

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2015.03.010

乙型肝炎基因治疗现状与展望

李建美¹ 李丙路² 王建礼¹ 综述

(1 济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067; 2 济南市传染病医院, 山东 济南 250021)

关键词 乙型肝炎; 基因治疗; HBV; cccDNA**中图分类号**: R373.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2015)06-180-05

急性和慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染仍然是一个重大的全球性健康问题,在全球范围内,有多达3.5~4亿乙型肝炎患者,该病可导致肝硬化,是全球80%原发性肝癌的直接病因^[1]。在我国,全国13亿人口中有1亿慢性HBV感染者,并且乙型肝炎发病率还在持续上升^[2]。目前,乙型肝炎的治疗策略主要是通过药物治疗长期或持久地抑制乙肝病毒复制,控制疾病的进展,而不能治愈这种疾病。因此,新的治疗选择要有效地治愈或消灭这一疾病。本文将对乙型肝炎基因治疗研究进展作一综述,其中特别介绍潜在的抗HBV的序列特异性DNA结合蛋白及其衍生物的设计和应用。

1 HBV生物学

HBV是一种病毒包膜的DNA病毒,属于嗜肝DNA病毒科,其基因组是双链松弛环状DNA

(relaxed circular, rcDNA),相对分子量为 $(1.6 \sim 2.0) \times 10^9$,全长约为312kb^[3]。HBV进入宿主细胞后,脱去包膜蛋白,释放核心颗粒,形成rcDNA,然后进入细胞核,rcDNA一部分双链DNA由宿主酶修复形成共价闭合环状DNA(cccDNA)。cccDNA作为模板,在病毒聚合酶的作用下,转录为pgRNA和病毒亚基因组RNA。随后,这些病毒RNA被运送到胞浆中。在胞浆内,pgRNA作为逆转录模板,经过一系列酶促反应合成HBV rcDNA,亚基因组RNA被翻译成病毒颗粒包装和装配所需的蛋白质。新合成的HBV rcDNA一方面进入细胞核内,转化为新的cccDNA,补充细胞内的cccDNA库;另一方面与病毒蛋白装配成新的完整HBV,释放至细胞外,再感染健康的肝细胞(见图1)^[3]。由此可见,cccDNA在HBV感染细胞过程中作为一个稳定的微小染色体存在。

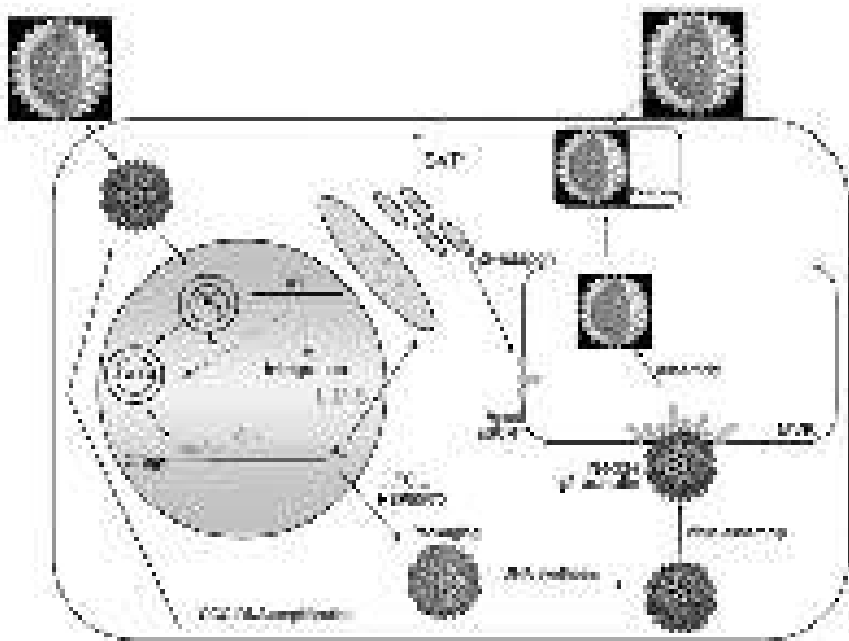


图1 HBV感染过程

2 乙型肝炎基因治疗

2.1 HBV 复制周期与基因治疗策略的选择

根据 HBV 复制周期中的不同阶段,可以采取不同的基因治疗策略。在 cccDNA 转录初始阶段,使用锌指核酸酶(ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases,TALENs)等 DNA 结合蛋白切断 cccDNA 双

链,可以阻止 cccDNA 的转录[见图 2(1)];应用 CRISPR/ Cas9 酶系统,阻碍 pgRNA 的合成和延长^[4][见图 2(2)]。在 cccDNA 转录后加工阶段,使用反义寡核苷酸等技术抑制 HBV 复制[见图 2(3)~(11)]。在 cccDNA 与病毒蛋白装配阶段,使用衣壳蛋白靶向病毒灭活(CTVI)方法阻碍完整 HBV 的合成^[5](见图 2)。

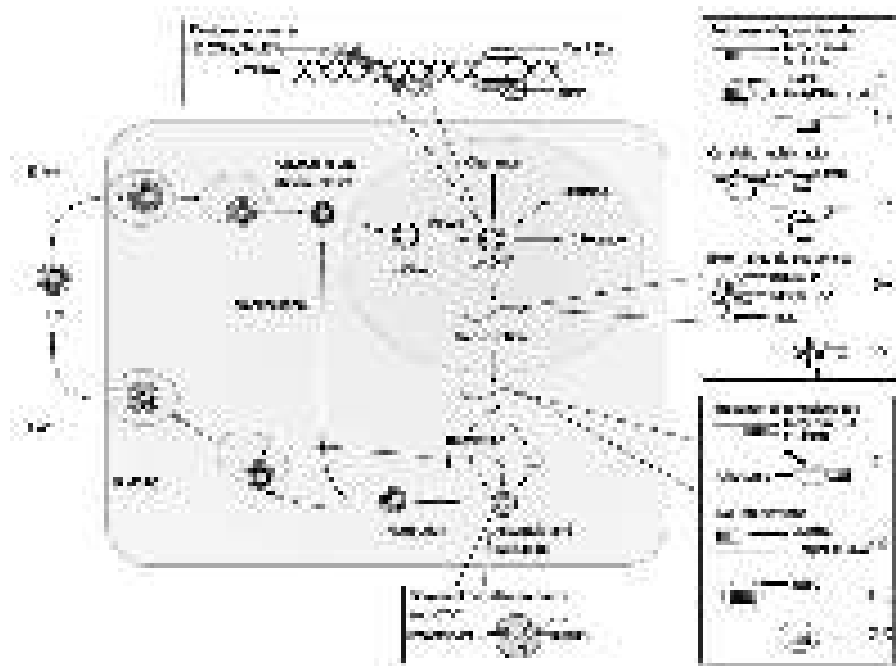


图 2 HBV 复制周期与基因治疗策略

2.2 反义核酸

反义核酸技术包括反义 RNA、反义寡核苷酸和核酶(ribozymes)3大技术。反义 RNA 通过激活 RNase,抑制病毒 mRNA 的起始部位与启动蛋白及核糖体的结合,阻断 mRNA 成熟等多个环节,从而阻断 mRNA 的翻译过程。Tung 等^[6]将编码 HBSAg 的反义和正义 RNA 的逆转录病毒载体和 HBV 表达共转染 Hep-G2 细胞,结果显示反义 RNA 共转染组细胞 HBSAg 表达比对照组减少了 40%~50%。然而,反义 RNA 对 cccDNA 池影响不大。反义寡核苷酸技术是利用三链 DNA 的构建来实现的,然而,它具有明显的剂量依赖性,且效率低,这限制了它在乙型肝炎基因治疗上的应用。核酶是具有催化活性的特殊的反义 RNA,能与靶 mRNA 特异结合,并催化 mRNA 在特定部位断裂。但随着研究的深入,核酶自身的某些缺点逐渐暴露出来,如真核细胞体内的核酶酶切产物不是很

稳定,这也限制了核酶在乙型肝炎基因治疗上的应用。

2.3 CTVI

CTVI 是一种有效的抗病毒策略,它将核酸酶与衣壳蛋白融合表达,从而使含有核酸酶的融合蛋白被包装到病毒粒子中,在此降解病毒核酸。Beterams 等^[7]首先将 CTVI 应用于乙肝病毒。他们将依赖于 Ca^{2+} 的核酸酶 SN 融合到 HBV 的衣壳蛋白 C 末端,形成的融合蛋白 core-SN 能够像野生型衣壳蛋白一样被组装到病毒粒子中,从而干扰衣壳内病毒 DNA 的正确合成。然而,CTVI 策略存在一个难点,即这些核酸酶缺乏特异性,它们在干扰衣壳内病毒 DNA 正确合成的同时,也对宿主细胞产生毒性。

2.4 RNAi 技术

RNAi 能通过 siRNAs (small interfering RNAs)作用来关闭特定的基因表达。已有国外学

者^[8]通过针对 HBV 基因组中不同编码区来设计相应的 siRNA 分子,并在体外培养细胞和 HBV 急性感染的小鼠模型中发挥了很好的抑制病毒复制的作用。Crowther 等^[9]将干扰片段表达盒(抗 HBV 的表达盒)导入细胞中能抑制 HBV 基因表达及病毒复制。然而,以 RNAi 为基础的治疗并不能完全消除 cccDNA 池,因此, RNAi 为基础的基因治疗不能完全治愈乙型肝炎。Starkey 等^[10]通过实验证实 RNAi 抗 HBV 药物能够抑制病毒 RNA、病毒蛋白与病毒粒子的形成,但对 cccDNA 池影响不大。因此,未来的 RNAi 抗 HBV 药物研发策略重点应放在 cccDNA 上,把 cccDNA 作为治疗靶点,灭活或消除 cccDNA,进而彻底治愈乙型肝炎。

2.5 序列特异性 DNA 结合蛋白

在过去的 10 年中,锌指蛋白(zinc finger proteins, ZFPs)等 DNA 结合蛋白已被广泛用于调节目的基因的表达。这些 DNA 结合蛋白起初作为真核转录因子存在于细胞核内,因此,可以把他们设计成针对特定 DNA 序列起作用的 DNA 结合蛋白。目前, DNA 结合蛋白已用于抑制 HBV 基因的表达。Zimmerman 等^[11]设计并合成几种多趾 ZFPs,这些 ZFPs 能结合鸭乙型肝炎病毒(DHBV) cccDNA 增强子区域内 9 或 18 个碱基对的序列,使 pgRNA 表达量降低 41.6%,HBV 表面蛋白、核心蛋白以及病毒粒子的合成显著下降。然而,这些

锌指蛋白对 HBV 的作用是短暂的,具有时间依赖性。但是, DNA 结合蛋白的应用带给人们治疗乙型肝炎新的理念和希望。改造过的 DNA 结合蛋白与 DNA 特定序列结合,能诱导 DNA 双链断裂(DSBs)。DSBs 可以通过同源指导修复(HDR)和非同源末端连接(NHEJ)进行修复^[12-13]。当没有外源的同源序列加入时,细胞就会启动 NHEJ 修复机制。NHEJ 修复容易出错,易导致 DSBs 位点 DNA 序列不正确的插入、删除和替换,往往会引入新的突变,因此,也就达到了进行基因敲除的目的。如果此时加入外源的同源碱基序列,就可以启动 HDR 修复,利用同源修复机制,可以帮助我们实现基因敲除和基因修复。研究人员通过改造 DNA 结合蛋白,使之作用于 cccDNA 靶位点,产生 DSBs,诱发 DNA 修复机制,形成基因敲除突变体,抑制 HBV 基因的表达^[14-15]。目前,以 cccDNA 作为靶点的序列特异性 DNA 结合蛋白及其衍生物主要有 3 种,一是核酸内切酶,把一些核酸内切酶改造成针对 12~40 bp DNA 序列起作用的 DNA 结合蛋白;二是 ZFPs,设计合成多趾 ZFPs,每个锌指(ZF)能绑定到一个特定的核苷酸三联体,当一个多趾锌指蛋白包括 4 个 ZF 时,每一个 L 或 R 亚基的目标是一个 12 bp 序列;三是 TALENs,把 TALENs 改造成靶向结合 19 bp DNA 序列的 DNA 结合蛋白^[16](见图 3)。

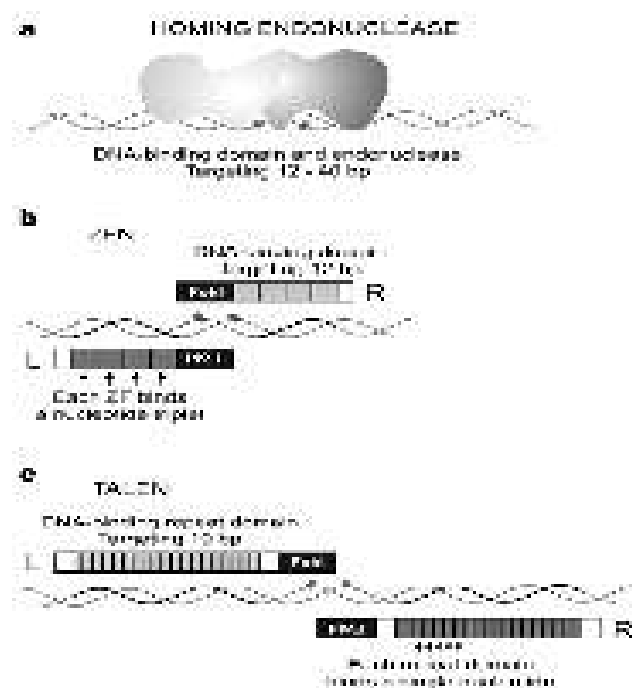


图3 序列特异性 DNA 结合蛋白及其衍生物

目前,设计和应用比较成功的 ZFPs 是由 Weber 等^[17]设计并合成的一种异二聚体 ZFN,它们在细胞内不能形成同源二聚体,这一设计最大限度地减少脱靶效应。这种异二聚体 ZFN 主要靶向作用于乙型肝炎病毒 X 蛋白(HBx)、HBcAg 和聚合酶的开放阅读框。Weber 等应用 scAAV 病毒载体,把异二聚体 ZFN 导入 HepAD38 细胞内,发现 HepAD38 细胞基因突变率由 9.8% 大幅增加至 34%,同时,HBV 复制关闭,在细胞内和细胞培养基上清液中未检测到 HBV 标志物水平明显增加,而未导入异二聚体 ZFN 的对照组 HepAD38 细胞 HBV 标志物水平胞内增加 30 倍,细胞培养基上清液增加 323 倍^[17]。因此,异二聚体 ZFN 能有效抑制 HBV 的复制。

TALENs 是另一种应用前景广阔的核酸酶,来自一类特殊植物病原体黄单胞杆菌,具有一些比 ZFNs 更优越的特点,现在已成为科研人员用于研究基因功能和潜在基因治疗应用的重要工具^[18-20]。TALENs 是一种嵌合蛋白,由 N 端核定位结构域和 C-末端的 FokI 核酸酶结构域组成。TALENs 的 DNA 结合结构域(DBD)由重复序列组成,含有重复序列可变的氨基酸残基(repeat-variable diresidues, RVD)。RVD 能够识别特异性 DNA 碱基对。TALENs 的 FokI 核酸酶形成二聚体特异性切割 DNA 序列,产生 DSBs,诱发 DNA 修复机制,形成基因敲除突变体。Bloom 等^[21]设计并合成一组针对 HBV 基因组 HBsAg 或 HBcAg 表达区的 TALENs。他们把靶向作用于 HBsAg 的 TALEN 导入 HepG 2.2.15 细胞内,发现约 31% cccDNA 发生断裂,HBsAg 分泌显著减少;应用尾静脉液压注射法,把具有复制能力的 HBV DNA 和 HBsAg 特异性的 TALENs 表达质粒共同导入小鼠体内,与只导入 HBV DNA 相比,小鼠肝细胞 HBV DNA 突变率大幅增加至 58%~87%,血清 HBsAg 水平下降 90% 以上,循环病毒颗粒(VPE)减少约 70%^[22]。Chen 等^[23]联合应用干扰素- α 和 TALEN,发现干扰素- α 和 TALEN 具有协同作用,能显著抑制 Huh7 细胞 HBV 转录;他们应用尾静脉液压注射法,把全长的单体线性 HBV DNA 和 TALEN 表达质粒共同导入 C3H/HeN 小鼠体内,发现与对照组相比,C3H/HeN 小鼠血清乙肝 HBsAg 和 cccDNA 水平以及肝前基因组 HBV RNA 明显下降。因此,TALENs 能够在他们的靶位点引入突变,降低 HBV 基因表达水平与

cccDNA 基因组数量。但是 TALENs 技术还存在一些问题,如 TALENs 蛋白可引起机体的免疫能力,TALENs 还存在脱靶的问题。因此,要实现 TALENs 技术在治疗乙型肝炎的广泛应用,在未来需要克服以上存在的问题,优化 TALENs 密码子,使其更有利于在哺乳动物细胞中发挥抗 HBV 作用。

由 RNA 引导的核酸内切酶 CRISPR/Cas9 正在被广泛用作首选基因组编辑工具,是目前基因组工程的研究热点^[24-25]。CRISPR/Cas9 是由 DNA 切割酶 Cas9 和一段与靶 DNA 片段匹配的 20 个核苷酸长度的短 RNA 片段构成。它的特点在于只需合成一个 gRNA 就能实现对基因的特异性修饰,Cas9 蛋白不具特异性;编码 gRNA 的序列不超过 100bp,因此,构建较简单方便。与 ZFPs、TALENs 相比,该系统易于操作,能在多种细胞中进行有效的靶向酶切,而且多个靶点可以同时进行靶向酶切。Lin 等^[26]首次将该技术应用于乙型肝炎基因治疗的研究。他们应用尾静脉液压注射法,把包含一个 gRNA 和 Cas9 表达盒的表达载体导入 HBV 小鼠模型,发现血清 HBsAg 水平显著降低,HBV 表达水平降低 20%~60%。Zhen 等^[27]也发现靶定 HBsAg 编码区的 CRISPR/Cas9 系统处理后,细胞培养基和小鼠血清 HBsAg 水平显著降低,小鼠肝脏组织中 HBsAg 阳性细胞显著减小。因此,CRISPR/Cas9 系统可能是一种有效抑制 HBV 复制的技术。

3 结语

综上所述,乙型肝炎基因治疗策略有很多种。反义核酸在治疗乙型肝炎感染有一定的优势,但是,它们缺乏稳定性,作用不精确,限制了它们的应用前景。RNAi 作为一种高效的序列特异性基因剔除技术在传染性疾病和恶性肿瘤基因治疗领域发展极为迅速。然而,以 RNAi 为基础的治疗并不能完全消除 cccDNA 池,因此,RNAi 为基础的基因治疗不能完全治愈乙型肝炎。序列特异性 DNA 结合蛋白及其衍生物的设计和应用可能是乙型肝炎基因治疗最有前途的方法之一,它们以 cccDNA 作为治疗靶点来灭活或消除 HBV。目前,序列特异性 DNA 结合蛋白及其衍生物的应用的主要障碍体现在生产、载体的选择和临床推广。如果序列特异性 DNA 结合蛋白及其衍生物能够在临床上推广使用,人类就有可能完全治愈乙型肝炎。

参考文献:

- [1] Ott J J, Stevens G A, Groeger J, et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity [J]. *Vaccine*, 2012, 30 (12): 2212-2219.
- [2] 谷昊明, 郭立燕, 刁玉涛. 某校大学生乙型肝炎血清学标志物检测结果分析[J]. *济宁医学院学报*, 2013; 36(6): 431-434.
- [3] Seeger C, Mason W S. Molecular biology of hepatitis B virus infection[J]. *Virology*, 2015, S0042-6822(15)00077-X. [Epub ahead of print].
- [4] Lin S R, Yang H C, Kuo Y T, et al. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3: e186.
- [5] Gebbing M, Bergmann T, Schulz E, et al. Gene therapeutic approaches to inhibit hepatitis B virus replication[J]. *World J Hepatol*, 2015, 27; 7(2): 150-164.
- [6] Tung F Y, Bowen S W. Targeted inhibition of hepatitis B virus gene expression: a gene therapy approach[J]. *Front Biosci*, 1998, 3: a11-15.
- [7] Beterams G, Nassal M. Significant interference with hepatitis B virus replication by a core-nuclease fusion protein[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 8875-8883.
- [8] Wooddell C I, Rozema D B, Hossbach M, et al. Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection[J]. *Mol Ther*, 2013, 1(5): 973-985.
- [9] Crowther C, Mowa M B, Ely A, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo using helper-dependent adenovirus vectors to deliver antiviral RNAi expression cassettes[J]. *Antivir Ther*, 2014, 19(4): 363-373.
- [10] Starkey J L, Chiari E F, Isom H C. Hepatitis B virus (HBV)-specific short hairpin RNA is capable of reducing the formation of HBV covalently closed circular (CCC) DNA but has no effect on established ccc DNA in vitro[J]. *J Gen Virol*, 2009, 90(Pt 1): 115-126.
- [11] Zimmerman K A, Fischer K P, Joyce M A, et al. Zinc finger proteins designed to specifically target duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA inhibit viral transcription in tissue culture. *J Virol*, 2008, 82(16): 8013-8021.
- [12] Tong Y, Charusanti P, Zhang L, et al. CRISPR-Cas 9 based engineering of achinomycetal genomes[J]. *ACS Synth Biol*, 2015. [Epub ahead of print].
- [13] Petolino J F. Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2015, 51(1): 1-8.
- [14] Hsleh Y H, Chang Y Y, Su I J, et al. Hepatitis B virus pre-S₂ mutant large surface protein inhibits DNA double-strand break repair and leads to genome instability in hepatocarcinogenesis[J]. *S Pathol*, 2015. [Epub ahead of print].
- [15] Hu X, Lin J, Xie Q, et al. DNA double-strand breaks potential targets for HBV integration[J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2010, 30(3): 265-270.
- [16] Bloom K, Ely A, Arbuthnot P. Recent advances in use of gene therapy to treat hepatitis B virus infection[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 848: 31-49.
- [17] Weber N D, Stone D, Sedlak R H, et al. AAV-mediated delivery of zinc finger nucleases targeting hepatitis B virus inhibits active replication[J]. *PLoS One*, 2014, 9: e97579.
- [18] Gai T, Gersbach C A, Barbas C F. IFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397-405.
- [19] Ain Q U, Chung J Y, Kim Y H. Current and future delivery systems for engineered nucleases: IFN, TALEN and RGEN [J]. *J Control Release*, 2015, 205: 120-127.
- [20] Gupta R M, Musunuru K. Expanding the genetic editing tool kit: IFNs, TALENs and CRISPR-Cas9 [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(10): 4154-4161.
- [21] Bloom K, Ely A, Mussolino C, et al. Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases[J]. *Mol Ther*, 2013, 21: (10)1889-1897.
- [22] Chen J, Zhang W, Lin J, et al. An efficient antiviral strategy for targeting hepatitis B virus genome using transcription activator-like effector nucleases[J]. *Mol Ther*, 2014, 22: 303-311.
- [23] 郑小梅, 张晓立, 于建东, 等. 基因 CRISPR-Cas9 介导的基因组编辑技术的研究进展[J]. *生物技术进展*, 2015, 5(1): 1-9.
- [24] 陈勇龙, 黄华荣, 唐平平, 等. 基因组编辑技术—CRISPR/Cas 系统[J]. *杭州师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 14(1): 60-65.
- [25] Bortesi L, Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond[J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(1): 41-52.
- [26] Lin S R, Yang H C, Kuo Y T, et al. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in Vivo[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3: e186.
- [27] Zhen S, Hua L, Liu Y H, et al. Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus[J]. *Gens Ther*, 2015, 22(5): 404-412.

(收稿日期 2015-05-15)