

反义前 S/S 基因转移表达抗乙型肝炎病毒的研究

季 伟

R512.605

(解放军 302 医院感染 7 区, 北京 100039)

王勤环[✓] 斯崇文 于 敏 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)

摘 要 为了观察反义基因转录表达抗乙型肝炎病毒(HBV)的作用, 将 HBV ayw 前 S/S 基因(preS/S)片段反向插入逆转录病毒载体质粒, 构建 preS/S 反义基因重组体, 经转染 PA317 细胞后, 获得重组逆转录病毒颗粒。用重组病毒转导 2.2.15 细胞后, 第 3 天即可见细胞培养上清 HBV 表面抗原(HBsAg)和 e 抗原(HBeAg)表达量减少, 到转导后第 5 天, 细胞培养上清中的 HBsAg 和 HBeAg 表达量降到最低水平, HBsAg 抑制率为 71%, HBeAg 抑制率为 27%, 抑制作用至少可持续到转导后第 11 天。空载及正向插入基因的重组逆转录病毒转导对 2.2.15 细胞内 HBV 抗原表达无抑制作用。

关键词 乙型肝炎病毒(HBV), 基因治疗, 逆转录病毒载体, HBV, preS/S.

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。将 HBV 前 C/C (preC/C)基因反向插入逆转录病毒载体, 构建表达 preC/C 反义 RNA 的重组逆转录病毒颗粒, 可以抑制 2.2.15 细胞 HBV 复制和表达^[1], 因而可利用基因转移技术开展抗 HBV 基因治疗。为了进一步探讨不同靶序列反义基因表达的抗病毒作用, 我们又进一步观察了重组逆转录病毒包装细胞系统介导前 S/S(preS/S)反义基因转移表达的抗 HBV 作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

1.1.1 pDOR 质粒由中国医学科学院肿瘤研究所提供。pCP10 由美国 Mountain Sinai Medical Center 提供^[1]。

1.1.2 PA317 细胞和 NIH3T3 细胞由中国医学科学院肿瘤研究所提供。2.2.15 细胞由美国 Mountain Sinai Medical Center 提供^[1]。

1.1.3 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。G418、DMEM、MEM 和胎牛血清为 GIBCO 公司产品。Polybrene 购于 Sigma 公司。地高辛 DNA 探针标记试剂盒为 Bohringer-Mannheim 公司产品。HBV DNA 地高辛标记探针试剂盒由中国预防医学科学院病毒研究所提供。HBsAg 和 HBeAg 固相放射免疫试剂盒为中国同位素公司北方免疫试剂研究所产品。

1.2 方法

1.2.1 HBV 反义基因重组载体质粒的构建和重组逆转录病毒颗粒的获得 用 Bgl II 酶切 pCP10, 分离 2.3

* 收稿日期: 1998-07-06, 修回日期: 1998-11-09

kb 的 preS/S 基因片段。将酶切片段分别正、反向插入 pDOR 质粒的 BamH I 多克隆位点,经限制性内切酶分析,筛选出 preS/S 正向、反向插入的重组逆转录病毒载体质粒 pDO(SENSE.S)和 pDO(ANTI.S)^[2]。用磷酸钙共沉淀法将上述两种质粒和空白载体质粒分别转染 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, preS/S 反向插入的重组病毒为 antisense-S, 正向插入的重组病毒为 sense-S。重组逆转录病毒贮存于 -70 °C 备用。

1.2.2 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 4 组,每组设 3 个复孔。第一至第三组分别为 R-control、sense-S 和 antisense-S 转导组。第四组为不加重组逆转录病毒的空白对照组。以感染倍数 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,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养,4 h 后换液,于换液后第 3、5、7、9 和 11 天再分别换液一次。每次换出的培养液放 -20 °C 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。细胞培养在含 10% 灭活胎牛血清、0.03% 谷氨酰胺、G418 200 μg/mL、100 u/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 MEM 培养液中。

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

1.2.3 重组逆转录病毒转导,对 2.2.15 细胞活性的观察 重组逆转录病毒转导细胞后第 5 天,按文献[3]方法进行 MTT 细胞毒试验。

1.3 统计处理

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

2 结果

2.1 重组逆转录病毒转导 2.2.15 细胞对 HBV 抗原表达的影响

antisense-S 转导 2.2.15 细胞后第 3 天,HBsAg 和 HBeAg 表达均受到抑制。转导后第 5 天,抑制率达高峰,并持续到转导后第 11 天。随后因细胞老化濒于死亡而未继续观察。空白及正向插入的重组逆转录病毒转导,对 2.2.15 细胞 HBV 抗原表达均无抑制作用(见表 1、表 2、图 1 及图 2)。

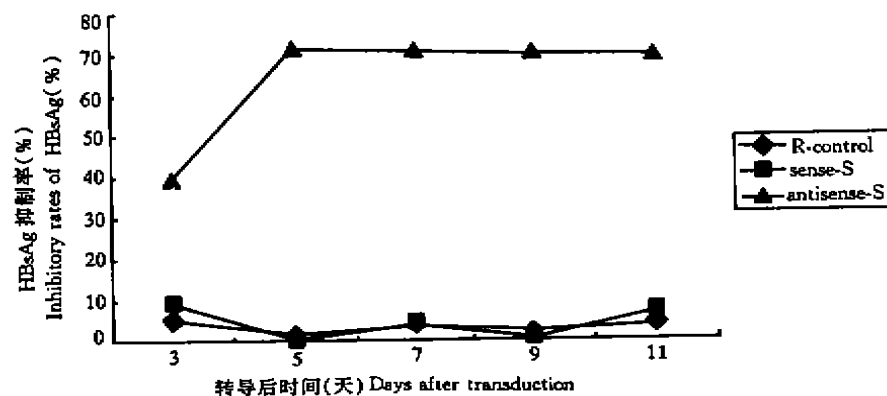


图 1 antisense-S 对 HBsAg 抑制作用的动态观察

Fig. 1 Inhibitory effects of antisense-S on HBsAg expression

2.2 反义基因重组逆转录病毒转导对 2.2.15 细胞 HBV 抗原抑制作用的比较

重组逆转录病毒转导 2.2.15 细胞后第 5 天, antisense-S 对 HBsAg 的抑制率为 71%, 对 HBeAg 的抑制率为 27%, 两者相比差别非常显著, $P < 0.01$ (表 3)。

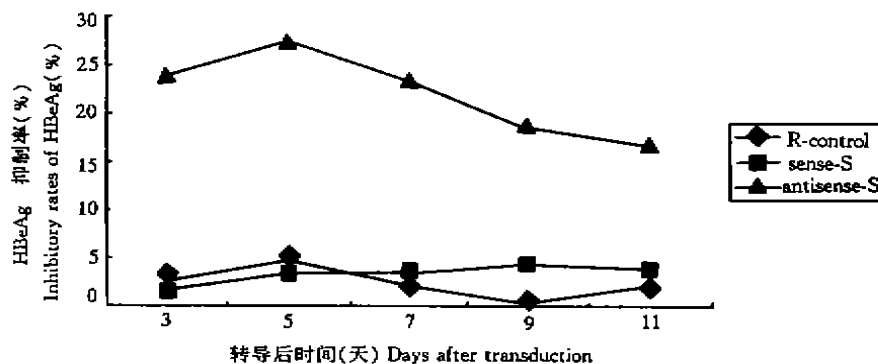


图 2 antisense-S 对 HBeAg 表达抑制作用的动态观察

Fig. 1 Inhibitory effects of antisense-S on HBeAg expression

表 1 重组逆转录病毒转导对 2.2.15 细胞 HBsAg 表达的影响 (cpm, $\bar{X} \pm s$)

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

实验分组 Groups	转导后时间 Time after transduction (d)				
	3	5	7	9	11
Blank	370 ± 34	615 ± 25	642 ± 47	621 ± 20	632 ± 41
R-control	351 ± 60	605 ± 37	619 ± 27	617 ± 15	605 ± 30
sense-S	335 ± 55	612 ± 20	617 ± 37	606 ± 14	589 ± 20
antisense-S	223 ± 22	178 ± 29	189 ± 29	182 ± 32	192 ± 41

表 2 重组逆转录病毒转导对 2.2.15 细胞 HBeAg 表达的影响 (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	转导后时间 Time after transduction (d)				
	3	5	7	9	11
Blank	615 ± 23	1418 ± 104	1725 ± 67	1750 ± 94	1626 ± 121
R-control	599 ± 15	1399 ± 95	1687 ± 144	1744 ± 99	1593 ± 92
sense-S	604 ± 17	1407 ± 104	1668 ± 70	1600 ± 159	1565 ± 57
antisense-S	469 ± 21	1031 ± 73	1327 ± 70	1428 ± 348	1356 ± 106

2.3 重组逆转录病毒转导对 2.2.15 细胞活性的影响

重组逆转录病毒转导 2.2.15 细胞后第 5 天, 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(结果未列出)。

3 讨论

逆转录病毒载体质粒 pDOR 是由莫氏小鼠白血病病毒改建的载体。将 HBV ayw 基因组 preS/S 片段插入此载体中的多克隆位点上, 经转染逆转录病毒包装细胞系 PA317 后, 获得重组逆转录病毒。体外用重组病毒转导 2.2.15 细胞可抑制 HBV 抗原表达。与我们以前的研究

结果类似,虽然表达 HBV preS/S 反义基因的重组逆转录病毒 antisense-S 对 HBsAg 和 HBeAg 均有抑制作用,但是它对 HBsAg 表达的抑制作用比对 HBeAg 的抑制作用强,表明反义基因转移表达的抗病毒作用具有特异性。由于实验设计的反义基因片段长约 2.3 kb,它不仅包括了所有 preS/S 基因片段,而且也重叠有 HBV 其它基因序列,因此构建的反义基因重组逆转录病毒不仅能够特异地抑制 HBsAg 表达,对 HBeAg 和 HBV DNA 也具有抑制作用。但重组病毒转导对靶细胞本身无毒性作用。

表 3 antisense-S 对 2.2.15 细胞 HBV 抗原表达抑制作用的比较 ($\bar{X} \pm s$)

Table 3 Comparison of inhibitory effects of recombinant retroviruses on HBV antigens expressions in the transduced 2.2.15 cells on day 5 ($\bar{X} \pm s$)

分组 Groups	抑制率 (%) Inhibitory rates (%)		P 值* Value*
	HBsAg	HBeAg	
R-control	1.6	1.3	>0.05
sense-S	0.5**	0.8**	>0.05
antisense-S	71.1***	27.3***	<0.01

注: n=3; * HBsAg 组与 HBeAg 组之间比较;

Note: n=3; * comparison between HBsAg and HBeAg;

**与 R-control 组比较, P>0.05;

***与 R-control 组比较, P<0.01

***与 R-control 组比较, P<0.01

*** Comparison with R-control, P<0.01

参 考 文 献

- 1 季伟,王勤环,斯崇文等.反义前 C/C 基因转移表达抗乙型肝炎病毒作用的研究.中国病毒学,1997,12(3):214~218
- 2 季伟,王勤环,斯崇文等.逆转录病毒载体介导乙型肝炎病毒反义基因的转录表达.中华实验和临床病毒学杂志,1997,11(4):325~328
- 3 Mostmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 1983, 65:55

Inhibition of Hepatitis B Virus by Retroviral Vectors Expressing Antisenses PreS/S

Ji Wei

(The Seventh Department of Infectious Diseases, 302 Hospital of the PLA, Beijing 100039)

Wang Qinghuan Si Chongwen Yu Ming et al

(Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100034)

Abstract Retroviral vector expressing antisense RNA complementary to HBV preS/S (antisense-S) 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 antisense-S on the expression of HBV antigens appeared as early as on day 3 after transduction, reached peak level on day 5, and persisted at least for 11 days. The inhibitory rates of HBsAg and HBeAg in the 2.2.15 cells by antisense-S were 71% and 27% on day 5 after transduction, and in comparison to blank or sense-S, the inhibitory effects of antisense-S were highly significant ($P<0.01$). The viability of transduced 2.2.15 cells was not affected as indicated by MTT assays. The results demonstrated that retroviral vectors containing antisense gene can inhibit HBV, and the antisense retroviral vectors may be potentially useful for anti-HBV gene therapy.

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