

反义脱氧寡核苷酸的抗SRS病毒活性

单易非 纪宏

(上海医科大学生物物理教研室, 上海200032)

裘慕绥 王德宝

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海200031)

提 要

本文研究了合成的反义脱氧寡核苷酸片段, 包括修饰的和非修饰的, 同聚的和异聚的脱氧寡核苷酸对 SRS 病毒感染细胞的增殖, 细胞群落形成, α c 融合细胞产生和逆转录酶活性的抑制作用。结果表明上述寡聚物对病毒都有抑制活性。小鼠急性毒性试验在高剂量下未见毒性。各种寡聚物的作用机制不同。

关键词: 反义寡核苷酸 竞争性杂交 抗病毒作用

包括艾滋病毒(HIV)在内的反转录病毒能引起家畜、家禽肉瘤、白血病, 尤其是艾滋病对人类危害极大, 而且正在世界范围内迅速地传播扩散。这类病毒属 RNA 病毒, 其增殖有共同规律, 即病毒进入宿主以后, 其逆转录酶能以病毒 RNA 为模板, 以 tRNA 为引物, 在 4 种脱氧核苷三磷酸存在下, 反转录成 DNA。因此, 可用与病毒核酸序列互补的化合物, 称为反义核酸 (Antisense Nucleic Acid) 来阻断病毒在细胞内的复制和病毒蛋白合成。反义核酸可以特异地抑制基因表达的能力最早是 1978 年 Zamecnik PC 等在 Rous 肉瘤病毒 (RSV)^[1] 中观察到, 后又在水泡性口膜炎病毒 (VSV)^[2]、单纯疱疹病毒 (HSV)^[3] 和流感病毒^[4] 等见到。本文以小鼠白血病病毒的一种, 小鼠腹水瘤病毒 (SRSV) 为模式研究材料, 合成并观察与 Moloney 病毒 (M-MuLV) 基因组某段顺序互补的脱氧寡核苷酸的抗病毒作用。

材 料 和 方 法

一、反义化合物

脱氧寡核苷酸片段由中国科学院上海生化所合成, 有未经修饰的 9 聚和 14 聚寡聚脱氧胞苷酸 (homooligodeoxycytidylic acid) (dC_9 和 dC_{14})。经修饰的异聚脱氧寡核苷酸有 14 聚 phosphorothioate oligodeoxynucleotides (14 mer(ps)) ($5' \dots CCGACGACCCCCA_3'$), 与 M-MuLV 基因

本文于 1990 年 3 月 5 日收到, 10 月 4 日修回

组 5' 端一段引物区序列互补; 18 聚 phosphorothioate oligonucleotides (18mer(ps)) (5'... CATTCCCCCTTTTCTG...3'), 与 M-MuLV 基因组 3' 端一段序列 (即 7802-19) 互补。

二、SRSV 和 NIH3T3 细胞

SRSV 感染和非感染的 NIH 3T3 细胞常规接种 2×10^4 /ml, 培养于 RPM I 1640 中, 内含谷氨酰胺 $20 \mu\text{mol/L}$, 15% 热灭活小牛血清和 HEPES 100U/ml , 37°C , 5% CO_2 /空气。实验组为病毒感染细胞 (SRSV/3T3), 加或不加反义化合物。对照组为非病毒感染细胞 (3T3), 但与实验组相同处理。培养过程中以一定时间间隔取出作活细胞计数。

三、SRSV 抑制分析

用感染细胞的群落 (colonies) 形成观察和 xc 融合细胞 (syncytia) 产生法进行病毒抑制分析。将 SRSV 感染细胞和非感染 3T3 细胞 (1×10^5 /ml) 接种于 24 孔板上, 分别加入 dC_{14} ($8.5 \mu\text{mol/L}$) 为实验组, 不加为对照组, 培养 60h 后, 观察细胞群落形成, 加入 xc 细胞 (RSV 转化的大鼠肿瘤细胞), 培养 48h 后观察融合细胞数。

四、感染培养上清液中逆转录酶 (RT) 活性测定

收集实验组和对照组 72h 培养液, $1500g$ 离心 10 分钟, 上清液经 $100000g$ 离心 1h, 病毒沉淀加含 0.01% NP40 的 Tris-HCl (pH8.3)。RT 活性用 poly (rA) · oligo (dT) 作引物模板测定。 $^3\text{H-dTTP}$ ($30 \text{Ci}/\mu\text{mol/L}$, $5 \mu\text{Ci}$)。方法见参考文献^[5]。

五、动物毒性试验

实验分五组, 每组昆明种小鼠 3 只, 雄性。实验组腹腔注射不同剂量寡聚物, 对照组不注射或注射生理盐水。

结 果

(一) 脱氧寡核苷酸对感染细胞增殖的影响

SRSV 感染引起细胞增殖加速^[6], 并具有某些恶性细胞的特性^[7], 但并不杀死细胞。因此, 药物对感染细胞增殖的抑制, 反映药物对病毒感染的控制, 表 1 显示 dC_{14} 、 dC_6 和 18mer (ps) 对 SRSV 感染细胞增殖的抑制作用。可见不加药物时, 非感染 3T3 细胞数少, 而在同样培养条件下, 感染细胞数多。感染细胞加 dC_{14} 、 dC_6 和 18mer (ps) 后, 增殖速率下降。培养 24、48、72 和 96h 时, 扣除药物对非感染细胞的影响后, dC_{14} 对感染细胞增殖的抑制率分别为 55%, 97%, 39% 和 96%; dC_6 是 69%, 26%, 97% 和 49%; 18mer (ps) 是 90%, 87%, 36% 和 24%。因此, dC_{14} 的抑制作用大而持续时间长, 对细胞毒性也小; dC_6 抑制作用较小而对细胞毒性较大; 18mer (ps) 发挥抑制作用快而持续时间较短。

进一步实验指出, dC_{14} 对 SRSV 感染细胞生长的抑制作用与寡聚物的剂量有关。培养第 3 天, 非感染 3T3 细胞数 8.21×10^4 /ml, SRSV 感染细胞数 11.34×10^4 /ml。加不同量 dC_{14} (8, 12, 18, 24 和 $30 \mu\text{mol/L}$) 细胞数都比不加 dC_{14} 的低。在 $30 \mu\text{mol/L}$ 以上, 出现细胞毒性 (图 1)。

(二) 经修饰的脱氧寡核苷酸的抗病毒作用

脱氧寡核苷酸中的磷酸二酯键对核酸酶敏感, 经修饰后可防止降解。图 2 是经修饰的异聚脱氧寡核苷酸片段 14mer (ps) ($14 \mu\text{mol/L}$) 在不同培养时间 (22, 48, 72 和 96h) 的感染细胞增殖抑制率, 它们分别是 92%, 96%, 89% 和 72%, 因此, 14mer

表1 三种寡聚物对SRSV感染细胞增殖的抑制作用
Table 1 Inhibition of SRSV-induced cellular multiplication by three classes of oligomers

实验批号	组别	接种时间							
		24h		48h		72h		96h	
		细胞数* (1×10^4 /ml)	抑制率** (%)	细胞数* (1×10^4 /ml)	抑制率** (%)	细胞数* (1×10^4 /ml)	抑制率** (%)	细胞数* (1×10^4 /ml)	抑制率** (%)
I	3T3	0.54		1.23		7.22		13.90	
	SRSV/3T3	0.92	55	2.27	97	11.20	39	52.10	96
	SRSV/3T3+dC ₁₄ (15 μ mol/L)	0.69		1.16		8.45		12.70	
	3T3+dC ₁₄	0.52		1.13		6.01		11.10	
II	3T3	1.34		1.52		3.78		7.19	
	SRSV/3T3	1.47		1.98		9.87		9.12	
	SRSV/3T3+dC ₉ (18 μ mol/L)	1.33	69	1.37	26	1.99	97	4.42	49
	3T3+dC ₉ (18 μ mol/L)	1.29		1.03		1.78		3.44	
III	3T3	1.60		1.80		5.40		28.00	
	SRSV/3T3	1.90		3.40		8.20		53.00	
	SRSV/3T3+18mer(ps) (15 μ mol/L)	1.40	90	1.60	87	5.20	36	44.00	24
	3T3+18mer(ps)(15 μ mol/L)	1.37		1.40		3.40		25.00	

* 起始细胞数为 2×10^4 /ml

** 药物对细胞生长的抑制率(%) = [(药物对 SRSV 感染细胞生长的抑制) - (药物对 3T3 细胞生长的抑制)] / (SRSV 感染细胞的生长 - 非感染细胞的生长)

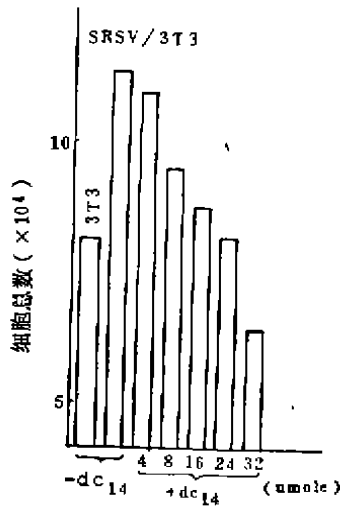


图1 不同浓度dC₁₄的抗病毒作用
Fig 1 Antiviral effect of different concentrations of dC₁₄

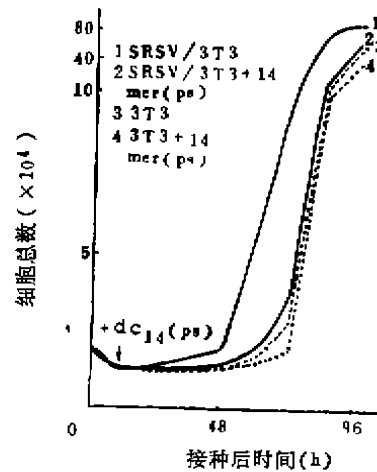


图2 14mer(ps)的抗病毒作用
Fig 2 Antiviral effect of 14mer(ps)

(ps) 对感染细胞增值的抑制作用在72—96%之间。

(三) 寡聚物对病毒的抑制作用

感染细胞的群落形成是由于病毒感染引起成纤维细胞的变化,失去细胞分裂的接触抑制,并具有某些恶性细胞的特征;xc 融合细胞形成是 xc 细胞与病毒感染细胞混合培养,发生融合,形成合体细胞。细胞群落形成分析中,不加寡聚物的感染细胞群落数为 38/孔,加寡聚物为 22.5/孔,同样培养条件下,非感染 3T3 细胞,加和 不加寡聚物均为 0/孔。细胞融合实验结果如表 2 所示,病毒感染细胞加寡聚物后融合细胞数从 11/孔减少至 0/孔,而非病毒感染的 3T3 细胞均未见有融合细胞形成。因此,实验结果表明寡聚物对病毒复制的抑制作用和作用特异性。

表2 寡聚物对感染细胞群落形成和细胞融合的影响

Table 2 Influence of colonies and syncytia formation of virus-infected cells by oligomers

组别	培养60h后 细胞数(孔)	加入xc细 胞数(孔)	融合细胞 数(孔)
SRSV/3T3	6.1×10^5	1×10^5	11
SRSV/3T3+dC ₁₄ (8.5 μ mol/L)	3.2×10^5	1×10^5	0
3T3	6.7×10^4	5×10^4	0
3T3+dC ₁₄ (8.5 μ mol/L)	8.7×10^4	5×10^4	0

表3 培养上清液病毒相关 RT 对 dC₁₄ 的敏感性

Table 3 Sensitivity of culture supernatant virion-associated RT to dC₁₄

组别	RT*
SRSV/3T3	1408
SRSV/3T3+dC ₁₄ (12.5nmol/ml)	521 抑制% = 63**
3T3	38
3T3+dC ₁₄ (12.5nmol/ml)	28

* 培养上清液中的 SRSV RT 活性以 cpm/ml 培养上清液表示

** 抑制% 以与不加药物时比较而得

(四) 寡聚物对 SRSV 复制的抑制作用

RT 在逆转录病毒复制中起重要作用,它使病毒 RNA 基因组转变成双链 DNA 并整合入宿主 DNA。表 3 是 dC₁₄ 对培养上清液中病毒相关 RT 活性影响的测定结果。可见,不加 dC₁₄ 的感染细胞上清液具有显著的 RT 活性 (1408cpm/ml),加 dC₁₄ (12.5 nmol/ml) 后,放射活性被抑制约 63%,而非感染 3T3 细胞,加或不加 dC₁₄ 均无明显的上清液 RT 活性,实验结果表明 dC₁₄ 能选择性地抑制病毒 RT 活性。

(五) 寡聚物对小鼠的毒性

小鼠急性毒性试验中,实验组分别腹腔注射 dC₁₄ 2.5, 10 或 30mg/kg 体重。在观察期间(16天)内,动物活动自如,毛发光滑,胃纳好,处死后脏器无损害征象。因此,在高达 30mg/kg 体重的剂量下,寡聚物对动物仍无毒性。

讨 论

核苷类似物用于肿瘤化疗,移植宿主的免疫学和病毒抑制已有多年,但由于核苷类似物转变成核苷酸掺入到细胞 DNA, RNA 和核苷酸辅酶中而引起毒性。反义寡核苷酸是与靶 RNA(即病毒 RNA)有一段互补顺序,可通过碱基配对的方式形成杂交链,因而抑制了病毒 RNA 的表达。本文所合成的反义化合物,包括修饰的和非修饰的,同聚的和异

聚的脱氧寡核苷酸对 SRSV 的复制都有不同程度的抑制作用。

脱氧寡核苷酸与靶分子的杂交能力取决于结合部位, 外源性和内源性核酸酶的降解。本研究选择 M-MuLV 基因组保守区, 即 5' 端引物区和 3' 端一段序列⁽⁸⁾ 合成寡聚物, 有的寡聚物还经修饰处理, 保证了作用的专一性和对核酸酶的稳定性。但是从表 1 可见寡聚物对 SRSV 感染细胞增殖的抑制率有波动现象 (如 dC_{14} 和 dC_6), 其原因可能和以药物对细胞增殖的抑制来动态研究药物对病毒感染的控制受到某些因素的影响有关, 因为抑制率除由药物对病毒生长本身的抑制作用引起外, 还受到药物对细胞的毒性作用, 细胞增殖周期和细胞计数误差等因素的影响。

表 1 中还见到同聚物和异聚物一样具有抗病毒能力, 而且作用的选择性和对细胞的毒性也并不比异聚物差, 有时甚至更好。我们的结果与 Matsukura M 等的结果相似。他报道与 HIV 序列互补的磷硫类似物以及包括同聚物在内的非互补类似物都显示强抗病毒活性, 同聚胞嘧啶核苷酸片段 ($S-dC_{14}$) 对 HIV 的细胞病理作用有更强的抑制作用。他还进一步做了 dC_{14} 与双脱氧腺苷 (ddA, 一个抗 HIV 核苷) 联合应用实验, 发现 $S-dC_{14}$ 对 ddA 的抗病毒作用有协同增强效应, 但他又认为 ddA 的作用机制是竞争性抑制逆转录酶和/或终止新 DNA 链的形成, 而同聚物的作用是通过与此不同的机制⁽⁹⁾。因此, 同聚物的作用机制问题并未解决, 推测它与序列特异结合的寡聚物不同, 可能是通过非连续的特异性结合而发挥抗病毒作用, 因为在 M-MuLV RNA 基因序列中有连续 5、6 个鸟嘌呤核苷酸区域, C 和 G 就可配对, 而 C-G 键是比较牢固的。

鉴于细胞内病毒和非整合线性 DNA 的存在, 要抑制病毒生长还必须连续给予足够量的脱氧寡核苷酸, 使其有充分机会与病毒 RNA 竞争性结合。在表 3 所示结果中, RT 活性未完全被抑制, 可能是由于只用一次剂量或用量不足所致。

本文虽然是研究反义化合物对 SRSV 的抑制作用, 但是寻找抑制逆转录病毒生长的条件和方法, 无论在理论上还是临床上都是重要的。

参 考 文 献

- (1) Zamecnik, P.C. et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 280—284.
- (2) Agre, C.H. et al., 1986, *Biochemistry* 25: 6268—6275.
- (3) Smith, C.C. et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 2787—2791.
- (4) Zerial, A. et al., 1987, *Nucleic Acids Res.* 15: 9909—9919.
- (5) 周金涛等, 1984, 上海第一医学院学报 11(5): 373—376.
- (6) 程立等, 1986, 病毒学杂志 1(3): 85—88.
- (7) 程立等, 1986, 上海医科大学学报 13(2): 91—95.
- (8) Sinnick, T.M. et al., 1981, *Nature* 293: 543—548.
- (9) Matsukura, M. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7706—7710.

Anti-SRSV Activity of Antisense Oligodeoxynucleotides

Shan Yi-fei Ji Hong Qiu Mu-sui* Wang De-bao*

(*Department of Biophysics, Shanghai Medical University, Shanghai 200032*

**Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*)

Synthesized antisense oligodeoxynucleotides, including modified and unmodified, homo- and hetero-forms, were tested for their ability to inhibit mouse SRSV virus-induced cellular multiplication, the formations of colonies of SRSV-infected cells and XC syncytia and RT activity. All oligomers were found to be active. Preliminary studies of acute toxicity in mice showed that his compound to be nontoxic at high levels. It is suggested that different classes of oligonucleotides may inhibit virus replication by different mechanisms.

Key Words: Antisense oligonucleotides Competitive hybridization
Antivirals