文章编号:1000-5404(2009)18-1715-05

论著

特异性脱氧核酶对小鼠呼吸道合胞病毒感染的抑制作用

周 娟,解元元,王莉佳,赵晓东,杨锡强 (重庆医科大学附属儿童医院肾脏免疫科,重庆 400014)

摘 要:目的 研究特异性抑制呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus,RSV)*N*基因的脱氧核酶DZ1133在小鼠体内对病毒复制和气道炎症的影响。**方法** RSV感染BALB/c小鼠滴鼻给予DZ1133及其变异体、反义寡核苷酸AS1133,空斑形成实验检测肺组织病毒滴度,RT-PCR检测病毒mRNA表达,支气管肺泡灌洗液白细胞计数,ELISA检测TNF-α、IL-12、IFN-γ和IL-10水平,肺组织病理学分析炎症情况。**结果** 0.2、0.4 mg和0.8 mg DZ1133治疗组小鼠肺组织病毒滴度分别为$(2.75\pm0.21)\times10^5$、$(1.86\pm0.20)\times10^5$ PFU/g和$(1.02\pm0.22)\times10^5$ PFU/g,与感染对照组小鼠$(7.94\pm0.42)\times10^5$ PFU/g比较明显下降($P<0.01$),上述各剂量治疗组小鼠肺组织病毒mRNA表达与感染对照组比较分别下降30.51%、47.38%($P<0.05$)和53.97%($P<0.01$)。0.4 mg DZ1133治疗降低RSV感染小鼠支气管肺泡灌洗液中白细胞总数,改善肺组织病理学损伤($P<0.05$),对TNF-α、IL-12、IFN-γ和IL-10水平无显著性影响($P>0.05$)。**结论** 特异性脱氧核酶DZ1133在小鼠体内有效抑制RSV复制、减轻气道炎症,是有效的抗RSV途径。

关键词: 呼吸道合胞病毒;脱氧核酶;基因治疗

中图法分类号: R373.1;R966;R978.7 **文献标识码:** A

Special deoxyribozyme suppresses respiratory syncytial virus infection to mice

ZHOU Juan, XIE Yuan-yuan, WANG Li-jia, ZHAO Xiao-dong, YANG Xi-qiang (Department of Kidneys and Immunology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of special deoxyribozyme DZ1133 targeting *N* gene of respiratory syncytial virus (RSV) on viral replication and airway inflammation in mice. **Methods** RSV infected BALB/c mice were nasally dripped with DZ1133, mutant DZ1133 and antisense oligonucleotide AS1133 respectively. Pulmonary viral titers were detected by plaque forming experiment. Pulmonary RSV *N* mRNA expression was assayed by RT-PCR. Leukocytes and the subgroup cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were counted, and the concentration of cytokines such as TNF-α, IL-12, IFN-γ and IL-10 in BALF were assayed by ELISA. Pulmonary histopathology was performed to observe the inflammation of airway. **Results** Pulmonary titers of 0.2, 0.4 and 0.8 mg DZ1133 treated mice were $(2.75\pm0.21)\times10^5$, $(1.86\pm0.20)\times10^5$ and $(1.02\pm0.22)\times10^5$ PFU/g respectively, which were significantly decreased as compared with those of infected control mice [$(7.94\pm0.42)\times10^5$ PFU/g, $P<0.01$]. Meanwhile the pulmonary viral mRNA of 0.2, 0.4 mg and 0.8 mg DZ1133 treated mice were inhibited by 30.51%, 47.38% ($P<0.05$) and 53.97% ($P<0.01$) respectively compared with infected control mice. The inhibitory effects of DZ1133 on viral titer and mRNA expression were much stronger than AS1133. The treatment of 0.4 mg mutant DZ1133 had no significant inhibitory effect on RSV. In 0.4 mg DZ1133 treated group, total number of leukocytes in BALF was decreased dramatically and pulmonary histology was significantly improved compared with infected control ($P<0.05$). But the treatment of 0.4 mg DZ1133 did not affect the productions of TNF-α, IL-12, IFN-γ and IL-10 in BALF of RSV

基金项目: 国家自然科学基金(30340045)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30340045)

作者简介: 周 娟,女,重庆市人,博士,主治医师,主要从事小儿感染与免疫性疾病方面的研究,发表论文11篇。电话:(023)63621847,E-mail:zhoujuan1112@yahoo.com.cn

通信作者: 杨锡强,电话:(023)63624479, E-mail: xqyang@163.com

收稿日期: 2008-12-15;**修回日期:** 2009-03-25

infected mice ($P>0.05$). **Conclusion** Special deoxyribozyme DZ1133 targeting RSV *N* gene effectively inhibits viral replication and reduces airway inflammation. DZ1133 is a potential therapeutic agent against RSV infection *in vivo*.

Key words: respiratory syncytial virus; deoxyribozyme; genetic therapy

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus,RSV)是全球婴幼儿下呼吸道感染首位病毒病原体,迄今尚无安全、有效、特异的疫苗或治疗药物。脱氧核酶(deoxyribozyme, DZ)是具有酶活性的DNA分子,特异性结合、切割底物RNA,发挥基因抑制作用,已应用于感染、肿瘤、心血管疾病等多个领域的研究中[1,2],是具有潜力的基因治疗途径。本研究自行设计脱氧核酶DZ1133在小鼠体内抗RSV感染以及对气道炎症的作用,为抗RSV感染开辟新兴治疗途径。

1 材料与方法

1.1 寡核苷酸

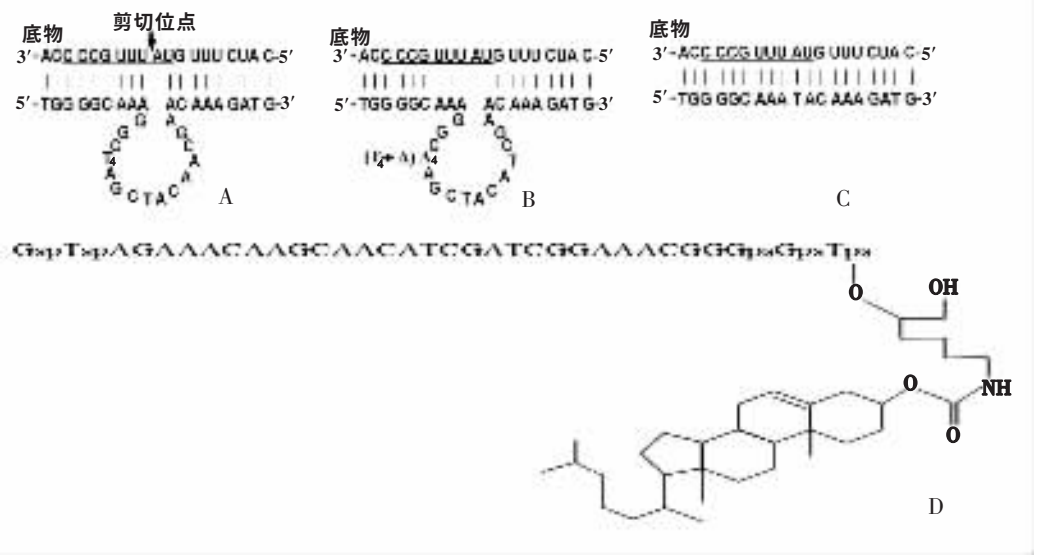
脱氧核酶DZ1133和反义寡核苷酸AS1133识别RSV N蛋白基因组1 124~1 142的保守序列,突变体mut DZ1133是DZ1133催化中心第4个核苷酸由T变为A的对照序列,上述寡核苷酸合成(采用ABI392 DNA/RNA合成仪)、HPLC纯化及其3′端胆固醇(购自美国Glen Research公司)连接和部分碱基硫代修饰(图1)均由中国军事医学科学院放射医学研究所完成。前期实验已证实DZ1133对RSV *N*基因具有体外切割效应[3]。

1.2 实验动物处理

无特殊病原菌SPF级8~12周龄雌性BALB/c小鼠80只(购自中国科学院上海实验动物中心),按SPF级要求饲养于本校实验动物中心,在本院P2实验室(生物安全2级)进行病毒学实验。采用随机数字表法抽样分成10组,每组8只,麻醉后鼻腔缓慢滴入10^6 PFU/50 μl RSV A2标准株病毒(购自中国预防医学科学院病毒研究所)建立RSV感染模型[4]。感染后24、48 h分别滴鼻给予0.2~0.8 mg DZ1133或AS1133、0.4 mg mut DZ1133,寡核苷酸溶于50 μl PBS中,剂量和时间参考DZ1133体外实验和小鼠体内药代动力学研究[3,5]。经鼻滴入荧光标记DZ1133在小鼠肺组织分布良好。感染对照组在感染后24、48 h分别经鼻滴入50 μl PBS。未感染RSV,给予2次0.4 mg DZ1133滴鼻的小鼠为阴性对照组;未感染RSV,给予2次50 μl PBS滴鼻的小鼠为空白对照组。

1.3 肺组织病毒负荷检测

感染后72 h,小鼠肺组织RSV复制高峰时[4],处死小鼠,无菌条件下取右肺称质量,按10 ml/g加入预冷肺组织平衡液(0.218 mol/L蔗糖,4.8 mmol/L谷氨酰胺,30 mmol/L $MgCl_2$,25 mmol/L Hepes,200 U/ml青霉素,200 μg/ml链霉素的磷酸盐缓冲液,pH=7.4,过滤除菌)匀浆,4 ℃,2 500×*g*离心10 min收集上清。接种10^{-2}稀释的上清液100 μl至单层致密无孔Vero细胞,设复孔,病毒吸附2 h后覆盖含1.5%的琼脂糖凝胶和2% FBS的1640培养基,培养5 d,5 mg/ml MTT显色,计数空斑,计算病毒滴度。



A:DZ1133及底物序列;B:mut DZ1133及底物序列;C:AS1133及底物序列;D:胆固醇连接和部分碱基硫代修饰的DZ1133结构 下划线:脱氧核酶作用底物剪切序列

图1 DZ1133、AS1133和mut DZ1133结构示意图

1.4　RT-PCR 检测

感染 72 h 处死小鼠,取左肺组织加液氮磨成粉末,加入 1 ml Trizol(Gibco BRL 公司)提取总 RNA,4 μl 总 RNA 用 M-MLV逆转录酶(Promega 公司)按说明生成 cDNA。PCR 反应为 cDNA 2 μl、5 × PCR Buffer 5 μl、Hot Start *Taq* DNA 聚合酶 2 U(TaKaRa 公司),上游引物和下游引物各 1 μmol/L,补水至 25 μl。扩增条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃ 变性 40 s,退火 40 s,72 ℃ 延伸 40 s。RSV *N* 基因引物上游:5′-CTGGTCTTACAGCCGTGAT-3′,下游:5′-CCAGCAGCATTGCCTAATAC-3′,产物 460 bp,退火温度 42 ℃,共 40 个循环,72 ℃延伸 7 min。内参 β-actin 引物上游:5′-ACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATC-3′,下游:5′-GTAGCCACGCTCGGTCAGGATCTTCAT-3′,产物 366 bp,退火温度 60 ℃,共 25 个循环,72 ℃延伸 7 min。取 5 μl 反应产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,分析条带平均光密度,在产物光密度标准曲线线性范围内,计算 *N* 基因相对表达强度。

1.5　支气管肺泡灌洗液白细胞计数

RSV 感染后 72 h 处死小鼠,气管插管,用预冷生理盐水 0.5 ml 灌洗 2 次,收集支气管肺泡灌洗液(BALF),血球计数仪计数白细胞总数。4 ℃,1 000 × *g* 离心 10 min,取细胞沉渣涂片,Wright 染色,显微镜下计数 200 个白细胞,按中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞形态学特点分类计数。

1.6　ELISA 检测细胞因子

小鼠 ELISA 试剂盒测定 BALF 上清 TNF-α(Diaclone 公司,Cat. No 860.040)、IFN-γ(Diaclone 公司,Cat. No 860.050)、IL-12(Biosource 公司,Cat. No KMC0121)、IL-10(Biosource 公司,Cat. No KMC0101)。操作均按各试剂盒说明书进行,450 nm 波长测吸光度 *D*(450)值,以标准品浓度建立标准曲线,计算样品细胞因子浓度。

1.7　肺组织病理学检查

RSV 感染后 6 d 处死小鼠,取未经支气管肺泡灌洗的小鼠肺组织,4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,苏木精 - 伊红(HE)染色,光镜观察形态结构。每只小鼠取 3 张切片,每张切片随机取 3 个视野,参照 Cimolai 的病理评分系统分析[6]。

1.8　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件统计行多组间比较 *q* 检验和 *q*′检验方差分析。

2　结果

2.1　脱氧核酶对 RSV 感染小鼠肺组织病毒负荷的影响

空斑形成实验分析小鼠肺组织病毒滴度,与感染对照组比较,0.2、0.4、0.8 mg DZ1133 治疗组肺组织病毒滴度水平都下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。DZ1133 对肺组织病毒滴度的抑制作用随剂量增加而逐渐增强,在相同剂量时 DZ1133 的抑制作用明显比 AS1133 强。0.4 mg mut DZ1133 对 RSV 感染小鼠肺组织病毒滴度的抑制作用比 0.4 mg DZ1133 和 0.4 mg AS1133 都弱(表 1)。

表 1　不同剂量 DZ1133、AS1133 和 mut DZ1133 对 RSV 感染小鼠肺组织病毒滴度的影响($\times 10^5$ PFU/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	*n*	0.2 mg	0.4 mg	0.8 mg
DZ1133 治疗组	8	2.75 ± 0.21^{b}	1.86 ± 0.20^{b}	1.02 ± 0.22^{b}
AS1133 治疗组	8	5.13 ± 0.21^{ac}	4.37 ± 0.32^{bc}	3.63 ± 0.20^{bc}
mut DZ1133 治疗组	8	–	6.92 ± 0.33^{ac}	–

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$,与感染对照组[$(7.94 \pm 0.42) \times 10^5$ PFU/g]比较; c: $P < 0.05$,与 DZ1133 治疗组比较

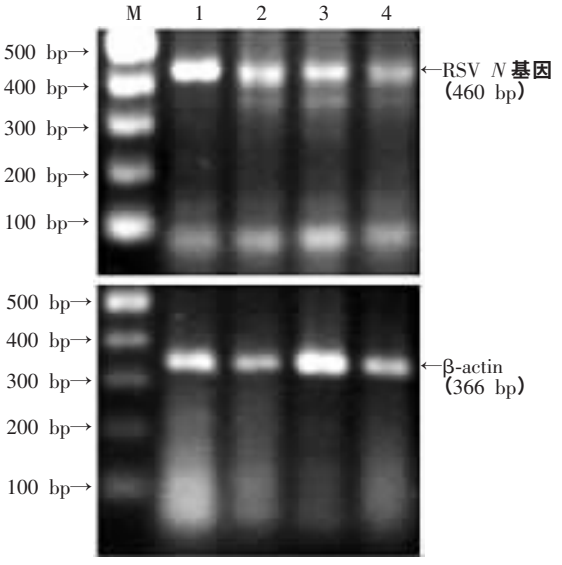
2.2　脱氧核酶对 RSV 感染小鼠肺组织病毒 mRNA 表达的影响

RT-PCR 检测小鼠肺组织 RSV *N* mRNA 表达情况,用 *N*/β-actin相对表达强度表示。0.2、0.4 mg 和 0.8 mg DZ1133 治疗组小鼠肺组织病毒 *N* 基因表达与感染对照组小鼠比较分别降低 30.51%、47.38% 和 53.97%,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。在相同剂量时 DZ1133 对 RSV 感染小鼠肺组织 *N* mRNA表达的抑制作用明显比 AS1133 强。0.4 mg mut DZ1133 治疗组小鼠肺组织 *N* 基因表达与感染对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2、图 2。

表 2　不同剂量 DZ1133、AS1133 和 mut DZ1133 对 RSV 感染小鼠肺组织病毒 *N* mRNA 表达的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	*n*	0.2 mg	0.4 mg	0.8 mg
DZ1133 治疗组	8	43.66 ± 10.23^{a}	33.06 ± 8.74^{a}	28.92 ± 9.24^{b}
AS1133 治疗组	8	50.07 ± 7.48^{ac}	43.58 ± 9.08^{ac}	38.81 ± 8.89^{ac}
mut DZ1133 治疗组	8	–	57.68 ± 10.34^{c}	–

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$,与感染对照组[(62.83 ± 9.12)%]比较; c: $P < 0.05$,与 DZ1133 治疗组比较



M:DNA 标准;1:感染对照组;2:0.4 mg mut DZ1133 治疗组;3:0.4 mg DZ1133 治疗组;4:0.4 mg AS1133 治疗组

图 2　RSV 感染小鼠在 0.4 mg DZ1133、AS1133 和 mut DZ1133 治疗后肺组织病毒 *N* mRNA 表达

2.3 脱氧核酶对小鼠支气管肺泡灌洗液细胞计数的影响

RSV 感染对照组与空白对照组比较 BALF 白细胞总数明显升高($P<0.01$),白细胞分类以淋巴细胞为主,而空白对照组是以单核细胞为主。0.4 mg DZ1133 治疗组小鼠 BALF 白细胞总数与感染对照组小鼠比较明显下降($P<0.05$),但白细胞各分类比例无显著变化,仍是以淋巴细胞占优势,提示 DZ1133 能降低 RSV 感染小鼠 BALF 中炎症细胞数,但不改变炎症细胞的类型。另一方面,单纯给予 0.4 mg DZ1133 滴鼻的阴性对照组小鼠与 PBS 滴鼻的空白对照组小鼠比较,BALF 白细胞总数和分类差异都无统计学意义($P>0.05$),提示 DZ1133 本身不诱导明显的气道炎症(表3)。

表3 DZ1133 对小鼠 BALF 中白细胞分类计数的影响

(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	淋巴细胞	单核细胞	中性细胞	嗜酸性细胞
空白对照组	8	21.65±4.26	58.72±8.46	18.74±6.33	0.89±0.46
阴性对照组	8	19.11±5.74	65.79±11.03	14.05±5.89	1.05±0.51
DZ1133 治疗组	8	68.43±10.61[a]	20.17±8.32[a]	8.76±3.67	2.64±1.41
感染对照组	8	77.51±28.23[a]	13.56±9.02[a]	7.56±3.89	1.37±0.98

a: $P<0.01$,与空白对照组比较

2.4 脱氧核酶对小鼠支气管肺泡灌洗液细胞因子的影响

RSV 感染对照组与空白对照组比较,BALF 中 TNF-α、IL-12、IFN-γ 和 IL-10 都明显增高($P<0.05$, $P<0.01$)。DZ1133 治疗组上述细胞因子水平与感染对照组比较,差异没有统计学意义($P>0.05$)。阴性对照组与空白对照组比较,BALF 中 TNF-α、IL-12、IFN-γ 和 IL-10 水平差异没有统计学意义($P>0.05$),提示 DZ1133 滴鼻对小鼠气道局部细胞因子的分泌无明显影响(表4)。

表4 DZ1133 对小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子的影响

(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	TNF-α	IL-12	IFN-γ	IL-10
DZ1133 治疗组	8	25.71±8.83[a]	64.48±11.23[a]	47.48±13.04[a]	70.59±6.49[a]
感染对照组	8	24.24±9.54[a]	68.21±7.42[a]	51.42±11.56[b]	77.56±9.01[a]
阴性对照组	8	22.33±6.78	55.64±19.67	38.60±4.98	62.38±9.78
空白对照组	8	12.09±5.27	52.46±10.06	29.49±4.16	60.87±8.69

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与空白对照组比较

2.5 脱氧核酶对小鼠肺组织病理学影响

空白对照组小鼠肺组织结构清晰,肺泡壁薄而完整,没有炎症细胞浸润,组织学评分(0.71±0.15)。感染对照组小鼠肺组织炎症明显,大量淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞浸润,肺泡壁充血、水肿、增厚甚至断裂,病理学评分(14.23±2.37)。0.4 mg DZ1133 治疗组小鼠肺组织细支气管和血管周围浸润的炎症细胞数量减少,肺泡隔的肿胀和增厚减轻,评分(7.49±1.92),与感染对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。阴性对照组小鼠肺组织学评分(0.63±0.11),与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。说明 DZ1133 滴鼻能改善 RSV 感染小鼠肺组织炎症病理改变,且本身不引起小鼠肺组织明显的病理学改变。

3 讨论

脱氧核酶是对 RNA 分子有裂解作用的寡核苷酸序列,按碱基互补配对原则与底物 RNA 特异性结合,使 RNA 剪切位点 2′羟基去质子化,亲核性攻击临近的磷酸基团,通过酯化反应使底物 RNA 分子裂解[7]。脱氧核酶特异性高、稳定性好、相对分子质量小,容易合成,活性中心序列短小而灵活,反应条件易于控制,自发现以来,受到普遍关注,用于抑制多种基因的表达,亦有体内研究的相关报道[2]。我们在前期研究中,针对 RSV 基因组 RNA 或 mRNA 设计了一系列脱氧核酶,其中 DZ1133 在体外无细胞系统和 RSV 细胞感染模型中证实具有特异性抗 RSV 作用[3]。本实验研究 DZ1133 在小鼠体内抗 RSV 感染,以及对感染引起气道炎症反应的作用。

靶点设计是基因治疗的关键,DZ1133 靶点 RSV *N* 基因编码核衣壳 N 蛋白参与构成病毒多聚酶复合体,对 RSV 转录、复制发挥重要作用;*N* 基因与基质蛋白 M 协同作用,完成病毒组装;*N* 基因结合在基因组 RNA 上,保护其不受核酸酶降解。DZ1133 通过对 *N* 基因剪切作用,降低 N 蛋白表达,干扰 RSV 生活周期多个环节,起到抗病毒作用。本研究发现 DZ1133 能明显抑制 RSV 感染小鼠肺组织病毒滴度、病毒 mRNA 表达,抑制作用随剂量加大而增强。

脱氧核酶在体内有效发挥基因抑制作用必须具备足够的稳定性和细胞导入效率。我们用硫代修饰 DZ1133 来抵抗核酸酶降解,提高其稳定性。但硫代修饰的同时可能降低脱氧核酶剪切活性和与靶 RNA 的亲和力[8],因此我们只对 DZ1133 两端的 2~3 个磷酸进行硫代修饰,提高稳定性,同时尽量降低毒副作用,保持生物学活性。DZ1133 的 3′端连接胆固醇,增强脂溶性和细胞导入效率,抵抗外切酶对脱氧核酶从 3′端开始的降解,增强脱氧核酶稳定性,提高治疗效能。

BALB/c 小鼠感染 RSV 后肺组织病毒滴度高峰是 72 h[4],感染后 24 h 和 48 h 2 次给予 DZ1133 治疗,能早期抑制病毒复制。对 DZ1133 滴鼻的药代动力学研究发现,肺部的药物浓度 6 h 达高峰,占所给药物 15.59%,以后缓慢下降,24 h 仅有 4.9% 药物存留肺部[5],因此

首次给药后 24 h,再给 1 次相同剂量 DZ1133 加强,维持气道有效药物浓度。滴鼻给予脱氧核酶具有如下优势:首先,脱氧核酶相对分子质量小,经鼻腔滴入能到达小气道,不经过肝脏代谢,生物利用度高;其次,气道上皮和黏膜细胞生长代谢旺盛,摄取核苷酸能力强,气道局部药物浓度高;再次,肺泡表面活性物质的主要成分卵磷脂在肺泡局部 pH 值下有阳离子脂质体特性,有利于脱氧核酶导入细胞;最后,气道给药在局部靶器官直接发挥作用,减少给药剂量和全身毒副作用,滴鼻后不同时间脱氧核酶肺部浓度远远高于肝、脾、肾等其他脏器和血液中的浓度[9]。

近年来反义寡核苷酸、核酶、脱氧核酶和 RNA 干扰等特异性基因沉默技术迅猛发展。脱氧核酶比核酶和 RNA 干扰等 RNA 分子更稳定,本身具有酶活性,不需要像反义寡核苷酸、核酶和 RNA 干扰那样依赖细胞内酶作用。目前已有抗 RSV 反义寡核苷酸体内外研究的报道[10,11]。我们比较研究作用于 RSV 相同靶位点的脱氧核酶 DZ1133 和反义寡核苷酸 AS1133 在小鼠体内抗病毒活性,结果发现在相同剂量下 DZ1133 抑制病毒复制和 mRNA 表达的作用明显强于 AS1133,说明脱氧核酶的基因抑制作用主要是酶切割活性,而不只是与底物 RNA 结合的基因封闭作用。脱氧核酶 15 nt 酶环中第 1 ~6 位以及第 13、14 位核苷酸直接参与催化中心形成,特别是 G1、G2、T4、G6 和 G14 是高度保守的位点,任何改变都会明显影响脱氧核酶活性[12]。mut DZ1133 是 DZ1133 酶环第 4 位的 T4 替换成 A4 的突变体,丧失了酶环剪切活性,它抑制 RSV 感染小鼠肺组织病毒滴度和 mRNA 表达的作用明显低于 DZ1133,甚至比 AS1133 更弱,可能是 15 nt 酶环的空间位阻作用,影响 mut DZ 和底物 RNA 靠近和结合。

RSV 感染的炎症反应与免疫失衡是致病的重要因素,也是治疗的目标。DZ1133 能减轻 RSV 感染小鼠肺组织病理改变,降低 BALF 中白细胞总数,但对 BALF 白细胞分类以及 TNF-α、IL-12、IFN-γ 和 IL-10 水平没有明显作用。DZ1133 抑制 RSV 复制,减轻感染后气道局部炎症反应强度,但不改变炎症反应类型以及细胞因子分泌失衡。RSV 感染早期免疫细胞就被激活,持续产生细胞因子,即使病毒复制被脱氧核酶抑制,这些免疫功能紊乱也不会被逆转,有效抗 RSV 感染需要联合抗病毒治疗和抗炎治疗。单纯给予 DZ1133 滴鼻的阴性对照小鼠与空白对照比较,肺组织学改变、BALF 白细胞计数和细胞因子水平都没有显著差别,说明滴鼻给予脱氧核酶的安全性。

综上所述,通过滴鼻给予 RSV 感染小鼠脱氧核酶 DZ1133,能有效抑制肺组织病毒复制和基因表达,减轻气道炎症反应,其抗病毒活性强于反义寡核苷酸 AS1133,是具有潜力的 RSV 感染基因治疗途径。

参考文献:

[1] Trepanier J, Tanner J E, Momparler R L, *et al*. Cleavage of intracellular hepatitis C RNA in the virus core protein coding region by deoxyribozymes [J]. J Viral Hepat,2006,13(2):131 -138.

[2] Hurtado A, Podinin H, Oudega M, *et al*. Deoxyribozyme-mediated knockdown of xylosyltransferase-1 mRNA promotes axon growth in the adult rat spinal cord[J]. Brain, 2008, 131(Pt 10): 2596 -2605.

[3] Xie Y Y, Zhao X D, Jiang L P, *et al*. Inhibition of respiratory syncytial virus in cultured cells by nucleocapsid gene targeted deoxyribozyme (DNAzyme) [J]. Antiviral Res, 2006, 71(1): 31 -41.

[4] Zhou J, Cui Y X, Yang X Q, *et al*. Respiratory syncytial virus infection in immunocompetent and immunocompromised murine[J]. J Microbiol Immunol, 2006, 4(1): 49 -57.

[5] 何　云, 魏钰书, 杨锡强. 抗 RSV 脱氧核酶经鼻内给药后在小鼠体内脏器生物分布研究[J]. 川北医学院学报, 2006,21(1): 1 -3.

[6] Cimolai N, Taylor G P, Mah D, *et al*. Definition and application of a histopathological scoring scheme for an animal model of acute Mycoplasma pneumoniae pulmonary infection[J]. Microbiol Immunol, 1992, 36(5): 465 -478.

[7] Breaker R R, Emilsson G M, Lazarev D, *et al*. A common speed limit for RNA-cleaving ribozymes and deoxyribozymes[J]. RNA, 2003, 9(8): 949 -957.

[8] Schubert S, Kurreck J. Ribozyme- and deoxyribozyme-strategies for medical applications[J]. Curr Drug Targets, 2004, 5(8): 667 -681.

[9] Bitko V, Barik S. Intranasal antisense therapy: preclinical models with a clinical future? [J]. Curr Opin Mol Ther, 2007, 9(2): 119 -125.

[10] Leaman D W, Longano F J, Okicki J R, *et al*. Targeted therapy of respiratory syncytial virus in African green monkeys by intranasally administered 2-5A antisense[J]. Virology, 2002, 292(1): 70 -77.

[11] 周　娟, 崔玉霞, 杨锡强, 等. 特异性反义寡核苷酸抗小鼠呼吸道合胞病毒感染的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(2): 112 -116.

[12] Zaborowska Z, Furste J P, Erdmann V A, *et al*. Sequence requirements in the catalytic core of the "10-23" DNA enzyme[J]. J Biol Chem, 2002, 277(43): 40617 -40622.

(编辑　龙　亮)