

RNA 干涉研究进展

张丽娜, 于玲, 俞诗源, 刘国安

(西北师范大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: RNA 干涉(RNAi)是由双链 RNA(dsRNA)引起的序列特异性基因沉默,这是目前研究的热点,具有广阔的应用前景.对 RNAi 的分子机制、生物功能、研究策略及 RNAi 技术在基因功能、基因治疗、植物品质改良等方面的应用进行了综述.

关键词: RNA 干涉;基因沉默;分子机制

中图分类号: Q 552

文献标识码: A

文章编号: 1001-988X(2006)05-0105-07

The research progress of RNA interference

ZHANG Li^{na}, YU Ling, YU Shi^{yu}an, LIU Guo^{an}

(College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, Gansu, China)

Abstract: RNA interference (RNAi) is the sequence-specific gene silencing induced by double-stranded RNA (dsRNA). It becomes research hotspot at present. It has been applied in some aspects and will be used widely in the future. Molecular mechanisms, biological functions and research strategies of RNAi are reviewed. The applications of RNAi in gene function, gene therapy and plant quality betterment are also reviewed.

Key words: RNA interference; gene silencing; molecular mechanism

RNA 干涉 (RNA interference, RNAi) 是指通过双链 RNA (dsRNA) 介导特异性降解靶 mRNA, 导致转录后水平的基因沉默现象 (post-transcriptional gene silencing, PTGS), 是生物保持基因组完整性和抵御外来核酸入侵或抑制转座子诱导基因组 DNA 突变的手段, RNAi 存在于线虫、大肠杆菌、真菌、植物、脊椎动物中^[1]. 由于 RNAi 技术能够迅速、特异地抑制某个基因的表达, 所以作为一种简单、有效地代替基因敲除的遗传工具. RNAi 研究的突破性进展是生物学领域近 20 年可与人类基因组计划相提并论的重大成果之一, 也是当前分子生物学和细胞生物学最热门的研究领域之一.

1 RNAi 的分子机制

RNAi 的作用机制包括起始阶段和效应阶段.

在起始阶段, 细胞内的 dsRNA 被 RNaseIII 家族中双链特异的 Dicer 核糖核酸酶以 ATP 依赖的方式切割成小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)^[2]. Dicer 酶首先是在果蝇中发现的, 随后在植物、真菌、线虫及哺乳动物细胞中也找到其同源基因, 可见该酶是一个进化上保守的蛋白质. Dicer 酶含有一个解螺旋酶结构域、一个 PAZ 结构域、一个 dsRNA 结合结构域和两个 RNaseIII 结构域^[2]. 其中 PAZ 结构域是 Argonaute 基因家族的保守结构域, 与 RNA 结合有关. 解螺旋酶结构域可能催化 dsRNA 解螺旋, 有利于 Dicer 酶切割. 细胞内的 dsRNA 可以是来源于实验导入的、异常表达的转基因、RNA 病毒、转座子或者短的内源发夹 RNA 分子^[3]. 被 Dicer 酶切割成的 siRNA 具有相似的结构特征: 长为 21 ~ 23 核苷酸 (nucleotide, nt) 的双链 RNA, 5' 单磷酸和 3' 羟

收稿日期: 2006-01-06; 修改稿收到日期: 2006-06-02

作者简介: 张丽娜 (1979—), 女, 甘肃靖远人, 硕士, 助教. 主要研究方向为植物分子生物学.

E-mail: lina791001@163.com

基末端, 互补双链的 3' 端均有 2~3 nt 的单链突出^[4].

在效应阶段, siRNA 与一个蛋白复合物结合, 形成一种能够特异性降解与 siRNA 同源的靶 mRNA 的复合物, 称为 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)^[5]. 首先 RISC 中的 siRNA 变性, 双链解开, 卸下正义链, 然后反义链在 ATP 的作用下, 通过碱基互补配对与同源的靶 mRNA 结合, 在核酸内切酶的作用下, 自 siRNA 中点位置将靶 mRNA 切断, 从而阻断其翻译成蛋白质. RISC 是一种核酸和蛋白质的复合物(包括蛋白质和 siRNA), 已经在果蝇和人类细胞中得到纯化, 而且都含有 Argonaute 蛋白家族的成员^[6], 这种蛋白被认为是 RISC 复合物的核心成分. 已分离的 Argonaute 蛋白家族的成员, 例如果蝇的 Ago2、线虫的 RDE1、脉孢菌的 QDE2、拟南芥的 AGO1 都是 RNAi 过程中至关重要的成分, 这些基因的缺失都会导致 RNAi 的缺陷^[7,10]. Argonaute 及其同源蛋白质的分子量大约有 100 kD, 含有 PAZ 结构域和 PiWi 结构域, 称为 PPD 蛋白质. PAZ 结构域在 Dicer 蛋白质也存在, 而 PiWi 结构域中的 PiWi-box 可直接与 Dicer 酶结合^[11]. 有趣的是, 在体外 PiWi 与 Dicer 的结合导致 Dicer 的催化活性丧失^[12]. 在果蝇中还分离了 RISC 的其它组分, 例如果蝇脆性 X 相关蛋白 (drosophila fragile X related protein, dFXR)、VIG (vasa intronic gene) 及 Tudor-SN. 研究表明, 果蝇 dFXR 与人类脆性 X 智力障碍蛋白 (fragile X mental retardation protein, FMRP) 同源. 已知 FMRP 是一个 RNA 结合蛋白, 对蛋白质的翻译起负调控作用. FMRP 蛋白很可能是通过 RNAi 机制起作用, 由此推测 RNAi 的缺陷可能导致人类疾病. VIG 是一个进化保守的蛋白质, 在各种生物体中都有其同源蛋白^[13]. dFXR 和 VIG 可能作为 RAN 结合蛋白参与 RNAi, 确切的功能还不清楚^[14]. Tudor-SN 具有核酸酶的活性, 可能负责 RNA 的降解^[15]. Tudor-SN 基因在线虫、果蝇、拟南芥、裂殖酵母以及哺乳动物中是保守的. 有趣的是, 在离体实验中, Tudor-SN 既可以切割 RNA 也可以切割 DNA, 但未发现 RISC 具有切割 DNA 的能力. 而且 Tudor-SN 对底物 RNA 的切割没有序列特异性^[15].

RNAi 效应具有高效性和持久性的特点. Fire

等^[1]发现少量的 dsRNA 能够导致线虫大量的靶 mRNA 的降解, 但少量的 dsRNA 被 Dicer 酶降解为几十个 siRNA 并不能解释这种高效性. 研究表明, dsRNA 通过 Dicer 产生的 siRNA, 一部分参与同源 mRNA 的降解, 一部分 siRNA 与 mRNA 结合之后, 以 siRNA 中的反义链作为引物, 以靶 mRNA 为模板, 在依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) 催化下合成新的 dsRNA, 然后由 Dicer 切割产生新的 siRNA^[16]. 新的 siRNA 再去识别 mRNA, 又产生新的 siRNA, 经过若干次合成-切割循环, 沉默信号会不断放大, 正是这种机制赋予了 RNAi 的高效性和持久性. 利用以上扩增产生的沉默信号分子的转移, RNAi 效应可以在细胞间及整个有机体内发生系统性的扩散. 如在植物中, RNAi 沉默信号分子可以通过胞间连丝在相邻细胞间传递, 还可以通过维管系统进行长距离系统性的扩散. 在线虫中, 沉默信号分子从体液(注射方法)、消化道(浸泡和饲喂方法)进入细胞, 引发系统性 RNAi, 且这种效应可以传递给后代^[17]. 而且 Hunter 等^[18]在线虫中鉴定了一种与沉默信号传递相关的蛋白, 它是由 sid-1 基因编码的一种跨膜蛋白, 能在膜上形成跨膜通道供沉默信号通过, 并且在人类和小鼠的基因组中发现了 SID-1 蛋白的同源物.

遗传学研究表明, 线虫和植物中的 RdRP 是 RNAi 信号扩增的主要分子, sgs2/sde1 基因突变的拟南芥缺乏对转基因的沉默作用^[19], 已知 sgs2/sde1 基因编码 RdRP, 推测其功能是将转基因所产生的微量 dsRNA 进行扩增. 脉孢菌中与 sgs2/sde1 同源的 qde-1 突变也表现类似的现象^[20]. 所有 RNA 病毒均编码 RdRP, RdRP 参与基因组的复制、mRNA 的合成以及其他一些重要的生物功能^[21]. 近来研究表明, 许多真核基因组有 RdRP 的编码基因, 且真核生物中的 RdRP 不但参与了 RNAi, 还参与了 RNAi 的信号传导与放大. 第一个被分离的真核生物的 RdRP 来自番茄, 其分子量为 127 KD, 可以以 RNA 为模板合成至少 100nt 的 RNA, 它与已知病毒的 RdRP 之间并没有同源性. 在拟南芥、线虫、脉孢菌和裂殖酵母中存在番茄 RdRP 的同源基因, 这些基因均与 RNAi 有关, 虽然在果蝇与人体内没有找到 RdRP 的同源物, 但是生化实验表明, 果蝇与人体内存在发挥 RdRP 作用的替代物^[22].

2 RNAi 的生物功能

2.1 RNAi 抑制转座子活性

1999年, Tabara 等^[8]和 Ketting 等^[23]在研究线虫 RNAi 缺陷的突变株时发现, 一些 RNAi 缺陷的突变株表现出转座子运动的激活. 如线虫 *mut-7* 基因除了参与 RNAi, 也与转座子的转座抑制有关^[24]. 在线虫突变株 *mut-7* 中, 转座子的转座作用被激活, 而且表现出 RNAi 功能的缺失^[8]. 在果蝇中发现了相似的现象, 参与 RNAi 的 RNA 解螺旋酶 *Spindle-E* 的突变将导致该基因引起的基因沉默的缺失, 同时提高了反转录转座子活性^[25]. 由此表明, RNAi 参与转座子转座的抑制.

2.2 RNAi 抵御病毒感染

RNAi 在生物体抵御外来病毒的入侵方面有着重要的作用, 可能是其最原始的生物功能之一. 在拟南芥中研究转基因引起基因沉默时发现, *sgs2/sde1* 基因突变的拟南芥对病毒的侵染表现出高度的敏感性^[26]. 而且在被病毒感染的植物细胞中, 病毒通过自身进化的基因阻碍 RNAi 的产生. 在果蝇细胞中, RNAi 可以抵御 FHV (flock house virus) 病毒的入侵^[27].

2.3 RNAi 参与异染色质的形成与维持

真核细胞异染色质包含了大量的重复序列和转座子. 位于着丝点附近的异染色质通常和细胞分裂时的染色体分离有关, 插入到异染色质区域的外源基因通常不表达, 这是由于组成异染色质的组蛋白 H3 被去乙酰化和 Lys9 的甲基化. 甲基化的 Lys9 可以和异染色质蛋白 1 (HP1) 结合, 导致该区域转录阻滞. Vople 等^[28]在敲除裂殖酵母 (*S. pombe*) 的 RNAi 途径基因 (如 *Argonaute*、*Dicer*、*RDRP*) 时发现, 这些基因敲除后, 可以引起异染色质重复序列转录本的错误堆积、插入到异染色质区域的转基因的去抑制以及组蛋白 H3、Lys9 的甲基化障碍. 产生这一现象的原因是异染色质转录得到的 dsRNA 可以在 RNAi 途径的参与下, 加工成 siRNA, siRNA 募集 HP1, 然后靶向性引起相应异染色质区域的转基因沉默^[29]. Hall 等^[30]研究表明, 着丝粒同源重复序列和 RNAi 组分一起正负调节着异染色质的形成并共同促使异染色质组装成核.

2.4 RNAi 参与机体发育

许多在 RNAi 过程中起关键作用的基因在生物

的发育过程中同样起着重要作用, 它们的突变往往造成发育的变异. 如拟南芥中的 *AGO1* 突变体表现为共抑制缺陷的同时也表现为叶发育缺陷, 可以认为与 RNAi 相关的一些酶或者过程可能也参与了发育调控过程^[31,32]. Knight 等^[33]发现单个 *Dicer* 基因 *dcr?1* 发生突变的线虫, 除了 RNAi 机制缺失外, 还产生一系列表型改变. 并且 *dcr?1* 突变体表现出的发育时序的改变与 *let?7* 和 *lin?4* 突变体相似, 而 *let?7* 和 *lin?4* 编码小分子 RNA, 在体内首先合成大约 70nt 长的 RNA 前体, 然后在 *Dicer* 作用下生成大约 22nt 的小分子 RNA, 称为暂时性小 RNA (small temporary RNA, stRNA), 这些小 RNA 在线虫的发育过程中参与对 mRNA 翻译的调节, 是特定基因的负调控因子, 但并不介导 mRNA 的降解, 而是结合于 mRNA 3' 非翻译区, 阻止核糖体与 mRNA 有效结合, 从而抑制翻译的进行^[34]. stRNA 和 siRNA 关系密切, 除了都由 *Dicer* 加工成熟之外, RNAi 必需的 *Argonaute* (*alg?1*、*alg?2*) 家族基因也是这两种 RNA 行使生物功能所必需的^[35]. 在 RNAi 过程中形成的 RISC 复合物既含有 siRNA 又含有 stRNA, 此复合物可根据不同情况产生不同效应, 它可利用 siRNA 与靶 mRNA 互补介导 mRNA 降解, 但若 siRNA 与靶序列不能严格配对 (如有单个碱基错配), 则 PTGS 无法进行, 此时复合物转而利用 stRNA 抑制核糖体在 mRNA 上延伸从而在翻译水平阻断基因表达. 此模型中的 RISC 作为一个平台, 不同情况下可以募集不同的组件在其上装配, 从而行使不同的功能, 但最终均导致特定基因沉默^[3].

3 RNAi 的研究策略

进行 RNAi 研究的技术路线包括以下 5 个步骤: ① 选取目的基因; ② 设计相应的 siRNA 序列; ③ 制备 siRNA 产物; ④ siRNA 转染; ⑤ RNAi 效果分析.

3.1 siRNA 序列的设计

siRNA 序列的设计是 RNAi 实验成败的关键. 研究发现, 对哺乳动物细胞, 最有效的 siRNA 是 21~23 个碱基大小、3' 端有两个突出碱基的双链 RNA; 而对非哺乳动物, 比较有效的是长片段 dsRNA. RNAi 技术要求 siRNA 的反义链与靶基因序列之间严格的碱基配对, 单个碱基错配就会大大降低沉默效应^[1]. 而且 siRNA 还可以造成与其

同源性的其它基因沉默(也叫交叉沉默)。所以设计的 siRNA 只能与靶基因具高度同源性而尽可能少的与其它基因同源。设计 siRNA 序列应注意: ① 从靶基因转录本起始密码子 AUG 开始, 向下游寻找 AA 双核苷酸序列, 将此双核苷酸序列和其下游相邻 19 个核苷酸作为 siRNA 序列设计的模板。② 每个基因选择 4~5 个 siRNA 序列, 然后运用生物信息学方法进行同源性比较, 除去与其它基因有同源性的序列, 选出一个特异性最强的 siRNA^[36]。③ 尽量不要以 mRNA 的 5' 端和 3' 端的非翻译区及起始密码子附近序列作为设计 siRNA 的模板, 因为这些区域有许多调节蛋白结合位点, 调节蛋白会与 RISC 竞争结合靶序列, 降低 siRNA 的基因沉默效应^[37]。

3.2 siRNA 的合成

目前获得 siRNA 主要有 4 种方法: 化学合成法、体外转录法、siRNA 表达载体法、siRNA 表达框架法。

3.2.1 化学合成法 siRNA 可以直接进行化学合成, 但合成一个 siRNA 需先分别合成两条单链(每条链合成需 20 步反应, 每步反应均需纯化), 然后再退火形成双链 RNA, 合成耗时长且费用高。它最适用的情况是: 已经找到最有效的 siRNA 序列, 需要大量的 siRNA 进行研究。

3.2.2 体外转录法 1) 特异性 siRNA 合成。多数生物尤其是哺乳动物, siRNA 仍是诱导 RNAi 的最佳选择。以 DNA Oligo 为模板, 通过体外转录合成 siRNAs, 成本相对化学合成法而言比较低, 能够比化学合成法更快的得到 siRNAs。而且体外转录得到的 siRNAs 毒性小, 稳定性好, 效率高, 一般只需化学合成的 siRNA 量的 1/10 就可以达到同等的效果。这类方法主要适用于: 筛选 siRNAs, 特别是需要制备多种 siRNAs, 以及化学合成的价格成为障碍时。

2) 非特异性 siRNA 合成。特异性制备 siRNA 的方法的不足, 是需要设计和检验多个 siRNA 序列以便找到一个有效的 siRNA。而此方法制备一份多种 siRNAs 的混合物就可以避免这个缺陷。该方法通常选择 200~1000 碱基的靶 mRNA 模板, 用体外转录的方法制备长片断双链 dsRNA, 然后用 RNase III(或 Dicer) 在体外消化, 得到多种 siRNAs 的混合物。在除掉没有被消化的长链 dsRNA 后, 这个 siRNA 混合物就可以直接

转染细胞, 转染方法和特异性 siRNA 一样。由于 siRNA 混合物中有许多不同的 siRNAs, 通常能够保证目的基因被有效地抑制。

3.2.3 siRNA 表达载体法 该方法的主要思路是: 将 siRNA 对应的 DNA 双链模板序列克隆入载体的 RNA 聚合酶 III 的启动子后, 这样就能在体内表达所需的 siRNA 分子。通过质粒表达 siRNAs 大都是用 Pol III 启动子启动编码 shRNA (small hairpin RNA) 的序列。选用 Pol III 启动子的原因在于这个启动子总是在离启动子一个固定距离的位置开始转录合成 RNA, 遇到 4~5 个连续的 U 即终止, 非常精确。当这种带有 Pol III 启动子和 shRNA 模板序列的质粒转染哺乳动物细胞时, 这种能表达 siRNA 的质粒确实能够下调特定基因的表达, 可抑制外源基因和内源基因。采用这种方法的优点在于: 该方法将合成 siRNA 的过程转移至细胞内进行, 排除了 RNA 酶的干扰, 延长了 siRNA 的半衰期; 同时, 由于载体可以复制扩增, 所以能够显著降低 siRNA 的成本。更重要的是, 利用该方法可以进行稳定表达细胞株的筛选, 并且随着载体质粒的复制扩增, RNAi 可以扩散到整个机体, 基因抑制效果能够传代。

3.2.4 siRNA 表达框架法 siRNA 表达框架 (siRNA expression cassettes, SECs) 是一种由 PCR 得到的 siRNA 表达模板, 包括一个 RNA Pol III 启动子、一段发夹结构 siRNA、一个 RNA Pol III 终止位点。它能够直接导入细胞进行表达而无需先克隆到载体中。和 siRNA 表达载体不同的是, SECs 不需要载体克隆、测序验证等颇为费时的步骤, 可以直接由 PCR 得到, 不到 1 天就可完成。因此, SECs 是筛选 siRNA 的最简单最有效的工具, 可作为构建高效的体内转录载体进行 RNAi 研究的预实验, 对不同宿主细胞优化筛选转录启动子和 siRNA 靶序列。如果在 PCR 两端添加酶切位点, 那么通过 SECs 筛选出的最有效的 siRNA 后, 可以直接克隆到载体中构建 siRNA 表达载体。构建好的载体可以用于稳定表达 siRNA 和长效抑制的研究。这个方法的主要缺点是 PCR 产物比较难转染到细胞中。如果有适合的新型转染试剂能提高 SEC 的转染效率, 可以解决很大问题。

3.3 siRNA 的转染

将 siRNA、siRNA 表达载体或 SECs 导入哺乳动物细胞中是诱导 RNAi 发生的关键, 有许多转

染试剂可供选用, 最常用的是脂质体转染试剂, 有些情况下电穿孔法也可用, 但易导致较高的细胞毒性反应.

3.4 RNAi 的效果分析

RNAi 分子水平的检测主要通过 mRNA 和蛋白 2 个方面进行分析. 在 mRNA 水平上, 可以采用 RT-PCR、定量 PCR、Northern 杂交等, 通过信号强弱判断目的基因的沉默效果. 蛋白质水平可通过 Western 杂交、ELISA、免疫荧光、流式细胞分析术和表型分析等. RNAi 最大以及最终的效果是细胞的代谢过程、生理生化系数等表型参数发生明显的变化.

4 RNAi 的应用

4.1 研究基因功能

目前, 针对某个已知的基因, 设计可诱导其表达抑制的 siRNA, 通过合适的方法导入细胞或机体, 使该基因的表达水平下降或完全抑制, 从而了解该基因的功能, 是 RNAi 技术在目前最广泛的应用. 如王水良等^[38]利用 RNAi 技术研究了焦磷酸法呢酯合成酶 (FPPS) 基因的表达, 发现该技术在细胞水平能有效抑制 hLRH?1 基因的表达, 且该基因表达抑制的细胞中 FPPS 基因的表达呈明显上调, 由此表明 hLRH?1 可能在 FPPS 基因的表达中起负调节作用. 同样, RNAi 技术被用来研究肿瘤细胞中基因的功能. 如李莹等^[39]应用该技术分别抑制了抗失巢凋亡的胃癌细胞 BGC823 中的 p130Cas 和 paxillin 基因的表达, 检测发现 p130Cas 和 paxillin 分子在 mRNA 及蛋白水平的表达量均明显降低, 初步证明 p130Cas 和 paxillin 是细胞存活的重要信号分子, 在肿瘤细胞抗失巢凋亡过程中具有重要作用. 相信随着众多生物体基因组的测序完成和后基因组时代的到来, RNAi 技术将在功能基因组学研究中成为确定基因功能的有力工具.

4.2 用于基因治疗

利用 RNAi 技术可以特异抑制与疾病有关的内源或外源基因. 而不会对个体的生长发育产生影响, 这一特性为 RNAi 技术在基因治疗上的应用开创了广阔的前景. 周琼等^[40]研究了导入肺癌细胞系 A549 中的 siRNA 对肿瘤中高度表达且参与肿瘤细胞增殖的 PoLo?Like 激酶 1 (Plk1) 基因产生的沉默效应. 结果表明, Plk1 siRNA 质粒能特异性

地抑制 Plk1 基因的表达并使其活性下降, 细胞周期蛋白 B1 及 p53 蛋白的表达水平升高, 微管聚集障碍或形成单极的纺锤体, A549 细胞增殖减慢, 出现 G₂/M 期阻滞并存在细胞凋亡. 王瑞瑛等^[41]将在近乎所有的肿瘤细胞和肿瘤组织中异常高度表达的凋亡抑制蛋白存活素基因的 siRNA 转染 HeLaS3 细胞发现, 抑制了存活素表达, HeLaS3 细胞凋亡比例显著提高. 这些研究结果表明, 利用 RNAi 技术抑制肿瘤相关基因将会成为肿瘤基因治疗的特异性手段. 同时, RNAi 将是治疗肌肉萎缩侧索硬化症 (ALS) 的一种有效方法. 研究发现, 遗传性 ALS 的发病原因是一种名为 SOD1 的蛋白质基因发生了突变. Raoul 等^[42]研究表明, 在小鼠中导入能抑制 SOD1 合成的 siRNAs, 可以推迟这种小鼠 ALS 疾病的发生, 并降低该疾病的发展速度. 除此之外, 利用 RNAi 技术降解外源病毒基因组、阻止病毒复制、抑制病毒感染, 是该技术在基因治疗方面的另一个主要应用.

4.3 研究信号传导通路

联合利用传统的缺失突变技术和 RNAi 技术可以很容易地确定复杂的信号传导途径中不同基因的上下游关系. Clemensy 等应用 RNAi 研究了果蝇细胞系中的胰岛素信号传导途径, 取得了与已知胰岛素信号传导通路完全一致的结果. RNAi 技术较传统的转染实验简单、快速、重复性好, 克服了转染实验中重组蛋白特异性聚集和转染效率不高的缺点, 因此认为 RNAi 技术将可能成为研究细胞信号传导通路的新途径.

4.4 用于植物品质改良

随着 RNAi 技术的不断发展, 它被逐渐用来改良植物品质. Byzova 等^[43]通过 RNAi 技术抑制拟南芥和甘蓝型油菜的花发育相关基因的表达, 获得花冠发育为萼片的拟南芥和萼片状花冠的油菜, 并且这些性状能够稳定遗传. 陈银华等^[44]利用 RNAi 技术有效抑制内源 ACO 基因的表达, 获得抗衰老的优良花椰菜. 相信随着生物发育与调控机理的深入研究, RNAi 技术在植物品质改良方面的应用将更加广泛.

5 展望

自 1998 年 RNAi 发现以来, 它已成为生命科学研究的热点, 并且有着十分诱人的应用前景. 它不仅能极大推进基因组功能的研究, 还能利

用设计的 RNAi 芯片, 进行高通量筛选靶基因药物, 而且在研究信号传导通路、基因治疗等方面开辟了新的途径. 但仍然有许多问题有待进一步阐明. 例如, 不同种的生物是否沿用同一种 RNAi 机制? RNAi 机制本身又受到哪些基因调控?

今后对 RNAi 的研究可能会沿着以下方面发展: ① RNAi 具体分子机制研究; ② RNAi 生物功能研究; ③ RNAi 技术在功能基因组学、基因治疗和植物品质改良、药物开发等许多领域的应用研究.

参考文献:

- [1] FIRE A, XU Si-qun, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [2] BERNSTEIN E, CAUDY A A, HAMMOND S M, et al. Role for a bidentate rebonuclease in the initiation step of RNA interference [J]. *Nature*, 2001, 409: 363-366.
- [3] HANNON, G J. RAN interference [J]. *Nature*, 2002, 418: 244-251.
- [4] SHARP P A. RAN interference [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(5): 485-490.
- [5] HAMMOND S M, BERNSTEIN E, BEACH D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cell [J]. *Nature*, 2000, 404: 293-296.
- [6] ZILBERTS D, CAO Xiaofeng, JACOBSEN S E. Argonaute4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation [J]. *Science*, 2003, 299: 716-719.
- [7] HAMMOND S M, BOETTCHER S, CAUDY A A, et al. Argonaute2: A link between genetic and biochemical analyses of RNAi [J]. *Science*, 2001, 293: 1146-1150.
- [8] TABARA H, SARKISSIAN M, KELLY W G, et al. The *rde1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans* [J]. *Cell*, 1999, 99: 123-132.
- [9] CATALANOTTO C, AZZALIN G, MACINO G, et al. Transcription: Gene silencing in worms and fungi [J]. *Nature*, 2000, 404: 245.
- [10] FAGARD M, BOUTET S, MOREL J B, et al. AGO1, QDE2, and RDE1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2002, 97: 11650-11654.
- [11] TAHBAZ N, KOLB F A, JARONCZYK K, et al. Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer [J]. *EMBO Rep*, 2004, 5(2): 189-194.
- [12] PELLINO J L, SONTHEIMER E J. R2D2 leads the silencing trigger to mRNAs death star [J]. *Cell*, 2003, 115(2): 132-133.
- [13] 何承伟, 刘芳, 刘新光, 等. RNA 干涉作用机制的研究进展 [J]. *医学综述*, 2005, 11(4): 291-294.
- [14] CAUDY A A, MYERS M, HANNON G J, et al. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery [J]. *Genes Development*, 2002, 16: 249-2496.
- [15] CAUDY A A, KETTING R F, HAMMOND S M, et al. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes [J]. *Nature*, 2003, 425: 411-414.
- [16] SIJEN T, FLEENOR J, SIMMER F, et al. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing [J]. *Cell*, 2001, 107: 465-476.
- [17] TIMMONS L, COURT D L. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Gene*, 2001, 263: 103-112.
- [18] WINSTON W M, MOLODOWITZ C, HUNTER C P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1 [J]. *Science*, 2002, 295(5564): 2456-2459.
- [19] DALMAY T, HAMILTON A, RUDD S, et al. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus [J]. *Cell*, 2000, 101(5): 543-553.
- [20] COGONI C, MACINO G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase [J]. *Nature*, 1999, 399(6732): 166-169.
- [21] AHLQUIST P. RNA-dependent RNA polymerase, viruses, and RNA silencing [J]. *Science*, 2002, 296: 1270-1273.
- [22] 王顺心, 王台, 朱宏, 等. RNAi 机制的研究进展 [J]. *哈尔滨师范大学自然科学学报*, 2004, 20(3): 84-93.
- [23] KETTING R F, HAVERKAMP T H, VAN

- LUENEN H G, et al. Mut⁷ of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD [J]. *Cell*, 1999, 99 (2) : 133-141.
- [24] KETTING R F, FISCHER S E, BEMSTEIN E, et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans* [J]. *Genes Dev*, 2001, 15 : 2654-2659.
- [25] ARAVIN A A, NAUMOVA N M, TULIN A V, et al. Double-stranded RNA mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline [J]. *Curr Biol*, 2001, 11 : 1017-1027.
- [26] MOURRAIN P, BECLIN C, ELMAYAN T, et al. Arabidopsis SGS2 and SGS3 gene are required for post-transcriptional gene silencing and natural virus resistance [J]. *Cell*, 2000, 101 : 533-542.
- [27] LI Hong-wei, LI Wan-xiang, DING Shou-wei. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus [J]. *Science*, 2002, 296 : 1319-1321.
- [28] VOPLÉ T A, KIDNER C, HALL I M, et al. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine⁹ methylation by RNAi [J]. *Science*, 2002, 297 (5588) : 1833-1837.
- [29] ALLSHIRE R. Molecular biology RNAi and heterochromatin a hushed up affair [J]. *Science*, 2002, 297 (5588) : 1818-1819.
- [30] HALL I M, SHANKARANARAYANA G D, NOMA K, et al. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain [J]. *Science*, 2002, 297 (5590) : 2232-2237.
- [31] COGONI C, MACINO G. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms [J]. *Genes Dev*, 2000, 10 : 638-643.
- [32] HAMMOND S M, CAUDY A A, HANNON G J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA [J]. *Nature Rev Gen*, 2001, 2 : 110-119.
- [33] KNIGHT S W, BASS B L. A role for the RNaseIII enzyme DCR¹ in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 2001, 293 (5538) : 2269-2271.
- [34] OLSEN P H, AMBROS V. The lin⁴ regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN¹⁴ protein synthesis after the initiation of translation [J]. *Dev Biol*, 1999, 216 (2) : 671-680.
- [35] GRISHOK A, PASQUINELLI A E, CONTE D, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing [J]. *Cell*, 2001, 106 (1) : 23-34.
- [36] 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 (6836) : 494-498.
- [37] 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 (1) : 107-108.
- [38] 王水良, 兰风华, 傅继梁. 基于载体的 RNA 干涉介导人核受体 hLRH¹ 的表达抑制实验研究 [J]. *遗传学报*, 2006, 33 (1) : 26-31.
- [39] 李莹, 药立波, 刘新平, 等. RNAi 引起的 paxillin 和 p130Cas 下调抑制胃癌细胞失巢性生长 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, 21 (3) : 408-414.
- [40] 周琼, 白明, 金阳, 等. RNA 干扰技术抑制 PoLo-Like 激酶 1 表达对 A549 细胞的影响 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, 21 (5) : 665-672.
- [41] 王瑞瑛, 梅柱中, 董燕, 等. RNA 干涉抑制存活素表达并诱导 HeLaS3 细胞凋亡的研究 [J]. *吉林大学学报: 理学版*, 2005, 43 (5) : 691-695.
- [42] RAOUL C, ABBAS-TERKI T, BENSADOUN J C, et al. Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS [J]. *Nature Medicine*, 2005, 11 : 423-433.
- [43] BYZOVA M, VERDUYN C, DE BROUWER D, et al. Transforming petals into sepaloid organs in Arabidopsis and oilseed rape: Implementation of the hairpin RNAi-mediated gene silencing technology in an organ-specific manner [J]. *Planta*, 2004, 218 : 379-387.
- [44] 陈银华, 张俊红, 欧阳波, 等. 花椰菜 ACC 氧化酶基因的克隆及其 RNAi 对内源基因表达的抑制作用 [J]. *遗传学报*, 2005, 32 (7) : 764-769.