

• 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[△] 审核

(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 结合的蛋白质因子具有 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 HBeAg 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 HBeAg 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 的前基因组 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、HBeAg 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(1374~1838 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 $(26.8 \pm 9.7)\%$ 、 $(100 \pm 7.8)\%$,RNA 拷贝数为 (1.5 ± 0.8) 和 $(4.2 \pm 0.9) \times 10^8/\text{L}$,HBV DNA 为 (4.8 ± 1.5) 和 $(18.0 \pm 1.8) \times 10^{10}/\text{L}$,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 $0.05 \mu\text{mol/L}$ 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

- [1] Xu C, Lee SA, Chen X. RNA interference as therapeutics for hepatocellular carcinoma [J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2011, 6(1): 106-115.
- [2] 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- β 1、HGF 水平变化及临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 329-330.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Giladi H, Ketzinil-Gilad M, Rivkin L, et al. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice [J]. Mol Ther, 2003, 8(5): 769-776.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 李绍祥, 闫彩珍, 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.

- [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, 邬开朗, 姜妮, 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)

• 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

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。