

靶向 HIV-1 *pol* 的高效人工 miRNA 的构建与体外抗病毒能力评价

程通, 张涛, 张雅丽, 魏丽华, 夏德镇, 王颖彬, 张军, 夏宁邵

厦门大学生命科学学院 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 厦门 361005

摘要: RNAi 技术在抗 HIV-1 治疗研究中已显示出巨大潜力, 获得可高效特异抑制 HIV-1 的 RNAi 元件是进行相关研究的重要基础。miRNA 在抑制和表达方式上相比 siRNA 具有更多的优势。本研究即探讨构建可高效特异靶向 HIV-1 的人工 miRNA 元件。选择以保守性较好的 HIV-1 *pol* 基因为靶区筛选高效保守的 RNAi 序列, 设计了 16 个可靶向 *pol* 区高保守区段的 RNAi 靶点, 构建表达载体与 HIV-1 感染性克隆进行共转染抑制实验, 筛选显示 pol1026 序列兼具高保守性及高抑制效率特点。以天然 miR-30a 为基础骨架构建了靶向 pol1026 靶点的人工 miRNA 元件, 通过与 HIV-1 感染性克隆质粒的共转染抑制实验验证获得了可有效抑制 HIV-1 表达的人工 miRNA 元件 (miR-1026E)。通过与携带靶序列的报告质粒的共转染实验证明 miR-1026E 具有良好的靶点特异性。本研究进一步构建了携带 miR-1026E 表达元件的重组慢病毒, 转导 MT-4 细胞并对转导后细胞进行克隆化筛选, 获得稳定整合 miR-1026E 表达元件的 MT-4-miR1026E 细胞克隆, 该细胞在体外攻毒实验中可高效抑制 HIV-1 的复制, 具有显著的抑制 HIV-1 的能力。同时应用实时 RT-PCR 方法检测显示, miR-1026E 在细胞中不会影响内源性代表 miRNA (miR-181 与 miR-16) 的表达水平和干扰素效应相关基因 *stat1* 的表达水平, 具有良好的特异性。所获得的可特异高效抑制 HIV-1 复制的人工 miRNA 元件可为抗 HIV-1 研究提供重要参考。

关键词: RNA 干扰, HIV-1, *pol*, 人工 miRNA

Construction and *in vitro* antiviral activity of highly effective artificial miRNA targeting to HIV-1 *pol*

Tong Cheng, Tao Zhang, Yali Zhang, Lihua Wei, Dezhen Xia, Yingbin Wang, Jun Zhang, and Ningshao Xia

National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: RNA interference (RNAi) has exhibited huge potentials on anti-HIV-1 therapy research. The obtainment of RNAi element targeting to HIV-1 highly effectively and specifically was crucial for relevant research. Recent reports had described that microRNAs (miRNAs) possess more characteristics of inhibition and expression mechanisms than small interfering RNAs (siRNAs). In this study we explored the construction of artificial miRNA targeting to HIV-1 effectively and specifically. Sixteen siRNAs

Received: July 22, 2009; **Accepted:** November 4, 2009

Supported by: Natural Science Foundation of Fujian Province (No. C0710041), Key Knowledge Innovation Project of MOE (No. 705031), Key Science and Technology Projects of Fujian Province (No. 2004YZ01).

Corresponding author: Ningshao Xia. Tel: +86-592-2184113; Fax: +86-592-2181258; E-mail: nsxia@xmu.edu.cn

福建省自然科学基金计划 (No. C0710041), 教育部科学技术研究重大项目培育基金 (No. 705031), 福建省科技重大专项 (No. 2004YZ01)资助。

sequences were selected based on the conserved regions in the HIV-1 *pol* gene. ShRNA expression vectors were co-transfected with HIV-1 clone pNL4-3 to evaluate the abilities of siRNAs to inhibit HIV-1 expression. The pol1026 sequence was selected from candidates. The target sequence in the stem-loop structure of the well-characterized native miR-30a was replaced with pol1026 sequences, and the artificial miRNA expression vectors were co-transfected with the HIV-1 clone pNL4-3, results showed that HIV-1 can be effectively inhibited by miR-1026E. Target specificity of miR-1026E was confirmed by co-transfection assay with reporter plasmids containing different target sequences. The miR-1026E expression element was then inserted into Lentivirus which was used as a vector to transduce the MT-4 cells, MT-4-miR1026E expressing miR-1026E stably was cloned from transduced cells. The MT-4-miR1026E cell effectively inhibited HIV-1 replication *in vitro*. And the intracellular miR-181 and miR-16 expression levels and *stat1* mRNA levels were not affected by the expression of miR-1026E in MT-4-miR1026E cells. miR-1026E is a promising candidate for future research.

Keywords: RNA interference, HIV-1, *pol*, artificial miRNA

RNA 干扰 (RNAi) 是细胞内序列特异性抑制靶基因表达的机制, RNAi 技术应用于抗 HIV-1 治疗研究是目前的研究热点^[1-2]。获得对 HIV-1 具有高效抑制能力和高特异性的 RNAi 元件是进行相关研究的重要基础。miRNA 是细胞内源性调节基因表达的 RNA 分子, 在细胞生长、分化和凋亡等功能中起着重要作用^[3]。miRNA 基因可由 RNA 聚合酶 II 或 III 启动转录, 前体经 RNaseIII 家族的 Drasha 和 Dicer 酶加工形成成熟 miRNA, 天然 miRNA 主要通过靶基因 mRNA 的 3'端非编码区的不完全匹配以翻译抑制方式负调控靶基因的表达^[4]。近来研究显示, 对天然 miRNA 进行靶序列区替换可改变 miRNA 的抑制靶点和抑制方式^[5], 显示了构建人工 miRNA 的可行性。由于 miRNA 在表达和抑制方式上相比 siRNA 具有其独特的优势, 因此可高效靶向 HIV-1 的人工 miRNA 元件具有更好的应用潜力。HIV-1 *pol* 基因编码病毒复制必需的蛋白酶、逆转录酶和整合酶, 序列保守性高。本研究即以 HIV-1 *pol* 基因为靶区域, 通过分析选择设计可靶向 *pol* 区高保守区段的 RNAi 靶位点。通过与 HIV-1 感染性克隆的共转染抑制实验筛选兼具高保守性及高抑制率的 RNAi 靶点, 并尝试以天然 miRNA 为基础骨架构建可靶向该靶点的人工 miRNA 元件, 并进一步通过脱靶效应检测、抑制特异性分析和体外攻毒实验对本研究构建的人工 miRNA 元件的抑制效率和特异性进行分析。本研究获得的可特异高效抑制 HIV-1 复制的人工 miRNA 元件为进一步的抗 HIV-1 研究提供了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和细胞株

MT-4 细胞株、*E. coli* DH5 α 菌株为本实验室保存。pSUPER 质粒购自 Oligoengine 公司。携带 *luciferase* 基因的报告质粒 pGL3-control 购自 Promega 公司。慢病毒包装质粒 (包含 pLP1、pLP2 和 pVSVG) 以及 293FT 细胞购自 Invitrogen 公司, 表达质粒 pMACSK^K.II 购自 Miltenyi 公司, 慢病毒转移质粒 pLL3.7 由厦门大学生命科学学院韩家淮教授^[6]惠赠。

1.2 生化试剂

DMEM、RPMI 1640 基础培养基购自 Gibco 公司。细胞培养用胎牛血清 (FBS) 购自 Hyclone 公司。引物由上海生工生物工程有限公司合成。Luciferase Reporter Assay Kit 购自 Promega 公司。DEAE Dextran 购自 Sigma 公司。Trizol、脂质体 Lipofectamine 2000、NCod miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit 和 Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG Kit 购自 Invitrogen 公司。IFN Response Watcher Kit 购自 TaKaRa 公司。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶购自 TaKaRa 公司。HIV Elisa 检测试剂盒来自北京万泰公司。 β -半乳糖苷酶原位染色试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。核酸提取试剂盒购自北京天根公司。

1.3 siRNA 表达载体的构建

以 HIV-1_{NL4-3} 序列为模板序列, 应用 Invitrogen 和 Genscript 公司提供的辅助设计软件设计靶向 HIV-1 *pol* 基因的 siRNA 序列。靶向 *luciferase* 基因

的 siRNA-luc^[7]和靶向 HIV-1 *gag* 基因的 siRNA-*gag*1607^[8]作为实验对照。合成表 1 各靶序列所对应的引物, 分别经退火处理后连接到经 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切的 pSUPER 载体, 经酶切和测序鉴定获得所需克隆。

1.4 miRNA 表达载体的构建

pLLK^K 表达载体的构建: 通过 PCR 方法扩增

pMACSK^K.II 质粒上的 H-2KK 表达框 (PCR 引物序列分别为: 5'-TTTACTAGTCATGTTTGACAGCTTATCATCG-3'和 5'-TTTCTCGAGATACAAGGATCCATCTACCCTCCTTTTCCACC-3'), PCR 产物以 *Spe* I 和 *Xho* I 双酶切处理后连接到经 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切处理的慢病毒转移载体 pLL3.7, 经酶切鉴定后获得 pLLK^K 表达载体。

表 1 用于 siRNA 合成的引物序列

Table 1 Primers used for siRNA construction

Primer name	Primer sequence (5'-3')
pol336f	GATCCCCAAGACAGTATGATCAGATATTCAAGAGATATCTGATCATACTGTCTTTT
pol336r	AGCTTAAAAAAGACAGTATGATCAGATATCTCTGAATATCTGATCATACTGTCTTGGG
pol378f	GATCCCCAGCTATAGGTACAGTATTATCAAGAGATAATACTGTACCTATAGCTTTT
pol378r	AGCTTAAAAAAGCTATAGGTACAGTATTATCTCTGAATAATACTGTACCTATAGCTGGG
pol877f	GATCCCCGAGACACCAGGGATTAGATTTCAGAGAATCTAATCCCTGGTGTCTCTTTT
pol877r	AGCTTAAAAAGACACCAGGGATTAGATTCTCTTGAATCTAATCCCTGGTGTCTCGGG
pol879f	GATCCCCGACACCAGGGATTAGATATTTCAGAGAATATCTAATCCCTGGTGTCTTTT
pol879r	AGCTTAAAAAGACACCAGGGATTAGATATTCTCTTGAATATCTAATCCCTGGTGTCTCGGG
pol897f	GATCCCCCTAGTACAATGTGCTTCCATTTCAGAGATGGAAGCACATTGTACTGATTTT
pol897r	AGCTTAAAAATCAGTACAATGTGCTTCCATCTCTTGAATGGAAGCACATTGTACTGAGGG
pol922f	GATCCCCCTGGAAGGATCACCAGCAATTCAAGAGATTGCTGGTGATCCTTTCCATTTT
pol922r	AGCTTAAAAATGGAAGGATCACCAGCAATCTCTTGAATTGCTGGTGATCCTTTCCAGGG
pol1026f	GATCCCCGTATGTAGGATCTGACTTATTCAAGAGATAAGTCAGATCCTACATACTTTT
pol1026r	AGCTTAAAAAGTATGTAGGATCTGACTTATCTCTTGAATAAGTCAGATCCTACATACGGG
pol1155f	GATCCCCGGGTATGAATCCATCCTTTCAAGAGAAGGATGGAGTTCATAACCCTTTT
pol1155r	AGCTTAAAAAGGGTATGAATCCATCCTTCTCTTGAAGGATGGAGTTCATAACCCGGG
pol1102f	GATCCCCGATTACACACCAGACATTCAAGAGATGTCTGGTGTGGTAAATCCTTTT
pol1102r	AGCTTAAAAAGGATTACACACCAGACATCTCTTGAATGTCTGGTGTGGTAAATCCGGG
pol1217f	GATCCCCGCTGGACTGTCAATGACATTCTCTTGAATGTCTGGTGTGGTAAATCCGGG
pol1217r	AGCTTAAAAAGCTGGACTGTCAATGACATTCTCTTGAATGTCTGGTGTGGTAAATCCGGG
pol1223f	GATCCCCCTGTCAATGACATACAGAATTCAAGAGATTCTGTATGTCAATTGACAGTTT
pol1223r	AGCTTAAAAACTGTCAATGACATACAGAATCTCTTGAATTCTGTATGTCAATTGACAGGGG
pol1411f	GATCCCCGAGTGATTATGACCAATTTCAGAGAATGGGTCATAATACACTCCTTTT
pol1411r	AGCTTAAAAAGGAGTGTATTATGACCAATTCTCTTGAATGGGTCATAATACACTCCGGG
pol1470f	GATCCCCCAATGGACATATCAAAATTTTCAAGAGAAATTTGATATGTCCATTGGTTT
pol1470r	AGCTTAAAAACCAATGGACATATCAAAATTTTCTCTTGAATTTGATATGTCCATTGGGGG
pol2252f	GATCCCCCTAGTAGCCAGCTGTGATAATTCAAGAGATTATCACAGCTGGCTACTATTTT
pol2252r	AGCTTAAAAATAGTAGCCAGCTGTGATAATCTCTTGAATTATCACAGCTGGCTACTAGGG
pol2289f	GATCCCCAGCCATGCATGGACAAGTATTCAAGAGATACTTGTCCATGCATGGCTTTT
pol2289r	AGCTTAAAAAAGCCATGCATGGACAAGTATCTCTTGAATACTTGTCCATGCATGGCTGGG
gag1607f	GATCCCCAATAGTAAGATGTATAGCCCTTCAAGAGAGGGCTATACATTCTTACTATTTT
gag1607r	AGCTTAAAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTCTCTTGAAGGGCTATACATTCTTACTATTTGGG
lucf	GATCCCCGTGCGCTGCTGGTGGCAACTTCAAGAGAGTTGGCACCAGCAGCGCACTTTT
lucr	AGCTTAAAAAGTGCCTGCTGGTGGCAACTCTCTTGAAGTTGGCACCAGCAGCGCACGGG

Note: sequence in italics is the siRNA targeting sequence.

miRNA 表达载体的构建:合成各靶点 miRNA 序列所对应的引物 (表 2),以 ddH₂O 溶解至终浓度为 60 mmol,每对互补引物各 3 μL 加入 24 μL 退火缓冲液中,95℃处理 4 min,70℃10 min 后逐步冷却至 4℃。退火产物进行 3.0%琼脂糖凝胶电泳,以单正链引物为对照检测是否退火成功。将退火成功的双链片段通过 T4 DNA 连接酶连接至经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切处理的 pLLK^K 表达载体,转化 *E. coli* DH5α 感受态菌株,经酶切鉴定后获得目标 miRNA 表达载体。

1.5 报告质粒的构建

以 HIV-1 感染性克隆质粒 pNL4-3 为模板扩增 *pol* 基因片段 (1279~1442 nt),5'端添加 *Xba* I 位点,3'端添加 *Fse* I 位点,PCR 产物以 *Xba*I 和 *Fse* I 双酶切后连接到相同酶切处理的 pGL3-control 质粒上,经酶切鉴定后获得的质粒命名为 pGL3-pol1402。采用相同的方法将带有 pol1026 靶点序列的 *pol* 基因片段 (890~1055 nt) 插入到 pGL3-control 获得 pGL3-pol1026。采用基因合成方法合成 *pol* 基因片段 (890~1055 nt),其中的 pol1026 靶点序列“GTATGTAGGATCTGACTTA”采用同义密码子突变为“GTATGTAGGCAGCGATTTA”,序列两端分别添加 *Xba* I 位点与 *Fse* I 位点,采用上述相同方法插入到 pGL3-control 获得 pGL3-pol1026EM。

1.6 共转染实验检测 miRNA 对 HIV-1 的抑制效率

24 孔细胞培养板中每孔铺入 2.0 × 10⁵ 个 293FT

细胞,12 h 后进行转染。将 miRNA 表达质粒 (0.3 μg) 与 HIV-1 感染性克隆质粒 pNL4-3 (0.3 μg) 混合后用脂质体 Lipofectamine 2000 进行转染,转染后 72 h 收集细胞培养上清进行检测,样品经 10 倍梯度稀释后用 HIV ELISA 检测试剂盒检测 p24 蛋白的活性。

1.7 荧光素酶 (Luciferase) 表达活性的检测

24 孔细胞培养板中每孔铺入 2.0 × 10⁵ 个 293FT 细胞,12 h 后进行转染。将 0.5 μg 待测 miRNA 表达质粒与 0.1 μg 报告质粒 (pGL3-control、pGL3-pol1026 或 pGL3-pol1402) 混匀后用脂质体 Lipofectamine 2000 进行转染,转染 48 h 后收集细胞裂解液用 Luciferase Reporter Assay Kit 检测荧光素酶活性。

1.8 IFN 效应相关基因 *stat1* 的检测

用 Trizol 试剂提取细胞的总 RNA,采用 TaKaRa 公司的 IFN Response Watcher Kit 及 Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG Kit 进行检测,检测过程参照产品说明书进行。

1.9 RT-PCR 检测 miRNA 水平

用 Trizol 试剂提取细胞的总 RNA,用 NCod miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit 和 Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG Kit 检测样品中的成熟 miRNA 分子的水平。以内源性 U6B RNA 分子为 PCR 内参,miRNA 特异性检测引物序列如表 3 所示。

表 2 用于 miRNA 构建的引物序列

Table 2 Primers used for miRNA construction

Primer name	Primer sequence (5'-3')
miR-pol1026Ef	<i>GATCCGCGCTTGTATGTAGGATCTGACTTAGCTGTGAAGCCACAGATGGGCTAAGTCAGATCCTACATACA</i> AATGCC
miR- pol1026Er	TCGAGGCATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGCCCATCTGTGGCTTCACAGCTAAGTCAGATCCTACATAC AAGCGCG
miR- pol1026Ff	<i>GATCCGCGCTGTATGTAGGATCTGACTTAGACTGTGAAGCCACAGATGGGTCTAAGTCAGATCCTACATAC</i> AATGCC
miR- pol1026Fr	TCGAGGCATTGTATGTAGGATCTGACTTAGACCCATCTGTGGCTTCACAGTCTAAGTCAGATCCTACATA CAGCGCG
miR-LacZf	GATCCTGCTGAAATCGCTGATTGTGTAGTCGTTTTGGCCACTGACTGACGACTACACATCAGCGATTTC GGAG
miR-LacZr	AATTCTCCTGAAATCGCTGATTGTGTAGTCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGACTACACATCAGCGATT CAGCAG

Note: sequence in *italics* is the miRNA targeting sequence.

表 3 用于 real-time PCR 检测的引物序列

Table 3 Primers used for real-time PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')
miR-181	AACATTCAACGCTGTGCGGTG
miR-16	TAGCAGCACGTAAATATTGGC
miR-1026E	CTAAGTCAGATCCTACATACAA
U6B	ATGACACGCAAATTCGTGAAGC

1.10 重组慢病毒的构建和鉴定

将 293FT 细胞铺于 10 cm 细胞培养皿中 (5×10^6 个/皿), 6 h 后用脂质体 Lipofectamine 2000 将 18 μg 包装质粒混合物、6 μg 的慢病毒转移质粒 pLLK^K-miRNA 和 6 μg 的 pSUPER-Drosha (携带靶向细胞 Drosha 基因的 siRNA 表达元件, siRNA 靶序列为 AACGAGUAGGCUUCGUGACUU^[9]) 混合转染, 转染 12 h 后更换为完全培养基, 72 h 后收集含重组慢病毒的细胞培养上清。重组慢病毒效价鉴定: 通过 293FT 细胞转导实验鉴定感染效价, 293FT 细胞铺于 24 孔细胞培养板 (5×10^4 个/孔), 12 h 后分别加入 100 μL 经 10 倍梯度系列稀释后的待测病毒样品。培养 48 h 后用流式细胞仪 (Beckman Coulter EPICS XL) 检测孔中表达 EGFP 的细胞数量, 测定重组病毒的滴度 (TU/mL)。

1.11 重组慢病毒转导 MT-4 细胞

将 1×10^5 个 MT-4 细胞铺于 24 孔细胞培养板中, 加入 polybrene 至终浓度为 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 慢病毒用量为 MOI=40, 室温 $600 \times g$ 水平离心 60 min, 12 h 后换液。

1.12 HIV-1_{NL4-3} 的制备与鉴定

将 293FT 细胞铺于 6 孔细胞培养板中 (8×10^5 个/孔), 6 h 后脂质体转染 2.4 μg pNL4-3 质粒, 12 h 后更换为完全培养基, 72 h 后收集含有 HIV-1_{NL4-3} 的细胞培养上清。通过梯度稀释后对 HIV-1 感染报告细胞株 TZM-b1 的感染实验鉴定其效价。将 TZM-b1 细胞铺于 96 孔细胞培养板 (1×10^4 个/孔), 6 h 后分别加入 50 μL 经 10 倍梯度系列稀释后的待测病毒, 加入 DEAE Dextran 至终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。培养 48 h 后用 β -半乳糖苷酶原位染色试剂盒显色, 通过检测样品孔中的蓝斑数量, 测定病毒滴度 (IU/mL) = 蓝斑数量 \times 稀释倍数 $\times 20$ 。

1.13 HIV-1_{NL4-3} 的体外攻毒实验

将 5×10^5 个 MT-4 细胞或改造后的 MT-4 细胞铺于 24 孔细胞培养板中, 总培养体积为 2 mL, 加入 HIV-1_{NL4-3} 感染 12 h 后用无血清培养基洗涤 2 次, 继续维持培养, 在不同时间点收集细胞培养上清检测 p24 蛋白的活性。其中, Day1 只采集 200 μL 细胞培养上清用于检测, 并补充 200 μL 完全培养上清; Day3 开始每个时间点均进行 1:1 细胞传代, 具体方法是: 在各时间点, 用移液器将孔中的 MT-4 细胞均匀吹散, 吸出一半细胞悬液 (1 mL), 部分取样进行台盼蓝染色后计数获得活细胞浓度 M, 其余低速离心收集培养上清用于检测 p24 蛋白活性; 样品孔中补入 1 mL 新鲜的完全培养基继续培养。各时间点细胞总数的计算公式为: 各时间点细胞理论增殖总数 = (样品孔活细胞浓度 M \times 培养体积 2 mL) $\times 2^N$ 。(其中 N 为累计传代次数, Day1 未进行传代, Day1 和 Day3 的 N 均为 0; Day3 及之后各时间点均进行了传代, Day5、Day8、Day11、Day14 和 Day17 的 N 分别为: 1、2、3、4 和 5)。

2 结果

2.1 靶向 HIV-1 *pol* 高保守区的高效 RNAi 靶点的筛选

本研究对 Los Alamos HIV Sequence Database 中的 625 株 HIV-1 的 *pol* 基因序列进行了保守性分析, 获得 16 个可靶向 *pol* 区高保守区段的 RNAi 靶位点。并构建了可靶向上述靶点的 siRNA 表达载体, 分别通过与 HIV-1 感染性克隆质粒 pNL4-3 在 293FT 细胞中进行共转染实验检测抑制 HIV-1 表达的能力。结果如图 1 所示, 本研究设计的靶向上述靶点的 siRNA 可显示出不同程度的抑制 HIV-1 表达的能力, 其中靶向 pol1026 的克隆可显示出较好的抑制效果。同时保守性分析数据也显示, pol1026 靶点也具有较好的保守性特征, 其在数据库中无点突变和仅有一个突变的序列数占总序列数的百分比分别为 45% 和 40%, 二者累计为 85%。因此, 本研究选择以 pol1026 为靶点构建人工 miRNA 元件。

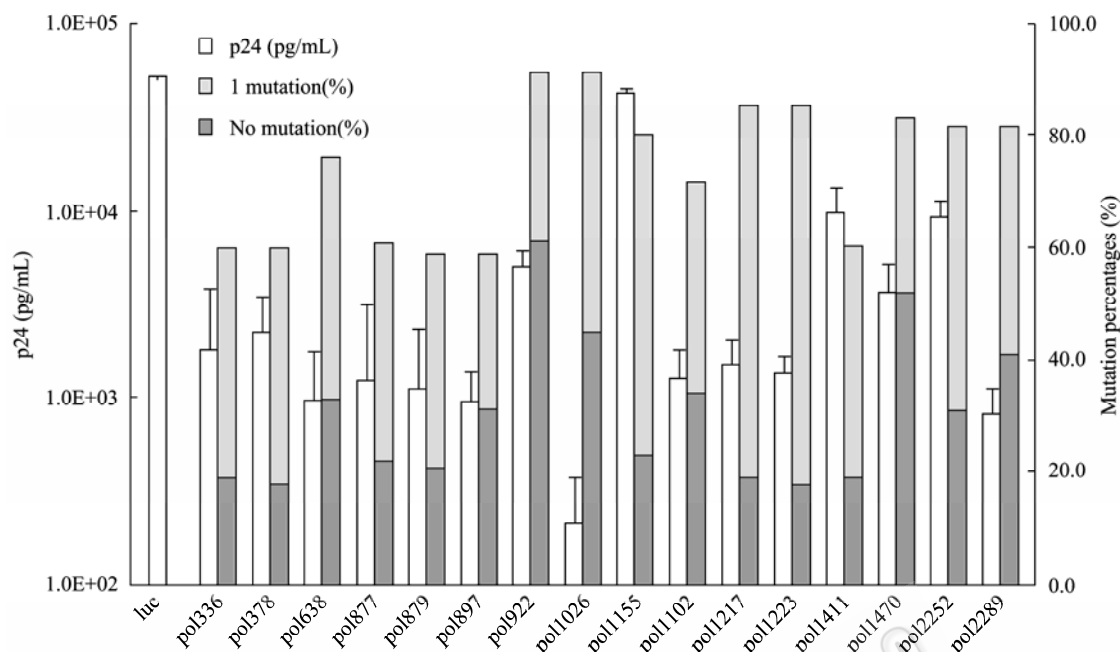


图1 不同 RNAi 靶点的抑制效率与保守性分析

Fig. 1 Analysis of inhibition efficiencies and conservation of different RNAi targeting sequences.

2.2 靶向 HIV-1 pol1026 的人工 miRNA 的构建与鉴定

miR-30a 是目前剪切位点研究较为清楚的自然 miRNA^[5], 因此本研究选择以 miR-30a 作为基础模板进行靶向 HIV-1 pol1026 靶点的人工 miRNA 的构建。有研究显示靶点序列仅移位 1 nt 的 siRNA 即可在抑制效率上表现出较大差别^[10], 因此本研究设计了 2 个可靶向 HIV-1 pol1026 靶点的仅移动 1 nt 的人工 miRNA (miR-1026E、miR-1026F) (图 2), 分别替换入天然 miR-30a 的靶序列区构建获得人工 miRNA 表达载体 pLLK^K-miR-1026E 和 pLLK^K-miR-1026F。通过与 HIV-1 感染性克隆质粒的共转染实验检验本研究设计的人工 miRNA 是否保持对 HIV-1 的抑制能力。共转染 48 h 后检测细胞培养上清中的 p24 活性, 以靶向 LacZ 基因的 pLLK^K-miR-LacZ 作为阴性对照。结果如图 3 所示, miR-1026E 具有较好的抑制 HIV-1 表达的能力, 而 miR-1026F 未表现出抑制效果, 因此本研究选择 miR-1026E 进行进一步的分析评价。该结果也说明了靶位区序列的选择对 miRNA 抑制效果存在较大影响, 采用步移方式对筛选针对特定靶位的高效 miRNA 是必要的。

2.3 miR-p1026E 抑制特异性分析

本研究进一步对 miR-1026E 的抑制特异性进行分析。目前较常用的分析特定 siRNA 或 miRNA 抑制效率的方法是通过与在报告基因终止密码子后携带 RNAi 元件靶序列的报告质粒进行共转染^[11]。本研究将 miR-1026E 靶序列及其相邻序列克隆入荧光素酶表达质粒 pGL3-control 的终止密码子和 ployA

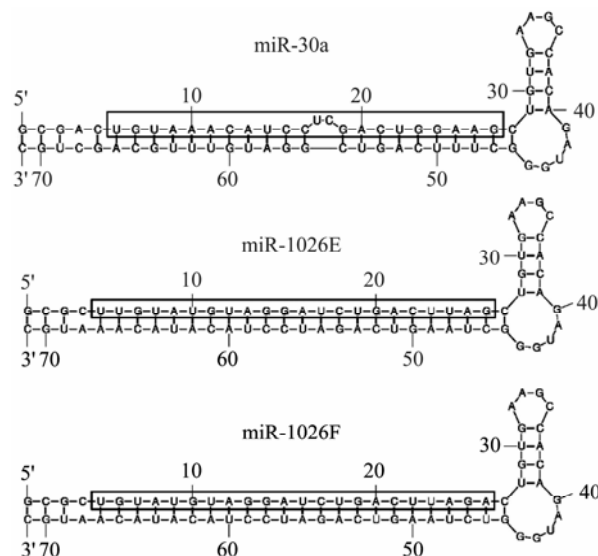


图2 人工 miRNA 元件的二级结构预测

Fig. 2 Predicted secondary structures of artificial miRNAs.

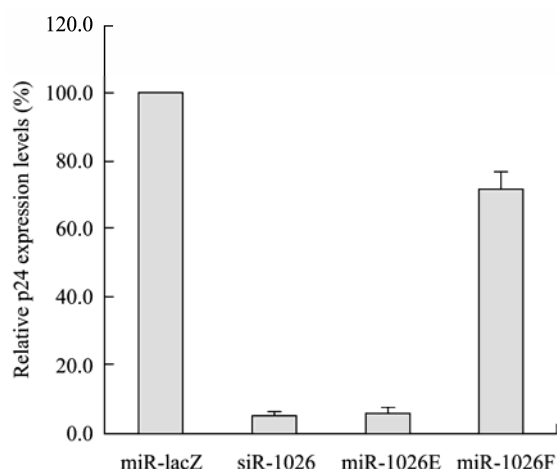


图3 共转染实验检测人工 miRNA 对 HIV-1 表达的抑制效率

Fig. 3 Analysis of HIV-1 p24 protein expression in 293FT cells cotransfected with different artificial miRNA expression vectors and pNL4-3.

之间获得报告质粒 pGL3-pol1026, 同时也构建了位于 HIV-1 *pol* 区但不包含 miR-1026E 靶序列的对照报告质粒 pGL3-pol1402 以及包含经序列突变后的 miR-1026E 靶序列的对照报告质粒 pGL3-pol1026EM。将 miR-1026E 表达载体 pLLK^K-miR-1026E 分别与各报告质粒进行共转染实验, 以靶向 *luc* 基因的 pSUPER-*luc* 和靶向 LacZ 的 pLLK^K-miR-LacZ 载体作为载体对照。共转染 48 h 后收集细胞裂解上清并检测荧光素酶活性。结果如图 4 所示, miR-1026E 可有效抑制 pGL3-pol1026 的表达, 不能抑制 pGL3-control 和 pGL3-pol1402 以及靶位点区序列突变的 pGL3-pol1026EM 表达, 表现出较好的抑制特异性。

2.4 重组慢病毒载体的构建与稳定表达 miR-1026E 的 MT-4 细胞的获得

来源于 HIV-1 的重组慢病毒是一种新型基因转移载体, 其可有效感染造血系统来源细胞并具有基因整合能力, 目前已在 HIV-1 的抗病毒研究中得到较为广泛的应用^[12]。本研究即应用第 3 代慢病毒载体系统在 Droscha 活性抑制的 293FT 细胞中构建了携带 miR-1026E 表达元件的重组慢病毒载体 Lenti-miR1026E。本研究使用的重组慢病毒载体同时带有 EGFP 表达元件, 可用于快速检测重组病毒效价对靶细胞的基因转移效率, 并便于检测慢病毒

转导后细胞的克隆化效果^[13]。MT-4 细胞是一种 HIV-1 受体细胞, 可在体外支持 T 嗜性 HIV-1 的复制^[14]。重组慢病毒载体 Lenti-miR1026E 对 MT-4 细胞进行转导, 应用有限稀释法进行克隆化筛选, 通过筛选检测获得一株可稳定表达报告基因的细胞克隆 MT-4-miR1026E, 流式细胞仪检测显示 MT-4-miR1026E 细胞中 EGFP 的表达阳性率接近 100% (图 5)。本研究进一步通过实时 RT-PCR 方法检测了 miR-1026E 在 MT-4-miR1026E 细胞中的表达水平, 检测结果 (图 6) 显示 miR-1026E 在 MT-4-miR1026E 细胞中获得了有效表达。

2.5 miR-1026E 在 MT-4 细胞中的脱靶效应检测

本研究进一步检测了 miR-1026E 对细胞内源性代表 miRNA 水平和干扰素应答途径的影响。miR-181 和 miR-16 是目前可用于评价脱靶效应的内源性 miRNA^[15]。通过实时 RT-PCR 方法检测

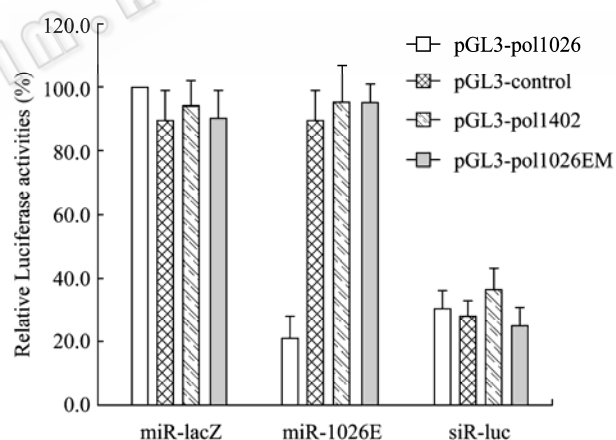


图4 miR-1026E 抑制特异性分析

Fig. 4 Analysis of target specificity of miR-1026E.

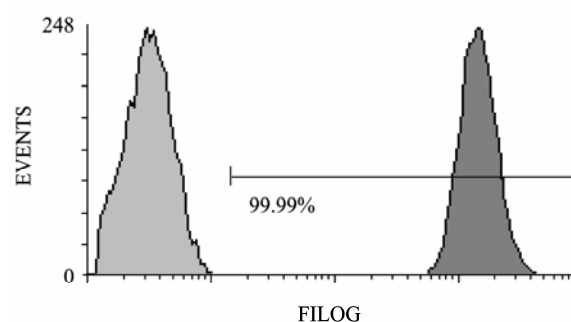


图5 报告基因在细胞克隆 MT-4-miR1026E 中的表达效率
Fig. 5 Expression efficiency of reporter gene EGFP in MT-4-miR1026E cells.

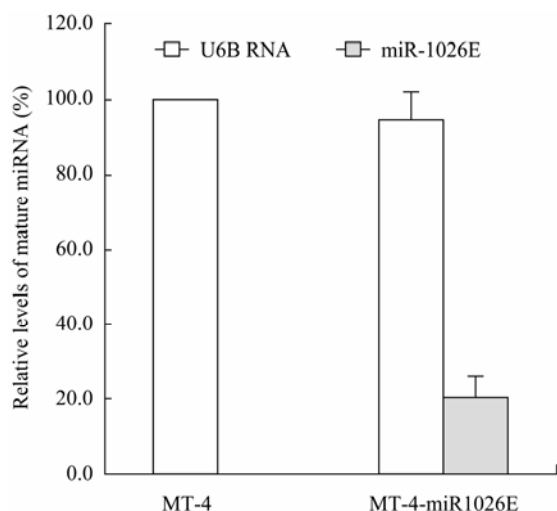


图6 miR-1026E 在 MT-4-miR1026E 细胞中的表达水平
Fig. 6 Expression level of miR-1026E in MT-4-miR1026E cells.

MT-4-miR1026E 细胞和对照 MT-4 细胞中 miR-181 和 miR-16 的表达水平,结果显示 miR-1026E 在细胞中未对内源性 miRNA 的表达造成明显影响 (图 7A)。同时应用实时 RT-PCR 方法检测了干扰素效应相关基因 *stat1* 的 mRNA 水平,检测结果如图 7B 所示,与 MT-4 细胞对照相比 MT-4-miR1026E 细胞的 *stat1* mRNA 水平未发生明显变化,说明 miR-1026E 在细胞中不会影响细胞的干扰素应答途径,进一步证明 miR-1026E 具有良好的抑制特异性。

2.6 稳定表达 miR-1026E 的 MT-4 细胞对 HIV-1 的抑制效果

本研究通过体外攻毒实验检验稳定表达 miR-1026E 的 MT-4 细胞对 HIV-1 复制的抑制效果。HIV-1_{NL4-3} 为 B 亚型、T 细胞嗜性的 HIV-1 病毒,可有效感染并在 MT-4 细胞中复制^[14]。HIV-1_{NL4-3} 以 MOI=0.2 的剂量对 MT-4-miR1026E 进行攻毒实验,在感染后不同时间点收集细胞培养上清检测 HIV-1 p24 蛋白的活性,同时也检测各时间节点的活细胞数量,以 MT-4 细胞和未携带 MT-4-miR1026E 表达元件的重组慢病毒 Lenti-H2K 转导后的 MT-4 细胞为对照。结果如图 8 所示,稳定表达 miR-1026E 的 MT-4-miR1026E 细胞对 HIV-1 感染可获得显著的抑制效果,并可有效存活和增殖。

3 讨论

RNAi 技术已在基因功能研究和疾病治疗等方

面显示出巨大的应用潜力,将 RNAi 技术应用于抗 HIV-1 治疗研究是目前的研究热点。获得对 HIV-1 具有高效抑制能力和特异性好的 RNAi 元件是进行相关治疗方法研究的重要基础。本研究在 HIV-1 *pol* 区筛选获得一个具有较好保守性特征和抑制效率的 siRNA 靶位,以天然 miR-30a 为基础骨架构建了可特异靶向该靶点的人工 miRNA (miR-1026E),通过脱靶效应检测、抑制特异性分析和体外攻毒实验证明该人工 miRNA 具有高效的抑制效率和特异性,具有良好的应用潜力。

siRNA 和 miRNA 是 RNA 干扰作用的主要作用成分,其加工和作用机制存在一些差别。siRNA 主要由病毒感染或基因转移表达产生的 dsRNA 或

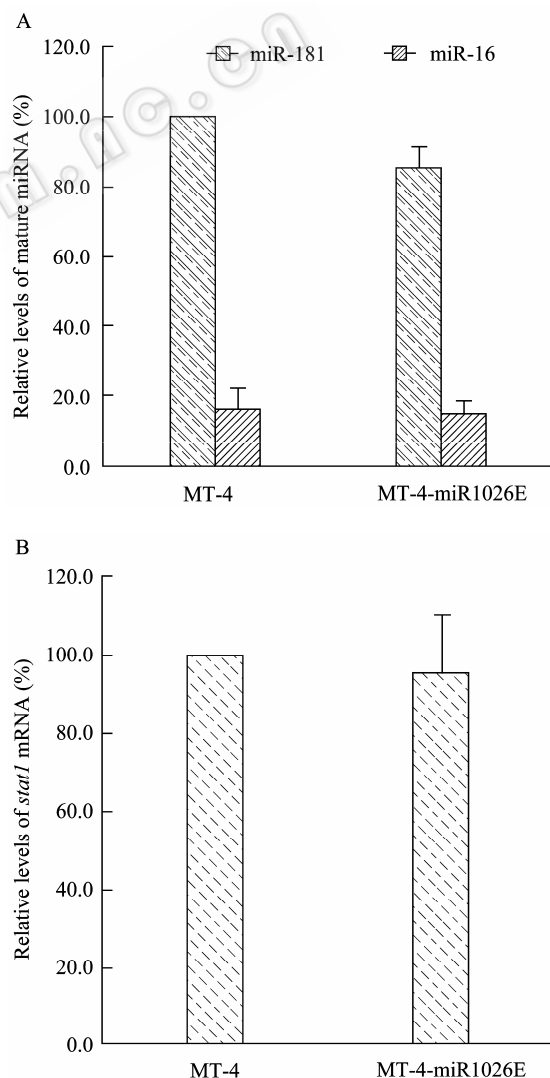


图7 miR-1026E 的脱靶效应分析

Fig. 7 Analysis of off-target effects of miR-1026E.

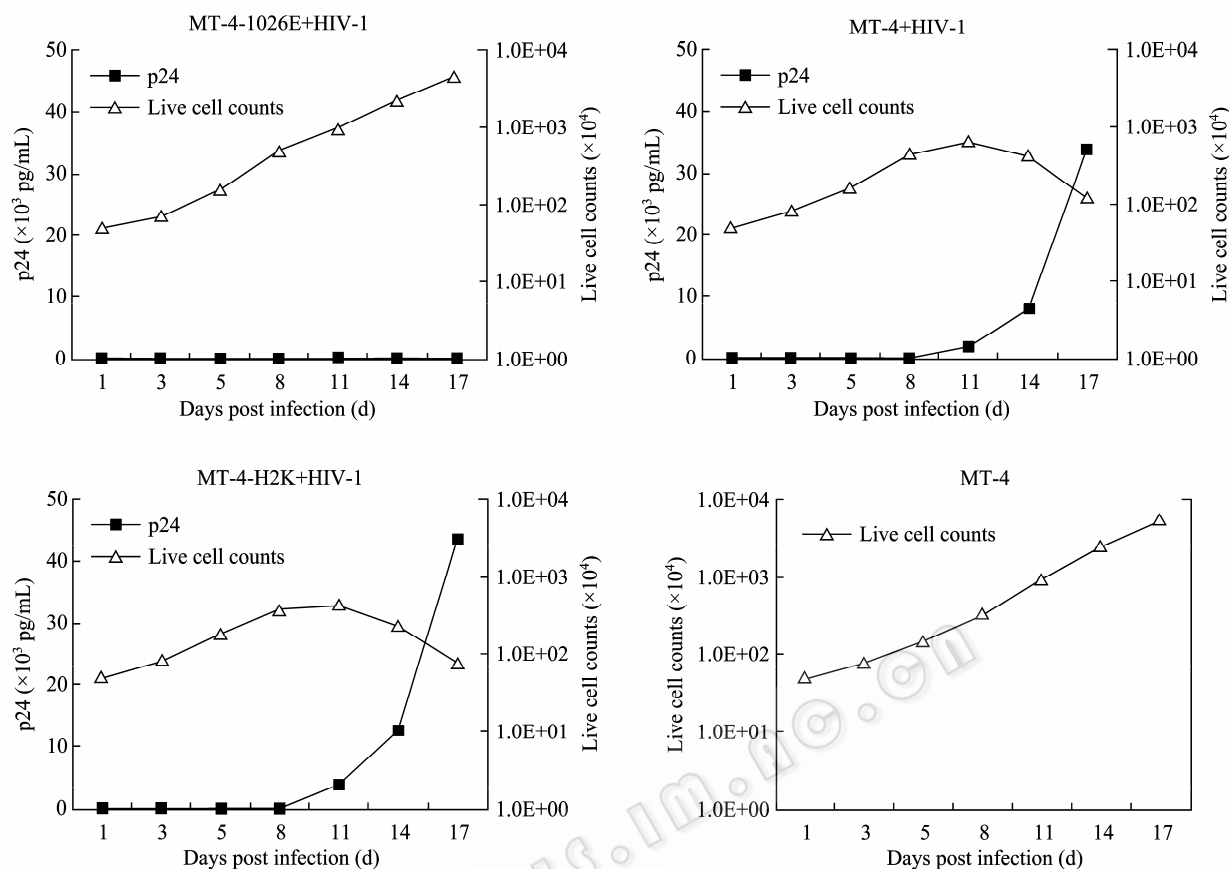


图8 稳定表达 miR-1026E 的 MT-4 细胞对 HIV-1 复制的抑制效果

Fig. 8 Inhibition of HIV-1_{NL4-3} replication in MT-4-miR1026E cells.

shRNA 在细胞中被 Dicer 酶所识别并剪切形成 siRNA, 与 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC) 结合形成 siRISC, 通过序列特异性识别并切割降解靶 mRNA^[16]。内源 miRNA 来自于细胞内非编码蛋白基因区转录产生的具有茎环结构的 pri-miRNA, 经过 2 个 RNase III 家族的 Drosha 和 Dicer 酶加工后形成成熟的 miRNA, 与 siRNA 作用途径相似, miRNA 可与 RISC 结合形成 miRNA 蛋白复合物 (miRISC)。miRISC 对靶 mRNA 的抑制方式和 miRNA 与靶序列的匹配程度有关, 天然 miRNA 多数是与靶 mRNA 序列不完全匹配, 通过非降解的翻译抑制方式调控靶基因的表达^[4], 近来研究显示当 miRNA 与靶 mRNA 序列高度匹配时也可通过类似 siRNA 的作用机制以剪切降解方式抑制靶基因的表达^[17]。目前以 miRNA 作为特异性的基因表达抑制工具已成为 RNAi 研究的一个重要方面。

同时, 值得注意的是通过 miRNA 抑制靶基因表

达相比 siRNA 具有一些独特的优势。miRNA 抑制靶基因表达方式的多样性使其可能在应对病毒的靶序列突变导致的逃避抑制上具有一定优势。同时, miRNA 相比 siRNA 在表达载体启动子选择上具有更大的范围和灵活性, miRNA 基因可使用 RNA 聚合酶 II 类启动子进行转录, 而不限限于 RNA 聚合酶 III 类启动子, 可通过使用组织特异性或诱导型启动子以实现 RNAi 分子表达的可控性, 也有利于避免表达过量而可能引发的对细胞正常功能的影响, 利于脱靶效应的控制。本研究构建获得的靶向 HIV-1 *pol* 区的人工 miRNA (miR-1026E) 即使用了属于 RNA 聚合酶 II 类启动子的 H2K 启动子进行表达, 在与 HIV-1 感染性克隆的共转染实验和体外攻毒实验中均显示出良好的抑制效果, 同时脱靶效应分析显示不会影响细胞正常 miRNA 的表达和干扰素应答途径。

目前, 构建靶向特定靶点的人工 miRNA 的策略

是将靶序列替换入天然 miRNA 的靶序列区。有研究显示, 在 miRNA 的加工成熟过程中, 影响 Drosha 剪切 pri-miRNA 的关键因素是其二级结构, 如环的大小、发卡长度、自由末端, 与 miRNA 一级序列无关^[18], 这为在天然 miRNA 基础上进行靶序列替换构建人工 miRNA 提供理论支持。本研究将筛选获得的靶向 HIV-1 *pol* 区的具有高保守性特征和抑制能力的 siRNA 的靶点序列替换入目前剪切位点较为清楚的 miR-30a 的靶序列区, 分别构建了两种其靶序列仅位移 1 nt 的人工 miRNA。共转染抑制检测实验结果显示, 二者的抑制效率存在很大区别, 应用 mFOLD 软件进行的二级结构预测未显示出具有明显差别, 这说明靶位区序列的微小差别即可能会对 miRNA 的抑制效率产生较大影响, 其具体机制将有待后续研究阐明。Brake 等在 siRNA 上的研究也显示出类似现象, 靶点序列仅移位 1 nt 的 siRNA 即可在抑制效率上存在显著差别^[10]。目前对于 miRNA 的加工成熟与作用机制仍需要进行更全面和深入地研究, 本研究结果可为进一步研究其作用机制提供一定的启示。

慢病毒载体可有效转导非分裂期细胞特别是造血系统来源细胞, 是目前包括对 HIV-1 感染在内的基因治疗研究中常用的基因转移载体。然而目前常用的慢病毒载体的包装质粒的 *gag-pol* 区来源于 HIV-1, 因此在构建表达靶向 HIV-1 *gag-pol* 区域的 RNAi 表达元件时会存在抑制自身慢病毒载体构建效率的现象。本研究应用常规方法构建携带 miR-1026E 表达元件的重组慢病毒的效率与对照病毒相比很低 (结果未显示)。因此, 本研究在制备重组慢病毒 Lenti-miR1026E 时在构建体系中增加了靶向 Drosha 的 siRNA 表达质粒, 可较好的恢复慢病毒的构建效率。该方法可无需对慢病毒包装序列进行同义突变, 可为应用于 HIV-1 基因治疗研究的慢病毒载体构建提供一个适用的选择。通过慢病毒载体转导筛选获得的 MT-4 细胞株在体外高剂量的攻毒实验中具有显著的抑制 HIV-1 复制的能力, 也进一步证明了本研究获得的特异靶向 HIV-1 *pol* 高保守区的人工 miRNA 具有良好的应用潜力, 可为进一步应用于新型艾滋病治疗方法研究提供重要基础。

REFERENCES

- [1] Kanzaki LI, Ornelas SS, Argañaraz ER. RNA interference and HIV-1 infection. *Rev Med Virol*, 2008, **18**(1): 5-18.
- [2] Berkhout B, ter Brake O. Towards a durable RNAi gene therapy for HIV-AIDS. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, **9**(2): 161-170.
- [3] Guarnieri DJ, DiLeone RJ. MicroRNAs: a new class of gene regulators. *Ann Med*, 2008, **40**(3): 197-208.
- [4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281-297.
- [5] Lo HL, Chang T, Yam P, *et al.* Inhibition of HIV-1 replication with designed miRNAs expressed from RNA polymerase II promoters. *Gene Ther*, 2007, **14**(21): 1503-1512.
- [6] Robinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, *et al.* A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet*, 2003, **33**(3): 401-406.
- [7] Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(5): 497-500.
- [8] Chang LJ, Liu X, He J. Lentiviral siRNAs targeting multiple highly conserved RNA sequences of human immunodeficiency virus type 1. *Gene Ther*, 2005, **12**(14): 1133-1144.
- [9] Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, *et al.* Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res*, 2007, **101**(1): 59-68.
- [10] Brake OT, Konstantinova P, Ceylan M, *et al.* Silencing of HIV-1 with RNA interference: a multiple shRNA approach. *Mol Ther*, 2006, **14**(6): 883-892.
- [11] Liu YP, Haasnoot J, ter Brake O, *et al.* Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(9): 2811-2824.
- [12] Strayer DS, Akkina R, Bunnell BA, *et al.* Current status of gene therapy strategies to treat HIV/AIDS. *Mol Ther*, 2005, **11**(6): 823-842.
- [13] Robinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, *et al.* A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet*, 2003, **33**(3): 401-406.
- [14] Schols D, Este JA, Cabrera C, *et al.* T-cell-line-tropic human immunodeficiency virus type 1 that is made resistant to stromal cell-derived factor 1alpha contains mutations in the envelope gp120 but does not show a switch in coreceptor use. *J Virol*, 1998, **72**(5): 4032-4037.

- [15] Kumar P, Ban HS, Kim SS, *et al.* T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. *Cell*, 2008, **134**(4): 577–586.
- [16] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, **136**(4): 642–655.
- [17] Steiner FA, Hoogstrate SW, Okihara KL *et al.* Structural features of small RNA precursors determine Argonaute loading in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, **14**(10): 927–933.
- [18] Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *Embo J*, 2005, **24**(1): 138–148.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 (不用单列标题书写)。目的(Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法(Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results): 本文最后得出的结果 (实验数据部分)。结论(Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的 (如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。