

RNA 干扰机理与应用

遇玲, 李名扬*, 郭余龙* (西南大学园艺园林学院, 重庆 400716)

摘要 RNA 干扰(RNA Interference, RNAi) 是一种转录后水平的基因沉默(Post-transcriptional Gene Silencing, PTGS) 现象, 是通过体外人工合成的或体内的双链RNA(Double-stranded RNA, dsRNA) 在细胞内特异性的降解其同源 mRNA, 使相应的基因沉默, 达到阻止基因表达的目的。因其具有特异、高效、易于操作等优点, 为细胞内基因表达研究提供了新思路、新方法, 从而使其具有广阔的应用前景。就 RNAi 机制及其应用研究进行了综述。

关键词 RNAi; PTGS; 机制; 应用

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)07-02870-03

Mechanism and Application of RNA Interference

YU Ling et al (College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400716)

Abstract RNA interference (RNAi) is a kind of post-transcriptional gene silencing (PTGS) phenomenon. It degrades its homologous mRNA specifically in cell through extracellular synthetic or intracellular double-stranded RNA (dsRNA) to make the corresponding gene silencing and obtain the aim of stopping the gene expression. Because of its advantages such as being efficient, specific and simple and so on, RNAi provided new thoughts and methods for intracellular gene expression research. So RNAi will be used widely in the future. The mechanism and the application researches of RNAi were summarized.

Key words RNAi; PTGS; Mechanism; Application

RNA 干扰(RNA Interference, RNAi) 技术为科学家们在基因功能研究等领域开辟了新的道路。RNAi 存在于许多生物体内, 如线虫、果蝇、青蛙、老鼠和人等。在自然界中, RNAi 有很重要的生物学作用, 它既能保护基因对抗由转座子和重复序列引起的不稳定性, 也可以对抗病毒等外源性物质的侵入。RNAi 技术近年来得到了人们越来越多的关注。

1 RNAi 的发现

1990 年 Napoli 与同事将由强启动子控制的色素基因查尔酮合酶(Chalcone Synthase, CHS) 导入矮牵牛, 以加深花的紫色, 结果许多花瓣颜色并未加深, 反而呈杂色甚至白色。进一步的分析发现, chs 基因和矮牵牛自身与其同源的色素合成基因均没有表达。他们把这一现象称为共抑制(Cosuppression) 现象, 用以定义所转入外源基因和同源内源性基因的表达同时减弱的现象。1994 年, Cogori 等在把类胡萝卜素合成基因导入粗糙链孢霉菌后, 发现 30% 的转化体霉菌自身的基因失活, 他们将真菌上的这种现象称为压制作用(Quelling)^[1]。1995 年 Su Guo 等在利用反义 RNA 技术研究秀丽新小杆线虫(C. elegans) 的 part-1 基因功能时发现, 正义 RNA 和反义 RNA 都可以抑制基因的功能^[2]。这一现象直到 1998 年才被阐明, Andrew Fire 等研究证明, 在正义 RNA 阻断基因表达的试验中, 真正起作用的是双链 RNA, 而这些双链 RNA 是体外转录正义 RNA 时生成的, 并将这一现象称为 RNA 干扰^[3-4]。

RNA 干扰现象普遍存在于真核生物中, 其中, 在动物中叫做 RNA 干扰, 而在植物中称为转录后的基因沉默(Posttranscriptional Gene Silence, PTGS), 真菌中则称为压制, 另外, 还包括病毒诱导的基因沉默(Virus Induced Gene Silence, VIGS)。

2 RNAi 的作用机理

2.1 siRNA 引起的基因沉默

细胞内的 dsRNA(细胞内的

dsRNA 可以是来源于试验导入的、异常表达的转基因, RNA 病毒, 转座子或者短的内源发夹 RNA 分子^[5] 被 RNase 家族中双链特异的 Dicer 核糖核酸酶以 ATP 依赖的方式切割成小干扰 RNA (Small Interfering RNA, siRNA)^[6]。Dicer 酶含有一个解螺旋酶结构域、一个 PAZ 结构域、一个 dsRNA 结合结构域和 2 个 RNase III 结构域。其中, PAZ 结构域是 Argonaute 基因家族的保守结构域, 与 RNA 结合有关。解螺旋酶结构域可能催化 dsRNA 解螺旋, 有利于 Dicer 酶切割。被 Dicer 酶切割成的 siRNA 具有相似的结构特征: 长为 21~23 核苷酸(Nucleotide, nt) 的双链 RNA, 5 单磷酸和 3 羟基末端, 互补双链的 3 端均有 2~3 nt 的单链突出^[7]。siRNA 中的一条链与蛋白质复合物结合后形成 RNA 诱导沉默复合物(RNA Induced Silencing Complex, RISC), 同时解链, 正义链离开, 然后反义链在 ATP 的作用下, 通过碱基互补配对原则与同源的靶 mRNA 结合, 在核酸内切酶的作用下, 将靶 mRNA 切断, 从而阻断其翻译成蛋白质。RISC 是一种核酸和蛋白质的复合物(包括蛋白质和 siRNA), 已经在果蝇和人类细胞中得到纯化, 而且都含有 Argonaute 蛋白家族的成员^[8], 这种蛋白被认为是 RISC 复合物的核心成分。另一种情况是, 与 mRNA 结合后, 在依赖于 RNA 的聚合酶作用下以 mRNA 为模板, siRNA 为引物指导合成 dsRNA, 然后 Dicer 酶再切割, 导致 mRNA 的降解。

在植物中的转录后基因沉默、共抑制、病毒诱导的基因沉默, 在动物中的 RNA 干扰及真菌和藻类中的基因压制, 它们都具有相似的核心机制, 即 siRNAs 与靶序列的同源序列结合, 并使靶序列降解^[9]。

2.2 miRNA 诱导的基因沉默

microRNA(miRNA) 是一种广泛存在于真核生物中内源性的、高度保守的、非编码的小 RNA 分子, 前体具有类似发夹形的茎环结构, microRNA 产生于该茎环结构的双链区。miRNA 为单链 RNA, 长 20~23 核苷酸。研究表明 miRNA 主要是通过抑制翻译过程来实现基因的沉默。大多数 miRNA 与底物 mRNA 不完全配对结合, 成熟的双链 miRNA 会很快被整合到 miRNA 介导的沉默复合物(miRNA-induced Silencing Complexes, miRISC) 中。复合体中含

基金项目 国家自然科学基金“矮牵牛 AGL15 亚家族基因 PMADS9 的功能研究”(30671481)。

作者简介 遇玲(1983-), 女, 吉林白山人, 硕士, 从事细胞生物学方面的研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-12-11

有 Argonaute 蛋白(只有成熟的单链 miRNA 能保留在该复合体中)^[10-11]。Argonaute 蛋白是 miRISC 复合体中的关键蛋白,其中具有有助于 miRNA 结合的 PAZ 结构域和与复合体中 RNase 内切酶和剪切体功能行使有关的 PIWI 结构域^[12]。成熟 miRNA 结合到与其序列互补的 mRNA 位点,通过2种依赖于序列互补机制负性调控靶基因的表达。通过抑制翻译还是降解发挥作用是由 miRNA 和它的目的 mRNA 之间的错配程度决定的,匹配程度高的目的 mRNA 将被降解^[13]。由于 miRNA 可以对不完全互补的 mRNA 配对来抑制蛋白质的翻译过程,因而每个 miRNA 可以有多个靶基因,而几个 miRNA 可以调节同一个基因^[14]。最新的研究发现,miRNA 也有可能通过影响 mRNA 的稳定性而对基因进行表达调控。如果 miRNA 与靶位点序列完全互补(或者几乎完全互补),那么 miRNA 的结合往往引起靶 mRNA 的降解^[15]。

3 RNAi 的生物功能

3.1 RNAi 抑制转座子活性 2 方面的证据提示转座子活性的抑制与 siRNA 有关:发现蠕虫 *mut-7* 基因参与 RNAi 并且与转座子的转座抑制有关^[16];在果蝇中,参与 RNAi 的 RNA 解螺旋酶 Spindle-E 的突变将导致该基因引起的基因沉默的缺失,同时提高了反转录转座子活性^[17]。由此可见, RNAi 参与转座子转座的抑制。

3.2 RNAi 抵御病毒感染 RNAi 在生物体抵御外来病毒的入侵方面有着重要的作用,可能是其最原始的生物功能之一。在拟南芥中研究转基因引起基因沉默时发现, *sgs2/sde1* 基因突变的拟南芥对病毒的侵染表现出高度的敏感性^[18]。而且在被病毒感染的植物细胞中,病毒通过自身进化的基因阻碍 RNAi 的产生。Novina 等合成分别针对 HIV-1 细胞受体 CD4、病毒结构蛋白 Gag 基因的 siRNAs,发现 siRNAs 能够有效抑制 HIV-1 进入细胞、HIV-1 生活周期的整合前和整合后感染,证明 siRNAs 在治疗 HIV-1 和其他病毒感染上有相当的潜力^[19]。在果蝇细胞中, RNAi 可以抵御 FHV(Flock House Virus) 病毒的入侵^[20]。

3.3 RNAi 参与异染色质的形成与维持 Hall 等研究表明,着丝粒同源重复序列和 RNAi 组分一起正负调节着异染色质的形成并共同促使异染色质组装成核^[21]。

Vople 等在敲除裂殖酵母(*S. pombe*)的 RNAi 途径基因(如 Argonaute、Dicer、RDRP)时发现异染色质转录得到的 dsRNA 可以在 RNAi 途径的参与下,加工成 siRNA, siRNA 募集异染色质蛋白 1(HPI1),然后靶向性引起相应异染色质区域的转基因沉默^[22]。这些都提示 RNAi 与异染色质的形成与维持有关。

3.4 RNAi 参与机体的发育调控及生理代谢 因为 RNAi 只抑制转录后的基因,所以 RNAi 在生物体发育学研究中具有优势。许多在 RNAi 过程中起关键作用的基因在生物的发育过程中同样起着重要作用,它们的突变往往造成发育的变异。Chuang 等用 RNAi 技术进一步证实了 AG、CLV3、AP1、PAN 等已知功能基因在拟南芥花发育过程中的功能。在 RNAi 过程中形成的 RISC 复合物可根据不同情况分别利用 siRNA 或 stRNA 行使不同的功能,但最终均导致特定基因沉默。

4 RNAi 的应用

4.1 研究基因功能 针对某个已知的基因,设计可诱导其表达抑制的 siRNA,将其导入细胞或机体,使该基因的表达水平下降或完全抑制,从而研究基因功能。

RNAi 技术可以简单快速地抑制一个基因的表达,而且能够通过选择不同的作用位点分别或同时作用于同一基因家族的若干个成员,因此 RNAi 技术是研究基因家族功能的理想工具。

4.1.1 植物基因功能研究。目前根据拟南芥和水稻测序结果已经得到了大量的基因序列,研究者们也利用比较基因组学的方法对其中一些基因的功能进行了预测。利用植物中已知基因的保守序列,通过 PCR 扩增的方法也得到了大量可能具有同种功能的候选基因,这些候选基因的进一步鉴定也可以用 RNAi 技术来进行。

4.1.2 动物基因功能研究。科学家们在哺乳动物细胞中探索了 siRNA 在基因组水平上的筛选方法。他们建立了一个包含 8 000 多个基因的 siRNA 表达框文库阵列,通过它来高通量筛选 NF- κ B 信号途径中已知的 Unique 基因,为建立神经系统的功能缺失模型找到了一些有价值的表型标记;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^[23]。RNAi 为系统地抑制 RNA 分子合成蛋白提供了快速而相对简便的途径。通过在一段时间内对一个基因 RNA 信号的抑制,研究者可以深入研究基因功能,进而描绘支配从细胞形态到信号系统的遗传网络。

4.2 研究信号转导通路 由于 RNAi 能高效特异地阻断基因的表达,可使其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 (Mek 的类似物),活化的 Dsor1 可以激活 ErkA (ERK 的类似物)。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,胰岛素刺激后 ErkA 不能活化^[24]。联合利用传统的缺失突变技术和 RNAi 技术可以很容易地确定复杂的信号传导途径中不同基因的上下游关系, Genesys 等应用 RNAi 研究了果蝇细胞系中胰岛素信息传导途径,取得了与已知胰岛素信息传导通路完全一致的结果。RNAi 技术较传统的转染试验简单、快速、重复性好,克服了转染试验中重组蛋白特异性聚集和转染效率不高的缺点,因此认为 RNAi 技术将可能成为研究细胞信号传导通路的新途径。

4.3 植物品质改良 植物在人类生活当中扮演着十分重要的角色,人类的生活必需品都是直接或间接地来源于植物。随着生活水平的提高,人们对植物品质的要求也日益提高。Shirjiro Ogita 等利用 RNAi 的方法对可可碱合成酶进行抑制,使植株中的咖啡因含量比原来减少了 70%^[25]。相信随着生物发育与调控机理的深入研究, RNAi 技术在植物品质改良方面的应用将更加广泛。

4.4 基因治疗 利用 RNAi 技术可以特异抑制与疾病有关的内源或外源基因,而不会对个体的生长发育产生影响,这一特性为 RNAi 技术在基因治疗上的应用开创了广阔的前景。

4.4.1 RNAi 在病毒感染性疾病中的应用。HBV 是一个 3.2 kb 的 DNA 病毒,只在肝细胞内复制。每年全球急性或慢性 HBV 感染会引起 100 万人的死亡,是一个全球性的问题。2003 年 Hamasaki 等将 RNAi 应用于阻止 HBV 复制中,并取得了很好的结果^[26]。Konishi 等也利用针对 HBV 的 siRNA 抑制了 HBV 的复制^[27]。

4.4.2 RNAi 在抗 HIV 中的应用。运用 RNAi 进行抗 HIV 治疗,可以分别设计针对病毒基因和宿主受体的 siRNA。Novina 等针对 HIV Gag 基因设计并合成了 siRNA,经研究证实可以高效率地抑制基因的表达,进而抑制 HIV 病毒的复制和表达^[28]。CD4 是 HIV 病毒与之结合并进入宿主细胞体内的主要载体,Philip 等研究的针对宿主细胞受体 CD4 的 siRNA 可以有效地抑制 HIV 病毒感染能力,进而影响其复制水平。Jacque 等针对 HIV-1 基因组的 LTR(Long Terminal Repeat) 、vif 和 nef 设计了 siRNA,将 siRNA 转染入 HIV 后,这些基因的水平降低了 95%^[29]。

4.4.3 RNAi 在抗肿瘤治疗中的应用。Brummelkamp 等采用逆转录病毒载体 shRNA 系统在体外成功地抑制了引发胰腺癌的 ras 基因的表达^[30]。Wilda M 等用 siRNA 抑制白血病 BCR/ ABL 融合基因表达也取得了成功^[31]。

5 展望

自 1998 年 RNAi 发现以来,它已成为生命科学研究的一大热点,并且有着十分诱人的应用前景。它不仅能极大推进基因组功能的研究,还能利用设计的 RNAi 芯片,进行高通量筛选靶基因药物,而且在研究信号传导通路、基因治疗等方面开辟了新的途径。虽然有关 RNAi 的许多方面仍不被人们所知,但它作为一种新技术方法,在动植物研究领域已得到广泛应用,并且已经有了一定的研究成果,在后基因组研究时代将作为一种很好的研究手段,为动植物的研究开辟出更广阔的天地。

参考文献

- [1] COGON C, ROMANO N, MACINO G. Suppression of gene expression by homologous transgenes[J]. *Artorie Van Leeuwenhoek*, 1994, 65(3): 205-209.
- [2] HIRE A. RNA triggered gene silencing[J]. *Trends Genet*, 1999, 15(9): 358-363.
- [3] GUOS, KEMPHUES K J, PAR L. A gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos encodes a putative Ser/ Thr kinase that is asymmetrically distributed[J]. *Cell*, 1995, 81(4): 611-620.
- [4] HIRE A, XUS, MONTGOMERY MK, et al. Perturb and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [5] HANNON G J. RNA interference[J]. *Nature*, 2002, 418: 244-251.
- [6] BERNSTEINE, CAUDY A A, HAMMONDS M, et al. Role for a bicarbonate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. *Nature*, 2001, 409: 363-366.
- [7] SHARP P A. RNA interference[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(5): 485-490.
- [8] ZI BRITSEN D, CAO X F, JACOBSENS E. Argonaute4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation[J]. *Science*, 2003, 299: 716-719.
- [9] 宋雪梅, 燕飞, 杜立新. RNA 诱导沉默复合体中的生物大分子及其装配[J]. *遗传*, 2006, 28(6): 761-766.
- [10] YUS, PRITCHARD M, KREMER E, et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA[J]. *Science*, 1991, 252: 1179-1181.
- [11] JACOBS P A, BULLMAN H, MACPHERSON J, et al. Population studies of the fragile X: a molecular approach[J]. *J Med Genet*, 1993, 30: 454-459.
- [12] SNOW K, DOUDL K, HAGERMAN R, et al. Analysis of a CCG sequence at the FMR1 locus in fragile X families and in the general population[J]. *Am J Hum Genet*, 1993, 53: 1217-1228.
- [13] VALENCIA SANCHEZ MA, IUJ, HANNON G J, et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNA and siRNAs[J]. *Genes Dev*, 2006, 20: 515-524.
- [14] LIN H, GREGORY J H. miRNA: Small RNAs with a big role in gene regulation[J]. *Nature*, 2006, 5: 522-531.
- [15] AURORA E K, FRANK J S. OncomiR: miRNA with a role in cancer[J]. *Nature*, 2006, 6: 259-269.
- [16] KETTING R F, HSCHERS E, BERNSTEINE, 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: 2654-2659.
- [17] ARAVIN A A, NAUMOVA N M, TULINA V, et al. Double-stranded RNA mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline[J]. *Curr Biol*, 2001(11): 1017-1027.
- [18] MOURRAIN P, BECIN C, ELMAYAN T, et al. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for post-transcriptional gene silencing and natural virus resistance[J]. *Cell*, 2000, 101: 533-542.
- [19] NOVINA C D, MURRAY MF, DYKXHOORN D M, et al. siRNA directed inhibition of HIV infection[J]. *Nat Med*, 2002, 8(7): 681-686.
- [20] LI H W, LI W X, DINGS W. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus[J]. *Science*, 2002, 296: 1319-1321.
- [21] HALLI M, SHANKARANARAYANA G D, NOMA KI, et al. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain[J]. *Science*, 2002, 297(5590): 2232-2237.
- [22] VOLPE T A, KUDNER C, HALLI M, et al., Martienssen R A. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine 9 methylation by RNA. *Science*, 2002, 297(5588): 1833-1837.
- [23] BAULCOMBE D. RNA silencing[J]. *Current Biology*, 2002(12): 82-84.
- [24] SJEN PLASTERK R H. Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germline by natural RNA[J]. *Nature*, 2003, 426: 310-314.
- [25] OGITA S, HROJAKA U, MASAYUKI M, et al. Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant Molecular Biology*, 2004, 54: 931-941.
- [26] HAMASAKI K, NAKAO K, MAISUMOTO K D AT. Short interfering RNA directed inhibition of hepatitis B virus replication[J]. *FEBS Letters*, 2003, 543(1/3): 51-54.
- [27] KONISHI M, WUCH, WUC Y, et al. Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV producing cell line[J]. *Hepatology*, 2003, 38(4): 842-850.
- [28] NOVINA C D, MURRAY MF, DYKXHOORN D M, et al. siRNA directed inhibition of HIV infection[J]. *Nature Medicine*, 2002, 8(7): 681-686.
- [29] JACQUE J M, TRIQUES K, STEVENSON M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference[J]. *Nature*, 2002, 418(6896): 435-438.
- [30] BRUMMELKAMP T R, BERNARDS R, AGAMI R, et al. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference[J]. *Cancer Cell*, 2002, 2(3): 243-247.
- [31] WILDA M, FUCHS U, WOESSMANN W, et al. Killing of leukemic cells with a BCR/ ABL fusion gene by RNA interference (RNAi) [J]. *Oncogene*, 2002, 21(37): 5716-5724.