

靶向乙型肝炎病毒的外源性microRNA的构建及作用

迟作华¹, 刘爱梅², 孙艳²

(广东药科大学1.临床医学院,广东广州510310;2.生命科学与生物制药学院,广东广州510006)

摘要:【目的】探讨靶向乙型肝炎病毒的外源性microRNA(amiRNA)的构建及其抑制HBV复制的作用。【方法】应用Invitrogen公司miRNA在线设计软件(BLOCK-iT™ RNAi Designer)针对HBV基因设计4条amiRNA序列;构建amiRNA真核表达质粒,Lipofectamine2000转染至人肝癌细胞株HepG2.2.15;荧光定量PCR检测HBV-DNA,ELISA检测HBsAg和HBeAg表达水平。【结果】设计合成的4条amiRNA均可下调培养体系中HBV-DNA水平以及HBsAg和HBeAg水平,与阴性对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中以miR3抑制HBV-DNA复制的效果最为显著。【结论】靶向HBV基因适当位点设计合成的amiRNA在体外可以有效抑制HBV的复制。

关键词: microRNA; 乙肝病毒; 复制; RNA干扰

中图分类号: R931.71

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2017)04-0489-05

Construction and Effect of Artificial MicroRNA Targeted on Hepatitis B Virus

CHI Zuo-hua¹, LIU Ai-mei², SUN Yan²

(1.Clinical Medical College, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, China; 2. School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Corresponding to: SUN Yan; E-mail: sxmshw77@163.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the construction and inhibitory effects of artificial microRNA targeted on hepatitis B virus. 【Methods】 Four artificial microRNA sequences for HBV gene were designed with Invitrogen online design software (BLOCK-iT™ RNAi Designer), amiRNA eukaryotic expression plasmid were constructed and transfected into human hepatocellular carcinoma cell line HepG2.2.15. Hepatitis B virus DNA in supernatant was detected by quantitative fluorescence PCR. HBsAg and HBeAg detected by ELISA. 【Results】 All of the four artificial microRNA sequences could down regulate the level of HBV-DNA, HBsAg and HBeAg. miR3 had the most significant effect on inhibiting HBV-DNA replication. 【Conclusion】 Artificial microRNA sequences can effectively inhibit the replication of HBV in vitro.

Key words: microRNA; hepatitis B virus; replication; RNA interference

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(4): 489-493]

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是导致肝硬化、重型肝炎及肝细胞癌的主要原因。在中国,有大约9%的人口存在慢性HBV感染。干扰素和核苷(酸)类似物等抗病毒治疗药物仍然是目前治疗慢性HBV的唯一选择^[1]。但上述药物副作用大,不能彻底清除肝细胞核内的共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA),而且长时间使用易产生耐药,因此有必

要探索治疗慢性HBV感染的新策略。RNA干扰(RNA interference, RNAi)作为重要的基因治疗手段之一,是治疗HBV等病毒感染最具前景的方法。研究显示,siRNA和shRNA在体内和体外均可以靶向并干扰HBV病毒基因转录体^[2-3]。但由于HBV病毒容易发生变异,因此常导致RNA干扰治疗失败。MicroRNA(miRNA)是一类在真核生物中广泛存在的大小约22 nt的非编码小分子单

收稿日期: 2017-05-05

基金项目: 国家自然科学基金(81000923); 广东省科技计划项目(2013B021800089, 2016A02021602, 2014A020212468)

作者简介: 迟作华, 博士, 副教授, 研究方向: 干细胞基础与临床, E-mail: zhchi33@126.com; 孙艳, 通信作者, 博士, 副教授, 研究方向: 肿瘤免疫机制, E-mail: sxmshw77@163.com

链RNA,仅仅需要和靶基因部分结合即可以发挥作用,因而可以在很大程度上避免上述问题,对容易发生变异的病毒(如HCV, HBV, HIV)治疗更有优势^[4-5]。研究显示,借助于miRNA表达框架,可以实现将靶向特定基因的外源性人工合成的miRNA导入细胞内,达到抑制靶基因的效果,且不影响其他基因的表达。因此本研究针对HBV基因设计并合成外源性miRNA(artificial microRNA, amiRNA),体外观察其对HBV-DNA复制的影响,以期筛选出具有应用前景的amiRNA。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肝癌HepG2.2.15细胞株由广东药科大学生命科学与生物制药学院提供。DMEM高糖培养基、南美胎牛血清(Fetal bovine serum, FCS)购自Gibco公司;感受态细菌TOP10 *E.coli*、pcDNA6.2-G/W-EmGFP-miR表达质粒、pcDNA6.2-G/W-EmGFP-miR-neg阴性对照质粒、Lipofectamine2000购自Invitrogen公司;壮观霉素(Spectinomycin)购自Sigma公司;HBV核酸定量检测试剂盒购自中山大学达安基因公司;HBsAg、HBeAg ELISA检测试剂盒购自上海科华生物工程有限公司;质粒纯化试剂盒购自Bio-Toyobo公司;amiRNA序列和测序引物由上海英骏公司合成。

1.2 构建amiRNA表达质粒

应用Invitrogen公司在线设计软件(BLOCK-iT™ RNAi Designer)分别针对HBV C基因区、P基因区、S基因区、X基因区相互之间重叠区域设计64 nt的amiRNA序列,选取G/C含量在30%~55%之间,评分高的序列4条。合成对应amiRNA及其互补序列,溶解后加入退火缓冲液中95℃反应4 min,室温放置10 min,退火形成双链寡核苷酸。将稀释双链寡核苷酸与线性载体pcDNA6.2-G/W-EmGFP-miR用T4 DNA连接。连接产物导入TOP10 *E.coli*,壮观霉素(50 μg/mL)筛选转化子。挑取单克隆振荡培养,提取质粒。测序确认插入序列正确。

1.3 脂质体转染amiRNA真核表达质粒至HepG2.2.15细胞

消化HepG2.2.15细胞,完全培养基(含体积分数为10%FCS的DMEM高糖培养基)重悬细胞

密度至 1×10^5 /mL,接种24孔板。37℃,体积分数为5%的CO₂培养至细胞密度达80%左右。更换无血清培养基,取1 μg amiRNA表达质粒与2 μL Lipofectamine 2000脂质体混合至培养基中加入24孔板。设置实验组(转染pcDNA6.2-G/W-EmGFP-miR, miR)、阴性对照组(转染pcDNA6.2-G/W-EmGFP-miR-neg, miR-neg)和空白对照组(仅转染Lipofectamine 2000脂质体, mock),每组均设置3个复孔。

1.4 荧光定量PCR检测HBV-DNA

分别于转染48 h和72 h取培养上清,按照HBV-DNA Q-PCR试剂盒说明将样本加入反应管后放入ABI7500 Q-PCR仪扩增,扩增条件:93℃ 2 min, 93℃ 45 s, 55℃ 60 s, 10 cycles; 93℃ 30 s, 55℃ 45 s, 30 cycles。计算HBV-DNA含量,并与空白对照组HBV-DNA含量相比计算HBV-DNA相对水平。

1.5 ELISA检测HBsAg、HBeAg

分别于转染48 h和72 h取培养上清,按照说明书操作测定HBsAg和HBeAg水平。分别设置空白对照组(仅转染Lipofectamine2000脂质体)、阴性对照组(转染空质粒)和实验组(转染miR组)。设置3个复孔。OD_{阴性对照组}或OD_{实验组}与OD_{空白对照组}相比计算HBsAg和HBeAg相对表达量。

1.6 统计学处理

各项指标结果以均数±标准差(mean±SD)表示,应用SPSS 17.0统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),取检验水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

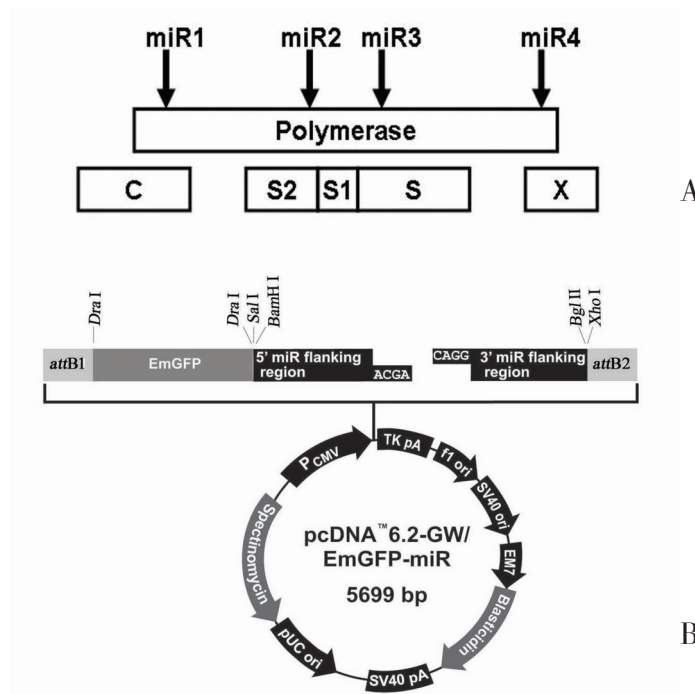
2.1 pcDNA6.2-G/W-EmGFP-miR表达质粒构建及转染

本研究针对HBV基因设计amiRNA,并用BLAST排除靶向人类基因的miRNA,在C基因区和P基因区重叠区设计了miR1, S基因区和P基因区重叠区为靶点分别设计miR2和miR3,在X基因区和P基因区重叠区设计了miR4,选择4个miR(靶向HBV基因位点见图1A)。合成4条miR(以miR1, miR2, miR3, miR4表示)的上游和下游单链序列(表1),退火形成双链后插入pcDNA6.2-G/W-EmGFP-miR质粒(图1B)。所有构建好的表达载体经测序引物测序证实插入序列均正确。

表 1 用于 miRNA 构建的引物序列

Table 1 Primers used for miRNA construction Sequence in italics is the miRNA targeting sequence

Primer name	Primer sequence(5'-3')
miR1 Top Strand	5'-TGCTGAAACAACAGTAGTCTCCGGAAGGTTTTGGCCACTGACTGACTACTGTGGTTACTCTCGTT-3'
miR1 Bottom Strand	5'-CCTGAACGAGAGTAACCACAGTAGTCAGTCAGTGGCCAAAACACTGTGGAGTTACTCTCGTTC-3'
miR2 Top Strand	5'-TGCTGTTGAAGTCCCAATCTGGATTTGTTTTGGCCACTGACTGACAAATCCAGTGGGACTTCAA-3'
miR2 Bottom Strand	5'-CCTGTTGAAGTCCCAGTGGATTTGTCTAGTCAGTGGCCAAAACAAATCCAGATTGGGACTTCAAAC-3'
miR3 Top Strand	5'-TGCTGTTTGGTGGAAAGGTTGTGGAATGTTTTGGCCACTGACTGACATTCCACACTTCCACCAA-3'
miR3 Bottom Strand	5'-CCTGTTTGGTGGAAAGTGTGGAATGTCTAGTCAGTGGCCAAAACATTCCACAACCTTCCACCAAAC-3'
miR4 Top Strand	5'-TGCTGAATATTTGGTGGCGGTTACCGTTTTGGCCACTGACTGACCGTGAACGCACCAAATATT-3'
miR4 Bottom Strand	5'-CCTGAATATTTGGTGGCGTTCACGGTTCAGTCAGTGGCCAAAACCGTGAACGCCACCAAATATTC-3'



A: Targeted the position of miR in HBV gene; B: Map of pcDNA6.2-G/W-EmGFP-miR vector

图 1 真核表达质粒的构建

Fig.1 Construction of eukaryotic expression plasmids

Lipofectamine 2000 脂质体转染 miR 真核表达质粒至 HepG2.2.15 细胞, 48 h 转染效率可达到 80% 以上。

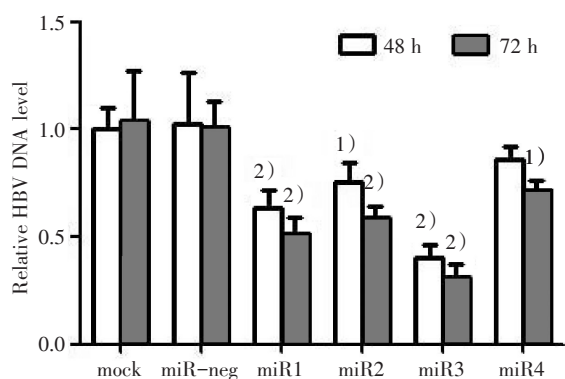
2.2 转染 miR 能抑制 HBV-DNA 复制

将构建的 4 个 miR 表达质粒转染 HepG2.2.15 细胞, 分别于 48 h 和 72 h 采用荧光定量 PCR 法检测 HBV-DNA。结果显示, 4 个 miR 均能下调培养上清中 HBV-DNA 水平(图 2)。以 miR3 抑制 HBV-DNA 复制的效果最为显著。转染 72 h, miR3 组 HBV-DNA 的相对水平为 0.31 ± 0.06 , miR-neg 组为 1.01 ± 0.12 , mock 组为 1.04 ± 0.24 。miR-

neg 组与 mock 组 HBV-DNA 相对水平比较差异没有统计学意义, ($P = 0.763$)。miR3 组与 miR-neg 组 HBV-DNA 相对水平比较有差异具统计学意义 ($P = 0.000$)。

2.3 转染 miR 能抑制 HBsAg 和 HBeAg 的表达

同时于转染后 48 h 和 72 h 采用 ELISA 法检测培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 表达相对水平, 结果显示 4 个 miRNA 均能下调培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 水平(图 3)。转染 72 h 的下调效果优于转染 48 h。4 个 miRNA 中 miR1 下调 HBsAg 效果最好, 而 miR3 下调 HBeAg 效果最好。转染 72 h,



All four miR plasmids had significant inhibitory effect on HBV-DNA replication. Statistical differences were determined using a one-way ANOVA. These results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. 1) $P < 0.05$ and 2) $P < 0.01$, compared with miR-negative control group.

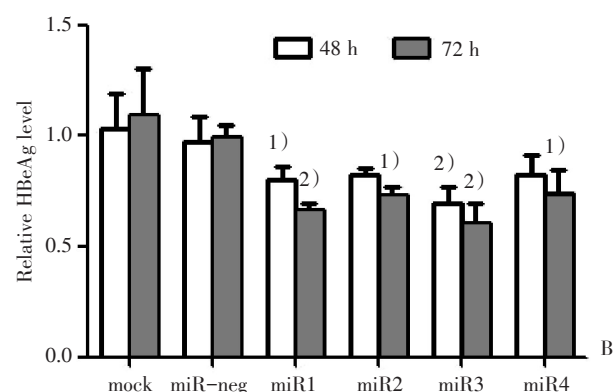
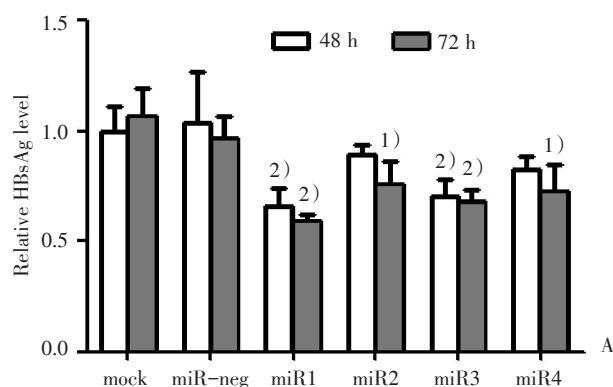
图2 转染 miR 抑制 HBV-DNA 复制

Fig.2 Inhibition effect of miR plasmids on HBV-DNA replication

miR1 组 HBsAg 表达相对水平为 0.59 ± 0.03 , miR-neg 组为 0.97 ± 0.10 , mock 组为 1.07 ± 0.12 。miR-neg 组与 mock 组 HBsAg 表达水平比较差异没有统计学意义 ($P = 0.207$)。miR1 组与 miR-neg 组 HBsAg 表达水平比较差异具有统计学意义 ($P = 0.000$)。转染 72 h, miR3 组 HBeAg 表达相对水平 0.61 ± 0.09 , miR-neg 组为 0.99 ± 0.06 , mock 组为 1.09 ± 0.21 。miR-neg 组与 mock 组 HBeAg 表达水平比较差异无统计学意义 ($P = 0.267$)。miR3 组与 miR-neg 组 HBeAg 表达水平比较差异具有统计学意义 ($P = 0.001$)。

3 讨论

HBV 基因组包含四个互相具有不同程度重叠的开放阅读框架(open reading frame, ORF), 分别称为 S、C、P 和 X 区, 尽管起始于 4 种不同的启动子并产生 4 种转录子, 但都终止于同一靶位, 因此理论上单一 HBV RNAi 即可以同时靶向 2~4 种病毒 mRNA, 是 RNAi 理想的靶向清除对象, 以往的体内外研究证实了这一理论^[6-7], 研究显示, siRNA 长期应用存在病毒基因突变易导致脱靶效应、易降解等问题。而 miRNA 介导的转录后基因调控是生物体内除了 siRNA 沉默之外另一种小



A: Relative level of HBsAg in supernatant after transfected for 48 h and 72 h. B: Relative level of HBeAg in supernatant after transfected for 48 h and 72 h. All four miR plasmids could significantly inhibit the expression of HBsAg and HBeAg. Statistical differences were determined using a one-way ANOVA. These results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. 1) $P < 0.05$ and 2) $P < 0.01$, compared with miR-negative control group.

图3 转染 miR 抑制培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 表达
Fig.3 Inhibition effect of miR plasmids on HBsAg and HBeAg expression

RNA 干扰路径, 尚没有发现明显的脱靶效应和副作用, 因此是目前 RNAi 领域的研究热点。

针对上述 HBV 基因组的特点, 本实验设计了 4 条分别靶向 HBV 四个 OFR 重叠区序列的 amiRNA, 确保每个 amiRNA 可以同时干扰与 HBV 生活周期和复制相关的 2 种蛋白表达。通过构建外源性 miR 表达载体, 脂质体转染 amiRNA 真核表达质粒至乙肝病毒稳定复制的肝癌细胞系 HepG2.2.15 细胞, 发现 4 条 amiRNA 在 48 h 及 72 h 均可下调培养上清中 HBV-DNA 水平, 也明显抑制了 HBsAg 和 HBeAg 的表达。这种抑制作

用随时间延长至 72 h 效果更明显。4 条 amiRNA 中以 miR3 抑制效果最为显著,72 h 对 HBV-DNA 的抑制率可达 70%,可能与 S 基因编码的 S 蛋白(即 HBsAg)是 HBV 组装的必要条件有关。Cheng 等^[8]认为 HBsAg 是 HBV 感染性肝病中一个重要的危险因素,其突变大大提高了 HBV 感染的治疗难度,进行特异性的基因沉默是抑制 HBV 的关键。郜玉峰等^[9-10]以 HBV P 基因和 X 基因为靶基因设计 amiRNA 序列,在 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 水平上均能抑制 HepG2.2.15 细胞中 HBV 的复制和表达。本实验筛选出的最优 amiRNA 对 HBV-DNA、HBsAg 和 HBeAg 的抑制效果均优于前者。

国内外有关 miRNA 在动物模型体内应用效果的研究报道较少,主要问题就在于相关载体体内传输、靶向性及免疫反应等限制。Mowa 等^[11]以辅助病毒依赖型腺病毒载体(helper dependent adenoviral vectors, HDAds)将 amiRNA 用于 HBV 模型小鼠体内。其中,肝组织特异性小鼠转甲状腺素蛋白启动子(murine transthyretin promoter, MTRP)靶向驱动 amiRNA 表达的作用优于没有组织特异性的 CMV 启动子,体内抑制 HBV 复制效率可高达 94%。研究还发现部分载体表达产物激发了体内免疫反应,而降低免疫反应水平可以提高 amiRNA 作用效果。Chen 等^[12]发现 shRNA 与拉米夫定联合作用的抗 HBV 效果较单用拉米夫定强 6 倍,比单用 shRNA 要强 3 倍。上述研究为 miRNA 体内应用及与其他手段联合应用抗 HBV 提供了重要的实验依据。

本研究设计合成并在体外筛选出一条效果较优的 amiRNA,为 HBV 治疗提供了新思路。后续实验将考虑进一步研究其在动物模型体内对 HBV 的抑制作用及与其他手段联合应用的体内外疗效。

参考文献:

- [1] Bitton AM, Shlomai A. New therapies for chronic hepatitis B[J]. *Liver Int*, 2016, 36(6): 775-782.
- [2] Arbuthnot P, Longshaw V, Naidoo T, et al. Opportunities for treating chronic hepatitis B and C virus infection using RNA interference [J]. *J Viral Hepat*, 2007, 14(7): 447-459.
- [3] Li GQ, Yu DM, Lu J, et al. Study of the efficacy of combination therapy of SiRNAs in HepG2.2.15 cells[J]. *Hepatogastroenterology*, 2011, 58(106): 570-574.
- [4] Ely A, Arbuthnot P. Differing prospects for the future of using gene therapy to treat infections with hepatitis B virus and hepatitis C virus [J]. *Discov Med*, 2015, 20(109): 137-143.
- [5] Marc SW, Patrick A. Progress in the use of RNA interference as a therapy for chronic hepatitis B virus infection[J]. *Genome Med*, 2010, 2(28): 21-28.
- [6] Hean J, Crowther C, Ely A, et al. Inhibition of Hepatitis B virus replication in vivo using lipoplexes containing altritol-modified antiviral siRNAs [J]. *Artif DNA PNA XNA*, 2010, 1(1): 17-26.
- [7] Marimani MD, Ely A, Buff MC, et al. Inhibition of replication of hepatitis B virus in transgenic mice following administration of hepatotropic lipoplexes containing guanidinopropyl-modified siRNAs [J]. *J Control Release*, 2015, 10(209): 198-206.
- [8] Cheng TL, Chang WW, Su IJ, et al. Therapeutic inhibition of hepatitis B virus surface antigen expression by RNA interference [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336(3): 820-823.
- [9] 郜玉峰,余莉,叶瑁,等. 外源性 microRNA 介导的 RNA 干扰抑制 HBV 复制和表达[J]. *安徽医科大学学报*, 2010, 45(4): 443-445.
- [9] Gao YF, Yu L, Ye M, et al. Inhibition of hepatitis B virus gene replication and expression by artificial microRNA [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2010, 45(4): 443-445.
- [10] Gao YF, Yu L, Wei W, et al. Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by artificial microRNA [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(29): 4684-4689.
- [11] Mowa MB, Crowther C, Ely A, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by helper dependent adenoviral vectors expressing artificial anti-HBV pri-miRs from a liver-specific promoter [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2014(9): 718743-718750.
- [12] Chen Y, Du D, Wu J, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by stably expressed shRNA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 311(8): 398-404.

(编辑 余 菁)