

丙型肝炎病毒锤头结构核酶的细胞内免疫

贾战生,陈琳,郝春秋,冯志华,李谨革,王九平,曹义战,周永兴

贾战生,郝春秋,冯志华,李谨革,王九平,周永兴,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038
陈琳,中国人民解放军第四军医大学唐都医院呼吸内科
陕西省西安市 710038
曹义战,中国人民解放军第四军医大学唐都医院急诊科
陕西省西安市 710038
贾战生,男,1959-10-30生,陕西省西安市人,汉族,副主任医师,副教授,医学博士。中华医学学会传染病与寄生虫病分会全国青年委员。主要从事病毒性肝炎发病机制和基因治疗研究,发表论文 50 篇,获军队科技进步成果奖 5 项,参与编写专著 5 部。
国家自然科学基金课题, No.30070687
全军医药卫生基金资助课题, No.89D048
项目负责人:贾战生,710080,陕西省西安市灞桥区新寺路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. jiazsh@fmmu.edu.cn
电话:029-3377742 传真:029-3537377
收稿日期:2002-10-15 接受日期:2002-11-16

Intracellular immunization by hammerhead ribozyme against HCV

Zhan-Sheng Jia, Lin Chen, Chun-Qiu Hao, Zhi-Hua Feng, Jin-Ge Li, Jiu-Ping Wang, Yi-Zhan Cao, Yong-Xing Zhou

Zhan-Sheng Jia, Chun-Qiu Hao, Zhi-Hua Feng, Jin-Ge Li, Jiu-Ping Wang, The Center of Diagnosis and Treatment of Infection Diseases of PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Shaanxi Province, Xi'an 710038, China
Lin Chen, Department of Respiratory System, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Shaanxi Province, Xi'an 710038, China
Yi-Zhan Cao, Department of Emergency Medicine, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Shaanxi Province, Xi'an 710038, China
Supported by the Scientific Foundation of Military Medicine, No.89D048
Correspondence to: Dr. Zhan-Sheng Jia The center of diagnosis and treatment of infection diseases of PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Shaanxi Province, Xi'an 710038, China.
jiazsh@fmmu.edu.cn

Received:2002-10-25 Accepted:2002-11-16

Abstract

AIM: To evaluate the effect of hammerhead ribozyme 213 (Rz 213) against hepatitis C virus (HCV) infection.

METHODS: Rz213 cleaving 5'noncoding region (5'NCR) of HCV was beforehand transfected in a human hepatic carcinoma cell (HHCC) line and selected for G418 resistance. Cells stably expressing Rz213 were retransfected with pCMVNCRIluc containing 5'NCR-luc fusion genes by lipofectAMINE;luciferase activity in lysate of transfectant was measured in scintillation counter.

RESULTS: HHCC cells stably expressing Rz213 exhibited significant resistance to retransfection of targeting gene.

CONCLUSION: Stably transfected cells with Rz213 were selected and expressed in HHCC, and thus exerted the intracellular immunity against infection of HCV.

Jia ZS, Chen L, Hao CQ, Feng ZH, Li JG, Wang JP, Cao YZ, Zhou YX. Intracellular immunization by hammerhead ribozyme against HCV. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(2):148-150

摘要

目的:探讨预先转染丙型肝炎病毒(HCV)核酶(Rz213)的人肝癌细胞对 HCV 再转染的抑制作用。

方法:应用从前构建的 HCV 锤头结构 Rz(Rz213),通过脂质体介导的基因转染方法,转染人肝癌细胞(HHCC),经G418 筛选转染 Rz213 的基因克隆,应用 luc 报告基因的表达活性 观察该细胞克隆对靶基因(pCMVNCR luc)转染的抑制作用。

结果:G418 筛选能使 Rz213 在转染细胞内有效表达 Rz RNA,转染Rz的多克隆细胞能有效地阻断靶基因的再转染。

结论:我们构建的Rz213真核表达载体能在HHCC细胞内有效表达,预先转染发挥细胞内免疫作用,可防止 HCV 感染。

贾战生,陈琳,郝春秋,冯志华,李谨革,王九平,曹义战,周永兴. 丙型肝炎病毒锤头结构核酶的细胞内免疫.世界华人消化杂志 2003;11(2):148-150
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/148.htm>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)非编码区(5' NCR)和核心(C)区高度保守,具有重要的生物学功能,是基因治疗选择的理想靶序列^[1-5]。锤头结构核酶(hammerhead Rz)分子较小,结构简单,易于体外设计合成,已广泛用于抗病毒基因治疗研究^[6-13]。应用 Rz 基因转染技术作为细胞内免疫的工具,由 Baltimore et al 首次提出,并应用于艾滋病毒(HIV)的防治研究。Heusch et al 应用发夹(hairpin)结构核酶作为细胞内免疫分子,预先转染人 CEM/1 细胞证明,该细胞可以有效抵抗HIV病毒感染。我们从前的研究结果表明,以 HCV 5' NCR 为靶序列设计的锤头结构 Rz,可在细胞内有效地抑制靶基因的表达^[10,14,15]。本研究探讨了抗 HCV 5' NCR 核酶预先转染靶细胞的预防作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株(human hepatic carcinoma cell, HHCC)由中科院上海细胞所细胞库引种,本校 863 研究室保存。核酶真核表达载体pcEM-Rz213 (Rz213)由本室自行设计构建,并经测序体外切割证明^[14]。靶基因 pCMVNCRIluc 含有 HCV 5' NCR 和 C 区 66 nt,并与 luc 基因融合,由德国的 Alt 教授惠赠^[1]。转染方法按试剂盒说明操作(Lipofectamine 和 G418 为 Gibco 产品)。

1.2 方法 通过显微镜观察 Rz 转染对细胞生长特性的影响,同时收集对数生长期细胞,用胰酶消化,尽可能消化成

单个细胞悬液, 75 ml/L 乙醇固定, 流式细胞仪检测细胞周期。细胞转染 Rz213 48 h 后, 传代细胞(1~5)于 6 孔和 24 孔培养板内, 换用 350 mg/L 的 G418 完全培养液, 筛选转染细胞, 每 3 d 换培养液 1 次。不同时间收集细胞, 制备裂解液。留一部分做克隆筛选, 直至细胞克隆出现。荧光素酶(Luc)活性检测按试剂盒说明操作(luciferase assay system 为 promega 产品)。取 20 μL 细胞裂解液, 加入 1.5 mL Eppendorf 管, 加 100 μL luc 测试液, 混匀; 尽快用液体闪烁计数仪计 1 min 的 cpm 值^[15]。同时用 Bradford 法测定 20 μL 裂解液中的蛋白含量, 最后核算成每 μg 蛋白所含的计数值。

统计学处理 数据均以均值加减标准差表示。两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 Rz 转染对细胞的影响 将 pcEM-Rz213 转染的 HHCC 细胞多克隆(20 d), 传代取对数生长期细胞, 作细胞周期检测, 同时用转染空载体的 HHCC 细胞对照。结果表明, 两组之间无显著意义, 说明 Rz 和载体在短期内对细胞的增生周期可能无影响。

2.2 G₄₁₈ 筛选对 Rz 与 luc 基因共转染的影响 pCMVNCRluc 为瞬时表达载体, 缺乏新霉素基因, 与 pcDNA3 共转染, 经 G₄₁₈ 筛选可明显延长 luc 的表达。然而, 该载体与 Rz213 共转染, G₄₁₈ 筛选提高了 Rz 基因的表达, luc 活性并没有延长, 说明 Rz 基因在细胞内抑制了 luc 的表达。靶基因组、Rz+ 靶基因组和对照组(空载体 + 靶基因)luc 活性均随时间下降, 但在第 5 天时各组之间就有显著差异, 对照组最高, Rz 组最低。8 d 后见 Rz 组 luc 活性明显低于对照组。随 G₄₁₈ 筛选时间延长(最长 20 d), 仅对照组可检测到 luc 活性, 但 cpm 值均在 5 000 以下, 远比前 72 h 低(图 1)。

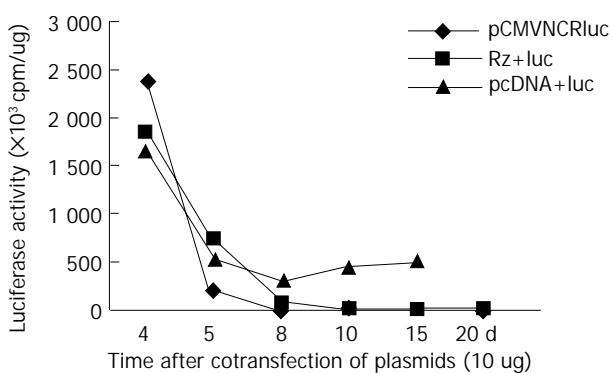


图 1 G₄₁₈ 筛选对 Rz+luc 基因共转染的影响

3.3 pcEM - Rz213 的细胞内免疫 Rz213 与 pCMVNCRluc 靶基因共转染细胞, Rz213 可有效地抑制 luc 的活性。为了证明 Rz 对细胞的保护作用, 预先将 pcEM-Rz213 转染 HHCC 细胞, 经 G418 筛选抗性多克隆细胞。以此为靶再用 pCMVNCRluc 转染。结果表明, 预先转染 pcEM-Rz213 的 HHCC 细胞可有效地阻断再转染靶基因的表达(图 2)。

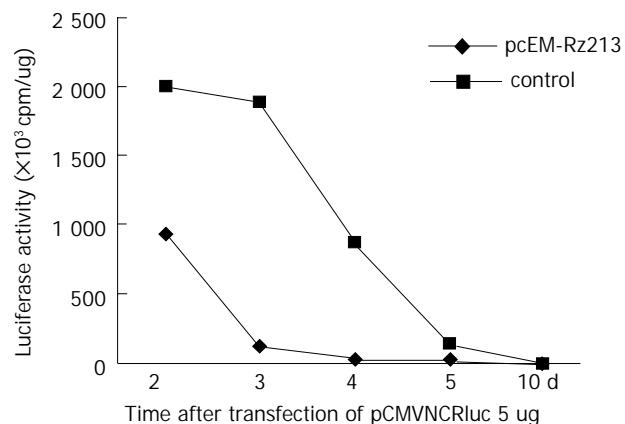


图 2 pCMVNCRluc 在 pcEM - Rz213 转染免疫细胞内的表达

3 讨论

细胞内免疫包括细胞内抗体、DNA 免疫、核酶和细胞因子基因转染等^[16~21], 是抗病毒基因治疗的重要手段之一。其主要步骤: 将目的基因转入靶细胞, 使靶细胞稳定表达某种抗病毒分子, 通过细胞内分子的作用, 有效地抑制病毒基因的表达和复制, 因此转入该基因的细胞能有效地抵抗病毒的攻击, 达到细胞内免疫的目的。Yu et al 应用逆转录病毒为载体, 将抗 HIV-1 病毒的核酶基因转入胎儿脐血 CD34⁺ 干细胞, 结果发现随细胞分化增生, 核酶基因仍有效表达, 转染目的基因的细胞可抵抗 HIV-1 病毒的感染。最近, Fraisier et al^[22] 应用抗 tat 核酶和抗 TAR 的 RNA 诱饵联合细胞内免疫, 并在靶基因的 3' 端添加 β- 球蛋白的 3' 非编码序列, 增加了靶基因的稳定性, 有效地提高了抗 HIV 效果。

HCV 感染者接受肝移植后, 发生移植肝再感染 HCV 是导致肝脏移植失败的主要原因^[23]。应用核酶技术, 采用 HIV 细胞内免疫的思路, 有可能防止移植肝再感染 HCV。HCV 核酶作为基因治疗的手段之一, 已经多位学者证明, 可有效地抑制病毒基因的表达^[11,12,22~24]。我们在研究了抗 HCV Rz 在细胞内抑制病毒基因表达的基础上, 探讨了该 Rz 预先转染肝细胞的细胞内免疫效应。结果表明, 抗 HCV 5' NCR Rz213 预先转染的 HHCC 细胞, 可有效地表达 Rz RNA 分子, 经 G₄₁₈ 筛选的抗性多克隆细胞能够有效地抵抗靶基因的再转染。提示将抗 HCV Rz 预先导入细胞, 有可能像 HCV “疫苗” 免疫一样, 防止 HCV 感染, 这对于慢性肝病晚期接受肝移植的患者可能是一种新治疗希望, 预先将抗 HCV Rz 导入移植的肝细胞, 以防止移植肝再感染 HCV。

基因治疗能否应用于临床, 一方面取决于基因治疗的有效性, 另一方面由其对机体的副作用决定^[25~27]。抗 HCV Rz 载体介导的内源性 Rz 在细胞内有效表达是 Rz 清除病毒的基础。借鉴体外切割实验的数据, Rz 在细胞内要达到完全清除病毒, 其分子数必需是靶基因的 100 倍以上, 并要求 Rz 能到达所有 HCV 感染的肝细胞和非肝细胞^[4, 24]。我们选择 pcDNA3 作为真核载体是一高效真核表达载体, 结果表明, 经 G₄₁₈ 抗性筛选可以提高 Rz

的表达。细胞生长特性和细胞周期的研究表明,该载体和Rz基因近期对靶细胞无毒副作用。

4 参考文献

- 1 Alt M, Eisenhardt S, Serwe M, Renz R, Engels JW, Caselmann WH. Comparative inhibitory potential of differently modified antisense oligodeoxynucleotides on hepatitis C virus translation. *Eur J Clin Invest* 1999;29:868-876
- 2 Pybus CG, Charleston MA, Gupta S, Rambaut A, Holmes EC, Harvey PH. The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science* 2001;292:2323-2325
- 3 Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 2001;313:451-464
- 4 Drazan KE. Molecular biology of hepatitis C infection. *Liver Transpl* 2000;6:396-406
- 5 Cornberg M, Wedemeyer H, Manns MP. Hepatitis C: therapeutic perspectives. *Forum* 2001;11:154-162
- 6 Schmitz V, Qian C, Ruiz J, Sangro B, Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Prieto J. Gene therapy for liver diseases: recent strategies for treatment of viral hepatitis and liver malignancies. *Gut* 2002;50:130-135
- 7 Ni YH. In vivo hepatic gene therapy. *Acta Paediatr Taiwan* 2001; 42:191-200
- 8 Feng Y, Kong YY, Wang Y, Qi GR. Inhibition of hepatitis B virus by hammerhead ribozyme targeted to the poly(A) signal sequence in cultured cells. *Biol Chem* 2001;382:655-660
- 9 Macejak DG, Jensen KL, Jamison SF. Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. *Hepatology* 2000;31:769-776
- 10 Jia ZS, Zhou YX, Lian JQ, Feng ZH, Li GY, Zhang WB. Computer design of the hammerhead ribozyme against hepatitis C virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:300-302
- 11 Wen SJ, Xiang KJ, Huang ZH, Zhou R, Qi XZ. Construction of HBV-specific ribozyme and its recombinant with HDV and their cleavage activity in vitro. *World J Gastroenterol* 2000;6:377-380
- 12 Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. Anti-HBV hairpin ribozyme-mediated cleavage of target RNA in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94
- 13 Lee PA, Blatt LM, Blanchard KS, Bouhana KS, Pavco PA, Bellon L, Sandberg JA. Pharmacokinetics and tissue distribution of a ribozyme directed against hepatitis C virus RNA following subcutaneous or intravenous administration in mice[J]. *Hepatology* 2000;32:640-646
- 14 Jia ZS, Zhou YX, Lian JQ, Feng ZH, Li GY. Inhibition of the expression of hepatitis C virus by hammerhead ribozyme in HHCC. Cell line[J]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1999;79:631-633
- 15 Jia ZS, Zhou YX, Feng ZH, Lian JQ, Li GY, Jiao CS, Li GY. Intracellular inhibition of viral gene expression by ribozyme against 5'-noncoding region of hepatitis C virus. *Zhonghua Chuanranbing Zazhi* 2000;18:10-12
- 16 Yamamoto M, Hayashi N, Takehara T, Ueda K, Mita E, Tatsumi T, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Intracellular single-chain antibody against hepatitis B virus core protein inhibits the replication of hepatitis B virus in cultured cells. *Hepatology* 1999;30: 300-307
- 17 zu Putlitz J, Skerra A, Wands JR. Intracellular expression of a cloned antibody fragment interferes with hepatitis B virus surface antigen secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255: 110-113
- 18 Chen L, Li G, Tang L, Wang J, Ge XR. The inhibition of lung cancer cell growth by intracellular immunization with LC-1 ScFv. *Cell Res* 2002;12:47-54
- 19 Oka Y, Akbar SM, Horiike N, Joko K, Onji M. Mechanism and therapeutic potential of DNA-based immunization against the envelope proteins of hepatitis B virus in normal and transgenic mice. *Immunology* 2001;103:90-97
- 20 Li JG, Zhou YX, Lian JQ, Jia ZS, Feng ZH. Inhibition of E antigen of hepatitis B virus by ribozyme in HHCC cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:28-30
- 21 Pertl U, Luster AD, Varki NM, Homann D, Gaedicke G, Reisfeld RA, Lode HN. IFN-gamma-inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy. *J Immunol* 2001;166: 6944-6951
- 22 Fraisier C, Irvine A, Wrighton C, Craig R, Dzierzak E. High level inhibition of HIV replication with combination RNA decoys expressed from an HIV-Tat inducible vector. *Gene Ther* 1998;5:1665-1676
- 23 Teixeira R, Papatheodoridis GV, Burroughs AK. Management of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *J Viral Hepat* 2001;8:159-168
- 24 Macejak DG, Jensen KL, Pavco PA, Phipps KM, Heinz BA, Colacino JM, Blatt LM. Enhanced antiviral effect in cell culture of type 1 interferon and ribozymes targeting HCV RNA. *J Viral Hepat* 2001;8:400-405
- 25 Lee PA, Blatt LM, Blanchard KS, Bouhana KS, Pavco PA, Bellon L, Sandberg JA. Pharmacokinetics and tissue distribution of a ribozyme directed against hepatitis C virus RNA following subcutaneous or intravenous administration in mice. *Hepatology* 2000;32:640-646
- 26 Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousoo P, Deist FL, Fischer A. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science* 2000; 288: 669-672
- 27 Schmitz V, Qian C, Ruiz J, Sangro B, Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Prieto J. Gene therapy for liver diseases: recent strategies for treatment of viral hepatitis and liver malignancies. *Gut* 2002;50:130-135