

[文章编号] 1007-385X(2003)01-0068-03

RNA 干扰研究进展

张 翊, 裴德宁 综述; 王军志 审阅(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

[摘要] RNA 干扰能使特异基因沉默, 目前 RNA 干扰研究成为热点, 并成功的在哺乳动物细胞和小鼠体内抑制部分基因的表达, 本文介绍了目前 RNA 干扰作用机理、导入技术和应用的研究进展, 可以预见 RNA 干扰技术在基因功能研究、细胞信号转导以及疾病的基因治疗等方面有着良好的应用前景。

[关键词] RNA 干扰; 基因沉默; 双链 RNA; 反义 RNA

[中图分类号] Q522; R459.5 [文献标识码] A

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)分子在 mRNA 水平关闭相应序列基因的表达使其沉默的过程, 是一种序列特异性的转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。这一现象已在植物、真菌、锥虫、涡虫、囊虫、水螅、果蝇、线虫、斑马鱼、老鼠早期胚胎等不同种属的生物体中被发现^[1], 近年来, RNA 干扰的研究成为热点, 下面对其研究进展作一综述:

1 RNA 干扰的发现

1990 年, Jorgensen 及 Mol 领导的 2 个研究组试图在矮牵牛属植物中通过添加过量的合成色素的基因拷贝, 来增加花瓣紫色的着色。结果不但紫色没有加深, 而且一些转基因的花出现白色或全白色。这说明不仅导入的基因未被表达, 反而连植物本身的某些合成色素的基因也失活, 他们称此现象为共抑制(cosuppression)^[2]。有人利用反义 RNA(antisense RNA)来抑制基因表达, 这些 RNA 被构建成与 mRNA 相反的序列, 以使两者结合抑制基因的活性, 从而防止相应蛋白的合成, 但是他们发现, 作为对照的正义 RNA, 本不应该与基因或 mRNA 结合, 却也表现出与反义 RNA 相同的阻碍基因表达的作用。1998 年, Fire 等^[3]通过研究发现反义 RNA 在线虫中的作用。他们分别运用反义 RNA、有义 RNA 及双链 RNA 分子进行研究, 出乎意料的是, 在使相应的 *C. elegans* 基因沉默的能力上, 双链 RNA 较单一的有义或反义 RNA 均有效, 他们称此现象为 RNA 干扰。

RNAi 对于生物的功能主要体现在以下几个方面: ①防御病毒感染, 例如, 当植物病毒侵入植物细胞时, 植物病毒产生的 dsRNA 将引起 RNAi, 封闭病毒繁殖和传播所需的基因^[4]。②维持基因组中转座子的稳定, 当一个转座子以反义方向整合在启动子附近时, 能够转录产生 dsRNA, 引起针对此转座子的 RNAi^[5]。③参与胚胎发育中相关基因表达的调节, 例如, 在果蝇中, *Argonaute* 家族成员的突变能影响正常的生长发育, 特别是 *Argonaute-1* 的突变能显著影响神经系统的发育, *piwi* 的突变能降低胚胎干细胞的增殖能力和稳定性^[6]。

2 RNA 干扰的作用机制研究进展

2.1 以 RISC 为基础的作用机制

目前对 RNAi 机制的了解主要来自于对线虫、植物、果蝇的研究, Kennerdell 等^[7]把 dsRNA 注入果蝇的胚胎后发现了转录后水平的序列特异性的沉默, Tuschl 等^[8]发现果蝇胚胎提取物可能含有参与 RNAi 的成分, dsRNA 在此提取物中孵育后, 能降低荧光素酶 mRNA 翻译形成荧光素酶的能力, 提示 dsRNA 可能会引起一个核酶复合体的组装, 从而引起同源 RNA 的降解, 此核酶复合体在称为 RISC(RNA-induced silencing complex, RNA 诱导的封闭复合物, 是一种核糖核蛋白, 具有核酸酶活性, 能够识别和破坏目标 mRNA), 已经从人工诱导形成 RNAi 的果蝇 S2 细胞中分离。一个关键的问题是此复合体如何识别同源 RNA 底物, Fire 和 Meuo 设想 dsRNA 的衍生物引导 RISC 对 RNA 底物的识别, 这种“引导 RNA”的证据最早来自植物中的转录后基因沉默, Hamilton 等^[9]发现了一种只在发生转基因共抑制的植物中出现的 ~25nt 的 RNA, 在由病毒引起的基因沉默的植物中也有类似的 RNA。果蝇胚胎提取物中 dsRNA 也可产生这种小的 RNA, Hammond 等^[10]对 RISC 进行部分纯化显示这些小 RNA 与核酶有联系。以上发现在植物的转基因共抑制与动物的 RNAi 之间建立了联系, 逐渐建立了 RNAi 的模型: 首先外源性或细胞内源性的 dsRNA 与胞内的 RNAi 核酸酶(如 Dicer)的 dsRNA 相结合, 之后 dsRNA 被 RNAi 核酸酶切割成 21~23 nt 的 siRNA(small interference RNA, 小干扰 RNA), 此 siRNA 含有 2~3 nt 的 3'突出端, 被输送到 RISC, siRNA 作为引导序列引导 RISC 与同源性的 mRNA 结合, 解旋酶催化 mRNA 与 siRNA 的正义 RNA 链相互交换, 反义 RNA 链与同源 mRNA 结合后, 核酸酶在 mRNA 与反义 RNA 所形成的双链区的 5'起始端下游 7~10 个核苷酸处(也就是双链区的靠近中间位置)切断 mRNA, 降解的 mRNA 被释放后, siRNA 双链重新形成, 可以继续降解同源的 mRNA^[11-12]。从不同的实验体系观察到的现象提示在 RNA 干扰现象中存在一个较保守的生化机制, 只是在不同的生物中具有一些特有的生物学

性质。

2.2 RNA 干扰相关基因和酶

利用突变的筛选策略,已鉴定出了几十种 RNAi 所必需或相关的基因,其中比较重要的有以下几种:①RNase III proteins: siRNA 存在 5' 端磷酸基和 3' 端羟基的事实以及 siRNA 的长度都说明 dsRNA 被与埃氏大肠杆菌 RNase III 相似的酶加工过,在动植物中存在 2 个 RNase III 家族,一个以果蝇 *drosha* 蛋白为代表,含有 2 个 RNase III 结构域和一个 dsRNA 结合结构域,此家族可能在 rRNA 的加工过程中起作用。第 2 个家族(Dicer enzymes)以线虫 K12H4.8 基因编码的蛋白为代表,含有一个 N 末端 ATP 依赖性解旋酶的结构域,2 个 RNase III 结构域,一个 dsRNA 结合模体。此蛋白的同源物已在 *S. pombe*, *Arabidopsis thaliana*, *D. melanogaster*, 果蝇,线虫和人类中发现^[11-12],这一家族很可能参与 RNAi,其中已经证明,Dicer 对于线虫 RNAi 是必不可少的^[13-14]。②mut-7 基因:存在于线虫中,含有 3', 5'-核酸外切酶,可能切割目标 mRNA,使其降解^[6]。③RdRP 同源物(RNA-dependent RNA polymerase):在脉孢菌、线虫、植物中,编码 RdRP 同源物的基因(分别是 *qde-1*, *ego-1*, *sds-1*)的突变会影响 RNAi, RdRP 可能复制 dsRNA 或是 siRNA,使 RNAi 在生物体内以及亲代与子代之间传播^[12]。Lipardi 等^[15]认为 RdRP 能以 mRNA 为模板,以 siRNA 为引物合成 dsRNA, dsRNA 再被加工成 siRNA。④RNA 依赖的 RNA 解旋酶(RNA-dependent RNA helicase): Mut-16 是 DEAH-box 解旋酶超家族成员,存在于 *Chlamydomonas reinhardtii* 中,它的突变会影响 RNAi, Mut-16 可能在 RNAi 的某些步骤中解开 RNA 双链^[6, 11]。

2.3 目标 mRNA 的降解

对诱导 RNA 干扰所需的 dsRNA 长度进行体内和体外分析已证明短的 dsRNA (<50 bp)引起有效的 RNAi 的能力比长的 dsRNA 要弱,其中的原因还不清楚。Elbashir 等^[11]合成了不同长度的、针对荧光素酶 mRNA 的 dsRNA,在果蝇细胞裂解物中研究了能够降解荧光素酶 mRNA 所需 dsRNA 的最小长度,发现只有 dsRNA 长于 38 bp 时,才能抑制 mRNA 的翻译。为了研究 mRNA 是在核内还是在细胞质中被降解,Zeng 等^[16]在人体细胞中使用了逆转录病毒 Rev/RRE 系统,当不存在出核转运时发现核内的含有 RRE 的目标 mRNA 的水平不受 RNAi 的影响,相反,当出核转运受 Rev 蛋白的诱导而发生,细胞质中的目标 mRNA 被 RNAi 特异地、有效地降解。有趣的是,当目标 mRNA 正在进行出核转运时, RNAi 可以导致 mRNA 的水平下降约 2 倍。实验结果表明, RNAi 可以使细胞质中的和正在进行出核转运的目标 mRNA 降解,但是细胞质中的 mRNA 或 pre-mRNA 能够抵抗 RNAi 的作用。除了能够降解目标 mRNA 外, RNAi 还可通过其他机制影响基因表达,如在植物中, dsRNA 可引起同源基因的甲基化,抑制基因表达;最近的研究表明,在果蝇、线虫和真菌中, RNAi 可通过改变染色体的结构影响基因的表达^[6, 11]。

3 RNA 干扰载体及导入方法研究

近年来,科学家用各种方法,如向细胞内注射 dsRNA,

用阳离子脂质体将 dsRNA 导入细胞,用载体将反向重复 DNA 转导入细胞、使其转录出发夹结构的 dsRNA,以及使用改造过的 RNA 病毒等方法诱导产生 RNAi,目前已经在许多种细胞,包括哺乳动物胚胎细胞中成功地诱导出了 RNA 干扰,但是当把 RNAi 应用于哺乳动物体细胞时,还是遇到了很大的困难,主要的问题是:在哺乳动物体细胞中,当 dsRNA 长于 30 bp 时,能够诱导 I 型干扰素的产生,由于非特异性抑制的掩盖, RNA 干扰很难测出^[16]。

通过实验, Elbashir 等^[11]在体外用化学方法合成了带有 2~3 个核苷酸的 3' 突出端的 21 nt 的 siRNA,把它同含有报告基因荧光素酶的质粒共转染入线虫 HEK S2 细胞、哺乳动物细胞如 NIH/3T3(鼠纤维原细胞)、293 细胞(人胚肾细胞)、Hela S3 细胞,都观察到了明显的报告基因表达抑制。但此种方法产生的 RNAi 比较短暂且不能遗传,因为哺乳动物细胞中缺乏 RNAi 放大机制。Sui 等^[18]利用载体介导技术在哺乳动物细胞中获得了 RNAi,他们用 pmU6 质粒作模板,用 PCR 技术分离扩增了 U6 启动子,在此启动子的转录起始位点加上一个 *Apa I* 位点,然后将此启动子克隆到 Bluescript (BS)产生亲代质粒 BS/U6。为了获得 RNAi 质粒,要将一段反向重复序列连接到 BS/U6 的 *Apa I* 位点,此反向重复序列以 GG 开始并用 BLAST 分析以确保它与其他基因没有同源序列,连接包括两步,例如为了产生 BS/U6/gfp RNAi 质粒,先将与外源性 GFP (green fluorescent protein, 绿色荧光蛋白) 106~127 位核苷酸序列相同的 22 nt 长的寡脱氧核苷酸(oligo 1)连接到经 *Apa I*(产生平端切口)和 *Xho I* 消化过的 BS/U6 质粒上,然后将含有 6 nt 间隔区和 5 个 T 的寡脱氧核苷酸(oligo 2)连接到质粒的 *Xho I* 和 *EcoR I* 位点上,产生 BS/U6/gfp。针对内源性基因组 laminA/C, cdk-2(周期素依赖性激酶-2), dnmt-1(DNA 甲基转移酶-1)的 RNAi 质粒的构建原理同上。实验中使用的细胞是 Hela, U-20s 等,用磷酸钙转染法将重组 DNA 转染入以上细胞,在胞内 RNAPol III 的作用下,形成发夹 siRNA,因为 RNA pol III 能在 4~5 个 T 处停止转录,所以转录形成的发夹 siRNA 的 3' 突出端不超过 5 个 T(尽管与以前描述的 siRNA 末端最好为 2~3 nt 不同,但仍可有效抑制基因表达),转染 2~3 d 后,用免疫荧光显微镜及 Western 印迹法检测,发现 siRNA 能特异地、几乎完全地抑制内源基因的表达,对外源性的 GFP 的表达的抑制约 80%(因为转染入细胞的 CMV-GFP 质粒带有 CMV 强启动子,导致了 GFP 的高水平表达)。Lee 等^[19]用类似的方法有效地抑制了 HIV-1 rev 在 293/ECR 细胞中的表达。Yu 等^[20]也用此方法显著抑制了小鼠 P19 细胞神经分化过程中 β -tubulin 蛋白的表达。Miyagishi 等^[21]用 RNAPol III 和含有 U6 启动子的 pU6 载体,在 Hela S3/EBNA-1 细胞中表达出无发夹结构的 siRNA,也能有效抑制外源性 EGFP 和内源性的 β -catenin 蛋白的表达。Michael TM 等第 1 次在正常哺乳动物体细胞中诱导出了 RNA 干扰,他们将体外合成的 siRNA 用钙脂质体法转染人 T 细胞,可以特异地抑制 CD4 及 CD8 α 的表达达 80% 以上(待发表)。

最近的研究已在小鼠体内导入 siRNA 获得成功, Lewis 等^[22]用“高压输送”技术将 siRNA 导入了出生后的小鼠器官内,他们将含有 siRNA 编码序列的质粒和编码荧光素酶的质粒注射入小鼠尾静脉后,在肝、脾、肾、肺、睾丸观察到荧光素酶的表达被抑制达 90% 以上。McCaffrey 等^[23]研究发现丙型肝炎病毒基因与 siRNA 共同感染鼠肝脏后病毒基因表达被抑制达到 90% 左右,但这些导入方法似乎很难应用于人类,因此导入 siRNA 的方法可能是应用 RNAi 治疗人类疾病的主要障碍。

4 RNA 干扰应用及展望

RNAi 具有广泛的用途:①它是一种研究基因功能的新工具, RNAi 能在细胞中灭活特异的基因,产生类似基因“剔除”的效应,已被证明是功能基因组研究的有效工具,这一技术明显具有投入少、周期短、操作简单等优势,它的应用将使转基因动物的构建简便易行,为基因功能的研究开辟新途径。②RNAi 可用来研究细胞信号转导通路和细胞生长分化过程,更好的了解肿瘤的生物学特性, Clemens 等^[24]应用 RNAi 研究了果蝇细胞系中胰岛素的信号转导通路,他们把体外合成的约 700 nt 的 dsRNA 加入含有 S₂ 细胞的六孔板,加入含有 FBS 的 Schneider's 培养基,室温下孵育 30 min,使 dsRNA 进入细胞,抑制 DACK 基因的表达,证明 DACK 是 DSH3PX1 磷酸化的上游激酶,并证明 RNAi 技术比传统的转染实验简单、快速、重复性好。RNAi 还可用于发现新的药物靶位点,研究药物作用的生化特点^[25]。③用于基因治疗,由于 RNAi 可以特异性的抑制基因表达,所以可用于基因病、病毒感染、癌症的治疗。

RNAi 作为基因敲除的工具将获得广泛的应用,可以预见在不远的将来,新的 RNAi 载体与腺病毒、腺相关病毒等导入系统将联合应用于基因治疗,并发展为基因治疗领域的重要手段。

【参考文献】

[1] Aravin AA, Klenov MS, Vagin VV, *et al.* Role of double-stranded RNA in eukaryotic gene silencing [J]. *Mol Biol*, 2002, 36(2): 180-188.

[2] van der Krol AR, Mur LA, de Lange P, *et al.* Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: Promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect [J]. *Plant Mol Biol*, 1990, 14(4): 457-466.

[3] Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.

[4] Ratcliff FG, MacFarlane SA, Baulcombe DC. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between virus [J]. *Plant Cell*, 1999, 11(7): 1207-1216.

[5] Tuschl T. RNA Interference and Small Interfering RNAs [J]. *ChemBiochem*, 2001, 2(4): 239-245.

[6] Hannon GJ. RNA interference [J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 244-251.

[7] Kennerdell JR, Carthew RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway [J]. *Cell*, 1998, 95(7): 1017-1026.

[8] Tuschel T, Zamore PD, Lehmann R, *et al.* Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro* [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(24): 3191-3197.

[9] Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants [J]. *Science*, 1999, 286(5441): 950-952.

[10] Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, *et al.* Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi [J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1146-1150.

[11] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschel T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(2): 188-200.

[12] Phillip AS. RNA interference-2001 [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(5): 485-489.

[13] Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, *et al.* Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans* [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(20): 2654-2659.

[14] Knight SW, Bass BL. Role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 2001, 293(5538): 2269-2271.

[15] Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs [J]. *Cell*, 2001, 107(3): 297-307.

[16] Zeng Y, Cullen BR. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm [J]. *RNA*, 2002, 8(7): 855-860.

[17] Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(3): 1443-1448.

[18] Sui G, Soohoo C, Affar EB, *et al.* A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(8): 5515-5520.

[19] Lee NS, Dohjima T, Bauer G, *et al.* Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 *rev* transcripts human cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5): 500-505.

[20] Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(9): 6047-6052.

[21] Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5): 497-500.

[22] Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, *et al.* Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice [J]. *Nat Genet*, 2002, 32(1): 107-108.

[23] McCaffrey AP, Meusel L, Pham TT, *et al.* RNA interference in adult mice [J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 38-39.

[24] Clemens JC, Worby CA, Simonson-Leff N, *et al.* Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6499-6503.

[25] O'Neil NJ, Martin RL, Tomlinson ML, *et al.* RNA-mediated interference as a tool for identifying drug targets [J]. *Am J Pharmacogenomics*, 2001, 1(1): 45-53.

【收稿日期】 2002-10-21

【修回日期】 2002-12-15