

易于使用

值得信赖

专业权威

siRNA和miRNA介导的基因沉默 从实验室到临床应用

siRNA and miRNA Gene Silencing
From Bench to Bedside

Mouldy Sioud

实验室解决方案

siRNA and miRNA Gene Silencing

From Bench to Bedside

siRNA 和 miRNA 介导的基因沉默

从实验室到临床应用

Edited by
Mouldy Sioud

*Department of Immunology, Institute for Cancer Research,
The Norwegian Radium Hospital, University of Oslo, Norway*

科 学 出 版 社

北 京

图字：01-2011-6661 号

This is an annotated version of

siRNA and miRNA Gene Silencing: From Bench to Bedside

Edited by Mouldy Sioud.

Copyright © Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC 2009

ISBN: 978-1-60327-546-0

All rights reserved.

No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopy, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher.

This reprint has been authorized by Springer-Verlag (Berlin/Heidelberg/New York) for sale in the People's Republic of China only and not for export therefrom.

本版本由 Springer 出版公司（柏林/海德堡/纽约）授权，仅限在中华人民共和国境内销售，不得出口。

图书在版编目(CIP)数据

siRNA 和 miRNA 介导的基因沉默：从实验室到临床应用 = siRNA and miRNA Gene Silencing: From Bench to Bedside; 英文 / (挪) 西乌德 (Sioud, M.) 主编. -- 北京：科学出版社，2012

(实验室解决方案)

ISBN 978-7-03-034002-3

I. ①s… II. ①西… III. ①基因表达调控—研究—英文 IV. ①Q786

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 065686 号

责任编辑：李小汀 田慎鹏 / 责任印制：钱玉芬

封面设计：耕者设计工作室

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012 年 4 月第 1 版 开本：787×1092 1/16

2012 年 4 月第一次印刷 印张：31 1/4

字数：741 000

定价：138.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

导 读

德国斯普林格 (Springer) 出版集团推出的“Springer 实验室指南” (*Springer Protocols*) 系列丛书中的《分子生物学方法》 (*Methods in Molecular Biology*) 系列已经陆续面世, 书中提供的科研指南和方法被众多科学家和研究员所采用。此次出版的《siRNA 和 miRNA 介导的基因沉默: 从实验室到临床应用》 (*siRNA and miRNA Gene Silencing: From Bench to Bedside*) 也是《分子生物学方法》系列中的一册。本书编者 Mouldy Sioud 博士长期从事 RNA 干扰领域的研究工作, 致力于寻找疾病诊断和预后的标记及新的治疗策略。本书的编写共有来自 RNA 干扰研究领域的 68 位科学家所组成的 20 个研究小组参与完成。他们介绍了 siRNA 在设计、表达、导入、体内成像和减少 siRNA 有害效应方法等方面的最新进展, 并通过具体的案例研究展示了 siRNA 在临床中的应用情况。因此, 作为一本专业性极强的指南类图书, 本书不仅保持了该系列丛书的一贯风格 (将涉及到的新方法和新技术给出了详细的研究思路和操作步骤), 而且更多地联系实际, 介绍了具体的应用情况。

RNA 干扰 (RNAi, RNA interference) 技术是一项高效、特异的基因沉默技术。RNAi 是生物体内的一种进化保守机制, 是机体为了抵御外源基因入侵的一种有效手段, 起着“细胞内免疫”的作用。这种沉默机制最初是在研究线虫 (*C. elegans*) 发育缺陷时发现的。随后, 在各种模式生物 (果蝇、拟南芥、小鼠等) 中, 人们通过克隆测序及生物信息学的方法发现并寻找到了多个类似的小分子非编码 RNA, 证明 RNA 介导基因沉默现象在生物体内普遍存在。

2001 年, Thomas Tuschl 小组发现人工合成的 siRNA 可诱导哺乳动物体内的 RNA 干扰现象。它的发生过程主要是 dsRNA 首先被核酸内切酶切割成长为 20~25 nt 的 siRNA (small interfering RNA, 小干扰 RNA), siRNA 然后与相关的蛋白结合成 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC), RISC 复合体通过 siRNA 的引导识别并降解靶 mRNA, 进而特异性导致基因沉默。

miRNA (microRNA, 微 RNA) 是真核生物和病毒中发现的一类长约 21~23 nt 的内源性小分子非编码 RNA, 成熟的 miRNA 是由具有发夹状结构的 pri-miRNA 经核酸内切酶切割而来, 以单链形式存在。miRNA 的作用方式与 siRNA 介导的沉默机制具有一定的相似性, 主要不同点在于 siRNA 通过与靶 mRNA 完全互补来切割靶 mRNA, 在转录水平介导沉默效应; 即 siRNA 的靶 mRNA 序列只要有一个核苷酸突变, 就会影响到 RNAi 的沉默效应; 而 miRNA 在植物中是通过与靶 mRNA 完全互补来切割靶 mRNA, 在转录水平介导沉默效应, 在动物中则不需与靶 mRNA 完全互补, 可以在转录水平及转录后水平介导多个靶基因的沉默效应。因此, 相对于 miRNA 而言, siRNA 更具有高度特异的特点。siRNA 和 miRNA 的研究表明在真核生物基因组中相对庞大的非编码区域蕴涵着重大的“秘密”。这些小 RNA 可以有效调控生物体的生长发育、细胞凋亡、神经分化和免疫等重要生命过程。因此, 可以针对目的基因设计相应的 siRNA, 再由载体介导输送到细胞内, 干扰特定基因的表达。目前, siRNA 介导的基因沉默技术已成为研究基因功能与筛选

药物靶标的一项重要工具之一。

RNAi 技术目前也存在一些挑战,包括 (1) 有效作用靶点的选择:如果靶点选择不当,设计的 siRNA 可能会非特异性地作用于非靶向 mRNA 并导致非靶基因的沉默,即脱靶效应 (off-target effects); (2) siRNA 有效导入体系的建立:目前,siRNA 导入细胞内的效率很低,如何提高细胞摄取 siRNA 的能力也是一个亟需解决的问题; (3) siRNA 在细胞中的稳定性:化学合成的 siRNA 在体内不稳定,因其相对分子质量小,容易被肾透析并很快清除,也容易被内源性的胞浆 RNA 酶降解。本书从科学和技术两个层面,全面审视、讨论并阐明上述 RNAi 方面的有关问题。

相对于同类书籍,本书具有以下几个方面的显著特点:

1. 严谨性。本书的每个章节在内容上都具有客观、真实、准确和逻辑性强等特点。例如,第 1 章综合阐明了如何运用统计学和聚类分析的方法来选择有效的 siRNA 序列;第 2 章还提供了为避免免疫识别和脱靶效应等有害效应的 siRNA 的设计策略和原理,并用详实的实验数据对其可靠性加以分析。

2. 前瞻性。参与本书编写的许多科学家都是目前常规方法的首创者,他们在书中提供了各自实验中总结的第一手资料及创造性的方法指导。例如,第 10 章报道了最新 RNAi 载体 - pSM155 和 pSM30 在 siRNA 表达中的潜在应用价值;第 4 章首次介绍了用生物荧光成像技术监测去端肽的胶原蛋白 (atelocollagen) 运载的 siRNA 在活体动物中的作用效果;第 6 章描述了如何在体外运用人工合成的 siRNA 与阳离子脂质或磁性纳米颗粒自组装成聚合物并通过磁力介导的方法将 siRNA 转入哺乳动物贴壁细胞,对于在各种细胞类型中筛选新介质和磁纳米粒子以优化 siRNA 转染体系也有很大参考价值。

3. 系统性。本书系统地介绍了 siRNA 从设计到靶向导入体外和体内的细胞再到让其成功起作用的各种技术和方法。RNAi 技术的主要作用在于对目标基因的定点敲除,而该技术的重要应用之一是肿瘤和病毒感染的治疗。本书从理论基础延伸到临床应用,系统全面地介绍了 siRNA 在生物学和医学研究领域的最新成果。

4. 实用性。作为方法学著作,本书不但给出了所涉及实验技术的原理和详细步骤,而且系统地介绍了各种方法的研究思路。这不仅有利于广大科研工作者参考本书进行相关的科研工作,更有利于我们举一反三,从书中获得科学研究的新思路。

5. 可读性。本书虽由来自不同国家的科学家分章节编写,但是总体上,用词生动、简繁得当,对于有生物学、化学及生物医学背景的读者来说简单易懂。另外,书中的实验原理、信号通路及实验数据等都配有图表及详细说明,可以加深我们对所涉及的知识与技术的理解。

“转化医学”是近年来国际医学健康领域出现的新概念。“转化医学”是指将生物基础研究的最新成果快速有效地转化为临床医学技术,即从实验室到临床 (bench to bedside) 再从临床到实验室 (bedside to bench) 的连续过程,简称为“B-to-B”。其核心在于紧密连接基础与临床,与从事基础科学研究的工作者和熟悉临床需求的医生之间建立起桥梁。RNAi 研究的显著特点就是其“转化医学”的性质。本书用大量的具体实例来介绍这方面的最新成果,如 Ahmadinejad 小组的研究表明 siRNA 靶向肿瘤细胞与间充质的相互作用是一个有潜力的治疗策略;Gondi 小组介绍了 siRNA 介导的靶向基质金属蛋白酶、尿激酶

纤维蛋白溶酶原激活剂及其受体的治疗潜质；Gillespie 小组用 RNAi 的方法在体外和体内沉默了人神经胶质瘤细胞中的 HIF-1 α 基因；Folini 小组验证了 RNAi 介导的靶向端粒维持和抗凋亡相关癌基因的治疗方法；Barik 小组使用经过化学修饰的第二代鼻内 siRNA 治疗呼吸道病毒性疾病；Martínez 小组对抗 I 型人类免疫缺陷病毒的 siRNA 临床治疗进展作了详尽描述；Tsuda 小组用合成的 microRNA 靶向神经胶质瘤相关抗原蛋白 1。最后，Koldehoff 小组运用 siRNA 直接抑制 *BCR-ABL* 转录产物的方法来靶向治疗耐伊马替尼的慢性髓细胞白血病患者并得到了良好的效果，表明临床上应用合成的 siRNA 是安全可行的，使用合成的非病毒载体进行基于遗传的治疗是有良好应用前景的。这对于更多的科学家与医学人员打破基础研究与临床医学之间的屏障，在其间建立起直接联系，努力缩短从基础研究到临床医学应用的时间带来更大信心。

近年来，RNAi 研究领域得到了前所未有的发展，在生物學研究和临床应用等领域都取得了大量的突破性成果。本书几乎囊括 RNAi 技术的各个方面，并对临床实际应用中常会遇到的问题也提出了很多宝贵的意见，因此该书对从事相关领域的科研研究者、临床医生和学生都有很大的启蒙与指导作用，它不仅是实验室中的操作指南，也将是生命科学图书馆中非常有价值的参考工具书之一。

陈月琴
中山大学生命科学学院
二零一二年三月

前言

RNA 干扰 (RNAi) 是指双链 RNA 沉默特定靶 mRNA 分子的过程。在发现小分子干扰 RNA (siRNA) 可以模拟 Dicer 酶剪切功能沉默哺乳动物基因后, RNAi 技术已经成为实验中抑制基因表达的实用工具并广泛应用于各种生物。此外, RNAi 已成为药物开发中的关键技术, 从靶基因的发现、验证到小分子的作用机制研究都是不可缺少的方法和手段。迄今为止, 人们采用多种策略来激活 RNAi 途径, 每一种都经过优化从而适应于不同的细胞系统。尽管这种技术较其他方法具有很多优点, 但是其基因沉默的特异性并不是绝对的, 仍然存在脱靶效应和激活先天免疫的风险。同时, siRNA 治疗策略的成功应用依赖于将其靶输送至病变细胞的载体的发展, 以及我们对 microRNA (miRNA) 生物形成的理解。本书主要为读者介绍有关 siRNA 的设计、表达、导入、体内成像的最新进展, 以及如何减少 siRNA 有害效应的方法及其在病人中的应用。

设计一个有效的 siRNA, 首先必须考虑目标位点的碱基组成以及是否易被结合。第 1 章回顾了已发表的 siRNA 设计指导原则, 并提供了如何选择有效 siRNA 序列的新的统计和聚类的设计策略。如果沉默的目标是一种变异迅速的 RNA 病毒, 则应该考虑靶向保守序列和/或联合不同的 siRNA 序列。

最近的研究表明, 某些 siRNA 序列可以激活先天免疫并导致前炎症因子和 I 型干扰素的产生。而且, siRNA 也会沉默不相干的基因, 即我们所说的脱靶效应, 这主要是由于与 siRNA 有义链种子序列互补的目标序列的长度有限而导致的。遗憾的是, 当前的 siRNA 设计工具 (见第 1 章) 并不能完全消除这些潜在的不利效应。第 2 章则详细描述了如何消除不利效应, 包括先天免疫的激活和脱靶效应。同时, 还介绍了基于 siRNA 技术来提高肿瘤免疫的方法。

值得注意的是, 体内运用 siRNA 技术的主要挑战在于其输送、组织靶向及 siRNA 效力的监测等。在体外, siRNA 双链主要通过脂质体介导的转染或是电穿孔转染的方式进入细胞, 而这两种方法都不适用于病人。目前主要通过采用纳米材料、新型脂质体和受体介导的靶向等的应用来提高体内 siRNA 的输送效率。第 3 章到第 8 章描述了在体外和体内具有应用前景的新构想和新策略。而第 5 章则介绍了第一个输送 siRNA 的多形纳米粒子, siRNA 摄取的成像和肿瘤中基因沉默的监控。第 6 章首次详尽阐明了 siRNA 在体外和体内的磁转染操作规程。

siRNA 在血清和细胞质中容易被核酸酶降解, 从而不利于其在细胞和病人中应用。通过化学修饰核糖基 (如锁核苷酸、2'-脱氧、2'-氟代、2'-(O-甲基) 能在不影响干扰效果的情况下提高其稳定性。第 9 章讲述了有望成为新型治疗药物的高稳定 siRNA 的研究进展。第 10 章则侧重新型 RNAi 载体的介绍, 它是基于 miR-155 和 miR-30 的前体而设计的茎环结构, 能表达合成的 siRNA 或 miRNA。这种新载体相比通过 RNA 聚合酶 III 启动的传统 RNAi 载体有诸多优势, 其中包括单个转录本可表达多个 miRNA, 以及如第 3 章讨论的可组织特异性表达等。

第 11 章和第 15 章中展示了 RNAi 技术沉默特定基因表达的实例, 描述了一系列在体

外和体内被验证的治疗靶基因，包括癌基因、生长因子、免疫调控因子、尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂和它的受体、基质金属蛋白酶、低氧诱导因子及端粒酶。

除了干扰内源基因，siRNA 也被用于抑制病毒的复制。然而，体外和体内实验都表明存在病毒突变体逃避干扰的问题。第 16 章描述了经化学修饰的新一代 siRNA 在呼吸道病毒相关疾病中的应用。第 17 章总结了近年来使用 siRNA 治疗 HIV-1 感染取得的进展，并提出了宝贵的建议。

值得一提的是，siRNA 的成功不仅取决于输送策略和化学修饰的发展，而且还取决于我们对 miRNA 生物发生的理解。内源的 miRNA 由长的初级转录本加工成 60~110 个核苷酸的发夹前体，再经过进一步剪切最终成为 19~24 个核苷酸的成熟体。目前，在人类中鉴定到的 miRNA 有 1000 多个。它们通过在转录后水平调节靶基因表达，从而在发育和生理过程中起重要作用，所以 miRNA 的表达失调导致特定的疾病表型也就不足为奇。本书有 3 章讲述近年来在 miRNA 表达、功能以及与疾病相关的研究进展。第 18 章和第 20 章着重总结了参与 miRNA 功能、生物发生和干扰病毒感染相关的蛋白分子。第 19 章论证了来源于内含子的 miRNA 不仅能够在体外而且能在成年小鼠体内沉默基因的表达。第 21 章描述了有效的 miRNA 的设计原则和应用情况。在最后一章（第 22 章），本书以针对白血病 *Bcl-Abl* 融合基因合成的 siRNA 为例介绍了第一个在临床应用的实例，结果表明使用 siRNA 是安全的，从而有利于促进基于 RNAi 的药物进入临床试验。

本书适合于对 RNAi、基因调控、基因和免疫治疗等感兴趣的研究人员、教师、学生和生物技术公司，我希望读者们能从这些 RNA 技术——从科研到临床进展中受益。

最后，我想感谢为本书做出贡献的作者，感谢编辑助理 Anne Dybwad 在工作中的优秀表现，感谢本系列的编辑 John Walkers 以及本书所有的参与者。

Mouldy Sioud

章节摘要

第 1 章 运用统计学和聚类分析的方法选择有效的 siRNA 序列

Shigeru Takasaki

短链干扰 RNA (siRNA) 已经广泛应用于哺乳动物细胞系的基因功能研究, 但基因沉默的效率不一。最近虽然报道了许多基于各种标准的 siRNA 设计原则或指南, 却不尽相同。这使得人们很难选取高效的靶向哺乳动物基因的 siRNA 序列。本章首次综合分析了已报道的 siRNA 设计指南, 并阐明了这些指南中涉及的问题; 阐述了一些新的选取有效 siRNA 序列的计分法, 如基于统计及聚类分析技术的自组织映射网络模型 (SOM) 和径向基函数网络模型 (RBF)。在推荐的计分法中, 个体打分被定义为一种基于位置特异性的具有统计学意义的基因降解程度。可以通过评估最近报道的 siRNA 的有效性以及对比其他打分方法来确定其效果。分值的高低与基因的降解程度密切相关, 并可容易地筛选高潜能的 siRNA。评估结果显示这种新方法对于筛选靶向哺乳动物 mRNA 的 siRNA 序列是非常有效的。

第 2 章 破解先天免疫识别 siRNA 的密码

Mouldy Sioud

小分子干扰 RNA (siRNA) 广泛应用于多个物种中基因表达的敲除。虽然已有肿瘤细胞系中的实验证明 siRNA 一般不会被先天免疫识别, 但是脂质体介导的 siRNA 进入血液细胞后常伴有免疫激活。最近的研究表明某些 siRNA 参与 toll 样受体 TLR7/8 信号通路从而激活大量的宿主防御基因如干扰素 (IFN)、前炎症细胞因子、Mx 蛋白、趋化因子、趋化因子受体、共刺激分子、RNA 解旋酶、半乳糖凝集素类和泛素化连接酶的表达。除免疫激活外, 大部分 siRNA 序列能够沉默除了目的基因之外的许多基因, 即所谓的脱靶效应。因此, siRNA 的临床应用最主要的挑战之一就是解密免疫系统识别 siRNA 的机制并找到避开激活免疫的方法。在这个方面, 可用 2'-O-甲基尿苷等 2' 端修饰的尿苷来避免免疫识别。有趣的是, 2'-O-甲基修饰尿苷的 RNA 不仅能避免激活 TLR7/8 敏感通路, 而且能降低脱靶效应, 同时对抗多种 RNA 激活的 TLR7/8 信号通路。含 2'-脱氧尿苷或胸苷的 RNA 寡核苷酸和 siRNA 双链没有明显的激活免疫效应及结合到 TLR 类分子的能力。因此, 我推荐使用这些修饰以避免免疫识别和脱靶效应。本章主要从分子和细胞水平阐述免疫系统识别 RNA 的机制并提出了一系列临床应用中最小化或最大化免疫激活效应的 siRNA 设计策略。

第 3 章 哺乳动物细胞中反义寡核苷酸和 siRNA 的靶向输送

Mouldy Sioud

RNA 干扰 (RNAi) 是一种天然的基因沉默机制, 可用于药物开发。虽然在体外人工合成的小分子干扰 RNA (siRNA) 都能通过脂质体介导或是电转染的方法进入几乎所有细胞系中, 但是在体内达到全身或特异靶向的效果还是主要挑战之一。在这些靶向策略

中,受体靶向输送是一种有选择地靶向肿瘤细胞的新型方法。我们有望通过将受体结合短肽包裹进基因输送小囊泡或直接结合到 siRNA 上的方法,使其定位到表达相应受体的靶标细胞。本章讨论了 siRNA 靶向策略的研究现状——鉴定迭代筛选噬菌体肽库的随机肽段或天然产生的短肽片段。同时,本章还介绍了从随机肽段文库中筛选得到的特异结合肿瘤细胞的短肽的转录靶向策略和详细操作流程。

第 4 章 用于局部及全身性治疗的寡核苷酸 siRNA 的导入

Fumitaka Takeshita, Naomi Hokaiwado, Kimi Honma, Agnieszka Banas, and Takahiro Ochiya

RNA 干扰 (RNAi) 是一种新近发现的转录后基因沉默现象,对生命活动过程中许多基因的表达起着广泛的调控作用。同时,通过 RNAi 来沉默基因的技术已经发展成为一个普遍的抑制基因表达的方法。而且体内实验数据表明小干扰 RNA (siRNA) 可用于治疗人类疾病。然而,成功应用于体内的最大挑战是如何将 siRNA 分子导入我们感兴趣的组织或细胞中。当然,评估 siRNA 在体内的有效性也是选择治疗型 siRNA 的核心问题。本章介绍了用生物荧光成像技术监测去端肽的胶原蛋白 (atelocollagen) 运载的 siRNA 在活体动物中的效果。

第 5 章 siRNA 转导及沉默成像

Anna Moore and Zdravka Medarova

RNA 干扰 (RNAi) 领域的快速发展急需一些监控小干扰 RNA (siRNA) 转入目标器官和评估特定基因沉默效率的手段。分子成像技术恰好满足了这一需求,它具有快速性、可重复性和非侵袭性的优点。本篇综述首次总结了现有的成像模式及其在 siRNA 成像中的运用情况。值得注意的是,在这个领域中,几乎每周都有新文章发表,作者们付出了诚挚的努力来呈现该领域的新进展。

第 6 章 磁转染及其在体外导入 siRNA 潜能的研究进展

Olga Mykhaylyk, Olivier Zelphati, Edelburga Hammerschmid, Martina Anton, Joseph Rose-necker, and Christian Plank

本章描述了如何设计并实施实验,以期在体外运用人工合成的小干扰 RNA (siRNA) 与阳离子脂质或磁性纳米颗粒自组装成聚合物并通过磁力介导的方法将 siRNA 转入哺乳动物贴壁细胞。这些磁介质通过一个梯度磁场靶向细胞表面。本章中,我们首先描述如何合成磁性纳米粒子以及 siRNA 与转染复合物中磁性元件的关系。其次,我们将描绘一个用于评估磁性 siRNA 转染复合物磁反应及磁性纳米粒子上样量的简易操作流程。此外,本章提供了制备磁性脂质和 siRNA 复合物、磁转染、下调基因表达及检测细胞活力的操作流程。若在磁力转染三聚复合物中加入融合肽——INF-7 肽,可增强其在 HeLa 细胞中的基因沉默效率。本章所描述的操作流程对于在各种细胞类型中筛选载体构成和新型磁纳米粒子以优化 siRNA 转染体系也有很大参考价值。

第7章 TransKingdom RNAi (tkRNAi) 在体外和体内的基因沉默

Shuanglin Xiang, Andrew C. Keates, Johannes Fruehauf, Youxin Yang, Hongnian Guo, Thu Nguyen, and Chiang J. Li

RNA 干扰 (RNAi) 是一个在 mRNA 水平沉默特异基因的机制。这种机制在进化过程中发生, 并且在从植物到人类细胞中都是高度保守的, 因其在治疗遗传、表观及传染疾病的潜能而在功能基因组和药物创新方面有着广阔的前景。然而, 如何发挥 RNAi 如此之大的潜能仍面临巨大的挑战。因为短的干扰 RNA (siRNA) 是负电荷聚合物, 进入细胞的效率较低, 并会在体内被酶快速降解, 导致输送是一个难题。再者, 长期研究和治疗应用中合成的 siRNA 价格不菲。近来, 我们的研究显示改造非病原菌可激活哺乳动物细胞中的 RNAi (即 TransKingdom RNA 干扰; tkRNAi)。这种新方法有几个优越性并有重要的应用价值。首先, 它可以方便地在实验室针对目的基因建立一个长期稳定的体外和体内的基因沉默体系, 并且使哺乳动物体系内高通量的功能基因筛选成为可能。就像我们现在用大肠杆菌来做基因克隆一样, RNAi 文库可以被构建、储存、再制、扩大。其次, 非病原菌作为基因载体的临床安全性已得到证实, 该技术为 RNAi 的临床治疗提供了应用的可能。tkRNAi 还可排除 siRNA 加工的问题, 并可能防止或缓和 siRNA 在宿主细胞内产生的干扰素样反应。

第8章 用细菌输送 siRNA: 一个实体瘤治疗的新方法

De-Qi Xu, Ling Zhang, Dennis J. Kopecko, Lifang Gao, Yueting Shao, Baofeng Guo, and Li-jing Zhao

RNA 干扰是用来沉默特定基因的一个有力的研究工具, 并为治疗策略带来新希望。然而, 因为缺少靶向的输送方法, RNAi 在治疗方面的发展依然缓慢。而在 siRNA 治疗中的最大挑战就是将其输送至靶细胞。目前体内的 siRNA 输送仍有很多障碍, 比如被内源酶降解及与血液组分相互作用等, 会导致 siRNA 被体内决定生物分配和利用的细胞非特异吸收。包括质粒表达载体 shRNA 等未经修饰的合成 siRNA 不可以穿透细胞膜, 因此, 系统性的应用尚不成熟。siRNA 成功用于基因治疗依赖于如何将其安全、经济以及有效地输送到体内的靶细胞。近来, 减弱的沙门氏菌被作为载体在哺乳动物细胞中输送 shRNA 表达质粒。这种方法在体外和体内都达到了基因沉默的效果。侵袭性沙门氏菌属兼性厌氧, 对包括转移性肿瘤在内的实体瘤有一种天然的趋向性。经遗传改造减弱的沙门氏菌近来已被用来作为潜在的抗癌剂, 以及用于输送特异的抗肿瘤药物。本章将介绍减弱的细菌在癌症治疗中作为靶向癌症的输送体系的应用。

第9章 锁核苷酸修饰的 siRNA 的治疗潜能: 通过对 siRNA 序列的化学修饰来减少脱靶效应

Kees Fluiter, Olaf R. F. Mook, and Frank Baas

双链 RNA (dsRNA) 介导的转录后基因沉默是一个进化中保守的细胞机制。像 miRNA 这样的小分子 dsRNA, 是细胞基因表达中的一种主要调控机制。Tom Tuschl 的团队在几年前发现并开始将这种内源的基因沉默机制应用于治疗, 他们用化学方法合成了一

条长 21 个碱基的双链 RNA (siRNA)，可以在不引起细胞抗病毒样反应的情况下抑制基因表达。siRNA 因可特异抑制突变的癌基因而引起人们的兴趣将其作为治疗肿瘤的手段。然而，近来的研究表明，siRNA 在可以作为药物前还面临很多障碍。其中一些问题比较类似经典反义链方法，如在细胞循环中的 RNA 稳定性、脱靶效应、与内源 miRNA 相互作用及与 dsRNA 的免疫反应。siRNA 的化学修饰可使其避免这些副作用。初始研究表明，用锁核苷酸对其进行最小限度的修饰就可最大程度的减少副作用。本章我们将探索锁核苷酸修饰的 siRNA 在未来治疗应用中的前景及其局限性。

第 10 章 miRNA 和 shRNA 的 pSM155 和 pSM30 表达载体

Junzhu Wu, Akua N. Bonsra, and Guangwei Du

miRNA 在发育时序、细胞分化、凋亡、增殖和器官发育等多种调控通路中都有重要作用。RNA 干扰 (RNAi) 是一种细胞内高度保守的在转录后调控基因沉默的机制，miRNA 则是通过这种机制来行使作用。RNAi 由通过表达载体产生的小发夹结构 RNA (shRNA) 加工而来的双链 siRNA 触发。在近期报道的载体中，siRNA 是从聚合酶 II 启动合成的 miRNA 茎环前体转录而来。我们曾报道过新的 RNAi 载体：pSM155 和 pSM30，这两种载体的设计考虑到 miRNA 的加工和 RNA 剪接，将设计好的 miRNA 置于合成的内含子中模拟 miRNA 的转录表达。正如最初的 miRNA 载体，pSM155 和 pSM30 的构造可以有效地降低它们靶基因的表达。而且，共表达的荧光标记 EGFP 也因这个新的设计而得到了改进。新的载体也为基因抑制和 miRNA 过表达提供了新的工具。本章将描述如何选择和克隆人工的及内源的 miRNA 或 shRNA，评估它们降低基因表达的效率，并讨论这些载体潜在的应用价值。

第 11 章 用 siRNA 靶向癌基因

Olaf Heidenreich

当前的癌症化疗药物非常依赖对增殖期细胞的非特异性抑制。这种非特异靶向肿瘤细胞的方法会引起严重的毒副作用，并可能因为对处于休眠期的肿瘤干细胞不起作用而导致肿瘤复发。由于癌基因在癌细胞和前癌细胞中特异表达，它们可以为治疗策略提供独有的、癌细胞特异的靶标。然而，它们在保持恶性表型中的作用尚不明确。此外，一般认为用传统的小分子方法抑制致癌的转录因子还不能应用于治疗。在此，癌基因特异的 RNA 干扰 (RNAi) 方法为在肿瘤环境中直接研究癌基因功能提供了一个鼓舞人心的新选择。而且，这种方法可以靶向致癌转录因子，从而在很大程度上扩大了癌症特异靶标结构的数量。本章将从理论和应用两方面描述 siRNA 如何靶向癌基因。特别是 RNAi 方法在难转染的血液细胞中的应用。另外，解决系统中 siRNA/shRNA 的运送问题将促进 RNAi 技术在更多有效和特异治疗策略中的运用。

第 12 章 用 siRNA 靶向间质与癌细胞之间的相互作用

Seyedhossein Aharinejad, Mouldy Sioud, Trevor Lucas, and Dietmar Abraham

肿瘤是由癌细胞和正常细胞共同组成的，包括成纤维细胞、内皮细胞、间质干细胞及

炎性免疫细胞（如巨噬细胞）。这些不同的间质组分与癌细胞相互作用，从而促进其生长与转移。例如，巨噬细胞被肿瘤细胞产生的集落刺激因子 1（CSF-1）诱导，而它反过来会产生多种生长因子，如可以提供肿瘤细胞生长并与血管内皮相互作用而增强肿瘤细胞扩散的血管内皮细胞生长因子。间质衍生的生长因子和细胞因子激活的自分泌和旁分泌致瘤信号途径已被证实与肿瘤细胞的增殖和转移相关。此外，来源于肿瘤细胞或间质组分的基质金属蛋白酶（MMPs）被认为在肿瘤细胞转移中起着重要作用。总的来说，近期的研究表明，在寻找人类癌症新疗法方面，靶向肿瘤与间质相互作用是一个非常有望的策略。本章将总结我们近期在肿瘤微环境方面的研究，并重点介绍一些可用 siRNA 进行干预治疗的潜在的靶。

第 13 章 siRNA 介导的靶向基质金属蛋白酶、尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂及其受体的治疗潜力

Christopher S. Gondi and Jasti S. Rao

靶向蛋白酶及其激活剂可以减弱癌细胞的侵袭能力，并在特定情况下诱导癌细胞凋亡。目前，已经开发出多个特异靶向蛋白酶分子的方法来延缓侵袭和迁移。在这些方法中，RNA 干扰（RNAi）有很大的治疗潜能。如今，靶向特定分子的 RNAi 技术已成为潜在的抗癌手段。RNAi 介导的沉默与反义链沉默相比具有催化性。在这些靶分子中，uPAR-uPA 体系和 MMPs 被认为是最有希望的。靶向 uPA/uPAR 与常规的化疗或放疗一起应用时可能得到累加的或协同的治疗作用。单独靶向 MMP-9、MMP-2 或与其他蛋白酶联合使用的研究可能对癌症的治疗有很大帮助。本章将讨论 siRNA 介导的靶向 uPAR-uPA 体系和 MMPs 作为肿瘤治疗药物的潜能。

第 14 章 用 RNA 干扰方法在体外和体内沉默人神经胶质瘤细胞中的 HIF-1 α 基因

David L. Gillespie, Jeannette R. Flynn, Brian T. Ragel, Maria Arce-Larreta, David A. Kelly, Sheryl R. Tripp, and Randy L. Jensen

血管内皮细胞增殖和癌旁水肿的增强是恶性神经胶质瘤的特征。一般认为这是被细胞氧分压调控的血管内皮生长因子所刺激而造成的。人低氧诱导因子 1 α （HIF-1 α ）是细胞内的主要低氧应答因子，它在包括神经胶质瘤在内的很多人类癌症中是过表达的。本章我们将提供一个在神经胶质瘤细胞 - U251、U87 和 U373 中用 RNA 干扰（RNAi）方法来研究 HIF-1 α 在体外和体内生长中的功能。

第 15 章 运用 RNA 干扰的方法验证参与端粒维持和抗凋亡相关的癌基因是否可作为癌症治疗的靶标

Marco Folini, Marzia Pennati, and Nadia Zaffaroni

新的癌症治疗靶标的发现主要是基于癌细胞中与无限复制、抗凋亡、血管生成、组织侵袭和癌细胞转移等相关通路中特异癌基因的鉴定。基因或基因产物是否能作为潜在的癌症靶标，是看在实验体系中调节其表达量是否可以引起特定的改变或癌症表型的逆转。RNA 干扰（RNAi）这种基因沉默机制在哺乳动物细胞中一经证实，就被当做一种基本的

基因敲除工具而应用到临床前模型里，使得许多人类基因的功能研究及与癌症发生和发展过程中相关基因的鉴定成为可能。RNAi 以其强大的基因沉默特质逐渐成为鉴定新的治疗靶标及开发抗肿瘤药物的有效工具。本章总结了近年来依赖 RNAi 方法验证的靶标，这些靶标与癌症两大特质有关，其一是细胞无限复制潜能（如激活端粒维持的机制）；其二是逃避细胞凋亡（如抗凋亡的因子表达上调）。

第 16 章 应用经化学修饰的第二代鼻内 siRNA 治疗呼吸道病毒疾病

Sailen Barik

化学合成短链干扰 RNA (siRNA) 为 RNA 干扰 (RNAi) 技术在抗病毒基因方面的应用开创了一个新时代。本章我们着重关注全球发病率和致死率极高的呼吸道病毒，临床上多以呼吸道合胞病毒 (RSV)、副流感病毒 (PIV) 和流感病毒为主。由于感染了这些病毒后的临床特征仅局限于呼吸道组织（主要是肺部），因而 siRNA 的治疗也采取相同的原理，如通过鼻腔给药。在第一代鼻内 siRNA 抗 RSV 成功的基础上，第二代 siRNA 针对病毒聚合酶大亚基 (L) 发挥作用，通过化学修饰，提高了稳定性，改善了活力及药代动力学等方面的特性。siRNA 的正义链和反义链上经 2'-O-甲基 (2'-O-Me) 和 2'-脱氧-2'-氟代 (2'-F) 修饰后，再用多种转染试剂转染至鼻内以抗 RSV。基于这些结论，我们对鼻内抗病毒 siRNA 的设计达成以下共识：(1) 经修饰的长为 19~27 个碱基的双链 siRNA 能在肺部起作用；(2) siRNA 的单链或是双链过多的被 2'-O-Me 和 2'-F 修饰将降低其功效；(3) 虽然 siRNA 的有效性可能存在位点依赖性，但是其正义链的有限修饰是有益的。

第 17 章 抗 1 型人类免疫缺陷病毒的 siRNA 应用进展

Miguel Angel Martínez

随着新药和新治疗策略的开发，抗 1 型人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) 的治疗手段有了更多的选择。然而，感染 HIV-1 患者的个体化治疗却越发棘手。如耐药个体的出现，长期使用抗逆转录病毒方案治疗产生的毒副作用及病毒源的持久性等，使得抗 HIV-1 新药物的研发任重道远。近来，利用 RNA 干扰 (RNAi) 技术特异性的抑制 HIV-1 复制，为对抗该病毒感染的基因治疗提供新的可能。本章着重回顾了 siRNA 相关的研究进展。

第 18 章 microRNA 通路的蛋白组分与人类疾病

Marjorie P. Perron and Patrick Provost

众所周知，microRNA (miRNA) 是信使 RNA (mRNA) 翻译的重要调节因子，参与了细胞的众多过程。事实上，某些 miRNA 出现缺失、突变或表达异常时，将导致疾病的发生，这一点正体现了它们的重要性。直到近期才发现 miRNA 通路中的蛋白复合体受影响也将导致疾病的发生。参与 miRNA 生物发生和功能发挥的主要蛋白复合物中的核心酶，如核糖核酸酶 III (RNases III) Drosha、Dicer 及 Argonaute2 (Ago2) 也是至关重要的。然而，miRNA 通路的其他蛋白，如 DiGeorge 综合征关键区域基因 8 (DGCR8)、输出蛋白 5 (Exp-5)、TAR RNA 结合蛋白 (TRBP) 和脆性 X 染色体智力缺陷蛋白 (FMRP) 等也与某些特殊遗传疾病有关。

第 19 章 内含子介导的 RNA 干扰和 microRNA 生物发生

Shao-Yao Ying and Shi-Lung Lin

大约 97% 的人类基因组是非编码 DNA，而基因编码区内的内含子占其中绝大部分。研究发现，众多内含子序列可以编码 microRNA (miRNA)，从而以类似 RNA 干扰 (RNAi) 的方式介导基因沉默。miRNA 是小的单链调节分子，它通过完全互补或部分配对的方式与信使 RNA (mRNA) 相互作用，这一机制对应对癌症多态性和病毒突变的治疗策略设计非常有利。相比双链小干扰 RNA (siRNA) 诱导的基因沉默必须严格互补而言，miRNA 的作用更为灵活。miRNA 最早是在秀丽隐杆线虫中发现的，作为内源 RNA 片段在其胚胎发育过程的多个信号通路中起调控作用。目前，多种 miRNA 在植物、动物，甚至微生物中都有广泛报道。内含子 miRNA 是在基因内含子加工过程中产生的一类新的 miRNA。该类 miRNA 的生物发生不同于之前描述的需 RNA 聚合酶 II (Pol- II) 和剪接体组分参与的基因间 miRNA。多种内含子 miRNA 已在秀丽隐杆线虫、小鼠及人类细胞中得到鉴定，但是其功能或应用还未见报道。这里我们首次提出内含子 miRNA 不仅能够在人类细胞、小鼠细胞，而且在斑马鱼、鸡、成年鼠中诱导 RNAi，这也体现了内含子 miRNA 介导基因干扰的功能在进化上的保守性。这些发现显示了一个由 miRNA 介导的微调编码蛋白 mRNA 降解的细胞内基因调控系统。

第 20 章 HIV-1 与 microRNA 通路的复杂关系

Dominique L. Ouellet, Isabelle Plante, Corinne Barat, Michel J. Tremblay, and Patrick Provost

最近的实验证据表明病毒与人类细胞中 microRNA (miRNA) 介导的 RNA 沉默机制存在着更加复杂的、多方面的联系。特异切割信使 RNA (mRNA) 的小分子干扰 RNA (siRNA) 的发现，推动了病毒学家根据 siRNA 可抑制一系列病毒复制的原理创立治疗方案，包括 1 型人类免疫缺陷病毒 (HIV-1)。病毒的 RNA 能被 miRNA 生成有关的 Dicer 酶加工或被细胞内 miRNA 识别，这被认为是一种抗病毒的防御机制。众所周知，miRNA 主要识别靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区，宿主或病毒本身来源的 miRNA 可能调控宿主和/或病毒基因，从而影响病毒的复制和/或宿主感染病毒后的反应。本章总结了已报道的 HIV-1 与 miRNA 介导的 RNA 沉默的关系，并讨论它们相互联系各个方面。

第 21 章 应用合成的 microRNA 靶向神经胶质瘤相关抗原蛋白-1

Naotake Tsuda, Takahi Mine, Constantin G. Ioannides, and David Z. Chang

转录因子神经胶质瘤抗原蛋白 1 (Gli-1) 介导了 sonic hedgehog (Shh) 通路的激活，该通路先于组织干细胞向肿瘤干细胞转化，并参与早期和晚期上皮细胞瘤的发生。基于靶向 Gli-1 mRNA 的 3'-非编码区 (3'-UTR) 可有效抑制上皮肿瘤细胞增殖的假设，我们评估了数个与之互补的 miRNA 分子在这个方面的功能。将合成的含有 3 个核苷酸 (nt) 环的 miRNA 和对应的双链小 RNA 设计在 Gli-1 的 3'-UTR 序列 GU 富集区上。特异的 miRNA (miRNA Gli-1-3548) 和它对应的双链 (双链 3548) 可以在 Gli-1⁺ 卵巢癌细胞系

(SK-OV-3) 和胰腺癌细胞系 (MiaPaCa-2) 中延缓细胞分裂、激活晚期凋亡, 从而有效抑制细胞增殖。本章我们描述了 miRNA 的有效序列和它们作为基因干扰试剂的应用。

第 22 章 运用 siRNA 直接抑制 *BCR-ABL* 转录产物的方法来靶向治疗耐伊马替尼的慢性髓细胞白血病患者

Michael Koldehoff and Ahmet H. Elmaagacli

近年来, RNA 干扰 (RNAi) 已成为一种敲除体外任意目的基因的标准方法。现今, 人们主要关注如何挖掘其在体内的应用潜能, 包括开发新的治疗策略。就机制而言, 小分子干扰 RNA 在 RNAi 的触发中起关键作用。因此, 如何有效地将靶向特异基因的 siRNA 运送到细胞是建立该治疗策略的重大挑战。这里, 我们将靶向并沉默 *bcr-abl* 的 siRNA 通过非病毒载体的运送方式来治疗一名慢性髓细胞白血病 (CML) 女性患者, 该患者费城染色体阳性, 经过异体造血干细胞移植后复发, 且伊马替尼耐受 (Y253F 突变)。我们发现抑制癌基因 *bcr-abl* 的表达能明显促进 CML 细胞凋亡。体内应用 siRNA 没有出现任何临床副作用。我们的研究表明临床上应用合成的 siRNA 是安全可行的, 使用合成的非病毒载体进行基于遗传的治疗具有良好的应用前景。

(翻译: 曾成武, 李晓娟, 刘晓丹, 张华, 陈月琴)

Preface

RNA interference (RNAi) refers to the process by which dsRNA molecules silence a target through the specific destruction of their mRNA molecules. Subsequent to the discovery that small interfering RNAs (siRNAs) mimicking the Dicer cleavage products can silence mammalian genes, RNAi has become the experimental tool of choice to suppress gene expression in a wide variety of organisms. In addition, RNAi has also become a method of choice for key steps in the development of therapeutic agents, from target discovery and validation to the analysis of the mechanisms of action of small molecules. To date, several strategies have been devised to trigger the RNAi pathway, each of which is adapted and optimized for different cell systems. Although the technology has several advantages over other methods, the specificity of gene silencing is not absolute and there is a danger of off-target effects and activation of innate immunity. Also, strategic success of therapeutic siRNAs will depend on the development of a delivery vehicle that can target pathogenic cells and from our understanding of the biogenesis of microRNAs (miRNAs). The purpose of this book is to provide readers with the recent advances in siRNA design, expression, delivery, in vivo imaging, and methods to minimize siRNA unwanted effects and use in patients.

To design an effective siRNA, one must consider the base composition of the chosen site and whether the target site will be accessible. Chap. 1 critically reviews the published design guide rules and presents new statistical and clustering design strategies that are useful for selecting effective siRNA sequences. If the chosen target is an RNA virus that can mutate rapidly, one may consider to target conserved site sequences and/or to combine diverse siRNA sequences.

Recent studies indicated that certain siRNA sequences can activate innate immunity resulting in the production of pro-inflammatory cytokines and type I interferons. Moreover, siRNAs can also silence the expression of unrelated genes, a phenomenon known as off-target effects that is mediated largely by limited target sequence complementary to the seed region of the siRNA guide strand. Unfortunately, the current tools for siRNA design (see Chap. 1) cannot eliminate all the potential unwanted effects of siRNAs. Chap. 2 offers valuable and detailed description of how to eliminate siRNA unwanted effects, including the activation of innate immunity and off-target effects. Also, it describes siRNA-based methods for enhancing tumor immunity.

Notably, some of the main challenges in using siRNAs in vivo are the delivery, tissue targeting, and monitoring of siRNA potency in vivo. In vitro, siRNA duplexes have been delivered to target cells mainly by lipid-mediated transfection or via electroporation. However, these methods are not broadly applicable in patients. Approaches to improve in vivo delivery of siRNAs are currently being pursued using nanoparticles, new lipid formulations, and receptor-mediated targeting. Chaps. 3–8 describe new formulations and strategies with promising applications in vitro and in vivo. While Chap. 5 describes the first multimodal nanoparticles to deliver siRNAs, image siRNA