

抑制 RNA 沉默现象的机理及其在生物医学领域内的应用*

张义玲 魏旭斌 蔡 荣** 钱 程**

(浙江理工大学生命科学院, 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

摘要 RNA 沉默在机体防御病毒入侵和调控基因表达中发挥着重要的作用, 目前已成为一种有效的工具应用于基因功能研究和疾病治疗等领域. RNA 沉默现象普遍存在于真核细胞中, 然而在宿主与病毒漫长的进化过程中, 病毒已经演化出一系列逃逸或抑制 RNA 沉默作用的方法和途径, 使 RNA 沉默效果显著降低, 另一方面, 哺乳动物体细胞自身也存在调节 RNA 沉默功能从而使生命活动的调节更加精细完善. 为了使 RNA 沉默发挥它的潜在效应, 人们设计出一系列的策略针对抑制 RNA 沉默效应以达到弱化抑制的目的. 全面总结抑制 RNA 沉默机制及其应用, 从而使人们充分认识到使用 RNA 沉默技术时应考虑到存在的不利因素.

关键词 RNA 沉默抑制现象, RNA 沉默, 病毒, 基因治疗
学科分类号 R730.5

RNA沉默(RNA silencing)是一种发生在真菌、动植物等真核生物细胞中, 由双链RNA分子介导, 在mRNA水平上序列特异性转录后基因沉默过程, 是生物体防御病毒入侵和调控基因表达的重要组成部分^[1]. 同时, 在真核生物组织生长发育和细胞分化等过程中, RNA干扰介导的转录后基因沉默在限制特定基因表达方面发挥重要作用^[2]. 由于RNA沉默普遍存在于生物界且具有高度特异性等优点, 因此, 人们已将其开发利用作为调节特异性基因表达的最佳选择方案. 目前, 通过化学合成 small interfere RNA (siRNA)沉默靶基因或抑制病毒复制技术已日渐成熟, 该技术不仅巧妙绕过RNA沉默机制中剪切过程, 使沉默效果更为显著, 而且操作快捷方便、实验成本大大降低, 因此, 作为一种有效工具已被广泛应用于基因功能研究和人类重大疾病的生物治疗^[3]. 例如RNA沉默已应用于特异性抑制HIV、SARS、HBV等病毒所致疾病, 特别是对癌基因、癌相关基因或突变基因的过度表达所诱发的恶性肿瘤, 也可以利用RNA沉默手段使这些致病基因保持在静默或休眠状态从而达到治疗目的. 国际社会已将2006年诺贝尔生理学或医学奖颁发给在这一研究领域内做出突出贡献的科学家, 充分肯定RNA沉默及其技术在生物医学中的应用价值. 然而

在使用该技术应用于重大疾病治疗中往往达不到较为理想的效果, 主要是因为人们在利用RNA沉默技术应用于实验研究过程中只考虑到它的生物学干扰作用, 却长期忽略了还有外源性生物与宿主之间RNA沉默以及抑制RNA沉默并存现象的存在, 是RNA沉默的一种抗衡力量. 研究发现: 沉默靶基因的siRNA转染细胞72 h后几乎检测不到基因沉默现象, 即使细胞被转染siRNA后有RNA沉默现象的发生, 但持续时间非常短暂. 分析其原因发现: siRNA半衰期、靶向区域的效率以及对RNA沉默的耐受性等因素均影响RNA沉默效率. 许多病毒可以通过目标区域的突变、编码沉默抑制因子或多种逃逸途径联合等方式来对抗RNA沉默, 从而达到逃避RNA沉默介导的抑制^[4,5]. 已有报道, 许多动植物病毒通过抗RNA沉默而感染宿主, 另外, 人们发现哺乳动物细胞本身存在着一类抗RNA沉默因子的天然抗体, 这些因素都制约RNA沉默的效率. 为了使

* 国家高技术研究发展计划(863)(20060102Z1107), 国家重点基础研究发展计划(973)(2004CB518804)和浙江省重点发展基金(116153A4E06009)资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 0571-86843182, Fax: 0571-86843185

蔡荣, E-mail: cairong801@hotmail.com; 钱程, E-mail: cqian@unav.es

收稿日期: 2007-05-08, 接受日期: 2007-07-02

RNA沉默达到最佳效果, 人们有必要认识和了解这些制约因素从而避开这些不利因素, 因此, 本文结合我们的研究成果将详细阐述抑制RNA沉默效率及抑制效应应用于临床上重大疾病治疗的最新研究进展。

1 抑制RNA沉默现象和抑制因子的发现

沉默抑制现象是Vance等^[6]于1991年在针对病毒协同现象的实验研究中首次被发现的, 表现为一种病毒与另一种非相关病毒共感染宿主后所引起的发病症状, 由于协同效应而加重。1997年该研究小组在进一步研究马铃薯X、Y病毒(Potato virus X, PVX; Potato virus Y, PVY)之间协同作用的相互关系时, 发现PVY基因组5'端序列编码的P1蛋白(HcPro)是PVX和PVY二者协同作用的关键分子^[7]。1998年Ruiz等^[8]利用携带GFP(green fluorescence protein, GFP)和PDS(phytoene desaturase, PDS)基因的PVX病毒诱导基因沉默, 观测到PVX感染含有GFP转基因烟草植株, 随着GFP沉默的增强而PVX累积量在不断减少, 机体似乎通过RNA沉默途径发挥防御能力。然而PVX与PVY共感染烟草植株时PVX的累积显著增加, 显示宿主对病毒的防御能力降低, 进一步研究发现该现象的发生是由于RNA沉默能力受到抑制而减弱所致。基于HcPro蛋白是PVX与PVY协同作用的关键因子, Ruiz等推断该蛋白质很可能作为RNA沉默的抑制因子而发挥抗RNA沉默的作用, 从而限制了PVX病毒量在机体内的累积。随后, 3个独立的研究小组^[9~11]也分别证实了HcPro确实能抑制转录后基因沉默, 并且他们在实验过程中还发现烟草中的黄瓜花叶病毒(CMV)所编码的2b蛋白和HcPro同样具有抑制RNA沉默的作用。另外, 人们还发现, 感染昆虫细胞的FHV病毒编码的b2蛋白也拥有抑制RNA沉默的功能, 如果将b2基因从FHV病毒基因组中删除, FHV病毒感染昆虫Drosophila S2细胞后, 病毒拷贝数急剧减少, 说明病毒入侵宿主后可能产生一种抑制因子抑制RNA沉默过程。

2 抑制RNA沉默的作用机制

人们对抑制RNA沉默作用机制的研究工作刚刚起步, 许多问题有待于阐明。截至目前为止, 已发现多种病毒均存在逃逸RNA沉默现象, 但不同病毒逃逸RNA沉默的机制则完全不同, 其主要原因是宿主与病毒长期协同进化的结果。另外, 动物

细胞自身也存在RNA沉默调控机制使生命活动的调节更加复杂和精确。

2.1 抑制因子对RNA沉默的抑制机理

2.1.1 蛋白质因子与siRNA结合导致抑制RNA沉默。p19是由番茄丛矮病毒属所产生的蛋白质分子, 该分子由5个 α 螺旋和4个 β 片层折叠构成, 通常以二聚体形式存在。体外重组实验显示: 重组p19蛋白可特异性地结合于化学合成双链siRNA, 特别是对长度为21~22核苷酸(nt)的siRNA具非常高的亲和力, 但对长dsRNA、单链siRNA等表现出较低亲和力。体内实验进一步证实p19可与同源siRNA结合, 使其不能整合进入RNA沉默复合体(RISC)而达到病毒逃逸RNA沉默抑制的目的。例如在免疫共沉淀试验中检测番茄矮丛病毒(tombusvirus)感染的组织细胞显示siRNA与p19共沉淀, 因而推测, tombusvirus可能通过p19蛋白捕获细胞中的siRNA, 使siRNA不能被解链酶所解链, 阻止其顺利装载进入RISC, 最终逃逸RNA沉默对其自身复制的抑制。p19蛋白的作用是使RNA沉默途径中断从而保证病毒顺利逃逸RNA沉默而成功复制。与此相类似, 甜菜黄化病毒(BYV)是一种RNA病毒, 编码p21蛋白也可直接结合siRNA以致机体不能顺利产生RISC, 进而表现出沉默抑制现象使得BYV在宿主内大量复制累积。说明病毒自身可以编码一类蛋白质因子抵抗宿主的防御机制, 通过抑制沉默使自身在一定环境条件得以生存^[12]。

2.1.2 转录因子间接抑制RNA沉默。另一种抑制RNA沉默的策略为病毒表达具有抑制RNA沉默功能的核转录因子。例如, 人们已经证明双粒病毒(geminivirus)产生的TrAP因子是一种RNA沉默的抑制子, 该类病毒颗粒通常成双配对存在而由此得名, 病毒颗粒直径约为18~20 nm, 以单链环状DNA作为遗传物质, 每2个颗粒中包含1~2个2.5~3.0 kb的环状DNA分子。

该病毒寄主广泛, 大多植物均为其感染对象, 但感染部位仅限于植物的维管组织, 且其传播媒介主要是通过昆虫, 非简单机械接种传播。由双粒病毒基因组编码的TrAP因子是一种已被鉴定的沉默抑制子。人们对TrAP的分子结构分析发现, 该因子拥有核定位和结合DNA功能, 暗示TrAP是在宿主DNA水平发挥功能的。实际上TrAP是一种转录因子, 可以诱导约30多个宿主基因的过量表达, 其中包括WEL-1蛋白, 有趣的是其同源蛋白因子MUT-7和WEX均为RNA沉默的正调节因子。由于

WEL-1与WEX竞争结合WEX行使上调RNA沉默功能所需的核因子，WEL-1高表达从而降低WEX对RNA沉默的正调节作用，或TrAP同时转录活化的蛋白质因子直接抑制RISC活性从而阻断RNA沉默途径^[13] (图1)。

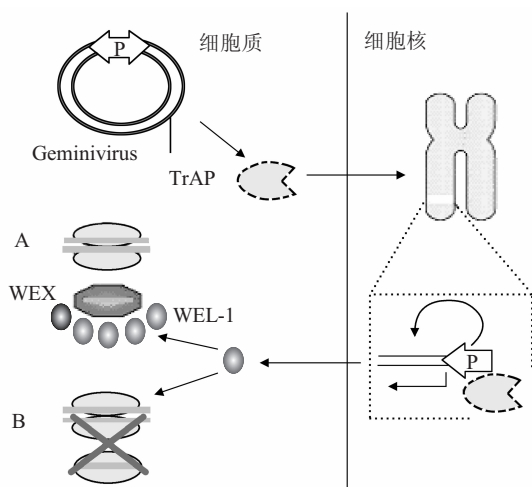


Fig. 1 Suppression of RNA silencing by TrAP ^[14]

图 1 TrAP介导的RNA沉默抑制 ^[14]

双粒病毒产生TrAP进入核内激活WEL-1等因子表达。A: WEL-1与WEX竞争结合下游RNA沉默正调节因子；B: WEL-1抑制RISC活性。

2.1.3 异源病毒蛋白可作为RNA沉默的抑制子。流感病毒是一类单链RNA病毒，分为A、B、C 3个亚型。该病毒编码产生NS1蛋白是一种含有3个功

能结构域的多功能性非结构蛋白。其中N端包含2个结构域：其一可以结合eIF4G(真核翻译起始因子)从而促进病毒mRNA的翻译，另一个结构域具有高度的dsRNA亲和能力，因此可与蛋白激酶R(PKR)竞争dsRNA从而阻断dsRNA诱导的干扰素途径，同时NS1与Dicer酶竞争结合dsRNA致使RNA沉默效果明显降低。该蛋白质的第3个结构域位于蛋白质分子的C端，在抑制mRNA剪切同时也可抑制mRNA输出核外，发挥转录后水平调控。研究表明：NS1蛋白是植物中RNA沉默的抑制因子，可以提高PVY在3种不同植物宿主中的致病能力^[15,16]。此外，Li等^[17]在果蝇细胞中进行的诺达病毒(Nodavirus)筛选分析发现：从流感病毒A、B、C 3个亚型中获得的NS1蛋白均为RNA沉默抑制因子。并且A型病毒产生的NS1可通过N端dsRNA结合域与siRNA结合从而抑制果蝇细胞中的RNA沉默。然而，NS1蛋白来源于动物病毒却是植物中RNA沉默的抑制子，异源抑制现象的产生原因仍未完全阐明，有待于进一步研究探索。

2.1.4 其他抑制因子对RNA沉默的抑制机理。CMV产生的2b因子抑制沉默信号远距离的传递；PVY病毒属产生的p1干扰RISC形成；兽棚病毒产生的b2因子抑制siRNA产生。截至目前，从植物和动物的病毒中已经鉴别出几十种沉默抑制因子(表1)。由于对这些因子的机制研究刚刚起步，许多因子沉默抑制机制知之甚少，将有待于更进一步探明。

Table 1 Identified RNA silencing suppressors encoded by plant and animal viruses

表 1 已被鉴定存在于动植物中的RNA沉默抑制因子

病毒家族	病毒	抑制因子	其他功能
香石斑驳病毒属	芜菁皱缩病毒	P38	角蛋白
黄瓜花叶病毒属	黄瓜花叶病毒	2b	宿主特异性移动
线性病毒属	甜菜黄化病毒	P21	增强复制能力
	柑橘衰退病毒	P20	增强复制能力
豇豆花叶病毒属	豇豆花叶病毒	S 蛋白	小角蛋白
大麦病毒属	大麦黄化花叶病毒	γ b	增强复制能力; 病原决定簇
花生丛簇病毒属	花生丛簇病毒	P15	迁移
马铃薯叶卷病毒属	甜菜西方黄化病毒	P0	病原决定簇
马铃薯 X 病毒属	马铃薯 X 病毒	P25	迁移
马铃薯 Y 病毒属	马铃薯 Y 病毒; 芜菁黄化病毒	HcPro	迁移; 蚜虫传播; 病原决定簇
南方菜豆花叶病毒属	水稻黄斑病毒	P1	迁移; 病原决定簇
番茄丛矮病毒属	番茄丛矮病毒; 国兰环斑病毒	P19	迁移; 病原决定簇
烟草花叶病毒属	烟草花叶病毒	P30	复制
芜菁黄花叶病毒属	芜菁黄花叶病毒	P69	迁移; 病原决定簇
番茄斑萎病毒属	番茄斑萎病毒	NSs	病原决定簇
细病毒属	水稻白叶病毒	NS3	未知
双粒病毒属	非洲木薯花叶病毒	AC2	转录催化蛋白
野田村病毒属	兽棚病毒; 野田病毒	B2	斑的形成
正粘病毒属	流感病毒 A	NS1	连接多聚 A; 抑 mRNA 的输出
痘病毒	痘苗病毒	E3L	PKR 抑制子

2.2 病毒基因组核苷酸序列变异导致RNA沉默的抑制

单链或双链RNA病毒在感染宿主细胞后, 其基因组RNA通过宿主编码产生的RNA依赖性的RNA聚合酶(RDRPs)进行复制, 该酶可在RNA病毒复制周期中产生dsRNA中间体. 然而由于RDRPs缺乏核苷酸校对功能, 导致基因组具有 $1 \times 10^{-4}/\text{nt}$ 的突变^[18]. 高突变率使RNA病毒在siRNA选择压力下, 通过siRNA靶区域的碱基突变而逃逸RNA干扰, 介导病毒复制的抑制, 从而使该突变型成为siRNA耐受型病毒. 研究发现: 用脊髓灰质炎病毒外壳蛋白或复制酶基因序列特异性的siRNA预处理HeLa细胞, 相对于未处理的HeLa细胞感染脊髓灰质炎病毒, 前者产生的病毒量仅为后者的1%~3%^[19]. 说明RNA沉默起到了抑制病毒复制的作用. 但是该病毒可以通过siRNA靶区域内nt的点突变而逃逸siRNA介导的沉默作用. 此类抗siRNA沉默效应在病毒感染后30~40 h内即可出现. 对该现象进一步分析显示, RNA沉默识别序列对靶区域或靶区域3'端的点突变是敏感的, 例如, 一对如同G:U的错配足以引起病毒逃逸siRNA的抑制. 另外, 靶向HIV-1的tat或nef基因同样由于HIV基因组序列的突变而导致HIV-1对RNA沉默的逃逸^[20].

与RNA病毒相比, DNA病毒的基因组较为稳定, 其碱基突变率仅为 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-9}/\text{nt}$, 因而迄今为止没有发现DNA病毒通过靶序列的突变而逃逸siRNA诱导的基因沉默, 然而, 最近对HBV的一项研究报告显示, DNA病毒也可以通过突变的方式逃逸RNA沉默. HBV为DNA病毒, 其复制过程必须经过一个RNA中间体且利用病毒编码的反转录酶. 由于反转录酶缺乏保真性, 在靶向HBV基因组序列的siRNA压力下导致HBV基因组在复制后出现大量突变, 其中在siRNA靶向HBV的s1基因诱导RNA沉默的研究中, 突变型较野生型HBV具有更高耐受性. 该现象类同RNA病毒复制产生的突变致使病毒产生RNA沉默抗性^[21].

2.3 病毒小RNA介导RNA沉默抑制

腺病毒和痘病毒通过小RNA介导方式抑制RNA沉默过程. 目前人类5型腺病毒(Ad5)已经被改造作为载体广泛地应用于人类基因治疗的基础研究和临床治疗之中. Ad5转录产生的非编码VA I RNA和VA II RNA, 其自身可形成类似于miRNA(microRNA)二级结构(图2). 在RNA沉默途径中, shRNA可被Dicer核酸酶切割成活性siRNA, 然后经

RISC向导作用与靶mRNA互补结合从而使RISC解解mRNA发挥基因沉默作用. 因此, RISC和Dicer在RNA沉默过程中扮演着至关重要的角色. 然而, VA I和VA II经Dicer酶切割成为有活性的siRNA立即与RISC和Dicer之间相互作用, 尤其可作为竞争性底物与Dicer酶相结合从而降低和阻断RNA沉默途径. 在病毒感染大量复制后期, VA I和VA II充分表达, 抑制RNA沉默显著. 实际上VA1高表达阻断了PKR的激活, 促进了病毒mRNA的翻译. PKR通常是在腺病毒复制周期由dsRNA诱导产生^[22,23]. Cullen等^[23]报道VA1抑制shRNA诱导RNA沉默, 但不影响由合成的siRNA诱导RNA沉默, VA1通过抑制shRNA运出核、竞争结合Exportin-5或直接与Dicer相结合等方式抑制RNA沉默过程. 研究表明, 病毒编码产生的具有miRNA类似特征的小RNA, 是动植物病毒感染宿主时抑制RNA沉默的一种普遍机制. 痘病毒通过同样的方式利用非编码序列E3L结构阻断PKR激酶而达到逃逸RNA沉默的目的^[24].

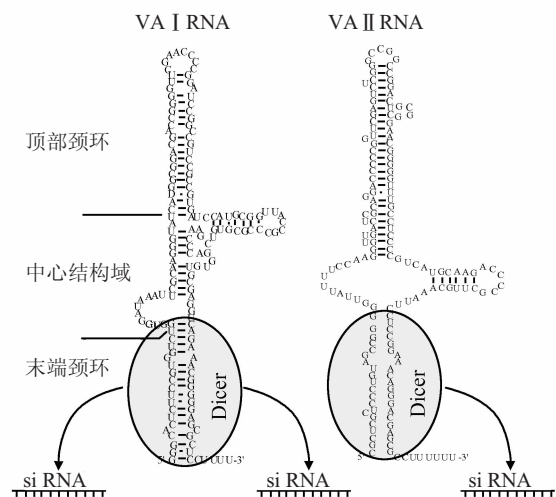


Fig. 2 The secondary structure of VA I RNA and VA II RNA ^[25]

图2 VA I RNA和VA II RNA二级结构 ^[25]

2.4 RNA编辑以及其他途径对RNA沉默的抑制作用

哺乳动物细胞中dsRNA不仅可以通过RNA沉默途径介导同源mRNA的降解, 也作为ADAR(依赖于RNA的腺苷脱氨酶)介导A-I RNA编辑的潜在靶标. ADAR可以特异性识别dsRNA序列并催化其中的腺苷酸脱去氨基成为次黄嘌呤核苷酸(I), 而翻译装配场所核蛋白体将I误读为G, 反转录酶也将其作为G处理, 因而经过ADAR处理后实际上发生了由

A到G的转换^[26]。

一般而言, dsRNA结合蛋白缺少结合的序列特异性, 因而人们认为A-I型RNA编辑机制可能是ADAR与RNA沉默中的组分竞争结合dsRNA从而降低细胞内RNA沉默的效率。研究表明: 在细胞内由于dsRNA被ADAR普遍编辑, 已经形成对Dicer抗性致使机体产生更少量siRNA, 最终导致RNA沉默效率的下降。已有报道显示细胞质中ADAR1L和siRNA紧密结合。人们通过比对ADAR突变型和野生型大鼠纤维原细胞中siRNA沉默靶基因的效率, 发现前者更具基因沉默效率。体外实验发现, ADAR编辑后dsRNA与Dicer酶的亲和力下降, Dicer酶不能识别编辑后的序列从而抑制siRNA的产生, 据此人们推测Dicer酶可以区分包含U:I摇摆突变的dsRNA和具有完全Watson-Crick配对的dsRNA^[27,28]。另有实验报道, 在adar基因缺失的小鼠成纤维细胞对siRNA介导基因沉默的效率比野生型细胞沉默效率更高。大量研究资料暗示, 人群ADAR1L在哺乳动物中作为一种细胞因子可限制siRNA的功能, 如同p19蛋白可降低siRNA的浓度以下调RNA沉默的效率相似。然而该机制与ERI-1作为RNA沉默的抑制机制则不同, 后者是一种特异性降解siRNA的核酸外切酶。最新研究显示, 部分miRNA前体pre-miRNA经过A-I RNA编辑后, miRNA成熟过程受到影响。而且哺乳动物的ADAR-1家族成员具有屏蔽siRNA的功能, 从而降低RNA沉默的效率(图3)。

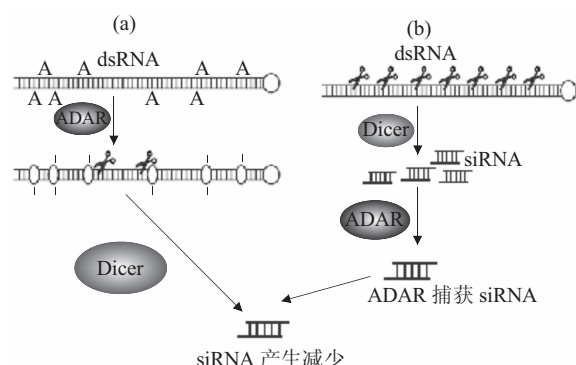


Fig. 3 Suppression of RNA silencing by RNA editing^[29]

图3 RNA编辑对RNA沉默的抑制^[29]

(a) 长 dsRNA 经 ADAR 修饰后不能被 Dicer 酶识别前切, 导致 siRNA 产生减少。(b) siRNA 经 ADAR 修饰后导致 siRNA 产生减少。

另有报道显示, 劳氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)可以通过其核衣壳对自身基因组的保护而逃

逸siRNA的识别和攻击^[29]。同样在HIV病毒RNA基因组折叠形成高级结构的某些区域也可以屏蔽RNA沉默的攻击。Westerhout等^[30]报道, HIV不但可通过突变或者删除siRNA靶序列的方式, 或通过核衣壳的屏蔽来逃逸RNA沉默介导的抑制效应, 而且还可通过改变其RNA二级结构使siRNA无法接近靶mRNA, 从而无法启动破坏病毒RNA程序, 最终使HIV基因组免受RNA沉默的抑制作用。

3 抑制RNA沉默效应的应用

目前, RNA沉默技术已经成为人们研究基因功能的一项重要工具, 然而不管使用病毒载体内源产生shRNA还是直接转染siRNA复合体, 均不同程度地遭遇宿主细胞产生抑制RNA沉默现象, 以致降低RNA沉默的效率, 甚至在某些情况下设计针对某些基因的siRNA完全没有抑制现象。为了使RNA沉默在抗病毒以及抗肿瘤等方面的应用发挥到最大限度, 人们设计出一系列策略来逃避RNA沉默现象的被抑制。

3.1 在抗艾滋病治疗研究领域

资料显示, 单个siRNA靶向HIV保守序列的疗效并不理想, 这是由于HIV基因组极易产生突变, 而HIV基因组单个nt的置换就足以显著影响单个siRNA对HIV复制的抑制作用。为此, Ter等^[31]提出联合表达一系列同时针对病毒基因组多个高度保守区域siRNA的新策略。该实验小组利用慢病毒作为治疗载体, 首先筛选出针对Gag, Pol和Rev/Tat等基因的86个保守序列而设计多个siRNA。将3个不同的siRNA串联于同一个慢病毒载体上以及将3个不同的siRNA分别插入到3个相同的慢病毒载体上, 实验设计从整体上划分成3个研究对象转染同一种细胞, 分别观察一个载体携带3个不同siRNA、3个载体分别携带不同siRNA以及单个载体携带其中之一的siRNA和比较3个研究对象之间沉默目的基因的效应, 结果发现, 一个载体携带3个不同siRNA和3个载体分别携带3个不同siRNA靶向数个保守序列的载体均使基因沉默效应更高效持久, 二者并无显著差异, 说明针对多个保守靶点的siRNA可起协同效应而增强抑制病毒复制, 而且仅当使用携带2个siRNA病毒载体转染细胞时, 病毒逃逸RNA沉默的能力在很长一段时期内即可被阻断。说明单个siRNA沉默基因时存在着RNA沉默的反抑制因素而未达到应有的沉默效果, 而联合表达多个siRNA沉默基因能显著地抑制RNA沉默的逃逸现象发生。

Nishitsuji等^[32]也利用慢病毒载体携带siRNA干扰沉默1型HIV病毒(HIV-1),但是他们靶向的区域是整合(int)和附着位点(att)基因,这2个位点对HIV-1整合作用是必需的。HIV-1患者CD⁴⁺ T细胞基因组中整合了HIV病毒基因, siRNA靶向int和U3区的att转录因子较tat转录因子能更有效地抑制HIV-1复制。但是如果只设计连续靶向int同一区域的多个siRNA转染含有大量HIV-1细胞时,即可出现HIV-1突变型。然而如果靶向int区域的siRNA间隔在50个nt,即可达到抑制野生型HIV-1和该区域突变型HIV-1的目的。联合表达靶向int和U3区att的siRNA显示出最强的抗HIV-1效果,该方法可完全阻断病毒DNA复制和整合。这些结果表明:利用不相重叠的多个siRNA能持续、有效地抑制高突变率的病毒。最近人们研究发现一种抗HIV-1新方法,用慢病毒载体表达抗HIV-1的siRNA体外转染造血干细胞,将转染siRNA的造血干细胞置入体内使之成熟转变为单核或巨噬细胞,因而可在体内产生对HIV-1有抵抗能力细胞群体,该方法已被建立,可能不久将应用于临床试验研究中。

3.2 在抗HBV研究领域

利用RNA沉默有效治疗肝炎仍然是面临一个巨大挑战。HBV是一种包膜病毒,由长度为3.2 kb部分双链的环形DNA基因组构成。HBV复制要经过一个至关重要的媒介中间体:共价封闭环状DNA(cccDNA)。在感染之前松弛环状DNA被运输到核内并转换成充当转录模板作用的cccDNA分子,也可以作为编码多功能聚合酶核心蛋白X、S蛋白的mRNA。然后通过前基因组mRNA逆转录负链DNA产生,紧接着以负链DNA为模板通过病毒聚合酶合成正链DNA,最终HBV基因组被包装产生新的病毒粒子并被分泌到胞外或重新进入到核内,使每个被感染的肝细胞含有大约5~50cccDNA个分子。许多研究表明cccDNA同样可能与抗病毒药物抗性和病毒持续感染患者有关。由于HBV的核定位信号在维持其cccDNA复制中间体复制过程至关重要,因此,最近Li等^[33]报道,通过质粒载体携带靶向核定位信号(nuclear localization signal, NLS)多个siRNA可以明显地减少HBV在肝癌细胞中的增殖,并证明siRNA可以显著抑制HBV的cccDNA复制,表明NLS可能作为防御HBV感染的一种新RNA干扰靶,它能提高抗HBV治疗效率从而克服当前治疗HBV存在的缺点。另外,HBV核心蛋白是磷酸蛋白,核心蛋白磷酸化是病毒复制产生病毒粒子能

力的关键,也可能是一种有效的抗HBV因子,该类研究项目仍在开展之中。在抗HCV方面,Zhang等^[34]使用腺病毒载体携带U6启动子调控的靶向细胞因子La和囊泡关联蛋白相关蛋白(二者均与HCV有关)的siRNA,结果发现,2个相关基因的抑制导致HCV在复制细胞中的增殖能力下降。该实验证明病毒相关的细胞因子也可以做为抗病毒治疗的潜在靶点。由于细胞因子不存在如同病毒在进化过程中的巨大压力,因而其基因更加稳定,然而该策略的临床安全性有待于进一步的证实。

3.3 在抗肿瘤治疗研究领域

腺病毒基因组转录可产生VA I和VA II RNA,二者具有类似于miRNA的二级结构(图4)。经Dicer酶切割成为有活性的siRNA后可与RISC和Dicer产生相互作用,尤其可作为竞争性底物与Dicer酶相结合从而降低和阻断RNA沉默途径,在病毒感染大量复制后期,VA RNA高表达导致RNA沉默显著降低^[35],因此腺病毒基因组中的2个非编码序列VA I和VA II是影响腺病毒载体介导RNA沉默效率的最主要因素。另有文献报道:当病毒感染细胞后将激活细胞内PKR激酶,PKR可使转录因子eIF2a等磷酸化,阻断所有蛋白质合成而阻止病毒复制。而腺病毒中的VA I和VA II RNA形成的具有miRNA结构的小RNA可阻断PKR激酶的活性,因此腺病毒感染细胞后可自行复制。如将VA RNA基因删除,腺病毒感染细胞后就失去自行复制能力,但是肿瘤细胞中高表达eIF4E、eIF4A、eIF4g、eIF3等转录因子(该类因子可弥补被磷酸化的转录因子)或Ras(通过未知机理削弱PKR活性)等过度活化现象,从而使病毒选择性地肿瘤细胞内复制,而在正常细胞内不复制。据此原理我们首次研究建立了具有肿瘤特异性复制的能力腺病毒载体工具平台,通过同源重组将腺病毒的VA I和VA II RNA删除,由于VA I和VA II在基因序列上前后相连,共约500多bp(大约腺病毒基因组第10 500~11 000 bp之间),VA I和VA II各自长约160 bp,中间被长为100 bp的序列相间隔,因此VA I和VA II可以一同被删除,我们首先设计分别靶向报告基因GFP和RFP(red fluorescence protein, RFP)的siRNA,前后串联在一起插入被删除的VA I和VA II区转染肿瘤细胞株,体外实验研究发,现报告基因沉默效果显著,作用明显,说明在同一个细胞内同时靶向2个目的基因理论正确、方法可行。我们模拟参考miRNA簇结构而设计siRNA簇骨架,由于miRNA在人类基因组结

构中往往成簇状分布, 这些簇状分布的miRNA在一个表达框架内由一个启动子所调控, 因此可被同时转录, 然后被切割成具有独立活性的miRNA. 另一方面, 参考miRNA簇结构设计siRNA骨架采用了生物体自身miRNA骨架可大大提高Drosha和Dicer酶识别与剪切效率, 与传统的shRNA相比, 新型设计的shRNA可显著提高RNA沉默基因的效率. 现已发现, 体内存在多种miRNA簇, 我们选择了研究最为成熟的miRNA簇, 例如mir-30、mir-21、mir-182~183、mir-17~92等簇骨架结构, 利用人端粒酶启动子(hTERT)调控2个siRNA沉默癌相关基因表达, 同时使用该重组腺病毒载体可以双重靶向肿瘤细胞. 在这些研究基础上, 我们进一步设计分别沉默不同的2个癌相关基因表达, 通过优化组合分别筛选出沉默具有协同效应2个不同的癌基因或相关的突变基因, 研究发现, 抗癌作用强且效果非常明显, 进一步地提高了腺病毒抗肿瘤疗效, 研究相关论文有待于发表, 相关研究正在进一步深入之中.



Fig. 4 Construction of specific adenovirus vector carrying siRNAs

图4 携带siRNAs特异性腺病毒载体构建

hTERT: 人类逆转录端粒酶启动子; siRNA: 小干扰RNA; pA: 多聚A.

4 结语和展望

从生物学意义角度去思考, RNA沉默在动植物防御病毒感染以及调控生物体生长发育中发挥着重要作用, 且已成为当今科学家探索基因的功能和疾病治疗等方面的首选使用工具. 宿主细胞本身具有抵御外源病毒入侵的RNA沉默机制, 而病毒又通过不同途径逃逸或抑制宿主自身防御, 二者的相互作用构筑了宿主与病毒之间的一种动态平衡. 另外, 动植物细胞中既存在RNA沉默机制, 又存在弱化RNA沉默的调节机制, 在一个微环境状态下二者构成防御与入侵之间的一种平衡状态.

然而, 更多的RNA沉默抑制机制还有待进一步阐明, 最近洛克菲勒大学植物分子生物学实验室的研究人员发现, 黄瓜花叶病毒的2b可结合并抑制Argonaute1, 进而抑制内源性miRNA介导的基因沉

默, 但是该抑制过程的详细机理至今仍未完全阐明^[36]. 另外, RNA沉默抑制效应的应用价值有待于进一步扩展, 目前RNA沉默用于抗病毒治疗至少存在2个主要问题: 一是如何将特异的siRNA高效输送到某一特定的组织细胞中并持续表达; 另一方面如何对病毒不断演化逃逸RNA沉默能力采取有效的阻止措施.

构建高效安全的载体仍然是一个长期研究、有待于解决的课题之一. 现常用pol II型启动子调控的siRNA多以脂质体或慢病毒为载体. 虽脂质体安全、容易制备, 但转染效率较低、表达时间较短暂. 慢病毒载体是最常用的siRNA载体, 然而Davidson等研究结果显示, 慢病毒载体影响由pol II型启动子调控siRNA的表达效率, 并且慢病毒具有非特异性整合到细胞染色体上的这一严重缺陷, 转入基因的安全性仍有待观察研究. 腺病毒载体作为最常用的基因治疗载体同时也是siRNA基因治疗的理想载体. 溶瘤腺病毒是在腺病毒基础上加以改造其基因组结构而构建的, 能够选择性地在肿瘤细胞中复制、增殖并杀死肿瘤细胞, 释放出子代病毒还可扩散到邻近的肿瘤细胞将其杀灭. ZD55、Ad-TERT也是构建的一种只能在肿瘤细胞内复制, 而不能在正常细胞内复制的新型溶瘤腺病毒. 我们已经利用ZD55、Ad-TERT构建出一系列对肿瘤有较强杀伤作用的载体, 应用靶向双基因-病毒治疗(targeting dual gene-virotherapy of cancer)策略在动物模型实验中已取得较好的杀伤效果. 人们对RNA沉默抑制机制的研究有利于进一步揭示病毒与宿主的相互关系, 以及更加深入地研究开发RNA沉默在抗病毒感染、抑制肿瘤转移和恶性转化等过程中的使用价值. 另外, 揭示RNA沉默抑制子的生物学意义和开发沉默抑制子将成为RNA相关研究领域中的一个新亮点.

参考文献

- 1 Dykxhoorn D M, Novina C D, Sharp P A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **4** (6): 457~467
- 2 Novina C D, Sharp P A. The RNAi revolution. *Nature*, 2004, **430** (6996): 161~164
- 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 Ding S W, Li H, Lu R, *et al.* RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res*, 2004, **102** (1): 109~115
- 5 Li W X, Ding S W. Viral suppressors of RNA silencing. *Curr Opin*

- Biotechnol, 2001, **12** (2):150~154
- 6 Vance V B. Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y. *Virology*, 1991, **182** (2): 486~494
 - 7 Pruss G, Ge X, Shi X M, *et al.* Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *The Plant Cell*, 1997, **9** (6): 859~868
 - 8 Ruiz M T, Voinnet O, Baulcombe DC. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant Cell*, 1998, **10** (6): 937~946
 - 9 Anandalakshmi R, Pruss G J, Ge X, *et al.* A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (22): 13079~13084
 - 10 Brigneti G, Voinnet O, Li W X, *et al.* Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J*, 1998, **17** (22): 6739~6746
 - 11 Kasschau K D, Carrington J C. A counter defensive strategy of plant viruses: suppression of post-transcriptional gene silencing. *Cell*, 1998, **95** (4): 461~470
 - 12 Voinnet O, Pinto Y M, Baulcombe D C. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **96** (24): 14147~14152
 - 13 Glazon E, Phillips K, Budziszewski G J, *et al.* A gene encoding an RNase D exonuclease-like protein is required for post-transcriptional silencing in *Arabidopsis*. *Plant J*. 2003, **35** (3): 342~349
 - 14 Voinnet O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infection. *Nature Review Genetics*, 2005, **6** (3): 206~221
 - 15 Delgadillo M O, Saenz P, Salvador B, *et al.* Human influenza virus NS1 protein enhances viral pathogenicity and acts as an RNA silencing suppressor in plants. *J Gen Virol*, 2004, **85** (pt4): 993~999
 - 16 Bucher E, Hemmes H, De H P, *et al.* The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol*, 2004, **85** (pt4): 983~991
 - 17 Li W X, Li H, Lu R, *et al.* Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (5): 1350~1355
 - 18 Dougherty JP, Temin HM. Determination of the rate of base-pair substitution and insertion mutations in retrovirus replication. *J Virol*, 1988, **62** (8): 2817~2822
 - 19 Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, 2002, **418** (6896): 430~434
 - 20 Boden D, Pusch O, Lee F, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J Virol*, 2003, **77** (21): 11531~11535
 - 21 Zamore P D. Plant RNAi: how a viral silencing suppressor inactivates siRNA. *Curr Biol*, 2004, **14** (5): R198~R200
 - 22 Sanoa M, Kato Y, Taira K. Sequence-specific interference by small RNAs derived from adenovirus VAI RNA. *FEBS Letters*, 2006, **580** (6): 1553~1564
 - 23 Lu S, Cullen B R. Adenovirus VAI noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and microRNA biogenesis. *J Virol*, 2004, **78** (23): 12868~12876
 - 24 Langland J O, Jacobs B L. Inhibition of PKR by vaccinia virus: role of the N- and C-terminal domains of E3L. *Virology*, 2004, **324** (2): 419~429
 - 25 Andersson M G, Haasnoot P C, Xu N, *et al.* Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol*, 2005, **79** (15): 9556~9565
 - 26 Yang W, Wang Q, Howell K L, *et al.* ADAR1 RNA deaminase limits short interfering RNA efficacy in mammalian cells. *J Biol Chem*, 2005, **280** (5): 3946~3953
 - 27 Bass B L. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell*, 2000, **10** (3): 235~238
 - 28 Scadden A D, Smith C W. RNAi is antagonized by A-I hyper-editing. *EMBO Rep*, 2001, **2** (12): 1107~1111
 - 29 Kazuko N. Editor meets silencer: crosstalk between RNA editing and RNA interference. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, **7** (12): 919~931
 - 30 Westerhout EM, Ooms M, Vink M, *et al.* HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33** (2): 796~804
 - 31 Ter B O, Konstantinova P, Ceylan M, *et al.* Silencing of HIV-1 with RNA Interference: a multiple shRNA approach. *Mol Ther*, 2006, **14** (16): 883~892
 - 32 Nishitsuji H, Kohara M, Kannagi M, *et al.* Effective suppression of human immunodeficiency virus type 1 through a combination of short- or long-hairpin RNAs targeting essential sequences for retroviral integration. *J Virology*, 2006, **80** (15): 7658~7666
 - 33 Li G Q, Gu H X, Li D, *et al.* Inhibition of Hepatitis B virus cccDNA replication by siRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, **355** (2): 404~408
 - 34 Zhang J, Yamada O, Yoshida H, *et al.* Down-regulation of viral replication by adenoviral-mediated expression of siRNA against cellular cofactors for hepatitis C virus. *Virology*, 2004, **320** (1): 135~143
 - 35 Cascallo M, Gros A, Bayo N, *et al.* Deletion of VAI and VA II RNA genes in the design of oncolytic adenoviruses. *Human Gene Therapy*, 2006, **17** (9): 1~12
 - 36 Rij R P, Saleh M C, Berry B, *et al.* The RNA silencing endonuclease argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Dev*, 2006, **20** (21): 2985~2995

Mechanisms of Suppression Effects of RNA Silencing and Its Application for The Field of Biomedicine*

ZHANG Yi-Ling, WEI Xu-Bin, CAI Rong **, QIAN Cheng **

(Xin Yuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract It is widely accepted that RNA silencing or RNA interference plays a crucial role in defending viruses from invasion and regulating gene expression, and has become a very potent tool for genetic function studies and some disease therapies. RNA silencing ubiquitously exists in eukaryotic cells, however, during the boundless process of synergistic evolution for the host and viruses, viruses have gained capacities of escaping or suppressing RNA silencing to make RNA interference sterile. On the other hand, some studies have revealed that mammiferous cells themselves also could regulate the effects of RNA silencing, which presents the regulation of vital activities under a more perfect condition. In order to develop the potential function of RNA silencing, people have worked out a number of strategies to decrease the suppression effects of RNA silencing. Here, all kinds of suppress mechanisms and application about RNA silencing were summarized in order to make people take cognizance of the disadvantage of RNA silencing technology while using it.

Key words suppression effect of RNA silencing, RNA silencing, virus, gene therapy

* This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (20060102Z1107), National Basic Research Program of China (2004CB518804) and Zhejiang Province Grant (116153A4E06009).

**Corresponding authors.

Tel: 86-571-86843181, Fax: 86-571-86843185

CAI Rong, E-mail: cairong801@hotmail.com, QIAN Cheng, E-mail: cqian@unav.es

Received: May 5, 2007 Accepted: July 2, 2007