

浅析 RNAi 技术的应用及发展前景

朱德艳 (荆楚理工学院生物工程学院, 湖北荆门 448000)

摘要 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 作为研究基因治疗、基因功能、生物品种改良等方面的一种有效方法已经被研究者广泛接受。作为基因抑制的一种有力工具, 与其他的方法相比, RNAi 的操作过程更简单, 成功率更高。通过 RNAi 可以实现对特定的 mRNA 的选择性降解, 进而抑制其翻译过程。对 RNAi 技术的应用及发展前景进行了探讨。

关键词 RNAi 技术; 基因治疗; 基因功能; 生物品种改良

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)24-07425-02

Discussion on the Application of RNAi and its Development Prospect

ZHU De-yan (Jingchu University of Technology, Jingmen, Hubei 448000)

Abstract As an effective method to study gene therapy, gene function and biological varieties improvement, RNAi has been widely accepted by researchers around the world. Compared with other methods to effectively interfere in gene, the operation procedure of RNAi is easier and wins higher rate of success. By RNAi, one can realize the selective degradation of specific mRNA and interfere in its translation process. In this paper discusses about the application of RNAi and its development prospect were discussed.

Key words RNAi; Gene therapy; Gene function; Biological variety improvement

RNAi 是生物界一种古老且进化上高度保守的现象, 是基因转录后沉默作用 (PTGS) 的重要机制之一^[1]。1998 年发现, 将 dsDNA 注入线虫 (*C. elegans*) 可特异性显著抑制特定基因的表达, 并将这种由 dsDNA 引发的特定基因表达受抑制现象称为 RNA 干扰作用 (RNA interference, RNAi, 也称 RNAi 干扰), 这是生物界有关 RNAi 存在的首次报道^[2]。近年来, 不同的研究领域和生物中发现了许多新的使基因关闭或者沉默的类型, 并赋予其不同的名称: 植物中称为 RNA 共抑制 (co-suppression), 真菌中叫 RNA 压制 (RNA quelling), 动物中则为 RNA 干扰^[3]。总体上来说, 它们的作用机制是一致的, 因此, 研究人员广泛接受 RNAi 这个名称。笔者就 RNAi 技术的研究进展以及应用前景作一综述。

1 RNAi 作用机理

dsRNA 进入细胞后, 一方面在 Dicer 酶的作用下直接被裂解成 21~23 nt 的干扰性小 RNA (siRNA); 另一方面在 RdRp (以 RNA 为模板指导 RNA 合成的聚合酶, RNA directed RNA polymerase) 的作用下 dsRNA 可以自身扩增, 再被 Dicer 酶裂解成 siRNA。裂解后的 siRNA 3' 末端具有两个核苷酸 TT 突出。siRNA 生成后就启动了 RNAi 反应。首先 siRNA 结合到核糖核酸酶复合物上形成 RNA 诱导的基因沉默复合物 (RISC, RNA-induced silencing complex), 随后以 ATP 提供能量, 将 RISC 中的 siRNA 的双链裂解成单链, RISC 被活化。活化后的 RISC 定位到与 siRNA 反义链互补的靶 mRNA 上, 使 mRNA 被 RNA 酶裂解。另外在复合物中, 以 siRNA 的单链为引物, 以 mRNA 为模板, 在 RdRp 作用下合成 mRNA 的互补链, 发生类似于 PCR 的反应, 使 mRNA 也变成 dsRNA^[4]。它在 Dicer 酶的作用下被裂解成新的 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 数量大大增加, 对基因表达的抑制作用显著增强。

2 RNAi 的作用特点

2.1 对基因抑制有严格序列特异性 RNAi 是一种转录后

基因沉默现象, dsDNA 能够非常特异地使之同源的 mRNA 降解, 而无关基因不受影响^[5]。

2.2 高效性 少量 dsRNA 就能有效抑制靶基因的表达, 在低等动物中抑制效率大于 90%, 这表示 dsRNA 介导的 RNA 干扰是以催化放大方式进行的, 因此, dsRNA 的抑制作用要比单独用反义 RNA 的抑制作用高 10 倍以上^[6]。

2.3 siRNA 是 RNAi 的中间效应分子 siRNA 的序列与所用的靶 mRNA 序列具有同源性, Sharp 等^[7] 在研究 dsRNA 的性质时就证实了 siRNA 是由长的 dsRNA 切割而来的, 是降解靶基因的中间效应分子, 而且决定了 mRNA 的切割位置。

2.4 需要 ATP 的参与 最新研究^[8] 表明, ATP 在 siRNA 介导的 RNAi 技术中具有重要作用, dsRNA 的切割和 RISC 的形成都具有 ATP 依赖性。

3 RNAi 技术的应用及发展前景

3.1 RNAi 技术在基因治疗中的应用及发展前景 RNAi 技术是一项高效率、高特异性的基因封闭技术, 随着 dsRNA 合成、质粒生成及导入方式的改进, 已快速成为基因功能研究的强有力工具^[9]。虽然理论上对于不同的疾病, RNAi 均具有一定的效果, 但截止目前, RNAi 技术主要应用于抗病毒治疗和肿瘤治疗等方面。

3.1.1 RNAi 与抗病毒治疗研究。 RNAi 抗病毒治疗研究其思路是根据动植物和人体的病原体中有一些是 RNA 病毒 (如导致艾滋病的 HIV 和 SARS 的冠状病毒都是 RNA 病毒), 设计和制备与这些基因序列有同源序列的 dsRNA, 转入动植物体内使有关的疾病基因“沉默”, 达到治疗的效果。此外, 有些 RNA 病毒在复制过程中会产生 dsRNA, 如果宿主体内有分解这种 dsRNA 的酶, 就可将 dsRNA 切割成许多小的片段, 这种小片段会与病毒 RNA 基因组的同源部分结合, 使病毒基因失去复制功能, 不能危害宿主, 从而达到治疗效果。

以治疗 HIV 为例, 原理是利用 siRNA 抑制病毒再生或传染所需的蛋白质的生成。它的优势在于能够不损伤细胞而只抑制病毒蛋白质, 其专一性是其他药物难以具备的。2001 年 Tuschl 研究组的突破性研究开创了 RNAi 技术治疗人类疾病的新途径, siRNA 迅速成为治疗 HIV 的新武器。2006 年 7 月《世界华人消化杂志》^[10] 上总结了人们针对 HIV 生活周期

作者简介 朱德艳 (1977-), 女, 湖北恩施人, 讲师, 从事农副产品深加工方面的教学和研究工作。

收稿日期 2007-04-28

的不同阶段设计了多种 siRNA, 针对 HIV 病毒 gag、tat、rev、nef 等基因的 siRNA 可用以控制病毒复制, 针对宿主细胞的表面 HIV 受体基因的 siRNA 可用以控制病毒进入宿主细胞内, 抑制病毒的感染过程。

从上述看, RNAi 技术在抗病毒治疗研究方面取得了一定的进展, 对于遏制感染性病毒的传染研究也取得了一些成绩, 但还存在一些问题。比如如何选择目标基因, 即如何筛选出针对致病蛋白质而不影响细胞正常的新陈代谢的 siRNA, 例如艾滋病毒变化迅速, 目标基因有可能在短时间内失效, 这就给筛选提出了巨大的挑战。对其他病毒的治疗也存在类似的问题, 如 SARS 等。目前研究大都处于初期阶段, 只在离体细胞或简单的真核细胞上做过试验, 哺乳动物与人的 RNAi 机制尚未清晰, 所以利用 siRNA 制备药物潜力巨大但前路漫漫。

3.1.2 RNAi 与肿瘤。 肿瘤是多基因疾病, RNAi 已经被用来辅助研究那些与肿瘤发生、发展、治疗期间的反应和扩散等方面相关基因的功能, 这样的工作不仅增加了人们对肿瘤发生机制的了解, 而且也有助于鉴定新的有效治疗靶点^[11]。例如: Agami 研究组采用逆转录病毒载体 shRNA 表达系统不仅特异性地在体外抑制了 CAPAN1 胰腺癌细胞内的 Kras 基因的表达, 也成功地抑制了裸鼠移植瘤的生长^[12]。Berkhardt 等采用 RNAi 技术成功抑制了 K562 白血病细胞中的 BCR/ABL 融合基因 mRNA 的表达^[13]。德国 Jovin 研究组通过化学合成的 anti-erbB1 siRNA 成功地抑制了 A431 细胞内 erbB1 的表达, 导致细胞凋亡数目增加和肿瘤增殖能力减弱^[14]。肿瘤发生发展过程中除癌基因被激活外, 还涉及到多种形式的基因改变。bd-2 是与血液系统恶性肿瘤密切相关的抗凋亡基因, 可以阻遏化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡。raf-1 和白血病的发生和耐药性也有密切联系。抑制 bd-2 和 raf-1 mRNA 的表达可以抑制白血病细胞的增殖^[15]。抑制肿瘤血管的生成是肿瘤治疗的又一策略, anti-VEGF siRNA 可以特异性地抑制血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达, 抑制肿瘤的生长^[16]。由此可知, RNAi 技术将改变肿瘤治疗的研究步伐, 使人类有可能在更短的时间内探寻到治疗肿瘤的有效途径。如何在体内实现靶基因 siRNA 转移到所有肿瘤细胞并稳定持久地抑制癌基因的表达是 RNAi 技术治疗肿瘤的关键。此外, 从目前 RNAi 的研究现状来看, 在哺乳动物细胞中, 不能产生系统性的甚至是可以遗传的 RNAi 现象^[17], 不可避免地面临着 RNAi 作用时间等一些因素的影响, 使其不能持续作用。RNAi 并不能完全阻断基因的表达, 尤其是异常高表达的基因, 这也将影响对肿瘤的治疗效果。

3.2 RNAi 技术在生物品种改良方面的应用 人类生活的必要物质基础都直接或间接地来源于植物, 随着生活水平的提高, 人们对食物品质的要求也日益提高, 传统育种很难满足需求。随着 RNAi 的作用机制被人们所认识, 对植物进行分子改良成为可能。RNAi 技术在植物改良中主要集中在培育抗病毒作物和改良作物品质方面。

在抗病毒研究方面, RNAi 技术能特异性地抑制某些基因表达, 利用基因转化系统将表达与病毒同源的 dsDNA 片段整合到基因组上, 表达后阻止病毒的复制扩散, 获得稳定遗

传的抗病毒植物。

在作物品质改良方面, Liu 等利用 RNAi 技术对棉籽油的成分进行了改良, 提高了棉花籽油中硬脂酸与油酸的比例。普通棉籽油含 26% 棕榈酸、15% 油酸及 58% 亚麻油酸。加工过的棉籽油会产生反式脂肪酸, 生成胆固醇, 增加心血管疾病发病率。因此目前倾向于使用低棕榈酸、高油酸及硬脂酸的油类。棉花种子的硬脂酸经棕榈酸合成后, 经 9 去饱和酶和 12 去饱和酶作用形成亚麻油酸, 最后形成次亚麻油酸, 各脂肪酸的含量比例会因参与酶活性的不同而有所差异。其中 ghSAD1 与 ghFAD2-1 是 9 去饱和酶及 12 去饱和酶的基因, 若 ghSAD1 沉默, 可造成硬脂酸的累积; 若 ghFAD2-1 沉默, 可使油酸大量累积。Liu 等利用 RNAi 技术以这 2 个基因为目标基因, 分别转化棉花 Coker 315 引起 PTGS 抑制目标基因, 分别得到了高硬脂酸和高油酸的转化植株, 然后利用两者杂交产生的 F₂ 分离群体得到了含高硬脂酸和高油酸的棉花植株^[19]。此外 Byzova 等通过 RNAi 技术成功地对拟南芥和油菜的花器官进行了改造, 创造出没有花瓣但其他功能完整的花, 使之更有利于授粉, 从而提高产量^[20]。

随着人们对生物发育与调控机理的深入研究, 通过该技术将创造出更多意想不到的成果。值得注意的是, 目前动物品质的改良还处于起步阶段, 关于 RNAi 在哺乳动物中应用的报道不多。同时在研究中也发现一些弊端, 如几个基因有相同或相近的序列, RNAi 会同时作用, 这样所观察到的表型就不能肯定是由哪些基因被干扰所致^[21]。

3.3 RNAi 技术在研究基因功能中的应用及前景 RNAi 能特异性地抑制基因的表达, 因此许多研究者将其作为一种研究基因功能的有效工具, 现已用 RNAi 探明了果蝇、线虫和一些植物的基因功能^[18]。在后基因组时代, 需要大规模的研究基因的功能, RNAi 与传统的基因敲除技术相比, 具有操作简便、成本低、时间短等优势。但是 RNAi 技术与传统基因敲除技术相比, 又有所不同, RNAi 只能抑制某基因的表达, 使其表达水平降低, 但不能将该基因的表达永远消除, 同时这种抑制作用会随时间的推移而解除。

3.4 RNAi 与生物进化^[4] 目前在许多真核生物中都发现了 RNAi 现象, 而在原核生物中却未发现, 彰显了 RNAi 的进化地位, 唤起了科学家们对“RNA 世界”的重视及对“生命起源于 RNA 分子”这一命题的兴趣。但是其在进化中是如何出现并保存下来, 在生物体中的意义如何, 目前均没有分析清楚, 还需更多的研究来阐明。总之, 随着 RNAi 机制研究的深入和 RNA 干扰技术的日趋完善, 一个崭新的 RNA 时代即将来临。尽管仍有一些问题有待研究, 如外源 dsDNA 如何产生 siRNA? 到底有哪些核酸酶参与了 dsRNA 和 mRNA 的切割, 其详细机制如何? RNAi 作用在其他生物中能否像在线虫中那样充分表达? RNAi 在哺乳动物中是否可以长期存在并遗传? 以及最近发现植物的一种钙调素相关蛋白参与 PTGS 的弱化, 提示钙信号可能调节 PTGS 或 RNAi 等。细胞中这种古老、多能的细胞水平的监督系统经过千万年的选择和进化的

(上接第7426页)

研、经济和社会价值,将被广泛用于农、林、牧、渔等领域。

参考文献

- [1] 陈忠斌,于乐成,王升启.RNA 干扰作用(RNAi)研究发展[J].中国生物化学与分子生物学学报,2002,18(5):525-528.
- [2] HIRE A,XUS, MONTGOMERY MK, et al. Perturb and specific genetic interference by double-strand RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669):806-811.
- [3] 蔡佩玲,牟林春,李新枝.RNA 干扰(RNAi)及其应用[J].四川解剖学杂志,2006,14(1):34-37.
- [4] 吕林海.浅析RNA 干扰研究的进展及其应用[J].哈尔滨学院学报,2006,27(6):138-140.
- [5] MCMANUS MT, SHARO PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(10):737-747.
- [6] DAVENPORT RJ. Gene silencing: A faster way to shut down genes [J]. *Science*, 2001, 292(5521):1469-1471.
- [7] SHARP PA. RNAi and double-strand RNA [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(2):139-141.
- [8] NYKANEN A, HALEY B, ZAMORE P D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNAi interference pathway [J]. *Cell*, 2001, 107(3):309-321.
- [9] 康慧聪,唐洲平.RNA 及其基因治疗研究进展[J].卒中与神经疾病,2005,12(3):191-193.
- [10] 陈煜,谢小芳.RNA 的作用机制及抗病毒研究进展[J].世界华人消化杂志,2006,14(22):2123-2129.
- [11] 王玮,朱焕章,薛京伦.RNA 干扰在基因治疗中的应用[J].生物化学与生物物理进展,2004,31(7):590-594.
- [12] BRUMELKAMP T R, AGAMIR B R. Stable suppression of tumorigenicity by virus mediated RNA interference [J]. *Cancer Cell*, 2002, 2(3):243-247.
- [13] WILDA M, FUCHS U, WOSSMANN W, et al. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi) [J]. *Oncogene*, 2002, 21(37):5716-5724.
- [14] NAGY P, ARNDFJOVIN DJ, JOVINTM, et al. Small interfering RNAs suppress the expression of endogenous and GFP-fused epidermal growth factor receptor (erbB1) and induce apoptosis in erbB1-overexpressing cells [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 285(1):39-49.
- [15] COCA DP, AOKI Y, KIYOSAWA K. RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines [J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(2):125-133.
- [16] ZHANG L, YANG N, MOHAMED HADLEY A, et al. Vector-based RNAi, a novel tool for isoform specific knock down of VEGF and anti-angiogenesis gene therapy of cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303:1169-1178.
- [17] SHLEY DJ, MCCALLUS D E, GORDANO T. RNAi: gene silencing in therapeutic intervention [J]. *Drug Discovery Today*, 2002, 7(20):1040-1046.
- [18] 张利生,陈大元.RNA 干扰及其应用前景[J].遗传,2003,25(3):341-344.
- [19] MARINA BYZOVA, CHRISTOPH VERDUYN. Transformation of seeds into sepals in *Arabidopsis* and silencing of the hairy gene in the RNAi mediated gene silencing technology in organ-specific manner [J]. *Harta*, 2004, 218(4):379-387.
- [20] S VARSHA WELSEY, CHRISTOPHER A. HELLIWELL, NEIL A SMITH, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants [J]. *The Plant Journal*, 2001, 27(6):581-590.
- [21] 张彦桃.RNAi 及其在植物研究中的应用[J].北方园艺,2006(5):51-52.