DOI:10.16016/j.1000-5404.202101014

抑制 HBV 核心启动子转录活性的化合物筛选与鉴定

孙瑜雪[1],魏霞飞[1],李 杰[1],崔 静[1],王瑜伟[2],胡接力[1] 400016 重庆,重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室[1];400021 重庆,重庆市中医院检验科,重庆市中医院感染性疾病中西医结合诊治实验室[2]

[**摘要**] **目的** 构建靶向核心启动子转录的稳定细胞系,筛选影响乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)转录的药物。**方法** 利用 HepG2 细胞,以重组慢病毒的方式构建由 HBV 核心启动子驱动的 Gaussia 荧光素酶稳定表达细胞系(HepG2-Pcore-Gluc)。通过检测荧光素酶活性来反映核心启动子的活性变化情况。在 HBV 复制细胞模型中,通过 Southern blot、荧光定量 PCR 等进一步评估经多轮筛选得到的化合物对 HBV RNA、HBV DNA 的影响。**结果** 利用 HepG2-Pcore-Gluc 细胞模型筛选 1 450 种小分子化合物,第 1 轮筛选到 41 种化合物,能影响荧光素酶活性 2 倍以上。将这 41 种化合物进行第 2 轮剂量依赖性测试,得到 2 种化合物:逆转素(Reversine)、SCH58261。进一步验证发现:Reversine 在瞬时转染 HBV1.3 倍体的 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞中,能够有效降低 HBV RNA、HBV DNA 以及 HBeAg、HBsAg 的水平。**结论** 建立了一种新型、高效的抗乙肝药物筛选细胞模型(HepG2-Pcore-Gluc),利用该模型筛选到一种新型分子 Reversine,该分子可以通过抑制 HBV 核心启动子的转录活性来抑制 HBV RNA 的转录。

[**关键词**] 逆转素;乙型肝炎病毒;核心启动子;细胞模型;药物筛选
[**中图法分类号**] R373.21; R965.1; R978.7 [**文献标志码**] A

Screening and identification of compounds inhibiting transcriptional activity of HBV core promoter

SUN Yuxue[1], WEI Xiafei[1], LI Jie[1], CUI Jing[1], WANG Yuwei[2], HU Jieli[1] [1]Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Clinical Laboratory, Laboratory of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases With Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing, 400021, China

[**Abstract**] **Objective** To construct a stable cell line targeting the transcriptional activity of core promoter for screening drugs that affect the transcription of HBV. **Methods** HepG2-Pcore-Gluc was constructed by recombinant lentivirus to stably express Gaussia luciferase driven by HBV core promoter in HepG2 cells, and then the luciferase was detected to indicate the activity of the core promoter. Southern blotting, fluorescence quantitative PCR and other experiments were used to further evaluate the effects of the screened compounds on the levels of HBV RNA and HBV DNA after several rounds of screening in HBV-replication cell models. **Results** Forty-one compounds that could affect luciferase activity larger than 2 times were screened out of 1 450 compounds in the first round screening by using HepG2-Pcore-Gluc cell model, which were tested in a second round of dose-dependent test to produce 2 compounds: Reversine and SCH58261. Further, Reversine effectively decreased the levels of HBV RNA, HBV DNA, HBeAg and HBsAg

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81871635);重庆市自然科学基金面上项目(cstc2020jcyj-msxmX0764);成都中医药大学杏林学者研究基金(YYZX2019067)
[**通信作者**] 胡接力,E-mail:hujieli1977@163.com
王瑜伟,E-mail:445054416@qq.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

in transiently-transfected HepG2 and HepG2.2.15 cells. **Conclusion** Reversine is identified by using a novel cell model (HepG2-Pcore-Gluc) which targets the transcription of HBV core promoter. These results provide evidences that Reversine acts through inhibiting the transcriptional activity of core promoter.

[**Key words**] Reversine; hepititis B virus; core promoter; cell model; compounds screening

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81871635), the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2020jcyj-msxmX0764), and the Xinglin Scholar Research Project of Chengdu University of TCM (YYZX2019067). Corresponding author: HU Jieli, E-mail: hujieli1977@163.com; WANG Yuwei, E-mail: 445054416@qq.com

虽然乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)疫苗已成功应用数十年之久,但HBV感染仍然是一个重要的公共卫生问题。据统计,全球约有2.5亿感染者[1-2],每年有近100万人死于肝硬化和肝癌等相关的肝脏疾病[2]。临床的抗HBV药物主要为两大类:聚乙二醇干扰素α(PEG-IFNα)和6种核苷类似物(NAs)。干扰素治疗存在副作用大、患者耐受性差等问题,而核苷类似物因停药后易反弹,需要长期乃至终身用药,而长期用药又会导致病毒耐药[3-5]。显然,乙肝问题的最终解决,有赖于新型抗乙肝药物的开发。

抗乙肝药物的开发,应该针对乙肝病毒生命周期的各个关键环节。这些环节包括病毒入胞、病毒cccDNA的合成、病毒RNA的转录、核衣壳组装、病毒出胞等[6]。在这些环节当中,cccDNA是一个关键分子,其稳定、持续地存在,并行使其转录功能,是乙肝病毒感染得以持续且难以彻底治愈的关键[7-8]。更为重要的是,现有药物并不能直接作用于cccDNA,因此,发展能有效靶向cccDNA的治疗策略是当前亟须解决的问题。

理论上,靶向cccDNA的策略,至少包括两种,一种是降低其数量,可以通过抑制其合成或加速其降解来实现;另一种则是抑制其活性。cccDNA的主要功能是作为所有HBV RNA的转录模板,因此,抑制其活性,主要指抑制其转录活性。目前有少量具有该类效应的化合物报道,例如P300/CBP相关因子组蛋白乙酰转移酶抑制剂Curcumin[9]、Sirt1抑制剂sirtinol和Ex527[10]、JMJD3组蛋白脱甲基酶抑制剂GSK-J1[11]等。这些分子通过控制cccDNA组蛋白的乙酰化和甲基化,抑制cccDNA的转录,而目前这些分子均处于初期研究阶段,最终效果仍待观察。对cccDNA转录事件而言,前基因组RNA(pgRNA)的转录尤其重要,因为pgRNA不但是病毒DNA的复制模板,也是HBV核心蛋白和聚合酶的翻译模板。本研究构建了一种靶向HBV核心启动子转录活性的药物初筛细胞模型,利用该模型筛选了一个包含1 450种小分子的化合物库,并从中鉴定到了一种能有效抑制HBV核心启动子的转录活性,从而能抑制HBV RNA转录的化合物逆转素(Reversine),并对该化合物的生物学效应进行评价,为进一步研发新型抗乙肝药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒模板来源 质粒pCMV-Gluc购自美国的New England Biolabs公司,质粒pEGFP-N1购自美国的Clontech公司,质粒pCH9/3091来自德国的弗莱堡大学Michael Nassal实验室[12],质粒LentiCRISPRv2、psPAX2、Pmd2.0G来自美国的麻省理工学院张峰实验室[13]。

1.1.2 质粒的构建

1.1.2.1 野生型及截短突变型核心启动子驱动的荧光素酶报告质粒 野生型以质粒pCH9/3091为模板,用引物F 1070GG+R 1901GG扩增包含增强子Ⅰ、增强子Ⅱ和基本核心启动子(BCP)区域,用胶回收试剂盒回收扩增片段并将其命名为frag 1;以pCH9/3091为模板,引物F SV40+R CMV扩增载体片段并将其命名为frag 2;以质粒pCMV-Gluc为模板,用引物F Gluc+R Gluc扩增Gluc报告基因并将其命名为frag 3,然后采用Golden-gate的方式将frag 1、2、3连接起来即得到质粒pCH9-Pcore-Gluc。

截短突变型:以pCH9-Pcore-Gluc质粒为模板,用引物F 1636GG+R CMV扩增片段frag 4、引物F 1745GG+R 1635GG扩增片段frag 5、引物F 1745GG+R CMV扩增片段frag 6,将frag 4、5、6采用Golden-gate克隆方式连接到载体上,即得到3种截短突变型质粒:pCH9-1636-1901-Gluc、pCH9-1070-1635/1745-1901-Gluc、pCH9-1744-1901-Gluc。

1.1.2.2 Lenti-Pcore-Gluc-heo报告质粒 以质粒pCH9/3091为模板,用引物F 1070GG2+R 1901GG扩增片段frag 7;以质粒pCMV-Gluc为模板,用引物F Gluc1GG+R GlucGG2扩增片段frag 8;以质粒LentiCRISPRV2为模板,分别用引物F LentiV2 flag+R LentiV2 13773扩增片段frag 9、引物F LentiV2 13769+R LentiV2 2607扩增片段frag 10,将frag 7、8、9、10以Golden-gate的方式连接起来构建Lenti-Pcore-Gluc质粒。为了将Lenti-Pcore-Gluc上的puromycin抗性替换为neomycin抗性,以Lenti-Pcore-Gluc为模板,引物

F LentiV2 13769+R 2AGG 扩增 frag 11、引物 F LentiV2 9947+R LentiV2 13773 扩增 frag 12;以 pEGFP-N1 质粒为模板,引物 F neoGG+R neoGG 扩增 frag 13,将 frag 11、12、13 以 Golden-gate 方式连接起来即得到质粒 Lenti-Pcore-Gluc-neo。

1.1.2.3 其他质粒 Pcore-3Flag-G4S92-HBc 为课题组前期构建[14],该质粒由核心启动子驱动,在 HBc 的 N 端通过 G4S linker(92 个氨基酸)连接 3 个 Flag 标签蛋白。同理,将该质粒上的核心启动子 Pcore 换成另外两种病毒来源的启动子 Psv40 和 Pcmv 即构出质粒 Psv40-3Flag-G4S92-HBc 和 Pcmv-3Flag-G4S92-HBc。质粒 HBV 1.3 倍体由首都医科大学赵学森博士惠赠。实验中所涉及的引物序列见表 1。

1.1.3 细胞来源 293FT 及人肝癌细胞系 HepG2 购自美国 ATCC,HepG2.2.15 由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室长期保存。

1.1.4 主要仪器与试剂 利用该模型进行筛选的化合物库购自美国 Selleckchem 公司,为一款含有 1 450 种小分子的生物活性化合物的定制库[名称为 Cherry Pick Library(96-well)-L2000-Z286554-30uL],每种化合物的浓度为 10 mmol/L,均溶解在 DMSO 中。主要试剂和仪器包括:X-tremeGENE HP 转染试剂(Roche Diagnostics 公司,美国);慢病毒浓缩试剂 PEG-it Virus Precipitation Solution(5×)(SBI 公司,美国);Golden-gate 连接所用到的 *Bsm*B Ⅰ 酶、Tango buffer、DTT(Thermo scientific 公司,美国);ATP(New England Biolabs 公司,美国);2×PrimeSTAR HS Mix(Takara 公司,日本);胶回收试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒(QIAGEN 公司,德国);胎牛血清(Lonsera 公司,乌拉圭);胰酶、DMEM 培养基、青链霉素(Gibco 公司,

表 1 实验引物序列

引物名称	引物序列(5′→3′)
F 1070GG	GCTGACCGTCTCCCGTTGATGCCTTTGTATGCATGT
R 1901GG	GCTGACCGTCTCTAGACGACATGCCCCAAAGCCACCCAAGGCT
F SV40	ACTCACCGTCTCTTCGTGGCCGCGACTCTAGATCAT
R CMV	GCTGACCGTCTCTAACGGCTATGAACTAATGACCCCGTA
F Gluc	GCTGACCGTCTCCGTCTGGAGTCAAAGTTCTGTTTG
R Gluc	ACTCACCGTCTCTACGAGTCACCACCGGCCCCCTTGAT
F 1636GG	GCTGACC CGTT ATTGCCCAAGGTCTTACATAAG
F 1745GG	GCTGACCGTCTCC CGTT GGGAGGAGATTAGGTTAAAGGT
R 1635GG	GCTGACCGTCTCTAACGTTTGGTGGGCGTTCACGGTGGT
F 1070GG2	GCTGACCGTCTCCTGACCGTTGATGCCTTTGTATGCATGT
R 1901GG	GCTGACCGTCTCTAGACGACATGCCCCAAAGCCACCCAAGGCT
F Gluc1GG	GCTGACCGTCTCCCATGGGAGTCAAAGTTCTGTTTG
R GlucGG2	ACTCACCGTCTCTAATCGTCACCACCGGCCCCCTTGAT
F LentiV2 flag	GCTGACCGTCTCCGATTACAAAGACGATGACGATAAG
R LentiV2 13773	ACTCACCGTCTCTCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCA
F LentiV2 13769	GCTGACCGTCTCCAGGGATTTTGGTCATGAGATTATC
R LentiV2 2607	ACTCACCGTCTCTGTCAGGTACCTTAATTAACCAAACTGG
F LentiV2 9947	GCTGACCGTCTCCTGAACGCGTTAAGTCGACAATCA
R 2AGG	TGCGTCCGTCTCTTCCAGGATTCTCTTCGACATCT
F neoGG	GCTGACCGTCTCCTGGACCGATTGAACAAGATGGATTG
R neoGG	ACTCACCGTCTCTTTCACTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG
F Actin	GTGATGGTTGGTATGGGCCA
R Actin	AAATCCAGTGCGACGTAGCA
F pgRNA	TGTTCAAGCCTCCAAGCTGT
R pgRNA	GACCTGCCTCGTCGTCTAAC
F HBVDNA	TCCTAGGACCCCTTCTCGTG
R HBVDNA	CTTGGCCCCCAATACCACAT
F NR1C2	GGCTTCCACTACGGTGTTCA
R NR1C2	TGAAGCTGGGGATGCTCTTG

美国);细胞培养箱 HERAcell 150i(Thermo scientific 公司,美国);胶原(Corning 公司,美国);Lipofectamine3000 Transfection Reagent、Platinum SYBR Green qPCR、G418(Invitrogen 公司,美国);TRIzol Reagent、Gaussia Luciferase Flash Assay Kit(Thermo scientific 公司,美国);病毒表面抗原和 E 抗原酶免法检测试剂盒(科华生物工程股份有限公司,上海);逆转录试剂盒(天根生化科技有限公司,北京);Southern blotting 试剂、Nylon 膜(Roche Diagnostics 公司,美国);酚氯仿(Amresco 公司,美国);微管酶(BioLabs 公司,美国);PVDF 膜(Amersham Hybond 公司,加拿大);Anti-Flag(1∶1 000,鼠抗,Sigma Aldrich 公司,美国);GAPDH、β-actin 小鼠单抗(1∶1 000,碧云天生物技术有限公司,上海);IRDye-cojugated-secondary antibodies(1∶10 000,Licor Biosciences 公司,美国);CCK-8 检测试剂盒(Bimake 公司,美国);Synergy H1 多孔板检测仪(Bio-Tek 公司,美国);SageCreation ChampChemi 凝胶成像系统(赛智创业科技有限公司,北京);Odyssey CLx system 红外激光双色图像分析系统(Licor Biosciences 公司,美国);UVP Hybridizer Oven 分子杂交炉(UVP 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 实验所用到的 293FT、HepG2、HepG2.2.15(HepG2 细胞上构建的能够稳定产生 HBV 病毒颗粒的细胞系)均在 37 ℃、5%CO_2 的环境下,于含 10%胎牛血清、1%青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 中培养。HepG2 细胞转染前的接种,需用胶原处理培养板。转染操作参照 Lipo3000 的转染试剂说明书进行。

1.2.2 细胞模型的构建 293FT 细胞以约 50%密度接种到 10 cm 细胞培养皿,用 X-tremeGENE HP 转染试剂将 Lenti-Pcore-Gluc-neo 质粒和慢病毒包装质粒 psPAX2、Pmd2.0G 共转染 293FT 细胞,然后收取细胞培养上清,再用慢病毒浓缩试剂浓缩上清,具体操作按照产品说明书进行。将 HepG2 细胞以约 50%密度接种到 6 cm 细胞培养皿,待细胞密度达到约 90%时,更换为新鲜无双抗的培养基,然后用浓缩的慢病毒感染 HepG2 细胞,48 h 后,将其消化传代至 10 cm 培养皿,同时用含 500 μg/mL G418 的培养基做筛选培养,2~3 周后,取上清检测 Gaussia 荧光素酶的活性(以下简称 Gluc 活性)。

1.2.3 药物筛选 利用 HepG2-Pcore-Gluc 细胞模型对 1 450 种小分子化合物进行筛选。首先,将稳定系细胞以 5×10^4/孔种于胶原处理后的 96 孔板,待细胞完全贴壁后,加入不同的化合物处理(终浓度为 10 μmol/L),阴性对照加入 DMSO 处理(DMSO 终浓度不超过 0.5%),48 h 后取每孔上清 10 μL 分别加入黑边透明底的 96 孔板中,然后各孔再加入 Gaussia 荧光素酶检测试剂 20 μL,用 Synergy H1 多孔板检测仪检测 Gluc 活性。每种化合物做 3 个复孔,通过本轮筛选,保留那些影响荧光素酶活性 2 倍及以上的化合物进入第 2 轮的剂量依赖性测试。

在第 2 轮剂量依赖性测试实验中,首先将第 1 轮筛选得到的化合物分别以 1 μmol/L 和 10 μmol/L 的终浓度处理稳定细胞系,48 h 后检测 Gluc 活性。本轮筛选通过增加化合物的一个低浓度(1 μmol/L),在一定程度上会排除可能由于化合物的高剂量(10 μmol/L)而导致细胞毒性,从而产生假阳性结果,然后将最终筛选得到的化合物在 HepG2-Pcore-Gluc 细胞模型上再做进一步的量效关系验证。

1.2.4 Western blot 实验 HepG2 细胞接种于胶原处理过的 24 孔板,待细胞贴壁后分别转染 Pcore-3Flag-G4S92-HBc、Pcmv-3Flag-G4S92-HBc 及 Psv40-3Flag-G4S92-HBc 质粒,然后用不同浓度的药物(终浓度为 0、1.0、5.0、10.0、20.0 μmol/L)处理细胞,48 h 后用 RIPA 裂解液于冰上裂解细胞,然后 4 ℃离心取蛋白上清,将蛋白加热变性后于 10%的 SDS-PAGE 上进行凝胶电泳,电泳结束后将样品转到 PVDF 膜上,然后用 5%的奶粉封闭膜 1 h、一抗孵育 1 h、绿色荧光二抗避光孵育 1 h,最后用 Odyssey CLx system 红外激光双色图像分析系统曝光成像。

1.2.5 HBV core DNA 的提取与 Southern blot 检测 HepG2.2.15 和 HepG2 细胞以 5×10^5/孔接种于胶原处理过的 12 孔板,待细胞完全贴壁后加入不同浓度的药物(终浓度为 0、0.5、2.5、5.0、10.0、20.0 μmol/L)处理 5 d,然后用裂解液(10 mmol/L Tris-HCL、1 mmol/L EDTA、0.2% NP-40)裂解细胞,取上清加入氯化钙和微管酶,37 ℃孵育 1 h 后,加入 EDTA、SDS,链酶蛋白酶,继续孵育 1 h,然后用酚氯仿抽提,最后加入氯化钠和无水乙醇沉淀 DNA。第 2 日,将 DNA 风干后溶于无酶水中,然后于 1.2%的琼脂糖凝胶中进行电泳分离,再将其转移至尼龙膜。后续的 DNA 杂交和检测按照产品的说明书进行操作,最后用 SageCreation ChampChemi 凝胶成像系统进行成像。

1.2.6 细胞总 RNA 的提取、逆转录与荧光定量 PCR HepG2.2.15 和 HepG2 细胞接种于胶原处理过的

12 孔板,药物处理 5 d 后,加入 TRIzol 裂解细胞,然后加入氯仿离心,异丙醇沉淀,75%的乙醇洗涤干燥,最后加入适量无酶水至其完全溶解。根据 RNA 的浓度,取 1 μg 将其逆转录成 cDNA,逆转录操作按照试剂盒说明书进行,再以 cDNA 为模板,利用荧光定量 PCR 检测 cDNA 的含量从而间接反映细胞内的 RNA 水平变化,细胞内 core DNA 的相对水平变化也利用荧光定量 PCR 检测评估,最后根据得到的 CT 值,利用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 计算相对含量。荧光定量 PCR 所用到的引物见表 1。

1.2.7　酶联免疫吸附实验(ELISA)　不同浓度的药物处理 HepG2.2.15 和 HepG2 细胞,48 h 后取适量的细胞培养上清进行乙肝表面抗原和乙肝 e 抗原的检测,具体操作按照试剂盒说明书进行。

1.2.8　细胞活力检测　HepG2 细胞按照 5 000/孔的密度接种于胶原处理过的 96 孔板,待细胞完全贴壁后,加入不同浓度的药物处理,48 h 后更换成新鲜的培养基,并加入培养基体积 10%的 CCK-8 试剂于 37 ℃、5%CO_2 的环境中避光孵育,然后在孵育 1、2、3 h 后(4 h 内完成检测)于多功能酶标仪上 450 nm 处检测各孔的光密度值 D(450),并将 DMSO 对照孔的细胞活性设置为 100%,分析其余浓度对细胞活性的影响[以细胞毒性浓度 CC_{50}(cytotoxicity concentration)数值表示,CC_{50}:细胞半数毒性浓度,即不同浓度药物处理后的细胞相对活性被抑制 50%时所对应的浓度]。

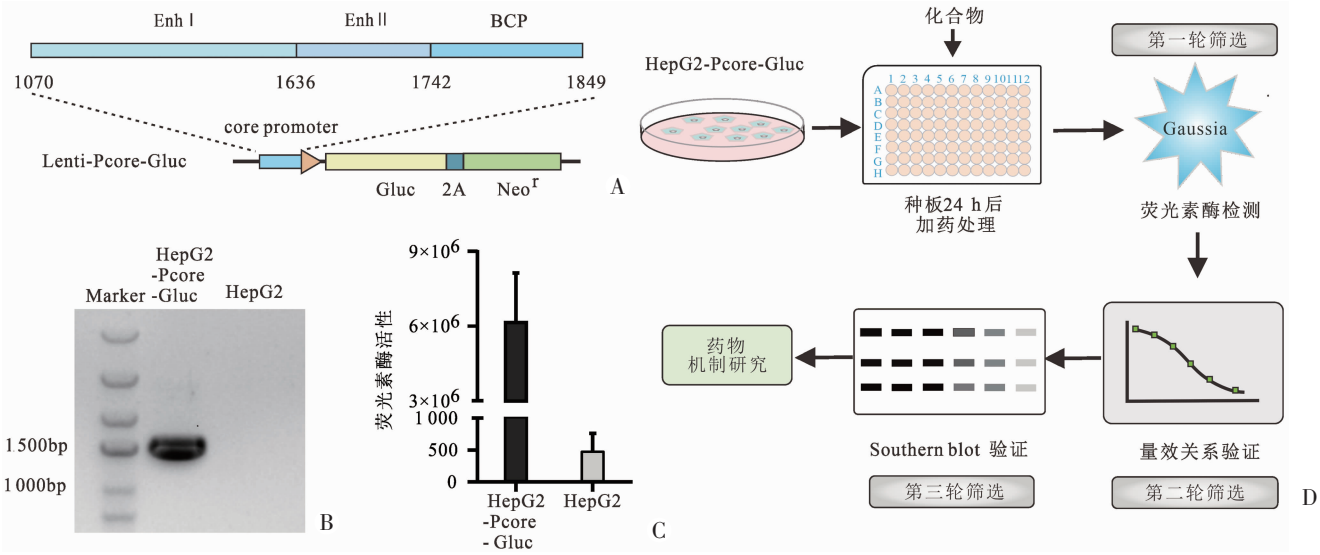
1.3　统计学分析

采用 SPSS 20.00 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,对照组与用药组间比较采用两独立样本的 t 检验,实验重复 3 次。图表均使用 GraphPad Prism 8 绘制。检验水准:$\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　HepG2-Pcore-Gluc 稳定表达细胞系的构建

为了构建一种表征 HBV 核心启动子(Pcore)转录活性的细胞模型,设计了由 Pcore 驱动表达的 Gaussia 荧光素酶报告质粒(图 1A),然后以重组慢病毒感染 HepG2 细胞的方式,经抗性(neomycin)筛选得到稳定表达细胞系。为了验证 HepG2-Pcore-Gluc 细胞系是否构建成功,提取 HepG2 和 HepG2-Pcore-Gluc 细胞的基因组 DNA,用引物 F 1070GG+R Gluc 做 PCR 扩增,结果显示:从 HepG2-Pcore-Gluc 细胞来源的基因组 DNA,可以扩增出 1 500 bp 单一条带(图 1B),而阴性对照(HepG2)无此条带。取 HepG2-Pcore-Gluc 细胞培养上清,检测其中的 Gluc 活性,可检测到高于阴性对照 10 000 倍以上的发光信号(图 1C)。以上结果提示 HepG2-Pcore-Gluc 细胞系构建成功。

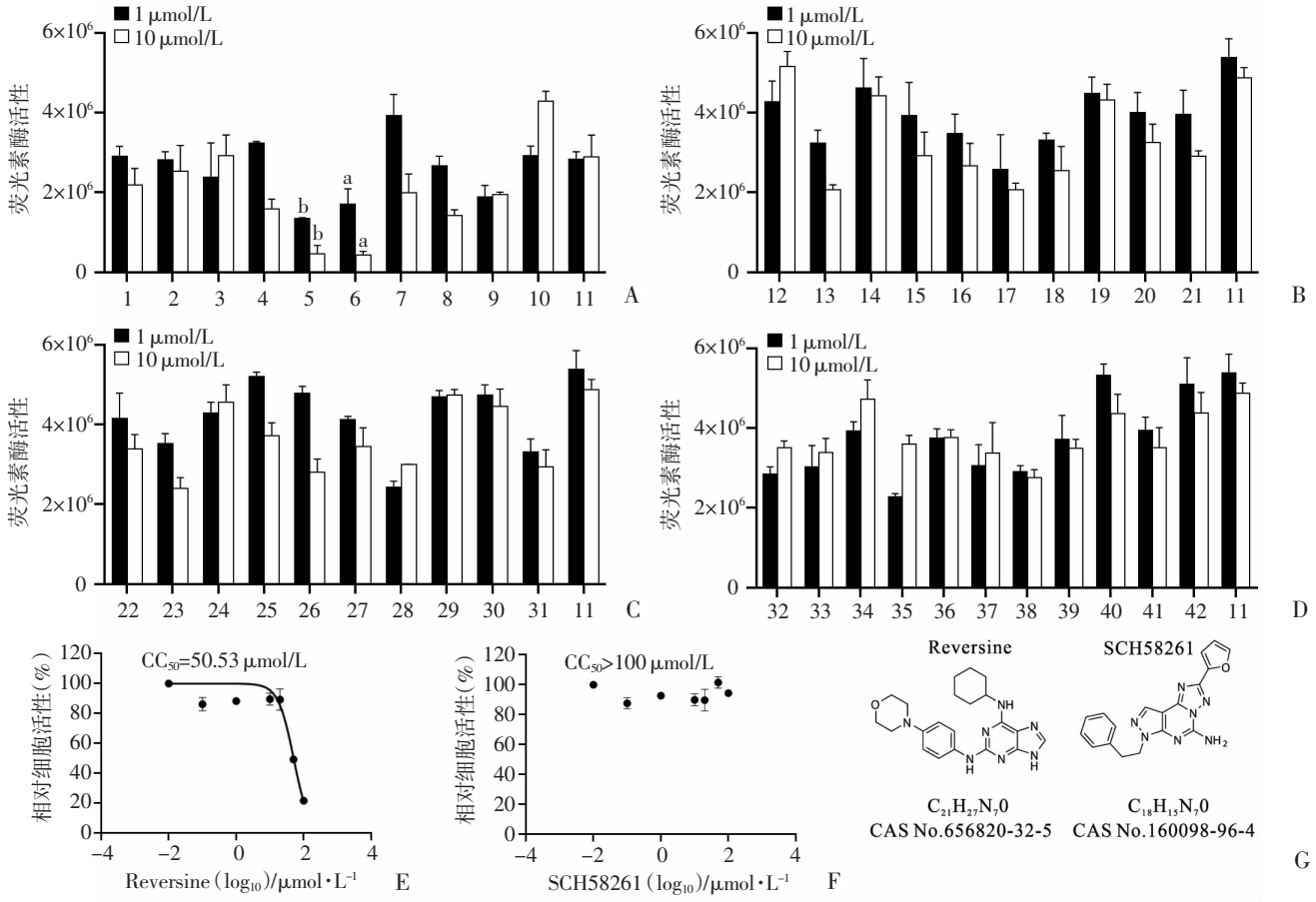


A:Lenti-Pcore-Gluc 质粒示意图　该质粒是由 HBV 核心启动子(包含增强子Ⅰ、Ⅱ和基本核心启动子)驱动的 Gaussia 荧光素酶的表达质粒;B、C:利用 PCR 扩增目的序列和检测 Gluc 的方式确定已成功获得由核心启动子驱动且高表达 Gluc 的 HepG2-Pcore-Gluc 稳定细胞系;D:化合物筛选流程示意图

图 1　细胞模型的构建及化合物库的筛选流程

2.2　化合物的第 1 轮筛选

为了筛选抑制核心启动子活性的药物,采用了 3 轮筛选流程(图 1D)。第 1 轮的筛选标准是:在 10 μmol/L 浓度下,能让 HepG2-Pcore-Gluc 细胞培养上清的 Gluc 活性降低 2 倍以上,同时显微镜下没有明显可见的细胞毒性。通过对 1 450 种小分子化合物进行初筛,发现有 41 种化合物能降低 Gluc 的活性 2 倍及以上。随后对 41 种化合物进行再次筛选以进一步排除假阳性,本次筛选用 1 μmol/L 和 10 μmol/L 两种浓度(图 2A~D)。经筛选后只有 2 种化合物 Reversine 和 SCH58261 在 1 μmol/L 时即表现出较好的抑制效果,在 10 μmol/L 时能抑制 Gluc 活性 3 倍以上,并且镜下观察细胞未发现有毒性改变(图 2A)。进一步通过细胞活力检测实验得出:Reversine 在 HepG2 细胞中的 CC_{50}=50.53 μmol/L(图 2E),SCH58261 在 HepG2 细胞中的 CC_{50}>100 μmol/L(图 2F),由此可见二者的活性较高且毒性较小,值得做进一步的验证。图 G 为 Reversine 和 SCH58261 的分子结构图。



1:Aminophylline;2:Theophylline-7-acetic acid;3:Proxyphylline;4:CGS21680 HCL;5:Reversine;6:SCH58261;7:ZM241385;8:A2ARantagonist;9:Adenosine Dialdehyde;10:Adenosine;11:DMSO;12:ABT-702;13:Tubercidine;14:Turofexorate Isopropyl;15:WY-14643 (Pirinixic Acid);16:GW4064;17:SR-18292;18:GW9662;19:Tozasertib;20:Barasertib;21:MLN8054;22:ZM 447439;23:Danusertib;24:SNS-032;25:SNS-314;26:JNJ-26854165;27:ENMD-2076;28:CHIR-99021;29:Aurora A Inhibitor Ⅰ;30:PHA-680632;31:Hesperadin;32:AEE788;33:KW-2449;34:TAK-901;35:AMG-900;36:GSK1070916;37:MK-5108;38:MK-8745;39:BI-847325;40:SNS-314 Mesylate;41:CCT129202;42:CCT137690;a:P<0.05,b:P<0.01,与对照 DMSO 孔比较

A~D:初筛得到的 41 种化合物在 HepG2-Pcore-Gluc 稳定细胞系上以低剂量(1 μmol/L)和高剂量(10 μmol/L)的终浓度进行进一步的活性测试,A 图的 11 种化合物中化合物 5(Reversine)和化合物 6(SCH58261)与对照(DMSO)相比,在 1 μmol/L 的终浓度下能有效抑制 Gluc 活性,且对细胞没有毒性;E、F:分别为化合物 Reversine、SCH58261 处理 48 h 后 HepG2 细胞的活力;G:Reversine、SCH58261 的分子结构图

图 2　采用荧光素酶的检测方法检测初筛得到的 41 种化合物的 Gluc 活性

2.3 化合物的量效关系验证

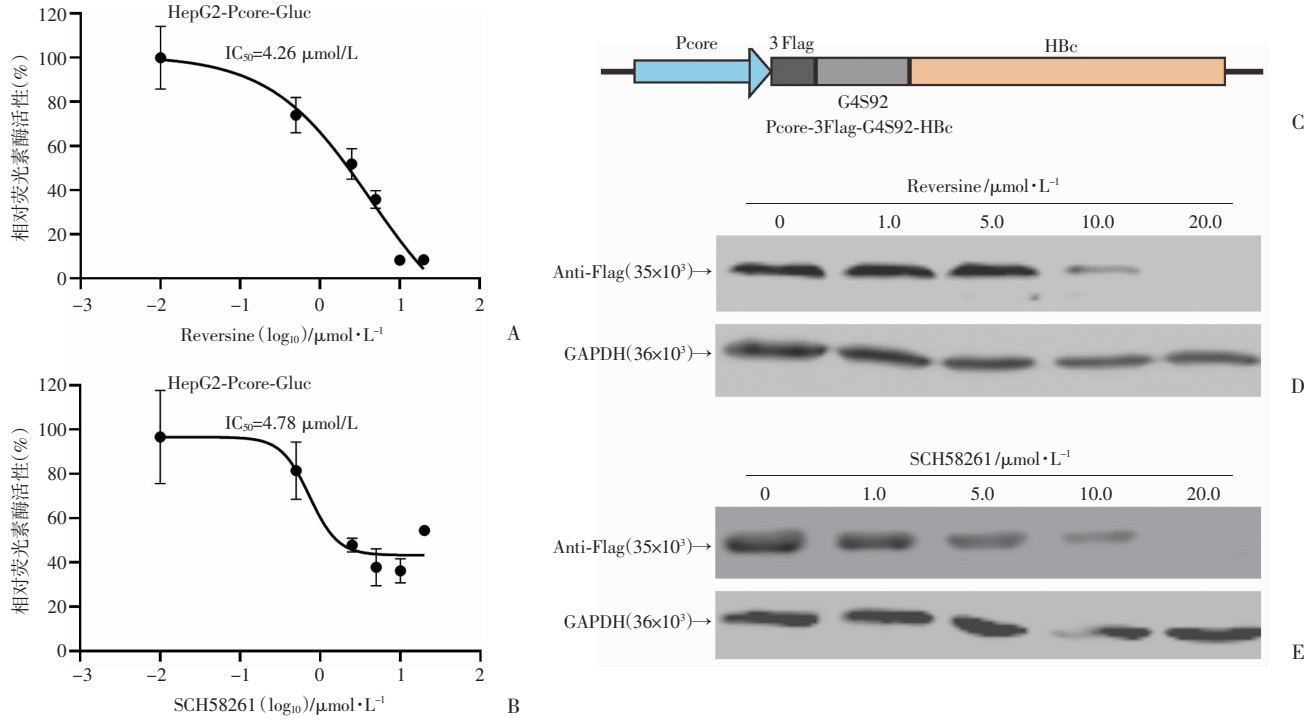
为了验证筛选出的化合物能否剂量依赖性地抑制 Gluc 的表达,采用两种不同的验证方式,第一种方式在 HepG2-Pcore-Gluc 细胞中用不同浓度药物处理细胞 48 h,然后检测 Gluc 活性。结果发现:Reversine 和 SCH58261 均能剂量依赖性地降低 Gluc 活性(图 3A、B)。第二种方式通过构建由核心启动子驱动的 HBc 表达质粒 Pcore-3Flag-G4S92-HBc(图 3C),经转染 HepG2 细胞并加药处理 48 h 后做 Western blot 实验。两种验证方式的结果显示:这两种药物均能剂量依赖性地抑制核心启动子的活性。但 Western blot 的结果还提示:两种药物抑制由核心启动子驱动的蛋白表达效应也有可能是通过影响转录或其他环节所致(图 3D、E)。

2.4 化合物对 HBV DNA 复制水平的影响

为了进一步验证候选药物对 HBV DNA 复制的影响,用不同浓度的药物处理 HepG2.2.15 或者瞬时转染 HBV 1.3 倍体的 HepG2 细胞(药物的终浓度为 0、0.5、2.5、5.0、10.0、20.0 μmol/L),5 d 后提取细胞内的 core DNA 做 Southern blot 检测。如图 4A 所示:在两种细胞中,Reversine 均能剂量依赖性地抑制 HBV DNA 的复制,但 SCH58261 不具有此效应。在同样的 HBV 复制细胞系中,两种药物分别处理细胞 5 d 后(终浓度为 0、0.1、1.0、5.0、10.0、20.0 μmol/L),利用荧光定量 PCR 的方式检测 HBV DNA 的水平变化,结果同样显示(图 4B):Reversine 能够剂量依赖性地降低 HBV DNA 的复制水平,而 SCH58261 不能。在 HepG2.2.15 和瞬时转染 HBV1.3 倍体的 HepG2 细胞中,Reversine 抑制 HBV DNA 的 IC_{50} 分别为 5.63 μmol/L 和 0.24 μmol/L。以上结果提示:Reversine 具有良好的 HBV DNA 抑制活性,但 SCH58261 没有。

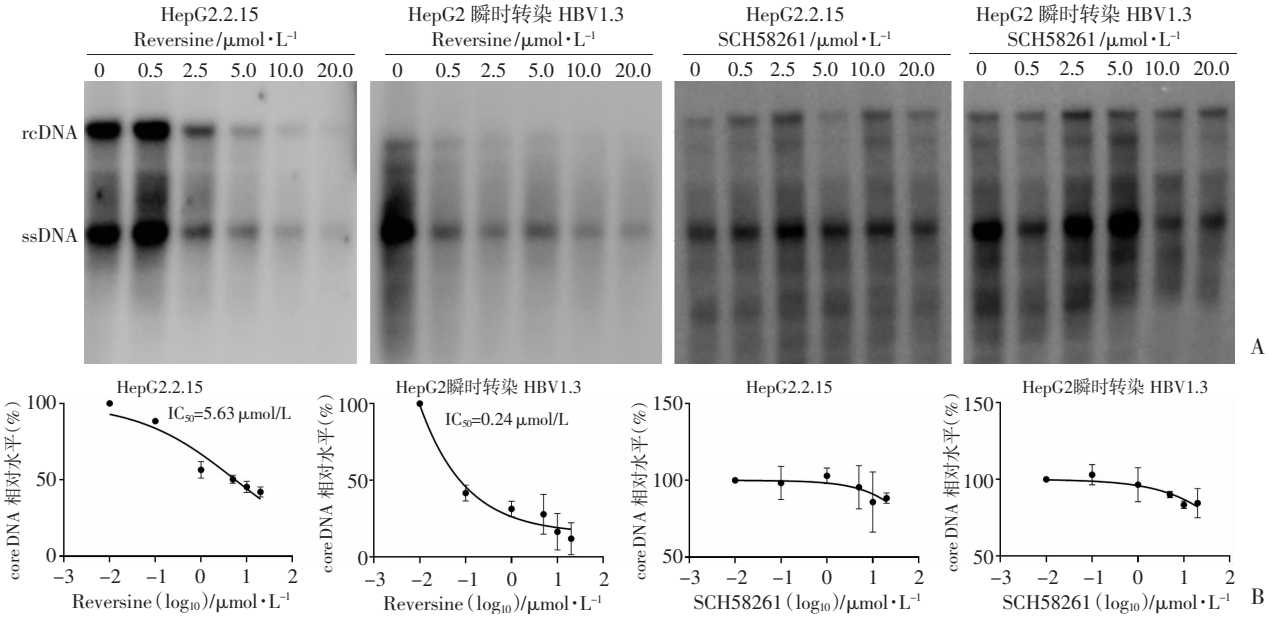
2.5 Reversine 对 HBV RNA 转录、乙肝表面抗原和乙肝 e 抗原的影响

为了进一步验证 Reversine 的生物学效应,用不同浓度的药物(0、0.1、1.0、5.0、10.0、20.0 μmol/L)处理细胞后,提取总 RNA,经逆转录后采用荧光定量 PCR 检测 HBV 前基因组 RNA(pgRNA)的转录水平。结果显示:Reversine 能剂量依赖性地降低 HBV pgRNA 的转录水平(图 5A、B)。细胞加药处理 48 h 后,取适量的上清做乙肝表面抗原和乙肝 e 抗原的检测,结果显示:Reversine 也能显著降低乙肝表面抗原和乙肝 e 抗原的分泌水平(图 5C、D)。以上结果提示:在 HepG2.2.15 和瞬时转染 HBV 1.3 倍体的 HepG2 细胞中,Reversine 能有效抑制 HBV pgRNA 的转录及乙肝表面抗原和乙肝 e 抗原的分泌。



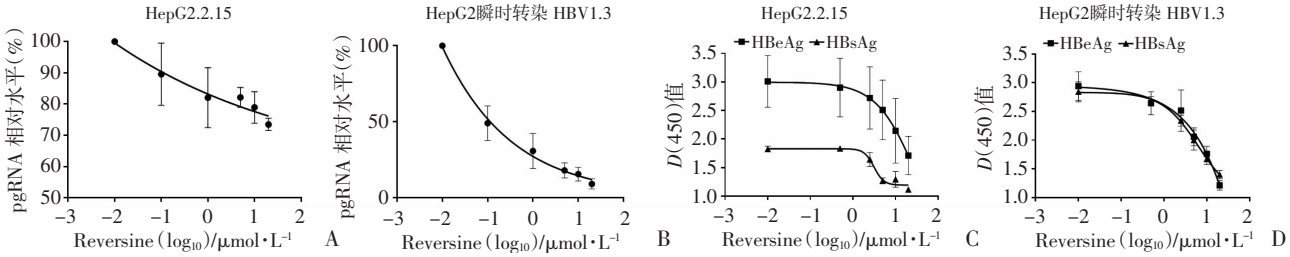
A、B:在 HepG2-Pcore-Gluc 细胞中,Reversine 和 SCH58261 均能剂量依赖性地降低 Gluc 活性 IC_{50} 为 Gluc 活性的半数抑制浓度,即不同浓度药物处理后的 Gluc 相对活性被抑制 50%时所对应的浓度;C:质粒 Pcore-3Flag-G4S92-HBc 的结构示意图;D、E:Reversine 和 SCH58261 均能有效抑制由核心启动子驱动的核心蛋白的表达

图 3 Reversine 和 SCH58261 对核心启动子活性的影响



A:在 HepG2.2.15 和瞬时转染 HBV1.3 倍体的 HepG2 细胞中分别经药物 Reversine 或 SCH58261 处理后,Southern blot 检测细胞内 HBV DNA 的复制水平;B:采用荧光定量 PCR 进一步检测两种药物对 HBV DNA 复制水平的影响,其结果同 Southern blot 结果一致 IC_{50} 为 core DNA 的半数抑制浓度,即不同浓度药物处理后的 core DNA 相对水平被抑制 50%时所对应的浓度

图 4 Reversine 和 SCH58261 对细胞内 HBV DNA 复制的影响

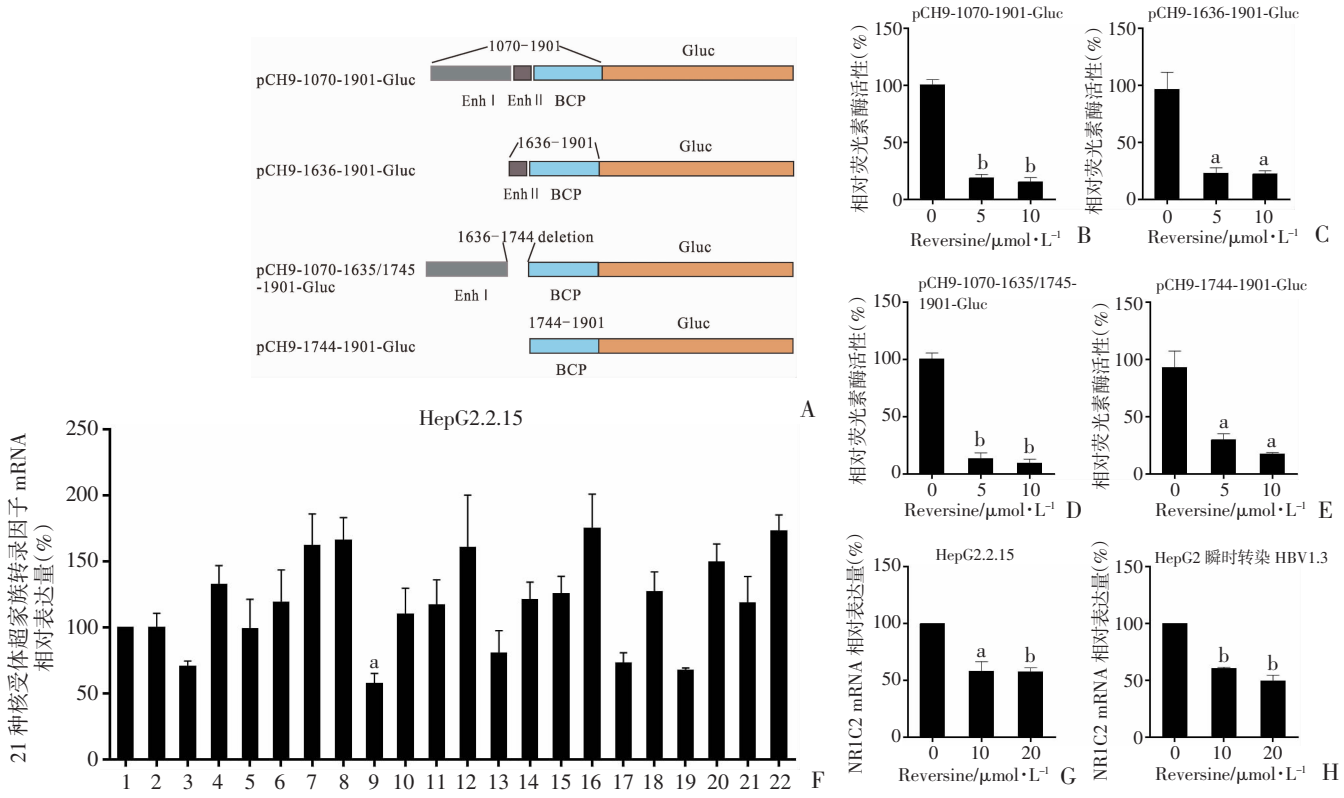


A、B:在 HepG2.2.15 和瞬时转染 HBV1.3 倍体的 HepG2 细胞中,Reversine 剂量依赖性地抑制 HBV pgRNA 的转录;C、D:在同样的 HBV 复制细胞系中,Reversine 也能有效降低乙肝表面抗原和乙肝 e 抗原的分泌水平

图 5 Reversine 对 HBV RNA 转录以及乙肝表面抗原和乙肝 e 抗原的影响

2.6 Reversine 在核心启动子上的作用区域及其对核受体超家族基因转录的影响

前述实验提示 Reversine 能抑制由核心启动子驱动转录的 pgRNA 水平。为了进一步探讨 Reversine 的作用机制,首先对 Reversine 在核心启动子上的作用区域进行了研究。如图 6A 所示:将 4 种不同启动子的荧光素酶报告质粒(分别为完整核心启动子和缺失增强子Ⅰ、或缺失增强子Ⅱ或二者均缺失的启动子)转染 HepG2 细胞,加药处理 48 h 后,检测 Gluc 活性(药物浓度设置为 0、5、10 μmol/L)。结果显示:不论是完整的还是截短的核心启动子,Reversine 均能显著降低其活性(图 6B~E)。鉴于这些报告质粒的启动子区域中均含有基本核心启动子序列(BCP),由此推测该药物可能作用在共同区域,即 BCP,但具体机制有待进一步探索。为了探讨 Reversine 对与转录相关的一些核受体超家族转录因子的影响,采用荧光定量 PCR 检测药物处理后(终浓度为 10 μmol/L)的 HepG2.2.15 细胞内核受体超家族转录因子的 mRNA 表达(图 6F)。在 21 个核受体超家族转录因子中,NR1C2(PPARβ)的 mRNA 表达被下调 40%。对 NR1C2 转录因子进行进一步的验证发现(药物浓度设置为 0、10、20 μmol/L):在两种 HBV 的复制细胞系中,NR1C2 因子表达水平的下降程度随着药物浓度的增加而增加,当药物浓度为 20 μmol/L 时,NR1C2 因子在瞬时转染 HBV 1.3 倍体的 HepG2 细胞内的表达下调了 50%(图 6G、H)。以上结果提示:Reversine 有可能通过抑制 NR1C2 mRNA 的表达来进一步影响 HBV 核心启动子的转录活性。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与对照 DMSO 孔(0 μmol/L)比较

A:完整或截短突变的核心启动子的荧光素酶报告质粒示意图; B~E:在 HepG2 细胞中,分别转染 pCH9-1070-1901-Gluc(B)、pCH9-1636-1901-Gluc(C)、pCH9-1070-1635/1745-1901-Gluc(D)、pCH9-1744-1901-Gluc(E)4 种质粒,Reversine 处理 48 h 后,检测该化合物对野生型和截短突变型核心启动子的抑制效应; F: 在 HepG2.2.15 细胞中,对 21 种核受体超家族转录因子的筛选结果 1: DMS0; 2: NR1H3; 3: NR1C3; 4: NR5A2; 5:NA1A2; 6:CEBPα; 7:NR2A1; 8:NR1C1; 9:NR1C2; 10:NR1H2; 11:NR3C3; 12:NR1H4; 13:NR2B3; 14:NR2B1; 15:NR2B2; 16:NR3C2; 17:NR4A2; 18:NR5A1; 19:NR4A1; 20:NR3C1; 21:NR1B3; 22:NR3A2; G、H: Reversine 抑制 HepG2.2.15 和瞬时转染 HBV 1.3 倍体的 HepG2 细胞内 NR1C2 的表达

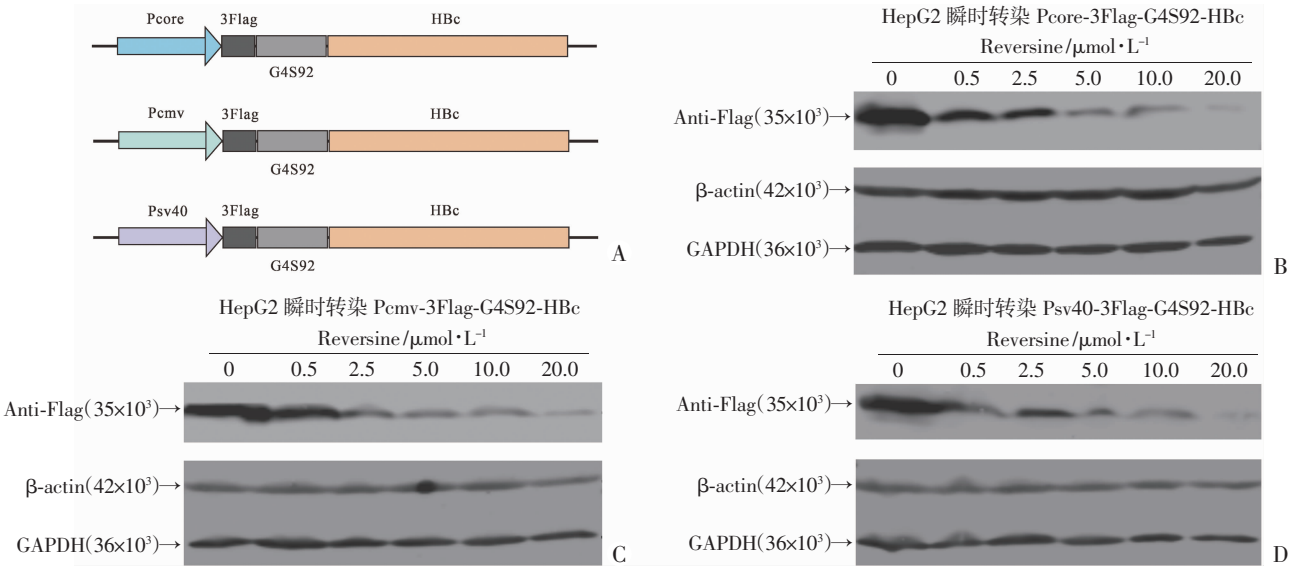
图 6 Reversine 抑制 BCP 活性且抑制 NR1C2 的转录

2.7 Reversine 的作用特异性分析

为了探索 Reversine 作用是否具有特异性,在 HepG2 细胞中分别转染 Pcore-3Flag-G4S92-HBc、Pcmv-3Flag-G4S92-HBc 及 Psv40-3Flag-G4S92-HBc 质粒,用不同浓度的 Reversine(终浓度为 0、0.5、2.5、5.0、10.0、20.0 μmol/L)处理细胞,48 h 后做 Western blot 检测。结果显示(图 7):Reversine 不仅对核心启动子(Pcore)具有剂量依赖性的抑制效应,对另外两种病毒启动子 Pcmv 和 Psv40 也表现出相似的抑制效应,但对两种内参基因(β-actin 和 GAPDH)的表达无影响。上述结果提示:Reversine 的作用存在一定的启动子选择性。

3 讨论

乙肝病毒的整个感染复制周期,可以看做由一系列过程组成的循环。干扰这个循环中的任一环节,理论上均可干扰病毒复制。将病毒复制周期做过程化分解,有助于我们设计的靶点相对明确和集中,同时易于实现构建高通量筛选的细胞模型。本研究将 HBV 核心启动子的转录这一过程单独分解出来,并用一种易于检测的方式加以表征。核心启动子是决定 HBV 复制肝细胞特异性的重要因素,其转录受宿主因子的严格调控[15]。该启动子在非肝源细胞中活性很低,而在肝源细胞中活性较高,这可能是由于非肝细胞中缺乏



A:3 种病毒源性启动子(Pcore、Pcmv、Psv40)驱动的 HBc 蛋白表达的质粒结构示意图; B~D:在 HepG2 细胞中,分别转染 Pcore-3Flag-G4S92-HBc、Pcmv-3Flag-G4S92-HBc 及 Psv40-3Flag-G4S92-HBc 质粒,经 Reversine 处理 48 h 后,Western blot 检测蛋白表达

图 7 Reversine 不具有 HBV 核心启动子的特异性

某些特异性表达的转录因子或者存在一些负性调节因子所致,而 HBV 的其他启动子,并不具有这种细胞特异性[16-18]。本研究采用了一种表征核心启动子活性的简便方式,即由核心启动子驱动表达的 Gaussia 荧光素酶,其灵敏度很高[19],且能分泌到细胞培养上清。这为检测带来巨大便利:无需裂解细胞,而仅需取少量培养上清直接检测即可。此外,本研究构建的核心启动子驱动的 Gaussia 荧光素酶稳定表达细胞系,由于无需转染步骤,因而使得筛选过程更加稳定便捷,便于实现化合物的高通量筛选。当然,由于 Gaussia 的最终表达,不但与转录相关,也涉及转录后的诸多步骤如翻译等。因此,本细胞模型仅适合作为一种初步筛选工具,筛选所得的分子是否通过抑制转录环节起作用,还需要其他实验进一步鉴定。但 HBV 某些病毒成分的减少(如 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 等)至少可以在很大程度上由转录被抑制来解释。

利用本筛选模型以及多轮鉴定,从 1 450 种化合物中筛选到两种化合物 Reversine 和 SCH58261。后者虽然在 HepG2-Pcore-Gluc 细胞中表现出良好的效应,但并不能在 HepG2.2.15 细胞中抑制 HBV DNA 的复制,提示前两轮筛选的确存在假阳性情况,筛选所得化合物最终需要在 HBV 复制细胞系上进行确认。Reversine 是一种 Aurora 激酶抑制剂,已经被证明是一种有效的抗肿瘤药物,主要通过诱导细胞凋亡、细胞周期阻滞和自噬来发挥抗癌作用[20-23]。在 HepG2.2.15 细胞和瞬时转染 HBV 1.3 倍体的 HepG2 细胞模型中,Reversine 能有效抑制 HBV DNA 的复制。在 HepG2 瞬时转染模型中,其 IC_{50} = 0.24 μmol/L,同时表现出较好的选择性(SI=210),好于最近 KARKERI 等[24]报道的 SRI32007(SI=7.2)。进一步研究显示:Reversine 能抑制 HBV pgRNA 的转录,提示其作用途径可能是影响了核心启动子的转录活性。本研究还发现:该化合物对另外两种病毒来源的启动子(Pcmv、Psv40)也具有抑制作用,但在同样的作用浓度下对细胞内 β-Actin、GAPDH 蛋白表达没有影响,提示该化合物的作用似乎存在一定的特异性,同时,Reversine 是否对其他病毒的启动子也有抑制作用值得进一步研究。

核心启动子的截短突变体实验显示:Reversine 对完整的核心启动子(含 Enh Ⅰ、Enh Ⅱ 和 BCP)和截短的(含有 Enh Ⅰ 和 BCP 或 Enh Ⅱ 和 BCP 或只有 BCP)核心启动子均具有相似的抑制效果,提示其起作用的部位应是这些表达载体共有的部分,即 BCP。BCP 包含多个核受体超家族转录因子的结合位点,包括 HNF4、PPARα-RXRα 异质二聚体,以及 C/EBP 等一系列转录因子,共同调控 preCRNA 和 pgRNA 的转录,对 HBV 的复制和致病性影响深远[15]。基于此,我们筛选了 21 种核受体超家族转录因子,结果显示:

Reversine 能将肝癌细胞内 NR1C2(或 PPARβ/δ,过氧化物酶体增殖物激活受体 β)的 mRNA 水平下调 50%。过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)属于核激素受体超家族,它是由配体激活的转录因子组成,在调节脂肪酸摄取和氧化、脂质和碳水化合物代谢、炎症等相关过程中发挥重要作用[25]。有研究报道 PPARs 和 RXRs 形成异源二聚体,可提高 Enh I/X 启动子的活性,从而进一步地激活病毒核心启动子的转录[26]。因此,Reversine 抑制核心启动子转录的效应是否是通过抑制 PPARβ 的表达来实现以及 Reversine 是如何下调 PPARβ 的表达,还有待进一步研究。有趣的是,Reversine 同时也能抑制 HBeAg 和 HBsAg 的水平,提示该药物对驱动这两种抗原表达的启动子可能也有抑制作用。有报道显示 HBsAg 可能是导致慢性乙型肝炎患者免疫应答的原因之一[27]。因此,Reversine 抑制 HBsAg 表达的作用,是否有助于缓解或逆转机体的免疫耐受也值得关注。

参考文献:

[1] ARENDS J E, LIEVELD F I, AHMAD S, *et al*. New viral and immunological targets for hepatitis B treatment and cure: a review[J]. Infect Dis Ther, 2017, 6(4): 461-476. DOI: 10.1007/s40121-017-0173-y.

[2] MARTINEZ M G, VILLERET F, TESTONI B, *et al*. Can we cure hepatitis B virus with novel direct-acting antivirals? [J]. Liver Int, 2020, 40(17): 27-34. DOI:10.1111/liv.14364.

[3] TERRAULT N A, LOK A S F, MCMAHON B J, *et al*. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance [J]. Hepatology, 2018, 67(4): 1560-1599. DOI: 10.1002/hep.29800.

[4] CHENG Z, ZHI X, SUN G, *et al*. Sodium selenite suppresses hepatitis B virus transcription and replication in human hepatoma cell lines[J]. J Med Virol, 2016, 88(4): 653-663. DOI:10.1002/jmv.24366.

[5] KÖSE Ş, TATLI KIŞ T, ATALAY S. Efficacy of tenofovir and entecavir in patients who relapsed after pegylated interferon therapy[J]. J Chemother, 2019, 31(4): 209-213. DOI:10.1080/1120009x.2019.1597420.

[6] ANDERSON R T, LIM S G, MISHRA P, *et al*. Challenges, considerations, and principles to guide trials of combination therapies for chronic hepatitis B virus[J]. Gastroenterology, 2019, 156(3): 529-533 e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.11.062.

[7] SUNG J J, WONG M L, BOWDEN S, *et al*. Intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy [J]. Gastroenterology, 2005, 128(7): 1890-1897. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.03.009.

[8] WERLE-LAPOSTOLLE B, BOWDEN S, LOCARNINI S, *et al*. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy[J]. Gastroenterology, 2004, 126(7): 1750-1758. DOI: 10.1053/j.gastro.2004.03.018.

[9] WEI Z Q, ZHANG Y H, KE C Z, *et al*. Curcumin inhibits hepatitis B virus infection by down-regulating cccDNA-bound histone acetylation[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(34): 6252-6260. DOI:10.3748/wjg.v23.i34.6252.

[10] DENG J J, KONG K E, GAO W W, *et al*. Interplay between SIRT1 and hepatitis B virus X protein in the activation of viral transcription[J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2017, 1860(4): 491-501. DOI:10.1016/j.bbagrm.2017.02.007.

[11] ZHANG Y, LOU C, XU Y, *et al*. Screening of inhibitors against histone demethylation jumonji domain-containing protein 3 by capillary electrophoresis[J]. J Chromatogr A, 2020, 1613: 460625. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.460625.

[12] NASSAL M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B[J]. Gut, 2015, 64(12): 1972-1984. DOI:10.1136/gutjnl-2015-309809.

[13] SANJANA N E, SHALEM O, ZHANG F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening[J]. Nat Methods, 2014, 11(8): 783-784. DOI:10.1038/nmeth.3047.

[14] WEI X F, GAN C Y, CUI J, *et al*. Identification of compounds targeting hepatitis B virus core protein dimerization through a split luciferase complementation assay [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018,62(12). DOI: 10.1128/AAC.01302-18.

[15] QUARLERI J. Core promoter: a critical region where the hepatitis B virus makes decisions [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(2): 425-435. DOI: 10.3748/wjg.v20.i2.425.

[16] KRAMVIS A, KEW M C. The core promoter of hepatitis B virus[J]. J Viral Hepat, 1999, 6(6): 415-427. DOI:10.1046/j.1365-2893.1999.00189.x.

[17] LIU C J, KAO J H. Genetic variability of hepatitis B virus and response to antiviral therapy[J]. Antivir Ther, 2008, 13(5): 613-624.

[18] RAMIÈRE C, SCHOLTÈS C, DIAZ O, *et al*. Transactivation of the hepatitis B virus core promoter by the nuclear receptor FXRalpha[J]. J Virol, 2008, 82(21): 10832-10840. DOI:10.1128/jvi.00883-08.

[19] TANNOUS B A, KIM D E, FERNANDEZ J L, *et al*. Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo[J]. Mol Ther, 2005, 11(3): 435-443. DOI:10.1016/j.ymthe.2004.10.016.

[20] BOSCO B, DEFANT A, MESSINA A, *et al*. Synthesis of 2, 6-diamino-substituted purine derivatives and evaluation of cell cycle arrest in breast and colorectal cancer cells[J]. Molecules, 2018, 23(8): 1996. DOI: 10.3390/molecules23081996.

[21] CHENG L, WANG H, GUO K C, *et al*. Reversine, a substituted purine, exerts an inhibitive effect on human renal carcinoma cells via induction of cell apoptosis and polyploidy[J]. Oncotargets Ther, 2018, 11: 1025-1035. DOI:10.2147/OTT.S158198.

[22] LU Y C, LEE Y R, LIAO J D, *et al*. Reversine induced multinucleated cells, cell apoptosis and autophagy in human non-small cell lung cancer cells[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0158587. DOI:10.1371/journal.pone.0158587.

[23] PICCOLI M, GHIROLDI A, MONASKY M M, *et al*. Reversine: a synthetic purine with a dual activity as a cell dedifferentiating agent and a selective anticancer drug[J]. Curr Med Chem, 2020, 27(21): 3448-3462. DOI:10.2174/0929867326666190103120725.

[24] KALKERI R, PENG J Z, HUANG C S, *et al*. HBV core promoter inhibition by tubulin polymerization inhibitor (SRI-32007)[J]. Adv Virol, 2020, 2020: 8844061. DOI:10.1155/2020/8844061.

[25] WAHLI W, MICHALIK L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation[J]. Trends Endocrinol Metab, 2012, 23(7): 351-363. DOI: 10.1016/j.tem.2012.05.001.

[26] TURTON K L, MEIER-STEPHENSON V, BADMALIA M D, *et al*. Host transcription factors in hepatitis B virus RNA synthesis[J]. Viruses, 2020, 12(2):160. DOI: 10.3390/v12020160.

[27] GEHRING A J, PROTZER U. Targeting innate and adaptive immune responses to cure chronic HBV infection[J]. Gastroenterology, 2019, 156(2): 325-337. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.10.032.

(**收稿**:2021-01-04;**修回**:2021-03-24)

(编辑 邓强庭)

·书讯·

由巫北海教授总主编的专门研究和讨论误诊的《当代医学影像误诊学》将于2021年10月由天津科学技术出版社正式出版,书号为ISBN 978-7-5576-9449-4。

作为《活体形态学》的姐妹篇,《当代医学影像误诊学》全书约800万字,图文并茂,与《活体形态学》一样,也分为六卷:第一卷(颅脑脊髓),第二卷(面颈和多系统多部位疾病),第三卷(胸心),第四卷(腹盆上),第五卷(腹盆下),第六卷(肌骨和脊柱)。本书适用于临床医学影像诊断各科医务工作者、临床各科医生、各类医学院校师生阅读,有利于扩大知识面,增加信息量,是有关临床医学影像诊断继续教育较好的参考资料。本书由新华书店发行,在京东、当当和淘宝网上可网购。