

# M1GS-HCV/C<sub>141</sub>核酶的构建及其体外抗病毒活性测定

李喜芳, 张文军, 黄志文, 张成成, 罗桂飞

广东药学院病原生物学与免疫学系, 广东 广州 510006

李喜芳, 张文军, 黄志文, 等. M1GS-HCV/C<sub>141</sub>核酶的构建及体外抗病毒活性测定. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1786-1795.  
Li XF, Zhang WJ, Huang ZW, et al. Construction of an engineered M1GS-HCV/C<sub>141</sub> ribozyme and determination of its antiviral activity *in vitro*. Chin J Biotech, 2013, 29(12): 1786-1795.

**摘要:** 丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 是引起慢性肝炎的重要病因之一, 严重危害公众健康。目前临床 HCV 感染常采用干扰素联合病毒唑进行治疗, 然而应答率不高且易反复。因此, 探索新型抗 HCV 治疗策略及药物显得尤为迫切。针对 HCV 核心基因的序列, 设计与之互补的引导序列 (Guide Sequence, GS), 通过 PCR 的方法将其共价连接于大肠杆菌核糖核酸酶 P(RNase P) 催化性亚基 (M1 RNA) 的 3'末端, 成功构建了一种靶向性 M1GS 核酶 (M1GS-HCV/C<sub>141</sub>)。经体外切割试验、胞内反义效应及胞内毒性研究, 结果表明: M1GS-HCV/C<sub>141</sub>核酶不仅能够体外对靶 RNA 片段产生特异性切割, 在 HCV 感染的 Huh7.5.1 细胞中, 也能显著抑制病毒核心蛋白的表达, 进而使 HCV RNA 的拷贝数减少约 1 000 倍。因此, 文中构建的 M1GS-HCV/C<sub>141</sub>核酶在体外具有显著的抗 HCV 活性, 这为 HCV 治疗研究提供了一条新的潜在途径。

**关键词:** 丙型肝炎病毒, 核心基因, M1GS 核酶, 抗病毒

## Construction of an engineered M1GS-HCV/C<sub>141</sub> ribozyme and determination of its antiviral activity *in vitro*

Xifang Li, Wenjun Zhang, Zhiwen Huang, Chengcheng Zhang, and Guifei Luo

Department of Pathogen Biology and Immunology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong, China

**Abstract:** Hepatitis C virus (HCV), one of the major pathogens of viral hepatitis, causes significant hazards in humans.

**Received:** March 22, 2013; **Accepted:** July 5, 2013

**Supported by:** Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (No. S2012010009471), Open Project of the State Key Laboratory of Virology (No. 2012008).

**Corresponding author:** Wenjun Zhang. Tel/Fax: +86-20-39352196; Fax: +86-20-89237296; E-mail: tzhangwj@126.com

广东省自然科学基金 (No. S2012010009471), 病毒学国家重点实验室开放基金项目 (No. 2012008) 资助。

网络出版时间: 2013-08-21

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130821.1714.002.html>

Interferon treatment in combination with ribavirin is used as the first line clinical treatment for HCV infection. However, good response to this treatment has only been observed in few patients and repeated recurrence has also been reported frequently. Therefore, new antiviral agents and therapies are in urgent demand. Here, we report a newly constructed *Escherichia coli* RNase P based M1GS ribozyme that can specifically and efficiently target the core gene of HCV. The guide sequence (GS) of this M1GS was designed according to the sequence of the core coding region of HCV genome. The GS was then covalently linked to the 3' terminus of M1 RNA, the catalytic subunit of RNase P from *Escherichia coli*. The specification of this sequence-specific ribozyme, M1GS, was then examined using an *in vitro* cleavage assay. The cytotoxicity and its activity in inhibition of HCV gene expression and viral proliferation were further studied *in vivo*. Our results show that the reconstructed M1GS ribozyme displayed obvious catalytic activity in cleaving target mRNAs fragment *in vitro*. Notable reduction in the expression of HCV core protein and a 1 000-fold reduction in viral growth were also observed in cultured HCV infected Huh7.5.1 cells expressing the functional M1GS ribozyme. This study demonstrated a direct evidence for the antiviral activity of the customized M1GS-HCV/C<sub>141</sub> ribozyme, and thus provided a promising new strategy for clinical treatment of HCV infection.

**Keywords:** HCV, core gene, M1GS ribozyme, antiviral

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 引起, 主要通过血源传播的一种世界性传染病。流行病学资料表明, HCV 感染呈全球性分布, 在西方国家普遍人群感染率为 1%, 我国高达 3.2%, 目前全世界至少有 1 亿人携带 HCV, 每年约有 100 万新的 HCV 感染者<sup>[1]</sup>。HCV 感染后, 约有 50%~80% 的感染者发展为慢性肝炎, 在此基础上约 25% 的患者最终演变为肝硬化, 并与肝癌的发生密切相关<sup>[2-3]</sup>。HCV 基因组变异率高, 病毒准种多<sup>[4]</sup>, 尚缺乏有效的 HCV 疫苗, 临床治疗 HCV 感染常采用干扰素联合病毒唑, 然而应答率较低且易反复<sup>[5]</sup>。因此, 发展新型抗 HCV 治疗策略及药物尤为迫切。

核糖核酸酶 P(RNase P) 是一种广泛存在于各类生物 (包括原核、古细菌及真核) 细胞的天然核酶, 其主要功能是参与 tRNA 前体 5'末端的切割成熟<sup>[6]</sup>。RNase P 最早在大肠埃希菌中发现。大肠埃希菌来源的 RNase P 由一个含 377 bp 的 RNA 亚基 (M1 RNA) 和一个约 14 kDa 的蛋白亚基 (C5 蛋白) 组成。其中, RNA 亚基的结构

与功能较为保守, 具有催化活性。这两个组分对于其胞内功能的发挥都是必要的。但在体外, M1 RNA 可以独自发挥催化功能, C5 蛋白的作用主要是增强 M1 RNA 与底物结合的亲和力<sup>[7]</sup>。研究表明, RNase P (或 M1 RNA) 识别的是 tRNA 前体特定的二级结构, 即只要具备 5'单链区、双螺旋区和 3'CCA 结构的底物均可被识别<sup>[8-9]</sup>。以 M1 RNA 及底物特征为理论基础, 产生了一种更为有效、更易实现的方法——M1GS。对于任何已知序列的靶 RNA, 均可通过设计一小段与其互补的引导序列 (Guide sequence, GS), 通过 PCR 的方法将 GS 共价结合到 M1 RNA 的 3'端, 就成功构建了 M1GS 分子<sup>[10]</sup>。这个人为设计的 GS 既可与目的基因互补配对, 又必须具有未剪接的 3'-CCA 末端, 以形成类 tRNA 的可被 RNaseP 识别的底物模式, 从而使目的 mRNA 被共价连接的 M1 RNA 有效切割<sup>[11]</sup>。有研究证明, M1GS 能有效阻断多种细菌 (沙门氏菌、耶尔森氏菌、土拉弗朗西斯菌等) 基因的表达<sup>[12-14]</sup>, 成功切割致癌细胞和人细胞病毒 (1 型单纯疱疹

病毒、巨细胞病毒、艾滋病毒、人流感病毒等) 基因的多个靶点<sup>[15-19]</sup>, 并能减少病毒对动物的感染率及其致病性<sup>[20]</sup>。这些表明, M1GS 在基因靶向应用领域 (基因疗法方面) 极有潜力。

本研究针对 HCV 基因组核心基因编码区设计 GS 序列, 通过 PCR 的方法将其连接至大肠杆菌来源 RNase P 的 M1 RNA 的 3' 末端, 构建一种靶向 HCV RNA 的新型人工核酶——M1GS-HCV/C 核酶。实验结果证明, 所构建的 M1GS-HCV/C<sub>141</sub> 不仅在体外对靶 RNA 具有明显的切割作用, 在 HCV 感染的 Huh7.5.1 细胞中, 该核酶也能抑制靶基因的表达及病毒的复制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌种、质粒及核苷酸片段

pGEM-3Z 载体及含 M1 RNA 的 pFL117 质粒 (暨南大学周天鸿教授惠赠); 大肠杆菌 JM109 菌株 (购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司); M1GS-HCMV/UL<sub>97</sub> 核酶及 pGEM-HCV/core 重组质粒由本实验室构建并保存<sup>[13,21]</sup>; 引物由英潍捷基生物技术有限公司合成。

#### 1.1.2 酶及试剂

限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III、绿豆芽核酶、T4 DNA 连接酶、T7 RNA 聚合酶、DNA 酶 I 购于宝生物工程有 限公司。质粒抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒、PCR 清洁试剂盒购于 BIOMIGA 公司; 脂质体 (Lipofectamine2000)、HCV 核酸定量检测试剂盒购于上海科华生物工程有限公司。

#### 1.1.3 细胞及病毒

人肝癌细胞系 Huh7.5.1 和 HCV 病毒株

(JFH-1), 由武汉大学吴建国教授惠赠。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 pGEM-M1GS/C<sub>141</sub> 重组质粒的构建

GS 的设计: 根据 HCV 核心基因编码区的核苷酸序列 (GenBank Accession No. HQ110091.1), 通过 DNAMAN 与 RNA Structure4.5 软件进行分析, 并参照 GS 设计原则<sup>[22-24]</sup>, 发现 AUG 起始密码下游第 141 位胞嘧啶 (C) 为潜在的 RNase P 切割位点。所以针对 HCV RNA (C<sub>141</sub>) 设计的 GS 序列为: 5'-GCGACTAGGAAGA-3'。

桥序列的插入: RNA 单链在体外较难保持完整线性, 有文献报道, M1 RNA 和 GS 之间插入长度为 20 bp 左右的连接序列, 对 M1GS 切割活性的维持至关重要<sup>[25-26]</sup>。根据之前的研究, 我们在 M1RNA 和 GS 之间引入 23 bp 的桥序列 (5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT-3')。

M1GS 核酶基因的克隆: 根据 M1GS 的设计原理, M1GS DNA 的通式应为<sup>[27]</sup>: 5'-TGG-NNNNNNNNNNNNNNN-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT-T7 Promoter-3' (加粗部分为 GS 序列, 斜体部分为插入的桥序列)。参照该通式, 设计核酶 M1GS-HCV/C<sub>141</sub> 的扩增引物序列 (表 1)。引物 P1 含有 *EcoR* I 识别位点和 T7 启动子序列; 引物 P2 含有限制酶 *Hind* III 识别序列、GS 及桥序列; 引物 P3 仅比引物 P2 缺少桥序列。以含 M1 RNA 基因组的 pFL117 质粒为模板, P1、P2 及 P1、P3 为两对引物进行 PCR 扩增, 即可得到 M1GS-HCV/C<sub>141</sub> (含桥序列) 和 M1GS-HCV/C<sub>141</sub>\* (不含桥序列) 核酶基因片段。PCR 反应体系为: 5×PCR mix 10 μL, primer (R+F) 各 2 μL, 质粒 DNA 模板 2 μL, *Taq* DNA 聚合酶 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 35 μL。其中 5×PCR mix

表 1 扩增 M1GS 核酶基因的引物序列

Table 1 Sequence of the PCR primers for the gene of M1GS ribozyme

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Endonuclease
P1	<u>CGGAATT</u> CGAAGCTGACCAGAC AG	<i>EcoR</i> I
P2	<u>CCAAGCTT</u> GGTGCGACTAGGA AGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTAGGTGAAACTG	<i>Hind</i> III
P3	<u>CCAAGCTT</u> GGTGCGACTAGGA AGAAGGTGAAACTG	<i>Hind</i> III

Notes: the protective bases are marked with gray body; the recognition sequence of restriction enzymes are showed in italics; the guide sequences are showed in bold; the bridge sequence is marked with double underline; T7 promoter sequence is marked with straight underline; the complementary sequences for the 3' terminal of M1 RNA gene are marked with wave underline.

的配方 (400  $\mu$ L) 为: dNTPs (10 mmol/L each) 40  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 40  $\mu$ L, 10 $\times$ Taq 缓冲液 200  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 120  $\mu$ L。

纯化 PCR 产物,以内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 分别双酶切核酶基因片段及 pGEM-3Z 载体, 1% 琼脂糖凝胶回收双酶切产物 (按试剂盒说明书操作), T4 DNA 连接酶连接双酶切目的基因及载体, 即可构建含 M1GS-HCV/C<sub>141</sub> 和 M1GS-HCV/C<sub>141</sub>\*核酶基因的重组质粒。最后用大肠杆菌 JM109 感受态细胞进行重组质粒的转化。转化产物涂含氨苄青霉素及 X-gal 的平板, 进行蓝白斑筛选, 挑取白斑克隆摇菌检测。

### 1.2.2 M1GS 核酶及靶 RNA 的制备

限制酶 *Hind* III 单酶切 M1GS-HCV/C<sub>141</sub> 和 M1GS-HCV/C<sub>141</sub>\*质粒, 再以绿豆芽核酸酶对切割产物的末端进行平滑, 所获得的线性质粒 DNA 可作为核酶体外转录的模板。转录方法为: 5 $\times$ T7 缓冲液 4  $\mu$ L, 2.5 mmol/L UTP 6  $\mu$ L, M1GS 模板 3  $\mu$ L, T7 RNA 聚合酶 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 5  $\mu$ L。

37  $^{\circ}$ C, 3~4 h。

转录后的产物加入 2  $\mu$ L DNA 酶 I, 37  $^{\circ}$ C 消化 30 min, 苯酚氯仿抽提 1 次, 70% 乙醇沉淀 2 次, 纯化产物保存于 80% 乙醇中备用。

pGEM-HCV/core 质粒含有 HCV 基因组 5' 端 (1~584 bp) 的基因片段, 以该重组质粒作为模板, 通过 <sup>32</sup>P-UTP 掺入的体外转录, 即可制备放射性核素标记的靶 RNA。具体操作除在转录反应体系中需加入一定浓度的 <sup>32</sup>P-UTP 外, 其余与 M1GS 核酶的制备方法相同。

### 1.2.3 胞外切割反应

底物 RNA 经 80  $^{\circ}$ C 热变性 3 min, 冰浴 1 min; 与等摩尔核酶混匀, 加入切割反应液 A, 37  $^{\circ}$ C 温育 30 min。实验分 4 组: 第 1 组不加核酶; 第 2 组加入 M1GS HCMV/UL<sub>97</sub> (针对 HCMV 病毒 UL<sub>97</sub> 位点设计的核酶); 第 3 组加入 M1GS HCV/C<sub>141</sub>\* (不含桥序列); 第 4 组加入 M1GS HCV/C<sub>141</sub>。最后, 加入等体积含 9 mol/L 尿素、0.05% 溴酚蓝及 0.05% 二甲苯蓝的终止液终止反应, 然后通过 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (含 7 mol/L 尿素) 对切割产物进行分离, 放射自显影及银染检测。

### 1.2.4 细胞毒性试验

细胞转染: 对数期 Huh7.5.1 细胞以 1 $\times$ 10<sup>8</sup>~4 $\times$ 10<sup>8</sup>/L 接种至 24 孔板中, 每孔 500  $\mu$ L, 继续培养 24 h 后细胞密度达 80% 左右, 可以用来转染。按照 Lipofectamine2000 脂质体使用说明书, 制备转染质粒与脂质体复合物。将混合物加到 24 孔板内, 每孔 200  $\mu$ L 轻轻混匀。脂质体空转染为对照组, 无血清 DMEM 培养液代替转染复合物作为空白对照组。37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 4~6 h 后, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液换

掉含有脂质体和质粒的培养液,继续孵育。

MTT 试验:转染 24、48、72 h 后胰酶消化各孔细胞后分别吸出,按  $10^4$ /孔接种至 96 孔培养板,至 48 h 每孔加入 10  $\mu$ L MTT (5 mg/mL),继续孵育 4 h 后吸弃上清液并加入 200  $\mu$ L DMSO,以无血清 DMEM 为调零孔,以未转染细胞为对照孔,酶联免疫仪测 490 nm 吸光度(OD),并计算细胞存活率(细胞存活率=转染细胞 OD/空白对照组细胞 OD $\times$ 100%)。所有数据统计均用  $\bar{x} \pm s$  表示,使用 SPSS11.0 软件进行统计学分析。

### 1.2.5 胞内切割反应

转染用核酶 DNA 质粒的获得:质粒小提试剂盒提取质粒 pGEM-M1GS/C<sub>141</sub> (浓度为 198 ng/ $\mu$ L, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.97) 及 pGEM-M1GS/C<sub>141</sub>\* (浓度为 217 ng/ $\mu$ L, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.91),用酚、氯仿:异丙醇 (24:1) 抽提 1 次,70%乙醇洗 1 次,超净台内放置 15 min,自然晾干。最后用无血清 DMEM 培养基稀释至 1  $\mu$ g/ $\mu$ L, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

转染液的制备:取 10  $\mu$ L 质粒 DNA 溶于 100  $\mu$ L 无血清 DMEM 混匀;取 10  $\mu$ L Lipofectamine 2000 溶于 100  $\mu$ L 无血清 DMEM 混匀。然后将两者缓慢混合,室温放置 15~40 min,加 800  $\mu$ L 无血清 DMEM 至总体积为 1 mL,混匀。即为细胞转染液。

M1GS 核酶质粒转染细胞:将 DMEM (含 10% FBS) 培养的 Huh7.5.1 细胞接种与 96 孔板 ( $1 \times 10^5$ /well),待细胞丰度约 80%~90%时,HCV 病毒株 (JFH1) 感染细胞,MOI 约为 1.0。感染后 2 h,以无血清培养基洗涤细胞 2 次。加入上述转染液于培养板 (1 mL/well),37  $^{\circ}$ C 培养 6~16 h,吸去转染液,加入含 20% FBS 的完全培养液继续培养,不同时间收集细胞。

设立 M1GS-HCV/C<sub>141</sub> 实验组、M1GS 核酶对照组 (M1GS-HCV/C<sub>141</sub>\*) 和空白组 (转染不含 M1GS 的空脂质体)。细胞转染 48 h 后,以 Western blotting 检测 HCV 核心蛋白的表达。此外,分别收获感染后 (1~7 d) 的细胞培养上清,以丙肝病毒核酸定量检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 检测 HCV RNA 的拷贝数,从而评价 M1GS 核酶在胞内对病毒生长的影响。

## 2 结果

### 2.1 M1GS 核酶的鉴定

限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切克隆的质粒,可见构建的含 M1GS-HCV/C<sub>141</sub> 和 M1GS-HCV/C<sub>141</sub>\* 核酶的质粒均可被切割产生大、小两个片段,大片段应为 pGEM3z 载体 (如图 1A,泳道 1、3),小片段应为 M1GS-HCV/C<sub>141</sub> 和 M1GS-HCV/C<sub>141</sub>\* 核酶基因片段,与预期大小 435 bp 和 411 bp 相当 (如图 1A,泳道 2、4)。此外,我们对 pG-M1GS 质粒进行了 PCR 鉴定,可见明显的特异性扩增产物条带 (如图 1B,泳道 1、2),与预期大小相符。上述结果表明,已成功构建 M1GS 核酶克隆。

### 2.2 M1GS 核酶及 HCV 核心基因体外转录产物的鉴定

以线性化的 pGEM-M1GS/C<sub>141</sub> 质粒及 pGEM-HCV/core 质粒为转录模板进行体外转录。预期 M1GS-HCV/C<sub>141</sub> 转录产物大小为 420 bp 左右,不含桥序列的核酶 M1GS-HCV/C<sub>141</sub>\* 转录产物为 400 bp 左右,HCV 核心基因转录产物大小为 585 bp 左右。转录得到的 RNA 纯化后经含 7 mol/L 尿素的 8% 聚丙烯酰胺电泳,银染可见转录产物,与预期大小相符 (图 2)。

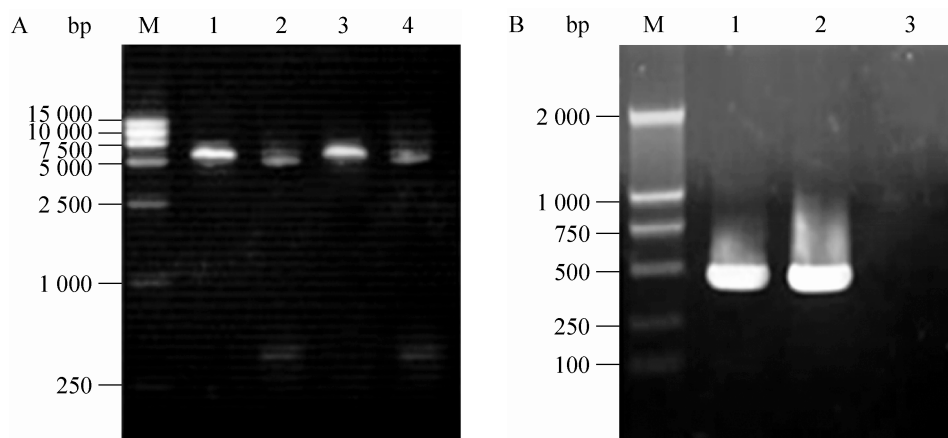


图1 M1GS核酶的鉴定

Fig. 1 Determination of the recombination plasmids that contain the gene of M1GS ribozyme. M: DNA marker. (A) The double digestion of constructed M1GS ribozyme plasmid. Recombinant plasmid pG-M1GS/C<sub>141</sub> and its double digested product by *EcoR* I and *Hind* III (lane 1, 2); recombinant plasmid pG-M1GS/C<sub>141</sub>\* and its double digested product by *EcoR* I and *Hind* III (lane 3, 4). (B) PCR product using pG-M1GS/C<sub>14</sub> and pG-M1GS/C<sub>141</sub>\* as the template (lane 1, 2); blank control group (lane 3).

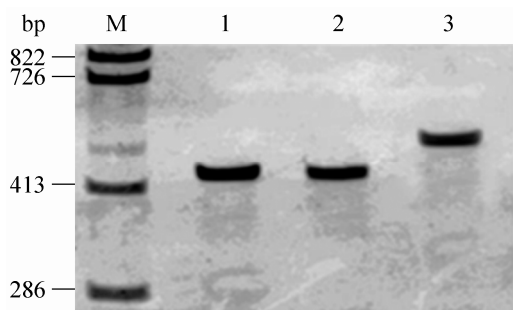


图2 M1GS核酶及HCV核心基因体外转录产物的鉴定(银染)

Fig. 2 Transcription products of M1GS ribozymes and substrate HCV core gene *in vitro*. Silver staining was carried out to detect the transcripts of the M1GS-HCV/C<sub>141</sub> ribozyme (lane 1), the M1GS-HCV/C<sub>141</sub>\* ribozyme (lane 2), and the substrate HCV RNA (lane 3).

### 2.3 M1GS体外切割活性

底物HCV核心基因RNA与M1GS-HCV/C<sub>141</sub>核酶RNA等摩尔混合,37℃条件下进行体外切割反应。结果如图3所示:不加核酶的对照组(图3,泳道1)只形成一条带,这条带应为底物

RNA;与对照组相比,泳道2产生两条明显的新条带,是核酶M1GS-HCV/C<sub>141</sub>对底物RNA产生切割作用的结果,5'切割产物大小约390bp,3'切割产物大小约200bp。从切割产物条带的位置看,符合预计大小。缺乏桥序列的M1GS核酶(M1GS-HCV/C<sub>141</sub>\*)以及非HCV靶向性核酶(M1GS-HCMV/UL<sub>97</sub>)均不能对底物RNA产生切割(图3,泳道3和4)。因此,M1GS-HCV/C<sub>141</sub>核酶对底物RNA的作用是靶向、定点的切割。与此同时,也再次证实桥序列对M1GS核酶的活性具有重要影响。

### 2.4 胞内毒性检测

MTT结果(图4)显示,脂质体转染M1GS进入Huh7.5.1细胞后,随着时间的推移,24、48、72h后细胞存活率出现逐渐减少的趋势,72h时达到最低。但总体而言,脂质体空转组细胞存活率可达到89%,M1GS转染组也

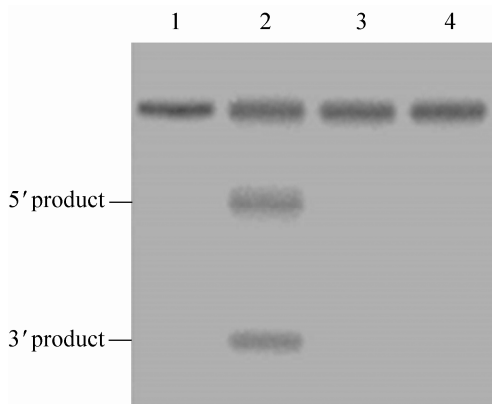


图3 M1GS核酶体外切割活性的测定

Fig. 3 Cleavage of substrate HCV RNA by M1GS *in vitro*. Substrate (10 nmol/L) was incubated alone (lane 1), with 10 nmol/L of M1GS-HCV/C<sub>141</sub> (lane 2), M1GS-HCV/C<sub>141</sub>\* (lane 3), or M1GS-HCMV/UL<sub>97</sub> (lane 4). Cleavage reactions were carried out for 30 min in buffer A (50 mmol/L Tris-HCl at pH 7.5, 100 mmol/L NH<sub>4</sub>Cl, 100 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) at 37 °C. Cleavage products were separated in 8 polyacrylamide gels containing 7 mol/L urea.

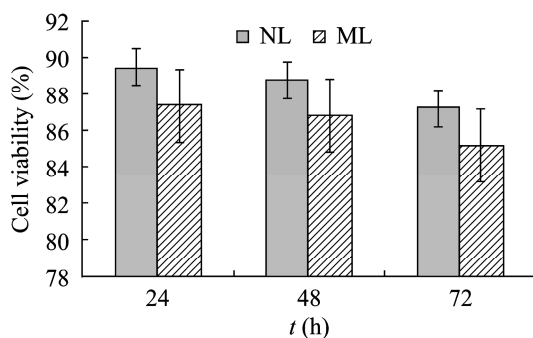


图4 MTT检测细胞存活率

Fig. 4 Cell viability after transfection was determined by classic MTT assay. Cytotoxicity of the M1GS-Lipofectamine complex (ML) was compared with that of naked Lipofectamine 2000 (NL) in Huh7.5.1 cells. These values are the means of triplicate experiments, and the standard deviation is indicated by the error bars.

有 85%，两者之间并无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。不同作用时间两两比较，有显著差异 ( $P < 0.05$ )，但即使在 72 h 时，两组的细胞存活率都

高于 85%，说明通过脂质体将 M1GS 转入细胞内具有毒性小的特点。

## 2.5 M1GS 胞内抗病毒作用

HCV 感染的 Huh7.5.1 细胞在 M1GS 核酶转染 48 h 后，抽提细胞蛋白，对 HCV 核心蛋白进行 Western blotting 分析，以 GAPDH 为内参蛋白。结果如图 5A、5B 所示，与不转染 M1GS 核酶的空白组相比，转染 M1GS-HCV/C<sub>141</sub> 核酶的细胞，HCV 核心蛋白的表达显著降低；而转染 M1GS-HCV/C<sub>141</sub>\*核酶的对照组，核心蛋白的表达量则无明显减少。

我们进一步测定了 M1GS 核酶对 HCV 病毒增殖的影响。荧光定量 PCR 测定不同时间 (1~7 d) 培养液中 HCV RNA 的拷贝数，变化曲线如图 5C 所示，感染 4 d 后，表达 M1GS-HCV/C<sub>141</sub> 核酶的实验组 HCV RNA 的复制减少了约 1 000 倍，而对照组 M1GS HCV/C<sub>141</sub>\*核酶与空白组几乎无差异。

这些实验结果具有一致性，说明针对 HCV 核心基因的序列而设计构建的 M1GS-HCV/C<sub>141</sub> 核酶，在胞内能有效抑制 HCV 病毒的复制，而且这种抗病毒作用具有特异性。

## 3 讨论

RNase P 主要生物学功能是参与 tRNA 5'末端成熟，在细胞内含量高、活性强。已证实，RNase P 识别的是底物特定的高级结构而非一级结构序列，底物 RNA 中的少量突变只要不影响特定的结构基序，仍可被 RNase P 识别并特异性切割<sup>[28-29]</sup>。以 RNase P 为工具，根据目的基因，设计一小段与之互补的 GS，通过 PCR 的方法将 GS 共价结合到 RNase P 催化亚基 M1

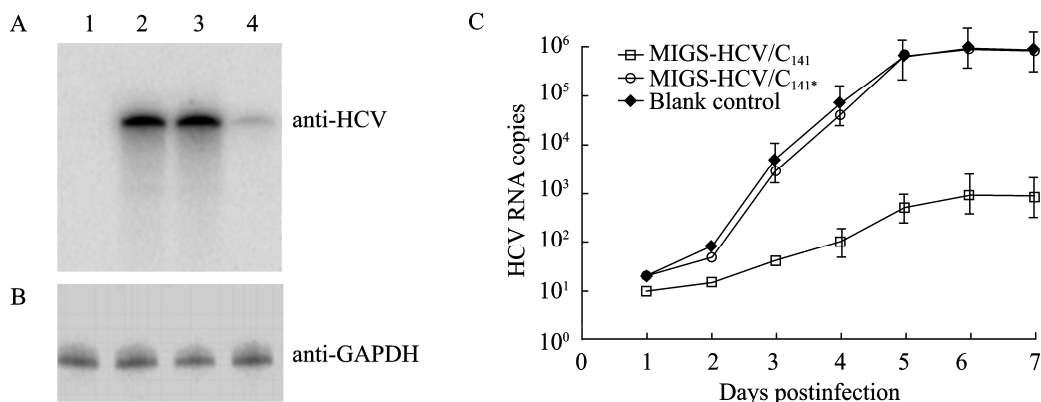


图5 M1GS核酶对HCV基因表达及病毒增殖的影响

Fig. 5 Action of the M1GS ribozymes on HCV gene expression and viral proliferation. Levels of HCV Core proteins (A) and human GAPDH (B) was determined by Western blotting analysis. Protein samples were harvested from cells that either mock-infected (lanes 1) or infected with JFH1 (moi=1; lanes 2, 3, 4) for 48 h, and then treated with M1GS-Lipofectamine complex that contained the sequence of M1GS-HCV/C<sub>141</sub>\* (lanes 2) and M1GS-HCV/C<sub>141</sub> (lanes 4) or the empty Lipofectamine2000 (lanes 3), separated in SDS 8% polyacrylamide gels, and then transferred to membranes. One membrane was allowed to react with a monoclonal antibody (anti-GAPDH) against human GAPDH (5B), whereas the others were stained with monoclonal antibodies anti-HCV Core protein against JFH1 HCV Core proteins (5A). (C) Growth analysis of JFH1 in Huh7.5.1 cells and cell lines that expressed M1GS-HCV/C<sub>141</sub> and M1GS-HCV/C<sub>141</sub>\*. Virus stocks were prepared from the infected cells at 1 day intervals for the 7 days after infection, and the HCV RNA copies in the cell culture supernatant that treated with different M1GS ribozymes was determined by the PCR-fluorescent probe method. These values are the means from triplicate experiments. The standard deviation is indicated by the error bars.

RNA的3'端,当GS与目的基因结合时,便可指导与之结合的M1 RNA到达适合位点,从而对目的位点发挥切割作用<sup>[24,30]</sup>(图6)。因此,这种基于RNase P的反义技术在抑制易变异基因(例如HCV)表达方面,具有其独特优势。Anna等和Lima等对不同HCV准种对RNase P敏感性方面的研究,说明个别碱基突变并不能使HCV逃离RNase P的切割<sup>[31-32]</sup>。

我们采用M1GS技术对HCV进行研究,将为HCV的抗病毒治疗开辟一条极具潜力的新途径。文中构建的M1GS核酶(M1GS-HCV/C<sub>141</sub>)不仅能够在体外对靶RNA片段产生明显的特异性切割,在HCV感染的Huh7.5.1细胞中,也能

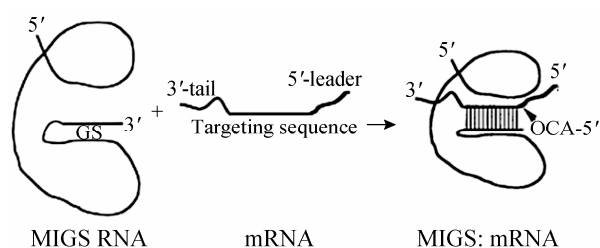


图6 M1GS核酶与底物的相互作用模式图

Fig. 6 Schematic representation of a small model substrate (mRNA) for M1 RNA and a M1GS construct to which a target mRNA has hybridized.

够显著抑制HCV核心基因的表达,说明M1GS核酶的确不失为抗HCV研究的一种具有前景的反义分子。但不得不承认,M1GS技术用于治疗应用还有很长的路要走。首先,递呈、稳定、



共区域及持续表达是需要优化的几个方面, 同时, 也有必要对 M1GS 在胞内或体内的代谢动力学进行深入探讨。最后, 其靶向效率需要在大量动物模型上得到证实。

## REFERENCES

- [1] Chen YT, Jiang JJ. Prevalence of hepatitis C virus. *Strait J Prev Med*, 2009, 15(5): 19–21 (in Chinese).  
陈攸涛, 江家骥. 丙型肝炎病毒流行现状. *海峡预防医学杂志*, 2009, 15(5): 19–21.
- [2] Yuan P, Chen SSL. Hepatitis C virus and cellular stress response: implications to molecular pathogenesis of liver diseases. *Viruses*, 2012, 4: 2251–2290.
- [3] Zaltron S, Spinetti A, Castelli F, et al. Chronic HCV infection: epidemiological and clinical relevance. *BMC Infect Dis*, 2012, 12(Suppl 2): 1–7.
- [4] Tan SL, ed. *Hepatitis C Viruses-Genomes and Molecular Biology*. Norfolk (UK): Horizon Bioscience Press, 2006: 448–460.
- [5] Li MD, Nie QH. Diagnosis management and treatment of Hepatitis C--AASLD. *J Clin Hepatol*, 2004, 7(4): 27–31 (in Chinese).  
李梦东, 聂青和. 丙型肝炎的诊断与治疗策略--美国肝病研究协会临床实践指南. *实用肝脏病杂志*, 2004, 7(4): 27–31.
- [6] Kurz JC, Fierke CA. Ribonuclease P: a ribonucleoprotein enzyme. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, 4(5): 553–558.
- [7] Altman S, Kirsebom LA. Ribonuclease P. *The RNA World*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1999, 233–241.
- [8] Haas ES, Brown JW, Pitulle C, et al. Further perspective on the catalytic core and secondary structure of ribonuclease P RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(7): 2527–2531.
- [9] Yuan Y, Altman S. Substrate recognition by human RNase P: identification of small, model substrates for the enzyme. *EMBO J*, 1995, 14(1): 159–168.
- [10] Dunn W, Liu F. RNase P-mediated inhibition of viral growth by exogenous administration of short oligonucleotide external guide sequence. *Methods Mol Biol*, 2004, 252: 425–436.
- [11] Ko JH, Izadjoo M, Altman S. Inhibition of expression of virulence genes of *Yersinia pestis* in *Escherichia coli* by external guide sequences and RNase P. *RNA*, 14(8): 1656–1662.
- [12] McKinney JS, Zhang H, Kubori T, et al. Disruption of type III secretion in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by external guide sequences. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 848–854.
- [13] Zhang WJ, Li HJ, Zhou TH, et al. Construction of an effective M1GS ribozyme targeting HCMV UL97 mRNA segment *in vitro*. *J Genet Genomics*, 2005, 32(11): 1205–1212.
- [14] Xiao G, Lundblad EW, Izadjoo M, et al. Inhibition of expression in *Escherichia coli* of a virulence regulator of *Francisella tularensis* using external guide sequence technology. *PLoS ONE*, 2008, 3: e3719.
- [15] Cobaleda C, Sanchez-Garcia I. *In vitro* inhibition by a site-specific catalytic RNA subunit of RNase P designed against the BCR-ABL oncogenic products: a novel approach for cancer treatment. *Blood*, 2000, 95: 731–737.
- [16] Dunn W, Trang P, Liu F. RNase P-mediated inhibition of cytomegalovirus protease expression and viral DNA encapsidation by oligonucleotide external guide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 14831–14836.
- [17] Trang P, Kilani AF, Liu F. A ribozyme derived from the catalytic subunit of RNase P from *Escherichia coli* is highly effective in inhibiting replication of herpes simplex virus-1. *J Mol Biol*, 2000, 301: 817–826.
- [18] Hnatyszyn H, Spruill G, Kraus G. Long-term RNase P-mediated inhibition of HIV-1 replication and pathogenesis. *Gene Ther*, 2001, 8:

- 1863-1871.
- [19] Plehn-Dujowich D, Altman S. Effective inhibition of influenza virus production in cultured cells by external guide sequences and ribonuclease P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 7327-7332.
- [20] Bai Y, Trang P, Liu F. Effective inhibition in animals of viral pathogenesis by a ribozyme derived from RNase P catalytic RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 10919-10924.
- [21] Zhang WJ, Liu BY, Zhang X, et al. Construction of an effective M1GS ribozyme targeting to HCV genome and its cleavage activity *in vitro*. *Basic Clin Med*, 2011, 31(3): 84-88 (in Chinese).  
张文军, 刘碧瑜, 张欣, 等. 一种 HCV 靶向性 M1GS 核酶的构建及其体外活性. *基础医学与临床*, 2011, 31(3): 84-88.
- [22] Forster AC, Altman S. External guide sequences for an RNA enzyme. *Science*, 1990, 249: 783-786.
- [23] Yuan Y, Altman S. Selection of guide sequences that direct efficient cleavage of mRNA by human ribonuclease P. *Science*, 1994, 263: 1269-1273.
- [24] Su YZ, Li HJ, Zhou TH, et al. *In vitro* construction of effective M1GS ribozymes targeting HCMV UL54 RNA segments. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, 37(3): 210-214.
- [25] Zhang WJ, Li YQ, Zhou TH, et al. The influence of bridge sequence on the cleavage activity of M1GS ribozyme *in vitro*. *J Guangdong Pharmac Univ*, 2006, 22(5): 537-540 (in Chinese).  
张文军, 李月琴, 周天鸿, 等. Bridge sequence 对 M1GS 核酶体外切割活性的影响. *广东药学报*, 2006, 22(5): 537-540.
- [26] Zheng YX, Zhang X, Zhou TH, et al. The role of bridge sequence in the construction of artificial ribozyme M1GS. *J Jinan Univ*, 2005, 26(2): 151-155 (in Chinese).  
郑永霞, 张欣, 周天鸿, 等. 桥序列在构建人工核酶 M1GS 中的作用. *暨南大学学报*, 2005, 26(2): 151-155.
- [27] Liu BY. Study on the cleavage activity of the optimized M1GS ribozymes that target the core gene of hepatitis C virus [D]. *Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University*, 2011 (in Chinese).  
刘碧瑜. 丙肝病毒核心基因靶向性 M1GS 核酶的优化及其活性研究[D]. 广州: 广东药学院, 2011.
- [28] Altman S, Kirsebom LA. Ribonuclease P. *The RNA World*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1999: 351-380.
- [29] Nadal A, Lytle JR, Guardia J, et al. Specific cleavage of hepatitis C virus RNA genome by human RNase P. *J Biol Chem*, 2002, 277: 30606-30613.
- [30] Trang P, Hsu AW, Liu FY. Nuclease footprint analyses of the interactions between RNase p ribozyme and a model mRNA substrate. *Nucl Acids Res*, 1999, 27(23): 4590-4597.
- [31] Nadal A, Robertson HD, Guardia J. Characterization of the structure and variability of an internal region of hepatitis C virus RNA for M1RNA guide sequence ribozyme targeting. *J General Virol*, 2003, 84: 1545-1548.
- [32] Lima WF, Brown-Driver V, Fox M, et al. Combinatorial screening and rational optimization for hybridization to folded hepatitis C virus RNA of oligonucleotides with biological antisense activity. *J Biol Chem*, 1997, 272: 626-638.

(本文责编 郝丽芳)