

RNA 干扰在眼底疾病中的新进展

孟 博,雷宁玉

基金项目:中国山东省教育厅立项课题资助项目(No. J05L12)
作者单位:(256603)中国山东省滨州市,滨州医学院附属医院
眼科
作者简介:孟博,男,在读硕士研究生,研究方向:眼底病。
通讯作者:雷宁玉,女,主任医师,主任,硕士. mengbo166@ yahoo.
com. cn
收稿日期:2009-11-02 修回日期:2010-03-25

Study on RNA interference technology in fundus diseases

Bo Meng, Ning-Yu Lei

Foundation item: Program of Department of Education in Shandong Province, China(No. J05L12)
Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, Shandong Province, China
Correspondence to: Ning-Yu Lei. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, Shandong Province, China. mengbo166@ yahoo. com. cn
Received: 2009-11-02 Accepted: 2010-03-25

Abstract

• The discovery of RNA interference (RNAi) has changed people's traditional concepts of the gene. This technique possesses advantages and potentials that traditional therapies can not compare especially in terms of its specificity and efficiency, and it is drawing more and more attentions from ophthalmologists all over the world these year. Although there are still a lot of problems in clinical use at present, various kinds of related experimental results make us firmly believe that RNAi will surely bring a new epoch for curing diseases in ophthalmology. This article provides an overview on some of the latest advances in fundus.

• **KEYWORDS:** RNA interference; fundus diseases; gene silencing

Meng B, Lei NY. Study on RNA interference technology in fundus diseases. *Int J Ophthalmol(Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(4):700-702

摘要

RNA 干扰(RNAi)发现,改变了人们对细胞基因调控的传统理解。这种技术具有传统治疗方法无可比拟的优势和潜力,因此近些年来越来越受全世界眼科医师的重视。目前,虽然在临床应用中还存在不少问题,但是 RNAi 必将为眼科疾病的治疗带来新的前景。我们就 RNAi 在眼底方面的研究进行综述。

关键词: RNA 干扰;眼底病;基因沉默

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.04.029

孟博,雷宁玉. RNA 干扰在眼底疾病中的新进展. 国际眼科杂志 2010;10(4):700-702

0 引言

RNA 干扰(RNA Interference, RNAi)是指 mRNA 降解所引起的转录后水平的基因沉默(Post-transcriptional Gene Silencing, PTGS)^[1]。这种技术的应用为体内和体外基因表达的抑制提供了新的方法^[1]。尽管 siRNAs 和反义寡核苷酸都是通过 Watson-Crick 碱基互补配对原理和目标 mRNA 结合^[2,3],但是相比之下,siRNAs 具有更强的优势和潜力^[4],可能为眼底方面疾病的治疗带来新的前景。我们就 RNAi 在眼底方面的研究进行综述。

1 RNA 干扰技术

1.1 RNAi 的发现 1995 年,康乃尔大学的 Su Guo 博士在试图阻断秀丽小杆线虫(*C. elegans*)的 *par-1* 基因时,发现了一个意想不到的现象。她们本想利用反义 RNA 技术特异性地阻断上述基因的表达,而同时在对照实验中给线虫注射正义 RNA 以期观察到基因表达的增强,但得到的结果是二者都同样地切断了 *par-1* 基因的表达途径^[5]。这是与传统上对反义 RNA 技术的解释正好相反。1998 年,Fire 和 Mello 通过实验发现,正义 RNA 抑制基因表达的现象及过去的反义 RNA 技术对基因表达的阻断,都是由于体外转录所得 RNA 中污染了微量双链 RNA(dsRNA)^[1,6]而引起。他们将单链 RNA 纯化后注射线虫时,基因抑制效应变得十分微弱,而经过纯化的双链 RNA 却正好相反^[6,9]。他们将这种现象称作 RNAi^[1]。1999 年,人们发现 RNA 干扰现象广泛存在于几乎所有的真核生物中细胞。2000 年,Hammond 和 Zamore 提出了 RNAi 作用机制模型^[3,10]。2001 年,人们利用 RNAi 技术成功诱导出培养的哺乳动物细胞基因沉默现象^[11]。2006 年,美国科学家 Fire 和 Mello^[12-14]发现了 RNAi^[1],获得了诺贝尔生理学或医学奖。

1.2 RNAi 的作用机制 RNAi 的作用机制尚不十分清楚,目前普遍认为 RNAi 很可能都是通过 dsRNA 的介导而特异地降解靶 mRNA,抑制相应基因的表达,属于 PTGS^[6]。现已初步阐明 dsRNA 介导的同源性靶 mRNA 降解过程主要分为两步:(1)一种称为 Dicer 的 RNase III 样核酸酶在 ATP 参与下把 dsRNA^[1,6]切割加工成长 21~23nt 的由正义和反义链组成的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNAs)^[15-17]。(2)siRNAs 在 ATP 参与下被 RNA 解旋酶解旋成单链,并由其中反义链指导形成 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)^[18,19]。RISC 在单链 siRNAs 引导下识别互补的 mRNA^[20],并在 RISC 中的核酸内切酶作用下从 siRNAs 引导链中心所对应的靶基因位置切割靶 mRNA^[18,21,22]。

1.3 RNAi 的重要特征

1.3.1 转录后水平的基因沉默 DNA 能够在细胞核中被稳定转录,但由 dsRNA 介导形成的 RISC^[18]特异地降解靶 mRNA,使细胞质里无相应的 mRNA 存在,抑制了相应基因的表达,导致了转录后水平的基因沉默。

1.3.2 高特异性 dsRNA 特异地抑制干扰 RNA 同源序列的靶基因表达,而对不相关序列的表达无干扰作用,这是由 siRNAs 的反义链^[19,23,24]与 mRNA 同源区互补配对所决定的。siRNAs 除正义链 3' 端的两个碱基在序列识别中不起主要作用外,其他单个碱基改变就可能使 RNAi 失效,而针对同源基因共有序列的 RNAi 则导致同源基因共同失活^[3,18,21,22]。

1.3.3 高效性 RNAi 抑制基因表达具有很高的效率,这是通过催化放大的方式进行的。siRNAs 不仅可引导 RISC 切割靶 RNA,而且可作为引物在 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRP)作用下以靶 mRNA 为模板合成新的 dsRNA。新合成的长链 dsRNA 同样可被 RNase III 样核酸酶切割、降解而生成大量的次级 siRNAs。次级 siRNAs 又可进入合成-切割的循环过程,进一步放大 RNAi 作用。另外,当 mRNA 降解时,siRNAs 可连续地发挥降解作用。

1.3.4 遗传性 Fire 等^[1]将 dsRNA 注射入秀丽新线虫的性腺后,在其第 1 子代中也诱导出了同样的基因抑制现象,这说明在原核生物中 RNAi 具有可遗传性。随后 Clemens 等在果蝇培养细胞中也发现了类似的现象。

2 RNAi 在眼底病中的研究进展

由于 RNAi 在疾病治疗方面具有潜在的优势^[4,25],近年来备受眼科医师的重视。目前,国内外在眼底疾病方面已经开展了大量的相关研究。

2.1 眼底新生血管性疾病 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是功能最强的血管形成促进因子,在脉络膜新生血管性疾病和缺血性视网膜病变的发生及发展中发挥着重要作用。Forooghian 等^[26]通过 RNAi 在 RPE 中分别促成了 VEGF 和低氧诱导因子(HIF-1)的基因沉默,低氧环境下培养 RPE,然后用酶联免疫吸附实验检测培养基中有 VEGF 和 HIF-1 存在,最后将此培养基提取出来用于培养人脐静脉血内皮细胞。通过定量检测毛细血管的形成,得出了针对 VEGF 的 RNAi 使 VEGF 和一些其它的临床上重要的血管形成因子,如血管形成因子、IL-6、IL-8、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、TGF-1 等的减少;而针对 HIF-1 的 RNAi 虽然使 VEGF、血管形成因子、TGF-1 的表达量减少,但是其它一些血管生成因子如 IL-6、IL-8、MCP-1 的量则升高。从而验证了 VEGF 在新生血管形成中的主要作用,并预示了 RNAi 在眼部新生血管性疾病治疗的新前景。

2.2 视网膜遗传性疾病 视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)属于视锥、视杆营养不良,是一组以进行性感光细胞及色素上皮功能丧失为共同表现的遗传性视网膜变性疾病^[9]。遗传异质性是主要以遗传为主的疾病治疗中的一大难题,RP 具有典型的遗传异质性。目前已分离出多种致病基因,视紫红质基因是其中的一种,在这一型 RP 患者中,就有不少于 100 个该基因的突变^[27],在基因水平分别补充缺失的基因或清除异常基因有望在病因上治愈 RP。Lewin 通过实验,发现锚定视紫红质 P23H 突变的核糖体酶可以使转基因鼠延缓感光受体的退变^[7]。由于突变型等位基因和野生型等位基因在 RNAi 中都可以被抑制,O'Reilly 等^[9]通过将 siRNAs 或短发夹 RNA(short hairpin RNAs, shRNAs),与不受它们抑制的被密码子修饰的野生型替代基因,一并转染到腺病毒相关病毒(AAV)^[28]中,发现了令人振奋的结果。因此, RNAi 和基因替代技术的联合应用,在未来有望克服突变异质性带来的治疗障碍,从而治愈眼部遗传性疾病。

2.3 视神经疾病 目前视神经疾病主要以改善微循环、积极抗炎等对症治疗为主。但是,单纯抗炎及使用非特异性免疫抑制剂常会导致严重毒副作用。并且由于血房水屏障和血视网膜屏障的存在,传统的药物很难在病灶部位达到治疗浓度,而用转基因法导入 dsRNA 产生的 RNAi,特别是基于它的特异性和潜力,有望取代反义 RNA 治疗技术^[4]作为一种新型的治疗策略,为眼科视神经疾病如视神经炎、Leber 氏遗传性视神经病(LHON)^[29]、多发性硬化的治疗带来新的前景。

2.4 近视的治疗 近视是一种发病率非常高的疾病,轻度近视对人们的生产和生活不会造成太大的影响。但是近视度数较高者可发生程度不等的眼底改变,如豹纹状眼底、新生血管膜的形成、黄斑部出血、视网膜脱离等,情况严重者可导致不可逆性眼底损伤甚至致盲。虽然我们可以通过激光光凝、后巩膜加固术等方法进行治疗,但其中大部分方法因有扩大损伤范围可能或操作复杂而受到一定限制。国内外研究发现,这种近视主要以遗传为主,已发现改变的基因有:Lumican 和 Fibromodulin^[30]、转化生长因子-β 诱导因子、成骨蛋白-2 等十多种^[31,32],表明病理性近视具有遗传异质性,与单纯性近视不同。我们可以用 RNAi 制作多种表型,而且抑制基因表达的时间可以控制在发育的任何阶段,产生类似基因敲除的效应,具有投入少,周期短,操作简单等优势。

2.5 眼底肿瘤的治疗 肿瘤治疗是疾病治疗的重点和难点,迄今为止尚没有特异有效的治疗药物。我们可以使用 DNA 芯片发现肿瘤组织中表达失调的基因,再利用 siRNAs 敲除点突变激活的癌基因,特异性地抑制癌基因、癌相关基因或突变基因的过度表达,使这类基因保持在静默或休眠状态,然后观察对细胞生长等方面的影响。目前已有实验证明分别针对 EZH2^[33]、survivin^[34]和 Ku80^[35]的 RNAi 在前列腺癌、结肠癌和宫颈癌的生长中有显著抑制作用,眼科领域中相关实验也已展开, Jia 等^[36]通过 siRNAs 特异性地抑制了视网膜母细胞瘤的异体动物模型的血管内皮生长因子的表达,从而有效地抑制了肿瘤的生长。

3 RNAi 在眼科应用中存在的问题

目前 siRNAs 转染哺乳动物细胞内效率低下,如何将 siRNAs 有效转染入体内成为 RNAi 在临床上应用的最大障碍^[37]。转染的方法有多种,如电穿孔、脂质体载体介导、显微注射技术、DNA 载体转染等,但效果都不甚理想。目前国内外研究倾向于载体的构建上,如 Zhao 等^[38]以 pGenSil-1 质粒为载体,利用 RNAi 技术构建出了抑制 LEDGFp52 表达的小干扰 RNA 重组体。但是重组质粒载体、逆转录病毒载体等各种载体可能引起机体毒性免疫反应,具有潜在危险性。另外, siRNAs 诱导基因沉默有一定剂量效应,注射中加入大体积的溶液会增加对实验动物的刺激,导致实验数据不准,而且导入的 siRNAs 与宿主基因组整合可能导致生物群体其它遗传特征改变。最后,由于眼部解剖屏障结构,在身体其它部位有效的 RNAi 可能不适用于眼部。虽然科学家已通过实验分别在短尾猴和小鼠中玻璃体和视网膜下成功注射了 siRNAs,为 siRNAs 的局部用药提供了可能,但是要想真正应用于临床还需要大量的研究。

4 总结

RNAi 的发现改变了人们对细胞基因调控的传统理解,具有传统治疗方法无可比拟的优势和潜力,为眼部疾

病基因治疗开创了新的道路。但是这种技术在实际应用中还存在不少问题,比如如何在目的 mRNA 上选择 21-23nt 左右的序列作为 siRNAs 作用靶点、如何进行有效的化学修饰以提高其稳定性和特异性、如何构建高效且毒性免疫反应小的载体等,且 siRNAs 触发哺乳动物细胞 RNAi 的研究,较之在低等生物中更为复杂和困难,因此还需要更多的探索。但是目前关于 siRNAs 的研究结果使我们深信,siRNAs 非常有希望被用于临床,有着广阔的应用前景。

参考文献

- 1 Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391(6669):806-811
- 2 Sun Y, Duan M, Lin R, *et al.* A novel integrated strategy (full length gene targeting) for mRNA accessible site tagging combined with microarray hybridization/RNase H cleavage to screen effective antisense oligonucleotides. *Mol Vis* 2006;12:1364-1371
- 3 Hammond SM, Bernstein E, Beach D, *et al.* An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000;404(6775):293-296
- 4 Ferrari N, Bergeron D, Tedeschi AL, *et al.* Characterization of antisense oligonucleotides comprising 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (FANA): specificity, potency, and duration of activity. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1082:91-102
- 5 Guo S, Kempthues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995;81(4):611-620
- 6 Akhtar S, Benter IF. Nonviral delivery of synthetic siRNAs *in vivo*. *J Clin Invest* 2007;117(12):3623-3632
- 7 Martin SE, Caplen NJ. Applications of RNA interference in mammalian systems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007;8:81-108
- 8 Xu Y, Linde A, Larsson O, *et al.* Functional comparison of single- and double-stranded siRNAs in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316(3):680-687
- 9 O'Reilly M, Palfi A, Chadderton N, *et al.* RNA interference-mediated suppression and replacement of human rhodopsin *in vivo*. *Am J Hum Genet* 2007;81(1):127-135
- 10 Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, *et al.* RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000;101(1):25-33
- 11 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411(6836):494-498
- 12 Fire AZ. Gene silencing by double-stranded RNA (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 2007;46(37):6966-6984
- 13 Couzin J. Nobel Prize in Physiology or Medicine. Method to silence genes earns loud praise. *Science* 2006;314(5796):34
- 14 Bots M, Maughan S, Nieuwland J. RNAi Nobel ignores vital groundwork on plants. *Nature* 2006;443(7114):906
- 15 Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, *et al.* A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001;293(5531):834-838
- 16 Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, *et al.* Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 2001;15(20):2654-2659
- 17 Nicholson RH, Nicholson AW. Molecular characterization of a mouse cDNA encoding Dicer, a ribonuclease III ortholog involved in RNA interference. *Mamm Genome* 2002;13(2):67-73
- 18 Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, *et al.* Purified Argonaute2 and an siRNAs form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12(4):340-349
- 19 Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, *et al.* Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 2002;110(5):563-574
- 20 Parker JS, Barford D. Argonaute: A scaffold for the function of short regulatory RNAs. *Trends Biochem Sci* 2006;31(11):622-630
- 21 Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2001;2(2):110-119
- 22 Parker JS, Roe SM, Barford D. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNAs recognition and slicer activity. *EMBO J* 2004;23(24):4727-4737
- 23 Braasch DA, Corey DR. Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. *Biochemistry* 2002;41(14):4503-4510
- 24 Gleave ME, Monia BP. Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;5(6):468-479
- 25 Friedberg JW. Unique toxicities and resistance mechanisms associated with monoclonal antibody therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005;329-334
- 26 Forooghian F, Das B. Anti-angiogenic effects of ribonucleic acid interference targeting vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1alpha. *Am J Ophthalmol* 2007;144(5):761-768
- 27 Andrés A, Garriga P, Manyosa J. Altered functionality in rhodopsin point mutants associated with retinitis pigmentosa. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303(1):294-301
- 28 Rolling F. Recombinant AAV-mediated gene transfer to the retina: gene therapy perspectives. *Gene Ther* 2004;11 Suppl 1:S26-32
- 29 Guy J, Qi X, Pallotti F, *et al.* Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Ann Neurol* 2002;52(5):534-542
- 30 Chakravarti S, Paul J, Roberts L, *et al.* Ocular and scleral alterations in gene-targeted lumican-fibromodulin double-null mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(6):2422-2432
- 31 Akamatsu S, Fujii S, Escalona MF, *et al.* Altered expression of genes in experimentally induced myopic chick eyes. *Jpn J Ophthalmol* 2001;45(2):137-143
- 32 Scavallo GS, Paluru PC, Ganter WR, *et al.* Sequence variants in the transforming growth beta-induced factor (TGIF) gene are not associated with high myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(7):2091-2097
- 33 Chen H, Tu SW, Hsieh JT. Down-regulation of human DAB2IP gene expression mediated by polycomb Ezh2 complex and histone deacetylase in prostate cancer. *J Biol Chem* 2005;280(23):22437-22444
- 34 Fan Y, Zhang YL, Wu Y, *et al.* Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 expression by RNA interference suppresses invasion through inducing anoikis in human colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2008;14(3):428-434
- 35 Zhuang L, Yu SY, Huang XY, *et al.* Effect of Ku80 expression inhibition by RNA interference on proliferation of cervical carcinoma cell line HeLa. *Ai Zheng* 2007;26(3):252-257
- 36 Jia RB, Zhang P, Zhou YX, *et al.* VEGF-targeted RNA interference suppresses angiogenesis and tumor growth of retinoblastoma. *Ophthalmic Res* 2007;39(2):108-115
- 37 Kawakami S, Hashida M. Targeted delivery systems of small interfering RNA by systemic administration. *Drug Metab Pharmacokin* 2007;22(3):142-151
- 38 Zhao HS, Wang Y. Construction of recombinant adenoviral vector carrying the LEDGF p52 gene by homologous recombination in bacteria and its expression *in vitro*. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2006;6(5):979-983