

浅析 RNA 干扰技术

孙紫薇 21301050290 临床医学（八年制）

引言：RNA 干扰（RNAi）是一种由双链 RNA（double-stranded RNA, dsRNA）介导的转录后的基因沉默现象。^[1]在 RNA 干扰技术中，Dicer 酶起着关键性作用。dsRNA 进入细胞后，Dicer 酶会将其特异性识别并将其裂解为含有 21 到 23 个核苷酸的小干扰 RNA 片段（small interfering RNA, siRNA），切割产生的 siRNA 片段解开变成单链，和某些蛋白质形成复合物（RNA-induced silencing complex, RISC）。RISC 能够结合到细胞内与 siRNA 互补的 mRNA 上，Dicer 酶会切割此双链 RNA，使其被降解，导致对应蛋白质无法合成。RNAi 具有着特异性、高效性、传播性和遗传性，其在生命科学的研究、治疗等多个领域都得到着广泛应用。但在 RNAi 技术中在脱靶效应、固有免疫反应的激发、给药方式和选择载体等多个方面仍存在着问题等待我们解决。由于字数限制，本报告中只包括了很少的一部分。我们期望在未来，RNAi 能够在更多领域“大展身手”！

一、 技术原理

RNAi 的作用机理可分为起始、效应和扩增三个阶段。^[2]

1. 起始阶段：Dicer 核酸酶在 ATP 供能下将 dsRNA 切割成 siRNA。siRNA 有着 5' 单磷酸和 3' 羟基末端，且 3' 端均有 2 到 3 个突出的核苷酸。
2. 效应阶段：siRNA 的一条链与 Argonaute 亚家族蛋白结合形成 RISC，在 ATP 供能下，siRNA 解旋释放正义链从而激活 RISC，有活性的 RISC 中的 siRNA 反义链按 Watson-Crick 碱基互补配对原则与同源 mRNA 分子上的靶序列结合，随后自 siRNA 的 3' 端将靶 mRNA 切割成小于 12 个碱基的片段。
3. 扩增阶段：这一阶段类似于聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR），RISC 与靶 mRNA 结合后，以 siRNA 反义链为引物，靶 mRNA 为模板，在 RNA 依赖性 RNA 聚合酶（RNA-dependent RNA polymerase, RDRP）的作用下，将单链 mRNA 转变为双链，随后 Dicer 核酸酶再对其进行切割，导致靶 mRNA 的降解。这种 PCR 使细胞内的 siRNA 数量明显增加，新产生的 siRNA 可再次参与上述循环，产生级联放大效应，从而显著增强了对

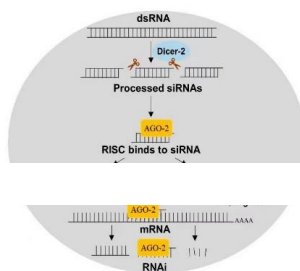


图 1：RNA 干扰的机制

基因表达的抑制作用。

目前有五种常用的 siRNA 合成方法，包括：化学合成法、体外转录法、“鸡尾酒”法、siRNA 表达载体法和 siRNA 表达框法。^[3]

二、 技术应用

RNAi 是 RNA 水平的基因沉默，不会影响到染色体 DNA 序列的复制和转录过程，且 dsRNA 只降解与之序列相应的内源 mRNA，而其他 mRNA 的表达不受影响，在各个领域都有着广阔的应用前景。

在有关主题“病”的方面，RNA 干扰技术在生命科学研究、疾病治疗和抗病毒方面均有着广泛的应用。

1. 利用 RNA 干扰可以抑制特定基因表达的作用，可以用来推断被沉默基因的功能，因此可以广泛被用于功能基因组计划中。^[4]在研究中，研究者们普遍利用动物模型或细胞株系，在传染后用 RT-PCR、Western blot 等方法分析 RNAi 作用后相应蛋白的表达水平。^[5]因此，RNAi 可以用作药物筛选实验以及肿瘤耐药性消除实验。

2. RNA 干扰在疾病治疗中也起着不可或缺的作用。RNA 干扰可以对目标基因产生良好的沉默效果，为疾病的研究和治疗带来福音。

现在 RNA 干扰技术已经广泛应用于疾病治疗领域。例如，在哮喘治疗的过程中，可以通过抑制 2 型辅助性 CD4+T 淋巴细胞所分泌的一系列细胞因子、在白细胞进入气道过程中起作用的趋化因子、在免疫过程中起作用的淋巴细胞特异性酪氨酸激酶和脾酪氨酸激酶、在抗原呈递细胞成熟过程中的受体表面分子及转录因子等，达到抑制气道过敏性炎症的作用。^[6]在后发性白内障的防治中，RNAi 通过沉默细胞内的信号通路的基因靶点来抑制白内障术后残留的晶状体上皮细胞向后囊膜混浊发生转化。^[7]

在肿瘤治疗中，可以通过抑制与癌细胞的存活和增殖有关的基因来达到治疗目的，如沉默肿瘤细胞中的抗凋亡基因，停止癌细胞的生长来抑制肿瘤的进一步扩大。^[8]

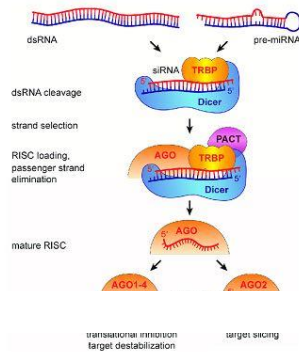


图 2: RNAi 在肾癌治疗方面的应用

且对于一些多基因调控的疾病，RNA 干扰技术能够同时抑制多个不同基因，达到更好的治疗效果。

3. RNA 干扰技术抗病毒的作用在植物中有着广泛应用，在临床上，RNAi 在抗人类免疫缺陷病毒（HIV）、丙型肝炎病毒、人乳头瘤病毒（HPV）等方面都表现出明显的治疗效果。^[9]例如，在抗 HIV 病毒感染中，利用以 HIV 病毒衣壳为靶标的 siRNA 药物，可以清除患者体内 HIV 病毒。

三、技术的局限或发展方向

siRNA 中特异的序列如 5' -GUCCUUCAA-3'，可被 Toll 受体 (Toll-like receptor, TLR) 识别进而诱导机体激活固有免疫系统，产生干扰素及一系列炎症细胞因子的产生，对一些疾病的治疗造成干扰。

脱靶效应在 RNAi 中有着较大的影响，但目前有关脱靶效应的机制尚未十分

明确，因此应先明确机制，再加以改进。

siRNA 具有着负电荷属性和化学易降解性，因此在基因干扰治疗中需要加入载体以增加其稳定性、促进对靶细胞的转染。目前的载体可大致分为两种，病毒载体和非病毒载体。非病毒载体，如脂质体等，转化效果较差。病毒载体方面也存在较多问题，如病毒本身具有对外源基因的防御机制，外来 siRNA 较难导入。病毒载体自身也可能激活免疫系统产生各种并发症。

此外，人体内还含有 RNase A 家族酶，会降解 siRNA，因此 siRNA 在人体内并不稳定。

在未来，我们应该提高化学修饰水平，对脱靶效应、病毒结构等有更深入的理解，在保证治疗效果的同时，尽量避免负效应。

四、展望

疫情当下，新冠肺炎的治疗及阻断传播一直是我们所关注的焦点。RNAi 的抗病毒效应可以在这一方面发挥着作用。COVID-19 与 SARS-CoV 在很多层面都有着相似之处，因此我们可以参考针对 SARS-CoV 的 RNAi 技术来设计出针对 COVID-19 的干扰 RNA。^[10]

[1] 姜汶辰. 浅析 RNA 干扰技术及其应用[J]. 中国科技纵横, 2020(10):203-204.

[2] 付瑞. RNA 干扰技术在抗病毒感染中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(9):1126-1128. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.030.

[3] 林盛国, 张嵘, 王家庆. RNA 干扰技术及应用[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(4):83-85. DOI:10.3969/j.issn.1671-7414.2008.04.059.

[4] 谢军, 龙晓茹, 任洛, 等. 慢病毒介导短发夹 RNA 干扰技术建立小鼠肺组织 TRIF 沉默模型[J]. 广西医学, 2021, 43(14):1704-1707. DOI:10.11675/j.issn.0253-4304.2021.14.11.

[5] 张丽颖, 徐爱丽, 李佩玲, 艾丽敏. RNA 干扰技术体外抑制内质网分子伴侣 GRP94 在卵巢癌细胞表达的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22(10):16-20. DOI:10.13404/j.cnki.cjbhh.2014.10.006.

[6] 杨宏宽, 潘俊杰, 张佳颖, 等. RNA 干扰技术在哮喘治疗的研究进展[J]. 浙江临床医学, 2017, 19(7):1369-1371.

[7] 席亚慧, 刘红玲. RNA 干扰技术干扰信号通路在后发性白内障防治中的应用[J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(12):1126-1129.

[8] 林盛, 吴敬波. RNA 干扰技术及其应用[J]. 华西医学, 2008, 23(1):170-170. DOI:10.3969/j.issn.1002-0179.2008.01.121.

[9] 付瑞. RNA 干扰技术在抗病毒感染中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(9):1126-1128. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.030.

[10] 刘鹏飞, 马文静, 赵爱华, 等. RNA 干扰技术防治新型冠状病毒肺炎的思考和展望[J]. 同济大学学报(医学版), 2020, 41(2):141-146. DOI:10.16118/j.1008-0392.2020.02.001.