

## RNA 干扰与慢性乙型肝炎治疗

洪源 成军

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的慢性感染是引发肝硬化(liver cirrhosis, LC)和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要危险因素<sup>[1-3]</sup>,长期以来威胁着我国人民的健康。目前,人群中普遍接种乙肝疫苗虽然可以有效减少乙型肝炎的发病,但有很大比例的疫苗无反应现象。此外,慢性乙型肝炎的药物疗效仍很不理想。因此,探索更加有效的治疗方法是当今控制乙型肝炎蔓延的重要课题。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种由双链 RNA(dsRNA)诱发的转录后水平基因沉默(posttranscriptional gene silence, PTGS)<sup>[4]</sup>。RNAi 技术特异性高、周期短、操作简便等优点是传统的基因敲除技术和反义技术所无法比拟的,在探查基因功能和治疗人类疾病方面有广阔的应用前景。2006 年,这一现象的发现者 Fire 等<sup>[5]</sup>和 Seydoux 等<sup>[6]</sup>获得了诺贝尔医学奖,说明了该技术的有效性和先进性。这一技术也促使抗 HBV 的研究进入了一个新的阶段,研究者们从阻断 HBV 基因在肝细胞中的复制和表达出发,在体外和体内水平上对 RNAi 抗 HBV 的机制和作用进行了深入的研究,取得了大量的成果。

### 一、RNAi 技术原理

1995 年 Guo 等<sup>[7]</sup>在研究秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的 *par1* 基因时,在给线虫注入正义及反义 RNA 后,却观察到 *Par1* 基因的表达抑制。1998 年, Fire 等<sup>[5]</sup>进一步研究发现其基因抑制作用由微量污染的 dsRNA 引起,其抑制基因表达的效率比反义 RNA 高两个数量级,由此命名为 RNA 干扰。其后短短几年, RNA 干扰现象在植物、真菌、线虫、昆虫、鸟类、鼠、猴及人类等几乎所有真核细胞生物中被广泛证实<sup>[8-11]</sup>。

1. RNAi 的作用机制: RNAi 的作用包括起始阶段和效应阶段。在起始阶段,加入的小分子 RNA 被细胞质中的核酸内切酶 Dicer 切割为 21 ~ 23 个核苷酸(nt)长的小分子干扰 RNA 片段<sup>[8-10]</sup>(small interfering RNA, siRNA)。Dicer 酶是 RNase III 家族中特异识别双链 RNA 的成员,能以一种 ATP 依赖的方式逐步切割由外源导入或者由转基因、病毒感染等各种方式引入的 dsRNA,降解后的 siRNA 每个片段的 3'-端都有 2 个突出的碱基。在效应阶段, siRNA 双链结合 1 个核酶复合物,形成 RNA 诱导沉默复合物(RNA induced silencing complex, RISC)。激活的 RISC 通过碱基配对定位到同源 mRNA 上,这时 RISC 上的核酸酶以一定的间隔,在被识别的 mRNA 上进行切割,产生 21 ~ 23 nt 的 RNA 片段。被降解的

作者单位:100011 北京,北京地坛医院传染病研究所

通讯作者:成军 Email: cj@genetherapy.com.cn

RNA 片段及未被降解的完整 RNA 均可作为引物,在 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRP)作用下,合成更多的 dsRNA。新合成的 dsRNA 再被 Dicer 酶识别并切断,形成新的 siRNA 进一步作用于 RNA。因此,只需少量的 dsRNA 即能高效、持久、特异地导致相应基因表达的沉默<sup>[12,13]</sup>。

2. RNAi 的主要特征:RNAi 为转录后水平的基因沉默。RNAi 具有高度特异性,只引起同源 mRNA 的降解。RNAi 的基因抑制具高效性,数量远远少于 mRNA 的 dsRNA 就能完全抑制基因的表达。RNA 抑制基因的效应可突破细胞界限,并传递给子代。RNAi 的长度限制为:dsRNA 通常为 21 ~ 30 nt,切割后的 siRNA 在 21 ~ 23 nt,并由 siRNA 介导 RISC 对 mRNA 切割,大于 30 nt 的 dsRNA 不能在哺乳动物中诱发特异的 RNAi,而是导致细胞非特异性和全面的基因表达受抑并凋亡。研究表明利用质粒载体转染,在体内合成的 siRNA 其基因抑制效果与体外合成 siRNA 相似,且成本低,并能克服外源合成 RNA 易降解的缺点。

近期研究提示病毒载体的方法最简便且转染率高,并可直接用于动物实验。

3. siRNA 的制备:目前,较为常用的方法主要有体外合成和体内表达 siRNA 法。体外制备 siRNA 主要包括化学合成、体外转录、长片段 dsRNA 经 RNase III 降解。主要缺点是 RNA 易于被 RNA 酶分解,不仅费用高,而且转染细胞后只能在短时间内起作用,还可引发非特异的基因沉默。这在一定程度上限制了 RNAi 技术的应用。Miyagishi 等<sup>[14]</sup>建立了 U6 启动子驱动的体内 siRNA 合成方法,成功地抑制了靶基因在哺乳动物细胞中的表达。构建了两个 U6 启动子分别引导 19 nt 的 siRNA 正义链和反义链的合成,两段 RNA 在细胞内退火成为双链 RNA。Sui 等<sup>[15]</sup>也构建了 U6 启动子控制的 siRNA 表达质粒,不同的是 siRNA 可形成回文结构。在 U6 启动子下游依次是 siRNA 21 nt 编码序列、6 个碱基的间隔序列、反向的 siRNA 21 nt 编码序列及由 5 个 T 寡核苷酸尾组成的转录终止序列。这个质粒合成的 RNA 为发夹样双链结构(small hairpin RNA, shRNA)。此结构的 siRNA 比由正义链和反义链退火后形成的 dsRNA 能更有效地抑制靶基因的表达。Brummelkamp 等<sup>[16]</sup>构建了 pSUPER 质粒载体,应用了聚合酶 III 基因启动子起始 RNA 合成。实验结果表明,表达的 shRNA 在体内被核酸酶切割成 siRNA 后起作用,其中环的序列和大小非常重要,当间隔 9 nt 时效果最佳。siRNA 表达载体的优点在于不需要直接操作 RNA,大大减低了实验成本和实验风险,增加了实验的可操作性。此外,逆转录病毒和腺相关病毒等也被用作载体,其优势在于转染细胞的高效率,而且转染效果更加稳定。

4. RNAi 的应用:RNAi 的发现及在生物中存在的普遍性,使其在功能基因组学、病毒学、肿瘤治疗、信号转导、遗传病治疗领域有广阔的应用前景。(1)基因功能研究:由于 RNAi 具有高度的序列特异性,可以使特异基因沉默,产生类似基因敲除的效应,并在投入及操作复杂程度等方面明显优于传统的基因敲除技术,使其成为研究基因功能不可或缺的工具。Brummelkamp 等<sup>[16]</sup>利用质粒载体构建并转染 siRNA 来抑制 CDH1 基因,结果有效抑制率为 92%,并且 CDH1 基因突变

体的 siRNA 对 CDH1 无基因抑制作用,进一步论证了 RNAi 技术的高度特异性。Sui 等<sup>[17]</sup>应用体外构建的 siRNA 转染 HeLa、U220S、C332A、H129 等细胞系,其基因沉默作用均达 86% 以上。Harborth 等<sup>[18]</sup>利用 siRNA 使哺乳动物细胞骨架蛋白基因表达沉默,则细胞生长受到抑制;(2) 病毒性疾病的治理:Yamamoto 等<sup>[19]</sup>利用 Lenti 病毒载体引入 siRNA 使其抑制 HIV-1 的辅助受体 CCR5,阻止病毒进入 T 细胞,结果发现 siRNA 可特异性地抑制 CCR5 的表达,对 CCR4 没有影响,可抑制 HIV 感染细胞。Gitlin 等<sup>[20]</sup>证实将特异性 dsRNA 转染细胞可显著抑制脊髓灰质炎病毒。Zhang 等<sup>[21]</sup>的研究证明,应用针对 SPIKE 蛋白的 siRNA 可以抑制 SARS 病毒在体外细胞中的复制。Jacque 等<sup>[22]</sup>利用 RNAi 敲除 HIV 感染细胞中 LTR、vif、nef 基因而抑制病毒增殖。Chen 等<sup>[23]</sup>针对口蹄疫病毒(FMDV) VP1 的基因序列合成出相应的 siRNA,并转染 BHK221 细胞,结果显示 VP1 表达下降 80% ~ 90%,而且经转染的 BHK221 细胞可以抵御 100 T<sub>50</sub> 的病毒感染,使抗病毒效应延长至转染后 48 h;(3) 肿瘤的治疗:在人肝细胞癌组织中尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, u-PA) mRNA 呈上调表达,其表达水平与患者的存活呈负相关。Salvi 等<sup>[24]</sup>构建靶向 u-PA 的发夹状的 dsRNA,再转染 Skhep1C3 细胞,结果表明:Skhep1C3 细胞转染 dsRNA 后,u-PA 蛋白水平下降,细胞生物活性如侵袭、转移和增殖能力下降,这提示靶向 u-PA siRNA 技术在治疗肝细胞癌方面具有潜力。Wilda 等<sup>[25]</sup>合成 dsRNA(BCR/ABL)转染白血病细胞株 K562 细胞,显示 siRNA 显著降低 BCR-ABL 的表达(mRNA 降低 87%,蛋白降低 80%),使癌细胞发生凋亡,可望在肿瘤治疗学上取得重大突破。Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白,如果用 RNAi 技术将 Bcl-2 蛋白水平降到足够低,肿瘤细胞的凋亡水平可望提高。Fu 等<sup>[26]</sup>合成了 19 个碱基的靶向 Bcl-2 siRNA 构建载体,转染人肿瘤细胞 HeLaB2 和 BGC823,结果表明:转染 72 h 后,两种细胞 Bcl-2 基因的表达水平显著降低。在体内实验中,注射 Bcl-2 siRNA 载体后对 BALB/c 鼠肿瘤的生长抑制了 66.5%。这些都证实了,通过 RNAi 介导特异性基因技术是一种有临床价值的治疗方法;(4) 遗传疾病的治理:Ishizuka 等<sup>[27]</sup>发现通过特异性 siRNA 可以抑制脆性 X 染色体综合征相关 FMR21 基因的表达,从而为治疗脆性 X 染色体综合征提供了可能。

## 二、RNAi 与慢性 HBV 治疗

HBV 是 DNA 病毒,在其复制过程中存在一个从前基因组 RNA 逆转录到 DNA 的重要环节,该步骤发生在细胞浆中,应用 RNAi 不仅可以阻断 HBV RNA 的表达,也能够干预 HBV 复制。从 2002 年开始利用 RNAi 技术对 HBV 进行研究至今,不同的研究者针对 HBV 的调控元件序列,设计了不同靶位的 siRNA。

1. RNAi 作用靶基因的选择:HBV 基因组为部分双链的环状 DNA,全长 3.2 kb,负链含遗传信息,有 4 个开放阅读框架(open reading frame, ORF),分别编码 S、C、P、X 蛋白。S 区基因编码表面抗原,C 区基因编码病毒的核心抗原 HBcAg 及 HBeAg,P 区基因负责编码病毒的 DNA 聚合酶,X 区基因编码 HBxAg,其中 P



基因与 S 基因完全重叠, X 基因与 P 基因部分重叠, 有 3.5、2.4、2.1 和 0.8 kb 4 种 mRNA。HBV 表达的病毒蛋白较少, 其中核心蛋白和聚合酶是病毒复制的必需蛋白, 包膜蛋白主要参与病毒核衣壳的形成和病毒的感染, X 蛋白参与病毒的转录调控。siRNA 在 HBV 前基因组 RNA 出核到胞浆逆转录过程中, 切割前基因组 RNA 和其他转录本, 阻止 HBV 遗传信息的传递、病毒颗粒的装配和蛋白表达, 从而破坏 HBV 的复制和表达。针对 HBV 的 RNAi 靶序列主要是 S、C、X 和 P 基因及 poly A、DR1、DR2 等调控元件。同一基因不同序列的 siRNA 具有不同的基因封闭能力, 一些靶 RNA 序列可能被埋在高度折叠区域的内部, 一些序列可能和蛋白质形成紧密结构复合体, 使 siRNA 无法对它们识别, 由于 HBV DNA 聚合酶缺乏纠错能力, 从而使病毒基因序列具有高度变异性。所以, 应将 siRNA 的靶序列设定为病毒的保守区域, 同时使用多个位点, 防止病毒变异株的出现。

2. RNAi 治疗 HBV 的研究进展: McCaffrey 等<sup>[28]</sup> 针对 HBV 的 C、X、S 和 P 基因区共设计 7 条 shRNA, 分别进行体内外实验, 发现不同 shRNA 的抑制效果不一致, 其中 2 个位点具有显著的抑制效果。Shlomai 等<sup>[29]</sup> 针对 HBV 的 C 和 X 基因, 分别构建 shRNA 表达载体, 与携带 1.3 拷贝 HBV 基因组的质粒载体共转染肝癌细胞系, 结果显示 siRNA 使 HBV RNA 和蛋白水平降低了 89% 和 63%, 且复制形式的 HBV DNA 也显著减少。针对 X 基因的 siRNA 表达不仅有效抑制 X 基因的 RNA 和蛋白表达, 且对 S、C 等其他 HBV 的 RNA 和蛋白表达也有很强的抑制作用。结果提示针对 X 基因的 siRNA 对 HBV 表达的抑制能力要优于针对 C 基因的 siRNA。为进一步证实这一发现, 他们将 Huh7 细胞换成可以稳定表达 HBV 的 HepG2. 2. 15 细胞系。Northern 印迹检测显示, X siRNA 组的细胞内病毒转录水平下降 68%, C siRNA 组仅下降 13%, 而核心蛋白表达下降 63%。Konishi 等<sup>[30]</sup> 针对 HBV 的 S、前-C 区和 polyA 区序列设计了 siRNA, 转染 HepG 2. 2. 15 细胞, 3 个位点均可有效抑制细胞分泌 HBsAg, 其中作用于 polyA 序列的 siRNA 抑制率最高。Giladi 等<sup>[31]</sup> 发现针对 HBV S 基因的双链 siRNA 片段转染 HepG2. 2. 15 细胞后, 明显抑制 HBV 的复制水平, 细胞上清中的 HBsAg、HBeAg 表达下降 80% 以上。尾静脉注射 HBV 质粒和 S 区特异性的 siRNA 片段后, Southern 印迹和免疫组织化学检测发现小鼠血清及肝脏组织的 HBV 复制和表达较对照组显著下降, 表明针对 HBV 的特异性 siRNA 可在体外或体内水平抑制 HBV 的复制表达, 起到抗 HBV 的作用。Ying 等<sup>[32]</sup> 用化学合成的针对 HBV C 基因的特异性 siRNA 片段, 转染 HBV 诱导的 HepAD38(产野生型病毒) 和 HepAD79(产 YMDD 变异型病毒) 细胞系, 实时定量 PCR 法检测显示, siRNA 可以明显降低两种细胞系内 HBV 的复制。蛋白免疫印迹检测发现两种细胞系内的 HBV HBcAg 表达水平也有显著下降, 并呈现剂量依赖关系。Zhang 等<sup>[33]</sup> 利用含 U6 启动子的质粒载体与 HBV 基因组的质粒共转染 Huh7 细胞系, 证实了针对 HBV 基因组不同区段的 siRNA, 可不同程度地引起病毒 DNA 复制率及 RNA 转录的下降。同时通过检测细胞内 Mx<sub>A</sub> 及 2', 5'-寡腺苷酸水平, 发现 siRNA 片段并没有激活胞内非特异性干扰素

途径的信号转导通路。Hamasaki 等<sup>[34]</sup>用 HBV DNA 和针对 HBV 前基因区的 siRNA 共转染 Huh7 细胞和 HepG2 细胞系,用酶联免疫吸附法(ELISA)分析病毒标志物 HBsAg, Northern 印迹和蛋白免疫印迹分析共转染后 2 d 的细胞裂解物,发现 siRNA 可降低 HBV RNA 水平,并引起病毒复制指标和病毒蛋白表达量的下降。本课题组刘顺爱等<sup>[35]</sup>针对 HBV 的 P 区设计了 5 个 RNAi 表达载体,结果发现其中的 2 个具有明显的 HBsAg 和 HBeAg 分泌抑制效应和表达抑制效应。转染后 24、48、72 和 96 h 培养上清中的 HBsAg 分泌抑制率分别为 28.88%、32.28%、29.10% 和 18.42%, HBeAg 的分泌抑制率分别为 38.33%、27.50%、33.41% 和 12.60%。免疫细胞化学结果显示,转染 HepG2.2.15 细胞后的 HBsAg 的表达阳性率约为 50%,而空白对照组的 HBsAg 的表达阳性率约为 82%。这些说明针对 HBV P 区的 RNAi 可以抑制 HBV 病毒抗原的分泌和表达。为了克服常规质粒介导的 RNAi 转染效率不高,作用时间不长的缺点,Upichard 等<sup>[36]</sup>将 shRNA 克隆入腺病毒载体,重组的腺病毒通过尾静脉注射 HBV 转基因小鼠,与对照组相比,发现血清 HBsAg 下降了 5~6 倍, HBeAg 下降了 3~4 倍,抑制作用可持续 13 d。在干扰素受体缺陷的 HBV 转基因鼠中,同样观察到 siRNA 对 HBV RNA、HBsAg 和 HBeAg 的特异性抑制作用。该实验首次将病毒载体应用于 HBV 转基因小鼠,提高了 RNAi 治疗 HBV 的有效性和持续性。Morissey 等<sup>[37]</sup>为了防止体内核酸酶对 siRNA 的降解,将合成的 siRNA 进行了化学修饰:2'-OH 缺失、2'-氟代、2'-O-甲基化、2'-磷硫酰化。这一修饰使 siRNA 的稳定性提高了近 900 倍,尾静脉注射小鼠后,抗病毒作用提高了 1.5 log<sub>10</sub> 倍。

3. 存在的问题及应用前景:无论是在细胞水平,还是在动物模型水平, RNAi 在控制肝炎病毒复制和表达,以及防止肝炎免疫损伤的发生发展方面,都已经逐步显示出其巨大的应用前景。我们有理由相信,借助 RNAi 技术我们能彻底根治慢性乙型肝炎病毒感染。当然,从实验室研究发展到进行临床治疗,还有许多问题有待研究解决:(1)特异性。与反义 RNA 技术一样, siRNA 位点也有高度选择性。HBV RNA 的变异及 2 级结构等因素都要求 RNAi 的序列特异性要好,建立一个能够快速确定 siRNA 针对的病毒特定序列筛选体系就显得十分必要;(2)转染效率。基因治疗往往面临转染效率不高的问题, RNAi 也不例外。常用的转染途径往往转染效率较低,不能满足治疗的需要,而依靠病毒载体转染则可能引起较严重的副反应,可行性尚待商榷。因此开发能特异地定位于肝脏细胞,具有高转染效率、高容量、可行安全的新型载体及解决有效的给药途径是 RNAi 应用于临床需要解决的问题;(3)药代动力学。RNAi 有浓度、时间双重依赖性, RNAi 要用于抗 HBV 治疗,其药代动力学也是研究的重点。siRNA 分子在胞内的有效时间长短不一,短者 72 h,长则 21 d。这种差别可能是因为序列及修饰程度的不同,所选实验模型的差异,具体实验方法的不同等原因造成的。下一步还需要通过实验进一步提高 RNAi 在体内的半衰期、延长降解时间,使其真正具有临床应用的可能;(4)副作用。目前还没有关于 RNAi 副作用的报道,可能与研究较少有关,

而 RNAi 基因表达的效应可以突破细胞界限,在不同的细胞甚至生物体间传递,并可能传递给子代,故其副作用需要我们给予充分重视。

总之,应用 RNAi 治疗慢性乙型肝炎病毒感染的研究虽然还在起步阶段,但目前的研究进展和成果说明该技术拥有着巨大的潜力,展示着该技术最终攻克慢性乙型肝炎病毒感染的美好前景。

### 参 考 文 献

- 1 赵鸿, 成军, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 S 基因单独和联合白细胞介素-12 免疫小鼠诱生的特异性体液和细胞免疫应答. 中华传染病杂志, 2000, 18: 190-191.
- 2 Mansell CJ, Locarnini S. Epidemiology of hepatitis C in East. Semin Liver Dis, 1995, 15: 15-32.
- 3 Huang YX, Wu GH. Relationship between hepatitis B and hepatocarcinoma. World J Gastroenterol, 2000, 8: 101-104.
- 4 Zamore PD. Ancient pathways programmed by small RNAs. Science, 2002, 296: 1265-1269.
- 5 Fire A, Xu S, Montgomery MK. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998, 391: 806-811.
- 6 Seydoux G, Mello CC, Pettitt J, et al. Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. Nature, 1996, 382: 713-716.
- 7 Guo S, Kemphuse KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell, 1995, 81: 611-620.
- 8 Elbashir W, Harborth J, Lendeckal W. Duplexes of nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature, 2001, 411: 494-498.
- 9 Rao MK, Wilkinson MF. Tissue-specific and cell type-specific RNA interference in vivo. Nat Protoc, 2006, 1: 1494-1501.
- 10 Amarzguoui M, Lundberg P, Cantin E, et al. Rational design and in vitro and in vivo delivery of dicer substrate siRNA. Nat Protoc, 2006, 1: 508-517.
- 11 Fan Y, Xin XY, Chen BL, et al. Knockdown of RAB25 expression by RNAi inhibits growth of human epithelial ovarian cancer cells in vitro and in vivo. Pathology, 2006, 38: 561-567.
- 12 Miyagishi M, Taira K. Promoter driven siRNA with four uridine overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. Nature Biotechnol, 2002, 20: 497-500.
- 13 Maeda K, Kohara YM, Suggion T. A large scale analyze of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high throughput RNAi. J Biol, 2001, 11: 171-176.
- 14 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.
- 15 Sui G, Soohoo C, Affar el B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 5515-5520.
- 16 Brummelkamp TR, Bernards R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science, 2002, 296: 550-553.
- 17 Sui D, Wilson JE. Selective depletion of the Type I, Type II, and Type III isozymes of hexokinase in mammalian cells using small interfering RNAs. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 319: 768-773.
- 18 Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, et al. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. J Cell Sci, 2000, 114: 4557-4565.
- 19 Yamamoto T, Miyoshi H, Yamamoto N, et al. Lentivirus vectors expressing short hairpin RNAs against the U3-overlapping region of HIV nef inhibit HIV replication and infectivity in primary macrophages. Blood, 2006, 108: 3305-3312.
- 20 Gitlin L, Karelsky S. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. Nature, 2002, 418: 430-434.
- 21 Zhang Y, Li T, Fu L. Silencing SARS CoV Spike protein expression in cultured cells by RNA interference. FEBS Lett, 2004, 560: 141-146.
- 22 Jacque JW, Triques K, Steveson M. Modulation of HIV1 replication by RNA interference. Nature, 2002, 418: 435-438.
- 23 Chen WZ, Yan WY. RNA interference targeting VP1 inhibits foot and mouth disease virus replication in BHK221 cells and suckling mice. J Virol, 2004, 78: 6900-6907.

- 24 Salvi A, Arici B, De Petro G, et al. Small interfering RNA urokinase silencing inhibits invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3: 671-678.
- 25 Wildam M, Fachus U, Wossman W. Kill of leukemia cells. *Oncogene*, 2002, 21: 5716-5724.
- 26 Fu GF, Lin XH, Han QW. RNA interference remarkably suppresses bcl-2 gene expression in cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4: 822-829.
- 27 Ishizuka A, Siomi MC, Siomi H. A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev*, 2002, 16: 2497-2508.
- 28 McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 639-644.
- 29 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology*, 2003, 37: 764-770.
- 30 Konishi M, Wu CH, Wu GY. Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV producing cell line. *Hepatology*, 2003, 38: 842-850.
- 31 Giladi H, Ketzinil-Gilad M, Rivkin L, et al. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther*, 2003, 8: 769-776.
- 32 Ying CX, De CE, Neyts J. Selective inhibition of hepatitis B virus replication by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309: 482-484.
- 33 Zhang XN, Wei X, Wang JD, et al. RNAi-mediated inhibition of HBV replication and expression. *World J Gastroenterol*, 2004, 10: 2967-2971.
- 34 Hamasaki K, Nakao K, Matsumoto K, et al. Short interfering RNA directed inhibition of hepatitis B virus replication. *FEBS Lett*, 2003, 543: 53-54.
- 35 刘顺爱, 魏红山, 董庆鸣, 等. 乙型肝炎病毒 P 区 RNA 干扰抑制 2.2. 15 细胞乙型肝炎病毒表面抗原和 e 抗原分泌的实验研究. *中华医学杂志*, 2005, 85: 3079-3083.
- 36 Uprichard SL, Boyd B, Althage A, et al. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 773-778.
- 37 Morrissey DV, Blanchard K, Shaw L, et al. Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication. *Hepatology*, 2005, 41: 1349-1356.

(收稿日期: 2007-07-13)

(本文编辑: 王丹静)