

- printing that lead to chronic disease[J]. Am J Clin Nutr, 1999, 69 (2): 179-197.
- [13] Devaskar SU, Thamocharan M. Metabolic programming in the pathogenesis of insulin resistance[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2007, 8(2): 105-113.
- [14] Simmons RA. Developmental origins of beta-cell failure in type 2 diabetes: the role of epigenetic mechanisms[J]. Pediatr Res, 2007, 61(5 Pt 2): 64R-67R.
- [15] Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function[J]. Physiol Rev, 2008, 88(2): 611-638.
- [16] Ling C, Del Guerra S, Lupi R, et al. Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion[J]. Diabetologia, 2008, 51(4): 615-622.
- [17] Kloc A, Zaratigui M, Nora E, et al. RNA interference guides histone modification during the S phase of chromosomal replication[J]. Curr Biol, 2008, 18(7): 490-495.
- [18] Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks[J]. Trends Genet, 2007, 23(8): 413-418.
- [19] Patel SR, Kim D, Levitan I, et al. The BRCT-domain containing protein PTIP links PAX2 to a histone H3, lysine 4 methyltransferase complex[J]. Dev Cell, 2007, 13(4): 580-592.
- [20] Bouchard M, Souabni A, Mandler M, et al. Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8[J]. Genes Dev, 2002, 16(22): 2958-2970.
- [21] Ting AH, Suzuki H, Cope L, et al. A requirement for DICER to maintain full promoter CpG island hypermethylation in human Cancer cells[J]. Cancer Res, 2008, 68(8): 2570-2575.
- [22] Shi H, Maier S, Nimmrich I, et al. Oligonucleotide-based microarray for DNA methylation analysis: principles and applications[J]. J Cell Biochem, 2003, 88(1): 138-143.
- [23] Ho SM, Tang WY. Techniques used in studies of epigenome dysregulation due to aberrant DNA methylation: an emphasis on fetal-based adult diseases[J]. Reprod Toxicol, 2007, 23(3): 267-282.

(收稿日期: 2012-11-25)

• 综 述 •

RNA 干扰技术在抗病毒感染中的应用

付 瑞 综述; 段 勇[△], 王玉明 审核

(昆明医科大学第一附属医院检验科, 云南昆明 650032)

关键词: RNA 干扰; 病毒感染; 治疗结果

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 09. 030

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)09-1126-03

病毒感染性疾病严重危害着人类的健康。目前临床控制这类疾病的主要方法是通过接种疫苗来预防病毒感染或使用抗病毒药物来降低病毒的活性以达到治疗的目的。但抗病毒药物缺乏特异性, 且其较强的不良反应会对机体造成损害, 此外, 长期应用会诱发耐药株的产生。因此, 寻找新的抗病毒治疗方法已成为一个急需解决的问题。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是序列特异的双链 RNA(double stranded RNA, dsRNA)介导同源 mRNA 降解, 使细胞表现出特定基因缺失表型的过程。它作为一种新的基因阻断技术, 具有高效、特异、操作简便等优点, 是传统基因敲除技术和反义技术所无法比拟的, 目前已广泛应用于功能基因组学、基因治疗及药物设计等领域, 特别是在抗病毒感染方面取得了显著的进步。大量体外实验表明, 应用 RNAi 技术能有效地抑制病毒复制相关基因的表达, RNAi 技术已成为抗病毒感染治疗的有力工具。

1 RNAi 的作用机制

RNAi 现象广泛存在于生物界中, 随着研究的不断深入, RNAi 的机制正在被逐步阐明, 其过程可分为起始、效应、扩增 3 个阶段。

1.1 起始阶段 RNA 酶 III 家族(Dicer 核酸酶)依赖 ATP 将内源性或外源性的 dsRNA 切割成约 21~23 碱基对的小干扰 RNA(short interfering RNA, siRNA)。siRNA 是完成 RNAi 的主要部分, 它们通常具有 5' 单磷酸和 3' 羟基末端, 且 3' 端均有 2~3 个突出的核苷酸。

1.2 效应阶段 siRNA 的一条链与 Argonaute 亚家族蛋白结合形成 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing com-

plex, RISC), 依赖于 ATP, 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^[1]。

1.3 扩增阶段 这一阶段类似聚合酶链反应(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^[2]。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, 从而显著增强了对基因表达的抑制作用^[3]。

2 RNAi 的生物学特性

RNAi 具有以下几个重要的特性: (1) RNAi 是转录后水平的基因沉默(post transcriptional gene silencing, PTGS)机制, 迄今的研究认为, RNAi 不会影响染色体 DNA 序列的复制和转录过程。(2) RNAi 具有普遍性。1998 年人们在对线虫的研究中首次发现了 RNAi 现象, 随后, 科学家们对不同种属的生物进行了深入的研究, 证实该现象广泛存在于多种生物中。细胞培养和动物模型的实验都证实, siRNA 可特异性地抑制多种器官细胞中基因的表达。(3) RNAi 具有高度的序列特异性。dsRNA 只降解与之序列相应的内源性 mRNA, 而其他 mRNA 的表达不受影响, siRNA 除正义 3' 端 2 个碱基在序列识别中不起重要作用外, 其他单个碱基的改变可能导致 RNAi 效应大大减弱, 甚至消失。(4) RNAi 具有抑制基因表达的高

效性。数量上远低于内源性 mRNA 的 dsRNA 可完全抑制相应基因的表达,从而引起该基因缺失突变的表型。(5) RNAi 具有传播性和遗传性。siRNA 可在 RdRp 的作用下大量扩增,并转运出细胞,在不同细胞间长距离传递和维持,使 RNAi 扩散到整个机体并可以传代^[4]。

3 RNAi 技术在治疗病毒感染中的应用

3.1 抗乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的治疗 据 WHO 报道,全球范围内每年约有 100 万人死于 HBV 感染所致的肝衰竭、肝硬化和原发性肝癌,但目前各种药物都无法彻底清除体内的 HBV,大量研究表明 RNAi 抑制 HBV 效果良好。

HBV 基因组为部分双链环状 DNA 分子,较短的一段为正链,长链则为负链,负链包含 4 个部分重叠的开放读码框(open reading frame, ORF),分别称为前 S/S 区、前 C/C 区、P 区、X 区。大量实验通过针对 HBV 基因组中不同编码区来设计相应的 siRNA,均在体外培养的细胞中发挥了较好的抑制病毒复制的作用。Yao 等^[5]采用 HBV P 区作为 RNAi 的作用靶点,通过逆转录 PCR(reverse transcriptase-PCR, RT-PCR)法观察细胞乙型肝炎病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X protein, HBx)、乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)、乙型肝炎病毒核心抗原(hepatitis B virus core antigen, HBcAg)的 mRNA 表达水平,实验结果显示 siRNA 对病毒的复制有显著的抑制效应。Xin 等^[6]针对 HBV 基因组的多个区域设计 siRNA,结果显示 HBsAg、乙型肝炎病毒 e 抗原(hepatitis B virus e antigen, HBeAg)的表达水平均降低,且 HBV DNA 和共价闭合环状 DNA(covalently closed circle DNA, cccDNA)的复制受到明显的抑制。李绍祥等^[7]选择 C 区设计相应的 siRNA,破坏其前基因组 RNA,结果显示 HBeAg 的表达明显降低。

目前,有研究报道大量的宿主蛋白参与 HBV 的复制和转录过程,抑制 HBV 相关的宿主基因可以抑制 HBV 的复制。以宿主基因为靶点进行 RNAi 抗 HBV 感染治疗,可以避免因病毒突变所引起的沉默效率减低的问题。紫外线-损伤 DNA 结合蛋白 1(damaged DNA binding protein 1, DDB1)是 HBx 完成刺激 HBV 复制、转录等功能的必需协助分子。Tang 等^[8]将针对 DDB1 基因和 HBV X 区的 siRNA 共转染到细胞中,显著增强了 HBx-siRNA 抑制 HBV 复制的效果。最近研究发现,热休克同源蛋白(heat shock protein cognate, HSC70)参与 HBV DNA 聚合酶反转录过程,Wang 等^[9]运用 RNAi 技术沉默 HSC70,显著抑制了 HBV 的复制,使细胞内 HBV DNA 的量减少。通过抑制相关宿主基因的表达从而抑制 HBV 的复制,可能成为治疗 HBV 感染的新策略。

3.2 抗丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染的治疗 治疗 HCV 感染的惟一方法是联合长效干扰素 α (interferon α , IFN- α)和病毒唑进行治疗,但不良反应大,且只有 50% 的患者能获得满意的疗效^[10],大量运用 RNAi 技术治疗 HCV 感染的研究都取得了理想的结果。

HCV 5'非翻译端(5' untranslated region, 5' UTR)是 HCV 基因组中最保守的区域,并且该区域包含了 1 个内源性核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES),对病毒的复制和蛋白质的翻译必不可少,因此,多数研究者选择该区域进行 RNAi。细胞培养和复制子复制观察中发现短发卡 RNA(short hairpin RNA, shRNA)抑制 IRES 的作用在 HCV 各型中均存在^[11]。Kanda 等^[12]针对 IRES III d 亚基和 III e 亚

基之间的部分设计 shRNA,构建载体后转染感染 1a 型 HCV 的人肝癌 Huh7.5 细胞,使细胞中病毒的数量显著减少。Khaliq 等^[13]在 3a 型 HCV 的 5' UTR 标记绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP),将靶向于 5' UTR 的 siRNA 转染 Huh7.5 细胞,结果显示在 mRNA 及蛋白水平 5' UTR-GFP 的表达均明显降低。

HCV 病毒核心以及非结构区域也常被选择作为 RNAi 的重要靶点。Ali 等^[14]针对 HCV 的非结构基因(NS2、NS3、NS4B 和 NS5B)设计了 6 对 21 bp 的 siRNA(NS2si-241、NS3si-229、NS3si-858、NS4Bsi-166、NS5Bsi-241 和 NS5Bsi-1064),将其分别转染 Huh7.5 细胞,发现它们均能有效抑制 HCV 的复制。其中,作用于 HCV NS3 的 siRNA(NS3si-229 和 NS3si-858)可使病毒滴度分别下降 58% 和 88%,在 siRNA 浓度达到 20 μ mol/L 时,NS4Bsi-166 和 NS5Bsi-1064 对病毒的抑制率达 90% 以上。Khaliq 等^[15]设计了针对核心基因的 5 对 siRNA,并在体外分析不同的 3a 型 HCV 病毒株转录情况,转染 Huh7.5 细胞后发现,这些 siRNA 对核心基因的抑制率达 80%。

3.3 抗人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染的治疗 目前,治疗 HIV 感染和获得性免疫缺陷综合征最有效的手段是抗 HIV 鸡尾酒疗法,虽然该疗法延缓了疾病的进程,但存在耐药性及长期毒性问题, RNAi 技术给抗 HIV 感染治疗带来了新的希望。

HIV 为双股正链 RNA 病毒,含有 *env*、*gag* 和 *pol* 3 个结构基因, *vif*、*vpr*、*vpu*、*tat*、*rev*、*tev*、*nef* 7 个附加调节基因以及病毒复制所必须的长末端重复序列(long terminal repeats, LTR),上述基因均是 RNAi 作用的靶点。体外细胞培养表明,靶向 HIV 基因组的 siRNA 能够抑制 HIV 在细胞内复制,使病毒数量显著减少^[16]。Dave 等^[17]针对 HIV nef 基因设计 siRNA,结果显示 HIV 的复制连续 3 d 受到抑制。同样,由于 HIV 基因组的快速变异大大削弱了靶向病毒基因的 siRNA 效果,细胞表面的 CD4 受体是 HIV 特异的细胞受体, HIV 要高效进入靶细胞,还需辅助受体 CXCR4 趋化因子受体 4(CXCR4)、CC 趋化因子受体 5(CC chemokine receptor 5, CCR5)的调节,因此,沉默细胞膜受体、辅助受体相关基因的表达,可以保护细胞免受感染,延缓病毒的复制。利用 siRNA 抑制宿主细胞表面 CD4 受体的表达,可明显阻止 HIV 侵入、感染细胞^[18]。但由于 CD4 受体在人体细胞免疫方面有重要的功能,因此,它并不是治疗 HIV 感染的理想靶点。CCR5 对细胞的免疫功能不是必需的,但它是 HIV 感染细胞必需的受体,因此,它被认为是预防和治疗 HIV 感染的最理想的细胞靶点。Qin 等^[19]将作用于 CCR5 的 siRNA 导入 CD4⁺ 淋巴细胞,使 CCR5 阳性细胞减少为原来的 1/10,并使感染 HIV 的细胞数减少为原来的 1/6。

3.4 抗其他病毒感染的治疗 单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)是最早发现的人类疱疹病毒, HSV-2 感染引起的生殖器疱疹是一种常见的性传播疾病。2009 年 Narute 等^[20]已在体外实验中运用 siRNA 有效地抑制了 HSV 的增殖。2011 年张云青^[21]等根据 HSV-2 VP16 和 DNA 聚合酶基因序列设计、合成 siRNA(VP2-1 和 DP2-1),采用病毒产量减少实验测定 siRNA 对病毒复制的抑制,荧光定量 RT-PCR 测定 siRNA 对病毒靶基因 mRNA 水平的影响。结果显示 siRNA VP2-1 和 siRNA DP2-1 使病毒滴度降低约 1 个数量级, siRNA VP2-1 使病毒 VP16 mRNA 水平在感染后 6 h 和 12 h 分别降

低 58.6% 和 79.5%，siRNA DP2-1 使病毒 DNA 多聚酶的 mRNA 水平分别降低 59.8% 和 77.4%，该实验表明 siRNA 在体外能有效抑制 HSV-2 的复制。

高危型人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV)，尤其是 HPV16 型的感染是宫颈癌发生的必要条件，其中 HPV16 型早期基因 E6 和 E7 的编码蛋白在维持转化组织恶性表型的过程中发挥重要的作用。李大可等^[22] 针对 HPV16 E6 基因序列设计 shRNA，然后构建质粒表达载体，通过脂质体法转染宫颈癌 CaSki 细胞株，结果显示 HPV16 E6 的 mRNA 及蛋白表达抑制率分别为 89.5% 和 98.1%。张晓等^[23] 采用化学法合成靶向 HPV16 E7 的 siRNA，对 HPV16 E7 mRNA 表达抑制率达 75%。

麻疹病毒 (measles virus, MV) 是引起儿童急性麻疹的病原体，且目前麻疹仍是威胁中国儿童健康的主要传染病。史俊岩等^[24] 针对 Rab9 鸟苷三磷酸酶 (guanosine triphosphatase, GTPase) 基因序列设计合成 siRNA，经脂质体法转染非洲绿猴肾 Vero-E6 细胞株，转染 10 h 后感染麻疹病毒 Edmonston，通过标准蚀斑实验检测麻疹病毒滴度，结果显示其对麻疹病毒复制的抑制率高达 90%。随后，该研究小组设计合成靶向 Rab9 GTPase 基因的 shRNA，构建 shRNA 表达载体，其对麻疹病毒复制的抑制率达 90% 以上^[25]。

4 存在的问题与展望

的确，在体外培养细胞及建立的动物模型中，利用 RNAi 技术治疗病毒感染取得了令人满意的效果，但 RNAi 技术要从实验室走向临床，还有一些问题有待解决。首先要解决的问题是如何将有治疗作用的 siRNA 片段安全、高效地导入体内的靶细胞；其次，siRNA 具有脱靶效应，siRNA 的这种非特异性作用直接影响其运用的安全性；再次，人体内含 RNase A 家族酶，因此，siRNA 在人体内具有不稳定，容易降解，且作用时间短的特点。尽管将 RNAi 技术有效应用于临床还存在上述问题，但笔者相信，随着对 RNAi 机制的深入研究和 RNAi 技术的不断完善，它一定可以成为治疗病毒感染的有效方法。

参考文献

[1] Hannon GJ. RNA interference[J]. Nature, 2002, 418(6894): 244-251.

[2] Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs[J]. Cell, 2001, 107(3): 297-307.

[3] Merritt WM, Bar-Eli M, Sood AK. The dicey role of Dicer: implications for RNAi therapy[J]. Cancer Res, 2010, 70(7): 2571-2574.

[4] Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, et al. An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus[J]. Cell, 2000, 101(5): 543-553.

[5] Yao J, Yu W, Chang Y, et al. Targeted screening of SiRNA directed HBV polymerase gene for effective inhibition of HBV expression[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2008, 28(3): 266-271.

[6] Xin XM, Li GQ, Guan XR, et al. Combination therapy of siRNAs mediates greater suppression on hepatitis B virus cccDNA in HepG2. 2. 15 cell[J]. World J Gastroenterol, 2008, 55(88): 2178-2183.

[7] 李绍祥, 闫彩珍, 张成平, 等. RNAi 靶向抑制 HBV 复制和 HBeAg

表达[J]. 河北医科大学学报, 2008, 29(3): 333-336.

[8] Tang KF, Xie J, Chen M, et al. Knockdown of damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1) enhances the HBx-siRNA-mediated inhibition of HBV replication[J]. Biologicals, 2008, 36(3): 177-183.

[9] Wang YP, Liu F, He HW, et al. Heat stress cognate 70 host protein as a potential drug target against drug resistance in hepatitis B virus[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(5): 2070-2077.

[10] Ansar M, Ashfaq UA, Shahid I, et al. Inhibition of full length hepatitis C virus particles of 1a genotype through small interference RNA[J]. Virol J, 2011, 8: 203.

[11] Khaliq S, Khaliq SA, Zahur M, et al. RNAi as a new therapeutic strategy against HCV[J]. Biotechnol Adv, 2010, 28(1): 27-34.

[12] Kanda T, Steele R, Ray R, et al. Small interfering RNA targeted to hepatitis C virus 5' nontranslated region exerts potent antiviral effect[J]. J Virol, 2007, 81(2): 669-676.

[13] Khaliq S, Jahan S, Pervaiz A, et al. Down-regulation of IRES containing 5' UTR of HCV genotype 3a using siRNAs[J]. Virol J, 2011, 8: 221.

[14] Ali Ashfaq U, Ansar M, Sarwar MT, et al. Post-transcriptional inhibition of hepatitis C virus replication through small interference RNA[J]. Virol J, 2011, 8: 112.

[15] Khaliq S, Jahan S, Ijaz B, et al. Inhibition of core gene of HCV 3a genotype using synthetic and vector derived siRNAs[J]. Virol J, 2010, 7: 318.

[16] Katakowski JA, Palliser D. siRNA-based topical microbicides targeting sexually transmitted infections[J]. Curr Opin Mol Ther, 2010, 12(2): 192-202.

[17] Dave RS, Pomerantz RJ. Antiviral effects of human immunodeficiency virus type 1-specific small interfering RNAs against targets conserved in select neurotropic viral strains[J]. J Virol, 2004, 78(24): 13687-13696.

[18] Subramanya S, Kim SS, Manjunath N, et al. 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] Qin XF, An DS, Chen IS, et al. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(1): 183-188.

[20] Narute PS, Raut AA, Saini M, et al. Inhibition of bovine herpesvirus multiplication in MDBK cells by small interfering RNAs[J]. Acta Virol, 2009, 53(3): 203-206.

[21] 张云青, 赖维, 谢淑霞, 等. 小干扰 RNA 抑制 2 型单纯疱疹病毒作用的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2011, 44(11): 772-775.

[22] 李大可, 彭芝兰, 尤志学. HPV16 E6 基因特异性 RNA 干扰表达载体的构建及对 HPV16 E6 基因抑制的研究[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2008, 28(11): 1393-1397.

[23] 张晓, 王传新, 李伟, 等. 特异性 siRNA 抑制 HPV16 E7 基因表达的实验研究[J]. 山东大学学报: 医学版, 2009, 47(11): 64-67.

[24] 史俊岩, 王美莲, 刘兵, 等. 抑制麻疹病毒体外复制的效应性小干扰 RNA 的鉴定[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(4): 44-48.

[25] 史俊岩, 王美莲, 刘兵, 等. RNA 干扰抑制麻疹病毒体外复制的实验研究[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(3): 69-73.