论著

文章编号:1000-5404(2011)03-0250-04

preS1 分子连接体转运 siHBX 抑制 HepG2-HBX 细胞株内 HBX 表达的实验研究

杨 兵[1],文阳安[1],黄世峰[1],周倩云[1],张莉萍[1],陈维贤[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院检验科[1];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院检验科[2])

【摘要】 **目的** 探讨应用 preS1 分子连接体作为 siRNA 转运载体对 HepG2-HBX 细胞株中稳定表达的乙型肝炎病毒 X 蛋白(HBX)的抑制效果及生物学效应。**方法** 构建 HepG2-HBX 稳定表达细胞株;化学合成 pres1 分子连接体及 HBX 特异性 siRNA 序列(siHBX);pres1 分子连接体分别与肝细胞系及 siRNA 进行结合能力试验,然后以 preS1 分子连接体作为转运载体转染 siHBX 入 HepG2-HBX 后经实时荧光 RT-PCR 及 Western Blot 检测 siHBX 对 HBX 基因的抑制效果。**结果** 成功构建了稳定表达 HBX 基因的 HepG2-HBX 细胞株,preS1 分子连接体能够与 siRNA 进行有效结合,同时可以携带 siRNA 进入肝细胞内高效抑制 HepG2-HBX 细胞株内 HBX 的表达。与空白组相比,阴性对照组抑制率为(11.94 ± 6.3)%,而阳性对照组(脂质体)及实验组(preS1 分子连接体)的抑制率分别为(85.24 ± 2.6)% 和(77.80 ± 6.10)%,实验组与空白组及阴性对照组相比,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** preS1 分子连接体可作为一种新型 siRNA 转运载体,携带 siHBX 进入肝癌细胞内发挥 RNA 干扰机制,为乙型肝炎病毒相关性肝脏疾病的治疗提供了新的途径。

【关键词】 preS1 分子连接体;乙型肝炎病毒 X 蛋白;细胞穿透性多肽;靶向性配体
【中图法分类号】 R394-33;R394.3;R512.620.2 【文献标志码】 A

prS1 molecule conjugate carrying siHBX inhibits expression of HBX in HepG2-HBX cells

Yang Bing[1], Wen Yang'an[1], Huang Shifeng[1], Zhou Qianyun[1], Zhang Liping[1], Chen Weixin[2] ([1]Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the inhibitory and biological effect of prS1 molecule conjugate carrying siHBX on expression of the HBX gene in HepG2-HBX cell line. **Methods** pres1 molecule conjugate and siHBX were chemically synthesized. Ability of the preS1 molecule conjugate to bind to HepG2-HBX and siRNA was tested. The siRNA was then transfected into the HepG2-HBX cell line by the preS1 molecule conjugate. Inhibiting effect of siHBX on expression of the HBX gene was detected by quantitative real-time RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** The HepG2-HBX cell line stably expressing the HBX gene was successfully constructed. The preS1 molecule conjugate could effectively bind to siHBX and inhibit expression of HBX in HepG2-HBX cells. The inhibition rate of pres1 molecule conjugate on expression of HBX was significantly lower in negative control groups than in postive and experimental group (11.94% ± 6.3% *vs* 85.24% ± 2.6% and 77.80% ± 6.1%, $P<0.05$) **Conclusion** preS1 molecule conjugate carrying siHBX can be used as a novel siRNA carrier and plays a role in interference with RNA in liver cancer cells, thus providing a new treatment modality for HBV-related liver diseases.

【**Key words**】 prS1 molecule conjugate; HBX; Cell Penetrating peptides; Cell targeting ligands

Supported by the National Science Foundation of China (30972582, 30973378, 81071621) and the Natural Scince Foudation of Chongqing (CSTC2009BB5276, 2009BB5257, 2010BB5390) and the Internal Medical Science Foudation of the Fisrt Affiliated Hospital of Chongqing Medical University. Corresponding author Zhang Liping, E-mail: LiuZhangcq@yahoo.com; Chen Weixian, E-mail: ache11@163.com

RNA 干扰(RNA interferencing,RNAi)机制的发现为肿瘤、慢性疾病及感染性疾病的治疗带来了新的思路[1]。目前,常用于转运 siRNA 的系统主要有纳米载体(nanocarrier)和分子连接体(molecular conjugate)两类[2]。但因纳米材料本身具有一定的细胞毒性而限

【基金项目】 国家自然科学基金(30972582,30973378,81071621);重庆市科委项目(2009BB5276,2009BB5257,2010BB5390);重庆医科大学附属第一医院院内医学科学基金(YXJJ2009-12)
【通信作者】 张莉萍,电话:(023)89012756,E-mail:liuzhangcq@yahoo.com
陈维贤,电话:(023)63703244,E-mail:ache11@163.com

制了其临床应用。分子连接体系统通常分为细胞靶向性配体(Cell targeting ligands,CTLs)和细胞穿透性多肽(Cell Penetrating peptides, CPPs)[3-4]两种。精氨酸多聚体具有亲水性,可帮助短肽穿越细胞膜而进入细胞质内;同时具有较强正电荷,可与带负电荷的siRNA结合[5]。因此,可采用将靶向性配体和精氨酸多聚体相结合的策略构建分子连接体用于siRNA的靶向转运。

目前,全球约有3亿人感染乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV),每年约有100万人死于HBV相关性疾病,研究新的抗HBV治疗策略刻不容缓[6]。HBV侵入肝细胞的过程尚未彻底清楚,其特异性受体尚无明确结论。但相关的研究表明preS1可能是病毒与细胞膜上特异性受体结合并携带病毒基因组进入细胞内的配体[7-8];而preS1与受体结合的区域主要在其N端,其中21~47aa.多肽片断被证实起关键性作用[9]。

本研究以表面可能具有配体功能的preS1蛋白中的关键性片段(21~47aa.)为基础,末端连接9个精氨酸构成了一个preS1分子连接体,命名为2147-9R。由于21~47aa.多肽片断具有特异性靶向肝细胞的潜能,而9个精氨酸具有穿透细胞的能力,因此,本实验构建的preS1分子连接体预期可作为肝细胞特异性载体,转运特异性针对HepG2-HBX细胞株内稳定表达的HBX基因的siRNA(siHBX)进入肝细胞。本课题旨在通过构建preS1分子连接体,探讨应用preS1分子连接体作为siHBX转运载体对HepG2-HBX细胞株中HBX基因的抑制效果及生物学效应,预期为HBV相关疾病的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 阳离子脂质体lipofectamine2000、Opti-MEM® I培养基、G418均购于Invitrogen公司,RT-PCR试剂盒及荧光定量试剂盒购于TaKaRa公司(大连),胎牛血清及MEM培养基购自Hyclone公司,鼠Flag抗体及RIPA(弱)蛋白裂解液购自碧云天公司,HRP标记的二抗及DAB显色剂均购自北京中杉金桥公司。内参鼠Tubulin抗体购于Cell Signaling Technology,总RNA提取试剂盒为Promega公司产品,相关PCR引物、Pres1分子连接体(2147-9R)订购于上海英骏生物科技有限公司。siHBX序列参考文献[10]合成于广州锐博生物科技有限公司,同时购买该公司的阴性荧光对照siRNA(siRNA-cy3)。

1.1.2 细胞株及质粒 携带HBX基因的质粒pCDNA3.1(+)/HBX-Flag及HepG2细胞由本试验组保存。

1.1.3 引物及分子连接体的序列及合成 相关引物由primer5软件设计。其中,扩增HBX基因用的上游引物为:5′-ACCGACCTTGAGGCCTACTT-3′,下游引物为:5′-GCTTGGCAGAGGTGAAAAAG-3′,扩增产物大小为179 bp;扩增内参GAPDH基因序列用的上游引物为:5′-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3′,下游引物为:5′-TCTAGACGGCAGGTCAGGTC-3′,扩增产物大小为209 bp。2147-9R序列为:PAF. GAN. SNN. PDW. DFN. PNK. DQW. PAA. NQV. GGG. RRRRRRRRR,同时以FITC标记部分2147-9R序列的N端。siHBX序列5′-CCGACCTTGAGGCCTACTT -3′。

1.2 方法

1.2.1 HBX稳定表达株的构建及鉴定 转染前1 d,胰酶消化HepG2细胞接种于6孔板,置于5% CO_2、37 ℃培养箱中培养,待其汇合度达60%~80%后进行转染。用250 μl Opti-MEM® I培养基稀释1 μg pCDNA3.1(+)/HBX-Flag,轻轻混匀。同样稀释5 μl阳离子脂质体于250 μl Opti-MEM® I培养基中,具体操作严格按照试剂说明书进行。48 h后加入G418,按照400、600和800 mg/L 3个浓度梯度进行加压筛选后,分别以RT-PCR和Western blot方法分别从mRNA及蛋白两个水平对HBX基因的稳定表达进行鉴定。

1.2.2 多肽细胞结合实验 转染前24 h,24孔板加玻片,铺板,计数使每孔细胞数约2.0×10^4个;结合试验前弃培养基,加PBS液体冲洗3次。然后每孔加入PBS 1 ml、1 μl浓度为100 μmol/L的2147-9R-FITC多肽及DAPI液0.5 μl,4 ℃孵育20 min后用PBS冲洗。加入多聚甲醛0.5 ml,室温避光15 min,弃多聚甲醛,PBS液体冲洗3次。将盖玻片从孔内取出后用甘油封闭,避光保存,荧光显微镜检测。

1.2.3 多肽电泳实验 为明确2147-9R-FITC与2147-9R的电荷性质及带电量差异进行多肽电泳实验。1 μl样品加6×loading buffer 0.5 μl混匀后加入2%的琼脂糖凝胶各孔内,并控制电泳液pH值在8.0~9.0之间进行电泳。电泳过程设置如下:电压80 V(伏),电流60 mA(毫安培),电泳时间25 min。为进一步证实多肽移动的相对距离,用考马斯亮蓝G250染色,染色30 min后振荡脱色过夜,凝胶成像仪成像。

1.2.4 EMSA实验 该实验旨在探讨2147-9R与siHBX的最佳结合比例。原理为:等量siRNA与不同量2147-9R多肽结合后进行凝胶电泳,观察该siRNA条带的亮度差异。具体方法如下:取100 pmol siHBX与不同比例的多肽结合,以未加多肽组作为对照,室温作用20 min后,取全部混合物电泳,凝胶成像,重复3次。

1.2.5 转染条件优化实验 已成功构建的HepG2-HBX细胞株培养于含200 mg/l G418、10%胎牛血清、100 μg/ml链霉素、100 U/ml青霉素的MEM培养基中。转染前1 d铺板,待细胞融合度为30%~50%时进行转染。红色荧光标记的阴性siRNA(siRNA-cy3)与2147-9R按照不同比例(1∶1~1∶50)混合,室温放置30 min后,按不同的siRNA-cy3浓度(10~100 μmol/L)转染细胞。转染时以脂质体转染siRNA-cy3组为阳性对照,无载体转运即自由siRNA-cy3为阴性对照,未加入siRNA-cy3为空白对照。

1.2.6 转染后总RNA提取及实时荧光RT-PCR检测 确定最佳转染条件后转染siHBX进行后续实验。细胞接种于6孔细胞培养板中,实验分为4组:空白组、阴性对照组、阳性对照组和试验组。转染48 h后按照Trizol试剂说明书提取总RNA,并测定总RNA浓度及A260/A280比值,逆转录为cDNA后保存于-80 ℃备用。用GAPDH和HBX特异性引物进行实时荧光定量PCR检测HBX mRNA表达水平,相关操作均按照说明

书进行。

1.2.7 免疫印迹法检测 HBX 蛋白表达水平 由于 HepG2-HBX 细胞株在构建时含 HBX-Flag 融合基因，因此用抗 Flag 抗体可以间接检测 HBX 蛋白表达水平。具体方法如下：siHBX 转染 HepG2-HBX 细胞株 72 h 后，提取各组细胞的总蛋白质，12 000 r/min 离心 15 min，取上清液，测定总蛋白浓度。按照标准 Western blot 操作规范进行相应的 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭、一抗、二抗孵育和 DAB 显色等操作。其中一抗鼠 Flag 抗体稀释度为 1∶300，内参鼠 Tubulin 抗体稀释度为 1∶1 000；二抗兔抗鼠稀释度均为 1∶1 000。

1.2.8 统计学处理 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，SPSS 11.0 统计软件进行分析，并采用 q 检验进行组间数据的两两比较。

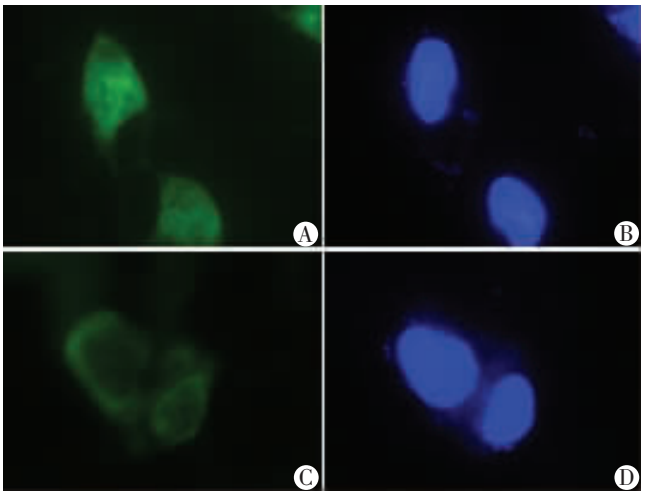
2 结果

2.1 HepG2-HBX 细胞株的构建及鉴定

G418 筛选实验证实未转染 pCDNA3.1(+)/HBX-Flag 的 HepG2 细胞 2 周后全部死亡，而用脂质体法转染 pCDNA3.1(+)/HBX-Flag 的细胞用 G418 抗性筛选后残留少量呈克隆样生长的细胞。挑取其中第 19 号克隆(命名为 HBX19)，行 RT-PCR 及细胞免疫组化实验验证 HBX mRNA 及 HBX-Flag 蛋白的表达，证实稳定表达 HBX 基因的 HepG2-HBX 细胞株构建成功(相关实验数据未显示)。

2.2 2147-9R 与 HepG2-HBX 细胞的结合能力

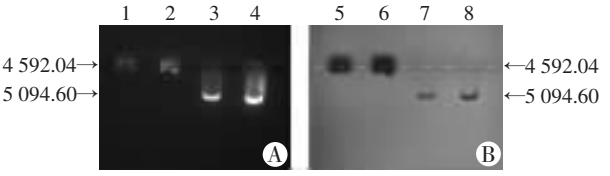
2.2.1 FITC-2147-9R 与 HepG2-HBX 细胞的结合能力 取 FITC 标记的 2147-9R 分别与 HepG2-HBX 及 HEK293 细胞进行孵育后用 DAPI 进行复染，荧光显微镜成像结果如图 1 所示：FITC-2147-9R 可进入包括细胞核在内的整个 HEK293 细胞中；而在 HepG2-HBX 细胞中主要定位于细胞质内。



A：HEK293 细胞株 FITC 荧光；B：HEK293 细胞株 DAPI 染色；C：HBX19 细胞株 FITC 荧光；D：HBX19 细胞株 DAPI 染色

图 1 荧光显微镜下 FITC-2147-9R 在不同细胞株的定位情况 (×40)

2.2.2 FITC 标记对 2147-9R 电荷特征的影响 FITC 标记标记前后的 2147-9R 进行电泳后的 Goldview 染色结果如图 2 所示：2147-9R 在加样孔附近呈现亮带，FITC-2147-9R 在加样孔下方呈特异性条带；考马斯亮蓝 G250 染色进一步证实 2147-9R 泳动距离较标记后 FITC-2147-9R 短。根据电泳原理推测，2147-9R 带正电荷，而 FITC-2147-9R 带负电荷。鉴于 FITC-2147-9R 与 2147-9R 均利用其所带正电荷与带有负电荷的细胞膜或 siRNA 结合，因此相对于 FITC-2147-9R 而言，2147-9R 更容易与 siRNA 或细胞膜结合而发挥作用。



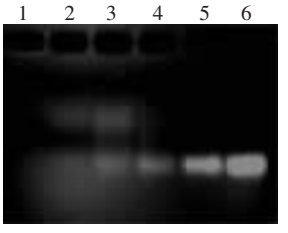
A：Goldview 染色；B：考马斯亮蓝染色

1,2：2147-9R；3,4：FITC-2147-9R；5,6：2147-9R；7,8：FITC-2147-9R

图 2 2147-9R 与 FITC-2147-9R 的电泳结果

2.3 2147-9R 与 siHBX 的(EMSA)结合比例的优化

EMSA 实验结果如图 3 所示。由此可见，在 siHBX 量一定(100 pmol)的情况下，随着多肽 2147-9R 量的增加，siHBX 条带的亮度越来越低，当 2147-9R 与 siHBX 的摩尔比为 10∶1 时，已看不到 siHBX 特异性条带，提示两者几乎完全结合。



各泳道 siHBX 均为 100 pmol，2147-9R 分别为 1：2 000 pmol；2：1 000 pmol；3：500 pmol；4：200 pmol；5：100 pmol，6：0 pmol

图 3 2147-9R 与 siHBX 的结合(EMSA)试验结果

2.4 2147-9R 与 siHBX 的转染比例

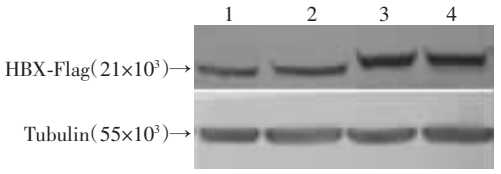
siRNA-cy3 与 2147-9R 结合后在 6 孔细胞培养板中进行转染实验，用荧光显微镜观察荧光强度。结果显示，当 siRNA-cy3 与 2147-9R 的摩尔比为 1∶10(siHBX 所用浓度为 50 μmol/L，而 2147-9R 为 500 μmol/L)时红色荧光强度最强，与上述 EMSA 实验中两者的最佳结合比例一致。将该转染条件用于后续所有相关实验。

2.5 siHBX 转染对 HBX mRNA 表达的抑制作用

荧光定量 RT-PCR 实验检测各实验组内 siHBX 对 HBX19 细胞株内 HBX mRNA 表达的沉默效果。实验结果所示。与空白组相比，阴性对照组抑制率为(11.94±6.3)%，而阳性对照组及实验组的抑制率分别为(85.24±2.6)%和(77.80±6.10)%。实验组抑制率与空白组及阴性对照组相比，差异均具有统计学意义($P<0.05$；$n=3$)，而与阳性对照组相比，差异无统计学差异($P>0.05$；$n=3$)。说明此多肽可以作为一种有效的 siHBX 转运载体，其效果与常用的脂质体类似。

2.6 siHBX 转染对 HBX 蛋白表达的抑制作用

为进一步探讨 preS1 分子连接体携带 siHBX 进入 HBX19 细胞成功沉默 HBX mRNA 后是否可抑制 HBX 蛋白的表达，采用 Western blot 实验来验证多肽是否最终影响了检测 HBX 蛋白的表达量，实验结果如图 4 所示。与阴性组及空白组相比，实验组 HBX-Flag 蛋白表达受到一定的抑制，但差异并不显著，可能与转染时间较短有关。



1:阳性对照组 2:实验组 3:空白组 4:阴性对照组

图4 免疫印迹法检测 siHBX 转染 72 h 后 HBX 蛋白的表达

3 讨论

本实验研究结果显示,preS1 分子连接体作为 siHBX 转运载体时可携带 siHBX 进入肝源性细胞细胞质内,并高效抑制 HepG2-HBX 细胞株内 HBX 基因的表达。提示 preS1 分子连接体可作为一种新型的 siRNA 转运载体,从而为乙型肝炎病毒相关性肝脏疾病的治疗提供了新的途径。相关研究国内外尚少见报道。

HBV X 基因编码的乙型肝炎病毒 x 蛋白(HBX)是一种多功能的调节蛋白,能与多种转录及调控因子(如 P53、NF-kappaB/p65)相结合而改变因子活性,激活细胞及病毒的启动子,破坏 DNA 的损伤修复,促进增殖,从而引起细胞癌变[11-13]。对 HBX 的研究对于探索肝细胞肝癌(HCC)的发生机制及分子治疗均具有重大意义,目前对 HBX 基因的研究多采用具有 HBV 基因全长的 HepG2.2.15 细胞系,然而 HBV 基因的重叠性会影响到 RNAi 效果的判定,影响 siHBX 对 HBX mRNA 及 HBX 蛋白的抑制作用;因此本实验室构建了稳定表达 HBX 基因的 HepG2-HBX 细胞株进行后续研究。

本实验首先验证了 FITC-2147-9R 与肝源性细胞的结合能力,结果显示 FITC-2147-9R 在 HBX19 及 HEK293 两种细胞内的定位存在差异:FITC-2147-9R 主要定位于 HBX19 细胞质内,而在非肝源性 HEK293 细胞中则分布于包括细胞核在内的整个细胞中。推测出现这种分布差异的原因可能在于 FITC-2147-9R 多肽进胞方式不同有关。但以上推测有待于细胞水平进行多来源的非 HepG2-HBX 细胞及无关肽结合试验进行试验进行验证。动物实验可采用在人鼠嵌合肝 SCID/Alb-uPA 小鼠动物实验中进行证实[14]。本研究至少证实了 FITC-2147-9R 多肽能够进入 HBX19 细胞细胞质内,而细胞质是 siRNA 发挥降解机制的主要场所。

考虑到 FITC 基团的标记可能影响 2147-9R 与细胞的结合,因此需要比较 FITC-2147-9R 与 2147-9R 的带电特性。本实验结果显示,与 FITC-2147-9R 多肽相比,2147-9R 多肽带有更多的正电荷,而细胞膜生理状态下带负电荷,因此 2147-9R 具备更好的细胞膜结合潜能。在此基础上,本研究进一步探讨了 2147-9R 与 siRNA 的最佳结合比例及最佳转染浓度,为后续实验奠定了实验基础。荧光定量 RT-PCR 实验结果表明,2147-9R 作为转运载体能够在高效携带 siHBX 进入肝源性细胞细胞质后,高效抑制 HepG2-HBX 细胞株内 HBX mRNA 基因的表达。而常用的转染试剂脂质体不但毒副作用大,且为被动转运,缺乏特异性;因此 2147-9R 可以作为肝源性细胞 RNAi 技术的新型高效转运载体。

参考文献:

[1] Lopez-Fraga M, Wright N, Jimenez A. RNA interference-based therapeutics: new strategies to fight infectious disease[J]. Infect Disord Drug Targets, 2008, 8(4): 262-273.

[2] Juliano R, Alam M R, Dixit V, *et al*. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(12): 4158-4171.

[3] Morris M C, Deshayes S, Heitz F, *et al*. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics[J]. Biol Cell, 2008, 100(4): 201-217.

[4] Debbage P. Targeted drugs and nanomedicine: present and future[J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(2): 153-172.

[5] Kumar P, Wu H, McBride J L, *et al*. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system[J]. Nature, 2007, 448(7149): 39-43.

[6] Lee W M. Hepatitis B virus infection[J]. N Engl J Med, 1997, 337(24): 1733-1745.

[7] Barrera A, Guerra B, Notvall L, *et al*. Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition[J]. J Virol, 2005, 79(15): 9786-9798.

[8] Kim D H, Ni Y, Lee S H, *et al*. An anti-viral peptide derived from the preS1 surface protein of hepatitis B virus[J]. BMP Rep, 2008, 41(9): 640-644.

[9] Neurath A R, Kent S B, Strick N, *et al*. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus[J]. Cell, 1986, 46(3): 429-436.

[10] Jiao J, Cao H, Chen X W, *et al*. Downregulation of HBx mRNA in HepG2.2.15 cells by small interfering RNA[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2007, 19(12): 1114-1118.

[11] Park I Y, Sohn B H, Yu E, *et al*. Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein[J]. Gastroenterology, 2007, 132(4): 1476-1479.

[12] Tang H, Oishi N, Kaneko S, *et al*. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus X protein[J]. Cancer Sci, 2006, 97(10): 977-998.

[13] Zhang F, Wang Q, Ye L, *et al*. Hepatitis B virus X protein upregulates expression of calpain small subunit 1 via nuclear factor-kappaB/p65 in hepatoma cells[J]. J Med Virol, 2010, 82(6): 920-928.

[14] Kenetman N M, Mercer D F. Mice with chimeric human livers: who says supermodels have to be tall?[J]. Hepatology, 2005, 41(4): 703-706.

(收稿 2010-09-17 修回 2010-11-14)
(编辑 邓强庭)