

细胞内表达的小干扰 RNA 靶向丙肝病毒 5' 保守区的研究*

吴叔文, 方 骢, 潘纪安, 田 波, 郭德银**

(武汉大学生命科学院现代病毒学研究中心, 湖北武汉, 430072)

Targeting the 5' untranslated Region of *Hepatitis C virus* by

Intracellularly Expressed Small Interfering RNA

WU Shu-wen, FANG Cong, PAN Ji-an, TIAN Bo, GUO De-yin**

(Modern Virology Research Center, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: In this study, we inserted the 5' untranslated region (UTR) of *Hepatitis C virus* (HCV) genome into the upstream of the reporter genes of enhanced green fluorescent protein (eGFP) and luciferase, and we also constructed the expression vector that can express the short interfering RNAs (siRNA) against the HCV 5'-UTR. The 5'-UTR-eGFP/luciferase and the siRNA-producing plasmid were cotransfected into Hela cells, and the inhibition effect was detected by the intensity of the fluorescence and luminescence. The results showed that the light from the cotransfected cells was obviously weaker than the negative control both in quality and in quantities, while density of the cotransfected cells had no difference with the control plasmid as detected by nucleus staining. This work demonstrated that certain siRNA can target the 5' UTR of HCV, while no toxic effect had been observed in the cells. This work is the basis for future research in which RNAi activity is supposed to be utilized in the gene therapy with the the HCV infection. The siRNA is expressed intracellularly by vectors instead of chemical synthesis, and a new method can be used as a model to quickly and safely screen effective siRNAs targeting HCV.

Key Words: *Hepatitis C virus* (HCV); Short-interfering RNA; RNAi

摘要: 将丙型肝炎病毒 (HCV) 基因组的 5' 非编码区 (5' UTR) 插入到报告基因绿色荧光蛋白 (eGFP) 和荧光素酶 (luciferase) 的上游, 并构建基于 III 型启动子的表达载体, 这种载体能产生针对 HCV 5' UTR 的小干扰 RNA。然后将含有 HCV 5' UTR 的 eGFP/luciferase 和能产生小干扰 RNA 的质粒共转染入 Hela 细胞, 通过测定细胞发出的荧光和化学发光强弱来观测抑制效果。实验结果表明, 与 HCV 5' UTR 特异性小干扰 RNA 表达质粒共转染的细胞无论从定性还是从定量上所测得的荧光和化学发光强度都明显低于阴性对照, 且细胞密度经核染色与对照组无明显区别。这揭示了小干扰 RNA 确实能引起 HCV 特异基因如 5' UTR 的沉默, 且转染进去的小干扰 RNA 表达质粒对细胞没有毒害作用。这一工作是通过载体直接在细胞内表达小干扰 RNA (siRNA) 而不是化学合成的, 可以使小干扰 RNA 在细胞内得到稳定表达, 因此本研究设计的 siRNA 表达载体不仅可以有效沉默 HCV 5' UTR, 而且该系统可以灵敏地筛选更有效的针对 HCV 的 siRNA, 因而这一结果为研究利用 RNA 干扰进行基因治疗 HCV 感染做了初步探索。

关键词: HCV; 小干扰 RNA; RNA 干扰

中图分类号: R512.8

文章标识码: A

文章编号: 1003-5125(2003)06-0515-04

收稿日期: 2003-05-07, 修回日期: 2003-05-21

* 基金资助: 国家自然科学基金项目 (30270313); 武汉大学引进人才启动经费

作者简介: 吴叔文 (1977-), 男, 安徽省歙县籍, 硕士研究生。

** 通讯作者: 郭德银 (1965-), 男, 河南省籍, 教授, 博士生导师, 从事分子病毒学研究。

Corresponding author. Tel: 027-87876506 E-mail: dguo@whu.edu.cn

丙型肝炎病毒 (*Hepatitis C Virus*, HCV) 是黄病毒家族的成员, 它的基因组是一条约 9.6kb 的正链 RNA 分子, 其由一个长开放阅读框架 (ORF) 和两侧的非编码区 (UTR) 5' UTR 和 3' UTR 组成。丙型肝炎病毒是危害公众健康的一个重要病毒, 全球约有高达二亿七千万慢性感染者^[7]。大多数被 HCV 感染的患者会发展成许多肝脏疾病, 包括肝硬化 (cirrhosis) 和肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma)^[1]。

目前针对慢性 HCV 感染的可行性治疗方法只有将干扰素 (interferon) 和三氮唑核苷 (ribavirin) 结合起来使用的疗法^[10]。这种疗法不仅反应效率低^[10], 副作用强, 而且对于某些基因型的 HCV 是无效的或低效的^[6], 这是因为 HCV 是高变异的病毒, 极易逃避宿主的免疫机制, 形成抗药物的突变株。

最近, 利用 RNA 干扰 (RNAi) 的活性来治疗由病毒导致的疾病和肿瘤已引起了科学界的广泛关注。小的双链 RNA 分子诱发同源的单链 RNA 特异序列的降解的现象称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)^[5]。小干扰 RNA (short interfering RNAs, siRNA) 是两端各有两个碱基突出的小于 30 个碱基对的双链 RNA。siRNA 所引起的特异性目的基因阻抑的分子机理在不同类型的生物中似乎是高度保守的^[2,5]。在真核细胞中, 长的双链 RNA 被一种类似 RNA 酶 III 的酶, 称为 DICER, 切割成约 21~25bp 的小干扰 RNA。接着, 这些小干扰 RNA 解旋, 并与一种已活化的 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex) 结合。然后, 单链 siRNA 就作为底物选择的引导, 导致同源的靶 RNA 分子被核酸酶切割^[4]。RNAi 之所以引起科学家们的兴趣, 很重要的一个原因是由于 siRNA 抑制作用的高特异性。已有实验证明, siRNA 在植物, 无脊椎动物个体, 小鼠早期胚胎和高等哺乳动物培养细胞内都能引发特异性目的基因沉默^[13]。

由于 HCV 的基因组是一条单链 RNA, 其既作为信使 RNA 又作为复制模板行使功能, 因此 HCV 是研究利用 RNAi 技术抗病毒的理想候选者^[7,9]。Kapadia 等人向能够稳定复制 HCV 基因组的 Huh-7 细胞系 (human hepatoma cell line) 中导入小干扰 RNA, 发现 RNAi 能特异性地抑制 HCV RNA 复制和表达, 而且这种抗病毒的效果是不依赖于干扰素的^[12]。Randall 等人也发现, 针对 HCV 的 RNA 设计的小干扰 RNA 能引起 HCV RNA 的指数性减少, 即转染四天后, HCV RNA 减少了 80 倍^[3]。以上这些都支持了利用小干扰 RNA 来治疗 HCV 感染的设想。目前国际上大多利用含有亚基因组复制子

(subgenomic replicon) 的细胞系来表达 HCV^[3,9,12], 而且小干扰 RNA 也都是化学合成的^[7]。为克服上述方法在费用和准确性方面的缺陷, 我们采取只合成部分寡聚核苷酸链 (DNA oligo), 经退火延伸补齐后, 将其克隆到 III 类 RNA 聚合酶启动子下游, 直接在细胞内表达小干扰 RNA 的方法。我们也没有采用繁琐的构建 replicon 的方法, 而是直接将 HCV 基因组中的一段特定序列接到报告基因的上游来构建载体, 从而提供了一个快速有效地筛选小干扰 RNA 的方法。

由于 HCV 5' 端非编码区 (5' UTR) 是高度保守的, 因此我们设计了能产生针对 HCV 1b 5' UTR 序列的小干扰 RNA 的质粒, 并将 HCV 1b 5' UTR 克隆到报告基因 eGFP 及 luciferase 的上游, 将两个质粒共转染哺乳动物细胞, 结果发现从构建质粒表达的小干扰 RNA 能够靶向 HCV 5' UTR, 进而抑制报告基因的表达。这表明小干扰 RNA 能诱导细胞对 HCV 的序列进行特异性切割, 这一结果为研发抗 HCV 基因工程药物做了有效的探索, 也能对利用小干扰 RNA 来抗其他病毒的研究有所启发。

1 材料与方法

1.1 细胞和质粒

Hela 细胞为本室保存, 细胞在含有 10% 的胎牛血清 (HyClone) 的 DMEM (Gibco) 培养基中于 37°C, 5% CO₂, 饱和湿度的培养箱培养。pEGFP-N1 质粒 (Clontech) 由本室购买, HCV 1b 全长克隆 pFK1-9605/Con1 质粒由德国海德堡大学 Ralf Bartenschlager 教授惠赠, pGL3 质粒 (Promega) 由本室保存, pGEM-T 载体购自 Promega, pSilencer-H1 质粒购自美国 Ambion 公司。

1.2 试剂

所用限制性内切酶, Taq 酶, T4 连接酶及 dNTP 均购自 MBI 公司, 转染试剂 Lipofectamine plus 购自美国 Invitrogen 公司, Klenow 酶购自美国 Progega 公司, 荧光素酶检测试剂盒 Bright-Glo™ Luciferase Assay System 购自美国 Promega 公司, 小干扰 RNA 表达载体 pSilencer siRNA Expression Vectors 购自美国 Ambion 公司。

1.3 引物

扩增 HCV 5' UTR 的引物为: H1: 5' aag cttg ccagc cccgattgggg3' 下划线为 HindIII 酶切位点。H2 5' Accggtggtgcacggctacgagac3' 下划线为 Age I 酶切位点。将 H1 与 H2 从质粒 pFK1-9605/Con1 扩增的产物克隆到 pEGFP-N1 的多克隆位点。H3: 5'

ctcaggccagccccgattggg-3' 下划线为 *Xho* I 酶切位点。H4: 5' -aagcttggtcagcgtctacgagac-3' 下划线为 *Hind* III 酶切位点。将 H3 与 H4 以质粒 pFK1-9605/Con-1 为模板扩增的产物克隆到 pGL3basic 的多克隆位点。扩增 CMV promoter 的引物为: CMV1: 5' -ggtagctagtaatacaattacgggg-3' 下划线为 *Kpn* I 酶切位点。CMV2: 5' -acgcgtgatctgacggtcactaac-3' 下划线为 *Mlu* I 酶切位点。将 cmv1 与 cmv2 以质粒 pEGFP-N1 为模板扩增的产物克隆到 pGL3basic 的多克隆位点。Hsi1a: 5' ATCGGATCCCGATCCAAGAAAGGACCCGGTCGTCCTGGCTTCAAGAGACCAGGACGA-3' 下划线为 *Bam*H 酶, Hsi2: 5' -GTCAAAGCTTTCCAAAAAGATCCAAGAAAGACCCGGTCGTCCTGGCTCTCTTGAAG-3' 下划线为 *Hind* III 酶切位点。

1.4 质粒 DNA 的提取纯化, 酶切及克隆

按照《分子克隆实验指南》^[14]介绍的方法进行。

1.5 表达小干扰 RNA 载体的构建

将部分互补配对的引物 Hsi1a 与 Hsi2 退火配对后, 用 *Klenow* 酶进行延伸, 经酶切纯化后克隆到载体 pSilencer-H1 上。

1.6 DNA 的转染

在转染的前一天将 2×10^5 的细胞接种于 35mm 的培养皿中培养过夜, 用脂质体按说明书将 5ug 的特定质粒导入细胞, 培养 24h 后进行观察或检测。细胞表达的绿色荧光蛋白用荧光倒置显微镜进行观测并照相。用细胞裂解液将细胞破碎, 加入底物进行反应, 用酶标仪检测荧光强度和化学发光强度。

1.7 细胞核的染色

将细胞吸去培养基后, 用 PBS 洗两次, 加入 500uL 的 10ug/mL 的碘化必碇。在 37°C 温育 2min 就可以在荧光显微镜进行观察及照相。

2 结果

2.1 以 HCV 5' UTR 为前导序列的报告基因的正常表达

将 HCV 5' UTR(1-342)的序列克隆到 pEGFP-N1 的多克隆位点, 经酶切及测序鉴定获得质粒 HCV 5' UTR-eGFP, 使 eGFP 的表达受到 HCV 5' UTR (作为前导序列) 的控制。将该质粒转入细胞, 24h 之后能在荧光显微镜下看到绿色荧光蛋白的表达 (见彩版 I 图 1c)。将 HCV 5' UTR 及 CMV 启动子序列克隆的 pGL3-Basic Vector (promega) 的多克隆位点, 经酶切及测序鉴定获得质粒 pGL3/CMV, pGL3/CMV-5' UTR。将该质粒转入细胞, 24h 后能

检测到荧光素酶的表达 (见图 2 柱 1)。说明以 HCV 5' UTR 作为报告基因的前导序列可以使报告基因得到正常表达, 因而所构建的模型可以用于筛选针对 HCV 5' UTR 的小干扰 RNA。

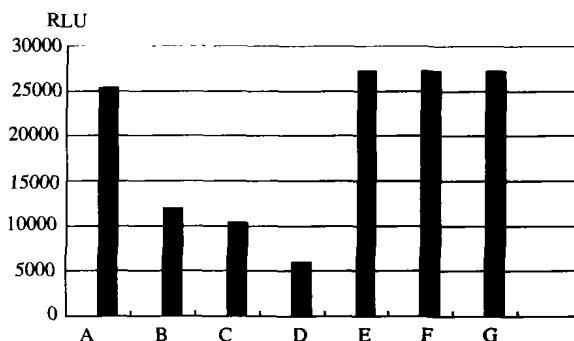


图2 小干扰 RNA 对以 HCV 5' UTR 为前导序列的荧光素酶表达的抑制作用

Fig.2 The inhibition effect of siRNA to the expression of luciferase with HCV 5'UTR

Column A represents pGL3/CMV-5' UTR; Column B/C/D represent pGL3/CMV-5' UTR and pSilencer-5' UTR; The molar ratios are 1:3, 1:5, 1:10; column E represents pGL3/CMV-5' UTR and pSilencer-NC(1:3); Column F represents pGL3/CMV; Column G represents pGL3/CMV and pSilencer-5' UTR(1:3). The plasmid of the reporter gene is 2 μ g.

2.2 表达小干扰 RNA 载体的构建

如材料方法中所述, 将化学合成的寡聚 DNA 片段退火延伸补齐后连接到小干扰 RNA 表达载体 pSilencer siRNA Expression Vector 上, 获得质粒 pSilencer-5' UTR, 测序表明其序列与设计的相符, 该质粒将表达针对 HCV 5' UTR 的 siRNA。

2.3 小干扰 RNA 特异性地抑制报告基因的表达

pSilencer-5' UTR 质粒与 HCV eGFP-5' UTR 质粒共转染细胞时, 表达绿色荧光的细胞明显减少, 且荧光强度也变弱 (彩版 I 图 1e)。而 pSilencer-5' UTR 质粒与不含 HCV 5' UTR 的 pEGFP-N1 共转染时, 绿色荧光的表达没有受到影响 (见彩版 I 图 1b)。表达与 HCV 5' UTR 无关的小干扰 RNA 和 eGFP-5' UTR 质粒共转染时, 没有发现绿色荧光强度的显著变化 (见彩版 I 图 1d)。通过细胞核染色发现, 转染 pSilencer-5' UTR 质粒并不引起细胞数目的急剧变化 (见彩版 I 图 1f), 表明表达绿色荧光细胞的减少并不是总细胞数目的变化引起的。HCV eGFP-5' UTR 质粒仅比 pEGFP-N1 多了 HCV 5' UTR 这一段序列, 说明 pSilencer-5' UTR 引起了细胞对 5' UTR 特异性降解机制, 而抑制了含有 5' UTR 的 GFP 的表达。为了进一步对 pSilencer-5' UTR 的抑制作用进行定量, 将 pGL3/CMV-5' UTR

和 pSilencer-5' UTR 共转染细胞, 荧光素酶的表达水平下降了 60%~80%(图 2)。而 pSilencer-5' UTR 对 pGL3/CMV 荧光素酶的表达没有影响。进一步定量表明 pSilencer-5' UTR 能诱导细胞对 HCV 5' UTR 特异地降解。且 pSilencer-5' UTR 对荧光素酶的抑制程度随其浓度加大而加强(见图 2), 再次表明 pSilencer-5' UTR 能特异地识别 HCV 5' UTR 序列并诱导细胞对其进行降解。

3 讨论

自从在哺乳动物细胞中发现基因沉默机制以来, 用小干扰 RNA 抑制病毒成了国际学术界关注的热点。在哺乳动物细胞模型中已经证明了小干扰 RNA 对 HIV, HCV 这两种 RNA 病毒有抑制作用, 但是还有很多问题没有明确^[7, 8]。

小干扰 RNA 起作用的关键是双链 RNA 能与病毒 RNA 或靶 mRNA 相互结合, 而病毒 RNA 或靶 mRNA 有很多复杂的二级结构或者蛋白结合域, 并非设计出来的所有 siRNA 都能与模板结合并产生作用, 因此如何筛选有效的 siRNA 就显得非常关键。本文所采用的方法就提供了一个高效快捷筛选小干扰 RNA 的方法, 即将病毒的一段特定序列接到报告基因的上游来构建表达载体, 因为这种方法跳过了构建病毒细胞模型这一瓶颈, 而且不涉及到全病毒, 所以提高了安全性。此模型可用于筛选对 HCV 5' UTR 更有效的 siRNA。除此以外, 为了获得双链小 RNA, 通常的方法是要合成较长的 DNA oligo。这不仅影响了准确性, 所花的费用也较高。而我们采用合成部分互补的 DNA oligo, 经退火延伸补齐的方法就大大减少了费用。

有人提出小干扰 RNA 对靶 RNA 的降解是级联放大反应, 也就是说, 少量的小干扰 RNA 能够引起高效甚至是彻底的特异性基因的封闭^[11], 但在本实验及其他一些研究中发现小干扰 RNA 并不能产生 100% 的抑制作用, 可能生物体内存在的扩增系统只负责将小干扰 RNA 进入的信号传递到周边细胞, 但小干扰 RNA 本身对基因的抑制作用并没有增强。因此对小干扰 RNA 的作用机制还有待深入研究, 因为只有尽力将小干扰 RNA 的效力不断提高, 才能使其具有作为基因治疗药物的潜力进一步开发出来。此外, 本实验中没有发现小干扰 RNA 对细胞有毒害作用, 因为将小干扰 RNA 转染进入细胞后, 并未引起细胞死亡, 进行核染色后, 发现

细胞密度与对照组没有差异。

HCV 有很多亚型, 而我国主要流行 HCV 中的 1b 亚型。因为 HCV 的 5' UTR 是一个高度保守的区域, 在不同的基因型中同源性很高, 在 1b 基因型的几个亚型中则几乎完全相同, 因此, 我们根据 1b 亚型 5' UTR 设计的小干扰 RNA 作用的范围特别广, 若能在此基础上研发出抗病毒药物, 就能克服传统疗法副作用强, 对 1b 亚型治疗效果差的缺点。当然, 我们所设计的小干扰 RNA 对全病毒的抑制作用还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Alter M J. Epidemiology of hepatitis C[J]. *Hepatology*, 1997, 3 (Suppl.1): 62s-65s.
- [2] Boshier J M, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: E31-E36.
- [3] Glenn R, Arash G, Charles M R. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs[J]. *PNAS*, 2003, 100: 235-240.
- [4] Hammond S M, Bernstein E, Beach D, et al. An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells[J]. *Nature*, 2000, 404: 293-296.
- [5] Hannon G J. RNA interference[J]. *Nature*, 2002, 418: 244-251.
- [6] Heathcote E J, Shiffman M L, Cooksley W G, et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis[J]. *New Engl J Med*, 2000, 343: 1673-1680.
- [7] Joyce A W, Sumedha J, Anastasia K, et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells [J]. *PNAS*, 2003, 100: 2783-2788.
- [8] Laurence J. RNA silencing: a new therapeutic strategy against HIV[J]. *AIDS Read* 2003, 13(2): 52-53.
- [9] Mi Y S, Sergio A, Michael H, et al. Letter to the Editor small interfering RNA-mediated inhibition of hepatitis C virus replication in the human hepatoma cell line huh-7[J]. *J Virol*, 2003, 77: 810-812.
- [10] McHutchison J G. Hepatitis C advances in antiviral therapy: what is accepted treatment now? [J] *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17: 431-441.
- [11] Peter M W, Ming-Bo W, Tony L. Gene silencing as an adaptive defence against viruses[J]. *Nature*, 2001, 411: 834-842.
- [12] Sharookh B K, Amy B, Francis V C. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs[J]. *PNAS*, 2003, 100: 2014-2018.
- [13] 黄宇琛, 江, 谭 琛, 等. 短双链 RNA 特异性抑制哺乳动物细胞中绿色荧光蛋白基因的表达[J]. *癌症*, 2002, 21 (7): 710-714.
- [14] 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南[M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1993.

彩版 I

吴叔文,等. 细胞内表达的小干扰 RNA 靶向丙肝病毒 5'保守区的研究(正文见第 515 页)

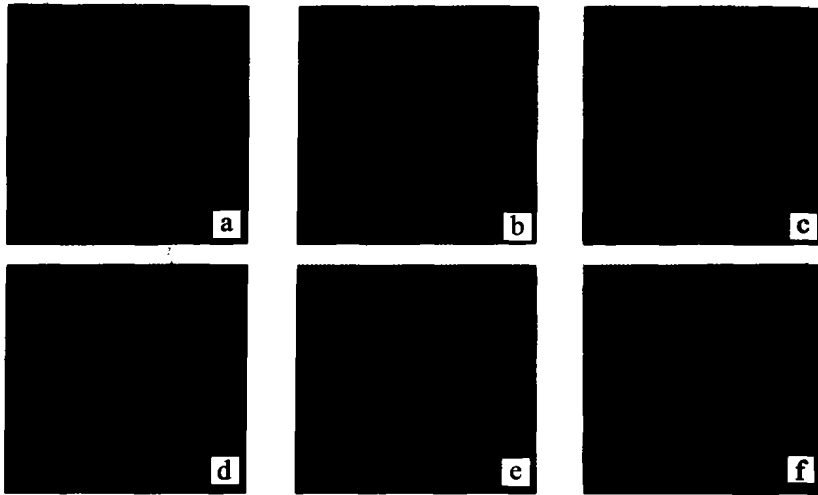


图 1 不同质粒转染 HeLa 细胞的荧光检测(×200)

Fig.1 Fluorescent analysis of HeLa cells that are transfected by different plasmids.

The molar ratios of two plasmids (vector/silencer) are 1:3. a, eGFP-N1; b, eGFP-N1+pSilencer-5'UTR; c, eGFP-5'UTR; d, eGFP-5'UTR+pSilencer-NC; e, eGFP-5'UTR+pSilencer-5'UTR; f, eGFP-5'UTR+pSilencer-5'UTR and the nucleuses are stained.

刘斌,等. 巨细胞病毒感染对多向造血祖细胞体外增殖的影响(正文见第 519 页)

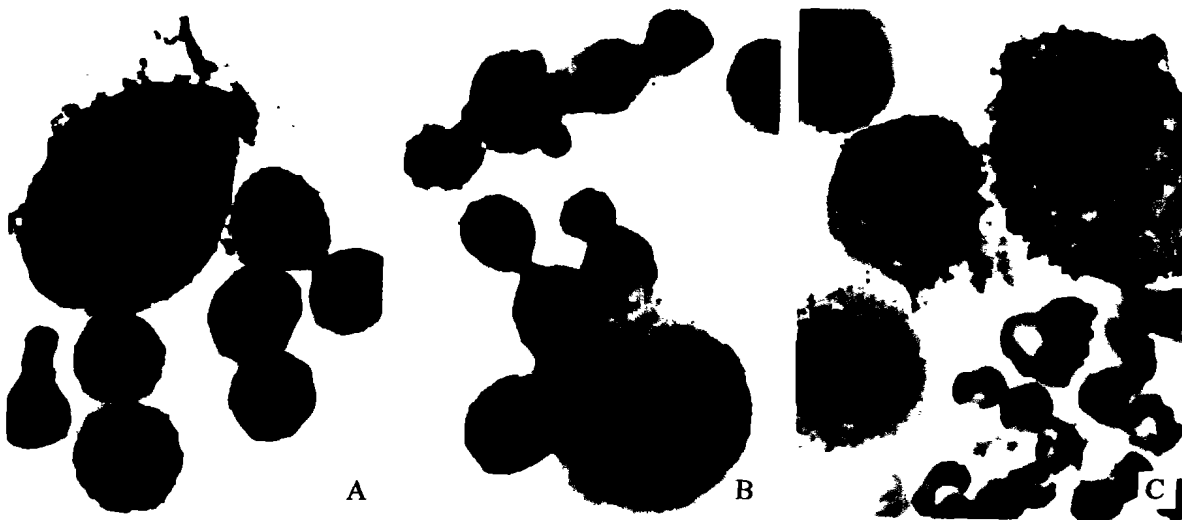


图 1 集落细胞形态学

Fig. 1 Morphology of colonies.

A, Granulocyte, erythrocyte and megakaryocyte in CFU-Mix(W-G staining); B, Granulocyte and macrophage in CFU-Mix(W-G staining); C, Granulocyte, erythrocyte and megakaryocyte in CFU-Mix(POX staining)