

RNA 干扰及其在动物繁殖研究中的应用

滑国华 杨利国*

(华中农业大学动物科技学院 武汉 430070)

摘要 :RNA 干扰(RNAi)是指小分子双链 RNA 通过特异性降解与其同源的 mRNA,而在 mRNA 水平上高效阻断体内特异性基因表达的现象,属于转录后水平基因沉默。利用该技术进行基因功能研究,经济有效,通用性好,已成为反向遗传学研究中最重要工具之一。在动物繁殖领域,RNAi 技术主要应用于体外研究哺乳类和禽类卵母细胞发育、胚胎发育和精子形成中重要基因的功能及其作用机制。随着该技术不断发展完善,RNAi 必将在动物繁殖生产实践中发挥巨大的作用。

关键词 :RNAi ;机制 ;卵母细胞发育 ;胚胎发育 ;精子形成

中图分类号 :Q522 **文献标识码** :A **文章编号** :0250-3263(2007)02-148-05

RNA Interference and its Application in Animal Reproduction Studies

HUA Guo-Hua YANG Li-Guo*

(College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract :RNA interference(RNAi),triggered by dsRNA precursors,is a phenomenon of sequence-specific post-transcriptional gene silencing.The dsRNA guide the recognition and ultimately the cleavage of homologous mRNA.As one of the most important tools for reverse genetics ,RNAi is an economic and efficient way for researching the gene function ,and it has its own advantages and broad perspective. In the field of animal reproduction ,RNAi has been extensively used to study the crucial functions of genes related to mammalian and poultry oocyte and embryo development as well as spermatogenesis. With the advancement of RNAi technique ,it will become a powerful tool for improving animal reproduction performance.

Key words :RNAi ; Mechanism ; Oocyte development ; Embryo development ; Spermatogenesis

RNA 干扰(RNA interference ,RNAi)现象属于转录后水平基因沉默(post-transcriptional gene silence ,PTGS),是指一些小分子双链 RNA(double strand RNA ,dsRNA)通过特异性降解与其同源的 mRNA,而在 mRNA 水平上高效阻断体内特异性基因表达的现象^[1]。RNAi 广泛存在于真菌、高等植物、无脊椎动物和哺乳动物中,是自然界中客观存在的进化保守防御机制,在维持基因稳定、保护基因组免受外源核酸侵入、基因表达调控等方面发挥重要生物学作用^[2]。自 1998 年美国卡耐基研究院 Fire 等报道在秀丽新小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中低剂量的双链 RNA 可有效调节基因表达现象,

并提出 RNAi 概念以来^[3],RNAi 现象引起特别重视,对其的研究也越来越深入。2002 年,Science 杂志将这一发现评为该年度世界十大科学成就之首,最近公布,该现象发现者荣获 2006 年度诺贝尔生理学或医学奖,对 RNAi 的研究和应用已逐渐成为分子生物学领域的热点。

基金项目 国家自然科学基金(No.30270959);

* 通讯作者 ,E-mail :yangliguo2006@yahoo.com.cn ;

第一作者介绍 滑国华,女,博士研究生,研究方向:分子生物学,E-mail :lionar1982@126.com

收稿日期:2006-10-12,修回日期 2006-12-28

1 RNA 干扰

1.1 RNA 干扰过程 有机体内不同来源的 dsRNA 在 Dicer 酶作用下,被逐步切割为 21 ~ 23 bp 的 siRNA (small interference RNA),而具有发夹环结构、长度为 70 ~ 80 nt 的单链 RNA 前体 (pre-miRNA) 则被切割为 21 ~ 25 nt 的双链 miRNA (microRNA); siRNA 和 miRNA 的作用机理相似,与核蛋白粒子 (RNP) 结合,分别形成 siRNA 核蛋白复合物和 miRNA 核蛋白复合物,然后重排为 RNA 诱导沉默复合物 (RNA induced silencing complex, RISC)^[4]。一般将含有 siRNA 的复合物称为 RISC,而将含有 miRNA 的复合物称为 miRNP^[5]。复合物中只含有小 RNA 的一条单链,由于反义链 (与靶 RNA 互补) 的 5' 端热力学稳定性较差 ($\Delta 0.5 \text{ kcal/mol}$),因此反义链形成复合物的几率较高,沉默效率也较高,该过程需消耗 ATP^[6,7]。RISC 和 miRNP 的大小及组成在物种间有差异,每个复合物都含有 Ago 蛋白家族的一个成员。Ago 与 RNA 结合紧密,即使在高温环境下也不发生解离^[1]。siRNA 不影响转录的启动与延伸,内源性的 mRNA 是其作用的靶位点。RISC 中的单链 siRNA 催化靶 RNA 磷酸二酯键水解,从中部开始降解相应的 mRNA,该过程并不必须依赖 ATP,但有 ATP 存在时效率较高^[8,9]。但是,miRNA 并不是在 mRNA 水平而是在翻译过程中干扰特异基因的表达。miRNA 与靶 mRNA 和核糖体结合,阻止翻译的延伸和终止,但并不影响翻译的启动 (图 1)^[10]。除作用位点不同外,最近研究表明,siRNA 和 miRNA 的功能也不尽相同,来源于内源转录本的 miRNA 表达具有高度的时间和组织特异性,调节生物发育过程中内源性基因的表达^[10]; siRNA 则在生物进化过程中维持基因稳定、保护基因组免受外源核酸侵入、抵御病毒感染等方面发挥重要生物学作用^[2]。

1.2 RNAi 的特点 随着大规模基因组测序的完成,当务之急是对大量功能未知的基因进行功能鉴定。一直以来,科学家们都致力于寻求一种方便、快捷、经济的实验方法, RNAi 技术由

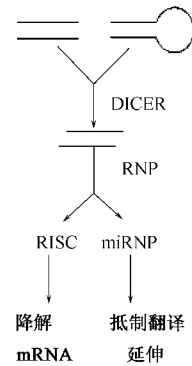


图 1 RNAi 途径

Fig.1 RNA interference pathways

于具有以下特点,因而应运而生。

①高特异性: RNAi 只能作用于特异性同源的内源性 mRNA,即使只有 1 个碱基的差异也会影响 RNAi 的效率,因此对非同源 mRNA 表达无影响。

②高效性: dsRNA 介导的 RNAi 以催化放大的方式进行,微量的 dsRNA 即能有效抑制靶基因的表达。

③可传递性: dsRNA 抑制效应有传递性, RNAi 可从亲代动物传递给子代,其效应也可以穿过细胞界限,在不同的细胞间长距离传递。

④长度依赖性: 在线虫、果蝇和植物中,长链 dsRNA (400 ~ 700 bp) 可引发特异有效的 RNAi,但在哺乳动物中,长链 dsRNA 会引发非特异性的干扰素反应^[11]。一般来说,在哺乳动物中,大于 30 bp 的 dsRNA 会结合并激活蛋白激酶 R (PKR) 和 2' , 5'-腺苷合成酶,导致非特异性 mRNA 降解和蛋白质合成终止^[12,13],但在卵母细胞、胚胎发育早期和未分化的胚胎干细胞中,长链 dsRNA 并不引发该反应。目前有多种方法可人工合成长度小于 30 bp 的 siRNA 或/和短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA),并有多种载体可用于哺乳动物 RNAi 实验^[14]。

⑤通用性: RNAi 几乎可以用于所有脊椎动物的基因功能研究,经济高效,而其他基因功能研究方法如转基因或传统的基因敲除,不仅在大型动物和人类中存在各种问题难以实施,而且费时、昂贵、无遗传性^[15],具有很大的局限

性。

1.3 RNAi 过程中重要的酶和蛋白质 dsRNA 特异性 RNase-III 型内切酶(包括 Drosha 和 Dicer 两种,其中 Drosha 为产生 miRNA 所必需)包含 RNase III 催化区和双链 RNA 结合区,可特异性切割不同来源的双链 RNA^[16]。不同物种含有不同的 Dicer 酶:在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中共发现 4 类 Dicer 蛋白(DCL1 ~ 4)^[17],在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中发现 2 种(DCR1 和 DCR2)旁系同源物(paralogues)^[18],线虫(*Caenorhabditis elegans*)和哺乳动物则只有一种 Dicer 酶,但存在一种与 Dicer 相互作用的包含双链 RNA 结合区的蛋白(Dicer-interacting dsRBD-containing proteins),可使 Dicer 识别不同来源的 dsRNA^[1]。Ago 蛋白分子量大约为 100 ku,包含 2 个保守结构域:PAZ 和 PIWI。PIWI 可与 Dicer 酶相互作用,且 PIWI 与 RNaseH 家族成员结构相似,可能与切割 RNA/siRNA 复合物中的靶 RNA 链有关;PAZ 可特异性识别 siRNA 的末端信息(2 个碱基的 3' 单链突出、5' 磷酸基和 3' 羟基)这种机制可确保特异的 siRNA 形成 RISC,同时避免其他来源的小 RNA 进入 RNA 沉默通路^[19,20]。

2 RNAi 在动物繁殖研究中的应用

2.1 RNAi 应用于动物卵母细胞 2000 年, Wianny 等^[21]首次将 RNAi 技术应用于小鼠卵母细胞研究,即选取在卵泡中表达的 *c-mos* 基因作为靶基因,通过显微注射方式导入 dsRNA,结果与对照组基因敲除小鼠实验结果完全相同,即 *c-mos* 基因表达被抑制,细胞减数分裂停滞在 M II 期,说明 RNAi 可以用于哺乳动物细胞基因功能研究;向小鼠生发泡(GV)期卵母细胞中显微注射三磷酸肌醇 I 型受体基因(*IP₃R-I*)的 dsRNA,该基因表达水平下调,实验组卵母细胞可发育至 M II 期,但皮质颗粒胞吐作用显著降低,且钙离子瞬时释放量下降,表明卵母细胞成熟过程中,钙离子通道蛋白(*IP₃*受体)与钙离子波动有一定关系^[22];通过显微注射方法,将具有卵母细胞特定 *Zp3* 启动子的

Msy2 长链发夹 dsRNA 注入小鼠卵母细胞,以降低 *Msy2* 基因表达量,导致一些与卵母细胞成熟相关的蛋白质无法合成,说明 *Msy2* 基因在小鼠卵子发生过程中对母源 mRNA 稳定性具有调节作用^[23];用 RNAi 方法抑制小鼠 X 连锁 α 地中海智力低下综合征基因(*ATRX*)的表达,发现该基因对小鼠卵母细胞减数分裂的级数无影响,但在染色体排列和减数分裂 M II 期纺锤体的形成中具有重要作用^[24];Park 等^[25]证实了金属硫蛋白(MT)转座子样元件 MT17 在小鼠卵母细胞中特异性表达,并参与卵母细胞成熟和胚胎发育过程中的核膜破裂;Han 等^[26]用 RNAi 技术证实 *Wee1B* 基因在小鼠卵母细胞中特异性表达,且与卵母细胞发育中减数分裂的暂停有关;Gs 联接 G 蛋白偶联受体(GRP3)存在于小鼠卵母细胞和卵泡发育的整个过程中,与细胞的减数分裂有关,将 *Grp3* 的 dsRNA 导入卵泡卵母细胞,导致小鼠卵母细胞减数分裂停止,经过一段时期培养后,其内源性蛋白质水平降低^[27]。

2.2 RNAi 应用于哺乳动物胚胎发育 为了证实 RNAi 是否影响小鼠胚胎中的基因表达, Wianny 等^[21]构建了转基因小鼠检测体系,该体系在延伸因子-1a(ET-1a)启动子调控下表达修饰型绿色荧光蛋白(MmGFP),将 MmGFP 的 dsRNA 注入单细胞受精卵,体外培养 3 ~ 4 d 后,发现未注射 dsRNA 的胚胎中大量表达 GFP,而注射组只有 6.8% 表现出微弱的荧光,说明 dsRNA 可以抑制 GFP 的表达;但在注入 *c-mos* 和 *E-cadherin* 的 dsRNA 单细胞受精卵中,GFP 表达并不受影响,说明 dsRNA 具有抑制的特异性^[21];若在小鼠受精卵中注入 *E-cadherin* 的 dsRNA,则胚胎发育受阻^[21];向单细胞胚胎注入 mDicer 的 siRNA 或长 mDicer 的 dsRNA,以抑制小鼠胚胎中的 RNAi,用于分析小鼠内源性逆转录酶 L(MuERV-L)和 IAP(顺反子内 A 粒子, intracisternal A particle)2 个自主性长端点重复序列在 8-细胞期胚胎的表达情况,结果 MuERV-L 和 IAP 的表达量提高 50%,说明 RNAi 抑制了重复寄生序列(repetitive parasitic

sequences) 在着床前胚胎中的表达, 这种机制有助于保持基因组的完整性^[28]; 在小鼠受精卵原核中注射 *Oct4* 的 siRNA 表达载体, 发现该基因 mRNA 和蛋白质水平下降, 胚胎发育停滞于囊胚期^[29]; DNA 聚合酶 α (*polβ*) 的功能之一是在哺乳动物中进行碱基切除修复, 利用 RNAi 技术降低 *polβ* 表达量, 发现缺乏 *polβ* 的细胞对烷基化基团十分敏感, 且该模型的构建有助于对其他 DNA 修复蛋白的研究^[30]; 利用 siRNA 抑制小鼠 *epithin* 基因表达后, 实验组胚胎发育停滞在 8-细胞期, 而 8-细胞期正是小鼠胚胎发生致密化的时期, 表明 *epithin* 在胚胎致密化过程中具有重要作用, 推测 *epithin* 可能诱导胚胎致密化过程中内细胞团和滋养层细胞的分化^[31]。

由于易于收集和培养, 因此鸡胚是进行动物体内实验的常用模型。Pekarik 等^[32]首创用 RNAi 和卵内电穿孔相结合的方法进行活体基因功能研究, 采用黄色荧光蛋白 (YFP) 作为指示蛋白, 用电穿孔法将 YFP 和 *axonin-1* 的 dsRNA 转入鸡胚, 发现 YFP 和 *axonin-1* 表达量明显降低, 随后 Dai 等^[33]构建了含有 *cAxin2* 和 *cParaxis* 两个目的基因 siRNA 的 pEGFP-shRNA 改良载体, 用电穿孔法导入鸡胚神经管或体节中, 发现 *cAxin2* 的表达被抑制, *cParaxis* 的 mRNA 表达量和肌浆蛋白量减少。

2.3 RNAi 应用于精子发生 精子形成包括精原干细胞有丝分裂增殖、精母细胞减数分裂和精细胞形成等过程, 是许多基因相互作用的结果。Shao 等^[34]用电穿孔法向小鼠睾丸中导入外源报告基因, 然后用同样的方法导入包含 shRNA 的 DNA 载体, 发现报告基因的表达量在各个时期均有不同程度的降低, 进一步用 RNAi 技术沉默精母细胞形成过程中编码 DNA 重组酶的内源性 *DMC1* (Disruption of Meiotic Control), 结果发现 *DMC1* 基因沉默小鼠精母细胞发育停滞、不育, 该实验体系为在体内研究精子发生相关基因的功能提供了一条新的思路; 用 RNAi 技术沉默葡萄球菌激酶 (Staphylokinase *SAK*) 结果显示其与人类细胞中心体的复制有关, 缺乏 *SAK* 基因的细胞表现为中心体复制受阻, 大部分精细胞不

能形成精子轴丝^[35]; 小鼠支持细胞中威尔氏瘤基因 (Wilms' tumor, *WT1*) 沉默后, 其干细胞凋亡率增高, 粘附能力丧失, 受精率降低, 说明 *WT1* 能够启动支持细胞干细胞信号传导, 从而促进精子的形成^[36]; 磷脂酶 *C-zeta* (*PLC-ζ*) 基因是睾丸特异性基因, 可能与雄性干细胞发育有关, 如果精子中缺少 *PLC-ζ*, 会造成男性不孕症, Williams 和 Schultz^[37]在前人研究基础上, 进一步证实该基因会引起一连串卵子上钙离子的冲击而诱发卵子受精。

3 RNAi 在动物繁殖中的应用前景

RNAi 技术是后基因组时代的一场革命, 作为一种新型反向遗传学工具, 它的出现和应用大大推动了后基因组计划 (蛋白组学) 的发展, 为基因功能、表达调控、基因治疗、新药开发以及癌症和遗传病治疗等领域的研究开辟了一条新的途径, 表现出巨大的应用前景^[38]。随着该技术的不断发展和完善, RNAi 必将成为动物繁殖领域强有力的工具, 广泛应用于繁殖性能候选基因功能研究, 并有望开发出提高动物繁殖能力的新型疫苗, 应用于生产实践。

参 考 文 献

- [1] Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 2004, **431**(7 006): 343 ~ 349.
- [2] Boshier J M, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Mature Cell Biology*, 2000, **2**: E31 ~ E36.
- [3] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, **391**(6 669): 806 ~ 811.
- [4] Hammond S M, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 2000, **404**(6 775): 293 ~ 296.
- [5] Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev*, 2002, **16**(6): 720 ~ 728.
- [6] Khvorova A, Reynolds A, Jayasena S D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 2003, **115**(4): 505.
- [7] Schwarz D S, Hutvagner G, Du T, et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 2003, **115**(2): 199 ~ 208.

- [8] Elbashir S M , Lendeckel W , Tuschl T . RNA interference is mediated by 21 and 22 nt RNAs. *Genes Dev* , 2001 , **15** (2) : 188 ~ 200 .
- [9] Hutvagner G , Zamore P D . A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* , 2002 , **297** (5 589) : 2 056 ~ 2 060 .
- [10] Bartel D P . MicroRNAs : genomics , biogenesis , mechanism , and function. *Cell* , 2004 , **116** (2) : 281 ~ 297 .
- [11] Stark G R , Kerr I M , Williams B R , et al . How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* , 1998 , **67** : 227 ~ 264 .
- [12] Baglioni C , Minks M A , De Clercq E . Structural requirements of polynucleotides for the activation of (2'-5') ana polymerase and protein kinase. *Nucleic Acids Res* , 1981 , **9** (19) : 4 939 ~ 4 950 .
- [13] Manche L , Green S R , Schmedt C , et al . Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol* , 1992 , **12** (11) : 5 238 ~ 5 248 .
- [14] 张定校 樊斌 刘榜等 . RNA 干涉 (RNAi) 技术应用于哺乳动物细胞的研究策略. *遗传* , 2005 , **27** (5) : 839 ~ 844 .
- [15] 韩蓓 王秀敏 顾学范 . 双链 RNA 干涉技术 (RNAi) 在不同生物中应用的研究进展. *遗传* , 2002 , **24** (2) : 200 ~ 202 .
- [16] Lee Y , Jeon K , Lee J T , et al . MicroRNA maturation : stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* , 2002 , **21** (17) : 4 663 ~ 4 670 .
- [17] Xie Z , Johansen L K , Gustafson A M , et al . Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* , 2004 , **2** (5) : E104 .
- [18] Lee Y S , Nakahara K , Pham J W , et al . Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* , 2004 , **117** (1) : 79 ~ 81 .
- [19] Tahbaz N , Kolb F A , Zhang H , et al . Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep* , 2004 , **5** (2) : 189 ~ 194 .
- [20] Ma J B , Ye K , Patel D J . Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* , 2004 , **429** (6 989) : 318 ~ 322 .
- [21] Wianny F , Zernicka-Goetz M . Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* , 2000 , **2** (2) : 70 ~ 75 .
- [22] Xu Z , Williams C J , Kopf G S , et al . Maturation-associated increase in IP3 receptor type 1 : role in conferring increased IP3 sensitivity and Ca²⁺ oscillatory behavior in mouse eggs. *Dev Biol* , 2003 , **254** (2) : 163 ~ 171 .
- [23] Yu J , Deng M , Medvedev S , et al . Transgenic RNAi-mediated reduction of MSY2 in mouse oocytes results in reduced fertility. *Dev Biol* , 2004 , **268** (1) : 195 ~ 206 .
- [24] De La Fuente R , Niveiros M M , Wigglesworth K , et al . ATRX , a member of the SNF2 family of helicase/ATPases is required for chromosome alignment and meiotic spindle organization in metaphase II stage mouse oocytes. *Dev Biol* , 2004 , **272** (1) : 1 ~ 14 .
- [25] Park C E , Shin M R , Jeon E H , et al . Oocyte-selective expression of MT transposon-like element , clone MTi7 and its role in oocyte maturation and embryo development. *Mol Reprod Dev* , 2004 , **69** (4) : 365 ~ 374 .
- [26] Han S J , Chen R , Paronetto M P , et al . Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Curr Biol* , 2005 , **15** (18) : 1 670 ~ 1 676 .
- [27] Mehlmann L M . Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. *Dev Biol* , 2005 , **288** (2) : 397 ~ 404 .
- [28] Svoboda P , Stein P , Anger M , et al . RNAi and expression of retrotransposons MuERV-L and IAP in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol* , 2004 , **269** (1) : 276 ~ 285 .
- [29] Haraguchi S , Saga Y , Naito K , et al . Specific gene silencing in the pre-implantation stage mouse embryo by an siRNA expression vector system. *Mol Reprod Dev* , 2004 , **68** (1) : 17 ~ 24 .
- [30] Polosina Y Y , Rosenquist T A , Grollman A P , et al . ' Knock down ' of DNA polymerase by RNA interference : recapitulation of null phenotype. *DNA Repair (Amst)* , 2004 , **3** (11) : 1 469 ~ 1 474 .
- [31] Khang I , Sonn S , Park J H , et al . Expression of epithin in mouse preimplantation development : its functional role in compaction. *Dev Biol* , 2005 , **281** (1) : 134 ~ 144 .
- [32] Pekarik V , Bourikas D , Miglino N , et al . Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nat Biotechnol* , 2003 , **21** (1) : 93 ~ 96 .
- [33] Dai F , Yusuf F , Farjah G H , et al . RNAi-induced targeted silencing of developmental control genes during chicken embryogenesis. *Dev Biol* , 2005 , **285** (1) : 80 ~ 90 .
- [34] Shoji M , Chuma S , Yoshida K , et al . RNA interference during spermatogenesis in mice. *Dev Biol* , 2005 , **282** (2) : 524 ~ 534 .
- [35] Bettencourt-Dias M , Rodrigues-Martins A , Carpenter L , et al . SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Curr Biol* , 2005 , **15** (24) : 2 199 ~ 2 207 .
- [36] Rao M K , Pham J , Imam J S , et al . Tissue-specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis. *Genes Dev* , 2006 , **20** (2) : 147 ~ 152 .
- [37] Williams C J , Schultz R M . Transgenic RNAi : a tool to study testis-specific genes. *Mol Cell Endocrinol* , 2006 , **247** (1 - 2) : 1 ~ 3 .
- [38] 刘星吟 黄炫樊 金立培 . RNA 干涉在纤毛虫中的研究进展. *动物学杂志* , 2004 , **39** (1) : 117 ~ 121 .