

慢病毒载体介导的 RNA 干扰

杨馨 胡应和*

(华东师范大学, 教育部脑功能基因组学重点实验室, 上海市脑功能基因组学重点实验室, 上海 200062)

摘要 RNA 干扰 (RNA interference) 是指由双链 RNA 分子抑制同源基因的表达。慢病毒载体 (lentivirus vector) 则是高效的基因转导工具, 能将外源序列稳定导入分裂相和非分裂相细胞。将慢病毒载体和 RNA 干扰结合, 能在哺乳动物各类细胞中, 特异性抑制同源基因的表达; 也是基因功能研究和基因治疗的有力手段。

关键词 RNA 干扰; 慢病毒载体

RNA 干扰是指由双链 RNA 诱发的基因沉默, 是生物进化中一项保守的防御机制^[1]。现在 RNA 干扰主要作为一种研究手段, 被用于特异性抑制基因的表达。RNA 干扰机制研究表明, 双链 RNA 分子首先被细胞内 RNA 酶 Dicer 降解成 21~23 个碱基大小的小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)。siRNA 结合一个核酶复合物形成 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)。RISC 通过碱基配对定位到有同源序列的 mRNA 上, 并在特定位置切割该 mRNA, 从而抑制该同源基因的表达^[2]。siRNA 被认为是 RNA 干扰的主要效应物。

直接转染合成的 siRNA 能特异性抑制哺乳动物细胞内同源基因的表达^[3], 但细胞内 siRNA 很容易被降解。因此这种方法不能实现稳定的 RNA 干扰。相比之下, 质粒载体或病毒载体就能在细胞内长时间、稳定地生成 siRNA^[4, 5]。但质粒载体转染哺乳动物细胞的效率不如病毒载体, 尤其无法转染非分裂相细胞。慢病毒载体是常用的病毒载体之一, 其特点为免疫原性低, 能感染分裂相和非分裂相细胞, 能将自身携带片段整合入宿主细胞基因组。目前研究表明慢病毒载体能在哺乳动物各类细胞稳定表达 siRNA, 长期抑制基因表达。

1 慢病毒载体

常用的病毒载体包括: 单纯疱疹病毒载体, 腺病毒载体, 腺相关病毒载体 (adeno-associated virus, AAV) 和慢病毒载体。其中 AAV 和慢病毒载体的特点是能作用于非分裂相细胞, 而且能与宿主细胞基因组发生整合^[6]。但当应用于整体动物时, AAV 会被

机体内本身存在的 AAV 抗体识别并发生免疫反应, 从而削弱了 AAV 转导基因的效率^[7]。慢病毒载体不存在这样的问题, 它在大鼠和恒河猴的脑内实现长期稳定的外源基因表达, 同时不引起明显的免疫反应^[8, 9]。

慢病毒包括多种灵长类慢病毒和非灵长类慢病毒。慢病毒经过改造成为慢病毒载体, 改造的目的主要是提高生物安全性以及增加外源基因的表达效率。各种慢病毒载体的结构和作用机制基本相同。以人类免疫缺陷病毒 I 型 (HIV-1) 慢病毒载体系统为例, 它由两部分组成, 即包装成分和载体成分。包装成分能够提供生产病毒颗粒所必需的蛋白质; 载体成分则包括了将在宿主细胞内表达的目的基因。将包括载体成分和包装成分的 3 或 4 个质粒共转染细胞, 即可从细胞上清液中收获具有感染能力、无复制能力、携带目的基因的 HIV-1 慢病毒载体颗粒。该病毒颗粒既保留了高效感染和整合的特性, 又避免了病毒复制对细胞的伤害^[10]。

慢病毒载体系统能在非分裂相的哺乳动物细胞中实现稳定的外源基因表达, 比如原代培养的神经元和大鼠纤维原细胞^[11]。用于生产转基因动物时, 慢病毒载体的效率远高于传统的显微注射法^[12]。慢病毒载体还能在实验动物在体细胞中实现外源基因的稳定表达, 如神经元、神经胶质细胞和视网膜细胞^[13, 14]。

收稿日期: 2005-12-28 接受日期: 2006-03-28

* 通讯作者。Tel: 021-62603004, Fax: 021-62601953, E-mail: yhu@brain.ecnu.edu.cn

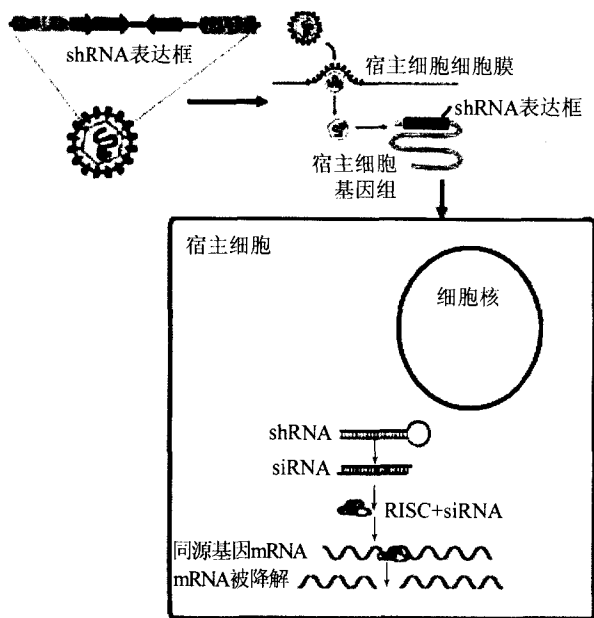


图1 慢病毒介导的RNA干扰^[15]

2 慢病毒介导的RNA干扰

慢病毒载体介导RNA干扰,就是将慢病毒载体高效感染和整合的特性与RNA干扰特异性抑制同源基因表达的作用相结合。

慢病毒RNA干扰的表达载体有两类:一类分别转录有义RNA和反义RNA,两条链在细胞内互补结合生成siRNA;另一类则转录短发卡RNA(short hairpin RNA, shRNA)。后者更加常用,其结构主要由慢病毒载体骨架和shRNA表达框组成。shRNA表达框主要包括:RNA聚合酶III(RNA polymerase III, PolIII)依赖的启动子、shRNA结构序列以及终止子。其中,shRNA结构序列由两段互补序列相向组成,两段序列之间有4~10个碱基的中间序列。慢病毒感染细胞后,将此shRNA表达框整合进宿主细胞基因组。shRNA在宿主细胞被转录后,两段互补序列碱基配对结合,中间序列则成为茎环结构。茎环结构可被Dicer酶识别并切除,产生的siRNA将执行RNA干扰(图1)。

最早有关慢病毒介导RNA干扰的报道发表于2003年。作者先在HeLa细胞和原代培养的树突状细胞(dendritic cell, DC)中表达外源性的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP);然后利用慢病毒载体,在这两种细胞中表达针对GFP的shRNA。实验结果显示:在分裂相(HeLa细胞)和非分裂相细胞(DC)中,慢病毒介导的RNA干扰都能特异性抑制

GFP的表达^[16]。此后的研究证明,慢病毒载体能在哺乳动物各类细胞中实现稳定有效的RNA干扰,如原代培养的人的巨噬细胞和造血干细胞^[17,18]。除shRNA表达框外,在慢病毒载体中再加入一个报告基因表达框,就能实时监测慢病毒感染细胞的效率,也可以对RNA干扰的效果进行预测。例如以GFP为报告基因的慢病毒载体,同时也能表达针对CD25基因的shRNA(CD25是T淋巴细胞表达的一种膜受体)。将该慢病毒载体作用于T淋巴细胞后:表达GFP的细胞中,CD25的表达被抑制,T淋巴细胞增殖受阻;而在不表达GFP的细胞中,CD25表达和细胞增殖能力都不受影响^[19]。

3 慢病毒介导RNA干扰的应用

慢病毒介导的RNA干扰能在各类细胞中稳定抑制同源基因的表达。该技术被应用于基因功能研究,也有可能成为基因治疗的新手段。以下将重点介绍它在基因治疗方面的研究进展。

3.1 抗病毒研究

对病毒应该从病毒的感染途径和作用机制入手。阻断病毒感染途径,或抑制其作用过程中关键蛋白质的表达,是对抗病毒感染最有效的方式。由于病毒的复制能力强、感染速度快,因此对抗病毒感染必须采用高效迅速稳定的方法。慢病毒介导的RNA干扰是很好的选择,目前常被用于病毒作用机制研究和抗病毒的基因治疗。

HIV-1型病毒感染早期,HIV-1病毒能结合DC特异性IGN受体(DC-SIGN),并被呈递给CD4 T淋巴细胞。病毒进入CD4 T淋巴细胞后,迅速复制并装配形成大量新的病毒颗粒,随之被释放到细胞间隙,并继续攻击其他的CD4 T淋巴细胞。于是大量CD4 T淋巴细胞被破坏,并最终导致机体免疫机能的崩溃。HIV-1病毒颗粒与DC-SIGN受体的结合是病毒感染早期的关键步骤,如果抑制DC-SIGN受体的表达就可能削弱其与病毒颗粒的结合。利用慢病毒载体在原代培养的DC中表达针对DC-SIGN的shRNA,DC-SIGN的表达被明显抑制;将HIV-1病毒与表达该shRNA的DC共培养,DC-SIGN结合HIV-1病毒颗粒的能力大大降低;将该DC再与CD4 T淋巴细胞共培养,结果显示CD4 T淋巴细胞被HIV-1感染的百分比明显下降^[20]。趋化因子受体5(chemokine receptor 5, CCR5)是免疫细胞表达的另一种膜受体,它在HIV-1病毒感染中也起关键作

用。在原代培养的巨噬细胞中, 慢病毒载体介导针对 CCR5 的 shRNA 的表达, 结果 CCR5 mRNA 被特异性降解, 同时该细胞对抗 HIV-1 病毒感染的能力也增强^[21]。

对病毒自身基因进行 RNA 干扰也能达到对抗病毒的目的。如 HIV 病毒 3 个关键基因 gag、rev、vif 在逆转录、整合及病毒包装方面有关键作用。用慢病毒载体在 CD4 T 淋巴细胞中表达针对这 3 个基因的 shRNA, 能增强该细胞对抗 HIV 病毒感染的能力^[22]。除对抗 HIV-1 型病毒感染外, 慢病毒介导的 RNA 干扰也被用于对抗其他病毒。在 293 细胞和狗的原代肾细胞中, 用慢病毒载体介导针对流感病毒基质蛋白 shRNA 的表达, 该蛋白质的表达被抑制, 而且流感病毒的复制能力明显降低^[23]。

3.2 癌症及其治疗

癌症发生涉及原癌基因的突变和异常激活。慢病毒能在各类细胞中实现针对原癌基因的 RNA 干扰, 特异性降低其表达, 从而抑制癌变细胞增殖。经人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染的 HeLa 细胞是一种常用的肿瘤细胞模型。HeLa 细胞本不表达原癌基因 E6 和 E7, 但经 HPV 感染的 HeLa 细胞会大量表达这两种基因。在 HPV 感染的 HeLa 细胞中, 利用慢病毒载体实现针对 E6 和 E7 的 RNA 干扰, 几乎完全阻断这两种基因的表达, 并使细胞出现衰老和增殖受阻。而同样的处理对未经 HPV 感染的 HeLa 细胞则没有影响^[24]。另一种原癌基因 B-raf (BRAF) 的突变可见于恶性黑素瘤(malignant melanoma, MM)。有的 MM 细胞系只表达野生型的 BRAF, 但是在另外的 MM 细胞系中 BRAF 则发生突变, 而且突变基因大量表达。用慢病毒载体转导针对突变型 BRAF 的 shRNA, 能够抑制其表达, 并且 BRAF 突变的 MM 细胞增殖能力减弱; 而同样的处理对 BRAF 未突变的 MM 细胞没有影响^[25]。在乳腺癌细胞系 4T1 中, 原癌基因信号转导及转录活化蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 被大量表达和磷酸化。在野生型小鼠的乳腺中注射 4T1 细胞可诱发乳腺癌。如果用慢病毒载体在 4T1 细胞中表达针对 STAT3 的 shRNA, 96 h 后 STAT3 的表达和磷酸化几乎被完全抑制; 而且经过这样处理的 4T1 细胞不能在小鼠中引发乳腺癌^[26]。

3.3 单基因遗传病

单基因遗传病是单个基因发生突变引起的遗传病。该种遗传病中遗传因素起决定作用, 普通方法

很难治愈。用慢病毒载体介导 RNA 干扰, 能稳定抑制突变基因的表达, 并缓解病症。DYT1 肌张力异常(DYT1 dystonia)是由 TOR1A(torsin family 1, member A)基因突变导致的一种单基因病。正常的 TOR1A 具有 ATP 酶活性; 突变型的 TOR1A 不但没有该功能, 而且会抑制正常蛋白质表达和作用。在该疾病的神经元模型中, 用慢病毒载体介导针对突变型 TOR1A 的 RNA 干扰, 结果显示突变型 TOR1A 表达被抑制, 而正常基因的表达量和功能则有所恢复^[27]。另一种单基因病, 遗传性肌萎缩性侧索硬化征(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)的致病原因是超氧化物歧化酶 1(superoxide dismutase 1, SOD1)突变。突变型 SOD1 转基因小鼠是遗传性 ALS 的一种动物模型, 此小鼠 SOD1 基因发生点突变。在该疾病模型的动物椎管内注射慢病毒颗粒, 使得运动神经元表达针对突变型 SOD1 的 shRNA。结果显示突变型 SOD1 的表达被抑制, 实验动物出现 ALS 症状的时间被延后, 该病发展的速度也被减缓^[28]。

4 小结和展望

慢病毒介导的 RNA 干扰应用于基因治疗是该技术发展的大方向。目前的研究进展主要集中在两方面: 动物在体细胞模型以及各种疾病的人源细胞模型。上文提到在 ALS 小鼠模型中, 对突变 SOD1 基因的 RNA 干扰, 就是在体细胞研究的例子。在可卡因成瘾的动物模型中, 用慢病毒在中脑针对 CD81(CD81 的表达与可卡因引起的运动增强有关)进行 RNA 干扰。结果显示中脑神经元中 CD81 的表达量降低达 90% 以上, 同时运动增强也被明显抑制^[29]。人源细胞模型中的工作也很多, 如上文提到 HPV 感染的 HeLa 细胞以及在 MM 细胞中的 RNA 干扰。最近研究发现, 在镰状细胞贫血(sickle cell anemia, SCA)病人的离体细胞中, 用慢病毒载体针对 β 珠蛋白突变基因(β 珠蛋白基因突变导致 SCA)进行 RNA 干扰, 突变基因 β 珠蛋白的表达被特异性抑制^[30]。综合两方面的进展: 慢病毒载体介导 RNA 干扰既能作用于在体细胞, 也能抑制人源细胞中致病基因的表达; 这就为在病人在体细胞中实现针对致病基因的 RNA 干扰提供了可能。但要达到这个目标还有很多工作要做, 比如确保慢病毒载体对人体的安全性, 以及进一步在猴、猿甚至人类身上大量的实验。

该技术的另一个发展方向, 是用慢病毒载体实

现可调控的RNA干扰。使用顺/反式转录调控元件对PolIII依赖的启动子进行修饰可以调控RNA干扰。如将四环素操纵序列(tetracycline operator sequence, tetO)插入到U6启动子中(一种常用的PolIII依赖的启动子),加入四环素后就能激活该启动子;或者通过Cre-LoxP系统控制PolIII依赖的启动子^[31],也能达到调控RNA干扰的目的。这意味着,慢病毒载体能够介导组织特异、时间特异的RNA干扰。

综上所述,慢病毒介导的RNA干扰具有高效、稳定、特异性强的特点;它能在哺乳动物各类细胞、多种疾病的离体细胞、以及动物在体细胞中,实现稳定的RNA干扰。该技术被广泛用于基因功能研究,在疾病的基因治疗上也具有良好的前景。

参考文献 (References)

- [1] Downward J *et al. BMJ*, 2004, **328**: 1245
- [2] Kim VN. *J Korean Med Sci*, 2003, **18**: 309
- [3] Elbashir SM *et al. Nature*, 2001, **411**: 494
- [4] Sui G *et al. Proc Natl Acad Sc USA*, 2002, **99**: 5515
- [5] Stewart SA *et al. RNA*, 2003, **9**: 493
- [6] Lois C *et al. Curr Opin Immunol*, 2001, **13**: 496
- [7] Wong LF *et al. Hum Gene Ther*, 2005, **17**: 1
- [8] Kordower JH *et al. Science*, 2000, **290**: 767
- [9] Martin-Rendon E *et al. Curr Opin Mol Ther*, 2001, **3**: 476
- [10] Delenda C. *J Gene Med*, 2004, **6** (Supp11): S125
- [11] Naldini L *et al. Science*, 1996, **272**: 263
- [12] Lois C *et al. Science*, 2002, **295**: 868
- [13] Lai Z *et al. J Neurosci Res*, 2002, **67**: 363
- [14] Migoshi H *et al. Proc Natl Acad Sc USA*, 1997, **94**: 10319
- [15] Mittal V. *Nat Rev Gene*, 2004, **5**: 355
- [16] Stewart SA *et al. RNA*, 2003, **9**: 493
- [17] Nishitsuji H *et al. Microbes Infect*, 2004, **6**: 76
- [18] Li M *et al. Methods Mol Biol*, 2005, **309**: 261
- [19] Rubinson DA *et al. Nat Genet*, 2003, **33**: 401
- [20] Arrighi JF *et al. J Virol*, 2004, **78**: 10848
- [21] Lee MT *et al. J Virol*, 2003, **77**: 11964
- [22] Lee SK *et al. Blood*, 2005, **106**: 818
- [23] Hui EK *et al. J Gen Virol*, 2004, **85**: 1877
- [24] Putral LN *et al. Mol Pharmacol*, 2005, **68**: 1311
- [25] Sumimoto H *et al. Oncogene*, 2004, **23**: 6031
- [26] Ling X *et al. Cancer Res*, 2005, **65**: 2532
- [27] Gonzalez-Alegre A *et al. J Neurosci*, 2005, **25**: 10502
- [28] Raoul C *et al. Nat Med*, 2005, **11**: 423
- [29] Bahi A *et al. J Neurochem*, 2005, **92**: 1243
- [30] Samakoglu S *et al. Nat Biotechnol*, 2006, **24**: 89
- [31] Wiznerowicz M *et al. J Virol*, 2003, **77**: 8957

Lentivirus-mediated RNA Interference

Xin Yang, Ying-He Hu*

(Key Laboratory of Brain Functional Genomics, Ministry of Education & Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract RNA interference is a process in which double-stranded RNA triggers the degradation of a homologous mRNA. Lentivirus vector can introduce interested sequence into dividing and nondividing cells efficiently. Lentivirus-mediated RNA interference can be used to inhibit the expression of homologous genes in different mammalian cells, both *in vitro* and *in vivo*. Extensive studies indicated that it was an important tool for gene functional analysis and gene therapy.

Key words RNA interference; lentivirus vector

Received: December 28, 2005 Accepted: March 28, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-21-62603004, Fax: 86-21-62601953, E-mail: yhu@brain.ecnu.edu.cn