

慢病毒介导的 RNA 干扰对乙型脑炎病毒感染的抑制作用

冯晓娟¹, 郑倩¹, 冯亚岚², 黄荣², 杨健², 袁磊²

(川北医学院基础医学与法医学院, 1. 机能学实验教学中心, 2. 病原生物学教研室, 四川南充 637000)

【摘要】目的: 研究由慢病毒介导的 RNA 干扰对乙型脑炎病毒 (JEV) 感染细胞与小鼠的抑制作用。**方法:** 以 JEV 的 C、NS3、NS4A 和 NS5 基因为靶点, 设计特异性 siRNA 序列, 并构建重组慢病毒。对慢病毒预处理的 BHK21 细胞接种 JEV, 并通过相对定量 PCR、病毒蚀斑和间接免疫荧光实验检测慢病毒对 JEV 的抑制作用。对慢病毒预处理的 7 日龄乳鼠脑内接种 JEV, 5 d 后测定其脑组织中的病毒滴度; 选取 3 周龄小鼠做攻毒保护实验。**结果:** 在细胞中, 4 种重组慢病毒均使 JEV 的 RNA 载量与病毒滴度降低 ($P < 0.05$), 其中 LV-C 组的 RNA 载量降低了 89.7%, 病毒滴度下降约 1 200 倍。4 组乳鼠的脑组织中, JEV 病毒滴度均降低 ($P < 0.05$), 其中 LV-C 组病毒滴度下降约 1 700 倍; 4 种重组慢病毒对 3 周龄小鼠的攻毒保护率为 50% ~ 70%。**结论:** 由慢病毒介导的靶向 JEV 的 C、NS3、NS4A 与 NS5 基因的 RNAi 对 JEV 感染细胞与小鼠具有抑制作用, 且有一定持续性, 其中靶向 C 基因的 RNAi 的抗病毒效果最强。

【关键词】 乙型脑炎病毒; 慢病毒; RNA 干扰; 抗病毒

【中图分类号】 R373.31 **【文献标志码】** A

Inhibitory effect of lentivirus mediated RNAi on Japanese encephalitis virus

FENG Xiao-juan¹, ZHENG Qian¹, FENG Ya-lan², HUANG Rong², YANG Jian², YUAN Lei²

(1. Functional Experiment Teaching Center; 2. Department of Pathogenic Biology, College of Basic Medicine and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To investigate the inhibition effect of Japanese encephalitis virus (JEV) in cells and mice by lentivirus-mediated RNA interference (RNAi). **Methods:** With the C, NS3, NS4A and NS5 bases of JEV as targets, specific siRNA sequences were designed and recombinant lentivirus was constructed. BHK21 cells pretreated with recombinant lentiviruses were inoculated with JEV, and the inhibition effect of JEV was detected by relative quantitative PCR, plaque assay and immunofluorescence analysis. The virus titer of JEV in the brains of suckling mice pretreated with recombinant lentiviruses were determined at 5 days after challenge. And the 3-week-old mice were selected to do the protective experiment. **Results:** The RNA loads and virus titer of JEV in cells were significantly reduced in 4 recombinant lentiviruses ($P < 0.05$), the RNA load of LV-C group decreased by 89.7% and the virus titer decreased by about 1,200-fold. The virus titer of JEV in the brains of suckling mice were significantly reduced in all 4 groups ($P < 0.05$), with the virus titer in LV-C group was reduced by about 1,700-fold. The protective rates of 3-week-old mice in the 4 groups were 50 ~ 70%. **Conclusion:** The lentivirus-mediated RNAi targeting the C, NS3, NS4A and NS5 gene of JEV showed significant and sustained inhibition on JEV in cells and mice, among which the RNAi targeting C gene showed the strongest antiviral effect.

【Key words】 Japanese encephalitis virus; Lentivirus; RNA interference; Antiviral

乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 是一种经蚊虫叮咬传播的人兽共患病, 可导致人中枢神经系统严重损伤^[1]。JEV 主要流行于亚洲地区, 全球每年报告 67 900 例临床病例, 其中约 75% 发生于 0 ~ 14 岁的儿童, 病死亡率 20% ~ 30%, 约有 50% 的治愈者会留下持续性后遗症^[2]。目前尚

无特异性疗法, 只能对症治疗。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是由双链 RNA 分子介导的使靶 mRNA 发生特异性降解, 以阻断翻译, 即转录后的基因沉默, 在高等生物基因表达调控和抵御病原体过程中发挥重要作用^[3]。目前人工合成的 siRNA 可以直接转染到细胞中介导 RNAi, 但时效较短。使用

含有短发夹 RNA (shRNA) 表达盒的质粒或病毒载体在细胞中生成 siRNA, 可以显著提高 RNAi 的效率和持续性。慢病毒对多种细胞有较强亲和力与低毒性, 是目前较为理想的 RNAi 传导工具^[4]。RNAi 分子治疗有可能成为一种新的抗病毒策略。多项研究^[5-7]表明, 运用 RNAi 可以有效抑制蜚传脑炎病毒、登革热病毒和丙型肝炎病毒等黄病毒在细胞和小鼠体内的增殖。本研究以同为黄病毒属的 JEV 为对象, 选取 4 个病毒基因作为靶点, 使用慢病毒载体分别在 BHK21 细胞和小鼠体内介导 RNAi, 研究其抗病毒效果, 为探索 RNAi 用于抗病毒治疗的可能性及潜在靶点提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 材料

幼仓鼠肾细胞 (BHK21) 购自美国 ATCC 保藏中心, 由川北医学院病原中心实验室培养, 采用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基, 于 37 °C 5% CO₂ 条件下传代培养。JEV 毒株 SCYA201201 (基因组序列, GenBank 登录号为 KU508409) 由四川大学动物医学院提供, 于川北医学院病原中心实验室保存, 荧光定量 PCR 预混液购至宝生物工程有限公司。抗 JEV E 蛋白鼠源单克隆抗体, 荧光素 Alexa Fluor 488 标记的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体购至 Abcam 生物技术有限公司。清洁级昆明雌鼠与昆明乳鼠由川北医学院实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 序列设计与重组慢病毒的构建 通过对国内外 23 株具代表性的 JEV 毒株, 进行全基因组序列比对, 选定 JEV 的 C、NS3、NS4A 与 NS5 基因为靶点。运用线设计软件 DSIR (<http://biodev.extra.cea.fr/DSIR/DSIR.html>), 设计出 4 条 shRNA 序列并合成。见表 1。将 shRNA 序列与载体 pGL-VU6/RFP 连接构建重组载体, 并将重组载体与包装质粒共转染入人肾上皮细胞 (293T) 包装出携带 shRNA 序列的重组慢病毒, 滴度 > 10⁸ TU/mL, 此步骤由上海吉玛基因科技有限公司完成。阴性对照慢病毒 LV-NC 购自上海吉玛基因。

表 1 靶基因与 shRNA 序列

靶基因	基因组定位	shRNA 序列
LV-C	254-274	5'-CTTCAAGTTTACAGCATTAGC-3'
LV-NS3	5361-5381	5'-GCATCAGGGAATGAAATAGT-3'
LV-NS4A	6659-6679	5'-GAGATTCTTCTGCTCATGA-3'
LV-NS5	9918-9938	5'-GGAGCTGGATGGAATGTGAAG-3'
LV-NC	阴性对照	5'-TTCTCCGAACGTGTACAGT-3'

1.2.2 慢病毒感染 待 BHK21 细胞在 6 孔板中铺满 70%, 用 PBS 洗涤两次后, 将重组慢病毒按感染复数 MOI = 10 接种细胞, 每孔加入 2 mL 含 10% FBS 和 5 μg/mL polybrene 的 DMEM 培养液。置于 37 °C, 5% CO₂ 培养 48 h 后, 用荧光显微镜观察红色荧光。

1.2.3 抑制 JEV 感染细胞 分别在感染重组慢病毒 48 h、96 h 后, 按照感染复数 MOI = 0.1 接种乙脑病毒 SCYA201201 株。病毒吸附 1.5 h 后, 弃上清, 每孔加入 2 mL DMEM 维持液 (含 2% FBS), 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养 72 h 后, 收毒做荧光定量 RT-PCR 与病毒滴度检测。另设实验组, 接种 JEV 48 h 后, 做间接免疫荧光检测。设阴性慢病毒 LV-NC 对照组、无慢病毒 JEV 攻毒组 (Non-RNAi) 与空白对照组 (Mock)。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 待接种 JEV 72 h 后, 收集细胞与上清, 反复冻融 3 次, 提取总 RNA, 并反转录成 cDNA。采用 25 μL 荧光定量 PCR 体系: 2 μL cDNA 模板、12.5 μL SYBR® Premix Ex Taq™ II、8.5 μL ddH₂O、上游和下游引物各 1 μL。定量 PCR 结果采用相对定量计算方法: 以 JEV E 基因作为目标基因, BHK21 细胞的 GAPDH 基因作为内参基因, 运用 2^{-ΔΔCt} 法计算 JEV RNA 的相对含量。见表 2。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列

编号	扩增基因	引物序列 (5'-3')	扩增长度 (bp)
P1	JEV E 基因	CATTGGAGCCACTTGGGTG	201
P2		TTGTGGGCTTCTCTCTGTCG	
P3	仓鼠 GAPDH 基因	TGCCAGAACATCATCCCT	191
P4		ATGCCTGCTTACCACCTT	

1.2.5 病毒滴度检测 待接种 JEV 72 h 后, 反复冻融 3 次后, 离心收集上清, 作 10 倍梯度稀释后, 加入铺满 BHK21 细胞的 6 孔板中, 500 μL/孔。病毒吸附 1.5 h 后, 弃上清, 每孔加入 2 mL 含 1% 甲基纤维素的 DMEM 维持液 (含 2% FBS), 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养 5 d。去上清, 用含 2% 甲醛的结晶紫染液染色 15 min 后, 做蚀斑计数, 计算病毒滴度。

1.2.6 间接免疫荧光检测 待接种 JEV 48 h 后, 用 PBS 洗涤 3 次, 依次进行固定、通透及封闭。加入 500 倍稀释的 JEV E 蛋白鼠源单克隆抗体, 4 °C 孵育 12 h。弃一抗, 洗涤 3 次后, 加入 1 000 倍稀释的荧光二抗, 避光室温孵育 45 min。避光洗涤 3 次后, 用倒置荧光显微镜观察绿色荧光。

1.2.7 抑制 JEV 感染小鼠 (1) 抑制乳鼠脑内的 JEV 增殖: 将 7 d 龄乳鼠分为 7 组, 每组 5 只。分别

在攻毒前 3 d 和 1 d, 颅内注射 2.5×10^5 TU 重组慢病毒。按 $5 \times LD_{50}$ 的剂量攻毒, 颅内注射 JEV SCYA201201 株 ($LD_{50} = 1.02 \log_{10}$ PFU), 5 d 后处死, 取脑组织制成 10% 组织悬液, 反复冻融 3 次, 离心收集上清, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后, 测定病毒滴度。(2) 攻毒保护试验: 将 3 周龄雌性昆明鼠分为 7 组, 每组 10 只。分别在攻毒前 3 d 和 1 d, 颅内注射 5×10^5 TU 重组慢病毒。按 $50 \times LD_{50}$ 的剂量攻毒, 颅内注射 JEV SCYA201201 株 ($LD_{50} = 1.87 \log_{10}$ PFU), 连续观察 21 d, 记录发病与死亡情况。

1.3 统计学分析

采用 Microsoft Excel 软件对数据进行分析与处理。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较据采用 one-way ANOVA 分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组慢病毒的构建与感染效率

感染重组慢病毒 48 ~ 96 h 后, 6 孔板中绝大多数细胞均呈现红色荧光, 且各组间荧光强度与数量差异无统计学意义 ($P < 0.05$)。慢病毒感染组与空白对照组的细胞形态和增殖数量差异无统计学意义 ($P < 0.05$), 说明各重组慢病毒均能高效感染 BHK21 细胞, 且对细胞无明显毒性。见图 1。

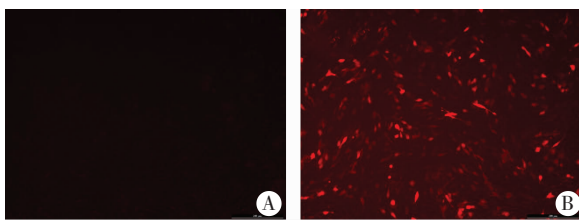


图 1 荧光显微镜观察慢病毒感染效率 (200 \times)
A. 空白对照; B. 慢病毒组。

2.2 对细胞中 JEV 增殖的抑制效果

荧光定量 PCR 结果显示, 在 48 h 组中, 相较于 LV-NC (JEV RNA 载量相对值 = 1), LV-C、LV-NS3、LV-NS4A 和 LV-NS5 分别使细胞中的 JEV RNA 载量降低 89.7%、87.7%、74.6% 和 72.4%。96 h 组与 48 h 相比, 对 JEV 的抑制效果略有降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 证明重组慢病毒 LV-C、LV-NS3、LV-NS4A 和 LV-NS5 均能显著抑制 JEV 在 BHK21 细胞中的增殖, 且具有一定持续性, 其中 LV-C 和 LV-NS3 的抑制效果强于 LV-NS4A 和 LV-NS5 ($P < 0.05$)。病毒蚀斑实验显示, 在 48 h 组中, 相较于 LV-NC 对照组 ($10^{7.51}$ PFU/mL), LV-C ($10^{4.43}$ PFU/mL)、LV-NS3 ($10^{4.79}$ PFU/mL)、LV-NS4A ($10^{5.42}$ PFU/mL) 和 LV-NS5 ($10^{5.33}$ PFU/mL) 均使细胞中的病毒滴度降低 ($P < 0.05$)。其中 LV-C 与

LV-NS3 使病毒滴度分别降低了约 1 200 倍与 525 倍, 96 h 组的降低程度与 48 h 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 3), 证明重组慢病毒能显著且持续抑制 JEV 在 BHK21 细胞中的增殖。间接免疫荧光检测显示, 在荧光显微镜下, LV-C、LV-NS3、LV-NS4A 和 LV-NS5 组的绿色荧光数量少于 LV-NC 对照组 ($P < 0.05$), 空白对照组无荧光出现, 证明重组慢病毒显著抑制了细胞中的 JEV 增殖。见图 2-图 4。

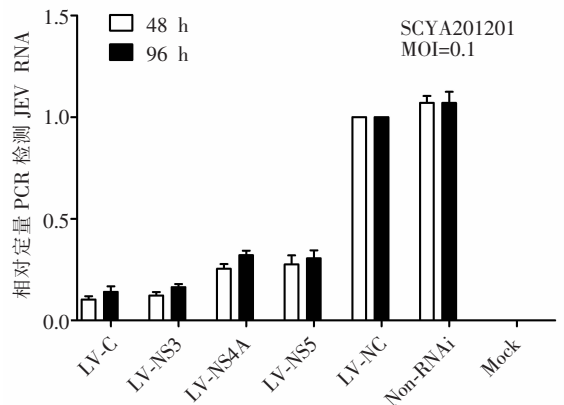


图 2 相对荧光定量 PCR 检测 JEV 的 RNA 载量

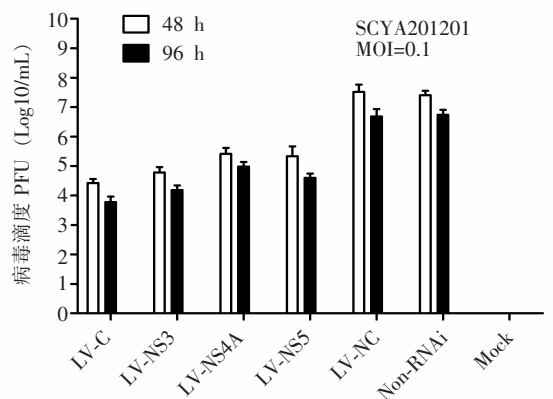


图 3 BHK21 细胞中的 JEV 病毒滴度检测

2.3 对乳鼠脑内 JEV 增殖的抑制效果

乳鼠脑组织悬液中的病毒滴度检测显示, 相较于 LV-NC 对照组 ($10^{8.21}$ PFU/mL), LV-C ($10^{4.96}$ PFU/mL)、LV-NS3 ($10^{5.29}$ PFU/mL)、LV-NS4A ($10^{5.82}$ PFU/mL) 和 LV-NS5 ($10^{5.68}$ PFU/mL) 均使乳鼠脑内的病毒滴度降低 ($P < 0.05$)。其中 LV-C 使病毒滴度降低了约 1 700 倍, 证明重组慢病毒能显著抑制 JEV 在乳鼠脑内的增殖。见图 5。

2.4 攻毒保护实验

3 周龄小鼠攻毒保护实验显示, LV-C、LV-NS3、LV-NS4A 与 LV-NS5 组的存活率分别为 70%、50%、60%、50%。LV-NC 对照组全部死亡, 空白对照组全部存活, 证明重组慢病毒对 3 周龄小鼠具有较好保护作用。见图 6。

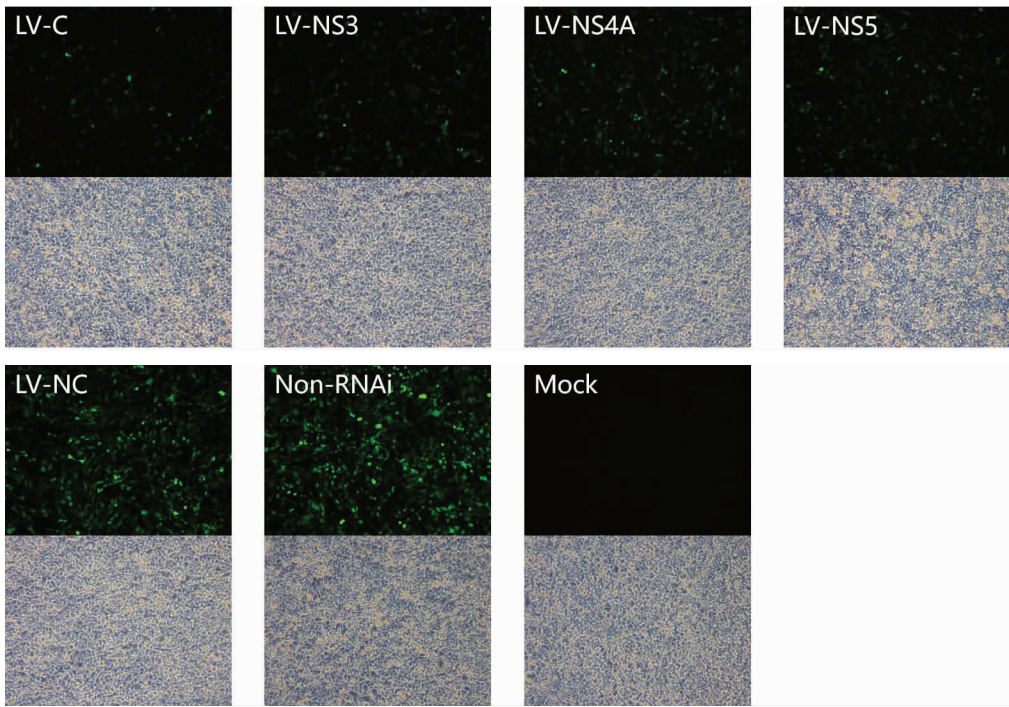


图4 间接免疫荧光检测 BHK21 细胞中的乙脑病毒

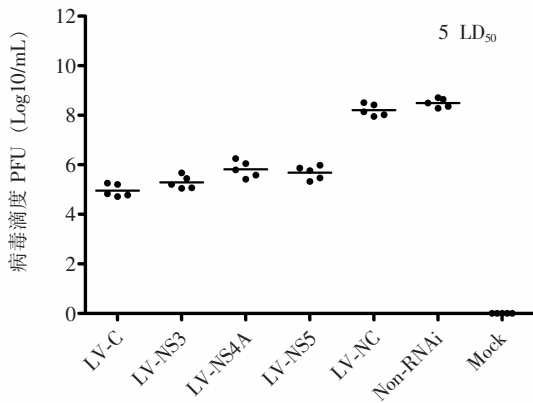


图5 乳鼠脑内的 JEV 病毒滴度检测

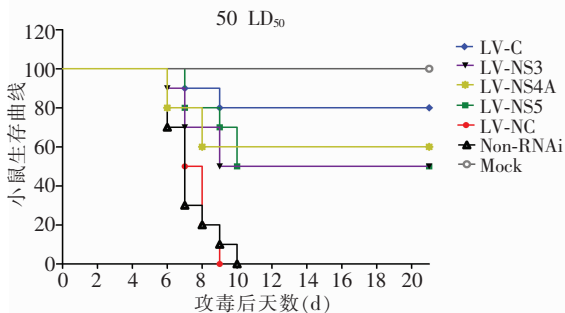


图6 3周龄小鼠生存曲线

3 讨论

JEV 的基因组为单股正链 RNA,其基因组即是复制模板,也行使 mRNA 功能。因此 RNAi 能同时

抑制 JEV 基因组的复制和病毒蛋白的合成,具有机制上的优势。C 基因具有较高的保守性,编码的 C 蛋白主要参与病毒的包装与核衣壳的形成^[8]。NS3 蛋白是具有丝氨酸蛋白酶和 RNA 解旋酶活性的多功能蛋白,参与病毒蛋白的剪切与 RNA 复制。JEV 复制时,细胞粗面内质网膜上会形成病毒 RNA 复制复合体,NS3 蛋白和病毒 RNA 聚合酶 NS5 蛋白,作为复合体的核心组分,在 JEV 复制周期中起关键作用^[9]。NS4A 蛋白是 NS3 发挥蛋白酶活性的辅助因子,其还能通过诱导细胞自噬来促进病毒增殖^[10-11]。

有研究^[12-13]表明,靶向 JEV 的 C、E 和 NS5 基因的 RNAi 可有效抑制病毒感染细胞和小鼠,其中靶向 E 基因的 RNAi 表现出最强的抗病毒效果。为了探索新的抗病毒 RNAi 靶点及更系统地评估 RNAi 对 JEV 的抑制作用,本次选取 C、NS3、NS4A 与 NS5 基因,设计新的 RNAi 位点进行研究,结果显示,4 个 RNAi 组均能明显抑制 JEV 对细胞和小鼠的感染($P < 0.05$)。其中 LV-C 组表现出最佳的抗病毒效果,使细胞中的病毒滴度降低约 1 200 倍,对 3 周龄小鼠的保护率达到 70%。本研究分别在慢病毒感染细胞 48 h 和 96 h 后进行 JEV 接种,结果显示 96 h 组与 48 h 组相比,抑制率差异无统计学意义($P > 0.05$),仍保持高抗病毒活性。与之前采用质粒载体的研究相比^[14],其抗病毒的持续性有明显提升。本次动物实验,慢病毒没有出现致毒性,但观察期仅为 21 d,因此要对安全性做出准确判断,还需更

长期系统的研究。目前脱靶效应是 RNAi 技术面临的一个主要问题。为降低脱靶效应,可针对靶基因采用多位点联合沉默的方式来降低脱靶率^[15]。因此本研究认为针对 JEV 多基因位点的联合 RNAi 可能会具有更佳的抗病毒效果,这有待进一步探索。

综上所述,以 JEV 的 C、NS3、NS4A 与 NS5 基因为靶点,由慢病毒介导的 RNAi 对病毒感染细胞和小鼠有显著抑制作用,其中靶向 C 基因的 RNAi 的抗病毒效果最强,其可能成为一种感染前的预防性治疗手段。由于本研究均在 JEV 感染前进行 RNAi,因此其感染后的抗病毒效果还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Wang H, Liang G. Epidemiology of Japanese encephalitis: past, present, and future prospects [J]. Ther Clin Risk Manag, 2015, 11:435-448.
- [2] Campbell GL, Hills SL, Fischer M, et al. Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review [J]. Bull World Health Organ, 2011, 89(10):766-774.
- [3] Hannon GJ. RNA interference [J]. Nature, 2002, 418(6894):244-251.
- [4] Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, et al. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown [J]. Methods Mol Biol, 2010, 629:141-158.
- [5] Achazi K, Patel P, Paliwal R, et al. RNA interference inhibits replication of tick-borne encephalitis virus in vitro [J]. Antiviral Res, 2012, 93(1):94-100.
- [6] AlMalki WH, Shahid I, Abdalla AN, et al. Consensus small interfering RNA targeted to stem-loops II and III of IRES structure of 5' UTR effectively inhibits virus replication and translation of HCV sub-genotype 4a isolates from Saudi Arabia [J]. Saudi J Biol Sci, 2021, 28(1):1109-1122.
- [7] Kakumani PK, Ponia SS, Rajgokul KS, et al. Role of RNA interference (RNAi) in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi suppressor [J]. J Virol, 2013, 87(16):8870-8883.
- [8] Ishida K, Goto S, Ishimura M, et al. Functional Correlation between Subcellular Localizations of Japanese Encephalitis Virus Capsid Protein and Virus Production [J]. J Virol, 2019, 93(19):e00612-e00619.
- [9] Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design [J]. Antiviral Res, 2010, 87(2):125-148.
- [10] Li XD, Ye HQ, Deng CL, et al. Genetic interaction between NS4A and NS4B for replication of Japanese encephalitis virus [J]. J Gen Virol, 2015, 96(Pt6):1264-1275.
- [11] McLean JE, Wudzinska A, Datan E, et al. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication [J]. J Biol Chem, 2011, 286(25):22147-22159.
- [12] Shen T, Liu K, Miao D, et al. Effective inhibition of Japanese encephalitis virus replication by shRNAs targeting various viral genes in vitro and in vivo [J]. Virology, 2014, 454-455(4):48-59.
- [13] Anantpadma M, Vrati S. siRNA-mediated suppression of Japanese encephalitis virus replication in cultured cells and mice [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(2):444-451.
- [14] Yuan L, Wu R, Liu H, et al. The NS3 and NS4A genes as the targets of RNA interference inhibit replication of Japanese encephalitis virus in vitro and in vivo [J]. Gene, 2016, 594(2):183-189.
- [15] Petri S, Meister G. siRNA design principles and off-target effects [J]. Methods Mol Biol, 2013, 986:59-71.

(收稿日期:2021-12-09

修回日期:2022-02-19)