

RNA 干涉与干细胞

庄淑珍 董武子 窦忠英*

(西北农林科技大学, 国家干细胞工程研究中心陕西分中心, 杨凌 712100)

摘要 RNA干涉(RNAi)现象普遍存在于生物体细胞中,在理论上已清楚其分子机制,为干细胞研究提供了新的方法。现从RNAi的分子机制、干细胞中的RNAi现象、研究干细胞RNAi效应的方法以及小分子干涉RNA(siRNA)干涉干细胞特异功能基因的检测方法等方面进行了综述。表明应用RNAi技术研究基因功能和干细胞维持及定向分化的调控具有广阔的发展前景。

关键词 RNA干涉; 转录后基因沉默; 干细胞; 功能基因

RNA干涉(RNA interference, RNAi)现象是外源双链RNA(dsRNA)介导的一种进化上保守的细胞防御机制,它能够特异而有效降解mRNA,从而引起转录后基因沉默^[1],导致相应功能基因表型缺失。因此,在功能基因研究方面, RNAi具有与基因剔除法相同的功效,且比基因剔除法更为简洁。

1998年, Fire等^[2]提出了RNAi概念,后来的研究者不断发现在许多生物体细胞中均有RNAi现象^[3]。RNAi广泛存在说明外源小分子RNA能操纵许多基因表达其细胞功能,甚至一些小分子干涉RNA (small interfering RNA, siRNA)可以通过指导基因的开关来调节细胞的发育过程。但长期以来,人们认为哺乳动物细胞不存在RNAi现象,主要原因是较长的dsRNA在哺乳动物细胞中能诱导干扰素的合成,影响许多基因表达并导致细胞的死亡;另一方面,长链的dsRNA激活了PKR(dsRNA依赖的蛋白激酶R),PKR活性使eIF2 α 磷酸化而失活,导致非特异性蛋白质合成障碍,同时,dsRNA激活抗病毒蛋白2',5'-寡聚腺苷酸合成酶,使细胞中出现2',5'-寡聚腺苷酸激酶活性的非特异性RNA酶L(RNase L),RNase L是一个对所有RNA都起作用的非特异性酶,从而引发RNA降解效应,使长链dsRNA启动的蛋白质合成全面关闭^[4]。研究发现,只要siRNA短于30 bp就不会引发干扰素效应,且能导致非特异性mRNA降解,引起基因沉默^[5]。在此过程中,dsRNA产生的小片段可降解mRNA,且不受抑制剂的影响,但必须有ATP的参与^[6]。

RNAi是由dsRNA诱导的复杂过程,在ATP的参与下使dsRNA 5'端磷酸化,尤其是参与寄主细胞内mRNA互补配对的反义链的磷酸化。但在哺乳动物细胞,dsRNA 5'端并不一定要磷酸化,当dsRNA进入靶细胞内后,同样能使细胞mRNA降解^[5]。RNAi的分子机制包括3个阶段:

1.1 siRNA生成

dsRNA进入细胞后,由Rde-1(RNAi缺陷基因-1)编码的蛋白质首先识别外来的dsRNA,引导RNase III家族的Dicer酶^[7]特异结合dsRNA,ATPase参与并提供能量,Dicer酶执行RNase III的活性,RNA解旋酶(Mut6)^[8]将dsRNA解旋并切成21~23 nt的小片段siRNA。

通过放射性核素标记dsRNA研究发现,标记dsRNA的正义链和反义链后,降解的RNA小片段均具有放射活性,表明双链均被裂解以及dsRNA核酸酶参与了这一过程。

由于Dicer酶仅存在于细胞质中,显然,这种RNAi发生在成熟的mRNA进入细胞质后,尽管可能有其他类似功能的酶可以引起核内RNAi的发生,但一般认为;mRNA的前体核内不均一RNA (heterogeneous nuclear RNA, hnRNA)可能通过后期的剪接抵抗RNAi效应。在21~23 bp的3'端带有两个碱基的siRNA诱导的RNAi效应最强^[9]。研究显示21~23 bp的siRNA片段识别同源序列的特异性最好,较长的siRNA与靶mRNA上的序列不能完全配

1 RNAi的分子机制

收稿日期: 2003-06-02 接受日期: 2004-03-18

* 通讯作者。 Tel: 029-87012124, Fax: 029-87013368, E-mail:

douzhongying@china.com

对, 扩大 siRNA 对靶 mRNA 的作用区域, 较短的 siRNA 识别同源序列的特异性较差^[10]。

1.2 siRNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)的形成

siRNA 双链产生以后, 就与一个核酸特异性的酶(Ago-2)结合形成 RISC, RISC 在 ATP 的参与下被激活, 使结合在 RISC 上的 siRNA 双链变性, 这一变性过程可能有两种方式: (1)dsRNA 双链首先在一些酶的作用下完全打开, 随后激活的 RISC 与 dsRNA 的反义链结合; (2)dsRNA 双链与 mRNA 形成复合物, 与之同源的 mRNA 上的序列侵入到双链中引起 dsRNA 变性。随后激活的 RISC 连接 siRNA 反义链并识别 mRNA 链上的同源序列。研究显示, 尽管 Ago-2 与 Dicer 有共同的 PAZ 区, RISC 形成与 dsRNA 生成 siRNA 的过程是相互独立的, 至少 Dicer 不参与 RISC 的形成过程^[11]。

1.3 RNAi 效应

RISC 与 mRNA 结合, siRNA 链上 3' 末端第 2 碱基起重要的作用^[5], 并随即产生一系列的连锁效应。即在特异内切酶(Ago-2)的作用下, 在距 siRNA 3' 端 12 bp(即中央位置附近)处将与之配对的宿主细胞单链 mRNA 切割, 表明 siRNA 链上中央位置碱基的特异性是 RNAi 效应的决定序列。一旦这一过程启动, 就会通过 RNA 聚合酶链式反应不断形成新生 siRNA, 在此过程中, 以 siRNA 中的一条链为引物, 以靶 mRNA 为模板, 在 RNA 介导的 RNA 聚合酶(RdRP)的作用下, 扩增 mRNA 产生新的 siRNA, 新生的 siRNA 又作用于 mRNA, 使其降解, 从而使 PTGS 具有持久性和系统性。于是 RNAi 效应不断循环进行并扩大, 因此, 初始低浓度的 siRNA 也能引发强大的 RNAi 效应。

研究也表明, 细胞中存在内源性的单链小片段 RNA(ssRNA, 或 small temporal RNA, stRNA), 如 Let-7 和 Lin-4 等内源性 RNAi 基因^[12]也具有干涉效应, 其长度在 21~25 nt 之间, 它们能特异地结合在 mRNA 3' 端的非翻译区, 抑制 mRNA 的翻译和蛋白质的合成, 也属于转录后基因沉默^[13]。可以推测, 内源性的 stRNA 可能是细胞内已存在的单链小片段 RNA, 也可能是激活的上游基因剪切下来的内含子。

2 细胞中的 RNAi 现象

RNA 干涉在许多动物细胞中存在, 在小鼠的早

期胚胎、胚胎癌性细胞(EC 细胞)和胚胎干细胞(ES 细胞)中均存在 RNA 干涉现象, 短的 dsRNA 能引起具有同源片段的 mRNA 在转录后沉默。一些研究表明, 早期胚胎细胞和 ES 细胞中不存在干扰素反应, 长的 dsRNA(>30 bp)也能够通过 RNAi 导致特异的基因剔除现象^[14]。研究者发现, 将 dsRNA 转染到培养在 STO 饲养层的未分化的 ES 细胞中, 显示序列特异性和剂量依赖性的基因表达抑制现象。由此可见, ES 细胞中的 RNAi 现象是存在的, 并且不受外源 dsRNA 长度的影响^[14]。有关成体干细胞 RNAi 现象的实验研究, 目前还未见相关报道, 可能是 RNAi 技术应用到成体干细胞研究上存在着许多问题和困难; 另一方面, 到目前为止, 有关成体干细胞还没有建成完善的细胞系。随着 RNAi 技术和成体干细胞研究的不断深入, RNAi 将是研究成体干细胞相关功能基因的重要手段。

3 RNAi 在干细胞中的应用

干细胞的分化和维持除了外界环境起重要作用外, 更重要的是因为相关的基因激活表达的结果, 使得不同干细胞具有不同的标记基因和细胞表面标记蛋白, 这为鉴定干细胞提供了依据。但是, 这些基因和标记蛋白在干细胞维持和分化中的作用还不太清楚, 尤其是哪些基因和蛋白质起决定作用更不清楚, 这是应用干细胞 RNAi 效应研究功能基因的基础。不同的干细胞具有不同的多能性和分化潜能, 就是不同的 ES 细胞系甚至来源于不同品系小鼠的 ES 细胞系也具有不同的特点。因此, 研究干细胞 RNAi 效应必须考虑不同干细胞的不同特性。干细胞的维持和定向分化发育是受特异基因和蛋白质因子决定的, 这些特异基因和蛋白质因子也决定了干细胞的特点。

3.1 ES 细胞

ES 细胞是动物早期胚胎(桑葚胚或囊胚)或者原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)在体外维持培养并传代, 经筛选出来的具有发育多能性的细胞。ES 细胞的 Oct-3/4 通过指导多种目的基因的表达而维持 ES 细胞多潜能性。Oct-3/4 是 Pou 家族中的一种转录因子, 只在早期胚胎、PGCs 和未分化胚胎细胞(embryonic cell, EC)、胚胎生殖细胞(embryonic germ cell, EG)、ES 细胞中存在^[15], 在 ES 细胞中, 持续表达 Oct-3/4 对维持其多潜能性很必要。如果 Oct-3/4 在干细胞中的表达消失, 那么其自我增殖将

停止, 导致启动不正常分化。至少可以通过检测 *oct-3/4* 基因以及与其相关的控制特征来鉴别干细胞。但是并不是说只要将 *oct-3/4* 从 ES 细胞中干涉掉, 就引起 ES 细胞的分化和死亡。研究显示, 只是当 *oct-3/4* 基因的 mRNA 被干涉到 RT-PCR 检测的最低下线时, ES 细胞生长增殖速度较慢, 立体感稍差, 但仍具有 ES 细胞的一些特性^[16]。*Gi-α2* 基因是在 ES 细胞中表达, 并能引起干细胞向脂肪细胞分化的主要基因^[17]。

3.2 成体干细胞

尽管 RNA 干涉用于成体干细胞研究未见报道, 但成体干细胞是另一类可用于研究功能基因的多能细胞, 目前, 比较感兴趣的是关于成体干细胞表面分子标记在细胞定向分化中的作用。

皮肤干细胞是未分化的表皮基底细胞, 通过高表达的 β_1 整合素来调控细胞对基底膜的黏附, 因此, β_1 整合素的表达水平可作为鉴别皮肤干细胞存在的分子标记^[18]。其他的如角蛋白 K19 也可作为皮肤干细胞的表面标记分子。而角蛋白 K15 是鉴别毛囊干细胞的一个分子标志。

目前已确定与胰腺干细胞有关的标记物有许多, 如胰肠同源盒因子 1 (pancreatic and duodenal homeobox factor 1, PDX-1), 肝细胞核因子 3 β (hepatic nuclear factor 3beta, HNF3 β)。研究表明, PDX-1 是胚胎胰腺发育的必要因子, 存在于胰腺的 HNF3 β 是 PDX-1 的调控结合蛋白, 参与胰导管细胞分化为胰岛细胞。神经原性因子 3 (neurogenin 3, Ngn3) 是一种蛋白质转录因子, 在表达 PDX-1 的小鼠胰腺导管上皮细胞表达^[19]。实验表明, 在 PDX-1 的调控下, Ngn3 的早期表达启动了胰岛细胞的分化。其他如胰岛因子 1 (islet-1, IS1-1)、酪氨酸羟化酶 (TH) 等也可以作为胰腺干细胞的相关标记分子^[20]。

CD34 分子是目前应用最广泛的用于分离造血干细胞的表面标志。而 AC133 分子被认为是更早期造血祖细胞和造血干细胞的特异性标记^[21]。KDR, 即血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 是新发现的一个可用于区别造血祖细胞的造血干细胞阳性功能性标志^[22]。

神经干细胞的表面标记蛋白有 Nestin、波形蛋白、RNA 结合蛋白 Musashi 以及 RC₁ 抗原等。Nestin 只在多潜能的神宫外胚层细胞表达, 常用作神经细胞的鉴定标志。

Kit 配体 *c-kit* 受体系统可用来鉴定精原干细胞^[23]。

资料表明, *c-kit* 受体的表达, 在 A₁₋₄ 型细胞为高水平; 在 In 型、B 型及早期的前细线期精母细胞为低水平; 在后期的精母细胞及精子细胞中不表达。因此, *c-kit* 受体可作为 A 型精原干细胞的标记物。最近, Shinohara 等^[24]发现小鼠精原干细胞表达 $\beta 1$ 和 $\alpha 6$ 整合素也可作为精原干细胞的表面标记, 并用其抗体鉴定了小鼠精原干细胞。

3.3 干细胞定位微环境

干细胞无限增殖或定向分化必须定位于微环境中并接受不同的外界信号才能实现。研究发现, 有两个蛋白质 DE-cadherin 和 *bate-catenin* 在果蝇生殖细胞和帽子细胞中高浓度累积, 是干细胞定位于微环境的决定蛋白。当这两个蛋白质从生殖细胞处移走后, 干细胞就会从那里消失^[25]。

4 研究干细胞 RNAi 效应的方法

研究干细胞 RNAi 效应, 一方面是研究标记基因在干细胞内的干涉直观现象, 另一方面用以研究在干细胞维持或分化中的基因功能。因此, 对干细胞基因组进行报告基因标记, 以及弄清干细胞中活性基因的表达状况是非常重要的。

4.1 干细胞基因的标记

应用干细胞研究 RNAi 效应的最好方法, 就是用特定的已知基因标记干细胞然后进行相应的研究。目前, 主要标记的干细胞是 ES 细胞。其基本方法是, 通过电穿孔等方法将线性化的重组质粒导入特定品系的 ES 细胞中, 筛选出相关抗体的抗性克隆 ES 细胞进行扩增培养, 从而得到备用的标记 ES 细胞^[14,16]。

4.2 dsRNA 的转染方法

无论是对干细胞基因组进行标记, 还是导入外源的 dsRNA, 必须采取合适的转染方法。

4.2.1 直接注射法 将在体外合成的 dsRNA 通过微注射法导入细胞中或者直接导入动物体内。早期的 RNAi 研究采用这种方法, 实际上, Guo 等^[26]应用该方法在 1995 年发现了 RNA 干扰现象, 但并没有得到很好的解释。一些研究表明, 用微注射法将外源 dsRNA 导入细胞, 用于 RNAi 的研究, 其效率极低, 但是干涉现象能从一个细胞感染另一个细胞, 扩大干涉效应。因此, 这种方法适用于将基因直接导入线虫等低等动物体内。

4.2.2 电穿孔法 就是利用脉冲电场将线性 dsRNA 导入细胞中。

4.2.3 干涉 dsRNA 质粒载体 Lipofectin 转染 将培养在24孔微量培养板中的标记好了的ES细胞根据研究需要进行培养,当培养板中的ES细胞集落密度足够大时,即达到培养面积的80%时,就可以进行质粒转染。在每孔中加入含有一定量的Lipofectin和特定的dsRNA质粒载体,一定时间后(5~6 h^[16], 45 min^[24]),洗掉转染液。转染时间为60 h左右,消化ES细胞,离心细胞悬液,将离心出来的ES细胞以PBS液稀释,通过流式细胞分析仪进行分析。进一步研究还可以进行常规干细胞培养,备用。研究显示,应用Lipofectin转染干细胞的转染效率与Lipofectin和质粒的量有关(当Lipofectin和质粒的量分别是12 μg和4 μg时,转染率为23.7%),且与二者的比率有关(Lipofectin和质粒比例4:1或Lipofectin量稍高时较好),孟国良等^[16]研究结果显示,应用干涉质粒转染ES细胞的转化率可达到20%~30%的水平。

外源基因导入动物细胞的方法均可以用于将dsRNA导入干细胞,如磷酸钙转染法;DEAE-葡聚糖转染法^[27]等。

4.3 siRNA 干扰干细胞特异功能基因检测方法

检测RNAi的效应可通过多种方法,在基因水平上特别是被降解的目的mRNA的检测是直接有效的;分析干涉基因的蛋白质表达水平可以相应的得到被干涉mRNA的翻译状况。另外,对于已知的干细胞基因的干涉效应的检测,还可以根据观察该基因决定干细胞的表型来分析干涉效果。

4.3.1 RT-PCR 检测干细胞被干涉的目的 mRNA 的转录水平^[14,15,27] 用RNA提取试剂盒提取经鉴定为阳性克隆的ES细胞的RNA,然后做RT-PCR,PCR过程使用两对引物,第一对是内源对照基因的引物,第二对是所要干涉的基因的引物。根据内源对照基因cDNA与目的基因cDNA片断电泳条带相对强度的比例,确定目的基因的mRNA被dsRNA干涉的程度。

4.3.2 用 Western 印迹分析被干涉基因的蛋白质表达水平^[27] 将被干涉mRNA的干细胞裂解,裂解物作SDS-PAGE电泳,然后将蛋白质从SDS聚丙烯酰胺凝胶电转移至硝酸纤维素膜,封闭硝酸纤维素滤膜的免疫球蛋白结合位点,以降低非特异性结合。用特异性抗体结合靶蛋白,染色。(将染色的膜)与对照(未干涉干细胞)进行比较,被干涉的mRNA干细胞裂解物的印迹条带无或色浅,表明目

的基因被完全干涉或部分干涉。

4.3.3 检测干细胞功能基因表型^[28] ①决定ES细胞形态的相关基因干涉的检测:可通过ES细胞的形态特征进行检测。如干细胞胞体小,核大,细胞致密,细胞间无界限、形似鸟巢;EG细胞形状呈圆形或纺锤形,带有尾座,与ES细胞生长方式相同,ES细胞的克隆细胞和周围存在明显界限,形成的克隆细胞彼此界限不清(显微镜检),细胞表面有折光较强的脂状小滴。克隆形态多样,多数呈岛状或巢状,等等。②体外分化实验:将ES细胞悬液在干细胞培养液中培养6~10天,ES细胞将形成简单胚体和类胚体的形态特点进行分析。③体内分化实验:将ES细胞悬液给同种动物皮下或腹腔注射,可形成畸胎瘤,制成切片可观察到多种分化的细胞类型及其分化效率。④嵌合体实验:用聚合法或注入法制作正常胚胎与ES细胞的嵌合体,体外培养后植入受体,可以妊娠生出嵌合体,只有生殖系嵌合的个体,才能将ES细胞传给后代。然后从其外型、蛋白质及DNA指纹等不同表达水平加以检测,可以知道其嵌合程度或对特定功能基因的干涉程度。⑤核移植:用ES细胞作细胞核供体,进行核移植,可获得克隆后代,将其与正常克隆后代进行表型比较,这种ES细胞多能性检测是判断干涉效应最有说服力的方法。⑥还可以通过碱性磷酸酶(AKP)活性来检测干细胞基因被干涉的效应。

5 展望

RNAi具有巨大的应用前景。通过干细胞和RNAi技术二者的结合,研究决定细胞发育特定基因的功能,抑制转座子的活动以防止自私基因的过量扩增,从而控制生物体的发育和基因调控。马晋平等^[13]应用RNAi研究表皮干细胞的染色体端粒酶亚基hTERT的功能。RNAi效应可以遗传给后代,表明获得性可以遗传,把外源dsRNA导入干细胞中引起相应功能基因改变,进行嵌合体制作或核移植以及体外发育成相应的组织器官,使被干涉的基因遗传给后代,在后代中出现或失去相应的表型,尤其干细胞作为一种多能性细胞,利用RNAi特异性抑制干细胞维持或定向分化研究,对进行疾病治疗或生产生物医药具有重要的现实意义。

参考文献 (References)

- [1] Bahramian MB *et al.* *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 274

- [2] Fire A *et al. Nature*, 1998, **391**: 806
- [3] Boşher JM *et al. Nat Cell Biol*, 2000, **2**: E31
- [4] Gitlin L *et al. Nature*, 2002, **418**: 430
- [5] Elbashir SM *et al. Methods*, 2002, **26**: 199
- [6] Zamore PD *et al. Cell*, 2000, **101**: 25
- [7] Benstein E *et al. Nature*, 2001, **409**: 363
- [8] Wu-Scharf D *et al. Science*, 2000, **290**: 1159
- [9] 张明等. *军事医学科学院院刊*, 2002, **26**: 61
- [10] Brantl S. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1575**: 15
- [11] Sui G *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(8): 5515
- [12] Grishok A *et al. Cell*, 2001, **106**: 23
- [13] 马晋平等. *自然杂志*, 2003, **25**: 1
- [14] Yang S *et al. Mol Cell Biol*, 2001, **21**: 7807
- [15] Pesce M *et al. Mech Dev*, 1998, **71**: 89
- [16] 孟国良等. *生物化学与生物物理学报*, 2003, **35**: 238
- [17] Su HL *et al. Am J Physiol*, 1993, **265**: C1729
- [18] Brakebusch C *et al. EMBO J*, 2000, **19**: 3990
- [19] Kritzik MR *et al. Endocrinol*, 1999, **163**: 523
- [20] Jensen J *et al. Diabetes*, 2000a, **49**: 163
- [21] Yin AH *et al. Blood*, 1997, **90**: 5002
- [22] Ziegler BL *et al. Science*, 1999, **285**: 1553
- [23] Dym M *et al. Biol Reprod*, 1995, **52**: 8
- [24] Shinohara T *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 8346
- [25] Song X *et al. Science*, 2002, **296**: 1855
- [26] Guo HC *et al. EMBO J*, 1995, **14**: 368
- [27] Sambrook J 等. *分子克隆实验指南*(第二版), 北京: 科学出版社, 1999
- [28] 董晓等. *外国畜牧科技*, 2000, **27**: 24

RNAi and the Stem Cell

Shu-Zhen Zhuang, Wu-Zi Dong, Zhong-Ying Dou*

(Shaanxi Province Branch Center of National Stem Cell Engineering & Technology Center,
Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract RNAi exists in all the cells of organism, whose molecular mechanism has been known theoretically. The technology provides a new method for studying stem cells. The paper reviewed the molecular mechanism, the RNAi phenomena in stem cells, the assay of the effects of RNAi on stem cells and the detection of interference of siRNA with the specific functional genes of stem cells. The review showed that the technological research on RNAi had great prospect in studying the function of genes and the maintenance and specific differentiation regulation of stem cells.

Key words RNAi; posttranscription gene silencing; stem cells; functional genes

Received: June 2, 2003 Accepted: March 18, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-29-87012124, Fax: 86-29-87013368, E-mail: douzhongying@china.com