

RNAi 研究进展

任玥欣, 宋于刚, 陈学清

任玥欣, 宋于刚, 陈学清, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军
消化疾病研究所 广东省广州市 510515
国家自然科学基金资助课题, No. 30300159
项目负责人: 任玥欣, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大
学南方医院全军消化疾病研究所. drrren@tom.com
电话: 020-61641544
收稿日期: 2003-08-26 接受日期: 2003-10-22

摘要

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)引发的转录后基因静默机制. RNAi是真核生物中普遍存在的抵抗病毒入侵、抑制转座子活动、调控基因表达的监控机制. 目前已成功用于基因功能和信号转导系统上下游分子相互关系的研究, 有可能为肿瘤基因治疗提供新策略.

任玥欣, 宋于刚, 陈学清. RNAi 研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(3):
748-750
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/748.asp>

0 引言

RNAi (RNA interference) 即 RNA 干扰, 是 1998 年由 Fire 首次发现并命名的转录后水平的基因静默, 是美国《Science》和《Nature》评出的 2002 年度最重要的科技成果之一, 正成为基因功能研究和基因治疗研究的热点. 1995 年, 康奈尔大学的 Guo 和 Kemphues et al^[1]利用反义 RNA(antisense RNA)技术特异性地阻断秀丽新小杆线虫(*C. elegans*)中的 par-1 基因的表达以期得到与对照组注射正义 RNA(sense RNA)相反的结果, 但最终的结果却令他们费解:二者同样阻断了 par-1 基因的表达途径. 直到 1998 年, Fire et al^[2]的研究证明, 在正义 RNA 也阻断了基因表达的试验中, 真正起作用的是双链 RNA. 这些双链 RNA 是体外转录正义 RNA 时生成的. 这种双链 RNA 对基因表达的阻断作用被称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi). 随后的研究发现, RNAi 现象在多种生物中存在, 如线虫, 果蝇, 斑马鱼, 真菌以及植物等. 生物体可利用 RNAi 来抵御病毒的感染, 阻断转座子的作用^[3].

到 1999 年 Tuschl et al^[4]报道在哺乳动物中也存在 RNAi, 只是导入的 RNA 是小干扰 RNA (siRNA); 2001 年 Berstein et al 提出: 只有 22 核苷酸(nt, nucleotide)才能特异性地阻断 dsRNA, 同时他们还发现了体内一个分解 dsRNA 为 siRNA 的叫 Dicer 的酶^[5]. 近几年来 RNAi 的研究取得了很大进展, 他被《Science》杂志评为 2001 年的十大科学成就之一. 2002 年 RNAi 的研究又有了新的

突破, 发现他在基因表达调控中发挥重要作用, 他也名列 2002 年《Science》杂志评的十大科学成就之首.

1 RNAi 的机制

RNAi 的机制可能是细胞内双链 RNA 在 Dicer 酶的作用下, 可形成 -22 bp 大小的小干扰 RNA (small interfering RNAs, siRNAs), siRNAs 可进一步掺入多部分核酸酶 (multicomponent nuclease, RISC) 并使其激活, 从而精确降解与 siRNAs 序列相同的 mRNA, 完全抑制了该基因在细胞内的翻译和表达.

RNA 酶 III 是一种能切割双链 RNA 的酶, 参与 RNAi 反应的 Dicer 酶是 RNA 酶 III 家族的一个成员. Dicer 酶广泛存在于蠕虫、真菌、物及哺乳动物体内. 他的结构中包括一个螺旋酶结构域, 两个 RNA 酶 III 结构域, 一个双链 RNA 结合位点. 在 Dicer 酶的作用下, 双链 RNA 被裂解成 21-23 个核苷酸的 siRNA, 他启动了细胞内的 RNAi 反应^[6]. 因少量双链 RNA 即能阻断基因表达, 且此效应可传至子代细胞, 研究者们推测细胞内存在 RNAi 效应的扩增系统. 研究者们发现, 在真核细胞中也存在能以 RNA 为模板指导 RNA 合成的聚合酶 (RNA-directed RNA polymerase, RdRP). 在 RdRP 的作用下, 进入细胞内的双链 RNA 通过类似于 PCR 的反应过程, 呈指数级的数量扩增. 双链 RNA 进入细胞后, 一方面在 Dicer 酶的作用下被裂解成小片段 siRNA, 另一方面在 RdRP 的作用下自身扩增后, 再被 Dicer 酶裂解成 siRNA. 小片段 siRNA 生成后与核酸酶形成复合物, 随后 mRNA 与小片段的正义链置换, 被 mRNA 替代. mRNA 的位置与最初正义链的位置相同, 从而被核酸酶在相同的位点降解. 更有意义的是 mRNA 的降解使核酸酶得以再生, 这样周而复始, mRNA 得以降解, 因此 RNAi 呈酶解动态^[6].

由于 mRNA 也以 21-23 nt 的特定间隔降解, 因此认为降解 dsRNA 与 mRNA 的核酸酶相同. 另一方面以 siRNA 作为引物, 以 mRNA 为模板, 在 RdRP 作用下合成出 mRNA 的互补链. 结果 mRNA 也变成了双链 RNA, 他在 Dicer 酶的作用下也被裂解成 siRNA. 这些新生成的 siRNA 也具有诱发 RNAi 的作用, 通过这个聚合酶链式反应, 细胞内的 siRNA 大大增加, 显著增加了对基因表达的抑制^[4-5]. RNAi 不同于其他基因阻断技术, 他是转录后水平的基因静默机制, 因此注射该基因的内含子或者启动子顺序的 dsRNA 都没有干涉效应. RNAi 具有较高的特异性, 能够非常特异地降解与之

序列相应的单个内源基因的 mRNA, 且抑制基因表达效率很高, 相对少量的 dsRNA 就可以使表型达到缺失突变体程度, 但 dsRNA 需要一个最小的长度才能产生有效的干扰效果. dsRNA 小片段如小于 21-23 nt (如 10-15 nt), 特异性将显著降低, 不能保证不与细胞内非靶向基因相互作用, 如远远大于 21-23 nt, 互补序列可能延伸, 超出抑制范围. RNAi 基因表达的效应可以突破细胞界限, 在不同细胞甚至生物体间长距离传递和维持, 并可传递给子一代^[6].

2 RNAi 在细胞中的研究和双链 RNA 的构建

2.1 Billy et al^[7]的研究表明: 在小鼠的胚胎细胞中也存在 RNAi. 将 727 个碱基对的双链 RNA 转入小鼠的畸胎瘤细胞, 诱发了细胞内的 RNAi 机制, 并抑制了报告基因的表达. 但大于 30 个核苷酸的双链 RNA 进入哺乳动物的成体细胞后, 会非特异的阻断基因的表达. 因为长的双链 RNA 进入哺乳动物成体细胞后, 细胞内的病毒防御机制被激活; 且 RNA 酶 L (RNase L) 被激活, 产生非特异的 mRNA 降解. 而未分化的胚胎细胞中, 上述防御病毒的机制存在缺陷, 因而双链 RNA 能特异的阻断基因的表达. 但 Tuschl et al^[8]人的研究克服了这一障碍, 他们发现, 21 个核苷酸的双链 RNA 能够诱发哺乳动物细胞内的 RNAi 机制, 同时不会激活细胞内的干扰素. 他们合成了以荧光素酶的 mRNA 为靶分子的 21 个核苷酸的双链 RNA, 将他和荧光素酶的表达质粒用脂质体共转染到 NIH3T3, COS-7, HeLa S3, 293 细胞中, 报告基因的表达被抑制了 90%. 由于报告基因得到的结果不能完全说明细胞内的情况, 他们又合成了细胞内源性基因 laminA/C 为靶目标的双链 RNA, 这个双链 RNA 也特异的抑制了 laminA/C 的表达, 抑制率达到 90% 以上.

2.2 双链 RNA 的构建 双链 RNA 可先在体外构建好, 用脂质体转染细胞. 但有些细胞脂质体转化效果差, 转化到细胞内的双链 RNA 半衰期短. 而先在体外构建能表达双链 RNA 的载体, 再将载体转到细胞内合成出双链 RNA, 不但能增加有效转染细胞的种类, 而且在长期稳定表达载体的细胞株中, 双链 RNA 能够长期发挥阻断基因的作用. 构建双链 RNA 表达载体, 使用 RNA 多聚酶 III 指导 RNA 的合成. 因为 RNA 多聚酶 III 有明确的起始和终止序列, 当 RNA 多聚酶 III 遇到连续 5 个胸腺嘧啶时, 他指导的转录就会终止, 且转录产物在第二个尿嘧啶处被切下来, 因此合成的 RNA 无 polyA 尾. U6 启动子能被 RNA 多聚酶 III 识别, 合成出 RNA. Sui et al^[9]用 Bluescript 作为载体, RNA 多聚酶 III 可识别的 U6 作为启动子, 从绿色荧光蛋白 (GFP) 的基因上选择了一个 21 个核苷酸的片段 (片段 1), 将其插入到 Bluescript 载体中. 然后合成出片段 1 的反向重复序列, 并在其后加了 5 个胸腺嘧啶, 称为片段 2. 他们将片段 2 接到 Bluescript 载体中片段 1 的后面, 将载体转移到细胞中后, 转录

出的 RNA 由于具有回文序列, 会形成一个发卡样结构, 从而得到了双链 RNA. 片段后面加了 5 个胸腺嘧啶, RNA 转录到这个位置时就会终止. 而且转录出的 RNA 形成发卡样结构后, 会在 3' 端形成 2 个突出的尿嘧啶, 这类似于天然的 siRNA, 因而有利于双链 RNA 诱发 RNAi. RNA 多聚酶 III 亦识别 H1-RNA 启动子. 在 H1-RNA 启动子后面接上能形成发卡样结构的反向互补序列, 将此载体转入细胞后也能在细胞内合成 dsRNA^[10]. T7 也可作为启动子合成 dsRNA. 将 PCR 产物用 NotI 酶切后自身连结, 回收正向片段和反向片段连结形成的具有反转重复序列的片段, 接到 pGEMTeasy 载体上, 就构建成了可以表达 dsRNA 的载体. 用此载体可先在体外合成 dsRNA, 或将其转入到细胞内合成 dsRNA. 在后一种情况下, 还须将能表达 T7RNA 多聚酶的载体也一起转入到细胞中, 以提供能识别 T7 启动子的 RNA 多聚酶^[11]. 腺病毒是体内转基因的常用载体. Xia et al^[12]用腺病毒做载体, 在体内和体外表达 dsRNA, 并成功的阻断了基因的表达.

3 RNAi 的应用

3.1 高通量研究基因功能 基因功能研究现在已经明确, 双链 RNAi 干扰 (RNAi) 技术不仅可抑制体外细胞中特定基因的表达, 而且也可抑制体内特定基因的表达. 在功能基因组研究中, 需要对特定基因进行功能丧失或降低突变, 以确定其功能. 21nt siRNA 的双链复合物在哺乳动物细胞中干扰成功为基因作用的研究提供了一种新的工具, 原来要花费 6mo-1 a 才能明确一个哺乳动物细胞基因如何关闭, 现在只需一个星期就能明确 10 个基因的关闭, 使工作进程大大加快. 可以预见, RNAi 作为一种快速静默基因的途径, 将会越来越多地用于哺乳动物基因研究. 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 可形成 dsRNA, 产生 RNA 干扰, 使目的基因静默, 从而进一步研究目的基因的功能. 根据所选用序列的不同, 可将其分为编码区 RNAi 和启动子区 RNAi^[13]. 线虫和果蝇的全部基因组序列已测试完毕, 发现大量未知功能的新基因, RNAi 将大大促进对这些新基因功能的研究^[14].

3.2 研究信号转导通路的新工具 由于 RNAi 能高效特异的阻断基因的表达, 他成为研究信号传导通路的良好工具. 在线虫体内, 胰岛素和受体结合后可以活化 Dsor1, 他是 Mek 的类似物, Dsor1 活化后可以激活 EekA, 他是 ERK 的类似物. 用以 Dsor1 为靶目标的 dsRNA 可以阻断 Dsor1 的表达, 虽然总的 ErkA 的表达不受影响, 但由于 Dsor1 的表达被抑制, 因而胰岛素刺激后 ErkA 不能活化^[15].

3.3 基因治疗的新方法 用 RNAi 特异性地抑制如艾滋病病毒基因、肝炎病毒基因、癌基因、癌相关基因或突变基因的过度表达, 使这类基因保持在静默或休眠状态,

从而有望用这种新的手段治疗各种病毒性疾病和恶性肿瘤等疑难病症。而肿瘤是多基因、多因素疾病, 单个癌基因的抑制往往很难达到治疗效果。但 RNAi 技术能够同时抑制多个不同基因, 而且抑制效果互不干扰。此外, RNAi 识别可以精确到一个核苷酸, 对由野生型点突变形成的癌基因, 如 ras, p53 等, 能够产生准确有效的封闭效果, 野生型基因则不受影响。实验证明, bcl-2, CDK-2, PLK-1 和 p53 等肿瘤相关基因的 RNAi, 能够使人类宫颈癌细胞(HeLa)增生速度减慢, 恶性程度降低, 凋亡加快。肝癌(Hep3B)、非小细胞肺癌(H1299)、头颈部鳞状细胞癌(C33-A)、骨肉瘤(U-2OS)及前列腺癌(LNCaP)^[16]、白血病^[14]等细胞系中的实验也发现类似效应。此外, 将 RNAi 应用于 Wilson 病等先天遗传性疾病的体外实验也获得令人满意的结果^[17-25]。2002-09, 科学家采用这项技术完全清除了生长在试管中的所有癌细胞, 而未伤及正常细胞。随着这一研究结果近日的公布, 另一个小组的研究人员正设计这一技术在世界上的第一次临床试验, 将在一组艾滋病患者中进行。由于双链 RNA 干涉, 通过使有害的基因“静默”而奏效, 因而科学家认为, 可用其来静默感染的病毒基因或已转为恶性的肿瘤细胞, 从而使他们变得无害。

总之, 科学家预言, 一旦 RNAi 技术能用于临床治疗艾滋病、肝炎和恶性肿瘤, 这将是病毒性、寄生虫病原性、突变基因和癌基因表达等所引起的疾病在基因治疗方面的一场新的革命。而基因的突变在胰腺癌的发病及发展中均占有重要地位, 通过改变癌基因的表达, 可以杀灭肿瘤或抑制肿瘤生长或增加癌细胞对化疗药物的敏感性, RNAi 将会是胰腺癌基因治疗的又一重要工具。

4 参考文献:

- Guo S, Kemphues KJ. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995;81:611-620
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000;101:25-33
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 1999;13:3191-3197
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363-366
- Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz RM. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 2000;127:4147-4156
- Billy E, Brondani V, Zhang HD, Muller U, Filipowicz W. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:14428-14433
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-498
- Sui GH, Soohoo C, Affarel B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5515-5520
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. System for stable expression of short interfering RNAs in Mammalian cells. *Science* 2002;296:550-553
- Yang SH, Tutton S, Pierce E, Yoon K. Specific Double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2001;21:7807-7816
- Xia HB, Mao QW, Paulson HL, Davidson BL. Si-RNA mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 2002;20:1006-1010
- Tavernarakis N, Wang SL, Dorovkov M, Ryazanov A, Driscoll M. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat Genet* 2000;24:180-183
- Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, Borkhardt A. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* 2002;21:5716-5724
- Morris JC, Wang Z, Drew ME, Englund PT. Glycolysis modulates trypanosome glycoprotein expression as revealed by an RNAi library. *EMBO J* 2002;21:4429-4438
- Lin SL, Chuong CM, Ying SY. A Novel mRNA-cDNA interference phenomenon for silencing bcl-2 expression in human LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:639-644
- Oh WJ, Kim EK, Ko JH, Yoo SH, Hahn SH, Yoo OJ. Nuclear proteins that bind to metal response element a (MREa) in the Wilson disease gene promoter are Ku autoantigens and the Ku-80 subunit is necessary for basal transcription of the WD gene. *Eur J Biochem* 2002;269:2151-2161
- Hannon GJ, Conklin DS. RNA interference by short hairpin RNAs expressed in vertebrate cells. *Methods Mol Biol* 2004;257:255-266
- Celotto AM, Graveley BR. RNA interference of mRNA processing factors in *Drosophila* S2 cells. *Methods Mol Biol* 2004;257:245-254
- Tang G, Zamore PD. Biochemical dissection of RNA silencing in plants. *Methods Mol Biol* 2004;257:223-244
- Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2004;32:936-948
- Hsieh AC, Bo R, Manola J, Vazquez F, Bare O, Khvorova A, Scaringe S, Sellers WR. A library of siRNA duplexes targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway: determinants of gene silencing for use in cell-based screens. *Nucleic Acids Res* 2004;32:893-901
- Caplen NJ, Mousset S. Short interfering RNA (siRNA)-mediated RNA interference (RNAi) in human cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1002:56-62
- Yoshinari K, Miyagishi M, Taira K. Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region. *Nucleic Acids Res* 2004;32:691-699
- Kwong SM, Skurray RA, Firth N. Staphylococcus aureus multiresistance plasmid pSK41: analysis of the replication region, initiator protein binding and antisense RNA regulation. *Mol Microbiol* 2004;51:497-509