

反义寡核苷酸体外抗流感病毒活性^{*}

陈忠斌 王升启 管 伟 杨秉呼 孙志贤

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘 要: 为了获得具有抗流感病毒活性的反义寡核苷酸, 针对 A 型流感病毒基因组 3' 和 5' 端保守序列, 设计并合成了多条硫代寡核苷酸(ODN) 3' 端反义 ODN(IV3#) 与 3' 端正义 ODN(IV3S) 5' 端反义 ODN(IV4#) 与 5' 端正义 ODN(IV4S) 以及由 5' 和 3' 端正义/反义保守序列组成的复合序列 ODN(IV6# 和 IV7#)。测定了 PS-ODN 的体外细胞毒性和在 MDCK 细胞中对流感病毒复制的影响。结果表明 (1) PS-ODN 浓度高达 50 $\mu\text{mol/L}$ 时对 MDCK 细胞未表现有毒性作用 (2) 与流感病毒基因组 5' 端互补的 ODN IV4# 以及由 5' 和 3' 端保守序列构成的 IV6# ODN 和 IV7# ODN 均具有较高的抗病毒活性, 如 IV4# ODN 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时对流感病毒 A/京防/86-1(H_1N_1) 抑制率近 50%, 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 或更高时抑制率超过 70%, 且 IV4# 抑制病毒活性呈现明显的序列和剂量依赖性 (3) IV4# ODN 不仅对 A 型流感病毒 H_1N_1 亚型有抑制作用, 对 H_3N_2 亚型也表现较高的抑制活性 (4) 病毒感染复数(MOI) 对 IV4# ODN 抗病毒活性有一定影响, 当 MOI 较低时, IV4# ODN 表现的剂量效应关系更加明显。抗流感病毒反义寡核苷酸 IV4# ODN 的发现为进一步研究流感新型药物奠定了实验基础。

关键词: 流感病毒, 反义寡核苷酸, 体外细胞毒性, 抗病毒活性, 感染复数

中图分类号: Q523 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2000)05-0482-87

流感是由流感病毒引起的危害人类健康和生命的一种急性病毒性呼吸道传染病。目前, 虽有流感病毒疫苗和唯一的流感药物金刚烷胺投入临床应用, 但由于流感病毒抗原高度变异, 上一个流感流行时期所用的有效疫苗对下一次爆发往往会失去预防作用, 并且目前对流感病毒抗原变异及流感发生流行的周期性尚乏可靠的预测方法。另一方面, 多年的临床实践表明, 金刚烷胺类药物具有神经毒性、易产生耐药毒株和对 B 型流感病毒无效等缺陷。因此, 研究特异高效低毒的新型流感药物具有重要的现实意义。

反义寡核苷酸(Antisense Oligodeoxynucleotide, ASODN) 是一类与 mRNA 互补结合并特异性阻断基因表达的人工合成 DNA 片段。由于 ASODN 及其类似物(如硫代物) 具有药用特性, 在病毒性传染病、肿瘤和炎症等疾病治疗中具有诱人的应用前景^[1, 2]。为治疗 AIDS 病人由 CMV 感染所引起的视网膜炎, 已将反义核酸药物 VitraveneTM 投入临床应用^[3]。

本文以 A 型流感病毒基因组末端保守序列为靶点, 设计并合成了多条寡核苷酸

^{*} 国家 863 课题(102-08-04-01) 和军队“九五”重点课题(97Z007)

作者简介: 陈忠斌(1969 -) 男, 湖北省咸宁市人, 军事医学科学院放射医学研究所, 博士, 助研, 主要从事病毒分子生物学和抗病毒药物基础研究

收稿日期: 1999-08-02, **修回日期:** 2000-02-15

(ODN)。通过体外细胞试验,筛选到特异性抑制流感病毒复制的 ASODN,为研制流感新型药物奠定了试验基础。

1 材料和方法

1.1 细胞与病毒

MDCK 细胞系和流感病毒毒株 A/京防/1/86(H_1N_1)、A/鲁防/9/93(H_3N_2)、A/山东/9/93(H_3N_2)购自中国预防医学科学院病毒学研究所国家流感中心。MDCK 培养液为含 10% 胎牛血清(GIBCO.BRL)的 DMEM 培养液,繁殖病毒和 ODN 筛选时使用含 5 μ g/mL 胰蛋白酶的 DMEM。冻干流感病毒在 10 日龄 SPF 鸡胚传代 3~4 次,收集尿囊液,2 000g 离心 10min,分装,-70℃ 保存,作为感染 MDCK 的病毒原液。

1.2 硫代寡聚脱氧核糖核酸(PS-ODN)分子设计与合成

参考 A 型流感病毒基因组末端保守序列^[4],设计如下序列的寡核苷酸(ODN)(表 1)。

以上 PS-ODN 均在 Applied Biosystems 391 型 DNA 合成仪中合成。合成后先用浓氨水 55℃ 脱保护 15h,然后用反相柱(购自 Solid Phase Sciences 公司)层析法纯化。

1.3 PS-ODN 体外细胞毒性测定

按参考文献^[5,6]报道方法及 CytoTox@Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒说明书进行。主要操作程序如下:把 100 μ mol/L PS-ODN(100 μ L)按 $2^0, 2^{-1}, \dots, 2^{-11}$ 顺序用含 2% FBS 的 DMEM 进行倍比稀释,加入长满单层的 MDCK 细胞,37℃ 培养 2d。取 10 μ L(10 $\times$)裂解液加到 100 μ L 正常细胞上清中,37℃ 作用 45min。分别取测定孔上清液、正常细胞上清液和正常细胞裂解液各 50 μ L 加到另一 96 孔板,向各孔加入 50 μ L Substrate Mix,避光室温保存 30min,再加入 50 μ L 终止液,去除气泡,用 VICTOR™ 1420 Multilabel Counter 测定 OD_{490} ,按如下公式计算细胞毒性:

$$[(OD_{\text{试验}} - OD_{\text{正常细胞}}) / OD_{\text{正常细胞裂解液}}] \times 100$$

1.4 抗流感病毒 PS-ODN 筛选

以 10^6 细胞/孔的量把 MDCK 细胞接种到 96 孔细胞培养板(Nunc),细胞生长液为含 10% 胎牛血清的 DMEM。37℃ 培养过夜,用 PBS(pH7.5)冲洗 3 次。用含 0.2% BSA 的 DMEM 把 PS-ODN 稀释成:0.1 μ mol/L、1 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L、20 μ mol/L,以 50 μ L/孔的量加入各孔(每个浓度重复 4 孔),37℃ 作用 1h,再以 PBS(pH7.5)冲洗 3 次,加入 50 μ L $320 \times$ 稀释的流感病毒 A/京防/1/86(H_1N_1)(MOI=1),37℃ 作用 45~60min;以 PBS(pH7.5)冲洗 3 次,加入含 0.2% BSA、5 μ g/mL 胰蛋白酶和相同浓度 PS-ODN 的 DMEM 培养液。设立病毒感染阳性对照和 MDCK 细胞阴性对照。37℃ 培养 2d,参考文献

表 1 反义寡核苷酸的分子设计

Table 1 The molecular design of ASODNs targeting to influenza virus

ODN No.	ODN sequences	Targets
IV3#	5'AGCIAAAGCAGG 3'	3' end of vRNA
IV3S	5'CCTGCTTTTGCT 3'	3' end of vRNA
IV4#	5'CCTTGTTTCTACT 3'	5' end of vRNA
IV4S	5'AGTAGAAACAAGG 3'	5' end of vRNA
IV6#	5'AGTAGAAACAAGGCTGGG CCCTGCTTTTGCT 3'	3'/5' end of vRNA
IV7#	5'AGCAAAAGCAGGGCGCGG	3'/5' end of vRNA
RODN	5'TTTATCGCCTTTC 3'	Random sequences

献^[7,8]报道方法用 Celltiter 96@ Aqueous One Solution 试剂盒 (Promega 公司产品) 测定病毒致细胞病变作用(以 OD_{490} 表示), 以如下公式计算 ODN 的病毒抑制率。[$(OD_{\text{试验}} - OD_{\text{病毒}}) / (OD_{\text{细胞}} - OD_{\text{病毒}})$] $\times 100$ 。或者取 $40\mu\text{L}$ 培养上清, 以 0.5% 鸡红细胞测定病毒血凝滴度^[9,10], 按如下公式计算病毒抑制率 [$1 - (HA_{\text{试验}} / HA_{\text{阳性}})$] $\times 100$

2 结果

2.1 PS-ODN 体外细胞毒性

在体外细胞水平筛选具有抗流感病毒活性 PS-ODN 的前提条件是 PS-ODN 不具有细胞毒性, 因此在测定 PS-ODN 抗病毒活性之前应先测定 PS-ODN 是否具有细胞毒性。

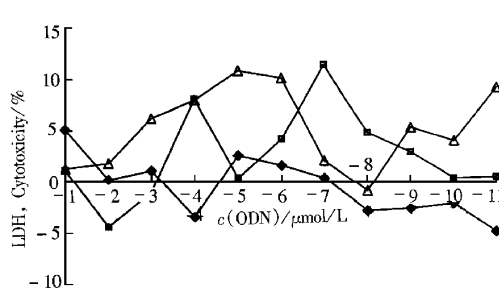


图1 PS-ODN IV4# ODN、IV3SODN 和 RODN 的体外细胞毒性

Fig.1 The *in vitro* cytotoxicity of PS-ODN IV4# ODN, IV3SODN and RODN
◆-RODN; □-IV4#; △-IV3S.

体外细胞毒性测定的依据是, 通过测定 MDCK 细胞上清中乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, LDH)活性来反映硫代寡核苷酸的体外细胞毒性^[5,6]。试验中以 IV4# ODN、IV3SODN 及 RODN 为例, 测定了 PS-ODN 的体外细胞毒性。结果发现, 与正常 MDCK 细胞裂解液相比, 不同浓度 ($50\mu\text{mol/L} \sim 0.024\mu\text{mol/L}$) IV4# ODN, IV3S ODN 以及 RODN 作用的细胞上清中 LDH 活性很低, 只有 $-5\% \sim 11\%$; 而且与 PS-ODN 的序列和浓度不相关(图 1)。另外, 光镜下观察发现, PS-ODN 浓度高达 $50\mu\text{mol/L}$ 时细胞生长状态正常, 与正常细胞对照无明显区别。说明 PS-

ODN 对 MDCK 细胞系不具有明显的细胞毒性。

2.2 抗流感病毒 PS-ODN 筛选

图 2 为 PS-ODN(IV4#, IV4S, IV3#, IV3S) 对流感病毒 A/京防/86-1(H1N1)在 MDCK 细胞复制抑制率。结果表明, IV4# 浓度为 $1\mu\text{mol/L}$ 、 $5\mu\text{mol/L}$ 、 $10\mu\text{mol/L}$ 和 $20\mu\text{mol/L}$ 时, IV4# 均表现抑制病毒活性。当浓度为 $1\mu\text{mol/L}$ 时抑制率近 50%; 浓度为 $10\mu\text{mol/L}$ 或更高时, 病毒抑制率超过 70%, 并且 IV4# ODN 对抑制流感病毒活性呈现明显的浓度依赖性。其它 ODN(IV4S, IV3# 和 IV3S)在低浓度时未表现抗病毒作用, 在高浓度时只具有较弱抑制病毒活性, 说明 IV4# ODN 抗病毒活性也存在序列相关性。另外发现 IV4# ODN 具有明显抑制病毒 CPE 作用, 且浓度越大抑制作用愈明显。

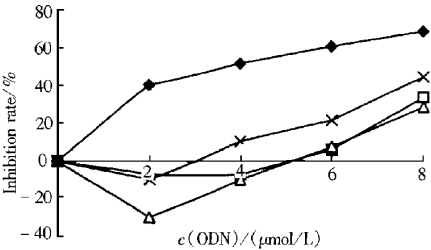


图2 不同浓度硫代 ODN 对流感病毒在 MDCK 细胞中复制的影响

Fig.2 Effect of increasing concentrations of PS-ODN on the inhibition activity against A/JingFang/1/86(H₁N₁) infected in MDCK cells
◆-IV4#; □-IV4S; △-IV3#; ×-IV3S.

同时,测定了 IV6 # ODN、IV7 # ODN 抗病毒作用,并与 IV4 # ODN 及随机序列 RODN 的抗病毒活性进行了比较。结果发现,IV6 # 和 IV7 # ODN 表现出与 IV4 # ODN 相当的抗病毒活性。浓度为 $1\mu\text{mol/L}$ 和 $5\mu\text{mol/L}$ 时对流感病毒抑制率分别为 49.4%、43.9% 和 60.0%、51.4% ;而与 IV4 # ODN 碱基构成相同而序列不同的随机序列 RODN 在同样浓度时对流感病毒抑制率均不超过 36%(图 3)。结果表明,IV4 # ODN、IV6 # ODN 与 IV7 # ODN 在体外细胞水平具有较高的抗流感病毒活性,而且抗病毒活性呈现明显的序列和剂量依赖性,揭示 IV4 # ODN、IV6 # ODN 与 IV7 # ODN 可能通过反义机制发挥其抗流感病毒作用。

2.3 病毒感染复数(MOI)对 IV4 # ODN 抗病毒活性的影响

在 IV4 # ODN 浓度较低时,MOI = 1 时 IV4 # ODN 抗病毒作用比 MOI = 0.5 时的抗病毒作用强,但在 IV4 # ODN 浓度较高时,MOI 越小,IV4 # ODN 的抗病毒作用越明显。同时还发现,MOI 越小,IV4 # ODN 的抗病毒作用呈现更加明显的剂量-效应依赖关系(图 4)。说明病毒感染复数影响 IV4 # ODN 的抗病毒活性,提示在进行反义寡核苷酸抗病毒活性评价时病毒接种剂量是必须考虑的一个重要影响因素。

2.4 IV4 # ODN 对流感病毒 H₁N₁、N₃N₂ 亚型的抑制作用

测定了 IV4 # ODN 对流感病毒 H₁N₁ 和 H₃N₂ 亚型代表毒株的抑制作用(图 5)。结果表明,IV4 # ODN 对 A 型流感病毒 H₁N₁ 和 H₃N₂ 亚型代表株均表现较高抑制活性,而且抗病毒活性呈现明显的剂量效应关系。

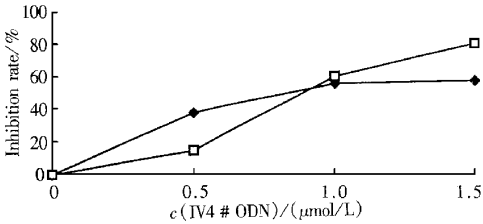


图 4 病毒感染复数(MOI)对 IV4 # ODN 抗流感病毒作用的影响

Fig. 4 The effect of multiplicity of infection(MOI)of influenza A virus on antiviral activity of IV4 # ODN
◆—MOI = 1 ; □—MOI = 5.

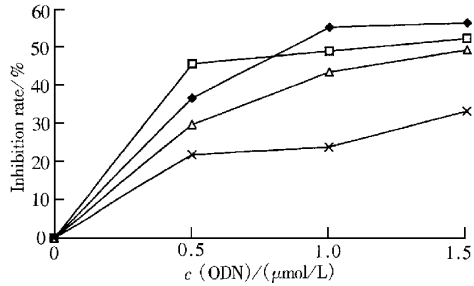


图 3 IV4 # ,IV6 # 和 IV7 # ODN 体外抗流感病毒活性

Fig. 3 The anti-influenza A virus activity *in vitro* of IV4 # ODN ,IV6 # ODN and IV7 # ODN
◆—IV4 # ; □—IV6 # ; △—IV7 # ; ×—RODN.

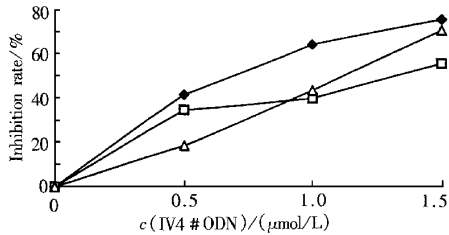


图 5 IV4 # ODN 对流感病毒代表株 A/京防/86/ (H₁N₁) ,A/鲁防/9/93/ (H₃N₂) 和 A/山东/9/93/ (H₃N₂) 的抑制作用

Fig. 5 The antiviral activity of IV4 # ODN against A/Jingfang/1/86/ (H₁N₁) ,A/Lufang/9/93/ (H₃N₂) and A/Sandong/9/93/ (H₃N₂)
◆—A/Jingfang/86-1(H1N1) ;
□—A/Lufang/93-9(H3N2) ;
△—A/Sandong/93-9(H3N2) .

3 讨论

研究证实, A 型流感病毒基因组 8 个片段 RNA 末端即 3' 端 12 个核苷酸(nt) 序列(3' UCGU/ CUUUCGUCC5') 和 5' 端 13 个核苷酸序列(3' GGAACAAAGAUGA5') 高度保守; 并且发现, 这种保守末端序列在流感病毒基因复制、转录、病毒装配及其调节等分子事件中具有重要调控作用^[4, 11, 12], 因而成为抗流感病毒 ASODN 设计的重要潜在靶标。Zerial 等^[13]以流感病毒 vRNA 3' 端 12nt 保守序列为靶点设计了 ASODN, 结果发现 7nt ASODN (5' AAAGCAG3') 当浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 时具有抑制病毒活性。考虑到该 ASODN 的长度只有 7nt, 体内外作用的特异性有待进一步研究, 因而研制和开发成流感药物的可行性尚需重新评价。本研究中, 我们以流感病毒基因组 vRNA 3' 和 5' 端保守序列为靶标, 设计并合成了与其互补的反义 ODN 和与其序列一致的正义 ODN; 并且, 通过计算机模拟设计了由基因组两端保守序列组成, 具有特殊高级空间结构的复合序列 ODN (IV6 #, IV7 #), 系统评价了 vRNA 两端保守区作为设计抗流感病毒 ASODN 靶标的可行性。首次证明流感病毒 vRNA 5' 端保守区是抗流感病毒 ASODN 设计的有效靶标, 在 ASODN 设计思路, 提出由基因组中针对不同区域的多个反义寡核苷酸序列组成复合寡核苷酸的策略, 应用于设计具有生物学活性的寡核苷酸, 拓展了 ASODN 分子设计的思路, 为抗病毒 ASODN 及其它 ASODN 药物分子设计奠定了基础。

从目前所揭示的 ASODN 作用机理^[14]可以推测, 本试验筛选的 ASODN 可能的作用机制是, ASODN 进入细胞后与流感病毒 vRNA 5' 端序列结合, 阻止病毒 RNA 多聚酶等与病毒复制有关的调节因子识别 vRNA 5' 端调控序列, 从而抑制病毒 RNA 的复制与转录。研究表明, 流感病毒 vRNA 3' 和 5' 端在病毒粒子内反向互补形成锅柄(panhandle) 样高级结构, 参与病毒颗粒装配、病毒基因组复制、表达的主要蛋白因子(包括病毒特异性的和来源于宿主细胞的) 通过与这一高级结构相互作用发挥其功能, vRNA 3' 和 5' 端均与 RNA 多聚酶形成复合体, vRNA 5' 端保守序列是激活 RNA 多聚酶必需并含有起始病毒基因组复制的内部启动子序列^[15, 16], 并且, 5' 端保守序列与 RNA 聚合酶结合是病毒特异性 mRNA 加 poly(A) 尾所必需的^[17], 揭示流感病毒 vRNA 5' 端保守序列作为设计抗流感病毒 ASODN 靶点在理论上是可行的。通过计算机模拟分析发现, IV6 # ODN 和 IV7 # ODN 在体温 37℃ 时呈现与病毒核蛋白体相似的锅柄样高级结构, 进入细胞后可能通过与参与病毒基因复制、表达有关的蛋白因子竞争性结合, 从而抑制病毒复制。最近的研究证实了这一机制存在的可能性^[18, 19]。但 RNase H 是否参与切割靶标序列, 从而抑制病毒在细胞中复制, 尚待试验证实。

参 考 文 献

- [1] Stein C A, Chen Y C. *Science*, 1993, **261**(20):1004~1012.
 - [2] Wagner R W. *Nature*, 1994, **372**(24):333~335.
 - [3] Crooke S T. *Antisense & Nucleic Acid Drug Dev*, 1998, **8**:7~8.
 - [4] Desselberger U, Racaniello V R, Zazra J J, et al. *Gene*, 1980, **8**(1):315~328.
 - [5] Behl C, Davis J B, Lesley R, et al. *Cell*, 1994, **77**(6):817~827.
- 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [6] Lappalainen K , Jaaskelainen I , Syrjanen K , *et al.* *Pharm Res* , 1994 , **11** (8) :1127~1131
- [7] Abe T , Hatta T , Takai K , *et al.* *Nucleosides & Nucleotides* , 1998 , **17** (1~3) :471~478.
- [8] Abe T , Suzuki S , Hatta T , *et al.* *Antivir Chem Chemother* , 1998 , **9** (3) :253~262.
- [9] Leiter J M , Agrawal S , Palese P , *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* , 1990 , **87** (9) :3430~3434.
- [10] Barrett T , Stephen C. Purification and titration of influenza virus. In :Mahy WJ. Ed. *Virology :A Practical Approach*. Washington D C , IRL Press , 1985. 119~151.
- [11] Fodor E , Pritlove D C , Brownlee G G. *J Virol* , 1995 , **69** (7) :4012~4019.
- [12] Stoeckle M Y , Shaw M W , Choppin P. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1987 , **84** (5) :2703~2707.
- [13] Zerial A , Thuong N T , Helene C. *Nucleic Acids Res* , 1987 , **15** (23) :9909~9919.
- [14] Crooker S T. *Med Res Reviews* , 1996 , **16** (4) :319~344.
- [15] Fodor E , Pritlove D C , Brownlee G G. *J Virol* , 1994 , **68** (6) :4092~4096.
- [16] Tiley L S , Hagen M , Matthews J J , *et al.* *J Virol* , 1994 , **68** (8) :5108~5116.
- [17] Poon L L , Pritlove D C , Sharps J , *et al.* *J Virol* , 1998 , **72** (10) :8214~8219.
- [18] Luo G , Danetz S , Krystal M. *J Gen Virol* , 1997 , **78** :2329~2333.
- [19] Hatta T , Ishikawa M , Takai K , *et al.* *Biochem Biophys Res Commun* , 1998 , **249** :103~106.

IN VITRO ANTIVIRAL ACTIVITY OF ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES AGAINST INFLUENZA VIRUS*

Chen Zhongbin Wang Shengqi Guan Wei Yang Binghu Sun Zhixian

(The Department of Biotechnology , Beijing Institute of Radiation Medicine , Beijing 100850)

Abstract : For developing of antisense oligonucleotides as potential antiviral therapeutic agents against influenza A virus , phosphorothioate oligodeoxynucleotide (PS-ODN) targeted to part to the 3' and 5' end sequences which are common to the eight RNAs of type A influenza virus were synthesized. The *in vitro* cytotoxicity of these PS-ODNs was assayed and then antiviral activity of these PS-ODNs was evaluated by using cultured MDCK cells infected by A/JingFang/86-1(H₁N₁). It was found that (1) No *in vitro* cytotoxicity was seen when concentration of PS-ODN was up to 50 μmol/L. (2) Oligonucleotides (IV4 #) complementary to 5' terminal conserved sequences and ODN (IV6 # , IV7 #) composed by 3'/5' terminal conserved sense sequences or antisense sequences all exhibited the most potent antiviral activity. IV4 # ODN exhibited significant antiviral activity with reduced hemagglutination titer about 50 % at concentration of 1 μmol/L , and over 70 % at 10 μmol/L. The antiviral activity of IV4 # was in a dose- and sequence-dependent manner. (3) IV4 # ODN showed significant antiviral activity not only against H₁N₁ subtype strains of influenza virus , but also against H₃N₂ subtype strains. (4) The multiplicity of infection (MOI) of influenza virus had effects on antiviral activity of IV4 # ODN. IV4 # ODN showed better dose-dependent antiviral activity when there was lower MOI. These results suggested the 3'/5' terminal sequences of influenza A virus could be used as a target for designing antiviral oligonucleotides against influenza A virus.

Key words : Influenza virus , Antisense oligonucleotides. *In vitro* cytotoxicity , Antiviral activity , Multiplicity of infection