维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)03－0264－03

反义硫代修饰寡核苷酸体外抗呼吸道合胞病毒感染的研究

俞海国，廉国利，杨锡强，赵晓东，赵长安

(重庆医科大学儿科学院免疫研究室，重庆 400014)

【摘 要】目的：在感染呼吸道合胞病毒(RSV)的 9HTE 细胞中观察与 RSVNS1 基因和 M2 基因互补的反义硫代寡核苷酸的抗病毒活性。方法：直接观察 RSV 的致细胞病变作用，用 MTT 方法测定细胞存活率。结果：1. RSV 感染复数(moi)在 0.1 以上时，培养 5 天后 RSV 感染的 9HTE 细胞全部死亡。2. 我们设计的反义核酸能够提高感染细胞的存活率，且呈量效依赖关系。结论：反义硫代寡核苷酸具有较明显的抗病毒活性，为进一步研究新型抗 RSV 药物奠定了基础。

【关键词】呼吸道合胞病毒；反义核酸；人气道上皮细胞

【中国图书分类法分类号】R978.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－09－17

Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide resistance to respiratory syncytial virus infection in vitro

YU Haiguo, et al

(*Division of Immunology, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate the antiviral effects of antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide (AODN) in 9HTE infected with respiratory syncytial virus (RSV) in vitro. Methods: In this study, the antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide which complemented to genomic NS1 and M2mRNA of RSV was used to investigate antiviral activity in vitro. The cytopathic effect was observed and the cell survival rates were measured by MTT assay. *Results*: 1. 9HTE cell infected with RSV almost all died when the multiplicity of infection(moi) is above 0.1 after 5 days cell culture. 2 The antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide could increase the cell survival rates in a dose dependent manner. *Conclution*: These studies indicate that the genomic NS1 gene and M2mRNA may play an important role in regulating RSV replication and AODN may have inhibitory activity on RSV replication. The results established the basis for further study on new drugs against RSV infection.

【Key words】 Respiratory syncytial virus; Antisense oligodeoxynucleotide ; 9HTE cell

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是婴幼儿和免疫力低下成年人下呼吸道感染的主要病原体之一，几乎所有 2 岁以下的小儿均有过 RSV 感染[1]。年幼患者可诱发哮喘，症状严重的患儿甚至导致死亡。迄今为止，对 RSV 感染尚缺乏有效的抗病毒治疗药物。反义核酸技术是利用人工或生物合成的寡聚脱氧核苷酸，特异的阻断、封闭基因的复制转录和翻译，达到基因控制的目的。在国外反义核酸对一些疾病的治疗已经进入了临床实验阶段[2,3]。本研究针对 RSV 基因组 RNA NS1 以及 M2mRNA 设计、合成了硫代寡聚核苷酸(AODN)，用脂质体转染的方法将其导入细胞，在体外观察其对 RSV 感染的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 病毒及细胞培养

呼吸道合胞病毒 A2 标准株购自中国预防科学院病毒研究所，用绿猴肾细胞(vero)繁殖传代，经空斑实验计算病毒滴度为 2.4×10^9。人气道上皮细胞(9HTE)购于美国 ATCC，用含 10% 胎牛血清的 RMPI－1640 进行细胞培养。

1.2 反义核酸

由上海生工合成针对基因组 RNA RNAn \ NS1 和

作者介绍：俞海国(1973－)，男，住院医师，博士研究生，主要研究方向：儿童临床免疫。

基金项目：国家自然科学基金项目(30070331)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

M2mRNA 的反义核酸，并做全硫代修饰，基因组 NS1 AODN 序列为：5′ - ATGGGGCAAATAAATCAATTCA - 3′，M2mRNA AODN 序列为：5′ - TTCTTGTGTGATATAAAG TTAGT - 3′。

1.3 细胞病变效应观察

接种 9HTE 细胞 1×10^4 于 96 孔细胞培养板内，待对数生长期时在每孔中加入不同感染量 RSV，分别为 0.001，0.01，0.1，1，10。感染吸附 2h 后弃去病毒液，用 PBS 清洗各培养孔，然后加入含 2% 胎牛血清的病毒维持液，培养 5d 后观察结果，以加减号表示病变程度。

1.4 反义核酸抗病毒效应检测

每孔细胞感染吸附病毒量 0.01moi，吸附 2h，将脂质体 (DOSPER，ROCHE) 与不同浓度的 AODN 用 RMPI - 1640 按比例混合后分别加入 96 孔培养板内，培养 12h 后再重复 1 次，于培养 5d 后用四唑盐 (MTT) 比色法计算细胞存活率：

$$细胞存活率(\%)=\frac{实验组\ A\ 组-空白组\ A\ 值}{正常组\ A\ 值-空白组\ A\ 值}\times100\%$$

1.5 统计学处理

均数用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 统计软件进行方差分析，检验水准 $a=0.05$。

2 结　果

2.1 病毒至细胞病变效应观察

分别用 5 种不同感染复数的呼吸道合胞病毒感染 9HTE 细胞，培养 5 天后，细胞存活情况见表 1：

表 1　不同感染复数 RSV 感染 9HTE 5 天后细胞情况

病毒感染量(moi)	活细胞数
0.001	+ + + ~ + + + +
0.01	+ ~ + +
0.1	+
1.0	-
10	-
0	+

由表 1 可以看出，当感染量为 0.001moi，大部分 9HTE 细胞能够存活，而病毒感染量在 0.1moi 以上时，培养 5d 后细胞全部死亡。

2.2 反义核酸对呼吸道合胞病毒的抑制作用

用脂质体转染方法将两种不同浓度的 AODN 导入 RSV 感染的 9HTE 细胞内，培养 5d 后用 MTT 法检测细胞存活率，结果见表 2：

由表 2 可见，设计的针对基因组 RNA NS1 和 M2mRNA 的 AODN 对 RSV 均有明显的抑制作用 ($P<0.05$)，随着 AODN 浓度的增加其抗病毒效应愈加明显。

表 2　不同浓度 AODN 对细胞存活率的影响

反义核酸	存活率(%)	
(μ mol/L)	AODN1	AODN2
15	74.94 ± 11.65*	71.95 ± 10.35*
10	65.20 ± 12.48*	59.61 ± 7.99*
5	39.90 ± 9.15*	39.77 ± 2.55*
1	32.86 ± 5.73	31.52 ± 4.84
0	31.03 ± 2.58	
F	24.12	39.99
P	0.00	0.00

注：AODN1 表示针对 M2mRNA 的反义核酸，AODN2 表示针对 NS1 基因的反义核酸，与对照组比较* $P<0.05$。

3 讨　论

呼吸道合胞病毒感染是儿童尤其是婴幼儿住院的最主要原因之一，严重危害儿童的生命健康。目前 RSV 的治疗主要依靠病毒唑 (ribavirin)，但不能明显的降低病死率和缩短住院日程，因此寻求一种安全有效的抗病毒药物有重要意义。

反义核酸进行抗病毒治疗是近年来研究的热点，它可以通过对基因的复制、转录和翻译过程阻断而进行基因控制或基因灭活，其作用机理可归纳为以下几点[4]：1. 通过碱基互补与相应的 mRNA 结合形成二聚体结构，并激活细胞内 RnaseH 酶，降解靶基因。2. 与 mRNA 结合后可阻止 mRNA 从胞核进入胞浆，抑制核糖体大亚基与 mRNA 的结合，抑制翻译过程。3. 与基因组 DNA 或 RNA 结合形成二聚体结构，通过空间位阻效应抑制复制酶与模板的结合，使复制不能进行。

众多的基因治疗实验研究表明，转染效率的高低是影响基因治疗效果的主要因素之一，所选用的给药途径和基因载体直接影响基因治疗效果。脂质体是由脂质双分子层包裹的小囊，内含水相空间，被脂质体包裹的外源 DNA 分子与靶细胞发生融合并转入细胞内。与其他脂质体相比，阳离子脂质体细胞毒性小，可减少容酶体酶的作用，提高转染效率。在本实验中我们采用阳离子脂质体 DOSPER 作为 AODN 的转运载体，观察 AODN 的抗 RSV 效应。

国外对 RSV 的研究较为深入，反义核酸抗 RSV 感染的研究已有报道[5]，而国内这方面的研究尚未见报道。呼吸道合胞病毒是一副链 RNA 病毒，其基因组可编码 10 种蛋白，其中 NS1 蛋白和 M2 蛋白对于病毒自身的复制和转录起着重要作

维普资讯 http://www.cqvip.com

用,在本实验中我们针对 RSV 基因组 RNA NS1 基因和 M2mRNA 设计了两种 AODN,用脂质体转染的方法将其导入细胞内,观察特异 AODN 抗 RSV 效应。首先以不同感染复数的 RSV 感染 9HTE 细胞,发现当 moi 在 0.1 以上时,细胞培养 5 天后大部分死亡,而感染复数为 0.01 时,细胞病变范围在 50%～75% 左右。在同一感染量(moi = 0.01)的 RSV 感染细胞后,分别加入两种反义核酸,浓度分别为 1μmol/L,5μmol/L,10μmol/L,15μmol/L,结果发现随着 AODN 浓度的增加,细胞存活率也逐渐增高,在 AODN 浓度为 15μmol/L 时显示出较强的抗病毒作用,细胞存活率分别为 74.94% 和 71.95%。

在研究中对 AODN 进行全硫代修饰,将寡核苷酸内极性的磷酸二脂键用硫原子修饰,转变为中性的磷酸二脂键,与天然的寡核苷酸相比具有更强的抗核酸酶水解和激活 Rnase H 的作用,是目前最为理想的反义核酸骨架修饰手段之一[6]。

本研究结果表明设计合成的两种 AODN 均显示出较强的抗 RSV 效应,同时也佐证了呼吸道合胞病毒的 NS1 基因和 M2 基因在病毒复制过程中具有重要作用。

参 考 文 献

[1] Shay DK, Holman RC, Newman RD, et al. Bronchiolitis-associated hospitalization among US children [J]. JAMA, 1999; 282(15): 1440-1443.

[2] Saghir A, Sudhir A. In vivo studies with antisence oligonucleotides [J]. Trends Pharmacol Sci, 1997; 18: 12-18.

[3] Nichols WG, Boeckh M. Recent advance in the therapy and prevention of CMV infection[J]. J Clin Virol, 2000; 16: 25-40.

[4] Oberbauer R. Not nonsence but antisence - application of antisence nucleotides in different fields of medicine [J]. Wein Klin Wochenschr, 1997; 109(2): 40-46.

[5] Player MR, Barnard DL, Torrence PF. Potent inhibition of respiratory syncytial virus replication using a 2-5A-antisence chimera targeted to signals within the virus genomic RNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998; 95(15): 8874-8879.

[6] 储 淳,罗天学. 反义核酸的骨架修饰及其应用[J]. 国外医学分子生物学分册, 2000; 22(2): 115-120.

(上接第 263 页)

Vaccine, 2001; 19(15-16): 2181-2189.

[3] Chow YH, Chiang BL, Lee YL, et al. Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes [J] J Immunol, 1998; 160(3): 1320-1329.

[4] Haddad D, Ramprakash J, Sedegah M, et al. Plasmid vaccine expressing granulocyte macrophage-colony stimulating factor attracts infiltrates including immature dendritic cells into injected muscles [J]. J Immunol, 2000; 164: 3102-3111.

[5] Myordomo JI, Zorina WJ, Storkus L, et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumor immunity [J] Nat Med, 1995; 1: 1297.

[6] Rakhmilevich AL, Imboden M, Hao Z, et al. Effective particle-mediated vaccination against mouse melanoma by coadministration of plasmid DNA encoding Gp100 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor [J]. Clin Cancer Res, 2001; 7(4): 952-961.

[7] 成 军,杨守纯. 现化肝炎病毒分子生物学[M],北京:人民军医出版社, 1997: 263.

[8] Chow YH, Huang WH, Chi WK, et al. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccine by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2[J]. J Virol, 1997; 71(1): 169-178.