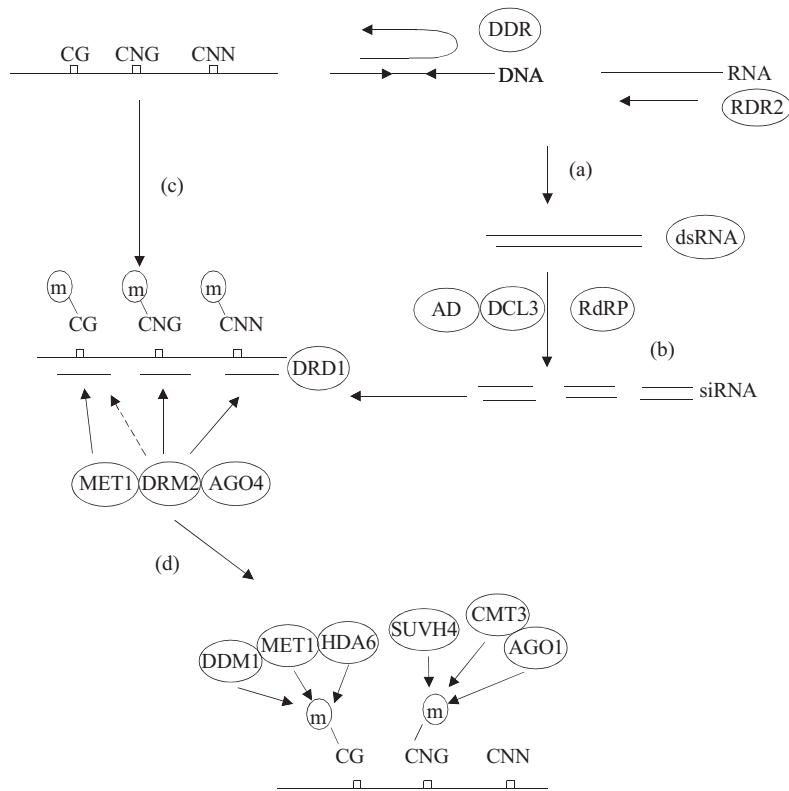


Fig. 1 RNA-directed DNA methylation

图 1 RNA 指导 DNA 甲基化

(a) dsRNA 的产生；(b) siRNA 的产生；(c) RNA 指导 DNA 重新甲基化；(d) DNA 甲基化的维持。

MET1 转甲基酶是作用于序列中 CGs 区域的，而 DRM2 转甲基酶主要是对序列中非 CGs 区域起作用，这些转甲基化酶可以催化 DNA 的重新甲基化。RNA 指导的 DNA 甲基化 (RdDM) 也需要蛋白质 DRD1 的活性，DRD1 是一种 SNF2 样的蛋白质，它的作用可能是使 DNA 更容易受 RNA 信号的影响而进行甲基化。CGs 和 CNGs 区域的甲基化在触发的 RNA 信号消失以后仍能依靠 MET1 和 CMT3 各自的活性继续作用于 DNA 一定范围的区域。CG 甲基化的维持需要组蛋白脱乙酰基酶 HDA6 和 SNF2 样的蛋白质 DDM1。而 CNG 的甲基化往往都伴随着由 SUVH4 催化的组蛋白 H3 赖氨酸 9

(H3K9) 的甲基化。Argonaute 蛋白 AGO4、AGO1 和 DNA 的重新甲基化或一些位点上的甲基化维持密切相关。DNA 糖基酶结构域包含蛋白 DME 和沉默抑制蛋白 ROS1，这是 DNA 去甲基化所需要的，能够选择性地使基因恢复表达<sup>[3,27-29]</sup>。

RdDM 不只出现在植物中，在哺乳动物中也存在着一些与 RdDM 相似的组分，在哺乳动物中介导 DNA 甲基化的是 DNA 甲基转移酶 (DNMT)。目前发现了 3 个有活性的哺乳动物 DNA 甲基转移酶 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B。DNMT1 是维持性 DNMT，它能够把甲基化母链的甲基化模式复制到子链上。这种 DNMT 可以区别一个在甲基化的

GC复制时产生的半甲基化位点和非甲基化的双链DNA位点。DNMT3A、DNMT3B是新型甲基化酶(denovo DNMT),它不区别非甲基化和半甲基化位点,因而能够引入新的甲基化位点<sup>[30]</sup>。因此,哺乳动物中也通过类似植物细胞中再甲基化和维持甲基化两个过程,实现基因组DNA甲基化改变。DNMT3A/B和DNMT1在植物中分别有相似的对物DNA甲基化转移酶DRM2和MET1,这两种酶对植物中的RdDM是必需的。DRM2仅在催化区域相对DNMT3A/B有重排,另有一些氨基端的差别。DNMT3A/B和DNMT1很可能也能够结合siRNA信号。另一个植物RdDM机制中的特异蛋白因子SNF2样(SNF2-like)蛋白DRD1,它最接近的非植物同源体是SNF2样蛋白保守的Rad54/ATRX亚家族,ATRX是哺乳动物中一些重复序列CG甲基化所必需的,它可能代替DRD1在哺乳动物细胞中实现RdDM。非CG的甲基化是植物中RdDM现象的一个明显信号,现在在哺乳动物干细胞和人类L1反录转座子中也发现了这种情况<sup>[29]</sup>。这些都暗示在哺乳动物细胞中很可能存在着和植物细胞中相近的RdDM机制。然而令人疑惑的是,哺乳动物RNAi现象中mRNA的降解发生在细胞质当中,因为哺乳动物只有一种Dicer酶,且存在于细胞质中。而植物细胞中有的Dicer样酶被定位在细胞核中,如拟南芥中的DCL3和DCL1。但是新的研究发现和证实了哺乳动物细胞核内存在着成熟的miRNA,因此,推测可能存在一种机制可以将细胞质内的小RNA带到细胞核内完成RdDM过程<sup>[29]</sup>。植物中RdDM途径的阐明,将十分有助于我们发现和解释哺乳动物和其他物种中siRNA指导的DNA甲基化现象,siRNA很可能和miRNA一样参与了生物体基因表达的调控。

## 2 siRNA 指导的 DNA 甲基化与抑癌基因沉默

肿瘤发生过程中,抑癌基因非一级核苷酸序列改变的异常沉默一直是科学家试图解释的现象。大量研究证据只表明肿瘤细胞内抑癌基因启动子区域发生了超甲基化现象,但甲基化对抑癌基因沉默的影响,以及这种甲基化如何产生,是谁指导了这种精确的过程,现在依然没有很好的解释。siRNA指导DNA甲基化的发现带给我们一些启示,siRNA指导DNA甲基化精确特异的基因沉默过程很可能与肿瘤中抑癌基因被诱导沉默相关。此外甲基化还可以引起突变,一些病毒的致癌机制也很可能和这

个过程相联系。

### 2.1 抑癌基因沉默机制

已经证实突变可能导致抑癌基因的功能减弱甚至丧失,但肿瘤发生时往往伴随着未突变的抑癌基因的异常沉默,这种沉默与基因启动子区CpG岛的甲基化水平相关。抑癌基因的DNA甲基化和基因突变一样都是肿瘤细胞的特点。一般来说,使抑癌基因失活,需要相关基因的两个拷贝都完全失活。Knudson<sup>[31]</sup>曾提出两步打击的假说,不管是在家族性肿瘤中遗传的突变还是在非遗传的肿瘤中自身机体的突变,若是纯粹的遗传改变引起的,这种改变发生在基因的一个拷贝的编码区,这是假说的第一步。第二步,生物自身体内包含另一份基因拷贝的染色体区域缺失,或者是杂合性的缺失。启动子区的超甲基化与一个基因拷贝的非编码区突变的效果是一样的,可以使该基因拷贝失活。在家族遗传的肿瘤中,DNA甲基化的改变不是第一步打击的机制,但它能引起第二步打击<sup>[29]</sup>。点突变极少能在家族遗传或机体的肿瘤中使抑癌基因的两步打击中都起作用,受表观修饰引起失活的肿瘤相关基因数目等于或超过由突变引起失活基因的数目。肿瘤细胞中许多受启动子超甲基化修饰的基因有典型的抑癌功能。例如肾癌中的VHL基因,许多肿瘤中的细胞周期调节基因p16和肠癌或其他一些肿瘤中的错配修复基因MLH1等等。启动子超甲基化的重要性已经通过去甲基药物如5-azacytidine,在培养的肿瘤细胞中重新激活受影响基因并恢复相关蛋白产生的能力而得到阐明<sup>[29]</sup>。人类肿瘤形成中肿瘤抑制基因的异常甲基化也可用MSP(甲基化特异PCR)方法进行检测。最近发展的一套试验体系给了我们一个评估基因沉默生化事件的机会。当DNMT1和DNMT3B两个基因通过基因打靶被同时破坏后,几乎所有的DNA甲基化酶和转甲基化酶的活性都消失了。类似情形也出现于发育中的精细胞。这套体系使我们可能了解抑癌基因沉默与DNA甲基化之间的关系。目前各种证据表明,DNA甲基化与肿瘤细胞中发现基因异常沉默有密切的关联,这些发现也暗示DNA甲基化可能在儿童和成人癌症的发病机理中起作用,也启示我们在肿瘤研究中应该更加重视DNA甲基化的研究。

### 2.2 肿瘤细胞中 siRNA 指导的 DNA 甲基化

肿瘤细胞中抑癌基因的异常沉默与启动子区域DNA超甲基化的密切关系已经被证实,目前正在寻求基因启动子区域发生DNA甲基化改变的机

制, 已经知道在哺乳动物中这一过程是由 DNA 甲基转移酶 (DNMT) 催化完成的, 但是谁引导了 DNA 甲基转移酶 (DNMT) 精确作用于 DNA, DNA 甲基化发生改变在细胞中的整个途径如何, 都是研究者们迫切想知道的。

siRNA 在植物中可以指导 DNA 启动子区域甲基化, 但在哺乳动物中却报道较少. 肿瘤细胞中是否存在 siRNA 指导的 DNA 甲基化途径, 也是国内外科研人员普遍关注的问题. 最近, Kawasaki 和 Taira 两位科学家<sup>[32]</sup>用实验揭示了在人类乳腺癌细胞和非转化的乳腺上皮细胞中 siRNA 能通过 RdDM 诱导转录水平基因沉默. 人工合成的靶向 E-cadherin 启动子 CpG 岛的 siRNAs, 在 MCF-7 和正常的乳腺上皮细胞中诱导出了有意义的 DNA 甲基化和 H3K9 的甲基化<sup>[32,33]</sup>. 这些 siRNAs 在转录水平上抑制了 E-cadherin 基因的表达. 另外, 研究还发现两个 DNA 转甲基酶 (DNMT1 或 DNMT3B) 中的任一个被特定的 siRNAs 破坏, 其表达就会终止 siRNA 介导的 DNA 甲基化. 并且这个过程同样也可以被 5-aza-deoxycytidine 甲基化抑制剂所抑制. ERBB2 在人类乳腺癌中一般是过表达的, 是一个不良预后的标志, 靶向 ERBB2 (也被叫做 HER2) 启动子的 siRNAs 在 MCF-7 细胞里也诱导了 DNA 的甲基化并降低 MCF-7 细胞的增殖能力, 用突变的 siRNAs 作用细胞后没有诱导 ERBB2 甲基化, 以上的实验表明了人类肿瘤细胞里靶向一个特定基因启动子中, CpG 岛的 siRNAs 可以依靠 DNA 转甲基酶以 DNA 甲基化的方式沉默转录的基因<sup>[32,34]</sup>. 这些实验中的 siRNAs 都是通过表达质粒带到细胞当中的. 早前有报道在 HEK293 细胞内源延长因子 1 $\alpha$  的转录被靶向启动子的 siRNA 抑制, 但这个实验发现, 将 siRNA 直接导入到细胞核这个过程是必需的。

此外, 在哺乳动物中还有一些 RNA 因其引起 DNA 修饰的证据, 例如, 反义 RNAs 同一些哺乳动物的印迹基因沉默有关, 在哺乳动物中具有剂量补偿效应. 有关  $\alpha$ -地中海贫血症的文献报道了反义转录导致 DNA 甲基化和珠蛋白基因稳定的沉默. RNA 可能是导致组蛋白修饰 (如 H3K9 甲基化) 和 DNA 特异性位点甲基化 (如中心粒周围的异染色质) 的直接触发因素, 从而引起可遗传的稳定基因沉默<sup>[35]</sup>. 正如前面所述, 哺乳动物中存在着已知的一些 RdDM 机制可能的组分, 而且这些已经发现的实验证据也更好地揭示了肿瘤细胞中存在 RdDM

可能性. 肿瘤细胞中 RdDM 途径存在的证实和机制的阐明, 将使我们可能解释肿瘤细胞抑癌基因沉默的发生机制以及致癌病毒等的致癌机制, 也能够使我们了解 siRNA 在基因表达调控方面的作用. 在该领域的研究将会为癌症治疗带来重大突破, 并且有助于揭开哺乳动物基因表达调控的分子机制。

### 3 肿瘤细胞中 siRNA 指导 DNA 甲基化的研究前景

DNA 甲基化的改变在人类癌症发生中起着重要的作用, 由此产生转录水平的基因沉默直接导致了抑癌基因的失活. 癌症发生的原因很可能也是相关基因启动子的甲基化所致. 实际上人类许多疾病包括癌症都具有 DNA 甲基化的改变, 这也是一种表观遗传学改变的病因. 许多药物已经发现具有改变 DNA 甲基化模式或进行组蛋白的修饰, 并且有部分药物正在进行临床实验, 例如甲基化抑制剂、DNA 甲基转移酶等. 在对细胞进行表观修饰的治疗之后, 这些细胞可能对于化疗、干扰素、免疫治疗更具有敏感性. 肿瘤细胞中 siRNA 很可能作为信号诱导了抑癌基因的甲基化, 从 siRNA 指导的 DNA 甲基化途径入手, 阻断 siRNA 指导的 DNA 甲基化通路, 将可能会抑制抑癌基因的甲基化, 也许会找出肿瘤治疗的新方法, 抑制肿瘤细胞中 DNA 异常甲基化的研究而给肿瘤治疗带来更广阔的前景, 更多的药物和治疗方法将在这个领域诞生。

另外, siRNA 指导的基因组表观修饰能够实现包含特异序列的基因沉默. RdDM 现象为 RNA-DNA 序列相互作用能够以一种高度精确的方式直接引起基因表观修饰提供了大量证据. siRNA 不仅能在转录后水平抑制基因表达, 也能通过诱导 DNA 甲基化达到转录水平的基因沉默. siRNA 干扰现象已成为一种特异地抑制靶基因表达的有效工具, 抑制肿瘤相关基因的表达一直是研究与开发新型抗肿瘤药物的一个重要思路. 针对肿瘤相关基因的启动子特异序列设计的 siRNA, 可以高效地抑制靶基因的表达, 降低靶蛋白的水平, 干扰肿瘤细胞的正常信号转导过程, 从而对肿瘤进行基因治疗. 目前针对肿瘤治疗的 siRNA 研究发现, siRNA-MDM2 可以明显抑制人乳腺癌 MCF-7 等肿瘤细胞的生长, siRNA 可能发展成为一类高效特异的新型抗肿瘤药物<sup>[36,37]</sup>. 不管是通过阻断肿瘤细胞 siRNA 信号通路来防止抑癌基因沉默, 还是利用 siRNA 介导的 DNA 甲基化在转录水平上特异性沉

默癌基因, siRNA 已经开始向人们展现它在基因表观遗传修饰治疗上的巨大魅力. 基因的表现修饰具有可遗传性, 这使 siRNA 成为肿瘤基因治疗药物开发上的一颗新星, 一些生物技术公司 (Ribopharma 和 Benitec 公司) 已经获得临床应用的专利许可<sup>[38]</sup>, 相信在不久的将来在 siRNA 指导的基因表观修饰方面的研究将会对人类健康和生命科学探索作出巨大贡献.

### 参 考 文 献

- 1 Yin J Q, Wang Y. siRNA-mediated gene regulation system: now and the future. *Int J Mol Med*, 2002, **10** (4): 355~365
- 2 Bachman K E, Park B H, Rhee I, *et al.* Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell*, 2003, **3** (1): 89~95
- 3 Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, *et al.* Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1677** (1~3): 129~141
- 4 Yin J Q, Jiang L. MiRNA-directed gene intertalk. *Chin Acad Forum*, 2004, **11** (20): 1~4
- 5 Ambros V, Lee R C, Lavanway P, *et al.* miRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol*, 2003, **13** (10): 807~818
- 6 Allen E, Xie Z, Gustafson A M, *et al.* microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 2005, **121**(2): 207~21
- 7 Hammond S, Boettcher S, Caudy A, *et al.* Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 2001, **293** (5532): 1146~1150
- 8 Ma J B, Yuan Y R, Meister G, *et al.* Structural basis for 5' -end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*, 2005, **434** (7033): 666~670
- 9 Noma K, Sugiyama T, Cam H, *et al.* RITS acts in *cis* to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nat Genet*, 2004, **36** (11): 1174~1180
- 10 Wassenegeger M, Heimes S, Riedel L, *et al.* RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, 1994, **76** (3): 567~576
- 11 Mette M F, Aufsatz W, van der Winden J, *et al.* Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J*, 2000, **19** (19): 5194~5201
- 12 Aufsatz W, Mette M F, van der Winden J, *et al.* RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (Suppl 4): 16499~16506
- 13 Wassenegeger M. RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol Biol*, 2000, **43** (2~3): 203~220
- 14 Schauer S E, Jacobsen S E, Meinke D W, *et al.* DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci*, 2002, **7** (11): 487~491
- 15 Papp I, Mette M F, Aufsatz W, *et al.* Evidence for nuclear processing of plant microRNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol*, 2003, **132** (3): 1382~1390
- 16 Zilberman D, Cao X, Jacobsen S E. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, 2003, **299** (5607): 716~719
- 17 Vaucheret H, Vazquez F, Crete P, *et al.* The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway a crucial for plant development. *Genes Dev*, 2004, **18** (10):1187~1197
- 18 Lippman Z, Gendrel A V, Black M, *et al.* Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*, 2004, **430** (6998): 471~476
- 19 Kanno T, Mette M F, Kreil D P, *et al.* Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol*, 2004, **14** (9): 810~805
- 20 Dennis K, Fan T, Geiman T, *et al.* A member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev*, 2001, **15**(22): 2940~2944
- 21 Cao X, Jacobsen S E. Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr Biol*, 2002, **12** (13): 1138~1144
- 22 Howell C Y, Bestor T H, Ding F, *et al.* Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell*, 2001, **104** (6): 829~838
- 23 Kankel M W, Ramsey D E, Stokes T L, *et al.* *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics*, 2003, **163** (3): 1109~1122
- 24 Lindroth A M, Cao X, Jackson J P, *et al.* Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, 2001, **292** (5524): 2077~2080
- 25 Aufsatz W, Mette M F, van der Winden J, *et al.* HDA6, a putative histone deacetylase needed to enhance DNA methylation induced by double-stranded RNA. *EMBO J*, 2002, **21** (24): 6832~6841
- 26 Bestor T H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, 2000, **9** (16): 2395~2402
- 27 Cao X, Aufsatz W, Zilberman D, *et al.* Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol*, 2003, **13** (24): 2212~2217
- 28 Aufsatz W, Mette M F, Matzke A J, *et al.* The role of MET1 in RNA-directed de novo and maintenance methylation of CG dinucleotides. *Plant Mol Biol*, 2004, **54** (6): 793~804
- 29 Matzke M A, Birchler J A. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet*, 2005, **6** (1): 24~35
- 30 Szyf M. DNA methylation and demethylation as targets for anticancer therapy. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, **70** (5): 533~549
- 31 Knudson A G. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*, 2001, **1** (2): 157~162
- 32 Kawasaki H, Taira K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature*, 2004, **431** (7005): 211~217
- 33 Morris K V, Chan S W, Jacobsen S E, *et al.* Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*, 2004, **305** (5688): 1289~1292

- 34 Kawasaki H, Taira K, Morris K V. siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Cell Cycle*, 2005, **4** (3):442~448
- 35 Egger G, Liang G, Aparicio A, *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 2004, **429** (6990): 457~463
- 36 Liu T G, Yin J Q, Shang B Y, *et al.* Silencing of hdm2 oncogene by siRNA inhibits p53-dependent human breast cancer. *Cancer Gene Ther*, 2004, **11** (11): 748~756
- 37 Tan F L, Yin J Q. Application of RNAi to cancer research and therapy. *Front Biosci*, 2005, **10**: 1946~1960
- 38 Swanton C, Nicke B, Downward J. RNA interference, DNA methylation, and gene silencing: a bright future for cancer therapy?. *Lancet Oncol*, 2004, **5** (11): 653~654

## Small RNA-directed DNA Methylation and Tumorigenesis

GUO Wei-Rui<sup>1,2</sup>, YIN JAMES Q<sup>1</sup>\*

<sup>1</sup>*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;*

<sup>2</sup>*Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)*

**Abstract** The most familiar action of mode performed by RNA regulation is the posttranscriptional gene silencing in the cytoplasm. The discovery of siRNA-directed DNA methylation in nucleus has proved that siRNA can induce transcriptional gene silencing by siRNA-guided genome modifications. DNA methylation was once predicted to be an epigenetic mechanism of tumor biogenesis. It is well known that the abnormal inhibition of tumor-suppressor genes is associated with DNA de novo methylation in the gene promoter region. Potential molecular mechanisms of tumour-suppressor gene silencing was analyzed, the principle of siRNA-directed transcriptional suppression was explored, and the possible relationship between them was clarified. The detailed study on the relationship between DNA methylation and RNA interference will be beneficial to better understand tumor biology and epigenetics, and also provide new therapeutic strategies for the prevention and treatment of cancer.

**Key words** DNA methylation, gene silencing, siRNA

---

\*Corresponding author . Tel/Fax: 86-10-64888572, E-mail: jqwyin@sun5.ibp.ac.cn

Received: July 15, 2005 Accepted: August 29, 2005