

利用适配子抗病毒性肝炎的新型治疗策略

胡康洪 冯辉

适配子(apptamer)指能与靶分子以高亲和力结合的配基,是通过指数富集配体系统进化(SELEX)技术,从人工合成的大容量单链随机寡核苷酸文库中通过反复“与靶分子作用-筛选-富集”过程而获得^[1,2]。近年来,已有大量的核酸适配子被筛选并鉴定。1996年,基于酵母双杂交系统的肽适配子筛选方法被建立^[3]。传统的核酸适配子和衍生出的肽适配子均具有特异性地阻断其靶分子而发挥其功能的作用。因此,适配子技术已成为有效地研究生物学途径的新型方法。

众所周知,传统药物常会引起患者的不良反应,同时也导致了具有药物抗性突变型病原体的产生。比如乙型肝炎患者接受长时间拉米夫定治疗后,很多患者会产生对拉米夫定耐药的病毒突变株。所产生的YMDD突变体(tyrosine-methionine-aspartate-aspartate)因其与野生型病毒株在逆转录酶方面的差异最终导致拉米夫定治疗策略失效,这也表明了发展能够克服上述药物抗性缺点的新型治疗策略的必要性和紧迫性。因此,能够克服上述缺点的适配子技术被看作是病毒性肝炎治疗中传统药物的优良替代品。

与传统抗体相比较,适配子具备很多优点,例如稳定性高、攻击靶分子的效率高以及胞内运输效率高,加之其具备的高亲和力和高特异性特点,使得适配子在诊断学和治疗学应用中表现突出。适配子的另一显著优点是研究者不需要预先了解其靶蛋白分子的详细特征,这一点尤其适用于筛选未知的蛋白质。因此,适配子被广泛筛选以发展能用于抗乙型肝炎病毒(hepatitis B Virus, HBV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C Virus, HCV)和其他病原体的抗病毒药物^[4-12],并逐渐在新型药物的开发中受到研究人员的青睐。第一个商品化的适配子药物-Pegaptanib以抗血管内皮生长因子(anti-vascular endothelial growth factor, anti, VEGF)为靶分子,已被广泛应用于眼底血管疾病的临床治疗^[13]。

一、抗乙型肝炎病毒适配子的筛选

乙型肝炎病毒是嗜肝DNA病毒科(hepadnaviridae)的成员之一,感染宿主后引发宿主产生乙型肝炎^[14]。HBV的感染呈世界性流行趋势,是全球性公共卫生问题。据报道全球约20亿人曾感染过HBV,其中3.5亿人为慢性HBV携带者(WHO Fact sheet no. 204);据估计每年约有100万人死于HBV感染相关性疾病,可见慢性HBV感染对人类的危害性极大,已逐渐成为最危险的人类病毒性病原

资助项目:国家自然科学基金(No. 30870131)

作者单位:430071 武汉市,中国科学院武汉病毒研究所病毒学国家重点实验室(胡康洪、冯辉);德国雷根斯堡大学分子和细胞解剖学研究所(胡康洪)

通讯作者:胡康洪,Email:hukgh@wh.iov.cn

体之一。

HBV 基因组作为所有已知病毒或者动物病毒中最小的基因组之一,其基因组仅为 3.2 kb,且其中有一段是不完全配对的单链区^[15,16]。HBV 基因组复制是通过对其复制中间体—前基因组 RNA (pregenomic RNA, pgRNA) 的逆转录来实现的,即 HBV 感染宿主细胞后,其松弛型环状 DNA (RC DNA) 基因组首先在宿主细胞核内转化为共价闭合环状 DNA (ccc DNA),ccc DNA 继而在宿主 RNA 聚合酶的作用下转录产生 pgRNA,pgRNA 进入到细胞质中翻译出衣壳亚单位和病毒反转录酶(P 蛋白),后者立即结合到 pgRNA 5'-端的 ε 茎环结构上,启动衣壳亚单位的装配和反转录的起始(图 1)。

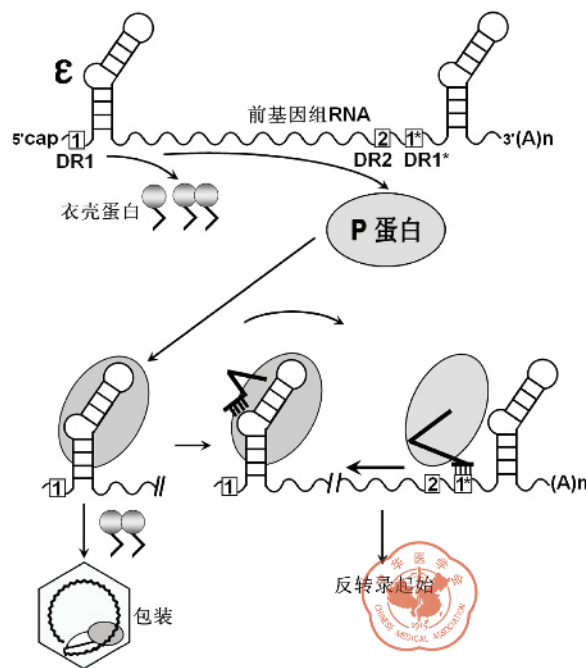


图 1 HBV 复制起始图

近年来,对 HBV 复制机理的研究取得了较大进展,但由于体外研究系统和 P 蛋白结构信息的缺乏,对 HBV 复制起始机理的研究发展相对滞后。直到 20 世纪 90 年代初,Wang 等人利用兔网织红细胞裂解液 (rabbit reticulocyte lysate, RL) 和鸭乙型肝炎病毒 (DHBV) 逆转录酶体外重建 DHBV 复制起始系统的成功建立,才使对 HBV 复制起始机理的研究获得突破性进展^[17]。尽管 DHBV 与 HBV 不完全相同,但其基因组复制的基本特征是高度保守的。因此,DHBV 为研究 HBV 的复制起始机理提供了一个良好的模型^[1,18,19]。

研究发现, ε 是一个由下茎、上茎、顶端环和侧向突出结构组成的 RNA 茎环结构。在反转录合成 HBV 负链 DNA 之前,HBV P 蛋白首先需要以 ε 分子内的侧向突出 (bulge) 结构为模板,合成 3~4 个寡核苷酸作为反转录合成的起始引物,该引物共价结合到 P 蛋白 TP 区内第 63 位的酪氨酸残基上,这一过程称为“蛋白质引发 (protein priming)”。引物合成后,P 蛋白及新合成引物转位到 pgRNA 3'-末端附近的 DR1 区,以 pgRNA 为模板,合成互补的 HBV 负链 DNA^[5,20]。

由于衣壳亚单位的装配启动和反转录的起始均是以细胞因子协助下的 P- ϵ 复合物的形成介导的,因此该结构对于启动衣壳亚单位的装配和反转录的起始至关重要。因此,我们利用 DHBV 系统构建了一个高通量的鸭乙型肝炎病毒 ϵ (D ϵ) 突变体 RNA 文库,并应用 SELEX 技术对其筛选以期获得能与 P 蛋白强结合的突变型 D ϵ 适配子^[6]。首先,我们在 D ϵ 上茎中引入 8 个随机核苷酸序列(引入突变的位置分别为 2583 ~ 2586 bp 和 2594 ~ 2597 bp),建立了容量约为 4^8 (65 000) 的 D ϵ 文库,然后将该文库与体外翻译的带组氨酸标签的 DHBV P 蛋白混匀,并用 Ni^{2+} 亲和层析的方法分离与融合 P 蛋白形成复合物的 RNA。最后,与 P 蛋白结合的 RNAs 经过洗脱、RT-PCR 扩增后便形成了下一轮用来筛选和体外扩增的文库(图 2)。

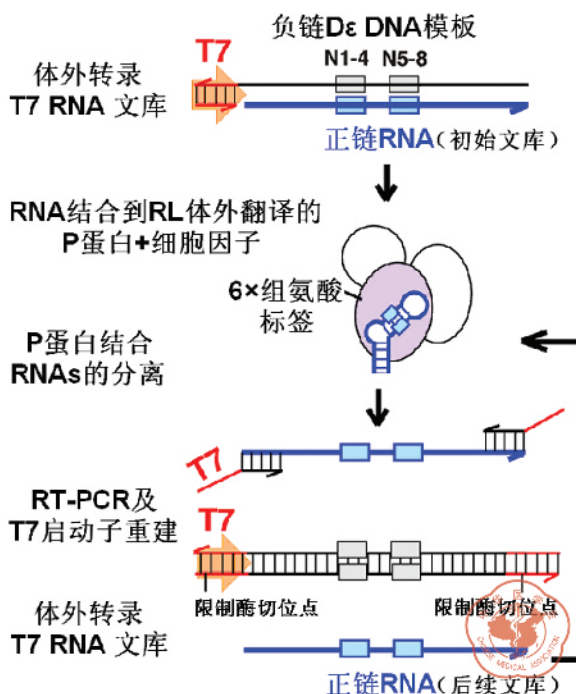


图 2 体外筛选 D ϵ 强结合适配子步骤

对上述实验条件进行优化后,经过连续 9 轮的 SELEX 筛选,筛选产物通过克隆和测序,我们得到了一批目的适配子;然后分别测定了这些适配子与 P 蛋白的体外结合活性和体外引发活性。其中,有两个适配子—S1 和 S2,尽管它们与 P 蛋白的体外结合活性分别是野生型 D ϵ 的 40 倍和 25 倍,但只有 S1 支持 P 蛋白的体外引发过程。此外,我们还利用筛选所得的适配子鉴定了对 P 蛋白结合和引发至关重要的 4 个关键核苷酸—G2586、C2594、U2590 和 U2604。为了研究 S1 和 S2 对病毒复制循环的影响效果,我们又将它们分别转染到包含有 pCD16 质粒的鸡肝癌细胞系 LMH 细胞中,该质粒编码在 CMV 启动子控制下的完整 DHBV 基因组。所得实验结果与上述体外实验结果一致 S2 不支持 DNA 的合成,但 S1 和野生型 D ϵ 相比较却并未在衣壳的形成和 DNA 合成的质量方面表现出明显差异,

推测可能由于细胞内环境中的其他因子中和了 S1 的强结合作用。综合 S2 在体外结合活性和体外启动活性两方面的特点,推测其很有可能成为今后进行 HBV 抗病毒治疗的药物。目前,与之相关的动物模型实验正在进一步开展之中。

除了我们开展的核酸适配子的筛选外, Tomai 等最近针对 DHBV 的核心蛋白(Core protein)开展了肽适配子的筛选^[21]。他们获得了一个目的适配子: PA34, PA34 能通过抑制病毒衣壳的形成进而表现出对 DHBV 复制的强阻断作用。

二、抗丙型肝炎病毒适配子的筛选

丙型肝炎病毒是属于黄病毒科(Flaviviridae)的正链 RNA 病毒,感染宿主后引起宿主产生非甲非乙型肝炎^[22]。据统计,全球约有 1.7 亿人被 HCV 感染^[23],被感染者往往会演化成慢性肝炎、肝纤维化以及肝癌等恶性疾病。HCV 的正义链是由中部的一个较大的单一 HCV 开放阅读框及其 5'-末端和 3'-末端的非编码区共同组成的,这个开放阅读框编码一个由 3010 个氨基酸组成的多聚蛋白,该蛋白能被进一步加工成 10 多个成熟的蛋白质,并且这些蛋白质被公认为对 HCV 子代病毒的产生具有极其重要的作用。因此,它们可作为发展抗 HCV 治疗的理想靶点。如病毒编码的非结构 3(nonstructural 3, NS3)蛋白、依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)、内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)及核心抗原(core antigen),均被作为靶点进行了核酸适配子和(或)肽适配子的筛选^[7,8,9,24,25,11],在此不一一赘述。

三、总结及展望

自 1990 年适配子诞生以来,越来越多的实验表明适配子不仅是诊断学、生物分析的有利工具,同时也是治疗学和药物开发的绝佳选择。然而,适配子在拥有众多优点的同时也有其自身的局限性,这些缺点也恰恰阻碍了适配子的广泛应用,比如怎样才能有效的将其运输到靶细胞内?此外,尽管对适配子的化学修饰显著提高了其在细胞内的稳定性和作用时间,但不利的细胞毒作用也往往会随之发生;还有一些文献报道适配子诱导的宿主免疫反应明显弱于抗体。显而易见,在适配子被大规模的商品化之前,仍有许多问题需要人们克服和解决。

总之,与抗体治疗策略相比,适配子有所不具备的众多优点,加之近年来新的有效筛选方法的建立与完善,使适配子在抗病毒性肝炎治疗中的应用得到迅速发展。目前,人们正在对筛选得到的 HBV 和 HCV 适配子的抗病毒效果进行相关的动物模型实验或 I ~ III 期临床试验。不久的将来,这些适配子的商品化必将为全球范围内病毒性肝炎的治疗提供新颖有效的治疗策略。

参 考 文 献

- 1 Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, 346: 818-822.
- 2 Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249: 505-510.
- 3 Colas P, Cohen B, Jessen T, et al. Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, 1996, 380: 548-550.

- 4 Bellecave P, Andreola ML, Ventura M, et al. Selection of DNA aptamers that bind the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus and inhibit viral RNA synthesis in vitro. *Oligonucleotides*, 2003, 13: 455-463.
- 5 Bellecave P, Cazenave C, Rumi J, et al. Inhibition of hepatitis C virus (HCV) RNA polymerase by DNA aptamers: mechanism of inhibition of in vitro RNA synthesis and effect on HCV-infected cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52: 2097-2110.
- 6 Hu K, Beck J, Nassal M. SELEX-derived aptamers of the duck hepatitis B virus RNA encapsidation signal distinguish critical and non-critical residues for productive initiation of reverse transcription. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 4377-4389.
- 7 Jones LA, Clancy LE, Rawlinson WD, et al. High-affinity aptamers to subtype 3a hepatitis C virus polymerase display genotypic specificity. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50: 3019-3027.
- 8 Kikuchi K, Umehara T, Fukuda K, et al. A hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES) domain III-IV-targeted aptamer inhibits translation by binding to an apical loop of domain IIIId. *Nucl Acids Res*, 2005, 33: 683-692.
- 9 Lee S, Kim YS, Jo M, et al. Chip-based detection of hepatitis C virus using RNA aptamers that specifically bind to HCV core antigen. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358: 47-52.
- 10 Pileur F, Andreola ML, Dausse E, et al. Selective inhibitory DNA aptamers of the human RNase H1. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 5776-5788.
- 11 Trahtenherts A, Gal-Tanamy M, Zemel R, et al. Inhibition of hepatitis C virus RNA replicons by peptide aptamers. *Antiviral Res*, 2008, 77: 195-205.
- 12 Umehara T, Fukuda K, Nishikawa F, et al. Rational design of dual-functional aptamers that inhibit the protease and helicase activities of HCV NS3. *J Biochem*, 2005, 137: 339-347.
- 13 Ng EW, Shima DT, Calias P, et al. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 123-132.
- 14 Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res*, 2008, 134: 235-249.
- 15 Hruska JF, Clayton DA, Rubenstein JL, et al. Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *J Virol*, 1977, 21: 666-672.
- 16 Landers TA, Greenberg HB, Robinson WS. Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J Virol*, 1977, 23: 368-376.
- 17 Wang GH, Seeger C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell*, 1992, 71: 663-670.
- 18 Fukuda K, Vishnuvardhan D, Sekiya S, et al. Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease. *Eur J Biochem*, 2000, 267: 3685-3694.
- 19 Schultz U, Grgacic E, Nassal M. Duck hepatitis B virus: an invaluable model system for HBV infection. *Adv Virus Res*, 2004, 63: 1-70.
- 20 Biroccio A, Hamm J, Incitti I, et al. Selection of RNA aptamers that are specific and high-affinity ligands of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*, 2002, 76: 3688-96.
- 21 Tomai E, Butz K, Lohrey C, et al. Peptide aptamer-mediated inhibition of target proteins by sequestration into aggresomes. *J Biol Chem*, 2006, 281: 21345-21352.
- 22 Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989, 244: 359-362.
- 23 Konno K, Nishikawa S, Hasegawa T, et al. Isolation of RNA aptamers specific for the HCV minus-IRES domain I. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 2007: 393-394.
- 24 Nulf CJ, Corey D. Intracellular inhibition of hepatitis C virus (HCV) internal ribosomal entry site (IRES)-dependent translation by peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs). *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 3792-3798.
- 25 Tallet-Lopez B, Aldaz-Carroll L, Chabas S, et al. Antisense oligonucleotides targeted to the domain IIIId of the hepatitis C virus IRES compete with 40S ribosomal subunit binding and prevent in vitro translation. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 734-742.

(收稿日期 2008-08-07)

(本文编辑 温少芳)

胡康洪, 冯辉. 利用适配子抗病毒性肝炎的新型治疗策略[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2009, 3(2): 231-235.

· 消息 ·

本刊加入“万方数据——数字化期刊群”的声明

为了实现期刊编辑、出版工作的网络化,本刊现已入网“万方数据——数字化期刊群”和“中国核心期刊(遴选)数据库”,所以,向本刊投稿并录用的稿件文章,将一律由编辑部统一纳入“万方数据——数字化期刊群”,进入因特网提供信息服务。凡有不同意者,请另投它刊或特别声明需另作处理。

“万方数据——数字化期刊群”是国家“九五”重点科技攻关项目。本刊全文内容按照统一格式制作,读者可上网查询浏览本刊内容,并征订本刊。

《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》编辑部