

RNAi的作用机制及抗病毒研究进展

陈煜, 谢小芳

陈煜, 谢小芳, 福建农林大学生命科学学院 福建省福州市 350002

通讯作者: 陈煜, 350002, 福建省福州市, 福建农林大学生命科学学院. Chenyuy521@126.com

电话: 0591-87694239

收稿日期: 2006-03-30 接受日期: 2006-05-22

摘要

由于RNAi具有特异性的抑制甚至关闭相关序列基因表达的特点, 已应用于重大传染病治疗、肿瘤治疗、基因功能研究和新基因的发现等领域. 现对近年来有关RNAi的机制、抗病毒应用及前景作一综述.

关键词: RNAi; 抗病毒

陈煜, 谢小芳. RNAi的作用机制及抗病毒研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2123-2129

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2123.asp>

0 引言

RNAi (RNA interference)是1995年康奈尔大学Guo博士试图阻断线虫基因表达时被意外发现的, 是指内源或外源双链RNA (double-stranded RNA, dsRNA)分子在基因转录水平上关闭相应序列基因转录所致的细胞内有效、特异性的基因封闭. 其主要借助转录后加工特异性抑制目标mRNA的生成, 并导致相应蛋白合成的减少甚至停止. 1998年Fire将这一发现正式命名为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS). 他广泛存在于生物界, 是生物体抵御病毒或其他外来核酸入侵而保持自身遗传稳定的保护性机制. 目前已在果蝇、真菌、昆虫、植物以及哺乳动物中均发现了RNAi现象, 由于其高效率、高特异性等特点, 一些科学家已将其以基因治疗的方式应用于一些重大传染病的治疗, 如HIV和HBV. 同时, 由于RNAi具有基因敲除的功能, 所以作为反向遗传学的工具已被广泛应用于基因功能的研究和新基因的发现. 现就其作用机制、抗病毒研究及应用前景和存在的问题进行综述.

1 RNAi的机制

1.1 RNAi的起始阶段 RNAi的一般机制是内源性或外源性dsRNA被切割成21-23 nt长度的小干扰RNA (small interference RNA, siRNA), 该过程由Dicer完成, Dicer是RNaseIII的成员之一. Brantl^[1]报道Dicer有以下结构域: 1个与Argonaute家族同源的PAZ结构域, 2个RNAase活性结构域, 1个dsRNA结合结构域, 1个DEAH/DCXH RNA解旋酶活性结构域. Dicer的处理结果是形成siRNA的复合物, 该复合物5'端磷酸化和3'羧基末端具有2-3个游离核苷酸. Chiu *et al*^[2]对siRNA的2'端的化学修饰研究表明, RNAi的过程并不需要2'羟基对siRNA的识别, 通过2'氟尿嘧啶和2'氟胞嘧啶的应用, 明显增加了siRNA的半衰期, 并延长了RNAi的作用. 利用该方法对人周期蛋白T1进行了研究, 发现在很长一段时间内能有效沉默内源性人类基因.

1.2 RNAi持续阶段或放大阶段 随后, 这些siRNA被RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)识别, 现有研究表明, RISC包含有Argonaute蛋白家族的多个成员, 可能有转运siRNA到RISC上的功能, Hannon *et al*在果蝇S2细胞的提取物中也检测到Dicer与Argonaute的相互作用. siRNA与RISC结合后, RISC被活化, 大小为100 kDa, 活化的RISC复合物通过ATP依赖的过程促进siRNA的解旋, 解旋酶包括QDE-3, MUT-6, MUT-14. Chiu *et al*^[2]研究表明, siRNA结构的5'端的完整性对于RNAi非常重要, 而不是其3'端, 这表明siRNA对解旋起始的识别具有不对称的性质. 解旋的反义链指引活化的RISC到互补的mRNA并与之结合, 然后siRNA与mRNA换位, 再由RISC将靶mRNA切割成21-23 nt片段, 这些片段由于缺少PolyA尾巴及特定的头部而很易被降解, 导致翻译受阻, 产生转录后基因沉默(PTGS). 换位后的siRNA可继续充当起始诱导物, 重复参与PTGS过程, 产生级联放大效应, 同时siRNA可在(RNA依赖的RNA聚合酶)RdRp作用下大量扩增, 并且转运出细胞,

■背景资料

康奈尔大学Guo博士于1995年发现RNAi. 随后一些研究人员证实, 在果蝇、真菌、昆虫、植物等生物及哺乳动物细胞中也存在RNAi现象. 本文综述了自2000年以来该现象的研究机制以及应用于爱滋病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、流感病毒以及其他病毒病的治疗的最新进展.

■ 研发前沿

在RNAi机制方面,由于RNAi应用于动物病毒病的治疗上存在siRNA半衰期短的问题,因此对siRNA的2'羟基的化学修饰研究、siRNA的结构以及反义链与目标mRNA复合物的双螺旋结构进行了深入的研究。在应用方面,研发出了不同的可表达siRNA的载体以及制作方法,同时对使用不同启动子的载体对细胞的特异性也进行了比较。在抗病毒方面,HIV受到了很大的关注,针对病毒复制的各个时期采用了不同的策略,取得一定的效果。在其他病毒病的治疗中,RNAi也显示出其美好的前景。

扩散至整个机体。siRNA还可作为一种特殊的引物,利用RdRp,以靶mRNA为模板,合成新的dsRNA,后者又被RISC降解成为新的siRNA,新合成的siRNA又进入上述循环,这一过程被称为随机降解PCR反应(random degradative PCR)^[3]。

1.3 RNAi的效应阶段 目标mRNA被活化的RISC在单一位点切割。此过程要求反义链的5'端的磷酸化必须发生,同时反义链与目标mRNA复合物的双螺旋必须是A型^[4]。DNA-RNA杂合子不能诱导RNAi,其失败的主要原因是双螺旋的结构,A型双螺旋是决定RNAi的决定因素。Cummins *et al*^[5]基于循环二色性色谱的分析表明,DNA-RNA杂合子是介于A型双螺旋与B型双螺旋之间的一种结构。RISC的核酸部分起靶向性作用,蛋白质部分起降解mRNA的作用,使得靶基因发生转录后沉默。

1.4 哺乳动物细胞中的RNAi 哺乳动物RNAi与其他真核生物RNAi之间一个明显的区别是哺乳动物细胞中对于RNAi的长期持续存在缺少放大系统。例如,果蝇中,大约35个dsRNA可使1000个拷贝的目标mRNA沉默并且可持续存在几个世代^[6-7]。而在哺乳动物细胞中,RNAi平均只存在66 h,因为siRNA经过几代细胞分裂而被稀释^[4]。在苍蝇和其他低等真核生物中的放大现象可归于3方面的原因:(1)是由Dicer切割dsRNA成较小的siRNA的过程增加了放大的程度,然而在哺乳动物细胞中,长的起引发作用的dsRNA会激发干扰素应答,其可激活蛋白激酶PKR^[8]。这就表明,除非siRNA转染在哺乳动物细胞中没有引起其他副作用并成功引发RNAi,否则想通过对长的dsRNA的切割处理而实现放大现象将不会发生;(2)是RdRp的存在,RdRp已在植物、蠕虫和真菌中发现。RdRp是扩增目标mRNA的基本条件,他通过一个随机降解PCR的模式^[9-11],把目标mRNA扩增成dsRNA。然而,在哺乳动物细胞中还没有发现RdRp的同源物,而且RdRp依赖的降解PCR所需的3'羟基并不是哺乳动物RNAi所必须的^[12-13]。所以基于PCR的放大效应在哺乳动物细胞中不太可能发生;(3)或许是,在靶向及切割mRNA过程中,RISC的酶的转化率较高,导致RNAi效率降低。

在哺乳动物细胞中存在两种竞争dsRNA的途径:大于30 nt的长双链RNA可激活两种酶,一种为无活性蛋白激酶,激活后使翻译起始因子eIF2a磷酸化;另一种为无活性2',5'-寡腺苷酸合成酶,激活后使RNaseL激活,两者的特点是特异

性不强,可降解所有mRNA及抑制所有蛋白质合成,从而引起细胞死亡,所以目前应用于哺乳动物细胞的dsRNA的长度一般在21 nt左右。同时科学家们还发现了RNA介导的同源DNA甲基化(RdDM)现象,即在RNAi的PTGS机制中产生了引导同源mRNA降解的siRNA,与此引导RNA序列互补的短至30 nt的DNA序列可被甲基化,位点是DNA序列中的胞嘧啶,如甲基化发生于编码区,则转录正常进行,产生PTGS;若发生于启动子区则阻断转录而发生转录水平基因沉默(transcriptional gene silence, TGS)^[14]。

1.5 植物中的RNAi 转基因引发的基因沉默还可发生在转录阶段,称为转录阶段基因沉默。TGS与PTGS不同,TGS是不传递的,没有级联放大效应。Wassenegger *et al*^[15]首先表明在植物中,RNA介导的沉默结果经常是DNA的甲基化;同时Mette *et al*^[16]以拟南芥和烟草为研究对象也证明dsRNA是转录沉默和DNA甲基化的主要原因;Allshire^[17]通过对转基因植物的研究发现,基因沉默也可以发生在转录水平。TGS的原因可能是基因启动子的甲基化导致RNA合成减少;或是DNA异位配对的结果;或是dsRNA诱导的转基因启动子灭活的结果。siRNA在细胞核内与一种甲基化酶相互作用,引导同源的DNA序列甲基化^[18],产生TGS。除了siRNA,Llave *et al*^[19]和Doench *et al*^[20]报道还存在一些其他的沉默信号,如:Micro-RNAs(miRNAs)。Ahlquist^[21]报道在植物体内,RNAi还可以通过PTGS的干扰物实现,如P25(一种马铃薯病毒)运动蛋白可诱导马铃薯体内的基因沉默。植物转录水平的沉默中包括以下几个保守的原件:Argonaute4(ago4),Dicer样3(Dicer-like 3)和RNA依赖的RNA聚合酶2(RNA dependent RNA polymerase 2, RDRP2)^[22-24]。

2 siRNA的来源

2.1 化学合成 直接通过化学方法合成两条互补的21-23 nt RNA单链,然后退火形成双链siRNA。这是最早应用的方法,不过该方法成本较高。

2.2 体外转录合成 通过T7 RNA聚合酶,体外转录合成两条互补的21-23 nt RNA单链,然后退火形成双链siRNA。该方法适用于筛选最有效的siRNA,尤其是需要制备多个siRNA而化学合成的成本较高时,但该方法不适用于特定siRNA进行长期研究。

2.3 用RNase III消化长片段dsRNA 用体外转录的方法制备200-1000 bp的dsRNA,然后用RNase III

(或Dicer)在体外消化, 得到各种不同的siRNA的混合物. 该方法省时、省力, 但缺点是有可能导致非特异性的基因沉默, 特别是与之同源或密切相关的基因.

2.4 利用质粒或病毒载体表达siRNA 通过转染含有RNA聚合酶II启动子U6或H1, 及其下游一小段特殊结构的质粒或病毒载体到宿主细胞体内, 转录出短发夹RNA (short hairpin RNA, shRNA), 有的学者在表达载体的同一启动子下加入报告基因, 如绿色荧光蛋白基因^[25], 使表达产物的检测更趋于简单化. 转录出的shRNA在胞内被Dicer酶剪切成siRNA. 该方法的优点是细胞特异性强. 也有使用聚合酶III的启动子的, 包括U6, H1和tRNA启动子, 但这些启动子的弊端是特异性不高, 可导致非靶序列的沉默和非特异性结果, 例如干扰素的应答和细胞毒性反应^[26-27].

2.5 PCR方法 利用引物延伸法进行PCR, 产生包含一个RNA聚合酶III启动子U6或H1、一小段编码shRNA的DNA模板和一个RNA聚合酶III终止位点的表达框架, 然后直接转染到细胞内表达shRNA. 其主要缺点是很难转染到细胞中^[28], 但一旦转染成功可建立稳定的细胞系.

3 RNAi抗病毒的研究

由于RNAi可以特异性地抑制基因表达, 所以可用于病毒感染的治疗及预防. 目前病毒病的治疗主要依赖于药物和干扰素, 但此两者随着时间的推移一些弊端就显露出来, 药物的长期应用产生了耐药性病毒株, 而且一种新药的开发需要几年、十几年甚至几十年的时间; 而干扰素是由细胞产生的一种非特异性的反应, RNAi的出现为抗病毒研究提供了新思路, 为病毒病的治疗带来了美好的前景.

3.1 防治HIV *Jacque et al*^[29]针对HIV-1复制的早期和晚期, 设计针对HIV-1基因组不同区域的siRNAs, 并转染人类细胞系、原始淋巴细胞及CD4⁺HeLa细胞, 结果证明RNAi能够降低HIV-1基因组的RNA. *Sijen et al*^[30]针对HIV-1共同受体CXCR4设计的siRNA可高效抑制细胞表面CXCR4蛋白的表达, 阻断HIV-1株对CXCR4-U87-C细胞的急性感染, 并抑制病毒复制. *Boden et al*^[31]建立了经修饰的、来源于tRNA甲硫氨酸(MTD)的启动子, 可靠、高效的驱动了HIV-1特异的siRNA于细胞内表达. MTD启动子被用于驱动针对HIV-1转移刺激因子蛋白tat的shRNA

时, 和其他几个聚合酶III启动子如H1, U6+1和U6+27比较起来对病毒产量产生高达56%的抑制. *Lee et al*^[32]将慢病毒载体应用于HIV-1的治疗, 研究对象为HIV-1的tat转录因子和细胞的CCR5. 该载体可稳定表达特异性的针对HIV-1 tat转录因子和细胞的共受体, CCR5的siRNA, 结果诱导了选择性地降解他们的目标mRNA, 从而免受HIV-1感染. 通过阻断特异性病毒基因表达和应用病毒载体来稳定表达合适的siRNA以阻断细胞基因的表达, 该策略可使细胞免受HIV-1的吸附而达到预防的目的. *Pusch et al*^[33]证明, shRNA的中部和5'端区域的突变对shRNA的RNAi的效果影响最大. *Boden et al*^[34]将编码靶向HIV-1转录激活因子蛋白-tat的siRNA合并到人miR-30的miRNA前体骨架中, 于细胞中表达tat. 结果被当作miRNA前体运输的tat的siRNA比被表达为传统的siRNA在降低HIV-1 p24抗原产生上的效率高80%, 暗示该策略能被用于增加RNAi的抗病毒潜力.

亲环素(CyPA)并不是细胞活力所需, 但他是HIV-1复制所必须的, 因此*Liu et al*^[35]试图阻断他的合成来抑制HIV-1的复制. 他们使用了可干扰CyPA mRNA前体的切割反义U7小核RNA(snRNA)和靶向CyPA mRNA的小干扰RNA(siRNA). 结果表明, 对CyPA蛋白有很强的抑制作用. 同时证明使用慢病毒载体作为转导方式可延长该抑制效果. *Dave et al*^[36]以HIV-1的gp41, nef, tat和rev基因为靶子, 设计了针对他们的siRNA, 结果表明他们的转录产物被切割, 同时病毒的组装受到很大的影响, 从整体上抑制了病毒的产生. *Arrighi et al*^[37]利用表达shRNA的慢病毒载体来研究未成熟的树突状细胞表达的树突状细胞特异性细胞间黏附分子3-结合非整合素因子(DC-SIGN)-DC209对于预防HIV-1的作用, 结果表明DC-SIGN受到了明显的抑制, 而且抑制了HIV-1的gp120包膜糖蛋白对DC-SIGN的吸附, 进一步证明了DC-SIGN在感染性病毒从DC到T细胞转移过程中的重要角色. *Leonard et al*^[38]建立了一个新的随机计算模型, 在HIV基因组水平上同时对多个位点进行打靶提供数量预测, 该模型要求导入系统必须是相当高效的以排除其他未感染病毒的细胞. *Anderson et al*^[39]用包含CXCR4和CCR5 shRNA表达盒的双特异性XHR慢病毒载体转化CD34⁺细胞, 该细胞培养在包含细胞因子的培养基中产生了形态上的正常转基因巨噬细胞. 在巨噬细胞中产生了对共受体的

下调, 体外攻毒试验表明对包含R5和X4的HIV-1产生了抗性. FACS分析显示, 转化的巨噬细胞具有正常的表面标志如CD14, CD4, MHCII和B7.1; 同时转基因巨噬细胞在LPS的刺激下, 可上调共刺激分子; IL-1和TNF- α 细胞因子对于LPS刺激也产生正常的应答. 因此, 转基因巨噬细胞在表型和功能上是正常的. 该方法对构建慢病毒载体以用于基因治疗进行了尝试, 该载体同时针对多个HIV-1感染的细胞分子的shRNA来抑制HIV-1的复制, 同时这些载体在干细胞中的应用使其在HIV/AIDS的治疗上显示出广阔的前景.

3.2 治疗HBV McCaffrey *et al*^[40]利用RNAi可抑制细胞培养中以及HBV质粒转染有免疫活性和免疫缺陷小鼠细胞中HBV复制中间体的产生, 有效抑制培养在肝细胞内的HBV的复制. Shlomai *et al*^[41]针对HBV的核心抗原开放阅读框和X蛋白开放阅读框设计了两个siRNA片段, 有效地抑制了Huh-7细胞系中HBV的复制. Uprichard *et al*^[42]通过重组腺病毒得到了乙肝转基因鼠, 其肝细胞中可表达乙肝特异性的siRNA, 而且可抑制事先存在的HBV基因的表达和复制, 甚至可以达到26 d内检测不到病毒的水平. 这些结果表明有效的导入的siRNA应该可以沉默慢性感染的乙肝患者体内的HBV.

3.3 治疗丙肝病毒(HCV) Kapadia *et al*^[14]利用RNAi技术, 对HCV进行研究, 用针对HCV的2个RNAi与表达HCV的质粒共转染人的肝癌细胞株Huh-7细胞, 2 d后, Northern杂交检测HCV的RNA含量降低, 证明HCV特异的siRNA抑制了病毒的复制. 5'非翻译区是病毒巨蛋白翻译进入核糖体的位点, 而且, 5'UTR是丙肝病毒基因组最保守的区域, 这使他成为siRNA的理想靶位点. Yokota *et al*^[43]设计了针对HCV基因组的5'非翻译区的siRNA, 只用了2.5 nmol/L浓度的siRNA抑制大约80% HCV的复制. Wilson *et al*^[44]针对HCV基因组设计了双链siRNA被通过电穿孔法倒入人的肝细胞系Huh-7, 两个siRNA非常明显的降低了病毒特异的蛋白的表达, 而且RNA的合成比未经siRNA处理的细胞下降了90%. 这些siRNA还能够保护天然的Huh-7细胞免受HCV复制子RNA的攻击. 合成的siRNA对细胞的处理后, 其效果可维持大于72 h, RNAi持续的时间可超过3 wk, 其方法是用双顺反子表达载体稳定表达相关RNA的互补链.

3.4 治疗流感病毒 Ge *et al*^[45]根据流感病毒基因组保守区序列设计了siRNA, 有效的抑制流感

病毒在细胞和鸡胚中的产生. 同时发现针对病毒核衣壳(NP)或RNA转录酶(PA)成分的siRNA不仅使相应的mRNA的组装, 而且使病毒RNA和他的互补链的组装失败. 这些siRNA同时很广泛的抑制了其他病毒RNA, 而不是细胞RNA的组装. 这些发现揭示出新合成的NP和PA蛋白对于流感病毒的转录和复制是必须的, 而且这些结果为预防及治疗人流感病毒的siRNA的建立打下了基础. Ge *et al*^[46]针对流感病毒基因保守区设计了siRNA用于研究对鼠流感病毒的预防及治疗作用. 应用小剂量的包含siRNA的聚阳离子载体混合物的方式转染老鼠, 结果表明感染鼠肺中病毒的产生在病毒感染前和感染后均被siRNA所降低, 为人流感病毒的治疗提供了理论依据. 同时指出开发符合人使用的导入系统在预防和治疗人流感病毒方面具有潜在应用价值. Tompkins *et al*^[47]针对A型流感病毒核蛋白或酸性聚合酶高度保守区设计了siRNA, 治疗抑制了A型流感病毒在体内的复制. 这些siRNA的导入明显降低了感染鼠肺中的病毒滴度而且保护了鼠免于致死性的攻毒, 同时证明这种保护是特异性的, 而不是由抗病毒干扰素应答所介导的.

3.5 治疗其他病毒病 Yuan *et al*^[48]为了研究RNAi是否能够保护柯萨奇病毒B3 (CVB3)的感染, 通过使用针对病毒基因组不同区域的5个CVB3特异的siRNA, 分析了RNAi对生长于HeLa细胞和鼠心肌细胞中的病毒的抑制作用. 最有效的是siRNA-4, 其针对病毒蛋白酶2A, 得到了对病毒复制92%的抑制. 该RNAi的特异性可持续48 h, 并且细胞活力分析实验显示90%由siRNA-4预处理的细胞仍然存活, 并在感染后48 h未能检测到病毒的存在. 而且, 在病毒感染后siRNA的应用可同样有效地抑制病毒的复制, 暗示他的治疗潜力. 通过组合, 进一步的分析发现, siRNA-4和其他4个候选物共同转染并不能提高抑制作用. siRNA作用机制的突变分析中, 发现siRNA通过靶向病毒的正义链而发挥作用, 并且需要与靶区域序列有较好的匹配, 同时发现反义链的3'端附近的错配比5'端的错配对其功能的发挥容忍性更高. Radhakrishnan *et al*^[49]根据人多瘤病毒JCV, 设计了针对靶向人星形胶质细胞中T抗原的表达和未知蛋白的siRNA, 两者的联合应用导致了病毒衣壳蛋白的合成完全停止, 暗示了siRNA高效抑制感染细胞中病毒复制的能力. 刘惠莉 *et al*^[50]针对鸡传染性支气管炎病毒的Pol, M, N基因筛选到12个siRNA, Vero细胞和

鸡胚的攻毒试验结果显示, 其中2个siRNA具有干扰作用, 并对siRNA有剂量依赖性. Chen *et al*^[51]针对口蹄疫病毒的VP1基因而设计了siRNA在BHK-21细胞和乳鼠中研究了VP1特异的siRNA对于口蹄疫病毒复制的抑制作用, 结果表明表达siRNA的质粒的转染对存在于BHK-21中的口蹄疫病毒的VP1基因产生了80%-90%的抑制作用. 而且, 用表达siRNA的质粒瞬时转染的BHK-21细胞当用100倍的50%病毒感染量的组织毒攻毒时, 发现对口蹄疫病毒有特异性的抵抗力, 而且抵抗力延长到感染后48 h. 同时, 用表达siRNA的质粒进行皮肤注射时, 乳鼠对口蹄疫病毒失去了易感性. Sanchez *et al*^[52]针对病毒L聚合酶和Z mRNAs所设计siRNA抑制了培养细胞中的沙粒病毒(LCMV), 结果分析显示, 针对LCMV的以RNAi为基础的治疗效果高度依赖于转导效应siRNA的方法. 认为化学合成的siRNA的转导在预防病毒增殖上是无效的. 相反, 应用复制缺陷型重组腺病毒表达系统在细胞内产生的针对病毒L和Z基因产物的siRNA非常高效的抑制了LCMV的增殖.

3.6 应用前景 RNAi从发现至今, 一直都是生物领域内的一大热点, 这是因为RNAi本身的保守性, 存在于各种生物中, 是机体维持自身核酸稳定的一种机制. 目前对于基因病、病毒性传染病和肿瘤的RNAi研究取得了令人满意的结果. RNAi作为一个工具, 他的应用范围可以从单细胞的原生动物一直扩展到人. 目前RNAi在线虫、果蝇以及植物等模式生物中的应用取得了许多成果, 特别是在基因功能的研究方面. 在哺乳动物中的研究和应用也取得不少进展. RNAi在疾病治疗中的应用前景是研究者以及大众热切关注的焦点, 利用RNAi有望在近几年内对AIDS, 乙肝等人类重大传染病的治疗实现突破性的进展. 在RNAi技术大规模临床使用之前, 还有以下问题亟待解决: (1)siRNA效应具有高度特异性, 1 bp的变化可大大降低siRNA的效力, 因此, 其对病毒的突变很敏感. 针对易变异的病毒, 如HIV, 可以设计一系列的预防病毒变异的siRNAs. 同时有些病毒RNA序列对siRNA不是很敏感, 可能原因是RNA的二级结构或高度折叠而影响RISC的识别; (2)siRNA导入细胞内的方式效率低. 转染对细胞系虽然有作用, 但对原代细胞的作用还不够满意. 电穿孔可引起大量细胞死亡(超过50%)^[44], 所以RNAi技术要想在实际的临床应用中获得成功, 给药的方式还有

待于进一步研究. 目前慢病毒载体在临床应用中被看好的一种途径. 另外, 一种非编码调节RNA, 可以用于转导抗病毒的RNAi^[34]; (3)siRNA的稳定问题. 为避免siRNA的降解, 导入病毒载体内的编码shRNA的DNA序列是一条有效的途径. 另外, Chiu *et al*^[4]通过2'氟尿嘧啶和2'氟胞嘧啶的应用, 明显增加了siRNA的半衰期, 并延长了RNAi的作用. 最近Arziman *et al*^[53]构建了网络平台, 可以对所要运用的dsRNA进行更优化的设计和评估. 新近发现病毒的某些蛋白可抑制RNAi介导的抗病毒防御机制. 从植物和动物病毒中都分离出RNAi抑制蛋白. 很多RNA病毒都编码dsRNA结合蛋白(dsRNA-binding protein, dsRBP), 在细胞内可灭活RNAi介导的宿主防御机制, 这些因素都为RNAi技术的应用造成了障碍.

总之, RNAi作为偶然发现的一种生物体的自然现象, 发现者本身可能并没有预料到其应用前景及潜在的价值, 但随着众多的研究人员的加入, 一个具有划时代意义的技术将有望使人类摆脱疾病的困扰.

4 参考文献

- 1 Brantl S. Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1575: 15-25
- 2 Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA* 2003; 9: 1034-1048
- 3 Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001; 107: 309-321
- 4 Chiu YL, Rana TM. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell* 2002; 10: 549-561
- 5 Cummins LL, Owens SR, Risen LM, Lesnik EA, Freier SM, McGee D, Guinosso CJ, Cook PD. Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 2019-2024
- 6 Kennerdell JR, Carthew RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 1998; 95: 1017-1026
- 7 Zamore PD. RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol* 2001; 8: 746-750
- 8 Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 227-264
- 9 Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 2001; 107: 297-307
- 10 Nishikura K. A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell* 2001; 107: 415-418
- 11 Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish

- S, Timmons L, Plasterk RH, Fire A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 2001; 107: 465-476
- 12 Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. *Mol Cell* 2002; 10: 537-548
- 13 Stein P, Svoboda P, Anger M, Schultz RM. RNAi: mammalian oocytes do it without RNA-dependent RNA polymerase. *RNA* 2003; 9: 187-192
- 14 Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2014-2018
- 15 Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 1994; 76: 567-576
- 16 Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 2000; 19: 5194-5201
- 17 Allshire R. Molecular biology. RNAi and heterochromatin—a hushed-up affair. *Science* 2002; 297: 1818-1819
- 18 Zamore PD. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* 2002; 296: 1265-1269
- 19 Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 2002; 297: 2053-2056
- 20 Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 438-442
- 21 Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 2002; 296: 1270-1273
- 22 Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 2003; 299: 716-719
- 23 Chan SW, Zilberman D, Xie Z, Johansen LK, Carrington JC, Jacobsen SE. RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science* 2004; 303: 1336
- 24 Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2004; 2: E104
- 25 Zhou H, Xia XG, Xu Z. An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e62
- 26 Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 2003; 34: 263-264
- 27 Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 635-637
- 28 Sui G, Soohoo C, Affar el 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
- 29 Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002; 418: 435-438
- 30 Sijen T, Vijn I, Rebocho A, van Blokland R, Roelofs D, Mol JN, Kooter JM. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr Biol* 2001; 11: 436-440
- 31 Boden D, Pusch O, Lee F, Tucker L, Shank PR, Ramratnam B. Promoter choice affects the potency of HIV-1 specific RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 5033-5038
- 32 Lee MT, Coburn GA, McClure MO, Cullen BR. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages by using Tat- or CCR5-specific small interfering RNAs expressed from a lentivirus vector. *J Virol* 2003; 77: 11964-11972
- 33 Pusch O, Boden D, Silbermann R, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. Nucleotide sequence homology requirements of HIV-1-specific short hairpin RNA. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 6444-6449
- 34 Boden D, Pusch O, Silbermann R, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 1154-1158
- 35 Liu S, Asparuhova M, Brondani V, Ziekau I, Klimkait T, Schumperli D. Inhibition of HIV-1 multiplication by antisense U7 snRNAs and siRNAs targeting cyclophilin A. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 3752-3759
- 36 Dave RS, Pomerantz RJ. Antiviral effects of human immunodeficiency virus type 1-specific small interfering RNAs against targets conserved in select neurotropic viral strains. *J Virol* 2004; 78: 13687-13696
- 37 Arrighi JF, Pion M, Wiznerowicz M, Geijtenbeek TB, Garcia E, Abraham S, Leuba F, Dutoit V, Ducrey-Rundquist O, van Kooyk Y, Trono D, Piguet V. Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells. *J Virol* 2004; 78: 10848-10855
- 38 Leonard JN, Schaffer DV. Computational design of antiviral RNA interference strategies that resist human immunodeficiency virus escape. *J Virol* 2005; 79: 1645-1654
- 39 Anderson J, Akkina R. CXCR4 and CCR5 shRNA transgenic CD34+ cell derived macrophages are functionally normal and resist HIV-1 infection. *Retrovirology* 2005; 2: 53
- 40 McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 639-644
- 41 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003; 37: 764-770
- 42 Uprichard SL, Boyd B, Althage A, Chisari FV. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 773-778
- 43 Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, Yi L, Kurosaki M, Taira K, Watanabe M, Mizusawa H. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 2003; 4: 602-608
- 44 Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatino S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, Sarangi F, Harris-Brandts M, Beaulieu S, Richardson CD. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:

- 2783-2788
- 45 Ge Q, McManus MT, Nguyen T, Shen CH, Sharp PA, Eisen HN, Chen J. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2718-2723
- 46 Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8676-8681
- 47 Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM, Epstein SL. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8682-8686
- 48 Yuan J, Cheung PK, Zhang HM, Chau D, Yang D. Inhibition of coxsackievirus B3 replication by small interfering RNAs requires perfect sequence match in the central region of the viral positive strand. *J Virol* 2005; 79: 2151-2159
- 49 Radhakrishnan S, Gordon J, Del Valle L, Cui J, Khalili K. Intracellular approach for blocking JC virus gene expression by using RNA interference during viral infection. *J Virol* 2004; 78: 7264-7269
- 50 刘惠莉, 陆承平, 朱伟云. 鸡传染性支气管炎病毒的RNA干扰. *中国病毒学* 2005; 20: 272-276
- 51 Chen W, Yan W, Du Q, Fei L, Liu M, Ni Z, Sheng Z, Zheng Z. RNA interference targeting VP1 inhibits foot-and-mouth disease virus replication in BHK-21 cells and suckling mice. *J Virol* 2004; 78: 6900-6907
- 52 Sanchez AB, Perez M, Cornu T, de la Torre JC. RNA interference-mediated virus clearance from cells both acutely and chronically infected with the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 2005; 79: 11071-11081
- 53 Arziman Z, Horn T, Boutros M. E-RNAi: a web application to design optimized RNAi constructs. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: W582-588

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

本刊讯 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》,荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》,俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

本刊主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号ISSN 1009-3079,国内统一刊号CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期8, 18, 28日,月价72.00,年价864元. 欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅. 联系地址: 100023 北京市2345信箱,世界胃肠病学杂志社. 联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wjcd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.