

RNAi 抑制丙肝病毒复制的研究进展

石川, 曹以诚, 杜正平, 卓敏

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 丙型肝炎病毒(HCV)感染引起的慢性肝病严重影响人类健康, 目前尚无有效的治疗方法, RNAi作为一种有效抵抗外来病毒入侵的机制, 在抗HCV上的应用有着巨大的前景, 本文就近年来在RNAi抑制HCV复制方面的研究进展进行综述。

关键词: RNAi; siRNA; HCV

中图分类号: R373.2⁺1; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2007)06-0059-05

Development of Antiviral Effect to HCV by RNAi

SHI Chuan, CAO Yi-cheng, DU Zheng-ping, ZHUO Min

(School of Biological Science and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, 510640, China)

Abstract: The chronic liver disease caused by Hepatitis c virus infection seriously influenced the human health. However, there is no valid treatment. As an effective mechanism against viral infection, the RNAi showed promising application prospect in the anti- HCV field. In this paper, the researches of RNAi in inhibiting hepatitis c virus infection were summarized.

Key words: RNAi; siRNA; HCV

HCV基因为美国学者于1989年首先发现。全球约有1.7亿人受到HCV感染, 每年有300~400万的新发病例。丙型肝炎病毒(HCV)感染可引起急、慢性病毒性肝炎, 慢性肝炎迁延不愈, 最终导致肝纤维化(LC), 甚至肝细胞癌。目前除干扰素等少数药物在部分患者有一定疗效外, 尚无治愈丙型肝炎的特效药。

Talamini R^[1]等发现高牛奶、酸乳酪、白肉以及水果的摄入可以明显降低HCV感染者的肝癌发病率。HCV之所以能够逃避免疫系统监测产生慢性感染, 其发生机制之一是基因的高度变异, 这迫使人们寻找新的抗病毒的方法。当前, 在体内外动物和细胞培养中利用RNAi抑制肝炎病毒复制取得了令人振奋的效果, 尤其是用于HCV的研究成果很丰富, RNAi有望成为一种新的抗病毒基因治疗方法。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术是指利用21~23 bp小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)诱导与其有同源序列的mRNA降解的过程^[2,3]。RNAi最早是由Fire在线虫实验中发现并提出的^[4]。随后, 在其他动物包括哺乳动物中也发现了RNAi。RNAi技术是一种发展很快的基因控制技术, 在动植物基因功能分析、基因治疗和诊断、作物品种改良等方面已显示出巨大的前景。RNA干扰机制及其医学应用获得

收稿日期: 2007-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(90412015)

作者简介: 石川(1981-), 男, 硕士研究生

2006年诺贝尔医学奖。

1 丙型肝炎病毒(HCV)的病毒特征

HCV是黄病毒家族中的一员, 主要在感染者的肝脏中进行复制, 它可有效破坏机体的免疫识别并表现出极高频率的病毒感染持续性。HCV主要有6种基因型, 我国主要为1型(1a, 1b及混合型)。

HCV是一条长约9.6 kb的正链RNA, 包括一个大的开放阅读框(ORF)和两侧的5', 3'非编码区(UTR)。其完整ORF为5'UTR-C-E1-E2/NS1-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-3'UTR。其中C区编码核心蛋白, E1-E2/NS1区编码包膜糖蛋白, NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b区编码多个非结构蛋白, 各自参与病毒的装配和复制。非编码区(UTR)起病毒翻译的调控作用。

不同的丙型肝炎病毒(HCV)基因链之间核苷酸序列有相当大的变异性(仅67%同源), 但这种变异性并不分布于整个基因组。HCV5'-UTR及上游核心C区是最保守的区域。HCV5'-UTR在不同基因型中高度保守, 形成一个广泛而稳定的二级结构, 并含有内源性核糖体进入位点(IRES), 是病毒基因组中唯一的翻译起始位点, 而且全长的UTR对病毒复制是必须的。C区含有至少5个重要的抗原表位, 表明C区可能与HCV的免疫致病及防御密切相关。因此, 假如增强宿主细胞对HCV C抗原决定簇的细胞免疫,

那么就有可能预防同一病毒不同毒株间的交叉感染。HCV C 区可能是实施基因免疫的重要结构区域。由于 HCV 基因组是一条单链的 RNA,其本身就是 mRNA,所以 HCV 是基于 RNAi 治疗的合适对象。

2 RNAi 在抗 HCV 中的作用

2.1 针对 UTR 区域

Ranadall 等^[9]设计针对 HCV 不同区域的 siRNA,其中针对 5'-UTR 的 siRNA,利用实时 PCR 检测 HCV RNA 的水平,发现转染 12 h 后病毒水平下降 5 倍,在转染 siRNA4d 后 Huh-7.5 细胞中 HCV RNA 的量下降到原来的 1/80。HCV RNA 的水平在 8 d 后依然能够检测出。并且 siRNA 对 HCV RNAs 封闭为剂量依赖性和序列依赖性。当 siRNA 仅和靶序列有 3nt 的差异,就不能抑制病毒复制,这种序列特异性证实 HCV 抗原表达的下降不是双链 siRNA 非特异性激活 IFN 系统所致。

Yokota 等^[10]针对包含了 IRES 的 5'-UTR 区选择了 5 个靶位。首先用化学合成的方法,他们发现,其中最有效的 siRNA 在浓度为 2.5 mmol 时就成功抑制了 81% 的 HCV 复制,当浓度提高到 125 mmol 时,抑制的效率达到了 94%。在此基础上,他们构建了 DNA 载体用以表达 siRNA。他们分别使用了两种方式构建载体,一种是串联的形式,把正义链和反义链分别置于 U6 启动子的下游,另一种是茎环形式的载体,在这种形式中正义链的 3' 末端和反义链的 5' 末端通过一段 9nt 的环状序列相连,同样也置于 U6 启动子的下游。两种 siRNA 表达载体对 HCV 的复制都产生了有效的抑制,但茎环结构的效率比串联结构要高。

Kronke 等^[11]认为以 siRNA 为基础的基因治疗的最大困难是 HCV 有许多高度不同的基因型并且快速出现新的基因型,于是他们探索相应的对策。他们将针对相应靶基因位点的 siRNAs 和病毒自身 RNA 酶相结合(即 esiRNAs)来刺激基因组多个靶位点,发现针对于 HCV 编码序列不同区段的 esiRNA 片段均能有效抑制亚基因组和基因组 HCV 复制子。此外他们制备了含有 shRNA 表达框的逆转录病毒载体,将 12 条靶向 5'-UTR 高度保守序列的 shRNA 片段转染 Huh-7 细胞,其中大部分都位于 5'-UTR 这一高度保守的区域。研究发现,只有在第 IV 域及其附近选择的靶位才能够比较理想地抑制病毒复制子的复制。

Mortimer Korf^[16]不但构建了基于逆转录病毒载体的针对 HCV 5'-UTR 与 3'-UTR 区域的 siRNA,也同样构建了包含针对 HCV 复制所需的辅助因子 PSMA7 与

HUR 的 siRNA 的载体。结果表明,不仅针对 HCV 5'-UTR 区的 siRNA 可以抑制 HCV RNA 与 NS5b 的表达。针对 PSMA7 与 HuR 区域的 siRNA 在抑制其靶位的 RNA 与蛋白表达的同时,也抑制了 HCV RNA 与 NS5B 蛋白的表达,并且针对 UTR 区的 siRNA 与针对辅助因子的 siRNA 的共同作用,以及针对两个辅助因子的 siRNA 的共同作用,都比其之中一种 siRNA 的单一使用有更强的抑制效果。

2.2 针对 IRES 蛋白和 C 蛋白

Liu M 等^[6]针对 HCV 的 core 蛋白和 E2 蛋白设计了 siRNA,他们构建了表达 core 蛋白和 E2 蛋白并整合了 EGFP 报告基因的质粒,与 siRNA 共转染 HEK293T 细胞,在多个时间点检测蛋白表达,结果显示 RNA 的转录和蛋白的表达均收到显著的抑制。

Meehyein Kim 等^[8]在他们所使用的 siRNA 表达载体里面同时使用了 H1 和 U6 启动子,并且方向相反。他们针对 HCV 基因组的 core, NS3, NS4a 和 NS4b 区域设计了 36 条 siRNA,在 Huh-7 细胞中有 15 条可以显著的抑制 HCV 的复制。之后他们采用化学合成的方法合成了其中有显著效果的针对 core 蛋白的 siRNA,导入一个瞬时表达 HCV 结构蛋白的小鼠体内去验证 siRNA 在体内的效果。结果显示,带有一个 G-U 碱基对的 21bp 长的 siRNA 在小鼠体内并没有显著的抑制基因表达,但将 siRNA 延长至 27bp 时,抑制效果显著增强,呈现剂量依赖性并且没有激活 IFN 反应。

2.3 针对 NS 蛋白

Tagigawa 等^[12]设计了针对 HCV 基因组不同区段的 5 条 shRNA 片段,通过表达质粒(pAVU6+27)和含有 pAVU6+27 表达框架的重组慢病毒载体包装两种方式转染,结果发现针对 NS3-1 区、NS5b 的 shRNA 可显著抑制 HCV 亚基因组复制,并且用化学合成的针对 NS3-1 区域的 siRNA 对 HCV 的抑制呈剂量依赖关系。

Sen 等^[13]在人类肝癌细胞系(HepG2)中针对 HCV 基因型 1a 型的 NS5a 区设计了 siRNA,成功抑制了 NS5a RNA 与蛋白的表达。该研究通过内源性的 α 肌动蛋白和 dsRNA 激活的丝氨酸色氨酸激酶作为参照进行检测,发现两者的量并没有相应地减少,并且针对 NS5a 的 siRNA 可以引起核心蛋白表达的抑制。研究还发现,siRNA 还有效地抑制了 NS5a 介导激活的 IL-8 启动子。

Kapadia 等^[14]则用“试错法”进行 RNAi 的研究,在 7 种 HCV 特异性 siRNA 中发现其中 2 种对 HCV 复制子的表达抑制效率最高,靶位分别是针对 NS3 和 NS5b 序列。他们用针对 HCV 的 2 个 siRNA (NS3-1948 和

NS5b-6133) 和 GAPDH 的 siRNA 分别与表达 HCV 的质粒共转染 Huh-7 细胞, 2 d 后, Northern 杂交检测 HCV 的 RNA 含量, NS3-1948 和 NS5B-6133 的抑制程度分别达 5.7 和 8.3 倍, 而 NS3 和 NS5b 蛋白表达水平在转染后第 4 d 和第 6 d 才显著降低。为更准确定量, 对本标本做实时 RT-PCR, 发现 NS3-1948 和 NS5b-6133 抑制 cDNA 效果分别达 21 和 23 倍, 而 GAPDH 特异的 siRNA 没有减少 HCV 的 RNA 含量。通过 IFN2 α 对照实验, 发现 IFN2 α 处理 Huh7 细胞后, 细胞 MxA 和 PKR 水平明显上升, 分别达基础水平的 367 倍和 614 倍, 而 siRNA 转染后, MxA 和 PKR 的水平仅略有上升, 证明 siRNA 的抑制作用存在序列特异性, 并非通过激活 IFN 通路或者改变细胞周期引起。

Wilson 等^[15]首先构建了针对 NS5b 的 siRNA 并转染肝细胞株 Huh-7 细胞, 72 h 后检测发现 NS5b 区的 siRNA 不仅能有效抑制 NS5b 蛋白的表达, 同时也能有效抑制 NS3 蛋白的表达和 HCV 正、负链 RNA 的生成。G418 抗性克隆形成实验则表明, 有的 siRNA 在电转染至 72 h 左右几乎完全抑制了 HCV 复制子的复制过程, 96 h 后此作用明显减弱。此后, 他们又采用了一个基于质粒的表达系统来合成 siRNA, 这个质粒系统可以分别表达 siRNA 的正义链和反义链。他们利用电穿孔的方法将 siRNA 和 HCV 亚基因组同时导入细胞。HCV 特异性的 RNA 干扰作用能维持 21 d 之久。

3 RNAi 对肝细胞的保护

研究者对于 siRNA 的研究, 并不局限于抑制 HCV 的复制, 也包括对肝细胞的保护。Wilson 等^[17]研究表明 RNAi 技术可显著减轻 HCV 复制引起的肝细胞损伤。

初步的研究结果提示, 在 HCV 系统中可能存在 RNAi 在细胞间的逐步蔓延, Kapadia 的研究证实, 在细胞被转染了 siRNA 后, 整个细胞培养系统中的 HCV 蛋白表达大幅下降^[13]。这项研究可能提示我们, 在哺乳动物细胞中的信号传播机制中用少量的具有 RNAi 的细胞来保护大量的正常的肝细胞免受病毒入侵这一新的思路。

Song^[19]等考虑到 Fas 介导的细胞凋亡在慢性肝损伤及肝脏纤维化进展过程中的作用, 设计了针对编码 Fas 基因的 siRNAs, 尾静脉注射入小鼠体内后, 发现小鼠肝细胞中 Fas 的 mRNA 水平下降, 表达的蛋白减少, 肝细胞的自身破坏明显缓解。在使用 Fas-siRNAs 后, 有 82% 的小鼠有效抑制了 Fas 基因并存活了 10 d, 而给予盐水和 GFP-siRNA 的对照组的小鼠都在 3 d 内

死亡。在注射 14 d 后, Fas-mRNA 水平仍保持在较低水平, 仅为对照组的 40%。实验结果还证明, Fas-siRNA 能减轻肝损伤中的延迟性肝细胞的凋亡和肝纤维化, 表明 siRNA 能影响肝损伤的急性期、亚急性期以及慢性期的病理生理过程。

4 HCV 对 RNAi 的逃逸

由于 HCV 的高突变率, 使得 siRNA 对 HCV 的抑制会由于 HCV 的突变而降低。Wolkowicz R^[18]报道在人体细胞的 RNAi 的过程中, siRNA 与 mRNA 的序列错配不会使其完全失效。Wilson^[17]也在他后续的文章中指出 HCV 会在 siRNA 的靶位产生点突变以逃逸 RNAi, 用 2 个或者更多的 siRNA 同时作用 HCV 会显著的抑制突变逃逸。

Konishi M 等^[7]在他们的针对 HCV 的 RNAi 实验中, 发现 siRNA 对 HCV 作用 4 周后, 抑制效果会减少到最初的 50%, 停止使用 siRNA 后 HCV 的表达量会升至原来的 85%, 他们发现抑制效果的降低与靶位及其上游序列的突变, 特别是点突变有关。

Scot D. Henry 等^[5]在针对 HCV 的 RNAi 实验中, 认为通过抑制 HCV 复制必须的细胞因子 (CD81) 可以避开 HCV 的高突变率对 RNAi 的逃逸。他们在一个慢病毒载体 (LV) 中分别插入 1~3 个 shRNA 的表达框来同时生成 1~3 个针对 HCV 不同靶位以及 CD81 的 shRNA, 每个 shRNA 都配有独立的 H1 启动子, 这些 shRNA 经 Dicer 酶剪切后生成有活性的 siRNA。实验结果显示, 含有针对 HCV 多个靶位的 shRNA 的慢病毒载体与含有同时针对 HCV 与 CD81 的 shRNA 的慢病毒载体都比只表达单一 shRNA 的慢病毒载体有更好的抑制效果。并且多表达载体对 HCV 的抑制效果可以持续 17 d。但这种多表达载体里至少需要两个针对 HCV 基因组的 shRNA。

5 结语

siRNA 可以高效抑制 HCV 特定基因的复制和表达, 而不干扰其他基因的转录, 同时还能通过关闭 Fas 基因来对肝细胞进行保护, 在近几年的研究中取得了可喜的成果。综合最近几年的研究成果可以发现, 针对 HCV 的 RNAi 的研究重点, 已经从筛选针对 HCV 基因组特定靶位的高效 siRNA 转移到其它方面, 包括如何避免 HCV 的高突变率所造成的对 siRNA 的逃逸, 如何增加 siRNA 在体内的稳定性, 在对 HCV 与宿主的免疫调节给与足够的重视, 特别是真核宿主的细胞因子对 HCV 复制、转录的调节。目前的方法包括同

时采用针对 HCV 多个靶位的 siRNA 及将靶位选择在 HCV 复制必须的辅助因子以避免 HCV 的高突变性;用含有多个表达框的慢病毒载体同时表达多个 siRNA,采用能够持续稳定表达 siRNA 的载体以产生持续的抑制效果。这表明 siRNA 在作为基因治疗的研究中取得了长足的进步,但要将其作为人类基因治疗的有效手段,还存在一些问题。(1)最佳靶位的选择,虽然已筛选出针对 HCV 的各个蛋白的高效 siRNA,但都有并不是所有的 siRNA 都有高效的抑制效果。这可能因为病毒的 mRNA 序列埋藏在二级结构或高度折叠区,或可能与某些蛋白质形成紧密的复合物,使 siRNA 难以接近 mRNA。(2)HCV 的突变对 RNAi 的逃逸。尽管已有研究发现多个 siRNA 的共同作用可以有效避免 HCV 的突变逃逸^[17],但 HCV 的突变始终存在,从长远观点出发是否要靠不断增加 siRNA 的条数来应对 HCV 的高突变率还不得而知。(3)siRNA 的长期稳定表达。虽已有文献报道依靠表达载体 siRNA 在体外的表达时间可达 0.5 月之久^[5],但在体内的情况还不明朗。(4)在小动物模型成功应用的转染方法并不适宜在人体进行,要使 siRNA 分子能顺利进入人体并在肝脏中特异表达,还需要寻找更为有效的靶向和传递方法。

siRNA 问世短短几年就取得了迅猛的发展并越来越受到人们的重视。相信随着 siRNA 机制的逐渐明了和相关问题的不断解决,siRNA 将在应对 HCV 感染方面发挥巨大作用。

参考文献

- [1] Talamini R, et al. Food groups and risk of hepatocellular carcinoma: A multicenter case-control study in Italy [J]. International Journal of Cancer,2006, 119 (12): 2916-2921
- [2] Zamore PD. RNA interference: listening to the sound of silence [J]. Nat Struct Biol ,2001,8(9):746-750
- [3] Elbashir SM, et al. RNA interference is mediated by 21 and 22 nucleotide RNAs[J]. Genes Dev ,2001,15(2):188-200
- [4] Fire A, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391(6669):806-811
- [5] Scot D. Henry, et al. Simultaneous Targeting of HCV Replication and Viral Binding with a Single Lentiviral Vector Containing Multiple RNA Interference Expression Cassettes [J]. Molecular Therapy.2006,14(4):485-493
- [6] Liu M, et al. RNA interference effectively inhibits mRNA accumulation and protein expression of hepatitis C virus core and E2 genes in human cells. Bioscience [J] Biotechnology and Biochemistry.2006,70(9):2049-2055
- [7] Konishi M, et al. siRNA-resistance in treated HCV replicon cells is correlated with the development of specific HCV mutations [J]. Journal of Viral Hepatitis, 2006,13(11):756-761
- [8] Meehyein Kim, et al. Inhibition of hepatitis C virus gene expression by small interfering RNAs using a tri-cistronic full-length viral replicon and a transient mouse model[J].Virus Research,2006,(122):1-10
- [9] Randall G, et al. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs.Proc [J] Natl Acad Sci USA,2003,100:235-240
- [10] Yokota T, et al. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs[J].EMBO Rep,2003,4:602-608
- [11] KrËnke J, et al. Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs[J].J Virol,2004,78(7):3436-3446
- [12] Takigawa, et al. Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5b regions of the viral genome [J]. Microbiology and Immunology,2004, 48:591-598
- [13] Sen A, et al. Inhibition of hepatitis C virus protein expression by RNA interference [J]. Virus Res, 2003,9(6): 27-35
- [14] Kapadia SB, et al. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003,100(4): 2014-2018
- [15] Wilson JA, et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003,100(5): 2783-2788
- [16] Mortimer Korf, et al. Inhibition of hepatitis C virus translation and subgenomic replication by siRNAs directed against highly conserved HCV sequence and cellular HCV cofactors [J]. Journal of Hepatology,2005,(43):225-234
- [17] Wilson JA, et al. Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region [J]. Journal of Virology 2005, 79 (11): 7050-7058
- [18] Wolkowicz R, et al. Gene therapy progress and prospects: Novel gene therapy approaches for AIDS [J]. Gene Therapy, 2005,12(6): 467-476
- [19] Song E, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis [J]. Nat Med, 2003,9(3): 347-351