

RNA 干 扰

付文金 巢时斌 彭剑雄

(中南大学湘雅医学院临床生化教研室 长沙 410078)

在多种生物细胞中,外源或内源性双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)可触发同源 mRNA 的特异性降解,从而使该基因表达沉默 (gene silence),这种现象称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)。因 RNA 干扰所致的基因沉默发生在转录后水平,亦称为转录后基因沉默 (post-transcription gene silence, PTGS)。这种转录后基因沉默与先前发现的植物“共抑制”(cosuppression,即植物中转基因与同源内源性基因一起失活)、真菌“缓解”(quelling,真菌中的共抑制)需要相同基因产物的参与并表现出若干共同的特征,因此认为它们可能具有类似的机制^[1,2]。Fire 等在研究反义 RNA 对线虫 (*C. elegans*) 基因阻断作用时首先发现了 RNAi,随后发现在多种生物,如果蝇、拟南芥菜、小鼠胚胎细胞及最近哺乳动物成体细胞^[3]中均存在 dsRNA 介导的 RNAi 现象。表明 RNAi 是生物界普遍存在的一种生命现象,目前研究认为 RNAi 在生物基因表达调控及细胞防御病毒感染等方面发挥重要作用。

一、RNAi 的机制

1. dsRNA 的产生

dsRNA 是诱导细胞 RNAi 的关键组分。外源 DNA、RNA 序列均可激发细胞产生相应的 dsRNA,但产生方式不尽相同。RNA 病毒在病毒或细胞 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 的作用下,合成病毒的 RNA 序列互补链,并与之结合形成 dsRNA;DNA 病毒、重组基因、转基因等 DNA 序列,在细胞转录出 RNA 后,经 RdRp 形成 dsRNA;而转座子由于其本身具有反向重复序列,细胞可通过“通读转录”这种反向重复序列直接产生 dsRNA。然而,细胞是如何判定哪些 RNA 和 DNA 是“异己”进而产生相应的 dsRNA,其机制尚不清楚。

2. dsRNA 对 RNAi 的诱导

对 dsRNA 诱导 RNAi 机制的探索主要是从生化和遗传学两个方面进行。在生化方面,Hamilton 等率先在发生 PTGS(转录后基因沉默)的西红柿中检测出了与沉默基因同源的约 25nt dsRNA,未发生

PTGS 的西红柿则不能检出这种 dsRNA^[4]。随后他们又发现,转染过 dsRNA 的果蝇 S2 细胞溶解液可介导特异 RNAi;如果用 DNase I 处理这种溶解液,以降解其中的 DNA,再加入相应 mRNA, RNAi 并不受影响(即同源 mRNA 仍能发生特异性降解);而若经微球菌核酸酶 (micrococcal nuclease,能降解 DNA 及 RNA) 处理该溶解液,则 RNAi 不能发生^[5]。表明 dsRNA 介导 RNAi 的中间过程有 RNA 分子的参与。果蝇胚胎细胞溶解液的应用极大地方便了 RNAi 的研究,研究者只需向这种溶解液中加入 dsRNA 便可诱导 RNAi。在这种溶解液中,Zamore 等发现长链 dsRNA 被切割为 21 - 23nt 的 dsRNA,与西红柿中的研究结果相似^[6]。提示 21 - 23nt 的 dsRNA 可能是 dsRNA 诱导 RNAi 的直接参与者。在此基础上,Sayda M 等进一步证实 21 - 23nt dsRNA 与长链 dsRNA 产生相同的效应,均可引起同源 mRNA 特异降解^[7]。他们将这种短链 dsRNA 称之为小干扰性 RNA (small interfering RNAs, siRNAs)。并认为 siRNAs 是长链 dsRNA 诱导 RNAi 的中介物,由它决定 mRNA 降解的特异性。这种 siRNA 源于长链 dsRNA,为 21 - 25nt,3' 端为 2nt 突出的黏性末端。该结构与 RNase III 加工 dsRNA 后的产物极为相似,因此推测,RNase III 家族蛋白可能是细胞降解长链 dsRNA 以生成 siRNAs 的作用酶^[6]。这一推测得到了后来的广泛实验支持。Berstein 等利用 RNAi 原理抑制果蝇细胞 RNase III,即 Dicer 蛋白的表达,首次确认 Dicer 蛋白是果蝇细胞将长链 dsRNA 降解为 siRNA 的作用蛋白^[8]。随后对线虫、拟南芥菜等生物的研究亦得出相同的结论。目前认为 RNase III 家族蛋白是 siRNAs 生成的作用酶。

siRNAs 是如何引起相应 mRNA 的降解呢? Sayda M 认为 siRNAs 可能需要与多种蛋白结合,形成多蛋白复合体后,才能降解 mRNA。并将这种多蛋白复合体称为小干扰性核糖核蛋白复合体 (small interfering ribonucleoprotein complex, siRNP)。RNA 解旋酶可能是 siRNP 必要组分之一,因为 siRNAs 要识别 mRNA,必须解开 siRNAs 的双链结构,以便反义链与 mRNA 形成碱基配对。

遗传学方面,人们利用遗传突变子筛选出了大量的 RNAi 必需基因,包括核酸酶基因 Mut-7(线虫);解旋酶基因:qde-3(链孢霉菌)、SDE3、MUT-6;RNA 依赖性 RNA 聚合酶基因 (RdRp):ego-1、qed-1、SDE1、SGS2(拟南芥菜)。

Bass 根据这些研究推测:siRNP 至少应包括 siRNA 结合、RNase 和 RNA 解旋酶三个活性区。首先 siRNAs 结合到该复合体的双链 RNA 结合区并引导 siRNP 识别靶 mRNA,接着 siRNP 的解旋酶完成 ATP 依赖性的靶 mRNA 与结合的 siRNAs 正义链换位,RNase 在靶 mRNA 结合位点附近切割 mRNA 并将其降解(图 1)^[9]。

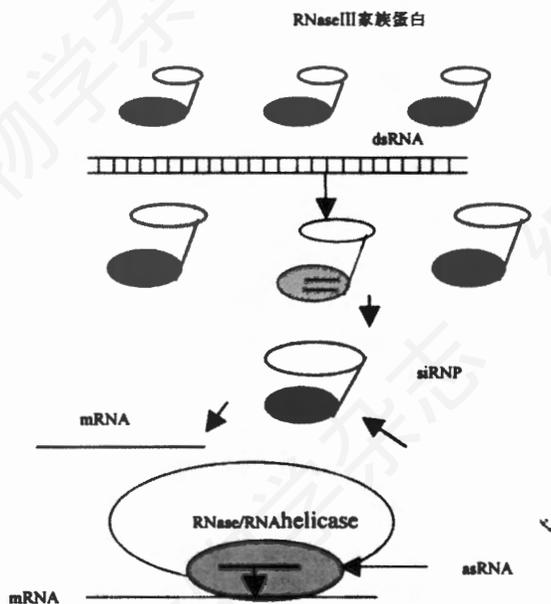


图 1 RNase III 家族蛋白降解 dsRNA 生成 siRNA,后者结合其他蛋白形成 siRNP,在 siRNAs 指引下[siRNA 的反链(asRNA)通过碱基配对识别并结合同源 mRNA],siRNP 降解 mRNA。随后,siRNP 又对该 mRNA 的其他分子进行降解作用(引自 Bass^[9])

二、RNAi 的特点

1. 特异性

dsRNA 介导的 RNAi 只特异地降解同源 mRNA,其他 mRNA 的表达并不影响,这是由于 siRNP 对 mRNA 降解的选择取决于 siRNA 碱基序列,无关 mRNA 不能被 siRNAs 识别。但在哺乳动物成体细胞中特异 RNAi 的诱导必须依赖 siRNAs,因为长链 dsRNA 一方面可激活 PKR(dsRNA 依赖性蛋白激酶),后者使翻译起始因子 eIF2 α 磷酸化而失活,致使所有 mRNA 不能表达;另一方面,长链

dsRNA 可激活 2',5' 腺苷合成酶(AS)/RNaseL 途径,活化的 RNaseL 非特异性降解各种 mRNA^[10]。siRNAs < 30bp 不能有效地激活上述两条途径,却能够形成 siRNP 并介导 RNAi 的发生。然而在小鼠卵母细胞及其胚胎细胞中长链 dsRNA 却能诱导特异 RNAi,可能是这些细胞中针对长链 dsRNA 上述两种反应途径尚未成熟的缘故^[11]。

2. 高效性

少量的 dsRNA 即可抑制大量同源 mRNA 的表达。对 RNAi 高效性的解释有两种:一种解释认为 siRNP 降解 mRNA 后,还能与这种 mRNA 的其他分子发生作用,即 siRNP 可连续地对 mRNA 进行降解^[9];另一种解释认为,它与 RNA 依赖性 RNA 聚合酶有关,即在细胞 RdRp 作用下 dsRNA 得以大量复制,从而生成更多的 siRNA、siRNP。体外实验亦证实,RdRp 能以单链甚至双链 RNA 为模板,合成出其互补链。目前认为具有 RdRp 的细胞这两种机制均可发挥作用,而尚不具备 RdRp 的细胞前者是 RNAi 的高效性的惟一原因。

3. 对 dsRNA 长度的依赖性

在果蝇、线虫等低级生物体中,长链 dsRNA 产生的 RNAi 明显强于较短的 dsRNA(不具备 siRNA 结构特征的 dsRNA)。Sadya. M 等发现 < 40bp dsRNA 不能产生明显的 RNAi。在线虫中 26 bp dsRNA 产生的基因抑制作用如果要达到 81bp dsRNA 同样的效果,则前者所需浓度应为后者的 250 倍^[12]。现有的研究表明有效诱导 RNAi 的 dsRNA 至少应 > 40bp。对这种结果的解释为:短链 dsRNA 结合 RNase III 家族蛋白的效率较低,因此不能有效地产生 siRNAs 并形成 siRNP。RNAi 对 dsRNA 长度的依赖性可以解释为什么在正常细胞内 RNA 分子间局部碱基互补,可形成短链 dsRNA,却不能由此诱发 RNAi 的发生^[6]。

4. 靶 mRNA 切割位点的确定性

在 siRNP 核酸酶作用下,同源 mRNA 被切割,切割位点之间相差 21 - 23nt^[6]。长链 dsRNA 可降解为多种不同序列的 siRNAs,并生成相应的 siRNP,由此可在多个位点切割 mRNA。但这些切点不是随机的,均位于与 siRNAs 反义链的互补序列之中,即在 mRNA 5' 端与 siRNAs 互补碱基的第 10 - 11 位之间。Sayda 等用化学合成的一系列 siRNAs 对 mRNA 进行切割发现,siRNAs 中反义链从某一特定位置移至另一位点时,mRNA 的切割点亦发生相应的位移(如图 2)^[7],这为在任意位点切割

mRNA 提供了可能的方法。

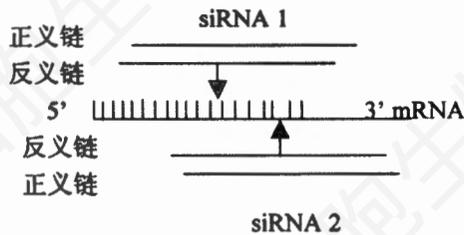


图2 化学合成 siRNA 1 及 siRNA 2 的反义链均与 mRNA 互补, 2 比 1 向 mRNA 3' 端移动 5nt, 两者对 mRNA 的切割位点亦相隔 5nt

RNAi 还具有其他一些特点, 如在植物、线虫中 RNAi 具有传播性, 即一个细胞发生 RNAi, 亦可引起相邻的细胞乃至整个生物体特异性 RNAi 的发生^[13], 其机理尚不清楚。

三、RNAi 的生物学意义

RNAi 广泛存在于多种生物体, 表明它对生物的生存意义重大, 主要体现在以下方面:

1. 防止外来核酸的干扰以维持生物体遗传信息传递表达的稳定性

病毒、转基因及转座子在细胞内引起相应 dsRNA 的产生, 诱导 RNAi, 从而沉默这些基因, 避免其基因产物对细胞功能的影响。RNAi 可能是生物体的本能反应, 因为无论是转基因、转座子还是病毒, 对生物体而言都是诱发突变的外来侵入核酸, 生物体为保护自己, 在长期进化中形成了这种限制外源核酸入侵的防卫保护机制。细胞对病毒 RNAi 作用, 无疑会破坏其生命周期, 从而发挥出抗病毒作用。

2. 参与机体发育及细胞分化

果蝇中, AGO1 及 ZWILL/PINHEAD (ZLL/PNH) 是 RNAi 发生不可缺少的组分, 这两个基因的突变可引起果蝇的发育障碍^[14]; 同时线虫中 Dicer 是降解 dsRNA 生成 siRNA 的作用酶, 还参与 stRNA (small temporal RNA)——let-7 的生成, 后者则是线虫发育、成熟的重要调节因子^[15]。可见 RNAi 与机体细胞的发育、分化关系密切。

3. 调节基因的表达

在植物中, dsRNA 除介导 RNAi 外, 还可指导同源 DNA 序列的甲基化, 以调节其表达。这种甲基化的发生同样需要将 dsRNA 加工成类似于 siRNAs 的小分子才能起作用。因此 dsRNA 诱导的

RNAi 与其指导的基因甲基化可能具有某些相同的过程及某些相同分子的参与^[16]。

四、结 语

RNAi 是在研究反义 RNA 技术中首先发现的, 它与反义 RNA 技术既有联系又存在着一定的差别。反义 RNA 是利用完全互补的 RNA 与同源性 mRNA/DNA 杂交, 封闭 mRNA/DNA, 以阻断基因的表达。RNAi 则是通过生成 siRNA、siRNP, 后者对同源 mRNA 进行特异降解引起基因沉默。然而, 反义 RNA 亦可通过 RNAi 的机理使基因的表达受到抑制, 即反义 RNA 与 mRNA 形成 dsRNA 后在一定程度上可通过生成 siRNA 而发挥基因抑制作用。

尽管 RNAi 的机理尚未完全阐明, 但它已显示出广泛的应用前景。首先, RNAi 提供了一种特异性失活功能基因的简便方法, 正成为基因功能研究的重要工具。人们已利用 RNAi 的原理成功的确定了线虫中两条染色体几乎所有基因的功能^[17,18]; 其次, RNAi 为某些疾病的基因治疗提供新的思路, 通过 RNAi 抑制癌基因的表达可能成为一种新的癌症基因治疗策略; 再次, 人们可以利用能抑制 RNAi 的病毒蛋白 (如 P25, HC-pro) 来预防转基因所诱发的 RNAi, 使转基因得以充分的表达。由于 RNAi 具有重大的生物学意义并显示出广泛的应用前景, 因此它正成为生命科学研究的新热点。

摘 要

RNA 干扰广泛存在于多种生物体, 它与生物的发育及抗病毒感染等多种生物功能密切相关, 并可能成为基因功能研究的一种新的技术。本文对 RNA 干扰的机理、特点及其生物学意义进行了综述。

参 考 文 献

- [1] Catalanetto, C. et al., 2000, *J. Nature*, **404**:245.
- [2] Ketting, RF. et al., 2000, *J. Nature*, **404**:296-298.
- [3] Sayda, M. et al., 2001, *J. Nature*, **411**:494-498.
- [4] Hamilton A.J. et al., 1999, *J. Science*, **286**:950-952.
- [5] Hamilton, S.M. et al., 2000, *J. Nature*, **404**:293-296.
- [6] Zamore, PD. et al., 2000, *J. cell*, **101**:25-33.
- [7] Sayda, M. et al., 2001, *J. Gene dev.*, **15**:188-200.
- [8] E. Bernstein. et al., 2001, *J. Nature*, **409**:363.
- [9] Bass B. 2000, *J. Cell*, **101**:235-238.
- [10] Minke, M.A. et al., 1979, *J. J. Biol. Chem.*, **254**:10180-83.
- [11] Bass. B. 2001, *J. Nature*, **411**:428-429.
- [12] Parrish, S. et al., 2000, *J. Mol. Cell*, **6**:1077-1087.
- [13] Voinnet O. et al., 1998, *J. Cell*, **95**:177-187.

- [14] Fagard, M. et al., 2000, *J. Pro. Nat. Acad. Sci.*, **97**: 11650 - 11654.
 [15] Hutvagner, G. et al., 2001, *J. Science*, **293**: 834 - 838.
 [16] Matzke, M. et al., 2001, *J. Science*, **293**: 1080 - 1083.
 [17] Fraser, A. G. et al., 2000, *J. Nature*, **408**: 311 - 336.
 [18] Pierre Gönczy et al., 2000, *J. Nature*, **408**: 325 - 330.

哺乳动物性别决定及其机制的研究*

朱必才 高建国 张子峰 王秀琴 张永 高俊芳
 (徐州师范大学生物系 徐州 221116)

哺乳动物(包括人)的性别决定大多属于XY型,对其性别决定机制的研究,一直是生命科学研究领域中的重要课题之一,也是一个难解之谜。然而在众多科学家经过数十年的不懈努力之后,人们终于对这一机制有了初步的认识。这一进程大体上经历了三个重要时期:性别决定依赖于Y染色体的发现;第一个性别决定基因SRY的克隆;更多相关基因的发现。性别决定已不再认为是由单个染色体或单个基因所能决定的,而是涉及多个基因共同调节作用的结果。深入研究哺乳动物性别决定机制,对人类控制性别、性别鉴定、及相关疾病诊断治疗具有重要意义。

一、哺乳动物性别决定与性别分化

性别发育包括性别决定和性别分化。性别决定是在卵子受精的瞬间就决定了。性别分化是指在性别决定的基础上,生物个体向雄性或雌性发育的过程。

哺乳动物在性别分化之前,XX和XY胚胎都具有牟勒氏管、吴夫氏管两套生殖导管和未分化的性腺。性别分化的过程中,在胚胎性腺分泌的激素控制下,两套生殖导管之一发育为相应的生殖器官,而另一套退化。如果性腺为精巢,则精巢足细胞(Sertoli cell,又称支持细胞)分泌的牟勒氏管抑制因子(Mullerian inhibitory substance, MIS)使牟勒氏管退化,随后精巢间质细胞分泌睾酮诱导吴夫氏管发育为雄性生殖器官。若没有精巢,也就没有MIS和睾酮,吴夫氏管退化,牟勒氏管发育为雌性生殖导管。MIS和睾酮从生理上决定了雌雄性别分化。雄性表型的出现得助于睾酮。而睾酮则由精巢分泌^[1,2,3]。可见,胚胎时期精巢的有无,决定性别分化的方向。人们就是循着这条途径找到了性别决定基因SRY。

二、哺乳动物性别决定基因、分子机制及其模型

20世纪60年代,人们才知道哺乳动物的性别

决定依赖于Y染色体,Y染色体具有强烈的雄性化作用。因此,人们认为Y染色体上携带有一个编码睾丸决定因子(testis determining factor, TDF)的基因,睾丸决定因子决定生殖嵴(genital ridge)发育为睾丸。1990年Sinclair等才克隆到Y染色体上的性别决定基因SRY(sex determining region)^[4]。1991年,Koopman等将含有SRY基因的14kb DNA片段导入雌鼠体内,并成功地诱导出雄性转基因小鼠,从而确定小鼠Sry基因就是Tdy(testis-determining y)^[5],也使SRY基因成为人类TDF的最佳候选基因。近年来,人们通过对性反转(sex reversal)、基因突变或缺失以及胚胎期基因的雄性特定表达模式的研究,又相继在性染色体和常染色体上发现了众多与性别决定相关的基因^[6]。弄清这些基因的功能及其相互作用是性别决定机制研究的关键所在。

1. SRY基因和SF-1基因

众多研究表明,SRY基因是性别决定的核心基因,直接诱导精巢发育,对睾丸发育起着遗传开关的作用。该基因在哺乳动物中具有高度的保守性。人们曾在兔、猩猩、牛、马、猪、虎、大熊猫等许多动物中都找到了SRY基因的同源基因。SRY编码的HMG蛋白结构呈L型,以一种序列特异方式和DNA结合,DNA结合域中任何一个氨基酸的突变都会减弱与DNA的亲合力^[1]。人类的SRY识别AACAAATG序列,通过小沟与DNA相结合,而小鼠的Sry与CATTGTT序列高度亲和,通过大沟与DNA相结合。SRY/Sry与DNA结合引起DNA弯曲,将调节位点和启动子拉近,从而调节基因表达。现已发现一些基因的特定序列能与SRY蛋白结合,推测它们可能是受其调控的候选基因,其中细胞色素P450芳香酶基因和MIS基因的启动子与SRY蛋白有较强的亲和性^[1],但SRY蛋白与MIS间无直接作用,需要另一个中介因子SF-1,SF-1直接调节MIS基因的表达。SF-1是小鼠编码甾类因子的

*国家自然科学基金资助项目(39970405)。