

反义寡聚脱氧核苷酸(ODN)衍生物 抑制乙型肝炎病毒抗原表达的研究

袁正宏 何丽芳 赵苏伶

(上海医科大学医学分子病毒学实验室,上海 200032)

吴祥甫

(中国科学院上海生物化学研究所,上海 200031)

陈常庆

(中国科学院上海生物工程研究中心,上海 200233)

R373.21

A

摘要 为比较针对中不同基因的 ODN 硫代衍生物阻断乙型肝炎病毒(HBV)的抗原表达,合成了与核心蛋白编码基因起始码上游序列(#1893-1907),多聚酶蛋白编码基因起始码上游及内部序列(#2297-2313, #2797-2813)3.5kb RNA 3'端起始负链 DNA 合成序列(#1817-1831)互补的寡聚脱氧核苷酸硫代衍生物[C-ODN, P-ODN, PM-ODN, PBS-ODN],分别在 HBV 短暂表达和稳定表达细胞培养系统中观察其抑制 HBV 抗原表达的作用。结果发现,当培养液中 ODN 浓度为 20 μ mol/L 时,四种 ODN 均能抑制 HepG₂ 2.2.15 细胞 HBeAg(乙肝表面抗原)的产生(抑制率分别为:C-ODN, 24.5%; P-ODN, 13.4%; PM-ODN, 38.4%; PBS-ODN, 28.4%);与 HBV DNA 双体质粒共转染 HepG₂ 细胞后部分 ODN 可明显抑制 HBV DNA 在细胞内表达(HBeAg 分泌抑制率分别为:C-ODN, 52%; PM-ODN, 70%; P-ODN, 48%; PBS-ODN, 18%)。用测定上清中人白蛋白的结果证明,C-ODN 的细胞毒作用最低。对 C-ODN 的作用机理及进一步发展 ODN 的应用也进行了讨论。

关键词 乙型肝炎病毒,反义寡聚脱氧核苷酸硫代衍生物,基因表达抑制

乙型肝炎病毒(HBV)感染是危害人民健康的重大问题,迄今缺乏有效治疗制剂^[1]。近年兴起的反义核酸技术已在阻断病毒感染方面取得可喜进展,可望发展成为潜在的基因治疗制剂^[2,3]。应用寡聚脱氧核苷酸[ODN]抑制 HBV 复制或抗原表达的研究报道不多。美国 Goodarzi 等^[4]合成了六段针对 HBV S 基因不同位点的 ODN,在有 HBV DNA 整合、表达和分泌 HBsAg 的 PLC/PRF/5 细胞中,证实互补于翻译起始位点序列的 ODN 抑制作用最强。吴祥甫等^[5]曾应用与 HBV PreS2 基因起始密码 5'端互补的 15 聚脱氧核苷酸-多聚赖氨酸,在有 HBV 复制的 Hep G₂ 2.2.15 细胞、HepG₂ T₁₁ 等细胞中发现,可使 HBsAg 及/或 HBeAg 表达显著减低。然而以上合

本文于 1994 年 1 月 18 日收到,7 月 16 日修回

“八六三”计划生物技术课题[102-14-(1)]

参加本工作的还有上海医科大学闻玉梅教授、上海生物工程中心陈波、徐金旺等。

成的 ODN 片段均针对 HBV 的 S 基因。

本研究根据目前对 HBV 分子生物学的认识,设计、合成了多个与在 HBV 复制周期中起关键作用的病毒基因序列互补的寡聚脱氧核苷酸硫代衍生物。通过观察其在 HBV 短暂和稳定表达细胞培养系统中抑制 HBV 抗原表达水平,评价其抗 HBV 基因复制及抗原表达的作用。结果显示,与核心蛋白编码基因起始密码上游序列互补的 ODN 的抗 HBV 的作用有一定意义。

材料和方法

1 细胞培养^[4]

肝癌细胞系 HepG₂ 细胞和 HepG₂ 2. 2. 15 细胞分别由联邦德国海德堡癌症研究中心、美国西奈山医学院生化科 Acs 博士提供。前一细胞有完整 HBV 基因组整合,能持续转录、翻译 HBV 基因,产生 HBsAg、HBeAg 及 Dane 颗粒。两细胞常规培养于含 15% 小牛血清的 DMEM 培养基(含青、链、卡那霉素各 100u/ml 及 0. 03% 谷氨酰胺)中,每 3—5 天传代 1 次。

2 反义寡聚脱氧核苷酸硫代衍生物的合成及纯化

由中国科学院生物工程中心负责。合成反应采用亚磷酸酰胺-TETD 法[即先按亚磷酸酰胺法合成亚磷酸三酯键,再用 TETD(Tetraethylthiuram disulfide)硫化]。反应结束后经聚丙烯酰胺凝胶电泳、Sephadex G-50 柱层析分离纯化。

3 HBV DNA 双体质粒的制备

HBV DNA 来自质粒 pTHBV-1,由汤华博士转赠。该质粒为首尾相连的双拷贝 ayw 型 HBV DNA 与 pBR322(EcoR I 位点)重组而成,具有 Amp^r 及 Tet^r 特征,可在 HepG₂ 细胞内完成病毒复制,产生 HBsAg 和 HBeAg。参照本室常规^[5]提纯质粒 DNA。

4 磷酸钙介导的转染技术

采用文献报道的磷酸钙沉淀法^[7]将 HBV DNA 和/或 ODN 转染 HepG₂ 细胞。HepG₂ 细胞在转染前 24 小时接种于 55mm 塑料皿,浓度为 10⁶/皿。转染 4 小时前换液。每皿内加入由:10μg pTHBV DNA,1×10⁶HeRS500μl, 2mol/L CaCl₂ 31μl 和/或 10μg ODN 组成的磷酸钙/DNA 混合物。为减少转染效率差异的影响,每实验组设置两皿。37℃、5% CO₂ 16—18 小时后洗去钙颗粒,换用新鲜培养液。

5 HBsAg 和 HBeAg 的测定

分别采用 ELISA(上海市传染病总院)、RIA(北京生物制品所)药盒测定 HBsAg、HBeAg,操作按说明书进行。

6 培养上清白蛋白的测定

采用本室自制的双抗体夹心 ELISA 法检测培养上清液中的白蛋白水平^[6]。

结 果

1 反义 ODN 硫代衍生物作用位点的选择

乙型肝炎病毒的复制周期较为特殊,主要表现在其基因组复制在核衣壳内经逆转录过程完成,需三种病毒成份(前基因组 RNA、核心蛋白、多聚酶蛋白)特异和有次序地相互作用^[9]。因此如能设法减少多聚酶蛋白、核心蛋白的合成,或干扰前基因组 RNA 的包装和正、负链 DNA 合成的起始,均有可能达到减弱甚至阻断 HBV 复制的目的。据此合成了一系列针对上述环节的反义 ODN 硫代衍生物(表 1)。为排除合成物非专一性干扰 HBsAg 和 HBeAg 产生的可能性,同时合成一段与 HBV 基因无相关序列的 ODN(表 1)。

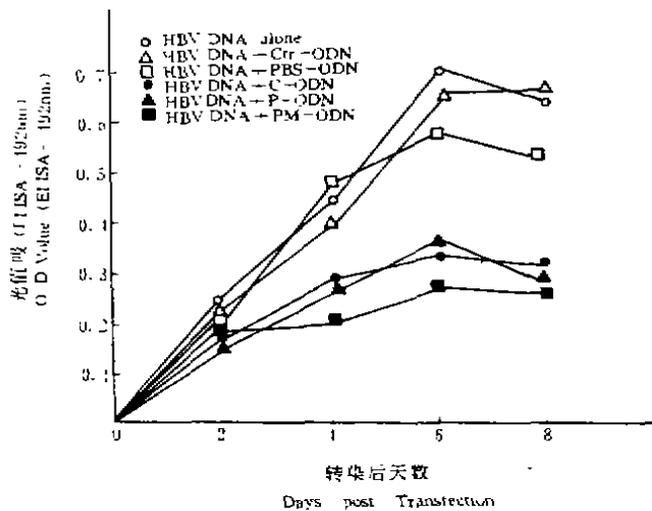
表1 合成ODN互补位点及序列

Table 1 Target sites and sequences of synthetic ODNs

寡聚脱氧核苷酸	序列(5'-3')	序数 ^a	对应功能
ODN	Sequence(5'-3')	Numbering ^a	Homologous function
C-ODN	CCATGCCCCAAAGCC	1893-1907	C gene initiator
P-ODN	GGCATTGGGTGGTCT	2297-2313	P gene initiator
PM-ODN	CTATGTGTTGTTTCTCT	2796-2813	Inside P gene
PBS-ODN	GTGAAAAAGTTGCA	1817-1831	Primer binding site
Ctrl-ODN	ATCACGAGGGGCTGT	NA #	Noncomplementary

2 反义ODN硫代衍生物对克隆HBV DNA在HepG₂细胞中短暂表达抗原的影响

定期收集 pTHBV DNA 和/或 ODN 共转染 HepG₂ 细胞的培养上清液, -30℃ 保存, 一并检测。每数据均为平行双皿测定值的平均值。结果发现(图1), 与对照组(HBV DNA 双体质粒单独或与无关序列 ODN 共转染 HepG₂ 细胞)相比, C-ODN、P-ODN、PM-ODN 对 HBV 的 e 抗原表达在转染后第 4-6 天有较强抑制作用, HBeAg 分泌抑制率分别为 52%, 48%, 70%; 而 PBS-ODN 对 HBV 抗原表达无明显抑制作用, 上清 HBeAg 分泌抑制率仅为 18% (转染细胞培养上清 HBeAg 的 ELISA 测定值较低故未列出)。

图1 HBV DNA, ODN 共转染 HepG₂ 细胞后上清中 HBeAg 的表达动态Fig. 1 Kinetics of the Expression of HBeAg in the culture media after transfection of HepG₂ cells with HBV DNA alone or with various antisense ODNs

3 反义ODN硫代衍生物对HepG₂ 2.2.15细胞分泌HBsAg和HBeAg的影响

HepG₂ 2.2.15 细胞按 1×10^5 细胞/ml 接种于 35mm 直径平皿, 每平皿 2ml。细胞贴壁(4-6h)后换液并加入 ODN, 使其在培养液中浓度为 20μmol/L, 隔天换用含 20μmol/L ODN 的培养液。收集的培养上清保存于 -30℃ 后一并检测 HBsAg 和 HBeAg。对照组除不加 ODN 而加等体

积三蒸水(10 μ l)外,均同实验组处理。结果显示(图2),四种反义ODN硫代衍生物对HepG₂ 2.2.15细胞HBsAg的产生均有不同程度的抑制作用,抑制率分别为:C-ODN,24.5%;P-ODN,13.4%;PM-ODN,38.4%;PBS-ODN,28.4%。然而所有ODN对HepG₂ 2.2.15细胞HBeAg的产生无明显抑制作用[各组细胞上清HBeAg的测定值(O.D.)分别为:对照组,0.714 \pm 0.051;C-ODN,0.729 \pm 0.034;P-ODN,0.696 \pm 0.097;PM-ODN,0.673 \pm 0.049;PBS-ODN,0.734 \pm 0.086]($P>0.05$)。

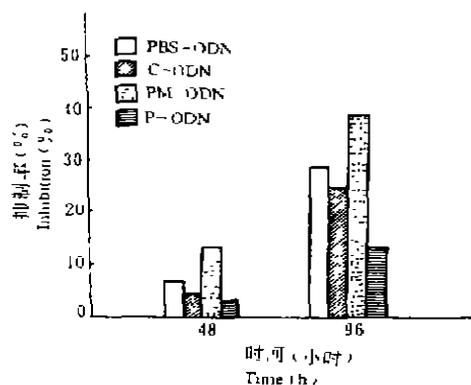


图2 四种寡聚物对HepG₂ 2.2.15细胞表达HBsAg的抑制作用。ODN分别在0和48h时加入,浓度为20 μ mol/L,ODN对HBsAg表达的抑制率为:[1-(ODN处理细胞培养上清测定值/对照细胞培养上清测定值)] \times 100

Fig. 2 Inhibition of HBsAg expression of HepG₂ 2.2.15 cells by four antisense ODNs. ODNs were added to the culture medium at 20 μ mol/L in duplicate at time 0 and 48h. The inhibition rate was calculated as follows: [1-(cpm of ODN-treated cell supernatants/cpm of untreated cell supernatants)] \times 100

4 反义ODN硫代衍生物处理的HepG₂ 2.2.15细胞分泌白蛋白水平

HepG₂ 2.2.15细胞按1 \times 10⁵/ml接种于24孔培养板,每孔1ml。贴壁(4-6小时)后换用含20 μ mol/L ODN的培养液,隔天换用相同培养液。加药后第四天取培养上清经适当稀释后使用双抗体夹心ELISA法测定白蛋白水平,结果见表2。从表中可以看出,PM-ODN对细胞代谢抑制率达22.69%;C-ODN则仅为7.69%,对白蛋白分泌的影响最小。

表2 ODN处理HepG₂ 2.2.15细胞培养上清白蛋白水平

Table 2 Albumins in culture media of ODN-treated HepG₂ 2.2.15 cells

寡聚脱氧核苷酸 ODN	抑制率(%) [*] Inhibition(%) [*]
PBS-ODN	13
C-ODN	7.69
PM-ODN	22.69
P-ODN	8.99

* ODN对细胞分泌白蛋白的抑制率为:[1-(ODN处理细胞上清测定值/对照细胞上清测定值)] \times 100。

The inhibition rates were calculated as follows: [1-(O. D. value of ODN treated cell culture media/O. D. value of untreated cell culture media)] \times 100

讨 论

HBV 的复制是一复杂而有序的过程。在同一实验条件下比较反义 ODN 的抑制作用将有利于选择更有效的 ODN 作用为今后用于治疗的首选制剂。本研究设计、合成的四段 ODN 互补于核心蛋白编码基因起始区(C-ODN)、多聚酶蛋白编码基因起始密码上游及下游序列(P-ODN, PM-ODN)、前基因组 RNA 3'端起始负链 DNA 合成的位点(PBS-ODN)等。通过短暂和稳定表达 HBV 细胞培养系统及结合用白蛋白测定作为对细胞毒性测定的实验结果说明,以 C-ODN 最为有效。通常认为 ODN 通过杂交扣留和激活 RNase H 发挥作用^[10,11]。本研究应用的反义 ODN 除通过上述机制发挥效应外还可能作用于 HBV 复制周期的其它环节。C-ODN 的设计作用位点为核心蛋白编码基因起始码上游序列,该序列又位于 HBV 前基因组 RNA 上的包装信号内^[12]。童舒平等曾发现,此区发生的某些点突变可导致前基因组 RNA 不被包装、DNA 复制缺陷。故 C-ODN 抑制作用的发挥可能通过抑制 HBcAg 合成、减少核衣壳装配、干扰前基因组 RNA 的选择性包装等几个环节。

实验还显示,ODN 在 HBV 稳定表达系统(HepG₂ 2. 2. 15)中的抑制作用远低于在短暂表达系统中的作用,这可能与两系统中 HBV 基因存在的状态不同有关。在 HepG₂ 2. 2. 15 细胞中,从整合 HBV DNA 持续转录产生的 mRNA 可将细胞内 ODN“稀释”使之不足以发挥有效作用。而在 HBV 短暂表达系统,HBV DNA 和 ODN 同时进入 HepG₂ 细胞,在 HBV DNA 进入肝细胞内启动其复制过程的同时,ODN 就可与相应互补序列特异性结合,发挥生物学效应。因此选用短暂表达系统更为恰当。至于 ODN 的毒性,一般采用台盼蓝染色计数存活细胞、细胞总蛋白测定、同位素掺入等方法^[14-16]。根据 HepG₂ 细胞、HepG₂ 2. 2. 15 细胞来源于肝细胞,能合成和分泌白蛋白、甲胎蛋白等特性,本室建立了检测细胞培养上清中白蛋白含量的双抗体夹心 ELISA 法^[6],以此作为评价 ODN 影响细胞代谢的指标,可更全面地反映 ODN 对细胞代谢的影响及毒性作用。

理论上推测,本研究合成的 ODN 均作用于 HBV 复制周期的某一环节,应均可影响 HBV 基因的复制和表达。本实验不同 ODN 显示不同程度抗 HBV 作用的结果提示,反义 ODN 能否有效地发挥其生物学效应,除与靶序列的互补作用外,还应考虑:靶序列二级或三级结构的特征、靶序列对 ODN 的可亲近性(accessibility)、反义 ODN 与靶序列结合后双链 DNA 的解离度及反义 ODN 在细胞内的分布等^[17]。实验也显示,反义 ODN 对 HBV 基因的表达只显示部分抑制效应。这可能是由于在反义 ODN 加入之时已有 mRNA 开始表达(如在 HepG₂ 2. 2. 15 细胞系统),故即使加入大剂量的 ODN 也难以完全阻断蛋白合成。此外还存在肝细胞膜对 ODN 的通透性差及 HBV 基因结构的复杂性等因素。

在初步比较了各段反义 ODN 抗 HBV 作用的基础上,还应研究配伍使用针对 HBV 基因不同位点的反义 ODN 或配合使用其它抗病毒药物的效应。如何使 ODN 有效、完整进入细胞也是一个重要问题。Wu^[18]等制备了偶联有半乳糖残基的反义 ODN,导向进入肝细胞,可明显提高反义 ODN 的抗病毒作用,因此采用肝细胞靶向剂与 ODN 直接交联或脂质体包裹 ODN 是值得探索的新途径。

参 考 文 献

- 1 Hoofnagle J H. Chronic Hepatitis B. *N Eng J Med*, 1990,323:337—339
- 2 Cohen J S. Antisense oligodeoxynucleotides as antiviral agents. *Antiviral Res*, 1991,16:121—133
- 3 Agrawal S. Antisense oligonucleotides as antiviral agents. *TIBTECH*,1992,10:152—158
- 4 Goodarzi G, Steven C G, Arun T, *et al*. Antisense oligodeoxyribonucleotides inhibit the expression of the gene for hepatitis B virus surface antigen. *J Gen Virol*,1990,71:3021—3025
- 5 吴祥甫,何丽芳,陈长庆,等. 互补寡聚核苷酸-多聚赖氨酸对乙肝病毒表面抗原表达的抑制. *生物化学与生物物理学报*,1992,24(3):219—224
- 6 闻玉梅,何丽芳,汪琪,等. 克隆乙型肝炎病毒 DNA 在 HepG₂ 细胞中的表达. *中华医学杂志*,1980,69(5):260—263
- 7 Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, 1987;7(8):2745—2752
- 8 张庆五,袁正宏,胡新美. 乙型肝炎病毒细胞培养模型中人白蛋白的研究. *上海医学*, 1993,16(12):689—692
- 9 袁正宏,闻玉梅. 嗜肝 DNA 病毒核衣壳装配的研究进展. *国外医学分子生物学分册*, 1992,14:226—229
- 10 Dolnick B J. Antisense agents in pharmacology. *Biochem Pharm*, 1990;40(4):671—675
- 11 Tidd D M. Synthetic oligonucleotides as therapeutic agents. *Br J Cancer*, 1931, 63:6—8
- 12 Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H, *et al*. A short cisacting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J*, 1990;9:3389—3396
- 13 Tong S P, Li J S, Trepo C, *et al*. Replication capacities of natural and artificial precore stop codon mutants of hepatitis B virus; relevance of pregenome encapsidation signal. *Virology*, 1992, 191:237—245
- 14 Hayashi Y, Katsuro K, *et al*. Interferon inhibit hepatitis B virus replication in a stable expression system of transfected viral DNA. *J Virol*, 1989, 63(7):2936—2940
- 15 Matthes E, Langen P, vor Janta-Lipinski M, *et al*. Potent inhibition of HBV production in vitro by modified pyrimidine nucleosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990,34(10):1986—1990
- 16 Doong S L, Tsai C H, Schinazi R F, *et al*. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 2, 3-dideoxy-3-thiacytidine and related analogues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991,88:8495—8499
- 17 Leonetti J P, Mechtli N, Degols G, *et al*. Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991,88:2702—2706
- 18 Wu G Y, Wu C H, *et al*. Specific inhibition of hepatitis B viral gene expression in vitro by targeted antisense oligonucleotides. *J Biol Chem*, 1992; 267(18):12436—12439
- 19 Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, *et al*. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature*, 1979,281:646—650

Comparison of the Inhibiting Effects of Four Antisense Oligodeoxynucleotide Phosphorothioates on Hepatitis B Virus Gene Expression

Yuan Zhenghong He Lifang Zhao Suling

(*Department of Molecular Virology, Shanghai Medical University, Shanghai 200032*)

Wu Xiangfu

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

Chen Changqing

(*Shanghai Center of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai 200233*)

In this study we evaluated the effects of four antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioates (ODN) against antigen expression of HBV gene. Four ODNs were synthesized with an average length of fifteen bases directed against the region upstream of the core gene initiation codon (# 1893—1907), against the region upstream and downstream of the polymerase coding gene initiation codon (# 2297—2313, # 2797—2813), against the 3' region of 3.5 kb RNA for initiation of reverse transcription (# 1817—1831). An ODN with random sequences was also synthesized as control. ODNs were tested against HBV in both HBV transient and stable expressing systems. When being added to HepG₂ 2.2.15 cells at 20 μmol/L every other day, compared to control, all four ODNs showed variable extent of inhibition on the expression of HBsAg. The inhibiting rates at day 4 were: C-ODN, 24.5%; P-ODN, 13%; PM-ODN, 38.4%; PBS-ODN, 28.4%. However all ODNs had no effect on the expression of HBeAg in this cell line. After being cotransfected into the HepG₂ cells with HBV DNA dimer, some ODNs showed marked inhibition on the expression of HBV gene (the inhibiting rates were: C-ODN, 52%; P-ODN, 48%; PM-ODN, 70%; PBS-ODN, 18%, respectively). When the amount of albumin in ODN-treated cells was assayed by ELISA, C-ODN showed the least cytotoxic effect. The possible mechanisms of inhibitory effect of C-ODN and future development of using ODNs were discussed.

Key words Hepatitis B virus, Antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate, Inhibition of gene expression