

文章编号: 1672-3384 (2006) -04-0045-04

慢性乙型肝炎的基因治疗进展

【作者】 洪源 成军

北京地坛医院传染病研究所 (北京 100011)

【中图分类号】 R512.62

【文献标识码】 B

全球约有 3.5 亿乙型肝炎病毒 (HBV) 携带者, 我国约 1.3 亿, 其中 1/4 为慢性乙型肝炎, 易发展为肝硬化、肝癌。近年来, 慢性乙型肝炎的治疗已取得较大进展。尤其是 α 干扰素 (IFN α) 和核苷 (酸) 类似物药物的开发与应用, 使慢性乙型肝炎的治疗有了较大进步, 但其疗效还不理想。IFN α 在有选择的病例中对乙肝的长期疗效仅为 30%~40%, 新近开发的抗病毒药物, 也由于其抗病毒作用短暂及易于筛选 HBV DNA 多聚酶的突变而形成耐药性和停药后易于复发等缺点, 使其应用受到一定限制。慢性乙型肝炎的基因治疗通过将外源基因导入细胞而发挥抗病毒作用, 是极具潜力的抗乙肝病毒治疗方法。本文就目前国内外抗慢性乙型肝炎的基因治疗技术作一简要介绍。

1 RNA 干扰技术

RNA 干扰技术 (RNA interference, RNAi) 是近年发展起来的一项很有前景的基因治疗策略。它是一种由序列特异性双链 RNA (dsRNA) 诱发的, 导致转录后水平基因沉默 (posttranscriptional gene silencing, PTGS) 的技术。在此过程中, 与 dsRNA 有同源序列的信使 RNA (mRNA) 被降解, 从而抑制该基因表达。RNAi 的干扰过程主要有 2 个步骤: ①细胞 dsRNA 被特异核酸酶切成 21~23 个碱基对的短 dsRNA, 即 siRNA。②siRNA 与细胞源性的某些酶和蛋白质形成复合体, 称为 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA induced silencing complex, RISC), 该复合体可识别与 siRNA 有同源序列的 mRNA, 并在特异位点将该 mRNA 切断^[1]。一种称为 Dicer 的核酸酶参与将 dsRNA 切成 siRNA 的过程。Shlomai

等^[2]将 HBV-绿色荧光蛋白 (GFP) 质粒和 RNAi 转染稳定表达 HBV 的 HepG 2.2.15 细胞。转染后 72h 免疫染色 HBV 核心蛋白, 用激光共聚焦显微镜观察到 GFP 阳性细胞明显减少而对照组无变化。用 Northern 印迹分析表明, 实验组的 HBV 转录水平下降 68%, 复制水平下降 95%。这些资料提示, 尽管翻译水平的干扰作用并不能排除, RNAi 主要在 mRNA 水平发挥作用, 而且 RNAi 有抑制病毒复制的作用。McCaffrey 等^[3]将编码 HBV 基因的质粒与 HBV 特异性 RNAi 质粒导入小鼠肝脏。结果发现, 在所有转染外源性 HBV DNA 的器官 (肝、脾、肾和胰腺) 中, 肝脏转染效率最高, 有 40% 肝细胞表达转染基因。Northern 印迹和 Western 印迹分析感染 HBV 小鼠肝组织, 发现可明显降低 HBV mRNA 水平和蛋白表达。分泌的 HBsAg 在细胞水平下降 94.2%, 鼠血清中下降 84.5%, 用免疫组化方法检测 RNAi 转入的肝细胞, 发现 HBV 核心抗原表达水平下降超过 99%。这些通过体内共转染质粒方法获得的结果, 为 RNAi 的抗病毒活性可以在动物体内发挥作用提供了重要证据。RNAi 作为治疗 HBV 工具的主要优势在于: 它针对的是病毒的特异靶序列, 不会对其他细胞成分发生反应, 从而大大减少了不良反应; 可以针对 HBV 设计多个不同序列的 siRNA, 提高作用效果, 为清除不同序列的 HBV 提供一种新的思路。但如何将 RNAi 导入细胞内部及其 RNAi 能否有效抑制已经存在的病毒感染, 还有待于进一步研究。

2 反义寡脱氧核苷酸技术

反义寡脱氧核苷酸是指人工合成的单链脱氧核

苷酸(15-40 碱基)片段,它通常结合到双螺旋分子富含A或G的一股链上形成三螺旋DNA,来阻止基因转录。Korba等^[4]证实,在体外实验中,针对HBV的C区、S区和前-S1区基因而合成的反义寡脱氧核苷酸可显著抑制HBV的复制和蛋白表达,而针对HBeAg和聚合酶基因的反义寡脱氧核苷酸则无抗病毒作用。此后,学者们先后设计并合成了针对几乎所有HBV特定功能区的反义寡脱氧核苷酸,如针对HBV多聚腺苷酸信号区、前-S2区及X区等,它们在细胞水平上都能不同程度地抑制HBV基因的表达。Wands等^[5]合成了一段针对HBV聚合酶区的反义寡脱氧核苷酸,结果发现可完全阻断HBV的复制。但在具体应用中,反义寡脱氧核苷酸在体内的稳定性及进入细胞的效率存在着许多问题。为提高其稳定性,可将合成的反义寡脱氧核苷酸进行化学修饰,如甲基化、烷基化、偶联某些基团或某些具有高级结构的核酸片段;为了提高肝细胞内反义寡脱氧核苷酸的浓度,可将反义寡脱氧核苷酸与去唾液酸粘蛋白交联,利用肝细胞表面特有的去唾液酸糖蛋白受体使进入肝细胞的反义寡脱氧核苷酸量提高10倍以上^[6]。目前来看,反义寡脱氧核苷酸还处于起步阶段,相关方面的研究也较少。

3 核酶技术

核酶最早是从四膜虫(一种纤毛原生生物)中的核糖体RNA前体中发现的。它能催化其他RNA分子的降解与聚合,使靶RNA链在某些特殊部位断裂,重新连接起来,核酶在切断mRNA后又可以从杂交链上脱落下来,重新结合并切割其他mRNA。目前的研究主要通过人工合成具有催化活性的小分子核酶(如锤头状核酶、发夹状核酶),与靶RNA中互补的序列特异结合,行使其切割功能^[7]。HBV基因组包括4个读码框,近来已有许多学者针对各个读码框设计出能切割信使RNA(mRNA)及前基因组RNA(pgRNA)的核酶。Kim等^[8]设计分别切割HBV-X可读框的114及309位核苷酸的核酶K2A与R2B,体外实验表明其对靶位点切割率达

52%和75%。将2种核酶应用于HBx表达质粒转染HepG2细胞后,发现K2A与R2B分别可降低HBx的mRNA水平(分别为40%和57%)。李谨革等^[9]针对HBV的Cp区双位点设计核酶,共转染人肝癌细胞株后对细胞所表达的HBeAg进行间接荧光染色后定量分析发现,共转染组HBV的mRNA明显较对照组低,提示核酶组HBV的mRNA被剪切。Welch等^[10]发现经过修饰的核酶能更好地发挥作用,他们分别针对编码HBV表面抗原、多聚酶、X区的前基因组RNA和mRNA,设计了3种发卡式的结构核酶,结果发现经过修饰后的核酶的RNA抑制率达87%,而未经修饰的核酶抑制率仅有66%。为了有效地提高核酶的体内切割效率和转导效率,可应用多个核酶联合,分别针对一条mRNA上不同的位点进行多位点切割,以提高核酶的剪切率,并阻止HBV利用变异以逃避核酶攻击。最初对核酶的研究仅限于根据靶序列的一级结构来制定,但由于底物复杂的二、三级结构,以及宿主细胞内诸多因素的相互作用,使核酶发挥作用很难达到预期效果,而运用核酶底物随机结合的方法,构建核酶库,以核酶活性为选择标准则可大大提高核酶在体内发挥作用的效率。Pulitz等^[11]自行构建了发卡状核酶库,并针对HBV全长pgRNA序列从中选出了40个核酶作用潜在位点,并最终选出所有的对HBV基因型都保守的17个位点来进一步研究,结果发现这17个位点主要分布于520-600nt、140-22100nt、3000-3200nt之间,经胞内转染证明只有4个位点即能显著抑制HBV复制,降低HBSAg和HBeAg的分泌。近年来,针对X区靶向核酶研究成为新的热点。Welnberg等^[12]对X区转录产物设计了相应的核酶转染靶细胞后发现效应分子能降低X区的反式激活作用,且抑制HBV复制。相信在不久的将来,核酶将有可能成为治疗HBV的特异药物,但在其应用于临床之前,还有许多问题有待进一步研究,如真核细胞体内的核酶酶切产物不是很稳定,由于核酶本质是RNA,内源RNA在5'-及3'-端往往带有转录调控碱基序列,常使核酶变构

而影响其酶切功能。

4 核酸疫苗技术

核酸疫苗, 又名 DNA 疫苗, 是将编码外源蛋白的基因表达载体导入机体, 以激发机体产生特异性免疫应答。它不仅可引起体液免疫, 而且可引起细胞免疫, 比常规疫苗更具优势。慢性乙型肝炎是由于 T 细胞反应的缺陷而不能有效地清除 HBV 病毒。T 细胞反应缺陷可以通过用具有免疫原性的多肽刺激 HBV 特异的细胞毒 T 细胞 (CTL) 以最终清除病毒。1993 年 Davis 等^[13]首次将 HBV ayw 亚型 S 基因的编码序列亚克隆到真核表达载体中, 通过肌注小鼠后发现抗-HBs 逐步上升, 并可见明显的量效关系。8 周后, 100% 的实验组表现为抗-HBs 阳性, 抗体水平平均高于 100 mIU/mL。1996 年 Davis 等^[14]将核酸疫苗技术应用于大猩猩体内进行实验研究, 并取得良好效果。Mancini 等^[15]构建了真核重组质粒, 可表达 HBV (ayw) 前-S2 和 S 基因, 将其注射于 HBV 转基因小鼠体内。之后发现接种核酸疫苗后, 小鼠血清中 HBsAg 含量明显下降, 免疫后 8 周, 血清中 HBsAg 检测值近为零; 免疫后 12 周, 肝脏中无法检测 HBsAg mRNA。接种后 2 周血清中抗-HBs 阳转, 12 周时仍可检测为阳性, 作者认为核酸疫苗可通过其内源性抗原提呈系统激活 CTL 细胞活性, 从而打破免疫耐受。中国台北学者 Chow 等^[16]首次将 IL-2 应用于核酸疫苗的研究中。他们将 IL-2 的编码序列直接连接在 HBV 前-S2/S 基因之后 (pS2-S-IL-2), 或通过串联启动表达系统, 在前-S2/S 基因之后另有 CMV 启动子启动 IL-2 的表达 (pS2-S/pIL-2)。联用 pS2-S 与 pS2-S-IL-2 或 pS2-S 与 pIL-2 之后, 体液免疫的效果强于单用 pS2-S 组, 持续时间长。Wild 等^[17]应用双顺反子质粒表达系统进行了 HBV 核酸疫苗研究。在 CMV 启动子下游, 接 HBcAg 编码序列, 之后跟一内部核糖体进入位点 (IRES), IRES 下游为 HBsAg 编码序列, 命名为 pCMV/C-S。免疫小鼠后可检测到高水平的抗-HBs 和抗-HBc。Tacket 等^[18]报道了第一次将 HBV 核酸疫苗应用于人类志愿者的 I 期临床试

验研究结果。该研究应用基因枪 (PowderJect XR1) 将包裹于金微粒表面的核酸疫苗质粒以高速注射入人体皮肤中, 6 例健康志愿者和 1 例 HBV 血清标志物阳性者分为 3 组, 共免疫 2 次, 相隔 56d, 结果在 6 例健康志愿者中, 有 1 例经 1 次接种后就产生了持续高滴度的抗-HBs 应答, 其余 5 例均未见免疫应答。后经分析回顾性资料, 发现此例阳性反应者以前可能暴露过 HBV 感染。这一研究结果说明核酸疫苗可诱导很强的加强免疫反应。但可能由于接种时质粒量、压力、基因枪系统等原因, 最终的免疫效果不尽人意, 还需进行进一步的研究。对于 HBV 核心抗原 (HBcAg) 核酸疫苗的研究, Geissler 等^[19]报道, 以 HBcAg 核酸疫苗免疫的小鼠都产生了抗-HBc 及强烈的 HBcAg 特异性 CTL 免疫应答。CTL 应答的动力学证实第一次免疫后 16~21d, CTL 就已产生抗-HBc 的细胞毒性溶解作用, 且此 CTL 活性至少可维持数月。核酸疫苗的研究近年来发展迅速, 日益显示出其巨大的潜力和应用前景, 但是, 它的历史毕竟很短, 还有许多问题急需解决: ①安全性: 尽管现有的动物实验研究未发现任何副作用, 但仍有必要进一步研究以探明外源核酸是否与宿主染色体整合。②核酸接种的免疫学机制仍待深入研究。③接种途径、接种方式及诱导效率有待进一步提高。

基因治疗是一种前景十分看好的针对慢性乙型肝炎病毒感染的治疗方式。10 多年的临床试验证明, 基因治疗总体上是安全有效的, 但是要真正实现基因治疗步入实际的临床应用还需要许多相关方面更深入的研究, 如: 进一步提高治疗效果, 寻找到有效的特异性基因进入被病毒感染肝细胞的方法; 降低潜在的毒副作用等。许多依赖于 HBV DNA 序列的特异性的基因治疗策略, 目前也受到 HBV 准种 (quasispecies) 特点, 即核苷酸序列不均一性 (heterogeneity) 等特点的困扰^[20]。相信随着理论和实践技术研究的深入, 这些问题会被逐步突破和改进。基因治疗终将造福于广大的慢性乙型肝炎患者。

【参考文献】

- [1] Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 1999, 286: 950-952
- [2] Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology*, 2003, 37: 764-767
- [3] McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 636-644
- [4] Korba BE, Gerin JL. Antisense oligonucleotides are effective inhibitors of hepatitis B virus replication in vitro. *Antiviral Res*, 1995, 28: 225-242
- [5] Wands JR, Geissler M, Putlitz JZ. Nucleic acid-based antiviral and gene therapy of chronic hepatitis B infection. *J Gastroenterol Hepatol*, 1997, 12: S354-S369
- [6] Bartholomew RM, Carmichael EP, Findeis MA. Targeted delivery of antisense DNA in woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks. *J Viral Hepat*, 1995, 2: 273-278
- [7] 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, 1995, 23: 4954-4962
- [8] Kim YK, Junn E, Park I. Repression of hepatitis B virus X gene expression by hammerhead ribozymes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 257: 759-765
- [9] 李谨革. 核酶对细胞内 HBeAg 表达抑制作用定量分析. *中华传染病杂志*, 1997, 17: 152-154
- [10] Welch PJ, Tritz R, Yei S. Intracellular application of hairpin ribozyme genes against hepatitis B virus. *Gene Ther*, 1997, 4: 736-743
- [11] Zu Putlitz J, Yu Q, Burke JM. Combinatorial screening and in-

tracellular antiviral activity of hairpin ribozymes directed against hepatitis B virus. *J Virol*, 1999, 73: 5381-5387

- [12] Weinberg M, Passman M, Kew M. Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells. *J Hepatol*, 2000, 33: 142-151
- [13] Davis HL, Michel ML, Whalen RG. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum Mol Genet*, 1993, 2: 1847-1851
- [14] Davis HL, McCluskie ML, Gerin JL. DNA vaccine for hepatitis B: evidence for immunogenicity in chimpanzees and comparison with other vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 7213-7218
- [15] Mancini M, Hachchouel M, Davis HL. DNA-mediated immunization in a transgenic mouse model of the hepatitis B surface antigen chronic carrier state. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 12496-12501
- [16] Chow YH, Huang WL, Chi WK. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. *J Virol*, 1997, 71: 169-178
- [17] Wild J, Gruner B, Metzger K. Polyvalent vaccination against hepatitis B surface and core antigen using a dicistronic expression plasmid. *Vaccine*, 1998, 16: 353-360
- [18] Tacket CO, Roy MJ, Widera G. Phage 1 safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. *Vaccine*, 1999, 17: 2826-2829
- [19] Geissler M, Tokushige K, Chante CC, et al. Cellular and humoral immune response to hepatitis B virus structural proteins in mice after DNA-based immunization. *Gastroenterology*, 1997, 112: 1307-1320
- [20] 成军. 述评: 应重视对乙型肝炎病毒准种特点的研究和认识. *中华检验医学杂志*, 2005, 28 (6): 562-564

(上接第 55 页)

醒配药师要不断学习, 不断开拓自己的知识领域。配置中心的工作不应只是简单的输液配制, 药师应更多地为保证病人用药安全, 提高临床用药水平, 参与临床合理用药做出更多的贡献。

【参考文献】

- [1] 陈新谦, 金有豫, 汤光. 新编药理学. 15 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003, 348-660
- [2] 赵汉臣, 曲国君, 王希海, 等. 注射药物应用手册. 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003, 137-875