

RNA 干扰技术及其在哺乳动物中的应用进展

阮井玲, 周佳勃, 李冲, 刘娣* (东北农业大学动物科学技术学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 作为一种有效的用于转录后基因沉默, 从而抑制特定基因表达的技术, 近年来在哺乳动物细胞中的研究已取得了长足发展, 且在基因功能以及疾病治疗的研究中有着广阔的应用前景。研究表明, 哺乳动物细胞中的 RNAi 作用方式与植物有所不同, 笔者对哺乳动物 RNAi 技术的发展、作用机制及其在基因功能、基因治疗、转基因动物研究、药物开发等方面的应用做了综述。

关键词 RNAi; 基因功能; 基因治疗

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)20-06050-01

RNAi Technique and its Application Advances in Mammalian

RUAN Jing-ling et al (College of Animal Science and Technique, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract As a novel and effective tool, RNA interference (RNAi) technique was extensively used for sequence-specific post-transcriptional gene silencing and therefore depressing specific gene expression, which was developed rapidly and had made great progress in mammalian studies. RNAi technique had wide application perspective in gene function studies and disease therapy. In this article, the progress, molecular mechanism and biological function of RNAi were described. The advantages and unsolved issues concerning RNAi technique were summarized as well as its application in gene function, gene therapy, transgenic animals, medicine development in mammalian.

Key words RNAi technique; Gene function; Gene therapy

1 RNAi 技术的发展

1995 年 Guo 和 Kemphues 试图用反义核糖核酸来阻断线虫 Par2 基因的表达以研究其功能^[1]。直至 1998 年 Andrew Z. Fire 和 Craig C. Mello 才真正提出双链核糖核酸能导致转录后基因沉默的理论^[2]。2000 年 Fraser 等应用 RNAi 技术研究了秀丽线虫 *C. elegans* 的基因组, 提供了大量有关线虫发育和生存必需基因的知识。2002 年, 科学家发现 RNAi 能永久性关闭或删除一部分 DNA, 而不只是简单地使 DNA 暂时沉默^[3]。2005 年王晓东揭示出 RNAi 的新机制: RNAi 作用由起始阶段和效应阶段构成^[4]。2006 年 Fire 和 Mello 由于在 RNAi 及基因沉默现象研究领域的杰出贡献, 获得了诺贝尔医学奖。RNAi 的临床应用已初步在长尾猕猴上被证明有效, 未来应用在人类疾病的治疗上将指日可待^[5]。

2 RNAi 的分子机制

研究表明, RNAi 在哺乳动物中的机制基本上与果蝇和其他低等生物中 RNAi 的机制相似。RNAi 的基本过程可分为 3 个阶段: 起始阶段, RNase III 以 ATP 依赖的方式, 逐步切割外源或内源的双链 RNA, 产生大量 21-23 个碱基的 siRNA, siRNA 与目的 mRNA 有高度的序列特异性; RNAi 效应阶段, siRNA 双链结合一个核酶复合物从而形成所谓 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC), 激活的 RISC 通过碱基配对定位到同源 mRNA 转录本上, 切割 mRNA, 从而诱发宿主细胞针对这些 mRNA 的降解反应; 倍增阶段: 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 聚合酶作用下合成更多的新的 dsRNA, 新合成的 dsRNA 再由 Dicer 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。

3 RNAi 技术的应用

3.1 基因功能研究 随着 DNA 序列精细图谱的完成, 生命

科学正式进入了后基因组时代, 对所有基因的功能进行阐释成为当前最重要的任务^[6]。从应用的角度看, RNAi 是一种非常有意义的基因敲减技术, 由于 RNAi 能高效特异地阻断基因的表达, 已成为大规模高通量研究基因功能的工具。Zheng 等用他们构建的 siRNA 表达框 PCR 表达文库, 针对 8000 个基因进行 TNF- α 活化 NF-KB1, RelA, IKK β 等^[7]。

3.2 RNAi 转基因动物研究 通过转基因技术研究 RNAi 转基因动物, 从而在全身组织细胞中抑制靶基因表达是 RNAi 技术的一个重要应用。RNAi 转基因小鼠的出现, 使得在哺乳动物整体水平研究靶基因的敲低成为可能。Masaru Okabe 实验室成功建立了第一种应用 RNAi 的转基因小鼠^[8]。

3.3 基因治疗

3.3.1 抗病毒。 RNAi 具有抵抗病毒入侵、防止自私基因序列过量增殖等作用, 因此可以利用 RNAi 技术产生抗病毒动物。在哺乳动物细胞中, dsRNA 通过激发干扰素系统行使其非特异性的抗病毒感染免疫功能。最近科研人员将 RNAi 技术用于多种人类病毒性疾病的治疗研究中, 均取得了可喜的试验结果, 如特异性针对人类免疫缺陷病毒 CD4 受体, 以及 HIV 辅助受体 CXCR4 和 CCR5 的 siRNA, 进行抗 HIV 的 RNAi 试验研究均有良好效果。

3.3.2 抗肿瘤。 RNAi 具有序列特异性, 针对肿瘤细胞特定靶基因的 siRNA 可抑制肿瘤细胞生长、诱导凋亡、增强化疗或放疗药物效果, RNAi 技术可以针对信号通路的多个基因或者基因簇的共同序列来同时抑制多个基因的表达, 从而能够更有效地抑制肿瘤生长。Zhang 等建立了质粒载体介导的 RNAi, 能够特异地抑制不同亚型 VEGF 的表达, 其优势显而易见^[9], RNAi 治疗肿瘤的候选基因将随着肿瘤分子生物学研究的深入而不断增加。

3.3.3 癌症治疗。 RNAi 应用在癌症治疗中的目的就是特异地敲除一些异常的细胞周期基因和抗凋亡基因, 从而抑制肿瘤的生长, 杀死肿瘤细胞。Siegmond D 等利用 RNAi 技术抑制 TNF 细胞死亡途径中 FLIP 蛋白的表达, 从而使在死亡受体被 TNF 激活后癌细胞表现出明显的凋亡倾向。但是利

基金项目 黑龙江省攻关项目 (GB01B104) 资助。

作者简介 阮井玲 (1982-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。* 通讯作者。

收稿日期 2007-03-12

(下转第 6053 页)

用 RNAi 对癌症进行基因治疗的体内试验还处于起步阶段,将 siRNA 特异的导入靶细胞是目前 RNAi 基因治疗中迫在眉睫的问题。

3.4 药物开发 作为寻找新的药物靶标的工具,基于 RNA 的治疗药物可以快速、大规模、高通量地对发现的药物靶基因进行功能分析。斯坦福大学医学院的 McCaffrey 等将编码丙肝病毒的基因和相应的 siRNA 均转染于小鼠体内,结果显示 siRNA 有效地使 HCV 沉默^[9]。尽管这些尚处试验阶段,但 RNAi 技术显示出很大的治疗潜能,显示了 siRNA 广阔的应用前景。目前 siRNA 用于人体的最大障碍在于现行的给药方法毒副作用太大。

3.5 研究信号传导通路的新途径 Biotech 认为,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,Clemensy 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,在此基础上分析了 DSH3PX1 与 DACK 之间的关系,证实了 DACK 是位于 DSH3PX1 磷酸化的上游激酶^[10]。RNAi 技术较传统的转染试验有明显的优势,因此认为 RNAi 技术可能成为研究细胞信号传导通路的新途径。

4 展望

RNAi 的发现具有划时代的意义,它不仅深入揭示了细胞内基因沉默的机制,而且还是后基因组时代基因功能分析的有力工具,极大地促进了人类揭示生命奥秘的进程。在疾病治疗中应用 RNAi 技术,将会使那些目前仍无法治疗或控制的恶性疾病如癌症、艾滋病等的治愈成为可能。与基因敲除技术相比, RNAi 技术都有着很大的优势,弥补了基因敲除的缺陷。尽管如此,在 RNAi 应用中仍面临一些尚未解决的问题:①可能存在一些基因或组织具有抵抗 RNAi 的能

力;②哺乳动物中 RNAi 的抑制效果不如低等生物的效果好,并对丰富表达的靶基因抑制效果较低;③RNAi 并不是完全靶特异性的,一些研究中出现脱靶现象;④siRNA 或 shRNA 导入细胞的效率还应当进一步提高等。随着 RNAi 技术研究的不断完善,相信 RNAi 技术不仅会对生命科学的发展产生深远影响,而且会给人类的健康带来新的曙光。

参考文献

- [1] Guo S, Kempheus K J. 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, 81: 611-620.
- [2] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
- [3] CARINA D. Small RNAs: The genome's guiding hand [J]. *Nature*, 2002, 420 (732): 1038.
- [4] TIM A, RAND, SEAN P, et al. Argonaute2 Cleaves the Anti-Guide Strand of siRNA during RISC Activation [J]. *Cell*, 2005, 118 (123): 621-629.
- [5] ZIMMERMANN T S, LEE A C, AKINC A, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates [J]. *Nature*, 2006, 441: 111-114.
- [6] ROSES A D. The genome era begins [J]. *Nature Genetics*, 2003, 3 (3): 217.
- [7] ZHENG L, LIU J, BATALOV S, et al. An approach to genome wide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (1): 135-140.
- [8] HASUWA H, KASEDA K, EINARSDOTTIR T, et al. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats [J]. *FEBS Lett*, 2002, 532 (1/2): 227-230.
- [9] ZHANG L, YANG N, MOHAMED HADLEY A, et al. Vector-based RNAi, a novel tool for isoform specific knock-down of EGF and anti-angiogenesis gene therapy of cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303 (4): 1169-1178.
- [10] MCCAFFREY AP, MEUSE L, PHAM T T, et al. RNA interference in adult mice [J]. *Nature*, 2002, 418 (6893): 38-39.
- [11] MORRIS J C, WANG Z, DREW M E, et al. Glycolysis modulates trypanosome glycoprotein expression as revealed by an RNAi library [J]. *EMBO J*, 2002, 21 (17): 4429-4438.