

# 靶向 HIV-1 细胞受体基因 CCR5 的人工 miRNA 的构建与鉴定

王颖彬,程 通\*,魏丽华,张 涛,梁露萍,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,福建 厦门 361005)

**摘要:**趋化因子 CCR5 是 HIV-1 入侵机体细胞的主要辅助受体之一,通过抑制 CCR5 的表达可以在一定程度上阻断 HIV-1 的复制进程。miRNA 介导的 RNA 干扰相比经典的 siRNA 在应用中具有更多的特点。本研究的目的是构建可特异有效靶向 CCR5 的人工 miRNA 元件。本研究以 CCR5 基因序列为模板设计了 14 个 miRNA 靶序列,以天然 miR-30a 为基础骨架通过靶序列区替换构建人工 miRNA 元件。通过将 miRNA 表达质粒与携带靶序列区的报告质粒的共转染抑制实验检测不同 miRNA 的抑制效率,结果显示 miCCR-13A 具有较好的抑制效率和特异性。进一步将 miCCR-13A 表达载体转染 CCR5 阳性的 HIV-1 受体细胞株 TZM-bl, RT-PCR 检测显示 miCCR-13A 可在细胞中获得有效表达,同时应用免疫流式细胞术检测显示在 miCCR-13A 转染细胞相比对照细胞的 CCR5 蛋白的检测活性明显降低。进一步的研究显示 miCCR-13A 在细胞中不会影响细胞活性和干扰素效应相关基因 *osal* 和 *stat1* mRNA 水平,具有良好的特异性。本研究获得的可特异靶向 CCR5 的人工 miRNA 元件可为进一步的抗 HIV-1 研究提供重要基础。

**关键词:** CCR5; RNA 干扰; 人工 miRNA

**中图分类号:** R 373

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0438-0479(2010)03-0410-07

RNAi 技术应用于 HIV-1 治疗研究是目前的研究热点,获得具有高效抑制特性的 RNAi 元件是进行相关研究的重要基础。由于 HIV-1 具有高突变性,仅使用靶向病毒基因的 RNAi 元件较难克服因病毒突变导致的逃避抑制的问题<sup>[1]</sup>。在 HIV-1 基因之外选择与 HIV-1 复制相关的 RNAi 靶点是一种有效的策略,如 HIV-1 感染所必需的受体基因或其它的辅助细胞因子等。研究已显示,靶向病毒受体基因 CCR5、CXCR4 及病毒转录相关的细胞蛋白 cyclin T1、CDK2 的 siRNA 可有效抑制 HIV-1 的感染<sup>[2]</sup>。CCR5 是 R5 型 HIV-1 感染细胞的必需辅助受体,有研究显示其对人体的正常生长、分化及免疫功能并非必不可少<sup>[3]</sup>,可作为研制抗病毒 RNAi 元件的良好靶标。miRNA 是细胞内源性调节基因表达的 RNA 分子,天然 miRNA 主要通过靶向 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<sup>[4]</sup>。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<sup>[5]</sup>,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,有望有更好的应用潜力。因此本研究探讨以天然 miRNA 为基础骨架构建可有效靶向 CCR5 的人工 miRNA 元件。通过共转染抑制实验、特异性检测、脱靶效应分析筛选获得可有效靶向 CCR5 的人工 miRNA 元件,为进一步应用于抗 HIV-1 研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒和细胞株

TZM-bl 细胞、*E. coli*. DH5 为本实验室保存。pCDNA3.1(+)质粒、293FT 细胞购自 Invitrogen 公司,pMACSKK.II 质粒购自 Clontech 公司,pRL-TK 质粒购自 Promega 公司。携带增强型绿色荧光蛋白 EGFP 报告基因元件的哺乳动物细胞表达质粒 pLL3.7<sup>[6]</sup>与携带荧光素酶(luc)基因的报告质粒 pST luc 由韩家准教授赠送。

### 1.2 生化试剂

限制性核酸内切酶购自大连宝生物工程有限公

收稿日期:2009-11-12

基金项目:“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项课题:“艾滋病毒诊断技术研究及产品研制”(2008ZX10001-013);教育部科学技术研究重大项目培育基金(705031);福建省自然科学基金计划资助项目(C0710041);福建省科技重大专项(2004 YZ01)

\*通讯作者: tcheng@xmu.edu.cn

司;T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司;质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒为北京天根公司产品;引物由上海生工生物工程有限公司合成;DMEM 培养基、Opti-MEM、Glutamine、细胞培养用非必需氨基酸购自 Invitrogen 公司;脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;细胞培养用胎牛血清(FBS)购自 HyClone 公司;Dual-Luciferase<sup>®</sup> 双萤光素酶报告基因检测系统购自 Promega 公司;抗体 PE-Cy<sup>™</sup> 5 Mouse Anti-Human CD195 购自 BD Pharmingen<sup>™</sup> 公司;NCode<sup>™</sup> miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit 及 Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix UDG 购自 Invitrogen 公司;IFN Response Watcher Kit 购自 TaKaRa 公司;Cell Counting Kit-8 试剂购自碧云天公司。

### 1.3 表达载体构建

#### 1.3.1 miRNA 表达质粒的构建

以 *CCR5* 基因序列为模板序列,应用 Invitrogen 公司提供的辅助设计软件(Block-iT RNAi Designer)设计了 14 个靶向 *CCR5* 基因的 miRNA 序列,以靶向 lacZ 基因的 miR-lacZ<sup>[7]</sup> 作为对照.合成各靶点序列所对应的 miRNA 引物(表 1),分别经退火处理后连接到经 *Bam*H I/*Eco*R I 双酶切处理的 pcDNA3.1(+ ) 载体,经 *Pvu* II/*Hind* III 小量酶切鉴定后获得系列 miRNA 表达质粒 pcDNA3.1-miRNA.

#### 1.3.2 报告质粒的构建

设计引物(表 2),通过特异性 PCR 扩增 miRNA 靶基因上包含靶点所在位置的一段约 130 bp 长度的 DNA 序列,与 pMD18-T 载体连接后转化 DH5 感受态细菌,挑取菌落培养、提取质粒,经 *Hind* III/*Eco*R I 小量酶切鉴定及测序确认为含单倍体靶序列的质粒 pT-target. pT-target 经 *Bam*H I/*Eco*R I 双酶切后回收 target 目的片段,将目的片段与经 *Bgl* II/*Eco*R I 双酶切处理的 pT-target 载体连接,转化 *E. coli*. DH5 感受态细菌,经酶切鉴定为含双倍体靶序列的 pT-Dtarget. pT-target 经 *Bam*H I/*Eco*R I 双酶切后回收双倍体靶序列片段,并与经 *Bam*H I/*Eco*R I 双酶切处理的 pST luc 载体连接,转化 *E. coli*. DH5 感受态细菌,经酶切鉴定得到分别含不同区段双倍体靶序列的报告质粒 pSTluc-C5A 和 pSTluc-C5B.

#### 1.3.3 pLL K<sup>K</sup>-miCCR13A 质粒的构建

通过 PCR 扩增 pMACSK<sup>K</sup>. II 质粒上的 H-2 K<sup>K</sup>

蛋白表达框,其中 5 端引入 *Xba*I 位点,3 端引入 *Xho*I 及 *Bam*H I 位点.pLL3.7 载体内部含有两个基因表达框,一个表达 GFP 报告基因,另一个为 U6 启动子指导表达的 shRNA.将 pLL3.7 质粒的 shRNA 表达框用 *Xba*I/*Xho*I 切下后,替换为上述的 H-2 K<sup>K</sup> 蛋白表达框,获得 pLL K<sup>K</sup> 载体.将人工构建的 miCCR-13A 编码序列以 *Bam*H I/*Xho*I 从 pcDNA3.1-miCCR13A 切下后,连接到同样经 *Bam*H I/*Xho*I 双酶切处理的 pLL K<sup>K</sup> 载体上,可获得 pLL K<sup>K</sup>-miCCR13A 表达载体.

### 1.4 荧光素酶活性检测

24 孔培养板中每孔铺入  $2 \times 10^5$  个 293FT 细胞,12 h 后换液,将 pcDNA3.1-miRNA 质粒与报告质粒 pST luc-Dtarget、pRL-TK 混合后以脂质体对细胞进行转染,3 种质粒用量分别为 0.4、0.2、0.001  $\mu$ g.转染后 48 h 裂解细胞,检测细胞裂解液中的荧光素酶活性.检测试剂为 Promega 公司产品 Dual-Luciferase<sup>®</sup> 双萤光素酶报告基因检测系统,检测过程参照说明书进行.

### 1.5 RT-PCR 检测 miRNA 表达水平

用 Trizol 试剂提取细胞的总 RNA,用 NCode miRNA First-Strand cDNA Synthesis kit 和 Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix UDG kit 检测样品中的成熟 miRNA 分子的水平.检测过程参照产品说明书进行.

### 1.6 CCR5 的流式细胞术检测

将  $5 \times 10^5$  个细胞用 PBS 洗涤离心后,以 10  $\mu$ L PBS 重悬,分别加入 10  $\mu$ L 标记抗体 PE-Cy<sup>™</sup> 5 Mouse Anti-Human CD195 于 37  $^{\circ}$ C 孵育,40 min 后离心吸弃上清,用 500  $\mu$ L PBS 洗涤离心后,用 500  $\mu$ L PBS 重悬进行流式检测.

### 1.7 CCK8 kit 检测细胞毒性

预先铺 100  $\mu$ L 293FT 细胞于 96 孔细胞培养板中 ( $1.5 \times 10^4$  个/孔),4 h 后转染 0.6  $\mu$ g 相应质粒.继续培养 60 h 后,每孔加 10  $\mu$ L CCK8 溶液,37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后,450 nm 检测 OD 值.

### 1.8 IFN 效应相关基因 *osal* 和 *stat1* 的检测

用 Trizol 试剂提取细胞的总 RNA,采用 IFN Response Watcher kit 及 Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix UDG kit 进行检测,检测过程参照产品说明书进行.

表 1 用于 miRNA 构建的引物序列

Tab. 1 The sequences of primers used for miRNA construction

引物名称	引物序列
mCCR5-1Af	5'-gatccgcgcaagagcatgactgacatctaccctgtgaagccacagatgggtagatgtcagtcagtccttcatgcg-3'
mCCR5-1Ar	5'-aattcgcatgaagagcatgactgacatctaccctccatctgttggttcacaggtagatgtcagtcagtccttgcgcg-3'
mCCR5-1Bf	5'-gatccgcgcaagagcatgactgacatctaccctgtgaagccacagatgggtagatgtcagtcagtccttcatgcg-3'
mCCR5-1Br	5'-aattcgcatgaagagcatgactgacatctaccctccatctgttggttcacaggtagatgtcagtcagtccttgcgcg-3'
mCCR5-1Cf	5'-gatccgcgcaagagcatgactgacatctaccctgtgaagccacagttgggtagatgtcagtcagtccttcatgcg-3'
mCCR5-1Cr	5'-aattcgcatgaagagcatgactgacatctaccctccaactgttggttcacagaggtagatgtcagtcagtccttgcgcg-3'
mCCR5-3Af	5'-gatccgcgcaatggcacaacgcttctgcaaatctgtgaagccacagttgggattgcagaagcgtttggcaaatatgcg-3'
mCCR5-3Ar	5'-aattcgcataatggcacaacgcttctgcaaatcccaactgttggttcacagattgcagaagcgtttggcaaatgcgcg-3'
mCCR5-3Bf	5'-gatccgcgctggcacaacgcttctgcaaatctgtgaagccacagatgggcattgcagaagcgtttggcaaatgcg-3'
mCCR5-3Br	5'-aattcgcatctggcacaacgcttctgcaaatcccatctgttggttcacagcattgcagaagcgtttggcaagcgcg-3'
mCCR5-3Cf	5'-gatccgcgctggcacaacgcttctgcaaatctgtgaagccacagatgggcatgcagaagcgtttggcaaatgcg-3'
mCCR5-3Cr	5'-aattcgcatctggcacaacgcttctgcaaatcccatctgttggttcacagcattgcagaagcgtttggcagcgcg-3'
mCCR5-5f	5'-gatccgcgcaagtgaggactttggaatacactgtgaagccacagatgggtgtatctccaaagtcctgatgcg-3'
mCCR5-5r	5'-aattcgcatcaagtgaggactttggaatacactccatctgttggttcacattgtatctccaaagtcctggcgcg-3'
mCCR5-6f	5'-gatccgcgcaactcttgacagggtctctattgtgaagccacataggaatagagccctgtcaagagtatgcg-3'
mCCR5-6r	5'-aattcgcatcaactcttgacagggtctctattccatctgttggttcacaaaatagagccctgtcaagagtatgcgcg-3'
mCCR5-7f	5'-gatccgcgcaaacaggttgaccagactatgtgaagccacagatgtcatagcttggtccaacctgttaagcg-3'
mCCR5-7r	5'-aattcgcataacaggttgaccagactatgacatctgttggttcacacatagcttggtccaacctgttagcgcg-3'
mCCR5-8f	5'-gatccgcgcaatgaggtgacagagactcttgtgaagccacagatgtcaagagtctctgtcacctgcatctgcg-3'
mCCR5-8r	5'-aattcgcatatgaggtgacagagactcttgcacatctgttggttcacacaagagtctctgtcacctgcatctgcg-3'
mCCR5-9f	5'-gatccgcgcaatgaggtgacagagactcttgtgaagccacagatggactaagaggtagttctgaaactctgcg-3'
mCCR5-9r	5'-aattcgcatatgaggtgacagagactcttgcacatctgttggttcacaactaagaggtagttctgaaactctgcg-3'
mCCR5-10f	5'-gatccgcgctggcacaacgcttctgcaaatctgtgaagccacagatgtcattgcagaagcgtttggcaactgcg-3'
mCCR5-10r	5'-aattcgcatctggcacaacgcttctgcaaatgacatctgttggttcacacattgcagaagcgtttggcaactgcg-3'
mCCR5-13Af	5'-gatccgcgcaagtgcaagtcctcaatctatctgtgaagccacagatgggcatagattggacttgacacttgatgcg-3'
mCCR5-13Ar	5'-aattcgcatcaagtgcaagtcctcaatctatcccatctgttggttcacagcatagattggacttgacacttgccgcg-3'
mCCR5-13Bf	5'-gatccgcgcaagtgcaagtcctcaatctatctgtgaagccacagatgggtcatagattggacttgacacttgatgcg-3'
mCCR5-13Br	5'-aattcgcatcaagtgcaagtcctcaatctatgacatctgttggttcacagtcagattggacttgacacttgccgcg-3'
miR-lacZf	5'-gatcctgctgaaatcgctgattttgtgtagctgtttggcactgactgacgactacacatcagcgatttcaggag-3'
miR-lacZr	5'-aattctctgaaatcgctgattttgtgtagctgtcagtcagtgcccaaacgactacacatcagcgatttcagcag-3'

注:带边框序列为 miRNA 的靶序列.

表 2 报告质粒 PCR 扩增引物序列

Tab. 2 Primer sequences for construction of reporter plasmids

目的报告质粒	引物名称	引物序列
pST Luc-C5A	C5Af	5'-ctacgatagatctatggattatcaagtgccaagtc-3'
	C5Ar	5'-gcatggatcccctgggagagacgcaaacaca-3'
pST Luc-C5B	C5Bf	5'-ctacgaattcatccatagatctcgctgctgtcatggtcatct-3'
	C5Br	5'-gcatggatccgctcgggagcctcttgc-3'

## 2 结果

### 2.1 靶向 *CCR5* 的人工 miRNA 表达载体的构建

本研究以 *CCR5* 基因序列为模板设计了 14 个 miRNA 靶序列. miR-30a 是目前剪切位点已研究清楚天然 miRNA<sup>[8]</sup>, 因此本研究选择 miR-30a 作为基础模板进行人工 miRNA 构建. 将天然 miR-30a 的靶序列区分别替换为本研究设计的靶向 *CCR5* 的 miRNA 靶序列, 再克隆入 pcDNA3.1 (+) 表达载体, 经酶切鉴定后获得分别靶向 *CCR5* 不同靶点的人工 miRNA 表达载体.

### 2.2 共转染实验检测靶向 *CCR5* 的 miRNA 的抑制效率

本研究通过将 miRNA 表达质粒与报告质粒共转染的方法检测靶向 *CCR5* 的不同 miRNA 的抑制效率. 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是目前较常使用的分析特定 siRNA 或 miRNA 抑制效率的方法<sup>[9]</sup>. 本研究设计的 14 个 miRNA 的靶序列主要分别位于 *CCR5* 基因序列的两个区段 (C5A: 1 ~ 488 nt 和 C5B: 617 ~ 1 000 nt) (图1). 本研究即将 *CCR5* 基因上述两个区段的序列以二倍体形式分别克隆入荧光素酶 (luciferase) 表达质粒 pST luc-C5A 和 pST luc-C5B. 将不同的靶向 *CCR5* 的 miRNA 表达质粒分别与 pST luc-C5A 和 pST luc-C5B 在 293FT 细胞中进行共转染实验, 48 h

后收集细胞裂解上清并检测荧光素酶活性. 结果如图 2 所示, 不同 miRNA 体现出不同程度的抑制效果, 其中 miCCR-13A 具有较好的抑制效果, 可有效抑制 pST luc-C5A 的表达, 但不能抑制 pST luc-C5B 和 pST luc-control 的表达, 体现出较好的抑制特异性. 因此本研究选择对 miCCR-13A 进行进一步的分析评价.

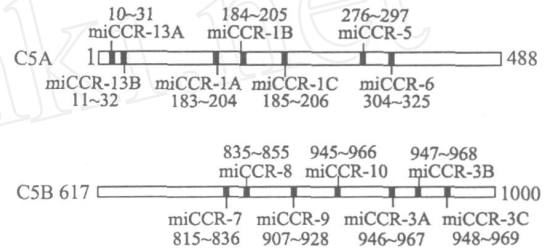


图 1 miRNA 靶序列在 *CCR5* 基因上的位置

Fig. 1 Locations of miRNA target sequences on *CCR5*

### 2.3 miCCR-13A 对 HIV-1 受体细胞 *CCR5* 表达的抑制效果

本研究进一步验证了 miCCR-13A 在 *CCR5* 阳性的 HIV-1 受体细胞 TZM-b1 中对 *CCR5* 表达的抑制效果. TZM-b1 为 *CCR5* 与 CXCR4 阳性的 HIV-1 受体细胞, 常用于 HIV-1 的滴度鉴定实验<sup>[10]</sup>. 本研究构建携带了 miCCR-13A 表达元件的表达载体 pLL K<sup>K</sup>-miCCR13A. 将 pLL K<sup>K</sup>-miCCR13A 和对照质粒 pLL K<sup>K</sup>-miR-lacZ 分别转染 TZM-b1 细胞, 转染 72 h 后传代一次, 继续培养 48 h 后进行检测实验. 本研究通过 RT-PCR 方法以细胞内源性 miRNA (miR-181) 为参比对照检测 miCCR-13A 在转染后细胞中的相对

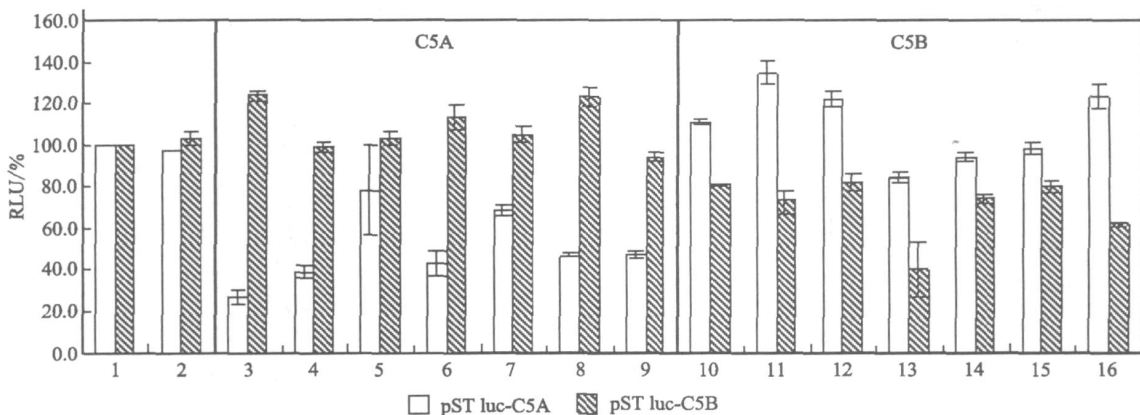


图 2 共转染实验检测靶向 *CCR5* 的 miRNA 的抑制效率

1. mir-lacZ; 2. pcDNA3.1; 3. miCCR-13A; 4. miCCR-13B; 5. miCCR-1A; 6. miCCR-1B; 7. miCCR-1C; 8. miCCR-5; 9. miCCR-6; 10. miCCR-7; 11. miCCR-8; 12. miCCR-9; 13. miCCR-10; 14. miCCR-3A; 15. miCCR-3B; 16. miCCR-3C

Fig. 2 Analysis of inhibition efficiencies of different miRNA against *CCR5* by cotransfection assay

表达水平,结果显示 miCCR-13A 在细胞中获得了有效的表达(图 3). 通过流式细胞术检测转染后细胞中 CCR5 蛋白的活性,结果如图 4 所示,与转染对照质粒 pLL K<sup>K</sup>-miR-lacZ相比,转染 pLL K<sup>K</sup>-miCCR13A 的细胞中 CCR5 蛋白活性明显降低,与对照相比 CCR5 表达的抑制效率约为 78.7%,说明 miCCR-13A 对 CCR5 具有较好的抑制效果.

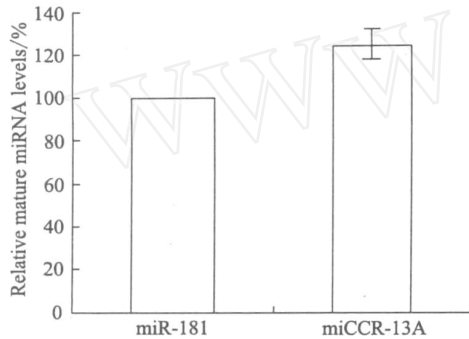


图 3 miCCR-13A 在转染后细胞内的表达水平  
Fig. 3 Expression level of miCCR-13A in T2M-b1 cells transfected with pLL K<sup>K</sup>-miCCR13A

### 2.4 miCCR-13A 的脱靶效应分析

本研究进一步检测了靶向 CCR5 的 miCCR-13A 对细胞活性及干扰素应答途径的影响. 将携带 miCCR-13A 表达元件的载体 pLL K<sup>K</sup>-miCCR13A 转染 T2M-b1 细胞,应用 CCK-8 细胞活性检测试剂盒检测 miCCR-13A 表达对细胞活性的影响,结果如图 5A,转染了 pLL K<sup>K</sup>-miCCR13A 的细胞与对照相比细胞活性未出现明显变化,说明 miCCR-13A 的表达不会影响细胞的增殖和代谢. 同时应用实时 RT-PCR 方法检测干扰素效应相关基因 *osa1* 和 *stat1* 的 mRNA 水平,以

-*Actin* 基因 mRNA 水平为内参,检测结果如图 5B,转染了 pLL K<sup>K</sup>-miCCR13A 的细胞与对照细胞相比 *osa1* 和 *stat1* 水平没有明显变化,说明 miCCR-13A 的表达不会影响细胞的干扰素应答途径. 因此进一步证明 miCCR-13A 具有良好的抑制特异性.

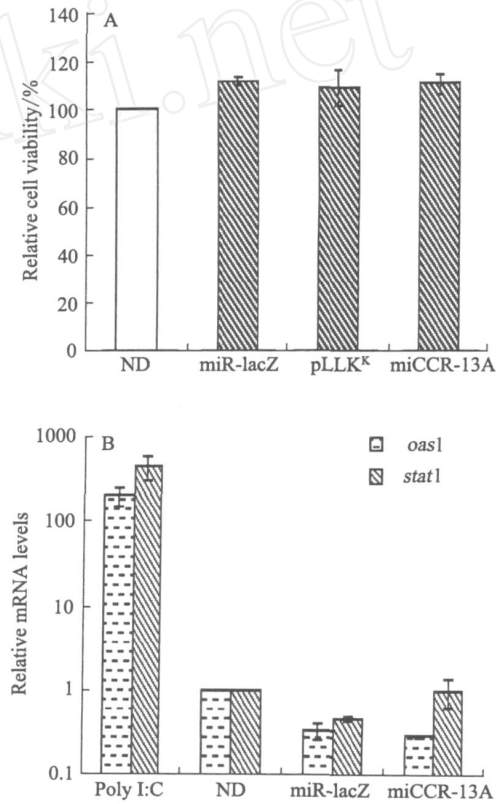


图 5 miCCR-13A 的脱靶效应分析  
A. miRNA 表达对细胞活性的影响;B. miRNA 表达对细胞中 *stat1* 和 *osa1* 基因 mRNA 水平的影响  
Fig. 5 Analysis of off-target effects of miCCR-13A

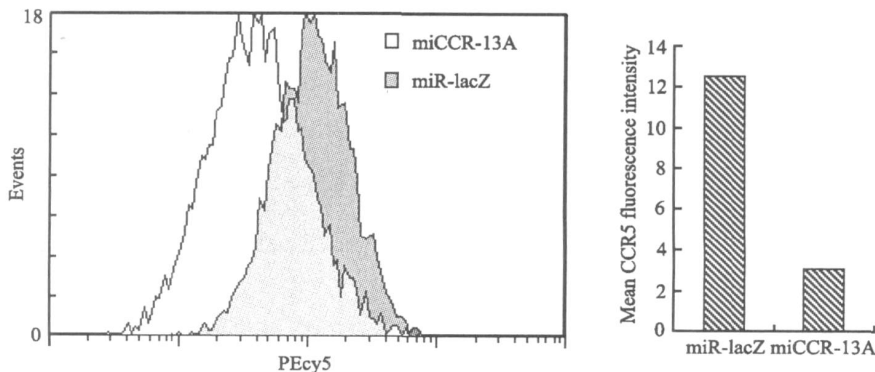


图 4 miCCR-13A 在转染后的 T2M-b1 细胞中对 CCR5 表达的抑制效率  
Fig. 4 Analysis of inhibition efficiencies of CCR5 expression in T2M-b1 cells transfected with pLL K<sup>K</sup>-miCCR13A

### 3 讨 论

RNAi 是近年来发现并逐步阐明的一种细胞内特异性抑制基因表达的机制,已广泛应用于基因功能及抗病毒、抗肿瘤等研究,显示出巨大的应用前景.将 RNAi 技术应用于 HIV-1 治疗研究是目前的研究热点,然而也面临许多问题,如何有效应对由于 HIV-1 的高突变率而导致逃避抑制的问题,是 RNAi 技术是否能够成功应用于 HIV-1 治疗的一个关键<sup>[11]</sup>.在目前已提出的各种可能的对策中,获得具有高效抑制特性的 RNAi 元件是开展相关研究的重要基础.在 HIV-1 基因外选择合适的与 HIV-1 复制相关的 RNAi 靶点也是一种有效的策略.本研究以天然 miR-30a 为基础骨架构建了可特异靶向该靶点的人工 miRNA 元件,筛选获得一个可有效抑制 CCR5 的 miRNA 元件(miCCR-13A),进一步的脱靶效应检测证明该人工 miRNA 具有较好的抑制特异性,具有良好的应用潜力.

研究已显示,R5 型 HIV-1 是建立初始感染的主要病毒,而 CCR5 是 R5 型 HIV-1 感染细胞的必需辅助受体<sup>[2]</sup>.在以基因治疗相关研究中,以体内基因作为 RNAi 的抑制对象是需要进行慎重选择的,特别是需要考虑是否会对细胞增殖活性及功能产生影响.目前认为,CCR5 对于人体的正常生长、分化及免疫功能并非必不可少.有研究显示,CCR5 先天性缺失的个体并未显示出发育或其他异常,同时对 HIV-1 的感染具有天然的抵抗作用<sup>[12]</sup>.也有报道显示,在 CCR5 表达降低 50% 的 HIV-1 感染患者中,其血清中的病毒载量明显低于普通患者,并且可以延缓病程的发展<sup>[13]</sup>.这说明 CCR5 缺失或降低不会影响机体的正常机制,同时有助于抑制 HIV-1 的感染,因此 CCR5 可以作为 RNAi 技术抗 HIV-1 研究的良好靶标.目前报道的抑制 CCR5 表达的 RNAi 方法主要是采用经典的 siRNA 途径,靶向 CCR5 的 siRNA 通过化学合成直接转染<sup>[14]</sup>或通过载体转染至细胞内表达<sup>[15]</sup>的方式在细胞中抑制 CCR5 的表达.本研究则结合了目前在 miRNA 方面的研究进展,采用了以天然 miRNA 为基础骨架构建靶向 CCR5 的人工 miRNA 元件的方法.

miRNA 与 siRNA 均为 RNAi 的主要作用分子.与 siRNA 不同,天然 miRNA 来自于细胞内基因的非编码区转录产生的具有茎环结构的 pri-miRNA,经由 RNase III 家族的 Drosha 和 Dicer 酶加工后形成成熟的 miRNA,miRNA 可与 RISC 结合形成 miRISC,内

源性 miRNA 主要通过与其靶 mRNA 序列不完全匹配的非降解的翻译抑制方式调控靶基因的表达<sup>[16-17]</sup>,而当 miRNA 与靶 mRNA 序列高度匹配时也可通过类似 siRNA 的作用机制特异识别并切割降解靶 mRNA<sup>[18]</sup>.在 miRNA 的加工过程中,影响 Drosha 剪切的关键因素是其二级结构,而与 miRNA 一级序列无关<sup>[19]</sup>,这为通过对天然 miRNA 的靶序列进行替换改造构建靶向特定靶点的人工 miRNA 提供了重要的理论支持.目前探讨以 miRNA 作为基因表达抑制工具已成为 RNAi 技术研究的一个重要方面.同时值得注意的是,以 siRNA 不同 miRNA 可使用 RNA 聚合酶 II 类启动子指导表达,因此在表达载体启动子选择上具有更大的灵活性.研究显示,目前常用于 siRNA 表达的 RNA 聚合酶 III 类启动子容易造成表达过量而影响细胞正常功能,而 II 类启动子选择范围较广,可以使用组织特异性或诱导型启动子,从而有利于脱靶效应的控制<sup>[5,8]</sup>.本研究构建的靶向 CCR5 的人工 miRNA(miCCR-13A)即使用属 RNA 聚合酶 II 类启动子的 H2K 启动子进行表达,对靶细胞中的 CCR5 表达具有良好的抑制效果,同时脱靶效应分析显示不会影响细胞活性和干扰素应答途径,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基础.

### 参考文献:

- [1] Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA intracellular antiviral immunity in human cells[J]. Nature, 2002, 418(6896): 430-434.
- [2] Berger E A, Murphy P M, Farber J M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease[J]. Annu Rev Immunol, 1999, 17: 657-700.
- [3] Nazari R, Joshi S. CCR5 as target for HIV-1 gene therapy[J]. Curr Gene Ther, 2008, 8(4): 264-272.
- [4] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [5] Lo H L, Chang T, Yam P, et al. Inhibition of HIV-1 replication with designed miRNAs expressed from RNA polymerase II promoters[J]. Gene Ther, 2007, 14(21): 1503-1512.
- [6] Rubinson D A, Dillon C P, Kwiatkowski A V, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference[J]. Nat Genet, 2003, 33(3): 401-406.
- [7] Dang L T, Kondo H, Aoki T, et al. Engineered virus-en-

- coded pre-microRNA (pre-miRNA) induces sequence-specific antiviral response in addition to nonspecific immunity in a fish cell line: convergence of RNAi-related pathways and IFN-related pathways in antiviral response [J]. *Antiviral Res*, 2008, 80(3): 316-323.
- [8] Boden D, Pusch O, Silbermann R, et al. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(3): 1154-1158.
- [9] Liu Y P, Haasnoot J, ter Brake O, et al. Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(9): 2811-2824.
- [10] Wei X, Decker J M, Liu H, et al. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(6): 1896-1905.
- [11] Boden D, Pusch O, Ramratnam B. Overcoming HIV-1 resistance to RNA interference[J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 3104-3116.
- [12] Liu R P W, Choe S, Ceradini D, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection [J]. *Cell*, 1996, 86(3): 367-377.
- [13] Dean M, Carrington M, Winkler C, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene [J]. *Science*, 1996, 273(5283): 1856-1862.
- [14] Kumar P, Ban H S, Kim S S, et al. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice [J]. *Cell*, 2008, 134(4): 577-586.
- [15] Anderson J, Akkina R. HIV-1 resistance conferred by siRNA cosuppression of *CXCR4* and *CCR5* coreceptors by a bispecific lentiviral vector [J]. *AIDS Res Ther*, 2005, 2(1): 1.
- [16] Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II [J]. *Embo J*, 2004, 23(20): 4051-4060.
- [17] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing [J]. *Nature*, 2003, 425(6956): 415-419.
- [18] Steiner F A, Hoogstrate S W, Okihara K L, et al. Structural features of small RNA precursors determine Argonaute loading in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(10): 927-933.
- [19] Zeng Y, Yi R, Cullen B R. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha [J]. *Embo J*, 2005, 24(1): 138-148.

## Construction and Identification of Artificial miRNA Targeting to HIV-1 Cell Receptor Gene *CCR5*

WANG Ying-bin, CHENG Tong<sup>\*</sup>, WEI Li-hua, ZHANG Tao,  
LIANG Lu-ping, XIA Ning-shao

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

**Abstract:** The chemokine receptor *CCR5* is one of the major co-receptors for HIV-1 cellular entry. HIV-1 replication can be blocked to some extent by inhibiting the expression of *CCR5*. RNA interference (RNAi) is a sequence-specific intracellular mechanism of gene silence. Recent studies have shown 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 element against *CCR5* effectively and specifically. Fourteen miRNA sequences were selected based on the sequence of *CCR5* gene and the target sequence in the stem-loop structure of the native miR-30a was replaced with the artificial miRNA sequence separately. Using various reporter plasmids containing different target sequences, the activities of the constructs against *CCR5* were determined and miCCR-13A was selected from the candidates. miCCR-13A expression vector was then transfected into *CCR5*-positive TZM-b1 cells, miCCR-13A expression was confirmed by RT-PCR detection in transformed cells, and the *CCR5* expression was effectively inhibited by miCCR-13A in transformed cells comparing to control cells. Results also showed that cell viabilities and intracellular *stat1* and *osa1* mRNA levels were not affected by miCCR-13A expression in transformed cells. miCCR-13A is a promising candidate for future research on HIV-1 therapy.

**Key words:** *CCR5*; RNA interference; artificial miRNA