DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.09.003
第22卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 9
2000年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2000

文章编号:1000-5404(2000)09-0819-04

论著

三螺旋结构寡核苷酸序列对DHBV基因的连接及封锁抑制作用研究

熊鸿燕,陈惠孙 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第二研究室,重庆 400042)

提 要:目的 筛选与鸭乙肝病毒(DHBV)-DNA X/C区目标基因特异连接的三螺旋结构寡核苷酸(TFO),探讨TFO对DHBV-DNA的特异连接及抑制作用。方法 将人工合成的TFO与目标基因片断和含(DHBV)DNA的重组细胞反应,用电泳转移印迹、PCR和鸭肝原代细胞培养等技术观察TFO对相应基因的连接以及对细胞内DHBV-DNA复制的抑制效应。结果 在所设计的多条TFO中,(3)TFO和(5)TFO在3~4 h内能与细胞内外目标基因双链直接连接,导致DHBV-DNA复制一定程度的抑制;在DHBV-DNA阳性的原代鸭肝细胞培养液中连续加入终浓度为4 μmol/L的TFO,大多数细胞组的培养液中DHBV-DNA的检测在10~12 d开始呈现阴性。结论 TFO能直接与病毒的DNA连接,导致目标基因的复制抑制,有着潜在的特异抗病毒价值。

关键词:三螺旋结构寡核苷酸;鸭乙肝病毒;基因
中图法分类号:R373.21;R394 文献标识码:A

Inhibitory effect of triple helix forming oligonucleotide on binding and inhibition of DHBV gene

XIONG Hong-yan, CHENG Hui-sun (Research Insitute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective Screening the triple helix forming oligonucleotides(TFO) which could bind with the target gene of duck hepatitis B virus(DHBV) DNA X/C specifically and explore the inhibitory effect of TFO on the binding and inhibition of DHBV gene. Methods The artificially synthesized TFO was contacted with the sequences of target gene and reconstituted cell containing DHBV-DNA. The effects of special binding and inhibition of DHBV-reproduced DNA were observed with electrophresis shift blotting, PCR and primary cell culture of duck liver. Results The designed (3)TFO and (5)TFO could bind with the target gene directly in intracellular and extracellular within 3—4 h and inhibit the reproduction of DHBV-DNA to certain extent. After continuous adding of TFO with the final density of 4 μmol/L into the culture medium of DHBV-infected primary cells, negative results were found in most of the culture medium on 10—20 d. Conclusion The TFO can bind with virus DNA directly and cause the inhibition of gene reproduction. The TFO has the value of potential application for virus inactivation.

Key words: triple helix forming oligonucleotide; duck hepatitis B virus

三股螺旋结构寡核苷酸(Triple helix forming oligonucleotide, TFO)能通过Hoogsteen氢键直接与DNA连接,从而阻止DNA的延伸、抑制转录因子与基因连结,在DNA水平干扰基因表达[1,2]。它弥补了Antisense技术只能在转录和翻译水平起抑制作用的不足,其对目标基因的有效定位及封锁有着重要应用研究价值,近年来倍受研究者的关注,相关的应用研究越来越多。研究表明,将TFO开发作为基因水平上高度特异性新型抗病毒和抗肿瘤药物具有重要的实用价值[3~5]。

DHBV是HBV的替代实验病毒,近年来被国内外研究者广泛用于抗HBV的研究[6,7]。DHBV-DNA X/C基因区与HBV的转录、复制以及病毒颗粒的成熟密切相关,设计与之直接连接的TFO对探讨利用TFH技术抑制HBV的方法有着重要意义。本实验以鸭乙肝病毒(DHBV)DNA X/C区为目标,初步观察了TFO对DHBV-DNA的连接和封锁抑制作用。

1 材料和方法

1.1 特异TFO的设计及筛选

1.1.1 所选目标基因的双链准备 X/C区中,171~400一

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870693);全军"九五"医学科研规划项目(98M096)
作者简介:熊鸿燕(1962—),女,重庆市人,博士,副教授,主要从事流行病学、消毒学方面的研究,发表论文14篇。电话:(023)68757432
收稿日期:1999-12-25;修回日期:2000-03-23

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

230 bp 片段和 2 532～2 552(含前基因 RNA)的一 203 bp 片段通过PCR 扩增纯化获得。PCR 引物根据重组 3.0 kb DHBV-DNA 全基因的已知序列,用 Golden Key1.0(军事医学科学院基础医学研究所提供)软件设计。PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成,Taq 酶及 4× dNTP 亦由该公司提供。PCR 模板由含 DHBV-DNA (3.0 kb)重组质粒(pUC18)的细胞(*E. coli*)(军事医学科学院流行病微生物研究所米志宝博士赠送)扩增而得。质粒及凝胶 DNA 提取试剂盒分别购自 Promega 公司和 Boehringer Mannheim 公司。

TFO 的准备:以 DHBV-DNA 的 X/C 区为目标,根据 TFO 设计原理,针对多嘌呤或多嘧啶序列,分别在该区 171～400 区设计了不同位置(331～350, 268～287, 214～233)的 3 条 20 bp 的序列,(1)5′-ggaagggagaagggggaga-3′,(2)5′-agaagaaga-aaagaaaaag-3′,(3)5′-gagggagggagaaaaagaag-3′。在 2532～2552(前基因 RNA)区设计了两条 20 bp 序列,(4)5′-gggaaggagagggagaaaa-3′,(5)5′-gggttggtgtggggtgtttt-3′。设计的 TFO 作用目标见图 1。序列合成(PEGE 纯化)由北京赛百盛生物技术有限公司完成。

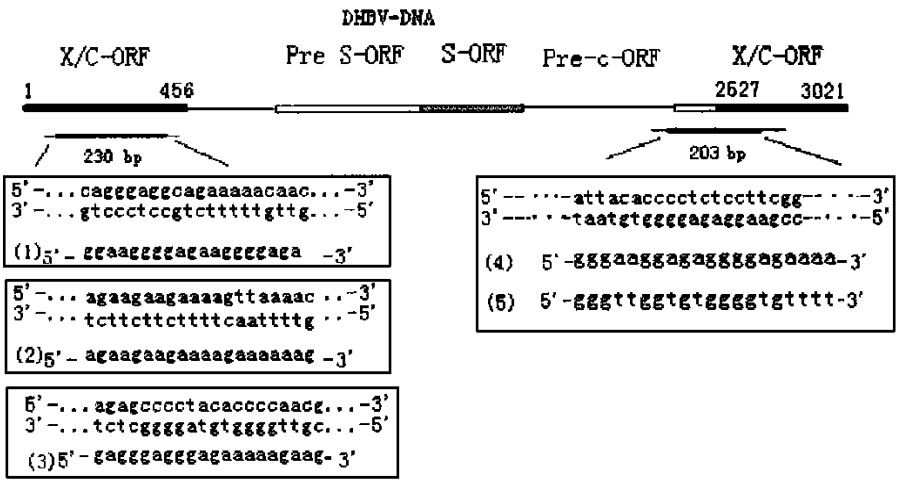


图 1 TFO 目标基因位置的示意图

Fig 1 Diagram showing the target gene site of TFO

1.1.2 TFO 与目标基因片断的连接 将 1 pmol 双链 DNA,100 pmol TFO 和 10 pmol 3′ 端标记地高辛(标记试剂盒由 Boehringer Mannheim 公司提供)的 TFO 加入 22 μl 标准连接反应缓冲液(20 mmol Tris, 20 mmol HEPES, 10 mmol $MgCl_2$, pH 7.2～7.6)中,在 37 ℃下作用 3 h。取反应液 20 μl 作 6% PAGE 电泳(40 V, 4～5 h)。凝胶经硝酸纤维膜转膜处理。BCIP/NBT 染色,观察不同 TFO 对目标基因片断的连接强度。

1.1.3 TFO 对 DHBV-DNA 目标基因的连接 用 LB 培养液将 *E. coli* 配成 1×10^5/ml 的浓度,取 200 μl,分别与 200 μl 用脂质体(Dosper liposome, Boehringer Mannheim 公司产品)包裹的 TFO (5 000 pmol TFO,其中 1/10 为地高辛 3′ 末端标记,70 μg 脂质体)混合,37 ℃下作用 4 h。取 300 μl 进行质粒 DNA 提取,提取液经内切酶(*EcoR* Ⅰ)切割后,作 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,得到 3.0 kb 和 2.7 kb 两个片段(分别为 DHBV-DNA 和 PUC-18-DNA),硝酸纤维膜转膜,BCIP/NBT,观察 TFO 对 DHBV-DNA 目标基因的连接强度。

1.2 TFO 对目标基因及 DHBV 的抑制作用

1.2.1 TFO 对目标基因的抑制 按 1.1.3 法将 TFO 与含 DHBV-DNA 质粒的 *E. coli* 反应,作用 4 h 后分别取 100 μl 加入 5.0 ml LB 培养液中,37 ℃下继续振摇培养 12～14 h,显微镜下进行细胞计数,用 Hanks 液调节,使悬液中的细胞浓度为(1.23～1.28)$\times10^6$/ml,各样品取 3 ml 作质粒 DNA 提取,再分别取 5 μl 质粒 DNA 提取液进行 PCR 扩增试验,同时将未经 TFO 作用的细胞对照组经相同程序处理后(用随机核酸序列 Foligo 代替 TFO)进行相应片段的扩增,观察 TFO 对细胞质粒中目标基因的抑制作用。扩增的目标基因为(3)TFO 目标区 230 bp 和(5) TFO 目标区 203 bp。Foligo 的序列为:5′-caaggtggcagaattgcaa-3′,由北京赛百盛生物技术有限公司合成。

1.2.2 TFO 对原代细胞中 DHBV 的抑制 从农贸市场购 3～7 d 龄重庆麻鸭,分别取颈静脉血 0.5 ml 作 DHBV-DNA (PCR 法)测定。PCR 正向引物始于 X/C 区基因图谱位置 2 657 bp,反向引物始于该区的 2 889 bp。取扩增产物 10 μl 加 6× 凝胶载样缓冲液,在含 0.25 μg/ml 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上电泳(TBE 缓冲液,1 h),254 nm 紫外线灯下观察 232 bp 橙红色条带。将 4 个 DHBV 阳性(++)的雏鸭肝脏分别制作原代细胞[8],分别编为细胞组 1、2、3、4。各自用 L_{15} 培养液培养将细胞稀释至 5×10^5/ml,接种于 24 孔培养板中,在 37 ℃,含 5% CO_2 条件下培养。细胞贴壁生长 3 d 后,将脂质体包裹的(3)TFO 与 L_{15} 培养液混合,以 TFO 1 nmol/孔的比例加入培养板中(终浓度 4 μmol/L),每天更换含此 TFO 的 L_{15} 培养液,在加 TFO 的第 7 天时开始收集细胞上层液,检测 DHBV-DNA:5% 聚乙二醇沉淀上清液中病毒,4 ℃过夜,10 000 r/min 离心 10min,病毒 DNA 提取,PCR 法测定 DHBV-DNA(方法同上),观察鸭肝原代细胞中 DHBV 的复制。对照组 A 只加 L_{15} 培养液与细胞作用。对照组 B 以相同浓度的 20 bp Foligo 代替 TFO,反应条件相同。每个试验点作 3 个复孔。Foligo 的序列同 1.2.1。

2 结果

2.1 特异 TFO 的筛选

从电泳转移印迹图可见,在所设计的 5 条序列中,(3)TFO

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

和(5)TFO 能与目标基因片断发生有效的连接, 而(1)、(2)、(4)TFO 未见连接, 见图 2。同样, 在细胞内, (3)TFO 和(5)TFO 与 3 kb DHBV-DNA 的连接也最为显著, 没有见到与 PUC-18-DNA 的非特异连接印迹, 见图 3。

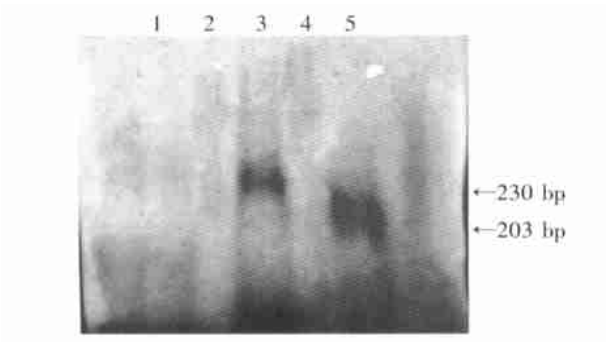


图 2　6% PAGE 电泳转移印迹图(显示设计序列与目标基因片断的连接)

Fig 2　The transferring blot of 6% PAGE electrophresis (Showing the linking of TFO and target gene)

1: Linking of(1) TFO and 230 bp sequences; 2: Linking of(2) TFO and 230 bp sequences; 3: Linking of(3) TFO and 230 bp sequences; 4: Linking of(4) TFO and 203 bp sequences; 5: Linking of(5) TFO and 203 bp sequences

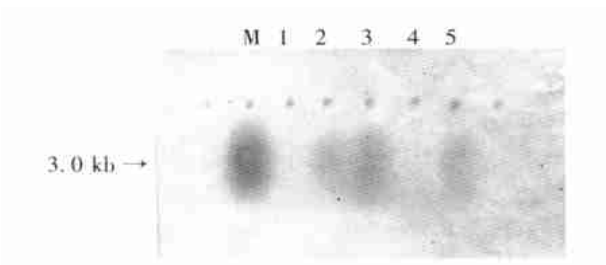


图 3　0.8% 琼脂糖电泳转移印迹图(显示设计序列与 DHBV-DNA 的连接)

Fig 3　Transferring blot of 0.8% agarose gel electrophoresis (Showing the linking of TFO and DHBV-DNA)

M: Marker of DNA; 1: The linking of(1) TFO and DHBV-DNA; 2: Linking of(2) TFO and DHBV-DNA; 3: Linking of(3) TFO and DHBV-DNA; 4: Linking of(4) TFO and DHBV-DNA; 5: Linking of(5) TFO and DHBV-DNA

2.2　TFO 对 DHBV-DNA 复制的抑制作用

从 PCR 扩增实验结果见到, 脂质体包裹的 TFO 与细胞作用 4 h 后, 重新进行孵育的细胞中, DHBV-DNA 的复制明显弱于未经 TFO 处理的对照组, 但没有被完全抑制, 见图 4。进一步将脂质体包裹的 TFO 连续每天加入含 DHBV 的鸭肝原代细胞培养液中, 分析对 DHBV-DNA 复制的影响发现, TFO 作用 10～12 d 时, 细胞组 1、2、4 的 DHBV-DNA 的检测分别开始呈现阴性, 但细胞组 3 直到 15 d 仍然呈阳性, 见表 1。



图 4　TFO 作用的细胞中 DHBV-DNA 特定片断的 PCR 扩增图

Fig 4　The PCR for special sequences of DHBV-DNA treated by TFO

M: Marker of DNA; 1, 2: Amplification of 203 bp in control cell; 3, 4: Amplification of 203 bp in cell treated by (5)TFO; 5, 6: Amplification of 230 bp in control cell; 7, 8: Amplification of 230 bp in cell treated by (3)TFO

表 1　TFO 作用后细胞上层液体中 DHBV-DNA 的测定结果

Tab 1　DHBV-DNA in supernant of cell treated with TFO

Cell group		Time of TFO treatment (d)								
		7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	Control A	++	++	+	+	+	+	+	+	+
	Control B	++	+	+	+	+	+	+	+	+
	Test	+	+	+	+	+	−	−	−	−
2	Control A	++	++	++	++	++	++	+	+	+
	Control B	++	++	++	++	+	+	+	+	+
	Test	+	+	+	−	−	−	−	−	−
3	Control A	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Control B	++	++	++	++	++	++	++	++	+
	Test	++	++	++	+	+	+	+	+	+
4	Control A	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Control B	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Test	++	++	+	+	+	−	−	−	−

3　讨论

THF 能直接连接于目标基因, 是人工干扰和抑制病毒复制的非常有价值的手段。国外研究者的实验结果显示, 一般 50 bp 的核酸序列能迅速进入细胞, 但在培养状态下 24 h 才能在细胞中检测到, 通过特殊方法, 如渗透缓冲剂法、电穿孔法、脂质体法等可使 TFO 在短时间内(数十分钟至数小时)进入细胞。THF 在特定基因位置形成后, 该基因区即被封锁。封锁的具体方式是①: 阻止调节转录因子接触。②: 在开始干扰 RNA 聚合酶作用。③: 干扰延伸步骤。④: 抑制 DNA

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

聚合酶作用和 DNA 复制。由于在设计TFO 时,目标基因一般是重要的基因调节区。因此区域的封锁将直接抑制某些重要基因序列,从而阻止转录启始和延伸,影响细胞内外的多种生理程序[9,10]。

我们曾探讨了 TFO 和 Antisene 与目标基因的连接及其基因抑制效应,发现在相同剂量和作用时间下TFO 对目标基因的连接及抑制作用明显强于 Antisene(结果另文报告)。这为我们进一步开展 TFO 的设计与抗基因研究展示了可喜前景。

由于嘧啶型 TFO 依赖较低的 pH 环境,不适宜于生理状态下的抗基因反应[1,2],因此本实验设计的 TFO 多为嘌呤型,即以鸟嘌呤与腺嘌呤(GA)或鸟嘌呤与胸腺嘧啶构成的序列为主。实验结果显示,(3)TFO 和(5)TFO 在细胞内外均能与目标基因发生紧密连接,而且能抑制细胞炮病毒的复制。但所设计的(1)、(2)、(4)TFO 不能与相应的目标序列发生连接,其原因还有待探讨,可能与 TFO 形成的三螺旋结构的空间构型及稳定性有关。

对鸭肝原代细胞中 DHBV-DNA 的抑制试验显示,细胞组 1、2、4 的培养液中,经(3)TFO 作用 10~12 d 时 DHBV-DNA 的检测呈现阴性,但细胞组 3 所受的抑制效应确很弱,在 TFO 作用到第 20 天时其培养液中的 DHBV-DNA 仍然呈阳性(结果未显示)。这可能是因为该细胞组中 DHBV-DNA 在 TFO 的目标序列处发生一定的变异所至。因为 TFO 与双链 DNA 的连接有显著的特异性。这也是反义核酸技术抗病毒研究中值得注意的问题。

有关 TFO 作用抑制人乙肝病毒(HBV)或 DHBV 的研究还未见报道。Jendis 等[11] 曾针对爱滋病病毒(HIV)的长末端序列区进行了研究,他们选用一 54 bp 的TFO,以 1~3 μmol/L 的浓度将其作用于 HIV-1 感染的人单核细胞,连续加入,30 d 后 p24 抗原和 PCR 的 DNA 检测均为阴性,而相同长度的 Antisense 序列不能抑制 HIV。我们对鸭肝原代细胞中 DHBV-DNA 的抑制试验也显示,对于敏感株的病毒,4 μmol/L 浓度的 TFO 连续作用 10~12 d 即可使病毒 DNA 复制完全抑制,这与 Antisense 抑制病毒的相关研究报道相比有明显优势,因为 Antisense 抑制病毒的效率一般在 75% 左右[12~14]。由此可见,将 THF 技术应用于抗病毒研究有着重要价值。

参考文献:

[1] Can P P, Glazer P M. Triplex DNA: Fundamentals, advances, and potential applications for gene therapy[J]. J Mol Med, 1997, 75(4): 267—282.

[2] Giovannangeli C, Helene C. Progress in developments of triplex-based strategies[J]. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 1997, 7(4): 413—421.

[3] Panyutin I G, Neumann R D. Sequence-specific DNA breaks produced by triplex-directed decay of iodine-125[J]. Acta Oncol, 1996, 35(7): 817—823.

[4] Belousov E S, Afonina I A, Kutyavin I V, *et al*. Triplex targeting of native gene in permeabilized intact cell: Covalent modification of the gene for the chemokine receptor CCR 5[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(5): 1 324—1 328.

[5] Kovacs A, Kandala J C, Webr K T, *et al*. Triple helix-forming oligonucleotide corresponding to the polypyrimidine sequence in the rat α1(I) collagen promoter specifically inhibits factor binding and transcription[J]. J Biol Chem, 1996, 271(3): 1 805—1 812.

[6] 何丽芳, 吴祥甫, 陈常庆, 等. 反义寡脱氧核苷酸在鸭体内抑制鸭乙型肝炎病毒[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1998, 12(1): 1—4.

[7] Shead A, Vickery K, Pajkos A, *et al*. Effects of phyllanthus plant extracts on duck hepatitis B virus *in vitro* and *in vivo*[J]. Antiviral Research, 1992, 18(2): 127—138.

[8] Turin F, Borel C, Benchaib M, *et al*. n-Butyrate, a cell cycle blocker, inhibits early amplification of duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA after *in vitro* infection of duck hepatocytes [J]. J Virol, 1996, 70(5): 2 691—2 696.

[9] Kim H G, Reddoch J F, Mayfield C, *et al*. Inhibition of transcription of the human c-myc protooncogene by intermolecular triplex[J]. Biochemistry, 1998, 37(8): 2 299—2 304.

[10] Svinarchuk F, Nagibneva I, Chem D, *et al*. Recruitment of transcription factors to the target site by triplex-forming oligonucleotides[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(17): 3 459—3 464.

[11] Jendis J, Strack B, Moelling K. Inhibition of replication of drug-resistant HIV type 1 isolates by polypurine tract-specific oligodeoxynucleotide TFO A[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 1998, 14(11): 999—1 005.

[12] Soni P N, Brown D, Saffie R, *et al*. Biodistribution, stability, and antiviral efficacy of liposome-entrapped phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides in ducks for the treatment of chronic duck hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 1998, 28(5): 1 402—1 410.

[13] Zu Putlitz J, Wieland S, Blum H E, *et al*. Antisense RNA complementary to hepatitis B virus specifically inhibits viral replication[J]. Gastroenterology, 1998, 115(3): 702—713.

[14] Offensperger W B, Offensperger S, Blum H E. Antisense therapy of hepatitis B virus infection[J]. Mol Biotechnol, 1998, 9(2): 161—170.

(编辑 陈聪连)

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