

RNAi 技术靶向 HBV 相关宿主因子治疗 慢性乙肝的研究进展 *

赵荣荣 韩秋菊 张 建 **

(山东大学药学院免疫药物学研究所, 济南 250012)

摘要 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种嗜肝性 DNA 病毒。HBV 慢性感染是导致肝炎、肝硬化以及肝癌的一个重要原因。早期抗 HBV 研究策略一般是靶向 HBV 自身进行干预, 包括核酸药物、干扰素药物等。然而, 由于病毒易突变, 且易发生耐药, 近年研究者将治疗靶点逐渐转向与 HBV 入侵、复制及组装等相关的宿主蛋白, 这为抗慢性 HBV 感染治疗带来了新的视野和思路。因此, 基于 RNAi 技术并靶向宿主蛋白抗 HBV 的策略受到研究者的青睐, 并且取得良好的治疗效果。本文将对这一研究领域的最新进展作一综述。

关键词 HBV, 宿主蛋白, RNAi

学科分类号 R967

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0014

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)最早于 1966 年被鉴定, 是一种主要经过血液、生殖系统或消化道等体液途径传播的嗜肝性 DNA 病毒。慢性 HBV 感染是导致肝炎、肝硬化以及肝癌的一个重要原因。目前, 全世界已经有超过 2.4 亿 HBV 慢性感染者, 每年死于 HBV 慢性感染疾病的人数高达 70 万^[1-2]。中国也是 HBV 感染的重灾区。因此, 面对数量庞大的 HBV 感染和死亡人数, 寻找预防和治疗慢性 HBV 感染策略一直是临床医学和公共卫生所面临的巨大挑战。

目前, 临床上治疗 HBV 的药物主要有干扰素以及核苷/核苷酸类似物(如拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦等)。但是, 干扰素对于 HBeAg 阴性的患者效果并不显著, 适应率较低(~30%), 且副作用较大, 常伴随疲劳、恶心、腹痛等不良反应^[3]。虽然核苷/核苷酸类似物可通过抑制 HBV DNA 多聚酶的活性而直接抑制病毒的复制, 从而有效降低血清 HBV 的 DNA 含量。但是, 治疗停止后易出现复发, 长期应用诱发病毒突变产生耐药^[4], 这些仍是对有效控制慢性 HBV 感染的巨大挑战。因此, 寻找有效的慢性 HBV 感染治疗策略仍是目前亟待解决的问题。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术的诞生使得人们可以根据自己的需要高效、特异地沉默病毒 mRNA, 从而抑制病毒抗原产生, 为病毒感染及相关疾病治疗提供了一柄利器。另外, 由于病毒的复制过程需大量宿主细胞蛋白质的帮助, 因此, 在不损害宿主的前提下, 利用 RNAi 技术靶向于 HBV 感染相关的关键宿主因子, 有望成为慢性 HBV 感染治疗的新策略。

1 RNAi 靶向 HBV 基因组

RNAi 是指由小非编码 RNA 诱导靶 mRNA 降解, 导致翻译抑制或促使异染色质形成等, 进而沉默基因表达, 产生相应的功能表型缺失现象^[5]。HBV 是目前已知的感染人类最小的双链 DNA 病毒, 且由于具有重复的基因序列, 故其基因排列紧

* 国家自然科学基金(81373222, 81172789), 山东省重点研发计划(2017GSF18159)和山东省自然科学基金博士基金(ZR2017BH029)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0531-88383781, E-mail: zhangj65@sdu.edu.cn

收稿日期: 2018-01-09, 接受日期: 2018-04-17

密, 利用率高, 能够编码病毒生存需要的多种成分, 其产生的 4 个转录本(S、C、P、X 转录本), 虽然起始于 4 个不同的启动子, 但它们终止于同一个多聚腺苷位点, 理论上单个 siRNA (small interfering RNA) 可以同时沉默 4 种病毒 mRNA. 另外, HBV 在自我复制过程中是利用自身前基因组 RNA (pregenomic RNA, pgRNA)来逆转录合成 DNA. 因此, RNAi 不仅可以靶向沉默 HBV 基因抑制其蛋白质表达, 也可以沉默 HBV pgRNA 抑制病毒复制, 故 RNAi 技术可以应用于慢性 HBV 感染治疗^[6-7].

设计靶向于 HBV 基因区的 siRNA, 是 RNAi 技术应用于慢性 HBV 感染治疗最常见最直接的研究方法.

RNAi 成功应用于慢性 HBV 感染治疗主要取决于两个重要因素, 一是筛选特异性的、有效沉默 HBV 基因组的 siRNA 靶序列, 并使其稳定表达, 二是为 siRNA 或 siRNA 表达载体开发安全有效的传输系统^[8]. 大量实验表明, 针对不同靶点的 siRNA 对抑制 HBV 的复制在共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA)、mRNA 和蛋白质水平上均达到预期效果. 近几年, 为使 RNAi 更适应抗慢性 HBV 感染临床应用的需要, 许多学者针对小干扰 RNA 靶序列化学修饰、转导方法及各种联合策略的选择等方面进行了大量研究 (表 1).

Table 1 Studies using RNAi to target HBV genome

表 1 利用 RNAi 技术靶向于 HBV 基因组的研究

靶点	靶序列表达形式	递送载体	结果	文献
X	H1 启动的 shRNA 表达载体	同时表达 shRNA 和 “tough decoy” 的双顺反子腺病毒载体	阻断 siRNA 正义链的非特异激活, 提高了 RNA 干扰的特异性, 更加安全有效地抑制 HBV 在小鼠体内的复制	[9]
X	U6 启动的 shRNA 表达质粒	聚乙二醇化辅助病毒依赖型腺病毒载体	能安全、有效地抑制 HBV 复制长达 8w	[10]
X	Guanidinopropyl (GP) 修饰的 siRNA	新型聚阴离子亲肝脂质体	修饰后的 siRNA 制剂能更加安全稳定地抑制 HBV 在小鼠体内的复制	[11]
HBV 基因组保守区域	siRNA 与亲肝性胆固醇共轭结合	N-乙酰半乳糖胺修饰的蜂毒多肽载体(NAG-MLP)	HBV 抗原和 DNA 多个数量级减少, 单次注射一个月后, 表面抗原抑制率高达 99%, 且效果稳定.	[12]
S、C、P、X	多条 HBV siRNA 等比例混合	多功能信封式纳米载体(MEND)	载体能成功递送 siRNA 至肝内, 体外体内均能降低 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg	[13]
S、C、P、X	3 条 HBV-siRNA 等比例混合	N-甲基-D 半乳糖胺修饰的聚乙二醇化脂质体	能特异性地传输 siRNA 入肝细胞内, 降低非特异性传输引起的炎症反应, 且不影响 siRNA 的沉默效果	[14]

缩略词: X, X 蛋白; C, 核心抗原; P, 聚合酶; S, 表面抗原; NAG-MLP, N-acetylgalactosamine-conjugated melittin-like peptide; MEND, multifunctional envelope-type nano device.

2 RNAi 靶向宿主基因抗慢性 HBV 感染治疗策略

大量研究报道, 多种宿主蛋白对于 HBV 在宿主体内持续存在是至关重要的. 宿主蛋白可与 HBV 病毒蛋白相互作用, 影响 HBV 的感染、复制和生命周期, 使病毒不断适应和调节宿主的环境, 最终达到在宿主细胞生存的目的. 另外, 介导

HBV 入侵肝细胞以及和免疫逃逸有关的宿主分子在慢性 HBV 感染过程中同样扮演着重要角色^[15]. 因此, 与 HBV 相关的宿主基因也可以成为 RNAi 治疗的一个新靶标. 并且, 与核苷类似物的作用机制不同, 以宿主蛋白为靶点的抗 HBV 治疗不会对病毒产生选择性压力, 从理论上讲, 长期作用不易产生因病毒变异而诱发耐药的现象. 另外, 与靶向于 HBV 基因组相比, 以宿主蛋白为靶点的 RNAi

治疗大大降低了由于病毒突变所引起的沉默效率低等现象. 因此, 靶向这些分子成为抗慢性 HBV 感染治疗的研究热点.

2.1 靶向 HBV 入侵的宿主蛋白

与 HBV 入侵细胞有关的宿主蛋白是理想的靶点分子. 去唾液酸糖蛋白受体 1 (asialoglycoprotein receptor 1, ASGPR1) 是一种特异性表达在肝脏窦状小管和基底外侧的肝实质细胞表面的转膜分子, 主要介导肝脏对去唾液酸糖蛋白的吸收和降解. ASGPR1 可与 HBV 病毒颗粒特异性结合, 并介导其进入肝细胞^[15-16]. 利用 ASGPR1 配体、抗体、反义核酸等方式阻断该通路后, 可明显抑制 HBV 对肝细胞的入侵, 进而影响 HBV 的复制^[17-19]. 采用 microRNA 介导的 RNAi 技术沉默 ASGPR1 在 HepG2.2.15 细胞的表达, 细胞培养上清液中的 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 水平均明显下降; 虽然对 HepG2.2.15 细胞的增殖并没有显著影响^[20], 其在动物模型和患者体内的抗病毒效果以及对宿主本身的影响尚需进一步研究.

2.2 靶向与 HBV 转录相关的宿主基因

人源 La 蛋白(hLa)是最早应用 RNAi 技术靶向 HBV 治疗的宿主蛋白分子, 该蛋白质属于 RNA 结合蛋白家族的一员, 是一类保守的 RNA 结合磷酸化蛋白, 含有 RNA 识别基序(RNA recognition motifs, RRM), 参与 RNA 的代谢, 终止 RNA Pol III 的转录, 能与多种病毒 RNA 和细胞 RNA 相互作用, 起到稳定 RNA 的作用^[20]. La 蛋白能以磷酸化依赖模式与 HBV RNA 结合, 保护 HBV mRNA 免受核酶的降解, 从而使 HBV 的复制和表达得以顺利进行^[21]. 研究报道, 抑制剂阻断 La 蛋白活性后, 能选择性改变宿主体内多种与 HBV 生存相关的 lncRNA(long noncoding RNA)和 miRNA(microRNA), 从而有效抑制 HBV 的复制, 是一个很好的 HBV 治疗靶点^[22-24]. 将靶向 La 蛋白的 siRNA 序列转染入 HepG2.2.15 细胞后, 在有效抑制 La 蛋白表达的同时, HBV mRNA 表达受到显著抑制, 而 HBsAg 和 HBeAg 的分泌水平并未发生明显变化^[25]. 值得注意的是, 沉默该分子对宿主细胞并不会产生明显的毒副反应.

2.3 靶向与 HBV 复制相关的宿主基因

紫外线损伤 DNA 结合蛋白复合物(UV-damaged DNA-binding protein, UVDDDB, 简称 DDB)能结合于 UV 损伤的 DNA, 具有核酸切除修复功能^[26], 并且能直接作用于 HBx 蛋白, 在 HBV 复制、肝细

胞周期和凋亡调控中发挥重要作用^[27]. Tang 等^[28]研究发现, 利用 siRNA 沉默靶 DDB1 基因后, 不仅能抑制 HBV 的转录, 阻断 HBV 的复制过程, 还能降低 HBx 的稳定性. 当与沉默 HBx 的 siRNA 联用时, 可进一步抑制 HBV 的复制. 同样, Guo 等^[29]也证明, 利用 RNAi 技术降低 DDB1 的活性后, HBV 的复制和基因表达均会受到抑制; 并发现, 在这一过程中, 可能通过抑制 HBx 与胞内 DDB1-E3 泛素连接酶结合, 从而靶向降解可促进 HBV cccDNA 形成的宿主限制因子 smc5/6 复合体, 进而影响病毒基因组的转录, 阻断 HBV 的复制^[30]. 研究者发现, 沉默 HBV 感染细胞的 DDB1 后并不会影响细胞的增殖, 且不会对宿主细胞产生明显的毒性反应^[29]. 该发现为阻止 HBV 持续性感染提供了一条全新的干预途径.

宿主的酪氨酸磷酸二酯酶(topoisomerase, TDP)是一种 DNA 修复酶, 包括 TDP1 和 TDP2, 可以特异性识别和修复由拓扑异构酶(TOP)介导的 DNA 损伤, 参与细胞的许多重要的生命活动, 如复制、转录和染色质重塑等. HBV 病毒颗粒进入细胞后, 经过一系列过程形成成熟的连接 P 蛋白的松弛环状 DNA(relaxed circular DNA, rcDNA), 随后 TDP 水解 P 蛋白与 rcDNA 之间的磷酸二酯键, 使 rcDNA 顺利向 cccDNA 转化. 研究发现, TDP2 在修复细胞蛋白质-DNA 加合物的过程中发挥着重要的作用, 通过 RNAi 技术沉默人体细胞中的 TDP2 后, 能显著抑制 HBV rcDNA 向 cccDNA 的转化^[31], 这一重大发现为慢性 HBV 感染治疗提供了又一新的靶标. 然而, TDP 作为近年被发现的 DNA 修复酶, 目前对其研究和认识尚处于初级阶段, 且以其为靶点发现的抑制剂种类较少, 阻断其表达对宿主的影响尚需进一步深入研究.

Kinoshita 等^[32]通过 siRNA 高通量筛选技术发现宿主因子 PRPF31(pre-mRNA processing factor 31)在 HBV cccDNA 形成过程中发挥着重要作用. 通过 siRNA 沉默该分子后, 能降低 HBV cccDNA 的形成, 并且不会对宿主细胞产生毒性反应. 因此, 该分子有望成为阻断 HBV cccDNA 形成和维持的有效靶点.

2.4 靶向介导 HBV 核衣壳组装的宿主蛋白

核衣壳是病毒 DNA 合成的场所, 在病毒复制及装配等一系列过程中, 核衣壳对病毒基因组起着免于降解的重要保护作用; 同时, 在病毒入侵感染过程中, 核衣壳还介导病毒 DNA 的释放. 因此,

核衣壳在 HBV 的复制及感染等方面起着重要的作用, 干扰核衣壳的装配过程中涉及到的非必须宿主蛋白, 可能会成为 RNAi 应用于慢性 HBV 感染治疗的靶点之一。

热激同源蛋白 70(heat shock cognate 70, Hsc70) 属于热激蛋白 70(heat shock protein 70, Hsp70) 家族, 是一种 ATP 结合蛋白, 包含 ATP 结合域、多肽结合域和 C 末端结构域。有研究表明, Hsc70 以多种方式与胞质锚定因子相互作用, 共同维持 HBV 大蛋白的形态, 影响 HBV 的组装^[33]。另外, Hsc70 对 HBV 聚合酶活性也有重要的作用^[34]。因此, Hsc70 分子在 HBV 的复制过程中发挥着关键作用。Wang 等^[35]利用 RNAi 技术沉默该分子后, 发现 HBV 的复制受到显著抑制, HBV DNA 量明显降低, 但是沉默 Hsc70 并不会影响宿主细胞生长。另有研究发现, 当利用 siRNA 同时沉默 HBV 基因组和 Hsc70 时, 抑制 HBV 的效果会显著提升^[36]。

热激蛋白家族的另一个分子热激蛋白 90(heat shock protein, Hsp90)能与 HBc 蛋白的二聚体相互作用, 进而维持核衣壳的稳定。当用 siRNA 沉默 HepG2.2.15 细胞中 Hsp90 后, 能显著抑制 HBV 在胞内的产生^[37]。另外, 最近一项报道提出, 热激蛋白 Hsp90 可作为癌症治疗干预的一个新靶点^[38]。目前有关 Hsp90 的研究报道较少, 其在宿主细胞的具体功能及机制研究尚属于初级阶段。因此, 其作为 HBV 感染的治疗靶点仍需大量深入研究。

宿主因子 $\gamma 2$ 接头蛋白, 是一种泛素分子结合蛋白, 在 HBV 的核衣壳后期的成熟和释放过程中发挥着重要的作用。该接头蛋白通过其 369~377 位氨基酸形成的泛素分子结合区域(UIM)与泛素分子结合, $\gamma 2$ 接头蛋白被泛素化。在 HBc 蛋白上 PPAY 结构域招募的 Nedd4 泛素连接酶的作用下, 泛素化的 $\gamma 2$ 接头蛋白识别 HBc 蛋白第 96 位赖氨酸的疏水结构域并与其结合, 进而介导 HBV 核衣壳的成熟与释放。靶向于 $\gamma 2$ 接头蛋白的 siRNA 并不会影响 HBV 相关蛋白质的分泌, 但是 HBV 颗粒的释放受到显著抑制^[39]。目前, 靶向该分子后对机体的影响尚不明确。

2.5 靶向 HBV 免疫逃逸相关的宿主蛋白

肝细胞不仅是肝脏的重要组成成分, 承担着物质代谢的功能, 还是重要的抗原递呈细胞, 在机体的免疫应答中占据着举足轻重的地位。病毒进入细胞后, 肝细胞一方面可以激活自身的内源性免疫,

在一定程度上抑制和清除 HBV; 同时, 肝细胞分泌大量的天然免疫因子诱导天然免疫应答, 并通过发挥抗原递呈作用激活机体的获得性免疫系统。但是, HBV 在宿主免疫反应的压力下, 亦进化出一些策略来逃避和抑制机体免疫功能, 使得病毒自身能够在肝细胞内持续存在。如, 微环境中 Treg 等负调细胞的聚集, TGF- β 、IL-10 等负调性细胞因子的大量产生, 以及 PD-1/PD-L1、CTLA-4 和 TIM-3 等共抑制性分子的表达上调等, 均会抑制机体免疫应答, 导致 HBV 的免疫逃逸^[40]。

T 细胞在慢性 HBV 感染中发挥着至关重要的抗病毒作用, 但是在 HBV 慢性感染患者体内, T 细胞的功能低下并且趋于凋亡, 呈现一种耗竭的状态^[41-42]。研究发现, 与健康人相比, CHB 病人肝组织共抑制性分子 PD-L1 表达明显上调^[43], 并且 CD8⁺ T 细胞表面的 PD-1^[43-44]、CTLA-4^[45-46]、TIM-3^[47]和 Bim^[48]等共抑制性分子表达水平也明显偏高, 共同抑制 T 细胞的功能, 诱导免疫系统的耗竭。大量研究发现, 利用阻断性抗体阻断 PD-L1/PD-1^[44, 49-50]、CTLA-4^[51]和 TIM-3^[52]信号通路, 可以逆转 CD8⁺ T 细胞功能的耗竭, 增强机体抗病毒能力。Jiang 课题组^[53]发现, 当用 siRNA 沉默 HBV 转基因小鼠体内 DC 细胞的 PD-L1, 能显著提高 DC 细胞所介导的 T 细胞功能, 明显增强小鼠体内的抗病毒免疫。另外, Yu 等^[54]在体外利用 siRNA 沉默 HBV 慢性感染病人的淋巴细胞表面的 CTLA 4 分子后, 发现其能明显增强 Th1/Th2 应答, IFN- γ 和 IL-2 的分泌增强, 在一定程度上抑制 HBV 的感染。因此, 利用 RNAi 干扰技术对这些共抑制性分子的靶向治疗, 可能会在抗慢性 HBV 感染治疗中为我们带来新的思路。

目前, 已有 4 种免疫检查点阻断剂获得美国食品和药物管理局(FDA)批准用于临床治疗, 分别是 CTLA-4 单抗(ipilimumab)、PD-1 单抗(nivolumab 和 pembrolizumab)及 PD-L1 单抗(atezolizumab)。这些药物在部分患者的临床治疗中取得了可喜的治疗效果, 但仍有大部分患者对该疗法没有应答。此外, 部分患者治疗过程中存在免疫相关性不良反应(immune-related adverse events, irAEs), 如皮疹和黏膜刺激、腹泻与结肠炎、内分泌失调及肝脏受损等多种病症^[55-57]。因此, 我们利用 RNA 干扰技术阻断这些免疫检查点的过程中, 应兼顾治疗效果及对机体的反应之间的平衡, 以评估该治疗策略用于抗 HBV 治疗的可行性。

2.6 靶向宿主蛋白的潜在靶点

靶向与 HBV 感染和复制相关的宿主基因为基于 RNAi 抗慢性 HBV 感染治疗研究开辟了一条新途径. 除了上述靶分子外, 可能还存在很多潜在靶点需要我们探索研究. 例如, 肝细胞表面表达的钠离子 - 牛磺胆酸共转运多肽(sodium taurocholate co-transporting polypeptide, NCTP), 也是目前广为接受的 HBV 包膜蛋白的功能性受体. 它可与 HBV 大蛋白 preS1 的受体结构域发生特异性结合, 从而介导 HBV 的入侵, 是 HBV 感染细胞的必要条件^[58]. 随着 NCTP 的发现, 以 NCTP 通路为靶点的药物也不断涌现出来, 如环孢素 A 及其衍生物, 经 FDA 批准上市后, 在 HBV 相关疾病治疗中取得显著成效^[59-61]. 因此, NCTP 的发现为 RNAi 技术应用于抗乙肝治疗提供了新的靶点和策略, 也为我们提供了一种 HBV 治疗领域的研究方向和模式. 另外, 前期研究证明, 利用反义核酸技术抑制 ABHT2、EREG 和 Hsp60 等分子后, 均能显著抑制 HBV 在胞内复制^[62-63], 这些均可能是抗慢性 HBV 感染的潜在靶点. 研究参与调节 HBV 复制的因素很多, 单独以宿主因子为靶点的抗病毒效果可能并不显著. 因此, 在靶向 HBV 基因的同时, 联合靶向宿主基因, 并以合适的表达或转输方法进行

治疗, 可能会得到更好的治疗效果.

3 慢乙肝 RNAi 药物的临床前研究

目前, 多个制药企业致力于 RNAi 药物传送策略的研发, 包括利用脂质胶囊包裹 siRNA, 或者将 siRNA 附着到其他分子上, 使其容易被肝细胞吸收^[7]. 最新数据显示, 靶向 HBV 基因组的多个 RNAi 药物已进入临床实验阶段 (表 2). 其中, Arrowhead 公司的 ARC-520 和 ARC-521 RNAi 药物主要靶向 HBV cccDNA 的转录本, 采用其独有的 EX1(动态多价偶联系统)输送系统对患者进行静脉给药, 延长药物在肝细胞内保留的时间. 然而, 由于 ARC-520 的一项独立实验中出现实验灵长类动物的死亡, 美国 FDA 口头决定暂时搁置这两种药物的临床测试工作^[64-65]. 在此基础上, Arrowhead 公司研发设计了用于慢性乙肝治疗的第三代皮下给药产品 ARO-HBV, 并提交了开展临床试验的申请, 利用 TRiMTM 平台推向临床试验^[65]. 另外, Alnylam 制药公司研发的 RNAi 治疗药物 ALN-HBV 靶向 HBX 基因, 临床前实验表明其在黑猩猩的乙肝模型中能够持久降低 HBsAg 水平. 目前, 这一药物的研究正处在 I / II 期临床试验阶段, 旨在探索这款药物的临床耐受与安全性^[66-68].

Table 2 RNAi therapeutics in clinical development for treatment of chronic HBV infection
表 2 慢性感染乙型肝炎病毒 RNAi 疗法的临床研究进展

名称	靶点	递送策略	研究阶段	公司
ARC-520	cccDNA 的转录本	静脉内给药 DPC 输送系统	II 期临床试验, 终止	Arrowhead 制药公司
ARC-521	cccDNA 和整合到宿主 DNA 中的 HBV DNA 产生的转录本	静脉内给药 DPC 输送系统	单剂量和多剂量 I / II 期 临床试验, 终止	Arrowhead 制药公司
ARO-HBV	cccDNA 和整合到宿主 DNA 中的 HBV DNA 产生的转录本	TRiM™ 平台	I / II 期单剂量递增临床 研究, 正在进行	Arrowhead 制药公司
ALN-HBV	X	皮下注射给药 ESC-GalNAc-siRNA 共轭技术	I / II 期临床试验, 正在 进行	Alnylam 制药公司

缩略词: X, X 蛋白; cccDNA, covalently closed circular DNA; DPC, dynamic polyconjugates; ESC-GalNAc-siRNA, enhanced stabilization chemistry-N-acetylgalactosamine-siRNA.

4 结 语

虽然通过抑制宿主基因进行慢性 HBV 感染治疗可以弥补由于病毒突变所引起的靶向 HBV 基因组的 siRNA 沉默效率低等问题, 但是抑制宿主基

因可能对宿主细胞造成伤害, 产生不可估量的副作用. 因此, 在选择宿主因子作为沉默靶点时, 该分子必须在 HBV 复制过程中发挥着至关重要的作用, 并且在一定条件下不会对机体细胞产生毒副作用. 在已有的文献报道中, 沉默 ASGPR1、hLa、

DDB1、PRPF31 及 Hsc70 等基因对宿主细胞活性并没有明显影响,而针对其他靶点如 TDP、Hsp90 及 $\gamma 2$ 接头蛋白等宿主因子的研究仅关注了抗 HBV 效果,并未探讨对宿主细胞的影响.随着研究的深入,对这些宿主分子的具体功能和机制的认识将不断成熟,从而有利于我们评估其作为 RNA 干扰靶点抗慢性 HBV 感染的可行性.

真正将 RNAi 应用于临床治疗仍有很多问题需要克服.例如,如何有效控制 siRNA 的剂量、脱靶效应怎样避免、以及如何将筛选到的有效 siRNA 或 siRNA 表达载体安全、特异地靶向转输到目的器官等,仍需要我们不断深入研究,以寻求最好的解决方案.相信随着对 RNAi 技术不断深入了解与完善,该技术必然更具实用性,最终安全、有效地应用于抗慢性 HBV 感染的基因治疗.

参 考 文 献

- [1] Hong X, Kim E S, Guo H. Epigenetic regulation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: implications for epigenetic therapy against chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2017, **66**(6): 2066–2077
- [2] Chen A, Brown C M. Prospects for inhibiting the post-transcriptional regulation of gene expression in hepatitis B virus. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, **20**(25): 7993–8004
- [3] Bitton Alaluf M, Shlomai A. New therapies for chronic hepatitis B. *Liver International*, 2016, **36**(6): 775–782
- [4] Terrault N A, Lok A S, McMahon B J, *et al.* Update on prevention, diagnosis, and treatment and of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology*, 2018, **67**(4): 1560–1599
- [5] Castel S E, Martienssen R A. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 2013, **14**(2): 100–112
- [6] Manzoor S, Saalim M, Imran M, *et al.* Hepatitis B virus therapy: what's the future holding for us?. *World Journal of Gastroenterology*, 2015, **21**(44): 12558–12575
- [7] Haussecker D. Current issues of RNAi therapeutics delivery and development. *Journal of Controlled Release*, 2014, **195**(7): 49–54
- [8] Michler T, Große S, Mockenhaupt S, *et al.* Blocking sense-strand activity improves potency, safety and specificity of anti-hepatitis B virus short hairpin RNA. *Embo Molecular Medicine*, 2016, **8**(9): 1082–1098
- [9] Crowther C, Mowa M B, Ely A, *et al.* Inhibition of hepatitis B virus replication *in vivo* using helper-dependent adenovirus vectors to deliver antiviral RNAi expression cassettes. *Antiviral Therapy*, 2013, **19**(4): 363–373
- [10] Marimani M D, Ely A, Buff M C, *et al.* Inhibition of replication of hepatitis B virus in transgenic mice following administration of hepatotropic lipoplexes containing guanidinopropyl-modified siRNAs. *Journal of Controlled Release Official Journal of the Controlled Release Society*, 2015, **209**(1): 198–206
- [11] Wooddell C I, Rozema D B, Hossbach M, *et al.* Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Molecular Therapy*, 2013, **21**(5): 973–985
- [12] Yamamoto N, Sato Y, Munakata T, *et al.* Novel pH-sensitive multifunctional envelope-type nanodevice for siRNA-based treatments for chronic HBV infection. *Journal of Hepatology*, 2015, **64**(3): 547–555
- [13] Sato Y, Matsui H, Yamamoto N, *et al.* Highly specific delivery of siRNA to hepatocytes circumvents endothelial cell-mediated lipid nanoparticle-associated toxicity leading to the safe and efficacious decrease in the hepatitis B virus. *Journal of Controlled Release Official Journal of the Controlled Release Society*, 2017, **266**(19): 216–225
- [14] Prange R. Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. *Medical Microbiology & Immunology*, 2012, **201**(4): 449–461
- [15] Owada T, Matsubayashi K, Sakata H, *et al.* Interaction between desialylated hepatitis B virus and asialoglycoprotein receptor on hepatocytes may be indispensable for viral binding and entry. *Journal of Viral Hepatitis*, 2006, **13**(1): 11–18
- [16] Zhang X, Lin S M, Chen T Y, *et al.* Asialoglycoprotein receptor interacts with the preS1 domain of hepatitis B virus *in vivo* and *in vitro*. *Archives of Virology*, 2011, **156**(4): 637–645
- [17] Treichel U, Kh M Z B S, Dienes H P, *et al.* Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Archives of Virology*, 1997, **142**(3): 493–498
- [18] Treichel U, Kh M Z B, Stockert R J, *et al.* The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers. *Journal of General Virology*, 1994, **75** (Pt 11)(11): 3021–3029
- [19] Yang J, Bo X C, Ding X R, *et al.* Antisense oligonucleotides targeted against asialoglycoprotein receptor 1 block human hepatitis B virus replication. *J Viral Hepat*, 2006, **13**(3): 158–165
- [20] Gao Y F, Yu L, Wei W, *et al.* Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by artificial microRNA. *World Journal of Gastroenterology*, 2008, **14**(29): 4684–4689
- [21] Maraia R J, Mattijssen S, Cruz-Gallardo I, *et al.* The La and related RNA-binding proteins (LARPs): structures, functions, and evolving perspectives. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 2017, **8**(6): e1430
- [22] Jing T, Huang Z M, Chen Y Y, *et al.* A novel inhibitor of human La protein with anti-HBV activity discovered by structure-based virtual screening and *in vitro* evaluation. *Plos One*, 2012, **7**(4): e36363
- [23] Pan J, Tong S, Tang J. LncRNA expression profiles in HBV-transformed human hepatocellular carcinoma cells treated with a novel inhibitor of human La protein. *Journal of Viral Hepatitis*, 2018, **25**(4): 391–400
- [24] Pan J, Tong S, Tang J. Alteration of microRNA profiles by a novel inhibitor of human La protein in HBV-transformed human hepatoma cells. *Journal of Medical Virology*, 2018, **90**(2): 255–262
- [25] Ni Q, Chen Z, Yao H P, *et al.* Inhibition of human La protein by

- RNA interference downregulates hepatitis B virus mRNA in 2215 cells. *World J Gastroenterol*, 2004, **10**(14): 2050–2054
- [26] Ghodke H, Wang H, Hsieh C L, *et al*. Single-molecule analysis reveals human UV-damaged DNA-binding protein (UV-DDB) dimerizes on DNA *via* multiple kinetic intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(18): E1862
- [27] Kim W, Lee S, Son Y, *et al*. DDB1 stimulates the viral transcription of hepatitis B virus *via* HBx-independent mechanisms. *J Virol*, 2016, **90**(21): 9644–9653
- [28] Tang K F, Xie J, Chen M, *et al*. Knockdown of damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1) enhances the HBx-siRNA-mediated inhibition of HBV replication. *Biologicals*, 2008, **36**(3): 177–183
- [29] Guo L, Wang X, Ren L, *et al*. HBx affects CUL4-DDB1 function in both positive and negative manners. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, **450**(4): 1492–1497
- [30] Decorsière A, Mueller H, Breugel P C V, *et al*. Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature*, 2016, **531**(7594): 386–389
- [31] Königer C, Wingert I, Marsmann M, *et al*. Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(40): 4244–4253
- [32] Kinoshita W, Ogura N, Watashi K, *et al*. Host factor PRPF31 is involved in cccDNA production in HBV-replicating cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, **482**(4): 638–644
- [33] Lambert C, Mann S, Prange R. Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins. *Journal of General Virology*, 2004, **85**(Pt 5): 1221–1225
- [34] Beck J, Nassal M. Efficient Hsp90-independent *in vitro* activation by Hsc70 and Hsp40 of duck hepatitis B virus reverse transcriptase, an assumed Hsp90 client protein. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**(38): 36128–36138
- [35] Wang Y P, Liu F, He H W, *et al*. Heat stress cognate 70 host protein as a potential drug target against drug resistance in hepatitis B virus. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 2010, **54**(5): 2070–2077
- [36] Bian Z, Xiao A, Cao M, *et al*. Anti-HBV efficacy of combined siRNAs targeting viral gene and heat shock cognate 70. *Virology Journal*, 2012, **9**(1): 275–288
- [37] Shim H Y, Quan X, Yi Y S, *et al*. Heat shock protein 90 facilitates formation of the HBV capsid *via* interacting with the HBV core protein dimers. *Virology*, 2011, **410**(1): 161–169
- [38] Lee S C, Min H Y, Choi H, *et al*. Deguelin analogue SH-1242 inhibits Hsp90 activity and exerts potent anticancer efficacy with limited neurotoxicity. *Cancer Research*, 2016, **76**(3): 686–699
- [39] Rost M, Mann S, Lambert C, *et al*. Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**(39): 29297–29308
- [40] Ortegaprieto A M, Dorner M. Immune evasion strategies during chronic hepatitis B and C virus infection. *Vaccines*, 2017, **5**(3): 24
- [41] Timm J, Walker C M. Mutational escape of CD8+ T cell epitopes: implications for prevention and therapy of persistent hepatitis virus infections. *Medical Microbiology & Immunology*, 2015, **204**(1): 29–38
- [42] Ye B, Liu X, Li X, *et al*. T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance. *Cell Death Dis*, 2015, **6**(3): e1694
- [43] Zhang W, Peng C, Zheng S. Programmed death 1 and programmed death ligand 1 expressions in patients with chronic hepatitis B. *HBDP INT*, 2013, **12**(4): 394–399
- [44] Bengsch B, Martin B, Thimme R. Restoration of HBV-specific CD8+ T cell function by PD-1 blockade in inactive carrier patients is linked to T cell differentiation. *J Hepatol*, 2014, **61**(6): 1212–1219
- [45] Wang L, Zhao C, Peng Q, *et al*. Expression levels of CD28, CTLA-4, PD-1 and Tim-3 as novel indicators of T-cell immune function in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Biomed Rep*, 2014, **2**(2): 270–274
- [46] Cho H, Kang H, Lee H, *et al*. Programmed cell death 1 (PD-1) and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) in viral hepatitis. *Int J Mol Sci*, 2017, **18** (7). pii:E1517. doi:10.3390/ijms18071517
- [47] Li Z, Li N, Li F, *et al*. Immune checkpoint proteins PD-1 and TIM-3 are both highly expressed in liver tissues and correlate with their gene polymorphisms in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore)*, 2016, **95**(52): e5749
- [48] Lopes A R, Kellam P, Das A, *et al*. Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection. *Journal of Clinical Investigation*, 2008, **118** (5): 1835–1845
- [49] Fisicaro P, Valdatta C, Massari M, *et al*. Combined blockade of programmed death-1 and activation of CD137 increase responses of human liver T cells against HBV, but not HCV. *Gastroenterology*, 2012, **143**(6): 1576–1585e1574
- [50] Tang Z, Hao Y, Zhang E, *et al*. CD28 family of receptors on T cells in chronic HBV infection: expression characteristics, clinical significance and correlations with PD-1 blockade. *Mol Med Rep*, 2016, **14**(2): 1107–1116
- [51] Ravi S, Spencer K, Ruisi M, *et al*. Ipilimumab administration for advanced melanoma in patients with pre-existing Hepatitis B or C infection: a multicenter, retrospective case series. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2014, **2**(1): 33–40
- [52] Ptf K, Sandalova E, Jo J, *et al*. Preserved T-cell function in children and young adults with immune-tolerant chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 2012, **143**(3): 637–645
- [53] Jiang W. Blockade of B7-H1 enhances dendritic cell-mediated T cell response and antiviral immunity in HBV transgenic mice. *Vaccine*, 2012, **30**(4): 758–766
- [54] 余永胜, 吴昊, 汤正好. CTLA-4 siRNA 对慢性乙型肝炎患者外周血 Th1/Th2 细胞因子的影响. *中国临床药理学与治疗学*, 2011, **16**(5): 553–558
- Yu Y S, Wu H, Tang Z H. *Chinese Journal of Clinical*

- Pharmacology & Therapeutics, 2011, **16**(5): 553–558
- [55] Chen T W, Razak A R, Bedard P L, *et al.* A systematic review of immune-related adverse event reporting in clinical trials of immune checkpoint inhibitors. *Annals of Oncology*, 2014, **26** (9): 1824–1829
- [56] Remon J, Vilarino N, Reguart N. Immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer (NSCLC): approaches on special subgroups and unresolved burning questions. *Cancer Treatment Reviews*, 2018, **64**(3): 21–29
- [57] Sznol M, Postow M A, Davies M J, *et al.* Endocrine-related adverse events associated with immune checkpoint blockade and expert insights on their management. *Cancer Treatment Reviews*, 2017, **58**(8): 70–76
- [58] Appelman M, Chakraborty A, Protzer U, *et al.* N-glycosylation of the Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) determines its trafficking and stability and is required for hepatitis B virus infection. *Plos One*, 2017, **12**(1): e0170419
- [59] Donkers J, Zehnder B, Van Westen G, *et al.* Reduced hepatitis B and D viral entry using clinically applied drugs as novel inhibitors of the bile acid transporter NTCP. *Sci Rep*, 2017, **7** (1): 15307–15319
- [60] Shimura S, Watashi K, Fukano K, *et al.* Cyclosporin derivatives inhibit hepatitis B virus entry without interfering with NTCP transporter activity. *J Hepatol*, 2017, **66**(4): 685–692
- [61] Zhang J, Fu L, Tian M, *et al.* Design and synthesis of a novel candidate compound NTI-007 targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide [NTCP]-APOA1-HBx-Beclin1-mediated autophagic pathway in HBV therapy. *Bioorg Med Chem*, 2015, **23**(5): 976–984
- [62] Ding X R, Yang J, Sun D C, *et al.* Whole genome expression profiling of hepatitis B virus-transfected cell line reveals the potential targets of anti-HBV drugs. *Pharmacogenomics Journal*, 2008, **8**(1): 61–70
- [63] Park S G, Lee S M, Jung G. Antisense oligodeoxynucleotides targeted against molecular chaperonin Hsp60 block human hepatitis B virus replication. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**(41): 39851–39857
- [64] Gish R G, Yuen M F, Chan H L Y, *et al.* Synthetic RNAi triggers and their use in chronic hepatitis B therapies with curative intent. *Antiviral Res*, 2015, **121**(12): 97–108
- [65] Wooddell C I, Yuen M F, Chan H L, *et al.* RNAi-based treatment of chronically infected patients and chimpanzees reveals that integrated hepatitis B virus DNA is a source of HBsAg. *Science Translational Medicine*, 2017, **9**(409): eaan0241
- [66] Zimmermann T S, Karsten V, Chan A, *et al.* Clinical proof of concept for a novel hepatocyte-targeting GalNAc-siRNA conjugate. *Molecular Therapy*, 2017, **25**(1): 71–78
- [67] Jls W, Chan A, Sehgal A, *et al.* Evaluation of GalNAc-siRNA conjugate activity in pre-clinical animal models with reduced asialoglycoprotein receptor expression. *Molecular Therapy the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2017, **26** (1): 105–114
- [68] Maepa M B, Roelofse I, Ely A, *et al.* Progress and prospects of anti-HBV gene therapy development. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, **16**(8): 17589–17610

Progress of RNAi Targeting The Host Genes for Treatment of Chronic HBV Infection*

ZHAO Rong-Rong, HAN Qiu-Ju, ZHANG Jian**

(Institute of Immunopharmaceutical Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract Hepatitis B virus, a small DNA virus, is the prototype of the Hepadnaviridae family. Chronic infection with HBV (CHB) remains a significant public health problem in worldwide, which is a major factor resulting in fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular. Previous HBV treatment devote to interfere the HBV genome, including nucleotide analogues (NAs) and type I interferon (IFN). However, virus mutation and drug resistance occur during these treatments. And current therapeutic strategy tend to intervene the host factors, involvement in the entry, replication and assemble of HBV, bringing us a new venue against HBV. Thus, numerous studies spent large amount efforts to explore RNA interference (RNAi) host gene silencers, which potentially could be a novel anti-HBV therapeutics. Here, we summarized the current progression targeting the host genes for curing chronic HBV infection.

Key words HBV, host protein, RNAi

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0014

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81373222, 81172789), Shandong Provincial Key Research and Development Program (2017GSF18159) and Shandong Provincial Natural Science Foundation, China (ZR2017BH029).

**Corresponding author.

Tel: 86-531-88383781, E-mail: zhangj65@sdu.edu.cn

Received: January 9, 2018 Accepted: April 17, 2018