

RNA 干扰技术治疗疾病

李菁菁 马正海 张富春*

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程国家重点实验室培育基地, 乌鲁木齐 830046)

摘要 RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 现象最早发现于秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*), 随后发现该现象普遍存在于真菌、植物和哺乳动物等真核生物, 并行使基因调控和抵御外源基因片段侵袭的作用。目前, RNAi 分子机制和 RNAi 在基因功能方面的研究已经取得了突破性的进展。鉴于 RNAi 在基因沉默中的特异性、高效性和易操作, 其在药物筛选和疾病治疗等方面有着广泛的应用前景。然而, RNAi 技术用于治疗疾病的安全性尚待确定, 分子传递途径也有待进一步的研究。

关键词 RNA 干扰; 基因治疗; 小干扰 RNA

自 Fire 等^[1]在秀丽隐杆线虫体内发现 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)现象以来, RNAi 在细胞信号转导途径、生长发育调控和疾病治疗等方面展开了广泛的研究。RNAi 技术作为基因沉默的有力工具, 可特异性阻抑相应同源基因的表达, 而且干扰效果比有义或反义 RNA 单链高出几个数量级, 极大地加快了基因功能的研究步伐, 同时也为人类探索各种疾病的治疗方法铺就了一条崭新的道路。自 RNAi 现象发现以来, 医药业即开始关注以 RNAi 为基础的病毒性、遗传病和肿瘤疾病的治疗。Grimm 等^[2]阐述了这种治疗方法的可行性, 并特别指出要深刻理解动物体的内源分子机制, 保证基因治疗实验的安全性和有效性。RNAi 从疾病模型研究工具转变为疾病模型治疗工具尚有许多方面需要探讨, 但 RNAi 技术治疗疾病的探索性研究和动物模型实验已显示该技术治疗疾病的广阔前景。本文就 RNAi 技术治疗疾病的研究作一综述。

1 RNAi 分子机制

RNAi 是生物体内抑制特定基因表达的一种现象。根据碱基互补配对的原则, 当细胞内导入双链 RNA(dsRNA)或短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA)表达载体时, 与之互补的内源 mRNA 编码区裂解, 从而导致基因表达沉默。RNAi 作用主要分为三个阶段^[3,4]。一是起始阶段, 类核糖核酸酶 III 家族的 Dicer 降解 dsRNA 为 21~23 nt 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 这些片段的 3' 端有两个碱基突出的双链结构, 是 RNA 发挥干扰作用的效应分子。二是效应阶段, siRNA、Ago (argonaute)蛋白

家族的成员(如果蝇体内的 Ago2)和其他辅助因子一同结合成为 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)。然后, RISC 经 ATP 供能解开 siRNA 双链, 其中有义链被裂解^[5], 反义链与同源互补 mRNA 结合, 并经历核酸酶的裂解, 使其丧失蛋白质编码功能。三是 RNAi 信号放大阶段, 在依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerases, RdRP)和 Dicer 作用下, 以靶 RNA 裂解产物作为效应分子, 再次激活 RISC 以催化另一轮靶 RNA 的裂解。

此外, 在哺乳动物和植物中存在另一种内源 RNAi 通路: 即微 RNA(microRNA, miRNA)途径^[6]。miRNA 是一类来自真核生物(目前又发现原核生物的 RNA 沉默系统)自身基因组的非编码单链小 RNA, 核苷酸长度约 21~25 nt, 与靶 mRNA 结合后起调控作用^[7]。最新研究发现在细胞质中, 由 pre-miRNA、Dicer、TRBP(TAR RNA-binding protein)和 Ago2 组成的 RISC, 可以直接抑制靶 mRNA 的表达^[8]。

2 RNAi 技术在治疗人类疾病中的优势和应用

2.1 RNAi 技术在治疗人类疾病中的优势

2.1.1 序列特异性 RNAi 技术的优势之一在于序列特异性, 即对大多数基因的特异靶向不受基因功能、蛋白质功能和蛋白质结构等因素的影响。利用 RNAi 技术选择性抑制缺陷基因的表达, 可以治疗哺

收稿日期: 2007-02-13 接受日期: 2007-05-16

国家自然科学基金资助项目(No.30360062)和中国博士后科学基金资助项目

* 通讯作者。Tel/Fax: 0991-8583259, E-mail: zfcxju@xju.edu.cn

乳动物的单基因显性突变引起的遗传病。尽管靶序列的单核苷酸多态性差异使 siRNA 序列的设计受到限制, RNAi 技术仍然能够沉默单基因, 并显示出抗肿瘤和治疗单基因遗传病的优势^[9]。

2.1.2 抑制基因表达的高效性 RNAi 技术与反义 RNA 和核酶技术相比的优势在于, 它是天然存在的生物反应, 每个细胞仅需少量分子, 就可对大量 mRNA 发挥作用, 其代表了对人类更加有益的基因调控策略。将大约 100 ng/ μ l dsRNA 注入线虫体内, 几乎能够抑制所有组织中功能基因的表达^[10]。Brummelkamp 等^[11]的实验证明 siRNA 表达载体在哺乳动物细胞系中可以增殖, 从而延长持续抑制靶 mRNA 的时间或者产生稳定的缺陷表型。RNAi 的高效性还与信号放大机制有关。

2.1.3 易操作性 RNAi 技术利用靶向哺乳动物基因的表达载体, 可使操作步骤简便化。Lee 等^[12]构建出以绿色荧光蛋白为报告基因的慢病毒 RNAi 载体, 将该 RNAi 载体转染 293 细胞中形成病毒颗粒, 随后用该病毒感染 CD4⁺T 细胞 2~3 天, 以绿色荧光蛋白表达量为基础观测结果显示, 病毒感染率高达 90% 以上, 大部分 siRNA 成功转入靶细胞。近来, 一些生物技术公司已经能够提供有效的 RNAi 载体。例如, Evrogen 公司提供的双色载体 p2FP-RNAi, 编码红色和绿色两种荧光蛋白。红色 / 绿色荧光比例增加是 siRNA 有效性的标志, 从而加快了 siRNA 的筛选过程。目前, 高通量 RNAi 正应用于信号转导、细胞生物学和发育生物学的研究, 这将缩短基因功能验证所用的时间, 为疾病治疗的研究铺平道路^[13]。

2.2 RNAi 技术在治疗人类疾病中的应用

随着 RNAi 技术的机制研究不断深入, 人们发现它在哺乳动物细胞中能有效阻止病毒和转座子的入侵, 沉默基因的错义突变, 这意味着 RNAi 技术可能成为预防和治疗疾病的新方法。体外培养细胞和动物模型的研究也表明 RNAi 在病毒性疾病、遗传疾病和癌症等疾病的治疗中有着广阔的应用前景。

2.2.1 RNAi 在抗病毒感染研究中的应用 目前, RNAi 在针对艾滋病、肝炎等病毒性疾病的治疗研究中都已取得重大进展, 科学家设计出靶向病毒关键基因的小干扰片段, 以抑制病毒在细胞内复制和表达。

生殖器疱疹是由单纯疱疹病毒(HSV-2)感染所致的一种性传播疾病。Pallister 等^[14]用 RNAi 技术阻断 HSV-2 对小鼠阴道黏膜的感染, 并有效地控制了生殖器周围皮肤的溃疡症状。针对丙型肝炎病毒通过基

因突变逃避药物抑制作用的现象, 设计靶向病毒保守基因的 siRNA 可能会更有效地抑制病毒。Kanda 等^[15]设计出靶向丙型肝炎病毒(HCV)5' 非编码保守区的 siRNA 表达载体(psh-274), 其分别转染由 1a 型 HCV、2a 型 HCV 病毒株感染的细胞系。病毒滴度测试结果证明, RNAi 对不同丙肝病毒变异株均能有效抑制, 从而显示出临床治疗丙型肝炎的巨大潜力。

RNAi 抗病毒的第二种策略是靶向宿主细胞受体。HIV-1 传播需要两种主要的辅助受体: CCR5 和 CXCR4。因为 CCR5 不是人体正常免疫功能的必需分子, 它的突变不但可以有效的保护细胞免受 HIV-1 的攻击, 同时又不影响正常的免疫功能。Dykxhoorn 等^[16]设计的 siRNA 表达载体转染细胞后, 使 CCR5 在细胞表面的表达量显著减少, 继而阻止其作为 HIV 辅助受体的功能, 有效阻断 HIV 感染细胞的途径。另外, 通过抑制 CXCR4 的表达阻断 HIV 感染亦有报道^[17]。

2.2.2 RNAi 在遗传病治疗研究中的应用 已知许多先天性遗传疾病与基因的错义突变有关, RNAi 技术抑制突变基因的表达为治疗遗传病开辟了新的途径。目前, RNAi 为基础的治疗多集中在肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿疾病等疾病的研究中。

肌萎缩性侧索硬化症是一类目前无法有效医治的遗传病。病因与 Cu/Zn 超氧化物歧化酶基因 *SOD1* 的点突变相关^[18]。研究者根据致病基因设计出优化的 siRNA 序列, 进而用 *SOD1*^{G93A} 的转基因鼠(肌萎缩性侧索硬化症病鼠模型)与 siRNA 的转基因鼠进行交配。结果显示, siRNA 不仅能抑制子鼠体内 G93A *SOD1* 的表达, 延迟肌萎缩性侧索硬化症的发病期, 而且能有效阻滞病情发展^[19]。

亨廷顿病主要表现为舞蹈样动作和精神智能障碍的家族遗传性疾病。其发病原因通常是由于致病基因中编码谷氨酸的核苷酸密码子 CAG 过度重复造成^[20]。Harper 等^[21]在小鼠中转入亨廷顿致病基因, 建立行为障碍的小鼠疾病模型。选用腺相关病毒载体将抑制亨廷顿致病蛋白表达的 shRNA 片段从脑内注入四周龄的疾病鼠体内。10 周以后进行行为学测试, 结果表明治疗组小鼠加速旋转能力显著改善, 同时有效控制了不随意动作的发生, 有效地改善小鼠亨廷顿病的症状。

除了靶向显性突变单基因以外, RNAi 技术也可以通过阻遏信号转导途径来治疗先天性遗传病。阿尔茨海默病是一种 Tau 蛋白异常表达引起的老年性痴呆病^[22]。Tau 蛋白异常表达与 β 淀粉样前体蛋白

的代谢途径中的 β 分泌酶的活性异常增高有关。Kao等^[23]在小鼠模型中用RNAi技术抑制 β 分泌酶表达,结果治疗组小鼠大脑新皮质区的淀粉样蛋白比未治疗组显著减少。

2.2.3 RNAi在肿瘤治疗研究中的应用 尽管传统的化疗和放疗法是杀伤癌细胞的有效方法,但是它们缺乏分辨肿瘤细胞与正常细胞的能力。最近,已有文献报道应用RNAi技术专一性靶向癌细胞的实验结果。

多种肿瘤细胞的原癌基因*ras*都发生了单个碱基的突变,与正常*ras*基因产生差异。Yang等^[24]用逆转录病毒RNAi载体H1/siRNA沉默H-*ras*的突变体H-*rasV12*,不仅有效地促进了人卵巢癌细胞系T80H凋亡,而且削弱了肿瘤在裸鼠体内的生长能力,该结果提示RNAi技术可望用于治疗人卵巢癌。

高危型人乳头瘤病毒的感染与宫颈癌发病密切相关,宫颈癌的发生主要由人乳头瘤病毒致癌蛋白E6和E7的协同作用引起。Lea等^[25]用HPV18 E6siRNA和E7siRNA在HPV18阳性的宫颈癌细胞系(HeLa和C4I)中沉默E6/E7基因表达。结果表明,如果转染E6siRNA,则只能抑制E6的表达,而E7不受影响;如果转染E7siRNA,则E6和E7的表达都受抑制。同时,细胞周期调控蛋白p53增加并反式激活调控因子p21,从而最有效地控制了癌细胞的生长。

一些研究组正在探索另一种癌症治疗途径,即利用RNAi技术抑制癌细胞转移过程。表达细胞运动受体蛋白CXCR4的肺癌细胞易向富含CXCR4配体的器官转移^[26]。Liang等^[27]在体外实验中通过RNAi技术,在mRNA和蛋白质水平抑制了CXCR4的表达,削弱了癌细胞的侵袭能力,从而阻止了肺癌细胞的恶变和转移。此外, RNAi技术还可用于抑制其他肿瘤发生发展相关的基因,如抑制血管内皮生长因子(VEGF)的表达,阻遏癌发部位的血管生成,从而限制肿瘤生长^[28]。

3 RNAi技术应用于疾病治疗的几个问题

RNAi作为一种处于探索中的疾病治疗手段,一方面具有广泛应用前景,另一方面其安全性和施用途径等问题也有待阐明,这将决定RNAi技术能否最终成为临床治疗的有效手段。

3.1 RNAi技术的靶向性问题

如何将siRNA准确安全的导入病灶组织仍是RNAi技术临床试验的最大障碍,目前的载体系统还

不能完全实现基因的靶向转运。对siRNA进行化学修饰或将RNA效应物与抗体偶联可以提高siRNA的靶向性^[29], Song等^[30]发现DNA结合蛋白protamine与抗HIV-1病毒抗体(Fab区)的融合产物能将DNA专一性地转运至表达HIV-1抗原的细胞,并能显著抑制HIV-1在受感染T细胞中的增殖。

3.2 RNAi技术的安全性问题

在RNAi技术有效抑制靶mRNA的同时, siRNA或者shRNA表达载体导入动物体内可能会激发细胞毒性反应。有人提出siRNA分子序列中存在诱导干扰素信号产生的“危险模体”^[31,32]。此外,过量施加shRNA会引起内源miRNA途径失控。Grimm等^[2]发现,在小鼠体内增加转运蛋白exportin-5的浓度可以缓解shRNA过量表达造成的肝中毒现象。因此,研究人员必须探索如何优化干扰序列和干扰物用量限制等问题,以最大程度保证试验个体的安全。

3.3 RNAi技术有效性和持续性问题

一些病毒靶基因可能在复制过程中产生突变,以逃避机体的免疫监视和基因工程药物的抑制作用,同时也会阻止siRNA对靶序列的识别。所以,要选择较保守的病毒RNA序列作为siRNA的识别序列。慢病毒载体在CD4⁺T淋巴细胞中表达针对HIV病毒关键基因*vif*的shRNA,能增强该细胞抗HIV病毒感染的的能力^[12]。

直接转染合成的siRNA在哺乳动物细胞内很容易被降解,这种方法很难实现稳定的RNAi,使用包装颗粒包裹效应物可延长siRNA持续作用的时间。病毒载体能在哺乳动物细胞内稳定表达siRNA,可达到长期抑制靶基因表达的目的。Kordower等^[33]用慢病毒载体在恒河猴的脑内实现了长期稳定的外源基因表达。

4 小结与展望

RNAi功能基因表达的特性使生物学研究发生了革命性变化,如目前研究人员已利用酶消化法建立了全基因组范围的siRNA文库,这种文库有助于人们高效研究几乎所有与特异生物学表型和疾病相关的基因,结合文库筛选的RNAi技术也将克服遗传学实验在哺乳动物细胞中难于操作的障碍^[34]。

在RNAi技术广泛应用于生物学研究的同时,其在治疗疾病中的巨大潜力也凸显出来,可望为人类征服遗传病、病毒感染、肿瘤等疾病提供新的有效途径。目前, RNAi技术在分子传递途径、组织靶向

性及安全性等方面的问题还有待进一步的改善或探讨, 这些问题的阐明将促使 RNAi 技术向临床应用迈进。

参考文献(References)

- [1] Fire A *et al.* *Nature*, 1998, **391**: 806
- [2] Grimm D *et al.* *Nature*, 2006, **441**: 537
- [3] Marsden PA. *N Engl J Med*, 2006, **355**: 953
- [4] Lv W *et al.* *World J Gastroenterol*, 2006, **12**: 4636
- [5] Rand TA *et al.* *Cell*, 2005, **123**: 621
- [6] Valencia-Sanchez MA *et al.* *Genes Dev*, 2006, **20**: 515
- [7] Voorhoeve PM *et al.* *Cell*, 2006, **124**: 1169
- [8] Gregory RI *et al.* *Cell*, 2005, **123**: 631
- [9] Gonzalez-Alegre P *et al.* *Ann Neurol*, 2003, **53**: 781
- [10] Hannon GJ. *RNAi: A Guide to Gene Silencing*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003, 42
- [11] Brummelkamp TR *et al.* *Science*, 2002, **296**: 550
- [12] Lee SK *et al.* *Blood*, 2005, **106**: 818
- [13] Perrimon N *et al.* *Genetics*, 2007, **175**: 7
- [14] Palliser D *et al.* *Nature*, 2006, **439**: 89
- [15] Kanda T *et al.* *J of Virol*, 2007, **81**: 669
- [16] Dykxhoorn DM *et al.* *PLoS Med*, 2006, **3**: e242
- [17] Anderson J *et al.* *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2003, **19**: 699
- [18] Ralph GS *et al.* *Nat Med*, 2005, **11**: 429
- [19] Yokota T *et al.* *Arch Neurol*, 2007, **64**: 145
- [20] Beal MF *et al.* *Nat Rev Neurosci*, 2004, **5**: 373
- [21] Harper S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 5820
- [22] Wang JW *et al.* *J Neurosci*, 2007, **27**: 574
- [23] Kao S *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279**: 1942
- [24] Yang G *et al.* *Oncogene*, 2003, **22**: 5694
- [25] Lea JS *et al.* *Reprod Sci*, 2007, **14**: 20
- [26] Lapteva N *et al.* *Cancer Gene Ther*, 2005, **12**: 84
- [27] Liang Z *et al.* *Cancer Res*, 2005, **65**: 967
- [28] Schiffelers R *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**: e149
- [29] Paula DD *et al.* *RNA*, 2007, **13**: 431
- [30] Song E *et al.* *Nat Biotechnol*, 2005, **23**: 709
- [31] Hornung V *et al.* *Nat Med*, 2005, **11**: 263
- [32] Kim D *et al.* *Nat Biotechnol*, 2004, **22**: 321
- [33] Kordower JH *et al.* *Science*, 2000, **290**: 767
- [34] Ito M *et al.* *FEBS Lett*, 2005, **579**: 5988

RNA Interference Therapy

Jing-Jing Li, Zheng-Hai Ma, Fu-Chun Zhang*

(State Key Laboratory Basis of Xinjiang Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumuqi 830046, China)

Abstract RNA interference (RNAi) was discovered in *Caenorhabditis elegans* firstly, then it was considered existing widely on eukaryotes (including fungi, plant and mammalian) and playing a role in gene regulation and cellular defense. At present, the breakthrough has achieved in RNAi molecular mechanism and gene function. In view of the sequence-specificity, effectivity and simplicity of the technology, RNAi has widespread application prospect in drug screening and therapy. However, it will be important to assess the safety of the RNAi-based therapies, and the further research on the systemic delivery of the siRNA should be done.

Key words RNA interference; therapy; small interference RNA

Received: February 13, 2007 Accepted: May 16, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30360062) and the China Postdoctoral Science Foundation

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-991-8583259, E-mail: zfcxju@xju.edu.cn