

## 靶向 HIV-1 *vif* 的高效 siRNA 的筛选及慢病毒介导的体外抗病毒研究

张涛,程通,张雅丽,魏丽华,蔡毅君,张军,朱桦,韩家淮,夏宁邵\*

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

**摘要:** RNAi 技术在艾滋病治疗研究中已展现出巨大的潜力,兼具高效抑制特性和保守性的 siRNA 靶位是其获得成功应用的重要基础。本研究选择以 HIV-1 *vif* 基因为靶区筛选高效保守的 RNAi 序列,共选择设计了 30 个识别不同位点的 siRNA 序列,以 pSUPER 为载体构建了相应的 shRNA 表达质粒。通过与 pNL4-3 质粒在 293FT 细胞中进行共转染抑制实验,以及对初筛获得的高效序列进行保守性分析显示 siRNA-*vif*37 序列具有高效抑制效率和较好的保守性特征。通过与 pGL3-*vif* 报告质粒的共转染实验证明 siRNA-*vif*37 具有 *vif* 基因抑制特异性。带有 shRNA-*vif*37 表达元件的重组慢病毒转导后的 MT-4 细胞在 HIV-1<sub>NL4-3</sub> 体外攻毒实验中可显示出较有效的抑制病毒复制的能力,本研究进一步对转导后细胞进行克隆化筛选,获得稳定整合 shRNA-*vif*37 表达元件的 MT-4-*vif*37 细胞克隆,该细胞具有显著的抑制病毒复制的能力,在高攻毒剂量下仍可获得良好的抑制效果。本研究为进一步应用 RNAi 技术进行新型艾滋病治疗方法研究提供了重要基础。

**关键词:** RNA 干扰; HIV-1; *vif*; 重组慢病毒

**中图分类号:** R373.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2008)02-0088-08

RNA 干扰(RNAi)是细胞内序列特异性抑制基因表达的机制,将 RNAi 技术应用于艾滋病治疗已成为当前的研究热点<sup>[1,2]</sup>。研究显示,靶向艾滋病病毒(HIV)基因或病毒感染相关细胞因子的 RNAi 元件均可抑制 HIV-1 的感染和复制<sup>[3]</sup>。然而由于 HIV-1 具有高突变率,可通过序列突变降低甚至消除 RNAi 对其的抑制作用<sup>[4]</sup>。针对此问题一个重要的解决策略是选择兼具高效抑制特性和保守性的 siRNA 靶位<sup>[5]</sup>。目前已提供的 siRNA 设计方法可用于辅助提高获得高效 siRNA 靶位的概率,但与获得理想抑制效率并不关联<sup>[6]</sup>,因此通过实验方法进行规模化筛选仍是获得高效靶点的一种直接且有效的策略。近来发现,HIV-1 的 Vif 蛋白可抑制宿主细胞蛋白 APOBEC3G 介导的抗病毒途径,是 HIV-1 建立持续感染的重要原因,抑制 Vif 的表达有助于提高宿主细胞的抗病毒能力<sup>[7,8]</sup>。因此 *vif* 区可作为

合适的高效 siRNA 靶位选择区域,以获得更有效的抗病毒效果。目前在 *vif* 区尚未报道获得兼具高效和保守特性的 siRNA 序列。本研究即以 HIV-1 *vif* 基因为靶区域,设计了 30 个靶向不同位点的 siRNA,通过与 HIV-1 感染性克隆的共转染抑制实验筛选及保守性分析显示 siRNA-*vif*37 具有较好的抑制能力和保守性特征,该序列的 shRNA 表达元件通过重组慢病毒载体导入人 T 淋巴细胞株 MT-4,可使其在 HIV-1 体外攻毒实验中获得显著的抑制病毒复制的能力。本研究为进一步应用 RNAi 技术进行 HIV-1 抗病毒治疗研究提供了基础。

### 材料与方法

**1 细胞株和质粒** MT-4 细胞由本实验室保存。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 pVSV-G)以及 293FT 细胞购自 Invitrogen 公司,慢病毒转移质粒 pLL3.7 赠自韩家淮教授<sup>[9]</sup>。

**2 试剂** 限制性内切酶、连接酶购自大连宝生物工程公司,脂质体、DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司,polybrene 购自 SIGMA 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。

**3 shRNA 表达质粒的构建** 以 HIV-1<sub>NL4-3</sub> 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

收稿日期:2007-06-21; 修回日期:2007-08-28

基金项目: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(2007J0111),病毒性疾病新药研发平台(2004YZ01),厦门市病毒性疾病新药研发平台建设(3502Z20041008)

作者简介:张涛(1978-)男,在读博士,分子病毒学, Tel: 86-592-2184113; E-mail: zhangtnidvd@xmu.edu.cn

通讯作者:夏宁邵, Tel: 86-592-2184110; E-mail: nsxia@xmu.edu.cn

长度为 19bp 的靶向 *vif* 基因的 siRNA 序列,其中选择了 30 个作为候选靶位。靶向 *luciferase* 基因的 siRNA-luc<sup>[10]</sup>和靶向 HIV-1 *gag* 基因的 siRNA-gag1607<sup>[11]</sup>作为对照。pSUPER 载体携带 H1 启动子,可用于表达短发卡 RNA (shRNA),shRNA 在胞内可形成茎-环结构并为 Dicer 酶识别剪切后形成 siRNA。shRNA 系列表达质粒的构建过程为:合表 1 各靶序列所对应的引物,以 H<sub>2</sub>O 溶解(3μg/μL),互

补引物各取 2μl,加入 46μl 的退火缓冲液中,95 4min,70 10min 后冷却至 37 。退火产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳,以单正链引物为对照,检测退火是否成功。退火成功的双链用 T4 连接酶连接至经 *Bgl* II 和 *Hin* dIII 双酶切的 pSUPER 载体,转化 DH5 菌株,经酶切和测序鉴定获得所需克隆。

表 1 用于 shRNAs 合成的引物序列

Table 1 The sequences of primers used to generate shRNAs

Name	Primer sequence
vif37f	5 - GA TCCCCGTA GA CA GGA TGA GGA TTA TTCAA GA GA TAA TCCTCA TCCTGTCTACTTTTAA-3
vif37r	5 - A GCTTAAAAA GTA GACA GGA TGA GGA TTA TCCTTGAA TAA TCCTCA TCCTGTCTACGGG-3
vif90f	5 - GA TCCCCCTA TTTCAA GGAAA GCTAA GTTCAA GA GACTTA GCTTTCCTTGAAA TATTTTAA-3
vif90r	5 - A GCTTAAAAA TATTTCAA GGAAA GCTAA GTCTCTTGAACCTA GCTTTCCTTGAAA TAGGG-3
vif122f	5 - GA TCCCCGA CA TCA CTA TGAAA GTA CTTCAA GA GA GTACTTTCA TA GTGA TGTCTTTTAA-3
vif122r	5 - A GCTTAAAAA GACA TCACTA TGAAA GTACTCTCTTGAAGTACTTTCA TA GTGA TGTCTGGG-3
vif129f	5 - GA TCCCCCTA TGAAA GTA CTA TCCA TTCAA GA GA TGGA TTA GTACTTTCA TAGTTTTAA-3
vif129r	5 - A GCTTAAAAA CTA TGAAA GTACTAA TCCA TCTCTTGAA TGGA TTA GTACTTTCA TAGGGG-3
vif216f	5 - GA TCCCCGCA TA CA GGA GAAA GA GA CTTCAA GA GA GTCCTTTCTCCTGTA TGCTTTTAA-3
vif216r	5 - A GCTTAAAAA GCA TACA GGA GAAA GA GACTCTCTTGAA GTCCTTTCTCCTGTA TGGCGG-3
vif284f	5 - GA TCCCCGCA CA CA A GTA GA CCGTGA TTCAA GA TCA GGGTCTACTTGTGCTTTTAA-3
vif284r	5 - A GCTTAAAAA GCACACAA GTA GACCCTGA TCTCTGAA TCA GGGTCTACTTGTGTGCGGG-3
vif299f	5 - GA TCCCCCTGA CCA GCA GA CCA A CTTCAA GA GAA GTTGGTCTGCTA GGTCA GTTTTAA-3
vif299r	5 - A GCTTAAAAA CTA GACCTA GCA GACCAACTTCTCTTGAAA GTTGGTCTGCTA GGTCA GGGG-3
vif300f	5 - GA TCCCCCTGA CCA GCA GA CCA A CTA TTCAA GA GA TA GTTGGTCTGCTA GGTCA TTTTAA-3
vif300r	5 - A GCTTAAAAA TGACCTA GCA GACCAACTA TCTCTTGAA TA GTTGGTCTGCTA GGTCA GGG-3
vif302f	5 - GA TCCCCA CCA GCA GA CCA A CTA TTCAA GA GAA TTA GTTGGTCTGCTA GGTTTTAA-3
vif302r	5 - A GCTTAAAAA ACCTA GCA GACCAACTAA TTCTCTTGAAA TTA GTTGGTCTGCTA GGTGGG-3
vif303f	5 - GA TCCCCCTA GCA GA CCA A CTA TTCAA GA GAAA TTA GTTGGTCTGCTA GGTTTTAA-3
vif303r	5 - A GCTTAAAAA ACCTA GCA GACCAACTAA TTCTCTTGAAA TTA GTTGGTCTGCTA GGGGG-3
vif344f	5 - GA TCCCCCTTCA GAA TCTGCTA TAA GTTCAA GA GACTTA TA GCA GA TTCTGAAA TTTTAA-3
vif344r	5 - A GCTTAAAAA TTTCA GAA TCTGCTA TAA GTCTCTTGAACCTA TA GCA GA TTCTGAAA GGG-3
vif365f	5 - GA TCCCCA TA CCA TA TTA GGA CGTA TTCAA GA GAA TACGTCTTAA TA TGGA TTTTAA-3
vif365r	5 - A GCTTAAAAA TACCA TA TTA GGACGTA TTCTCTTGAAA TACGTCTTAA TA TGGA TGGG-3
vif366f	5 - GA TCCCCCTA CCA TA TTA GGA CGTA TA TTCAA GA GA TA TACGTCTTAA TA TGGA TTTTAA-3
vif366r	5 - A GCTTAAAAA TACCA TA TTA GGACGTA TA TCTCTTGAA TA TACGTCTTAA TA TGGA GGG-3
vif372f	5 - GA TCCCCA TTA GGA CGTA TA GTTA GTTTCAA GA GAACTAACTA TACGTCTTAA TTTTAA-3
vif372r	5 - A GCTTAAAAA TTA GGACGTA TA GTTA GTTCTCTTGAACTAACTA TACGTCTTAA TGGG-3
vif376f	5 - GA TCCCCGGA CGTA TA GTTA GTCCTA TTCAA GA GA TA GGACTAACTA TACGTCTTTTAA-3
vif376r	5 - A GCTTAAAAA GGACGTA TA GTTA GTCCTA TCTCTTGAA TA GGACTAACTA TACGTCCGGG-3
vif404f	5 - GA TCCCCA TCA A GCA GGA CA TAA CAA TTCAA GA GA TTGTTA TGTCTGCTTGA TTTTAA-3
vif404r	5 - A GCTTAAAAA TCAA GCA GGACA TAACAA TCTCTTGAA TTGTTA TGTCTGCTTGA TGGG-3
vif408f	5 - GA TCCCCA GCA GGA CA TAA CAA GGTA TTCAA GA GA TACCTTGTTA TGTCTGCTTTTAA-3
vif408r	5 - A GCTTAAAAA GCA GGACA TAACAA GGTA TCTCTTGAA TACCTTGTTA TGTCTGCTGGG-3
vif414f	5 - GA TCCCCA CA TAA CAA GGTA GGA TCTTTCAA GA GAA GA TCCTACCTTGTTA TGTTTTAA-3
vif414r	5 - A GCTTAAAAA ACA TAACAA GGTA GGA TCTTCTCTTGAAA GA TCCTACCTTGTTA TGTGGG-3
vif423f	5 - GA TCCCCGGA GGA TCTCTA CA GTA CTTCAA GA GA GTACTGTA GA GA TCCTACCTTTTAA-3
vif423r	5 - A GCTTAAAAA GGTA GGA TCTCTACA GTACTCTCTTGAA GTACTGTA GA GA TCCTACCGGG-3
vif431f	5 - GA TCCCCCTCA CA GTA CTTGGCA CTTTCAA GA GAA GTGCCAA GACTGTA GA GTTTTAA-3
vif431r	5 - A GCTTAAAAA CTA CTA GACTTGGCACTTCTCTTGAAA GTGCCAA GACTGTA GA GGGG-3
vif432f	5 - GA TCCCCCTCA CA GTA CTTGGCA CTA TTCAA GA GA TA GTGCCAA GACTGTA GA TTTTAA-3
vif432r	5 - A GCTTAAAAA TCTACA GACTTGGCACTA TCTCTTGAA TA GTGCCAA GACTGTA GA GGG-3
vif433f	5 - GA TCCCCCTA CA GTA CTTGGCA CTA GTTCAA GA GACTA GTGCCAA GACTGTA GTTTTAA-3
vif433r	5 - A GCTTAAAAA CTA CTA GACTTGGCACTA GTCCTTGAACCTA GTGCCAA GACTGTA GGGG-3

Name	Primer sequence
vif441f	5 - GA TCCCCCTTGGCA CTA GCA GCA TTA TTCAA GA GA TAA TGCTGCTA GTGCCAA GTTTTTTA-3
vif441r	5 - AGCTTAAAAA ACTTGGCACTA GCA GCA TTA TCTCTTGAA TAA TGCTGCTA GTGCCAA GGGG-3
vif444f	5 - GA TCCCCGGA CTA GCA GCA TTA TA TTCAA GA GA TTA TGCTGCTA GTGCCTTTTTA-3
vif444r	5 - AGCTTAAAAA GGCACCTA GCA GCA TTA TA TCTCTTGAA TA TTA TGCTGCTA GTGCCGGG-3
vif445f	5 - GA TCCCCGCA CTA GCA GCA TTA TAA TTCAA GA GA TTA TTA TGCTGCTA GTGCTTTTTA-3
vif445r	5 - AGCTTAAAAA GCACTA GCA GCA TTA TAA TCTCTTGAA TTA TTA TGCTGCTA GTGCCGGG-3
vif446f	5 - GA TCCCCCA CTA GCA GCA TTA TAAA TTCAA GA GA TTTA TTA TGCTGCTA GTGTTTTTA-3
vif446r	5 - AGCTTAAAAA ACACCTA GCA GCA TTA TAAA TCTCTTGAA TTTA TTA TGCTGCTA GTGGGG-3
vif471f	5 - GA TCCCCA CA GA TAAA GCCA CCTTGTTCAA GA GACAAA GGTGGCTTTA TCTGTTTTTA-3
vif471r	5 - AGCTTAAAAA ACA GA TAAA GCCACCTTGTCTCTTGAACAAA GGTGGCTTTA TCTGTGGG-3
vif475f	5 - GA TCCCCA TAAA GCCA CCTTGCCTA TTCAA GA GA TA GGCAAAA GGTGGCTTTA TTTTTTA-3
vif475r	5 - AGCTTAAAAA TAAA GCCACCTTGCCTA TCTCTTGAA TA GGCAAAA GGTGGCTTTA TGGG-3
vif481f	5 - GA TCCCCCA CCTTGCCTA GTGTTA TTCAA GA GA TAACACTA GGCAAAA GGTGGTTTTTA-3
vif481r	5 - AGCTTAAAAA ACCACCTTGCCTA GTGTTA TCTCTTGAA TAACACTA GGCAAAA GGTGGGGG-3
vif489f	5 - GA TCCCCGCTA GTGTTA GGAAA CTGTTCAA GA GACA GTTCTTAACACTA GGCTTTTTTA-3
vif489r	5 - AGCTTAAAAA GCCTA GTGTTA GGAAACTGTCTCTTGAACA GTTCTTAACACTA GGCGGG-3
gag1607f	5 - GA TCCCCAA TA GTAA GAA TGTA TA GCCCTCAA GA GA GGGCTA TACA TTCTTACTA TTTTTTA-3
gag1607r	5 - AGCTTAAAAA A TAGTAA GAA TGTA TA GCCCTCTCTTGAA GGGCTA TACA TTCTTACTA TTGGG-3
lucf	5 - GA TCCCCGTGCGCTGCTGGTGCCAA CTTCAG GA GA GTTGGCACCA GCA GCGCACTTTTTTA-3
lucr	5 - AGCTTAAAAA GTGCCTGCTGGTGCCAACTCTCTTGAA GTTGGCACCA GCA GCGCACGGG-3

Sequence in italics is the siRNA targeting sequence.

**4 共转染实验检测 siRNA 的抑制效率** 24 孔培养板中每孔铺入  $2 \times 10^5$  个 293FT 细胞, 12h 后换液, 将  $1 \mu\text{g}$  pSUPER-shRNA 系列质粒分别与  $0.1 \mu\text{g}$  pNL4-3 质粒混合后用脂质体对细胞进行转染, 48h 后收集培养上清样品进行 p24 蛋白的检测。

**5 HIV-1 p24 蛋白的检测** 样品经 10 倍梯度稀释后用 HIV ELISA 试剂盒(北京万泰公司)检测 p24 蛋白的活性。

**6 Luciferase 表达活性的检测** 24 孔培养板中每孔铺入  $2 \times 10^5$  个 293FT 细胞, 12h 后换液, 将  $0.5 \mu\text{g}$  待测 pSUPER-shRNA 质粒与  $0.1 \mu\text{g}$  pGL3-control (或 pGL3-vif、pGL3-gag) 质粒混匀后用脂质体对细胞进行转染, 48h 后用 Luciferase 检测试剂盒 (Luciferase Reporter Assay Kit, Promega) 检测 Luciferase 的活性。

**7 重组慢病毒的构建和鉴定** 带有 shRNA 表达元件的 pSUPER-shRNA 质粒以 *Xba*I 和 *Xho*I 双酶切后的回收片段连接到同样酶切的 pLL3.7 载体, 连接得到重组慢病毒转移质粒 pLL3.7-shRNA。293FT 细胞以 70% 的汇合率铺于 9cm 细胞培养皿中, 6h 后用脂质体将  $18 \mu\text{g}$  包装质粒混合物和  $6 \mu\text{g}$  慢病毒转移质粒混合转染(制备重组慢病毒 Lenti-vif37 时, 使用的包装质粒 pLP1 在 siRNA-vif37 的靶区域采用同义密码子突变两个碱基, 消除 shRNA 对慢病毒自身的抑制), 转染 12h 后更换为完全培养基, 72h 后收集细胞培养上清。收集的细胞培养上清在  $4 \sim 25 \text{ 000 r/min}$  离心 90min (Beckman 超速离心机, sw-28 转头), 弃上清, 每管加入  $200 \mu\text{l}$  无血清 DMEM 培养基, 4 过夜, 振荡 1 min, 收集上清。浓缩后的重组慢病毒用 293FT 细胞鉴定其感染效价, 将 293FT 细胞铺于 24 孔细胞培养板 ( $5 \times 10^4$  细胞/well), 6h 后分别加入  $100 \mu\text{l}$  经 10 倍梯度系列稀释后的待测病毒。培养 48h 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)。

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

**9 HIV-1<sub>NL4-3</sub> 的制备与鉴定** 293FT 细胞以 60% 的汇合率铺于 6 孔板中, 6h 后用脂质体转染  $2 \mu\text{g}$  pNL4-3 质粒, 12h 后更换为完全培养基, 72h 后收集含有 HIV-1<sub>NL4-3</sub> 的细胞培养上清, 并检测其中 p24 的浓度。

**10 HIV-1<sub>NL4-3</sub> 感染 MT-4 细胞** 慢病毒感染 MT-4 细胞一周后, 取  $5 \times 10^5$  个 MT-4 细胞铺于 24 孔细胞培养板中, 加入 HIV-1<sub>NL4-3</sub> 感染 2h 后用无血清培养基洗涤 2 次, 继续培养, 每两天收集细胞培养上清样品检测 p24 蛋白的含量。

## 结 果

### 1 共转染实验检测不同 siRNA 对 HIV-1 的抑制效率

本研究共设计了 30 条靶向 HIV-1 *vif* 基因区的 siRNA 序列, 分别克隆至 pSUPER 载体构建获得表达系列 shRNA 表达质粒。pNL4-3 质粒包含 HIV-1<sub>NL4-3</sub> 的全基因组, 转染 293FT 细胞后可产生具有感染能力的 HIV-1<sup>[12]</sup>, 其 p24 表达水平与病毒效价呈正相关<sup>[13]</sup>。本研究即通过检测共转染抑制实验中的 p24 表达水平对不同 siRNA 抑制 HIV-1 复制的效率进行检验。用 shRNA 的表达质粒分别

与 pNL4-3 质粒共转染 293FT 细胞,48h 后检测细胞培养上清中 p24 的活性,结果如图 1 所示。结果显示,本研究设计的靶向 HIV-1 *vif* 区不同位置的

siRNA 可在不同程度上抑制 HIV-1 的表达,其中部分克隆体现出较好的抑制效果,我们选择了 13 个抑制效率较好的克隆用于进一步分析筛选。

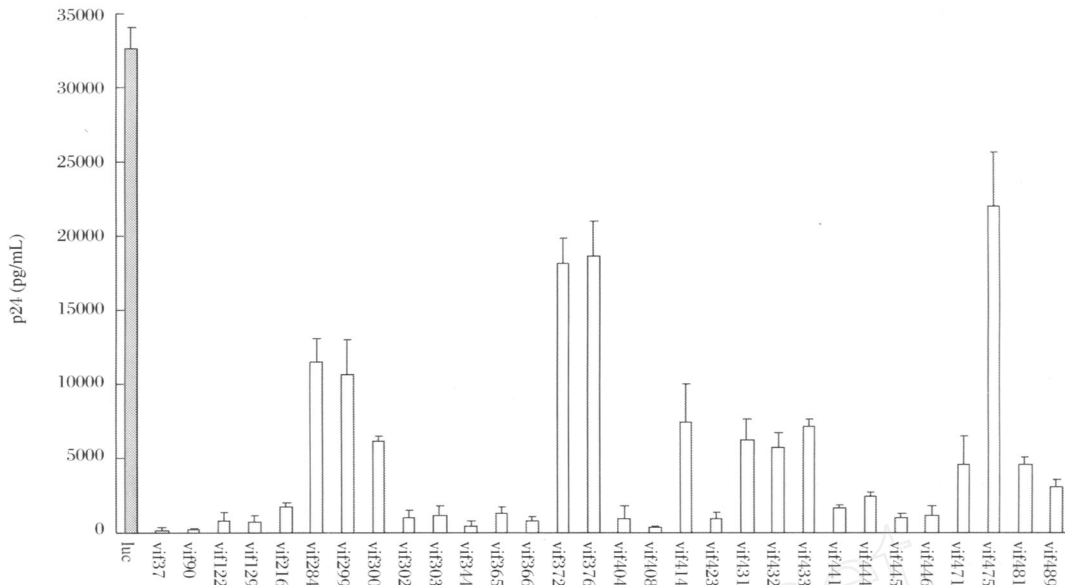


图 1 共转染实验检测不同 siRNA 对 HIV-1 p24 表达的抑制效率

Figure 1 Analysis of HIV-1 p24 protein expression in 293FT cells co-transfected with different shRNA expression vectors and pNL4-3

## 2 siRNA 序列的保守性分析

应用 Los Alamos HIV Sequence Database 中的 Primalign 软件对初筛获得的 13 个 siRNA 序列的保守性进行了分析。该数据库目前共有 625 个 HIV-1 全基因序列,包含了 HIV-1 已知的所有亚型。以在靶位序列区域内无或含 1 个点突变的序列数目的百分比显示不同 siRNA 的保守性。分析显示(图 2)所选的序列中 vif37 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 66% 和 26%,二者累计为 92%。

## 3 siRNA 抑制特异性验证

本研究进一步对 siRNA-vif37 序列的抑制特异性进行验证。在 pGL3-control 质粒的 *luciferase* 基因的终止密码子与 PolyA 之间分别插入 *vif* 序列和 *gag* 序列构建了报告质粒 pGL3-vif 和 pGL3-gag。分别以靶向 HIV-1 *gag* 基因的 shRNA-gag1607 和靶向 *luciferase* 的 shRNA-luc 表达质粒为对照进行共转染抑制实验,测量 *luciferase* 活性。结果如图 3 所示,siRNA-vif37 只能抑制 pGL3-vif 的表达,说明 siRNA-vif37 具有 *vif* 基因靶向特异性。

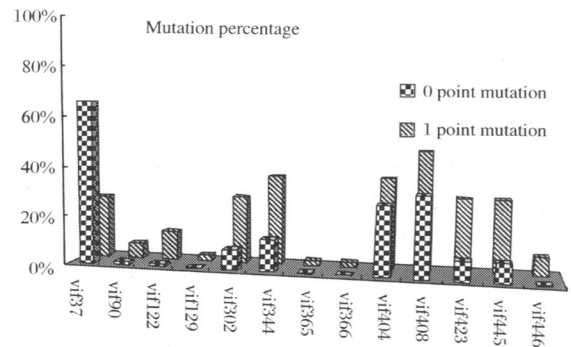


图 2 siRNA 序列的保守性分析

Figure 2 Conservation analysis of the siRNA targeting sequence

## 4 重组慢病毒的构建及对 MT-4 细胞的基因转移效率

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,在基因治疗研究中已显示出特别的优势<sup>[14]</sup>。本研究应用第 3 代慢病毒载体系统分别构建了带有 shRNA-vif37、shRNA-luc 表达元件的重组慢病毒 Lenti-vif37、Lenti-luc。本研究使用的

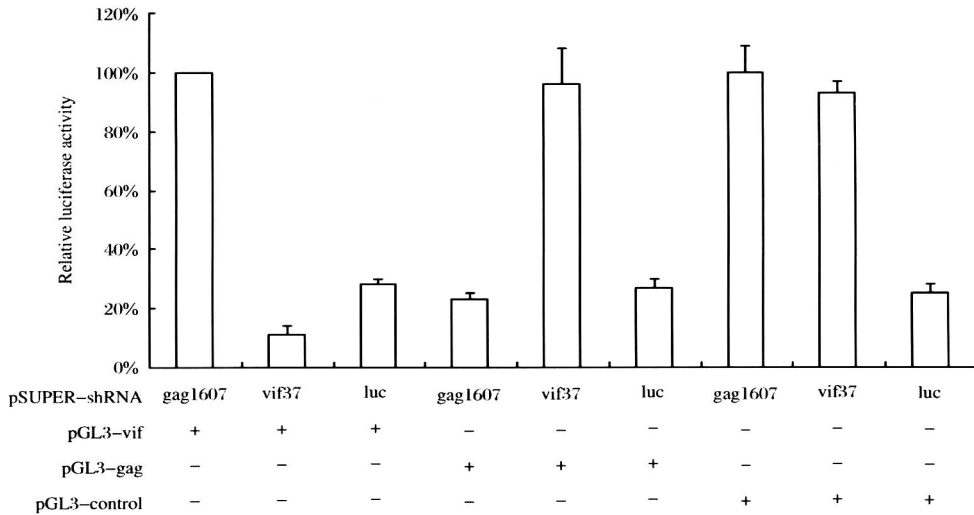


图3 siRNA-vif37 抑制特异性的验证

Figure 3 Analysis of target specificity of siRNA-vif37

重组慢病毒包装载体同时带有绿色荧光蛋白 (GFP) 表达元件,可用于快速检测重组病毒的效价及对靶细胞的基因转移效率<sup>[9, 15]</sup>。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<sup>[16, 17]</sup>。将重组慢病毒 Lenti-vif37 以 MOI = 40 对 MT-4 细胞进行转导实验,用流式细胞仪检测靶细胞 GFP 的表达效率(图 4)。结果显示,重组慢病毒 Lenti-vif37 可有效转导 MT-4 细胞。

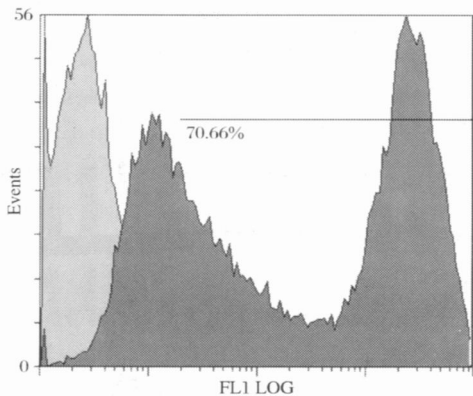


图4 重组慢病毒 Lenti-vif37 对 MT-4 细胞的基因转移效率

Figure 4 Gene transfer efficiencies of recombinant lentivirus Lenti-vif37 in MT-4 cells

### 5 重组慢病毒介导的 siRNA-vif37 在 MT-4 细胞中对 HIV-1<sub>NL4-3</sub> 的抑制作用

HIV-1<sub>NL4-3</sub> 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<sup>[16]</sup>。将重组慢病毒 Lenti-vif37 转导后培养 1 周的 MT-4 细胞分别用不同剂量的 HIV-1<sub>NL4-3</sub> (100pg 和 500pg) 进

行攻毒实验,在攻毒后的不同时间分别收集细胞培养上清检测 p24 蛋白的活性,同时以未转导的 MT-4 细胞和经重组慢病毒 Lenti-luc 转导的 MT-4 细胞作为攻毒实验对照。结果如图 5 所示,携带 shRNA-vif37 表达元件的重组慢病毒转导后的 MT-4 细胞可显示出抑制 HIV-1 复制的能力,对 100pg 的攻毒剂量可获得显著的抑制效果,当攻毒剂量加大至 500pg 时抑制效果有所减弱。

### 6 稳定表达 siRNA-vif37 的 MT-4 细胞的获得

本研究进一步对重组慢病毒 Lenti-vif37 转导后的 MT-4 细胞应用有限稀释法进行克隆化筛选。由于慢病毒载体具有稳定整合能力,可将位于同一表达载体上的 shRNA-vif37 和 EGFP 表达元件整合到靶细胞基因组,因此可通过检测报告基因的表达对克隆化效果进行鉴定。通过筛选检测,获得了一株可稳定表达报告基因的细胞克隆 MT-4-vif37。应用流式细胞仪检测 MT-4-vif37 细胞中 EGFP 的表达,结果如图 6 所示,可在超过 99% 的 MT-4-vif37 细胞中检测到 EGFP 的表达。

### 7 稳定表达 siRNA-vif37 的 MT-4 细胞对 HIV-1<sub>NL4-3</sub> 的抑制作用

本研究进一步应用 MT-4-vif37 细胞进行 HIV-1<sub>NL4-3</sub> 攻毒实验,将攻毒剂量加大至 2 500pg 和 12 500pg。结果如图 7 所示,相比对照细胞和未进行筛选的慢病毒转导后细胞,克隆化筛选后获得的 MT-4-vif37 细胞在高攻毒条件可获得显著的抑制效果。我们同时注意到,在高剂量攻毒条件下,对照细胞和重组慢病毒 Lenti-luc 转导后的 MT-4 细胞出现较明显的生长状

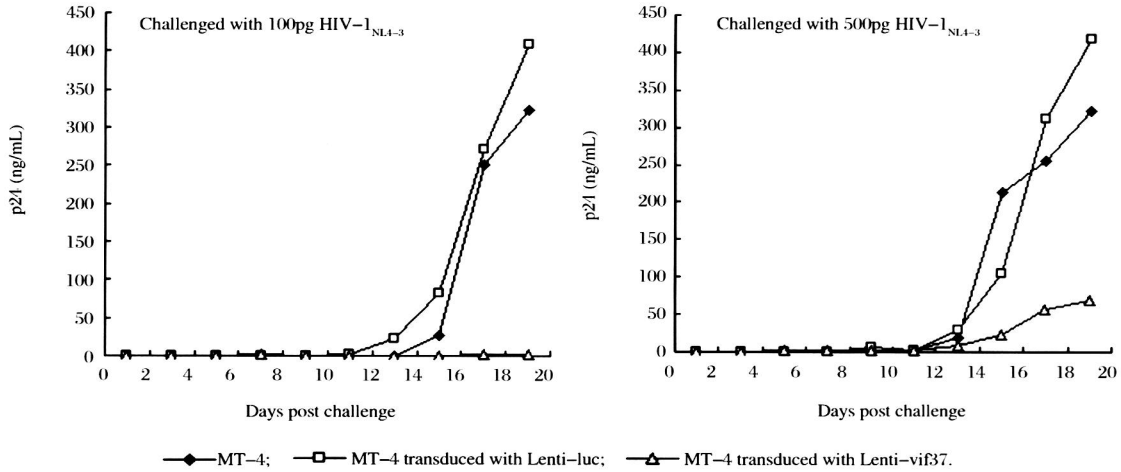


图 5 重组慢病毒 Lenti-vif37 转导后的 MT-4 细胞对 HIV-1<sub>NL4-3</sub> 复制的抑制作用  
Figure 5 Inhibition of HIV-1<sub>NL4-3</sub> replication in MT-4 cells transduced with recombinant lentivirus Lenti-vif37

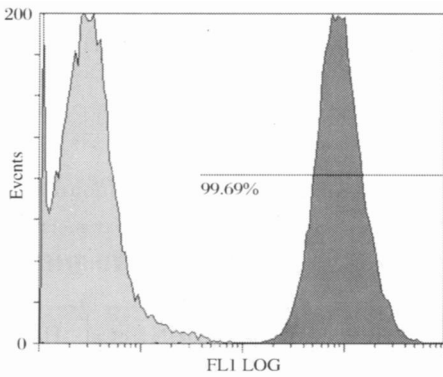


图 6 报告基因在细胞克隆 MT-4-vif37 中的表达效率  
Figure 6 Expression efficiency of reporter gene EGFP in MT-4-vif37 cells

态改变,15d 后细胞数量明显下降,在 MT-4-vif37 细胞中未见明显的细胞状态变化。

### 讨 论

RNAi 技术可用于有效抑制特定基因的表达,在基因功能研究和疾病治疗等方面已展现出广阔的应用前景,将 RNAi 技术应用于艾滋病治疗已成为当前的研究热点<sup>[18]</sup>。HIV-1 的病毒基因和宿主细胞的病毒受体基因均可作为 RNAi 的作用靶,其中以病毒基因为靶标设计有效的 RNAi 作用元件是十分重要且较具有应用前景的研究方向,其目标是寻找获得具有高效抑制特性的 RNAi 元件。本研究即

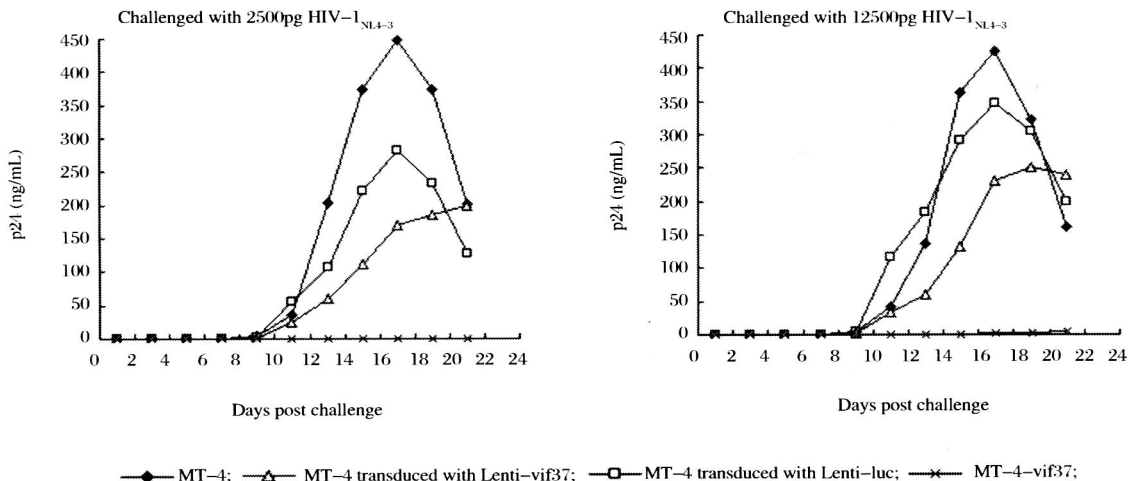


图 7 MT-4-vif37 细胞对 HIV-1<sub>NL4-3</sub> 复制的抑制作用  
Figure 7 Inhibition of HIV-1<sub>NL4-3</sub> replication in MT-4-vif37 cells

在 HIV-1 *vif* 基因区中筛选获得一个具有高效抑制特性和较好保守性特征的 siRNA 序列,同时证明其具有 *vif* 基因抑制特异性,整合有该 siRNA 表达元件的 HIV-1 易感 T 细胞株可高效抑制 HIV-1 在细胞中的复制,具有良好的应用潜力。

RNAi 对靶基因的抑制作用是序列特异性的。在应用 RNAi 技术抗 HIV-1 研究中,兼具高效抑制能力和良好保守性特征的 siRNA 将具有更好的应用前景。然而由于 HIV-1 基因组的复杂性和高突变率,在 siRNA 长度范围上选取高度保守区相对困难,同时高保守的 siRNA 识别位点可能是蛋白结合区或形成复杂二级结构等原因而不具备抑制高效性。选择 siRNA 序列必须从抑制效率、保守性特征、非人类基因同源性等方面进行综合考虑。研究已显示当前的 siRNA 辅助设计方法尽管不能用于预测 siRNA 的抑制效率,但可提高获得高效序列的概率并可有效避免与人类基因组同源的问题<sup>[19, 20]</sup>。因此本研究为提高筛选效率,通过采用结合 siRNA 设计软件辅助设计、共转染筛选实验和保守性特征分析的方法筛选高效 siRNA 靶位。研究已显示适当的规模化筛选对于获得高效 siRNA 是十分必要的<sup>[6, 21]</sup>,本研究因此采取扩大筛选面的方法,在 HIV-1 *vif* 基因区中共选择设计了 30 个识别不同位点的 siRNA 序列,从中筛选获得较为理想的 siRNA,该序列可用于进一步的研究。

重组慢病毒是一种新型基因转移载体,相比其他重组病毒载体具有独特的优点,如可有效感染非分裂期细胞特别是造血系统来源细胞、具有稳定整合表达能力、细胞毒性低、免疫反应小等,在基因治疗研究中已显示出良好的应用前景<sup>[14]</sup>。本研究显示,重组慢病毒可有效地转导 HIV 易感的人 T 细胞株 MT-4,可作为合适的基因转移载体在 HIV-1 体外细胞攻毒实验中进行抗病毒元件研究。值得注意的是,慢病毒载体也来源于 HIV-1,与 HIV-1 在 gag-pol 区域存在序列同源性,靶向 gag-pol 区域的 siRNA 可抑制重组慢病毒的构建。因此,对慢病毒包装质粒的相关序列进行同义突变是十分必要的,这样可有效减弱 RNAi 对重组慢病毒构建的影响。

本研究结果显示,携带 shRNA-*vif37* 表达元件的重组慢病毒转导后的 MT-4 细胞可获得较明显的抑制病毒复制效果,但在较高攻毒剂量下抑制效果有所下降。这可能与重组慢病毒载体对 MT-4 细胞的转导效率有限有关,部分未被转导的细胞不能抑制 HIV-1 在细胞中的复制。本研究进一步通过流

式分选的方法对转导后细胞进行克隆化筛选,获得了可稳定表达的细胞克隆。HIV-1 攻毒实验的结果显示,稳定表达 shRNA-*vif37* 的 MT-4 细胞株具有显著的抑制病毒复制的能力,可在 12 500pg 的高攻毒剂量下仍可获得良好的抑制效果,优于目前文献中报道的攻毒水平<sup>[22]</sup>。这也进一步证明了本研究获得的 siRNA-*vif37* 具有高效抑制特性,具有良好的应用前景,为进一步应用 RNAi 技术进行新型艾滋病治疗方法研究提供了重要基础。

#### 参考文献:

- [1] Takaku H. Gene silencing of HIV-1 by RNA interference[J]. *Antivir Chem Chemother*, 2004, 15(2):57-65.
- [2] Lee N S, Rossi J J. Control of HIV-1 replication by RNA interference[J]. *Virus Res*, 2004, 102(1):53-58.
- [3] 高永珍,金奇. RNA 干扰抗病毒研究进展[J]. *病毒学报*, 2005, 21:314-317.
- [4] Das A T, Brummelkamp T R, Westerhout E M, et al. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition[J]. *J Virol*, 2004, 78(5):2601-2605.
- [5] Leonard J N, Schaffer D V. Computational design of antiviral RNA interference strategies that resist human immunodeficiency virus escape[J]. *J Virol*, 2005, 79(3):1645-1654.
- [6] Zhao H F, L Abbe D, Jolicoeur N, et al. High-throughput screening of effective siRNAs from RNAi libraries delivered via bacterial invasion[J]. *Nat Methods*, 2005, 2(12):967-973.
- [7] Mehle A, Strack B, Ancuta P, et al. Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(9):7792-7798.
- [8] Mezei M, Minarovits J. Reversal of HIV drug resistance and novel strategies to curb HIV infection: the viral infectivity factor Vif as a target and tool of therapy[J]. *Curr Drug Targets*, 2006, 7(7):881-885.
- [9] 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.
- [10] Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5):497-500.
- [11] Chang L J, Liu X, He J. Lentiviral siRNAs targeting

- multiple highly conserved RNA sequences of human immunodeficiency virus type 1 [J]. *Gene Ther*, 2005, 12(14):1133-1144.
- [12] Adachi A, Gendelman H E, Koenig S, et al. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone[J]. *J Virol*, 1986, 59(2):284-291.
- [13] Sova P, Volsky D J. Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and nonpermissive cells with *vif*-negative human immunodeficiency virus type 1 [J]. *J Virol*, 1993, 67(10):6322-6326.
- [14] Strayer D S, Akkina R, Bunnell B A, et al. Current status of gene therapy strategies to treat HIV/AIDS[J]. *Mol Ther*, 2005, 11(6):823-842.
- [15] Zufferey R, Nagy D, Mandel R J, et al. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(9):871-875.
- [16] Schols D, Este J A, Cabrera C, et al. T-cell-line-tropic human immunodeficiency virus type 1 that is made resistant to stromal cell-derived factor 1 contains mutations in the envelope gp120 but does not show a switch in coreceptor use [J]. *J Virol*, 1998, 72(5):4032-4037.
- [17] Szabo J, Cervenak L, Toth F D, et al. Soluble gC1qR/p33, a cell protein that binds to the globular "heads" of C1q, effectively inhibits the growth of HIV-1 strains in cell cultures[J]. *Clin Immunol*, 2001, 99(2):222-231.
- [18] Leonard J N, Schaffer D V. Antiviral RNAi therapy: emerging approaches for hitting a moving target [J]. *Gene Ther*, 2006, 13(6):532-540.
- [19] Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(3):326-330.
- [20] Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference [J]. *Nucl Acids Res*, 2004, 32(3):936-948.
- [21] Shirane D, Sugao K, Namiki S, et al. Enzymatic production of RNAi libraries from cDNAs [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(2):190-196.
- [22] Nishitsuji H, Kohara M, Kannagi M, et al. Effective suppression of human immunodeficiency virus type 1 through a combination of short- or long-hairpin RNAs targeting essential sequences for retroviral integration [J]. *J Virol*, 2006, 80(15):7658-7666.

## Screening of Highly Effective siRNA Sequence Targeting to HIV-1 *vif* and the Lentiviral-mediated Antiviral Research *in vitro*

ZHANG Tao, CHENG Tong, ZHANG Ya-li, WEI Li-hua, CAI Yi-jun, ZHANG Jun,  
ZHU Hua, HAN Jia-huai, XIA Ning-shao\*

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

**Abstract:** Discovery of the RNA interference (RNAi) pathway has led to exciting new strategies for developing HIV treatment. This study was to find out the highly effective and conserved siRNA target sequences for improving RNAi-based therapy against the HIV-1. We constructed 30 shRNA expression plasmids for expressing different siRNAs targeted to HIV-1 *vif* and co-transfected them with the pNL4-3 to score for its ability to inhibit the expression of p24 protein of HIV-1. Then, the highly effective siRNAs targeting sequences were selected to align with 625 HIV-1 sequences in database including all HIV-1 subtypes to analyze their conserved character. In addition, *vif*37 the highly effective and most conserved target sequence was confirmed of its sequence-specific inhibition by independent reporter assays. MT-4 cell transduced with lentiviral shRNA-*vif*37 vector could inhibit HIV-1<sub>NL4-3</sub> replication *in vitro*. Moreover, MT-4-*vif*37 cloned from transduced MT-4 cell could stably express shRNA-*vif*37 and inhibit virus replication more efficiently when challenged with high titer virus. These results showed that RNAi has great potential as an antiviral gene therapy approach and supports the efforts to develop treatment for HIV-1-infected individuals.

**Key words:** RNA interference; HIV-1; *vif*; recombinant Lentivirus