

· 综 述 ·

RNA 干扰的研究进展

何洁凝, 田生礼*

(深圳大学 生命科学学院, 中国广东 深圳 518060)

摘 要: RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种由双链 RNA 诱发的转录后水平的基因沉默现象,是近几年发展起来的基因表达调节新机制。RNAi 广泛存在于真菌、植物和动物中,这种调控可以由 siRNA、shRNA 及 miRNA 等小分子 RNA 参与。在此主要对 RNAi 的研究进展如背景、分子调控机制、存在的问题和应用前景等进行了综述。

关键词: RNA 干扰;小分子 RNA;研究进展

中图分类号:Q819

文献标识码:A

文章编号:1007-7847(2014)03-0265-04

Research Proceedings of RNA Interference

HE Jie-ning, TIAN Sheng-li*

(College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China)

Abstract: RNA interference(RNAi) is a phenomenon of post-transcriptional gene silencing induced by double-stranded RNA and a new mechanism of regulating gene-expression. It widely exists in fungi, plants and animals and in which it is regulated by siRNA, shRNA, miRNA and other small RNA molecules. The proceedings such as background, molecular mechanisms, problems and prospects of RNAi have mainly been reviewed.

Key words: RNA interference(RNAi); small molecule RNA; research proceedings

(*Life Science Research*, 2014, 18(3): 265~268)

2006 年,美国斯坦福大学的 Andrew Z. Fire 和美国马萨诸塞大学的 Craig C. Mello 分别被授予了诺贝尔生理学 and 医学奖,以表彰他们发现了 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 现象,即用双链 RNA 使基因沉默 (RNA interference gene silencing by double-stranded RNA)。自发现 RNAi 现象至 2006 年的 8 年间,在 PubMed 网站上能搜索到的有关 RNAi 的文章已经达到 8900 多篇,可见,从 RNA 干扰理论提出到现在已经历十余年时间,人们对其机制和应用的研究热情始终没有冷却。为了加深对该技术的了解与追踪,本文主要对 RNAi 的发现、作用机制、应用的研究进展予以综述。

1 RNAi 的发现

RNA 干扰是一种在进化过程中存在的高度

保守、由双链 RNA 分子 (double-stranded RNA, dsRNA) 诱发同源 mRNA 高效特异性降解的基因转录后沉默现象 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)。1990 年初,科学家在向矮牵牛花导入能使花卉变得更鲜艳的查尔酮基因后,结果却发现,一些花的颜色不但没有变鲜艳反而被“漂白了”。这种过度表达内源基因而引发的基因沉默的现象当时被称为共阻遏。1998 年 Fire 等在向线虫中分别导入正义、反义和双链 RNA 同样干扰 par-1 基因表达,结果发现单链反义 RNA 和双链 RNA 均能特异性沉默靶基因的表达,双链 RNA 的效果明显比单链 RNA 的沉默效果强,于是他们将这种双链 RNA 抑制基因表达的现象称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi),把引发 RNA 干扰现象的 RNA 分子称为干扰 RNA^[1]。此后, RNA 干

收稿日期:2013-09-02;修回日期:2013-10-08

基金项目:深圳市科技计划项目(C201006010725A)

作者简介:何洁凝(1988-),女,广东珠海人,硕士研究生,主要从事 RNAi 的研究;* 通讯作者:田生礼(1960-),男,辽宁人,深圳大学生命科学院教授,研究生导师,主要从事小分子 RNA 的基因表达与调控方面的研究, Tel: 0755-26534149, E-mail: sltian@szu.edu.cn。

扰这种现象被证明广泛存在于多种真核生物中。

2 RNAi 的作用机制

众所周知, RNAi 的分子主要包括以下几种: siRNA、shRNA、miRNA, 虽然它们在结构上各不相同, 但是所有这些分子都具有诱导基因沉默的能力, 它们在细胞中的作用机制主要有 3 个步骤^[2]:

起始阶段: 外源性或内源性双链 RNA 分子被核酸酶 Dicer 加工剪切成 21~25 个核苷酸长度的小分子双链。

RISC (RNA-induced silencing complex) 的组装: 产生的小分子双链 RNA 中其中一条链与相关的蛋白(主要是 Argonaute 蛋白)组装形成具有活性的沉默复合体 RISC。

效应阶段: 组装形成的具有活性的 RISC 作用于与其上的单链小分子 RNA 序列互补的 mRNA, 并将该 mRNA 降解, 使其翻译受到抑制, 最终导致基因的沉默。siRNA、shRNA 与 miRNA 对靶基因 mRNA 沉默时作用的位点有所不同, siRNA 沉默目的基因主要作用于 mRNA 的编码序列, 而 miRNA 主要作用于 mRNA 的 3' 的非翻译区。

在 RNAi 过程中, 研究得较清楚的蛋白主要是 Argonaute 蛋白家族: Argonaute (Ago) 蛋白属于一个高度保守的蛋白家族, 包括 Ago1、Ago2、Ago3、Ago4。它的大小约 100 kD, 这 4 种蛋白都包含两个重要的结构域: PAZ、MID 结构域, 分别与 miRNA 3' 与 5' 端相互作用。在所有的 Ago 蛋白中只有 Ago2 所包含的 PIWI 结构域具有切割活性, Ago1、Ago3、Ago4 没有此活性^[3,4]。Argonaute 能跟不同的小分子 RNA (miRNA、siRNA) 结合, 根据小分子 RNA 结构的不同, 它们所结合的 Argonaute 蛋白也有所区别, 其中 miRNA 与 Ago1 结合, 而 siRNA 则与 Ago2 结合^[5]。最近研究发现, Ago2 能提高细胞中 miRNA 的稳定性及提高成熟 miRNA 在细胞中的水平^[6]; Ago3 蛋白的 PIWI 与 Piwi-interacting RNAs (piRNAs) 相互作用产生沉默转座子的作用; Ago4 在调控哺乳动物精细胞进入减数分裂和减数分裂性染色体失活 (MSCI) 中起作用^[7]。

3 RNAi 的应用

3.1 基因功能研究

在后基因组时代, 基因功能的研究显得尤其迫切, 可是, 由于我们在进行研究基因功能实验时难以直接在人活体内进行, 建立有效的转基因或

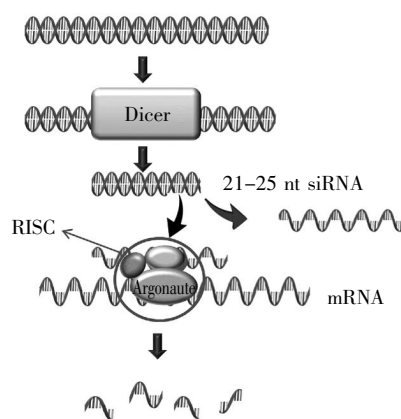


图 1 RNA 干扰作用机理^[2]

Fig.1 Mechanism of RNA interference^[2]

基因敲除的动物模型显得尤为重要, RNAi 技术在此方面做出重大贡献。Kim 等利用针对影响胚胎发育的两种内源性的 *Oct3/4* 和 *c-mos* 基因的 siRNA, 将其植入鼠卵母细胞前胚胎中, 成功地清除了内源性的 *Oct3/4* 和 *c-mos* 产物, 建立了敲除 *Oct3/4* 和 *c-mos* 基因的动物模型^[8]; 其次利用 RNAi 文库也是基因功能研究的重要手段, RNAi 文库是人工构建的一种混合文库, 研究者能通过它诱导 RNAi 抑制众多不同基因表达。目前, 研究者利用 RNAi 文库已经发现了许多与生物功能相关的新基因和治疗疾病的新靶点。Buss 等在秀丽隐杆线虫中通过全基因组 RNAi 筛选的方式, 发现烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptor subunit ACR-7) 是抗精神病药物的靶点^[9]。

3.2 临床基础研究

RNAi 技术具有简单、快速、特异性沉默任意基因的特点, 使其被广泛用来研究肿瘤、肺动脉高压、先天性遗传病等疾病的治疗靶点, 并取得了一定成果。最近 Ku 等证实通过脂质体的方式向 T24 膀胱癌细胞中导入针对生存素 (survivin) 的 siRNA, 该 siRNA 能特异性地干扰膀胱癌细胞中生存素的表达, 同时加速了膀胱癌细胞的凋亡^[10]。Wedgwood 等运用 RNAi 技术研究发现过氧化氢酶在新生儿肺动脉高压中血管的重塑中起着重要作用, 有望成为该疾病治疗的靶点^[11]。Leachman 等对先天性厚甲遗传病患者通过皮下注射 siRNA 的方式针对突变的 K6a 角质蛋白进行沉默, 3 个月后成功对该蛋白进行沉默的同时发现患者皮肤起茧情况明显得到好转。此外, RNAi 治疗并没有给患者带来其他负面影响^[12], 这是 RNAi 在药物治疗方法上的重要进展。RNAi 技术还被应用于整形外科方面, 整形外科的开展主要以手术为主,

RNAi技术的应用为整形外科的开展注入了新的力量。众所周知,当人体皮肤深层受到创伤后,机体产生的炎症反应及应激反应会导致基质层许多生长因子异常增多,从而诱使皮肤深层基质细胞变性转化疤痕组织,产生疤痕,这是目前整形外科研究的热点和难点。Liu等将RNAi技术与胶原壳聚糖硅橡胶皮肤再生材料(collagen-chitosan/silicone membrane bilayer dermal equivalent)结合起来应用于背部皮肤严重缺损的猪的皮肤修复上,研究发现siRNA能明显抑制TGF- β 1生长因子的表达并同时抑制皮肤修复过程中疤痕的产生^[13]。在整形外科软骨移植中,经常会发现软骨外质细胞被大量降解,出现使细胞质中蛋白多糖与胶原水平失衡的现象,Wang等采用RNAi的手段通过抑制软骨细胞多聚蛋白聚糖酶1,2(aggreacanase)的表达,减少其对蛋白多糖的分解,维持软骨移植后软骨细胞外基质的平衡^[14]。

3.3 药物开发研究

RNAi技术还被应用于鉴定药物靶点和筛选药物方面。RNAi技术的应用明显地缩短了从筛选到鉴定药物靶基因功能的时间,有助于药物开发过程中对已知靶基因功能的高通量分析。在鉴定RNAi药物靶点上,Watanabe等研究发现通过siRNA干扰的方式在小鼠中沉默蛋白转移酶9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9,PC-SK9)能有效地减少血清中胆固醇水平,首次证明通过沉默PCSK9有望成为降低胆固醇的治疗靶点^[15]。在筛选药物上,Liu-Sullivan^[16]等通过pooled shRNA的方法发现维甲酸类药物能增强pk11激酶抑制剂药物GSK461364的抑制作用,进而阻止细胞有丝分裂,加速了癌细胞凋亡的速度。

4 影响RNAi效率的因素及RNAi应用中存在的问题

4.1 影响RNAi效率的因素

4.1.1 RNAi序列的设计

RNAi技术的关键是如何有效发挥siRNA的干扰作用。在RNAi的实际应用中经常发现合理设计的siRNA不能发挥有效的干扰作用,分析影响siRNA干扰效果的因素包括dsRNA双链末端的稳定性,siRNA与RISC的结合情况及干扰载体的转染效率。在对siRNA特异性研究中,发现siRNA最好设计在19~25个碱基之间,且siRNA的GC含量应在30%~52%之间。此外,在siRNA特定的位

置应设计特定的核苷酸,例如:siRNA的sense序列的5'端的第一个碱基最好是U,第3、10位碱基最好是A^[17],因为A在热力学上结合力更低,因此会降低siRNA双链的稳定性使RISC更好解开双链siRNA,同时增加siRNA的基因沉默效率。相反,若siRNA序列中存在反向重复序列会降低siRNA的沉默效果。

4.1.2 RNAi序列的稳定性

一般siRNA在血清的环境下,很容易被降解以致其难以在细胞中发挥其RNAi作用。因此对siRNA进行适当的化学修饰是必要的。

目前已经存在很多siRNA优化方法,研究发现siRNA经过tricyclo-DNA修饰后能明显提高siRNA在血清中的稳定性^[18]。除了上述修饰外,还有一种化学修饰称LNAs修饰(locked nucleic acids),它是一种核酸类似物,其能使RNA/DNA增加耐受核酸酶的能力,此外,这种修饰能降低siRNA对细胞的毒性。Petri等^[19]研究发现利用LNAs修饰后的siRNA更利于Ago2聚集和剪切,从而能明显提高siRNA的稳定性及减少siRNA的脱靶效应。

4.1.3 RNAi序列的导入方式

RNAi技术被广泛的应用,成功将RNAi分子导入目的细胞,是实现RNAi的先决条件。RNAi分子存在易降解和不稳定的特点,为了保证RNAi分子能有效地被运送到目的组织细胞,需要特定的导入方式。文献报道的导入方式有多种,比如浸泡、注射、脂质体包裹转染、纳米材料导入、噬菌体包装转染或通过物理的方式直接导入等,其中,很多研究者会选择采用病毒载体,利用病毒高感染率、高表达的特性开展RNAi实验研究。但是它同时也存在着一些风险,比如病毒会诱发细胞中基因产生突变或会引起细胞中各种炎症反应等。

针对于病毒载体给细胞带来的各种影响,非病毒性的导入方式越来越受到研究者的青睐。目前,有一种著名的tkRNAi运输shRNA小分子的技术,这种技术主要是用非治病性的大肠杆菌内含产生特定shRNA的质粒DNA,并将其运送到细胞中以产生RNAi的效果。Kruhn等运用该技术将针对ABC1的shRNA导入到人胃癌细胞中,shRNA能有效干扰ABC1蛋白的表达,调节了癌细胞中由ABC1蛋白介导的多药抗性的表型^[20]。

4.2 RNAi技术应用中存在的问题

4.2.1 免疫反应

细胞中免疫系统对自身的核酸和外源核酸总

是有区别对待的,这种反应主要体现在细胞水平上和分子水平上,其主要的机理是:外源的 RNA 或 DNA 会刺激细胞中 IFN(type I interferon)因子和细胞炎症因子的产生。在 RNAi 过程中,依赖 dsRNA 的激酶(dsRNA dependent protein kinase, PKR)能激活 2'-5'寡腺苷酸合成酶(2'-5'oligo adenylate synthetase, OAS),OAS 会刺激 ATP 形成 2'-5'寡腺苷核糖核苷酸,进一步激活细胞中核糖核酸酶(RNaseL)形成,进而降解细胞中的 RNA,包括 RNAi 小分子,降低 RNAi 的沉默效率^[21]。适当的化学修饰能改善 siRNA 引起的细胞免疫反应,如将 siRNA 用 2'-O-Me, 2'-O-F 加以修饰足以改善 siRNA 的免疫刺激活性并能更好地优化 siRNA 的沉默效果^[22]。

4.2.2 脱靶效应

众所周知,Ago-RISC 对靶 mRNA 的剪切是具有高度特异性的,可是在 siRNA 的应用过程中也会出现许多脱靶效应从而诱发细胞毒性。siRNA 的脱靶效应主要与其序列中靠近 5'端的 2~8 个碱基密切相关,因为它们与 mRNA 的 3'UTR 互补并与 RISC 结合紧密。为了减少 siRNA 的脱靶效应,提高 siRNA 的特异性主要通过以下方式:1)降低 siRNA 中 5'端的热力学稳定性;2)在选择靶 mRNA 位置时要避免靠近 mRNA 的起始编码区;3)通过使用 siRNA pools 的方法,在既能保持 siRNA 的沉默效率下,又能减低 siRNA 的脱靶效应^[23];4)文献报道,在 siRNA 的第 7 位加入一个不稳定的 unlocked nucleic acid (UNA) 修饰能减少 siRNA 的脱靶效应^[24]。

4.2.3 饱和现象

在正常细胞中,小 RNAi 分子与其靶基因之间始终保持着一种平衡的状态,这使细胞一直保持着正常的生理功能。大量外源的 siRNA/shRNA 被导入到细胞内,使细胞中正常 RNAi 水平达到一种不平衡的状态。大量外源的 siRNA/shRNA 进入细胞会与内源的 miRNA 竞争某些蛋白因子,如 Dicer、Ago 蛋白等,以致细胞内的 miRNA 不能行使正常的功能。在细胞中,即使使用弱启动子表达了大量 shRNA 也会诱发生物体内细胞毒性。为了避免上述问题的产生,Grimm 等将 Ago2、Exp5、U6-shRNA 共同导入到小鼠内,结果发现 shRNA 的干扰效果明显增强,同时检测小鼠肝脏毒性明显降低^[25]。为了避免内源 miRNA 与外源的 shRNA 竞争 Dicer 因子,Liu 等最近研究出一种 Ago2shRNA,

该 shRNA 可以不通过 Dicer 而直接利用 Ago2 行使剪切功能,这种设计有望能在进一步提高 RNAi 的同时避免引起 RNA 干扰效果的脱靶效应^[26]。

5 展望

RNA 干扰技术是一个生物学研究的亮点,它给许多疾病的治疗与药物的开发提供了新的思路,其中 RNAi 药物具有药效测试周期短,在理论上适合于任何基因治疗的特点,其中比如 anti-sense RNAi 药物,它的特异性非常强,有可能在 RNAi 药物开发中引来新的一场革命。目前,许多 RNAi 药物迅速地进入了临床研究阶段。虽然还存在一些问题,如出现脱靶效应、免疫反应等问题,但我们始终相信这些问题最终会被解决,使 RNAi 技术能更好地被广泛地应用在基础研究、临床研究及 RNAi 药物研发之中。

参考文献(References):

- [1] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [2] SIOMI H, SIOMI M C. On the road to reading the RNA-interference code[J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 396-404.
- [3] JUUVUNA P K, KHANDELIA P, LEE L M, *et al.* Argonaute identity defines the length of mature mammalian microRNAs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(14): 6808-6820.
- [4] WEI N, ZHANG L, HUANG H, *et al.* siRNA has greatly elevated mismatch tolerance at 3'-UTR sites[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49309.
- [5] GHILDIYAL M, ZAMORE P D. Small silencing RNAs: an expanding universe[J]. *Nature Reviews Genetic*, 2009, 10(2): 94-108.
- [6] WINTER J, DIEDERICH S. Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization[J]. *RNA Biology*, 2011, 8(6): 1149-1157.
- [7] MODZELEWSKI A J, HOLMES R J, HILZ S, *et al.* AGO4 regulates entry into meiosis and influences silencing of sex chromosomes in the male mouse germline[J]. *Developmental Cell*, 2012, 23(2): 251-264.
- [8] KIM M H, YUAN X, OKUMURA S, *et al.* Successful inactivation of endogenous Oct-3/4 and c-mos genes in mouse preimplantation embryos and oocytes using short interfering RNAs[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 296(5): 1372-1377.
- [9] SAUR T, DEMARCO S E, ORTIZ A, *et al.* A genome-wide RNAi screen in *Caenorhabditis elegans* identifies the nicotinic acetylcholine receptor subunit ACR-7 as an antipsychotic drug target[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(2): e1003313.
- [10] KU J H, SEO S Y, KWAK C, *et al.* Cytotoxicity and apoptosis by survivin small interfering RNA in bladder cancer cells[J]. *BJU International*, 2010, 106(11): 1812-1816.
- [11] WEDGWOOD S, LAKSHMINRUSIMHA S, CZECH L, *et al.* Increased p22(phox)/Nox4 expression is involved in remodeling through hydrogen peroxide signaling in experimental persistent pulmonary hypertension of the newborn[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 18(14): 1765-1776.

(下转第 274 页)

- [25] EDWARDS A, ANESIO A M, RASSNER S M, *et al.* Possible interactions between bacterial diversity, microbial activity and supraglacial hydrology of cryoconite holes in Svalbard[J]. International Society for Microbial Ecology Journal, 2011, 5 (1): 150–160.
- [26] ANESIO A M, MINDL B, LAYBOURN-PARRY J, *et al.* Viral dynamics in cryoconite holes on a high Arctic glacier (Svalbard)[J]. Journal of Geophysical Research, 2007, 112(G04S31):10.
- [27] SHELLEY M, SEAN F. The formation and hydrological significance of cryoconite holes[J]. Progress in Physical Geography, 2008, 32(6): 595–610.
- [28] FOUNTAIN A G, TRANTER M, NYLEN T H, *et al.* Evolution of cryoconite holes and their contribution to meltwater runoff from glaciers in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica[J]. Journal of Glaciology, 2004, 50(168): 35–45.
- [29] PORAZINSKA D L, FOUNTAIN A G, NYLEN T H, *et al.* The biodiversity and biogeochemistry of cryoconite holes from McMurdo Dry Valley glaciers, Antarctica[J]. Arctic Antarctic and Alpine Research, 2004, 36(1): 84–91.
- [30] SAWATROM C, MUMFORD P, MARSHALL W, *et al.* The microbial communities and primary productivity of cryoconites holes in an Arctic glacier (Svalbard 79 degrees N)[J]. Polar Biology, 2002, 25(8): 591–596.
- [31] SAWATROM C, GRANIELI W, LAYBOURN-PARRY J, *et al.* High viral infection rates in Antarctic and Arctic bacterioplankton[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(1): 250–255.
- [32] HODSON A J, ANESIO A M, TRANTER M, *et al.* Glacial ecosystems[J]. Ecological Monographs, 2008, 78(1): 41–67.
- [33] BAGSHAW E A, TRANTER M, FOUNTAIN A G, *et al.* Biogeochemical evolution of cryoconite holes on Canada Glacier, Taylor Valley, Antarctica[J]. Journal of Geophysical Research, 2007, 112(G04S35): 8.
- [34] ANESIO A M, HODSON A J, FRITZ A, *et al.* High microbial activity on glaciers: importance to the global carbon cycle[J]. Global Change Biology, 2009, 15(4):955–960.
- [35] SMITH L C, MACDONALD G M, VELICHKO A A, *et al.* Siberian peatlands a net carbon sink and global methane source since the early Holocene[J]. Science, 2004, 303(5656): 353–356.
- [36] 王德宣, 丁维新, 王毅勇. 若尔盖高原与三江平原沼泽湿地 CH₄ 排放差异的主要环境影响因素[J]. 湿地科学(WANG De-xuan, DING Wei-xin, WANG Yi-yong. Influence of major environmental factors on difference of methane emission from Zoige plateau and Sanjiang plain wetlands[J]. Wetland Science), 2003, 1(1): 63–67.
- [37] HIROTA M, TANG Y H, Hu Q W, *et al.* Carbon dioxide dynamics and controls in a deep-water wetland on the Qinghai-Tibetan plateau[J]. Ecosystems, 2006, 9(4): 673–688.
- [38] SHURPALI N J, VERMA S B, KIM J, *et al.* Carbon dioxide exchange in a peatland ecosystem[J]. Journal of Geophysical Research, 1995, 100(7): 14319–14326.
- [39] 焦念志. 海洋固碳与储碳——并论微生物在其中的重要作用[J]. 中国科学:地球科学(JIAO Nian-zhi. Carbon fixation and sequestration in the ocean, with special reference to the microbial carbon pump (in Chinese)[J]. Scientia Sinica Terrae), 2012, 42(10): 1473–1486.
- [40] 焦念志, 张传伦, 李超, 等. 海洋微生物碳泵储碳机制及气候效应[J]. 中国科学:地球科学(JIAO Nian-zhi, ZHANG Chuan-lun, LI Chao, *et al.* Controlling mechanisms and climate effects of microbial carbon pump in the ocean (in Chinese)[J]. Scientia Sinica Terrae), 2013, 43(1): 1–18.

(上接第 268 页)

- [12] LEACHMAN S A, HICKERSON R P, SCHWARTZ M E, *et al.* First-in-human mutation-targeted siRNA phase Ib trial of an inherited skin disorder[J]. Molecular Therapy, 2010, 18(2): 442–446.
- [13] LIU X, MA L, LIANG J, *et al.* RNAi functionalized collagen-chitosan/silicone membrane bilayer dermal equivalent for full-thickness skin regeneration with inhibited scarring[J]. Biomaterials, 2013, 34(8): 2038–2048.
- [14] WANG Z H, YANG Z Q, HE X J, *et al.* Lentivirus-mediated knockdown of aggrecanase-1 and -2 promotes chondrocyte-engineered cartilage formation *in vitro*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 107(4): 730–736.
- [15] DUFF C J, HOOPER N M. PCSK9: an emerging target for treatment of hypercholesterolemia[J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2011, 15(2): 157–168.
- [16] LIU-SULLIVAN N, ZHANG J, BAKLEH A, *et al.* Pooled shRNA screen for sensitizers to inhibition of the mitotic regulator polo-like kinase(PLK1)[J]. Oncotarget, 2011, 2(12): 1254–1264.
- [17] DYXHOOM D M, LIEBERMAN J. Running interference: prospects and obstacles to using small interfering RNAs as small molecule drugs[J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2006, 8: 377–402.
- [18] ITTIG D, LUISIER S, WEILER J, *et al.* Improving gene silencing of siRNAs via tricyclo-DNA modification[J]. Artificial DNA, PNA & XNA, 2010, 1(1): 9–16.
- [19] PETRI S, DUECK A, LEHMANN G, *et al.* Increased siRNA duplex stability correlates with reduced off-target and elevated on-target effects[J]. RNA, 2011, 17(4): 737–749.
- [20] KRuhn A, WANG A, FRUEHAUF J H, *et al.* Delivery of short hairpin RNAs by transkingdom RNA interference modulates the classical ABCB1-mediated multidrug-resistant phenotype of cancer cells[J]. Cell Cycle, 2009, 8(20): 3349–3354.
- [21] SIOUD M. Recent advances in small interfering RNA sensing by the immune system[J]. New Biotechnology, 2010, 27(3): 236–242.
- [22] ROBBINS M, JUDGE A, MACLACHLAN I. siRNA and innate immunity[J]. Oligonucleotides, 2009, 19(2): 89–102.
- [23] BRAMSEN J B, KJEMS J. Chemical modification of small interfering RNA[J]. Methods in Molecular Biology, 2011, 721: 77–103.
- [24] BRAMSEN J B, PAKULA M M, HANSEN T B, *et al.* A screen of chemical modifications identifies position-specific modification by UNA to most potently reduce siRNA off-target effects[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(17): 5761–5773.
- [25] GRIMM D, WANG L, LEE J S, *et al.* Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2010, 120(9): 3106–3119.
- [26] LIU Y P, SCHOPMAN N C, BERKHOUT B. Dicer-independent processing of short hairpin RNAs[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(6): 3723–3733.