

214-218

30155(4)

第12卷第3期
1997年9月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol.12 No.3
Sep. 1997

反义前 C/C 基因转移表达抗乙型肝炎病毒作用的研究*

季 伟

(解放军 302 医院感染四科,北京 100039)

王勤环 / 斯崇文 张国庆 刘丹

(北京医科大学第一临床学院感染疾病科,北京 100034)

A

提 要 为了观察逆转录病毒载体包装细胞系统介导反义基因转移表达的抗乙型肝炎病毒 (HBV) 作用, 将 HBV ayw 前 C/C 基因 (pre C/C) 片段反向插入逆转录病毒载体质粒。将重组体转染逆转录病毒包装细胞 PA317 后, 获得重组逆转录病毒。用重组逆转录病毒感染 2.2.15 细胞后发现, 感染后第 3 天, 细胞培养上清 HBV 表面抗原 (HBsAg) 和 e 抗原 (HBeAg) 表达量即明显减少, 抑制作用于感染后第 5 天达到高峰, 其中对 HBsAg 表达的抑制率为 27.0%, 对 HBeAg 表达的抑制率为 59.5%。反义基因重组逆转录病毒感染 2.2.15 细胞对 HBV 抗原表达的抑制作用至少可以持续到转导后的第 11 天。空载及正义基因重组逆转录病毒感染对 2.2.15 细胞 HBV 抗原表达无明显抑制作用。此外, 反义基因重组逆转录病毒感染对 2.2.15 细胞 HBV DNA 复制也有抑制作用, 无细胞毒性。

关键词 乙型肝炎病毒 (HBV) / 基因治疗, 逆转录病毒载体

R512.620.5, R394
基因转移, 反义基因

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染是我国常见传染病, 迄今尚无有效的治疗方法。利用反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASON) 进行抗 HBV 研究已取得了可喜的成果^[1]。与 ASON 不同, 重组表达载体可以将反义核酸基因整合到细胞染色体上, 使靶细胞内不断产生反义核酸, 因而在抗病毒治疗中可能具有一定的优越性。为了探讨转基因表达反义 RNA 进行抗 HBV 基因治疗的可能性, 我们观察了重组逆转录病毒载体包装细胞系统介导反义基因转移表达的抗 HBV 作用。

材料和方法

1 主要材料和试剂

1.1 质粒 pDOR 是莫氏小鼠白血病病毒改建的载体, 它有新霉素抗性基因 (neomycin resistant gene, NeoR) 和多克隆位点, 外源基因插入多克隆位点后由 5' 端长末端重复序列驱动表达。pDOR 由中国医学科学院肿瘤医院研究所提供。pCP10 是 pBR322 EcoRI 位点中插入双拷贝头尾相接的 HBV ayw DNA 重组质粒。pCP10 由美国 Mountain Sinai Medical Center 提供。

1.2 细胞 PA317 细胞是逆转录病毒包装细胞。NIH 3T3 细胞是小鼠成纤维细胞。两种细胞由中国医学科学院肿瘤医院研究所提供。2.2.15 细胞是能够稳定表达 HBV 抗原和释放病毒颗粒的人肝母细胞瘤细胞系, 由美国 Mountain Sinai Medical Center 提供。

收稿日期: 1996-09-12, 修回日期: 1996-11-27

* 本课题是国家自然科学基金资助项目

1.3 试剂 (1)分子克隆所用各种工具酶、DNA-磷酸钙细胞转染试剂盒、细胞总 RNA 提取试剂盒均购于 Promega 公司。(2)G418、DMEM、MEM 和胎牛血清为 GIBCO 公司产品。(3)Polybrene 购于 Sigma 公司。(4)地高辛 DNA 探针标记试剂盒为 Bohringer-Mannheim 公司产品。(5)HBV DNA 地高辛标记探针由中国预防医学科学院病毒研究所提供。(6)HBsAg 和 HBeAg 固相放射免疫检测试剂盒为中国同位素公司北方免疫试剂研究所产品。

2 实验方法

2.1 构建 HBV 反义基因重组载体质粒和获取重组逆转录病毒颗粒 用 BamHI 酶切 pCP10, 分离 1.5 kb 的 pre C/C 基因片段。将酶切片段分别正、反向插入 pDO.R 质粒的 BamHI 多克隆位点上, 经限制性内切酶分析, 筛选出 pre C/C 片段正、反向插入的重组逆转录病毒载体质粒 pDO(SENSE.C)和 pDO(ANTI.C)。用磷酸钙共沉淀法将上述两种质粒和空白载体质粒 pDO.R 分别转染 PA317 细胞, 经 G418 筛选及扩增培养后, 收获含逆转录病毒颗粒的细胞培养上清液。空白载体病毒为 R-CONTROL, pre C/C 反向插入的重组病毒为 ANTI-C, 正向插入的重组病毒为 SENSE-C。重组逆转录病毒贮存于 -70℃ 备用。

2.2 感染 2.2.15 细胞 将对数生长期的 2.2.15 细胞以每孔 1×10^4 接种于 24 孔细胞培养板上, 20 h 后分四组, 每组设三个复孔。第一至第三组分别用 R-CONTROL、SENSE-C 和 ANTI-C 感染, 第四组为不加重组逆转录病毒的空白对照组。以感染倍数 (multiplicity of infection, M.O.I.) 5 的比例, 分别加入相应量的重组病毒上清。最后用完全 MEM 培养液将每孔细胞培养液补充至 2 mL, 放 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。4 h 后换液, 于换液后第 3、5、7、9、11 天再分别换液一次, 每次换出的培养液放 -20℃ 备检, 最后用固相放射免疫法检测培养上清 HBsAg 和 HBeAg 含量, 结果以 cpm 表示, 并计算 HBV 抗原表达的抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{空白对照组 HBV 抗原 cpm 值} - \text{实验组 HBV 抗原 cpm 值}}{\text{空白对照组 HBV 抗原 cpm 值}} \times 100\%$$

细胞培养在含 10% 胎牛血清、0.03% 谷氨酰胺、200 μg/ml G418、100 u/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 MEM 培养液中。

2.3 反义基因重组逆转录病毒感染对 2.2.15 细胞 HBV DNA 复制的影响 重组病毒感染后第五天, 提取 2.2.15 细胞培养上清 DNA, 用地高辛标记的 HBV DNA 探针, 进行 HBV DNA Dot blot 杂交。

2.4 重组逆转录病毒感染对 2.2.15 细胞活性的观察 重组逆转录病毒感染 2.2.15 细胞后第五天, 按文献^[2]进行 MTT 细胞毒试验。

3 统计学处理

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组资料秩检验(rank test)处理。两组资料的处理用 t 或 t' 检验。

结 果

1 反义基因重组逆转录病毒感染对 2.2.15 细胞 HBV 抗原表达的影响

重组逆转录病毒感染 2.2.15 细胞后定期收集细胞培养上清, 并贮存于 -20℃, 一并用 RIA 方法进行 HBsAg 和 HBeAg 表达量检测。每种重组逆转录病毒设 3 个复孔, 同时设不加重组病毒的空白对照组。结果显示, 反义基因重组逆转录病毒感染 2.2.15 细胞后第 3 天, HBsAg 和 HBeAg 表达均受到了抑制, 于感染后第五天抑制作用达到高峰, 并持续到感染后的第 11 天。

以后因细胞老化濒于死亡而未继续实验。空载及正义基因重组逆转录病毒对 HBV 抗原表达均无明显抑制作用(表 1、表 2、图 1 及图 2)。

2 反义基因重组逆转录病毒感染对 2.2.15 细胞 HBV 抗原抑制作用的比较

反义基因重组逆转录病毒感染 2.2.15 细胞后第 5 天, ANTI-C 对 HBsAg 的抑制率为

27.0%, 对 HBeAg 的抑制率为 59.5%, 两者相差非常显著, $P < 0.01$, 表明 ANTI-C 对 HBeAg 的抑制作用大于对 HBsAg 的抑制作用(表 3)。

表 1 重组逆转录病毒感染对 2.2.15 细胞 HBeAg 表达量的影响 (cpm, $\bar{X} \pm s$)

Table 1 HBeAg expression in the 2.2.15 cells transduced with recombinant retroviruses (cpm, $\bar{X} \pm s$).

实验分组 Groups	感染后时间(天) Days after transduction				
	3	5	7	9	11
Blank	338.7 ± 66.1	605.3 ± 42.5	615.0 ± 49.2	603.0 ± 20.3	566.7 ± 76.5
R-CONTROL	334.3 ± 50.1	595.3 ± 47.2	607.0 ± 60.0	592.3 ± 21.5	557.0 ± 84.5
SENSE-C	330.7 ± 32.1	597.3 ± 18.3	562.0 ± 62.8	593.0 ± 19.3	556.7 ± 84.5
ANTI-C	267.3 ± 38.7	442.0 ± 67.8	456.7 ± 46.0	442.0 ± 73.4	425.7 ± 41.1

表 2 重组逆转录病毒感染对 2.2.15 细胞 HBeAg 表达量的影响 (cpm, $\bar{X} \pm s$)

Table 2 HBeAg expression in the 2.2.15 cells transduced with recombinant retroviruses (cpm, $\bar{X} \pm s$).

实验分组 Groups	感染后时间(天) Days after transduction				
	3	5	7	9	11
Blank	615.0 ± 62.6	1350.7 ± 74.9	1693.3 ± 99.1	1769.7 ± 44.3	1640.0 ± 52.6
R-CONTROL	604.0 ± 60.2	1314.0 ± 89.6	1649.3 ± 49.1	1725.0 ± 36.3	1596.7 ± 14.3
SENSE-C	599.0 ± 61.5	1304.0 ± 98.1	1666.0 ± 91.4	1734.0 ± 58.0	1604.0 ± 96.7
ANTI-C	468.0 ± 53.6	547.7 ± 68.6	695.7 ± 44.5	727.0 ± 79.3	691.7 ± 95.5

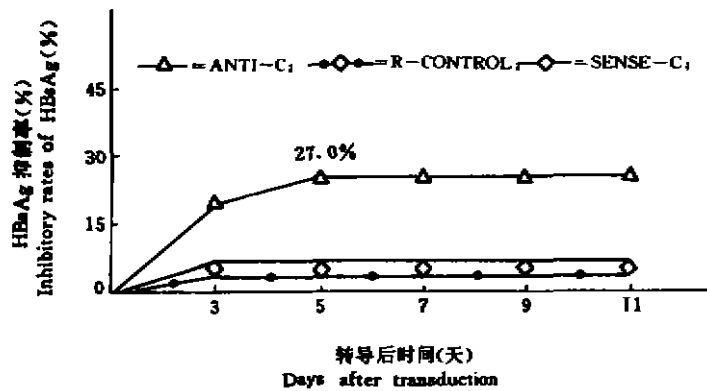


图 1 ANTI-C 感染 2.2.15 细胞对 HBeAg 表达抑制作用的动态观察

Fig 1 Kinetics of inhibitory rates of HBeAg expression in the supernatants of 2.2.15 cells transduced with recombinant retroviruses

3 反义基因重组逆转录病毒感染对 2.2.15 细胞 HBV DNA 复制的影响

重组病毒感染 2.2.15 细胞后第五天, 分别从感染的 50 μ L 细胞培养上清中提取 HBV DNA, 以地高辛标记的 HBV DNA 为探针进行斑点杂交。结果显示, ANTI-C 感染的 2.2.

表 3 ANTI-C 感染对 2.2.15 细胞 HBV 抗原抑制作用的比较 ($\bar{X} \pm s$)

Table 3 Comparison of inhibitory effects of recombinant retroviruses on HBsAg and HBeAg expression of transduced 2.2.15 cells on the day 5 ($\bar{X} \pm s$)

组别 Groups	抑制率(%) Inhibitory rates(%)		P 值 * P value
	HBsAg	HBeAg	
R-CONTROL	1.7 ± 0.4	2.7 ± 0.5	>0.05
ANTI-C	27.0 ± 0.6	59.5 ± 0.7	<0.01
SENSE-C	1.5 ± 0.7	3.5 ± 0.9	>0.05

注: n=3 Note: n=3 * * -SR- Control 组比较 $P < 0.01$

* HBsAg 之间比较 * * Comparison with R-control group $P < 0.01$ comparison between HBsAg and HBeAg

15 细胞培养上清 HBV DNA 杂交显色比 SENSE - C 和 R - CONTROL 感染的细胞培养上清 HBV DNA 杂交显色明显减弱,表明 ANTI - C 对 HBV DNA 复制也有抑制作用(图 3)。

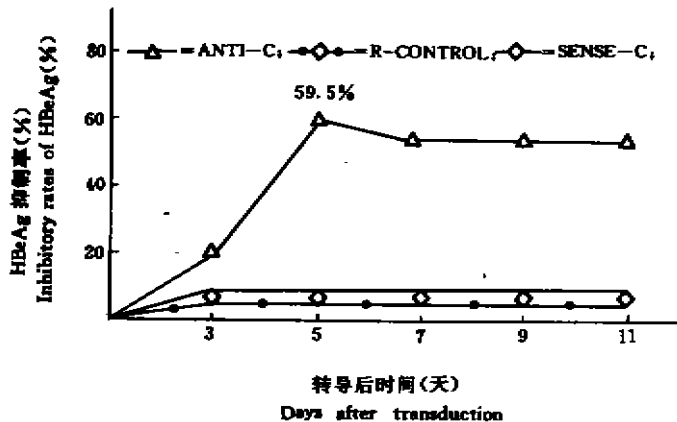


图 2 ANTI - C 感染 2.2.15 细胞对 HBeAg 表达抑制作用的动态观察

Fig 2 Kinetics of inhibitory rates of HBeAg expression in the supernatants of 2.2.15 cells transduced with recombinant retroviruses.



图 3 ANTI - C 感染的 2.2.15 细胞培养上清 HBV DNA Dot blot 分析

Fig 3 HBV DNA Dot blot analysis of 2.2.15 cells transduced with recombinant retroviruses.

1. ANTI - C 感染组; 2. R - Control 感染组;

ANTI - C group; R - Control group;

3. SENSE - C 感染组; 4. 空白对照组;

SENSE - C group; blank control.

4 重组逆转录病毒感染对 2.2.15 细胞活性的影响

重组病毒感染后第五天,对 2.2.15 细胞进行 MTT 细胞毒试验,结果表明,重组逆转录病毒感染对 2.2.15 细胞无毒性作用(结果未列入)。

讨 论

实验结果表明,反义基因重组逆转录病毒感染 2.2.15 细胞,对 HBV DNA 复制及抗原表达均有抑制作用。针对 pre C/C 基因的 ANTI - C 对 2.2.15 细胞 HBeAg 的抑制作用比对 HBsAg 的抑制作用强,对靶细胞本身无毒性作用,表明 ANTI - C 感染对 2.2.15 细胞 HBV 抗原表达的抑制作用具有特异性。

实验研究设计的反义基因片段长 1.5 kb。它所针对的靶序列不仅有 HBV 结构基因,而且也有调控基因。从理论上说,长序列反义核酸不仅能够抑制它所针对的靶基因表达,而且对突变株病毒也有抑制作用。序列越长,反义核酸的作用也就越强^[3-5]。但长序列反义核酸发生自身折叠的机会也多。当靶序列或反义核酸结合存在蛋白质时,反义核酸封闭靶基因表达的作用也将下降。此外,反义核酸封闭靶基因表达的同时也在不断消耗。目前反义核酸基因转移表达量较低,反义核酸与靶序列之间浓度的相对比例也低,因而影响了反义核酸的作用^[6]。因此选择与 HBV 复制和表达密切相关的靶序列、优选适当长度的反义核酸、减少反义核酸分子内的不必要折叠、增强反义核酸在靶细胞内的稳定性、促进反义核酸与靶序列之间的可接近性、提高反义核酸基因表达的效率等,均是进行反义核酸抗 HBV 基因治疗的重要环节。

参 考 文 献

- 1 Goodarzi G, Gross SC, Tewari A *et al*. Antisense oligonucleotides inhibit the expression of the gene for hepatitis B virus surface antigen. *J Gen Virol*, 1990, 71:3021
- 2 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, 65:55
- 3 Rhodes A, James W. Inhibition of heterologous strains of HIV by antisense RNA. *AIDS*, 1991, 5:145
- 4 赵小侠,曹雷,毛冬丽等.痘苗病毒载体介导的反义RNA抑制HBsAg基因表达的研究. *病毒学报*, 1991, 7:309.
- 5 赵小侠,毛冬丽,张爱臣等.在大肠杆菌中反义RNA抑制乙型肝炎病毒核心抗原的表达. *病毒学报*, 1992, 8:125
- 6 Chuan MKL, Vandendriessche T, Chang, H-K *et al*. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 by retroviral vectors expressing antisense-TAR. *Hum Gene Ther*, 1994, 5:1467

Inhibition of Hepatitis B Virus by Retroviral Vectors Expressing Antisenses Pre C/C

Ji Wei

(The Fourth Department of Infectious Diseases,

The 302nd Hospital of the PLA, Beijing 100039)

Wang Qinghuan Si Chongwen Zhang Guoqing *et al*

(Department of Infectious Diseases, The first Affiliated Hospital,

Beijing Medical University, Beijing 100034)

Retroviral vector expressing antisense RNA complementary to HBV pre C/C (ANTI-C) was used to transduce human hepatoblastoma cell 2.2.15, which was transfected with HBV DNA and can express HBV markers. The results showed that the inhibitory effects of antisense gene transfer mediated by retroviral vector ANTI-C on the expression of HBV antigens appeared as early as on the 3rd day after transduction, reached peak level on the fifth day, and persisted at least for 11 days. The inhibitory rates of HBsAg and HBeAg in 2.2.15 cells by ANTI-C were 27.0% and 59.5% on the fifth day after transduction, and in comparison to blank or sense-expressing vectors, the inhibitory effects of ANTI-C were highly significant ($P < 0.01$). HBV DNA in the supernatants of 2.2.15 cells transduced with ANTI-C in comparison to blank or SENSE-C was also reduced on the fifth day after transduction as detected by DNA dot blot assays, but the viability of transduced 2.2.15 cells was not affected as indicated by MTT assays. Our results demonstrated that HBV can be inhibited by retroviral vectors containing antisense gene and the antisense retroviral vectors may be potentially useful for anti-HBV gene therapy.

Key words Hepatitis B virus (HBV). Gene therapy, Retroviral vector