基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001380

CRISPR-Cas9系统抑制乙型肝炎病毒复制相关研究

邓万燕[1],孟 田[1],钱克莉[2],蔡雪飞[1],邓海君[1],胡接力[1],黄爱龙[1],龙泉鑫[1]

(1. 重庆医科大学附属第二医院感染性疾病分子生物学教育部重点实验室、肝病研究所,重庆 400016;
2. 重庆市第五人民医院感染科,重庆 400061)

【摘 要】目的:探讨成簇的、规律间隔的短回文重复序列-相关核酸酶 9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein-9 nuclease,CRISPR-Cas9)技术的抗乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)作用。**方法**:通过生物信息学筛选,获得 12 条靶向 HBV 基因组不同区域的 sgRNA(single-guide RNA,sgRNA)并分别构建 pspCas9-sgRNA 质粒,与 HBV1.3 倍体复制质粒共转染至 HepG2 细胞,通过荧光定量 PCR 筛选能够有效抑制 HBV 复制的 sgRNA,并使用 Southern blot 验证获得的 sgRNA 功能;使用最新报道的重组共价闭合环状 DNA(recombinant covalently closed circular DNA,rcccDNA)模型评估 CRISPR-Cas9 对 HBV 共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA,cccDNA)的抑制水平,并通过克隆测序检测 rcccDNA 的突变状况;对 C57 小鼠进行尾静脉高压水动力注射(hydrodynamic injection,HDI)rcccDNA 质粒与 pspCas9-sgRNA,检测不同时间点外周血中乙型肝炎病毒 s 抗原(hepatitis B virus surface antigen,HBsAg)及 e 抗原(hepatitis B virus e antigen,HBeAg)水平,通过免疫组化技术观察 CRISPR-Cas9 处理后肝脏中乙型肝炎病毒核心抗原(hepatitis B virus core antigen,HBcAg)水平,在动物水平评估 CRISPR-Cas9 对 HBV 复制的抑制作用。**结果**:所筛选的靶向乙型肝炎病毒基因组聚合酶编码区以及衣壳蛋白编码区的 sgRNA5 及 sgRNA9 能有效抑制细胞中 HBV 复制,分别使细胞复制模型中 rcDNA 降低至对照组的(43.64 ± 4.66)%(P=0.000)和(44.86 ± 2.25)%(P=0.000);在 rCCCDNA 细胞模型中证实 2 组 sgRNA 分别使 cccDNA 降低至对照组的(29.39 ± 3.18)%(P=0.000)及(26.83 ± 1.76)%(P=0.000);CRISPR-Cas9 系统主要使 rcccDNA 的靶点区域发生以短片段缺失为主的突变,突变率位 50%~60%。CRISPR-Cas9 系统能够有效降低 HBV 水动力小鼠模型血清 HBsAg(sgRNA5:P=0.000;sgRNA9:P=0.001)及 HBeAg 浓度(sgRNA5:P=0.000;sgRNA9:P=0.000);小鼠血清 HBV DNA 水平与对照组相比降低约 1 个 lg 值(sgRNA5:P=0.000;sgRNA9:P=0.001),肝脏免疫组化结果显示 CRISPR-Cas9 系统能够降低组织 HBcAg 表达。**结论**:CRISPR-Cas9 系统作为一种基因编辑技术,能够在细胞水平及动物模型中发挥抗 HBV 作用,可以作为一种新型的抗病毒策略并为 HBV 感染的治疗提供了一个新的方向。

【关键词】乙型肝炎病毒;成簇的、规律间隔的短回文重复序列-相关核酸酶 9 技术;抗病毒作用

【中图分类号】R373.2 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2016-05-02

Targeting hepatitis B virus with CRISPR-Cas9 efficiently inhibited virus replication

Deng Wanyan[1], Meng Tian[1], Qian Keli[2], Cai Xuefei[1], Deng Haijun[1], Hu Jieli[1], Huang Ailong[1], Long Quanxin[1]

(1. The Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University; 2. Department of Infection Disease, the Fifth Hospital of Chongqing)

【Abstract】*Objective*: To investigate the antivirus activity of HBV targeted CRISPR-Cas9 system. ***Methods***: Twelve sgRNAs (single-guide RNA) that target to different hepatitis B virus (HBV) genome were designed by bioinformatic screening. After transient transfection experiment in HepG2 cell, Southern blot and quantitative real time PCR were performed to prove the anti-HBV efficiency of each pspCas9-sgRNA plasmid. A newly published rcccDNA cell model was employed to evaluate the activity of CRISPR-Cas9 in eliminating cccDNA. The anti-HBV effects of CRISPR-Cas9 in vivo were evaluated in hydrodynamic injection mice model. ***Results***: sgRNA 5 and sgRNA 9 targeted to polymerase and core genes of HBV genome were proved to be effective by

作者介绍:邓万燕,Email:453932548@qq.com,
研究方向:乙型肝炎病毒分子病毒学。

通信作者:龙泉鑫,Email:longquanxin@gmail.com。

基金项目:传染病防治重大专项资助项目(编号:2017ZX10202203)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170630.1048.050.html (2017-06-30)

transient transfection experiment in HepG2 cell, rcDNA were reduced significantly (P=0.000, *respectively*). CRISPR-Cas9 system with sgRNA5 and sgRNA9 significantly reduced cccDNA level in rcccDNA cell model (P=0.000, respectively), and the short fragment deletions nearby target sites were the major mutation phenotype, 50% to 60% cccDNA possessed these deletion characteristics. SgRNA5 and sgRNA9 containing pspCas9 plasmid can reduce HBsAg (P=0.000, P=0.001, respectively), HBeAg (P=0.000, P=0.000, respectively) and HBV DNA level (P=0.000, P=0.001, respectively) in mice serum on day 3 and day 6 after injection effectively. Immunohistochemical detection of HBcAg in the liver tissue of mice treated with sgRNA containing CRISPR-Cas9 plasmid revealed a decrease in measurable HBcAg in hepatocytes. ***Conclusion***: Targeting Hepatitis B virus with CRISPR-Cas9 is an effective therapeutic approach to control the virus replication.

【Key words】*hepatitis B virus; clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein-9 nuclease; antiviral*

乙型肝炎病毒感染仍然是一个严重公共卫生问题，世界范围内约 3.5 亿人群感染乙型肝炎病毒[1]。其中 10%的乙型肝炎病毒感染者会转换为慢性感染（chronic hepatitis B virus infection，CHB），导致肝硬化及肝癌等临床症状的出现，每年大约有 70 万人死于乙型肝炎病毒感染引发的临床症状[2]。过去 20年已经开发出多种可以有效抑制乙型肝炎病毒复制的药物，但是至今仍无彻底清除病毒的有效手段[3]。乙型肝炎病毒在细胞内的复制始于共价闭合环状 DNA（covalently closed circular DNA，cccDNA）[4]。HBV cccDNA 作为模板，通过转录获得 HBV 的 4种 RNA 产物，包括前基因组 RNA（pregenomic mRNA，pgRNA）、preCore、preS/S 以及 X mRNA。被感染细胞细胞质中的 pgRNA 通过逆转录生成成熟病毒DNA，实现病毒的复制[5]，现有的核苷酸类似物抗病毒疗法干预病毒的逆转录过程，进而阻止子代病毒的合成。这种核苷类似物并不靶向细胞核中的 cccDNA 故不能彻底清除病毒隐藏于胞核中的遗传物质。开发能清除被感染细胞细胞核中的 HBV cccDNA 是彻底治愈乙型肝炎病毒感染的关键。

最近 10 年来，一些新型的基因组定点编辑工具被广泛用于分子生物学研究，包括锌指核酸酶（zinc finger nucleases，ZFNs）及转录激活因子样效应因子核酸酶（transcription activator-like effector nucleases，TALENs）以及成簇的、规律间隔的短回文重复序列-相关核酸酶 9（clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein-9 nuclease，CRISPR-Cas9）技术等[6-7]。这类靶向核酸酶技术可以使 DNA 特定的位置出现双链断裂（double-strand DNA breaks，DSB）形成，宿主 DNA 修复系统通过易错的非同源末端链接的方式修复 DSB，并在 DSB 位置引入导致该基因功能失活的碱基插入或者缺失（insertions and deletions，indels）。ZFNs 及 TALENs 存在靶标位置突变率较低以及多位点同时编辑存在技术难度[8-9]。最近几年，源自 Streptococcus pyogenes SF370 的Ⅱ型 CRISPR-Cas9 系统被改造为一种引导 RNA（guide RNA）介导的 DNA 序列特异性切除系统[10-11]。CRISPR-Cas9 以及其他的基因组编辑技术被用来靶向编辑对病毒有利宿主基因或编辑病毒本身基因组[12-13]。此前使用不同 HBV 细胞复制或者感染模型的研究结果显示靶向核酸酶技术可以有效抑制 HBV 复制[14-17]。本文介绍了我们通过设计靶向 HBV 基因组的 sgRNA（single-guide RNA），在 HBV 细胞复制模型和及动物模型中使用新型重组共价闭合环状 DNA（recombinant covalently closed circular DNA，rcccDNA）模型证实 CRISPR-Cas9 技术可以降低病毒多种标志物表达水平，抑制病毒复制且有效降低细胞复制模型及感染动物模型 HBV cccDNA。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 sgRNA 经过生物信息学筛选，获得了 12 条靶向 HBV 基因组不同位置的 sgRNA，其序列、具体位置、GC 含量以及 Tm 值见表 1，筛选方案见实验方法部分。其中 7 条 sgRNA 靶向 HBV 聚合酶编码区域，2 条 sgRNA 靶向 HBV X 基因编码区，2 条 sgRNA 靶向 Core 基因编码区，1 条 sgRNA 靶向 preS1/polymerase 重叠区域。过半（67%）sgRNA 靶向 HBV 基因组的正义链（sense strand）。

1.1.2 质粒 pspCas9（BB）-2A-Puro（PX459）质粒通过签署转让协议由 addgene 获取（plasmid #48139）。该质粒克隆构建过程参见参考文献[18]。不同基因型 HBV 全基因组序列下载

表 1 生物信息学设计的靶向 HBV 基因组的 sgRNAs

Tab.1 Sequences of HBV gene targeted sgRNAs designed by bioinformatic method

sgRNAs	起始位置	正链/负链	序列	GC(%)	编码区
HBV_sgRNA1	1183	S	TTTGCTGACGCAACCCCCAC	60.9	Polymerase
HBV_sgRNA2	1230	S	GCGCATGCGTGGAACCTTTG	60.9	Polymerase
HBV_sgRNA3	1254	S	TCCTCTGCCGATCCATACTG	60.9	Polymerase
HBV_sgRNA4	1255	AS	TCCGCAGTATGGATCGGCAG	60.9	Polymerase
HBV_sgRNA5	1224	AS	AGGTTCCACGCATGCGCTGA	60.9	Polymerase
HBV_sgRNA6	1594	AS	GGTCTCCATGCGACGTGCAG	65.2	Polymerase
HBV_sgRNA7	1570	AS	GAAGCGAAGTGCACACGGTC	65.2	Polymerase
HBV_sgRNA8	1679	S	AATGTCAACGACCGACCTTG	52.2	X
HBV_sgRNA9	2340	S	CTGTTGTTAGACGACGAGGC	56.5	Core
HBV_sgRNA10	2916	S	ATTCTTTCCCGATCACCAGT	47.8	PreS1/Polymerase
HBV_sgRNA11	1679	S	AATGTCAACGACCGACCTTG	52.2	X
HBV_sgRNA12	2340	S	CTGTTGTTAGACGACGAGGC	56.5	Core

注：S，正义链；AS：负义链

至 NCBI 数据库。Pch9-HBV1.3 倍体质粒由本实验室构建并保存。重组 cccDNA(prcccDNA 以及 pCMV-Cre)质粒由Qiang Deng 教授惠赠[19]。

1.1.3 细胞与动物 实验中采用的细胞系为 HepG2，由本实验室保存，培养条件：MEM 培养基，10%胎牛血清，1%青链霉素；动物为 4~6 周龄 SPF 级 C57 小鼠，购于重庆医科大学动物实验中心并由重庆医科大学动物实验中心代养。

1.1.4 实验试剂 细胞转染试剂 Lipofectamine 2000 及 *Dpn* Ⅰ购于 Thermo scientific 公司；real-time PCR 试剂盒及地高辛标记及检测系统(DIG DNA labeling and detection Kit)购于罗氏公司；PCR 试剂购于 Takara 公司；乙型肝炎表面抗原(hepatitis B virus surface antigen，HBsAg)及乙型肝炎 e 抗原(hepatitis B virus e antigen)酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay，ELISA)试剂盒购于上海科华生物工程股份有限公司；HBV 核心抗原(hepatitis B virus core antigen，HBcAg)抗体购于 Abcam 公司；血清病毒 DNA 提取试剂盒 QIAamp DNA Mini kit blood spin 购于 Qiagen 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 靶向 HBV 基因组的 sgRNA 设计及质粒构建 选择不同基因型 HBV 保守序列作为 input 序列，使用 Zhang 等提供的 CRISPR-sgRNA 设计网站(http://crispr.mit.edu/)进行 sgRNA 的筛选，将获得的候选 sgRNA 使用 NCBI BLAST 与人基因组 HG19 比对，剔除与人基因组具有同源性的 sgRNA 序列。通过筛选获得的 sgRNA 应该具有以下特征：①在不同基因型 HBV 基因组共有序列中，具有相同的碱基构成，即保证获得 sgRNA 具有靶向不同基因型 HBV 保守序列的能力；②序列的 5'为 G，且 3'端为"NGG"，即保证所筛选的 HBV 序列能够被 Cas9 内切酶识别和切割；③与人基因组 HG19 相比，同源性低于 1%，即尽可能地从设计层面上降低脱靶效应。sgRNA 序列由华大基因合成。pspCas9-sgRNA 质粒构建参考 Ran 等发表在 Nature Protocol[20]的步骤。

1.2.2 细胞转染实验 实验中采用细胞系为 HepG2，由本实验室保存。使用 12 孔板进行转染实验，进行转染实验前 1 d 按照 2.5×10^5 个/孔细胞量进行种板，按照使用说明，使用 Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent 完成转染实验。构建的 CRISPR 系统对 HBV 复制抑制效果的快速鉴定及 HBV 复制中间体的检测实验中，对照组细胞使用 pspCas9(BB)载体质粒与 pCH9-HBV1.3 质粒共转染，处理组细胞使用构建的 pspCas9-sgRNA 质粒与 pCH9-HBV1.3 质粒共转染，pspCas9 与 pCH9-HBV1.3 的摩尔比为 1:1。CRISPR 系统对 cccDNA 的清除作用的验证实验中，对照组细胞使用 pspCas9(BB)载体与 rcccDNA 质粒系统(pre-rcccDNA、cmv-Cre)共转染，处理组细胞使用构建的 pspCas9-sgRNA 质粒与 rcccDNA质粒系统共转染，pspCas9 与 rcccDNA 质粒系统摩尔比为 1:1。转染 HBV 相关质粒 5 d 后收取细胞，分别进行HBV 荧光定量 PCR 及 rcDNA 和 cccDNA 的分离及检测。

1.2.3 HBV core DNA 及 cccDNA 的分离及检测 提取细胞质 HBV core DNA 的方法由 Yang 等[21]报道方法改进。从转染 HBV rcccDNA 质粒系统的 HepG2 细胞中提取 cccDNA 的方法参考 Guo 等报道的方法[22]。coreDNA 及 cccDNA Southern blot 方法以及 HBV DNA 定量检测方法参加课题组前发表文章[23-24]。使用 *Dpn* Ⅰ对 Hirt 法提取的去蛋白化 DNA(deproteinized DNA)进行酶切处理，因 *Dpn* Ⅰ对于细菌甲基化 DNA 具有活性，用于酶解转染质粒。

1.2.4 动物实验 将 12 μg rcccDNA(8 μg prcccDNA+4 μg pCMV Cre)质粒与 20 μg pspCas9-sgRNA 质粒配成小鼠体质量 10%体积的生理盐水溶液，使用高压水动力注射(hydrodynamic injection，HDI)方法，5 s 内将质粒溶液经小鼠尾静脉注射至小鼠体内，对照组小鼠使用相同质量的 rcccDNA 质粒与 pspCas9(BB)载体质粒进行注射。高压水动力注射 3 d 后(注射当天为 day 0，3 d 后为 day 3)采集小鼠血清备用，6 d 后处死小鼠，收集血清及小鼠肝脏组织。小鼠 day 3 与 day 6 血清

稀释 10 倍后使用 ELISA 试剂盒进行 HBsAg 和 HBeAg 检测，将吸光值作为统计量进行分析。使用 QIAamp DNA Mini kit blood spin 试剂盒提取小鼠 day 6 血清病毒 DNA，使用荧光定量 PCR 进行 HBV DNA 绝对定量检测。免疫组织化学用于确定小鼠肝组织中 HBcAg 表达水平，所使用的 HBcAg 抗体为鼠抗体。动物实验由重庆医科大学伦理委员会批准。

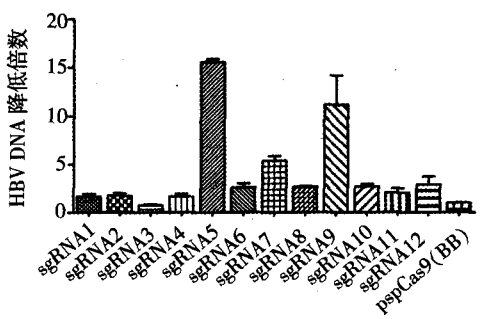
1.3 统计学方法

使用 ImageJ 1.5i 软件进行 Southern blot 定量分析，使用 SPSS 20.0 软件进行资料数据的统计分析，数据使用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。细胞实验结果使用单因素方差分析，采用 Levene 法进行方差齐性检验，使用 Tukey HSD 法进行两两比较，检验水准 α=0.05。动物实验结果采用重复测量方差分析，对照组与处理组作为分组变量，血清检测时间作为重复测量变量，LSD-t 法进行组间多重比较，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 不同 sgRNA 对 HBV 复制的抑制效果的快速鉴定

将所构建的含不同 sgRNA 的 pspCas9(BB)质粒与pch9-HBV1.3 质粒共转染至 HepG2 细胞中，培养 5 d 后提取 HBV core DNA，稀释 200 倍后作为模板，使用荧光定量 PCR 方法评价细胞复制模型中 HBV 总 DNA 量，用于评估靶向 HBV 基因组不同位置的 sgRNA 载体对于 HBV 复制的影响。不同 sgRNA 质粒与 HBV 质粒共转染实验重复 3 次。对照组细胞中 HBV DNA 量为 pspCas9-sgRNA5 共转染组细胞的(15.60 ± 0.29)倍，pspCas9-sgRNA7 及 pspCas9-sgRNA9 共转染组细胞内 HBV DNA 量也有明显的降低，对照组细胞内 HBV DNA分别为两者的(5.43 ± 0.48)及(11.18 ± 3.00)倍。含其他 sgRNA 的 pspCas9 质粒共转染组细胞内 HBV DNA 量虽然有一定程度的降低，但是为使后续实验结果更为突出，本研究选择对 HBV 复制抑制效果最为明显的 2 条 sgRNA 即 pspCas9-sgRNA5 与 pspCas9-sgRNA9 用于后续的实验验证。见图 1。



SgRNA1-12 为靶向 HBV 基因组不同位置的 sgRNA，pspCas9(BB)为背景质粒

图 1 靶向 HBV 基因组不同位置的 sgRNA 载体对 HBV 复制的抑制能力的评估

Fig.1 Evaluation of the inhibition efficiency of sgRNAs targeting different HBV gene regions

2.2 使用 Southern blot 验证 sgRNA5 及 sgRNA9 对 HBV 复制水平的抑制效果

进一步使用 Southern blot 方法验证 pspCas9-sgRNA5 及 pspCas9-sgRNA9 对 HBV 复制的抑制效果。该实验组中引入两条文献报道的可以抑制 HBV 复制的 sgRNA(pspCas9-XCP 及 pspCas9-P1)作为对照[25]，使用 pspCas9-sgRNA5、pspCas9-sgRNA9、pspCas9-XCP 以及 pspCas9-P1 分别与等摩尔的 pcH9-HBV1.3 共转染至 HepG2 中，5 d 后提取细胞内 HBV coreDNA 进行 Southern blot 检测。如图 2A 所示，HBV3 种 DNA 复制中间体包括 rcDNA、dslDNA、ssDNA 均可被清晰检测，pspCas9-sgRNA5 及 pspCas9-sgRNA9 转染组中 HBV3 种 DNA 复制中间体均明显降低，而作为对照的 pspCas9-XCP及 pspCas9-P1 转染组中，rcDNA 有明显降低，但 ssDNA 有明显的积累。进一步使用 ImageJ 对各转染组的 rcDNA 条带进行量化分析，结果见表 2。单因素方差分析显示实验处理对细胞内的 rcDNA 产生了影响(F=192.870，P=0.000)，实验组与对照组后续两两比较显示 pspCas9-sgRNA5、pspCas9-sgRNA9、pspCas9-P1 以及 pspCas9-XCP 转染组细胞内 rcDNA 量均与对照组存在统计学差异(P=0.000)，如图 2B 所示。

表 2 HBV core DNA 定量分析结果

Tab.2 Quantitative analysis of HBV core DNA

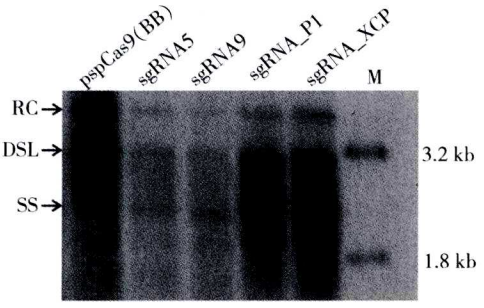
组别	rcDNA定量	百分比(%)	n	P值
pspCas9(BB)	212.00 ± 7.00	100.00	3	-
sgRNA5	92.33 ± 7.51	43.64 ± 4.66	3	0.000
sgRNA9	95.00 ± 2.00	44.86 ± 2.25	3	0.000
sgRNA_P1	134.00 ± 5.57	63.25 ± 3.38	3	0.000
sgRNA_XCP	141.67 ± 6.51	66.93 ± 5.14	3	0.000

注：P值为各组与 pspCas9(BB)相比较

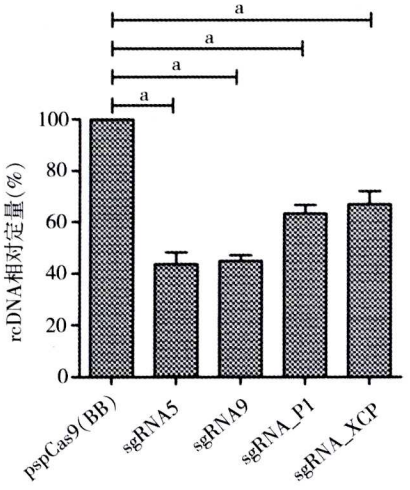
2.3 使用 rCCCDNA 模型证实靶向 HBV 基因组的 sgRNA 可以定点编辑 cccDNA

Qi 等[19]报道一种重组质粒作为使用 HBV cccDNA 替代模型。我们采用该系统进行后续 HBV cccDNA 及动物实验研究。首先分别将 pspCas9-sgRNA5、pspCas9-sgRNA9、psp-Cas9-P1、psp-Cas9-XCP 与 HBV cccDNA 重组质粒(pre-rc-ccDNA 及 CMV-Cre，质量比 1:1)共转染至 HepG2 细胞中(pspCas9 质粒与 HBVcccDNA 重组质粒摩尔比为 1:1)，3 d 后使用改进 Hirt 法提取细胞复制模型中 HBV cccDNA 进行 Southern blot 检测，获得图 3A 的结果。对于阴性对照 psp-Cas9(BB)共转染组，可以比较清晰地观察到 rcDNA 以及 cc-cDNA，而 dslDNA 量则最多。pspCas9-sgRNA5 共转染组细胞内，HBV rcDNA 以及 cccDNA 与对照相比明显降低；psp Cas9-sgRNA9、pspCas9-p1 以及 pspCas9-XCP 组也有类似的结果呈现，且 xcp 共转染组在 cccDNA 位置无明显条带。Southern blot ImageJ 定量结果见表 3，单因素方差分析显示存在组间差异(F=681.720，P=0.000)，各实验组与对照组相比均明显降

低（P=0.000，图 3B）。使用 rcccDNA 模型证实，靶向 HBV 基因组特定位置的 sgRNA 可以明显抑制 cccDNA 的合成。



A. Southern blot



a：与 pspCas9(BB)比较，P=0.000

B. 使用 ImageJ 对 rcDNA 进行定量分析

图 2　Southern blot 检测靶向 HBV 基因组不同区域的 sgRNA 共转染后细胞内 HBV 复制中间体

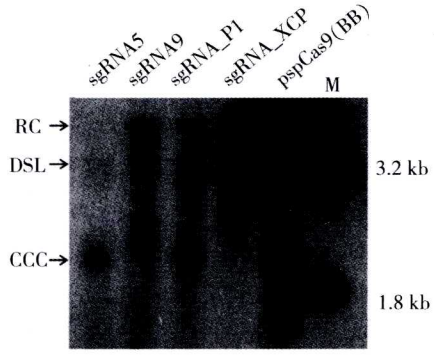
Fig.2　Evaluation of Cell HBV replicative intermediates level after co-transfection with pcH9-HBV1.3 and sgRNAs targeting different HBV gene region by southern blot

表 3　HBV cccDNA 定量分析结果

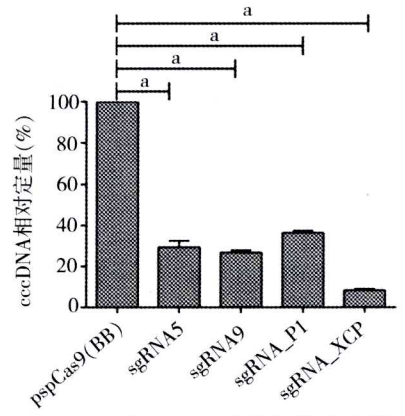
Tab.3　Quantitative analysis of HBV cccDNA

组别	cccDNA定量	百分比(%)	n	P值
pspCas9(BB)	1 516.23 ± 48.98	100.00	3	-
sgRNA5	444.74 ± 37.86	29.39 ± 3.18	3	0.000
sgRNA9	406.36 ± 17.32	26.83 ± 1.76	3	0.000
sgRNA_P1	552.45 ± 44.35	36.40 ± 1.88	3	0.000
sgRNA_XCP	125.74 ± 10.22	8.31 ± 0.92	3	0.000

注：P值为与 pspCas9(BB)相比较



A. Southern blot



a：与 pspCas9(BB)比较，P=0.000

B. 使用 ImageJ 对 cccDNA 进行定量分析

图 3　Southern blot 检测不同 sgRNA 与 cccDNA 模型共转染后细胞内 Rcccdna

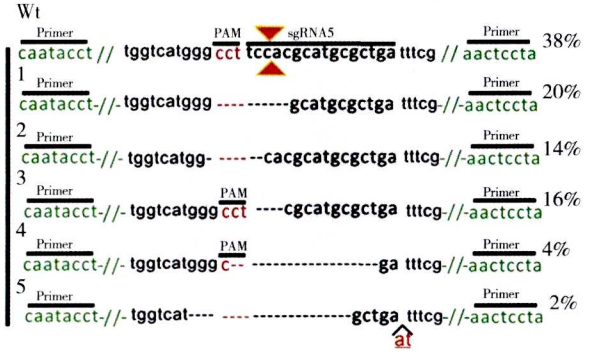
Fig.3　Evaluation of cell cccDNA level after co-infection with cccDNA and sgRNA by southern blot

为进一步探究 CRISPR-Cas9 系统对 rcccDNA 编辑的序列特点，根据所设计的 sgRNA 靶向的 HBV 基因组位置设计引物，以提取的 cccDNA 作为模板扩增该区段，并进行克隆测序，引物序列见表 4。sgRNA5 与 sgRNA9 共转染组各完成 50 个克隆测序，典型序列及比例如下图所示（图 4）。sgRNA5 转染组细胞内 cccDNA 克隆测序结果显示，19 个克隆为野生型序列（38%），25 个克隆的在“NGG”序列附近发生短片段的缺失事件（50%），也有部分克隆发生长达 10 bp 碱基缺失事件。46%sgRNA9 转染组 cccDNA 靶标区段序列为野生型，“NGG”序列及其之前位置同样为缺失发生的高频区域。对于插入突变，只在 sgRNA5 共转染组中观察到 1例。CRISPR-Cas9 系统靶向位置发生突变率（<70%）及以短片段缺失为主的突变特征与此前研究报道类似[26-28]。

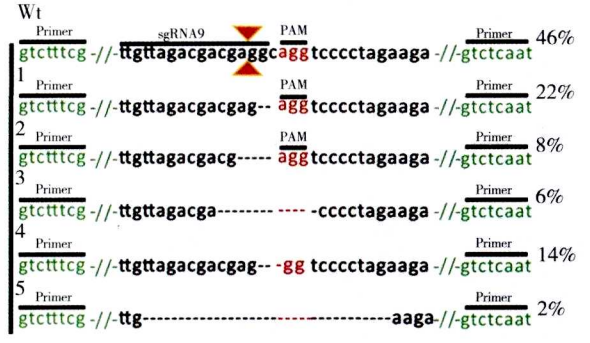
表 4　用于鉴定 sgRNA5 及 sgRNA9 靶向编辑位点序列的 PCR 引物

Tab.4　Primers for sgRNA5 and sgRNA9 targeted gene region

	正义引物(5'-3')	反义引物(5'-3')
sgRNA5编辑位点引物	CAATACCTGAACCTTTACCC3	AGGAGTTCCGCAGTATGGAT
sgRNA9编辑位点引物	GTCTTTCGGAGTGTGGATTC	ATTGAGACCTTCGTCTGCGA



A. sgRNA5 靶向位置碱基突变分析



B. sgRNA9 靶向位置碱基突变分析

图 4　sgRNA 靶向位置碱基突变分析

Fig.4　Mutation analysis of HBV gene regions targeted by sgRNAs

2.4　动物实验结果

接下来，采用 HDI 小鼠模型测试 CRISPR-Cas9 系统对 HBV 复制抑制的效果。尾静脉注射 HBV 质粒及相应的 pspCas9 质粒，3 d 及 6 d 后小鼠血清中 HBsAg、HBeAg 检测结果与 6 d 后血清中 HBV DNA 水平见表 5。重复测量方差分析结果显示，Day 3、Day 6 两时间点的血清 HBsAg 有统计学差异（F=17.070，P=0.001），处理因素与采血时间无交互作用（F=0.202，P=0.820），各处理组间血清 HBsAg 存在统计学差异（F=39.850，P=0.000），组间比较显示 pspCas9-sgRNA5 与 pspCas9-sgRNA9 处理组小鼠血清 HBsAg 明显降低（P<0.001，P=0.001）；不同时间点的血清 HBeAg 同样存在统计学差异（F=13.956，P=0.003），处理因素与采血时间无交互作用（F=0.859，P=0.448），靶向 HBV sgRNA 的 CRISPR-Cas9 作为处理因素对小鼠血清 HBeAg 也产生了明显影响（F=18.816，P=0.000），pspCas9-sgRNA5 与 pspCas9-sgRNA9 均能有效降低血清 HBeAg（P=0.000）。单因素方差分析显示尾静脉注射 6 d 后小鼠血清 HBV DNA 存在组间差异（F=23.985，P=0.000），与对照组相比，pspCas9-sgRNA5 处理组（P=0.000）与 pspCas9-sgRNA9 处理组（P=0.001）血清 HBV DNA 明显降低，统计图如图 5A-C 所示。通过免疫组化检测小鼠肝脏组织中 HBcAg 信号也发现 2 组靶向 HBV 的 sgRNA 处理可以明显降低 HBcAg 信号强度，如图 5D 所示。

3　讨　论

使用 CRISPR-Cas9 技术对基因组进行定点编辑的方法目前已经在抗病毒领域得到广泛的探讨[12]。本研究从多个层次证实靶向 HBV 不同基因组位置的 CRISPR-Cas9 核酸酶系统可以有效地降低病毒复制和相关病毒基因的表达，证实该系统可以有效地对 HBV rcccDNA 进行定点编辑，引入缺失或者插入；使用小鼠高压水动力注射模型，也证实该系统可以在体内有效地降低病毒 DNA 水平及其他病毒蛋白水平。

根据生物信息学筛选标准，一共获得 12 条靶向 HBV 基因组不同编码区的 sgRNA。但在细胞复制模型中进行功能筛选时，只有 sgRNA5、sgRNA7 以及 sgRNA9 具有明显的抑制 HBV 复制的功能，可能是因为 Cas9 多结构域核酸酶难以接近特定的 HBV 基因组形态（比如 cccDNA），提示在进行 sgRNA 设计与选择时必须加倍慎重。

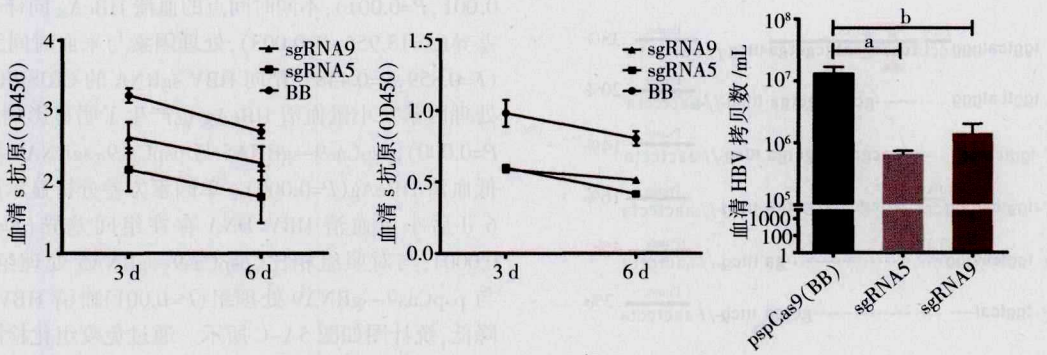
最近 1 年，多篇文章报道使用 CRISPR-Cas9 技术可以有效抑制 HBV 复制。Seeger 等[28]首先证实稳

表 5　CRISPR-Cas9 治疗小鼠模型中 HBV 血清标志物水平

Tab.5　Hepatitis B serologic test of CRISPR-Cas9 sgRNA treatment in HDI mice model

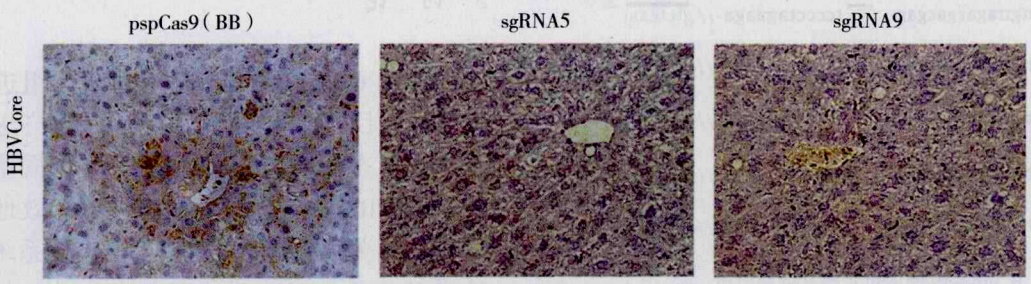
	组别	Day3	Day6	n	P 值
HBsAg（OD450）	pspCas9（BB）	3.22 ± 0.22	2.71 ± 0.21	5	-
	sgRNA5	2.18 ± 0.30	1.79 ± 0.36	5	0.000
	sgRNA9	2.62 ± 0.22	2.26 ± 0.23	5	0.001
HBeAg（OD450）	pspCas9（BB）	0.98 ± 0.21	0.80 ± 0.11	5	-
	sgRNA5	0.60 ± 0.10	0.42 ± 0.09	5	0.000
	sgRNA9	0.59 ± 0.15	0.51 ± 0.09	5	0.000
HBV DNA（Log10）	pspCas9（BB）	-	7.04 ± 0.38	5	-
	sgRNA5	-	5.79 ± 0.14	5	0.000
	sgRNA9	-	6.04 ± 0.32	5	0.001

注：P 值为各组与 pspCas9（BB）相比较



a：与 pspCas9(BB)比较，P=0.000；b：与 pspCas9(BB)比较，P<0.01

A. 不同时间点小鼠外周血 HBsAg 水平　B. 不同时间点小鼠外周血 HBeAg 水平　C. 高压水动力注射相关质粒后 6 d 小鼠外周血 HBV DNA 拷贝数



D. 免疫组化评估不同处理组小鼠肝脏组织中 HBcAg

图 5　CRISPR-Cas9 sgRNA 在高压水动力注射小鼠模型中的抗病毒作用

Fig.5　Antivirus activity of CRISPR-Cas9 system in hydrodynamic injection mice model

定表达 CRISPR-Cas9-HBV sgRNA 的细胞感染模型(HepG2/NTCP)可以有效降低 HBV 病毒颗粒的感染率；Ramanan 等[29]也在 HBV 复制模型(HepG2.2.15)中使用 Southern blot 及定量 PCR 方法证实CRISPR-Cas9 系统可以降低病毒复制和细胞内 cccDNA 水平，并进一步检测到稳定表达 CRISPR-Cas9-HBV sgRNA 的 HepG2/NTCP 感染细胞模型可以抵御病人来源的病毒的感染；Gao 等[30]则使用高压水动力注射模型与 HBV 转基因小鼠模型证实 CRISPR-Cas9 系统可以在体内作用于 HBV 基因组，抑制 HBV 复制和其他标志分子水平，但这 2 种 HBV 感染动物模型体内并不能形成 cccDNA，故并没有直接评估动物体内 cccDNA 突变情况；Lu 等[17]则使用另外一种 HBV 稳定细胞系(HepAD38)作为复制模型，使用 cccDNA 特异定量 PCR 方法证实双重 sgRNA 可以有效降低 cccDNA 池。Qi 等[19]使用报道了一种使用 Cre 重组酶及 rcccDNA 质粒共转染或者共注射模拟 HBV cccDNA 特征的方法，该 rcccDNA 模型可以在免疫健全小鼠中体内进行 cccDNA 相关特征研究。本研究中，除使用 HBV 细胞复制模型进行CRISRP-Cas9-sgRNA 作用效果评估外，进一步使用Qi 等[19]发表的 rcccDNA 系统，在细胞水平和动物水平中较为细致地评估了该系统对 HBV cccDNA 的影响。

靶向 HBV 基因组不同位置的 CRISPR-Cas9-sgRNA 介导较为接近的靶位点突变发生率。Ramanan 等[29]发现靶向不同 HBV 位置的 CRISPR-Cas9-sgRNA 系统在靶位置产生的插入缺失率为21%~62%；Gao 等[30]从动物模型体内扩增得到的 sgRNA 靶位的 HBV 序列的突变率为 58%~75%；在本结果中，sgRNA5 及 sgRNA9 靶位点的突变发生率分别为 62%及 54%。现有研究评估 CRISPR-Cas9-sgRNA 系统的抗病毒效果所采用的 HBV 复制或者感染模型各有不同，但其靶位点都呈现部分突变的特征，这一方面可能是 CRISPR-Cas9 系统本身的切割效率导致，也有可能是宿主 DNA 修复系统对HBV 基因组产生的双链断裂的修复具备的一定保真性所导致。

虽然本文从体内体外证实 CRISPR-Cas9 系统可以有效的清除 HBV，但是使用该系统的临床转化还需要很长的路要走。首先，该系统对病毒的复制抑制效率还需要进一步提高，在小鼠模型中，CRISPR-Cas9 处理组小鼠血清中 HBV 滴度与对照相比，只有约 10 倍的下降，且在细胞模型中约 40%的 cccDNA

还是以野生型形式存在；其次 CRISPR-Cas9 系统的脱靶效应（off target effect）效应需要进一步的评估，目前大多数的研究都是对生物信息学预测得到的可能的脱靶位点进行测序，检测是否具有突变发生，或者是采用深度测序的方法全局性扫描宿主基因组发生的插入缺失 indel（insertion and deletion）事件是否在处理前后是否存在统计学上的差异，这两种方法都只能在一定程度上评估脱靶效应；最后还需要进一步开发安全并且有效的投送系统，保证 CRISPR-Cas9 系统有效到达靶细胞。

参 考 文 献

[1] Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection[J]. Lancet, 2009, 373(9663): 582-592.

[2] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. Lancet, 2012, 380(9859): 2095-2128.

[3] Trepo C, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection[J]. Lancet, 2014, 384(9959): 2053-2063.

[4] Guo JT, Guo H. Metabolism and function of hepatitis B virus cccDNA: implications for the development of cccDNA-targeting antiviral therapeutics[J]. Antiviral Res, 2015, 122: 91-100.

[5] Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy[J]. Science, 1986, 232(4749): 477-484.

[6] Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases[J]. Nature, 2005, 435(7042): 646-651.

[7] Mahfouz MM, Li L, Shamimuzzaman M, et al. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(6): 2623-2628.

[8] Sung YH, Baek IJ, Kim DH, et al. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(1): 23-24.

[9] Fujii W, Kawasaki K, Sugiura K, et al. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(20): e187.

[10] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.

[11] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826.

[12] Hu W, Kaminski R, Yang F, et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(31): 11461-11466.

[13] Han Y, Li Q. Application progress of CRISPR/Cas9 genome editing technology in the treatment of HIV-1 infection[J]. Yi Chuan, 2016, 38(1): 9-16.

[14] Bloom K, Ely A, Mussolino C, et al. Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases[J]. Mol Ther, 2013, 21(10): 1889-1897.

[15] Chen J, Zhang W, Lin J, et al. An efficient antiviral strategy for targeting hepatitis B virus genome using transcription activator-like effector nucleases[J]. Mol Ther, 2014, 22(2): 303-311.

[16] Weber ND, Stone D, Sedlak RH, et al. AAV-mediated delivery of zinc finger nucleases targeting hepatitis B virus inhibits active replication[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97579.

[17] Wang J, Xu ZW, Liu S, et al. Dual gRNAs guided CRISPR/Cas9 system inhibits hepatitis B virus replication[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(32): 9554-9565.

[18] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. Nat Protoc, 2013, 8(11): 2281-2308.

[19] Qi Z, Li G, Hu H, et al. Recombinant covalently closed circular hepatitis B virus DNA induces prolonged viral persistence in immunocompetent mice[J]. J Virol, 2014, 88(14): 8045-8056.

[20] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. Nat Protoc, 2013, 8(11): 2281-2308.

[21] Yang W, Mason WS, Summers J. Covalently closed circular viral DNA formed from two types of linear DNA in woodchuck hepatitis virus-infected liver[J]. J Virol, 1996, 70(7): 4567-4575.

[22] Cai D, Nie H, Yan R, et al. A southern blot assay for detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA from cell cultures[J]. Methods Mol Biol, 2013, 1030: 151-161.

[23] Hu JL, Cui J, Guo JJ, et al. Phenotypic assay of a hepatitis B virus strain carrying an rtS246T variant using a new strategy[J]. J Med Virol, 2012, 84(1): 34-43.

[24] Luo YY, Tao Y, Cai XF, et al. A novel method for nucleos(t)ide analogues susceptibility assay of hepatitis B virus by viral polymerase transcomplementation[J]. Antiviral Res, 2016, 126: 99-107.

[25] Lin SR, Yang HC, Kuo YT, et al. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2014, 3: e186.

[26] Kennedy EM, Bassit LC, Mueller H, et al. Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease[J]. Virology, 2015, 476: 196-205.

[27] Dong C, Qu L, Wang H, et al. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication[J]. Antiviral Res, 2015, 118: 110-117.

[28] Seeger C, Sohn JA. Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9 [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2014, 3: e216.

[29] Ramanan V, Shlomai A, Cox DB, et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus[J]. Sci Rep, 2015, 5: 10833.

[30] Zhen S, Hua L, Liu YH, et al. Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus[J]. Gene Ther, 2015, 22(5): 404-412.

（责任编辑：冉明会）