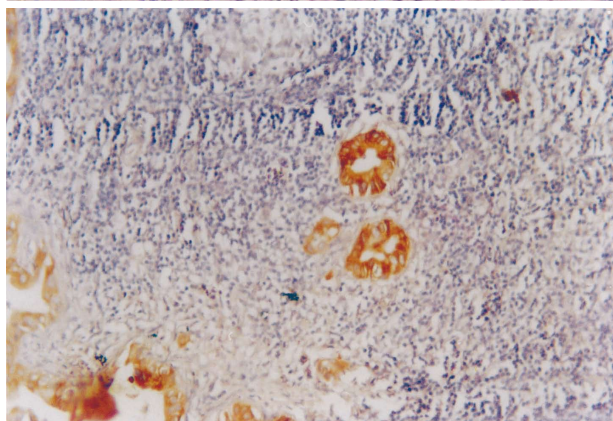
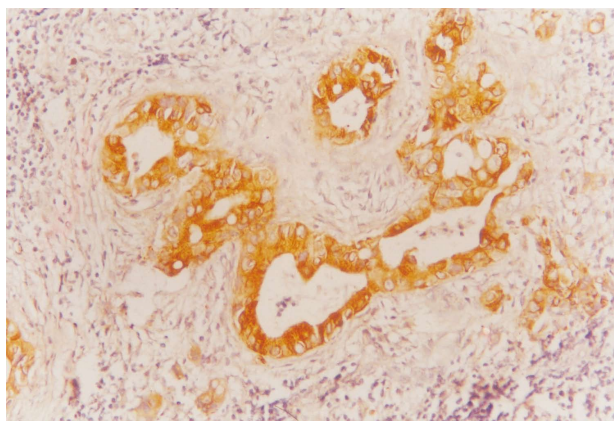
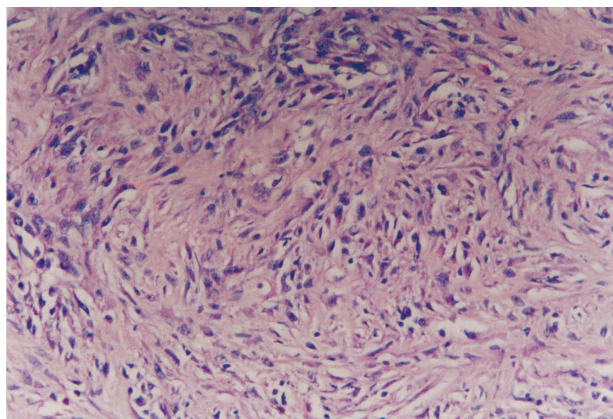
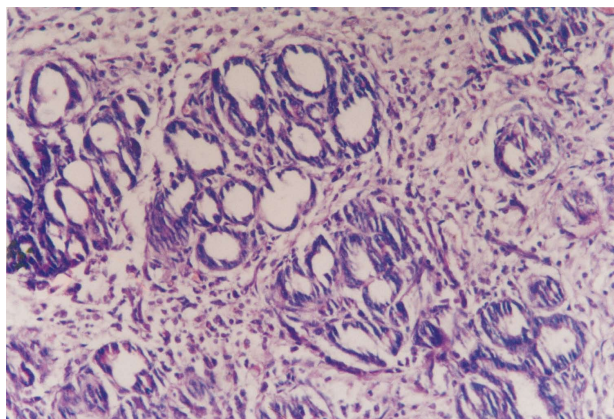


世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 9 月 28 日 第 13 卷 第 18 期 (Volume 13 Number 18)



18/2005

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,
俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2005 年 9 月 28 日

第 13 卷

第 18 期

(总第146期)

述 评

- 2173 临床试验刍议 谭学瑞, 张学中
2179 RNA 干扰在肝病治疗中的研究进展 韩苏夏, 马瑾璐

基 础 研 究

- 2183 甘草甜素下调基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因的表达
王巧侠, 成军, 郭江, 李文凡, 魏红山
2188 改良聚合酶链反应检测 HBV 共价闭合环状 DNA 汤勃, 王宇明, 刘俊, 张瑞
2193 肝癌细胞 BEL7402 中神经元特异性烯醇化酶的表达
朱爱萍, 张青云, 王雅明, 徐建军, 孙丽
2197 肝移植前受体亚低温对急性肝衰大鼠移植肝脏的保护作用
王志东, 韩德恩, 崔云甫, 姜明山, 张新宇, 曾兆林
2201 慢性丙型肝炎患者 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞表达增加 杨江华, 张永祥, 苏川, 孙南雄
2205 草苈蓉乙醇提取物对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的治疗作用 朴熙绪, 黄红果, 朴东明
2210 树突状细胞在黏膜免疫模型鼠体内的分布及趋化因子的表达
谢遵江, 贺业春, 贾立敏, 刘颖, 刘丽
2213 塞来昔布对胃癌细胞生长及 ERK2 表达的影响
张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 熊碧君, 翁敏
2217 益气活血软坚解毒含药血清诱导人肝癌细胞系 Bel-7402 细胞的凋亡
李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 林洪生
2222 肿瘤坏死因子- α 、细胞间黏附分子-1与扑热息痛肝损害
田丰, 王颖, 吴作艳, 王学清, 李岩
2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达
杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰

文 献 综 述

- 2231 乳酸杆菌作为一种新型活疫苗抗原递送载体 庾庆华, 杨倩
2235 一氧化氮和一氧化氮合酶与肿瘤放疗敏感性的关系 江春平, 丁义涛
2238 Id 基因家族对消化系统实体瘤作用的研究进展
杨海彦, 刘连新, 曲志博, 刘改云, 陈炜, 郭化鑫, 陈曦
2243 影响拉米夫定相关乙型肝炎病毒 YMDD 变异的因素 陆德云, 王甦, 赵连三
2246 成人间活体肝移植中小肝综合征的预防策略 马跃峰, 李相成
2251 肝细胞癌生物标志物的研究进展 王嘉信, 刘连新
2257 肠黏膜免疫调节紊乱介导炎症性肠病的发生 王旭丹, 袁学勤

研 究 快 报

- 2263 sp600125 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞凋亡及 Caspase-3 蛋白表达的影响 唐文, 蒋明德, 李小安
2266 血小板活化因子对幼鼠肠道免疫屏障功能的影响 王丽杰, 刘冬妍, 孙梅, 赵恂

临 床 经 验

- 2269 肝硬化患者食管静脉曲张的相关因素分析 501 例
崔春吉, 金永日, 朴熙绪, 裴凤郁
2272 中晚期肝门部胆管癌诊治15例
张宗明, 邢海林, 李刚, 刘凯, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星
2275 肝病患者 IgA 和 sIgA 含量变化的临床意义 刘冬妍, 刘沛
2278 全直肠系膜切除术切缘血管内皮生长因子检测的临床意义 战学雷, 田素礼
2281 善宁对急性胰腺炎患者血小板参数变化的影响 黄坚, 陆士奇, 陈建荣

病 例 报 告

- 2284 肝肾联合移植术治疗移植肾慢性失功伴肝硬化 1 例
朱建平, 张宗明, 管德林, 李刚, 黄庆荣, 宿砚明, 陈以安, 刘辉
2287 丙型肝炎肝硬化患者骨髓和血液同时分离出鼠伤寒沙门菌 1 例
郭微媛, 齐桂云, 多丽波, 闫立昕, 孙琪, 张和光

致 谢	2288 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2187 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会征文通知 2200 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛第一轮通知 2209 首届北京地坛感染病学术会议 2221 《世界华人消化杂志》欢迎投稿 2226 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 2234 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2237 世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊 2250 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2256 2006年即将召开的国际会议 2262 消化道肿瘤外科治疗2006高级论坛征文通知 2286 中国生物医学基金论文摘要注册方法
封面故事	2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达 杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰 世界华人消化杂志 2005;13(18):2227-2230 http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2227.asp
国际会议	13th United European Gastroenterology Week, UEGW October 15-20, 2005 American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005 ISGCON 2005 November 11-15, 2005 isgcon2005@yahoo.co.in isgcon2005.com Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 www.asge.org/education II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 gec@stradini.lv www.gastroenterologs.lv 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 c.chase@imedex.com www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(半月刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2005-09-28
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生

编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁

英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街77号

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
E-mail: wcjd @ wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

2005年版版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期24.00元 全年576.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

September 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 18

EDITORIAL

Meager opinions on clinical experimentation

Tan XR, Zhang XZ 2173

Advancement of RNA intervention in the treatment of hepatic diseases

Han SX, Ma JL 2179

BASIC RESEARCH

Glycyrrhizin down-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1

Wang QX, Cheng J, Guo J, Li WF, Wei HS 2183

Detection of hepatitis B virus cccDNA with modified polymerase chain reaction

Tang B, Wang YM, Liu J, Zhang R 2188

Expression of human neuron-specific enolase gene in human hepatocellular cancer cells BEL7402

Zhu AP, Zhang QY, Wang YM, Xu JJ, Sun L 2193

Moderate hypothermia therapy for acute liver failure in rats before liver transplantation

Wang ZD, Han DE, Cui YF, Jiang MS, Zhang XY, Zeng ZL 2197

Increase of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C

Yang JH, Zhang YX, Su CH, Sun NX 2201

Therapeutic role of ethanolic extract of *Boschniakia Rossica* in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Piao XX, Huang HG, Piao DM 2205

Distribution of dendritic cells and expression of chemokines in mouse models of mucosal immune *in vivo*

Xie ZJ, He YC, Jiao LM, Liu Y, Liu L 2210

Effects of celecoxib on cell proliferation and ERK2 expression of ERK2 in gastric cancer cells

Zhang Y, Jiang MD, Zeng WZ, Xu H, Xiong BJ, Weng M 2213

Growth inhibitory and apoptosis inducing effect on hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line by serum from rabbit fed with *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu* decoction

Li DT, Shun GZ, Pei YX, Qi X, Li J, Ling HS 2217

Association of tumor necrosis factor- α and intercellular adhesion molecule-1 with acetaminophen-induced liver damages

Tian F, Wang Y, Wu ZY, Wang XQ, Li Y 2222

Expression of nerve growth factor messenger RNA in pancreatic cancer tissues in Sprague Dawley rats

Yang ZL, Deng XH, Yang LP, Li QL, Fan WT, Liang S, Miao XY 2227

REVIEW

Lactobacillus as a new living vaccine carrier in delivery of antigen

Yu QH, Yang Q 2231

Influence of nitric oxide and nitric oxide synthase on tumor radiotherapy sensitivity

Jiang CP, Ding YT 2235

Advance in effect of Id family gene on solid tumor in digestive system

Yang HY, Liu LX, Qu ZB, Liu GY, Chen W, Guo HX, Chen X 2238

Influential factors of Lamivudine associated YMDD variations of hepatic B virus

Lu DY, Wang S, Zhao LS 2243

Preventive methods for small-for-size liver syndrome in adult-to-adult living-donor liver transplantation

Ma YF, Li XC 2246

Advance in research of biological markers of hepato-cellular carcinoma

Wang JB, Liu LX 2251

Occurrence of inflammatory intestinal disease mediated by intestinal mucosal immunoregulation disturbance

Wang XD, Yuan XQ 2257

BRIEF REPORT

Effects of sp600125 on acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells and expression of Caspase-3 protein in rats

Tang W, Jiang MD, Li XA 2263

Effect of platelet activating factor on intestinal immunological barrier in young rat

Wang LJ, Liu DY, Sun M, Zhao X 2266

CLINICAL PRACTICE

Correlative factors of esophageal varices in patients with hepatocirrhosis: an analysis of 501 cases

Cui CJ, Jin YR, Piao XX, Pei FY 2269

Diagnosis and treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma: an analysis of 15 cases

Zhang ZM, Xing HL, Li G, Liu K, Li G, Zhu JP, Su YM, Zhong H, Guo JX 2272

Changes of IgA and sIgA and its clinical significant in hepatic diseases

Liu DY, Liu P 2275

Clinical significance of detection for vascular endothelial growth factor in resection margin following total mesorectal excision

Zhan XL, Tian SL 2278

Effects of octreotide on platelet parameters in patients with acute pancreatitis

Huang J, Lu SQ, Chen JR 2281

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology Monthly

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date September 28, 2005

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

RNA 干扰在肝病治疗中的研究进展

韩苏夏, 马瑾璐

韩苏夏, 马瑾璐, 西安交通大学肿瘤研究中心 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤科 陕西省西安市 710061; 西北大学生命科学学院 陕西省西安市 710068
韩苏夏, 男, 1968-03-14生, 陕西省富平县人, 汉族, 主治医师, 在读博士(西北大学生命科学学院), 主要从事肿瘤预防和综合治疗的基础与临床研究, 作为第一作者共发表论文10余篇, 曾负责或参与科研项目6项, 先后获陕西省政府、西安市政府、陕西省教育厅科技进步奖3项。
国家自然科学基金资助项目, No. 30300300
西安交通大学自然科学基金资助项目, No. 2003-12
陕西省科学技术研究发展计划项目, No. 2004K13-G10
通讯作者: 韩苏夏, 710061, 陕西省西安市雁塔区健康路1号, 西安交通大学肿瘤研究中心, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤科。
hansuxia22099@sohu.com
电话: 029-85323249
收稿日期: 2005-08-10 接受日期: 2005-08-26

摘要

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)引发的转录后基因静默机制, 它是真核生物中普遍存在的抵抗病毒入侵、抑制转座子活动、调控基因表达的监控机制, RNA干扰在细胞分裂过程中发挥了至关重要的控制作用, 对引导细胞形成某种特定类型的组织产生深远的影响。《科学》把这一令人激动的发现当作2002年最重大的科学突破来欢呼, 这些发现将使生物学家们重新审度细胞及其演化过程。目前已成功用于基因功能和信号转导系统上下游分子相互关系的研究, RNA干扰有可能成为包括病毒感染在内的许多肝病的一种有效治疗手段, 并有可能为肿瘤基因治疗提供新策略。

关键词: RNA干扰; 肝病治疗; 研究进展

韩苏夏, 马瑾璐. RNA干扰在肝病治疗中的研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2179-2182
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2179.asp>

0 引言

RNA干扰(RNA interference, RNAi)最早发现在线虫类秀丽隐杆线虫, 反应于双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA), 使目标mRNA以序列特异性的退化, 是一种具有序列特异性的RNA依赖性转录后基因沉默现象(posttranscriptional gene silencing, PTGS)^[1]。RNAi广泛存在于从真菌到植物, 从无脊椎动物到哺乳动物的各种生物中。RNAi的表现形式是多种多样的, 除动物中的RNAi外, 还包括在植物中的PTGS、共抑制(cosuppression)及RNA介导的病毒抗性, 真菌的抑制(quelling)现象等。

RNAi最核心的生物学功能在于它能监控异常的或外源的遗传物质在机体内的水平, 调控基因的表达。利用

dsRNA可以特异性地降解与之有同源序列的mRNA, 从而特异性的阻断相应基因的表达。因此, RNAi被认为是真核生物的遗传监视器^[2]和基因组水平的免疫系统^[3]。目前, RNAi技术已被广泛用于新基因筛选、基因功能鉴定、信号传导研究及基因治疗^[4-5]等方面, 显示了非常广阔的应用前景。

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)所导致的慢性肝炎、肝癌是严重危害人类健康的疾病。目前, 慢性乙型肝炎的治疗主要是用干扰素(IFN)和拉米夫定, 治疗丙型肝炎感染的主要是干扰素和利巴韦林联用, 其效果均不很理想。肝癌作为一种恶性肿瘤更是缺乏有效的治疗方法。siRNA技术经研究发现可用于肝病抗病毒和肿瘤的治疗^[6-11], 以下就近期的研究进展进行综述。

1 RNAi的作用的机制

RNAi作用过程可分为启动过程和效应过程。启动过程中, 外源性dsRNA被Dicer(RNase III家族中的dsRNA2特异性核糖核酸酶)以一种ATP依赖的方式降解为19-21 bp的双链siRNAs, 后者被称为“向导RNA”。效应过程中, siRNAs结合siRNA2核糖核蛋白复合物(siRNP)形成RNA诱导的沉默复合物(RISC)^[12]。活化的RISC遵循碱基配对原则靶向性与同源mRNA结合并导致其降解, 从而使得内源基因不能表达, 导致内源基因的沉默^[4, 13, 14]。切断后的mRNA或者被核酸外切酶降解, 或者可能成为异常RNA, 在RNA依赖多聚酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)的作用下又形成了新的dsRNA进一步作用于另外的靶向mRNA。这种不断被放大的瀑布式作用形成大量新的siRNA, 使RNAi在短时间内达到迅速, 有效地抑制mRNA翻译形成蛋白或多肽, 从而有效地抑制靶向基因蛋白质或多肽的形成。

2 RNAi的作用特征

RNAi的作用特征主要有: (1)RNAi具有高度的特异性。单个碱基改变就可能使RNAi失效, RNAi只能特异地降解与之序列相应的单个内源基因的mRNA, 而其他mRNA的表达则不受影响^[15]。(2)RNAi存在放大效应: 1)长的dsRNA被Dicer酶裂解成的每个初级siRNA, 都具有结合一个同源mRNA的能力, 此步放大效应约10-20倍。2)RISC复合物中, 在RdRP酶的作用下, 经类PCR合成的mRNA互补链也形成了dsRNA, 再被酶裂解成次

级siRNA. 这样细胞内的siRNA数量大大增加, 显著增强干扰作用. 3) 以上生成的siRNA可多次重复应用, 进一步提高了其放大作用^[4, 15], 这表明dsRNA介导的RNA干扰是一个以催化放大的方式进行的. (3) RNAi效应具有高效性. 无论是在体内还是体外实验中, 仅需少量的dsRNA(几个数量级浓度)就能有效的抑制靶基因表达, 抑制的效率在低等动物中>90%^[16]. 且siRNA作为RNAi的中介分子, 通过序列互补配对法则特异性降解目的基因^[17-18]. (4) RNAi需要ATP参与其效应. 在去除ATP的样品中RNA干扰现象降低或消失显示RNA干扰是一个ATP依赖的过程, 可能是Dicer和RISC的酶切反应是必须由ATP提供能量^[19]. (5) RNAi作用广泛并可遗传. 基因表达的效应可以跨越细胞界限, 在不同细胞甚至生物体间长距离传递和维持, 并可传递给子一代.

3 RNAi的生物学功能

随着对RNAi的大量深入研究, 人们逐步认识到RNAi与获得性免疫反应一样具有特异性、多样性、记忆性、可遗传性等特征. 目前认为RNAi的本质是一种由RNA介导的序列特异性的获得性免疫反应, 是一种原始的基因组对抗外来基因表达的保护机制, 是生物体在基因组水平上的免疫系统^[20]. RNAi的核心功能是抗病毒感染免疫, 维持基因组中转座子的稳定性, 清除异常RNA, 同时参与基因表达的调控.

4 RNAi在肝病治疗中的应用

siRNA的这种生物学作用使它具有潜在的临床应用价值, 可发展为高度特异的性的基因封闭治疗手段, 具有极诱人的前景. siRNA正在被用于包括肝癌的多种疾病的广泛研究, 并初步取得成果.

4.1 RNAi对HBV的抑制 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)属于肝DNA病毒属家族. 虽然在有些时候疫苗对于肝炎的治疗和预防是有效的, 但是据调查, 全世界约有一百万的人死于HBV相关疾病. 许多慢性转染HBV病毒的患者随后发展为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[21]. 现在, 已知的至少有两种针对慢性肝炎的抗病毒疗法, 一种是 α -干扰素, 另一种为包括拉米夫定(3TC 3-硫胞苷), 阿德福韦, 恩替卡韦的核苷类似物. 虽然这些方法成功的减少了病毒的载量但是效果不令人满意. 用RNA干扰技术就成了一个吸引人的选择. 在以下的最近各项研究中证明了它对HBV表达的有效抑制.

Qian *et al*^[22], 在体外构成包括t7和tac启动子的表达载体. 目的cDNA片断被克隆到该载体相对的启动子之间. 在大肠杆菌中dsRNA被载体表达, 并通过亲和色普法纯化. 然后在含锰离子的缓冲溶液中被核糖核酸酶III降解, 后用15%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电

泳法分离, siRNA(大约25 bp)便可以得到. siRNA通过克隆, 发酵, 消化, 提纯, 与靶基因表达质粒共转染入人细胞系. 结果表明siRNA特异性的与乙肝病毒聚合酶部分相对应, 并特异性的抑制病毒蛋白的表达. HBsAg表达水平下降了10%. 对HBsAg和HBeAg表达抑制的剂量依赖效应于HepG2细胞被观察到. 在转染7.5 nmol/L si HBV p后的6 d抑制率持续于70%左右的最高水平. Moore *et al*^[23], 在体外试验中首先鉴别出有效抑制乙肝表面抗原的RNA干扰序列, 并证明它是由聚合酶III表达盒表达. 该表达盒被插入不同的两个载体, 原型的泡沫状病毒(PFV)和腺伴随病毒(AAV). 它们的共同点是都是非致病的, 并且有整合入细胞DNA的能力. 包含HBV目的RNA干扰分子的载体被引入293 t(一种稳定表达乙肝表面抗原的细胞), 载体也被在HepG2. 2. 15细胞(一种分泌有传染性的HBV病毒粒子的细胞)中评估. 7 d后HBVAg的敲低率与对照相比高达90%. Chen *et al*^[24]的该试验表明合成的siRNA作用于HBV的c基因和s基因, 可以有有效的特异的抑制乙肝病毒和抗原的表达. HBsAg和HBeAg以及HBV的表达可以被siRNA被抑制呈剂量反应关系. 此外, 该试验表明在相同终浓度的情况下siRNA的联合体作用于多个区域, 抑制HBV表达的效果优于单个siRNA. 在siRNA处理后未观察到细胞凋亡的变化. 得出试验结论为, 在细胞体外培养中, siRNA有明显的抑制HBV和抗原表达的作用, 而且siRNA作用于不同的区域展现了其潜力. Yang *et al*^[25]用荧光激活细胞分选术. 发现siRNA作用于HBsAg减少了绿色荧光蛋白信号56%与对照组相比. 实时PCR表明乙型肝炎表明绿色荧光蛋白mRNA提取于与pAVU6+27共转染的HepG2细胞, 并且与空的媒介防除相比乙型肝炎表明绿色荧光蛋白质粒的表达减少了90%. HBsAg和HBeAg的表达同样被分别抑制了43%和64%. 从而得出试验结论siRNA表达载体可以抑制HBsAg的表达并且提供了新的有效途径筛选siRNA. Uprichard *et al*^[26]该试验通过腺病毒重组体在HBV转基因小鼠的肝脏表达HBV特异siRNA, 抑制预成HBV基因的表达和复制在至少26 d. Zhu *et al*^[27]用HepG2. 2. 15作为靶细胞, 质粒和微脂体共转染入培养细胞, HBV DNA经过PCR检测, HBV c-mRNA被半定量PCR检测到. 试验表明质粒成功的表达了siRNA, 两个构建的siRNA有效的抑制了HBV的表达, 并且它对HBV的抑制作用存在反应关系.

4.2 RNAi对HCV的抑制 HCV为单股正链RNA病毒, 在肝细胞中直径为37-40 nm. 现今没有有效治疗HCV的疫苗. 现在流行的受人们欢迎的治疗HCV感染的方法是peg干扰素联合病毒唑. 最近经限制性临床试验证明ns3蛋白酶的小分子抑制子比peg干扰素和病毒唑的效果更好. 但是现在将其用于标准疗法治疗HCV感染还为时过早. 因为HCV病毒是RNA病毒, 既能当作病毒mRNA进行蛋白翻译, 又可作为模板经性病毒复制, 因此成为RNA干

扰研究的理想模型.

Takigawa *et al*^[28]在此试验中用了两种方法表达siRNA, 一个是表达质粒(Pavu6+27), 另一个是包含Pavu6+27衍生表达盒的慢病毒重组体. Gomez *et al*^[29]在试验中观察了HCV RNA基因组的三性从基本序列到三级结构, 它说明了RNA为基础治疗的限制和可能性. 并描述了一些以RNA为基础的抗HCV的方法. 虽然5'-utr曾经被认为是最适合治疗性siRNA或siRNA的区域, 因为它是极端保守的序列. 他们观察到经过siRNA对5'-utr的抑制, HCV亚基因组的表达只有微弱的抑制. 在质粒和慢病毒介导的表达系统中, siRNA通过对ns3-1和ns5b的抑制使其在没有抑制宿主细胞基因的情况下, 更为有效的抑制HCV的表达. 合成的siRNA通过对ns3-1的作用也可以有效的抑制HCV的表达, 并存在剂量反应关系. Randall *et al*^[30]的实验中证明了siRNA治疗HCV的潜在可能性, 但是仍然存在不确定性. Kronke *et al*^[31]认为以siRNA为基础的基因治疗的最大困难是HCV有许多高度不同的基因型并且快速出现新的种型. 为了这个原因, 他们用可选择的策略克服它. 在一种方法中, 使用核糖核酸内切酶修饰过的siRNA(esRNA)同时多位点处理病毒基因组. 在该实验中他们发现esRNA直接抑制除5'非编码区(5' ntr)的HCV编码序列的多个区域, 从而有效的抑制了HCV基因组和亚基因组的表达. 在另一可供选择的方法中, 利用逆转录病毒的产生的假模标本编码小发卡结构RNA(siRNA). Seong *et al*^[32]认为prk2是NS5B磷酸化和HCV表达所必须的, 所以用siRNA敲低prk2的表达便可干扰HCV RNA的表达. Jong *et al*^[33]在体内实验和体外实验的数据强有力的指出NSAP1蛋白增加HCV ires依赖翻译通过在HCV Mrna编码区预acr相互作用. Wilson *et al*^[20]通过电穿孔(electroporation)基因转移方法将被设计成靶向HCV基因组的双链小干扰RNA(siRNA)分子导入含有HCV亚基因组复制子的人肝细胞瘤细胞系(huh7)细胞中, 显示两种siRNA均可明显降低病毒特异性蛋白的表达和RNA合成, 其水平较未用siRNA处理的细胞低90%, 这两种siRNA还能保护原始的huh7细胞免受HCV复制子RNA的实验感染. Randal *et al*^[34]发现siRNA对HCV RNAs封闭为剂量依赖性和序列依赖性. 靶序列内有3 nt不同的2细胞株HCV变异只能被各自同源序列的siRNA所封闭, 这种序列特异性证实HCV抗原表达的下降不是双链siRNA非特异性激活ifn系统所致, 而且经siRNA治疗后HCV RNA水平下降, 转染后4 d HCV RNA水平降低了80倍, 导入siRNA后是受HCV RNA感染的细胞数降低了98%以上.

4.3 RNAi在肝癌治疗中的应用 肝细胞癌(HCC)的发生与一些致癌基因的过度表达有关. 在70%的

HCCs中c-myc呈过度表达. Cheng *et al*^[35]的实验中通过真核生物生存素基因rna干扰表达载体和与生存素基因结合的重组质粒(pSuNeo-SVV), pSuperssorNeo(pSuNeo)被消化酶Xba I和Sa I及特异的双链RNAi引物处理. 大鼠肝癌细胞系SMMC-7721辅助细胞模型在用siRNA处理后用大鼠肝癌细胞系SMMC-7721转染细胞处理. 用免疫组化染色法和逆转录酶PCR检测大鼠肝癌细胞系细胞表面生存素基因. 流式细胞计量术用于细胞周期的分析. 透射电子显微术检测是否有RNAi处理细胞编程性死亡. 结果发现通过siRNA的处理几乎未检测到生存素基因在SMMC-7721细胞表面的表达. 凋亡指数上升了15.6%. 并且细胞数量在G2/M期减少, 细胞生长被抑制. 从而得出结论siRNA可以敲低生存素基因的表达, 诱导凋亡和抑制肝癌细胞的生长. Xu *et al*^[36]在实验中发现细胞被psilencer-c-myc转染后c-myc Mrna和蛋白的表达被抑制且与模拟转染细胞相比抑制率高达67%. 在被转染的HepG2细胞中可以检测到细胞的凋亡. 从而得出结论c-myc在转录子的表达和在siRNA转染的HepG2细胞中的翻译水平明显被抑制. Liu *et al*^[37]在哺乳动物中siRNA表达载体被成功构建, 并且与对照组相比, 表达siRNA的pUC18U6 HBV抗HBV减少HBsAg的浓度值得注目的减少了44%($P<0.05$).

5 结语

siRNA在体外(细胞培养)和体内(小鼠模型)实验性抗病毒感染, 调节机体基因表达的研究中已取得了迅速进展. 虽然这些研究还相当初步, 但明显提示siRNA有可能成为包括病毒感染在内的许多肝病的一种有效治疗手段. 同时, siRNA也有助于我们重新认识慢性病毒感染的机制. 相信随着siRNA研究的进展和对其认识的提高, 必将对肝病的防治产生巨大的影响.

6 参考文献

- 1 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811
- 2 Boshier JM, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol* 2000;2:E31-36
- 3 Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 2002;296:1263-1265
- 4 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418:244-251
- 5 McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 2002;3:737-747
- 6 Klein C, Bock CT, Wedemeyer H, Wustefeld T, Locarnini S, Dienes HP, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo by nucleoside analogues and siRNA. *Gastroenterology* 2003;125:9-18
- 7 Konishi M, Wu CH, Wu GY. Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV-producing cell line. *Hepatology* 2003;38:842-850
- 8 McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA. Inhibition of hepatitis B virus

- in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 2003;21:639-644
- 9 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003;37:764-770
- 10 Wu J, Nandamuri KM. Inhibition of hepatitis viral replication by siRNA. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:1649-1659
- 11 Zhang XN, Xiong W, Wang JD, Hu YW, Xiang L, Yuan ZH. siRNA-mediated inhibition of HBV replication and expression. *World J Gastroenterol* 2004;10:2967-2971
- 12 Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67:657-685
- 13 Cerutti H. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions. *Trends Genet* 2003;19:39-46
- 14 Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo TA, Vaucheret H. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 2000;101:533-542
- 15 Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002;26:199-213
- 16 Davenport RJ. Gene silencing. A faster way to shut down genes. *Science* 2001;292:1469-1471
- 17 Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000;101:25-33
- 18 Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001;15:188-200
- 19 Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001;107:309-321
- 20 Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatons S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, Sarangi F, Harris-Brandts M, Beaulieu S, Richardson CD. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2783-2788
- 21 Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* 1987;56:651-693
- 22 Qian ZK, Xuan BQ, Min TS, Xu JF, Li L, Huang WD. Cost-effective method of siRNA preparation and its application to inhibit hepatitis B virus replication in HepG2 cells. *World J Gastroenterol* 2005;11:1297-1302
- 23 Moore MD, McGarvey MJ, Russell RA, Cullen BR, McClure MO. Stable inhibition of hepatitis B virus proteins by small interfering RNA expressed from viral vectors. *J Gene Med* 2005;7:918-925
- 24 Chen Z, Xu ZF, Ye JJ, Yao HP, Zheng S, Ding JY. Combination of small interfering RNAs mediates greater inhibition of human hepatitis B virus replication and antigen expression. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005;6:236-241
- 25 Yang ZG, Chen Z, Ni Q, Xu N, Shao JB, Yao HP. Inhibition of hepatitis B virus surface antigen expression by small hairpin RNA in vitro. *World J Gastroenterol* 2005;11:498-502
- 26 Uprichard SL, Boyd B, Althage A, Chisari FV. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:773-778
- 27 Zhu C, Fan XG, Li N, Ying RS. Inhibition of hepatitis B virus replication by RNA interference in vitro. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004;12:522-525
- 28 Takigawa Y, Nagano-Fujii M, Deng L, Hidajat R, Tanaka M, Mizuta H, Hotta H. Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5B regions of the viral genome. *Microbiol Immunol* 2004;48:591-598
- 29 Gomez J, Nadal A, Sabariego R, Beguiristain N, Martell M, Piron M. Three properties of the hepatitis C virus RNA genome related to antiviral strategies based on RNA-therapeutics: variability, structural conformation and tRNA mimicry. *Curr Pharm Des* 2004;10:3741-3756
- 30 Randall G, Rice CM. Interfering with hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res* 2004;102:19-25
- 31 Kronke J, Kittler R, Buchholz F, Windisch MP, Pietschmann T, Bartenschlager R, Frese M. Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol* 2004;78:3436-3446
- 32 Kim SJ, Kim JH, Kim YG, Lim HS, Oh JW. Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem* 2004;279:50031-50041
- 33 Kim JH, Paek KY, Ha SH, Cho S, Choi K, Kim CS, Ryu SH, Jang SK. A Cellular RNA-Binding Protein Enhances Internal Ribosomal Entry Site-Dependent Translation through an Interaction Downstream of the Hepatitis C Virus Polyprotein Initiation Codon. *Mol Cell Biol* 2004;24:7878-7890
- 34 Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100: 235-240
- 35 Cheng SQ, Wang WL, Yan W, Li QL, Wang L, Wang WY. Knock-down of survivin gene expression by RNAi induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *World J Gastroenterol* 2005;11:756-759
- 36 Xu Y, Wang YH, Gao JD, Ye J, Zhu HX, Xu NZ, Wang XY, Sun ZT. Suppression of c-myc expression by interference RNA in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2004;26:458-460
- 37 Liu J, Guo Y, Xue CF, Li YH, Huang YX, Ding J, Gong WD, Zhao Y. Effect of vector-expressed siRNA on HBV replication in hepatoblastoma cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:1898-1901

电编 李琪 编辑 张海宁