

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00295

慢病毒介导基于 microRNA 系统的 HBs RNAi 技术抑制 HBV 复制

罗祥基,程庆保,徐峰*,谭蔚锋,姜小清,张柏和,王红阳,吴孟超

第二军医大学东方肝胆外科医院胆道一科,上海 200438

[摘要] **目的:**构建 HBs 基因 RNAi 慢病毒载体,观察其对 HBV 复制和抗原表达的作用。**方法:**针对已经筛选确定的 HBs 基因 RNAi 有效靶序列,合成靶序列的 Oligo DNA,退火形成双链 DNA,与经 *Mlu* I 和 *Cla* I 酶切后的 pGCLM-GFP 载体连接产生慢病毒载体,PCR 筛选阳性克隆,测序鉴定。用 pGCLM-GFP、pHelper1.0 和 pHelper2.0 质粒共转染包装细胞 293T,包装产生慢病毒,以 293T 细胞 GFP 蛋白的表达水平测定病毒滴度。培养 HepG2.2.15 细胞系,用慢病毒(MOI=1 和 MOI=10)对肝癌细胞进行感染,感染后细胞培养上清进行 ELISA、Western 印迹、HBV DNA 定量分析。**结果:**PCR 和测序结果证实,成功构建 HBs shRNA 的慢病毒载体。包装慢病毒后浓缩病毒悬液的滴度为 $5 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$ TU/ml。慢病毒 HBs RNAi 后,对 HBV 复制和抗原表达的抑制作用显著。感染 4 d 后,抑制效应开始出现,一直持续到第 9 天,抑制效应达到高峰($P < 0.05$)。相对于阴性对照,HBs shRNA 作用后细胞上清中 HBsAg 分泌量下降 70% 以上($P < 0.05$),而 Western 印迹和 real-time PCR 结果进一步证实了上述结果,在蛋白水平和 mRNA 水平都得到了进一步验证。经 HBV DNA 定量,发现慢病毒 RNAi 后 DNA 水平也显著下降($P < 0.05$)。**结论:**成功构建 HBs 基因 RNAi 慢病毒载体,以 HBs 基因为靶点的慢病毒介导的基于 microRNA 系统的 RNAi 技术能有效抑制 HBV 的复制和抗原表达。

[关键词] RNA 干扰;乙型肝炎表面抗原;慢病毒;乙型肝炎病毒

[中图分类号] R 373.21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)03-0295-05

Lentiviral vector-mediated RNA interference of HBs gene inhibits replication of HBV

LUO Xiang-ji, CHENG Qing-bao, XU Feng*, TAN Wei-feng, JIANG Xiao-qing, ZHANG Bai-he, WANG Hong-yang, WU Meng-chao

No. 1 Department of Biliary Surgery, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[ABSTRACT] **Objective:** To construct a lentiviral vector(LV) of RNA interference (RNAi) targeting HBs gene and to observe its effect on the replication of HBV and expression of antigens. **Methods:** The effective sequence of siRNA targeting HBs gene was confirmed in our previous study. The complementary DNA containing both sense and antisense Oligo DNA of the targeting sequence was designed, synthesized and cloned into the lentivirus vector (pGCLM-GFP). The resulting lentivirus vector containing HBs shRNA was named LVshHBs, and it was confirmed by PCR and sequencing. 293T cells were cotransfected with lentivirus vector pGCLM-GFP, pHelper 1.0 and pHelper 2.0. All virus stocks were produced by calcium phosphate-mediated transfection. The titer of virus was tested according to the expression level of GFP. HepG2.2.15 cells were infected with LVshHBs and the supernatant of the cells was subjected to ELISA, Western blotting analysis and HBV DNA quantitative analysis. **Results:** PCR and DNA sequencing demonstrated that the LVshHBs-producing HBs shRNA was successfully constructed. The titer of concentrated virus was $5 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$ TU/ml. The inhibitory effect was efficient and the corresponding viral transcript and expression of antigens were decreased after infection. The inhibitory effect was observed 4 days after infection and peaked 9 days after the initial treatment with RNAi. Secreted HBsAg was reduced by $>70\%$ in cell culture compared with the negative control, which is also confirmed by Western blotting and real-time PCR. After quantification of HBV DNA, the level of DNA relative to the controls was also significantly reduced after RNAi treatment($P < 0.05$). **Conclusion:** The lentivirus RNAi vector of HBs has been successfully constructed. The lentiviral microRNA-based RNAi targeting HBs can specifically mediate the down-regulation of HBs expression, inhibiting HBV replication and antigen expression.

[KEY WORDS] RNA interference; hepatitis B surface antigens; lentivirus; hepatitis B virus

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(3):295-299]

[收稿日期] 2008-08-02 **[接受日期]** 2008-12-19

[基金项目] 上海市科委重点基金(54119519). Supported by Key Program of the Shanghai Science and Technology Committee(54119519).

[作者简介] 罗祥基,副教授、副主任医师. E-mail: xjluo2002@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81875532, E-mail: victorf2255@hotmail.com

近来有不少研究^[1-2]显示在细胞内利用针对 S 基因的小干扰 RNA (siRNA) 可以成功抑制 HBV 复制, 不过这些研究主要采用化学合成或者质粒载体编码发夹状 RNA (shRNA) 方法将 siRNA 导入胞内, 并没有进一步探讨细胞内 HBs RNAi 后对 HBV 相关肝细胞癌 (HCC) 以及对 HBs 的生物学功能的影响。除了上述两种方法以外, 通过 pre-miRNAs 结构也可以携带 siRNA 进入胞内发挥 RNAi 作用, 且更符合体内的生理情况, 相比上述两种方法有更大的优势。迄今为止, 还没有利用 miRNA 骨架携带的 siRNA 抑制 HBs 蛋白的相关研究, 尤其是由 pol II 类启动子启动、慢病毒载体介导 RNAi 技术的相关研究。因此, 本研究首先在进行靶点初步筛选的基础上选取有效靶点构建慢病毒载体, 进行病毒的大规模包装、扩增、浓缩纯化以及滴度测定, 并观察其对 HBs 生物学功能的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 慢病毒包装细胞 293T 由上海吉凯生物公司提供, 慢病毒包装试剂盒购自 Qia-gen 公司, 包括 pGCLM-GFP 载体、pHelper 1.0 (gag/pol 元件) 载体、pHelper 2.0 (VSVG 元件) 载体; Centricon plus20 试剂盒购自 Millipore 公司。大肠杆菌菌株 DH5 α 、DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶 (Invitrogen 公司)。Midi 质粒纯化试剂盒购自 Qia-gen 公司, HepG2.2.15 细胞系由中国科学院上海生化所馈赠。

1.2 慢病毒 HBs RNAi 双链 DNA oligo 的制备 设计寡核苷酸插入片段, 所选择的针对 HBs 蛋白的靶点已经被证实有效, 抑制率达 80%。siRNA 二聚体中的两条链都在单个的 DNA 模板中。结构域长 21 个核苷酸且与目标基因的编码区相对应。这两个结构域能形成反向重复序列被 19 个核苷酸所分开形成 miR-30 发夹茎环。插入片段可通过合成两条互补的寡核苷酸片段, 退火形成, 5'、3' 两端分别含有 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切位点。

1.3 慢病毒 RNAi 载体的构建 经退火形成双链 DNA, 退火反应体系: 5 μ l DNA oligo (sense) 1 μ g/ μ l, DNA oligo (anti-sense) 1 μ g/ μ l, 5 \times Universal Buffer 20 μ l, ddH₂O 70 μ l, 混匀, 90 $^{\circ}$ C 温育 4 min, 70 $^{\circ}$ C 温育 10 min, 缓慢冷却至室温。12% 非变性 PAGE 凝胶检测双链形成效率。将退火产物与经 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切后的 pGCLM-GFP 载体连接, 连接体系如下: 酶切回收的载体 DNA 100 ng/ μ l 1 μ l, 退火的双链 DNA 100 ng/ μ l 1 μ l, 10 \times T4 噬菌

体 DNA 连接酶缓冲液 1 μ l, T4 噬菌体 DNA 连接酶 1 μ l, dd H₂O 6 μ l, 于 4 $^{\circ}$ C 12 h 连接反应, 将连接产物转化到 DH5 α 大肠杆菌。

1.4 PCR 鉴定 挑取重组阳性克隆行 PCR 及测序鉴定 (上海博亚生物技术有限公司)。PCR 体系 (50 μ l): Primer (+) 0.4 μ l (0.1 nmol/L), Primer (-) 0.4 μ l, ddH₂O 15.2 μ l, 10 \times Buffer 2 μ l, dNTPs (2.5 mmol/L) 0.8 μ l, *Taq* 酶 0.2 μ l, 菌落裂解液 1 μ l。PCR 参数: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min。

1.5 DNA 测序鉴定 选择测序鉴定正确的克隆, 接菌, 过夜培养后, 进行阳性克隆质粒抽提, 送测序 (Invitrogen 公司 3730 型测序分析仪测序分析)。

1.6 慢病毒大量包装、纯化、浓缩以及滴度测定

1.6.1 病毒包装、纯化及浓缩 转染前 2 h 将细胞培养基更换为无血清培养基。离心管中加入所制备的各 DNA 溶液 [pGCL-GFP 载体 20 μ g, pHelper 1.0 (gag/pol 元件) 载体 15 μ g, pHelper 2.0 (VSVG 元件) 载体 10 μ g], 与相应体积的 Opti-MEM 混合均匀, 调整总体积为 2.5 ml, 在室温下温育 5 min。取 100 μ l Lipofectamine 2000 试剂在另一管中与 2.4 ml Opti-MEM 混合, 在室温下温育 5 min。将稀释后的 DNA 与稀释后的 Lipofectamine 2000 进行混合, 室温下温育 20 min。将 DNA 与 Lipofectamine 2000 混合液转移至 293T 细胞的培养液中, 混匀, 于 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。培养 8 h 后倒去含有转染混合物的培养基, 每瓶细胞加入 20 ml 的 PBS 液, 洗涤残余的转染混合物, 然后倒去。每瓶细胞中加入含 10% 血清的细胞培养基 25 ml, 于 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO₂ 培养箱内继续培养 48 h。收集转染后 48 h 的 293T 细胞上清液。于 4 $^{\circ}$ C, 4 000 \times g 离心 10 min, 除去细胞碎片。以 0.45 μ m 滤器过滤上清液于 40 ml 超速离心管中。再 4 000 \times g 离心, 至需要的病毒浓缩体积。通常需要的时间为 10~15 min。将离心杯从样品收集杯上移开。样品收集杯中的即为病毒浓缩液。将病毒浓缩液移出, 分装后保存在病毒管中, -80 $^{\circ}$ C 长期保存。取其中一管进行病毒生物学滴度测定。

1.6.2 病毒滴度测定 使用逐孔稀释滴度测定法。测定前 1 d 为测定滴度所需的细胞铺板, 每个 96 孔中加 4 \times 10⁴ 个细胞, 体积为 100 μ l。根据病毒的预期滴度, 准备 7~10 个无菌的 Eppendorf 管。在每个管中加入 90 μ l 的新鲜培养基。取待测定的病毒原液 10 μ l 加入到第 1 个管中, 混匀后, 取 10 μ l 加入到第 2 个管中。继续相同的操作直到最后一管。选取所需的细胞孔, 吸去 90 μ l 培养基。加入稀释好的

病毒溶液。放入培养箱培养。24 h 后,加入新鲜培养基 100 μ l。小心操作。4 d 后观察荧光表达情况。荧光细胞数随稀释倍数的增加而减少。数出荧光细胞比例在 10% 左右的孔中的荧光细胞个数。将得到的数值除以相应的稀释倍数就得到了病毒原液的滴度值。进行病毒滴度计算。

1.7 细胞培养及上清定量分析 HepG 2. 2. 15 细胞用 DMEM、10% FBS 培养,置 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO₂ 孵箱中培养,保持饱和湿度。细胞传代后,在 12 h 内进行感染,慢病毒感染细胞时,用尽可能小体积的无血清 DMEM 稀释慢病毒感染 24 h,12 h 时观察细胞状态,如毒性过大则予以换液,然后加完全培养基至正常培养体积。参照细胞计数结果(24 孔板约 2×10^5 左右),采用慢病毒(MOI=1 和 MOI=10)对肝癌细胞系 HepG2. 2. 15 进行感染,感染后细胞培养上清参照试剂盒方法直接进行后续 ELISA、Western 印迹及 HBV DNA 定量分析,分析方法参照试剂盒说明书进行。

1.8 统计学处理 采用 *t* 检验进行均数比较。

2 结果

2.1 慢病毒 RNAi 载体阳性克隆 PCR 鉴定结果 载体酶切后与退火后双链 DNA 连接,连接后转化筛选阳性克隆,质粒抽提后 PCR 方法筛选。阳性克隆质粒抽提琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)与预期一致。PCR 筛选结果(图 2)表明阳性克隆插入片段正确。测序结果(图 3)证实阳性克隆包含所要 HBs RNAi 片段。

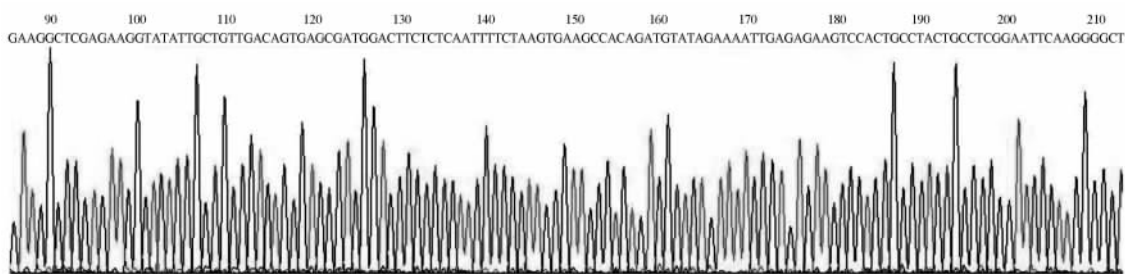


图 3 质粒测序结果

Fig 3 Plasmid identified by sequencing shows the aimed sequence

2.2 病毒滴度测定结果 设荧光细胞比例是 *I*,病毒颗粒数是 *X*,根据公式: $X = I \times M$,其中:*M* 为病毒加入时的细胞总数。设病毒滴度为 *T*,根据公式: $T = X/V$,其中 *V* 为所加入病毒液中含有的病毒原液数(ml 数值)。计算结果表明病毒滴度为 $5 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$ TU/ml。

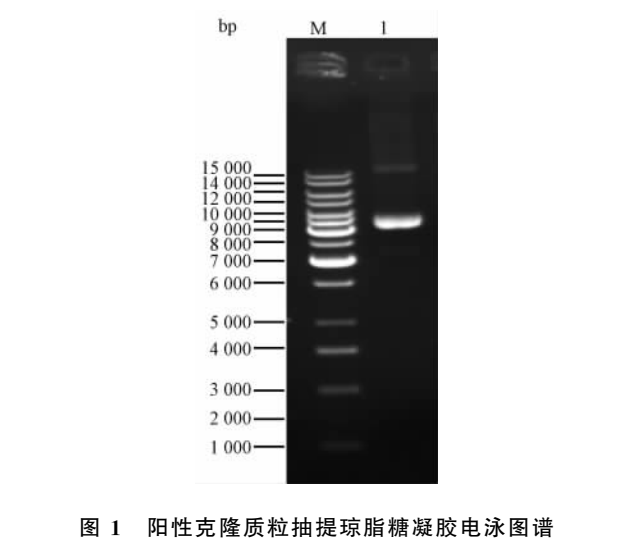


图 1 阳性克隆质粒抽提琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of positive cloning plasmid

M: Marker; 1: Positive cloning plasmid

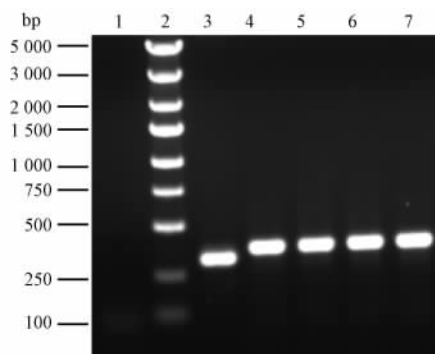


图 2 PCR 鉴定结果

Fig 2 Plasmid identified by PCR

1: Negative(ddH₂O); 2: Marker; 3: Negative(empty vector group); 4: Positive(insert sequence); 5-7: siHBs-1,2,3

2.3 慢病毒介导 RNAi 后在蛋白水平对 HBsAg 的抑制

2.3.1 ELISA 法检测细胞上清 HBsAg 结果 细胞培养上清可以直接进行 ELISA 法检测,选 3 次实验平均值作图(图 4),空白对照设为 1,可见感染第 4 天后 MOI 值为 10 的 RNAi 孔,浓度下降 50% 左右,

第9天下降最为明显,降至阴性对照20%以下($P < 0.05$)。由于HepG2.2.15细胞系内稳定整合的HBV基因组数量没有明确报道,我们推断数量可能较多,所以本实验中MOI值为1的实验孔的抑制效果不明显(图4、图5)。

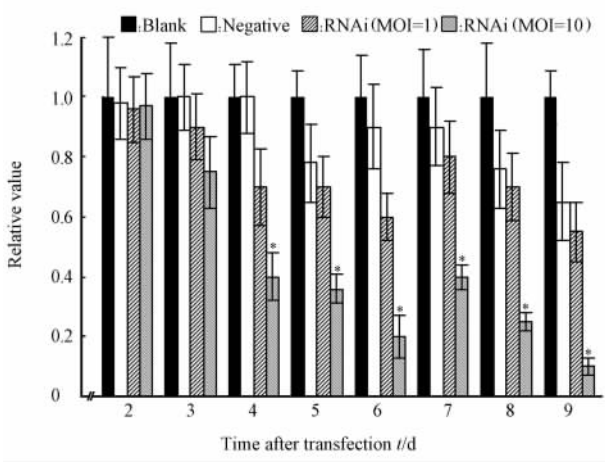


图4 慢病毒 HBs RNAi 对 HepG2.2.15 细胞 HBsAg 表达的影响
 Fig 4 Inhibition of HBsAg in HepG2.2.15 cells after HBs RNAi treatment
 * $P < 0.05$ vs blank group; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3.2 Western 印迹检测细胞内 HBsAg 表达抑制情况 细胞分为4组: HBs RNAi 组 (siHBs, MOI=1)、HBs RNAi 组 (siHBs, MOI=10)、阴性对照和空白对照组,细胞感染方法同前,置 CO₂ 孵箱 24 h 后,加完全培养基至正常培养体积,以后 24 h 换液 1 次,取第 5 天样本实验,采用 Western 印迹和 real-time PCR 检测 RNAi 后的效果。细胞裂解液进行 Western 印迹实验前均用 BCA 试剂盒进行总蛋白定量测定,上样量 80 μg/道。Western 印迹结果(图 6)所示,MOI 值为 10 组表达下降明显;而 MOI=1 组、阴性对照以及空白对照组的蛋白表达相比较均无明显变化。

2.4 慢病毒介导 RNAi 后 HBsAg RNA 水平的变化 根据 ELISA 和 Western 印迹结果,可以明确慢病毒介导的 RNAi 技术可以在蛋白水平对 HBsAg 进行有效的抑制,抑制效率在 HepG2.2.15 细胞系可以达到 70% 以上。为进一步明确其确切的作用途径,本研究进一步采用 real-time PCR 方法测定了细胞内 HBV 复制过程中 3 种 RNA,即 3.6、2.4、2.1 kb 的 RNA 含量,实验方法证实 RNA 水平干扰效果在 50% 以上,抑制效果不如蛋白水平显著,但可以与蛋白水平相互印证($P < 0.05$, 图 7)。

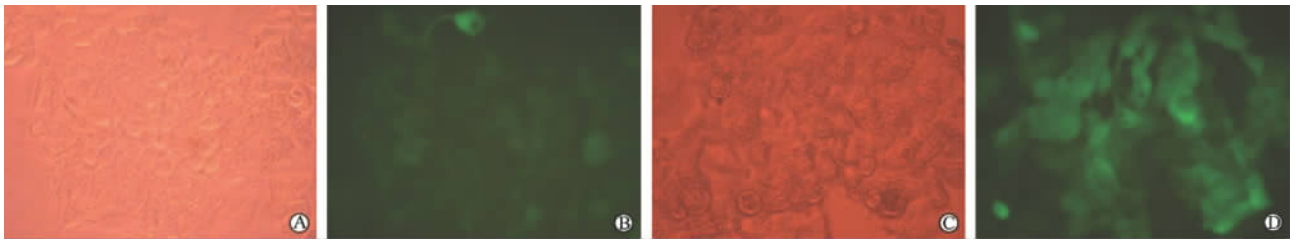


图5 不同 MOI 值的抑制效果
 Fig 5 Inhibitory effects of LVshHBs at different MOI values

A, B; MOI=1; C, D; MOI=10. When the multiplicity of infection (MOI) was 10, the infection efficiency of lentivirus-GFP was above 90% after 96 h. Original magnification: $\times 200$

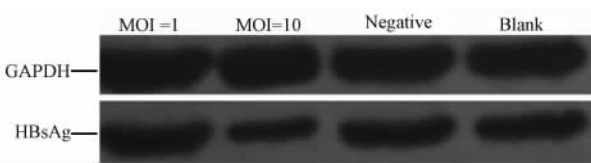


图6 Western 印迹检测 HepG2.2.15 细胞 HBsAg 的表达
 Fig 6 Results of HBsAg expression in HepG2.2.15 by Western blotting after HBs RNAi

(P 均 < 0.05), 阴性对照以及空白对照组相比较均无明显变化。

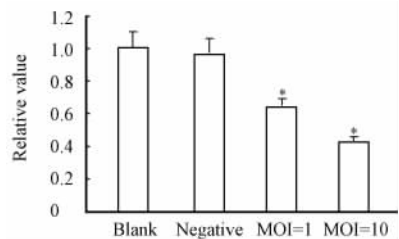


图7 Real-time PCR 检测各组 RNA 相对含量
 Fig 7 Results of real-time PCR after HBs RNAi in different groups
 * $P < 0.05$ vs blank group; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.5 慢病毒 RNAi 后细胞培养上清中 HBV DNA 水平的变化 为进一步观察病毒复制水平的变化,本研究对细胞培养上清中 HBV DNA 含量进行了测定,结果如下(图 8): MOI=10 组 DNA 表达下降显著,MOI=1 组的 DNA 表达也有下降

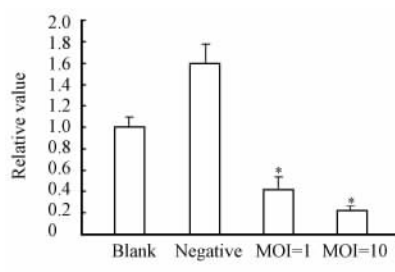


图8 细胞培养上清 HBV DNA 含量测定结果

Fig 8 Supernatant HBV DNA levels after HBs RNAi in different groups

* $P < 0.05$ vs blank group; $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

本研究中所用的载体系统是基于 microRNA 的慢病毒 RNAi 载体系统, 由 pol II 类启动子启动, 经研究证实该载体系统可以在单拷贝 (MOI=1) 的情况下发挥有效抑制作用^[4-6]。本研究所构建的慢病毒基于人的免疫缺陷病毒 (HIV), 是一种非常有效的慢病毒载体, 因为它已经进化成一种能够感染辅助性 T 淋巴细胞和巨噬细胞, 以及将自身基因组整合到宿主细胞基因组中, 稳定整合后可以持续表达 siRNA, 这样就避免了质粒载体或者化学合成 siRNA 方法的时效性短的缺点。

本研究中选用了 HepG2. 2. 15 细胞系作为体外模型, 细胞基因组中稳定整合了 HBV 基因组, 可以表达 Dane 颗粒, 上清中可以检测到 HBsAg 和 HBeAg, 更加符合 HBV 在体内复制的自然状态, 论证力更强。HBV DNA 是稳定整合在细胞基因组上的, 表达更加稳定, 避免了质粒转染的不确定性以及转染效率、抑制作用不宜判断的缺点, 但是由于 HBV 基因组是稳定整合在细胞基因组上的, HBV 表达水平高, RNAi 技术抑制难度大, 蛋白及 RNA 水平抑制效果难以达到 90% 以上, RNA 水平的抑制率在 60% 左右, Ren 等^[7] 通过质粒载体转染 HepG2. 2. 15 细胞, 4 d 后 HBsAg 和 HBeAg 的表达被抑制了 72. 8% 和 55. 8%。

目前, 乙型肝炎病毒与肝细胞癌发生的关系已经在流行病学领域得到了证实, 就 HBV 相关肝细胞

癌而言, 几种病毒基因编码产物的长期表达, 主要是 X 蛋白和 HBs 蛋白的长期表达, 可能通过增加宿主免疫反应的严重程度而参与了癌变过程^[8-9]。

本研究构建了基于 miRNA 的慢病毒 RNAi 载体, 由 CMV 启动子启动, 携带着目前证实最为有效的 HBs RNAi 片段, 为下一步针对 HBs 和 HCC 的研究提供了基础, 也提供了慢病毒 RNAi 研究的平台。

[参考文献]

- [1] Morrissey D V, Blanchard K, Shaw L, Jensen K, Lockridge J A, Dickinson B, et al. Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication[J]. Hepatology, 2005, 41: 1349-1356.
- [2] Morrissey D V, Lockridge J A, Shaw L, Blanchard K, Jensen K, Breen W, et al. Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23: 1002-1007.
- [3] Marrero J A, Fontana R J, Fu S, Conjeevaram H S, Su G L, Lok A S. Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2005, 42: 218-224.
- [4] Tiscornia G, Tergaonkar V, Galimi F, Verma I M. CRE recombinase-inducible RNA interference mediated by lentiviral vectors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 7347-7351.
- [5] Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference[J]. J Virol, 2003, 77: 8957-8961.
- [6] Zhou H, Xia X G, Xu Z. An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi[J]. Nucl Acids Res, 2005, 33: e62.
- [7] Ren X R, Zhou L J, Luo G B, Lin B, Xu A. Inhibition of hepatitis B virus replication in 2. 2. 15 cells by expressed shRNA[J]. J Viral Hepat, 2005, 12: 236-242.
- [8] Grimm D, Streetz K L, Jopling C L, Storm T A, Pandey K, Davis C R, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways[J]. Nature, 2006, 441: 537-541.
- [9] Chan D W, Ng I O. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells[J]. J Pathol, 2006, 208: 372-380.

[本文编辑] 贾泽军