

专 论 与 综 述

反义 RNA: 原理与应用

李 伟 吴 旻

(中国医学科学院肿瘤研究所 北京)

提 要

反义 RNA 是一种与特异 mRNA 互补的 RNA 分子,它天然存在于原核细胞中,能阻断 mRNA 的翻译,从而调节基因表达。利用这一特点,可制造人工反义 RNA 系统,用于研究基因功能、肿瘤治疗、人工免疫及植物遗传工程等。

一、引 言

基因表达是受严格调节控制的。尤其是在转录水平的调节,它包括负调节(阻遏物)与正调节(促进物),通过特异蛋白质调节特异基因的作用。如众所周知的操纵子模型。最近,新的事实证明反义 RNA (antisense RNA) 参与了基因表达的调节。反义 RNA 是一种与 mRNA 互补的 RNA 分子,它是反义基因 (antisense gene) 和/或基因的反义链 (antisense strand) 转录的产物。应用基因工程技术,制造反义 RNA 可抑制特异基因表达,目前这一技术在基因基本功能研究、恶性生长的控制、人工免疫及植物遗传工程等方面的作用日现显著。本文将综述这方面的材料并讨论其应用前景。

二、RNA 参与的基因表达抑制

自然产生的 RNA 抑制基因表达首先由 Mizuno 等人发现^[1,2]。他们在研究大肠杆菌的主要外膜蛋白 (Major outer membrane protein, Omp.) 基因表达时发现,两种主要外膜蛋白 OmpF 和 OmpC 的量是由培养液的渗透压决定的。当渗透压升高时,蛋白 OmpF 的合成下降,而 OmpC 上升,从而保持 OmpF 和

OmpC 的总量不变。基因 OmpF 和 OmpC 接受 OmpB 座位 (Locus) 的调控。此座位包括两个基因: OmpR 和 envZ。envZ 的产物为越膜蛋白,它接受环境渗透压变化信号,并将之传给 OmpR,后者作为促进物调节 OmpF 和 OmpC。此时,OmpC 双向转录,一方面转录出 OmpC 的 mRNA,另一方面转录上游紧邻 OmpC 的独立转录单位,其产物为一个 174 碱基的小分子 RNA,它与 OmpF 的 mRNA 的 3' 端互补,并通过与之形成互补双链而抑制 OmpF RNA 的翻译。Mizuno 等将这种 RNA 称之为 micRNA,即干扰 mRNA 的互补 RNA (mRNA-interfering complementary RNA)。这种独立的基因又称之为反义基因^[3],它天然存在于细菌的遗传结构中。

细菌体内存在反义基因调控基因表达的意义在于,通过直接干扰 mRNA 的翻译能力而准确有效地控制外膜蛋白的总量。他们进一步发现这种机制并非 OmpF 基因特有,脂蛋白基因也有这种现象。近年来的实验证明,原核类普遍存在反义 RNA 调控系统,如细菌、粘菌^[3-5]。真核类虽未发现反义基因,但通过基因工程技术成功地导入了这一调控系统,包括果蝇^[6]、哺乳动物细胞^[7]、蛙卵母细胞^[8]和植物细胞^[9]等。

三、抑制机理及真核反义 RNA

由于 mic RNA 是与 mRNA 互补的 RNA, 它不仅可以由天然的反义基因转录获得, 而且可以由基因的反义链转录而成, 即同一基因片段的反方向转录而获得, 故现在通称反义 RNA。目前尚无直接证据说明反义 RNA 抑制基因表达的分子过程。但在体外翻译系统中, 早就观察到次级结构的 RNA, 如双链 RNA, 是很难作为模板合成蛋白质的, 并曾提出过几种不同的模型^[10]。其中可以肯定的是反义 RNA 与 mRNA 形成互补双链。实验是这样的, 用特异降解单链 RNA 的 RNA 酶 A 和 T₁ 处理细胞总 RNA 样品, 经变性后, 其中含有可与反义 RNA 杂交的片段, 说明细胞内存在双链 RNA^[11], 进一步的工作表明它们存在于细胞核内。这种双链 RNA 可能会抑制 mRNA 向细胞质转移^[12], 或阻止核糖体与 mRNA 结合^[8]。而在粘菌中, 则是双链 RNA 在核内迅速降解^[5], 总的效应是阻止了蛋白质的产生。

影响反义 RNA 抑制效率的因素主要有作用部位与长度、半衰期及剂量等四个方面。关于与 mRNA 结合的部位与长度, 已发现不需要与 mRNA 等长的反义 RNA, 在一定范围内, 越长则特异性越高, 但过长的 RNA 会使双链难于形成。就 OmpF 而言, 它是一个 174 个核苷酸的 RNA 分子。它结合部位包括 mRNA 5' 端参与结合核糖体的 Shine-Dalgarno 序列、起始密码及其后一部分。其它实验也证明在原核类, 结合上述部位能有效地抑制 mRNA 的翻译。在真核类, 结合部位无一定规律, 最短的仅由 8 个核苷酸组成。反义 RNA 也有其半衰期, 一般为 8 至 14 分钟, 并且存在剂量效应, 即分子数越多, 抑制越完全。

真核类细胞是否也有反义 RNA, 目前尚无直接证据。有一线索来自 myc 癌基因^[3], 它有 3 个外显子(exon), 外显子 1 为非编码区, 起始密码位于第二个外显子。外显子 1 与外显子 2 之间有部分互补序列, 在生理条件下两者可形成环状次级结构 ($\Delta G^\circ \approx -90\text{kcal/mmol}$)。外

显子 1 是否参与了 myc 表达的调控尚不知, 但引人注意的是在人 Burkitt 淋巴瘤和鼠浆细胞瘤中, myc 基因过量表达, 同时也失去了可能具有负调节作用的外显子 1。线索之二是 RNA 的剪切、外显子的重接过程中须经过 RNA: RNA 的部分配对。线索之三即核内存在大量小分子 RNA (hn RNA), 已有不少证据表明, hnRNA 参与了基因表达的调控。我们可根据这些实验、猜想真核类可能也有反义 RNA。

细胞内存在这一机制, 无疑增加了基因表达调控的精确性。它的最大特点是高度特异性, 一种反义 RNA 抑制一种 mRNA。由此可设计人工的反义 RNA 系统, 抑制靶基因的表达。

四、反义 RNA 的合成与导入细胞

有体内合成与体外合成两类。

体内合成方法与一般基因工程方法相同。首先将靶基因(全长或部分)片段插入适当的质粒载体, 形成重组质粒, 所不同的是插入基因的方向与正常基因是相反的。这样的质粒导入细胞后即在活细胞内转录出反义 RNA。

体外合成包括体外转录与化学合成。体外转录常用的是噬菌体 SP6 聚合酶反应体系。该酶稳定、易分离, 以 DNA 为模板合成 RNA。用此方法合成的反义 RNA, 通过显微注射导入细胞内, 特别适合于研究早期胚胎发育过程中各种基因的功能。而这是上述重组质粒的方法办不到的。因为在早期卵裂过程中, 转录活性很低或没有, 新的 RNA 不产生, 新的蛋白质的产生是靠卵母细胞贮存的 mRNA。

化学合成的反义 RNA 一般分子较小, 其优点是可以设计特异的序列, 还可以对核苷酸进行化学修饰。Ts'o, P.O.P. (曹安邦) 等合成了一种非离子甲基磷酸寡聚核苷酸 (nonionic oligonucleotide methylphosphonates), 即将核酸链上 3'-5' 磷酸二酯键上与磷相接的氧负离子转换为不带电的甲基或乙基。这种他们称之为反义寡聚物的主要特点是: ①能与互补核酸链形成稳定的双链结构; ②能自由穿过活细

胞膜;③抵抗细胞内核酸酶的降解作用^[12,13]。

在合成反义 RNA 的设计过程中,应主要考虑以下几个问题。①长度。它直接关系到作用效率;②特异性。要检查所用的小片段是否与其它基因的部分序列互补,这可通过计算机辅助分析从基因银行(gene bank)中获取资料。③可调性。即控制反义 RNA 的表达,因为在研究某些基因,如与生长、分化密切相关的原癌基因或一些调控基因的功能时,不能长期地抑制这些基因的表达,否则细胞就会死亡。这就需要可诱导的反义 RNA,一般是在反义基因前接上可诱导的启动子,如热诱导的 pL 启动子,重金属离子诱导的 MT 启动子及半乳糖诱导的 Lac 启动子(最近有实验证明可用于真核细胞)。

关于反义 RNA 导入细胞的方法,几乎所有的基因转移方法都可用于反义 RNA 的导入。主要使用的有 DNA-磷酸钙沉淀法,显微注射法,脂质体介导法及电穿孔法(electroporation)。

五、反义 RNA 的应用

1. 研究基因的基本功能

新的基因的发现及其功能研究一般是通过突变体认识的。如在果蝇、蠕虫等低等生物及植物有许多自发突变体,还可用不同的物理、化学方法诱发突变,通过研究突变体表型,可了解突变基因及其正常等位基因的功能。然而这种经典遗传学方法却不适于如蛙类、鼠类等高等动物及人类。在这些种类中,突变体常常是隐性的或致死的。另外,对于那些多拷贝的基因(基因家族),单个基因突变所引起的表型变化是没有或很难看见的。解决问题的办法之一是将药物或抗体作为特异抑制物导入细胞,使靶基因或蛋白暂时失活,再研究表型变化来推测靶基因的功能。但抗体中和与药物干扰均需复杂的预处理,设计和寻找特异性抑制物也很困难。

应用反义 RNA 技术显然是一条简便的途径。cDNA 文库的建立与差异筛选(different

screening of cDNAs)及减法分子杂交(subtractive hybridization)使我们能够获得特定时期特定细胞内表达的单个基因,然后制造此基因的反义 RNA,运用前面提到的技术,即可准确地知道其产物在活体内的功能。对于基因文库(gene library)中分离出的任一片段,也可用反义 RNA 技术,在不需测序、不分析其蛋白产物的情况下,了解该片段的功能。

Izant 等首先提出在真核细胞导入反义 RNA,他们将重组的单纯疱疹病毒反义 TK 基因注入小鼠 L 细胞,观察到 TK 酶活性的下降,从而证明反义 RNA 可用于真核细胞^[7]。与之相似, Melton 等将 β -珠蛋白反义基因注入蛙卵母细胞中同样获得成功^[8]。但他们继续将反义 RNA 注入受精卵的实验却失败了。他们希望用反义 RNA 技术研究胚胎发育早期基因的功能,却意外地发现与卵母细胞不同,受精卵具有解螺旋作用,抑制双链 RNA 的形成。这种情况是否具有普遍性尚不清楚,看来需要克服新的困难^[14]。Lachman 应用反义 RNA 技术,发现 myc 癌基因在小鼠红白细胞病细胞(mouse erythroleukemia cells)的诱导分化中具有双重作用^[15]。Holt 等人用此技术研究 fos 癌基因的功能时发现, c-fos 的表达是 Swiss 3T3 细胞受血清刺激进行分裂所必需的^[16]。

从上述开创性的工作及近年来的应用研究我们可以看到,反义 RNA 技术:①能抑制给定的任何一个基因;②能在不需分离、鉴定基因产物的情况下揭示该基因的功能;③干扰那些并不翻译成蛋白质的 RNA 的功能;④可作为分析克隆基因的功能的一个基本方法。

2. 恶性生长的控制

大量事实证明,癌基因在细胞的恶变与肿瘤的演进(neoplastic progression)过程中起着关键作用,目前已在膀胱癌、胃癌、肝癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、白血病等几乎所有的人类恶性肿瘤中都发现了激活的癌基因。原癌基因的异常表达或其突变体的表达是致癌的关键之一,于是有人希望通过针对癌蛋白的抗体特异性地使癌蛋白失活而逆转癌细胞,这种方

法在研究癌蛋白的功能上起了一定的作用,但由于抗体的不稳定性和数量有限,导入方法繁琐等原因,还不能用于恶性肿瘤的治疗。

反义 RNA 技术为我们提供了特异抑制癌蛋白产生的技术,即将癌基因的反义 RNA 引入癌细胞,阻断癌基因的表达,从而控制恶性生长。这与恶性肿瘤的基因治疗的设想是相一致的。

前文提到的曹安邦教授多年来一直从事反义寡聚物的研究。他们合成了一种与劳斯肉瘤病毒相关的反义寡聚物,此寡聚物在麦胚系统中能有效地抑制蛋白的翻译,加入培养液后(10 $\mu\text{g/ml}$),能抑制 RSV 在鸡胚成纤维细胞内的再生和细胞转化,成功地将反义物用于抗癌研究^[10,17]。Esther Chang (张惠平)等人将此技术用于恶性细胞的逆转研究,他们利用曹安邦等合成的反义寡聚物,长度为 8 个核苷酸,与癌基因 EJ-Ras 的 12 位点突变处的一段序列互补,加入细胞培养液后,它能顺利地进入细胞行使功能。浓度在 400 $\mu\text{g/ml}$ 的反义物能完全抑制 EJ-Ras 转化的 NIH/3T3 细胞内 P_{21} 蛋白的产生,同时细胞发生形态上的逆转,他们将这种反义物称为 Matagen (Masking tape for gene expression)。这项工作刚刚开始,它的突出特点在于,Matagen 小,仅 8 个核苷酸,而且是化学修饰过的,易进入细胞可望发展为高度特异性的药物。

3. 人工免疫

迄今所有的免疫反应,均是通过抗原-抗体相互作用,即蛋白质间的相互作用实现的。Coleman 等报道^[18],制造针对 *E. coli* 噬菌体 SP 的外壳蛋白及复制酶的反义基因,导入 *E. coli* 后,有效地抑制了 SP 的复制,从而人工制造了一个新的免疫系统:通过核酸间的相互作用,使细胞获得了防御噬菌体感染的能力。前面提到的抗 RSV 的工作也是一个很好的例证。Benedetti 等做了一个相反的实验,也证明了这一点^[19]。在干扰素诱导下产生的细胞对病毒的抗感染过程中,需先产生一种 2'-5' 寡聚腺苷 2'-5' $\text{P}_3(\text{A})_n$,构建反义的 (2—5A) 导入细胞

后,使细胞失去了活性的 2'-5' $\text{P}_3(\text{A})_n$,从而抗病毒作用消失。

这使我们联想到,是否能用反义 RNA 制造这样的免疫系统,以抵抗病毒的感染或抑制它在体内的复制,包括乙肝病毒 (HBV),口蹄疫病毒 (foot and mouth virus),脊髓灰质炎病毒 (poliovirus) 和人免疫缺陷病毒即爱滋病毒 (HIV) 在内的严重危害生命健康的病毒,特别是后几种,均为单链 RNA 病毒,更易获得成功,前景是诱人的。

另外,反义 RNA 技术在植物细胞也获得了成功^[9]。人们期待着这项技术在植物抗病毒感染植株的培育等方面获得成功。

综上所述,反义 RNA 技术为基因基本功能的研究开辟了一条新的道路,为癌症治疗、人工免疫、植物遗传工程等提供了广阔的研究与应用前景。我们认为,这项技术可能作为一项基本的分子生物学方法而被普遍应用。

参 考 文 献

- [1] Mizuno, T. et al.: *Proc. Jan. Acad. Sci.*, 1983, 59, 335.
- [2] Mizuno, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 1966.
- [3] Green, P. J. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1986, 55, 569.
- [4] Simons, R. W. et al.: *Cell*, 1983, 34, 683.
- [5] Crowley, T. E. et al.: *Cell*, 1985, 43, 633.
- [6] Rosenberg, U. B. et al.: *Nature*, 1985, 313, 703.
- [7] Izant, J. G.: *Cell*, 1984, 36, 1007.
- [8] Melton, D. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 144.
- [9] Ecker, J. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 5372.
- [10] Stephenson, M. L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 280.
- [11] Kim, S. K.: *Cell*, 1985, 42, 129.
- [12] Miller, P. S. et al.: *Biochemistry*, 1977, 16, 1988.
- [13] Miller, P. S. et al.: *Biochemistry*, 1979, 18, 5134.
- [14] Rebagliati, M. R. et al.: *Cell*, 1987, 48, 599.
- [15] Lachman, H. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 6480.
- [16] Holt, J. T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 4794.
- [17] Jayaraman, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 1537.
- [18] Colman, J. et al.: *Nature*, 1985, 315, 601.
- [19] Benedetti, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 458.

[本文于 1987 年 8 月 24 日收到]