

# RNA 干扰在哺乳动物卵母细胞及早期胚胎发育研究中的应用

佟慧丽 李树峰 严云勤\*

(东北农业大学生命科学学院组织胚胎学教研室, 哈尔滨 150030)

**摘要** RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种真核生物体内由特定双链 RNA 介导的转录后基因沉默现象。近年来, RNAi 的作用机制已基本阐明, 并广泛的应用于基因功能的研究。现对 RNAi 在哺乳动物卵母细胞及早期胚胎研究中的作用特点、应用情况、存在问题等几方面进行综述。

**关键词** RNA 干扰; 双链 RNA; 卵母细胞; 早期胚胎

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 现象是 Fire 等<sup>[1]</sup>在秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 中发现的。他们将双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 注入线虫体内后, 发现可以诱导与之同源的 mRNA 降解, 特异性地阻断相应基因的表达, 并且证实这种抑制作用主要发生在转录之后, 所以又称 RNAi 为转录后基因沉默 (posttranscriptional gene-silencing, PTGS)。进一步研究发现 RNAi 是真核生物中普遍存在且非常保守的机制<sup>[2]</sup>。dsRNA 在细胞内被 ATP 依赖的 Dicer 酶<sup>[3,4]</sup>切成约 19~22 nt 的短干扰 RNA (short interference RNA, siRNA), siRNA 参与形成 siRNA 干扰复合物 (siRNA-induced interference complex, RISC), 有活性的 RISC 通过识别、降解具有同源序列的 mRNA, 最终导致特异性的基因表达沉默<sup>[5]</sup>。此外, RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRP) 是参与 RNAi 的组分之一, 可以作为 RNAi 反应的扩增子, 增加 RNAi 反应的持续时间和作用强度<sup>[6]</sup>。

哺乳动物的 RNAi 机制与果蝇和线虫的 RNAi 机制基本相似, 不同之处是很多哺乳动物细胞缺乏 RdRP 同源类似物, 有的动物中即使发现了 RdRP, 但其并不参与 RNAi 过程<sup>[7]</sup>, 这可能是哺乳动物细胞中 RNAi 效率较低的原因之一<sup>[8,9]</sup>。

RNAi 作为一种基因功能研究的新手段在众多领域里都发挥着重要的作用。近几年来随着 RNAi 技术水平的发展, RNAi 在哺乳动物卵母细胞及早期胚胎研究领域已经显示了其强大的作用, 具有广阔的应用前景。

## 1 哺乳动物卵母细胞及早期胚胎中 RNAi 的作用特点

研究发现, 哺乳动物细胞中长度超过 30 bp 的外源 dsRNA 进入细胞后会启动细胞内抗病毒的干扰素途径, 可以关闭蛋白质的合成并引起非特异性的基因表达的抑制<sup>[10]</sup>, 甚至导致细胞凋亡<sup>[11]</sup>。所以现在 RNAi 在哺乳动物细胞中的应用都是将小双链 siRNA 或编码发夹结构的质粒表达载体转染到细胞内使靶基因表达水平下调。目前 RNAi 筛选技术的突破, 使 siRNA 和短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 文库收录了大量具有应用前景的基因, 使哺乳动物细胞中 RNAi 的研究变得简单、快捷。

卵母细胞和早期胚胎的 RNAi 效应也可以通过转染外源的 siRNA 或编码发夹结构的质粒表达载体来实现。不同的是, 在干扰素途径还未启动的小鼠早期胚胎、畸胎瘤细胞 (EC) 以及胚胎干细胞 (ES cell) 等少数早期胚胎细胞系中, 可以利用长 dsRNA 分子诱导产生特异性的 RNAi 效应<sup>[12,13]</sup>。卵母细胞和早期胚胎中使用的长 dsRNA 有两种, 一是传统的长 dsRNA 分子, 其制备的大致步骤是: 首先通过转录准备模板, 然后进行有义链和反义链的转录及退火, 最后纯化得到长 dsRNA; 二是发夹结构的长 dsRNA, 即通过转录一个反向重复序列进而形成具有发夹样结构的 dsRNA。Svoboda<sup>[14]</sup>就是使用质粒

收稿日期: 2005-08-10 接受日期: 2005-10-24

\* 通讯作者。Tel: 0451-55190846, E-mail: yanyunqin@sohu.com

形式表达的发夹结构的长 dsRNA 在小鼠卵母细胞和早期胚胎中取得了与传统的直接转染长 dsRNA 同样的 RNAi 效应。无论何种长 dsRNA 都可以通过显微注射导入到哺乳动物卵母细胞及早期胚胎中, 并且不存在 dsRNA 的非特异性反应<sup>[15]</sup>, 因而成为哺乳动物卵母细胞及早期胚胎中 RNAi 研究的一种独特而有效的方式, 这也是研究者们目前普遍采用的 RNAi 的作用方式。

值得强调的是, 哺乳动物卵母细胞和早期胚胎中外源 dsRNA 的导入一般都借助显微注射来实现, 这在很大程度上限制了 dsRNA 的导入次数以及每次操作的卵母细胞和胚胎的数量, 造成转染效率低且不能实现稳定的 RNAi 效应, 而且很难靶向后期活化的基因, 因为此时 dsRNA 可能已经发生稀释和降解<sup>[16]</sup>。科学家利用转基因 RNAi 解决了这一问题, 目前用长发夹和短发夹表达载体介导的转基因 RNAi 都获得了成功<sup>[17,18]</sup>。转基因 RNAi 的一般方法是先对胚胎干细胞或受精卵中的特定基因进行 RNAi 处理, 然后将这些细胞通过显微注射或病毒转染的方法导入囊胚腔中, 得到嵌合体, 通过后代交配实现动物体内稳定的、长期的 RNAi 效应。

## 2 RNAi在哺乳动物卵母细胞研究中的应用

母源性基因在哺乳动物卵母细胞中的转录和 mRNA 的积累, 对卵母细胞的成熟和以后的胚胎发育有十分重要的作用。RNAi 作用可以使卵母细胞中特定基因的表达受到抑制, 有助于很好的了解一些基因的功能。因此, 近年来卵母细胞中 RNAi 的应用大多都集中在母源性基因功能的研究, 为探明哺乳动物卵母细胞和胚胎发育机制提供了重要帮助。

### 2.1 Mos 基因

Mos 基因的产物具有丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性, 在启动哺乳动物卵母细胞成熟过程中具有重要作用。最早把 RNAi 技术应用于卵母细胞研究的是 Svoboda 等<sup>[8]</sup>。他们将 Mos 基因和 Plat 基因的长 dsRNA 显微注射入小鼠卵母细胞中, 引发了具有时间和浓度依赖性的 RNAi, 有效破坏了目标 Mos mRNA 和 Plat mRNA 的表达, 成功抑制了休眠性母源 mRNA 的功能。Wianny 等<sup>[12]</sup>通过显微注射长 dsRNA 和长 dsRNA 的质粒表达载体也都抑制了 Mos 基因的表达, 使卵母细胞发生了孤雌激活。

### 2.2 细胞周期蛋白 B1(cyclinB1)基因

细胞周期蛋白 B1 是减数分裂过程中重要的蛋白

质。Lazar 等<sup>[19]</sup>在大鼠卵母细胞中导入细胞周期蛋白 B1 dsRNA, 结果降低了促成熟因子(maturation-promoting factor, MPF)的活性, 影响了卵母细胞向 MII 期的转变。Paradis 等<sup>[20]</sup>在体外培养的牛卵母细胞中显微注射细胞周期蛋白 B1 dsRNA 发现细胞周期蛋白 B1 表达的下降使卵母细胞的激活率增加了 33%。

### 2.3 碱性核蛋白(basonuclin)基因

Ma 等<sup>[21]</sup>利用 RNAi 研究转录因子碱性核蛋白在卵母细胞发生过程中的功能。他们将碱性核蛋白基因特异的长 dsRNA 导入小鼠生发泡期的卵母细胞, 有效地降低了碱性核蛋白基因 mRNA 的丰度及表达, 为研究转录因子碱性核蛋白在卵母细胞早期发育中的功能提供了依据。

### 2.4 CDC6 基因

CDC6 基因具有参与 DNA 复制, 调控细胞周期等重要作用。Anger 等<sup>[22]</sup>利用 RNAi 对卵母细胞成熟过程中 CDC6 基因的功能进行了研究。他们通过向小鼠生发泡期卵母细胞中显微注射 CDC6 的长 dsRNA, 使 CDC6 基因的表达下调, 形态学观察发现尽管这些卵母细胞可以发生生发泡破裂, 但是不排出第一极体同时也检测不到纺锤体的形成, 卵母细胞不能进入 MI 期。说明 CDC6 基因对于卵母细胞纺锤体的形成是必需的。

### 2.5 GDF9 基因

已知小鼠卵巢中卵母细胞分泌的卵母细胞生长分化因子 -9(growth differentiation factor-9, GDF9)在早期卵泡的发育中具有刺激原始卵泡启动其生长的功能, 近期 Gui 等<sup>[23]</sup>利用 GDF9 基因长 dsRNA 介导的 RNAi 实验, 实现了 GDF9 基因 mRNA 表达水平的下调, 观察发现几乎所有的卵丘细胞都保持紧密的连接, 不发生卵丘扩展。说明 GDF9 基因是小鼠卵母细胞卵丘扩展中的关键调节因子。

### 2.6 钙离子通道蛋白(IP<sub>3</sub>受体)基因

许多研究表明, 钙离子波动引发的皮质颗粒外排在卵母细胞成熟过程中具有重要作用, Xu 等<sup>[24]</sup>向小鼠生发泡期卵母细胞中显微注射 IP<sub>3</sub>受体-1 基因的 dsRNA, 成功的介导了靶基因表达水平的下调, 这些被注射的卵母细胞可以发育成熟到 MII 期, 但是皮质颗粒的外排明显减少, 且瞬时的钙离子释放也发生下降。表明卵母细胞成熟过程中, 钙离子通道蛋白(IP<sub>3</sub>受体)与钙离子波动有一定关系。

### 2.7 MSY2 基因

MSY2 基因的表达产物 MSY2 蛋白属于 Y-box 蛋白家族, MSY2 基因在精子和卵子的发育过程中都起重要作用。Yu 等<sup>[25]</sup>在小鼠卵母细胞中,通过具有卵母细胞特定 ZP3 启动子的长链发夹 dsRNA 介导的 RNAi 实现了 MSY2 基因的表达下降,结果导致一些与卵母细胞成熟过程相关的蛋白质无法合成,说明 MSY2 基因在小鼠卵子发生过程中对母源性 mRNA 的稳定性具有调节作用。

实际上,卵母细胞成熟的调控涉及众多激素和分子的作用,其成熟机制探明仍然需要研究的不断进展。以上虽然仅仅是研究者对卵母细胞成熟机制的一些重要探索,但已充分表明 RNAi 作为一种重要手段在卵母细胞基因功能的研究中发挥着越来越重要的作用,为今后的研究提供了坚实的理论和实验基础。

### 3 RNAi 在哺乳动物早期胚胎发育研究中的应用

RNAi 在哺乳动物胚胎的研究中主要局限于早期胚胎发育阶段,由于该阶段胚胎发育无法停止或减慢速度,使 dsRNA 没有充足的时间作用表达特异基因的细胞,而且并不是所有的基因都能被 RNAi 抑制,通常靶 mRNA 被特异性降解后,相应的蛋白质会根据其稳定性的长短,在一定时间后才表现出表达水平下降,导致 RNAi 处理往往达不到预期效果。尽管如此,人们仍进行了一些有益的探索。

#### 3.1 Oct4 基因

Oct4 是一个和胚胎发育全能性相关的转录因子,Haraguchi 等<sup>[26]</sup>在小鼠受精卵原核中注射 Oct4 基因的 siRNA 表达载体,体外培养到囊胚期阶段检测到 Oct4 基因 mRNA 和蛋白质表达水平的下降,且胚胎发育阻滞在囊胚期。

#### 3.2 E-钙黏着蛋白(E-cadherin) 基因

E-钙黏着蛋白是一种细胞黏附分子,在胚胎发育细胞间的识别和黏附过程中发挥重要的作用。Wianny 等<sup>[12]</sup>在小鼠受精卵中显微注射 E-钙黏着蛋白基因的 dsRNA, E-钙黏着蛋白基因表达的下调影响了胚胎正常的致密化过程。尽管母源性 E-钙黏着蛋白的存在可以使胚胎形成正常的致密化桑椹胚,却无法发育为正常的囊胚,这说明 E-钙黏着蛋白基因的表达在早期胚胎致密化过程中具有重要作用。

#### 3.3 Epithin 基因

Epithin 是一种小鼠 II 型跨膜的丝氨酸蛋白酶,

Khang 等<sup>[27]</sup>利用 RT-PCR 的方法检测到 epithin 在小鼠胚胎 1-细胞到囊胚期的发育过程中一直都有表达;通过免疫荧光实验发现 epithin 和 E-钙黏着蛋白协同定位于致密化的桑椹胚卵裂球接触面上;而且利用 RNAi 技术抑制小鼠 epithin 基因的表达以后,胚胎发育停滞在 8-细胞期,而 8-细胞期正是小鼠胚胎发生致密化的时期,表明 epithin 在胚胎致密化过程中具有重要作用,推测 epithin 可能诱导胚胎致密化过程中内细胞团和滋养层细胞的分化。

### 4 问题及展望

RNAi 在哺乳动物卵母细胞及早期胚胎发育研究中已经取得了一定的成果,但仍有一些方面需要探讨:①卵母细胞和早期胚胎中 RNAi 的作用机制,以便更有效的利用 RNAi;②如何提高 siRNA 和 shRNA 导入效率以及降低 dsRNA 对细胞毒性等问题;③如何在哺乳动物整体水平提高 RNAi 作用的特异性;④如何准确控制 RNAi 靶向基因阶段性的表达及其表达水平;⑤根据哺乳动物卵母细胞及早期胚胎中 RNAi 的作用特点,尽快建立一套完善、标准的 RNAi 实验方案。

目前, RNAi 作为一种新的研究手段已经广泛应用于肿瘤及癌症的治疗, HIV、SARS 等多种病毒的抑制,基因组功能、细胞信号转导通路、哺乳动物卵母细胞和早期胚胎基因功能研究等许多重要领域。尽管卵母细胞和早期胚胎中的 RNAi 研究还主要局限于小鼠,但是随着该技术的不断发展和完善,必将成为哺乳动物早期发育研究的强有力的工具,为人类胚胎发育机制的探索提供重要帮助。

### 参考文献 (References)

- [1] Fire A *et al. Nature*, 1998, **391**: 806
- [2] Zamore PD. *Science*, 2002, **296**: 1265
- [3] Zamore PD *et al. Cell*, 2000, **101**: 25
- [4] Bernstein E *et al. Nature*, 2001, **409**: 363
- [5] Hannon GJ. *Nature*, 2002, **418**: 244
- [6] Sijen T *et al. Cell*, 2001, **107**: 465
- [7] Stein P *et al. RNA*, 2003, **9**: 187
- [8] Svoboda P *et al. Development*, 2000, **127**: 4147
- [9] Ui-Tei K *et al. FEBS Lett*, 2000, **479**: 79
- [10] Bass BL. *Nature*, 2001, **411**: 428
- [11] Paddison PJ *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 1443
- [12] Wianny F *et al. Nat Cell Biol*, 2000, **2**: 70
- [13] Yang S *et al. Mol Cell Biol*, 2001, **21**: 7807
- [14] Svoboda P. *Cytogenet Genome Res*, 2004, **105**: 422
- [15] Svoboda P *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **287**:

- 1099
- [16] Hannon GJ. *RNAi: A Guide to Gene Silencing*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003, 322
- [17] Hasuwa H *et al.* *FEBS Lett*, 2002, **532**: 227
- [18] Stein P *et al.* *Dev Biol*, 2003, **256**: 187
- [19] Lazar S *et al.* *J Mol Endocrinol*, 2004, **33**: 73
- [20] Paradis F *et al.* *Mol Reprod Dev*, 2005, **70**: 111
- [21] Ma J *et al.* *Sci China Ser C*, 2002, **45**: 593
- [22] Anger M *et al.* *Biol Reprod*, 2005, **72**: 188
- [23] Gui LM *et al.* *Biol Reprod*, 2005, **72**: 195
- [24] Xu Z *et al.* *Dev Biol*, 2003, **254**: 163
- [25] Yu J *et al.* *Dev Biol*, 2004, **268**: 195
- [26] Haraguchi *et al.* *Mol Reprod Dev*, 2004, **68**: 17
- [27] Khang I *et al.* *Dev Biol*, 2005, **281**: 134

## Application of RNA Interference in the Study of Mammalian Oocyte and Early Embryo Development

Hui-Li Tong, Shu-Feng Li, Yun-Qin Yan\*

(Histology and Embryology Unit, College of Biological Sciences, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

**Abstract** RNAi is a phenomenon of post-transcriptional gene silencing, initiated by special double-stranded RNA (dsRNA) in eukaryotic cells. In recent years, the mechanism of RNAi has been clearly illustrated, and it has been widely used in the study of gene function. In this paper, we have summarized the mechanism of reaction, application, problem and prospect of RNAi in mammalian oocytes and early embryos.

**Key words** RNAi; dsRNA; oocyte; early embryo

Received: August 10, 2005 Accepted: October 24, 2005

\*Corresponding author. Tel: 86-451-55190846, E-mail: yanyunqin@sohu.com