

## RNA 干扰技术在蛋白质组学研究中的应用

徐 敏 黄晓武<sup>△</sup> 谭长军 代 智 周 俭 樊 嘉

(复旦大学附属中山医院肝癌研究所 上海 200032)

**【摘要】** 人类基因组测序的完成宣告人类已经进入后基因组时代,此后的一个重要任务就是从蛋白质水平对基因的功能进行验证,高通量的蛋白质组(proteome)研究方法应运而生,为筛选有价值的生物蛋白标记提供了有效的方法;而 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术近年来亦已成为研究基因表达功能的强有力工具之一,它可在转录水平对蛋白质的表达进行调控,这两种新兴研究技术的已经互相成为重要的补充。本文将在简介蛋白质组技术、RNAi 技术后,对 RNAi 在蛋白质组学研究中的现状简要作一综述。

**【关键词】** RNAi 技术; 蛋白质组学; 应用

**【中图分类号】** R 503 **【文献标志码】** B

## Application of RNA interference technique in proteome research

XU Min, HUANG Xiao-wu<sup>△</sup>, TAN Chang-jun, DAI Zhi, ZHOU Jian, FAN Jia

(Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**【Abstract】** Human genome sequencing has been completed at present, declaring the coming of post-genome era. An important task of post-genome era is to annotate genome function from the protein level. The proteomics study technique emerged as the times require providing an effective method for the screening of biomarkers. RNA interference technique developed recent year has become one of the most powerful tools in molecular biological study, which could regulate the expression of protein at transcriptional level. These two techniques would be important supplementary to each other. In this review, we will give some introduction to both RNA interference and proteomics study, and then focus on the combined Application of them.

**【Key words】** RNA interference technique; proteome; application

虽然双向电泳技术(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)在 20 世纪 70 年代就已经出现,但是直到 90 年代后期随着基因组(genome)概念的产生,才提出了蛋白质组(proteome)概念,此后蛋白质组学研究技术有了显著的提高。人类基因组测序的完成标志着后基因组时代的来临,从整体水平上对生命功能的执行者蛋白质进行研究日益重要。自 20 世纪 90 年代中期发现 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)现象以来, RNAi 技术已经成为分子生物学中重要研究手段之一,在分析和研究目的基因功能、抗病毒及肿瘤等方面取得了不少突破性进展<sup>[1]</sup>。在 21 世纪最初几年里,高通量的蛋白质组分析手段得到完善,使用 RNAi 在转录水平对蛋白质进行调控,以了解蛋白质功能的研究逐渐兴起,这两种新兴技术已经互相成为了重要的补充,为基因组和蛋白质组之间的研究提供重要的桥梁。限于复杂的技术及昂贵的设备,我国这方面的研究开展尚未得到较好的普及,但随着条件的改善这必将得到重

要发展。相信在不久的将来,这两项技术的结合将会使疾病的诊断从基因组到蛋白组水平上联系起来,并提供新的潜在治疗靶点。因此,本文将对蛋白质组技术原理、RNAi 技术原理及 RNAi 在蛋白质组学研究中的现状简要作一综述。

**蛋白质组学原理** 蛋白质组指由一个基因组或一个细胞、某种组织表达的所有蛋白质,也可以说是细胞或组织或机体全部蛋白质的存在及其活动方式,强调对蛋白质的整体水平上的研究。蛋白质组学旨在阐明生物体全部蛋白质的表达模式及功能模式。目前蛋白质组学技术主要由三部分构成:蛋白质的分离、识别和功能鉴定,即利用蛋白质的相对分子质量、大小及等电点等理化性质上的差异将不同蛋白分离开来,再对蛋白进行识别,通过功能鉴定研究蛋白质在机体病理生理过程中的作用<sup>[2]</sup>。蛋白质作为生命功能的体现者和执行者,蛋白质组学研究主要目的在于鉴定其结构和功能, Yates 等<sup>[3]</sup>提出该技术是扩展蛋白质研究的有力工具,

国家高技术研究发展计划资助项目(2007AA02Z479);复旦大学“211 工程”三期重点学科建设项目(211XK21)

<sup>△</sup>Corresponding author E-mail: xiaowu@zs-hospital. sh. cn

蛋白质组技术优势在于可以高通量分析经过翻译后修饰和加工(磷酸化、羟基化、糖基化、硫键形成及蛋白质自剪接等)的蛋白质差异表达,但是对低丰度、相对分子质量极端的蛋白质及其生物效应的检测难以令人满意。

**RNAi 原理** 外源或内源产生的双链 RNA 进入细胞后,在核酸酶作用下被切割成 3'端有 2 个碱基突出的 21~23 nt 长度的小分子干扰 RNA (small interference RNA, siRNA),这些 siRNA 与 RNAi 特异性酶结合,形成 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC),而后 RISC 在 siRNA 反义链的指导下与 siRNA 同源靶 RNA 相结合,并在近中点位置将其切割,达到抑制靶基因表达的作用<sup>[4]</sup>。RNAi 技术主要包括三个环节,即靶 siRNA 序列设计、siRNA 的制备和 siRNA 的转染。RNAi 技术的巨大价值在于它可以使特异性靶基因表达沉默,从而可广泛应用于基因功能鉴定及疾病的治疗领域。然而, RNAi 效应的高特异性亦决定了它不适合用于大批量基因功能鉴定,此时高通量比较蛋白质组学技术可以提供良好的补充,即先找到疾病状态差异表达的生物蛋白标记点,后通过 RNAi 调控其表达水平,从而达到研究或治疗目的。

**RNAi 与肿瘤蛋白质组学研究** Li 等<sup>[5]</sup>使用基于 2-DE 和 MALDI-Q-TOF/MS 技术的蛋白质研究方法发现在子宫内腺癌患者中有 99 种差异表达的蛋白质,其中 Cyclophilin A 是最为有意义的蛋白之一,它的高表达还同时被 RT-PCR 和 Western blot 分析所确认。免疫组化提示 Cyclophilin A 的高表达和肿瘤低分化及低生存率相关。应用 RNA 干扰技术下调 Cyclophilin A 的表达可抑制子宫内腺癌细胞系 HEC-1-B 的生长并诱导其发生凋亡,同时体内试验显示了对肿瘤生成的抑制作用,从而提示 Cyclophilin A 可能是子宫内腺癌潜在的预后因素和治疗靶点。

Li 等<sup>[6]</sup>在黄曲霉素 B1 诱导树鼯肝癌模型中,应用 2-DE 和 MS 技术比较肿瘤组织、肿瘤周围组织、及它们自身的癌前穿刺组织的蛋白质组表达变化,从而获取一批在肿瘤组织中差异表达的蛋白质,Prx II (peroxiredoxin II) 是其中发生明显改变的蛋白质,然后使用 RNA 干扰技术在 Hep3B 肝癌细胞系中抑制 Prx II 的表达,结果提示肿瘤细胞的增殖和克隆明显减少,流式细胞检测发现肿瘤细胞的凋亡增加。Chen 等<sup>[7]</sup>结合使用蛋白质组学手段及 RNAi 技术在对肝细胞肝癌的研究中发现, EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) 的下游信号通路肿瘤的发生有关。Wu 等<sup>[8]</sup>使用蛋白质组手段从 ATRA (all-trans retinoic acid, 全反式维甲酸) 处理过的肝癌细胞系中获得的 PFN1 (Profilin 1) 与抑制肿瘤增殖和转移相关;基于 RNA 干扰的 PFN1 下调后, ATRA 的增殖抑制和肿瘤转移作用减弱,提示 ATRA 通过 PFN1 起作用。

在 50% 胰腺癌中,抑癌基因 Smad4 发生了突变或是变异,通常认为它是通过 TGF- $\beta$  介导的肿瘤生长抑制起作用。Imamura 等<sup>[9]</sup>通过 RNAi 建立了 Smad4 敲除的胰腺癌细胞系,然后使用 2-DE 和 MS 发现 10 种 TGF- $\beta$  的新靶点,提示可能有不经过 Smad4 的其他 TGF- $\beta$  信号通路。

**RNAi 与感染性疾病蛋白质组学研究** 多种病毒已被证实是慢性进展性疾病的病因,与其持续性相关。然而病毒持续感染的机制尚未完全解决。Takahashi 等<sup>[10]</sup>建立麻疹病

毒长期感染的胶质母细胞瘤细胞系,之后使用 2-DE 和 MS 技术观察宿主蛋白质组变化,观察到线粒体短链 ECHS (enoyl-CoA hydratase) 差别表达,应用 RNAi 基因敲除此基因后,病毒复制及其细胞毒性明显下降。

乙型肝炎属嗜肝 DNA 病毒科,基因组为环状 DNA,全长 3.2 kb。HBV 是第一个用于 RNAi 抑制活体哺乳动物病毒复制研究的 DNA 病毒,有学者设计并构建与 HBV mRNA 同源 shRNA,向鼠肝细胞内共转染 HBV-DNA 和 shRNA 表达质粒,检测分泌到血清中的 HBV 表面抗原以评价 RNAi 的抑制效果。结果显示,抗原量降低了 6 倍<sup>[11]</sup>。人感染性疾病的小动物模型的建立充分表明,在哺乳动物体内应的 RNAi 干扰技术发挥抗病毒作用是可以实现的<sup>[12]</sup>。丙型肝炎病毒基因组为单股正链 RNA,由于 HCV 不能体外培养,因此病毒的 RNAi 研究需要利用复制子系统在 Huh-7 细胞上建立 HCV 复制模型。Kapadia 等<sup>[13]</sup>以非结构区为靶位点合成 7 个 siRNA 表达质粒转染 Huh7 细胞,发现 NS3 和 NS5B 的 mRNA 水平分别下降了 21 倍和 23 倍,有效地抑制了病毒复制。

甲型流感病毒其基因组 RNA 由 8 个节段组成,研究针对核衣壳蛋白 (nucleicapsid protein, NP) 和 RNA 聚合酶 A (polymerase A, PA) 基因序列设计的 siRNA 均能有效抑制 RNA 的增加,说明 NP 和 PA 蛋白在病毒转录和复制中发挥着重要作用,可以作为 RNAi 抗病毒治疗的优先靶基因<sup>[14]</sup>。

Jacque 等<sup>[15]</sup>发现, siRNA 能介导 HIV 病毒基因组的降解并下调基因表达。RNAi 甚至在病毒基因组包含核蛋白复合体时也同样发挥作用。这为治疗 HIV 提供了可能的基因治疗途径。

**RNAi 与亚细胞蛋白质组学研究** 中间体 (midbody) 是一种在细胞分裂期出现的结构,来自中心纺锤体,出现在两个子代细胞即将分裂前的连接处。Skop 等<sup>[16]</sup>对哺乳动物中间体蛋白质进行了组学研究,鉴定到了 160 种候选中间体蛋白质。运用免疫荧光实验验证了 10 个新蛋白定位于中间体上。为了验证这些蛋白质是否参与细胞的有丝分裂,他们运用 RNAi 实验对其进行验证,其结果证明 80 种蛋白质与有丝分裂相关,还发现内质网蛋白质 GRP94 在染色体的分离中起重要的作用。在这项研究中引入 RNAi 技术对蛋白质组学结果的验证发挥了重要的作用。在另一项确定糖蛋白及其在糖链中功能的糖组学研究中, RNAi 技术和蛋白质组技术的结合使用也被证明起到重要作用<sup>[17]</sup>。

**RNAi 与移植免疫蛋白质组学研究** 肝脏是移植领域的特惠器官,但如果供者和受者的主要组织相容性复合物 (MHC) 不匹配,就会发生移植肝排斥反应。但有研究表明,在不同种系的大鼠之间进行原位肝移植能够自发诱导免疫耐受<sup>[18]</sup>,此外还发现在不用免疫抑制剂的情况下许多受者的新肝脏能很好地发挥作用<sup>[19]</sup>。有学者利用蛋白质组技术在大鼠免疫耐受模型的血清水平上探讨原位肝移植 (orthotopic liver transplantation, OLT) 术前后的蛋白质表达差异,以期让受体能在不使用免疫抑制药物的情况下有效接受移植肝,研究结果显示,在排斥期与耐受期结合珠蛋白 (Hp) 的定位有显著不同:术后第 14 天 (处于排斥期), Hp 分散在整个肝细胞内;术后第 60 天 (进入耐受期), Hp 显示为高度集中的斑点,聚集在

肝细胞高尔基体内,这种 Hp 高度聚集在肝细胞高尔基体内的现象可能是 OLT 模型中导致免疫赦免(immunological privilege)的一个重要因子。Hp 能够直接影响 T 细胞增殖和抑制 Th2 细胞细胞因子的释放<sup>[20-21]</sup>。应用 RNAi 对这些生物标记功能进行的研究有待更进一步的报道。

此外,Lacourse 等<sup>[22]</sup>在线虫 GST(glutathione transferase)基因的研究中,阐明在进行 RNA 干扰后 2-DE 和凝胶分析可对蛋白质进行定量研究<sup>[22]</sup>。而 Chen 等<sup>[23]</sup>采用类似的方法发现,玉米中 PR10 的表达有助于抵抗黄曲霉素的污染;Nozumi 等<sup>[24]</sup>则发现了 17 个与神经元细胞轴突生长相关的生物标记。

**小结与展望** 在后基因组时代,基因的表达产物蛋白质作为生物功能的体现者和直接执行者,在机体的生理及病理过程中扮演着重要角色,高通量的蛋白质组学研究手段可以在上述过程中筛选出具有潜在价值的生物标记和靶点;而 RNAi 亦是新兴的研究手段,可以作为桥梁将基因组和蛋白质组研究联系起来,是破译各种生物中的基因表达功能的强大工具。RNAi 与蛋白质组学技术已经互相成为非常有价值的补充,它们在肿瘤学、病毒学、亚细胞结构及移植免疫等方面的应用日益广泛,有着广阔的研究前景。

## 参 考 文 献

- [1] Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code[J]. *Nature*,2009,457(7 228):396-404.
- [2] Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, *et al.* From proteins to proteomes; large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis[J]. *Biotechnology*,1996,14(1):61-65.
- [3] Yates J R 3<sup>rd</sup>, Gilchrist A, Howell KE, *et al.* Proteomics of organelles and large cellular structures[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2005,6(9):702-714.
- [4] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. *Nature*,2001,409:363-366.
- [5] Li Z, Zhao X, Bai S, *et al.* Proteomics identification of cyclophilin A as a potential prognostic factor and therapeutic target in endometrial carcinoma [J]. *Mol Cell Proteomics*,2008,7(10):1 810-1 823.
- [6] Li Y, Qin X, Cui J, *et al.* Proteome analysis of aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) and functional identification of candidate protein peroxiredoxin II [J]. *Proteomics*,2008,8(7):1 490-1 501.
- [7] Chen Y, Lin MC, Wang H, *et al.* Proteomic analysis of EZH2 downstream target proteins in hepatocellular carcinoma[J]. *Proteomics*,2007,7(17):3 097-3 104.
- [8] Wu N, Zhang W, Yang Y, *et al.* Profilin 1 obtained by proteomic analysis in all-trans retinoic acid-treated hepatocarcinoma cell lines is involved in inhibition of cell proliferation and migration[J]. *Proteomics*,2006,6(22):6 095-6 106.
- [9] Imamura T, Kanai F, Kawakami T, *et al.* Proteomic analysis of the TGF-beta signaling pathway in pancreatic carcinoma cells using stable RNA interference to silence Smad4 expression[J].

*Biochem Biophys Res Commun*,2004,318(1):289-296.

- [10] Takahashi M, Watari E, Shinya E, *et al.* Suppression of virus replication via down-modulation of mitochondrial short chain enoyl-CoA hydratase in human glioblastoma cells [J]. *Antiviral Res*,2007,75(2):152-158.
- [11] Gadkari DA. RNA interference & inhibition of viruses [J]. *Indian J Med Res*,2005,121(3):147-150.
- [12] Saleh MC, Van Rij RP, Andino R. RNA silencing in viral infections; insights from poliovirus [J]. *Virus Res*,2004,102(1):11-17.
- [13] Kapadia SB, Bridean-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2003,100(4):2 014-2 018.
- [14] Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells [J]. *Nature*,2002,418(6 896):430-434.
- [15] Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference [J]. *Nature*,2002,418(6 896):435-438.
- [16] Skop AR, Liu H, Yates JR 3<sup>rd</sup>, *et al.* Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms [J]. *Science*,2004,305(5 680):61-66.
- [17] Kondo A, Li W, Nakagawa T, *et al.* From glycomics to functional glycomics of sugar chains; Identification of target proteins with functional changes using gene targeting mice and knock down cells of FUT8 as examples [J]. *Biochim Biophys Acta*,2006,1764(12):1 881-1 889.
- [18] Kamada N, Davies HS, Roser B. Reversal of transplantation immunity by liver grafting [J]. *Nature*,1981,292(5 826):840-842.
- [19] Calne RY, Sells RA, Pena JR, *et al.* Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts [J]. *Nature*,1969,223(5 205):472-476.
- [20] Pan TL, Wang PW, Huang CC, *et al.* Expression, by functional proteomics, of spontaneous tolerance in rat orthotopic liver transplantation [J]. *Immunology*,2004,113(1):57-64.
- [21] Addredouani M, Matthijs P, Van Hoeyveld E, *et al.* Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release [J]. *Immunology*,2003,108(2):144-151.
- [22] Lacourse EJ, Perally S, Hernandez-Viadel M, *et al.* A proteomics approach to quantify protein levels following RNA interference: case study with glutathione transferase superfamily from the model metazoan *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Proteome Res*,2008,7(8):3 314-3 318.
- [23] Chen ZY, Brown RL, Damann KE, *et al.* PR10 expression in maize and its effect on host resistance against *Aspergillus Flavus* infection and atlatoxin production [J]. *Mol Plant Pathol*,2010,11(1):69-81.
- [24] Nozumi M, Togan T, Takahashi-Niki K, *et al.* Identification of functional maker protein in the mammalian growth cone [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2009,106(40):17 211-17 216.

(收稿日期:2009-01-05;编辑:张秀峰)