DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.013
第25卷第10期 第三军医大学学报 Vol.25, No.10
870 2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)10-0870-04

HCV脱氧核酶在表达荧光素酶HepG2细胞中的活性

于乐成[1],顾长海[1],王升启[2],毛 青[1],陈忠斌[2],王宇明[1] ([1]第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所,重庆 400038;[2]军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

提 要:目的 对丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus,HCV)5′-非编码区(5′-Noncoding region,5′-NCR)靶向性脱氧核酶(Deoxyribozymes,DRz)在靶基因调控性荧光素酶表达HepG2细胞中的活性进行评价。方法 根据HCV 5′-NCR中符合5′…Y↓R…3′(Y=A/G,R=U/C)特征的位点及5′-NCR的二级结构选择靶位,采用10-23 DRz基序,设计并合成HCV靶向性脱氧核酶DRz-232、DRz-127、DRz-84、DRz1以及两端被硫代修饰的DRz(Phosphorothioate deoxyribozymes,TDRz)和活性中心区人工突变的硫代DRz(Mutant phosphorothioate DRz,MDRz)。直接将其加入体外培养的受HCV 5′-NCR调控的表达荧光素酶HepG2细胞(HepG2.9706细胞株)中,或用脂质体转染法将其导入靶细胞。用化学发光法检测荧光素酶活性,计算抑制率。结果 转染终浓度为0.5 μmol/L的药物24 h后,DRz-232/TDRz-232、DRz-127/TDRz-127、DRz-84/TDRz-84和DRz1/TDRz1的抑制率分别约14.3%/14.9%、53.2%/50.6%、25.6%/23.8%和44.7%/43.3%,均高于对应的MRz,其中DRz-127/TDRz-127与MRz-127(41.2%)相比抑制率有显著性差别($P<0.05$)。直接将TDRz-127或MRz-127加入细胞培养体系中被动作用5 h和24 h,抑制率无明显差别,但均显著低于脂质体转染组。结论 靶位合适的特异性脱氧核酶在靶基因调控性荧光素酶表达细胞中对HCV 5′-NCR可能同时具有反义抑制和剪切作用;应用脂质体转染将药物导入细胞内显著优于直接加药的效果。

关键词:脱氧核酶;肝炎病毒,丙型;5′-非编码区;荧光素酶;基因治疗
中图法分类号:R373.21;R394.2 文献标识码:A

Activity of specific deoxyribozymes targeting at HCV 5′-NCR controlling luciferase expression in transfected HepG2 cells

YU Yue-cheng, GU Chang-hai, WANG Sheng-qi, MAO Qing, CHEN Zhong-bing, WANG Yu-ming (Institute of Infectious Diseases of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the inhibitive effect of several deoxyribozymes (DRz) targetting at hepatitis C virus (HCV) 5′-noncoding region (5′-NCR) which controls luciferase expression in transfected HepG2 cells. Methods Based on the sites characterized by 5′…Y↓R…3′ (Y=A/G, R=U/C) in HCV 5′-NCR, four deoxyribozymes which adopted the active center of 10~23 DRz were designed. They were named as DRz-232, DRz-127, DRz-84 and DRz1, and their corresponding phosphorothioate ones (TDRz) and active-region-mutated phosphorothioate ones (MDRz) were obtained too. They were directly added to the cultured HepG2 cells transfected with plasmid pHCV-*neo* which contains lu
cells were lysed at certain time points after the addition of these drugs to release luciferase, and the reduction of luciferase activity was measured by chemiluminescence method for calculating the inhibition rates. Results Inhibition rates of DRz-232/TDRz-232, DRz-127/TDRz-127, DRz-84/TDRz-84 and DRz1/TDRz1 were 14.3%/14.9%, 53.2%/50.6%, 25.6%/23.8% and 44.7%/43.3% at 24 h time point after transfection of drugs at a final concentration of 0.5 μmol/L, respectively, and the rates were higher than those of the corresponding MDRzs. There was significant difference between the results from transfection and non-transfection groups. Conclusion Specific deoxyribozymes with appropriate target sites may have both antisense inhibition and cleavage effect in cells. Inhibition rates of transfected drugs are significantly better than those of the directly-added nontransfected drugs.

Key words: deoxyribozymes; hepatitis C virus; 5′-noncoding region; luciferase; gene therapy

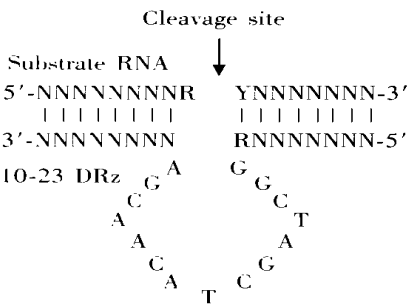
脱氧核酶(Deoxyribozyme,DRz)是近年发现的具有催化RNA分子定点裂解等活性的小分子酶性DNA(Catalytic DNA)[1],是继酶性RNA(Catalytic RNA)即核酶(Ribozyme)发现以来生命科学中又一重要发现。其

作者简介:于乐成(1970-),男,江苏省姜堰市人,博士,主治医师,主要从事病毒性肝炎发病机制及防治方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68754147,68754289

收稿日期:2002-09-08;修回日期:2003-01-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中研究较深的是所谓“10-23 DRz”, 其活性中心高度保守, 但两侧的底物结合区可以变动以适应不同位点, 见图 1[2~4]。目前, 应用 DRz 来抑制或剪切人类免疫缺陷病毒-1(HIV-1)mRNA、人乳头状瘤病毒-16(HPV-16)E6 mRNA、乙型肝炎病毒(HBV)RNA 等的初步实验性研究已取得不同程度的效果, 在防治病毒感染、抗肿瘤等方面的潜在价值引起学者们注意[5~7]。丙型肝炎病毒(HCV)感染易于慢性化, 并与肝硬化和原发性肝癌的发生密切相关, 而当前首选的抗病毒药物 α-干扰素(IFN-α)疗效并不十分满意[8]。本研究对 HCV 靶向性脱氧核酶在靶基因调控性荧光素酶表达细胞中的活性进行了评价。



R= A/ G, Y= U/ C, ↓ means cleavage site

图 1　10-23 DRZ 的结构及剪切 RNA 示意图

Fig 1　Structure of 10-23 DRz and its site-specific cleavage of substrate RNA

1　材料与方法

1.1　主要材料

DRz、TDRz 和 MDRz 由上海 Sangon 公司合成。荧光素酶分析系统(Bright-Glo™)购自 Promega 公司。HepG2 9706 细胞为转染有质粒 pHCV-neo 的 HepG2 细胞, 由军事医学科学院放射医学研究所提供。pHCV-neo 含全长 HCV 5′-NCR(341nt)及 C 区 5′端部分 cDNA 序列, 测序分析证实与毕胜利等报道的中国人 HCV 5′-NCR 及 C 区 5′ 端序列基本一致[9], 其下游紧接荧光素酶基因。脂质体 Lipofectin、胎牛血清、G418、DMEM 培养基均为 GIBCO 公司产品。采用多标记检测仪(VictorTM Wallac 1420 multiple label counter)测定荧光发射强度。

1.2　靶位选择

入选靶位均符合 5′…R↓Y…3′(R= A/ G, Y= U/ C)特征, 且 R 不与 DRz 形成 Watson-Crick 碱基配对; 尽量避开 HCV 5′-NCR-C 中存在碱基变异或形成过长分子内碱基配对(尤其是≥8 bp)的区域, 避免两个靶位处于 HCV 5′-NCR-C 双链区的对称位置。HCV RNA 序列以起始密码子的第一个碱基为 1, 向后依次为 2…n, 向前依次为-1, -2…-m。

1.3　DRz、TDRz 和 MDRz 的设计

采用 10-23 DRz 的活性中心结构, 根据所选择的靶位确定底物结合区序列, 从而设计出 DRz-232、DRz-127、DRz-84 和 DRz1, 见表 1。DRz 两端各两个磷酸二酯键被硫代修饰后即得 TDRz-232、TDRz-127、TDRz-84 和 TDRz1。随机将各 TDRz 活性中心区第 3 和 10 位碱基分别突变为 A 和 G, 得 MDRz-232、MDRz-127、MDRz-84 和 MDRz1。

表 1　DRz 和 TDRz 的序列

Tab 1　Sequences of DRz and TDRz

DRz	TDRz	Sequences
DRz-232	TDRz-232	5′ αcTGGAGG GGCTAGCTACAACGA TGCACCGac3′
DRz-127	TDRz-127	5′ tcCAGGCA ……TGAGCCggg3′
DRz-84	TDRz-84	5′ caACACTA ……TCGGCTag3′
DRz1	TDRz1	5′ cgTGCTCA ……GGTGCAcg3′

Lower cases are phosphorothioate bases; TDRz transformed to MDRz after the framed C mutated

1.4　细胞培养和药物转染

HepG2 9706 细胞常规复苏后以 1× 10^4/ 孔接种于 NUNC 96 孔培养板, 37 ℃、5% CO_2 孵育 18~20 h, 80%左右细胞汇合后, 向每孔中直接加入或用 Lipofectin 按说明书转染终浓度为 0.5 μmol/ L 的药物。转染时每孔细胞用 1 μg Lipofectin, 总体积 100 μl。药物作用 5h 后换含 10% 胎牛血清、700 μg/ ml G418 的 DMEM 培养基继续培养 24、48、72 h。每组每个时间点均做 3 孔, 取其平均值。设空白培养对照及 Lipofectin 空转染对照。

1.5　化学发光强度测定及抑制率的计算

于直接加药或转染完毕后 24 h 或 48 h 终止培养, 向每孔中加入平衡至室温的荧光素酶发光试剂 100 μl, 轻轻混匀 2 min 以使细胞完全裂解, 立即应用多标记检测仪检测各孔 1 s 发光强度, 输出值为 CPS。转染药物抑制率 =(空转染组平均 CPS 值-实验组平均 CPS 值)/ 空转染组平均 CPS 值× 100%; 直接加药组抑制率 =(空白培养组平均 CPS 值-实验组平均 CPS 值)/ 空白培养组平均 CPS 值× 100%; 空转染组非特异性抑制率 =(空白培养组平均 CPS 值-空转染组平均 CPS 值)/ 空白培养组平均 CPS 值× 100%。

1.6　统计学处理

采用 SPSS 统计软件包(10.0 版)中的最小显著性差异法(LSD)和 SNK 方差分析程序进行各组数据均值比较。

2　结果

2.1　转染条件下各药物作用组的平均发光强度

以 Lipofectin 介导转染终浓度为 0.5 μmol/ L 的不同药物, 于转染结束后继续培养 24 h, 然后检测各组细胞的发光强度。结果显示 DRz-127 和 DRz1 组的平均发光强度显著低于对照组(P < 0.05), 各 DRz 组与对应的 TDRz 组相比平均发光强度无明显差别(P > 0.05), 各 DRz 组、TDRz 组的平均发光强度均不同程度高于对应的 MDRz 组(P < 0.05), 见表 2。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表2 转染条件下不同药物作用组的平均发光强度(CPS)

Tab 2 Luminescence(CPS) of each group under the action of different transfected drugs

Group	Luminescence($\bar{x}\pm s$)	Group	Luminescence($\bar{x}\pm s$)
A	5576±390	TDRz-127	2457±284
B	4974±296	TDRz-84	3970±223
DRz-232	4263±506	TDRz1	2771±174
DRz-127	2327±162	MDRz-232	4272±239
DRz-84	3701±203	MDRz 127	2925±196
DRz1	2751±106	MDRz-84	3845±285
TDRz-232	4233±295	MDRz1	3158±251

A: No transfection and drugs; B: Transfection without drugs. Luminescence between A and B, each experimental group and B, every two DRz groups, or DRz-127 and MDRz-127 have significant difference, $P<0.05$

2.2 转染条件下各药物作用组抑制率的比较

转染终浓度为0.5 μmol/L的不同药物并继续培养24 h,各药物对细胞中荧光素酶表达的抑制率见图2。DRz-127和TDRz-127的抑制率分别达53.2%和50.6%,DRz1和TDRz1的抑制率分别达44.7%和43.3%,显示了相对较高的活性。Lipofectin空转染组的非特异性抑制率约10.8%。

2.3 不同给药途径下发光强度的差异

选取TDRz-127和MDRz-127进行转染5 h后、直接加药5 h后24、48、72 h,以及直接加药24 h后0、24、48 h抑制效应的观察,各组在不同时间的发光强度见表3。转染5 h组的发光强度明显低于直接加药5 h组和24 h组,而后两组之间发光强度相差不大。

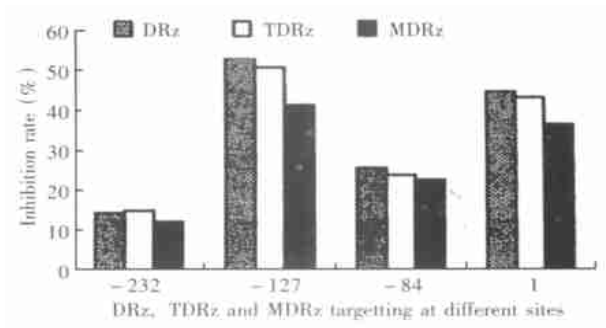


图2 转染终浓度为0.5 μmol/L的不同药物作用24 h抑制率的比较

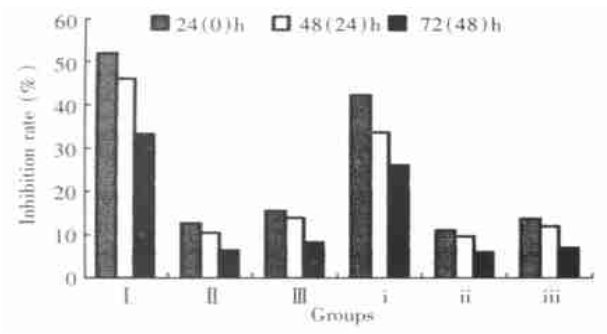
Fig 2 Comparison of inhibition percentages among different drug groups under a transfected final concentration of 0.5 μmol/L for 24 h

表3 不同给药途径组发光强度(CPS, $\bar{x}\pm s$)的比较

Tab 3 Luminescence of experimental groups under different drug-delivering ways(CPS, $\bar{x}\pm s$)

Group	A	B	T-127			M-127		
			I	II	III	I	II	III
24 h(0 h *)	5415±126	4944±98	2377±176	4727±174	4570±69	2854±313	4809±251	4668±129
48 h(24 h *)	5874±130	5334±168	2881±170	5252±64	5046±110	3538±35	5293±39	5158±151
72 h(48 h *)	6222±232	5755±183	3839±119	5824±273	5706±168	4256±206	5842±58	5774±174

A: No transfection and drugs; B: Transfection without drugs. Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ represent after transfection for 5 h, direct addition of drugs for 5 h and 24 h, respectively. *: the measureing time points of Ⅲ



Ⅰ and i, Ⅱ and ii, Ⅲ and iii represent groups of transfection for 5 h, direct addition of drugs for 5 h and 24 h, respectively. 24(0), 48(24) and 72(48) h and measureing time points and 0, 24, 48 in the brackets are that of Ⅲ and iii groups

图3 TDRz-127(Ⅰ-Ⅲ)和MDRz-127(i-iii)在不同给药途径下抑制率的比较

Fig 3 Inhibition percentages of TDRz-1277(Ⅰ-Ⅲ) and MDRz-127 (i-iii) under different drug-delivering methods

2.4 三种给药方法下药物抑制率的比较

TDRz-127和MDRz-127在转染5 h、直接加药5 h和直接加药24 h三种给药方法下连续培养24(0)、48(24)或72(48)h后抑制率的比较见图3。转染5 h组的抑制率明显高于各直接加药组,而两直接加药组之间的抑制率无显著性差异。

3 讨论

本研究表明,针对HCV RNA 5′-NCR-C设计的4组共12种脱氧核酶在转基因肝癌细胞中对靶RNA均具有不同程度的抑制活性,但差别较大。以DRz/TDRz/MDRz-127系列和DRz/TDRz1/MDRz1系列的抑制活性相对较高,这可能至少与下述两点有关:①它们所对应的靶位处在HCV RNA 5′-NCR-C极重要的功能区。例如前者的靶位处于HCV RNA 5′-NCR二级结构的Ⅲb-Ⅲc区、内侧核糖体进入位点(Internal ribosome entry

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

site, IRES)内, 而此区域对 HCV RNA 翻译的启动和调控可能至关重要[10]; 后者的靶位实际上是 HCV RNA 的翻译起启密码子。②剪切位点均为 5′…A ↓U…3′。虽然符合 5′…R ↓Y…3′(R=A/G, Y=U/C)特征的序列均有可能成为脱氧核酶潜在的剪切位点, 但 5′…A ↓U…3′可能是最易被切开的位点[3,4]。终浓度为0.5 μmol. L-1 作用 24 h, DRz-127、TDRz-127、MDRz-127 的抑制率均分别高于对应的 DRz1、TDRz1、MDRz1, 这与后者的两底物结合区之间可能形成 4 bp 的自身分子内碱基配对从而使抑制活性有所降低有一定关系, 尽管两组抑制率的差异无显著性意义(分别为 53.2% *vs* 44.7%, $P=0.064$; 50.6% *vs* 43.3%, $P=0.167$; 41.2% *vs* 36.5%, $P=0.302$)。

理论上, 脱氧核酶在细胞内对靶 RNA 的总抑制活性包括两个方面。一是通过 Watson-Crick 碱基配对与靶 RNA 结合所产生的特异性反义抑制效果, 二是对靶 RNA 的定点剪切效应。直接测定细胞内的剪切效应十分困难, 通常的做法是设计一组无剪切活性但反义抑制效果相似的对照组进行比较以间接推证。DRz-127 和 TDRz-127 的抑制率与活性中心突变的 MDRz-127 相比差异有显著性意义(分别为 53.2% *vs* 41.2%, $P=0.012$; 50.6% *vs* 41.2%, $P=0.044$), 提示 DRz-127 和 TDRz-127 在细胞内确实存在一定的剪切效果。DRz1 和 TDRz1 与 MDRz1 相比(44.7% *vs* 36.5%, $P=0.079$; 43.3% *vs* 36.5%, $P=0.092$)、DRz-84 和 TDRz-84 与 MDRz-84 相比(25.6% *vs* 22.7%, $P=0.55$; 23.8% *vs* 22.7%, $P=0.547$)、DRz-232 和 TDRz-232 与 MDRz-232 相比(14.3% *vs* 12.1%, $P=0.968$; 14.9% *vs* 12.1%, $P=0.861$)虽然差别无显著性意义, 但其抑制率均高于或略高于相应的 MDRz, 推测也存在程度不等的剪切活性。这与我们所观察到的体外分子水平剪切试验的结果基本一致。

本研究显示, 脂质体转染加药组的抑制效果明显优于直接加药 5 h 组和 24 h 组, 差异均有显著性意义; 直接加药 24 h 组的抑制率虽然略高于直接加药 5 h 组, 但差异无显著性意义。提示这些药物被动扩散和/或细胞主动摄取的能力较差, 难以在细胞内达到足够有效的浓度。因此选择适当的手段将这类药物导入细胞内是必要的。

与反义寡脱氧核苷酸分子(Antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)相比, 特异性脱氧核酶分子对靶 RNA 不仅存在反义抑制作用, 还可能具有特异性剪切活性; 与核酶相比, 脱氧核酶不仅对靶 RNA 分子具有特异性剪切活性, 而且分子量相对较小, 化学性质相对稳定, 不易受核酸酶的降解[5], 易于合成和纯化; 因此, 针对不同病原体 RNA 设计特异性脱氧核酶来进行基因调控可能是一种新的途径[11,12]。本研究显示, 靶位适当的特异性脱氧核酶可以在细胞内反义抑制和剪切 HCV RNA。如何进一步优化剪切靶位和底物结合区以筛选出活性最好的脱氧核酶值得继续探讨。

参考文献:

[1] Breaker R R. Making catalytic DNAs[J]. Science, 2000, 290(5499): 2095-2096.

[2] Santoro S W, Joyce G F. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(9): 4262-4266.

[3] Santoro S W, Joyce G F. Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme[J]. Biochemistry, 1998, 37(38): 13330-13342.

[4] Khachigian L M. Catalytic DNAs as potential therapeutic agents and sequence-specific molecular tools to dissect biological function [J]. J Clin Invest, 2000, 106(10): 1189-1195.

[5] 于乐成, 顾长海, 王升启, 等. 基因治疗新策略——酶性 DNA 的设计和应用[J]. 中国药物化学杂志, 2002; 12(4): 236-242.

[6] Cieslak M, Niewiarowska J, Nawrot M, *et al*. DNAzymes to beta 1 and beta 3 mRNA down-regulate expression of the targeted integrins and inhibit endothelial cell capillary tube formation in fibrin and matrige[J] l. J Biol Chem, 2002, 277(9): 6779-6787.

[7] Liu C, Cheng R, Sun L Q, *et al*. Supression of platelet-type 12-lipoxygenase activity in human erythroleukemia cells by an RNA-cleaving DNAzyme [J]. Biochem Biophys Res Com, 2001, 284(4): 1077-1082.

[8] He Y, Katze M G. To interfere and to anti-interfere: the interplay between hepatitis C virus and interferon [J]. Viral Immunol, 2002, 15(1): 95-119.

[9] 王升启, 王小红, 管　伟, 等. HCV 5′NCR 调控抑制活性的反义核酸的筛选[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(5): 288-290.

[10] Jubin R, Vantuno N, Kieft J, *et al*. Hepatitis C virus internal ribosome entry site(IRES)stem loop IIId contains a phylogenetically conserved GGG triplet essential for translation and IRES folding [J]. J Virol, 2000, 74(22): 10430-10437.

[11] Unwalla H, Banerjea A C. Inhibition of HIV-1 gene expression by novel macrophage-tropic DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAT/Rev RNA [J]. Biochem J, 2001, 357(1): 147-155.

[12] Asahina Y, Ito Y, Wu C H, *et al*. DNA ribonucleases that are active against intracellular hepatitis B viral RNA targets[J]. Hepatology, 1998, 28(2): 547-554.

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net