

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2020.01.004

靶向柯萨奇病毒 B3 siRNA 的设计与筛选*

代海丽 王 艳 孙 权 时连瑞

(山东英才学院医学院, 济南 250101)

摘 要 **目的** 针对柯萨奇病毒 B3(CVB3) 基因筛选抑制效率较高的 siRNA 新序列, 同时探究顺式作用复制元件(CRE) 以外的 2C 区是否是设计 siRNA 序列的有效靶点。**方法** 在 CVB3 的基因组中以 3D、3C、2C、2A、VP3、VP2 和 VP1 区为靶点设计新的 siRNA 序列, 在 HeLa 细胞中转染 siRNA 序列, 转染 12h 后, 进行 CVB3 感染。感染病毒 36h 后收毒, 用 TCID₅₀、MTT、Western blot 和 real-time RT-PCR 4 种方法从不同水平上检测本研究设计筛选的 siRNA 序列在 CVB3 复制方面的抑制效果。**结果** 设计的 siRNA 序列共 11 条, 其中 5 条对 CVB3 的复制在细胞的死亡率、病毒的相关致病性、RNA 分子水平和蛋白表达水平 4 个方面均表现出了较好抑制效果。其中 siRNA-5 对 CVB3 复制的抑制率达到了 84%, 本序列是针对 2C 区 CRE 以外的部分设计的。**结论** 本文发现了 5 条新的抑制率较高的 siRNA 靶序列, 同时首次证明 CRE 以外 2C 区也是设计 siRNA 序列的有效靶点。

关键词 柯萨奇 B3 病毒; RNA 干扰; siRNA

中图分类号: R373 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2020)02-014-05

Design and screening of small interfering RNA targeting to coxsackievirus B3

DAI Haili, WANG Yan, SUN Quan, SHI Lianrui

(Department of Medical Faculty, Shandong Yingcai University, Jinan 250101, China)

Abstract: Objective To investigate several effective siRNAs against different regions of the CVB3 genome for CVB3 silencing in vitro and explore whether the sequences except CRE within the 2C region was potential targets for CVB3-specific siRNAs design. **Methods** In this study, eleven siRNAs were designed to target seven distinct regions of the CVB3 genome including 3D, 3C, 2C, 2A, VP3, VP2 and VP1. All of the siRNAs were individually transfected into HeLa cells, which were subsequently infected with CVB3 12h later. After 36h the virus were harvested and the impacts of RNA interference (RNAi) on viral replication were evaluated using five measures: 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀), 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) assay, Western blot, and real-time RT-PCR. **Results** Five of the eleven siRNAs were highly efficient at inhibiting viral replication in the levels of cell viability, cytopathic effect, infectious viral particles, viral protein expression and viral RNA. This was especially true for siRNA-5, which targeted the ATPase 2C. The viral RNA recovered from samples with siRNA-5 treatment was decreased by 84%. **Conclusion** Our results revealed five effective siRNAs for CVB3 silencing and provided evidence that the sequences except CRE within the 2C region may also be potential targets for CVB3-specific siRNAs design.

Keywords: Coxsackievirus B3; RNA interference; Small interfering RNA

柯萨奇病毒 B3(CVB3) 是单正链 RNA 病毒, 属于肠道病毒, 小 RNA 病毒科, 基因组序列全长约 7.4kb, 有开放读码框架一个。一旦感染本病毒, 即会在宿主体内进行大量复制, 造成溶细胞性感染,

可导致宿主很快出现大量的细胞损伤死亡。CVB3 可引发多种疾病, 如肝炎、干燥综合征、胰腺炎、病毒性心肌炎^[1-2]、扩张型心肌病^[3]、无菌性脑膜炎等疾病^[4]。目前应用的各种防治方法均未起到满意效果, 需要进一步探究更加安全的、效果更好的防治策略。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 近年来

* [基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目(2018WS210)

在抗病毒研究领域展现了巨大的潜力。siRNA 对很多种病毒的抑制效果均比较理想^[5-7],针对 siRNA 抑制 CVB3 复制的研究目前也有很多团队在进行,有研究证实 VP1 区^[8]、2A 区^[9]、3C 区^[10]、3D 区^[11]均可以设计出有效的 siRNA 序列, Kim 等^[12]已证实 2C 区的 CRE 部位是设计 siRNA 序列的有效靶点。

本文将设计的 siRNA 序列转染入 HeLa 细胞,筛选抑制效果好的 siRNA 序列,同时探究 2C 区 CRE 以外的基因是否可以设计 CVB3 特异性较高的 siRNA 序列。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和细胞 HeLa 细胞由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所细胞中心提供。CVB3 H3 株是用包含 CVB3 基因全长的感染性克隆 PMSK-1 质粒^[13](登录号 U57056)转染入细胞后获得^[14],该病毒是由哈尔滨医科大学的钟照华教授馈赠,将其在 HeLa 细胞中活化,滴定该病毒滴度为 10^8 TCID₅₀/ml。

1.1.2 主要试剂和仪器 EntransterTM-R 转染试剂购自英格恩生物公司;荧光定量 PCR 试剂盒 Premix Ex TaqTM(DRR039)由宝生物工程有公司销售提供;LEICA-HC 荧光显微镜购自 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒 TCID₅₀ 滴定 在 96 孔的细胞培养板中接种 HeLa 细胞,密度为 5×10^4 个细胞/孔,将细胞培养 12h 后,进行病毒 50% 组织培养感染剂量 (50% Tissue culture infective dose, TCID₅₀) 的滴定。稀释病毒,其浓度依次为 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} ,各取 100 μ L 分别加入 96 孔板中,每个稀释度进行了 8 个重复,第 11 列和 12 列为对照,每天在显微镜下观察细胞的病变 (cytopathic effect, CPE),记录结果,直至 CPE 的终点出现。该过程要保证设置的对照组始终保持正常的形态和特征。用 Reed-Muench 法计算本病毒的 TCID₅₀/ml。

1.2.2 siRNA 的设计、合成和标记 CVB3 基因序列在 GenBank 中已登录,其登录号为 U57056,按照 Elbashir 等^[15]及 Reynolds^[16]的设计原则,在 CVB3

的 3D、3C、2C、2A、VP3、VP2 和 VP1 区设计了 siRNA 序列共计 11 条,分别命名为 siRNA1-11。增设了用 FAM 标记的无关 siRNA 序列设置为阴性对照组 siRNA-NC,阳性对照组 siRNA-PC 选取往年发表验证的抑制效率较高的 siRNA 序列^[10]。13 条 siRNA 制备合成时 3'端均设计了 dTdT 悬突(序列见表 1)。合成的 siRNA 序列是干粉状,将其融入 DEPC 水中,稀释至终浓度为 20 μ M,存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

表 1 siRNA 序列和对应靶区域

名称	基因序列 (5'-3')	靶区域	核苷酸位置
siRNA-1	AAGCGTACCAGATACCTGTGA	VP3	1932-1952
siRNA-2	AAGAACTACCATTCAAGGTCT	VP1	2609-2629
siRNA-3	GGUAGUAAAUAAGACAUCUA	2A	3340-3358
siRNA-4	GGATCAATCTACGCACCAA	VP2	1518-1536
siRNA-5	AAGTTAAACAGCTCAGTGTAT	2C	4484-4504
siRNA-6	GCTGGTAACTGAGATGTTT	2C	4954-4972
siRNA-7	AACTCACGGATTACGGTTTCC	3C	5712-5732
siRNA-8	GCTAAAGAGTTAGTGGATA	3C	5534-5552
siRNA-9	GCACGAATATGAGGAGTTT	3D	7189-7207
siRNA-10	AAGGAGACCAATTACATTGAT	3D	6689-6709
siRNA-11	AAGACCATGTGCGCTCATTGT	3D	7143-7163
siRNA-PC	AATCATGACACCAGCAGACAA	3D	6972-6990
siRNA-NC	UUCUCCGAACGUGUCACGU	None	None

1.2.3 确定最佳转染条件 将 FAM 标记的阴性对照序列 siRNA-NC 稀释浓度分别为 200nM、150nM 和 100nM, EntransterTM-R (μ L): siRNA (μ g) 设为 4:2 和 5:2, HeLa 细胞接到细胞培养板中用不含抗生素的 DMEM 营养液进行培养,待细胞达到 40% 左右的融合度时进行 siRNA 转染,转染 siRNA 12h 后通过荧光显微镜及流式细胞术技术观察筛选最适宜的转染 siRNA 的条件。

1.2.4 转染 siRNA 后感染 CVB3 将浓度为 150nM 的 siRNA 和 EntransterTM-R 按照 2:5 的比例进行混合后转染入 HeLa 细胞。本次实验共分 16 组, siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3、siRNA-4、siRNA-5、siRNA-6、siRNA-7、siRNA-8、siRNA-9、siRNA-10、siRNA-11 组分别转染相应的 siRNA 序列, siRNA-PC 为转染阳性对照组, siRNA-NC 为转染阴性对照组, mock 为仅加转染试剂 EntransterTM-R 组, virus only 组为 HeLa 细胞未转染任何物质组。于转染后 12h 在以上 15 组 HeLa 细胞上分别感染 0.01 MOI 的 CVB3, sham infected 是正常细胞对照组,未转染

siRNA 和未感染病毒。于病毒感染 HeLa 细胞 36h 后收获目的细胞和病毒,检测 siRNA 对病毒复制的抑制效果。

1.2.5 MTT 法检测抑制效率 收获 16 个观察组的目的细胞,分别加入 MTT 液培养 4h,弃去培养液上清分别加入二甲基亚砜,在酶联免疫检测仪 A490nm 处测量各孔的吸光值。sham infected 是正常细胞对照组,将其细胞的活率设定为 100%,分别计算各组细胞的存活率。

1.2.6 Real-time RT-PCR 检测抑制效率 收获目的细胞和病毒采用实时荧光定量 RT-PCR 进行检测,选取 β -actin 为内参,将 siRNA-NC 处理组设置为 calibrate 定为 1,通过相对定量方法,检测设计的 11 条 siRNA 序列对 CVB3 复制的抑制情况。

1.2.7 Western blot 检测 VP1 蛋白表达变化 收获目的细胞,处理后样品按 20 μ L/孔上样,分别用 β -actin 单克隆抗体(1:5000)和 VP1 蛋白特异性的多克隆抗体(1:1000)37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,洗膜后分别加入辣根(HRP)标记的山羊抗鼠 IgG 二抗和山羊抗兔 IgG 二抗,孵育处理后,扫膜仪扫膜。

1.2.8 毒价滴定检测病毒抑制率 HeLa 细胞转染 13 条 siRNA 序列 12h 后感染 CVB3,感染病毒 36h 后收获 HeLa 细胞,滴定病毒液上清 TCID₅₀ 值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计学软件进行数据分析,定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 ANOVA, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

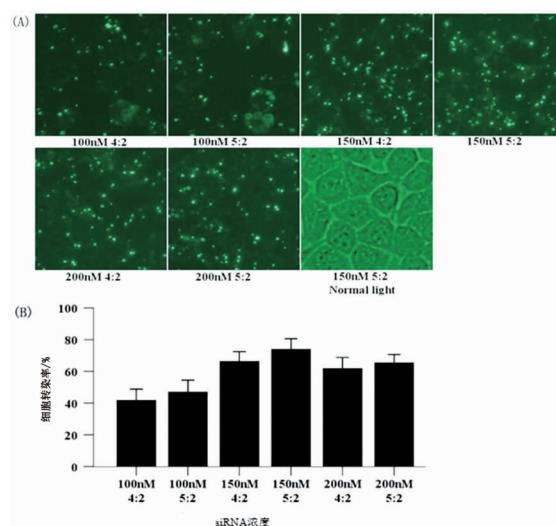
2.1 转染率的测定

在倒置荧光显微镜下观察不同浓度下 siRNA-NC 的转染率,发现 siRNA 染率在浓度为 200nM 和 150nM 时较高。流式细胞检测结果显示当 siRNA 浓度为 150nM, EntransterTM-R (μ L): siRNA (μ g) = 5:2 时, siRNA 转染的效率最好,确定此时为最佳转染条件(图 1)。

2.2 siRNA 在细胞病变方面对 CVB3 的抑制

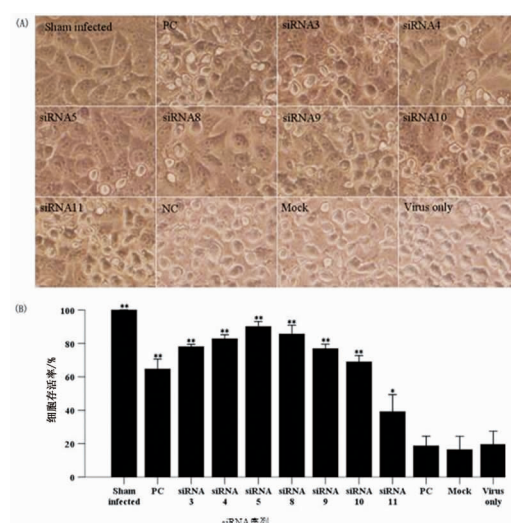
siRNA 并感染病毒 36h 后 HeLa 细胞的病变情况,发现三个对照组 siRNA-NC、mock 和 virus only 中大部分的 HeLa 细胞均已出现病变。siRNA-1、siRNA-2、siRNA-6 三组细胞病变情况与阴性对照组相似,基本未表现出保护效果。siRNA-5 组病变最少, siRNA-8 和 siRNA-4 组病变次之(见图 2)。

与倒置显微镜下观察的细胞病变结果相似, MTT 法检测结果显示三个对照组 mock、siRNA-NC、virus only 和 siRNA-1、siRNA-2、siRNA-6 处理组中细胞死亡率高达 80%,而其它组细胞的死亡率排序依次为: siRNA-11 > siRNA-10 > siRNA-9 > siRNA-3 > siRNA-4 > siRNA-8 > siRNA-5。因 siRNA-1、siRNA-2、siRNA-6 三组 siRNA 未表现出保护效果,故在此处淘汰此三组,后期不再进行检测和实验。所有数据进行了三个重复实验,三次重复之间进行比较, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ 。



注: (A) 荧光显微镜观察; (B) 流式细胞技术检测

图 1 HeLa 细胞中 siRNA-NC 转染率观察(400 $\times$)



注: A, 倒置显微镜下观察 HeLa 的细胞病变情况(200 $\times$); B, MTT 法检测不同组细胞存活率

图 2 siRNA 对 CVB3 导致的细胞病变的抑制

2.3 RNA 水平上 siRNA 对 CVB3 病毒的抑制

Real-time PCR 方法结果显示 siRNA-5 对病毒的抑制率最高,为 84%,siRNA-8 次之,为 82%,siRNA-11 最低仅为 28%。siRNA-PC、siRNA-3、siRNA-4、siRNA-9 和 siRNA-10 分别为:62%、72%、80%、72%和 63%。所有数据进行了三个重复实验,三次重复之间进行比较, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$ (图 3)。

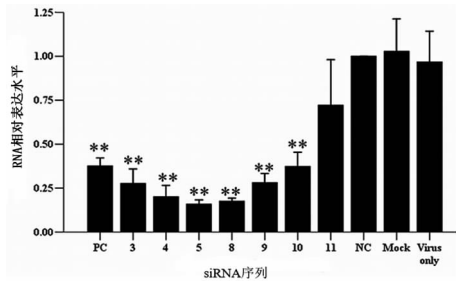


图 3 mRNA 水平检测 siRNA 的抑制效果

2.4 蛋白水平上检测 siRNA 对 CVB3 的抑制

VP1 蛋白的特异性条带出现在所有感染 CVB3 的细胞组中,三个对照组 virus only、mock 和 siRNA-NC 处理的 HeLa 细胞中 VP1 蛋白表达的量相差不大,均较多。但 siRNA-5、siRNA-8、siRNA-4 处理的 HeLa 细胞中 VP1 蛋白的量明显减少。所有数据进行了三个重复实验,三次重复之间进行比较, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$ 。见图 4。

2.5 siRNA 处理后 CVB3 毒价的变化

毒价滴定结果显示,siRNA-11 对病毒的抑制率最低,与 siRNA-NC 相比,CVB3 的毒价只降低了 0.7log₁₀。其中 siRNA-5 的抑制率最高,CVB3 的毒价下降了 2log₁₀。与 MTT、CPE、Western blot 和 real-time PCR 结果相吻合,siRNA 对 CVB3 的抑制率依是:siRNA-5 > siRNA-8 > siRNA-4 > siRNA-3 > siRNA-9 > siRNA-10 > siRNA-11 (见图 5)。所有数据进行了三个重复实验,三次重复之间进行比较, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$ 。

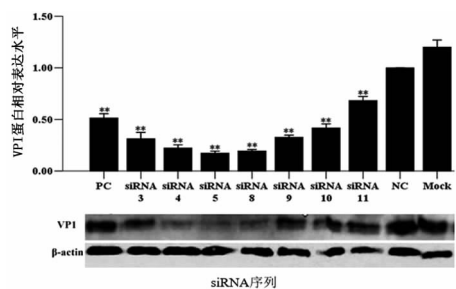


图 4 蛋白水平检测 siRNA 对 CVB3 的抑制

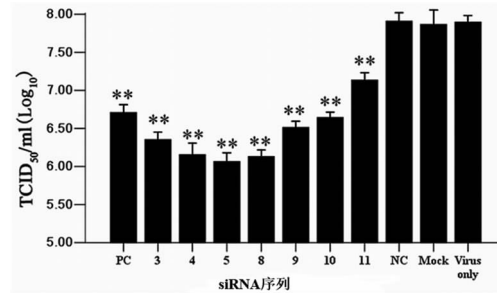


图 5 siRNA 对 CVB3 毒价的抑制

3 讨论

柯萨奇病毒 B3 呈球形,直径约 22 ~ 30nm,为单股正链 RNA,全长由 7396 个碱基组成,具有 mRNA 活性和感染性^[17]。依功能分区为 5'端非编码区(5'-untranslated region, 5'-UTR)、P1 区、P2 区、P3 区、3'端非编码区(3'-UTR)和一个 Poly(A) 尾,CVB3 可以引起很多疾病,至今尚无有效治疗手段。部分研究表明,在哺乳类细胞,甚至人类细胞中导入 21 ~ 23 个核苷酸(nucleotide, nt)的短双链 RNA(small interfering RNA, siRNA)可使靶向基因的表达产生明显的特异性强抑制效应,而且不会诱发免疫反应和细胞毒性,因此 siRNA 应用于临床治疗成为可能^[18]。

CRE 对病毒复制是必不可缺的,在 CVB3 基因组中 3'-UTR 区、5'-UTR 区和 2C 区各有一个 CRE 存在。研究发现一旦病毒的 CRE 遭到破坏,其在宿主体内的复制将会受到严重影响,因 3'-UTR 区和 5'-UTR 区不是设计 siRNA 的适宜靶点,故很多研究选取 2C 区的 CRE 为靶点进行研究。Merl 等^[11]的研究已证实在 EV71 和 CAV24 两种病毒中在其基因序列中的 2C 区 CRE 部分设计的 siRNA 序列有效的沉默了这两种病毒的致病性。然而针对 CVB3 目前仅有 Kim 等^[12]组成的团队在其 2C 区的 CRE 部分发现了一条沉默效率较高的 siRNA 靶序列,那么在 CVB3 基因组中 2C 区 CRE 以外的部分是否是设计 siRNA 的有效靶点迄今为止没有任何研究证实。为此,本研究设计了 siRNA-5 和 siRNA-6 两条 siRNA 序列,它们均以 2C 区 CRE 以外的基因序列为靶点。本文结果显示本次筛选的 11 条 siRNA 序列中,siRNA-5 对 CVB3 的抑制率最高,其沉默效率高达 84%,经 siRNA-5 处理的 HeLa 细胞组其细胞活率达到了 86%。首次证实验证了 CVB3 基因组中 2C 区 CRE 以外的部分也是设计 siRNA 的有效靶点。

部分研究发现针对 2A 区为靶点设计的 siRNA 序列对病毒的沉默效率较高^[11]。本研究设计的 siRNA-3 以 2A 区为靶点,其对 CVB3 的沉默效率达到了 72%。但本研究中以 2C 区为靶点设计的 siRNA-5 对 CVB3 的沉默效率远远高于在 2A 区设计的 siRNA-3,因此,本研究团队推测 CVB3 基因组中 2A 区可能并非是设计 siRNA 靶序列最理想的区域。

本文发现了 5 条新的 siRNA 靶序列,它们对 CVB3 的沉默效率均较高,同时首次证实了 2C 区 CRE 以外的部分也是设计 siRNA 的理想靶点。本研究为防治 CVB3 感染引起的病毒性疾病提供了新的靶点和策略。

参考文献:

- [1] 李红艳,刘银芝,王慧杰,等. 羟基红花黄色素 A 对 CVB3 病毒性心肌炎小鼠血清 TNF 配体相关分子-1 A 及 IFN- γ 表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13 (10): 64-66. DOI: 10. 13935/j. cnki. sjzx. 181016.
- [2] Fung G, Luo H, Qiu Y, et al. Myocarditis [J]. Circ Res, 2016, 118 (3): 496-514. DOI: 10. 1161/circresaha. 115. 306573.
- [3] 古宏标,张丽蓉,胡太平,等. “先天性因素”不宜作为独立的致病因素提出[J]. 中国医院用药评价与分析, 2016 (S1): 213. DOI: 10. 14009/j. issn. 1672-2124. 2016. s1. 184.
- [4] Luo X, Yao H, Song J, et al. Coxsackievirus B3 infection triggers autophagy through 3 pathways of endoplasmic reticulum stress [J]. Biomed Environ Sci, 2018, 31 (12): 867-875. DOI: 10. 3967/bes2018. 115.
- [5] Ren L, Ding S, Song Y, et al. Profiling of rotavirus 3' UTR-binding proteins reveals the ATP synthase subunit ATP5B as a host factor that supports late-stage virus replication [J]. Biol Chem, 2019 (online). DOI: 10. 1074/jbc. RA118. 006004.
- [6] 王帅,孔霞,张国安,等. RNAi 介导 ObR 基因沉默对人乳头状甲状腺癌 K1 细胞增殖与侵袭能力的影响 [J]. 济宁医学院学报, 2015, 38 (2): 99-102. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2015. 02. 006.
- [7] 秦燕霞,李京,柳新平. siRNA 沉默 B7-H4 基因对人卵巢癌细胞增殖能力的影响 [J]. 济宁医学院学报, 2016, 39 (5): 320-323. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2016. 05. 005.
- [8] Ahn J, Jun ES, Lee HS, et al. A small interfering RNA targeting coxsackievirus B3 protects permissive HeLa cells from viral challenge [J]. Virol, 2005, 79 (13): 8620-8624. DOI: 10. 1128/jvi. 79. 13. 8620-8624. 2005.
- [9] Merl S, Michaelis C, Jaschke B, et al. Targeting 2A protease by RNA interference attenuates coxsackieviral cytopathogenicity and promotes survival in highly susceptible mice [J]. Circulation, 2005, 111 (13): 1583-1592. DOI: 10. 1161/01. cir. 0000160360. 02040. ab.
- [10] Merl S, Wessely R. Anti-coxsackieviral efficacy of RNA interference is highly dependent on genomic target selection and emergence of escape mutants [J]. Oligonucleotides, 2007, 17 (1): 44-53. DOI: 10. 1089/oli. 2007. 0057.
- [11] Yuan J, Cheung PK, Zhang HM, et al. Inhibition of coxsackievirus B3 replication by small interfering RNAs requires perfect sequence match in the central region of the viral positive strand [J]. Virol, 2005, 79 (4): 2151-2159. DOI: 10. 1128/jvi. 79. 4. 2151-2159. 2005.
- [12] Kim YJ, Ahn J, Jeung SY, et al. Recombinant lentivirus-delivered short hairpin RNAs targeted to conserved coxsackievirus sequences protect against viral myocarditis and improve survival rate in an animal model [J]. Virus Genes, 2008, 36 (1): 141-146. DOI: 10. 1007/s11262-007-0192-y.
- [13] Knowlton KU, Jeon ES, Berkley N, et al. Mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3 [J]. Virol, 1996, 70 (11): 7811-7818. DOI: 10. 1111/j. 1365-2893. 1996. tb00107. x.
- [14] Slifka MK, Pagarigan R, Mena I, et al. Using recombinant coxsackievirus B3 to evaluate the induction and protective efficacy of CD8 + T cells during picornavirus infection [J]. Virol, 2001, 75 (5): 2377-2387. DOI: 10. 1128/jvi. 75. 5. 2377-2387. 2001.
- [15] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interfering is mediated by 21-and-22-nucleotide RNAs [J]. Genes Dev, 2001, 15 (2): 188-200. DOI: 10. 1101/gad. 862301.
- [16] Reynolds A, Leak D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22 (3): 326-330 DOI: 10. 1038/nbt936.
- [17] Kim K, Kanno T, Chapman NM, et al. Genetic determinants of virulence in the group B coxsackieviruses [J]. Future Virol, 2006, 1 (15): 597-604. DOI: 10. 2217/17460794. 1. 5. 597.
- [18] Grimm D. Small silencing RNAs: state-of-the-art [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61 (9): 672-703. DOI: 10. 1016/j. addr. 2009. 05. 002.

(收稿日期 2020-01-09)

(本文编辑:石俊强)