维普资讯 http://www.cqvip.com

临床研究 文章编号:0253-3626(2007)06-0568-03

HBx 基因重组逆转录病毒载体的构建及表达

吴明军[1,2],毕 杨[1,2],黄佳祎[1,2],赵迎泽[1,2],何通川[3],冯 涛[2]

(1.重庆医科大学基础医学研究所,重庆 400016;2.重庆医科大学生物化学与分子生学教研室,重庆 400016;
3.美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室)

【摘 要】目的:构建携带 HBx 基因的重组逆转录病毒载体,为进一步研究 HBx 基因在 HBV 相关性 HCC(原发性肝癌)发病机制中的作用以及建立肝癌动物模型奠定基础。方法:根据基因库中已公布的 HBx 序列设计引物,采用 PCR 技术从 HBx 腺病毒质粒中扩增出 HBx 基因。将 HBx 基因克隆到逆转录病毒载体 pSEB-HUS 质粒中。酶切、PCR 及测序鉴定后经脂质体介导转染 L02 细胞,Western Blotting 检测 HBx 蛋白的表达。结果:PCR、酶切及测序鉴定证实目的基因正确克隆至逆转录病毒质粒 pSEB-HUS 中,目的基因序列与 GENE BANK 报道一致,转染 L02 细胞后荧光显微镜可观察到 GFP 的表达。Western Blotting 检测可见 HBx 蛋白的表达。结论:成功构建 HBx 重组逆转录病毒载体。

【关键词】HBx 基因;逆转录病毒载体;PCR;Western Blotting

【中国图书分类法分类号】Q781;R512.6+2 **【文献标识码】**A **【收稿日期】**2006-11-29

Construction and expression of Retroviral Vector containing HBx gene

WU Mingjun, et al

(*Institution for Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the retroviral vector containing HBx gene so as to investigate the effects of HBx gene in the pathogenesis of HBV-dependent hepatic cell carcinoma (HCC) and further construct animal models of hepatic cell carcinoma. *Methods*: HBx gene was amplified from the HBx adenovirus Plasmid by polymerase chain reaction (PCR) technique whose primer was designed according to the announced sequences of HBx gene in gene bank, then cut by two endonucleases and directionally cloned into the pseb-hus vector and analyzed by gene sequencing analyzer, the correct constructed vectors were transfected into L02 cell line. At last, HBx protein was detected by Western Blotting. *Results*: Through PCR, endonuclease cutting and gene sequencing, the target gene was verified into be correctly cloned to retroviral plasmid pSEB-HUS and the high expression of green fluorescence protein (GFP) in L02 cell line was observed under fluorescent microscope. The expression of HBx protein was also observed by Western Blotting. *Conclusion*: Recombinant retroviral vector expressing HBx protein was successfully constructed.

【Key words】HBx gene; Retroviral Vector; PCR; Western Blotting

HBV 的慢性感染与原发性肝细胞癌的发生存在密切关系。据卫生部最新流行病学调查显示,中国是世界乙肝大国,高达 10%的人群病毒携带率。全球 HCC 病例的 60%,HBV 流行地区该病例的 70%被认为是由 HBV 引起[1]。HBV 全部基因组序列都是蛋白质编码区,分别编码核心蛋白、S 蛋白、前 S1 蛋白和前 S2 蛋白以及 X 蛋白(HBx)。HBx 可以通过激活一些信号转导通路导致肝癌的发生,如 Ras、MAPK、PI13K-Akt、DAG-PKC、Src、JAK/STAT、Wnt/β-catenin 等信号通路[2-4]。因此,有必要进一步研究 HBx 对病毒自身的复制与增殖以及宿主细胞中基因的表达与调控、细胞的凋亡与癌变等过程的机制[5]。

本研究采用逆转录病毒载体系统,成功构建携带 HBx 基因的重组逆转录病毒载体,为进一步在体内外研究 HBx 基因功能、建立肝癌动物模型、阐明 HBV X 蛋白在导致 HCC(原发性肝癌)发病机理中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

HBx 腺病毒质粒由重庆医科大学生物化学与分子生物

作者介绍:吴明军(1975-),男,硕士研究生,
主要研究方向:肿瘤基因治疗研究。

基金项目:国家自然科学基金资助课题(NO30371274)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

学教研室冯涛教授构建[6]；HBx 基因的重组逆转录病毒 pSEB-HUS 质粒载体由美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室何通川教授提供；大肠杆菌 Top10 及细胞株 L02 均为本实验室保存；限制性内切酶 Sal I 和 Xho I 及 T4DNA 连接酶和 DNA marker 均购自 TaKaRa 公司；蛋白质 marker 购自晶美生物有限公司；PCR 引物合成由上海英俊生物技术公司完成；基因测序由省部共建国家感染性疾病分子生物学教育部重点实验室完成；Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。

1.2 仪器

垂直电泳槽及转膜仪，DYY-11 型电泳仪，紫外分光光度计，高速冷冻离心机，荧光倒置显微镜等。

1.3 实验方法

1.3.1 获取目的基因 以 HBx 腺病毒质粒为模板，PCR 扩增获得目的基因片段。PCR 反应条件：94℃预变性 5min；94℃变性 20s，64℃退火 20s，72℃延伸 40s，25cycles；72℃ 2min 延伸，2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。引物设计如下：

正向引物：5'ATA GTCGAC ATGGCTGCTAGGCTGT-GCT 3'

反向引物：5'ATG CTCGAG TTAGGCAGAGGGGAAA AAGT 3'

1.3.2 构建 pSEB-HUS 逆转录病毒质粒 PCR 产物纯化后经 Sal I 和 Xho I 双酶切（40μl 体系：Xho I：2μl，sal I：2μl，10×H buffer：4μl，DNA：4μg），再次纯化后定向连接到同样经 Xho I 和 Sal I 双酶切处理的 pSEB-HUS 逆转录病毒质粒（20μl 连接体系：T4DNA 连接酶：1μl，10×H buffer：2μl，PCR 产物：质粒 =10：1）。连接产物 10μl 转化感受态大肠杆菌 Top10，氨苄青霉素抗性平板筛选，挑取最小阳性单克隆，LB 培养基 37℃，200r/min 过夜培养，质粒小抽试剂盒抽提质粒，1.0%琼脂糖凝胶电泳初步鉴定并检测浓度；经 PCR 和 Sal I，Xho I 双酶切（引物及条件同前）鉴定确证后送省部共建国家感染性疾病分子生物学教育部重点实验室测序，获得 HBx 重组逆转录病毒质粒。

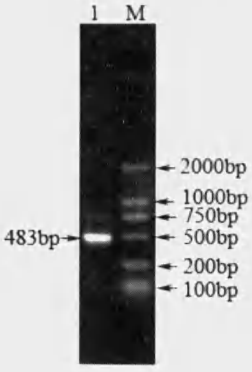
1.3.3 pSEB-HUS 重组逆转录病毒质粒在 L02 细胞中表达 将 1×10^6 L02 细胞接种至 6 孔培养板中，用含 15%小牛血清的 1640 培养液培养 24h，待细胞的融合度约为 60%~70%时转染。用 pSEB-HUS 重组逆转录病毒质粒、Lipofectamine 2000 各 10μl 加培养液 250μl，室温孵育 5min，混合再孵育 20min，转染 L02 细胞，4~6h 后更换新鲜培养液，24h 后倒置荧光显微镜下观察 GFP 的表达，继续培养 1 天，荧光数量不再增加时离心收集细胞，提取蛋白质，Western Blotting 检测 HBx 蛋白的表达。

2 结 果

2.1 目的基因的获取

以 HBx 腺病毒质粒为模板做 PCR 扩增，1.0%琼脂糖凝胶电泳可见一条约 480bp 左右的特异性电泳条带（图 1）。

2.2 重组逆转录病毒质粒的鉴定



1：DNA MARKER DL2000；2：PCR 产物

图 1 利用 HBx 腺病毒质粒作 PCR 的电泳图

挑取重组的 pSEB-HUS 逆转录病毒质粒能在氨苄青霉素抗性平板上长出的菌落，进行筛选，摇阳性菌提取质粒，经 Sal I 和 Xho I 双酶切，1.0%琼脂糖凝胶电泳可见约 7.0kb 左右的和 480bp 左右两条带，以此质粒为模板的 PCR 产物为一大小约 480bp 左右的片断；以未处理 pSEB-HUS 逆转录病毒质粒为对照，经 Sal I 和 Xho I 双酶切比较：酶切后出现一条 7.0kb 左右的条带。重组逆转录病毒质粒由省部共建国家感染性疾病分子生物学教育部重点实验室测序，目的基因序列与 GENEBANK 报道一致，表明重组逆转录病毒质粒构建成功（图 2）。

2.3 pSEB-HUS 重组逆转录病毒质粒在 L02 细胞中表达

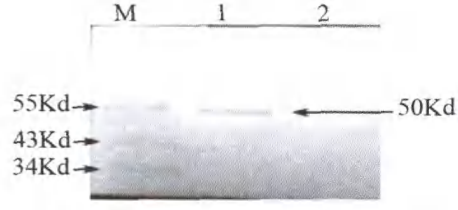


M_1：DL2000 MARKER；1：重组 PSEB-HUS 质粒 PCR 产物；M_2：λHIND III DNA MARKER；2：双酶切重组质粒的条带；3：重组 PSEB-HUS 质粒

图 2 重组 PSEB-HUS 质粒的鉴定

维普资讯 http://www.cqvip.com

pSEB-HUS 重组逆转录质粒，Lipofectamine 2000 各 10μl 转染 L02 细胞，24h 后 GFP 大量表达（图 3）。继续培养 1 天，提取蛋白质，Western Blotting 检测到 HBx 与 GFP 融合蛋白的表达（图 4）。



1:PROTEIN MARKER;2:HBx PROTEIN;3:空白对照

图 3 重组质粒 pSEB-HBx 转染 L02 细胞 Western blotting 检测 HBx 蛋白在 L02 细胞中表达



图 4 重组质粒 PSEB-HBx 转染 L02 细胞 24h后的照片(200×)

TAGCCGCCGGGATCCTCTCGGCATGGACGAGCTGTACTAAT
CGATTTAATTAAAGATCTAGGCCTGTCGACATGGCTGCTAG
GCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTT
TACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCTGCGGACGACCCTTCT
CGGGGTCGCTTGGGACTCTCTCGTCCCCTTCTCCGTCTG
CCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGG
ACTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTG
TGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTCGCATGGAGACCAC
CGTGAACGCCCACCAAATATTGCCCAAGGTCTTACATAAGA
GGACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTT
GAGGCATACTTCAAAGACTGTTTGTTTAAAGACTGGGA
GGAGTTGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTGTACTAg
GAGGCTGTAgGCATAAATTGGTCTGCGCACCAGCACCATGC
AACTTTTTCCCcTCTGCcTAACTCGAGAAGCTTTACGTAA
CGCGTTTaAtTaACGATAAATAAAAGATTTtAaTTtAGTCT
CCAGAAAAGGGGGATGAAAGACCCACTGTAAGTTTGCC
AGCTAGCTAGTACGCCATTGCAGCATGAAATACATACTG
AAATAAGAAGTCGATCAGTAGAACAGAGACCCAATTG
CCAAAGAATTTGGTAAATTCGCCCGCCAGCAAAAAATG
TCAATGGTCCCCCCTCCGTTCAGAACCAAAGTTCCAGTCA
GGCAGGAGCTGCTATGAAAACAATCTCTCCTTTGGCGGT

图 5 重组质粒 pSEB-HUS-HBx 测序结果，EGFP-07-005，ABI3100 测序仪

3 讨 论

HBx 在 HCC 的形成中起主导作用，HBx 具有多种调控功能，激活宿主细胞和病毒自身基因的转录、调控凋亡、抑制细胞中受损 DNA 的外切修复反应以及激活细胞中信号转导通路。转基因鼠实验也已证实，HBx 的表达①能干扰肝细胞的生长，增加肝癌发生率。②缩短 HCC 发生的潜伏期。而且人群调查还发现，85%HCC 患者的肝组织中含有特异性的 HBx 蛋白[7]。这充分说明 HBx 在 HBV 相关性HCC 的发生中起重要作用[8-10]。HBx 基因成为目前大家关注的焦点。本研究之所以选用逆转录病毒表达系统，因为逆转录病毒 DNA 能整合于宿主基因组内，长时间稳定表达外源基因，只感染有丝分裂细胞，在体内不会引起免疫反应；而腺病毒表达系统则不同，短时间瞬时表达外源基因，感染分裂细胞和不分裂细胞，在体内会引起免疫反应。本研究使用的 pSEB-HUS 逆转录病毒质粒上还带有独立、完整的 eGFP 表达系统，以 eGFP 作为示踪标记，使重组逆转录病毒的包装、转染的状况可以直接观察，简便操作，适用于细胞内蛋白质的定位及转运研究[11,12]；利用该系统，我们已经初步把 HBx 转染到 L02 细胞，通过观察带 GFP 的融合蛋白表达，以及通过 Western blot 分析，已经得到了 HBx 表达的阳性结果，为该研究的完成和 pSEB-HUS 重组逆转录病毒包装、转染以及筛选基因稳定转染细胞系和肝癌动物模型的建立奠定了重要基础。

（通讯作者：冯 涛，男，博士生导师，主要研究方向：肿瘤发生机制及基因治疗。）

参 考 文 献

[1] Stuver SO. Towards global control of liver cancer[J].Semin Cancer Biol,1998;8(4):299-306.

[2] Tarn C,Lee,HU Y,et al. Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes[J].J Biol Chem, 2001;276(37):34671-34680.

[3] Lee YI,Kang-Park S,Do SI.The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade[J].J Biol Chem,2001;276(20):16969-16977.

[4] Man-Young Cha,Chang-Myeong Kim,Young-Min Park,et al. Hepatitis B virus X protein is essential for the activation of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells[J].Hepatology,2004;39:

（下转第 587 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

效果的评定,需要测定机体的体液免疫反应和细胞免疫反应,只有这样才能全面地认识机体对结核感染的免疫应答。本研究结果表明,实验组 Ag85B-DNA/H37Ra 可以诱导小鼠产生特异性体液免疫和细胞免疫。免疫 4 周或 8 周后,小鼠血清中抗PPDIgG 水平显著高于未免疫组,且在 Ag85B -DNA/H37Ra 组和 H37Ra 组中,8 周显著高于 4 周(表 2)。这表明实验组 Ag85B -DNA/H37Ra 产生的抗体较持久,并随着时间的延长明显增高。也说明 H37Ra 单独免疫产生的抗体也较持久。而 Ag85B -DNA/BCG 组或 BCG 组的抗 PPD IgG 水平 8 周虽高于 4 周,但无显著性差异。所以,可以认为 Ag85B-DNA/H37Ra 组的组合较 Ag85B-DNA/BCG 组的组合更优越,可能与 H37Ra 比 BCG 的抗原性完整[5-6]等方面有关。

淋巴细胞增殖转化是观察细胞免疫功能的指标之一。免疫 4 周或 8 周后,本研究的实验组 Ag85B-DNA/H37Ra 的脾淋巴细胞 SI 均值超过未免疫组的两倍以上,且比单独用 H37Ra 或 BCG 皮内接种组小鼠的增殖反应较强;其与 Ag85B-DNA/BCG 组比较,在 4 周有显著性差异,而 8 周无显著性差异(见表 3)。这些结果表明,Ag85B-DNA 初次免疫后,再用 H37Ra 活菌苗加强免疫,小鼠脾淋巴细胞发生了显著的增殖转化,其结果优于 H37Ra 或 BCG 单独免疫,也略好于 Ag85B-DNA/BCG 组。

综上所述,Ag85B-DNA/H37Ra 序贯免疫策略可以诱导小鼠产生持久的高抗体水平和较强的细胞免疫应答,初步证明其免疫效果略优于 BCG,其初次免疫疫苗和加强免疫疫苗对于整个序贯免疫策略起到相辅相成的作用。Ag85B-DNA/H37Ra 组合式疫苗较 Ag85B-DNA/BCG 组合式疫苗的免疫应答稍好些,而且对于预防大多由 MTB 感染所致的 TB,H37Ra 具有 BCG 不可比拟的优越性。这些说明选用 H37Ra 来进行加强免疫更具潜力,但仍需要更全面地研究 Ag85B-DNA/H37Ra 组合式疫苗的免疫效果,从而为 TB 的防治开辟新途径。

(通讯作者:卢贤瑜,电话:68485813,E-mail:lxy0627@sina.com)

参 考 文 献

[1] 王锦彤,卢贤瑜.序贯免疫策略用于结核疫苗研究的进展[J].微生物学免疫学进展,2006;34(2):43-45.

[2] Feng CG,Palendira U,Demangel C,et al.Priming by DNA immunization augments protective efficacy of Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin against tuberculosis[J].Infect Immun,2001;69(6):4174-4176.

[3] 夏长胜,卢贤瑜,陈思静. 结核分枝杆菌 H37Ra 免疫小鼠后细菌在体内定植的研究[J].重庆医科大学学报,2005;30(4):561-563.

[4] 陶 昆,卢贤瑜. H37Ra 皮内接种对巨噬细胞的激活效应[J].中国人兽共患疾病学报,2006;22(3):232-235.

[5] Mostowy S,Cousins D, Brinkman J,et al.Genomic eletions suggest a phylogeny for the Mycobacterium tuberculsis complex[J].J Infect Dis,2002;186(1):74-80.

[6] Brosch R,Gordon SV,Marmiesse M,et al.A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex[J].Proc Natl Acad Sci USA,2002;99(6):3684-3689.

[7] 方海红.结核病疫苗新策略[J].国外医学-预防、诊断、治疗用生物制品分册,2003;26(5):207-210.

[8] 范雄林,徐志凯,李 元,等.结核分枝杆菌 Ag85B 成熟蛋白基因免疫[J].第四军医大学学报,2001;22(14):1283-1282.

[9] 范雄林,徐志凯,李 元,等.结核分枝杆菌 Ag85B 基因疫苗免疫保护作用的初步研究[J].细胞与分子免疫学杂志,2003;19(1):90-92.

(上接第 570 页)

1683-1693.

[5] OrlTle IM,Mcmurray DN,Belisel JT.Fuberculosis vaccinedevelopment:recent progress[J].Trends Microbiol,2001;9(3):115-118.

[6] 冯 涛, 何通川, 宋文鑫.HBX 基因重组腺病毒载体的构建[J].重庆医科大学学报,2004;29(3):273-275.

[7] HwangGY,LinCY,HuangLM, et al.Detection of the hepatitis B virus X protein(HBX)antigen and anti-HBX anti-HBX antibodies in case of human hepatocellular carcinoma[J].Clinical microbiology reviews,2003;41: 5598-5603.

[8] Koike k,Moriya K,Lino s,et al.High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice [J].Hepatology,1994;19(4):810-819.

[9] Slagle BL,Lee TH,Median D,et al Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus X gene[J].Mol Carcinog,1996;15(4):261-269.

[10] Terradilos O,Billet O,Renard CA,et al. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice[J].Oncogene,1997;14(4):395-404.

[11] ChalifeM,Tu Y,EuskirchenG,et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J].Science,1994;263(5148):802-805.

[12] ChalifeM.Green fluorescent protein[J].Photochem photobiol,1995;62(4):6512-6656.