

• 中药现代化论坛 •

RNA 干扰及其在药用植物代谢工程中的应用

潘夕春¹, 孙敏¹, 张磊², 廖志华^{1*}

(1. 西南师范大学生命科学学院生物技术研究所 天然产物与代谢工程实验室, 重庆市甘薯研究中心, 重庆 400715;

2. 第二军医大学药学院 生药学教研室, 上海 200433)

摘要: RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是把双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)导入某些生物和细胞而引起同源 mRNA 降解的现象,是一种转录后基因沉默机制。dsRNA 在体内被 Dicer 二聚体切割成 21~25 bp 的小干涉 RNA(small interfering RNA, siRNA),然后在 siRNA 引导下,由 RNA 诱导沉默复合体(RNA induced silencing complex, RISC)降解靶 mRNA。RNA 干扰作为一种新型反义技术可以有效的抑制特异基因的表达,因此可用于对药用植物次生代谢产物的生物合成途径进行调控,达到调控天然产物生物合成的目的。现将 RNAi 机制研究的最新进展及 RNAi 在药用植物代谢工程方面的应用进行综述。

关键词: RNA 干扰; 基因沉默; 药用植物; 代谢工程

中图分类号: R282.12; R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)09-1281-04

RNA interference and its application to metabolic engineering in medicinal plants

PAN Xi-chun¹, SUN Min¹, ZHANG Lei², LIAO Zhi-hua¹

(1. Chongqing Sweetpotato Research Center, Laboratory of Natural Products and Metabolic Engineering, Institute of Biotechnology, School of Life Science, Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China; 2. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: RNA interference (RNAi) is a phenomenon in which the introduction of double-stranded RNA (dsRNA) into certain organisms and cell types causes degradation of the homologous mRNA and it is a mechanism of post-transcriptional gene silencing. The dsRNA is processed into 21-25-nucleotide's small interfering RNA (siRNA) by Dicer-dimer *in vivo* and then the target mRNA will be degraded by RNA induced silencing complex (RISC) which is induced by siRNA. As a novel antisense technology that can be used to inhibit the expression of extraordinary genes, RNAi can be applied to regulate the biosynthetic pathway of secondary metabolites of medicinal plants and finally to control the biosynthesis of the natural products. This review focuses on the recent progress in mechanism of RNAi and its application to metabolic engineering of medicinal plants.

Key words: RNA interference (RNAi); gene silencing; medicinal plant; metabolic engineering

RNA 干扰(RNAi)是在适当生物和细胞内导入小干涉 RNA(small interfering RNA, siRNA)后引起同源 mRNA 降解的现象,它是一种转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)机制。1995 年,美国康奈尔大学 Guo 在研究线虫 *Caenorhabditis elegans* Brunei 时,首次发现 RNAi 现象^[1]。1998 年,Fire 等对线虫进行阻断效应实验,发现双链 RNA(double-stranded, dsRNA)的阻断效

果比单个正义或反义 RNA 强 10 倍以上^[2]。他们把这种现象称为 RNA 干扰,这是学术界首次提出这一概念。近年来,人们又陆续在烟草、拟南芥、番茄、水稻等植物和果蝇、斑马鱼、鼠等动物中发现了 RNAi 现象^[3],表明 RNAi 广泛存在于生命体中。RNAi 在生命体防御病毒入侵和转座子沉默效应中起着重要作用,已经成为目前分子生物学研究中一个最热门的话题。目前 RNAi 技术在功能基因组、基因治疗等研究

收稿日期:2005-03-24

基金项目:国家“863”计划资助项目(2002AA212191);西南师范大学博士基金资助项目(240-432108)

作者简介:潘夕春(1982-),男,四川省仁寿县县人,硕士研究生,从事药用植物代谢工程及分子生物学领域的研究。

E-mail: xcp@swnu.edu.cn

* 通讯作者 廖志华 Tel: (023)68367146 Fax: (023)68252365 E-mail: zhiliao@swnu.edu.cn

领域的应用引起了人们广泛的兴趣,在代谢工程尤其是药用植物代谢工程方面也得以成功应用,呈现飞速发展的趋势,并能够带领植物反义技术进入代谢工程时代^[4]。在药用植物代谢工程中应用该技术可快速有效的抑制特异基因的表达,从而阻断某些代谢途径,达到调控目标产物产量的目的。

1 RNAi 的机制

尽管在不同生物中的细节可能不同,但 RNAi 具有高度保守的作用机制:dsRNA 被裂解为 21~25 bp 的 siRNA,然后它作为起始诱导物,引起互补靶序列 mRNA 的降解, RNAi 的机制见图 1。遗传与生化分析表明 RNA 干扰有 3 个阶段:起始阶段、活化阶段和效应阶段。在第 1 个阶段,dsRNA 被 Dicer 二聚体降解为 21~25 bp 的 siRNA,然后 siRNA 磷酸化形成成熟的 siRNA^[5]。在第 2 个阶段,成熟的 siRNA 与核糖核酸酶复合物一起形成 RNA 诱导沉默复合体(RNA induced silencing complex, RISC), RISC 在第 3 个阶段 siRNA 引导下降解靶 mRNA。RISC 需要通过 siRNA 的解链而活化^[6]。(Slicer:核糖核酸内切酶;EXO:核糖核酸外切酶;Helcase: dsRNA 解旋酶亚基;Ago: Argonaute 家族蛋白;RecA:大肠杆菌中发现的同源区导向蛋白)。

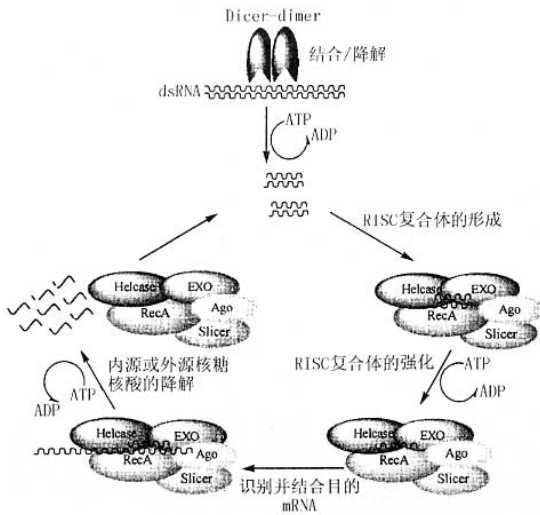


图 1 RNA 干扰的机制

Fig. 1 Mechanism of RNA interference

2 RNAi 途径中的一些蛋白和酶

RNAi 途径主要包括 Dicer 和 RISC 两种蛋白。Dicer 属于核糖核酸酶 III (RNase III) 家族,是一种进化上非常保守的酶^[7]。迄今为止,在线虫、果蝇、拟南芥、烟草甚至哺乳动物中都发现了 Dicer 家族蛋白的存在^[8]。它们都具有把 dsRNA 降解成 siRNA 的功

能。在 RNAi 途径中起着关键作用。根据 Bernstein 等的研究,果蝇的 Dicer 包括核糖核酸酶 III 亚基、解旋酶亚基、Piwi/Argonaute/Zwille 结构域、双链 RNA 的结合位点、致死盒解旋酶亚基 5 个功能域^[7]。在切割 dsRNA 时,两个 Dicer 蛋白形成二聚体,这样使 Dicer 蛋白上的催化中心总是相隔一定距离,从而保证了切割下来的 siRNA 长度总是一定的。Dicer 虽然在进化上很保守,但如果它的编码基因发生突变,可以导致 RNAi 的失效^[9]。RISC 的结构目前尚不清楚,可以肯定的是 RISC 中包含 siRNA、1 个核糖核酸内切酶亚基、1 个核糖核酸外切酶亚基和 1 个解旋酶亚基。RISC 中有一类属于 Argonaute (Ago) 家族的蛋白,其中一个被称为 DmAgol 的蛋白与人类细胞 RISC 活性相关^[10];另一个 DmAgo2 蛋白则是果蝇 S2 细胞中 RISC 的组成部分^[11]。Hammond 等报道,大肠杆菌的 RISC 中有 1 个 RecA 蛋白,它与 siRNA 识别靶 mRNA 有关^[12]。

3 植物中 RNAi 的特点

RNAi 是首先在植物中发现的。研究表明,植物中 RNAi 还涉及 DNA 的甲基化^[13]。DNA 的甲基化是由病毒来源的 siRNA 引起的,由 RNA 指导的 DNA 甲基化酶(RNA-directed DNA methylase, RdDMs)催化。Hamilton 等用绿色荧光蛋白标记两组不同长度的 siRNA,结果显示:21 bp 的一组诱导了典型的 RNAi,而 24 bp 的一组则引发了同源 DNA 的甲基化^[14]。两组 siRNA 有不同的序列偏好:21 bp 的一组主要降解 5'端为尿嘧啶的同源 mRNA;24 bp 的一组则主要引发 5'端为 A 的 DNA 的甲基化。DNA 的甲基化可以导致两种结果^[15]:靶基因编码区的甲基化引起转录水平上的基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS);启动子区域的甲基化则会导致染色质结构的改变。一些报道显示植物中 RNAi 现象是可以遗传的。Palauqui 等发现,植物中的 RNAi 现象可以通过嫁接传给后代的植株^[16];Chuang 等在拟南芥中导入一个含胭脂碱合酶基因片段的融合基因,它转录出的 dsRNA 产生 siRNA 可以抑制内源胭脂碱合酶的表达,并且这种 RNAi 效应也是可遗传的^[17]。

4 RNAi 技术在药用植物代谢工程中的具体应用

药用植物代谢工程主要是利用基因工程和分子生物学方法阐明植物次生代谢产物生物合成的机制,获得途径上的相关基因,用于在分子水平上改造代谢途径;并通过转基因技术和其他方法在植物细胞、组织或完整的植株中表达这些基因,从而达到对

代谢途径改造、提高目标产物产量的目的,开发出高产、抗病虫害、耐旱涝酸碱等恶劣条件的药用植物新品种。RNAi 技术是一门新兴技术,由于它可以方便、快捷、高效地阻断基因表达,从而对代谢途径进行调控,最终表现为目标产物的产量获得提高或者有害产物产量被降低。目前 RNAi 技术已成为药用植物代谢工程研究中的一颗明星,引起了研究人员的广泛关注。它在药用植物代谢工程中主要应用于以下 3 个方面。

4.1 作为发现代谢调控基因和功能验证的工具:传统的药用植物功能基因组研究方法依赖于突变技术,该方法成功率低、费用高,并且一次只能研究少量基因。近年来利用 RNAi 技术进行药用植物功能基因组研究的方法逐渐发展起来。该方法可针对多个基因的保守序列设计 siRNA,一次性抑制多个基因。因此利用 RNAi 技术可以大规模、高效率地分析药用植物基因,找出可能的代谢调控基因并验证其功能,并且比使用传统方法节约人力、物力资源。Gossele 等用 RNAi 技术在烟草中分别抑制纤维素合成酶基因、转羟乙醛酶基因、八氢番茄红素脱饱和酶基因,产生了预期的表型,验证了 3 种基因的功能^[18]。Allen 等用 RNAi 技术一次性抑制罂粟中可待因酮还原酶基因家族中所有基因的表达,结果也产生了预期的效果^[19]。

4.2 作为代谢工程中调控目标产物生物合成的工具:利用 RNAi 技术抑制药用植物有害产物合成途径或无药效产物合成途径上的一些关键酶基因,可以减少甚至抑制有害或无药效产物的生物合成,从而提高药用植物品质。2003 年,Ogita 等首次报道 RNAi 技术在咖啡中的成功应用^[20]。咖啡因是咖啡中一种有害成分,可以导致心悸、高血压、失眠。在咖啡因的生物合成途径中有黄苷甲基化酶、可可碱合酶、咖啡因合酶 3 种甲基转移酶,是咖啡因生物合成途径中的关键酶。选取其中的可可碱合酶,用农杆菌转化法将其 mRNA 的 3'-非翻译区片段导入咖啡植株后,可可碱合酶基因受到抑制,得到的转基因咖啡植株比作为对照的非转基因咖啡植株中咖啡因的量降低 70%。这种转基因咖啡植株可用于生产含低咖啡因的咖啡豆,作为健康饮料取代普通咖啡豆,具有巨大的商业化前景。该研究也成为 RNAi 技术在药用植物代谢工程研究领域的经典范例和里程碑。随后,一系列基于 RNAi 技术的药用植物代谢工程高水平研究成果不断报道。2004 年,Allen 等报道了 RNAi 技术在罂粟中的成功应用。罂粟中含有的可待因酮是一种麻醉剂

类生物碱,其药用价值远远低于常用的麻醉剂吗啡。可待因酮与吗啡有共同的前体分子——非麻醉剂类生物碱(S)-网状番茄枝碱。因此可待因酮的积聚会导致吗啡的产量偏低。用 RNAi 技术抑制罂粟中可待因酮还原酶基因家族中所有基因的表达,其生物合成途径在可待因酮处被阻断,位于可待因酮上游的前体分子(S)-网状番茄枝碱及甲基-(S)-网状番茄枝碱均得到积聚^[19]。(S)-网状番茄枝碱是多种高等植物中苜蓿异喹啉类生物碱的前体分子,它的积聚可以极大地提高罂粟中含吗啡的量,在其他植物中也有类似的效果。该报道为提高一些药用价值很高的生物碱在植物中的产量树立了一个成功的范例。Dubouzet 等在 2005 年报道了用 RNAi 技术抑制黄连中异喹啉生物合成途径中金黄紫堇碱 9-O 甲基转移酶基因,使该酶的表达水平明显降低^[21]。

4.3 作为植物抵御病毒感染工具:RNAi 最初被认为是植物转基因操作中一个不可预知的偶然现象,是难以控制的。随着研究的深入,人们意识到 RNAi 可以作为植物抵御病毒感染的工具,并且在自然界中也存在这种现象。据报道,用 RNAi 技术抑制烟草中马铃薯病毒 Y(PVY),这种转基因植株在受到 PVY 感染后与普通植株相比完全正常,这种转基因植株通过 RNAi 技术获得了对 PVY 的免疫性^[22]。Tenllado 等用 RNAi 技术抑制烟草中的 PMMV 病毒,引发了两种截然不同的植物抗病毒效应,并且发现这两种效应被引发后都不依赖于靶 mRNA 的转录水平^[23]。

5 药用植物代谢工程中 RNAi 技术应用的几个关键

RNAi 技术应用过程中需要根据靶基因来设计 siRNA,因此需要知道详细的靶基因序列信息,这对当前药用植物基因组学研究提出了较高要求。目前药用植物基因组的研究需要加快进度,才能跟上整个药用植物研究领域的发展。

将 siRNA 导入植物细胞的常用方法包括轰击法、农杆菌-DNA 转化法;使用的表达载体有内含子区发夹 RNA (intron-containing hairpin RNA, ihp RNA) 表达载体、病毒载体^[15]。其中轰击法需要专门的设备——基因枪,成本很高,而且转化频率不高,转化子多为嵌合体;农杆菌转化法是比较简易的方法,成本低廉、技术成熟,可广泛应用于在植物中导入 siRNA,但不同植物的转化率差异很大;病毒载体技术比较稳定,但对植物种类有一定选择性。因此,根据植物种类设计不同的 siRNA 导入方案是 RNAi 技术应用中的难点。

RNAi 技术可以在许多植物中获得成功,但很多只能获得短时间的效果,如何获得 RNAi 稳定遗传的转基因植株成为目前 RNAi 技术应用中的另一个难题。Waterhouse 等报道,使用 ihpRNA 表达载体技术可以得到 RNAi 稳定遗传的植株,并且这项技术适用于很多植物^[15]。

6 展望

进入 21 世纪以来,癌症、艾滋病、心脑血管疾病等严重危害人类健康的重大疾病发病率越来越高;由于病原体的变异株和耐药株越来越多,许多在 20 世纪已经得到控制的传染病如疟疾、结核病、麻风病等也死灰复燃。在这种严峻的形势下,现有药物和疫苗难以满足医药卫生事业的需求,从天然产物尤其是药用植物中获取的药物已经得到越来越多的重视和应用。很多药用植物品质较低,远远不能满足市场需求,需要运用代谢工程的手段进行改良。目前 RNAi 作为一种反义调控技术已经相当成熟,在已有的报道中显示出了传统代谢工程技术所无法比拟的优越性,必将在药用植物代谢工程领域得到最广泛的应用,引领药用植物代谢工程研究进入一个新的时代。目前国际上在这方面已经提前起步,基于 RNAi 技术的成功范例报道越来越多,并且实现了 RNAi 试剂的商品化。中国作为中药的故乡,拥有世界上最大的药用植物资源库,需要在已有的基础上加大在 RNAi 技术领域的研究力度和资金投入,以在未来的代谢工程时代中占有一席之地。

References:

- [1] Guo S, Kempthues K J. *par-1*, A gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed [J]. *Cell*, 1995, 81: 611-620.
- [2] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
- [3] Cogoni C, Macino G. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2000, 10: 638-643.
- [4] Capell T, Christou P. Progress in plant metabolic engineering [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, 15: 148-154.
- [5] Elbashir S M, Martinez J, Patkaniowska A, et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate [J]. *EMBO J*, 2001, 20(23): 6877-6888.
- [6] Hammond S M, Caudy A A, Hannon G J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA [J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2: 110-119.
- [7] Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference [J]. *Nature*, 2001, 409: 363-366.
- [8] Tabara H, Yigit E, Siomi H, et al. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DexH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans* [J]. *Cell*, 2002, 109: 861-871.
- [9] Grishok A, Pasquinelli A E, Conte D, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing [J]. *Cell*, 2001, 106(1): 23-34.
- [10] Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi [J]. *Cell*, 2002, 110: 563-574.
- [11] Hammond S, Boettcher S, Caudy A, et al. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi [J]. *Science*, 2001, 293: 1146-1150.
- [12] Hammond S M, Caudy A A, Hannon G J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA [J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2: 110-119.
- [13] Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, et al. RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants [J]. *Cell*, 1994, 76: 567-576.
- [14] Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, et al. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing [J]. *EMBO J*, 2002, 21: 4671-4679.
- [15] Waterhouse P M, Helliwell C A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing [J]. *Nat Rev Genet*, 2003, 4: 29-38.
- [16] Palauqui J C, Elmayan T, Pollien J M, et al. Systemic acquired silencing: transgene specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silencing scions [J]. *EMBO J*, 1997, 16: 4738-4745.
- [17] Chuang C F, Meyerowitz E M. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PNAS*, 2000, 97: 4985-4990.
- [18] Gossele V, Fache I, Meulewaeter F, et al. SVISS—A novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants [J]. *Plant J*, 2002, 32(5): 859-866.
- [19] Allen R S, Millgate A G, Chitty J A, et al. RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(12): 1559-1566.
- [20] Ogita S, Uefuji H, Yamaguchi Y, et al. Producing decaffeinated coffee plants [J]. *Nature*, 2003, 423: 823.
- [21] Dubouzet J G, Morishige T, Fujii N, et al. RNA silencing of scoulerine 9-O-methyltransferase expression by double stranded RNA in *Coptis japonica* protoplasts [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(1): 63-70.
- [22] Waterhouse P M, Wang M B, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses [J]. *Nature*, 2001, 411: 834-842.
- [23] Tenllado F, Garcia-Luque I, Serra M T, et al. *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the 54-kDa region of the pepper mild mottle tobamovirus replicase gene exhibit two types of resistance responses against viral infection [J]. *Virology*, 1995, 211: 170-183.