

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2007)07-0596-04

针对 HBV_x 基因的 siRNA 重组腺病毒的制备及其对 HBV_x 基因表达的抑制作用

秦炜炜¹, 刘家云², 张瑞¹, 王涛¹, 王凯¹, 孟艳玲³, 杨安钢³(第四军医大学¹: 基础部生物化学与分子生物学教研室; ²西京医院临床检验科; ³基础部免疫学教研室 陕西 西安 710033)

Preparation of recombinant adenovirus mediated siRNA targeting HBV_x gene and its suppressive effect on HBV_x gene expression

QIN Wei-Wei¹, LIU Jia-Yun², ZHANG Rui¹, WANG Tao¹, WANG Kai¹, MENG Yan-Ling³, YANG An-Gang³¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, ³Department of Immunology, School of Basic Medicine, ²Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To construct the recombinant adenovirus vectors for siRNA targeting HBV_x gene (HBV_x) and to evaluate the inhibitive effect on the expression of HBV_x gene in human hepatoma HepG2 cell line. **METHODS:** The shuttle vector pShuttle-HBV_x was co-transfected into *E. coli* BJ5183 with adenovirus backbone plasmid. The homologous recombinants were transfected into HEK293 packaging cells and adenovirus was packaged and amplified, followed by infection of the HepG2 cells transfected with HBV_x gene. The expression levels of HBV_x were determined by RT-PCR and Western Blot after the total RNA and protein were collected. **RESULTS:** The recombinant adenoviral vectors containing siRNA targeting HBV_x gene were successfully constructed, which were confirmed by restriction enzyme digestion. RT-PCR results demonstrated that the HBV_x mRNA was markedly decreased and Western Blot results showed that the expression of HBV_x protein was also significantly reduced in HepG2 cell line. **CONCLUSION:** Adenovirus-based siRNA targeting HBV_x gene can inhibit HBV_x expression with great potency and specificity *in vitro*.

【Keywords】 hepatitis B virus; RNA interference; adenovirus; gene therapy

【摘要】目的 构建针对乙型肝炎病毒 x 基因 (HBV_x 基因) 的小干扰 RNA (siRNA) 重组腺病毒表达载体, 并在能表达 HBV_x 基因的人肝癌细胞株 HepG2 中观察其对 HBV_x 基因表达的抑制作用. 方法 重组腺病毒穿梭载体 pShuttle-HBV_x 与骨架载体在大肠杆菌 BJ5183 中同源重组得到重组腺病毒载体, 后者转染 HEK293 细胞, 包装并扩增出病毒颗粒. 用获得的病毒感染能表达 HBV_x 基因人肝癌细胞株 HepG2, 收集细胞总 RNA 和总蛋白, 采用 RT-PCR 和 Western Blot 方法检测细胞中 HBV_x 基因表达的变化. 结果 经限制性内切酶酶切鉴定, 证实针对 HBV_x 基因的 siRNA 重组腺病毒载体构建成功. RT-PCR 和 Western Blot 方法证实, 在 HepG2 细胞中, HBV_x 基因在 mRNA 和蛋白水平均有降低. 结论 腺病毒介导的针对 HBV_x 基因的 siRNA 在体外能够高效、特异地抑制 HBV_x 基因的表达.

【关键词】 乙型肝炎病毒; RNA 干扰; 腺病毒; 基因治疗

【中图分类号】 R392.116 **【文献标识码】** A

0 引言

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 基因组中 HBV_x 基因编码的 HBV_x 蛋白是 HBV 编码蛋白中唯一具有多种调控功能的病毒蛋白质^[1-2], 可以激活宿主细胞中受损 DNA 的修复^[3-4], 并且同多种肿瘤相关分子有相互作用. 因此认为, HBV_x 与肝细胞肝癌的发生和发展密切相关. 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 (post-transcriptional gene silencing, PTGS) 现象, 其主要生物学功能在于抵抗病毒感染, 维持基因组中转座子的稳定性, 清除异常 RNA, 并参与基因表达的调控^[5-6]. 我们构建针对 HBV_x 基因重组腺病毒干扰载体, 在人肝癌细胞株 HepG2 中检测其对 HBV_x 基因表达的抑制效果, 为乙型肝炎病毒感染以及感染后发生的肝细胞肝癌的基因治疗提供新思路.

1 材料和方法

1.1 材料 含有针对 HBV_x 基因的两个干涉靶序列的干涉表达质粒 pSUPER-HBV_x2, pSUPER-HBV_x5 (干涉序列分别针对 HBV_x 基因的 301 ~ 319 位和 198 ~ 216 位) 表达 HBV_x 基因的质粒 pCND3.1-HBV_x-myc, 对

收稿日期 2006-11-13; 接受日期 2007-01-06

基金项目 国家自然科学基金 (30370314)

通讯作者 杨安钢. Tel (029) 84774528 Email agyang@fmmu.edu.cn

作者简介 秦炜炜. 硕士生 (导师杨安钢). Tel (029) 84774516 Ext. 22

Email wivianq1126@yahoo.com

照载体 Adeasy-H1, pCDNA3-EGFP, 大肠埃希菌 DH5 α , HEK293 细胞以及人肝癌细胞 HepG2(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室). pAdeasy-1 腺病毒重组系统(Stratgene 公司), 限制性内切酶 *Xba* I, *Hind* III 和 T4 DNA 连接酶(TaKaRa 公司), 限制性内切酶 *Pac* I 和 *Pme* I(New England Biolab 公司), 质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒(合肥优晶生物技术有限公司); H-DMEM 培养基和 RPMI 1640 培养基(Hyclone 公司), 胎牛血清(杭州四季青公司), LipofectAmineTM2000, RT-PCR 试剂盒和 TRIZOLTM 试剂(Invitrogen 公司); myc 标签, EGFP 多克隆抗体(Santa Cruz 公司); 兔抗人 β -actin 多克隆抗体和辣根酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(武汉博士德公司), ECL 化学发光试剂盒为(Pierce 公司). 用于扩增 HBx 基因的上游引物: 5'-TTTAAGCTTATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCC-3', 下游引物: 5'-TTTGGTACCTTAGGCAGAGGTGAAAAAGTTGC-3'; 用于扩增内参照 β -actin 基因的上游引物: 5'-TGCGCAGAAAA-CAAGATGAGATT-3', 下游引物: 5'-TGGGGCA-CAAAAAGGGGAAGG-3'; 用于扩增 EGFP 基因的上游引物: 5'-ATGCCAGCGGGACAGCAGC-3', 下游引物: 5'-GGTCTCTCCTGGTCTCTTCC-3', 上述引物由北京三博远志生物技术有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 pShuttle-HBx2, pShuttle-HBx5 载体的构建 经 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切反应, 从 pSUPER-HBx2, pSUPER-HBx5 质粒获取 RNAi 表达框片断 HBx2 和 HBx5(大小 300 bp 左右) 将两目的片断回收后亚克隆入同样经 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切的腺病毒穿梭质粒 pShuttle, 卡那霉素选择性培养基筛选阳性克隆, 提取质粒, 用 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切, 10 mL/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定. 获得含小干扰 RNA (short interfering RNA, siRNA) 表达框的腺病毒穿梭质粒 pShuttle-HBx2 和 pShuttle-HBx5.

1.2.2 pAdeasy-HBx2, pAdeasy-HBx5 载体的构建 将 pShuttle-HBx2, pShuttle-HBx5 质粒用 *Pme* I 酶切线性化, 与 pAdeasy-1 按 10:1 的比例电转化至 BJ5183 感受态细菌. 卡那霉素选择性培养基筛选阳性克隆, 挑取较小的克隆扩增培养, 提取质粒. 用 *Pme* I 酶切鉴定质粒, 将鉴定正确的重组质粒再次转化 DH5 α 感受态细胞, 扩增阳性克隆并大量提取质粒, 得到含针对 HBx 干扰表达框的重组腺病毒质粒. (阴性对照质粒 Adeasy-H1 为带有 H1 启动子的 pAdShuttle 质粒, 用 *Pme* I 酶切线性化后与 pAdeasy 同源重组得到).

1.2.3 重组腺病毒的包装与病毒滴度测定 ①包装细胞培养: 含 100 mL/L 胎牛血清的 H-DMEM 培养基 37 $^{\circ}$ C 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养 HEK293 细胞, 当细胞汇合度达 70% ~ 80% 时转染. ②重组腺病毒质粒转染 HEK293 细胞: 重组质粒 pAdeasy-HBx2, pAdeasy-HBx5 用 *Pac* I 酶切线性化后回收, 按照 LipofectAmineTM2000 说明书转染 6 孔培养板中的 HEK293 细胞, 37 $^{\circ}$ C 50 mL/L CO₂ 培养箱中孵育, 10 ~ 12 d 后收集细胞, 液氮与 37 $^{\circ}$ C 两个温度下反复冻融 4 次, 裂解细胞以收获原始病毒, 病毒感染 HEK293 细胞使病毒大量扩增. 重复上述步骤, 最终收集 3 轮扩增的病毒液, 分装保存于 -70 $^{\circ}$ C. ③病毒滴度的测定: 用 TCID 法检测病毒滴度后, 得到 1×10^{10} pfu/mL 的病毒工作液.

1.2.4 RT-PCR 检测重组腺病毒对 HBx 基因 mRNA 的降解作用 制备的重组腺病毒感染人肝癌细胞株 HepG2, 同时转染表达 HBx 基因的质粒 pCND3.1-HBx-myc 和 pCDNA3-EGFP, 后者用来监测各组转染效率, 对照组转染只含有 H1 启动子的质粒 Adeasy-H1. 37 $^{\circ}$ C 50 mL/L CO₂ 培养箱中孵育 48 h 后, 分别收集细胞总 RNA 和蛋白. 通过 RT-PCR 检测 HepG2 细胞 HBx 转录水平的变化: 提取实验组和对照组 HepG2 细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 取 5 μ g 总 RNA 按照 SuperScriptTM II 说明书进行 cDNA 第一链的合成, 以反转录得到的 cDNA 为模板, 在 PE2400 型 DNA 扩增仪上进行 PCR 反应. HBx PCR 条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 再 95 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. 反应产物为 HBx 基因片段, 长度为 464 bp; 内参照 β -actin 基因扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min 后, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共 20 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. 扩增片断大小为 438 bp. EGFP 基因 PCR 反应参数为 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 再 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 27 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 反应产物为 538 bp. 10 mL/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 比较干涉组与对照组 mRNA 水平表达差异.

1.2.5 Western Blot 检测重组腺病毒对 HBx 蛋白表达的影响 用 100 μ L 的细胞裂解液裂解上述各组细胞, 4 $^{\circ}$ C 10 000 g 离心 20 min, 收集上清液, 加入等量 2 \times SDS Loading Buffer, 煮沸 5 min, 每孔上样 30 μ L, 蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后, 电转移到硝酸纤维素膜上. 依次加入 5 g/L 脱脂奶粉(室温封闭 2 h), 1:200 myc 标签抗体和 EGFP 抗体(室温孵育 2 h), 1:2000 的 HRP 酶标羊抗兔二抗(室温孵育 1 h). 用 TBST 缓冲液洗涤后, 加入底物发光剂 ECL 1 mL, 反

应 5 min 后吸干发光剂,用单层透明薄膜包裹后曝光 X 光胶片显影。

2 结果

2.1 pShuttle-HBx2, pShuttle-HBx5 载体的鉴定
用 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切构建的腺病毒穿梭质粒 pShuttle-HBx2 和 pShuttle-HBx5, 得到 6300 bp 及 300 bp 左右的片断(图 1)与预期大小一致,证明穿梭质粒构建成功。



1 DL2000 marker 2 pAdShuttle-HBx2 3 pAdShuttle-HBx5.

图 1 穿梭载体酶切鉴定结果

2.2 pAdeasy-HBx2, pAdeasy-HBx5 载体的鉴定
用 *Pme* I 分别酶切重组质粒 pAdeasy-HBx2, pAdeasy-HBx5, 得到 23 000 bp 和 4300 bp 两个片断(图 2)结果与预期一致,证明骨架质粒同源重组成功。

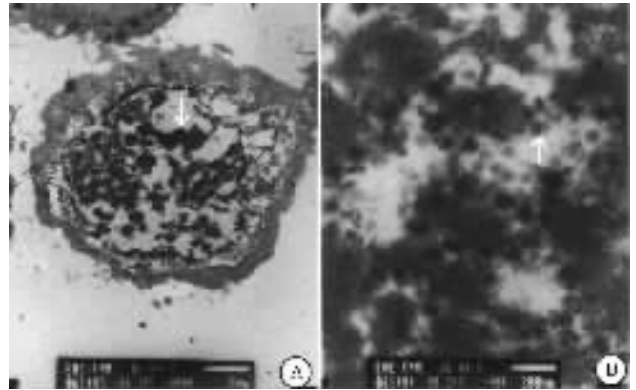


1:DL2000 marker; 2:pAdeasy-HBx2; 3:pAdeasy-HBx5.

图 2 骨架载体酶切鉴定结果

2.3 重组 pAdeasy-HBx2, pAdeasy-HBx5 腺病毒的包装
含重组腺病毒的质粒转染包装细胞 HEK293, 培养 1 wk 后,显微镜下可见特征性圆球状及葡萄串样聚合的细胞病理性改变,电镜下可见病毒感染后的死细胞,胞体肿胀,胞膜不完整,细胞内充满病毒颗粒(图 3A,图中箭头所示即为病毒颗粒),以及感染细胞的胞核,内有成堆的病毒颗粒(图 3B,图中箭头所

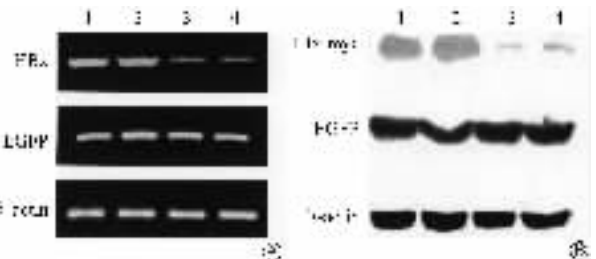
示为病毒颗粒)。第 10 日,可见大部分包装细胞肿胀脱落,细胞出现细胞病理反应(cytopathological effect, CPE)样变化。



A: 病毒感染的包装细胞 $\times 4000$; B: 包装细胞胞质内的病毒颗粒 $\times 40\ 000$ 。

图 3 电镜下观察到的包装细胞及细胞内的病毒颗粒

2.4 共转 HepG2 细胞观察 HBx 基因表达情况
包装完成的病毒颗粒以 30 MOI 感染人肝癌细胞株 HepG2, 48 h 后,分别收集细胞总 RNA 和蛋白,检测其变化。RT-PCR 结果表明,与未处理组和转染空载体组细胞相比,感染腺病毒组细胞的 HBx 基因 mRNA 量明显降低(图 4A);Western Blot 结果显示,感染腺病毒可使细胞 HBx 蛋白的表达量显著减少(图 4B)。



A: RT-PCR; B: Western Blot. 1: untreated cell; 2: Adeasy-H1; 3: pAdeasy-HBx2; 4: pAdeasy-HBx5.

图 4 构建的腺病毒载体对 HBVx 基因表达的抑制

3 讨论

目前,在我国广泛应用的抗 HBV 药物主要有两类,即 α -干扰素和核苷类药物如拉米夫定等。但疗效均不理想,新型有效的抗 HBV 药物仍在探索中。RNAi 用于 HBV 治疗在理论上具有以下优点^[7] 特异性降解 HBV mRNA,从而阻止病毒复制,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,这是通常抗病毒药无可比拟的。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。因而, RNAi 技术为各类慢性 HBV 感染开辟了新的途径。有学者认为 RNAi 技术应用于抗 HBV 治疗,有望成为治疗乙型肝炎的革命性新方法,将有巨大的社会价值^[8]。腺病毒载体是目前基因治疗研究和临床试验中应用最广泛的病毒载体之一。由于腺病毒载体宿主范围广,感染效率高,可插入外源基因片段大,可介导外源基因短时呈高水平表达和不整合到感染细胞的基因组中等特点^[9]。

在本实验中,我们采用 He 等^[10]创建的 pAdeasy 腺病毒载体系统,通过细菌体内同源重组的方法,构建针对 HBV_x 基因的两个不同位点的 siRNA 重组腺病毒载体。该方法不但发挥了重组腺病毒高效、安全等优点,同时,还具有重组效率高,包装时间短等特点。腺病毒载体介导的 RNA 干扰克服了以往用质粒作为 siRNA 输送载体转染效率低的缺陷。

实验中我们使用 RT-PCR, Western Blot 的方法在 mRNA 水平和蛋白质水平证实针对 HB_x 基因的 siRNA 重组腺病毒有效地抑制了 HB_x 基因的表达。

本实验表明腺病毒是一种有应用前景的抗 HBV 感染的基因治疗载体,其可为慢性 HBV 感染以及 HBV 感染后发生的肝细胞肝癌的基因治疗提供新思路。

【参考文献】

[1] Birrer RB, Birrer D, Klavins JV, et al. Hepatocellular carcinoma and

hepatitis virus [J]. *Ann Clin Lab Sci* 2003, 33(1) 39 - 54.

[2] Hwang GY, Lin CY, Huang LM, et al. Detection of the hepatitis B virus X protein(HBX) antigen and anti-HBX antibodies in cases of human hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 11(12) : 5598 - 5603.

[3] Tang H, Delgermaa L, Huang F, et al. The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication [J]. *J Virol*, 2005, 79(9) : 5548 - 5556.

[4] 彭绍华, 厉浩, 邓红等. HBx 蛋白和 p53 蛋白对细胞凋亡的调节及其在肝细胞癌发生中的作用 [J]. *肿瘤防治杂志*, 2003, 10(8) : 792 - 794.

[5] Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution [J]. *Nature* 2004, 430 : 161 - 164.

[6] Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs : Applications in functional genomics and potential as therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3 : 318 - 329.

[7] Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference [J]. *Hepatology*, 2003, 37(4) : 764 - 770.

[8] 张岩, 刘家云. RNA 干扰技术抗乙型肝炎病毒的实验研究进展 [J]. *医学研究生学报* 2005, 18 : 454 - 457.

[9] Mizuguchi H, Hayakawa T. Targeted adenovirus vectors [J]. *Hum Gene Ther* 2004, 15(11) 1034 - 1044.

[10] He TC, Zhou S, Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(5) : 2509 - 2514.

编辑 杨湘华

欢迎投稿 欢迎订阅

《第四军医大学学报》是国内外公开征稿和发行的高级综合性医学学术期刊,曾荣获首届国家期刊奖,第二届国家期刊奖提名奖,中国百种杰出学术期刊,全国高校优秀期刊和陕西省编辑出版优秀期刊,是中国各大检索系统源期刊,《中文核心期刊要目总览》收入期刊,美国化学文摘(CA),俄罗斯文摘杂志(AJ)和哥白尼索引(IC)源期刊。本刊主要刊载基础医学、临床医学、预防医学、军事医学、口腔医学、航空航天医学、中医中药学、生物医学工程学方面的研究原著、研究快报、经验交流、病例报告、综述和述评等各类学术性中文文稿。

地址 (710033) 西安市长乐西路 169 号

电话 (029) 84774674, 84773456, 84773804, 84773814

传真 (029) 84774499

http://journal.fmmu.edu.cn

Email : edjfmumu@fmmu.edu.cn