

· 基础论著 ·

重组逆转录病毒转导 HBV 载体表达显性阴性突变体抗 HBV 作用的研究

孙殿兴 刘风军 胡大荣 胡学玲 范公忍 韩聚强

【摘要】 目的 探讨重组逆转录病毒转导 HBV 载体表达显性阴性突变体的抗 HBV 作用。**方法** 在逆转录病毒载体中插入两种不同类型表达显性阴性突变体的 HBV 基因复制单元,制备重组逆转录病毒 pRV-CP、pRV-CS 和空载体 G1Na 对照,并转染 HepG2. 2. 15 细胞,ELISA 法检测细胞培养上清液中 HBsAg 和 HBeAg,斑点杂交法检测细胞内 HBV 核壳中 HBV DNA,PCR 检测上清液中重组 HBV 颗粒。**结果** 转染 HepG2. 2. 15 细胞后 3 d、5 d、7 d、9 d 和 11 d, pRV-CP、pRV-CS 和 G1Na 对照组对 HBsAg 表达的平均抑制率分别为 $(28.9 \pm 4.73)\%$ ($P < 0.01$)、 $(39.3 \pm 7.04)\%$ ($P < 0.01$) 和 $(2.6 \pm 3.77)\%$; 对 HBeAg 表达的平均抑制率分别为 $(40.38 \pm 2.59)\%$ ($P < 0.01$)、 $(33.1 \pm 4.27)\%$ ($P < 0.01$) 和 $(3.1 \pm 3.02)\%$; 对 HBV 复制的抑制率分别为 67.2% 和 55.8%, 对照组为 13.4%。只有 pRV-CP 组培养上清液中检测出突变型 HBV 颗粒。**结论** 重组逆转录病毒能转导 HBV 载体表达显性阴性突变体,对 HBV 复制及抗原表达有抑制作用,有望用于抗 HBV 治疗。

【关键词】 逆转录病毒载体;乙型肝炎病毒载体;显性阴性突变体;基因治疗

Inhibition of HBV replication with HBV mutants transduced by recombinant retrovirus vector SUN Dian-xing*, LIU Feng-jun, HU Da-rong, HU Xue-ling, FAN Gong-ren, HAN Ju-qiang. *Department of Liver Diseases, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China

Corresponding author: SUN Dian-xin, E-mail: sundianxing@hotmail.com

【Abstract】 Objective To test the anti-HBV effects by intracellular expression of dominant negative mutants. **Methods** Two kinds of full length of mutant HBV gene, which expressed dominant negative mutants, were inserted into retrovirus vector. After recombinant retroviruses, pRV-CP, pRV-CS and G1Na were harvested to infect HepG2. 2. 15 cell lines, respectively. HBsAg and HBeAg, which had existed in the culture medium, were tested by an ELISA kit. HBV DNA packaged in the

基金项目:国家自然科学基金(30170854)

作者单位:050082 石家庄,白求恩国际和平医院肝病科(孙殿兴);石家庄市第四医院(刘风军);北京军区总医院肝病研究所(胡大荣、胡学玲、范公忍、韩聚强)

通讯作者:孙殿兴 Email: sundianxing@hotmail.com

nucleocapsid was examined by dot blot hybridization. The existence of recombinant HBV virion in the culture medium was examined by PCR. **Results** After the recombinant retrovirus transinfected HepG2. 2. 15 cells for 3, 5, 7, 9 and 11 days, the mean inhibitory rates of HBsAg were 28. 9% , 39. 3% and 2. 6% in the pRV-CP, pRV-CS and the empty vector G1Na groups, respectively. The mean inhibitory rates of HBeAg were 67. 2% , 55. 8% and 3. 1% , respectively. The inhibitory rates on HBV DNA contained in nucleocapsid were 67. 2% , 55. 8% and 13. 4% , respectively. Recombinant HBV virion was detectable in the culture medium of recombinant retrovirus infected HepG2. 2. 15 cell of pRV-CP group. **Conclusions** The results indicate that dominant negative mutants expression in HepG2. 2. 15 cell upon retrovirus-HBV vector could inhibit the replication and antigen expression of HBV and it may be a potential candidate for gene therapy against HBV infection.

【Key words】 Retrovirus vector; Hepatitis B virus vector; Dominant negative mutants; Gene therapy

基因治疗虽已显示出诱人的应用前景,但目前还难以过渡到临床应用,遇到的主要障碍是载体缺乏导向性及难以向众多的靶细胞导入足量的目的基因^[1]。如果用 HBV 作为基因治疗载体,有可能利用体内野生型 HBV 为之提供包装,在体内形成具有抗 HBV 作用的 HBV 样颗粒,进一步感染其它肝细胞,实现放大效应^[2]。我们的前期研究也证明了利用 HBV 载体表达显性阴性突变体或反义 RNA 具有抗 HBV 作用^[3-5],但无论体内外实验或未来临床应用,必需首先把一定量的 HBV 载体导入 HBV 感染的肝细胞。非病毒载体转染肝细胞的效率均不高,我们曾将 HBV 载体插入逆转录病毒载体,证明重组逆转录病毒能携带 HBV 载体在细胞内表达,并在有野生型 HBV 提供结构蛋白的前提下,发挥 HBV 载体的功能^[6]。本研究把表达显性阴性突变体的 HBV 载体插入逆转录病毒载体,利用 HepG2. 2. 15 细胞作为模型,观察其抗 HBV 作用及 HBV 样颗粒的形成。

材料与方法

一、材料

1. 质粒:pHBV 为表达 HBV 全基因组的质粒,ayw 亚型,由德国 Nassal M 教授赠送。逆转录病毒载体 G1Na 由中国医学科学院基础医学研究所刘德培教授赠送。

2. 细胞:逆转录病毒包装细胞系 Ψ -2 和细胞 PA317,由中国医学科学院基础医学研究所刘德培教授赠送。肝癌细胞系 HepG2 细胞和能释放 HBV 颗粒的 HepG2. 2. 15 细胞由军事医学科学院王升启博士赠送。

二、方法

1. 重组逆转录病毒与 HBV 双病毒载体构建:pRV-CP 及 pRV-CS 的构建见文献^[6],其在肝细胞内重组 HBV 的表达见图 1 和图 2。

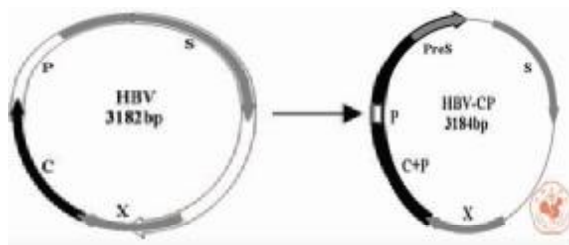


图 1 突变型 HBV 核心蛋白与部分 P 蛋白融合表达示意图

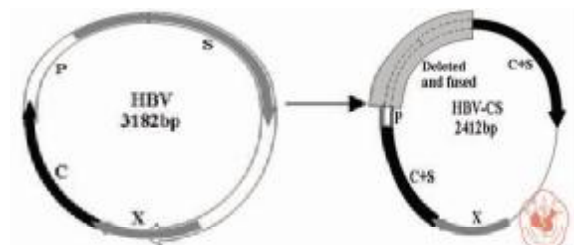


图 2 突变型 HBV 核心蛋白与表面抗原融合表达示意图

2. 重组逆转录病毒的获取: 逆转录病毒重组质粒经脂质体转染单向性包装细胞 Ψ -2, 3 d 后用含出芽病毒颗粒的上清液感染双向性包装细胞系 PA317, 在含 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 培养液中进行选择培养, 抗性细胞克隆经大量培养, 收获培养 16 h 的上清液。测定病毒滴度, -70°C 保存备用。

3. 重组逆转录病毒感染 HepG2. 2. 15 细胞: 以表达 HBV 抗原并释放 HBV 颗粒的 HepG2. 2. 15 细胞为靶细胞。将对数生长期的 HepG2. 2. 15 细胞以每孔 1×10^4 量接种于 24 孔细胞培养板, 分 4 组, 分别为 HepG2. 2. 15 对照组、G1Na 组、pRV-CP 组及 pRV-CS 组, 每组设 3 个复孔, 20 ~ 22 h 后, 除 HepG2. 2. 15 组外, 其余 3 组以感染倍数 (MOI) 为 5: 1 (病毒量: 被感染细胞数) 的比例, 分别加入相应量的 3 种重组病毒上清 (含聚凝胺 6 g/ml), 空白对照组加平均量的已培养 16 h 的 HepG2 细胞培养上清液, 再经 5 h, 每孔补加新鲜培养基 (含聚凝胺 6 g/ml) 至 2.0 ml。于感染后 3 d、5 d、7 d、9 d 和 11 d 分别留取细胞上清液, -20°C 冻存待测。

4. HepG2. 2. 15 细胞上清 HBsAg、HBeAg 的检测: 采用华美公司生产的 HBsAg、HBeAg ELISA 试剂盒, 操作按说明书进行。结果以 P/N 值表示, 对 HBsAg、HBeAg 表达的抑制作用按下列公式计算: 抑制率 = $[(\text{对照孔 P/N 值} - \text{实验孔 P/N 值}) / (\text{对照孔 P/N 值} - 2.1)] \times 100\%$

5. 重组逆转录病毒感染后 HepG2. 2. 15 细胞内核心颗粒中 HBV DNA 狭缝斑点杂交: 重组逆转录病毒感染 HepG2. 2. 15 细胞后 11 d, 各孔已长满, 收集细胞培养上清液后, 胰酶消化, 收集所有细胞, 按参考文献介绍的方法^[3]提取细胞内核心蛋白颗粒中 HBV DNA, 进行 DNA 狭缝斑点杂交 (试剂盒购自上海医科大学), 按试剂盒说明书操作。

6. 培养上清中突变型 HBV 的 PCR 检测: pRV-CP 及 pRV-CS 感染 HepG2. 2. 15 细胞后, 形成的突变型 HBV 分别命名为 HBV-CP 和 HBV-CS。用于检测 HBV-CP 的上游引物: 5'-ATCCTATCAACACTTCCGG-3', 下游引物: 5'-GGAATTCTACTCAATGGCCTGA-3'; 用于检测 HBV-CS 的上游引物与前者相同, 下游引物为 5'-AGGCAGTAGTCAGAACAGG-3'。反应条件: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 50 s, 52°C 退火 50 s, 72°C 延伸 60 s, 进行 32 个循环, 72°C 再延伸 8 min。扩增产物经纯化后用 30 U *Bsr*BR I 酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测。

7. 细胞毒性试验:取最后 1 次获取的细胞培养上清液,采用 ELISA 法检测甲胎蛋白水平(试剂盒购自山东三维公司),并观察细胞生长状态。

三、统计学处理

文中数据以均数标准差表示,应用 SAS 软件进行方差分析及 Dunnet t 检验。

结 果

一、重组逆转录病毒及 HBV 双载体的构建

两个载体 pRV-CP 和 pRV-CS 的构建均需经两步进行,首先在 pHBV 质粒上应用 PCR 方法引入突变点,构建 pHBV-CP 和 pHBV-CS,经测序证实与设计完全相符。再把其 HBV 部分连同 CMV 启动子切下,插入到 G1Na 载体上,构建 pRV-CP 和 pRV-CS,因正向插入出现两个 Poly A 信号,为提高逆转录病毒滴度,选择反向插入者作为研究对象。酶切及测序鉴定均与理论值相符。

测得重组逆转录病毒滴度,在 G1Na、pRV-CP 及 pRV-CS 组分别为 8.2×10^4 、 1.2×10^5 、 1.3×10^5 CFU/ml。

二、重组逆转录病毒感染 HepG2. 2. 15 细胞后对 HBV 抗原表达的抑制作用

3 种重组逆转录病毒载体分别以 MOI = 5 的剂量感染 HepG2. 2. 15 细胞,于感染后 3 d、5 d、7 d、9 d 和 11 d 分别收集细胞培养上清液,测定 HBsAg 和 HBeAg P/N 值。结果感染 HepG2. 2. 15 细胞后 3 d, pRV-CP 及 pRV-CS 即对 HBsAg 和 HBeAg 的表达产生抑制作用,于第 5 d 达高峰,随后其抑制作用基本保持在相同水平, pRV-CP 及 pRV-CS 组对 HBsAg 表达的平均抑制率分别为 $(28.9 \pm 4.73)\%$ ($P < 0.01$) 和 $(39.3 \pm 7.04)\%$ ($P < 0.01$), G1Na 对照组为 $(2.6 \pm 3.77)\%$; 对 HBeAg 表达的平均抑制率分别为 $(40.38 \pm 2.59)\%$ ($P < 0.01$) 和 $(33.1 \pm 4.27)\%$ ($P < 0.01$), 对照组为 $(3.1 \pm 3.02)\%$ 。见图 3、4。

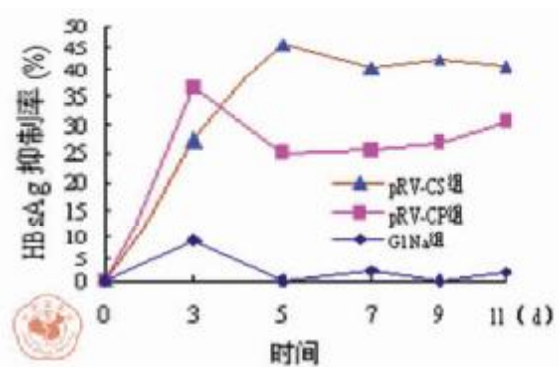


图 3 重组逆转录病毒载体转导突变型 HBV 对 HepG2. 2. 15 细胞 HBsAg 表达抑制作用

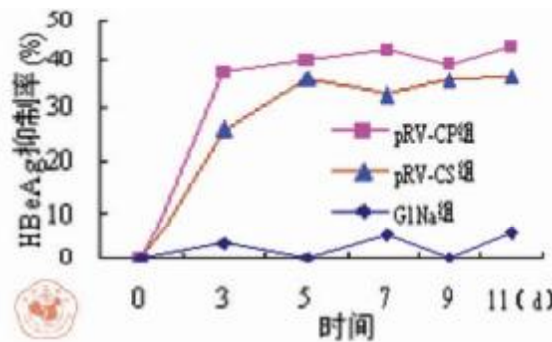


图 4 重组逆转录病毒载体携带突变型 HBV 对 HepG2. 2. 15 细胞 HBeAg 表达抑制作用

三、重组逆转录病毒感染对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV 复制的抑制作用

重组逆转录病毒感染 HepG2. 2. 15 细胞后 11 d, 收集细胞培养上清液后, 胰酶消化并收集所有细胞, 提取细胞内核心蛋白颗粒中 HBV DNA, 进行 DNA 狭缝

斑点杂交,经计算机扫描密度分析,pRV-CP 组、pRV-CS 组及 G1Na 组对 HBV 复制的抑制率分别为 67.2%、55.8% 和 13.4%。见图 5。

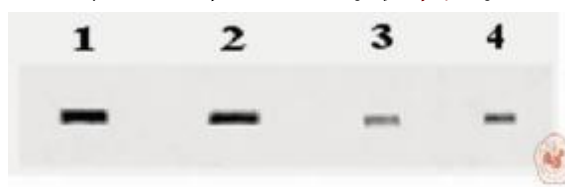


图 5 逆转录病毒携带 HBV 载体表达显性阴性突变体对 HBV 复制的抑制作用

1. HepG2.2.15 细胞
2. 感染 G1Na 的 HepG2.2.15 细胞
3. 感染 pRV-CP 的 HepG2.2.15 细胞
4. 感染 pRV-CS 的 HepG2.2.15 细胞

四、重组逆转录病毒感染 HepG2.2.15 细胞后培养液中突变型 HBV 的分泌
pRV-CP 组及 HepG2.2.15 细胞组上清液可扩增出 872 bp 片段,PCR 产物纯化后经 30 U *Bsr*BR I 酶切,pRV-CP 组不能完全被 *Bsr*BR I 酶切,可获得 872 bp、758 bp 和 114 bp 3 个片段,而 HepG2.2.15 细胞组完全酶切为 758 bp 和 114 bp 2 个片段。经凝胶成像系统密度分析,pRV-CP 组上清液中突变型 HBV 占 16%。pRV-CS 组上清液仅扩增出 975 bp 片段,未检测出突变型 HBV,而用 pRV-CS 质粒可扩出 223 bp 片段。见图 6。

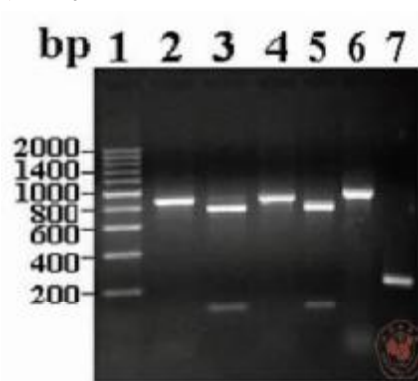


图 6 重组逆转录病毒感染 HepG2.2.15 细胞后培养液中突变型 HBV 的 PCR 检测。

1. 200 bp DNA Ladder
2. pRV-CP 组培养液 PCR 产物
3. pRV-CP 组培养液 PCR 产物 *Bsr*BR I 酶切
4. HepG2.2.15 细胞培养液 PCR 产物
5. HepG2.2.15 细胞培养液 PCR 产物酶切
6. pRV-CS 组培养液 PCR 产物
7. pRV-CS 质粒 PCR 产物

五、重组逆转录病毒感染对 HepG2.2.15 细胞的毒性观察

在实验范围内,3 种重组逆转录病毒感染的 HepG2.2.15 细胞与空白对照组相比,在细胞形态、生长速度方面无明显差异,11 d 后取培养上清液检测甲胎蛋白水平,各组无明显差异($P > 0.05$)。

讨 论

本研究在逆转录病毒载体中插入复制缺损型 HBV 全基因复制单元后,在包装细胞系 PA317 中能形成较高滴度的重组逆转录病毒,以此感染有能进行 HBV 复制的 HepG2.2.15 细胞后,在对 HBV 基因改造较小的 pRV-CP 组,细胞培养上清中能检出突变型 HBV,而 pRV-CS 组未检出,可能由于对 HBV 基因组的改动过大,不能正确包装。

培养上清液中能检测出突变型 HBV 颗粒,表明重组逆转录病毒能在细胞内表达 HBV 前基因组 mRNA,在 HepG2.2.15 细胞提供结构蛋白的情况下,包装为完整的 HBV 样颗粒,在体内即可感染其他肝细胞,发挥 HBV 载体的功能。

目前所应用的基因治疗载体,存在的共同缺陷是难以向众多的靶细胞导入足量的目的基因^[1],HBV 感染者体内有众多的感染细胞,目的基因到达体内如果没有导向性及放大效应,很难获得满意的临床疗效。目前仍缺乏理想的 HBV 易感细胞模型,HBV 载体难以感染现有的细胞系,此外,HBV 载体制备困难,难以获得高滴度的重组 HBV。本研究把逆转录病毒用于转导 HBV 载体,这一联合策略,充分利用了逆转录病毒方便制备、感染效率高的优点,也利用了 HBV 载体用于慢性 HBV 感染者时具有嗜肝导向性、放大效应、无细胞毒性及免疫原性的优点。

国外将显性阴性突变体用于抗 HIV 的研究较多,也有用于抗嗜肝 DNA 病毒的研究^[7-10]。其原理是将嗜肝 DNA 病毒核心蛋白与 HBsAg 或异源蛋白融合,形成假核心蛋白,干扰病毒的包装与复制,报道 HBV 复制水平可下降 95%^[10]。但这些研究用于表达假核心蛋白的载体多为逆转录病毒、腺病毒等。未见应用 HBV 载体表达显性阴性突变体的报道。

斑点杂交结果显示,pRV-CP 和 pRV-CS 两种突变型 HBV 对 HBV 复制的抑制率分别为 67.2% 和 55.8%。Scaglioni 等^[10]通过共转染的方式研究显性阴性突变体对 HBV 复制的影响,发现其对 HBV 抑制率达 95%。差别的原因可能与所用模型及融合的基因不同有关。

有报道^[8]显性阴性核心蛋白突变体通过两个步骤干扰 HBV 的复制,(1)干扰病毒前基因组 RNA 的包装;(2)抑制病毒在核壳内的拟转录。本研究显示 pRV-CP 和 pRV-CS 两种突变型 HBV 对 HBsAg 表达的平均抑制率分别为 28.9% 和 39.3%,对 HBeAg 表达的平均抑制率分别为 40.38% 和 33.1%。国内资料大多应用 HepG2.2.15 细胞作抗病毒治疗模型,与文献资料比较,显性阴性核心蛋白突变体治疗对 HBV 抗原的抑制作用均低于反义 RNA 及反义寡核苷酸治疗的结果^[11-14],分析其原因认为:(1)显性阴性核心蛋白突变体治疗主要作用是干扰病毒的复制,而对于整合在细胞基因组的基因表达无作用,因而,细胞仍表达各种抗原蛋白;(2)重组逆转录病毒不能感染所有细胞,而且,感染每一个细胞的量也不确定,形成的重组 HBV 在细胞培养条件下难以进入肝细胞,使得未受重组病毒感染仍继续表达病毒抗原;(3)重组病毒 pRV-CP 仍能表达 HBsAg,当然,由于是融合的大蛋白,尚不知其能否再分泌。

基因重组 HBV 由于与野生型 HBV 序列相似,有可能发生基因重组而“返祖”为野生型 HBV。但因细胞内已有大量野生型 HBV,在有显性阴性突变体抗病毒效应存在的情况下,即使出现少量“返祖”的野生型 HBV,也不至于导致病情明显加重。

总之,本研究证实了重组逆转录病毒转导 HBV 载体表达显性阴性突变体,这种突变体对 HBV 复制及抗原表达有抑制作用,有望用于抗 HBV 的基因治疗。

参 考 文 献

- 1 Marshall E. Gene therapy's growing pains. *Science*, 1995, 269:1050-1055.
- 2 孙殿兴, 胡大荣, 邬光惠. 抗乙型肝炎病毒分子生物学治疗新策略. *中华肝脏病杂志*, 2001, 9:317-318.
- 3 孙殿兴, 刘风军, 胡大荣, 等. 基因重组 HBV 的构建及其表达反义 RNA 抗-HBV 作用的研究. *中华传染病杂志*, 2004, 22:90-93.
- 4 孙殿兴, 刘风军, 胡大荣, 等. 复制缺损型 HBV 表达显性阴性突变体抗 HBV 作用的研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2004, 18:145-149.
- 5 孙殿兴, 胡大荣, 邬光惠, 等. 基因重组 HBV 联合表达反义 RNA 及显性阴性突变体抗 HBV 作用的研究及 HBV 包装细胞系的构建. *中华肝脏病杂志*, 2002, 10:260-265.
- 6 孙殿兴, 胡大荣, 邬光惠, 等. 重组逆转录病毒载体携带乙型肝炎病毒载体的构建与表达. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2002, 16:162-165.
- 7 Yi J, Gong WD, Wang L, et al. VP22 fusion protein-based dominant negative mutant can inhibit hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol*, 2005, 11:6429-6432.
- 8 Von-Weizsacker F, Kock J, Wieland S, et al. Dominant negative mutants of the duck hepatitis B virus core protein interfere with RNA Pregenome packaging and viral DNA synthesis. *Hepatology*, 1999, 30:308-315.
- 9 Koschel M, Oed D, Gerelsaikhan T, et al. Hepatitis B virus core gene mutations which block nucleocapsid envelopment. *J Virol*, 2000, 74:1-7.
- 10 Scaglioni P, Melegari M, Takahashi M, et al. Use of dominant negative mutants of the hepadnaviral core protein as antiviral agents. *Hepatology*, 1996, 24:1010-1017.
- 11 Ji W, Wang QH, Yu M, et al. Inhibition of hepatitis B virus by retroviral vectors expressing antisens RNA. *J Viral Hepatol*, 1997, 4:167-173.
- 12 张建军, 陈枫, 钟森, 等. 乙型肝炎病毒 C 区反义 RNA 靶向肝细胞抗病毒的研究. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8:169-170.
- 13 杨林, 陈幼明, 高志良, 等. 三螺旋形成寡核苷酸抑制乙型肝炎病毒复制及抗原合成的实验研究. *中华肝脏病杂志*, 1999, 7:8-10.
- 14 赵蔚, 陈红, 彭源, 等. 双靶区反义 RNA 对乙型肝炎病毒转基因小鼠抗病毒疗效的研究. *中华医学杂志*, 2005, 85:3486-3490.

(收稿日期:2007-07-24)

(本文编辑:樊文梅)