

HCV 特异性反义 RNA 表达载体的构建及活性评价

王小红 王升启* 管伟 毛秉智

(军事医学科学院放射医学科学院 北京 100850)

摘 要 反义 RNA 是反义技术的一个重要领域,为探索丙型肝炎病毒治疗新途径及验证转基因细胞模型 HepG2.9706 的有效性,设计了一条互补于 HCV 5'NCR 及翻译起始区(397-13 核苷酸)的反义 RNA 序列,将其插入 pGL3 载体 SV40 启动子下游,构建了 HCV 特异性的反义 RNA 真核表达载体(pHCV-asR)。通过 PCR 扩增、酶切反应及序列分析进行了初步鉴定,并将其转染 HepG2 细胞,通过 RT-PCR 方法检测其在细胞中的表达并将 pHCV-asR 转染转基因细胞模型 HepG2.9706,评价其对 HCV 5'NCR 的抑制活性。结果表明,构建的反义 RNA 表达载体插入序列正确,并能在 HepG2 细胞中表达,pHCV-asR 在 HepG2.9706 中对 HCV 5'NCR 调控荧光素酶基因表达具有特异性的剂量依赖性抑制活性,最高抑制率可达 57%。

关键词 HCV 反义 RNA HepG2.9706 pHCV-asR

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0179-04

丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)是慢性肝病的主要病因,其分子生物学研究进展为抗 HCV 反义核酸类药物的开发奠定了良好的基础。HCV 是一单股正链 RNA 病毒,属黄热病病毒家族,其基因组长约 9.6kb,由 5'与 3'非编码区(Non-coding region, NCR)及 1 个大的开读框(Open reading frame, ORF)组成,5'NCR 含 341 个核苷酸(nt),是所有 HCV 分离株中最保守的区域,并形成了稳定的二级结构,内有 5 个非功能性 AUG,这些特征类似于微小 RNA 病毒,提示 HCV 5'NCR 具有内核糖体进入位点(Internal ribosomal entry site, IRES)的功能。研究已证明 HCV 最佳 IRES 活性残基位于 40-370 位 nt,包含了翻译起始区的 29 个 nt, HCV 5'NCR 的 4 个茎环结构均是 IRES 功能所必需的。5'端发夹结构并非 IRES 的重要成分,而位于编码区的 IRES 成分是帽非依赖性翻译启动的关键。实验显示 AUG 下游的 9 个 nt 由 12 个 nt 替代,或 AUG 下游的前 42 个 nt 内多个静止性变异均能强烈地抑制翻译。资料显示该作用可能是通过改变茎环结构 IV 的稳定性,使 IRES 活性明显下降所致。翻译起始区序列在 IRES 活性中的作用可能是降低了茎环结构 IV 的稳定性,使其分离为单链 RNA,便于 40S

核糖体亚单位的直接结合及翻译启动。综上所述, HCV 5'NCR 对 HCV RNA 的翻译及复制具有重要调控作用^[1-2],明确的序列结构与功能为抗 HCV 反义药物研究奠定了基础。

反义药物抗 HCV 的研究,国内外主要采用 HCV 基因组的部分转基因细胞模型及体外翻译系统进行的,设计的反义药物主要针对 HCV 5'NCR,初步实验结果显示互补于 5'NCR 的某些反义药物(包括反义寡核苷酸及核酶)能明显地抑制 HCV 基因的表达^[3-5]。我们曾采用 HCV 5'NCR 调控荧光素酶基因的瞬时表达系统及稳定表达细胞株 HepG2.9706^[6],进行了 HCV 特异性反义寡核苷酸抑制活性的研究,发现针对 5'NCR 横跨翻译起始密码子的反义寡核苷酸对 HCV 5'NCR 调控功能有明显抑制活性^[7],这些研究结果提示 HCV 5'NCR 是抗 HCV 药物作用的重要靶标。本研究以 HCV 5'NCR 及翻译起始区为作用靶标,研究反义 RNA 对 HCV 调控基因的抑制作用,探索可能的 HCV 治疗基因药物新途径。

1 材料与方法

1.1 反义 RNA 表达质粒(pHCV-asR)的构建

收稿日期 2000-09-26 修回日期 2000-12-18。

基金项目 国家 863 高技术研究项目(102-08-04-01)和军队九·五重点课题基金资助(96Z007)。

* 联系作者:Tel 86-10-66932211, Fax 86-10-68214653, E-mail sqwang@nic.bmi.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.1.1 反义 RNA 的设计:反义 RNA 针对 HCV 5' NCR 和翻译起始区序列(13-397 位核苷酸),长 375 个核苷酸,覆盖 HCV 的内核糖体进入位点。

1.1.2 目的基因的制备:设计并合成两条引物,上游引物序列为:

5' GTAATTCTAGATTGGGGCGCACTCCACC 3'

含有 *Xba* I 酶切位点,下游引物序列为:

5' GCATCAAGCTTGGGCGGCGGTTGGTGTAC 3'

含有 *Hind* III 酶切位点,用 PE 公司产 391A 型自动 DNA 合成仪合成。模板为含 HCV 5' NCR-C 基因的 pHCV-neo4 质粒^[6],Taq 酶为 Panozyme 产品。PCR 条件为 94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,共反应 35 个循环。PCR 产物采用 Promega 产品 Wizard PCR Preps DNA Purification System 纯化。为了便于酶切反应,将上述纯化 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接(Promega pGEM-T System 1),按说明书操作。JM109 感受态细胞及转化反应按《分子克隆》操作。获得的阳性克隆采用 Promega 产品 Wizard Plus MiniPreps DNA Purification System 提取质粒,用 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切,采用 1.5% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离,切胶后再用 Wizard PCR Preps DNA Purification System 纯化。

1.1.3 pHCV-asR 的构建:真核表达载体 pGL3 经 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切后,采用 0.8% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离,切胶后再用 Wizard DNA Clean-up Purification System 纯化。然后将酶切的目的基因片段反向插入酶切的载体 SV40 启动子的下游。连接及转化反应同上。

1.1.4 pHCV-asR 的鉴定(1)PCR 鉴定:在载体插入片段的两侧各合成 1 条引物,上游引物为:

5' GAGCTATTCCAGAAGTAGTG 3'

下游引物为:

5' ATCTTATCATGTCTGCTCGA 3'

用 PE 公司产 391A 型自动 DNA 合成仪合成。取少许菌体进行 PCR 扩增,条件同上。(2)双酶切鉴定:取 PCR 阳性克隆采用 Wizard Plus MiniPreps DNA Purification System 提取质粒,用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切进行鉴定。(3)序列分析:阳性克隆用自动测序仪进行序列分析,引物为上述载体上游引物。

1.2 pHCV-asR 在细胞内的表达

1.2.1 细胞培养:HepG2 细胞采用 DMEM 培养基内含 10% 小牛血清(Hyclone 公司产品),青霉素 100u/mL,链霉素 100μg/mL,在 37℃ 5% CO₂ 条件下进行培养及传代。

1.2.2 质粒转染:HepG2 细胞接种于 24 孔板(NUNC)5×10⁴/孔,80%~90% 细胞融合后,取质粒 0.5μg/孔,采用脂质体 Lipofectin(1mg/mL,GIBCO)试剂盒进行转染,按说明书操作。

1.2.3 RT-PCR 检测:细胞转染 24h 后,收集转染细胞,用 TRIzol 试剂(GIBCO)提取总 RNA,按说明书操作,再用 RQ1DNase(华美生物工程公司)消化可能残留的痕量 DNA。模板 RNA 溶液于 65℃ 变性 2min,即置冰浴中待用。RT-PCR 体系为 20μL,含 10×PCR 缓冲液(Promega 产品),dNTP(Promega 产品)0.2mmol/L,MgCl₂ 1.5mmol/L,上、下游引物(上游引物序列为:

5' TTTAGGATTCGTGCTCATGG 3'

下游引物序列为:

5' CACCATGAATCA CTCCCCTGTGA 3'

模板 RNA 1μL 及酶混合物 0.5μL(Panozyme Taq 酶 1u,反转录酶 AMV 2u 及 RNasin 4u,后两者为 Promega 产品),于 42℃ 反转录 40min,接着进行 PCR 扩增,反应条件为 94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,共反应 35 个循环,最后,延伸 7min。同时设不加 AMV 的反应体系,以排除 DNA 的污染。采用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3 pHCV-asR 对 HCV 调控基因的抑制活性

1.3.1 转基因细胞模型 HepG2.9706 株:HepG2.9706 细胞株^[6]由含 HCV5' NCR 及部分多聚蛋白起始区序列与荧光素酶基因的融合基因片段的真核表达载体 pHCV-neo4 转染 HepG2 细胞,建立的稳定表达荧光素酶基因的转基因细胞模型,其荧光素酶基因的表达受 HCV 5' NCR 调控。采用含 10% 胎牛血清(Hyclone 公司产品)及 400μg/mL G418(GIBCO)的 DMEM 培养基,在 37℃ 5% CO₂ 条件下进行培养及传代。

1.3.2 pHCV-asR 的转染:HepG2.9706 细胞株接种于 96 孔板(NUNC),1×10⁴/孔,80%~90% 细胞融合后,取 3 个浓度的反义 RNA 表达质粒采用 Lipofectin 介导进行质粒转染,转染方法按说明书操作。同时设非相关序列表达质粒作对照。每一浓度均设 3 孔,结果取其平均值。

1.3.3 荧光素酶活性检测:荧光素酶活性检测采用荧光素酶测定试剂盒并参考其推荐的操作步骤进行。待测细胞用 PBS(pH7.3)洗 2 次,每孔细胞加 1×细胞裂解液 200μL,室温下裂解 10min,加荧光素酶作用底物 100μL,混匀,立即在多标记检测仪

上测每秒发光强度。

2 结果

2.1 pHCV-asR 的构建

随机挑取 18 个克隆进行 PCR 扩增,电泳分析均可见 465bp 的阳性条带(图未显示),取其中 5 个克隆提取质粒用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切分析,可见 3 个克隆有 384bp(目的基因片段)与 3567bp 的 2 条阳性条带,而对照 pGL3 质粒可见 1689bp 与 3567bp 的两条阳性条带(图未显示)。序列分析结果表明构建质粒的插入片段序列正确。上述结果表明成功地获得了 pHCV-asR。

2.2 pHCV-asR 在细胞中的表达

如图 1 所示,转染细胞提取的 RNA 进行 RT-PCR 分析,可见特异性地扩增条带,说明转染细胞中有反义 RNA 序列存在,在无反转录酶的反应体系中,则未见特异性条带,从而排除了质粒 DNA 的污染。

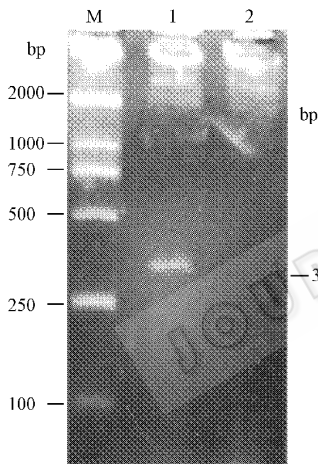


图 1 转染细胞反义 RNA 的 RT-PCR 检测

Fig. 1 Detection of antisense RNA in transfected cells by RT-PCR

M. 2000D; 1. Amplification product of RT-PCR; 2. RT-PCR without AMV

2.3 pHCV-asR 对 HCV 调控基因的抑制活性

取 3 个浓度(0.05 μ g、0.1 μ g、0.2 μ g)的 pHCV-asR 及非相关序列表达质粒转染 HepG2. 9706 细胞,连续 3 次,结果见图 2,随着质粒用量的增加,荧光素酶活性抑制率明显增加,质粒用量为 0.2 μ g 时,抑制率可达 57%。而非相关序列表达质粒对荧光素酶活性几乎无影响。

3 讨论

α -干扰素单项或联合三唑核苷治疗慢性丙型肝炎效果非常有限,仅 15%~25% 的有效率,感染病

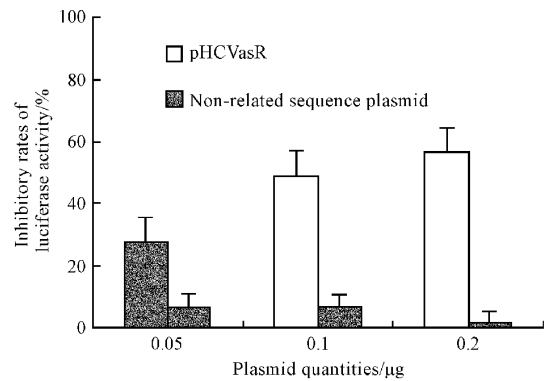


图 2 pHCV-asR 的细胞内抑制活性

Fig. 2 Inhibitory activities of pHCV-asR in HepG2.9706 cells

毒的型别与病素载量明显影响其治疗效果。探索丙型肝炎治疗新途径一直是一个重要的问题。反义技术是抗病毒药物研究开发的一个重要工具,主要包括反义 DNA、反义 RNA 及核酶三大领域。体外实验表明,反义寡核苷酸及核酶能够特异有效地抑制 HCV RNA 的翻译。反义 RNA 是反义技术的一个重要领域,其优势在于反义 RNA 可通过更有效的核酸转运媒介-病毒表达载体转运到肝细胞^[8]。

为进一步验证建立的反义核酸药物筛选细胞株的有效性,及探索 HCV 治疗的新途径,进行了 HCV 特异性反义 RNA 的研究。文献报道 HCV 特异性反义 RNA 分子能够特异性抑制 HCV RNA 的体外翻译,抑制率为 41%~56%,反义 RNA 分子短至 67 个残基即具有特异性抑制活性,序列优化发现 5' NCR 的下游及翻译起始区是重要的靶位,但包含第 402-1 位核苷酸的反义 RNA 序列抑制活性最好,抑制率为 56%^[9]。本研究构建的反义 RNA 表达载体包含第 397-13 位核苷酸,初步研究表明其在 HepG2 细胞中能够表达反义 RNA,在 HepG2.9706 细胞中对 HCV 5' NCR 调控功能呈现与质粒用量相关的特异性的抑制作用,这种抑制作用可达 57%,与文献报道的结果相一致,提示反义 RNA 技术是抗 HCV 药物开发的又一可能途径。为检测反义 RNA 在体内的抗病毒作用,可对逆转录病毒或腺病毒载体介导反义 RNA 转运体系进行研究。

众所周知,在 HCV 自然感染过程中,常产生病毒逃逸变异株。值得注意的是反义 RNA 作用的靶标几乎包括了整个 5' NCR 及翻译起始区,该区域不仅具有复杂的二级结构,而且具有翻译启动所必需的内核糖体进入位点的功能,由于在病毒生命周期中这种重要的生物学功能及反义 RNA 分子具有的

大的作用范围,病毒变异似乎不能逃逸反义 RNA 的反义作用。反义 RNA 作用的细胞内机理可能依赖于其与靶 RNA 二聚体的形成,从而干扰了病毒 RNA 的功能或通过二级结构稳定性的破坏促进了 RNA 的降解。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Major M E ,Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* ,1997 **25** (6):1527~1538
- [2] Clarke B. Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* , 1997 **78** 2397~2410
- [3] Ohkawa K ,Yuki N ,Kanazawa Y *et al.* Cleavage of viral RNA and inhibition of viral translation by hepatitis C virus RNA-specific hammerhead ribozyme *in vitro*. *J Hepatol* , 1997 **27** (1) : 78~84
- [4] Alt M ,Renz R ,Hofschneider PH ,*et al.* Core specific antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides as potent and specific in-

hibitors of hepatitis C viral translation. *Arch Virol* 1997 **142** :589~599

- [5] Hanecak R ,Brown-Driver V ,Fox MC *et al.* Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus gene expression in transfected hepatocytes. *J Virol* ,1996 **70** :5203~5212
- [6] WANG X(王小红),WANG S Q(王升启),LI M D(李梦东)*et al.* Establishment of HCV 5'NCR transgenic cell model. *Chinese Journal of Virology(病毒学报)* ,1998 **14** (4) 296~301
- [7] WANG X(王小红),WANG S Q(王升启),LI M D(李梦东)*et al.* Evaluation of *in vitro* inhibitory activity of antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides against HCV regulatory gene. *Chinese Journal of Virology(病毒学报)* ,1999 **15** (3) : 225~230
- [8] Chatterjee S ,Johnson P ,Wong KJ. Dual-target inhibition of HIV-1 *in vitro* by means of an adenovirus-associated virus antisense vector. *Science* ,1992 **258** :1485~1488
- [9] Wakita T ,Moradpour D ,Tokushihge K *et al.* Antiviral effects of antisense RNA on hepatitis C virus RNA translation and expression. *J Med Virol* ,1999 **57** :217~222

The Construction and Evaluation of Antisense RNA Expression Vector Targeting at HCV 5'NCR

WANG Xiao-Hong WANG Sheng-Qi GUAN Wei MAO Bing-Zhi

(Institute of Radiation Medicine ,Academy of Military Medical Sciences ,Beijing 100850 ,China)

Abstract Antisense RNA is an important field of antisense technique. In order to explore a novel approach for the treatment of hepatitis C virus(HCV) infection and prove the availability of transgenic cellular model HepG2. 9706 ,an antisense RNA was designed targeting at the highly conserved 5'NCR and translation initiation site of HCV RNA at nt positions 13-397. It was inserted into the downstream of SV40 promoter sequence of pGL3 control vector in which luciferase gene is deleted. The antisense RNA expression vector(pHCV-asR)was constructed and identified by PCR endonucleases reaction and DNA sequencing. Its expression in transfected HepG2 cells was tested by RT-PCR. To evaluate the inhibitory activities of pHCV-asR ,HepG2. 9706 cells were transfected using this construct via Lipofectin method. Luciferase activity in cell lysates was measured for quantitative determining antiviral effects within the cells. The results showed that the inserted sequence of the pHCV-asR is the same as the designed sequence and can express in HepG2 cells. It was also found that pHCV-asR in HepG2. 9706 has a dose-dependent inhibitory effects on luciferase expression controlled by HCV 5' NCR with a inhibitory rate of 57% .

Key words HCV ,antisense RNA ,HepG2. 9706 ,pHCV-asR