

doi: 10.11830/ISSN.1000-5013.201704012



核酶的发现及其在基因治疗中的应用

周耕民, 刁勇, 李三暑

(华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 核酶是具有催化功能的结构性 RNA 分子,且大多数核酶具有剪切 RNAs 的功能,可以利用它们剪切信使 RNA(mRNAs)调节基因表达,从而作为基因治疗的新手段. 阐述核酶的发现历程,以及其在艾滋病、肝炎、肿瘤和生殖道系统感染等基因治疗的研究进展. 最后,分析核酶在基因治疗中的技术优势及存在问题,并对核酶领域包括更多核酶晶体结构的确立、酶切机理的理解、核酶新的生物学功能的发现等研究进行展望.

关键词: 核酶; 非编码 RNA; 基因治疗; 基因表达; 剪切 RNA

中图分类号: Q 7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2017)04-0509-06

Discovery of Ribozymes and Their Application in Gene Therapy

ZHOU Gengmin, DIAO Yong, LI Sanshu

(School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: Ribozymes are structured RNA molecules with catalytic activities. Since most ribozymes have the ability to cleave RNAs, they could be used to cleave mRNAs and regulate gene expression, and therefore becoming new tools for gene therapy. This paper describes the discovery history of ribozymes and their applications in the therapy researches of acquired immune deficiency syndrome, hepatitis, tumor, reproductive tract infection and other diseases. Lastly, the paper analyzes the technological advantages and the existing problems of the ribozyme's application in gene therapy, and looks into the future of researches on the establishment of more crystal structures of new ribozymes, understanding of ribozyme cleavage mechanisms, and the discovery of new biological functions of ribozymes.

Keywords: ribozyme; non-coding RNA; gene therapy; gene expression; cut RNA

1 核酶的发现

核酶是具有催化功能的 RNA 分子^[1],在生物界中执行着非常重要的生物功能,如核糖体 RNA (rRNA)和 RNase P 分别可以合成氨基酸和加工 tRNA 的前体^[2-3]. 迄今为止,已证实自然发生的核酶种类有 14 类. 由于大多数核酶具有剪切 RNA 的功能,可利用其对靶标 RNA 进行切割,从而控制基因的表达. 核酶的研究已有 30 多年的历史. 在 1980—1990 年的 10 a 间共发现了 7 类,分别是 Group I^[4], Group II^[5], Rnase P^[3], Hammerhead^[6], Hairpin^[7-8], HDV^[9], Neurospora VS^[10]; 在 1991—2013 年的近 25 a 间仅发现了 3 类,分别是 GIRI^[11], ribosomal RNA^[12], glmS^[13]. 在 2014—2015 年的两年间, Breaker 实验室发现了 4 类自我剪切的核酶,分别是 Twister^[14], Twister Sister^[15], Hatchet^[15-16], Pistol^[15,17], 并且 Steitz 实验室和另外几个实验室根据这些发现,确立其中两类核酶的晶体结构^[18-19].

收稿日期: 2017-03-30

通信作者: 李三暑(1972-),男,教授,博士,主要从事核酶和核糖开关的研究. E-mail: sanshuli@126.com.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81271691, 81371669); 华侨大学高层次人才科研启动项目(Z16Y0015); 华侨大学研究生科研创新能力培育计划资助项目(1511316013)

大多数核酶具有自我剪切的功能,因此,大多数核酶是通过它们的剪切产物被发现的.如 Group I 内含子就是从 26S rRNA 前体的“隐藏的剪切”产物中被发现的^[4]; Neurospora VS 核酶是在线粒体 RNA 的剪切条带中被发现的^[10]; 当病毒采用滚环复制策略进行复制时,有的核酶作为病毒 RNA 的一部分发生剪切,把多聚的病毒 RNA 剪切成单位长度的病毒个体,因而被观察到^[20],如 Hammerhead 和 Hairpin 核酶就是在烟草环斑病毒的卫星 RNA (satellite RNA of tobacco ringspot virus) 的复制中被观察到的^[6-8]; HDV 核酶也是在肝病病毒的复制中被发现的^[9]. 另外, glmS 核酶是在发现核糖开关的过程中被意外发现的,它既是一个核酶,也是一个核糖开关^[13]. 由此可见,这些发现带有比较大的偶然性,通常是在 RNA 放射性标记、PAGE 胶分离和纯化的过程中通过剪切产物被偶然发现的.

最近, Breaker 实验室发现 4 类自我剪切的核酶^[14-17]. 先是通过生物信息学发现许多结构性的 RNA, 但由于单从 RNA 二级结构上很难判断它们是否具有核酶的功能, 因此, 又结合包括合成、放射性标记、胶分离等生物化学方法检测到核酶. 这种方法虽然费时费力, 但发现方法显然有很大提高.

2 核酶在基因治疗中的应用

由于核酶具有切割 RNA 的功能, 可以利用它们来切割目标 RNA, 降低基因的表达. Sarver 等^[21] 把加工过的锤头状核酶的催化链部分与底物部分的 HIV-1 GAG RNA 相混合, 发现这个核酶能切割目标 GAG RNA, 且在细胞内也能切割. 这一实验证明利用核酶来开发抗人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的基因治疗是可行的. 此后, 核酶已经应用于许多疾病包括艾滋病、肝炎、肿瘤和生殖道系统感染等的基因治疗研究中^[21-31].

2.1 核酶在抗艾滋病中的应用

艾滋病又称获得性免疫缺陷综合征, 是由于 HIV (human immunodeficiency virus) 病毒侵入人体并强烈破坏体内的免疫系统, 引发各种严重的并发症. 在艾滋病的基因治疗研究方面, 有针对艾滋病 HIV 基因的 RNA 靶标, 如 Gag^[21], LTR^[22], Pol^[23], Tat^[24,32], Tar^[25], Nef^[26], Env^[27,33]; HIV 受体的 RNA 靶标, 如 CD4 和共受体 CCR5^[34]. 虽然靶标不同, 但效果都很好, 比如靶标 Gag mRNA 的锤头状核酶不仅可以显著降低 Gag mRNA 和它编码的 p24 抗原, 还降低了 HIV-1 前病毒 DNA 100 倍以上^[21].

另外, 为了提高酶切的效率, 有的科学家还构建了靶标同一基因的不同位点的核酶. Bai 等^[34] 构建能够在 3 个位点切割 CCR5 mRNA 的三联体核酶, 并将它转导至 CD34⁺ 造血祖细胞中, 与未经转导的对照组相比, 实验组感染 HIV 的比率下降 70%. 在靶标 HIV 不同基因的核酶中, 靶标 Tat 的锤头状核酶已用于治疗艾滋病的临床一期 (10 个 HIV 病人) 和二期 (74 个 HIV 病人) 的实验^[35]. 试验结果表明, 核酶在艾滋病的基因治疗方面有良好的应用前景.

2.2 核酶在抗肝炎中的应用

在乙肝 (HBV)、丙肝 (HCV) 的基因治疗研究方面, Welch 等^[36] 用发夹状核酶靶向切割 pgRNA (pregenomic RNA) 和乙肝表面抗原 (HBsAg) RNA, 通过逆转录病毒导入 Hub7 细胞与 HBV 共表达后, 病毒颗粒减少 66%~83%; Tan 等^[37] 将加工过的锤头状核酶转导至 PLC/PRF5 细胞, 特异性地抑制了 80% 的 HBsAg 的表达. Dai 等^[38] 用锤头状核酶靶标 HBV 的 3 个不同靶点, 大大降低 HBsAg RNA 的表达. 这 3 个实验靶标 HBsAg RNA, 效果都很好, 表明用核酶进行乙肝基因治疗是可行的.

贾战生等^[39] 用锤头状核酶靶向切割丙肝病毒的两个非编码区, 发现核酶能抑制报告基因的表达. Ryu 等^[40] 利用 group I 内含子靶向切割 HCV 的 IRES (核糖体内结合位点) RNA, 并导入白喉毒素 A 基因 (diphtheria toxin A), 从而使被 HCV 病毒感染的细胞发生凋亡. 张文军等^[41-42]、李小英等^[43] 利用核糖核酸酶 P (RNase P) 靶标 HCV 的 5' UTR (untranslated region), 可减少 HCV RNA 约 1 000 倍. 由此说明, 用核酶靶标非编码 RNA 进行丙肝的基因治疗是可行的.

2.3 核酶在抗生殖道系统感染中的应用

据报道, 高危人乳头状瘤病毒 (HPV) 感染与宫颈癌有密切的联系, 超过 90% 的宫颈癌患者被感染了 HPV. 因此, 防治 HPV 很可能有助于预防宫颈癌, 但到目前为止仍没有治疗 HPV 的有效方法. 利用核酶和寡核苷酸来抑制 HPV 基因的表达成为治疗 HPV 的新方法^[44], 主要靶标为 E6 mRNA 和 E7

mRNA. Lu 等^[45]设计针对编码 HPV-16 E6 与 E7 转录产物开放阅读框(ORF)的特异性核酶,即 Rz110 与 Rz558,并利用腺相关病毒(AAV)作载体转导至受体细胞,发现靶标 RNA 水平明显降低. Liu 等^[46]通过分析 HPV-6b 和 11E1 mRNA 的同源序列,设计可同时剪切 HPV-6b 与 11E1 mRNA 的通用核酶 Rz1198;然后,由体外实验证明 Rz1198 能够特异性切割靶标 mRNA,降低 HPV DNA 复制所必须的 E1 蛋白质的表达.

Zheng 等^[47]、饶智国等^[48-49]构建具有特异性靶向 HPV-16 E6 和 E7 转录产物的锤头状核酶——Rz170,并将其转染至 HPV-16 阳性宫颈癌细胞 CaSKi. 结果表明,E6 mRNA,E7 mRNA 和蛋白质的表达显著降低,c-myc 和 BCL-2 蛋白质也表达下调,而 p53 和 Rb 蛋白质的表达上调;受体细胞在体外和体内实验中的生长均受抑制,凋亡的比率上升,并增强了对化疗和放疗的敏感度. 因此,核酶具有治疗宫颈癌的潜力并可与化疗或放疗进行联合治疗.

2.4 核酶在抗白血病中的应用

慢性骨髓性白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)是一种干细胞来源的白血病,其肿瘤细胞含有费城(Philadelphia)染色体和相关的癌蛋白 BCR-ABL^[50]. P210 蛋白是由 BCR-ABL 融合基因编码的,具有异常蛋白酪氨酸激酶活性,是造成 CML 的重要因素. 为了提高酶切效率,Leopold 等^[51]合成针对 BCR-ABL mRNA 的多元核酶(multi-unit ribozyme),并用脂质体或叶酸-聚赖氨酸(folic acid-polylysine)作载体将核酶转染至用 BCR-ABL 融合基因转化的鼠骨髓细胞(32D 细胞). 结果表明,该核酶可降低 BCR-ABL mRNA 达 1 000 倍. 另外,通过优化靶标的结合位点也能提高酶切效率. 付辉等^[52]用构建靶标文库和逆转录相结合的方法筛选靶标跨膜糖蛋白(glycophorin A, GPA)的最佳 mRNA 结合位点,并用白血病细胞株 K562 细胞进行验证,发现最好的结合位点可下调 GPA 的基因表达 90%.

为了提高酶切的特异性,Kuwabara 等^[53]构建带有能识别目标序列(BCR-ABL mRNA)的感应臂(sensor arms)的新核酶. 只有在目标序列存在的情况下,它才能与 Mg^{2+} 结合形成正确的三维空间结构并具活力. 该新核酶 Maxizyme 不但在体外(*in vitro*),而且在培养的细胞包括源于病人的带费城染色体的 BV173 细胞中具有高特异性和酶切活力. Tanabe 等^[54]进一步将转导了抗 BCR-ABL 核酶后的 CML 细胞接种到 NOD/SCID (非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷)小鼠体内,与对照组相比,实验组的小鼠在 14 周后仍然健康存活. 由此可见,Maxizyme 可完全抑制 CML 细胞在小鼠体内的浸润(infiltration).

为了提高转染效率,Soda 等^[55]利用 VSV-假型慢病毒载体(lentiviral vectors)构建针对 ELA2 型 BCR-ABL mRNA 的特异性核酶并转染至 CML 细胞. 结果显示,CML 细胞中的 BCR-ABL mRNA 的水平明显降低,细胞凋亡率升高. 为了研究核酶在体外净化骨髓的作用,吴勇等^[56]设计了抗 BCR-ABL 基因的核酶,转导至 CML 和正常骨髓细胞,并检测核酶对原代 CML 细胞的影响. 结果表明,核酶能显著抑制肿瘤生长和原代 CML 细胞中 P210 融合蛋白的表达,但不影响正常造血祖细胞的生长. 在缓解模型中,核酶抑制了 K562 细胞的增殖和 BCR-ABL mRNA 的表达,但不影响 ABL mRNA 的表达. 因此,抗 BCR-ABL 核酶可用于净化骨髓白血病细胞.

3 核酶在基因治疗中的技术优势及面临的问题

核酶是具有催化功能的 RNA 分子,大多数具有剪切 RNA 的功能,在肿瘤和病毒性疾病的基因治疗方面极具应用潜力. 它的技术优势有如下 4 点:1) 核酶能够促使靶基因失活且让其无法恢复,因为 mRNA 被剪切之后就无法翻译出全长的肽链,而且它的稳定性可能也会降低;2) 核酶能够在体外进行循环使用^[57],核酶剪切 mRNA 后,可以脱离 mRNA 并找到下一个目标 mRNA;3) 核酶直接剪切目标 RNA,而不需要像 CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats), siRNA (small interfering RNA) 或 microRNA (miRNA) 那样需要由蛋白酶来剪切目标 RNA;4) 常用于基因治疗的核酶如锤头状和发夹状核酶分子量比较小,免疫原性弱^[57].

核酶的基因治疗面临的问题主要有如下 5 点:1) 特异性,核酶的酶链部分即使与靶标没有完全配对也可能发生微弱的非特异性剪切^[16];2) RNA 分子在人体内常常不稳定,在受体细胞里容易降解;3) 酶切效率,特别是细胞体内的酶切效率. 高水平的酶切效率是降低靶标 RNA 的关键;4) 可塑性,每一种核酶都有保守的核苷酸,如果保守的核苷酸越多,与之相匹配的靶标序列的可选度就越少,即可塑性小.

如锤头状核酶只要靶标的序列含有 GUC 即可,因此,它的可塑性比较强;5) 载体类型和导入技术^[58].

容易构建的、高表达的、稳定性好的、转染效率高的载体,以及高效、安全的细胞导入技术也是核酶基因治疗的关键环节. 现在常用的载体有慢病毒载体、腺病毒载体、重组腺病毒载体、腺病毒相关载体(AAV),而常用的导入技术有脂质体导入技术、电穿孔法、显微注射等. 这些方法在核酶基因治疗的应用有待进一步探索和完善.

4 研究展望

核酶作为一类非常独特的 RNA 分子,在生物界占有重要的生物学地位,如蛋白质的合成是由核酶执行的. 然而,核酶发现的步伐比较艰难,在刚开始的 10 a 里发现了 7 类,之后的近 25 a 里仅发现了 3 类,而且大多是在偶然的实验中发现的. 随着生物科技的发展,Breaker 实验室于 2014—2015 年共发现 4 类自我剪切的核酶,大大加快了核酶发现的步伐. 这些发现将推进核酶领域的研究进一步深入,包括更多核酶晶体结构的确立、酶切机理的理解和核酶新的生物学功能的发现等.

发现核酶不久,锤头状核酶就被应用于 HIV 基因治疗的研究. 核酶能够促使靶基因失活且让其无法恢复,并能够在体外进行循环使用,这些优势的存在都使核酶被广泛关注. 但是核酶的应用技术还没有完全成熟,受到诸多因素的影响,如核酶的可塑性、最佳靶位点的选择、核酶的剪切效率、转染的效率、在受体细胞内的稳定性等. 随着更多新核酶的发现、核酶晶体结构的确立、剪切机理的深入了解、转染载体技术的进步、不断发展的阳离子脂质体导入技术和核酶化学修饰技术^[59]的提高,核酶的基因治疗研究将不断深入,最终会成为疾病治疗的一个重要手段.

参考文献:

- [1] CECH T R. Evolution of biological catalysis: Ribozyme to RNP enzyme[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2009, 74: 11-16. DOI: 10. 1101/sqb. 2009. 74. 024.
- [2] MOORE P B, STEITZ T A. The roles of RNA in the synthesis of protein[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011, 3(11): a003780. DOI: 10. 1101/cshperspect. a003780.
- [3] ALTMAN S. Ribonuclease P: An enzyme with a catalytic RNA subunit[J]. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1989, 62: 1-36.
- [4] KRUGER K, GRABOWSKI P J, ZAUG A J, *et al.* Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena[J]. Cell, 1982, 31(1): 147-157.
- [5] PEEBLES C L, PERLMAN P S, MECKLENBURG K L, *et al.* A self-splicing RNA excises an intron lariat[J]. Cell, 1986, 44(2): 213-223.
- [6] PRODY G A, BAKOS J T, BUZAYAN J M, *et al.* Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA[J]. Science, 1986, 231(4745): 1577-1580.
- [7] HAMPEL A, TRITZ R. RNA catalytic properties of the minimum (-) sTRSV sequence[J]. Biochemistry, 1989, 28(12): 4929-4933.
- [8] FELDSTEIN P A, BUZAYAN J M, BRUENING G. Two sequences participating in the autolytic processing of satellite tobacco ringspot virus complementary RNA[J]. Gene, 1989, 82(1): 53-61.
- [9] SHARMEEN L, KUO M Y, DINTER-GOTTLIED G, *et al.* Antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can undergo self-cleavage[J]. J Virol, 1988, 62(8): 2674-2679.
- [10] SAVILLE B J, COLLINS R A. A site-specific self-cleavage reaction performed by a novel RNA in neurospora mitochondria[J]. Cell, 1990, 61(4): 685-696.
- [11] NIELSEN H, WESTHOF E, JOHANSEN S. An mRNA is capped by a 2', 5' lariat catalyzed by a group I-like ribozyme[J]. Science, 2005, 309(5740): 1584-1587.
- [12] BAN N, NISSEN P, HANSEN J, *et al.* The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution[J]. Science, 2000, 289(5481): 905-920.
- [13] WINKLER W C, NAHVI A, ROTH A, *et al.* Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme[J]. Nature, 2004, 428(6980): 281-286.
- [14] ROTH A, WEINBERG Z, CHEN A G Y, *et al.* A widespread self-cleaving ribozyme class is revealed by bioinformatic

- mathematics[J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(1): 56-60.
- [15] WEINBERG Z, KIM P B, CHEN T H, *et al.* New classes of self-cleaving ribozymes revealed by comparative genomics analysis[J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(8): 606-610.
- [16] LI S, LÜNSE C E, HARRIS K A, *et al.* Biochemical analysis of hatchet self-cleaving ribozymes[J]. *RNA*, 2015, 21(11): 1845-1851. DOI: 10.1261/rna.052522.115.
- [17] HARRIS K A, LÜNSE C E, LI S, *et al.* Biochemical analysis of pistol self-cleaving ribozymes[J]. *RNA*, 2015, 21(11): 1852-1858. DOI: 10.1261/rna.052514.115.
- [18] NGUYEN L A, WANG J, STEITZ T A. Crystal structure of Pistol, a class of self-cleaving ribozyme[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(5): 1021-1026. DOI: 10.1073/pnas.1611191114.
- [19] REN A, VUŠUROVIĆ N, GEBETSBERGER J, *et al.* Pistol ribozyme adopts a pseudoknot fold facilitating site-specific in-line cleavage[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(9): 702-708.
- [20] de la PEÑA M, GARCÍA-ROBLES I, CERVERA A. The hammerhead ribozyme: A long history for a short RNA [J]. *Molecules*, 2017, 22(1): 78.
- [21] SARVER N, CANTIN E M, CHANG P S, *et al.* Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents[J]. *Science*, 1990, 247(4947): 1222-1226.
- [22] HABU Y, MIYANO-KUROSUKI N, TAKEUCHI H, *et al.* Inhibition of HIV-1 replication by the Cre-loxP hammerhead ribozyme[J]. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2001, 20(4/5/6/7): 723-726.
- [23] GIORDANO V, JIN D Y, REKOSH D, *et al.* Intravirion targeting of a functional anti-human immunodeficiency virus ribozyme directed to pol[J]. *Virology*, 2000, 267(2): 174-184.
- [24] WANG L I, WITHERINGTON C, KING A, *et al.* Preclinical characterization of an anti-tat ribozyme for therapeutic application[J]. *Human Gene Therapy*, 1998, 9(9): 1283-1291. DOI: 10.1089/hum.1998.9.9-1283.
- [25] WYSZKO E, BARCISZEWSKA M Z, BALD R, *et al.* The specific hydrolysis of HIV-1 TAR RNA element with the anti-TAR hammerhead ribozyme: Structural and functional implications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2001, 28(5): 373-380.
- [26] LARSSON S, HOTCHKISS G, SU Jin, *et al.* A novel ribozyme target site located in the HIV-1 nef open reading frame[J]. *Virology*, 1996, 219(1): 161-169.
- [27] RAMEZANI A, DING S F, JOSHI S. Inhibition of HIV-1 replication by retroviral vectors expressing monomeric and multimeric hammerhead ribozymes[J]. *Gene Therapy*, 1997, 4(8): 861-867.
- [28] SCARBOROUGH RJ, GATIGNOL A. HIV and ribozymes[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 848: 97-116.
- [29] OPALINSKA J B, GEWIRTZ A M. Nucleic-acid therapeutics: Basic principles and recent applications[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1(7): 503-514. DOI: 10.1038/nrd837.
- [30] FEDORUK-WYSZOMIRSKA A, SZYMAŃSKI M, GÍODOWICZ P, *et al.* Inhibition of HIV-1 gp41 expression with hammerhead ribozymes[J]. *Biochemical Journal*, 2015, 471(1): 53-66. DOI: 10.1042/BJ20150398.
- [31] PELLETIER R, CARON S O P, PUYMIRAT J. RNA based gene therapy for dominantly inherited diseases[J]. *Current Gene Therapy*, 2006, 6(1): 131-146.
- [32] ZENG W, CHEN Y C, BAI Y, *et al.* Effective inhibition of human immunodeficiency virus 1 replication by engineered RNase P ribozyme[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51855.
- [33] FEDORUK-WYSZOMIRSKA A, SZYMAŃSKI M, GÍODOWICZ P, *et al.* Inhibition of HIV-1 gp41 expression with hammerhead ribozymes[J]. *Biochemical Journal*, 2015, 471(1): 53-66.
- [34] BAI J, ROSSI J, AKKINA R. Multivalent anti-CCR5 ribozymes for stem cell-based HIV type 1 gene therapy[J]. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2001, 17(5): 385-399.
- [35] MITSUYASU R T, MERIGAN T C, CARR A, *et al.* Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells[J]. *Nature Medicine*, 2009, 15(3): 285-292.
- [36] WELCH P J, TRITZ R, YEI S, *et al.* Intracellular application of hairpin ribozyme genes against hepatitis B virus [J]. *Gene Ther*, 1997, 4(7): 736-743.
- [37] TAN T M C, ZHOU L, HOUSAIS S, *et al.* Intracellular inhibition of hepatitis B virus S gene expression by chimeric DNA-RNA phosphorothioate minimized ribozyme[J]. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 2002, 12(4): 257-264.
- [38] DAI Wei, ZHOU Rong, YU Hong, *et al.* Inhibition of hepatitis B virus replication and expression *in vitro* and *in vi-*

- vo by the hammerhead ribozymes targeted different sites[J]. *Infection International*,2012(4):206-210.
- [39] 贾战生,周永兴. 锤头结构核酶在人肝癌细胞内对丙型肝炎病毒基因表达的抑制作用[J]. *中华医学杂志*,1999,79(8):631-632.
- [40] RYU K J,KIM J H,LEE S W. Ribozyme-mediated selective induction of new gene activity in hepatitis C virus internal ribosome entry site-expressing cells by targeted trans-splicing[J]. *Molecular Therapy*,2003,7(3):386-395.
- [41] 张文军,刘碧瑜,周玉珍,等. 一种 HCV 靶向性 M1GS 核酶的构建及其体外活性[J]. *基础医学与临床*,2011,31(1):84-88.
- [42] 张文军,李喜芳,罗桂飞,等. 丙肝病毒核心基因靶向性 M1GS 核酶的体外抗病毒活性[J]. *微生物学报*,2013,53(8):875-881.
- [43] 李小英,伍婧茹,刘琳,等. AIVPB2 基因靶向性 M1GS 核酶的构建及其体外切割活性测定[J]. *广东药学院学报*,2017,33(1):1-5.
- [44] ALVAREZ-SALAS L M,BENÍTEZ-HESS M L,DIPAOLLO J A. Advances in the development of ribozymes and antisense oligodeoxynucleotides as antiviral agents for human papillomaviruses[J]. *Antiviral Therapy*,2003,8(4):265-278.
- [45] LU D,CHATTERJEE S,BRAR D,*et al.* Ribozyme-mediated *in vitro* cleavage of transcripts arising from the major transforming genes of human papillomavirus type 16[J]. *Cancer Gene Therapy*,1994,1(4):267-277.
- [46] LIU D Z,JIN Y X,HOU H,*et al.* Preparation and identification of activity of anti-HPV-6b/11E1 universal ribozyme: Rz1198 *in vitro*[J]. *Asian Journal of Andrology*,1999,1(4):195-201.
- [47] ZHENG Y,ZHANG J,RAO Z. Ribozyme targeting HPV16 E6E7 transcripts in cervical cancer cells suppresses cell growth and sensitizes cells to chemotherapy and radiotherapy[J]. *Cancer Biology and Therapy*,2004,3(11):1129-1134.
- [48] 饶智国,高建飞,章必成,等. 特异性核酶增强宫颈癌细胞对多种化疗药物的敏感度研究[J]. *肿瘤防治研究*,2011,38(5):512-514.
- [49] 饶智国,高建飞,章必成,等. 抗 HPV16E6 核酶对宫颈癌 CaSki 细胞顺铂敏感性影响和机制的探讨[J]. *中华肿瘤防治杂志*,2011,18(11):851-855.
- [50] SADPVMOL I, HERRMANN H, EISENWORT G, *et al.* Expression of CD25 on leukemic stem cells in BCR-ABL1(+) CML: Potential diagnostic value and functional implications[J]. *Exp Hematol*,2017,51:17-24.
- [51] LEOPOLD L H,SHORE S K,NEWKIRK T A,*et al.* Multi-unit ribozyme-mediated cleavage of BCR-ABL mRNA in myeloid leukemias[J]. *Blood*,1995,85(8):2162-2170.
- [52] 付辉,李菲菲,马琼,等. 逆转录法筛选 mRNA 靶点设计核酶对 GPA 的表达干预实验研究[J]. *中国生物工程杂志*,2014,34(3):84-90.
- [53] KUWABARA T,WARASHINA M,TANABE T,*et al.* A novel allosterically trans-activated ribozyme, the maxizyme, with exceptional specificity *in vitro* and *in vivo*[J]. *Mol Cell*,1998,2(5):617-627.
- [54] TANABE T,KUWABARA T,WARASHINA M,*et al.* Oncogene inactivation in a mouse model[J]. *Nature*,2000,406(6795):473-474.
- [55] SODA Y,TANI K,BAI Y,*et al.* A novel maxizyme vector targeting a BCR-ABL fusion gene induced specific cell death in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*,2004,104(2):356-363.
- [56] 吴勇,陈元仲,黄慧芳,等. 针对 BCR/ABL 的锤头状核酶的骨髓净化作用[J]. *生物化学与生物物理学报(英文版)*,2003,35(9):859-863.
- [57] 周颖,毛建平. Ribozyme 和 DNAzyme 的基因治疗实验应用进展[J]. *中国生物工程杂志*,2010,30(6):122-129.
- [58] 王巍杰,杨永强,徐长波. 基因治疗导入载体的研究进展[J]. *生物技术通报*,2010(2):38-41.
- [59] ROUGE J L,SITA T L,HAO L,*et al.* Ribozyme-spherical nucleic acids[J]. *Journal of the American Chemical Society*,2015,137(33):10528-10531. DOI:10.1021/jacs.5b07104.

(责任编辑:黄仲一 英文审校:刘源岗)