DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.015

锤头状核酶 RCP在 HepG 2215细胞中阻断 HBV基因表达的初步研究*

甘立霞** 陈万荣*** 朱锡华**** 董燕麟 (第三军医大学基础医学部生物化学教研室) 重庆, 400038

提 要 目的: 在细胞水平上观察核酶对 HBV基因表达的作用。方法: 将在体外具有切割活性的核酶 RCP的基因构建在表达载体 pSV L中,获得重组质粒 RCP/pSV L,运用脂质体介导的基因转染技术将重组核酶基因引入 HepG 2215细胞,并以空载体 pSV L转染组为对照,通过固相放射免疫测定方法检测细胞培养上清的 HBsAg及 HBeAg分泌量,以此观察核酶 RCP对 HBV基因表达的影响。结果: 在暂时性表达系统中,针对 P基因 5′端 2360位点的核酶 RCP对 HepG 2215细胞中 HBsAg和 HBeAg分泌量的抑制率分别是 26.7%、24.8%。结论: 锤头状核酶 RCP在细胞水平上能一定程度抑制 HBV基因的表达。

关键词 锤头状核酶; HBV; HepG 2215细胞; 基因转染
中图法分类号 R512.62

乙型肝炎的预防和治疗是我国医学领域中急待解决的问题。由于 HBV的聚合酶基因编码产物身兼逆转录酶及 DNA聚合酶双重职能,而针对这一编码基因的核酶设计及对 HBV的切割阻断效果却未见报道。我们针对 HBV聚合酶基因 5′端 2360位点设计了锤头状核酶 RCP[1],并在体外证实 RCP成功地切割了底物 RNA分子。为进一步证实核酶基因处于细胞生理环境中,其作用底物为 HBV基因组完整转录物时,它是否仍然能发挥其特异的催化裂解活性,从而对 HBV的基因表达产生影响。本研究旨在为筛选出在细胞内有酶切活性的核酶,并进一步将其引入动物体内观察其阻断 HBV复制及基因表达的实验研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 RCP/3Zf(-)

由本室构建[1]; pSV L(pharmacia公司); DMEM、胎牛血清及 Lipofectamine(GIBCO公司); G418 地高辛标记检测试剂盒(Boehringer Mannheim公司); ^{125}I-标记的乙型肝炎 HBsAg和 HBeAg固相放射免疫测定试剂盒(北京北方免疫试剂研究所), HepG2215细胞(军事医学科学院微生物流行病研究所陈万荣教授提供)。

1.2 分子克隆常规技术

参照分子克隆实验指南进行[2]。

1.3 HepG2215细胞培养

用含 10%胎牛血清, 100 u/ml青霉素和 100 μg/ml链霉素的 DMEM培养基,并于培养液中加入 400 μg/ml的 G418, 37℃, 5% CO_2孵箱培养。

1.4 重组真核表达质粒导入 HepG2215细胞

脂质体 Lipofectamine介导的基因转染参照 GIBCO公司试剂说明书及文献[3,4]进行: 将处于良好生长状态的 HepG 2215传代细胞接种于一次性无菌 24孔塑料平板中,每孔加入培养液 1 ml,培养至细胞长成约 80%成片时供转染使用。转染前先吸弃培养液,用不含血清及抗菌素的培养液洗细胞单层 3次,向每孔加入无血清无抗菌素的 DMEM 0.5 ml,缓慢滴加脂质体-DNA复合物(每孔含 Lipofectamine 5 μg,表达质粒 DNA 1 μg),轻轻混匀,于 37℃, 5% CO_2孵箱中培养 12~18 h后,吸弃转染液,换加含 10%胎牛血清的培养液,每孔 1 ml,继续培养 24~48 h后,收集培养液,供 HBsAg和 HBeAg的放射免疫测定使用。细胞 DNA供斑点杂交检测。

1.5 HBsAg、HBeAg的放射免疫测定

按北方免疫研究所乙型肝炎表面抗原 HBsAg及 HBeAg固相放射免疫测定盒进行。在洁净的塑料管中加入 200 μl细胞培养上清,放入一颗抗 HBs包被的塑料珠, 45℃温育 1.5 h,用 PBS(含 0.5‰吐温-20)洗涤 6遍,吸尽水份后,加入 200 μl ^{125}I-抗-HBs标记物, 45℃保温 3 h,同上洗涤条件洗 6遍。至此,在塑料珠载体表面形成了抗 HBs-HBsAg-^{125}I-抗 HBs夹心复合物。吸尽水份,将塑料小珠转入测定管中,于 ^{125}I 放射免疫检测仪(γ计数器)中计数 1 min。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\text{转染核酶基因细胞上清 CPM值} - \text{阴性对照 CPM值}}{\text{转染空载体细胞上清 CPM值} - \text{阴性对照 CPM值}}\right) \times 100\%$$

2 结果

2.1 重组真核表达载体 RCP/pSV L的构建及酶切鉴定

用 PvuII及 SacI双酶切质粒 RCP/3Zf(-),切下带有核酶基因 RCP的长约 280 bp片段。低融点琼脂糖法回收该片段,

* 全军"八五"医药卫生青年科研基金资助项目
** 甘立霞,女, 32岁,副教授,博士
*** 军事医学科学院微生物流行病研究所 北京, 100071 **** 基础医学部免疫学教研室
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

将其定向克隆到载体 pSV L的 SmaI及 SacI位点中,经筛选获得了带有核酶基因的重组子 RCP/pSV L,见图 1 2

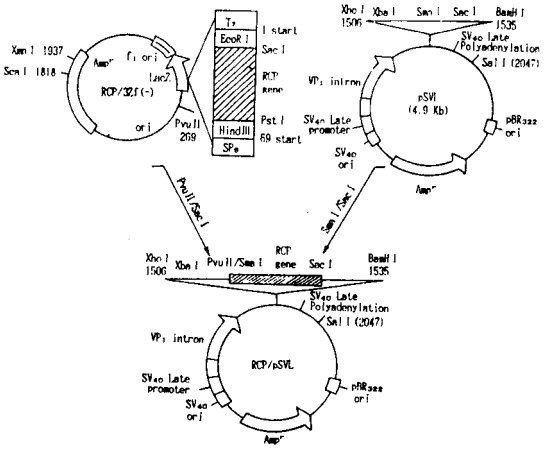


图 1 重组质粒 **RCP/pSVL**的构建

Fig 1 Construction of recombinant plasmid RCP/pSVL

Hind III在载体 pSV L的第 1047 4818bp处存在酶切位点,插入片段中带有一个切点; Pst I 及 Xho I 分别在载体 pSV L的第 3612bp及 1500bp处各存在一个切点,插入片段上各带有一个切点。因此选用这三种酶消化鉴定重组质粒,预期分别应产生如下如果: Hind III切出→ 3. 3kb, 1. 1kb, 0. 7kb; Pst I 切出→ 3. 0kb, 2. 1kb; Xho I 切出→ 4. 8kb, 0. 3kb 由图 2可见,该重组子的酶切结果完全符合预期要求。

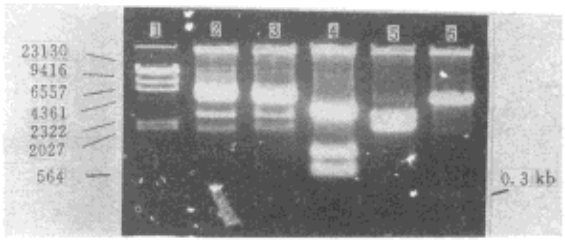


图 2 重组质粒 **RCP/pSVL**的酶切鉴定

1: 核酸分子量标准 λDNA/Hind III; 2 3 重组质粒的 DNA 对照; 4~ 6 重组子 RCP/pSV L分别用 Hind III, Pst I, Xho I酶切。

Fig 2 Restriction analysis of recombinant plasmid RCP/pSVL

Lane1: λDNA digested with HindIII as the molecular marker; Lane2, 3 Plasmid DNA of RCP/pSVL; Lane4~ 6 Recombinant plasmid RCP/pSV L digested with HindIII, Pst I and Xho I, respectively.

2.2 核酶基因的暂时表达对 HBsAg及 HBeAg分泌量的影响

应用脂质体介导的 DNA转染技术,分别将空载体 pSV L及表达核酶的重组质粒 RCP/pSV L导入 HepG2215细胞,提取转染细胞及未经转染的 HepG2215细胞 DNA,以地高辛标记的 pSV L DNA为探针,观察到外源基因确能进入靶细胞后,通过测定培养细胞上清中 HBsAg及 HBeAg的分泌量,结果表明,见附表。针对 P基因 5′端 2360位点的核酶 RCP能对 HBsAg和 HBeAg的表达产生一定抑制作用。

附表 锤头状核酶 **RCP**在 **HepG 2215**细胞中对 **HBsAg**和 **HBeAg**表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table Effect of hammerhead ribozyme RCP on HBsAg and HBeAg expression in HepG 2215 cell line ($\bar{x}\pm s$)

Plasmid	HBsAg		HBeAg	
	CPM average	Inhibition(%)	CPM average	Inhibition(%)
pSV L	1731± 369		3163± 220	
RCP/pSV L	1279± 214	26.7	2404± 771	24.8
Control	39± 4		84± 18	

3 讨论

要将外源基因导入细胞,首先需要构建合适的载体。本研究选择的载体是一种既能在原核细胞中复制增殖,又能在真核细胞中进行转录表达的穿梭型质粒载体 pSV L,它所带有的启动子是利用细胞内的聚合酶II 进行转录的 SV 40晚期启动子。与逆转录病毒载体相比,由于它不含有病毒的 LTR序列,因而不能将外源基因整合到细胞的染色体中做长期稳定的表达,因此这一载体系统被称为暂时性表达系统。这一系统的优越性是可以快速简便地观察外源基因在细胞内的作用。王平等[5]曾采用该载体将一个针对 HBV pre C区的核酶 Ripc基因构建在 SV 40晚期启动子下游,采用共转染技术方法导入肝癌细胞系 HepG2细胞中,获得过核酶 Ripc的表达。选择合适的靶细胞是我们在进行这一工作中又一需要考虑的问题。实验中我们曾采用基因共转染技术,将表达核酶基因的重组质粒 RCP/pSV L与带有头尾相连的双拷贝 HBV基因组(pUC-2HBV)共转染 HepG2细胞,观察它们对 HBV复制及基因表达的影响。通过测定细胞培养上清中的

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

HBsAg 及 HBeAg的表达量,发现采用这一方法,HBV抗原的表达量太低(数据未列出),因此我们认为不适宜在 HepG2细胞上用共转染技术开展我们所欲进行的核酶活性的评价工作,于是放弃了这一技术路线。

HepG2215细胞是由头尾相接的 HBV双拷贝基因组转染 HepG2细胞而建立的一株能稳定分泌 HBV各种抗原和完整病毒颗粒的细胞系[6,7]。相对于共转染技术路线而言,它的抗原表达量水平较高而且较为恒定,因此选择它作为靶细胞,只需向细胞中导入一种外源基因,因而简化了实验条件和可控因素。实验结果表明,在这一暂时性表达系统中,针对 P基因 5′端 2360位点的核酶 RCP对 HBsAg和 HBeAg的表达都有抑制作用(抑制率分别为 26.7%和 24.8%),其抑制率不高的原因与实验结果的计算方法有关,因为转染的效率不会是 100%,因此有一部分细胞是未带有核酶基因的,由于应用这一暂时性表达系统不能作转染成功细胞的筛选,因而不能选择转染进了核酶基因的那部分细胞进行测定,所测定的细胞培养上清中 HBsAg和 HBeAg的分泌量是带有核酶基因及不带有核酶基因的 HepG2215细胞混合群体分泌量之和,因而这一计算方法所得抑制率之值并不能完全真实地反映实际抑制率(应比真实的抑制率低),其抑制率的准确定量方法正在进一步完善之中。

参考文献

1 Gan Lixia, Wang Ping, Zhu Xihua *et al*. Effect of hammerhead ribozyme (RCP) on HBV P gene *in vitro*. J Med Coll PLA, 1996; 11(3): 171

2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992. 16~55

3 Bichko V, Netter H J, Taylor J. Introduction of hepatitis delta virus into animal cell lines via cationic liposomes. J Virol, 1994; 68(8): 5247

4 Fassati A, Takahara Y, Walsh F S *et al*. Production of high titre helper-free recombinant retroviral vectors by lipofection. Nucl Acids Res, 1994; 22(6): 1117

5 王　平,郭巨涛.阻断乙肝病毒复制、基因表达的研究."863"高技术生物技术领域年报, 1992~1993. 143

6 Sells M A, Chen M L, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84(4): 1005

7 成　军,斯崇文. HBV DNA转染细胞系的建立及其应用研究进展.国外医学:流行病与传染病分册, 1994; 21(2): 60

(收稿: 1997-08-10;修回: 1997-12-18)

(编辑　汪勤俭)

Blocking effects of hammerhead ribozyme RCP on HBV gene expression in HepG2215 cell line

Gan Lixia, Chen Wanrong, Zhu Xihua, Dong Yanlin (Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To investigate the cleavage activities of ribozyme RCP in blocking HBV gene expression and replication in eukaryotic cells. **Methods**: The recombinant plasmid RCP/pSVL which can transiently express ribozyme RCP in eukaryotic cells was constructed and then intrduced into HepG2215 cell line with the technique of lipofectamine-mediated gene transfer. The vector pSVL transfection group was employed to serve as the control. HBsAg and HBeAg from the culture medium of the cells were tested with solid-phase radioimmunoassay (RIA). **Results**: The cpm obtained form the medium samples showed that the inhibition rates of ribozyme RCP for HBsAg and HBeAg were 26.7% and 24.8% respectively in this transient expression system. **Conclusion**: Hammerhead ribozyme RCP can inhibit HBV gene expression in eukaryotic cells on the cell level.

Key words hammerhead ribozyme; HBV; HepG2215 cell line; gene transfection

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