DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.11.009

论著

文章编号:1000-5404(2004)11-0960-03

HepG2.9706细胞内HDV核酶对HCV RNA抑制活性的初步研究

郭焕珍,毛 青,李奇芬,王宇明,顾长海,于乐成 (第三军医大学西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨HDV核酶在细胞内抑制HCV RNA的可能性。方法 将重组载体转染至转基因细胞HepG2.9706中,通过荧光定量PCR检测细胞和培养上清中的HCV RNA,初步探讨HDV核酶对HCV RNA的抑制活性。结果 ①RzC1,RzC2,RzC3 3组HDV核酶定向插入到真核表达载体。②在转基因细胞HepG2.9706中,pC1-RzC1、pC1-RzC2、pC1-RzC3对HCV-5′NCR-C RNA抑制活性分别为69.2%,38.7%、4.2%。结论 ①成功构建了3个HDV核酶重组表达载体。②pC1-RzC1、pC1-RzC2在转基因细胞HepG2.9706具有抑制HCV-5′NCR-C RNA的活性。

关键词:核酶;HDV核酶;丙型肝炎;荧光定量PCR
中图法分类号:R394.3;R512.6;R73-3 文献标识码:A

Preliminary studies on the intracellular inhibiting activity of HDV ribozymes against HCV RNA

GUO Huan-zhen, Mao Qing, LI Qi-fen, WANG Yu-ming, GU Chang-hai, YU Le-cheng (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To discuss the possibility of hepatitis delta virus (HDV) ribozymes inhibiting HCV RNA in cells. **Methods** Three recombined expression vectors were transfected to engineered cell HepG2.9706 using liposome-mediated method. The inhibitory effects of HDV were evaluated by HCV RNA quantitation in cultured cells and supernatants. **Results** ① The mammalian expression vectors contained ribozymes cDNA of RzC1, RzC2, and RzC3. ② The inhibitory effects of pC1-RzC1, pC1-RzC2, and pC1-RzC3 were 69.2%, 38.7% and 4.2%, respectively, in the HepG2.9706. **Conclusion** ① Three eukaryotic expression vectors are constructed. ② The inhibitory activity of pC1-RzC1 (107—113 nt) and pC1-RzC2 (268—274 nt) is more efficient than that of pC1-RzC3 (345—351 nt) in HepG2.9706 cells.

Key words: ribozyme; hepatitis delta virus (HDV) ribozyme; hepatitis

将RzC1、RzC2、RzC3分别克隆至真核载体pC1-neo中,获得重组表达载体pC1-RzC1、pC1-RzC2、pC1-RzC3,采用脂质体介导将它们转染至含HCV-5′NCR-C转基因细胞HepG2.9706和HCV阳性胎肝细胞中,通过荧光定量PCR检测细胞和培养上清中的HCV RNA,初步探讨HDV核酶在细胞内对HCV RNA的抑制活性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

pC1-neo、*Nhe*Ⅰ、*Sal*Ⅰ、T4 DNA连接酶、*Taq* DNA多聚酶购于Promega公司;核酶RzC1、RzC2、RzC3y于Sangon公司合成;HepG2.9706转基因细胞由军事科学院王小红博士惠赠[1];逆转录酶购于Sigma公司产品;Trizol RNA提取试剂盒购于GIBCO公司;脂质体购于Roche公司;荧光定量PCR检测HCV RNA试剂盒购于深圳匹基公司。

1.2 方法

1.2.1 反式基因组核酶的设计 设计与HCV-5′HCR-C RNA互补,长度为69 bp的反式基因组核酶RzC1、RzC2、RzC3如图1所示。

1.2.2 载体pC1-neo质粒线性化 在1.5 ml Eppendorf管内依次加入10× Buffer D 2 μl,pC1-neo 10 μl(10.8 mg/ml),*Nhe*Ⅰ 1 μl(10 U/μl),加ddH_2O至20 μl,离心,37 ℃酶切2 h。待2 h后,65 ℃ 20 min灭活*Nhe*Ⅰ,继续加10× Buffer B 3 μl,*Sal*Ⅰ 1.5 μl(10 U/μl),加ddH_2O至总体积30 μl,离心,37 ℃酶切2 h,电泳分离并回收DNA片段。

1.2.3 连接反应 载体与目的片段按克分子比1∶2~1∶5的比例加入连接体系。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600031)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39600031)
作者简介:郭焕珍(1966—),女,内蒙古自治区呼和浩特人,硕士研究生,主治医师,主要从事病毒性肝炎发病机制方面的研究,现在解放军第253医院传染科。电话:(0471)6824932
收稿日期:2002-06-09;修回日期:2003-10-14

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

RzC1 *Nhe* I

JP3 5′- CTAGCGTCCCAGCCTCCTCGCTGGC *AGGCTGT* GGGCAACATTCTTCGGAATGGCGAA TGGG ACG -3′

3′- GCAGGGTCGGAGGAGCGACCG *TCCGACA* CCC GTTGTAAG AAGCCTTACCGCTTACCCTG CAGCT -5′

RzC2 *Nhe* I　*Sal* I

5′- CTAGCGTCCCAGCCTCCTCGCTGGC *CGGACCT* GGGCAACATTCTTCGGAATGGCGAATGGGAC G -3′

3′- GCAGGGTCGGAGGAGCGACCG *GCCTGGA* CCCGTTGTAAGAAGCCTTACCGCTTACCCTG CAGCT -5′

RzC3 *Nhe* I　*Sal* I

5′- CTAGCGTCCCAGCCTCCTCGCTGGC *CGTGCTT* GGGCAACATTCTTCGGAATGGCGAATGGGAC G -3′

3′- GCAGGGTCGGAGGAGCGACCG *GCACGAA* CCCGTTGTAAGAAGCCTTACCGCTTACCCTG CAGCT-5′

图 1　RzC1、RzC2、RzC3 cDNA 合成序列

Fig 1　Synthetic sequence of RzC1, RzC2 and RzC3 cDNA

1.2.4　克隆鉴定　①PCR 鉴定; ②酶切鉴定; ③序列测定

1.2.5　HepG2.9706 mRNA 转录鉴定　①一瓶细胞弃培养液, 直接加 Trizol 试剂 1 ml, 轻摇, 室温 5 min; ②氯仿 0.2 ml, 振荡 15 s, 室温 3 min, 4 ℃, 12 000 r/min 离心 15 min; ③0.5 ml 异丙醇, 室温 10 min, 4 ℃, 11 200 r/min 离心 10 min, 75%乙醇洗 1 次; ④取 1 μl(1 μg/μl)总 RNA 溶解于 19 μl PCR 混合物并加入酶混合物 0.5 μl, 42 ℃反转录 40 min 后, 进行 PCR 扩增条件同上。

1.2.6　脂质体(1 μg/μl)介导的质粒转染　70%～80%细胞融合后开始转染。转染前用无血清培养基洗 2 次。取不同剂量的重组表达载体、空载体、核酶、双核酶、核酶互补链及脂质体分别加无血清 RPMI1640 培养基 25 μl 稀释, 将脂质体分别加到上述液体中, 室温下置 30 min, 以便形成脂质体——质粒复合物, 加 RPMI1640 培养基 200 μl 作用 5 h 后加含 20% FCS 的 RPMI1640 培养基 250 μl, 继续培养。

1.2.7　Light Cycler 荧光定量 PCR 检测　①样本处理。②逆转录: 逆转录液 24.5 μl 和逆转录酶 0.5 μl, 混匀离心 5 s, 37 ℃保温 60 min; 95 ℃变性 5 min, 离心 5 s 冰上保存备用。③PCR 扩增: 反应体系: 逆转录产物 2.5 μl, PCR 反应液 22.3 μl, *Taq* 酶 0.2 μl; 反应条件: 37 ℃ 3 min, 92 ℃ 1 min, 92 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 40 个循环。

1.2.8　HDV 核酶抑制活性的评价　取复苏成功的 HepG2 细胞作为阴性对照, HepG2.9706 细胞作为阳性对照, 将重组质粒、核酶、双核酶、核酶互补链、空载体分别转染至 HepG2.9706 细胞中, 每组设 3 孔分别收集第 2、3、5、6、7 天细胞或培养上清, 检测 HCV-5′NCR-C RNA 含量, 并计算 HDV 核酶的抑制活性。

$$\text{抑制率} = 1 - \frac{\text{实验组测得值(III)}}{\text{对照组 PCR 值(HepG 2.9706)}} \times 100\%$$

1.3　统计学处理

连续变量值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ各组间差异及重组载体和核酶间用方差分析。

2　结果

2.1　pC1-neo 线性化

Nhe Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 酶切可获得 5.439 kb 的大片段, 见图 2。

2.2　RT-PCR 鉴定阳性克隆

阳性克隆的限制片段长度 128 bp, 对照组 pC1-neo、自连长度为 94 bp, pC1-RzC1 有 1 个阳性(3 个)、pC1-RzC2 有 2 个阳性(4 个)、pC1-RzC3 有 2 个阳性(5 个), 阳性克隆率约 30%, 2.0%琼脂糖凝胶电泳分析, 见图 3。



1, 6: PC1-neo (annular); 2, 3: PC1-neo/*Nhe* Ⅰ + *Sal* Ⅰ digestion; 4: PC1-neo/*Sal* Ⅰ enzyme digestion (linear); 5: PC1-neo/*Nhe* Ⅰ enzyme digestion (linear); 7: Marker (564－21 226 bp)

图 2　质粒 pC1-neo 线性化

Fig 2　Linearization of pC1-neo



1－3: PC1-RzC1 (1, 2 from company; 3 positives); 4: PC1-neo (Control group); 5: H_2O; 6: Marker (110－501 bp); 7－10: PC1-RzC2 (7 and 8 negatives; 9, 10 positives); 11－15: PC1-RzC3 (11 and 12 negatives; 13, 14: positives; 15: from company)

图 3　13 个克隆的筛选

Fig 3　Selection of 13 clone

2.3　测序结果

pC1-RzC1、pC1-RzC2、pC1-RzC3 测序结果与设计一致。

2.4　HepG2.9706 细胞中 HCV-5′NCR-C RNA 片段的鉴定

HepG2.9706 细胞扩增出 220 bp 的 mRNA、DNA 片段, β2 珠蛋白 mRNA 为内参照, 其限制性扩增片段长 317 bp, 提示 HepG2.9706 细胞中有外源性的 HCV-5′NCR-C 基因 mRNA 表达, 对照组 HepG2 细胞未扩增出 DNA 片段, 见图 4。

2.5　HDV 核酶对 HCV-5′NCR-C RNA 的抑制

分别收集以 0.5 μmol/L 转染 HepG2.9706 细胞 24 h 后的空载体组、重组载体组、核酶组、双核酶组以及阴性、阳性对照组的细胞进行检测。结果显示, HepG2 细胞组为 0; 阳性对照组 HepG2.9706 细胞为 1.572E+05; 空载体组与核酶 RzC3 比较无明显差异, 与其它组均有显著性差异($P < 0.05$); 重组载体组与核酶比较: pC1-RzC3 与 RzC3 之间无显著差异($P > 0.05$), 与其余组均有显著差异($P < 0.05$); 双核酶 RzC1+RzC2、RzC2+RzC3、RzC1+RzC3 之间、核酶互补链之间各自均无显著差异, 见表 1。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



1: H_2O; 2: Amplification product of HepG2DNA; 3: Amplification product of HepG2. 9706 RNA (without RNA enzyme); 4: Amplification product of HepG2. 9706 DNA; 5: Amplification product of HepG2RNA; 6: Amplification product of HepG2. 9706 RNA; 7: Marker

图 4 HepG2 和 HepG2.9706 细胞内 HCV 片段的 PCR 及 RT-PCR

Fig 4 RT-PCR and PCR of HCV fragment in HepG2 and HepG2. 9706 cells

表 1 HepG2.9706 细胞内加入 HDV 核酶 24 h 后 HCV-5′NCR RNA PCR 定量值

Tab 1 HDV ribozyme 24 h in HepG2. 9706 cells rear HCV-5′ NCR the quantitative value of RNA PCR

Group		*n*	PCR value
HepG2 cell		1	0
HepG2. 97076 cell		1	1. 572E+05
pCI-neo(idle vector group)		3	1. 551E+05±458. 26▲
Recombined vectors	PC1-RzC1	3	4. 840E+04±400. 00△▲
	PC1-RzC2	3	9. 630E+04±360. 56△▲
	PC1-RzC3	3	1. 505E+05±452. 60▲
Ribozyme chain group	RzC1	3	9. 400E+04±700. 00△▲
	RzC2	3	9. 730E+04±264. 58△▲
	RzC3	3	1. 513E+05±692. 82▲
Ribozyme complementary chain	RzC1	3	1. 553E+05±200. 00
	RzC2	3	1. 547E+05±608. 28
	RzC3	3	1. 572E+05±624. 50
Double two ribozyme chain	RzC1+RzC2	3	6. 240E+04±529. 15△▲
	RzC2+RzC3	3	6. 502+04±200△▲
	RzC1+RzC3	3	7. 992+04±372. 42*▲

*: $P<0.01$, *vs* HepG2. 9706; △: $P<0.01$, *vs* HepG2 cell; ▲: $P<0.01$, *vs* ribozyme complementary chain

3 讨论

构建的含 HDV 基因组核酶真核表达载体的特点：①RzC1、RzC2、RzC3 基因 5′上游为真核表达的巨细胞病毒强启动子。②RzC1、RzC2、RzC3 基因 3′下游含有新霉素磷酸转移酶 neo 基因，使转染成功的细胞能在新霉素衍生物 G418 培养基中抗性生长。③外源基因 3′下游为真核表达的调控元件转录终止结构和 poly(A)加尾信号。因此，构建的重组质粒 pC1-RzC1、pC1-RzC2、pC1-RzC3 具有转染多种哺乳类细胞通用性。

转基因 HepG2.9706 细胞是将 pHCV-Luc 所含 HCV-5′NCR-C RNA 基因与 luc 的融合基因片段克隆于含 neo 基因(G418 抗性基因)的 pC1-neo 载体上，获得了既能在真核细胞内表达荧光素酶活性，又具有 G418 抗性的质粒 pHCV-neo4[1]。HepG2.9706 主要特点是检测简单省时，通过定量荧光 PCR 检测 HCV-5′NCR-C RNA 活性，即可初步了解 HCV-5′NCR-C RNA 基因起始区受封闭的程度。

本实验所用的 Light Cycler 荧光 PCR 检测仪是一种实时(real time)检测技术[2]，即扩增和产物检测一步完成。可评价 HDV 核酶在细胞内对 HCV5′NCR-C 的抑制活性。结果表明我们设计的 3 种 HDV 核酶对 HCV-5′NCR-C RNA 呈现程度不等的抑制作用，当剂量为 0.5 μmol/L 时，pC1-RzC1、pC1-RzC2、pC1-RzC3 的抑制率分别为 69.2%，38.7%、4.2%，pC1-RzC1 和 pC1-RzC2 的抑制活性与 pC1-RzC3 相比具有显著性差异($P<0.05$)。说明互补于 HCV RNA107-113nt 是 HDV 核酶(RzC1)作用的重要序列。这与 Seki 等[3]报道提出 HCV RNA103-127nt 和 124-169nt 是反义脱氧寡核苷酸作用的敏感区相一致。

参考文献：

[1] 王小红，王启升，朱宝珍. 反义寡核苷酸对 HCV 5′ NcR 基因调控的特异性抑制作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2000，20(5)：436－437.

[2] Martell M, Gomez J, Esteban J I, *et al*. High-thoughput real-time reverse transcription PCR quantitation of hepatitis C virus RNA[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(2): 327－332.

[3] Seki M, Honda Y. Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides capable of inhibiting hepatitis C virus gene expression, in vitro translation assay [J]. J Biochem (Tokyo), 1995, 118(6): 1199－1204.

(编辑 陈聪连)

关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期，减少编排错误，请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后，将修改稿以纯文本格式存入软盘，并请标明软盘中的文件名、作者姓名及稿件编号，连同修改稿一并送交本刊编辑部(校外稿件请邮寄)。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net