

## RNA 干涉及其在寄生虫学研究中的应用

杨明夏 朱昌亮

中图分类号: R38

文献标识码: A

RNA 干涉(RNA interference, RNAi)是一种内源性或外源双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)所引起的细胞内有效的、序列特异性的基因关闭或基因缄默(gene-silencing)现象<sup>[1]</sup>。它发生在基因转录后即 mRNA 水平上对基因的调控,所以又被称为转录后基因缄默(post-transcription gene silencing, PTGS)<sup>[1-4]</sup>。RNAi 已先后在真菌、牵牛花、线虫、果蝇、斑马鱼和小鼠等种类被实验证实。推测 RNAi 引起的基因关闭可能广泛存在于各种生命中,是生物在进化过程中形成的一种重要的自身防御功能。自从 RNAi 在哺乳动物细胞中被发现后,由于在基因功能研究、基因治疗等方面的潜在作用,受到了广泛的重视。

在寄生虫学领域内,最近有学者将 RNAi 技术运用于阻止蚊媒传病的研究<sup>[5,6]</sup>,抑制疟原虫生长的研究<sup>[7,8]</sup>,以及锥虫基因功能的研究<sup>[9,10]</sup>。

本文简要回顾 RNAi 发现背景,对其研究进展和在寄生虫学领域的初步应用作一扼要综述。

### 1 RNAi 的发现背景

RNAi 是在研究反义 RNA 的基因阻断作用时发现的。1995 年,Guo 等用反义 RNA 技术关闭线虫(*Caenorhabditis elegans*) *pan-1* 基因表达,研究 *pan-1* 基因的失活与它的第 1 次卵裂不对称的关系时发现,作为正义(sense)的对照组也产生了与反义(antisense)组一样的结果:无效或减效的突变型。这和反义 RNA 技术的传统理解机制完全相违背<sup>[11]</sup>。1998 年,Fire 通过大量的实验,发现 Guo 等观察到的现象是由于体外制备的正义和反义 RNA 中混入了微量的双链 RNA,他们将体外转录的 RNA 电泳纯化出单链 RNA 和双链 RNA,再分别注入线虫体内,结果发现单链组只表现出微弱的基因抑制作用,而双链组却表现出高效特异的基因表达抑制作用。他们将这一现象称之为 RNA 干涉<sup>[1]</sup>。

早在 20 世纪 90 年代初,Napoli 等就观察到了这种现象。他们在研究牵牛花颜色变化时发现,通过人为增加过量的合成色素基因的拷贝数来增加花瓣紫色

着色的实验,并没有给他们带来满意的结果,相反,一些转基因花的颜色没有变得更深,反而变得部分白色甚至全白。这提示,转入的基因没有表达,甚至连本身的部分色素基因也受到了抑制,他们称之为共抑制(co-suppression)<sup>[2]</sup>。

在其它生物中,如真菌中的消除作用(quelling)<sup>[12]</sup>,植物中的基因缄默(gene-silencing),果蝇(*Drosophila*)<sup>[13,14]</sup>中双链 RNA 所引起的基因抑制或关闭的现象,以及在脊椎动物斑马鱼(zebrafish)<sup>[15]</sup>中表现出 RNAi 的现象,提示似乎都存在一个同样的分子作用基础。

真正引起大家重视的是在小鼠早期胚胎细胞中也观察到了 RNAi 现象<sup>[16]</sup>。2001 年,科学家成功地运用 RNAi 技术实现了在小鼠早期胚胎细胞内使特异性基因表达缄默。细胞内注入的长 dsRNA 可能与病毒侵入相似,诱导了广泛的干涉反应,导致广泛的基因翻译减少甚至细胞死亡。用小片段的 21~23 bp 的 RNA (small interfering RNA) 在细胞内同样实现了特异性基因缄默<sup>[16,17]</sup>。

### 2 RNAi 研究进展

2.1 RNAi 可能的作用机制 在 RNAi 的研究中,学者们发现外源 dsRNA 进入细胞后,引起 mRNA 的特异性降解,引发了 PTGS。RNA 诱导产生了一种缄默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),为一种糖蛋白,具有核酸外切酶的活性。RNAi 可能的作用机制概述如下<sup>[18-23]</sup>。

2.1.1 外源双链 RNA 通过人为或病毒感染的方法进入细胞内,相关蛋白如 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)结合到双链 RNA 上,在如螺旋酶(helicase)<sup>[20]</sup>等的协同下小片段双链 RNA 被大量复制,在 RISC、Dicer 酶等相关酶的作用下被降解成 21~25 nt 的小片段双链 RNA。降解位点一般位于尿嘧啶碱基处。小片段 RNA 序列特异性的识别 mRNA,以一种类似正反馈的方式,在 RISC、Dicer 酶等具有外切酶活性酶的作用下,mRNA 被特异性地反复多次地切割,最终变成 21~25 nt 大小的 RNA 片段,从而蛋白质合成失去了所依赖的

作者单位:南京医科大学病原生物学系,南京 210029

mRNA 模板, 产生了 PTGS。

2.1.2 RNAi 是一种可传递和遗传的生物现象 在植物中, dsRNA 通过细胞液在细胞间相互传递 RNAi 作用。在蠕虫的小肠内注入 dsRNA, 能引起蠕虫各部分的 RNAi 效应, 且能下传一代至数代, 在第一代中比较稳定<sup>[21]</sup>。果蝇中, 若将 dsRNA 改造成发夹样结构的 RNA (hairpin-loop RNA) 进行 RNAi, 则能获得稳定的遗传<sup>[22]</sup>。将一段编码区反向插入热休克诱导的启动子 Hsp16-2 的下游, 将此载体转入其宿主菌中, 用热休克的方式筛选 (screen) 那些可诱导产生 RNAi 并可稳定遗传的菌落。这是 Tavernarakis 等建立的可以遗传的 RNAi 技术<sup>[23]</sup>。

2.2 用 RNAi 文库 (RNAi library) 研究基因表达 基因文库给基因研究带来很大的方便。通过建立一个 cDNA 文库, 可以从中克隆出感兴趣的全长基因, 进行下游的基因功能研究。Morris 等第一次建立了一种 RNAi 文库研究锥虫糖蛋白的基因表达。他们将基因组片段插入到载体 PZJM- $\beta$  构建一个滴度为  $10^5$  级的文库, 通过诱导锥虫表达 dsRNA, 来筛选那些刀豆抗凝素 A (con canvalin A, con A) 被减少结合的个体。因为这种植物凝集素 (lectin) 是结合表面糖蛋白 EP-procyclin 的, 他们设想, 如果 RNAi 真的使基因沉默, 从而影响 EP-procyclin 基因的表达或修饰, 那么细胞将失去对 con A 的亲合性, 从而从糖基化 EP-procyclins 表达细胞株中筛选出非糖基化的 GPEET-procyclins 表达细胞株。基因 procyclin 的表达和糖基化的关系是通过关闭其它糖基化通路上的基因表达来研究的, 通过观察亲代细胞在无糖培养基中相似基因 GPEET-procyclin 的表达上调加以证实。他们证实糖的水平 and procyclin 的表达调节是同步的<sup>[24]</sup>。

2.3 PTGS 抑制物的发现 学者们在研究 RNAi 的时候发现存在一些物质能抑制 PTGS。根据 Radhamani 等的研究, 一种钙调节相关蛋白 rgs-cam (calmodalin-related protein) 与辅助蛋白酶 Hc-pro (helper component-proteinase) 作为一种细胞抑制剂能抑制 PTGS。它能阻止小片段 mRNA 的聚集, 从而阻止对同源 RNA 的降解<sup>[25]</sup>。

在植物中 PTGS 是作为一种抵抗病毒入侵的手段, 病毒要想成功感染植物, 就必须能消除和抑制基因的沉默。Silhavy 等发现, 番茄丛矮病毒 (tombusvirus) 的 19 kDa 蛋白 (19 kDa protein, p19) 能阻止基因沉默信号的传递和扩散。离体研究表明, p19 蛋白能结合 PTGS 所产生的 21~25 nt 的 dsRNA 以及人工合成的 3' 额外带有 2 nt 末端的 dsRNA, 而它几乎不与单链 RNA (ssRNA)、长 dsRNA 及平端 21 nt dsRNA 相结

合。他们提出, p19 蛋白通过分离 PTGS 产生的 21~25 nt dsRNA 消除了特异性的 PTGS 有效复合物, 达到抑制基因沉默的目的<sup>[26]</sup>。

通过对 PTGS 的抑制物研究, 也许能增加 RNAi 的可操作性, 从而在基因功能的研究中发挥更大的作用。

2.4 RNAi 的导入方式 据报道, 外源双链 RNA 可以通过注射 (injection / microinjection)<sup>[27,28]</sup>、机体摄取 (ingestion)<sup>[29]</sup>、浸泡 (soaking)<sup>[30]</sup> 和构建病毒载体感染 (virus-infection)<sup>[6]</sup> 等方式。Kiehl 等用注射的方法将秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 肌肉和神经组织中高表达的未知功能 atx-2 基因和 fox-1 基因的双链 RNA 分别导入 L4 期幼虫体内触发产生 RNAi, 发现 atx-2 基因表达被干涉后, 幼虫的下一代胚胎发育受到抑制; 当 fox-1 基因表达受到干涉时, 成虫的产卵率明显下降<sup>[27]</sup>。Dzitoyeva 等将果蝇中枢神经系统和消化道表达的 lac Z 基因和 GM06434 基因的双链 RNA 注入成熟果蝇的腹腔, 发现果蝇的中枢神经系统中两者的内源性基因表达沉默<sup>[28]</sup>。提示, 用这种方法研究果蝇中枢神经系统基因功能更省时省力, 不需要去寻找典型的基因突变体。

传统认为喂食方法产生 RNAi 的效果没有直接注射的效果好, 但是, Kamath 等通过优化条件, 用能表达对应于特异基因的双链 RNA 的大肠杆菌喂食秀丽线虫, 发现其 RNAi 效果不比直接注射差<sup>[29]</sup>。

Maeda 等将标本浸泡在含有对应特异基因的双链 RNA 的液体中, 考察基因的表达情况, 作基因功能的分析。他们用一组序列明确的无冗余信息的 cDNA 序列标签进行系统的 RNAi 的分析, 处理了大约 2 500 个基因, 27% 出现可检测的表现型如不育、形态学异常等<sup>[30]</sup>。

将想要研究的基因的片段插入病毒载体内, 借助它的感染性和其反转录能力作双链 RNA 在机体内触发产生 RNAi。Adelman 等用此法抑制登革热病毒在蚊虫体内的繁殖<sup>[6]</sup>。

注射方法是比较常用的, 效果也比较好; 浸泡法和摄入法在机制上也许是类似的, 通过吞食作用进入消化道, 然后触发 RNAi 的作用; 构建载体法相对比较复杂, 但其效果比较确定。

### 3 RNAi 在寄生虫学中的应用

目前已有 RNAi 应用于蚊虫、恶性疟原虫和锥虫的报道。

3.1 RNAi 在媒介蚊虫研究中的应用 虫媒性疾病因其传播性和流行性依然是学者研究的热点, 运用生

物手段预防蚊媒病是学者们努力的重点。将 RNAi 运用到蚊媒研究中是一个新的尝试。

Adelman 等在一种叫双链亚基因组新德毕斯病毒 (double subgenomic Sindbis virus, dsSIN) 中插入源自 4 种血清型的登革热病毒 (dengue, DEN) 中的一种或几种基因组序列片段, 然后将重组后的病毒注入埃及伊蚊体内, 发现蚊虫产生了对相同血清型的登革热病毒很高的抗性, 而且, 这种抗性是不依赖于插入片段所转录出的效应 RNA 的方向。用重组的能表达 DEN-2 型膜前编码区序列的 dsSIN 转染 C6/36 细胞, 由于能阻止 DEN-2 RNA 的聚集, 使细胞产生对 DEN-2 病毒很高的抗性。即使在后来表达量降低的时候, 这种抗性依然存在。由于蚊虫体内和细胞内外源双链 RNA 的表达而使其产生了对相同血清型病毒的抗性, 这种抵御机制和报道过的植物和无脊椎动物中的 PTGS/RNAi 相类似<sup>[5]</sup>。Caplen 等证实在蚊虫 C6/36 细胞中 dsRNA 能介导序列特性的基因表达抑制。他们用 1 型登革热病毒 (DEN-1) 和 Semliki Forest 病毒 (Semliki Forest virus, SFV) 做实验, 证明 dsRNA 能序列特异性的抑制导入细胞质粒的表达及 SFV 病毒复制子的复制, 能明显改变 DEN-1 RNA 和病毒复制子的生物动力学。这种作用比反义单链 RNA (antisense singlestranded RNA, ssRNA) 的抑制作用要强很多<sup>[6]</sup>。

作者认为, 运用 RNAi 抑制病原体在宿主昆虫体内复制以阻止蚊媒病的传播, 也许是可以实现的。

3.2 RNAi 在疟原虫研究中的应用 Malhotra 等的研究表明, 恶性疟原虫存在 RNAi 现象。他们在疟原虫体内用半胱氨酸蛋白酶基因 (cysteine protease gene) 的双链 RNA 去干预该基因的表达, 发现双链 RNA 被降解成 25 nt 大小的片段, 序列特异性地抑制了该基因的表达。这种双链 RNA 的引入, 使内源性的半胱氨酸蛋白酶的 mRNA 水平下降, 还出现了表型上的变化<sup>[7]</sup>。McRobert 等用编码二氢乳清酸脱氢酶 (dihydroorotate dehydrogenase, DHODH) 基因片段的双链 RNA 处理红内期疟原虫。二氢乳清酸脱氢酶在嘧啶的生物合成中起重要作用。在这种双链 RNA 的处理下, 疟原虫的生长受到抑制, DHODH 的 mRNA 表达水平下降。双链 RNA 表现出序列特异性的基因抑制<sup>[8]</sup>。

研究显示, RNAi 在疟原虫的防治研究方面似有其独特之处, 用它去开发预防和治疗疟疾的基因药物可能会有新的突破。

3.3 RNAi 在锥虫研究中的应用 Bastin 等构建了一种可诱导反向表达副鞭毛杆蛋白 (paraflagellar rod protein, PFRA) 的锥虫细胞系 snl-2。通过诱导, 细胞

表达 PFRA 基因的反向双链 RNA 表达后, PFRA 蛋白迅速消失, 从而这种副鞭毛杆的构造也受到了影响, 导致细胞不能运动<sup>[9]</sup>。Wang 等借助 RNAi 技术, 用布氏锥虫的拓扑异构酶 II 茎环结构 (stem-loop) 状双链 RNA 来研究拓扑异构酶 II 的功能。发现在表达了这种茎环结构的双链 RNA 后, 拓扑异构酶 II 蛋白表达消失。他们运用这种方法进而去研究了拓扑异构酶 II 和线粒体 DNA 的关系, 发现它在线粒体 DNA 的网络式调节中起重要作用<sup>[10]</sup>。

目前虽然 RNAi 的作用机制尚不十分明确, 但是它操作简便、效果确定。与反义 RNA 相比, RNAi 关闭基因的效果更强; 与基因敲除相比, RNAi 在操作、花费方面明显更具优越性, 对于一些敲除后能导致细胞死亡的重要功能基因的研究, RNAi 则可为一种有效的替代方法。而且, RNAi 的可遗传性对基因功能也许能提供更多的信息。对 RNAi 文库技术和 PTGS 抑制物的研究, 也能增加我们对 RNAi 机制的认识, 从而使 RNAi 在基因功能研究、基因治疗等方面发挥巨大作用。RNAi 显示的卓越性相信会给生命科学研究, 包括寄生虫学研究带来广阔的发展空间。

#### 参 考 文 献

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391: 806 - 811.
- [2] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans [J]. Plant Cell, 1990, 2: 279 - 289.
- [3] Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, et al. Flavonoid genes in *Petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression [J]. Plant Cell, 1990, 2: 291 - 299.
- [4] Smith CJ, Watson CF, Bird CR, et al. Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants [J]. Mol Gen Genet, 1990, 224: 477 - 481.
- [5] Adelman ZN, Blair CD, Carlson JO, et al. Sindbis virus-induced silencing of dengue viruses in mosquitoes [J]. Insect Mol Biol, 2001, 10: 265 - 273.
- [6] Caplen N, Zheng Z, Falgout B, et al. Inhibition of viral gene expression and replication in mosquito cells by dsRNA-triggered RNA interference [J]. Mol Ther, 2002, 6: 243 - 251.
- [7] Malhotra P, Dasaradhi PV, Kumar A, et al. Double-stranded RNA-mediated gene silencing of cysteine proteases (falcipain-1 and -2) of *Plasmodium falciparum* [J]. Mol Microbiol, 2002, 45: 1245 - 1254.
- [8] McRobert L, McConkey GA. RNA interference (RNAi) inhibits growth of *Plasmodium falciparum* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2002, 119: 273 - 278.
- [9] Bastin P, Ellis K, Kohl L, et al. Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system [J]. J Cell Sci, 2000, 113: 3321 - 3328.
- [10] Wang Z, Englund PT. RNA interference of a trypanosome topoisomerase II causes progressive loss of mitochondrial DNA [J]. EMBO J,

2001, 20: 4674 - 4683.

[11] Guo S, Kempthues KJ. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *Caenorhabditis elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed[J]. Cell, 1995, 81: 611 - 620.

[12] Cogoni C, Romano N, Macino G. Suppression of gene expression by homologous transgenes[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1994, 65: 205 - 209.

[13] 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: 1017 - 1026.

[14] Misquitta L, Paterson BM. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNAi): a role for *nautilus* in embryonic somatic muscle formation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 1451 - 1456.

[15] Wargelius A, Ellingsen S, Fjose A. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 263: 156 - 161.

[16] Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2: 70 - 75.

[17] John DR. Gene silencing: A faster way to shut down genes[J]. Science, 2001, 292: 1469 - 1471.

[18] Bass BL. Double-stranded RNA as a template for gene silencing [J]. Cell, 2000, 101: 235 - 238.

[19] Gura T. A silence that speaks volumes [J]. Nature, 2000, 404: 804 - 808.

[20] Ikegami M, Fraenkel-Conrat H. Characterization of the RNA-dependent RNA polymerase of tobacco leaves[J]. J Biol Chem, 1979, 254: 149 - 154.

[21] Jean M. Interfering with gene expression[J]. Science, 2000, 288:

1370 - 1372.

[22] Kennerdell JR, Carthew RW. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18: 896 - 898.

[23] Tavernarakis N, Wang SL, Dorovkov M, et al. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes [J]. Nat Genet, 2000, 24: 180 - 183.

[24] Morris JC, Wang Z, Drew ME, et al. Glycolysis modulates trypanosome glycoprotein expression as revealed by an RNAi library [J]. EMBO J, 2002, 21: 4429 - 4438.

[25] Radhamani A, Rajendra M, Xin G, et al. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants[J]. Science, 2000, 290: 142 - 144.

[26] Silhavy D, Molnar A, Lucioli A, et al. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25- nucleotide double-stranded RNAs[J]. EMBO J, 2002, 21: 3070 - 3080.

[27] Kiehl TR, Shibata H, Pulst SM. The ortholog of human ataxin-2 is essential for early embryonic patterning in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Mol Neurosci, 2000, 15: 231 - 241.

[28] Dzitoyeva S, Dimitrijevic N, Manev H. Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system[J]. Mol Psychiatry, 2001, 6: 665 - 670.

[29] Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, et al. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Genome Biol, 2001, 2: research 0002.

[30] Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, et al. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi [J]. Curr Biol, 2001, 11: 171.

(收稿日期: 2002-11-12 编辑: 庄兆农)

文章编号: 1000-7423(2002)-06-0367-01

## 【病例报告】

### 红斑狼疮性肾炎合并粪类圆线虫感染一例

盛颖萍 邓延俊

中图分类号: R383.1

文献标识码: D

患者男性, 33岁, 农民。1997年9月因四肢关节疼痛住院治疗, 诊断为“红斑狼疮性肾炎”。给予抗凝及抑制免疫等治疗, 症状缓解后出院。此后患者坚持口服“强的松”。2001年9月17日因暴晒后出现头晕, 伴轻度腹泻和持续性胀痛, 四肢乏力, 解暗红色血便而再次就诊。

查体: 贫血貌, 脐周轻压痛, 肠鸣音亢进。化验检查: 血红蛋白 67 g/L, RBC  $2.08 \times 10^{12}/L$ , 免疫学检查: IgG < 3.3, IgA 0.97 g/L, IgM < 0.08 g/L, C3 0.66 g/L, C4 0.23 g/L; 粪便涂片, 镜检见一虫体呈S形, 运动活泼, 长 0.25 mm, 头端钝圆, 尾部稍尖, 未见分叉, 口腔短浅, 食道前后膨大呈双球型, 长度约占虫体 1/3, 生殖原基大而显著, 位于虫体 1/2 稍后处, 经鉴

定为粪类圆线虫 (*Strongyloides stercoralis*) 杆状蚴。

讨论: 粪类圆线虫致病作用与人体机体免疫功能状态密切相关。当机体免疫功能正常时, 一般无临床症状和体征; 一旦机体营养、抵抗力低下或长期使用激素等抑制免疫制剂时, 寄生于肠道的粪类圆线虫可大量繁殖, 不但引起腹痛、腹泻、腹胀、血便等严重的消化道症状, 其幼虫还可进入脑、肝、肺、肾等脏器而危及生命。本例患者因患有红斑狼疮性肾炎而长期服用“强的松”, 机体免疫力降低, 导致粪类圆线虫在肠道引起病变。患者曾用肠虫清治疗 3 d, 大便恢复正常, 后又复发, 再用肠虫清治疗 1 wk, 但 7 d 后又复发。以后未再跟踪调查。

粪类圆线虫病主要分布在热带和亚热带地区, 我国在长江流域及其以南各省、市、自治区均有该病的报道。

作者单位: 广州军区第一五七中心医院检验科, 广州 510510

(收稿日期: 2002-03-06 编辑: 庄兆农)