

RNA 干扰(RNAi)及其在抑制 HIV-1 感染中的应用 RNA Interference and its Application in Inhibiting HIV-1 Infection

魏 玲^{1,2}, 刘 萱¹, 曹 诚^{1*}

WEI Ling^{1,2}, LIU Xuan¹ and CAO Cheng^{1*}

1. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049

1. Beijing Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

摘 要 RNA 干扰(RNA interfering, RNAi)现象是生物界近 10 年来最令人兴奋的发现,它是动植物抵抗外来病毒感染、抑制病毒复制的一种重要细胞保护机制。RNAi 现象是一种序列特异性的、转录后基因沉默(post-transcriptional gene-silencing, PTGS)的过程,启动这个过程的双链(double-stranded, ds)RNA 与被沉默基因在序列上是同源的,并在多种有机体中成为沉默基因表达的有力工具。近来已有实验证明 21~25 个核苷酸的双链 siRNA 可以转染相关的细胞并抑制特异的 RNA。在哺乳动物细胞中,30bp 或更长的双链 RNA 可以导致干扰素效应,从而引发细胞内非特异反应,这也限制了 RNAi 作为实验手段和治疗工具的应用。然而,19~25 个核苷酸长短且 3' 端有突出碱基的双链 siRNA(small interfering RNA),在培养的哺乳动物细胞内可以以序列特异性的方式,有效地抑制基因表达。人们可以利用这种方法来抑制 HIV-1 对人类细胞的感染。体外实验表明, RNAi 作为一种抗病毒的有力武器,将给病毒性疾病的基因治疗带来新的希望。

关键词 RNA 干扰, 基因沉默, 小干扰 RNA

中图分类号 Q522 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0516-04

Abstract RNA interfering (RNAi)—one of the most exciting discoveries in biology in the last couple decades has quickly become one of the most powerful and indispensable tools in the molecular biologist's toolkit. It is an important protection mechanism in cells, by which animals and plants defend viral infection and inhibit viral replication. RNAi is the process of sequence-specific, posttranscriptional gene silencing in animals and plants initiated by dsRNA that is homologous to the silenced gene and has emerged as a powerful tool to silence gene expression in multiple organisms. It has recently been shown that double-stranded, small interfering RNAs (siRNAs) of 21~25 nucleotides can be transfected into relevant cells to target specific RNAs. In mammalian cells it is known that dsRNA 30 base pairs or longer can trigger interferon responses that are intrinsically sequence-nonspecific, thus limiting the application of RNAi as an experimental and therapeutic agent. Duplexes of 19~25nts (nucleotides) siRNA with short 3' overhangs, however, can efficiently inhibit gene expression in a sequence-specific manner in cultured mammalian cells. This approach was utilized to inhibit human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in human cells. The in vitro experiments indicate that RNAi as a powerful antiviral tool will bring a promising future to gene therapy for virus disease.

Key words RNA interference, gene silencing, siRNA

Received: March 3, 2005; Accepted: April 28, 2005.

This work was supported by a grant from The National Sciences Foundation of China (No.30270316)

* Corresponding author. Tel 86-10-66931810; E-mail caoc@nic.bmi.ac.cn

国家自然科学基金资助项目(No.30270316)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

RNAi现象是真核生物高度保守的分子机制,动植物利用小的双链RNA以序列特异性的方式降解目标RNA,从而控制基因表达,并保护基因组免受外源可移动基因的入侵,如转座子、病毒等^[1]。这种现象是Rich Jorgensen和同事在对矮牵牛(*Petunias*)进行研究时发现的。1998年Fire等人在线虫中也发现了这种现象^[2],后来称之为RNA干扰。在随后的几年中,RNAi现象被广泛地发现于真菌、植物和果蝇等其它各种真核生物中^[3-4]。RNA干扰现象是生物界近10年来最令人兴奋的发现。它很快成为分子生物学中最有力而且必不可少的工具。转录后基因沉默可以导致细胞和病毒的RNA降解。近来已有实验证明:21~25个核苷酸的双链siRNA可以转染相关的细胞并抑制特异的RNA。人们可以利用这种方法来抑制HIV-1对人类细胞的感染。

1 RNAi的分子生物学机制

通过实验,人们提出一种RNAi作用的简单模型,如图1所示^[3],RNAi可能的作用途径分为两种:一种是以线虫、真菌和植物为代表的RdRp(RNA-dependent RNA polymerase)依赖的RNAi途径,另一种是以果蝇和哺乳动物为代表的非RdRp依赖的RNAi途径。这两种途径都是由启动和效应阶段构成,在启动阶段,RNase III型酶(在果蝇中称为Dicer,进化上相对保守,包括两个活性区域、一个RNA解旋酶活性区域及一个PAZ活性区域)以ATP依赖的方式,逐步切割外源或内源的双链RNA,产生大量21~25个碱基的siRNA,siRNA与目的mRNA有高度的序列特异性。在RNAi效应阶段,被切割成21~25个碱基的siRNA达到有效浓度后,能够启动RNAi机制降解目标mRNA。siRNA与解旋酶、核酸酶等一起形成诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)结构并被激活,siRNA在ATP提供的能量下解链,以它的反义链作为模板识别目的mRNA,引导此复合物对其进行降解^[5-6,7],最终抑制目的基因的表达。反义的siRNA可能是通过传统的Watson-Crick碱基配对原则,与目的基因特异性结合而执行相应的功能。在线虫、真菌和植物中,siRNA的反义链结合到目的mRNA后,不仅诱导RISC对该基因进行降解,同时还激活RdRp(RNA-dependent RNA polymerase)介导的单链RNA的合成,产生大量的dsRNA,这些dsRNA再次被Dicer切割成许多siRNA,进入下一个RNAi的循环。因此,放大了siRNA引起的基因沉默作用。

RNAi技术已经成功地应用于线虫、果蝇、植物、真菌和脊椎动物等生物体功能研究中。当研究人员开始试图将RNAi技术应用于哺乳动物细胞时,虽然在大鼠的早期胚胎中证明RNAi技术是可行的,但是在其他体细胞中却发现双链RNA的导入造成了细胞中的非特异性基因沉默。探究其原因,可能是长链的dsRNA(大于30bp)通过某种途径激活了两种酶:一种是双链RNA依赖的蛋白质激酶(dsRNA-dependent protein kinase, PKR),PKR的激活导致广泛的RNA的转录抑制,同时诱导细胞的凋亡。细胞内dsRNA的出现,激活干扰素和STAT(signal transducers and activators of transcription)介导的PKR的表达,除了诱导PKR的表达外,dsRNA还直接结合到PKR分子上使它激活,引起真核细胞转

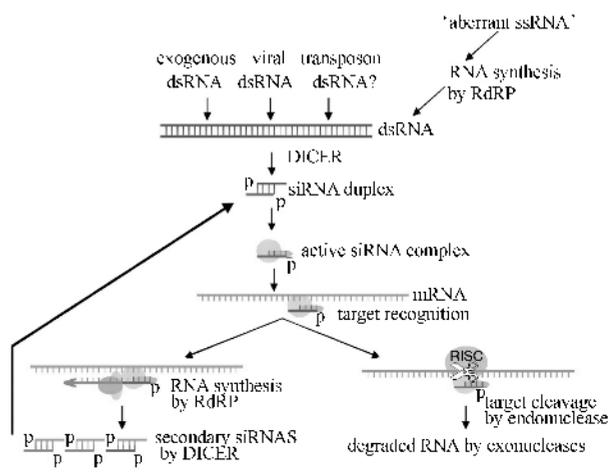


图1 RNA介导的基因沉默机制

Fig. 1 The mechanism of RNA-mediated gene silencing

录起始因子eIF2 α (initiation factor 2)磷酸化,导致广泛的基因转录封闭。另一种酶是2' 5'寡腺苷酸合成酶,其催化合成的2' 5'寡腺苷酸能够活化RNase L,RNase L可以非特异性水解mRNA^[5]。因此限制了RNAi作为试验工具和治疗手段的应用。

随着研究的深入,在2001年有报道说在哺乳动物中也存在RNAi现象,研究学者认为最有效的双链siRNA序列应该是与靶mRNA序列互补的19个核苷酸序列,外加3'端2个碱基突出构成21个碱基的双链RNA,这样的双链siRNA的反义链具有识别靶点基因序列的功能,其不仅能特异性地降解靶mRNA,导致基因沉默,而且也不会诱发干扰素效应^[8,9]。这一结果开辟了RNAi现象研究与应用的新领域。目前,RNAi机理已成为哺乳动物基因功能研究的重要方法和有效的逆向遗传学研究手段。该技术可用于新基因的筛选、基因功能鉴定以及基因治疗等方面的研究^[10,11]。RNA干扰也很快成为攻击HIV的前沿武器。目前已经报道很多例siRNA能够作用于HIV-1的自身、病毒进入人体的受体以及在已经感染的情况下抑制复制等多个环节。可见siRNA在抑制HIV感染方面的工作已广泛展开。

2 RNAi在抗HIV-1感染中的进展

人类免疫缺陷病毒1型(human immunodeficiency virus 1, HIV-1)属于逆转录病毒科慢病毒属,是正链RNA病毒。HIV-1两端基因是长末端重复区(long terminal repeat, LTR),主要结构蛋白的基因为gag、pol、env。与其它灵长类动物的逆转录病毒不同的是,HIV-1含有许多额外的调节基因,包括tat、rev、vif、vif、nef等,这些基因所表达的蛋白各有其独特的功能,如重要的调节蛋白Ne(negative factor),它具有多种功能,最重要的是降低病毒表达。Klatzmann等人最早发现了细胞表面的CD4分子是HIV的主要受体。HIV-1表面糖蛋白gp120能与CD4分子结合,通过引发胞内一系列信号传导途径,引起AIDS病人体内有选择性的CD4⁺T淋巴细胞减少^[12],机体的细胞免疫功能受到损害。RNAi技术出现后,研究发现siRNA可以作用于病毒感染的多个过程。Jacque等^[13]针对

HIV-1 复制的早期和晚期,设计针对 HIV-1 基因组不同区域的 siRNA(LTR, 辅助基因 *vif*, *nef*)并转染人类细胞系及原始淋巴细胞、CD4⁺ HeLa 细胞。结论均说明可以利用 RNAi 来调节 HIV 复制循环以及可以降解核蛋白逆转录复合物中的基因组 HIV-1RNA。Novina 等^[14]合成分别针对 HIV-1 细胞受体 CD4、病毒结构蛋白 Gag 基因的 siRNAs,发现 siRNAs 能够有效抑制 HIV-1 进入细胞、HIV-1 生活周期的整合前和整合后感染,证明 siRNAs 在治疗 HIV-1 和其它病毒感染上有相当的潜力。

H1 启动子是人类细胞中 RNA 聚合酶 用于转录 H1 RNA 的启动子,包含保守的 DSE、PSE、TATA 3 个顺式作用元件以及其它必需元件^[15]。H1 启动子转录产物没有多聚腺苷酸尾,转录终止信号由 5 个连续的胸腺嘧啶(T5)组成。转录产物在第二个尿嘧啶(U)后断裂,形成由两个 U 组成的 3' 端尾^[16]。为了能够筛选出抑制 HIV-1 基因表达的有效 siRNA,本实验室利用人 H1 启动子构建了 pBS/H1SP-siRNA 表达载体,用于在哺乳动物细胞中自主合成 19bp(base pairs)的针对 HIV-1 特异性序列的 siRNA 样转录产物。pBS/H1SP 质粒的转录产物形成由两个尿嘧啶(U)组成的 3' 端尾,并在细胞内形成 19bp 互补双链发夹结构,且包含一个 9nts 的茎环。研究表明,带有 9nt 茎环结构的 siRNA 比带有 7nts 或 5nts 茎环结构的 siRNA 具有更高的抑制效应^[17]。

本实验室通过对 HIV-1 多个序列的同源比较,选择了 HIV-1 *gag*、*env*、*nef* 基因中较保守的序列作为 siRNA 作用的靶序列。在 siRNA 实验中,为了比较由 H1 启动子转录的 siRNA 在细胞内的作用,我们使用以绿色荧光蛋白(EGFP)为报告基因的载体—pEGFP-C1 质粒,在荧光显微镜下,很容易地看到 EGFP 在细胞中表达。本实验室构建了几种 siRNA 表达载体,分别针对 HIV-1 基因组上不同位点,并分别将它们与相应的 pEGFP-HIV 共转染到 293 细胞中。结果显示,一些转染了 pHIV-siRNA 质粒的细胞比转染了对照质粒(siRNA 空载体)的细胞其 EGFP-HIV 蛋白的表达量要明显降低很多。通过这种方法,我们成功地筛选出能抑制 HIV-1 基因表达的有效 siRNA,为进一步试验奠定了基础。同时,也总结了一些 siRNA 的设计原则:

(1) 在 mRNA 的编码区内选择 21 ~ 23bp 的序列,使它的 GC 含量尽可能在 50% 左右;

(2) 在 siRNA 中尽量避免出现 GGG 的序列,GGG 的出现会影响 siRNA 的解链,间接干扰 RNAi 的作用机制;

(3) 优先选择以 AA 起始的 siRNA,这样在转录后 siRNA 的 3' 端会合成 TT 的突出端;

(4) 确保所选序列与宿主其它非相关基因没有同源性;

(5) 所选序列应高度保守,并且对病毒生长繁殖影响大。

用于基因治疗,在靶基因的选择上要考虑两个问题,一个是所选位点的相应 siRNA 效果问题,另一个是所选基因的稳定性问题。本实验室将筛选出来的有效 siRNA 串联在载体上,即针对病毒基因的多个位点进行抑制作用,为进一步用 siRNA 进行病毒感染的基因治疗提供了一个方案,当一个位点效果不显著时,可以联合几个位点使用,这样就可以得到较好的抑制效果。

3 RNAi 存在的问题及展望

RNAi 最后要成为临床治疗的有效手段,仍有很多问题需要解决:

(1) 一些 mRNA 的识别靶点因其二级结构或高度折叠而被遮盖,还有一些 mRNA 与蛋白质形成复合物而隐藏了其 siRNA 序列的识别位点。

(2) 也有研究结果表明,siRNA 的高度特异性使其与 mRNA 间单个碱基的错配都会降低基因沉默效率,会产生大量的 siRNA 逃避突变体^[15],在不同个体间,HIV-1 巨大序列多样性给高度特异性的 siRNA 的设计带来很大困难。为此,在设计靶序列时,尽量从抑制效果、序列的保守性及与人类基因组的非同源性等几个因素综合考虑。另外,选择宿主细胞膜上的受体或协同受体作为靶点也不失为一种有效的方法^[18,19]。

(3) siRNA 的稳定性问题,体外合成的 siRNA 导入细胞后易被 RNase 降解,因此理想的方法是构建能在细胞内稳定表达的载体和高效的转移系统^[20]。

近来国内有报道表明,科研人员已成功构建了以慢病毒为基础的能够转录 shRNA(short hairpin RNA)的质粒,并将它们运用于人体细胞^[21]。此系统的建立证明了利用慢病毒载体可以稳定地表达 shRNA,它既可以作为细胞基因敲除的工具,又可以作为抑制人体细胞外源侵染物(如病毒)的一种有效的方法。2004 年 Boden 等^[22]人报道,他们成功地利用 rAAV- χ recombinant adeno-associated virus 2)将 shRNA 表达单元转移到人的细胞内。rAAV-2 可以稳定地整合到寄主基因组中,从而能够长期表达 tat shRNA,与对照相比,H9 细胞和人淋巴细胞中 HIV-1 的复制得到了有效抑制。研究结果表明利用 rAAV-2 载体可以介导转移 HIV-1 特异性 shRNA 进入人类细胞,提供了利用逆转录病毒载体作为 RNAi 有效转移体系的方法。

据 2005 年的最新报道,Anderson 等^[23]人构建了慢病毒载体,此载体上整合了两种茎环结构的 siRNAs,分别针对寄主细胞表面受体 CXCR4 和 CCR5。其中 CXCR4 siRNA 利用 U6 启动子,而 CCR5 siRNA 利用 H1 启动子。在这个含双特异性 siRNA 的载体上,还包含一个由 CMV 启动表达的 EGFP 报告基因。将此慢病毒载体高效转入 Magi 和 Ghost 细胞系后,随之发生的是细胞表面这两种受体分子的数量明显下降。因此他们得出了这样的结论: CXCR4 和 CCR5 受体分子的表达可以分别被整合在同一个重组慢病毒载体上的相应的 siRNAs 所抑制,而这两种受体分子可以协助 HIV-1 感染寄主细胞,这表明了稳定减少寄主细胞表面的这两种受体分子将会成为 HIV 基因治疗的长期的有效手段。如何研制出能够稳定整合于基因组并长期表达的 RNAi 将会成为未来研究的又一热点。

REFERENCES(参考文献)

- [2] Fire A ,Xu S ,Montgomery MK *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* ,1998 ,**391**(6669) :806 – 811
- [3] Hannon GJ. RNA interference. *Nature* ,2002 ,**418**(6894) :244 – 251
- [4] Kasschau KD ,Carrington JC. A counter defensive strategy of plant viruses : suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* , 1998 ,**95**(4) :461 – 470
- [5] Hammond SM ,Bernstein E ,Beach D *et al.* An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000 ,**404**(6775) :293 – 296
- [6] Smardon A ,Spoerke JM ,Stacey SC *et al.* EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* ,2000 ,**10**(4) :169 – 178
- [7] Lipardi C ,Wei Q ,Paterson BM. RNAi as random degradative PCR : siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* , 2001 ,**107**(3) :297 – 307
- [8] Elbashir SM ,Harborth J ,Lendeckel W *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001 ,**411**(6836) :494 – 498
- [9] Caplen NJ ,Parrish S ,Imani F *et al.* Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Sci USA* 2001 ,**98**(17) :9742 – 9747
- [10] Park WS ,Hayafune M ,Miyano-Kurosaki N *et al.* Specific HIV-1 env gene silencing by small interfering RNAs in human peripheral blood mononuclear cells. *Gene Ther* ,2003 ,**10**(24) :2046 – 2050
- [11] Paddison PJ ,Candy AA ,Bernstein E *et al.* Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002 ,**16**(8) :948 – 958
- [12] Willey RL ,Bonifacino JS ,Potts BJ *et al.* Biosynthesis ,cleavage ,and degradation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc Natl Sci USA* ,1988 ,**85**(24) :9580 – 9584
- [13] Jacque JM ,Triques K ,Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002 ,**418**(6896) :435 – 438
- [14] Novina CD ,Murray MF ,Dykxhoorn DM *et al.* siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 2002 ,**8**(7) :681 – 686
- [15] Hammon G ,Chubb A ,Maroney PA *et al.* Multiple cis-acting elements are required for RNA polymerase III transcription of the gene encoding HI RNA ,the RNA component of human RNase P. *J Biol Chem* ,1991 ,**266**(34) :22796 – 22799
- [16] Baer M ,Nilsen TW ,Costigan C. Structure and transcription of a human gene for HI RNA ,the RNA component of human RNase P. *Nucleic Acids Res* ,1990 ,**18**(1) :97 – 103
- [17] Brummelkamp TR ,Bernards R ,Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* , 2002 ,**296**(5567) :550 – 553
- [18] Ming-Ta M Lee ,Glen A Coburn ,Myra O McClure *et al.* Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages by using Tat- or CCR5-Specific small interfering RNAs expressed from a lentivirus vector. *Journal of Virology* ,2003 ,**77**(22) :11964 – 11972
- [19] Meister G ,Landthaler M ,Dorsett Y *et al.* Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA* , 2004 ,**10**(3) :544 – 550
- [20] Brummelkamp TR ,Bernards R ,Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* , 2002 ,**296**(5567) :550 – 553
- [21] An DS ,Xie Y ,Mao SH *et al.* Efficient lentiviral vectors for short hairpin RNA delivery into human cells. *Hum Gene Ther* ,2003 ,**14**(12) :1207 – 1212
- [22] 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. *Mol Ther* ,2004 ,**9**(3) :396 – 402
- [23] Anderson J ,Akkinä R. HIV-1 resistance conferred by siRNA cosuppression of CXCR4 and CCR5 coreceptors by a bispecific lentiviral vector. *AIDS Res Ther* 2005 ,**2**(1) :1