

RNA 干扰技术及其在放射医学研究中的应用

沈波 鞠桂芝

(吉林大学公共卫生学院卫生部放射生物重点实验室 长春 130021)

摘要 核糖核酸 (RNA) 干扰技术是一个经典的基因调控途径, 它可使与小片段干扰性 RNA 序列互补的 RNA 发生降解。从其应用前景上说, 它会成为研究特定基因功能、细胞内防御机制及维护 RNA 正常功能的重要工具, RNA 干扰技术也会被应用于放射医学研究领域, 成为辐射敏感性、辐射效应及放射治疗等研究工作的有效工具。

关键词 核糖核酸干扰, 小片段干扰性核糖核酸

中图分类号 R811.5

RNA 干扰技术 (RNA interfering, RNAi) 也被称为 RNA 沉寂 (RNA silencing) 或转录后基因沉寂 (Postranscriptional gene silencing, PTGS)。它是一种由小的双链 RNA 分子引起与其序列互补的单链 RNA 发生降解的现象^[1]。早在 90 年代初, Jorgensen 等^[2]将产紫色素基因的 RNA 导入牵牛属植物体内以改良花的颜色, 使紫色更深, 然而转染后, 内源与外源产紫色素基因的表达都受抑制—花朵颜色甚至变为白色, 当时将此现象称为共抑制 (Co-suppression)。1998 年, Fire 等^[3]把反义 RNA、正义 RNA 及两者混合物分别导入 *C. elegans* 体内观察 *unc-22* 基因的表达程度发现混合物的抑制效应极高, 电泳检测表明: 在此抑制过程中起主要作用的是反义 RNA 与正义 RNA 结合形成的双链 RNA (Double-stranded RNA, dsRNA), 他们将此现象称为 RNAi。此后, 研究者陆续在锥虫、果蝇、植物及哺乳动物细胞中观察到此现象, 并且发现它可能是生物体维持基因自稳、对抗外源基因或自身异常基因侵害的自我保护系统。

1 siRNA 在 RNAi 中的作用

RNAi 是通过小片段干扰性 RNA (Small interfering RNA, siRNA) 实现的, 并且 siRNA 在此过程中起向导作用。siRNA 是 9-23 个寡核苷酸形成的双链 RNA 分子, 在 3'-末端有两个突出的核苷酸, 每一条链的 5'-端为磷酸基团, 3'-端为羟基基

团^[4]。当外源或内源性基因编码的长的双链 RNA (dsRNA) 进入体内会激活生物机体内的 III 型核酸酶蛋白 (Dicer) 将其切割生成 siRNA。siRNA 与一种具有核酸酶活性的复合物—RNA 诱导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 结合。但此时的 RISC 还并不具有生物活性, 只有与其结合的双链 siRNA 发生解链, 丢失其有意义链, RISC 才表现为活化态, 具有了酶切活性, 降解与反义单链互补结合的 mRNA 靶序列, 完成 RNAi^[5]。目前还未识别参与 siRNA 解旋过程的酶, 但有研究者认为^[6]: siRNA 能进一步激活 Dicer 使其 N 端保守的 RNA 解旋结构域开放, 促进 siRNA 解旋, 是否 Dicer 具有此催化功能, 还有待实验进一步验证。siRNA 不仅指导 RNA 的顺利进行, 而且也影响 RNAi 作用的特异性。当 RNA 分子大于 50 个核苷酸时, 在哺乳动物细胞中会引起非特异双链 RNA 依赖性效应 (Nonspecific double-stranded RNA-dependent response), 使基因组的表达普遍受到抑制, 这是由于长链 RNA 分子能激活双链 RNA 依赖性蛋白激酶 (dsRNA-dependent protein kinase, RPKRs) 及 2', 5'-寡聚腺苷酸合成酶的合成, 而后者均能导致非特异性翻译抑制及 RNA 降解^[7]。只有小于 30 个核苷酸的 siRNA 才能特异地识别靶 mRNA 发生特异性降解。Gitlin 等^[8]在将 HeLa 细胞感染脊髓灰质炎病毒后, 利用 siRNA 干扰特性对所启动的细胞内免疫作用进行研究时发现: 表现为

国家自然科学基金 (30270346) 资助

第一作者: 沈波, 女, 1974 年 4 月出生, 1999 年毕业于山西医科大学, 临床医疗专业, 现攻读吉林大学放射生物专业博士学位
通讯联系人: 鞠桂芝

收稿日期: 初稿 2004-05-26, 修回 2004-07-05

siRNA 抗性的病毒基因中与 siRNA 互补的序列存在无义碱基错配,因而病毒 mRNA 不能被降解,能完成病毒蛋白的装配,发挥侵袭效应。此外, Frank^[9]等的研究也证实了不同的 siRNA 结构诱导 RNAi 发生的效率也有所差异:(1)反义链 5' 端碱基序列的保守性对于 RNAi 有着重要意义,将反义链 5' 端氨基基团的 6 号位碳原子进行磷酸化后会大大降低其 RNAi 活性;(2)反义链序列与靶序列的高度互补是实现 RNAi 的有效保证:在 siRNA 的不同碱基位点引入突变会抑制其诱导 RNAi 发生;(3)诱导有效 RNAi 发生的 siRNA 长度至少由 19 个碱基组成。这个长度并非由与靶序列互补的碱基对决定,它是由 RISC 所能识别的最短碱基数决定的。因此我们有理由认为 siRNA 在指导准确、特异的 RNAi 中起重要作用。

2 RNAi 的作用特点

PTGS 是由 mRNA 降低而引起基因表达抑制现象的统称。在转基因植物中这种现象被称为共抑制,在链孢霉菌中,这种现象被取名为基因消除 (Gene quelling),直至 Fire 用 dsRNA 在秀丽线虫中诱导了同样的现象产生才将这种现象称为 RNAi。RNAi 普遍存在于低等生物内。当受到病毒侵害或因转座子基因移位而产生异常 RNA 时,启动 RNAi 机制对于避免危及种系的生存、延续的事件发生有着重要意义。这种抑制在低等生物中可以稳定存在甚至可以传递给子代,然而除外胚胎期的细胞,RNA 很难在真核细胞中诱导稳定的 RNAi^[10]。这可能与真核细胞体内缺乏可以放大 RNAi 效应的相应酶系统有关。

RNAi 放大效应指的是最初引入的 siRNA 可以作为引物,以靶 mRNA 为模板,在 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerases, RdRP) 催化作用下生成 dsRNA,进而激活 Dicer 酶产生更多 siRNA,生成的这些次级 siRNA 既可以与 RISC 结合活化 RNAi 的发生,又可作为引物产生更多的 siRNA,使 RNAi 效应不断增强、放大^[11]。在线虫、锥虫、果蝇、植物这些低等生物中 RNAi 都表现出放大效应,且持续时间较长。在植物实验中还发现局部诱导的 RNAi 可迅速漫及整个植物体^[12],这可能也是通过放大效应来实现的。但在真核细胞中,切割生成的 siRNA 的 3' 端会被甲基化,因而不能充当引物,产生次级 siRNA。同时,没有在真核细胞基因组中检测到与低等生物体内的 RdRP 家族成员同源的基因序列存在。那么,为何输入少量 siRNA 进入真核细胞即足以诱导 RNAi 的发生?是否真核

细胞体内存在有与 RdRP 功能相同但非同源性的物质呢?这还有待于我们进一步的研究证实。虽然真核生物也有防御外来基因物质发生重组的机制,但它仍对体内的转座基因及异源病毒基因的重组具有较高的耐受性,因而,有人认为真核生物中 RNAi 功能的丧失可能是物种进化的要求^[13]。

在植物与线虫中被 RISC 切割生成的新的 siRNA 可以作为引物促进靶 mRNA 的合成,进而放大性地激发下一循环 RNAi 的开始。但是在哺乳动物中此功能是缺失的,干扰持续的时间很短,大约只有 3—5d。目前有研究者专门设计了具有 III 型 RNA 聚合酶启动子的双链 siRNA 的 RNAi 表达载体及含有 siRNA 表达质粒的稳定的细胞株,以延长哺乳动物细胞的 RNAi 作用时限^[10]。

3 RNAi 在放射医学领域的应用

随着人类基因组计划的完成,反向基因学成为相关基因研究工作的有效方法。RNAi 利用其高度特异的靶向性、较高干扰效率等优点已被广泛用于基因功能及抗病毒感染等研究领域。这也势必为我们放射医学研究工作提供新思路。分析特定基因的辐射损伤效应,探讨影响机体辐射敏感性因素及研究辐射防护策略等工作都可能成为 RNAi 技术应用的前景。

染色体等生物大分子对辐射损伤的敏感性较高,当接受电离辐射照射后主要表现为 DNA 断裂、染色体畸变、基因突变等类型的损伤。当细胞 DNA 分子产生损伤后,会自发启动自身的修复系统对损伤 DNA 进行修复。在此过程中细胞周期阻滞 (Cell cycle arrest) 为 DNA 的修复赢得了宝贵时间。p53 基因是目前研究较为深入的与细胞周期调控相关的基因,当发生点突变时会失去正常生理功能,使细胞逃逸周期检查点 (Cell cycle checkpoint) 的监控带错进入下一循环周期。Martinez 等^[14]通过 RNAi 技术设计与突变 p53 相互互补的 siRNA 序列使体内突变 P53 蛋白发生降解、正常 P53 蛋白产物堆积,正常的 P53 蛋白就可以发挥正常的生理功能—使受损细胞发生周期阻滞,进而修复损伤。Yoon 等^[15]用 RNAi 技术干扰 KLF4 蛋白表达对它在 p53 基因依赖的 G₁/S 期细胞周期阻滞过程中所起的作用进行了分析。用 γ 射线照射 HCT116 (p53+/+)、HCT116 (p53-/-) 细胞,条件性刺激 KLF4 的表达后,两种细胞被阻滞于 G₁ 期的细胞数相当,用 siRNA 干扰 KLF4 蛋白表达后进行 γ 射线照射,发现 HCT116 (p53+/+) 细胞被阻滞在 G₁ 期的细胞数明显减少,同时这些细胞还伴有 p21 (WAF1/CIP1) 表达的下

调,说明 KLF4 是细胞染色体接受射线照射产生损伤后发生 p53 诱导的周期阻滞过程中的重要中间作用分子。

同样, RNAi 也可用于对辐射敏感因素进行分析。在正常的人成纤维细胞系中对编码 DNA 依赖性蛋白激酶 (DNA-dependent protein kinase, DNA-PKcs) 的催化亚单位的 *Prkdc* 基因表达进行抑制后,细胞表现为辐射诱导的间期染色体断裂的重接能力下降、照射后首次分裂相中双着丝粒染色体的增多及致死性辐射敏感性的提高,从而验证 DNA-PKcs 是维持人正常的成纤维细胞辐射敏感性的重要因素。然而在三株与人相关的淋巴细胞中,转染 *Prkdc* 基因的 siRNA 后只在次黄嘌呤-鸟嘌呤核酸转移酶 (HGPRT) 位点上表现出比对照高 1.5-2 倍的点突变,却并不表现有或只表现出极低水平的致死性辐射损伤敏感性,因此可以得出结论 DNA-PKcs 在不同的细胞系中所起作用不尽相同^[16]。

由于辐射致癌是一个多因素作用、多途径参与的复杂过程,探讨其发病机理,对于我们预防癌症的发生、延长病程发展有着重要意义。在许多癌症细胞中都表现有 *Ink4a/cyclinD/cdk4* 遗传途径的异常改变,提示 *cdk4* 可能在癌症的发生过程中起重要作用。*Cdk4* 通过独立于 *Arf/p53* 途径来影响细胞的永生生长。正常的 *cdk4* (-/-) 细胞在培养一段时间后会表现出同野生型细胞一样的老化现象,但 *cdk4* (+/+) 细胞却始终维持其永生态生长。此外, *cdk4* (-/-) 细胞在生长过程中还伴有 P21 蛋白相对稳定的高表达。为了解 P21 蛋白在此过程中的作用,我们用 RNAi 技术封闭其表达,此时 *cdk4* (-/-) 细胞表现为永生生长;同时未进行 P21 表达干扰的细胞在 *Ras* 诱导下可以发生成熟前老化,但不出现 *Ras* 介导的细胞恶性转化,当 P21 表达受抑后,细胞可出现恶性转化,说明 *cdk4* 对细胞抵抗恶性转化起着关键性的作用^[17]。

4 问题与展望

随着对 RNAi 研究的深入, RNAi 封闭基因的高效性、对靶基因的特异性、操作的简单性等优点越来越引起研究者的广泛兴趣。虽然我们已经初步了解了 RNAi 的作用机制,仍有一些问题需作进一步探讨。如:参与 siRNA 解旋的酶有哪些?真核生物中是否存在与低等生物体内的 RdRP 功能相似的分子?少量的 siRNA 为何在真核生物中能有效诱导 RNAi 的发生?在胚胎期细胞能够实现稳定转染而在成熟的体细胞内只表现为瞬时效应,两者之间差异是如何产生的?由于不同生物对外源基因导入

的能力不同,如何提高真核生物的导入效率,诱导高效、持久的干扰是我们研究过程中急待解决的问题。对于一些高活度酶类分子如何实现有效的 RNAi,也是我们进一步研究的重要内容。

虽然 RNAi 技术可广泛应用于各个研究领域,但它的应用也存在一定的局限性。首先,因为 RNAi 是在 mRNA 水平对基因的表达进行干扰,并不能从基因水平上将基因剔除,因而只能用于结构基因功能的研究,而对一些调控基因的研究还未有报道。其次,由于引起 RNAi 的 siRNA 结构有一定的特异性—与靶序列完全互补,故要求靶基因所在区域内碱基序列应较为保守,其转录产物 mRNA 的二级结构较简单,使反义链容易与之结合,实现干扰。

随着对 RNAi 技术的掌握,对其作用机理的深入了解,它必将成为我们放射医学研究工作者的有力工具,方便我们对直接与间接辐射损伤效应与生物大分子损伤机制的相互关系、基因组不稳定性与辐射致癌等后遗效应的相互关系、放射治疗与辐射旁效应之间的相互关系等方面的内容进行深入研究。

参考文献

- 1 Zamore P D. *Science*, 2002, **296**(5571): 1265-1269
- 2 Jorgensen R. *Trends Biotechnol*, 1990, **8**(12): 340-344
- 3 Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* *Nature*, 1998, **391**(6669): 806-811
- 4 Dennis C. *Nature*. 2002. **420**(6917): 732
- 5 Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. *Genes Dev*, 2001, **15**(2): 188-200
- 6 Nykanen A, Haley B, Zamore P D. *Cell*, 2001, **107**(2): 309-321
- 7 Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* *Nature*, 2001, **411**(6836): 494-498
- 8 Gitlin L, Karelsky S, Andino R. *Nature*, 2002, **418** (6896): 430-434
- 9 Frank C, Melanie F, Sibylle D, *et al.* *Nucleic Acid Res*, 2003, **31**(11): 2705-2716
- 10 Holen T, Amarzguoui M, Wiiger M T, *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(8): 1757-1766
- 11 Martens H, Novotny J, Oberstrass J, *et al.* *Mol Biol Cell*, 2002, **13**(2): 445-453
- 12 Ray D, White K A. *J Virol*, 2003, **77**(1): 245-257
- 13 Matzke M A, Mette M F, Matzke A J M. *Plant Mol Biol*, 2000, **43**(2-3): 401-415
- 14 Martinez L A, Naguibneva I, Lehmann H, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(23): 14849-14854

- 15 Yoon H S, Chen X, Yang V W. J Biol Chem, 2003, **278**(4): 2101-2105
- 16 Peng Y, Zhang Q, Nagasawa H, *et al.* Cancer Res, 2002, **62**(22): 6400-6404
- 17 Zon X, Ray D, Aziyu A, *et al.* Genes Dev, 2002, **16**(22): 2923-2934

RNAi and its application in research of radiation medicine

SHEN Bo JU Guizhi

(Department of Radiation Biology, Public Health School, Jilin University, Changchun 130021)

ABSTRACT RNA interference is an typical gene regulation pathway. The article focuses on the mechanism and the mediate role of siRNA. Being a potentially powerful tool to study specific gene function, the mechanism of cellular defense and the efficiency RNA surveillance, RNAi technology will be applied in radiobiology to provide effective tools for not only the research of radiosensitivity and radiation damage, but also radiotherapy.

KEYWORDS RNAi, siRNA

CLC R118.5