

文章编号:1671-8836(2010)01-0063-06

综 述

RNA 药物抗乙型肝炎病毒的研究进展

王薇薇, 胡康洪[†]

(中国科学院 武汉病毒研究所/病毒学国家重点实验室, 湖北 武汉 430071)

摘 要: 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)导致的慢性感染已经成为威胁全球健康的主要问题之一. 传统的抗乙肝药物如以拉米夫定和阿德福韦为代表的核苷类似物以及干扰素类药物在临床上都存在一定的局限性, 因此寻找新的抗乙肝药物已经成为当务之急. 本文从小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、微小 RNA (microRNA, miRNA) 和配体指数富集的系统进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 筛选的 RNA 适配子这 3 个方面来分别阐述用小分子 RNA 药物抗 HBV 的研究进展和展望.

关 键 词: 乙肝病毒; 小干扰 RNA; 微小 RNA; RNA 适配子

中图分类号: R 373.21 **文献标识码:** A

0 引 言

乙型肝炎病毒(HBV)感染已经成为严重威胁全球健康的主要问题之一,我国 HBV 乙肝表面抗原携带者占全国人口的 10%~15%. HBV 感染是引起慢性肝炎、肝硬化和肝癌的最主要原因. 目前,针对慢性乙肝的抗病毒治疗主要采用重组干扰素和以拉米夫定和阿德福韦为代表的核苷类似物. 但是迄今为止,其治疗效果却不能让人满意. 高剂量重组干扰素的持续应答率低,一般只有 30%~40%,而且伴有严重的副作用;虽然核苷类似物可以通过抑制 HBV 的 DNA 聚合酶的活性来发挥迅速、有效的抗病毒的作用,但是停药后的反弹和耐药株的出现仍然是个亟待解决的难题. 因此,研究新的抗乙肝病毒慢性感染的方法仍然是目前的重点和难点.

乙肝病毒虽然是隶属于嗜肝 DNA 病毒家族,其基因组是约 3.2 kb、不完全的环状双链 DNA (RC-DNA),HBV 感染肝细胞后,RC-DNA 进入细胞核中,修复成共价闭环状 DNA (cccDNA),以此为模板,利用宿主的 RNA 聚合酶转录成几种不同的转录产物,其中 3.5 kb 的 mRNA 是 HBV 的前基因组 RNA (pgRNA),它不仅是翻译 HBV 的 P 蛋白

和核衣壳蛋白的模板,同时也是 HBV 逆转录的模板^[1]. 因此用 RNA 药物来干扰 HBV 复制的关键靶点是一种新颖的思路. 本文就小干扰 RNA (siRNA)、微小 RNA (microRNA, miRNA) 和配体指数富集的系统进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 筛选的 RNA 适配子这 3 种主要的 RNA 药物抗 HBV 的最新研究进展,以及它们各自的优缺点作一综述.

1 siRNA 抗 HBV 复制和表达的研究

siRNA 是一种 19~21 bp 的小分子双链 RNA,通过转录后基因沉默 (post-transcription gene silencing, PTGS) 的方式来特异性的降解与之同源的 mRNA^[2]. 它在生物体调节异常基因的表达、研究特定基因的功能、抗病毒、抗肿瘤等方面都发挥着重要作用^[3]. 尤其在抗病毒方面,siRNA 可以在病毒生活周期的多个阶段干扰病毒的复制,如在病毒进入细胞后,转录前作用于病毒 RNA;逆转录后进入细胞核前作用于病毒 RNA;病毒整合后转录成 mRNA 在细胞质中被降解^[4]. 但是目前主要集中在 siRNA 对基因转录后抑制的研究上.

收稿日期: 2009-10-10 [†]通信联系人 E-mail: hukgh@wh.iov.cn

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30870131)

作者简介: 王薇薇,女,硕士,现从事 siRNA 抑制 HBV 复制研究. E-mail: wangweiwei329@163.com

1.1 siRNA 抗 HBV 的体外研究

在 Brummelkamp 等^[5]用含有 H1 启动子的 pSuper 载体体内转录形成 siRNA 的基础上,以色列学者 Shlomai 等^[6]率先在体外研究了 pSuper 载体表达的 siRNA 对 HBV 复制的抑制情况.他们用 pSuper 载体构建了分别针对 HBV 的 X 区(nt1649 ~ nt1667)和 C 区(nt2191 ~ nt2209)的含 19 个核苷酸的 dsRNA 的表达载体,然后和相应的 X 区和 C 区的表达载体或者 1.3 倍 HBV 基因组共转染进 Huh-7 细胞中,3 d 后 northern blot 和 western blot 显示 HBV 的 X 区和 C 区的转录水平和蛋白翻译水平都明显地下降,southern blot 显示所有复制形式的 DNA 都显著减少,其中 X-siRNA 组的 HBV 的 DNA 被抑制了 95%,而 C-siRNA 组的 HBV 的复制水平只被抑制了 40%.这说明靶点不同,siRNA 的干扰效果也不同.

不久,Ying 等人^[7]化学合成针对 HBV 的 C 基因(nt2149 ~ nt2168)的 siRNA 来研究它对野生株 HBV(由 HepAD38 细胞系分泌)和拉米夫定耐药株 HBV(由 HepAD79 细胞系分泌)的抑制作用.转染后 48 h 用荧光定量 PCR 检测上清中 DNA 的含量,发现在 4 mg/L 的浓度下 DNA 水平分别被抑制了 98%(HepAD38)和 89%(HepAD79),这也为临床上针对拉米夫定耐药株的治疗提供了新的指导.但是 72 h 后检测其沉默水平都开始下降,原因可能是化学合成的 siRNA 不稳定,在细胞中被快速的降解.

为了提高干扰效率和延长干扰持续的时间,Moore 等人^[8]将针对 S 区和 P 区重叠的 siRNA(nt460 ~ nt478)插入到原型泡沫病毒(PFV)和腺病毒(AAV)这两种病毒载体上,再将其转导进稳定表达 HBsAg 的 293T、HBs 细胞和能够分泌 HBV 感染颗粒的 Hep G2.2.15 细胞中,7 d 后观察对 HBV 复制和表达的影响.结果显示:在 293T、HBs 细胞的上清中,HBsAg 的分泌量分别下降了 57%和 89%,筛选出稳定的克隆子后,5 个月后检测上清中 HBsAg 的分泌量分别下降了 86%和 83%;而在 Hep G2.2.15 细胞中,转导后 7 d 检测上清中 HBsAg 的分泌量分别降低了 71%和 98%,RT-PCR 的结果也显示了 pgRNA 被抑制了 80%.他们第 1 次证明了用病毒作为载体将 siRNA 导入细胞来治疗 HBV 感染存在一定的可行性,从而为体内使用病毒导入途径来抗 HBV 干扰提供了基础.

1.2 siRNA 抗 HBV 的体内研究

一系列的体外实验证实了 RNAi 的抗 HBV 效

果,因此研究人员也希望这些结果在体内实验中也得到验证.McCaffrey 等人^[9]在 2003 年将 2 个在体外实验中分别针对 S 区和 X 区的 siRNA(nt673 ~ nt697 和 nt2368 ~ nt2392)表达载体和 1.3 倍的 HBV 基因组利用水动力学注射的方法共同注射到正常和免疫缺陷的小鼠尾静脉中,7 d 后,用免疫组化的方法检测到正常小鼠的肝组织切片中 HBcAg 的含量被抑制了 99%以上,而免疫缺陷小鼠中 HBcAg 含量也被抑制了 94%;肝细胞中 HBV 的 DNA 含量和 3.5、2.4、2.1、0.8 kb 的 mRNA 含量均被明显的抑制.该研究显示了 RNAi 在免疫缺陷的小鼠中同样有干扰作用,这说明了 RNAi 是不依赖与抗原介导的免疫反应的.

Cheng 等^[10]将被证明有很好干扰效果的针对 S 区的 siRNA(nt460 ~ nt478)表达载体用水动力学转染 HBV 的转基因小鼠中,3 d 后,western blot 和 northern blot 显示 HBV 的蛋白表达量和 mRNA 含量跟管家基因相比都有很大的降低.这说明 RNAi 在体内和体外都能发挥高效的抗病毒作用.

Li 研究组^[11]最新报道将针对 HBV 的 S 区(nt157)和 X 区(nt1694)的 siRNA 导入 AAV 载体中,然后利用尾静脉注射的方式打入 BALB/C 裸鼠来研究 AAV-siRNA 在体内的干扰效果.7 d 后,组织化学分析和测定丙氨酸转氨酶(ALT)、草酰乙酸转氨酶(AST)含量都显示该载体对小鼠的肝脏没有明显的损伤.注射后第 1、3、5、9、21 d 分别用 ELISA 检测血清中 HBV 的抗原分泌量,并用实时 PCR 检测血清中 HBV 的 DNA 含量的变化.发现在第 21 天血清中 HBsAg 和 HBeAg 的含量均下降了 90%以上;血清中 HBV 的 DNA 含量在第 5 天到 21 d 被抑制了约 100 倍.该研究表明了 AAV-siRNA 在哺乳动物体内也有干扰效果,为临床上使用 AAV 偶联的 siRNA 提供了理论依据.

1.3 siRNA 抗 HBV 治疗的优势和存在的问题

利用 siRNA 抗 HBV 治疗有以下几种优势: siRNA 只特异性地作用于 HBV 的转录物上,并不会激活非特异性的细胞反应,从而减少不必要的副作用; HBV 存在很多的相对保守区,因此针对这些保守区设计干扰靶点,可以限制 HBV 出现突变而逃避干扰的机会;即使 HBV 处于不活跃的复制期,siRNA 同样可以减少 HBV 的转录和翻译产物,因此可以和拉米夫定协同作用来治疗 HBV 慢性感染.此外,HBV 的基因组很紧凑,只有 3.2 kb,转录生成 4 个重叠的 ORFs,所以针对重叠区设计干扰靶点也是一种比较有效的干扰手段^[6].

尽管 siRNA 被证实对 HBV 有很好的干扰效果,但是真正应用到临床上还需要很长的过程.因为目前需要解决的问题是:迄今为止,没有在接近人类的动物体内(如大猩猩、猴等)进行过 siRNA 实验;如何将 siRNA 安全有效的导入到靶器官的感染细胞中,这也是基因药物普遍存在并亟需解决的问题;即使将 siRNA 导入进靶细胞中,如何让 siRNA 在靶细胞中稳定地表达并保持抗病毒作用的持久性? siRNA 进入体内后会不会激活干扰素应答反应也需要进一步证实; siRNA 的干扰作用具有高度特异性,要求与靶序列完全配对,所以长期使用 siRNA 也容易出现病毒的突变株^[12].

2 miRNA 抗 HBV 的研究

RNAi 导致基因沉默的诱因不仅有 siRNA,同样也包括 miRNA. siRNA 诱导的基因沉默要求 siRNA 与靶序列严格配对,这样的后果是病毒容易通过突变而逃避干扰. miRNA 分子是近年来研究发现的长约 22 nt 的调控 RNA,参与了细胞生长、肿瘤发生、基因调控等许多生物学过程,其丰度和显著的生物学作用已经使之成为新的研究热点之一^[13].

2.1 miRNA 的发现、生物学形成过程和作用机制

miRNA 分子是一类生物体普遍存在的、在转录后水平调节细胞基因表达、长度只有 19 ~ 25 nt 的非编码蛋白的单链小 RNA. miRNA 首先是在秀丽新小杆线虫(*C. elegans*)中发现的,它是由 *Lir4* 基因转录而成、长约 22 nt 的非编码 RNA,通过与 *Lir14* 基因的 3'-UTR 部分配对来调控比它大很多的 *Lir14* mRNA 的表达^[14,15]. 但是 *Lir4* 这样一类数量庞大的小调控 RNAs 直至 2001 年才被正式统一命名为 microRNAs 或 miRNAs^[16,17].

miRNA 的生物学形成过程是:首先由 RNA 聚合酶(Pol)转录形成有发卡结构的原始转录本(pri-miRNA),在细胞核中被一种叫做 Drosha 的 RNase 切割成 miRNA 前体(pre-miRNA),前体 miRNA 在依赖 Ran 的核转运受体家族成员 exportin5(Ran-GTP/exportin5)的帮助下进入细胞质,被胞浆中 RNase Dicer 酶加工成成熟的 miRNA^[18].

根据 miRNA 与靶 mRNA 的配对程度不同,将其作用机制分为 2 种:靶 mRNA 的切割和翻译抑制.前者是 miRNA 与靶 mRNA 几乎或完全配对,通过 RNA 诱导的沉默复合体(RISC)作用,来直接降解靶 mRNA. 大多数动物体内 miRNA 的作用机

制属于后者:miRNA 通过与靶 mRNA 的 3'-UTR 部分互补,同样通过 RNA 诱导沉默复合体的形式来抑制转录后翻译水平的基因表达,而不影响 mRNA 本身^[19].

2.2 miRNA 抗 HBV 研究进展

尽管学者们对 miRNA 的生物学作用产生了极大的兴趣,包括调节基因表达、参与细胞生长和组织分化、肿瘤发生、抗病毒感染等等.但是目前国内利用 miRNA 来抑制 HBV 的研究比较少,研究最早的是南非科学家 Ely 等人^[20]用含 Pol 启动子(CMV 启动子)的表达载体来体内转录针对 HBV 的 X 区域(nt1575 ~ nt1597)的 pri-microRNA31/5 和 pri-microRNA122/5;将该表达载体和 HBV 全基因组质粒 pCH-9/3091 共转染进 Huh-7 细胞中,检测上清中 HBsAg 的含量跟对照组相比分别降低了 98%和 90%,而且他们也研究了 microRNA 的 2 个表达载体是否像 shRNA 表达载体一样引起干扰素效应,实时荧光定量 PCR 显示 IFN- γ 的 mRNA 跟对照组相比并没有出现很大的降低.随后,他们又做了体内实验,利用水动力学尾静脉注射的方法将 miRNA 表达载体打入小鼠体内,第 3 天和第 5 天检测血清中 HBsAg 的含量降低了 95%以上,血清中病毒的滴度也下降了 95%以上,southern blot 结果也证明了前两项结果.这项研究是第 1 次将 miRNA 应用到抑制 HBV 的复制上,为寻求 RNAi 抗 HBV 治疗提供了新的视角.

我国安徽医药大学的 Gao 等人^[21]针对 HBV 的 S 区设计 3 个干扰靶点(nt89 ~ nt109; nt367 ~ nt387; nt608 ~ nt628),在成熟的 miRNA-155 的结构基础上,构建了 3 个 miRNA 表达载体,转染到 Hep G2. 2. 15 细胞中,72 h 后检测上清中 HBsAg 最大抑制率达(49.8 \pm 4.7)%,HBeAg 最大抑制率达(39.9 \pm 6.7)%;筛选出稳定克隆子后,检测上清中 HBsAg 的最大抑制量达(81.5 \pm 2.2)%,HBeAg 的最大抑制量达(58.1 \pm 5.2)%;实时荧光定量 PCR 检测 HBV 的 DNA 含量最大抑制率为(70.1 \pm 3.3)%.

罗祥基等人^[22]基于 miRNA 系统构建针对 HBsAg 的慢病毒载体,感染肝癌细胞系 Hep G2. 2. 15,感染后进行 ELISA、western blot、实时 PCR 定量分析,发现感染 4 d 后,抑制效应开始出现,一直持续到第 9 天,抑制效应达到高峰.跟阴性对照相比,上清中 HBsAg 的分泌量降低 70%以上,western blot 和实时 PCR 结果进一步证实了以上结果.该研究为慢病毒介导的 miRNA 诱导的 RNAi

的理论研究提供了很好的平台。

2.3 miRNA 抗 HBV 的优点和劣势

以上研究表明 miRNA 介导的 RNAi 是一种具有潜力的新颖的抗 HBV 的方法,相比较 siRNA 来说,miRNA 不需要通过严格地与靶 mRNA 完全配对来抑制 HBV 靶基因的表达,这对应对病毒突变有很大的帮助;其次,miRNA 是单链 RNA 分子,对干扰素应答不敏感,因此,不论是体内还是体外实验,都避免了 siRNA 或者 shRNA 造成的细胞毒作用^[23]。因此,它可能会解决目前 siRNA 介导的抗 HBV 治疗所引起了干扰素效应问题以及 HBV 抗干扰突变等问题,为临床上治疗 HBV 慢性感染提供了新的思路。但是,由于 miRNA 的研究时间不长,目前针对 miRNA 抗 HBV 治疗的理论数据还不是很多,所以真正将其应用到临床上治疗 HBV 的慢性感染还需要更多的理论数据来支持。

3 SELEX 技术筛选 RNA 适配子抗 HBV 的研究

3.1 SELEX 技术的概述

配体指数富集的系统进化技术(SELEX 技术)是 20 世纪 90 年代初美国 Tuerk 和 Gold 报道的一种组合化学技术,主要是应用人工合成的随机寡核苷酸文库,通过筛选、分离、富集获得能与各种配体特异性结合、并且具有高亲和力的寡核苷酸适配子(apramer)^[24]。

自从该技术问世以来,其发展非常迅速,涌现了很多改良的技术方法,如导向 SELEX 技术、复合靶分子 SELEX 技术、基因组 SELEX 技术、消减 SELEX 技术等。该技术作用的基本原理是:体外人工化学合成一个寡核苷酸文库包括 RNA、DNA 或修饰的 RNA 和 DNA 与目标分子去相互作用,并结合体外 PCR 扩增,指数级富集与靶分子特异性结合的寡核苷酸,经过几轮或者数十轮筛选过程,获得高亲和力、高特异性的寡核苷酸配体,即适配子。该技术的实质即为适配子筛选、扩增、再循环的过程。

3.2 SELEX 技术筛选 RNA 适配子在抗 HBV 中的应用

虽然 SELEX 技术应用研究仍然处于初级阶段,但是其发展的速度却十分快。目前已经广泛应用于基础研究、疾病治疗、药物筛选、免疫调节等方面。近年来利用 SELEX 技术筛选适配子来治疗病毒感染已经成为研究热点之一,目前针对 HIV、HCV、HSV、人流感病毒等都已经筛选出来了许多 RNA

或 DNA 适配子^[25~29]。

利用 SELEX 技术筛选针对 HBV 的 RNA 适配子也已经成为研究抗 HBV 治疗的一种方法。Rieger^[30]早在 1995 年就利用这种技术来研究 HBV 的结构的 5 端对 RNA 包装的重要性,通过体内筛选不同的适配子、体外扩增和鉴定发现的 5 端核酸序列是 RNA 包装所必须的。因此,该研究表明人们可以通过 SELEX 技术筛选一些能够结合 HBV P 蛋白但是不支持 HBV RNA 包装的 RNA 适配子,从而阻止 HBV 的复制过程。2004 年胡康洪等^[31]利用兔网织红细胞系统体外表达纯化鸭乙型肝炎病毒(duck hepatitis B virus, DHBV)的 P 蛋白,这个系统同时也会提供一些活化 DHBV P 蛋白的细胞因子,如 Hsp40、Hsp70、Hsp90、Hop、ATP 等,从而使活化的 P 蛋白与 D RNA 结合来实现在体外引发复制的起始。在这个原理的基础上,我们在体外将 D RNA 上茎中的 8 个易发生天然变异的位点随机化,寻求与 DHBV P 蛋白有更强结合能力的结构,结果显示:9 轮筛选后得到的适配子结合 P 蛋白能力比野生型病毒株强 25 倍,但是却不能引发复制的开始。

3.3 SELEX 技术筛选 RNA 适配子抗 HBV 的优点和劣势

由于作用方式都是直接结合并抑制靶分子,但是跟反义核酸相比,这种筛选出来的适配子跟单克隆抗体或其他的小分子药物的作用机理更相似。它的优势在于:靶分子范围很广,没有任何限制、高度特异性、高亲和力,与靶分子的结合能力更强、便于修饰、给药的方便性,更重要的是它不需要掌握所干扰的靶蛋白的结构信息^[26]。这对筛选针对结构信息并不完整的 HBV P 蛋白的高亲和力 RNA 适配子来说更是一个好消息。因此可以作为抗 HBV 慢性感染的另一种治疗策略。目前,第 1 个商业化的适配子:抗血管内皮生长因子(VEGF)的培加他尼,已经被应用于血管源性疾病的治疗中^[32]。

尽管 SELEX 技术前景非常乐观,但是我们必须承认该技术本身也存在不足之处,而且适配子的大量应用同样存在一些限制性因素。例如适配子的成本高,治疗的靶向性不强等等。所以如何降低生产成本、增强靶向性是目前适配子领域亟需解决的难题。

4 RNA 技术在抗 HBV 研究中的展望

近年来,基因治疗策略如核酶、反义寡核苷酸、

干扰肽、治疗性 DNA 疫苗等逐渐被研究应用于慢性乙肝的分子治疗。其中,由 siRNA 和 miRNA 介导的 RNAi 技术以其快速、简便、高效、特异性的抑制基因表达引起了科学家们极大的关注,已经成为近几年科学研究的前沿,为疾病治疗和药物研发提供了全新的构思和技术途径。尽管 RNAi 技术目前存在一些给药途径及安全性的问题,但是这一项新技术为治疗 HBV 慢性感染开拓了一个全新的方向。而通过 SELEX 技术筛选与 HBV P 蛋白有更高亲和力的 RNA 适配子来干扰 HBV 的复制也是一项创新型的研究^[33]。该技术是从复制水平来干扰 HBV 的生活史,目前很多针对 HBV、HCV 筛选出来的适配子都已经开始了动物模型的测试,并开始进入临床 期到 期的试验。相信不久的将来,随着研究的不断深入,这些 RNA 类药物有望应用于抗 HBV 慢性感染的临床治疗。

参考文献:

- [1] Nassal M. Hepatitis B viruses: Reverse transcription a different way[J]. *Virus Res*, 2008, **134**(1-2): 235-249.
- [2] Kasschau K D, Carrington J C. A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing [J]. *Cell*, 1998, **95**(4): 461-470.
- [3] Aagaard L, Rossi J J. RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, **59**(2-3): 75-86.
- [4] Hannon GJ. RNA interference[J]. *Nature*, 2002, **418**(6894): 244-251.
- [5] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. *Science*, 2002, **296**(5567): 550-553.
- [6] Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference [J]. *Hepatology*, 2003, **37**(4): 764-770.
- [7] Ying C, De Clercq E, Neyts J. Selective inhibition of hepatitis B virus replication by RNA interference[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **309**(2): 482-484.
- [8] Moore M D, McCarvey M J, Russell R A, et al. Stable inhibition of hepatitis B virus proteins by small interfering RNA expressed from viral vectors[J]. *J Gene Med*, 2005, **7**(7): 918-925.
- [9] McCaffrey A P, Nakai H, Pandey K, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(6): 639-644.
- [10] Cheng T L, Chang W W, Su I J, et al. Therapeutic inhibition of hepatitis B virus surface antigen expression by RNA interference [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **336**(3): 820-830.
- [11] Li Z, He M L, Yao H, et al. Inhibition of HBV replication and gene expression *in vitro* and *in vivo* with a single AAV vector delivering two shRNA molecules [J]. *BMB Rep*, 2009, **42**(1): 59-64.
- [12] Wu H L, Huang L R, Huang C C, et al. RNA interference-mediated control of hepatitis B virus and emergence of resistant mutant[J]. *Gastroenterology*, 2005, **128**(3): 708-716.
- [13] Hwang H W, Mendell J T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis[J]. *Br J Cancer*, 2006, **94**(6): 776-780.
- [14] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, **75**(5): 843-854.
- [15] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, **391**(6669): 806-811.
- [16] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. *Science*, 2001, **294**(5543): 853-858.
- [17] Lau N C, Lim L P, Weinstein E G, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 2001, **294**(5543): 858-862.
- [18] Esau C C, Monia B P. Therapeutic potential for microRNAs [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, **59**(2-3): 101-114.
- [19] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, **116**(2): 281-297.
- [20] Ely A, Naidoo T, Mufamadi S, et al. Expressed anti-HBV primary microRNA shuttles inhibit viral replication efficiently *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Ther*, 2008, **16**(6): 1105-1112.
- [21] Gao Y F, Yu L, Wei W, et al. Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by artificial microRNA [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, **14**(29): 4684-4689.
- [22] 罗祥基,程庆保,徐峰,等.慢病毒介导基于 microRNA 系统的 HBsRNAi 技术抑制 HBV 复制 [J]. 第二军医大学学报, 2009, **30**(3): 295-299.
- Luo Xiangji, Cheng Qingbao, Xu Feng, et al. Lentiviral vector-mediated RNA interference of HBs gene inhibits replication of HBV [J]. *Acad J Sec Mil Med*

- Univ, 2009, **30**(3) :295-299(Ch).
- [23] Ying S Y, Lin S L. Current perspectives in intronic microRNAs (miRNAs) [J]. *J Biomed Sci*, 2006, **13**(1) :5-15.
- [24] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. *Science*, 1990, **249**(4968) :505-510.
- [25] James W. Aptamers in the virologists' toolkit [J]. *J Gen Virol*, 2007, **88**(Pt 2) :351-364.
- [26] Gopinath S C. Antiviral aptamers [J]. *Arch Virol*, 2007, **152**(12) :2137-2157.
- [27] 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 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, **52**(6) :2097-2110.
- [28] Bryant K F, Cox J C, Wang H, *et al.* Binding of herpes simplex virus-1 US11 to specific RNA sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(19) :6090-6100.
- [29] Khati M, Schuman M, Ibrahim J, *et al.* Neutralization of infectivity of diverse R5 clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 by gp120-binding 2 F-RNA aptamers [J]. *J Virol*, 2003, **77**(23) :12692-12698.
- [30] Rieger A, Nassal M. Distinct requirements for primary sequence in the 5' and 3' part of a bulge in the hepatitis B virus RNA encapsidation signal revealed by a combined *in vivo* selection/*in vitro* amplification system [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23**(19) :3909-3915.
- [31] 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 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(14) :4377-4389.
- [32] Ng E W, Shima D T, Calias P, *et al.* Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, **5**(2) :123-132.
- [33] Feng H, Hu K. Aptamers against viral hepatitis: from rational design to practical application [J]. *Virologica Sinica*, 2008, **23**(5) :315-320.

Progress of Studies on Anti-HBV Based on RNA Drugs

WANG Weiwei, HU Kanghong

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences/ State Key Laboratory of Virology,
Wuhan 430071, Hubei, China)

Abstract : Chronic hepatitis B virus (HBV) infection has been one of the most serious problems threatening global health. However, currently available clinic treatments against HBV including interferon- and nucleoside analogs such as lamivudine and adefovir have been proved to be limited successful. Therefore, it is necessary to develop a more effective antiviral therapy with fewer side effects. In this review, we discuss anti-HBV strategies of several small RNA drugs including small interfering RNA (siRNA), microRNA and nucleic acid aptamers obtained by SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment).

Key words : hepatitis B virus (HBV); siRNA; microRNA; RNA aptamers