

## 针对不同基因靶位的锤头状核酶对 HBV 的抑制作用研究

李晓娟, 况二胜, 杨复华\*\*

(武汉大学生命科学院, 湖北武汉, 430072)

Inhibition of Hepatitis B Virus Expression and Replication in Cultured Cells by  
Hammerhead Ribozymes Targeted at Different Sites

LI Xiao-juan, KUANG Er-sheng, YANG Fu-hua\*\*

(College of Life sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** The pregenomic RNA, serves as a template for reverse transcription and encodes the reverse transcriptase for *Hepatitis B virus* (HBV) replication, has the energetically flexible secondary and tertiary structures, which may reduce the accessibility of ribozyme. To identify accessible target sites for hammerhead ribozyme, the secondary structure analysis of the full-length HBV pregenomic RNA was analyzed using the newest bioinformatic tools. Screening the accessible sites for ribozyme based on the structures show that the accessible sites located on the encode region of S, C, X genes and almost not on the regulation region or the encapsidation signal( $\epsilon$ ). Thereby three hammerhead ribozymes targeted different sites were designed and transfected into cells to evaluate the catalytically inactivation of HBV gene expression. Experimental results validated that the encoding regions of S, C, X genes were the effective cleavage sites for hammerhead ribozyme and the ribozyme targeted X gene was most potential to inhibit HBV RNA accumulation.

**Key words:** *Hepatitis B virus* (HBV), Pregenomic RNA, Secondary structure, Hammerhead ribozyme

**摘要:** 前基因组 mRNA 是 HBV(*Hepatitis B virus*) 基因表达和复制的重要中间产物, 全长的前基因组 mRNA 分子具有复杂易变的二级结构, 是设计抑制 HBV 的核酶时必须考虑的因素。我们使用多个最新的计算机软件对 HBV 前基因组 mRNA 二级结构进行模拟、分析, 在全面分析核酶的可作用位点的基础上设计三个针对不同基因靶位的锤头状核酶, 并对它们在细胞中对 HBV 的抑制作用进行研究。结果表明在 HBV 前基因组 mRNA 上存在几个高度复杂二级结构的区域, 可能对核酶完全不敏感, 而 S、C、X 基因的编码区是合适的核酶作用位点, 都可达到对 HBV 的有效抑制, 而且 X 基因位点的核酶对 HBV 的各种 mRNA 的抑制作用最为明显, 是设计针对 HBV 核酶时应该优先考虑的位点。

**关键词:** HBV 前基因组 mRNA; 二级结构; 锤头状核酶

**中图分类号:** Q78

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1003-5125 (2004)04-0329-06

乙型肝炎是一种严重危害人类健康的传染病, 在我国每年与乙肝病毒 (*Hepatitis B virus*, HBV) 相关的肝癌和肝硬化死者达数十万。因此对 HBV 有效治疗的研究尤为迫切<sup>[1,2]</sup>。但目前对于乙型肝炎并无确切有效的常规治疗方法。核酶(Ribozyme)是一类具有催化活性的 RNA 分子, 可序列特异地结合并切割靶 RNA, 从而抑制其功能<sup>[3-5]</sup>。核酶作为 HBV 基因治疗手段具有重大的应用前景, 引起人们

广泛的兴趣。但自开始就发现在 HBV 基因组上存在一些对核酶不敏感的位点, 虽然这些核酶在体外反应中可有效的切割底物, 甚至在核抽提物中也作用明显, 但在细胞中对 HBV 并无抑制作用<sup>[6]</sup>。很久以来人们都无法准确预测核酶在细胞和体内的作用。现在人们已认识到底物的复杂空间结构影响核酶对靶位点的接近和切割, 于是开始从靶序列的整体状况考虑核酶的可作用位点: 在全面分析靶序列

收稿日期: 2004-02-10, 修回日期: 2004-03-15

作者简介: 李晓娟 (1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子病毒学。

\*\* 通讯作者: 杨复华 (1946-), 男, 副教授, 研究方向为分子病毒学。Corresponding author. Tel: 027-87684950-9007, E-mail: fhayang@whu.edu.cn

空间结构的基础上鉴定核酶的可作用位点, 或从随机核酶库中筛选有效的核酶<sup>[7-9]</sup>。对 HBV 前基因组 mRNA 的核酶有效作用位点的研究已经有了一些很好的进展。本研究是利用一些最新的分子生物学分析工具全面分析了 HBV 全基因组 mRNA 的二级结构和锤头状核酶的可作用位点, 据此设计三个分别针对不同基因位点的核酶, 并在细胞水平证实了其对 HBV 的有效抑制作用, 为将核酶应用于肝细胞靶向性乙肝基因治疗奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 RNA 二级结构预测和核酶设计

根据文献<sup>[1]</sup>编辑全长为 3299bp 的 ayw3 型 HBV 前基因组 mRNA 序列, 然后用 WDNAsis, mFOLD3, RNAstructure 等软件按能量最低原则分析其二级结构和核酶易接近位点<sup>[10]</sup>。用 GENDOC 软件进行 HBV 全基因组序列多序列对比, 分析 HBV 基因组中保守位点。然后用 OligoWalk 扫描核酶的靶位点和 RNAdraw 模拟核酶与长靶序列的形成正确的活性核酶二级结构, 核酶设计部分可参照文献<sup>[11]</sup>。

### 1.2 质粒和靶向性核酶的构建

在 pBR322 的 *EcoRI* 位点插入两个拷贝头尾相连的 HBV 全基因组 (3182bp, ayw3 型) 的质粒 pTHBV 由本室保存。

经过筛选确定的针对 HBV 前基因组 1750(S)、3050 (X)、343 (C) 基因位点的三对核酶引物对分别退火、延伸、5' 末端磷酸化后, 插入到表达绿色荧光蛋白 GFP 和真核抗生素 *zeocin* 融合基因的真核表达载体 pTracerSV40 (Invitrogen) 的 *EcoRV* 位点, 得到相应的核酶表达质粒 pTracerS1, pTracerC4, pTracerX3, 引物见表 1, 这些质粒可从两个不同的启动子同时表达绿色荧光蛋白和核酶 (见图 1), 通过荧光显微镜和流式细胞计数器对 EGFP 绿色荧光

表 1 核酶构建所用引物

Table 1 Primers for ribozyme constructs

Ribozyme	cleavage sites*	primer (5' → 3')	Arm length(R/L)
RzS	1750	GATAAAACGCCGCACTGA	13/14
		TGAGTCCGTGAGGAC (FP)	
		TCGCTGGATGTGTTTCGTC	
		CTCACGGACTCAT (RP)	
RzX	3050	TCAAGGTCGGTCGTCTGA	14/15
		TGAGTCCGTGAGGAC (FP)	
		GACTCTCAGCAATGTTTCG	
		TCCTCACGGACTCAT (RP)	
RzC	343	AACATTGACATAGCTCTGA	15/15
		TGAGTCCGTGAGGAC (FP)	
		CAGGGAATTAGTAGTTTC	
		GTCTCACGGACTCAT (RP)	

\*Position according to the pregenomic RNA

蛋白的检测即可有效地鉴定核酶表达细胞, 具体方法参考文献<sup>[12]</sup>。构建的核酶经测序证实。

### 1.3 细胞, 培养条件及转染

人肝癌细胞株 Huh-7 和稳定转染 HBV 的肝癌细胞株 HepG2215 由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。细胞在含 10% 胎牛血清 (杭州, 四季青) 的 DMEM (GIBCO BRL) 中, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培养。转染采用 LipofectAMINE2000<sup>TM</sup> 转染试剂 (GIBCO BRL) 按说明书进行, 共转染时核酶表达质粒和 pTHBV 质粒的摩尔比为 5:1。每样品每次平行 3 孔。转染后 48h 培养基中加入 200 μg/mL *zeocin* 抑制未转染细胞生长, 同时统计 5 个不同视野的荧光细胞数和细胞总数以计算转染效率。

### 1.4 ELISA 检测 HBV e 抗原

转染细胞培养基经 6,000 × g, 5min 离心后, 上清中分泌型 HBV e 抗原 (HBeAg) 用乙肝 e 抗原酶联免疫检测试剂盒 (上海, 科华) 进行检测。ELISA 检测结果统计自至少三次独立的转染。

### 1.5 RNA 定量分析

采用定量 RT-PCR 的方法确定核酶的表达对 HBV mRNA 表达水平的影响。核酶表达质粒和 pTHBV 共转染 Huh-7 细胞后用 TriPure 分离试剂 (Roche) 分离总 RNA, 经随机引物逆转录后分别对 C 和 X 基因转录产物 PCR 扩增, 扩增 β-actin mRNA 作内对照校正样品量间的差异。控制退火温度使 PCR 得到特异性单一条带, 在 PCR 循环数的优化总发现, C 和 X 基因在 13~16 个循环, β-actin 在 23~26 个循环之间加入模板量与终产物呈线性关系, 严格控制条件终产物误差不大于 ±20%。引物和优化的反应条件见表 2。

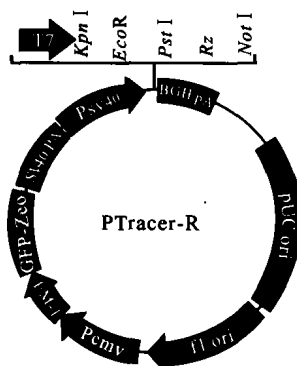


图 1 核酶表达质粒的构建

Fig. 1 Construction of ribozyme expressing vectors

PCR 产物电泳后用凝胶成像系统(Eastman Kodak Co.)成像, 然后用 LabImage version 2.62a 软件(Kapelan GmbH)和 BandScan 4.50 (Glyko)进行光密度分析, 每次电泳设标准含量 DNA marker 对照以确定线性关系。

表 2 RT-PCR 分析所用引物

Table 2 primers used for RT-PCR analysis

Interest gene	Primer (5' → 3')	Denature temperature, °C	Cycle
HBV C gene	GTAACAACAGTA	56	15
	GTTTCCG(R)		
	TGCCCTTCTGACT		
	TCTTTCC(S)		
HBV X gene	GCAGAGGTGAAGCG	68	15
	AAGTGCACACGG(R)		
	TCTGCCGTTCCGGCC		
	GACCACGGGGCG(S)		
β-actin	ATGATATCG CCGCGC	55	25
	TCG (R)		
	CGCTCGGTGAGGATC		
	TTCA (S)		

## 2 结果

### 2.1 乙肝前基因组 mRNA 二级结构分析和核酶可作用位点预测

3299nt 的 HBV 前基因组 mRNA 用 mFOLD3 分析得到 73 个能量相似的二级结构, 能量最小为 -991.18kcal/mol (见图 2a)。WDNAsis 分析得最低能量为 -1492.6kcal/mol 的二级结构 (见图 2b)。因 RNAstructure 和 RNAdraw 无法完成全长序列的结构分析, 将序列分成前后两部分 (每部分为全长的 2/3) 进行分析。对这些结构进行详细分析发现无论哪种结果, 都存在一些结构复杂和结构简单的区域, 而且基本一致。这些结构大致可分成三个结构域, 每个结构域的序列单独就可形成相同的二级结构, 结构域之间基本不存在相互干扰 (具体结构未列出)。图 2c 为 RNAstructure 分析第一个结构域得到 4 个能量相近的结构中的最低能量结构。将结构域与 HBV 编码基因进行对比, 发现复杂结构区域大都位于基因的调控序列, 基因 S、C、X 编码区的结构相对要简单得多。这可能与基因表达的调控和 HBV 基因组上的增强子所必需的空间结构相关。

核酶作用需要与靶序列形成特定的空间结构, HBV 前基因组 mRNA 高度折叠的空间结构可阻止核酶与靶位点接近, 阻碍核酶活性结构的形成, 从而抑制针对该区域的核酶的作用。因此 HBV 前基因组 mRNA 高度折叠区域不适合作为核酶作用的

位点。而对于结构简单或单链区域核酶就很容易接近并形成活性核酶结构, 如图 1a 的主干茎环位置、图 1c 的单链部分。经分析发现 S、C、X 基因编码区的二级结构简单, 而 ε 序列和基因表达的调控区基本都是具有复杂和稳定结构的区域, 没有可供核酶容易接近的位点。

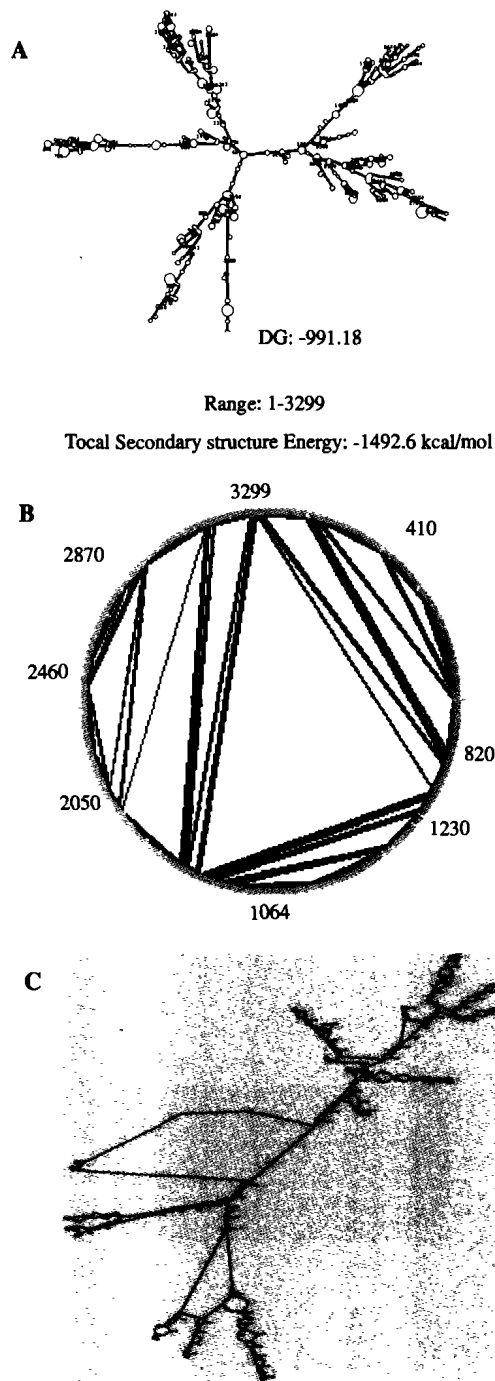


图 2 HBV 前基因组 mRNA 二级结构

Fig. 2 The secondary structure of HBV pregenomic mRNA. The secondary structure of 3299nt HBV pregenomic mRNA was analyzed by several bioinformatic tools. These are the minimum free energy structure predicted by mFOLD(A), WDNAsis(B) and the first 1/3 part of pregenomic RNA by RNAstructure(C).

接下来我们仔细分析在 HBV 前基因组 RNA 上核酶的可能作用靶位点。为保证设计的核酶能切割所有的 HBV 基因型，我们在 GenBank 中每一基因型选取 2~3 个完全基因组序列用 GenDoc 软件进行多序列对比，选择保守的核酶作用位点（未公布结果）。经分析共得到 19 个符合上述原则的核酶作用位点（见图 3），这些作用位点都分布于 S、C、X 基因的编码区内，在 ε 序列和基因表达的调控区内基本没有核酶作用位点。

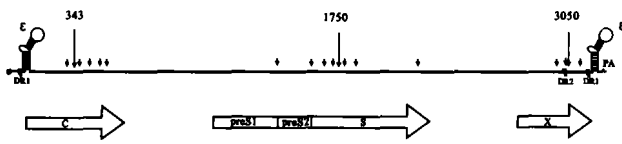


图 3 HBV 前基因组 RNA 的锤头状核酶切割位点预测  
Fig. 3 The predicted cleavage sites for hammerhead ribozymes within the pregenomic RNA

The arrows indicate the positions of cleavage sites. Three hammerhead ribozymes targeted 1750(S), 3050(X), 343(C) were designed to inhibit HBV expression and replication(see below).

### 2.2 核酶设计

在上述 19 个核酶位点中选择可以针对所有 HBV 亚型、保守性最好和核酶最有可能有效作用的 HBV 前基因组 mRNA 1750 (S)、3050 (X)、343 (C) 基因位点作为本实验的核酶靶位点。用 RNA draw 模拟核酶和相应的靶序列结构域的相互作用时结果显示核酶两臂每端 9nt 可形成正确的核酶结构，但 6nt 或更短时不能形成。核酶的最新研

究表明长反义臂的锤头状核酶在细胞内比短臂核酶为有效，并且长臂很明显比短臂更能有效地结合长底物 mRNA<sup>[5]</sup>。HBV 前基因组 mRNA 结构极其复杂且有可能结合较多的蛋白，同时考虑到细胞内的核酶切割前后对底物的有效转换，故将核酶臂长选定为 Tm 值小于 37℃ 的最大长度（见表 1），以利于切割后核酶与底物的快速转换。

### 2.3 核酶对 HBV mRNA 的抑制作用

将针对 HBV 前基因组不同靶位的结构相同的核酶与 pTHBV 共转染 Huh-7 细胞，以确定核酶的抑制效果，pTracerSV40 与 pTHBV 共转染 Huh-7 细胞作为对照。考虑到共转染效率对 HBV 抑制效果的影响，在共转染时核酶表达质粒和 pTHBV 的摩尔比为 5 : 1，以期达到较高的共转染效率。转染后 72h 统计荧光细胞数和细胞总数校正转染效率。提取细胞总 RNA，转录产物用 RT-PCR 扩增后电泳，光密度分析确定线性范围后进行相对定量。核酶抑制效率计算方法为： $(1 - [\text{signal}_{Rz} / \text{signal}_{\text{control}}] / [\text{GFP}\%_{Rz} / \text{GFP}\%_{\text{control}}]) \times 100$ 。与对照相比，实验测得核酶 RzS, RzC, RzX 下调 C 基因转录本 43.6%, 54.3%, 50.8%，下调 X 基因转录本 37.8%, 59.8%, 55.9%（图 4B）。受共转入两种质粒的细胞占转入 pTHBV 的细胞的比例影响，这一抑制效果低于核酶实际抑制率，即核酶实际抑制率比实验所测还要高得多。作用位点不同的核酶都能通过切割前基因组 RNA 达到对 HBV 转录的抑制（图 4A）。总的抑制效果存在一些差别，其中针对 X 位点的核酶效果最好（图 4B）。

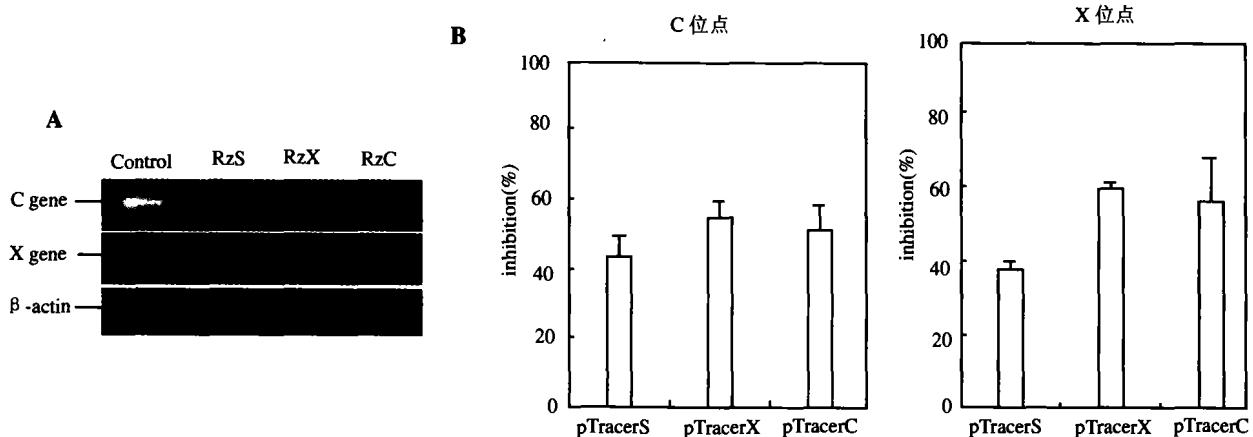


图 4 核酶对 HBV 转录的抑制效率

Fig. 4 The ribozyme has inhibition on HBV transcription.

1μg pTHBV was transfected with 2μg pTracerSV40 or vectors expressing RzS, RzX and RzC. A: Semiquantitative RT-PCR analysis of C and X mRNA expression in pTracerSV40 control and ribozymes, relative to that of β-actin as an endogenous control. Representative pictures of PCR bands are shown. B: Inhibition percentages calculated from densitometry. Values in the graph were obtained from four independent experiments.

### 2.4 核酶对 HBeAg 表达的影响

由于分泌型 HBeAg 是 HBV 活跃复制的标志物，

可作为乙肝复制是否受到抑制的指标。在瞬时表达和稳定整合了乙肝二倍体基因组的肝癌细胞系

Huh-7 和 HepG2215 细胞中, (共) 转染核酶表达质粒 72h 后考察细胞内源性表达核酶对乙肝 HBeAg 表达和分泌的影响, 模拟核酶对 HBV 刚感染时和 HBV 感染后基因组整合到宿主基因组的抑制效果。用 ELISA 法检测转染细胞培养液中 HBeAg 的相对含量 (Ag), 以 pTracerSV40 转染组为对照, 计算瞬时表达的核酶对 HBeAg 表达的影响。计算方法为:  $(1 - [Ag_{Rz}/Ag_{control}]/[GFP\%_{Rz}/GFP\%_{control}]) \times 100\%$ 。核酶 RzS、RzX、RzC 使共转染 pTHBV 的 Huh-7 细胞上清中 HBeAg 的量分别下降 16.26%、32.90%、26.36%。核酶 RzX 的抑制效果强于 RzS、RzC (如图 5 左), 同时瞬时表达的核酶使稳定整合 HBV 基因组的 HepG2215 细胞中上清中分泌 HBeAg 分别下降 26.80%、28.10%、30.33% (如图 5 右)。这与 RT-PCR 的结果基本相符。在相同时间点与对前基因组 mRNA 抑制效率比较, 核酶对 HBeAg 的抑制率较低, 可能是由于蛋白分泌稍晚于基因转录和比 mRNA 更稳定所造成的。由于脂质体转染肝癌细胞系 Huh-7 和 HepG2215 细胞的效率受到一定的限制, 我们实验中核酶的抑制效果明显低于核酶的实际抑制效果, 更接近实际状态的抑制效率可通过稳定转染或病毒载体介导等方式得到。

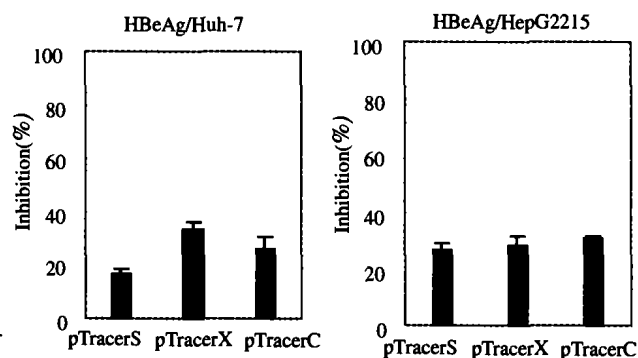


图 5 核酶对细胞培养上清中 HBeAg 水平的抑制

Fig. 5 HBeAg levels inhibition of ribozymes in cell culture supernatants.

After transfection, cell culture supernatants were analyzed for HBeAg levels. Results were expressed as percent inhibition compared with pTracerSV40, expressing variations were corrected by  $\beta$ -actin assay. Left, co-transfection with pTHBV and three ribozyme expression vectors in Huh-7 cells. Right, transfection with three ribozyme expression vectors in HepG2215.

### 3 讨论

目前针对 HBV 的核酶设计中尚未见从 HBV 全长基因组考虑设计的报道, 而是只针对 HBV 的部分区域。我们使用多个最新的计算机软件对全长 HBV 前基因组 mRNA 二级结构进行模拟、分析, 在全面分析 HBV 的保守序列和核酶可作用位点的

基础上得到 19 个锤头状核酶的可作用位点, 选择其中三个针对不同基因靶位的最佳位点设计锤头状核酶, 并对它们在细胞中对 HBV 的抑制作用进行研究。

核酶应用研究已经进行了很多年, 但直到现在并没有完全了解核酶作用的影响因素, 也无法准确预测人工设计的核酶在细胞内的作用<sup>[3-5]</sup>。针对 HBV 的核酶研究中出现多次不成功的报道<sup>[6]</sup>, 直到现在核酶设计仍然存在许多不确定的因素。但人们已经开始认识到靶序列的空间结构严重影响核酶的进入和作用, 在设计核酶时必须全面考虑靶序列的复杂结构<sup>[7-9]</sup>。我们应用多个最新的分子生物学分析工具详细的分析 HBV 前基因组 mRNA 的二级结构和预测核酶的作用位点。通过对 RNA 二级结构的分析发现 HBV 前基因组 mRNA 中存在几个高度稳定的二级结构区域, 这些区域处于乙肝基因表达的调节序列, 可能与基因转录调节和增强子所需的结构相关, 而 S、C、X 基因的编码区没有太复杂的二级结构, 相对来说处于比较暴露的位置, 是核酶和反义 RNA 容易作用的位点。人们已从另外的途径对 HBV 前基因组 mRNA 上核酶的有效作用位点进行研究, 用随机核酶库筛选的有效抑制 HBV 的核酶<sup>[7-9]</sup>, 这些大多位于 S、C、X 基因的编码区,  $\varepsilon$  序列和该三基因编码区之间存在核酶完全不敏感的区域。这些结果与我们分析的结果基本一致。因此应用分子生物学分析工具分析和预测靶序列的结构对设计核酶是行之有效的办法。我们用该方法成功地设计了三个针对 HBV 不同靶位的锤头状核酶。

由于 HBV 在细胞中转录多种 mRNA 和前基因组 mRNA, 我们设计的三个核酶对 HBV 不同的 mRNA 的抑制效果有差别。但该三基因为乙肝病毒复制所必需, 因此对任一基因的抑制最终导致对乙肝病毒复制的抑制, 对 HBV 活跃复制的标志物 HBeAg 的抑制效果基本相同。但所有 HBV mRNA 的 3' 端相同, 都含有 X 基因序列, 针对 X 位点的核酶对 HBV 总 mRNA 的切割最为有效。同时 X 基因是 HBV 致肝细胞癌变的主要因子, 可以反式激活很多原癌基因, 因此在选择核酶的作用位点时应该优先考虑 X 基因位点<sup>[13]</sup>。

### 参考文献

- [1] 侯云德. 分子病毒学[M]. 北京: 学苑出版社, 1990.
- [2] 琦祖和, 袁建刚. 乙肝病毒基因表达德调控. 真核基因表达调控[M]. 北京: 高等教育出版社, 1996.

- [3] Lewin A S, Hauswirth. Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine[J]. Trends in molecular medicine, 2001, 7: 221-228.
- [4] Vaish N K, Kore A R and Eckstein F. Recent developments in the hammerhead ribozyme field[J]. Nucleic acids research, 1998, 26: 5237-5242.
- [5] Zhou D M and Taira K. The hydrolysis of RNA: From theoretical calculations to the hammerhead ribozyme-mediated cleavage of RNA[J]. Chem. Rev, 1998, 98: 991-1026.
- [6] Beck J and Nassal. Efficient hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the structured hepatitis B virus encapsidation signal in vitro and in cell extracts, but not in intact cells[J]. Nucleic acids Research, 1995, 23: 4954-4962.
- [7] Putlitz J Z, Yu Q, Burke J M, *et al.* Combinatorial screening and intercellular antiviral activity of hairpin ribozymes directed against hepatitis B virus[J]. J Virol, 1999, 73: 5381-5387.
- [8] Bergeron L J and Perreault J P. Development and comparison of procedures for the selection delta ribozyme cleavage sites within the hepatitis B virus[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30: 4682-4691.
- [9] Pan W H, Devlin H F, Kelley C, *et al.* A selection system for identifying accessible sites in target RNAs[J]. RNA, 2001, 7: 610-621.
- [10] Ljunggren K K, Zuker M, Hofacker I L, *et al.* The hepatitis B virus pregenome: prediction of RNA structure and implications for the emergence of deletions[J]. Intervirology, 2000, 43: 154-164.
- [11] Lu C (陆长德), Chen N (陈农安), Qi G (祁国荣). Computer analysis of the cleavage reaction of hammerhead ribozyme[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1996, 28(3): 279-285.
- [12] Kuang E (况二胜), Yang F (杨复华), Wen S (温淑娟), *et al.* Construction and in vitro activity of specific dual-ribozyme against  $\alpha_1(I)$  and(III) procollagen genes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2002, 18(3): 67-71.
- [13] Weinberg M, Passman M, Kew M and Arbutnot P. hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells[J]. J Hepatology, 2000, 33:142-151.