

文章编号 :1000-1336(2005)04-0339-04

siRNA 的化学修饰和临床应用

孙莉萍 翁建 张秀明 张其清

(厦门大学医学院生物医学工程研究中心、厦门市生物医学工程技术研究中心, 厦门 361005)

摘要: RNA 干扰(RNAi)是目前分析基因组功能及基因治疗的一个有力工具,引起基因沉默现象的小干扰 RNA (siRNA)需要经过适当的化学修饰才能应用于体内。该文总结了既能稳定 siRNA 双链,又能有效抑制靶基因的几种常用化学修饰法,包括磷酸骨架修饰、核糖修饰和碱基修饰等。正确的修饰将会极大地促进 RNAi 药物从体外到体内、从实验室到临床应用的转化。siRNA 作为一种很有潜力的药物将为治疗病毒性疾病、肿瘤和遗传病开辟一条崭新的道路。

关键词: siRNA; 化学修饰

中图分类号: Q52

RNA 干扰(RNAi)是具有同源序列的双链 RNA 引起的转录后基因沉默现象,这一技术已成为分子生物学家分析基因组功能和基因治疗的一个有力工具^[1]。siRNA (小干扰 RNA)是 RNAi 的效应分子,由两条互补的 RNA 单链构成,长 21-23 个核苷酸(nt)。siRNA 双链中和信使 RNA (mRNA) 的靶向序列相同的链称为正义链,与之互补的另一条链为反义链。siRNA 包括 5'-磷酸末端、19nt 的双链区、3'-羟基末端和 2 个不配对的 3 端核苷酸突起,可指导 mRNA 的裂解^[2](图 1)。

产生 siRNA 的方法有多种,其中化学合成法

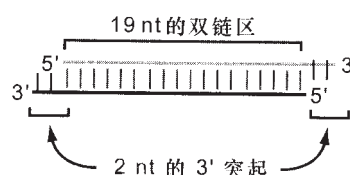


图 1 siRNA 的结构
(nt 代表核苷酸)

简单易行。但由于 siRNA 的稳定性较差,在体内容易被核酸酶降解,不易被组织吸收,因而在体内的应用受到了限制^[1]。对合成的 siRNA 进行化学修饰是可行的办法,恰当的修饰能够增加 siRNA 的稳定性,同时有效抑制目的基因的表达。未修饰的 siRNA 与血浆蛋白亲和力不够,不被细胞摄取,所以用于治疗 siRNA 在不使用病毒等基因治疗载体时,需要先进行化学修饰^[1]。siRNA

收稿日期: 2005-04-18

厦门大学引进人才基金资助

作者简介: 孙莉萍 (1974—), 女, 博士, 讲师, 联系作者, E-mail: sunliping@xmu.edu.cn; 张其清 (1954—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: zhangjq@xmu.edu.cn

H5N1 流感病毒、口蹄疫疾病病毒、星状病毒(astrovirus)和鸟类的 H7 亚型流感病毒等物质的测定。

ECL 核酸分析法由于其设备简单、灵敏度高、可控性强和选择性好等优点已成为生物电化学的一个非常有生命力的科学前沿。开发廉价并具有良好性能的 ECL 标记物和嵌合剂,建立新型 ECL 核酸序列分析方法,研制微型化、实用性强 ECL 核酸序列分析仪器,扩大 ECL 核酸序列分析法在临床医学分析、环境检测中的应用,将无疑是 ECL 核酸分析的主要方向。

参 考 文 献

- [1] 王 鹏 等. 科学通报, 1998, 43(21): 2241—2247
- [2] 陈 扬 等. 化学通报, 2001, 9: 537—546
- [3] 陈国南 等. 世界科技研究与发展, 2004, 26(4): 66—74
- [4] 张成孝 等. 世界科技研究与发展, 2004, 26(4): 7—13
- [5] Richter MM. Chem Rev, 2004, 104(6): 3003—3036
- [6] Gerardi RD et al. Anal Chim Acta, 1999, 378: 1—41
- [7] Fahrnich KA et al. Talanta, 2001, 54: 531—559
- [8] Blackburn GF et al. Clin Chem, 1991, 37 (9): 1534—1539
- [9] Kenten JH et al. Clin Chem, 1992, 38 (16): 873—879
- [10] Yang ML et al. Analyst, 2002, 127: 1267—1271
- [11] Miao WJ et al. Anal Chem, 2003, 75: 5825—5834
- [12] Dennany L et al. J Am Chem Soc, 2003, 125: 5213—5218
- [13] Bard AJ et al. Anal Chem, 2004, 76: 5379—5386
- [14] Kuwabara T et al. Anal Biochem, 2003, 314: 30—37
- [15] Kenten JH et al. Clin Chem, 1991, 37(9): 1626—1632
- [16] Motmans K et al. Immunol Methods, 1996, 190: 107—116

表1 几种有效的 siRNA 化学修饰

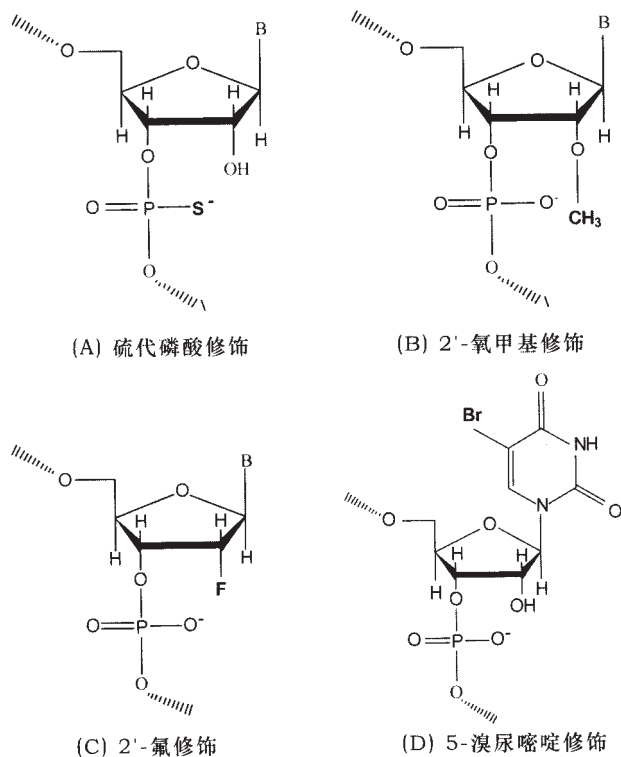
siRNA的靶基因	修饰方式	修饰部位	实验对象	文献
hTF	硫代磷酸 (P-S键)	磷酸骨架	HaCaT细胞	[3]
hTF	2-氧甲基 (2-OMe)	核糖	HaCaT细胞	[3]
EGFP	2-氟嘧啶 (2-FU, 2-FC)	核糖	HeLa细胞	[4]
EGFP	5-溴尿嘧啶 (5-BrU)	碱基	HeLa细胞	[4]
luc	脱氧胸腺嘧啶替代3突出的2个尿嘧啶	碱基、核糖	HeLa细胞	[5]
apoB	胆固醇修饰 (siRNA 双链含部分 P-S键和 2-OMe核糖)	正义链的3端	C57BL/6小鼠	[6]

的化学修饰主要有三类：磷酸骨架修饰、核糖修饰和碱基修饰。表1总结了既能增加 siRNA 的稳定性，又能维持其基因沉默效力的几种化学修饰。

1. 磷酸骨架修饰

连接 RNA 磷酸骨架的磷酸二酯键是核酸酶作用的化学键，而磷原子是核酸酶攻击的中心，对该原子稍加改变即会大大影响酶的降解作用，故研究最多的化学修饰是磷原子，如硫代修饰。硫代修饰最初广泛用于反义技术中提高寡聚核苷酸对核酸酶的抗性。硫代磷酸是用一个硫原子取代磷酸二酯键的非桥氧原子 [图 2(A)]，即 P-S 键替代 P-O 键，提高了 siRNA 抗核酸酶的能力，增加它的稳定性^[4]。

siRNA 正义链的硫代磷酸修饰对 RNA 干扰的活性影响较小，基因表达抑制率为 62%；而对

图2 siRNA 的不同化学修饰^[4]

(B代表碱基,粗体字为修饰部位)

siRNA 反义链或双链的硫代磷酸修饰会明显影响 RNAi 的活性，基因表达抑制率小于 50%^[4]。小鼠体内药代动力学试验显示：硫代磷酸修饰提高了 siRNA 在小鼠血中的滞留时间，但不改变 siRNA 静脉注射后在体内的生物分布。小鼠分别静脉注射双链均为磷酸二酯键的 siRNA (用 PO/PO 表示) 或一条链为磷酸二酯键、另一条为硫代磷酸酯键的 siRNA (用 PO/PS 表示) 后，前 4 小时 PO/PS 在血中的浓度显著高于 PO/PO，肝、肾对 PO/PS 的摄取低于对 PO/PO 的摄取，说明 PO/PS 双链抗血清核酸酶的能力较强^[7]。

2. 核糖修饰

对 siRNA 最重要的修饰是对核苷酸戊糖 2-羟基 (2-OH) 的修饰。2-OH 是 RNA 与 DNA 的主要区别，RNA 水解时，在 RNA 酶催化下，2-OH 首先进攻磷酸基，在断开磷酸酯键的同时形成环状磷酸二酯，再在碱的作用下形成水解产物。在核糖的 2 位置引入某些取代基如甲基、氟后，使 siRNA 具有更强的抵抗核酸酶水解的性能。实验结果显示，2-OH 对 RNA 干扰的效果并不重要，siRNA 与 mRNA 形成的双链结构是诱导 RNAi 的重要因素。单纯正义链、单纯反义链和双链的核糖修饰都明显抑制了靶基因的表达^[4]。

第一种核糖修饰是在 siRNA 戊糖的 2 位置引入烷基，如 2-O-甲基 (2-OMe) [图 2(B)]。siRNA 任何一条链的核苷酸如果全部甲基化将导致 siRNA 失去基因沉默的活性，故一般只对两条链的末端核苷酸甲基化。体外试验证明，3 端最多修饰 4 个核苷酸有效，一个 5 端有两个甲基化核苷酸、3 端有 4 个甲基化核苷酸的 siRNA 与未经修饰的 siRNA 抑制基因表达的活性基本相同，但是在细胞培养物中引起基因沉默现象的时间延长。3 突起端可以耐受各种类型的修饰，但随着 siRNA 甲基化核苷酸的数目增多，其 RNA 干扰的活性逐渐下降^[3]。

第二种修饰 2-氟嘧啶是将 siRNA 上嘧啶核

苷酸的 2-OH 用 2-F 替代 [图2(C)], 2-F 使 RNA 酶不易识别 siRNA, 从而增加了 siRNA 的稳定性。血浆试验证明, 一半以上的 2-OH siRNA 在 1 分钟内降解, 4 小时后全部降解。而 50% 以上的 2-F siRNA 在 24 小时后仍保持完整, 48 小时后 25% 的 2-F siRNA 保持完整。细胞转染试验和小鼠体内试验发现 2-F siRNA 与 2-OH siRNA 的基因沉默效应无明显差别^[6]。双链 2-F siRNA 的稳定性最强, 无论修饰或未修饰的单链 siRNA 都没有双链 siRNA 稳定。修饰和未修饰的 siRNA 最大 RNAi 效应均出现在细胞转染后 42 小时, 对靶基因 EGFP 表达的最大抑制率均在 85%~90%, 但 66~120 小时 2-F siRNA 的基因沉默效应比 2-OH siRNA 作用更持久。转染后 120 小时 2-F siRNA 仍抑制 80% 的 EGFP 表达, 而 2-OH siRNA 抑制率仅为 40%^[7]。

3. 碱基修饰

siRNA 与 mRNA 通过碱基互补形成氢键, 发挥 RNAi 的作用, 因此可以对碱基进行修饰, 加强碱基之间的相互作用。在尿嘧啶的 5 位点引入溴或碘是常使用的碱基修饰方法, 如 5-溴-尿嘧啶 [图2(D)]、5-碘-尿嘧啶可加强腺嘌呤-尿嘧啶 (A-U) 之间的连接, 提高碱基的相互作用, 从而增强对靶 mRNA 的效应^[4]。

4. 其他修饰

siRNA 带负电荷且有较强的亲水性, 因此不易与带同样电荷的靶细胞接触, 更不易透过由脂质双分子层构成的细胞膜进入细胞内与 mRNA 发生作用。引入亲脂性基团如胆固醇能加强 siRNA 的亲脂性, 增加其透过细胞膜的能力。所以科学家将一个胆固醇分子附着在 siRNA 正义链 (含部分硫代磷酸键和 2-O-甲基核糖) 的 3 端; 把这种改良后的 siRNA 分子注射到具有高胆固醇水平的小鼠血管中, 通过抑制载脂蛋白 B 基因的表达, 间接降低血胆固醇的水平, 结果表明实验鼠体内的有害胆固醇含量下降了 44%^[6]。

另外, 用 2 脱氧胸腺嘧啶核苷酸代替 3 突出的尿嘧啶核苷酸, 其 RNA 干扰的效果相同, 但是合成时更廉价, 而且更能抵抗核酸酶的消化^[5]。

siRNA 的正义链和反义链有不同的功能, 反义链决定靶点的识别, 正义链突出端的修饰不影响靶点的识别, 从而不影响 RNA 干扰的效果。反义链 3 端的突起起识别与结合靶 mRNA 的作用, 该处的化学修饰显著降低了 RNA 干扰的程度^[9]。

总的来说, siRNA 的修饰方法可以归纳为以下几点: (1) siRNA 核苷酸的 2-羟基不是产生 RNAi 的必要条件, 可以用氟或甲基等替代; (2) 全链修饰将导致 siRNA 失去活性, 一般仅对双链末端 1~4 个核苷酸进行修饰; (3) 对正义链的修饰或正义链少数碱基不配对较少影响 siRNA 的活性, 而反义链的修饰对 siRNA 基因沉默的活性影响较大; (4) 用脱氧核苷酸替代 siRNA 3 端突出的核苷酸, RNA 干扰的效果相同, 但合成价格更低, 更能抵抗核酸酶; (5) 为了促进 siRNA 进入细胞内, 可以在以上修饰的基础上在 siRNA 正义链的末端引入胆固醇等亲脂性基团。

siRNA 在哺乳动物细胞中的研究近 3 年得到了迅速的发展, 其特异性和高效性使人们对它的研究热情很快超过了反义寡聚脱氧核苷酸和核酶。由于 siRNA 能抑制特定基因的表达, 应用 siRNA 进行基因治疗有非常广阔的临床应用前景。各大生物技术公司都在积极开发这类药物, 并即将进入临床试验阶段^[1]。siRNA 可望用于治疗某些病毒性疾病、癌症和遗传病。

siRNA 用于病毒性疾病的治疗首先研究的是艾滋病病毒 HIV, 包括针对 HIV 基因组 RNA 的 siRNA 和针对宿主细胞 HIV 受体 CD4 的 siRNA。对乙型肝炎病毒 HBV 的研究均也获得了巨大的进展, 小鼠试验中, siRNA 通过直接抑制 HBV 的基因组显著减少了病毒的复制。针对丙型肝炎病毒 HCV 的 siRNA 在体内可以有效地切割 HCV RNA, 起到抗病毒的作用^[10]。

其他病毒如 SARS 病毒、呼吸道合胞病毒、脊髓灰质炎病毒等均有体外 siRNA 的研究, 但体内抗病毒的效果尚须在动物实验中进一步证实。

原癌基因是细胞基因组中的正常组成成分, 当受到多种因素的作用使其发生变异时, 激活成为癌基因, 癌基因与细胞异常增殖及癌的发生有关。目前已经有治疗癌症的反义寡聚核苷酸上市, 由于 siRNA 比反义技术具有更加显著的基因抑制效应和高度特异性, 因此应用 siRNA 来抑制癌基因的 mRNA, 从而抑制肿瘤生长, 将会成为一种很有前景的肿瘤治疗手段。亨廷顿氏症是一种导致神经退化的遗传性疾病, 由一种有缺陷的蛋白质造成, siRNA 可以干扰制造这种缺陷蛋白质的 mRNA^[10], 减少缺陷蛋白质的产生, 从而减轻对神经系统的毒害作用。另外, siRNA 通过抑制载脂蛋白 B 的基因表达还可以间接降低血胆固醇

硫代葡萄糖苷及其降解产物异硫代氰酸盐

王忠英 王向阳

(浙江工商大学食品系,杭州 310035)

摘要: 硫代葡萄糖苷是一种含硫的次级代谢产物,广泛分布于十字花科植物中。不同的栽培种、不同的生理阶段、不同的组织部位以及不同的栽培条件,都会使植物中含有的硫代葡萄糖苷的含量和成分有所变化。当硫代葡萄糖苷经葡萄糖硫苷酶作用时会发生降解,生成异硫代氰酸盐等产物。采后的一系列处理会影响植物中硫代葡萄糖苷的含量。硫代葡萄糖苷的降解产物异硫代氰酸盐作为一种化学预防剂,能抑制阶段酶(phase enzyme),诱导阶段酶(phase II enzyme),从而防止癌症的发生。目前对硫代葡萄糖苷的鉴定方法主要是高效液相色谱法,气相色谱法等。

关键字: 硫代葡萄糖苷; 异硫代氰酸盐; 甲基亚磺酰烷异硫代氰酸盐

中图分类号: Q74

硫代葡萄糖苷(glucosinolates, GLS)是植物的一种含硫次级代谢产物,目前,在植物中已发现了120多种硫代葡萄糖苷,其基本结构如图1所示。目前,国际上对硫代葡萄糖苷及其降解产物异硫代氰酸盐(isothiocyanate, ITC)的研究非常热门,有很多研究已经表明异硫代氰酸盐有良好的抗癌效果^[1,2]。同时,异硫代氰酸盐还具有防止微生物繁殖和间接的抗氧化作用^[3]。

1. 硫代葡萄糖苷的分布

硫代葡萄糖苷广泛存在于15种双子叶植物中。这15种双子叶植物是叠珠树科、Bataceae、十字花科、伯乐树科、白花菜科、番木瓜科、大戟科、环蕊科、沼花科、辣木科、Pentadiplandraceae、木犀草科、Salvadoraceae、旱

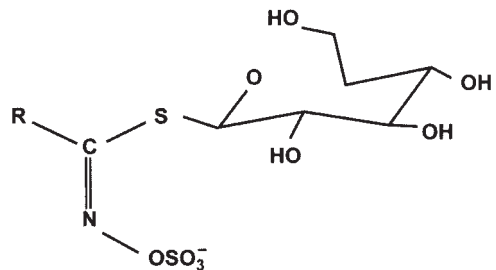


图1 硫代葡萄糖苷的基本结构

金莲科和多籽果科。其中的十字花科植物含有非常丰富的硫代葡萄糖苷,抗癌活性很高,受到了广泛的关注。目前含硫代葡萄糖苷的绝大多数栽培种属于十字花科芸苔属。

2. 硫代葡萄糖苷的种类与含量

到目前为止,已经从植物中发现了120多种硫代葡萄糖苷。根据支链R的不同结构,可将硫代葡萄糖苷分为三大类:脂肪族硫代葡萄糖苷(第一类)、芳香族硫代葡萄糖苷(第二类)和吲哚族硫代

醇的水平^[6]。

虽然 siRNA 用于疾病治疗还存在许多尚未解决的问题,如药物释放方式、药物靶向性、潜在的毒性等,但作为一种很有潜力的药物, siRNA 将为人类疾病的治疗开辟一条崭新的道路。而正确的化学修饰将极大地促进 RNAi 药物从实验室研究到临床应用的转化。

参 考 文 献

[2] Dykxhoorn DM et al. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 457—467

[3] Amarzguioui M et al. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 589—595

[4] Chiu YL et al. *RNA*, 2003, 9(9): 1034—1048

[5] Elbashir SM et al. *Methods*, 2002, 26: 199—213

[6] Soutschek J et al. *Nature*, 2004, 432: 173—178

[7] Braasch DA et al. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14: 1139—1143

[8] Layzer JM et al. *RNA*, 2004, 10(5): 766—771

[9] Hamada M et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2002, 12: 301—309

[10] Hannon GJ et al. *Nature*, 2004, 431: 371—377