

反义技术研究进展

王 波 陈梅红*

(中国医学科学院基础医学研究所中国协和医科大学基础医学院医学分子生物学国家重点实验室 北京 100005)

摘要 反义技术利用 DNA 或 RNA 分子通过 Watson-Crick 碱基配对原则与目的基因的 mRNA 互补结合,通过各种机制使其降解或抑制其编码蛋白的翻译,从而抑制目的基因的表达。与基因敲除 (gene knockout) 等功能缺失性研究方法相比,反义技术具有投入少,周期短,操作简单等优点,因此受到了广泛的关注。对几种常用反义技术的研究进展及存在的问题进行概述。

关键词 反义技术 反义寡核苷酸 核酶 DNA 酶 RNA 干扰 小干扰 RNA

人类基因组计划的完成为研究者提供了大量的序列信息,如何利用这些序列信息阐明未知基因的功能成为后基因组时代的研究热点。反义技术利用 DNA 或 RNA 分子通过 Watson-Crick 碱基配对原则与目的基因的 mRNA 互补结合,通过各种机制使其降解或抑制其编码蛋白的翻译,从而抑制特定目的基因的表达,为阐明基因的功能提供了一种有效的方法。

目前,可用于抑制基因表达的反义技术包括三类:反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, AS-ONs),包括反义寡脱氧核苷酸 (AS-ODNs) 和反义 RNA;具有催化活性的核酶 (ribozymes) 及 DNA 酶 (DNAzymes);小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)。

1 反义寡核苷酸

AS-ONs 的作用机制与其骨架结构有关^[1]: (1) 带有负电荷的 ODNs 与互补 mRNA 结合后可以激活 RNase H,后者切割 RNA-DNA 杂化双链中 mRNA 链,抑制其表达。(2) 其他不带负电荷的 AS-ONs 通过空间位阻效应发挥作用。

应用 AS-ONs 抑制特定基因表达时首先要解决寡核苷酸的稳定性问题。因为寡核苷酸在生物学介质中很容易被广泛存在的核酸酶降解。为解决这一问题,许多化学修饰的核苷酸被引入到 AS-ONs 中,包括磷酸骨架的改变,戊糖的修饰(主要在

核糖的 2' 羟基) 等等。例如硫代寡核苷酸 (PS-ODNs), 2'-O 甲基 RNA 及 2'-O 甲氧基 RNA 等二代 AS-ONs,以及两者的结合体“gapmer”等都大大提高了寡核苷酸抗核酸酶降解的能力。

近年来,许多与 DNA 或 RNA 结构类似但由完全不同的化学成分构成的 DNA、RNA 类似物也应用于反义研究中。例如肽核酸 (peptide nucleic acids, PNAs),将 DNA 的磷酸脱氧核糖骨架用聚酰胺键取代,锚定核酸 (locked nucleic acids, LNAs),将 RNA 中的 2'-O 与 4'-C 通过亚甲基相连,以及 DNA: LNA 嵌合体等等。这些第三代 AS-ONs 使寡核苷酸在生理条件下更加稳定,与互补 mRNA 的亲和力更高,但它们大多不能激活 RNase H。因此目前应用最广泛的 AS-ONs 仍然是 PS-ODNs。

为有效抑制某一特定基因表达,必须针对该基因的 mRNA 序列选择有效作用位点。因为在细胞内 mRNA 通常存在二级结构或与 RNA 结合蛋白等反式作用因子相互作用,阻碍 AS-ONs 与 mRNA 的结合,导致许多 AS-ONs 并不能发挥作用。针对这一问题,近年来出现了几种筛选 mRNA 序列上有效作用位点的方法。当前多种计算机软件可以预测 RNA 的二级结构,用于筛选靶点时操作简便快捷,但计算机软件没有将 mRNA 与蛋白等的相互作用考虑进去,因此成功率不高。此外研究者针对自然折叠的 mRNA 设计了几种 mRNA 的实测分析法,例如利用寡核苷酸随机文库鉴别 mRNA 上的 RNase H 切割位点即 RNase H 作图法^[2];利用寡核苷酸芯片进行的扫描分析^[3];随机寡核苷酸库结合逆转录 (Reverse Transcription Random Oligonucleotide Library, RT-ROL)

收稿日期: 2004 06 11 修回日期: 2004 08 17

* 通讯作者, 电子信箱: chenmh@chgb.org.cn

分析法^[4];以及 mRNA 可接近位点标记技术(mRNA accessible site tagging, MAST)^[5]等。这些方法直接针对生理状态下的 mRNA 序列进行筛选,成功率较高,在反义因子的设计方面将发挥重要作用。

2 核酶与 DNA 酶

尽管早在 1981 年, Cech 等就证实了 RNA 分子可以具有催化活性,直到上世纪 80 年代末 90 年代初,研究人员鉴定出一种相对简单的核酶催化结构域——“锤头”结构,使其更容易化学合成后,核酶才真正广泛用于抑制目的基因的表达。锤头结构的核酶仅含有大约 30 个核苷酸,包括两个结构域:催化结构域和位于两侧的底物结合结构域。催化结构域在目标 RNA 的 NUH 位点处切割(其中 H 为除 G 外的任意核苷酸)^[6]。

在实际应用中,核酶同样面临着稳定性和有效位点的选择等问题。对于核酶,提高其稳定性较 AS-ONs 更困难,因为对核酶进行的修饰可能引起其构象的改变,造成酶活性的降低甚至失活。通过尝试,研究者设计了几种几乎不影响核酶活性的修饰,例如 Usman 等^[7]设计的一种稳定核酶结构:含有 5 个未修饰的核苷酸,第 4 位为 2'-ε 烯丙基尿嘧啶,4 个硫代核苷酸,其他位点为 2'-O 甲基 RNA,3' 末端由反向 3'-3' deoxyabasic sugar 保护。除化学修饰外,研究者还利用含 Pol III 启动子的载体在细胞内表达核酶^[8],并且可通过改造启动子进行诱导表达或组织特异性表达,这是 AS-ODNs 所无法比拟的。

对于核酶有效位点的选择,除了可以利用 AS-ONs 的筛选方法外,研究者还通过各种方法,例如 cDNA 文库部分降解法^[9]等,构建了底物结合结构域为随机序列的核酶文库来鉴定有效的靶位点或进行新基因功能的筛查。

鉴于核酶的不稳定性以及化学修饰的复杂性, Santoro 等^[10]利用体外筛选的方法设计出了 Mg^{2+} 依赖性的特异性切割 RNA 的 DNA 酶,其中应用最广泛的是“10-23 DNAzyme”,其结构和功能均与锤头结构的核酶类似,由 25 个核苷酸的催化结构域和两侧大约 8 个核苷酸的底物识别结构域组成,特异性地切割与两臂互补的 RNA 中未配对的嘌呤和配对的嘧啶之间的磷酸二酯键,产生 2'-3'-环磷酸基末端与 5'-羟基末端。

与核酶相比, DNA 酶更容易合成,对化学物质或核酸酶有更强的抵抗力,而且由于 DNA/RNA 杂

化双链与 RNA/RNA 双链在药代动力学方面的区别,酶的评价指标如底物的选择性和特异性、催化效率、酶的转换速率等方面 DNA 酶较核酶均有所提高^[10]。

3 RNAi 和 siRNA

1998 年 Fire 等^[11]发现将 dsRNA 注入线虫后可以有效地引起序列特异性的基因抑制,并将这种转录后水平的基因沉默机制称为 RNAi (RNA interference)。RNAi 在自然界中广泛存在,目前已经在植物、真菌、锥虫、涡虫、囊虫、果蝇、线虫、鼠早期胚胎等不同种属的生物体中得到证实。虽然在很多模式生物中可以应用 dsRNA 进行基因功能的研究,但在哺乳动物中这种应用受到了限制,因为较长的 dsRNA 在哺乳动物细胞中可以引发干扰素途径^[12]:激活 RNA 依赖的蛋白激酶(PKR)和 2', 5'-寡腺苷酸聚合酶。活化的 PKR 可使 eIF2α 发生磷酸化导致非特异性翻译停滞;2', 5'-寡腺苷酸聚合酶是非特异性核糖核酸酶——RNase L 的辅因子, RNase L 可降解 RNA。因此, dsRNA 在哺乳动物中可以引起非特异性的蛋白翻译抑制和 RNA 降解。2001 年 Elbashir 等^[13]发现将人工合成的 21 个核苷酸长的双链 siRNA 导入哺乳动物细胞,可以避开干扰素途径而特异性地抑制目的基因的表达。

虽然真菌、植物等可以通过 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRP)进行 siRNA 的复制^[14],在酵母、哺乳动物中尚无证据表明 siRNA 也可以复制,因此在哺乳动物中通过转染 siRNA 介导的基因沉默是短暂的。为此,研究人员设计了多种载体表达 siRNA 或者表达可以在细胞内被加工成 siRNA 的 RNA 分子^[15],例如发夹结构 RNA 等。目前报道的 siRNA 表达载体大多采用 RNA 聚合酶 III 启动子,尤其是 U_6 和 H_1 启动子。应用各种 siRNA 表达载体比直接导入 siRNA 有明显的优势。一方面,利用载体表达 siRNA 可以延长作用时间;另一方面利用载体可以将 RNAi 技术与基因的诱导表达和组织特异性表达等技术相结合,使研究者可以在特定的时空条件下抑制特定基因表达^[15],从而有利于阐明基因在发育过程中以及组织器官中的功能,同时也为 RNAi 在基因治疗等方面提供更广的应用前景。此外利用病毒载体介导的 RNAi 技术可以进行转基因试验^[16],为 RNAi 在生物体整体水平的研究提供了

条件。最近一些研究小组构建了针对不同生物不同路径的 RNAi 文库进行了大规模的基因功能筛查^[17, 18], 这将是功能基因组学研究中比较有希望的新方法之一。

4 几种反义技术的比较和选择性应用

理论上上述几种反义技术均可用于基因功能的研究, 在实际应用中如何选择适当的技术是基因功能研究者关心的问题, 因此有必要对以上几种技术加以比较。

4.1 目标 RNA 分子的选择

有证据表明 RNAi 主要在哺乳动物细胞的胞质中发挥作用^[19], 其目标 RNA 主要是成熟的 mRNA, 因此针对 RNA 内含子序列或定位于细胞核内的 RNA 序列如剪接体 RNA 设计的 siRNA 没有观察到基因沉默效应。但是, 核酶和 AS-ONs 却可以用于针对内含子序列或核定位的 RNA 分子, 抑制其表达。因此需要选择性地降解仅内含子序列不同的高度同源的基因家族中某一成员时, 或需要在 mRNA 进入胞质前就将其降解时, 核酶、AS-ONs 将比 siRNA 更有效。当然对于多数 mRNA 序列而言, 胞质内的降解就足以达到预期的抑制效果, 这时 siRNA 将是最有效的因子。因为与反义寡核苷酸相比, 达到相同的抑制水平时 siRNA 所需的浓度最低^[20]。

4.2 靶序列的选择

正如前面所提到的, 针对某一基因必须选择有效的作用位点。经验表明针对某一基因设计的反义寡核苷酸通常每 8 个中仅一个有效^[21]。前面提到的筛选 mRNA 序列上有效作用位点的方法在几种技术中均可应用, 因为这几种筛选方法的目的都是确定 mRNA 上的单链序列, 而这种单链序列正是设计反义因子时所必须考虑的。

此外, 核酶的切割位点要求为 NUH 三联体结构^[6], 这种序列要求在一定程度上限制了核酶的应用。同样对于不能激活 RNase H 的反义 DNA 或反义 RNA, 由于仅能通过空间位阻效应发挥作用, 通常必须选择 5'-UTR 或翻译起始位点附近的序列作为靶位点。而对于 siRNA 则没有这种限制, 当然现在一般认为设计 siRNA 时应尽量避免 5'-UTR, 3'-UTR, 起始密码子和外显子接触位点^[15]。

曾有研究者将 poly(A) 序列连接到核酶的 3' 末端, 利用 poly(A) 序列募集解旋酶 eIF4A1 使针对

mRNA 二级结构部位序列的核酶也可发挥作用^[22]。但是对于 siRNA, 目前普遍认为如果 mRNA 上某位点对 siRNA 不敏感, 那么将无法提高该位点的敏感性。

4.3 “脱靶”(off target) 效应

在选择某一技术抑制目标基因表达时, 必须考虑是否会发生非特异性的抑制即脱靶效应。有研究发现 AS-ONs 激活的 RNase H 可以切割非目标 RNA 序列, 因为实际上只要 AS-ONs 与目标 RNA 有 6 或 7 个连续碱基互补就可以激活 RNase H^[23]。此外针对翻译起始位点附近设计的 AS-ONs 也可能发生非特异性抑制, 因为该位点有可能含有保守序列, 例如 Kozak 序列^[21]。比较而言, 核酶的序列特异性较强, 对切割位点的多态性更加敏感, 因此曾被用于鉴别单核苷酸多态性^[24]。对于 siRNA 的序列特异性目前还没有定论, 多数研究认为 siRNA 是高度特异的^[25], 但也有文献报道应用合成的 siRNA 观察到了脱靶效应^[26]。

当然, 序列的特异性与所用反义因子的浓度也有很大关系, 因此在保证抑制效果的前提下应尽量降低使用浓度。

4.4 副作用

在选择反义技术时, 同样要考虑是否有非预期的副作用。例如, 如果 AS-ODNs 中存在 CpG 结构域可以在体内诱发强烈的固有免疫和获得性免疫^[21], 如同宿主细胞抵御病毒等感染的免疫反应。此外 AS-ONs 中的化学修饰也可能引起细胞毒性。而且 AS-ONs 与核酶均有可能引发 aptamer 活性, 即非特异性的与细胞内蛋白相结合, 引起细胞毒性^[21]。对于 RNA 干扰, 最近有文献表明 siRNA 和 shRNA 仍可激活干扰素途径^[27, 28], 引起干扰素途径的主要组分以及干扰素活化基因的表达升高。虽然研究表明这种激活并不影响 RNA 干扰作用的序列特异性, 但是在应用 RNA 干扰引起某种细胞表型变化时应当注意区分这种变化是由特异性基因抑制引起的还是由干扰素途径被激活引起的。

4.5 作用持续性

应用反义技术能否达到理想的抑制效果, 还取决于靶 mRNA 的丰度、半衰期及其表达蛋白的寿命。因此在选择适当的反义技术时还要考虑其作用时间的长短, 例如 AS-ODNs 仅能通过瞬时转染导入细胞, 其作用时间取决于 AS-ODNs 的降解速率, 通常较短; 而对于核酶与 siRNA 则可以通过载体导入细胞进行稳定表达, 因此作用时间相对较

长。如果仅需短期抑制,则几种方法均可应用;如果用于 HIV 或 HBV 等慢性感染,就需要持续应用或表达反义因子。另外如果内源性表达是最好的应用途径,那么 siRNA 或核酶将是首选,因为它们可以通过载体表达而发挥作用,并且可以利用可诱导的或组织特异性启动子控制其表达。

5 问题与展望

随着研究人员对 RNAi 作用机制的深入了解, siRNA 的应用将继续扩大,但 RNAi 不可能完全代替反义寡核苷酸、核酶、DNA 酶等技术,例如降解核定位序列时;而且反义寡核苷酸、核酶等技术在调控基因表达方面除了可以下调基因表达外还可以改变基因表达的方式,例如反义寡核苷酸可用于调控 mRNA 的选择性剪接^[29],核酶可用于纠正突变^[30]等。另外目前对于 RNAi 还有许多问题有待解决,例如 RNAi 的确切机制及参与成分, siRNA 的序列特异性, siRNA 与 microRNA 的关系, RNAi 与染色质状态的关系等等。

对于反义技术,还有许多共性的问题需要解决或改善:例如反义因子有效导入细胞或生物体的方法,如何进一步提高其稳定性,减少脱靶效应与毒性,更简单的筛选敏感位点的方法等。尽管仍然存在许多问题,但随着研究的深入,反义技术在功能基因组学,药物靶标的筛选以及基因治疗等方面必将发挥更大的作用。

参考文献

- [1] Crooke S T. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1489: 31~ 44
- [2] Ho S P, Britton D H, Stone B A, et al. Potent antisense oligonucleotides to the human multidrug resistance 1 mRNA are rationally selected by mapping RNA-accessible sites with oligonucleotide libraries. *Nucleic acids Res*, 1996, 24: 1901~ 1907
- [3] Southern E M, GaseGreen S C, Ekher S C, et al. Arrays of complimentary oligonucleotides for analyzing the hybridization behavior of nucleic acids. *Nucleic acids Res.*, 1994, 22: 1368~ 1373
- [4] Hatim T, Fang D, Hon S I, et al. Mapping of RNA accessible sites by extension of random oligonucleotide libraries with reverse transcriptase. *RNA*, 2001, 7: 314~ 327
- [5] Zhang H Y, Mao J P, Zhou D X, et al. mRNA accessible site tagging (MAST): a novel high throughput method for selecting effective antisense oligonucleotides. *Nucleic acids Res.*, 2003, 31: e72~ e80
- [6] Haseloff J, Gerlach W L. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Biotechnology*, 1992, 24: 264~ 269

- [7] Usman N, Blatt L M. Nuclease resistant synthetic ribozymes: developing a new class of therapeutics. *J Clin Invest*, 2000, 106: 1197~ 1202
- [8] Michienzi A, Rossi J J. Intracellular application of ribozymes. *Methods Enzymol.*, 2001, 341: 581~ 596
- [9] Pierce M L, Ruffner D E. Construction of a hammerhead ribozyme library: towards the identification of optimal target sites for antisense mediated gene inhibition. *Nucleic acids Res*, 1998, 26: 5093~ 5101
- [10] Santoro S W, Joyce G F. Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochemistry*, 1998, 37: 13330~ 13342
- [11] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806~ 811
- [12] Patrick J P, Amy A C, Gregory J H. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 1443~ 1448
- [13] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411: 494~ 498
- [14] Cogoni C, Macino G. Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2: 657~ 662
- [15] Dykxhoorn D M, Novina C D, Sharp P A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003, 4: 457~ 467
- [16] Hasuwa H, Kaseda K, Einarsdottir T, et al. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett*, 2002, 532: 227~ 230
- [17] Kamath R S, Fraser A G, Yan D, et al. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, 2003, 421: 231~ 237
- [18] Carpenter A E, Sabatini D M. Systematic genomewide screens of gene function. *Nature Reviews Genetics*, 2004, 5: 11 ~ 22
- [19] Zeng Y, Cullen B R. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA*, 2002, 8: 855~ 860
- [20] Grunweller A, Wyszko E, Bieber B, et al. Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 3185~ 3193
- [21] Schiavone N, Donnini M, Nicolin A, et al. Antisense oligonucleotide drug design. *Curr Pharm Des*, 2004, 10: 769~ 784
- [22] Hiroaki K, Kazunari T. Identification of genes by hybrid ribozymes that couple cleavage activity with the unwinding activity of an endogenous RNA helicase. *EMBO reports*, 2002, 3: 443~ 450
- [23] Giles R V, Tidd D M. Increased specificity for antisense oligodeoxynucleotide targeting of RNA cleavage by RNaseH using chimeric methylphosphonodiester/ phosphodiester structures. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 763~ 770
- [24] Millington Ward S, O' Neill B, Kiang A S, et al. A mutation independent therapeutic stratagem for osteogenesis imperfecta. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1999, 9: 537~ 542
- [25] Chi J T, Chang H Y, Wang N N, et al. Genome wide view of gene silencing by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 635~ 637
- [26] Jackson A L, Bartz S R, Schelter J, et al. Expression profiling reveals off target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 635~ 637

- [27] Bridge A J, Pebernard S, Ducraux A, et al. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature Genetics*, 2003, 34: 263~ 264
- [28] Sledz C A, Holko M, de Veer M J, et al. Activation of the interferon system by short interfering RNAs. *Nature cell biology*, 2003, 9: 834 ~ 839
- [29] Peter S, Ryszard K. Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing. *J Clin Invest*, 2003, 112: 481~ 486
- [30] Watanabe T, Sullenger B A. Induction of wild type p53 activity in human cancer cells by ribozymes that repair mutant p53 transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 8490~ 8494

Progress in the Studies of Antisense Technologies

WANG Bo CHEN Mei-hong

(National Laboratory of Medical Biology, Institute of Basic Medical Science,
Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100005, China)

Abstract Antisense technologies inhibit the expression of a target gene in a sequence specific manner, with DNA or RNA molecules binding complementally to the target mRNA via Watson Crick base pairing. As a result, the target mRNA is either degraded or blocked for translation by various mechanisms. Compared with other loss of function studying methods such as gene knockout, antisense technologies exhibit advantages such as low cost, short period, and easy operation etc. This review briefly summarizes the latest progress and problems in antisense technologies that are in common use, and compares the advantages and disadvantages of these technologies.

Key words Antisense technologies Antisense oligonucleotides Ribozymes DNazymes RNA interference siRNA

(上接第 42 页)

Regulatory Mechanism of Secondary Metabolism in *Streptomyces*

ZHANG Yarr Juan HONG Bin*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract *Streptomyces* is Gram positive, filamentous, soil inhabiting bacteria, which is characterized by the complex morphological differentiation and the ability to produce various valuable secondary metabolites, including compounds used as antimicrobial, antiviral, antitumor, antiparasitic and immunosuppressive drugs. There are huge and complicated regulatory networks of secondary metabolism in *Streptomyces*. These networks can be classified into three levels in genetics. The lowest level is pathway specific regulation. The regulatory genes are cluster linked and regulate transcription of antibiotic biosynthetic genes. This regulation is growth phase dependent. The middle one is pleiotropic regulation. γ -butyrolactone is a low-weight molecule, which is expected to be the “hormone” of *Streptomyces*. The signalling systems in which γ -butyrolactone is involved control more than one pathway of secondary metabolism and/or morphological differentiation. The highest one is global regulation, regulating both cell differentiation and secondary metabolites production. These genes usually lie beyond the biosynthetic gene cluster. Two-component-type signal transduction systems are global regulators in *Streptomyces*. With the new developed technologies, including microarray applying to the research of the secondary metabolism regulation, more regulatory networks will be elucidated. These knowledge will provide the basis for elevating the yields of secondary metabolites by the method of metabolic engineering, optimizing their structure and investigating more novel and useful agents.

Key words *Streptomyces* Secondary metabolism Regulatory mechanism