体内 RNAi 经验大家谈

对于那些之前只能用基因敲除小鼠来研究基因功能而备受挫折的研究人员而言，体内 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）技术的出现就好像是救兵一般，令人欣喜。基因敲除方法欠缺灵活性而受到很多限制，比如不能用于人，周期长、操作难度大、成功率低、不可逆、基因组整体敲除而非局部，不能用于关键基因等等；而相反，体内 RNA 干扰使研究人员在时间和空间上灵活调控基因敲除效果成为可能。对于那些由于某些基因过表达而导致的疾病，比如老年痴呆症、一些癌症、视网膜病变、哮喘、慢性肺部阻塞、SARS、风湿性关节炎等等，RNAi 技术可以阻断过表达基因而成为潜在的治疗新方法。

但是这并不意味着体内 RNAi 是一件容易完成的实验，实际上体内 RNAi 最令人困扰的难题是——递送——如何有效将 siRNA 传递到目标细胞内。同样的问题也存在于培养细胞。就像来自 Integrated DNA Technologies 公司的 Mark Behlke 说的一样，“在体内，问题其实是一样的，不同的只是要更加困难十倍”。研究人员需要将 siRNA 导向指定的靶器官和靶细胞，有效的转染细胞，并且还要解决好毒性和脱靶的问题。

体内 RNAi 实验可分为主流的递送方法可分为 2 大类，病毒载体和人工合成的 siRNA，后者又可分为 2 种途径：局部给药（Local 即目标区域局部注射）和全身给药（Systemic，包括(尾)静脉注射、肌肉注射、腹腔注射等方法）。局部给药的用量低、靶向性强、siRNA 定位好、也降低了对其他器官的影响，但是在操作上难度很大。目前报道中成功的例子仅限于鼻内给药、肝脏内给药、睾丸内给药、肌肉注射、视网膜内注射、肿瘤内注射等。眼部局域注射 siRNA 恐怕是目前最成功的体内 RNAi 例子。早在 2003 年 Reich 就报道在小鼠视网膜下腔（subretinal space ）注射靶向 VEGF 的无标记 siRNA 成功减少眼部血管生成。Acuity Pharmaceuticals 的 siRNA 药物更在 II 期临床大获成功，有望成为第一个 RNAi 药物。在大鼠实验中，靶向痛觉相关阳离子通道 P2X3 的修饰 siRNA 经植入泵灌注到蛛网膜下腔，成功阻断大鼠神经疼痛响应，证明局域注射 siRNA 于鼠类大脑可用于研究中枢神经系统相关的基因功能。2005 年中国学者用鼻腔给药的方法将 SARS 病毒相关的 siRNA 递送到恒河猴肺部有效降低了发烧、减低了病毒和肺泡损伤。这提示 siRNA 在对付肺部传染性疾病有一定的前景。

全身给药操作简单，但是 siRNA 靶向性差，问题不说也想得到。2003 年 Song 等人以尾静脉注射方式将靶向 Fas 的 siRNA 注入小鼠体内，发现 siRNA 汇聚于小鼠肝细胞内并录得 Fas 基因表达沉默，保护肝细胞不受 Fas 抗体和 ConA 诱导的细胞凋亡，以及爆发性肝炎。同样方法注射 Caspase 8 siRNA 保护小鼠不受由 Fas 抗体或者 Fas 受体激活而引发的肝急性损伤。Soutschek 等人 2004 年在 Nature 的文章表明低剂量常压静脉注射经过胆固醇包被的 siRNA 能定向在小鼠肝脏和肠内引发目标载脂蛋白 B 的降解

另外一个问题是 siRNA 的稳定性。有资料显示 siRNA 在 100%血清中的半衰期仅为 10 分钟不到。这个问题可以通过化学修饰

siRNA 或者靠递送试剂保护 RNA 不受到核酸酶、免疫反应、其它脱靶效应的影响，从而加以加以改善。不过，最新的研究结果表明，siRNA 代谢排出体外的速度也是需要考虑的问题——虽然化学修饰确实有助于提高 siRNA 稳定性，可是很多时候这不大需要——修饰的 siRNA 在降解发生前就已经被排泄出体外了，而脂质体或者纳米颗粒在改善药物代谢动力学和药物靶向性等方面比化学修饰更有前途，对于人工合成的 siRNAs，目前可行的递送试剂有 3 大类：**阳离子脂质体**类可以中和核酸负电荷使其容易通过细胞膜，在培养细胞中表现良好，但是在体内实验中表现出更高的毒性和更低的转染效率；聚多胺类转染试剂（dendrimer，例如 Ambion 的 siPort Amine、Qiagen 的 Effectene 和 Transmessenger、Sigma 的 Nanoparticle 等）在体内实验中表现出比脂质体的转染效率显著提高、细胞毒性更小等优势，对于体内实验来说更优于脂质体。第三类是去端肽胶原 atelocollagen，这种广泛应用于医学领域（作为支架）的一种低免疫原性、低毒性的蛋白质，由于可以增加细胞内吞、提高对核酸酶抗性、延长 siRNA 释放，应该会成为非常有前景的体内 RNAi 递送试剂。新一代的传送方法，比如纳米粒子，PEG 修饰脂质体（pegylated liposomes）初露曙光。可惜这些方法通常难以制备，除非你有在化学或者制药学方面的合作伙伴，否则“你只能从资料上查到它们，但是就是搞不到。”

由于病毒转导 shRNA 的效率非常高，可达到 100%，病毒载体传送短发夹结构编码 siRNA 是一种更为有效的敲除方法。但不适合一些实验应用的需要。

电转移也是非常有效的方法，几乎可以对付各种难缠的细胞和组织。有报道说局部电击也有助于细胞内吞 siRNA。不过对于体内实验来说还有很多问题有待解决。

对于第一次进行体内 RNAi 实验的研究人员来说，这些都是问题，ABI 的 Steven Suchyta 说，“并没有什么捷径可以让你轻松过关，可以借鉴的只是经验”，毕竟，体内 RNAi 实验是基因功能研究的必由之路，也是 RNA 干扰应用于临床前的必经之路。到底该如何做体内 RNA 干扰，我们不妨从以下用户经验中借鉴一下。

肿瘤敲除

实验人：德国埃朗根大学（University of Erlangen）肝病学与肿瘤学教授 Matthias Ocker

项目： 敲除抗细胞凋亡基因 Bcl-2，以及其它与胰腺癌，肝癌相关基因

问题：将 siRNA 传递到全身肿瘤

方法：Ocker 的实验室将培养的肿瘤细胞作为异种移植注射到小鼠中，待这些肿瘤生长之后，研究人员以低剂量（体重 100 mg/kg），低体积（每天 100ml），通过腹腔注射，将溶于生理盐水的未修饰 siRNA 注入小鼠，对靶基因进行系统敲除。

Ocker 表示，“我们也发现使用的载体对于敲除效率十分重要，生理盐水或者 PBS 都不错，但无菌水效果却不好。”

优点：全身性的 siRNA 传输对原位癌和转移癌已经扩散的癌症来说是有意义的。

缺点：没有运输载体靶向特异性的细胞类型，降低了效率。

底线：Ocker 表示，“针对癌症，你需要一种系统性的方法”，“目前存在个大问题——我们现在缺乏一种能专门帮助胰腺癌细胞特异性吸收（siRNA）的运输载体或者靶向工具”。要解决这个问题需要一段时间，来自哈佛医学院的 Judy Lieberman 最近发现融合有抗体片段的融合蛋白能识别特异性受体，从而

可以靶向乳腺癌细胞。

特异靶向

实验人：德州大学医学院麻醉学副教授 Helen Lee Hellmich

项目：研究大鼠海马区因脑外伤而表达上调的神经元一氧化氮合成酶及 其它基因的治疗前景

问题：如何在正确的时间靶向正确的器官

方法：Hellmich 等人利用芯片技术鉴别出在受伤后几天（而不是几个小时）增加表达的基因，并以此作为瞬时 RNA 干扰的靶标。Hellmich 最早将 siRNA 克隆进了一个腺病毒载体——能持续表达 4 个星期，比起其它整合型病毒载体时间更短。为了向临床靠拢，Hellmich 转向用阳离子脂质体包裹 siRNA，立体定位注射（stereotactic injection）到海马 CA3 区域，在几个小时到几天的时间内，siRNAs 获得了更精确的瞬时传递。由于 Hellmich 在 RNAi 方面缺少经验，因此他采用了商业产品来完成。“我从厂家购买了这个产品，祈祷获得最好的结果。”

优点：

- 比较于基因敲除小鼠，siRNA 更容易推测得到的表型
- 公司能提供一些现成的产品

缺点：

- 通过手术定向给药困难
- 对于不同的基因，过程需要重新优化

底线：鞘内注射（Intrathecal injection），这是一种靶向大脑的常见方法，但对于靶向大脑某些特定区域并不合适。Hellmich 的方法能得到体内 50%—60%的基因沉默，她说，“这也许足够 了，如果一个基因对于生存而言是必需的，那么你只要敲除那些过量表达的部分就可以了”。终极而言，这个领域需要更好的递送系统，现有的产品“也许并不是最优的，但五年来 ，我得说至少是可以用的。”

病毒入侵（Viral Invaders）

实验人：南阿拉巴马州立大学微生物学和免疫学教授 Sailen Barik

项目：敲除编码呼吸融合病毒 (Respiratory Syncytial Virus，RSV) 功能亚基的基因，阻断病毒在小鼠体内感染

问题：将脂质体方法传递与化学修饰 siRNA 和 27bp 的 siRNA 结合的情况下，操作方法通用。

方法：通过鼻内给药的方法将阳离子脂质体和 siRNAs 复合物递送到目标。Barik 说：“对于呼吸病毒来说，这是最好的途径，因为 病毒基本上停留在肺中，不会扩散到其他部位。”未经修饰的 siRNA 也是有效的，但效率低。于是研究人员对其进行化学修饰，但困难是如何确定对 siRNA 修饰的位点， 因为经过修饰后，原本有效的试剂有时会无效。他们还尝试了 27mer 链，Barik 说结果没有明显改善。

优势：对于肺部研究，存在一个有效的传递途径

缺点：某些参数修改意味着需要重新优化操作流程

底线：要将不同的方法整合起来应用，需要付出很多劳动。已发表的操作方法不一定有什么帮助。“我认为现在应该将不同的化学修饰与 27mer 结合起来，检测在体内的效果，”Barik 说，化学修饰通常有效，“但 你得指出在你的系统中哪个位置修饰才有用。”更何况，化学修饰过的 siRNA 在使用递送试剂时，情况完全不同。"

载体敲除（Vector Knockdown）

实验人：斯坦福大学研究生 Daniel Paskowitz

项目：敲除成体大鼠视网膜中的基因，研究视网膜病变

问题：维持遗传表达的稳定性

途径：Paskowitz 通过注射的方式，利用腺相关病毒（adeno-associated viral ，AAV）载体将 shRNA 递送到视网膜中。Paskowitz 说 DNA 能够以一种比 siRNA 更稳定的方式被递送到细胞内。尽管大多数 AAV 载体的表达需要 2－4 周，但利用一种 经多个实验室改进的强启动子将表达时间缩短到几天内。

优点：shRNA 载体在“定位导向”上比 siRNA 更灵活。研究人员可以同一种已经优化的病毒载体输送方法来输送不同的 siRNA，一些病毒亚型有细胞特异性，可用于定位导向。

缺点：敲除效果好坏不一，克隆病毒载体比直接用 siRNA 需要的时间长，许多病毒载体需要较长时间开启表达。

底线：“不是所有的 shRNA 效果都一样，”Paskowitz 说，“预测哪个有效、哪个无效，仍然不可能。”不同病毒有不同的表达时长，但在视网膜中，AAV 递送的基因基本上是持续表达的。虽然 Paskowitz 实验中使用的器官（视网膜）局部递送 siRNA 并不困难，但他认为，病毒载体传递比大多数 siRNA 方法灵活。某些 AAV 特异感染感光细胞，其它的特异感染色素细胞，理论上，可以利用不同类型病毒靶向截然不同的细胞类型。

全面敲除取代（Full-on Knockout Replacement）

实验人：哈佛大学医学院非肥胖型糖尿病小鼠中心管理员 John Stockton

项目：构建可遗传的基因敲除，如与 I 型糖尿病有关的 CELA4。

问题：多个病毒整合位点导致表达水平差异。

方法：Stockton 与其同事通过显微注射，利用慢病毒载体将 shRNA 递送到小鼠胚胎，然后将这些胚胎移植到预先怀孕的雌鼠体内。雌鼠所产子代体内靶基因被部分敲除。“与普通转基因过程相似，”Stockton 说，“但这里，因为出现不同的病毒整合插入位点，表达水平更加有差异。”

优点：可遗传的、永久的基因抑制效果；比构建基因敲除小鼠快 3 倍；适用范围广，除小鼠外还可用于鸟、鱼、大鼠、家畜。

缺点：不完全敲除；表达率不稳定；慢病毒的生物安全等级为 2，操作要小心。

底线：编码 RNAi 的病毒载体能快速实现类似传统基因敲除的功能。但目前只能部份阻断靶基因的功能。不管怎么说，该技术不仅更快而且更有效。 运气好的一天就可以 100% 成功，一般的成功率也接近 30%，比核内注射（pronuclear injection）的效率高，Stockton 认为，第一代小鼠体内有 10％－40％的细胞能表达 hRNA，这种差异性在其子代就会稳定下来。