

学校编码: 10384
学号: 20120051302125

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

靶向 HBV 的高效 siRNA 的筛选及体内、外抗
病毒研究

The screening of anti-HBV siRNA s and antiviral research
in vitro and in vivo

张雅丽

指导教师姓名: 张军

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2008 年 月 日

论文答辩时间: 2008 年 月 日

学位授予日期: 2008 年 月 日

答辩委员会主席: _____
评 阅 人: _____

2008 年 07 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

摘 要

乙型肝炎病毒（HBV）感染是全世界最重要的公共卫生问题之一，严重危害人类健康。尽管预防疫苗免疫降低了乙肝发生率，但目前全世界仍有约 4 亿 HBV 感染者，当前的药物治疗方法尚不足以应对该挑战，因此迫切需要发展新的更为有效的治疗手段以对付 HBV 的威胁。RNAi 是近年来发现的细胞内序列特异性抑制基因表达的机制，将 RNAi 技术应用于包括病毒性肝炎等在内的疾病治疗已成为当前的研究热点，而获得兼具高效抑制特性和保守性特征的 RNAi 靶位是 RNAi 治疗方法获得成功应用的重要基础。本研究以生物信息学为辅助，通过建立多基因型 HBV 细胞和小动物表达模型，对 HBV 基因组上潜在的 siRNA 靶点进行了规模化筛选和验证，获得多个具有良好应用潜力的 siRNA 靶点，为进一步应用 RNAi 技术开发新型乙肝治疗方法提供重要基础。

本研究首先通过 Genbank 数据库获得 623 个已报道的 HBV 全基因组序列，应用 GCG 生物信息学工作站对其进行全基因组的序列保守性分析，获得同源率为 95% 以上的高保守序列区段。采用步移法设计可靶向上述高保守序列区段的 siRNA，并通过 RNAi 脱靶效应分析软件进行分析，初筛获得 40 个可识别不同位点并具有高保守特征的候选 siRNA 靶点序列，并以 pSUPER 为载体分别构建了相应的 shRNA 表达质粒，用于进行进一步的筛选实验。本研究采用与 HBV 1.3 倍体克隆质粒的共转染实验检测不同 siRNA 对 HBV 的抑制效率。应用本实验室构建的 5 个分属 C1、D1、Ae 基因型的 HBV 1.3 倍体克隆在 Huh-7 细胞中建立了体外 HBV 瞬时表达模型，结果显示其均可有效在 Huh-7 细胞中表达 HBV 重要标志性抗原 HBsAg 与 HBeAg。同时通过对检测时间点与共转染质粒用量配比的比较分析，确定了较有利于筛选高效靶点的检测条件。在此基础上，将本研究构建的 40 个包含候选 siRNA 表达元件的质粒克隆分别与上述 HBV 1.3 倍体克隆以 1: 10 的用量比例对 Huh-7 细胞进行共转染实验，检测不同靶点 siRNA 对 HBV 蛋白表达的抑制能力。结果显示，本研究选择设计的 40 个 siRNA 可在不同程度上抑制 HBV 的表达，其中部分靶点的 siRNA 体现出良好的抑制效果（部分靶点已申请发明专利，申请号：200810110686.4）。本研究选择了其中 3 个抑制效率较好的 siRNA 靶点（B244、B245、B376）用于进一

步的研究和验证。通过 CCK8 检测细胞毒性与细胞活力, 和干扰素相关基因 STAT-1 及 OSA-1 表达水平检测显示上述 3 个靶点 siRNA 在细胞中的表达不会引起的细胞活性及干扰素相关基因基因转录水平的异常变化, 显示其无脱靶效应。

RNAi 技术应用于抗病毒治疗研究中另一重要方面是如何有效地将 siRNA 或 siRNA 表达元件导入靶细胞中。应用 HBV 表达细胞株 HepG2-N10, 本研究探讨了通过重组慢病毒载体和化学修饰 siRNA 的方式导入 siRNA 抑制 HBV 表达的可行性。本研究分别构建了可表达靶向 B1579、B1881、B2391、B2393 的 siRNA 的重组慢病毒, 转导 HBV 表达细胞株 HepG2-N10 后检测结果显示可显著抑制 HBV 的表达。本研究同时合成了可靶向 B244、B376 的 siRNA, 以及针对同样靶点的分别经 5' 端甲氧基修饰、磷酸化修饰和固醇修饰的 siRNA, 对 HepG2-N10 细胞的转染实验结果显示, 化学合成的 siRNA 均能有效下调 HepG2-N10 细胞 HBV 蛋白的表达, 其中经修饰后的 siRNA 可表现出更好的抑制效果。

为进一步验证本研究获得的 siRNA 在动物模型体内对 HBV 表达的抑制效果, 本研究应用尾静脉高压注射法和不同基因型的 HBV 1.3 倍体克隆建立了 HBV 小鼠模型。通过检测血清样品中 HBsAg、HBeAg 的表达及 HBV-DNA 的拷贝数评估靶向 B244、B245 及 B376 的 siRNA 在动物模型对 HBV 表达的抑制效果, 结果显示本研究获得的靶向 HBV 的 siRNA 在小鼠体内可显著抑制不同基因型的 HBV 的表达与复制。

关键词: 乙型肝炎病毒; RNA 干扰;

Abstract

Hepatitis B infection is one of the most important popular healthy problem. Although the application of HB vaccine greatly reduced the incidence of Hepatitis B, more than 400 million people worldwide are persistently infected with the hepatitis B virus (HBV). The current drug treatments is still insufficient to cope with the challenges. RNA interference is a sequence-specific gene silencing mechanism in vivo found in recent years. RNAi technology has being focused on being applied including viral hepatitis and other infectious diseases therapy. And access to both high efficient and suppression of the conservative nature of the target sequences is the important foundation of the RNAi therapy. In the study, through the establishment of a multi-genotype of HBV cell model and small animal model and assisted by bioinformatics, confirmed the siRNA target on the HBV genome with large-scale screening and verification. The study provided an important basis for further application of RNAi technology to new hepatitis B therapy.

In this study, 623 reported HBV genomes downloading from Genbank was done homology analysis by GCG, resulting a 95% conservative sequence. This conservative sequence was selected as the template which was employed to design siRNA sequences. Assisted by the online tools (siRNA Off-target Search), we got 40 siRNA sequences, which were constructed to the corresponding shRNA expression plasmids on pSUPER vector, aiming to HBV genome. We detected the inhibition efficient of the 40 siRNAs using co-transfection shRNA plasmids and 5 HBV 1.3 genome that belong to genotype C1, D1 and Ae and can express HBsAg and HBeAg effectively in Huh7 cell. Through the analysis in transfection, we established the best time point for detection and the community plasmid transfer ratio. Then we cotransfected shRNA expressing plasmids and HBV 1.3 genome at the 1:10 ratio to Huh7 cell and evaluated the inhibition ability of the 40 designed siRNA. The result indicated all of them can inhibit the HBV in varying degrees, some of them are very effective in inhibiting HBV (Some targets have applied for patents, the application No: 200810110686.4). We

chosed 3 (B244,B245 and B376) for further research and verification. The result in CCK8 test and IFN related mRNA test suggested that all of the three siRNA have no cytotoxicity and can not induce off-target effects.

Another important problem of RNAi therapy for anti-virus focuses on delivering RNAi element into the target cells effectively. We studied the feasibility of lentiviral vector and chemical modification on siRNA delivery. We constructed some shRNA on lentiviral vector and confirmed the recombinant lentivirus with shRNA element inhibiting HBV effectively through infecting the HepG2-N10 cell. On the other hand, siRNAs with chemical modifications include phosphorothiolation of the non-bridging oxygen and cholesterol modification at the 3'end, 2'sugar modification has better effect on HBV inhibition.

A mouse model of acute HBV infection was developed successfully using hydrodynamics to validate the effect of anti-HBV siRNA in vivo. Through co-infection 5 HBV 1.3 genomes and shRNA expression plasmids (B244,B245 and B376), the significantly reducing of HBsAg, HBeAg and HBV DNA expression indicated that the siRNA we got inhibited the replication and expression of various HBV of different genotype.

Key words: HBV; RNA interference ;

目 录

中文摘要	1
英文摘要	11
前言	1
1 乙型肝炎及乙型肝炎病毒	1
1.1 乙型肝炎	1
1.2 乙型肝炎病毒	2
2 RNA 干扰及其研究进展	17
2.1 RNA 干扰的发现	17
2.2 RNAi 的作用机制	18
2.3 RNAi 的特征	20
2.4 RNAi 技术的应用	21
3 RNAi 用于乙肝治疗的研究	24
4 本论文研究的目的和意义	26
材料与amp;方法	28
1 材料	28
1.1 主要仪器	28
1.2 菌株、质粒、细胞株、实验动物	29
1.3 试剂	30
1.4 常用溶液及培养基本配制	30
2 方法	32
结果与分析	39
1 靶向 HBV 的 siRNA 的设计与克隆构建	39
2 不同基因型 HBV 1.3 倍体克隆细胞瞬时表达模型的构建	45
3 共转染实验检测 siRNA 对不同基因型 HBV 的抑制效率	49
4 高效靶向 HBV 的 siRNA 的脱靶效应检测	55
5 重组慢病毒和化学修饰方式介导的 siRNA 体外抗病毒研究	56
6 高效靶向 HBV siRNA 的体内抗病毒效果验证	60
讨论	66
结论和展望	71
参考文献	72
致谢	77
在校期间发表的论文	78

Content

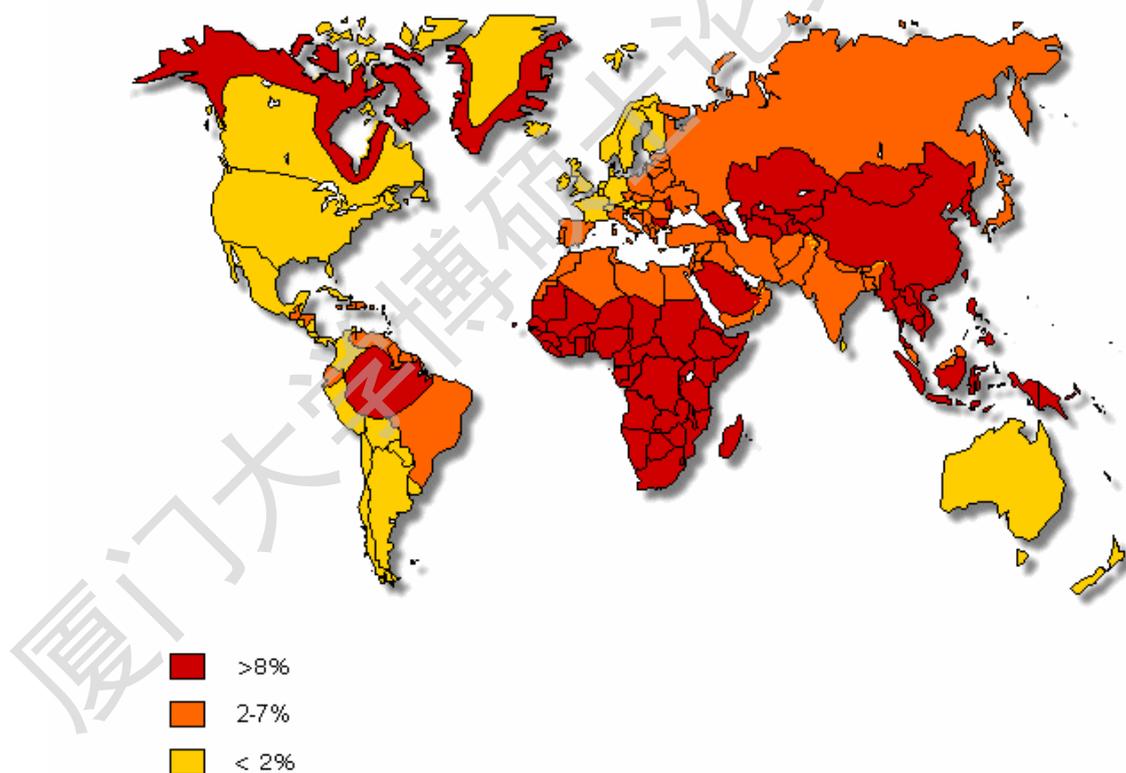
Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Preface	1
1 Hepatitis B and Hepatitis B virus.....	1
1.1 Hepatitis B.....	1
1.2 Hepatitis B virus.....	2
2 RNAi interference and its research progress.....	17
2.1 discovery of RNA interference.....	17
2.2 Molecular mechanism of RNA interference.....	18
2.3 Characteristic of RNA interference.....	20
2.4 Application of RNA interference.....	21
3 Advantages of RNA interference in Anti-hepatitis B Virus Therapy...24	
4 Aim and meanings of this dissertation.....	26
Materials and Methods	28
1 Materials.....	28
1.1 Instrument.....	28
1.2 Strains,Plasmids,cell lines,experiment animals.....	29
1.3 Regent.....	30
1.4 Protocols for commonly used solutions and culture media.....	30
2 Methods.....	32
Results and Analysis	39
1 Design and construction of anti-HBV siRNA.....	39
2 Different genotype HBV1.3 DNA gene transfected to establish cell model.....	45
3 Contransfection siRNA and HBV in vitro.....	49
4 Off-target analysis of the high inhibitive efficiency siRNA.....	55
5 Anti-virus research mediated by recombined lentivirus and modified siRNA.....	56
6 High inhibitive efficiency siRNA evaluated in vivo.....	60
Discussion	66
Summary and prospect	71
References	72
Acknowledgement	77
Published articles	78

前言

1 乙型肝炎及乙型肝炎病毒

1.1 乙型肝炎

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus) 感染是全世界最重要的公共卫生问题之一。HBV 引起急性或慢性乙型肝炎。目前全世界共有 4 亿 HBV 感染者, 20 亿人感染 HBV, 慢性 HBV 携带者中有相当一部分发展成为 CHB, 部分患者发展成为 HC, HCC 或非致癌性 HC 并发症, 每年因 HBV 感染而死亡的人数超过 110 万^[1-3]。我国乙肝病毒感染率为 57.6%, 乙肝病毒携带率为 9.75% , 6.9 亿人感染过 HBV, 1.2 亿人长期携带 HBV, (1992—1995 全国流调)。在各型病毒性肝炎中, HB 对人类健康的危害最为严重。



Prevalence of Hepatitis B virus as of 2005

图1. 乙型肝炎病毒的全球分布

Fig 1. Global distribution of Hepatitis B Virus infections

在全世界现有 HBV 感染者中 75%~80%在非洲,亚洲和西太平洋地区。慢性 HBV 携带者 (Chronic asymptomatic HBV carrier,ASC) 发展成为肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma,HCC) 的风险是正常人的 100 倍。HBV 可感染各年龄段的人群,但 70%-80%的慢性 HBV 感染发生在围产期,哺乳期和婴幼儿期,成人 HBV 感染慢性化的几率仅为 10%。对一个乙型肝炎患者而言,持续 6 个月以上的血清学 HBsAg 阳性则意味着感染的慢性化,慢性 HBV 感染可能是长时间的健康或亚健康的携带者,又或是亚临床肝脏病变的缓慢进展,但这些感染者均面临逐渐发展成为慢性乙型肝炎 (Chronic Hepatitis B),肝硬化 (Hepato cirrhosis,HC) 和肝细胞癌 (HCC) 的较高风险^[2-5]。

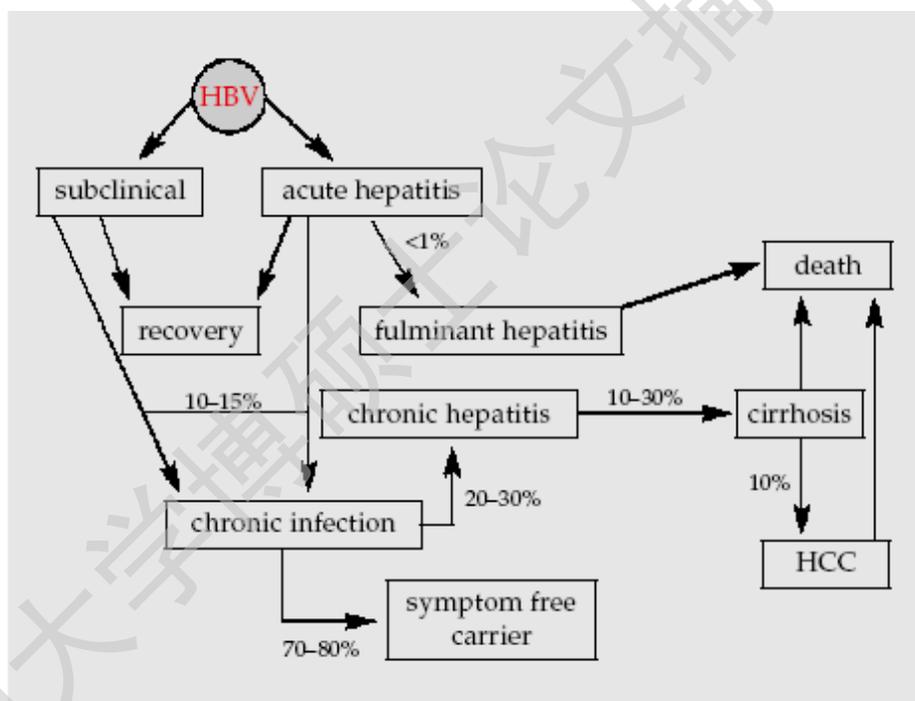


图2. HBV感染者的可能结局

Fig.2. Possible outcome of HBV infection

1. 2 乙型肝炎病毒

1. 2. 1 HBV 的基因组结构

HBV 是已知最小的真核细胞 DNA 病毒之一,基因组为一全长约 3.2kb (3182~3221)的小环形 DNA,属于嗜肝 DNA 病毒科(Hepadnavirus)。HBV DNA 双链长度不对称,单链部分占全长的 15~50%,全长的负链与病毒 mRNA 互补;正链仅 5'末端固定,长度约 1700-2600nt。HBV 颗粒核心内含有 DNA 聚合酶

(DNAP/RT), 以负链 DNA 为模板, 将正链 DNA 3' 末端延长而成为完全的 dsDNA。环状结构由负链和正链的附着末端 (约 224bp) 维持, 其两侧存在 11bp 正向重复序列 (DR1 和 DR2)。此重复序列与 HBV-DNA 的复制及与宿主 DNA 的整合相关。负链 DNA 从 DR1 内开始, 5' 末端与 5' 末端结合蛋白以共价键结合, 3' 末端有长约 5~8bp 的冗余序列并与 5' 末端形成末端重复。正链 DNA 5' 末端有帽子结构 (cap sequence) 18bp RNA 以共价键结合, 而形成 DR2。正链 DNA 3' 末端则结合 DNAP。

HBV-DNA 共有 4 个 ORF, 即: S ORF; P ORF; C ORF; X ORF。四种 ORF 分别有各自的启动子, S ORF 分别编码三个包膜蛋白: LHBs (preS1+preS2+S)、MHBs (preS2+S) 和 SHBs (S)。C ORF 分为 C 基因和前 C 区 (preC), 各有起始密码 ATG, 该段最为保守, 是免疫攻击的 CTL 靶表位主要所在, 其变异易引起乙肝病毒的持续感染。P ORF 编码 HBV-DNA 聚合酶等, 几乎参与病毒复制的全过程。X 基因产物是一种重要的反式调节因子, 具有转录激活功能, 其在病毒生命周期中的功能尚未充分阐明。HBx 蛋白可以激活细胞的原癌基因和改变细胞的生长特性, 可能与肝细胞癌的发生有关^[8-10]。在 X 基因和 C 基因的启动子上游, 有增强子 Enh I 和 Enh II, S 区基因存在糖皮质激素应答元件 (GRE), 糖皮质激素与其受体结合, 可促进转录活性。

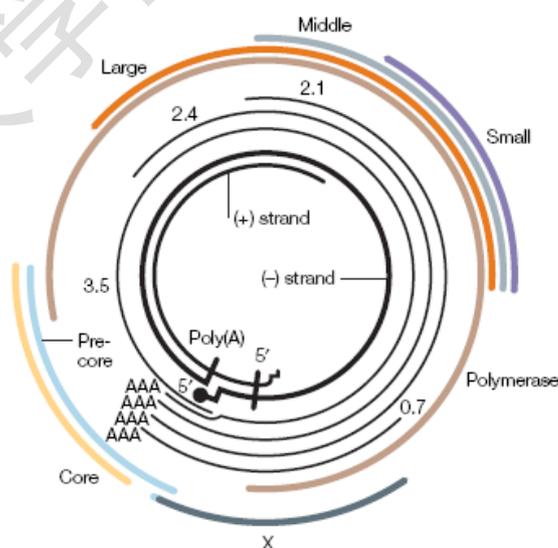


图3. 乙型肝炎病毒的基因组结构^[3]

Fig.3. The genome structure of Hepatitis B virus

1.2.2 HBV 的病毒结构

HBV 的完整颗粒首先由 Dane 等描述^[6,7]，也称为 Dane 颗粒。Dane 颗粒呈球形，直径约 42nm，外被膜（LHBs, MHBs 和 SHBs），内具有衣壳（HBcAg），其内包裹着基因组。血清中除了 Dane 颗粒外，还存在两种外膜蛋白颗粒，其中以 17-22nm 的小球形颗粒为主，也存在直径 22nm 长度不一的管形颗粒。只有 Dane 颗粒具有感染性，小球形颗粒和管形颗粒不具有核酸，也不具有感染性^[2]。

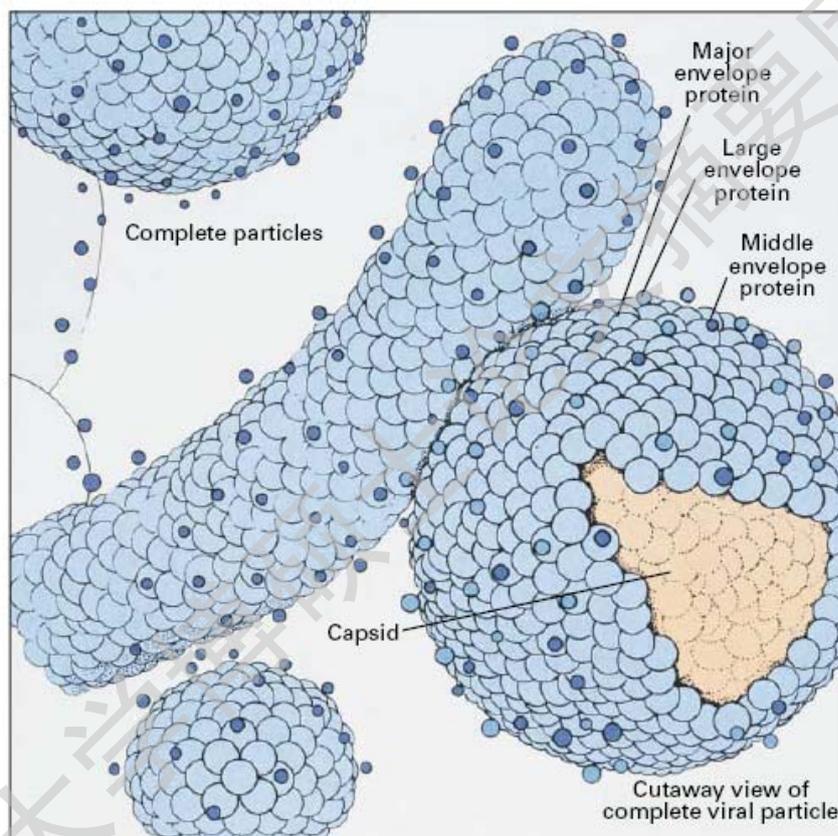


图4: 乙型肝炎病毒的三种病毒颗粒

Fig.4: The three forms of hepatitis B virus^[4]

1.2.3 HBV 的生活周期

病毒首先通过外膜前 S 蛋白附着细胞，目前尚不能肯定 HBV 的病毒受体和细胞受体，但多数研究认为前 S1 区是病毒与人肝细胞最重要的附着部位，肝细胞受体可能与 IL-6、无涎糖蛋白受体、前 S1 结合蛋白 BP35 相关。吸附上细胞后，病毒通过内吞作用摄入细胞，包裹病毒核酸的病毒衣壳脱出，以不明机制向细胞核移动。病毒 DNA 进入细胞核后，开始启动 DNA 复制^[8,9]。

HBV-DNA 的复制包括以下 5 个主要环节：（1）、在感染的肝细胞核内，内

因性的 DNAP 作用下首先形成双股链松弛环状 DNA (rcDNA)，继而形成 cccDNA。(2)、以 cccDNA 为模板，经 RNAP 转录为 mRNA，在以约 3.5kb 的 RNA 为模板转录出前基因组 RNA (preRNA)。(3)、在 core 内，以 preRNA 为模板，在 RT 作用下合成负链 DNA。(4)、以 preRNA 5'端的寡聚核苷酸为引物，负链 DNA 为模板，最后合成正链 DNA。在上述的 preRNA 进入核心包装(packing)过程中，该 RNA 5'端的壳体化信号即所谓 ϵ 信号起着重要作用。 ϵ 信号最长部分为 137bp, 其中 80 bp 的功能尤为重要。该部分有逆向重复序列, 能形成 stem-loop, 在 core 的包装上是必要的。(5) 病毒在完成 DNA 复制后可整合入宿主细胞基因组, 但整合是随机的^[2,3]。

完成复制后，核心颗粒向内质网出芽，进入内质网时已包被成为完整的病毒颗粒，病毒颗粒与过剩的外膜颗粒经 Golgi 体向细胞表面移动，而后向细胞外释放^[3,5]。

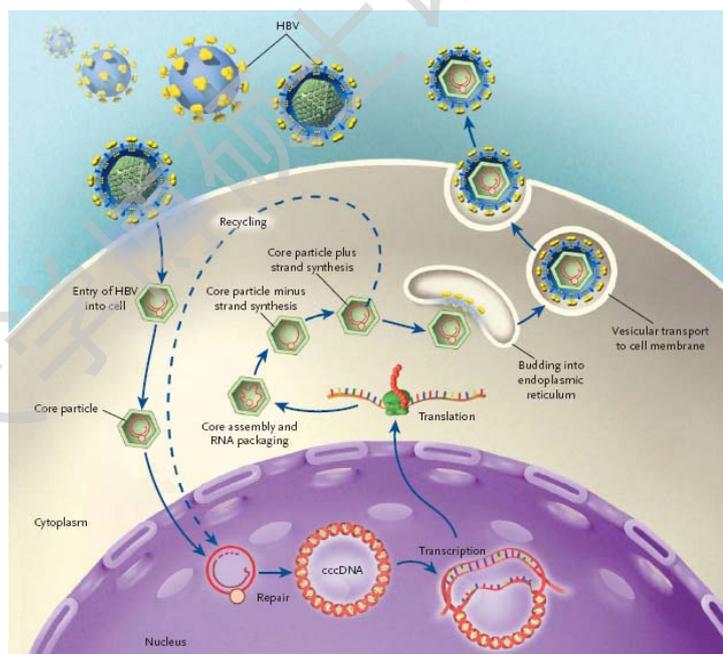


图5: HBV生活周期

Fig.5 :The replication cycle of HBV^[5]

1.2.4 HBV 的结构蛋白与功能

HBV 基因组编码七种病毒蛋白，包括 SHBs,LHBs,MHBs 三种外膜蛋白、结构型核壳 c 蛋白 (HBcAg) 和分泌型 e 蛋白 (HBeAg)、HBx 蛋白及聚合酶 P 蛋

白。其中外膜蛋白和核壳蛋白为结构蛋白，用于组装完整的病毒颗粒；聚合酶和HBx蛋白为功能蛋白，用于病毒的复制过程。

外膜蛋白是由S ORF编码的S、preS1、preS2蛋白组成，3个编码区各有起始密码ATG，但共同合用S ORF的终止密码。SHBs又称小表面蛋白（S蛋白），即HBsAg，SHBs由226个氨基酸组成是HBV病毒颗粒衣壳和小球颗粒管型的主要成分，含量最高，占70%-80%。MHBs由S和preS2蛋白共同构成，preS2蛋白由55个氨基酸，在HBV吸附和侵入肝细胞的机制中起重要作用。LHBs由preS1蛋白、preS2蛋白、S蛋白共同构成，仅存在于Dane颗粒和管型颗粒表面，球型颗粒不具有LHBs，preS1蛋白由108-119个氨基酸，其21-47肽段相当保守，是HBV与肝细胞的结合位点，变异的病毒只要存在这一表位即具有侵染性。在一个典型的HBV携带者1ml的血液中，Dane颗粒、管型颗粒和小球型颗粒的大致摩尔比为 10^8 : 10^{10} : 10^{13} ，小球颗粒由主蛋白和约5%中蛋白组成；管状颗粒由主蛋白、2-5%中蛋白和5-10%大蛋白组成；Dane颗粒中主、中和大蛋白的含量约分别为70-75%、5-10%和20%，一个毒粒的外膜约含300-400个主蛋白分子、40-80个中蛋白和大蛋白分子，照此估算，preS1:preS2:HBsAg的大致比例为1: 20: 10000^[2,10-12]。

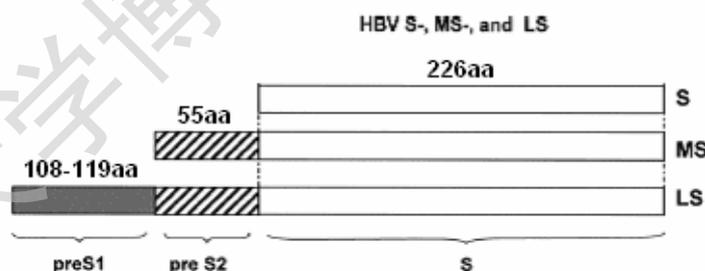


图6: 三种HBV包膜蛋白结构示意图

Fig.6: Schematic representation of HBV envelope proteins

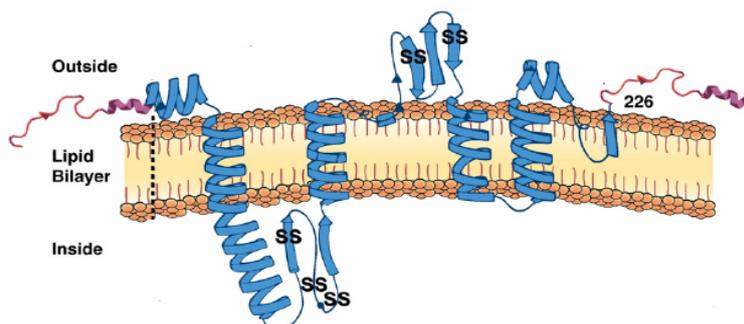
图7. HBsAg的跨膜结构^[13]

Fig.7: Schematic representation of HBsAg membrane fusion protein

C ORF 编码 HBcAg 和 HBeAg。C ORF 有 2 个起始密码 ATG。由 C ORF 内部第 2 个 ATG 转录编码 HBcAg, Mr 为 22KD。C 蛋白由 4 个 α -helix 组成, 有 2 个内部螺旋形成反向平行的发夹。2 个 C 蛋白单体形成 1 个二聚体, 90-120 个二聚体亚单位装配成 T=3/4 的正二十面体核心颗粒, 电镜下可见的刺突即为暴露于表面的发夹结构。HBcAg 的 B 细胞表位可能位于或靠近这些刺突的表面。AA78-AA143 之间的序列以及 Cys 的交联参与二聚体的形成和聚合过程。C 蛋白可分为两个区, 即 N 端装配区 AA1-AA144, 和具有重要功能的富 Arg 区, 位于颗粒的内部。C 端区对 preRNA 的结合和基因组的复制是必须的, 并涉及 core 在 PKC 途径磷酸化和核转运。两区通过 A145-AA150 间的 AA 形成绞链相连接。当 C ORF 从第 1 个 ATG 开始翻译时, 合成 preC, 其 N 端含有 19aa 的信号肽。preC 在信号肽介导下进入内质网腔, 形成成熟的 17KD 的 HBeAg, HBeAg 并非 HBV 的结构蛋白, 而是分泌到细胞外进入血循环^[14-17]。

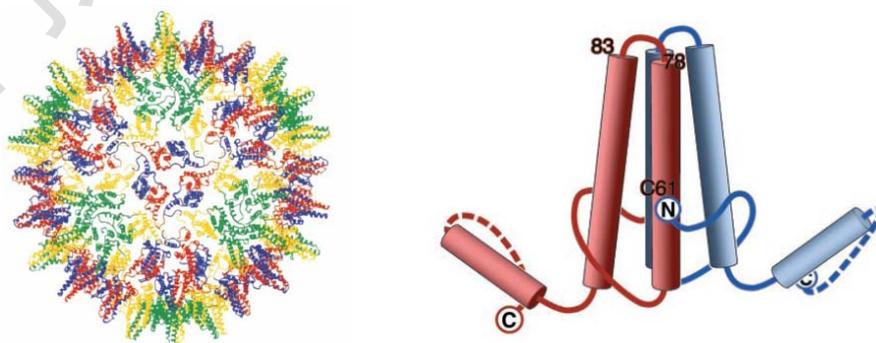
图8: C ORF产物的particle和dimers结构示意图^[15]

Fig.8: Schematic representation of particals and dimer of C ORF

P ORF 长 2532nt, 为 HBV 基因组中最长的 ORF, 除包含全部的 S ORF 外,

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库