

RNA 干扰在抗乙肝治疗中的应用及其研究进展 *

张学智 山长亮 叶丽虹** 张晓东**

(南开大学生命科学学院教育部生物活性材料重点实验室, 天津 300071)

摘要 据世界卫生组织(WHO)报道, 全世界约有 20 亿人曾感染过乙型肝炎病毒(HBV), 其中 3.5 亿人为慢性 HBV 感染者. 我国现有 1.3 亿乙肝病毒携带者和 3 000 多万乙肝患者, 其中约有 20%~40% 的患者经过多年慢性炎症的反复发作可发展为肝硬化和肝癌. 然而, 至今人们仍没有找到一种能够彻底治愈慢性乙肝的特效药物. 自从 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术建立以来, 人们致力于将其应用于抗病毒药物的研究与开发. 研究表明, RNAi 可有效地抑制乙肝病毒的复制, 但靶向目的基因的不同 RNA 干扰片段所沉默的效率不同. 关于将 RNAi 抗病毒药物应用于人体治疗的安全性和有效性还有待进一步研究, RNAi 发生“脱靶”的现象是临床应用的难点之一.

关键词 RNA 干扰, 乙型肝炎, 乙型肝炎病毒

学科分类号 Q522

目前, 全球大约有 3.5 亿人患有乙型肝炎病毒(HBV)引起的慢性肝炎, 而其中的 3/4 分布在亚洲地区, 我国现有 1.3 亿乙肝病毒携带者和 3 000 多万乙肝患者, 其中约有 20%~40% 的患者由于多年慢性炎症的反复发作可发展为肝硬化和肝癌. HBV 基因组为一个不完全双链的环状 DNA 分子, 压缩度极高, 其中的长链(负链)约 3 200 个核苷酸, 包括 S 区、C 区、P 区和 X 区 4 个相互重叠的开放阅读框, 能够转录出长度为 0.9、2.1、2.4 和 3.5 kb 的 4 种 mRNA, 并翻译生成表面(surface)蛋白、前核心/核心(PreCore/Core)蛋白、多聚酶(polymerase)和 X 蛋白. 这 4 种 mRNA 相互重叠并且终止于同一个 poly A 位点区, 其中 3.5 kb 的转录产物还能作为 HBV 的前基因组 RNA 通过反转录产生出整个 HBV 基因组, 即 cccDNA^[1]. 虽然, 高效安全的乙肝疫苗已问世多年, 以 lamivudine、adefovir 为代表的核酸类似物和干扰素- α (interferon- α)也已成为国际上常用的治疗药物, 但 HBV 的全球性传播并没有停止, 现阶段的药物治疗仅对 HBeAg 阳性患者有效, 且长期服用 lamivudine 会产生病毒耐药性, 停药之后又会伴有病情的恶性反弹^[2, 3]. 很显然, 人们需要发现更安全有效的新方法来彻底治疗病毒性乙型肝炎. 目前, 人们已将 RNA 干扰技术应用用于乙肝的抗病毒治疗, 在细胞培养和动物模型

水平上获得了理想的效果, 经过大量实验筛选出的有效的 RNA 干扰片段能够将细胞以及动物体内的乙肝病毒 mRNA 和病毒抗原降低到极低的水平. 随着研究的不断深入, RNAi 已经成为 HBV 抗病毒研究领域中的研究热点, 它与传统疗法相比所具有的明显优势也使之成为未来抗 HBV 药物研究的方向.

1 RNA 干扰的分子机制

RNA 干扰是真核生物细胞中普遍存在的一种序列特异性基因沉默机制^[4]. RNA 干扰主要有两种实现途径: 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)途径和微 RNA (micro RNA, miRNA)途径. siRNA 主要来自于侵入细胞的病毒或转座子所产生的双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA)以及人工用质粒表达的短发卡 RNA (short hairpin RNA, shRNA), 而 miRNA 则主要源于真核细胞 mRNA 成熟过程中被剪切掉的非编码区域以及一些专门编码 RNA 的基因序列的转录物^[5]. 当 siRNA 和

* 国家自然科学基金资助项目(30670959).

** 通讯联系人. Tel: 022-23506830, Fax: 022-23501385

张晓东. E-mail: zhangxd@nankai.edu.cn

叶丽虹. E-mail: yelihong@nankai.edu.cn

收稿日期: 2007-09-28, 接受日期: 2007-11-06

miRNA 的前体分子出现在细胞中时,二者分别在 Dicer 和 Drosha 两种双链核酸内切酶的作用下形成平均长度为 21~23 bp 的双链 siRNA 和 miRNA^[6],随后被 RNA 诱导的沉默复合体(RNA induced silencing complex, RISC)解螺旋,其中一条单链与其同源的 mRNA 结合,或者将 mRNA 降解或者阻止 mRNA 的正常翻译^[7],从而使基因表达沉默。

2 RNAi 疗法在治疗乙肝中的优势

HBV 的感染以及致癌过程与人体免疫系统密切相关,当 HBV 侵入人体后,由于少数感染者的免疫系统功能低下无法清除 HBV 病毒颗粒,HBV 的前基因组 RNA 通过反转录产生出稳定的 cccDNA,不断释放出病毒抗原,带有病毒抗原的肝细胞受到免疫系统的攻击产生持续性的免疫损伤,从而导致慢性乙型肝炎发生。人们还发现,在慢性乙肝感染者体内,HBV 基因能够整合入人的基因组中,在宿主的 RNA 聚合酶的作用下不断地产生出病毒抗原,使得乙肝感染难以根除^[8]。目前,传统的核酸类似物药物 lamivudine 和 adefovir 等虽然能够显著降低病人体内的病毒滴度,但由于 cccDNA 的存在和病毒基因的整合,使其无法有效清除病毒抗原,肝脏的免疫损伤仍然存在^[9]。而 RNAi 与传统的抗病毒药物相比具有明显的优势,由于 RNAi 直接针对 mRNA 起作用,因此能够有效地抑制病毒抗原的生成,消除免疫系统对肝脏的损伤,从而限制甚至阻止乙肝病毒携带者向慢性乙肝、肝硬化和肝癌发展。

RNAi 是真核细胞中普遍存在的一种内源性基因沉默机制,在长期的进化过程中,其特异性和准确性对细胞的正常生长发育至关重要,外源性的病毒或转座子(也包括人工合成的 siRNA 以及能产生 shRNA 的载体)进入细胞后,主要通过 siRNA 途径产生沉默效应,这一途径要求 RNAi 片段与靶序列精确配对^[10]。因此,以 HBV 基因组中的保守区段为靶序列设计出的 21 bp 左右的 RNAi 片段已能够为靶基因的沉默提供足够的特异性,从而抑制靶基因的表达,不易产生副作用。

传统的抗病毒药物在治疗乙肝时往往是以 HBV 生活史中某一单一的过程或反应作为靶点,因此,不可避免地会由于突变而产生抗药性,而 RNAi 可以将多个基因作为靶点同时进行基因沉默。实验证明,这种“鸡尾酒”疗法不仅能够提高抗病毒的效率,而且还能大大降低病毒由于发生点突变

而产生抗药性的机会^[9]。并且,由于 HBV 基因组高度压缩,4 个开放阅读框彼此互相重叠,从理论上讲,将重叠的区域作为 RNAi 的靶序列将会提高基因沉默的效率。

3 RNAi 在抗 HBV 研究中的应用

3.1 研究概况与实验模型

目前,人们已经运用 RNAi 对 HBV 基因组中的许多位点进行了抗病毒机制的研究,靶位点已涉及到所有的 4 个开放阅读框。实验的模型大致可分为两种,即体外细胞水平的研究与体内动物模型实验,前者主要集中于对瞬时转染和稳定转染了 HBV 基因组的肝细胞系所进行的 RNA 干扰实验,而后者则是以鼠科动物作为模型,通过适当的载体系统导入人工合成的 siRNA 或是能够产生 shRNA 的质粒载体,从而实现对靶基因沉默。

3.2 RNA 干扰抗 HBV 的靶位点初探

McCaffrey 等^[11](图 1,表 1)针对 HBV 基因组的不同区域设计出相应的 shRNA,并以含有 U6 启动子的质粒作为载体将这些 shRNA 导入到宿主细胞体内。在体外细胞培养实验中,他们将含有 HBV 基因组的 pTHBV2 质粒、含有 U6 启动子的 shRNA 表达质粒以及能产生人类 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶的 pThAAT 质粒共转染到人类肝癌细胞系 HuH7 的细胞中。在体内动物模型实验中,将含有 3 种质粒的溶液通过高压尾静脉注射注入小鼠体内。通过检测发现,导入的 shRNA 对 HBsAg 的分泌和 HBV mRNA 的生成均有不同程度的抑制作用,其中,针对 S 区与 P 区的重叠序列设计的一段 shRNA 最为有效,它在体外和体内实验中能够将 HBsAg 的含量分别降低 94%和 85%,尤其是在体内动物模型中,这段 shRNA 使 HBV mRNA 的含量几乎降低到了无法检出的水平。

Giladi 等^[12](图 1,表 1)应用不同的 siRNA 对 S 区进行序列特异性基因沉默,结果发现针对 S 区起始部位的 9~27 个核苷酸设计出的靶序列效果最显著,在体外和体内实验中,它能够明显降低病毒抗原的数量并强烈地抑制病毒基因的转录。Shlomai 和 Shaul^[13](图 1,表 1)所进行的体外细胞培养实验也表明,RNA 干扰具有显著的抗 HBV 作用。他们将针对 C 区和 X 区设计的 shRNA 通过质粒导入被 HBV 感染的细胞,通过检测病毒的抗原、mRNA 和 DNA 水平发现,针对 X 区设计出的靶序列抑制病毒复制的效率更高。Konishi 等^[14](图 1,表 1)针对

HBV 4 种 mRNA 共有的 poly A 位点区、前核心区 和 S 区进行靶序列的设计, 将人工合成的相应 siRNA 导入稳定转染 HBV 质粒的细胞系 HepG2.2.15 中, 经检测发现, 靶向 polyA 位点区的 siRNA 具有最为显著的抗病毒作用.

Table 1 Effective fragments of RNAi targeting HBV mRNA
表 1 有效的 RNA 干扰片段及其序列

作者	有效的靶序列	载体类型	靶基因
McCaffrey 等 ^[11]	5' GAACAAATGGCACTAGTAAAC 3'	质粒	S, P
Giladi 等 ^[12]	5' CATCACATCAGGATTCCTA 3'	质粒	S, P
Shlomai 等 ^[13]	5' GGTCTTACATAAGAGGACT 3'	质粒	X
Zhang 等 ^[15]			
Konishi 等 ^[14]	5' ACCCTTATAAAGAATTTGG 3'	质粒	Poly A
Uprichard 等 ^[16]	5' CCTCTATGTTTCCCTCTTGT 3' 5' GTCTGTACAACATCTTGAGTCC 3'	腺病毒	S, P
Moore 等 ^[17]	5' GGTATGTTGCCCGTTTGTC 3'	腺相关病毒	S, P

3.3 以腺病毒为载体的 RNA 干扰在抗 HBV 中的应用

Uprichard 等^[16](图 1, 表 1)在 RNA 干扰的抗 HBV 研究中做出了较为开创性的工作. 他们针对 HBV 基因组的 P 区、S 区和 X 区设计出相应的 DNA 序列, 并以腺病毒为载体将该 DNA 序列导入 HBV 转基因小鼠中, 经过转录表达出所需 siRNA, 从而起到抗病毒的作用. 通过对 HBsAg、HBcAg、

HBcAg、血清转氨酶活性、HBV DNA 以及 HBV mRNA 进行定量和半定量分析发现, 在处理后的 20 天内, RNAi 使得转基因小鼠体内 HBV DNA 和 RNA 的量下降了 90% 以上, 并且使 HBsAg 和 HBcAg 的量比对照降低了近 100 倍. Uprichard 等(图 1, 表 1)使用腺病毒作为 siRNA 的导入载体是对现今很有限的 RNAi 导入技术的一次完善, 使 RNA 干扰技术的临床应用又向前推进了一步.

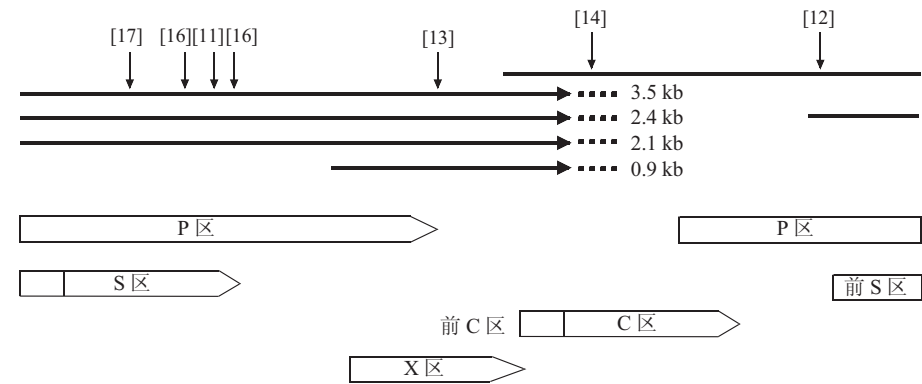


Fig. 1 Effective fragments of RNAi targeting HBV mRNA
图 1 RNA 干扰有效片段在 HBV 基因组上的分布
括号中数字表示参考文献序号

3.4 以腺相关病毒为载体的 RNA 干扰在抗 HBV 中的应用

Moore 等^[17](图 1, 表 1)利用腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV)作为载体, 将靶向 S

区的 siRNA 片段导入到 293T.HBs 和 HepG2.2.15 细胞中, 结果发现 HBsAg 以及 HBV 前基因组 RNA 在 RNAi 的作用下降低了 71%~98%. 同时发现, 由于腺相关病毒在宿主基因组中可稳定整

合,使得 RNA 干扰的效果长达 5 个月之久.并且由于 AAV 本身不具有病毒致病性,不易引起宿主的免疫反应,是美国食品药品监督管理局(Food and Drug, FDA)批准的可用于临床的最安全的病毒载体,成为目前基因治疗较为理想的载体系统.因而,这一实验为今后腺相关病毒载体系统在 RNAi 抗 HBV 研究中应用的可行性做出了有价值的探索.

3.5 RNA 干扰与 lamivudine 在抗 HBV 中存在协同效应

Chen 等^[18]发现,将 RNAi 与 lamivudine 结合应用的抗 HBV 效率与二者单独应用相比分别高出了 3 倍和 6 倍,这说明 RNAi 与 lamivudine 在抗 HBV 中具有一定的协同效应. Lamivudine 作为一种核酸类似药物,其药效依赖于 HBV 基因组的活跃复制,而对于 RNAi,无论 HBV 的 DNA 合成与否,它都能直接抑制 HBV 的复制^[18].

3.6 RNA 干扰对 HBV 感染后肝细胞癌的影响

我们实验室应用 RNA 干扰技术对乙肝病毒 X 基因的致癌机理进行了研究^[19](表 1).以 pSilencer3.0-X 质粒为载体将靶向 X 基因的 shRNA 导入到能稳定表达 X 蛋白的肝癌细胞系 H7402-X 中,结果发现,随着 X 蛋白表达水平的降低,细胞中 survivin 的表达水平也逐渐减少.这一实验结果表明,靶向 X 基因的 RNAi 不仅能够抑制 X 蛋白的表达,同时还有可能降低 HBV 的致癌作用.

4 RNAi 疗法在抗 HBV 的应用中存在的问题

RNAi 靶序列的选择还具有一定的盲目性.由于长的 mRNA 通常会产生高级结构,使得 RNAi 片段不能有效地与之结合,因此,在整个 HBV 基因组中并不是所有的区段都能成为理想的 RNAi 靶序列.实验中有许多 RNAi 片段是低效或无效的,需要经过 mRNA 高级结构的预测以及大量的实验筛选才能得到高效的 RNAi 片段.此外,有些靶序列会与蛋白质紧密结合为复合物,从而阻碍了 siRNA 对靶基因序列的识别,这也增加了 RNAi 靶序列选择的难度.

RNAi 的“脱靶”(off-target)现象需要引起高度重视.有报道指出^[20],由于病毒 DNA 的突变使得 HBV 对 RNAi 产生了抗性,这些突变大多发生在 RNAi 靶序列内部的点突变或缺失突变,由于 siRNA 具有高度的特异性,这就使得其无法对靶基

因实施有效的沉默.此外,人们在研究 HIV 时还发现,位于 RNAi 靶序列外部的突变也能导致病毒对 RNAi 产生抗性,这很可能是由于突变改变了靶基因 mRNA 的空间结构,影响了 RISC 与靶序列的结合所致^[20].目前对于突变所引起的“脱靶”,较好的解决方法是将多个基因区段作为靶序列同时进行 RNA 干扰,从而降低突变的风险.但是,经过长时间积累,这些 RNAi 片段仍有可能失去原有的抗病毒能力.

miRNA 的多靶性和设计 siRNA 时导致的非特异性应注意避免. MicroRNA (miRNA) 具有多靶性,主要由机体自身的基因编码产生,并具有与 mRNA 不完全配对的特性^[21]. miRNA 可与多个靶位点结合,造成一批基因的沉默,对于其具体作用机制目前还不很明确,因而在基因治疗中很少被应用^[22].设计 siRNA 时产生的缺陷也会导致非特异的基因沉默.实验报道,较短的 RNAi 片段(≤ 11 bp)即使与靶序列完全匹配也会引起非特异的基因沉默^[23],但如果 RNAi 片段过长(≥ 30 bp)则会诱使细胞产生强烈的干扰素反应^[24].在这一过程中 RNA 酶活性升高,大量的 RNA 分子被非特异性地降解,甚至导致细胞凋亡^[25].因此,在应用 RNAi 进行乙肝抗病毒治疗过程中需要加以注意,今后还应针对 RNAi 多靶性和非特异性的原因和分子机制进行更加深入的研究.

在 RNAi 抗 HBV 研究领域,目前所进行的实验在体系的建立、靶区域的选择和 RNA 干扰片段的导入手段等方面存在着较大的差异.今后应摸索和建立一套较为统一而有效的实验标准,并在此标准下对所有有效的和潜在的 RNAi 片段进行进一步的验证与检测,筛选出最为可靠和高效的 RNAi 片段.目前,在体外细胞培养和体内动物模型实验中已取得了较为理想的效果,其 RNAi 片段主要是通过细胞转染、电穿孔以及高压尾静脉注射等方式导入细胞和动物体内.但是,要将 RNAi 用于临床治疗就需要采用更为安全的方法将 RNAi 片段高效地导入病人的肝组织中,这也是临床应用中亟待解决的问题.

5 展 望

大量实验表明,在应用 RNAi 进行抗 HBV 的研究中已取得了令人鼓舞的结果. RNA 干扰与传统抗病毒疗法相比所具有的明显优势使其成为乙肝研究领域里的热点.临床前动物实验证明,将

RNAi 用于乙肝的治疗是可行的, 而目前存在的一些困难也是可以通过各种技术手段加以解决的. 总之, RNA 干扰将成为未来乙肝研究的新方向, 并将为人们彻底治愈乙肝甚至 HBV 相关性肝癌提供新的手段.

参 考 文 献

- 1 Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J Lab Clin Med*, 2006, **147** (2): 58~66
- 2 Colacino J M, Staschke K A. The identification and development of antiviral agents for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Prog Drug Res*, 1998, **50**(2): 259~322
- 3 Delaney W E t, Locarnini S, Shaw T. Resistance of hepatitis B virus to antiviral drugs: current aspects and directions for future investigation. *Antivir Chem Chemother*, 2001, **12**(1): 1~35
- 4 Hannon G J. RNA interference. *Nature*, 2002, **418**(6894): 244~251
- 5 Paddison P J, Caudy A A, Bernstein E, *et al.* Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 2002, **16**(8): 948~958
- 6 Lee Y, Ahn C, Han J, *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003, **425**(6956): 415~419
- 7 Mocellin S, Costa R, Nitti D. RNA interference: ready to silence cancer?. *J Mol Med*, 2006, **84**(1): 4~15
- 8 Romano P R, McCallus D E, Pachuk C J. RNA interference-mediated prevention and therapy for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2006, **25**(27): 3857~3865
- 9 Papatheodoridis G V, Dimou E, Papadimitropoulos V. Nucleoside analogues for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and viral resistance. *Am J Gastroenterol*, 2002, **97**(7): 1618~1628
- 10 Arbuthnot P, Carmona S, Ely A. Exploiting the RNA interference pathway to counter hepatitis B virus replication. *Liver Int*, 2005, **25** (1): 9~15
- 11 McCaffrey A P, Nakai H, Pandey K, *et al.* Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2003, **21** (6): 639~644
- 12 Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, *et al.* Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther*, 2003, **8**(5): 769~776
- 13 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology*, 2003, **37** (4): 764~770
- 14 Konishi M, Wu C H, Wu G Y. Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV-producing cell line. *Hepatology*, 2003, **38** (4): 842~850
- 15 Zhang X, Dong N, Yin L, *et al.* Hepatitis B virus X protein upregulates survivin expression in hepatoma tissues. *J Med Virol*, 2005, **77**(3): 374~381
- 16 Uprichard S L, Boyd B, Althage A, *et al.* Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(3): 773~778
- 17 Moore M D, McGarvey M J, Russell R A, *et al.* Stable inhibition of hepatitis B virus proteins by small interfering RNA expressed from viral vectors. *J Gene Med*, 2005, **7**(7): 918~925
- 18 Chen Y, Du D, Wu J, *et al.* Inhibition of hepatitis B virus replication by stably expressed shRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **311**(2): 398~404
- 19 Wu H L, Huang L R, Huang C C, *et al.* RNA interference-mediated control of hepatitis B virus and emergence of resistant mutant. *Gastroenterology*, 2005, **128**(3): 708~716
- 20 Westerhout E M, Ooms M, Vink M, *et al.* HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(2): 796~804
- 21 Mack G S. MicroRNA gets down to business. *Nat Biotechnol*, 2007, **25**(6): 631~638
- 22 Scaria V, Hariharan M, Maiti S, *et al.* Host-virus interaction: a new role for microRNAs. *Retrovirology*, 2006, **3**(1): 68
- 23 Jackson A L, Bartz S R, Schelter J, *et al.* Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, 2003, **21** (6): 635~637
- 24 Moss E G, Taylor J M. Small-interfering RNAs in the radar of the interferon system. *Nat Cell Biol*, 2003, **5**(9): 771~772
- 25 Saunders L R, Barber G N. The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *Faseb J*, 2003, **17**(9): 961~983

Advantages of RNA Interference in Anti-hepatitis B Virus Therapy*

ZHANG Xue-Zhi, SHAN Chang-Liang, YE Li-Hong**, ZHANG Xiao-Dong**

(Key Laboratory of Bioactive Material of Ministry of Education, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract According to the report from World Health Organization (WHO), about two billion people worldwide have been infected with hepatitis B virus (HBV), of which 350 million people with chronic HBV infection. Now China has 130 million HBV carriers and 30 million patients suffered from hepatitis B. About 20 % ~40% of patients after years of inflammatory damage may develop into liver cirrhosis and liver cancer. Even today, however, people still have not found a specific drug that can completely cure chronic hepatitis B. Since the phenomenon of RNA interference (RNAi) was discovered, people have been constantly trying to apply it to the anti-viral drug research and development. Findings show that RNAi can indeed inhibit the replication of HBV. However, the efficiency of gene silencing varies considerably due to the different sequences of RNAi. In addition, the safety and effectiveness of RNAi-based antiviral drugs tested on humans still need to be further investigated. And the "off target" phenomenon of RNAi is another problem that must be resolved before its clinical trial.

Key words RNA interference (RNAi), hepatitis B, hepatitis B virus

*Supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30670959).

**Corresponding author . Tel: 86-22-23506830, Fax: 86-22-23501385

ZHANG Xiao-Dong. E-mail: zhangxd@nankai.edu.cn

YE Li-Hong. E-mail: yelihong@nankai.edu.cn

Received: September 28, 2007 Accepted: November 6, 2007