文章编号:1000-5404(2014)23-2343-06

论著

HBV 人工转录因子与拉米夫定抗 HBV 作用的比较研究

刘济铭[1],陈 聪[2],罗 伟[1],蒋清虎[1],胡惠文[1],魏旭福[1],刘 锐[1],吴忠均[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院肝胆外科[1]; 402760 重庆 璧山,璧山县人民医院肝胆外科[2])

[摘要] **目的** 构建特异性结合乙型肝炎病毒X基因启动子(Hepatitis B virus X promoter, HBV Xp)的人工转录因子真核表达载体,并与拉米夫定(3TC)体外抗乙肝病毒效果进行比较研究。**方法** 利用Zine finger tools 3.0软件设计特异性结合HBV Xp的锌指蛋白(zinc finger protein,ZFP)并融合抑制性效应结构域kRAB,全基因合成后载入真核表达载体pcDNA3.1(+),构建重组质粒pcDNA3.1(+)-nls-ZFP-kRAB-Flag (ATF)、pcDNA3.1(+)-nls-ZFP -Flag(ZFP1)、pcDNA3.1(+)-nls -kRAB-Flag(ZFP2),通过酶切、测序鉴定重组质粒的正确性,Western blot和细胞免疫荧光鉴定重组质粒在HepG2细胞表达情况。将重组质粒转染HepG2.2.15细胞,设空白组(Blank组)、ATF组、ZFP1组、ZFP2组、空质粒组(Empty vector组)和拉米夫定组(3TC组),分别培养2、6、10 d,用Western blot、FQ-PCR、ELISA分别检测各组HBx蛋白、HBV DNA、上清中HBsAg和HBeAg的表达情况。**结果** 重组质粒成功构建且能在HepG2细胞中表达;ATF组抑制HepG2.2.15细胞中X蛋白和HBV DNA的表达,与其余各组相比差异有统计学意义($P<0.05$),且6 d和10 d抑制作用强于2 d;3TC组亦能抑制HepG2.2.15细胞中X蛋白和HBV DNA的表达($P<0.05$)。ATF组能抑制上清中HBsAg,HBeAg的分泌,与其余各组相比差异有统计学意义($P<0.05$);3TC组亦能抑制上清中HBsAg,HBeAg的分泌($P<0.05$)。**结论** 人工设计的特异性ATF在真核细胞中能正常表达,并能有效发挥抑制HBV的作用,且抑制作用强于拉米夫定。

[关键词] 锌指蛋白;人工转录因子;乙型肝炎病毒;X蛋白;HepG2.2.15细胞
[中图法分类号] R373.21; R394.3; R966 [文献标志码] A

Comparison of HBV artificial transcription factor and lamivudine in anti-virus effect for HBV *in vitro*

Liu Jiming[1], Chen Cong[2], Luo Wei[1], Jiang Qinghu[1], Hu Huiwen[1], Wei Xufu[1], Liu Rui[1], Wu Zhongjun[1]([1]Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Bishan County, Chongqing, 402760, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct an eukaryotic expression vector encoding artificial transcription factor (ATF) which was designed to bind specifically HBV X gene promoter (HBV Xp) and compare its anti-virus effect on hepatitis B virus (HBV) *in vitro* with lamivudine (3TC). **Methods** Zinc finger tools 3.0 was used to select a sequence from the HBV Xp as the target site of zinc finger protein (ZFP), and then the selected sequence was combined with an inhibitory effector structure domain kRAB. Then the nucleic acid sequence of total gene was synthesized and cloned into pcDNA3.1(+) to construct the recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-nls-ZFP-kRAB-Flag(ATF), pcDNA3.1(+)-nls-ZFP-Flag(ZFP1), and pcDNA3.1(+)-nls-kRAB-Flag(ZFP2). Enzyme digestion and DNA sequencing was used to identify the correct of recombinant plasmid. Western blotting and immunofluorescence microscopy were used to determine the expression of recombinant plasmid in HepG2 cells. The recombinant plasmid or 3TC was transfected into HepG2.2.15 cells and cultured for 2, 6 and 10 d respectively. Western blotting, fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) and ELISA were carried out to evaluate the expression of HBx, the copy numbers of HBV

[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(2011-1-010)
[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.20141106.1615.026.html(2014-11-06)

DNA and the contents of HBsAg and HBeAg, respectively. **Results** The recombinant plasmids were constructed correctly which could express well in the transformed HepG2 cells. ATF group reduced HBV X protein and HBV DNA significantly compared with other groups ($P<0.05$), and the inhibitory effect was stronger after 6 and 10 days' treatment than after 2 days'. 3TC group also reduced HBV X protein and HBV DNA significantly ($P<0.05$). The secretion of HBsAg and HBeAg was significantly decreased in ATF group than other groups ($P<0.05$). The secretion of HBsAg and HBeAg was also significantly decreased in 3TC group ($P<0.05$). **Conclusion** The specific ATF is successfully expressed in eukaryotic cells and functions as an HBV inhibitor, even more effective than lamivudine.

[**Key words**] zinc finger protein; artificial transcription domain factor; hepatitis B virus; HBV X protein; HepG2.2.15 cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81171562) and the Project of Science and Technology Plan of Yuzhong District, Chongqing (2011-1-010). Corresponding author: Wu Zhongjun, Tel: 86-23-89012704, E-mail: wzjtcy@126.com

乙型病毒性肝炎是一种分布广泛的全球性传染病[1]。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)为部分环状双链结构DNA,有4个开放阅读框(open reading frame,ORF),分别为C、S、P、X区,其中X基因是最小的ORF,其表达产物X蛋白(hepatitis B virus X protein,HBx)尤为重要,具有反式激活作用,它既能活化HBV自身启动子,也能激活多种病毒,还参与对HBV的各种调节[2-4];有研究证实X蛋白是HBV相关的原发性肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)发生发展的独立致病因素。因此,如果能特异性抑制HBV基因的转录复制,将为HBV相关疾病提供新的防治方法。

天然转录因子包括DNA结合结构域和功能结构域,前者又包括螺旋-转角-螺旋结构、类固醇受体及锌指蛋白(putative zinc finger protein,ZFP)等,其中ZFP可以选择性结合于特异的DNA靶序列,从而在基因的表达中发挥调控作用[5-7]。目前大多数人工转录因子(artificial transcription domain factor,ATF)都是以C_2H_2型锌指蛋白作为DNA结合结构域,因此,本研究通过构建特异性结合HBV Xp的ZFP真核表达质粒,以HepG2.2.15细胞为模型细胞,研究ZFP体外抗HBV的作用,并以拉米夫定(3TC)作为阳性对照,从细胞和分子水平观察其抗HBV作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 基因合成 ZFP全基因序列和重组质粒由上海生工公司构建。

细胞株HepG2.2.15由重庆医科大学肝病研究所实验室惠赠;空质粒pcDNA3.1(+)由重庆医科大学生物工程技术学院惠赠。

1.1.2 试剂 质粒抽提试剂盒、G418购自Beyotime公司;限制内切酶,FQ-PCR试剂盒,RNAiso Plus购自TaKaRa公司;高糖DMEM培养基、胎牛血清购自Hyclone公司;Lipofectamine2000脂质体购自Invitrogen公司;抗Flag单克隆抗体、抗辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠二抗、X蛋白单克隆抗体购自Santa cruz公司;拉米夫定购自Sigma公司;人HBeAg、HBsAg ELISA试剂盒购自北京四正柏公司;Western blot试剂盒购自凯基生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 特异性结合HBV Xp的ZFP的设计 将HBV Xp序列提交至Zine finger tools[8],获得一段长为18 bp的序列作为ZFP在Xp上的靶序列5′-CAATACCTGAACCTTTAC-3′,利用NCBI BLAST和Swiss MOEDL进行同源建模性评估比对,以确保靶序列的特异性。利用ZF tools中的Design a Zinc Finger Protein获取ZFP的氨基酸序列(结果略),ExPASy tools[9]对ZFP的结构特征进行评估。

1.2.2 ZFP表达质粒的构建 将由上海生工公司构建的重组质粒pcDNA3.1(+)-nls-ZFP-kRAB-Flag、pcDNA3.1(+)-nls-ZFP-Flag、pcDNA3.1(+)-nls-kRAB-Flag,分别命名为ATF、ZFP1、ZFP2。用酶切和质粒测序鉴定重组质粒的正确性(测序结果略)。

1.2.3 ZFP的表达 用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基,37 ℃,5% CO_2培养HepG2细胞,按1.2×10^5/孔细胞种于6孔板,待细胞生长融合在70%左右时进行转染。按照Lipofectamine2000说明书操作,将重组质粒转染入HepG2细胞,用细胞免疫荧光、Western blot检测重组质粒的表达。

1.2.4 细胞免疫荧光法检测重组质粒的表达 将6孔板中爬好细胞的玻片用PBS浸洗3次后,用4%多聚甲醛固定细胞15 min,自然干燥后用PBS浸洗3次后,用0.5% Triton X-100(PBS配制)室温通透30 min,用羊血清室温封闭30 min,加入鼠抗Flag单克隆抗体4 ℃孵育过夜,洗涤3次后加入荧光羊抗鼠二抗室温孵育1 h,用DAPI染核5 min,洗涤玻片在荧光显微

镜下观察图像并采集。

1.2.5 Western blot 检测重组质粒的表达 收集转染重组质粒 2 d 的各组细胞,提取细胞总蛋白,每组各取 30 μL 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,电转蛋白至 PVDF 膜(45 min),5% 脱脂奶粉封闭 3 h,1∶100 鼠抗 Flag 单克隆抗体 4 ℃过夜,1∶10 000 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠二抗,37 ℃,2 h,ECL 增强发光法反应曝光。

1.2.6 重组质粒转染 HepG2.2.15 细胞 用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基、37 ℃、5% CO_2 培养 HepG2.2.15 细胞,按 1.2×10^5/孔细胞种于 6 孔板,分别设空白组(Blank 组)、ATF 组、ZFP1 组、ZFP2 组、空质粒组(Empty vector 组)和拉米夫定组(3TC 组),待细胞生长融合至 70% 左右时进行转染。按照 Lipofectamine2000 说明书操作,将 ATF,ZFP1,ZFP2,空质粒分别转染入 HepG2.2.15 细胞中,空白组不做处理,3TC 组加入终浓度为 5 μg/mL 的 3TC[最佳剂量参照文献[10]],各组于处理后 6 h 半量换液,3TC 组再加入终浓度为 5 μg/mL 的 3TC,分别处理 2、6、10 d。每隔 2 d 换液 1 次,ATF 组、ZFP1 组、ZFP2 组、空质粒组半量换液,再次重复转染,3TC 组再加入终浓度为 5 μg/mL 的 3TC。

1.2.7 Western blot 检测 HBx 蛋白的表达情况 参考说明书提取各组 2、6、10 d 的细胞蛋白。将处理好的蛋白样品加入电泳槽中(Bio-Rad),每孔 30 μL,12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转至 PVDF 膜上(45 min),5% 脱脂奶粉封闭 3 h,1∶100 鼠抗 HBx 单克隆抗体 4 ℃过夜,1∶10 000 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠二抗,37 ℃,2 h,TBST 洗膜 3 次,ECL 增强发光法反应曝光。结果采用 Quantity one 4.6.2 图像分析软件进行相对定量(特异性基因光密度值/管家基因光密度值)。将得出的比值按下式计算:抑制率抑制率 =(光密度值$_{空白对照}$ − 光密度值$_{实验组}$/光密度值$_{空白对照}$)×100%。

1.2.8 FQ-PCR 检测各组 HBV DNA 的表达情况 收集各组细胞 2、6、10 d 培养上清,按照试剂盒说明书操作。PCR 反应,反应条件为 37 ℃ 2 min,94 ℃ 2 min,94 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,共 40 个循环。上游引物为:5′-AGAATCCTCACAATACCGCAGAGT-3′,下游引物为:5′-CACACGGTAGTTCCCCCTAGAA-3′,探针为:5′-AGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT-3′。结果按下式计算:抑制率 =(光密度值$_{空白对照}$ − 光密度值$_{实验组}$/光密度值$_{空白对照}$)×100%。

1.2.9 ELISA 检测各组细胞上清液 HBeAg、HBsAg 的表达情况 用 ELISA 法检测各组细胞 2、6、10 d 上清中 HBeAg、HBsAg 的表达情况,操作按说明书进行,每组重复 3 次,取均值。结果按下式计算:抑制率 = $[D(490)_{空白对照} - D(490)_{实验组}]/D(490)_{空白对照}\times100\%$。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件进行实验数据的统计分析,实验数据采用单因素方差分析和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 酶切鉴定重组质粒

构建的 ATF、ZFP1、ZFP2 经限制内切酶 *Bam*H Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 酶切,琼脂糖凝胶电泳后显示,ATF 经双酶切后在 5 400 bp 和 897 bp 处有明显的目的条带(图 1A),经单酶切在 6 297 bp 处有明显的目的条带(图 1B);ZFP1 经双酶切后,在 5 909 bp 和 373 bp 处有明显的目的条带(图 1C)。ZFP2 经 *Eco*R Ⅰ 单酶切后,在 5 688 bp 处有明显的目的条带(图 1D),结果与理论值相符。

2.2 重组质粒转染 HepG2 细胞后绿色荧光蛋白的表达

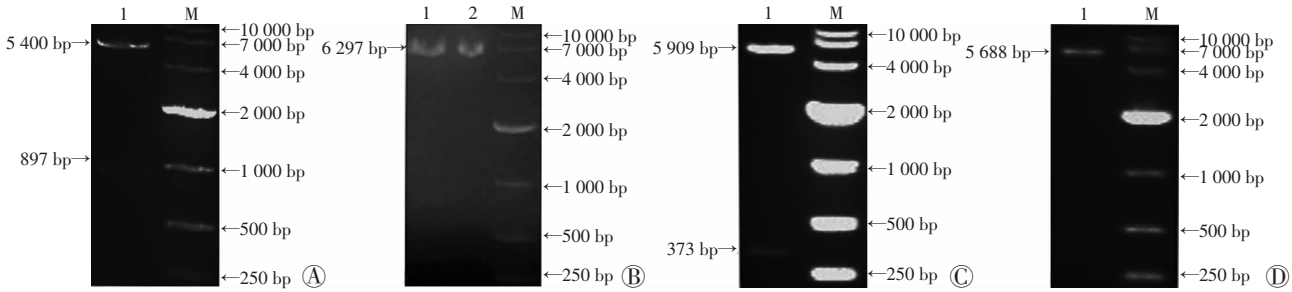
重组质粒转染细胞 2 d,应用细胞免疫化学法进行荧光染色,由于 ATF、ZFP1、ZFP2 带有 Flag 标签,因此在荧光显微镜绿光激发下均可见较多绿色荧光细胞(图 2)。

2.3 带 Flag 标签的 ZFP 蛋白在 HepG2 细胞内表达

转染 ATF、ZFP1、ZFP2 重组质粒和空质粒 2 d 后,Western blot 检测结果显示,由于 ATF、ZFP1、ZFP2 带 Flag 标签,因此转染的 HepG2 细胞有明显的蛋白印迹,而 Empty vector 无蛋白印迹,见图 3。

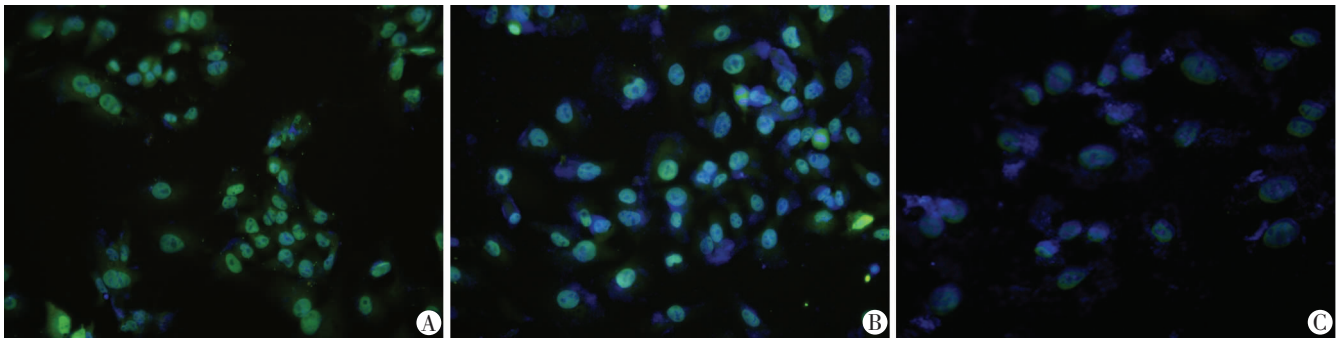
2.4 ATF 对 HepG2.2.15 细胞 HBx 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示:在 3 个时间点,ATF 组均能抑制 X 蛋白的表达,与 Blank 组、ZFP1 组、ZFP2 组、Empty vector 组、3TC 组相比差异有统计学意义($P<0.05$);3TC 组亦能抑制 X 蛋白的表达,与 Blank 组、ZFP1 组、ZFP2 组、Empty vector 组相比差异有统计学意义($P<0.05$);ATF 组抑制 X 蛋白表达的作用随着时间增加而逐渐增强,6 d 和 10 d 与 2 d 相比差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。



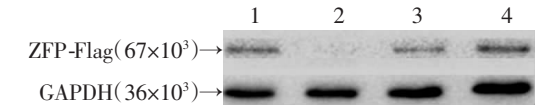
A:*Bam*H Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切 M:DNA 标准(DL 10 000),1:ATF; B:*Eco*R Ⅰ 单酶切 M:DNA 标准,1、2:ATF; C:*Bam*H Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切 M:DNA 标准(DL 10 000),1:ZFP1; D:*Eco*R Ⅰ 单酶切 M:DNA 标准;1:ZFP2

图 1 重组质粒酶切鉴定结果



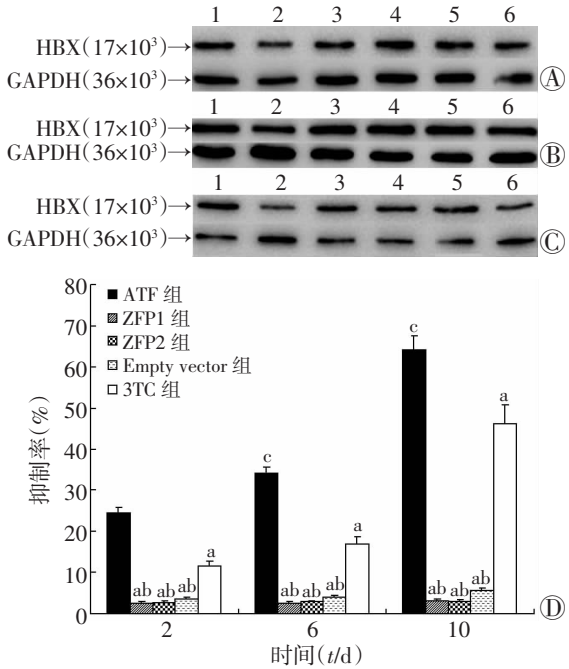
A：ATF 转染 2 d；B：ZFP1 转染 2 d；C：ZFP2 转染 2 d

图 2　带 Flag 标签的重组质粒在 HepG2 细胞中的表达　（荧光显微镜 ×400）



1：ATF 组；2：Empty vector 组；3：ZFP1 组；4：ZFP2 组

图 3　Western blot 鉴定 ZFP-Flag 融合蛋白的表达

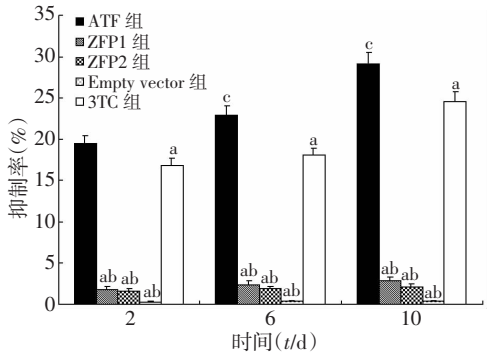


A：2 d；B：6 d；C：10 d　1：ATF 组；2：Empty vector 组；3：ZFP1 组；4：ZFP2 组；5：Blank 组；6：3TC 组；D：X 蛋白的抑制率　a：$P<0.05$，与 ATF 组比较；b：$P<0.05$，与 3TC 组比较；c：$P<0.05$，与 2 d 比较

图 4　Western blot 检测各组 X 蛋白的表达（$n=12$，$\bar{x}\pm s$）

2.5　ATF 对 HepG2.2.15 细胞 HBV DNA 表达的影响

检测上清液中 HBV DNA 结果显示：在 3 个时间点中，ATF 组能抑制 HBV DNA 复制，与 3TC 组、ZFP1 组、ZFP2 组、Empty vector 组相比差异有统计学意义（$P<0.05$），3TC 组亦抑制 HBV DNA 复制，与 ZFP1 组、ZFP2 组、Empty vector 组相比差异有统计学意义（$P<0.05$）；ATF 组抑制 HBV DNA 的作用随着时间增加而逐渐增强，6 d 和 10 d 与 2 d 相比差异有统计学意义（$P<0.05$），见图 5。



a：$P<0.05$，与 ATF 组比较；b：$P<0.05$，与 3TC 组比较；c：$P<0.05$，与 2 d 比较

图 5　FQ-PCR 检测各组 HBV DNA 复制的抑制率（$n=45$，$\bar{x}\pm s$）

2.6　ATF 对 HepG2.2.15 细胞上清中 HBsAg、HBeAg 表达的影响

根据公式计算出抑制率。各组检测 HBsAg、HBeAg 结果显示：3 个时间点，ATF 组能抑制上清中 HBsAg（表 1）的分泌，与 3TC 组、ZFP1 组、ZFP2 组、Empty vector 组相比差异有统计学意义（$P<0.05$），3TC 组亦能抑制 HBsAg 的分泌，与 ZFP1 组、ZFP2 组、Empty vector 组相比差异有统计学意义（$P<0.05$）；3 个时间点，ATF 组能抑制上清中 HBeAg（表 2）的分泌，与 3TC 组、ZFP1 组、ZFP2 组、Empty vector 组相比差异有统计学意义（$P<0.05$），3TC 组亦能抑制 HBeAg 的分泌，与 ZFP1 组、ZFP2 组、Empty vector 组相比差异有统计学意义（$P<0.05$）。

表 1　ATF 对培养上清 HBsAg 浓度的影响［$n=9$，$D(490)$，$\bar{x}\pm s$］

组别	2 d	6 d	10 d
Blank 组	0.69 ± 0.10^{ab}	0.88 ± 0.13^{ab}	0.99 ± 0.13^{ab}
ATF 组	0.42 ± 0.06	0.44 ± 0.06	0.46 ± 0.06
Empty vector 组	0.68 ± 0.10^{ab}	0.84 ± 0.13^{ab}	1.01 ± 0.13^{ab}
ZFP1 组	0.73 ± 0.11^{ab}	0.83 ± 0.12^{ab}	0.87 ± 0.11^{ab}
ZFP2 组	0.71 ± 0.11^{ab}	0.76 ± 0.11^{ab}	0.98 ± 0.13^{ab}
3TC 组	0.57 ± 0.08^{a}	0.64 ± 0.10^{a}	0.74 ± 0.09^{a}

a：$P<0.01$，与 ATF 组比较；b：$P<0.01$，与 3TC 组比较

表 2　ATF 对培养上清 HBeAg 浓度的影响［$n=9$，$D(490)$，$\bar{x}\pm s$］

组别	2 d	6 d	10 d
Blank 组	0.60 ± 0.06^{ab}	0.74 ± 0.07^{ab}	0.93 ± 0.09^{ab}
ATF 组	0.33 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.42 ± 0.04
Empty vector 组	0.63 ± 0.06^{ab}	0.77 ± 0.08^{ab}	0.90 ± 0.09^{ab}
ZFP1 组	0.61 ± 0.06^{ab}	0.75 ± 0.08^{ab}	0.89 ± 0.09^{ab}
ZFP2 组	0.62 ± 0.06^{ab}	0.77 ± 0.08^{ab}	0.97 ± 0.10^{ab}
3TC 组	0.51 ± 0.052^{a}	0.62 ± 0.06^{a}	0.73 ± 0.08^{a}

a：$P<0.01$，与 ATF 组比较；b：$P<0.01$，与 3TC 组比较

3 讨论

人工转录因子(artificial transcription domain factor,ATF)是通过模仿天然转录因子的作用机制[11],因此也是由结合结构域(DNA binding domain,DBD)和效应结构域(effector domain,ED)构成[12],前者具有与特定DNA结合的特性,后者则发挥效应作用,KRAB即是一种具有较强转录抑制功能的ED,相对分子质量为54.6×10^3,为一蛋白质-蛋白质相互作用区,可以被分成A、B两个box,其中A box在转录抑制中起着核心作用,B box对A box的转录抑制功能起加强作用。锌指蛋白是最为丰富的DBD,也是特异性强的DBD,许多ATF含有3个或6个锌指蛋白来结合特定的DNA序列,但由于锌指蛋白调控作用较弱,因此还需要选择ED与其形成融合蛋白来对特定基因进行转录和表达调控,尤其是调控转录水平的起始步骤,而分析转录起始水平上基因调控的基本出发点是鉴定启动子,所以要实现人为干预基因的表达,必须首先对所调控基因的启动子进行研究[13-15]。

X基因是HBV基因组中最小的开放阅读框码,编码约16.5×10^3蛋白,即X蛋白,是一种重要的具有反式激活作用的多功能因子,具有调节DNA转录、细胞周期、信号通路、蛋白质降解等作用[16]。有研究发现HBV X基因及其编码的产物X蛋白与肝癌的发生、发展过程密切相关,其可能通过影响机体细胞的信号传导通路和反式激活作用诱导HCC的发生;X蛋白还在HBV的复制中扮演重要的作用,是启动和维持HBV感染后HBV复制、转录的重要因素[17];而缺少X基因的HBV转染入细胞后,HBV的复制水平显著降低,仅为野生型HBV的10%[18]。

因此,我们针对X基因启动子(Xp)设计人工转录因子,运用Zine finger tools设计特异性结合HBV Xp的ZFP[8,19],通过干扰Xp,达到抑制HBV DNA的目的。本研究中我们利用Zine finger tools确定了HBV X基因启动子上一段长为18 bp的靶序列,通过ZF tools中的Design a Zinc Finger Protein得到能特异性结合该靶序列的ZFP氨基酸序列,构建出重组质粒ATF、ZFP1、ZFP2,酶切结果正确,同时细胞免疫荧光证实ZFP能以融合蛋白形式在细胞内表达,Western blot也证实ZFP能在细胞内正常表达,从而为后续实验奠定了基础。

HepG2.2.15细胞是具有完整的双拷贝乙型肝炎病毒基因的肝胚瘤细胞系。该细胞能稳定分泌HBsAg、HBeAg,是目前体外研究HBV的理想细胞模型[20-22]。拉米夫定(3TC)是目前临床中治疗HBV感染疗效较好且具有代表性的核苷类似物,主要机制是与dCTP竞争结合位点,渗入HBV DNA及抑制HBV反转录酶的活性导致链合成终止而实现抑制HBV DNA复制的作用[23-24],因此,本研究选拉米夫定为阳性对照。为了观察ZFP体外抗HBV的效果,我们通过Western blot检测X蛋白表达情况,结果发现ATF可以抑制HepG2.2.15细胞X蛋白的表达,其抑制作用强于3TC,尤以10 d抑制作用最强;而ATF对HBV DNA复制的抑制作用与X蛋白的检测结果相一致,即ATF能抑制HBV DNA的复制,使分泌到上清的DNA减少,其抑制率高于3TC,提示特异性结合HBV Xp的ATF抑制X蛋白的表达,而HBV DNA复制减少的原因可能是由于X蛋白表达降低,使HBV DNA复制受损;另外HBV X基因受ATF所阻断,因此也抑制了HBV DNA复制。

慢性乙型肝炎有效的抗病毒治疗能达到病毒复制的控制、HBsAg消失以及血清学转变,而获得HBeAg血清学转换的患者能长期控制疾病的发展,降低肝硬化的发生几率[25-26],获得HBsAg消失及血清学转换的患者能更提高生存率[27]。HBsAg是HBV基因组表达的一种病毒包膜蛋白,其水平高低与HBV复制模版cccDNA的水平相关[28];HBeAg是HBV感染后表达的核心蛋白,其能反应病毒复制的活跃程度[29]。本研究中,我们通过检测各组上清中HBsAg、HBeAg的表达情况,结果发现ATF能抑制HBsAg、HBeAg的分泌,其抑制率高于3TC,并随着时间的延长抑制作用逐渐增强,10 d时达到最高的抑制率,提示由于ATF抑制X蛋白的表达,使X蛋白的反式激活功能降低,使HBsAg、HBeAg翻译减少,导致HBsAg、HBeAg的分泌降低,而HBsAg、HBeAg的分泌降低会有利于机体免疫调整,提高肝细胞存活率,降低肝脏疾病的进程。

本研究提示ATF抗HBV作用明显优于3TC,具有较好的抑制HBV的作用,由于目前治疗HBV相关疾病的药物副作用不可避免,且任何一种核苷类似物比如拉米夫定、阿德福韦等均可能导致病毒变异且不能根除HBV感染。而ATF却能通过识别结合特定的DNA序列,对基因的转录进行调控,具有很好的靶向性,并且可以进行模块化设计、筛选应用十分灵活,将更有利于清除体内乙肝病毒。但是本研究仍然存在不

足之处，HepG2.2.15细胞虽然能在体外模拟HBV的复制等作用，但与自然感染仍然存在差异，脱离了人体自身免疫系统对HBV感染产生的影响；再者ATF抑制HBV的强度还十分有限，并且其在体内的生物分布及安全性还需进一步研究。

参考文献：

[1] Zoulim F. Therapy of chronic hepatitis B virus infection: inhibition of the viral polymerase and other antiviral strategies[J]. Antiviral Res, 1999, 44(1):1-30.

[2] Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication — an update[J]. J Viral Hepat, 1996, 3(5): 217-226.

[3] Dewantoro O, Gani R A, Akbar H. Hepatocarcinogenesis in viral Hepatitis B infection: the role of HBx and p53[J]. Acta Med Indones, 2006, 38(3): 154-159.

[4] Fernandez A F, Rosales C, Lopez-Nieva P, *et al*. The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer[J]. Genome Res, 2009, 19(3): 438-451.

[5] Sera, T. Zinc-finger-based artificial transcription factors and their applications[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(7/8): 513-526.

[6] Beerli R R, Barbas C F 3rd. Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(2): 135-141.

[7] Ansari A Z, Mapp A K. Modular design of artificial transcription factors[J]. Curr Opin Chem Biol, 2002, 6(6): 765-772.

[8] Mandell J G, Barbas C F 3rd. Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(Web Server issue): W516-W523.

[9] Wikins M R, Gasteiger E, Bairoch A, *et al*. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server[J]. Methods Mol Biol, 1999, 112: 531-552.

[10] Ying C, De-Clercq E, Neyts J. Lamivudine, adefovir and tenofovir exhibit long-lasting anti-hepatitis B virus activity in cell culture[J]. J Viral Hepat, 2000, 7(1): 79-83.

[11] 魏勇，应大君，朱楚洪，等. 人工锌指蛋白真核表达载体的构建及表达[J]. 第三军医大学学报，2008，30(2):134-137.

[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] Kuhlman B , Baker D. Native protein sequences are close to optimal for their structures[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(19): 10383- 10388.

[14] Fuhrmann M, Hausherr A, Ferbitz L, *et al*. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in Chlamydomonas reinhardtii by using a synthetic luciferase reporter gene[J]. Plant Mol Biol, 2004, 55(6): 869- 881.

[15] Lee E G, Boone D L, Chai S, *et al*. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice[J]. Science, 2000, 289(5488): 2350-2354.

[16] Melegari M, Wolf S K, Schneider R J. Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression[J]. J Virol, 2005, 79(15): 9810-9820.

[17] Keng V W, Tschida B R, Bell J B, *et al*. Modeling hepatitis B virus X-induced hepatocellular carcinoma in mice with the Sleeping Beauty transposon system[J]. Hepatology, 2011, 53(3): 781-790.

[18] Zhang Z, Protzer U, Hu Z, *et al*. Inhibition of cellular proteasome activities enhances hepadnavirus replication in an HBX-dependent manner[J]. J Virol, 2004, 78(9): 4566-4572.

[19] Morton J, Davis M W, Jorgensen E M, *et al*. Induction and repair of zinc-finger nuclease-targeted double-strand breaks in Caenorhabditis elegans somatic cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(44): 16370-16375.

[20] Arnold K, Bordon L, Kopp J, *et al*. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling [J]. Bioinformatics, 2006, 22(2):195-201.

[21] Zheng D L, Zhang L, Cheng N, *et al*. Epigenetic modification induced by hepatitis B virus X protein *via* interaction with de novo DNA methyltransferase DNMT3A[J]. J Hepatol, 2009, 50(2): 377-387.

[22] Sureau C, Romet-Lemonne J L, Mullins J I, *et al*. Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA[J]. Cell, 1986, 47(1): 37-47.

[23] Lai C L, Chien R N, Leung N W, *et al*. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group [J]. N Engl J Med, 1998, 339(2): 61-68.

[24] Dienstag J L, Schiff E R, Wright T L, *et al*. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States[J]. N Engl J Med, 1999, 341(17):1256-1263.

[25] Fattovich G, Olivari N, Pasino M, *et al*. Long-term outcome of chronic hepatitis B in Caucasian patients: mortality after 25 years[J]. Gut, 2008, 57(1): 84-90.

[26] Bortolotti F, Guido M, Bartolacci S, *et al*. Chronic hepatitis B in children after e antigen seroclearance: final report of a 29-year longitudinal study[J]. Hepatology, 2006, 43(3): 556-562.

[27] Fattovich G, Giustina G, Sanchez-Tapias J, *et al*. Delayed clearance of serum HBsAg in compensated cirrhosis B: relation to interferon alpha therapy and disease prognosis. European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP)[J]. Am J Gastroenterol, 1998, 93(6): 896-900.

[28] Ben-Slama N, Ahmed S N, Zoulim F. HBsAg quantification: virological significance[J]. Gastroenterol Clin Biol, 2010, 34(Suppl 2): S112-S118.

[29] Tujios S R, Lee W M. New advances in chronic hepatitis B[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2012, 28(3): 193-197.

（**收稿**：2014-07-11；**修回**：2014-09-17）

（编辑　邓强庭）