

· 研究原著 ·

文章编号:1000-2790(2005)12-1093-04

针对 HBVS 区的 siRNA 的抗病毒活性

张岩,白雪帆,张颖,黄长彤,李羽,李光玉,王平忠,洪沙,陈伟红,任广立

(第四军医大学唐都医院全军感染病中心,陕西西安710038)

Anti-HBV effect of siRNA expression plasmid targeting the S antigen of HBV

ZHANG Yan, BAI Xue-Fan, ZHANG Ying, HUANG Chang-Xing, LI Yu, LI Guang-Yu, WANG Ping-Zhong, HONG Sa, CHEN Wei-Hong, REN Guang-Li

Center of Infectious Diseases of Chinese PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

【Abstract】 AIM: To identify the siRNA interference ability for the replication of HBV. **METHODS:** Based on the sequence of HBV in GenBank, siRNA targeting the S-RNA of HBV were synthesized and cloned into pSilencer ZY1, pSilencer ZY2, pSilencer ZY3 and pSilencer HK. Transfected into HepG2 2.2.15 cells with the new recombinant vectors was carried out by Metafectene. The expression of HBsAg and HBeAg was assayed by MEIA and HBV S-mRNA was detected by RT-PCR. **RESULTS:** The construction of the recombinant expression vectors was successfully conformed by the results of enzyme digestion, electrophoresis and gene sequencing. The three siRNAs could suppress HBV S-mRNA and the expression of HBsAg and HBeAg in the supernatant of HepG2 2.2.15 cells. The inhibitory rates of HBsAg were 81%, 29% and 78%, and that of HBeAg were 35%, 3% and 49% respectively. **CONCLUSION:** The three siRNA mentioned above targeting the S-mRNA of HBV could effectively inhibit HBV replication.

【Keywords】 hepatitis B virus; S antigen; RNA interference

【摘要】目的:体外观察 siRNA 对 HepG2 2.2.15 细胞中乙型肝炎病毒(HBV)S-mRNA 及 HBsAg、HBeAg 产生的影响。方法:设计并合成针对 HBV S 区的三条 siRNA,构建含上述 siRNA 的表达载体 pSilencer ZY1、pSilencer ZY2 和 pSilencer ZY3、pSilencer HK2 测序及酶切鉴定后用脂质体介导重组质粒转染 HepG2 2.2.15 细胞,用酶免分析法对 HepG2 2.2.15 细胞上清中 HBsAg、HBeAg 进行检测,用逆转录聚合酶链反应检测 HBV S-mRNA。结果:成功构建了针对 HBV S 区的 siRNA 的表达载体,三条 siRNA 均可程度不同地抑制 HepG2 2.2.15 细胞上清中 HBsAg、HBeAg 的分泌,72 h 抑制率达高峰,对 HBsAg 的抑制率分别为 81%、29% 及 78%,对 HBeAg

的抑制率分别为 35%、3% 及 49%,并有抑制 HBV S-mRNA 的作用。结论:针对 HBV S 区的 siRNA 能明显抑制 HBV 的复制。

【关键词】 肝炎病毒;乙型 S 抗原;RNA 干扰

【中图分类号】 R512.6+2 **【文献标识码】** A

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是引起病毒性肝炎的主要病原体之一。HBV 复制的过程中有一个前基因组 RNA 参与(介导)的逆转录过程。应用 RNA 干扰技术抑制前基因组 RNA 的转录,为慢性 HBV 感染的治疗开辟了新的途径。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指由双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)分子在 mRNA 水平关闭相应序列基因表达或使其沉默的过程。RNAi 是一种典型的转录后基因调控方法,又称转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。RNAi 具有高特异性和高效性^[1,2]。

1 材料和方法

1.1 材料 含 H1 启动子的转录载体 pSilencer3.1-H1 hygro 的质粒购于美国 Ambion 公司;HepG2 2.2.15 细胞由本科实验室保存;T4DNA 连接酶、T₄ 磷酸酶、内切酶 *Sal*I 和 *Mlu*I 及 λ EcoT14 I marker 是大连宝生物工程公司产品;逆转录试剂盒购自 Takara 公司;Trizol、反转录酶 SuperscriptTM II 购自美国 Invitrogen 公司;Metafectene 脂质体转染试剂为德国 Biontex 公司产品;宿主菌 DH5 α 为本科实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 HepG2 2.2.15 细胞的培养 用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基(含青霉素 100 u/mL,链霉素 100 u/mL)置 37 $^{\circ}$ C,体积分数为 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 靶位的选择和 siRNA 的设计 将在 GenBank 中查到序列号为 U95551 的 HBV S 基因作为靶序列,同时根据 siRNA 的设计原则,靶位 1 序列为(258 nt) GTGGTGGACTTCTCTCAAT,靶位 2 序列为(586 nt) GACGGAAATTGCACCTGTA,靶位 3(326 nt)序列为

收稿日期 2004-01-19; 修回日期 2005-03-28

作者简介:张岩(1965-),男(汉族),黑龙江省哈尔滨市人,主治医师,博士生(导师白雪帆)。Tel.(029)83377595 Email.zyhpohc@fmmu.edu.cn

CCTCCAATCACTCACCAAC. 随机序列为 GAGCTTCATAAGGGCATGC. 经 BLAST 分析, 以上序列没有发现与人相同的序列.

1.2.3 重组载体的构建

1.2.3.1 对引物的合成

ZY1 正链引物: 5'-GATCCGTGGTGGACTTCTCTCAATTC AAGACGATTGAGAGAAGT CCACCAC TTTTTT-3'
ZY1 负链引物: 3-GCACCCACCTGAAGAGAGTAAAGTTCTGCTAACTCTTTCAGGTGGTAAAAAATTCGA-5';

ZY2 正链引物: 5-GATCCGACGGAAATTGCACCTGTATCAAGACGTACAGGTGCAATTTCCGTC TTTTTT-3',

ZY2 负链引物: 3-GCTGCCTTTAAGGTGGACATAAGT-TCTGCATGCCACGTTAAAGGCAGAAAAA ATTCGA-5';

ZY3 正链引物: 5'-GATCCCCTCCAATCACTCACCAAC TTCAAGACGTTGGTGAGT GATTGGAGG TTTTTT-3',

ZY3 负链引物: 3-GGGAGTTAGTGAAGTTCTGCCAACCACTACTAACCTCCAAAATTCGA-5';

无关序列正链引物: 5'-GATCCGAGCTTCATAAG-GCGCATGCTTCAAGACGGCATGCGCCTTATGAAGCTC TTTTTT-3',

无关序列负链引物: 3'-G CTCGAAGTATTCCGCG-TACG AAGTTCTGC CGTACGCGGAATACTTCGAGAAAATTCGA-5';

以上引物均由武汉晶赛生物制品公司合成.

1.2.3.2 插入片段退火 取等摩尔(100 mmol/L)的 ZY1, ZY2, ZY3, HK 的正负链于退火缓冲液(100 mmol/L NaCl)中, 94℃ 4 min, 然后缓慢降至室温, 得到退火双链 DNA.

1.2.3.3 载体的构建 以限制性内切酶 *Bam*HI, *Hind*III 分别酶切线形化载体和双链 DNA, 纯化后片段与线形载体连接. 应用 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜. 连接产物转化感受态细菌 DH5 α 后铺于 Amp⁺ 的 LB 平板, 置 36℃ 孵箱培养过夜.

1.2.3.4 重组载体的鉴定 质粒 Psilencer3.1-H1-hygro 不含 *Mlu*I 的酶切位点, 但是在我们设计的插入目的基因序列 ZY1, ZY2, ZY3 中设计了一个 *Mlu*I 的酶切位点, 如果插入 Psilencer3.1-H1-hygro 载体成功, 就应该能够被 *Mlu*I 所酶切. 而我们设计的 HK 阴性对照无关序列中设计了一个 *Sal*I 的酶切位点, 但是在载体 pSilencer3.1-H1-hygro 的 2727 bp 的位置也有一个 *Sal*I 的酶切位点, 如果插入成功, 就应该被 *Sal*I 酶切出两条差不多大小的 DNA 片段, 一条 2170 bp, 另一条 2382 bp.

1.2.4 质粒转染 HepG2 2.2.15 细胞 转染前用含

2.5 g/L 胰蛋白酶和 0.2 g/L 的 EDTA 消化细胞, 细胞计数后, 在 24 孔板上接种, 于 37℃、体积分数为 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养, 待细胞融合度达到 50% ~ 70% 后进行转染, 转染前更换无血清培养基, 质粒与 Metafectene 脂质体按 1:3(质量/体积或 mg/L) 共转染, 室温放置 20 min 后加入每孔中, 在 37℃、体积分数为 50 mL/L CO₂ 培养箱中孵育 6 h 后换含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基(含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL) 置 37℃、体积分数为 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养, 设空质粒对照组、无关序列对照组、ZY1 pSilencer, ZY2 pSilencer 和 ZY3 pSilencer 5 组进行观察, 同时在 24, 48 和 72 h 收集培养上清液, 每组重复 3 次.

1.2.5 细胞上清中 HBsAg、HBeAg 的检测 用美国雅培公司 AXSYM 自动免疫分析仪及配套的微粒子酶免分析法(MEIA) 诊断试剂盒对细胞上清液进行 HBsAg, HBeAg 检测, HBsAg 结果用 S/N 值表示, HBeAg 结果用 S/CO 值表示, HBsAg S/N \geq 2.0, HBeAg S/CO \geq 1.0 为阳性. 同时计算抑制率.

1.2.6 HBV S-mRNA 的检测

1.2.6.1 RNA 抽提 收集转染 72 h 的细胞, Trizol 1 mL 裂解细胞, 加入 0.2 mL 的氯仿, 室温 3 min, 4℃ 12 000 g 离心 15 min, 取上清液, 加入 0.5 mL 的异丙醇, 室温 10 min, 4℃ 12 000 g 离心 10 min, 去清液, 加入 750 mL/L 的乙醇溶液 1 mL, 8000 g 离心 5 min, 去上清, 干燥后溶于 40 mL DEPC 处理过的水中.

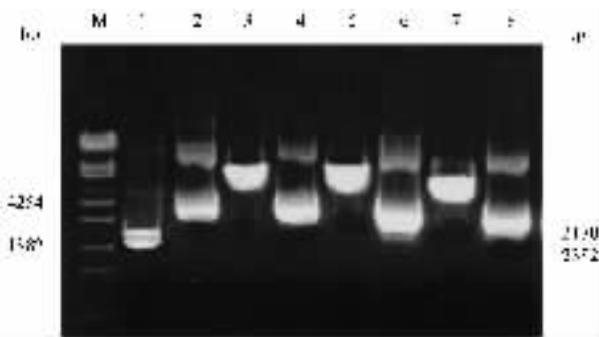
1.2.6.2 RT-PCR 将提取的 RNA 7 μ L、特异性引物 1 μ L、随机引物 1 μ L 混合后放置 70℃ 水浴中 15 min 后置冰上 2 min, 加入反转录混合液, dNTP(2.5 nmol/L) β μ L, 5 \times buffer 4 μ L, DTT 2 μ L 及 RNase inhibition 1 μ L, 室温放置 5 min, 42℃ 水浴中 20 min 后加入反转录酶 SuperscriptTM II 1 μ L, 室温放置 5 min, 42℃ 水浴中 50 min, 70℃ 水浴中放置 10 min. 以 RNA 逆转录合成后的第一条 cDNA 链为模板, 进行 PCR 扩增 S 区基因及内参基因, S 区基因引物 P1(nt 203-221) 5'-GCGGGGTTTTTCTTGTGTA-3', P2(nt 788-768) 5'-GGGACTCAAGATGTTGTACAG-3', 产物为 585 bp, 反应条件: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s, 设平台期前一循环数作为半定量时的扩增循环数, 共扩增 25 个循环. 内参照选用 β -actin 基因, 上游引物: B1: 5'-GGCTACAGCTTACCACCAC-3', 下游引物: B2: 5'-GCACTGTGTTGGCGTACAGG-3', 扩增片段为 320 bp. PCR 反应设定: 94℃ 预变性 3 min, 然后按 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 28 个循环, 再 72℃ 延

伸 10 min. 根据产物电泳条带相对强度,以确定 HBV-S-mRNA 被干扰的程度.

统计学处理:实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 进行重复测量方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义.

2 结果

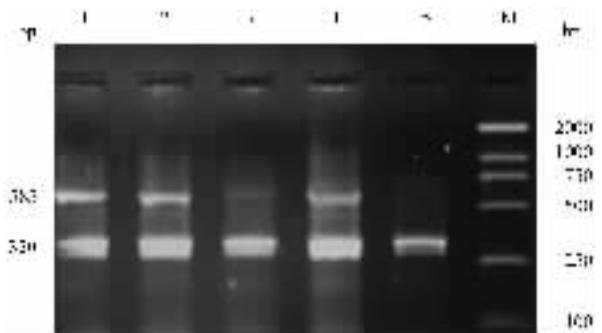
2.1 构建载体酶切鉴定及基因测序鉴定 用 *Mlu*I 进行酶切, pSilencer ZY1, pSilencer ZY2, pSilencer ZY3 均被切开,用 *Sal*II 对 pSilencer HK 进行酶切,可见两条 DNA 片段,一条 2170 bp,另一条 2382 bp,与预期结果完全一致(Fig 1),进一步测序结果分析表明,插入的序列与设计的完全相符.



M: λ EcoT14 I marker; 1: pSilencer3.1-ZY1; 2: pSilencer ZY1 digested with *Mlu*I; 3: pSilencer ZY2; 4: pSilencer ZY2 digested with *Mlu*I; 5: pSilencer ZY3; 6: pSilencer ZY3 digested with *Mlu*I; 7: pSilencerHK; 8: pSilencerHK digested with *Sal*II.

Fig 1 Electrophoresis of siRNA expression plasmids

图 1 表达干扰 RNA 重组质粒的酶切鉴定



1: pSilencer3.1; 2: siRNA control; 3: pSilencer ZY1; 4: pSilencer ZY2; 5: pSilencer ZY3. M: λ EcoT14 I Marker.

Fig 2 Inhibition of HBV S-mRNA by the siRNAs at 72 h
图 2 在干扰 RNA72 h 时对 HBV 的 mRNA 的干扰结果

2.2 对 HBsAg 和 HBeAg 表达的抑制效应 转染后 24, 48 和 72 h, ZY1-pSilencer3.1-H1-hygro, ZY2-pSilencer3.1-H1-hygro, ZY3-pSilencer3.1-H1-hygro 转染组细胞上清液中的 HBsAg 和 HBeAg 均明显减少($P < 0.05$) 转染 72 h 抑制率达最高峰,对 HBsAg 的抑制率分别为 81% 29% 78% 对 HBeAg 的抑制率分别为 35% 3% 49%. 而 HK-pSilencer3.1-H1-hygro 及空白质粒对细胞分泌的 HBsAg, HBeAg 均无明显的抑制作用(Tab 1).

2.3 对 HBV-S-mRNA 的抑制作用 转染 72 h RT-PCR 检测显示(以 β -actin 条带的相对强度作为对照, Fig 2), ZY1-pSilencer3.1-H1-hygro, ZY3-pSilencer3.1-H1-hygro 抑制明显. ZY2-pSilencer3.1-H1-hygro 的抑制作用较弱.

表 1 含 siRNAs 的重组质粒转染 HepG2 2.2.15 细胞系后对 HBsAg 和 HBeAg 表达的抑制作用

Tab 1 Inhibition of expression of HBsAg and HBeAg in the supernatant of HepG2 2.2.15 cells by the three siRNAs

[$n = 3 \bar{x} \pm s (\%)$]

Group	HBsAg			HBeAg		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
pSilencer3.1 control	3.48 \pm 0.02	4.19 \pm 0.06	6.52 \pm 0.08	2.83 \pm 0.03	3.62 \pm 0.05	4.22 \pm 0.07
Negative control	3.42 \pm 0.03	4.01 \pm 0.05	6.19 \pm 0.07	2.76 \pm 0.02	3.48 \pm 0.06	4.17 \pm 0.08
ZY1 pSilence3.1	3.03 \pm 0.03(30)	2.58 \pm 0.04(74)	3.01 \pm 0.05(81)	2.23 \pm 0.01(32)	2.71 \pm 0.03(35)	3.11 \pm 0.03(35)
ZY2 pSilence3.1	3.10 \pm 0.02(26)	3.90 \pm 0.03(15)	5.50 \pm 0.03(29)	2.78 \pm 0.02(3)	3.58 \pm 0.03(2)	4.12 \pm 0.03(3)
ZY3 pSilence3.1	3.07 \pm 0.02(28)	2.71 \pm 0.04(68)	3.04 \pm 0.05(78)	2.25 \pm 0.01(32)	2.76 \pm 0.02(33)	2.63 \pm 0.02(49)

3 讨论

目前在我国广泛应用的抗 HBV 药物主要有两类 α -干扰素和核苷类药物,但疗效均不理想,仍需探

索新型有效的抗 HBV 的药物. RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术的出现,为各类慢性 HBV 感染的治疗开辟了新的途径. 整个 RNAi 过程主要有以下两

个阶段^[3,4],加入的小分子 RNA 被切割为 21~23 核苷酸长的小分子干扰 RNA 片段(small interfering RNAs, siRNAs); siRNA 双链结合一个核酶复合物从而形成所谓 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),激活的 RISC 通过碱基配对定位到同源 mRNA 转录体上,利用酶切作用破坏 mRNA。与反义核酸和核酶等技术相比, RNAi 技术更加经济、快速和有效。目前较为常用的 siRNA 的制备方法有主要有体外合成和体内表达 siRNA 法。体外合成制备 siRNA 主要包括化学合成、体外转录、长片段 dsRNAs 经 III 类 RNase 降解,主要的缺点是 RNA 易于被 RNA 酶分解,价格高,且费时费力,而且转染细胞后只能在短时间内起作用,还可引发非特异基因沉默,这在一定程度上限制了 RNAi 技术的应用。体内表达 siRNA 法主要包括 siRNA 表达载体或病毒载体在细胞中表达 siRNAs 及聚合酶链反应(PCR)制备的 siRNA 表达框在细胞中表达。siRNA 表达框的方法能快速筛选 siRNA,价格相对较低,但 PCR 产物不易导入细胞内, siRNA 表达载体的构建虽然相对繁琐,但优点在于可以进行较长期研究,带有抗生素标记的载体可以在细胞中持续抑制靶基因的表达,持续数星期甚至更久。这种方法的优点还在于不需要直接操作 RNA,大大减低了实验成本,增加了实验的可操作性。

HePG2 2.2.15 细胞是一种整合 ayw 型 HBV 全基因组的较为理想的细胞感染模型^[5],它能够部分模拟 HBV 的生活周期,是一种能够表达各种 HBV 产物并能分泌 HBV 颗粒的较稳定的人类肝癌细胞株。选择它作为靶细胞进行研究,更接近于人体肝细胞内环境的实际情况。

我们针对 HBV 的 S 区设计构建的 3 个表达 siRNA 的重组载体转染细胞后,对 HBV 表现出不同的抑制作用。对转染 24、48 和 72 h 的细胞上清液中 HBsAg、HBeAg 的表达均有强弱不等的抑制作用,72 h 抑制率达高峰,对 HBsAg 的抑制率分别为 81%、29% 及 78%,对 HBeAg 的抑制率分别为 35%、3% 及 49%,其中 ZY1、ZY3pSilence3.1 载体的抑制作用较强,ZY2Psilence3.1 的抑制作用较弱。可见,不是所有的 siRNA 都能产生强效抑制作用。分析原因主要为:①一些序列可能被埋在 RNA 立体结构中或高度折叠区域的内部;②还有一些序列可能和一些蛋白质形成紧密结

构复合体,制止 siRNA 对它们的识别^[6,7]。我们虽然设计构建了针对 S 区的 3 个表达 siRNA 的载体,但对 HBeAg 的表达也有一定的抑制作用。RT-PCR 能快速、灵敏地反映目的 mRNA 的水平。本实验的 RT-PCR 的显示结果表明, siRNA 能有效的抑制 mRNA。无关序列对照无论在蛋白水平上还是在 RNA 水平上都没有对 HBV 产生抑制作用,可见 siRNA 作用的序列特异性。

人们利用 RNAi 技术抑制 HBV 的研究才刚刚起步,但已经取得了很大的成绩。要筛选出最终能完全清除 HBV 感染的 siRNA,必须进一步提高转染效率和 RNAi 作用的时间,减少人体细胞对 siRNA 导入产生的拮抗性,并生产出对人体细胞具有高效性的载体等。HBV 的基因结构及复制周期较为复杂,如何选择 siRNA 作用的基因靶位也非常重要。由于 siRNA 的作用不依赖于病毒的复制,使得该技术和现有抑制 HBV 复制的药物联合应用,或许可能建立抗 HBV 的“鸡尾酒疗法”。但应用到人体还需要一个漫长的过程。相信随着科技的发展, RNAi 技术的应用也必将从体外细胞实验走向动物和临床。RNAi 将为发展特异性的抗 HBV 基因药物治疗提供新的技术平台。

【参考文献】

- [1] Hannon GJ. RNA interference[J]. *Nature*, 2002; 418(6894): 244-251.
- [2] Gitlin L, Andino R. Nucleic acid-based immune system: The antiviral potential of mammalian RNA silencing[J]. *J Virol*, 2003; 77(13): 7159-7165.
- [3] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals[J]. *Cell*, 2000; 101(1): 25-33.
- [4] Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway[J]. *Cell*, 2001; 107(3): 309-321.
- [5] Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987; 84(4): 1005-1009.
- [6] Chen Y, Du D, Wu J, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by stably expressed shRNA[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 311(2): 398-404.
- [7] Yoshinari K, Miyagishi M, Taira K. Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004; 32(2): 691-699.