

## RNA 干扰的途径和机制

李绍祥, 郭汉斌, 曹建彪  
(北京军区总医院全军肝病治疗中心, 北京 100700)

[摘要] 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。现就 RNAi 的两种途径: 小干扰 RNA 和微小 RNA 的特点和机制作一综述。

[关键词] RNA 干扰; 小干扰 RNA; 微小 RNA

[中图分类号] R392.13 [文献标识码] A [文章编号] 1003-4706 (2012) 11-0148-04

## Pathway and Mechanism of RNA Interference

LI Shao-xiang, GUO Han-bin, CAO Jian-biao  
(Institute of Hepatology of PLA, Beijing Military General Hospital, Beijing 100700, China)

[Abstract] RNA interference (RNAi) is sequence-specific gene silencing phenomena mediated by double-stranded RNA, and it can block gene expression at the level of transcription, post-transcription and translation, with high efficiency and high specificity. The characteristics and mechanisms of the two pathways of RNAi, including short interfering RNA and microRNA, are reviewed in this paper.

[Key words] RNA interference; Short interfering RNA; MicroRNA

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是存在于生物中的一种古老现象, 是生物抵抗异常 DNA (病毒、转座因子和某些高重复的基因组序列) 的保护机制, 同时在生物发育过程中扮演着基因表达调控的角色<sup>[1]</sup>, 它可以通过降解 RNA、抑制翻译或修饰染色体等方式发挥作用。

### 1 RNAi 的途径

RNAi 存在两种既有联系又有区别的途径: 小干扰 RNA (Short interfering RNA, siRNA) 途径和微小 RNA (microRNA, miRNA) 途径。

#### 1.1 siRNA 途径

siRNA 途径是由双链 RNA (double-strand RNA, dsRNA) 引发的, dsRNA 被一种 RNase III 家族的内切核酸酶 Dicer 切割成 21~26 bp 长的

siRNA, 通过 siRNA 指导形成 (RNA-induced silencing complex, RISC) 复合体, 降解与 siRNA 序列互补的靶 mRNA 而引发 RNA 沉默。

### 2 miRNA 途径

miRNA 途径中的 miRNA 是真核生物中发现的一类含量丰富的非编码小 RNA (21~24 nt), 它们主要参与基因转录后水平的调控。动物 (尤其是人) miRNA 的生物合成过程已经初步阐明: 首先, miRNA 基因的初级转录产物 (pri-miRNA)<sup>[2]</sup> 在细胞核中被 RNase III Drosha 切割成为前体 miRNA (pre-miRNA), 在最初的剪切后, pre-miRNA 在转运蛋白 exportin-5 的作用下由核内转到胞质中<sup>[3]</sup>, 然后由另一种 RNase III Dicer 进一步切割产生成熟的 miRNA。这些成熟的 miRNA 与其他蛋白质一起

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30872353)

[作者简介] 李绍祥 (1968~), 男, 河北邯郸市人, 医学博士后, 主治医师, 从事肝癌和肝病的临床与基础研究工作。

[通讯作者] 曹建彪. E-mail:shxili@163.com

组成 RISC 复合体, 从而引起靶 mRNA 的降解或者翻译抑制<sup>[4]</sup>.

### 3 siRNA 和 miRNA 的联系与区别

siRNA 和 miRNA 长短相似, 都参与构成结构相似的 RISC, 在作用方式上二者有很大的相似性, 区别在于: (1) 引发沉默的来源不同, siRNA 途径的 dsRNA 是外源性的, 而 miRNA 是由细胞核内编码 miRNA 的基因转录而来<sup>[2]</sup>. (2) siRNA 与靶 mRNA 的编码区以完全互补方式结合并降解靶 mRNA, 而 miRNA 则多以不完全互补方式与靶 mRNA 3' 非编码区 (NCR) 结合来抑制 mRNA 的翻译 (最近发现有的也可以结合在靶 mRNA 5'NCR)<sup>[5]</sup>, 而不影响 mRNA 的稳定性. 如果 miRNA 与靶 mRNA 序列完全互补时也可以降解靶 mRNA. (3) siRNA 对基因表达的调节是单向的, 只能降低基因表达, 而 miRNA 除此之外还可以用来上调基因表达<sup>[6-8]</sup>, 这是 miRNA 不同于 siRNA 的另一个特点. (4) miRNA 在不同的物种间具有高度的保守性, 而 siRNA 则不一定有此特点. (5) RNAi 虽有强大的基因沉默效应, 但多数情况下要求 siRNA 与靶序列完全互补, 而病毒可以通过改变 siRNA 的靶基因序列而逃避 RNAi 效应; 与 siRNA 不同, miRNA 与靶 mRNA 序列不完全互补时, 也可通过抑制蛋白翻译起到基因沉默的作用, 所以当病毒出现变异时也可以干扰病毒的复制, miRNA 的基因沉默作用可能比 siRNA 更有效.

miRNAs 在动物、植物和真菌的转录后基因调节中起重要的作用, 宿主细胞可以产生 miRNA 抑制病毒, 反过来, 很多病毒也被发现含有 miRNA 基因, 可以编码 miRNA, 如 Kaposi's 肉瘤相关疱疹病毒、SV40、EBV、HCMV、HIV-1 和人类乳头瘤病毒 (HPV) 16 等病毒<sup>[9-13]</sup>, 可产生 miRNAs 抑制宿主细胞基因的表达, 或抑制病毒自身基因的表达, 以达到免疫逃逸.

#### 3.1 RNAi 的特征

**3.1.1 RNAi 是转录后水平的基因沉默** 只干扰转录后的靶基因的 mRNA, 翻译抑制剂对 RNAi 不产生影响.

**3.1.2 RNAi 具有很高的特异性** siRNA 与靶 mRNA 的结合严格遵循碱基互补原则. 19 个 nt 的 siRNA 几乎可以完全抑制靶基因的表达, 而将靶基因的一个核苷酸突变后, siRNA 对基因的抑制作用就消失了, 这对 siRNA 的应用是非常重要的, 它

可以避免 siRNA 对靶 mRNA 同家族的其他 mRNA 的降解.

**3.1.3 RNAi 抑制基因表达具有高效性** 相对很少量的 dsRNA 分子就能抑制相应基因的表达. 从遗传分析看, 通过特异性扩增 dsRNA 可以提高 RNAi 介导基因沉默的效率.

最近在线虫的研究中发现, siRNA 可能是合成 dsRNA 的特殊引物, 在 RNA 依赖 RNA 聚合酶 (RdRP) 作用下, 以靶 mRNA 为模板合成 dsRNA. 新生成的 dsRNA 在 Dicer 酶的作用下, 裂解产生新的 siRNA, 新生成的 siRNA 又可进入上述循环. 大量集中的 siRNA 可以形成 RISC 复合物, 这样可以提高 mRNA 降解的效率. 在这种 RNAi 过程中, 对靶 mRNA 的特异性扩增有助于增强 RNAi 的特异性基因监视功能, 每个细胞只需少量的 dsRNA 就能完全关闭相应基因的表达.

**3.1.4 RNAi 具有一定的传递效应** 在植物中, RNAi 抑制基因表达的效应可以穿过细胞界限, 在不同细胞间传递并维持. 在线虫中干扰效应甚至可以传递到后代中去. 这说明 RNAi 过程中可能存在维持 mRNA 降解序列特异性的信号小分子, 作为可传递的 RNAi 信号.

人们一直认为 miRNA 分子不会在细胞间移动, 只会在一个细胞中“定居”, 最近的研究表明并非如此, miRNA 可以通过血液循环进入其它细胞中发挥作用. 所有类型的细胞都具有分泌和接受 miRNA 的能力, 并且在特定的生理与病理生理条件下, 细胞可一次性分泌多种 miRNA. 另外在靶细胞中 miRNA 更能调节多个基因的翻译. 所以, 它的信号传递方式可以是双向或多向的<sup>[14, 15]</sup>.

**3.1.5 双干扰系统** 哺乳动物细胞中存在两条相互独立的干扰途径. 非特异性干扰反应, 由大于 30 bp 的长序列 dsRNA 介导, 可导致整个细胞非特异性蛋白合成抑制及 RNA 降解; 特异性干扰反应, 由 21 ~ 25 nt 的 siRNA 介导, 可逃避非特异性干扰系统的“监控”, 只降解与之序列相应的单个基因的 mRNA.

#### 3.2 RNAi 的作用机制

RNAi 的作用机制据目前研究成果来看主要有 3 种形式, 即转录水平、转录后水平和翻译水平, 其中转录后水平研究的最早也较深入.

**3.2.1 转录水平基因沉默 (transcriptional gene silencing, TGS)** 转录水平使基因沉默首先在植物细胞核及真菌中发现, TGS 通过 siRNAs 及 RNAi 介导的靶基因染色质结构的变化, 使其基因转录受限, 导致表达系统的关闭. dsRNA 被降解成 21 ~

23 nt 的小片段 RNA 时, 这些小的 RNA 分子在细胞核可以诱导组蛋白 H3 的基因及相应 DNA 的甲基化<sup>[16]</sup>。这种序列特异性甲基化的信号与 RNA 和 DNA 结合有关。当 dsRNA 含有与启动子同源的序列, 即可使同源靶启动子序列甲基化, 从而使靶启动子失去功能, 导致下游基因沉默, 则转录不能进行。若甲基化出现在编码区, 转录能进行, 但在转录后水平上沉默。在哺乳动物细胞中, 针对外源性的 siRNA 分子会发生 TGS, 但确切机制不清楚。

**3.2.2 RNAi 参与 DNA 甲基化** 目前研究认为 RNAi 也是一种转录水平的基因沉默机制, 参与异染色质的形成, 抑制基因表达, RNAi 介导的异染色质形成称为核 RNAi, 它是细胞周期中基因组表观遗传学调节的重要机制。核 RNAi 能参与基因组 DNA 甲基化使基因组序列发生表观遗传学修饰。研究表明哺乳动物细胞周期中 21 nt 的 siRNA 参与 RNA 引导的 DNA 甲基化, 哺乳动物细胞中重新甲基化酶 DNMT3b 功能和植物细胞中的重新甲基化酶 DRM2 相似, 它是 siRNA 引导的 DNA 重新甲基化所必需的<sup>[17]</sup>。在表观遗传学研究中, siRNAs 引导 DNA 甲基化, 以及异染色质组蛋白修饰, 导致序列特异性转录基因沉默。这一路径称为 RNA 介导的 DNA 甲基化路径 (RNA-directed DNA methylation, 简称 RdDM)<sup>[18]</sup>。

**3.2.3 DNA 甲基化抑制转录** DNA 甲基化状态使双链 DNA 形成双螺旋结构紧密缠绕在组蛋白上, 此时 DNA 序列不发生转录, 即 DNA 甲基化状态抑制转录, 维持染色体的稳定。DNA 去甲基化或低甲基化状态启动转录, 破坏染色体的稳定性<sup>[19]</sup>。

**3.2.4 DNA 甲基化与肿瘤** 肿瘤细胞基因组 DNA 处于低甲基化状态, 在正常细胞向肿瘤细胞转化的细胞周期中, 基因组 DNA 低甲基化状态作为良性细胞向恶性细胞转化的一个原因。而抑癌基因的启动子区被高甲基化, 从而促进肿瘤产生<sup>[20]</sup>。

**3.2.5 DNA 甲基化可稳定遗传** DNA 甲基化在不改变基因组 DNA 序列的情况下, 使 DNA 不能转录, 功能受到抑制, DNA 甲基化的印记可以稳定遗传给子代细胞, 即所谓的表观遗传学<sup>[21,22]</sup>。

**3.2.6 转录后基因沉默 (post transcriptional gene silencing, PTGS)** 目前在有关 RNAi 发生机制的研究中, 转录后水平上的干扰是研究的最多、最清楚的一种机制。为便于理解, 人为将这一发生过程分为: 起始阶段、扩增放大阶段、效应阶段等几个步骤。(1) 起始阶段。较长的 dsRNA 被 RNA 酶 III 核酸酶 (Dicer) 降解为多段大小为 21~23 个 bp 的 siRNA, 其 3' 端有 2 个碱基的突

出, 5' 端是磷酸化的。siRNA 与靶 mRNA 有高度的序列同源性, 是基因沉默现象开始的重要特征。

(2) 效应阶段。siRNA 在细胞内 RNA 解旋酶的作用下解链成正义链和反义链, 然后反义 siRNA 再与体内一些酶 (包括核酸内切酶、核酸外切酶、解旋酶和同源 RNA 搜索蛋白) 结合形成 RISC。双链 siRNA 为 RISC 的重要组分, 它依赖 ATP 解旋导致 RISC 活化, 然后通过碱基配对原则识别靶 mRNA, 与之结合并自 siRNA 的 3' 端将 mRNA 切割成小于 12nt 的片段, 被切割后的断裂 mRNA 随即降解, 已转录的基因表达终止。(3) 扩增放大阶段。siRNA 不仅能引导 RISC 切割同源单链 mRNA, 而且可作为引物与靶 RNA 结合并在 RNA 聚合酶 (RdRP) 作用下合成更多新的 dsRNA, 新合成的 dsRNA 再经 Dicer 酶切割, 形成新的 siRNA, 并再次作用于靶 mRNA, 如此反复、倍增, 从而使 RNAi 的作用进一步放大<sup>[23]</sup>。

**3.2.7 翻译水平上的干扰机制即 miRNA 途径** 翻译水平上的干扰机制, 是通过抑制 mRNA 的翻译, 使相应的蛋白质表达受阻。其中起重要作用的是 miRNA, 它是由长度约 70 nt 的 RNA 形成的茎环样前体, 经 Dicer 酶作用后形成长约 21~25 nt 的单链 RNA, 与相关蛋白结合成 miRISC 复合体。然后识别并结合在 mRNA 的 3' 末端非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 上, 阻止核糖体与 mRNA 的结合及核糖体的移行, 从而抑制翻译的进行。

内源性的 miRNA 途径作为细胞的变阻器在发育及分化过程中, 通过两种机制中的任意一种精确地调节基因的表达。一种是 miRNA 作用于 mRNA 的 3'UTR, 并与之部分互补, 阻止 mRNA 的翻译。另一种是和 siRNA 一样, 与靶 mRNA 结合, 促进其降解。如果 siRNA 分子结合到靶 mRNA 的 3'UTR, 则发挥 miRNA 的作用。这些约 22nt 的小 RNAs 通过翻译水平的抑制诱导 PTGS 的发生, 之后常伴随着 mRNA 的降解, 在细胞浆中的 processing bodies (P-bodies) 中进行。

#### [参考文献]

- [1] KANELLOPOULOU C, MULJO S A, KUNG A L, et al. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(4): 489 - 501.
- [2] LEE Y, KIM M, HAN J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II [J]. *EMBO J*, 2004, 23 :

- 4 051 – 4 060
- [3] LUND E, GITTINGER S, CALADO A, et al. Nuclear export of microRNA precursors [J]. *Science*, 2004, 303 (5 654):95 – 98.
- [4] BARTEL D P. MicroRNAs genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 119(2):281 – 297.
- [5] JOPLING C L, YI M, LANCASTER A M, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA [J]. *Science*, 2005, 309 (5 740):1 577 – 1 581.
- [6] HAMPTON T. MicroRNAs linked to pancreatic cancer [J]. *JAMA*, 2007, 297 (9):9 371.
- [7] 潘秋卫, 蔡荣, 刘新桓, 等. MicroRNAs与肿瘤发生、诊断和治疗 [J]. *自然杂志*, 2006, 28 (2):842 – 871.
- [8] ZHANG L, COUKOS G. MicroRNAs: a new insight into cancer genome [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(19):22 162 – 22 191.
- [9] SAMOLS M A, HU J, SKALSKY R L, et al. Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus [J]. *J Virol*, 2005, 79(14):9 301 – 9 305.
- [10] SULLIVAN C S, GRUNDHOFF A T, TEVETHIA S, et al. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells [J]. *Nature*, 2005, 435(7 042):682 – 686.
- [11] PFEFFER S, ZAVOLAN M, GRASSER F A, et al. Identification of virus-encoded microRNAs [J]. *Science*, 2004, 304(5 671):734 – 736.
- [12] PFEFFERS, SEWER A, LAGOS, QUINTANA M, et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family [J]. *Nat Methods*, 2005, 2(4):269 – 276.
- [13] BENNASSER Y, LE S Y, YEUNG M L, et al. HIV-1 encoded candidate micro-RNAs and their cellular targets [J]. *Retrovirology*, 2004, 1(1):43.
- [14] ZHANG, YJLIU, DQCHEN, et al. Secreted monocytic mi-r150 enhances targeted endothelial cell migration [J]. *Molecular cell*, 2010, 39 (1):133.
- [15] ANNELIE CARLSBECKER, JI-YOUNG LEE, CHRISTINA J, et al. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate [J]. *Nature*, 2010, 465 (7 296):316 – 321.
- [16] GREWALS I, RICE J C. Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(3):230 – 238.
- [17] KANELLOPOULOU C, MULJO S A, KUNG A L, et al. Dicer deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(4):489 – 501.
- [18] XIN-JIAN H E, YI-FENG H S U, SHIHUA Z H U, et al. An effector of RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis is an argonaute 4- and RNA-binding protein [J]. *Cell*, 2009, 137(3):498 – 508.
- [19] STRAUSSMAN R, NEJMAN D, ROBERTS D, et al. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16:564 – 571.
- [20] TAMMINGA J, KATHIRIA P, KOTURBASH I, et al. DNA damage induced upregulation of miR 709 in the germline downregulates BORIS to counteract aberrant DNA hypomethylation [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7 (23):3 731 – 3 736.
- [21] PROBST A V, DUNLEAVY E, AMOUZNI G. Epigenetic inheritance during the cell cycle [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(3):192 – 206.
- [22] SLOTKIN R K, VANGHN M, BORGES F, et al. Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen [J]. *Cell*, 2009, 136(3):461 – 472.
- [23] MERRITT W M, BAR ELI M, SOOD A K. The dicey role of Dicer: implications for RNAi therapy [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7):2 571 – 2 574.

(2012 – 08 – 24 收稿)