

## pRNA 介导的 RNA 干扰抑制 HBV 表达和复制的研究\*

张正茂<sup>1</sup>, 田拥军<sup>1</sup>, 杨燕<sup>1</sup>, 王宝菊<sup>1</sup>, 郭培宣<sup>2</sup>, 杨东亮<sup>1\*\*</sup>

(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. Department of Pathobiology and Purdue Cancer Research Center, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA)

### Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by pRNA-escorted siRNA

ZHANG Zheng-mao<sup>1</sup>, TIAN Yong-jun, YANG Yan, WANG Bao-ju, GUO Pei-xuan, YANG Dong-liang<sup>1\*\*</sup>

(1. Division of Clinical Immunology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Department of Pathobiology and Purdue Cancer Research Center, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA)

**Abstract:** The objective of our present study is to explore the potential use of pRNA as a bio-carrier of siRNA to inhibit HBV gene expression and replication. After co-transfected with pHA-HBs into 293T cells, HBVsi18-42, a pRNA-escorted siRNA, suppressed HBsAg and accumulated in the cells in a dose-dependent fashion. HBVsi18-42 substantially inhibited HBV gene expression and replication initiated by pHBV1.3 in HepG2 cells. In hydrodynamic injection mouse model, Balb/cJ mice were co-injected with pHBV1.3 and HBVsi18-42. Serum concentrations of HBsAg were analyzed by ELISA on days 1, 2, and 3 post-injection. HBV core protein in mouse liver was visualized by immunohistochemical staining. The results showed that the HBsAg levels in mice sera were reduced by 60%~90% in consecutive days relative to the control group, and the number of HBcAg positive hepatocytes in the mouse liver sections was decreased substantially by 79.1%. Our preliminary data showed that pRNA could be used as bio-carrier for the delivery of siRNA to knock down HBV gene expression and repress viral replication.

**Key words:** RNAi; pRNA; Hepatitis B virus

**摘要:** 为了研究由 pRNA 携带的 siRNA (HBVsi18-42) 所介导的 RNAi 过程能有效地抑制 HBV 的基因表达和病毒复制, 我们利用细胞模型和高压注射小鼠模型评价 HBVsi18-42 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 含量, 用 ELISA 检测细胞培养上清和小鼠血清中的 HBsAg 水平, 采用 Southern 印迹检测 HBV 的复制中间体, 通过免疫组织化学检测肝组织切片中 HBcAg 的表达情况。试验结果显示, HBVsi18-42 能以剂量依赖的方式在 293T 细胞中抑制 HBsAg 的表达以及在 HepG2 细胞中下调病毒 HBsAg 和 HBeAg 的表达和病毒复制中间体的水平。在小鼠模型中, 注射后的 3d 内 HBVsi18-42 使小鼠血清中 HBsAg 的水平分别下降了 98.98%、77.07% 和 60.73%, 免疫组织化学检测显示, 在注射后的第 3 天小鼠肝组织内 HBcAg 阳性细胞数减少了 79.1%。初步结果显示 HBVsi18-42 无论是在细胞或是在小鼠模型中都能下调 HBV 的复制和基因的表达。本研究为我们下一步实现由 pRNA 介导的靶向 RNAi 及基因治疗提供了理论和技术支持。

**关键词:** RNA 干扰; pRNA; 乙型肝炎病毒

中图分类号: Q7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)06-0599-05

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<sup>[1]</sup>。尽管目前重组疫苗具有良好的保护性, 但每年慢性和急性 HBV 感染仍可造成一百万人死亡, 在

收稿日期: 2006-04-14, 修回日期: 2006-09-08

\* 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 (30271170, 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

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<sup>[2]</sup>, 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治疗的药物主要是干扰素和核苷类似物, 但两者都不能清除体内的病毒, 而且都存在明显的副作用<sup>[2]</sup>。

为了寻求更为特异和高效的分子治疗手段, 我们采用了 RNA 干扰的方法, 但化学合成的 siRNA 会被细胞内大量存在的 RNA 酶降解而表达 shRNA 的质粒或病毒载体又存在整合至宿主基因组 DNA 的可能性。为了克服传统 RNAi 方法存在的不足, 本次试验我们采用细胞和动物模型对 pRNA 携带的 siRNA 在抑制 HBV 基因表达和病毒复制中的应用进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pRNA 是来源于噬菌体 phi29 的一种 RNA 分子, 其功能是介导噬菌体核酸的包装过程, 故名 packaging RNA 简称 pRNA。pRNA 经人工改造后与 siRNA 相连接形成 pRNA-siRNA<sup>[3]</sup>。HBVsi18-42 为携带针对 HBV 的 siRNA 的 pRNA-siRNA, 其靶序列为: 5'-AGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTG-3'。18SRNA 为连接有 18sRNA 的 pRNA, 作为阴性对照。HBVsi18-42 和 18SRNA 均由美国 Purdue University 郭培宣教授合成。实验所用 HBV 复制性克隆 pHBV1.3、表达 HBs 的真核载体 pHA-HBs、大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、293T 细胞和 HepG2 细胞为本实验室保存。6 周龄 BALB/cJ 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。Lipofectine<sup>TM</sup> 为 Invitrogen 公司产品。琼脂糖、探针标记试剂盒 Prime- $\alpha$ -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。<sup>32</sup>P-dCTP 购自北京福瑞公司。

### 1.2 293T 细胞和 HepG2 细胞的培养及转染

293T 细胞和 HepG2 细胞用含 10% 新生牛血清 (FCS)、100U/mL 青霉素、100 $\mu$ g/ml 链霉素的高糖 DMEM 培养液, 于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。采用 Lipofectine<sup>TM</sup> 将 1 $\mu$ g 的 HBs 表达质粒 pHA-HBs 或 HBV 复制性克隆 pHBV1.3 与不同浓度的 HBVsi18-42 以及 400ng 18S RNA 分别共转染 293T

细胞或 HepG2 细胞, 转染试验按试剂说明书进行。

### 1.3 PAGE 电泳及 Western blotting 检测

12-孔板中的细胞每孔用 200 $\mu$ L 预冷 PBS 冲洗后, 加 200 $\mu$ L 1 $\times$ SDS Loading Buffer 裂解细胞, 将裂解物沸水浴 10min, 上样至 SDS-PAGE 系统, 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 (兔抗 HA 多克隆抗体) 和二抗 (HRP 标记的羊抗兔 IgG) 孵育后加 Lumi-light-A/B 混合液反应 5min, 用 X 胶片曝光。

### 1.4 培养细胞总 DNA 的提取

采用 TaKaRa 公司的基因组 DNA 抽提试剂盒提取纯化细胞基因组 DNA。最后用 25-30 $\mu$ 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 基因型单拷贝全长质粒 (克隆位点为 *EcoR* I, 该质粒由德国 Essen 大学陆蒙吉教授赠与) 用 *EcoR* I 酶切, 琼脂糖凝胶电泳后, 回收 3.2kb HBV 片断, 然后按 Prime- $\alpha$ -Gene Labeling System (Promega) 说明书标记探针。

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。次日将尼龙膜于 120 $^{\circ}$ C 烤膜 30min 固定, 预杂交 4h 后杂交过夜。第 3 日依次用 2 $\times$ SSC/含 1g/L SDS、0.5 $\times$ SSC/含 1g/L SDS 和 0.1 $\times$ SSC/含 1g/L SDS 洗涤杂交后的尼龙膜。最后将膜置滤纸上吸干水分后夹于胶片夹中, 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, 每组 5 只。将 13 $\mu$ g pHBV1.3 质粒和 1nmol (约 50 $\mu$ g) HBVsi18-42 或 18SRNA 溶于 1.6mL Ringer's 液, 在 5s 内通过尾静脉注入小鼠体内<sup>[4]</sup>。注射后第 1、2、3d 眼眶采血, 分离血清。注射后第 3d 处死小鼠, 取部分肝组织用于基因组 DNA 抽提和 southern blotting 检测, 其余的肝组织用中性福尔马林液固定, 用于免疫组织化学检测。

### 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 $\mu$ L 用于 ELISA 检测, 小鼠血清以 1:100 倍稀释后用于 ELISA 检测。

### 1.8 免疫组织化学检测

中性福尔马林液固定的小鼠肝组织, 经常规石蜡包埋, 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, 用正常羊血清封

闭, 依次加入兔抗 HBcAg 多克隆抗体 (Dako) 和 HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体, 用 DAB 显色。再经苏木素复染, 常规脱水、透明封片后, 镜下观察记录随机十个视野中 HBcAg 阳性细胞的个数并计算其平均百分比。

## 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, 最后确定靶序列为: 5'-AGG ATTCCTAGGACCCCTGCTCGTG-3'。然后将靶序列交与美国 Purdue University 郭培宣教授合成携带 pRNA 的 siRNA, 并将其定名为 HBV si18-42。

### 2.2 HBVsi18-42 抑制 HBV 表面抗原表达的剂量依赖性试验

将 pHA-HBs 与不同浓度的 HBVsi18-42 共转染 293T 细胞后第 36h 收集细胞, 细胞及其培养上清分别进行 Western blotting 和 ELISA 检测。结果显示 HBVsi18-42 介导的 RNAi 具有剂量依赖性, 低浓度的 HBVsi18-42 (50ng) 对 HBsAg 表达的抑制不明显, 而当 HBVsi18-42 达到 100ng 时, HBsAg 的表达即受到明显抑制。(图 1)

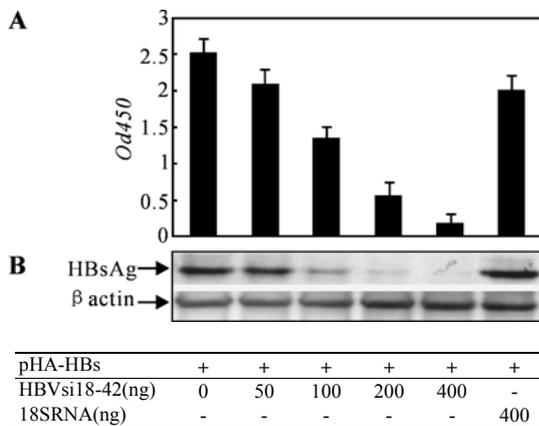


图 1 HBVsi18-42 抑制 HBsAg 表达的剂量依赖性试验  
Fig.1 Inhibition of viral gene expression by HBVsi18-42 in dose-dependent manner

After transfection of 293T cells with pHA-HBs and various amounts of HBVsi18-42, the HBsAg level of media were assayed by ELISA (A), and the HBsAg in the cell lysates were detected by Western blotting (B).

### 2.3 HBVsi18-42 可有效抑制 HBV 的复制和基因表达

将 pHBV1.3 与不同浓度的 HBVsi18-42 共转染 HepG2 细胞后的第 48h 收集细胞培养上清作 ELISA 检测, 通过检测上清中 HBsAg 和 HBeAg 的含量反映 HBV 基因表达水平。将收集的细胞裂解后,

抽提细胞基因组 DNA 作 Southern blotting 检测。结果显示, 当 HBVsi18-42 的浓度达到 50ng 时即可有效抑制 HBV 的蛋白表达, 而 HBVsi18-42 达 200ng 时才对 HBsAg 和 HBeAg 表达有明显的抑制作用。

(图 2) 在 Southern blotting 检测中, 用 400ng HBVsi18-42 与 pHBV1.3 共转染后, 与 18SRNA 处理组相比病毒的复制中间体明显减少。(图 3)

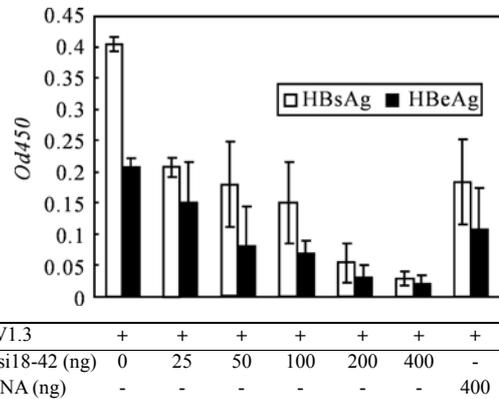


图 2 HBVsi18-42 抑制 HBV 基因表达的剂量依赖性试验  
Fig.2 Inhibition of viral gene expression by HBVsi18-42 in dose-dependent fashion

After transfection of HepG2 cells with pHBV1.3 and variant amounts of HBVsi18-42, the viral antigen expression was detected by ELISA.

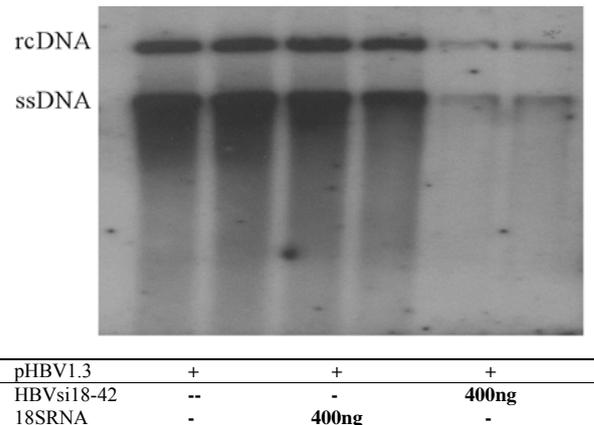


图 3 HBV 复制中间体的水平受到 HBVsi18-42 的下调

Fig.3 Inhibition of viral replication by HBVsi18-42

After transfection of HepG2 cells with pHBV1.3 and 400ng of HBVsi18-42 or 18SRNA, the intracellular viral replicative intermediates were detected by Southern blotting.

### 2.4 HBVsi18-42 抑制 HBV 基因表达和病毒复制的在体检测

在体实验中将 pHBV1.3 质粒与 HBVsi18-42 或 18SRNA 共注射小鼠。注射后第 1、2、3d 小鼠血清 HBsAg 水平的 ELISA 检测显示, 与 18SRNA 处理组相比, HBVsi18-42 处理组的小鼠血清中 HBsAg 分别下降了 98.78%、77.07% 和 60.73%。(图 4A) 在第 3 天取小鼠肝脏, 通过免疫组化检测肝组织中 HBcAg 的表达情况, 结果显示小鼠肝内 HBcAg 阳性的细胞数平均降低了 79.1%, 说明病毒基因的表

达受到 HBVsi18-42 的明显抑制。(图 4B) 另外在小鼠血清的 ELISA 检测中观察到 HBsAg 水平虽受到 HBVsi18-42 的抑制, 但有随时间延长而递增的趋势, 其原因可能在于 pRNA 是一种 RNA 载体在动物体内易被核酸酶降解, 随观察时间的延长 HBVsi18-42 被

逐渐降解, 导致血清 HBsAg 水平有递增的趋势。取小鼠肝组织基因组 DNA 作 Southern blotting 杂交, 结果显示 HBVsi18-42 与 pHBV1.3 共注射小鼠后, 与 18SRNA 处理组相比肝组织中病毒的复制中间体明显减少, 说明病毒的复制受到明显抑制 (图 4C)。

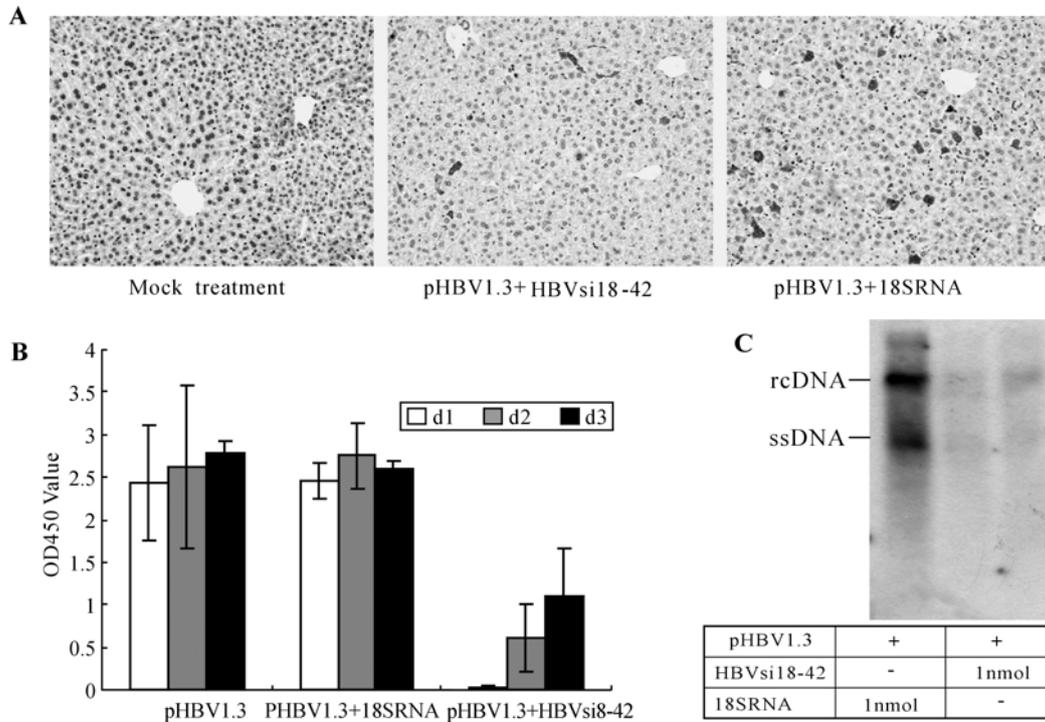


图 4 小鼠血清和肝脏中病毒抗原的水平受到 HBVsi18-42 的明显下调

Fig.4 Suppression of viral gene expression by HBVsi18-42 in mouse serum and liver

At day 3 after co-injection, mice were sacrificed and HBcAg expression in mice livers was detected by immunohistochemistry (A). (magnification  $\times 400$ ) In consecutive three days after co-injection of mice with pHBV1.3 and HBVsi18-42 or 18SRNA, the HBsAg level in mice sera were assayed by ELISA (B). HBV replicative intermediates in mice livers were detected by DNA hybridization. (C)

### 3 讨论

HBV 感染是全球重要的卫生问题<sup>[1]</sup>。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, 但两者的治疗效果欠佳且存在明显的副作用<sup>[5, 6]</sup>。为了寻求更为特异和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。考虑到乙肝病毒的前基因组 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, 这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, 所以我们将 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。传统的 RNAi 技术是通过化学合成的 siRNA 和质粒或病毒载体表达的 shRNA 在细胞内能降解靶 mRNA, 但 siRNA 会被细胞内大量存在的 RNA 酶所降解, 而质粒或病毒载体由于其存在

整合至宿主基因组 DNA 的可能性, 其临床应用也受到局限。此外 RNAi 技术的临床应用受到限制的另一个因素是其缺乏细胞或组织的靶向性, 在动物实验中, 研究者可通过局部注射或水高压注射的方式将 siRNA 输送到靶组织, 但这种方法不适用于临床<sup>[7-9]</sup>。

在此次试验中, 我们采用一种生物载体 pRNA 携带 siRNA 介导 RNAi 过程以抑制 HBV 的复制。pRNA 是来源于噬菌体 phi29 的一种功能 RNA, 由于该 RNA 直接参与了噬菌体 DNA 包装, 因而被命名为包装 RNA (packaging RNA, pRNA)<sup>[10]</sup>。通过人工改造修饰后的 pRNA 能形成一系列长短大小不一的单体、二聚体和三聚体。研究发现这些多聚体不仅可耐受极端 pH 值 (pH4~10) 和极端温差 ( $-70^{\circ}\text{C}$ ~ $80^{\circ}\text{C}$ ), 而且可耐受高盐环境 (2 mol/L MgCl<sub>2</sub> 和 2mol/L NaCl), 并且在一定程度上能耐受 RNase A (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的降解<sup>[11]</sup>。此外, 由 pRNA 携带的针对乙肝病毒 RNA 的核酶能在 HepG2 细胞中

有效地降解 HBV 的 RNA<sup>[12]</sup>。由于 pRNA 分子具有高度的可塑性, 因而由 pRNA 组成的二聚体有可能

携带多种效应分子或同时携带不同的配体或受体分子, 使效应分子具有组织或细胞靶向性(图 5A)。

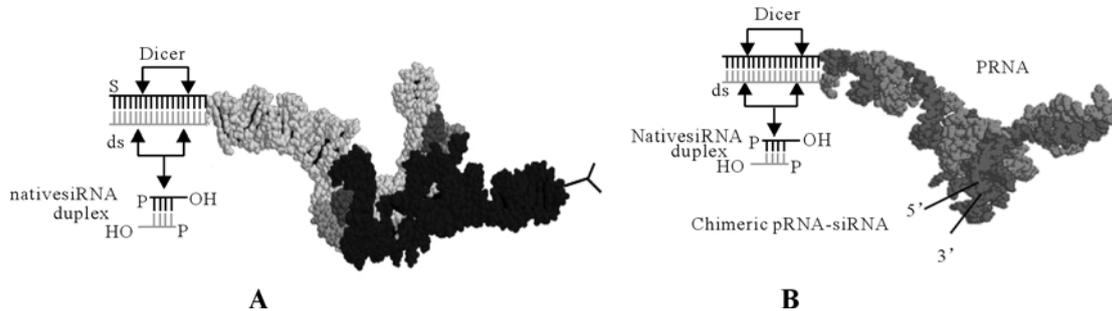


图 5 pRNA 二聚体和单体示意图。

Fig.5 Schematic representation of pRNA dimer and monomer.

Manufactured pRNAs can automatically form the dimers with siRNA conjugated to one part of the dimer and other effector molecules to another. (A) Schematic representation of HBVsi18-42, a chimeric pRNA-siRNA, which can be recognized and processed by endogenesis Dicer to form siRNA. (B)

Guo 等人已经证实 pRNA-siRNA 在细胞内能被内源性的 Dicer 酶切割形成 siRNA<sup>[3]</sup>。为了最终实现抗乙肝病毒治疗中由 pRNA 介导的靶向 RNAi, 我们首先要证实携带 siRNA 的 pRNA 单体 (HBVsi18-42, 图 5B) 能够在细胞中和小鼠体内抑制乙肝病毒的复制和基因表达。试验结果显示, HBVsi18-42 能在细胞中有效抑制 HBV 的抗原表达和病毒的复制且存在明显的剂量依赖性。在急性 HBV 感染小鼠模型中, 我们在处理后的第 1、2 和 3d 对小鼠血清 HBsAg 含量、肝组织中 HbcAg 的表达以及病毒复制中间体的水平进行检测。结果显示, 与对照组相比, 小鼠血清和肝细胞中的病毒蛋白和肝内病毒复制中间体的水平受到 HBVsi18-42 的明显抑制。以上研究显示, HBVsi18-42 能在哺乳动物细胞中有效诱导 RNAi 过程, 有效地抑制病毒的复制和基因的表达, 为我们后续的靶向 RNAi 研究打下了良好的基础。

## References

- [1] [http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB\\_whoocscsrlyo2002\\_2.pdf](http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whoocscsrlyo2002_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] Guo S, Tschammer N, Mohammed S, *et al.* Special delivery of therapeutic RNAs to cancer cells via the dimerization mechanism of phi29 motor pRNA. [J]. *Human Gene Therapy*, 2005, 16: 1097-1109
- [4] Yang P L, Althage A, Chung J, *et al.* Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 13825-13830.
- [5] Lee W M. Hepatitis B virus infection [J]. *N Engl J Med*, 1997, 337: 1733-1745.
- [6] 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.
- [7] McCaffery A P, Meuse L, Pham T, *et al.* Gene expression: RNA interference in adult mice [J]. *Nature*, 2002, 418: 38-39.
- [8] Xia H, Mao Q, Paulson H L, *et al.* siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo [J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20: 1006-1010.
- [9] Ge Q, Filip L, Bai A, *et al.* Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference [J]. *PNAS*, 2004, 101: 8676-8681.
- [10] Guo P X, Erickson S, Anderson D. A small viral RNA is required for in vitro packaging of bacteriophage phi 29 DNA [J]. *Science*, 1987, 236: 690-694.
- [11] Shu D, Huang L P, Hoepflich S, *et al.* Construction of phi29 DNA-packaging RNA monomers, dimers, and trimers with variable sizes and shapes as potential parts for nanodevices [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2003, 3: 295-302.
- [12] Hoepflich S, Zhou Q, Guo S, *et al.* Bacterial virus phi29 pRNA as a hammerhead ribozyme escort to destroy hepatitis B virus [J]. *Gene Ther*, 2003, 10: 1258-1267