基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0046-02

人 MxA 基因重组真核载体抗乙型肝炎病毒作用的实验室研究

黄 琴[1],彭明利[2],赵瑞秋[1],刘爱平[1],任 红[2],许红梅[1]

(1.重庆医科大学儿童医院传染科,重庆 400014;2.重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室、重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究重组真核载体 PcDNA3.1-MxA 体外抗 HBV 的作用,为研究 MxA 基因(myxovirus-resistant A)治疗慢性 HBV 感染奠定基础。方法:将构建成功的重组真核载体 PcDNA3.1-MxA 转染入 HepG 2.2.15。将 HepG 2.2.15 分为实验组(转染 PcDNA3.1-MxA 的 HepG 2.2.15)和对照组(转染 PcDNA3.1 的 HepG 2.2.15),应用 RT-PCR 方法检测两组 HepG2.2.15 内 MxA mRNA($P<0.01$),并应用 ELISA 法检测两组 HepG2.2.15 内 HBsAg、HBeAg 的水平。结果:RT-PCR 扩增结果显示实验组的 MxA mRNA 水平均较对照组明显升高,实验组 HBsAg、HBeAg 水平明显低于对照组(均 $P<0.01$)。结论:转染重组真核载体 PcDNA3.1-MxA HepG 2.2.15 内 MxA 蛋白明显抑制了 HBV DNA 的复制及表达,为进一步研究 MxA 蛋白体内抗病毒作用提供理论。

【关键词】PcDNA3.1-MxA,HepG 2.2.15,HBV 复制及表达

【中国图书分类法分类号】R512.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-01

Experimental study of antiviral effects of recombinant eukaryotic plasmid PcDNA3.1-MxA on Hepatitis B virus

HUANG Qin, et al

(*Department of Infectious Disease and Gastroenterology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the anti-HBV effects of the recombinant eukaryotic plasmid PcDNA3.1-MxA in HepG 2.2.15 cells in vitro. *Methods*: The recombinant eukaryotic plasmid PcDNA3.1-MxA was transfected into HepG 2.2.15 cells with Lipofection after extracted and confirmed with restrictive endonuclease analysis. The control group was HepG2.2.15 cells transfected with PcDNA3.1. The levels of MxA mRNA were detected by RT-PCR and the titers of HBsAg and HBeAg in supernatant liquids were detected by ELISA. *Results*: The RT-PCR results showed the level of MxA mRNA in the treatment group was much higher than that in the control group. The titers of HBsAg and HBeAg in supernatant liquid of the treatment group were significantly lower than those in the control group cells($P<0.01$). *Conclusion*: The study indicates that MxA protein can inhibit replication and expression of HBV.

【Key words】PcDNA3.1-MxA; HepG 2.2.15; Replication and expression of HBV

MxA 基因即抗粘液病毒基因,其编码的蛋白为 MxA 蛋白,对于大多数病毒均具有抗病毒活性。为了探讨该基因在人含有 HBV 全基因组的肝癌细胞(即 HepG 2.2.15)中的表达以及抗病毒作用,并为进一步研究 MxA 蛋白体内抗病毒提供理论和实验基础,本研究将已成功构建 PcDNA3.1-MxA[1] 转染 HepG 2.2.15,使用 RT-PCR 和 ELISA 方法检测 MxA 蛋白对于 HBV 的抗病毒作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

HepG2.2.15 由重庆医科大学病毒性肝炎研究所保存,DMEM/F12(1:1)培养基,胰蛋白酶,Hepes 购于美国 Gibco 公司,Lipofectamine ™2000,Trizol 试剂购于美国 Invitrogen 公司,胎牛血清购于美国 PAA 公司,RNA-PCR 逆转录试剂盒,高保真 Pyrobest DNA 合成酶,限制性内切酶 Not I、Xba I,DNA Marker(DL15000)均购于 TaKaRa 公司,HBsAg、HBeAg ELISA 检测试剂盒购于雅培公司,MxA 基因引物,β-actin 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 PcDNA3.1-MxA 转染 HepG2.2.15 将 HepG2.2.15 按 2×10^5 个细胞接种于 6 孔培养板,采用 DMEM/F12 培养基(10%FCS,G418 200 μg/ml)培养 24 h,利用 Lipofectamine ™2000 将已成功构建的重组真核载体 PcDNA3.1-MxA 转染 HepG2.2.15,对照组为转染质粒 PcDNA3.1 的 HepG2.2.15(方法严格按说明书进行),均设 3 个复孔。待 2 组细胞培养72 h,收集细胞及上清液。

1.2.2 转染细胞上清液 HBsAg 和 HBeAg 的检测 使用 ELISA 试剂盒检测细胞上清液中 HBsAg、HBeAg 水平。

作者介绍:黄 琴(1981-),女,硕士,研究方向:乙型肝炎的基因治疗。

通讯作者:许红梅,女,主任医师,E-mail:xuhongmwpx@yahoo.com。

1.2.3 转染细胞内 MxA mRNA 的检测 提取收获细胞总 RNA，RT-PCR 扩增细胞中的 MxA mRNA。内参照基因为 β-肌动蛋白（β-actin），产物大小为 475 bp，引物序列如下：

上游：5'-CTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGC-3'

下游：5'-TTTACACGAAAGCAATGCTATCACC-3'

MxA 引物序列如下：

F：5'-CGCGGCCGCATGGTTGTTTCCGAAGTGGAC-3'

R：5'-GTCTAGATTAGTTAACCGGGGAACTGGGCAAG-3'

RT 及 PCR 体系均严格按照说明书（TaKaRa）比例加入，RT 反应条件：42℃ 60 min，99℃ 5 min，5℃ 5 min。PCR 热循环条件为：94℃变性 5 min；94℃30 s，55℃30 s，72℃ 2 min，共 35 个循环；72℃再延伸 7 min，并以等量灭菌水为模板作为阴性对照。取 5 μl RT-PCR 产物以 1%琼脂糖凝胶电泳检测，采用 QUANTITYONE 软件对条带进行半定量分析。

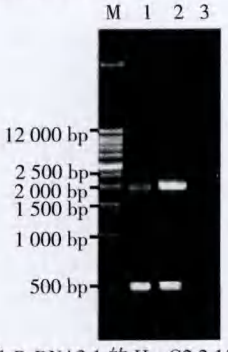
1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 11.5 统计软件包进行分析，各组数据为均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$），组与组间数据应用两独立样本比较的 t 检验方法进行分析。

2 结 果

2.1 HepG2.2.15 中 MxA mRNA 的检测

取 RT-PCR 产物 5 μl 进行 1%琼脂糖凝胶电泳，结果显示：在相同亮度 β-action 蛋白背景下，含 PcDNA3.1-MxA 的 HepG2.2.15 的 RT-PCR 产物亮度明显高于对照组，而阴性对照（纯水）则无条带出现，提示 HepG2.2.15 经转染 PcDNA3.1-MxA 后胞内 MxA mRNA 水平明显升高（如图 1）。电泳结果用 QUANTITYONE 软件进行半定量分析，以 beta-actin 为内对照吸光度扫描进行半定量分析显示，相对吸光度值试验组为 0.98 ± 0.10；对照组为 0.33 ± 0.12；试验组明显高于空质粒对照组（t=8.45，P<0.01）。



1. 为转染 PcDNA3.1 的 HepG2.2.15；2. 为转染 PcDNA3.1-MxA 的 HepG2.2.15；3. 为纯水的阴性对照

图 1 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

表 1 转染 PcDNA3.1-MxA 的 HepG 2.2.15 上清液中 HBsAg、HBeAg 水平（ELISA 法）

细胞分组	HBsAg(S/N)	HBeAg(S/CO)
对照组	11.54 ± 0.35	31.72 ± 1.23
实验组	9.38 ± 0.53	24.68 ± 2.09
t 值	5.919	5.024
P 值	0.004	0.007

2.2 HepG2.2.15 中 HBsAg 和 HBeAg 的检测

表 1 结果表明：与对照组 HepG2.2.15 相比，表达 PcDNA 3.1-MxA 的 HepG2.2.15 上清液中所含 HBsAg、HBeAg 有明显下降，并且均具有明显的统计学意义（P<0.01）。

3 讨 论

1964 年 Lindenmann 在实验中发现 A2G 小鼠比其他小鼠更能耐受高剂量流感病毒感染，提示其对这种病毒有天然抵抗力，深入了解得知：A2G 小鼠这种特性是由其 16 号染色体单一显性等位基因遗传获得的，因其可抗流感病毒（属于正粘液病毒科）故称为 myxovirus-resistant（Mx）基因，即抗粘液病毒基因。在人类 Mx 基因定位于 21 号染色体长臂上，编码两种蛋白即 A 型和 B 型，其中仅 A 型即 MxA 具有抗病毒活性。

MxA 蛋白是由 IFN-α/β 诱导产生的、分子量为 75KD 的胞浆内蛋白。当 IFN-α 与感染细胞表面相应受体结合，诱导细胞产生具有抗病毒作用的效应蛋白之一，是继 2,5-寡腺苷酸合成酶和蛋白激酶等两种 IFN-α 效应蛋白之后发现的新型抗病毒蛋白，也是其中作用最强的一种。其是由一个 GTP 结合区域和多个 C-末端效应器结构域组成，有两种构型，一种是非活性的 GDP 结合形式，另一种是活性的 GTP 结合形式，两种构型可相互转化。当 GDP 形式的 MxA 蛋白与病毒的壳核蛋白（Nucleocapsid Protein，NP）结合后其构象发生改变，成为 GTP 结合形式而活化发挥抗病毒作用，公认的机制为活化的 MxA 水解病毒的 NP，释放出的病毒核酸被细胞质内的内切酶降解，水解作用后的 MxA 又转化为 GDP 结合形式[2]。除此之外，其还通过其他机制发挥抗病毒活性，目前的研究主要集中在负链 RNA 病毒（包括布尼亚病毒科及正粘液科病毒、副粘液科病毒）：观察显示 MxA 蛋白和这类病毒的 NP 通过相互作用而阻止病毒核壳进入核内高尔基体进行装配，阻碍病毒基因组在核内复制，影响了新病毒颗粒产生，并使之不能定位于靶部位，从而达到抗病毒作用[3-7]；除了负链 RNA 病毒外，Chieux[8]实验证明其抗病毒活性已经扩大到了柯萨奇（CVB4）等正链 RNA 病毒，原位杂交和逆转录 PCR 结果提示在病毒进入转染了 MxA 的 Vero（Vero/MxA）细胞后，CVB4 在其复制早期就受到抑制，但具体作用机制仍不明确。

Gordien E 等人的体外试验发现在表达 MxA 蛋白的 HuH_7 细胞株被转染入 HBV 后，HBV DNA 复制的中间产物（负链 DNA）几乎全部消失，细胞质中 HBV 前基因组 RNA 减少了 2~4 倍，提示 MxA 在转录后水平抑制了 HBV 的复制[9]；Peltekian 对转基因鼠的体内试验也证实了这一点[10]。而 Fernandez M[11] 等人研究发现：慢性乙型肝炎病毒感染者机体对于 IFN 反应是受损的，由 IFN-α/β 诱导产生的 MxA 蛋白受到了明显抑制。这些均提示使用 MxA 基因表达产生的抗病毒蛋白（MxA 蛋白）对于病毒性疾病，尤其是 HBV 具有广阔的治疗前景。

HBsAg 是 HBV 的外壳蛋白，其输出与病毒的复制呈正相关，是 HBV 感染标志之一。HBeAg 是 HBV 核壳的一种主

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0048-03

高强度聚焦超声建立骨骼肌失神经萎缩动物模型的研究

徐 鹏,王 涛,冯 露,王 茜,胡文煦
(重庆医科大学附属口腔医院口腔颌面外科,重庆 400015)

【摘 要】目的:利用高强度聚焦超声(High intensity focused ultrasound,HIFU)设计及建立骨骼肌失神经萎缩动物模型。方法:实验兔共计 12 只,利用 HIFU 损伤实验动物一侧坐骨神经,与另一侧比较。1 周,2 周和 4 周后观察坐骨神经组织病理学改变及腓肠肌和比目鱼肌萎缩变化,并综合评价。结果:所有实验动物辐照侧均发生神经损伤症状,各辐照侧坐骨神经发生变性,腓肠肌和比目鱼肌与对照侧比较均萎缩。结论:利用 HIFU 建立骨骼肌失神经萎缩动物模型的方法可行、有效。

【关键词】高强度聚焦超声;失神经萎缩;动物模型;神经损伤
【中国图书分类法分类号】R454.3;Q95-33 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-25

Experimental study on the establishment of skeletal muscle denervated atrophy models by high intensity focused ultrasound

XU Peng, et al
(*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: The aim of this study was to evaluate the possibility and the safety to make use of image -guided high-intensity focused ultrasound (HIFU) to establish the skeletal muscle denervated atrophy models. *Methods*: One of sciatic nerves of 12 rabbits was treated by HIFU, under the guidance of ultrasound imaging. The other side was control group. The observation time was 1 week, 2 weeks and 4 weeks after HIFU treatment. The thickness?of soleus muscle was measured by B-mode ultrasonography. The weight of gastrocnemius muscles and soleus muscle was measured. Histological analysis of gastrocnemius muscles and nerve sections at the HIFU site were performed. *Results*: All the rabbits had taken place in the obvious symptoms of claudication. The soleus muscle and gastrocnemius muscle from the treated group were atrophy. The

作者介绍:徐 鹏(1982-),男,硕士,
研究方向:口腔颌面部整形。
通讯作者:王 涛,男,教授,E-mail:dtaosan@sina.com。

要结构蛋白,其存在与 HBV DNA 含量有明显的关系,是病毒复制的重要标志。因此将二者作为观察 HBV 表达复制的重要观察指标。

本实验将构建成功的重组真核载体 PcDNA3.1-MxA 通过脂质体法转染入 HepG2.2.15 中,RT-PCR 法测定 HepG2.2.15 中 MxA mRNA 水平以及 ELISA 法测定其对 HBsAg、HBeAg 抑制效率。结果显示:MxA 基因在转染后细胞内表达升高并且明显抑制了 HBV DNA 复制及表达,提示 MxA 蛋白具有明显的抗 HBV 作用,为进一步研究 MxA 蛋白体内抗 HBV 作用奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 黄 琴,赵瑞秋,刘爱平,等. 人 MxA 基因重组真核载体的构建及鉴定[J]. 重庆医科大学学报,2008,33(2):152-154.

[2] Haller O,Kochs G. Interferon-induced Mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity [J]. Traffic,2002,3(10): 710-714.

[3] Hefti HP,Frese M,Landis H,et al. Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against La crosse virus and other lethal viral infections [J]. J Virol,1999,73(8): 6984-6991.

[4] Reichelt M,Stertz S,Spiegel M,et al. Missorting of La Crosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes [J]. Traffic,2004,5(10): 772-784.

[5] Turan K,Mibayashi M,Sugiyama K,et al. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome [J]. Nucleic Acids Res,2004,32(2): 643-652.

[6] Haller O,Kochs G. Interferon-induced Mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity [J]. Traffic,2002,3(10): 710-714.

[7] Ogata S,Ogata A,Schneider-Schaulies S,et al. Expression of the interferon-alpha/beta-inducible MxA protein in brain lesions of subacute sclerosing panencephalitis [J]. J Neurol Sci,2004,223(2):113-119.

[8] Chieux V,Chehadeh W,Hautecoeur P,et al. Inhibition of coxsackievirus B4 replication in stably transfected cells expressing human MxA protein [J]. Virology,2001,283(1): 84-92.

[9] Gordien E,Rosmorduc O,Peltekian C,et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein[J]. J Virol,2001,75(6): 2684-2691.

[10] Peltekian C,Gordien E,Garreau F,et al. Human MxA protein participates to the interferon-related inhibition of hepatitis B virus replication in female transgenic mice [J]. J Hepatol,2005,43(6):965-972.

[11] Fernandez M,Quiroga JA,CarrenoV. Hepatitis B virus downregulates the human interferon-inducible MxA promoter through direct interaction of precore/core proteins [J]. J Gen Virol,2003,84(8): 2073-2082.

(责任编辑:关蕴良)