

Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract The androgen receptor (AR) belongs to the steroid hormone receptor superfamily that is a ligand-dependent transcription factor. It can regulate gene transcription through binding to specific DNA

element. The action mechanism of androgen receptors is summarized with a special emphasis on the specificity of the function of androgen receptors.

Key words androgen receptor, response element, transcriptional regulation, specificity

反义核酸抗肝炎病毒研究进展*

林汝仙 王升启

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 病毒性肝炎的治疗一直是困扰人类的一个难题。目前可利用的药物仍屈指可数。反义核酸技术的发展为病毒性肝炎的治疗带来了新的希望。利用反义 DNA, 反义 RNA 和核酶技术来抑制乙型肝炎病毒, 丙型肝炎病毒和丁型肝炎病毒, 在体外已进行了大量的研究, 体内也进行了一些研究, 为临床应用反义核酸治疗病毒性肝炎奠定了基础。

关键词 反义核酸, 抑制, 肝炎病毒

学科分类号 Q75, R512.6

病毒性肝炎是人类与其长期抗争的恶魔, 迄今已发现有 7 种类型。由于病毒性肝炎的传染性强, 尤其是乙型及丙型病毒性肝炎可形成慢性感染, 造成肝细胞的持续损伤, 加重肝脏病变, 常导致病情反复发作, 长期迁延不愈, 部分病人可发展成肝硬化和肝癌, 危害极大。近年来, 对病毒性肝炎的研究有较大的进展, 但能有效治疗病毒性肝炎的临床药物仍屈指可数, 尤其是对慢性乙型及丙型病毒性感染, 临床可用的药物仍是各型干扰素, 对有选择性的病人来说, 其治愈率也只有 30% ~ 40%^[1]。因此寻找一种有效的抗肝炎病毒药物已成为迫在眉睫的问题。

由于病毒的遗传物质不同于宿主细胞, 从基因治疗的角度去发现新的抗病毒药物已成为近年来的研究热点。反义核酸技术是一种新的基因治疗技术, 包括反义寡核苷酸 (ASON), 反义 RNA (asRNA) 及核酶三大部分。反义寡核苷酸是一段反义的 DNA 序列, 能与特异性的靶序列互补, 抑制靶基因的表达。由于它特异性强, 毒副作用小而成为人们研究抗病毒药物的热点。近几年来已有几种抗病毒反义寡核苷酸药物进入临床试验阶段。反义 RNA 是指一段与 mRNA 互补的 RNA 分子, 是通过将正常 cDNA 反向插入到启动子下游后转录产

生的。核酶是一种小的 RNA 分子, 能以序列特异的方式在特定的位点断裂 RNA 分子, 从而阻断特异蛋白的表达。核酶的抗病毒作用也引起了研究者的广泛兴趣和关注。本文主要对近几年来应用反义寡核苷酸, 反义 RNA 和核酶技术抗肝炎病毒的研究进展作一简要综述。

1 反义核酸抗乙型肝炎病毒

病毒性乙型肝炎 (HBV) 以其感染面广, 慢性化和难以治愈而成为临床治疗的难点。目前, 全世界约有 3 亿人感染 HBV, 我国乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 的携带率占全国人口的 9.8%, 占全世界感染者的 1/3 强。干扰素是目前临床上唯一可用于治疗 HBV 感染的药物, 但治疗效果不好, 随着反义寡核苷酸技术的产生和发展及对 HBV 基因结构, 功能和复制等主要环节的认识和了解, 应用 ASON 来抑制 HBV 基因的复制和表达在体外已进行了大量的研究, 体内也进行了一些研究。体外研究主要采用转染了 HBV DNA 并能长期稳定分泌病毒的肝癌细胞系进行的 (HepG2,

* 国家“863”国家自然科学基金 (102-08-04-01) 及总后“9.5”重点课题 (962007) 资助。

收稿日期: 1997-12-15, 修回日期: 1998-04-20

Huh7 等). 分别针对 HBV 基因的吸附、转录、反转录、翻译和包装等阶段设计出各类 ASON, 体外抑制 HBV 的复制. 主要的靶部位有 Pre S、DR1、Pol、SP 启动子转录 mRNA 帽区、S 基因、C 基因、Poly A 增强信号区、RNA 前导序列等, 针对这些部位设计的 ASON 均能不同程度的抑制 HBsAg、HBeAg 或 HbcAg 的表达, 对病毒 DNA 也具有不同程度的抑制作用^[2,3]. Korba 等^[4]针对以上不同部位合成了 56 条不同的硫代 ASON (14 ~ 23 nt), 分别检测了它们对 HepG2. 2. 15 细胞中 HBsAg、HBeAg、HbcAg 及 HBV DNA 的抑制效果, 结果表明: 包含 S 基因起始编码子的 ASON 均能有效抑制 HBsAg 的产生和病毒颗粒的释放, 但不影响细胞内 HBV 的复制; 针对 C 基因的 ASON 能抑制病毒颗粒的产生和细胞内 HbcAg 和 HBV DNA 复制中间体的水平; 针对 HBV 包装信号的茎环结构上游的 ASON 能最有效的抑制 HBV 的复制, 但针对 HBeAg 和 HBV 聚合酶基因区的 ASON 却不能影响 HBV 的复制. Goodarz 等^[5]针对 HBV 基因 S 区的 5 个位点 (SP2 启动子转录 mRNA 帽区, Pre-s2 基因内部, S 基因翻译起始区, S 基因起始区下游 10 个碱基区和 S 基因内部) 设计了 6 段 ASON, 以 17.4 $\mu\text{mol/L}$ 的终浓度与 PLC/PRF5 共同孵育 72 h 后检测 HBsAg 的分泌量, 结果发现, 针对前 4 个位点设计的 ASON 对 HBsAg 有明显的抑制作用, 其中以 S 基因翻译起始区的作用最强, 抑制率达 96%. 我国姚志强等^[6]的研究也表明针对 HBV mRNA SP2 增强子帽区, poly A 增强信号区的硫代 ASON 能有效抑制 HBsAg 的产生, 抑制率达 85% ~ 90%, 对 HBeAg 的抑制率也近 50% ~ 60%. 国内还有其他一些单位也展开了类似的工作. 由于缺乏一个很好的动物模型, 对抗 HBV 反义寡核苷酸的体内作用研究进展较慢. 1993 年, Offensperger 等^[7]第一次用针对 Pre S 基因 5' 区的反义寡核苷酸 AS2 以 20 μg 每克体重的剂量腹腔注射到鸭肝炎病毒 (DHBV) 感染的北京鸭中, 连续 10 d, DHBV 的复制几乎被完全抑制, 血清中的 DHBsAg 及肝中的 HbcAg 也消失了. Moriya^[8]等用一个转染了的 HBV X 基因的肝癌小鼠做模型, 将一段含 HBV X 基因起始编码子的硫代 ASON 腹腔注射到小鼠体内, 每周 3 次, 连续 8 周, 能有效的抑制肝脏 HBV X 基因的表达, 阻止小鼠癌细胞恶性化. 这一研究表明针对 HBV X 基因的 ASON 也许可用于阻止 HBV 感染成

肝癌.

ASON 的稳定性及透膜性是影响 ASON 作用的一个重要因素. 通过对 ASON 进行各种化学修饰能有效地提高它在细胞内的稳定性, 这些修饰主要是对磷酸二酯键中的氧原子进行各种取代, 包括用硫基、甲基、甲氧基、乙氧基等取代, 以提高 ASON 对核酸酶的抗性, 硫代是目前最常用的修饰方式. ASON 的透膜性直接影响到细胞摄入 ASON 的量, 因而是目前进行 ASON 研究的一个热点. 在肝细胞的表面有独特的无唾液酸糖蛋白受体 (ASGP-R), 将 ASON 连接到 ASGP-R 配体上, 能定向地将 ASON 导到肝细胞, 增加肝细胞对 ASON 的摄取量^[9]. 目前人们已对许多肝细胞特异的 ASON 载体进行了研究^[10], 这为进一步地进行反义寡核苷酸的体内和临床研究奠定了基础. 由于反义 RNA 能在转染的细胞中连续、稳定地表达, 对整合的病毒能提供长期的治疗效应, 因此这一技术也被用于抑制 HBV 的复制. Wu 等^[11]构建了三个互补于 HBsAg mRNA 整个编码区 (1.4 kb), 1.0 kb 和 5' 区的 582 bp 的反义 RNA 表达质粒, 在体外翻译系统, 三个反义 RNA 均能以浓度依赖的方式抑制 HBsAg mRNA 的翻译, 进一步将其克隆到哺乳动物细胞表达载体上, 转染到 Hep 3B 细胞, 几乎完全阻抑了 HBsAg 的产生, 转染后抑制率持续 10 个月左右. 在反义 RNA 表达的细胞, HBV mRNA 的水平显著低于对照细胞, 这表明反义 RNA 抑制 HBsAg 合成部分可能是通过降低 HBV mRNA 水平而起作用的. 这一研究第一次证明了反义 RNA 对 HBV 基因表达的抑制作用, 也为治疗 HBV 感染提供了一条新的途径.

利用核酶抑制 HBV 在体外也进行了一些研究. Beck 等^[12]针对 HBV 基因设计了几个锤头型核酶, 在体外能有效的断裂 HBV 基因. 将 HBV 表达质粒和核酶共转染到 Huh7 细胞中, 发现在细胞内核酶只能中等程度抑制 HBV 前基因组的产生, 而当细胞裂解后, 核酶能有效的断裂 HBV 前基因组 RNA, 尤其当用蛋白酶 K 和酚抽提后, 核酶的活性大大提高, 这可能是由于细胞内存在着一些蛋白质, 与基因结合, 从而抑制了核酶与靶 RNA 的杂交; 另外, 细胞内 Mg^{2+} 的浓度太低也可能是影响核酶活性的一个原因. 总之, 核酶在体内的活性是一个很复杂的问题, 仍需进行大量的研究.

2 反义核酸抗丙型肝炎病毒

丙型肝炎病毒 (HCV) 为一正的单链 RNA, 与乙型肝炎病毒感染一样, HCV 感染也易慢性化, 并进一步发展成为肝癌. 估计世界上约有 1% 的人感染了 HCV, 20% ~ 40% 的病人将发展成肝硬化或肝癌. 目前临床上可用于治疗 HCV 感染的较有效药物也只有干扰素.

由于 HCV 基因的变异性较高 (同源性在 67% 左右), 其变异性被认为是感染复发率高的一个原因^[13], 而其 5' 非编码区 (5' noncoding region, 5' NCR) 是高度保守的 (92% ~ 100% 的同源性), 因此抗 HCV 的 ASON 大部分是针对这一部位设计的. Wakita 等^[14]首先研究了 ASON 抗 HCV 的作用. 他们针对 HCV 5' NCR 的 nt38~65, 134~175, 312~339 合成了三段 ASON, 在一个无细胞蛋白质合成系统中, 能有效抑制病毒蛋白的翻译, 表明这些区域对 HCV RNA 的翻译是重要的, 但由于缺乏一个很好的细胞模型, 这些 ASON 在细胞内的作用仍不清楚. Mizutani 等^[15]发现一个嗜人 T 淋巴细胞病毒 I 型 (HTLV-1) 感染的细胞系 MT-2 能支持 HCV 的复制. 他们用 MT-2 的研究表明: 针对 HCV C 基因含起始编码子的一段 ASON (342~361) 及其下游的一段序列 (346~363) 均能特异地抑制 HCV 的复制, 而针对起始编码子上游的一段序列 (321~340) 则只有轻微的抑制作用. Alt^[16]的实验也表明, 针对 HCV 5' NCR nt326~348 的硫代反义核酸, 在体外能有效抑制受 HCV RNA 5' NCR 调控的报告基因荧光素酶的活性, 当浓度为 4.14 $\mu\text{mol/L}$ 时, 抑制率达 96%. 利用核酶抑制 HCV 的复制体外也进行了一些研究. Lieber 等^[17]针对 HCV 5' 端的高度保守区设计了 6 个锤头型核酶, 用重组的腺病毒载体进行表达, 联合或单独应用能有效抑制 CHO 细胞中 HCV RNA 的表达. 从慢性 HCV 感染者体内分离肝细胞进行培养, 并转染含核酶的腺病毒载体, 也能有效降低 HCV RNA, 而且对来自二个由不同基因型 HCV 感染的病人的肝细胞都是有效的. 由于腺病毒载体表达的产物能够在体内直接到达肝脏, 因此, 这一研究为临床上利用核酶治疗 HCV 感染提供了新的希望. Welch 等^[18]则针对 HCV 5' 非翻译区设计了 4 个发夹型核酶 CR2、CR6、CR7、CR8, 用 HCV 5' NCR 的 nt38~187 这一片段作为底物, 体外研究发现 CR2 能以时间依赖的方式切

割底物, 在作用 2 h, 底物被切割 32.2%, 而当底物为 HCV 的 nt38~698 时, CR2 在体外的切割活性就很低, 除非底物在切割前预先进行变性, 这可能是由于底物中存在二级结构, 使核酶不能达到切割部位. 通过设计一些能减少底物 RNA 二级结构的 RNA 分子, 能使 CR2 的活性增强 3~5 倍. 另外, 他们还针对 HCV RNA 包被蛋白编码区设计了三个核酶, 体外均能有效切割 HCV nt38~698 的底物 RNA. 随后, 他们构建了这些核酶的真核表达载体, 分别在 HT1080 和 HeLa 细胞中分析它们的切割活性, 结果表明能有效抑制报告基因抗性克隆的产生, 在未感染的 HepG2 和 HT1080 细胞中稳定表达核酶能阻止随后的 HCV 感染. 这些结果表明抗 HCV 核酶在人中具有抑制 HCV 基因表达和感染的潜力, 但核酶要应用到体内, 仍需进行大量的研究.

3 反义核酸抗丁型肝炎病毒

丁型肝炎病毒 (HDV) 是一缺陷型单股环状负链 RNA 病毒, 需 HBV 的辅助方可感染人体, 其与 HBV 同时或重叠感染常导致肝炎慢性化或重型化. HDV 是目前已知的唯一具有核酶活性的动物病毒, 其基因链和抗基因链均具有自裂活性, 核酶为假结样 (pseudoknot-like) 结构, 在 HDV 复制过程中起着关键的作用^[19], 这从理论上为利用 ASON 抑制核酶活性以阻断 HDV 复制提供了理论依据. 用反义核酸阻断 HDV 感染在国外还未见报道. 我们室和第三军医大学及 302 医院合作进行了这方面的工作. 我们在进行了中国人 HDV 核酶活性区 cDNA 克隆及序列分析, 并构建了含 HDV 核酶 cDNA 片段的质粒 (PHDV_{rz} 227) 的基础上, 以 HDV 基因链核酶区具有重要作用的 nt721~735 位核苷酸为封闭靶序列, 设计合成了 15 聚的 ASON, 发现在体外能有效抑制 112nt 核酶催化的自裂反应, 并进一步对此 ASON 进行硫代修饰, 观察其在 HDV 感染的树鼯动物模型体内的作用, 结果表明能较好地阻断树鼯体内 HDV 的感染^[20]. 这些研究为深入进行 ASON 的抗丁型肝炎病毒作用及临床治疗提供了重要依据.

综上所述, 应用 ASON 技术抗肝炎病毒研究已取得了一些可喜的成绩, 为进一步过度到临床应用奠定了基础. 但由于该领域的研究毕竟刚起步不久, 仍有许多问题亟待解决. ASON 的修饰和导向仍是 ASON 治疗研究中的二个重要问题. 核酶虽

能特异性切割病毒 RNA, 但要达到理想的治疗目的还需改善其透膜性和稳定性. 对 HBV 和 HCV 来说, 如何从众多的作用部位中筛选出最佳的 ASON 序列仍需进行大量的研究工作. ASON 在体内的抗病毒活性可利用的资料仍很有限, 对它们在体内的药动学、药效学、毒副作用、抗病毒活性评价等仍需进行探讨, 建立更多合适的动物模型也极为迫切. 另外, ASON 的大量制备及成本问题也是影响 ASON 推广应用的二个关键问题. 尽管如此, ASON 无疑为肝炎病毒的治疗带来了新的希望. 相信不久的将来, 这些问题都将得到解决, ASON 将成为一种有效的抗肝炎病毒新药物.

参 考 文 献

- 1 Wong D K H, Cheung A M, O'Rourke K, *et al.* Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B antigen positive chronic hepatitis B. *Ann Intern Med.* 1993, **119** (4): 312~ 323
- 2 Offensperger W B, Blum H E, Gerokw. Therapy of hepadnavirus infection using antisense oligonucleotides. *Intervirology*, 1995, **38** (2): 113~ 119
- 3 Sang-Hwan OH, Yeh B H, Kim S H. Inhibition of HBV replication by antisense oligodeoxyribonucleotides in HepG2 cells transfected with a cloned HBV DNA. *Yonsei Medical Journal*, 1995, **36** (6): 527~ 533
- 4 Korba B E, Gerin J L. Antisense oligonucleotides are effective inhibitors of hepatitis B virus replication *in vitro*. *Antiviral Res.* 1995, **28** (3): 225~ 242
- 5 Goodarzi G, Gress S C, Tewari A, *et al.* Antisense oligodeoxyribonucleotides inhibit the expression of the gene for hepatitis B virus surface antigen. *J Gen Virol*, 1990, **71** (12): 3021~ 3025
- 6 姚志强, 周家兴, 郭 军, 等 (Yao Z Q, Zhou J X, Guo J, *et al.*). 反义核酸抗乙型肝炎病毒基因治疗基础研究. *中华传染病杂志* (*Chin J Infectious Diseases*), 1996, **14** (1): 6~ 10
- 7 Offensperger W B, Offensperger S, Walter E, *et al.* *In vivo* inhibition of duck hepatitis B virus replication and gene expression by phosphorothioate modified antisense oligodeoxynucleotides. *EMBO J*, 1993, **12** (3): 1257~ 1262
- 8 Moriya K, Matsukura M, Kurokawa K, *et al.* *In vivo* inhibition of hepatitis B virus gene expression by antisense phosphorothioate oligonucleotides. *Biochemical Biophys Res Commu*, 1996, **218** (1): 217~ 223
- 9 Madon J, Blum H E. Receptor mediated delivery of hepatitis B virus DNA and antisense oligodeoxynucleotides to avian liver cells. *Hepatology*, 1996, **24** (3): 474~ 481
- 10 Rensen P C, de Vruet R L, Berkel T J. Targeting hepatitis B therapy to the Liver: clinical pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet*, 1996, **31** (2): 131~ 155
- 11 Wu J W, Gerber M A. The inhibitory effects of antisense RNA on hepatitis B virus surface antigen synthesis. *J General virology*, 1997, **78** (3): 641~ 647
- 12 Beck J, Nassal M. Efficient hammerhead ribozyme mediated cleavage of the structured hepatitis B virus encapsidation signal *in vitro* and in cell extracts, but not in intact cells. *Nucleic Acids Res.* 1995, **23** (24): 4954~ 4962
- 13 Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology*, 1995, **21** (2): 570~ 583
- 14 Wakita T, Wands J R. Specific inhibition of hepatitis C virus expression by antisense oligonucleotides. *J Biol Chem*, 1994, **269** (19): 14205~ 14210
- 15 Mizutani T, Kato N, Hirota M. Inhibition of hepatitis C virus replication by antisense oligonucleotide in culture cells. *Biochem Biophys Res Commu*, 1995, **212** (3): 906~ 911
- 16 Alt M, Renz R, Hofschneider P H. Specific inhibition of hepatitis C viral gene expression by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Hepatology*, 1995, **22** (4): 707~ 717
- 17 Lieber A, He C Y, Polyak S J, *et al.* Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus mediated expression of ribozymes. *J Virology*, 1996, **70** (12): 8782~ 8791
- 18 Welch P J. Apotential therapeutic application of hairpin ribozymes: *in vitro* and *in vivo* studies of gene therapy for hepatitis C virus infection. *Gene Ther*, 1996, **3** (11): 994~ 1001
- 19 Perrotta A T, Been M D. A pseudoknot-like structure required for efficient self cleavage of hepatitis delta virus RNA. *Nature*, 1991, **350** (6317): 434~ 438
- 20 毛 青, 王升启, 李奇芬, 等 (Mao Q, Wang S Q, Li Q F, *et al.*). 反义寡核苷酸抗丁型肝炎病毒的作用. *免疫学杂志* (*Immunological J*), 1996, **12** (1): 5~ 8

The Advance of Antisense Nucleotides Against Hepadnavirus. LIN Ru-Xian, WANG Sheng-Qi (*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract Therapy of hepadnavirus infection is still one of the most difficult problems for human beings. At present few drug can be used for therapy. Antisense strategies against hepadnaviral infections gives a new hope for patients. A lot of study was carried out *in vitro*, and very good results were shown. Some investigation have been done *in vivo*. These results demonstrate the potential clinical use of antisense nucleotides for hepadnavirus infection.

Key words antisense nucleotides, inhibit, hepatitis virus