

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2005)11-0961-04

瞬时转染和稳定转染对 RNAi 抑制乙型肝炎病毒 S 基因表达的影响

刘家云¹ 李庆霞² 黄红艳² 马龙洋² 鲍 炜¹ 贾林涛² 薛采芳³ 刘 军³ 王成济² 杨安钢^{1,2}(第四军医大学基础部:¹免疫学教研室,²生物化学与分子生物学教研室,³病原生物学教研室 陕西 西安 710033)

Effect of transient and stable transfection on inhibition of hepatitis B virus S gene expression by RNA interference

LIU Jia-Yun¹, LI Qing-Xia², HUANG Hong-Yan², MA Long-Yang², BAO Wei¹, JIA Lin-Tao², XUE Cai-Fang³, LIU Jun³, WANG Cheng-Ji², YANG An-Gang^{1,2}¹Department of Immunology, ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, ³Department of Etiology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To construct pSUPER vectors expressing short interfering RNAs (siRNA) targeting hepatitis B virus (HBV) S gene sequence and to evaluate the effect of transient and stable transfection on the inhibition of hepatitis B virus gene expression in 2.2.15 cells by RNA interference. **METHODS:** Based on the sequence of HBV in 2.2.15 cells, two sequences targeting HBV S gene were designed and cloned into siRNAs expression vector pSUPER. The constructed plasmids were transiently and stably transfected into 2.2.15 cells respectively. The HBsAg and HBeAg in the supernatant of the transfected cells were assayed with Abbott MEIA Kits and HBV mRNA was measured by RT-PCR. The effect of transient and stable transfection on the inhibition of hepatitis B virus gene expression by RNA interference was also compared. **RESULTS:** In single cell strains stably transfected with recombinant pSUPER plasmids and screened in Hygromycin media, the pSUPER-S1 and pSUPER-S2 siRNA expression vectors could effectively inhibit the secretion of HBV surface and e antigen by 83% and 78% respectively ($P < 0.01$), and RT-PCR results showed that the HBV mRNA decreased. However, the results at protein level and mRNA level in transiently transfected cells were not as good as those in stably transfected cells. **CONCLUSION:** siRNAs targeting HBV S gene sequence

can specifically inhibit HBV gene expression with great potency *in vitro*. The transfection efficiency has obvious effect on RNA interfering target gene.

【Keywords】 hepatitis B virus; RNA interference; transfection

【摘要】目的 构建针对乙型肝炎病毒(HBV) S基因的 siRNA 表达载体 pSUPER-S1 和 pSUPER-S2, 观察瞬时转染及稳定转染对 RNAi 抑制 HBV 基因表达作用的影响。方法 设计并合成针对 HBV S 基因的 siRNA 寡核苷酸, 经退火形成双链后克隆入 pSUPER 载体, 构建成功的 siRNA 表达载体分别瞬时转染和稳定转染表达 HBV 的 2.2.15 细胞, 对所得细胞上清中的 HBsAg 和 HBeAg 进行定量检测, RT-PCR 检测 siRNA 对靶基因 mRNA 的抑制效果, 并比较两种转染方式对 RNAi 抑制 HBV 基因表达作用的影响。结果 在稳定转染并经潮霉素筛选所得的单克隆细胞株中, pSUPER-S1 和 pSUPER-S2 均能明显抑制 HBsAg 及 HBeAg 的分泌($P < 0.01$), 抑制率分别为 83% 和 78%。RT-PCR 结果证实 HBV 的 mRNA 明显降低, 而瞬时转染细胞在蛋白质水平上及 mRNA 水平上的结果则比稳定转染的结果逊色。结论 针对 HBV S 基因的 siRNA 能稳定、高效、特异地抑制 HBV 基因的表达, 转染效率对于靶基因的 RNA 干扰作用有明显的影 响。

【关键词】 乙型肝炎病毒; RNA 干扰; 转染

【中图分类号】 R373.21 **【文献标识码】** A

0 引言

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是双链 RNA (double-strand RNA, dsRNA)介导的、序列特异的转录后基因沉默(posttranscriptional gene silencing, PTGS)现象, 广泛存在于线虫、果蝇、植物、真菌及哺乳动物等多种生物体中, 具有高效性和特异性^[1]。目前, RNAi 已发展成为一种高效的实验技术, 广泛用于新基因筛选、基因功能鉴定以及基因治疗等方面, 显示了非常广阔的应用前景^[2]。而由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)持续感染所引起的病毒性肝炎、肝硬化和肝癌等严重危害人民生命健康的疾病, 多年来一直没有令人满意的抗病毒治疗手段^[3]。为探索 RNAi 对 HBV 复制的抑制作用, 我们选择 HBV 表面抗原编码区(S 区)基因为靶序列, 用含 H1 启动子的转录载体 pSUPER 构建了能产生发夹结构小干

收稿日期 2004-12-23; 修回日期 2005-03-11

基金项目 国家重点基础研究发展规划 973 "基金(2004CB518804)、国家高技术研究发展计划" 863 "基金(2001AA217101)"

通讯作者 杨安钢。Tel. (029) 83374528 Email. agyang@fmmu.edu.cn

作者简介 刘家云(1971-)男(汉族), 云南省宜良县人, 博士生(导师 杨安钢)。Tel. (029) 83374531 Email. jiajun@fmmu.edu.cn

涉 RNA(short interfering RNA , siRNA)的质粒 ,采用稳定转染和瞬时转染表达 HBV 的 2.2.15 细胞 ,定量检测细胞上清中的 HBsAg 和 HBeAg ,RT-PCR 检测靶基因 mRNA 抑制效果 ,并对所得到的结果进行比较。

1 材料和方法

1.1 材料 含 H1 启动子的 siRNA 表达载体 pSUPER 和潮霉素抗性质粒 pTK-Hyg 均为第四军医大学免疫学教研室保存。用于扩增 HBV S 基因序列的上游引物 :5'-CAACTTGTCTCTGTTATCGC-3' ,下游序列 5'-AAGCCCTACGAACCACTGAA-3' ;用于扩增内参照 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase ,GAPDH)基因的上游引物序列 5'-CAACGGATTGCTCGTATTGGG-3' ,下游引物序列 5'-CCTGGAAGATGCTGATGGGATT-3' ,上述引物均由北京三博远志生物技术有限公司合成。稳定表达 HBV 的 2.2.15 细胞系由第四军医大学病原生物学教研室提供 ,培养条件为含 100 mL/L 胎牛血清(Invitrogen 公司)和 G418 浓度为 400 mg/L 的 DMEM 培养基 ,37℃ ,50 mL/L CO₂ 培养。T4 DNA 连接酶、T4 多聚核苷酸激酶(PNK)和各种限制性内切酶均为大连宝生物公司产品。胎牛血清、DMEM 培养基和脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 购于美国 Invitrogen 公司 ,G418 为 Sigma 产品 ,潮霉素购于 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 HBV S 基因 siRNA 表达载体的构建 ① HBV S 基因干涉位点的选择与寡核苷酸的设计合成 根据 siRNA 的设计原则^[4] ,从 HBV S 基因编码区中寻找符合设计特征的靶序列 ,经 BLAST 软件进行同源分析证实为 HBV 保守序列后 ,选择 HBV 编码区 413 ~ 431 ,671 ~ 689 核苷酸序列为 S 基因干涉位点 ,按照 pSUPER 载体的要求设计 2 对 4 条能编码 siRNA 的寡核苷酸链。HBV-S1 序列为 5'-GATCCCCTCCTGCTGCTATGCCTCATTTC AAGAGAATGAGGCATAGCAGCAGGATTTTTGGAAA-3' (正义链) 5'-AGCTTTCCAAAAATCCTGCTGCTATGCCTCATTCTTGAATGAGGCATAGCAGCAGGAGGG-3' (反义链) ;HBV-S2 序列为 5'-GATCCCCGGCTCAGTTTACTAGTGCCTTCAAGAGAGGCACTAGTAAACTGAGCCTTTTTGGAAA-3' (正义链) 5'-AGCTTTTCCAAAAAGGCTCAGTTTACTAGTGCCTCTCTTGAAGGCACTAGTAAACTGAGCCGGG-3' (反义链) 。寡核苷酸序列两端包含 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切位点 ,能直接与经相同酶切的 pSUPER 载体连接。此外还设计了与 HBV 序列无关的增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的 siRNA 表达载体 pSUPER-

EGFP 作为对照。其正义链序列 5'-GATCCCCGGACGACGCAACTACAAGTTCAAGAGACTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTTTTGGAAA-3' ,反义链序列 5'-AGCTTTCCAAAAAGGACGACGCAACTACAAGTCTCTTGA-CTTGTAGTTGCCGTCGTCGGG-3'。上述单链寡核苷酸由北京赛百盛公司合成。②含 HBV S 基因序列的双链核苷酸的获得 将合成的单链寡核苷酸溶解于 H₂O 中 ,调整其浓度为 3 g/L。各取 1 μL 相应的寡核苷酸合成片段 ,加入 48 μL 退火缓冲液 ,95℃ 保温 5 min ,70℃ 孵育 10 min ,缓慢冷却至 4℃ 得到退火双链 DNA ,取 2 μL 退火的寡核苷酸 ,加 1 μL T4 PNK 缓冲液、1 μL 1 mmol/L ATP ,1 μL T4 PNK ,5 μL H₂O ,在 37℃ 水浴进行 30 min 磷酸化 ,70℃ 孵育 10 min 灭活 PNK。③寡核苷酸与 pSUPER 的连接以及阳性克隆的鉴定 取退火并磷酸化的寡核苷酸 2 μL ,经 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切的 pSUPER 载体 1 μL ,1 μL T4 DNA 连接酶缓冲液 ,4 μL H₂O 在 1 μL T4 DNA 连接酶的作用下于室温连接 1 h。连接产物转化 DH5α 感受态细胞并提取质粒 ,*Eco*R I 和 *Hind* III 酶切鉴定 ,阳性克隆切出大约 300 bp 的条带 ,而空质粒的大小为 240 bp ,筛选出含 HBV 基因的阳性克隆 ,并进行 DNA 测序加以确定。采用相同方法进行 EGFP siRNA 表达载体 pSUPER-EGFP 的构建与鉴定。

1.2.2 细胞转染及单克隆细胞株的筛选 2.2.15 细胞生长于含 100 mL/L 胎牛血清、G418 浓度为 400 mg/L 的 DMEM 培养基中 ,转染前 24 h 接种 5 × 10⁵ 细胞于 6 孔板 ,瞬时转染时 ,取 5 μg 的质粒 pSUPER-S1 ,pSUPER-S2 ,pSUPER 或 pSUPER-EGFP 按 Lipofectamine2000 操作说明转染 2.2.15 细胞 ,每种质粒 3 复孔 ,调整每孔中的液体量为 900 μL ,转染 6 h 后加入 100 μL 胎牛血清于 37℃ ,50 mL/L CO₂ 条件下培养 72 h ,检测培养上清中的 HBsAg 和 HBeAg。稳定转染时上述 3 种质粒与 pTK-Hyg 均按照 10:1 共转染 2.2.15 细胞 ,转染 24 h 后消化细胞 ,按照 1:10 的比例接种于 6 孔板 ,用含 100 mL/L 胎牛血清、G418 为 400 mg/L 及潮霉素 200 mg/L 的 DMEM 培养基加压筛选 3 wk 后出现潮霉素抗性的单克隆细胞 ,挑取单克隆细胞并经约 2 mo 的扩大培养而获得能稳定表达 siRNA 的 2.2.15 单克隆细胞株接种 3 × 10⁵ 于 6 孔板 ,共 3 个复孔 ,加 1.0 mL 含 G418 和潮霉素的 DMEM 培养基置 CO₂ 孵箱中培养 72 h。收集细胞培养上清用于 HBsAg 和 HBeAg 的检测。

1.2.3 上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的检测 用 Abbott 的 AXSYM 自动免疫分析仪及其配套的微粒子酶免疫分析法(MEIA)诊断试剂对细胞培养 72 h 的上

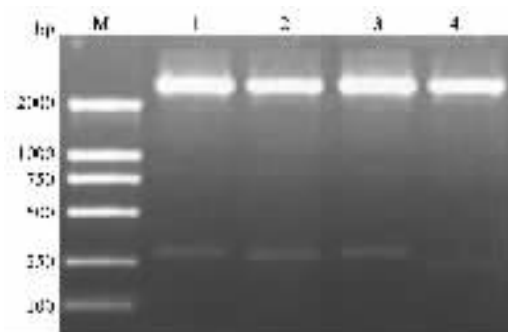
清液中 HBsAg 及 HBeAg 含量进行检测,计算抑制率,并对瞬时转染和稳定转染所得结果进行分析。

1.2.4 siRNA 对 2.2.15 细胞中 HBV mRNA 的降解作用 按 Trizol(Invitrogen)试剂盒操作说明提取转染所得细胞的总 RNA,紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,取 1 μ g 总 RNA 按照 ImProm-IITM Reverse Transcription System(Promega)进行 cDNA 第一链的合成:每个反应管加 1 μ g 总 RNA, Oligo(dT)₁₅ 1 μ L,用 DEPC 水补足总体积 5 μ L 后,70 $^{\circ}$ C 5 min,冰上骤冷后加入 5 \times buffer 4 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, RNA 酶抑制剂 0.5 μ L, 逆转录酶 1 μ L,调整至总体积为 20 μ L, 42 $^{\circ}$ C 保温 1 h, 70 $^{\circ}$ C 灭活 15 min,冰上骤冷后进行 PCR。PCR 扩增反应总体积为 50 μ L,其中 10 \times buffer 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, Tag 酶 1 μ L, 模板 cDNA 2 μ L,用于扩增 HBV 或 GAPDH 引物各 1 μ L,余下体积用无菌双蒸水补足。在 PE2400 型 DNA 扩增仪上进行 PCR 反应的参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min,共 25 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增结束后取 PCR 产物 5 μ L 在 15 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,观察并记录结果。

统计学处理:上清液中 HBsAg 和 HBeAg 检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析及 Dunnett-*t* 检验,用 SPSS 10.0 软件完成。

2 结果

2.1 siRNA 表达载体的鉴定 构建的重组 pSUPER 载体经 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,观察到重组质粒的双酶切片段在 300 bp 左右,明显高于对照 pSUPER 载体经相同酶切产生的 240 bp 片段(Fig 1)结果与预期相符,表明寡核苷酸已插入重组质粒中。进一步用 DNA 测序技术证实重组质粒序列与所设计序



M: DL2000 marker; 1: pSUPER-S1; 2: pSUPER-S2; 3: pSUPER-EGFP; 4: pSUPER.

Fig 1 Identification of siRNA expression vector with *Eco*R I and *Hind* III digestion

图 1 siRNA 表达载体的双酶切鉴定结果

列完全一致,表明针对 HBV S 基因的 siRNA 表达载体已成功构建。

2.2 转染方式对 siRNA 抑制细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 作用的影响 稳定转染细胞培养上清的 HBsAg 和 HBeAg 定量测定结果显示 HBsAg 和 HBeAg 均受到明显抑制,其中 pSUPER-S1 对细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率分别为 83% 和 78% ($P < 0.01$ vs pSUPER), pSUPER-S2 的抑制率为 60% 和 54% ($P < 0.01$ vs pSUPER)。相比之下,瞬时转染组结果除 pSUPER-S1 对细胞分泌 HBsAg 有 38% 的抑制率,其余的瞬时转染结果与相应的对照相比均无显著差异 ($P > 0.05$, Tab 1)。

表 1 转染方式对 siRNA 抑制 2.2.15 细胞分泌 HbsAg 和 HBeAg 作用的影响

Tab 1 Effect of transfection modes on HBsAg and HBeAg secretion in culture supernate ($n=3, \bar{x} \pm s$)

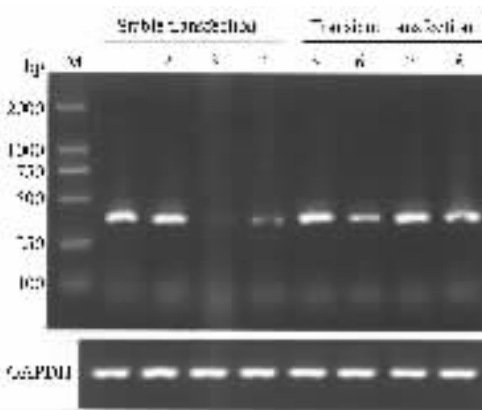
Group	HBsAg (S/N)		HBeAg (S/CO)	
	Stable	Transient	Stable	Transient
pSUPER	79.0 \pm 2.5	129.9 \pm 3.1	169.9 \pm 3.9	173.2 \pm 4.2
pSUPER-EGFP	77.6 \pm 3.2	127.6 \pm 3.6	171.3 \pm 4.5	175.3 \pm 5.0
pSUPER-S1	13.4 \pm 1.6 ^b	79.4 \pm 2.6 ^b	38.0 \pm 3.1 ^b	154.4 \pm 4.6
pSUPER-S2	31.4 \pm 2.1 ^b	126.4 \pm 3.4	78.4 \pm 3.2 ^b	172.1 \pm 5.3

^b $P < 0.01$ vs pSUPER.

2.3 转染方式对 siRNA 降解 2.2.15 细胞中 HBV mRNA 作用的影响 HBV mRNA 经 RT-PCR 扩增产生 358 bp 片段,内参照 GAPDH mRNA 经 RT-PCR 扩增产生 210 bp 片段,结果与预期片段大小相符。RT-PCR 结果显示,稳定转染 pSUPER-S 所得细胞的 HBV mRNA 表达明显降低,转染 pSUPER-EGFP, pSUPER 细胞的 HBV mRNA 表达产物与 2.2.15 细胞相比无明显变化,表明 siRNA 对 2.2.15 细胞中 HBV mRNA 的降解作用是高效、特异的。而瞬时转染细胞的 HBV mRNA 降低不明显(Fig 2)。

3 讨论

RNAi 作为一种高效特异、简便易行的实验技术,在肿瘤、病毒感染等的治疗方面已取得积极进展^[5],在抗 HBV 治疗方面则具有明显优势^[6]。RNAi 能特异性地降解 HBV mRNA 从而阻断病毒复制,对已整合入宿主细胞基因组的前病毒及无复制活性的病毒, RNAi 也可以起到有效的抑制作用,这是通常抗病毒药物无法比拟的。其次, RNAi 可以针对病毒基因保守区发挥作用,从而限制病毒产生逃避突变株的能力。实验中所用的 2.2.15 细胞是由头尾相接的 *ayw*



M : DL2000 marker 1 : pSUPER 2 : pSUPER-EGFP 3 : pSUPER-S1 4 : pSUPER-S2

Fig 2 Effect of transfection modes on degradation of HBV S gene mRNA by siRNA

图2 转染方式对 siRNA 抑制 HBV mRNA 作用的影响

型 HBV 双拷贝基因组转染 HepG2 细胞而建立的一株能稳定表达 HBV 各种抗原并分泌完整病毒颗粒的细胞系, 它的抗原表达量水平较高而且较为恒定, 此外 2.2.15 细胞模拟了 HBV 感染, 其基因组已整合到宿主细胞基因组中的状态, 选择它作为靶细胞进行 RNAi 抗病毒研究更接近于疾病的治疗过程^[7]。

尽管 RNAi 在诸多实验中有着出色的表现, 但在实际应用中往往面临转染效率不高的问题。为提高转染效率, An 等^[8]采用病毒作为载体将编码 siRNA 的载体运送到细胞中, 后者在细胞内转录生产 siRNA, 从而实现对靶基因的沉默。但由于病毒载体潜在的危害, 这种方法比直接注射 siRNA 具有更大的风险, 因此开发具有高转染效率、高基因容量和较低毒性的新型载体是 RNAi 技术应用于基因治疗所面临的一大难题^[9]。在本实验中我们选用 pSUPER 载体在细胞内转录生成 siRNA, 虽然构建载体相对费时、繁琐, 但结合抗性筛选后的这一方法不仅克服了瞬时因转染效率不同所带来的基因表达差异, 实现了对 HBV 的高效抑制, 而且能维持较长时间的基因沉默, 是目前唯一可以用来进行长期研究的方法。研究中我们用成功构建的针对 HBV S 基因的 siRNA 表达载体 pSUPER-S1 和 pSUPER-S2, 在蛋白质水平上

siRNA 对所得稳定转染细胞上清中的 HBsAg 和 HBeAg 抑制率分别为 83% 和 78%, 显著优于瞬时转染细胞的结果, 在 mRNA 水平 siRNA 对稳定转染细胞 HBV 基因的抑制作用也比它在瞬时转染细胞中的作用强, 相比之下无关序列的 siRNA 及对照则无此作用, 导致瞬时转染的干涉效果不佳可能的原因是细胞转染效率不高。上述结果不但表明针对 HBV S 基因的 siRNA 能稳定、高效、特异地抑制 HBV 基因的表达, 而且提示转染效率的高低对于 RNAi 实验的成功至关重要, 只有将 siRNA 高效地转染哺乳动物细胞, 才能真实地反映 siRNA 对基因表达的干涉效果。

【参考文献】

- [1] Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution [J]. *Nature*, 2004; 430(6996):161-164.
- [2] 刘家云, 贾林涛, 王成济, 等. RNAi-dsRNA 介导的基因沉默 [J]. *国外医学·遗传学分册* 2004; 27(1):4-10. Liu JY, Jia LT, Wang CJ, et al. RNAi-gene silencing mediated by dsRNAs [J]. *Section Genet Foreign Med Sci*, 2004; 27(1):4-10.
- [3] Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures [J]. *J Viral Hepat*, 2004; 11(2):97-107.
- [4] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. *Science*, 2002; 296(5567):550-553.
- [5] Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004; 3(4):318-329.
- [6] Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference [J]. *Hepatology*, 2003; 37(4):764-770.
- [7] Konishi M, Wu CH, Wu GY. Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV-producing cell line [J]. *Hepatology*, 2003; 38(4):842-850.
- [8] An DS, Xie Y, Mao SH, et al. Efficient lentiviral vectors for short hairpin RNA delivery into human cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2003; 14(12):1207-1212.
- [9] Stevenson M. Therapeutic potential of RNA interference [J]. *N Engl J Med*, 2004; 351(17):1772-1777.

编辑 杨湘华