

小环载体介导的 siRNA 稳定抑制乙肝病毒的复制和表达

刘晓曼¹ 杨倬² 冯涛^{1*}

¹ 重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室 重庆 400016

² 清华大学生命科学学院 北京 100084

摘要: 【目的】尝试构建表达小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 的小环载体, 并初步鉴定其对乙肝病毒 (hepatitis B virus, HBV) 复制及其基因表达的抑制作用。【方法】设计并合成靶向 HBV S 区的 siRNA, 将其克隆到小环载体 pMC-BESPX-MCS2 上, 测序正确后将重组体 pMC-H1-siHBS-U6 转化入感受态 *E. coli* ZYCY10P3S2T, 然后在培养基中加入 L-阿拉伯糖, 诱导其降解细菌骨架, 获取只含有目的基因表达盒的小环 RNA 干扰载体 pmc-H1-siHBS-U6。将小环 RNA 干扰载体与 HBV 真核表达质粒 pHBV1.3 共转染 Huh-7 细胞, 分别在转染后 1-7 天, ELISA 法检测 Huh-7 细胞上清中的 HBsAg、HBeAg, 并且通过 Real-time RT-PCR 法分析干扰 RNA 对 HBV DNA 及 mRNA 的抑制效果。【结果】成功构建了靶向 HBV S 基因的 siRNA 小环表达载体 pmc-H1-siHBS-U6。该载体能显著抑制 Huh-7 细胞 HBsAg 和 HBeAg 分泌, 并且其抑制效果能够维持 2-3 周时间。Real-time PCR 证实 HBV 的 DNA 与 mRNA 水平分别降低了 71% 和 80%, 而对照 siRNA 及空载体则无此作用。【结论】成功构建了靶向 HBV 的小环 RNA 干扰载体, 并且其能稳定、高效、特异地抑制 HBV 基因的表达与复制, 该研究不仅对探索 HBV 的基因治疗提供了重要线索, 而且为 RNA 干扰的应用提供了新的运载体系。

关键词: 小环载体, 乙肝病毒 (hepatitis B virus, HBV), RNA 干扰, Huh-7 细胞

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 02-0191-07

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是引起病毒性肝炎的主要病原体之一。由 HBV 所引起的乙型肝炎是一种流行久远、传播广泛、危害严重的传染性疾病。目前我国广泛应用的抗 HBV 药物主要有两类, α -干扰素和核苷类药物, 但效果均不理想, 仍需探索新型有效的抗 HBV 药物。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指由双链 RNA 分子引起的转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS), 具有高特异性和高效性^[1-2]。HBV 复制的

过程中有一个前基因组 RNA 参与 (介导) 的逆转录过程, 其多种转录体间又存在重叠与交叉, 此特点使其特别适用于 RNAi: 一是用 RNAi 破坏其前基因组 RNA (pregenomic RNA, pgRNA), 使其缺少逆转录的模板, 复制受阻; 二是设计一条 siRNA 即可同时降解几条 mRNA, 从而阻断病毒复制; 三是可以针对病毒基因保守区发挥作用, 从而限制病毒产生逃避突变株的能力。因此应用 RNA 干扰技术来抑制前基因组 RNA 的转录, 为慢性 HBV 感染的治疗带来了

基金项目: 国家自然科学基金 (81071770)

* 通信作者。Tel: +86-23-68485627; E-mail: fengtao9_9@yahoo.com

作者简介: 刘晓曼 (1986-), 女, 重庆人, 硕士研究生, 主要研究方向为分子病毒学。E-mail: lxm1926@hotmail.com

收稿日期: 2011-09-05; 修回日期: 2011-12-14

新的希望^[3] 然而困扰 RNA 干扰实际应用的主要问题是 如何将干扰片段或表达干扰 RNA 的载体导入到靶细胞中,让其安全、高效、稳定地表达目的基因。

迄今为止,应用于基因治疗的基因导入手段主要有两种,病毒载体系统和非病毒载体系统^[4],许多病毒载体,包括逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒等都已运用于基因治疗和疫苗的研究开发^[5-6],虽然在体内有很高的转染率,但病毒载体的应用由于其免疫反应性和潜在的致癌性而受到制约^[7-10]。非病毒载体主要是质粒载体,而传统的质粒载体又因其真核表达框与细菌 DNA 相连,会导致目的基因的转录沉默^[11],同时导致机体对载体的免疫反应^[12],从而大大降低了质粒载体的效果。小环质粒载体在由 L-阿拉伯糖诱导后,通过位点特异性重组可产生两种质粒,其中带有目的基因的较小质粒去除了大部分的细菌骨架 DNA 序列,相比传统意义上的质粒载体具有更高的转染效率和表达效率,已经在多项研究中得以证实^[13-19]。而本实验应用小环质粒载体介导的 RNA 干扰系统来抑制 HBV 病毒的复制,具有较好的应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞株:小环载体 pMC、BESPX-MCS2(以下简称 pMC)和感受态细胞 ZYCY10P3S2T *E. coli* 购自美国 SBI 公司,含有 H1 和 U6 双启动子的 pSUPER-U6 载体^[20-21]以及 HBV1.3 质粒为本实验室保存。大肠杆菌

(*Escherichia coli*) DH5 α 以及 Huh-7 细胞均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:Huh-7 细胞用 DMEM 培养,培养基内加 10% FBS、链霉素(100 μ g/mL)、青霉素(100 U/mL),培养于 37 $^{\circ}$ C、5%的 CO₂ 及饱和湿度的条件下。TRIzol、脂质体 Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品。Opti-MEM 购自 GIBCO 公司,胰蛋白酶购自 Thermo 公司。PCR 高保真酶、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶、DNA Marker 购于 TaKaRa 公司。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购于 Qiagen 公司。质粒大量提取纯化试剂盒购自 Vigorous 公司。逆转录试剂盒以及 Real-time PCR 试剂盒均为 Promega 公司产品,乙型肝炎病毒(HBV)核酸定量检测试剂盒购于 Qiagen 公司,其他试剂均为国产或进口分析纯。凝胶成像仪为上海天能有限公司的 Tanon1600,酶标仪购于 Bio-RAD 公司,Real-time PCR 仪为美国 ABI 公司 7300 PCR 自动荧光检测仪。

1.2 针对 HBV S 基因的 siRNA 小环质粒的构建

1.2.1 设计靶向 HBS 基因和对照 siRNA:根据 siRNA 的设计原则,从 HBV S 基因编码区中寻找符合设计特征的靶序列,经 BLAST 软件进行同源分析证实为 HBV 保守序列后,选择 HBV 编码区 673-697 核苷酸序列为 S 基因干扰位点,应用 Invitrogen 公司的在线 RNAi 设计软件设计并筛选 1 对带有特定酶切位点且能编码 siRNA 的寡核苷酸链 siHBS,此外还设计与 HBV 序列无关的靶向 EGFP 的 siEGFP 作为无关对照。其序列如表 1 所示,此两对 siRNA 送奥科公司合成。

表 1 siHBS 和 siEGFP 寡核苷酸链序列
Table 1 The Sequences of siHBS and siEGFP

siRNA	Restriction site	Sequences(5' \rightarrow 3')
siHBS	<i>Bgl</i> II	Forward sequence :GATCAAAAACCTCAGTTTACTAGTGCCATTG TTCTTCAAGAGAG AACAAATGGCACTAGTAAACTGAGTTTTT
	<i>Sal</i> I	Reverse sequence :TCGAAAAAACCTCAGTTTACTAGTGCCATTG TTCTCTCTTGAAGAACAATGGCACTAGTAAACTGAGTTTTT
siEGFP	<i>Bgl</i> II	Forward sequence :GATCAAAAAAAGAACGGCATCAAGGTGAA CTTCAAGAGAGTTCACCTTGTATGCCGTTCTTTTTTTT
	<i>Sal</i> I	Reverse sequence :TCGAAAAAAAAGAACGGCATCAAGGTGAA CTCTCTTGAAGTTCACCTTGTATGCCGTTCTTTTTTTT

1.2.2 将 siRNA 构建到 pSUPER-U6 载体上:以上两对寡核苷酸序列 5 端分别包含 *Bgl* II 和 *Sal* I 酶切位点,经退火后形成双链核苷酸能直接加入 T4 DNA

连接酶与经相同酶切的 pSUPER-U6 载体相连成 pSUPER-siHBS-U6 和 pSUPER-siEGFP-U6。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞并提取质粒,*Spe* I 和

EcoRI 酶切鉴定,阳性克隆切出大约 600 bp 的条带,而空质粒的大小为 520 bp,筛选出含 siHBS 基因和 siEGFP 基因的阳性克隆,并进行 DNA 测序加以确定。

1.2.3 将 pSUPER-U6 上构建好的表达盒转移到小环载体 pMC 上:用两载体共有的酶切位点 *Spe I* 和 *EcoRI* 将表达盒 H1-siHBS-U6、H1-siEGFP-U6 以及空表达盒 H1-U6 从 pSUPER-U6 转移至 pMC,同样用酶切鉴定筛选阳性克隆,最终成功构建小环 RNA 干扰体系 pMC-H1-siHBS-U6、pMC-H1-siEGFP-U6 和 pMC-H1-U6。

1.3 仅含 siRNA 表达盒的小环 RNA 干扰质粒的诱导

首先摸索小环 RNA 干扰质粒的诱导条件,以细菌骨架 DNA 降解程度为标准,改变诱导时间以及各诱导试剂的浓度,最终获得理想的诱导结果,其条件如下:将保存的甘油菌 100 μL 接种入 5 mL 的含卡那霉素(50 μg/mL)的 LB 培养液中,37℃ 250 rpm/min 6-8 h,将所摇菌液以 1:1000 的比例接种到 100 mL 含卡那霉素(50 μg/mL)的 TB 培养基 37℃,250 rpm/min 培养 16-18 h,使 OD₆₀₀ 达到 4-5,再加入相同体积即 100 mL 的 LB 以及 4 mL 1N 的 NaOH 溶液和 10 mL 20% L-阿拉伯糖(终浓度为 1%),30℃ 250 rpm/min 培养 5 h,收菌,提取小环 RNA 干扰质粒 pmc-H1-siHBS-U6、pmc-H1-siEGFP-U6 和 pmc-H1-U6。

1.4 小环 RNA 干扰质粒转染 Huh-7 细胞

Huh-7 细胞消化并计数后,接种在 12 孔板中,于 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养,待细胞融合度达到 70%-90% 后进行转染,转染前更换无血清 opti-MEM 培养基,将质粒 pmc-H1-siHBS-U6 以 0.5 ng、1 ng、2 ng 的量和 pHBV1.3 以 0.5 ng 的量按照 1:1、2:1、4:1 的比例在脂质体介导下分别共转染 Huh-7 细胞,在 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中孵育 6 h 后换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,继续置 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中

培养。此实验同时设置 siRNA 无关对照 pmc-H1-siEGFP-U6 以及空载体对照 pmc-H1-U6,每组设 3 个重复。

1.5 细胞上清液 HBsAg 和 HBeAg 的检测

在细胞转染后 24-168 h 的 7 d 内每天收集一定量的各组细胞培养上清液,放 -80℃ 保存,待样品全部收集完后用 ELISA 半定量法检测各组的 HBsAg 和 HBeAg 含量,酶标仪读出吸光度数值。

1.6 细胞上清中 HBV DNA 的检测

按照 QIAGEN 的乙型肝炎病毒(HBV)核酸定量检测试剂盒使用说明书操作,采用 ABI7300 PCR 自动荧光检测仪检测转染 24 h、48 h、72 h 的细胞培养液上清的 HBV DNA,结果以 copies/ml 表示。

1.7 检测细胞中 HBV mRNA 的变化

按 Trizol(Invitrogen)试剂盒操作说明提取转染 72h 的细胞总 RNA,逆转录为 cDNA 后,以 cDNA 为模板,用 ABI7300 PCR 自动荧光检测仪同时扩增 HBS 和内参 β-actin。PCR 反应参数为:95℃ 10 min;94℃ 10 s,60℃ 60 s 40 个循环。结果中的 CT 值运用公式 $2^{-\Delta CT} \times 100\%$ 计算表达基因的相对变化。

1.8 统计学方法

所得数据采用 SPSS10.0 软件,统计处理以每组 3 个重复测定值的 ±SD 表示,组间比较用方差分析, P < 0.05 为显著差异。

2 结果和分析

2.1 siRNA 表达载体 pSUPER-siHBS/siEGFP-U6 的鉴定

设计并合成的单链寡核苷酸经退火后形成双链 siRNA(图 1),定向插入 pSUPER-U6 载体,转化感受态细胞后扩增并提取质粒,经 *Spe I* 和 *EcoRI* 双酶切鉴定,观察到重组质粒的双酶切片段在 600 bp 左右,明显高于对照空质粒经相同酶切产生的 520 bp 片段(图 2),结果与预期相符,表明寡核苷酸已克隆入具有双启动子的 pSUPER-U6 质粒载体中。进一

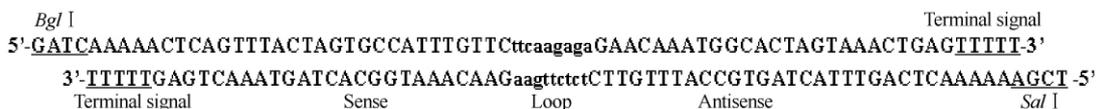


图 1 单链核苷酸退火生成双链 siHBS 的示意图

Fig. 1 The oligonucleotides siHBS1 (top) and siHBS2 (below) annealed to generate double-stranded siHBS.

步的 DNA 测序证实该重组质粒序列与所设计序列完全一致,表明针对 HBV S 基因的 siRNA 表达载体初步构建成功。

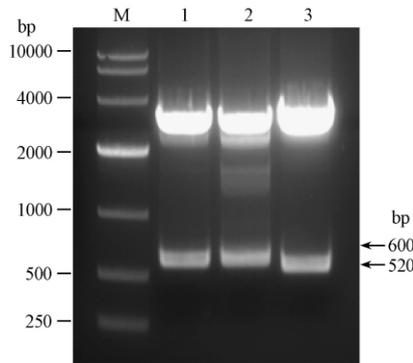


图2 pSUPER-siHBS/EGFP-U6 使用 *SpeI* 和 *EcoRI* 双酶切鉴定

Fig. 2 pSUPER-siHBS/siEGFP-U6 was digested by *SpeI* and *EcoRI*. lane M. TaKaRa DL10,000 DNA marker; lane 1. pSUPER-siHBS-U6; lane 2. pSUPER-siEGFP-U6 lane 3. pSUPER-U6 as the empty vector control.

2.2 小环 RNA 干扰质粒的构建、诱导及鉴定

将表达盒 H1-siHBS-U6、H1-siEGFP-U6 及空表达盒 H1-U6 成功构建到小环载体 pMC 上,然后诱导使其绝大部分细菌骨架自我降解,成功诱导出仅含有 RNA 干扰片段表达盒的小环 RNA 干扰质粒 pmc-H1-siHBS-U6 (图 3-A)。600 bp 左右的 DNA 条带是真正所需的目的条带,但由于经自身重组后的小环质粒存在多种超螺旋结构,所以为了检测诱导后的小环的纯度,必须使其线性化,于是使用存在于小环重组质粒上的 *BglII* 和存在于细菌骨架 DNA 上的 *EcoNI* 双酶切诱导后的产物 (图 3-B)。

2.3 细胞培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 的检测

将 pmc-H1-siHBS-U6 和 pHBV1.3 按照 1:1、2:1、4:1 的比例共转染 Huh-7 细胞后用 ELISA 半定量法检测细胞培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 的含量,发现培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 均受到明显抑制,其中 pmc-H1-siHBS-U6 在 4:1 的比例中抑制效果最佳(数据未列出),且在培养 72 h 的细胞上清中 HBsAg 和 HBeAg 抑制率达到最高值,分别为 72.5% 和 89%,其抑制作用到 168 h 时依旧稳定。上述结果与相应的对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),相比之下无关对照 pmc-H1-siEGFP-U6 和空质粒对照 pmc-H1-U6 无

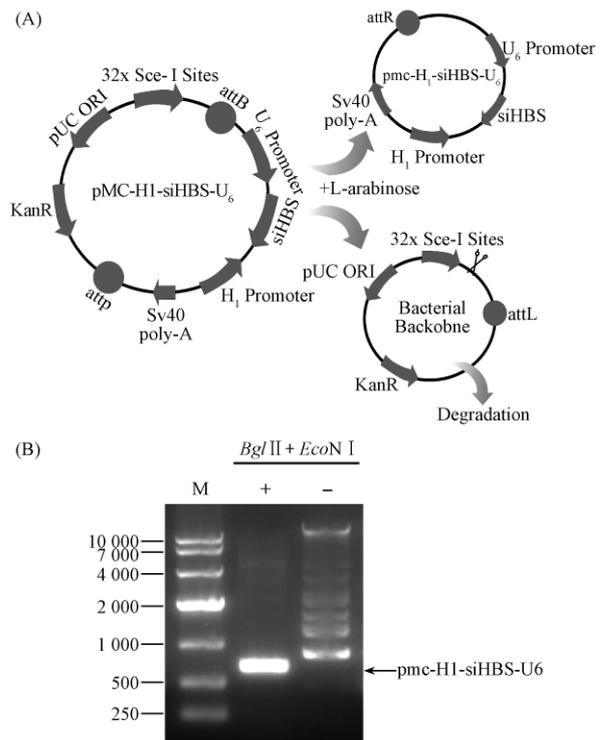


图3 小环 RNA 干扰质粒的构建、诱导及鉴定

Fig. 3 The construction, generation and identification of Minicircle RNAi vector. A. Diagram of production process of a minicircle DNA vector. B. pmc-H1-siHBS-U6 was digested by *BglII* and *EcoNI* restriction enzymes before electrophoresis. lane M. TaKaRa DL10,000 DNA maker. lane +. pmc-H1-siHBS-U6 with *BglII* and *EcoNI* restriction enzymes. lane -. pmc-H1-siHBS-U6 without *BglII* and *EcoNI* restriction enzymes.

明显抑制作用(图 4),显示 siRNA 的抑制作用是稳定、高效、特异的。

2.4 siRNA 对 HBV-DNA 的抑制作用

收集 pmc-H1-siHBS-U6 转染组细胞上清液,使用 QIAGEN 乙型肝炎病毒(HBV)核酸定量检测试剂盒,提取细胞上清中的 HBV-DNA,然后采用 ABI7300 PCR 自动荧光检测仪检测转染 24 h、48 h、72 h 的细胞培养液上清中 HBV DNA 的含量,数据显示,实验组 pmc-H1-siHBS-U6 中的 HBV-DNA 受到明显抑制,其转染 24 h、48 h、72 h 的抑制率分别为 64%、67%、71%,上述结果与相应的对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而相比之下无关对照 pmc-H1-siEGFP-U6 和空质粒对照 pmc-H1-U6 无明显抑制作用(表 2)表明 siRNA 对 HBV-DNA 的降解作用是高效、特异的。

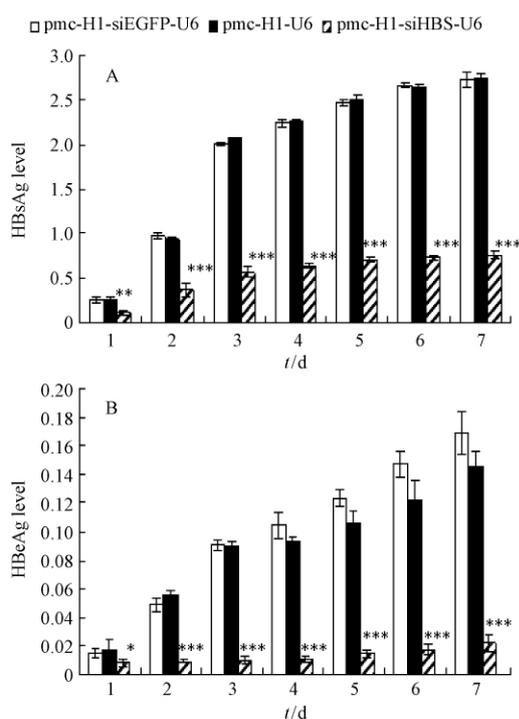


图4 ELISA 半定量法检测小环载体介导的 siRNA 对细胞分泌 HBsAg (A) 和 HBeAg (B) 的抑制作用

Fig. 4 Inhibition of HBsAg (A) and HBeAg (B) by RNAi based on Minicircle DNA vector delivery in Huh-7 cell pools. The amount of HBsAg and HBeAg in the culture medium was measured in 1-7 days by ELISA. The data shown represent the mean values \pm S. D. based on three independent experiments. Compared with control groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$, *** $P < 0.001$.

表2 Real-time PCR 法检测小环载体介导的 siRNA 对 Huh-7 细胞 HBV DNA 的抑制作用

Table 2 Inhibition of HBV DNA by RNAi based on Minicircle DNA vector delivery in Huh-7 cell pools. The amount of HBV DNA was measured by Real-time PCR. The data shown represent the mean values \pm S. D. based on three independent experiments. ($\times 10^6$ copies/mL \pm SD)

Species	Number	24h	48h	72h
pmc-H1-siEGFP-U6	3	5.33 \pm 0.8*	7.86 \pm 0.9	10.56 \pm 1.2
pmc-H1U6	3	5.18 \pm 0.5	7.57 \pm 0.3	11.34 \pm 1.3
pmc-H1-siHBS-U6	3	1.88 \pm 1.1**	2.57 \pm 0.9**	3.16 \pm 0.4***

*: $\times 10^6$ copies/mL \pm SD; Compared with control groups, ** $P < 0.02$, *** $P < 0.001$.

2.5 siRNA 对 Huh-7 细胞中 HBV mRNA 降解的作用

提取 pmc-H1-siHBS-U6 转染组 72h 的细胞总 RNA 逆转录为 cDNA 后将其作为模版, 分别用 HBS 和 β -actin 的引物在 ABI7300 PCR 自动荧光检测仪

上进行扩增。反应完毕所得到的 CT 值用公式 $2^{-\Delta CT}$ 计算表达基因的相对变化。数据结果显示, 实验组 pmc-H1-siHBS-U6 对 Huh-7 细胞中的 HBV mRNA 有明显降解作用, 且在 72 h 时降解率高达 80% (图 5)。上述结果与相应的对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而相比之下无关对照 pmc-H1-siEGFP-U6 和空质粒对照 pmc-H1-U6 无明显抑制作用 (图 5), 表明 siRNA 对 HBV mRNA 的降解作用是高效、特异的。

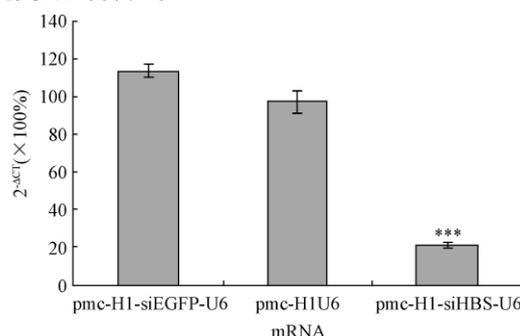


图5 Real-time RT-PCR 法检测小环载体介导的 siRNA 对 HBV S 基因 mRNA 的降解作用

Fig. 5 Inhibition of HBV S gene mRNA by RNAi based on Minicircle DNA vector delivery in Huh-7 cell pools. The amount of HBV S gene mRNA was measured by Real-time RT-PCR. The data shown represent the mean values \pm S. D. based on three independent experiments. Compared with control groups, *** $P < 0.001$.

3 讨论

小环 DNA (minicircle DNA) 载体是一种自 1997 年发展起来的新型的基因载体。与常用的非病毒载体——质粒载体相比, 小环 DNA 载体仅由外源基因的表达盒构成, 不含有来自细菌质粒的骨架结构, 从而减少了未甲基化的 CpG 所致的炎症反应, 提高了安全性; 而碱基数的减小, 更有效的提高了目的基因的表达和生物利用度。小环 DNA 载体克服了质粒载体转染率低、易引起免疫反应及外源基因在体内表达时间短的缺点, 是一种安全、高效的新型载体。由于小环载体纯化方法的复杂性增加了其大规模制备的困难, 限制了其在临床上的应用。然而 Chen、Kay 等分别在 2003 年^[14]、2005 年^[22]、2010 年^[23] 重新改造小环载体系统, 包括小环载体与感受态细胞, 采用源于链霉菌温和噬菌体的 Φ C31 整合酶, 并在母体质粒上插入内切酶 I-SceI 的表达盒。 Φ C31 整合酶在宿主菌内完成重组过程后, 诱导 I-SceI 的表达, 可将环状骨架及少量未重组的母体质粒消化成

为线性 DNA,继而在细菌核酸外切酶的作用下降解,小环 DNA 即可从细菌中一步获得,毋需进一步纯化,产量高达 99%,从而建立起了一个简单、快速、低成本的小环质粒生产体系,本实验就是采用此系统来诱导小环目的质粒。

小环载体较普通的质粒载体有明显的优越性,但是目前尚无用它来介导 siRNA 作用的相关报道。本研究构建了小环载体的 siRNA 表达系统,并成功诱导出小环 RNA 干扰质粒 pmc-H1-siHBS-U6,与含有 1.3 倍 HBV 基因组的完整病毒复制体 pHBV1.3 共转染 Huh-7 细胞。pHBV1.3 是包含了 5 末端重复 Enh I、Enh II,复制起始区(直接重复序列 DR1、DR2),前基因组转录起始点、X 和前 C 区启动子,X 开放读码框等,可产生 3.5 kb、2.4 kb、2.1 kb 和 0.7 kb 等几乎所有 HBV 特异转录子。该重组体已被证实能高效启动 HBV 复制,体外转染和转基因小鼠试验有高度的肝细胞特异性^[24]。将其转染细胞作为 HBV siRNA 靶向的体外复制模型结果客观、准确。

实验结果表明,在蛋白水平上,pmc-H1-siHBS-U6 转染 72 h 后的细胞培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 含量明显下降,抑制率分别为 75% 和 91%,且抑制作用到 168 h 时依旧稳定;在 DNA 水平上,定量 PCR 显示 pmc-H1-siHBS-U6 能明显降低 HBV DNA 拷贝数,且 72 h 抑制率达 71%;在 RNA 水平上,定量 PCR 结果表明 pmc-H1-siHBS-U6 能较大程度的引起细胞中 HBV mRNA 的降解,且在 72 h 降解率高达 80%。而同时,无关序列对照组 pmc-H1-siEGFP-U6 与空载体对照组 pmc-H1-U6 无明显抑制作用,表明 siRNA 作用是序列特异性的。

总之,小环载体较普通载体有明显的竞争优势,高转染率、低免疫反应及外源基因在体内长效表达等优点,加上其大规模制备的困难也逐步被解决,使其成为一种安全、高效的新型载体。本实验中小环干扰 RNA 载体的构建及其在体外的成功表达,使其有望成为一种新型抗病毒基因治疗的载体,不仅为后续的体内实验,而且为将来 HBV 基因治疗的临床应用提供了可靠的理论和实验依据。

参考文献

- [1] Hannon GJ. RNA interference. *Nature*, 2002, 418 (6894): 244-251.
- [2] Gitlin L, Andino R. Nucleic acid-based immune system: the antiviral potential of mammalian RNA silencing. *Journal of Virology* 2003, 77(13): 7159-7165.
- [3] Chen Y, Cheng G, Mahato RI. RNAi for treating hepatitis B viral infection [J]. *Pharmaceutical Research*, 2008, 25 (1): 72-86.
- [4] Gardlik R, Palffy R, Hodosy J, Lukacs J, Turna J, Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Medical Science Monitor* 2005, 11(4): RA110-RA121.
- [5] Kootstra NA, Verma IM. Gene therapy with viral vectors. *Annual Reviews of Pharmacol and Toxicol* 2003, 43: 413-439.
- [6] Verma IM, Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annual Reviews of Biochem* 2005, 74: 711-738.
- [7] Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, 1999, 286 (5448): 2244-2245.
- [8] Marshall E. Volunteer's death prompts review. *Science*, 2001, 292(5525): 2226-2227.
- [9] Marshall E. Gene therapy a suspect in leukemia-like disease. *Science* 2002, 298(5591): 34-35.
- [10] Marshall E. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science* 2003, 299(5605): 320.
- [11] Pang AS. Production of antibodies against *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by injecting its plasmids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994, 202(3): 1227-1234.
- [12] Chen ZY, He CY, Meuse L, Kay MA. Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo. *Gene Therapy* 2004, 11: 856-864.
- [13] Bigger BW, Tolmachov O, Collombet JM, Fragkos M, Palaszewski I, Coutelle C. An *araC*-controlled bacterial *cre* expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy. *Journal of Biological Chemistry* 2001, 276: 23018-23027.
- [14] Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, Kay MA. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression *in vivo*. *Molecular Therapy* 2003, 8: 495-500.
- [15] Darquet AM, Cameron B, Wils P, Scherman D, Crouzet J. A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Therapy*, 1997, 4(12): 1341-1349.
- [16] Darquet AM, Rangara R, Kreiss P, Schwartz B, Naimi S, Delaère P, Crouzet J, Scherman D. Minicircle: an improved DNA molecule for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *Gene Therapy*, 1999, 6(2): 209-218.
- [17] Suzuki M, Kasai K, Saeki Y. Plasmid DNA sequences present in conventional herpes simplex virus amplicon vectors cause rapid transgene silencing by forming inactive chromatin. *Journal of Virology* 2006, 80(7): 3293-3300.

- [18] Vaysse L, Gregory LG, Harbottle RP, Perouzel E, Tolmachov O, Coutelle C. Nuclear-targeted minicircle to enhance gene transfer with non-viral vectors in vitro and in vivo. *Journal of Gene Medical* 2006 8(6):754-763.
- [19] Wu J, Xiao X, Zhao P, Xue G, Zhu X, Zheng L, Zeng Y, Huang W. Minicircle-IFN γ induces antiproliferative and antitumoral effects in human nasopharyngeal carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2006 12:4702-4713.
- [20] Mitaqishi M, Taira K. U6-promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells [J]. *Nature Biotechnology* 2002 20(5):497-500.
- [21] Brummelkamp TR, Bernards R, Aqami R. A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* 2002 296 (5567):550-553
- [22] Chen ZY, He CY, Kay MA. Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo. *Human Gene Therapy* 2005 16 (1):126-131.
- [23] Kay MA, He CY, Chen ZY. A robust system for production of minicircle DNA vectors. *Nature Biotechnology* 2010 28(12):1287-1289.
- [24] Tang H, McLachan A. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is critical determinant of viral tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001 98(4):1841-1846.

A minicircle DNA vector-mediated siRNA to stably suppress hepatitis B virus replication and expression

Xiaoman Liu¹, Zhuo Yang², Tao Feng^{1*}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

² School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: [Objective] We used a minicircle DNA vector system to express small interfering RNA (siRNA) and studied the inhibition of hepatitis B virus (HBV) replication and gene expression *in vitro*. [Methods] siRNA targeting HBV S gene (siHBS) was designed, synthesized and cloned into a minicircle DNA vector pMC. BESPX-MCS2. After sequencing, we transformed the recombinant pMC-H1-siHBS-U6 into *E. coli* ZYCY10P3S2T, and induced the degradation of its bacterial backbone by adding L-arabinose into the bacterial growth medium. As expected, a minicircle RNA interference (RNAi) vector pmc-H1-siHBS-U6 was generated only consisting of gene expression cassette. Then pmc-H1-siHBS-U6 was co-transfected into Huh-7 cells with HBV expression vector pHBV1.3. ELISA and Real-time PCR were performed to evaluate the inhibition effect of the secretion of HBsAg and HBeAg and the levels of HBV DNA and mRNA in Huh-7 cells. [Results] We Successfully established the minicircle-based RNAi vector pmc-H1-siHBS-U6, which can significantly inhibit the secretion of HBsAg and HBeAg in Huh-7 cells for two to three weeks. Real-time PCR results show that HBV DNA and mRNA levels were also down-regulated about 71% and 80%. [Conclusion] The minicircle DNA-based RNAi vector pmc-H1-siHBS-U6 can suppress HBV replication and gene expression specifically, efficiently and steadily. Thus, this study provided us a new siRNA delivery system and a new gene therapy strategy of HBV infection.

Keywords: minicircle DNA vector, hepatitis B virus (HBV), siRNA, Huh-7 cell

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Science Foundation of China (81071770)

* Corresponding author. Tel: +86-23-68485627; E-mail: fengtao9_9@yahoo.com

Received: 5 September 2011 / Revised: 14 December 2011