论著

文章编号:1000-5404(2010)01-0054-03

丙型肝炎病毒NS5B在Hep3B细胞的表达及活性分析

孔令保,刘志文,吴晓玉,刘好桔,王园秀 (330045 南昌,江西农业大学生物科学与工程学院南昌市发酵应用技术重点实验室)

[摘要] **目的** 丙型肝炎病毒NS5B基因转染人肝癌细胞系Hep3B细胞,检测NS5B的表达与细胞内RNA聚合酶活性。**方法** 使用脂质体把包含全长丙型肝炎病毒NS5B基因的重组载体pcDNA-5B转染到Hep3B细胞。RT-PCR和Western blot鉴定NS5B基因的表达,荧光素酶检测NS5B的细胞内RNA依赖的RNA聚合酶活性。**结果** RT-PCR和Western blot发现转染NS5B基因的Hep3B细胞产生NS5B mRNA和NS5B蛋白,荧光素酶分析表明Hep3B细胞表达的NS5B蛋白具有细胞内RNA依赖的RNA聚合酶活性。**结论** 人肝癌细胞系Hep3B细胞可以成功表达NS5B基因,且表达的NS5B蛋白具备细胞内RNA依赖的RNA聚合酶活性。

[关键词] 丙型肝炎病毒;NS5B;Hep3B细胞;活性
[中图法分类号] R373.21; R394.2; R735.7 [文献标志码] A

Expression and activity analysis of hepatitis C virus NS5B in Hep3B cells

Kong Lingbao, Liu Zhiwen, Wu Xiaoyu, Liu Haoju, Wang Yuanxiu (Nanchang Key Laboratory of Fermentation Application Technology, College of Life Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi Province, 330045, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B gene transfection on the expression of the transfected gene and the activity of RNA polymerase in human hepatic carcinoma cell line Hep3B for studying the mechanisms of HCV replication. **Methods** The recombinant vector pcDNA-5B expressing wild-type HCV NS5B gene was transfected into Hep3B cells using Lipofectamine 2000 reagent kit. Expression of the transfected NS5B gene was determined by RT-PCR and Western blot analysis. Luciferase assays were used to analyze the activity of RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). **Results** The results from both RT-PCR and Western blot analysis demonstrated that there was the expression of NS5B gene at mRNA and protein levels in the transfected Hep3B cells. Luciferase assays revealed that there was RdRp activity of expressed NS5B protein in transfected Hep3B cells. **Conclusion** The enzymatically active HCV NS5B can be expressed in human hepatic carcinoma cell line Hep3B by transfection, and the expressed NS5B has RdRp activity.

[**Key words**] hepatitis C virus; NS5B; human hepatic carcinoma cell line Hep3B; activity

Supported by the PhD Foundation of Jiangxi Agricultural University (2727). Corresponding author: Kong Lingbao, Tel: 86-791-3813459, E-mail:lingbaok@hotmail.com

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是肝炎的主要病原因子,高达85%的感染者可发展成慢性肝炎,慢性肝炎进一步又可发展成肝硬化、肝细胞癌[1,2]。迄今为止还没有疫苗预防HCV感染,也没有专门针对HCV的治疗药物。现有的主要治疗手段是聚乙二醇化干扰素α加核苷类似物病毒唑的联合治疗,但其治疗效率低,副作用大[3]。因此,研究HCV的复制过程、致病机制和开发新的治疗药物意义重大,刻不容缓。

HCV是一种具囊膜的正链RNA病毒,基因组长约9.6 kb,由5′非编码区、3′非编码区和一个大的开放阅读框架(ORF)组成。ORF编码一个约3 000个氨基酸残基组成的多聚蛋白前体,经宿主蛋白酶和HCV编码的蛋白酶切割后产生病毒的结构蛋白和非结构蛋白。其中,非结构蛋白NS5B具有RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)活性。

[基金项目] 江西农业大学博士基金(2727)
[通信作者] 孔令保,电话:(0791)3813459, E-mail:lingbaok@hotmail.com

它是HCV基因组复制的关键酶,因而成为抗HCV药物的一个理想靶标[4,5]。本研究将丙型肝炎病毒NS5B基因转染人肝癌细胞系Hep3B细胞,检测NS5B的表达与细胞内活性,旨在为开展NS5B抑制剂的筛选研究和NS5B催化的丙型肝炎病毒复制机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系Hep3B由中国典型培养物保藏中心提供。NS5B蛋白免疫血清由University of Kentucky的罗广湘教授惠赠。*Ex-Taq* DNA聚合酶、限制性内切酶*Pst* Ⅰ、AMV RTase、Trizol、兔抗actin多克隆抗体、海肾荧光素酶质粒pRL-CMV、Lipofectamin™ 2000、DMEM、胎牛血清、Dual-luciferase Reporter Assay system kit和ECL Chemiluminescence Detection Kit购自Santa Cruz、Invitrogen、Gibco、Promega、Amersham、大连宝生物工程公司和晶美生物工程公司。包含HCV野生型NS5B基因的重组质粒pcDNA-5B、包含丧失酶活性的HCV突变型NS5B基因的重组质粒pcDNA-5BGAA、包含对应于HCV负链RNA 3′末端区[简称为(-)3′T]序列(长度为578 nt)的DNA片段的重组质粒pGEM-(-)3′T和包含依次反向连接在CMV启动子后面的萤火虫荧光素酶基因和HCV 5′非翻译区的重组质粒pcDNA-(-)luc-(-)IRES为以前构建[6-8]。

1.2 细胞转染

Hep3B细胞用含10%胎牛血清的DMEM于37 ℃、5% CO_2中培养,按照转染试剂盒Lipofectamin™ 2000说明书要求将重组质粒pcDNA-5B$_{GAA}$和pcDNA-5B转染HepG3B细胞。转染48 h后,收集细胞进行RT-PCR和Western blot检测。

1.3 RT-PCR检测

Trizol试剂提取细胞的总RNA。使用提取的RNA、NS5B特异性的反向引物或GAPDH特异性的反向引物、AMV RTase进行逆转录。以逆转录产生的cDNA作为模板,加入*Ex-Taq* DNA多聚酶、NS5B特异性的引物对或GAPDH特异性的引物对进行PCR反应。NS5B特异性的反向引物对:正义链5′-CCTCGAGATGGCGTCAATGTCTTATACCTGG-3′,反义链5′-GTTCACCGGTTGGGGAGG-3′。GAPDH特异性的反向引物对:正义链5′-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3′,反义链5′-ATGAGGTCCACCACCCTGTT-3′。RT-PCR产物用0.7%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 Western blot检测

裂解液(0.3% NP40, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9, 2 mmol/L EGTA, 1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 25 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na_3VO_3, 10 μg/ml PMSF)裂解细胞,冰浴30 min,12 000×*g*离心15 min(离心半径14.6 cm),12%聚丙酰胺凝胶分离蛋白,转膜,以NS5B蛋白免疫血清或兔抗actin多克隆抗体作为一抗,羊抗兔IgG为二抗进行Western blot反应,按ECL试剂盒说明书检测蛋白带。

1.5 荧光素酶活性检测

参照文献[8],重组质粒pcDNA-(-)luc-(-)IRES用*Pst* Ⅰ酶切,回收酶切约6.0 kb的大片段(简称CLI:该片段中萤火虫荧光素酶基因和HCV 5′非翻译区依次反向连接在CMV启动子后面)。pcDNA-5B$_{GAA}$(0.01 μg/孔)或pcDNA-5B(0.01 μg/孔)、CLI(0.1 μg/孔)和内参报告质粒pRL-CMV(0.001 μg/孔)共转染96孔培养的Hep3B细胞,转染后1、2、3、4、5 d,按照Dual-luciferase Reporter Assay system kit说明书收获裂解细胞和检测荧光素酶活性。

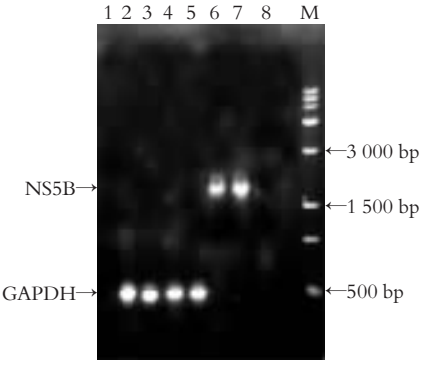
1.6 统计学方法

实验重复3次,采用Excel 2003计算3次重复实验的平均值和标准偏差,结果以$\bar{x} \pm s$表示。

2 结果

2.1 RT-PCR检测NS5B基因在Hep3B细胞的转录

RT-PCR结果显示,pcDNA-5B和pcDNA-5B$_{GAA}$转染的Hep3B细胞检测到1.8 kb的NS5B带,阴性对照空载体pcDNA3.1(-)转染和未转染的Hep3B细胞未见NS5B带;作为内参,所有细胞均检测到446 bp的GAPDH带(图1)。这些结果表明转染的野生型和突变型NS5B基因均已转录产生相应的mRNA。

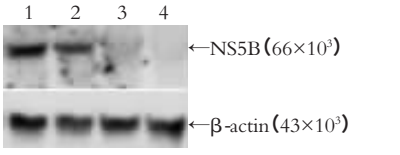


M:*Trans*15K DNA标准;1、5:pcDNA-5B$_{GAA}$转染的Hep3B细胞;2、6:pcDNA-5B转染的Hep3B细胞;3、7:空载体pcDNA3.1(-)转染的Hep3B细胞(阴性对照);4、8:未转染的Hep3B细胞(阴性对照)

图1 RT-PCR检测NS5B mRNA的表达

2.2 Western blot检测NS5B蛋白的表达

以NS5B蛋白免疫血清作为一抗进行Western blot反应,pcDNA-5B和pcDNA-5B$_{GAA}$转染的Hep3B细胞均检测到66×10^3的NS5B蛋白带,而阴性对照组没有检测到此带;以兔抗actin多克隆抗体作为一抗进行Western blot反应,细胞均检测到43×10^3的β-actin蛋白带(图2)。上述结果说明转染的野生型和突变型NS5B基因经翻译产生了野生型和突变型NS5B蛋白。



1:pcDNA-5B$_{GAA}$转染的Hep3B细胞;2:pcDNA-5B转染的Hep3B细胞;3:空载体pcDNA3.1(-)转染的Hep3B细胞(阴性对照);4:未转染的Hep3B细胞(阴性对照)

图2 Western blot检测NS5B蛋白的表达

2.3 荧光素酶分析 Hep3B 细胞表达的 NS5B 的细胞内活性

参照文献[8]通过分析相对荧光素酶活性确定 NS5B 在 Hep3B 细胞内是否具有 RdRp 活性。pcDNA-5B 转染的 Hep3B 细胞在转染后第1、2、3、4 天和第 5 天,相对荧光素酶活性值分别为(56.03±6.38)、(96.72±3.99)、(65.31±7.30)、(46.11±2.84)和(12.19±6.45); pcDNA-5B$_{GAA}$转染的 Hep3B 细胞在转染后第 1、2、3、4 天和第 5 天,荧光素酶活性值分别为(1.04±0.44)、(0.96±0.41)、(0.99±0.83)、(0.48±0.23)和(0.82±0.63)。这些结果表明 Hep3B 细胞表达的野生型 NS5B 具有细胞内的 RdRp 活性。

3 讨论

HCV 非结构蛋白 NS5B 是 HCV 复制的关键酶和抗 HCV 药物研发的一个理想靶标。因此,有关该蛋白的研究很快成为 HCV 研究的热点之一。NS5B 基因的重组表达及活性系统构建是研究 NS5B 催化的复制机制和 NS5B 抑制剂筛选的重要基础。近些年来,国内一些学者分别使用大肠杆菌或昆虫细胞成功表达了 NS5B[9-12]。前期我们构建了稳定表达 NS5B 的人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞,该细胞系表达的 NS5B 在体外和细胞内均表现出 RdRp 活性[8]。人体内 HCV 感染的主要宿主细胞是肝细胞[13]。本研究中,我们尝试利用人肝癌细胞系 Hep3B 表达有细胞内 RdRp 活性的 NS5B。RT-PCR 和 Western blot 鉴定表明转染的 NS5B 基因在 Hep3B 细胞可以成功转录和翻译,产生 NS5B 蛋白。鉴于体外的 NS5B 活性条件与细胞内的 NS5B 活性条件有很大的差异,我们直接检测转染 Hep3B 细胞表达的 NS5B 在细胞内是否有 RdRp 活性,结果显示与 HeLa 细胞表达的 NS5B 一致[8], Hep3B 细胞表达的 NS5B 也具有细胞内的 RdRp 活性,这与本研究结果类似。

另外,我们前期研究发现 NS5B 也可以在另外 2 个人肝癌细胞系 Bel-7402 和 Huh7 细胞中成功表达和具备细胞内的 RdRp 活性[14,15]。

目前对 NS5B 催化的 HCV 复制机制的许多细节仍不了解,而且作为抗 HCV 药物设计的一个理想靶标,迄今还没有理想的针对 NS5B 的临床用药问世[16-18]。我们构建的基于人肝细胞的 NS5B 活性系统为进一步研究 NS5B 催化的 HCV 复制机制和以 NS5B 为靶标的抗 HCV 药物筛选奠定了基础。

参考文献:

[1] Seeff L B. Natural history of hepatitis C[J]. Hepatology, 1997, 26 (3 Suppl 1): S21-S28.

[2] 闫涛, 季伟, 王慧芬. 丙型肝炎病毒感染至肝硬变进程影响因素的分析[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(7): 672-673.

[3] Chander G, Sulkowski M S, Jenckes M W, *et al*. Treatment of chronic hepatitis C: a systematic review[J]. Hepatology, 2002, 36(5 Suppl 1): S135-S144.

[4] Lindenbach B D, Rice C M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function[J]. Nature, 2005, 436(7053): 933-938.

[5] De-Francesco R, Migliaccio G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C[J]. Nature, 2005, 436(7053): 953-960.

[6] Ye L, Timani K A, Ye L, *et al*. Two cis-acting elements in negative RNA strand of Hepatitis C virus involved in synthesis of positive RNA strand *in vitro*[J]. Acta Virol, 2005, 49(2): 83-90.

[7] 叶力, 叶林柏, 佘应龙, 等. HCV NS5B 蛋白对 HCV RNA 的模板特异性研究[J]. 中国病毒学, 2005, 20(3): 232-238.

[8] Kong L B, Ye L B, Ye L, *et al*. Establishment of stable HeLa cell lines expressing enzymatically active hepatitis C virus RNA polymerase [J]. Arch Virol, 2006, 151(2): 361-367.

[9] 张跃红, 段惠娟, 鞠连才. 丙型肝炎病毒 NS5B 基因的克隆及在大肠杆菌的分泌表达[J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(8): 696-698.

[10] 杨华凤, 潘明洁, 吕敏, 等. 丙型肝炎病毒 NS5B 全长基因及截短形式基因的克隆、表达及鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(1): 1-4.

[11] 兰水云, 郑玲洁, 胡芸文, 等. 丙型肝炎病毒 RNA 多聚酶在昆虫细胞中的表达[J]. 中国病毒学, 2000, 15(4): 313-317.

[12] 李磊, 郜金荣, 徐进平, 等. 丙型肝炎病毒 NS5B 基因在昆虫细胞中的表达[J]. 武汉大学学报:理学版, 2001, 47(2): 217-219.

[13] 王健, 赵金红, 江水清, 等. 丙型肝炎病毒慢性感染与 IL-8、IP-10、Mig 表达相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(13): 1420-1423.

[14] 孔令保, 吴晓玉, 李昆太, 等. 持续表达 HCV NS5B 的 Bel-7402 细胞系的构建与鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(4): 717-722.

[15] 孔令保, 吴晓玉, 朱向东, 等. HCV NS5B 在人肝癌细胞系 Huh7 细胞内的表达及活性分析[J]. 山东医药, 2009, 49(35): 34-36.

[16] Sigal S, Jacobson I. Future therapies for hepatitis C: where do we go from here? [J]. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2007, 4(2): 60-61.

[17] Kwong A D, McNair L, Jacobson I, *et al*. Recent progress in the development of selected hepatitis C virus NS3.4A protease and NS5B polymerase inhibitors[J]. Curr Opin Pharmacol, 2008, 8(5): 522-531.

[18] Gaudieri S, Rauch A, Pfafferott K, *et al*. Hepatitis C virus drug resistance and immune-driven adaptations: relevance to new antiviral therapy[J]. Hepatology, 2009, 49(4): 1069-1082.

(**收稿**:2009-04-25;**修回**:2009-06-01)

(编辑 龙 亮)