DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.06.001

硫代反义寡脱氧核苷酸在树鼩体内对 HDV复制与表达的抑制作用*

论著

毛 青** 李宏文 李奇芬 吴纯清 王升启*** 刘 志 顾长海 (第三军医大学附属西南医院传染病中心) 重庆, 400038

提 要 目的: 在树 (Tupaia)体内观察硫代反义寡脱氧核苷酸(S-ASODN)对 HDV复制、表达的抑制作用。方法: 树 同时接种 HBV阳性血清 0.1 ml HDV阳性血清 0.3 ml后,将 16只 HDV/HBV感染成功的树 随机分为两组,给药组 8只树 按每只每次经尾静脉注射 S-ASODN 3 mg,隔日 1次,共 7次。对照组中 2只注射等量生理盐水,另 6只不作处理。注射后 5、10、15、25 d取血及肝组织采用免疫组化、斑点杂交及原位杂交法检测 HDV Ag及 HDV RNA 结果: 于注射结束时(15 d)给药组有 7只树 肝内 HDV Ag及 HDV RNA转为阴性,对照组 8只树 中仅 1只转为阴性。停止使用 S-ASODN 10 d后,给药组 2只阴转树 肝内又可检出 HDV Ag和 HDV RNA,对照组仍有 7只可检出。结论: S-ASODN在树 体内能有效抑制 HDV复制及表达,但作用并不完全,可能与用药剂量不足,时间不够长及仅用硫代修饰尚不能直接导向靶基因有关。

关键词 反义寡脱氧核苷酸;硫代修饰;丁型肝炎病毒;树

中图法分类号 Q522.4; R512.63

体外实验已经证实针对 HDV基因链核酶不同功能区的反义寡脱氧核苷酸(Antisense oligodeoxynucleotides, ASODN)能不同程度地抑制 HDV核酶的自裂活性,其中互补于自裂位点和 stemⅠ区者几乎可完全抑制核酶的自裂[1]。同时发现封闭该区 684-698位核苷酸的 15聚 ASODN及其硫代修饰物(S-ASODN)可抑制转基因细胞中 HDV基因的复制与表达。本研究在上述基础上进一步观察 S-ASODN在已感染 HDV的树 体内对 HDV复制与表达的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

野生成年树 ,购自中国科学院昆明动物研究所,体重 124~158 g,单只或双只关养,雌雄不拘。喂予膨化小鼠颗粒饲料,辅以牛奶、苹果等,饮用自来水。

1.2 抗 HDV反义寡脱氧核苷酸的合成及修饰

互补于 HDV基因链核酶自裂位点和 stemⅠ区 684-698位核苷酸的 15聚硫代修饰 ASODN采用 TETD/乙氰法合成,高效薄层色谱法纯化。

1.3 实验方法

1.3.1 感染血清的筛选

1.3.1.1 HBV感染血清 从无症状乙型肝炎病毒携带者中筛选出 HBsAg阳性、HBeAg阳性、抗-HBc阳性血清 1份,经斑点杂交检测 HBV RNA阳性,-20℃冻存,用前过滤除菌。

1.3.1.2 HDV阳性血清 筛选出 HBsAg阳性、HDV Ag强阳性血清 1份,经斑点杂交检测 HDV RNA强阳性,-20℃冻存,用前过滤除菌。

1.3.2 接种及标本留取 30只树 于接种前取心血及肝组织检测 HBsAg HDV Ag及 HDV RNA证实均为阴性后,每只经尾静脉接种 HBV阳性血清 0.1 ml及 HDV阳性血清 0.3 ml 接种后每周无菌采心血 1次,分离血清,-20℃冻存待检。次日在麻醉下行肝部分切除留取肝组织标本,4%中性甲醛固定。

1.3.3 实验分组及给药方法 树 同时感染 HDV/HBV后,分别用免疫组化和原位杂交检测肝组织切片中 HDV Ag及 HDV RNA,第 14天时共有 16只阳性,随机分成两组。

给药组: 8只树 尾静脉注射 S-ASODN 3 mg/次/只(给药剂量按每克组织 20μg计算[2,3]),隔日 1次,共 7次,总剂量 21 mg/只。

对照组: 6只树 不作任何处理,另 2只树 尾静脉注射生理盐水。

给药组及对照组均于给药开始后 5、10、15、25 d各取血、肝组织 1次。

1.3.4 检测指标及方法

1.3.4.1 血清及肝组织 HDV RNA 分别采用斑点杂交法及原位杂交法,试剂购自华西医科大学附一院肝炎研究室,按说明书操作。

1.3.4.2 肝组织 HDV Ag及 HBsAg检测 均采用免疫组化 S-P法。抗-HD为本科用合成肽免疫家兔制备,工作浓度

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39570166

** 毛 青,男,34岁,副教授,副主任医师,博士 *** 军事医学科学院放射医学研究所 北京, 100850

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1∶120,其余试剂购自福建迈新生物技术公司。

1.3.4.3 实验对照 本实验设立阳性对照、阴性对照、空白对照、替代对照。

1.4 结果分析及统计处理

血清 HDV RNA斑点杂交阳性标本显蓝紫色,阴性标本不显色,对结果进行薄层色谱扫描,得出目标阳性面积(TPA),阳性面积比(目标阳性面积/阳性总面积,PAR)。

血清 HDV RNA抑制率公式为:

$$抑制率=\frac{给药前阳性面积比-给药后阳性面积比}{给药前阳性面积比}\times 100\%$$

肝组织 HDV Ag免疫组化结果用 MD20型真彩色图像分析仪进行分析,每张切片随机取 5个视野,600倍下观察,使观察目标充满视野,分析各组积分光密度(OPTDI)变化。

抑制率计算公式:

$$抑制率=\frac{给药前\ OPTDI值-给药后\ OPTDI值}{给药前\ OPTDI值}\times 100\%$$

全部数据经数理统计 PDA-2进行方差分析,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 S-ASODN对树鼩肝组织中 HDV Ag及 HDV RNA的抑制作用

给药组 8只树 给药前肝组织 HDV Ag及 HDV RNA均为阳性,给药 15 d后,7只转为阴性,但停药 10 d(第 25天)2只又转为阳性;对照组仅 1只转阴。给药组及对照组肝组织 HBsAg均无明显变化。定量观察给药组及对照组 16只树 肝组织 HDV Ag表达,给予 S-ASODN 5 d和 15 d后 HDV Ag表达均受抑制,抑制率分别为 39.65%和 83.66%,见表 1。

表 1 给药前后肝组织 HDV Ag免疫组化染色真彩色图象分析($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Real color image analysis of immunohistochemistry stained liver tissues before and after administration ($\bar{x}\pm s$)

	n	Total Area	OPTDI	Inhibition ratio(%)
Administration	8			
Before		8545.25± 294.14	4693.33± 338.88	
5 d after		5157 ± 171.34	2682.5 ± 954.31	39.65
15 d after		1985 ± 208.20	766.53± 63.23*	83.66
Control	8			
Before		7238.75± 640.26	3356.75± 223.29	
15 d after		6765.33± 318.39	3010 ± 792.41#	

*:$P<0.01$ *vs* before administration

#:$P<0.01$ *vs* administration group

2.2 S-ASODN对树鼩血清中 HDV RNA的抑制作用

8只树 给药前血清 HDV RNA 7只阳性,给药 15 d后,6例转阴,1例仍阳性,对照组 7只血清中 HDV RNA持续阳性。薄层色谱扫描显示给药组树 给药 15 d阳性面积比由 2.7下降至 0.35,抑制率为 87.04%。停药后 10 d,2例动物血清中 HDV RNA重新转为阳性,阳性面积比为 1.85 对照组观察期间阳性面积比无变化,见表 2 初步表明 S-ASODN对 HDV RNA在树 体内复制有抑制作用。

表 2 给 S-ASODN后树鼩血清 HDV RNA斑点杂交薄层扫描分析($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Thin layer scanning analysis of HDV RNA blot hybridization in Tupaia serum after administration of S-ASODN ($\bar{x}\pm s$)

	Administration		Control	
	PAR	TPA	PAR	TPA
Before	2.70± 0.52	329.5 ± 95.45	2.50± 0.87	329.5± 95.45
5 d after	2.32± 0.64	317.0 ± 42.40	2.12± 0.58	312.7± 18.68
15 d after	0.35± 0.05*	42.25± 0.24*	2.33± 0.64#	309.0± 14.99#
10 d after withdrawal	1.85± 0.36	127.0 ± 8.82	2.47± 0.74	327.0± 88.19

*:$P<0.01$ *vs* before administration

#:$P<0.01$ *vs* administration group

3 讨论

要在整体水平观察 ASODN的抗病毒作用,首先需要有可感染 HDV的动物模型。研究表明树 不仅能感染人 HBV而且能同时和重叠感染 HDV,是我国研究 HBV和 HDV感染良好的动物模型[4~6]。为探讨树 感染 HDV后何种感染指标能更好地反映 S-ASODN的作用效果,我们观察比较了树 感染 HDV后血清及肝组织 HDV Ag HDV RNA表达时间及状况,发现血清中 HDV Ag出现晚于肝组织,持续时间短,且多数呈间断性。而肝组织中 HDV Ag出现早,持续时间长,呈连续表达。因此认为用免疫组化方法观察肝组织中 HDV Ag表达,评价 S-ASODN抗 HDV效果优于血清 HDV Ag 另外血清和肝组织内 HDV RNA的表达是病毒受抑制与否的直接指标,亦应作为观察指标。为避免因接种感染血清被动携带 HDV,我们选择特异性强而敏感性稍差的斑点和原位杂交法而不用 PCR及原位 PCR技术,确保实验结果可靠。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

较早的研究初步证实 S-ASODN可预防性阻断树　感染 HDV[7]。本研究结果提示互补于 HDV基因链核酶自裂位点和 stem Ⅰ 区的 S-ASODN能抑制树　体内 HDV复制和表达。但停药后 10 d有 2只转阴树　肝及血中又可检出 HDV Ag和 HDV RNA,提示 S-ASODN抑制 HDV作用持续时间较短,其原因可能有:用药时间短,用药剂量不足及 S-ASODN进入体内呈均匀分布而非直接导向肝细胞[3]。尽管如此,本研究为深入进行 S-ASODN抗病毒作用的研究提供了实验依据。

参考文献

1 毛　青,王升启,李奇芬,等.反义寡脱氧核苷酸抑制丁型肝炎病毒基因链核酶活性的作用.中华医学杂志, 1996, 76(1): 30

2 Offensperger W B, Offensperger S, Walter E, *et al*. *In vivo* inhibition of duck hepatitis B virus replication and gene expression by phosphorothioate modified antisense oligodeoxynucleotides. EMBO J, 1993, 12(3): 1257

3 Sharma H W, Narayanan R. The therapeutic potential of antisense oligonucleotides. Bioessays, 1995, 17(12): 1055

4 苏建家,严瑞琪.成年树　实验感染人乙型肝炎病毒的研究.中华病理学杂志, 1987, 16(2): 103

5 李奇芬,丁明权,王　洪,等.树　感染丁型肝炎病毒的实验研究.中华医学杂志, 1995, 75(9): 611

6 Walter E, Keist R, Niederost B, *et al*. Hepatitis B virus infection of Tupaia hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. Hepatology, 1996, 24(1): 1

7 毛　青,王升启,李奇芬,等.反义寡脱氧核苷酸抗丁型肝炎病毒的作用.免疫学杂志, 1996, 12(1): 5

(收稿: 1998-09-05;修回: 1998-11-10)

(编辑　刘　鹏)

Inhibitory effects of antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide on replication and expression of HDV in Tupaiae*

Mao Qing, Li Hongwen, Li Qifen, Wu Chunqing, Wang Shenqi, Liu Zhi, Gu Changhai (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the inhibitory effects of antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide (S-ASODN) on replication and expression of HDV in Tupaiae. Methods: Tupaiae were co-inoculated with 0.1 ml HBV positive serum and 0.3 ml HDV positive serum. Sixteen Tupaiae infected with HDV/HBV were then randomized into two groups with equal number for each: the treated-group (TG) and the control group (CG). The animals in TG were treated with injection of 3 mg S-ASODN via the caudal vein once every two days for 7 times. In CG, 2 animals were treated with normal saline in the same way and the left 6 were not given any treatment. Blood samples and liver specimens were collected on the 5th, 10th, 15th and 25th day after treatment. HDV Ag and HDV RNA in the liver were detected with immunohistochemistry and *in situ* hybridization. Results: On the 15th day after treatment, HDV Ag and HDV RNA in the liver became negative in 7 out of 8 in TG while only 1 out of 8 in CG. On the 25th day after treatment, they were positive in 2 out of the 7 negative ones in TG and in 7 out of 8 in CG. Conclusion: S-ASODN can effectively inhibit the replication and expression of HDV in Tupaiae. However, the inhibitory effects are not strong enough. The reason might be related to the inadequate dosage or treatment duration and indirect modification to the target.

Key words antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide; hepatitis D virus; Tupaia

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39570166

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net