

文章编号: 1004-0374(2009)04-0566-08

RNA 干涉的临床前实验研究进展

王俊霞, 郑金枝, 常 灏, 朱宝长*

(首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

摘要: RNA 干涉(RNA interference, RNAi)是一种非常保守的细胞现象, 在基础研究和疾病治疗方面具有重大的应用前景。尤其引人注目的是, 新的 RNAi 方法学与已建立的转基因策略相结合, 有效地将组织特异性 RNAi 导入到患者体内, 有望治疗人类疾病。本文综述了 RNAi 的机制与在其临床前的实验研究, 简要介绍了 RNAi 的新用途, 讨论了 RNAi 基因治疗存在的问题, 展望了 RNAi 基因治疗的应用前景。

关键词: RNA 干涉; 临床前应用; 机制; 病毒; 癌症

中图分类号: Q522; R730.59 **文献标识码:** A

New advances in preclinical applications of RNA interference

WANG Jun-xia, ZHENG Jin-zhi, CHANG Hao, ZHU Bao-chang*

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: RNA interference (RNAi) is a conserved cellular phenomenon. It holds great prospects in basic research and therapeutic applications. Remarkably, the new RNAi methodology, in combination with the well established transgene technology, can introduce tissue specific RNAi to patients effectively to cure diseases. This paper mainly summarized the mechanism of RNAi and its preclinical applications. The new usage of RNAi and its prospects of therapeutic application were also introduced.

Key words: RNA interference; preclinical application; mechanism; virus; cancer

RNAi 现象是 1995 年康奈尔大学 Guo 博士在试图阻断线虫基因表达时被意外发现的, 是指外源或内源性的双链 RNA (dsRNA) 进入细胞后引起与其同源的 mRNA 特异性降解, 从而抑制相应基因表达, 表现出特定基因缺失的现象。1998 年, Fire 将这一发现正式命名为 RNA 干涉。后来研究发现它广泛存在于生物界, 是生物体抵御病毒或其他外来核酸入侵而保持自身遗传稳定的保护性机制。目前在果蝇、真菌、昆虫、植物以及哺乳动物中均发现了 RNAi 现象。目前, RNAi 已用于基础研究和疾病临床前治疗研究。本文详细阐述了 RNAi 的机制, 重点介绍了 RNAi 的临床前实验研究, RNAi 的临床前实验研究主要是在培养细胞或小型动物模型(如小鼠)上进行的。

1 RNAi 的机制

1.1 RNAi 的起始阶段

RNAi 的起始阶段是指 RNase III 家族的成员之一 Dicer 将内源性或外源性 dsRNA 切割成 21—23nt 的小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 片段。Brantl^[1]报道 Dicer 有以下几个结构域: 一个与 Argonaute 家族同源的 PAZ 结构域、两个 RNAase 活性结构域、一个 dsRNA 结合结构域和一个 DEAH/DCXH RNA 解旋酶活性结构域。Dicer 处理形成的 siRNA 5' 端磷酸化, 3' 端有 2—3 个游离核苷酸。

收稿日期: 2009-06-15; 修回日期: 2009-07-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870934)

*通讯作者 E-mail: baochang@mail.cnu.edu.cn; Tel: 010-68903623

1.2 RNAi的持续放大阶段

起始阶段形成的 siRNA 被 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)识别并与其结合。siRNA 与 RISC 结合后, RISC 被活化, 活化的 RISC 复合物通过 ATP 依赖的途径促进 siRNA 的解旋, 解旋酶包括 QDE-3、MUT-6、MUT14。解旋的反义链指引活化的 RISC 到互补的 mRNA 并与其结合, 然后 siRNA 与 mRNA 换位, siRNA 被释放出来, 再由 RISC 将靶 mRNA 切割, 导致翻译受阻, 产生转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。siRNA 不仅能引导 RISC 切割同源单链 mRNA, 而且可以作为引物与靶 RNA 结合并在 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)作用下合成更多新的 dsRNA, 新合成的 dsRNA 再由 Dicer 切割产生大量的次级 siRNA, 从而使 RNAi 的作用进一步放大, 最终将靶 mRNA 完全降解。

1.3 RNAi的效应阶段

目标 mRNA 被活化的 RISC 在距离 siRNA 3' 端 12 个碱基的位置切割^[2]。此过程要求反义链的 5' 端必须发生磷酸化, 同时反义链与目标 mRNA 复合物的双螺旋必须是 A 型^[3]。

2 RNAi 在基因治疗方面的临床前应用

目前, 很多研究小组试图将基因治疗和 RNA 干涉这两个生物医药领域最有前途的技术结合起来, 使 RNAi 在治疗方面令人感兴趣的原因是它诱导基因沉默的强度很高, 超过了以往用任何其他基因抑制物(如反义链和核酶)所观察到的基因沉默强度。目前, 越来越多的报道证明 RNAi 具有抑制细胞癌基因、病毒基因等几乎所有基因的功能。

2.1 抗病毒感染的临床前应用研究

RNAi 是生物体古老而保守的一种抗病毒机制。因此, 科研工作者模仿生物体内产生的 siRNA 设计、合成了 siRNA, 用来干扰病毒感染, 以达到治疗由病毒感染引起的疾病的目的。实验结果表明, 这些 siRNAs 介导的 RNAi 可以抑制病毒的复制、减少病毒 RNA 的数量和阻断病毒蛋白的表达。

2.1.1 抗人类免疫缺陷病毒-1(human immunodeficiency virus-1, HIV-1) 应用 RNA 干涉技术可以用来阻止 HIV-1 病毒的感染。HIV-1 病毒的感染需要其外膜糖蛋白 gp120 诱导 CD4 和趋化因子受体(CCR5 或 CXCR4)在细胞表面簇集, 这些表面受体的簇集激活了 HIV-1 跨膜糖蛋白 gp41, 从而形成复合物以介导病毒包膜和靶细胞的结合。大多数 HIV-1 的感染

还需宿主细胞膜表面存在趋化因子受体。在 HIV-1 感染的高危人群中对趋化因子受体 CCR5 的研究发现, 缺少两个 CCR5 基因的人对 HIV-1 的感染有抵抗力^[4]。缺少一个 CCR5 基因的人, 即使感染 HIV-1, 病程也比 CCR5 基因正常的 AIDS 患者的病程明显减缓。由于缺失 CCR5 的人体没有任何免疫异常, 因此抑制 CCR5 的表达、减少细胞膜表面上 CCR5 的数量是一种非常理想的抗 HIV-1 感染的方法。Novina 等^[5]的实验证实抑制细胞表面 HIV-1 受体 CD4 分子的表达, 也可以明显地阻止 HIV-1 病毒的感染。他们将 CD4-siRNA 转染 Magi-CCR5 细胞, Northern 杂交表明 siRNA 能将易感细胞 CD4 的表达降低 87.5%, 从而使病毒进入细胞的数量减少了 75%。Jacque 等^[6]使用与 HIV-1 调控基因 *LTR*、*vif* 和 *nef* 对应合成的 siRNA 成功阻止了 HIV-1 对 Magi-CD4 细胞和 CCR5 细胞的感染。目前也有实验证明将针对 CD4 受体蛋白和 CXCR4 受体蛋白设计的两种 siRNA 吸附至一种新型纳米材料——碳纳米管(nanotube), 再用这些碳纳米管处理人 T 细胞, 发现 60% 的 CD4 和 80% 的 CXCR4 表达被阻断, 从而阻止 HIV-1 对健康细胞的感染。

应用 RNA 干涉技术还可以抑制 HIV-1 病毒的胞内复制。在 HIV-1 病毒的生活周期中, 病毒 RNA 在整合后、反转录前存在于细胞质中, 这时作用于 RNA 可在整合之前抑制病毒感染, 最可能是通过裂解胞质中病毒的基因组 RNA。Yamamoto 等^[7]用自己合成的与 *nef* 基因 dsRNA 相应的片段转染 MT11 和巨噬细胞, 结果显示随着 *nef* 基因活性的降低, 病毒复制可被持久抑制。Jacque 等^[6]将人工合成、针对 HIV-1 基因组的 siRNA 导入细胞, 发现能够有效抑制 HIV-1 病毒周期的晚期活动。其中, 针对 HIV-1 的长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)、*vif* 和 *nef* 基因的 siRNA 能使感染细胞的病毒产生量减少 96.67% - 98.00%。改变 siRNA 的一个碱基, 会明显减弱其抑制病毒产生的作用。如果将针对 *vif* 的 siRNA 的 4 个碱基突变, 则完全失去了抑制作用, 提示 siRNA 发挥作用具有高度序列特异性的特征。最近, Lau 等^[8]针对 HIV-1 整合宿主细胞基因组所必需的整合酶 IN 成功设计出小发卡 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 转染 HeLa 细胞, 数据显示能够有效抑制整合蛋白 IN 的合成, 并显著减少 HIV-1 病毒颗粒释放。此外, Novina 等^[5]针对表达 HIV-1 核心蛋白的结构基因 *gag* 设计的 siRNA, 结果发现

siRNA能成功抑制染色体中已整合的前病毒*gag*基因的表达。Li等^[9]构建了慢病毒表达载体,可表达抑制HIV-1 *TAT/REV*基因的shRNA及裂解细胞CCR5受体的核酶,这一三重载体在原始造血细胞中很有效,完全抑制了HIV-1。

2.1.2 抗乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV) McCaffrey等^[10]发现RNAi对培养细胞中HBV质粒转染有免疫活性,且可抑制免疫缺陷的小鼠中HBV复制中间体的产生,可有效抑制培养细胞及哺乳动物肝脏内的HBV的复制。Shlomai和Shaul^[11]针对HBV的核心抗原开放阅读框和X蛋白开放阅读框设计了两个siRNA片段,有效地抑制了Huh-7细胞系中HBV的复制。Uprichard等^[12]通过重组腺病毒得到了转基因鼠,其肝细胞中可表达HBV特异性的siRNA,从而抑制事先存在的HBV基因的表达和复制,其抑制效果可以达到至少26 d内检测不到病毒的水平。这些结果表明有效地导入的siRNA应该可以沉默慢性感染的乙肝患者体内的HBV。HBV的共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, CCC DNA)是HBV转录体的来源,持续存在于慢性感染患者体内,Jason等^[13]为研究RNAi对HBV的CCC DNA的作用,向HBV复制起始前或正在进行HBV慢性复制的HepG2细胞中转染表达shRNA的杆状病毒,发现只在HBV感染开始前施用shRNA才会影响CCC DNA的数量,对后者的CCC DNA的数量无影响。这表明, RNAi只对HBV的CCC DNA的形成有影响,而对已形成的CCC DNA不起作用。

2.1.3 抗丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV) HCV是一种单链RNA病毒,在其增殖周期中不断进行着RNA复制,它是丙型肝炎和肝癌的主要诱因之一。单独用干扰素或将干扰素与利巴韦林共用是目前治疗HCV感染的惟一方法,但是该治疗方法对很多患者不起作用,因此,亟需开发新的HCV治疗方法。目前已有许多HCV RNAi临床前治疗的研究。Kapadia等^[14]利用RNA干涉技术,对HCV进行研究,用抑制HCV RNA复制的2个siRNA转染稳定进行HCV RNA复制的人肝癌细胞株Huh-7细胞,2 d后,Northern杂交检测HCV的RNA含量降低,证明HCV特异的siRNA抑制了病毒的复制。5'非翻译区是病毒巨蛋白翻译进入核糖体的位点,而且,5'非翻译区是丙肝病毒基因组最保守的区域,这使它成为siRNA的理想靶位点。Kanda等^[15]构建了三种以HCV 5'非翻译区为靶点的shRNA表达

载体,转染Huh-7和Huh-7.5细胞系,有效抑制了HCV的复制。Wilson等^[16]基于HCV基因组设计合成了双链siRNA,通过电穿孔法将体外合成的siRNA导入Huh-7细胞,显著地降低了病毒特异的蛋白的表达,而且RNA的合成比未经siRNA处理的细胞下降了90%。

2.1.4 抗其他病毒 Ge等^[17]针对流感病毒基因保守区设计了siRNA用于研究对鼠流感病毒的预防及治疗作用。应用小剂量的包含siRNA的聚阳离子载体混合物的方式分别在病毒感染前和感染后转染小鼠,结果表明被感染鼠肺中病毒的产生量均被siRNA所降低,为人流感病毒的治疗提供了理论依据。同时指出开发符合人使用的导入系统在预防和治理人流感病毒方面具有潜在应用价值。

禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)不仅给国内外养鸡业造成重大经济损失,而且对人类健康构成了严重威胁。目前的疫苗和抗病毒药物仅能提供有限的保护,因此,迫切需要新的治疗策略。Tompkins等^[18]证明了针对高度保守的核蛋白或酸性聚合酶的siRNA在体内可抑制禽流感病毒复制。这些siRNA显著降低了感染鼠肺内的病毒滴度,并且抵抗了致死性攻击。而且,流感特异性siRNA治疗是广谱有效的,保护动物免受H5和H7亚型高致病性禽流感的致死性攻击。这些结果表明RNAi有望控制流感病毒的感染。

2.2 治疗癌症的临床前应用研究

在癌症治疗方面,有四类RNAi靶点:致癌基因、癌细胞转移相关基因、放疗过程中的肿瘤抗性产生相关基因以及融合基因。

2.2.1 以致癌基因为靶点的临床前治疗 在癌症的RNAi治疗方面最明显的靶点是致癌基因本身。在肿瘤的发病机制中凋亡受抑是肿瘤细胞恶性克隆增殖的基础之一,多种致癌基因均与之密切相关。bcl-2特异性地在人神经胶质瘤细胞中过表达,从而抑制其凋亡,Kock等^[19]构建了以bcl-2为靶点的siRNA慢病毒表达载体,同时他们还构建了表达,分泌型凋亡诱导物TRAIL的载体,将它们共转染到神经胶质瘤细胞中,再将该转染的细胞移植到裸鼠体内,几乎完全避免了肿瘤发生。这不仅说明了RNAi治疗肿瘤的潜能,也展示了共转染途径的强大力量。BRAF和Skp-2在黑素瘤细胞中通常过表达并且是突变的。Sumimoto等^[20]用RNAi慢病毒载体共同抑制这两个基因,也观察到了很好的抗肿瘤

效果。最近又有另一个新的 RNAi 靶点——Hec1 基因, 该基因在很多类癌症中高表达, 用腺病毒载体、慢病毒载体、腺相关病毒载体进行的两项研究表明 Hec1 缺失能使各种异种移植模型中肿瘤显著减小^[21, 22], Hec1 成为在治疗神经胶质瘤、肺癌和胰腺癌方面的一个很有希望的靶点。

2.2.2 以癌细胞转移相关基因为靶位点的临床前治疗 肿瘤的转移是一个主动过程, 肿瘤细胞通过迁移突破宿主结缔组织、血管、淋巴管壁, 从而进入体液循环, 再次突破结缔组织、血管、淋巴管壁在靶器官定位形成转移灶。在肿瘤发生发展的过程中, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最重要的相关因子, 其编码的糖蛋白 VEGF 能促进新生血管形成和增加血管通透性, 并直接影响肿瘤血管的生长和原发肿瘤的生长与浸润。由于肿瘤生长转移具有血管依赖性, 因此封闭 VEGF 基因, 抑制血管形成, 成为治疗实体肿瘤的新思路。Shen 等^[23]用抗 VEGF 的 shRNA 处理过表达 VEGF 的人 K562 细胞后进行异种移植, 结果形成的肿瘤与对照相比更小, 而且血管的密度更低。Yoo 等^[24]表达抗 VEGF 的 shRNA, 与传统的腺病毒表达载体相比, 具有溶解癌细胞作用的 shRNA 表达载体在神经胶质瘤异体移植中具有更强的抗肿瘤效应。

2.2.3 以化放疗中的肿瘤抗性产生相关基因为靶点的临床前治疗 目前放疗仍然是两种重要的肿瘤治疗方法, 然而化疗耐药性和对放疗的不敏感性是肿瘤治疗中最大的障碍。

化疗是目前治疗肿瘤的有效方法之一, 但一旦对某种药物产生耐受, 对其他化疗药物也易产生交叉耐受, 因此肿瘤的多药耐药性(multidrug resistance, MDR)是肿瘤化疗失败的主要原因, 通过 RNAi 干扰 MDR mRNA 表达是逆转肿瘤多药耐药性治疗的新靶点。NF- κ B p65 在 MDR 中占有重要地位, NF- κ B p65 可反式激活很多基因, 调节细胞的生长、凋亡、血管形成和侵袭转移。Guo 等^[25]应用 RNAi 技术抑制 NF- κ B p65 亚基的表达, 从而在体内和体外增强了肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 促进了肿瘤细胞的凋亡。Mdr-1 基因编码相对分子质量为 170 k 的跨膜 p-糖蛋白, 它是 ABC(ATP binding cassette, ABC)转运体超家族的成员之一, 与放疗过程中的 MDR 密切相关。Nieth 等^[26]通过 mdr1-siRNA 分别抑制胰腺癌 EPG85-257RDB 细胞及胃癌 EPG85-

181RDB 细胞的耐药性, 发现其对抗肿瘤药正定霉素的耐药性分别下降到其原来的 58% 和 89%。Pichler 等^[27]用表达 mdr1- shRNA 的逆转录病毒表达载体转染癌细胞, 增强了其对细胞毒素类药物的敏感性。这些研究表明通过 RNAi 技术可以调节 MDR, 这为临床肿瘤耐药性的研究带来了新的希望。

放射线导致细胞损伤的主要靶点是 DNA。由放射线的直接作用导致 DNA 单链和双链断裂损伤, 其中以 DNA 双链断裂损伤(DNA double-strand break, DSB)最为重要。DNA 双链断裂信号传导/修复蛋白 ATM、ATR 和 PKC 可修复断裂的双链 DNA, 避免细胞死亡或癌症发生, 这些蛋白表达缺陷或缺失会阻碍 DNA 的修复, 这将会增加细胞对 DNA 损伤因素的敏感性。针对 DNA 双链断裂的信号传导/修复蛋白 ATM、ATR 和 PKC 亚单位设计 siRNA 是增强肿瘤放疗敏感性的良好靶标。Collis 等^[28]将外源可编码以上蛋白的 shRNA 质粒转入肿瘤细胞, 使靶细胞蛋白的表达降低 90%, 与仅转染空载体的对照组细胞相比, 靶细胞致死照射剂量仅为后者的 1/4。这为 siRNA 增强放疗敏感性提供了有力证据。

2.2.4 以融合癌基因为靶点的临床前治疗 融合癌基因在白血病中尤其普遍。相比较于其他肿瘤, 白血病在分子水平的一个特点就是有着较多的染色体方面的改变, 比如染色体易位, 染色体易位后能激活特定的癌基因或者导致新的融合癌基因的产生。由于这些基因产生后能直接引起白血病或者能维持白血病的病理状态, 因而经常被选作沉默基因的靶点。

在体外的细胞实验中, 针对融合基因 BCR-ABL mRNA 的 siRNA 可以显著地降低白血病细胞的增殖, 促进白血病细胞的凋亡^[29]。Scherr 等^[30]使用慢病毒作为载体携带 BCR-ABL-siRNA 转染 BCR-ABL 阳性的 K562 白血病细胞, 实验发现, 只有稳定转染而非瞬时转染才能够有效的抑制 K562 细胞 BCR-ABL 融合癌基因的表达。转染成功后 K562 细胞的增殖能力降低, 凋亡能力增强。Chen 等^[31]设计了针对 TEL-PDGFR β 融合基因的 siRNA, 然后用病毒载体携带该 siRNA 转染 Ba/F3 白血病细胞。TEL-PDGFR β 融合蛋白可以通过磷脂酰肌醇-3-激酶途径和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白途径促进白血病细胞的恶性增殖。TEL-PDGFR β -siRNA 抑制 TEL-PDGFR β

基因后,这两条信号通路的活性也明显降低。在实验中发现,沉默 TEL-PDGFR β 基因后虽然可以降低 Ba/F3 细胞的增殖能力,但仍不足以引起细胞的死亡。不过 TEL-PDGFR β 基因沉默后,细胞对抗肿瘤药物的敏感性却明显增强。这提示在临床治疗白血病时,可以采用药物化疗联合基因沉默的方法。Heidenreich 等^[32]设计了能够特异沉默 AML1/MTG8 融合基因,但对野生型 AML1 基因没有沉默作用的 siRNA。去除 AML1/MTG8 基因后的细胞停滞在 G₁ 期,不能再次增殖分化。实验结果说明,AML1/MTG8 在白血病早期的细胞扩增过程中和以后病情的发展过程中都发挥着重要作用。以上说明 RNAi 技术在白血病治疗中有巨大潜力。

融合癌基因也出现在实体瘤中,因此也是一种良好的实体瘤 RNAi 治疗的靶点。黏液表皮样癌(mucoepidermoid carcinoma, MEC)是由融合基因 Mect1-Mam12 引起的, Komiya 等^[33]构建抗该融合基因的 shRNA 表达载体转染腮腺或肺 MEC 肿瘤细胞系,肿瘤细胞克隆的生长被抑制了 90%,这提示融合基因 Mect1-Mam12 可以作为 MEC 癌 RNAi 治疗的靶点。横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RMS)是一种儿童期发生的高度恶化的软组织瘤,分为两种主要的亚型——胚胎型和肺泡型。肺泡型横纹肌肉瘤以 PAX3/7-FKHR 易位为特征。PAX3 和 PAX7 调控 MET 受体的转录,为证明 MET 是否在横纹肌肉瘤的维持中起作用, Taulli 等^[34]构建了诱导型 MET-shRNA 慢病毒表达载体转染 RMS 细胞系, Met 的表达显著下调并影响了 RMS 细胞系的增殖、存活和侵袭能力,引入 MET-shRNA 后在 RMS 异体移植模型中肿瘤数量显著减少。这些都表明 Met 基因可以成为 RMS 的 RNAi 治疗的靶点。

2.3 RNAi 在其他临床前治疗中的应用

更进一步的 RNAi 基因治疗临床前应用的证据来自在小型动物模型上对神经退行性紊乱疾病进行的功能获得性(gain-of-function)研究。PolyQ 重复单位紊乱目前用传统的药物无法治疗,这类疾病包括前庭小脑运动性失调(SCA)和亨廷顿疾病(HD)。神经退行性紊乱 RNAi 治疗的靶点还有帕金森症、老年痴呆症及肌萎缩性脊髓侧索硬化。与以上所有神经类疾病相应的 shRNA 病毒表达载体已经被在适当的小型动物模型中评估。Raoul 等^[35]用基于病毒的 shRNA 表达载体沉默神经退行性疾病相关基因,结果改善了运动协调性和肌肉功能,延迟了疾病的发

生和发展,明显延长了小鼠的寿命。

3 RNAi 应用的新途径

3.1 保护新转入的治疗基因的表达

基因治疗的最大障碍之一是引起免疫系统排斥新转入的基因,致使载体被清除,这样就阻碍了稳定的基因转移。为消除排斥反应而采取的措施,如与免疫抑制药物共用或与组织特异性的启动子(可使专门的抗原呈递细胞中的新转入基因的表达降到最低)共用,效果都是有限的。

在克服新抗原特异性免疫和引导载体耐受的实验中, Brown 等^[36]报道了依据 miRNA(microRNA) 确定细胞身份的作用设计基因治疗载体的新范例。他们建立了一种慢病毒载体,其强抗原 GFP 报告基因被加了一个标签,该标签序列(mir-142-3p)是血细胞系特异的 miRNA 的靶标序列,这样导致在全身转染了载体的有免疫活性的小鼠中, GFP 的表达在造血细胞系中被抑制,而在非血细胞(尤其是在肝实质细胞和内皮细胞中)仍存在,相反,未加标签的 GFP 变体在鼠体内完全被清理掉。在这些转基因鼠中, GFP 在免疫细胞中不表达,这样就不会产生 GFP 抗体,从而使 GFP 转基因小鼠中加标签的载体所转基因的表达被保护,免疫排斥消失。

这一新方法有可能被用来保护全身转染的 RNAi 基因治疗载体的表达。用 miRNA 结合位点作为 shRNA 表达盒的标签是可行的,这导致了表达这些 miRNA 的细胞寻靶失败,增强了 RNAi 基因治疗的说服力。然而,这一成功的新策略有赖于 miRNA 的特异性和新的组织特异性 miRNAs、发育特异性 miRNAs 和肿瘤特异性 miRNAs 的发现。

3.2 促进干细胞生物学与干细胞治疗的发展

RNAi 技术现已用于干细胞生物学的研究,如对人类干细胞进行修饰后用于治疗,这一应用正处于初级的研究阶段,具有很大的发展潜力。目前,这方面最适合的载体是水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV) G 糖蛋白包装慢病毒的假病毒,对小鼠和人的干细胞有很高的靶向性和转染率^[37]。现已证明,这些载体可以使基因转移到各种干细胞中,可以是全能的胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES cell),也可以是成体干细胞(adult stem cell, ASC),如神经干细胞或造血干细胞^[37]。

基于载体的 RNAi 可能会首先用于 ES 细胞基因的发现,以阐明并最终控制自我更新和全能性的分子机制。目前各学术团体和商业机构已将 RNAi 载

体技术与高通量文库筛选方法相结合^[38]。与治疗最相关的重要目标是识别调控细胞类型的基因。已有一些基因,用传统方法将它们转染到ES细胞中促使了ES细胞的分化,比如分化成为造血祖细胞^[39]。另一个与血细胞生成相关的例子来自于Zou等^[40]用转染的siRNAs抑制了鼠科动物ES细胞中的Pu.1转录因子,得到了造血祖细胞。这些分化成的原始造血细胞有特有的细胞表面标记和转录因子。这例证了RNAi作为遗传工具有促进ES细胞向所需的细胞类型分化的潜能。

其次,载体介导的RNAi可应用于对ES细胞进行遗传控制以预防和治疗人类疾病。一种可行的方法是分离和无性繁殖特定患者的干细胞库,然后识别、阐明和纠正潜在的遗传缺陷(比如通过RNAi调控介导多种癌基因的抑制)。RNAi载体库的应用极其有益,因为它们将推动大范围的干细胞特异表达基因的发现。而且,RNAi载体可能对基于ES细胞的疫苗接种来抗感染有帮助,如Li等^[41]利用慢病毒RNAi载体在人类造血干细胞中表达抗HIV的shRNA。不久的将来,载体RNAi在ES细胞方面的应用是通过敲除增殖相关基因降低其潜在的致癌性,或控制它们的免疫功能将器官移植患者的排斥反应降到最低^[42]。

3.3 制作转基因动物

一种颇具前景的载体RNAi应用是辅助传统方法(例如通过同源重组获得基因敲除小鼠)对动物(和植物)进行遗传操作。传统方法制作基因敲除动物有两个局限性:除小鼠外,大多数哺乳动物缺少稳定的ES细胞;可供选择的办法成本高,效率低。还有一个障碍就是,在基因敲除鼠中基因功能完全丧失,这与典型的人类疾病自然突变后的基因仍有部分功能的情况不符。RNAi介导的基因敲除可能提供更恰当的遗传工具来捕获和模拟致病表型,因为它能产生携带不同缺陷程度的亚效等位基因的动物,近似于在人类疾病中的遗传情况^[43,44]。

最近关于RNAi基因转移方面的一项重要发现是可以体外直接转染慢病毒shRNA表达盒到着床前小鼠胚胎。这就提供了一个简便、可重复的方法制作基因敲除小鼠,不需进行原核DNA注射^[45]。慢病毒RNAi基因转移基本方法是在小鼠中建立的^[46,47],一些最新报道是关于该方法在其他哺乳动物(山羊、猪、牛)中的可用性。Dann等^[48]的一项最新实验性研究将慢病毒RNAi基因转移应用于大鼠,这些大

鼠是有价值的人类疾病模型。以与生殖有关的基因Dazl为靶,Dann等^[48]制作了携带在生殖细胞发生和发育能力方面有可遗传缺陷的亚效等位基因的大鼠,类似于基因敲除鼠的表型。

在基因治疗方面最令人兴奋的是,最近一些报道展示了家畜的慢病毒RNAi基因转移。这些研究的目的是预防朊病毒或其他病毒的感染,目前还没有治疗这些病毒的药理学化合物。有抵抗力的家畜在生产生物医学产品(动物药)方面高度引人关注,因为疾病传染到人类的风险最小。几个研究小组实现了在小鼠^[49]、山羊和牛^[50]中进行基于RNAi的朊病毒疫苗接种。其他小组制作了转基因猪以研究整合载体的表观遗传调控,整合载体在猪中产生的稳定的RNAi可能很有价值,因为这些动物可用于细胞治疗和器官移植。在这一领域,Dickins等^[51]最近报道了第一例携带可诱导的组织特异性的RNAi表达盒的转基因鼠。时间-空间特异的RNAi基因转移策略将在基础研究和临床前疾病模型研究方面有广泛的应用。

4 存在的问题和展望

RNAi目前正从基础研究向临床应用的方向发展,其速度是令人惊异和空前的。这一发展的主流是病毒基因转移载体和已建立的基因治疗方法,这些基因治疗方法与RNAi技术的结合更进一步加强了该方法。很明显,RNAi可有力的抑制致病基因的表达,从而也就抑制了它们的功能,优于之前所采用过的所有其他基因治疗方法。基于应用病毒载体转移shRNA固有的优点,RNAi基因治疗可能会成为多种慢性疾病的主要临床治疗方案。RNAi用于已发现的流感病毒的临床前治疗,目前新发现的H1N1甲型流感病毒毒株包含有猪流感、禽流感和人流感三种流感病毒的基因片断,是一种新型的流感病毒,可以人传染人。目前主要是对其进行药物治疗和中医辨证治疗,相信随着研究的不断深入,也能对其进行RNAi基因治疗。

尽管RNAi基因治疗有势不可挡的医学前景,但是不能忽视将RNAi和基因治疗结合应用可能也会混合了两者可能引起的潜在有害效应。妨碍该方案更广泛应用的可能障碍包括:首先最重要的是载体和RNAi的安全性问题。例如,需要更多的数据充分评估来自于整合载体引起插入突变的危险,尽管那些整合载体大部分以游离状态存在,如AAV。而且,各种载体和假病毒逃逸宿主免疫或避免引发体

液或细胞免疫反应的能力需要更全面地阐述和大量的实验研究。同样, 还要重点考虑到目前的 RNAi 引发者的安全性和特异性。从积极的一面来看, 目前所报道的体内研究还未发现 shRNA 引发的干扰素反应, 而且在动物中还未发现脱靶现象。然而, 由于 RNAi 基因治疗仍然是一个新兴领域, 任何关于其有害效应的证据都将表明要发展安全可行的基因治疗方法必须不断研究 RNAi 的机制。事实上, 首批体内长期 RNAi 基因治疗的评估提出了新的问题——有害的胞内 RNAi 途径的饱和, 尤其是 miRNA 的加工途径。这一问题可通过利用精选的 shRNA 序列和最小有效剂量的载体来克服^[52]。因此, 如果设计和运用合理, RNAi 基因治疗可具有极广的治疗价值, RNAi 基因治疗仍是目前惟一最有前景降低不希望的基因表达的生物治疗措施, 我们相信, RNAi 基因治疗的方法终将应用于临床。

[参 考 文 献]

- [1] Brantl S. Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1575(1-3): 15-25
- [2] Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(2): 110-9
- [3] Chiu YL, Rana TM. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell*, 2002, 10(3): 549-61
- [4] Dean M, Carrington M, Winkler C, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. *Science*, 1996, 273(5283): 1856-62
- [5] Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, et al. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *J Nat Med*, 2002, 8(7): 681-6
- [6] Jacque JM, Triques KM, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*, 2002, 418(6896): 435-8
- [7] Yamamoto T, Omoto S, Mizuguchi M, et al. Double-stranded *nef* RNA interferes with human immunodeficiency virus type 1 replication. *Micobiol Immunol*, 2002, 46(11): 809-17
- [8] Lau TS, Li Y, Kameoka M, et al. Suppression of HIV replication using RNA interference against HIV-1 integrase. *FEBS Lett*, 2007, 581(17): 3253-9
- [9] Li M, Li H, Rossi JJ. RNAi in combination with a ribozyme and TAR decoy for treatment of HIV infection in hematopoietic cell gene therapy. *Ann NY Acad Sci*, 2006, 1082(1): 172-9
- [10] McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(6): 639-44
- [11] Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology*, 2003, 37(4): 764-70
- [12] Uprichard SL, Boyd B, Althage A, et al. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 773-8
- [13] Jason L, Starkey EF, Chiari, et al. Hepatitis B virus (HBV)-specific short hairpin RNA is capable of reducing the formation of HBV covalently closed circular (CCC) DNA but has no effect on established CCC DNA *in vitro*. *J Gen Virol*, 2009, 90: 115-26
- [14] Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(4): 2014-8
- [15] Kanda T, Steele R, Ray R, et al. Small interfering RNA targeted to hepatitis C virus 5' nontranslated region exerts potent antiviral effect. *Virology*, 2007, 81: 669-76
- [16] Wilson JA, Jayasena S, Khvorovova A, et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2783-8
- [17] Ge Q, Filuip L, Bai A, et al. Inhibition of influenza virus production in virus infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 8676-81
- [18] Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM, et al. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(23): 8682-6
- [19] Kock N, Kasmieh R, Weissleder R, et al. Tumor therapy mediated by lentiviral expression of shBcl-2 and S-TRAIL. *Neoplasia*, 2007, 9(5): 435-42
- [20] Sumimoto H, Hirata K, Yamagata S, et al. Effective inhibition of cell growth and invasion of melanoma by combined suppression of BRAF (V599E) and Skp2 with lentiviral RNAi. *Int J Cancer*, 2006, 118(2): 472-6
- [21] Li L, Yang L, Scudiero DA, et al. Development of recombinant adeno-associated virus vectors carrying small interfering RNA (shHec1)-mediated depletion of kinetochore Hec1 protein in tumor cells. *Gene Ther*, 2007, 14(10): 814-27
- [22] Gurzov EN, Izquierdo M. RNA interference against Hec1 inhibits tumor growth *in vivo*. *Gene Ther*, 2006, 13(1): 1-7
- [23] Shen HL, Xu W, Wu ZY, et al. Vector-based RNAi approach to isoform-specific downregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) 165 expression in human leukemia cells. *Leuk Res*, 2007, 31(4): 515-21
- [24] Yoo JY, Kim JH, Kwon YG, et al. VEGF-specific short hairpin RNA-expressing oncolytic adenovirus elicits potent inhibition of angiogenesis and tumor growth. *Mol Ther*, 2007, 15(2): 295-302
- [25] Guo J, Verma UN, Gaynor RB, et al. Enhanced chemosensitivity to irinotecan by RNA interference-mediated downregulation of the nuclear factor- κ B p65 subunit. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(10): 3333-41
- [26] Nieth C, Priebisch A, Stege A, et al. Modulation of the classical multi-drug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett*, 2003, 545(2-3): 144-50
- [27] Pichler A, Zelcer N, Prior JL, et al. *In vivo* RNA interference-mediated ablation of MDR1 P-glycoprotein. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 4487-94
- [28] Collis SJ, Swartz MJ, Nelson WG, et al. Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells

- by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. *Cancer Res*, 2003, 63(7): 1550-4
- [29] Scherr M, Battmer K, Winkler T, et al. Specific inhibition of *bcr-abl* gene expression by small interfering RNA. *Blood*, 2003, 101(4): 1566-9
- [30] Scherr M, Battmer K, Schultheis B, et al. Stable RNA interference (RNAi) as an option for anti-*bcr-abl* therapy. *Gene Ther*, 2005, 12(1): 12-21
- [31] Chen J, Wall NR, Kocher K, et al. Stable expression of small interfering RNA sensitizes TEL-PDGFR β to inhibition with imatinib or rapamycin. *J Clin Invest*, 2004, 113(12): 1784-91
- [32] Heidenreich O, Krauter J, Riehle H, et al. AML1/MTG8 oncogene suppression by small interfering RNAs supports myeloid differentiation of t(8;21)-positive leukemic cells. *Blood*, 2003, 101(8): 3157-63
- [33] Komiya T, Park Y, Modi S, et al. Sustained expression of Mect1-Mam12 is essential for viability of salivary gland tumors carrying the t(11;19) translocation. *Oncogene*, 2006, 25(45): 6128-32
- [34] Taulli R, Scuoppo C, Bersani F, et al. Validation of met as a therapeutic target in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*, 2006, 66: 4742-9
- [35] Raoul C, Barker SD, Aebischer P. Viral-based modeling and correction of neurodegenerative diseases by RNA interference. *Gene Ther*, 2006, 13(6): 487-95
- [36] Brown BD, Venneri MA, Zingale A, et al. Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med*, 2006, 12(5): 585-91
- [37] Chang AH, Sadelain M. The genetic engineering of hematopoietic stem cells: the rise of lentiviral vectors, the conundrum of the LTR, and the promise of lineage-restricted vectors. *Mol Ther*, 2007, 15(3): 445-56
- [38] Root DE, Hacohen N, Hahn WC, et al. Genome-scale loss-of-function screening with a lentiviral RNAi library. *Nat Methods*, 2006, 3(9): 715-9
- [39] Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell*, 2002, 109(1): 29-37
- [40] Zou GM, Chen JJ, Yoder MC, et al. Knockdown of Pu.1 by small interfering RNA in CD34⁺ embryoid body cells derived from mouse ES cells turns cell fate determination to pro-B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 13236-41
- [41] Li M, Li H, Rossi JJ. RNAi in combination with a ribozyme and TAR decoy for treatment of HIV infection in hematopoietic cell gene therapy. *Ann NY Acad Sci*, 2006, 1082: 172-9
- [42] Heidersbach A, Gaspar-Maia A, McManus MT, et al. RNA interference in embryonic stem cells and the prospects for future therapies. *Gene Ther*, 2006, 13(6): 478-86
- [43] Hemann MT, Fridman JS, Zilfou JT, et al. An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes *in vivo*. *Nat Genet*, 2003, 33(3): 396-400
- [44] Kunath T, Gish G, Lickert H, et al. Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(5): 559-61
- [45] Singer O, Tiscornia G, Ikawa M, et al. Rapid generation of knockdown transgenic mice by silencing lentiviral vectors. *Nat Protoc*, 2006, 1(1): 286-22
- [46] Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, et al. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 1844-8
- [47] 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. *Nat Genet*, 2003, 33(3): 401-6
- [48] Dann CT, Alvarado AL, Hammer RE, et al. Heritable and stable gene knockdown in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 11246-51
- [49] Pfeifer A, Eigenbrod S, Al-Khadra S, et al. Lenti vector mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice. *J Clin Invest*, 2006, 116(12): 3204-10
- [50] Golding MC, Long CR, Carmell MA, et al. Suppression of prion protein in livestock by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 5285-90
- [51] Dickins RA, McJunkin K, Hernando E, et al. Tissue-specific and reversible RNA interference in transgenic mice. *Nat Genet*, 2007, 39(7): 914-21
- [52] Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, 2006, 441(7092): 537-41