

· 综 述 ·

RNA 干扰技术研究新进展*

赵震宇 综述, 张 铀[△] 审校

(昆明医学院第二附属医院血液科, 昆明 650101)

关键词: RNA 干扰; 临床应用; 新进展

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2011. 09. 035

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)09-0914-03

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是由双链 RNA 介导的序列特异的基因沉默现象,它在转录水平、转录后水平和翻译水平上阻断基因的表达,具有高效性和高特异性的特点。小干扰 RNA(small interfering RNA 或 short interfering RNA, siRNA)是 RNAi 作用中的效应分子,作为引导序列,按照碱基互补原则识别靶基因转录出的信使 RNA(mRNA),并引导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)复合体结合 mRNA。随后 siRNA 与 mRNA 在复合体中换位,核酸酶 Dicer 将 mRNA 切割成 21~23 核苷酸(nucleotide, nt)的片段,从而可以破坏特定目的基因转录产生的 mRNA,使其功能沉默。现就 RNAi 作用的机制、RNAi 的特点以及 RNAi 在临床应用的新进展作一综述。

1 研究背景

DNA 的遗传信息决定生命的主要性状,而 mRNA 在信息传递中起着很重要的作用。其他两大类 RNA, rRNA 和 tRNA 同样在蛋白质的生物合成中发挥不可替代的重要功能。因此 mRNA、rRNA、tRNA 在遗传信息由 DNA 传递到表现生命性状的蛋白质的过程中起着举足轻重的作用。

2 RNAi 技术

RNAi 是指细胞中导入与内源性 mRNA 编码区某段序列同源的双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA),可致该 mRNA 发生特异性降解从而导致基因表达沉默的现象^[1]。目前,对于 RNAi 的发生机制普遍认为是:外源性(如病毒)或内源性的 dsRNA 在细胞内与一种具有 dsRNA 特异性的 RNA 酶 III 内切核酸酶(RNase III end nuclease)——Dicer 结合为酶-dsRNA 复合物,随即被切割成 21~23 nt 的 RNA 片段,即 siRNA。siRNA 与 Dicer 形成 RISC。siRNA 作为引导序列,按照碱基互补原则识别靶基因转录出的 mRNA,并引导 RISC 复合体结合 mRNA。随后 siRNA 与 mRNA 在复合体中换位,核酸酶 Dicer 将 mRNA 切割成 21~23 nt 的片段,从而可以破坏特定目的基因转录产生的 mRNA,使其功能沉默,即基因沉默(gene silencing)。而新产生的 siRNA 片段可再次与 Dicer 酶形成 RISC 复合体,介导新一轮的同源 mRNA 降解,从而产生级联放大效应,显著增强了对基因表达的抑制作用^[2]。

3 siRNA 的设计与合成

设计特异性的高效 siRNA 是至关重要的步骤,直接关系到抑制基因表达的效率。

3.1 siRNA 的设计步骤 高效率的 siRNA 的设计包括两个步骤,首先获得靶标的正确序列,应用 NCBI、DDBJ、BMBL 这 3 个基因序列数据库,检索相关的基因序列,通常是检索 ESTs(已表达序列)库中的 mRNA 序列;其次是合理的 siRNA 的设计。常规 siRNA 的设计,根据 siRNA 设计原则^[3]选取 19~21

个碱基对的序列,在基因组数据库中进行 BLASTIM 分析,这种方法普遍适用于动物细胞,设计的 siRNA 中有 60%~70% 可以发挥沉默效应,但沉默效应率差异较大,针对一个靶基因需要设计 3~4 条 siRNA,以保证能够筛选出一条有效序列^[4]。

3.2 siRNA 的合成方法

3.2.1 化学合成法 此法所获产物非常纯,siRNA 干扰成功率高,但价格昂贵限制了其应用和推广。

3.2.2 体外转录法 分别合成互补的两条带有某启动子的 DNA 范本,各自在体外转录形成两条单链,将两条单链退火后形成双链 RNA。

3.2.3 酶消化法 抑制率高,但此法产生的混合物可能导致非特异性抑制,另外在体外转录长链 RNA 有困难,Dicer 酶费用较高^[5]。

4 RNAi 技术的特点

RNAi 广泛存在于植物、真菌、线虫、昆虫、大鼠、小鼠、猴以及人等几乎所有的真核生物细胞中^[6],其共同特点为:(1)RNAi 是转录后水平的基因沉默机制;(2)RNAi 具有高度特异性,dsRNA 只降解与之序列相应的单个内源性 mRNA;(3)RNAi 抑制基因表达具有高效性;(4)RNAi 抑制基因表达具有遗传性;(5)发生 RNAi 的 dsRNA 长度为 21~23 个核苷酸长度比较稳定,较长的 dsRNA 必须由 Dicer 酶切割成相应长度的 siRNA 后才可发生作用;(6)RNAi 具有 ATP 依赖性^[7]。

5 RNAi 技术的研究进展

5.1 RNAi 技术在基础医学的研究新进展 Dunn 等^[8]利用 RNAi 技术针对海葵肌动蛋白和半胱氨酸蛋白酶这两个基因,用原位杂交的方法证实这两个基因的表达均受抑制,进而研究该基因的功能。利用 RNAi 技术可以容易地确定复杂的信号转导途径中相关基因的上下游关系及其作用。James 等^[9]应用 RNAi 研究了果蝇细胞系中胰岛素信号转导途径,取得了与已知胰岛素信号通路完全一致的结果。另外基因组范围的 RNAi 表型筛选已成为研究基因在特殊细胞功能和生物活性中作用的一种有效方法,但对于在相关基因之间的相互关系,利用 RNAi 还不能确定。

除了以上两个主要应用方面,RNAi 还被应用于生理学、生长发育过程研究方面的基础研究中。Palmer 等^[10]利用 RNAi 技术进行动物细胞离子通道生理学的研究和应用。

5.2 RNAi 技术在肿瘤治疗中的研究新进展 正常人体组织细胞增殖与凋亡总是处以一个平衡状态,而肿瘤的发生不仅与细胞增殖失控有关,也与细胞的凋亡减少有关,因此肿瘤的基因治疗前提是找到与肿瘤的发生及侵袭转移密切相关的靶基因,如 Bcl-2 是一种抗凋亡基因,而野生型 p53 是一种抑癌基因^[11]。由于 RNAi 技术是转录后水平的基因沉默机制,故在

转染细胞 48 h 后即可了解抑制靶向基因表达后的生物学现象。因此, RNAi 技术为基因功能的研究提供了更加快捷的途径, 而 RNAi 的特异性、高效性及操作简便等特点也使其成为肿瘤靶基因治疗的有力工具^[12]。

5.3 RNAi 技术在白血病治疗中的研究新进展 目前, 化疗仍然是治疗白血病的主要手段, 而多药耐药 (MDR) 是化疗失败的主要原因, 其中 MDR1 是细胞耐药的常见机制之一。有人用 MDR1 特异的 RNAi 处理, 在胰腺癌和胃癌中, 发现肿瘤细胞对柔红霉素的耐药率明显降低, 在血液肿瘤研究中有类似报道^[13]。有学者用 MDR1 特异的 siRNA 转入耐药的急性髓细胞白血病细胞 HL-60, 发现 survivin mRNA 水平及蛋白水平均降低, 细胞对化疗的敏感性增强, 细胞内药物浓度增加, 提示这一策略能有效逆转 MDR1 引起的耐药^[14]。同时, 有研究利用 RNAi 技术设计靶向 siRNA 重组表达载体转染 HL-60 细胞, 不仅增加了 HL-60 细胞的凋亡率, 同时增加了 HL-60 细胞对阿糖胞苷的敏感性。这就为今后在临床应用 RNAi 技术治疗白血病开拓了新的前景。

5.4 RNAi 技术在抗病毒方面的应用新进展 RNAi 技术在抗病毒治疗中也得到了广泛应用。病毒可以将自身的遗传物质整合到宿主的细胞核中, 使一般的药物难以直接发挥作用。目前有研究表明, RNAi 可以作为一种抗病毒的有效武器, 在治疗病毒性疾病的研究中, 可以设计针对病毒基因组 RNA 的 siRNA 或针对宿主细胞病毒受体的 siRNA 来抗病毒^[15]。

目前, 利用体外培养人类细胞研究 RNAi 抗病毒感染主要限于单链 RNA 病毒, 包括人类免疫缺陷病毒 (HIV)、流感病毒、丙型肝炎病毒 (HCV) 和脊髓灰质炎病毒^[16]。体外培养细胞实验证实, 针对 HIV 基因的 siRNA 能够抑制 HIV 在细胞内复制, 使产生的病毒数量减少 30~50 倍^[17]。RNAi 降低宿主细胞膜表面 HIV 受体 CD4 的表达, 也明显阻止 HIV 侵入、感染细胞^[18]。针对 HCV 基因组的 siRNA 在体外培养细胞中, 可抑制 90% 的病毒 RNA 和蛋白合成^[19]。

此外, 利用培养细胞和鸡胚接种实验证实, 病毒特异的 siRNA 能有效地抑制流感病毒和脊髓灰质炎病毒的产生^[20]。美国科学家近日开发出了一种利用抗体与短链 RNA (siRNAs) 结合直接送至免疫 T 细胞的方法, 该抗体能够绑定 T 细胞表面的 CD7 蛋白, 而 T 细胞正是 HIV 感染的主要细胞类型之一。并通过三种不同的 siRNA, 其中一种阻碍 HIV 借以进入 T 细胞的表面受体蛋白产生, 另外两种标靶 HIV 基因, 如果 HIV 设法进入了 T 细胞, 它们会阻止它的复制^[21]。RNAi 极大地帮助抑制 HIV 病毒对小鼠的感染, 因此 RNAi 已成为抗病毒治疗的一种新的特异方法。

6 RNAi 技术尚存在的问题

RNAi 技术发展迅速, 在白血病及各种肿瘤的研究中具有巨大潜力, 但是 RNAi 技术本身具有不足之处, 如 RNAi 的特异性是相对的, 在某些情况下, siRNA 能在翻译水平抑制与之不完全相关的基因表达即脱靶效应^[22], 须从 siRNA 的设计、siRNA 的特异性修饰等方面研究解决的方法^[23]。有研究表明, siRNA 被导入细胞后, 还可能和细胞内原有的微小 RNA 形成竞争, 因此可以影响原本由微小 RNA 控制的一些基因的表达, 从而对细胞的一些生理或者病理过程产生影响^[24]。在临床应用中如何有效地把 siRNA 导入细胞或者体内尚是难题, 虽然现在已经发展起来很多技术促使此问题的解决方案崭露头角, 但是都还未从根本上克服, 同时 RNAi 这一方法具有严重的不良反应, 从而导致了临床应用的局限^[25], 但是在微 RNA (miRNA) 与血液肿瘤的关系中, 随着发现的 miRNA 序

列不断增多和研究的深入, 可能会有新的参与肿瘤发生的 miRNA 被发现^[26], 之前许多不明了的发病机制中, 有的可能与 miRNA 的调节作用有关, 因此 miRNA 参与发病的具体机制也会成为研究的重点。

7 RNAi 技术的前景

总之, siRNA 的发现以及 RNAi 技术的应用大大丰富了人类研究基因的手段和对基因调节的认识, 在血液学尤其恶性血液病的研究中必将发挥越来越重要的作用, 因此还是有理由相信随着在理论与技术的源头上长久不懈的努力会给这项技术带来光明的前程。

参考文献:

- [1] Ashihara E, Kawata E, Maekawa T. Future prospect of RNA interference for cancer therapies [J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(3): 345-360.
- [2] Merritt WM, Bar Eli M, Sood AK. The dicey role of Dicer; implications for RNAi therapy [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7): 2571-2574.
- [3] Mohr S, Bakal C, Perrimon N. Genomic screening with RNAi: results and challenges [J]. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79(2): 37-64.
- [4] Grimm D. Small silencing RNAs: state-of-the-art [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(9): 672-703.
- [5] Shrey K, Suchit A, Nishant M. RNA interference: emerging diagnostics and therapeutics tool [J]. *Biochemi Biophys Res Commun*, 2009, 386(2): 273-277.
- [6] Lee SK, Kumar P. Conditional RNAi: towards a silent gene therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(7): 650.
- [7] Wang SL, Yao HH, Qin ZH. Strategies for short hairpin RNA delivery in cancer gene therapy [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9(11): 1357-1368.
- [8] Dunn SR, Philips WS, Green DR, et al. Knockdown of actin and caspase gene by RNA interference in the symbiotic anemone *Aiptasia pallida* [J]. *Biol Bull*, 2007, 212(3): 250-258.
- [9] James CC, Carolyn AW, Nancy SL, et al. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways [J]. *RNAs*, 2006, 9(5): 6499-6503.
- [10] Palmer ML, Fahrenkrug SC, Grady SM. RNA interference and ion channel physiology [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2006, 46(2): 175-191.
- [11] Li F, Wang XY, Chen L. Effects of RNAi targeting-L survivin on proliferation and apoptosis of MDA-MB-231 cells [J]. *Acta Acad IAE Med Milit Tertian*, 2008, 12(30): 2302-2320.
- [12] Shukla S, Sumaria CS, Pradeepkumar PI. Exploring chemical modifications for siRNA therapeutics: a structural and functional outlook [J]. *Chem Med Chem*, 2010, 5(3): 328-349.
- [13] Lee AJ, Kolesnick R, Swanton C. RNAi-mediated functional analysis of pathways influencing cancer cell drug resistance [J]. *Expert Rev Mole Med* [electronic resource], 2009, 11(21): 15-19.
- [14] Grosshans H, Filipowicz W. Molecular biology: the ex-

- panding world of small RNAs [J]. Nature, 2008, 451 (7177):414-416.
- [15] 董婉维,孙开来,郑志红. RNA 干扰技术在基因治疗中的应用进展[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(6):1174-1177.
- [16] Anesti AM, Coffin RS. Delivery of RNA interference triggers to sensory neurons in vivo using herpes simplex virus[J]. Expert Opin Bio Ther, 2010, 10(1):89-103.
- [17] Khaliq S, Khaliq SA, Zahur M. RNAi as a new therapeutic strategy against HCV[J]. Biotechnol Adv, 2010, 28(1):27-34.
- [18] Subramanya S, Kim SS, Manjunath N. RNA interference-based therapeutics for human immunodeficiency virus HIV-1 treatment: synthetic siRNA or vector-based shRNA[J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(2):201-213.
- [19] Katakowski JA, Palliser D. SiRNA-based topical microbicides targeting sexually transmitted infections[J]. Curr Opinion Mole Thera, 2010, 12(2):192-202.
- [20] Pan Q, Tilanus HW, Janssen HL. Prospects of RNAi and microRNA-based therapies for hepatitis C [J]. Expert Opin Biol Ther, 2009, 9(6):713-724.
- [21] Tang Q, Li B, Woodle M, et al. Application of siRNA against SARS in the rhesus macaque model[J]. Methods Mol Biol, 2008(442):139-158.
- [22] Rassouli FB, Matin MM. Gene silencing in human embryonic stem cells by RNA interference[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 390(4):1106-1110.
- [23] 程建国, 霞明, 文峰. MTA1 靶向 RNA 干扰对人肝癌 HepG2 细胞生物学行为影响的研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(14):1824-1826.
- [24] 李高峰, 王宏梅, 陈龙华. RNAi 对肝癌细胞放射增敏的实验研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(12):1492-1496.
- [25] Rao DD, Senzer N, Cleary MA. Comparative assessment of siRNA and shRNA off target effects: what is slowing clinical development [J]. Cancer Gene Ther, 2009, 16(11):807-810.
- [26] 黄环, 吴永忠. RNA 干扰技术及其在肿瘤研究中的进展[J]. 重庆医学, 2008, 37(2):198-200.

(收稿日期:2010-09-10 修回日期:2010-10-10)

· 综 述 ·

新生儿早发败血症相关高危因素的研究进展

邓洪涛¹, 周 敏¹ 综述, 王家蓉² 审校

(1. 四川省广安市人民医院儿科 638000 2. 重庆医科大学附属儿童医院新生儿科 400014)

关键词: 婴儿, 新生儿; 出血性败血症; 危险因素

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.09.036

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)09-0916-02

新生儿败血症是导致新生儿死亡的重要原因, 发生率占活产儿的 0.1%~1.0%, 占极低体重质量儿的 16.4%, 病死率为 10%~50%^[1]。其中早发败血症多见, 对新生儿造成的危害也较严重。而新生儿败血症尤其是日龄越小的新生儿往往缺乏典型的临床表现, 如果能够明确具有感染相关高危因素的高危新生儿, 对其在早期进行感染筛查, 争取在感染的早期即给予相应处理, 可以降低其危害。本文对新生儿早发败血症相关的高危因素的研究进展进行综述。

1 定 义

当前对早发败血症的定义标准还存在争议, 有学者主张定义为生后 72 h 内发生的败血症^[2], 有学者主张定义为生后小于 7 d 内发生的败血症^[3], 但都一致认为感染的来源是来自宫内或在胎儿分娩的过程中获得。

2 常见病原

与早发性感染密切相关最常见的细菌微生物包括 B 族链球菌、大肠埃希菌、流感嗜血杆菌和李斯特菌^[4]。新生儿败血症往往缺乏典型症状, 故早期容易被忽视, 主要表现为少吃、少哭、少动、黄疸、体重质量不增、体温异常等^[1,5-6]。

3 高危因素

3.1 早产和低出生体质量 早产和低出生体质量在临床的发生上有一定关系。据调查, 在低体质量儿中, 早产占 62.5%, 早产儿中的 37.5% 属于低体质量儿^[7]。早产儿或低出生体质量儿由于身体各个系统、器官的发育成熟度常较足月儿和正常体质量儿差, 无论是非特异性还是特异性免疫力均较差, 因此发生感染的概率更高。另外早产也提示胎儿发生宫内感染[巨

细胞病毒(CMV)、单纯疱疹病毒(HSV)、乙型肝炎病毒、弓形虫等]的可能性, 因为早产发生的一个重要因素就是胎盘炎症引起的大量促炎性细胞因子的释放, 从而导致前列腺素的大量合成和释放, 而前列腺素可以促进子宫收缩, 导致分娩发动。另外早产儿更可能需要侵入操作, 如脐导管插管, 增加了感染风险。

有资料表明随着出生体质量和胎龄的降低, 发生败血症的风险会相应增加^[8]。有学者在对大肠埃希菌早发败血症的研究中发现, 2/3 的患儿为早产^[9], 提示早产是早发败血症最大的风险, 只要控制早产的发生即可控制早发大肠埃希菌感染的发生。

3.2 尿道生殖道感染 在正常情况下, 在尿道生殖道也会有一些细菌的定植, 但它们会保持平衡状态, 不会引起感染。但在某些因素如妊娠打破这个平衡后, 就会使某些细菌生长占优势, 导致疾病的发生。在西方发达国家, 最常见的导致妇女尿道生殖道感染的细菌是 B 族链球菌。它可以引起孕妇无症状性的菌尿、羊膜炎、子宫内膜炎、尿路感染, 还可在产前或产时通过垂直传播的方式感染胎儿, 因而引起早发败血症的最主要病原。有研究发现尿道生殖道的定植细菌与新生儿败血症有着明显的联系, 且越到孕晚期, 相关性越高^[10]。但是近年有研究却发现母亲生殖道分泌物培养出的主要细菌和早发败血症患儿血培养出的主要细菌之间的关联并不明显^[11]。

3.3 胎膜早破 目前对胎膜早破发生的具体机制还不是很清楚, 目前认为主要与细菌感染有关, 因为很多生殖道定植细菌如 B 族链球菌、大肠埃希菌等可以产生分解胎膜胶原蛋白的