

RNA 干扰技术在哺乳动物中的应用

邱 爽, 罗建红

(浙江大学医学院, 浙江 杭州 310006)

[摘 要] RNA 干扰技术已被广泛应用于线虫、植物和果蝇的基因功能分析中。随着 Dicer 酶和 siRNAs 的发现, 人们已经能够利用人工合成的 siRNAs, 或转染 siRNAs 的表达载体来诱发哺乳动物细胞特定基因的抑制以及将上述方法应用于整体实验中, 证明整体哺乳动物也存在 RNA 干扰现象。

[关键词] RNA 干扰; 哺乳动物; siRNAs; dsRNA; miRNA

[中图分类号] Q 522 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2004)02-0180-04

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指双链 RNA(dsRNA)诱导同源 mRNA 降解, 在转录后水平导致基因静默的过程。其过程至少包括两个阶段, 首先由 RNase III 样的 Dicer 酶将 dsRNA 加工成小干扰 RNA (small interfering RNAs, siRNAs), 随之 siRNAs 识别 RNA 诱导的静默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)并与之结合, 降解底物 mRNA^[1]。siRNAs 是由约 19~25 个碱基对(base pair, bp)构成的双链结构, 其 5'端磷酸化, 3'端有 2 个核苷酸的突出。RNA 干扰现象最初在线虫中发现, 随后作为基因功能分析的一种有效手段应用到真菌、植物和果蝇中。然而, 对于哺乳动物, RNA 干扰技术的应用受到很大的限制。这是因为大于 30 个核苷酸的 dsRNA 可以引起细胞非特异性的基因表达抑制, 甚至诱发细胞凋亡^[2]。近一年来, 随着对 RNA 干扰过程的进一步了解, 以及能介导同源 RNA 降解的 siRNAs 的发现, 人们已经能够利用合成的 siRNAs 或载体表达的 siRNAs 诱导哺乳动物细胞特定的基因静默。最近, 又有报道 RNA 干扰技术已经成功应用到整体哺乳动物中, 可以预期这项技术在哺乳动物基因功能研究和疾病的基因治疗中将具有重要的应用前景。

1 RNA 干扰在体外实验中的应用

1.1 dsRNA 众所周知, 大于 30 bp 的 dsRNA 会引起大多数哺乳动物细胞(如 HeLa、

HEK293、CHO、NIH3T3 等)基因表达的非特异性抑制^[2]。一是 dsRNA 可以激活 dsRNA 依赖性蛋白激酶(dsRNA-dependent protein kinase, PKR), 引起蛋白合成普遍抑制和细胞凋亡; 二是 dsRNA 还可以激活 2', 5'寡聚腺苷酸合成酶, 导致单链 RNA(ssRNA)被 RNase L 非特异地降解。因此, 虽然长链 dsRNA 已经成功地在果蝇、线虫中诱导 RNA 干扰, 但是在较高等生物中, 很难通过转染合成的长链 dsRNA 实现特异性基因静默。在少数胚胎和未分化哺乳动物细胞中能观察到长链 dsRNA 诱导的特异性基因静默, 目前推测这可能与这些细胞缺乏相关的 PKR 有关^[3]。然而, 最近有研究发现, 用表达长链 dsRNA 的载体转染非胚胎期哺乳动物细胞可以产生特异和稳定的基因静默^[4], 作用可以持续几个星期, 而且不会引起 PKR 介导的非特异性抑制反应。载体在体内表达的 dsRNA 经 Dicer 酶加工成更多的 siRNAs, 从而作用于多个靶位, 产生更有效的基因静默, 而且还可以减缓因点突变导致的 RNA 干扰抵抗, 这一点对于将 RNA 干扰技术应用于抗病毒和治疗肿瘤是非常重要的。

1.2 siRNAs 随着对 RNA 干扰发生机制的研究, 人们发现体外合成的 siRNAs(大约 21

收稿日期: 2003-03-27 修回日期: 2003-05-26

作者简介: 邱 爽(1976—), 女, 硕士研究生, 从事神经生物学研究。

通讯作者: 罗建红(1958—), 男, 教授, 博导, 主要从事神经生物学的研究和教学工作; E-mail: luojianhong@zju.edu.cn

个核苷酸)也可以应用到哺乳动物细胞中产生特定基因的抑制作用,而不会激活非特异的应激反应。实验表明,可以通过体外合成的 siRNAs 抑制哺乳动物体细胞和胚胎细胞(如 HeLe、HEK293、P19 等)的许多特定基因^[5,6]。神经元比别的细胞类型难以产生 RNA 干扰,这可能与神经元的 RNA 跨膜运输和胞内 RNA 干扰产生的通路有别于其他细胞有关。但是最近有报道指出,应用阳离子 TransMessenger 转染试剂可将合成的 siRNAs 导入皮层和海马神经元中并能特异性抑制相关基因的表达^[7]。目前看来,体外合成的 siRNAs 最大问题是作用时间短暂,在人类细胞更是如此,原因可能是合成的寡核苷酸不够稳定,也可能是因为哺乳动物不像线虫或果蝇那样具有基因静默的放大机制。

为了克服体外合成的 siRNAs 基因抑制作用时间短和效率低的弱点,研究者采用 RNA 聚合酶 III 的启动子(如 U6 或 H1)来构建载体和表达 siRNAs^[8,9]。RNA 聚合酶 III 多转录小的、非编码区的 RNA,并且不进行 5'端加帽和 3'端加尾的加工过程,而且它还能识别特定核苷酸转录起始点,遇到 4~5 个连续的胸腺嘧啶时则终止转录,因此它所指导合成的 RNA 其 3'末端有 1~4 个尿嘧啶,这个结构与 Dicer 酶剪切形成的 siRNAs 是相类似的。表达 siRNAs 的载体有 2 种不同设计, RNA 聚合酶 III 启动子位于转录成分的上游(图 1)。其中之一有 2 个启动子,分别指导合成 siRNAs 的正义链和反义链,转录产物在细胞核内形成双链结构^[8];另一种是只有 1 个启动子,指导合成被不同长度核苷酸链间隔开的反向重复序列,因此转录产物可形成发夹样结构^[9],包括 19~29nt 的茎部,中间由 3~9nt 连接, 3'末端有 1~4 个尿嘧啶。这种结构可被 Dicer 酶加工,产生 siRNAs,并激活 RNAi。目前表达 siRNAs 的载体已经广泛应用到多种哺乳动物细胞中,包括 HeLa3、293/EcR 以及小脑颗粒神经元细胞等等。

不论是合成的 siRNAs 还是载体表达的 siRNAs,其作用效率都受到靶位点在 mRNA 上定位的影响,因此合理设计 siRNAs 的序列非常关键。现在的 siRNAs 序列大多凭经验设

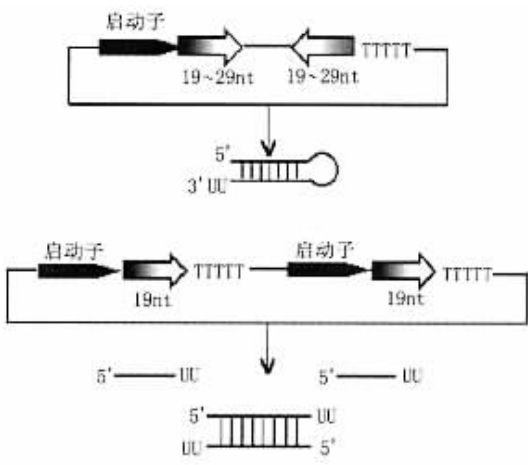


图 1 两种表达 siRNA 的载体
Fig. 1 Two different vectors expressing siRNA

计,有人选择翻译起始位点 100~200 个碱基之后的编码序列,也有选择 3'端 UTR^[10],一般认为首先要避开高度保守的区域,如催化区、配体结合区等等。最近有研究提示利用实验的方法来选靶位点的可能性^[8],即利用与靶 RNA 分子不同部位互补的寡核苷酸链当作探针,在细胞提取液中与靶序列杂交形成双链后,靶序列对 RNase H 的敏感性增加,但是敏感程度不一。这样,就可以利用 RNase H 对不同探针杂合链的敏感性来选择反应的靶位点,并预测 siRNA 的作用效率。

1.3 miRNA 最近又发现一类大约 22 nt 的微小 RNA (microRNA, miRNA),属于非编码 RNA,它们并不是广泛存在和表达,而是在特定的时间、特定的组织中出现,对发育的时程控制非常重要。目前在动物中已经发现了 100 多种 miRNA,其中最典型的是线虫中的 let-7 和 lin-4^[11,12]。miRNA 的前体是具有 70 nt 左右的发夹样结构,在 Dicer 酶的作用下剪切为 22 nt 大小的单链结构。与 siRNA 不同的是,miRNA 与其作用的靶 mRNA 只有部分序列是互补的,因此配对后只在翻译水平上抑制基因的表达,而不能引起 mRNA 的降解^[9](图 2)。但是,最近有研究表明 let-7 可以进入 RNA 干扰途径,诱导与之完全互补的人工合成的靶 RNA 降解。在上述研究的基础上,又构建了表达 miRNA 的载体,其表达产物与 siRNA 功能相同,都可以介导序列完全互补的靶 RNA 的降

解^[13]。与由 U6 或 H1 启动子合成的小的发夹样 RNA 不同,这种载体在细胞内首先合成约 70 nt 的发夹样前体,其茎部含有与靶基因完全互补的序列,因此经加工后形成的 miRNA 可以像 siRNAs 一样诱导靶 RNA 的降解。

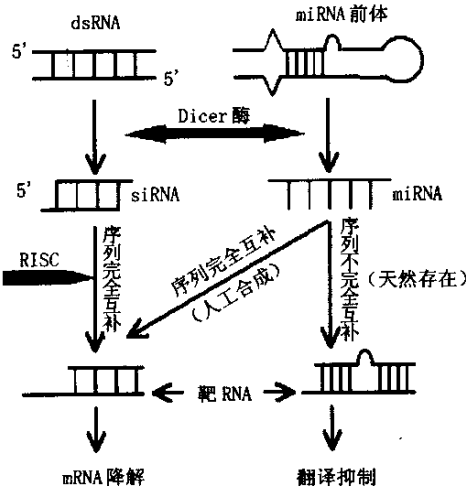


图 2 siRNA、天然 miRNA、合成 miRNA 的作用途径
Fig. 2 Pathways of siRNA, natural miRNA, and artificial miRNA

2 RNA 干扰在体内实验中的应用

在植物和蠕虫中,局部给予 dsRNA、注射 dsRNA 或用逆转录病毒和质粒载体表达 dsRNA,都能引起系统性的抑制反应(systemic suppression),甚至可以遗传至 F1 代^[14]。对于哺乳动物,整体动物实验一直是空白,直到最近才有报道利用水压动力转染的方法,将合成的 siRNAs 或表达 siRNAs 的载体注入大鼠的尾静脉,并观察大鼠基因的功能状况,从而证实可以应用这项技术在整体动物中抑制基因的表达^[15,16]。但同时也观察到,至少在肝脏细胞中, RNAi 是不能在细胞之间扩散的,这一点可能会成为 RNAi 技术用于疾病治疗的障碍。不过人们已经在线虫中发现一个新的基因位点——系统性 RNA 干扰缺陷基因(systemic RNA interference deficient, SID)^[17],这些基因编码的蛋白并不在基因静默的起始阶段起作用,而是对 RNA 干扰在蠕虫中的系统性扩散是必须的。更有意义的是,在大鼠和人类中都有 SID-1 同源基因,对于 SID-1 的进一步了解可能有助

于人们解决这个难题。

3 RNA 干扰技术是功能基因研究和基因治疗的有力工具

RNA 干扰最显著的特征就是高度序列特异性,如果在发夹样 siRNAs 中引入一个碱基位点的错配,就足以消除其 RNA 干扰作用^[18]。正是因为 RNA 干扰这种高度的序列特异性,使之可以用来选择性地抑制具有点突变、插入或缺失等突变基因的表达,因此, RNA 干扰技术不仅可以用来研究特定基因的功能,还可以进行基因治疗。

基因敲除技术是利用同源重组的原理破坏内源基因,造成基因功能缺失,从而在生物体内研究该基因的功能。但是这项技术的应用受到很大的限制,例如,必须获得与目的基因相关的基因组区域 DNA 序列和片段,生产基因敲除小鼠的周期长、胚胎致死率高,更重要的是这种技术不适宜应用于人类。相对而言, RNA 干扰技术周期短,操作方便,不用改变基因组就能使特定的功能表型缺失。随着人类及小鼠基因组序列的测定,完全可以通过 RNA 干扰技术抑制任何一个基因。目前采用的 siRNAs 表达载体还有一个优点就是启动子可以接受调控,例如四环素调节系统可以控制 U6 启动子的开放或关闭,从而能够对 siRNAs 介导的基因静默进行严格开关调控^[19]。

基因治疗已成为分子生物学最重要的应用领域之一。其中,反义 RNA 技术利用人工合成的反义 RNA 或能转录反义 RNA 的表达载体,实现对特异 mRNA 的阻断^[20];另外,利用三链 DNA 的构建同样也可以达到抑制基因表达的目的^[21]。但是它们在体内实验中的应用都受到基因转移技术的限制。siRNAs 除了与上述核酸分子一样具有特异性和靶向性外, siRNAs 是通过激活细胞内的正常过程,从而导致高度特异的 RNA 降解。而且,更重要的是,在一些 RNA 干扰研究模型中可以观察到基因静默作用在细胞之间的扩散。尽管目前还没在哺乳动物中观察到这种系统性扩散的现象,但是正如前文提到,已经在人类和大鼠中发现了与蠕虫 RNA 干扰作用系统性扩散相关基

因的同源基因^[17],这方面的研究必然会对 RNA 干扰技术在基因治疗中的应用产生巨大推动作用。

4 问题与展望

RNA 干扰已经成为在哺乳动物细胞中抑制特定基因表达的有力工具。但是,siRNAs 在哺乳动物细胞中介导基因静默是通过干扰 mRNA 的稳定性,还是在翻译或转录水平起作用,目前还不是很清楚,需要进一步阐明具体的分子机制。另外,为了更有效地应用 RNA 干扰技术,产生高效、稳定的基因抑制,需要进一步探索影响其效率的相关因素。例如,目前主要是凭借经验设计 siRNAs 的序列,因此有必要弄清是否有内在的规律可用来指导设计。可以预期随着上述问题的解决,以及 siRNAs 可诱导表达系统和各种病毒载体的开发和应用,RNA 干扰技术会更加成熟。因而,该技术在哺乳动物基因功能的研究,甚至人类疾病的治疗中也具有重要的应用前景。

References:

[1] BERNSTEIN E, CAUDY A A, HAMMOND S M, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference [J]. **Nature**, 2001, 409 (6818):363—366.

[2] STARK G R, KERR I M. How cells respond to interferons [J]. **Annu Rev Biochem**,1998,67(1):227—264.

[3] LI Y X, FARRELL M J, LIU R, et al. Double-stranded RNA injection produces null phenotypes in zebrafish [J]. **Dev Biol**, 2000, 217(2):394—405.

[4] PADDISON P J. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2002, 99(3):1443—1448.

[5] ELBASHIR S M, HARBORTH J, LENDECKEL W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. **Nature**, 2001,411(6836):494—498.

[6] CALPEN N J, PARRISH S, IMANI F, et al. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2001, 98(17):9742—9747.

[7] KRICHEVSKY A M, KOSIK K S. RNAi functions in cultured mammalian neurons [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2002,99(18):11926—11929.

[8] LEE N S, DOHJIMA T, BAUER G, et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells [J]. **Nat Biotechnol**, 2002,20 (5):500—504.

[9] AMBROS V. microRNAs: tiny regulators with great potential [J]. **Cell**, 2001,107(7):823—826.

[10] MCMANUS M T, PETERSEN C P, HAINES B B, et al. Gene silencing using micro-RNA designed hairpins [J]. **RNA**, 2002,8(6):842—850.

[11] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 [J]. **Cell**, 1993,75(5):843—854.

[12] REINHART B J, SLACK F J, BASSON M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans [J]. **Nature**, 2000, 403(6772):901—906.

[13] HUTVAGNER G, ZAMORE P D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex [J]. **Science**, 2002,297(5589):2056—2060.

[14] HANNON G J. RNA interference [J]. **Nature**,2002, 418(6894):244—251.

[15] MECAFFREY A P, MEUSE L, PHAM T T, et al. RNA interference in adult mice [J]. **Nature**, 2002,418 (6893):38—39.

[16] LEWIS D L, HAGSTROM J E, LOOMIS A G, et al. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice [J]. **Nat Genet**, 2002,32 (1):107—108.

[17] WINSTON W M, MOLODOWITCH C, HUNTER C P. Systemic RNAi in C. elegans requires the putative transmembrane protein SID-1 [J]. **Science**, 2002,295 (5564):2456—2459.

[18] BRUMMELKAMP T R, BERNARDS R, AGAMI R. A system for stable expression of short-interfering RNAs in mammalian cells [J]. **Science**, 2002, 296 (5567):550—553.

[19] OHKAWA J, TAIRA K. Control of the functional activity of an antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter [J]. **Hum Gene Ther**,2000, 11(4):577—585.

[20] DEAN N M. Functional genomics and target validation approaches using antisense oligonucleotide technology [J]. **Curr Opin Biotechnol**, 2001,12(6):622—625.

[21] CASEY B P, GLAZER P M. Gene targeting via triple-helix formation [J]. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, 2001,67:163—192.