

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.049

小干扰 RNA 的研究进展*

赵德根¹ 王建校¹ 刘旭¹ 徐涛¹ 顾永清^{1,2△}

(1 石河子大学医学院 新疆 石河子 832000; 2 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京 100850)

摘要: RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 是近年发展起来的一种新技术。RNAi 是指通过外源性或内源性的双链 RNA 在体内诱导靶基因 mRNA 产生特异性降解, 进而引起不同水平的基因沉默, 其效应分子主要是小干扰 RNA(siRNA)。siRNA 是生物界普遍存在的一种抵御外来基因和病毒感染的基因调控方式, 也是一种重要的研究工具。大量的研究工作致力于设计合理的 siRNA 片段用于基因功能研究, 并将其作为一种治疗方法用于肿瘤、病毒性感染等基因治疗以及药物靶向研究。因此本文对 siRNA 的作用机制、设计原则及其在临床应用中的缺点和解决方法进行综述。

关键词: siRNA; 干扰机制; 设计原则; 缺点

中图分类号: Q75, Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)04-792-03

Advance of the Study of siRNA*

ZHAO De-gen¹, WANG Jian-xiao¹, LIU Xu¹, XU Tao¹, GU Yong-qing^{1,2△}

(1 School of Medicine, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang, 832000, China;

2 Department of Radiation Toxicology and Oncology, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing, 100850, China)

ABSTRACT: RNA interference (RNAi) is a newly developed technology. It is the different levels of gene silencing induced by specific degradation of targeted genes *in vivo*, and both exogenous and endogenous double-stranded RNAs could induce the specific degradation, which was realized mainly by Small interfering RNA (siRNA). siRNA was commonly exists in the nature as a gene regulation way to prevent alien gene and viral infection. And siRNA is becoming an important investigating tool. A lot of studies were devoted to the effective sequence design of siRNA to study gene's function. siRNA is regarded as an effective therapy for cancer, viral disease and study for drug targeting. This paper focuses on the interference mechanisms, design regulations, shortcomings in clinical treatment and solutions of siRNA.

Key words: Small interfering RNA; Interference mechanisms; Regulation of design; Shortcomings

Chinese Library Classification(CLC): Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)04-792-03

外源或内源性的双链 RNA(dsRNA)导入生物体的细胞中, 与 dsRNA 同源的 mRNA 受到降解, 其相应的基因受到抑制, 这种现象首先在线虫中得以证实, 由于这是一种在 RNA 水平的基因表达抑制, 故也称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)^[1]。RNAi 以针对性强、特异性高等特点被广泛应用于阻断或抑制基因表达, 成为基因治疗的新手段^[2]。目前, RNAi 技术主要通过引入外源性的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)介导靶基因沉默^[3]。因此, 本文对 siRNA 的作用机制、设计原则及其缺点与补救措施进行综述。

1 siRNA 介导 RNAi 的作用机制

最早研究者认为 siRNA 介导靶基因沉默发生在转录后水平。随着研究的深入, 发现 siRNA 也可以在转录水平介导靶基因沉默。

1.1 siRNA 介导转录后水平的基因沉默机制

转录后基因沉默是指在“异常 RNA”的诱导下, 内源基因发生基因沉默的调控过程, 被抑制的基因能够正常转录, 但转录后的 mRNA 迅速降解而失去正常功能^[4]。当病毒基因、人工转入基因、转座子等外源性基因随机整合到宿主细胞基因组内, 利用宿主细胞进行转录, 产生与外源基因互补的 dsRNA, 随后 dsRNA 被 Dicer 酶切割成大小为 21~23nt 的双链 siRNA^[5]。在解旋酶的参入下, siRNA 被解链为正义链和反义链, 其中反义链与核酸内外切酶、解旋酶与和同源 RNA 搜索活性蛋白等核酸复合物共同构成 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-inducing silencing complex, RISC), RISC 在 siRNA 反义链的介导下特异地与靶 mRNA 结合, 随即 RISC 执行 RNA 干扰功能, 从 siRNA 中部开始酶切降解 mRNA, 使转录的基因表达终止^[6]。此外, 以 siRNA 的反义链作为引物, 以宿主细胞的 mRNA 为模板, 在 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的作用下形成新的 dsRNA, 重复以上过程从而形成大量的 siRNA, 在短时间内高效地抑制

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30960093; 31160183; 31270894)

作者简介: 赵德根(1980-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白质功能与疾病, 电话: 13121649732,

电话: 010-66932292, E-mail: zhaodegen_lover@163.com

△ 通讯作者: 顾永清(1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向: DNA 损伤与修复,

E-mail: yqgu96@163.com

(收稿日期: 2013-03-30 接受日期: 2013-04-23)

mRNA 翻译形成蛋白质或多肽,从而高效地沉默了靶基因^[7]。

1.2 siRNA 介导转录水平基因沉默的机制

RNA 介导的 DNA 的甲基化最早是在研究植物病毒系统时发现的,DNA 的甲基化引起转录水平的基因沉默,是一种转录水平的基因沉默^[8]。Kawasaki^[9]等用 siRNA 干扰 E2cadherin 基因启动子区的 CpG 岛,结果诱导出转甲基酶依赖的 DNA 的甲基化,抑制了该基因的表达,于是推测,siRNA 在转录水平的作用机制可能与启动子区 CpG 岛同源的 siRNA 诱导 DNA 甲基化有关。有报道显示,在转录水平,siRNA 与互补的 DNA 结合后,DNA 的甲基化水平提高,靶基因转录受阻^[10]。

2 siRNA 的设计原则

过去认为 siRNA 沉默靶基因是特异性的,然而,随着研究的深入发现,siRNA 可对靶基因之外的其它基因发挥作用,导致非靶向效应,产生 siRNA 脱靶效应^[11]。因此,如何针对目的基因设计合理、高效的 siRNA 是实现靶基因特异性沉默的关键。目前影响 siRNA 活性的因素主要有 siRNA 双链 5' 末端的热力学稳定性、siRNA 的碱基组成及含量、siRNA 目的位置二级结构及靶基因的序列特异性。

2.1 siRNA 双链 5' 末端碱基设计

RNA 诱导 RISC 复合体形成的起始过程是解旋酶介导 siRNA 末端解链的过程,因此双链 5' 末端的热力学稳定性决定了解链的开始部位。在 siRNA 沉默靶基因的过程中,反义链的 5' 端是 siRNA 双链的解链的起始位点。G;C 碱基比 A;U 碱基具有更高的热力学稳定性,因此,反义链 5' 应该选 A:U,与报道结果一致,反义链的 5' 端越松散^[12],越易引导 siRNA 识别目的 mRNA 序列、降解 mRNA 从而使靶基因沉默;正义链的 5' 端选择 G;C,使其具有较高的热力学稳定性,防止从此处开始解链,避免正义链引起的非靶向效应。

2.2 siRNA 的碱基组成及含量

Reynolds 等^[13]以萤火虫荧光素酶和人胞溶质蛋白 B 基因为靶基因,分别设计了 90 个 siRNA,然后测定其沉默效率,结果表明,高效 siRNA 至少有超过 3 个 A:U 在 15 和 19 之间,正义链 19 位不为 G 或 C,正义链 13 位不为 G。因为富含 G:C 的序列比富含 A: T 的序列更易形成稳定的双链,所以在—序列中不应同时存在 7 个以上的 G:C;4 个以上的 G 易形成交连复合体,所以同一条链中也不应存在 4 个以上的 G。G:C 含量低有利于 siRNA 双链的解开,但太低的 G:C 含量降低了反义链与靶 mRNA 的结合,所以 G:C 含量应在 30%~52%,尽量接近 50%^[13]。

2.3 siRNA 目的位置二级结构预测提高 siRNA 效率

在一个 mRNA 中,针对不同位点的 siRNA 的沉默率存在很大差异的原因可能是,靶 mRNA 形成的复杂分子内结构影响了其与 siRNA 反义链的结合,进而影响 siRNA 的 RNAi 的效率^[14],提示 siRNA 目的位置的二级结构可能影响了其对靶基因的沉默率。Heale 等采用计算双链末端稳定性的方法研究二级结构在 siRNA 设计中的作用,发现二级结构预测可改善 siRNA 位点的预测效率。

2.4 靶基因的序列特异性

靶基因的序列影响 siRNA 的活性,因此要保证靶基因的序列与其他基因没有同源性,是否具有同源性可以用 BLAST

程序进行分析。

3 siRNA 的缺点及解决方法

siRNA 已被广泛用来抑制靶基因的表达、阐明基因功能、鉴定药物靶点,开发比目前临床用药更有效的药物^[15],且已被用于肿瘤^[16]、病毒感染^[17]、乙型肝炎^[18]、癌症^[19]等多种疑难杂症的治疗,但其临床应用中最主要的障碍是 siRNA 的分子量小,在人体内不稳定,作用时间短,易被 RNase A 家族酶降解^[20],缺乏有效的靶向转运途径^[21]。siRNA 存在以上缺点,所以很难应用于临床。2007 年 7 月,Bevasiranib 启动了为期 104 周的 III 期临床试验,因试验结果不佳,于 2009 年 2 月 6 日终止^[22]。

针对 siRNA 的缺点,学者们提出对其进行化学修饰和采用有效的载体输送可以克服其在临床应用中的不足。化学修饰包括核糖修饰、磷酸链修饰、碱基修饰、突出及末端的修饰及 siRNA 双螺旋结构的修饰。对 siRNA 糖基的甲基化、甲氧乙基化和氟基化等 2- 羟基修饰,即提高 siRNA 稳定性,同时也增强 siRNA 与互补 mRNA 的结合能力^[23],大大提高了靶基因沉默率。Morrissey 等^[24]分别用 2-F、2-O-Me 和 2-H 取代 2-OH 并结合到磷酸酯基末端,结果均显示 siRNA 的半衰期明显延长。要使 siRNA 安全有效地应用于疾病的临床治疗,除了保证其体内稳定性外,还必须保证其能顺利到达目的位置且保持原有 RNAi 活性,所以研究者们提出了用稳定、低毒的载体输送 siRNA。病毒载体是最早用于体内递送 siRNA 的载体,由于病毒载体在基因治疗实验中出现一些毒性作用、免疫原性、致瘤性、致死性等问题,所以受限于临床应用。非病毒载体包括阳离子脂质及脂质类似物、聚合物、阳离子肽段、共价结合的 CPP-siRNA、非共价结合的 CPP-RNA 复合物、适体及抗体等。阳离子脂质载体^[25]已经成为最常用的核酸转运方法,但是因快速的肝脏清除作用和缺乏组织特异性而不能用于体内;其它非病毒载体因靶向性低,药物不能集中在病灶部位,导致非靶向效应^[26],限制了其在临床中的应用。有学者报道采用非病毒载体用于体内导入 siRNA 时,在载体上连接配体^[27]、抗体^[28]和适配子(aptamer)^[29]等靶向性配基可以提高 siRNA 的靶向性。

综上所述,随着 RNAi 技术研究的深入,siRNA 的研究也越来越多。目前,siRNA 介导转录后水平靶基因沉默的机制已经明确,但是在转录水平的具体机制有待于进一步研究。siRNA 所含碱基序列、双链末端的热力学稳定性、靶 mRNA 序列的二级结构等均影响 RNAi 的效果,因此在设计 siRNA 时应尽量排除这些因素的影响。siRNA 序列的设计直接影响 RNAi 效果,因此明确 siRNA 的作用机制,严格遵守设计原则可以设计高效的 siRNA,加上对其进行适当的化学修饰,采用有效的运载体,可以提高 siRNA 在体内的靶基因沉默率,减少脱靶效应。相信随着生物技术的不断发展,siRNA 有望成为各种疑难病的临床治疗方法之一。

参考文献(References)

- [1] Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, et al. Potent and specific interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391 (6669): 806-811
- [2] 鞠吉雨, 李在连. RNA 干扰与肿瘤基因治疗. 食品与药品, 2009, 11 (1): 54-57
- Ju Ji-yu, Li Zai-lian. RNA Interference and Tumor Gene Therapy [J].

- Food and Drug, 2009,11(1): 54-57
- [3] Lambeth LS, Van Hateren NJ, Wilson SA, et al. A direct comparison of strategies for combinatorial RNA interference [J]. BMC Mol Biol, 2010,11 (77): 1-15
- [4] Hammond SM. Dicing and slicing the core machinery of the RNA interference pathway[J]. FEBS Lett, 2005, 579 (26): 5822-5829
- [5] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs[J]. Cell, 2009, 136 (4): 642-55
- [6] 刘元宁,常亚萍,李誌,等. 针对 H1N1 病毒的多特征 siRNA 设计[J]. 吉林大学学报:工学版, 2010, 40(3): 776-781
Liu Yuan-ning, Chang Ya-ping, Li Zhi, et al. The multi-feature design of siRNA on H1N1 virus [J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2010, 40(3): 776-781
- [7] Brummkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mam-malian cells [J]. Science, 2002, 296 (5567): 550-553
- [8] Wassenegger M, Pelissier T. A model for RNA- mediated gene silencing in higher plants[J]. Plant Mol Biol, 1998, 37 (2): 349-362
- [9] Kawasaki H, Taira K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells [J]. Nature, 2004, 431(7005): 211-217
- [10] Kawasaki H, Taira K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells [J]. Nature,2004, 431 (7005): 211-217
- [11] Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application [J]. Nature Rev Drug Discov, 2010, 9 (1): 57-67
- [12] Gong D, Ferrell JE. Picking a winner : new mechanistic insights into the design of effective siRNAs [J]. Trends Biotechnol, 2004, 22(9): 451-454
- [13] Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22 (3): 326-330
- [14] Overhoff M, Alken M, Far RK, et al. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis [J]. J Mol Biol, 2005, 348 (4): 871-881
- [15] Richard WC, Erik J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 642-655
- [16] Kallur IR, Kanasak IK. RNA interference: generic block on angiogenesis[J]. Nature, 2008, 452(7187): 543-545
- [17] Okumura A, Pitha P, Harty RN. RNISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105 (10):3974-3979
- [18] Chen Y, Cheng GF, Mahoto RI. RNAi for treating hepatitis B viral infection[J]. Pharm Res, 2008, 25(1): 72-86
- [19] Kim SH, Jeong JH, LEE SH, et al. Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer[J]. J Control Release, 2008, 129 (2): 107-116
- [20] Haupenthal J, Baehr C, Kiermayer S, et al. Inhibition of RNase a family enzymes prevents degradation and loss of silencing activity of siRNAs in serum[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 71 (5): 702-710
- [21] Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference[J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(3): 173-184
- [22] 范鸣.OPKO 公司研发治疗湿性老年黄斑变性的 siRNA 药物 Bevasiranib[J].药学进展, 2009, 33(3): 432-432
Fan Ming. OPKO company developed the medicine of Bevasiranib for treating wet old macular degeneration [J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2009, 33(3): 432-432
- [23] Allerson CR, Sioufi N, Jarres R, et al. Fully 2' modified oligo-nucleotide duplexes with improved in vitro potency and stability compared to unmodified small interfering RNA [J]. J Med Chem, 2005, 48 (4): 901-904
- [24] Morrissey DV, Blanchard K, Shaw L, et al. Activity of stabilized short- interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication[J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1349-1356
- [25] Behlke M A. Progress towards use of siRNAs[J]. Mol Ther, 2006, 13 (4): 644-670
- [26] Svoboda P. Off-targeting and other non-specific effects of RNAi experiments in mammalian cells [J]. Curr Opin Mol Ther, 2007, 9 (3): 248-257
- [27] De Paula D, Bentley MV, Mahato RI. Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting [J]. RNA, 2007, 13 (4): 431-456
- [28] Pirolo KF, Zon G, Rait A, et al. Tumor-targeting nanoimmunoliposome complex for short interfering RNA delivery [J]. Hum Gene Ther, 2006, 17 (1): 117-124
- [29] McNamara JO, Andrechek ER, Wang Y, et al. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras [J]. Nat Biotechnol, 2006, 24 (8): 1005-1015