

综述

RNA 干扰在抗病毒研究中的应用

陈芸 朱作言

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

APPLICATION OF RNA INTERFERENCE (RNAI) IN VIRUS RESISTANCE

CHEN Yun and ZHU Zuo-Yan

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072)

关键词: RNA 干扰(RNAi); 小干扰 RNA(siRNA); 抑制; 靶基因; 病毒

Key words: RNAi; siRNA; Suppression; Target gene; Virus

中图分类号: Q075 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2006)03-0356-04

内源性或外源性的双链 RNA(Double-stranded RNA, dsRNA)在细胞内使其同源 mRNA 降解和基因沉默, 这种转录后基因沉默(Posttranscriptional gene silencing, PTGS)的现象称为 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)。这是植物^[1]和线虫^[2]中自然存在的一种古老的抗病毒免疫防御机制。在植物中, 长 dsRNA 前体被 Dicer 核酸酶切割成小干扰 RNA(Small interfering RNA, siRNA)而导致基因沉默^[3]。但在哺乳细胞内没有 Dicer 酶, 并且长于 30 个碱基的 dsRNA 会激活干扰素途径而导致非特异性基因沉默^[4,5]。

因此, 研究者们模仿 Dicer 酶切割长 dsRNAs 的产物而设计合成 siRNA。这些化学合成的 siRNA 一般长 19—23 个碱基, 在 3' 端有两个碱基突出, 将其转染到培养细胞中, 结果高效特异地抑制了靶基因的表达而未出现非特异性基因沉默^[5]。大量实验证实, 由 siRNA 介导的 RNAi 技术在哺乳类细胞中可以防止病毒入侵、抑制病毒复制、减少病毒 RNA 的数量、阻断病毒蛋白的表达、切断病毒的发病途径。因此, RNAi 作为一种基因治疗的新途径受到研究者的高度重视。本文就近几年来 RNAi 在抗病毒防御方面的研究做一个总体的概括, 为 RNAi 应用于鱼类抗病毒研究提供参考。

1 RNAi 作用机制

目前认为, 当 siRNA 进入细胞后与一些蛋白结合形成

RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)。siRNA 在 RISC 上解旋酶作用下解链, 其中反义链指导 RISC 与同源 mRNA 链结合。随后 RISC 上的内切酶在同源 mRNA 上距离 siRNA 3' 端 12 个碱基的位置切割 mRNA, 使其降解。新形成的 siRNA 重新参与新一轮循环, 将反应扩大^[3]。

2 siRNA 的设计、转移和 siRNA 表达载体

2.1 siRNA 设计规则

siRNAs 序列高度特异, 必须与同源 mRNA 完全配对^[6]。因此, 其与靶 mRNA 之间的结合能力对 RNAi 作用效果至关重要。基于此, siRNA 的设计需遵循一些规则: (1)一般正义链 5' 端用 G·C 碱基对; 反义链 5' 端用 A·T 碱基对; (2)G-C 串边碱基不要超过 9 个, GC 含量为 30%—50%, 避免 4 个 T 或 A 碱基的连续序列; (3)避免选择起始密码下游 50—100 个碱基、终止密码上游 100 个碱基以及 5' 和 3' 的非编码区域; (4)检查设计序列的特异性, 排除那些和其他编码序列/EST 同源的序列^[7]。但 siRNAs 在细胞中的作用时间不超过一个星期^[8], 所以需构建表达载体而持续稳定表达 siRNAs。

2.2 siRNA 表达载体

用 RNA 聚合酶 III 启动子表达载体在哺乳类细胞内可以持续转录出 siRNA^[9-13], 比如 H1 和 U6 RNA 聚合酶 III 启动子和 5 个 T 碱基终止子形成的转录表达框, 可转录成 siRNA 或

收稿日期: 2005-10-20; 修订日期: 2005-12-30

基金项目: 国家自然科学基金海外杰出青年基金(30428024)资助

作者简介: 陈芸(1978—), 女, 湖北大冶市人, 博士, 主要从事鱼类发育和分子遗传学研究, 目前工作于集美大学水产学院, E-mail: chenyun-hb@yahoo.com.cn

通讯作者: 朱作言, E-mail: zy-zhu@ihb.ac.cn

者 shRNA (short hairpin RNA, 发卡状小干扰 RNA), 使靶基因沉默。

2.3 siRNA 的转移

siRNA 不能通过细胞膜。在体外培养细胞实验中, 可以用电转导或阳离子脂质体转染^[14]。在体内实验中, siRNA 或其表达载体可通过电转导入鸡胚神经管^[15]、通过液体动力注射导入鼠的尾部静脉^[16]、通过注射到鼻内^[17]和皮下^[18]等方法导入体内, 并成功介导 RNAi 使靶基因沉默。

3 RNAi 的抗病毒作用

3.1 siRNA 靶向 RNA 病毒基因组

病毒基因组的大部分基因都可以作为 RNAi 靶位点, 不管是正链或负链 RNA 基因组病毒还是 DNA 病毒, RNAi 都是一种非常有力的调节病毒基因表达的工具。

正链 RNA 病毒的基因组更是 siRNA 作用的绝佳靶位, 因为它们的基因组既是 mRNA 又是复制模板。Gitlin 等^[19]设计靶向脊髓灰质炎病毒 (poliovirus, PV) 外壳蛋白和 3D RNA 聚合酶的 siRNAs, 结果病毒的一步生长曲线可降低 100 倍。转染后不久, siRNAs 即开始抑制病毒的增殖, 并且特异性的剪切降解病毒 RNA。

另外, 像甲肝病毒^[20]、丙肝病毒^[21]、登革热病毒^[22]、SARS 病毒^[23]等正链病毒的 siRNAs 在转染细胞中可以阻断被感染细胞产生细胞病变, 并且阻断病毒 RNA 和蛋白的合成, 减少病毒粒子的产生。

引起艾滋病的 HIV-1 (Human immunodeficiency virus type 1) 为单链 RNA 病毒, 可逆转录成 DNA 并整合到宿主染色体。Nishitsuji 等^[12]用慢病毒载体构建 shRNA 表达系统直接靶向 HIV-1 基因组, 在 293 细胞中以病毒感染复数 MOI=10 的单轮感染中, 病毒基因组减少了 90%; 并且这些 shRNAs 表达细胞至少可以再抵抗 4 次感染, 这种抗病毒活性在培养细胞中可以持续 35d。而在多轮感染中, 慢病毒载体表达的 shRNA 至少在一个星期内都可以抑制 HIV-1 复制。

在负链病毒如流感病毒 (Influenza viruses)^[24], DNA 病毒如乙肝病毒 (Hepatitis B virus, HBV)^[25-26]等研究中, 针对基因组的 siRNA 都可以有效抑制病毒 RNA 的水平, 并且在体内体外都可发挥高效特异的抗病毒作用。

虹彩病毒 (Iridoviridae) 为双链 DNA 病毒^[27]。近年来, 由虹彩病毒引起的爬行动物、两栖动物和鱼类疾病已在美洲、欧洲、亚洲和澳洲等地普遍流行。谢俊锋^[28]等针对蛙虹彩病毒主要外壳蛋白基因 (*mcp*) 设计 siRNA, 在肥头鲤肌肉细胞系中这些 siRNA 有效的抑制了病毒的复制; 明显降低了 *mcp* 基因 mRNA 水平; 并延长了细胞病变出现的时间; 降低了细胞中病毒的滴度。因此, RNAi 作为一种基因治疗的手段也将可能应用于水生生物的病毒防治。

3.2 siRNAs 靶向参与病毒增殖的细胞因子

第一个参与病毒增殖的细胞因子就是与病毒的结合和入侵有关的受体, 缺乏受体则病毒周期的后续步骤都无法进行下去, 因此也是 siRNA 作用的良好选择。

由于 HIV-1 主要是侵犯和破坏 CD4+T 淋巴细胞, 也能感染单核巨噬细胞、B 细胞、小神经胶质细胞、骨髓干细胞等, 因此 RNAi 抗 HIV-1 病毒研究主要集中在抑制调控基因和细胞因子上。大量报道显示调节某些基因表达如 gag, pol, tat, vif, nef 和 rev 可以降低 HIV-1 的传染能力^[14, 29-33]。但 HIV-1 的高突变率使得病毒突变体可以逃避 siRNA 对病毒基因的抑制^[35-37]。因此, 对支持 HIV-1 生活周期的细胞因子进行 RNAi 介导的基因敲除提供了另外一种可供选择的途径。实际上, 细胞因子, 比如 CD4, CXCR4, CCR5, NF- κ B, P-TEFb, Cyclophilin A, DC-SIGN, SPT-5 和 PARP-1 已经被成功的抑制, 结果抑制了 HIV-1 的复制和感染^[14, 30, 31, 37-38]。然而, 对这些因子的下游调节会不会导致细胞的程序化死亡? Sayah 等^[39]通过在 293T、HeLa 和 U373-MAG-CR2 细胞内对人细胞周期蛋白 T1 的 RNAi 研究证实, T1 蛋白的下游调节可以有效的抑制 HIV-1 病毒的复制, 但不会引起细胞的程序化死亡, 并且 HIV-1 的复制水平与 T1 的量相关。T1 蛋白是 HIV-1 病毒前体的长末端重复序列启动子转录 mRNA 和基因组 RNA 时必须的细胞因子。这也进一步说明了靶向细胞因子 T1 的 shRNAs 可以有效的进行 HIV-1 的基因治疗。

4 RNAi 的发展趋势

RNAi 作为天然存在的抗病毒免疫反应已经在哺乳动物细胞中被证实, 它可以减少病毒 RNA 的数量、阻断病毒蛋白的表达、抑制病毒的复制、切断病毒的感染途径, 从而达到预防和治疗病毒感染的目的。但是目前仍然有一些问题需要解决: (1) 怎样将适量的特异性 siRNAs 及时地输送到靶组织。(2) 如何防止病毒突变体的逃逸。当用单一的特异性 siRNA 和高剂量病毒感染细胞时, 会有病毒突变体的出现^[19, 34, 35], 这是用 RNAi 进行基因治疗所面临的最大问题^[40]。(3) 如何避免位置效应。RNA 病毒基因组中有许多非翻译区高度结构化, 抑制了 RNAi 的作用; 并且有一些位置上的 siRNA 不但没有抑制甚至增强了基因的表达; 而有些 siRNA 靶向错误的基因位点^[6, 41, 42]。不过, 研究者们针对每一种基因不同位点设计多个 siRNA, 筛选出抑制效果最好的 siRNA, 可以从很大程度上避免位置效应。另外, 用多重 siRNA 靶向病毒基因组相对保守的不同基因位点, 可以减少突变体的逃逸^[41, 42]。

siRNA 介导的 RNAi 技术既可以靶向病毒基因组又可以靶向细胞基因, 因此对于目前没有疫苗、没有有效的药物、没有适合的治疗手段的水生生物病毒性疾病治疗非常有发展性。

近年来, 水产养殖业快速发展, 由水产养殖所提供的鱼虾贝等食品数量逐年增加。但相应地水生动物疾病, 尤其是因病毒引起的爆发性流行病明显增加, 为水产养殖造成巨大的经济损失。病毒病已成为制约水产养殖业发展的重要因素。在水生动物中, 目前对于病毒性疾病目前尚无特效药, 疫苗的制备也还不成熟; 而通过筛选或基因工程培养抗病毒新品种, 是很有希望并能从根本上进行病毒防治的途径。转基因鱼为鱼类病毒抗原基因转移提供了理论和技术依据^[43], 而用病毒特异性 siRNAs 在水生动物中进行疾病预防

是可行有效的。因此利用 siRNA 介导的 RNAi 手段, 结合转基因技术, 将有望成为一种研究水生动物病毒致病机理及其防治方法的新途径。

参考文献:

- [1] Matzke M A, Priming M, Timovsky J, *et al*. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants[J]. *EMBO J*. 1989, **8**: 643—649
- [2] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al*. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*. 1998, **391**: 806—811
- [3] Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A, *et al*. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals[J]. *Cell*. 2001, **101**: 25—33
- [4] Stark G R, Kerr I M, Williams B R, *et al*. How cells respond to interferons[J]. *Annu. Rev. Biochem.* 1998, **67**: 227—264
- [5] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al*. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*. 2001, **411**: 494—498
- [6] Saxena S, Jonsson Z O, Dutta A. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells [J]. *J. Biol. Chem.* 2003, **278**: 44312—44319
- [7] Schwarz D S, Hutvagner G, Du T, *et al*. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex[J]. *Cell*, 2003, **115**: 199—208
- [8] Tuschl T. Expanding small RNA interference[J]. *Nat. Biotechnol.* 2002, **20**: 446—448
- [9] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. *Science*. 2002, **296**: 550—553
- [10] Lee N S. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells[J]. *Nat. Biotechnol.* 2002, **20**: 500—505
- [11] Rubinson D A, Dillon C P, Kwiakowski A V, *et al*. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference[J]. *Nat. Genet.* 2003, **33**: 401—406
- [12] Nishitsuji H, Ikeda T, Miyoshi H, *et al*. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells [J]. *Microbes Infect.* 2004, **6**: 76—85
- [13] Pinkenburg O, Platz J, Beisswenger C, *et al*. Inhibition of NF-kappaB mediated inflammation by siRNA expressed by recombinant adeno-associated virus[J]. *J. Virol. Methods*. 2004, **120**: 119—122
- [14] Han S, Mahato R I, Sung Y K, *et al*. Development of biomaterials for gene therapy[J]. *Mol. Ther.* 2000, **2**: 302—317
- [15] Hu W Y, Myers C R, Kilzer J M, *et al*. Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference[J]. *Curr. Biol.* 2002, **12**: 1301—1311
- [16] Lewis D L, Hagstrom J E, Loomis A G, *et al*. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice[J]. *Nat. Genet.* 2002, **32**: 107—108
- [17] Tompkins S M, Lo C Y, Tumpey T M, *et al*. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004, **101**: 8682—8686
- [18] Chen W, Yan W, Du Q, *et al*. RNA interference targeting VP1 inhibits foot-and-mouth disease virus replication in BHK-21 cells and suckling mice[J]. *J. Virol.* 2004, **78**: 6900—6907
- [19] Gitlin L, Karelsky S and Andion R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells *Nature*. 2002, **418**: 430—434
- [20] Kanda T, Kusov Y, Yokosuka O, *et al*. Interference of hepatitis A virus replication by small interfering RNAs[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, **318**: 341—345
- [21] McCaffrey A P, Meuse L, Pham T T T, *et al*. RNA interference in adult mice[J]. *Nature*. 2002, **418**: 38—39
- [22] Zhang W, Singam R, Hellemann G, *et al*. Attenuation of dengue virus infection by adeno-associated virus-mediated siRNA delivery[J]. *Genet. Vaccines Ther.* 2004, **2**: 8
- [23] Wang Z, Ren L, Zhao X, *et al*. Inhibition of severe acute respiratory syndrome virus replication by small interfering RNAs in mammalian cells[J]. *J. Virol.* 2004, **78**: 7523—7527
- [24] Ge Q, Filip L, Bai A, *et al*. Inhibition of influenza virus production in virus infected mice by RNA interference[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004, **101**: 8676—8681
- [25] Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, *et al*. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice[J]. *Mol. Ther.* 2003, **8**: 769—776
- [26] Konishi M, Wu C H, Wu G Y. Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV-producing cell line[J]. *Hepatology*. 2003, **38**: 842—850
- [27] Zhang Q Y. A review of viral diseases of aquatic animal in chin[J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, 2002, **26**(1): 89—101[张奇亚. 我国水生动物病毒病研究概况. 水生生物学报, 2002, **26**(1): 89—101]
- [28] Xie J F, Lu F, Deng M, *et al*. Inhibition of reporter gene and Iridovirus-tiger frog virus in fish cell by RNA interference[J]. *Virology*, 2005, **338**(1): 43—52
- [29] McCaffrey A P, Nakai H, Pandey K, *et al*. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference[J]. *Nat. Biotechnol.* 2003, **21**: 639—644
- [30] Novina C D, Murray M F, Dykxhoorn D M, *et al*. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection[J]. *Nat. Med.* 2002, **8**: 681—686
- [31] Park W S, Hayafune M, Miyano-Kurosaki N, *et al*. Specific HIV-1 env gene silencing by small interfering RNAs in human peripheral blood mononuclear cells[J]. *Gene Ther.* 2003, **10**: 2046—2050
- [32] Park W S, Miyano-Kurosaki N, Hayafune M, *et al*. Prevention of HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells by specific RNA interference[J]. *Nucleic Acids Res.* 2002, **30**: 4830—4835
- [33] Boden D, Pusch O, Lee F, *et al*. Efficient Gene Transfer of HIV-1-Specific Short Hairpin RNA into Human Lymphocytic Cells Using Recombinant Adeno-associated Virus Vectors[J]. *Molecular Therapy*, 2004, **9**(3): 396—402
- [34] Boden D, Pusch O, Lee F, *et al*. Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference[J]. *J. Virol.* 2003, **77**:

11531—11535

[35] Das A T, Brummelkamp T R, Westerhout E M, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition[J]. *J. Virol.* 2004, **78**: 2601—2605

[36] Westerhout E M, Ooms M, Vink M, *et al.* HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome[J]. *Nucleic Acids Res.* 2005, **33**: 796—804

[37] Anderson J, Banerjee A, Akkina R. Bispecific short hairpin siRNA constructs targeted to CD4, CXCR4, and CCR5 confer HIV-1 resistance[J]. *Oligonucleotides.* 2003, **13**: 303—312

[38] Kameoka M, Nukuzuma S, Itaya A, *et al.* RNA interference directed against Poly (ADP-Ribose) polymerase 1 efficiently suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in human cells[J]. *J. Virol.* 2004, **78**: 8931—8934

[39] Sayah D M, Sokolskaja E, Berthoux L, *et al.* Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1 [J]. *Nature.* 2004, **430**: 569—573

[40] Florence C G, Bruno B, Aure S, *et al.* Silencing viruses by RNA interference[J]. *Microbes and Infection.* 2005, **7**(4): 767—775

[41] Jackson A L, Bartz S R, Schelter J, *et al.* Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi[J]. *Nat. Biotechnol.* 2003, **21**: 635—637

[42] Kawasaki H, Suyama E, Iyo M, *et al.* siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells[J]. *Nucleic Acids Res.* 2003, **31**: 981—987

[43] Wei Y Z, Xie Y F, Li G H, *et al.* the status quo and prospect of fish gene engineering researches[J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, 1992, **16**(1): 71—78[魏彦章, 谢岳峰, 李国华, 等. 鱼类基因工程研究的现状和展望. 水生生物学报, 1992, **16**(1): 71—78]