

技术前沿

DOI: 10.11699/cyxh20131207

HBx-shRNA 重组腺病毒的构建及功能鉴定

刘正淑¹, 李 凯², 邹程程², 王 森², 盛艳蕊², 汤 华²

(1. 重庆医科大学附属第一医院健康体检部, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学教育部感染性疾病分子生物学重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建携带绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)标签的乙型肝炎病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X protein, HBx)特异性 shRNA 重组腺病毒, 并对其干扰效果进行鉴定。**方法:**将前期构建的真核表达载体 pGenesil-1-HBx-shRNA 和 pGenesil-1-Scramble sequence 的表达启动子 U6 连同 shRNA 亚克隆到穿梭质粒 pAdTrack-CMV, 构建 pAdTrack-CMV-U6-HBx-shRNA 和对照 pAdTrack-CMV-U6-Scramble sequence 穿梭质粒; 酶切及 DNA 测序鉴定后, 经 *Pme* I 线性化后转化入感受态 AdEasier 细菌, 获得重组腺病毒质粒 pAd-U6-HBx-shRNA 和 pAd-U6-Scramble sequence, *Pac* I 酶切后转染 AD293 细胞获得重组腺病毒 Ad-U6-HBx-shRNA 和 Ad-U6-Scramble sequence; 扩增病毒, 测定滴度; 以 RT-PCR 和 real-time PCR 鉴定重组腺病毒 Ad-U6-HBx-shRNA 对 HBx 的干扰效果。**结果:**酶切鉴定得到阳性 pAd-U6-HBx-shRNA 和 pAd-U6-Scramble sequence 重组质粒; 转染到 AD293 细胞并包装成功; RT-PCR 以及 real-time PCR 表明, 重组腺病毒 Ad-U6-HBx-shRNA 携带的干扰片段能够明显干扰 HBx 表达 ($P=0.01$)。**结论:**成功构建了 HBx 特异性 shRNA 重组腺病毒 Ad-U6-HBx-shRNA, 它能抑制 HepG2.2.15 细胞中的 HBx 的表达, 为研究 HBx 作为肝癌基因治疗作用的一个靶点以及机制奠定基础。

【关键词】重组腺病毒; 乙型肝炎病毒 X 蛋白; shRNA; 肝细胞肝癌**【中国图书分类法分类号】**R373.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-03-17

Construction of recombinant adenovirus HBx-shRNA and identification of its inhibition effect

LIU Zhengshu¹, LI Kai², ZOU Chengcheng², WANG Sen², SHENG Yanrui², TANG Hua²

(1. Department of Physical Examination, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct and identify the recombinant adenovirus vector of a short hairpin RNA (shRNA) targeting HBx. **Methods:** U6 expression promoter and shRNA of pGenesil-1-HBx-shRNA and pGenesil-1-Scramble sequence, which was constructed and identified in our previous experiment, were subcloned to pAdTrack-CMV shuttle plasmid, and further identified by enzyme digestion and DNA sequence analysis. Recombinant shuttle plasmids were restrictedly digested with *Pme* I, and subsequently transformed into competent AdEasier *E. coli* for homologous recombinant to obtain the adenovirus plasmids pAd-U6-HBx-shRNA and pAd-U6-Scramble sequence (control). Recombinants were digested with *Pac* I and finally transfected into AD293 for packaging. Recombinant adenoviruses Ad-U6-HBx-shRNA and Ad-U6-Scramble sequence were amplified in AD293 and the titers were determined. Expression of HBx gene was identified by RT-PCR and real-time PCR. **Results:** Recombinant adenovirus plasmid was correctly constructed. Real-time PCR proved that the expression of HBx was reduced by Ad-U6-HBx-shRNA ($P=0.01$). **Conclusions:** Recombinant adenovirus vector Ad-U6-HBx-shRNA is correctly constructed, and it could inhibit HBx expression in HepG2.2.15 cells. This recombinant adenovirus vector provides a useful tool for further study of HBx function.

【Key words】recombinant adenovirus; HBx; shRNA; hepatocellular carcinoma

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的感染被认为是导致肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma,

作者介绍: 刘正淑, Email: 1969lzs@163.com,

研究方向: 分子生物学。

通信作者: 汤 华, Email: tanghua86162003@aliyun.com。

基金项目: 重庆市渝中区软科学研究资助项目 (编号: 20110213); 国家临床重点专科护理建设资助项目 (编号: 财社[2010]305号)。

HCC) 的重要因素之一^[1]。HBV X 蛋白 (hepatitis B virus X protein, HBx) 是由 HBV 基因组编码的 17 kD 蛋白, 大量研究表明 HBx 与 HCC 的发生与发展有重要的联系, 因此对 HBx 的研究成为治疗 HCC 的热点^[2]。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术因其特有的高效性和特异性广泛应用于基因治疗与基

因研究,为 HCC 的治疗提供了一条新的途径^[3]。本研究采用 RNAi 技术,通过构建 HBx-shRNA 的重组腺病毒,在稳定表达 HBV 各种蛋白的 HepG2.2.15 细胞系中干扰 HBx 的表达,验证其干扰效果,为 HBV 感染的肝细胞的治疗提供新思路,同时为抗肝癌治疗及分子机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及细胞

pGenesil-1-HBx-shRNA 和 pGenesil-1-Scramble sequence 质粒由本实验室保存;干扰质粒 pGenesil-1-HBx-shRNA 靶向干扰 HBx 的 shRNA 序列为:正向链为 5'-GAT-CCGCACTTCGCTTCACCTCTGTTCAGAGACAGAGGTGAAGCGAAGT-GCTTTTTTAAGCTT-3',反向链为 5'-AAGCTTA-AAAAAG-CACTTCGCTTCACCTCTGTCTCTTGAACAGAGGTGAAGCGA-AGTGCGGATC-3'^[4]。将 shRNA 片段连接于质粒 pGenesil-1 的酶切位点 *Hind* III 和 *Bam* H I 之间,构建出重组干扰质粒 pGenesil-1-HBx-shRNA。腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV、骨架质粒 pAdEasy-1、*E.coli* DH5 α 、*E.coli* BJ5183、AD293 和 HepG2.2.15 细胞也由本实验室保存。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Pme* I 购自 Fermentas 公司;*Pac* I 和 T4DNA 连接酶购自 Promega 公司;限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam* H I、RT-PCR 试剂盒、Trizol 试剂等均购自 TaKaRa 公司;质粒提取购自 OMEGA 公司;脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司;DMEM 培养基购自 HyClone 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 GIBCO 公司。

1.3 细胞培养

用含 10%FBS 的 MEM 培养基培养 HepG2.2.15 细胞;用含 10%FBS 的 DMEM 培养基培养 AD293 细胞,于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养。

1.4 重组穿梭质粒的构建

将 pGenesil-1-HBx-shRNA 和 pGenesil-1-HK 用 *Hind* III 和 *Sal* I 酶切,胶回收干扰片段,同样 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切 pAdTrack-CMV,胶回收质粒片段,4℃,T4 DNA 连接酶连接过夜,转化大肠杆菌 DH5 α ,挑选单克隆菌落,摇菌,提质粒,经双酶切鉴定正确后,送华大公司测序。鉴定正确的重组穿梭质粒命名为 pAdTrack-CMV-U6-HBx-shRNA 和 pAdTrack-CMV-U6-Scramble sequence。

1.5 重组腺病毒质粒的构建

CaCl₂ 法制备感受态大肠杆菌 BJ5183,骨架质粒 pAdEasy-1 转化感受态大肠杆菌 BJ5183,挑取单克隆菌落,CaCl₂ 法制备含骨架质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态,命名为 AdEasier。*Pme* I 酶切重组穿梭质粒 pAdTrack-CMV-U6-HBx-shRNA 和 pAdTrack-CMV-U6-Scramble sequence,乙醇沉淀法纯化后转化到 AdEasier,50 μ g/ml 的卡那霉素板上 37℃培养 12~18 h,挑取最小单克隆菌落摇菌,提取质粒,琼脂糖凝胶电泳

初筛后 *Pac* I 单酶切鉴定,并测序。测序正确的重组腺病毒质粒命名为 pAd-U6-HBx-shRNA 和 pAd-U6-Scramble sequence。

1.6 重组腺病毒的包装

转染前 6~15 h 将 AD293 细胞接种于 25 cm² 的组织培养瓶,每个培养瓶接种 2×10^6 个细胞。*Pac* I 酶切重组质粒 pAd-U6-HBx-shRNA 和 pAd-U6-Scramble sequence 使之线性化,乙醇沉淀法回收线性化质粒产物。用 Lipofectamine™ 2000 将线性化质粒转入 AD293 细胞,37℃、5%CO₂ 孵育 4~6 h,移去培养基,换成新鲜 DMEM 完全培养基,37℃、5%CO₂ 孵箱中培养。荧光显微镜下观察到绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)的表达,了解转染效果。14 d 左右出现细胞病变时,收集病毒悬液,经过 3 次冷冻-融化-涡旋振荡、4℃、1 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液获得第 1 代重组腺病毒,命名为 Ad-U6-HBx-shRNA 和 Ad-U6-Scramble sequence。

1.7 高滴度重组腺病毒的扩增

感染前 6~15 h 将 3×10^6 个 AD293 细胞接种于 25 cm² 培养瓶,细胞融合度达 80%~90%时,以 40%~50%病毒上清原液进行感染。通常在感染后 3~5 d 后,当 30%~50%感染细胞脱落,出现细胞病变时,把细胞刮下/冲洗并收集,制备病毒悬液,方法同 1.6。

1.8 重组腺病毒滴度的测定

将 AD293 细胞接种于 96 孔板, 1×10^6 个/ml, 50 μ l/孔,培养 12~20 h 后,用无血清 DMEM 培养 20 min,弃上清,加入不同稀释度的重组病毒(10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13}),每孔 10 μ l,与 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养 2 h,再加入 90 μ l 含 5%FBS 的 DMEM 培养基,孵育 24 h 后,于荧光显微镜下观察,并进行荧光计数,用如下公式计算病毒滴度。

病毒滴度(pfu/ml)=(每孔平均荧光数 $\times$ 10)/稀释度

1.9 重组腺病毒的 PCR 和 real-time PCR 检测

将重组腺病毒 Ad-U6-HBx-shRNA、对照腺病毒 Ad-U6-Scramble sequence 分别感染 HepG2.2.15 细胞,48 h 后用 Trizol 法提取总 RNA,逆转录成 cDNA 作为模板,HBx 上游引物为:5'-CCCGTCTGTGCCTTCTCATC-3',HBx 下游引物为:5'-CCCAACTCCTCCCAGTCTTT-3',内参 β -actin 上游引物为:5'-CCTTCTACAATGAGCTGCGT-3', β -actin 下游引物为:5'-CCTGGATACGAACGTACATG-3',RT-PCR 反应条件为:94℃ 5 min,94℃ 60 s,58℃ 60 s,72℃ 30 s,共 28 个循环;72℃再延伸 10 min。PCR 产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪下成像,用软件 Quantity One 对目的基因 HBx 与内参 β -actin 的灰度比值进行分析。real-time PCR 体系为:1 μ l 10 倍稀释的 cDNA 为模板,各 1 μ l,10 μ mol/L 的上、下游引物,10 μ l 的 UltraSYBR Mixture,7 μ l 的 ddH₂O。HBx 基因的相对表达差异用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 方法进行统计学分析。

1.10 统计学分析

用 SPSS 16.0 软件对数据进行分析。real-time PCR 的数据来自 3 次独立的重复实验,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,组间比较采用方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 重组穿梭质粒的构建与鉴定

干扰质粒 pGenesil-1-HBx-shRNA 经 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切后可见一条大约 400 bp 左右的目的条带(图 1A)。然后与 pAdTrack-CMV 质粒做连接反应, 构建重组穿梭质粒 pAdTrack-CMV-HBx-shRNA, 经 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切可见一条大约 400 bp 左右的目的条带(图 1B)。测序结果也与预期完全吻合(测序图略)。

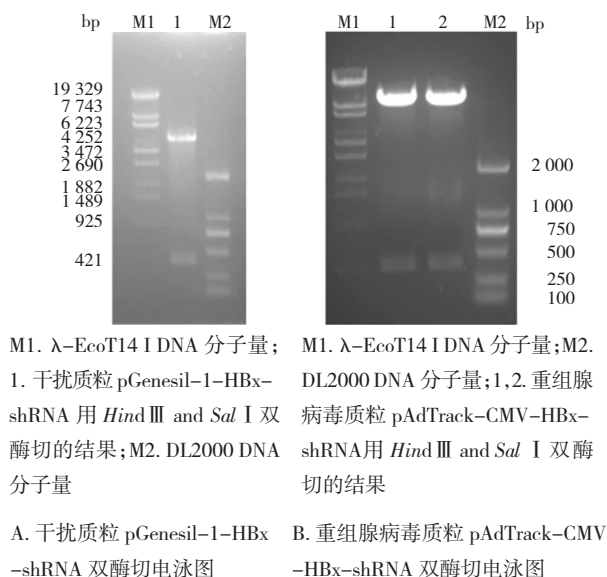


图 1 重组穿梭质粒的构建与鉴定
Fig.1 Construction and identification of recombinant shuttle plasmid

2.2 重组腺病毒质粒的鉴定

重组穿梭质粒 pAdTrack-CMV-HBx-shRNA 经 *Pme* I 酶切线性化(图 2)后转入 AdEasy 感受态细胞与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 重组。用 *Pac* I 酶切重组腺病毒质粒 pAd-U6-HBx-shRNA 后, 可见到 1 条约 4 500 bp 的条带, 提示重组腺病毒质粒构建成功(图 3)。

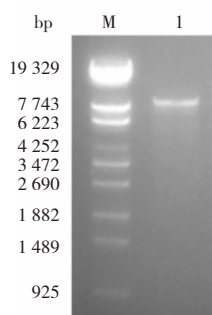


图 2 *Pme* I 酶切 pAdTrack-CMV-HBx-shRNA 鉴定
Fig.2 Restriction map of plasmid pAdTrack-CMV-HBx-shRNA with *Pme* I digestion

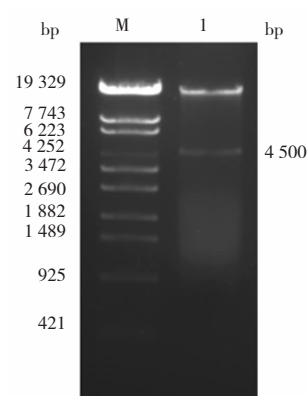


图 3 重组腺病毒质粒 pAd-U6-HBx-shRNA *Pac* I 酶切鉴定
Fig.3 Restriction map of recombinant plasmid pAd-U6-HBx-shRNA with *Pac* I digestion

2.3 重组腺病毒转染到 AD293 细胞中进行病毒包装、扩增、滴定

重组腺病毒 Ad-U6-HBx-shRNA 转染 AD293 细胞 24 h 后在荧光倒置显微镜下能观察到少量荧光蛋白表达; 第 5 天后荧光蛋白的数量和强度增加; 第 14 天, 可以看到明显的细胞病变, 收集病毒, 方法同 1.6。经过 3 轮的病毒扩增, 重组腺病毒 Ad-U6-HBx-shRNA 和 Ad-U6-Scramble sequence 都可以得到 10^{12} 以上的滴度。收集后的病毒 Ad-U6-HBx-shRNA 和 Ad-U6-Scramble sequence 分别感染 AD293 细胞和 HepG2.2.15 细胞(图 4)。

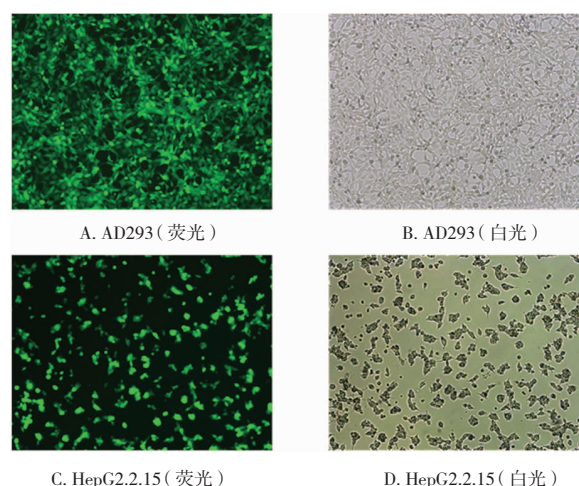


图 4 重组腺病毒感染细胞后显微镜观察 (100 ×)
Fig.4 Microscope observation of cells after being infected with recombinant adenovirus (100 ×)

2.4 干扰 HBx 基因效果的鉴定

重组腺病毒感染肝癌细胞 HepG2.2.15 48 h 后 RT-PCR 和 real-time PCR 检测 HBx 基因的相对表达, 内参基因为 β -actin。real-time PCR 结果显示感染 Ad-U6-HBx-shRNA 组 (0.13 ± 0.04) 与感染 Ad-U6-Scramble sequence (1.66 ± 0.60)

组和未感染组(1.04 ± 0.33)相比,HBx 基因的相对表达量均显著降低($P=0.01, P=0.01$),而感染 Ad-U6-Scramble sequence 组和未感染组相比,无明显差异($P=0.19$),见图 5。RT-PCR 结果与 real-time PCR 结果一致,图 6。

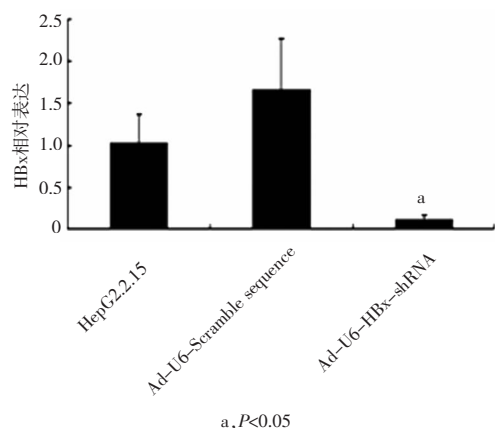
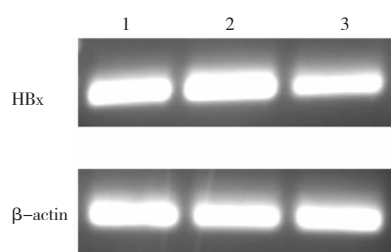


图 5 重组腺病毒 Ad-U6-HBx-shRNA 干扰效果的 real-time PCR 鉴定

Fig.5 Inhibition effect of recombinant adenovirus Ad-U6-HBx-shRNA by real-time PCR



1. 未感染组;2. Ad-U6-Scramble sequence 对照感染组;3. Ad-U6-HBx-shRNA 感染组

图 6 重组腺病毒 Ad-U6-HBx-shRNA 干扰效果的 RT-PCR 鉴定

Fig.6 Inhibition effect of recombinant adenovirus Ad-U6-HBx-shRNA by RT-PCR

3 讨论

目前对 HBV 4 种主要的编码蛋白的研究主要集中在 HBx 上,大量研究证据表明 HBx 是 HBV 感染,复制的关键调节蛋白^[5],同时 HBx 可以发挥其转式激活因子的作用调控许多宿主基因的表达,如 Raf1^[6],AKR1C1^[7]等目前主要通过稳定细胞株的建立和瞬时转染的方法对 HBx 的生物学功能进行研究。特别是能产生病毒感染颗粒的 HepG2.2.15 细胞

在 HBV 的研究中得到了广泛地应用^[8]。在表达 HBV 的细胞中干扰 HBx 的表达,反向观察 HBx 的生物学功能是科学研究中必不可少的步骤。

RNA 干扰是一种基因沉默技术,是基因功能研究中非常重要的工具,具有广阔的前景。在本研究中,将 RNAi 技术与重组腺病毒技术结合,成功构建了高滴度的病毒 Ad-U6-HBx-shRNA,可以显著干扰 HBx 的表达。该病毒克服了质粒 pGenesil-1-HBx-shRNA 在 HepG2.2.15 细胞中转染效率不高的缺点,同时腺病毒系统具有易于制备和扩增,感染细胞广泛,仅瞬间表达,安全性高,进入细胞内并不整合到宿主细胞基因组等优点^[9]。Ad-U6-HBx-shRNA 的构建为进一步研究 HBx 的生物学功能奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Birrer R B, Birrer D, Klavins J V, et al. Hepatocellular carcinoma and hepatitis virus[J]. Ann Clin Lab Sci, 2003, 33(1): 39-54.
- [2] Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator[J]. J. Gastroenterol, 2001, 36(10): 651-660.
- [3] 陈启斌, 英卫东. RNA 干扰及其在肝癌治疗中的研究进展[J]. 实用肝脏病杂志, 2012, 15(1): 78-80.
- [4] Chen Q B, Jia W D. RNA interference and its research progress in the treatment of liver cancer[J]. Journal of Clinical Hepatology, 2012, 15(1): 78-80.
- [5] Wu K L, Zhang X, Zhang J, et al. Inhibition of hepatitis B virus gene expression by single and dual small interfering RNA treatment[J]. Virus Res, 2005, 112(1-2): 100-107.
- [6] Tang H, Delgermaa L, Huang F J, et al. The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication[J]. J virol, 2005, 79(9): 5548-5556.
- [7] Tian Y Y, Hu Y, Wang Z C, et al. Hepatitis B virus regulates Raf1 expression in HepG2.2.15 cells by enhancing its promoter activity[J]. Arch Virol, 2010, 156(5): 869-874.
- [8] 万 涛, 张小花, 张 磊, 等. HBV 对肝癌细胞中 AKR1C1 基因表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(3): 297-299.
- [9] Wan T, Zhang X H, Zhang L, et al. HBV regulated the expression of AKR1C1 in hepatoma cells[J]. Journal of third Military Medical University, 2010, 32(3): 297-299.
- [10] Sells M A, Zelent A Z, Shvartsman M, et al. Replicative intermediate of hepatitis B virus in HepG2 that produce infectious virions[J]. J virol, 1988, 62(8): 2836-2844.
- [11] Hitt M M, Addison C L, Graham F L, et al. Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells[J]. Adv Pharmacol, 1997, 40: 137-206.

(责任编辑: 关蕴良)