

靶向 HIV-1 *vif* 的高效人工 miRNA 的构建及慢病毒介导的体外抗病毒研究

张涛,程通*,魏丽华,张雅丽,王颖彬,蔡毅君,张军,夏宁邵

(厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,厦门 361005)

摘要: RNAi 在 HIV-1 的治疗研究中得到了广泛的应用,构建高效并且安全的 RNAi 抗病毒元件是开展相关研究的基础。*vif37* 是以前的研究中筛选获得的靶向 HIV-1 *vif* 的高抑制效率兼具保守性的 RNAi 靶点。miRNA 在抑制效率和启动子的选择上比常用的 shRNA 具有优势。本研究探索以人工 miRNA 结构引发 *vif37* 靶点对应的 RNAi。本研究以天然的 miR-155 前体为骨架,采用步移的方式设计了 3 个靶向 *vif37* 的人工 miRNA,以 RNA 聚合酶 Ⅱ 类启动子指导表达。miRNA 表达质粒和 HIV-1 的感染性克隆 pNL4-3 共转染的结果显示,3 个人工 miRNA 中只有 miR-*vif37*H 具有抑制效果,效率与 shRNA-*vif37* 相当。与携带靶序列的荧光素酶报告质粒共转染实验证明 miR-*vif37*H 具有良好的抑制特异性。用表达 miR-*vif37*H 的重组慢病毒转导 HIV-1 的敏感细胞 MT-4,克隆化后获得稳定表达 miR-*vif37*H 的细胞株 MT-4-miR37H,该细胞可以有效抑制 HIV-1 的体外复制。实时 RT-PCR 检测结果显示,与 shRNA-*vif37* 相比,miR-*vif37*H 的表达水平明显下降,安全性更好。进一步的实时 RT-PCR 检测结果还显示,miR-*vif37*H 在细胞内的稳定表达不会影响内源代表性 miRNA (miR-181 和 miR-16) 的加工以及干扰素应答相关基因 *Stat1* 的 mRNA 水平。miR-*vif37*H 是一个特异的高效 RNAi 元件,为 *vif37* 靶点的进一步应用研究奠定了基础。

关键词: RNA 干扰; HIV-1; *vif*; 人工 miRNA

中图分类号: R373.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2010)01-0008-08

RNAi 是转录后水平序列特异性的抑制基因表达的一种天然机制,在 HIV-1 的抗病毒研究中得到了广泛的应用。通过 RNA 聚合酶 Ⅱ 类启动子在细胞内表达短发卡 RNA (shRNA),是目前广泛使用的引发特异性 RNAi 的方法。但是 Ⅱ 类启动子的高表达活性会导致过量的 shRNA 产生,干扰内源性 miRNA 的加工过程,引起可观测的细胞毒性^[1],甚至动物致死性^[2]。如何在细胞内高效、低毒的引发 RNAi,是 HIV-1 抗病毒研究中需要解决的问题。

miRNA 由高等真核生物基因组编码,其前体 (pri-miRNA) 多数位于基因的非编码区^[3],含有类似 shRNA 的发卡结构,由 RNA 聚合酶 Ⅱ 类启动子指导表达^[4-6],是一种天然 RNAi 诱导分子。RNA 聚合酶 Ⅱ 类启动子的表达量较低^[7,8],其中还包括组织特异性启动子和诱导性启动子,有助于避免过量表达引起毒副作用。有报道显示,用人工

miRNA 引发靶向 HIV-1 的 RNAi,可以有效的抑制病毒复制^[8],比 shRNA 的抑制效率更高^[9]。*vif37* 是通过筛选 shRNA 表达结构获得的靶向 HIV-1 *vif* 的高抑制效率兼具保守性的 RNAi 靶点^[10]。为了提高 *vif37* 靶点进一步应用的安全性,本研究以天然 miRNA 为骨架,设计了靶向 *vif37* 的人工 miRNA,将其置于基因的 3'UTR 区,使用聚合酶 Ⅱ 类启动子表达,并进一步检测了人工 miRNA 的抑制特异性、体外抗病毒效果和脱靶效应。*vif37* 靶点相关人工 miRNA 的成功构建为该靶点的进一步应用奠定了基础。

材料与方法

1 细胞株和质粒 MT-4 细胞、大肠杆菌 DH5 菌株由本实验室保存。pSUPER 质粒购自 Oligoengine 公司。携带荧光素酶基因的报告质粒 pGL3-control 购自 Promega 公司。慢病毒包装质粒以及 293FT 细胞购自 Invitrogen 公司,慢病毒转移质粒 pLL3.7 赠自韩家淮教授^[11]。H-2K^K 基因的表达质粒 pMACS K^K 购自 Miltenyi 公司。报告质粒 pGL3-*vif* 或 pGL3-*gag* 为本实验室构建^[10]。pNL4-3 从 NIH AIDS Research & Reference Reagent Program 获得。

2 试剂 限制性内切酶、连接酶购自大连宝生物工程公司。核酸提取试剂盒购自北京天根公司。脂质体 Lipofectamine

收稿日期:2009-09-01; 修回日期:2009-11-20

基金项目:福建省自然科学基金计划资助项目(基金项目编号: C0710041)

作者简介:张涛(1978-),男(土家族),博士研究生,湖北人,主要从事分子病毒学研究, Tel: 0592-2184113; E-mail: zhangtnidvd@xmu.edu.cn

*通讯作者:程通, Tel: 0592-2184113; E-mail: tcheng@xmu.edu.cn

2000、RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司。DMEM、1640 培养基购自 Gibco 公司。polybrene 购自 Sigma 公司。DEAE Dextran 购自 Sigma 公司。细胞培养用胎牛血清 (FBS) 购自 Hyclone 公司。引物由上海生工生物工程有限 公司合成。Luciferase Reporter Assay Kit 购自 Promega 公 司。NCod miRNA First-Strand cDNA Synthesis kit 和 Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG kit 购自 Invitrogen 公司。IFN Response Watcher kit 购自 TaKaRa 公司。-半 乳糖苷酶原位染色试剂盒购自碧云天生物技术研究所。 HIV ELISA 检测试剂盒购自北京万泰公司。

3 pLLK^K 表达载体的构建 以 pMACSK^K II 质粒为模板 通过 PCR 方法扩增 H-2 K^K 表达框序列, PCR 引物序列分别 为: 5'-TTTACTA GTCA TGTTTGACA GCTTA TCA TCG 3'

和 5'-TTTCTCGA GA TACAA GGA TCCA TCTACCCTCT- TTTCCACC-3'。PCR 产物经回收后用 *Spe*I 和 *Xho*I 进行双 酶切处理,然后连接到经 *Xba*I 和 *Xho*I 双酶切处理的慢病毒 转移载体 pLL3.7,连接物转化大肠杆菌 DH5 感受态菌株, 经酶切鉴定获得 pLL K^K 表达载体。

4 人工 miRNA 表达载体的构建 如表 1 所示,合成各靶点 miRNA 构建所需的引物,以 ddH₂O 溶解至终浓度为 60mmol,将每对互补引物各 3μl 加入 24μl 的复性缓冲液中, 95 4min,70 10min 后逐步冷却至 4 。退火产物用 T4 连接酶连接到经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切的 pLL KK 载体,转 化大肠杆菌 DH5 感受态菌株,经酶切鉴定获得所需的 miRNA 表达载体。

表 1 用于 miRNA 合成的引物序列

Table 1 The sequences of primers used for miRNAs construction

Name	Primer sequence
miR-vif37Hf	5- <u>GATCCT</u> GCTGAA <i>GTA GA CA GGA TGA GGA TTA</i> GTTTTGGCCACTGA CTGACTAA TCCTCA TCCTGTCTACTTCA GGAC-3
miR-vif37Hr	5-TCGA GTCCTGAA GTA GACA GGA TGA GGA TTA GTCA GTCA GTGGCC AAAAC TAA TCCTCA TCCTGTCTACTTCA GCA G-3
miR-vif37Jf	5- <u>GATCCT</u> GCTGAA <i>GTA GA CA GGA TGA GGA TTA</i> GTTTTGGCCACTGAC TGACCTAA TCCTCA TCCTGTCTACTTCA GGAC-3
miR-vif37Jr	5-TCGA GTCCTGAA GTA GACA GGA TGA GGA TTA GGTCAGTCA GTGGCCAAAA CCTAA TCCTCA TCCTGTCTACTTCA GCA G-3
miR-vif37Kf	5- <u>GATCCT</u> GCTGGA <i>GTA GA CA GGA TGA GGA TTA</i> GA GTTTTGGCCACTGACTG ACTCTAA TCCTCA TCCTGTCTACCA GGAC-3
miR-vif37Kr	5-TCGA GTCCTGGTA GACA GGA TGA GGA TTA GA GTCA GTCA GTGGCC AAAAC TCTAA TCCTCA TCCTGTCTACCA GCA G-3
miR-LacZf	5-GA TCCTGCTGAAA <i>TCGCTGA TTTGTGTA GTCG</i> TTTTGGCCACTGACT GACGACTACACA TCA GCGA TTCA GGAC-3
miR-LacZr	5-TCGA GTCCTGAAA TCGCTGA TTTGTGTA GTCGTCAGTCA GTGGCC AAAACGACTACACA TCA GCGA TTCA GCA G-3

Sequence in italics is the RNAi target sequence

5 共转染实验检测 miRNA 的抑制效率 0.3μg 的 miRNA 表达质粒和 0.3μg 的 pNL4-3 混合,用脂质体 Lipofectamine 2000 转染 24 孔板中的 293FT 细胞 (2.0 × 10⁵ 个/孔),转染 后 72h 收集细胞培养上清,样品经 10 倍梯度稀释后用 HIV-1 ELISA 试剂盒检测 p24 蛋白的活性。

6 与 Luciferase 报告质粒共转染检测 miRNA 抑制特异性

0.5μg 的 miRNA 表达质粒与 0.1μg 的荧光素酶报告质粒 (pGL3-control,pGL3-vif 或 pGL3-gag) 混合,用脂质体 Lipofectamine 2000 转染 24 孔板中的 293FT 细胞 (2 × 10⁵ 个/孔),转染后 48h 用 Luciferase Reporter Assay Kit 检测细胞裂解液中荧光素酶的活性。

7 重组慢病毒的制备和鉴定 293FT 细胞以 5 × 10⁶ 个铺于 10cm 细胞培养皿中,6h 后用 Lipofectamine 2000 将 18μg 包装质粒混合物、6μg 的 pLL K^K-miRNA 和 6μg 的 pSUPER-Drosha (携带靶向细胞 Drosha 基因的 siRNA 表达元件,siRNA 靶序列为 AACGAGUAGG CUUCGU GAC-UU^[12]) 混合转染,转染 12h 后更换为完全培养基,72h 后收

集细胞培养上清。重组慢病毒用 293FT 细胞转导实验鉴定其效价,将 293FT 细胞铺于 24 孔细胞培养板 (5 × 10⁴ 个/孔),6h 后分别加入 100μl 经 10 倍梯度系列稀释后的待测病毒。培养 48h 后用流式细胞仪 (Beckman Coulter EPICS XL) 检测孔中表达 EGFP 的细胞数量,测定重组病毒的滴度 (TU/mL)。

8 重组慢病毒转导 MT-4 细胞及稳定表达细胞株的获得 将 1 × 10⁵ 个 MT-4 细胞铺于 24 孔细胞培养板中,加入 polybrene 至终浓度为 6μg/mL,慢病毒用量为 MOI = 40,室温 600g 水平离心 60min,12h 后换液。感染 4d 后的细胞用有限稀释法进行克隆化,筛选可稳定表达 EGFP 的细胞株。

9 miRNA 水平的检测 用 Trizol 试剂提取细胞的总 RNA,用 NCod miRNA First-Strand cDNA Synthesis kit 和 Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG kit 检测样品中的成熟 miRNA 分子的水平。以内源性 U6B RNA 分子为 PCR 内参^[13],miRNA 特异性检测引物序列如表 2 所示。

表 2 用于 Real-time PCR 检测的引物序列

Table 2 The sequences of primers used for Real-time PCR

Primer name	Primer sequence
miR-181	5'-AACAATTCAACGCTGTCGGTG-3'
miR-16	5'-TAGCAGCACGTAATAATTGGC-3'
U6B	5'-ATGACACGCAAAATTCGTGAAGC-3'

10 IFN 效应相关基因 *stat1* 的检测 提取细胞的总 RNA, 采用 TaKaRa 公司的 IFN Response Watcher kit 及 Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG kit 进行检测, 检测过程参照产品说明书进行。

11 HIV-1_{NL4-3} 制备与鉴定 将 293FT 细胞铺于 6 孔板中 (8×10^5 个/孔), 6h 后用脂质体转染 pNL4-3 质粒, 12h 后更换为完全培养基, 72h 后收集含有 HIV-1_{NL4-3} 的细胞培养上清, 病毒效价用 TZM-b1 细胞鉴定。将 TZM-b1 细胞铺于 96 孔细胞培养板 (1×10^4 个/孔), 6h 后分别加入 50 μ l 经 10 倍梯度系列稀释后的待测病毒, 加入 DEAE Dextran 至终浓度为 20 μ g/mL。培养 48h 后用 -半乳糖苷酶原位染色试剂盒显色, 通过检测样品孔中的蓝斑数量, 测定病毒滴度 (IU/mL) = 蓝斑数量 \times 稀释倍数 \times 20。

12 HIV-1_{NL4-3} 感染 MT-4 细胞 5×10^5 个 MT-4 细胞或改造后的 MT-4 细胞铺于 24 孔细胞培养板中, 加入 HIV-1_{NL4-3} 感染 12h 后用无血清培养基洗涤 2 次, 继续维持培养, 在不同时间点收集细胞培养上清样品并检测 p24 蛋白的含量。

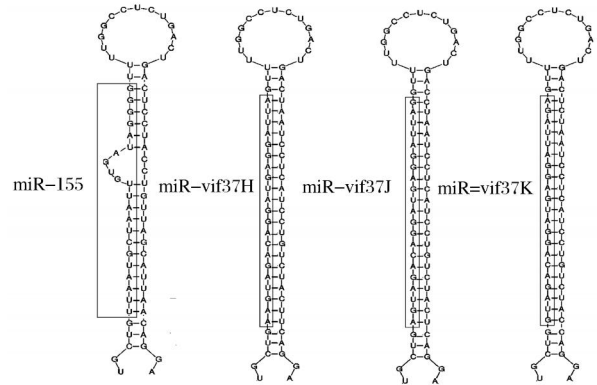
结 果

1 靶向 *vif37* 的人工 miRNA 的构建

vif37 是 HIV-1 基因组中一段高度保守的序列, Los Alamos HIV Sequence Database 的 625 个 HIV-1 全基因序列包含了 HIV-1 已知的所有亚型, 其中 66% 的病毒在 *vif37* 序列区没有突变, 26% 的病毒只有一个突变^[14]。miR-155 是目前剪切位点研究较为清楚的天然 miRNA^[15], 本研究选择 miR-155 作为骨架构建靶向 *vif37* 的人工 miRNA。研究已显示, 靶点序列仅移位 1nt 的 siRNA 可能在抑制效率存在较大的差别^[16]。为了提高人工 miRNA 的设计成功率, 本研究从 *vif37* 上游第二个碱基向 3 端步移, 设计了 3 个用于构建人工 miRNA 的靶序列, 分别为 *vif37H*、*vif37J*、*vif37K*。根据这些靶点序列, 设计完全互补的双链 RNA, 替换 miR-LacZ 前体中的 miRNA 序列, 得到靶向 *vif37* 的人工 miRNA 表达结构 miR-*vif37H*、miR-*vif37J* 和 miR-*vif37K* (图 1)。

2 不同人工 miRNA 表达元件的抑制效率检测

本研究用共转染的方法检测人工 miRNA 对

图 1 靶向 HIV-1 *vif37* 靶点的人工 miRNA 的结构Figure 1 Structures of the artificial miRNAs targeted to HIV-1 *vif37*

HIV-1 的抑制效率。慢病毒载体 pLL K^K 的 H-2 K^K 基因用 RNA 酶聚合酶 II 类启动子 H-2 K^K 指导表达。miR-*vif37H*、miR-*vif37J* 和 miR-*vif37K* 被构建到 H-2 K^K 基因的 3' UTR 区, 分别得到表达人工 miRNA 的慢病毒转移质粒 pLL K^K-miR-*vif37H*、pLL K^K-miR-*vif37J*、pLL K^K-miR-*vif37K*。将表达 miRNA 的慢病毒转移质粒分别与 HIV-1 感染性克隆质粒 pNL4-3 共转染 293FT 细胞, 48h 后检测细胞培养上清中的 HIV-1 p24 蛋白的活性。表达 shRNA-*vif37* 的 pSUPER 质粒作为阳性对照, 表达靶向 *LacZ* 基因的人工 miRNA 的 pLL K^K 质粒为阴性对照。结果如图 2 所示, miR-*vif37H* 具有和 shRNA-*vif37* 相当的良好抑制效果, 而 miR-*vif37J* 和 miR-*vif37K* 的抑制效果很弱。这个结果说明序列差异很小的 siRNA 在抑制效果上可能存在较大的差异, 与文献报道^[16] 一致, 同时也证明了采用步移法设计多个人工 miRNA 的必要性。以上的实验初步证实, miR-*vif37H* 是一个有效的人工 miRNA 表达结构, 但是还需要进一步的实验评价其应用潜力。

3 miR-37H 的抑制特异性分析

本研究用共转染荧光素酶报告基因的方法检测 miR-37H 的抑制特异性。荧光素酶表达质粒 pGL3-control 的终止密码子和 ployA 之间插入 *vif37* 及其相邻序列得到报告质粒 pGL3-*vif37*, 插入 *gag* 基因得到报告质粒 pGL3-*gag*^[14]。同时构建靶向荧光素酶的 shRNA 表达质粒作为对照^[14]。将表达 miR-*vif37H* 的慢病毒转移质粒或者表达 shRNA-luc 的 pSUPER 的质粒与荧光素酶报告质粒共转染 293FT 细胞, 转染 24h 后检测荧光素酶的活性。如图 3 所示, miR-*vif37H* 能够抑制 pGL3-*vif37*

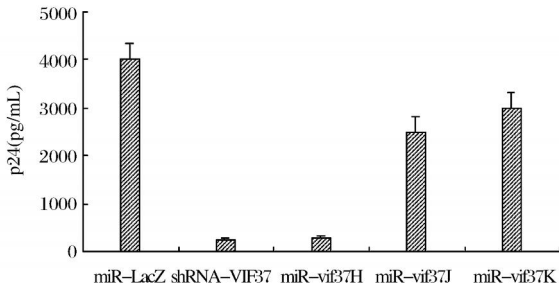


图 2 共转染 293FT 细胞检测不同 miRNA 的抑制效率
Figure 2 Analysis of the inhibit efficiency of different miRNAs in co-transfection experiments

的表达,但是不能抑制 pGL3-control 和 pGL3-gag 的表达,这说明 miR-vif37H 的抑制活性是特异性的靶向 vif37 靶序列。

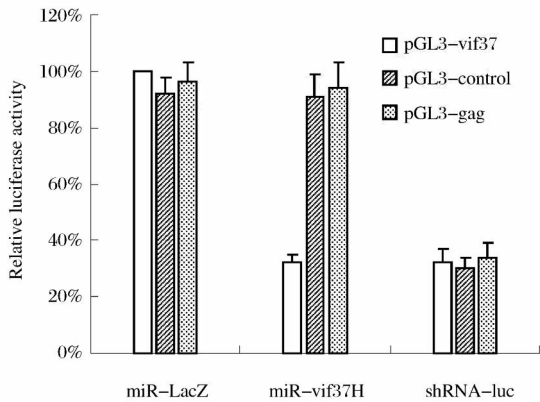


图 3 miR-vif37H 的抑制特异性分析
Figure 3 Analysis of inhibit specificity of miR-vif37H

4 重组慢病毒的构建及稳定表达 miR-vif37H 的 MT-4 细胞的获得

慢病毒载体系统来源于 HIV-1,可将外源基因稳定的整合到目的细胞,在 HIV-1 的抗病毒研究中得到了广泛的应用^[17]。本研究所用的慢病毒载体系统带有 EGFP 表达元件,可用于快速检测重组病毒效价对靶细胞的基因转移效率,并便于检测慢病毒转导后细胞的克隆化效果^[11]。MT-4 细胞是一种 HIV-1 受体细胞,可在体外支持 T 嗜性 HIV-1 的复制^[18, 19]。在抑制 Drosha 表达的 293FT 细胞中制备表达 miR-vif37H 的重组慢病毒,转导 MT-4 细胞。本研究构建的重组慢病毒载体同时带有 miRNA 和报告基因 EGFP 表达元件,转导后的 MT-4 细胞可同时表达 EGFP,因此可通过以 EGFP 作为标记筛选转导后的细胞,获得可稳定表达报告基因的细胞株 MT-4-miR37H。流式细胞仪检测结果显示(图 4)该细胞的 EGFP 表达阳性率接近 100%。

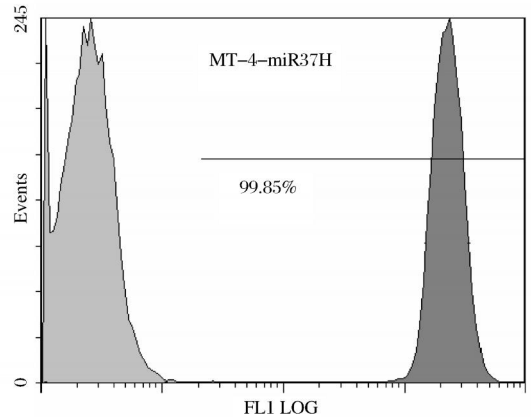


图 4 报告基因在细胞克隆 MT-4-miR37H 中的表达效率

Figure 4 Flow cytometry expression analyses of GFP reporter to reveal the stable expression of miR-vif37H in the MT-4-miR37H cells

5 稳定表达 miR-vif37H 的 MT-4 细胞对 HIV-1_{NL4-3} 的抑制作用

HIV-1_{NL4-3} 为 B 亚型、T 细胞嗜性的病毒,可有效感染并在 MT-4 细胞中复制。HIV-1_{NL4-3} 攻毒实验的剂量为 MOI=0.21,在攻毒后的不同时间分别收集细胞培养上清检测 p24 蛋白的活性。未转导的 MT-4 细胞和不表达 miRNA 的重组慢病毒 lenti^K 转导的 MT-4 细胞(MT-4-H2K)作为攻毒实验阴性对照。结果如图 5 所示,稳定表达 miR-vif37H 的 MT-4 细胞可抑制 HIV-1_{NL4-3} 的复制。

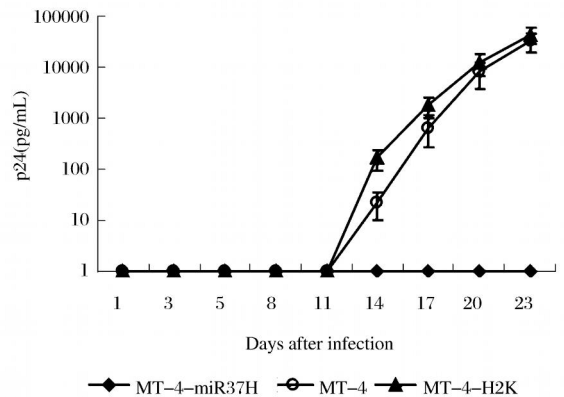


图 5 HIV-1_{NL4-3} 的复制在 MT-4-miR37H 细胞中受到抑制
Figure 5 Inhibition of HIV-1_{NL4-3} replication in MT-4-miR37H cells

6 miR-vif37H 在 MT-4 细胞中的表达水平与脱靶效应检测

本研究进一步检测了人工 miRNA 的表达水平及其表达对内源性 miRNA 和干扰素应答反应的影响。将表达 shRNA-vif37 的 pSUPER 质粒和

表达 miR-vif37H 的慢病毒转移质粒分别转染 293FT 细胞,转染后 48h 用实时 RT-PCR 检测细胞内 siRNA 的水平,结果显示 miR-vif37H 表达的 siRNA 约为 shRNA-vif37 的 20% (图 6, A)。shRNA 在细胞内的过量的表达会干扰内源天然 miRNA 的加工^[2]。miR-181 和 miR-16 是天然的 miRNA,可作为检测指标显示外源 RNAi 元件对内源性 miRNA 加工的影响^[20]。用实时 RT-PCR 检测细胞内成熟 miRNA 分子的含量,结果显示在 MT-4-miR37H 细胞和 MT-4 细胞中,成熟的 miR-181 和 miR-16 没有丰度差异 (图 6, B),这说明 miR-vif37H 在细胞内的稳定表达不会影响天然 miRNA 的加

工。双链 RNA 是干扰素反应的天然诱导分子, miR-vif37H 含有长发卡结构,因此需要检测其是否会诱发干扰素免疫反应^[21]。本文以 *stat1* 的表达水平显示干扰素免疫反应的强度^[22]。分离 MT-4-miR37H 的总 RNA,反转录后,用 Real-time PCR 检测细胞中的 *stat1* 的 mRNA 水平,未感染慢病毒的 MT-4 细胞作为对照。结果显示 (图 6, C),两种细胞内的 *stat1* 的 mRNA 含量在同一水平,说明 miR-vif37H 在细胞内的稳定表达不会引发干扰素免疫反应。根据以上检测结果,可以初步认为 miR-vif37H 的表达水平相对于 shRNA-vif37 明显下降,其在细胞内的稳定表达没有可检测的脱靶效应。

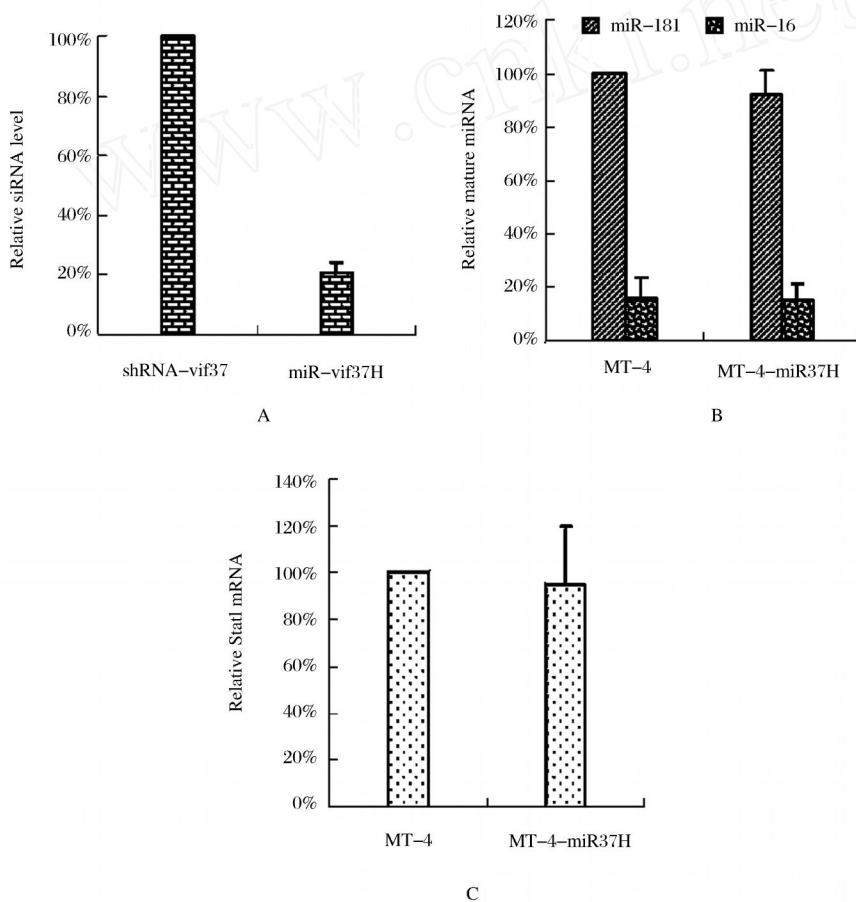


图 6 miR-vif37H 的表达水平及脱靶效应分析

Figure 6 Analysis of expression level and off-target effects of miR-vif37H

A. Expression levels of mature miR-vif37H compared with shRNA; B. Mature miRNA levels of miR-16 and miR-181 in MT-4 and MT-4-miR37H; C. *Stat1* mRNA levels in MT-4 and MT-4-miR37H.

讨 论

RNAi 技术在 HIV-1 的抗病毒研究中获得了

广泛的应用。在细胞内表达 shRNA 是最常使用的引发 RNAi 的方法,采用该方法我们筛选获得了一个高抑制效率兼具保守性的 RNAi 靶点 vif37。siRNA 和 miRNA 均能引发 RNAi,但是

两者在表达方式上存在差异。shRNA 的末端结构对 Dicer 蛋白的识别剪切极为重要,指导 shRNA 表达的启动子一般采用能精确的控制转录的起始和终止的 RNA 聚合酶 类启动子(H1 或 U6)。但是 RNA 聚合酶 类启动子的转录活性很高,会产生高丰度的 shRNA,干扰天然 miRNA 的加工,引发细胞毒性^[21]。天然的 miRNA 前体通常位于基因的 UTR 区,在 RNA 聚合酶 类启动子的指导下表达。RNA 聚合酶 类启动子的表达活性较低,其中还包括一些组织特异性启动子和诱导表达型启动子,有助于降低 miRNA 过量表达引发毒副作用的可能性。本研究以天然的 miR-155 为骨架,构建了靶向 *vif37* 的人工 miRNA (miR-*vif37H*),用 RNA 聚合酶 类启动子 H-2K^K 指导表达。miR-*vif37H* 能够特异性的引发 RNAi,在保持抑制效率的前提下,表达水平明显降低,具有明显的细胞保护性效果,没有检测到明显的脱靶效应,是一个良好的 RNAi 元件,为 *vif37* 靶点的进一步研究奠定了基础。

Vif 蛋白可以帮助 HIV-1 逃逸天然免疫系统的抑制作用,对其作用机制的研究解释了 *vif37* 靶点高度保守的原因。APOBEC3F 属于天然免疫家族成员,具有胞嘧啶脱氨酶活性,在 HIV-1 复制过程中可包装进入病毒颗粒。在 HIV-1 的逆转录过程中, APOBEC3F 在病毒基因组中引入广泛的超突变,从而发挥抗病毒作用。HIV-1 编码的 Vif 蛋白可以结合 APOBEC3F 并通过泛素-蛋白酶体的降解途径来拮抗其抗病毒活性。Vif 的 DRMR 区是 Vif 与 APOBEC3F 相互作用的直接结合位点,该区段一个氨基酸的突变就能消除 Vif 对 APOBEC3F 的降解作用^[23]。*vif37* 靶序列的中部是 DRMR 的编码序列位,因此极为保守。

siRNA 和 miRNA 均能引发 RNAi,但是两者在来源、加工过程以及作用机制上均存在差别。siRNA 主要由病毒感染的双链 RNA 和基因转移载体表达的 shRNA 所引起,经过 Dicer 的剪切后,得到完全互补的 siRNA 分子,通过切割 mRNA 的方式高度序列特异性的抑制基因表达。miRNA 前体由细胞基因组编码,先后经过 Drosha-DGCR8 复合体和 Dicer 的剪切后,成为非完全互补的成熟的 miRNA 分子,通过非降解的翻译抑制方式调控基因的表达,miRNA 和靶 mRNA 不完全互补,通常一个 miRNA 可以抑制多种 mRNA 分子的表达^[24]。miRNA 较低的抑制特异性不利于其作为基因沉默

工具用于比较深入的抗病毒研究,因为这会增加抑制宿主蛋白表达的风险。有报道显示,将天然的 miRNA 前体分子中的非互补碱基改变为互补碱基,会导致对应的成熟 miRNA 分子在细胞内被识别为 siRNA^[25]。本研究为了提高人工 miRNA 的特异性,将完全互补的双链 RNA 置入 miR-155 的骨架。本研究发现虽然 miR-*vif37H* 的表达量的表达明显低于 shRNA-*vif37*,但是在共转染实验中对 HIV-1 的抑制效果类似,其原因可能是 miRNA 的抑制效率更高^[9]。

慢病毒载体来源于 HIV-1 能够高效的感染造血干细胞及 T 淋巴细胞是 HIV-1 基因治疗研究中应用的最为广泛的基因转移载体。制备高滴度的表达 miR-*vif37H* 的重组慢病毒是本研究体外攻毒实验的基础。*vif37* 靶点位于 pol 和 *vif* 的重叠区,慢病毒包装质粒 pLP1 表达 gag-pol 基因。因此,编码 miR-*vif37H* 的慢病毒转移质粒会抑制包装质粒 pLP1 的表达,降低慢病毒的滴度。在以前的研究中,采用同义密码子替换的方式突变 pLP1 中的 *vif37* 靶序列,可以消除 shRNA-*vif37* 对包装质粒的表达抑制,恢复表达 shRNA-*vif37* 的慢病毒滴度^[10]。本研究发现,采用突变后的 pLP1 制备表达 miR-*vif37H* 的慢病毒,虽然 pLP1 表达量得到有效恢复,但是慢病毒的滴度仍然很低。经过多种尝试,本研究在慢病毒制备过程中通过添加抑制 Drosha 表达的 siRNA,有效提高了表达 miR-*vif37H* 的慢病毒滴度,其具体机制尚待深入研究。

参考文献:

- [1] An D S, Qin F X, Auyeung V C, et al. Optimization and functional effects of stable short hairpin RNA expression in primary human lymphocytes via lentiviral vectors[J]. Mol Ther, 2006, 14(4):494-504.
- [2] Grimm D, Streetz K L, Jopling C L, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways[J]. Nature, 2006, 441(7092):537-541.
- [3] Cai X, Hagedorn C H, Cullen B R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs[J]. Rna, 2004, 10(12):1957-1966.
- [4] Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II[J]. EMBO J, 2004, 23(20):4051-4060.
- [5] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing[J]. Nature, 2003,

- 425(6956) :415-419.
- [6] Cullen B R. Transcription and processing of human microRNA precursors [J]. *Mol Cell*, 2004, 16(6) : 861-865.
- [7] Boden D, Pusch O, Silbermann R, et al. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(3) : 1154-1158.
- [8] Lo H L, Chang T, Yam P, et al. Inhibition of HIV-1 replication with designed miRNAs expressed from RNA polymerase II promoters [J]. *Gene Ther*, 2007, 14(21) : 1503-1512.
- [9] Liu Y P, Haasnoot J, ter Brake O, et al. Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(9) : 2811-2824.
- [10] 张涛, 程通, 张亚丽. 靶向 HIV-1 vif 的高效 siRNA 的筛选及慢病毒介导的体外抗病毒研究 [J]. *病毒学报*, 2008, 24(2) : 88-95.
- [11] Rubinson D A, Dillon C P, Kwiatkowski A V, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference [J]. *Nat Genet*, 2003, 33(3) : 401-406.
- [12] Kuehbach A, Urbich C, Zeiher A M, et al. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis [J]. *Circ Res*, 2007, 101(1) : 59-68.
- [13] Wu H, Neilson J R, Kumar P, et al. miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells [J]. *PLoS One*, 2007, 2(10) : e1020.
- [14] Hassaine G, Courcoul M, Bessou G, et al. The tyrosine kinase Hck is an inhibitor of HIV-1 replication counteracted by the viral vif protein [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(20) : 16885-16893.
- [15] Dang L T, Kondo H, Aoki T, et al. Engineered virus-encoded pre-microRNA (pre-miRNA) induces sequence-specific antiviral response in addition to nonspecific immunity in a fish cell line: convergence of RNAi-related pathways and IFN-related pathways in antiviral response [J]. *Antiviral Res*, 2008, 80(3) : 316-323.
- [16] ter Brake O, Konstantinova P, Ceylan M, et al. Silencing of HIV-1 with RNA interference: a multiple shRNA approach [J]. *Mol Ther*, 2006, 14(6) : 883-892.
- [17] Strayer D S, Akkina R, Bunnell B A, et al. Current status of gene therapy strategies to treat HIV/AIDS [J]. *Mol Ther*, 2005, 11(6) : 823-842.
- [18] Schols D, Este J A, Cabrera C, et al. T-cell-line-tropic human immunodeficiency virus type 1 that is made resistant to stromal cell-derived factor 1alpha contains mutations in the envelope gp120 but does not show a switch in coreceptor use [J]. *J Virol*, 1998, 72(5) : 4032-4037.
- [19] Szabo J, Cervenak L, Toth F D, et al. Soluble gC1qR/p33, a cell protein that binds to the globular "heads" of C1q, effectively inhibits the growth of HIV-1 strains in cell cultures [J]. *Clin Immunol*, 2001, 99(2) : 222-231.
- [20] Kumar P, Ban H S, Kim S S, et al. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice [J]. *Cell*, 2008, 134(4) : 577-586.
- [21] Seth R B, Sun L, Chen Z J. Antiviral innate immunity pathways [J]. *Cell Res*, 2006, 16(2) : 141-147.
- [22] Sledz C A, Holko M, de Veer M J, et al. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(9) : 834-839.
- [23] Russell R A, Smith J, Barr R, et al. Distinct domains within APOBEC3 G and APOBEC3 F interact with separate regions of human immunodeficiency virus type 1 Vif [J]. *J Virol*, 2009, 83(4) : 1992-2003.
- [24] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2) : 281-297.
- [25] Steiner F A, Hoogstrate S W, Okihara K L, et al. Structural features of small RNA precursors determine Argonaute loading in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(10) : 927-933.

Construction of Highly Effective Artificial miRNA Targeted to HIV-1 *vif* and the Lentiviral-mediated Antiviral Research in vitro

ZHANG Tao , CHENG Tong^{*} , WEI Li-hua , ZHANG Ya-li , WANG Ying-bing ,
CAI Yi-jun , ZHANG Jun , XIA Ning-shao

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, School of
Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract : Effective and specific RNA interference (RNAi) elements are essential for the RNAi-based anti-HIV-1 research which has achieved extensive application. *vif37* targeted to HIV-1 *vif* is a highly effective and conserved RNAi target obtained from the previous study on screening. In this study, we explored the construction of artificial miRNAs to induce RNAi targeted to *vif37*, which had advantages on inhibition efficiency and flexibility of promoter selection. Three artificial miRNA targeted to *vif37* were constructed by walking method using native miR-155 as a backbone and expressed by RNA polymerase promoter. Then, expression vectors of artificial miRNA were co-transfected with HIV-1 infectious clone pNL4-3 to score its inhibition ability and showed that only miR-*vif37* had the significant inhibition efficiency similar to shRNA-*vif37*. Subsequently, co-transfections with luciferase reporter plasmids into which different target sequences were inserted proved the specificity of miR-*vif37*H. The replication of HIV-1 was inhibited in MT-4-miR37H cells which could express miR-*vif37*H stably and were cloned from MT-4 cells transduced with recombinant lentiviral vectors containing the miR-*vif37*H expression element. Real-time RT-PCR revealed that miR-*vif37*H had much lower expression level than shRNA-*vif37*. Results also showed that intracellular miR-181 and miR-16 expression levels and *stat1* mRNA levels were not effected by the expression of miR-*vif37*H in MT-4-miR37H cells. We conclude miR-*vif37* is a specific and highly effective artificial miRNA which will promote the further application of *vif37* target.

Key words : RNA interference ; HIV-1 ; *vif* ; artificial miRNA

^{*} Corresponding author: CHENG Tong, Tel: 86-592-2184113; Email: tcheng@xmu.edu.cn