

免疫与感染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000178

设计特异性结合 HBV X 基因启动子的人工锌指蛋白以抑制 HepG2.2.15 细胞中 HBV 的转录

祝艺耘, 付 愚, 李中堂, 刘 锐, 魏续福, 吴忠均
(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:设计人工锌指蛋白(zinc finger protein,ZFP)特异性结合于乙型肝炎病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X protein, HBX)基因启动子,观察 ZFP 在体外对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)转录的抑制。**方法:**将 pcDNA3.1-ZFP 转染入 HepG2.2.15 细胞 24 h 后,用 Western blot 检测 HBX 蛋白的含量;用 ELISA 和 real-time PCR 检测上清液中乙型肝炎核心相关抗原(hepatitis B e antigen,HBeAg)和 HBV DNA 含量,用 RT-PCR 检测胞内 HBV mRNA 水平。**结果:**ZFP 可抑制 HepG2.2.15 细胞中 HBX 的表达;相比空质粒组,ZFP 组细胞培养上清液中 HBV DNA 拷贝量和 HBeAg 含量分别下降了 51.7%($t=23.079, P=0.000, 95\%CI=44.98\% \sim 58.52\%$)、33.8%($t=3.887, P=0.003, 95\%CI=12.12\% \sim 55.48\%$);细胞内 HBV mRNA 也明显减少($t=3.616, P=0.022$)。**结论:**人工设计的可特异性结合于 HBX 的 ZFP 可于 HepG2.2.15 细胞中有效抑制 HBV 转录。

【关键词】乙型肝炎病毒;X 基因启动子;锌指蛋白;HepG2.2.15 细胞

【中图分类号】R373.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-10-11

Inhibition of HBV transcription in HepG2.2.15 cells by artificial Zinc finger protein designed specifically to target HBX gene promoter

Zhu Yiyun, Fu Yu, Li Zhongtang, Liu Rui, Wei Xufu, Wu Zhongjun

(Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the inhibition of hepatitis B virus (HBV) transcription in vitro by Zinc finger protein (ZFP) which was designed specifically to target X gene promoter of HBV (HBX). **Methods:** Recombinant plasmid pcDNA3.1-ZFP was transfected into HepG2.2.15 cells. Expression of HBX protein was detected by Western blot at 24 h after being transfected. Hepatitis B e antigen (HBeAg) and HBV DNA levels in supernatant of HepG2.2.15 cells at 24 h after being transfected with pcDNA3.1-ZFP were detected by ELISA and real-time PCR. HBV mRNA was tested by RT-PCR. **Results:** ZFP could inhibit the expression of HBX in HepG2.2.15 cells. In the presence of ZFP, HBV DNA level and HBeAg was considerably reduced by 51.7% ($t=23.079, P=0.000, 95\%CI=44.98\% \sim 58.52\%$) and 33.8% ($t=3.887, P=0.003, 95\%CI=12.12\% \sim 55.48\%$) respectively, while HBV mRNA was sharply decreased ($t=3.616, P=0.022$). **Conclusion:** ZFP protein designed to target X gene promoter of HBV can inhibit the transcription of HBV in HepG2.2.15 cells effectively.

【Key words】 hepatitis B virus; X gene promoter; Zinc finger protein; HepG2.2.15 cell

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)基因组有 4 个开放阅读框架(open reading frame, ORF), 分别为 C、S、P、X, 其中 X-ORF 位于碱基(nt)1 374~1 837 之间, 其表达产物乙型肝炎病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X protein, HBX)是一种具有反式作用的多

功能调节蛋白, 参与细胞的各种调控机制, 包括细胞周期调节、转录调控、信号通路以及调控癌基因与抑癌基因表达的作用^[1-2]。抑制 X 区的表达将可能会严重影响 HBV 的生物周期, 为降低甚至消除 HBV 对肝脏的伤害提供新的方法与视角。

锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)是指含有通过结合 Zn^{2+} 稳定的短的可以自我折叠形成“手指”结构的一类蛋白质, 由于其自身的结构特点, 可以选择性地结合特异 DNA 靶序列, 从而在基因的表达调控中发挥重要作用^[3-4], Cys_2His_2 (C_2H_2) 锌指结构是人

作者介绍: 祝艺耘, Email: cherryjozyy@163.com,

研究方向: 乙型肝炎病毒和肝癌发病机制。

通信作者: 吴忠均, Email: wzjey@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81171562)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000178.html>

工构建 ZFP 一种理想的结构框架。本研究团队已成功构建出了特异性结合于 HBX 基因启动子的人工 ZFP 真核表达载体^[9], 本文旨在研究 HepG2.2.15 细胞模型中, 研究 ZFP 对 HBV 转录及复制的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料

HepG2.2.15 细胞购自重庆医科大学感染性疾病分子生物学实验室; 胎牛血清、DMEM 培养基、改良型 RPMI1640 购自 Gibco 公司; 脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; HBV DNA 荧光定量检测试剂盒购自凯杰生物; HBeAg 检测试剂盒购自 RD; ZFP 全基因组质粒 pEGFP-N1/ZFP-Flag 与阴性对照质粒 pEGFP-N1 及引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。抗 Flag 抗体、HRP 标记的二抗购自碧云天公司, 小鼠抗人 HBX 抗体购自 Abcam 公司, HRP 标记的兔抗小鼠二抗购自美国 Santa-Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 HepG2.2.15 细胞的培养及转染 操作步骤: 用含 100 ml/L FBS 的改良型 RPMI1640 培养基, 37 °C、50 ml/L CO₂ 培养 HepG2.2.15 细胞。转染前 24 h, 按 1.0×10^5 个/孔细胞浓度种于 24 孔板, 待细胞生长致 70%~80% 时进行转染。按脂质体 Lipofectamine™ 2000 说明书操作, 利用 Lipofectamine™ 2000 将含有 ZFP 的质粒 pcDNA3.1-ZFP(ZFP 组) 和不含有 ZFP 质粒 pcDNA3.1-NC(空白对照组) 分别转染入 HepG2.2.15 细胞, 转染 24 h 后, 收集细胞培养上清液和提取总 RNA, 总蛋白。

1.2.2 Western blot 检测 HepG2.2.15 细胞中 HBX 蛋白的表达水平 将 6 孔板置冰面上用预冷 PBS 清洗细胞 3 次, 每孔加入预冷的 RIPA 裂解液(碧云天公司) 200 μ l, RIPA 裂解液预先加入苯甲基磺酰氟(PMSF) 2 μ l 使终浓度为 1 mmol/L。冰上裂解细胞, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清用 BCA 法测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度, 每蛋白样品加入 5 $\times$ 加样缓冲液, 按 5:1 混合, 99 °C 蛋白变性 5 min, 取 200 μ g 蛋白行 12% SDS-PAGE 电泳, 电泳电转移印迹到 PVDF 膜, 加 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 加入人 HBX 蛋白小鼠抗人单克隆抗体 (Abcam 公司), 按 1:2 000 稀释并孵育 2 h 后洗涤, 添加二抗 (美国 Santa-Cruz 公司) 按 1:5 000 稀释, ECL 法 (碧云天公司) 检测。

1.2.3 ELISA 检测上清液中 HBeAg 用酶标记免疫吸附测定法 (ELISA) 检测细胞培养上清液中 HBeAg 表达水平, 根据标准品的浓度及对应的吸光度 (absorbance, A) 值, 计算出标准曲线的直线回归方程, 再根据样本的 A 值, 在回归方程上计算出对应的样品浓度。最终浓度为实际测定浓度乘以稀释倍数。HBeAg 抑制率 = (空白对照组 HBeAg 浓度 - ZFP 组 HBeAg 浓度) / 空白对照组 HBeAg 浓度。

1.2.4 Real-time PCR 检测 HBV DNA 取 100 μ l 所培养上

清液, 加入等量 DNA 提取液 1, 以 13 000 g 离心 10 min, 吸弃上清液, 加入 25 μ l DNA 提取液 2, 煮沸 10 min, 13 000 g 离心 10 min, 取 2 μ l 上清液进行 PCR 反应, 反应条件: 37 °C 5 min, 94 °C 1 min, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环, 结果以 iu/ml 表示。HBV DNA 抑制率 = (空白对照组 HBV DNA 拷贝数 - ZFP 组 HBV DNA 拷贝数) / 空白对照组 HBV DNA 拷贝数。

1.2.5 RT-PCR 检测 HBV mRNA 提取转染后总 RNA, 取 1 μ l 按照试剂盒说明书进行。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环, 72 °C 延长 10 min。HBV 扩增引物序列为 R: 5'-AATTGGTCTGG-CGCACCAGCACCA-3', F: 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'; PCR 产物为 120 bp。内参 GAPDH 引物序列为 R: 5'-GAGTCAACGGATTGCTCGT-3', F: 5'-GACAAGCTTCCCG-TTCTCAG-3'; PCR 产物为 530 bp。

1.3 结果判定

1.3.1 RT-PCR 技术图像分析 显影结果经 Quantity one 软件进行图片分析、计算净光密度值。并以 Bio-Image Analysis System 进行半定量分析, 结果以相对光密度值 (relative optical density, ROD) $\times$ 面积 (mm²) 表示。mRNA 的相对含量 = (目的条带 ROD $\times$ mm²) / (GAPDH 条带 ROD $\times$ mm²)。

1.3.2 Western blot 技术图像分析 显影结果经 Quantity one 软件进行图片分析、计算净光密度值。并以 Bio-Image Analysis System 进行半定量分析, 结果以 ROD $\times$ 面积 (mm²) 表示。蛋白的相对含量 = (目的蛋白条带 ROD $\times$ mm²) / (GAPDH 条带 ROD $\times$ mm²)。

1.4 统计学分析

PCR 与 Western blot 条带平均光密度值由 Quantity One 软件 (版本号: 4.6.2) 计算, 数据分析由 SPSS 19.0 统计软件处理, 光密度值以表示, 组间比较应用两独立样本 *t* 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ZFP 对 HBX 表达的影响

为了证实本课题组所构建的特异性结合 HBX 基因启动子的 ZFP 可抑制 HBX 的功能, 将 ZFP 表达质粒转染入 HepG2.2.15 细胞 24 h 后, 用 Western blot 检测 HepG2.2.15 细胞中 HBX 蛋白表达水平, 发现实验组与对照组相比, HBX 表达明显下调 (图 1), 差异有统计学意义 (表 1)。

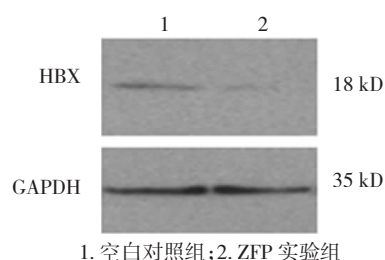


图 1 Western blot 检测转染 ZFP 后 HBX 的表达

Fig.1 Expression of HBX protein in HepG2.2.15 cells transfected with ZFP by Western blot

表 1 ZFP 对 HepG2.2.15 细胞中 HBX 的抑制作用
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.1 Inhibition on HBX in HepG2.2.15 cells transfected with ZFP ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HBX/GAPDH	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
空白对照组	0.613 ± 0.058	11.225	0.003
ZFP实验组	0.211 ± 0.022		

2.2 ZFP 对 HBeAg 表达的影响

与空白对照组相比,ZFP 表达质粒转入 HepG2.2.15 细胞 24 h 后,细胞上清液中的 HBeAg 含量明显减少(表 2, $t=3.887$, $P=0.003$),抑制率为 33.80%,置信区间为(12.12%~55.48%),提示 ZFP 可明显抑制 HBeAg 的表达与 HBV 的复制,差异具有统计学意义。

表 2 ZFP 对 HepG2.2.15 细胞上清液中 HBeAg 的抑制作用
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.2 Inhibition on HBeAg in the supernatant of HepG2.2.15 cells transfected with ZFP ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HbeAg浓度(μg/L)	抑制率(%)
空白对照组	2.53 ± 0.311	—
ZFP实验组	1.69 ± 0.424 ^a	33.80

注:—,无该项指标

2.3 ZFP 对 HBV DNA 复制的影响

与空白对照组相比,ZFP 表达质粒转入 HepG2.2.15 细胞 24 h 后,细胞上清液中的 HBV DNA 拷贝数含量明显减少(表 3, $t=23.079$, $P=0.000$),抑制率为 51.7%,置信区间(44.98%~58.52%),提示 ZFP 可明显抑制 HBV 的复制,差异具有统计学意义。

表 3 ZFP 对 HepG2.2.15 细胞上清液中 HBV DNA 的抑制作用
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.3 Inhibition on HBV DNA in the supernatant of HepG2.2.15 cells transfected with ZFP ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HBV DNA 拷贝数(iu/ml)	抑制率(%)
空白对照组	9.33 ± 0.153	—
ZFP实验组	4.50 ± 0.331 ^a	51.7

注:—,无该项指标

2.4 ZFP 对 HBV DNA 转录的影响

转染 ZFP 48 h 后,用 RT-PCR 法检测 ZFP 对 HepG2.2.15 细胞中 HBV mRNA 的抑制情况(图 2)。ZFP 实验组 HBV mRNA 表达量较空白对照组表达量明显降低(表 4),说明 ZFP 在 HepG2.2.15 细胞内可以抑制 HBV 的转录。

表 4 分别转染 ZFP 或阴性对照质粒后,HBV mRNA 在 HepG2.2.15 细胞中的表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.4 Expression of HBV mRNA in HepG2.2.15 cells transfected with ZFP or negative control plasmid ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HBV mRNA/GAPDH	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
空白对照组	0.72 ± 0.029	3.616	0.022
ZFP实验组	0.65 ± 0.012		

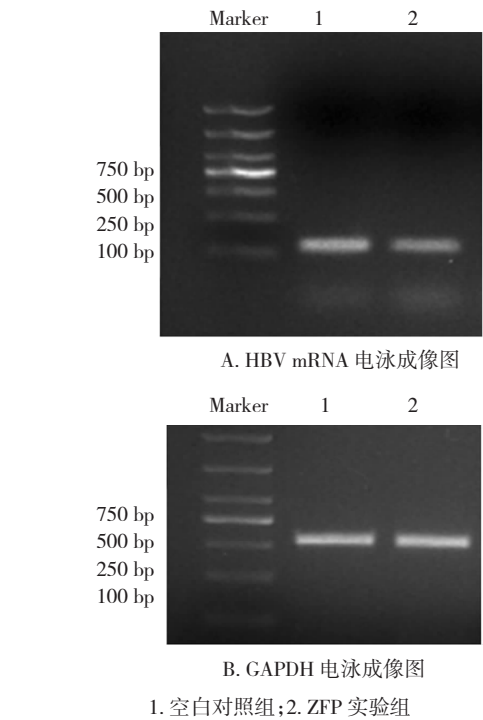


图 2 RT-PCR 检测转染 ZFP 后 HBV mRNA 的表达水平

Fig.2 Expression of HBV mRNA after being transfected with ZFP by RT-PCR

3 讨论

随着基因工程技术的不断发展,人工干预内源性基因表达的方法越来越多,人工锌指蛋白技术则是应用最广泛,最成熟的技术之一。日本学者 Hi-raoka 等^[6]开发出了利用人工锌指蛋白检测 DNA 甲基化水平的技术;美国科学家 Wilson 等^[7]利用人工锌指蛋白技术成功抑制了端粒酶反转录酶的表达。ZFP 入核后识别 DNA 上的特异性核酸位点,对特定基因的转录进行调控,利用少量的 ZFP 往往就能起到很好的调控效果。一个合适的 ZFP 甚至可以调节某个基因家族或是整条代谢通路中的一系列相关产物。HBV 基因组编码的 HBX 蛋白是一个具有反式作用的多功能调节蛋白,且已被证实与 HBV 的持续复制密切相关。因此,本课题针对 HBV 复制的特点,设计了靶向 HBX 基因特异性高结合力的 ZFP。本研究团队在前期的研究中已成功构建出了特异性结合 HBX 基因启动子的 ZFP,通过干扰 HBX 蛋白的表达减少 HBV mRNA 的形成,达到抑制 HBV 复制的目的。为证实人工设计的 ZFP 能够抑制 HBX 蛋白表达,将 pcDNA3.1-ZFP 转染入 HepG2.2.15 细胞,运用 Western blot 检测到 HBX 蛋白表达水平的减

免疫与感染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000009

CD133⁺ 细胞的干性鉴定及 ¹³¹I-CD133 抗体对其体内外抑制作用

段丽群, 侯妍利, 陈兴月, 唐 敏, 康强强, 舒 锦, 李少林

(重庆医科大学基础医学院放射医学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究 CD133⁺细胞的干性鉴定和 ¹³¹I-CD133 抗体在体内外对人肝癌 CD133⁺-HepG2 干细胞的抑制作用。**方法:**氯胺 T 法制备并鉴定 ¹³¹I-CD133 抗体;免疫磁珠(magnetic-activated cell sorting, MACS)分选 CD133⁺-HepG2 细胞;流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测分选前后 CD133 表达率;体外克隆形成实验、成球实验和体内成瘤实验验证其干细胞特性;将分选出的 CD133⁺细胞分组为 CD133 抗体、¹³¹I-¹³¹I-CD133 抗体和 ¹³¹I+CD133 抗体 4 个组, MTT 法检测不同处理后不同组中 CD133⁺细胞生长抑制率;成功构建人肝癌 CD133⁺-HepG2 移植瘤模型;随机分 4 组, 1 次/2 d 给予尾静脉用药, 共 14 次。4 周后, 处死小鼠, 比较肿瘤的体积、质量、计算抑瘤率;HE 染色观察肿瘤组织病理学改变。**结果:**¹³¹I-CD133 抗体标记率为 89.34%, 放化纯度为 98.21%。流式显示分选前后 CD133 表达率分别为 $(1.78 \pm 0.54)\%$ 和 $(98.46 \pm 0.97)\%$ 。成球实验、克隆形成实验和裸鼠成瘤实验显示 CD133⁺细胞相对于 CD133⁻细胞更具有干细胞特性。¹³¹I-CD133 抗体治疗组体外对细胞抑制率及体内抑瘤率明显高于其余各实验组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:**¹³¹I-CD133 抗体在体内外均能有效抑制人肝癌 CD133⁺-HepG2 细胞的生长。

【关键词】CD133; 肝癌干细胞; ¹³¹I; 单克隆抗体; 裸鼠

【中图分类号】R735.7

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-09-10

作者介绍:段丽群, Email: qunqunduan1314@163.com,

研究方向: 肝癌干细胞体内显像与靶向治疗。

通信作者:李少林, Email: lishaolin@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:30970843、81171365)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000009.html>

少, 提示人工设计的 ZFP 可抑制 HBX 蛋白表达, 为后续实验奠定了基础。

HepG2.2.15 细胞是一株完整整合有 HBV 基因组的 HepG2 细胞, 能稳定表达 HBsAg、HBeAg 以及 Dane 颗粒, 并可在细胞内检测到 cccDNA, 是目前国际上研究 HBV 复制与筛选抗 HBV 药物的经典细胞模型。实验结果证实, 与阴性对照组相比, ZFP 转染入 HepG2.2.15 细胞后, 可明显检测到 HBV mRNA, HBV DNA 和 HBeAg 的显著减少, 提示人工设计的 ZFP 可以抑制 HBV 的转录。

本文率先设计并验证了结合于 HBX 基因启动子的 ZFP 可明显干扰 HBV 的转录, 抑制病毒的复制, 但是 ZFP 在体内实验中是否也存在同样效果有待于进一步探索。

参 考 文 献

[1] Kuo TC, Chao CC. Hepatitis B virus X protein prevents apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by up regulating SATB1 and HURP ex-

pression[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(7): 1093-1102.

[2] Arzumanyan A, Friedman T, Ng IO, et al. Does the hepatitis B anti-gen HBx promote the appearance of liver cancer stem cells? [J]. Cancer Res, 2011, 71(10): 3701-3708.

[3] Yu J, Liang QY, Wang J, et al. Zinc-finger protein 331, a novel putative tumor suppressor, suppresses growth and invasiveness of gastric cancer[J]. Oncogene, 2013, 32(3): 307-317.

[4] Mori H, Ueno-Noto K. A theoretical study of the physicochemical mechanisms associated with DNA recognition modulation in artificial zinc-finger proteins[J]. J Phys Chem B, 2011, 115(16): 4774-4780.

[5] 李 鑫, 吴忠均, 陈 聪. 特异性结合于 HBV X 基因启动子的人工锌指蛋白真核表达载体的构建及表达[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(3): 270-273.

[6] Hiraoka D, Yoshida W, Abe K, et al. Development of a method to measure DNA methylation levels by using methyl CpG-binding protein and luciferase-fused zinc finger protein[J]. Anal Chem, 2012, 84(19): 8259-8264.

[7] Wilson KA, Chateau ML, Porteus MH. Design and development of artificial Zinc finger transcription factors and Zinc finger nucleases to the hTERT Locus[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2013. doi: 10.1038/mtna.2013.12. [Epub ahead of time].

(责任编辑: 冉明会)