

HCV 1a/1b 型嵌合体能在 HepG2 细胞内复制与表达*

王宏卫¹, 赵平¹, 谢南², 张珉¹, 朱诗应¹, 戚中田^{1**}

(1. 第二军医大学微生物学教研室, 上海, 200433; 2. 南昌市第九医院, 江西南昌, 330002)

Replication and Expression of HCV 1a/1b Chimeric Genome
in Transfected HepG2 Cells*WANG Hong-wei¹, ZHAO Ping¹, XIE Nan², ZHANG Min¹, ZHU Shi-ying¹, QI Zhong-tian^{1**}

(1. Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Nanchang 9th Hospital, Nanchang 330002, China)

Abstract: To investigate the replication and expression of *Hepatitis C virus*(HCV) 1a and 1b chimeric cDNA in HepG2 cells, HCV 1a/1b chimeric cDNA was used to construct an expression plasmid for the transfection of HepG2 cells. HCV protein and HCV genomic RNA and anti-genomic RNA in the transfected HepG2 cells and the culture supernatants were detected by immunocytochemical staining, Western blotting and RT-PCR respectively. The results showed that HCV NS3 protein with about 70kDa was detectable in the transfected HepG2 cells, HCV genomic RNA and anti-genomic RNA were found positive both in the HepG2 cells and the culture supernatants for more than 20 generations. HCV 1a/1b chimera can replicate and express in HepG2 cells, suggesting that the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of HCV 1b can initiate the replication of HCV containing genotype 1a untranslated region(UTR). The alterations of 5' UTR of HCV 1b at nucleotides 11, 12, 13, 34 and 35 do not influence its binding to ribosome. The 3' UTR at nucleotides 9400, 9403 and 9407, the deletion 'A' at nucleotide 9439 and insertions 'TT' and 'AAT' at nucleotides 9409, 9410 and 9495, 9496, 9497, do not significantly influence the RdRp binding and activities of HCV 1b. This HCV chimeric cDNA can be of value in the studies of HCV replication and expression.

Key words: *Hepatitis C virus*(HCV); Chimeric cDNA; Transfection; HepG2 cell; RNA-dependent RNA polymerase; Expression

摘要: 采用 HCV 1a/1b 嵌合体 cDNA 构建表达质粒转染 HepG2 细胞, 以免疫组化和 Western blotting 检测 HCV 蛋白表达, RT-PCR 检测 HCV 正、负链 RNA, 研究丙型肝炎病毒 (HCV) 1a 和 1b 型嵌合体全长 cDNA 在 HepG2 细胞中的复制和表达。结果证明, 转染细胞中检测到分子量约 70 kDa 的 HCV NS3 蛋白, 转染细胞连续传 20 代, 仍能检测到 HCV 正、负链 RNA。表明该 HCV 嵌合体可以在细胞中复制和表达, HCV 1b 型的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRp) 可以起始含 1a 型非编码区的病毒复制。HCV 5' 端非翻译区第 11、12、13、34 和 35 位核苷酸改变可不影响其与核糖体结合。3' 非翻译区 9400, 9403 和 9407 位核苷酸改变, 9435 位缺失 "A", 9409, 9410 位及 9495, 9496, 9497 位分别插入 "TT" 和 "AAT" 可不影响 RdRp 的生物活性。本研究对阐明 HCV 复制和翻译机制有重要意义。

关键词: 丙型肝炎病毒; 嵌合体 cDNA; HepG2 细胞; RNA 依赖的 RNA 聚合酶; 表达

中图分类号: R512.6

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 05-0423-05

丙型肝炎病毒(*Hepatitis C virus*, HCV)是单股正链 RNA 病毒, 属黄病毒科家族成员, 主要有 1a、

1b、2a、2b、3a 和 3b 基因型。病毒基因组全长约 9600nt, 由一个高度保守的 5' 非翻译区(5' UTR),

收稿日期: 2003-03-20, 修回日期: 2003-05-20

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划, 2002AA214161); 上海市科技发展基金 (02DJ14015)

作者简介: 王宏卫 (1970-), 男, 河南省籍, 博士研究生, 研究方向为分子病毒学。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel: 021-25070312. Fax: 021-25070312. E-mail: qizt@smmu.edu.cn

一个长约 9000nt 的开放读码框架 (ORF) 和一个 3' UTR 组成。5' UTR 约 340nt, 构成的 IRES 主要与 HCV 蛋白的翻译有关^[1]。3' UTR 含有一个可变区^[2, 3], 一个 poly(A) 或 poly(U) 及一个 98nt 的高度保守区, 主要与 HCV 的复制有关。ORF 编码一个大的蛋白前体, 可经宿主或病毒蛋白酶切割出 10 种不同的病毒蛋白, 其中 HCV NS5b 基因区编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRp), 与病毒 RNA 复制起始有关。

HCV 是输血后肝炎的重要致病因子, 易形成慢性感染并可导致肝硬化甚至肝细胞癌, 目前尚无特异、有效的治疗方法, 亦缺乏合适的细胞模型对 HCV 的复制、表达等进行深入研究。Michalak 等以 HCV 不同基因片段转染细胞^[4, 5], 研究了 HCV 多肽链的表达和剪切过程。Hiramatsu 等通过对 HCV 基因进行突变, 研究了不同基因区域在 HCV 复制中的作用^[6-8], 发现 3' UTR 保守区的 98 个核苷酸及 C 区对 HCV 复制并非必需, 而非结构蛋白的某些基因突变可导致 HCV 复制水平增高。为观察 HCV 1b 型的 RdRp 能否起始含 1a 型非编码区的病毒复制及 5' UTR 核苷酸改变对蛋白翻译的影响, 本研究利用 HCV 1a 与 1b 的嵌合体全长 cDNA 构建表达质粒, 以其转染 HepG2 细胞, 检测细胞中 HCV 的复制和表达, 以探讨 HCV 不同基因型的结构与功能的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自上海 Sangon 生物工程公司。转染试剂 LipofectAMINETM reagent 购自 GIBCOBRL 公司。RNA 抽提试剂 TRIZOL 和 TRIZOL LS 购自上海华舜生物工程公司。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗小鼠 IgG、丙烯酰胺等购自华美生物工程公司。真核表达载体 pcDNA3.1 为 Invitrogen 产品。大肠杆菌 DH5 α 和人 HepG2 细胞株均由本室保存, HCV NS3 单克隆抗体由本室自制。含 HCV 1a/1b 嵌合体全长 cDNA 的质粒 pH CJ4 由美国 NIH 的 Yanagi 教授惠赠。该嵌合体 HCV 全长 cDNA 见图 1, 其中 5' 端 1-155 核苷酸、3' 端可变区的最后 15nt、poly(U) 序列及保守区来自 HCV 1a(H77), 其余序列 (包括整个 ORF) 来自 HCV 1b(HCJ4)。

1.2 真核表达载体的构建与转染

质粒 pH CJ4 用 Not I+Xba I 双酶切, 得到 9595bp 的 HCV 全长基因组 cDNA。定向插入 pcDNA3.1

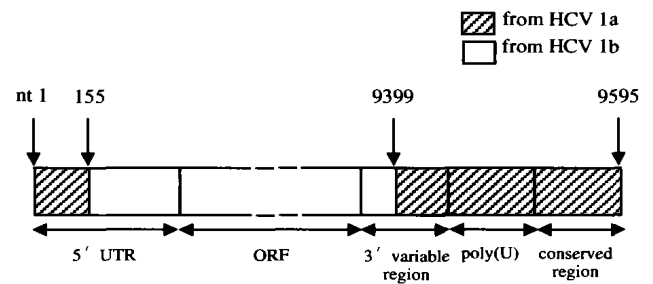


图 1 HCV 1a/1b 嵌合体 cDNA 基因结构示意图

Fig. 1 Genomic structure of HCV 1a/1b chimeric cDNA

The 5' UTR of HCV 1a differs from the authentic sequence of HCV 1b at nucleotides 11, 12, 13, 34 and 35. The 3' variable region differs from the authentic sequence of HCV 1b at nucleotides 9400, 9403 and 9407, deletes 'A' at nucleotide 9439 and inserts 'TT' at nucleotides 9409, 9410. The 3' conserved region inserts 'AAT' at nucleotides 9495, 9496 and 9497.

载体 CMV 启动子下游多克隆位点的 NotI 和 XbaI 处, 酶切鉴定得到重组质粒, 命名为 p3.1HCV。培养 HepG2 细胞至 50% 融合, 用 LipofectAMINE 将 p3.1HCV 转染至细胞, G418 筛选。具体操作参照使用说明。

1.3 HCV 基因组 RNA 及负链 RNA 的检测

取 10^7 转染细胞, 用 Trizol 试剂提取 RNA, 溶于 $10\mu\text{L}$ DEPC 处理的水中, 用 DNase I 消化后。取 $5\mu\text{L}$ 进行 RT-PCR 检测。引物位于 HCVC 区, 上游引物为 5'-CCAAAACCCCAAAGAAA-3', 下游引物为 5'-GTACCCCATGAGGTCCGGCG-3'。先用上游引物 (检测负链时) 或下游引物 (检测正链时) 37°C 逆转录 1h, 再用引物进行扩增。反应条件为: 94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 45s, 共 35 个循环, 反应结束前于 72°C 延伸 7min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行分析, 预期扩增片段为 414bp, 每次反应均设阴、阳性对照。

1.4 免疫组化

按参考文献操作^[9]。转染细胞和对照细胞分别制备玻片, $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 甲醇溶液室温 15min, 甲醇 -20°C 透化 20min, 6% 的正常羊血清 37°C 温育 30min, 吸弃多余封闭液。加 HCV NS3 单克隆抗体 (1:1000 稀释), 4°C 反应 16h。加碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 (1:100), 37°C 温育 1h, TMS₁ 和 TMS₂ 各 5min \times 2 次梯度碱化, NBT/BCIP 避光显色 10min, 每步间以 PBS 充分洗涤。

1.5 Western blotting 分析

35mm 平皿培养的细胞用 PBS 洗一次, 加 $200\mu\text{L}$ 预热的 $1\times\text{SDS}$ 上样缓冲液充分裂解细胞, 收

集裂解液, 煮沸 5min, 离心收集上清。各取 20 μ L 上清行 10% SDS-PAGE 电泳后, 将凝胶中的蛋白条带电转至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉封闭 30min, 加入 1:500 稀释的 HCV NS3 单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜。加入 1:500 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠抗体, 室温 1h, 用 DAB/H₂O₂ 显色。

2 结果

2.1 真核表达载体的构建

含 HCV 1a/1b 嵌合体全长 cDNA 的重组质粒 P3.1HCV 经 *Not*I 和 *Xba*I 酶切后, 在 0.7% 琼脂糖凝胶电泳中可见 2 个片段, 分别为载体及 HCV 基因全长 (图 2), 与预期片段大小相符。

2.2 转染 HepG2 细胞中 HCV 的复制

以 p3.1HCV 转染 HepG2 细胞, 分别在转染前 (0 代) 及转染后第 1、3、5、10 和 20 代收集细胞培养上清液和细胞, 进行 RT-PCR 分析, 以判断转

染的 HCV 1a/1b 体能否在 HepG2 细胞内复制。结果表明, 在转染细胞和培养上清液中均检测到 HCV 正、负链 RNA, 而转染 pcDNA3.1 的对照组皆为阴性 (见图 3)。



图 2 p3.1HCV *Not*I+*Xba*I 酶切鉴定

Fig.2. Restriction endonuclease digestion of the recombinant plasmid p3.1HCV

M, λ DNA/*Hind* III+*Eco*R I marker; 1, p3.1HCV digested with *Not*I+*Xba*I

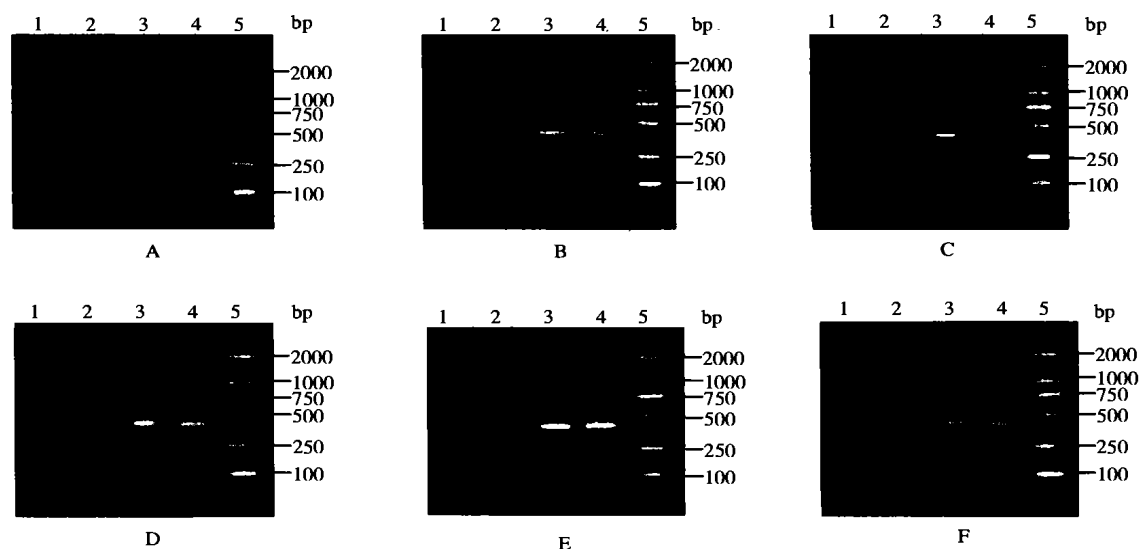


图 3 HCV 1a/1b 嵌合体转染的 HepG2 细胞中 HCV RNA 的检测

Fig.3 RT-PCR detection for positive and negative strand HCV RNA in transfected HepG2 cells

A, B, C, D, E and F represent 0, 1st, 2nd, 3rd, 5th, 10th and 20th generation, respectively. Lane 1, Positive strand HCV RNA in cells transfected with pcDNA3.1; 2, Negative strand HCV RNA in cells transfected with pcDNA3.1; 3, Positive strand HCV RNA in cells transfected with p3.1HCV; 4, Negative strand HCV RNA in cells transfected with p3.1HCV; 5, DNA marker DL 2,000.

2.3 转染细胞内 HCV 蛋白质的表达

以 p3.1HCV 转染 HepG2 细胞, 分别在转染后第 1、3、5、10 和 20 代收集培养细胞, 以免疫组化法在 HepG2 细胞中均检出了 HCV NS3 蛋白的表达。转染 pcDNA3.1 的对照细胞及 PBS 对照均为阴

性。以 Western blot 对转染细胞表达的蛋白进行鉴定。如 Fig.3 所示, 在约 70 kDa 处出现与 HCV NS3 单克隆抗体发生反应的特异条带, 证明转染细胞有 HCV NS3 蛋白的表达, 转染 pcDNA3.1 的对照细胞无相应条带。

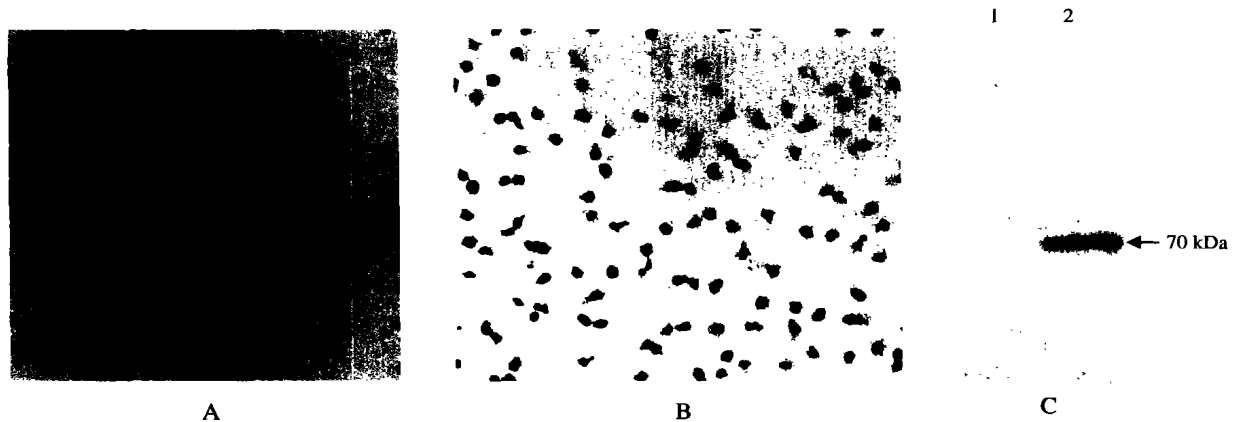


图 4 转染的 HepG2 细胞中 HCV NS3 蛋白的表达

Fig.4 Detection of HCV NS3 protein in transfected HepG2 cells

A: Negative control of HepG2 cells transfected with pcDNA3.1($\times 200$). B: Immunocytochemical staining of HCV NS3 protein in HepG2 cells transfected with p3.1HCV ($\times 200$). C: Immunoblots of HCV NS3 expressed in transfected HepG2 cells. Lane 1, transfected with pcDNA3.1; Lane 2, transfected with p3.1HCV.

3 讨论

HCV NS5b 基因区编码 RdRp, 其晶体结构不同于其它聚合酶的 U 形, 为酶活性位点包裹其中的球形分子^[10]。另外, HCV RdRp 有一 12 个氨基酸的 β 发夹结构, 可作为分子闸门阻止 3' 末端模板从酶活性位点滑脱, 从而保证 HCV 基因从头复制的起始^[11,12]。HCV 复制的一个特点是极易产生突变株, 原因是 HCV 的 RdRp 起始 RNA 复制时的错配率高, 导致准种病毒产生^[13]。HCV 的 ORF 在胞浆中翻译不是帽依赖性的, 而是通过 5' 非翻译区(5' UTR)的内在核糖体结合位点 (IRES) 结合于核糖体^[14, 15]。

研究证明, 起始 HCV 复制需 HCV RdRp 与 3' UTR 的特定部位结合, 由于 HCV 1b(HCJ4 株)和 HCV 1a(H77 株)的 RdRp 在氨基酸序列上有 10% 以上的差异, 故研究 HCJ4 的 RdRp 能否起始含有 H77 基因的嵌合体基因组的复制具有重要意义。本研究所用嵌合体 HCV 全长 cDNA 的 5' UTR 与 HCJ4 存在 5 个核苷酸差异, 3' 端可变区有 5 个核苷酸差异, 3' 端保守区有 3 个核苷酸差异^[16]。以该质粒转染培养细胞检测蛋白表达发现, 并非所有的转染细胞都能表达病毒蛋白, 其机理可能是转染的 cDNA 在细胞核转录出 RNA, RNA 的剪切及甲基化使转录体失活, 或是由于胞核转录的 RNA 不完整或 5' 和 3' 端序列错误。考虑上述因素, 本研究选择肝来源的细胞系 HepG2 为转染细胞。为排除质粒污染对检测结果的可能影响, 对转染细胞提取的 HCV RNA 样品以 DNase 充分消化, 保证了检测 HCV 正、负链 RNA 的样品中不含 HCV cDNA。转染细胞内 HCV RNA 特别是标志病毒复制的负链

RNA 水平保持 20 代以上, 表明转染细胞中有 HCV 复制, 也提示 HCV 1b 型编码的 RdRp 可以起始 1a 型病毒的复制。3' UTR 第 9400, 9403, 9407 位核苷酸的改变, 第 9439 位缺失“A”及第 9409, 9410 位和 9495, 9496, 9497 位分别插入“TT”和“AAT”不影响病毒基因的复制。转染细胞可表达 HCV NS3 蛋白, 分子量大小正确, 表明 5' UTR 第 11, 12, 13, 34, 35 位核苷酸的改变不影响其起始翻译的功能。

本研究以 HCV 1a/1b 嵌合体 cDNA 克隆构建表达质粒转染细胞, 证实该 HCV 嵌合体 cDNA 克隆在转染细胞中可转录出病毒 RNA, 由来自 HCV 不同亚型的 UTR 组成的嵌合体可以在细胞内复制与表达, 为 HCV 复制及蛋白翻译机制的深入研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Honda M, Ping L H, Rijnbrand R A, *et al.* Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA[J]. *Virology*, 1996, 222: 31-42.
- [2] Ito T, Tahara S M, Lai M C. The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhance translation from an internal ribosomal entry site[J]. *J Virol*, 1998, 72: 8789-8796.
- [3] Hahn B, Kim Y K, Kim, J H, *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus[J]. *J Virol*, 1998, 72: 8782-8788.
- [4] Michalak J P, Wychowski C, Choukhi A, *et al.* Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins[J]. *J Gen Virol*, 1997, 78: 2299-2306.
- [5] Tokushige K, Moradpour D, Wakita T, *et al.* Comparison between cytomegalovirus promoter and elongation factor-1 alpha promoter-

- driven constructs in the establishment of cell lines expressing hepatitis C virus core protein[J]. *J Virol Methods*, 1997, 64(1): 73-80.
- [6] Hiramatsu N, Dash S, Gerber M A. HCV cDNA transfection to HepG2 cells[J]. *J Virol Hepat*, 1997, 4(suppl): 61-67.
- [7] Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations[J]. *J Virol*, 2001, 75(10): 4614-4624.
- [8] Lohmann V, Korner F, Koch J O, *et al.* Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line[J]. *Science*, 1999, 285: 110-113.
- [9] 赵兰娟, 刘厚奇, 曹洁, 等. 丙型肝炎病毒 E2 蛋白对 HepG2 细胞 MAPK/ERK 的激活[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2001, 33(6): 691-695.
- [10] Bressanelli S, Tomei L, Roussel A, *et al.* Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 13034-13039.
- [11] Hong Z, Cameron C E, Walker M P, *et al.* A novel mechanism to ensure terminal initiation by hepatitis C virus NS5B polymerase[J]. *Virology*, 2001, 285: 6-11.
- [12] Zhong W, Ferrari E, Lesburg C A. *et al.* Template/primer requirements and single nucleotide incorporation by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase[J]. *J Virol*, 2000, 74: 9134-9145.
- [13] Martell M, Esteban J I, Quer J, *et al.* Hepatitis C virus(HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution[J]. *J Virol*, 1992, 66: 3225-3229.
- [14] Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome binding mechanism[J]. *J Virol*, 1993, 67: 3338-3344.
- [15] Boyer J C, Haenni A L. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses[J]. *Virology*, 1994, 198: 415-426.
- [16] Masayuki Y, Marisa S T, Max S, *et al.* Transcripts of a chimeric cDNA of hepatitis C virus genotype 1b are infectious in vivo[J]. *Virology*, 1998, 244: 161-172.

书讯

《植物病毒种类分子鉴定》

由中国科学院院士田波作序, 浙江省农业科学院陈炯、陈剑平二位研究员合著的《植物病毒种类分子鉴定》一书已于 2003 年 4 月由科学出版社出版。该书是我国首部植物病毒种类分子鉴定的专著, 汇聚了作者近 10 年来在植物病毒领域的研究成果和资料, 共涉及 9 个属 47 种植物病毒, 其中 6 种可能为新种。该书主要描述病毒的细胞病理学和病毒的基因组序列特征, 并对它们的起源、变异、分化及与相关病毒的系统进化关系做了详细分析; 介绍了马铃薯 Y 病毒科特异性简并引物 PCR 检测方法和基因组全序列扩增技术; 对线状植物病毒的研究概况做了简明的综述。此外, 书后还附了有关病毒基因组序列和 68 版制作精美、特征明显的病害症状彩色照片, 以及病毒粒子、内含体电子显微镜照片。

该书可供农业科研单位、农业院校和综合性大学从事植物病毒学、植物病理学、分子生物学、植物检疫和生物技术的科研教学工作者、高等院校师生和农技人员参考。

该书为大 16 开精装, 正文 384 页, 85.7 万字, 每本订价 150 元, 免邮费。

需要订阅者, 请将书款寄至: 杭州市石桥路 198 号浙江省农业科学院《浙江农业学报》编辑部, 邮编: 310021; 银行帐户: 浙江省农业科学院农村发展与信息研究所; 帐号: 312-015301040007606-55; 开户行: 杭州市农行机场路分理处; 联系人: 陈华平, 袁醉敏, 张琦; 电话: 0571-86404190, 86404129; E-mail: zjnxb@zaas.org