

RNAi 影响因素初探

姜法铭^{1,2} 吕良旭³ 姚惠娟² 华修国¹ 樊超生² 朱志盈² 崔立¹ 缪德年²

(1 上海交通大学农业与生物学院 201101 2 上海市农科院畜牧所 201106 3 福建南安仑苍镇政府 362304)

摘要:自 1998 年发现 RNA 干扰现象以来, RNAi 已经成为一个新兴的实验技术, 广泛应用于基因功能分析、肿瘤和疾病的基因治疗等研究领域。在进行 RNAi 实验时, 效果的持久性、毒副作用、先天性免疫和病毒逃逸这些因素与实验效果密切相关。本文就这些突出因素做一综述, 以期给从事 RNAi 实验的研究者们提供参考。

关键词: RNAi; 干扰; 因素

中图分类号: Q503, S811.3 **文献标识码:** A

Studies on the Influencing Factors in RNAi Experiment

JIANG Fa-ming^{1,2}, LV Liang-xu³, YAO Hui-juan², et al

(1 School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China;

2 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Sciences of Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China;

3 Luncang Government of Nan'an Town 362304, Fujian, China)

ABSTRACT: Since the RNA interference (RNAi) phenomenon was discovered in 1998, RNAi has already become a newly-emerging experimental technology, which is widely used in the gene function analysis, tumor and disease gene treatment etc. In the experiments, these factors, such as the effect durability, the poisonous side effect, the congenital immunity and the virus escape, are closely related with the experiment results, about which, this text does a summary, and offers some references for the researchers who are engaged in the RNAi experiment.

Key words: RNA interference; Interference; Factor

RNA 干扰(RNAi), 又称 RNA 干预或者 RNA 干涉, 是一种新的有效的实验手段, 广泛应用于基因功能分析、肿瘤和疾病的基因治疗等科学研究领域。体外实验证实, 小干扰 RNA (siRNA) siRNA 作为一种小分子物质, 能有效干扰目的基因的表达。美国《Science》杂志把小分子核糖核酸和 RNAi 评为 2002 年度重大科技成果之首, 是生物医学领域近 20 年来, 可以与人类基因组计划(human genomics program, HGP)相提并论的最重大的成果之一。siRNA 的干扰效果与实验中存在的一些问题密切相关, 如效果的持久性、毒副作用、先天性免疫和病毒逃逸等突出问题。本文就 RNAi 实验中的这些问题进行综述。

1 效果的持久性

1.1 siRNA 序列设计

大部分研究中所报道的 siRNA 都是利用 21 个碱基对的短双链 RNA, 主要因为体内 Dicer 酶消化双链 RNA 的产物为 21nts^[1]。另外有报道用 25 个碱基对的双链 RNA 进行实验, 也取得了很好的结果^[2]。不对称的 27 个碱基的双链 RNA, 在体外实验中表现出来很好的效力^[3,4]。也有采用改良的 siRNA, 即“叉状双链 siRNA”(fork-siRNA), 它的有义链的 3' 端有 1 到 4 个与反义链不匹配的碱基。这种分子在哺乳动物细胞中能

够增加传统 RNA 干扰的强度。

1.2 siRNA 的修饰

虽然双链 RNA 比单链更能抵抗核酸酶的消化, 但是未被修饰的 siRNAs 在哺乳动物静脉注射时仍是很快的被降解掉。SiRNAs 经过低磷酸化和(或)通过携带一种物质或活性粒子的化学修饰, 可以延缓或避免这种降解。许多研究对修饰和没有修饰的双链 siRNA 干扰效果进行比较, 结果显示修饰的 siRNA 干扰效果更好^[5-8]。

Morrissey 等^[9]对比了未修饰 siRNA 和过渡修饰, 2'-O-甲基化嘧啶, 2'-F 化嘧啶, 末端硫代磷酸脂化修饰, 但双链仍保留 DNA 骨架。乙肝病毒表达质粒和修饰/未修饰的双链一起经小鼠尾静脉通过同样高压水法注射, 在注射 72 小时后检测到乙肝病毒 DNA 产物和乙肝表面抗原。通过剂量和效果的曲线比较, 结果发现修饰过的双链效果更好。Morrissey^[10]等研究报道了血清中未修饰的 siRNA 半衰期为 0.03h; 修饰过的 siRNA 半衰期延长到 0.8h; 利用 SNALP(Stable Nucleic Acid Lipid Particle) 载体递送修饰过的 siRNA, 半衰期最长, 为 6.5h。Soutschek 等^[11]也做了同样的实验, 结果表明修饰过的 siRNA 在老鼠中半衰期为 0.1h, 而结合了共轭胆固醇的双链半衰期延长到 1.5h。

现在对 siRNA 进行修饰的方法有很多, 如硫代磷酸酯化、核糖 2' 位置的修饰或结合上一些物质(如胆固醇、特殊的藻

• 基金项目: 上海市启明星计划资助(03QC14041)

作者简介: 姜法铭, (1982-), 男, 在读研究生, 主要研究方向: 预防兽医

通讯作者: 崔立 Tel: 021-64782958, E-mail: lcui@sjtu.edu.cn

缪德年 Tel: 021-62208660-3339, E-mail: mcn70@263.net

(收稿日期: 2006-03-28 接受日期: 2006-07-20)

类、肽等),可以很好的提高 siRNA 的稳定性,提高对核酸酶的耐受性。在 RNAi 实验中,当需要持续性效果时,应当将 siRNA 进行修饰。

1.3 给药途径

siRNA 给药的途径直接影响到剂量的确定、组织中的分布、效果的持久性等问题。

全身给药时,静脉注射(iv)是一种十分常用的方法,已经在很多的研究中应用^[12-13];也可以采用腹腔注射^[14]和皮下注射等方法进行全身给药。局部给药时通常采用高浓度低剂量的给药以减小局部副作用。局部给药通常进行直接注射(如进行肿瘤、关节、眼内直接注射)或直接表面涂抹(如通过口粘膜直接吸收)。中枢神经系统给药时,可通过心室直接给药,使药物通过血脑屏障从而到达中枢神经系统。通过呼吸道系统给药可以将药物送达肺部等呼吸器官。

siRNA 在血清中容易被核酸酶等很快降解,采用合适的给药途径,可以改善药动学,延长 RNAi 干扰作用时间。

2 毒副作用

研究表明通过脂质体等载体能将 siRNA 成功的转入到体内进行实验,但是其残留下来的毒副作用对实验结果有所影响,应该引起注意。Chien 等^[15]通过老鼠尾静脉注射给药,连续给药 2 周,剂量为 100mg/kg/day,评估了用阳离子 DOTAP 脂质体(1,2-二油酰-3-三甲胺基丙烷)和 CCLA:DOPE(类心磷脂:二油酰脂酰乙醇胺)分别作为 siRNA 载体时的实验效果比较。结果发现 DOTAP 组老鼠存活率为 2/3,而用 CCLA 组的老鼠存活率仅为 0/3;CCLA 组给予不同剂量研究时,发现连续给药 3 天,摄入量为 100mg/kg/day 的小鼠存活率为 1/3。

给药后动物会产生相关反应,这会影响到实验结果,必须予以重视。当实验中过量的应用阳离子脂质体时,会导致淋巴细胞减少、血小板减少和肝细胞坏死等毒性作用。采用腹腔注射给药、神经系统直接注射给药或粘膜给药时,能降低或避免这些毒副作用。

siRNA 也可以不用载体直接进行转染,这样可以更好的降低毒性作用。Sharma 等^[16]将靶点为突变基因 v599EB-raf 的 siRNA,没有用载体系统而是用电穿孔的办法,转染到人黑色素瘤细胞中进行研究,转染后的细胞植入裸鼠中。结果发现对照组在 5 天后就出现了 10mm 的肿瘤灶,而实验组在 14-16 天才出现 10mm 的肿瘤灶,并且没有出现毒副作用。

3 先天性免疫

在实验中,核苷酸序列能激活先天免疫系统。这种特性源于 Toll 样受体 9 对含有非甲基化脱氧胞嘧啶基序的 CpG 的识别。当核苷酸序列进入体内时,先天免疫系统可通过一系列受体分子对其进行识别,引起细胞免疫反应。Toll 样受体家族是其中一种受体分子,能够识别从细菌脂多糖到核酸等化合物^[17-19]。人类确定的 11 个 TLRs 家族成员中,已经被确定能特异性的识别 RNA 的 3 个是:TLR3、TLR7 和 TLR8^[20-22]。

随着越来越多的核苷酸序列被确定能被 TLR3/7/8 识别而激活 IFN,在体内实验中,许多研究通过不同的方法寻找降低或避免引起先天免疫系统的方法。Sioud 等^[23]电穿孔法进

行 siRNA 递送时可以减少刺激 IFN 的分泌;Kariko 等发现原核生物的 RNAs 比真核生物的 RNAs 能更容易被 TLR3、7 和 8 识别而激活 IFN^[24];Judge 等研究证明对双链 siRNA 铰链区上的 2 个位点进行 2'-O-甲基化,能阻止 TLR 的激活^[25]。

4 病毒逃逸

病毒频繁突变和 RNAi 高度特异性之间的矛盾一直是 RNAi 实验的难点。人们通过将细胞表面病毒受体或协同受体作为 RNAi 的靶位点,不但能减少突变病毒粒子的逃逸,还能有效地抑制封闭于浓缩的蛋白-RNA 复合体中的病毒 RNA^[26,27],从而最大限度地发挥 siRNA 抑制病毒的作用。siRNA 在抑制病毒核酸复制的同时也能激发病毒对 RNAi 的耐受性,这种具有耐受 siRNA 的病毒粒子在最初的病毒群体中就已存在,在转染 siRNA 的压力选择下,这种具有耐受性的病毒粒子得到了选择优势,引起病毒逃逸。事实上,脊髓灰质炎病毒(poliovirus)^[28]和人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus-1, HIV-1)的 RNAi 实验中已经证实存在这一现象^[29]。

5 结论

RNA 干扰技术从被发现到广泛应用仅仅 7-8 年时间,在哺乳动物上的研究仅仅 4-5 年,由于其高效性和高度特异性,便已成为颇为理想的细胞水平基因敲除工具,并迅速成为后基因组时代功能基因组学研究中不可或缺的重要手段。然而在 RNA 干扰实验积累的经验中发现,效果的持久性、毒副作用、先天性免疫和病毒逃逸因素直接影响着实验结果。如何正确的处理这些影响因素,避免它们成为直接或者主要影响实验结果的因素非常重要。随着 RNA 干扰技术体外实验的成熟以及在动物体内的应用,这些影响因素就越发的突出了,可能成为以后必须解决的首要问题。所以,如何解决这些影响因素的干扰作用将会成为国内外研究学者对 RNA 干扰技术下个阶段的研究重点。尽管 RNA 干扰还存在着这些影响因素的干扰,但是对于病毒或者细胞基因,当疫苗和普通治疗没有效果时,这项技术仍然是一种非常有前景的治疗手段,具有巨大的发展潜力。

参考文献

- [1] Czauderna F. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells [J]. Nucleic Acids Res, 2003,31: 2705-2716
- [2] Chen D. Surface calreticulin mediates muramyl dipeptide-induced apoptosis in RK13 cells [J]. J Biol Chem, 2005,280:22425-22436
- [3] Kim D H, Behlke M A, Rose S D, et al. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy [J]. Nat Biotechnol, 2005, 23:222-226
- [4] Rose S D. Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs [J]. Nucleic Acids Res, 2005,33:4140-4156
- [5] Lu P Y, Xie F, and Woodle M C. In vivo application of RNA interference: from functional genomics to therapeutics [J]. Adv Genet, 2005, 54:117-142
- [6] Rose S D. Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs [J]. Nucleic Acids Res, 2005,33:4140-4156
- [7] Chiu Y L and Rana T M. siRNA function in RNAi: a chemical modifica-

- tion analysis [J]. RNA 2003,9:1034 ~ 1048
- [8] Elmen J. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality [J]. Nucleic Acids Res, 2005,33:439 ~ 447
- [9] Morrissey D V. Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication [J]. Hepatology, 2005,41:1349 ~ 1356
- [10] Morrissey D V. Potent and persistent in vivo anti - HBV activity of chemically modified siRNAs[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23: 1002 ~ 1007
- [11] Soutschek J. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs[J]. Nature, 2004,432:173 ~ 178
- [12] Kiang A S. Toward a gene therapy for dominant disease: validation of an RNA interference - based mutation - independent approach [J]. Mol Ther, 2005, 12:555 ~ 561
- [13] Matsui Y, Kobayashi N, Nishikawa M, et al. Sequence - specific suppression of mdr 1a/1b expression in mice via RNA interference [J]. Pharm Res, 2005, 22:2091 ~ 2098
- [14] Yin C, Xi L, Wang X, et al. Silencing heat shock factor 1 by small interfering RNA abrogates heat shock - induced cardio protection against ischemia - reperfusion injury in mice [J]. J Mol Cell Cardiol, 2005, 39:681 ~ 689
- [15] Chien P Y. Novel cationic cardiolipin analogue - based liposome for efficient DNA and small interfering RNA delivery in vitro and in vivo [J]. Cancer Gene Ther, 2005, 12:321 ~ 328
- [16] Sharma A, Trivedi N R, Zimmerman M A, et al. Mutant V599EB - Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors [J]. Cancer Res, 2005, 65:2412 ~ 2421
- [17] Ishii K J, Gursel I, Gursel M, et al. Immunotherapeutic utility of stimulatory and suppressive oligodeoxynucleotides [J]. Curr Opin Mol Ther, 2004, 6:166 ~ 174
- [18] Rotherfusser S, Tuma E, Wagner M, et al. Recent advances in immunostimulatory CpG oligonucleotides [J]. Curr Opin Mol Ther, 2003, 5:98 ~ 106
- [19] Tosi M F. Innate immune responses to infection [J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 116:241 ~ 249
- [20] De Veer M J, Sledz C A, and Williams, B. R. Detection of foreign RNA: implications for RNAi. Immunol [J]. Cell Biol, 2005, 83:224 ~ 228
- [21] Robbins M A, and Rossi J J. Sensing the danger in RNA [J]. Nat Med, 2005, 11:250 ~ 251
- [22] Karpala A J, Doran T J, and Bean A G. Immune responses to dsRNA: implications for gene silencing technologies [J]. Immunol Cell Biol, 2005, 83:211 ~ 216
- [23] Sioud M. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double - stranded and single - stranded siRNAs is sequence - dependent and requires endosomal localization [J]. J Mol Biol, 2005, 348: 1079 ~ 1090
- [24] Kariko K, Buckstein M, Ni H, et al. Suppression of RNA recognition by Toll - like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA [J]. Immunity, 2005, 23:165 ~ 175
- [25] Judge A D, Bola G, Lee A C, et al. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo [J]. Mol Ther, 2005, 9(11):1
- [26] Kitabwalla M, Ruprecht RM. RNA interference: a new weapon against HIV and beyond [J]. N Engl J Med, 2002, 347(17):1364 ~ 1367
- [27] Bitko V, Barik S. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence specific double stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative strand RNA viruses [J]. BMC Microbiol, 2001, 1(1):34
- [28] Gitlin L, Stone JK, Andino R. Poliovirus escape from RNA interference: short interfering RNA - target recognition and implications for therapeutic approaches [J]. J Virol, 2005, 79(2):1027 ~ 35
- [29] 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 USA, 2003, 100:2718 ~ 2723

(上接第 94 页)

2.3 锌

锌通过催化、结构及调节作用来参与抗氧化防御过程。锌是许多氧化还原酶的组分,这些酶在蛋白质、脂肪、糖类、核酸等代谢中起催化作用;锌能稳定 SOD 等酶的结构,使其发挥抗氧化功能;锌还参与金属硫蛋白基因表达的调节,后者具有清除自由基的效能^[5]。

综上所述,维生素 E、C、 β -胡萝卜素和硒、锌、铜等微量营养素,在体内与其他抗氧化剂和抗氧化酶一起,构成了一个完整的抗氧化防御体系,它们从多个方面、以多种形式和多条途径参与抗氧化防御过程,影响着细胞抗氧化防御系统的正常运行,决定着机体的健康状态。它们的抗氧化作用相互协同与保护,形成了一个维持机体健康、预防某些疾病和减缓衰老的有机体系。只要人们合理摄入这些微量营养素,必定会有益于健康。

参考文献

- [1] 陈炳卿主编.营养与食品卫生学[M]第四版.北京:人民卫生出版社,2002:63 ~ 66,115 ~ 116,130
- [2] 陈君石,闻之梅主编.食物、营养与癌症预防[M]上海:上海医科

大学出版社,1999:455 ~ 457

- [3] 李胜利主编.营养与膳食[M].北京:人民卫生出版社,2004:44
- [4] 方允中,杨胜,伍国耀.自由基、抗氧化剂、营养素与健康的关系[J].营养学报,2003,25(4):337 ~ 341
- [5] 顾景范,杜寿玟,查良铎主编.现代临床营养学[M].北京:科学出版社,2003:120 ~ 122,139,145,94 ~ 104,275 ~ 278,631
- [6] 郭红卫主编.营养学[M].北京:科学出版社,2000:43,94
- [7] 和红,王福梯,蔡梅雪.抗氧化维生素对内皮细胞增殖及凋亡的影响[J].营养学报,1999,21(4):444 ~ 449
- [8] 刘晓冬,马淑梅,郭英,等.维生素 E 及其联合维生素 C 对老龄小鼠肝细胞凋亡的影响[J].营养学报,1999,21(4):405 ~ 408
- [9] 张爱珍主编.临床营养学[M].北京:人民卫生出版社,2000:13,18,23
- [10] 周爱儒主编.生物化学[M].北京:人民卫生出版社第五版,2001:387,389
- [11] 成晓龙,崔永萍,陈彦球,等.维生素 E 和胡萝卜素对巨噬细胞氧化修饰低密度脂蛋白的影响[J].营养学报,2001,23(1):9 ~ 11
- [12] 马爱国,刘四朝.不同剂量维生素 C 对 DNA 氧化损伤影响的研究[J].营养学报,2001,23(1):12 ~ 15
- [13] 彭光华,李忠,刘良忠.类胡萝卜素对乳腺癌细胞株 MCF - 7 细胞 DNA 的损伤作用的影响[J].营养学报,2003,25(3):279 ~ 281