

siRNAs在基因治疗中的应用

胡迎宾, 李定国

胡迎宾, 李定国, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科 上海市 200092
通讯作者: 李定国, 200092, 上海市, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科. dingguo_li@hotmail.com
电话: 021-55571294
收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-05-30

摘要

利用小分子物质特异性沉默基因表达是一种有效的治疗手段, 许多研究正在利用这些小分子物质的作用而创造出新的治疗性药物. 小干扰RNAs (small interfering RNAs, siRNAs) 最有可能成为这类药物中的新成员. 本文将从 siRNAs 的沉默机制、基因沉默效率、表达载体, siRNAs 在活体内的应用以及作为可能的治疗性药物等方面, 探讨其应用于临床治疗的巨大潜能.

胡迎宾, 李定国. siRNAs 在基因治疗中的应用. 世界华人消化杂志 2005;13(16):2040-2042
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2040.asp>

0 引言

小干扰RNAs (small interfering RNAs, siRNAs) 是 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 过程中的效应分子. Fire *et al*^[1] 在 1998 年向秀丽隐杆线虫中注射双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 分子后降解了细胞质中含有同源序列的靶 mRNA. 随后的研究表明, RNAi 现象广泛存在于真菌、拟南芥、斑马鱼、果蝇、小鼠及大鼠等大多数真核生物中. 早期在哺乳动物细胞中应用长 dsRNA 可引起非特异性干扰素反应而导致细胞死亡, 后来遗传学和生物化学研究证明将 dsRNA 切割成 21-28 个核苷酸的 siRNAs 后不引起干扰素反应, 并能有效降解含有同源序列的靶 mRNA. 因此, siRNAs 正迅速发展成为研究基因功能的新工具和作为治疗的新手段.

1 siRNAs 的沉默机制

siRNAs 是由 RNase-III 家族中被称为 Dicer 的核酸内切酶在细胞质中剪切自然存在的长 dsRNA 的过程中产生的. Dicer 将长 dsRNA 剪切为 21-28 个核苷酸的 siRNA 双链. 这种 siRNA 双链除了在 5' 末端是磷酸, 3' 末端是羟基外, 3' 端还有由 2 个核苷酸构成的悬突. siRNA 双链与诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 结合后裂解为 siRNA 单链, 与 siRNA 单链完全互补结合的同源性靶 mRNA 被 RISC 剪切降解, 从而达到基因沉默的目的. 现在 siRNA 能够像核酶一样通过化学合成的方法或者通过载体表达双链短发夹样 RNA (short hair-

pin-like RNA, shRNA) 进入到细胞内, 后者在细胞内可转化为 siRNA 而发挥基因沉默效应. 一些研究证明 siRNAs 还有其他沉默机制, 例如在几种生物中能够通过 RNAi 途径修饰细胞染色质导致转录水平的基因沉默^[2-3].

miRNAs (microRNAs) 是一类非编码小分子 RNA, 具有和 siRNAs 相似的功能, 调节细胞内基因表达. 成熟的 miRNA 是由胞质中 70 个核苷酸组成的发夹样结构前体剪切为 21-22 个核苷酸分子组成的单链. 他们组装成蛋白复合物 (miRNP) 后在核糖体内与 mRNA 3' 端非翻译区部分互补结合从而阻止 mRNA 的翻译. 如果与同源性靶 mRNA 完全互补结合, 那么 miRNAs 像 siRNAs 一样能够通过正反馈途径循环降解靶 mRNA.

2 siRNAs 的基因沉默效率及其安全性

各种基因沉默的方法是否能够高效作用于靶目标仍然是其应用于治疗的一个关键问题. Harborth *et al*^[4] 研究表明 RNA 结合蛋白, mRNA 的二级结构和三级结构能够影响 siRNA 的沉默效率. 绝大多数研究都证实 siRNAs 比各种寡脱氧核苷酸 (oligodeoxyribonucleic acids, ODNs) 更有效, 并且作用时间更长. 作用于同样的靶目标 siRNAs 的半数最大抑制浓度 (IC₅₀) 比磷酸酯修饰的 ODNs 低 100-1 000 倍. 尽管尚未对 siRNAs 与核酶和 / 或 DNA 酶的效率进行广泛地系统性比较, 但 Drew *et al*^[5] 研究表明 siRNAs 比核酶和 / 或 DNA 酶更有效, 且具有长发夹结构的 RNA 比锤头结构的核酶能更强烈的抑制靶基因表达.

低浓度的 siRNAs 就能启动基因沉默的过程, 因为他们能快速、特异性与 RISC 结合, 从而减少了与非特异性蛋白结合的可能, 这有利于减少 siRNAs 在治疗中的非特异性反应. 事实上已有研究证明转染中等浓度的 siRNAs 并不引起全身非特异性反应^[6]. 也有三项研究^[7-9] 认为 siRNAs 引起的非特异性反应与 siRNAs 的浓度、细胞类型、转染试剂以及 siRNAs 的转染方式有关. 这些非特异性反应包括刺激基因型引起的干扰素反应, 但研究并非像人们想象的那样, 所产生的干扰素反应并不影响细胞生长.

3 siRNAs 的表达载体

由于 siRNAs 既可以通过化学合成获得, 也可以通过载体表达, 这使具有靶向性的药物应用于基因治疗成为可能. 表达 siRNAs 的载体通常含有 RNA 聚合酶 III 启动子 (RNA polymerase III promoter, pol III) 或 RNA

聚合酶 II 启动子 (pol II) 序列, 首先转录生成与 miRNA 前体相似的 shRNA, 然后在细胞内变成 siRNA 发挥基因沉默效应. 在活体内和培养组织细胞中应用表达 siRNA 的载体能够长时间整合到基因组中并“敲除”内源性基因. 许多研究证明腺病毒载体、腺相关病毒 (adeno-associated viral, AAV) 载体、逆转录病毒载体及慢病毒载体都能有效转染到活体内和培养细胞中. Shinagawa *et al*^[10] 研究表明含 pol II 的表达载体能在体内产生由数百个碱基对构成的 shRNA, 而不诱导非特异性干扰素反应, 这为 siRNAs 应用于哺乳动物提供了一种安全的新方法.

4 siRNAs 在活体中的应用

通过电穿孔、局部注射或静脉注射的方法已经能够成功地将化学合成的 siRNAs、表达 siRNAs 的质粒以及表达 siRNAs 的病毒导入到哺乳动物细胞中. 但很难评价哪种方法能更有效的引起基因沉默. 经鼠尾静脉高压注射溶于生理盐水的 siRNA 已经成功地将 siRNA 导入大鼠组织中, 其中在肝中靶基因的沉默效率达 90% 以上, 而在肺、肾、脾、胰中靶基因的沉默效率稍低^[11-12]. 采用这种方法引起的基因沉默效应一般持续数天, 在有些情况下可超过 1 wk, 并且基因沉默的效率因物种的差异而不同.

表达 siRNAs 的病毒载体为研究哺乳动物的基因功能提供了新方法, 更为治疗人类主要疾病带来了新希望. 已经有几种病毒被设计用于表达 siRNAs. 重组 AAV 能在哺乳动物分裂期细胞和静止期细胞中长期表达 siRNA. 他们通常以附加体的形式随机、低频整合到宿主基因组中. 有研究^[13]表明向大鼠脑内注射表达 siRNA 的 AAV 载体能引起长达 7 wk 之久的基因沉默效应. 在 HIV 感染的组织模型中表达 siRNA 病毒载体也被成功地应用于治疗^[14].

现在又有几种新的方法将 siRNAs 导入活体内. 最近有研究^[15]表明大分子能够促进几种小分子物质经皮吸收, 包括 siRNAs 分子. 这将有利于 siRNAs 经皮吸收进入全身血液循环发挥治疗性药物的作用. 将含 siRNAs 的气溶胶导入肺内也能起到基因治疗的作用^[16].

5 以 siRNAs 为基础的基因治疗

虽然 siRNA 在哺乳动物细胞中的应用仅仅 4 a, 但他正以飞快地速度发展成为基因治疗的一种新方法. 如果 siRNAs 通过尾静脉高压注射能有效到达肝脏, 那么他可以将广泛应用于治疗各种肝病. 通过沉默肝中内源性凋亡基因的表达, 经抗凋亡酶 Caspase-8 或者抗 Fas 细胞死亡受体的 siRNAs 预处理的小鼠能有效预防各种试剂诱导的急性肝功能衰竭; 用同样的 siRNA 也能够治疗已经发生的肝损伤^[11-12]. siRNAs 通过抑制病毒自身或者抑制病毒转录所必须的辅助因子达到抗病毒的目的. 将乙型肝炎病毒 (HBV) 基因组和 siRNAs 共转染可以有效降低 HBV 的复制水平和蛋白合成^[17]. Wohlbold *et al*^[18] 证明用 siRNAs

能有效沉默异常 BCR-ABL 融合基因表达, 而不影响正常 c-BCR 和 c-ABL 的转录, 这为治疗 Ph 染色体阳性的慢性粒细胞白血病提供了新方法.

在血浆中 siRNAs 双链能抵抗核酸内切酶的降解作用, 但这并不意味着它能够稳定地存在于机体内. 因为未被修饰的 siRNAs 不能迅速进入细胞内, 或者与血浆蛋白亲和力低而较早地被机体清除. 如果不是通过表达 siRNAs 载体的方法, 那么必须经过化学修饰的 siRNAs 才能更有效的作为基因治疗的手段. 有研究^[19-20]正通过硫磷酰修饰 siRNA 提高细胞的摄取能力, 从而增强基因沉默的效果. 去年美国 FDA 已批准经过修饰的 siRNAs 进行临床新药试验, 用于治疗与年龄相关的黄斑退化性改变 (age-related macular degeneration) 的患者^[21]. 最近 Soutschek *et al*^[22] 经鼠尾静脉注射胆固醇修饰的抗 apoB siRNA 能有效沉默同源性靶基因的过度表达, 并且证实经修饰的抗 apoB siRNA 导致小鼠胆固醇水平降低的程度与 apoB 基因敲除小鼠的水平相近, 这实现了 siRNA 作为静脉注射性治疗药物的可能.

siRNAs 作为一种新的基因治疗方法引起了许多研究者的兴趣, 在很大程度上是因为其作为细胞内源性基因表达调节物质的低毒性和特异性, 另外一方面则是其比 ODNs、核酶有更强的基因沉默效率. 然而将 siRNAs 应用于临床治疗还存在一些挑战, 如将 siRNAs 导入细胞内的最佳方法及如何获得更高效率, 如何避免脱靶现象及非特异性反应. 因此, 进一步深入研究 RNAi 的机制将会丰富我们对基因表达调控的认识, 也将有利于基因治疗的实际应用.

6 参考文献

- 1 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
- 2 Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SI, Moazed D. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 2004;303:672-676
- 3 Pal-Bhadra M, Leibovitch BA, Gandhi SG, Rao M, Bhadra U, Birchler JA, Elgin SC. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science* 2004;303:669-672
- 4 Harborth J, Elbashir SM, Vandenburgh K, Manninga H, Scaringe SA, Weber K, Tuschl T. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2003;13:83-105
- 5 Drew HR, Lewy D, Conaty J, Rand KN, Hendry P, Lockett T. RNA hairpin loops repress protein synthesis more strongly than hammerhead ribozymes. *Eur J Biochem* 1999; 266:260-273
- 6 Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100: 6347-6352
- 7 Persengiev SP, Zhu X, Green MR. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* 2004; 10:12-18

- 8 Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 2003;5:834-839
- 9 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
- 10 Shinagawa T, Ishii S. Generation of Ski-knockdown mice by expressing a long double-strand RNA from an RNA polymerase II promoter. *Genes Dev* 2003;17:1340-1345
- 11 Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, Waltemathe M, Gosling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kuhnel F, Kubicka S. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7797-7802
- 12 Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003;9:347-351
- 13 Hommel JD, Sears RM, Georgescu D, Simmons DL, DiLeone RJ. Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 2003;9:1539-1544
- 14 Coburn GA, Cullen BR. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol* 2002;76:9225-9231
- 15 Karande P, Jain A, Mitragotri S. Discovery of transdermal penetration enhancers by high-throughput screening. *Nat Biotechnol* 2004;22:192-197
- 16 Gautam A, Densmore CL, Xu B, Waldrep JC. Enhanced gene expression in mouse lung after PEI-DNA aerosol delivery. *Mol Ther* 2000;2:63-70
- 17 Klein C, Bock CT, Wedemeyer H, Wustefeld T, Locarnini S, Dienes HP, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo by nucleoside analogues and siRNA. *Gastroenterology* 2003;125:9-18
- 18 Wohlbold L, van der Kuip H, Miething C, Vornlocher HP, Knabbe C, Duyster J, Aulitzky WE. Inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (STI571). *Blood* 2003;102:2236-2239
- 19 Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygun H, Klippel A, Pronk GJ, Giese K, Kaufmann J. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2003;31:2705-2716
- 20 Braasch DA, Jensen S, Liu Y, Kaur K, Arar K, White MA, Corey DR. RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* 2003;42:7967-7975
- 21 Karagiannis TC, El-Osta A. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. *Cancer Gene Ther* 2005; May 13: [Epub ahead of print]
- 22 Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Kotliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004;432:173-178

编辑 王谨晖 审读 张海宁

广东中西医结合、中医消化病学术会议

本刊讯 广东中西医结合、中医消化病学术会议定于 2005-11 在广州召开, 现将征稿通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文、结构式摘要(800 字左右)各一份, 电脑打印(附软盘), 2005-09-30 截稿。

2 联系方式

广东省广州市广州大道北 1838 号南方医院消化科 智发朝 教授, 电话: 020-65641531。