

RNA 干扰技术抑制病毒复制的研究进展

姜法铭¹ 缪德年² 崔立¹

(1 上海交通大学农业与生物学院 上海 201101 2 上海市农科院畜牧所 上海 201106)

摘要: RNA 干扰是指 dsRNA 抑制细胞内同源基因表达的现象, RNA 干扰现象自发现以来在短短的几年里, 已成功地用于不同种属的生物研究。dsRNA 不仅参与内源基因表达调控, 而且能够抑制宿主内病原微生物基因的表达, 参与构筑生物体的防御机制。近年来, 运用 RNAi 技术在哺乳动物中的研究不断深入, 尤其是抑制病毒复制的研究成果令人欣喜, 这为人类动物抗病毒治疗提供了新的思路。

关键词: RNA 干扰; dsRNA; 抑制病毒复制; 抗病毒治疗

中图分类号: Q81 **文献标识码:** A

Advances in the Inhibition of Viral Replication by RNA Interference

JIANG Fa-ming¹, MIAO De-nian², CUI Li¹

1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201101, China;

2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Sciences of Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

ABSTRACT: RNA interference refers to the inhibition of gene expression by dsRNA. The RNA interference technique has already used to the dissimilarity kinds of creature researches successfully in very short years. DsRNA can not only participate in gene regulation, but also inhibit gene expression of pathogenic microbes. RNAi is believed to function as a defense against viruses. Recently, inhibition of virus replication by means of induced RNAi has been reported for many human and animal pathogens. It makes possible the development of RNAi-based antiviral therapeutics. In this article, we review the current researches on RNAi-mediated inhibition of virus replication.

Key words: RNAi; dsRNA; inhibition of virus replication; antiviral therapeutics

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种生物进化的保守机制, 是指细胞利用内源的或外源的双链的小干扰 RNA (siRNA) 激发相关的酶复合体, 其序列特异的降解同源基因的 mRNA, 从而导致靶基因转录后的基因沉默。RNAi 广泛存在于从真菌到植物, 从无脊椎动物到哺乳动物的各种生物中, 且表现形式多样^[1-10]。利用 dsRNA 可以特异性地降解与之有同源序列的 mRNA, 从而特异性地阻断相应基因的表达。RNA 干扰现象自发现以来在短短的几年里, 已成功地用于不同种属的生物研究其基因功能如线虫、真菌、果蝇和哺乳动物; RNAi 技术被广泛用于新基因筛选、基因功能鉴定、信号转导研究以及基因治疗等方面^[11-12]。随着研究的深入, 研究人员又发现利用 RNAi 技术在哺乳动物细胞上能有效抑制导致多种病毒的感染和复制; 更重要的是近来又证实了 siRNA 分子能在小鼠体内有效诱导 RNAi 作用, 这些研究表明 RNAi 不仅在后基因组时代功能基因的研究中具有重要的应用前景而且在将来有可能成为预防和治疗病毒疾病的新方法。

1 RNAi 抑制病毒复制的分子基础

研究证实, 21~23 个碱基对的短双链 RNA (short interfering RNA, siRNA) 是启动整个干扰过程的决定因子^[13]。类似于 RNase III 的 dicer 酶通过剪切长的双链 RNA 前体可以得到 siRNAs, 这些 siRNAs 与多种相关蛋白结合形成 RNA 介导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC), 该复合物在反义链引导下与互补的 mRNA 靶序列结合并将其降解。

病毒在哺乳动物细胞内的复制可以激活 RNAi 应答反应^[14]。病毒复制过程中的 dsRNA 复制中间体是激活 RNAi 反应的有效作用因子。这些中间体被加工成 siRNA, 然后与 RISC 结合, 靶向病毒 RNA 或 mRNA, 并将其降解。另外, 病毒复制过程中, 高水平的 RNA 累积也被认为是启动 RNAi 的原因之一。这种机制被人们称为阈值模型(threshold model)。过量的病毒 RNA 或 mRNA 在病毒自身编码的 RNA 多聚酶(RNA-directed RNA polymerase, RdRP)作用下形成 dsRNA, 由此引发 RNAi 过程^[13, 15-16]。目前 RNAi 技术已被用于抑制哺乳动物体内病毒复制的研究。结果表明, 无论体内还是体外试验, siRNA 均能够抑制多种哺乳动物病毒的增殖^[17]。

2 RNAi 抑制病毒复制的研究

RNAi 抑制病毒复制的研究多以人类免疫缺陷病毒 I 型(human immunodeficiency virus type I, HIV-I)为模型, 也有 RNAi 抑制其它哺乳动物病毒报道, 而且数量在不断增加。这些病毒包括 RNA 病毒, 如 HIV-I、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)、脊髓灰质炎病毒(poliomyelitis virus, PMV)、甲型流感病毒(influenza A)等和人乳头瘤病毒 16 型(human papillomavirus type 16, HPV-16)、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)等 DNA 病毒。多数研究都是通过直接合成特异 siRNA 降解病毒 RNA 或 mRNA, 也有部分研究是利用胞内表达的 siRNA 或 shRNA 抑制病毒复制。

2.1 RNAi 对 DNA 病毒的抑制

RNAi 对抑制 DNA 病毒的研究集中在与人类密切相关的病毒的治疗, 如乙型肝炎病毒、艾滋病病毒、疱疹病毒科病毒等。

RNAi 对乙肝病毒、艾滋病病毒的抑制效果均可达到 90%

作者简介: 姜法铭, (1982-), 男, 在读硕士

通讯作者: 崔立, Tel: 021-64782958

E-mail: lcui@sjtu.edu.cn

(收稿日期: 2006-03-28 接受日期: 2006-04-23)

以上。2002年,斯坦福医学院的科学家采用流体动力转染技术(Hydrodynamic transfection)将 siRNA 导入小鼠体内,成功地抑制了人类丙型肝炎病毒 NS5B 蛋白的表达^[18]。2003年,他们采用同样的转染技术,在正常小鼠和免疫功能缺陷小鼠的肝脏中发现, siRNA 有效地抑制了人类乙型肝炎病毒(HBV)的复制,而且这种抑制作用并非是抗体依赖的免疫应答的结果^[19]。2005年曾志锋采用 HCMV(人巨细胞病毒)的 UL49 基因为靶基因,设计了其 U6 启动子的 siRNA 表达片段。同时构建了 Pegfp-UL49 质粒,在人宫颈癌细胞 HeLa 细胞中共转染,在荧光显微镜下观察,结果显示 siRNA 片段能抑制 UL49 基因在 HeLa 细胞中的表达。

2005年叶景佳^[20]还通过多种小分子干扰 RNA 联合抑制 HBV 研究。这次研究通过对不同 HBV 不同靶点的 siRNA 在可稳定分泌 HBV 颗粒的 HepG2 2.2.15 细胞中转染,通过酶联免疫实验检测上清中的 HBsAg 和 HBeAg 的含量,实时定量 PCR 技术检测细胞中的 HBV 的 DNA 含量来查看效果,结果发现 12 个分子均能在不同程度上抑制病毒复制,多分子 siRNA 组合在小剂量时就能达到对 HBsAg 的高抑制率,但是抑制率提高不明显。这为进一步开发新的联合应用多种 siRNA 治疗病毒病的途径打下了基础。

2005年^[21]王秀花将通过构建 MDV(马立克氏病病毒)的 vp22 蛋白基因的 siRNA 片段,在 CEF(鸡成纤维细胞)细胞中采用脂质体转染方法,通过 RT-PCR 技术和间接免疫荧光蚀斑技术进行检测,结果显示 siRNA 片段能有效的抑制 MDV 在 CEF 细胞中的增殖。

2.2 RNAi 对 RNA 病毒的抑制

对 RNAi 抑制 RNA 病毒的研究主要集中在单链 RNA 病毒上,如小 RNA 病毒、流感病毒、SARS 病毒、脊髓灰质炎病毒等。

2.2.1 目前研究应用 siRNA 技术抑制的单股正链 RNA 病毒包括: DEN-2(登革病毒 II 型)、SFV(猴泡沫病毒)、HCV(丙型肝炎病毒)、HGV(庚型肝炎病毒)、SARS 病毒、West Nile Virus(西尼罗河病毒)、CVB3(柯萨奇病毒 3 组)、CSFV(猪瘟疫病毒)、IBV(鸡传染性支气管炎病毒)等。

HCV 是导致人慢性肝炎和肝细胞肿瘤的主要原因之一。由于 HCV 不能体外培养,因此病毒的 RNAi 研究需要利用复制子系统在 Huh-7 细胞上建立 HCV 复制模型。这个复制子只能够进行 HCV RNA 的转录和病毒蛋白质的合成。不能产生具有感染性的病毒。针对 HCV 的衣壳蛋白、NS5T3 和 NS3 编码区合成 siRNA,并导入细胞。病毒 RNA 抑制率达到 90%^[22]。尽管该研究结果令人振奋,但如何将其引申到人类的抗病毒治疗中去,如何将 siRNA 正确安全的导入人体组织仍是尚未解决的问题。

2005年,严春晖^[23]等选择并克隆了针对 SARS-CoV 编码基因的共同前导序列非结构蛋白-1(NSP1)的 siRNAs 对 NSP1 进行抑制,通过 RT-PCR 和 FACS 法检测进行初步筛选,利用 MTT 法检测选取的 siRNAs 对病毒干扰细胞生存率,用空斑形成实验证实 siRNAs 存在下病毒量,RT-PCR 和 Western-bolt 法进一步检测细胞中 S 和 N 基因在 mRNA 和蛋白水平的表达情况,结果表明, siRNAs 能特异的抑制靶序列的表达,在体外培养的 Vero E6 细胞中能显著的抑制 SARS-CoV 的复制与增殖。

2.2.2 目前研究应用 siRNA 技术抑制单股负链 RNA 病毒包括: RSV(呼吸道合胞体病毒)、Influenza(流感)病毒、PIV(副流感病毒)等。

2002年 Hu WY 等^[24]证明了 siRNA 能阻抑逆转录呼吸合胞体病毒(RSV)感染脊椎动物。2003年 Ge^[25]等针对流感病毒的不同位点设计了 20 个 siRNA,结果显示以 NP 和 PA 基因为靶点的 siRNA 对流感病毒感染有抑制作用。

3 RNAi 作为抗病毒治疗存在的问题

目前,多数的 RNAi 抗病毒研究采用的都是瞬时转染 siRNA 的方法。这种转染双链 RNA 抑制病毒复制的作用是短暂的,不适合作为治疗病毒病的手段。胞内表达的 siRNA 和 shRNA 能够长时间发挥抗病毒作用,这种方法已经成功应用到 HIV-1、HCV、HBV 的研究中。逆转录病毒载体和慢病毒载体已成功用于哺乳动物细胞 siRNA 的导入。

此外,突变是病毒进化的基础,病毒很易突变以适应改变的环境而生存下来。当 siRNA 启动 RNAi 机制时,病毒靶序列可能发生可遗传的突变来逃避对它的抑制作用这种潜在的困难,对 RNAi 技术应用于治疗病毒病是个严峻的挑战。事实上,在应用 RNAi 干扰脊髓灰质炎病毒(poliiovirus)^[26]和 HIV-1^[27]复制的研究中已经证实了这一现象。有报道,用化学合成的抗脊髓灰质炎病毒 siRNA 可减少病毒产生达 100 倍,但是延长温育时间,病毒数量增加到很高的水平,而且后代病毒序列分析显示,在 siRNA 靶序列的中心存在逃逸突变^[28], HIV-1 中也发现类似的情况,研究发现病毒的突变启动 HIV-1 逃逸,如稳定表达抗 Nef shRNA 的 T 细胞在转染后初期 HIV-1 复制明显减少,但转染后第 23 代,含有 Nef 靶序列缺失的逃逸突变明显增加^[29]。

病毒逃逸现象对于 RNA 病毒和逆转录病毒而言较之 DNA 病毒更为严重。病毒基因准种的存在可以逃避 RNAi 的降解^[30]。然而最近另有证据表明,在人体细胞的 RNAi 过程中, siRNA 与 mRNA 的序列错配不会使其完全失效。所以,完全抑制病毒的理想方式是采用复合 siRNA 的治疗方式靶向病毒多个重要的目的序列,这样可以克服逃逸变异产生的障碍。另一种避免病毒逃逸的途径是抑制宿主细胞基因的表达,这些基因编码的蛋白是病毒复制所必需的。

RNAi 应用的第二个严重的问题就是如何预测设计有效的 siRNA 序列。所有的 RNAi 研究中都存在一个问题,即并非所有的 siRNA 都能起到同样的抑制作用,由于具体机制目前还不清楚,有人推测可能与病毒 RNA 序列和二级结构有关。除此之外, RNAi 治疗试剂的应用是否会对细胞的正常生理过程产生负面影响,也需要进一步的论证。如外源 siRNA 的引入是否会影响内源 RNAi 途径,而内源途径正是细胞基因表达调控所必需的。

由此可见,应当针对以上问题进行深入研究,找到解决方案,才能使 RNAi 更能切合临床抗病毒治疗的需要。

4 展望

虽然目前 RNAi 作为一种新技术治疗病毒性疾病还存在很多问题,但 RNAi 仍然被认为是对抗病毒感染最有效的方法

之一,人们给予很大的关注,国内外在这方面的研究成为热点和焦点,期望能在将来研制出一种以 RNAi 为支持的治疗药物,创造出全新的领域。值得一提的是,2004 年 10 月 Acuity 制药公司研制的 Cand5 获准开展人体临床试验,2004 年 11 月 Sirna 公司研制的 Sirna-027 也启动了 I 期临床试验,到目前为止,上述两种药物在临床试验中都表现出一定的安全性,患者耐受良好。这是一个很好的证明, RNAi 以后将成为抑制一些难以治疗疾病特别是病毒病的最佳途径。

参考文献

- [1] McRobert L, McConkey GA. RNA interference (RNAi) inhibits growth of *Plasmodium falciparum*[J]. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2002, 119: 273–278
- [2] Al-Anouti F, Quach T, Anarwanich S. Double-stranded RNA can mediate the suppression of uracil phosphoribosyltransferase expression in *Toxoplasma gondii*[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 302: 316–323
- [3] Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T. RNA interference in protozoan parasites[J]. *Cell Microbiol.*, 2004, 6(6): 509–519
- [4] Robinson KA, Beverley SM. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*[J]. *Mol Biochem Parasitol.*, 2003, 128: 217–228
- [5] Stauber M, Taubert H, Schmidt-Ott U. Function of biocide and hunchback homolog in the basal cyclorhaphan fly *Megaselia* (Phoridae)[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000, 97: 10844–10849
- [6] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nucleic acid mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells[J]. *Nature*, 2000, 404: 293–296
- [7] Kennerdell JR, Carthew RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway[J]. *Cell*, 1998, 95: 1017–1026
- [8] Misquitta L, Paterson BM. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNAi): a role for *nautilus* in embryonic somatic muscle formation[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 1451–1456
- [9] Brooks DR, Isaac RE. Functional genomics of parasitic worms: the dawn of a new era[J]. *Parasitol. Int.*, 2002, 51: 319–325
- [10] Caplen NJ, Parrish S, Iman F, et al. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNA in invertebrate and vertebrate systems[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98: 9742–9747
- [11] Brown SJ, Mahaffey JP, Lorenzen MD, et al. With RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during the development of distant related insects[J]. *Evol. Dev.*, 1999, 1: 11–15
- [12] Cottrell TR, Doering TL. Silence of the strands: RNA interference in eukaryotic pathogens[J]. *Trends Microbiol.*, 2003, 11: 37–43
- [13] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. *Genes: Dev.*, 2001, 15: 188–200
- [14] Li H, Li WX, Ding SW. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus[J]. *Science*, 2002, 296: 1319–1321
- [15] Baulcombe D. Viral suppression of systemic silencing[J]. *Trends Microbiol.*, 2002, 10: 306–308
- [16] Caplen N J, Zheng Z, Falgout B, et al. Inhibition of viral gene expression and replication in mosquito cells by dsRNA-triggered RNA interference[J]. *Mol Ther.*, 2002, 6: 243–251
- [17] Smith NA, Singh SP, Wang BiB, et al. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs[J]. *Nature*, 2000, 407: 319–320
- [18] McCafrey AP, Meuse L, Pham TT, et al. RNA interference in adult mice[J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 38–39
- [19] McCafrey AP, Nakai H, Pandey K, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference[J]. *Nat Biotechnol.*, 2003, 21(6): 639–644
- [20] 叶景佳、许则丰. 多种小分子干扰 RNA 联合抑制乙型肝炎病毒的体外研究[J]. *实验生物学报*, 2005, 38(2): 141–147
- [21] 王秀花. RNA 干扰抑制马立克氏病毒繁殖的研究[D]. 南京: 南京农业大学预防兽医学系, 2005: 67–78
- [22] Wilson JA, Jayasena S, Khvorov A, et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replications propagated in human liver cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(5): 2783–2788
- [23] 严春晖, 倪兵, 刘峰, 等. 质粒介导的 RNAi 抑制 SARS-CoV 复制和感染[J]. *免疫学杂志*, 2005, 21(5): 358–362
- [24] Hu WY, Myers CP, Kilzer JM, Pfaff SL, Bushman FD. Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference[J]. *Curr Biol.*, 2002, 12(15): 1301–11
- [25] 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
- [26] Gitlin L, Stone JK, Andino R. Poliovirus escape from RNA interference: short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches[J]. *J Virol.*, 2005, 79(2): 1027–35
- [27] Ge Q, McManus MT, 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: 2718–2723
- [28] 高永珍, 金奇. RNA 干扰抗病毒研究进展[J]. *病毒学报*, 2005, 4: 314–317
- [29] Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells[J]. *Nature*, 2002, 418: 430–434
- [30] Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells[J]. *Nature*, 2002, 418: 430–434