

胚胎干细胞研究的新工具: RNA 干扰

张艳丽 许丹 洪俊君 王子玉 王锋*

(南京农业大学动物胚胎工程技术中心, 南京 210095)

摘要 胚胎干细胞研究是 20 世纪 90 年代以来在生物医学领域中最引人注目的热点之一, 而新近发展起来的 RNA 干扰技术, 能快速有效地沉默基因表达, 将成为胚胎干细胞生物学研究的得力工具。现对 RNA 干扰的作用机制, 以及 RNA 干扰应用于胚胎干细胞研究的方法与 RNA 干扰在胚胎干细胞研究领域的进展作一综述, 以期今后这方面的研究提供参考。

关键词 RNA 干扰; 胚胎干细胞; siRNA; 自我更新; 细胞分化

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)是由早期胚胎内细胞团(inner cell mass, ICM)或原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)经分离、体外培养和抑制分化获得的多能性细胞, 其最主要的生物学特征是自我更新和高度的分化潜能, 以及受精精密复杂的信号转导机制的调控。因此, 借助于选择性剔除或抑制特定目的基因的手段, 将有助于进一步阐明 ES 细胞自我更新和分化过程中的内在机制。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指将外源双链 RNA(double stranded RNA, dsRNA)导入细胞后引起与其序列同源的特异基因 mRNA 降解的现象, 它是由 Fire 等^[1]于 1998 年在线虫中发现的一种转录后基因沉默(post transcriptional gene silencing, PTGS)机制。迄今, RNAi 的分子机制才被基本阐明, 但 RNAi 已迅速成为实验室进行基因沉默最有效的工具, 它比反义核酸技术有效, 比基因剔除技术简单。随着 RNAi 技术的发展, 可望成为 ES 细胞研究领域的又一得力工具, 并为细胞替代治疗带来新的希望。

1 RNAi 的作用机制

目前研究较多的基因沉默小分子是 21~25 bp 的双链小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA) 和 21~22 nt 的非编码的单链微小 RNA (microRNAs, miRNA), 它们分别在转录后水平和翻译水平上引导基因沉默。

siRNA 和 miRNA 都是由 RNAIII 类的核酸酶 Dicer 切割长的 dsRNA 或发夹状 RNA 前体产生的, 进而形成 RNA 诱导沉默复合体(RISC)引起基因沉默。在 siRNA 作用途径中, 外源或转基因、病毒感染等方式引入的 dsRNA (线性或发夹结构)被 Dicer 加工为

19 个核苷酸左右的双链 siRNA, siRNA 与 RNAi 特异性酶结合形成 RISC, RISC 在 ATP 作用下活化, 再介导 siRNA 反义链与靶 mRNA 分子互补结合, 切割 mRNA, 诱导 mRNA 降解, 从而在 RNA 水平上抑制靶基因的表达^[2,3] (图 1)。

在 miRNA 作用途径中, 细胞内源基因首先被转录成原始 miRNA (primary miRNA, Pri-miRNA), 之后在 Drosha 酶催化下产生 75 个核苷酸左右的 miRNA 的前体(Pre-miRNA), Pre-miRNA 转运出细胞核, 细胞质中的 Pre-miRNA 再在 Dicer 和 ATP 的共同作用下剪切为成熟的单链 miRNA。这些成熟的 miRNA 与其他蛋白质一起形成核糖蛋白复合体(miRNA ribonucleoprotein, miRNP), 这个复合物通过部分互补结合到 mRNA 的 3' UTR 非编码区域, 从而阻遏 mRNA 的翻译。除此之外, miRNA 也可以通过切割完全互补的 mRNA, 使靶 mRNA 降解。这一点与 siRNA 的作用机制相似^[2,4]。但是在哺乳动物中, miRNA 大多是通过阻遏翻译来发挥作用的^[5] (图 1)。

2 ES 细胞中的 RNAi 现象

在哺乳动物体细胞中, 只有短的 dsRNA 能产生 RNAi 效应, 但是在小鼠早期胚胎、畸胎瘤干细胞和 ES 细胞中不存在干扰素反应, 长的 dsRNA (>30 bp) 能够通过 RNAi 导致特异的基因沉默现象^[7-9]。资料表明, 以绿色荧光蛋白(GFP)基因为靶基因, 采用纯化的长 dsRNA 分别直接转染来自 129/sv 小鼠的 ES 细

收稿日期: 2006-10-31 接受日期: 2006-12-25

江苏省国际合作项目(No.BZ2005041)

* 通讯作者。Tel: 025-84395381, Fax: 025-84395314, E-mail:

f_wang2001@sina.com

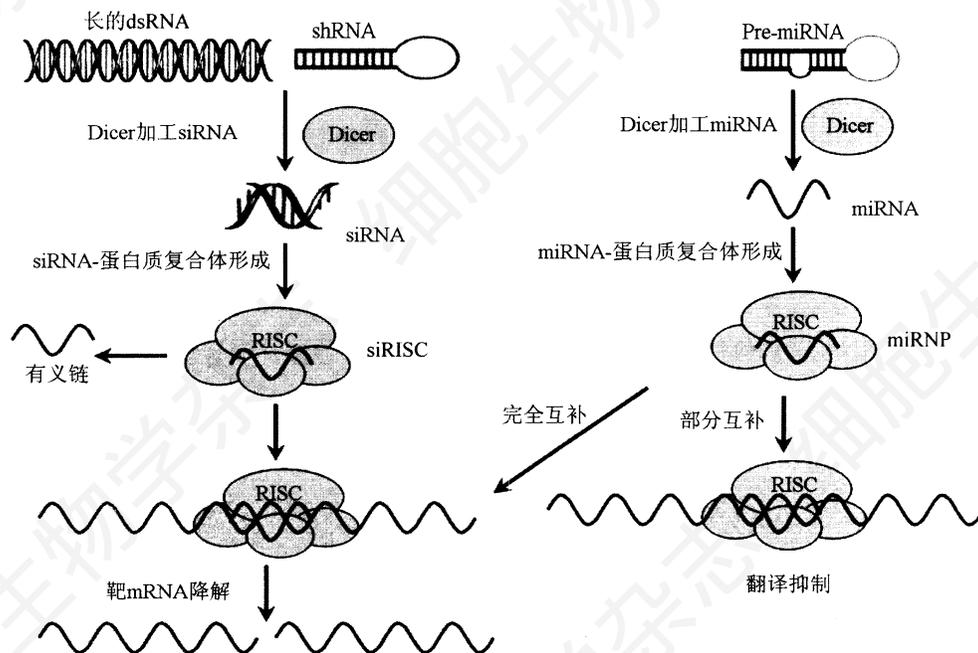


图1 siRNA与miRNA引起的基因沉默机制^[3,6]

胞系 AB2.2 和 J1, 能使这些 dsRNA 在细胞内引起 RNAi 效应^[7,8]。但是一旦 ES 细胞分化, 干扰素途径就会被激活, 长的 dsRNA 会致使蛋白质合成的全面关闭以及非特异的基因沉默^[9]。而利用 siRNA 能够克服这种非特异效应, Zou 等^[10]将 siRNA 转染分化的 ES 细胞, 发现可以降低 PU.1 和 C/EBP α 等基因的表达。

此外, Houbaviy 等^[11]发现小鼠 ES 细胞中有 miRNA 的表达, 一旦 ES 细胞分化, 在 ES 细胞中特异性表达的一些 miRNA 就会被抑制, 这说明 miRNA 可能对 ES 细胞分化的调控有举足轻重的作用。最新研究还表明, ES 细胞缺失产生 miRNA 的 Dicer, 就会影响增殖和分化, 说明 Dicer 也参与了 ES 细胞分化的调控过程^[12]。

3 RNAi 技术应用于 ES 细胞研究的方法

设计 ES 细胞的 RNAi 实验首先必须考虑: 是利用化学合成的寡核苷酸 siRNA 还是 RNAi 表达载体。化学合成的 siRNA 会随细胞分裂增殖而稀释, 因此只能暂时沉默基因的表达。而 RNAi 表达载体能在转染的 ES 细胞中持续抑制靶基因的表达, RNAi 表达载体可以分为 DNA 载体和病毒载体, 对于 ES 细胞, DNA 载体通常以 U6 启动子和 U1 启动子构建表达载体; 病毒载体又可以分为慢病毒载体、腺病毒载体以及腺病毒相关载体。其中慢病毒载体能够在分裂细胞和非分裂细胞中长期有效地表达 RNAi, 应用

VSV-G 包膜的假构型慢病毒载体拓宽了载体的嗜性范围, 增加了载体的稳定性, 并允许利用高速离心对载体进行浓缩以提高其滴度, 这些特性使慢病毒适合于高效感染 ES 细胞并用于制备 RNAi 转基因动物^[13]。

根据研究目的制备好 siRNA 或 RNAi 表达载体后, 下一步就是转染 ES 细胞。电穿孔法和脂质体法都是转染 ES 细胞的有效方法, 但在实验中一般采用脂质体法来转染 ES 细胞, 它比电穿孔法效率更高, 而且电穿孔法本身易造成细胞死亡, 还必须严格控制转染细胞中质粒 DNA 的拷贝数。此外, ES 细胞利用 RNAi 技术时还必须考虑: 如何筛选得到表达干扰载体的转基因 ES 细胞, 以排除非转基因细胞中靶基因表达的影响。将流式细胞术与抗生素筛选相结合是较为理想的办法, 目前有很多种荧光标记和抗生素可供选择, 其中 EGFP 和 DsRed2.1 是理想的荧光标记物, 新霉素抗性基因和嘌呤霉素抗性基因是常用的两种抗性标记。研究显示, 在转染后的 ES 细胞中添加 350 $\mu\text{g/ml}$ G418 或 1 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素可以抑制非转基因 ES 细胞的过度生长。但是不同的 ES 细胞系对抗生素的耐受性不同, 抗生素的剂量以能杀死非转基因细胞但不会影响大部分转基因细胞的生长为宜^[6]。

筛选得到成功转染 RNAi 载体的 ES 细胞后, 最后就是检测 RNAi 的效果。RNAi 作用的检测可从多个水平全方位, 多层次进行检测。表达水平上可以

表1 siRNA 抑制 ES 细胞中内源基因表达

靶基因	siRNA 类型	转染方式	ES 细胞	参考文献
Oct4	裸 siRNA	脂质体	mES, hES	[14], [15]
	载体 shRNA	脂质体	mES	[16]
Oct4, SOX2	载体 shRNA	脂质体	mES, hES	[17]
Oct4, Nanog	载体 siRNA+U6 启动子	逆转录病毒、慢病毒载体	hES	[18]
Oct4, Nanog	修饰的 siRNA	脂质体	mES	[19]
Oct4, Nanog, SOX2, Esrrb, Tbx3, Tc11	载体 shRNA	慢病毒载体	mES	[20]
p53	载体 siRNA	脂质体	mES	[21]

通过免疫荧光检测、Western 印记等来检测蛋白质含量的变化, 转录水平上可以采用 RT-PCR、定量 PCR 等判断目的基因的沉默效果。此外, 还可以通过相差显微镜和扫描电镜观察细胞的表型来分析。

大量文献资料表明, 已经成功地利用 RNAi 技术抑制了 ES 细胞中一些内源基因的表达, 以研究基因功能和 ES 细胞维持及定向分化调控 (表 1)。

4 RNAi 在 ES 细胞研究中的应用

Oct4 和 Nanog 是调节 ES 细胞多能性的两个关键性转录因子, 其表达水平在 ES 细胞多向分化中起着重要作用。通过 RNAi 证实: Oct4 或 Nanog 表达量下降会引起 mES 和 hES 细胞丧失多能性和自我更新的能力^[20,21], 表明这些转录因子在 mES 和 hES 细胞中有着相似的作用。然而, 该转录因子维持多能性的机制还有待进一步地研究, 尤其是它们作用的靶蛋白尚待进一步识别。因此, 对 ES 细胞自我更新和多向分化的调控是 ES 细胞今后研究的热点, 而 RNAi 正是研究 ES 细胞生物学特性的有力工具。

4.1 在 ES 细胞自我更新维持方面的应用

微阵列分析结果显示, ES 细胞中一些基因的表达量远比体细胞要高, 表明这些基因可能对干细胞特性的维持起重要调控作用。通过功能获得 (gain of function, GOF) 和功能丢失 (loss of function, LOF) 实验证实了 Nanog、Oct4、Sox2 等基因在维持 ES 细胞未分化状态方面起着重要作用, 但这种方法仅局限于研究携带此类突变基因的动物模型。从理论上讲, RNAi 可以在任何动物模型上进行, 并可能获得对靶基因不同程度的沉默效果, 从而更好地阐明众多基因在 ES 细胞自我更新维持方面的功能^[5]。

用带有独立表达报告基因和 III 型 RNA 聚合酶启动子的质粒转染 ES 细胞, 使其表达相应于 Oct4 mRNA 的小茎-环 RNA 转录产物, 结果发现转染 Oct4

shRNA 干扰质粒的 ES 细胞表现出 Oct4 mRNA 表达水平降低, 并显示出向滋养外胚层分化的特征^[16]。Hay 等^[14]用 Oct4 siRNA 转染人和小鼠的 ES 细胞, 也发现 Oct4 mRNA 的表达水平下降。Zachres 等^[18]利用逆转录病毒和慢病毒载体释放 siRNA, 使人 ES 细胞中 Oct4 和 Nanog 被高效抑制, 进一步证明了 Oct4 和 Nanog 在维持人 ES 细胞自我更新方面的作用。最近, Ivanov 等^[20]通过慢病毒载体传递 shRNA, 证实了 Esrrb、Tbx3、Tc11 三个基因以及先前报道的 Nanog、Oct4、Sox2 基因是 ES 细胞自我更新所必需的, 且其中每一个基因表达的下降都将诱导 ES 细胞向某一特定细胞系分化。

4.2 在 ES 细胞定向分化调控方面的应用

ES 细胞具有高度的发育和分化潜能, 在体内外可分化为属于三个胚层来源的各种组织和细胞。已有研究表明, ES 细胞分化得到的多巴胺神经元能用于治疗大鼠帕金森病^[22]。转录因子 Nurr1 和 Pitx3 的共转录活性能促进鼠和人 ES 细胞最终分化成多巴胺神经元类型细胞, 再将这些神经元前体移植到注射 6-OHDA 引起单侧脑损伤的成年小鼠脑内后, 能明显改善其“打转”的病症^[23]。转录因子 HoxB4 的过表达能促进 mES 细胞向造血细胞前体分化, 再将这些前体细胞成功地移植到经辐射的小鼠能使受体后代产生稳定的造血细胞^[24]。虽然已有研究报道认为, ES 细胞来源的胰岛细胞能够扭转小鼠糖尿病^[25], 但是从 ES 细胞分化得到肝细胞和胰腺细胞等内胚层细胞仍具有一定的挑战性。因此, 通过 RNAi 沉默基因表达还能发现分化途径中决定细胞命运的关键基因, 从而有助于克服 ES 细胞向内胚层分化的瓶颈。

目前, RNAi 已经被用于探明 ES 细胞分化调控机制和诱导 ES 细胞分化的研究中。最近组蛋白修饰在 ES 细胞早期分化中的作用机制备受关注, Lee 等^[26]利用 RNAi 技术抑制不添加 LIF 后的 ES 细胞中 MSK1

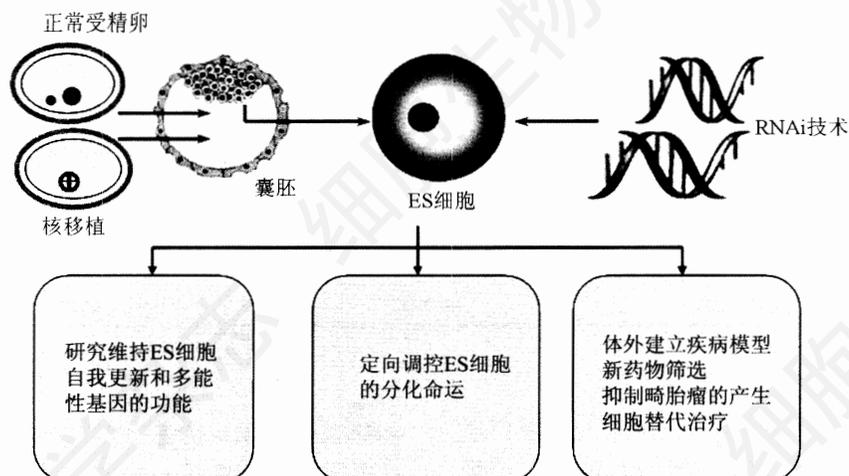


图2 RNAi应用于ES细胞研究的前景^[5,31]

的表达,发现MSK1通过调节组蛋白(H3)磷酸乙酰化进而调控ES细胞的早期分化。抑癌基因p53的沉默能够诱导视黄酸处理的mES细胞向肌肉细胞分化^[21]。PU.1是造血前体细胞中Ebf和Pax-5表达的抑制基因,Zou等^[27]用siRNA抑制mES细胞来源的CD34⁺细胞中PU.1表达,从而支持了mES细胞向B淋巴祖细胞的分化。瞬时转染经化学修饰的siRNA抑制Oct4和Nanog表达后,将可能诱导mES细胞向胚外组织的分化,Oct4表达水平的下降会诱导滋养层标记基因Cdx2、Hand1和PL-1表达,培养6天后形成滋养层巨细胞样细胞。Nanog表达水平的下降与胚外内胚层基因GATA4、GATA6、LamininB1的表达相关,并产生壁内胚层表型的细胞,这表明瞬时抑制Oct4和Nanog的表达均可以诱导ES细胞的分化^[19]。总之,RNAi可望成为诱导ES细胞分化的一个重要工具,抑制ES细胞中某个关键基因的表达,将可能促进ES细胞在短期内诱导分化为重要的功能性细胞,这在重大疾病的细胞治疗中将具有重要意义。

4.3 条件型RNAi载体的应用

目前,基于强力霉素(doxycycline)诱导的时间可控型RNAi载体^[28]和基于Cre-LoxP原理的组织特异性表达载体^[29]已经在ES细胞中得到证实。在细胞水平的试验证明,通过改变加入四环素的剂量浓度可以调节siRNA产生的量,进而调控对靶基因的抑制水平^[30]。利用Cre-LoxP介导的RNAi慢病毒载体可以组织特异性地抑制ES细胞中Dnmt1的表达^[29]。条件型RNAi载体的应用,可以通过条件性调控基因表

达并进一步分析基因功能,将为阐明ES细胞必要的调控途径带来新的曙光。

5 小结与展望

ES细胞能够无限增殖并易于基因操作,一些损伤的组织能够被ES来源细胞替代,这使得ES细胞为临床治疗提供不竭的细胞来源成为可能。除了传统的以修复损伤组织的细胞替代方法以外,ES细胞与RNAi技术相结合将提供治疗传染性疾病的新方法,如HIV、结核病等。通过这一研究可能找到攻克诸如心血管疾病、神经退行性疾病、癌症、糖尿病等顽症的新方法。

尽管RNAi在ES细胞研究中已经取得了一定的进展,但是RNAi在ES细胞中的实际应用中仍有许多问题有待进一步研究解决。例如,如何提高siRNA或shRNA的导入效率与RNAi的特异性,以及如何避免ES细胞治疗中畸胎瘤的形成与防止免疫排斥的产生等等。

目前,RNAi和ES细胞研究尚处于初级阶段,但二者的结合已经显示出了巨大的应用潜力。通过RNAi技术可以干扰构成ES细胞行为基础的蛋白质与基因,并观察干细胞的反应,从而发现更多涉及ES细胞多能性和自我更新的基因,这些基因可以进一步用于诱导细胞分化;通过抑制与特定细胞系发育相关的基因以增加纯化的细胞,从而减少非目的细胞类型的产生;通过沉默与细胞增殖相关的基因,有可能抑制ES来源细胞产生畸胎瘤。总之,RNAi的应用将为ES细胞研究开辟一条全新的途径(图2)。

参考文献 (References)

- [1] Fire A *et al. Nature*, 1998, **391**: 806
[2] Meister G *et al. Nature*, 2004, **431**: 343
[3] Lee SH *et al. Eur J Pharm Sci*, 2006, **27**: 401
[4] Doench JG *et al. Genes Dev*, 2003, **17**: 438
[5] Heidersbach A *et al. Gene Ther*, 2006, **13**: 478
[6] Velkey JM *et al. Methods Mol Biol*, 2006, **329**: 233
[7] Yang S *et al. Mol Cell Biol*, 2001, **21**: 7807
[8] Paddison PJ *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 1443
[9] Paddison PJ *et al. Genes Dev*, 2002, **16**: 948
[10] Zou GM *et al. Biol Cell*, 2003, **95**: 365
[11] Houbaviy HB *et al. Dev Cell*, 2003, **5**: 351
[12] Kanellopoulou C *et al. Genes Dev*, 2005, **19**: 489
[13] Pfeifer A. *Transgenic Res*, 2004, **13**: 513
[14] Hay DC *et al. Stem Cells*, 2004, **22**: 225
[15] Maryam MM *et al. Stem Cells*, 2004, **22**: 659
[16] Velkey JM *et al. Genesis*, 2003, **37**: 18
[17] Chew JL *et al. Mol Cell Biol*, 2005, **25**: 6031
[18] Zaehres H *et al. Stem Cells*, 2005, **23**: 299
[19] Hough SR *et al. Stem Cells*, 2006, **24**: 1467
[20] Ivanova N *et al. Nature*, 2006, **442**: 533
[21] He Z *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **335**: 676
[22] Kim JH *et al. Nature*, 2002, **418**: 50
[23] Martinat C *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 2874
[24] Kyba M *et al. Cell*, 2002, **109**: 29
[25] Hori Y *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 16105
[26] Lee ER *et al. J Biol Chem*, 2006, **281**: 21162
[27] Zou GM *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 13236
[28] Szule J *et al. Nature*, 2006, **3**: 109
[29] Ventura A *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 10380
[30] Matsukura S *et al. Nucleic Acids Res*, 2003, **31**: e77
[31] Keller G. *Genes Dev*, 2005, **19**: 1129

A New Tool for Studying Embryonic Stem Cells: RNAi

Yan-Li Zhang, Dan Xu, Jun-Jun Hong, Zi-Yu Wang, Feng Wang*

(Center of Animal Embryo Engineering and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Embryonic stem (ES) cells is one of the most popular topics in biomedical research since 1990s, and the newly developed RNA interference (RNAi) technology can silence the genes of interest quickly and efficiently, which would be a very useful tool to study the biological function of ES cells. Here, we review the mechanism of RNAi and the main methods to produce RNAi in ES cells, as well as the prospects of combining RNAi and ES cell manipulation for both basic research and future therapies.

Key words RNAi; embryonic stem cells; siRNA; self-renewal; cell differentiation

Received: October 31, 2006 Accepted: December 25, 2006

This work was supported by the International Cooperation Project of Jiangsu Province (No.BZ2005041)

*Corresponding author. Tel: 86-25-84395381, Fax: 86-25-84395314, E-mail: f_wang2001@sina.com