核醣核酸干擾術及其應用

作者：陳一村

關鍵字：核醣核酸干擾（RNA interference; RNAi）、雙股核醣核酸（dsRNA）、微核醣核酸（micro RNA; miRNA）、小片段干擾核醣核酸（short interfering RNA; siRNA）、小髮夾型核醣核酸（short hairpin RNA; shRNA）、基因沈默（gene silencing）、反義股核醣核酸（antisense RNA）、切丁酶（dicer）、核醣核酸誘導沈默複合物（RNA induced silencing complex; RISC）、線蟲（Caenorhabditis elegans ; C. elegans ）

BIOMEDICINE・生物醫學期刊網址：http://www.idealversion.com/

核醣核酸干擾術及其應用

陳一村[1,2]

[1]國立陽明大學醫學生物技術暨檢驗學系，台北，台灣

[2]社團法人台灣分子醫學會，台北，台灣

摘要

1998年，Fire與Mello研究如何阻斷特定基因的表現，從而發現意義重大的核醣核酸干擾（RNA interference; RNAi）作用一雙股核醣核酸（dsRNA）能夠誘發基因沈默（gene silencing）效應，一種意想不到的新基因調控機制。他們當年刊載於「自然」（Nature）雜誌上的論文，已是近代生物學的里程碑之作。核醣核酸干擾作用可快速又有效的關閉幾乎所有基因的表現，現在已是研究基因功能最佳的工具。令人意外的是，至少有500種細胞內生性微RNA（micro RNA; miRNA）一來自於無法轉譯（translate）成蛋白質的核醣核酸一可藉由核醣核酸干擾作用，調節細胞內大約30%的基因。微RNA與胚胎發育神經退化疾病及癌症的形成有關，因而成為生物學最熱門的主題之一。在疾病治療應用上，小片段干擾核醣核酸（short interfering RNA; siRNA）可抑制病毒的感染與複製（replication）能力、可用來篩選新藥、改善癌症治療等。儘管發展歷史不長，核醣核酸干擾就像是聚合酶鏈鎖反應（polymerase chain reaction; PCR）技術一樣，對生物與臨床醫學做出革命性的貢獻，因而在不到10年內，得到2006年諾貝爾生理或醫學獎的肯定。（生醫 2008;1(3):276-283）

關鍵字：核醣核酸干擾（RNA interference; RNAi）、雙股核醣核酸（dsRNA）、微核醣核酸（micro RNA; miRNA）、小片段干擾核醣核酸（short interfering RNA; siRNA）、小髮夾型核醣核酸（short hairpin RNA; shRNA）、基因沈默（gene silencing）、反義股核醣核酸（antisense RNA）、切丁酶（dicer）、核醣核酸誘導沈默複合物（RNA induced silencing complex; RISC）、線蟲（*Caenorhabditis elegans*; *C. elegans*）

核醣核酸干擾（RNA interference; RNAi）之發現

2006年諾貝爾生理或醫學獎由兩位美籍遺傳學家－Andrew Z. Fire與Craig C. Mello共享，表彰他們在1998年發現「核醣核酸干擾」－雙股核醣核酸（dsRNA）能夠誘發基因沈默（gene silencing）的卓越貢獻[1]。他們都是線蟲人（worm people）－以線蟲（*Caenorhabditis elegans*; *C. elegans*）為模式研究生物學的科學家。1998年，他們將核醣核酸干擾現象變成可測試的科學，自從他們在1998年發表的論文以後，已有超過8000篇相關的論文發表[2]。雙股核醣核酸干擾的發現，暗示生物學中存在一種新的基因調控機制，也提

通訊作者：陳一村副教授
電話：886-2-2826-7213
傳真：886-2-2826-4092
地址：112台北市石牌區立農街155號國立陽明大學醫學生物技術暨檢驗學系
電子郵件：chenit@ym.edu.tw

2008年8月15日來稿；2008年10月1日修改；2008年10月6日同意刊登

供現代醫學新工具，因此諾貝爾委員會在不到10年內就肯定他們的成就，他們是廿年來最年輕的諾貝爾生理或醫學獎得主。

其實早在1990年，植物學家Jorgensen和其同事將一個能產生花色素的基因一苯基苯乙烯酮合成酶（chalcone synthase）基因，置於一個強啟動子（promoter）後面，導入矮牽牛花（petunia）中，試圖加深花朵的紫顏色，結果多數花朵出現花斑的顏色，甚至白色。他們將這種現象命名為協同抑制（cosuppression）[3]，因為導入的基因和其相似的同源基因同時都被抑制，但他們沒有解釋造成此現象的原因。1997年，Baulcombe實驗室發現，植物病毒可引發基因沈默作用，他們推測RNA可能是啟始者（initiator）[4]。

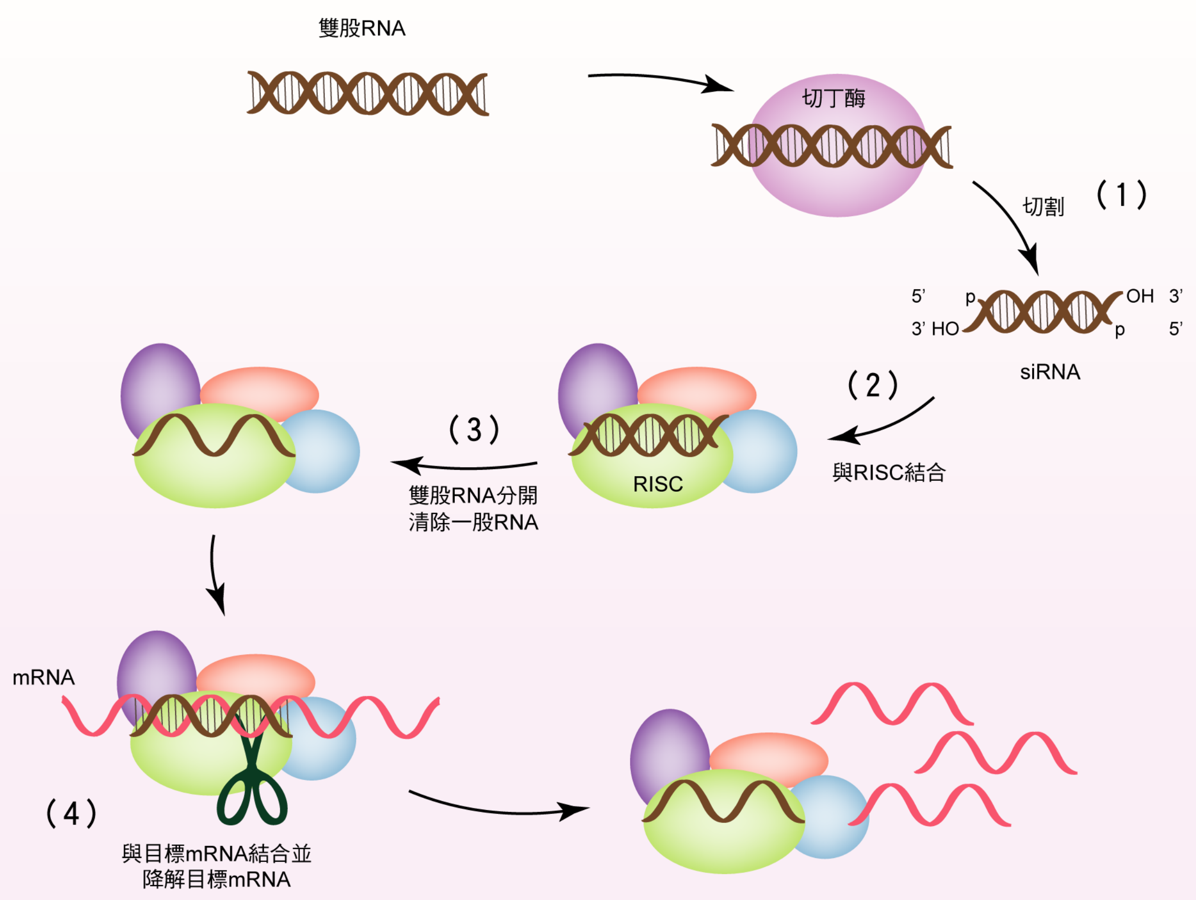
在1995年，Guo和Kemphues試圖阻斷線蟲中的肌肉蛋白*par-1*基因時，發現了一個意想不到的現象[5]。他們本是利用反義股RNA（antisense RNA）技術，專一性地阻斷*par-1*基因的表達，同時在對照實驗中，給線蟲注射正義股RNA（sense RNA）。但結果是二者都切斷了*par-1*基因的表達途徑，對此，他們一直沒能給予合理的解釋。

1998年，Fire和Mello首次揭開這個懸疑之謎，並發表於英國的「自然」（Nature）期刊上[1]。他們透過巧妙而完整的實驗證實，Guo和Kemphues所觀察到的正義股RNA及反義股RNA抑制基因表現的現象，都是由於體外轉錄（transcript）後的RNA遭到微量雙股RNA污染而引起。當他們將體外轉錄得到的單股RNA純化後，再注射到線蟲時，*par-1*基因抑制效應顯得十分微弱，相反地，經過純化的雙股RNA，卻能夠專一性地阻斷*par-1*基因的表現，同時線蟲會出現顫抖（twitching）的行為[6]。這與*par-1*基因剔除（knockout）的線蟲所表現的顫抖行為完全相同。而且有趣的是，每個細胞只要少量分子的雙股RNA，就足夠阻斷同源基因的表現，甚至會導致其第一子代的同源基因沈默。該研究小組將這個現象稱為RNA干擾。RNA干擾極少導致完全阻斷基因的表現，所以常稱為「減弱（knockdown）」，而非「剔除（knockout）」。Fire和Mello的論文已是近代生物學的里程碑之作，他們在文中也暗示RNA干擾機制的存在可能是有生物方面的目的。瑞典卡洛林斯卡學院（The Karolinska Institute in Stockholm）的Erna Moller教授說：「就像早晨拉開窗簾，眼前景物豁然開朗。」

核醣核酸干擾機制

dsRNA如何引發基因沈默呢？首先雙股RNA與切丁酶（dicer）結合，被切成許多小片段干擾RNA（small interfering RNA; siRNA），約21-23個核苷酸（nucleotide）長。且此雙股siRNA在3'端（3' terminal）均有兩個核苷酸突出（overhang），並帶3'-OH，此種siRNA可最有效地誘導RNA干擾作用[7,8]。之後，核醣核酸誘導沈默複合物（RNA induced silencing complex; RISC）與siRNA結合，造成siRNA雙股分開，其中一股RNA被清除，另一反義股RNA則會留下，引導RISC結合至互補的信使核醣核酸（messnager RNA; mRNA）上，之後mRNA會被RISC切斷而分解，使其無法轉譯（translate）蛋白質，因此目標基因的表現遭到抑制並失去功能（圖一）[8]。注射反義股RNA之所以無法引發基因沉默作用，是因為單股RNA不能活化切丁酶或RISC。

若siRNA是引導RNAi現象的關鍵，則應該可以在細胞中偵測到siRNA。當時許多學者利用低解析度洋菜凝膠（agarose gel）與北方墨點法(northern blot) 去尋找反義股RNA，但都失敗了。直到1999年，Baulcombe實驗室使用高解析度聚丙烯醯胺膠（polyacrylamide gel），才成功在植物中找到21-25個核苷酸長的分子[9]，這些RNA分子分別與沉默基因的正義股和反義股互補。而RNAi秘密的另一關鍵一切丁酶與RISC則是在一系列的果蠅（*Drosophila melanogaster*）細胞萃取物實驗



圖一、雙股RNA（dsRNA）引發基因沈默（gene silencing）之機制。
（1）首先雙股RNA與切丁酶（dicer）結合，被切成許多小片段干擾RNA（siRNA），約21-23個核苷酸（nucleotide）長，此雙股siRNA在3'端（3' terminal）均有兩個核苷酸突出（overhang），並帶3'-OH；（2-3）之後，誘導核醣核酸沈默複合物（RNA induced silencing complex; RISC）與小片段干擾RNA結合，造成雙股RNA分開，其中一股RNA被清除，另一反義股RNA會留下，引導RISC結合至互補的信使RNA（messnager RNA; mRNA）上；（4）之後mRNA會被RISC切斷而分解，使其無法轉譯（translate）蛋白質，因此目標基因的表現遭到抑制並失去功能。（彩圖詳見本刊網頁）

中被發現[10-12]。而哺乳動物細胞中RNAi的現象，直到2001年才被證實[7]。

微RNA（micro RNA; miRNA）與核醣核酸干擾

Fire-Mello的發現還有另一層意義，那就是細胞的演化，讓無法進一步轉譯成蛋白質的RNA，即所謂非編碼RNA（non-coding RNA; ncRNA），形成類似病毒的dsRNA之二級結構，然後利用核醣核酸干擾沈默效應，來調控自己的基因，這些RNAs稱為微RNA。

微RNA是來自一些從DNA轉錄，但無法進一步轉譯成蛋白質的RNA，包括末端含有一些不轉譯區域（untranslated regions; UTRs）。微RNA是從髮夾型RNA（hairpin RNAs）中，利用切丁酶而產生長約21到23個核苷酸的RNA分子。因

為微RNA不能轉錄DNA上的遺傳信息，因此科學家長期以來認為微RNA是多餘的遺傳物質（junk DNA）；但微RNA在動物及植物中，具高度演化保留性（conservation），顯示其在生物體的重要。

微RNA先驅物（primary miRNAs; pri-miRNAs）需要核蛋白Drosha與Pasha（或哺乳類核蛋白DGCR8）的加工處理，製成約70個核苷酸的微RNA前驅物（precursor miRNAs; pre-miRNAs），形成小髮夾型核醣核酸（short hairpin RNA; shRNA）之構造，然後藉由蛋白質exportin 5輸送到細胞質，與切丁酶結合，而RISC的切割還需要阿革蛋白家族（Argonaute; AGO）[13]及P body中GW182的參與[14]。微RNA之干擾效應有兩種，一為引導RISC結合至完全互補（perfect match）的mRNA上，之後mRNA會被RISC切斷而分解，另一為透過不完全互補（mismatch）的mRNA 3'端不轉譯區域（3' untranslated region; 3' UTR），抑制轉譯進行（圖二），前者之干擾效應，用在植物及病毒，後者多發生在動物細胞上[15]。雖然微RNA如何抑制蛋白質的轉譯機制仍無定論，但一般認為至少包括下列幾種：（1）抑制轉譯的起始或延伸；（2）干擾蛋白質的轉譯；（3）影響mRNA的半衰期，包括去除尾端多A（poly(A)）及蓋帽之構造（cap structure）等[14]。

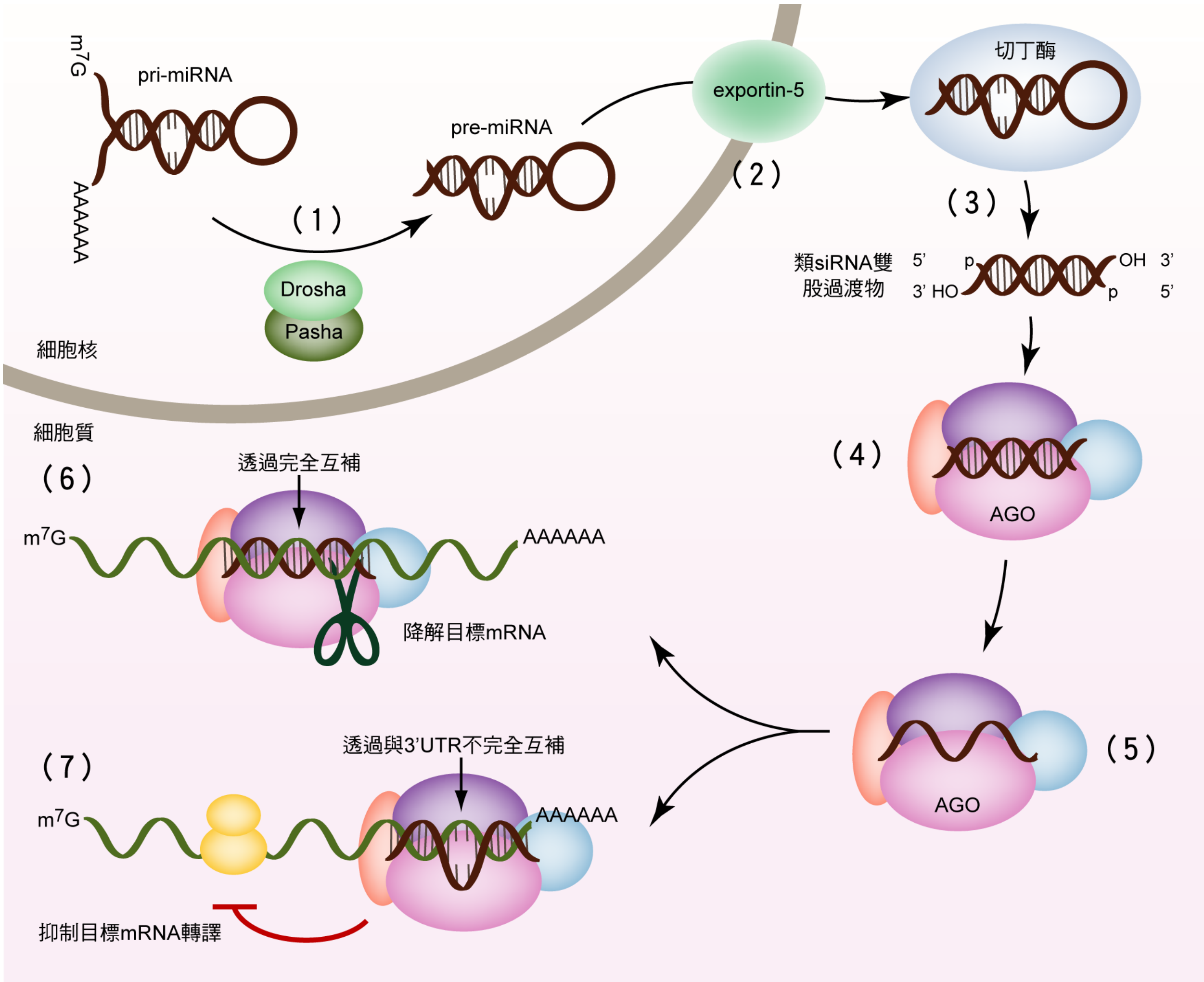
最近的研究已經證明，微RNA不但是控制胚胎發育和細胞複製的關鍵物質，而且微RNA的表現與神經退化疾病及癌症的形成有密切關係[16]。例如，最早發現的微RNA—*lin-4*與*let-7*。它們與線蟲發育有關[17,18]，這些基因的突變，會造成線蟲發育缺陷。在線蟲中至少有55種基因與微RNA有關。哺乳動物細胞的微RNA—*let-7*可抑制致癌基因（oncogene）—*RAS*，因此*let-7*似乎扮演抑瘤基因（tumor suppressor gene）的角色，實驗也發現，*let-7*在肺癌病患的表現微弱，與*RAS*成反比關係[19]。微RNA表徵（miRNA signature）已被認為可用來做為癌症的診斷、疾病的進展、分期（stage）、預後的判定以及藥物的反應，甚且判定下游（downstream）目標基因與癌症之關係[20]。

目前在人類細胞中發現的微RNA至少有800種，可能接近1000種。因為微RNA可透過不完全互補的mRNA，抑制蛋白質的轉譯，估計這些微RNA可調節細胞內大約30%的基因。因此，科學家正積極尋找微RNA的目標基因與疾病的關係，以及人類基因體中單核苷酸多型性（single nucleotide polymorphism; SNP）是否會影響微RNA與目標基因之作用[21]。科學家於2007年發表了約800篇與微RNA研究相關的論文，內容涉及微RNA與癌症、微RNA與神經疾病和幹細胞（stem cell）分化等的關係[22]。2008年科學家將開始研究如何利用微RNA揭開一些疾病的發病機理，並希望深入瞭解微RNA是如何起作用的，微RNA與核醣核酸干擾一夜之間成為生物醫學的顯學。

核醣核酸干擾的應用

核醣核酸干擾在細胞中至少有下列四項功能[6,8]：（1）當RNA病毒感染細胞後，會把病毒的dsRNA注入細胞中，RNAi機制因此被啟動來消滅病毒RNA，不讓病毒產生複製（replication）所需的蛋白，以防止子代病毒的產生，尤其是在植物與果蠅中；（2）細胞本身的基因可表現微RNA，這些分子經由RNAi機制，以阻止mRNA轉譯成蛋白質；（3）隨著演化的累積，人類基因體序列中，許多是由病毒基因與跳躍基因（jumping genes or transposable elements）所組成，藉著RNAi可以沈默「跳躍基因」，維持基因體的穩定。另外，RNAi也參與異染色體（heterochromatin）形成，而導致基因沈默[23]；（4）科學家利用人造dsRNA，活化細胞內RNAi機制，而造成基因沈默效應。

就像是聚合酶鏈鎖反應（polymerase chain reaction; PCR）技術對生物與臨床醫學，以及電腦斷層攝影與核磁共振對現代醫學的貢獻一樣，核



圖二、微RNA（microRNA; miRNA）引發基因沈默之機制。
（1）微RNA先驅物（primary miRNA; pri-miRNA）需要核蛋白Drosha與Pasha的加工處理，製成約70個核苷酸的前驅物（precursor-miRNA; pre-miRNA），形成小髮夾型核醣核酸（short hairpin RNA; shRNA）；（2）然後藉由輸出蛋白exportin 5輸送到細胞質，與切丁酶結合；（3）形成類雙股RNA過渡物；（4-5）誘導RISC的切割，還需要阿革蛋白家族（Argonaute; AGO）的參與。微RNA之干擾效應有兩種；一為（6）引導RISC結合至完全互補（perfect match）的mRNA上，之後mRNA會被RISC切斷而分解；另一為（7）透過不完全互補（mismatch）的mRNA 3'端不轉譯區域（3' untranslated region; 3'UTR），抑制轉譯進行。（彩圖詳見本刊網頁）

醣核酸干擾儘管發展歷史不算長，但因為能夠快速又有效的抑制幾乎任何基因的表現，已革命性地成為科學家最好的研究工具，幾乎觸及生物醫學的每個領域[2]，茲說明如下。

（1） 研究

核醣核酸干擾，尤其對探討新基因的功能方面如基因體學，更是不可缺少的工具。一般來說，科學家可人工合成小分子的RNA（siRNA, < 30核苷酸），或是將shRNA接在質體（plasmid）中，然後送入細胞。shRNA在細胞中被轉換成siRNA，或利用改良的病毒質體，永久的插入細胞染色體（chromosome）中作持續的表達[24,25]，這些方法都可誘發基因沈默作用。但在哺乳動物細胞中，長的dsRNA（> 30核苷酸）會誘發抗病毒反

應，產生干擾素（interferon），因而啟動關閉蛋白質合成的機制，故要避免長的dsRNA[26]。據聞基因體國家型計畫已取得上萬筆人類與老鼠的核醣核酸干擾基因庫（shRNAs in Lentiviral vector），可供各研究單位使用，這對研究人員而言是一大助力。

（2） 發展新藥物

因為核醣核酸干擾可快速、有效的抑制基因，研究員可選擇抑制特定基因或非特定基因，抑制單一基因或一群基因，可用細胞或動物模式做實驗，然後觀察其對藥物的反應，尤其是針對常用來做藥物實驗的激酶（kinases）、離子通道（ion channels）、受體（receptors）等基因家族。核醣核酸干擾也可用來篩選產生抗藥性（drug resistance）的基因或訊息傳導路徑。相較於小分子藥物，siRNA可能更多元、便宜又省時。目前全世界有近一百家製藥公司從事相關的研究。同時科學家正努力利用RNAi基因書庫（library）及矩陣（array），篩選與癌症有關的基因[8,27]，例如使癌細胞增生、轉移（metastasis）等的基因，及證實某一基因是否為新抗癌藥物的目標基因等研究[28]。

（3）治療

在疾病治療應用上，小片段干擾核醣核酸具有莫大潛力，可抑制病毒的感染與複製能力，為愛滋病（人類免疫力缺乏病毒（human immunodeficiency virus; HIV））、肝炎病毒（hepatitis virus）與人類皰疹病毒（human herpes virus; HHV）等的治療帶來曙光[15]。但若欲將siRNA當作藥物注射入人體（systemic delivery）而達到治療效果，siRNA至少有三點缺失需作一些改良[26]。一為穩定性，未改變的siRNA分子在血液中的半衰期很短；二為偏離目標的影響（off-target effects; OTEs)，siRNA如果含有種子序列（微RNA 5'端2-7或2-8核苷酸序列）可與mRNA之3' UTR配對，則siRNA可能有微RNA之功能，產生OTEs的影響。通常siRNA很難避免此影響，但可嘗試用化學方式改變種子序列之關鍵核苷酸，以減少此影響[29]。三為毒性的考量及siRNA也許會干擾內生性的微RNA[30]。

研究者已嘗試下列之改良[31]，例如將siRNA接在膽固醇分子，這些分子會與肝及小腸細胞表面的低密度脂蛋白受體（low-density lipoprotein receptor; LDL receptor）結合而被吸收。已在動物實驗證實，apoB-siRNA接膽固醇分子，可降低載脂蛋白質基因（*APO*）的表現，而降低血清中30%的膽固醇[32]。另外針對血液細胞、HIV感染的細胞或表現人類上皮生長因子受體2（human epidermal growth factor receptor 2; HER2）的乳癌細胞，siRNA也可接在單株抗體（monoclonal antibady）片段－protamine fusion protein（帶正電荷蛋白質）[33]。siRNA可包裹在微脂體（liposome）或奈米粒子（nanoparticle）中，而降低老鼠中B型肝炎病毒（hepatitis B virus）複製[34]，或減少靈長類*APOB*基因的表現[35]。siRNA也可利用病毒質體等。若藉由黏膜組織進入人體，則無需改良，可直接使用裸露的siRNA，例如局部發炎疾病如氣管、頭、眼、頸、鼻、子宮頸等地方[31]。

結語

RNA干擾技術好比關掉讓細胞異常的基因，阻斷讓細胞表現失常的蛋白質合成，對癌症或病毒引起的感染症，提供專一性、低副作用的基因治療新方向。儘管發展史並不長，但RNA干擾作用已是研究基因功能不可或缺的工具之一，在基因調控與基因轉殖領域，RNA干擾作用更是生物學最熱門的主題之一。利用RNAi在疾病治療應用上，以治療眼球退化性黃斑部病變(ocular diseases, age-related macular degeneration; AMD）進度最快，已進入第一期人體臨床試驗。

其他神經退化疾病，如阿茲海默症（Alzheimer's disease）、第二型糖尿病（type II diabetes mellitus）、杭廷頓氏舞蹈症（Huntington's disease）則還在動物實驗階段[15]。未來的研究若是能改善siRNA，使其可更有效、安全地被輸送到特定組織細胞中，作持續性的表現，那麼相信不久以後，以RNA干擾技術為基礎的治療將會廣泛地應用在臨床醫學上。

引用文獻

1. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans . Nature 1998;391:806-811.
2. Zamore PD. RNA interference. Cell 2006;127:1083-1086.
3. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chalcone synthase gene into Petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant Cell 1990;2:279-289.
4. Ratcliff FG, Harrison BD, Baulcombe DC. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. Science 1997;276:1558-1560.
5. Guo S, Kempheus KJ. Par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell 1995;81:611-620.
6. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006 Press Release: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/press.html.
7. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 2001;411:494-498.
8. Hannon GJ, Rossi JI. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. Nature 2004;431:371-378.
9. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 1999;286:950-952.
10. Hammond S, Bernstein E, Beach D, Hannon G. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. Nature 2000;404: 293-298.
11. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 2000;101:25-33.
12. Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional Gene Silencing by Double-stranded RNA. Nature Rev Gen 2001;2:110-119.
13. Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science 2004;305:1434-1437.
14. Equlaliop A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. Cell 2008;132:9-13.
15. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. Nat Rev Genet 2007;8:173-182.
16. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer 2006;6:259-269.
17. Lee RC, Feinbaum RL, Ambrose V. The C elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementary to the lin-14. Cell 1993; 75:843-854.
18. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in C elegans. Nature 2000;403:901-906.
19. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. Ras is regulated by the let-7 microRNA family. Cell 2005;120:635-647.
20. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer 2007;6:857-863.
21. Chang TC, Mendell JT. MicroRNAs in vertebrate physiology and human disease. Annu Rev Genomics Hum Genet 2007;8:215-239.
22. Stadler BM, Ruohola-Baker H. Small RNAs: keeping stem cells in line. Cell 2008;132:563-565.
23. Wassenegger M. The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. Cell 2005;122:13-16.
24. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami RA. System for stable expression of shRNAs in mammalian cells. Science 2002;296:550-553.
25. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. shRNAs induce sequence-specific silencing in mammalian cells. Genes Dev 2002;16:948-958.
26. Bernards R. Exploring the uses of RNAi – gene knockdown and the Nobel Prize. N Eng J Med 2006;355:2391-2393.
27. Ngo VN, Davis RE, Lamy L, Yu X, Zhao H, Lenz G, Lam LT, Dave S, Yang L, Powell J, Staudt LM. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. Nature 2006;441:106-110.
28. Iorns E, Lord CJ, Turner N, Ashworth A. Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery. Nat Rev Drug Disc 2007;6:556-562.
29. Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, Linsley PS. Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. RNA 2006;12:1197-1205.

30. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/shRNA pathways. Nature 2006;441:537-541.
31. Dykxhoorn DM, Liberman J. Knocking down disease with siRNAs. Cell 2006;126:231-235.
32. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. Nature 2004;432:173-178.
33. Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA, Lieberman J. Antibody mediated in vivo delivery of siRNAs via cell-surface receptors. Nat Biotechnol 2005;23:709-717.
34. Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, Blanchard K, Jensen K, Breen W, Hartsough K, Machemer L, Radka S, Jadhav V, Vaish N, Zinnen S, Vargeese C, Bowman K, Shaffer CS, Jeffs LB, Judge A, MacLachlan I, Polisky B. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. Nat Biotechnol 2005;23:1002-1007.
35. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Röhl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Koteliansky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachlan I. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. Nature 2006;441:111-114.

核醣核酸干擾術及其應用

葉添順（國立陽明大學解剖學及細胞生物學研究所副教授）

在本篇文章中，作者鉅細靡遺地闡述小片段干擾核醣核酸（short interfering RNA; siRNA）發現的起源、核醣核酸干擾（RNA interference; RNAi）術的介紹及其應用，對讀者而言，就像是聆聽一則精彩的故事一般，十分引人入勝。此技術的研發，對於研究工作的進行以及疾病的治療提供了另一種可行的策略，因此目前全世界生物醫學研究者正積極研究發展中。

作者詳細地描述siRNA發現的起源，但是文中並未提到微核醣核酸（micro RNA; miRNA）發現的過程。目前已知微RNA發現的契機是源自1980年代初期，科學家們對於線蟲（*Caenorhabditis elegans*; *C. elegans*）的研究。在英國劍橋分子生物研究所的Sulton、Ambros博士以及麻省理工學院的Horvitz教授等人，發現在線蟲*lin-4*、*lin-14*、*lin-28*與*lin-29*基因上的突變，會導致其後期胚胎發育發生時間控制上的異時（heterochronic）缺陷[1,2]。隨後的研究進一步證實，由*lin-4*基因所合成出一段約22個核苷酸（nucleotide）的非編碼（non-coding）RNA序列，能夠與*lin-14*基因所轉錄（transcript）出的RNA之3'端不轉譯區（3' untranslated region; 3'UTR）的七個位置，進行不完全互補（mismatch）[3]。因為這樣的調控機制，使得*lin-4*基因在lin-14蛋白的轉譯（translate）過程中，扮演抑制的角色[4]。

文中描述核醣核酸誘導沈默複合物（RNA induced silencing complex; RISC）切割信使RNA（messnager RNA; mRNA）的作用，需要阿革蛋白家族（Argonaute）的參與。目前已知至少有四種不同的阿革蛋白複合物，而不同阿革蛋白結合的小分子RNAs具有不同的5'端（5' terminal）核苷酸偏好性。其中AGO1結合以尿嘧啶（uracil; U）起始的小分子RNAs，而AGO2主要結合以腺嘌呤（adenine; A）起始的小分子RNAs。因為不同的阿革蛋白對5'端核苷酸不同的小分子RNAs的結合活性存在很大差異，因此小分子RNA的序列本身決定了小分子RNA最終進入的阿革蛋白種類，並且行使其功能。此外，使用不同的阿革蛋白複合物也決定了其標的mRNA是否被切割。

目前有關於微RNA的研究主要為：鑑定新的微RNA、探討微RNA所扮演的生物功能及其影響的標的基因。截至目前為止，已知約60%的微RNA為單獨表現，15%的微RNA是以群聚（cluster）的方式聚集在一起，25%微RNA則可能表現於內含子（intron）。因此以往所探討有功能性的基因約聚集於人體內部不到1%的DNA序列上，而大於99%的DNA序列則被稱為多餘的遺傳物質。微RNA的發現再度引起全球科學家對於DNA序列的注意，全世界正如火如荼的展開在鑑定新的微RNA研究上。另一方面在探討微RNA功能的部分，目前研究也發現微RNA具有促進和抑制腫瘤生成的一體兩面角色，因此尋找微RNA所調控的下游（down stream）標的基因，以及探討其對於腫瘤生成及轉移（metastasis）作用的影響，均為當下重要的研究課題。

作者在文中也指出：微RNA不但是控制胚胎發育和細胞複製的關鍵物質，且其表現與神經退化疾病以及癌症的形成有密切關係。目前有越來越多的證據指出：微RNA的突變或是異常的表現情形，可能與許多人類癌症有關[5,6]。異常表現的微RNA常常在各種不同的癌症中直接調控腫瘤形成相關的致癌基因（oncogene），或是抑瘤基因（tumor suppressor gene）的mRNA，影響癌症的發展機制[5]。例如：在血癌（leukemia）中，

miR-142、miR-155與*c-Myc*致癌基因之間的作用關係、miR-34家族對於腫瘤抑制基因*p53*在腫瘤抑制上所扮演的重要性、miR-15/16在細胞凋亡（apoptosis）路徑上的貢獻、以及miR-21參與腫瘤促進的作用機制等等。

siRNA與微RNA之間相同點為：（1）兩者長度皆約22個鹼基（base）左右；（2）均為切丁酶（dicer）產物，因此具有切丁酶產物的特點，在3'端（3' terminal）有突出（overhang）；（3）兩者的形成都需阿革家族蛋白的存在；（4）均屬於RISC的組成成分，因此在siRNA和微RNA主導的沈默機制上有重疊。而兩者不同之處為：（1）siRNA是在RNAi過程中形成的中間產物，即siRNA是在病毒感染或是人工藉由體外送入之雙股RNA後誘導而成，而微RNA則是來自細胞內染色體的內生性RNA成份；（2）siRNA是由長的單股RNA轉變而來，而微RNA是由具有髮夾狀結構之微RNA前驅物（precursor miRNA; pre-miRNA）轉變而來；（3）siRNA主要以雙股形式存在，而微RNA則是以miRNA:miRNA*雙股形式存在；（4）兩者對標的RNA的特異性不同：在siRNA之標的序列上，一個核苷酸的突變就會影響到RNAi的沈默效應。但如果標的RNA產生突變，而不能與微RNA完全互補時，仍有很大的機會不影響到微RNA途徑的調節效應；（5）siRNA通過RNAi途徑發揮功能，而微RNA通過微RNA途徑發揮作用。原始的RNAi功能主要是抑制轉位子（transposon）的活性和病毒感染，有點類似於基因組的免疫系統，微RNA主要在發育過程中發揮作用，調節內在基因的表現；（6）RNAi主要在轉錄後發揮作用，影響mRNA的穩定性；微RNA則主要在蛋白質合成階段發揮作用；（7）兩者與標的mRNA的結合位置不同。siRNA完全互補（perfect match）於mRNA上，而微RNA多與標的mRNA之3'端不轉譯區域以不完全互補方式結合。

作者文中提及了發展新藥物以及治療的重要性。目前已知多種不同的微RNA能與致癌基因、抑瘤基因協同作用，參與腫瘤形成的調控機制。因此若能在治療上採用多管齊下的治療方式，同時將微RNA與致癌基因、抑瘤基因當作標靶，以不同的藥物組合治療疾病，可能可以提高治療的效率與選擇性，或許將不失為一種新的治療良方。

引用文獻

1. Ambros V, Horvitz HR. Heterochronic mutants of the nematode Caenorhabditis elegans. Science 1984;226:409-416.
2. Chalfie M, Horvitz HR, Sulston JE. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of C. elegans. Cell 1981;24:59-69.
3. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 1993;75: 843-854.
4. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell 1993;75:855-862.
5. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer 2006;6:857-866.
6. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer 2006;6:259-269.