



小鼠体内SEG蛋白靶向运送shRNA抑制狂犬病毒复制

杨瑞梅¹, 王化磊^{2,3}, 郑学星^{2,3}, 单虎¹, 杨松涛^{2,3*}, 夏咸柱^{2,3*}

¹ 青岛农业大学动物科技学院, 山东 青岛 266109

² 军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林 长春 130122

³ 吉林省人畜共患疾病预防与控制重点实验室, 吉林 长春 130122

摘要:【目的】本试验前期已经证实, 用单链抗体(scFv)-绿脓杆菌跨膜区(ETA)-酵母DNA结合结构域(GAL4)表达的蛋白(简称为SEG蛋白), SEG能与含shRNA (short hairpin RNA)的质粒(pRNATU6.3-shRNA)结合形成复合物SEG-shRNA, 并靶向运送该质粒进入感染狂犬病毒(Rabies virus, RV)的细胞, 抑制RV复制。本研究用感染狂犬病病毒的小鼠模型, 进行SEG-shRNA复合物小鼠体内靶向性运送siRNA (short interfering RNA)和抑制RV复制的研究。【方法】用已建立RV CVS-24株小鼠肌肉注射模型进行试验。取50 LD₅₀ CVS-24攻毒, 在攻毒后12 h尾静脉注射SEG-shRNA, 流式细胞仪检测SEG-shRNA的体内靶向性; 同样方法攻毒后, 尾静脉注射SEG-shRNA, 连续4 d, 攻毒后第5天小鼠脑组织用qRT-PCR、RT-PCR、Western blot、免疫荧光染色法检测其中RV的含量; 统计小鼠存活率; 并检测小鼠体内IFN- α 含量, 从而分析SEG-shRNA在体内的抗病毒作用。【结果】结果表明仅在RV攻毒小鼠的注射部位检测到绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达, 未注射RV的腿部及脑、肝、脾、肾均无GFP表达, 说明SEG-shRNA可靶向RV感染细胞运送shRNA。攻毒后第5天脑组织qRT-PCR结果表明靶向药物组比病毒对照组减少4.88倍(3.9/0.8); RT-PCR、Western blot、免疫荧光染色试验结果表明使用SEG-shRNA组病毒量明显少于病毒对照组; 且攻毒后13 d, 动物存活率达50%, 而病毒对照100%死亡。检测小鼠体内IFN- α 未见升高。【结论】以上试验表明SEG蛋白在小鼠体内靶向运送含shRNA的质粒到感染组织细胞; 对小鼠体内RV有明显抑制作用, 因此可以用于狂犬病毒感染的特异辅助性救治研究。

关键词: 狂犬病毒, shRNA, 靶向传递, 小鼠, 动物模型

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由小的双链RNA介导的转录后基因沉默现象, 将RNAi用于治疗的研究越来越多^[1-2]。RNAi的优势在于具有很高的特异性和潜在的基因沉默功能。将小干

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201103032, 201303042)

*通信作者。夏咸柱, Tel: +86-431-86985508, E-mail: xixzh@cae.cn; 杨松涛, Tel: +86-431-86985928, E-mail: yst62041@163.com

收稿日期: 2015-05-07; 修回日期: 2015-05-27; 网络出版时间: 2015-09-11

扰RNA (short interfering RNA, siRNA)作为小分子治疗药物的一个关键问题是将siRNA由细胞膜外运送到细胞质中, 因为不能到达细胞质就无法发挥其干扰作用, 一旦到达细胞质中就可进入RNAi途径, 从而实现序列特异性mRNA降解。许多细胞包括对外界有吞噬活性的巨噬细胞都不能自动吸收siRNA进入细胞, 它们都需要转染试剂或用压力作用使siRNA进入细胞, 常用的转染试剂如脂质体、聚乙烯亚胺(PEI)等对细胞都有毒性, 不适合于体内运送^[3]; 另外用高压的方法使质粒进入会损害细胞膜。早期研究证明用高压法(也叫做流体动力作用)静脉注射迫使siRNA进入细胞。然而流体动力注射可引起右侧心脏衰竭, 不合适在人体中使用^[4]。现已有研究表明用细胞表面受体能介导siRNA进入特定细胞, 从而获得最佳治疗效果、降低药物使用剂量、避免非特异的基因沉默效果^[5-6]。

狂犬病是一种动物源性人兽共患传染病, 人或动物一旦发生狂犬病, 几乎没有治愈的希望。对人而言, 狂犬病控制的基本策略就是暴露后处理(Post exposure prophylaxis, PEP), 即被疑似狂犬病动物咬伤或抓伤后, 根据暴露程度, 按WHO建议的处置程序尽快启动PEP。要求立即清洗处理伤口, 及时注射狂犬病疫苗, 并联合应用抗狂犬病血清或免疫球蛋白进行伤口周围及基底部浸润注射。抗体作为大分子蛋白, 仅能中和细胞外的游离病毒, 而对感染细胞内, 尤其是中枢神经系统内的病毒无能为力。

RNAi现象的发现, 让人们看到了解决上述问题的一丝曙光, 同时也为狂犬病的治疗研究开辟了新的探索领域。靶向运输siRNA到目的细胞是实现其治疗的关键, 也是目前研究的热点^[7-9]。由于siRNA的不稳定性及昂贵的合成价格, 因此选用载体表达短发夹RNA (short hairpin RNA, shRNA), 启动RNAi效应。一般载体表达shRNA作用时间明显比化学合成siRNA长。因此, 本研

究选用质粒pRNATU6.3-shRNA表达shRNA, 该载体表达绿色荧光蛋白(GFP), 观察到GFP可知启动了shRNA的转录; 并且由于质粒易于提取, 可大量获得, 比siRNA成本低。本研究的前期试验已经证实, 用单链抗体(scFv)-绿脓杆菌跨膜区(ETA)-酵母DNA结合结构域(GAL4)表达的蛋白(简称为SEG蛋白), SEG能与含shRNA的质粒(pRNATU6.3-shRNA)结合, 并靶向运送该质粒进入感染狂犬病毒(Rabies virus, RV)的细胞, 抑制RV复制^[10-11]。由于体外培养的细胞与体内生长的细胞仍然存在很多差异, 体外具有抗病毒活性的药物在体内并非起到抗病毒效果, 药物作用于机体是一个非常复杂的过程, 除了药物在机体内吸收、分布及代谢过程外, 还与机体自身的免疫状态密切相关, 是体外试验难以模拟的。本试验将在前述研究的基础上, 以感染狂犬病病毒的小鼠模型, 进行SEG蛋白与表达shRNA的质粒形成的复合物(简称SEG-shRNA复合物)体内靶向性和治疗研究, 以期为SEG-shRNA复合物应用于狂犬病的暴露后治疗乃至发病后治疗积累必要的实验数据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 shRNA、SEG蛋白、病毒: shRNA: 质粒pRNATU6.3-shRNA^[10](文中简称为shRNA)此质粒中增强型CMV启动子后为U6启动子, 启动shRNA转录, 其后为普通CMV启动子表达的绿色荧光蛋白(GFP), 当观察到绿色荧光蛋白, 可判断质粒已转入细胞, 并且启动了shRNA的转录。

SEG蛋白由本室制备^[11]; 狂犬病病毒CVS-24株, 由本实验室保存。

1.1.2 实验动物: 4-6周龄, 13-15 g昆明小鼠, 购自长春生物制品研究所实验动物中心。用狂犬病病毒标准攻击毒CVS-24测得其后腿肌肉注射半数致死量(LD₅₀)为10^{2.0}/50 μ L。

1.1.3 主要试剂和引物：MEM培养基及新生牛血清为Gibco公司产品；FITC标记的抗狂犬病毒核蛋白单克隆抗体由本实验室制备；伊文思蓝为Sigma公司产品；TRIzol Reagent购自Invitrogen公司；One step RT-PCR Kit、dNTPs、SYBR[®] Premix Ex Taq[™]等为TaKaRa公司产品。狂犬病毒N蛋白单克隆抗体由本室制备；山羊抗小鼠IgG-HRP购自博士德生物工程有限公司；IFN- α 定量酶联检测试剂盒购自森雄科技实业有限公司。

小鼠管家基因 β -actin引物及其荧光定量标准品由本室侯小强博士构建。设计并人工合成针对核蛋白基因保守序列的一对引物。N-up: 5'-GCCAAATAGGAACATACATCGTC-3'和N-low: 5'-ATTCAAAGTCAATACTCAGCTGGTC-3', 作为荧光定量RT-PCR扩增的引物。

1.2 SEG体内靶向转运shRNA能力的检测

13-15 g昆明鼠右侧后腿肌肉注射50 LD₅₀的CVS-24狂犬病毒，每组8只，病毒感染12 h后，尾静脉注射SEG-shRNA之后30 h处死小鼠，分别收集小鼠四肢肌肉、脑组织、肝、脾、肾，剪成小碎块后，用0.25%胰酶消化液消化，铜网过滤，轻缓并充分吹打成单细胞后，制备单细胞悬液，用流式细胞仪分析绿色荧光蛋白的含量。

1.3 SEG-shRNA复合物在体内的抗病毒作用检测

1.3.1 小鼠脑组织的收集和处理：将SEG与shRNA按10:1摩尔比混合，总体积为100 μ L，室温孵育50 min，小鼠右侧后腿接入50 μ L 50 LD₅₀/50 μ L的CVS-24，8 h后尾静脉注射SEG-shRNA复合物，每24 h注射1次，连续注射4 d，每个处理组做1组重复，接毒后第5天，一组通过眼球采血，分离血清，处死动物，取出完整脑组织，放入1.5 mL离心管，研磨棒研成浆后，5倍稀释原脑组织，混匀后取300 μ L，分别采用如下述方法检测病毒的RNA水平、病毒抗原蛋白的有无。

另一组继续每天观察并记录治疗后小鼠的发病及死亡情况。

1.3.2 qRT-PCR、RT-PCR检测体内狂犬病毒RNA水平：取上述5倍稀释脑研磨物300 μ L，用Trizol提取核酸，用primer、oligo dT反转录获得cDNA。

RT-PCR：用引物N1：5'-ATAGAGCAGATTTTCGAGACAGC-3'，引物N2：5'-CCCATATAGCATCTCCAACAAAGTG-3'在PCR仪上扩增目的片段，反应参数：94 $^{\circ}$ C 3 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，55 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 20 s，30个循环。同时扩增小鼠 β -actin作为内参照。

Real-time RT-PCR：取cDNA产物1.0 μ L为模板，N-up和N-low为引物，SYBR[®] Premix Ex Taq[™]酶进行real-time RT-PCR。同时进行 β -actin标准品和目的基因标准品扩增，建立双标准曲线。反应结果用公式计算： $F=(\text{样本相对数值}/\text{样本内参照数值})/(\text{对照相对数值}/\text{对照内参照数值})$ ，获得样本相对定量数值。每个样本均进行3次重复。

1.3.3 Western blot检测脑组织中RV N蛋白含量：取上述鼠脑研磨物300 μ L，用1/10体积的TE (pH 8.0)悬浮，加入等体积的2 \times SDS凝胶加样缓冲液(100 mmol/L Tris-Cl pH 6.8，5% β -巯基乙醇，4% SDS，0.2%溴酚蓝，20%甘油)，煮沸10 min，置冰上备用。取20 μ L上样，进行SDS-PAGE。32 V，12.5 h转膜后，用含10%的洗涤缓冲液以1:200稀释一抗(小鼠源狂犬病毒N蛋白单克隆抗体)，37 $^{\circ}$ C反应2 h；再与1:3000倍稀释的二抗(山羊抗小鼠IgG-HRP)反应，37 $^{\circ}$ C反应2 h。用洗涤缓冲液漂洗膜3次，每次10 min。将膜放到辣根过氧化物酶底物液中避光反应3-5 min。显色完成后，将硝酸纤维素膜移至蒸馏水中终止显色。

1.3.4 免疫荧光染色法(DFA)检测脑组织中RV：无菌开颅，以镊子夹取约米粒大小的小脑、脑干组织，置于木质压舌板一端，用载玻片盖压其上，并以拇食指用力紧压，使脑组织形成薄层；室温干燥20-30 min；以预冷至-20 $^{\circ}$ C的80%丙酮水溶液固定30 min，室温下自然干燥约20 min；

以PBS配制含0.01%伊文思蓝的荧光抗体工作液；置37 °C水浴温箱内温育60–90 min，弃染色液，以PBS洗涤3次，每次3 min，自然干燥；荧光显微镜下观察并记录。

1.4 小鼠血清IFN- α 水平的检测

用ELISA试剂盒检测小鼠血清中IFN- α 水平，具体做法如下：标准曲线孔用倍比稀释标准品，设标准孔8孔，每孔加入样品稀释液100 μ L，第一孔加标准品100 μ L，混匀后吸出100 μ L移入第二孔，依次倍比稀释至第七孔，从第七孔吸出100 μ L弃去，第八孔为空白对照；待测样品孔中各加入经10倍稀释的小鼠血清100 μ L；将反应板置37 °C 2 h；用PBST洗板3次，每次3 min；加入第一抗体工作液50 μ L，37 °C 1 h；洗板同前；加入酶标抗体工作液100 μ L，37 °C 1 h；洗板同前；加入底物工作液100 μ L，37 °C暗处反应5–10 min；加入终止液50 μ L，在492 nm处测吸光值。

1.5 统计学处理

采用统计学软件SPSS13.0处理数据，数据以Means \pm SD表示，组间比较采用两独立样本 t 检验，以 $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果和分析

2.1 shRNA在狂犬病毒感染鼠体内的靶向运送结果

于注射病毒后12 h将SEG-shRNA复合物尾静

脉注射入小鼠体内，30 h后处死动物，将鼠四条腿部肌肉、脑组织和肝、脾、肾分别制成单细胞悬液，通过流式细胞仪检测GFP的表达和shRNA的细胞摄取情况。结果表明狂犬病毒感染组小鼠腿部肌肉中检测到明显GFP，未感染组未检测到GFP阳性细胞；同一只感染鼠腿部仅注射狂犬病毒腿部肌肉有荧光，其它3只腿部肌肉无荧光(图1)；小鼠脑组织、肝、脾、肾中无GFP表达，与阴性对照无差异，说明靶向药物未进入其它组织。表明SEG蛋白可以将含shRNA的质粒特异性的转运入病毒感染细胞，具有靶向性。

2.2 SEG-shRNA在体内的抗病毒作用检测结果

2.2.1 qRT-PCR和RT-PCR检测体内病毒RNA水平的结果：昆明鼠后腿肌肉接种RV 50 LD₅₀/50 μ L CVS-24，每只鼠50 μ L，小鼠感染病毒8 h后将SEG-shRNA混合物尾静脉注射入小鼠体内，每天注射1次，连续注射4 d，再经过1 d后，用qRT-PCR和RT-PCR检测处死小鼠鼠脑中病毒RNA的水平。qRT-PCR结果表明(图2)：SEG-shRNA复合物处理组中病毒含量比病毒对照减少4.88倍(3.9/0.8)，表明该复合物对病毒有明显抑制作用；SEG蛋白处理组的病毒含量比病毒对照减少1.18倍(3.9/3.3)，表明SEG蛋白对病毒有一定抑制作用；而用shRNA组病毒含量与病毒对照无明显差异，说明shRNA在无SEG蛋白运转时对病毒几乎无抑制作用。

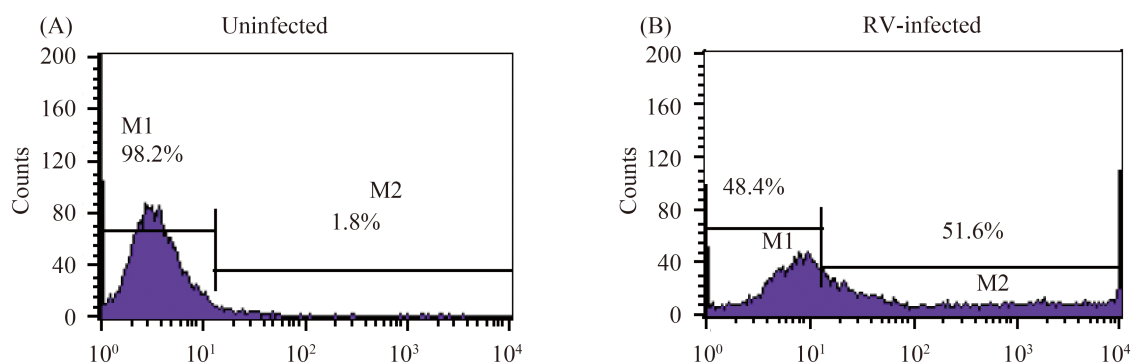


图 1. SEG蛋白靶向运送含shRNA的质粒进入RV感染小鼠肌肉细胞

Figure 1. Plasmid DNA were specifically delivered into RV-positive cells by SEG fusion protein detected by flow cytometric analysis.

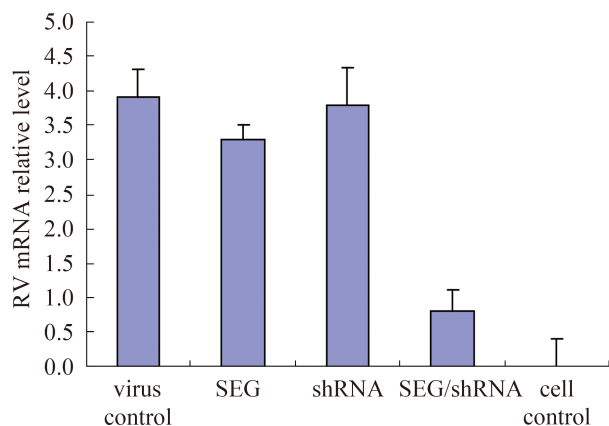


图 2. 荧光定量PCR法检测SEG-shRNA对RV mRNA的抑制效率

Figure 2. SEG-shRNA inhibitory efficiency to RV mRNA measured by quantitative RT-PCR.

RT-PCR结果表明(见图3), 各组 β -actin在同一水平情况下, 仅SEG-shRNA处理组脑部病毒N蛋白mRNA的RT-PCR产物带弱, 其它处理组与病毒对照差异不明显, 说明SEG-shRNA处理组病毒含量减低。

2.2.2 Western blot 检测脑组织中RV N蛋白含量的结果: RV感染的小鼠使用SEG-shRNA, 5 d后处死动物取出脑组织, 进行Western blot检测, 分析病毒的抗原水平。结果显示, 经SEG-shRNA处理脑组织中病毒抗原的带明显弱于病毒对照组, 表明抗原水平明显下降(图4)。

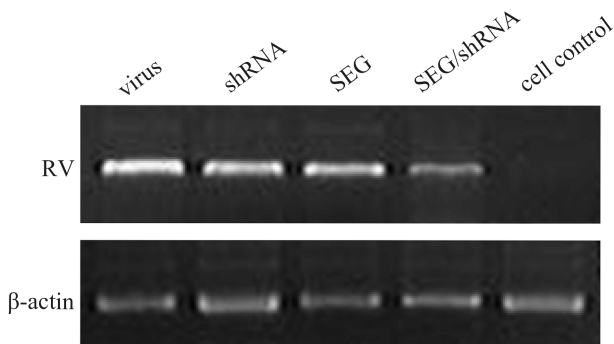


图 3. RT-PCR法检测SEG-shRNA对RV mRNA的抑制效果

Figure 3. RV mRNA level detected by RT-PCR.

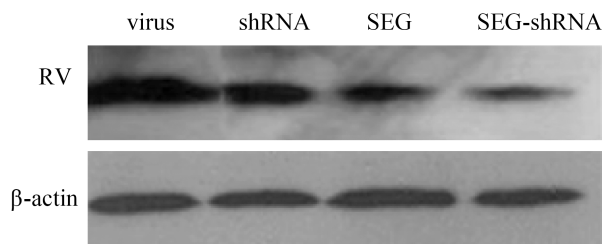


图 4. Western blot 分析小鼠脑组织中RV N蛋白含量

Figure 4. Western blot analysis of mice RV brain tissue nucleoprotein.

2.2.3 免疫荧光染色法检测脑组织中RV含量变化

结果: 为了证实SEG-shRNA处理组对RV有靶向抑制作用, 在上述检测基础上又用鼠脑组织免疫荧光染色法直观观察脑部组织中RV的含量。将不同组鼠脑组织进行免疫荧光染色, 分析病毒的感染和复制水平。结果证明, 给予SEG-shRNA处理, 病毒感染的小鼠脑组织RV荧光灶明显减少, 证明RV感染和复制受到明显抑制(图5)。

2.3 动物生存率的观察

4-6周龄小鼠感染50 LD₅₀/50 μ L CVS-24各50 μ L后, 发病鼠症状为接毒第5天后部分小鼠出现被毛蓬松; 用镊子将鼠尾提在空中时小鼠颤抖; 接毒后6-14 d陆续出现后肢运动丧失协调性, 放在桌面或驱使其运动时出现不稳步态, 直到麻痹、濒死和死亡。

SEG-shRNA处理组发病时间比病毒对照晚24-48 h; 并且shRNA组与病毒对照组第13天小鼠全部死亡, 而SEG-shRNA动物存活率为50% ($P < 0.01$), 表明SEG-shRNA复合物对小鼠有明显保护作用(图6)。

2.4 动物体内IFN- α 水平

体内非特异性的IFN生成可以对病毒感染产生保护性作用, 为了排除这一机制, 我们检测各组小鼠体内IFN水平, 结果显示, 与未给予shRNA的对照组相比, SEG介导的shRNA体内转运并未诱导IFN- α 的产生, 表明在动物体内产生的保护作用

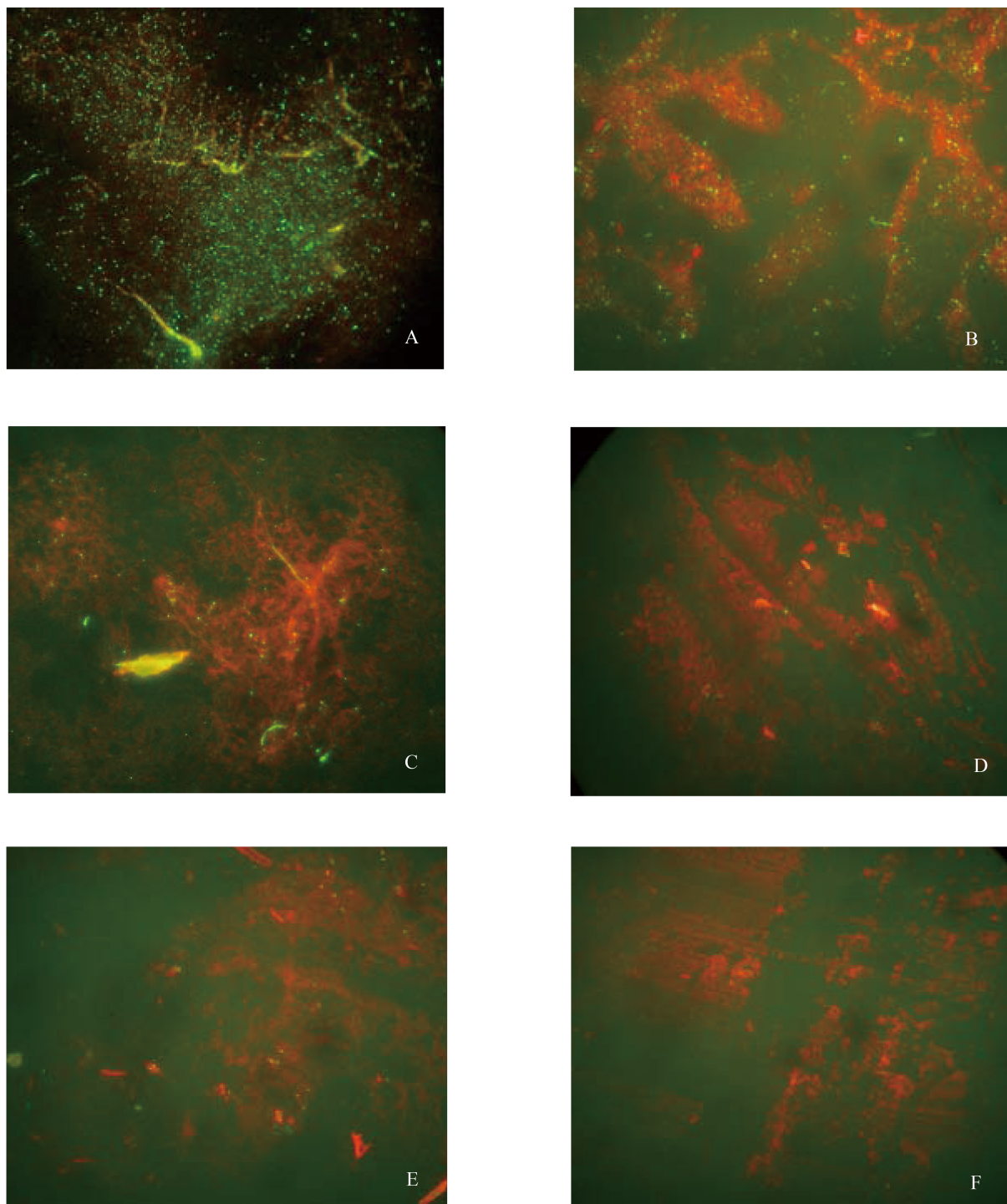


图 5. 感染狂犬病毒小鼠的脑组织直接免疫荧光检测(200 \times , 部分)

Figure 5. DFA detection of brain tissue of mice infected by RV rabies (200 \times , partial). A: Brain smear of a virus control mouse; B: Brain smear of a shRNA injection mouse; C: Brain smear of SEG protein injection mouse; D, E: Brain smear of SEG-shRNA injection mouse; F: Brain smear of a control mouse.

用是由针对病毒特异RNA干扰机制所致。总之，结果显示，SEG可以特异转运shRNA至狂犬病毒

感染的细胞内，并沉默基因的表达，因此可用于狂犬病感染的特异辅助性救治(图7)。

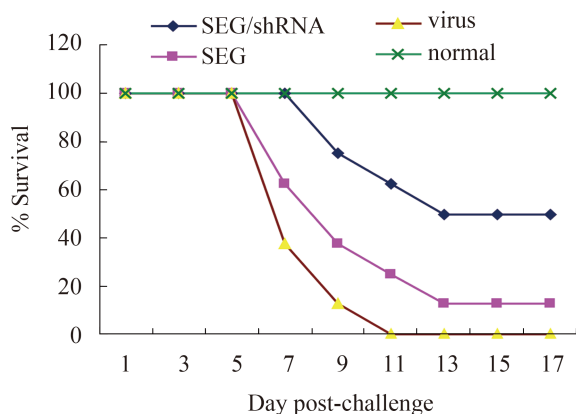


图 6. SEG-shRNA复合物部分保护小鼠抵抗CVS-24毒攻击

Figure 6. SEG-shRNA complexes treatments partially protected mice against lethal challenge with RV CVS-24. The SEG-shRNA groups differ from the negative groups in survival rate ($P < 0.01$) log rank test from one of three separate experiments.

3 讨论

以致病基因为靶点的RNAi技术, 可用于治疗包括肿瘤、感染性疾病和遗传病在内的各种疾病。抗病毒RNAi策略作为治疗方法的应用研究正倍受关注, 有多种基于该策略的方案正在进行临床试验^[12-13]。但治疗性小干扰RNAs正面临着如何在体内被特异和有效地转运到靶细胞的难题^[14-15]。目前以抗体指导的siRNA复合物通过内吞作用进入靶细胞, 特异性地沉默靶基因表达已取得可喜进展, Song等^[16]研究表明用针对HIV-1外膜糖蛋白的抗体片段Fab与鱼精蛋白结合后, 在体内和体外实现靶向运送siRNA, 从而抑制HIV病毒复制; Wen等^[17]用单链抗体转运siRNA, 在体内外均实现对HBV靶向抑制; Li等^[18]用scdsFv介导外源DNA进入肿瘤细胞, 实现对乳腺癌细胞的杀伤。

Murphy等的研究表明^[19], RV在咬伤局部进行小量繁殖, 此期在动物体上表现为潜伏期, 然后病毒传入外周神经纤维, 随后迅速逆行性上传到脊髓和大脑。如果能在感染早期对咬伤部位感染

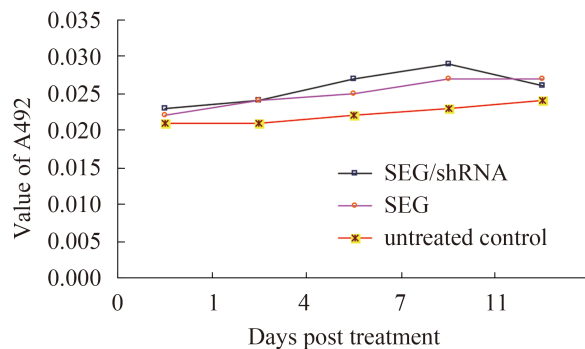


图 7. 动物体内IFN- α 水平检测

Figure 7. RV-infected KunMing mice were tested for IFN- α levels by enzyme-linked immunosorbent assay.

细胞识别或是对神经细胞内病毒识别, 用siRNA抑制病毒, 而不是杀伤细胞, 这对于嗜神经性感染的RV的治疗显得尤为重要。本研究用针对RV G糖蛋白单链抗体特异识别病毒感染细胞, 用绿脓杆菌外毒素跨膜区实现跨膜运转, 以酵母DNA结合结构域GAL4结合含shRNA的质粒DNA, 实现对感染细胞靶向运转。试验结果表明, 当SEG-shRNA尾静脉注射进入小鼠体内。30 h后用流式细胞仪在感染RV的右后腿检测到质粒表达的绿色荧光蛋白(GFP), 其余三条腿部均无GFP, 脑、肝、脾、肾中也无GFP表达, 说明RV标准攻击毒CVS-24注射后, 用SEG-shRNA治疗, 可靶向RV感染细胞运送含shRNA的质粒。此时未在脑组织中检测到GFP表达, 分析原因可能是一则30 h时注射到腿部肌肉的病毒尚未感染到达脑组织, 二则SEG蛋白分子量为57 kDa此分子量的蛋白不能通过血脑屏障进入脑组织中。而在攻毒后连续4 d的SEG-shRNA尾静脉注射治疗组, 小鼠大脑内病毒比对照组减少4.88倍, 是因为SEG-shRNA靶向作用于注射RV的腿部组织及外周神经组织中的感染细胞, 抑制了细胞中病毒的复制, 减少了病毒传入大脑中的数量。

将siRNA从细胞外跨过细胞膜运送至细胞

内, 这是阻碍siRNA发挥功能的关键步骤, 而在体内运送受到更多挑战。最早在体内应用水压力注射siRNA来实现其进入细胞内, 但人使用该法不现实。目前报道的可使用脂质复合物、脂质体、纳米颗粒及胆固醇共价连接进入动物体内, 然而这些方法都不具有细胞型特异性。用抗体介导运送shRNA沉默是高效的, 使用siRNA的量比用胆固醇连接的siRNA要少15倍^[18]。由于我们研究的蛋白-shRNA复合物易于制备, 可用同种试剂来运送多种shRNA。改变scdsFv后, 这种方法可适用于靶向多种不同细胞, 而且该方法在体内易于操作, 本研究显示siRNA运送障碍是可以克服的。由于机体RNA酶的降解作用, siRNA在体外血清半衰期为1 h, 然而, 融合蛋白与siRNA形成的复合物比单独siRNA表现为更长的半衰期, 与融合蛋白结合后可保护复合物中siRNA被细胞质中RNA酶作用, 这在一些研究中均已得到证实^[15]。体内siRNA代谢的一个限速作用是肾脏对单独siRNA的滤过作用^[20], 本研究表明复合物没有被肾脏滤过作用除去。形成的蛋白-siRNA复合物也没有被网状内皮细胞系统如组织巨噬细胞和树突状细胞干扰。

研究表明在小鼠体内SEG融合蛋白可以特异性运送shRNA, 并阻断RV的感染和复制, 有效地控制感染病变, 并且不引起非特异性免疫反应和全身毒性, 有助于RV感染的保护。下一步将对其在动物体内药代动力学特点进一步研究, 并根据siRNA的最新研究进展, 进一步提高SEG-shRNA的药效, 以期为临床应用奠定基础。

参考文献

- [1] Cardoso ALC, Simões S, de Almeida LP, Plesnila N, de Lima MCP, Wagner E, Culmsee C. Tf-lipoplexes for neuronal siRNA delivery: a promising system to mediate gene silencing in the CNS. *Journal of Controlled Release*, 2008, 132(2): 113–123.
- [2] Omi K, Tokunaga K, Hohjoh H. Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Letters*, 2004, 558(1/3): 89–95.
- [3] Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nature Medicine*, 2005, 11(1): 50–55.
- [4] Song EW, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang NT, Min J, Chen JS, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Medicine*, 2003, 9(3): 347–351.
- [5] Chen SY, Khouri Y, Bagley J, Marasco WA. Combined intra- and extracellular immunization against human immunodeficiency virus type 1 infection with a human anti-gp120 antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(13): 5932–5936.
- [6] Chen SY, Zani C, Khouri Y, Marasco WA. Design of a genetic immunotoxin to eliminate toxin immunogenicity. *Gene Therapy*, 1995, 2(2): 116–123.
- [7] Tagalakis AD, Lee do HD, Bienemann AS, Zhou HY, Munye MM, Saraiva L, McCarthy D, Du ZX, Vink CA, Maeshima R, White EA, Gustafsson K, Hart SL. Multifunctional, self-assembling anionic peptide-lipid nanocomplexes for targeted siRNA delivery. *Biomaterials*, 2014, 35(29): 8406–8415.
- [8] Zhou JH, Satheesan S, Li HT, Weinberg MS, Morris KV, Burnett JC, Rossi JJ. Cell-specific RNA aptamer against human CCR5 specifically targets HIV-1 susceptible cells and inhibits HIV-1 infectivity. *Chemistry & Biology*, 2015, 22(3): 379–390.
- [9] Xu W, Pan R, Zhao DY, Chu DF, Wu Y, Wang R, Chen BL, Ding Y, Sadatmousavi P, Yuan YF, Chen P. Design and evaluation of endosomolytic biocompatible peptides as carriers for siRNA delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 2015, 12(1): 56–65.
- [10] Yang RM, Yang ST, Wang CY, Cui Y, Xia XZ. Detection of the interference to the replication of rabies virus by BHK cell strains transcribing shRNA targeted to the N gene. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(3): 315–321. (in Chinese)

杨瑞梅, 杨松涛, 王承宇, 崔燕, 夏咸柱. 靶向狂犬病病毒N基

- 因shRNA抑制狂犬病病毒复制的研究. 畜牧兽医学报, 2010, 41(3): 315–321.
- [11] Yang RM, Cui Y, Yang ST, Wang CY, Shan H, Wang HL, Xia XZ. Targeted inhibition of Rabies Virus replication *in vitro* by single chain antibody domain mediated vector expression shRNA delivery. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(2): 256–262. (in Chinese)
- 杨瑞梅, 崔燕, 杨松涛, 王承宇, 单虎, 王化磊, 夏咸柱. 基于狂犬病病毒G蛋白scFv介导的靶向shRNA制备与鉴定. 微生物学报, 2010, 50(2): 256–262.
- [12] Zhou JH, Li HT, Li S, Zaia J, Rossi JJ. Novel dual inhibitory function aptamer-siRNA delivery system for HIV-1 therapy. *Molecular Therapy*, 2008, 16(8): 1481–1489.
- [13] Zhou JH, Swiderski P, Li HT, Zhang J, Neff CP, Akkina R, Rossi JJ. Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(9): 3094–3109.
- [14] Layzer JM, McCaffrey AP, Tanner AK, Huang Z, Kay MA, Sullenger BA. *In vivo* activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA*, 2004, 10(5): 766–771.
- [15] Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliensky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 2004, 432(7014): 173–178.
- [16] Song EW, Zhu PC, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA, Lieberman J. Antibody mediated *in vivo* delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(6): 709–717.
- [17] Wen WH, Liu JY, Qin WJ, Zhao J, Wang T, Jia LT, Meng YL, Gao H, Xue CF, Jin BQ, Yao LB, Chen SY, Yang AG. Targeted inhibition of HBV gene expression by single-chain antibody mediated small interfering RNA delivery. *Hepatology*, 2007, 46(1): 84–94.
- [18] Li XG, Stuckert P, Bosch I, Marks JD, Marasco WA. Single-chain antibody-mediated gene delivery into ErbB2-positive human breast cancer cells. *Cancer Gene Therapy*, 2001, 8(8): 555–565.
- [19] Murphy FA, Bauer SP. Early street rabies virus infection in striated muscle and later progression to the central nervous system. *Intervirology*, 1974, 3(4): 256–268.
- [20] Contreras JL, Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Thompson JA, Eckhoff DE. Caspase-8 and caspase-3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver in mice. *Surgery*, 2004, 136(2): 390–400.

Targeted inhibition of Rabies virus gene expression by a chimeric multidomain protein mediated shRNA delivery

Ruimei Yang¹, Hualei Wang^{2,3}, Xuexing Zheng^{2,3}, Hu Shan¹, Songtao Yang^{2,3*}, Xianzhu Xia^{2,3*}

¹ College of Animal Science and Veterinary Medicine, Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, Shandong Province, China

² Institution of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130122, Jilin Province, China

³ Jilin Province Key Laboratory for Disease Prevention and Control, Changchun 130122, Jilin Province, China

Abstract: [Objective] In this study, a new chimeric protein SEG expressed in previous work was applied to evaluate its translocating efficiency of shRNA to rabies virus infected cells in mice, meanwhile, the capability of anti-rabies virus was investigated. **[Methods]** Rabies virus strain CVS-24 was inoculated into the hind leg to establish a mouse model of rabies in a dose of 50 LD₅₀; 12 h thereafter the mice were injected intravenously with shRNA-producing plasmid mixed with SEG. To test shRNA delivery, single-cell suspensions from brain, spleen and liver were examined by flow cytometry. Rabies virus in brain tissue of mice was detected by qRT-PCR, RT-PCR, western blot and directed immunofluorescence assay. Mice were monitored for survival and serum samples were tested for IFN- α levels. **[Results]** No green fluorescent protein (GFP) was seen in the spleen or liver, suggesting that SEG allows specific targeting of RV-infected cells. RT-PCR and western blot showed that mice treated with SEG-shRNA had lower rabies virus RNA and protein levels than the controls. Real-time PCR showed that rabies virus was reduced 4.88 fold compared to the mock cells. Survival of RV-infected mouse showed a significant protection from rabies virus infection by SEG-shRNA treatment. The survival was up to 50% whereas the control group all died. IFN was not induced in SEG-shRNA treated animals. **[Conclusion]** shRNA-producing plasmid was specifically delivered into rabies virus infected cells using the SEG protein, and effectively inhibited rabies virus gene expression and replication in vivo. SEG-shRNA can be used for adjuvant treatment for rabies.

Keywords: Rabies virus, short hairpin RNA, targeting delivery, mice, animal model

(本文责编: 李磊)

Supported by the Public Welfare (Agricultural) Industry Research Special Program (201103032, 201303042)

*Corresponding author. Xianzhu Xia, Tel: + 86-431-86985508, E-mail: xixzh@cae.cn; Songtao Yang, Tel: + 86-431-86985928, E-mail: yst62041@163.com

Received: 7 May 2015; Revised: 27 May 2015; Published online: 11 September 2015