

## 综述与专论

# 反义 RNA 研究新进展

涂长春 殷震

(兽医大学军事兽医研究所, 长春 130012)

### 提 要

近年来,人们不断发现原核生物和真核生物中自然存在的反义 RNA,这可能揭示另一个新的基因调控方式。反义 RNA 通过碱基配对,特异性地与 mRNA 结合,阻止 mRNA 的翻译,从而抑制细胞中内源性或外源性基因的表达。因此,反义 RNA 技术为基因表达的功能研究以及基因定位和表达量检测提供了一种比常规遗传分析更为有效的方法,也为肿瘤病、病毒病等预防和治疗提供了可能途径。

**关键词** 反义 RNA, 基因表达调控, 应用

反义 RNA 的真正发现和研究开始于原核生物。它们是一类基因组自然转录的 RNA,通过碱基互补与靶 RNA (主要是 mRNA) 配对结合,抑制靶 RNA 的功能,从而调控基因的表达。不同的反义 RNA 功能各异,它们控制着质粒的复制频率、不相容性和细菌结合,控制着大肠杆菌 IS10 基因的转座及其它细菌基因的表达,也控制着噬菌体的遗传发展。此后在真核细胞中也发现了自然存在的反义 RNA 系统<sup>[1]</sup>。因此,人们推测自然存在的反义 RNA 系统可能是基因表达调控的另一种方式。反义 RNA 特异抑制 mRNA 功能的发现,为人为地控制基因表达提供了一个更为直接而有效的方法,从而引起了科学家们的高度重视,并使反义 RNA 的研究迅速发展起来。本文就近年来反义 RNA 研究,特别是真核细胞中反义 RNA 的研究进展和应用前景作一概述。

## 1 反义 RNA 的作用位点及方式

虽然,反义 RNA 的作用机制尚不十分清

楚,但从目前的研究结果来看,反义 RNA 作用于靶 RNA 的下列区域,便可呈现明显的抑制功能: a. mRNA 5' 端非翻译区,包括 SD 序列或核糖体结合位点 (RBS); b. mRNA 5' 端编码区,主要是起始密码 AUG; c. mRNA 5' 末端帽子形成位点; d. 前 mRNA 外显子与内含子结合部; e. mRNA PolyA 形成位点。

原核细胞中的研究已经表明,反义 RNA 主要在翻译水平发挥其功能,它与 mRNA 的 SD 序列 (含 RBS 位点) 或/和编码区互补结合就可以抑制蛋白质的合成。此外,在复制水平,反义 RNA 可与引物 RNA 互补结合,抑制 DNA 的复制,从而控制着 DNA (如质粒 ColE1) 的复制频率;在转录水平,反义 RNA 还可与 mRNA 5' 末端互补结合,阻止完整的 RNA 的转录。但是,目前有关真核细胞中自然存在的反义 RNA 调控体系的报道很少,其作用方式也远不如其在原核生物清楚。就基因表达与调

控的一般过程而言,真核细胞反义 RNA 的作用方式与原核生物可能有很多相似之处。人工反义 RNA 抑制病毒基因,癌基因或某些真核细胞基因的实验表明,真核细胞中反义 RNA 除在上述三个水平发挥作用外,可能还在下列阶段呈现功能。

a. 作用于 mRNA 5' 末端,阻止帽子结构形成; b. 作用于外显子和内含子的连接区,阻止前 mRNA 的剪接<sup>[2]</sup>; c. 作用于 polyA 形成位点,阻止 mRNA 的成熟及其向胞浆中的转运<sup>[3]</sup>。

以下一些研究结果可以说明真核细胞中反义 RNA 的作用方式。在转基因烟草中,反义 RNA 导致靶 mRNA 的减少,并降低其翻译效率,因为反义 RNA 的配对结合使靶 mRNA 不能进入胞浆或不能在胞浆中有效翻译。这一反义抑制可使靶 mRNA 的翻译效率降低 3 倍。与不同部位互补的反义 RNA 对爪蛙  $\beta$ -珠蛋白 mRNA 在蛙卵母细胞中翻译影响的研究表明,只有与 5' 端非编码区和编码区(含 AUG)互补的反义 RNA 才能抑制珠蛋白的合成,而与编码区 3' 端或非编码区互补的反义 RNA 不能抑制 mRNA 的翻译。这一结果不同于劳氏肉瘤病毒(RSV),与 RSV 囊膜蛋白 env 基因转录的 mRNA 5' 端和 3' 端互补的反义 RNA 均可抑制 env 的表达和病毒复制<sup>[4]</sup>。由此可见,反义 RNA 既可在胞核中,也可在胞浆中发挥其功能,无论作用于靶 RNA 5' 端或 3' 端均可表现出一定的抑制效果,但是,抑制作用的强弱因靶 RNA 的特点及在细胞中的分布不同而有差异。在胞浆中与 mRNA 5' 端互补的反义 RNA 比与 3' 端互补的反义 RNA 有更强的抑制作用,因为,据报道反义 RNA 可阻止翻译的起始,却难以阻止翻译的延伸。而在胞核中,由于阻止 mRNA 的剪接和转运,所以互补于 3' 端的反义 RNA 也有明显的抑制作用。

## 2 真核细胞中自然存在的反义 RNA 系统

发现原核生物反义 RNA 后不久,人们就

广泛应用人工构建的反义 RNA 抑制真核细胞基因(癌基因、病毒基因及其它细胞内源基因)的表达,借以研究这些基因的调控及功能。但有关真核中自然存在的反义 RNA 系统的报道首先来自 Williams (1986 年)的研究,他首次观察到小鼠基因组中同一 DNA 上正、负链的转录,由其转录出来的正义和反义 RNA 的 3' 端有 133nt 长的互补区,推测其反义 RNA 的功能在基因调控中,呈现原核反义 RNA 的作用<sup>[1]</sup>。Nepveu (1986 年)报道了正常或转化的小鼠细胞系中,在 c-myc 基因位点(c-myc locus)存在 3 个彼此分开的反义 RNA 转录区域,它们分别位于第一外显子的上游,第一内含子的内部和基因组的 3' 端,并在 RNA 多聚酶 II 指导下高水平转录反义 RNA<sup>[2]</sup>。Jakowlew (1989 年)发现几种人肿瘤细胞中存在一类约 350nt 长的功能不详的小 RNA 分子,它们能与 4800bp 长的人转移生长因子(TGF)cDNA 3' 端非编码区互补杂交,可能来源于 TGF 基因反义链的转录<sup>[3]</sup>。鼻咽癌细胞 C15 的基因组中含有非线性的 EB 病毒 DNA, Hitt (1989 年)发现这些癌细胞中存在着从病毒 DNA 多聚酶编码区和另一较大基因区转录来的一类反义 RNA 分子<sup>[4]</sup>。自然情况下,布氏锥虫基因组末端重复序列 TRS 邻近的核糖体移动因子(ribosomal mobile element)也可反向转录出少量长约 1.6kb 的反义 RNA 分子<sup>[5]</sup>。也许还有许多自然存在的真核细胞反义 RNA 系统有待发现。Kunisawa(1987 年)用计算机比较分析了某些受体的基因序列与数据库中现有核苷酸序列之间的正义/反义相似性,结果表明,诸如在低密度脂蛋白受体、淋巴细胞 IgE 受体、T 细胞受体、表皮生长因子受体、胰岛素受体、雌激素受体等的基因中,均有核苷酸序列的正义/反义相似性,并提出新蛋白质发生中反义链的作用以及蛋白质进化的一种可能方式<sup>[6]</sup>。但迄今尚未真正发现这些受体的反义 RNA。不过真核细胞中自然存在的反义 RNA 的不断发现,无疑对真核细胞基因调控机制的进一步揭示具有重要的意义。

原核细胞中自然存在的反义 RNA 往往对基因表达起着调控作用, 虽然目前在真核细胞中仅发现少数自然存在的反义 RNA, 而且对其功能和遗传背景所知甚少, 但在哺乳动物细胞和锥虫细胞中反义 RNA 的发现说明它存在的广泛性。这一切表明, 在基因表达调控中, 除顺式(*cis*)和反式(*trans*)调控方式以外, 很有可能存在另一种调控方式, 即反义 RNA 调控方式。同样反义 RNA 对某些癌基因的表达也起一定的调控作用, 这方面深入的研究有可能对癌或肿瘤的发生乃至其防治提出新的见解。

### 3 反义 RNA 技术的应用

#### 3.1 基础研究中的反义 RNA 技术

发现反义 RNA 的重大意义在于其可为基因分析提供更好的手段, 不需改变基因结构, 就能分析简单或复杂生物体内基因的功能, 从而可以避免应用对基因进行条件性突变的比较复杂的常规方法。通过向细胞中导入反义 RNA 或其表达载体, 就可特异阻止相应基因的表达, 从而可以研究这些基因对细胞发育和细胞功能的影响。例如体外构建的 p53 反义 DNA 导入细胞后, 所转录的反义 RNA 特异抑制了细胞中 p53 蛋白的合成, 结果细胞由静止期进入 DNA 复制期的能力降低, 细胞分化明显被抑制, 从而证明 p53 蛋白适当表达对细胞增殖的促进作用<sup>[40]</sup>。类似的方法还可用于研究其它基因表达对细胞发育和功能, 乃至对胚胎发育的影响。这一方法的最大优点是高度特异地抑制某一 mRNA 的翻译, 从而抑制相应基因的功能, 而不影响其它邻近基因的正常表达。此外, 将正义和反义表达载体分别导入同一种细胞, 还可以研究细胞内固有基因表达暂时增加或减少时对细胞周期的影响。

以标记的反义 RNA 或反义寡聚脱氧核苷酸作为探针进行原位杂交即可在细胞或亚细胞水平上对基因表达进行定位和定量研究。该项技术已经用于研究某些组织细胞在不同发育阶段或不同状态(健康与疾病)下特异 mRNA 的转录与表达, 从而探索特定基因在不同发育阶

段的表达水平或某些基因的表达状况与疾病发生的相关性。例如用反义核酸探针直接证明了: a. 糖尿病大白鼠肝细胞中钙调素(calmodulin) mRNA 大大降低, 导致钙调素表达不足, 因此推测这一蛋白的表达不足与糖尿病发生有关<sup>[41]</sup>; b. 1, 25(OH)<sub>2</sub> Vit D<sub>3</sub> 使胸骨细胞中胶原蛋白 mRNA 转录量增加, 并由此增加了胶原蛋白的合成, 促进了软骨细胞的成熟<sup>[42]</sup>; c. 颌下腺组织超薄切片中表达表皮生长因子和神经生长因子的 mRNA 存在于颗粒曲管细胞(GCT)中, 而不存在于腺泡细胞和管道上皮细胞中<sup>[43]</sup>。

#### 3.2 肿瘤研究中的反义 RNA 技术

虽然大量研究表明, 肿瘤的发生可能与细胞内某些致癌基因(oncogene)或原癌基因(protooncogene)的激活有关, 但仍不清楚单一细胞基因的激活是否真正具有导致细胞转化或恶性变的能力。因为在探索这样的问题时, 常规的遗传分析方法难以干扰或阻止细胞内单一基因的表达。而反义 RNA 却能提供一个有效的方法, 特异阻断细胞内单一基因的表达, 而不致影响其他基因的正常功能, 从而易于分析基因功能与转化表型的关系。例如以 c-fos 反义表达载体转化已携带小鼠肉瘤病毒(SSV)的 NIH-3T3 细胞, 结果转化细胞中 c-fos 反义 RNA 的表达导致 c-fos mRNA 含量及翻译水平的特异性降低, 转化细胞恶性变停止, 接触抑制生长恢复, 同时致癌性减弱<sup>[44]</sup>。同样, 在多瘤病毒转化的大鼠细胞中, pp60-src 的激酶活性可被导入的反义 RNA 所抑制, 致使细胞生长变慢, 在软琼脂上形成的克隆较少, 注射小鼠后的致瘤性也大为降低<sup>[45]</sup>。这些结果说明 c-fos, c-src 等都直接参与细胞的恶性转变, 同时也说明反义 RNA 对细胞癌变的抑制作用。这可能为肿瘤治疗与预防提供了新的思路。根据这样的想法, 人们已经尝试用反义寡聚脱氧核苷酸代替反义 RNA, 探索肿瘤治疗的新方法。虽然这是一个很有前途的领域, 但在取得普遍成功之前, 仍有许多理论和技术问题有待阐明和解决。根据现有资料, 反义 RNA 不能

使已经显示转化表型的细胞发生表型逆转。

某些基因的过量表达可能参与肿瘤的发生,由于反义 RNA 能够检测出这种过量表达,从而又为肿瘤的早期诊断提供了一个新的可能手段。用反义 RNA 检测多种乳房肿瘤组织中脂肪酸合成酶 (FAS) mRNA 的转录状态时,发现了一些肿瘤组织中 FAS mRNA 过量转录,这种过量转录在预测高危乳房疾病和低浸润性乳腺癌中具有一定的临床价值<sup>[16]</sup>。至此,有理由认为,应用反义 RNA 技术,不仅可以进一步研究肿瘤的发生机制,而且有可能为肿瘤的预防、治疗及其早期诊断提供新的方法。

### 3.3 病毒研究中的反义 RNA 技术

应用反义 RNA 抑制病毒基因的表达与复制有可能成为防治病毒感染的有效途径。人工构建的反义表达载体导入细胞后,可在细胞内持续表达反义 RNA,抑制相应病毒的增殖,从而保护细胞抵御病毒侵袭。在动物、植物和细菌病毒方面的研究结果已经表明这一途径是有效的。自首次使用这一途径使大肠杆菌特异抵抗噬菌体 SP 的感染以来<sup>[17,18]</sup>,已经成功地构建了劳氏肉瘤病毒<sup>[4]</sup>, HIV<sup>[9]</sup>, HTLV-1<sup>[20]</sup>, 逆转病毒<sup>[21]</sup>, 人 5 型腺病毒<sup>[22]</sup>等 5 种动物病毒的反义 RNA 表达载体,用其转化相应细胞,均可明显抑制相应病毒基因组的复制或表达。作用于病毒基因组不同位点的反义 RNA 具有不同的抑制效率。为能获得有效的抗病毒效应,必须选择那些对病毒生存和复制至关重要的基因部位进行反义抑制 (antisense inhibition)。SP 噬菌体成熟蛋白基因是反义抑制的最佳部位<sup>[18]</sup>, 劳氏肉瘤病毒基因组 5' 端的先导区, 中部 env 基因区和 3' 端非编码区均是反义抑制的有效部位。但 env 基因内含子区的抑制效果差<sup>[4]</sup>。腺病毒基因组 E1A 区对病毒感染的起始及其它基因的激活至关重要,在此区发生反义抑制效率达 90% 以上,但是针对此区不同位点的反义 RNA 抑制效率不尽相同<sup>[22]</sup>。病毒是一个庞杂的生物群体,各个成员的基因都有其各自的特点。了解病毒基因的结构及其调控序列,十分有助于有效反义 RNA 的设计。病

毒基因组 5' 端调控序列,复制和转录起始序列,早、晚期蛋白编码及其调控区等都可能成为病毒反义抑制的有效部位。

将反义 RNA 作为一种探针,用以对病毒基因的复制与转录以及病毒基因的表达水平进行定位和定量研究,探讨和阐明病毒的致病机理,看来也是可行的。Rotbart (1988 年)用体外转录的反义链和正义链柯萨奇病毒 RNA 作为探针,检测了感染细胞中病毒基因正义链(基因组或 mRNA)和反义链(复制中间型或负链)的分布及含量组成,从而进一步探索了肠道病毒的复制与感染机制<sup>[23]</sup>。

## 4 问题与展望

反义抑制理论的研究远没有跟上其应用研究,虽然反义 RNA 已被逐渐用作阻断特定基因表达的有效手段,但是有关其作用的分子机制尚不清楚。目前还不了解反义 RNA 及 RNA/RNA 杂交体在体内的稳定性及归宿,不能区分核内抑制(或许导致靶 mRNA 迅速降解)和胞浆内抑制。也不明白自然反义 RNA 调控系统,特别是真核细胞中的反义 RNA 系统是如何发生的。虽然反义 RNA 的互补结合就可导致靶 RNA 功能抑制,但难以解释为什么在有些基因中,这种结合并不抑制靶 RNA 功能。从理论上说一个反义分子只与一个正义分子结合,便可导致正义 RNA 的功能丧失,但实际上有效的抑制需要数十倍甚至上百倍过量的反义 RNA,这似乎不能简单归因于反义 RNA 的稳定性问题。目前讨论 RNA 结构与功能的关系通常是在二级结构水平上进行的,三级结构知之甚少。RNA 结构与功能的研究无疑将促进上述问题的解答。

反义 RNA 可以特异关闭某一基因,甚至可以选择性地抑制单一启动子控制的多基因区内某一基因的表达,而不影响这一多基因区内其它基因的表达,这是常规遗传分析手段难以完成的。用反义 RNA 不仅可以控制特定基因的表达,从而观察这一基因产物对细胞生理过程的影响,还可以抑制有害外源或内源基因的

表达,这可能为病毒病、肿瘤病和遗传病等的预防和治疗提供新的手段。用遗传工程方法构建反义表达载体,用其转化细胞,组织内就能自行或诱导表达反义 RNA,从而拮抗相应基因的表达。应用这一途径已有成功地使细胞抵抗恶性转化和病毒感染的报道。但是有效反义抑制的获得,除与作用位点的选择有关外,反义 RNA 表达量是一个重要因素。目前反义 RNA 的表达量,仍受一些尚不清楚的因素制约。因此反义抑制应尽量发生在有害基因表达的初期,一旦有害基因大量表达,导致细胞不可逆变化(如细胞癌变,病毒感染导致的细胞损伤等),反义 RNA 也就无能为力了。据报道,反义 RNA 能完全抑制低转录量的靶 RNA 活性,而不能完全抑制高转录量的靶 RNA 活性。几乎在发现反义 RNA 的同时,人们还发现了具有酶活性的 RNA,即 ribozyme,它可在特定部位剪断 mRNA,使其丧失功能。因此,在怎样提高反义 RNA 抑制强度时,可以尝试这样的设计,即在构建反义表达载体时,可以构建反义-ribozyme 融合基因,使转录的反义 RNA 末端带有一个 ribozyme,这样的反义 RNA 就具有反义抑制及剪断靶 RNA 的双重功能,从而加强对有害基因表达的抑制,由此构建多功能反义 RNA。此外在构建反义表达质粒时,可以将两个以上反义基因(针对同一位点或不同位点)串在一起,插入表达载体,彼此构成独立的转录单位,这样的反义表达载体一次转录就可以产生数个相同或不相同的反义 RNA,从而加强反义抑制效果。这种尝试已取得某些预想结果。例如:能同时转录出针对 SP 噬菌体外壳蛋白 mRNA 起始密码子及 SD 序列(A区)和复制酶 mRNA 起始密码子及 SD 序列(B区)的反义 RNA 的反义表达载体对 SP 噬菌体感染的抑制率达 91%,而只针对二者之一的反义表达载体对 SP 噬菌体的抑制率最高只达 64%(B区)。至此,我们完全可以认为,用组织特异或诱导型启动子构建病原性基因的反义表达载体,将其导入动物受精卵或植物原生质体,就有可能培育出

抵抗相应疾病的动植物抗病新品种。例如:应用反义 RNA 技术,在植物领域已成功地培育出抗黄瓜花叶病毒(CMV)的烟草植株<sup>[24]</sup>;保鲜期长的西红柿品种<sup>[25]</sup>;花色改变的矮牵牛花植株<sup>[26]</sup>。在动物上已成功地获得抵抗白血病病毒感染转基因小鼠个体(个人通信)。

除抑制基因表达外,反义 RNA 还拓宽了原位杂交的应用领域,人们用标记的反义核酸作为探针就可以比较容易地、特异而准确地进行细胞内基因定位,转录水平检测, mRNA 加工和运转过程跟踪及其核内外分布观察,以及病毒在细胞内正义和反义的复制及表达研究。这一技术已逐渐成为生命科学各领域研究基因表达的有效手段。

## 参 考 文 献

- 1 Williams T *et al.* *Nature*, 1986; 322: 275
- 2 Tikhonenko T I. *Mol Biol (Mosk)*, 1989; 23: 629
- 3 Cornelissen M. *Nucleic Acids Res*, 1989; 17: 7203
- 4 Chang L J *et al.* *J Virol*, 1987; 61: 921
- 5 Nepveu A *et al.* *EMBO J*, 1986; 5: 2859
- 6 Jakowlew S B *et al.* *Mol Endocrinol*, 1988; 2: 1056
- 7 Hitt M M. *EMBO J*, 1989; 8: 2639
- 8 Murphy N B. *J Mol Biol*, 1987; 195: 855.
- 9 Kunisawa T. *Protein Seq Data Anal*, 1987; 1: 117
- 10 Prasolov V S *et al.* *Mol Biol (Mosk)*, 1988; 22: 1371
- 11 Solomon S S *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1990; 168: 1007
- 12 Gerstenfeld L C *et al.* *Connect Tissue Res*, 1990; 24: 29
- 13 Noji S *et al.* *Radioisotopes*, 1989; 38: 366
- 14 Mercola D *et al.* *Gene*, 1988; 72: 253
- 15 Amini S *et al.* *Mol Cell Biol*, 1986; 6: 2305
- 16 Chalbos D *et al.* *J Natl Cancer Inst*, 1990; 82: 602
- 17 Coleman J *et al.* *Nature*, 1985; 315: 601
- 18 Hirashima A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 7726
- 19 Kohn B D *et al.* *Pediatr Res*, 1989; 25: 182
- 20 Rueden V *et al.* *J Virol*, 1989; 63: 677
- 21 Hopper P *et al.* *Current Communications in Molecular Biology: viral vector*, 1988: 139-145
- 22 Miroshnichenko O *et al.* *Biomedical Science*, 1990; 1: 267
- 23 Rotbart H A *et al.* *J Virol Methods*, 1988; 22: 295
- 24 孙国凤. 生物技术通报, 1990; 12: 12
- 25 Shechy R E *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 8805
- 26 Alexander R *et al.* *Nature*, 1988; 333: 866