

RNA干扰抑制HepG₂-N10细胞系中HBV基因表达及复制

潘金水, 任建林, 程通, 董菁, 黄松洁, 施华秀

■背景资料

HBV携带者及慢性感染者数量众多, 但是对于慢性感染者的抗病毒治疗选择仍然有限, 且效果不尽理想. RNAi效应已经成为基因功能研究及抗病毒治疗的重要工具. 本研究设计并构建了可产生siRNA的表达质粒, 通过转染肝癌细胞系HepG₂-N10, 研究其抑制HBV基因表达及病毒复制的效应.

潘金水, 任建林, 董菁, 施华秀, 厦门大学附属中山医院消化内科 福建省厦门市 361004

程通, 福建省分子医学病毒研究中心, 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 福建省厦门市 361004
黄松洁, 厦门大学附属中山医院厦门市临床检验中心 福建省厦门市 361004

潘金水, 在读硕士研究生, 厦门大学附属中山医院消化内科主治医师, 主要从事消化道肿瘤分子生物学研究.

通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院消化内科. jianlinr@msn.com

电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017

收稿日期: 2006-02-22 接受日期: 2006-03-15

RNA interference inhibits hepatitis B virus gene expression and replication in HepG₂-N10 cells

Jin-Shui Pan, Jian-Lin Ren, Tong Cheng, Jing Dong, Song-Jie Huang, Hua-Xiu Shi

Jin-Shui Pan, Jian-Lin Ren, Jing Dong, Hua-Xiu Shi, Department of Gastroenterology, the Affiliated Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Tong Cheng, Fujian Research Center of Medical Molecular Virology, Key Laboratory of Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Ministry of Education, Xiamen University, Xiamen 361002, Fujian Province, China

Song-Jie Huang, Xiamen Center of Clinical Laboratory, the Affiliated Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Correspondence to: Professor Jian-Lin Ren, Department of Gastroenterology, the Affiliated Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China. jianlinr@msn.com

Received: 2006-02-22 Accepted: 2006-03-15

Abstract

AIM: To evaluate the effect of vector-based small interfering RNA promoted by U6 (pSilencer2.0-U6) on the inhibition of hepatitis B virus (HBV) replication in HepG₂-N10 cells.

METHODS: Several sequences targeting on different regions of HBV genome were inserted into pSilencer vectors. The expression plasmids were then transfected into HepG₂-N10 cells, a cell line which stably expressed HBsAg, HBeAg and adw2 subtype Dane Particles. Viral antigens were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Viral mRNA was analyzed

by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The covalent closed circular DNA (cccDNA) secreted into the culture media were measured by quantitative real-time PCR.

RESULTS: Vector-based RNA interference potently reduced HBsAg and HBeAg expression in cell culture. Furthermore, RT-PCR analysis showed that viral mRNAs were effectively degraded, thus eliminating the messengers for protein expression as well as templates for reverse transcription. Quantitative Real-time PCR analysis of cccDNAs revealed that vector-based RNA interference inhibited HBV replication efficiently (HBV DNA log₁₀: pS: 4.00 ± 0.13; pC: 4.08 ± 0.10; pX: 4.28 ± 0.06; pN: 5.05 ± 0.07; HepG₂-N10: 4.74 ± 0.06; HepG₂: <2.70).

CONCLUSION: RNA interference can inhibit HBV gene expression and virus replication.

Key Words: Hepatitis B Virus; RNA interference; Virus replication

Pan JS, Ren JL, Cheng T, Dong J, Huang SJ, Shi HX. RNA interference inhibits HBV gene expression and replication in HepG₂-N10 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(12):1172-1177

摘要

目的: 评估以U6启动子作为启动序列(pSilencer2.0-U6)载体介导的小RNA干扰片段在培养细胞株中抑制HBV复制的效应.

方法: 将针对HBV基因组不同区域(S, X及C区)的核苷酸序列插入至pSilencer载体中, 并将重组后的pSilencer质粒(分别为pS, pX及pC)载体转染入HepG₂-N10细胞株(可稳定表达HBsAg、HBeAg及adw2亚型Dane颗粒)中. 以ELISA法检测病毒抗原, 以逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测病毒mRNA, 并以荧光定量PCR法检测分泌入培养基的共价闭合环状DNA (covalent closed circular DNA, cccDNA).

结果: 质粒载体介导的RNA干扰能明显抑制培养基中HBsAg及HBeAg的表达. 并且RT-PCR法检测显示病毒mRNA也被降解了, 从而减少了蛋白表达及病毒逆转录复制的模板. 荧光定量PCR法检测显示分泌入培养基的cccDNAs明显下降(HBV DNA log₁₀: pS: 4.00 ± 0.13; pC: 4.08 ± 0.10; pX: 4.28 ± 0.06; pN: 5.05 ± 0.07; HepG₂-N10: 4.74 ± 0.06; HepG₂: <2.70).

结论: RNA干扰能抑制HBV基因表达及病毒复制, 并且RNA干扰可能为HBV的治疗带来巨大的变化.

关键词: 乙型肝炎病毒; RNA干扰; 病毒复制

潘金水, 任建林, 程通, 董菁, 黄松洁, 施华秀. RNA干扰抑制HepG₂-N10细胞系中HBV基因表达及复制. 世界华人消化杂志 2006;14(12):1172-1177

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1172.asp>

0 引言

HBV可导致急性慢性肝炎及肝细胞癌. 目前全球范围内约3.5亿人携带有HBV, 而其中每年约有100万死于HBV感染的慢性并发症, 如肝硬化、肝癌或两者并存^[1]. 虽然目前已有预防用疫苗供应, 但是对于慢性感染者的治疗选择仍然有限. 研究表明, 拉米夫定治疗1 a后能出现病毒学及生化反应^[2-3]. 然而, 多数研究表明, 继续治疗每年约有20%患者产生耐药现象^[4]. α -干扰素及聚乙二醇干扰素抗病毒效应也较强, 但停药后应答持续时间较短^[5-6]. 阿迪福韦治疗144 wk后能取得病毒复制抑制、酶学正常及组织学反应改善等益处. 然而, 常出现耐药突变现象^[7]. 因此, 必须寻找可供替代的现症感染治疗方法. RNA干扰是双链RNA引发同源mRNA降解这一现象^[8]. 在过去应用于打断由HIV-1、肝炎病毒、流感病毒等引起的疾病过程^[9-12]. 业已证明, 在体外试验中将小干扰片段或干扰片段表达盒导入细胞中能抑制HBV基因表达及病毒复制^[10-11]. 这些结果表明高效率转染的小干扰片段可能将有效地抑制慢性感染患者中HBV的复制. 然而, 多数这类研究先在体外合成干扰片段, 然后将其转染入细胞内. 体内转运、血浆中稳定性低及细胞摄取率低仍是目前最主要的困难^[13-14]. 为了解决这些问题, 学者们在质粒^[15-17]或病毒载体^[18-20]基础上建立了几个哺乳动物源性表达载体. 我们建立了以U6启动子启动的质粒表达载体(pSilencer 2.0-U6),

旨在观察该表达载体产生的小干扰片段能否抑制培养细胞中HBV的复制.

1 材料和方法

1.1 材料 Trizol试剂及阳离子脂质体Lipofectamine购自Invitrogen公司. Dulbecco改进的Eagle培养基(DMEM)、胎牛血清及抗生素购自Hyclone公司. DNA测序及发夹RNA (short hairpin interfering RNAs, shRNAs)合成由Invitrogen上海公司进行. 质粒pSilencer 2.0-U6由Ambion公司提供. HBsAg及HBeAg ELISA试剂盒购自厦门新创公司. RT试剂盒、T4 DNA连接酶、*Taq* DNA聚合酶购自Promega公司. HepG₂-N10细胞株 (承蒙福建省分子医学病毒研究中心, 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室夏宁邵教授惠赠)能稳定表达HBsAg, HBeAg以及adw2亚型Dane颗粒, 并且HBV 4个开放读码框(open reading frame, ORF)转录的mRNA也能由RT-PCR法检测出来^[21]. HepG₂-N10细胞株的培养条件包括DMEM培养基, 并含有100 mL/L胎牛血清, 2 mol/L的L-谷氨酰胺, 100 mg/L青霉素及100 kU/L链霉素. 培养条件包括: 增湿的37℃温箱, 含有50 mL/L的CO₂. 细胞活力以台盼蓝染色排除法判断. HepG₂-N10细胞在转染前24 h内铺入24孔板. 以Lipofectamine阳离子脂质体作为转染试剂, 转染后48 h收获细胞. 每种质粒分别转染3个细胞孔. 单独转染环状pSilencer阴性质粒作为阴性对照. 该阴性对照质粒能表达与任何已知的人类、小鼠及大鼠基因同源性均极低的siRNA. 每种质粒转染均重复3次.

1.2 方法 应用Ambion公司在线软件, 我们选择了3个adw2基因亚型HBV(GenBank编号: AY707087)基因位点作为靶序列, 并命名为si-HBVS, X及C. si-HBVS的靶序列位于HBV基因组的S区及P区(nt 593-611), si-HBVX的靶序列位于X区(nt 1648-1666), si-HBVC的靶序列位于C区(nt 1923-1941). 这3对完全与靶位点配对的核苷酸片段由Invitrogen上海公司合成, 序列如下: si-HBVS正义链为5'-GATCCATTGCACCTGTA TTCCATTTC AAGAGAATGGGAATACAGGT GCAATTTTTTGGAAA-3', 反义链为5'-AGCT TTTCCAAAAAATTGCACCTGTATTCCATT CTCTTGAAATGGGAATACAGGTGCAATG-3'; si-HBVX正义链为5'-GATCCGGTCTTACATAA GAGGACTTTC AAGAGAAGTCCTTATGTA

■ 研发前沿

应用siRNA抗HBV富有吸引力, 因为HBV的mRNA有着极大的经济性, 由于其长度较小并且具有重叠读码框. 因此应用RNAi技术抗HBV已成为RNAi抗病毒作用的研究热点.

■ 创新盘点

多数RNAi抗HBV研究先于体外合成siRNA片段,然后转染入宿主细胞并观察其效应。本实验则构建能于细胞内产生siRNA的表达质粒,将其导入细胞内观察其对HBV基因表达及病毒复制的抑制作用。并且所采用的细胞系HepG₂-N10能表达国内常见流行株的adw亚型HBV,不同于常用的HepG₂ 2.2.15表达的ayw亚型HBV。

表 1 PCR扩增引物信息

引物	GenBank序列号	引物序列
β-肌动蛋白	BC023204 (nt 974-1530)	上游: 5'-GGCACCACCATGTACCCT-3' 下游: 5'-CTGGGCCATTCTCCTTAGAG-3'
HBs	AY707087 (nt 229-716)	上游: 5'-ATCCTCACAATACCGCAGAG-3' 下游: 5'-GAAAGCCCTACGAACCACT-3'
HBc	AY707087 (nt 1901-2456)	上游: 5'-GCATGGACATTGACCCTTA-3' 下游: 5'-CATTGAGATTCCTCGAGATTG-3'
HBx	AY707087 (nt 1391-1790)	上游: 5'-TACTGCCAACTGGATCCTTC-3' 下游: 5'-GCCTACAGCCTCCTAATACA-3'

表 2 PCR扩增条件

靶序列	条件
β-肌动蛋白	94.0°C 30 s, 55.0°C 30 s, 72.0°C 45 s, 26循环
HBs	94.0°C 30 s, 52.5°C 30 s, 72.0°C 45 s, 28循环
HBc	94.0°C 30 s, 53.0°C 30 s, 72.0°C 50 s, 29循环
HBx	94.0°C 30 s, 52.5°C 30 s, 72.0°C 40 s, 26循环

AGACCTTTTTTGAAA-3', 反义链为5'-AGCTTTTCCAAAAAAGGTCTTACATAAGAGGACTTCTCTTGAAAGTCCTCTTATGTAAGACCG-3'; si-HBVC正义链为5'-GATCCAGAATTTGGAGCTACTGTGTTCAAGAGACACAGTAGCTCCAAATTCTTTTTTTTGAAA-3', 反义链为5'-AGCTTTTCCAAAAAAGAATTTGGAGCTACTGTGTCTCTTGAACACAGTAGCTCCAAATTCTG-3'。每条正义链分别与其反义链退火后,可形成一个限制性核酸内切酶*Bam*HI及*Hind*III的黏性末端。pSilencer 2.0-U6表达质粒由供应商分别以*Bam*HI及*Hind*III酶切处理,形成线性化片段,并除去酶切下来的小片段而纯化,因此他不能发生自身连接。按照供应商的说明,应用T4 DNA连接酶将退火后的双链核苷酸片段插入线性化的载体。按照说明,将退火后的双链核苷酸片段插入pSilencer 2.0-U6载体*Bam*HI及*Hind*III位点中。这样,即完成了可分别表达针对S区、X区及C区shRNA表达质粒的构建。这3种表达质粒分别命名为pS、pX及pC。同样地,阴性对照质粒命名为pN。所有构建好的质粒经Invitrogen上海公司DNA测序后加以确认。分泌入培养基的HBsAg及HBeAg采用ELISA诊断性试剂盒(厦门新创公司)测定,并按试剂盒说明操作。

1.2.1 病毒RNA的RT-PCR分析 按照供应商说明,以Trizol试剂提取转染后细胞的总RNA。以DNaseI消化30 min除去残存DNA,总RNA以Trizol试剂再次提取,离心沉淀后溶解入DEPC-水。以oligo (dT) 18作为引物,总RNA1.0 mg在

Mu-MLV逆转录酶(Promega公司)的催化下生成互补DNA。并使用合成的引物PCR法扩增四个开放读码框及β-肌动蛋白相应的互补。逆转录酶经95°C加热5 min预灭活。PCR扩增反应体系设定为20 μL,并含有模板2 μL,0.18 mmol/L的dNTP混合物,3.00 mmol/L MgCl₂,1.96 μL的10×嗜热缓冲液,上游及下游引物各750 nmol/L。并设立阳性对照与空白对照。经电泳及扫描后,所有PCR产物条带经β-肌动蛋白标化后由分析软件Gel Pro analyzer32测定。引物信息如表1所示,PCR条件如表2所示。

1.2.2 HBV DNA的荧光定量PCR法测定 分泌入培养基的共价闭环环状DNA以一个敏感的荧光定量商业试剂盒(深圳市匹基生物工程有限公司)测定。测定下限为500×10³拷贝/L。cccDNA的提取及测定在转染后2 d进行。所有操作步骤均按说明进行。100 μL的培养基与等量的提取液I混合。混合物以13 000 r/min离心10 min,在移去上清液后加入25 μL的提取液II,充分重悬浮沉淀物后再次以2 000 r/min离心10 s,并100°C水浴10 min。当混合物经第二次13 000 r/min离心10 min后,cccDNA即溶解入上清液中。每40 μL的反应体系含有2 μL的上清液(模板)。PCR扩增反应在PE Gene Amp 5700荧光PCR仪(美国Perkin-Elmer公司)上进行。PCR扩增反应程序设定为37°C 5 min,94°C 1 min,95°C 5 s,60°C 30 s,扩增40个循环。

统计学处理 HBsAg及HBeAg测定及病毒mRNA RT-PCR结果采用方差分析。HBV DNA测量值取对数后亦采用方差分析。HBV DNA测量值低于检测下限(500×10³拷贝/L)的将其假定为499×10³拷贝/L。所有统计分析均采用双侧检验,显著性水平设为0.05。

2 结果

2.1 siRNA对HBsAg表达水平的影响 为了评估

表3 HBsAg及HBeAg的测定水平 (mean ± SD, A)

蛋白	pS	pC	pX	pN	HepG ₂ -N10	HepG ₂
HBsAg	1.13 ± 0.18	1.52 ± 0.13	1.49 ± 0.16	2.02 ± 0.12	2.12 ± 0.16	0.05 ± 0.01
HBeAg	0.86 ± 0.14	0.54 ± 0.10	0.68 ± 0.12	1.58 ± 0.14	1.75 ± 0.13	0.07 ± 0.01

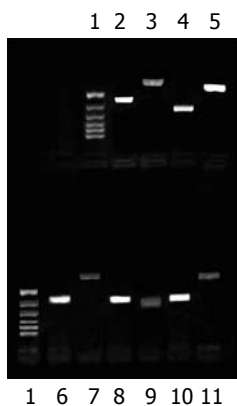


图1 HepG₂-N10细胞mRNA表达水平(RT-PCR法)。1: Marker, 上: 0.5 kb; 2, 6, 8, 10: β -肌动蛋白; 2, 5经pN处理; 3: X基因mRNA; 4: C基因mRNA; 5: S基因mRNA; 6, 7: 经pX处理; 7: X基因mRNA; 8, 9: 经pC处理; 9: C基因mRNA; 10, 11: 经pS处理; 11: S基因mRNA。

HBV特异性siRNA对HBV基因表达的影响, 以诊断性ELISA试剂(厦门新创公司)于转染后48 h分别测定处理组及对照组培养基中的HBsAg水平。经pS-Lipofectamine复合物处理48 h后HepG₂-N10细胞的HBsAg表达水平较阴性对照组下降47%, 并且具有显著性差异($P < 0.05$)。与阴性对照组相比, 经pX-Lipofectamine及pC-Lipofectamine处理后HBsAg表达水平分别下降30%及25%(表3)。

2.2 HBV特异性siRNA对HBV转录产物的影响
假定siRNA能导致特异性的靶mRNA降解, 可以预计经pS, pX及pC处理后HBV转录产物水平将下降。相应地, HBV的mRNA表达水平采用RT-PCR法分析测定。与经pN-Lipofectamine处理后细胞的S基因mRNA(条带5)相比, 经pS-Lipofectamine处理后同一mRNA有明显下降(条带11, 图1)。HBV-mRNA水平经过同一标本的 β -肌动蛋白mRNA标化处理。与阴性对照组相比, 经pC-Lipofectamine处理后C基因mRNA表达水平下降46%, 并有显著性差异($P < 0.001$)。同样地, 经pX-Lipofectamine处理后相应mRNA表达水平下降47%, 亦有显著性差异($P < 0.001$, S-pN: 0.75 ± 0.11 ; X-pN: 0.59 ± 0.13 ; C-pN: 0.61 ± 0.03 ; S-pS: 0.34 ± 0.07 ; X-pX: 0.31 ± 0.07 ; C-pC: 0.33 ± 0.08)。

2.3 表达质粒对HBV cccDNA的影响 HBV cccDNA的表达水平采用荧光定量PCR法测定, 该法测定下限为 500×10^3 拷贝/L。与阴性对照组相比, 经pS, pC-Lipofectamine处理后HBV cccDNA的表达水平下降。有趣的是, 实验中尚发现经pX-Lipofectamine处理后HBV cccDNA的表达水平下降亦达83%, 并且差别具有显著性($P < 0.001$, HBV DNA log₁₀: pS: 4.00 ± 0.13 ; pC: 4.08 ± 0.10 ; pX: 4.28 ± 0.06 ; pN: 5.05 ± 0.07 ; HepG₂-N10: 4.74 ± 0.06 ; HepG₂: < 2.70)

3 讨论

虽然RNA干扰的发现仅有数年, 但是他已经成为分析基因功能及治疗肿瘤、感染性疾病及遗传性疾病的有力工具。然而, 血浆中稳定性差、细胞摄取率低及非特异性免疫刺激对发展RNA干扰技术仍是巨大的挑战^[13-14,22]。为了克服这些困难, 设计了几种哺乳动物源性表达载体以产生内源性shRNA^[15-17]。近来, RNA干扰的体内外抗HBV效应已有报道^[11,23-24]。我们的结果表明, 载体介导的RNA干扰能显著抑制HBV抗原表达(HBsAg及HBeAg)。我们的结果还表明, 针对HBV基因组特定位点的shRNA能抑制HBV复制, 导致能稳定表达HBV的细胞株中HBV抗原的下降。之所以选用HepG₂-N10细胞株, 是因为其能组成性表达HBV, 并且mRNA及相关抗原表达较为恒定。他是个较为理想的细胞模型, 因为HBV基因组已整合入宿主基因组。因此, 即使所有具有复制能力的中间体均被siRNA所降解, HBV的复制亦能恢复, 除非抑制作用能无限期持续下去。在出现不可逆转的肝损伤之前清除HBV是最好方法。然而, 清除HBV是难以实现的, 由于肝外HBV储存库的存在、HBV DNA可整合入宿主基因组中, 并且存在不需重感染即可扩增转录模板库(cccDNA)的细胞内转化途径。因此, 停药后常伴有快速病毒反弹。由于细胞株和自然感染株具有相同的靶序列, 因此本实验中所使用的siRNA对自然感染株可能亦有抑制作用。然而, 对自然感染株的抑制作用能否与本实验中所观察到的抑制同等有效尚有待于进一

■应用要点

本实验构建了能产生siRNA的表达质粒, 并在DNA, mRNA及蛋白质等3个水平研究RNAi对HBV基因表达及病毒复制的抑制作用, 对发展治疗性RNAi技术进行了有益的探索。

■同行评价

研究内容重要,又有新颖性,论证有力,方法得当.

步观察.

应用siRNA抗HBV富有吸引力,因为HBV的mRNA有着极大的经济性,由于其长度较小并且具有重叠读码框,使得我们可能设计一条siRNA即可同时降解几条mRNA. si-HBVS的选择即是基于这种设想,由于si-HBVS的靶位点同时位于HBV基因组的S区及P区. 尽管如此,多条siRNA同时作用于HBV的不同位点发挥的抑制HBV复制作用可能比本实验所报告的单一siRNA要大. 但是,应用这一策略发生非特异性及意料外的效应可能增加,并导致不相关的mRNA降解(RNA干扰的“脱靶效应”^[25-26]). 脱靶效应指的是与一个内源性基因某一位点并不完全同源的RNA亦能通过抑制翻译而导致基因表达的静默. G-U摆动配对可能是其主要的原因. 长度为21 nt的siRNA是达到较高的序列特异性与较低的脱靶效应的理想平衡点^[27]. 在所选择的siRNA中, pS具有最强的抑制HBV复制作用. 由于pS编码产生的siRNA作用于病毒的S区,病毒的多种mRNA均可被抑制. 除此之外,他还能下调P基因的表达(因为S基因位于P基因内),因此能发挥反式抑制HBV复制的作用. 这些因素可能部分解释了pS编码产生的siRNA具有最强的抑制HBV复制作用. 而且,我们还观察到经过pX-Lipofectamine处理后的细胞株,HBV DNA的拷贝数亦有明显的下降. 这提示X蛋白可能在HBV的复制中起到重要的作用. X蛋白由X基因编码产生,是一个小分子量蛋白质,可能与肝细胞癌的发生^[28]及病毒复制^[29-30]有关. 然而, X蛋白在这两个过程中的作用机制尚有待阐明. Leupin *et al*^[31]研究表明X蛋白刺激HBV基因组复制可能与DDB1依赖途径有关.

总之,我们的数据表明RNA干扰是抑制HBV复制的一个令人感兴趣的新策略. 然而,在RNA干扰上升为一个可能的治疗方法之前尚必须克服一些困难. 最大挑战是RNA干扰试剂在体内的输送. 血浆中稳定性低、跨膜摄取率差也是显著的困难. 另一问题是病毒可能产生变异体以逃避siRNA的抑制. Das *et al*^[32]观察到在培养几周之后, HIV-1即可产生不受siRNA抑制的变异株. Wu *et al*^[33]也在HBV中观察到类似的现象. 虽然RNA干扰现象是近来发现的,并且存在上述的不足之处,但是这一领域还是取得快速的突破. 越来越明确, RNA干扰是真核生物在演变过程中形成的控制基因表达及保护自身基因组免受外来入侵的高度保守的分子机制. 最

新的数据表明这一古老的防御机制可以作为抗HBV及其他病毒的强有力武器. 简而言之, RNA干扰可能为HBV的治疗带来革命性的变化.

4 参考文献

- Hepatitis B. Fact sheet WHO/204. Geneva: World Health Organization, October 2000. (Accessed September 25, 2005, at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html>)
- Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A, Papaioannou C. Efficacy of long-term lamivudine monotherapy in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000; 32: 847-851
- Wai CT, Lok AS. Treatment of hepatitis B. *J Gastroenterol* 2002; 37: 771-778
- Richman DD. The impact of drug resistance on the effectiveness of chemotherapy for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000; 32: 866-867
- Lampertico P, Del Ninno E, Manzin A, Donato MF, Rumi MG, Lunghi G, Morabito A, Clementi M, Colombo M. A randomized, controlled trial of a 24-month course of interferon alfa 2b in patients with chronic hepatitis B who had hepatitis B virus DNA without hepatitis B e antigen in serum. *Hepatology* 1997; 26: 1621-1625
- Papatheodoridis GV, Manesis E, Hadziyannis SJ. The long-term outcome of interferon-alpha treated and untreated patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001; 34: 306-313
- Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Ma J, Arterburn S, Xiong S, Currie G, Brosgart CL. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352: 2673-2681
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- Coburn GA, Cullen BR. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol* 2002; 76: 9225-9231
- Konishi M, Wu CH, Wu GY. Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV-producing cell line. *Hepatology* 2003; 38: 842-850
- McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 639-644
- Ge Q, McManus MT, Nguyen T, Shen CH, Sharp PA, Eisen HN, Chen J. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2718-2723
- Downward J. RNA interference. *BMJ* 2004; 328: 1245-1248
- Stevenson M. Therapeutic potential of RNA interference. *N Engl J Med* 2004; 351: 1772-1777
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-553
- Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress

- targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 497-500
- 17 Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002; 16: 948-958
- 18 Barton GM, Medzhitov R. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14943-14945
- 19 Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 2003; 33: 401-406
- 20 Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL. siRNA-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 1006-1010
- 21 Cheng T, Pan JS, Xu CY, Zhang T, Lu WX, Zhang J, Xia NS. Establishment of a human hepatoma cell line which stably expresses adw subtype HBV genome (In Press)
- 22 Leung RK, Whittaker PA. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther* 2005; 107: 222-239
- 23 Hamasaki K, Nakao K, Matsumoto K, Ichikawa T, Ishikawa H, Eguchi K. Short interfering RNA-directed inhibition of hepatitis B virus replication. *FEBS Lett* 2003; 543: 51-54
- 24 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003; 37: 764-770
- 25 Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 635-637
- 26 Saxena S, Jonsson ZO, Dutta A. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 44312-44319
- 27 Qiu S, Adema CM, Lane T. A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 1834-1847
- 28 Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 357-368
- 29 Zhang Z, Torii N, Hu Z, Jacob J, Liang TJ. X-deficient woodchuck hepatitis virus mutants behave like attenuated viruses and induce protective immunity *in vivo*. *J Clin Invest* 2001; 108: 1523-1531
- 30 Bouchard MJ, Wang LH, Schneider RJ. Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science* 2001; 294: 2376-2378
- 31 Leupin O, Bontron S, Schaeffer C, Strubin M. Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death. *J Virol* 2005; 79: 4238-4245
- 32 Das AT, Brummelkamp TR, Westerhout EM, Vink M, Madiredjo M, Bernards R, Berkhout B. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J Virol* 2004; 78: 2601-2605
- 33 Wu HL, Huang LR, Huang CC, Lai HL, Liu CJ, Huang YT, Hsu YW, Lu CY, Chen DS, Chen PJ. RNA interference-mediated control of hepatitis B virus and emergence of resistant mutant. *Gastroenterology* 2005; 128: 708-716

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

NERD及相关疾病国际研讨会

本刊讯 NERD及相关疾病国际研讨会将于2006-08在三亚举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文和结构式摘要800字, 电脑打印附软盘或E-mail, 2006-06-15截稿.

2 联系方式

北京市鼓楼大街41号中国医学论坛报社 张莉; 邮编: 100009; 电话: 010-64002844; E-mail: NERD@gisummit.com.

www.wjgnet.com