

综述

RNAi 在神经退行性疾病发病机制及防治研究中的应用

赵月莹, 程肖蕊, 周文霞*, 张永祥
(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术能特异性降解 mRNA, 沉默靶基因, 在转录后水平抑制基因的表达, 从而可用来进行基因功能的分析和药物靶标的研究。RNAi 技术日趋成熟, 已被广泛应用于生命科学的各个领域。在神经科学上, 尤其是在神经退行性疾病, 如阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、脊髓小脑性共济失调、肌萎缩性侧索硬化症、朊病毒病等的研究中取得了显著进展, RNAi 的应用为神经退行性疾病发病机制的揭示和治疗另辟了蹊径。

关键词: RNA 干扰; 神经退行性疾病; 基因功能

中图分类号: Q522, R741.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2007)02-0081-06

Applications of RNAi in study of the mechanism and therapy of neurodegenerative diseases

ZHAO Yue-ying, CHENG Xiao-rui, ZHOU Wen-xia, ZHANG Yong-xiang
(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: RNA interference(RNAi) technique can specifically degradate mRNA, silence the target gene and suppress the expression of gene at post-transcription level, so it can be used to analyze the gene function and study the drug target. RNAi technique has been extensively applied to various fields of life science due to its great promotion. RNAi has got much appealing advancement in neuroscience, especially in Alzheimer's disease(AD), Parkinson's disease(PD), Huntington's disease(HD), spinocerebellar ataxia(SCA), amyotrophic lateral sclerosis(ALS), and prion disease. A novel path for revealing the pathogenesis and therapy of neurodegenerative diseases was offered by the application of RNAi technique in neuroscience.

Key word: RNA interference; neurodegenerative disease; gene function

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)现象自1998年被 Fire 等^[1]首次报道后, 2001年, Elbashir 等^[2]应用 RNAi 技术又成功地在哺乳动物细胞产生了特异性的基因沉默, 从此, RNAi 作为一种崭新的

技术手段, 为人类正常生理和病理过程的研究展示了激动人心的前景。本文就 RNAi 的作用机制特点和在神经退行性疾病研究中的应用作一概述。

1 RNAi 的作用机制和特点

首先, dsRNA 介导的依赖 dsRNA 的特异性核酸内切酶(dsRNA-specific endonuclease, Dicer 酶)把 dsRNA 降解成 21~23 个核苷酸片段的短小 RNA 即 siRNA(small interference RNA), 其每一条链均有 2 个核苷酸的 3'端, 一个磷酸化的 5'端^[3]。其次, 在 ATP 参与下 siRNA 多组分核酶-RNA 诱导沉默复合物(RNA induced silencing complex, RISC)的解螺旋

收稿日期: 2006-11-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(2004CB518907)、国家自然科学基金资助项目(No 30200367; No 30600760)

作者简介: 赵月莹, 女, 主治医师, 在读硕士研究生, 研究方向: 分子药理学, Tel: 010-66931627; E-mail: zyydeb2001@vip.sina.com

* 通讯作者: 周文霞, 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 药理学, Tel: 010-66931625, E-mail: zhouwx@nic.bmi.ac.cn

酶结合并解开 siRNA 双链,使其正义链从 RISC 中解聚下来,反义链和复合物进行碱基配对从而定位到同源 mRNA 上,RISC 的核酸酶在 siRNA-mRNA 结合体 3'端大约 12 个碱基处切割 mRNA,使之丧失转录信息,达到特异性抑制目的基因表达的效果。这些小 dsRNA 序列作为向导序列,介导 RISC 与 siRNA 结合,引导 RISC 对靶 mRNA 酶解。siRNA 不仅能引导 RISC 切割同源单链 mRNA,而且可作为引物与靶 RNA 结合并在 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)作用下合成更多新的 dsRNA,新合成的 dsRNA 再由 Dicer 酶切割产生大量的次级 siRNA,从而使 RNAi 的作用进一步放大,最终将靶 mRNA 完全降解。基于 RNAi 的作用机制,该技术具有特异性强、高效、廉价、周期短、稳定性好、可传递性、时间可选性及 ATP 依赖性等特点。

2 RNAi 在神经退行性疾病中的应用

神经退行性疾病是指一类慢性、进行性神经系统退行性疾病。主要包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、亨廷顿病(Huntington's disease, HD)、脊髓小脑共济失调(spino cerebellar ataxia, SCA)、肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、朊病毒病(prion disease)等。大脑特定区域的迟发性神经细胞退行性病变、细胞丢失是它们的共同特征。这些疾病严重影响着人类的健康,对其发病机制和治疗方法的研究一直备受重视,但进展并不显著, RNAi 这一崭新技术的出现为该领域的研究带来了新的曙光。

2.1 RNAi 在阿尔茨海默病研究中的应用

AD 是最常见的隐匿性、渐进性的神经退行性疾病,其特征是渐进性的痴呆和认知功能障碍,主要病理变化有脑内神经元丢失、神经原纤维缠结(NFT)和淀粉样斑沉积(SP),其核心主要是 β -淀粉样肽(β -amyloid, $A\beta$)的沉积,此肽来源于淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)。tau 蛋白(τ 蛋白)与 NFT 发生相关,其异常磷酸化及糖基化最终导致 NFT 的形成。早老素(presenilin, PS)分为 PS1 和 PS2,与 AD 关系密切,PS 基因突变是遗传性家族型 AD 的主要病因,形成多蛋白复合物是其功能的关键,PS 参与 APP 酶切生成 $A\beta$ 的过程,突变的 PS 可导致 $A\beta$ -42 沉积增加。

2.1.1 APP 相关的 RNAi 研究

研究表明,早发型

AD(年龄小于 60 岁)与一些基因的突变密切相关,如 APP 突变体使 $A\beta$ 更易产出^[4],了解这些突变体在早发性 AD 中的病理角色,对 AD 的治疗大有帮助。Feng 等^[5]用中国仓鼠卵巢细胞(CHO cells)及 HeLa 细胞,利用 RNAi 选择性对 APP 瑞士突变体(APP_{sw})和伦敦突变体(APP_{lon})进行了有效的沉默。并且在 5'端多加一个 G 来增强 RNA 干涉效应,为进一步探讨突变体在 AD 中的作用机制开辟了一条可行的技术路线。

$A\beta$ 是由 I 型跨膜蛋白 APP 在外功能区由 β -分泌酶(β -secretase, BACE1)、跨膜区由 γ -分泌酶经连续切割产生的,APP 外功能区也可以由 α -分泌酶切割,但要早于 BACE1 途径。若 α -分泌酶能在中段切割 β -APP,则可以减少正常大脑 $A\beta$ 的形成,所以研究 α -分泌酶的作用机制对防治 AD 具有重要意义。Asai 等^[6]首次报道了内源性 α -分泌酶由 3 种 ADAM 酶(一种解离素和金属基质蛋白酶)组成,他们通过脂质体转染技术转染编码 ADAM 的 dsRNA 来干扰富含大量内源性 α -分泌酶的人类胶质母细胞瘤 A172 细胞中 ADAM 的表达,结果表明,ADAM9,ADAM10 和 ADAM17 可以催化 α -分泌酶的切割作用,并在 A172 细胞中行使 α -分泌酶的功能。随后更多的研究表明,ADAM9,ADAM10 和 ADAM17 是 α -分泌酶候选基因,它们同属于细胞表面锚定蛋白 ADAM 家族^[7]。

BACE1 和天冬氨酸蛋白酶(beta-位点的 APP 切割酶 1)是 I 型膜整合糖蛋白,它切割 APP 最先产生 C 端 99 或 89 个氨基酸膜连接片段,包括 $A\beta$ 的 N 端(BCTF)。BACE1 切割是 $A\beta$ 产生的一个关键步骤和治疗 AD 的重要靶点。Kao 等^[8]用 RNAi 在不同的细胞系中,如儿茶酚胺能细胞系(CAD cells)、人类胚胎肾细胞系(HEK293 cells)、鼠胚胎原代皮层神经元沉默 BACE1,抑制 BACE1 蛋白表达,结果表明,APP 的 BCTF($A\beta$ 的 N 端)的产出减少,来源于野生小鼠及包含瑞典 APP 突变的转基因小鼠原代培养的皮层神经元中的 $A\beta$ 产物均减少,说明 BACE1 的 siRNA 可特异地影响 APP 的 BACE1 酶切作用,提示应用 siRNA 可能成为一种潜在的 AD 治疗方法。

2.1.2 tau 相关 RNAi 研究 Miller 等^[9]用 tau 和 APP 作为靶基因,用 siRNA 锚定非常具有代表性的 tau 的突变体 V337M 和被广泛研究的 APP 突变体 APP_{sw} ,结果使这两种蛋白表达明显下调,提示

RNAi 技术可能为探讨 AD 的发病机制及改善 AD 的病理变化发挥积极的作用。

2.1.3 PS 相关的 RNAi 研究 PS 基因突变是多数家族性 AD (familial form of Alzheimer's disease, FAD) 的主要病因, PS 为 γ -分泌酶活性所必需, 参与膜内 Notch 和 β -APP 的切割, 突变则导致 A β -42 过度表达。 γ -分泌酶的活性依赖于结构稳定的高分子团块复合物的形成, 该复合物由内切蛋白水解形式的早老素片段、几种必需的辅助因子(如 Nicastrin, APH1 及 PEN2)组成, 但复合物内每个蛋白的功能及酶活性最终是如何形成的尚未阐明。Takasugi 等^[10]利用过表达技术和 RNAi 技术分别过度表达和抑制表达各种辅助因子, 在果蝇 S2 细胞系、哺乳动物神经元中证实了 PS 辅助因子在形成 γ -分泌酶复合体中的作用及机制。结果表明, APH-1 和 Nicastrin 共同作用能稳固 PS 全蛋白(holoprotein), 而 PEN-2 参与 γ -分泌酶复合体的成熟, 使其成为活性形式, 且能诱导 PS 的内切蛋白酶解; PS, Nicastrin, APH-1 和 PEN-2 形成了 γ -分泌酶复合体主要的框架。

APH-1 是多起源的膜蛋白, 它的功能是作为早老素- γ 分泌酶(presenilin- γ -secretase)复合体的辅助成分。人有 APH-1 的两个同源基因: APH-1a 和 APH-1b, 由于不同的剪切, 其 mRNA 可产生两种异构体 APH-1aS、APH-1aL。Shinya 等^[11]利用半定量 PCR 方法研究人的细胞系和组织中这 3 个 APH-1 异构体 mRNA 的表达, 发现 APH-1a 和 APH-1b 几乎在所有的组织中表达, 而且 APH-1aS 表达是 APH-1aL 的 1.5 ~ 3 倍。用 RNAi 分别沉默 APH-1a 和 APH-1b, 观察其在 APH-1 和 PS 复合体上的表达效应, 结果表明, 敲除 APH-1a (APH-1b 无此效应) 能够导致成熟的 Nicastrin 受损, 同时减弱 PS1, PS2 和 Pen-2 蛋白的表达。这些结果说明, APH-1a 在早老素- γ -分泌酶复合体形成中起着重要的作用。

Luo 等^[12]利用 PS1 中 3 个 RNAi 的位点和 1 个对照错配位点, 用能转录 siRNA 的双链 DNA 构建了 pSilencer 3.1-H1 质粒, 转入 PS1 和 APP 基因突变的 CHO/PS1/APP 细胞中, 研究 γ -分泌酶对 A β 产出过程的调控作用, 结果表明, PS1 被抑制, γ -分泌酶活性和 A β 42 产出降低, 证实了 PS 对于 γ -分泌酶的活性是至关重要的, 而且 PS1 mRNA 的一些位点可能是一些新药物的靶标。

PS 蛋白可被蛋白酶内切为两个主要片段, 即氨

基端片段(PS N-terminal fragment, NTF) 和羧基端片段(PS C-terminal fragment, CTF), 这两个片段被认为是组成 γ -分泌酶的催化中心, 所以调节 PS 片段对研究 γ -分泌酶显得尤为重要。研究表明, 泛素(ubiquitin)-1 这个蛋白质在体内外都和 PS 有交互作用, 并且过度表达泛素-1 或泛素-2 能导致 PS 全长蛋白沉积的增加。Massey 等^[13]用野生型 HEK293 细胞和 PS 诱导细胞, 过度表达泛素-1 或者泛素-2 蛋白, 都能使 PS 的 NTF 和 CTF 表达下调。相反, siRNA 介导的泛素-1 和泛素-2 蛋白的沉默增加 PS 的 NTF 和 CTF 表达。由此推测, 泛素可能改变 PS 片段的沉积, 作为一种穿梭因子运送 PS 片段到蛋白酶体并使之降解。然而通过蛋白酶体抑制剂研究发现却并非如此, 事实是泛素直接调节 PS 片段产物, 同时泛素的过度表达还可导致 γ -分泌酶复合体两种主要成分 Pen-2 和 Nicastrin 表达水平的降低, 而用 RNAi 沉默泛素-1 和泛素-2, 能增加 Pen-2 和 Nicastrin 表达, 这些研究结果提示, 泛素辅酶 Q 可能是调节 PS 产生与代谢的重要因素。

在 FAD 中, PS1 突变能使半胱天冬酶(caspase) 激活并导致凋亡。为了揭示 PS1 突变是否是通过影响细胞敏感性从而激活 caspase, Xie 等^[14]用 RNAi 锚定编码 γ -分泌酶复合体 4 种组分的基因 Pen1, APH-1, Pen-2 和 Nicastrin 的表达来改变 PS1 产出过程, 结果表明, 细胞敏感性与 caspase 的激活和所有 PS 蛋白表达水平相关联, 尤其是和全长 PS1 蛋白(FL-PS1) 的表达水平关系密切。

2.2 RNAi 在帕金森病研究中的应用

人的突触核素过度表达和它在神经元及神经胶质细胞中的毒性蓄积在 PD 和其他相关的神经退行性疾病的突触核病理中起着关键作用。 α -突触核素(α -synuclein) 基因的 2 个单一的点突变以及该基因 2 倍、3 倍复制与家族性 PD 相关, 而 α -突触核素基因启动子和原发性 PD 相关。通过载体介导的 RNAi 沉默人类的 α -突触核素对突触核病是一种有前景的治疗手段。人的 α -突触核素编码区内的 21 个核苷酸序列, 可组成一个强有力的 RNAi 沉默的有效靶位, Sapru 等^[15]用一个质粒载体依赖的 RNAi 锚定人 α -突触核素突变体 A53T, 成功地对人的多巴胺能神经细胞系 SH-SY5Y 中内源性的 α -突触核素进行了有效沉默, 同时在表达人的 α -突触核素大鼠脑内, 对该基因也进行了有效的沉默, 结果表明, 体内和体外都可以通过病毒载体依赖的 RNAi 对人

突触核素的表达进行沉默。这些研究结果提示, RNAi 对于突触核素病变如 PD 等疾病发展有效的基因沉默治疗方法来讲,不失为一种强有力的工具。

2.3 RNAi 在亨廷顿病研究中的应用

HD 是一种常染色体显性遗传性神经障碍疾病,它的特征是中年时出现进行性的运动异常和认知损害,主要是由于异常的多聚谷氨酸域(Poly Q)在亨廷顿蛋白 Htt 基因产物 N 端的表达重复扩展引起的。在 PQ 域出现 Htt(mHtt)的突变被认为是导致机能异常、尾状核和壳核产生氨基丁酸的棘状神经元渐进性丢失的级联病理变化出现的原因。Rodriguez-Lebron 等^[16]采用一种腺病毒血清型 5(rAAV5)基因重组体转染策略,利用 RNAi 进行转录后抑制 R6/1HD 转基因小鼠纹状体突变 mHtt 的表达水平,并用表达部分人 mHtt 的质粒瞬时共转染来源于 R6/1 转基因小鼠的 HEK293 细胞和一种短发夹 RNA 直接抑制 mHtt mRNA(siHUNT-1)的表达,结果使 mHtt 的 mRNA 表达降低 75%,蛋白表达降低 60%。体内长期 rAAV5 介导的小鼠纹状体 siHUNT-1 表达可使 mHtt 的 mRNA 表达降低 78%,蛋白表达降低 20%,另外,mHtt 的下调伴随着核内包涵体大小和数量的减少。rAAC5-siHUNT-1 双向表达导致 R6/1 小鼠后爪抱握表型延迟出现,用 RNAi 降低纹状体 mHtt 表达水平能改善 R6/1 小鼠 HD 的表型。Bae 等^[17]研究 p53 在线粒体相关的细胞机能失调,以及在 HD 行为异常中的重要作用机制时,发现有着多聚谷氨酸突变的 mHtt 连结 p53,可使培养神经元的 p53 表达水平上调,并使其转录活性增强,这种现象是非常特异的,它仅仅出现在有 PQ 的 mHtt 中,而在有着同样 PQ 突变的 Ataxin-1 中则不出现。在 mHtt 转基因小鼠和 HD 病人中 p53 的表达水平是增加的。他们应用 RNAi 对 p53 基因进行沉默后,发现能防止 HD 细胞线粒体膜去极化及细胞毒性,同时降低了 mHtt-Tg(转基因)小鼠线粒体呼吸链复合体 IV 的活性,而且还发现 p53 基因沉默能抑制转基因果蝇中神经退行性变和转基因小鼠的神经行为异常。这些研究结果表明,在 HD 病理进程中,p53 在细胞核和线粒体之间起着重要作用。

突变的 htt 外显子是引发 HD 的原因,然而在神经元核内包涵体(neuronal intranuclear inclusions, NII)中,突变的 htt 外显子对细胞是否有害,以及是否在隔离有害的可溶性突变 Htt 的防御中发挥作用仍存在一些争议。大量证据是一致的,即脑内突变

的 Htt 形成不可见的或极微小的沉积,这些沉积通过下调或上调 CRE(cAMP 效应元件)介导的转录而影响细胞的存活。所有这些研究表明,Htt 是通过一个“功能放大的机制”来引发 HD 的,因此使突变的 htt 表达下调提示,这可能是一种很有希望的治疗 HD 的策略。

HD 转基因小鼠模型研究表明,在成年期关闭基因 htt 表达能减轻 HD 的严重程度,提示 HD 能够发生逆转。Wang 等^[18]在细胞培养模型中用 siRNA 锚定 htt 外显子 1 的 mRNA,siRNA 的 21 核苷酸序列紧邻人 httCAG 重复区上游,用 httQ72-d1 表皮生长因子受体(EGFP)和 siRNA-HD 外显子 1 转染 Cos-7 细胞,结果表明,siRNAs 能够有效地抑制重组体 httQ72-d1EGFP 的表达,而对照组 siRNA(non-silencing control siRNA)对其表达无影响,在 SH-SY5Y 细胞获得相同的结果,表明这种抑制效果在各种细胞系中无太大差别。另外,用 httQ72-d1EGFP 体内转染小鼠脑神经元,发现 siRNA HD 外显子 1 可使 httQ72-d1EGFP 在新生鼠脑神经元中的表达呈下调状态。这些研究结果表明,siRNA-HD 外显子 1 在 HD 基因抑制中无论是体内体外都是高效的,同时在 HD 转基因鼠中应用 siRNA 能够抑制 htt 的表达,并最终使小鼠体重增加,寿命延长,运动神经功能改善。病理检测发现在脑内突变 htt 核内包含体减少,神经元丢失减少,脑萎缩减轻。

2.4 RNAi 在脊髓小脑共济失调研究中的应用

SCA1 是至少由 9 个多聚谷氨酰胺异常重复导致的神经退行性疾病之一,其特征是渐进性运动失调、小脑共济失调和小脑浦肯野细胞和脑干神经元的丢失。在 SCA1 中,突变的等位基因重复数目从 44 到 82 个谷氨酰胺不等,其重复的长度和发病初始年龄呈负相关。SCA1 疾病基因产物为 Ataxin-1, SCA1 转基因小鼠中 Ataxin-1 核内包涵体形成为浦肯野细胞组织学早期改变之一,在果蝇模型和转基因鼠模型中研究表明,对 Ataxin-1 来讲,这种异常重复是一种功能放大毒性^[19]。其他一些研究表明,Ataxin-1 的 776 位丝氨酸被 AKT 磷酸化是 SAC-1 病理遗传学的重要特征^[20],所以在一些生物疾病模型中,进行分子伴侣的操作和阻抑 AKT 磷酸化 Ataxin-1 就成了很有潜力的治疗途径。Xia 等^[21]在 SCA1 小鼠模型上用 RNAi 抑制突变的 ataxin-1 基因表达,在小鼠小脑内注射表达短发卡 RNA(能特异地锚定突变的 ataxin-1 基因)的重组腺病毒载体,结果表

明,该操作能极大改善 SCA1 小鼠模型运动协调能力,恢复小脑形态结构,去除在 SCA1 鼠中浦肯野细胞的 Ataxin-1 包涵体。这一研究结果表明,体内用 RNAi 这种技术治疗此类疾病有着良好的前景。

Ataxin-2 是 SCA2 的疾病基因 ataxin-2 的表达产物,它可以与一种 RNA 结合蛋白 Ataxin-2 结合蛋白 1 (ataxin-2 binding protein1, A2BP1) 相互作用。Ataxin-2 和 A2BP1 在线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的同源体分别为 ATX2 和 FOX1。Kiehl 等^[22] 用注射或浸泡方式给线虫导入 ATX2 和 FOX1 的 dsRNA, 结果成功地诱导了 RNAi 现象,并证明了 ataxin-2 同源体在线虫早期胚胎发育中是必需的。利用这种方法研究 ataxin-2 的功能及其产物的作用方式,为疾病的治疗提供线索与依据。

2.5 RNAi 在肌萎缩性侧索硬化症研究中的应用

ALS 是一类致死性的神经退行性疾病,能引起大脑及脊髓运动神经元选择性的死亡。一些家族性的 ALS 病人主要是由于超氧化物歧化酶 1 (SOD1) 的显性突变引起的。

Ralph 等^[23] 用慢病毒载体介导 siRNA 分子的表达,这种 siRNA 专门锚定人突变的 SOD1 (SOD G93A) 基因,把这一载体注入已被诱发过度表达人 SOD1 突变基因的小鼠的不同肌肉群中,可导致有效而特异的 SOD1 基因表达下调,同时可增加脑干和脊髓中易受损的运动神经元的存活率。此外,对 SOD1 的沉默能增进这些动物的运动行为,近 100% 推后了 ALS 症状的出现,近 80% 延长了它们的生命周期。这些研究结果表明,在致死性、显性遗传的神经退行性病的动物模型中采用 RNAi,是此类疾病目前较好的治疗方法。

ALS 的主要临床表现是全身渐进性麻痹,病理变化是神经系统特异的退行性变和脊髓及脑干上运动神经元的丢失^[24]。细胞内凋亡级联的活化反应可能参与 ALS 中神经元的退行性变^[25]。前列腺凋亡反应-4 (prostate apoptosis response 4, Par-4) 是一种与神经退行性疾病相关的神经元变性调节因子^[26],它主要在脊髓腹角的突触小体和突触后致密质中富集。在 hSOD1 G93A (甘氨酸在 93 位突变为丙氨酸) 突变小鼠中,Par-4 在突触小室中的水平主要是在肌张力快速和慢速衰减期中增加,脊髓腹角中 hSOD1 G93A 突变致敏的突触小体能增加 Par-4 的表达,随后而来的是兴奋毒性的凋亡性损伤。在脊髓突触小体中,Par-4 所介导的细胞前凋亡细胞因

子主要是被 hSOD1 G93A 突变所增强。采用 RNAi 技术抑制脊髓腹角 Par-4 基因的表达,可以阻抑由 G93A 突变诱导引起的线粒体功能失衡及 caspase-3 的激活反应,并能保护脊髓运动神经元免于凋亡,而在运动神经元的细胞死亡中,突触是促进 Par-4 活性的关键位点。这些研究结果表明, RNAi 锚定 Par-4 基因的有效沉默,对运动神经元退行性变来说,是一种强效的保护性策略^[27]。

2.6 RNAi 在朊病毒病研究中的应用

朊病毒病又称可传播性海绵状脑病 (transmissible spongiform encephalopathies, TSE) 是一种致死性的神经退行性疾病,它和异常的 PrPc 宿主编码蛋白异构体有关^[28]。它的发病机制目前并不完全明了,有蛋白质构象致病假说:(1) 朊病毒蛋白有两种构象:细胞型 (正常型 PrPc) 和瘙痒型 (致病型 PrPsc), 区别在于空间构象的差异。PrPsc 溶解度低,且抗蛋白酶解;(2) PrPsc 可胁迫 PrPc 转化为 PrPsc, 实现自我复制,并产生病理效应;(3) 基因突变可导致细胞型 PrPc 结构不稳定,自发性转化,最终变为 PrPsc 型,并通过多米诺效应倍增致病。无效的 Pmp 基因编码 PrPc, 能使转基因小鼠健康存活并且能够抵制病原体的感染, Vilotte 等^[29] 的研究表明, Pmp 基因表达的下调是一种潜在的治疗朊病毒病的方法。他们用 RNAi 锚定 Pmp 基因,在转染细胞中能有效并高特异地减低 PrPc 的表达水平,说明 RNAi 在抗朊病毒病中是一种大有前景的治疗方法。

Daude 等^[30] 在感染了绵羊瘙痒病的非传代的神经胶质瘤细胞中用 siRNA 对特异的 Pmp 基因进行沉默,结果发现能去除 PrPsc 包涵物。他们用不同细胞进行同样试验,发现均不影响 RNAi 的效应,也没有发现 RNAi 有任何细胞毒性。虽然这种效应是短暂的,但为此类疾病的治疗带来了希望。

3 结语

RNAi 是研究未知功能基因的一种强有力工具,它能对神经退行性疾病的发病机制进行探索,从而揭示这些疾病的发病机制,又可以对已知相关疾病基因进行有效的沉默,减少其致病蛋白的产生,推迟疾病的发生,延缓其进程及改善已有症状。目前临床上对神经退行性疾病尚无有效的治疗手段,依赖对 RNAi 的深入了解,通过一些相关动物模型体内外的 RNAi 技术的摸索,攻克神经退行性疾病的路程会随着涌出的新成果而逐渐缩短。

参 考 文 献

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669):806 – 811.
- [2] Elbashir SM, Harboth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411(6836):494 – 498.
- [3] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. *Nature*, 2001, 409(6818):363 – 366.
- [4] Goate A. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2006, 9(3):341 – 347.
- [5] Feng XR, Zhao P, He YX, *et al.* Allele-specific silencing of Alzheimer's disease genes. The amyloid precursor protein genes with Swedish or London mutations[J]. *Gene*, 2006, 371(1):68 – 74.
- [6] Asai M, Hattori C, Szabo B, *et al.* Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha secretase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 301(1):231 – 235.
- [7] Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, *et al.* Membrane-anchored metalloprotease AMDC9 has an a-secretase activity responsible for the processing amyloid precursor protein[J]. *Biochem J*, 1999, 343(2):371 – 375.
- [8] Kao SC, Krichevsky AM, Kosik KS, *et al.* BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(3):1942 – 1949.
- [9] Miller VM, Gouvion CM, Davidson BL, *et al.* Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles victor[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(2):661 – 668.
- [10] Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, *et al.* The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex [J]. *Nature*, 2003, 422(6930):438 – 441.
- [11] Shinya S, Wataru A. Expression profiles of two human APH-1 genes and their roles in formation of presenilin complexes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 327(1):18 – 22.
- [12] Luo HM, Deng H, Xiao F, *et al.* Down-regulation of amyloid β -protein 42 production by interfering with transcript of presenilin 1 gene with siRNA [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(12):1613 – 1618.
- [13] Massey LK, Msh AL, Monteiro MJ. Ubiquitin regulates presenilin endoproteolysis and modulates gamma-secretase components, Pen-2 and Nicastrin[J]. *Biochem J*, 2005, 391(3):513 – 525.
- [14] Xie ZC, Romano DM, Kovacs DM, *et al.* Effects of RNA interference-mediated silencing of γ -secretase complex components on cell sensitivity to caspase-3 activation [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(33):34130 – 34137.
- [15] Sapru MK, Yates JW, Hogan S, *et al.* Silencing of human α -synuclein *in vitro* and in rat brain using lentiviral-mediated RNAi [J]. *Exp Neurol*, 2006, 198(2):382 – 390.
- [16] Rodriguez-Lebron E, Denovan-Wright EM, Nash K, *et al.* Intrastratial rAAV-mediated delivery of anti-huntington shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice[J]. *Mol Ther*, 2005, 12(4):618 – 633.
- [17] Bae BII, Xu H, Igarashi S, *et al.* p53 Mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease [J]. *Neuron*, 2005, 47(1):9 – 41.
- [18] Wang YL, Liu WZ, Wada E, *et al.* Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA[J]. *Neurosci Res*, 2005, 53(3):241 – 249.
- [19] Fernandez-Funez P, Nino-Rosales ML, de Gouyon B, *et al.* Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration[J]. *Nature*, 2000, 408(6808):101 – 106.
- [20] Emamian ES, Kaytor MD, Duvick LA, *et al.* Serine 776 of ataxin-1 is critical for polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice[J]. *Neuron*, 2003, 38(1):375 – 387.
- [21] Xia H, Mao Q, Eliason SL, *et al.* RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia[J]. *Nature Med*, 2004, 10(8):816 – 820.
- [22] Kiehl TR, Shibata H, Pulst SM. The ortholog of human ataxin-2 is essential for early embryonic patterning in *C. elegans* [J]. *J Mol Neurosci*, 2000, 15(3):231 – 241.
- [23] Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, *et al.* Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALD model[J]. *Nature Med*, 2005, 11(4):429 – 433.
- [24] Strong M, Rosenfeld J. Amyotrophic lateral sclerosis: a review of current concepts[J]. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2003, 4(3):136 – 143.
- [25] Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system[J]. *Nature*, 2000, 407(6805):802 – 809.
- [26] Guo Q, Xie J. AATF inhibits aberrant production of amyloid beta peptide 1-42 by interacting directly with Par-4[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(6):4596 – 4603.
- [27] Xie J, Awad KS, Guo Q. RNAi knockdown of Par-4 inhibits neurosynaptic degeneration in ALS-linked mice [J]. *J Neurochem*, 2005, 92(1):59 – 71.
- [28] Tilly G, Chapuis J, Vilette D, *et al.* Efficient and specific down-regulation of prion protein expression by RNAi[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305(3):548 – 551.
- [29] Vilotte JL, Laude H. Transgenesis applied to transmissible spongiform encephalopathies[J]. *Transgen Res*, 2002, 11(6):547 – 564.
- [30] Daude N, Marella M, Chabry J. Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt13):2775 – 2779.