

RNA 干扰抗戊型肝炎病毒感染的研究进展

马天武, 井申荣, 黄 芬

摘要: 戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)是一种可跨种间传播,严重危害人类健康的病毒性肝炎(hepatitis E, HE)的病原体,目前尚无有效的治疗方法和药物。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是真核生物的一种自我保护机制,可以阻止病毒入侵宿主细胞。RNAi 技术广泛应用于病毒基因的转录后调节,已经成功抑制了多种病毒的复制。现介绍 RNAi 的干涉机制在抗戊型肝炎病毒中的研究进展。

关键词: 戊型肝炎病毒; RNA 干扰; 病毒基因组

中图分类号:R373.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)06-0625-03

Advance in research of anti-HEV infection through RNAi

MA Tian-wu, JING Shen-rong, HUANG Fen

(Faculty of Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: Hepatitis E virus (HEV) is transmitted across species, which is the causative agent of acute fulminant hepatitis E (HE). To date, there is no effective antiviral treatment or medicine against the infection. RNA interference (RNAi) is a self-defense mechanism in eukaryote for suppressing virus into host cell. It has been widely used to suppress viral gene expression by post-transcriptional regulation, which has been successfully applied in viral replication studies in viruses. In this paper, researches on anti-HEV infection by RNAi were introduced.

KEY WORDS: hepatitis E virus; RNA interference; virus genome

Corresponding author: Jing Shen-rong, Email:jingshenrong@163.com

戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)是一种经粪口途径传播,严重危害人类健康的病毒性肝炎病原体,感染病死率较高(0.5%~3%),孕妇感染死亡率可达20%~25%^[1]。当前,市场上还没有针对HEV感染特效的治疗方法和药物。HEV至少可分为4个基因型,4种基因型只有一种血清型,因此疫苗曾经被认为是阻断HEV感染最佳的策略^[2]。目前,我国自主研制的HEV疫苗(HEV 239)已完成3期临床试验^[3],该疫苗是根据HEV 1型而设计的,结果证明对戊肝病毒感染能起到很好的预防效果,但是对HEV 2型、HEV 3型和HEV 4型也有同样的预防效果尚不清楚。我国自2000年后主要流行4型HEV,该疫苗对4型HEV的保护效果还需进一步验证。

RNAi(RNA interference)是真核生物阻止病毒入侵宿主细胞的一种自我保护机制, RNAi能够

通过直接靶向病毒的mRNA,从而导致病毒主要蛋白的降解^[4-5]。RNAi技术已经广泛应用于病毒基因的转录后调节,并且已经成功抑制了多种病毒的复制,如乙肝病毒(Hepatitis B virus, HBV)^[6]、丙肝病毒(Hepatitis C virus, HCV)^[7]、流感病毒(Influenza virus A)^[8]、人免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)^[9]和严重急性呼吸综合征(Severe acute respiratory syndrome, SARS)^[10]等。本文主要对RNAi技术及应用于HEV感染治疗方面的研究进行综述。

1 RNA 干扰及作用机制

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是由双链RNA(double stranded RNA, dsRNA)分子在mRNA水平关闭相应序列基因表达或使其沉默的过程。RNAi是真核细胞的一种防御措施,当转座子、人工转入基因、病毒基因随机整合到宿主细胞基因组内,并利用宿主细胞进行转录时,常产生dsRNA。宿主细胞对这些dsRNA迅速产生反应,胞质

中的 RNaseIII Dicer 与 dsRNA 相结合,然后以 ATP 依赖的方式逐步将 dsRNA 切割为 21~23 nt 的小干涉 RNA(siRNA)。siRNA 在细胞内 RNA 的作用下解链成正义链和反义链,反义 siRNA 与体内一些酶(包括内切酶、外切酶、解旋酶等)结合形成 RISC。RISC 与外源性基因表达的 mRNA 的同源区特异性结合,并在结合部位切割 mRNA,从而诱发 mRNA 的降解。因此,RNAi 可以作为基因功能研究、基因治疗等的新工具。

dsRNA 主要有 siRNA 及 miRNA 两类。siRNA 是 RNAi 过程中形成的中间体,是在病毒感染或人工插入 dsRNA 而产生的,而 miRNA 则是细胞内的 RNA 成分之一。siRNA 来源于转基因或病毒,miRNA 来源于内源转录本。siRNA 如果与靶序列 RNA 有一个碱基错配,将直接影响到 RNAi 的沉默效应,但 miRNA 则不会影响 miRNA 途径的调节效应^[11]。

2 siRNA 在 HEV 中的研究进展

HEV 基因组全长约 7.3 kb,由 ORF1、ORF2 和 ORF3 共 3 个开放阅读框组成。ORF1 编码病毒多聚蛋白,与病毒的起始复制密切相关。ORF2 基因编码 HEV 主要的外壳蛋白。ORF3 与 ORF1 和 ORF2 部分重叠,其编码的蛋白至少含有 4 个抗原表位,该蛋白在细胞信号转导、HEV 颗粒装配、释放与免疫抑制等方面有重要作用^[1,12]。近年来,人们针对 HEV 的 3 个 ORF 设计 siRNA 进行研究,并取得了较好的效果。

2.1 HEV ORF1 区的 siRNA HEV ORF1 长约 5 kb,位于基因组 5'末端,主要编码与病毒 RNA 复制有关的非结构蛋白,包括甲基化转移酶、蛋白酶、RNA 解旋酶和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp),RdRp 也称为 RNA 复制酶。RdRp 酶催化病毒的起始复制,对病毒的复制循环周期具有重要作用。研究表明,敲除 RdRp 基因的戊肝病毒不具备复制能力^[13]。因此,RdRp 区域一直被认为是进行 RNAi 研究的最佳区域。

Huang 等^[14]针对 RdRp 区域设计了 4 条 siRNA,并在体外和体内进行 RNA 干扰 HEV 病毒复制的实验。研究结果表明,在 A549 细胞中,这些针对 HEV RdRp 特异的 siRNA (5'-UUUCUCAAUAGCACGGAACdTdT-3'; 5'-UGUCUCACCAGUUGUAACdTdT-3') 能够有效和特异地抑制 HEV RdRp 基因的表达,用特异的 siRNA-

RdRp 转染细胞能够保护细胞减弱或免受 4 型 HEV 的攻击。此外,动物活体实验的研究表明,RNAi 能够有效防止 HEV 的感染和复制。同样 Kumar 等^[15]根据 HEV 解旋酶区域和 RdRp 区域设计的 shRNA,在 HepG2 细胞中进行 RNAi 抑制 HEV 复制研究,这些 shRNA 能够在不激活干扰素的情况下,有效地在 HepG2 细胞中抑制 1 型 HEV 的复制。

2.2 HEV ORF2 区的 siRNA ORF2 与 ORF1 间隔 41 个核苷酸,全长 1 980 bp,编码 660 个氨基酸的多肽,编码病毒的主要结构蛋白。ORF2 包含了病毒的细胞受体结合位点,是机体抗 HEV 保护性体液免疫应答的主要靶抗原。目前几乎所有血清学检测方法都是针对 ORF2 区域进行的,由于具有高度的同源性,并且不存在不同基因型间的障碍,即针对 ORF2 区域的抗体可以中和不同基因型的抗原^[2,16]。Huang 等^[17]为了开发一种利用 RNAi 治疗 HEV 感染的有效方法,根据 HEV ORF2 基因设计了 4 种特异的 siRNA,在 A549 细胞中进行 RNAi 抑制 HEV 感染研究,研究结果显示,这 4 条特异的 siRNA (5'-UUUCCUGACGGCUGCAdTdG-3'; 5'-UCCAGCAGUAUUCUAAGACdTdT-3'; 5'-UAUUUAUAAUACUACCGCCdAdG-3'; 5'-UGAGUAUCCUGCUCGAGCdTdC-3') 均能够在一定程度上有效且特异地保护细胞免受 HEV 的感染。

2.3 HEV ORF3 区的 siRNA HEV ORF3 含 372 个碱基,位于病毒基因的 3'端,与 ORF1 重叠 1 个碱基,而与 ORF2 重叠 328 个碱基,编码 129 个氨基酸的调控蛋白,与细胞骨架的结合和细胞骨架的形成有关,该蛋白在 HEV 感染过程中起传导信号的作用^[1-2]。Liu 等^[18]根据来自于猪 4 型 HEV 的 ORF3 基因,设计了 4 条 siRNA,并在 HEK 293 细胞系中进行了干扰实验,实验证明特异的 siRNA (5'-CUUCGCAUCUGACAUUCCATT-3'; 5'-CCUAUAUCAUCCAACCAATT-3') 在体外能够抑制 HEV ORF3 mRNA 的合成及蛋白表达。这些特异的 siRNA 也许在研究戊肝病毒的基因功能、病毒与宿主间的相互作用、抗病毒等方面将起到重要作用。

3 miRNA 在 HEV 中的研究进展

microRNA (miRNA) 是一类新近发现的分布广泛的,长度约为 22 nt 的单链小分子 RNA,它主要通过与相关蛋白质形成 RNA 诱导沉默复合体来

抑制靶基因 mRNA 的翻译,从而介导转录后基因的表达调控^[19],是 RNAi 的另外一种形式。miRNA 调节多种信号通路,生物信息学数据显示,每个 miRNA 可以调节数百个靶基因,这也表明 miRNAs 可能影响所有的信号途径。miRNA 主要在蛋白质合成水平发挥作用,与 mRNA 的稳定性无关,miRNA 可能比 siRNA 的功能更加广泛,它能在 RNA 代谢的多个层面上对与其同源的底物进行调控^[21]。在人类基因组中已发现数百条 miRNA,miRNA 在特定的组织中表达,在细胞增殖、细胞凋亡、变异中起着重要作用。人体中 miRNA 的异常表达,会导致肝癌和胰腺癌的发生^[20]。

2004 年,Pfeffer 等^[21]人首次报道由病毒编码,具有调节基因表达的 microRNAs,随后,有约 80 条病毒性 miRNAs 被发现。病毒编码的 miRNA 具有调控自身相关基因的表达、下调宿主基因的表达、干涉宿主的免疫应答、增强病毒在宿主细胞中的感染能力。随着人们对病毒 miRNA 数量及功能的逐步认识,有针对性的阻止或破坏病毒的 miRNA,即可对治疗病毒性疾病提供新的途径。目前,miRNA 已用于 HBV、HCV、HIV 等的研究,并取得了较好的效果。

参考文献:

- [1]Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention [J]. *J Med Virol*, 2008, 80(4): 646-658. DOI: 10.1002/jmv.21116
- [2]Panda SK, Thakral D, Rehman S. Hepatitis E virus[J]. *Rev Med Virol*, 2007, 17(3): 151-180. DOI: 10.1002/rmv.522
- [3]Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2010, 376(9744): 895-902. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61030-6
- [4]Shabalina SA, Koonin EV. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference[J]. *Trends Ecol Evol*, 2008, 23(10): 578-587. DOI: 10.1016/j.tree.2008.06.005
- [5]Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system[J]. *Science*, 2002, 296(5571): 1263-1265. DOI: 10.1126/science.1072148
- [6]Panjaworayan N, Brown CM. Effects of HBV genetic variability on RNAi strategies[J]. *Hepat Res Treat*, 2011, 2011: 367908. DOI: 10.1155/2011/367908
- [7]Ashfaq UA, Yousaf MZ, Aslam M, et al. siRNAs: potential therapeutic agents against hepatitis C virus[J]. *Virol J*, 2011, 8:276. DOI: 10.1186/1743-422X-8-276
- [8]Li W, Yang X, Jiang Y, et al. Inhibition of influenza A virus replication by RNA interference targeted against the PB1 subunit of the RNA polymerase gene[J]. *Arch Virol*, 2011, 156(11): 1979-1987. DOI: 10.1007/s00705-011-1087-8
- [9]Zhang T, Cheng T, Wei L, et al. Efficient inhibition of HIV-1 replication by an artificial polycistronic miRNA construct[J]. *Virol J*, 2012, 9(1): 118. DOI: 10.1186/1743-422X-9-118
- [10]Lu A, Zhang H, Zhang X, et al. Attenuation of SARS coronavirus by a short hairpin RNA expression plasmid targeting RNA-dependent RNA polymerase[J]. *Virology*, 2004, 324(1): 84-89. DOI: 10.1016/j.virol.2004.03.031
- [11]Li JX, Zhou KY. Recent advance of micro RNA[J]. *Progr Biochem Biophysics*, 2003, 30(5): 702-705. (in Chinese)
- 李继霞,周克元. miRNA 的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(5): 702-705.
- [12]Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease[J]. *J Hepatol*, 2008, 48(3): 494-503. DOI: 10.1016/j.jhep.2007.12.008
- [13]Agrawal S, Gupta D, Panda SK. The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)[J]. *Virology*, 2001, 282(1): 87-101. DOI: 10.1006/viro.2000.0819
- [14]Huang F, Hua X, Yang S, et al. Effective inhibition of hepatitis E virus replication in A549 cells and piglets by RNA interference (RNAi) targeting RNA-dependent RNA polymerase[J]. *Antiviral Res*, 2009, 83(3): 274-281. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.06.008
- [15]Kumar A, Panda SK, Durgapal H, et al. Inhibition of Hepatitis E virus replication using short hairpin RNA (shRNA)[J]. *Antiviral Res*, 2010, 85(3): 541-550. DOI: 10.1016/j.antiviral.2010.01.005
- [16]Zhou YH, Purcell RH, Emerson SU. An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4[J]. *Vaccine*, 2004, 22(20): 2578-2585. DOI: 10.1016/j.vaccine.2003.12.017
- [17]Huang F, Zhou J, Yang Z, et al. RNA interference inhibits hepatitis E virus mRNA accumulation and protein synthesis *in vitro*[J]. *Vet Microbiol*, 2010, 142(3/4): 261-267. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.10.023
- [18]Liu T, Lei M, Jiao H, et al. RNA interference induces effective inhibition of mRNA accumulation and protein expression of SHEV ORF3 gene *in vitro*[J]. *Curr Microbiol*, 2011, 62(5): 1355-1362. DOI: 10.1007/s00284-010-9863-3
- [19]Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5
- [20]Saito Y, Suzuki H, Matsuura M, et al. MicroRNAs in hepatobiliary and pancreatic cancers[J]. *Front Genet*, 2011, 2:66. DOI: 10.3389/fgene.2011.00066
- [21]Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, et al. Identification of virus-encoded microRNAs[J]. *Science*, 2004, 304(5671): 734-736. DOI: 10.1126/science.1096781