

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0223-03

## 载体介导的哺乳动物细胞 RNA 干扰技术与基因治疗

宋现让<sup>1,2</sup>, 柳永蕾<sup>2</sup>综述; 于金明<sup>2</sup>审阅 (1. 山东大学医学院分子生物学研究所, 济南 250014; 2. 山东省肿瘤医院基础研究中心, 济南 250117)

[摘要] RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是生物在进化过程中,抵御病毒感染及由重复序列和突变引起基因组不稳定性的保护机制。RNAi 是由双链 RNA 引发的靶基因 mRNA 降解而导致基因转录后沉默的现象,研究者利用这一现象对要研究的基因进行抑制,从而形成了 RNAi 技术。RNAi 具有特异高效的特点,因此该技术已在研究基因功能和进行基因治疗中得到广泛应用。RNAi 的实现途径有多种,每种方式都各有优缺点。

[关键词] RNA 干扰; siRNA; shRNA; 基因治疗

[中图分类号] Q813.4 [文献标识码] A

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA)分子诱导细胞内与其序列同源的基因 mRNA 降解而引起的基因转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)的现象<sup>[1]</sup>。RNA 干扰的特点是能高效特异性抑制基因的表达,这种作用较强且易于实现,已成为研究热点。在低等生物,如果蝇、线虫、植物、真菌,以及哺乳动物卵胚细胞包括鼠卵细胞、胚胎细胞、胚胎干细胞等,长 dsRNA 被 Dicer 酶水解产生 3'端 2~3 nt 突出长约 21~23 nt 双链的小干扰 RNA (small interference RNA, siRNAs)诱导 PTGS<sup>[1]</sup>。而在哺乳动物体细胞,由于长 dsRNA 可引起非特异性的基因表达抑制,所以只有 19~23 nt 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)能诱导 RNAi<sup>[2,3]</sup>。siRNA 可通过化学合成或体外转录产生,也可由启动子转录形成短发卡结构 RNA(short hairpin RNA, shRNA)来模拟 siRNA<sup>[4,7]</sup>。用于基因治疗时,siRNA 易被 RNase 降解,且体外合成 siRNA 的量也不能满足体内实验的要求,所以载体介导的 RNAi 成为主要方式。下面重点介绍载体介导的 RNAi 及其在基因治疗方面的研究进展。

### 1 RNAi 质粒表达载体构建

RNAi 质粒表达载体有 2 类:一类是转录分别产生 sense 和 antisense RNA,共转染同一细胞,生成 siRNA;另一类转录产生 shRNA。后者常用,它由质粒骨架和 shRNA 表达结构组成。shRNA 表达结构由 3 部分组成:启动子(promoter)、发卡结构序列(short hairpin sequence)和终止子(terminator)。发卡结构位于启动子与终止子之间,由 19~29 nt 正向靶基因序列(sense strand)、间隔/环序列(spacer/loop)和 19~29 nt 靶基因反向互补序列(antisense strand)组成<sup>[1,8]</sup>。设计 RNAi 质粒表达载体应注意以下几点:

#### 1.1 启动子的选择

选择合适的启动子是产生有效 siRNA 的关键。目前用于表达 shRNA 的启动子有:人/鼠 U6 启动子、人 H1RNA 启

动子和 tRNA<sup>val</sup>启动子等<sup>[1,8,9]</sup>。前三者常用,均为 RNA 多聚酶(polymerase, pol III)。pol III 启动子系统的特点是:起始和终止位置明确,能在各种细胞中高水平启动基因的持续表达,现已广泛用于构建 shRNA 质粒表达载体。pol III 表达系统适合小的 5'、3'末端固定的非编码转录产物的表达,每个细胞可产生大约  $4 \times 10^5$  拷贝数转录产物<sup>[5,8]</sup>。U6 启动子要求转录产物的第 1 个核苷酸总是 G,3'末端必是 C,正反义链均如此;H1 RNA 启动子第 1 位 T, C, G 均可,这并不影响基因沉默的效果<sup>[1]</sup>。转录产物定位于核内还是胞浆取决于 pol III 表达系统类型。U6 + 27 转录产物提供 U6 序列的前 27 个核苷酸带有  $\gamma$ -甲基磷酸帽而定位于细胞核,与 U6 + 27 不同, U6 + 19 只含 U6 序列的前 19 个核苷酸,转录产物不戴帽<sup>[1]</sup>。

#### 1.2 靶序列的选择

选择已知 cDNA 开放阅读框架中的序列区域。原则是:靶序列选择在酶活性区域或中间,有文献支持靶序列选择在翻译起始点下游 100 nt 范围内<sup>[8]</sup>;避免 5'或 3'端的非翻译区域、内含子区域和多态性位置;避开多聚鸟苷酸序列区,以免形成四聚体结构,抑制 RNAi 作用;重复序列不能过多;GC 含量在 30%~50%,过高的 GC 含量会降低 RNAi 效果;选择前面为 AA, G 开始的 19~29 nt 的核苷酸序列作为 siRNA 靶点。将选出的序列作 NCBI BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>),确认与其它基因无同源序列。因为无法预测 mRNA 的哪个区域对 RNAi 敏感,为确保靶基因表达的有效抑制,一般选择 2~4 个针对同一基因的不同区域的靶序列,测试后选择最有效的序列供下一步研究使用<sup>[8]</sup>。

#### 1.3 环序列

环序列的长度及其碱基序列对 RNAi 的作用效果文献报道并不一致。Brummelkamp 构建 5 nt、7 nt 和 9 nt 环的 shRNA,比较 3 种载体在乳腺癌细胞 MCF-7 中抑制 CDH1 基因的效果,结果 9 nt 环的 shRNA 抑制率达 90%,7 nt 环的 shRNA 只有中等程度抑制,5 nt 环的 shRNA 无抑制活性;而且还指出在环序列中有 2 个尿嘧啶对基因有效抑制很重要<sup>[6]</sup>。

Kawasaki 等<sup>[5]</sup>报道来自 miRNA( microinterferencing RNA )的环序列助于 shRNA 出核并被 Dicer 酶加工,提高 RNAi 的效果<sup>[9]</sup>。说明环核苷酸长度和序列对构建有效的 shRNA 载体是重要的。而 Patrick 等认为环的大小及序列并不影响 RNAi 作用。一般说来,设计构建 RNAi 载体时选择 3~9 nt 的环长度即可,且环序列不能与靶基因和表达结构内的其他序列有任何同源。

#### 1.4 转录终止子

在设计 shRNA 表达结构时,转录终止子是必需的,它提供转录终止的信号。一般是紧随 19~29 nt 靶基因反向互补序列之后加 4~5 个 T<sup>[1,8]</sup>。

1.5 模板两端加供插入载体的酶切位点,前提是不能互补。在体外合成双链 DNA,作为 shRNA 表达结构,定向克隆入载体,然后筛选鉴定所需质粒,对表达结构区测序确定序列的正确性。

#### 1.6 其它

Petr 等<sup>[5,10]</sup>构建 RNAi 质粒载体,在其反向序列和报告基因上游插入 SV40 内含子序列可提高 shRNA 的表达水平并增强其稳定性。

### 2 病毒载体构建

应用质粒介导 RNAi 有其局限性,如在不同的宿主细胞质粒的转染效率差别很大,转染效率低的细胞中 shRNA 不能有效表达,抑制基因表达的作用较弱,而且持续时间短,不适宜用做基因治疗研究<sup>[1]</sup>。应用病毒载体介导 RNAi 可克服这一缺点。目前用腺病毒( adenovirus )、腺相关病毒( adeno-associated virus )、逆转录病毒( retrovirus )为载体介导 RNAi<sup>[11-14]</sup>已见报道。

将经筛选 RNAi 效果显著的质粒载体中的 shRNA 表达结构酶切后插入病毒载体,与含有病毒包装结构的质粒共转染细胞,收获病毒,转导细胞,观察基因抑制效果或进行基因治疗。腺病毒载体效率很高但只有短暂的 siRNA 的表达,Shen 等<sup>[11]</sup>用腺病毒载体介导的 siRNA( H1 RNA 启动子 )有效特异地抑制乳腺癌细胞 MCF-1 和肺腺癌细胞 A549 中 p53 基因的表达,Tomar 等<sup>[13]</sup>构建 siRNA 腺相关病毒载体能有效抑制 HeLa S3 细胞 p53 及 Caspase8 表达。慢病毒( lentivirus )载体由于:①能感染非分裂细胞和终末分化细胞;②将目的基因整合到宿主细胞 DNA;③单纯疱疹口炎病毒壳糖蛋白( VSVG )扩大了载体感染细胞的范围;所以介导的 RNAi 作用强而持久<sup>[14-16]</sup>。Stewart 等<sup>[14]</sup>构建的 U6 启动子逆转录病毒表达载体 Retrohair-siGFP1 转导 GFP 表达细胞结果抑制 HeLa-GFP 10 倍,抑制 DC-GFP 达 3 倍;构建含有 U6 启动子的慢病毒载体 LentiHair-siGFP1 转导表达 GFP 的 BMDC-GFP 和 HeLa-GFP 细胞,抑制 GFP 分别大于 3 倍、10 倍,较逆转录病毒表达载体 Retrohair-siGFP1 抑制效果强。Terki 等<sup>[15]</sup>构建的 H1 RNA 启动子慢病毒载体,转导细胞 72 h 后可见 EGFP 表达抑制,这种作用持续了至少 25 d。

### 3 RNAi 载体在基因治疗方面的应用

RNAi 用作治疗目的在过去的 2 年中已经有许多试验。可用 RNAi 治疗的疾病包括病毒感染性疾病、肿瘤和显性遗传性疾病。

#### 3.1 感染性疾病

HIV 是第一个试验应用 RNAi 治疗的疾病。通过 RNAi 抑制病毒基因 tat, rev, nef 和 gag, 观察到在培养细胞中病毒复制受到抑制。CD4, CCR5 和 CXCR4 等 HIV 感染必需的分子,经 RNAi 抑制其表达也获得相似的结果<sup>[17]</sup>。丙型肝炎病毒 HCV,引起慢性肝病的主要致病原,基因组只有单链 RNA,是 RNAi 的理想攻击靶,抑制 HCV 的 RNA 进而阻止病毒复制,为治疗该疾病提供了一种新的基因治疗方式<sup>[18]</sup>。人乳头状瘤病毒( human papilloma virus, HPV )被认为有导致肿瘤的作用,通过 siRNA 抑制 HPV 16 型的 E6 和 E7 基因可降低宫颈癌细胞增殖并诱导凋亡<sup>[19]</sup>。siRNA 可以抑制流行性感冒病毒的核壳体或 RNA 转录酶成分,破坏了病毒 mRNAs 的积聚<sup>[20]</sup>。这些成果令人鼓舞,但是如何根除体内的病毒还有许多的困难,需要在动物模型和临床中进一步实验。

#### 3.2 恶性肿瘤

RNAi 的序列特异性使其能特异性敲除突变的癌基因。K-ras 是第 1 个试验的癌基因。用逆转录病毒载体介导的以 H1RNA 为启动子的 K-ras shRNA 表达系统,作者成功地抑制 K-ras 的表达而不影响其他 ras 基因,更重要的是这一结果不只在组织培养而且在动物模型取得了成功<sup>[21]</sup>。相似的研究很快扩展到其它基因。癌基因可通过染色体易位导致两不相关基因的融合被激活, M-BCR/ABL 融合导致白血病细胞基因重排,特异性 dsRNA 转染 K562 细胞能下调 M-BCR/ABL 融合蛋白的表达<sup>[22]</sup>。肿瘤耐药相关基因,如 MDR1 基因、MGMT 基因是肿瘤耐药的重要原因, RNAi 能成功地抑制 P-gp 的表达从而增加肿瘤细胞的药物敏感性<sup>[23]</sup>。Shen 等<sup>[24]</sup>用腺病毒载体介导的 siRNA( H1 RNA 启动子 )有效特异地抑制乳腺癌细胞 MCF-1 和肺腺癌细胞 A549 中 p53 突变基因的表达。用 RNAi 特异性抑制 VEGF 的表达,减少血管生成,也是一种治疗肿瘤的尝试。此外用慢病毒载体介导的 RNAi 技术移植 ATM 基因的表达可显著提高肺腺癌细胞 SP-CA1 对放射线的敏感性,联合放疗对移植瘤的控制率显著提高。

#### 3.3 其它疾病

显性遗传病通常是由于 1 个等位基因的改变引起的,特异地抑制突变基因可以让正常的等位基因恢复细胞的功能。重复的 CAG 序列编码一种聚谷氨酸蛋白导致至少 8 种神经退行性病变,包括 Huntington's 病和 Kennedy's 病。尽管导致神经退行性变的机制尚不清楚,但突变的聚谷氨酸蛋白具有毒性。针对 5'-或 3'末端的 CAG 重复序列的 siRNA 能恢复聚谷氨酸蛋白的毒性,提示 RNAi 是一种有希望的治疗方式<sup>[25]</sup>。

#### 4 问题与展望

应用 RNAi 作基因治疗,还存在一些问题,特别是慢性疾病,需要靶细胞稳定表达 shRNA 或重复使用 siRNA 才可以<sup>[1]</sup>。但是如何将 siRNA 或 shRNA 表达载体有效地转移至病人,至今尚无理想的方法。即使发展有效的药物制剂将 siRNA 或 shRNA 表达载体成功导入病人体内, RNAi 也只是抑制而不能完全清除异常基因表达<sup>[1]</sup>。RNAi 只是降解与其序列同源的 mRNA,对体内已经存在的蛋白,用 RNAi 的方式是无法清除的,而蛋白是细胞功能的执行者。病毒性载体是一种不错的选择,可以使细胞长期表达 shRNA 发挥 RNAi 作用。但靶向应用是一个难题。此外, RNAi 的特异性本身可能限制其在某些易发生改变的基因,如病毒性感染,突变了病毒基因可以逃过 RNAi 的降解作用。

尽管存在很多要解决的问题, RNAi 技术已成为继反义核酸技术之后抑制靶基因功能达到基因治疗目的的一种重要技术手段,载体介导的 RNA 干扰技术使 RNAi 的应用变得简单、广泛。由于插入基因的片断很短,一个载体携带多个靶基因的 shRNA 表达结构成为可能,这对一些复杂疾病如肿瘤或病毒感染性疾病的联合基因治疗将十分有用。

#### [ 参考文献 ]

[ 1 ] Scherr M, Morgan MA, Eder M. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells[ J ]. *Curr Med Chem*, 2003, 10( 3 ): 245-256.

[ 2 ] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[ J ]. *Nature*, 2001, 411( 6836 ): 494-498.

[ 3 ] Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99( 9 ): 6047-6052

[ 4 ] Sui G, Soohoo C, Affar el B, *et al.* A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, 99( 8 ): 5515-5520.

[ 5 ] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, *et al.* Short hairpin RNAs ( shRNAs ) induce sequence-specific silencing in mammalian cells [ J ]. *Genes Dev*, 2002, 16( 8 ): 948-958.

[ 6 ] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[ J ]. *Science*, 2002, 296( 5567 ): 550-553

[ 7 ] Yang D, Buchholz F, Huang Z, Goga A, *et al.* Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells[ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99( 15 ): 9942-9947.

[ 8 ] Kim VN. RNA interference in functional genomics and medicine [ J ]. *J Korean Med Sci*, 2003, 18( 3 ): 309-318.

[ 9 ] Kawasaki H, Taira K. Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA( Val ) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells[ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31( 2 ): 700-707.

[ 10 ] Petr Svoboda, Paula Stein, Richard M, Schultz. RNAi in mouse

oocytes and perimplantation embryos: Effectiveness of hairpin dsRNA[ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287: 1099-1104.

[ 11 ] Shen C, Buck AK, Liu X, *et al.* Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA[ J ]. *FEBS Lett*, 2003, 539( 1-3 ): 111-114

[ 12 ] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference[ J ]. *Cancer Cell*, 2002, 2( 3 ): 243-247.

[ 13 ] Tomar RS, Matta H, Chaudhary PM. Use of adeno-associated viral vector for delivery of small interfering RNA[ J ]. *Oncogene*, 2003, 22( 36 ): 5712-5715.

[ 14 ] Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, *et al.* Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells[ J ]. *RNA*, 2003, 9( 4 ): 493-501.

[ 15 ] Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Deglon N, *et al.* Lentiviral-mediated RNA interference[ J ]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13( 18 ): 2197-201.

[ 16 ] Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, *et al.* A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference[ J ]. *Nat Genet*, 2003, 33( 3 ): 401-406.

[ 17 ] Martinez MA, Gutierrez A, Armand-Ugon M, *et al.* Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication[ J ]. *AIDS*, 2002, 16( 18 ): 2385-2390.

[ 18 ] Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, *et al.* RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells[ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100( 5 ): 2783-2788.

[ 19 ] Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference[ J ]. *Oncogene*, 2002, 21( 39 ): 6041-6048.

[ 20 ] Ge Q, McManus MT, Nguyen T, *et al.* RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription[ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100( 5 ): 2718-2723.

[ 21 ] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference[ J ]. *Cancer Cell*, 2002, 2( 3 ): 243-247.

[ 22 ] Wu H, Hait WN, Yang JM. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 ( P-glycoprotein ) restores sensitivity to multi-drug-resistant cancer cells[ J ]. *Cancer Res*, 2003, 63( 7 ): 1515-1519.

[ 23 ] Futami T, Miyagishi M, Seki M, *et al.* Induction of apoptosis in HeLa cells with siRNA expression vector targeted against bcl-2 [ J ]. *Nucleic Acids Res Suppl*, 2002, ( 2 ): 251-252.

[ 24 ] Shen C, Buck AK, Liu X, *et al.* Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA[ J ]. *FEBS Lett*, 2003, 539( 1-3 ): 111-114.

[ 25 ] Caplen NJ, Taylor JP, Statham VS, *et al.* Rescue of polyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference[ J ]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11( 2 ): 175-184.