

基因功能研究新途径 - RNA 干扰

万志红, 王宇明

万志红, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038
国家自然科学基金资助课题, No. 30300304
项目负责人: 万志红, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. zhihong_wan@sohu.com
电话: 023-68754289 传真: 023-65337618
收稿日期: 2003-08-11 接受日期: 2003-10-18

摘要

近年来的研究表明, 一些小的双链RNA可以高效特异地阻断体内特定基因表达, 促使mRNA降解, 诱使细胞表现出特定基因缺失的表型, 称为RNA干扰(RNA interference, RNAi)。他是体内抵御外在感染的一种重要保护机制, 也可以作为一种简单有效的代替基因敲除的遗传工具。现就RNAi的研究进展做一综述。

万志红, 王宇明. 基因功能研究新途径 - RNA 干扰. 世界华人消化杂志 2004; 12(4):962-964

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/962.asp>

0 引言

传统基因功能的研究方法包括: 基因敲除、转基因、反义技术和显微注射等。随着人类和鼠基因组序列分析工作的完成, 要求我们用更快捷、准确、有效的工具去研究哺乳动物的基因功能。RNA干扰(RNA interference, RNAi)提供了一个基因功能研究的新途径。虽然已有证据显示RNAi在小鼠早期发育中起作用, 但对所有哺乳动物是否有普遍意义还不够清楚。现就RNAi的研究进展做一综述。

所有有机物都有限制异常或外源基因表达的保护机制。随着转基因技术的广泛应用, 发现转入的基因可被机体当作外源遗传物质。以植物为例, 发现转入基因可诱导其自身沉默, 并以一种称为转录后基因沉默(post transcriptional gene silencing, PTGS)或共抑制(cosuppression)的过程同时引起同源基因的沉默^[1]。而当在线虫中转入双链RNA后导致的同源基因沉默比正义或反义RNA更为有效, 这一现象因此引起研究者的关注。在许多种属中引入双链RNA(double stranded RNA, dsRNA)均可引起强烈、特异性的基因沉默(gene silencing), 这种现象称为RNA干扰^[2-4]。这种特异性抑制靶基因的转录后表达的现象, 存在于从低等的线虫到人类培养细胞等多种有机体, 通过序列特异性引起转录后基因沉默。如今, RNA干扰已成为分子生物学领域最热门的研究课题之一。过去几年的研究表明RNA干扰在植物和动物中都会发生, 并且参与抵抗病毒感染、转座子沉默机制等过程。

RNAi有关技术是研究转录后调控的有效工具, 可用于功能基因组学研究以及基因治疗等临床用途。

1 RNA 干扰的作用特点

RNA干扰可以从两个水平引起基因沉默: (1)转录后沉默: 特异性抑制靶基因的转录后表达。即RNAi作用于信使RNA从宿主细胞DNA模板转录后, dsRNA通过碱基互补结合于mRNA的特定区域, 随后通过引导相关的酶复合物引起mRNA互补片段的降解, 诱导相关的基因沉默。(2)转录水平沉默: 序列特异性调节基因组功能。其中RNA引导的DNA甲基化(RdDM)现象第1次在植物中发现, 尽管RdDM只在植物中研究较深, 但越来越多的证据表明他能在许多生物体中调节基因功能^[5-6]。与启动子序列同源的siRNA(short interfering RNA, siRNA), 一般引起启动子甲基化, 从而在转录水平干扰基因表达; 与开放性阅读框架序列同源的siRNA, 一般抑制靶基因的转录后表达。

目前认为RNAi至少包括两步RNA的降解过程, 第一步为dsRNA降解形成特征性的与靶基因同源的21-23个核苷酸的双链RNA, 第二步为这些短核苷酸序列参与形成多亚基复合物, 称为RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC), 并引导复合物中的核酸内切酶降解特异性的mRNA, 阻止mRNA翻译成蛋白质。序列特异性要求siRNA与目的基因之间必须完全配对。最近有学者报道从果蝇中成功分离到执行上述第一步核酸降解过程的名Dicer的酶, 他是特异性酶解dsRNA的RNase III核酸酶家族成员, 在进化中高度保守^[7]。此外, siRNA可作为一种特殊引物, 在RNA依赖RNA聚合酶(RdRp)作用下以靶mRNA为模板合成dsRNA, 后者可被降解形成新的siRNA; 新生成的siRNA又可进入上述循环, 这种过程称为随机降解性多聚酶链反应(random degradative PCR)。新生的dsRNA反复合成和降解, 不断产生新的siRNA, 使靶mRNA渐进性减少, 从而发挥强大的诱导基因沉默现象^[8-9]。

与反义核酸、核酶相比较, 干扰RNA的作用特点包括: (1)特异性抑制目的基因。针对某特定的内源基因的dsRNA转入动物体内或胚胎内, 能特异抑制该基因的功能, 而单链正义或反义RNA的抑制作用较弱或缺失。(2)广泛分布且可遗传。dsRNA分子能够在线虫体内被有效转运至全身各处, 用经小肠微注射或者浸润喂食线虫的方法都能得到各组织中对靶基因的抑制, 在体细胞和生殖细胞中都能检测RNA的表达, 并且其子

代也产生了对相应基因强烈而特异的抑制效应^[10],但此特点仅限于低等生物,目前在哺乳动物尚未发现;(3) RNAi的靶序列需慎重选择.实验证明,只有针对编码区的dsRNA才能产生有效和特异性的干涉,针对内含子区域的dsRNA序列则不能产生;此外dsRNA的长度对RNAi的效率有影响^[11].选择靶序列应避免高度同源序列之间的交叉干扰,例如对线虫的体壁肌肉肌球蛋白重链的编码区基因进行RNAi实验,当选择其5'端高度保守区作为靶序列进行dsRNA注射时产生致死表型,而选择其他部分进行实验时则产生预期的瘫痪表型^[12].

2 RNA干扰的应用

2.1 研究基因功能的新工具 通过RNAi特异性抑制基因的表达来阐明基因在生物体中的特定功能.现存的一些抑制哺乳细胞特定基因表达的方法的效果和重复性都不理想,而RNAi,由于能在极低浓度,微量(nmol范围)siRNA存在情况下显示出特殊有效性,在研究哺乳动物细胞培养物的基因功能方面有极大的应用前景.许多基因已被成功地从哺乳动物体细胞和胚胎细胞系中敲除,包括常用的HeLa, HEK293, 和P19细胞^[13-15]. 21 nt的双链RNA,已经成为敲除特定基因在哺乳动物细胞系中表达的强大工具,对分析功能显性缺陷型也非常有用.将靶向特定基因的大约21碱基长短的双链siRNAs (small interfering RNAs),或者是45-50碱基长短的发夹结构RNA (small hairpin RNA, shRNA)转染到细胞. shRNA在细胞内会自动被加工成为siRNA,从而引发基因沉默或者表达抑制.现在有多个报道证实通过质粒表达siRNAs同样可以抑制特定基因的表达.尽管细节各有不同,但载体大都是用Pol III启动子启动编码shRNA的序列.选用Pol III启动子的原因在于这个启动子总是在离启动子一个固定距离的位置开始转录合成RNA,遇到4-5个连续的U即终止,非常精确.当这种带有Pol III启动子和shRNA编码序列的质粒转染哺乳动物细胞时,这种能表达siRNA的质粒确实能够下调特定基因的表达,抑制范围包括外源基因和内源基因.采用质粒表达siRNA的优点在于:通过siRNA表达质粒的选择标记,siRNA载体能够更长时间地抑制目的基因表达;此外,由于质粒可以复制扩增,相比起化学合成来说,能够显著降低制备siRNA的成本^[16-17].

目前可以实现RNAi在特定时期针对特定组织细胞,对目的基因功能的干扰,如dsRNA成功用于小鼠早期胚胎特异基因的阻断,分别阻断了卵母细胞的c-mos和早期胚胎(植入前)的E-cadherin及GFP转基因的表达^[18],为基因调控和发育研究提供了广泛使用该技术的可能.人工导入dsRNA以抑制基因功能将成为在后基因组时代进行基因功能分析的有效手段.

2.2 抗病毒治疗的新策略 对哺乳动物而言,30 bp以上的dsRNA能够诱导抗病毒干扰素反应,整体性地抑制mRNA翻译^[19-20].但导入短的siRNA到哺乳动物细胞中

不会激活干扰素反应,却能诱导序列特异性的mRNA降解^[21-22]. RNAi介导的转录后沉默提供了在病毒生命周期的多个阶段抑制病毒和细胞内基因复制的强有力的潜在工具^[23-24]. siRNA抗病毒机制与依赖于细胞及体液免疫不同,而是依赖于siRNA与目标RNA的核苷酸碱基配对,引导酶降解病毒的目的基因. Novina et al^[25]证实siRNA能通过HIV-1病毒受体进入人体细胞,针对HIV受体CD14及次要受体CCR5设计的siRNA能降低两个受体的表达;针对关键基因gap的siRNA能降解gap基因,最终抑制病毒基因组RNA聚集及P24蛋白产生,并能降低现症感染的病毒复制. Gitlin et al^[26]也报道用脊髓灰质炎病毒的siRNA预处理人和小鼠细胞能够显著降低病毒滴度以及从感染的细胞中清除病毒.这些最新的实验研究表明, RNAi确实能抑制病毒感染.但由于这些实验都是在体外合成siRNA导入细胞内,而RNA oligo合成费用昂贵,及其对基因表达抑制的暂时性及RNA的不稳定性严重制约了他的应用.由于体外转录的缺陷,最近Jacque et al^[27]用T7启动子在细胞内转录siRNA,并报道RNAi能抑制人细胞株及淋巴细胞感染HIV,结果发现, siRNA能作用于HIV的多种基因阻止病毒复制,并且进入细胞内的病毒可被siRNA降解.

3 存在问题及展望

siRNA可能用于许多抗病毒作用,但仍有许多问题还需进一步研究.最重要的一点是siRNA并不能作用于所有病毒的RNA序列:某些序列可能藏于二级结构或目的RNA的折叠区域;某些序列可能与蛋白质形成紧密结构从而使siRNA无法识别^[28].因此最合靶序列的选择需要反复试验.此外,病毒容易发生变异,一方面逃避机体免疫识别,另一方面避免siRNA识别.可以针对病毒的保守区域或病毒的多个靶序列设计多个siRNA.在使用siRNA抗病毒的过程中病毒可能产生抵抗siRNA的蛋白, Silhavy et al^[29]报道病毒产生19 ku的蛋白(p19)是一基因沉默的抑制因子,体外实验发现p19能与21-25 nt的RNA3'末端的2个核苷酸结合,从而阻断siRNA的作用.

siRNA已经很有效地导入了培养细胞,但如何把他用于动物体内,甚至患者体内还需要更进一步改进方法.尽管抗病毒siRNA方法还不够完善,但siRNA已显示出比以往基因治疗更明显的优势.目前处于研究状态的反义核酸和核酶,虽然表现出一定程度的抗病毒活性,但核酶不稳定,反义核酸的抑制作用较弱. RNAi和siRNA的发现产生了一种新的功能基因组研究策略,同时有可能研究出基于RNAi的基因治疗药物.

4 参考文献

- 1 Vaucherel H, Fagard M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet* 2001;17:29-35
- 2 Boshier JM, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol* 2000;2:E31-E36

- 3 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;409:363-366
- 4 Pickford AS, Cogoni C. RNA-mediated gene silencing. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:871-882
- 5 Yotsuyanagi H, Hino K, Tomita E, Toyoda J, Yasuda K, Iino S. Precore and core promoter mutations, hepatitis B virus DNA levels and progressive liver injury in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2002;37:355-363
- 6 De Clercq E. Highlights in the development of new antiviral agents. *Mini Rev Med Chem* 2002;2:163-175
- 7 Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363-366
- 8 Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNA that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 2001;107:297-307
- 9 Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001;293:834-838
- 10 Baulcombe D. RNA silencing. Diced defence. *Nature* 2001;409:295-296
- 11 Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000;404:293-296
- 12 Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001;15:188-200
- 13 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;114:4557-4565
- 14 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
- 15 Caplen NJ. RNAi as a gene therapy approach. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:575-586
- 16 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
- 17 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002;296:550-553
- 18 Wiannty F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-strand RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* 2000;2:70-75
- 19 Kumar M, Carmichael GG. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1415-1434
- 20 Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998;67:227-264
- 21 Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001;15:188-200
- 22 Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryolysate. *EMBO J* 2001;20:6877-6888
- 23 Carmichael GG. Medicine: silencing viruses with RNA. *Nature* 2002;418:379-380
- 24 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
- 25 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
- 26 Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 2002;418:430-434
- 27 Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002;418:435-438
- 28 Silhavy D, Molnar A, Lucioli A, Szittya G, Hornyik C, Tavazza M, Burgyan J. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J* 2002;21:3070-3080