

反义锁核酸体外抗乙肝病毒的实验研究

唐 盈¹, 王燕菲^{2△}, 朱文渊² (1. 广州市人口和计划生育技术服务指导所中心实验室 510410; 2. 广州医学院生物化学与分子生物学教研室, 广州 510410)

【摘要】目的 探讨锁核苷酸(LNA)修饰的反义寡核苷酸抑制乙型肝炎病毒(HBV)表达的效果及其抗 HBV 作用的特点。**方法** 针对 HBV S 基因同一靶位分别合成三段不同化学修饰的反义寡核苷酸: 锁核酸修饰、未修饰和全硫代修饰, 并以无关序列为对照直接作用于 HepG₂ 2. 2. 15 细胞, ELISA 法动态检测细胞上清液中 HBsAg 含量; 实时荧光定量 PCR 法(FQ-PCR)检测细胞上清中 HBV DNA 含量; MTT 法监测细胞活性。**结果** 针对 HBV S 基因的反义 LNA 能显著抑制 HepG₂ 2. 2. 15 细胞表达 HBsAg ($P < 0. 05$) 且第 3 天出现抑制高峰, 抑制作用随时间延长逐渐减弱。反义锁核酸组对 HBsAg 及细胞内、细胞外 HBV DNA 均有较强抑制作用, 最高抑制率分别为 51. 19%、56. 73%、86. 9%, 与其他实验组相比差异有统计学意义 ($P < 0. 05$), 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0. 01$); LNA 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内对细胞代谢无影响。**结论** 针对 S 基因的反义 LNA 体外能发挥高效、特异、低毒的抗 HBV 作用, 为乙型肝炎的基因治疗注入了新的思路。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 锁核酸; 基因治疗

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 13. 018 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)13-1671-03

Experimental research of the inhibitory effects in vitro on hepatitis B virus by antisense locked nucleic acid TANG Ying¹, WANG Yan-fei^{2△}, ZHU Wen-yuan² (1. Central Laboratory, Guangzhou Research Institute for Population and Family Planning, Guangzhou, Guangdong 510410, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510410, China)

【Abstract】Objective To investigate the inhibitory effects on hepatitis B virus (HBV) expression by locked nucleic acid (LNA) modified antisense oligonucleotides and the anti-viral characteristic. **Methods** Three antisense oligonucleotides with different modify were complementary to the initiator of HBV S gene, were synthesized including locked nucleic acid-modified, unmodified and all phosphorothioate-modified. All of the sequences introduced into HepG₂ 2. 2. 15 cells with unrelated sequence as a contrast. The concentration of HBsAg in the supernatant of the cell was dynamic tested by ELISA. HBV DNA levels were quantified by fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). Cell activity was detected by MTT assay. **Results** It showed antisense LNA targeting HBV S gene significantly inhibited the expression of HBsAg in HepG₂ 2. 2. 15 cells ($P < 0. 05$). In third days, the peak of inhibition appeared and inhibition decreased gradually with time. Antisense-LNA group showed the strongest inhibitory effects on HBsAg, intracellular, extracellular HBV DNA, the maximum inhibition rates were 51. 19%, 56. 73%, 86. 9% respectively, there was significant difference compared with the other experimental groups ($P < 0. 05$), there was statistically significant difference compared with the control group ($P < 0. 01$); Within 20 $\mu\text{mol/L}$ concentration, antisense LNA had no impact on cell metabolism. **Conclusion** It concludes that antisense LNA targeting S gene in vitro can play anti-hepatitis B viral roles with high efficiency, specificity and low toxicity, provides a new idea for gene therapy of hepatitis B.

【Key words】 Hepatitis B virus; lock nucleic acid; gene therapy

目前临床上使用的药物专一性不高, 易引起乙型肝炎(乙肝)病毒变异, 对乙肝的疗效不理想^[1-2]。反义技术一直是近几年来基因治疗的热门领域, 引入反义技术从分子水平上探索治疗乙肝的新途径具有广阔的前景。本研究从细胞水平将锁核苷酸(LNA)与传统的反义寡核苷酸进行比较, 深入探讨新一代反义寡核苷酸-锁核苷酸体外抗乙肝病毒(HBV)的活性及其抗病毒作用的特点。

1 材料与方 法

1.1 材料 HepG₂ 2. 2. 15 细胞由广州医学院生化与分子生物教研室传代培养。该细胞株为 HBV DNA 全基因转染肝癌细胞系 HepG2, 能稳定分泌 HBsAg。DMEM 培养基, G418 为 GIBCO 产品, 胎牛血清购自杭州四季清公司, HBsAg ELISA 检测试剂盒购自上海科华公司, HBV 核酸扩增荧光定量试剂

盒购自中山大学达安基因公司。荧光定量 PCR 仪为美国 ABI7500, 由本室提供。

1.2 反义核酸的合成与修饰 选择抑制作用较强、互补于 HBV S 基因翻译起始区的同一靶位合成以下几段 11 聚脱氧核苷酸: (1) 反义锁核苷酸, 5'-GtTcTccAtGt-3', 大写字母代表碱基经 LNA 修饰, 小写字母代表 DNA, 由美国 GENELINK 公司合成, RPC 方式纯化, 纯度超过 90%。(2) 未修饰反义寡核苷酸, 序列为 5'-gttctccatgt-3'。(3) 全硫代反义寡核苷酸, 序列同(2)。(4) 与 HBV 基因无关对照序列, 5'-atcagtcagtc-3'。LNA 和无关序列分别以不同浓度(1、5、10 $\mu\text{mol/L}$)一次性作用于 HepG₂ 2. 2. 15 细胞, 共同培养 72 h, 以不加药物的细胞为空白对照。

1.3 ELISA 法检测细胞上清液 HBsAg 含量 将 HepG₂ 2. 2.

15 细胞按 1×10^5 个/mL 的最适浓度接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μ L, 待细胞贴壁后弃培养液分别加入不同修饰的反义/ 无关序列寡核苷酸-DMEM 液, 各设 3 个复孔, 另设不加药物的细胞为空白对照。用 ELISA 法测定 HBsAg 含量, 每个样品重复 3 次取平均值。分别加入 10 μ M LNA、未修饰、全硫代修饰和无关对照序列, 以正常细胞(不加寡核苷酸)为对照, 连续 6 d 收集培养上清测定 HBsAg 含量。反义寡核苷酸对 HBsAg 的抑制率按下述公式计算:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照孔 OD} - \text{实验孔 OD}}{\text{对照孔 OD}} \times 100\%$$

注: OD = OD₅₇₀ - OD₆₃₀

1.4 FQ-PCR 法检测细胞内外 HBV DNA 含量 取培养上清液 50 μ L 加等量体积的 DNA 提取液, 充分混匀 100 $^{\circ}$ C 恒温处理 10 min; 12 000 r/min 离心 5 min 备用。细胞消化制成 1 mL 单细胞悬液, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 1 mL PBS 重悬洗涤, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用病毒 DNA 提取试剂盒提取细胞内 HBV DNA。HBV-DNA 阳性定量标准品由试剂盒提供, 分别稀释成 4 个梯度 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 copy/mL。上述各取 2 μ L 与反应液混合后进行扩增反应, 条件如下: 93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min(1 个循环), 93 $^{\circ}$ C 5 s, 57 $^{\circ}$ C 退火、延伸 45 s, 共 40 个循环。细胞贴壁 1 d 后加入 10 μ M LNA 和全硫代修饰寡核苷酸的 DMEM 维持液, 隔 24 h 换相同药物浓度的维持液, 连续 3 d, 设不含药物的细胞做对照, 72 h 后收集细胞和细胞上清液。结果分析: 以 Ct 值(达到阈值的循环数, Threshold Cycle)为纵坐标, HBV DNA 浓度的对数值为横坐标, 制作标准曲线, 利用待测标本的 Ct 值求出相应的 HBV DNA 含量, HBV DNA 含量(copy/mL) $< 1 \times 10^3$ 为阴性, $> 1 \times 10^3$ 为阳性。

1.5 细胞的毒性试验 LNA 分别以 1、5、10、20 μ mol/L 一次性作用 HepG₂ 2. 2. 15 细胞 3 d 后测 OD 值, 设 6 个复孔取均值。MTT 比色法检测 LNA 对细胞代谢活性的影响。

1.6 统计学分析 SPSS18.0 软件处理, 各组间均数比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LNA 抗 HBV 的剂量相关性抑制作用 LNA 的浓度在 1~10 μ mol/L 对 HBV 基因表达的抑制作用呈剂量相关性, 以 10 μ mol/L 浓度对 HBsAg 的抑制作用最佳($P < 0.01$); 无关序列无明显抑制作用(表 1)。

2.2 LNA 抗 HBV 的时间依赖性抑制作用 结果显示不同修饰的反义寡核苷酸均可不同程度抑制 HepG₂ 2. 2. 15 细胞分泌 HBsAg, 各实验组与无关序列相比差异有统计学意义($P < 0.01$)(表 2)。LNA 抗病毒作用具有时效性, 加药后第 1 天出现抑制作用, 第 3 天抑制率最高达 51. 19%, 其后随时间延长逐渐下降, 抑制作用比未修饰(30. 72%)和全硫代修饰寡核苷酸(47. 78%)强。无关序列抑制率无明显时效关系。

2.3 LNA 对 HepG₂ 2. 2. 15 细胞 HBV DNA 复制的影响 阳性对照品 FQ-PCR 的标准曲线: 以拷贝数的对数值为横坐标, 以 Ct 值为纵坐标, 进行线性回归, 相关系数 $r = 0.999\ 357$ 。阴性对照显示 HBV DNA 为阴性。对细胞上清液和细胞内 HBV DNA 的抑制率与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)且相同浓度下 LNA 抗病毒作用优于全硫代寡核苷酸($P < 0.05$), 见表 3。

2.4 LNA 对细胞活性的影响 各实验组细胞无明显形态异常, 细胞数目未见明显差异, 结果显示 LNA 在 20 μ mol/L 浓度范围内对细胞生存与代谢无明显影响($P > 0.05$), 见表 4。

表 1 LNA 不同浓度对宿主细胞分泌 HBsAg 的抑制作用

序列编号	浓度(μ mol/L)	OD($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)
LNA	1	0.244 \pm 0.042 *	19.87
	5	0.221 \pm 0.037 *	27.54
	10	0.161 \pm 0.008 **	47.21
无关序列	1	0.304 \pm 0.021	0.00
	5	0.295 \pm 0.024	3.28
	10	0.290 \pm 0.001	4.92
细胞对照	—	0.305 \pm 0.011	—

注: LNA 与细胞对照比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; — 表示无数据。

表 2 不同修饰反义寡核苷酸对 HepG₂ 2. 2. 15 细胞分泌 HBsAg 的抑制率(%)

时间(d)	LNA	未修饰	全硫代修饰	无关序列
1	14.29	6.25	16.07	4.46
2	25.86	15.52	25.29	7.47
3	51.19 **	30.72 **	47.78 **	8.87
4	49.56	20.70	43.44	4.96
5	37.04	10.58	24.87	4.12
6	27.40	5.15	18.03	3.28

注: 各实验组分别与无关序列相比, ** $P < 0.01$; — 表示无数据。

表 3 LNA 和全硫代寡核苷酸对 HBV DNA 的抑制作用

序列	上清液		细胞	
	含量(IU/mL)	抑制率(%)	含量(IU/mL)	抑制率(%)
LNA	(8.36 \pm 0.68) $\times 10^5$ *	86.90	(2.57 \pm 0.23) $\times 10^7$ *	56.73
全硫代修饰	(1.70 \pm 0.28) $\times 10^6$	73.35	(4.60 \pm 0.47) $\times 10^7$	22.56
对照组	(6.38 \pm 0.12) $\times 10^6$	—	(5.94 \pm 0.17) $\times 10^7$	—

注: LNA 与全硫代序列比较, * $P < 0.05$; — 表示无数据。

表 4 不同浓度 LNA 对 HepG₂ 2. 2. 15 细胞活性的影响(OD 508 nm)

分组	浓度(μ mol/L)	OD($\bar{x} \pm s$)
LNA	1	1.173 \pm 0.049
	5	1.161 \pm 0.042
	10	1.156 \pm 0.042
	20	1.147 \pm 0.046
正常对照组	—	1.203 \pm 0.043

注: — 表示无数据。

3 讨 论

LNA 与天然核酸非常相似, 因其核糖的 2'-O 和 4'-C 通过缩水作用形成氧亚甲基桥, 使其 3' 内部构象形似锁状, 从而降低了核糖结构的可塑性, 增强了磷酸盐骨架局部的稳定^[3-5]。

研究表明, 反义 LNA 能与 HBV S 基因 mRNA 翻译起始区特异性结合从而阻断 HBsAg 表达, 对病毒蛋白的抑制作用在一定浓度范围内呈剂量相关性, 浓度越大, 对 HBsAg 的抑制效果越好。此外, LNA 抗 HBV 还具有时间依赖性, 抑制作用随时间延长逐渐减弱, 原因可能是: (1) 在细胞内与 mRNA

结合,激活了 RNaseH,降解杂交双链中的 RNA,从而阻断蛋白质的翻译过程。(2)HepG₂ 2. 2. 15 细胞中整合的 HBV DNA 持续产生 mRNA,逐渐使细胞内的 LNA 稀释,不足以发挥有效作用。前期研究表明当等量隔天反复投药时,抑制率随反义核酸作用时间的延长表现为缓慢增高趋势^[6]。本研究还显示 LNA 能显著抑制细胞内外 HBV DNA 的合成,与传统的反义寡核苷酸相比抗病毒效果更好($P < 0.05$),这可能与 LNA 的高亲和力、良好的抗核酶降解能力和水溶性有关^[7-8]。

MTT 实验证实 LNA 本身不影响宿主细胞正常的增殖与代谢,可见 HepG₂ 2. 2. 15 细胞 HBsAg 分泌减少主要是 LNA 以序列特异性方式作用于 HBV 基因引起的,而不是 LNA 本身毒性导致细胞活性的显著降低。LNA 如何有效进入靶细胞发挥特异性抗病毒作用是基因治疗的关键,反义寡核苷酸能通过胞饮的方式直接穿过胞膜,进入细胞发挥“基因封条”的作用,但采取直接导入的方式需要足够剂量的 LNA 才能在靶细胞内达到药效浓度,而增加含量会产生细胞毒性作用。此外,体外合成的 LNA 只能抑制病毒不能彻底消灭,因此如何找到一种满意的肝靶向性核酸药物载体是开发特异性抗 HBV 药物亟待解决的难题。已有文献报道利用脂质体技术将 LNA 导入靶细胞内是一条可行的途径^[9]。本文在细胞水平上探讨了 LNA 成为新一代分子药物治疗乙肝的可能性,为抗 HBV 药物筛选和临床应用提供了一个很好的依据,LNA 显示出更好的反义活性但它的抗 HBV 作用必须进一步通过动物实验及临床试验验证。

参考文献

[1] Buti M, Esteban R. Drugs in development for hepatitis B

[J]. *Drugs*, 2005, 65(11):1451-1460.

[2] 于乐成,何长伦,汪茂荣. 乙型肝炎肝硬化抗病毒治疗的研究进展[J]. *实用肝脏病杂志*, 2010, 13(4):245-248.

[3] Veedu RN, Wengel J. Locked nucleic acids; promising nucleic acid analogs for therapeutic applications[J]. *Chem Biodivers*, 2010, 7(3):536-542.

[4] Veedu RN, Wengel J. Locked nucleic acid as a novel class of therapeutic agents[J]. *RNA Biol*, 6(3):321-323.

[5] Kaur H, Scaria V, Maiti S. "Locked onto the target": increasing the efficiency of antagomirzymes using locked nucleic acid modifications [J]. *Biochemistry*, 2010, 49(44):9449-9456.

[6] 唐盈,王燕菲. 针对 HBV S 基因的反义锁核酸抗乙型肝炎病毒表达的初探[J]. *江西医药*, 2006, 41(4):205-208.

[7] Kaur H, Babu BR, Maiti S. Perspectives on chemistry and therapeutic applications of Locked Nucleic Acid (LNA) [J]. *Chem Rev*, 2007, 107(11):4672-4697.

[8] Vester B, nucleic WL. High-affinity targeting of complementary RNA and DNA[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(42):13233-13241.

[9] 邓益斌,王燕菲. 阳离子脂质体介导双靶区反义锁核酸抗病毒疗效研究[J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2008, 35(3):149-153.

(收稿日期:2013-01-16 修回日期:2013-02-12)

(上接第 1670 页)

较小,感染后一般只是引起慢性浅表性胃炎而无临床症状。世界上超过半数的人感染 Hp,但并不是所有的 Hp 都产生空泡毒素,只有 50%~60% 具有空泡毒素活性的 Hp 才是产毒菌株^[4]。因此对指导 Hp 感染的治疗具有重要的意义。免疫印迹试验是将标准的 Hp 产毒株 CagA 阳性和 VacA 阳性的各种抗原成分提取出来,用聚丙烯酰胺凝胶电泳按分子量大小不同依次分开,再将其转印至印迹膜上,如果被检者血清有相应抗体,应用酶联免疫反应,就会在抗原的相应位置出现显色区带,据此可判断出被检血清中各种 Hp 抗体^[5]。根据抗体的不同可推断 Hp 类型,根据显色带的强弱、消长可观察治疗效果,预测溃疡有无复发的可能性。

临床上用来诊断感染的方法很多^[6-10]。如取胃组织作快速尿酶测定,组织切片染色,细菌培养,¹⁴C 呼气试验等,但 these 方法结果易受试剂质量,标本量,反应时间,环境温度,用药情况,主观经验的影响,还需采用侵入性、创伤性的手段来采集样本,给患者带来一定的痛苦和心理负担;另外,所需的仪器昂贵,代价较高,限制了临床的普及。免疫印迹法能同时检出全部抗体,并且根据抗体的不同,能判定的类型并预测胃病的严重程度。此外免疫印迹法为无创伤性诊断检测方法,还具有敏感性高、特异性强、方法简单、时间短等特点,具有较大应用价值,值得临床推广使用。

参考文献

[1] Etukudo OM, Ikpeme EE, Ekanem EE. Seroepidemiology of helicobacter pylori infection among children seen in a

tertiary hospital in Uyo, southern Nigeria [J]. *Pan Afr Med J*, 2012, 12(3):39.

[2] 王强,谢跃文,辛焰. 211 例上消化道症状儿童幽门螺杆菌抗体检测分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(2):268.

[3] 王瑞锋. 儿童幽门螺杆菌感染检测方法评估[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(5):564-566.

[4] 陈海英,番敏,张柳. 免疫印迹技术在临床幽门螺杆菌检测中的应用[J]. *中国实验诊断学*, 2006, 10(9):995-996.

[5] 王丽姣,周国华,冷明芳,等. 免疫印迹试验在检测幽门螺杆菌感染中的临床价值[J]. *临床消化病杂志*, 2012, 24(3):182-183.

[6] 李红娟. 某电力公司员工幽门螺杆菌检测结果分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(8):937.

[7] 周洪. 幽门螺杆菌实验检测技术的研究进展[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(22):103-105.

[8] 胡久叶,杜晓莉,黄莉. ¹⁴C 一尿素呼气试验在诊断幽门螺杆菌感染中的价值[J]. *湘南学院学报:医学版*, 2008, 10(3):36-37.

[9] 王晓波,庄小芳,郭峰. 2 种非侵入检测方法对幽门螺杆菌感染的诊断价值[J]. *新疆医科大学学报*, 2012, 35(7):949-952.

[10] 周兴,袁伟. PCR 检测技术在幽门螺杆菌诊断检测中的应用探讨[J]. *检验医学与临床*, 2012, 9(19):2430-2431.

(收稿日期:2012-12-21 修回日期:2013-03-02)