

# 针对HBV S基因mRNA反义锁核酸设计及其在2.2.15细胞内的抗病毒作用

邓益斌, 王燕菲

邓益斌, 右江民族医学院附属医院医学检验中心 广西壮族自治区百色市 533000

王燕菲, 广州医学院生物化学与分子生物学教研室 广东省广州市 510182

邓益斌, 2009年广东省广州医学院硕士, 主要从事基因诊断与基因治疗的研究。

广州市科技攻关计划基金资助项目, No. 2002Z3-E4081

作者贡献分布: 该实验由邓益斌设计; 实验过程由邓益斌操作完成; 实验研究所需经费由王燕菲提供; 数据分析由邓益斌完成; 论文写作由邓益斌完成, 王燕菲提出修改意见。

通讯作者: 王燕菲, 教授, 510182, 广东省广州市东风西路195号, 广州医学院生物化学与分子生物学教研室。

yanfeiw@hotmail.com

电话: 020-81340212

收稿日期: 2009-08-18 修回日期: 2009-10-20

接受日期: 2009-10-26 在线出版日期: 2009-12-08

## Antiviral effects of locked nucleic acid antisense oligonucleotides targeting HBV S gene mRNA in HepG2 2.2.15 cells

Yi-Bin Deng, Yan-Fei Wang

Yi-Bin Deng, Center for Medical Laboratory Science, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yan-Fei Wang, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Foundation of Guangzhou Municipality, No. 2002Z3-E4081

Correspondence to: Professor Yan-Fei Wang, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangzhou Medical College, 195 Dongfeng Western Road, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China. yanfeiw@hotmail.com

Received: 2009-08-18 Revised: 2009-10-20

Accepted: 2009-10-26 Published online: 2009-12-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the inhibitory effects of locked nucleic acid (LNA) antisense oligonucleotides targeting hepatitis B virus (HBV) S gene in HepG2 2.2.15 cells, and screen effective LNA antisense oligonucleotides.

**METHODS:** Four LNA antisense oligonucleotides of different lengths that are complementary to the translation initiation region of

HBV S gene were designed, synthesized, and introduced into HepG2 2.2.15 cells by cationic liposome-mediated transfection. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and HBV DNA levels in cell supernatant were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and fluorescent quantitative-polymerase chain reaction (FQ-PCR) 24, 48 and 72 hours after transfection. The cell toxicity of LNA antisense oligonucleotides was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay.

**RESULTS:** All four LNA antisense oligonucleotides (10, 15, 20 and 25 base, respectively) could inhibit the expression of HBsAg and the replication of HBV DNA. Seventy-two hours after transfection, the reduced rates of HBsAg and HBV DNA levels were 46.58%, 54.38%, 72.43% and 69.92% as well as 27.09%, 28.77%, 34.71% and 32.68%, respectively. No obvious cell toxicity of LNA antisense oligonucleotides was noted.

**CONCLUSION:** LNA antisense oligonucleotides targeting HBV S gene show strong inhibitory effects on HBV replication *in vitro*. The optimal length of LNA antisense oligonucleotides ranges from 15 to 25 base. LNA antisense oligonucleotides targeting HBV S gene have a therapeutic potential in patients infected with HBV.

**Key Words:** Hepatitis B virus; Locked nucleic acid; HepG2 2.2.15 cell; Gene therapy; Cationic liposomes

Deng YB, Wang YF. Antiviral effects of locked nucleic acid antisense oligonucleotides targeting HBV S gene mRNA in HepG2 2.2.15 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3497-3501

## 摘要

**目的:** 探讨针对乙型肝炎病毒(HBV)S基因翻译起始区反义锁核酸(LNA)片段在HepG2.2.15细胞内抗病毒效果及有效LNA序列筛选。

**方法:** 设计合成互补于HBV S基因mRNA翻译起始区同一位点的4条不同序列长度LNA片

## ■背景资料

近年来, 锁核酸(LNA)的出现给反义核酸技术带来了新的希望与机遇。LNA是新发现的一种在2'-O与4'-C发生缩水作用而形成带环状结构的核苷酸衍生物, 具有稳定性好、分子杂交能力强、抗核酸酶降解能力强、脂溶性好和低细胞毒性等特点, 因而具有广阔的研究与应用前景。

## ■同行评议者

李增山, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学病理教研室

## ■ 研发前沿

在反义核酸技术基础上发展起来的反基因技术,即三螺旋构象寡核苷酸技术(TFO)是目前研究的热点。日前亟待解决的问题是寻找一种满意的肝靶向性核酸药物载体以及特异性抗HBV药物。

段及无关对照序列,以阳离子脂质体介导,作用于HepG2.2.15细胞,采用ELISA法和FQ-PCR法分别监测24、48和72 h细胞培养上清液中HBsAg和HBV DNA的含量;MTT法检测LNA对细胞代谢的影响。

**结果:** 4条不同序列长度(10、15、20及25个碱基)的反义LNA对HBsAg的表达和HBV DNA的复制均有显著性抑制作用,72 h后的抑制率分别为46.58%、54.38%、72.43%、69.92%及27.09%、28.77%、34.71%、32.68%,且抑制率随时间呈增高趋势。LNA对细胞代谢无明显影响。

**结论:** 针对HBV S基因mRNA翻译起始区的反义LNA短序列体外能显著抑制HBV基因的表达,且抑制作用最强的序列长度应在15-25个碱基之间。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; 锁核酸; 2.2.15细胞; 基因治疗; 脂质体

邓益斌, 王燕菲. 针对HBV S基因mRNA反义锁核酸设计及其在2.2.15细胞内的抗病毒作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(34): 3497-3501

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3497.asp>

## 0 引言

慢性乙型肝炎是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染引起的一种死亡率较高的慢性传染性疾病,易发展为肝硬化和肝细胞癌,已成为一个全球性健康问题。全球约有3.5亿HBV携带者,而我国约有1.3亿,占全球患者的37.14%<sup>[1-5]</sup>。目前临床治疗药物主要是干扰素<sup>[6-9]</sup>和核苷类似物(如拉米夫定)<sup>[10-12]</sup>,干扰素的远期疗效不理想,而长期使用拉米夫定则易引起基因变异,导致耐药。因此,探索廉价、高效、不良反应小、稳定且专一性强的抗HBV新型药物具有重要的意义。反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)是近几年来研究较广泛的一种基因疗法,其抗HBV机制是通过导入外源寡核苷酸片段与细胞内特定的mRNA结合形成杂交分子,从而达到阻断特定基因表达的目的<sup>[13-15]</sup>。但是,由于反义寡核苷酸稳定性差、亲和力不强、抗核酸酶降解能力弱等因素,故一直未取得满意效果。锁核酸(locked nucleic acid, LNA),是新发现的一种带环状结构的核苷酸衍生物,因其核糖的2'-O和4'-C通过缩水作用形成氧亚甲基桥,形似锁状,故得名。LNA与

传统寡核苷酸相比,具有更高的热稳定性、更好的分子杂交能力和更强的抗核酸酶降解能力<sup>[16-24]</sup>,因而具有广阔的应用前景。S基因是HBV的关键基因,其编码产物是乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)的主要组成部分。封闭S基因的表达有可能影响病毒颗粒的装配和成熟,达到抑制HBV复制的作用。我们前期研究结果表明,反义LNA抗HBV基因复制与表达的能力比传统全硫代修饰的ASODN强<sup>[25-27]</sup>。为了进一步筛选出针对S基因靶位的最佳LNA片段,我们在前期研究的基础上,针对HBV S基因mRNA翻译起始区同一靶位设计合成4条不同序列长度的反义LNA片段,观察其在HepG2.2.15细胞内的抗病毒效果,旨在筛选出针对S基因靶位的最佳LNA序列。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HepG2.2.15细胞由中国人民解放军广州军区空军医院刘光泽博士惠赠,该细胞株为HBV DNA全基因转染肝癌细胞系HepG2,能稳定分泌HBsAg,本室常规培养于含G418(380 ITI1)、100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基中,37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下5-6 d传代1次;DMEM培养基、G418为Gibco产品;胎牛血清购自杭州四季青公司;Lipofectamine<sup>TM</sup>2000购自Invitrogen公司;HBsAg检测试剂盒为深圳丽珠生物技术有限公司产品;HBV DNA定量检测试剂盒为深圳匹基生物有限公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 反义LNA片段合成与修饰:** 根据国内外报道选择抑制作用较强、互补于HBV S基因翻译起始区同一位点为研究对象,分别合成以下几段锁核酸序列: (1)序列I: 互补HBV S基因区151-160 nt处,共10个碱基(5'-CcATgTTCaG-3',其中7个大写字母代表LNA,3个小写字母代表DNA); (2)序列II: 互补于HBV S基因区151-165 nt处,共15个碱基(5'-GtTcTccAtGtTcaG-3',其中7个大写字母代表LNA,8个小写字母代表DNA); (3)序列III: 互补于HBV S基因区151-170 nt处,共20个碱基(5'-GtGaTgTtCtccaTgtcaG-3',其中7个大写字母代表LNA,13个小写字母代表DNA); (4)序列IV: 互补于HBV S基因区151-175 nt处,共25个碱基(5'-CtgAtGtgaTgTtCtccaTgtcag-3',其中7个大写字母代表LNA,18个小写字母代表DNA); (5)与HBV S基因无关序列,共20个碱基

## ■创新盘点

锁核酸(LNA)是一种新兴环状核苷酸衍生物,具有分子杂交能力强、抗核酸酶降解能力等特性,本研究在前期工作基础上,进一步探讨了反义LNA片段的设计与筛选,为下一步的实验提供理论基础。

表 1 各LNA序列对HepG22.2.15细胞HBsAg表达的影响 ( $n = 6$ , P/N, mean  $\pm$  SD)

分组	0 h	24 h	48 h	72 h
空白对照	1.238 $\pm$ 0.025	1.241 $\pm$ 0.032	1.268 $\pm$ 0.026	1.270 $\pm$ 0.049
无关序列	1.248 $\pm$ 0.037	1.252 $\pm$ 0.027	1.265 $\pm$ 0.019	1.271 $\pm$ 0.023
序列 I	1.245 $\pm$ 0.041 <sup>d</sup>	0.928 $\pm$ 0.111 <sup>d</sup>	0.769 $\pm$ 0.155 <sup>d</sup>	0.665 $\pm$ 0.133 <sup>d</sup>
序列 II	1.245 $\pm$ 0.028 <sup>f</sup>	0.865 $\pm$ 0.031 <sup>f</sup>	0.675 $\pm$ 0.073 <sup>f</sup>	0.568 $\pm$ 0.602 <sup>f</sup>
序列 III	1.233 $\pm$ 0.033 <sup>h</sup>	0.762 $\pm$ 0.048 <sup>h</sup>	0.496 $\pm$ 0.045 <sup>h</sup>	0.340 $\pm$ 0.039 <sup>h</sup>
序列 IV	1.237 $\pm$ 0.032 <sup>i</sup>	0.792 $\pm$ 0.744 <sup>i</sup>	0.545 $\pm$ 0.054 <sup>i</sup>	0.372 $\pm$ 0.031 <sup>i</sup>

<sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 空白对照组与无关序列组; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 序列 I; <sup>h</sup> $P < 0.01$  vs 序列 II; <sup>i</sup> $P < 0.01$  vs 序列 III。

表 2 各LNA序列对HepG22.2.15细胞HBV DNA复制的影响 ( $n = 6$ ,  $\times 10^6$  copies/mL, mean  $\pm$  SD)

分组	0 h	24 h	48 h	72 h
空白对照	6.121 $\pm$ 0.425	6.137 $\pm$ 0.481	6.110 $\pm$ 0.527	6.108 $\pm$ 0.529
无关序列	6.108 $\pm$ 0.476	6.023 $\pm$ 0.584	6.183 $\pm$ 0.273	6.047 $\pm$ 0.706
序列 I	6.182 $\pm$ 0.602 <sup>d</sup>	5.708 $\pm$ 0.576 <sup>d</sup>	5.128 $\pm$ 0.527 <sup>d</sup>	4.507 $\pm$ 0.358 <sup>d</sup>
序列 II	6.201 $\pm$ 0.618 <sup>f</sup>	5.615 $\pm$ 0.452 <sup>f</sup>	4.793 $\pm$ 0.409 <sup>f</sup>	4.417 $\pm$ 0.388 <sup>f</sup>
序列 III	6.123 $\pm$ 0.405 <sup>h</sup>	5.373 $\pm$ 0.423 <sup>h</sup>	4.373 $\pm$ 0.369 <sup>h</sup>	3.987 $\pm$ 0.249 <sup>h</sup>
序列 IV	6.116 $\pm$ 0.501 <sup>i</sup>	5.475 $\pm$ 0.293 <sup>i</sup>	4.583 $\pm$ 0.324 <sup>i</sup>	4.117 $\pm$ 0.435 <sup>i</sup>

<sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 空白对照组与无关序列组; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 序列 I; <sup>h</sup> $P < 0.01$  vs 序列 II; <sup>i</sup> $P < 0.01$  vs 序列 III。

(5'-TtCaAgAtTgtgaGtgtgaC-3', 其中7个大写字母代表LNA, 13个小写字母代表DNA), 以上片段均由美国Genelink公司合成修饰并纯化。

**1.2.2 脂质体包裹反义LNA的制备:** 脂质体与反义LNA按1:10比例充分混匀(1  $\mu$ g反义LNA+10  $\mu$ L脂质体), 室温下静置1 h后, 此即为稳定的脂质体-LNA混合物。

**1.2.3 HepG22.2.15细胞培养与转染:** 将HepG22.2.15细胞按 $1 \times 10^5$ 细胞/mL接种于96孔培养板, 每孔100  $\mu$ L, 设定6个组(即序列 I 组、序列 II 组、序列 III 组、序列 IV 组、无关序列组和不加药的空白对照组), 每组各设6个复孔, 待细胞贴壁后吸取培养上清液(-20 $^{\circ}$ C保存), 分别在各组每孔中一次性加入含LNA量为10  $\mu$ mol/L的LNA-Lipo-DMEM混合液1 mL, 分别于24、48和72 h收集各孔培养上清液保存于-20 $^{\circ}$ C待测。

**1.2.4 培养上清液HBsAg含量测定:** 采用ELISA法, 每个样品重复3次, 取均值, 严格按试剂盒说明书操作。

**1.2.5 培养上清液HBV DNA含量测定:** 采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)法检测。取培养上清液50  $\mu$ L, 加等量体积DNA提取液, 充分混匀, 100 $^{\circ}$ C恒温处理10 min, 1200 r/min离心5 min, 取2  $\mu$ L上清于PCR反应管中并加入反应

液, 总体积共25  $\mu$ L, 各反应管放入荧光定量PCR仪, 扩增条件: 37 $^{\circ}$ C保温2 min, 94 $^{\circ}$ C预变性3 min, 94 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 共35个循环。由计算机软件自动分析所收集的荧光信号并计算出定量结果, 采用计算对数平均值的方法计算HBV DNA平均拷贝数。

**1.2.6 LNA对细胞的毒性检测:** 采用MTT比色法检测LNA对细胞代谢活性的影响。

**统计学处理** 所有数用mean $\pm$ SD表示, 应用SPSS12.0统计软件处理, 各组间均数比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。抑制率(%) = (用药前P/N-用药后P/N)/(用药前P/N-2.1)  $\times 100\%$ 。其中: P/N表示阳性孔A值/阴性孔A值。

## 2 结果

**2.1 LNA对HepG22.2.15细胞HBsAg表达的影响** LNA加入24 h后, HBsAg的分泌量即开始下降, 且下降率随时间呈增高趋势, 72 h后下降率最高可达72.43%。各组间比较均有显著性差异(均 $P < 0.01$ ), 与对照组比较, HBsAg的分泌量均明显下降(均 $P < 0.01$ ), 且在序列 II-IV组间(即15-25个碱基)下降最为明显(表1, 图1)。

**2.2 LNA对HepG22.2.15细胞HBV DNA复制的影**



### ■同行评价

本文将LNA应用于HBV的研究,并发现具有抑制mRNA翻译和DNA复制的功能,具有一定的实际应用价值和参考性。

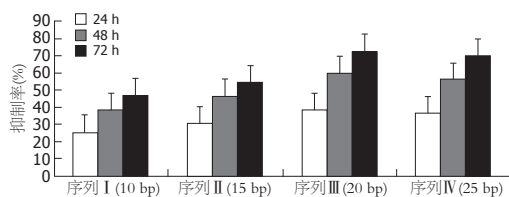


图1 不同时间内各序列LNA对HBsAg表达的抑制率(%)。

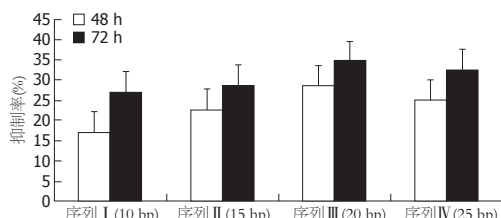


图2 不同时间内各序列LNA对HBV DNA复制的抑制率(%)。

响 LNA加入48 h后,对HBV DNA的复制开始出现抑制作用,且抑制率随时间呈增高趋势,72 h后抑制率最高可达34.71%。各组间比较均有显著性差异(均 $P<0.01$ ),与对照组比较,HBV DNA的拷贝数均下降明显(均 $P<0.01$ ),且在序列II-IV组间(即15-25个碱基)下降最为明显(表2,图2)。

**2.3 LNA-Lipo混合物对HepG22.15细胞活性的影响** 用药3 d后,采用MTT比色法测定各实验组的A值,序列I、II、III、IV的A值分别为 $1.173 \pm 0.049$ 、 $1.161 \pm 0.042$ 、 $1.156 \pm 0.042$ 、 $1.147 \pm 0.046$ ,与对照组(A值为 $1.203 \pm 0.043$ )比较均无差异性( $P>0.05$ ),表明实验范围内LNA对细胞基本无毒性。

### 3 讨论

自20世纪90年代初,Patil *et al*<sup>[13]</sup>首次报道利用反义核酸技术抗HBV的实验研究以来,反义核酸技术抗病毒研究已取得了很大的进展。但由于传统ASODN易被降解、杂交结合能力不强以及对机体存在不良反应等因素,其抗病毒感染的基因治疗一直未取得满意的效果。1994年,Rodriguez *et al*首次发现LNA,它是一种特殊的双环核酸衍生物,由核糖的2位氧与4位碳通过缩水作用形成氧亚甲基桥、硫亚甲基桥或胺亚甲基桥等,作为一种新型反义核酸,具有比传统ASODN更强的优势<sup>[16-24]</sup>:(1)更高的热稳定性;(2)更强的分子杂交能力;(3)更强的抗核酸酶降解能力;(4)更好的脂溶性,可自由穿入细胞膜;(5)对细胞的毒性较低。

HBV基因组至少有7个重要的基因靶位,其中,S基因是关键基因靶位之一<sup>[28-29]</sup>。S基因编码

产物是HBsAg的主要组成部分,不仅参与完整HBV Dane颗粒的装配,而且还组装成直径为22 nm的球形颗粒以及管型颗粒,大量存在于HBV携带者血液中,并随血液、唾液、精液、分泌物等在易感人群中传播。封闭S基因的表达有可能抑制HBsAg的分泌,从而干扰HBV Dane颗粒的装配和HBV颗粒的成熟,发挥抗HBV的作用。

研究表明,由阳离子脂质体介导的反义LNA,能有效进入肝细胞内,发挥抗HBV基因表达的作用,对HBsAg的抑制率最高可达72.43%,且随反义LNA作用时间的延长呈逐渐增高趋势。这比文献[30]报道的抑制作用时间要长,原因可能是反义LNA的亲合力及抗核酸降解能力均较传统ASODN强,这将为反义LNA用于抗HBV的基因治疗研究提供了参考价值。但其抑制率是否持续性增高,还有待于进一步的研究。我们的研究结果也表明,LNA抗HBV效果与LNA序列长度之间存在相关性,但并不随LNA序列长度无限增高,而是存在一个最适序列长度,约在15-25个碱基之间。

此外,反义LNA对HBV DNA的复制也有比较显著的抑制作用,原因可能是LNA的高亲和力、强抗核酸酶降解能力和良好的脂溶性,促使部分LNA通过核孔进入细胞核内,结合到与HBV S基因mRNA翻译起始位点相对应的基因组cccDNA的编码链上,形成三链杂交分子,从复制和转录水平发挥抑制作用,其作用机制还有待于进一步的研究。

总之,互补于S基因的反义LNA片段体外能显著抑制HBV的复制与表达,且抑制作用最强的序列长度在15-25个碱基之间,因此,LNA有望成为抗HBV基因治疗的新型分子药物,同时也为其他疾病的基因研究带来新的应用前景。

**致谢:** 研究过程中,得到中国人民解放军广州军区空军医院的刘光泽博士及广州医学院组织胚胎学教研室的马宁芳教授的帮助,在此深表感谢。

### 4 参考文献

- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol* 2003; 39 Suppl 1: S64-S69
- Fleming J. Current treatments for hepatitis. *J Infect Nurs* 2002; 25: 379-382
- elSaadany S, Tepper M, Mao Y, Semenciw R, Giulivi A. An epidemiologic study of hepatocellular carcinoma in Canada. *Can J Public Health* 2002; 93: 443-446
- Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, Beasley P, Patt YZ. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of

- alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2002; 36: 1206-1213
- 5 Kannangai R, Molmenti E, Arrazola L, Klein A, Choti M, Thomas DL, Torbenson M. Occult hepatitis B viral DNA in liver carcinomas from a region with a low prevalence of chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat* 2004; 11: 297-301
- 6 Hino O, Kajino K, Umeda T, Arakawa Y. Understanding the hypercarcinogenic state in chronic hepatitis: a clue to the prevention of human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2002; 37: 883-887
- 7 Buti M, Esteban R. Drugs in development for hepatitis B. *Drugs* 2005; 65: 1451-1460
- 8 Wai CT, Chu CJ, Hussain M, Lok AS. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 2002; 36: 1425-1430
- 9 Manns MP. Current state of interferon therapy in the treatment of chronic hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2002; 22 Suppl 1: 7-13
- 10 Liaw YF. Therapy of chronic hepatitis B: current challenges and opportunities. *J Viral Hepat* 2002; 9: 393-399
- 11 Wolters LM, Hansen BE, Niesters HG, de Man RA. Viral dynamics in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine, lamivudine-famciclovir or lamivudine-ganciclovir. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 1007-1011
- 12 Song JW, Zhang G, Lin JG, Tang WX, Lin JS. [Clinical study of lamivudine and interferon combinate administration to inhibit hepatitis B virus replication] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004; 12: 593-596
- 13 Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review. *AAPS J* 2005; 7: E61-E77
- 14 Gruegelsiepe H, Brandt O, Hartmann RK. Antisense inhibition of RNase P: mechanistic aspects and application to live bacteria. *J Biol Chem* 2006; 281: 30613-30620
- 15 Wo JE, Wu XL, Zhou LF, Yao HP, Chen LW, Dennin RH. Effective inhibition of expression of hepatitis B virus genes by DNazymes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3504-3507
- 16 Wengel J, Petersen M, Frieden M, Koch T. Chemistry of locked nucleic acids (LNA): Design, synthesis, and bio-physical properties. *Lett Pept Sci* 2003; 10: 237-253
- 17 Inohara H, Obika S, Imanishi T. 2',4'-BNA derivatives bearing an unnatural nucleobase: synthesis and application to triplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2004; 63-64
- 18 Braasch DA, Liu Y, Corey DR. Antisense inhibition of gene expression in cells by oligonucleotides incorporating locked nucleic acids: effect of mRNA target sequence and chimera design. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 5160-5167
- 19 Rapozzi V, Cogoi S, Xodo LE. Antisense locked nucleic acids efficiently suppress BCR/ABL and induce cell growth decline and apoptosis in leukemic cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1683-1692
- 20 Swayze EE, Siwkowski AM, Wancewicz EV, Migawa MT, Wyrzykiewicz TK, Hung G, Monia BP, Bennett CF. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 687-700
- 21 Elmén J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, Wahren B, Liang Z, Ørum H, Koch T, Wahlestedt C. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 439-447
- 22 Castoldi M, Schmidt S, Benes V, Noerholm M, Kulozik AE, Hentze MW, Muckenthaler MU. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* 2006; 12: 913-920
- 23 Vester B, Hansen LH, Lundberg LB, Babu BR, Sørensen MD, Wengel J, Douthwaite S. Locked nucleoside analogues expand the potential of DNazymes to cleave structured RNA targets. *BMC Mol Biol* 2006; 7: 19
- 24 Braasch DA, Corey DR. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol* 2001; 8: 1-7
- 25 唐盈, 王燕菲. 针对HBV S基因的反义锁核酸抗乙肝病毒表达的初探. *江西医药* 2006; 41: 205-208
- 26 邓益斌, 王燕菲. 阳离子脂质体介导双靶区反义锁核酸抗病毒疗效研究. *国际流行病学传染病学杂志* 2008; 35: 149-153
- 27 邓益斌, 农乐根, 王燕菲. HBVS基因的反义锁核酸对乙型肝炎转基因小鼠HBV复制和表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2338-2345
- 28 Funk A, Mhamdi M, Will H, Sirma H. Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 91-103
- 29 Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein acts as a tumor promoter in development of diethylnitrosamine-induced preneoplastic lesions. *J Virol* 2001; 75: 3851-3858
- 30 刘素侠, 孙汶生, 郭春, 张向红, 张艳, 姜昱竹. 互补于hTERT关键区段的反义RNA抑制肝癌细胞. *基础医学与临床* 2006; 26: 381-385

编辑 李军亮 电编 何基才