

# IRES 特异性 IRNA 对 HCV IRES 启动蛋白翻译细胞内抑制作用

梁雪松,连建奇,周永兴,聂青和,郝春秋

梁雪松,连建奇,周永兴,聂青和,郝春秋,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
梁雪松,女,1970-12-03生,汉族,医学博士,主治医师.山西省和顺县人.  
国家自然科学基金课题, No:3000147  
项目负责人:连建奇,710038,陕西省西安市新寺街1号,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. lianjq@yahoo.com  
电话:029-3377595  
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-20

## Inhibitory effect of IRES specific inhibitor RNA on HCV IRES mediated protein translation

Xue-Song Liang, Jian-Qi Lian, Yong-Xing Zhou, Qing-He Nie, Chun-Qiu Hao

Xue-Song Liang, Jian-Qi Lian, Yong-Xing Zhou, Qing-He Nie, Chun-Qiu Hao, The Center of Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital of Fourth Military Medical University Xi'an, Shaanxi Province, 710038, China  
Supported by National Nature Science Foundation of China, No:3000147  
Correspondence to: Dr Jian-Qi Lian, The center of diagnosis and treatment of infectious diseases of PLA, Tangdu Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710038, China. lianjq@yahoo.com  
Received:2002-10-25 Accepted:2002-11-20

## Abstract

AIM: To explore the inhibitory effect of internal ribosome entry site (IRES) specific inhibitor RNA (IRNA) on HCV IRES mediated protein translation *in vivo*.

METHODS: Human hepatic carcinoma cell line (HHCC) was transfected with the eukaryotic vectors of IRNA or miRNA (pcRz-IRNA or pcRz-miRNA), and then selected with G418 for 4 weeks. HHCC expressing IRNA or miRNA was cotransfected with pCMVNCRLuc containing HCV IRES. HHCC stably expressing pCHCVluc was transfected with pcRz-IRNA, and pcRz-miRNA, respectively, the luciferase activity was examined at desired time post-transfection.

RESULTS: The pCMVNCRLuc was efficiently suppressed in HHCC expressing IRNA rather than the cell line expressing miRNA. The IRES specific IRNA inhibited expression of HCV IRES mediated luc gene by 20% to 80% in pCHCVluc expressing cell after transfection; However, no inhibitory effect of the mutant IRNA was observed.

CONCLUSION: pCHCVluc could be expressed successfully in HHCC, and IRNA inhibited HCV IRES mediated gene expression *in vivo*.

Liang XS, Lian JQ, Zhou YX, Nie QH, Hao CQ. Inhibitory effect of IRES specific inhibitor RNA on HCV IRES mediated protein translation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(2):157-160

## 摘要

目的:研究核糖体内部进入位点(internal ribosome entry site, IRES)特异性抑制性RNA (inhibitor RNA, IRNA)细胞内对丙型肝炎病毒(HCV) IRES介导蛋白翻译的抑制作用。

方法:体外应用脂质体细胞转染法,将IRNA及其突变体miRNA真核表达载体pcRz-IRNA/pcRz-miRNA转染人肝癌细胞株(HHCC),经G418筛选4 wk后建立IRNA及miRNA表达株;以相同的方法构建pCHCVluc转染株;以脂质体介导细胞转染法将pCMVNCRLuc转染IRNA及miRNA细胞株,于转染后48 h检测荧光素酶表达量;将IRNA及miRNA真核表达体转染pCHCVluc表达株,于转染后不同时间检测荧光素酶表达量。

结果:HCV IRES介导蛋白翻译在IRNA表达株明显受到抑制,同样IRNA对HCV翻译复制子的蛋白翻译作用有明显抑制性;突变体miRNA表达株和空载体对照株中未见相似的抑制性。

结论:pCHCVluc在HHCC细胞中获得有效表达;IRES特异性IRNA能有效的抑制HCV IRES介导细胞内蛋白翻译作用。

梁雪松,连建奇,周永兴,聂青和,郝春秋.IRES特异性IRNA对HCV IRES启动蛋白翻译细胞内抑制作用.世界华人消化杂志 2003;11(2):157-160  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/157.htm>

## 0 引言

随着丙型肝炎病毒感染的蔓延<sup>[1-24]</sup>,治疗方法的研究成为目前研究的热点<sup>[25]</sup>,尤其是近年有关基因治疗的研究更是日新月异<sup>[26-33]</sup>.HCV 5'非编码区(NCR)含有一富含嘧啶区即IRES区,该区的完整性和稳定性对病毒蛋白翻译和核酸复制至关重要.基于其结构的重要性而成为目前基因治疗的主要靶位点<sup>[34]</sup>.我们对IRES特异性IRNA及其突变体miRNA对HCV IRES介导报道基因荧光素酶细胞内表达量的抑制活性进行了初步研究。

## 1 材料和方法

1.1 材料 质粒pcRz-IRNA/pcRz-miRNA为本研究室构建保存,该质粒在多克隆位点内含有两个具有自剪切作用的顺式核酶及IRNA/miRNA;质粒pCMVNCRLuc由德国Alt教授惠赠,含HCV 5' NCR基因和66 nt的C

区基因，与荧光素酶基因(Luciferase,luc)融合，可通过检测 luc 活性间接反应 HCV 5' NCR 的功能。pcHCVluc 由本研究室构建保存，含 HCV IRES 及核心抗原部分编码序列。人肝癌细胞系(HHCC)为本室保存株。脂质体转染试剂及 1 640 培养基、新生牛血清为 Gibico 公司产品。荧光素酶及 β 乳糖酶检测试剂盒为 Promega 产品。

1.2 方法 用含 100 ml/L 新生小牛血清的 RPMI 1 640 培养液,加青链霉素,在 37 ℃,50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。建立 IRNA 及 miRNA 表达株和 HCV IRES 介导蛋白翻译细胞株:6 孔板中传单层 HHCC 培养至密度为 0.06-0.08。准备 A 液:无血清 1 640 培养液 250 μL 中加 10 μg pcRz-IRNA/pcRz-miRNA 或 pcHCVluc。准备 B 液:脂质体 12 μL 与无血清 1 640 培养液 250 μL 混合,混匀 A、B 液,室温静置 20 min,然后补足无血清 1 640 1 mL,加于待转染细胞上,37 ℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>,培养 17 h,更换完全培养液,培养 48 h 细胞形态好转后更换含 G418 200 mg/L 选择培养基,继续培养 4 wk 至细胞形成单克隆,并继续传代培养。质粒转染: pCMVNCRIuc 5 μg、pSV40-βgal 5 μg 共转染表达 IRNA 或 miRNA 细胞株,于转染后 48 h 收获细胞裂解液进行荧光素酶活性检测; pcRz-IRNA/pcRz-miRNA/pcDNA3 10 μg 转染 pcHCVluc 转染株,于转染后不同时间检测荧光素酶表达量。用荧光素酶检测试剂盒(Promega)于 TD-20/20 发光仪上检测荧光素酶活性;用 β-Gal 活性检测试剂盒(Promega)于可见-紫外分光光度仪上检测 β-Gal 浓度。荧光素酶表达量以荧光素酶活性单位(IU)/β-Gal 浓度(U)表示,抑制率 = 1 - 实验孔荧光素酶表达量/对照孔荧光素酶表达量 × 100 %。转染细胞玻片上生长、固定,抗 HCV C 单克隆抗体稀释液均匀滴于细胞玻片,放于湿盒,37 ℃ 温育 1 h;取出后 PBS 缓冲液振洗 3 次,10min/次;0.1g/L 伊文氏兰配制的 PBS 与 FITC 标记二抗 10<sup>-1</sup> 稀释后均匀滴于玻片上,放入湿盒,37 ℃ 温育 1 h;PBS 缓冲液振洗 3 次,10 min/次,500 mL/L 甘油缓冲液封片。

2 结果

2.1 荧光素酶基因在 HHCC 中表达 pCMVNCRIuc 为一瞬时表达载体,当转染于 HHCC 细胞后,表达荧光素酶的活性随转染后时间的延长而下降。因此,我们分别于转染后 2 d、3 d、4 d、7 d 和 10 d 收集细胞,裂解保留上清液,检测荧光素酶活性。结果证实,该载体在转染 HHCC 细胞后可有效表达,转染后 2 d 的活性最高,4 d 时荧光素酶活性明显下降,于 10 d 时将为本底水平(图 1)。

2.2 HCV IRES 介导荧光素酶基因在 IRNA/miRNA 表达株中的表达 将含 HCV IRES 的瞬时表达载体 pCMVNCRIuc 与转染效率控制载体 pSV 40-β gal 共转染 IRNA/miRNA 表达株及空载体 pcDNA3 株和空白 HHCC 株,于转染后 48 h 时检测荧光素酶活性,并以抑制率表示 IRNA 的活性。检测结果显示,在 IRNA 表达株中由 HCV IRES 介导的荧光素酶表达量同对照组相比明显下降,在

荧光素酶表达最高的转染后 48 h 时,抑制率达到 80 %,而在 miRNA 表达株中及空载体对照株中却仅有不到 5 % 的抑制率。同时进行的由帽状结构介导的荧光素酶表达量在 3 种细胞株中同空白组相比抑制率均低于 5 % (图 2)。

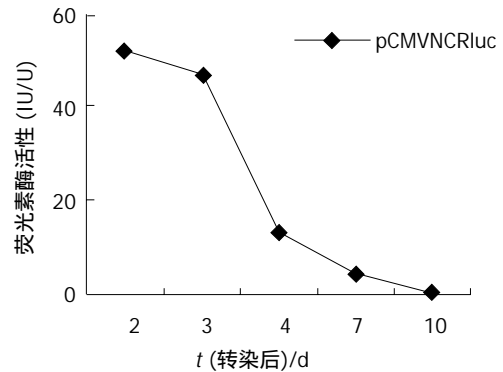


图 1 pCMVNCRIuc 在 HHCC 中的表达

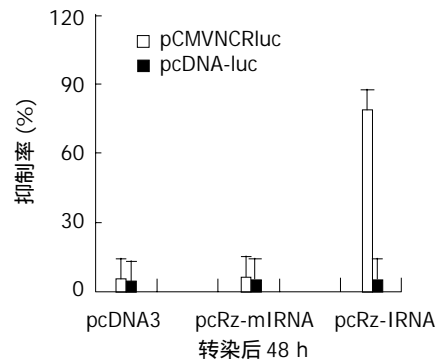


图 2 HCV IRES 介导荧光素酶基因在 IRNA 表达株中的表达

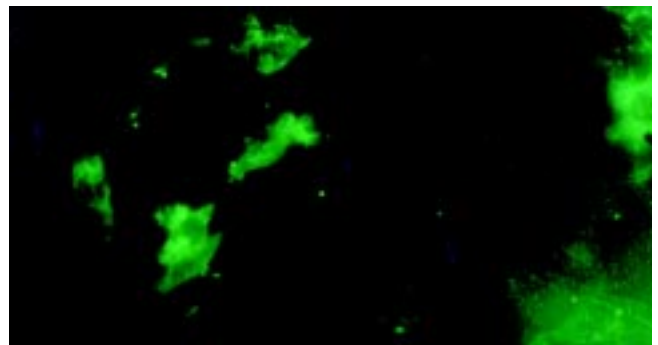


图 3 pCHCV-luc 在人肝癌细胞株 HHCC 中稳定表达免疫荧光鉴定

2.3 pcHCVluc 在 HHCC 中的表达 质粒转染并经 G418 筛选 4 wk 后,转染 HHCC 细胞形成单克隆,进一步传代培养后用间接免疫荧光检测 HCV 核心抗原。同未转染细胞相比,pcHCVluc 在 HHCC 中获得稳定表达(图 3)。

2.4 IRNA 及 miRNA 在 pcHCVluc 细胞表达株中的表达 IRNA 在转染 pcHCVluc 细胞表达株后 24 h 时,由 HCV IRES 介导的荧光素酶表达量同未转染 IRNA 株相比下降 15 % 左右,随着时间的延长 IRNA 对 HCV IRES 介导的荧光素酶表达量抑制性增加,在转染后 72 h 时达到最大 80 %,在转染后 7 d 时转染效率仍为 80 %。同时转染的 miRNA 和空载体 pcDNA3 未见对 HCV IRES 介导荧光素酶具抑制活性(图 4)。

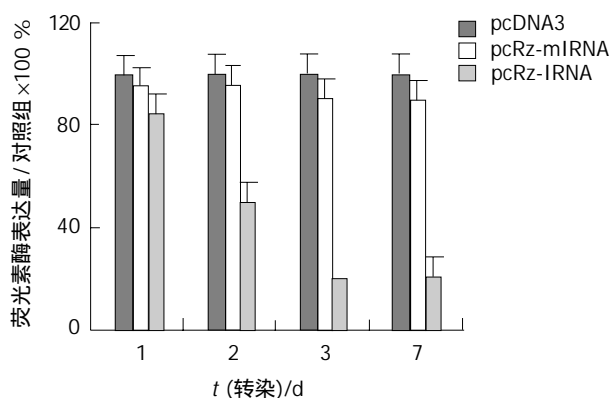


图4 IRNA 及 miRNA 在 pcHCVluc 细胞表达株的表达

### 3 讨论

在全世界范围内 HCV 感染人数达到 1.7 亿人左右,成为严重威胁着人类健康和生活质量的疾病之一。然而,目前抗 HCV 感染的主要药物 - 干扰素疗效有限,且副反应较多不易耐受。因此有必要寻找更有效的治疗途径。HCV 为一单链正股 RNA 病毒,含有一个开放读码框(ORF)。HCV5' 端含有一长的非编码区,且该区具有多个起始密码子(AUG)和明显的空间结构,这种结构同脊髓灰质炎病毒和 EMCV 等的 IRES 结构相似<sup>[32-34]</sup>。研究证实, HCV IRES 区在 HCV 基因复制和蛋白翻译过程中具有重要的作用,因而该区成为抗 HCV 感染治疗的重要靶位之一。近年已经在体内外研究中证实,针对 HCV IRES 区的反义核酸和核酶能明显的抑制病毒蛋白翻译和核酸复制<sup>[35-37]</sup>。

HCV IRES 介导蛋白翻译过程中一些宿主细胞因素同 IRES 功能相关。这些因素的作用主要是促进 IRES 与核糖体结合从而增强病毒蛋白翻译功能。目前已经证实的宿主蛋白包括聚嘧啶束蛋白(PTB)、La 蛋白及核仁素等<sup>[38]</sup>。这些发现可激发人们发现新的抗病毒感染策略。在 1992 年时, Coward et al 偶然反现在酿酒酵母中脊髓灰质炎病毒 IRES 介导蛋白翻译受到抑制,原因是由于一长 60 nt 的 RNA 片段,并命名为抑制性 RNA(IRNA)。此后,在体外实验中证实 IRNA 对 HCV IRES 介导蛋白翻译具有抑制作用,且 IRNA 作用机制是通过与宿主因素 La 抗原等相结合而发挥作用的<sup>[39]</sup>。我们在体外化学合成 IRNA 互补 cDNA 并应用能量级最低原则建立了其突变体,成功建立了在 IRNA 和 miRNA 两端引入具自剪切作用顺式核酶的原核表达载体,并于体外实验证实 IRNA 对 HCV IRES 介导蛋白翻译具有抑制作用。为了进一步研究其对 HCV IRES 介导蛋白翻译的体内抑制性,我们用含 HCV IRES 的瞬时表达载体转染 IRNA 及 miRNA 表达细胞株,结果提示 IRNA 在细胞内同样具有抑制 HCV IRES 介导蛋白翻译作用,而 miRNA 却完全失去了抑制活性。在此基础上我们进一步证实,由 HCV IRES 介导的报道基因荧光素酶表达量同对照组和空载体对照组相比明显受到抑制,而在基本结构明显改变的 miRNA 株却未见有明显的减少。

为了排除非特异性短片段 RNA 对 HCV IRES 介导

蛋白表达的影响,我们在实验中同时将靶基因 pCMVNCRIuc 转染空载体(pcDNA3)细胞株,结果证实非特异性短片段 RNA 对 HCV IRES 介导蛋白翻译无明显的抑制作用。同空白对照相比空载体株和 miRNA 表达株蛋白表达量均有轻度下降(抑制率 5% 左右),这可能是由于转染并经 G418 筛选后细胞活性较空白细胞株相比较差。此外,为了排除转染效率的影响,我们应用靶基因和转染效率控制载体共转染靶细胞,并应用荧光素酶活性(IU)/ $\beta$  牛乳糖酶活性(U)表示 HCV IRES 介导荧光素酶表达量。Das et al 应用相似的研究方法得到了相同的研究结果。我们的研究结果提示, pcDNA-luc 转染 IRNA 表达株后,荧光素酶表达量未受到明显的抑制,这提示 IRNA 对由帽状结构依赖性方式进行的蛋白翻译无抑制活性。别的学者研究中得到了相似的结果,并且他们还证实 IRNA 对宿主细胞蛋白翻译无影响,这为其进一步的抗 HCV 治疗应用奠定了基础<sup>[40]</sup>。本研究中反过来将 IRNA 表达体转染含 HCV IRES 的 pcHCVluc 细胞表达株,结果是在 IRNA 转染后 24 h 是荧光素酶表达量就被抑制,到转染后 72 h 时抑制率达最高(80% 左右),而转染后 7 d 时抑制率并未见提高,这一结果提示 IRNA 并不能完全阻断 HCV IRES 介导的蛋白翻译。

### 4 参考文献

- Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:208-215
- Huang F, Zhao GZ, Li Y. HCV genotypes in hepatitis C patients and their clinical significances. *World J Gastroenterol* 1999;5:547-549
- Chen MY, Huang ZQ, Chen LZ, Gao YB, Peng RY, Wang DW. Detection of hepatitis C virus NS5 protein and genome in Chinese carcinoma of the extrahepatic bile duct and its significance. *World J Gastroenterol* 2000;6:800-804
- Yan J, Dennin RH. A high frequency of GBV-C/HGV coinfection in hepatitis C patients in Germany. *World J Gastroenterol* 2000;6:833-841
- Wang NS, Liao LT, Zhu YJ. Follow-up study of hepatitis C virus infection in uremic patients on maintenance hemodialysis for 30 months. *World J Gastroenterol* 2000;6:888-892
- Worman HJ, Lin F. Molecular biology of liver disorders: the hepatitis C virus and molecular targets for drug development. *World J Gastroenterol* 2000;6:465-469
- Song ZQ, Hao F, Min F, Ma QY, Liu GD. Hepatitis C virus infection of human hepatoma cell line 7721 in vitro. *World J Gastroenterol* 2001;7:685-689
- Zhou HC, Xu DZ, Wang XP, Zhang JX, Huang Y, Yan YP, Zhu Y, Jin BQ. Identification of the epitopes on HCV core protein recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocytes. *World J Gastroenterol* 2001;7:583-586
- Cheng JL, Tong WB, Liu BL, Zhang Y, Yan Z, Feng BF. Hepatitis C virus in human B lymphocytes transformed by Epstein-Barr virus in vitro by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *World J Gastroenterol* 2001;7:370-375
- Meier V, Mihm S, Wietzke-Braun P, Ramadori G. HCV-RNA positivity in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic HCV-infection: does it really mean viral replication? *World J Gastroenterol* 2001;7: 228-234
- Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;15:7:208-215
- Yan FM, Chen AS, Hao F, Zhao XP, Gu CH, Zhao LB, Yang DL,

- Hao LJ. Hepatitis C virus may infect extrahepatic tissues in patients with hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2000;6:805-811
- 13 Woitas RP, Petersen U, Moshage D, Brackmann HH, Matz B, Sauerbruch T, Spengler U. HCV-specific cytokine induction in monocytes of patients with different outcomes of hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2002;8:562-566
- 14 Jin J, Yang JY, Liu J, Kong YY, Wang Y, Li GD. DNA immunization with fusion genes encoding different regions of hepatitis C virus E2 fused to the gene for hepatitis B surface antigen elicits immune responses to both HCV and HBV. *World J Gastroenterol* 2002;8:505-510
- 15 Zhu LX, Liu J, Li YC, Kong YY, Staib C, Sutter G, Wang Y, Li GD. Full-length core sequence dependent complex-type glycosylation of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *World J Gastroenterol* 2002;8:499-504
- 16 Jiang RL, Lu QS, Luo KX. Cloning and expression of core gene cDNA of Chinese hepatitis C virus in cosmid pTM3. *World J Gastroenterol* 2000;6:220-222
- 17 Yang SS, Wu CH, Chen TH, Huang YY, Huang CS. TT viral infection through blood transfusion: retrospective investigation on patients in a prospective study of post transfusion hepatitis. *World J Gastroenterol* 2000;6:70-73
- 18 Yu YC, Mao Q, Gu CH, Li QF, Wang YM. Activity of HDV ribozymes to trans-cleave HCV RNA. *World J Gastroenterol* 2002;8:694-698
- 19 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 20 Assy N, Paizi M, Gaitini D, Baruch Y, Spira G. Clinical implication of VEGF serum levels in cirrhotic patients with or without portal hypertension. *World J Gastroenterol* 1999;5:296-300
- 21 Zhang SZ, Liang JJ, Qi ZT, Hu YP. Cloning of the non-structural gene 3 of hepatitis C virus and its inducible expression in cultured cells. *World J Gastroenterol* 1999;5:125-127
- 22 Assy N, Minuk GY. A comparison between previous and present histologic assessments of chronic hepatitis C viral infections in humans. *World J Gastroenterol* 1999;5:107-110
- 23 Feng DY, Chen RX, Peng Y, Zheng H, Yan YH. Effect of HCV NS3 protein on p53 protein expression in hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5:45-46
- 24 Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of HCV infection on expression of several cancer-associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 1999;5:25-27
- 25 Maier I, Wu GY. Hepatitis C and HIV co-infection: a review. *World J Gastroenterol* 2002;8:577-579
- 26 Scheiflinger F, Dorner F. Recent advances in the understanding of the molecular biology of hemophilia A: possible implications towards a more effective therapeutic regime. *Wien Klin Wochenschr* 1999;111:172-180
- 27 Fang J, Edwin O. Transfection and expression of HCV-NS(5)B gene in Huh-7 cells. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2000;8:33-34
- 28 Kolarski V. The European consensus on hepatitis C. *Vutr Boles* 1999;31:21-28
- 29 Fang J, Ouyang E, Wu CH, Wu GY, Qiu D, Xiao S. Transfection and expression of HCV-NS5B gene in Huh-7 cells. *Chin Med J (Engl)* 2000;113:602-605
- 30 Wang QM, Heinz BA. Recent advances in prevention and treatment of hepatitis C virus infections. *Prog Drug Res* 2001;79-110
- 31 Odreman -Macchioli F, Baralle FE, Buratti E. Mutational analysis of the different bulge regions of hepatitis C virus domain II and their influence on internal ribosome entry site translation ability. *J Biol Chem* 2001;276:41648-416455
- 32 Jubin R, Vantuno NE, Kieft JS, Murray MG, Doudna JA, Lau JY, Baroudy BM. Hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) stem loop IIIId contains a phylogenetically conserved GGG triple essential for translation and IRES folding. *J Virol* 2000;77:10430-10437
- 33 Macejak DG, Jensen KL, Jamison SF, Domenico K, Roberts EC, Chaudhary N, von Carlowitz I, Bellon L, Tong MJ, Conrad A, Pavco PA, Blatt LM. Inhibition of hepatitis C virus RNA dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. *Hepatology* 2000;31:769-776
- 34 Collier AJ, Gallego J, Klinck R, Cole PT, Harris SJ, Harrison GP, Aboul-Ela F, Varani G, Walker SA. A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site. *Nat Struct Biol* 2002;9:375-380
- 35 Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequence in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 2001;75:12047-12057
- 36 Wiklund L, Spangberg K, Goobar-Larsson L, Schwartz S. Cap and poly A tail enhance translation initiation at the hepatitis C virus internal ribosome entry site by a discontinuous scanning, or shunting mechanism. *J Hum Virol* 2001;4:74-84
- 37 Zhang H, Hanecak R, Brown-Driver V, Azad R, Conklin B, Fox MC, Anderson KP. Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant. *Antimicro Agents Chemother* 1999;43:347-353
- 38 Lukavsky PJ, Otto GA, Lancaster AM, Sarnow P, Puglisi JD. Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nat Struct Biol* 2000;7:1105-1110
- 39 Izumi RE, Valdez B, Banerjee R, Srivastava M, Dasgupta A. Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res* 2001;76:17-29
- 40 Venkatesan A, Das S, Dasgupta A. Structure and function of a small RNA that selectively inhibits internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Nucle Acid Res USA* 1999;27:563-572