

# RNA 干扰机制及应用研究进展

马 丽<sup>1</sup>, 张 春 庆<sup>2</sup>

(1. 枣庄学院 生命科学学院, 山东 枣庄 277160; 2. 山东农业大学 农学院, 山东 泰安 271000)

**摘 要:** RNA 干扰是外源和内源的双链 RNA(double-strand RNA, dsRNA) 特异性诱导生物体内同源靶基因 mRNA 的降解, 从而导致转录后基因沉默的现象。目前对于 RNA 干扰机制已有深入研究, 同时 RNA 干扰在抑制有害基因表达、功能基因组学及基因治疗等方面的应用研究也取得了较大进展。现主要综述了 RNA 干扰的作用机制、作用特点和技术应用等方面的研究进展。

**关键词:** RNA 干扰; dsRNA; 转录后基因沉默

**中图分类号:** Q 946-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2012)10-0191-03

RNA 干扰(RNA interference, RNAi), 又称 RNA 干涉, 该技术是由 Guo S 等<sup>[1]</sup>于 1995 年在研究反义 RNA 技术的过程中首次发现的, 并命名为 RNA 干扰。RNAi 是由与生物体内源靶基因 mRNA 同源的双链 RNA(double stranded RNA, dsRNA) 特异性引发的靶 mRNA 降解, 导致目的基因表达沉默的一种反向遗传学技术。由于此技术可以特异性关闭靶基因的表达, 近年来, RNAi 的研究取得了很大进展, 已被广泛用于探索基因功能、基因治疗及药物开发等领域。

## 1 RNAi 技术的作用机制

RNAi 是在果蝇、线虫、动物和植物体内普遍发生的一种基因转录后沉默的现象。科学家对 RNAi 的作用机制进行了大量研究, 现已阐明 RNAi 发生机制大致分为 3 个阶段(图 1)。启动阶段: Bernstein E 等<sup>[2]</sup>研究结果表明, 在果蝇中存在降解 dsRNA 的主要的酶, 命名为 Dicer 酶, Dicer 是 RNaseIII 家族中的成员, 具有解旋酶活性、结合 dsRNA 的结构域和 PAZ 结构域。PAZ 结构域能结合 3'-端凸出 2 个碱基为特征的 siRNA。当转座子转录、RNA 病毒侵染, 基因中反向重复序列转录而形成 dsRNA 时, Dicer 核酸酶识别 dsRNA 并与之结合形成酶-dsRNA 复合体。Dicer 把 dsRNA 剪切成 21~23 nt RNA 片段(small interference RNA, siRNA)。序列分析表明, 50% 以上 siRNA 的特征是 3'末端具有 2 个或 3 个碱基的突出末端(图 2), 可以有效地作用于靶位点并裂解 mRNA。3'端突出的双链 siRNA 裂解目的 RNA 的效率比平末端 siRNA 的效率。磷酸化的 5'端是检测裂解区域的分子参照部

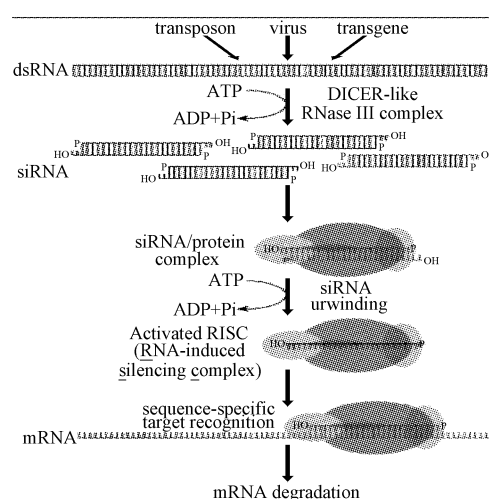


图 1 RNA 干扰的作用机制

Fig. 1 Molecular mechanism of RNAi

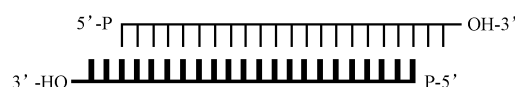


图 2 siRNA 的结构

Fig. 2 The structure of siRNA

位, 也是 siRNA 进入 RNA 干扰途径的通行证<sup>[3-4]</sup>。效应阶段: 由 Dicer 切割产生的 siRNA 与细胞内其它蛋白质形成 RNA 介导的 RISC (RNA-induced silencing complex, RISC)。RISC 复合物具有解旋酶、核酸外切酶、核酸内切酶和搜索同源 RNA 等活性。在 ATP 作用下, Dicer 利用解旋酶活性使 siRNA 解链, 其反义链能特异配对结合细胞中与其同源的 mRNA, 然后 RISC 介导切割与 siRNA 反义链互补的靶 mRNA 中的区域。切割产生的 mRNA 由于没有 Poly(A) 尾巴和 5'帽结构的保护, 可被其它的核酸酶快速降解, 从而达到干扰基因表达作用<sup>[5]</sup>。级联放大: 研究表明细胞内存在 siRNA 效应的扩增系统<sup>[6]</sup>。细胞内的 RdRP 在扩增 RNAi 中起

**第一作者简介:** 马丽(1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为植物基因工程。E-mail: mary1976816@163.com。

**基金项目:** 转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2009ZX08003-014B); 枣庄学院博士科研启动基金资助项目。

**收稿日期:** 2012-03-05

着关键作用。RdRP 是以 RNA 为模板指导合成 RNA 的一种聚合酶(RNA directed RNA polymerase, RdRP), 该种酶能以小分子 siRNA 作为特殊引物, 靶 mRNA 作为模板合成新的 dsRNA, Dicer 酶识别新产生的 dsRNA 并将其降解形成新的 siRNA, 起始 RdRP 级联反应, 从而基因沉默效应被放大和维持<sup>[6]</sup>。因此, 每个细胞内只需少量的 dsRNA 就可以完全抑制相应基因表达。

## 2 RNAi 技术的分子生物学特征

RNAi 有以下 4 个主要特征: 第一, RNA 干扰是典型的转录后基因沉默(Post-transcriptional gene silencing, PTGS)调控基因表达的方法。Fire A 等<sup>[7]</sup>研究表明, 当向细胞导入特定的 dsRNA 时, 外源基因能被转录, 但转录产物 mRNA 积累量很低或没有稳定 mRNA 的存在, 用特异性的抗体也几乎检测不到靶基因所表达的蛋白质。该结果说明转录后的 mRNA 在细胞质中发生了序列特异的降解而导致在蛋白质水平表达的基因沉默; 第二, RNAi 具有沉默目的基因表达的高效性。RNAi 干扰效应在 RdRP 的作用下能被维持和放大。这种类似 PCR 扩增的级联放大作用能产生大量的新 siRNA, 在短时间可使干扰效应迅速的有效关闭靶 mRNA 翻译形成蛋白质。每个细胞少量的 dsRNA 即能使目标基因表达降到极低水平甚至完全“剔除”。Bass B L<sup>[8]</sup>表明 RNAi 比基因敲除技术更简便快速, 能在 1 周内抑制 10 个基因的表达, 并可以一次设计并注射多个基因的 dsRNA, 则可以实现对多个基因的沉默。第三, 具有高度的序列特异性。很多研究表明生物体内的 siRNA 只能抑制与其同源的基因表达, 并不影响其它基因的表达。在 siRNA 中除正义链 3'端突出的 2 个碱基外, 其它碱基改变就可能使 RNAi 失效。Elbashir S M<sup>[4]</sup>和 Scherr M 等<sup>[9]</sup>发现在 21~23 个碱基对中有 1~2 个碱基错配会大大降低对靶 mRNA 的降解效果。第四, 具有可扩散性。Fire A 等<sup>[7]</sup>研究表明在线虫内注射 dsRNA, 在注射的细胞和体内其它细胞都能检测到 dsRNA 的存在, 说明 dsRNA 具有扩散效应, 能引起其它细胞的基因沉默。Rishok A 等<sup>[10]</sup>研究表明 RNAi 有穿透细胞的能力, 在不同细胞间能维持和传递, 干涉效应甚至能传递给后代。

## 3 RNAi 技术的应用

RNAi 技术作为一种反向遗传学技术, 在基因功能的研究、生物遗传改良及基因治疗等多个领域得到广泛的应用。

### 3.1 RNAi 在基因功能方面的应用

随着分子生物学的发展, 众多生物的基因组全序列已经被成功测序分析, 各个基因功能的研究越来越受到人们的关注, 了解一些重要基因在生物生长和发育中的作用是十分重要的。很多学者认为依据 RNAi 发生的机理及作用特点, RNAi 可以作为研究基因功能的一个有效工具。目前, RNAi 已成功用于研究果蝇、线虫和一些植物的基因的功能。如在线虫体内注射 dsRNA, 把能

表达 dsRNA 的细菌饲喂线虫, 甚至是把含 dsRNA 溶液浸泡线虫, 都能高效而方便地找突变表型。

大量研究表明 RNAi 能特异高效抑制目的基因表达, 使基因功能丧失, 是研究基因功能的一种有效策略。Prasanth 等<sup>[11]</sup>利用 siRNA 关闭基因 Orc6 表达, 阻碍细胞有丝分裂, 导致多核细胞产生。如果长时间缺失 Orc6, 细胞数目增殖速度变慢, 表明 Orc6 的主要作用是负责细胞分裂和染色体的复制。此外, RNAi 技术也可高通量研究基因功能。Ashrafi K 等<sup>[12]</sup>用 RNAi 系统关闭了线虫体内数个已知基因的表达, 结果表明 305 个基因的失活导致体内脂肪减少, 失活的 112 个基因使线虫脂肪累积。这些研究结果表明, RNAi 具有高效、特异性强、周期短、操作简单等优点。在不久的将来, 科学家可以构建包含多种 siRNA 片段组成的点阵芯片, 把多种类型的细胞培养在这种点阵芯片上就能观察基因组中的基因表达被抑制而产生的表型, 形成各种基因失活后的表型库, 找到相应 mRNA 和表型的对应关系。因而, RNAi 可以在后基因组时代中发挥重要作用。

### 3.2 RNAi 在治疗疾病中的应用

基因异常表达是导致许多疾病的主要原因。用 RNAi 技术可以关闭变异基因的表达, 治疗基因表达异常产生的疾病, 所以 RNAi 在治疗疾病方面比传统治疗方法更有效, 副作用更小。

3.2.1 在抗病毒治疗中的应用 RNAi 技术能有效抑制特异基因的表达, 在病毒病治疗中, RNAi 可以作为抗病毒的一种有效工具。Lee N S 等<sup>[13]</sup>针对艾滋病(AIDS), 根据 RNAi 发生机理, 把 HIV21 末端重复序列、*vif* 和 *nef* 附件基因的部分序列设计成干扰片段, 结果均能有效抑制病毒 AIDS 基因的表达, 这为抑制 AIDS 病毒感染的基因治疗提供了一个有效的新途径。针对乙型肝炎病毒(HBV), McCaffrey A P 等<sup>[14]</sup>在小鼠内表达了含 siRNA 的载体, 在小鼠肝脏中成功抑制了 HBV 的复制。此外, RNAi 技术在脊髓灰质炎病毒(Poliovirus)、流感病毒(Influenza virus)、SARS、疱疹病毒等基因治疗中的应用也取得了较好效果。

3.2.2 在抗肿瘤治疗中的应用 RNAi 在抗肿瘤治疗中也得到有效应用。如在细胞内形成 *Bcr-Abl* 杂合基因, 会提高酪氨酸激酶活性, 使白细胞增多而导致白血病。Scherr M 等<sup>[9]</sup>研究表明, 根据 *Bcr-Abl* 序列设计 siRNA, 在细胞内可有效抑制 *Bcr-Abl* 基因的表达, 研究结果为治疗此种白血病提供了技术手段; Yuri P 等<sup>[15]</sup>利用 RNAi 技术发现了 2 个与慢性淋巴细胞白血病有关的 miRNA(miR181 和 miR29), 这 2 个微小 RNA 可以抑制 *TCL1* 癌基因的表达, 为未来治疗慢性淋巴细胞白血病奠定了基础。Zhang L 等<sup>[16]</sup>合成 VEGF 不同的 siRNA 异构体导入小鼠内, 特异抑制了 VEGF 的表达, 有效抑制了肿瘤细胞的生长。以上研究结果说明 RNAi 能从肿瘤发生发展的多方面治疗肿瘤。

3.2.3 在遗传性疾病治疗中的应用 日本基因研究学家 Ishizuka A 等<sup>[17]</sup>研究了 RNAi 在脆性 X 染色体综合征(与 FMR21 基因异常有关的导致智力低下的染色体病)发生中的作用。研究结果表明, RNAi 与脆性 X 染色体综合征之间的关系密切,揭示了缺陷 RNAi 相关机制可能导致人类疾病的病理机理。使 RNAi 技术在遗传性疾病治疗中应用成为 RNAi 领域的一大热点研究。

3.2.4 新药物的开发 RNAi 能特异抑制某种疾病目的基因 mRNA 的表达,能成为寻找新的药物靶标的工具,高通量的发现药物靶基因。豚鼠蛋白相关肽 AGRP 是与肥胖有关的一个基因, Makimura H 等<sup>[18]</sup>利用 RNAi 使 AGRP 表达量降低 50%,结果生物体在不减少摄食量的情况下通过提高代谢率来减轻肥胖,为肥胖的治疗提供了一个新思路。

此外, RNAi 在植物遗传改良中也得到应用,牛颜冰等<sup>[19]</sup>在植物抗病毒研究中发现,利用植物病毒来源基因的 dsRNA 可以直接引发 PTGS,从而引发植物对病毒的终生系统抗性。该实验室利用针对玉米矮花叶病毒基因设计 dsRNA,导入玉米植株后诱导 RNAi 的发生,降解病毒的 mRNA,使玉米植株对病毒具有一定的抗病性<sup>[20]</sup>。

#### 4 RNAi 技术的前景展望

RNAi 是一种基因转录后沉默表达的基因调控方法,进一步的深入研究基因沉默可揭示生物体基因遗传表达调控的实质。由于 RNAi 有特异的作用机理和简便的操作流程,在研究基因功能中的应用正逐步代替基因敲除和反义核酸技术。而且作为基因治疗的新方法, RNAi 在疾病治疗方面会发挥着越来越重要的作用。

#### 参考文献

- [1] Guo S, Kempthues K J, Par-I. A gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed[J]. Cell, 1995(4): 611-620.
- [2] Bernstein E, Hammond S M, Hannon G J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference [J]. Nature, 2001, 409 (6818): 363-366.
- [3] Nykanen A, Haley B, Zamore P D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway [J]. Cell, 2001, 107 (3): 309-321.
- [4] Elbashir S M, Lendeckel W, Yalcin A. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs [J]. Genes Dev, 2001, 15(2): 188-200.
- [5] Thomas T, Zamore P D. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro* [J]. Genes Dev, 1999, 13(24): 3191-3197.
- [6] Nishikura K. A short primer on RNAi: RNA directed RNA polymerase acts as a key catalyst [J]. Cell, 107(4): 455-481.
- [7] Fire A, Xu S, Montgomery M K I. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391: 806-811.
- [8] Bass B L. RNA interference, the short answer [J]. Nature, 2001, 411 (6836): 428-429.
- [9] Scherr M, Battmer K, Winkler T, et al. Specific inhibition of bcr abl gene expression by small interfering RNA [J]. Blood, 2003, 101 (4): 1566-1569.
- [10] Rishok A, Tabara H, Mello C C. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans* [J]. Science, 2000, 287(5462): 2494-2497.
- [11] Prasanth S G, Prasanth K V, Stillman B. Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis [J]. Science, 2002, 297(5583): 1026-1031.
- [12] Ashrafi K, Chang F Y, Watts J L. Genome wide RNAi analysis of the *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes [J]. Nature, 2003, 421 (6920): 268-272.
- [13] Lee N S, Dohjima T, Bauer G. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV21 rev transcripts in human cells [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(5): 500-505.
- [14] McCaffrey A P, Nakai H, Pandey K, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(6): 639-644.
- [15] Yuri P, Urmila S, Amelia C, et al. Td1 expression in Chronic Lymphocytic Leukemia is regulated by *miR-29* and *miR-181* [J]. Cancer Res, 2006, 66 (24): 11590-11593.
- [16] Zhang L, Yang N, Mohamed Hadley A, et al. Vector based RNAi, a novel tool for isoform specific knock down of VEGF and anti angiogenesis gene therapy of cancer [J]. Biochem and Biophys Res Commun, 2003, 303 (4): 1169-1178.
- [17] Ishizuka A, Siomi M C, Siomi H A. Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins [J]. Genes Dev, 2002, 16(19): 2497-2508.
- [18] Makimura H, Mizuno T M, Mastaitis J W, et al. Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake [J]. BMC Neurosci, 2002, 3(1): 18.
- [19] 牛颜冰, 于翠, 张凯, 等. 瞬时表达黄瓜花叶病毒部分复制酶基因和番茄花叶病毒移动蛋白基因的 dsRNA 能阻止相关病毒的侵染 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(4): 484-485.
- [20] 马丽. 白草花叶病毒基因 RNAi 表达载体的构建 [J]. 江苏农业学报, 2009(4): 53-55.

## Mechanism of RNA Interference and Progress of its Application

MA Li<sup>1</sup>, ZHANG Chun-qing<sup>2</sup>

(1. Department of Life Science, Zaozhuang College, Zaozhuang, Shandong 277160; 2. College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271000)

**Abstract:** RNA interference is the process of the post-transcriptional gene silencing in which it degraded endogenous mRNA specifically by the mediation of corresponding double stranded RNA. Many studies on the mechanism of RNA interference were made. RNAi provided a new tool for studying gene function, gene therapy and inhibit the expression of unfavorable genes. The mechanism, the characteristics and application of RNAi were reviewed in this paper.

**Key words:** RNA interference; double strand RNA; post-transcriptional gene silencing