

· 综述 ·

RNA 干扰技术用于乙型肝炎病毒感染治疗的研究进展*

吴园园 综述, 管世鹤[△] 审校

(安徽医科大学第二附属医院检验科, 合肥合肥 230601)

关键词: RNA 干扰; 基因沉默; 肝炎病毒, 乙型; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.046

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)06-0731-03

急、慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染是临床常见病, 可因HBV长期存在而导致肝细胞持续损害和肝纤维化, 甚至发展为肝硬化、肝癌。目前药物抗病毒治疗还没有取得根本性突破。采用 RNA 干扰(RNAi)技术可在组织细胞内介导基因沉默, 进而发挥治疗疾病的作用, 为 HBV 感染的基因治疗带来了新的希望。本文就 RNAi 在抗 HBV 基因治疗中的应用作一综述。

1 RNAi 作用机制及生物学特性

RNAi 可用于沉默各种病毒基因和病毒复制所必需的细胞基因。RNAi 是一种由双链 RNA(dsRNA)引发的序列特异性基因沉默, 在内切酶 Dicer 的作用下, 将 dsRNA 水解成大小为 21~23 bp 的小 dsRNA 片段, 即小干扰 RNA(siRNA), 由 siRNA 介导在 mRNA 水平关闭相应序列基因的表达或使其沉默的过程, 即转录后基因沉默(PTGS)。siRNA 解旋后的反义链与蛋白因子形成 RNA 诱导的沉默复合体(RISC), 可识别和切割靶 mRNA。与 siRNA 结合的蛋白因子具有 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RDRP)活性, 在 RDRP 的作用下 siRNA 以靶 mRNA 作为模板合成 dsRNA, 后者可被降解形成新的 siRNA。目前 RNAi 已广泛用于抑制基因表达的试验研究, 是研究人工合成哺乳动物 siRNA 的有力工具, 特别是用于癌症和病毒感染相关研究。RNAi 通过双链小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)的介导, 以序列特异性方式结合靶基因 mRNA, 从而实现基因表达的沉默。

2 RNAi 在 HBV 感染治疗中的应用

HBV 属于嗜肝 DNA 病毒家族, 其基因组全长 3.2 kb, 含有部分双链结构。HBV DNA 的长链为负链, 短链为正链, 负链含有 4 个开放阅读框(ORF), 分别为 S、C、P 和 X 区。S 区编码 HBV 衣壳蛋白 HBsAg, PreS1 及 PreS2 抗原; C 区编码 HBcAg 和 HBeAg; P 区最长, 其表达产物与 HBV 复制密切相关, 在病毒基因组包装、RNA 依赖的 DNA 合成等不同环节发挥作用。X 区的表达产物 HBxAg 具有反式激活作用, 可激活 HBV 本身、其他病毒或宿主细胞内的多种调控基因。虽然 HBV 是 DNA 病毒, 但其复制过程中存在从前基因组 RNA 逆转录到 DNA 的重要环节。研究表明, RNAi 可有效作用于 HBV, 通过切割前基因组 RNA 和其他转录本 mRNA, 从而阻断 HBV 的表达和复制^[1-5]。HBV DNA 的负链包含的 4 个区可提供数百个 RNAi 作用位点^[6-7]。

2.1 针对 HBV DNA S 区 S 区包括 S 基因和前 S 基因。S 基因主要编码 HBsAg, 位于 S 基因之前的是编码 163 个氨基酸的前 S 基因, 编码 Pre S1 和 Pre S2 蛋白。周豪杰等^[8]以

HBV S 基因为靶点, 根据 RNAi 设计原则, 选择 HBV DNA 序列 357~375 及 520~538 位点设计了 2 对寡核苷酸 S1 和 S2, 同时设计 1 对无关序列, 构建 RNAi 表达载体 pSUPER-S1 和 pSUPER-S2, 对细胞培养上清中 HBsAg 抑制率分别为 79.0% 和 43.2%, 而无关序列干扰载体无类似的抑制作用, Western blot 检测结果与细胞上清检测一致, 表明针对 HBV S 基因的 RNAi 干扰载体能高效且特异地抑制 HBV S 基因的表达, 且 pSUPER-S1 的抑制作用强于 pSUPER-S2。Giladi 等^[9]则证实, 具有 HBV S 基因特异性的 siRNA 不但能够在体外, 更能在小鼠体内抑制 HBV 抗原和 DNA 水平, 当给小鼠注射复制功能缺陷的 HBV 质粒后, siRNA 治疗仍能取得很好的效果。

针对 HBV S 基因的 siRNA 能稳定、高效、特异地抑制 HBV 基因表达, 但转染效率对干扰作用有明显影响^[10]。刘家云等^[11]采用针对 HBV S 基因的 siRNA 表达载体 pSUPER-S1 和 pSUPER-S2, 分别瞬时转染和稳定转染表达 HBV 的 HepG2. 2. 15 细胞, 证实 pSUPER-S1 和 pSUPER-S2 均能明显抑制 HBsAg 及 HBeAg 的分泌($P < 0.01$), 抑制率分别为 83% 和 78%, RT-PCR 结果证实 HBV mRNA 水平明显降低, 而瞬时转染对病毒蛋白质及 mRNA 水平的影响弱于稳定转染。

2.2 针对 HBV C 区 HBV DNA 的 C 区长度为 639 bp, 编码 HBcAg 和 HBeAg。李绍祥等^[12]选择 HBV DNA C 区 2 021~2 049 位核苷酸作为靶序列, 合成相应的正、反义寡核苷酸, 克隆入 shRNA 表达质粒, 将得到的质粒与 HBV 质粒共转染 HepG2 细胞, 观察 HepG2 细胞中 HBV 的受抑制情况, 结果显示病毒复制及 HBeAg 的表达明显受抑。Hamasaki 等^[13]用针对 C 区的 siRNA 与 HBV DNA 全长质粒共转染 Huh-7 和 HepG2 细胞, 并以针对绿色荧光蛋白的 siRNA 作为阴性对照, 发现 HBeAg 表达水平下降了 5 倍, Southern blot 试验也证实了病毒复制的下降。

2.3 针对 HBV P 区 HBV DNA 的 P 区是病毒最大的读码框, 其编码的 DNA 聚合酶与 HBV DNA 的复制、逆转录及 3.5 kb 的前基因 RNA 的消化分解功能有关。Yao 等^[14]针对 P 区设计了 4 种 RNAi 和对照组, 分别转染 HepG2. 2. 15, 并对转染后细胞培养上清进行 ELISA、Western blot、HBV DNA 定量分析, 结果显示 4 种对于不同靶 mRNA 的 siRNA 对 HBV 的转录和翻译具有不同程度的抑制作用。高海燕等^[15]通过流体动力学方法构建了 HBV 感染小鼠模型, 能显著抑制 HBV DNA 复制, 抑制率为 33%, 对 HBV 3.5 kb mRNA、S-mRNA 和肝内 HBsAg、HBcAg 的表达也有抑制作用; 而无关干扰在 DNA、RNA 和蛋白质水平均未产生抑制作用, 说明 siRNA 的作用具

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81171662); 安徽省卫生厅科学基金资助项目(2010C057)。 △ 通讯作者, E-mail: Shiheguan@126.com

有序列特异性。对 0.7 kb mRNA 无明显抑制作用,可能与 pSiHBV/P 的靶序列有关。HBV DNA 可转录出 4 种 mRNA,即 0.7、2.1、2.4 和 3.5 kb mRNA, pSiHBV/P 的靶序列位于 HBV 1012~1030 位核苷酸之间,故对 0.7 kb mRNA 无直接抑制作用,而对 HBV 2.1、2.4、3.5 kb mRNA 均有抑制作用。另有研究也证实 RNAi 技术在体内外均有抗 HBV 作用,且具有很多优势^[16~18]。

2.4 针对 HBV X 区 X 区 (l374~1838 位核苷酸) 长度为 465 bp,是最小的蛋白质编码区,编码 154 个氨基酸。由于 HBV X 基因常常整合入宿主细胞基因组中,且 x 蛋白在病毒复制和肝癌发病中具有重要作用,针对 HBV 保守序列设计的 siRNA 在核酸杂交治疗中发挥重要作用^[19]。李绍祥等^[12]选择 HBV 基因组 X 区 1681~1708 位核苷酸作为靶序列,合成相应的正、反义寡核苷酸,退火后形成双链,克隆入 shRNA 表达质粒,将得到的质粒与野生 HBV 质粒共转染 HepG2 细胞为实验组,野生 HBV 质粒转染 HepG2 细胞为对照组;结果发现,实验组与对照组的 HBeAg 表达量分别为 (26.8 ± 9.7)%、(100 ± 7.8)%,RNA 拷贝数为 (1.5 ± 0.8) 和 (4.2 ± 0.9) × 10⁸/L,HBV DNA 为 (4.8 ± 1.5) 和 (18.0 ± 1.8) × 10¹⁰/L,三者均明显受抑。段梦夕等^[20]构建了 Bcl-xL 靶向 shRNA,转染肝癌细胞 HepG2 后,经采用 RT-PCR 和流式细胞术分别检测 shRNA 对 Bcl-xL mRNA 和蛋白水平的抑制效应,采用 MTT、TUNEL 等技术检测 shRNA 处理前后细胞生物学行为的变化;结果证实 shRNA 能有效抑制 Bcl-xL 基因表达,mRNA 和蛋白表达明显降低,抑制率分别为 86.6% 和 70.2%;肝癌细胞生长明显减慢。细胞转染非特异性 shRNA 后的增殖能力未受到影响 ($P > 0.05$),而转染 Bcl-xL 靶向 shRNA 的细胞增殖能力降低、凋亡增加 ($P < 0.05$)。可见 RNAi 在体外可明显抑制肝癌细胞中 Bcl-xL 基因的表达和肿瘤细胞增殖,可能与促进细胞凋亡有关,为开辟 Bcl-xL 靶向 RNAi 治疗肝癌提供了实验基础。有学者构建 shRNA 抑制 HBx 的表达,并观察相应的调控作用,研究表明 RNAi 能降低 HBx mRNA 和蛋白水平,靶向 HBV X 基因的 shRNA 可明显减少细胞增殖及瘤组织在裸鼠中的生长速度^[21]。

2.5 siRNA 的联合应用 联合应用两种以上的 siRNA,无论针对 HBV 同一基因区还是不同基因区,其抑制效率均比单一 siRNA 高^[22]。Li 等^[23]用重组 HBV 质粒转染 HepG2.2.15,并用含 0.05 μmol/L 拉米夫定的培养基培养转染后的细胞,分别于 48、72、96 h 采集上清液,ELISA 检测 HBeAg、HBsAg,实时荧光定量 PCR 检测 HBV DNA,逆转录 PCR 检测 HBV mRNA,结果显示 siRNA 和拉米夫定联合处理 HepG2.2.15 细胞 96 h 时,对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率分别达 82.40% 和 91.80%,siRNA 单独处理的抑制率分别只有 60.57% 和 70.92%,拉米夫定单独处理抑制率分别为 30.53% 和 22.85%;HBV DNA 复制也明显受抑,siRNA 和拉米夫定联合组、siRNA 组、拉米夫定组的抑制率分别为 88.42%、65.48%、73.27%;siRNA 和拉米夫定联合处理对 mRNA 的抑制率也明显高于 siRNA 或拉米夫定单独处理。因此,siRNA 和拉米夫定联合作用比 siRNA 或拉米夫定单独作用更有效。此外,汤宏斌等^[24]的动物模型研究也证实,与单表达 siRNA 相比,双表达 siRNA 对 HBV 抗原表达的抑制更为明显。

3 小 结

以 S、C、P 和 X 区作为靶向基因各有优势,但均可有效抑制 HBV 复制。针对相同基因区的不同 siRNA 具有不同的抑制率,选择高效、保守的靶向基因区能达到更高的抑制率。 siRNA 技术用于抗 HBV 治疗具有可行性和较大的发展潜力。随着 siRNA 作用机制研究的深入和 RNAi 技术的不断改进,相信 siRNA 技术必将给抗 HBV 治疗带来巨大飞跃。

参考文献

- Xu C, Lee SA, Chen X. RNA interference as therapeutics for hepatocellular carcinoma [J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2011, 6(1): 106~115.
- 付汉东, 张爱华, 鲁艳, 等. 自体骨髓干细胞移植治疗肝硬化患者血清 IL-18、TNF-α、TGF-β1、HGF 水平变化及临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 329~330.
- Gish RG, Satishchandran C, Young M, et al. RNA interference and its potential applications to chronic HBV treatment: results of a Phase I safety and tolerability study [J]. Antivir Ther, 2011, 16(4): 547~554.
- 李云, 夏正武, 瞿良. 乙型肝炎血清学标志物与 HBV DNA 的相关性分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(4): 442~443.
- Carmona S, Jorgensen MR, Kolli S, et al. Controlling HBV replication in vivo by intravenous administration of triggered PEGylated siRNA-nanoparticles [J]. Mol Pharm, 2009, 6(3): 706~717.
- Xiang WQ, Feng WF, Ke W, et al. Hepatitis B virus X protein stimulates IL-6 expression in hepatocytes via a MyD88-dependent pathway [J]. J Hepatol, 2011, 54(1): 26~33.
- Dyer V, Ely A, Bloom K, et al. tRNA Lys3 promoter cassettes that efficiently express RNAi-activating antihepatitis B virus short hairpin RNAs [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 398(4): 640~646.
- 周豪杰, 汪传喜, 滕青. 载体介导的 RNAi 抑制乙肝病毒 S 基因的研究 [J]. 海南医学, 2010, 21(20): 4~6.
- Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, et al. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice [J]. Mol Ther, 2003, 8(5): 769~776.
- Xiangji L, Feng X, Qingbao C, et al. Knockdown of HBV surface antigen gene expression by a lentiviral microRNA-based system inhibits HBV replication and HCC growth [J]. J Viral Hepat, 2011, 18(9): 653~660.
- 刘家云, 李庆霞, 黄红艳, 等. 瞬时转染和稳定转染对 RNAi 抑制乙型肝炎病毒 S 基因表达的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(11): 961~964.
- 李绍祥, 同彩珍, 张成平, 等. RNAi 靶向抑制 HBV 复制和 HBeAg 表达 [J]. 河北医科大学学报, 2008, 29(3): 333~336.
- Hamasaki K, Nakao K, Matsumoto K, et al. Short interfering RNA-directed inhibition of hepatitis B virus replication [J]. FEBS Lett, 2003, 543(1~3): 51~54.
- Yao J, Yu W, Chang Y, et al. Targeted screening of SiRNA directed HBV polymerase gene for effective inhibition of HBV expression [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2008, 28(3): 266~271.
- 高海燕, 张建军, 杨向东, 等. 聚合酶 RNA 干扰对小鼠体内乙型肝炎病毒的抑制作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(22): 2448~2452.
- 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.
- McCaffrey AP. RNA interference inhibitors of hepatitis B virus [J/OL]. Ann N Y Acad Sci, 2009-11-21 [2011-12-19], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19796073>.

- [18] Kim JW, Lee SH, Park YS, et al. Inhibition of in vitro hepatitis B virus replication by lentivirus-mediated short-hairpin RNA against HBx[J]. Korean J Hepatol, 2009, 15(1): 15-24.
- [19] Pu C, Wang L, Miao X, et al. Optimized tandem amiRNA mediates stronger inhibitory effects on hepatitis B virus infection[J]. J Gastrointest Liver Dis, 2011, 20(3): 271-278.
- [20] 段梦夕,袁宏,等. RNA 干扰沉默 Bcl-xL 基因对肝癌细胞 HepG-2 生物学行为的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(3): 98-101.
- [21] Chan DW, Ng IO. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells[J]. J Pathol, 2006, 208(3): 372-380.

· 综述 ·

干细胞体外三维培养的研究进展*

王甜甜 综述, 赵树铭[△] 审校

(第三军医大学西南医院输血科, 重庆 400038)

关键词: 干细胞; 三维培养; 生物支架; 生物反应器; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.047

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2012)06-0733-03

胚胎干细胞(ESCs)、造血干细胞(HSCs)和间充质干细胞(MSCs)等属于全能或多能干细胞, 具有自我更新、无限增殖和多向分化潜能, 可在特定条件下诱导分化为巨核细胞、骨细胞、生殖细胞等^[1-2]。目前干细胞的主要来源于脐血, 具有采集方便、移植成活率高、移植物抗宿主病(GVHD)发生率低、扩增能力强等特点, 故广泛应用于各系统疾病的肝细胞移植治疗^[3]。但单份脐血量较少, 且移植后归巢定植率不高, 有时无法满足成人移植需要, 因此需要体外大量扩增干细胞以达到治疗所需^[4-6]。近年来, 细胞治疗的临床应用日益广泛, 也需要对干细胞进行体外扩增和诱导分化, 以获取大量的治疗用细胞。传统的干细胞培养主要依赖二维平面培养, 其培养体系在空间结构、细胞外基质、细胞因子添加等方面无法模拟体内的三维造血微环境。因此, 国内外学者在干细胞三维培养方面进行了广泛探索, 取得了较大进展。本文将对干细胞体外三维培养技术的研究进展进行综述。

1 三维细胞培养

细胞的发育和功能都依赖于细胞微环境中分子间的相互作用。传统的二维细胞培养是较为普遍的细胞培养手段, 并不是细胞生长的自然状态, 因而细胞在基因表达、信号转导和形态学方面都可能与天然状态存在差异。三维细胞培养(TDCC)是将三维载体与细胞在体外共培养, 使细胞在载体的立体空间结构中迁移、生长, 构成三维的细胞载体复合物。三维培养体系为细胞提供类似体内生长环境的支架或基质, 细胞通过紧密连接和(或)缝隙连接等方式建立细胞间及细胞与基质间的联系, 形成一定的三维结构; TDCC 在基因表达、基质分泌及细胞功能活动等方面与二维培养均有明显差异, 与体内细胞生长环境更为相似。因此, TDCC 既能保留体内细胞微环境的物质结构基础, 又能体现细胞培养的直观性及条件可控制性。

2 三维培养材质

2.1 生物支架 组织工程的关键在于构建细胞和生物支架的

- [22] Chen CC, Sun CP, Ma HI, et al. Comparative study of anti-hepatitis B virus RNA interference by double-stranded adeno-associated virus serotypes 7, 8, and 9[J]. Mol Ther, 2009, 17(2): 352-359.
- [23] Li GQ, Xu WZ, Wang JX, et al. Combination of small interfering RNA and lamivudine on inhibition of human B virus replication in HepG2. 2. 15 cells[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(16): 2324-2327.
- [24] 汤宏斌, 郭开朗, 姜鲲, 等. 双表达小干扰 RNA 抑制小鼠体内 HBV 感染[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(9): 1-6, 封 2.

(收稿日期: 2011-12-31)

三维复合体, 为细胞摄取营养和气体交换等提供立体空间。目前, TDCC 所用的生物材料主要包括可降解高分子材料、新肽生物材料、天然高分子与合成高分子的复合物、有机材料与无机材料的复合物等^[7-8]。天然高分子材料及生物可降解材料无毒性、无致癌作用, 对人体无不良反应, 但材料中存在杂质, 因此选用时必须经过严格的纯化, 而且力学强度相对比较差。合成高分子材料及新肽生物材料的操作性更强, 可以根据要求进行分子设计, 并用物理化学方法调节支架大小, 可批量生产, 但材料中残存的杂质, 例如低聚物、催化剂等, 会对细胞产生不利影响, 因此必须进行生物毒性及相容性检测。Ouyang 等^[9] 用聚对苯二甲酸乙二酯(PET)纤维材料培养、扩增 ESCs, 研究表明 PET 的三维结构能够为细胞提供仿生环境, 并可使细胞免受剪切力的损伤, 孔径小的 PET 纤维材料更利于细胞生长。Cao 等^[10] 将 MSCs 接种在 PET 支架上, 培养 20 d 后观察细胞生长和代谢, 鉴定表面标志。结果表明, MSCs 接种密度最低时, 扩增倍数最高, 并维持其未分化状态及细胞的多潜能性, 细胞扩增受支架孔隙率、表面积、吸水性、种植率等因素的影响。

2.2 微载体 微载体直径介于 60~250 μm , 是用明胶、胶原、纤维素、甲壳质及其衍生物海藻酸盐等材料制成微珠^[11]。细胞培养时, 将其悬浮在细胞培养液中, 细胞可完全舒展, 紧密黏附于微载体表面。微载体悬浮于培养体系中, 细胞吸收营养均匀, 培养环境也易于检测、控制和优化, 细胞更易贴壁培养, 因此, 可以获得较高的细胞密度。Eibes 等^[12] 在搅拌式生物反应器(Stirred-tank Bioreactor)中采用明胶微载体复合血清培养基培养 MSCs, 结果显示, 细胞很好地黏附和扩展, 第 8 天时可扩增 8 倍以上, 并保留成脂和成骨分化潜能, 流式细胞仪测得 CD73、CD90 和 CD105 的标记率可达 90%。在大规模细胞培养中, 微载体培养有利于利用培养基的有效空间, 与搅拌反应器结合, 可更好地增加细胞的营养物质的吸收和代谢产物的扩散, 提高了扩增效率。

* 基金项目: 重庆市科委科技攻关项目(CSTC: 2011AC5039)。

△ 通讯作者, E-mail: shumingzhao@yahoo.com.