RNA 干扰技术

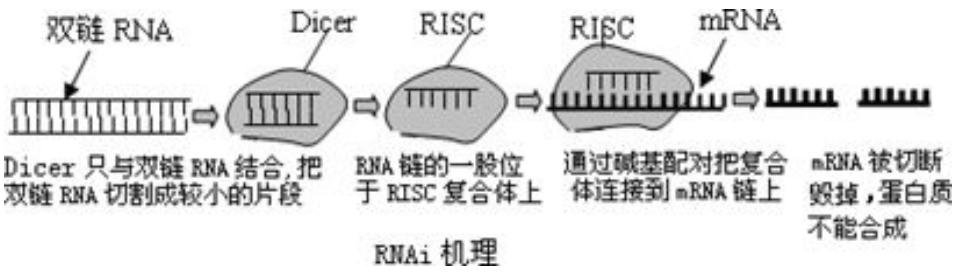
14301050273　但妍君

1998 年，美国的两位教授安德鲁·法尔和克雷格·梅洛在《自然》杂志上共同发表论文，称他们发现了 RNA 具有可以干扰基因的机制。因在 RNA（核糖核酸）干扰机制方面的突出贡献，他俩一起获得了 2006 年度诺贝尔生理学或医学奖。

RNA 干扰（RNA interference, RNAi）是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA（double-stranded RNA，dsRNA 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象。近几年来 RNAi 研究取得了突破性进展，被《Science》杂志评为 2001 年的十大科学进展之一，并名列 2002 年十大科学进展之首。由于使用 RNAi 技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达，所以该技术已被广泛用于探索基因功能和传染性疾病及恶性肿瘤的基因治疗领域。

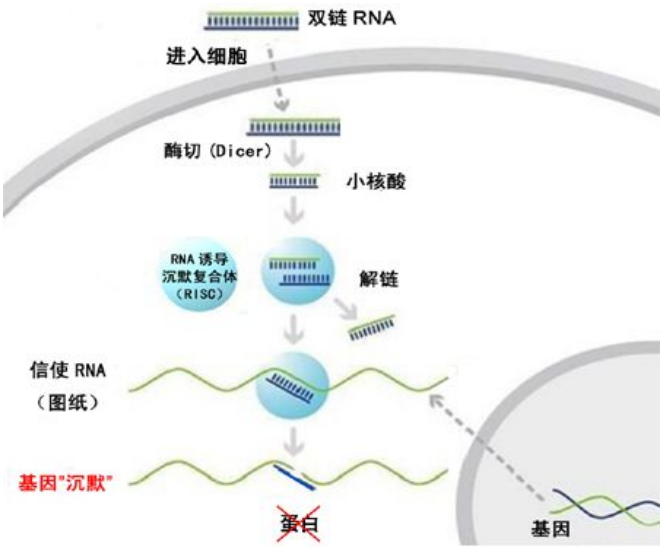
技术原理

我们知道，在真核生物中，完成蛋白质是要经历以下的几个步骤。首先在细胞核中进行 DNA 的转录，生成单链的 mRNA 穿过核孔到达细胞质，携带有遗传信息 mRNA 会与核糖体结合，在一系列酶的辅助下，变成一条多肽链，在经过内质网、高尔基体的盘区折叠进一步加工，变成蛋白质。RNAi 是当细胞中导入与内源性 mRNA 编码区同源的双链 RNA 时，该 mRNA 发生降解而导致基因表达沉默的现象，这种现象发生在转录后水平，又称为转录后基因沉默。



RNAi 机理

当双链 RNA（double-stranded RNA，dsRNA）进入细胞，宿主细胞对这些 dsRNA 迅即产生反应，其胞质中的核酸内切酶 Dicer 将 dsRNA 切割成多个具有特定长度和结构的小片段 RNA（大约 21～23 bp），即 siRNA。siRNA 在细胞内 RNA 解旋酶的作用下解链成正义链和反义链，继之由反义



siRNA 再与体内一些酶(包括内切酶、外切酶、解旋酶等)结合形成 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex，RISC)。RISC 与外源性基因表达的 mRNA 的同源区进行特异性结合，RISC 具有核酸酶的功能，在结合部位切割 mRNA。被切割后的断裂 mRNA 随即降解，从而诱发宿主细胞针对这些 mRNA 的降解反应。

技术的应用

1.RNAi 在探索基因功能中的应用

人类基因组计划的完成标志着后基因组时代的来临。阐明人类基因组中功能基因表达产物的生物学作用对医学发展有着深远意义。传统的基因敲除、转基因或突变的方法存在受齐唱、不能大规模同步进行等缺点，而 RNAi 技术可以利用 siRNA 或 siRNA 表达载体快速、经济、简便的以序列特异方式剔除目的基因表达，所以现在已经成为探索基因功能的重要研究手段。同时 siRNA 表达文库构建方法的建立，使得利用 RNAi 技术进行高通量筛选成为可能。

目前最宏伟的计划是由英国和荷兰科学家联合启动的设计针对人类基因组中每个基因的 siRNA 项目，然后使用它们靶定肿瘤细胞系中每个基因来确定细胞恶性转化所需的基因。

2. 肿瘤病的治疗

肿瘤是多个基因相互作用的基因网络调控的结果，传统技术诱发的单一癌基因的

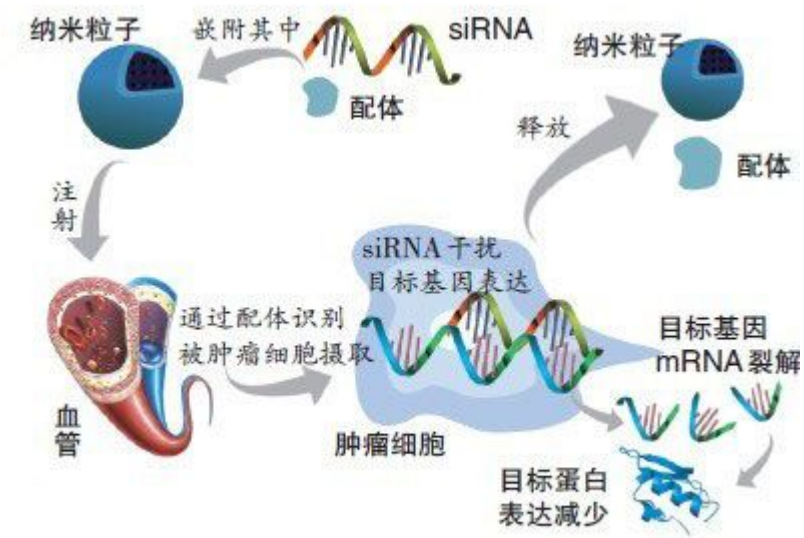


图 siRNA嵌附纳米粒子抑制目标基因表达示意图

阻断不可能完全抑制或逆转肿瘤的生长，而 RNAi 可以利用同一基因家族的多个基因具有一段同源性很高的保守序列这一特性，设计针对这一区段序列的 dsRNA 分子，只注射一种 dsRNA 即可以产生多个基因同时剔除的表现，也可以同时注射多种 dsRNA 而将多个序列不相关的基因同时剔除。

Maen 等人应用 RNAi 技术成功地阻断了 MCF7 乳腺癌细胞中一种异常表达的与细胞增殖分化相关的核转录因子基因 Sp1 的功能。

3.RNAi 在基因治疗领域中的应用

RNAi 作为一种高效的序列特异性基因剔除技术在传染性疾病和恶性肿瘤基因治疗领域发展极为迅速。在利用 RNAi 技术对 HIV-1、乙型肝炎、丙型肝炎等进行基因治疗研究中发现，选择病毒基因组中与人类基因组无同源性的序列作为抑制序列可在抑制病毒复制的同时避免对正常组织的毒副作用。同时将抑制序列选择在特定的位点，可对部分有明确基因突变的恶性肿瘤细胞如含有 BCL/ABL 或 AML1/MTG8 融合基因的白血病细胞产生凋亡诱导作用。

4.病毒性疾病的治疗

根据 RNAi 发挥作用的机制，理论上讲，所有可能在细胞中形成双联 RNA 的外源核酸，都应该对 RNAi 有效。而对于病毒而言，不论是 DNA 还是 RNA 病毒，只要其在细胞中经历双链 RNA 的阶段，都应该可以成为 RNAi 的靶目标。它可能成为阻断病毒入侵和抑制基因表达的新技术。目前 RNAi 技术已经被广泛应用于许多种病毒的防治研究中。

加州大学洛杉矶分校和加州理工学院的研究人员开发出使用 RNAi 技术来阻止艾

滋病病毒进入人体细胞。这个研究小组设计合成的 lenti 病毒载体引入 siRNA，激发 RNAi 使其抑制了 HIV-1 的 coreceptor-CCR5 进入人体外周 T 淋巴细胞，而不影响另一种 HIV-1 主要的 coreceptor-CCR4，从而使以 lenti 病毒载体为媒介引导 siRNA 进入细胞内产生了免疫应答，由此治疗 HIV-1 和其他病毒感染性疾病的可行性大大增加。RNAi 还可应用于其它病毒感染如脊髓灰质炎病毒、禽类逆转录病毒、肝炎病毒、流感病毒、SARS 相关冠状病毒等等。

技术的优缺点

优点：

①RNAi 具有很高的特异性，只降解与之序列相应的单个内源基因的 mRNA；

②RNAi 抑制基因表达具有很高的效率，表型可以达到缺失突变体表型的程度，而且相对很少量的 dsRNA 分子(数量远远少于内源 mRNA 的数量)就能完全抑制相应基因的表达，是以催化放大的方式进行的；

③RNAi 抑制基因表达的效应可以穿过细胞界限，在不同细胞间长距离传递和维持信号甚至传播至整个有机体以及可遗传等特点;

④应用范围广，潜力极为巨大。

缺点：

① 如何导入 dsRNA 或 siRNA 是 RNAi 应用的最大障碍；

② dsRNA 并不能在所有生物中引起 RNAi 应答，有的物种（斑马鱼）可能趋向引起非特异性致死性应答反应；

③ 在去除 ATP 的样品中 RNA 干扰现象降低或消失显示 RNA 干扰是一个 ATP 依赖的过程；RNAi 是转录水平上，其他的基因治疗都是基因组水平的，并没有改变生物体的基因组，也就是治标不治本；

④对于含有 dsRNA 的食物是否对群体或环境有什么副作用，其安全性尚需进一步研究。