

生命奥秘

LifeOmics

2011 年

1月

总第32期

聚焦RNAi——一起进入
RNAi的大世界

- 全球化背景下转化医学的现状、存在的问题及解决方法
- 冷水鱼也赶时髦，改造自身鱼鳃以排毒

生命世界

无奇不有

走进科学

解读生命

目录 CONTENTS

专题译述

聚焦RNAi——一起进入RNAi的大世界

2	一、RNA干扰机制解码
3	1. 小RNA的合成
11	2. RISC复合体与小RNA分子结合及对其分选
15	3. RNA沉默途径中的“卫兵”
16	4. RISC复合体的靶标感知模式和效应模式
16	5. RNA沉默途径的调控措施
17	6. 前景展望
18	二、RNA干扰三维分子机制研究
21	1. 小RNA分子生物合成的结构学信息
24	2. Argonaute蛋白结构与功能之间的关系
31	3. 未来的发展方向
32	三、RNAi治疗技术的应用前景及面临的挑战
33	1. 内源性基因沉默途径
36	2. 小RNA分子的优设计
37	3. siRNA“突破”并“攻入”
41	4. 使用RNAi治疗人体疾病的临床试验
44	5. 小RNA治疗的安全性问题
45	6. 展望未来

本刊文章主要由国外网站文章编译而成，如有版权问题，请版权所有人与本刊联系。

凡本刊所载文章，版权归作者本人和本刊所有，如需转载，请注明作者及出处“生命奥秘”。

本刊提供的任何信息都不能作为医疗凭证和依据，仅供科研参考。

下一期预告：组织工程与再生医学研究进展

2008年，25岁的美国士兵Hernandez被迫击炮击中，左腿仅剩下骨头。可到了2010年，他的伤腿却奇迹般地恢复了35%。让大家始料不及的是，帮助Corporal原本残缺的伤腿恢复得如此之快的是一种不起眼的白色粉末。当各大媒体争相报道这种被称为“神奇粉末”的生物活性材料时，人们对组织工程与再生医学的热情再次被点燃。下期《生命奥秘》介绍组织工程与再生医学领域的研究进展，希望能给科研人员带来新的启发！

热点话题

46	全球化背景下转化医学的现状、存在的问题及解决方法
----	--------------------------

生命百态

54	“冷水鱼”也赶时髦，改造自身鱼鳃以排毒
56	飞鱼像鸟儿一样滑翔
57	贪吃的淡水栉水母捕食于无形
58	新发现对鲨鱼嗅觉神话产生质疑

专题译述

Worthy Issues

聚焦RNAi

一起进入RNAi的大世界

前言

2004年9月,《自然》(*Nature*)首次刊登了美国科学家Andrew Z. Fire与Craig C. Mello等人撰写的关于RNA干扰的成果文章。时隔不久, RNAi技术取得了非凡的成就。人们逐渐意识到, RNAi将会对生物学的发展带来深远的影响。

谁能想象理解及探索这种基因调控系统之路将来到底能走多远呢?现在,借助晶体学研究以

及经由生化检测采集而来的动力学机理等细节描绘而成的静态图谱,我们可以更清晰地了解,与RNAi调控相关的小非编码RNA是如何生成的。人们付出大量的时间和精力绘制出受其中一种小RNA——microRNA影响的基因表达图谱,从而有助于研究其它多种生物学过程。现在几乎每天都有文章对各种小RNA与机体发育之间关系的进展进行报道。而精明的生物技术公司也正在以惊人的速度积极地将RNAi的相关知识运用于药物筛选研究。



2006年生理学或医学诺贝尔奖颁发给两位美国科学家Andrew Z. Fire (左小图)和Craig C. Mello,以表彰他们在RNA干扰——双链RNA引发的基因沉默领域所做出的杰出贡献。图片来源: Copyright © The Nobel Foundation。

毫无疑问，打开了RNAi这一潘多拉盒子的Andrew Fire与Craig Mello获得了2006年的生理学或医学诺贝尔奖。诺贝尔委员会成员Goran Hansson在该年的颁奖词中说道：“RNAi为我们了解生命提供了新视角，并为医学发展提供了新工具。”不过，RNAi的故事才刚刚开始，许多悬念有待人们逐个解开。借助现今先进的测序技术，人们鉴定出了多种新型小RNA，而随后，它们的强大功能将会继续吸引我们研究下去，相信研究结果一定会让我们感到惊喜。

本期《生命奥秘》编译的5篇综述文章，篇篇都是RNAi领域专家撰写的经典，相信对相关领域研究人员来说，这无疑是一场精彩的学术盛宴！我们希望，通过这些文章，能向对RNAi感兴趣的读者传递相关领域的最新资讯。

我们衷心期待，RNAi技术在2011年有新的突破，造福人类！

一、RNA干扰机制解码

双链RNA能够以序列特异性的方式导致基因沉默的机制自发现起就对生物学的发展产生了巨大影响，它揭示了人们以前未曾注意到的基因表达调控机制。这种机制被称为RNA干扰（RNAi）或者RNA沉默（RNA silencing）。一些非编码小RNA分子（small non-coding RNA）也参与了该途径。它们先与包含了核酶的调控复合体相结合，随即与序列互补的信使RNA靶标配对，阻止其表达。科学家们已经对RNAi途径进行了非常多的研究，也取得了很多重大进展，我们现在几乎可以像了解转录因子那样非常透彻地解密“RNAi 密码”了，这样，我们就能够更好地调控、协调基因表达过程，更好地了解细胞的生理学及发展过程。

RNAi机制的发现对于RNA生物学来说不亚于一场革命。科研人员发现了一种“隐藏多年”的基因表达调控机制——许多以前未曾发现的仅长20~30 nt的小RNA分子可以介导基因沉默。我们在RNAi过程中发现了多种基因调控机制，这些机制在RNAi过程中都起到了关键性的作用，比如沉默内源性基因表达的机制和抑制各种病毒或转座子等寄生性或致病性外源“入侵者”表达的机制等。

尽管不同生物体内，参与RNAi途径的蛋白和相关机制各有不同，但是它们的干扰策略却惊人地一致。在所有被研究过的物种中，RNAi都包含两种主要的组成成分，即决定干扰特异性的小RNA和发挥抑制作用的Argonaute蛋白。

根据RISC复合物中Argonaute蛋白的天然活性以及小RNA与其靶标mRNA之间互补程度的不同，RISC复合物与靶标mRNA结合后会发挥几种不同的作用，它可以控制mRNA的稳定性和蛋白质合成、维持基因组完整性，或产生一系列特异性的小RNA。随着高通量测序技术的出现以及生

物信息学的不断进步，科研人员得以对小RNA的起源及其靶向机制开展更深入的研究。他们发现，在各个不同的物种当中，RNAi系统获得了不同程度的改进，包括进化出“内置式的”分子“刻度尺”，用来控制小RNA的大小和结构，从而挑选出小dsRNA中最合适的那条单链分子进入下一步骤；或进化出防止“脱靶”现象出现的机制等等。

科研人员还发现RNAi通路的活性会在各个水平（从小RNA的生成到RISC复合物的沉默模式）受到严密调控。

最基本的RNAi途径

细胞内表达的长dsRNA或外源性长dsRNA（可以由正链转录产物和负链转录产物配对而成的结构，也可以是ssRNA内形成的茎环结构）在Dicer酶的作用下降解成小RNA；



小RNA的双链解开，其中一条链被优先装载入RNA诱导沉默复合物（RISC）中；



装载了小RNA的RISC复合物就会在细胞内积极地“搜索”转录组，探寻潜在的RNA靶分子。被装载入RISC复合物当中的向导链（guide strand）——ssRNA随后引导RISC复合物当中的核酸内切酶（有时被称作“切割机”，现在人们知道它是Argonaute蛋白）反复剪切拥有向导链同源序列的mRNA靶分子。向导链就是通过这种方式来发挥特异性的RNAi作用的；

1. 小RNA的合成

RNAi机制中最引人注目的亮点就是仅由20~30 nt组成的小dsRNA。它们是由RNaseIII酶（可以是Dicer单独发挥作用，也可以是Drosha和Dicer共同发挥作用）剪切长RNA得到的产物。按照小RNA的来源前体的不同，我们可以将其分为两大类：一是小干扰RNA（siRNA），它是细胞为了应对病毒感染或者其它人工导入分子而剪切外源性长dsRNA前体而生成；二是miRNA，它由细胞运用其自身基因组编码的茎环结构加工而来。借助高通量测序技术，人们发现了好几种内源性小RNA，包括最近发现的PIWI相互作用RNA（PIWI-interacting RNA, piRNA）和内源性siRNA（esiRNA）。

不过，这些小RNA子都有一个共同的特征，那就是它们都能与Argonaute蛋白相结合，从而发挥它们的靶向作用。图1是小RNA形成机制概览。

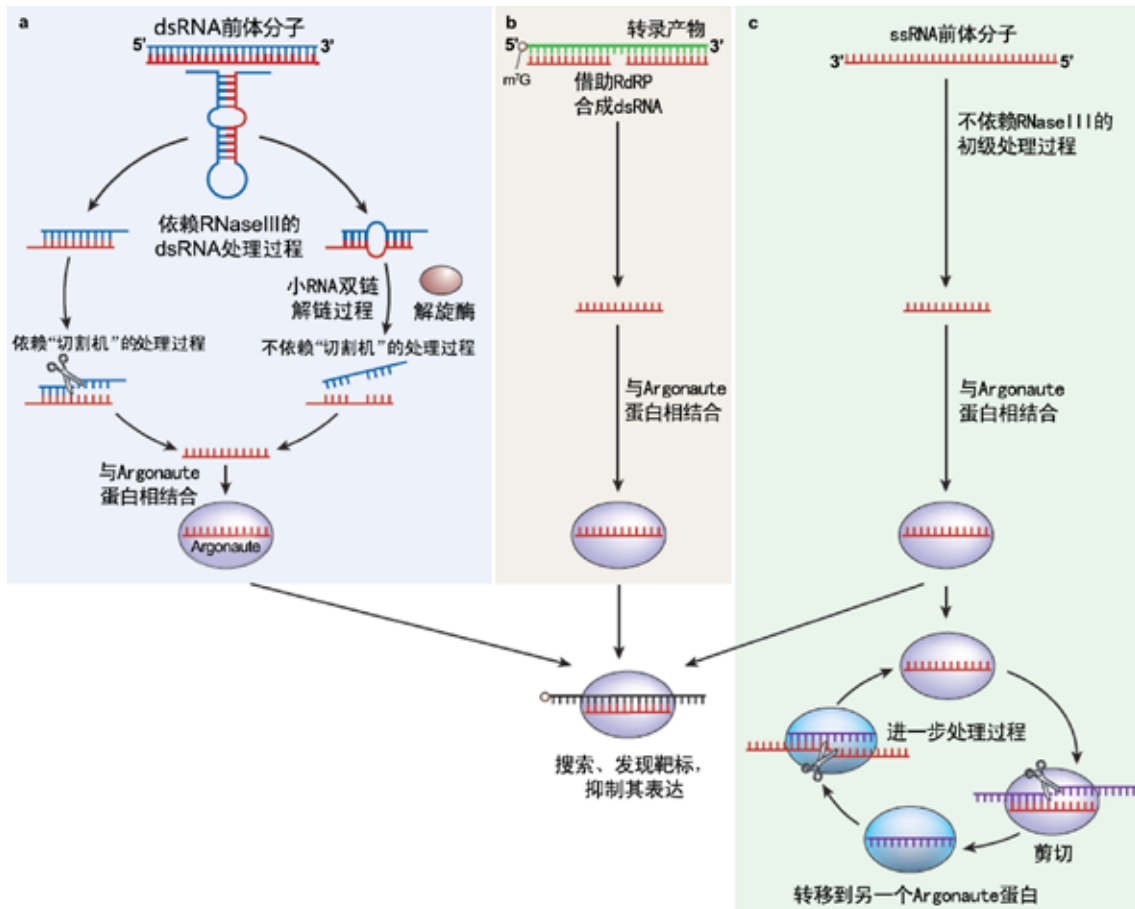


图1 简述小RNA分子的形成过程以及RNA沉默的机制。a，能够形成dsRNA结构或者发夹结构的天然转录产物是形成小RNA分子的前体物质。这些双链结构的RNA分子经由Drosha或Dicer等RNaseIII处理之后就能得到小dsRNA分子。如果这些小dsRNA分子之间的配对情况非常好，如图中左侧所示，那么就会经由Argonaute蛋白的酶切活性进行进一步处理，生成小ssRNA产物。如果像图中右侧所示的那样，小dsRNA分子之间的配对情况不是非常好，比如出现了错配或者有环状凸出，那么它们就不能被Argonaute蛋白酶切处理，只能经由一种不依赖酶切活性的方式生成最终的小ssRNA产物。目前，我们对于究竟是哪种蛋白参与其中来发挥解链活性还不得而知。生成的小ssRNA分子随后会与Argonaute蛋白结合，但究竟是哪一条单链分子（正链或负链）结合到Argonaute蛋白上则取决于它们的热力学稳定性。结合了单链小RNA分子的Argonaute蛋白会根据单链RNA分子的序列寻找能够与其互补配对的mRNA分子，并与之结合，然后抑制其表达。而究竟采用哪种机制沉默该基因的表达，比如是直接降解目的mRNA还是仅仅抑制其表达，在很大程度上取决于mRNA和小RNA分子之间的互补程度。b，在秀丽隐杆线虫和某些植物细胞中发现，某些小RNA分子还可以通过RNA依赖的RNA聚合酶（RdRP）来合成。有一些天然转录产物（通常它们都是异常的转录产物）都是这种依赖RdRP途径合成的小RNA分子的前体来源物质。因此，缺乏RdRP活性的物种，比如哺乳动物和黑腹果蝇等物种体内是不会发现这种小RNA合成机制的。经过这种途径生成的小RNA分子随后同样也是与Argonaute蛋白相结合，发挥抑制靶基因表达的作用。c，有一类Argonaute蛋白只存在于生殖细胞当中，它们被称作PIWI亚科蛋白，它们可以与piRNA结合，随后形成的复合物能够沉默转座子。单链前体RNA分子在未知蛋白的作用下经过初步处理过程形成piRNA。在生殖细胞内，PIWI蛋白在沉默转座子的同时还能大量扩增piRNA分子，这个过程被称作进一步处理过程，或者叫ping-pong扩增环路反应，这种反应在包括小鼠和斑马鱼在内的多个物种体内都广泛存在，非常保守。在这步反应当中，PIWI蛋白的剪切活性会不断剪切转座子转录产物（即piRNA的前体物质）形成piRNA的5'端，但是piRNA的3'端是由什么蛋白质负责生成的，我们现在还不清楚。

1.1 siRNA的生物合成

Dicer（详见表1）能够将长dsRNA剪切成siRNA。这些小双链siRNA的长度只有21~25 nt，它们分别在5'端有一个磷酸基团，3'端有一个羟基基团和由两个核苷酸形成的突出末端，所有这些特征都非常适合于RNaseIII介导的剪切作用发挥功能。Dicer蛋白包含一个PAZ结构域（与siRNA的3'端结合）和两个具有催化活性的RNaseIII结构域。Dicer蛋白可单独发挥作用，但此时两个RNaseIII结构域彼此结合在一起形成一个内部二聚体（internal dimer）结构。PAZ结构域与两个RNaseIII结构域之间的距离刚好等于RNA中25 bp的长度，因此Dicer蛋白自身就是一条分子尺。

表1 参与RNA沉默途径的各物种关键蛋白一览表

参与蛋白	酵母（粟酒裂殖酵母 <i>Schizosacc haromyces pombe</i> ）	植物（拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> ）	线虫（秀丽隐杆 线虫 <i>Caenorha bditiselegans</i> ）	果蝇（黑腹果 蝇 <i>Drosophila melanogaster</i> ）	哺乳动物	
					小鼠	人
RNaseIII	Dcr1	DCL、 DCL2、 DCL3、 DCL4	DCR-1、 DRSH-1	DCR-1、 DCR-2、 DROSHA	DICER1、 DROSHA	DICER1、 DROSHA
Argonaute: AGO亚科 蛋白	Ago1	AGO1、 AGO2、 AGO4、 AGO5、 AGO6、 AGO7 ZIPPY)、 AGO10 (ZLL、 PNH) 以及其它 3种蛋白	ALG-1、 ALG-2以及其它3 种蛋白	AGO1、 AGO2	AGO1、 AGO2、 AGO3、 AGO4、 AGO5（可 能是一种假 基因）	AGO1、 AGO2、 AGO3、 AGO4
Argonaute: PIWI亚科 蛋白	无	无	ERGO-1、 PRG-1、 PRG-2	AGO3、 PIWI、 AUB	MILI (PIWIL2)、 MIWI (PIWIL1)、 MIWI2 (PIWIL4)	HILI (PIWIL2)、 HIWI (PIWIL1)、 HIWI2 (PIWIL4)、 PIWIL3 (HIWI3)
Argonaute: WAGO亚 科蛋白	无	无	RDE-1、 SAGO-1、 SAGO-2、 PPW-1、 PPW-2、 CSR-1、 NRDE-3以及其它 11种蛋白	无	无	无

续下表

接上表

参与蛋白	酵母（粟酒裂殖酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ）	植物（拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> ）	线虫（秀丽隐杆线虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> ）	果蝇（黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i> ）	哺乳动物	
					小鼠	人
含有dsRBD的RNaseIII辅因子蛋白	无	HYL1	PASH-1、RDE-4	PASHA、R2D2、LOQS	DGCR8、TRBP (TARBP2)、PACT (PRKRA)	DGCR8、TRBP (TARBP2)、PACT (PRKRA)
RNA依赖的RNA聚合酶	Rdp1	RDR1、RDR2 SMD1)、RDR6 (SDE1、SGS2)以及其它3种蛋白	EGO-1、RRF-1、RRF-3以及其它1种蛋白	无	无	无

1.2 miRNA的生物合成

和siRNA一样，miRNA也是由21~25 nt组成的小RNA分子。不过，它们两者的生物合成过程却有着显著的差别。miRNA分子的初级前体（pri-miRNA）就是由细胞基因组编码产生的，而编码pri-miRNA的这段基因在基因组中所处的区域主要由RNA聚合酶II负责转录。pri-miRNA分子含有茎环结构，miRNA分子就存在于该结构的5'端或3'端之中。

细胞中miRNA的合成

植物细胞

一种名为Dicer样蛋白1（DCL1）的RNaseIII在核内负责生成miRNA-miRNA*双链分子。其中，miRNA*是在茎环结构与miRNA片段互补的那一段序列，它相当于siRNA双链分子中相对于向导链的那段随从链（passenger strand）

动物细胞

核内的RNaseIII，即Drosha识别miRNA-miRNA*双链分子的一端，然后释放出长约65~70核苷酸的pre-miRNA



pre-miRNA发夹结构被转运至胞质，由Dicer负责完成后续步骤

Drosha与其它分子一起形成“微处理器复合体（microprocessor complex）”，从而发挥分子尺的作用，判断pri-miRNA中的切割位点。在这个复合体中，Drosha与其辅酶因子DGCR8或Pasha（选择哪一个主要取决于物种）相互作用。与Drosha一样，DGCR8或Pasha同样能够在dsRNA结合结构域（dsRBD）的作用下与dsRNA相结合。一个典型的多细胞动物的pri-miRNA包含一个33bp长的茎环结构、一个末端环状结构，以及一个ssRNA侧翼片段（flanking segment）。这个侧翼片段对于pri-miRNA与DGCR8因子的结合非常重要，而33bp长的茎环结构对于它们的有效结合同样意义重大。Drosha蛋白可以利用微处理器复合体这种“切割前”复合体短暂地与dsRNA的茎环结构相互作用，而蛋白的酶切作用中心位点位于ssRNA与dsRNA交界处长11bp的一段序列中，在该位点切开之后会形成交错配对的切口，生成长约65~70bp的pre-miRNA。这种情况下，DGCR8蛋白可以发挥分子尺的作用，“测量”ssRNA与dsRNA交界处的长短。微处理器复合体很有可能通过识别ssRNA末端的环状结构找到RNA，然后在另一端与其茎环结构相结合。在这种情况下，可能会在一段靠近RNA末端环状结构的长约11bp的可变区域里发生不完全剪切。不过，绝大部分的pri-miRNA分子内部都含有突出结构，或者配对不十分匹配的区域，而这段区域也都是位于离末端环状结构大约11bp处，因此这就能够避免在该处发生错误切割的问题。

最近发现，有很多编码这种miRNA的基因都位于内含子区域，对这类miRNA的处理是不需要Drosha酶参与的，而是直接通过剪接体

（spliceosome）来完成。这些内含子miRNA（也被称作mirtron）3'端的茎环结构和一个细小的、已注释的内含子3'端的剪接位点的剪切机制与核内pre-mRNA的剪接机制相同，所以无需

Drosha酶的参与。接下来，以套索形式被剪接体释放出来的mirtron前体分子会在去分支酶（debranching enzyme）的作用下线性化。随后，它们模拟pre-miRNA的发夹结构直接进入miRNA处理程序，继而被转移至胞质被Dicer酶处理，而不是被Drosha酶剪切。

由于Dicer酶和Drosha酶缺乏剪切精确性，因此可能会生成一系列5'端和3'端各异的miRNA-miRNA*双链产物。在动物细胞中，大部分miRNA都会与目的mRNA形成配对不十分精确的杂交双链。这种配对的精确性绝大部分都是由miRNA分子的5'端的第2~8位序列来提供的，这段序列也被称作种子区域。Dicer酶和Drosha酶不精确的剪切既有可能改变种子区域，也有可能颠覆双链分子5'端和3'端的相对稳定性。不过，最近一系列针对小RNA开展的深度测序研究结果显示，人体细胞可能刚好利用了这种剪切的不精确性，因为这样可以利用同一前体RNA分子获得大量不同的miRNA产物，从而大大扩展了miRNA分子的调控对象和途径。

1.3 不依赖于RNaseIII的小RNA合成途径

在某些情况下，小RNA似乎并不来源于dsRNA，但此时小RNA的沉默信号同样获得扩增。因为这些小RNA不源自dsRNA前体，因此RNaseIII不参与它们的合成过程。这种情况的出现让我们开始质疑RNAi的定义。接下来，我们将详细介绍这种不依赖于RNaseIII的小RNA合成途径，包括piRNA、21U-RNA以及秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）体内次级siRNA（secondary siRNA）的合成途径。

piRNA因其可与名为PIWI蛋白的Argonaute家族蛋白相结合而得名。我们以前就已经知道，Argonaute家族蛋白位于RISC中心，它们可以直接与小RNA的向导链相结合。Argonaute蛋白由一个可变的氨基末端和PAZ、MID及PIWI这三个保守结构域组成。小RNA的3'端可以与Argonaute蛋白的PAZ结构域相互作用，而小RNA分子5'端的磷酸基团则可以与Argonaute蛋白MID结构域和PIWI结构域之间的裂隙相结合。PIWI结构域具有RNaseH样的折叠结构和切割活性（尽管某些Argonaute蛋白看起来没有剪切活性）。

Argonaute蛋白可以分为三类

根据在拟南芥中发现的AGO1蛋白而命名的AGO亚科；

根据在黑腹果蝇中发现的PIWI蛋白而命名的PIWI亚科；

根据在秀丽隐杆线虫中发现的Argonaute蛋白而命名的WAGO亚科。

其中，PIWI家族蛋白可以与piRNA分子相结合（表1）。piRNA分子只见于生殖细胞当中，它们对于生殖细胞的发育作用非常重要，它们可以在哺乳动物、鱼类和黑腹果蝇（*D. melanogaster*）生殖细胞里抑制细胞中转座子的表达。piRNA要比miRNA稍长，约24~31 nt。通常，在piRNA分子的5'端会有一个单磷酸基团和一个尿嘧啶。piRNA与哺乳动物细胞的miRNA不太相似，倒是与植物细胞的miRNA比较相似。piRNA 3'端核苷酸有2'-O-甲基化（2'-O-Me）修饰现象，这通常都是HEN1样甲基转移酶（HEN1-like methyltransferase）催化的结果。有研究发现，Dicer蛋白发生突变并不会影响piRNA的生成，这说明piRNA的合成途径与miRNA和siRNA完全不同，并且该合成途径没有dsRNA前体分子的参与。

对与黑腹果蝇（*D. melanogaster*）PIWI亚科蛋白PIWI、AUB和AGO3相互作用的小RNA进行测序后发现，piRNA主要在逆转录转座子（retrotransposon）的反义链的帮助下才得以与AUB蛋白和PIWI蛋白结合；而它与AGO-3的结合则主要获得了逆转录转座子的正义链的帮助。与AUB和PIWI相结合的piRNA在5'端几乎都会有尿嘧啶，而与AGO-3相结合的piRNA分子则倾向于在第10位碱基处出现腺苷酸。与AUB结合的piRNA的前10个核苷酸能够与和AGO-3相结合的piRNA分子的前10个核苷酸互补。另外，由于PIWI亚科蛋白具有酶切活性，因此它们可以在与之结合的piRNA底物的对应链上的第10个碱基处进行切割。这种现象提示piRNA分子生成途径可能是一个自我不断扩增的循环反应（见图1）。

在这个循环反应中，结合了正链piRNA分子的AGO3蛋白会切割长链的反义转录产物，促使反义piRNA分子的5'端与AUB蛋白或PIWI蛋白相结合，然后结合了反义链piRNA分子的AUB蛋白或PIWI蛋白又会切割长链的正义转录产物，促使正义链与AGO3蛋白相结合，如此循环、扩增下去。在这个被称为ping-pong循环扩增的途径中，转座子既是piRNA产物的来源，也是piRNA沉默的靶标。在piRNA 5'产物与下一个PIWI蛋白结合之后，会在另一个未知核酸酶的作用下生成piRNA 3'端，这步反应似乎发生在2'-O-甲基化修饰作用之前。这样最终得到的piRNA产物的大小就刚好符合通过印记实验（footprint）证明的能够与PIWI蛋白相结合的RNA分子的大小。在每一个PIWI亚科蛋白中，PAZ结构域都会远离MID结构域，它们之间的距离刚好符合与PIWI

蛋白结合的RNA分子的长度。因此，PAZ结构域可能部分起到了一种分子尺的作用，帮助将piRNA分子处理成合适大小。这种扩增循环反应特点在斑马鱼（*Danio rerio*）生殖细胞和处于精子发生期中的、减数分裂粗线期之前的哺乳动物生殖细胞中也非常明显。

PIWI亚科蛋白可能会和与之相结合的piRNA一起，通过卵子进入胚胎当中，这说明piRNA分子可能会借此方式在种系中进行传播。但是其它证据表明，在胚胎当中必须有不同于ping-pong循环的其它方式来扩增piRNA。首先，黑腹果蝇（*D. melanogaster*）细胞中的扩增循环过程由AGO3蛋白和AUB蛋白的参与而启动，但是piRNA却仍然结合在PIWI蛋白上。从亚细胞定位及细胞类型就可以区分PIWI蛋白与AGO3蛋白和AUB蛋白；其次，piRNA源自基因组中的flamenco位点，该位点只与PIWI位点相关。这些证据都表明由flamenco位点编码的piRNA是一种不同于ping-pong循环的其它方式合成的。不过，是否真的存在这样一条途径还需要进一步研究。

在秀丽隐杆线虫（*C. elegans*）中还发现了一种新的小RNA，名为21U-RNA。这种小RNA仅长21 nt，在5'端的第一个碱基都是尿嘧啶，但是后面的20个碱基里就不会再出现尿嘧啶了。编码21U-RNA的遗传区域中在21U-RNA起始碱基上游会有一个特征性的42bp长的序列。很有可能这些RNA源自数千个独立的、自主表达的基因位点，这些基因位点广泛散布在一条染色体的两大块区域当中。这些位点在生殖细胞中各自单独表达，其产物与PIWI亚科成员PRG-1蛋白相结合。从这个角度来说，21U-RNA等同于秀丽隐杆线虫体内的piRNA。和piRNA一样，21U-RNA的合成依赖PRG-1蛋白的活性，而不是DCR-1（即秀丽隐杆线虫体内的Dicer）的活性。prg-1基因发生突变的秀丽隐杆线虫会表现出温度敏感不育表型而且后代数量会减少，这与PIWI蛋白参与生殖细胞维持作用有关。和其它处于减数分裂粗线期的哺乳动物生殖细胞中发现的piRNA一样，21U-RNA同样具有非常明显的序列多样性，但是它们缺乏明显的靶标。

在嗜热四膜虫（*Tetrahymena thermophila*）这种纤毛虫动物中也发现了具有和piRNA类似作用的小RNA。这些名为scnRNA的小RNA分子可以诱导转座子样DNA序列降解，也能与PIWI家族蛋白TWI1相结合。与piRNA及21U-RNA不同的是，scnRNA是由Dicer蛋白介导的途径合成的。

上面介绍的piRNA、21U-RNA和scnRNA这三种小RNA的合成表明PIWI蛋白和piRNA机制是进化过程中获得的合成小RNA的途径，继而由小RNA利用各种不同策略沉默靶标。

RNA沉默机制包括下调内源性基因表达、限制自私基因和外源性遗传物质的表达等，不论哪条途径都需要多种因子，比如Dicer酶的参与。因此，在不同沉默途径之间就会出现竞争情况。当然细胞也有办法来应对这种竞争现象，比如扩增较弱的那个沉默信号等等。在秀丽隐杆线虫中，会有各种不同的Argonaute蛋白分别负责在RNAi途径的不同阶段依序发挥作用，如在RNA沉默的第二阶段指挥不依赖RNaseIII的小RNA分子的合成。首先，“初级”Argonaute蛋白，例如用于合成外源性siRNA（exo-siRNA）的RDE-1蛋白和用于合成内源性siRNA（endo-siRNA）的ERGO-1蛋白会被“初级”siRNA（即长链dsRNA经DCR-1蛋白处理得到的第一轮siRNA产物）引导；随后，这种沉默信号会被扩增，产生大量“二级”siRNA信号，这轮反应主要是依靠RdRP蛋白（见图1）。这些二级产物会分别与不同的“二级”Argonaute蛋白，比如WAGO亚科蛋白SAGO等蛋白相结合，来介导下游沉默作用。

在植物细胞中，RNA还具有异常特征，比如缺乏多聚A尾，缺乏5'帽结构等，这些小RNA会在RdRP酶的作用下形成dsRNA，继而成为Dicer酶的底物，然后被切割成双链siRNA。相反，在秀丽隐杆线虫体内的RdRP大部分的产物都是21 nt的单链小RNA分子，它们的5'端会有

三磷酸基团，而且这种小RNA是RdRP酶直接以目的mRNA为模板，以一种不需要引物的方式合成的，而不是常规的通过Dicer酶切割dsRNA而来。这种合成方式使得dsRNA的合成不再需要消耗siRNA，不过我们还不清楚这些二级siRNA分子的3'端是如何产生的，也不清楚是哪种“分子尺”决定siRNA分子的大小。

1.4 各种类型小RNA之间的界限正在不断模糊

正如前面所述，siRNA、miRNA和piRNA这三种小RNA在生物合成途径和细胞功能方面都有所差异。不过，它们之间的这种界限正在不断模糊，因为有研究发现，参与这三类小RNA分子生物合成途径的分子之间具有我们以前未曾了解的复杂的相互作用。对黑腹果蝇组织和体外培养的黑腹果蝇细胞内的小RNA分子进行深度测序研究后，研究人员又发现了一种小RNA分子，这种21nt长的小RNA分子源自黑腹果蝇基因组，它的3'端有甲基化修饰现象。这些内源性的RNA主要由转座子和基因组中的其它几个位点编码。这些位点包括编码天然顺式反义转录体（cis-natural antisense transcript pairs）的基因位点和在茎环结构中包含许多错配序列的长链茎环结构的基因位点。在黑腹果蝇中，含有Dicer蛋白的复合体能够生成exo-siRNA和miRNA。DCR-1蛋白能在dsRNA结合蛋白Loquacious（LOQS）的辅助下生成miRNA，随后这些miRNA会结合到AGO1蛋白上。相反，DCR-2在dsRNA结合蛋白R2D2的辅助下生成exo-siRNA，然后这些exo-siRNA与AGO2蛋白相结合。最近新发现的这些内源性小RNA也和exo-siRNA一样，都经由DCR-2蛋白途径生成，它们同样也能与AGO2蛋白相结合，因此我们管这些小RNA分子叫做endo-siRNA。不过，很多endo-siRNA的生成都需要DCR-1蛋白途径中的LOQS蛋白，而不是在DCR-2蛋白途径中发挥作用的R2D2蛋白。如果黑腹果蝇缺乏DCR-2蛋白或AGO2蛋白，那么细胞内转座子的表达量就会上升，因此我们推测endo-siRNA的主要功能可能就是在不表达piRNA分子的细胞内负责沉默转座子这种“自私基因”。从这个角度来说，endo-siRNA和piRNA是比较类似的。这一发现还表明，黑腹果蝇拥有两条途径来抑制转座子的表达。人们同样在小鼠卵母细胞中发现了endo-siRNA分子，这些小RNA分子来源广泛，能够源自转座子本身，也能够源自功能基因及其同源的假基因之间的重叠区域。这一发现表明，我们一直都认为没有功能的蛋白化石——假基因也能够调控它们“祖先（founder gene）”的表达。

以往我们是按照生成途径而不是大小和功能将小RNA分子分为siRNA和miRNA，但是自从发现了endo-siRNA之后，我们突然觉得很难再区分siRNA和miRNA。这种界限的模糊实际上表明了小RNA分子之间非常奇妙的进化关系。用于生成endo-siRNA的长链茎环结构RNA其实就是植物细胞里的pre-miRNA。有一种理论认为，编码植物细胞miRNA的基因位点可能就是“祖先基因”反向重复之后的产物，这种基因位点就能转录出发夹结构RNA产物。这些发夹结构RNA具有非常好的自我互补配对能力，可以经Dicer样的酶处理，但是不会经由植物细胞中主要负责生成miRNA的DCL1酶途径处理，因为DCL1蛋白对发夹结构的RNA酶切活性很弱。随后，由于遗传漂移（genetic drift）而不断积累了大量的突变，使得RNA产物里的发夹结构不再能够形成那么完美的匹配，这时这些RNA产物就会转由DCL1酶途径处理。因此，用于生成endo-siRNA的茎环结构RNA可能是一种向miRNA前体分子逐渐转变过程中出现的进化中间体。在黑腹果蝇中，这种进化过程很有可能也会出现在编码miRNA分子基因的进化过程当中，在这条途径中是DCR-1蛋白生成了miRNA，而不是DCR-2蛋白生成了endo-siRNA。

2. RISC复合体与小RNA分子结合及其分选

在由dsRNA前体分子启动的基因沉默途径当中，先由Dicer酶剪切得到小dsRNA中间分子即小RNA双链，然后这些小RNA双链必须先解链，形成“有功能的”单链，这样才能为RISC复合体起到“向导”作用。对于每一个小dsRNA分子来说，只有一条链，即向导链能与特定的Argonaute蛋白结合，形成活化的RISC复合体。而另一条链，即随从链则会被降解。很多真核生物不止表达一种Argonaute蛋白，这些蛋白都能够与小RNA分子结合，不论这些小RNA分子的序列如何。那么这些小RNA分子是如何被Argonaute蛋白识别、分选，并与之结合的呢？

2.1 结合、装载过程

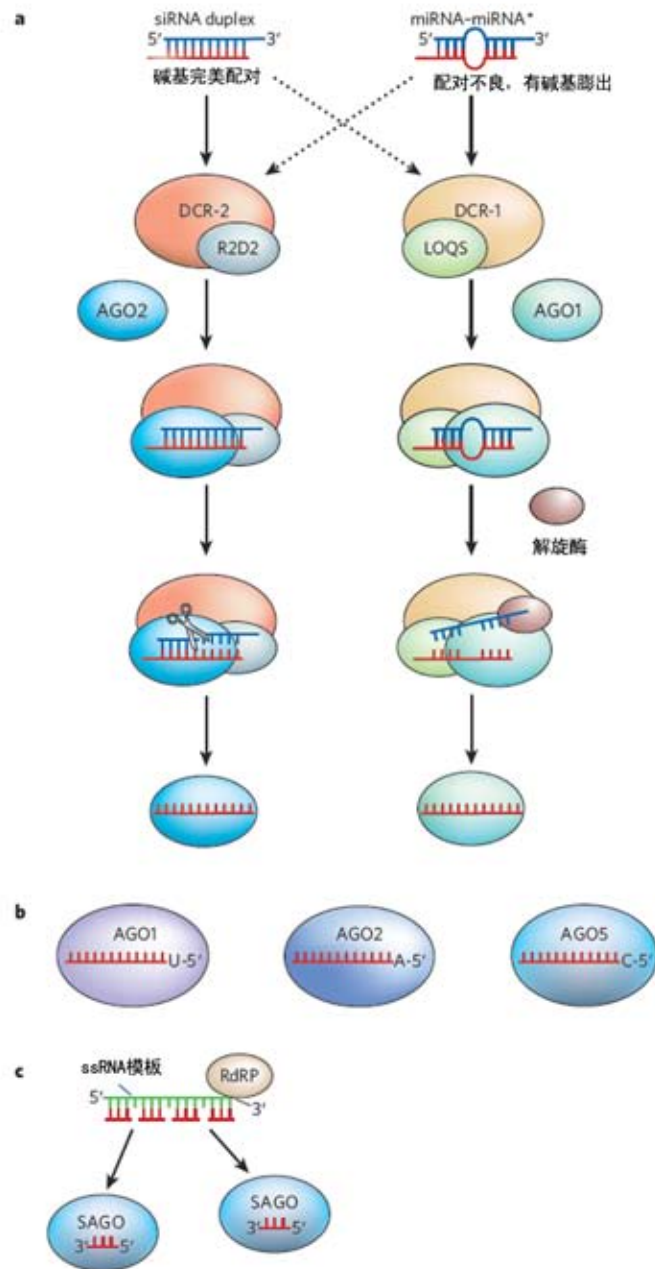
由dsRNA前体分子生成的小RNA在结合、装载到RISC复合体时会从双链状态解离成单链状态。这其中的关键步骤就是小dsRNA的解链过程和向导链被选择的过程。大家普遍认为RISC装载过程实际上就是一个热力学问题。由于小dsRNA分子的热力学不对称（thermodynamic asymmetry）特性使得其中一条链被选择，另一条链被“抛弃”、降解。也就是说，小dsRNA分子中哪一条链的5'端如果在热力学上显得更不稳定，那么它就更有可能被RISC复合体“挑中”成为向导链，这也就是所谓的不对称原理（asymmetry rule）。

在siRNA途径中，我们都知道Dicer蛋白和Argonaute蛋白之间能够发生相互作用，这说明siRNA分子的生成和它与RISC复合体的结合过程可能是藕联的。比如，在黑腹果蝇细胞中，DCR-2蛋白不仅将siRNA转移给RISC复合体，还能和siRNA分子一起参与形成RISC复合体。这就说明DCR-2蛋白不仅仅只在siRNA沉默途径的第一阶段发挥作用。siRNA双链与AGO2蛋白的结合也是在有DCR-2蛋白和R2D2蛋白的RISC复合体的帮助下完成的。siRNA双链中究竟哪一条链能够与AGO2蛋白结合似乎取决于DCR-2-R2D2异源二聚体与siRNA双链分子之间的方向。可能是先由R2D2蛋白来探测siRNA双链的热力学稳定性，然后与其中更为稳定的那条链相结合，然后DCR-2蛋白负责招募较不稳定的那条链。DCR-2-R2D2异源二聚体可能还会通过DCR-2蛋白与AGO2蛋白间的相互作用来招募AGO2蛋白。以前的模型认为从双链到单链的沉默诱发转换过程可能是在某种未知的ATP依赖的RNA解旋酶的作用下完成的。不过，如图1所示，siRNA双链的解旋过程和向导链与RISC的结合过程都是在AGO2蛋白降解随从链过程的推动下完成的，而这个过程是不需要消耗ATP的。从中间切割随从链会降低退火温度和双链结合的自由能，这样就会促进siRNA双链的解离。这些研究发现都表明，siRNA分子是先以双链状态与含有AGO2蛋白的pre-RISC结合的（图2）。

相反，在人体细胞中，pre-miRNA会与AGO2蛋白、DICER1蛋白和TRBP蛋白组成的三聚体相结合。这个复合体可以利用pre-miRNA降解目的RNA，也能在缺乏ATP水解作用的情况下区分miRNA和miRNA*，这说明在这个三聚体当中，是DICER1蛋白来切割并感知RNA分子的热力学稳定性情况的。

这个RISC复合体聚合的过程也能以一种不依赖酶切作用的途径来完成。在人体细胞内，四种Argonaute蛋白中有三种，即AGO1、AGO3和AGO4都缺乏酶切活性，但是它们仍然能够与siRNA向导链结合。同样，尽管我们最开始认为的在未解链pre-miRNA双链分子中，由于存在错配情况，会遮蔽随从链的酶切位点，但是我们仍然在人体细胞内发现单链miRNA能够与AGO2蛋白相结合。因此，在人体细胞内肯定还存在一条不依赖酶切作用的旁路途径来帮助RISC复合体的组成。在这条旁路途径中，我们已经发现RNA解旋酶A可能会参与其中，发挥RNA解链作用。

图2 各种Argonaute蛋白分选小RNA机制简介。小RNA可以根据各种不同类型的Argonaute蛋白来进行分类，这其中也牵涉好几种机制。a，在黑腹果蝇体内，由dsRNA分子生成的小RNA分子会根据其自身的结构与AGO1或AGO2蛋白结合。如果小dsRNA分子中出现错配或者像miRNA那样在中部出现片段膨出现象，那么它们就会与AGO2蛋白相结合。之所以会出现这种选择机制是因为与小RNA分子相结合的Argonaute蛋白是组成含有Dicer蛋白复合体的一部分，而Dicer蛋白有两种形式，即DCR-1和DCR-2，它们分别能够与不同结构的RNA分子相结合。DCR-2蛋白会与R2D2蛋白一起形成异源二聚体，这种二聚体能够与配对非常好的RNA双链相结合，但对中部有错配的dsRNA识别能力则会大打折扣。另一种复合体DCR-1-LOQS则主要识别含有错配片段的双链RNA分子。AGO2蛋白能高选择性地与DCR-2-R2D2复合体相结合。小dsRNA分子会进一步被处理形成小ssRNA分子（图1）。b，拟南芥的miRNA和反式作用siRNA（ta-siRNA）的5'端都含有尿嘧啶，因此与AGO1蛋白的亲合力比较高。而AGO2蛋白和AGO5蛋白则分别比较容易与5'端含有腺嘌呤和胞嘧啶的RNA分子结合。不过，这种依靠RNA分子5'端碱基的分选方式应该不是拟南芥唯一的选择机制。c，在秀丽隐杆线虫和酿酒酵母等物种体内，次级endo-siRNA都具有非常显著的链选择性，只有反义siRNA链能够结合到Argonaute蛋白上。这些siRNA都是RdRP蛋白合成的。在秀丽隐杆线虫体内，RdRP蛋白可以直接以目的mRNA为模板，以不依赖引物的方式合成小RNA。因此，这些次级小RNA分子都表现出一种负极性（negative polarity），这种机制进一步巩固了初级小RNA分子的沉默效果。



2.2 小RNA的分选过程

RISC复合体一旦组成,就会继续完成RNA沉默机制里后续的一系列反应,包括抑制mRNA翻译,维持基因组稳定性等等。RISC复合体的这些特异性功能都与和Argonaute蛋白相结合的特殊蛋白有关。换句话说,那就是不同的RISC复合体可根据组成它的Argonaute蛋白来区分。因此,哪一种小RNA与哪一种Argonaute蛋白相结合就显得尤其重要了。我们对各种小RNA与Argonaute蛋白相结合的情况,即小RNA的分选机制进行了研究,发现这里面存在好几个影响因素,比如小dsRNA的结构、小RNA 5'端的确认、组成小RNA分子的碱基是否存在修饰情况及存在何种修饰情况等等。

在黑腹果蝇中,pre-miRNA是由DCR-1蛋白生成的,而exo-siRNA双链则由DCR-2切割长dsRNA分子而来(图2a)。小RNA生成之后就依其自身结构与AGO1或AGO2蛋白相结合。如果小dsRNA分子中有不配对序列存在,中部形成突出结构(该情况多见于miRNA前体分子中),那么它就会与AGO1蛋白结合。如果小dsRNA之间配对情况良好,那么它就会与AGO2蛋白相结合。这是因为DCR-2-R2D2异源二聚体可以招募AGO2蛋白形成RISC复合体前体,这种复合体可以很好地结合配对良好的小dsRNA分子,但是不能与上述配对不佳的小dsRNA分子结合。这样,DCR-2-R2D2二聚体就不仅能够根据小RNA分子的热稳定性情况来决定siRNA装载的极性,还可以在AGO2蛋白装载到RISC复合体过程中担负起一个“守门员”的角色,从而促进siRNA而不是miRNA与RISC复合体的结合。这些现象说明,每一个siRNA双链分子在生成之后都会从Dicer蛋白的活性位点上解离,然后与DCR-2-R2D2二聚体相结合。

不过,虽然AGO1蛋白比较倾向于结合序列中部有错配情况的小RNA分子,但是有大部分没有错配情况的miRNA-miRNA*双链分子同样能够与含有AGO1蛋白的RISC复合体结合,这说明AGO1结合途径是有选择性的,它不会毫无保留地完全接受被AGO2蛋白“筛掉”的小RNA分子。

小RNA分子5'端是由哪种碱基组成的,这些碱基的磷酸化情况如何等等这些信息也能够影响Argonaute蛋白与小RNA分子结合的情况。在拟南芥中,因为所有的miRNA都只由一种特定的Dicer酶——DCL1蛋白生成,然后再由不同的Argonaute蛋白对这些小RNA分子进行分选、结合,因此这些小RNA经由Dicer蛋白处理的过程和它们与Argonaute蛋白结合的过程不是藕联的,这一点与黑腹果蝇体内的情况完全不同。在拟南芥中,miRNA和反式作用siRNA(ta-siRNA)这种负责调控植物发育的小RNA分子的5'端通常都是由尿嘧啶组成的,因此倾向于与AGO1蛋白结合(图2b)。相反,AGO2蛋白则倾向于与5'端是由腺嘌呤碱基形成的小RNA分子结合。而AGO5蛋白则倾向于与5'端是由胞嘧啶碱基形成的小RNA分子结合。

有意思的是,如果miRNA双链中一条链的5'端是腺嘌呤碱基,另一条链的5'端是胞嘧啶碱基,那么它们会分别与AGO2蛋白和AGO5蛋白结合。于是我们提出了一个假设,即Argonaute蛋白与小RNA分子之间的结合亲和力是由小RNA分子5'端的碱基决定的。虽然在植物细胞中这条规律似乎屡试不爽,但是仍然有例外情况出现:拟南芥中有一种miRNA叫做miR-172,它的5'端是由腺嘌呤组成的,但是它却倾向于与AGO1蛋白相结合。另一种5'端是由腺嘌呤组成的miRNA,叫做miR-390,它则倾向于与AGO7蛋白相结合。因此,这种5'端决定机制似乎不是唯一的一种决定机制。

秀丽隐杆线虫似乎采用另有一种机制来生成次级siRNA。通过这条机制产生的小RNA分子能特异性地与SAGO蛋白结合。这些次级siRNA分子的5'端携带一个由三磷酸基团修饰的碱基,这是RdRP反应特有的产物,这些次级siRNA分子可能就是通过这个独特的标志来与SAGO蛋白

相结合，而不是与RDE-1蛋白等初级Argonaute蛋白结合的。

在粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 和秀丽隐杆线虫体内的Endo-siRNA (包括前面刚刚提到的次级siRNA) 双链分子都具有非常明显的单链偏好性 (strand bias)，即在这些小RNA双链分子中，只有RdRP酶根据目的RNA链为模板合成的反义siRNA单链才能结合到含有Argonaute蛋白的复合体上。这是因为如同图2c中所示的那样，秀丽隐杆线虫体内的RdRP酶可以以一种不需要引物的方式根据目的RNA链为模板合成小RNA分子。这样生成的所有的次级siRNA分子都具有负极性 (negative polarity)，可以进一步加强对目的mRNA分子的沉默作用。粟酒裂殖酵母同样存在这种单链偏好性的原因可能是由于它体内存在另一种不同于秀丽隐杆线虫体内的RdRP机制。在粟酒裂殖酵母中，Dicer蛋白会与一个含有RdRP酶的名为RDRC的复合体以及另一个含有Argonaute蛋白的名为RNA诱导的转录沉默复合体 (RNA-induced transcriptional silencing complex, RITS) 的复合物相结合，从而在Dicer蛋白切割RdRP酶产物的同时促进siRNA分子定向与Argonaute蛋白相结合，并剪切由RdRP生成的dsRNA产物，通过这种方式形成反义链偏好性。这说明，Dicer蛋白的酶切极性决定了siRNA单链分子在与Argonaute蛋白相结合时表现出来的极性。

Argonaute蛋白随着进化的历程表现出了明显的多样性，形成了各种功能。根据我们前面所述的Argonaute蛋白对小RNA分子分选功能的描述我们可以推测，Argonaute蛋白功能方面的多样性可能是它们与不同小RNA分子相结合之后产生的结果。我们可能可以根据Argonaute蛋白的构象来判断它们会与哪种小RNA分子结合，但首先，我们还得弄清楚真核生物Argonaute蛋白的构象。

3. RNA沉默途径中的“卫兵”

在RNA沉默途径中，Argonaute蛋白这种没有序列特异性的RNA结合蛋白可以与各种不同序列小RNA向导链相结合，形成有沉默功能的RISC复合体。因此这条途径还需要一个“卫兵”或者“看门人”构成一套监视系统，以确保Argonaute蛋白是与小RNA分子相结合，而不是降解这些效应分子，导致“脱靶”效应发生。目前看来，这种监视系统主要是通过小RNA向导链分子特异性的结构特征来形成的。

如前所述，Dicer蛋白可以帮助siRNA分子结合到RISC复合体上，防止siRNA合成之后漫无目的地在胞质中“游荡”。Dicer蛋白的这种功能也许还能够帮助鉴别哪些是真正的siRNA分子，哪些是无用的RNA降解产物。由Dicer蛋白这类RNaseIII酶生成的小RNA产物具有特异性的5'端单磷酸基团和3'端二碱基突出末端。Argonaute蛋白的PAZ结构域在这条监视途径（即区分哪些是真正的siRNA分子，哪些是其它无用的RNA降解产物）中可能是第一个发挥作用的，因为它能够与小RNA产物特异性的3'端二碱基突出末端相结合。另外，小RNA分子向导链要能够与RISC复合体结合并诱导目的mRNA分子降解也需要其5'端具备单磷酸基团。在人体中，siRNA分子5'端的磷酸化修饰过程是CLP1酶作用的结果，CLP1酶还在mRNA 3'端生成过程和tRNA剪切过程中发挥了作用。有意思的是，tRNA剪切过程和mRNA 3'端生成过程都发生在核内，这说明5'端有羟基基团的siRNA双链分子是被转运或弥散到核内的，然后在经由CLP1酶磷酸化修饰之后再进入胞质中与RISC复合体结合。

RNA沉默信号在扩增过程中还需要同时注意避免将危险的“脱靶”信号也一同放大了。比如，piRNA生成过程中发挥重要作用的ping-pong循环机制就不会导致过度的RNA沉默，因为RdRP酶只会根据目的mRNA分子上游或下游的起始触发区域（initial trigger region）来互补生成siRNA产物。ping-pong循环机制只会保守地扩增功能性的初级piRNA序列（即来自生殖细胞的序列）。不过，我们也能够预测，任何RdRP酶生成的脱靶信号同样会导致沉默连锁反应或过度沉默效应，导致非常严重的后果。因此，细胞必须能够防止RdRP酶“被滥用”。基于RdRP酶的信号扩增途径有一个非常明显的特征，那就是该途径只在靶标出现时才会发挥作用，这也就是说只有在真正需要扩增信号时该途径才会被启动。在秀丽隐杆线虫中对触发沉默途径的dsRNA的处理和促进初级siRNA与含有RDE-1蛋白复合体结合的效率似乎都不怎么高，这也就限制了含有RDE-1蛋白的复合体对靶标第一轮的识别，从而尽量将脱靶信号的扩增概率降到了最低。另外，每一个次级siRNA分子似乎都是由非持续性的、能够自由抑制的RdRP酶生成的，因此这也能够避免发生过度的沉默效应。细胞内还有一种机制，那就是能够与次级siRNA结合的SAGO蛋白上缺乏能够降解mRNA分子的活性位点，这样就能够抑制沉默信号的放大。不过，细胞内生成的SAGO蛋白比较有限，因此它们所能发挥的限制作用也不够强大。

在粟酒裂殖酵母和秀丽隐杆线虫体内的RNA干扰途径中还有一个负向调控因子，那就是保守的siRNA核酸酶，这条调控途径也被称作增强型RNAi途径（enhanced RNAi）。在粟酒裂殖酵母和秀丽隐杆线虫体内保守的siRNA核酸酶分别是Eri1蛋白和ERI-1蛋白。在粟酒裂殖酵母中，转基因沉默（transgene silencing）途径与类似于酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）体内的TRAMP复合体的一种复合物有关。该复合体负责在核内发挥监视作用，主要降解来自外来体（exosome）的异常转录产物。因此，粟酒裂殖酵母体内的RNAi途径是被严密监控的，它只能对细胞基因组转录产物发挥作用，从目前研究结果来看，该途径似乎受制于RNA质控系统。

4. RISC复合体的靶标感知模式和效应模式

当RISC复合体与小RNA分子的向导链结合之后，它又是如何发现靶标mRNA的呢？绝大部分RISC复合体与靶标mRNA之间的结合能（binding energy）都来自于小RNA分子种子区的核苷酸。看来RISC复合体之所以能够被靶标识别并结合主要是因为RISC复合体在通过小RNA分子5'端种子区与靶标发生特异性的结合之后表现出来的对ssRNA具有固有的、非特异性的亲和力。但是，靶标的可结合性是直接与其降解效率相关的，这说明RISC复合体并不能够打开RNA分子的二级结构。

在细胞内，mRNA分子均与核蛋白（ribonucleoproteins, RNP）结合在一起，以复合体的形式存在，因此mRNA分子的可识别性还会受到几种RNA结合蛋白的影响，因为这些蛋白有可能会遮蔽mRNA分子的结合位点或者打开mRNA分子的二级结构。因此，RISC复合体的作用似乎就是根据结合的靶标而定的，它的作用模式不仅会受到靶标mRNA分子上用来与小RNA分子结合的位点结构的影响，还会受到与每一个Argonaute蛋白结合的RNA结合蛋白的影响。比如，在动物体内，miRNA至少可以通过作用于靶mRNA 3'端非翻译区里的结合位点的三条各不相同的途径来沉默基因表达，即切割mRNA靶标分子、抑制mRNA靶标分子的翻译表达，或降解mRNA靶标分子。

不过，对于每一个单独的miRNA-mRNA沉默复合体来说，由抑制翻译和直接降解而造成的基因沉默效果并不相同。此外，最终的沉默效果可能还会受到其它能够与靶mRNA或RISC复合体发生相互作用、抵消miRNA的蛋白质的影响。这样，每种组织因其所含蛋白的不同，导致了完全不同的调控结果。

5. RNA沉默途径的调控措施

本文到这里，对于RNA沉默途径的介绍基本结束了，大家应该从图1和图2中获得了关于RNA沉默途径的相关知识。不过，为了更进一步了解RNA沉默过程，我们还有必要介绍一下该途径里的调控机制。我们已经知道各种不同的RNA沉默途径之间存在竞争关系，比如黑腹果蝇中的endo-siRNA和miRNA之间就相互竞争LOQS。这种竞争机制就是RNAi途径中决定每一个阶段里如何发生调控的关键步骤。很多植物和动物病毒都会编码抑制蛋白来抑制宿主细胞的RNAi途径，使得这些调控机制无法在各个不同阶段发挥正常作用。细胞的蛋白质同样也能够调控RNAi。比如，在人体胚胎细胞中，miRNA let-7分子（一种抑癌分子，同时也是一种细胞周期调控分子）的生成过程就是一条转录后被抑制的过程，该途径被多潜能因子LIN28所抑制。LIN28蛋白可以阻止pri-let-7分子在微处理器复合物中的剪切过程及后续由Dicer蛋白负责的pre-let-7前体分子的处理过程。不过，人体同时存在另一条路径。转化生长因子 β （TGF- β ）和生长因子家族中的骨形成蛋白（BMP）都能促进miR-21这种促癌分子的生成。这是因为这些蛋白能够促进DROSHA将pri-miR-21转化成pre-miR-21。更确切地说，SMAD蛋白家族成员TGF- β 和BMP信号转换因子与RNA解旋酶p68组成的复合物一起被招募至pri-miR-21，促进pre-miRNA形成。另外，不均一核糖核酸RNP A1蛋白（heterogeneous nuclear RNP A1, hnRNP A1）这种著名的前体mRNA分子剪切调控因子也会帮助DROSHA发挥作用，有效地生成pre-miR-18，这可能是由hnRNP A1蛋白能够重新折叠发夹结构，或者直接与pri-miRNA结合，为DROSHA构建出一个酶切位点而造成的。这也说明在pri-miRNA分子中，某些发夹结构可能是在pri-miRNA分子与RNA伴侣蛋白结合之后才会形成并被剪切的。

RISC复合体的活性同样能够被调控。在拟南芥中，非编码基因IPS1中含有的一段基序能够与miR-399序列互补，但是它们之间的互补配对过程却被该miRNA分子中酶切位点处的一段错配形成的环状结构给破坏了。这样，IPS1基因的mRNA产物不仅没能被miR-399降解，反而还大量“扣押了”miR-399分子。因此，如果IPS1基因大量表达会使得胞内“积聚”大量miR-399分子的靶标——PHO2基因mRNA。这种靶标之间的相似性会给RNA调控网络带来不可预料的复杂性。我们预测，最近在人体细胞中发现的大量mRNA样非编码RNA分子（mRNA-like non-coding RNA）可能会在小RNA-Argonaute蛋白复合体调控过程中起到“减速器（attenuator）”的作用。

6. 前景展望

最近的研究成果告诉我们，在人体细胞中存在大量的与miRNA和siRNA类似的小RNA分子，这些新发现的小RNA分子都有可能参与人体基因表达调控过程。因此，将来的发展方向我们也就很清楚了。

新一代
测序技术很快
就能帮助我们
解右边的问
题

到底存在多少种小RNA分子？

这些小RNA分子是怎么产生的？

它们的生物学功能是什么？

这些RNA调控机制又是如何被调控的？

多种小RNA分子的5'端或3'端会被修饰，那么现有的测序技术能够应付细胞里所有的小RNA分子吗？

我们还会面临一大挑战，那就是弄清楚RNA结合蛋白是如何影响小RNA干扰途径最终的调控结果的。这是因为细胞内的RNA通常都是以与各种蛋白质相结合的方式存在的。这些蛋白可以调控基因表达。比如，我们借助结合了免疫沉淀技术和高通量测序技术的体内全基因组技术（genome-wide in vivo approach）来研究蛋白质-mRNA相互作用，并找出与RNP复合体相互结合后能抑制基因表达的mRNA上的结合位点。

最后，RNA沉默途径中活性和特异性的变动也会令基因表达出现定量和定性突变，从而形成一套全新的基因表达调控网络。这种变动会影响多个过程，甚至包括人类进化过程。由于所有的脊椎动物几乎都有同样数目的编码基因，因此我们很难从这个方面进行判断。我们在秀丽隐杆线虫体内发现的第一个RNA——miRNA lin-4，一个可以调控参与秀丽隐杆线虫的发育进程的基因。与其它的哺乳动物不同，人类大脑在出生后还会以胎儿期的生长速度继续发育，因此人体大脑是我们研究发育时期出现突变的绝佳材料。很多人都想知道如果我们改变了大脑的发育速度是否会让人类进化成另一个新物种。

原文检索：

Haruhiko Siomi & Mikiko C. Siomi. (2009) On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457(22):396-404.

 筱玥/编译

二、RNA干扰三维分子机制研究

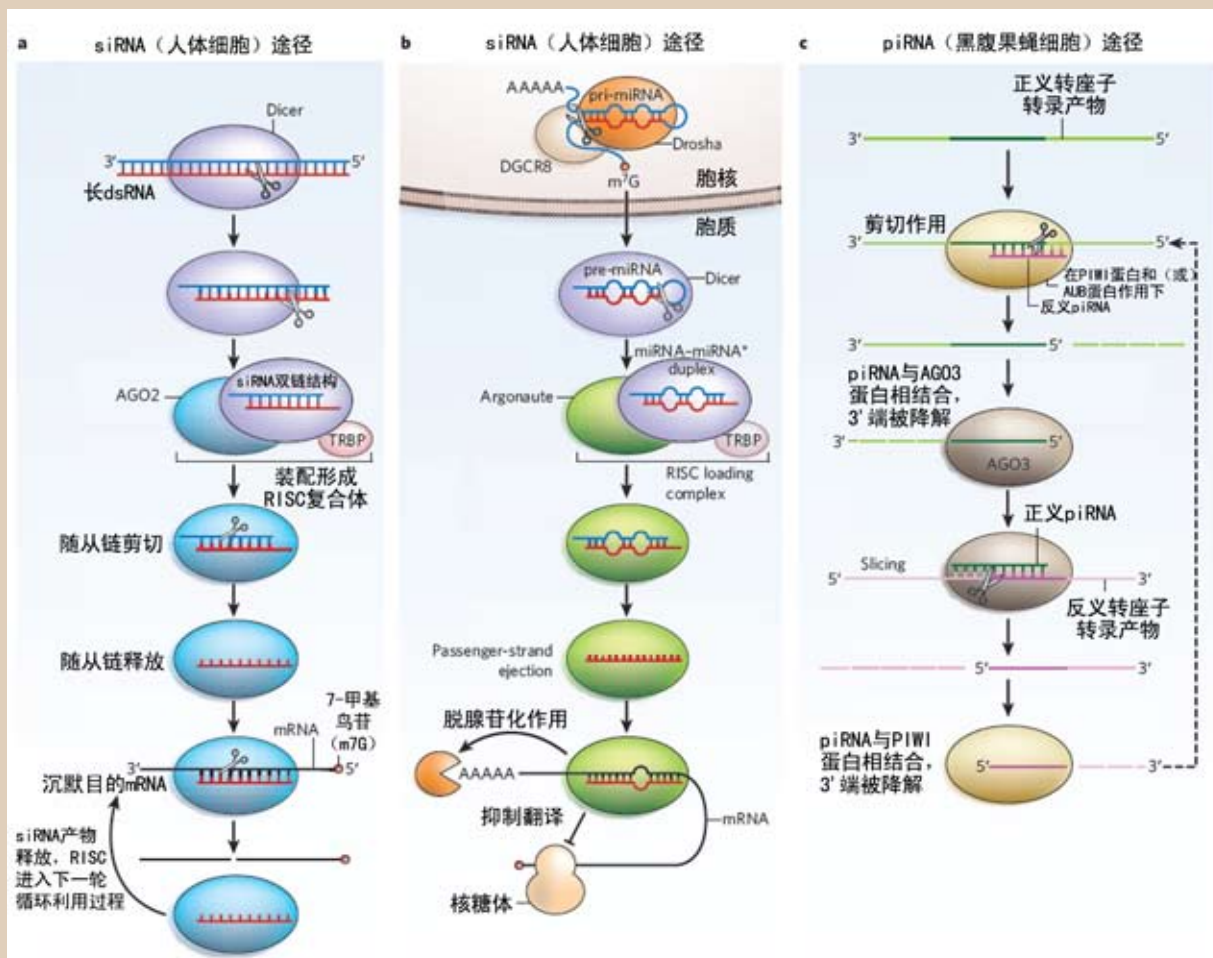
真核生物细胞会利用小非编码RNA (small non-coding RNA) 调控基因表达, 控制细胞代谢、生长及分化进程, 从而维持细胞基因组的完整性, 并帮助细胞对抗病毒以及其它各种“漂移的”遗传物质的侵袭和干扰。细胞主要依靠两种特殊的核糖核酸酶——Dicer酶和Argonaute蛋白来行使上述功能, 它们可以调控细胞小调控RNA (small regulatory RNA) 的生成及其功能。Dicer酶可以剪切dsRNA前体物质, 在胞质中生成小干扰RNA和miRNA。这些小RNA分子生成之后就被“转交”给Argonaute蛋白, 在Argonaute蛋白的帮助下以序列特异性互补的方式沉默某些mRNA分子的表达, 其作用机制既可以是直接将该mRNA分子酶切降解, 也可以是抑制其翻译。因此, 更多地了解Dicer酶和Argonaute蛋白的分子结构信息以及它们与小RNA分子之间的结合及解离情况都能够告诉我们更多有用的信息, 帮助我们更好地了解RNA沉默的分子机制。

在真核细胞中发现了RNAi机制及其相关小RNA介导的调控通路在基因表达沉默方面所具有的重要地位之后, 我们对于基因表达调控机制的理解产生了深刻的变化。据估计, 至少有30%的人类基因表达受到了小RNA分子当中的miRNA分子的调控。在牵牛花 (petunia)、线虫 (nematode)、果蝇 (fruitfly)、斑马鱼 (zebrafish) 以及小鼠等多个物种当中, 如果在编码蛋白或RNAi途径中所需的各种小RNA分子的遗传区域里发生了突变, 将会对细胞的生长和发育产生严重, 有时甚至是致命性的后果。这些发现也让我们产生了很多疑问, 比如细胞为何会进化出这种在各物种间广泛分布的, 依靠RNA分子来介导的基因表达调控机制? 这种机制又是如何进化发展的? 这种基因表达调控机制又是如何帮助细胞在各种内部和外部刺激因子的作用下面对细胞的基因表达进行精细调控的呢?

RNA干扰以及相关的基因表达沉默途径都是由只有20~30 nt的小RNA分子启动的, 这些小RNA分子中含有与受其调控的靶标序列互补的序列。这些小RNA分子主要分为三大类, 分别是小干扰RNA (siRNA)、微小RNA (miRNA) 以及PIWI相结合RNA (piRNA)。在背景知识框1中我们将详细的介绍上述三种小RNA分子的来源情况以及它们的作用机制。

各种生化研究以及结构生理学研究都已经非常详细地向我们揭示了RNAi途径的分子机制以及该途径可能的进化历程。有文献从结构学的角度向我们介绍了病毒通过抑制宿主细胞的RNAi途径来帮助自身复制传播的机制。本文主要关注两种核糖核酸酶——Dicer和Argonaute。其中, Dicer在siRNA和miRNA合成途径当中主要起到分子尺的作用, 而Argonaute则是一种广泛存在的, 在RNA分子指引作用下对RNA靶分子发挥剪切或抑制作用的蛋白。最近, 有科学家运用上述两种核糖核酸酶的分子结构信息来深入解析RNA沉默的分子机制。

背景知识框1：几种主要小RNA调控分子的合成途径及其作用机制



小调控RNA分子是一种非编码RNA分子，它们能够以序列特异性的方式沉默目的RNA。从图a中可以发现，siRNA可以通过核酸内切酶的切割作用来下调目的RNA的丰度，从而达到RNA干扰的目的，而且图中每一条RNA分子的大小并不一致。siRNA这种小RNA分子来源于长dsRNA分子，这些前体分子可能是RNA病毒的复制产物，也有可能是聚合的细胞基因转录产物或者是其它外源性转入的遗传物质、自我退火配对的转录产物或实验中转染的实验材料等。

核酸内切酶Dicer能够起到分子尺的作用，按照21~25 nt的距离来切割dsRNA。经Dicer酶剪切之后，siRNA双链产物当中的一条链，即向导链会与RISC中处于核心位置的Argonaute蛋白相结合。在图中为了简化起见，我们就以Argonaute蛋白来替代RISC复合体了。siRNA与Argonaute蛋白的结合发生在RISC复合体当中，RISC复合体由Argonaute蛋白、Dicer蛋白、dsRNA结合蛋白（该蛋白在人体细胞中名为TRBP蛋白）等三种组分构成。在siRNA与Argonaute蛋白的结合过程中，随从链会被Argonaute蛋白切割、释放出来。然后，Argonaute

续下

接上

背景知识框1：几种主要小RNA调控分子的合成途径及其作用机制

蛋白会在向导链的“指引”下找到目的RNA（即能够与向导链互补配对的RNA），并将之切割、降解，然后释放出来。这样RISC复合体又能进入下一轮RNA沉默途径，继续发挥作用。

miRNA分子是由细胞基因组自身编码产生的。植物细胞中的miRNA分子和siRNA分子一样，可以介导剪切方式来沉默目的mRNA分子，但是动物细胞中的miRNA则不是通过剪切途径来达到RNA沉默目的的，详见图b。miRNA分子由细胞内源性的、名为初级转录产物，即pri-miRNA的miRNA基因转录而来。pri-miRNA含有一个长约65~70 nt的茎环结构。核内pri-miRNA的发夹结构会被Drosha-DGCR8复合体切除，从而生成miRNA前体分子，即pre-miRNA。然后pre-miRNA转移到胞质中，在Dicer酶的切割作用下生成miRNA-miRNA*双链产物。其中miRNA相当于向导链，miRNA*相当于随从链。然后向导链与Argonaute蛋白相结合。通常情况下，动物细胞的miRNA都只能与目的mRNA分子3'端非翻译区的序列部分互补，所以这种不完全互补产物就无法通过Argonaute蛋白进行切割、降解。

另外，还有一些参与miRNA作用途径的Argonaute蛋白缺乏切割活性位点。我们目前还没有完全弄清楚miRNA分子介导的RNA干扰机制，但是我们认为该途径是通过抑制目的mRNA分子的翻译以及去除目的mRNA分子的多聚A尾（即脱腺苷化作用），并促使其降解的方式来完成RNA干扰作用的。

piRNA是一种长约24~31 nt的小RNA分子，它们见于哺乳动物生殖细胞，能够沉默转座子等“漂移”性遗传物质。我们对piRNA分子的来源和作用机制知之甚少。图c给出了黑腹果蝇细胞里piRNA的来源及作用机制模式图。piRNA的前体是一单链RNA分子，因为piRNA的合成不需要Dicer酶的参与。piRNA能够交替促使正义转座子转录产物和反义转座子转录产物被切割、降解。该过程由Argonaute家族成员PIWI蛋白负责完成。PIWI蛋白家族包括PIWI蛋白、Aubergine（AUB）蛋白和黑腹果蝇细胞中的Argonaute 3（AGO3）蛋白。在PIWI蛋白或者AUB蛋白介导的正义转录产物降解过程中会生成正义piRNA，这种正义piRNA产物能够与AGO3蛋白一起降解反义转座子转录产物，在这个过程中又会得到反义piRNA产物，然后它又能够与PIWI蛋白和AUB蛋白相结合降解正义转座子转录产物并生成正义piRNA。如此循环往复。



1. 小RNA分子生物合成的结构学信息

siRNA和miRNA分子的生物合成需要细胞在核酸内切酶的作用下对dsRNA前体分子进行切割。细胞内长dsRNA分子可能是RNA病毒的复制产物，也可能是细胞自身基因或者其它外源性的遗传物质的转录产物，还有可能是细胞内各种转录产物自身退火配对而成的产物。Dicer这种核酸内切酶属于RNaseIII家族，它能够将上述长dsRNA分子切割，形成长约21~25 nt的双链siRNA分子。而miRNA则源自各种细胞能够形成茎环结构的内源性的转录产物前体分子，即pri-miRNA（背景知识框1）。另一种属于RNaseIII家族的核酸内切酶Drosha可以在核内切割pri-miRNA分子当中的发夹结构，不过如果这种pri-miRNA分子没有在核内得到切割，转移到胞质当中之后，分子中的发夹结构就会在另一种核酸内切酶Dicer的作用下进行切割，形成长约21~25 nt的miRNA-miRNA*双链分子。其中miRNA链是反义链，也被称作向导链，miRNA*链是正义链，也称随从链。

siRNA和miRNA之所以能被有效地装载进RISC复合物，主要因为它们的两大大特征：dsRNA分子的长度和它们在5'端和3'端的特征，即分别在dsRNA分子的5'端和3'端各有一个单磷酸基团和一个突出的双核苷酸单链结构。最近对原核生物RNaseIII和真核生物Dicer酶进行的结构研究结果，向我们揭示了siRNA和miRNA分子的上述这两大特征是如何在Drosha和Dicer酶的作用下产生的。

1.1 RNaseIII家族

负责切割dsRNA的是RNaseIII家族蛋白，包括Drosha和Dicer。RNaseIII家族蛋白切割dsRNA之后会生成特征性的末端，即在5'端有一个单磷酸基团，在3'端有一个两个核苷酸突出的单链末端。我们在原核生物和某些真菌中发现了最简单的RNaseIII酶。这些酶含有一个RNaseIII结构域（该结构域具有催化活性），（通常还有一个dsRNA结合结构域（dsRBD）（图1a）。这些RNaseIII酶以同源二聚体形式发挥作用。在RNaseIII酶同源二聚体中，两个RNaseIII结构域会形成一个“处理中心”，其中每一个结构域负责水解dsRNA中的一条链。和这些最简单的RNaseIII酶不同，Drosha蛋白和Dicer蛋白都是单体蛋白，都含有两个首尾相连的RNaseIII结构域和一个dsRBD结构域。

图1b中向我们展示了原核生物嗜热菌（*Aquifex aeolicus*）来源的最简单的RNaseIII蛋白与一个已剪切的dsRNA产物组成的复合物的晶体结构。从图中可以看出两个催化结构域组成的同源二聚体形成了一个浅浅的裂隙，将两个活性位点分隔开来。每一个催化中心里都有一组保守的氨基酸残基位点，它们都能够结合一个镁离子。这些RNaseIII蛋白与底物结合时都会发生重构，使得dsRBD结构域能够“夹住”位于催化结构域二聚体上方的dsRNA底物。

1.2 Dicer

核酸内切酶Dicer可以将dsRNA底物（即长dsRNA和pre-miRNA）降解成特定长度，通常为21~25 nt的短dsRNA片段，即siRNA和miRNA。除了在C末端有两个保守的RNaseIII结构域和一个dsRBD结构域之外，Dicer的N末端通常还会有一个DEXD/H-盒结构域（DEXD/H-box domain），以及一个小的功能不明的DUF283结构域和一个PAZ结构域（图1a）。Argonaute蛋

白也含有PAZ结构域，它们能够特异性地与ssRNA的3'端相结合。

根据我们对单细胞真核生物兰氏贾第鞭毛虫 (*Giardia intestinalis*) 的Dicer蛋白晶体结构的研究表明，Dicer酶之所以能够形成特定长度的dsRNA产物是因为它的PAZ结构域和RNaseIII结构域之间具有一种特定的空间排布关系。兰氏贾第鞭毛虫的Dicer蛋白是一种天然的“向下倾斜(trimmed-down)”的酶，它仅由一个PAZ结构域和两个串联排布的RNaseIIIa结构域和RNaseIIIb结构域组合而成(图1a)。这种蛋白的结构就好像一把大斧，其中两个RNaseIII结构域组成了“斧子刃”，PAZ结构域则构成“斧子柄”(图1c)。RNaseIIIa结构域和PAZ结构域之间通过一条长(足有整个“斧子柄”那么长)螺旋结构相连。该螺旋结构由Dicer蛋白N末端的扁平结构域形成。两个RNaseIII结构域组成了一个分子内二聚体，这种结构与原核生物的RNaseIII同源二聚体结构非常相似(图1b)。在Dicer蛋白里，每一个RNaseIII结构域活性位点中的四个保守的氨基酸位点都会与两个金属离子相结合，这说明Dicer蛋白会利用“双金属离子”机制(two-metal-ion mechanism)来催化RNA降解反应。这两个金属离子之间的距离为17.5埃米，该距离刚好与dsRNA分子大沟的距离相吻合。研究dsRNA与Dicer蛋白结合过程后我们发现，dsRNA分子沿着Dicer蛋白N末端的扁平结构域形成的扁平表面移动，然后与Dicer蛋白里带有金属阳离子的氨基酸残基位点发生静电相互作用。如果这些位点发生突变，就会影响到Dicer蛋白对dsRNA的酶切活性。这说明这些带正电荷的氨基酸位点是Dicer蛋白与dsRNA底物之间相互结合的关键因素。

Dicer蛋白的PAZ结构域与后面将会介绍到的Argonaute蛋白的PAZ结构域具有相同的折叠形式和3'端突出的氨基酸残基结合位点。这个3'端突出的氨基酸残基结合位点和RNaseIIIa结构域之间的距离为65埃米，这段距离刚好与25 nt的RNA分子的长度相当(图1c)。而兰氏贾第鞭毛虫的Dicer蛋白在体外反应中生成的siRNA产物的长度刚好就是25 nt。Dicer蛋白所具有的这种结构特征刚好就是一把“分子尺”，被这把尺“裁剪”出的产物的长度刚好符合要求。Dicer蛋白首先将dsRNA底物因为非特异性切割而产生的3'端二核苷酸与其自身的PAZ结构域相结合，然后根据自身的“分子尺”长度在dsRNA固定位置处进行切割，形成小RNA分子的5'端。这种机制已经被兰氏贾第鞭毛虫Dicer蛋白缺失了PAZ结构域的截短体试验所证实。在体外实验中发现，缺失了PAZ结构域的兰氏贾第鞭毛虫Dicer蛋白能够生成长度各异的小RNA产物，而不是固定长度的小RNA产物。根据兰氏贾第鞭毛虫Dicer蛋白的晶体结构研究表明，蛋白中那段非保守的链接螺旋结构的序列长度是决定小RNA产物分子长度的关键，这可能就是导致不同物种小RNA分子长度之间各有差异的原因。

我们最近才解析了仅仅只有RNaseIIIb和dsRBD这两个结构域的小鼠Dicer蛋白片段的晶体结构。研究发现，在小鼠Dicer蛋白与底物分子结合时，dsRBD结构域会发生在原核生物RNaseIII中观察到的那种构象改变现象。另外，我们在体外试验中还发现，缺失了dsRBD结构域的人体Dicer蛋白的截短体对RNA底物的切割能力也会大大降低，但是其底物结合能力不会受到影响。大部分Dicer蛋白都含有一个DEXD/H盒结构域。这些结构域广泛见于各种参与依赖ATP的核酸结合或重构反应的蛋白质间。虽然有一些无脊椎动物的Dicer蛋白，比如黑腹果蝇的DCR-2蛋白等似乎也需要ATP的帮助来完成长链dsRNA底物切割反应，但是哺乳动物的Dicer蛋白似乎并不需要ATP的参与。对野生型和突变型人Dicer蛋白进行酶切动力学分析，结果表明DEXD/H盒结构域可能具有自我抑制功能(auto-inhibitory function)，因为如果去掉这个结构域会加快酶切速度。这说明DEXD/H盒结构域使得Dicer蛋白形成了一种不利于酶切反应进行的构象，因此必须在进行酶切反应前改变这种构象。我们还需要对全长Dicer蛋白与其底物共同形

成的复合体的结构和生化功能进行更加深入的研究，这样才能发现DEXD/H盒结构域在小RNA分子与RISC复合体结合时是否真的参与了Dicer蛋白和底物的结合反应以及底物dsRNA分子的解旋反应。

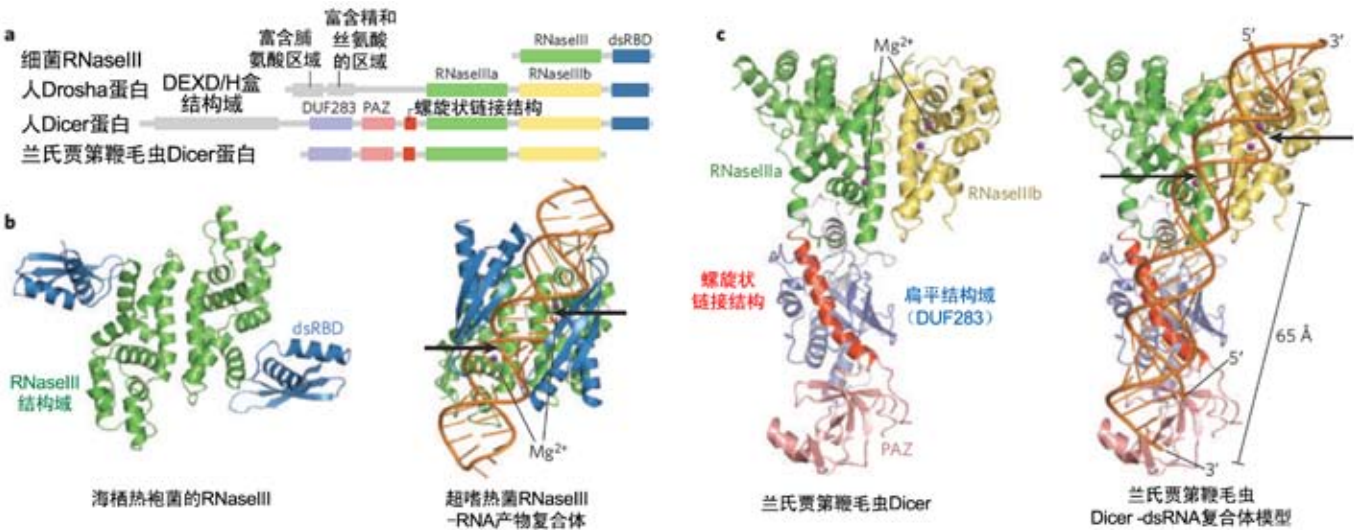


图1 RNaseIII家族蛋白结构图。a, RNaseIII家族蛋白结构域结构示意图。b, 在dsRNA与原核生物RNaseIII相结合时互相诱导契合模式图。图中所示为I类RNaseIII同源二聚体分子。图中左侧表示的是海栖热袍菌的RNaseIII蛋白 (PDB数据库查询序列号1O0W) 在没有与RNA底物结合时的晶体结构。图中右侧表示的是超嗜热菌的RNaseIII (PDB数据库查询序列号2EZ6) 在与RNA底物结合时的晶体结构。图中蛋白结构域的颜色与a中标注一致, RNA底物以金色表示。镁离子以紫色小球表示。图中箭头所示为酶切作用位点。在这些模式图中, 我们可以清楚看到蓝色标注的dsRNA结合结构域, 即dsRBD结构域在与底物结合时会发生明显的旋转。c, 兰氏贾第鞭毛虫Dicer蛋白切割dsRNA底物机制模式图。图中左侧所示为兰氏贾第鞭毛虫Dicer蛋白 (PDB数据库查询序列号2FFL) 晶体结构, 右侧为结合了RNA底物之后的复合体结构。在该模型中, RNA底物的3'端突出序列与Dicer蛋白的PAZ结构域相连接, 然后在65埃米距离处被切割, 形成产物的5'端。图中图片均使用PyMol (<http://www.pymol.org>) 软件制成。

1.3 Drosha蛋白和“微处理器复合体”

作为RNaseIII家族成员的Drosha蛋白可以催化pri-miRNA分子起始处理步骤, 生成pre-miRNA分子。pre-miRNA分子呈发夹结构, 它的5'端有磷酸化修饰基团, 3'端有二个碱基的部分突出单链。Drosha蛋白是一种核蛋白, 它由富含脯氨酸的区域以及富含精氨酸和丝氨酸的区域组成的N末端和两个RNaseIII结构域和一个dsRBD结构域组成 (图1a)。纯化的Drosha蛋白可以非特异性地切割dsRNA, 它必须在名为“微处理器复合体 (microprocessor

complex)”中的DGCR8蛋白（即无脊椎动物体内的PASHA蛋白）的辅助下才能特异性地切割pri-miRNA分子。DGCR8蛋白能够与pri-miRNA分子中形成发夹结构的碱基结合，帮助Drosha蛋白定位到酶切位点处，即pri-miRNA分子茎部距离位于双链茎部和侧翼ssRNA序列之间的连接部位的11bp处。因此，DGCR8蛋白似乎是一个反式作用决定因子（trans-acting specificity determinant），其作用类似于Dicer蛋白里的PAZ结构域，只不过PAZ结构域是顺式作用因子。我们现在还不清楚Drosha蛋白的分子结构，但是由dsRBD结构域串联组成的人类DGCR8蛋白核心区域的结构最近已经得到了解析。研究发现，该核心区域里与RNA结合的两个dsRBD结构域的结合表面是不连续的，这说明DGCR8蛋白是分别与pri-miRNA分子茎环结构中不连续的两个部分结合的。

2. Argonaute蛋白结构与功能之间的关系

RNA干扰以及所有由小RNA分子介导的基因表达沉默机制都有一个共同的特点，那就是会有一个负责沉默作用的小RNA分子（在本文中我们称这个分子为向导链）与Argonaute家族蛋白发生相互作用。这种RNA-Argonaute蛋白复合体就构成了RISC复合体里最基本的，也是最为核心的效应元件。在RISC复合体中，小RNA分子起到这样的作用：通过碱基互补配对原则，以序列特异性的方式引导Argonaute蛋白与靶标分子结合。mRNA的这些靶标分子被Argonaute蛋白识别之后会被切割或者抑制翻译，最终被细胞降解。

Argonaute蛋白在进化过程中演变出了各种亚科蛋白。这些亚科蛋白可以识别各种不同类型的小RNA分子，从而在各种小RNA沉默途径中发挥作用。siRNA和miRNA都能与Argonaute亚科蛋白AGO蛋白结合，但是piRNA则与Argonaute亚科蛋白PIWI蛋白结合。在经典的由siRNA分子介导的RNAi途径中，Argonaute蛋白可以用内切核酸酶活性来沉默mRNA靶分子，这种过程被称作切割。在生殖细胞中，面对各种外来的遗传物质，Argonaute亚科蛋白PIWI蛋白在piRNA介导的RNA沉默途径中，利用的也是切割机制。在进行切割反应时，目标RNA分子主要在磷酸基团处被切割，该处主要是对应向导链5'端开始第10和第11位碱基处磷酸基团处的位点。只有向导链和靶标链在切割位点处互补情况非常好，切割反应才能发挥作用。Argonaute蛋白也可以不依赖切割反应来达到沉默RNA的目的。在动物细胞的miRNA沉默途径中，Argonaute蛋白可以通过抑制目的mRNA翻译的办法，以及诱导目的mRNA发生脱腺苷化作用（deadenylation）后降解的方法来达到基因沉默的作用。不过，有关miRNA介导基因沉默的精细机制我们现在还不是非常清楚。

作为小RNA介导基因沉默途径里的效应分子，Argonaute蛋白必须要能够在与siRNA双链或miRNA-miRNA*双链分子结合时准确识别出小RNA向导链并与之结合，剔除掉没有功能的随从链和miRNA*链，然后依照向导链的指引发现目的RNA（背景知识框1）。在需要RNA切割机制参与的沉默途径中，Argonaute蛋白会被多次循环利用。在Argonaute蛋白循环识别靶标分子，进行切割反应，释放出产物的过程当中，向导链继续与Argonaute蛋白结合，不会脱

离。在多细胞动物miRNA的沉默途径里切割机制是通过一种不需要“切割机”的形式(slicer-independent manner)来发挥作用的,此时的Argonaute蛋白需要一直与靶标mRNA分子紧密结合,这样才能阻止其翻译。

2.1 功能结构域

Argonaute蛋白都是多结构域蛋白,其含有N末端结构域、PAZ结构域、MID结构域和PIWI结构域(图2a)。原核生物Argonaute蛋白的晶体结构表现出一个二叶状(bilobate)结构。MID结构域和PIWI结构域形成其中一叶,而N末端结构域和PAZ结构域形成另一叶(图2b)。Argonaute蛋白家族里的两个标志性的结构域——PAZ结构域和C末端的PIWI结构域最初都是用系统发生序列分析(phylogenetic sequence analysis)的方法发现的。对黑腹果蝇Argonaute蛋白中分离出来的PAZ结构域进行三维结构解析的结果表明,PAZ结构域的折叠情况比较类似于低聚糖/低聚核苷酸结合折叠结构域(oligosaccharide/oligonucleotide-binding-fold domain)和Sm折叠结构域(Sm-fold domain)的情况。我们得到的第一个全长Argonaute蛋白的晶体结构是极端嗜热菌(*Pyrococcus furiosus*)来源的Argonaute蛋白的晶体结构。该结构显示,曾被Lorenzo Cerutti等人认定为PIWI结构域的序列基序实际上是由MID结构域和PIWI结构域共同组成的。这两个结构域由被遮盖的Argonaute蛋白C末端中心部位非常保守的位点连接起来(图2b)。MID结构域与lac抑制子里的糖结合结构域比较相似。PIWI结构域的折叠方式则与切割RNA-DNA杂交分子的核糖核酸内切酶RNaseH比较类似。古细菌闪烁古生球菌(*Archaeoglobus fulgidus*)里的PIWI样蛋白Piwi的晶体结构表明该蛋白是由两个结构域组成的,即结构域A和结构域B,分别对应于MID结构域和PIWI结构域。超嗜热菌(*A. aeolicus*)的全长Argonaute蛋白的PIWI结构域也具有RNaseH样折叠情况。生化研究表明,原核生物的Argonaute蛋白和RNaseH一样,可以起到DNA引导的核糖核酸酶(DNA-guided ribonuclease)作用,而真核生物的Argonaute蛋白则具有RNA引导的核糖核酸酶(RNA-guided ribonuclease)作用。

2.2 切割活性

Argonaute蛋白的PIWI结构域具有RNaseH样的折叠情况,这说明Argonaute蛋白应该是具有切割活性的。和RNaseH酶一样,Argonaute蛋白同样也需要二价金属离子的辅助来完成切割反应,从而生成3'端是自由羟基基团的RNA产物的5'端,和5'端是磷酸基团的RNA产物的3'端。RNaseH酶的活性位点包括一个天冬氨酸-天冬氨酸-谷氨酸/天冬氨酸基序(Asp-Asp-Glu/Asp motif),而且正是这段基序与二价金属离子结合。同样,在极端嗜热菌Argonaute蛋白Ago的晶体结构中,我们也发现了镁离子,和与这个离子结合的天冬氨酸-天冬氨酸-组氨酸基序(Asp-Asp-His motif)(图2b)。在体内和体外实验中,将人体AGO2蛋白中的这段基序突变掉后证实了它对Argonaute蛋白切割功能的重要性,这也证明了Argonaute蛋白是RISC复合体发挥切割作用的关键元件。我们对粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)RITS复合体组分Ago1蛋白进行了类似的研究,结果发现Ago1蛋白的切割活性是完成转录沉默的关键。在AGO1、AGO2、AGO3和AGO4这四个人体Argonaute蛋白中,只有AGO2蛋白表现出了切割活性。AGO1蛋白和AGO4蛋白中的基序都和那段保守的天冬氨酸-天冬氨酸-组氨酸基序不同,不过AGO3蛋白含有这段保守序列,但是AGO3蛋白在体外试验中仍旧没能表现出切割活性。但是,最近有人发现含有天冬氨酸-天冬氨酸-组氨酸基序的黑腹果蝇PIWI蛋白表现出切割活性,这

说明PIWI蛋白在piRNA沉默途径里具有重要作用。黑腹果蝇AGO1蛋白和AGO2蛋白都有完整的天冬氨酸-天冬氨酸-组氨酸基序，也都具有切割活性。不过，AGO1蛋白的酶切效率要远远低于AGO2蛋白，这是因为AGO1蛋白释放产物的速度要远远低于AGO2蛋白，因而循环作用的速度也较慢。这些研究成果都表明，除了那段重要的序列之外，还有很多其它的因素都能够影响到体内Argonaute蛋白的切割效率。

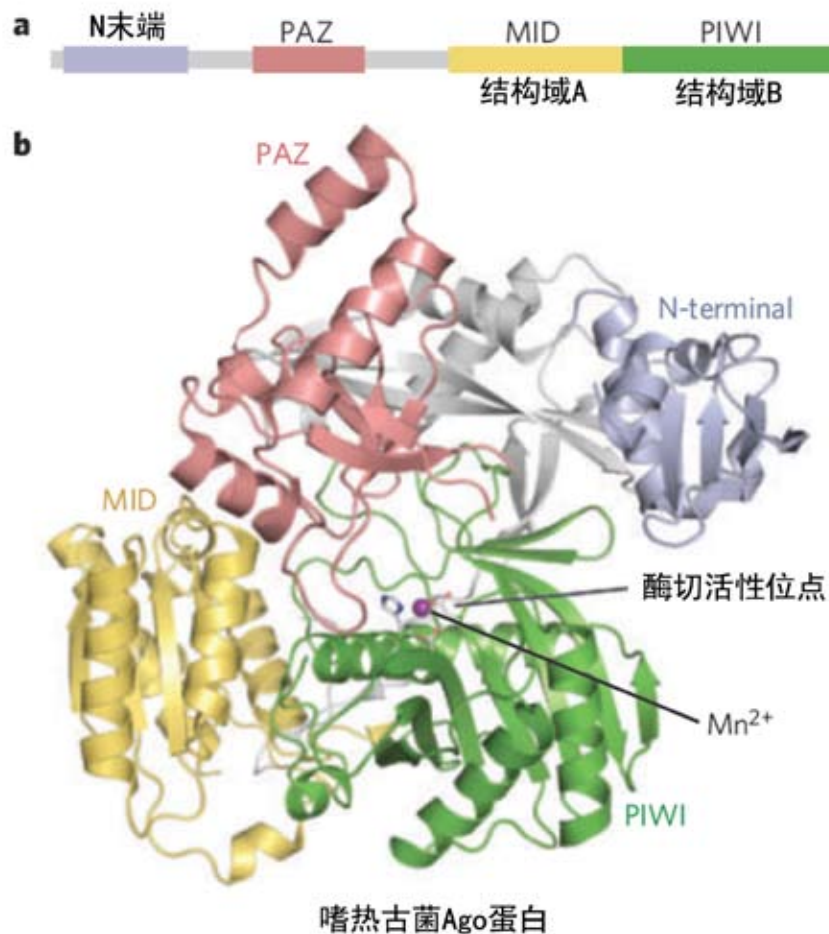


图2 Argonaute蛋白分子结构示意图。a，真核生物的Argonaute蛋白具有四个结构域：N末端、PAZ结构域、MID结构域和PIWI结构域。在某些情况下要特别注意闪烁古生球菌（*Archaeoglobus fulgidus*）Piwi蛋白的结构。其中MID结构域和PIWI结构域分别表示为结构域A和结构域B。b，结合了Mn²⁺离子的嗜热古菌（*Pyrococcus furiosus*）Argonaute蛋白Ago（PDB数据库查询序列号1Z25）的晶体结构示意图。该蛋白结构分为两部分，其中蛋白的N末端和PAZ结构域形成一部分，MID结构域和PIWI结构域则形成另外一部分。结合在活性位点处的金属离子以紫色小球表示。在酶切活性位点处与金属离子结合的氨基酸残基位点以小柱状结构表示。

2.3 识别RNA分子的末端

在siRNA和miRNA分子掺入RISC复合体的过程中需要对其5'端的磷酸基团和3'端的突出碱基进行处理。研究发现PAZ结构域具有RNA结合作用，它尤其能够识别ssRNA的3'端，这说明在RISC复合体中它可能起到了将向导链的3'端锚定起来的作用。对结合了siRNA样双链结构的人AGO1蛋白PAZ结构域晶体结构的解析，以及对结合了ssRNA寡核苷酸分子的黑腹果蝇AGO2蛋白PAZ结构域进行的磁共振结构的研究让我们能够对RNA识别机制进行更深入的研究。在这些结构当中，我们发现RNA分子3'端突出的碱基插入了PAZ结构域中一个沿保守的芳香族氨基酸残基形成的疏水口袋（图3a）。虽然这种相互作用缺乏序列特异性，但是3'端突出的末端碱基的确是保守的苯丙氨酸残基上的芳香族环发生了相互作用。

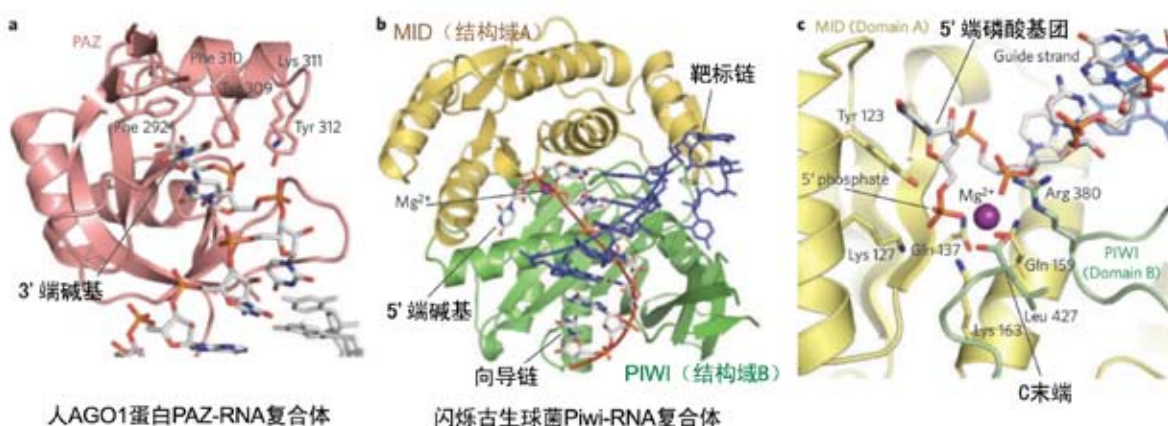


图3 Argonaute蛋白PAZ结构域和MID结构域识别小RNA分子末端机制模式图。a，人AGO1蛋白PAZ-RNA复合体晶体结构图（PDB数据库查询序号为1SI3）。图中带状结构为人AGO1蛋白PAZ结构域，小棍状结构为siRNA样双链分子。AGO1与RNA 3'端结合的保守氨基酸残基位点以小棍表示。siRNA 3'末端插入了AGO1的疏水口袋之中，其中3'端突出的碱基插入了第292位苯丙氨酸的芳香环。b，闪烁古生球菌Piwi-RNA双链分子复合体晶体结构示意图（PDB数据库查询序号为2BGG）。该dsRNA模拟了向导链与靶标链之间的相互作用。如图所示，闪烁古生球菌Piwi蛋白由MID结构域（结构域A）和PIWI结构域（结构域B）组成。图中红色骨架结构显示向导链5'端碱基与MID-PIWI结构域于交界处结合，它并不与蓝色的靶标链配对。c，详细展示了闪烁古生球菌Piwi蛋白中与RNA分子5'端结合的口袋结构。与Piwi蛋白C末端第427位亮氨酸和小RNA分子5'端结合的镁离子以紫色小球表示。图中小棍状结构表示的是Piwi蛋白中能够与镁离子和小RNA分子5'端结合的保守的氨基酸残基位点。Phe：苯丙氨酸；Lys：赖氨酸；Tyr：酪氨酸；Phe：苯丙氨酸；Gln：谷氨酸；Arg：精氨酸；Gln：谷氨酸；Leu：亮氨酸。

siRNA和miRNA分子5'端的磷酸基团是这些小RNA分子合成时形成的。这些磷酸基团对于siRNA和miRNA分子掺入RISC复合体也起到了至关重要的作用。而且这些5'端的磷酸基团还保证了切割反应的保真性，因为靶RNA上的切割位点是由它到向导链5'端磷酸基团的距离决定的。与一短链dsRNA（该结构模拟了RISC复合体中的向导链-靶标链双链结构）结合的闪烁古生球菌Argonaute蛋白Piwi的晶体结构表明，向导链5'端的碱基被扭曲了，因而无法与靶标链互

补配对（图3b）。这也刚好可以解释我们观察过的现象，即如果该位点发生了碱基错配也不会带来什么严重后果，反而可能会增强切割活性。向导链5'端的磷酸基团被深埋在MID结构域与PIWI结构域形成的口袋当中。在这里，它与一个镁离子结合，并且还与Argonaute蛋白的C末端相互作用（图3c）。如果四个金属离子结合位点以及5'端磷酸基团结合位点中的任何一个位点（这些位点都是Argonaute家族蛋白中最为保守的位点）发生突变，就会影响到Argonaute蛋白的切割活性。这也说明了Argonaute蛋白这个5'端磷酸基团结合口袋在绑定向导链过程中发挥了重要作用。

在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中，各种不同类型的非编码小RNA分子的5'端与各种不同的Argonaute蛋白相结合。拟南芥的AGO1蛋白主要与5'端是尿嘧啶的小RNA分子结合，而AGO2蛋白则主要招募5'端是腺嘌呤的小RNA分子。使用异源嵌合体蛋白进行的结构域交换试验（Domain-swap experiment）发现，Argonaute蛋白对小RNA分子5'端的碱基特异性是由MID结构域和PIWI结构域决定的。同样，主要与piRNA结合的PIWI蛋白比较倾向于结合第一个碱基是尿嘧啶的piRNA分子。因此，分别负责与不同小RNA分子结合的Argonaute蛋白的MID结构域和PAZ结构域可能是Argonaute蛋白在进化过程中不断适应的结果，这样小RNA分子可以根据其5'端和3'端被Argonaute蛋白分选。

2.4 RISC复合体装载过程

在siRNA和miRNA介导的基因沉默途径里，向导链与Argonaute蛋白的结合过程与向导链自身的合成过程紧密相连（背景知识框1）。最初，Dicer蛋白切割dsRNA，生成siRNA双链或miRNA-miRNA*双链产物，这些产物分子中5'端的热稳定性较差的那条链就是向导链。根据结合了siRNA样双链分子的闪烁古生球菌Piwi蛋白的晶体结构分析，我们发现向导链上的第一个碱基深埋在Piwi蛋白5'端磷酸基团结合结构域口袋里，不参与双链RNA分子配对，这说明这种向导链结合模式是高选择性的。Argonaute蛋白也可以促进这个选择过程，因为它能够降解随从链，促进其释放。不过，对于具有多个错配位点的RNA双链分子（这种情况在miRNA途径中比较常见）来说，它们不需要与Argonaute蛋白结合也能被切割。因此，AGO1、AGO3和AGO4等缺乏切割活性的人Argonaute蛋白同样能够结合miRNA分子。

RISC复合体装载过程发生在RISC装载复合体里。在人体细胞中，RISC装载复合体是由Argonaute蛋白、Dicer蛋白和含有dsRBD结构域的TRPB蛋白组成的。在体外实验中，这种三聚体可以切割pre-miRNA分子，装载正确的向导链，并切割目的RNA分子，所有这一系列反应都不需要ATP的参与。那么，TRPB蛋白在RNA分选和RISC装载过程中发挥了什么作用呢？在黑腹果蝇中，DCR-1蛋白能够与含有dsRBD结构域的LOQS蛋白结合，将pre-miRNA分子切割生成miRNA-miRNA*产物。而DCR-2蛋白与含有dsRBD结构域的R2D2蛋白组成的复合体则可以生成siRNA产物，并将它们装载到AGO2蛋白上。最近的研究表明，在黑腹果蝇中，siRNA和miRNA前体双链分子的结构和碱基配对的程度（即有无错配情况发生）都会决定向导链是否能够与AGO1蛋白或AGO2蛋白结合。DCR-2-R2D2复合体对配对精确的小RNA产物亲和力较高，这也就是在AGO2蛋白装载时表现出的小RNA分选效应的作用机制。

2.5 靶标确认

闪烁古生球菌Piwi蛋白-RNA复合体晶体结构里，向导链-靶标链双链分子位于一个保守的碱性通道里，这个通道横跨MID结构域和PIWI结构域表面（图3c）。从结构图中我们可以看出，

向导链上的第2~6位碱基序列暴露在外,它能够与靶标RNA分子配对。以往大量的计算机模拟实验和生化实验也都表明,向导链上的第2~8位碱基序列(即种子区域)是决定靶标识别特异性的重要区域,这与结构分析结果比较吻合。我们将靶标RNA上磷酸化位点所对应蛋白的酶切位点,对全长siRNA-靶标双链分子进行建模分析发现,特异性的酶切就发生在距离向导链5'端固定距离处的靶标分子上。只有在这个区域双链分子配对良好,才能进行酶切反应。根据模型推测,切割位点应该是位于第10~11位碱基处。

在全长Argonaute蛋白所形成的二叶结构内,向导链-靶标链双链分子与一个带正电荷的裂隙结合在一起,这个裂隙位于由PAZ-N末端结构域所形成的一叶结构和由MID-PIWI结构域所形成的另一叶结构之间。最近对结合了向导DNA链的全长极端嗜热细菌(*Thermus thermophilus*) Argonaute蛋白晶体结构进行了分析,结果发现了向导链与靶标链之间相互确认的分子机制。该Ago蛋白与一个5'端有磷酸化修饰的21 nt长的DNA结合形成了复合体,向导链以其5'端磷酸化基团与Ago蛋白的MID结构域结合,以其3'端与Ago蛋白的PAZ结构域结合(图4a)。通过与保守的精氨酸残基相互作用,向导链上第2~10位碱基形成了一个折叠的螺旋结构。因此,向导链种子区域提前与靶标链进行碱基配对(图4a)。在缺失靶标链时,向导链的第10、11位碱基是扭曲的,这说明在发现、确认靶标链时,向导链还会经历一个重构过程。

最近,在靶标链识别机制方面取得的进展来自极端嗜热细菌Ago蛋白、21 nt向导DNA链和20 nt靶标链组成的复合体的晶体结构信息,其中向导链和靶标链在第10~11碱基处有错配(图4b)。向导链和靶标链的末端分别都与各自的结合位点铆定在一起,这样就形成了Ago蛋白-向导链-靶标链复合体。向导链中的种子区域会通过Watson-Crick碱基配对原则与靶标链结合,形成一个A型螺旋结构。Ago蛋白为了适应装载于中心裂隙里的靶标RNA分子,也会发生一次明显的构象改变,形成一个更为开放的构象。这主要是通过旋转其N末端结构域和PAZ结构域,使它们远离MID结构域和PIWI结构域完成的。

构的人AGO1蛋白PAZ结构域晶体结构的解析,以及对结合了ssRNA寡核苷酸分子的黑腹果蝇AGO2蛋白PAZ结构域进行的磁共振结构的研究让我们能够对RNA识别机制进行更深入的研究。在这些结构当中,我们发现RNA分子3'端突出的碱基插入了PAZ结构域中一个沿保守的芳香族氨基酸残基形成的疏水口袋(图3a)。虽然这种相互作用缺乏序列特异性,但是3'端突出的末端碱基的确是保守的苯丙氨酸残基上的芳香族环发生了相互作用。

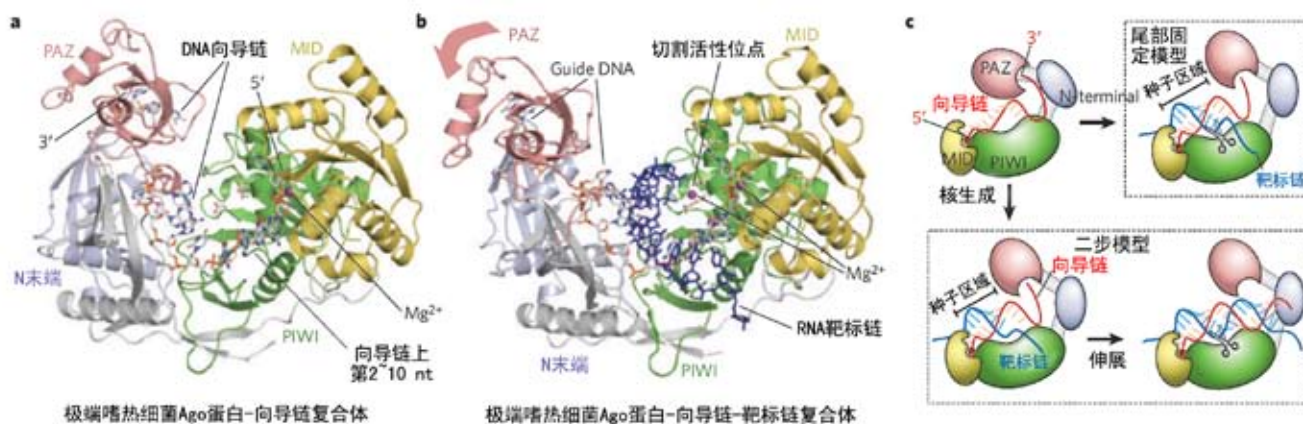


图4 Argonaute蛋白识别向导链和靶标链过程示意图。a, 极端嗜热细菌Ago蛋白-21 nt 5' 端磷酸化修饰向导链复合体晶体结构示意图 (PDB数据库查询序号为3DLH)。图中带状结构表示Ago蛋白, 小棍状结构表示DNA链。图中可以见到以小棍状结构表示的DNA向导链上第1~11和第18~21位核苷酸。向导链5' 端的磷酸化基团与Ago蛋白的MID结构域结合, 3' 端与Ago蛋白的PAZ结构域结合。b, 极端嗜热细菌Ago蛋白-21nt 5' 端磷酸化修饰向导链-20 nt RNA靶标链复合体晶体结构示意图 (PDB数据库查询序号为3F73)。图中所示结构方向与图a中保持一致, 只不过加上了PIWI结构域。图中蓝色的靶标RNA分子和灰色的向导DNA分子都以小棍状结构表示。箭头表示结合了靶标RNA分子的PAZ结构域和N末端结构域正在发生的构象变化。c, 有关Argonaute蛋白与靶标分子识别的两种模型。尾部固定模型认为向导链的两端在Argonaute蛋白进行切割时都会保持与Argonaute蛋白的结合状态。二步模型认为向导链中的种子区域会发生二步变化。第一步, 与靶标分子配对, 发生核形成; 第二步, 促使更多的向导链序列与靶标链序列配对, 致使向导链的3' 端与PAZ结构域解离。

我们现在已经有了Argonaute蛋白识别并切割靶标RNA分子的两种模型, 即尾部固定模型 (fixed-end model) 及二步模型 (two-state model)。

尾部固定模型

该模型认为, 在Argonaute蛋白进行切割反应时, 向导RNA链的两端都会保持与Argonaute蛋白结合的状态。但是, 这样就给向导链与靶标链之间的相互作用带来了拓扑学方面的限制, 因为只有一个螺旋之内, 即11个碱基对距离上的螺旋结构才能满足这种要求, 也就像种子区只有6个碱基长 (第2~8个碱基序列) 一样

二步模型

该模型认为, 靶标链是先与向导链上的种子区域结合, 然后进一步沿着向导链3' 端方向促进更多的碱基进行配对, 最后向导链的5' 端从Argonaute蛋白的PAZ结构域上解离下来

目前, 我们还不清楚极端嗜热细菌的Ago蛋白三聚体是否就是一个尾部固定模型里需要的那种具有切割活性的复合体, 还是二步模型里描述的那种具有中间状态的复合体。我们还需要对与向导链-靶标链配对良好的双链结构结合的不具备酶切活性的Argonaute蛋白的晶体结构进行深入研究, 这样才能彻底解决这个问题。不过无论如何, 我们在极端嗜热细菌的Ago蛋白三聚体模型里观察到的靶标识别过程, 都可以代表多细胞生物体内发生的miRNA介导的基因沉默途径里靶标mRNA分子识别过程。在miRNA介导的基因沉默途径里通常会因为miRNA-mRNA双链在第10~11碱基处出现的错配而导致沉默机制失效。

2.6 不依赖切割反应的功能

在多细胞生物中, miRNA介导的基因沉默途径仅仅只有在含有miRNA的RISC复合体结合了目的mRNA分子之后才会起作用, 但在这个途径中是不会对目的分子进行切割的。目前miRNA介导的基因沉默的具体机制尚不明了, 但是其中肯定会包括RISC复合体和负责mRNA翻

译及降解的细胞器之间的相互作用。最近体外实验证明，miRNA可能会通过干扰EIF4F因子与mRNA 7-甲基鸟苷帽子结构相结合的正常作用而影响翻译的起始过程。人AGO2蛋白的MID结构域具有和EIF4E因子（EIF4F因子亚基）帽结合基序同源的序列（尽管这种同源性比较有限），这说明人AGO2蛋白能够与EIF4E因子竞争mRNA的帽结构。不过，Argonaute蛋白的MID结构域在结构上还缺乏和EIF4E蛋白的同源性。因此，AGO2蛋白和mRNA帽结构之间真的存在一种直接发生的相互作用，那么这可能就是一种新的mRNA识别机制。

Argonaute蛋白、miRNA以及它们的靶标mRNA分子都共同定位于细胞质处理小体（P bodies，是mRNA被降解和退化的部位）当中。在哺乳动物细胞和黑腹果蝇细胞中，Argonaute蛋白和细胞质处理小体蛋白GW182之间的相互作用是miRNA介导的基因沉默途径中的关键步骤，这也是影响到Argonaute蛋白定位的关键步骤。最近发现GW182蛋白富含甘氨酸和色氨酸的基序（GW motif），它可以直接与人Argonaute蛋白的MID-PIWI区域相互作用，还发现由两个GW基序串联组成的名为“Ago钩（Ago hook）”的最小片段也能够完成这种相互作用。有趣的是，能够破坏Argonaute蛋白与GW182蛋白间相互作用的突变位点主要都集中在Argonaute蛋白的MID结构域和PIWI结构域之间的，能够与RNA分子5'端磷酸基团结合的区域。

3. 未来的发展方向

继续开展分子结构研究和以结构为基础的生化研究，这将继续帮助我们了解RNA干扰途径的分子机制及其进化历程，以及两者之间的关系。未来有一个十分重要的目标，那就是弄清楚真核生物里参与RNA干扰途径的蛋白和蛋白复合体的结构。弄清楚RISC装载复合体的分子结构将极大地帮助我们了解小RNA分子的生成过程，Argonaute蛋白的装载过程以及向导链的选择过程。最近开展的蛋白质组学研究发现了很多能够与Argonaute蛋白发生相互作用的蛋白质，比如GW182、MOV10和FXR1等。这些新发现将有助于我们了解Argonaute蛋白的下游作用机制。了解这些相互作用的结构信息和以结构为基础的功能信息可以帮助我们发现在小RNA介导的基因沉默途径里发挥重要作用的Argonaute蛋白的分子作用机制。这些研究成果不仅可以为我们提供新的分子作用机制信息，还可以为我们打下坚实的基础，更好地改造RNA干扰途径，使其有朝一日能够成为临床治疗的利器。

原文检索：

Martin Jinek & Jennifer A. Doudna. (2009) A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 457(22): 405-412.

 YORK/编译

三、RNAi治疗技术的应用前景及面临的挑战



RNA干扰（RNA interference, RNAi），即小RNA分子可以利用Watson–Crick发现的碱基互补配对原则来控制含有与其序列互补的mRNA分子的表达，让我们对真核生物基因表达调控及基因功能的认识又向前迈进了一大步。小RNA序列所具有的强大的基因表达调控能力使我们又获得了一大利器。我们可以用它进行基因功能方面的研究，而且还有可能将其运用到疾病治疗领域，给临床治疗带来革命性的改变。虽然自1998年RNAi首次被发现至今只有短短十多年，但是基于这一机制开发的治疗措施已经进入到了临床试验阶段，而许多专注于RNAi治疗技术开发的生物技术公司也早已上市交易。

在1980年之前，大家通常都认为RNA分子只不过就是在DNA和蛋白质合成之间起到信息传递作用的一个被动介质（passive intermediate）。不过，随后的一系列发现改变了大家的想法。在80年代初期，Tom Cech和Sidney Altman发现了催化性RNA（catalytic RNA，即核酶），这一发现让他们后来共同获得了1989年的诺贝尔化学奖。1986年，Walter Gilbert提出了“RNA世界（the RNA world）”的概念。今天，这一观点已经被广为接受，RNA也为自己在细胞生物学研究领域争取到了重要的一席之地。

10多年前，人们在秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）中发现了一种新的RNA功能——dsRNA可以导致与其序列互补的mRNA分子表达沉默，于是RNAi这一新兴研究领域诞生了。随后不久，又发现利用人工合成的短小dsRNA，又称siRNA也同样可以在哺乳动物细胞内诱使基因表达沉默，而且通常情况下（但不是绝对的）siRNA都不会诱使机体出现先天免疫反应，要知道这可是机体对抗RNA病毒入侵的重要防御机制。这一发现对基础科学研究和应用研究都带来了巨大的影响。目前，RNAi机制已经成了最有前途的新兴治疗方法之一。

人们最早是在一个感染了乙型肝炎病毒的动物体内发现RNAi机制也可发生于哺乳动物体内的。随后就应运而生了第一例siRNA疗法。该疗法是在一个自体免疫性肝炎（autoimmune hepatitis）小鼠动物模型中使用了靶向针对*Fas*基因mRNA分子的siRNA，结果，接受治疗的小鼠没有发生肝纤维化。2004年（即RNAi机制发现之后6年），第一项siRNA人体疗法进入了I期临床试验，该疗法是用于治疗渗出性老年性黄斑变性（wet age-related macular degeneration）疾病的。在生物学领域，RNAi是进展最为迅速的一个研究方向，而且伴随着RNAi研究而出现的各种治疗方法也向我们阐明了从实验室走向临床的真正含义。

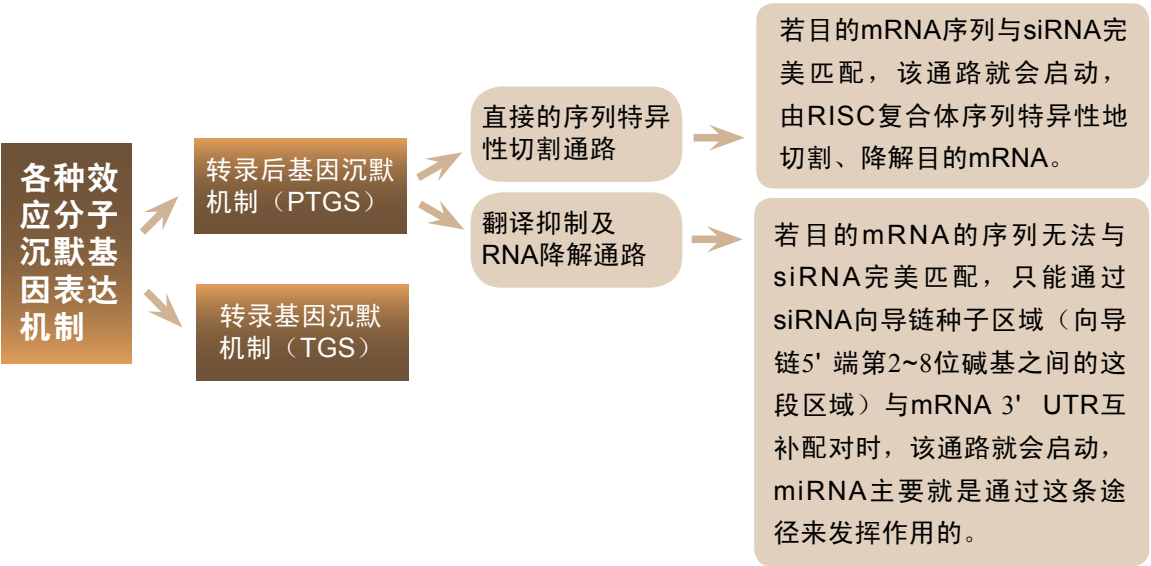
尽管我们现在已经对RNAi机制有了更多的了解，不过还是有很多应用方面的问题等待我们去解决。比如RNAi机制是细胞内非常重要的一条基础的基因表达调控机制，因此，将其运用到临床治疗就会不可避免地带来一系列副作用。外源性导入细胞的dsRNA可以抑制细胞内参与基因表达沉默途径的组分的作用，起到抑制细胞内正常的miRNA途径的作用。另外，还有一些人

工合成的siRNA中含有一些序列（**sequence motif**，一般指蛋白质序列上4-15个连续的氨基酸残基，具有很强的保守性和特定生物学功能），这些序列可以诱导I型干扰素反应，促进促炎性细胞因子的合成。

近几年来，有很多科学家都在努力工作，希望能够解决上述问题，并提高RNAi治疗技术的安全性。本文将对他们的工作进行一个简要的总结，向读者介绍几种最新的RNA干扰疗法，几种常见的减少副作用的治疗策略，还将对正在接受检测的几种疗法展开讨论。由于RNAi疗法可以运用于多种疾病，因此要使其成为一种临床上常用的方法我们就必须十分谨慎，必须对其利弊进行充分的考虑才能使其真正造福人类。

1. 内源性基因沉默途径

RNAi途径的各种效应分子长约20~30 nt。这些小RNA分子会与RNA诱导的沉默复合体（RISC）中的组成蛋白结合形成复合物。在植物和动物（单细胞生物除外）中，这种复合物的催化核心是AGO2蛋白（属于高度保守的Argonaute蛋白家族成员）。各种效应分子沉默基因表达的机制（图1）。



在稷酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）、植物和哺乳动物细胞里都发现了TGS途径。在稷酒裂殖酵母中，该基因沉默功能具体是由RNA介导的转录沉默复合体（RNA-induced transcriptional silencing complex, RITS）来完成的。RITS复合体包含Ago1蛋白、染色质域蛋白（chromodomain protein，指从酵母到哺乳动物的真核生物中普遍存在的大约由50个氨基酸组成的一个保守结构，它可介导蛋白间相互作用，也可与DNA和RNA相结合）——Chp1蛋白，以及包含甘氨酸、色氨酸重复序列的Tas3蛋白。在哺乳动物细胞内，具体是哪种机

制在发挥作用还不清楚，但是可以肯定的是AGO1蛋白和AGO2蛋白肯定都发挥了重要的作用。最近，有研究发现在体外培养的人体细胞中，miR-320这种miRNA分子可以调控RNA聚合酶III的亚单位POLR3D蛋白的转录。

目前，人们已经在包括人、小鼠、黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）、秀丽隐杆线虫等多个物种体内发现了各种内源性的小RNA。这些小RNA分子当中有一些源自转座子、病毒以及DNA重复序列。这些小RNA分子都有一个共同的特点，那就是它们都能够与Argonaute家族中的PIWI蛋白发生相互作用，因此它们被称作PIWI相互作用RNA（PIWI-interacting RNA），简称piRNA。不过，piRNA分子只见于生殖细胞。最近，人们又在黑腹果蝇的生殖腺和体细胞组织以及小鼠卵母细中发现了一种新的内源性小RNA分子，称作endo-siRNA或esiRNA。在小鼠体内的endo-siRNA可能具有调控逆转录转座子移动（retrotransposon movement）的作用。在真菌、植物和动物细胞中已经发现了许多种小RNA分子，比如重复相关siRNA（repeat-associated siRNA, ra-siRNA）、小非编码RNA（tiny non-coding RNA, tncRNA）、反式作用siRNA（trans-acting siRNA, ta-siRNA）、扫描RNA（scan RNA, scnRNA）等（表1）。不过到目前为止，还没能够在哺乳动物细胞中发现上述小RNA分子中的任何一种。有证据显示，piRNA能够借助siRNA信号通路或miRNA信号通路等各种胞内途径来发挥作用，因此piRNA也是一个非常好的临床治疗候选靶点。

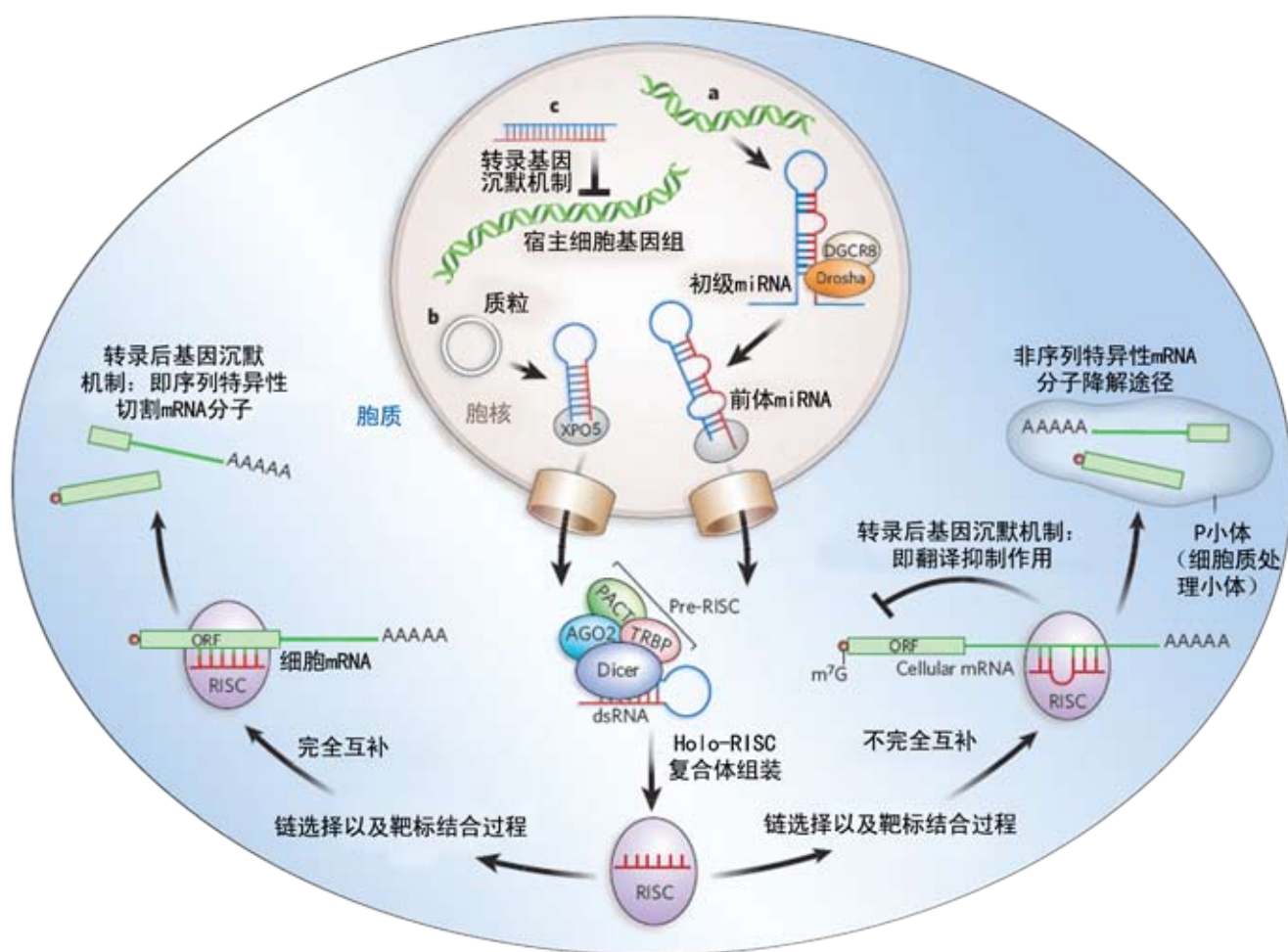


图1 细胞基因沉默机制示意图。a, 在植物细胞和动物细胞中, 初级miRNA (Primary microRNA, pri-miRNA) 会由Drosha蛋白及其辅助因子DGCR8蛋白处理, 形成前体miRNA (precursor miRNA, pre-miRNA), 随后pre-miRNA被输出蛋白5 (XPO5) 转至胞质。胞质中的pre-miRNA与含有Dicer蛋白的RISC前体结合后被RISC前体处理生成向导链, 随后向导链装载到含有基因沉默所有必需组分的holo-RISC复合体中。AGO2蛋白是RISC复合体中的催化核心。向导链能够与其靶mRNA分子3' UTR结合。如果这种结合是完全互补的, 如图中左侧所示, 那么就会激活位点特异性切割途径, 通过AGO2蛋白的催化作用降解mRNA靶分子。如果这种结合是不完全互补的, 只是miRNA分子里的种子区 (第2~8位碱基序列) 参与了互补结合, 如图中右侧所示, 那么就会激活非序列特异性mRNA分子降解途径, 通过P小体使mRNA分子降解。b, 与miRNA作用机制相仿, 人工转录的shRNA (即图中质粒所编码的) 也可以被XPO5蛋白转运至胞质。胞质中的dsRNA被Dicer蛋白识别, 并被降解成21~25bp的siRNA片段, 然后装载到RISC复合体上。siRNA也能识别与其序列互补的细胞mRNA, 然后通过AGO2蛋白使其降解。c, siRNA在核内如果能够与启动子区域互补, 那么就能促使染色质重构和组蛋白修饰反应的发生, 从而导致转录后基因沉默。在哺乳动物细胞中, 这条途径的具体作用机制尚未完全阐明, 但是Argonaute家族蛋白肯定在其中发挥了重要的作用。图中涉及的蛋白包括TRBP (HIV tar-RNA-结合蛋白, 也即TRBP2P) 和PACT (蛋白激酶PKR激活剂, 也即PRKRA)。m7G即7-甲基鸟苷。

表1 部分参与细胞基因沉默途径的小RNA一览表

类别	碱基数	功能	作用机制	来源	所属物种
siRNA	21~25	调控基因表达、参与抗病毒作用、限制转座子移动	降解RNA、限制转座子移动	基因间区域、外显子、内含子	秀丽隐杆线虫、黑腹果蝇、粟酒裂殖酵母、拟南芥、稻
endo-siRNA	21~25	限制转座子移动、调控mRNA和异染色质	降解RNA	转座元件、假基因	黑腹果蝇、哺乳动物
miRNA	21~25	在转录后水平调控基因表达	抑制翻译、降解RNA	基因间区域、内含子	秀丽隐杆线虫、黑腹果蝇、粟酒裂殖酵母、拟南芥、稻、哺乳动物
piRNA	24~31*	调控生殖细胞发育和完整性、沉默自私DNA	不明	有缺陷的转座子序列和其它重复序列	秀丽隐杆线虫、黑腹果蝇、斑马鱼、哺乳动物
ra-siRNA	23~28	染色质重构、转录基因沉默	不明	重复序列元件 (属于piRNA来源中的一部分)	秀丽隐杆线虫、黑腹果蝇、粟酒裂殖酵母、布氏锥虫、斑马鱼、拟南芥

续下表

接上表

类别	碱基数	功能	作用机制	来源	所属物种
ta-siRNA	21~22	反式作用切割内源性mRNA	降解RNA	非编码内源性转录产物	黑腹果蝇、粟酒裂殖酵母、拟南芥、稻
natRNA	21~22	在转录后水平调控基因表达	降解RNA	中间重叠转录产物	拟南芥
scnRNA	26~30	调控染色质结构	清除DNA	减数分裂期微核	四膜虫、双小核草履虫
tncRNA	22	不明	不明	非编码区	秀丽隐杆线虫

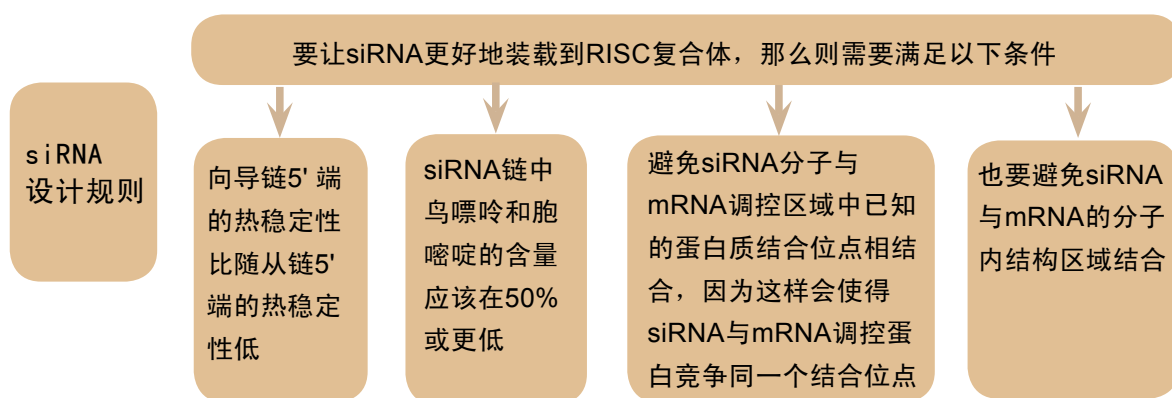
*秀丽隐杆线虫piRNA是21nt。endo-siRNA(endogenous siRNA): 内源性siRNA; miRNA(microRNA): 微小RNA; natRNA (natural antisense transcript siRNA): 天然翻译转录siRNA; piRNA (PIWI-interacting RNA): PIWI相互作用RNA; ra-siRNA (repeat-associated siRNA): 重复关联siRNA; scnRNA (scan RNA): 扫描RNA; siRNA (short interfering RNA): 小干扰RNA; ta-siRNA (trans-acting siRNA): 反式作用siRNA; tncRNA (tiny non-coding RNA): 小非编码RNA。

2. 小RNA分子的优设计

细胞基因可以被外源性的siRNA分子利用细胞内源性的PTGS机制特异性抑制。siRNA既可以用来转染细胞，随后直接进入RISC复合体；也可以借助含有Pol II启动子或Pol III启动子的载体在胞内表达、生成。这些RNAi“触发开关”可以在动物或植物细胞里经Drosha蛋白和（或）Dicer蛋白切割后以miRNA或shRNA的形式表达，不过不能在粟酒裂殖酵母细胞中表达。这些miRNA或shRNA随后会被Drosha和/或Dicer切割成为21~25 nt的小RNA。如果这些小RNA“触发开关”分子的两条链能够完全互补，那么随从链（passenger strand）就会被AGO2蛋白切割、降解，只留下向导单链作为模板帮助RISC复合体识别靶标基因，如图1所示。

大部分即将问世的以RNAi为基础的治疗方案都是采用直接将人工合成的siRNA分子转入细胞内的策略。使用这种人工合成分子的好处是可以利用各种化学修饰方法增强siRNA分子的稳定性，防止它们与其它非目的靶标发生错误结合，既能够避免特异性的脱靶现象（specific off-target effects）发生，同时又能够尽量减少对免疫系统的刺激，从而避免非特异性的脱靶现象（general off-target effect）发生。不过，这些外源性小RNA分子只能短暂地发挥作用，而借助在启动子控制下表达的shRNA或miRNA则可以达到长效抑制的作用。

传统意义上的siRNA是大约22nt长，在3'端有类似于Dicer蛋白的酶切产物的两个碱基突出的小RNA分子。由于并非所有siRNA都能够达到同样的基因沉默效果，所以在进行基因沉默治疗之前，我们需要进行大规模的筛查工作，找出沉默效果最佳的那个小RNA分子。鉴于此，人们制定了一整套siRNA设计规则。



此外，统计学分析也能帮上忙。我们可以利用统计技术发现在siRNA序列里其实也存在一定的规律，比如在某些特定的位点上有一些碱基出现的频率会更高。现在有许多计算机程序可以帮助我们找出一个基因里最适合成为RNA干扰靶标的序列。人工神经网络（artificial neural network）就是这些程序中的一个。目前，它已被用来开发人体全基因组siRNA文库，而且它已经成功地设计出了有效的siRNA沉默分子。

我们在人工合成siRNA分子时通常都会引入各种化学修饰，比如有选择性地添加磷硫酰键（phosphorothioate linkage），或者将某个位点的2'核糖（2' ribose）替换成2'氟嘧啶（2' fluoropyrimidine）或2'-O-甲基（2'-O-methyl）。这些修饰都不会影响siRNA的沉默活性，而且还能增强siRNA分子对核糖核酸酶的抵抗性，这一点对于体内应用来说非常重要。在siRNA双链分子中，随从链上的一个2'-O-甲基基团就能够完全抑制Toll样受体的活化，从而阻止I型干扰素信号通路激活对细胞造成伤害。最近研究证实，FANA（fluoro-β-d-arabinonucleic acid）或4'-S-FANA以及ANA（arabinonucleic acid）修饰可以增强siRNA分子在血清中的稳定性，同时还能提高其基因沉默效能。还有一些化学修饰也具有非常重要的作用，它们能够减弱，甚至完全抑制随从链的作用，从而降低脱靶作用的特异性。另外一些修饰，比如添加一个十二烷酸（auric acid）、石胆酸（lithocholic acid）或者胆固醇衍生物则能够增加细胞对siRNA分子的摄取量，而这正是阻碍RNA干扰技术进入实际应用的一大难题。

3. siRNA “突破” 并 “攻入”

要使siRNA能够真正应用到临床，成为一项治疗措施，首先就需要保证能将它们送达目的细胞和组织。目前主要有两种方法，一种是不依赖病毒的递送方法，将人工化学合成的siRNA分子直接注入体内；另一种是利用基因工程病毒，即利用编码shRNA基因的病毒感染细胞在胞内转录、生成siRNA。

3.1 不依赖病毒的递送途径

siRNA分子的大小和负性特点都让它很难穿透细胞膜。，因此如何将它们送达指定部位

是困扰RNA干扰疗法的一大难题。迄今为止已经开发出了多种递送方案，比如直接将RNA分子注入肺、眼等器官，或者以纳米颗粒、包被阳离子、胆固醇基团或者细胞表面受体为载体将RNA注入器官。目前这些方法都已经在鼠类和非人类的灵长类动物模型上进行过实验，图2将向您详细介绍这些方法。

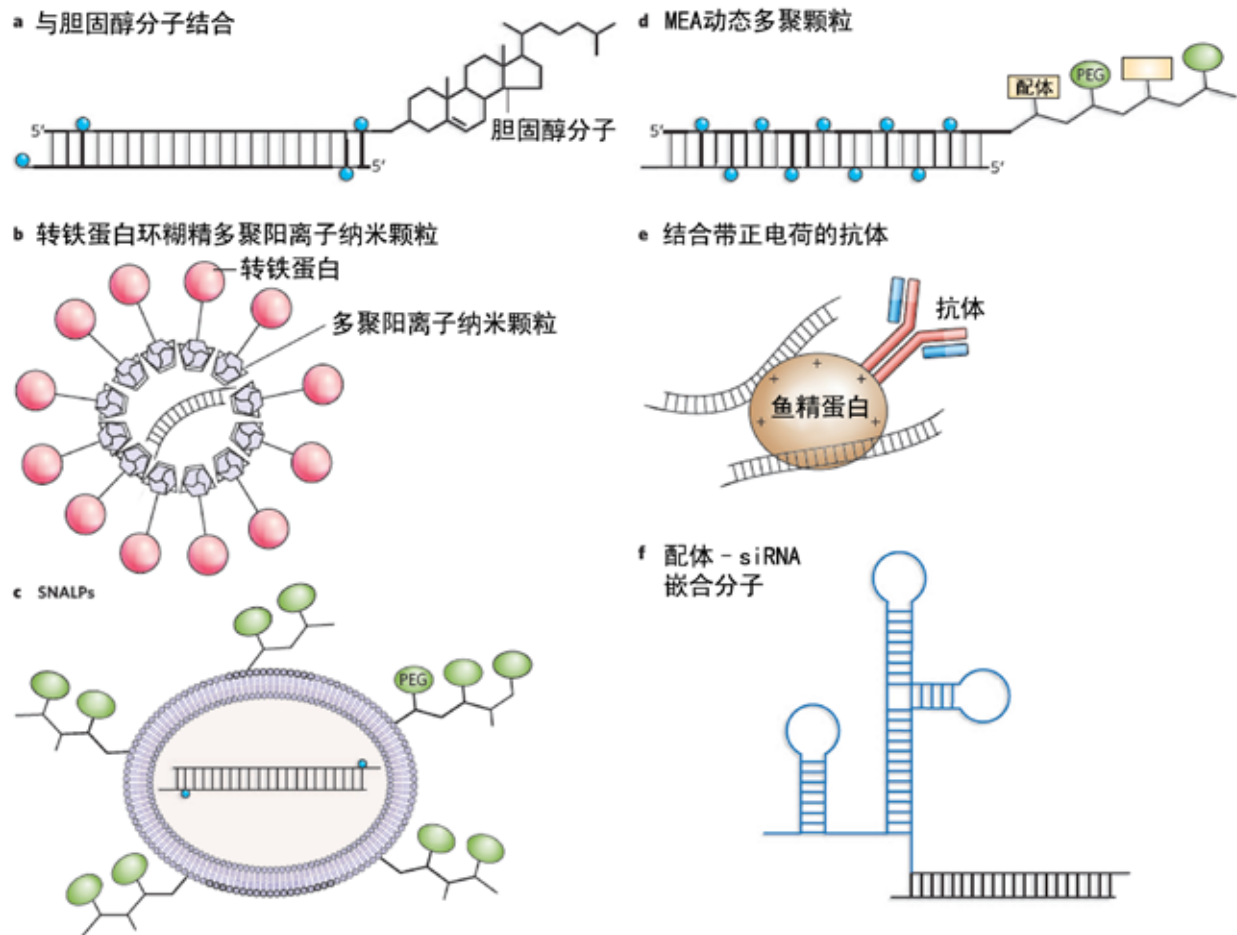


图2 各种治疗性siRNA体内递送机制。a，将胆固醇分子结合到被修饰的siRNA分子上，可以增强它们的稳定性。最常用的siRNA修饰方法是结合了磷硫酰键的2'-O-甲基尿苷（2'-O-methyluridine）或2'-氟尿苷（2'-fluorouridine），即图中蓝色小圆球。b，多聚阳离子纳米颗粒可以通过其表面与靶细胞上某个受体结合的配体，比如转铁蛋白等直接将siRNA分子递送到特定靶细胞上。c，SNALP颗粒方法是将修饰过的siRNA包裹进一个阳离子或中性脂质双分子层颗粒中，这个颗粒上还结合了可扩散的聚乙二醇（PEG）脂质分子结合物。这种SNALP颗粒将siRNA递送至细胞，随后siRNA会被内体系统降解、释放出小RNA分子。d，MEA动态多聚颗粒（MEA-DPC）与SNALPS颗粒比较相似，只不过体积更小一些，而且还含有配体分子能帮助颗粒到达特定的靶细胞。MEA-DPC颗粒上还加入了对PH值不稳定的化学键，因此更有利于内体系统释放siRNA分子。e，使用鱼精蛋白或其它阳离子物质将特异性的抗体结合到siRNA分子上，这样也可以将siRNA分子递送到特定的靶细胞。f，化学连接或在siRNA转录时加上RNA配体分子也可以将siRNA分子递送到特定的表达该配体受体分子的靶细胞。

端胶原 (atelocollagen) 和聚氨基葡萄糖 (chitosan) 这两种多聚分子也曾被人试用过。聚氨基葡萄糖具有粘膜粘着特性, 它曾被用于siRNA分子经鼻腔吸入到细支气管上皮细胞实验中。在小鼠和非人类的灵长类动物模型上已经证实, 这是一种非常有效的siRNA递送方式, 可以完全阻断呼吸道合胞病毒对动物上呼吸道的感染。实际上, 这种经粘膜的递送似乎是一种非常有效的方法。比如, 阴道内注入脂质包被的专门靶向HSV-2病毒的siRNA就能有效地保护实验小鼠, 使超过三分之二的小鼠免受这种致命病毒的侵害。

使用粘膜活性多聚物 (membrane-active polymer, 这种多聚物可以一直不发挥活性, 直至进入内涵体才会表现出活性) 向肝脏内递送靶向APOB蛋白和PPAR- α 蛋白的siRNA分子也获得了成功, 用这种方法只需简单的静脉注射就能将siRNA分子递送到肝细胞。还有一种递送方法使用的是转铁蛋白和环糊精多聚阳离子聚合物 (transferrin conjugated to a cyclodextrin-polycation polymer)。在小鼠试验中, 这种方法可以借助转铁蛋白受体递送靶向尤文氏肉瘤 (Ewing's sarcoma) Ews-Fli1融合mRNA的siRNA分子, 从而成功抑制肿瘤扩散。在小鼠动物模型中还发现, 如果将特异性靶向APOB蛋白的siRNA与胆固醇基团结合, 则能够将其递送至肝内和空肠 (jejunum), 抑制APOB基因的表达, 降低血脂水平。

最近, 在siRNA递送方面取得了一项重大进展, 就是成功使用了包被有聚乙二醇 (PEG) 聚合物链, 即SNALP的稳定的核苷酸脂质颗粒 (nucleic-acid lipid particle)。在试验中, 使用这种脂质颗粒递送系统将靶向针对APOB基因mRNA的siRNA分子递送到了非人类灵长动物的肝脏内。使用这种方法一次静脉注射后基因沉默的疗效就可以持续11天, 沉默效率超过了90%, 而且不会发生毒性反应。这项激动人心的成果进一步增强了我们使用siRNA治疗肝脏疾病的信心。

直到最近, 绝大部分体内的小RNA递送方法还都只是针对特定的器官, 比如眼部、肺或肝脏。最近又有人报道成功地将小RNA分子定向递送到了一种参与肠道炎症反应的粒细胞内。在这项实验中, 针对细胞周期蛋白D1基因的siRNA被结合到了稳定的纳米颗粒上, 这个纳米颗粒表面结合了一种能够特异性识别该粒细胞表面受体的抗体。在小鼠实验中发现, 使用这种方法也能有效下调粒细胞内细胞周期蛋白D1基因的表达水平、抑制粒细胞的增殖, 并逆转人工诱导的小鼠结肠炎病程。

目前, 要有效地将siRNA分子递送至神经系统细胞面临着许多挑战。众所周知, 血脑屏障的存在令siRNA分子尤其难以被传递至大脑。不过, 有研究发现, 直接将siRNA注入大鼠脑内可以使siRNA分子到达外周神经系统, 缓解实验动物的慢性疼痛或焦虑症状。还有人在鼠类动物试验中将siRNA分子与脂质体、抗体或神经肽结合, 尝试用这些方法将siRNA递送到大脑组织里。不过, 上述方法都没有特异性地针对某种神经元细胞, 而且都使用了令“人”痛苦的颅内直接注射方式, 这些都是需要我们进一步攻克的难题。

最近, 有一项研究使用了全身静脉注射 (systemic intravenous injection), 让我们看到了siRNA分子能够被递送到中枢神经系统的可能性。在这项实验中使用的siRNA是针对日本脑炎病毒的小RNA分子。这些siRNA分子上连接了狂犬病毒糖蛋白短肽, 从而可以与神经元细胞上的乙酰胆碱受体结合。静脉注射之后, 有80%的实验小鼠在感染日本脑炎病毒后都能继续存活, 而未给药对照组则全部死亡。

另一种比较有趣的siRNA递送方法则是使用鱼精蛋白和抗体的融合蛋白 (protamine-antibody fusion protein)。具体方法就是将鱼精蛋白和HIV-1包膜蛋白gp160 (HIV-1 ENV gp160) 抗体的Fab链结合。带正电荷的鱼精蛋白结合了带负电荷的靶向HIV病毒gag基因的

siRNA之后，就能选择性地将这些小RNA分子递送到细胞表面表达有gp160蛋白的细胞。在鼠类动物模型试验中发现，这种siRNA抗体复合物到达细胞表面后会被细胞内摄作用吞入，释放出siRNA，下调HIV病毒gag基因的表达。在同一项试验中还发现，如果将结合的抗体换成特异性识别激素受体ERBB2的抗体，则可以将siRNA分子特异性地递送到表达ERBB2受体的肿瘤细胞里。

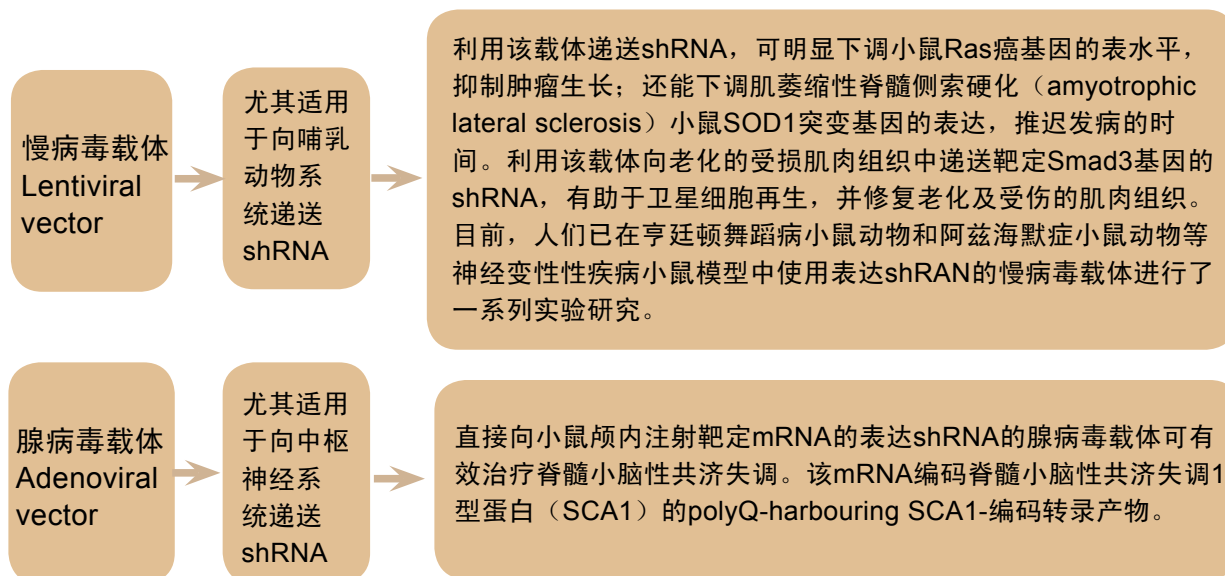
还有一种类似的特异性递送技术使用的是配体——siRNA嵌合分子。这些配体分子都是在体外合成的核酸分子，能够高选择性地与体内的某些特定分子结合。有人设计了一种专门结合前列腺特异性膜抗原PSMA（又称FOLH1）的RNA配体分子，将其连接到靶定PLK1基因的siRNA分子上，这样就能高选择性地siRNA递送到前列腺癌细胞当中发挥治疗作用。在小鼠异种移植前列腺癌动物模型试验中发现，肿瘤内注射这种靶定PSMA-Plk1基因的siRNA或靶定PSMA-Bcl2基因的siRNA都可以诱导肿瘤细胞出现凋亡、生长抑制以及肿瘤消退等现象。

还有一种方法是将siRNA与结合了维生素A的脂质体分子连接，这样能够成功地将抗纤维化siRNA分子递送到肝星状细胞（hepatic stellate cell）。在这项大鼠试验中，人们使用多个针对胶原伴侣分子编码基因的siRNA可以成功地逆转肝纤维化进程，增加实验动物的存活率，因为这些siRNA分子能够阻止胶原沉着。这项研究将有望帮助我们攻克肝硬化顽症。

另外，还要重点介绍的是，最近有报道称研究人员构建了一个脂质样分子文库，它可用于为不同的组织筛选合适的siRNA递送方法。

3.2 病毒递送途径

还有一种启动RNA干扰的方法就是借助载体启动子表达的siRNA分子。这些siRNA分子都是shRNA分子或类似于miRNA分子的前体物质处理之后生成的。通常，我们都将编码这些发夹结构前体分子的序列插入到病毒载体当中，在PolIII或PolIII启动子的操控下表达。使用这种病毒载体的一大优势就是，一次给药之后能获得长期的RNA干扰疗效。这种方法尤其适用于病毒感染导致的慢性疾病，比如艾滋病或病毒性肝炎等疾病的治疗。



目前，病毒载体方法取得了许多成功。但即便如此，我们也应该意识到，某些非致病性的病毒载体仍然具有潜在的免疫原性。此外，使用病毒载体还存在一大问题，那就是存在病毒序列突变的可能。这会造成载体插入宿主细胞基因组后，导致宿主基因突变，诱发异常的基因表达。不过，病毒载体也有其优势。它们能转导分裂细胞和非分裂细胞，长期表达shRNA疗效分子，大大减少用药量。最后，还要强调的就是，任何小RNA分子如果被大量表达都有可能导致毒性反应和免疫反应的发生。

因此，我们在选择递送方式时需要考虑小RNA分子的耐受性、长期表达效率、有效性、特异性以及基因沉默效果等情况。没有一种递送方式是适合所有情况的，我们需要为每一种情况“量身定制”一种最佳的递送方式。

4. 使用RNAi治疗人体疾病的临床试验

siRNA作为一种新兴的治疗技术，却已经以一种前所未有的速度迈进了临床试验阶段。下面，我们将介绍几种已经进入临床试验阶段的人体疾病RNAi疗法。

第一个被siRNA治疗指南批准获得临床研究新药（investigational new drug, IND）资格，并且进入了临床试验的就是Bevasiranib，它是美国Acuity制药公司生产的针对血管内皮细胞生长因子（VEGF）的siRNA类药物。该药主要用于治疗渗出性老年性黄斑变性（详表2）。所谓渗出性老年性黄斑变性，主要是因为视网膜后血管大量生长，导致患者出现严重的不可逆性视力损伤。单是美国大约就有160万人受该病困扰。据估计，到2013年，全球患病人数将达到1100万。在小鼠试验中对Bevasiranib进行的临床前研究表明，直接眼部注射该药能够下调Vegf基因的表达，有效减少新生血管数量。目前，Bevasiranib在治疗渗出性老年性黄斑变性方面已经进入了III期临床试验，同时还在治疗糖尿病黄斑水肿方面进入了II期临床试验。待这些临床试验结束时累计将有数百名患者可接受Bevasiranib的治疗。

表2 目前正在进行临床试验的RNAi疗法

使用的siRNA	负责开发公司	治疗疾病	临床试验阶段
Bevasiranib	Acuity制药公司	渗出性老年性黄斑变性	III期临床试验
		糖尿病黄斑水肿	II期临床试验
Sirna-027	Merck-Sirna Therapeutics公司	渗出性老年性黄斑变性	II期临床试验
RTP801i-14	Quark制药公司和Silence Therapeutics公司	渗出性老年性黄斑变性	I/IIA期临床试验
ALN-RSV01	Alnylam制药公司	呼吸道合胞体病毒感染	II期临床试验
NUC B1000	Nucleonics公司	乙型肝炎病毒感染	I期临床试验

续下表

接上表

使用的siRNA	负责开发公司	治疗疾病	临床试验阶段
Anti-tat/rev shRNA	希望之城医疗中心和Benitec公司	艾滋病	尚处初期可行性研究阶段
CALAA-01	Calando制药公司	实体肿瘤	I期临床试验
TD101	TransDerm公司和国际雅-雷二氏综合征协会	雅-雷二氏综合征	I期临床试验

还有两家公司也专注于用siRNA治疗黄斑变性疾病，他们分别是美国的Merck's Sirna Therapeutics公司（主要产品是针对VEGF受体VEGFR1蛋白的Sirna-027）和Quark制药公司。他们和伦敦及柏林的Silence Therapeutics公司（即以前的SR制药公司）合作，主要生产靶定RTP801基因（又名DDIT4基因，该基因与黄斑变性疾病的进展有关）这种缺氧诱导基因的siRNA产品RTP801i-14。RTP801i-14已经被授权给英国的Prizer制药公司，进行I/IIA期临床试验。Quark制药公司也已经获得了IND资格可以进行另一项临床前试验，他们目前正在为这项实验招募志愿者。这项实验的药物靶定TP53基因的siRNA。该药通过抑制p53蛋白的表达能够阻碍细胞凋亡通路，从而有望避免手术后出现的急性肾衰竭。

与此同时，美国的Calando制药公司也开始了一项I期临床试验项目。他们实验的新药是用于治疗实体瘤的靶定核糖核苷酸还原酶RRM2（该酶参与DNA的合成）亚基的siRNA。值得一提的是，这是第一项使用受体介导递送方式的siRNA临床试验，该产品被连接有转铁蛋白的环糊精颗粒包裹。这样，药物就只会被细胞表面表达有转铁蛋白受体的细胞摄取，而转铁蛋白受体在肿瘤细胞表面表达量就非常高。

Acuity制药公司与Merck公司旗下的Sirna Therapeutics公司合作进行的临床药物试验成功地稳定了患者的病情，阻止了病情进一步加重，明显改善了患者的视力，而且还没有副作用和不良反应。这些成果让我们对玻璃体内注射siRNA这种治疗方法充满了信心。但是，Kleinman等人的报道给我们当头泼了一盆冷水。Kleinman等人认为，患者新生血管数量的减少并不是因为siRNA特异性的基因沉默作用，而是因为它非特异性地激活了TLR3受体，继而导致 γ 干扰素和白介素12活化，从而下调了VEGF因子的表达。换句话说，特异性的siRNA药物和非特异性的siRNA对照药物都能因为siRNA与TLR3之间的相互作用而产生这种非特异性的血管生成抑制作用。而且，这种非特异性的效应与细胞对siRNA分子的摄取作用无关，同时由于TLR3蛋白参与细胞内多条信号通路，因此这也让我们对siRNA疗法的安全性问题感到了担忧。

美国Alnylam制药公司是一家专业的siRNA制药公司，他们的主打产品ALN-RSV01目前已经进入了II期临床试验。ALN-RSV01主要针对呼吸道合胞病毒感染（在美国每年有大约30万人会感染呼吸道合胞病毒）。它可以沉默病毒复制过程中必需的病毒核衣壳蛋白编码基因N基因。ALN-RSV01也是第一款进入临床试验的抗病毒siRNA产品，目前人们已经计划将试验对象扩展到儿科患者。就现有的试验结果来看，ALN-RSV01的疗效非常好，而且志愿者对它的耐受性也非常高。最近，Alnylam制药公司又与Kyowa Hakko Kogyo结成了独家合作关系，共同在日本和其他亚洲国家研发商业化的ALN-RSV01产品。

Alnylam制药公司同时也在开发一系列治疗高胆固醇血症、亨廷顿舞蹈病（与美国Medtronic共同开发）、丙型肝炎病毒（与美国Isis制药公司共同开发）、进行性多病灶脑白质病（与美国Biogen Idec公司共同开发）以及流感（与瑞士Novartis制药公司共同开发）等疾病的siRNA产品。

国际雅-雷二氏综合征协会（The International Pachyonychia Congenita Consortium, IPCC）也正与美国TransDerm公司合作，共同开发治疗雅-雷二氏综合征的siRNA产品。他们希望该产品能够“纠正”患者角蛋白的合成，从而达到治疗这种罕见的皮肤疾病的目的。

美国希望之城医疗中心（The City of Hope National Medical Center）正在与澳大利亚Benitec公司合作开发一款治疗艾滋病淋巴瘤的药物，目前已经进入了I期临床试验。该药物是一款使用了Pol III启动子载体的shRNA类药物，主要靶定HIV病毒的tat基因和rev基因的共有外显子序列。它使用的载体是基于HIV病毒的一种慢病毒载体，同时在载体上还插入了另外两个RNA抗HIV基因，最后通过该载体将shRNA基因导入血液干细胞。在临床试验中，通过自体骨髓移植方式将这种经过基因改造的血液干细胞输入HIV病毒感染患者体内，看看是否能够起到治疗艾滋病相关骨髓瘤的作用。到目前为止已经有四位患者接受了这种治疗。

正如前面提到的那样，在siRNA药物研发领域合作已成为非常普遍的现象。通过合作可以获得更多的好处，比如获得更多的科研资金，缩短最后药物成品上市的时间等等。

有一些公司，比如美国Regulus Therapeutics公司等则将目光投向了miRNA。丹麦Santaris制药公司最近也开始为他们靶定人体miRNA分子（miR-122）的新药开始了I期临床试验项目。在该项药物试验里，miR-122是被下调的靶标，被试验的药物是抗miRNA的锁核酸药物SPC3649。锁核酸是一种骨架被修饰过的寡核苷酸分子，经过修饰之后它能更好地与底物杂交，避免底物被核酸酶降解。SPC3649最终的目的是希望能够治疗丙型肝炎患者，因为miR-122可以促进丙型肝炎病毒复制。下调miR-122分子还能用于治疗高胆固醇血症患者。直接靶定在心脏里表达的miRNA分子，比如miR-208（它能够调控心脏肥大和纤维化）等也会达到治疗目的，因为在医疗实践中早就发现直接往靶器官里给药是可行的。

miRNA功能的获得或缺失与各种疾病的发生发展都有着密切的关系。蛋白质功能既可以直接也可以间接地受miRNA分子的调控，因此，miRNA表达水平的些许改变也会对基因表达调控带来巨大的影响。在因为miRNA表达水平改变而造成的疾病中，我们可以设想是否如此，如果能使miRNA表达水平恢复正常，那么就应该能够治愈该疾病呢？那么如果是这样，当miRNA表达水平过高时我们就对其进行针对性下调，如果表达水平过低我们就往细胞内注入一些类似的miRNA模拟物。不过要达到这个目的，我们现有的小RNA递送系统的特异性和有效性都还有待提高。另外，要想对目标miRNA分子表达水平进行精细、准确的调控并非一件容易的工作，而且人们现在还不清楚能否精确地只对一个miRNA分子施加影响而不会“伤及”同一miRNA分子家族中的其它成员。

在实际治疗时，不论是上调还是下调miRNA的功能，我们都还应该考虑到miRNA分子调控机制的复杂程度。要知道一个miRNA分子就可以调控数百个蛋白质的表达水平，因此我们哪怕对一个miRNA分子进行调控也要特别小心。

5. 小RNA治疗的安全性问题

将siRNA分子用于临床治疗会产生很多安全性问题。完成了最初的试验之后，有很多报道都指出了这种新兴疗法可能存在很多潜在的安全问题。最早报道的是在一项小鼠试验中，使用Pol III启动子载体在肝脏中表达shRNA进行治疗，结果导致试验小鼠死亡。具体的致死机制现在还不清楚，但是至少有部分原因可能是因为负责将miRNA分子从核内转运到胞质中的转运因子输出蛋白5（exportin 5）出现了饱和。现在其它试验数据也表明很多参与RNAi处理过程的因子在细胞大量表达外源性siRNA时都会被这些小RNA分子所饱和，因此就无法转运正常的细胞内源性miRNA分子。由于每一个细胞miRNA都能够调控上百种基因的表达，因此对miRNA途径哪怕只带来一点小小的扰动也会造成非常严重的后果。

要解决这个问题有一种办法就是设计能被Dicer酶切割的外源性siRNA（即增加siRNA的长度），这样就能在达到同样治疗效果的前提下使用最低剂量的siRNA药物。这些RNA分子经过Dicer酶切割之后就进入了RNAi途径，这样相比直接使用外源性的21nt的siRNA药物通常都能够以更低的剂量达到更好的基因沉默效果。虽然少量的siRNA分子应该不足以饱和整个RNAi体系，但是它们也能够与其它miRNA竞争RISC复合体进入位点。这种竞争会造成什么样的远期结果现在还不清楚。

使用微阵列芯片可以很明显地发现，往胞内导入外源性siRNA分子之后会改变靶基因的表达水平，但同时也能改变其它非靶基因的表达状况，因为仅凭6、7个核苷酸互补序列的结合就会通过一种miRNA样机制产生特异性的脱靶效应。不过，微阵列芯片只能够反映mRNA水平的改变，不能够反映翻译水平的改变，因此我们还不能明确这种脱靶效应会造成多大的影响。由于使用人工合成的siRNA只能短期抑制细胞基因的表达，因此在临床实践中，这种特异性的脱靶效应可能还不是一个大问题。不过无论如何，在进行适当的毒性试验时我们都应该考虑siRNA与非靶基因mRNA 3'端UTR区域结合后可能出现的问题。

在进行siRNA设计的时候可以采取一些策略，尽量减少这种脱靶情况的发生。比如，在siRNA双链分子中引入2'-O-Me修饰或者进行DNA替换都能够明显降低脱靶现象的发生率。改变热稳定性或者封闭正义链5'端的磷酸化位点，这都能改善反义链选择过程，这对于降低脱靶率也是非常有帮助的。

RNAi机制是一条非常保守的作用机制，它最初的作用可能是帮助物种抵抗病毒的感染。如果是这样，我们也就不会感到奇怪，为什么在某些情况下siRNA能够起到Toll样受体激动剂的作用；某些序列，比如富含尿嘧啶的序列或者富含鸟嘌呤及尿嘧啶的序列能够诱导细胞的免疫应答。siRNA能够刺激细胞出现免疫应答不仅是因为它的序列，还可能是因为它的结构、所使用的递送系统或者细胞类型等等因素。虽然这种免疫刺激在某些情况下可能会有所帮助，但是通常来说我们都不希望它发生。上面提到的TLR3反应对VEGF或VEGF受体起到的非序列特异性调控作用，以及另一起报道中提到的在鼠类动物模型中，靶定巨噬细胞迁移抑制因子（migration inhibitory factor, Mif）的siRNA和非特异性的对照siRNA分子都能够通过能激活蛋白激酶（PKR）的dsRNA的活性增强乳腺癌细胞的增殖能力。上述无一不提示我们，在解释siRNA体内实验结果时一定要倍加仔细。

虽然我们还没能找到一种方法可以避免所有的脱靶效应，但是可以预见，使用恰当的RNA修饰方法和递送途径，从而使RNA分子避免接触天然免疫系统的受体，我们就一定能够解决脱靶这个问题。

6. 展望未来

尽管RNAi技术还非常年轻，但是可以使用它来进行治疗的疾病却非常广泛，这其中就包括帕金森氏症、肌萎缩侧索硬化症（Lou Gehrig's disease）、艾滋病、渗出性老年性黄斑变性、II型糖尿病、肥胖症、高胆固醇血症、类风湿性关节炎、呼吸系统疾病以及肿瘤等等。RNAi已经成为了一个价值数百万美元的产业。到2010年，相关投资总额已经达到了10亿美元，在今后的几年里，知识产权问题将显得越来越重要。

不过，虽然我们已经取得了一定的成绩，但是仍然存在很多阻碍RNAi技术真正走向临床的问题。如果不解决小RNA分子递送途径的安全问题、疗效问题以及可靠性问题，我们就无法使RNA干扰治疗技术真正造福患者。在这个问题上，使用全身给药法进行靶向递送，是我们取得的一大进展。开发新型的非侵入式成像方法，比如用近红外染料对小RNA分子进行标记的方法来监测体内siRNA分子的递送情况。这也将会非常有帮助，这样我们就能及时掌握组织器官对药物的摄取情况以及药物的生物分布情况。

虽然RNAi技术目前还不是一项临床治疗技术，但是全世界都对RNA干扰投注了巨大的关注，因此我们有理由相信，在不久的将来很快就会看到更多更好的进展。RNAi已经彻底改变了整个基础研究领域，而且正在以史无前例的速度走向临床，我们相信未来的几年里一定会收获更多的惊喜。

原文检索：

Daniela Castanotto & John J. Rossi. (2009) The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*, 457(22): 426-433.

 YORK/编译

生命世界 无奇不有

www.LifeOmic.com

热点话题

Hot Topics

全球化背景下 转化医学的现状、 存在的问题及解决方法

转化医学是近2~3年来国际医学健康领域出现的一种新概念。它实际上是我们以前所说的循证医学的升级版，指的是从实验室研究到最终的实际临床应用，包括从最初的构想到最后成为一个真实有用的、可以针对某个疾病的临床诊断工具、判断预后的方法或者治疗药物等。转化医学并非传统意义上的一门学科，它包含了来自各个学科（有时这些学科之间甚至是毫无关联的）的各种知识、工作和研究成果。一项标准意义上成功的转化医学案例通常并不取决于最初的构想是否可行，更重要的其实是在项目进展过程当中能否及时地“随机应变”。

碎片化、效率低下、缺乏条理和连贯性已经成为影响新技术发展的重大障碍。在全球化大背景下的今天，地域界限已经变得十分模糊。要解决各自为政的碎片化格局就需要有全球化的统一视角。我们需要以整体的观念来开发新的方法和工具、培养制定并管理开发流程的能力，最重要的是懂得与各个领域的研究人员合作，合理运用团队的力量。

1. 存在的问题

1.1 知识爆炸的悖论

基础科学的发展曾经迎来了知识大爆炸，不过海量的知识并不足以有效地催生大量的临床诊治技术，这是因为理论和实际之间还存在严重的脱节情况。最近几年这种情况越发严重，这就和信息产业里的Web 1.0升级成Web 2.0的情况一样。至于转化医学，它的进展速度也很缓慢，远远没有跟上同时期文化发展的速度。基础科学领域里的快速发展刺激各学科走向更加细致的专业化方向，但在生物医学领域却没有注意高通量学科和低通量学科之间的联合。一个药物要从众多的候选药物当中脱颖而出，最终成为引领市场的领先药品（lead drug），从最初的分子水平研究到后来的细胞水平，乃至动物水平研究，需要突破好几个重要的瓶颈。而且，随着项目复杂程度的增加，随之碰到的问题也会更多。大量组学概念的应用也导致对疾病的认识出现了疾病碎片化（disease fragmentation）倾向。大量的数据能够让我们对身患同一种疾病，有着同样临床诊断（现在这种临床诊断模式已经过时了），但是在生物学背景上又各异各个亚群患者进行更为细致的分类。于是，就衍生了循证医学。比如，用生物药品来治疗关节炎已经被证明是一种非常有效的方法。值得注意的是，其中某一种药品可能对相当一部分患者是无效的，但是其它的药品却又能给这部分患者带来很好的疗效。这是由于患者之间在遗传背景、表观遗传学以及生物学背景方面存在诸多差异所造成的。然而迄今为止，还没有人在评价不断涌现的各种新兴疗法时将上述这些因素考虑在内。除此之外，在新药开发过程中必须考虑上述因素，按照这些差异将志愿者进行分类，这样才能更好、更准确地判断疗效。

某些情况下，各种高通量检测技术在相对简单的临床实践中的应用似乎并没能取得预期的良好效果。比如，最近有一项研究就表明，使用54个基因组位点信息（54-loci genomic profile）来判断个体身高的新方法还不如早在维多利亚女王时代（即1886年）就被使用的，通过父母身高来判断子女身高的方法准确。

因此，数据越多并不代表一定能够获得更精确、更可靠的结果，也不代表一定能告诉我们更多的信息。

1.2 制药企业、学术机构以及管理机构面临的困境

制药企业里一直沿用的工业化流水式的生产方式的作用已经被发挥到了极限。通过基础研究开发的新药变得越来越少并且越来越复杂，加上存在前面提到的各种各样复杂的因素的影响，我们就更难以判断到底哪个新药才会产生更好的疗效。而且，制药企业里各种专业化的分工现象也使得情况变得更加复杂难办。与此同时，学术科研机构也面临着种种制约，比如缺乏生产能力、没有药物毒性试验条件等等。因此学术科研机构也难以为他们研发的新药开展新药I期临床试验等项目。小型的生物技术公司面临的困难则不一样，他们主要缺乏资金，因为各大投资基金的要求变得越来越严格，他们现在只对成熟度比较高的产品感兴趣（表1）。



表1 转化医学面临的挑战

涉及部门	涉及内容	挑战
制药企业	与研究机构互动	商业机会越来越少但却越来越复杂，从中选择有价值的机会非常困难，缺乏进行药品生产及毒性研究的资源；
	处于小型生物技术公司阶段	产品成熟度的要求越来越严格，风险投资也越来越少，限制了企业的发展；
	企业内部文化	风险规避和过时的管理制度
研究机构	生物医学研究	高通量及低通量技术之间没有充分融合
	知识产权，文章发表及资金投入	各种各样的竞争
	动物模型	动物及人类的生理构造通常有着十分明显的区别
	人体实验	不同个体之间差别较大、参与实验的病人及组织数量有限、伦理及法律方面限制较多；
管理机构	提高监管力度的需求增加	卫生保健费用的增长
	经济衰退	资助研究的国内及国际资金越来越少

近几年来，各国都制定了一系列的法律法规来保护患者权益。在某些情况下，这些管理条例会矫枉过正，从而导致严重的官僚问题，相应的也增加了新药开发的成本。不同国家的立法即使不相矛盾，也会有所不同，在多国参与的研究项目和药品审批过程当中有可能引起进一步的分裂。而且，管理机构以及管理条例本身也都没有足够的能力规范目前处于研发阶段的新型疗法和药物带来的各种问题。另外，管理机构和制药企业一样，也都无法正确地处理这样一种需要，那就是如何发现、确认并正常使用各种生物标志物，以更好、更细致地划分患者人群，而不是按照传统的临床诊断笼统地将患者人群按照病种进行分类。只有这样才能更好地为患者人群“量体裁衣”，开发出最合适的疗法和新药。

1.3 专业人才紧缺

在所有参与转化医学研究的人员当中，有一群专业的“领航员”，他们负责指导整个研发过程。这其中首要的问题就是专业知识，因为不可能要求每个人都是全才，精通各个领域，而且这也不切实际。为了解决这个问题，我们就需要了解整个研究过程，尤其需要配备精通国际领域问题的专业人才，但是我们最急需的这类人员恰恰也就是最缺乏的。其实这已经是一个困扰我们多年的老问题了，早在30年前，当时的临床科研人员（即我们今天的转化医学研究人员）就已经被称作“濒危人群”了。

1.4 我们再也无法承担的成本

有史以来失败过的转化医学研究项目足以列出一张长长的清单，远远要多过取得成功的数目。在病人保健（patient care）方面遭受的挫败十分明显，失败的项目同样使得新药研发的成本不断增加。2003年，美国医学会（Institute of Medicine）临床研究圆桌会议（Clinical Research Round-table, CRR）曾进行过一项广泛的研究，结果发现在基础科学研究成果和最终

能够获得改进的医疗保健服务水平之间存在严重的脱节和不匹配现象。这说明前文中提到的那些问题依旧存在，而且在很大程度上并没有获得改进。在这份报告中将转化医学面临的巨大问题比作“民族的危机和迅速行动起来的信号（national crisis and a call to action）”。不过，这一问题至今还是没能得到充分、有效的解决。

2. 碎片化问题和区域化问题的全球解决思路

随着转化医学专业知识的不断累积，不论是从个体角度还是公共整体角度来说，我们最终是一定能够找到有效的解决办法的。首先，这些知识需要让更多的转化医学从业人员有机会学习和使用到。其次，制药企业、学术科研机构和政府管理部门需要适应专为转化医学重新建立的一整套管理规范。在各个部门之间要建立起良好有效的沟通渠道，国家和国际间的矛盾和冲突也需要得到妥善的解决。主动打造国际视角而不是区域化的局限性思维有助于解决这些问题。通常来说，宏观层面的改变也是微观层面一个个的小成就堆积起来的。

2.1 普及知识、培训人才

该领域需要一类新型的专业人才，以起到促进领域发展和相互协调的作用（表2）。对于这些新型工作者来说，最首要的任务不仅仅是学到足够的理论知识，而是及早投身到转化医学实践领域，接受这个真实而又充满营养的环境对他们的滋养。除此之外，最理想的训练方式还应该是能够在面对各种理论问题的同时，又能亲身体会到各种实际模拟困难的挑战，最好还有老师全程指导。我们从一开始就要培养国际视野，要从中意识到转化医学的复杂性和多样性，这样才能更好地领会国际规则、流程和工作方法。在各行各业都正走向专业化的今天，这一套理论听起来好像是要培养通才，但实际情况并非如此，我们不是在培养全能选手，只是在培养“乐队指挥”。通常来说，指挥家既不用谱曲也不用演奏乐器，但他必须了解所有乐器，知道各种乐器共同演奏会达到什么样的效果，并知道如何呈现一场完美的音乐会。

因此，一位受过专门训练的转化医学研究人员可以帮助各大科研机构重新调整项目原理、入手角度和工作流程，还能够具体指导科研工作者，帮助他们克服一系列困难。有关科研项目流程的专业知识可以帮助转化医学研究人员为每一个实际的、合理的、有前途的研究项目制定开发流程。另外，经过正规训练的转化医学研究人员能够在各个研究机构，比如学术科研单位和制药企业之间，甚至在同一机构的不同部门之间起到联络人的作用。不过，面临各种各样复杂的问题，要获得解决问题的能力、接受有效的系统培训只是一种手段而已。

表2 科学家们需要获得的各种技能和达成此项目的办法

转化医学需要具备的各种特征和技术		训练方法
涉及领域	具备的各种特征和技术	通过各种国际合作项目和实习机会以及各个专门的学术研讨会和综合学习班进行训练；通过国际教育机构帮助训练年轻的研究人员，即翻译医学职业训练；提供学术水平的不同学科训练和翻译医学训练，并且通过各种奖励鼓励参与这种训练；设计翻译医学研究项目或者加入类似的项目
生物医学研究	* 评估生产能力和科学影响力	
	* 各个学科的知识	
	* 良好的实验研究技能	
	* 合理的试验设计	
沟通技巧	* 良好的沟通技巧	
	* 良好的合作能力，能建立起有效的工作团队	
知识产权	* 能寻求到合适的专家帮助产品开发和保护	
	* 有知识产权和专利方面的专门工作	
伦理问题	* 了解本地区和国际上对患者和动物权益保护的相关知识，熟悉大学和管理机构对流程开发的相关规则。	
法律问题	* 了解与转化医学领域、刚成立的公司以及制药企业相关的知识产权法、病人权利、研究人员的权利等的相关法律法规；	
资金	* 有资金支持	
	* 强大的资本支持	
	* 具备风险收益比方面的分析能力	
监督管理机构	* 具备管理机构需要的相关知识和要求	
	* 能够评价标准操作流程的有效性，具备流程优化能力	
临床前实验	* 了解临床实验开展之前的相关监管规定，能评估临床前实验的可行性、优化实验资源及改善实验技术；	
临床前及临床实验设计	* 了解临床前及临床实验设计的相关程序及要求，设计合理的实验方案，克服实验过程中出现的各种难题，开发相关实验技术，促进多方合作；	
基本技能	* “转化式的”思维模式	
	* 有效的、长期的计划	
	* 具有批判式的思维方式，能够处理各种问题	
	* 能开发出完备的操作流程	

2.2 开发工具

转化医学研究人员在实际工作中需要用到的各种手段和工具是他们在学校里学不到的。这些知识包括如何帮助科研人员构想、设计出一个研发项目等。我们之前曾经介绍过新型训练系统的概念，即辅助培养出能够引领转化医学研究人员并帮助他们推动研究项目向前进展的能力，这套系统就是转化医学研究辅助系统（translational medicine research interfaces, TMRI）。这套系统可以起到一种暂时的辅助作用，帮助将同一地区或研究机构中与转化医学有关的各种功能、各个部门和单位整合起来（图1）。

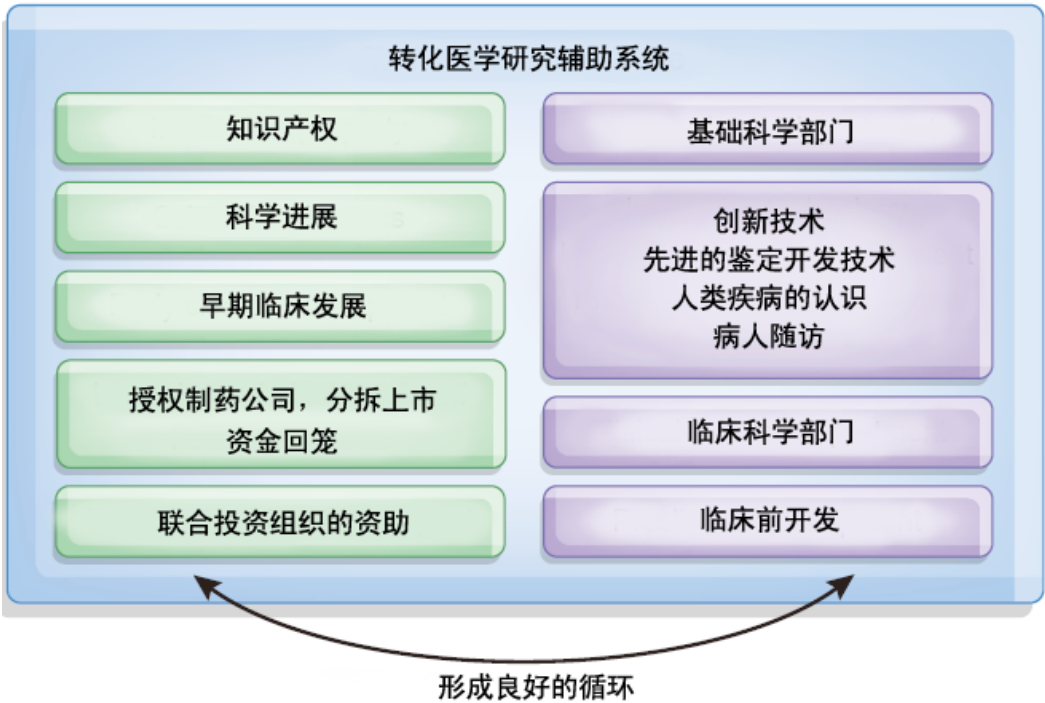


图1 转化医学研究辅助系统图解。绿色方框描述了将构思从概念阶段转化为早期临床开发阶段的步骤。从长远来看，TMRI会建立一个资金循环体系来寻找并开发额外的商业机会。紫色方框表示研究人员必须经历的转化医学阶段。只有很好地发展并改善这些阶段才有可能成功地将研究成果转化为真正的治疗手段。

TMRI的作用是促进、确定并推动医学科技进步向临床工作的转化，这其中重点强调多学科的协作开发能力。TMRI可以将所有的主要持股人汇聚一堂，大家共同制定政策，帮助改进旧有的、但仍旧能够发挥作用的操作流程，使其更具效率，或者干脆将不再适用的“古老”规则

推倒，重新建立起一套新的操作流程。对于学术科研机构来说，TMRI的作用是不可替代的，因为TMRI可以帮助他们攻克一个困扰学术机构多年的“顽疾”——那就是不能有效地将科研成果“转化成”临床上可以使用的实际产品。这其中就包括为科研机构或者科研人员个人提供知识产权建立和保护服务，引导科学家走出实验室，帮助制定政策，以及重新排定工作的先后顺序，制定工作流程等等。当地的TMRI还可以为新型的科技公司提供最为重要，同时又是最为难办的融资服务。

TMRI和美国NIH最初在美国设立的临床及转化科技大奖（Clinical and Translational Science Award, CTSA）之类的机构作用完全不同。设立CTSA之类大奖主要目的是为了代替临床研究中心基金（General Clinical Research Center grant）的作用，为临床研究及相关活动提供更合适的支持和服务。在CTSA大奖的评审过程中，主要支持如何将科学构想转化成实际成果这一类的项目，这部分奖金通常都是分成一个个小部份分别授予的。TMRI是遍布世界各地的生物科技产业孵化器的有力补充部分和“先头部队”。实际上，TMRI这些系统的作用就是筛选出有潜力的科学构想，然后帮助它们走向成熟，最终成为临床可用的产品。

2.3 优化方法、流程和思维方式

将计算机和实验室里的科学构想顺利地转变成病床旁的实际产品，具有非常重要的意义。我们需要大量的新技术和方法，帮助我们将各种抽象的、字面上的、有各种重大功能的组学知识转变成实际的、有用的生物标志物，继而用来进行临床诊断、判断预后或者检测临床药物试验疗效的生物技术产品。这就需要美国食品与药品监督管理局（FDA）以及欧洲医药管理局（EMA）之类的监管机构以及制药企业形成新的监管态度和思维方式（表3）。这种新的思维方式应该重点关注各种新型的转化医学产品，比如能够将计算机试验、体外试验和体内试验等多种临床前试验数据与相应的实验模型结合起来用于药物研发的转化医学药物代谢动力学及药效学模型（translational pharmacokinetic/pharmacodynamic model, PK /PD model）。这将推动各种临床前试验结果和临床实际工作的整合。要想通过PK /PD动物模型实验数据精确推导出人体对药物的反应，则需要应用新的实验方法对PK /PD动物模型实验数据进行“缩放”推导工作。从这个角度来说，将未来的临床研究与相应的生物标志物研究以及与对实验动物模型数据建设性的评估结合起来就显得至关重要了。比如，事实证明在免疫学研究工作中使用人体化的小鼠动物模型（humanized mouse model）就要优于在非人类的灵长类动物中进行药物毒性实验。再比如，按照表观遗传学的理论，我们很好理解为什么某种药物对有些人群无效，而且我们也能够根据各种功能基因组学理论或者免疫组学理论对患者进行分类，从而准确预测药物对哪类人群有效，对哪类人群无效，而不是按照传统的病种分类方法判断对哪种疾病有效。

此外，态度的转变可以由该领域的先行者来提供。例如Critical Path用一种新方法、新技术或新理论重新审视大批人群对某种正在生产、销售或使用的药物的反应，这样就有可能促使大家调整药物的用法，达到更好的疗效。科技的进步加上对以往数据的重新分析就会引导管理机构和政府部门在面对海量碎片化知识时做出根本性的转变。这在开发生物标志物或者对患者人群进行分类以及为新药研发和应用制定相应规则时显得尤为重要。

表3 为了美好的未来需要的其它条件

转化医学所需要的各种管理机构和资助机构	获得方法
在管理领域的需要	● 带来改变的“最原始的”方法，从来自不同领域和专业的人开始 ● 改变思维态度和文化 ● 在地区和国际间营造转化医学研究氛围开展专题研讨会 ● 政府、制药企业和风险投资机构重点支持有潜力的项目进行临床前研究 ● 招募转化医学科学家参与临床试验模型设计工作，最大限度地利用最新的科技和生物标志物 ● 刺激管理人员的积极性，让他们引导科研人员开发新项目 ● 让基础科研人员参与到知识产权工作当中 ● 比较、确认并标准化操作流程，并让科学家、管理人员和制药企业等都参与到操作流程的制定过程当中
* 尽量降低国际间的矛盾	
* 制定并优化操作流程，使其比传统的流程效率更高	
* 在所有关键领域的最高决策会议里都需要有主要持股人参加	
* 制定并完善规则，保证临床试验顺利进行并确保实验的安全性，尤其需要开发针对不同细分人群的生物标志物和疗法	
在新药研发领域里的需要	
* 政府、学术机构和制药企业间紧密合作，尽量发挥最大的潜能，尽力减少损失	
* 重视并优先发展、支持临床前研发	

原文检索：

S Albani, J Colomb and B Prakken. (2010) Translational Medicine 2.0: From Clinical Diagnosis-Based to Molecular-Targeted Therapies in the era of Globalization. *Nature*, 87(6): 642-645.

Salvatore Albani & Berent Prakken. (2009) The advancement of translational medicine—from regional challenges to global solutions. *Nature Medicine*, 15(9): 1006-1009.

 YORK/编译

生命百态

A **mazing Lives**

“冷水鱼”也赶时髦 改造自身鱼鳃以排毒

在冷水环境（cold water）中，金鱼（gold fish）的代谢会相对较慢，那么，你想知道它们是如何设法排出体内毒素的吗？

鱼鳃确实是不寻常的东西，这种多功能器官的日常工作囊括了鱼的呼吸、调节盐分平衡

和废物处理。不过，加拿大渥太华大学（University of Ottawa）的Steve

Perry表示，鱼鳃具有的这些原本极具

竞争力的需求功能现在出现了一些令人

饶有兴味的挑战性问题。比如，大家知

道，宽大的鱼鳃有利于鱼的呼吸和排出

毒素（例如氨），却不利于保留有用的

物质（例如盐分）——而盐分对于淡水

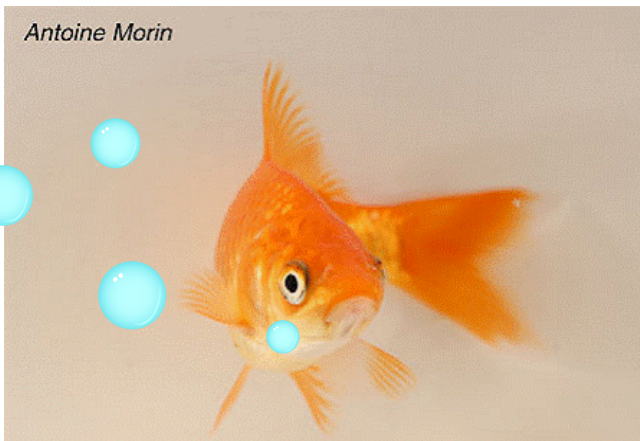
鱼来说是一个大问题。对此，Perry解

释说：“在冷水中，欧洲鲫（crucian

carp）和金鱼（gold fish）利用了一

种叫瓣间细胞团（interlamellar cell

Antoine Morin



mass) 的结构。它覆盖在鱼体的鳃部上用以减少盐分的损失。”然而，要是处于冷水中的鱼的鳃被覆盖住了，那么它们如何能够继续排出毒素呢？

为了找出答案，Perry及其研究小组首先必须证明一点，即具有鳃盖的处于冷水中的鱼（下面简称“冷水鱼”）比暖水中的鱼（下面简称“暖水鱼”）排氨更困难。但是，当研究小组分别对7℃和25℃的金鱼栖居的水缸进行氨水平测量时，他们惊奇地发现，“冷水鱼”排氨并不比“暖水鱼”慢，而是接近于后者的水平。不过，Perry也知道，鱼对新环境温度的适应也能影响体内氨的产生量，于是决定标定鱼体内的氨的含量。果然，在研究小组为金鱼注入大剂量的氨之后，“冷水鱼”在3个小时内只能把注入的负荷氨泵出40%的量，而“暖水鱼”则可以排出90%。

“这个结果与我们的设想是一致的，即具有鳃盖的鱼比没有鳃盖的鱼更难排出氨。”Perry说道：“但是，‘暖水鱼’之所以在这方面表现更好，也可能是因为它们呼吸更快，血流速度更高的缘故。”为了测试这一点，研究小组用一个渔网围着水缸转，以追逐里面的“冷水鱼”，直到它们的呼吸与“暖水鱼”一样快为止。接着，他们分别测量活动过和未活动过的鱼所在鱼缸里的氨水平。结果令Perry很满意：“瞧！我们可以把一条7℃的鱼变成25℃的了！”所以，“冷水鱼”能够仅仅通过加快呼吸来避免中毒。不过，这样就够了吗？研究小组仍未满足，他们对一件事情依然很困惑，当他们比较处于不同水温的鱼时，发现“暖水鱼”摄食较多、呼吸频率较快、血流速度也较高，而这些因素全都能影响氨的排出。于是，研究小组设计了一个方法，他们把具有鳃盖和没有鳃盖的冷水鱼进行比较，这样就能把温度因素从整个平衡式中单独提取出来了。

接下来，研究人员设法使有鳃盖的“冷水鱼”处于缺氧的状态，这样它们就得被迫打开鱼鳃了。实验的结果使研究小组很兴奋，他们发现：这些打开鳃盖的鱼比未打开鳃盖的鱼排氨的速度快得多。Perry认为：“这清楚地表明了瓣间细胞团确实妨碍了氨的排泄。我们现在回到了最初的问题：当‘冷水鱼’合上鳃盖时，它们会如何设法像‘暖水鱼’一样排泄氨呢？”

研究小组的人员知道，氨是通过一种叫Rhesus蛋白的通道进行转运的。因此，他们决定进一步观察Rhesus蛋白分别在“冷水鱼”和“暖水鱼”体内的表达和分布情况。结果，小组发现，尽管Rhesus蛋白的表达不随温度的变化而改变，但这种蛋白却在“冷水鱼”的鳃边缘进行重分布。这样，即使它们的鳃被覆盖，冷水鱼也能轻松地把氨排出体外。最后，Perry总结说，当温度下降时，鱼能通过改造鱼鳃以减少盐分的流失，同时也能简单地通过重置氨转运蛋白，从而避免自己中毒。

原文检索：

Perry, S. F., Schwaiger, T., Kumai, Y., Tzaneva, V. and Braun, M. H. (2010). The consequences of reversible gill remodeling on ammonia excretion in goldfish (*Carassius auratus*). *The Journal of Experimental Biology*. 213, 3656-3665.

 文佳/编译



飞鱼像鸟儿一样滑翔

我们都熟悉那些玩潜水就像飞行一样自如的鸟儿们。但是，只有一种鱼才能够把飞行玩得跟潜水一样好，那就是飞鱼了（flying fish）。飞鱼能够持续飞行超过40秒，并以70km/h的速度飞行长达400米的距离。很神奇吧？当一位来自韩国首尔大学（Seoul National University）的机械工程师Haecheon Choi在给自家孩子念科普读物时，被书上描述的这种飞鱼迷住了。他跟同事Hyungmin Park意识到：原来飞鱼真的能飞行，而不仅仅是个传说。于是，他俩决定发掘一下这些出人意料的飞行者是怎么在高空停留的。

不过，想要让飞鱼乖乖地在风道里进行试验，做起来可就不像说的那么容易了。两位研究者为此跑到了日本，试试能否从世界著名的筑地鱼市买到这种鱼。结果，他们居然碰到了与韩国水产业协同组合中央会合作的机会。于是，Park到韩国东部海域，并成功运回40条拥有深色边缘翅膀的飞鱼。他从中遴选了5条大小相似的鱼，把它们带回了韩国海洋动物研究中心，并在那儿对鱼儿们进行了干燥和填充处理。在这些经过处理的鱼之中，除了一只鱼的鳍收拢在身体两侧外，其余鱼的鱼鳍均被展开，就像它们飞行时的样子。这样，就为它们将在风道进行的空气动力学测试做好了准备。Park和Choi把六维力传感器系在鱼的翅膀上，再把鱼体倾斜，使其角度处于 -15° 至 45° 的范围内。然后，他们测量了在模拟飞行时飞鱼标本鱼鳍的受力情况。

Choi和Park计算了飞鱼的升阻比，这是对滑翔过程中水平距离和下降高度之比的量度。结果，他们发现飞鱼表现得非常好：它们的滑翔水平比昆虫要好，甚至能和海燕、林鸳鸯（Aix sponsa）这类鸟儿媲美。然后，两位研究者在分析飞鱼的升阻比是如何随着倾斜角度的变化而改变时，发现当飞鱼平行于水平面时，其升阻比最高，滑翔得也最远，而它们在海上飞翔的时候也是这么做的。接着，两位研究者通过测量空中飞鱼的倾斜瞬间，还发现它们滑翔的时候非常平稳。而当他们分析飞鱼在收回鱼鳍呈游泳姿态的稳定性时，发现飞鱼变得不平稳了，而这正是它们需要的水中机动性。因此，飞鱼能完美地适应两种不同环境的生活。

Choi和Park知道，飞鱼总是在海平面附近飞行，于是他们决定看看飞鱼是否因为接近海平面飞行，而因此受其产生的空气动力学效应而受益。他们降低了鱼在风道里的高度，结果发现鱼标本在接近地面“滑翔”的时候，其升阻比增加了。接着，Park用一缸水代替固体平面，结果鱼的升阻比进一步提高，从而使鱼得以滑翔得更远。因此，鱼在海平面附近滑翔能助其飞得更远。

最后，Choi和Park设想，如果直接让气流通过并环绕着飞鱼的翅膀及其整个身体，会出现什么样的情况呢？两位仁兄说干就干，他们在鱼体上方喷入雾状气流，结果看到喷涌而出的空气加速推动了鱼体的前进。Park解释说，在飞鱼身体的前部是宽大的胸鳍，后部则是较小的腹鳍，这样一前一后的生理构造促使空气加速向鱼的尾部流动，使其看上去就像一架喷气式飞机。这样，鱼的升阻比就进一步地增加了，飞鱼的飞行能力也就更进一步地提高了。

现在，Choi和Park已经证明了飞鱼的确是出色的飞行者。接下来，他们渴望循着飞鱼技术激发的灵感，利用地面空气动力学效应制造一架飞机。让我们拭目以待吧！

原文检索：

Park, H. and Choi, H. (2010). Aerodynamic characteristics of flying fish in gliding flight. *J. Exp. Biol.* 213, 3269-3279.



文佳/编译

飞鱼属银汉鱼目飞鱼科，广布于全世界的温暖水域，以能飞而闻名。这种鱼体型皆小，最大约长45公分（18寸），具翼状硬鳍和不对称的叉状尾部。飞鱼其实并不是依靠翼状翅飞翔，而是依靠鱼鳍和尾部的推动力滑翔。这种鱼生活在海洋上层，平时并不轻易跃出水面；但它同时也是各种凶猛鱼类争相捕食的对象，因此每当遭受敌害攻击，或轮船引擎震荡声刺激的时候，就会施展出“飞翔”本领。

贪吃的淡海栉水母捕食于无形

北美的淡海栉水母（North American comb jellyfish）虽然身体结构简单，却可以像一艘肩负秘密行动任务的高科技潜艇一样，悄无声息地捕食猎物。这种不可多得的优势使水母成为食肉动物界的翘楚。如今，研究者们，包括一位来自哥德堡大学（University of Gothenburg）的学者已经能够证明水母在水流中是如何“潜伏”的了。

长期以来，北美淡海栉水母（*Mnemiopsis leidyi*）以吞食大量浮游生物而声名在外。数年前，这种生物就在北欧站稳了脚跟。

淡海栉水母如同其它多种水母一样，拥有庞大的胶质身体。它的庞大身躯增加了碰到猎

物的机会，但也给自身带来了一些麻烦，原因在于它的猎物往往对水中的动静高度敏感。不过，淡海栉水母仍能设法捕捉到大量以快速逃逸反应而著称的桡足类浮游动物。

“桡足类动物拥有一种高度进化的能力，能检测出哪怕最轻微的水波变化。”那位来自哥德堡大学海洋生态学系的研究者Lars Johan Hansson说，“它们能在水波刚刚变化的瞬间，就清楚地知道其变化的源头，然后游走。这样，淡海栉水母究竟如何靠近并捕捉到这些世界上时刻都最为警惕的浮游动物的呢？在此之前，根本无人知晓。”

于是，这些先驱的研究者们利用先进的视频技术来研究淡海栉水母周围和体内的水流情况。然后，他们运用这些测量数据计算水母产生的水波变动情况，再与能使浮游生物产生逃逸反应的水波强度进行比较。

“结果显示，淡海栉水母运用它口腕里面极细微、如头发丝般的纤毛，形成一股向内移动的气流，它极小心地把水引入栉水母的口腕之间，随同在内的猎物也缓慢地随波流动，在不知不觉中跟着水流进入了栉水母的口中。只有当它们接近水母口腕内的捕捉部位时，才惊觉警报袭来，然而为时太晚，根本无法逃走了。依靠这样的捕食妙招，淡海栉水母就成为了潜伏于水流之中的沉默杀手了。”



图 北美淡海栉水母（*Mnemiopsis leidyi*）身体结构简单，只有两条用于捕猎的大口腕。

原文检索：

<http://www.physorg.com/news/2010-10-voracious-jellyfish-invisible-prey.html>

文佳/编译

淡水栉水母属栉水母动物门兜水母目，俗名栉水母或海胡桃，以可食性浮游动物、鱼卵以及幼虫等肉食为生，会破坏水产养殖业。这种动物原生于北美与南美大西洋沿岸的温带至亚热带河口，在上世纪八十年代初意外经由船只压舱水传至黑海，并对当地生态系造成灾难性的冲击。八十至九十年代间，淡水栉水母入侵至亚速海、马摩拉海与爱琴海，而后更经由油轮的压舱水被引入了里海。目前该物种已被研究得较为透彻。

新发现对鲨鱼嗅觉神话产生质疑

大家都知道鲨鱼拥有惊人的嗅觉。如果你向加利福尼亚州的蒙特利尔湾水族馆的鲨鱼水箱中扔一块鲑鱼肉，那么马上就能够看到它的行动了。

“只要气味一触及水，它们马上就能知道。”一位在蒙特利尔湾水族馆饲养几种鲨鱼的饲养员Erin Carter如是说，“如果是早上刚从甲板运来的新鲜食物，它们会马上不顾一切地扑上去。”

但是，这些水上猎犬真的如同传说中所言，能够在标准的奥林匹克游泳池中发觉一滴血的存在吗？

对于佛罗里达州的科学家们而言，这个神话听起来有点可疑，于是他们决定拿它来验证一下。他们发现，与它们在电影、纪录片和页数可观的科学日志中的表现相比，鲨鱼是盛名之下其实难副。他们表示，尽管一条鲨鱼的嗅觉非常灵敏，但也不会比一条普通的鱼好多少。位于博卡拉顿的佛罗里达大西洋大学（Florida Atlantic University）的一位生物学家Tricia Meredith说：“以我们目前所知，鲨鱼在一个标准的奥林匹克游泳池中是无法嗅出任何一滴什么的。”



水中滴血试验

关于鲨鱼拥有海洋中最灵敏的鼻子的想法恐怕部分是由于我们对嗜齿食肉动物的恐惧而激发出来的。**Meredith**说：“人们担忧的是，如果他们在海洋中撒尿或流血，鲨鱼就会嗅出来，然后把他们吃掉。”

但其实科学界认为，鲨鱼的嗅觉美名是基于其解剖生理结构的。它们与人类不同，拥有不同的开口负责呼吸和嗅觉。鲨鱼头部两侧的鱼鳃负责吸取水中的氧气，而位于脸部前方的两个鼻孔则把水吸入鼻腔，并探索其中的味道。

鼻腔中的大量组织被许多薄片包裹，这些薄片被称为“小片”。与其它种类的鱼相比，鲨鱼的“小片”显得十分巨大。因此，科学家们长期以来都认为，这块巨大的表皮区赋予了鲨鱼更灵敏的嗅觉。不过，**Meredith**说：“这其实是一个极具逻辑性的推论，过去从未有人真正测试过它的真实性。”

为了测试这个假说，**Meredith**研究了五种不同种类的板鳃亚纲鱼类（学术上表示一种囊括了鲨鱼的亚纲）。它们在远离佛罗里达海岸的水域中被捕，种类由扁髯鱼、黄貂鱼到短吻柠檬鲨、头像锤子一般的锤头鲨不等。

每一种板鳃亚纲鱼都被放养在一只水箱里，每只水箱都配有与鱼的鼻子相连的仪器装置。这套仪器装置包括一条可释放20种氨基酸的管子（这些氨基酸是“建材”，它们组成了可引导鲨鱼捕猎的动物蛋白质），还有一套电极，用于测量鱼鼻腔中针对气味应答而产生的电脉冲。

结果，实验记录表明，一般而言，鼻内褶面积较大的鲨鱼在察觉微弱气味方面没有表现得更突出。

另外，五种受测的鲨鱼的嗅觉灵敏度彼此相差无几，不但如此，它们的嗅觉灵敏度与在其它研究中已测试过的非鲨鱼类鱼的也差不多。研究者测出这些鲨鱼的最好成绩是：能从十亿滴水中嗅出溶于其中的一滴有气味的液体。十亿滴水是个什么概念呢？我们知道，一滴水大约为0.05ml，而一升水相当于0.001立方米，那么十亿滴水的体积仅仅是50立方米，与标准游泳池相比简直是小巫见大巫了。

这样的事实或许有点儿令人失望，不过，研究者们对此有这么一种解释：鲨鱼的嗅觉灵敏度哪怕再多一丁点儿，事实上都会让它无所适从。其实，十亿分之一的浓度大概与自然条件下沿岸海水中漂浮的氨基酸浓度差不多。如果鲨鱼能轻而易举地嗅出比这还要低的浓度气味，那么它们恐怕会难以区别出什么是海上偶然碰到的水中漂浮物（比如沉船残骸和垃圾），什么是潜在的意外美餐。

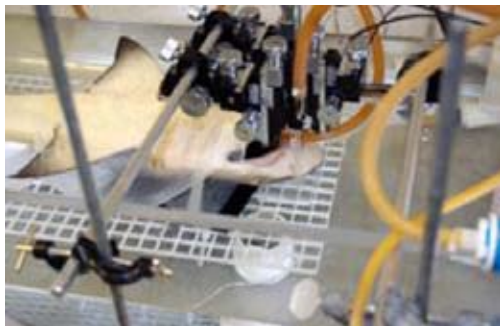


图 一条鲨鱼正待被喷入有气味的氨基酸。

“想象一下吧，如果你对声音高度敏感，甚至能非常清楚地听到耳语声，”Meredith说，“那么要是让你一直住在高声播放立体声音响的房间里，一定会感到很痛苦。”

所以，论及鲨鱼的无敌嗅觉神话，Meredith的结论是：“神话破灭了。”

不过，对于波士顿大学（Boston University）研究鲨鱼嗅觉的学者Jelle Atema而言，这个神话只是破灭了大半。尽管对这项新研究印象深刻，但他依然表示科学仍为进一步的探索留下了一点儿空间。

Atema认为，Meredith的电极实验是检测数以百万计的嗅觉感受器加起来对某种气味的整体电反应。而他希望能进一步检测单个细胞群——或许它们其中的一部分会对特定的气味专门发生反应呢？

“假定这些嗅觉感受器是一个合唱团，”Atema说，“那么团体本身的合唱可能不会很大声，但如果你走近倾听，或许能发觉其中某些人的声音会比其他成员更大一些。”

目前，Meredith的研究只是集中于海岸附近的鲨鱼。Atema想知道研究的结果是否同样适用于开阔海域的鲨鱼，毕竟它们所处环境的气味浓度会稍低一些。

Atema的研究工作也表明：水生动物能察觉出极低浓度的非氨基酸化合物。而金枪鱼则能从数万亿滴水中嗅出溶于其中的一滴色氨酸（火鸡肉中含有的一种常见化合物）的气味。

现在我们知道，迄今为止，最有力的科学证据表明关于鲨鱼的流行神话该出升级版了：内容是鲨鱼只能从后院的小游泳池那么大体积的水中嗅出一滴血的气味。不过，它依然令人印象深刻，只是不会像好莱坞使我们以为的那样可怕罢了。

原文检索：

<http://www.physorg.com/news/2010-10-shark-myth-fishy.html>

 文佳/编译



www.LifeOmic.com

www.LifeOmic.cn