

DOI: 10.13376/j.cbls/2016075

文章编号: 1004-0374(2016)05-0576-08



吴立刚, 研究员, 博士生导师。1996年本科毕业于上海交通大学, 2001年博士毕业于中国科学院上海植物生理研究所, 2001年至2008年在美国纽约大学(NYU)医学院从事博士后研究, 2008年起任中科院上海生科院生化与细胞所研究员, 入选“百人计划”。课题组主要运用生化和分子手段, 结合高通量测序和生物信息学方法, 在分子水平和RNA组学水平研究非编码小RNA在肿瘤发生和精子、卵子生成中的功能及其分子机制; 对RNAi和CRISPR等非编码RNA分子机器进行研究和改造, 以减少脱靶效应并提高效率, 为基础研究和疾病治疗提供新工具。

RNA干扰的机制及其应用

尚仁福, 吴立刚*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要: RNA干扰(RNA interference, RNAi)是真核生物中高度保守的, 由小分子干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) 介导的转录后基因沉默现象, 在基因功能的研究中得到了非常广泛的应用, 并有望成为小核酸药物在疾病治疗中发挥重要作用。现对近年来RNAi的作用机制、siRNA的产生途径、引起RNAi副作用的原因以及RNAi表达载体的设计这四个方面的国内外研究进展进行了总结, 对RNAi与CRISPR技术在应用中的关系进行了探讨, 展望了RNAi技术未来的发展。

关键词: RNAi; siRNA; RNAi表达载体; Ago2; 基因沉默; 脱靶效应

中图分类号: Q52; Q789 **文献标志码:** A

Mechanism and application of RNA interference

SHANG Ren-Fu, WU Li-Gang*

(State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: RNA interference (RNAi) is an evolutionarily conserved post-transcriptional gene silencing mechanism mediated by small interfering RNA (siRNA) in eukaryotes, which has become a powerful tool to silence gene and holds great promising for combating human diseases. This review summarizes the current knowledge about the mechanism of RNAi, off-target effects and designing of siRNA-expressing vectors. We also compare the RNAi with CRISPR technology and further discuss the prospect of its future applications.

Key words: RNA interference; siRNA; RNAi vectors; Ago2; gene silencing; off-target effect

收稿日期: 2016-03-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31470781)

*通信作者: E-mail: lgwu@sibcb.ac.cn

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是真核生物中由小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 所介导的转录后基因沉默现象, 在调控基因表达、防止基因组中逆转座元件扩增和抵御病毒入侵等方面具有重要功能。RNAi 现象最初发现于秀丽线虫中^[1], 此后的研究表明 RNAi 在果蝇、拟南芥、斑马鱼和哺乳动物等真核生物中都高度保守。由于 RNAi 可特异性地抑制靶基因的表达, 操作简易, 使用成本低, 既能灵活组合同时抑制多个靶基因, 又能用于大规模的基因筛选^[2], 在探索基因功能以及作为小分子核酸类药物进行疾病治疗中都具有巨大的应用潜力^[3-4]。2006 年的诺贝尔生理学或医学奖也因此授予了发现 RNAi 现象的 Craig Mello 和 Andrew Fire 教授。

1 RNAi 的作用机制

siRNA 是介导 RNAi 现象的关键分子, 由长度约为 21 个碱基的两条小 RNA 组成, 其中与靶标 RNA 完全互补配对的一条 siRNA 链为 guide 链 (guide strand), 另一条 siRNA 链为 passenger 链 (passenger strand)。guide 链和 passenger 链之间有 19 个碱基互补配对, 在双链 siRNA 两端各形成 2 个碱基的 3' 末端悬垂。外源导入或细胞内加工生成的 siRNA 在细胞质内与 Argonaute (Ago) 等蛋白质因子结合, 形成 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC)。RISC 复合物中通常只有一条 siRNA 链被保留, 另一条链大部分被丢弃并降解, 这种链选择性主要取决于双链 siRNA 5' 末端碱基配对的热力学稳定性, 5' 末端碱基配对相对不稳定的那条链更倾向于被 RISC 保留^[5-6]。siRNA 通过碱基互补配对识别靶标 RNA, 在镁离子和 ATP 的参与下, Ago 利用其核酸内切酶活性切割与 siRNA 完全互补配对的靶标 RNA, 产生的 RNA 片段易受到 5' 或 3' 核酸外切酶的攻击而快速降解, 从而在转录后水平沉默靶基因的表达^[7-8]。

Ago 是 RISC 复合物中的核心蛋白质, 结合 siRNA 并切割靶基因的 RNA。Ago 蛋白的结构在进化中高度保守, 主要由 PAZ、MID 和 PIWI 三个特征结构域组成^[9-10]。其中, PAZ 结构域结合 siRNA 3' 末端; MID 结构域特异性结合 siRNA 5' 末端, 尤其偏好 U 和 A 碱基^[11]; PIWI 结构域包含类似 RNase H 的结构, 具有核酸内切酶活性, 如哺乳动物的 Ago2 蛋白^[12]。在不同物种中, Ago 家族成员的数目有显著差异: 裂殖酵母中仅有 1 种, 线

虫中多达 27 种, 果蝇中有 2 种 (Ago1 和 Ago2), 包括人类在内的哺乳动物表达 4 种 Ago 蛋白质 (Ago1~4), 但其中只有 Ago2 具有核酸内切酶活性^[13-14]。另外, siRNA 还需要细胞内的 TRBP 等蛋白质的协助才能以正确的方式高效地进入 RISC 复合物, 并组装形成具有活性的 RNAi 分子机器^[15]。

2 siRNA 的产生途径

siRNA 和 Ago2 是 RNAi 分子机器 RISC 中最重要的两个组分, 如果将 Ago2 比喻为锋利的分子剪刀, siRNA 就是提供靶位点序列信息的导向标 (guide)。在体外重组实验中, 仅仅加入 siRNA 和 Ago2 就足以对靶标 RNA 进行切割。siRNA 主要由四种方式产生: 长的双链 RNA (double strand RNA, dsRNA) 加工生成、直接通过化学方法合成、RNA 聚合酶 III 启动子转录产生、RNA 聚合酶 II 启动子转录产生。在线虫中首次发现的 RNAi 现象就是由 dsRNA 在细胞质内被 RNase III 家族的核酸酶 Dicer 切割产生的 siRNA 所介导。虽然 dsRNA 可以在植物以及线虫、果蝇等低等动物中高效地诱发 RNAi, 但在哺乳动物中 dsRNA 只能用于在胚胎干细胞中诱导 RNAi。这是由于在其他类型细胞中, 大于 30 bp 的 dsRNA 会激活细胞的抗病毒及干扰素反应, 如 PKR 和 RNase L 途径 (胚胎干细胞中该途径被关闭), 导致细胞的迅速凋亡^[16], 因而 dsRNA 的应用范围受到限制。为了解决这个问题, 研究人员通过转染直接将化学方法合成的 21 bp 的双链 siRNA 导入哺乳动物体细胞, 成功实现了对靶基因的沉默作用^[17-18]。由于该方法较为方便快捷, 很快获得了广泛应用。由于 siRNA 易被细胞内核酸酶降解, 并会随细胞的分裂而被不断稀释, 故其发挥功能的持续时间较短。虽然硫代和甲基化等化学修饰能够显著提高 siRNA 在体内的稳定性^[19], 但成本高昂, 并且仍然会随着细胞的生长和分裂而被稀释和代谢, 加之很多原代细胞难以被转染, 因此 siRNA 在应用中仍有一定局限。

为了在细胞内长期稳定地表达 siRNA, 研究人员开发出了由细胞内 RNA 聚合酶 III 启动子 (如 H1、U6 等) 驱动转录产生的 siRNA 前体—shRNA (short hairpin RNA)^[20-21]。目前广泛使用的 shRNA 包含一段长 4 nt 的顶端单链环结构, 以及长度为 21~25 bp 的双链配对区, 转录产生后在 Ran-GTP 的协助下由核质转运蛋白 Exportin-5 识别并运出细胞核, 在细胞质中被 Dicer 及其协助蛋白 TRBP 等

识别并切割,产生约 21 bp 的成熟双链 siRNA 分子并发挥调控功能。shRNA 表达框架可构建在慢病毒、腺病毒和腺相关病毒等多种病毒载体上,能够在包括原代细胞在内的绝大多数组织和细胞类型中沉默靶基因^[22]。

近来科研人员还开发了基于 miRNA 前体的 siRNA 表达载体。miRNA 是一类长度约为 22 nt 的内生小分子 RNA,广泛存在于动植物细胞中,调控超过 60% 的蛋白质编码基因的表达^[23]。大多数 miRNA 基因首先由 RNA 聚合酶 II (Pol II) 转录产生长度为几百到几万个碱基的带有 5' 端帽子和 3' 端多聚腺苷酸 (poly(A) tail) 尾的初始 miRNA 前体 (primary miRNA, pri-miRNA)。Pri-miRNA 在细胞核内被 RNase III 蛋白质家族的 Droscha 及其协助蛋白 DGCR8 识别并切割生成长度约 70 nt 的前体 miRNA (precursor miRNA, pre-miRNA), Exportin-5 识别 pre-miRNA 的 3' 末端两个碱基的悬垂结构并将其运输到细胞质中,由 Dicer/TRBP 进一步切割去除顶端单链环,产生长度约 22 bp 的双链 miRNA,其中 5' 末端碱基配对相对不稳定那条链会进入 RISC 发挥功能^[24]。与 siRNA 介导切割与之完全互补配对的靶标 RNA 不同,成熟的 miRNA 与靶标 mRNA 之间主要是通过 miRNA 的种子区 (seed region, 也就是 miRNA 的 2~7 位碱基) 互补配对,由 Ago 招募 TNRC6 和 CCR4-NOT 复合物介导 mRNA 的翻译抑制和加速降解,进而影响该基因的表达^[25-26]。由于 siRNA 和 miRNA 在长度、结构、加工途径和结合的蛋白质上都较为类似,研究人员基于 miRNA 的产生途径,将 pri-miRNA 中的 miRNA 序列替换成 siRNA 序列,通过 RNA 聚合酶 II 启动子 (如 CMV、EF1) 转录产生类似 pri-miRNA 结构的 siRNA 前体,被细胞核内的 Droscha 及细胞质中的 Dicer 进行连续切割并产生成熟的 siRNA,同样可有效沉默靶基因的表达。这种基于 miRNA 前体的 RNAi 载体被称为 shRNAmir^[27-28]。相对于 Pol III 启动子的高效性,使用 Pol II 启动子优点是能够选择不同组织特异性的启动子表达 siRNA,如肝脏特异性的启动子 IGF II、Alb,或神经组织特异性的启动子 NSE、GFAP 等,从而达到组织特异性沉默靶基因的目的。此外,利用各种诱导型启动子,如四环素诱导的 Tet 启动子^[29]或光调控的启动子^[30],可以实现由小分子化合物或光诱导的基因沉默,更为灵活。

3 RNAi的脱靶效应

RNAi 技术作为一种功能强大的基因调控工具,其固有的缺点随着其广泛应用逐渐显露。其中,最早引起关注的是 RNAi 的脱靶效应 (off-target)。siRNA 通过与靶基因 RNA 完全互补配对实现特异性沉默靶基因的表达 (on-target)。若 siRNA 与其他 RNA 上的碱基发生部分互补配对 (siRNA 的 2~7 位碱基与 RNA 互补配对),则 siRNA 以类似 miRNA 的作用方式抑制 mRNA 的翻译并加速其降解,非特异性抑制靶基因以外其他基因的表达,这种现象被称作 RNAi 的脱靶效应^[31-32]。此外,在哺乳动物中不具有切割活性的 Ago 家族成员 (Ago1、Ago3、Ago4) 也能够结合 siRNA,它们介导脱靶效应的能力甚至比 Ago2 更强^[33]。研究表明,siRNA 可能会对细胞内几十到几百个基因的表达产生影响^[31,34-35],导致对靶基因功能的错误解读。

双链 siRNA 分子中除 guide 链外,passenger 链也会产生脱靶效应。虽然在设计时通过改变双链 siRNA 5' 末端碱基配对的稳定性可以提高 guide 链保留的比例,但仍有部分 passenger 链被保留下来并产生脱靶效应。另外,越来越多的研究发现,细胞中大量基因存在反义链转录本 (antisense transcript)^[36-38],这些反义链 RNA 通过调控转录或改变正义链 RNA 的稳定性等方式影响正义链基因或其他基因的表达^[39-40]。例如,P15 (又名 CDKN2B) 基因的反义链 P15-AS (又名 ANRIL) 通过结合某些蛋白质抑制 P14、P15 和 P16 等抑癌基因的表达,从而促进前列腺癌等癌症的发展^[41-42]。因此,当 siRNA 的 guide 链沉默正义链 RNA 时,其 passenger 链可能会沉默其反义链 RNA,导致在运用 RNAi 技术研究存在反义链 RNA 的基因时产生实验假象。

4 对细胞内源miRNA的竞争抑制

RNAi 载体表达 siRNA 时对细胞内源 miRNA 加工和功能的竞争抑制也可造成毒副作用。不论是 Pol III 启动子转录产生的 shRNA 或 Pol II 启动子转录产生的 shRNAmir,它们在加工产生成熟的 siRNA 时都需要利用细胞内源的 Droscha、Dicer 和 Exportin-5 等蛋白质因子,这些蛋白质也是细胞内 miRNA 加工成熟所必需的因子,因此,在细胞内过表达 shRNA 时必然对 miRNA 的加工造成竞争作用。即使是化学合成的双链 siRNA,转到细胞内也会与内源 miRNA 竞争与 Ago 蛋白的结合,从而影

响 miRNA 的表达和功能^[43]。在小鼠肝脏中长期高表达 shRNA 会造成肝损伤并致死, 其主要原因就是过量的 shRNA 竞争 Exportin-5 和 Ago2 等蛋白质, 影响了小鼠肝脏内源 miRNA 的表达和调控功能, 导致 miRNA 靶基因的表达上调^[44-45]。由于这种竞争作用对细胞内几乎所有 miRNA 的加工和功能都造成影响, 其引发的生理效应在不同的组织细胞中极为复杂。因此, 如何既能实现对靶基因的高效抑制, 同时又能将对细胞内源 miRNA 的影响降到最低, 成为 RNAi 载体设计的挑战之一。

5 安全高效RNAi载体的探索

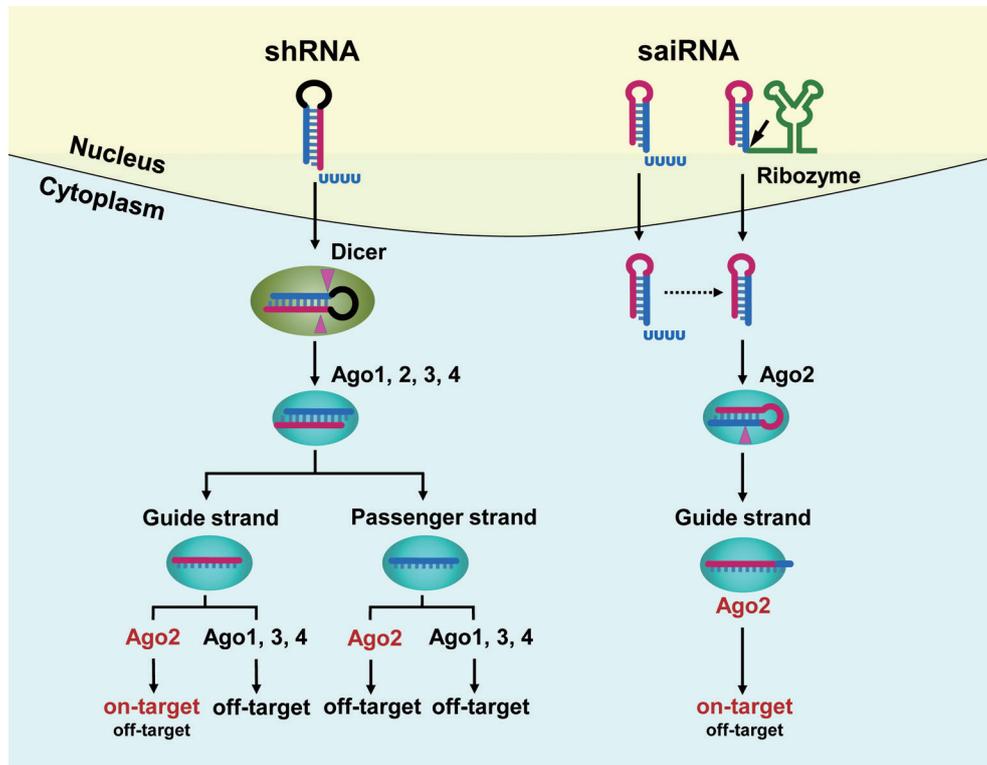
利用 siRNA 或 shRNA 文库进行大规模功能性筛选时, RNAi 沉默效率低可导致假阴性结果, 而脱靶效应对内源 miRNA 的竞争往往会造成假阳性结果, 这些因素都会对后期的实验验证和功能研究造成困扰。临床治疗中 RNAi 的效率和副作用直接决定了 siRNA 药物的成效和使用成本。研究表明, RNAi 副作用与 shRNA 抑制靶基因的效率密切相关。低效 shRNA 对靶基因表达的抑制不完全, 需使用更多的 shRNA, 引起更严重的脱靶效应对内源 miRNA 的影响, 结果导致细胞生长抑制或死亡^[44]。因此, 如何最大限度地提高效率和减少副作用是 RNAi 应用研究中最重要的问题之一。

对 siRNA 中特定位置的核苷酸进行化学修饰可以提高其稳定性, 降低脱靶效应^[46]。有关 siRNA 链内部化学修饰的报道较少, 大多数修饰是针对靠近 siRNA 3' 或 5' 端的核苷酸, 如硫代和甲基化, 以增强对细胞内核酸酶的抵抗能力或改变其碱基配对的热力学稳定性。由于化学修饰种类多, 可修饰的位点和效果不明确, 加上合成成本高昂, 目前主要由少数大型制药和生物技术公司在进行研发。经过化学修饰的单链 siRNA 可在动物体内介导 RNAi, 该方法消除了 passenger 链造成的脱靶效应^[47-48]。然而, 由于单链 siRNA 并非 Ago2 识别的天然底物, 其结合 Ago 并进入 RISC 复合物的效率较低, 部分转入细胞的单链 siRNA 很可能直接通过部分碱基互补配对与细胞内 RNA 结合, 以反义寡核苷酸 (antisense oligo) 的方式影响某些 RNA 的功能, 其引发的副作用有待继续研究观察。

优化 siRNA 表达载体的设计是提高 RNAi 效率和降低副作用的有效方法。例如, 在设计 shRNA 载体时, 将位于 3' 链上的成熟 siRNA 序列与顶端环之间的距离固定为两个碱基, 可大幅提高 Dicer

加工 shRNA 的精确度, 产生的 siRNA 具有更准确的 5' 末端, 从而避免了由于生成的 siRNA 序列的异质性所带来的脱靶效应^[49]。近期, 一类短双链区的新型 RNAi 载体 (sshRNA、AgoshRNA 或 saiRNA) 受到广泛关注^[50-52]。相较传统含 21~25 bp 双链区的 shRNA, 新型 RNAi 载体双链区长度仅为 16~18 bp, 顶端环大小为 3~8 nt, 且顶端环越小其对靶基因的抑制效率越高^[52]。这类短茎环结构的新型 siRNA 前体在细胞内由 Pol III 启动子转录并出核后, 不经过 Drosha 和 Dicer 的加工, 直接被 Ago2 蛋白识别并在茎环结构 3' 链上第 8~9 位碱基处切割, 切割产物的 3' 端在细胞内被外切核酸酶进一步切短, 最终形成长度为 24~27 nt 的单链 siRNA, 明显长于经典的 21 nt 的 siRNA, 但同样能以 RNAi 的方式沉默靶基因 (图 1)。这种依赖于 Ago2 的加工途径类似于在斑马鱼和哺乳动物中保守的一种特殊 miRNA 前体——pre-miR-451 的加工步骤^[53-55]。进一步在 saiRNA (single-stranded Ago2-processed interfering RNA) 的 3' 末端连接经过改造的丁型肝炎病毒 (hepatitis delta virus, HDV) 核酶 (ribozyme), 利用该核酶的高效自切割活性准确地在 saiRNA 的 3' 端产生两个碱基悬垂, 明显促进了其与 Ago2 的结合, 显著提高了基因沉默的效率^[52]。有趣的是, saiRNA 所产生的 siRNA 量远低于传统的 shRNA, 但对靶基因却有同样甚至更高的抑制效率, 即单位分子的 siRNA 对靶基因的沉默效率更高。而 saiRNA 依赖于 Ago2 内切酶活性的特殊加工方式避免了成熟的 siRNA 进入无切割活性的 Ago1、Ago3 和 Ago4 所引起的脱靶效应, 同时也大幅降低了对细胞内源 miRNA 的竞争作用^[52,56-57]。另外, saiRNA 中的 passenger 链在加工过程中被 Ago2 切断并降解, 完全消除了该链带来的脱靶效应 (图 1), 进一步减少了副作用。

siRNA 和 shRNA 序列的选择规则也有极大的提升空间。未经优选的 shRNA 对靶基因的抑制效率较低, 通常需设计 3~5 条 shRNA 以保证其中 1~2 条能对靶基因达到 70% 以上的沉默效率^[58-59], 要获得沉默效率超过 90% 的 shRNA 则必须进行大量的筛选。Gregory Hannon 实验室建立了基于高通量克隆和深度测序的筛选系统, 证实“超级”shRNAmir 存在的比例仅为几百分之一, 每个细胞的基因组中只需整合一个拷贝的“超级”shRNAmir 即能实现对靶基因高达 90% 以上的抑制效率^[59]。然而, 目前除了一些基本的设计规则, 尚无有效的通用算法



shRNA被细胞内的Dicer识别加工后产生双链siRNA，其guide链(guide strand)和passenger链(passenger strand)都能被细胞内的Ago1~4所结合，但只有Ago2才能介导与guide链完全互补配对的靶基因RNA的切割和沉默作用(on-target)，而与guide链结合的Ago1、3、4，以及与passenger链结合的Ago1~4都会引起脱靶效应(off-target)。saiRNA可直接被Ago2识别并加工，其特殊的加工过程避免了产生passenger链及其脱靶效应，而且只有与Ago2结合的saiRNA才能产生guide链发挥on-target效应，从而大大减少了其他Ago引起的off-target效应。saiRNA转录后通常具有较长的3'端悬垂，不能被Ago2直接识别。通过在saiRNA的3'末端融合一个自切割J型肝炎病毒(HDV)核酶，精确产生具有2个碱基的3'端悬垂，大大促进了saiRNA与Ago2的结合效率，从而显著提高了saiRNA的沉默效率。

图1 shRNA和saiRNA加工及作用机制示意图

能预测 siRNA 和 shRNA 的效率，逐个构建克隆和测试的“try and error”方法显然难以在短时间获得全面的信息。因此，未来需要以结构生物学为指导，结合高通量筛选方法，通过生物信息学分析和机器学习总结规律，实现 siRNA 和 shRNA 的理性设计。另外，其他类型小 RNA 加工机制的研究成果可用来启发新型 RNAi 载体的设计，如细胞内存在大小类似于 pre-miRNA 的内含子，在被剪接复合体剪切下来后跳过了 Drosha 加工的步骤，直接被 Dicer 识别并加工生成成熟的 miRNA，称为 mirtron^[60-61]。因此，随着对各种小 RNA 加工和沉默机制的深入研究，对 siRNA 序列设计规则的经验积累，以及各类新型病毒载体的不断创新，RNAi 载体将越来越安全和高效。

6 总结及展望

近几年 CRISPR 和 TALEN 等基因组编辑技术

的出现使得复杂费时的基因敲除变得简单易行^[62-65]，在基因功能的研究中得到广泛应用，难免使人对 RNAi 技术的未来发展产生困惑。我们认为 CRISPR 和 RNAi 各有所长，今后将会长期共存，在各自擅长的领域发挥重要作用。CRISPR 技术的优势是能永久性地改变基因组 DNA 的序列，但在基因沉默方面 RNAi 技术有其独特的优势。(1) RNAi 无需引入额外的蛋白质因子，更安全，成本更低。RNAi 依赖细胞内源的 RISC 发挥作用，除 siRNA 外无需引入其他因子。而 CRISPR 需同时转入 Cas9 蛋白和 sgRNA，这不仅增加了投递技术的难度，Cas9 还可能引发人体的免疫反应和其他意想不到的副作用。(2) RNAi 是一种转录后水平的可逆的基因沉默技术，只需通过 siRNA 的添加与否，或使用小分子化合物调控 siRNA 表达载体上诱导型启动子的活性就能实现对靶基因的沉默与开启。CRISPR 对基因的关闭作用是不可逆的，并且同样存在脱靶效应^[66-68]，

但由于 CRISPR 改变的是 DNA 序列, 这种不可逆的脱靶效应所导致的后果可能更严重。虽然 CRISPRa 或 CRISPRi 技术能够实现可逆的基因表达操作, 但需引入额外的转录调控因子, 由此导致的副作用尚有待进一步研究。(3) RNAi 沉默基因见效更快。在细胞水平上 RNAi 沉默基因的效果只需 2~3 天就能显现, 而 CRISPR 通常需要 5~7 天, 有时还需进行单克隆细胞的筛选和扩增, 对研究细胞生长或生存必需基因的功能造成一定困难。此外, 很多人类疾病源于基因表达水平的变化, 而非基因的丢失或关闭, RNAi 是更为适合的研究手段。(4) RNAi 在转录后水平调节基因的表达, 故设计 siRNA 时只需参考转录组数据。CRISPR 在基因组和转录水平调节基因表达, 设计 sgRNA 以及预测脱靶效应时需参考基因组数据, 但现有基因组序列的很多区域注释不完善, 且沉默效果受到染色体高级结构的影响。因此, 研究人员在选择应用基因沉默技术时应针对上述特点加以考量^[69]。

RNAi 技术在动植物中都具有广泛的应用前景。例如, RNAi 可用于防治植物病虫害。在植物中转入针对特定种类有害昆虫的生长必需基因的 RNAi 载体, 当害虫摄取植物茎叶时同时摄入了 siRNA, 从而特异地抑制害虫生长相关基因的表达^[70]。在植物中表达 siRNA 也可以直接用于调控作物本身抗逆和产量等农艺性状相关基因的表达, 从而大幅提高农作物的产量和品质。在人类疾病治疗方面, 越来越多的生物技术和制药公司加入了对 RNAi 药物的研发, 包括针对呼吸道合胞体病毒感染 (respiratory syncytial virus infection)、湿性年龄相关性黄斑变性病症 (wet age-related macular degeneration) 和乙型肝炎 (hepatitis B) 等在内的几十种疾病的 siRNA 治疗药物已经分别进入一到三期临床试验^[71]。2014 年以来, 国际大型制药企业对 RNAi 生物技术公司的并购活动日益活跃, 如罗氏制药公司 (Roche) 以 4.5 亿美元收购丹麦的 RNAi 专业研究公司 Santaris, 重启 RNAi 药物研究; 赛诺菲公司投资 7 亿美元收购 Ainylam 公司约 12% 的股份以支持其在 RNAi 领域的研究。预期未来 3~5 年内基于 RNAi 技术的新药或新疗法就可能上市, 引领继抗体药物之后的新一轮药物创新热潮。总之, 通过提高 RNAi 载体的效率, 降低其毒副作用, 以及改进投递方法, RNAi 技术必将在今后的科学研究和疾病治疗中继续大放异彩。

[参 考 文 献]

- [1] Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806-11
- [2] Moh SE, Smith JA, Shamu CE, et al. RNAi screening comes of age: improved techniques and complementary approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 591-600
- [3] Houssecker D, Kay MA. RNA interference. *Drugging RNAi*. *Science*, 2015, 347: 1069-70
- [4] Pecot CV, Calin GA, Coleman RL, et al. RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 59-67
- [5] Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 2003, 115: 209-16
- [6] Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 2003, 115: 199-208
- [7] Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 2004, 431: 343-9
- [8] Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 2009, 457: 396-404
- [9] Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 2009, 457: 405-12
- [10] Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet*, 2013, 14: 447-59
- [11] Frank F, Sonenberg N, Nagar B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature*, 2010, 465: 818-22
- [12] Schirle NT, MacRae IJ. The crystal structure of human Argonaute2. *Science*, 2012, 336: 1037-40
- [13] Liu J, Carmell MA, Rivas FV, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 2004, 305: 1437-41
- [14] Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, et al. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 2004, 15: 185-97
- [15] Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 2005, 436: 740-4
- [16] Paddison PJ, Hannon GJ. RNA interference: the new somatic cell genetics? *Cancer Cell*, 2002, 2: 17-23
- [17] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411: 494-8
- [18] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Gene Dev*, 2001, 15: 188-200
- [19] Behlke MA. Chemical modification of siRNAs for *in vivo* use. *Oligonucleotides*, 2008, 18: 305-19
- [20] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, 296: 550-3
- [21] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in

- mammalian cells. *Gene Dev*, 2002, 16: 948-58
- [22] Li CX, Parker A, Menocal E, et al. Delivery of RNA interference. *Cell Cycle*, 2006, 5: 2103-9
- [23] Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 2009, 19: 92-105
- [24] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 509-24
- [25] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136: 215-33
- [26] Wu L, Belasco JG. Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 2008, 29: 1-7
- [27] Dickins RA, Hemann MT, Zilfou JT, et al. Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. *Nat Genet*, 2005, 37: 1289-95
- [28] Stegmeier F, Hu G, Rickles RJ, et al. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 13212-7
- [29] Premssirirut PK, Dow LE, Kim SY, et al. A rapid and scalable system for studying gene function in mice using conditional RNA interference. *Cell*, 2011, 145: 145-58
- [30] Wang X, Chen X, Yang Y. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nat Methods*, 2012, 9: 266-9
- [31] Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 635-7
- [32] Wu LG, Fan JH, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 4034-9
- [33] Wu LG, Fan JH, Belasco JG. Importance of translation and nonnucleolytic ago proteins for on-target RNA interference. *Curr Biol*, 2008, 18: 1327-32
- [34] Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, et al. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods*, 2006, 3: 199-204
- [35] McBride JL, Boudreau RL, Harper SQ, et al. Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 5868-73
- [36] Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 2005, 309: 1559-63
- [37] He YP, Vogelstein B, Velculescu VE, et al. The antisense transcriptomes of human cells. *Science*, 2008, 322: 1855-7
- [38] Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, et al. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science*, 2005, 309: 1564-6
- [39] Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, et al. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of β -secretase. *Nat Med*, 2008, 14: 723-30
- [40] Modarresi F, Faghihi MA, Lopez-Toledano MA, et al. Inhibition of natural antisense transcripts *in vivo* results in gene-specific transcriptional upregulation. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 453-9
- [41] Yap KL, Li SD, Munoz-Cabello AM, et al. Molecular interplay of the noncoding RNA *ANRIL* and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of *INK4a*. *Mol Cell*, 2010, 38: 662-74
- [42] Yu WQ, Gius D, Onyango P, et al. Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature*, 2008, 451: 202-6
- [43] Khan AA, Betel D, Miller ML, et al. Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol*, 2009, 27: 549-55
- [44] Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, 2006, 441: 537-41
- [45] Grimm D, Wang L, Lee JS, et al. Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver. *J Clin Invest*, 2010, 120: 3106-19
- [46] Behlke MA. Chemical modification of siRNAs for *in vivo* use. *Oligonucleotides*, 2008, 18: 305-19
- [47] Lima WF, Prakash TP, Murray HM, et al. Single-stranded siRNAs activate RNAi in animals. *Cell*, 2012, 150: 883-94
- [48] Yu DB, Pendergraff H, Liu J, et al. Single-stranded RNAs use RNAi to potently and allele-selectively inhibit mutant huntingtin expression. *Cell*, 2012, 150: 895-908
- [49] Gu S, Jin L, Zhang Y, et al. The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing *in vivo*. *Cell*, 2012, 151: 900-11
- [50] Ge Q, Ilves H, Dallas A, et al. Minimal-length short hairpin RNAs: the relationship of structure and RNAi activity. *RNA*, 2010, 16: 106-17
- [51] Liu YP, Schopman NC, Berkhout B. Dicer-independent processing of short hairpin RNAs. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 3723-33
- [52] Shang R, Zhang F, Xu B, et al. Ribozyme-enhanced single-stranded Ago2-processed interfering RNA triggers efficient gene silencing with fewer off-target effects. *Nat Commun*, 2015, 6: 8430
- [53] Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, et al. A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, 2010, 465: 584-9
- [54] Cifuentes D, Xue HL, Taylor DW, et al. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science*, 2010, 328: 1694-8
- [55] Yang JS, Maurin T, Robine N, et al. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 15163-8
- [56] Dueck A, Ziegler C, Eichner A, et al. microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 9850-62
- [57] Ma HM, Zhang JL, Wu HQ. Designing Ago2-specific siRNA/shRNA to avoid competition with endogenous miRNAs. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3: e176
- [58] Buchholz F, Kittler R, Slabicki M, et al. Enzymatically prepared RNAi libraries. *Nat Methods*, 2006, 3: 696-700

- [59] Fellmann C, Zuber J, McJunkin K, et al. Functional identification of optimized RNAi triggers using a massively parallel sensor assay. *Mol Cell*, 2011, 41: 733-46
- [60] Okamura K, Hagen JW, Duan H, et al. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 2007, 130: 89-100
- [61] Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 2007, 448: 83-6
- [62] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819-23
- [63] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346: 1258096
- [64] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 143-8
- [65] Morbitzer R, Romer P, Boch J, et al. Regulation of selected genome loci using *de novo*-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 21617-22
- [66] Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 822-6
- [67] Kucsu C, Arslan S, Singh R, et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 677-83
- [68] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 839-43
- [69] Boettcher M, McManus MT. Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol Cell*, 2015, 58: 575-85
- [70] Mao YB, Cai WJ, Wang JW, et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 1307-13
- [71] Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 541-55