

新技术讲座

RNA 干扰技术在哺乳动物中的应用*

陈杰** 白春学 张敏

(复旦大学附属中山医院肺科, 上海 200032)

摘要 RNA 干扰 (RNAi) 是生物界普遍存在的一种抵御外来基因和病毒感染的进化保守机制. RNAi 是由双链 RNA 触发的转录后基因沉默机制, 具有序列特异性, 在哺乳动物细胞中, RNAi 由 21~23 个核苷酸组成的双链 RNA 引发. 小干扰 RNA (siRNA) 可以在体外合成或通过表达载体在哺乳动物细胞内合成. 由于 RNAi 技术具有快速、简单和特异性强等特点, 在基因功能研究、抗病毒治疗和抗肿瘤治疗等方面有广泛的应用前景.

关键词 RNA 干扰, 小干扰 RNA, 哺乳动物

学科分类号 Q3, Q52

RNA 干扰 (RNAi) 是由双链 RNA (double strands RNA, dsRNA) 引起的, 广泛存在于动物植物中的序列特异性转录后基因沉默过程, 是生物体在进化过程中, 抵御病毒感染及由于重复序列和突变引起基因组不稳定性的保护机制. Elbashir 等^[1]发现, 一种称为短干扰或小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 的 RNA 干扰中间体, 能在果蝇中导致 mRNA 的降解. 这种 siRNA 为 21 个核苷酸, 形成 19 bp 的双链 RNA 分子, 3'端有 2 个核苷酸突出 (overhang), 可激活哺乳动物细胞的 RNAi 机制.

1 RNAi 的机制

RNAi 在哺乳动物中的机制基本上与果蝇和其他低等生物中 RNAi 的机制相似^[2,3]. 基本步骤由启动和效应步骤构成^[4], 启动步骤为较长的双链 RNA 经过 RNA 酶 III 核酸酶 (Dicer) 处理后, 降解成 21~23 个碱基的 siRNA, siRNA 与靶 mRNA 有高度的序列特异性. siRNA 在 3'端有 2 个碱基突出. 效应步骤为 siRNA 与 RNA 酶结合形成一个 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC), RISC 是分子质量为 50 ku 的内源性核酸酶, 并与 siRNA 序列互补的内源性 mRNA 结合, 核酸酶在 siRNA-mRNA 结合体 3'端大约 12 个碱基处切割 mRNA, 使之丧失转录信息, 达到特异性抑制目的基因表达效果.

2 RNAi 在哺乳动物细胞中的应用

2.1 体外合成 siRNA

如何实现哺乳动物细胞中 RNAi, 目前使用得最多最广泛的是 siRNA 双链复合体 (deplexes). siRNA 双链复合体是根据靶 mRNA 序列设计的 21 个核苷酸的双链, 由一条正义链和反义链组成, 其中正义链 19 个核苷酸序列与靶序列相同, 3'端有 2 个碱基突出, 一般为 UU 或 dTdT, 反义链 19 个核苷酸序列与正义链互补, 3'端也有 2 个碱基突出, 一般为 dTdT 或 UU, 3'端 dTdT 结构对 siRNA 双链复合体的稳定性有很大贡献, 而 3'端 UU 结构有利于 siRNA 介导的基因沉默.

研究哺乳动物 RNAi 机制的学者建议, 最有效的双链 siRNA 序列应该是与靶 mRNA 序列互补的 19 个核苷酸序列, 外加 3'端 2 个碱基突出构成 21 个碱基的双链 RNA, 研究表明^[3] siRNA 双链的反义链具有识别靶点基因序列的功能, 而正义链没有序列识别功能. 在设计双链 siRNA 时, 通常将 mRNA 开放阅读框区域作为作用靶点, 从启动子下游 50~100 个核苷酸开始搜寻理想的靶序列. 为了避免 mRNA 调控蛋白的影响, 3'端和 5'端非翻

* 上海市科技发展基金项目 (00JC14041).

** 通讯联系人.

Tel: 021-64041990-2445, E-mail: jazz0331@hotmail.com

收稿日期: 2002-12-20, 接受日期: 2003-01-28

译区域或者启动子不应该作为作用靶点. Tuschl 等在化学合成 21~23 nt siRNA 方面的研究取得了很好的成绩^[5].

目前已经有多家公司可以提供 siRNA 化学合成服务, 比较著名的有 Dharmacon(www. dharmacon. com)、Qiagen (www. qiagen. com)、Proligo (www. proligo. com)和 Ambion(www. ambion. com)等. 厂家可进行 siRNA 序列设计和合成, 他们采用 (AA-N19)标准进行 siRNA 设计, 即 19nt+dTdT 或 UU, 19nt 序列基础上在 3'端加 2 个碱基 (图 1). 研究者也可以根据自己的需要进行设计, RNA 最大合成碱基数量为 80 nt, 为了防止 siRNA 的降解, siRNA 通常采用了碱基保护措施, 使用前根据试剂盒提供的缓冲液和步骤去保护. 采用 2'-ACE 技术保护的合成 RNA 冻干粉, 在 -20℃ 可以保存 1 年. 另外, siRNA 的保存时间与 siRNA 自身序列、所采用的保护方法、保存温度等因素有关. 2'-OH 形式的 RNA 可以保存 6 个月. 研究表明, 以 AA-N19 标准设计的 siRNA, 在哺乳动物细胞中 70%~80%有 RNAi 作用.

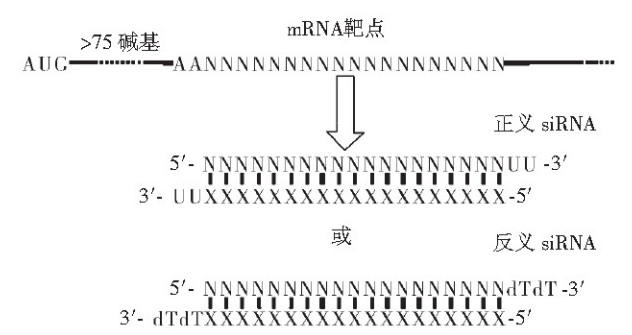


Fig. 1 Design of siRNA
图 1 siRNA 的设计原理

AA-N19 设计原则: 从启动序列下游 75 个碱基开始寻找第一个 AA 序列, 确定 AA 序列之后的 19 个碱基序列为目的序列; 计算 AA-N19-21 序列中的 G/C 含量比值, G/C 含量应该在 30%~70% 之间, 最好为 50%. 如果在此序列中 G/C 含量不能达到要求, 继续寻找下一个 AA 序列, 直到获得满意结果. 在 GenBank 表达序列标签 (EST) 数据库中用 BLAST 检索, 确认所设计 siRNA 序列的唯一性. 如果未达到要求, 重新设计.

按照 Tuschl 等设计原则^[5], AA (N19) TT 模式是最理想的 siRNA 序列, 如果靶点基因序列中没有理想中序列, AA (N21) 或 CA (N21) 序

列模式可以作为 siRNA 替代序列, 由于双链 siRNA 中的正义链并不参与靶点序列的识别, 所以正义链的设计可以用 dTdT 替代.

已经有多个实验室按照 Tuschl 等设计原则, 设计的 siRNA 取得了很好的 RNAi 效果. 但是从多个方面反馈的信息表明, siRNA 的设计并不一定要严格遵守 AA 序列起始原则. QIAGEN 公司根据现有的研究结果和客户的反馈意见, 对 Tuschl 的 AA 原则进行了修订和补充. 认为 mRNA 21 个碱基中 G/C 含量应为 50%, 这比确定 AA 起始序列更重要. 另外序列中应该避免连续同时出现 3 个鸟嘌呤碱基对, 多个 G 序列重叠形成的多聚体将大大减弱 siRNA 的阻断作用. 以下是 QIAGEN 公司的 siRNA 设计原则. 第一, 在 mRNA 编码区选择 21 个或 23 个碱基序列, 序列中 GC 含量比值尽量接近 50%. 理想的 GC 含量比值为 45%~55%, 上限 60%, 超过 70%作用明显减弱. 50~100 nt 的 AUG 启动子和 50~100 nt 的终止子区域应该避免. 第二, 在一排序列中避免出现 3 个以上的鸟嘌呤. Poly G 序列可以重叠, 因此形成块状结构, 严重影响 siRNA 的作用效果. 第三, 优先选择 AA 起始序列. 如果选择 AA 起始, 对应的 siRNA 3'端碱基突出可以为 dTdT, 从 RNA 合成的角度来讲, 可以大大降低 RNA 合成成本和增加 siRNA 对核苷酸酶的抵抗性. 如果难以发现 AA 起始序列和满足第一、第二条原则, 选择另外 23 nt 编码区域, 继续按第一和第二条原则重新选择. 第四, 确保所选靶序列与其他基因序列没有同源性. 在 GenBank 中用 BLAST 软件查对, 确保靶序列的唯一性. 根据客户的反馈意见, 正义链 3'端的标记不影响 siRNA 的效果. 依照上述原则设计的 siRNA, 80%有效. 为了确保满意的 RNAi 实验效果, 建议设计 2 条以上不同序列的 siRNA. 上述的设计没有考虑 mRNA 的二级结构. 研究表明^[6], 相对于反义 RNA 和核酶技术, mRNA 二级结构对 siRNA 的作用没有明显的影响.

体外合成的 siRNA 必需导入细胞内才能诱导 RNAi, 因此, 如何有效地导入 siRNA, 成为研究热点之一. 研究表明, 以往在基因治疗中使用的载体可用于某些 siRNA 的导入^[7], 目前使用最多的是阳离子脂质体载体.

2.2 细胞内合成 siRNA

由于体外合成 siRNA 在细胞内的作用, 受到

转染技术和效率的影响, 另外体外合成 siRNA 成本较高, 体内表达短暂. 因此研究者一直在寻找哺乳动物体内表达 siRNA 的方法, 拓宽 RNAi 技术的应用范围. 研究表明, 在体外构建 siRNA 表达载体, 通过启动子诱导表达, 在细胞内产生 siRNA, 触发 RNAi, 是一个切实可行的方案 (图 2)^[8~10]. Brummelkamp 等^[11] 采用 RNA 聚合酶 III H1-RNA 作为启动子, 用 pSUPER 质粒作为表达载体, 以 DNA 为模板在哺乳动物细胞内合成 siRNA, 在 10 多种细胞中取得满意的抑制特异基因表达效果, 并且在细胞中表达时间长, 对细胞无毒性. 设计插入序列时, 环路结构 (loops) 的大小和序列至关重要, 直接影响所得 siRNA 的抑制效果. 在机制方面, 认为首先由 DNA 模板产生一个 stem-loop 前体, 在细胞中切割后, 变成具有功能的 siRNA. 作者认为该技术是高通量筛选基因功能缺失表型的有效方法. 同样, Paddison 等^[9] 用发夹 RNAs 也取得了成功. 将 siRNA 序列的 DNA 模板插入 RNA 聚合酶 III (pol III) 的转录单位 (基于核 RNA U6 或人类 RNase P RNA H1 转录单位序列).

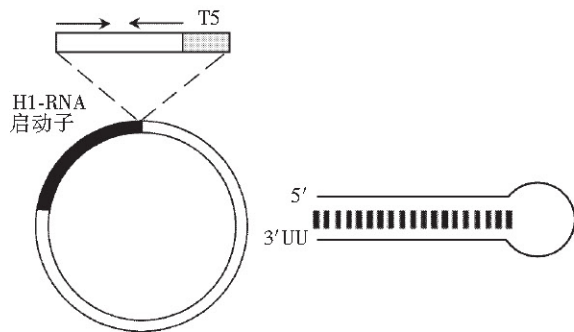


Fig. 2 Plasmid-based expression of siRNA *in vivo*

图 2 siRNA 表达载体设计

因此利用表达载体在哺乳动物细胞内合成 siRNA 是体外合成 siRNA 有效的替代方案, 具有表达时间长、作用持久和成本低等特点, 更接近生物体产生 RNAi 现象的自然机制, 是未来 RNAi 研究的方向.

3 RNAi 与反义 RNA、核酶技术的比较

反义寡核苷酸主要指一类人工合成的反义脱氧核糖核酸 (antisense oligodeoxynucleotide, ASODN), 在抗病毒和抗肿瘤药物的研究中具有广阔的应用前

景, ASODN 抑制基因表达的机制有多种, 最主要的是与靶 mRNA 通过碱基配对原则结合, 激活 RNA 酶 H 以降解 RNA/DNA 杂交分子中的靶 RNA, 阻断 RNA 加工处理和翻译, 从而抑制基因表达. 反义 RNA 是利用完全互补的 RNA 与同源性 mRNA/DNA 杂交, 封闭 mRNA/DNA, 以阻断基因表达. 核酶 (ribozyme) 是一类具有催化活性的单链 RNA 分子 (catalytic single strand RNA), 能通过碱基配对原则与靶 RNA 结合并在特定的位点特异性剪切靶 RNA, 同时兼有反义抑制效果. 反义核酸由于其作用靶点序列清楚、容易设计和制造, 被认为是极具潜力的肿瘤治疗药物, 然而在实际应用中, 由于抑制效率低, 专一性较差和较大的毒性成为目前这一方法所面临的一个现实问题, 另一方面, 用药量较大, 成本过高也会影响临床应用. 而 RNAi 除了具有和反义核酸相同的优点外, 还具有针对靶点抑制的专一性高、用量少和毒性小等特点, 这些特点为 RNAi 的大剂量、多靶点应用提供了可能.

4 RNAi 技术的应用前景

4.1 基因功能研究

在后基因组时代, 仅仅有序列已经远远不够, 在基因专利、药物开发等巨大利益的推动下, 基因功能的研究以前所未有的速度快速发展, 各种研究基因功能的新技术不断涌现. RNAi 作为一种新的、强有力的研究工具, 在功能基因组学领域呈现出巨大的应用前景, 使得 RNAi 成为当今研究领域最引人注意的话题之一. 相对于基因敲除技术 (knock out), RNAi 具有快速、有效、容易操作和序列特异性强等优点, 被称为基因抑制 (knock down) 技术, 是研究特定基因功能的有效方法, 因此, 在某种程度上可以替代操作复杂和费用昂贵的基因敲除技术. 总之, RNAi 是一种有效、快捷和成本相对低廉的基因功能研究手段, 与基因芯片等高通量基因筛选技术相结合, 在哺乳动物细胞基因组学功能研究中将起重要作用, 其应用前景不亚于 PCR 技术.

4.2 抗病毒治疗

由于 RNAi 是机体中古老而天然的抗病毒机制, HIV 病毒感染是我们亟待解决的问题, 将 RNAi 技术应用于艾滋病治疗是顺理成章之事. 目前利用 RNAi 抗病毒感染的研究已经展开, 主要集中在 HIV 病毒和脊髓灰质炎病毒, 并取得了令人

鼓舞的结果^[12]. 针对 HIV 病毒研究有 Jacque 等^[13]设计的抑制 HIV-1 长末端重复序列、附件基因 *vif* 和 *nef* 表达的 siRNA, Lee 等^[14]针对 *rev* 转录子设计的 siRNA 及 Novina 等^[15]针对 HIV 病毒 *gag* 基因设计的 siRNA, 其基本策略都是选择 HIV 病毒或宿主细胞基因为靶点. 然而, RNAi 治疗 HIV, 应用于临床, 有几个重要问题必须解决^[16]. a. 作用靶点的选择. siRNA 对序列要求非常严格, 1 个碱基的错配, 将大大降低 siRNA 基因表达抑制作用. 如果 HIV 逆转录酶有较高的错配率 (1/1 000 个核苷酸每个复制循环), 就可能迅速导致所谓 siRNA 逃逸突变的出现. 感染个体中 HIV 序列的多样性, 为 siRNA 的设计和合成增加了难度. b. 如何有效导入 siRNA. DNA 质粒、逆转录病毒载体、腺病毒载体和脂质体等在培养细胞株中有良好的导入效果, 但在原代细胞中效果较差. c. 增强 siRNA 在细胞中的稳定性. 为了防止细胞内 RNA 酶对 siRNA 的降解, 可以用 DNA 质粒和病毒载体将 siRNA 以发夹 (hairpins) 的形式导入细胞内.

4.3 抗肿瘤治疗

多种癌基因可以作为靶点设计相对应的 siRNA^[17]. Brummelkamp 等^[18]用逆转录病毒载体将 siRNA 导入肿瘤细胞中, 特异性抑制了癌基因 K-RAS (V12) 的表达. 对急性髓性白血病的研究已经取得了乐观的结果. Scherr 等^[19]以引起慢性髓性白血病和 *bcr-abl* 阳性急性成淋巴细胞白血病的 *bcr-abl* 癌基因为靶基因, 设计了对应的 siRNA, 并获得了 87% 的有效抑制率. Wilda 等^[20]用 siRNA 抑制白血病 BCR/ABL 融合基因表达也取得了成功. 因此基于 RNAi 技术的抗肿瘤治疗药物开发潜力巨大.

参 考 文 献

- 1 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
- 2 Carmichael G G. Medicine: silencing viruses with RNA. *Nature*, 2002, **418** (6896): 379~380
- 3 McManus M T, Sharp P A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*, 2002, **3** (10): 737~747
- 4 Hannon G J. RNA interference. *Nature*, 2002, **418** (6894): 244~251
- 5 Elbashir S M, Harborth J, Weber K, *et al.* Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 2002, **26** (2): 199~213
- 6 Harborth J, Elbashir S M, Bechert K, *et al.* Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci*, 2001, **114** (24): 4557~4565
- 7 Krichevsky A M, Kosik K S. RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (18): 11926~11929
- 8 Tuschl T. Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2002, **20** (5): 446~468
- 9 Paddison P J, Caudy A A, Bernstein E, *et al.* Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 2002, **16** (8): 948~958
- 10 McCaffrey A P, Meuse L, Pham T T, *et al.* RNA interference in adult mice. *Nature*, 2002, **418** (6893): 38~39
- 11 Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R, *et al.* System for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, **296** (5567): 550~553
- 12 Martinez M A, Clotet B, Este J A. RNA interference of HIV replication. *Trends Immunol*, 2002, **23** (12): 559~561
- 13 Jacque J M, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*, 2002, **418** (6896): 435~438
- 14 Lee N S, Dohhijima T, Bauer G, *et al.* Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 *rev* transcripts in human cells. *Nat Biotechnol*, 2002, **20** (19): 500~505
- 15 Novina C D, Murray M F, Dykxhoorn D M, *et al.* siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med*, 2002, **8** (7): 681~686
- 16 Kitabwalla M, Ruprecht R M. RNA interference—a new weapon against HIV and beyond. *N Engl J Med*, 2002, **347** (17): 1364~1367
- 17 Borkhardt A. Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference—new hope for a highly specific cancer treatment? *Cancer Cell*, 2002, **2** (3): 167~168
- 18 Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, 2002, **2** (3): 243~247
- 19 Scherr M, Battmer K, Winkler T, *et al.* Specific inhibition of *bcr-abl* gene expression by small interfering RNA. *Blood*, 2003, **101** (4): 1566~1569
- 20 Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, *et al.* Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene*, 2002, **21** (37): 5716~5724

Application of RNA Interference in Mammalian Cells*

CHEN Jie**, BAI Chun-Xue, ZHANG Min

(Department of Pulmonary Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract RNA interference (RNAi) is a biological process in which the introduction of double-stranded RNA (dsRNA) into a cell leads to targeted post-transcriptional gene silencing. Historically, RNAi has been used as a tool for functional genomics research in *C.elegans* and *Drosophila*. Initial attempts to activate the RNAi pathway in mammalian cells were unsuccessful, since the introduction of dsRNA > 30 nucleotides in length results in non-specific suppression of gene expression. Much of this response is due to activation of the dsRNA-dependent protein kinase PKR, and the subsequent phosphorylation and inactivation of the translation factor eIF2a. As RNAi mechanism being extensively studied, researchers discovered that double stranded short interfering RNA (siRNA) oligotides of 21~23 nucleotides could be used to mediate a gene silencing effect in mammalian cells. The application of RNAi to mammalian cells has the potential to revolutionize the field of functional genomics. The ability to simply, effectively, and specifically down-regulate the expression of genes in mammalian cells holds enormous scientific, commercial, and therapeutic potential.

Key words RNA interference, small interfering RNA, mammalian cell

* This work was supported by a grant from The Development Foundation of Science and Technology in Shanghai (00JC14041).

** Corresponding author. Tel: 86-21-64041990-2445, E-mail: jazz0331@hotmail.com

Received: December 20, 2002 Accepted: January 28, 2003