

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.37.019 [http://www.cjter.org/cjter-2012-qikanquanwen.html]

潘晓瑜, 吕延成, 王志勇, 樊俊, 周丹丹, 袁俊杰. 靶向UL5小干扰RNA对II型单纯疱疹病毒的抑制[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(37): 6931-6936.

靶向UL5小干扰RNA对II型单纯疱疹病毒的抑制**

潘晓瑜, 吕延成, 王志勇, 樊俊, 周丹丹, 袁俊杰

文章亮点: 以II型单纯疱疹病毒UL5基因为靶目标, 设计、合成特异性小干扰RNA。应用RNA干扰技术分析特异性小干扰RNA对II型单纯疱疹病毒UL5基因的干扰作用。结果显示针对UL5基因的有效小干扰RNA可以特异性降低II型单纯疱疹病毒的复制水平。

关键词: 小干扰RNA; II型单纯疱疹病毒; UL5; RNA干扰; RT-PCR; 组织工程

缩略语: II型单纯疱疹病毒: herpes simplex virus type-2, SV-2; 小干扰: small interfering RNA, siRNA

摘要

背景: 解旋酶-引发酶复合体是II型单纯疱疹病毒进行复制的必需基因, UL5基因为II型单纯疱疹病毒解旋酶-引发酶复合体的组成单位之一。

目的: 应用RNA干扰技术分析特异性小干扰RNA对II型单纯疱疹病毒UL5基因的干扰作用。

方法: 以II型单纯疱疹病毒UL5基因为靶目标, 设计、合成5对特异性小干扰RNA。通过Lipofectamine 2000脂质体将特异性小干扰RNA转染HEK293细胞。48h后行荧光定量RT-PCR检测UL5基因转录水平, 终点滴定法测定干扰后病毒滴度, 观察其干扰效果。

结果与结论: 小干扰RNA成功转染入细胞内。荧光定量RT-PCR结果显示, siRNA 722、siRNA 2 394、siRNA 2 513和siRNA 2 627均可不同程度降低靶mRNA表达, 病毒滴度检测结果显示siRNA 722、siRNA 2 394、siRNA 2 513和siRNA 2 627均可不同程度降低上清液中病毒感染滴度, 阴性对照组和siRNA 374对病毒感染滴度无影响。针对UL5基因的有效小干扰RNA可以特异性降低II型单纯疱疹病毒的复制水平。

遵义医学院珠海校区生化教研室, 广东省珠海市 519040

潘晓瑜, 女, 1984年生, 广东省乐昌市人, 汉族, 2007年韶关学院毕业, 主要从事肿瘤分子生物学研究。64262624@qq.com

通讯作者: 吕延成, 博士, 副教授, 遵义医学院珠海校区生化教研室, 广东省珠海市 519040

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344 (2012)37-06931-06

收稿日期: 2012-01-11
修回日期: 2012-02-25
(20111101014/G·W)

Restraint effect of small interfering RNA targeting UL5 gene on herpes simplex virus type II

Pan Xiao-yu, Lü Yan-cheng, Wang Zhi-yong, Fan Jun, Zhou Dan-dan, Yuan Jun-jie

Abstract

BACKGROUND: Helicase-primase complex is the necessary gene for the replication of herpes simplex virus type II (HSV-2), and UL5 gene is one of the composing units of HSV-2 helicase-primase complex.

OBJECTIVE: To analyze the interference effect of specific small interfering RNA (siRNA) on HSV-2 UL5 genes using RNA interference technology.

METHODS: To target at HSV-2 UL5 gene, we designed and synthesized five pairs of specific siRNA. By means of liposome Lipofectamine 2000, the specific siRNA would be transfected into the HEK293 cells. After 48 hours, fluorescence quantitative reverse transcription-PCR test was performed to determine the UL5 gene transcription as well as virus titer detection in order to observe the interference effect of siRNA.

RESULTS AND CONCLUSION: siRNA would be successfully transfected into the cells. The fluorescence quantitative reverse transcription-PCR test showed that siRNA 722, siRNA 2 394, siRNA 2 513 and siRNA 2 627 could variously reduce the expression of the target mRNA. The virus titer detection showed siRNA 722, siRNA 2 394, siRNA 2 513 and siRNA 2 627 could in various degrees lower the titer of virus infection in the supernatant, negative control group and siRNA 374 had no effect on the titer of virus infection. The siRNA which is effective to UL5 gene could specifically reduce the replication of HSV-2.

Pan XY, Lü YC, Wang ZY, Fan J, Zhou DD, Yuan JJ. Restraint effect of small interfering RNA targeting UL5 gene on herpes simplex virus type II. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(37): 6931-6936.

Department of
Biochemistry, Zhuhai
Campus, Zunyi
Medical College,
Zhuhai 519040,
Guangdong Province,
China

Pan Xiao-yu,
Department of
Biochemistry, Zhuhai
Campus, Zunyi
Medical College,
Zhuhai 519040,
Guangdong Province,
China
64262624@qq.com

Corresponding
author: Lu
Yan-cheng, Doctor,
Associate professor,
Department of
Biochemistry, Zhuhai
Campus, Zunyi
Medical College,
Zhuhai 519040,
Guangdong Province,
China
yjskyb@163.com

Supported by: the
Science and
Technology
Foundation of
Guizhou Province,
No. [2008]2313*; the
Special Fund of the
Governor of Guizhou
Province for Excellent
Scientific,
Technological and
Educational Talents,
No. (2009)122*

Received: 2012-01-11
Accepted: 2012-02-25

0 引言

II型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus type II, HSV-2)为双链DNA病毒,基因组约150 kb,编码77个蛋白质。HSV-2主要通过直接接触、性接触和垂直传播引起生殖器疱疹和新生儿感染。HSV-2不仅对患者及其性伴有直接的危害,还可以增加宫颈癌和艾滋病的发病概率^[1-2]。新生儿可通过垂直传播感染HSV-2,感染后可出现脑膜炎等症状,严重危害了新生儿的身体健康^[3]。目前临床用于治疗HSV-2的抗病毒药物不能完全抑制和清除潜伏的病毒,同时还受到不良作用和耐药性的限制,故研究开发用于治疗HSV-2感染新的药物和疫苗一直是临床关注的热点。

RNA干扰是广泛存在于真核生物甚至原核生物中的一种高度保守的序列特异性基因表达调控机制^[4]。随着研究的深入, RNA干扰作用机制被不断阐明, RNA干扰的理论日趋完善。RNA干扰技术现已广泛应用于基因功能、细胞信号转导通路、基因治疗和药物靶点筛选等研究领域^[5-10]。

有研究发现,小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)能够阻止病毒在多个感染阶段的复制,通过把病毒生命环节中的关键基因作为靶基因,特异性siRNA/双链RNA与之结合而阻断病毒多个环节的感染。这些研究结果显示了RNA干扰用于抵御病毒感染的潜力^[11]。

DNA病毒和RNA病毒的生命周期中都要经历RNA阶段,这为利用RNA干扰进行抗病毒研究提供了可能。通过干扰DNA病毒的mRNA、干扰RNA病毒的基因组或mRNA等,都可抑制病毒的复制。第1个利用RNA干扰在动物细胞中抑制病毒复制的报道发表于2002年结果发现siRNA像药物一样可进入细胞,有效降低了病毒滴度^[12],初步展示了RNA干扰增强细胞抗病毒侵袭的作用。此后,很多不同种、属的病毒都作为RNA干扰的靶病毒进行了研究,包括RNA病毒,如鼠疱疹病毒、反转录病毒如劳氏肉瘤病毒^[13-14]。

国际上针对HSV的RNA干扰治疗研究起步相对较晚。到目前为止,可以查阅的国内外使

用RNA干扰技术治疗HSV感染文献较少,并且绝大部分来自欧美国家^[15-19]。有学者报道,在体外使用针对HSV-1的糖蛋白E的siRNA,可以干扰HSV的糖蛋白E表达和功能,因此使侵入培养细胞的病毒产生更小的侵蚀斑。Palliser等^[16]发现,小鼠阴道宫颈黏膜上皮能摄取脂质体包裹的siRNA,被摄取的siRNA在局部能产生效果。体外实验中,针对某些靶基因筛选出有效抑制HSV-2的siRNA;转到体内实验,在阴道黏膜使用含siRNA的制剂,保护了受致死剂量HSV-2攻击的小鼠。这些结果显示了使用RNA干扰技术治疗HSV感染的可能性、有效性以及瞩目的前景。在国内冯海等^[20]研究发现针对UL30特异性siRNA能有效地抑UL30蛋白的表达,阻断HSV-2在HEK293细胞内的复制。还有研究发现用特异性的siRNA下调细胞P21基因表达时,可显著地抑制HSV-2 gB蛋白水平,减少培养细胞上清液中病毒50%的组织感染率^[21]。另外Perng等^[22]发现表达LAT的质粒能阻断Fas抗体诱导的细胞凋亡。LAT是单纯疱疹病毒在潜伏期间惟一大量表达和可被检测到的基因组转录产物,它被认为在单纯疱疹病毒潜伏的建立、维持和再激活过程中起重要的作用。

孙朝晖等^[23]研究发现HSV-2潜伏感染复发中LAT基因ORF的siRNA对LAT ORF表达有抑制作用。

HSV-2具有相对独立的自身复制酶系统,包括编码DNA复制聚合酶的UL30、编码DNA复制酶-螺旋酶的UL5、编码起始结合蛋白的UL9、编码单链DNA结合蛋白的UL29、编码DNA多聚酶亚单位的UL42、参与DNA复制的UL8、UL53等^[24-25]。解旋酶-引发酶复合体是HSV-2进行复制的必需基因,具有包括DNA解旋酶、引物酶、单链DNA依赖型ATP水解活性及与DNA结合能力的多重功能。最近有研究针对UL5和UL30基因或UL29和UL52在豚鼠模型上进行急性和复发性的HSV-2疾病的治疗,取得了较好的效果^[26-28]。UL5基因为HSV-2解旋酶-引发酶复合体的组成单位之一,基因序列全长3 404 bp。作者使用siRNA在线设计软件对Genebank上UL5的基因序列进行初步筛选后,对候选靶mRNA进行了二级结构预测、热动力学参数分析以及脱靶分析,并用BLAST分析排

除了与其他基因有高度同源性的序列。选择了5条序列作为靶序列并设计合成出对应的siRNA, 以分析特异性siRNA对UL5基因的抑制作用及对HSV-2复制的影响。

1 材料和方法

设计: 方法学体外实验。

时间及地点: 于2009-03/12在遵义医学院珠海校区完成。

材料:

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
胎牛血清、胰蛋白酶、总 RNA 抽提试剂盒、DMEM	上海生物工程技术有限公司
Lipofectamine2000	美国 Invitrogen 公司
opti-MEM I	美国 Gibco 公司
化学合成 siRNA、Cy3 荧光标记 siRNA	广州锐博生物公司
RNA-direct Realtime PCR Master Mix (SYBRGreen)	上海硕盟生物公司
DMSO	美国 MERK 公司
荧光显微镜	珠海黑马公司
全自动凝胶成像分析系统	英国 SYNGENE 公司
5810R 台式冷冻离心机	德国 eppendorf 公司
电泳仪、电泳槽	美国 Bio-red 公司
超低温冰箱	丹麦 Heto-Holten 公司
CO ₂ 培养箱	美国 SHEL 公司
倒置光显微镜	德国莱卡公司
ELx-800 型酶标仪	美国 Bio-TEK 公司

细胞株: HEK293细胞由遵义医学院珠海校区中心实验室惠赠。用含体积分数10%胎牛血清及100 KU/L青霉素, 100 mg/L链霉素的DMEM高糖培养基培养、传代, 取对数生长期细胞用于实验。

病毒株: HSV-2(333株)购自广州博特生物技术公司(来源于美国细胞收藏中心, ATCC), HSV-2在HEK293细胞中测定其50%的组织感染率为10⁷。

实验方法:

靶向HSV-2 UL5基因的siRNA的设计: 从GeneBank上获得HSV-2 UL5基因序列。针对UL5基因序列, 利用invitrogen公司在线siRNA设计软件设计siRNA, 使用RNA structure 4.6软件分析靶mRNA二级结构, 并用BLAST在线工具进行检索, 以排除与人基因组有高度同源性的序列。最终筛选出5条靶序列siRNA, 见表1。

表1 筛选 UL5 中的靶 mRNA 对应小干扰 RNA 序列
Table 1 The small interfering RNA (siRNA) sequence of the target mRNA in UL5

No.	Start site (nt)	siRNA sequence
1	374	Sense 5'-CGC AGA ACA UGU ACG UUA AUU-3' Antisense 3'-UUG CGU CUU GUA CAU GCA AUU-5'
2	722	Sense 5'-GCA GCA ACA UUA UCG UCA UUU-3' Antisense 3'-UUC GUC GUU GUA AUA GCA GUA-5'
3	2 394	Sense 5'-CUA CGG CAU CAG CUC CAA AUU-3' Antisense 3'-UUG AUG CCG UAG UCG AGG UUU-5'
4	2 531	Sense 5'-CCG AGU UCC UGC ACA UGA AUU-3' Antisense 3'-UUG GCU CAA GGA CGU GUA CUU-5'
5	2 627	Sense 5'-UGU GGU CAU UGU CUA UUA AUU-3' Antisense 3'-UUA CAC CAG UAA CAG AUA AUU-5'

siRNA转染: HEK293细胞在含体积分数10%胎牛血清的DMEM高糖培养基内, 体积分数5%CO₂、37 °C 湿化空气中常规培养, 取对数生长期细胞用于下面的实验。转染前1 d, 接种HEK293细胞至24孔培养板中, 每孔加入5 000-10 000个细胞。细胞生长达到30%-50%融合时, 将培养基吸弃, 更换为400 μL无抗生素、无血清的培养基。将lipofectamine 2000转染试剂轻轻摇匀, 然后吸取1 μL至1.5 mL EP管, 用50 μL Opti-MEM I 培养基稀释, 轻轻混和, 室温孵育5 min; 吸取荧光标记的siRNA 1.5 μL至1.5 mL EP管用50 μL Opti-MEM I 培养基稀释siRNA, 轻轻混和; 稀释好的lipofectamine 2000经过5 min的孵育后, 将之与稀释好的siRNA轻轻混和, 室温培养20min以形成siRNA-lipo2000混和物。将siRNA-lipofectamine 2000混和液逐滴缓缓加入含有细胞以及培养液的细胞培养板中, 轻轻摇晃, 使之混和。将培养板置于37 °C、体积分数5%CO₂培养箱中培养4-6 h后, 将每孔里含siRNA-lipo2000混合液的培养基移去, 更换新鲜的生长培养基。12 h后于荧光显微镜下观察转染效率。确定转染条件后, 细胞进行24孔板接种, 取5块培养板。每块板包括空白对照组(只加转染试剂); 阴性对照组(siNContraI_05815)和siRNA处理组。每组设3个复孔。接种细胞数10 000/孔, 脂质体转染量1μL/孔, 转染体系100 μL/孔, siRNA转染量1.25 μL/孔, 终浓度50 nmol/L。以Invitrogen公司Opti-MEM无血清无抗生素培养基稀释siRNA和脂质体。转染完成后置于37 °C、体积分数5%CO₂, 饱和湿度培养箱培养, 4-6 h

后更换新鲜的生长培养基。

HSV-2感染: siRNA转染过夜后, 更换培养基, 3 h 后每孔接种病毒, 48 h后收集细胞, 提取细胞总RNA, 用于mRNA的实时定量RT-PCR检测。同时收集细胞培养上清, 用于病毒滴度分析。

实时定量 RT-PCR 检测HSV-2 UL5 mRNA表达: 采用RNA提取试剂提取细胞总RNA, 根据吸光度($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$)测定RNA纯度及浓度。采用引物设计软件PrimerPremier 5.0设计出上、下游引物, 引物由上海生工生物有限公司合成。UL5上游引物5'-CCA ACG CCA GTC GCA TCA-3', 下游引物5'-TCC CGT CGA ACC CAA ACA-3', β -Actin上游引物5'-CGT ACC ACT GGC ATC GTG AT-3', 下游引物5'-GTG TTG GCG TAC AGG TCT TTG-3。反应条件: 90 °C 变性 30 s, 61 °C 反转录20 min, 95 °C变性30 s。PCR共45个循环: 95 °C 变性5 s, 55 °C退火10 s, 74 °C延伸15 s。采用Comparative Delta-delta Ct相对定量法, 然后各siRNA处理组以空白对照组为对照进行相对表达率的计算。

终点滴定法测定干扰后病毒滴度: 转染后48 h收集细胞培养上清液, 将上清培养液做10倍倍比稀释(10^{-2} - 10^{-6}), 100 μ L/孔接种到铺满细胞的96孔板上, 每个稀释度平行5孔, 并设不接种病毒的细胞对照组, 连续培养72 h, 观察细胞病变情况, 记录细胞病变效应结果。每样品重复测定3次, Reed-Muench法计算每毫升上清液病毒滴度(50%的组织感染率)。

主要观察指标: ①相对荧光定量RT-PCR法测定UL5基因mRNA表达。②终点滴定法测定干扰后病毒滴度。

统计学分析: 由潘晓瑜应用SPSS 11.0软件进行单因素方差分析, 多组间比较采用方差分析, 两两组间比较采用LSD *t* 检验, 所有数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 相对荧光定量RT-PCR法测定UL5基因mRNA表达 从转染siRNA后UL5 mRNA表达和统计学分析结果可知, 和空白对照组比较, 阴性对照组HSV-2 UL5基因mRNA相对表达量略有下降, 但差异无显著性意义($P > 0.05$)。与阴性对照组比较, siRNA 374表达量有下降, 但差异无显著性意义($P > 0.05$)。siRNA 722、siRNA 2 394、siRNA 2 531、siRNA 2 627 HSV-2 UL5基因mRNA相对表达量均下降, 与阴性对照组相比差异有显

著性意义($P < 0.01$)。siRNA各处理组中, 两两之间差异均有显著性意义($P < 0.01$), 其中siRNA 2 627和siRNA 722对UL5基因mRNA抑制作用最为明显, 见表2。

表2 转染小干扰RNA后UL5 mRNA表达和统计学分析结果
Table 2 Expression of UL5 mRNA after small interfering RNA (siRNA) transfection ($\bar{x}\pm s, n=27$)

Group	HSV-2 UL5 mRNA relative expression
Blank control	1.02 \pm 0.27
Negative control	0.94 \pm 0.07
siRNA 374	0.96 \pm 0.26
siRNA 722	0.30 \pm 0.14 ^a
siRNA 2 394	0.42 \pm 0.10 ^a
siRNA 2 531	0.41 \pm 0.19 ^a
siRNA 2 647	0.18 \pm 0.04 ^a

^a $P < 0.01$, vs. negative control group; HSV-2: herpes simplex virus type II

2.2 终点滴定法测定干扰后病毒滴度 从转染siRNA后各组的病毒滴度测定和统计学分析结果可知, 和空白对照组比较, 阴性对照组HSV-2 病毒滴度量略有下降, 但差异无显著性意义($P > 0.05$)。与阴性对照组比较, siRNA 374、siRNA 722、siRNA 2 394、siRNA 2 531、siRNA 2 627 HSV-2病毒滴度量均下降, 其中siRNA 722、siRNA 2 394、siRNA 2 531和siRNA 2 627与阴性对照组相比差异有显著性意义($P < 0.01$)。siRNA各处理组中, 两两之间差异均有显著性意义($P < 0.01$), 其中, siRNA 2 627和siRNA 722对HSV-2的抑制作用最为明显, 见表3。

表3 转染小干扰RNA后各组的病毒滴度测定和统计学分析结果
Table 3 The results of virus titer of herpes simplex virus type II after transfection ($\bar{x}\pm s, n=27$)

Group	Relative TCID50
Blank control	100.00 \pm 1.06
Negative control	96.18 \pm 1.28
siRNA 374	93.40 \pm 0.61
siRNA 722	32.82 \pm 0.46 ^a
siRNA 2 394	46.64 \pm 1.33 ^a
siRNA 2 531	42.11 \pm 1.58 ^a
siRNA 2 647	28.20 \pm 1.56 ^a

^a $P < 0.01$, vs. negative control group; siRNA: small interfering RNA; TCID50: 50% tissue culture infective dose

3 讨论

RNA干扰技术的出现为病毒感染性疾病的治疗提供了新手段, 其本质是siRNA与对应的mRNA特异结合、降解, 从而阻止mRNA的翻译。

HSV是具有相对独立自身复制酶系统的病毒。因此,选择影响病毒自身复制的重要成分设计靶标,开发抗病毒药物,是一种值得探索的抗病毒药物研制策略。解旋酶-引发酶复合体是HSV-2进行复制的必需基因,具有包括DNA解旋酶、引物酶、单链DNA依赖型ATP水解活性及与DNA结合能力的多重功能。UL5基因为HSV-2解旋酶-引发酶复合体的组成单位之一,基因序列全长3 404 bp,为DNA复制所必须的。

作者根据siRNA的作用机制,针对UL5基因使用相关生物信息学软件设计了5对siRNA,使用Lipofectamine 2000成功将其转染至人胚肾293细胞,荧光定量RT-PCR和终点滴定法测定干扰后的病毒滴度均显示,设计的5对siRNA之中有4对在病毒感染24 h后可不同程度地抑制UL5的mRNA的表达并降低病毒的滴度。其抑制效率依次为: siRNA 2 627 > siRNA 722 > siRNA 2 531 > siRNA 2 394, siRNA干扰效率的高低基本符合生物信息学软件对其效果的预测。siRNA 374对病毒无明显抑制作用($P < 0.05$)。分析其原因可能为: ①基因序列位于预测的非保守区,发生碱基突变的概率较高,当siRNA反义链的种子区发生碱基突变或非种子区碱基突变数大于2时,都会使干扰效果显著降低甚至消失。②靶mRNA的“可接近性”较差, siRNA无法顺利与其结合而发挥作用。这可以从本实验进行siRNA的设计依据得到很好的解释。

本实验还通过观察对不同时间点感染细胞细胞病变效应情况来判断子代病毒的生长情况。感染8 h,各组细胞均无明显病变出现,这是由于HSV-2在细胞内完成1个复制周期约需12 h,此时子代病毒尚未完成1个复制周期,而初期由于病毒复制的需要不会使宿主细胞产生病变。感染24 h时,各组细胞病变效应出现明显差异,这时病毒完成了1次复制,开始大量繁殖,而siRNA又处于最佳作用时期,由于抑制效果的不同,导致不同组中病毒数量不一,对细胞造成的影响也各不相同。

本实验还观察到, siRNA抑制病毒滴度的程度与UL5基因mRNA表达量的下降量并不完全同步,病毒滴度下降的程度总是相对较小。这可能与组成病毒自身复制酶系统各成分功能不同有关。UL5基因是HSV-2酶-引物复合体的成分之一,而除酶-引物复合体外,HSV-2的复制还需要其他蛋白的参与,由于代偿作用可能在一定程度上减轻敲除UL5基因后对病毒复制的影响。有研究发现,特异靶向UL27.2基因、UL29.2基因的2种siRNA,采用联合siRNA抑制包膜糖蛋白gB和DNA结合蛋白基因,阻止HSV-2病毒吸附和穿入以及干扰病毒

DNA合成复制,可以有效抑制HSV-2病毒感染和复制。联合靶向特异性siRNA可能以不同途径阻止HSV-2感染增殖,加强其对病毒的抑制^[29]。因此,若综合多个靶点进行siRNA设计,不仅可以防止由于病毒的对抗导致siRNA失效,从病毒复制的角度考虑也是一种提高干扰效果的策略。

致谢:感谢遵义医学院珠海校区研究生与科研部及中心实验室老师的指导和帮助。

4 参考文献

- [1] Johnson AM, Laga M. Heterosexual transmission of HIV-1. *AIDS*. 1998;2(1):549-556.
- [2] Zhu J, Hladik F, Woodward A, et al. Persistence of HIV-1 receptor-positive cells after HSV-2 reactivation is a potential mechanism for increased HIV-1 acquisition. *Nat Med*. 2009; 15(8):886-892.
- [3] Song B, Chen XS, Li WZ. Guowai Yixue: Pifu Xingbingxue Fence. 2003;29(1):45-48.
宋彪,陈祥生,李文忠.单纯疱疹病毒2型感染血清流行病学研究进展[J].国外医学:皮肤性病学分册,2003,29(1):45-48.
- [4] Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*. 2006;1:7.
- [5] Brown SJ, Mahaffey JP, Lorenzen MD, et al. With RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during the development of distant related insects. *Evol Dev*. 1999;1(1): 11-15.
- [6] Corttrell TR, Doering TL. Silence of the strands: RNA interference in eukaryotic pathogens. *J Trends Microbiol*. 2003;11:37-43.
- [7] Zhang H, Feng H. Distinct effects of knocking down MEK1 and MEK2 on replication of herpes simplex virus type 2. *Virus Res*. 2010;150(1-2):22-27.
- [8] Gailhouste L, Ezan F. RNAi-mediated MEK1 knock-down prevents ERK1/2 activation and abolishes human hepatocarcinoma growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2010;126(6):1367-1377.
- [9] Miller VM, Gouvion CM, Davidson BL, et al. Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32(2):661-668.
- [10] Miller VM, Xia H, Marrs GL, et al. Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100 (12):7195-7200.
- [11] Gao YZ, Jin Q. Bingdu Xuebao. 2005;21(4):314-317.
高永珍,金奇. RNA干扰抗病毒研究进展[J].病毒学报,2005, 21(4): 314-317.
- [12] Gitlin I, Kareisky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*. 2002;418 (6896):430-434.
- [13] Jia Q, Sun R. Inhibition of gamma herpesvirus replication by RNA interference. *J Viral*. 2003;77:3301-3306.

- [14] Hu WY, Myers CP, Kilzer JM, et al. Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference. *Curr Biol.* 2002;12: 1301-1311.
- [15] Cristofaro P, Ramratnam B. RNAi tackles a sexually transmitted disease. *Nat Biotechnol.* 2006;24(1):48-49.
- [16] Palliser D, Chowdhury D, Wang QY, et al. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature.* 2006;439:89-94.
- [17] Rossi JJ. A practical siRNA microbicide. *Gene Therapy.* 2006;13:1493-1494.
- [18] Lbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001;411:494-498.
- [19] Wu Y, Navarro F. Durable protection from Herpes Simplex Virus-2 transmission following intravaginal application of siRNAs targeting both a viral and host gene. *Cell Host Microbe.* 2009;5(1): 84-94.
- [20] Feng H, Zhang H, Tu J, et al. Zhongguo Shengwu Huaxue yu Fenzi Shengwu Xuebao. 2007;23(12):1025-1030.
冯海,张浩,屠静,等. 敲减单纯疱疹病毒II型(HSV-2)UL30蛋白表达可抑制HSV-2复制[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2007, 23(12):1025-1030.
- [21] Zhou Q, Zhang H, Wang B, et al. Zhongguo Shengwu Huaxue yu Fenzi Shengwu Xuebao. 2009;25(4): 339-344.
周琦,张浩,王波,等. 下调细胞P21WAF1/CIP1基因表达可抑制单纯疱疹病毒II型复制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(4): 339-344.
- [22] Perng GC, Jones C, Ciacci-Zanella J, et al. Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science.* 2000;289(5485): 1500-1503.
- [23] Sun ZH, Yang HL, Shi YL, et al. Zhongguo Pifu Xingbingxue Zazhi. 2009;23(12):774-777.
孙朝晖,杨慧兰,石玉玲,等. HSV-2潜伏感染激活人神经母细胞瘤细胞中siRNA对LAT ORF的抑制作用[J]. 中国皮肤性病学期志,2009,23(12):774-777.
- [24] Weindler FW, Heilbronn R. A subset of herpes simplex virus replication genes provides helper functions for productive adenoassociated virus replication. *J Virol.* 1991;65(5):2476-2483.
- [25] Dudek T, Mathews LC, Knipe DM. Disruption of the UL41 gene in the herpes simplex virus 2 dl5-29 mutant increases its immunogenicity and protective capacity in a murine model of genital herpes. *Virology.* 2008;372(1):165-175.
- [26] Morello CS, Levinson MS, Kraynyak KA, et al. Immunization with herpes simplex virus 2 (HSV-2) genes plus inactivated HSV-2 is highly protective against acute and recurrent HSV-2 disease. *J Virol.* 2011;85(7):3461-3472.
- [27] Hoshino Y, Pesnicak L, Dowdell KC, et al. Protection from herpes simplex virus (HSV)-2 infection with replication-defective HSV-2 or glycoprotein D2 vaccines in HSV-1-seropositive and HSV-1-seronegative guinea pigs. *J Infect Dis.* 2009;200(7):1088-1095.
- [28] Hoshino Y, Pesnicak L, Dowdell KC, et al. Comparison of immunogenicity and protective efficacy of genital herpes vaccine candidates herpes simplex virus 2 dl5-29 and dl5-29-41L in mice and guinea pigs. *Vaccine.* 2008;26(32): 4034-4040.
- [29] Liu JF, Guan CP, Tang X, et al. Zhonghua Shiyan he Linchuang Bingduxue Zazhi. 2010;24(3):199-201.
刘继峰,关翠萍,唐旭,等. siRNA对单纯疱疹病毒2型ICP4基因抑制作用的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2010,24(3): 199-201.

来自本文课题的更多信息—

基金声明: 贵州省科学技术基金(黔科合 J 字 [2008]2313 号)以及贵州省优秀科技教育人才省长专项资金(黔省专合字(2009)122 号)资助项目。

作者贡献: 实验设计者为吕延成, 实验实施者为潘晓瑜、王志勇、樊俊、周丹丹、袁俊杰, 资料收集者为潘晓瑜。潘晓瑜成文, 吕延成审校, 吕延成、潘晓瑜对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 无涉及伦理冲突的内容。

文章概要:

文章要点: HSV-2 是引起生殖器疱疹的主要病原体, 可增加艾滋病、宫颈癌等疾病的发生概率, 在国内生殖器疱疹发病率呈逐年上升趋势。尽管抗病毒药物对该病有一定的疗效, 但在治疗中的不良作用、停药后反弹、易产生耐药突变等问题仍未得到解决。

关键信息: RNA 干扰是近年来发展起来的一项新的基因调控技术, 具有高效、高特异性及毒性低等优点, 在病毒性疾病治疗方面具有广阔的应用前景。

研究创新之处与不足: 国内外未见选用 HSV-2 中的 UL5 基因设计合成 siRNA 对 HSV-2 的复制进行抑制的报道。不足之处在于 siRNA 转染 HEK293 细胞效率较低。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。