

RNA 干扰抑制人乙型肝炎病毒复制的研究*

张正茂¹, 田拥军¹, 孟忠吉^{1,2}, 雷延昌¹, 李新宇^{1,2}, 王宝菊¹, 杨东亮^{1**}

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院临床免疫研究室, 湖北武汉, 430030; 2. 邵阳医学院附属太和医院感染科, 湖北十堰, 442000)

Inhibition of Hepatitis B Virus Replication *in vitro* and *in vivo* by RNAi

ZHANG Zheng-mao¹, TIAN Yong-jun¹, MENG Zhong-ji^{1,2}, LEI Yan-chang¹,
LI Xin-yu^{1,2}, WANG Bao-ju¹, YANG Dong-liang^{1**}

(1. Division of Clinical Immunology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Taihe Hospital of Yuyang Medical Collage, Shiyan 442000, China)

Abstract: In this study, psiHBs was constructed through the backbone of psiRNA-vector to transcribe a small hairpin RNA(shRNA) corresponding to the messenger RNA of the HBV small surface antigen. After transfection of HepG2 cells or Balb/c mice with psiHBs and pHBV1.3, a plasmid containing 1.3-genomic-length replicative-competent HBV DNA, the viral antigens were evaluated by ELISA, Western blotting, or immunohistochemistry and the viral replicative intermediates were detected by Southern hybridization. The data indicated that after transfection of HepG2 cells with pHBV1.3 and psiHBs, the HBsAg and HBeAg levels were reduced by over 90%, and the replicative intermediates in cells were decreased to 10% relative to control. In hydrodynamic injection mouse model, Balb/c mice were co-injected with pHBV1.3 and psiHBs. The HBsAg levels in mice sera were reduced by 80% relative to the control group, whereas the number of HBcAg positive hepatocytes in the mouse liver sections was decreased substantially by 75.1%. Our study showed that shRNA inhibits the HBV replication and gene expression substantially and effectively. The RNAi-based approach might become a potential and novel tool for medical therapeutics in the future.

Key words: RNA interference; shRNA; *Hepatitis B virus*; Hydrodynamic injection mouse model

摘要: 采用表达 shRNA 的载体构建了表达针对病毒 HBsAg mRNA 保守区的 shRNA 的质粒 psiHBs, 利用细胞模型和高压注射小鼠模型评价 RNA 干扰对 HBV 复制和基因表达的抑制作用。通过 Western 印迹检测细胞内的 HBsAg, 用 ELISA 检测细胞培养上清和血清中的 HBsAg, 采用 Southern 印迹检测 HBV 的复制中间体, 最后通过免疫组化的方法检测肝组织切片中 HBcAg 的表达情况。结果显示 pHBV1.3 和 psiHBs 共转染 HepG2 后, 与对照组相比病毒 HBsAg 和 HBeAg 的表达和病毒复制中间体的水平下降了 90% 以上, 并且 shRNA 的作用效率存在序列特异性和剂量依赖性。在高压注射小鼠模型中, psiHBs 表达的 shRNA 使小鼠血清中 HBsAg 的水平下降了 80% 以上, 免疫组化检测显示, 小鼠肝组织内 HBcAg 阳性细胞数减少了 75.1%, 而且 shRNA 的抑制作用至少能持续 4d。研究显示载体表达的 shRNA 无论是在细胞或是在小鼠模型中都能对 HBV 的复制和基因的表达发挥序列特异性的抑制作用。本研究为我们下一步实现由 RNAi 介导的基因治疗提供了理论和技术支持。

关键词: RNA 干扰; shRNA; 乙型肝炎病毒; 高压注射小鼠模型

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)04-0348-05

乙型肝炎病毒 (*Hepatitis B virus*, HBV) 是一种嗜肝 DNA 病毒, 可导致人类急性和慢性肝炎, 在成人感染中约有 5% 发展成慢性, 患者可能经历

无症状或不同期的慢性肝损后发展成为肝硬化或肝细胞癌^[1]。尽管目前重组疫苗具有良好的保护性, 但每年慢性 and 急性 HBV 感染可造成一百万人死亡,

收稿日期: 2006-02-13, 修回日期: 2006-03-16

* 基金项目: 国家教育部博士学科点科研基金 (20030487070); 国家自然科学基金 (30571646)

作者介绍: 张正茂 (1975-), 男, 湖北武汉籍, 博士研究生, 研究方向为病毒感染与免疫。

** 通讯作者: 杨东亮 (1955-), 男, 教授, 博士, 研究方向为病毒感染与免疫。

Corresponding author. Tel: 027-83662894, E-mail: dlyang@tjh.tjmu.edu.cn

在 3.5 亿 HBV 慢性感染患者中, 15%~25% 的患者有罹患晚期肝硬化和肝细胞癌的风险^[2], 所以 HBV 感染仍是全球重要的卫生问题。

目前应用于慢性乙肝的治疗药物主要是干扰素和核苷类似物。在 IFN- α 的治疗中, HBeAg 的转阴率约 30%, 长期使用会出现明显的副作用。拉米夫定是一种口服核苷类似物药物, 通过抑制 HBV 多聚酶的活性而抑制 HBV 的复制。在治疗后可迅速降低血清 HBV DNA 水平, 长期服用能提高转换率, 但也可产生 HBV 耐药性突变株^[2]。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是普遍存在于生物体中的一种序列特异性的基因表达调控方式, 它主要表现为 mRNA 的特异性降解, 引起相应基因的沉默。目前已在哺乳动物细胞中成功发现并诱导了 RNA 干扰过程^[3-10]。我们将 RNAi 应用到 HBV 抗病毒治疗领域, 为实现 HBV 的基因治疗提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

HBV 复制性克隆 pHBV1.3 质粒由本实验室雷延昌博士构建。pCR3.1-HBs 和大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 为本实验室保存。小发卡 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 表达质粒 psiRNA-vector (由美国 Baylor College of Medicine 冯新华教授提供) 含有哺乳动物 H1 启动子, 在转染哺乳动物细胞后可转录出 shRNA。psiHBs 是以 psiRNA-vector 为骨架表达 shRNA 的质粒, 作用靶点位于 HBV 表面抗原 (HBV surface antigen, HBsAg) 的 mRNA, 其靶序列为: 5'-GAATCCTCACAAATACCGCA-3' (HBV Small HBsAg 71~89nt)。piWx1 可表达针对土拨鼠肝炎病毒 X 蛋白 mRNA 的 shRNA, 此段序列与 HBV 无同源性。pXF3H-HBs 为表达 HBs-HA-tag 的真核表达质粒。实验所用细胞 Hela 和 HepG2 细胞为本实验室保存。6 周龄 BALB/c 小鼠购自湖北省卫生防疫站。兔抗 HA 多克隆抗体和 HRP 标记的羊抗兔 IgG 为 Santa cruz Biotechnology 公司产品。Lumi-light 化学发光底物为 Roche 公司产品。LipofectineTM 为 Invitrogen 公司产品。琼脂糖、探针标记试剂盒 Prime- α -Gene Labeling System 购自美国 Promega 公司。GeneScreenPlus 尼龙膜为 NEN 公司产品。X-ray 胶片为柯达公司产品。复方氯化钠溶液 (Ringer's) 为双鹤药业公司产品。ELISA 试剂盒为上海科华公司产品。³²P-dCTP 购自北京福瑞公司。

1.2 Hela 细胞和 HepG2 细胞的培养及转染

Hela 细胞和 HepG2 细胞用含 10% 新生牛血清 (FCS)、100 μ mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的高糖 DMEM 培养液, 于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养。采用 LipofectineTM 对细胞进行转染。将细胞接种于 12 孔培养板, 培养 18~20h 后, 加入质粒 DNA 和脂质体 6h 后换为 DMEM 完全培养基。

1.3 PAGE 电泳及 Western blotting 检测

每孔细胞用 200 μ L 预冷 PBS 冲洗后, 加 200 μ L 1 \times SDS Loading Buffer 裂解细胞, 将裂解物沸水浴 10min, 以 12 000r/min, 取上清上样至 SDS-PAGE 系统中电泳分离。电泳完毕后通过半干转印将蛋白质转印至硝酸纤维素膜上, 经过封闭、一抗和二抗孵育后加 Lumi-light-A/B 混合液反应 5min。然后用 X 胶片曝光。

1.4 细胞或组织中总 DNA 的提取

贴壁细胞用 1.9mL 预冷的匀浆缓冲液裂解后, 再入 8 μ L 蛋白酶 K (20mg/mL) 和 100 μ L 100g/L SDS 充分混匀。在 50 $^{\circ}$ C 孵育 3h, 然后用酚/氯仿抽提, 异丙醇沉淀 DNA。最后用 25~30 μ L TE 缓冲液充分溶解 DNA, 贮存于 4 $^{\circ}$ C 备用。

1.5 HBV 放射性探针标记及 Southern Blotting 分析

标记模板的制备: 取含 HBV A 基因型全长质粒 (克隆位点为 *EcoR* I) 用 *EcoR* I 酶切, 琼脂糖凝胶电泳后, 回收 3.2kb HBV 片断, 然后按 Prime- α -Gene Labeling System (Promega) 操作说明书对探针进行标记。

在 TAE 电泳缓冲系统中用 10g/L 的琼脂糖凝胶分离 DNA 样本, 用碱性转移体系通过毛细作用将 DNA 转移至尼龙膜。次日取下尼龙膜于 120 $^{\circ}$ C 烤膜 30min 固定。然后对膜进行预杂交 4h 和杂交过夜。洗涤后将膜置滤纸上吸干水分后夹在胶片夹中, 然后固定 X 胶片, 置 -70 $^{\circ}$ C 放射自显影 72h。

1.6 动物实验

选 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 体重 14~16g。每组 5 只, 将 13 μ g pHBV1.3 质粒加上 10 μ g psiHBs 质粒或 psiRNA-vector 空载体, 加入 1.6mL Ringer's 液中, 通过尾静脉注入小鼠体内。注射后第 1、2、3、4d 眼眶采血, 分离血清。注射后第 4d 处死小鼠取肝脏, 部分肝组织用福尔马林固定, 其余肝组织液氮冻存。

1.7 HBsAg 和 HBeAg 的检测

细胞培养上清中的 HBsAg、HBeAg 和小鼠血清中的 HBsAg 采用科华公司的 ELISA 试剂盒检测。细胞培养上清取 50 μ L 用于 ELISA 检测，而小鼠血清以 1:100 倍稀释后用于 ELISA 检测，用经过纯化和定量的血源 HBsAg 检测值绘制标准曲线。

1.8 免疫组织化学检测

小鼠肝组织用中性福尔马林液固定，常规石蜡包埋，经切片、脱蜡、微波修复抗原，3%过氧化氢消除内源性过氧化物酶活性后，用正常二抗同源血清封闭，依次加入一抗、二抗及二氨基联苯胺(DAB)显色，苏木素复染，常规脱水、透明封片，镜下观察，记录 HBcAg 阳性细胞的个数并计算其百分比。

2 结果

2.1 RNAi 作用靶点的选择

在 RNAi 作用靶点的选择上，我们采用了 Ambion 公司 (www.ambion.com) 和 Dharmacon 公司 (www.dharmacon.com) siRNA 在线设计软件对靶基因进行分析，在获得了软件提供的靶序列后，再根据 Reynolds 等人^[1]发表的靶点设计评价标准，对候选的靶位点进行逐一评价，最后选取累计分值最高者。确定的靶序列为：5'-GAATCCTCACAATACCGCA-3'，位于 HBV 小 S 蛋白编码区 71~89nt 处。

2.2 shRNA 介导的 RNAi 的剂量依赖性试验

将不同浓度的 psiHBs 和 1.0 μ g 的 pXF3H-HBs 共转染 Hela 细胞，转染后的第 48h 收集细胞和培养上清，通过 ELISA 和 Western blotting 评价 psiHBs 的作用效率图 1。实验结果显示，转染 psiHBs 后 Hela 细胞培养上清和细胞内 HBsAg 的表达水平均显著降低，呈现剂量依赖性。低剂量的 psiHBs (25ng) 对 HBsAg 的表达无明显的抑制效果。当 psiHBs 的剂量增为 50ng 时，细胞培养上清中 HBsAg 的水平变化不明显，但此时的 Western blotting 检测显示，细胞内 HBsAg 的水平已出现明显下降。当 psiHBs 的剂量大于 400ng 时，ELISA 和 Western blotting 结果均显示细胞培养上清中或细胞内的 HBsAg 含量显著降低，抑制率达 95% 以上。

2.3 shRNA 作用特异性的检测

将 1 μ g psiHBs 质粒、空载体 psiRNA-vector 或非相关 shRNA 表达质粒 piWx1 与 1 μ g pHBV1.3 共转染 HepG2 细胞，转染 48h 后，通过 ELISA 检测培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 的表达量。结果显示，与空白组相比，在空载体和非相关 shRNA 表达载体共转染组中，HBsAg 和 HBeAg 的表达受到轻微的抑制，

其原因可能是共转染时 pHBV1.3 的转染效率受到影响，同时也不能排除空载体和非相关 shRNA 表达载体产生了一些未预测到的效应，这种现象将作进一步探讨。与空载体和非相关 shRNA 表达载体共转染组相比，RNAi 处理组中，HBsAg 和 HBeAg 的表达受到 HBV 序列特异 shRNA 的显著抑制 (图 2)。

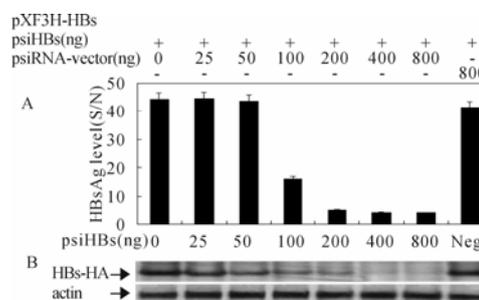


图 1 RNA 干扰效应的剂量依赖性试验

Fig.1 Inhibition of viral gene expression by shRNA in dose-dependent manner

After transfection of Hela cells with pXF3H-HBs and variant amounts of psiHBs, the HBsAg level of media were assayed by ELISA (A), and the HBsAg in the cell lysates were detected by Western blotting (B).

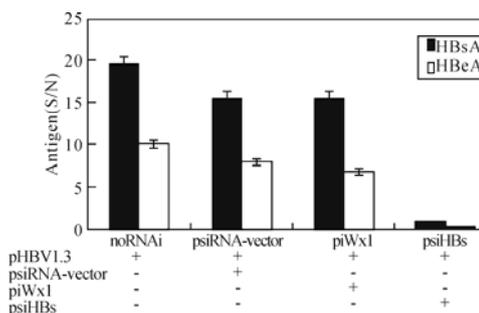


图 2 RNA 干扰效应的序列特异性试验

Fig.2 Inhibition of viral gene expression by shRNA in sequence-specific fashion

After transfection of HepG2 cells with pHBV1.3 and distinct shRNA expression plasmids, the viral antigen expression was substantially suppressed by psiHBs relative to piWx1 and psiRNA-vector treatment.

2.4 shRNA 对 HBV 复制和基因表达的抑制作用

将不同浓度的 psiHBs 与 1 μ g pHBV1.3 质粒共转染 HepG2 细胞，48h 后 ELISA 检测显示，细胞上清中 HBsAg 和 HBeAg 的表达在 psiHBs 的剂量为 50ng 时即受到明显抑制，HBsAg 的表达水平降低 90%，HBeAg 抑制率稍稍低于 HBsAg 的抑制率，其原因可能是 psiHBs 的作用靶分子为 HBsAg mRNA，而不直接影响 HBeAg 的表达。Southern blotting 检测显示，HBV 病毒复制中间体的水平也受 shRNA 的抑制，当 psiHBs 的剂量为 200ng 时，病毒复制中间体的水平出现明显的降低 (图 3)。理论上，病毒 mRNA 的减少会使得病毒蛋白和子代病毒 DNA 同时减少，但试验中却出现了病毒抗原和病毒 DNA 的抑制水平

不一致的情况, 这种现象值得进一步研究。

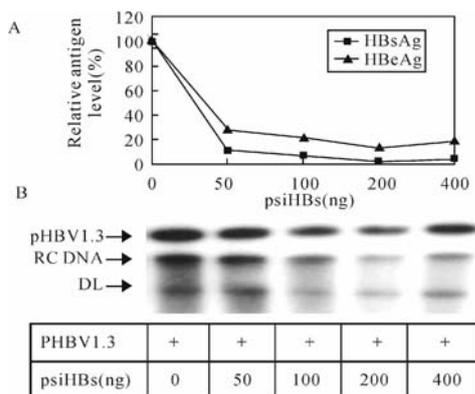


图3 HBV 的复制和基因表达受到 shRNA 的明显抑制
Fig.3 Inhibition of viral replication and gene expression by shRNA

After transfection of HepG2 cells with pHBV1.3 and variant amounts of psiHBs, the viral antigen level in media was assayed by ELISA (A), and the intracellular viral replicative intermediates were detected by Southern blotting (B). (RC DNA: relaxed-circular DNA; DL: Double-stranded linear DNA)

2.5 shRNA 抑制 HBV 基因表达的在体检测

水高压注射在体转染的小鼠在注射后第 1、4、7d, 可在小鼠肝脏提取物中检测到 HBV 复制中间

体和 HBV RNA 转录物。HBsAg 在注射后第 1 天即达到 4μg/mL, 第 2d 达到高峰 6μg/mL, 第 3d 又回到第 1d 的水平, 然后逐渐下降, 至第 10d 已低于检测试剂最小检出值。在第 5d, 出现抗 HBsAg 抗体。注射后第 1d, 在小鼠肝组织中便可检测到 HBV 核心抗原 (HBV core antigen, HBcAg) 阳性细胞, 肝组织 HBcAg 表达水平在注射后第 1d 达到峰值 (约 5%), 并维持在较高水平持续到注射后第 7d, 到注射后第 20d 消失^[12]。

在实验组中, 我们将 13μg pHBV1.3 质粒与 10μg psiHBs 质粒或空载体 psiRNA-vector 共注射小鼠。注射后第 1、2、3 和 4d, 通过 ELISA 检测小鼠血清 HBsAg 的表达水平, 在第 4 天取小鼠肝脏, 通过免疫组化检测肝组织中 HBcAg 的表达情况。结果显示, 与空载体处理组相比, psiHBs 质粒处理组的小鼠血清中 HBsAg 降低了 80% 以上, 肝内 HBcAg 阳性的细胞数降低了 75.1%, 说明病毒基因的表达受到 shRNA 的显著抑制, 并且这种抑制水平至少能持续 4d (图 4)。

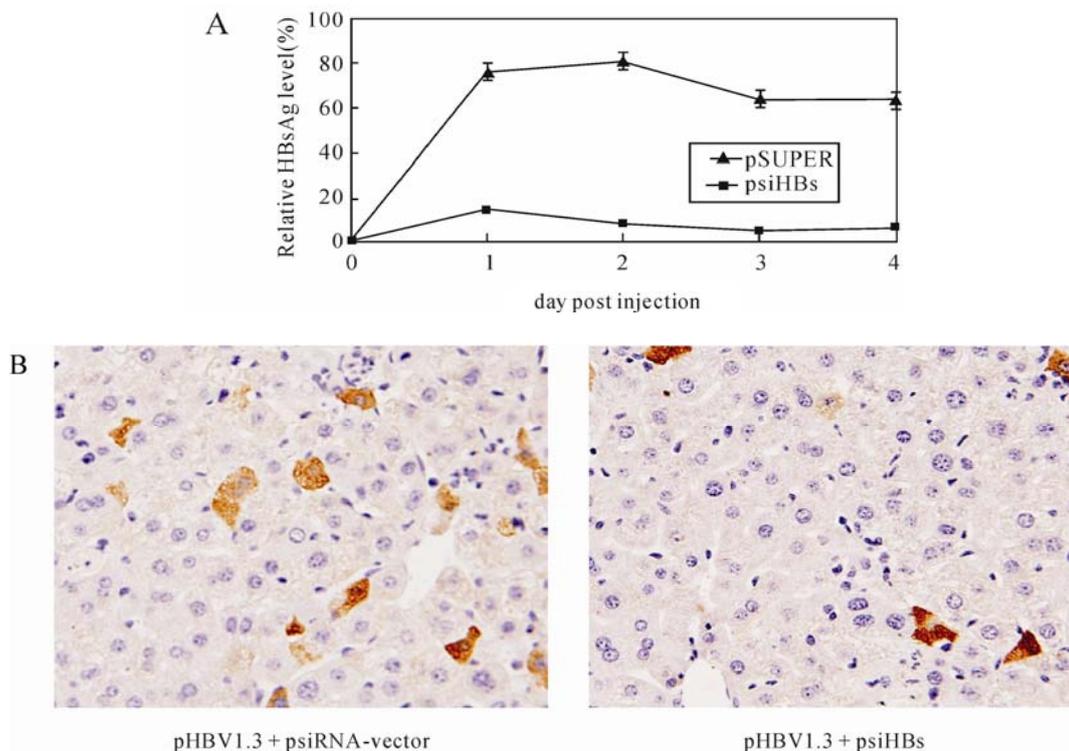


图4 小鼠肝脏中的 HBV 基因表达受到 shRNA 的显著抑制

Fig.4 Inhibition of viral gene expression by shRNA in mouse liver

A: At consecutive four days after co-injection of mice with pHBV1.3 and psiHBs, the HBsAg level in mice sera were assayed by ELISA. B: At day 4 after co-injection, mice were sacrificed and HBcAg expression in mice livers was detected by immunohistochemistry.

3 讨论

HBV 感染是全球重要的卫生问题^[1]。目前应用

于慢性乙肝治疗的药物主要是干扰素和核苷类似物。长期使用 IFN-α 会出现明显的副作用, 导致肝脏严重失代偿, 特别是在肝硬化患者中较为明显。

尽管长期服用拉米夫定能提高转换率,但也可产生 HBV 耐药性突变株,三年的拉米夫定治疗可在 57% 的患者中发现 YMDD 变异。此时虽然病毒水平仍较拉米夫定治疗前低,但可能出现肝脏的损伤 [13,14]。

为了寻求更为特异更为高效的分子治疗手段,我们将目光投向了新发现的“RNA 干扰”现象。RNAi 作用的特异性基于 siRNA 与靶 mRNA 的碱基互补。由于病毒的前基因组 RNA (pgRNA) 既是负链 DNA 的合成模板又是核心蛋白和病毒多聚酶的合成模板,所以 pgRNA 是子代病毒产生的基础。又因为病毒 S 基因与病毒多聚酶基因部分重叠,所以将 RNAi 的靶点设在小 HBsAg 基因的内部,使其能降解病毒的三种 mRNA (3.5-、2.4-和 2.1-kb),抑制子代病毒产生。

试验中使用的 psiRNA-vector 质粒上携带有的哺乳动物 H1 启动子。在启动子的下游将靶序列按照“正义链—间隔区—反义链”的形式排列构建了 psiHBs 质粒,其转录产物可形成回折的茎—环结构 [15, 16], 即 shRNA。在体外试验中,对 shRNA 效应的特异性和剂量依赖性进行了检测。在 HBV 体外复制模型中,将 shRNA 与 pHBV1.3 共转染 HepG2 细胞,HBV 的基因表达受到显著抑制,细胞上清中 HBsAg 的表达水平降低了 90%, HBeAg 的抑制率达到 85% 以上,并且 shRNA 对二者的抑制作用均呈剂量依赖性。细胞总 DNA 的 Southern blotting 检测显示,HBV 病毒复制中间体水平也受到 shRNA 的抑制。在在体试验中,将 pHBV1.3 与 psiHBs 或空载体 psiRNA-vector 以水高压注射的方式共注射小鼠,注射后的第 1、2、3 和 4d 通过 ELISA 检测小鼠血清 HBsAg 的表达水平,通过免疫组化检测肝组织中 HBeAg 的表达情况。结果显示,与共注射空载体组相比,小鼠血清中 HBsAg 和肝内 HBeAg 的表达水平受到 shRNA 的显著抑制,而且 shRNA 的抑制作用至少可持续 4d。以上研究显示,shRNA 能在哺乳动物细胞中有效诱导 RNAi 过程,并且其作用具有序列特异性和剂量依赖性。

RNAi 技术为 HBV 感染的治疗提供了崭新的策略。由于 RNAi 特异地作用于靶基因,而且没有明显毒副作用,其应用于 HBV 感染的治疗具有明显的优势。初步的研究结果显示,载体表达的 shRNA 可以在细胞和小鼠模型中对 HBV 的复制和基因的表达发挥序列特异性的抑制作用。本项研究为下一步实现由 RNAi 介导的基因治疗提供了理论和技术方面的支持。

References

- [1] http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whoedscsrlyo2002_2.pdf.
- [2] Kao J H, Chen D S. Global control of hepatitis B virus infection [J]. *Lancet Infect Dis*, 2002, 2: 395-403.
- [3] Cheng T L, Chang W W, Su I J, *et al*. Therapeutic inhibition of hepatitis B virus surface antigen expression by RNA interference [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336: 820-830.
- [4] Ren G L, Bai X F, Zhang Y, *et al*. Stable inhibition of hepatitis B virus expression and replication by expressed siRNA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335: 1051-1059.
- [5] Yang Z G, Chen Z, Ni Q, *et al*. Inhibition of hepatitis B virus surface antigen expression by small hairpin RNA in vitro [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 498-502.
- [6] Zhang X N, Xiong W, Wang J D, *et al*. siRNA-mediated inhibition of HBV replication and expression [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10: 2967-2971.
- [7] Ni Q, Chen Z, Yao H P, *et al*. Inhibition of human La protein by RNA interference downregulates hepatitis B virus mRNA in 2.2.15 cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10: 2050-2054.
- [8] Liu J, Guo Y, Xue C F, *et al*. Effect of vector-expressed siRNA on HBV replication in hepatoblastoma cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10: 1898-1901.
- [9] 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: 398-404.
- [10] Ying C, De Clercq E, Neyts J. Selective inhibition of hepatitis B virus replication by RNA interference [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309: 482-484.
- [11] Reynolds A, Leake D, Boese Q, *et al*. A Rational siRNA design for RNA interference [J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22: 326-330.
- [12] Meng Z J, Li L, Li X Y, (孟忠吉, 李磊, 李新宇) *et al*. Development of a Mouse Model for Acute Hepatitis B Virus Infection [J]. *Virologica Sinica (中国病毒学)*, 2005, 20: 565-569.
- [13] Lee W M. Hepatitis B virus infection [J]. *N Engl J Med*, 1997, 337: 1733-1745.
- [14] Malik A H, Lee W M. Chronic Hepatitis B Virus Infection: Treatment Strategies for the Next Millennium [J]. *Ann. Intern. Med*, 2000, 132: 723-731.
- [15] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. *Science*, 2002, 296: 550-553.
- [16] Paul C P, Good P D, Winer I, *et al*. Effective expression of small interfering RNA in human cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 505-508.