

# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 11 月 15 日 第 11 卷 第 11 期 (Volume 11 Number 11)



**11/2003**

ISSN 1009-3079



9 771009 307001

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

World Journal of Gastroenterology 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports® Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录。2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532。世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录。2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920。

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2003 年 11 月 15 日 第 11 卷 第 11 期 (总第 115 期)

## 述 评

- 1661 创办具有中国特色的国际先进水平的 WJG: 2004 年由月刊改为半月刊 马连生, 潘伯荣, 马景云, 徐家祚, 应协中, 王先林, 陆汉明, 夏华向, 张建中, 苏勤, 任师颜, 朱立, 朱丽虹, 吕有勇  
1665 细胞分化与食管鳞状细胞癌 孔建平, 刘芝华, 吴昊  
1670 轮状病毒致病机制研究进展 王大燕, 王健伟, 于修平, 洪涛

## 肝 癌

- 1674 小鼠甲胎蛋白基因的克隆真核表达载体构建及表达鉴定 田耕, 马继林  
1677 原发性肝细胞癌中 PITG 和 c-myc 基因表达的研究 金中元, 程瑞雪, 郑长黎, 郑晖  
1682 肝细胞癌变过程中 cyclin D1 的异常表达与端粒酶活性的相关分析及意义 李宝杰, 王新红, 曲波  
1686 HCC 合并阻塞性黄疸 ERCP164 例 樊彪, 潘亚敏, 沈丽, 胡冰, 吴萍, 王书智, 周岱云

## 基础研究

- 1690 巨噬细胞 Smad4 反义基因转移及对细胞外基质合成的抑制作用 徐新保, 冷希圣, 何振平, 梁志清  
1694 冷冻保存再灌注期间离体肝组织内氧自由基及  $[Ca^{2+}]_i$  对 p38MAPK 激活的影响 王丽, 田伏洲, 汤礼军, 张晓璋  
1699 大黄素对大鼠结肠环行平滑肌细胞  $[Ca^{2+}]_i$  的影响 马涛, 齐清会, 简序, 费乃昕  
1703 大肠癌细胞可产生趋化因子 IP-10 杨春康, 陈道达, 田源, 张景辉  
1706 干扰素对野生型 p53 转染的结肠癌细胞株 SW480 的影响 张桂英, 徐美华, 谢兆霞, 何春梅  
1711 大鼠胃黏膜损伤修复时早期应答基因 c-Jun 及 c-met 的表达 姚永莉, 徐波, 宋子刚, 张万岱

## 临床研究

- 1715 功能性消化不良患者症状分型、胃排空功能、胃肠激素水平的相关性 唐虹卫, 黄裕新, 徐海峰, 高巍, 周润锁, 尚磊, 王庆莉, 高峰, 安晓丽  
1720 肝硬化患者血清和腹水 CA125 升高 肖文斌, 刘玉兰  
1723  $\alpha$ -2b 干扰素治疗慢性乙型肝炎的前瞻性研究 熊锦华, 胡大荣, 张成平, 范公愚, 刘勇, 闻炜

## 焦点论坛

- 1727 胃干细胞 王天德, 展玉涛  
1730 肠道干细胞 姜佳丽, 王虹, 展玉涛  
1732 胃肠道间质瘤干细胞 王虹, 展玉涛  
1735 肝性干细胞 展玉涛, 任继萍  
1738 肝脏干细胞 展玉涛, 毕泰山  
1740 胰腺干细胞 姜佳丽, 万小平, 张敏, 展玉涛

## 文献综述

- 1743 乙型肝炎病毒 e 抗原阴性慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗 董青, 成军  
1749 HGF/SF、c-met 基因信号异常与胃肠道恶性肿瘤 李宏武, 单吉贤  
1752 幽门螺杆菌对胃激素的影响 郭玉, 郭霞, 姚希贤  
1755 胃癌组织生长抑素及其受体的表达与 EGF、VEGF 的影响 李秋萍, 徐军全, 李红梅, 张利华  
1760 结、直肠癌临床病理分期系统及其临床意义 卿三华  
1764 铂佐剂机制及其纳米化前景 何萍, 吕凤林, 任建敏, 何凤慈  
1769 RNA 干扰的抗病毒效应 李中, 范学工  
1773 Peutz-Jeghers 综合征 赵喜荣, 康进春, 吕有勇  
1777 食管癌中的等位基因缺失 李洁, 刘芝华  
1782 溃疡性结肠炎发病机制及其研究进展 周琦, 林平, 潘慧, 梅林  
1787 蛋白酶激活受体-2 与胃肠道疾病的研究进展 朱雄伟, 王强, 温光保, 李兆申

## 研究快报

- 1793 轮状病毒胃肠炎与表皮生长因子关系初步研究 吴建春, 姚英民  
1794 尿毒症患者透析前后胃肌电活动的研究 武立群, 王虹, 顾清, 张悦, 李松扬  
1796 消炎痛和幽门螺杆菌在胃溃疡致病中的相互作用研究 迟晶, 赵金满, 于继红, 傅宝玉  
1797 原发性肝癌乙型肝炎病毒 mRNA 的表达及其意义 陈晓晓, 刘颖斌, 时开同, 彭淑娟, 彭承宏, 史留斌, 沈宏伟  
1800 MDM2 基因扩增和蛋白表达与胃癌相关性的研究 孙利平, 李岩, 张宁, 姜乃佳, 付伟, 薛一雷  
1802 HBsAg 疫苗对非溶细胞性和溶细胞性细胞免疫应答的影响 熊一力, 贾彦征, 施理, 张宜俊

## 研究快报

- 1804 P27kip1、CyclinE 和 CyclinA 在胃癌中的表达及意义 金顺花, 朴熙雄, 金海峰, 朴凤顺, 许强  
1807 血管紧张素 II 对大鼠 HSC 合成 PAI-I 的影响及 NO 的干预作用 张磊, 李定国, 尤汉宇, 刘清华, 宗喜华, 陆汉明

## 临床经验

- 1809 TTF1 在正常及损伤胃黏膜中的表达改变 任建林, 卢维正, 王琳, 陈建民, 施华芳, 叶震世, 吴艳环, 钟燕, 林进广, 林琛, 潘金水, 罗金燕  
1811 肝性脊髓病 8 例 王春平, 冯永毅, 苏淑慧, 李迎新, 彭晓君  
1812 直肠癌前哨淋巴结检测 102 例 魏寿江, 王树树, 赵国刚, 侯华芳  
1814 功能性消化不良患者胃排空障碍与胃肠激素的关系 何美蓉, 宋子刚, 何春容  
1816 上消化道流行病学研究 黄中平  
1818 胃液抗 Hp IgA 测定对 Hp 根除治疗效果的判断 谢勇, 吕农华, 黄德强, 陈江, 徐泽, 王崇文  
1820 原发性十二指肠癌 16 例 谢磊, 刘之武, 王志川  
1822 丙型肝炎病毒母婴传播及羊水、乳汁和唾液的作用 王占英, 牛美智, 曹学强, 李颖, 乔光彦  
1824 十二指肠癌 120 例 吴江, 邓长生  
1825 乙肝病毒感染相关原发性肝癌 320 例 苏淑慧, 王春平, 李迎新, 冯永毅  
1827 胆管癌组织 p53 和血管内皮生长因子表达与血管生成的相关性研究 陈勇军, 俞亚红, 丁志强  
1830 奥曲肽治疗肠梗阻 25 例 张长青, 张聚珍, 吴伟岗, 黄永毅  
1832 理学检查慢性胃十二指肠炎症 280 例 谭允熙, 李增芬, 谭汇泉  
1835 艾滋病患者中 HCV、HBV 及 HGV 的感染状况 骆嘉社, 桂希恩, 庄柯  
1837 胆心反射及胆心综合征的诊治 卫洪波, 汪壮流, 杨柳, 李文胜, 陈勇, 唐秋林  
1839 陕西部分农村 0-18 月婴幼儿肠道内微生物菌群状况研究 孙晓魁, 刘黎明, 郝炳华, 杨文方, 贾梅, Acheson K  
1841 糖尿病患者胆囊排空功能与胃肠激素的关系 王艳军, 徐永泉, 林艳, 李士星  
1843 慢性小肠性腹泻中的 IBS 吴杰, 邓昊, 贾贵贵, 陈时  
1844 矿区居民幽门螺杆菌感染状况及危险因素分析 雷静静, 周力, 谭玉洁, 杨斌, 刘星峰, 杜纪恩  
1848 直视微创胆道手术 52 例 姜伟青, 周建明, 陆军

## 病例报告

- 1851 分体联合手术治疗小儿原发性肝静脉海绵样变 1 例 方艳华, 朱新勇, 方石岗  
1852 马内非青霉素 1 例 尹雯, 汪光强, 郑晓平, 彭国林  
1853 胰性胸内 8 例 王平, 廖勇, 古敏, 刘子沛, 李晓璐  
1855 胃移植术后回肠结肠并出血、梗阻 1 例报告 金红旭, 张雪峰, 王正强

## 读者来信

- 1698 徐新保  
1705 Ferenc SZALAY

## 封面故事

- 1664 复方健脾胃胃胶囊 II 期临床研究方案讨论会在福州举行

## 世界华人消化杂志

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

- 吴阶平 题写封面刊名  
陈可冀 题写版权刊名  
(月刊)  
创刊 1993-01-15  
改刊 1998-01-25  
出版 2003-11-15  
原名 新消化病学杂志

- 总编辑 陈可冀  
黄家骝  
黄志强  
廖介寿  
刘耕陶  
袁法强  
汤树敏  
王宝恩  
危北海  
关益超  
关成中

- 社长兼编辑 马进荣  
中文编辑 潘柏松  
王理晖  
英文编辑 朱丽红  
排版 廖少华  
校对 李天华

## 编辑 世界华人消化杂志编辑委员会

030001, 山西省太原市迎泽西大街 77 号  
E-mail: wjgd@wjgnet.com

## 出版 世界胃肠病学杂志社

100023, 北京市 2345 信箱  
E-mail: wjgd@wjgnet.com  
http://www.wjgnet.com  
电话 010185381892  
传真 010185381893

## 印刷 北京科德印刷厂

发行 国内 北京报刊发行局  
国外 中国图书贸易总公司  
(100044, 北京 399 信箱)

## 订购 全国各地邮局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部  
(100023, 北京市 2345 信箱)

电话 010185381892  
传真 010185381893

2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

## 本刊已被国内外

## 检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》  
荷兰《医学文摘/医学文摘(EM)》  
俄罗斯《文摘杂志(PJ)》  
中国科技论文统计与分析  
中国学术期刊文摘  
中国中医药信息资源网  
中国生物医学文献光盘数据库  
《中文科技资料目录(医药卫生)》  
中国生物医学期刊目录数据库  
中国医学文摘外科学分册(英文版)  
中国医学文摘内科学分册(英文版)

## 特别声明

本刊刊登的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明, 本刊如有印刷质量问题, 请向本刊编辑部联系。

ISSN 1009-3079  
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262  
国外代号 M 4481

国内定价 每册 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营许可证  
1401004000

# RNA 干扰的抗病毒效应

李 宁, 范学工

李宁, 范学工, 中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008  
项目负责人: 范学工, 410008, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院传染科.  
xgfan@hotmail.com  
电话: 0731-4327392 传真: 0731-4327332  
收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-02

## 摘要

双链RNA介导的RNA干扰(RNA interference, RNAi)能序列特异性的诱发转录后基因沉默,被认为是机体阻止外来病毒感染、保护细胞免受病毒入侵的一种细胞自我保护机制.近年来研究表明,以病毒基因和宿主细胞受体分子为靶点,引入外源的小分子干扰RNA(siRNA)能显著性抑制病毒的复制与感染. RNAi作为一种抗病毒的有力武器,将给病毒性疾病的基因治疗带来新的希望.

李宁, 范学工. RNA 干扰的抗病毒效应. 世界华人消化杂志 2003;11(11): 1769-1772

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1769.asp>

## 0 引言

病毒性疾病是一类严重危害人类健康的疾病.目前临床治疗这类疾病的措施主要是接种疫苗和以病毒特异性蛋白为靶点的药物治疗,这些药物并不能直接清除人体内的病毒,并且因其严重的毒副作用及耐药变种的出现,而限制了这些药物的临床应用.为此,寻找新的抗病毒治疗方法成为当前临床工作中急需解决的重要问题.近年发现的RNA干扰(RNA interference, RNAi)是动、植物抵御外来病毒感染、抑制病毒复制的一种重要细胞保护机制.体外实验表明, RNAi 能特异、高效性地阻断病毒复制相关基因及宿主细胞受体基因的表达,以 RNAi 为手段的抗病毒基因治疗新近受到相关学者的极大关注.

## 1 RNAi 的发现

RNAi 现象最初是在转基因植物中发现的. 10 a 前,在对牵牛花(*Petunias*)进行研究时发现,将色素合成基因置于一个强启动子后,导入牵牛花中,试图加深花朵的紫颜色,结果是不仅转入的基因未表达,而且自身色素合成也减弱了.当时将这种现象称为转录后基因沉默(posttranscriptional gene silencing, PTGS)或“共抑制”(co-suppression),并认为这是少数几种植物中的特殊现象,因为当人们将外源基因转入受体后,总是希望外源基因能高效表达,然而事与愿违的是,转基因导致的基因沉默广泛存在于植物、真菌、动物中.这表明,

转基因沉默并非偶然现象,而是普遍存在的一种基因调控机制.

几年后,有学者用反义 RNA 阻遏华丽新小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*) par-1 基因的表达以探讨该基因的功能,结果反义 RNA 确能阻断 par-1 基因的表达,但奇怪的是,注入正义链 RNA 作为对照,同样也阻断了该基因的表达<sup>[1]</sup>.接着, Fire 及其同事首次将正义链和负义链的双链 RNA(dsRNA)注入线虫,结果表现出比单独注射正义链或负义链都强得多的基因沉默.实际上每个细胞只需少数几个 dsRNA 分子就能完全阻断同源基因的表达.注入双链 RNA 不仅可以高效阻断整个线虫的同源基因表达,还会导致其下一代同源基因的沉默, Fire 将这种现象称为 RNAi<sup>[2]</sup>. RNAi 代表了一种古老的 PTGS 通路,目前, RNAi 现象已经在很多生物体中被发现<sup>[3, 4]</sup>,比如植物、真菌、果蝇及包括小鼠在内的脊椎动物.针对基因功能研究中的敲除技术,科学家将 RNAi 称为对靶基因的“knockdown”,这是一个在后基因组研究中可与“knockout”相媲美的技术.2001 年, RNAi 技术被成功地引入到哺乳动物细胞基因功能的研究中,使其应用前景更为诱人<sup>[5, 6]</sup>.

## 2 RNAi 的作用机制

自从 RNAi 现象被发现后,其机制的研究就成为一个热点.在对线虫、果蝇进行大量研究后,产生了现有 RNAi 作用机制模型,该模型包括起始阶段和效应阶段<sup>[7-9]</sup>.在起始阶段,导入的 dsRNA 被切割成 21-23 nts 的小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA).有证据表明,一个被称为 Dicer 的核酸内切酶能以 ATP 依赖的方式逐步切割由外源导入的双链 RNA,将其降解为 19-21 nts 的小片段,该片段具有 5' - 磷酸, 3' - 羟基和 1-2 个核苷酸的 3' - 粘性末端. Dicer 是 RNase 家族成员之一,在进化上相对保守,包括 2 个活性区域、1 个 RNA 解旋酶活性区域及一个 PAZ 活性区域.研究发现,重组人 Dicer(re-hDicer)能体外切割 dsRNA 而生成有活性的 siRNA,这表明 Dicer 参与了 RNAi 过程<sup>[10, 11]</sup>.对大多数哺乳动物来说,长片段的 dsRNA 的引入可激活 RNA 依赖的蛋白激酶(RNA-dependant protein kinase, PKR)和 2', 5' 寡腺苷酸合成酶,而引起非特异性反应. PKR 可通过一系列磷酸化使得翻译起始因子 eIF-2 $\alpha$  (initiation factor-2 $\alpha$ )失活而导致 RNA 大范围、非特异性的翻译阻遏,而 2', 5' 寡腺苷酸合成酶可活化 RNase L,进而非特异性降解 RNA<sup>[12]</sup>.随着研究的

深入,人们逐渐认识到,在基因沉默发生过程中,大约 21nts 大小的 siRNA 直接起“干扰作用”,引入小片段的 siRNA 不仅能特异性的抑制同源基因的表达,而且也不会导致由 PKR 引起的非特异性反应<sup>[13-17]</sup>,这无疑会加快哺乳动物基因功能的研究,为疾病的基因治疗带来新的希望。

在 RNAi 效应阶段,被 Dicer 加工成的 siRNA 与解旋酶、核酸酶等一起组成 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC).此外,亦有文献<sup>[18]</sup>报道,来源细胞核的发夹(hairpin)RNA 亦可经细胞内酶的作用后产生内源性 siRNA,进而在胞质内形成 RISC. RISC 激活时需要解旋酶以 ATP 依赖方式将 siRNA 解开,激活的 RISC 通过碱基配对将反义链定位到同源的 mRNA 转录本上,引导核酸酶在距离 siRNA 3' 端 12 个碱基的位置切割 mRNA.研究表明,被切割的 mRNA 不产生任何中间产物,这提示 RISC 复合物中可能还含有核酸外切酶<sup>[19]</sup>.

RNA 干扰至少具有以下几个重要特征: (1)高专一性.与靶 mRNA 之间一个碱基错配都会明显削弱基因沉默的效果.不过并非所有符合条件的 siRNA 都同样有效,具体原因还不清楚,可能是位置效应(postitional effects)所致<sup>[20]</sup>. (2)高效性.实验表明,极少量的 dsRNA 分子就能完全抑制相应基因的表达,达到缺失突变体表型的程度,而仅凭几个 dsRNA 被 Dicer 切割成数十个 siRNA 并不能作出令人信服的解释,为此,有人提出随机降解 PCR (random degradative PCR)模型.认为一种称之为 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, PdRP)以 siRNA 为引物扩增模板 mRNA,产生的 dsRNA 供给 Dicer,结果产生更多的 siRNA<sup>[9, 21]</sup>. (3)传递性. RNAi 具有很强的细胞穿透力,可以在不同细胞间传递和维持,甚至可以传至子代。

### 3 RNAi 抗病毒效应的研究进展

转录后基因沉默作为植物细胞抗病毒的机制早已得到确认<sup>[22-27]</sup>,随着对 RNAi 现象的深入研究,人们发现动物细胞同样存在 RNA 干扰介导的抗病毒效应<sup>[28, 29]</sup>. RNAi 并被认为是机体阻止病毒复制、保护细胞免受病毒入侵的一种古老防御机制.动物细胞基因组中含有大

量的病毒和转座子 DNA,如何识别并抑制这些“非己”分子是机体面临的确重大挑战.通常,导入的 DNA 由于甲基化而失活.近年来研究表明,细胞为保护自身基因免受损害,如病毒入侵或转座子插入而采取基因沉默这一调节机制,目的是使入侵的外源基因失活,而不影响自身基因的表达,因此有学者称 RNA 干扰为基因组的“免疫系统”<sup>[9, 30]</sup>.近年来,已有多个研究小组在植物病毒和动物病毒中发现并分离出能特异性抑制 RNA 干扰的某些抑制因子<sup>[28, 31-35]</sup>,这一发现有力说明了 RNAi 是机体自然的抗病毒防御机制,对 RNAi 的抑制是病毒对宿主细胞抗病毒感染的一种适应.尽管 RNA 干扰抗病毒的精确机制尚不清楚,研究表明,在小鼠和人的细胞中,直接转入 siRNA,产生了具有序列特异性的抗病毒效应,其过程并不激活 PKR 及 RNase L 酶.

HIV-1 是一种 RNA 逆转录病毒,其生活周期特殊而复杂.病毒包膜糖蛋白 gp120 与宿主细胞膜上的 CD4 抗原作用,引起 gp120 构象改变,使之适合与协同受体结合, gp120-gp41 复合物构象的进一步改变导致 gp41 介导的病毒与细胞膜间的融合,病毒衣壳分解, RNA 进入细胞质内.随后, RNA 被逆转录为 cDNA,在整合酶的作用下, cDNA 整合至宿主细胞 DNA 上,形成前病毒.当病毒获得活化信号时,其 DNA 转录 RNA,经过修饰与翻译,成熟的子代被装配和释放出来. HIV-1 生活周期早期阶段和晚期阶段,均可成为 siRNA 作用的靶点. siRNA 一旦进入细胞,其作用就如同药物,能特异性地阻止病毒继续感染.新近几个研究小组将不同 siRNA 小片段体外引入细胞中,发现与 siRNA 同源的靶基因不同程度地被降解,同时, HIV 的复制受到抑制,表现出 HIV-1 p24 的产量显著下降.除 HIV-1 本身的结构与调节基因外,与病毒复制有关的宿主细胞受体分子如 CD4, CCR5 亦可成为 RNAi 的靶点(表 1).

丙型肝炎病毒(HCV)是导致慢性肝病和肝细胞癌的一个主要致病因子,其基因组为单链正股 RNA,长约 9.5 kb,编码一条约含 3 000 个氨基酸的多聚蛋白前体,此蛋白前体经酶切加工成结构蛋白和非结构蛋白.结构蛋白组成病毒的核衣壳和包膜,非结构蛋白参与病毒的复制.体外细胞培养不能稳定繁殖 HCV,近年来有学者将含有 HCV 基因组全序列或部分序列的质粒

表 1 HIV-1 复制相关靶点 siRNA 的抗病毒效应

靶基因	方法	RNAi 效应
gag <sup>[36]</sup>	体外合成 21 nts 的 p24 siRNA, 转染细胞	p24 蛋白合成降低, HIV 复制抑制率提高
tat <sup>[37]</sup>	体外合成 21 nts 的 p24 siRNA, 转染细胞	抑制靶基因的表达与 HIV 的复制
rev <sup>[38]</sup>	构建特异性表达靶基因的细胞内表达载体	较长时间地抑制 HIV 复制, 多位点的联合作用显著提高抗 HIV 效率
CD4 <sup>[36]</sup>	体外化学合成 21 nts siRNA, 转染细胞	CD4 表达下降 8 倍, HIV 感染率降低
CCR5(CXCR4) <sup>[39]</sup>	体外化学合成 21 nts siRNA, 转染细胞	选择性下调靶基因表达, 抑制病毒对细胞的感染
vif <sup>[40]</sup>	A: 设计不同位点的 siRNA, 化学合成 B: 构建能表达茎环发夹结构 siRNA 表达载体	HIV 复制受抑制, 单碱基的错配便降低抗病毒效应 HIV 复制下降 20-30 倍

转染传代细胞株(Huh-7), 构建了能稳定表达 HCV RNA 的细胞模型, 为进一步研究病毒的复制及其蛋白功能等提供了条件<sup>[41-45]</sup>. Randall et al<sup>[46]</sup>以 NS5B 为靶点化学合成 siRNA 并转染 Huh-7 细胞, 发现 HCV RNA 表达竟下降 80 倍. Kapadia et al<sup>[47]</sup>以非结构区为靶点构建了 7 个 siRNA 表达质粒, 转染 Huh-7 后, 运用实时 RT-PCR 分析发现 NS3 siRNA 和 NS5B siRNA 分别使同源的病毒基因表达下调 21 倍和 23 倍, 从而有效抑制病毒的复制, 此研究小组进一步发现这种抑制作用并不涉及 IFN 途径. 此外, 亦有其他学者对 siRNA 的抗 HCV 效应进行了研究, 均取得了明显的靶基因沉默效果<sup>[48, 49]</sup>. 新近 Shlomai et al<sup>[50]</sup>以乙型肝炎(HBV)X 区和核心区为靶点, 构建 siRNA 表达质粒 pSUPER x 和 pSUPER core, 将质粒分别导入 HBV 感染细胞后, 发现能显著而特异性降低 X 蛋白和核心蛋白的表达水平. 这些结果表明, 作为抗病毒的有力武器, RNAi 能胜任多种病毒的基因治疗.

#### 4 问题与展望

诸多研究表明, RNAi 作为新发现的抗病毒方法, 在抗病毒感染与复制过程中发挥了重要作用, 但 RNAi 最后要成为临床治疗的一种有效手段仍需要解决一些问题. (1)并不是所有病毒 mRNA 都易被 siRNA 识别并结合, 一些 mRNA 的识别靶点因其二级结构或高度折叠而被遮盖了; 另外, 一些 mRNA 可能和别的蛋白形成复杂的复合物而隐藏了其 siRNA 的识别位点. (2)有报道称, mRNA 与 siRNA 间单个碱基的错配便能降低基因沉默效率<sup>[40]</sup>, 而病毒在逃避免疫监视或药物的抑制时, 会产生大量的变异体, 这样给 siRNA 序列的设计带来困难, 为此, 必须选择不同种系间转录序列高度保守的同源序列作为靶点. 另外, 选择宿主细胞膜上的受体或协同受体作为靶点也不失为一种有效的方法. CCR5 结构上较为保守, 单个碱基的改变并不影响其免疫功能, 而被看作是抗 HIV 基因治疗较为理想的靶点<sup>[39]</sup>. 此外, 有学者<sup>[30]</sup>提出以联合多个靶点的 siRNA 诱导基因沉默的方法来治疗 AIDS, 即高效抗逆转录病毒基因沉默疗法 (highly active anti-retroviral gene silencing, HAAGS). (3) siRNA 稳定性的问题. 体外合成 siRNA 虽然简单, 但导入的 siRNA 易被 RNase 降解, 且转染以瞬时表达为主. 构建能在细胞内稳定表达的载体被认为是一种较理想的方法. Brummelkamp et al<sup>[51]</sup>构建了一个能在哺乳动物细胞(MCF-7)中表达的载体 pSUPER, 此载体含有转录 RNA 的启动子 Pol-III H1, 其特点是转录后该 RNA 能折叠形成茎环结构, 并且经修饰后能在 3' 端形成两个尿苷酸(U)的突出. 实验表明该载体能有效表达 siRNA, 介导十多个基因的“knockdown”, 而且不产生任何细胞毒性作用. 此外, 含有 U6 启动子的 siRNA 表达载体也见于多篇文献报道<sup>[15, 18, 52]</sup>. 这种载体可含 1-2 个启动子, 并且在正义链与反义链间有 UUCG 4 个碱基连接. 转录

后两段 RNA 在细胞内形成 siRNA. Lee et al<sup>[38]</sup>运用此载体表达 rev siRNA, 取得了很好的抗病毒效果. Sui et al<sup>[16]</sup>报道的方法与此类似, 不同的是 siRNA 模板为回文结构, 在 U6 启动子下游依次是 siRNA 编码序列、6 nts 的间隔序列、反向 siRNA 编码序列以及 5 个 T 的终止序列. 在细胞内, 该质粒可转录出一个含发夹结构的 siRNA. 最近, 有几个研究小组尝试用病毒如腺病毒、逆转录病毒作为载体, 将 siRNA 引入细胞, 取得了很好的基因沉默效果<sup>[53, 54]</sup>.

15 a 前, 针对 HIV 感染的抗病毒治疗, Baltimore et al<sup>[55]</sup>提出“细胞内免疫(intracellular immunization)”的概念, 预见今后细胞可通过产生某些抑制分子来阻止病毒的感染与复制. siRNA 的发现为这种预见带来可能. 如今, 除 HIV 和肝炎病毒外, RNAi 作为一种抗病毒感染的有力武器已成功地应用于其他病毒, 如脊髓灰质病毒、呼吸道合胞病毒、流感病毒、人乳头瘤病毒等研究中<sup>[56-61]</sup>, 为这些感染性疾病的基因治疗开辟了新的途径.

#### 5 参考文献

- Guo S, Kemphues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. Elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995;81:611-620
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000;101:25-33
- Krichevsky AM, Kosik KS. RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11926-11929
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363-366
- Knight SW, Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001;293:2269-2271
- Hutvagner G, Zamore PD. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:225-232
- Baulcombe D. RNA silencing. *Curr Biol* 2002;12:R82-84
- Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 2002;296:1263-1265
- Myers JW, Jones JT, Meyer T, Ferrell JE. Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. *Nat Biotechnol* 2003;21:324-328
- Kawasaki H, Suyama E, Iyo M, Taira K. siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res* 2003;31:981-987
- Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1443-1448
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-498
- Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 24):4557-4565
- Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2002;20:497-500
- Sui G, Soohoo C, Affarelli B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene ex-

- pression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5515-5520
- 17 Shi Y. Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet* 2003;19:9-12
  - 18 Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002;16:948-958
  - 19 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418:244-251
  - 20 Holen T, Amarzguoui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 2002;30:1757-1766
  - 21 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
  - 22 Waterhouse PM, Wang MB, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 2001;411:834-842
  - 23 Vance V, Vaucheret H. RNA silencing in plants-defense and counterdefense. *Science* 2001;292:2277-2280
  - 24 Li WX, Ding SW. Viral suppressors of RNA silencing. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12:150-154
  - 25 Dougherty WG, Lindbo JA, Smith HA, Parks TD, Swaney S, Proebsting WM. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol Plant Microbe Interact* 1994;7:544-552
  - 26 Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 1998;10:937-946
  - 27 Al-Kaff NS, Covey SN, Kreike MM, Page AM, Pinder R, Dale PJ. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* 1998;279:2113-2115
  - 28 Li H, Li WX, Ding SW. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 2002;296:1319-1321
  - 29 Lindenbach BD, Rice CM. RNAi targeting an animal virus: news from the front. *Mol Cell* 2002;9:925-927
  - 30 Martinez MA, Clotet B, Este JA. RNA interference of HIV replication. *Trends Immunol* 2002;23:559-561
  - 31 Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH, Vance VB. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13079-13084
  - 32 Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 1998;17:6739-6746
  - 33 Kasschau KD, Carrington JC. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 1998;95:461-470
  - 34 Kasschau KD, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington JC. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA uncton. *Dev Cell* 2003;4:205-217
  - 35 Thomas CL, Leh V, Lederer C, Maule AJ. Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* 2003;306:33-41
  - 36 Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, Collman RG, Lieberman J, Shankar P, Sharp PA. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 2002;8:681-686
  - 37 Surabhi RM, Gaynor RB. RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency Virus Type 1 replication. *J Virol* 2002;76:12963-12973
  - 38 Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A, Salvaterra P, Rossi J. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* 2002;20:500-505
  - 39 Martinez MA, Gutierrez A, Armand-Ugon M, Blanco J, Parera M, Gomez J, Clotet B, Este JA. Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication. *AIDS* 2002;16:2385-2390
  - 40 Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002;418:435-438
  - 41 Ikeda M, Yi M, Li K, Lemon SM. Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol* 2002;76:2997-3006
  - 42 Kishine H, Sugiyama K, Hijikata M, Kato N, Takahashi H, Noshi T, Nio Y, Hosaka M, Miyanari Y, Shimotohno K. Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:993-999
  - 43 Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110-113
  - 44 Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 2001;75:1252-1264
  - 45 Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000;290:1972-1974
  - 46 Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:235-240
  - 47 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
  - 48 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
  - 49 McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002;418:38-39
  - 50 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of Hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003;37:764-770
  - 51 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002;296:550-553
  - 52 Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 2002;20:505-508
  - 53 Shen C, Buck AK, Liu X, Winkler M, Reske SN. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett* 2003;539:111-114
  - 54 Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, Sabatini DM, Chen IS, Hahn WC, Sharp PA, Weinberg RA, Novina CD. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* 2003;9:493-501
  - 55 Baltimore D. Gene therapy. Intracellular immunization. *Nature* 1988;335:395-396
  - 56 Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 2002;418:430-434
  - 57 Bitko V, Barik S. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol* 2001;1:34
  - 58 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
  - 59 Jia Q, Sun R. Inhibition of gammaherpesvirus replication by RNA interference. *J Virol* 2003;77:3301-3306
  - 60 Valdes VJ, Sampieri A, Sepulveda J, Vaca L. Using double-stranded sRNA to prevent viral infections in vitro and in vivo by recombinant baculoviruses. *J Biol Chem* 2003;278:19317-19324
  - 61 Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene* 2002;21:6041-6048



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,  
CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

