

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0143-05

嵌合寡核苷酸对端粒酶活性的抑制作用

伍 勇, 陈 辉, 刘 丽, 郭建军, 罗 鹭(中南大学湘雅三医院检验科, 长沙 410013)

[摘 要] **目的:** 研究嵌合寡核苷酸对端粒酶活性的抑制作用。**方法:** 合成各种寡核苷酸(ODNs), 利用 HL-60 细胞溶解液实施体外实验, U-87 细胞系观察这些寡核苷酸在细胞水平的作用。**结果:** 硫代磷酸酯寡核苷酸(PS-ODNs)和 RNA 模板反义 ODNs 都可以抑制端粒酶的活性, 且可产生累积效应。PS-ODNs 的 3' 端延长一段与端粒酶 RNA 模板区域互补的各种修饰的 ODNs 则可以更进一步地提高它们的抑制效率。**结论:** 研究设计的嵌合反义寡核苷酸(cODNs)作为目前较有效的端粒酶活性抑制剂, 可成为肿瘤治疗中较有前途的药物之一。

[关键词] 端粒酶; 寡核苷酸; 抑制剂

[中图分类号] Q555⁵.7 [文献标识码] A

Inhibition of Telomerase Activity by Chimeric Oligonucleotide

WU Yong, CHEN Hui, LIU li, GUO Jian-jun, LUO Ao (Department of Clinical Laboratory of the Third Xiangya Hospital, the Central Southern University, Changsha 410013, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of telomerase activity by chimeric oligonucleotide. **Methods:** Here various oligonucleotides were designed and synthesized. Inactivity of the telomerase activity inhibitors was observed with HL-60 cell-lysates *in vitro* and with U-87 cell *in vivo*. **Results:** Both phosphorothioate-modified oligonucleotides (PS-ODNs) and oligonucleotides complementary with telomerase RNA template inhibited telomerase activity. And application of the tow ODNs together increased the inhibition activity in upfold. the various modification extensional oligonucleotides complementary with telomerase RNA template at 3'-end of the PS-ODNs enabled the chimeric oligonucleotides to increase their inhibition efficiency. **Conclusion:** These cODNs emerged as powerful inhibitors of human telomerase detected so far and might be promising candidates to investigate the effect of permanent of inhibition of telomerase on tumor growth.

[**Key words**] telomerase; oligonucleotide; inhibitor

研究发现, 绝大多数人类体细胞缺乏端粒酶, 而在 85% ~ 95% 的恶性肿瘤细胞中可检测出端粒酶的活性^[1-2]。因此, 端粒酶的活化也可能是恶性肿瘤细胞维持其生长的关键, 而端粒酶抑制剂则可能成为新的抗癌治疗的一种途径^[3-5]。端粒酶的 RNA 分子是其完整性的一部分, 因此, 可能通过反义 RNA 封闭端粒酶 RNA 模板的功能而抑制端粒酶的活性^[6]。

Matthes 报道硫代磷酸酯寡核苷酸(phosphorothioate-modified oligonucleotides, PS-ODNs), 对端粒酶活性具有极强的抑制作用, 它与 PS-ODNs 序列特异性无关, 但在它们的 3' 端可以延伸出一段可与随后的端粒酶 RNA 模板区有效杂交的序列, 即构成嵌合 ODNs (chimeric ODNs, cODNs)^[7]。本文旨在探讨 PS-ODNs 和反义 ODNs 共同应用以及嵌合 cODNs 对端粒酶活性所产

生的抑制效应。

1 材料与方法

1.1 材料

肝素是从多家公司购买的(Sigma, St. Louis, MO; Fluka, Buchs, Switzerland)。所有 HPLC 纯化的 PS-ODNs(序列见表 1)是由德国 Biotec 和比利时 Eurogentec 公司提供。“基础”寡核苷酸是由一个脱氧鸟苷酸残基在 3' 端通过硫代磷酸酯键连结 19 个脱氧核糖基而组成的。其合成和 HPLC 纯化是由 Eurogentec 公司完成的。PNA(T9/U4/PNA, 序列见表 1)由德国 TIB

[作者简介] 伍勇(1967-), 男, 湖南衡阳人, 副教授, 主要从事鼻咽发病方面的研究。Email: wuyong@xysm.net

MOLBIOL 公司合成并纯化,并通过质谱进一步确认证实其分子量。cDNA 是本实验室在 Applied Biosystems 391 DNA 合成仪(Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA)上用 5'-氰乙基磷酸法合成。3'-(三苯甲基)氨-2',3'-二脱氧核苷和 5'-N,N-二异丙基(2-氰乙基)磷酸等按照 Matthes 的文献所描述的方法制

备^[7]。3'-O-(双甲基三苯甲)-2'-脱氧核苷,5'-N,N-二异丙基(2-氰乙基)磷酸,5'-O-(二甲基三苯甲)-2'-O-甲基核糖核苷,3'-N,N-二异丙基(氰乙基)磷酸等试剂都是委托 Glen Research(Sterling, VA)公司制备并购得。通过反相 HPLC 法纯化嵌合寡核苷酸,然后用 MALDI-TOF 仪进行质谱分析。

表 1 寡核苷酸端粒酶抑制剂的序列、修饰和缩写

Tab. 1 Sequence, modifications and abbreviation of oligomer investigated as inhibitors of telomerase

Oligmer	Sequences and modification	Abbreviation
RNA-sequence	3'.. AAGAGUCAAUCCCAAUCUGUUUU.. 5'	
Antisense sequences	5'-CAGTTAGGGTTAG-3'	D2/T11/PO *
	5'-TAGGGTTAGACCAA-3'	T9/U4/PNA
	5'-GTTAGGGTTAG-3'	T11/PO/OMet/PO, PAM
Noncomplementary sequences(PS-ODN)		
Single-stranded	5'- <u>ACTGCTCAGA</u> -3'	10 n/PS
	5'- <u>TTAGTACTGCTCAGA</u> -3'	15 n/PS
	5'- <u>TCAGATTAGTACTGCTCAGA</u> -3'	20 n/PS
Double-stranded PS/PO hybrid	5'- <u>TTAGTACTGCTCAGA</u> -3'	d15n/PS/PO
	3'-AATCATGACGAGTCT-5'	
Chimeric ODNs (cODNs)		
Noncomplementary PS-ODNs/ antisense ODNs(T5)T11	5'-ACTGCTCAGA-(GTTAG)GGTTAG-3'	10 n/PS(T5)T11/ PO/ OMet/PO/3PS/PAM
	5'-TTAGTACTGCTCAGA-(GTTAG)GGTTAG-3'	15 n/PS(T5)T11/ PO/ OMet/PO/3PS/PAM
	5'- <u>TCAGATTAGTACTGCTCAGA</u> -(GTTAG)GGTTAG-3'	20 n/PS(T5)T11/ PO/ OMet/PO/3PS/PAM
Noncomplementary PS-ODNs/ noncomplementary ODNs(11n)	5'-ACTGCTCAGA-TCAGATACAGA-3'	10 n/PD/11nOMet/PO/3PS
	5'-TTAGTACTGCTCAGA-TCAGATACAGA-3'	15 n/PS/11 n/PO
	5'-TCAGATTAGTACTGCTCAGA-TCAGATACAGA-3'	20 n/PS/11 n/PAM

* Backbone structure and abbreviations of the oligomers: /PO = phosphodiester; /OMet/PO = 2'-methylribo-oligonucleotide/phosphodiester; /OMet/PO/3PS = 2' methylribo-oligonucleotide/phosphodiester/3' terminal phosphorothioates; /PAM = N3'-P5' phosphoramidate; /PNA = N-(2-aminoethylglycine). Undrelined parts of oligomers are phosphorothioated.

1.2 细胞培养和萃取

用含有 RPIM-1640 培养基培养人类早幼粒白血病细胞 HL-60(中南大学肿瘤研究所惠赠), 按照 Matthes^[7]描述的方法获得用于检测端粒酶活性的上清液

(TRAP 法), 分装并贮存于 -80℃。24 孔板培养人类恶性胶质瘤细胞 U-87(中南大学肿瘤研究所惠赠), 9000 细胞/孔, 37℃, 5% CO₂。培养基为加了某些补充成分的 EMEM。处理方法同 HL-60。

在寡核苷酸的瞬时转染过程中,将寡核苷酸和脂质体分别稀释入 50 μ l 的无血清的 EMEM 培养基中。两种溶液混合,室温放置 15 min,再加入至 0.3 ml 含有 4% FCS 的 EMEM 中,形成转染混合液。将混合液平铺于粘附细胞上,于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO₂ 的空气中共同孵育约 4 h。移去混合液,洗涤,用 1.0 ml 的 EMEM 完全培养基孵育 20 h。洗落成单个分散状并计数,溶解细胞。

1.3 端粒酶活性的分析

端粒酶活性的检测是以端粒重复扩增法(TRAP)为基础的^[8],应用 TRAPeze 试剂盒(Intergen, Purchase, NY)及改良 TRAP 法。用 25 μ l 的总反应体积代替 50 μ l,其中包括: 20 mmol/L Tris-HCl(pH8.3),1.5 mmol/L MgCl₂,63 mmol/L KCl,0.05% Tween-20,1 mmol/L EGTA,50 μ mol/L dNTP,1 μ l 5'-³²P-磷酸化标记的 TS 引物^[7](5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3';终浓度为 200 nmol/L),0.5 μ l 引物混合物,以及 HL-60 或 U-87 细胞提取物(500 或 5000 细胞)和待检测的寡核苷酸。PCR 扩增的产物以 10% 聚丙烯酰胺胶电泳,然后用磷发光法显影成像。端粒酶活性和寡核苷酸抑制性的百分率 IC₅₀ 值是根据 Matthes 的文献,通过比较端粒酶梯度带的强度与 36 bp 内标的比值计算而得到^[7]。将 PNA (T9/U4/PNA;序列见表 1)单独加入或与其它寡核苷酸共同加入至 HL-60 细胞溶解液中。在 TRAP 分析法中 PCR 的循环按照 94 $^{\circ}$ C 45 s;50 $^{\circ}$ C 45 s;和 72 $^{\circ}$ C 45 s;共 25 到 28 个循环。最后的样品按照 Matthes^[7]描述的方法电泳。

2 结果

2.1 端粒酶的不同位点

作为聚阴离子复合物的肝素对端粒酶活性有抑制作用,其因链长度的不同而分子量有明显的差别,对端粒酶活性的抑制效率也有不同。抑制活性最强的肝素(Sigma; Mw 大约 4 000 ~ 30 000)的 IC₅₀ 值是 0.01 ~ 0.1 μ g/L。

结果显示肝素对端粒酶活性的抑制与 TS 引物并没有竞争关系,提示 TS 引物和肝素可能作用于端粒酶的不同位点。

2.2 寡核苷酸分别作用于端粒酶的蛋白质和其 RNA 的累积效应

首先,研究各单个寡核苷酸抑制剂的效果。即 1 nmol/L 的 20 个碱基 PS-ODN (20 n/PS)和不同浓度(3 nmol/L, 4 nmol/L, 5 nmol/L)的未修饰的反义 ODN (D2/T11/PO)的抑制活性,后者是指覆盖端粒酶 RNA 模板区域 11 个碱基(T11)及其下游的两个碱基(D2)的 ODN,结果表明其抑制活性随浓度增加而增加。

D2/T11/PO 的 IC₅₀ 约是 5.3 nmol/L。然后,将两种寡核苷酸同时加至 HL-60 细胞溶解液中,二者共同应用后活性得到累加。

2.3 嵌合寡核苷酸作为端粒酶活性抑制剂

合成序列随机的各种长度 PS-ODN (10 n/PS, 15 n/PS, 20 n/PS;序列见表 1)。在它们的 3' 末端延长未修饰或已修饰的 5 ~ 11 个碱基的端粒酶 RNA 模板的反义互补序列(/T5/或 T11/)或 5 ~ 11 个碱基的非互补序列(/11n/)。将 PS-ODNs 和与之相对应的延长产物(cODN)作为端粒酶活性抑制剂进行检测。每一种在 3' 末端含端粒酶 RNA 模板反义互补序列的 cODN 比其相应的在 3' 末端含非互补序列的 cODN 的抑制效果有显著的提高。如 10 n/PS 的 IC₅₀ 是 220 nmol/L,而 10 n/PS/T5/PO 和 10 n/PS/T11/PO 的 IC₅₀ 分别是 2.6 nmol/L 和 2.3 nmol/L。用 5 个反义碱基代替 11 个碱基并没有引起其在活性上的明显不同。与单纯的覆盖 RNA 全部模板的反义寡核苷酸(T11/PO)相比较,通过在 3' 末端加上单独的 2'-O-甲基核糖(/OMet/PO),或通过 2'-O-甲基核糖和 3-PS-链接(Omet/PO/3PS),或者用 N3'-P5'磷酸胺(PAM)代替所有的 PO-内核苷链接来修饰反义核寡核苷酸部分可能增强与 RNA 亲和的能力,但是并不明显改变它们的抑制强度。实验中发现越长的 PS-ODNs (15 个碱基,20 个碱基)表现出越强的抑制效果(IC₅₀ = 6.5 nmol/L 和 IC₅₀ = 3.3 nmol/L),而且,通过 3' 端延长反义序列可以进一步提高其抑制强度(IC₅₀ = 0.45 ~ 5.0 nmol/L)。寡核苷酸的长度(10 n,15 n 和 20 n)和几种不同的修饰对它们的效果没有明显影响。当 c-ODNs 的反义序列被一个非反义互补者所代替,则原来反义部分对抑制效果所起的作用就消失或显著降低。

将前文所述的 cODNs 转染进 U-87 细胞 20 h 后, FITC (Fluorescein isothiocyanate, 异硫氰酸荧光素)标记的 cODN (20 n/PS/T5/OMet/PO;序列见图解 1)与脂质体共同转染 4 h,在这些细胞的细胞核中大量出现(图 1)。在活细胞中,单纯的 10 n/PS 寡核苷酸与它们相应的延长 5 个或 10 个未修饰反义碱基的嵌合寡核苷酸(10 n/PS/T5 和 10 n/PS/T11)都几乎没有抑制活性(IC₅₀ > 1.25 μ mol/L)。而 10 n/PS-ODNs 通过延长一段 11 个已修饰的反义碱基即可以增强它们的抑制效果(IC₅₀ = 0.5 ~ 0.6 μ mol/L)。对于 15 n/PS-ODNs 和 20 n/PS-ODNs,反义序列的延长能够明显增强 cODN 的抑制活性。含有短的修饰反义部分(T5)的 15 n/PS-ODNs 产生的 IC₅₀ 值位于 0.6 ~ 1.0 μ mol/L 之间,延长至 11 个碱基的修饰反义部分(T11)产生的 IC₅₀ 值位于 0.4 ~ 0.6 μ mol/L。含修饰反义序列(T5 和 T11)的

20n/PS-ODNs, IC_{50} 值在 0.1 ~ 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.04 ~ 0.15 $\mu\text{mol/L}$ 之间。最有效的 cODNs 是在反义部分包含完整磷酸替代物的 20 n/PS/T11/PAM ($IC_{50} = 0.04 \mu\text{mol/L}$) 和 20 n/PS/T11/OMet/3PS ($IC_{50} = 0.06 \mu\text{mol/L}$), 后者在反义部分含有 2'-OMet 修饰并且在 3' 末端携带了 3 个 PS-链接。在 3' 端包含未修饰 PO-链接反义部分的 cODNs 在大多数情况下其效率低于它们已修饰物, 用 RNA 模板非互补序列取而代之, 则 cODNs 的效果将随之而去。

3 讨论

作用于不同靶位点的药物可以产生累积效应。动力学数据(图 1)证实了在 TS 引物存在时, 肝素对端粒酶活性的抑制是非竞争性的, 这说明肝素作用位点可能是另一个, 而不是引物结合位点。研究也发现 PS-ODNs 主要作用于端粒酶蛋白质上的功能基团而肝素可能是作用于另一位点^[7]。这都提示可以将 PS-ODNs 与以端粒酶 RNA 模板为靶位点的反义寡核苷酸结合起来。PS-ODNs 除了显示反义序列的抑制效果外, 还显示出另一部分的抑制效果, 这部分作用可能主要源于其与蛋白质的非序列依赖性的相互作用。相对于未修饰的 ODNs, PS-ODNs 与蛋白质的结合具有高度的亲和力, 而且可以干扰所结合蛋白质的功能。同样, PS-ODNs 能广泛的非序列特异性地抑制如 HIV-RT 或其相关的 RNase H 等各种酶^[9]。PS-ODNs 能较强地广泛地以非序列特异性方式抑制类似于肝素结合蛋白类的蛋白质的活性^[7,10], 人类端粒酶可能也是一样。因此, PS-ODNs 可能同引物竞争性地与端粒酶蛋白质的引物结合位点相作用^[7]。

言, RNA 模板和蛋白质的 PS-ODN 结合位点非常靠近。这样, 就可能设计一种新的 cODN, 它对端粒酶的蛋白质和 RNA 模板结合位点都有很强的结合力。这样的 cODN 同时具有 PS-ODNs 的结合高效性和延长的反义序列的选择性^[7]。首先检测了分别作用于端粒酶两个靶位点的两种单独的寡核苷酸(20 n/PS 和 D₂/T11/P) 的抑制效率, 发现与单独的寡核苷酸比较, 二者联合使用提高了其效率。

这些结果提示我们合成各种 cODN, 在它的 3' 端延长不同长度(覆盖 5 或 10 个模板碱基: T5, T11) 反义序列的 PS-ODN, 并也带有不同的修饰。几乎所有的 PS-ODNs 对端粒酶活性的抑制都能通过延长一段反义 ODN 而得到增强。增强幅度最大的是 10 个碱基的 PS-ODN(10 n/PS 的 $IC_{50} = 220 \text{ nmol/L}$, 而 10n/PS/T11/OMet/PO/3PS 的 $IC_{50} = 1.8 \text{ nmol/L}$, 增加了 100 倍以上), 其次是 15 个碱基的 PS-ODN(增加 10 倍以上), 最小的是 20 个碱基的 PS-ODN(增加 6 倍以上)。而且, 长度(T5, T11) 的变化或反义部分(2'-OMet, PAM) 修饰的变化对 cODNs 的效果没有本质的影响。但在实验中, 随着 PS-ODNs 长度的增加, 反义部分在抑制活性中所起的作用会逐渐消失(图 2)。

cODNs 对蛋白位点的作用可能诱导出某些结构变化, 这些变化有利于它们与 RNA 模板结合。有文献^[9] 描述过 PAM 修饰可以促进 ODN 的反义特性, 即增加它对各种 RNA 的亲和力和特异性, 且具有高度的核酸稳定性, 所以, PAM 修饰的 RNA 模板的反义 ODNs 与 PS-ODNs 链接而得到的 cODNs 可能成为一种极强的端粒酶抑制剂。实验中, T11/PAM 的 $IC_{50} = 472 \text{ nmol/L}$, 而 10n/PS/T11/PAM, 15 n/PS/T11/PAM 和 20 n/PS/T11/PAM 的 IC_{50} 分别为 5.0 nmol/L, 1.4 nmol/L 和 0.04 nmol/L。原理尚不清楚, 可能是 PS-ODNs 与引物结合位点的作用促进了寡核苷酸与 RNA 模板接触。

实验中较为有效的寡核苷酸是: 15 n/PS/T5/OMet/PO, 15 n/PS/T5/PAM, 20 n/PS/T5/PO, 它们的 IC_{50} 是 0.5 nmol/L。如果将反义互补序列转变成非互补序列则可能导致这些 cODN 的活性与单纯的 PS-ODNs (15 n/PS, 20 n/PS) 的活性相当或者比其相应的含互补序列的 cODN 低 5 ~ 10 倍(本文没有显示具体数据)。这些都提示反义序列对于 cODNs 发挥其抑制功能起关键作用。

将 cODNs 转染至 U-87 细胞中, 其对端粒酶活性抑制效果有所改变。这可能是源于细胞对其的吸收率、cODNs 在细胞内的稳定、cODNs 的长度和其接近靶的难易程度的不同。单纯的 10 n/PS 和 15 n/PS 寡核苷酸几乎没有活性。在细胞内, PS-ODNs 的反义延长部

图 1 转染后人类恶性胶质瘤细胞 U87 的细胞核的现象

Fig. 1 Uptake of a FITC labeled cODN into nuclei of U87 glioblastoma cells

PS-ODNs 对某些蛋白的序列非特异性的作用可能不利于 PS-ODNs 作为反义抑制剂。然而, 就端粒酶而

分也能增强其抑制性,而且与反义部分(T5 或 T11)的长度和修饰密切相关,这与体外实验的结果类似。本文发现在细胞水平上,未修饰的反义序列 cODN(/PO)和在 3'端携带 2'-OMet 及磷酸二酯键的 cODNs(/Om-et/PO)比那些含有 3 个末端硫代磷酸的 cODN(/Om-et/PO/3PO)及含有可以显著降低其 3'端对核酸酶敏感性的 N3', N5'磷酸胺骨架 cODNs(/PAM)的抑制活性要低。末端含有覆盖 RNA 模板的 11 个碱基并且核

酸酶稳定的较长的 PS-ODN(20 n)在细胞水平的端粒酶抑制活性最强(如 20 n/PS/T11/PAM; 20 n/PS/T11/OmMet/3PS, $ID_{50} = 0.04 \mu\text{mol/L}$; $0.06 \mu\text{mol/L}$,而单纯的 20/PS 是 $0.35 \mu\text{mol/L}$)。实验中也曾以一段随机的(修饰的和未修饰的)序列代替反义序列,它导致 cODNs 的活性几乎趋于灭活($IC_{50} > 1 \mu\text{mol/L}$),这提示延长的碱基序列在细胞水平对 cODNs 发挥其活性同样具有重要意义。

图 2 15 n/PS/T5/PAM 与 15 n/PS 对 HL-60 细胞的端粒酶的抑制效果

Fig. 2 Inhibitory effects 15 n/PS/T5/PAM in comparison to 15 n/PS on telomerase activity from HL-60 cell-lysates

A: TRAP-gal showing telomerase products after addition of different concentrations of 15 n/PS/T5/PAM (left) or 15 n/PS (right).
1: Lysis; 2: Control; 3: Control (15 n/PS/T5/PAM); 4: 0.5 nmol/L (15 n/PS/T5/PAM); 5: 1.0 nmol/L (15 n/PS/T5/PAM);
6: 2.5 nmol/L (15 n/PS/T5/PAM); 7: 5.0 nmol/L (15 n/PS/T5/PAM); 8: 10 nmol/L (15 n/PS/T5/PAM);
9: 100 nmol/L (15 n/PS/T5/PAM); 10: 5.0 nmol/L (15 n/PS); 11: 10 nmol/L (15 n/PS)
B: 20 n/PS/T11 and 20 n/PS/T5 chimeric oligersms as inhibitor of telomerase with different modification.
a: 20 nPS (Controls); b: 20 nPS/T11 n (Controls); c: Unmodified (20 nPS/T11); d: 2'-OMet (20 nPS/T11);
e: PNA (20 nPS/T11); f: Unmodified (20 nPS/T5); g: 2'-OMet (20 nPS/T5);
h: 2'-OMetOEt (20 nPS/T5); i: Phosphoramidate (20 nPS/T5)

本研究认为,嵌合寡核苷酸(cODNs)是目前有效的端粒酶活性抑制剂之一,它可能成为肿瘤治疗中较有前途的药物之一。另外,是否能够通过改变 PS 的序列来减少其对 PS 靶的的非特异性效果,从而避免某些文献曾描述过的单纯 PS 序列的直接反增殖效果,有待进一步的研究。

[参考文献]

[1] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. *Science*, 1994, 266 (5193): 2011-2015.
[2] Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer [J]. *Eur J Cancer*, 1997, 33 (5): 787-791.
[3] Hamilton SE, Corey DR. Telomerase: Anti-cancer target or just a fascinating enzyme? [J]. *Chem Biol*, 1996, 3 (11): 863-867.
[4] Raymond E, Sun D, Chen SF, *et al.* Agents that target telomerase and telomeres [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1966, 7 (6): 583-591.

[5] Sharma S, Raymond E, Soda H, *et al.* Preclinical and clinical strategies for development of telomerase and telomere inhibitors [J]. *Ann Oncol*, 1997, 8 (11): 1063-1074.
[6] Feng J, Funk WD, Wang SS, *et al.* The RNA component of human telomerase [J]. *Science*, 1995, 269 (5228): 1236-1241.
[7] Matthes E, Lehmann C. Telomerase protein rather than its RNA is the target of phosphorothioate-modified oligonucleotides [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27 (4): 1152-1158.
[8] Pitts AE, Corey DR. Inhibition of human telomerase by 2'-O-methyl-RNA [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95 (20): 11549-11554.
[9] Moelling K, Schulze T, Diringer H. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 RNase H by sulfated polyanions [J]. *J Virol*, 1989, 63 (12): 5489-5491.
[10] Gryaznov SM. Oligonucleotides N3' -> P5' phosphoramidates as potential therapeutic agents [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1489 (1): 131-140.

[收稿日期] 2004 - 12 - 28

[修回日期] 2005 - 04 - 03

[本文编辑] 韩丹