维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)05-0652-03

乙肝病毒 X 基因真核表达载体 pEGFP-X 的构建及其表达

王文龙,贺兴鄂,杨 旭,蒋永芳,雷建华,孙会卿

(中南大学湘雅二医院肝病研究中心,湖南长沙 410011)

【摘 要】目的:构建 pEGFP-X 真核表达载体,观察其在肝癌细胞株中的表达。方法:从质粒 pcDNA3.1(+)-X 酶切获 HBV X 基因片段,克隆至 pEGFP-N1;用酶切、PCR 和测序鉴定 pEGFP-X 载体;用脂质体法,将重组载体(pEGFP-X)和空载体(pEGFP-N1)瞬时转染肝癌细胞细胞株 BEL-7402;分别用 RT-PCR、荧光显微镜鉴定 HBV X 和 EGFP 基因表达。结果:鉴定证实 pEGFP-X 载体构建成功;该质粒瞬时转染的 BEL-7402 有 HBV X 基因表达,并发绿色荧光。结论:构建的 pEGFP-X 真核载体能在 BEL-7402 中表达,绿色荧光蛋白示踪利于表达 HBV X 基因稳定细胞株的筛选,并为探讨 HBV X 基因在 HCC 中的致瘤机理提供实验模型奠定基础。

【关键词】乙型肝炎病毒 X 基因;加强型绿色荧光蛋白;真核表达载体;RT-PCR;Bel-7402

【中国图书分类法分类号】R512.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-05-15

Construction and expression of eukaryotic expression vector for hepatitis B virus X gene containing EGFP

WANG Wenlong, et al

(*Liver Diseases Research Department, the Second Xiangya Hospital, Central South University*)

【Abstract】*Objective*: To construct eukaryotic expression vector for hepatitis B virus X(HBV X) gene with enhanced green fluorescence protein(EGFP), and confirm its expression in hepatocellular carcinoma(HCC) cell line. *Method:* HBV X gene was cloned from pcDNA3.1 (+)-X by enzyme digestion and inserted to pEGFP-N1. The rector was confirmed by enzyme digestion, PCR assay and sequencing. Then pEGFP-X was transfected to HCC cell line Bel-7402. After transient transfection, expressions of HBV X and EGFP gene were detected by RT-PCR and fluorescence microscope respectively. *Results:* The results showed that the recombinant plasmid could express HBV X gene efficiently in Bel-7402, which showed green fluorescence. *Conclution:* The pEGFP-X was constructed and the fused HBV X-EGFP gene was expressed in Bel-7402 successfully. These facilitate the study of the effect of HBV X protein on the development of HCC.

【Key words】Hepatitis B virus X gene; EGFP; Eukaryotic expression vector; RT-PCR; Bel-7402

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)的慢性感染与原发性肝癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)的发生存在密切的关系[1]。在 HBV 四个基因编码产物中,HBV X 基因编码的小分子-X 蛋白,在 HCC 的形成中起主导作用[2-5]。EGFP(Enhancement green fluorescent protein)是绿色荧光蛋白 GFP(Green fluorescent protein)的一种突变体,能在异源组织中表达并产生荧光,作为报告分子运用于生物学研究领域[6]。我们拟构建包含 HBV X-EGFP 融合基因的真核表达载体,为进一步研究 HBV X 蛋白致 HCC 的机理提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

①质粒、菌株和细胞株 含 HBV X 基因的质粒 pcDNA3.1(+)-X 由我中心构建,保存于菌株 JM109[7]。pEGFP-N1购自 Clontech 公司。大肠杆菌 JM109、人肝癌细胞株 BEL-7402 由我中心保存。②工具酶:EcoRI、*Hind* III 为 Fermentas 产品;Taq 酶购自 Tarkara 公司。③试剂盒:高效感受态细胞制备试剂盒(上海生工公司)。质粒小提、无内毒素质粒小提试剂盒(中国 TianGen 公司)。DNA 连接试剂盒、RT 试剂盒(美国 Promega 公司)。④其他:Trizol、Lipofectamin 2000 为 Invitrogen 产品;低熔点胶(美国 Promega 公司);DNAMarker(Takara、BBI 公司);DMEM(高糖)、Ampi-

作者介绍:王文龙(1971-),男,博士,主治医师,主研方向:肝癌基因治疗。

基金项目:国家自然科学基金(No. 30371402)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

cillin为 Gibco 产品；Kanamycin 为 Armresco 产品；胎牛血清为天津灏洋产品；引物合成由上海生物工程公司完成。DNA 测序由上海英骏公司完成。

1.2 方法

1.2.1 pEGFP-N1-X 真核载体的构建　按说明书抽提质粒 pcDNA3.1（+）-X 和 pEGFP-N1，经 *Hind* III 和 EcoRI 双酶切，0.7%低熔点琼脂糖凝胶电泳，回收约 470bp HBV X 基因片段与 4.7Kb p EGFP-N1 质粒片段，用 DNA 连接试剂盒快速连接，构建重组子，称 pEGFP-X。转化感受态细胞 JM109，选取 Kanamycin 抗性克隆并用质粒提取试剂盒提取质粒；经 *Hind* III 和 EcoRI 双酶切和 HBV X-PCR，用琼脂糖凝胶电泳证实含有目的基因片段并将阳性克隆测序证实。

1.2.2 瞬时转染　人肝癌细胞株 BEL-7402 用含 10%胎牛血清的 DMEM（高糖）中，接种于 6 孔板中，50%汇合后；设 pEGFP-X、空载体 pEGFP－N1（阳性对照）及空白对照组，用 Lipofectamin 2000 对细胞作瞬时转染。具体操作按说明书进行。

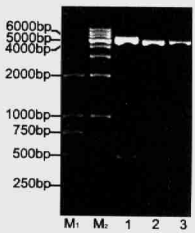
1.2.3 EGFP 表达检测　分别于瞬时转染后 24h、48h 用荧光显微镜观察转染细胞中绿色荧光蛋白表达情况。

1.2.4 RT-PCR 鉴定 HBV X 基因表达　转染 48h 后取 1×10^6 细胞用预冷 PBS 洗涤后加入 1ml 预冷的 Trizol 试剂提取总 RNA；取 2μg 总 RNA 以 AMV 逆转录酶进行逆转录。PCR 反应，以 1μg cDNA 为模版，HBV X 扩增产物为 470bp，正向引物序列为：CAG AAT TCG TGA ATA GGC AGA GG3'，反向引物序列为：5'GGAGAATTCATGATTAGGCAGAGGTG3'；同时以 β-actin 上下游引物扩增 561bp 条带为内对照，正向引物序列为：5'CACCCTGAAGTACCCCATCG 3'，反向引物序列为：5'TTG CCA ATG GTG ATG ACC TG 3'；PCR 条件为：94℃预变性 5min，94℃变性 30s，57℃退火 30s，72℃延伸 45s，循环 30 次，72℃10min 延伸，4℃5min。

2 结　果

2.1 真核表达载体的鉴定

①酶切鉴定：见图 1。

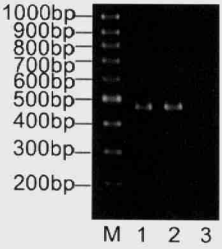


1.pCDNA3.1-X（阳性对照）　2.pEGFP-X
3.pEGFP-N1（阴性对照）

图 1　重组质粒 pEGFP-X 双酶切鉴定

提取 pEGFP-X、pcDNA3.1（+）-X(阳性对照)和 pEGFP-N1（阴性对照），用 *Hind* III 和 EcoRI 双酶切。酶切产物：pEGFP-X 一条 470bp 与 pcDNA3.1（+）-X 的 HBV X 基因片段相近；另一为 4.7kb，与 pEGFP-N1 空载体酶切片段相近，为 pEGFP-N1 质粒片段。经酶切证实 HBV X 基因插入成功。

②PCR 鉴定：见图 2。以 pEGFP-X、pcDNA3.1（+）-X 和 pEGFP-N1 质粒为模板，扩增 HBV X 基因产物，pEGFP-X 和 pcDNA3.1（+）-X 扩增出目的条带为 470bp，而 pEGFP-N1 质粒未扩增出目的条带。



1.pCDNA3.1-X（阳性对照）　2.pEGFP-X;
3. pEGFP-N1（阴性对照）

图 2　重组质粒 pEGFP-X　PCR 鉴定

③测序：见图 3。重组质粒 pEGFP-X 进行测序分析，证实 HBV X 是插入在 pEGFP-N1 质粒多克隆位点的 *Hind* III 和 EcoRI 酶切位点之间（测序编号：CS060109056. S060109-0247）；经 Blast 进同源性比对，证实成功地将 HBV X 基因正向克隆于 pEGFP-N1，命名为 pEGFP-X。

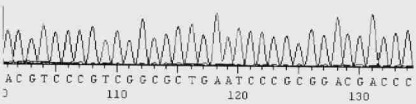


图 3　重组质粒 pEGFP-X 部分测序图

2.2 EGFP 的表达（见图 4）

瞬时转染 24h、48h，在荧光显微镜下观察，在 Bel-7402 肝癌细胞的胞浆和胞核有 EGFP 表达，发出特异性的绿色荧光。

2.3 RT-PCR 检测 HBV X 基因的表达（见图 5）

瞬时转染 48h 后 RT-PCR 检测 HBV X 在 mRNA 水平上的表达，初步证明转染 pEGFP-X 组的 Bel-7402 细胞 mRNA 水平上有 HBV X 表达。

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 4 转染重组质粒 pEGFP-X 的 Bel-7402 肝癌细胞中 EGFP 的表达



1.转 pEGFP-X 组 2.转 pEGFP-N1 组
3.空白组

图 5 重组质粒 pEGFP-X 转染 Bel-7402 后 RT-PCR 检测 HBV X 基因的表达

3 讨 论

HBV-X 基因全长 462bp,编码产物为小分子多肽 HBV XAg;依 HBV X 基因在细胞内表达的高低,HBV XAg 主要分布于胞核和 / 或胞浆[8,9]。HBV X 蛋白主要通过蛋白质 - 蛋白质作用,反式激活宿主细胞和病毒基因的启动子。研究表明 HBV X 蛋白能影响肝细胞的生长、转化、迁移和凋亡,及 DNA 的修复过程,并能促进肿瘤新生血管的形成。正因为对肝细胞基因发挥如此广泛而深刻的影响,HBV X 蛋白在 HBV 相关的 HCC 发生与发展中起着致关重要的作用[10]。由于 HBV S 基因表达的表面抗原大蛋白也与 HCC 发生与发展关系密切[11],现有的HBV 全基因表达细胞模型并不适合 HBV X 蛋白致 HCC 机理的研究。构建有效的 HBV X 基因真核表达载体,将极大的便利于我们的研究。

GFP 基因能在异源组织中表达并产生荧光,便于在活体内观察;同时其相对分子质量较小,容易与其他目的基因融合且不影响目的基因产物的空间构象和功能。EGFP 是 GFP 的突变体,它发出的荧光强度比 GFP 强 6 倍以上,两者相比 EGFP 更适合作为报告基因来研究基因表达、调控、蛋白质在细胞中的定位和转运等[6,12]。

我们利用 pEGFP - N1 质粒上带有的 EGFP 表达系统,将 HBV X 基因插入该载体;经酶切、PCR 和测序鉴定证实了构建的 pEGFP-X 真核载体获得成功。在此基础上,将重组 pEGFP-X 质粒转染人肝癌细胞株 BEL-7402 中;转染 24h 后可见绿色荧光,说明报告基因 EGFP 的特异表达;转染 48h 后,RT-PCR 检测,证实 HBV X 基因的表达,表明 pEGFP-X 的肝癌细胞 BEL-7402 瞬时转染获成功表达。以 EGFP 作为示踪标志,可极大的方便我们对转染后融合蛋白表达及分布状况的观察;同时为进一步筛选建立 HBV X 基因稳定转染细胞系,研究 HBV X 蛋白致 HCC 的机理奠定了基础。

(通讯作者:贺兴鄂;0731-5292105)

参 考 文 献

[1] Stuver SO.Towards global control of liver cancer [J].Semin CancerBiol, 1998;8:299 - 306.

[2] 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;19:810-819.

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

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

[5] Hwang Gy, Lin Cy, Huang LM, et al. Detection of the hepaitits B virus X protein (HBx) antigen and anti-HBx antibodies in case of human hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Microb, 2003;41:5598-5603.

[6] ChalfieM, TuY, EuskirchenG, et al.Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. Science, 1994;263: 5148-5151.

[7] 贺兴鄂,雷建华,杨 旭,等.构建不同筛选特性的 HBV X 基因真核表达载体[J].中西医结合肝脏病杂志,2005;15(5):274-276.

[7] He XE, Lei JH, Yang X, et al. Construction of eukaryotic expression vector for HBV X gene with different selection characteristic[J]. Journal of Combination of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine of Hepatology, 2005;15(5):274-276.

[8] Henkler F, J Hoare, N Waseem, et al. Intracellular localiztion of the hepaitits B virus infected hepatocytes[J]. J Gen Virol, 2001; 82:871-882.

[9] Kim KH, B.L. Seong. Pro-apoptotic function of HBV X protein is mediated by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing

(下转第 680 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞增殖及端粒酶活性的同时，也诱导细胞凋亡，提示两药对肿瘤的抑制作用与端粒酶活性的调节以及凋亡有关。但是端粒酶活性的降低是凋亡的原因还是结果，尚不能明确，有待进一步研究。至于凋亡启动后端粒酶活性发生改变的机制，可能是由于凋亡过程中细胞的完整性受到破坏而影响到端粒酶的活性和表达，或端粒酶受凋亡相关基因的调控所致。最近的研究表明，凋亡相关基因如 c-Myc，Bcl-2 和 p53 等直接或间接参与端粒酶活性的调控[4]。

流式细胞仪检测结果显示 CDDP、OMT 影响了 QGY 细胞的周期分布。作用 72h 后，CDDP 出现 S 及 G_2/M 期阻滞；OMT 则以 S 期阻滞为主，说明两种药物均能阻滞 QGY 细胞的细胞周期进程同时诱导细胞凋亡。较多的实验表明端粒酶活性的调节亦具有细胞周期依赖性，在细胞周期的不同阶段端粒酶的表达发生明显变化。但是 Holt 等[5]指出，端粒酶活性的表达在细胞周期的各个阶段中并不发生明显变化，端粒酶活性通常与肿瘤细胞的增长速率密切相关，退出细胞周期而处于静止期后端粒酶活性受到抑制。两药对肝癌细胞周期的影响与下调端粒酶表达的关系有待进一步研究.

Kondo 等[6]研究表明，抑制端粒酶活性能增强顺铂诱导神经胶质瘤细胞系 U251-MG 凋亡的敏感性，提示端粒酶可能与化疗敏感性有关。应用端粒酶抑制剂抑制肿瘤细胞端粒酶活性能增加化疗药物如 CDDP 的敏感性，将低细胞毒性的端粒酶抑制药物如苦参碱和化疗药物联合应用不仅能够降低化疗药物的剂量以减少毒副作用，而且能够提高肿瘤治疗的效果，为肿瘤治疗提供了一条新途径。

从本研究结果看，CDDP、OMT 在体外通过阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用，其在诱导凋亡的同时又伴有端粒酶活性的下降，这提示对端粒酶活性的抑制可能是两种药物发挥抗肿瘤作用的机制之一，也为联合促进凋亡、抑制端粒酶活性及提高化疗敏感性的这一治疗途径提供了理论依据。

参 考 文 献

[1] 汤为学，骆云鹏，王瑞雪.人实体瘤抗癌药物敏感试验 MTT 法的建立[J]. 重庆医科大学学报，1992；17(21)：103-108.

[2] Cai X,Shen YL,Zhu Q,et al.Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia [J]. Leukemia,2000;14(2):262-270.

[3] Kyo S,Kanaya T,Takakura M,et al.Expression of human telomerase subunits in ovarian malignant,borderline and benign tumors[J].Int J Cancer,1999;80(6):804-809.

[4] Li H,Cao Y,Berodt MC,et al.Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in virtro[J].Oncogene,1999;18(48):6785-6794.

[5] Holt SE,Wright WE,Shay JW.Regulation of telomerase activity in immortal cell lines[J].Mol Cell Biol,1996;16(6):2932-2939.

[6] Kondo Y,Kondo S,Tanake Y, et al.Inhibition of telomerase increases the susceptibility of human malignant glioblastoma cells to cisplatin-induced apoptosis [J].Oncogene,1998;16(17):2243-2248.

(上接第 654 页)

signal [J]. EMBO J, 2003;22:2104-2116.

[10] 刘亮明，罗 文，刘晶美，等.HBx 在原发性肝癌发病中的作用及其生物治疗策略[J].世界华人消化杂志，2005；13(4)：432-439.

[10] Liu ML, Luo W, Liu JM, et al. The role of HBx protein played in the development of primary hepatocellular carcinoma and the biological therapy strategy aimed at it [J]. World Chin J Digestol, 2005;13(4):432-439.

[11] 张 瑞，顾长海，张绪清，等.HBV 前 S1/S2 基因变异所致大、中、小蛋白的比例变化与肝细胞损伤的关系[J].中华肝脏病杂志，1999；7：146-148.

[11] Zhang R, Gui CH, Zhang XQ, et al. The relationship between the hepatocytes damage and the ratio change of the large,middle and small protein resulted from the pre-S1/S2 gene mutation[J]. Chin J Hepatol, 1999;7:146-148.

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