

RNA 干扰在生物基因治疗中的应用及意义

肖 倩^{1,2}, 孙晓宁^{2*}

(1. 南华大学, 湖南 衡阳 421001; 2. 海南省人民医院消化内科)

摘 要: RNA 干扰(RNAi)是指一种分子生物学上由双链 RNA 诱导的基因沉默现象,其机制是通过阻碍特定基因的翻译或转录来抑制基因表达。RNAi 以其高特异性、高效性等显著优势将成为研究基因功能的全新手段,在生物医学领域有着广阔的应用前景。本文拟就 RNAi 作用机制,及其在功能基因组学、基因治疗(如肿瘤、病毒、自身免疫性疾病等)领域的研究现状简要作一综述。

关键词: RNA 干扰; 基因沉默; 功能基因组学; 基因治疗

中图分类号:R394 **文献标识码:**B

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)现象是指双链 RNA(double strands RNA, dsRNA)与细胞内的同源序列 mRNA 相结合并使其降解的现象,从而特异抑制相应基因表达的调控系统,是生物进化过程中发展起来的自我保护机制。RNAi 现象广泛存在于各种生物中,如果蝇、水稻、小鼠及人类等,属于 RNA 水平上调节基因表达的方式,对生物的生长发育起着非常重要的作用。自发现以来, RNAi 的研究取得了巨大的进展,被广泛用于探索基因表达调控、基因治疗及药物开发等领域。

1 RNAi 的发现

RNA 干扰现象最早应追溯到 1990 年矮牵牛花颜色基因的共抑制现象。1995 年,Guo 等^[1]用反义 RNA 技术阻断线虫 par-1 基因的表达时,发现正义 RNA 具有与反义 RNA 同样可以抑制该基因表达的作用。这一现象直到 1998 年才有了新的解释,Fire 等^[2]推断之前提到的 ssRNA(single strand RNA, 单链 RNA)导致 par-1 基因沉默是因为制备单链时混有微量的 dsRNA 所致,发现这种抑制现象在原核生物中具有可遗传性,将这种现象命名为 RNA 干扰(RNA interference),简称 RNAi。2001 年 Elbashir 等^[3]率先在哺乳动物细胞中观测到了 RNAi 现象,从而开启了 RNAi 技术在哺乳动物细胞中应用研究

的闸门。2002 年研究发现 RNAi 能在哺乳动物细胞内高效沉默目标基因的表达后, RNAi 技术开始应用在生命科学的各个领域。目前,实验中常用的 RNAi 手段主要包括直接转染小或短干扰 RNA(small/short interfering RNA, siRNA)以及转染携带小或短发卡 RNA(small/short hairpin RNA, shRNA)的质粒。

2 RNAi 的作用机制

RNAi 的作用机制目前还不十分清楚。目前初步阐明 RNAi 发生的机制大致可分成 3 个阶段:(1)启动阶段:外源性基因如病毒基因、人工转入基因等随机整合到宿主细胞组内并进行转录,产生的 dsRNA 被一双链 RNA 酶 III 型(Dicer 酶)剪切成 21 ~ 23nt 的小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)。另外, siRNA 的 5'端磷酸化, 3'端为羟基末端且有两个不配对核苷酸,此结构形式可能是 siRNA 进入 RNA 干扰的通行证^[4-5]。(2)效应阶段: siRNA 与细胞内的特异蛋白结合形成 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),但激活 RISC 得需要一个 ATP 依赖的 siRNA 解双链的过程^[5]。之后正义链 RNA 被置换出来,而反义链 RNA 仍结合在复合物上,从而形成具有生物活性的复合物。具有活性的 RISC 作用于与其上的单链 siRNA 序列互补的 mRNA,由核酸内切酶在距离 siRNA 3'端 12 个碱基的位置将 mRNA 剪切成 21 ~ 23 nt 的片段,从而特异性地抑制了靶基因的表达^[6]。(3)级联放大阶段: RISC 与靶 mRNA 结合后以 siRNA 反义链为引物,以靶 mRNA 为模板,在

收稿日期:2014-10-24;修回日期:2014-12-10

基金项目:海南省重点科技项目资助(ZDXM20100042)。

* 通讯作者, E-mail: xnsun-0108@163.com.

RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)作用下,将单链 mRNA 转变为双链。后者再由 Dicer 酶切割产生新的大量 siRNA,使得 RNAi 的作用进一步放大,最终把靶 mRNA 完全降解,从而显著增强了对相关基因表达的抑制作用^[6-8]。

3 RNAi 的应用及意义

3.1 RNAi 与功能基因组学

人类已经进入后基因组时代,基因组学的重心已由结构基因组学转向功能基因组学, RNAi 技术以其高度特异性、高效、操作简单及周期短等特点,也就义不容辞的成为研究基因功能的强大工具。将功能未知的基因的编码区(外显子)或启动子区,以反向重复的方式由同一启动子控制表达。这样在转基因个体内转录出的 RNA 形成 dsRNA 产生 RNA 干涉,使得目的基因沉默,从而进一步研究目的基因的功能^[9],使目的基因按照人们的意图去表达。所以, RNAi 能够在后基因组时代里发挥其不一般的作用。

3.2 RNAi 在基因治疗中的应用

RNAi 作用的这种高度特异性有可能特异地抑制致病的突变等位基因,且又不影响正常的等位基因^[9],所以 RNAi 在治疗疾病方面较传统治疗方法更有效而副作用更小。

3.2.1 RNAi 与肿瘤 肿瘤是由多个基因相互作用的基因网络调控异常的结果,如果只针对单个突变基因进行的肿瘤基因治疗,效果并不理想。而 RNAi 可以利用同一基因家族的多个基因具有一段同源性很高的保守序列这一特性设计,针对这一序列的 dsRNA 分子只需导入一种 dsRNA 就可以使多个基因同时沉默多种癌基因可以作为靶点设计相对应的 siRNA。目前 RNAi 对肿瘤进行基因治疗主要集中在与肿瘤发生和肿瘤转移相关基因(如癌基因、抑癌基因、肿瘤转移相关基因)以及与肿瘤耐药基因、细胞凋亡、信号传导、有丝分裂及肿瘤血管生长等一系列有关的基因方面。如 Zhang 等^[10]以人的肝细胞癌细胞系 SMMC7721 为模型检测到信号传导蛋白和转录激活物 5(signal transducer and activator of transcription 5, Stat5)(Stat5 在人的多种肿瘤中被发现高表达)在细胞系中高表达,发现用 RNAi 介导的 Stat5 基因沉默可以抑制肿瘤细胞生长,甚至诱导细

胞凋亡。Qiu 等^[11]利用慢病毒包装针对血管内皮生长因子(VEGFA)基因的 RNAi 载体,导入结直肠癌细胞后发现 VEGFA 表达被抑制后,结果有效的抑制了肿瘤细胞的生长、迁移及增殖。以上研究说明 RNAi 的发现为肿瘤的基因治疗带来了希望之光。

3.2.2 RNAi 与病毒 RNAi 是机体的一种由小分子 RNA 介导的序列特异性免疫保护性机制。RNAi 能够通过直接靶向病毒的 mRNA 从而导致病毒主要蛋白的降解^[12-13]。RNAi 技术已经广泛应用于病毒基因的转录后调节并且已经成功抑制了多种病毒的复制。RNAi 治疗最关键的一点是寻找合适的靶点。到目前为止,几乎所有的人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)编码和调控基因已经被用作抗 HIV RNAi 治疗的靶点并在体外实验中得以验证。其中效果比较好的有 tat、rev 基因等^[14]。来自宿主的 RNAi 靶点,目前已经通过实验证明有效的包括 NF- κ B、CD4、趋化因子受体 CCR5 和 CXCR4 等,抑制这些分子的表达可以有效的抑制病毒复制和病毒感染过程^[15-16]。此外,在体内外的研究均证实了 RNAi 在抗乙型肝炎病毒^[17-18](hepatitis B virus, HBV)、抗(hepatitis E virus, HEV)^[19]等病毒感染中的作用。RNAi 已成为抗病毒感染治疗的有力工具。

3.2.3 RNAi 与自身免疫性疾病 RNAi 亦被用于自身免疫性疾病的研究。导致类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)关节退化的机制之一是滑膜细胞异常抗凋亡的存在,产生高水平的促炎细胞因子和金属蛋白酶。诱导细胞凋亡的是一种常见的死亡受体,其中大部分属于肿瘤坏死因子(TNF)的家庭。用抗 TNF- α 的单克隆抗体治疗可显著减少软骨和骨侵蚀^[20]。用 siRNA 技术沉默疾病相关基因的表达对 RA 的治疗也具广泛的应用前景。如运用 siRNA 沉默树突细胞中的 CD40、CD80、和 CD86 可抑制胶原诱导的关节炎的发生。慢病毒载体介导的 TNF 超家族成员 B 细胞激活因子的基因沉默,可抑制 Th17 细胞的增殖以改善小鼠中自身免疫性关节炎的病情^[21]。Crispin 等^[22]用 siRNA 技术处理系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)的 T 细胞,结果显示白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)的分泌水平得以恢复。而 IL-2 的减少是 SLE 最主要的免疫病理学表现。RNAi 为各种自身免疫病的治疗提供重要的理论和实验依据,并发挥着重要作用。

3.2.4 RNAi 与神经系统疾病 阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是最常见的神经退行性疾病。对 AD 进行的 RNA 干扰的研究也最为深入。AD 主要表现为脑组织淀粉性斑块和神经元纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)^[23]。淀粉样斑块由淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 水解过程产生的 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, A β) 错误折叠组成。RNAi 技术被用来减少体内的 A β 肽, 其原理是作用于 APP 水解蛋白水解过程所需的酶 (如 BACE1) 的表达或者直接作用于 APP 的表达^[24-25]。在不同情况下, A β 肽水平的明显减少与改善神经病理学和记忆相关的表型有关。AD 另外一个病理学特点是 NFTs, 它是由高度磷酸化的 Tau 组成^[26], Tau 是 AD 的另一个治疗靶点^[27]。Tau 似乎对于哺乳动物的功能来说并不是必不可少的, 而且会引起一系列的神经退化性疾病^[28]。虽然没有在 AD 模型的小鼠上直接以 Tau 的表达为目标研究, 但有研究在转基因的 AD 小鼠模型上通过沉默细胞周期素依赖性激酶 5 (cyclin-dependent kinase 5, CDK5) (CDK5 是 Tau 高磷酸化所需要的酶) 来阻碍 NFTs 的产生^[29]。所以这项研究证实了 CDK5 也间接的证实了把 Tau 作为 RNAi 治疗 AD 的靶点的可行性。

4 结 语

RNAi 现象一经发现就成为科学研究的一大热点, 且在生物医学方面的研究成果斐然, 但仍有一系列问题亟待解决。如 RNAi 的具体作用机制、病毒的逃逸、如何把理论上可行的治疗模型用于人体以及评价其作用效果等。相信随着 RNAi 的深入研究, RNAi 有望在将来成为一种高度特异的以核苷酸为基础的基因治疗技术, 不仅只应用在肿瘤、抗病毒等治疗中, 甚至在功能性疾病的治疗中发挥巨大作用。

参考文献:

- [1] Guo S, Kempthues KJ. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed [J]. *Cell*, 1995, (4): 611-620.
- [2] Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391 (6690): 806-811.
- [3] Elaashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, et al. Functional

anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate [J]. *EMBO J*, 2001, 20(23): 6877-6888.

- [4] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs [J]. *Cell*, 2009, 136 (4): 642-655.
- [5] 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.
- [6] Manjunath N, Dykxhoorn DM. Advances in synthetic siRNA delivery [J]. *Discov Med*, 2010, 9(48): 418-430.
- [7] Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code [J]. *Nature*, 2009, 457 (7228): 396-404.
- [8] Merritt WM, Bar-Eli M, Sood AK. The dicey role of Dicer implications for RNAi therapy [J]. *Cancer Res*, 2010, 70 (7): 2571-2574.
- [9] 曾雪爱, 洪炎国, 黄俊山. RNA 干扰技术在生物医学领域中的应用 [J]. *生物医学工程与临床*, 2011, 15(2): 189-192.
- [10] Zhang L, Zhao Z, Feng Z, et al. RNA interference-mediated silencing of Stat5 induces apoptosis and growth suppression of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Neoplasia*, 2012, 59(3): 302-309.
- [11] Qiu JF, Zhang ZQ, Yong W, et al. Lentivirus-mediated RNAi knockdown of VEGFA in RKO colorectal cancer cells decreases tumor formation and growth in vitro and in vivo [J]. *Clin Exp Pathol*, 2012, 5(4): 290-298.
- [12] Shabalina SA, Koonin EV. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference [J]. *Trends Ecol Evol*, 2008, 23(10): 578-587.
- [13] Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system [J]. *Science*, 2002, 296(5571): 1263-1265.
- [14] Tsygankov AY. Current developments in anti-HIV/AIDS gene therapy [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10 (2): 137-149.
- [15] Singh SK, Gaur RK. Progress towards therapeutic application of RNA interference for HIV infection [J]. *Bio-Drugs*, 2009, 23(5): 269-276.
- [16] Chan JK, Greene WC. Dynamic roles for NF- κ B in HTLV-I and HIV-1 retroviral pathogenesis [J]. *Immunol Rev*, 2012, 246(1): 286-310.
- [17] Keiy Y, Cheng G, Mahato RI. RNAi for treating hepatitis B viral infection [J]. *Pharm Res*, 2008, 25 (1): 72-86.
- [18] 孔令波, 佟立新, 王锡育. RNA 干扰技术在抗乙型肝炎病毒感染应用中的研究进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17 (13): 1324-1328.

(上接第 97 页)

- [19] 马天武, 井中荣, 黄芬. RNA 干扰抗戊型肝炎病毒感染的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29 (6):625-627.
- [20] Shi Q, Zhang XL, Dai KR, et al. siRNA therapy for cancer and non-lethal diseases such as arthritis and osteoporosis[J]. Expert Opin Biol Ther, 2011, 11(1):5-16.
- [21] Zheng X, Suzuki M, Ichim TE, et al. Treatment of autoimmune arthritis using RNA interference-modulated dendritic cells[J]. J Immunol, 2010, 184(11):6457-6464.
- [22] Crispin JC, Apostolidis SA, Finnell MI, et al. Induction of PP2A B β , a regulator of IL-2 deprivation-induced T-cell apoptosis deficient in systemic lupus erythematosus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(30):12443-12448.
- [23] Bertram L, Lill CM, Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease; back to the future[J]. Neuron, 2010, 68(2):270-281.
- [24] Singer O, Marr RA, Rockenstein E, et al. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. [J]. Nat Neurosci, 2005, 8(10), 1343-1349.
- [25] Rodriguez-Lebron E, Gouvion CM, Moore SA, et al. Allele-specific RNAi mitigates phenotypic progression in a transgenic model of Alzheimer's disease. [J]. Mol Ther, 2009, 17(9), 1563-1573.
- [26] LaFerla, FM, Oddo S. Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction[J]. Trends Mol Med, 2005, 11(4), 170-176.
- [27] Piedrahita D, Hernandez I, Lopez-Tobon A, et al. Silencing of CDK5 reduces neurofibrillary tangles in transgenic Alzheimer's mice [J]. J Neurosci, 2010, 30(42), 13966-13976.
- [28] Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. [J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(10), 783-793.
- [29] Boudreau RL, Rodriguez-lebron E, Davidson BL. RNAi medicine for the brain: progresses and challenges [J]. Hum Mol Genet, 2011, 20(R1):21-27.

(此文编辑:朱雯霞)