文章编号:1000-5404(2005)23-2393-03

综述

RNA 干扰与人类疾病

RNA interference and human diseases

李 阳[1] 综述,倪 兵[2] 审校 (第三军医大学:[1]新桥医院检验科,重庆 400037,[2]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

RNA 干扰(RNA interference,RNAi)是将一段双链 RNA 序列导入机体或细胞中,其中与之有同源序列的基因的表达将会受到部分或完全抑制,即基因沉默。

最初在对秀丽线虫的研究中,Guo 等试图用反义 RNA 阻断 Par-1 基因的表达以研究其功能,出乎意料的是作为阴性对照的正义 RNA 也同样抑制了基因表达。该结果一直让人费解,直到3年后 Fire[2] 进行了另一项实验才真正提出 dsRNA 能导致转录后基因沉默的理论,即发现把反义和正义 RNA 的混合物导入线虫后,其抑制效应远远强于单独导入反义或正义 RNA 的抑制效应。其后,Hamilton 等[3] 首先发现是 25 个核苷酸的 RNA 能特异性抑制具有相应互补序列的基因表达。很快,人们在对不同机体如植物、果蝇、原生动物、锥体虫等的研究中也证实了 RNAi 的广泛存在。目前,利用 RNA 干扰来研究与人类疾病相关基因的功能已经取得令人鼓舞的进展,现做一简要综述。

1 RNAi 的作用机制

RNAi 的具体作用机制目前还不是十分清楚,但有两种基本作用模式得到实验证明。第1种是 Dicer 和 Slicer 依赖模式,它主要包括4个步骤:①长序列的 dsRNA 在导入细胞后,被剪切成长度约 21~25 核苷酸的双链,即小分子 RNA 干扰片段。其中,对 dsRNA 起剪切作用的 Dicer 是 RNase 家族成员之一,属特异性双链 RNA 核酸内切酶。②siRNA 与一种蛋白复合物相结合,这种蛋白复合物含有1个 siRNA 和1个蛋白核酸酶分子。该酶分子已被分离纯化,并不同于 Dicer,有人将它命名为"Slicer"。③在 siRNA 指导下,蛋白复合物形成一种有活性的 RNA 诱导的基因沉默复合体(RNA-induced silencing complex,RISC)。④在少量或没有 ATP 参与下,活化后的 RISC 识别与 siRNA 具有同源互补序列的靶 RNA,对其进行剪切,产生 RNAi 作用。

第2种是"随机降解 PCR"模式,这与一种名叫 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerases,RdRPs)有关,RdRPs 不仅可以扩增 dsRNA,同时还可扩增 siRNA。该模式作用机制是:RdRP 利用 siRNA 链作为引物,以靶 RNA 作模板来合成新的双链 RNA。合成的双链 RNA 分子被 Dicer 水解,被 Dicer 水解释放出的新的 siRNA 又可以作为引物指导新一轮 dsRNA 合成,降解。但在人类细胞中还未检测到这种 RdRP 的活性[4]。

作者简介:李 阳(1976-),男,安徽省巢湖市人,硕士,技师,主要从事分子生物学和临床微生物学方面的研究。电话:(023)68774890
通讯作者:倪 兵,电话:(023)68752238-614
收稿日期:2005-03-14;修回日期:2005-08-04

2 RNAi 与医学

RNAi 技术的日渐发展和成熟为人类开启了寻找新型治疗策略的大门。不同于传统的药物靶点如蛋白质、酶和受体,siRNA 诱导的抑制提供了转录后的靶点。因此在医学研究领域,学者们将 RNAi 作为潜在的基因治疗手段并通过加强转染效率来提高其效应,这些都给人们带来了希望。以下分别介绍 RNAi 在血液学、肿瘤学、干细胞生物学和感染性疾病学等研究领域中的应用。

2.1 RNAi 与血液学

Bruton 氏酪氨酸激酶(Btk)以及其他蛋白酪氨酸激酶家族的成员在各种造血细胞中有不同表达,在免疫受体信号转导中起关键作用,RNAi 就有助于这些激酶的功能研究。用 RNAi 技术抑制 Btk 时可引起 RBL-2H3 肥大细胞释放的组胺量下降,证明在过敏反应时,Btk 对组胺释放有直接作用[5]。胆红素从生理意义讲是一种抗氧化剂,有保护细胞的作用。通过 RNAi 介导的胞内胆红素含量减少,可使细胞对氧化剂的反应性显著增强,最终导致细胞死亡。

由于临床上很多血液病是由于基因突变或基因功能丧失引起的(如丙酮酸激酶缺失症、球形细胞增多症、葡萄糖-6-磷酸酶缺失症、血红蛋白病等),因此利用 RNAi 技术可以建立这些疾病进程的体内模型。相信 RNAi 介导的血液病模型有助于发现具有开发价值的新的药学靶点或寻找到基因治疗方面的效应靶点。

2.2 RNAi 与肿瘤学

在该领域中,早期运用 RNAi 技术主要针对的靶点是突变癌基因、已扩增的癌基因、易位产物和病毒癌基因。而且,RNAi 为研究确定肿瘤发生中起作用的新型信号传导分子如 PLK 提供了方便。针对 K562 细胞中融合癌基因 BCR/ABL 的 RNAi 产生了令人鼓舞的结果。两位学者在各自的实验中,使用定量 RT-PCR 和 Western blot 检测发现 RNAi 可以有效降低 BCR/ABL mRNA 和癌相关蛋白产量[6,7]。最近发现在人白血病细胞系 SKNO-1 中,AML1-MTG8 的易位也可通过 RNAi 来抑制。该基因受抑制后,可观察到细胞形态变化,对 TGF-β_1/维生素 D_3 诱导的分化的敏感性增加,由此阐明了 AML1-MTG8 有阻止细胞分化的作用[8]。所以选择该融合基因作靶点,为寻找杀死肿瘤细胞的新途径提供了线索。

在使用反义 DNA 寡核苷酸进行肿瘤治疗的Ⅰ/Ⅱ期研究失败后,人们针对普遍存在的突变癌基因使用了 RNAi。人类癌症中 Ras 基因经常突变,这使其成为一种难以被靶向的癌基因。Brummelkamp 等使用 RNAi 逆转录病毒系统成功的抑制了 K-Ras 在人胰腺癌细胞中的表达,并导致该细胞丧失成瘤

性[9]。而且,该干扰效应选择性的抑制突变 K-Ras 而非野生型证明 RNAi 的特异性能满足基因治疗的要求。随后,用 RNAi 对抑癌基因 PML 或早幼粒细胞白血病基因的研究揭示,PML 和 MHC 类分子表达之间没有调节关系。对 PML 进行抑制,并没有出现 MHC 类分子会下调这种假想结果,因此提示,存在着另外的可以使急性早幼粒白血病细胞逃避免疫监视的途径。

病毒癌基因是 RNAi 介导的肿瘤治疗的另一类潜在靶标。通过对 HPV 阳性的宫颈癌细胞的研究,表明用 siRNA 可使 HPV 的 E6 和 E7 基因表达持续沉默,这是首次发现在哺乳动物细胞中外源性病毒基因可被抑制[10]。因此,选择性的抑制被致癌病毒感染的细胞是可行的。RNAi 介导的病毒抑制不会阻碍细胞内在的调控系统工作,细胞仍然有表达其它基因和进行凋亡的能力,这一点有至关重要的生物学意义和临床使用价值。

提高化疗和放疗对肿瘤细胞的效应是 RNAi 另一潜在应用价值。已知 DNA 双链断裂修复功能的缺失可使细胞对电离辐射高度敏感。Prkdc 是一种编码依赖 DNA 的蛋白激酶催化亚基的基因,这种亚基在 DNA 修复时有整合作用。Peng 等[11]在人成纤维细胞中针对 Prkdc 进行干扰,结果显示细胞对放射的敏感性增高,尤其是在 $0 \sim 3.7 \times 10^{10}$ Bq 的低剂量时也是如此。

RNAi 还可用于研究与异常信号通路有关的能导致肿瘤发生的转录因子。核转录因子 CREB 在活动性白血病病人骨髓中的过度表达被认为与白血病发生有关[12],有实验表明:转染 CREB siRNA 能导致白血病细胞 K562 和 TF-1 的生长和存活数量减少。CREB siRNA 也能抑制人胚肾细胞系 293T 生长、存活,这提示 CREB 在白血病和非白血病细胞中都有关键作用。

2.3 RNAi 和干细胞生物学

当前,干细胞治疗是热点问题,引入 RNAi 技术后这个领域研究更是方兴未艾。将未分化胚胎细胞或多能干细胞作靶标,在模型动物的发育中可以看到基因沉默效应。已有人用造血干细胞(HSCs)来建立其感兴趣的鼠恶性肿瘤模型。Hemann 等[13]先将针对抑癌基因 Trp53 的小发夹 RNAs 转染至 HSCs,再把这种 HSCs 输入到用致死剂量放射线照射后的老鼠体内,最后观察到了独特的肿瘤表现型,而且 Trp53 受抑制的程度和疾病严重性呈正相关。

杆状病毒载体也许是抑制干细胞基因最有前途的 siRNA 表达系统。由杆状病毒表达的转基因在发育过程中会持续表达,并可用其感染胚胎干细胞或胚胎以产生转基因动物。RNAi 在干细胞学中的运用使得构建缺少某种特异抗原并可用于器官移植的组织成为可能。

2.4 RNAi 和感染性疾病

人类免疫缺陷病毒(HIV)一直是全世界研究的重点和热点。现在人们正利用 RNAi 来尝试抑制导致疾病迁延不愈的细胞因素或病毒因子。目前,用 siRNA 针对 HIV-1 tat 蛋白的方法已经成功抑制了 HIV-1 的复制[14]。其他一些 siRNA 靶标包括非结构蛋白 rev 和 gag 基因。另一种抑制 HIV 的新途径是特异性抑制像 CD4 这样的分子表达从而阻止病毒入侵。相似的实验还有抑制人外周血 T 细胞上的 HIV 共受体 CCR5 以达到阻止病毒感染细胞的目的[15]。但是,要将以上结果在体内模型中得到重复,并获得稳定抑制病毒的效果,还需要做大量工作。

此后,研究者又把目标投向了 HCV 和 HBV。HCV 基因组是 1 条只有 1 个 ORF 的正链 RNA,很适合作 RNA 干扰的对象。首先,先选择了针对 HCV NS3 和 NS5B 的 siRNA,再将其转染到能稳定复制 HCV 复制子的细胞系 Huh-7,然后观察到 HCV 的 RNA 复制和蛋白表达都受到了有效抑制,而且这一效应是不依赖于 IFN 的[16]。紧接着,又有人证实:用 RNAi 针对 HCV NS5A 也可在人肝癌细胞系 HepG2 中抑制 NS5A 的 RNA 和蛋白表达,更为重要的是这种靶向作用于 NS5A 的 siRNA 还能抑制 HCV 核心蛋白表达。这些都为治疗 HCV 持续感染提供了新途径。尽管 HBV 是一种 DNA 病毒,但研究同样证明:HBV 在人类 HepAD38 和 HepAD79 细胞中的复制可以特异性的受到 siRNA 的干扰。SARS 病毒基因组也是一条非常稳定的正链 RNA[17,18],我们的研究也已经为用 RNA 来治疗 SARS 提供了实验依据[19]。

呼吸道合胞体病毒(RSV)和轮状病毒对儿童危害较大,分别引起急性呼吸道感染和胃肠炎。现在这两种病毒作为 RNAi 的对象,在哺乳动物细胞中初步被成功干扰[20]。Ge 等[21]报道针对流感病毒核衣壳和 RNA 转录酶的 siRNA 可抑制病毒复制和阻止病毒其他 RNAs 发挥作用。这提示 siRNA 可能对预防和治疗流感起到作用。恶性疟原虫疟疾是发展中国家常见的地方病,危害严重。Malhotra 等运用 RNAi 技术,抑制胱氨酸蛋白酶的基因 falcipain-1、2 的表达,以期达到治疗疟疾的目的。

3 展望

人类基因组计划的完成使人们纷纷将 RNA 干扰技术引入这一领域进行研究。由于掌握了人类基因的全部序列,就可以利用反向基因分析的策略来深入研究人类疾病。科学家正在将 RNAi 应用于患有人类疾病的动物模型中,以观察其在体内的效应。RNAi 不但有用于基因治疗的潜力,而且将 shRNA 用现有的杆状病毒载体转导入干细胞或转基因小鼠后,还可加强研究各种基因在体内具体功能的能力。尽管 RNAi 的详细机制尚不明确,但相信它将在基因功能的研究、人类疾病的防治和新药开发等领域展现出良好潜力并发挥重要作用。

关键词:RNAi;siRNA;基因治疗;恶性肿瘤;感染性疾病
中图法分类号:R394 **文献标识码**:A

参考文献

[1] 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[J]. Cell, 1995, 81(4): 611-620.

[2] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al*. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.

[3] Hamilton A J, Baulcombe D C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants[J]. Science, 1999, 286(5441): 950-952.

[4] Pal Bhadra M, Bhadra U, Birchler J A. RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in Drosophila[J]. Mol Cell, 2002, 9(2): 315-327.

[5] Heinonen J E, Smith C I, Nore B F. Silencing of Bruton's tyrosine kinase (Btk) using short interfering RNA duplexes (siRNA)[J]. FEBS Lett, 2002, 527(1-3): 274-278.

[6] Scherr M, Battmer K, Winkler T, *et al*. Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA[J]. Blood, 2003, 101(4): 1566-1569.

[7] Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, *et al*. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi)[J]. Oncogene, 2002, 21(37): 5716-5724.

[8] Heidenreich O, Krauter J, Riehle H, *et al*. AML1/MTG8 oncogene suppression by small interfering RNAs supports myeloid differentiation of t(8;21)-positive leukemic cells[J]. Blood, 2003, 101(8): 3157-3163.

[9] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference[J]. Cancer Cell, 2002, 2(3): 243-247.

[10] Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference[J]. Oncogene, 2002, 21(39): 6041-6048.

[11] Peng Y, Zhang Q, Nagasawa H, *et al*. Silencing expression of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase by small interfering RNA sensitizes human cells for radiation-induced chromosome damage, cell killing, and mutation[J]. Cancer Res, 2002, 62(22): 6400-6404.

[12] Crans Vargas H N, Landaw E M, Bhatia S, *et al*. Expression of cyclic adenosine monophosphate response-element binding protein in acute leukemia[J]. Blood, 2002, 99(7): 2617-2619.

[13] Hemann M T, Fridman J S, Zilfou J T, *et al*. An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes *in vivo*[J]. Nat Genet, 2003, 33(3): 396-400.

[14] Surabhi R M, Gaynor R B. RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency Virus Type 1 replication[J]. J Virol, 2002, 76(24): 12963-12973.

[15] Qin X F, An D S, Chen I S, *et al*. Inhibiting HIV-I infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(1): 183-188.

[16] Kapadia S B, Brideau Andersen A, Chisari F V. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(4): 2014-2018.

[17] 王嘉丽, 张俊磊, 安　静. SARS 病毒的研究进展[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(9): 828-830.

[18] 吕燕波, 万　瑛, 吴玉章. SARS 病毒 S 蛋白的 B 细胞表位预测[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(2): 101-103.

[19] 李　阳, 倪　兵, 石辛甫, 等. 质控表达型 SiRNA 对 SARS-CoV 复制与感染干扰的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(2): 91-94.

[20] Dector M A, Romero P, Lopez S, *et al*. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs[J]. EMBO Rep, 2002, 3(12): 1175-1180.

[21] Ge Q, McManus M T, Nguyen T, *et al*. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(5): 2718-2723.

（编辑　王　红）

（上接 2387 页）

2　结果

A 组的起效时间、插管时间分别为(173.5±82.02) s、(111±46.48) s,插管条件均为优良,插管后 TOF 计数为(2.3±1.3),T_1最大抑制为(99%±3.16%)。B 组的起效时间、插管时间分别为(111.8±77.29) s、(99.3±42) s,插管条件优良占 90%,插管后 TOF 计数为(0.5±0.7),T_1最大抑制为 100%。C 组的起效时间、插管时间分别为(122.5±72.43) s、(87±30.48) s,插管条件优良占 90%,插管后 TOF 计数为(1.2±1.2),T_1最大抑制为(99%±2.11%)。B、C 组与 A 组相比,罗库溴铵的起效时间、插管时间、插管条件、T_1最大抑制均无显著差别($P>0.05$)。但 B 组与 A 组相比,插管后 TOF 计数有显著差别($P<0.05$),而 C 组与 A 组相比,插管时 TOF 计数无显著差别($P>0.05$)。

3　讨论

文献[1,2]报道罗库溴铵的 2 倍 ED_{95} 约量(0.6 mg/kg)的起效时间一般在 1-2 min,3 倍 ED_{95} 约量(0.9 mg/kg)的起效则在 1 min 左右。本观察使用的罗库溴铵(批号:176786,欧加农公司,荷兰),起效时间在组内个体间存在较大差异。3 组病人的起效时间分别为(173.5±82.02) s、(111.8±77.29) s、(122.5±72.43) s,与文献报道相差甚远,其可能的原因:①病人对罗库溴铵的敏感性差异较大。②罗库溴铵制剂中加入乙酸钠、氯化钠、乙酸及注射用水等赋形剂成分,其在储存过程中的约效稳定性值得怀疑。③临床及实验的条件不同,以及不同的监测和刺激模式。

罗库溴铵引起的神经肌肉阻滞在喉肌快于拇指内收肌,因此能在拇指内收肌的颤搐完全消失之前行气管插管。也有人观察到只有小剂量(0.4 mg/kg)罗库溴铵的起效在喉肌快于拇指内收肌,超过 0.8 mg/kg 时两组肌群起效时间相似。我们在临床上也观察到,在 3 倍 ED_{95} 约量组、插管时间比较接近起效时间,大多数病例插管后 TOF 计数很快降到 0,说明喉肌阻滞时间与拇指内收肌阻滞的时间相近;而在 2 倍 ED_{95} 约量组和预注组观察到大多数病例在插管后要经过较长时间才出现 T_1 最大抑制。本研究以 TOF 计数第 4 个反应消失时作为插管时机,虽然有的病例在插管过程中出现体动,但下颌、咽喉部肌肉松弛,能顺利完成气管插管。

有研究表明罗库溴铵的起效时间缩短有剂量依耐性[1,2]。本研究观察到 2 倍 ED_{95} 约量(0.6 mg/kg)的起效时间与 3 倍 ED_{95} 约量(0.9 mg/kg)的起效时间为(173.5±82.02) s 和(111.8±77.29) s,插管时间为(111±46.48) s 和(99.3±42.00) s,但经统计学处理无显著差异。此外,本研究结果显示预注罗库溴铵并不能使其起效时间缩短。

综上所述,罗库溴铵的起效时间存在明显的个体差异,无论是 3 倍 ED_{95} 约量或者预注给药均不能明显改善快速气管插管时的肌松效应,TOF 计数为 3-4 就能完成气管插管,没必要等待 TOF 计数进一步减少。能否把插管时机再提前,还需进一步临床观察。

关键词:罗库溴铵;气管插管;肌松效应

中图法分类号:R971.8　　文献标识码:B

参考文献:

[1] Cooper R A, Mirakhur R K, Maddineni V R. Neuromuscular effects of rocuronium bromide(Org 9426) during fentanyl and halothane anaesthesia[J]. Anaesthesia, 1993, 48(2): 103-105.

[2] Magorian T, Flannery K B, Miller R D. Comparison of rocuronium, succinylcholine, and vecuronium for rapid-sequence induction of anesthesia in adult patients[J]. Anesthesiology, 1993, 79(5): 913-918.

（编辑　薛国文）