

文章编号: 1004-0374(2011)04-0359-05

应用RNAi技术治疗HBV的研究进展

陈雅晴^{1,2}, 彭薇², 陆毅祥², 奚涛^{1*}

(1 中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009; 2 百奥迈科生物技术有限公司, 南通 226016)

摘要: 乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是一种全球性的健康问题。全球大约有 4 亿 HBV 慢性感染患者, 尤其在中国, 感染率高达 9.8%。RNAi(RNA interference) 技术具有特异性地抑制, 甚至关闭基因表达的特点, 在治疗 HBV 感染方面有很大的应用前景。近年来, 研究者针对 HBV 基因设计或筛选有效 siRNA 靶点做了很多研究, 最近还出现了针对与 HBV 代谢相关的宿主基因设计或筛选 siRNA 靶点治疗 HBV 的新策略。该文对 RNAi 技术在 HBV 治疗方面取得的研究进展作一综述。

关键词: RNAi; HBV; 宿主基因

中图分类号: R394; R-33; R512.6

文献标识码: A

Progress in treating HBV by RNAi technologies

CHEN Ya-Qing^{1,2}, PENG Wei², LU Yi-Xiang², XI Tao^{1*}

(1 School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2 Biomics Biotechnologies Co.Ltd, Nantong 226016, China)

Abstract: Hepatitis B virus (HBV) infection is a worldwide health problem. There are estimated 400 million chronic HBV infected patients all over the world, especially in China, with a high infection rate of 9.8%. RNA interference (RNAi) can specifically suppress or even knockdown gene expression, and thus has the potential of treating HBV infection. Many studies have been conducted to design or screen effective siRNAs, which targeted HBV genes and the host genes associated with HBV. In this review, we briefly address the progress of RNAi in HBV infection treatment.

Key words: RNAi; HBV; host genes

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染在全世界流行, 持续感染会导致慢性肝炎、肝硬化和肝癌等并发症, 严重危害人类健康。目前治疗 HBV 的药物主要有干扰素以及核苷/核苷酸类似物拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦等。干扰素存在人口适应率低 (~30%)、副作用大的缺点。核酸类似物可通过抑制反转录酶阻断病毒的复制, 但病毒 e 抗原血清转换率低, 仍会诱导宿主免疫应答, 导致肝脏损伤。此外, 由于病毒突变, 长期应用会发生耐药变异^[1]。因此, 现有治疗方法疗效均不佳, 寻求新的治疗方法变得越来越重要。RNAi(RNA interference) 是一种转录后基因沉默机制, 通过 RNase III 家族的 Droscha 酶和 (或) Dicer 酶将长双链 RNA(dsRNA) 切割加工成小 RNA, 降解与其同

源的靶 mRNA 或抑制靶 mRNA 翻译, 从而下调靶基因表达^[2]。这种机制存在于几乎所有真核生物中^[3]。RNAi 技术发展迅速并极富应用前景, 它具有沉默病毒 mRNA, 减少病毒抗原产生的能力^[4], 为抗 HBV 基因治疗带来新希望。

RNAi 成功应用于 HBV 感染治疗主要取决于两个重要因素, 一是筛选特异性的、能有效沉默 HBV 转录体的 RNAi 靶序列; 二是为 siRNA 或 siRNA 表达载体开发有效的细胞内传输系统^[5,6]。

收稿日期: 2010-11-08; 修回日期: 2010-12-22

基金项目: 南通市科技创新计划(AS2008005)

*通讯作者: E-mail: qinggu518@163.com; Tel: 025-85271022

其中,设计和筛选有效 siRNA 靶点的研究开展迅速,本文即对近年来利用 RNAi 技术,以 HBV 基因或宿主细胞中参与 HBV 基因代谢的基因为靶点,在抗 HBV 治疗中应用的研究进展作一综述。

1 RNAi分子机制

小 RNA 可分为三类:小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、microRNA(miRNA)和 piwi- 相互作用 RNA (piRNA)^[7,8]。其中 siRNA 和 miRNA 在生物进化的各过程和多种生理条件中均广泛存在^[8], 这两者的应用前景较好,研究较为深入。

RNAi 作用过程与小 RNA 和 Argonature 蛋白关系密切,小 RNA 决定反应的特异性,Argonature 蛋白执行抑制基因表达的作用^[9]。RNAi 的基本过程可以分成三个步骤:第一步,体内表达生成的或是体外引入的 dsRNA 被 Dicer 酶切割为长度在 19~23 bp 之间的小 RNA 双链;第二步,双链解旋,其中一条链(一般是引导链)与 Argonature 蛋白形成 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC);第三步,RISC 寻找潜在的目的靶 mRNA,在 Argonature 蛋白的作用下切割靶 mRNA,最终沉默靶基因的表达。RISC 中 siRNA 序列与同源性靶基因完全互补,在 siRNA 5' 末端的第 10 和 11 位碱基之间切割靶 mRNA,使 mRNA 降解,从而抑制基因的表达^[10]。

miRNA 是另一种小 RNA 分子,大小为 21~25 nt,它的生成与 siRNA 有很大的不同。它的生成原理一般是首先由细胞内基因转录生成初级 miRNA (pri-miRNA),pri-miRNA 包含茎—环结构,在茎的 5' 或 3' 端是编码 miRNA 的序列。在动物中,miRNA 加工首先由位于细胞核的 Drosha 酶在蛋白辅助因子 DiGeorge 综合征危象区基因 8(diGeorge syndrome critical region gene 8, DGCR8)或 Pasha 协助下,切割 pri-miRNA 生成 70~80 nt 大小的发夹状 pre-miRNA,然后在蛋白 Exportin-5 作用下运输到细胞浆中,由 Dicer 酶加工生成 miRNA-miRNA* 双链(miRNA 是反义链或引导链,miRNA* 是正义链或过客链)^[7,9,11]。miRNA-miRNA* 中的一条链与 AGO1 蛋白(Argonature 蛋白家族的一员)装载生成 miRISC 或 RISC 样核蛋白复合物——miRNP,装载的单链 RNA(single-strand RNA, ssRNA)与靶 mRNA 形成不完全匹配的异源双链核酸分子,从而抑制靶 mRNA 的翻译,这与 siRNA 介导的基因沉默机制不同。miRNA 在生物体中,对细胞发育、分化、增殖、凋亡等方面

起调节作用^[12-14]。

2 HBV基因组结构

HBV 的基因组 DNA 结构是一环状的部分双螺旋结构,长约 3.2 kb,结构非常紧凑,包含四个部分重叠的开放阅读框(opening reading frame, ORF),称为 P、S、C 和 X,分别编码聚合酶、表面抗原(HBsAg)、核心抗原/e 抗原(HBcAg, HBeAg)和 HBV X 蛋白(HBx)^[2,15]。核心抗原和聚合酶是病毒复制的必需蛋白,表面抗原主要参与病毒核衣壳形成和病毒感染,HBx 蛋白可能参与病毒的转录调控,在肝癌的发生和抗凋亡机制中发挥重要作用^[16]。HBV 的复制包括进入细胞质、脱去核衣壳、传递病毒基因组到细胞核三个步骤。进入细胞核后,病毒 DNA 在宿主酶的作用下转化为环状共价闭合 DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA),以 cccDNA 为模板进行病毒基因表达和形成复制中间体——3.5 kb 大小的前基因组 RNA。前基因组 RNA 转移到细胞质,在 HBV 逆转录酶的作用下生成子代部分双链环状 DNA,完成生命周期^[15]。

HBV 是目前已知的感染人类最小的双链 DNA 病毒,基因排列紧凑,适合于 RNAi 方法治疗。其产生的四个转录本,虽然起始于四个不同的启动子,但它们终止于同一个多聚腺苷位点,理论上单个 siRNA 可以同时沉默四种病毒 mRNA^[2]。由于 HBV 的复制需要通过逆转录形成前基因组 RNA。因此, RNAi 在转录水平发挥作用,既可以抑制病毒蛋白表达,也可以抑制病毒的复制。

3 RNAi在抗HBV中的应用

目前,大多数研究的目的是利用 RNAi 技术抑制 HBV 基因的复制和表达, RNAi 的靶标可以是 HBV 基因,也可以是病毒复制和转录过程中必需的关键性蛋白。近年来,人们针对 HBV 基因或宿主基因设计 siRNA,取得了许多成果。

3.1 以HBV基因为靶点

3.1.1 siRNA介导的RNAi

研究表明,HBV 的 4 个 ORF 中,S 区域上游是保守区,不易突变,且大部分病毒转录体共享该区;C 区的序列位于前基因组转录本的起始部位,在病毒复制时起重要作用;X 区是最小蛋白质 HBx 的编码区,HBx 能与大量细胞内蛋白相互作用,影响细胞活力,对病毒转录起调控作用;P 区编码对病毒复制起关键作用的聚合酶。HBV 各区域都有

可能成为治疗的靶点, 但是针对不同的靶位点设计的 siRNA 序列抑制 HBV 复制的效率不尽相同, 这是因为 RNA 二级结构会影响 siRNA 的有效性。其中, P 区是最长的一个读码框架, S 区完全处于其中, C 区、X 区与 P 区也部分重叠。因此, 靶向 P 区设计的 siRNA 可能效果较好。Qian 等^[17]制备了靶向于聚合酶基因的 esiRNA(endoribonuclease-prepared siRNA), 在 HepG2 细胞中验证了可以特异性抑制 HBV 的复制。随后, 他们又设计了针对其他三个 ORF 的 esiRNA, 通过实验发现, 针对 P 区的 siRNA 抑制 HBV 复制的效率最高^[18]。esiRNA 是由内切核糖核酸酶在体外切割长 dsRNA 而得到的带有不同序列的 siRNA 混合物, 抑制 HBV 复制的效率比化学合成的 siRNA 更高, 且可以容忍靶序列的有限突变^[18,19]。但是, 由于 esiRNA 是 siRNA 的混合物, 实际发挥作用的序列并不确定, 这在临床应用中存在缺陷。不过, 可以利用核酸酶切割 HBV 聚合酶基因, 建立全位点 siRNA 文库, 从中筛选有效的 siRNA 序列, 得到的结果具有全面性与可靠性。虽然 RNAi 可以有效抑制 HBV 蛋白表达, 但对细胞核中已存在的 cccDNA 却没有影响^[1]。新的研究发现, 靶向作用于 HBV 的核定位信号区(nuclear localization signal, NLS)可以抑制病毒基因进入细胞核进行 cccDNA 的扩增, 从而减少 cccDNA 的继续形成^[20], 这可能成为治疗 HBV 的一个新思路。

3.1.2 miRNA介导的RNAi

常用的 siRNA 制备方法是质粒表达法, 该方法能够持续沉默靶基因, 且具有稳定、经济的优点。但是, 由于质粒载体表达系统通常采用 U6、H1 聚合酶 III 启动子, Pol III 启动子的活性是持续的, 因此, 不能调节控制细胞内 shRNA 的浓度。表达的高浓度的 siRNA 会与内源性的 miRNA 机制竞争, 导致细胞毒性^[21]。为了克服 Pol III 启动子所引起的毒副作用, 近来一些研究者利用大多数内源性 miRNA 由 Pol II 启动子转录而得的性质, 设计了以 miRNA 为基础的 RNAi 来进行 HBV 治疗研究。抗 HBV 的 pri-miR 表达质粒的设计原理是用可以有效沉默靶基因的 shRNA 序列代替天然 miRNA 的引导链和互补链, 且尽可能保持 miRNA 的骨架序列, 其二级结构也尽量模仿天然 miRNA 的结构^[22]。目前, pri-miR-30 骨架应用最广泛, 其他的 pri-miR 穿梭载体, 如 miR-155、miR-31、miR-122 也成功应用于表达外源性 RNAi。Ely 等^[22]构建了 miR-31 和 miR-122

抗 HBV 穿梭载体, 通过实验证明, 带 Pol II 启动子的 pri-miR 穿梭载体表达的 miRNA 浓度即使比 U6 启动子产生的 shRNA 浓度低 98.8%, 两者抗 HBV 的效果却相当, 说明 Pol II 表达的 pri-miR 模拟物在 HBV 感染治疗方面具有极大的应用潜力。此外, 由 Pol II 启动子转录表达的外源性 miRNA 不会与其他合成的外源性 miRNA 和内源性 miR-21 竞争, 可以认为是最安全的 RNAi 产生模式^[23]。基因簇编码的 miRNA 是由剪接体直接加工而成的, 不需要经过 Drosha 酶的作用, 利用 miRNA 簇模拟物这种性质产生沉默序列聚合体, 不仅可以提高沉默效率, 同时也能克服由于靶位点突变引起的沉默效果减弱问题^[24,25]。

3.2 以宿主基因为靶点

针对 HBV 基因设计筛选 siRNA, 是 RNAi 治疗 HBV 最常见最直接的研究方法。但是 HBV 病毒要完成生命周期, 必须依赖宿主细胞, 且研究报道大量的宿主蛋白对于 HBV 复制是至关重要的。因此, 沉默与 HBV 相关的宿主基因, 或许也能起到抑制 HBV 复制与表达的作用。近些年, 陆续出现了一些这方面的相关报道。

最早报道的 RNAi 沉默宿主基因, 从而抑制 HBV 复制的研究是关于 La 蛋白的研究。人 La 蛋白(hLa)是一种相对分子质量为 47 k、位于细胞核的磷蛋白(phosphoprotein), 属于 RNA 结合蛋白家族的一员, 包含 RNA 识别基序(RNA recognition motif, RRM), 参与 RNA 代谢的多个步骤, 可以终止 RNA Pol III 的转录, 还与多种病毒和细胞 RNA 相互作用, 起到稳定 RNA 的作用^[26]。体外实验证明, hLa 蛋白与 HBV mRNA 具有高亲和力, 参与 HBV mRNA 的代谢^[27]。Ni 等^[28]针对 hLa 蛋白设计 siRNA 序列, 利用表达框法表达, 在 HepG2.2.15 细胞中引起 hLa 表达抑制的同时, 也使 HBV mRNA 明显减少。尤其是 HBe mRNA, 在第 3 d 时显著降低, 几乎检测不到, 且在第 9 d 时仍维持低水平。但是, 沉默 hLa 蛋白对 HBsAg 和 HBeAg 的分泌影响不大, 说明 hLa 并不是调控病毒 RNA 稳定性或 HBV 表达的唯一因素。

在肝脏中普遍存在的转录因子, 如 UV- 损伤 DNA 结合蛋白 1 (UV-damaged DNA binding protein 1, DDB1)、肝细胞核因子 4 (hepatic nuclear factor 4, HNF4)、维甲酸 X 受体 α (retinoid X receptor α , RXR α)、过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α) 等均会调节 HBV 的转

录, 其中针对 DDB1 设计的 siRNA 下调 DDB1 表达的同时, 也可以引起 HBV 转录的抑制。DDB1 是一种高度保守的、相对分子质量大小为 127 k 的蛋白^[29], 是 HBx 蛋白完成包括刺激 HBV 复制、转录以及干扰细胞周期进程等功能的必需协助分子。沉默 DDB1 基因表达, 不仅可以抑制 HBV 转录, 也会使 HBx 蛋白不稳定。将 DDB1-siRNA 和 HBx-siRNA 共转染到细胞中, 结果引起 HBx 转录体降解, 同时明显加强了 HBx-siRNA 介导的 HBV 复制的抑制, HBV DNA 减少 88%, 比单独使用 HBx-siRNA 的沉默效率提高了 20%^[30]。

热激同源蛋白 70(heat stress cognate 70, Hsc70) 属于热应激蛋白 70(heat stress protein, Hsp70) 家族, 是一种 ATP 结合蛋白, 包含 ATP 结合域、多肽结合域和 C 末端结构域。在多肽结合域中, 存在一个核定位信号区域和卷曲螺旋(coiled-coil, CC) 区域。实验发现, Hsc70 蛋白参与 HBV DNA 聚合酶反转录过程, 其中 CC 区序列编码的结构域对 HBV 复制起到了关键的作用。因此, 这种蛋白可能也是一个有效的宿主基因靶点。最近的研究发现, 采用 RNAi 技术沉默 Hsc70 蛋白确实可以明显抑制 HBV 的复制, 细胞内 HBV DNA 的量减少; 而且通过细胞增殖实验发现, 沉默 Hsc70 不会损伤细胞, 不影响细胞生长, 无细胞毒性^[31]。

去唾液酸糖蛋白受体 1(asialoglycoprotein receptor 1, ASGPRI) 是研究发现的另一种可以作为靶点的宿主基因。ASGPRI 是肝细胞膜表面特异性表达的转膜分子, 是数量丰富的一种主要存在于肝脏实质细胞朝向窦状隙一侧的细胞膜表面的内吞受体, 可介导去唾液酸糖蛋白黏附并进入肝细胞。研究表明, ASGPRI 不仅可以与 HBV 病毒颗粒特异性结合并介导它们进入肝脏细胞, 从而使乙肝病毒感染肝细胞, 而且可以促进 HBV 在体内的复制。郜玉峰等^[32] 针对该基因设计了外源性 microRNA 表达载体, 转染进 HepG2.2.15 细胞中, 显著降低 ASGPRI mRNA 和蛋白的表达, 细胞培养上清液中的 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 水平也有明显下降。

通过抑制宿主基因治疗 HBV, 这是近年来出现的一种新策略, 但是抑制宿主基因对细胞可能造成伤害, 会存在不可预测的副作用。因此, 在选择宿主基因作为靶点时, 宿主靶点对 HBV 病毒复制必须是至关重要的, 而对于细胞存活不是必需的或只是在特殊条件下才必需。文献报道, 沉默上述四种基因, 对宿主细胞活性没有明显的影响, 这为以

后的进一步临床应用研究奠定了基础。以宿主基因为靶点进行 RNAi 抗 HBV 治疗, 可以避免因为病毒突变所引起的沉默效率低的问题。但是调节 HBV 表达, 稳定 HBV RNA 的宿主因子很多, 仅以一个宿主因子为靶点的抗病毒策略是不实际的, 从 Tang 等^[30] 的实验结果来看, 可以考虑将宿主基因与 HBV 基因同时作为靶点, 使用 siRNA 鸡尾酒疗法进行治疗, 提高抗病毒的效率。

另外, 通过 DNA 微阵列分析, 检测 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞中宿主基因的表达情况, 发现了 ABHD2、EREG、ACVR2B、CDC34、KHDRBS3、RORA 等可能是细胞内抗 HBV 的潜在靶点。Ding 等^[33] 使用反义技术, 验证了抑制 ABHD2 或 EREG 可以有效阻断 HBV 在 HepG2.2.15 细胞中的复制。而且 Ding 等^[34] 通过实验证明, 沉默 EREG 并不影响 HepG2.2.15 的存活率。因此, 我们猜测上述基因均可能成为 RNAi 的靶点, 为 RNAi 技术治疗 HBV 研究带来新的宿主靶基因。

4 结语

目前, 研究者在靶点设计与筛选方面做出了一系列的研究成果。但是, 抗 HBV 的 RNAi 治疗还处在临床前研究阶段, RNAi 要应用于临床治疗仍有很多难点需要克服, 包括剂量控制如何优化、脱靶效应怎样限制等, 其中最大的瓶颈还在于如何将设计或筛选到的有效 siRNA、siRNA 表达载体靶向传输到目的器官, 这需要我们不断研究, 克服困难, 以寻求最好的解决方案。虽然真正将 RNAi 应用于临床还需要一个比较长的过程, 但随着对 RNAi 技术不断深入了解, 不断完善, 该技术必然更具实用性, 最终应用于临床治疗。

[参 考 文 献]

- [1] Starkey JL, Chiari EF, Isom HC. HBV-specific shRNA is capable of reducing the formation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA, but has no effect on established covalently closed circular DNA *in vitro*. *J Gen Virol*, 2009, 90(1): 115-26
- [2] Weinberg MS, Arbuthnot P. Progress in the use of RNA interference as a therapy for chronic hepatitis B virus infection. *Genome Med*, 2010, 2(4): 28-34
- [3] Hannon GJ. RNA interference. *Nature*, 2002, 418(6894): 244-51
- [4] Snyder LL, Essera JM, Pachukb CJ, et al. Vector design for liver specific expression of multiple interfering RNAs that target hepatitis B virus transcripts. *Antiviral Res*, 2008, 80(1): 36-44

- [5] Sun Y, Li Z, Li LJ, et al. Effective inhibition of hepatitis B virus replication by small interfering RNAs expressed from human foamy virus vectors. *Int J Mol Med*, 2007, 19(4): 705-11
- [6] Arbuthnot P, Ely A, Weinberg MS. Hepatic delivery of RNA interference activators for therapeutic application. *Curr Gene Ther*, 2009, 9(2): 91-103
- [7] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, 136(4): 642-55
- [8] Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 2009, 457(7228): 405-12
- [9] Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 2009, 457(7228): 396-404
- [10] Kong Y, Ruan LF, Ma LL, et al. RNA interference as a novel and powerful tool in immunopharmacological research. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(4): 417-26
- [11] Murchison EP, Hannon GJ. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(3): 223-9
- [12] Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, et al. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol*, 2005, 15(3): 331-41
- [13] 周凡, 庄诗美. microRNA与肿瘤. *生命科学*, 2008, 20(2): 207-12
- [14] Megosh HB, Cox DN, Campbell C, et al. The role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination. *Curr Biol*, 2006, 16(19): 1884-94
- [15] Chen Y, Cheng GF, Mahato RI. RNAi for treating hepatitis B viral infection. *Pharm Res*, 2008, 25(1): 72-86
- [16] Chan DW, Ng IO. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells. *J Pathol*, 2006, 208(3): 372-80
- [17] Qian ZK, Xuan BQ, Min TS, et al. Cost-effective method of siRNA preparation and its application to inhibit hepatitis B virus replication in HepG2 cells. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(9): 1297-302
- [18] Xuan BQ, Qian ZK, Hong J, et al. EsiRNAs inhibit hepatitis B virus replication in mice model more efficiently than synthesized siRNAs. *Virus Res*, 2006, 118(1-2): 150-5
- [19] Tan C, Xuan BQ, Hong J, et al. RNA interference against hepatitis B virus with endoribonuclease-prepared siRNA despite of the target sequence variations. *Virus Res*, 2007, 126(1-2): 172-8
- [20] Li GQ, Gu HX, Li D, et al. Inhibition of hepatitis B virus cccDNA replication by siRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(2): 404-8
- [21] Arbuthnot P, Thompson LJ. Harnessing the RNA interference pathway to advance treatment and prevention of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(11): 1670-81
- [22] Ely A, Naidoo T, Mufamadi S, et al. Expressed anti-HBV primary microRNA shuttles inhibit vira replication efficiently *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther*, 2008, 16(6):1105-12
- [23] Keck K, Volper EM, Spengler RM, et al. Rational design leads to more potent RNA interference against hepatitis B virus: factors effecting silencing efficiency. *Mol Ther*, 2009, 17(3): 538-47
- [24] Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 2007, 448(7149): 83-6
- [25] Ely A, Naidoo T, Arbuthnot P. Efficient silencing of gene expression with modular trimeric Pol II expression cassettes comprising microRNA shuttles. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(13): e91
- [26] Horke S, Reumann K, Rang A, et al. Molecular characterization of the human La protein.hepatitis B virus RNA.B interaction *in vitro*. *J Biol Chem*, 2002, 277(38): 34949-58
- [27] Ehlers I, Horke S, Reumann K, et al. Functional characterization of the interaction between human La and hepatitis B virus RNA. *J Biol Chem*, 2004, 279(42): 43437-47
- [28] Ni Q, Chen Z, Yao HP, et al. Inhibition of human La protein by RNA interference downregulates hepatitis B virus mRNA in 2.2.15 cells. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(14): 2050-4
- [29] Leupin O, Bontron S, Schaeffer C, et al. 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(7): 4238-45
- [30] Tang KF, Xie J, Chen M, et al. Knockdown of damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1) enhances the HBx-siRNA-mediated inhibition of HBV replication. *Biologicals*, 2008, 36(3): 177-83
- [31] Wang YP, Liu F, He HW, et al. Heat stress cognate 70 host protein as a potential drug target against drug resistance in hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(5): 2070-7
- [32] 郜玉峰, 余莉, 李家斌, 等. 靶向ASGPR1的外源性microRNA对HBV表达和复制的抑制作用. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(7): 699-704
- [33] Ding XR, Yang J, Sun DC, et al. Whole genome expression profiling of hepatitis B virus-transfected cell line reveals the potential targets of anti-HBV drugs. *Pharmacogenomics J*, 2008, 8(1): 61-70
- [34] Ding XR, Wang F, Duan M, et al. Epiregulin as a key molecule to suppress hepatitis B virus propagation *in vitro*. *Arch Virol*, 2009, 154(1): 9-17