

RNA 干涉分子机制研究进展

孙建国^{1)*} 廖荣霞²⁾ 陈正堂¹⁾

(¹⁾第三军医大学附属新桥医院全军肿瘤中心, 重庆 400037; ²⁾第三军医大学基础部生物化学教研室, 重庆 400038)

摘要 RNA 干涉 (RNA interference, RNAi) 是生物体内的一种通过双链 RNA (dsRNA) 来抵抗病毒入侵和抑制转座子活动的自然机制. 双链 RNA 与同源 mRNA 互补结合而使特定基因失活, 这一过程已经在包括拟南芥、线虫和真菌等多种模式生物中得到揭示. 近来研究表明, 21~25 nt 的小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 可介导哺乳动物细胞特异性基因沉默. RNAi 具有高效性和高度特异性, 可能成为关闭基因的新技术而在基因功能研究和疾病基因治疗中发挥重要作用.

关键词 RNA 干涉, 小干扰 RNA, 基因沉默

学科分类号 Q-3, Q52

RNA 干涉 (RNA interference, RNAi) 作为关闭特定基因功能的新技术, 为基因功能研究提供了一个快速、简便的方法, 在非哺乳动物细胞中已经产生巨大影响, 在哺乳动物细胞中, 可能延伸到功能基因组和人类疾病基因治疗中, 带来哺乳动物细胞遗传学的全新革命. 本文综述了这方面的最新研究进展.

1 RNAi 的研究进展

早在 10 年前, 科学家们在向牵牛花转导色素合成基因时, 观察到“共抑制” (cosuppression) 现象, 不仅是转入的基因未表达, 而且自身的色素合成也减弱了. 相似的现象还发生在真菌的研究中, 当把合成类胡萝卜素的基因转入到红色面包霉中时, 却导致大约 30% 转染细胞自身基因的失活, 这种现象称为“压制” (quelling).

1998 年^[1], 在研究秀丽隐杆线虫基因沉默机制时发现, 将反义 RNA、正义 RNA 和双链 RNA (dsRNA) 分别导入虫体, 作为对照组的正义核酸, 虽不能与活性基因或 mRNA 结合, 却同反义核酸有相似的阻断基因表达能力, 与反义 RNA 技术的传统机制相违背; 而令人惊奇的是, 双链 RNA 较正义和反义核酸更能高效地特异性阻断相应基因的表达, 抑制基因表达的效率比单链 RNA 至少高 2 个数量级. 这种现象被称为 RNAi, 由此揭开了研究双链 RNA 介导特异性基因沉默机制的序幕.

动物中双链 RNA 诱导的 RNAi, 与植物中的共抑制和真菌中的压制现象是高度保守的相似机制, 它们具有相同的起源^[2], 是生物界中的普遍

现象. 细胞为保护自身基因免受损害, 如病毒入侵或转座子插入编码基因引起突变, 而采取的一种重要的调控机制, 使入侵的外源基因失活, 却不影响其他基因的表达.

虽然 RNAi 在小鼠卵细胞和胚胎中得到证实, 但双链 RNA 在其他哺乳动物细胞通常引起整个细胞蛋白合成非特异性抑制, mRNA 降解, 细胞死亡. 直到最近, 德国科学家发现, 长度仅为 21~25nt 的双链 RNA (小干扰 RNA, siRNA), 能激发哺乳动物细胞特异性 RNAi 效应, 并抑制非特异性 RNAi 反应^[3], 从而为 RNAi 技术广泛用于人类基因功能研究以及疾病基因治疗展示了美好的前景.

目前, RNAi 作为研究基因功能的有力工具, 已经在真菌、植物、蠕虫、低等脊椎动物 (如斑马鱼) 以及哺乳动物基因功能研究中获得成功. Ravi 等^[4]利用喂食表达双链 RNA 的大肠杆菌的方法, 从秀丽隐杆线虫 1 号染色体构建的粘粒库中, 随机挑选了 86 个基因, 从产生的 RNAi 表型中鉴定了 13 个基因的功能. Momoyo 等^[5]利用 RNAi 技术筛选线虫胚系发育相关基因. 从消减杂交 cDNA 文库中检测了 168 个克隆, 共获得 15 个阳性克隆, 为进一步研究虫体发育机制打下基础. Harborth 等^[6]则利用小干扰 RNA 在培养的哺乳动物细胞系中鉴定了大量细胞生长必需基因, 包括以前认为的生长非必需基因如核纤层蛋白 B1 和 B2、胞浆动力蛋

* 通讯联系人.

Tel: 023-65428277, E-mail: sunjianguo@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2002-03-29, 接受日期: 2002-05-15

白、蛋白激酶 cdk1、肌动蛋白 α 和 β 等。

由于双链 RNA 随生物体生长发育或细胞分裂逐渐降解, 浓度下降使 RNAi 作用逐渐失效, 不能稳定存在, 不利于发育晚期基因和某些神经系统基因的研究, 因此, 建立在细胞内稳定表达双链 RNA 的体系应运而生。Tavernarakis 等^[7]利用基因工程技术, 将反向重复排列的目的基因插入表达载体启动子下游, 转染线虫细胞后, 在细胞内转录表达出发夹结构 RNA, 从而诱发了 RNAi 反应, 建立了稳定的功能缺失表型。类似策略在小鼠胚胎干细胞、卵细胞以及胚胎肿瘤细胞中也建立了 RNAi 体系^[8], 但这类 RNAi 体系表达长序列双链 RNA, 不能在其他哺乳动物细胞中诱导特异性 RNAi, 直到最近, 小干扰 RNA 表达体系才建立起来^[9], 为研究人类基因功能及进行人类疾病基因治疗奠定了基础。

2 RNAi 的特征

RNAi 具有如下重要特征: a. RNAi 是双链 RNA 介导的转录后基因沉默 (PTGS) 机制^[1], 在此情况下, 启动子是活跃的, 外源基因也能被转录, 但不能正常积累 mRNA。当转基因细胞中存在与外源基因同源的内源基因时, 不但外源基因在转录后水平上失活, 也诱导与之同源的内源基因沉默; b. 高稳定性: 以 3' 端悬垂 TT 碱基的双链 RNA 尤为稳定, 无需像反义核酸那样进行广泛的化学修饰以提高半衰期^[3]; c. 高效率: 能在低于反义核酸几个数量级的浓度下, 使目标基因表达降到极低水平甚至完全“剔除”, 从而产生缺失突变体表型; 比基因敲除技术更快更简单, 可以仅仅在一周时间内关闭 10 个基因的表达, 而且, 那些在胚胎中敲除后导致死亡的基因, 也可以利用 RNAi 的方法在培养细胞中进行研究^[10]; d. 双干扰系统: 哺乳动物细胞中存在两条相互独立的“干扰”途径: 非特异性干扰反应, 由 > 30 bp 长序列双链 RNA 介导, 可导致整个细胞非特异性蛋白合成抑制及 RNA 降解; 特异性干扰反应, 由 21~ 25 nt 的小干扰 RNA 介导, 可逃避非特异性干扰系统的“监控”, 只降解与其序列相应的单个基因的 mRNA^[3]; e. 高特异性: 小干扰 RNA 除正义链 3' 端的两个碱基在序列识别中不起主要作用外, 其他单个碱基改变就可能使 RNAi 失效, 而针对同源基因共有序列的 RNAi 则导致同源基因共同失活^[6]; f. 高穿透性: RNAi 具有强大的细胞穿透能力, 可

在不同细胞间长距离传递和维持; 在线虫中干扰效应甚至可通过生殖系传递到后代中去^[1]。

3 RNAi 分子机制的研究进展

虽然遗传学和生物化学的方法都已用于探索 RNAi 的机制, 但目前真正的机理尚未明了。下面是 RNAi 机制研究中的一些可能机制。

3.1 小干扰 RNA 介导同源 RNA 降解

德国科学家在体外建立了 RNAi 机制研究系统^[11], 将双链 RNA 加入试管, 来激发编码荧光素蛋白的 mRNA 的降解。试验表明, 双链 RNA 首先断裂为 21~ 23 个核苷酸的小片段, 在降解 mRNA 时, 也是将 mRNA 切割成大约 22 个核苷酸的片段。研究还发现, 在番茄细胞中, 短序列 (21~ 25 nt) RNA 在 PTGS 中发挥作用, 而从果蝇细胞中纯化出的能够诱导 RNAi 的核糖核酸酶, 酶相关的 RNA 大约也为 25 个核苷酸。

将这些结果综合考虑, 似乎核糖核酸酶首先将双链 RNA 切割成短的片段, 然后酶与这些片段结合, 再与同源序列 mRNA 配对, 在酶的作用下将 mRNA 降解, 酶降解 mRNA 的特异性由与之相结合的小片段 RNA 序列决定。更为详尽的生化试验表明, RNA 降解过程涉及两个步骤^[12, 13], 第一步是双链 RNA 被名为 Dicer 的核酸内切酶 III (RNase III) 样蛋白加工成 21~ 25 nt 长度的小干扰 RNA。第二步, 反义链 RNA 引导核酸内切酶复合体 (RISC) 去切除单链的同源 mRNA。RISC 在小干扰 RNA 的引导下, 切断序列特异性的 mRNA, 切断部位大约在与反义小干扰 RNA 配对序列的中部, 而后, mRNA 进一步降解。

3.2 RNA 介导同源 DNA 甲基化 (RdDM)

RNA 介导同源 DNA 序列中胞嘧啶甲基化作用, 需要在 PTGS/RNAi 中引导同源 RNA 降解的小干扰 RNA 的产生, 只有与引导 RNA 序列互补的 DNA 序列才能被修饰, 表明 RNA 与 DNA 直接发生相互作用。短至 30 bp 的 DNA 序列能够作为甲基化的目标, 胞嘧啶是甲基化位点, 而且, 在胞浆中产生的诱导 PTGS 的 RNA 能从细胞质进入细胞核中, 产生对细胞核的反馈作用, 激发同源 DNA 的甲基化, 这种 RNA 指导的 DNA 甲基化, 扩大了原来有限的甲基化, 从而进一步加强了基因沉默。研究证实, RdDM 可能在启动或维持基因沉默中起作用, DNA 甲基化缺陷将引起 PTGS 缓解^[14]。

RNA 触发 RdDM 可能与 DNA 甲基转移酶 (MTase) 相关, 小 RNA 可能接近部分解链的 DNA 以形成 RNA-DNA 异二联体和单链 DNA 环, 或 RNA-DNA 三分子螺旋. 这些异常结构可能吸引 MTase 靠近, 经过充分的循环, 催化同源 DNA 甲基化.

3.3 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRP) 模型

DNA 甲基化能引起转基因转录的提前终止, 从而产生异常 RNA; 转基因在细胞核中表达, 也导致高水平的异常 RNA 的转录. 当异常 RNA 的量超过一定阈值水平时, 就被存在于细胞质中的某一体系所感受, 并激活细胞质中 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRP), 于是 RdRP 以异常 RNA 为模板转录出小片段互补 RNA (cRNA), 这些 cRNA 与核糖核酸酶形成一个序列特异的复合物 RISC, 且 cRNA 处于复合物的中心位置. 这个复合物能与 mRNA 杂交, 捕获并降解与转基因序列相同的或互补的 RNA, 从而成为专一性作用于双链 RNA 的 RNA 降解酶的底物, 结果导致低水平转基因 RNA 的积累.

已从番茄中发现了 RdRP, 体外实验证明该酶能以 RNA 为模板合成 cRNA, 在体内这些 cRNA 杂合到相应的 mRNA 上, 被特异作用于双链 RNA 的 RNA 降解酶降解. RdRP-cRNA 模型可以很好地解释 PTGS 很强的序列特异性. 非正常 RNA 能作为 RdRP 的底物, 从而激活了 RNA 降解机制, 导致外源基因转录后水平上的沉默. 脱腺苷化的 mRNA 作为异常 RNA 或 RNA 指导下的 RNA 聚合酶的模板, 在细胞质中作为潜在的基于同源降解机制的激活剂. 只要有足够的宿主编码 RNA 指导下 RNA 聚合酶的底物, 反义 RNA 就能被合成. 如果相关 mRNA 的 3' 特定部分的降解, 就会导致转录后水平的基因沉默^[15].

3.4 与 RNAi 相关基因的克隆

到目前为止, 已经鉴定了多个在双链 RNA 合成和加工过程中起关键作用的酶类, 包括 Dicer、RdRP、解旋酶和 PAZ/Piwi 家族成员等, 这些基因的精确功能目前还不清楚, 但在 RNAi 中提示一些关键性问题. 比如, RNAi 突变基因 *qde1* 及其同源基因, 目前认为在 PTGS 中起着辅助的作用, 指导 RNA 的复制过程, 其编码的蛋白质是 RdRP, 可引导更多的小 RNA 的合成, 后者引导降解 mRNA 的核糖核酸酶到特定的靶基因^[16]. 解旋酶是另一个重要的酶类^[17], 在多种突变筛选中反复

获得 (QDE3, SMG-2, MUT6, SDE3), 其中 QDE3 是 DNA 解旋酶, MUT6 和 SMG2/SDE3 是 RNA 解旋酶. 多种解旋酶可能作用于 RNAi 的不同步骤, 意味着对每种生物有待鉴定更多的解旋酶. 另一个是 PAZ/Piwi 家族蛋白^[18], 可能通过其 PAZ 结构域与 Dicer 相互作用, 与小干涉 RNA 一起组合到核酸内切酶复合体中. 编码 PAZ/Piwi 家族的基因 (AGO1, QDE2, RDE1) 与转录因子 eIF2C 同源, 在几个突变株中筛选分离得到, 证明是 RNAi 的必需基因.

细胞浆中, 小干涉 RNA 引导同源 mRNA 降解与核酸内切酶复合体 (RISC) 有关, 虽然多数 RISC 蛋白成分尚未明确, 但可能包括核酸内切酶、核酸外切酶、解旋酶等活性物质. 从 RNAi 突变体中筛选到 *mut-7* 基因^[19], 其序列是 3'-5' 核酸外切酶, 为 RNA 酶 D 样蛋白, 识别并切割特定的 mRNA 分子. 这很有意义, 因为 mRNA 降解明显是 RNAi 过程的最后步骤.

4 展望与未来

RNAi 不仅发挥抗病毒入侵和限制转座子移动作用, 可能还在个体生长发育中有着重要的作用. 在秀丽隐杆线虫发育机制研究中发现一种长度约 21 nt 的单链 RNA (*lin-4*、*let-7*), 能与目标 mRNA 的 3' 端非翻译区互补配对, 干扰基因的翻译, 与影响 mRNA 稳定性的小干涉 RNA 具有惊人的相似性, 实验证明, 这种小时序 RNA (small temporary RNA, stRNA), 与小干涉 RNA 都来自于较长的双链 RNA, Dicer 酶同时参与小时序 RNA 与小干涉 RNA 的成熟过程^[20], 表明两条途径在产生小 RNA 的步骤中存在共同途径, 进一步的研究有可能探明 RNA 在基因表达与调控中的重要作用.

虽然双链 RNA 在 RNAi 中的作用机制并不十分清楚, 但已经充分展示了 RNA 研究的新领域, 给基因功能研究和疾病的基因治疗带来了希望. 然而, RNAi 研究还存在许多问题有待解决, 比如, RNAi 是否与转录水平相偶联? RNA 逆向信息传递反作用于 DNA, 生命的信息是否起源于 RNA? 为什么长序列双链 RNA 能够诱导小鼠卵细胞和胚胎细胞发生特异性 RNAi, 难道这些细胞缺乏非特异性抑制途径吗? 在秀丽隐杆线虫中, 能够用简单的办法来向体内导入双链 RNA, 如注射、在含有双链 RNA 的溶液中浸泡、喂食表达双链 RNA 的细

菌等^[7], 如何才能更有效地将小干扰 RNA 导入哺乳动物细胞, 进行基因功能研究以及疾病基因治疗呢? 另外, 参与 RNAi 调控的基因还有待进一步扩展, 核糖体组学的研究, 有望鉴定全部非编码 RNA, 决定其在不同生物体中调节外源基因表达的程度。

参 考 文 献

- 1 Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, **391** (6669): 806~ 811
- 2 Sharp P A. RNA interference-2001. *Genes Dev*, 2001, **15** (5): 485~ 490
- 3 Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, **411** (6836): 494~ 498
- 4 Ravi S K, Maruxa M C, Peder Z, *et al.* Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol*, 2001, **2** (1): RESEARCH0002.1~ 0002.10
- 5 Momoyo H, Makoto M, Naoto U, *et al.* Use of cDNA subtraction and RNA interference screens in combination reveals genes required for germ-line development in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (15): 8686~ 8691
- 6 Harborth J, Elbashir S M, Beichert K, *et al.* Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci*, 2001, **114** (24): 4557~ 4565
- 7 Tavernarakis N, Wang S L, Dorovkov M, *et al.* Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat Genet*, 2000, **24** (2): 180~ 183
- 8 Patrick J P, Amy A C, Gregory J H. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (3): 1443~ 1448
- 9 Paul C P, Good P D, Winer I, *et al.* Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol*, 2002, **20** (5): 505~ 508
- 10 Bass B L. RNA interference. The short answer. *Nature*, 2001, **411** (6836): 428~ 429
- 11 Tuschl T, Zamore P D, Lehmann R, *et al.* Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev*, 1999, **13** (24): 3191~ 3197
- 12 Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 2001, **15** (2): 188~ 200
- 13 Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, **409** (6818): 363~ 368
- 14 Jones L, Ratcliff F, Baulcombe D C. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr Biol*, 2001, **11** (10): 747~ 757
- 15 Nishikura K. A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell*, 2001, **107** (4): 415~ 418
- 16 Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, *et al.* An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, 2000, **101** (5): 543~ 553
- 17 Matzke M A, Matzke A J, Pruss G J, *et al.* RNA-based silencing strategies in plants. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, **11** (2): 221~ 227
- 18 Morel J B, Godon C, Mourrain P, *et al.* Fertile hypomorphic Argonaute (ago1) mutants impaired in post transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell*, 2002, **14** (3): 629~ 639
- 19 Stein P, Svoboda P, Stumpo D J, *et al.* Analysis of the role of RecQ helicases in RNAi in mammals. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **291** (5): 1119~ 1122
- 20 Grishok A, Pasquinelli A E, Conte D, *et al.* Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 2001, **106** (1): 23~ 34

Progress in Molecular Mechanism of RNA Interference

SUN Jian-Guo^{1)*}, LIAO Rong-Xia²⁾, CHEN Zheng-Tang¹⁾

⁽¹⁾ Oncology Department, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China;

⁽²⁾ Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract RNA interference (RNAi) is a natural mechanism in organisms in resistance to virus invasion and inhibition of transposon mobility by double-stranded RNA (dsRNA). dsRNA can match with homologous mRNA by base pairing to make specific gene inactivation. RNAi was observed in many model organisms, such as *Arabidopsis*, *C. elegans* and fungi. Latest study shows that 21~ 25 nt small interference RNA (siRNA) can mediate specific gene silencing in mammal cells. Being effective and highly specific, RNAi probably becomes a novel technique in knocking gene down and plays important roles in gene function study and gene therapy of diseases.

Key words RNA interference, small interference RNA, gene silencing

* Corresponding author. Tel: 86-23-65428277, E-mail: sunjianguo@mail.tmmu.com.cn

Received: March 29, 2002 Accepted: May 15, 2002