论著

文章编号:1000-5404(2014)05-0450-06

HBV人工转录因子的制备及其靶向抑制HBV增强子活性研究

罗 伟,蒋清虎,刘济铭,胡慧雯,温 路,魏续福,刘 锐,吴忠均 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 构建可靶向性识别HBV增强子的锌指蛋白人工转录因子真核表达载体,检测其在真核细胞内的表达、对细胞增殖影响及生物学活性分析。**方法** 应用锌指蛋白(zinc finger protein,ZFP)设计工具Zinc finger tools 3.0获取人工转录因子(artificial transcription factor,ATF)结合结构域并融合抑制性效应结构域KRAB,全基因合成ATF克隆进真核表达载pcDNA3.1(+),酶切、测序来鉴定构建载体的正确性,X-tremeGENE HP转染pcDNA3.1-ATF于HepG2细胞,采用RT-PCR、免疫荧光及Western blot检测ATF mRNA与蛋白的表达情况;CCK-8检测不同浓度的ATF表达载体转染后对细胞增殖的影响;双荧光素酶报告基因检测ATF对HBV增强子序列的靶向性抑制作用。**结果** 成功构建pcDNA3.1-ATF真核表达载体;在HepG2细胞中能够正常表达;CCK-8检测ATF对细胞增殖生长无明显的毒性作用;双荧光素酶报告基因分析ATF能靶向性结合增强子并抑制报告基因的表达。**结论** 通过基因工程的方法构建pcDNA3.1-ATF的真核表达载体可正常表达且无明显细胞毒性作用,可靶向性识别HBV增强子并具有相应的生物学活性。

[关键词] 增强子;锌指蛋白;人工转录因子;真核表达载体
[中图法分类号] R373.21; R394-33; R394.3 [文献标志码] A

Preparation of artificial transcription factors to HBV and its targeted inhibitory effect on activity of HBV enhancer

Luo Wei, Jiang Qinghu, Liu Jiming, Hu Huiwen, Wen Lu, Wei Xufu, Liu Rui, Wu Zhongjun (Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To prepare a zinc finger protein eukaryotic expression vector of artificial transcription factor targeting HBV enhancer and determine its expression in eukaryotic cells and the effect on cell proliferation and other biological activities. **Methods** Using the zinc finger protein (ZFP) design tool Zinc finger tool 3.0 to obtain DNA-binding domain of the artificial transcription factors (ATF), combing with an inhibitory effector structure domain KRAB, cloning total synthesis ATF gene into eukaryotic expression vector pcDNA3.1 (+), confirmed correctness by using enzyme cleavage and sequencing. pcDNA3.1-ATF were transformed into HepG2 cells by X-tremeGENE HP. The mRNA and protein expression of ATF were detected by RT-PCR, immunofluorescence staining and Western blotting. The cell proliferation was tested by CCK-8 kit by using transfection of ATF expression vector at different concentrations. Dual luciferase report gene was used to detect whether ATF recognizing HBV sequence and exerted targeted inhibition. **Results** pcDNA3.1-ATF eukaryotic expression vector was successfully constructed and expressed in HepG2 cells. CCK-8 assay indicated that ATF had no obvious toxic effect on cell proliferation. Dual luciferase report gene analysis showed that ATF specifically combined with enhancer and then inhibited report gene expression. **Conclusion** pcDNA3.1-ATF eukaryotic expression vector can normally express and have no cytotoxic effect in HepG2 cells by genetic engineering, which can target HBV enhancer and have corresponding biological activities.

[**Key words**] enhancer; zinc finger protein; artificial transcription factors; eukaryoticexpression vector

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81171562) and the Science Foundation of Yuzhong District of Chongqing (20130118).
Corresponding author: Wu Zhongjun, E-mail: Wzjtcy@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81171562);重庆市渝中区科技计划项目(20130118)
[通信作者] 吴忠均,E-mail:Wzjtcy@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131220.1112.011.html(2013-12-20)

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)属嗜肝性DNA病毒,其持续感染可导致慢性活动型肝炎、肝硬化、肝细胞癌等疾病的发生[1]。HBV基因组为闭合环状3.2 kb DNA,包含4个开放阅读框架(open reading

frame,ORF),即 Pre-S/S、Pre-C/C,Pol、X,分别负责编码表面抗原(preS/S)、核心抗原(pre-C/C)、DNA 多聚酶(P)和 X 蛋白(X),这些基因的表达受到顺式元件启动子和增强子的调控,调件元件主要包括 4 个启动子 C、X、SP1、SP2,2 个增强子(EnhI 和 EnhII)[2-4];EnhI 位于 S 基因和 X 基因之间,在 1 070 ~ 1 234 nt 前后加减 100 bp 的区段,末端与 X 基因启动子重叠,主要增强 C 和 X 启动子的转录活性,由于 C 启动子在 HBV 复制、形态学发生及调控 3.5 kb mRNA 转录发挥重要作用,X 启动子调节 X 蛋白的表达参与 HBV 复制起始和维持过程以及肝癌的发生、发展机制密切相关[5-9],如果能抑制 HBV EnhI 活性进而达到干预 HBV 复制的目的,可为探索抗 HBV 寻找一种新的实验方法。

转录因子包含结合结构越(DNA-binding Domain,DBD)与效应结构域(effector domain,ED),前者具有特异性识别并结合 DNA 的作用,后者则发挥相应的效应作用[10-11]。人工转录因子(artificial transcriptionfactor,ATF)技术[12]通过体外构建 ATF,入核后识别 DNA 上的特异性核酸位点,对特定基因的转录进行调控,其中构建可特异识别 DNA 的 ED 是其最主要的工作。研究表明,Cys2His2 锌指蛋白可作为 DNA 结合域的理想结构框架[13]。本研究根据 Cys2His2 锌指模型,以 HBV EnhI 为目标靶序列,应用生物信息学筛选获得一段 18 bp 核酸序列作为人工锌指蛋白结合的靶序列及与此靶序列相互识别的 ZFP 氨基酸序列,通过基因工程的方法结合 ED 体外构建人工转录因子真核表达质粒载体 pcDNA-ATF(nls-ZFP-KRAB-Flag),通过转染 HepG2 细胞,检测其在真核细胞的表达情况与对细胞增殖的影响及生物学活性,为应用 ATF 技术抑制 HBV 复制的实验研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 载体、菌株、细胞株及引物合成 pCH9/3091(1.3 倍 HBV)与 pGL3-Control 冻存菌液为重庆医科大学感染病重点实验室邹程程惠赠,Top10 大肠杆菌与 HepG2 细胞为本实验室保存;pMD18-T 载体、pGL3-promoter 分别购自大连 TaKaRa 与上海 Invitrogen 公司,引物为上海生工生物公司合成。

1.1.2 主要试剂与酶 高纯度质粒小提中量试剂盒与普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司,荧光素酶检测仪器为 ELx800 通用酶标仪(基因有限公司);MEM 培养基及胎牛血清购自 HyClone 公司;X-tremeGENE HP DNA 转染试剂购自上海罗氏公司;$ZnCl_2$ 购自 Sigma 公司;一抗 Flag 多克隆抗体与一抗单克隆抗体 β-actin 购自 ImmunoWay 公司;二抗HRP 标记山羊抗兔 IgG(H + L)购自北京康为世纪;二抗 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 购自中杉金桥;限制性内切酶 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ、RNAiso Plus 及 RT-PCR 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司,*Kpn*Ⅰ、*Bgl*Ⅱ 酶与 T_4 DNA 连接酶分别购自 MBI 及 NEB 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 锌指蛋白人工转录因子真核表达载体与荧光素酶报告基因质粒的设计及构建 ①根据 HBV Enh I(1 070 ~ 1 234 bp)序列区域提交锌指蛋白 ZFP 在线设计服务器[14],设置相关参数,可根据 Cys2His2 锌指蛋白类型获得最佳目标靶序列及与此靶序列(5′-CCCCCACTGGCTGGGGCT-3′)相互识别的 ZFP 氨基酸序列,NCBI BLAST 比对与人基因组核苷酸序列无同源性;以 KRAB[10]为人工转录因子的功能抑制结构域连接到 ZFP COOH 端,应用 Primer premier 5.0,提交 ATF 氨基酸序列逆向翻译为核酸编码序列并进行优化,对 ATF 进行如下修饰:5′-端 ATG 之后加入核定位信号(nuclear localization signal,NLS)[15],3′-端 TAG 终止密码子前加入便于检测蛋白表达的 Flag Tag[16]克隆进入真核表达载体 pcDNA3.1(+);ATF(NLS-ZFP-KRAB-Flag)的全基因序列由上海生工生物公司合成,两端加上便于检测的限制性内切酶切位点 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ;经测序及酶切鉴定所构建表达载体的正确性。②TA 克隆测序鉴定 Enh I 基因片段正确后亚克隆进荧光素酶报告基因表达质粒载体 pGL3-promoter。以 pCH9/3091 为 HBV DNA 模板,PCR 扩增 HBV Enh I(1 070 ~ 1 234 bp)基因片段 165 bp,引物序列上游:5′-GGGTACCGTATTCAATCTAAGCA-3′, 下游: 5′-CGAGCTCTGCGCTGATGGCCCATGA-3′,PCR 扩增后 2% 琼脂糖电泳,按操作说明切胶回收纯化目的片段,经 TA 克隆制备 pMD18-165 重组质粒,测序验证正确后行质粒 pMD18-165 与载体 pGL3-promoter 双酶切,电泳回收目的片段与载体,转化感受态细菌 Top10;重组克隆载体 pGL3-165-promoter 质粒经测序及单双酶切鉴定后质粒扩增,采用质粒中量试剂盒抽提。

1.2.2 细胞培养及转染 10% 胎牛血清的 MEM 培养基(含终浓度为 0.1 mmoL/L $ZnCl_2$)培养 HepG2 细胞,置于 37 ℃,5% CO_2 培养箱内孵育,待细胞生长至 90% 汇合时传代接种于培养孔板,按照 X-tremeGENE HP DNA 转染试剂说明进行转染。实验组转染真核表达质粒 pcDNA-nls-ZFP-KRAB-flag,阴性对照组转染空载 pcDNA3.1(+)质粒。

1.2.3 RNA 提取与 RT-PCR 检测 ATF mRNA 转染 48 h 后,按照 RNAiso Plus 使用说明提取细胞总 RNA,按试剂盒说明进行逆转录、扩增,扩增循环参数如下:预变性 94 ℃ 3 min,如下条件循环 30 次:变性 94 ℃ 30 s、退火 60 ℃ 30 s、延伸 72 ℃ 30 s、最后 72 ℃延伸 5 min。PCR 扩增产物为 ZFP 编码序列上大小为 545 bp 的序列,引物序列如下:ZFP 上游:5′-AGTTCTCGAGCTGGAGCCTGGTGAAAA-3′; 下游: 5′-CGTCCTGCAGAGACGTTTTCTTGCCGTGAG-3′,将 RT-PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳结果分析。

1.2.4 免疫荧光检测 ATF 蛋白的表达 ATF 转染 HepG2 细胞 48 h 后,免疫荧光检测 ATF 在细胞内的表达情况,免疫荧光所采用的一抗为兔 Flag 多克隆抗体,二抗为山羊抗兔 FITC 标记的 IgG,所有操作按常规进行,荧光显微镜下观察 ATF 蛋白在 HepG2 细胞中的表达情况。

1.2.5 Western blot 检测带 Flag 标签的 AFT 蛋白在 HepG2 细胞内的表达 分别提取转染 pcDNA-nls-ZFP-KRAB-flag 及空载 pcDNA3.1(+)质粒后 12、24、48、72 h 的细胞内总蛋白,蛋白浓度测定按照试剂说明,取 40 μL 处理蛋白样品,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,湿转将蛋白转移至 PVDF 上,在 5% BSA 溶液中封闭 1 h;稀释 1∶2 000 的兔源 Flag 多克隆抗体(4 ℃过夜);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1∶1 000) 37 ℃孵育 2 h,于暗室加入配好的 ECL 反应液,置于图像采集仪内显影曝光成像,内参 β-actin 检测方法相同。

1.2.6 细胞增殖检测 制备 HepG2 细胞悬液,接种在 96 孔板中每孔细胞数为 2 000 个,37 ℃,5% CO_2 培养箱预培养,待细胞汇合度约 80% 时,按照 X-tremeGENE HP DNA 转染试剂说明进行实验组不同浓度(50、100、150、200 ng/μL)的 pcDNA-nls-ZFP-KRAB-flag 蛋白表达载体、阳性对照组 pcDNA3.1(+)转染及设空白对照组,每组设 6 个复孔,转染培养 48 h 后,向每孔加入 20 μL CCK-8 溶液,在培养箱内孵育 4 h 后,用酶标仪测定在 450 nm 波长处的光密度值[D(450)],重复以上实验 3 次。

1.2.7 双荧光素酶报告基因系统检测 ATF 的生物学活性

1.2.7.1 重组克隆载体 pGL3-165-promoter 转染 HepG2 细胞荧光素酶活性测定 HepG2 细胞接种于 24 孔板,按照 X-treme GENE HP DNA 转染试剂说明进行试验。实验组用 pGL3-165-promoter 800 ng、pRL-TK 40 ng 转染,阳性对照组、阴性对照组分别用 pGL3-Control、pGL3-promoter 替代 pGL3-165-promoter。转染 48 h 后按照双荧光素酶报告基因检测系统说明检测各组的荧光素酶读数及计算其相对比值,每组重复 3 孔。

1.2.7.2 人工转录因子 ATF 的活性分析 细胞接种及转染方法同前,分别进行待测质粒(pcDNA-nls-ZFP-KRAB-flag、pcDNA-nls-ZFP-flag、pcDNA-nls-KRAB-flag)与 pGL3-165-promoter 300 ng、pRL-TK 50 ng 共转染,其中各待测质粒的用量各为 500 ng,另设空白对照 pcDNA3.1(+)500 ng、pGL3-165-promoter 300 ng 与 pRL-TK 50 ng 共转染;转染 48 h 后检测其荧光素酶活性,方法同前,每组重复 3 孔。

1.2.7.3 人工转录因子对 pGL3-165-promoter 靶序列的抑制效率检测 细胞接种及转染方法同前,分别进行实验组一系列浓度(0、100、200、300、400 ng/μL)的 pcDNA-nls-ZFP-KRAB-flag 及对照组 pcDNA3.1(+)400 ng/μL 分别与 pGL3-165-promoter 300 ng/μL、pRL-TK 50 ng/μL 共转染,转染 48 h 后检测其荧光素酶活性,方法同前,每组重复 3 孔。

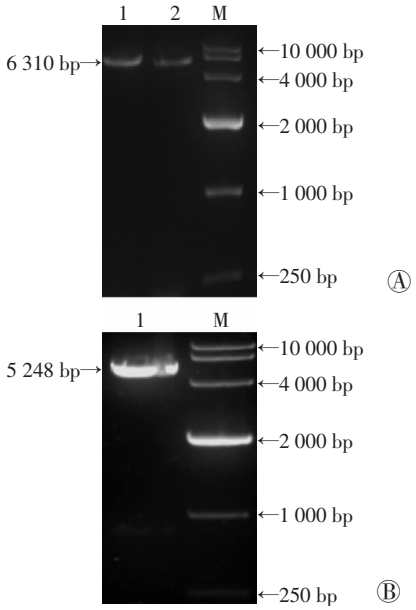
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 统计软件,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 锌指蛋白人工转录因子真核表达载体与荧光素酶报告基因质粒构建结果

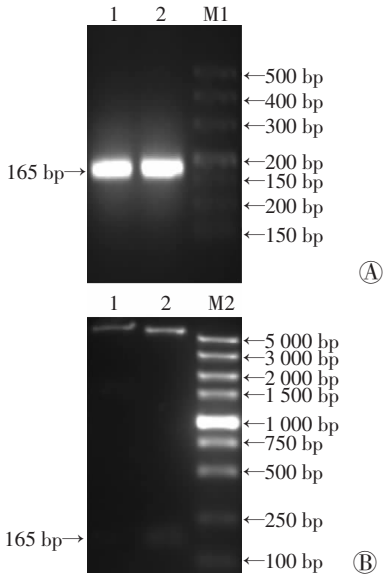
2.1.1 真核表达质粒 pcDNA-ATF(nls-ZFP-KRAB-Flag)酶切鉴定结果 由上海生工生物公司进行全基因合成 ATF 真核表达载体,经限制性内切酶 *Eco*RⅠ和 *Bam*HⅠ双酶切,*Eco*RⅠ单酶切;2% 的琼脂糖凝胶电泳显示在 882、5 428、6 310 bp 处有明显的目的条带(图 1),各条带酶切电泳鉴定与理论设计合成 ATF 基因相符;上海生工测序结果提示完全符合预期结果。



A:*Eco*RⅠ单酶切 M:DNA 标准(DL 10 000);1、2:pcDNA3.1-ATF;B:*Eco*RⅠ和 *Bam*HⅠ双酶切 M:标准;1:pcDNA3.1-ATF

图 1 真核表达质粒 pcDNA-ATF(nls-ZFP-KRAB-Flag)酶切鉴定

2.1.2 HBV Enh-Ⅰ片段的扩增鉴定与 pGL3-165-promoter 重组质粒的酶切鉴定 以 pCH9/3091 为 HBV DNA 表达质粒载体为模板,设计引物扩增后琼脂糖凝胶电泳显示,在 165 bp 有明显的目的条带(图 2A),回收目的片段经 TA 克隆测序鉴定 PCR 基因片段正确后亚克隆进荧光素酶表达质粒载体 pGL3-promoter,构建重组克隆载体 pGL3-165-promoter,经限制性内切酶 *Kpn*Ⅰ与 *Bgl*Ⅱ单、双酶切(图 2B)电泳结果提示与理论设计相符,上海 Invitrigeon 测序结果显示序列完全正确。

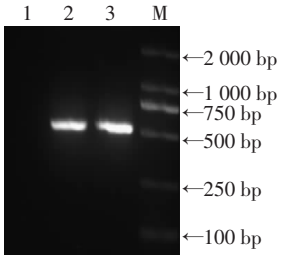


A:*Kpn*Ⅰ单酶切 M1:DNA 标准(DL 500);1、2:pGL3-165-promoter;B:*Kpn*Ⅰ与 *Bgl*Ⅱ双酶切 M2:DNA 标准(DL 5 000);1、2:pGL3-165-promoter

图 2 HBV Enh-Ⅰ片段的扩增鉴定结果

2.2 RT-PCR 检测 ATF 表达产物 mRNA 的表达

RT-PCR 反应后进行琼脂糖凝胶电泳结果提示 ATF 转染组在 545 bp 处有明显的特异性扩增条带，与理论预期结果相符（图 3），转染 pcDNA3.1(+)的阴性对照组无 ZFP mRNA 的表达。

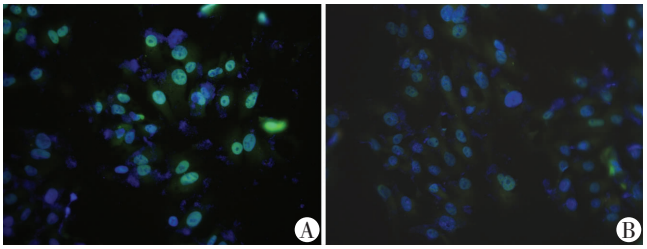


M：DNA 标准（DL 2 000）；1：pcDNA3.1(+)转染组；2、3：pcDNA3.1-ATF 转染组

图 3 RT-PCR 鉴定 ATF mRNA 的表达

2.3 免疫荧光观察 ATF 在 HepG2 细胞中的表达

转染 HepG2 细胞 48 h 后，应用免疫细胞化学方法进行荧光染色，在荧光显微镜绿光激发下见转染 pcDNA-ATF 组细胞核内有较多绿色荧光荧光细胞（图 4A），而阴性对照组（图 4B）细胞爬片上未见绿色荧光细胞，表明构建的 ATF 真核表达质粒能在 HepG2 细胞核内转录翻译为蛋白质的表达。

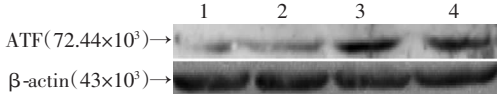


A：转染 pcDNA-ATF 质粒组；B：转染 pcDNA3.1(+)质粒阴性对照组

图 4 荧光显微镜下观察转染 HepG2 细胞 ATF 蛋白表达 （×400）

2.4 检测带 Flag 标签的 AFT 蛋白的表达

分别提取转染后各时间点细胞总蛋白，Western blot 检测结果（图 5）提示转染 48 h 后，目的蛋白印迹表达量随转染时间明显增加。



1～4：分别转染 12、24、48、72 h

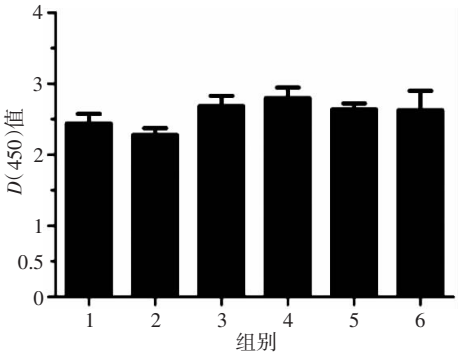
图 5 Western blot 鉴定 ATF 蛋白在 HepG2 细胞内的表达

2.5 CCK-8 检测结果

转染不同浓度锌指蛋白 ATF 表达质粒 48 h 后，通过 CCK-8 检测其光密度值与对照组比较差异无统计学意义（$P>0.05$，图 6），提示通过构建的 ATF 真核表达质粒载体对细胞增殖无明显的毒性作用，可为 ATF 的安全性应用奠定实验基础。

2.6 荧光素酶活性测定结果

转染 HepG2 细胞 48 h 后，按照双荧光素酶报告基因检测方法测定结果，pGL3-165-promoter（实验组）的相对荧光素酶活性（与 pRL-TK 比值，F/R）为 38.52，是阴性对照组 pGL3-promoter 的 7.08 倍，是阳性对照组 pGL3-Control SV40 增强子活性的 5.05 倍，表明通过重组亚克隆 HBV Enh-I 基因序列 165 bp 具有增强 pGL3-promoter SV40 启动子活性。

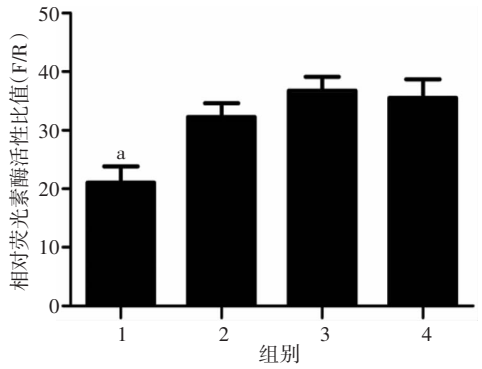


1～4：ATF 50、100、150、200 ng/μL；5：200 ng/μL pcDNA3.1(+)；6：对照组

图 6 CCK-8 检测不同浓度 ATF 真核表达质粒对细胞增殖的影响

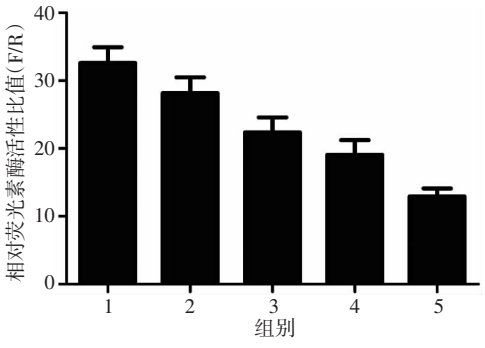
结果显示共转染 pcDNA-nls-ZFP-KRAB-flag 质粒组的相对荧光素酶活性比值（F/R）与 pcDNA3.1(+)质粒对照组相比被抑制 65.18%，当仅含效应抑制结构域 KRAB 或结合结构域 ZFP 表达质粒组共转染对抑制报告基因表达与对照组 pcDNA3.1(+)相比无显著性差异（图 7）。说明只有当结合结构域 ZFP 与效应结构域 KRAB 结合表达完整的 ATF，才能有效抑制荧光素酶报告基因的表达作用。

通过一系列不同浓度的完整表达人工转录因子 ATF 质粒与荧光素酶报告基因质粒共转染，结果显示报告基因的表达随着质粒 pcDNA-nls-ZFP-KRAB-flag 转染量的增加而降低，具有明显的量效抑制作用（图 8）。



1：pcDNA-nls-ZFP-KRAB-flag；2：pcDNA-nls-ZFP-flag；3：pcDNA-nls-KRAB-flag；4：pcDNA3.1(+)　a：$P<0.05$，与其余 3 组比较

图 7 人工转录因子 ATF 的活性分析结果



1～5：分别 0、100、200、300、400 ng/μL ATF

图 8 ATF 抑制效率检测

3 讨论

理论上 ATF 包括 DNA 结合结构域与效应结构域,通常蛋白质进入细胞核是由蛋白质分子内部的 NLS 引导的,我们在优化后的 ATF 核酸序列 5′-端 ATG 之后添加 NLS 便于 ATF 入核发挥作用,此外研究报道 Flag 作为融合表达标签,不会与目的蛋白相互作用并且通常不会影响目的蛋白的功能、性质,Flag 标记物亦广泛应用于细胞染色、免疫印迹和免疫沉淀试验中[17],因此,我们在 ATF 的 3′端引入便于检测 ATF 蛋白表达与细胞定位的 Flag Tag,而 Flag Tag 是否会影响 ATF 的生物学活性还有待进一步研究。DNA 结合结构域特异性识别并结合基因序列,效应结构域可上调或抑制靶基因的作用,因此,通过人工合成 DNA 结合结构域与效应结构域,将其核酸序列拼接起来进行相关修饰后重组于表达载体,按照这一模式细胞内的任何基因都可被相应的激活或抑制[18-20]。

构建能够识别特定基因序列的 DNA 结合结构域是 ATF 设计过程中的核心工作,由于锌指结构为真核细胞中最常见的 DNA 结合基序[21],其中 Cys2His2 型锌指是最经典的锌指蛋白 ZFP 类型,每个 Cys2His2 锌指单元大约由 30 个氨基酸组成,通过 Zn^{2+} 来稳定其作用,形成一对反向平行的 β 折叠和一个 α 螺旋结构,锌指以一种特异性的方式与靶序列相互作用,通过其 α-螺旋插入特异的 DNA 双螺旋“大沟”与 3 bp DNA 特异性相结合,通过设计 6 个串联的锌指能识别 18 bp DNA 靶序列[22-23]。ATF 技术根据转录因子的结构特点,选择 Cys2His2 型锌指蛋白为 DNA 结合结构域,应用生物信息学工具,我们选取 HBV Enh-I 序列一段 18 bp 为靶序列,获得与此靶序列相互识别的 ZFP 氨基酸序列,结合效应结构域 KRAB 构建人工转录因子真核表达质粒载体 pcDNA3.1-ATF。本结果表明,我们所构建的锌指蛋白人工转录因子真核表达载体 pcDNA3.1-ATF,分别通过 RT-PCR、免疫荧光及Western blot 检测 mRNA 与 ATF 蛋白的表达,双荧光素酶报告基因检测提示 ATF 可靶向性结合 HBV Enh-I,并可特异性抑制报告基因的表达。同时通过 CCK-8 检测不同浓度的 ATF 表达载体转染对细胞增殖无明显毒性作用。真核表达载体 pcDNA3.1-ATF 在细胞中可正常表达并具有相应的生物学活性且对细胞增殖生长无明显影响,为探索防治 HBV 感染的方法提供了实验依据。

一个合适的 ATF 可调节某个基因家族或是整条代谢通路中的一系列相关产物,ATF 技术在基础研究、肿瘤的基因治疗与抗病毒治疗中也都有广泛的应用[24-26];但是 ATF 技术应用于抗 HBV 治疗时也有不利之处,如靶序列与 ATF 之间碱基错配足以使结合特异性与亲合力降低导致功能丧失,当存在不同准种甚至不同基因型的 HBV 基因组序列,病毒基因组碱基组成也有所不同,加之 HBV 本身存在一定的变异率,病毒变异碱基的存在就可能逃离特异性 ATF 的抑制作用。因此,我们针对 HBV Enh-I 保守区序列设计 ATF,通过与 HBV 各基因型核酸序列比对发现 HBV EnhI 靶序列(5′-CCCCCACTGGCTGGGGCT-3′)在 A-D 型病毒株中只存在一个碱基的变异,E-H 型病毒株中具有固定的靶位点。我们所构建的 ATF 在各 HBV 基因型中具有一定的通用性,对 ATF 的特异性结合可能影响较小而不会降低其生物学活性。如何选择最佳的增强子靶位点以便达到最广的病毒抑制还需要我们进行大量的实验来探索。

参考文献:

[1] Liaw Y F, Chu C M. Hepatitis B virus infection[J]. Lancet, 2009, 373(9663): 582-592.

[2] 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(2): 125-128.

[3] Ganem D, Varmus H E. The molecular biology of the hepatitis B viruses[J]. Annu Rev Biochem, 1987, 56: 651-693.

[4] Moolla N, Kew M, Arbuthnot P. Regulatory elements of heptitis B virus transcription[J]. J Viral Hepat, 2002, 9(5): 323-331.

[5] Fukai K, Takada S, Yokosuka O, *et al*. Characterization of a specific region in the hepatitis B virus enhancer I for the efficient expression of X gene in the hepatic cell[J]. Virology, 1997, 236(2): 279-287.

[6] Honigwachs J, Faktor O, Dikstein R, *et al*. Liver-specific expression of hepatitis B virus is determined by the combined action of the core gene promoter and the enhancer[J]. J Virol, 1989, 63(2): 919-924.

[7] Doitsh G, Shaul Y. Enhancer I Predominance in Hepatitis B Virus Gene Expression[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(4): 1799-1808.

[8] 王建军, 成军, 刘妍, 等. 乙型肝炎病毒增强子的结构和调控研究[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(7): 1008-1011.

[9] Julie Lucifora, SilkeArzberger, David Durantel. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection[J]. J Hepatol, 2011, 55(5): 996-1003.

[10] Margolin J F, Friedman J R, Meyer W K, *et al*. Kr ppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(10): 4509-4513.

[11] Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, *et al*. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator[J]. Nature, 1988, 335(6190): 563-564.

[12] Urnov F D, Rebar E J. Designed transcription factors as tools for therapeutics and functional genomics[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(5/6): 919-923.

[13] Lee D K, Seol W, Kim J S. Custom DNA-binding proteins and artificial transcription factors[J]. Curr Top Med Chem, 2003, 3(6): 645-647.

[14] Zine Finger Tools [EB/OL][2013-12-30]. http://www.scripps.edu/mb/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php.

[15] Kalderon D, Roberts B L, Richardson W D, *et al*. A short amino acid sequence able to specify nuclear location[J]. Cell, 1984, 39(3 Pt 2): 499 - 509.
[16] Einhauer A, Jungbauer A. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins[J]. J Biochem Biophys Methods, 2001, 49(1/3): 455 - 465.
[17] Bell M R, Engleka M J, Malik A, *et al*. To fuse or not to fuse: What is your purpose? [J]. Protein Sci, 2013, 22(11): 1466 - 1477.
[18] Sera T. Zinc-finger-based artificial transcription factors and their applications[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(7/8): 513 - 526.
[19] Falke D, Fisher M, Ye D, *et al*. Design of artificial transcription factors to selectively regulate the pro-apoptotic bax gene[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(3): e10.
[20] Beerli R R, Barbas C F 3rd. Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(2): 135 - 141.
[21] Schmidt D, Durrett R. Adaptive evolution drives the diversification of zinc-finger binding domains[J]. Mol Biol Evol, 2004, 21(12): 2326 - 2339.
[22] Jamieson A C, Miller J C, Pabo C O. Drug discovery with engineered zinc-finger proteins[J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 2(5): 361 - 368.
[23] Nagaoka M, Sugiura Y. Artificial zinc finger peptides: creation, DNA recognition, and gene regulation[J]. J Inorg Biochem, 2000, 82(1/4): 57 - 63.
[24] 赵兴卉, 朱旭东, 黄培堂. 人工转录因子研究进展[J]. 生物工程学报, 2005, 21(3): 341 - 347.
[25] Beerli R R, Dreier B, Barbas C F 3rd. Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(4): 1495 - 1500.
[26] Zimmerman K A, Fischer K P, Joyce M A, *et al*. Zinc finger proteins designed to specifically target duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA inhibit viral transcription in tissue culture[J]. J Virol, 2008, 82(16): 8013 - 8021.

（**收稿**:2013-09-29;**修回**:2013-12-05）
（编辑　邓强庭）

文章编号:1000-5404(2014)05-0455-01

个案与短篇

腹膜后恶性神经鞘瘤 4 例 CT 表现

陈　波,吕富荣,肖智博　（400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院放射科）

［**关键词**］ 腹膜后肿瘤;恶性神经鞘瘤;CT
［**中图法分类号**］ R816.5　［**文献标志码**］ B

腹膜后恶性神经鞘瘤是来源于腹膜后神经鞘膜的恶性肿瘤[1]。其临床表现多样,位置较深,术前 CT 诊断较困难。现报告本院收治 4 例腹膜后恶性神经鞘瘤 CT 表现,为本病的影像诊断提供参考价值。

1　临床资料

病例 1:男性,54 岁,2011 年 10 月 24 日因“持续性中下腹胀痛 1 月余,盗热、潮汗 10 d”入院,无腰背部放射痛。查体:除下腹部压痛外无其他特殊体征。CT 表现(图 1A):盆腔内见一大小约 11.2 cm×12.3 cm 巨大团块状混杂密度肿块影,边界较清晰,其内见不规则斑片状低密度坏死区,增强后轻中度持续性强化,部分小肠包绕其中,邻近肠管不同程度受压、移位,并向下压迫膀胱上壁,考虑恶性肿瘤,来源于小肠可能。手术送检标本见一段长约 24.5 cm,直径 3 ~ 9 cm 的肠管,局部区域扩张大小约 17 cm×12 cm×8 cm 的囊性包块。

病例 2:女性,53 岁,2012 年 3 月 27 日因“右中上腹包块 5 年,明显增大 1 月余”。临床表现为明显腹胀,进食后加重,前倾位及肛门排气后减轻。查体:于右中腹扪及一大小约 15.3 cm×10.4 cm 硬质包块,稍突出腹平面,不能推动,伴轻微压痛,余无特殊。CT 表现(图 1B):右侧腹腔内见一大小约 17.3 cm×13.8 cm 巨大混杂密度肿块影,向下延伸达盆腔,边界清楚,其内可见较多脂肪密度影,增强后轻度不均匀强化,病灶与右肾分界不清,右肾及邻近肠管明显受压,右肾积水,考虑肿瘤性病变,错构瘤? 脂肪肉瘤?

病例 3:男性,32 岁,2012 年 4 月 2 日因“反复左侧腹隐痛 15 d”入院。临床症状为无明显诱因的左侧腹部持续性隐痛。查体:于左侧腹扪及一大小约 4.2 cm×3.5 cm 质韧包块,可推动,无触痛,无搏动感,余无特殊。CT 表现(图 1C):左上腹部脾门附近见一大小约 6.8 cm×7.0 cm 混杂密度肿块影,边缘可见条状及中心见斑片状高密度钙化影,增强后轻度强化,邻近胰腺受压向前移位,左侧肾动脉及肾静脉向右推移位,考虑恶性纤维组织细胞瘤可能。

病例 4:女性,58 岁,2012 年 5 月 8 日因“反复嗳气 6 年,加重伴发现右侧腹部包块半年”入院。临床表现为无明显诱因的嗳气,进食后明显,伴有轻微腹胀。查体发现右侧下腹部一直径约 5.5 cm 的偏硬包块,有轻微触痛,静息时有局部刺痛感,余无特殊。CT 表现(图 1D):右肾周腹膜后间隙见一大小约 17.2 cm×13.8 cm×10.7 cm 边界欠清的不规则混杂密度肿块,其内可见点状钙化影及絮状软组织影,增强后未见明显强化,病灶向上推挤肝脏,并包绕右侧肾脏,向左推压胰头、胃窦及部分肠管,考虑肿瘤性病变,错构瘤? 脂肪肉瘤?

4 例患者都顺利进行了手术切除,术后病检结果为:病例 1 为腹膜后色素性恶性神经鞘瘤;病例 2、3 为腹膜后恶性神经鞘瘤;病例 4 为腹膜后恶性神经肿瘤,考虑恶性神经鞘瘤。

（下转 460 页）

［**通信作者**］ 吕富荣,E-mail:lfr918@sina.com
［**优先出版**］ http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140115.1519.016.html(2014-01-15)