

# 第 17 章 siRNA

吴立刚<sup>1</sup> 光寿红<sup>2</sup>

1. 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心；2. 中国科学技术大学

## 本章概要

RNA 干扰是真核生物中由小干扰 RNA 所介导的基因沉默现象。1998 年，Andrew Fire 和 Craig C. Mello 等人研究发现纯化后的双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA) 能特异性地高效阻断靶基因的表达，并将此现象命名为 RNAi。其原理是：dsRNA 在细胞内被 Dicer 加工后产生 siRNA，siRNA 与细胞内的 Argonaute (AGO) 等蛋白质形成 RISC 复合物，识别 mRNA 中与之反向互补配对的序列，直接切断并降解该 mRNA，在转录后水平抑制靶基因表达 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)，或者通过改变染色质结构和阻碍基因转录，在转录水平调控靶基因表达 (transcriptional gene silencing, TGS)。RNAi 在生物体内防止基因组中逆转座元件扩增、调控异染色质的形成，并且在发育的时空调节、细胞命运决定和抵御病毒入侵等方面都发挥了重要功能。同时，由于 RNAi 可通过碱基互补配对特异性地调控任何靶基因的表达，操作简易，使用成本低，因此作为反向遗传学工具被广泛用于探索基因的功能，在临床应用中作为小分子核酸类药物用于疾病治疗，在农业领域被用于植物功能改造和害虫防治，显示出巨大的应用价值。本文对 RNAi 的概念、加工生成、作用机制及毒副作用进行了概述，并探讨了 RNAi 药物的现状与前景。

## 17.1 RNAi 概述

### 关键概念

- RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是真核生物中由小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 所介导的基因沉默现象。
- RISC 复合物 (RNA-induced silencing complex) 在转录后水平抑制靶基因表达，或在转录水平调控靶基因表达。
- RNAi 所介导的基因沉默现象在绝大多数真核生物细胞中保守存在。
- RNAi (RNA interference, RNAi) 是由 dsRNA 引发的靶标基因沉默现象。

RNA 干扰是真核生物中由小干扰 RNA 所介导的基因沉默现象。siRNA 与细胞内的 AGO 等蛋白质形成 RISC 复合物，识别 mRNA 中与之反向互补配对的序列，直接降解该 mRNA，在转录后水平抑制靶基因表达，或者通过改变染色质结构和阻碍基因转录，在转录水平调控靶基因表达。RNAi 在生物体内防止基因组中逆转座元件扩增、异染色质的形成、发育的时空调节、细胞命运决定和抵御病毒入侵等方面都发挥了重要功能。同时，由于 RNAi 可特异性地调控任何靶基因的表达，操作简易，使用成本低，作为

反向遗传学工具被广泛用于探索基因的功能，在临床应用中作为小分子核酸类药物用于疾病治疗，在农业领域被用于植物功能改造和害虫防治，显示出巨大的应用价值。

RNAi 所介导的基因沉默现象在绝大多数真核生物细胞中保守存在，而这一普遍存在的现象却一直到了 20 世纪末才被科学家发现和阐明。早在 20 世纪八九十年代，随着植物组织培养和基因工程技术的发展成熟，在植物中转入某种基因进而改进植物的特定性状成为可能，各国科学家争相在各种植物中进行尝试，获得了大量成功的案例，但也意外遇到了不少适得其反的情况。育种学家希望通过转入色素合成基因改变观赏花卉的色泽，例如，矮牵牛花的紫色深浅由花青素的含量决定，其中查尔酮合成酶是花青素合成过程的限速酶，因此转入查尔酮合成酶基因应该能够获得深紫色，甚至接近黑色的矮牵牛花，但结果却出乎意料，转基因得到的却是浅紫色、白紫相间，甚至白色的矮牵牛花<sup>[1]</sup>。检测结果发现转基因植株中查尔酮合成酶的浓度远远低于未转基因的普通矮牵牛花，这种在植物中由引入同源基因而导致的基因沉默现象被称为共抑制（co-suppression）。几乎同时，科学家在单细胞生物中也观察到了类似的现象，在粗糙链孢霉菌中导入外源基因会抑制具有同源序列的内源基因表达，这种现象被称为基因抑制（quelling）<sup>[2]</sup>。而在研究秀丽隐杆线虫（*C. elegans*）基因功能的实验中发现，注射正义 RNA（sense RNA）不但不能增加该基因的表达，反而有可能会特异性地阻断该基因的表达<sup>[3]</sup>，产生了与注射反义 RNA（antisense RNA）同样的结果，但当时无法对产生这种现象的分子机制做出合理解释，也没有把这些在不同物种中观察到的由同源序列介导的基因沉默现象联系起来。直到 1998 年，Andrew Fire 和 Craig C. Mello 等人制备了高纯度的 RNA 进行研究发现，正义 RNA 不具有抑制靶基因的作用，反义 RNA 对靶基因的抑制作用也很微弱，而纯化后的 dsRNA 却能特异性地高效阻断靶基因的表达<sup>[4]</sup>。研究发现，过去注射反义 RNA 之所以能高效抑制靶基因的表达，主要是由于在以 dsDNA 为模板通过体外转录制备反义 RNA 的过程中，RNA 聚合酶（如噬菌体来源的 T7 RNA 聚合酶）除了转录产生大量反义 RNA 之外，还会以 dsDNA 的反义链为模板转录生成少量正义 RNA，虽然正义 RNA 和反义 RNA 互补配对形成的 dsRNA 量很少，但由于 dsRNA 介导基因沉默的效率比反义 RNA 至少高两个数量级，因此足以对靶基因的表达产生显著的抑制作用。同样原理，在体外转录制备正义 RNA 过程中也会产生少量反义 RNA，配对形成 dsRNA 抑制靶基因的表达。Fire 和 Mello 将这种由 dsRNA 引发的靶标基因沉默现象命名为 RNAi。随后在果蝇细胞中的研究表明，dsRNA 是被加工生成 21~23bp 的小干扰 RNA 来发挥 RNAi 效应的。此后更多的研究表明，植物中的共抑制现象和真菌中的 quelling 现象与动物中的 RNAi 具有很大的相似性，也是由小 RNA 介导的转录后基因沉默现象。RNAi 现象在果蝇、拟南芥、斑马鱼和哺乳动物等真核生物中普遍存在，是生物在长期进化过程中产生的一种监控机制，用来抵御病毒感染、沉默基因组中转座元件，并参与了对内源基因的表达调控。更为重要的是，外源导入的 siRNA 可以被用来调控细胞内几乎任何基因的表达，不仅作为重要的遗传学研究工具被广泛应用于研究生物体内基因的功能，还被进一步开发成为小核酸靶向药物用于疾病的治疗。因此，2006 年的诺贝尔生理学或医学奖授予了发现 RNAi 现象的 Craig C. Mello 和 Andrew Fire 教授，由此开启了非编码小 RNA（small non-coding RNA, small ncRNA）的研究热潮。

## 17.2 siRNA 的加工生成

### 关键概念

- siRNA 是介导 RNAi 现象的关键分子，由两条长度约为 21 个碱基的互补配对的小 RNA 组成。
- 在哺乳动物中，endo-siRNA 主要存在于卵子细胞和早期胚胎中。
- siRNA 主要由四种方式产生：长链 dsRNA 加工生成；RNA 聚合酶 III 启动子转录产生具有茎环结构的 RNA 前体加工生成；RNA 聚合酶 II 启动子转录产生具有短茎环结构的 RNA 前体加工生成；直接通过有机化学方法合成。
- 动物中的 siRNA 通常由 Dicer 剪切长链 dsRNA 而产生，但在植物和线虫中 siRNA 的生成还存在级联放大效应。
- 哺乳动物中可以通过直接化学合成短的双链 siRNA 或通过载体表达 siRNA 前体来产生成熟的 siRNA。
- 短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 是由细胞内 RNA 聚合酶 III 启动子 (如 H1、U6 等) 驱动转录产生的 siRNA 前体。

### 17.2.1 siRNA 的加工生成机制

#### 1. siRNA 的基本概念

siRNA 是介导 RNAi 现象的关键分子，由两条长度约为 21 个碱基的互补配对的小 RNA 组成，其中与靶标 RNA 完全互补配对的一条 siRNA 链为引导链 (guide strand)，另一条 siRNA 链为随从链 (passenger strand)。引导链和随从链之间有 19 个碱基互补配对，在双链 siRNA 两端各形成 2 个碱基的 3' 端悬垂。外源导入或细胞内加工生成的 siRNA 在细胞质内与 AGO 等蛋白质因子结合，形成 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)。siRNA 根据其序列来源可以分为细胞内源的 siRNA 和外源导入的 siRNA。由细胞自身基因组编码转录生成的长 dsRNA，通过 Dicer 蛋白切割产生的 siRNA 被称为细胞内源性 siRNA (endo-siRNA)；不是由细胞自身基因组编码，而是由外源导入细胞的长链 dsRNA 和短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 加工生成的 siRNA，或由化学方法体外合成的 siRNA 被称为外源性 siRNA。

在哺乳动物中，endo-siRNA 主要存在于卵子细胞和早期胚胎中，长度与 miRNA 相似，序列高度异质化，其由细胞内的 RNA 聚合酶 II 或 III 转录生成的正义和反义 RNA 互补配对形成长的 dsRNA，或者同一长 RNA 自身折叠形成具有长的互补配对区的茎环结构的前体，经过 Drosha/DGCR8 加工形成长的 dsRNA，再被细胞质中的 Dicer 酶识别并切割生成 siRNA，然后与 AGO 结合形成 RISC 复合物。endo-siRNA 与靶标 RNA 完全互补配对，通过 AGO2 的内切核酸酶活性切割靶标 RNA 分子，从而导致靶标 RNA 快速降解，是细胞自身编码的内源 siRNA 介导的 RNAi。超过 80% 的 endo-siRNA 来源于重复序列区域，尤其在长散在重复序列 (LINE) 和长末端重复序列 (LTR) 家族富集，在配子发生和早期胚胎发育中抑制反转座子，对维持物种基因组的稳定性具有重要功能，可能也参与了配子生成相关基因的表达调控。

## 2. siRNA 的加工生成机制

siRNA 主要由四种方式产生：长链 dsRNA 加工生成；RNA 聚合酶 III 启动子转录产生具有茎环结构的 RNA 前体加工生成；RNA 聚合酶 II 启动子转录产生具有短茎环结构的 RNA 前体加工生成；直接通过有机化学方法合成。其中，前三种产生途径都需要经过细胞内 Dicer 蛋白的加工。Dicer 基因在不同物种间表现出高度保守性，不仅 dsRNA 加工生成 siRNA 需要 Dicer，细胞内源的 microRNA (miRNA) 的加工生成也离不开 Dicer (参阅本书 microRNA 相关章节)。Dicer 由 DExH-Box 解旋酶结构域、PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) 结构域、tandem RNase III 结构域和 dsRNA 结合域组成。果蝇基因组编码两个 Dicer 同源基因，其中 Dcr-1 含有 PAZ 结构域但缺少 DExH-Box 解旋酶结构域，主要参与 miRNA 的加工；而 Dcr-2 缺少 PAZ 结构域但含有 DExH-Box 解旋酶，能更高效地结合和切割 dsRNA，主要负责 siRNA 的加工生成。哺乳动物通常只编码一个 Dicer 基因，但在小鼠中由于 Dicer 基因的内含子中插入了一个 MT-C 反转座子的启动子，因此同一个基因可以由两个启动子分别转录表达两种不同的 Dicer 蛋白。其中在体细胞中表达全长 Dicer 蛋白 (Dicer<sup>s</sup>)，主要用于生成 miRNA；而在卵子中特异性表达缺失了 N 端 DExH-Box 解旋酶结构域的 Dicer 蛋白 (Dicer<sup>o</sup>)，能高效切割长链 dsRNA，产生大量细胞内源性的 siRNA (endo-siRNA) [5]。已有研究表明 endo-siRNA 主要存在于小鼠卵子细胞和早期胚胎中，长度与 miRNA 相似，序列高度异质化，其由长链 dsRNA 不经过 Drosha/DGCR8 加工，直接被细胞质中的 Dicer<sup>o</sup> 识别并切割，然后与 AGO 结合形成 RISC 复合物切割靶标 RNA 分子，从而导致靶标 RNA 被快速降解。endo-siRNA 在其他哺乳动物卵子和组织中的报道很少，可能是由于缺少类似小鼠卵子中特异性高表达的截短 Dicer 蛋白，导致 dsRNA 被加工生成 endo-siRNA 的效率很低。

## 3. RdRP 介导的 siRNA 扩增效应

动物中的 siRNA 通常由 Dicer 剪切长链 dsRNA 而产生，但在植物和线虫中 siRNA 的生成还存在级联放大效应。首先由 Dicer 对 dsRNA 剪切产生初级 siRNA (primary siRNA)，然后以初级 siRNA 中的一条链为引物、与之互补配对的靶标 RNA 为模板，通过 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA dependent RNA polymerase, RdRP)，如 SGS2 和 QDE21，催化合成新的 dsRNA，随后 Dicer 再次剪切新合成的 dsRNA，生成大量次级 siRNA (secondary siRNA)，进一步作用于靶标 RNA，周而复始产生级联放大效应，少量起始 dsRNA 即能产生大量 siRNA，持久、高效地沉默靶基因的表达<sup>6</sup>。在秀丽隐杆线虫中，次级 siRNA 直接由 RdRP 合成，不依赖于 dsRNA 和 Dicer。小剂量的 dsRNA 分子不仅能引起整个机体对靶基因及其同源基因表达的抑制，而且这种基因沉默的信息还能够通过 siRNA 经由配子传递给下一代。但在其他很多种类昆虫中 RNAi 效率并不高，可能是由于它们体内缺乏能够产生次级 siRNA 效应的 RdRP 酶，导致 RNAi 效率相对较低。

### 17.2.2 siRNA 的前体

在哺乳动物中可以通过直接化学合成短的双链 siRNA 或通过载体表达 siRNA 前体来产生成熟的 siRNA。通过载体表达 siRNA 主要有两种方法：①RNA pol III 启动子 (如 H1、U6 等) 转录产生 shRNA，直接被细胞内的 Dicer 加工成 siRNA；②RNA pol II 启动子 (如 CMV、EF1 等) 转录产生以 miRNA 前体 (pri-miRNA) 为骨架的 shRNAmir，由细胞内的 Drosha/DGCR8 复合物及 Dicer 进行两步加工产生 siRNA。以上两类 siRNA 前体的表达框都可以构建到质粒或病毒载体上进行表达，从而提高其适用的普遍性。产

生的双链 siRNA 被细胞内的 RISC 识别，其中 5'端配对相对不稳定的一条链通常被保留，另外一条链会被降解。被保留下来的单链 siRNA 与 AGO2 结合后通过碱基配对，识别并切割与其序列完全互补的 mRNA 从而沉默靶基因的表达（图 17-1）。理想的 siRNA 能产生较多的引导链和较少的随从链，从而具有更高的沉默效率和更少的脱靶效应。

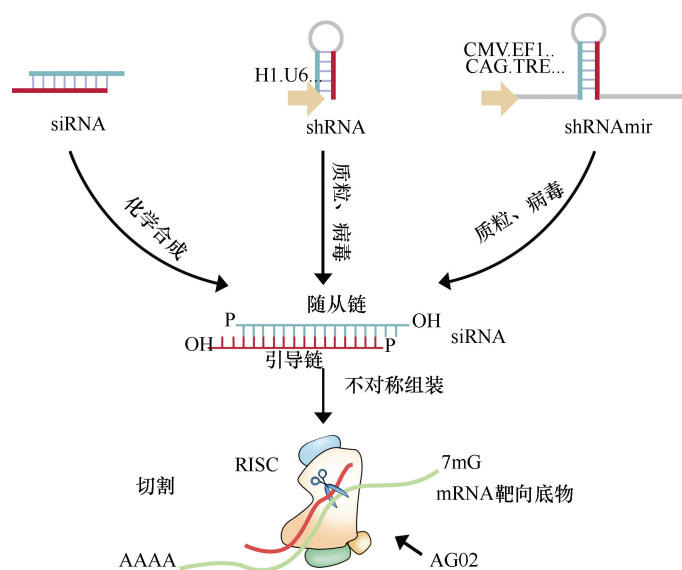


图 17-1 RNA 干扰的分子机制

siRNA 可以通过有机化学方法直接合成，或由 dsRNA、shRNA 和 shRNA 在细胞内被加工生成。其中，dsRNA 和 shRNA 由 RNA 聚合酶 II 启动子（例如，通用启动子 CMV、EF1 等，诱导型启动子 TRE 等）转录产生；shRNA 由 RNA 聚合酶 III 启动子（如 H1、U6 等）转录产生。siRNA 与细胞内源的 Argonaute2 (AGO2) 蛋白结合并组装形成 RISC 复合物，其中的引导链被保留，通过碱基互补配对识别靶位点，在 AGO2 的核酸内切酶活性作用下切割并降解 mRNA。

## 1. 双链的 siRNA 前体 dsRNA

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 30bp 的 dsRNA 会激活细胞的抗病毒及干扰素反应（在胚胎干细胞中该途径被关闭），如 PKR 和 RNase L 途径，导致细胞的迅速凋亡，因而使得 dsRNA 介导的 RNAi 的应用范围受到很大限制。

## 2. 化学合成的 siRNA

为了解决哺乳动物细胞中转入长链 dsRNA 极易引发细胞凋亡的问题，研究人员通过化学方法合成 21bp 的双链 siRNA，直接通过转染导入哺乳动物体细胞，成功实现了对靶基因的沉默作用<sup>7</sup>。由于该方法较为方便快捷，很快获得了广泛应用。研究发现，仅仅转入单链 siRNA 并不能高效引发 RNAi，可能是由于在细胞中单链 siRNA 更容易被核酸酶降解，并且体外结合实验发现单链 siRNA 与 AGO2 的结合效率远远低于双链 siRNA。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。对 siRNA 进行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，但成本高昂，并且进入细胞的 siRNA 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，因此化学合成的 siRNA 在应用中仍有一定局限性。

### 3. 具有茎环结构的 siRNA 前体 shRNA

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——短发夹 RNA（short hairpin RNA, shRNA）<sup>[8, 9]</sup>。目前广泛使用的 shRNA 包含一段长于 4nt 的顶端单链环结构，以及长度为 21~25bp 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 21bp 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。

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 22nt 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。大多数 miRNA 基因首先由 RNA 聚合酶 II（RNA polymerase II, RNP 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'端多聚腺苷酸尾[poly (A) tail]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 Drosha 及其协助蛋白 DGCR8 识别并切割生成长度约 70nt 的前体 miRNA（precursor miRNA, pre-miRNA），Exportin-5 识别 pre-miRNA 的 3'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 22bp 的双链 miRNA，其中 5'端碱基配对相对不稳定的那条链会进入 RISC 发挥功能。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。由于 siRNA 和 miRNA 在长度、结构、加工途径和结合的蛋白质等方面都较为类似，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 Drosha 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<sup>[10, 11]</sup>。相对于 Pol III 启动子的高效性，使用 Pol II 启动子的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 启动子或光调控的启动子，可以实现由小分子化合物或光诱导的基因沉默，且更为灵活，目前已经成为在哺乳动物中使用最为广泛的 RNAi 工具。

## 17.3 RNAi 的调控机制

### 关键概念

- RNAi 在细胞质中沉默基因表达的手段主要是通过 siRNA-RISC 介导的核酸内切酶作用降解 mRNA。这种作用机制在各种动植物中高度保守。
- microRNA (miRNA) 是一类长度约为 21nt 的细胞内源小分子非编码 RNA，具有重要的基因表达调控功能。
- RNAi 不仅能在细胞质中通过抑制翻译和降解 RNA 来调控靶基因的表达，还能进入细胞核内，通过调控转录、组蛋白修饰和 RNA 加工等多种方式发挥其功能。

### 17.3.1 siRNA 介导的转录后基因表达调控机制

#### 1. siRNA 介导的 RNA 降解机制

RNAi 介导的基因沉默现象在细胞质和细胞核内都可以发生。其中 RNAi 在细胞质中的作用机制研究得相对比较清楚，其沉默基因表达的手段主要是通过 siRNA-RISC 介导的核酸内切酶作用降解 mRNA。这种作用机制在各种动植物中高度保守。其中 AGO 是 RISC 复合物中的核心蛋白，结合 siRNA 并切割靶基因的 RNA。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，仅加入 siRNA 和 AGO2 就足以对靶 RNA 进行切割。AGO2 蛋白的分子质量约为 100kDa，结构特征在进化中高度保守，主要由 PAZ、MID 和 PIWI 三个结构域组成。其中，PAZ 结构域识别 Dicer 切割形成的 RNA 3'端悬垂碱基；MID 结构域可以特异性结合 siRNA 5'端的磷酸基团，偏好 U 和 A 碱基，可以将 siRNA 锚定在 AGO 蛋白上；PIWI 结构域包含类似核酸酶 RNase H 的催化核心结构。在进化过程中，部分 AGO 家族成员的 PIWI 结构域中氨基酸序列发生改变而丧失了原有的核酸内切酶活性。在不同的物种中，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 (AGO1~AGO4)，它们均可以结合 siRNA，但其中只有 AGO2 具有核酸内切酶活性<sup>[12]</sup>，AGO1、AGO3 即使结合了 siRNA，也只能通过类似 miRNA 的机制发挥对靶基因的抑制作用，但效率要远远低于由 AGO2 介导的 RNAi，在 RNAi 中发挥次要作用。与 AGO2 结合的 siRNA 通常 5'端带有单磷酸基团，3'端带有羟基。化学方法体外合成的 siRNA 通常 5'端带有羟基，但在进入细胞后会被磷酸激酶迅速磷酸化生成单磷酸基团，然后能被 AGO 蛋白的 MID 结构域特异性识别和结合。另外，siRNA 还需要细胞内 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。siRNA 在结合 RISC 复合物后，通常只有一条 siRNA 链被保留，另一条 siRNA 链大部分在形成 RISC 复合物过程中被丢弃并降解。siRNA 的这种链选择性主要取决于双链 siRNA 5'端碱基配对的热力学稳定性，5'端碱基配对相对不稳定的那条链更倾向于被 RISC 保留<sup>[13, 14]</sup>。RISC 携带的 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 蛋白利用其 PIWI 结构域的核酸内切酶活性，催化切割与 siRNA 完全互补配对的靶标 RNA，切割位点位于与 siRNA 第 10 位和第 11 位核苷酸配对的靶标 RNA 上所对应的两个核苷酸之间的磷酸二酯键，切割产生的 5'RNA 片段的 3'端带有羟基，3'RNA 片段的 5'端带有磷酸基团。AGO2 切割后产生的 RNA 片段极易受到细胞内 5'或 3'核酸外切酶的攻击而被快速降解，从而在转录后水平沉默靶基因的表达。

#### 2. siRNA 和 miRNA 介导的转录后调控机制的异同

miRNA 是一类长度约为 21nt 的细胞内源小分子非编码 RNA，具有重要的基因表达调控功能。包括人类和哺乳动物在内的大部分真核生物的基因组都编码数百种 miRNA，并且在不同组织和发育阶段，miRNA 的表达水平具有显著差异，呈现出明显的时空特异性。目前认为 miRNA 直接调控基因组中 1/3 以上基因的表达，参与了细胞增殖、分化、凋亡和代谢等几乎所有的生命过程。同时，越来越多的证据表明，miRNA 的表达异常与包括癌症、心血管疾病、病毒感染在内的多种疾病的发生发展密切相关。siRNA 与 miRNA 在核酸序列长度及结合的蛋白质复合物组成上相似，但它们在分子机制和功能上又有显著差别。RNAi 发挥功能主要依赖于 AGO2 蛋白，要求 siRNA 与靶位点序列完全互补配对，RISC 中的 AGO2 直接切割靶 RNA，并导致其被快速降解。如果 siRNA 第 2 位到第 19 位之间的碱基与靶 RNA 间存在错配，

会对 AGO2 切割靶 RNA 的效率产生极大影响。由于这个特点, siRNA 可以被用来选择性切割只有单碱基差别的不同 RNA, 如选择性清除由于基因发生点突变而产生的有害 mRNA。而 miRNA 发挥作用依赖于包括 AGO1 到 AGO4 等多种 AGO 蛋白, 通常只需要 miRNA 第 2 位到第 8 位的碱基与靶 RNA 互补配对, 通过 AGO 蛋白招募 TNRC6 和 CCR4-NOT 复合体, 介导靶 RNA 的翻译抑制, 并且加速脱去靶 RNA 上 3'端的 poly (A) tail], 导致多聚腺苷酸结合蛋白 (polyadenylate-binding protein 1, PABPC1) 逐步丢失, 促进脱帽酶 DCP1 和 DCP2 对 mRNA 5'端帽子结构 (m7Gppp) 的切除, 最终导致 mRNA 失去 5'端和 3'端的保护而被核酸外切酶降解<sup>[15]</sup> (图 17-2)。

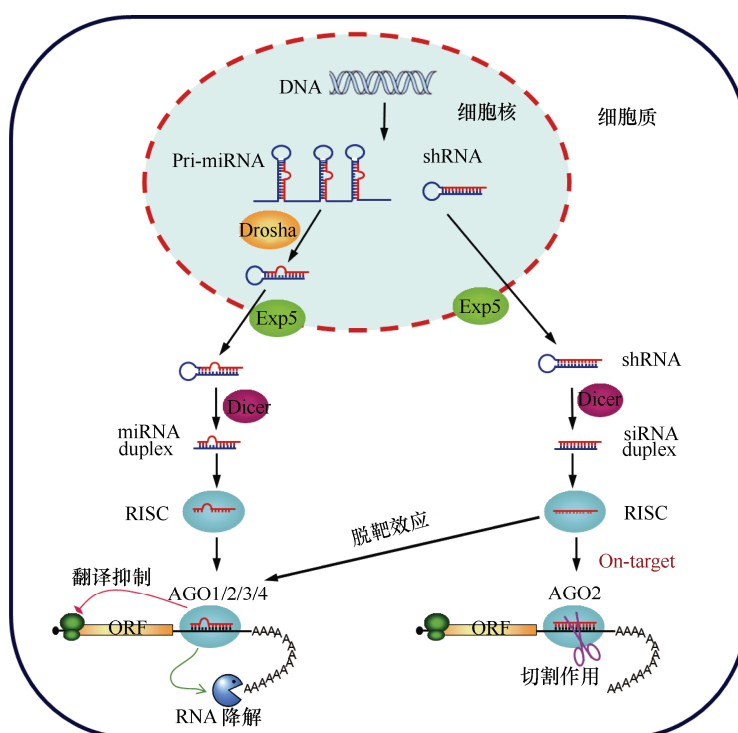


图 17-2 RNA 干扰与 miRNA 的分子机制比较

siRNA 与 microRNA (miRNA) 长度相似, 调控靶基因的分子机制有显著差别。siRNA 与 mRNA 上的结合位点完全互补配对, RISC 中的 AGO2 直接切割 mRNA 导致其被快速降解 (on-target)。而 miRNA 与 mRNA 上的结合位点部分互补配对, RISC 中的 AGO1、2、3、4 通过招募下游其他因子导致 mRNA 的翻译被抑制, 并加速 3'端的 poly (A) 缩短而导致 mRNA 降解。如果 siRNA 与 mRNA 上的结合位点部分互补配对, 则 siRNA 通过类似 miRNA 的机制沉默基因的表达, 造成脱靶效应 (off-target)。

siRNA 和 miRNA 作用机制的不同造成了它们的效率差别显著。RISC 复合物中的 siRNA 与靶 RNA 互补配对后, 通常在几分钟内 AGO2 就可以完成对靶 RNA 的切割, RISC 迅速离开靶 RNA 后可以对下一个靶 RNA 进行识别和切割, 如此循环往复发挥功能, 少量 siRNA-RISC 就能完成对大量靶 RNA 的切割, 因而沉默靶基因表达的效率很高。相对而言, miRNA 发挥作用的速度较为缓慢, miRNA-RISC 识别和结合靶 RNA 通常持续若干小时, 直到靶 RNA 被降解后 miRNA 才能被释放重新发挥调控功能。另外, siRNA 和 miRNA 不同作用机制引起的后果也有显著区别: 当 mRNA 被 siRNA-RISC 从中间切断后, 不仅无法进行翻译, 而且被截断的 RNA 会被迅速降解, 是不可逆的转录后调控方式。而 miRNA 介导的是可逆调控, 翻译被抑制的 mRNA 在抑制作用被解除后可以重新进行翻译, 即使是已经发生了 3'端 poly (A) 尾部分被缩短的 mRNA, poly (A) 尾也可以重新被延长而进行翻译。例如, 在正常生理条件下, CAT-1 mRNA 的翻译被肝脏特异性表达的 miR-122 抑制, mRNA 被运输并储存在细胞质中



的 P 小体 (P-body) 中。当外界生理条件发生改变时, CAT-1 mRNA 可以在 HuR 蛋白的作用下从 P 小体中被释放出来并重新开始翻译。

### 17.3.2 siRNA 介导的基因表达转录调控机制

RNAi 不仅能在细胞质中通过抑制翻译和降解 RNA 来调控靶基因的表达, 还能进入细胞核内, 通过调控转录、组蛋白修饰和 RNA 加工等多种方式发挥其功能<sup>[16]</sup>。

#### 1. RNAi 介导的表观遗传修饰

染色质修饰是调节基因表达和染色体稳定性的基本方式之一。RNAi 通路在细胞核内可以通过组蛋白或者 DNA 的甲基化来表观修饰染色体, 从而在转录水平抑制靶标基因<sup>[17-20]</sup>。在多细胞动物中, 异染色质的形成对于维持基因组的完整性具有重要的调节功能。异染色质必须被精确地调控以防止重要的基因被抑制而不能正常表达, 当染色质的修饰发生缺陷时会造成癌症等许多疾病。拟南芥中, hc-siRNA 主要来源于重复序列和转座子区域, 并被招募回基因组上其产生位点或具有同源序列的染色质区域, 可以序列特异性地指导基因组上 DNA 的甲基化 (RNA-directed DNA methylation, RdDM) 和组蛋白修饰, 并最终导致转录抑制。在裂殖酵母中, RNAi 对于具有大量重复序列的着丝粒、端粒、交配位点的异染色质的形成具有重要的作用。着丝粒周边区域的重复序列, 可以通过双向转录形成 dsRNA, 然后由 Dcr1 加工成为 siRNA。siRNA 诱导的 RISC 复合体募集染色质修饰因子, 通过使 DNA 甲基化、组蛋白去乙酰化、组蛋白甲基化、染色质构象改变等多种途径造成异染色质的形成和维持, 从而沉默区域内的基因表达<sup>[20-22]</sup>。果蝇的染色体中引入多拷贝串联的转基因时, 会导致转基因及其同源的内源基因共同沉默。这种重复序列导致的基因沉默与植物中 RNA 介导的转录水平共抑制相类似, 都需要多梳状组分基因 (polycomb-group protein, PcG), 以及包括 PIWI 和 AGO2 在内的许多 RNAi 通路因子。在秀丽隐杆线虫中, 导入外源的 dsRNA 可以诱导对应靶基因的 H3K9 和 H3K27 的三甲基化修饰。这一过程依赖于细胞核内 RNAi 通路和 RdRP。NRDE-3 是一种 AGO 蛋白, 可以从细胞质转运由 RdRP 生成的 siRNA 进入细胞核。在细胞核内, siRNA/NRDE 复合物招募 SET-25 来介导靶基因位点的 H3K9me 和招募 PRC2 复合物来介导 H3K27me (图 17-3)。在哺乳动物细胞中, 细胞核 RNAi 的功能与机制的研究还相对滞后。早期的很多研究往往集中在小 RNA 靶标到启动子区域时, 可以通过诱导异染色质的形成来实现转录水平的基因沉默<sup>[23]</sup>。

在真核生物中, 甲基化的 H3K27 是 PcG 介导转录水平基因沉默的重要标志。组蛋白 H3K27me 是由含有 SET 结构域的组蛋白甲基转移酶催化, 同时被组蛋白修饰 reader 蛋白识别以调控基因表达或者维持基因组完整性。在果蝇中, PcG 复合物和 RNAi 机器可以一起发挥作用使基因沉默, 同时调节靶标染色体的组装、影响转录水平和转录后水平的基因沉默<sup>[24]</sup>。果蝇的 PcG 蛋白可以通过结合 PcG 响应元件 PRE 来抑制同源异型基因的表达。Dcr2、PIWI、和 AGO1 这三个 RNAi 关键因子的突变会显著性地减少 PcG 蛋白与内源同源异型基因的结合。在秀丽隐杆线虫中, siRNA 可以介导 H3K27me3 的获得和遗传, 这一过程依赖于 Nrde 通路。外源性和内源性的 siRNA 都可以通过 Nrde 通路实现基因靶向位点的 H3K27 的甲基化修饰。RNAi 介导的 H3K27me 不仅对基因表达起到调控作用, 也参与染色体完整性的维持。例如, piRNA 介导的 H3K27 甲基化在四膜虫基因组的程序性消除中起着关键作用<sup>[25]</sup>。一个特异性结合 H3K27 甲基化的组蛋白甲基转移酶 EZL1 可以介导 H3K27 的甲基化, 并且对于发育相关的 DNA 消除和 RNAi 沉默的调节也是必需的。

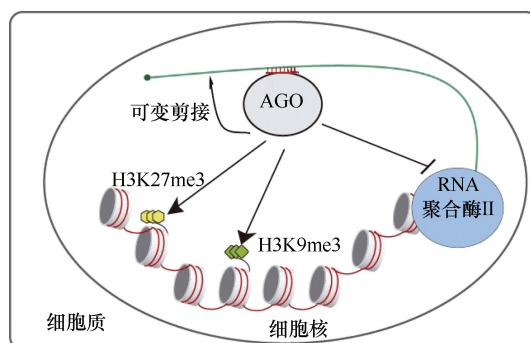


图 17-3 细胞核 RNA 干扰的分子机制

AGO 蛋白结合小干扰 RNA，进一步结合到序列互补的正在被转录的 pre-mRNA 上。通过尚未完全明了的机制，影响 pre-mRNA 的选择性剪切、靶基因区域组蛋白 3 的赖氨酸 9 和赖氨酸 27 的三甲基化，同时还抑制 RNA 聚合酶 II 的转录延伸过程。

## 2. RNAi 与转录调控

细胞核是 RNA 合成、加工和调控的中心，转录和剪切都在细胞核中发生。nascent RNA 的转录本可以募集 RNAi 复合物到达靶标基因，促进染色质水平的转录沉默，同时抑制 RNAP II 在 DNA 上的延伸。在动物细胞中，RNAi 通路在细胞核内调控转录过程的机制还不明确，仍存在很大争议。有研究表明，针对启动子区域的小 RNA 可以抑制基因表达。SETDB1 作为 H3K9 特异性的甲基转移酶可以和 AGO2 相结合，在小 RNA 介导的转录水平基因沉默中起着重要作用。染色质免疫共沉淀表明，小 RNA 诱导的 AGO2 首先靶标到雄性激素受体 (AR) 的启动子上。在秀丽隐杆线虫中，细胞核 AGO 蛋白 NRDE-3 从细胞质转运由 RdRP 生成的 siRNA 进入细胞核。在细胞核内，siRNA 指导 NRDE-3 靶标到 pre-mRNA 上进一步募集 NRDE-2 和 NRDE-1，从而终止 RNAP II，抑制转录的延伸，造成转录的提前终止<sup>[26]</sup>。有意思的是，另外一个 AGO 蛋白 CSR-1 结合 22G RNA，靶标到基因组序列上，募集 RNAP II，反而促进基因的表达。因此，CSR-1 通路可以帮助维持激活的转录本，促进区分转录激活和沉默的基因组区域，这一现象的分子机制尚不清楚。

## 3. RNAi 与染色体分离

染色体上中性粒是一个特殊区域，它对染色体在动粒上的组装和染色体与纺锤体的结合都非常关键。中性粒区域的异染色质可以帮助动粒形成和姐妹染色体的联会，抑制重组，还能帮助减数分裂过程中的染色体配对。异染色质往往富集 H3K9me3 修饰，从而引导 HP1 及其相关含克罗英结构域的蛋白质结合在这一区域。真核生物的中性粒区域往往有很长的物种特异的 DNA 重复序列，而且这些重复序列可以被转录出来。RNAi 机器和 siRNA 则可以通过调控这些转录本，在染色体配对分离中起重要作用。在裂殖酵母中，RNAi 导致动粒周边区域的异染色质化，并促进 CENP-A (Cnp1) 和动粒的组装<sup>[27, 28]</sup>。在果蝇中，生殖细胞特异的 DEAD-box RNA 解旋酶 Vasa 通过帮助凝缩蛋白 (condensin) I 相关因子 Barren 在染色体上的定位来促进有丝分裂中染色体的分离。在人类细胞中，RNAi 机器和 siRNA 在有丝分裂后期染色体的分离中也起着关键作用。

秀丽隐杆线虫缺乏类似人类细胞的单一中心粒结构，而采取一种弥散着丝粒 (holocentromere) 模式。RNAi 机器也在秀丽隐杆线虫的染色体配对分离中起重要作用。CSR-1 及其辅助因子都位于生殖细胞的染色体上，并依赖于 CSR-1 结合的内源性 siRNA<sup>29</sup>。siRNA/CSR-1 可能通过标记染色质的不同区域来监控染色体分离。当 CSR-1 缺失的时候，染色体不能正确排列在赤道板上，动粒也不能正确

定位到纺锤体的相反方向。

## 4. RNAi 与选择性剪切

选择性剪切给基因组的功能多样性提供了重要的物质基础，大于 90% 的人类基因存在选择性剪切。选择性剪切的缺陷会导致众多的人类疾病。选择性剪切通常通过 pre-mRNA 中的一些结构域来调控，包括剪切增强子和沉默子。RNAP II 转录速率的改变及染色质的局部结构也可能参与这一调控。哺乳动物细胞中，siRNA 可以调控转录过程中转录本的选择性剪切<sup>[19, 30]</sup>。siRNA 把 AGO2 招募到 pre-mRNA 上，改变 pre-mRNA 的剪切方式，却并不造成 pre-mRNA 的降解。例如，在 CD44 基因中，AGO1 和 AGO2 可以被招募到 pre-mRNA 上，这一过程依赖于 Dicer。dsRNA 也可以招募 AGO2 到 SMN2 和 dystrophin 的 pre-mRNA 上，诱导选择性剪切。去除 AGO1 或 Dicer 会改变基因组里很多基因的选择性剪切方式。AGO1 还可以结合增强子 RNA (enhancer RNA, eRNA) 的转录区域，从而改变邻近基因的选择性剪切方式。有意思的是，AGO2 介导的选择性剪切在果蝇里也有类似的报道。

尽管过去几年里我们对细胞核内 siRNA 如何调控基因表达有了一些初步的了解，然而这里面还存在大量的问题有待研究。例如，我们并不清楚细胞核 RNAi 造成 H3K9 甲基化、H3K27 甲基化和 RNAP II 的转录延伸暂停具体的分子机制是什么，RNAi 如何调控转录的其他过程如起始、终止、剪切等。在细胞核内，小 RNA 和 RNAi 机器在多大程度上参与染色体的配对分离，以及是否受生殖发育过程的调控也不清楚。阐明这些问题不仅会加深我们对遗传和进化过程的理解，而且将给我们对真核基因组表观遗传调控的研究带来新的启示。

## 17.4 RNAi 引起的毒副作用

### 关键概念

- 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，这种现象被称为 RNAi 的脱靶效应<sup>[31]</sup>。
- RNAi 载体表达 siRNA 时对细胞内源 miRNA 加工和功能的竞争抑制可造成毒副作用。
- RNAi 副作用与 shRNA 抑制靶基因的效率密切相关。

### 17.4.1 siRNA 的脱靶效应

RNAi 技术作为一种功能强大的基因调控工具得到广泛应用，但其固有的缺点也逐渐显现，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 的第 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，这种现象被称为 RNAi 的脱靶效应<sup>[31]</sup>。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，它们所介导的脱靶效应甚至比 AGO2 更高。研究表明，siRNA 可能会对细胞内几十甚至几百个基因的表达产生影响，导致对靶基因功能的错误解读。

双链 siRNA 分子中除引导链外，随从链也会产生脱靶效应。虽然在设计时通过改变双链 siRNA 5'端

碱基配对的稳定性可以提高引导链保留的比例, 但仍有部分随从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), 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。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<sup>[32]</sup>。因此, 当 siRNA 的引导链沉默正义链 RNA 时, 其随从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。

### 17.4.2 siRNA 对内源 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 还是 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 Drosha、Dicer 和 Exportin-5 等蛋白因子, 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, 转到细胞内也会同内源 miRNA 竞争与 AGO 蛋白的结合, 从而影响 miRNA 的表达和功能<sup>[33]</sup>。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<sup>[34, 35]</sup>。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, 已成为 RNAi 载体设计的挑战之一。

### 17.4.3 减少 RNAi 毒副作用的对策

在利用 siRNA 或 shRNA 文库进行大规模功能性筛选的过程中, RNAi 沉默效率低可导致假阴性结果, 而脱靶效应和对内源 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 药物的功效和使用成本。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和对内源 miRNA 的影响, 结果导致细胞生长抑制或死亡。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。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公司和生物技术公司在进行研发, 尚没有统一的通用方案。经过化学修饰的单链 siRNA 可在动物体内介导 RNAi, 该方法消除了随从链造成的脱靶效应。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' 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<sup>[36]</sup>。近期, 一类短双链区的新型 RNAi 载体 (sshRNA、AGOshRNA、saiRNA) 受到广泛关注<sup>[37-39]</sup>。相较传统含 21~25bp 双链区的 shRNA, 新型 RNAi 载体双链区长度仅为 16~18bp, 顶端环大小为 3~8nt,



且顶端环越小,其对靶基因的抑制效率越高。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 24~27nt 的单链 siRNA,明显长于经典的 21nt 的 siRNA,但同样能以 RNAi 的方式沉默靶基因。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<sup>40, 41</sup>。进一步在 saiRNA (single-stranded AGO2-processed interfering RNA) 茎环结构的 3'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茎环结构 3'端产生两个碱基悬垂,明显促进了其与 AGO2 的结合和基因沉默效率<sup>[39]</sup>。依赖于 AGO2 内切酶活性的特殊加工方式不仅消除了随从链带来的脱靶效应,以及 siRNA 引导链进入无切割活性的 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,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,要获得沉默效率超过 90%的 shRNA 则必须进行大量的筛选。基于高通量克隆和深度测序的筛选研究证实“超级”shRNA 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”shRNA 即能实现对靶基因高达 90%以上的抑制效率<sup>[42]</sup>。然而,目前除了一些基本的设计规则,尚无有效的通用算法能预测 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内获得全面的信息。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 识别并加工产生成熟的 miRNA,称为 mirtron<sup>[43, 44]</sup>。因此,我们预期随着对各种小 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。

## 17.5 RNAi 药物的前景与挑战

### 17.5.1 RNAi 药物的特点

RNAi 作为疾病治疗的新工具,具有其独特的优势。目前在疾病治疗中使用的绝大多数药物都是小分子化合物,具有穿透细胞能力强、给药简单、化学性质稳定、较易规模化生产和廉价等优点,但大多数具有重要功能的潜在治疗靶点蛋白难以找到或设计特异性的小分子抑制剂,如与肿瘤发生发展密切相关的 *Ras* 基因和 *P53* 基因,不可成药性 (undruggable target) 成为小分子药物发展的巨大瓶颈。RNAi 通过 siRNA 与基因转录生成的 RNA 之间的碱基序列互补配对降解 RNA,从而选择性沉默靶基因。近年来发现了大量具有重要生物学功能的长非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA),小分子药物几乎不可能降解或抑制 lncRNA 的功能,而运用 RNAi 技术同样可以通过设计相应的 siRNA 达到抑制作用。因此,RNAi 几乎可以特异性靶向细胞内表达的任何 RNA,克服了小分子药物的局限,大大拓展了靶向治疗的基因选择范围,并且设计多个 siRNA 分子就能实现同时抑制多个不同的基因,为治疗由于多基因改变和多因素引起的疾病提供了可能。

RNAi 技术的应用前景光明,但也还存在一系列技术难点需要在未来的研究中克服和改进。①特异性和安全性。RNAi 作为小核酸药物应用于疾病治疗中首先要考量的因素是 siRNA 必须具有高度的靶向选

择性和较低的毒副作用,因此必须进行严格的筛选和测试。除了利用生信分析进行预测外,还必须进行充分的生化实验测试,包括细胞生长和毒性测试,尽可能选择脱靶效应低、毒副作用小的 siRNA 用于人体实验。②高效性。使用少量的高效 siRNA 就能完全抑制靶基因的表达,不仅能节省治疗的费用,也有利于减少毒副作用。RNAi 的效率取决于众多因素,例如,siRNA 在细胞中的半衰期、进入 RISC 复合物和链选择性分离的效率、介导切割靶 RNA 的效率等,需要全面考虑各个步骤。未经修饰的 siRNA 在细胞内的半衰期很短,通过对 siRNA 进行特定化学修饰可以大大提高其稳定性,并且有利于选择性保留 siRNA 靶向链和减少脱靶效应。③siRNA 的定向递送。实现组织特异性高效递送 siRNA 是实现 RNAi 在疾病治疗中应用的关键,也是难点。由于 siRNA 具有较强的亲水性,因此需要借助脂质体或纳米颗粒包裹后方能穿过细胞膜,也可以通过在 siRNA 上进行胆固醇修饰而直接进入细胞内。静脉注射的 siRNA 会随血液流动大量进入肝脏被清除,在纳米颗粒载体表面交联特异性抗体可以将更多的 siRNA 定向递送到表达特定表面抗原的组织和细胞中,不仅提高了效率,而且减少了对其他组织器官的毒性。另一重要 siRNA 递送策略是使用病毒载体表达 shRNA,利用特定血清型的病毒表面蛋白包装 shRNA 载体,并结合使用组织特异性的启动子,可以实现在特定细胞或组织中持续长时间表达 siRNA。

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,在基因功能的研究中得到广泛应用。我们认为 CRISPR 和 RNAi 各有所长,今后将在各自擅长的领域发挥重要作用。CRISPR 技术的优势是能永久地改变基因组 DNA 的序列,但在基因沉默方面 RNAi 技术有其独特的优势。①RNAi 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 发挥功能,除 siRNA 外无需引入其他因子。而 CRISPR 需同时转入 Cas9 蛋白和 sgRNA,这不仅增加了递送技术的难度,而且 Cas9 还可能引发人体的免疫反应和其他意想不到的副作用。②RNAi 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,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。③RNAi 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,给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。④RNAi 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 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,在选择应用基因沉默技术时应针对上述特点加以考量。

## 17.5.2 RNAi 在农业生产和疾病治疗中应用的展望

RNAi 能特异性抑制基因表达,具有简单高效和应用灵活的特点,在动、植物中都得到了广泛的应用。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,达到利用 RNAi 防治植物病虫害的目的。2007 年中国科学家在棉花中表达针对棉铃虫的棉酚解毒基因的 dsRNA,棉铃虫食用了该转基因棉花后棉酚解毒基因 *P450* 的表达显著降低,导致对棉酚的耐受性大大降低而死亡<sup>45</sup>,创立了一种新的害虫防治策略。另外,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 I 到 III 期临床试验, 并取得了较好的预期治疗结果。2018 年, 美国 FDA 批准了由 Alnylam 公司开发的首款 siRNA 药物 ONPATTRO (patisiran), 用于治疗成人遗传性转甲状腺素蛋白 (hATTR) 淀粉样变性引起的多发性神经病变 (polyneuropathy), 具有里程碑的意义。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。

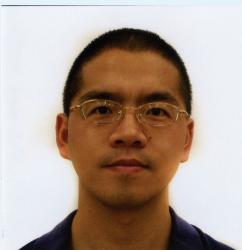
总之, 通过提高 RNAi 载体的效率, 降低其毒副作用及改进递送方法, RNAi 技术必将在今后的科学研究和疾病治疗中继续发挥巨大价值。

## 参 考 文 献

- [1] Napoli, C. *et al.* Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289(1990).
- [2] Romano, N. & Macino, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 6, 3343-3353(1992).
- [3] Guo, S. & Kemphues, K. J. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C.elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611-620(1995).
- [4] Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811(1998).
- [5] Flemr, M. *et al.* A retrotransposon-driven dicer isoform directs endogenous small interfering RNA production in mouse oocytes. *Cell* 155, 807-816(2013).
- [6] Zamore, P. D. *et al.* RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33(2000).
- [7] Elbashir, S. M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498(2001).
- [8] Brummelkamp, T. R. *et al.* A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553(2002).
- [9] Paddison, P. J. *et al.* Short hairpin RNAs(shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes & Development* 16, 948-958(2002).
- [10] Dickins, R. A. *et al.* Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. *Nature Genetics* 37, 1289-1295(2005).
- [11] Stegmeier, F. *et al.* A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13212-13217(2005).
- [12] Liu, J. D. *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441(2004).
- [13] Khvorova, A. *et al.* Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216(2003).
- [14] Schwarz, D. S. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208(2003).
- [15] Wu, L. & Belasco, J. G. Let me count the ways: Mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 29, 1-7(2008).
- [16] Feng, X. & Guang, S. Small-interfering RNA-mediated epigenetics and gene regulation in the nucleus. *Scientia Sinica Vitae* 47, 59-68(2017).
- [17] Baulcombe, D. RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363(2004).
- [18] Moazed, D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 457, 413-420(2009).
- [19] Castel, S. E. & Martienssen, R. A. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and

- beyond. *Nat Rev Genet* 14, 100-112(2013).
- [20] Cam, H. P. Roles of RNAi in chromatin regulation and epigenetic inheritance. *Epigenomics* 2, 613-626(2010).
  - [21] Verdel, A. *et al.* RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 303, 672-676(2004).
  - [22] Martienssen, R. & Moazed, D. RNAi and heterochromatin assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a019323(2015).
  - [23] Kim, D. H. *et al.* Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 13, 793-797(2006).
  - [24] Pal-Bhadra, M. *et al.* RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol Cell* 9, 315-327(2002).
  - [25] Feng, X. & Guang, S. Non-coding RNAs mediate the rearrangements of genomic DNA in ciliates. *Sci China Life Sci* 56, 937-943(2013).
  - [26] Feng, X. & Guang, S. Small RNAs, RNAi and the inheritance of gene silencing in *Caenorhabditis elegans*. *J Genet Genomics* 40, 153-160(2013).
  - [27] Folco, H. D. *et al.* Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science* 319, 94-97(2008).
  - [28] Hall, I. M. *et al.* RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 193-198(2003).
  - [29] Claycomb, J. M. *et al.* The Argonaute CSR-1 and its 22G-RNA cofactors are required for holocentric chromosome segregation. *Cell* 139, 123-134(2009).
  - [30] Matzke, M. A. & Birchler, J. A. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet* 6, 24-35(2005).
  - [31] Jackson, A. L. *et al.* Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology* 21, 635-637(2003).
  - [32] Yap, K. L. *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* 38, 662-674(2010).
  - [33] Khan, A. A. *et al.* Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol* 27, 549-555(2009).
  - [34] Grimm, D. *et al.* Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441, 537-541(2006).
  - [35] Grimm, D. *et al.* Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver. *Journal of Clinical Investigation* 120, 3106-3119(2010).
  - [36] Gu, S. *et al.* The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo. *Cell* 151, 900-911(2012).
  - [37] Ge, Q. *et al.* Minimal-length short hairpin RNAs: The relationship of structure and RNAi activity. *Rna-a Publication of the Rna Society* 16, 106-117(2010).
  - [38] Liu, Y. P. *et al.* Dicer-independent processing of short hairpin RNAs. *Nucleic Acids Research* 41, 3723-3733(2013).
  - [39] Shang, R. *et al.* Ribozyme-enhanced single-stranded Ago2-processed interfering RNA triggers efficient gene silencing with fewer off-target effects. *Nat Commun* 6, 8430(2015).
  - [40] Cheloufi, S. *et al.* A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465, 584-U576(2010).
  - [41] Cifuentes, D. *et al.* A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires argonaute2 catalytic activity. *Science* 328, 1694-1698(2010).
  - [42] Fellmann, C. *et al.* Functional identification of optimized RNAi triggers using a massively parallel sensor assay. *Mol Cell* 41, 733-746(2011).

- [43] Okamura, K. *et al.* The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 130, 89-100(2007).
- [44] Ruby, J. G. *et al.* Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448, 83-86(2007).
- [45] Mao, Y. B. *et al.* Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology* 25, 1307-1313(2007).



**光寿红** 中国科学技术大学教授。1996 年在中国科学技术大学生物系获得学士学位。1996~1999 年师从中国科大施蕴渝院士进行多肽的溶液构象研究, 并获得硕士学位。1999~2004 年, 在美国威斯康星大学癌症研究所师从 Janet Mertz 教授, 研究真核生物中病毒起源的无内含子 RNA 的表达和调控机制并获得博士学位。2005~2010 年, 作为博士后在威斯康星大学遗传系 Scott Kennedy 教授实验室, 从事模式生物中小干扰 RNA 的功能和调控机理的研究。2010 年, 作为中国科学技术大学百人计划和青年千人特聘教授加入生命科学院, 进一步研究非编码 RNA 的功能和调控机制。以第一作者和通讯作者在 *Nature* 和 *Science* 等国际著名期刊上发表论文。主要研究领域有: ①真核细胞中 RNA 的表达与加工的调节; ②真核生物中转录调节机制; ③非编码 RNA 的表达与调节机制; ④模式生物的遗传与发育; ⑤基因编辑和染色体操纵的新技术和新方法。



**吴立刚** 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心研究员、博士生导师。1996 年本科毕业于上海交通大学生物科学与技术系。2001 年博士毕业于中国科学院上海植物生理研究所遗传学专业。2001~2008 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物化学与细胞生物学研究所研究员。主要研究哺乳动物中非编码小 RNA (miRNA、siRNA、piRNA) 和 RNA 代谢调控的分子机制。主要成果包括: ①发现 miRNA 加速 mRNA 降解的机制, 并且证明该途径也是 siRNA 引起的 RNAi 脱靶效应 (off-target) 的机制, 该研究成果于 2006 年以封面文章发表在 PNAS 上, 他引超过 800 次; ②发现 Ago 蛋白家族各个成员对 RNAi 的 on-target 和 off-target 的贡献差异, 是影响 RNAi 效率和专一性的重要因素, 并且翻译抑制对 RNAi 也有重要贡献, 在此基础上重新设计了 RNAi 载体, 并引入了自切割核酶, 研发了更为安全高效的单链 saiRNA; ③鉴定了 miRNA 引起 mRNA 降解的关键脱腺苷酸化酶 CCR4 和 Caf1, 并且证明该酶对 siRNA 引起的 RNAi 脱靶效应也发挥了重要作用; ④发现 CCR4-NOT1 复合物加速 m6A 修饰 RNA 的 3'端 poly (A) 尾和降解的分子机制; ⑤发现 miRNA 作为细胞内的质量监控系统, 负责清除无义突变 mRNA 的新功能; ⑥建立了高灵敏的单细胞小 RNA 深度测序技术, 在哺乳动物精子和卵子中发现了多种新类型的小 RNA。