

丙肝病毒全基因组克隆转染细胞体系的初步研究*

郭 佳¹, 姚相杰¹, 郑从义^{1**}, 方呈祥¹, 屈三甫¹, 李信墙², 李卫云²

(1. 武汉大学生命科学学院, 湖北武汉 430072; 2. 广州中海潮生物技术有限公司, 广东广州 510010)

Study of Cell Culture System Transfected with Full-length cDNA Clone of
Hepatitis C Virus*GUO Jia¹, YAO Xiang-jie¹, ZHENG Cong-yi^{1**}, FANG Cheng-xiang¹ QU San-fu¹,
LI Xin-qiang², LI Wei-yun²

(1. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Chinawave Biotechnology Co. Ltd, Guangzhou 510010, China)

Abstract: A Vero-E6 culture system was developed to assay *Hepatitis C virus* (HCV) replication by plasmid (pHCV) transfection, which contains a T7 promoter at the 5' end, full-length cDNA of the HCV genome and a T7 terminator. To facilitate high-level transcription of HCV RNA, Vero-E6 cells were transfected with pHCV and then infected with recombinant vaccinia virus (vTF7-3) containing the T7 RNA polymerase gene. This transfection-based cell culture system produced high levels of HCV genome (10^7 - 10^8 copies/mL) detectable by real-time quantitative PCR and the production of HCV RNA transcripts was confirmed by RT-PCR. Western blot analysis revealed that HCV structural and non-structural proteins were correctly processed. The transfected Vero-E6 cells assembled 40-50nm virus-like particles were analysed with transmission electron microscope. This model can be utilized for studying mechanisms of HCV replication, preparation of HCV vaccine and to test potential antiviral drugs.

Key words: Full genome of HCV; Clone; Transfected cell culture system; Recombinant vaccinia virus

摘要: 采用一种含有 HCV 全基因组和噬菌体 T7 启动子和终止子序列的载体 (pHCV) 转染 Vero-E6 细胞, 随后感染高效表达 T7 RNA 聚合酶的重组痘病毒 (vTF7-3), 通过 vTF7-3 的辅助作用, 使 Vero-E6 细胞高效增殖 HCV 病毒体, 建立了一种新的 HCV 体外细胞培养体系。RT-PCR、荧光定量 PCR 检测转染细胞裂解液中 HCV 滴度的结果显示: pHCV 转染细胞内 HCV 基因拷贝达 10^7 - 10^8 /mL, 同时有 HCV 正链 RNA 合成; 免疫印迹显示该培养体系中有 HCV 结构蛋白、非结构蛋白的表达; pHCV 转染细胞经透射电镜观察, 可见清晰的 HCV 病毒体, 直径在 40-50nm。这一新体系的初步建立, 为研究 HCV 的复制机制、制备 HCV 疫苗和研发抗病毒药物奠定了基础。

关键词: HCV 全基因组; 克隆; 转染细胞体系; 重组痘病毒

中图分类号: R512.6

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0320-05

丙型肝炎病毒(*Hepatitis C virus*, HCV)是引起人类丙型肝炎的病原体, 其感染往往发展成肝硬化或肝癌, 严重威胁人类健康^[1,2]。按照基因序列的同源性 HCV 分为 6 个大型 (I, II, III, IV, V, VI), 型内

又可分为许多亚型, 基因型的多样性特征对研究其感染的分布和传播意义重大, 但却给丙型肝炎的预防带来困难^[3]。鉴于 HCV 流行病学及其感染的特殊性, 众多学者高度关注, 试图研制有效而实用的疫

收稿日期: 2004-01-14, 修回日期: 2004-05-09

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) (2002AA216031)

作者简介: 郭佳 (1980-), 女, 云南省籍, 硕士研究生。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel: 027-87682319, E-mail: cctcc@whu.edu.cn.

苗,但结果不尽人意。

迄今, HCV 病毒疫苗研究主要分两类,一类是基于病毒结构和非结构蛋白的多表位蛋白疫苗,或以模拟表位为基础的重组多肽疫苗;另一类是模拟多表位的 DNA 疫苗。这些疫苗有部分已进行过动物实验,有一定的免疫效果。但由于 RNA 病毒的变异性,加之缺乏有效支撑 HCV 病毒大量增殖的细胞培养体系,使得疫苗的研究与应用相距甚远^[4-6]。

近年来,我们构建了一种含有 HCV 全基因组和噬菌体 T7 启动子、终止子序列的克隆载体 (pHCV)。pHCV 转染细胞后,可在高效表达 T7 RNA 聚合酶的重组痘病毒 (vTF7-3) 辅助下,产生高滴度的 HCV 病毒体^[7]。但由于该体系在选择 pHCV 的受染细胞时,主要考虑痘病毒感染的宿主特异性,因而选用了痘病毒敏感的肿瘤细胞 (HeLa) 作为受染细胞,致使该体系获得的 HCV 病毒体不能用于疫苗研究。本文选择几种正常细胞作为 pHCV 转染宿主,初步研究了 pHCV 的转染效率,测定了转染细胞中 HCV 结构蛋白和非结构蛋白的表达,观察了电镜下病毒体在细胞中的形态特征,建立了一种新的 pHCV 细胞转染体系。为 HCV 的疫苗研制和抗病毒药物的研发奠定了良好基础。

1 材料与方 法

1.1 HCV 全基因组 cDNA 克隆、突变与质粒构建

HCV 全基因组克隆、突变与质粒构建由李信墙博士完成^[7],其构建方法简述如下:用 RNA 提取试剂盒 (Promega) 从急性丙肝患者血清中提取总 RNA,根据 Aizaki 等人^[8]报道的 HCV 基因组序列设计 6 对引物,其中引物 6 的 5'UTR 上游添加 T7 启动子序列,利用 RT-PCR 技术以分段扩增的方法合成全长的 HCV 基因组 DNA,经 *Hind* III 和 *Spe* I 酶切后克隆到 PFK-1 载体的 *Hind* III 和 *Spe* I 位点上,获得 PFK-1 HCV DNA,然后应用点突变技术在 HCV 基因组的 NS3 和 NS5A 基因上进行三个特异氨基酸点突变 (NS3 区 1202 位点的 Glu 变为 Gly; 1280 位点的 Thr 变为 Ile, NS5A 区 2197 位点 Ser 变为 Pro),得到含 HCV 全基因组的 pHCV 质粒用于转染实验。

1.2 痘病毒及其宿主细胞

表达 T7 RNA 聚合酶的重组痘病毒 (vTF7-3) 购自美国 ATCC,由 Fuerst TR 等人构建^[9],病毒滴度为 10^{10} TCID₅₀。兔肾细胞系 RK-13,非洲绿猴肾细胞系 Vero-E6 和 Vero 细胞由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供,细胞于含 10%胎牛血清 (FBS) 的

MEM 培养基中常规培养、传代。

1.3 重组痘病毒感染

以 RK-13, Vero-E6 和 Vero 作为宿主细胞,加入适当稀释的重组痘病毒 (vTF7-3),吸附 2h 后弃掉,换成 2%FBS 的 MEM 培养基继续培养,观察细胞病变情况,同时设正常细胞对照。

1.4 pHCV 质粒转染

pHCV 质粒转染 Vero-E6 细胞按 Lipofectamine 2000(Invitrogen)说明书进行。转染后加入稀释的重组痘病毒 vTF7-3,吸附 2h 后弃掉,最后加入含 2% FBS 的 MEM 培养。转染实验设正常细胞、只感染痘病毒细胞对照。通过 RT-PCR 技术检测评估转染效率。

1.5 RNA 的提取和 RT-PCR

RNA 的提取按 Trizol 试剂盒 (Invitrogen) 说明书操作。提取的 RNA 用 DNase I 于 37℃水浴处理 30min,以除去质粒 DNA 的干扰。用逆转录引物 5'-ATGATGCACGGTCTACGAGACCTCCCGGGGC-3' 合成第一条 cDNA 链,再用一对特异性引物 5'-CCAGC CCCCTGATGGGGGCGACA-3', 5'-ACTCGCAAGCACCC TATCAGGCA-3' 对该 cDNA 进行特异片段扩增。目的扩增片段为 310bp,位于 HCV 基因组的 5'端的保守区。

1.6 荧光定量 PCR

在 pHCV 质粒转染细胞后培养 2-6d 收集细胞裂解液,根据荧光定量 PCR 试剂盒的说明书 (购自深圳达尔安生物技术有限公司) 测定样品的 HCV 基因拷贝数。在测定过程中将 RNA 提取物用 DNase I 于 37℃水浴处理 30min。

1.7 免疫印迹

Western-blotting 按文献^[10]的方法进行。一抗采用鼠抗 HCV 的 E2, Core 和 NS5 蛋白的单克隆抗体 (购自美国 Virostat 公司)。二抗为碱性磷酸酶标记马抗小鼠 IgG (购自北京中山生物技术有限公司)。利用 NBT-BCIP 显色。

1.8 电镜观察

收集培养 60h 的转染 Vero-E6 细胞,以 1500 r/min 离心 10 min,弃上清,细胞沉淀用 2.5%戊二醛固定,按照常规电镜样品制备程序^[11]脱水、包埋、切片、染色,于透射电镜下观察。

2 结 果

2.1 重组痘病毒敏感宿主细胞的筛选

已知痘病毒是一种典型的溶细胞病毒,感染敏感宿主细胞后可产生明显的细胞病变 (CPE)^[12],

因此可通过痘病毒感染后细胞的病变程度来确定细胞对痘病毒的敏感性。本研究选择 RK-13、Vero-E6 和 Vero 作为 vTF7-3 的感染宿主, 筛选敏感的宿主细胞, 结果见图 1 和表 1。

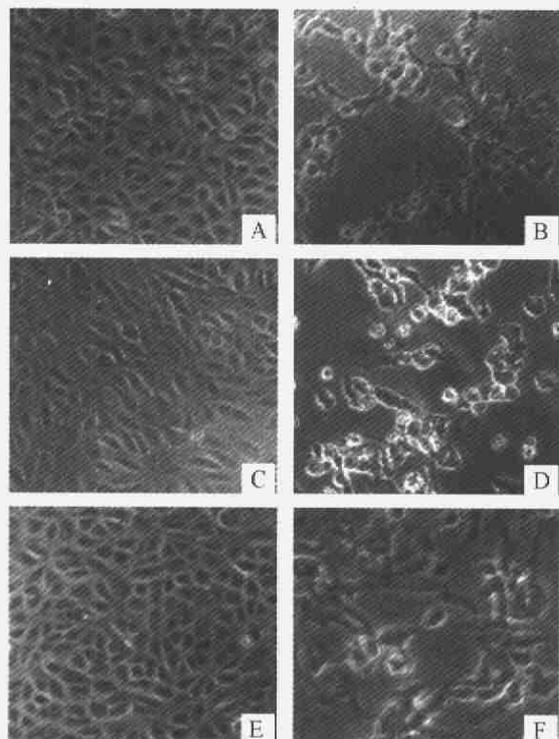


图 1 vTF7-3 感染宿主后的细胞形态变化

Fig. 1 Morphological change of different cells infected with vTF7-3

A, RK-13 CK; B, 48h after RK-13 infected with vTF7-3; C, Vero-E6 CK; D, 48h after Vero-E6 infected with vTF7-3; E, Vero CK; F, 48h after Vero infected with vTF7-3.

表 1 重组痘病毒感染宿主细胞产生的细胞病变程度

Table 1 The CPE of different host cells coursed by vTF7-3

Cell line	(vTF7-3 dilution)			Time after infection (d)	CK
	10	100	1000		
RK-13	++	+	-	1	-
	+++	++	+	2	-
	+++	+++	++	3	-
Vero-E6	+	-	-	1	-
	+++	+	-	2	-
	+++	++	+	3	-
Vero	+	-	-	1	-
	+++	+	-	2	-
	+++	++	+	3	-

“+”: 40%-50% cells CPE, “++”: 50%-60% cells CPE, “+++”: more than 80% cells CPE, “-”: normal cells.

图 1 显示了三种细胞系均能被 vTF7-3 感染, 并产生细胞病变, 且细胞病变程度呈时间相关性

(表 1)。其中, RK-13 对 vTF7-3 最为敏感, 而 Vero-E6 和 Vero 稍差一些, 但考虑到用于疫苗研制时的适用性和安全性, 我们选择了非洲绿猴肾细胞系 Vero-E6 作为转染实验的宿主细胞。

2.2 转染 Vero-E6 细胞中 HCV 正链 RNA 的合成

RT-PCR 扩增结果显示 (图 2), 在同时加入了 pHCV 质粒和 vTF7-3 的 Vero-E6 细胞中, 24h, 48h 和 72h 均可扩增

到分子量大小约为 310bp 的产物, 与设计的片段大小相符, 且重复性好。而在对照组中则没有出现该扩增片段, 表明在该细胞转染体系中能有效的合成 HCV 正链 RNA。

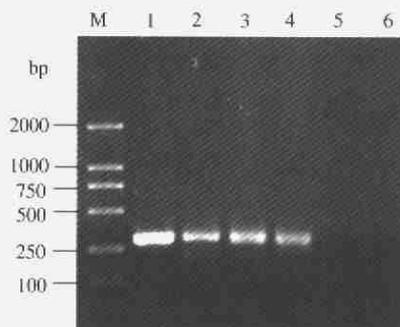


图 2 RT-PCR 检测转染 Vero-E6 细胞中 HCV 正链 RNA 的合成

Fig. 2 Electrophoretogram of RT-PCR assay of Vero-E6 cells transfected with pHCV

M, PCR Marker; 1, pHCV; 2, 24h after Vero-E6 cells transfected with pHCV; 3, 48h after Vero-E6 cells transfected with pHCV; 4, 72h after Vero-E6 cells transfected with pHCV; 5, Vero-E6 cells infected with vTF7-3; 6, Vero-E6 cells.

2.3 转染 Vero-E6 细胞中 HCV 基因组复制的动力学曲线

用荧光定量 RT-PCR 技术测得 pHCV 转染 Vero-E6 细胞体系中的 HCV 基因拷贝数变化如图 3。在转染 2d 后, HCV 的基因拷贝数达到了峰值, 为 $(1.52 \pm 0.30) \times 10^8$ 拷贝/mL, 比患者阳性血清 (10^4 - 10^5 基因拷贝/mL) 高 100~1000 倍, 表明在该转染体系中, HCV 基因组能有效转录和复制; 但 4d 后有所下降, 为 $(1.96 \pm 1.69) \times 10^7$ 拷贝/mL; 培养到第 6d 时, 甚至下降了约 3 个数量级。这种随培养时间的延长而基因拷贝数有所下降的原因, 可能是感染的 vTF7-3 在宿主细胞中大量增殖, 导致部分细胞病变溶解所致。

2.4 转染细胞中 HCV 蛋白的表达

Western-blotting 检测结果表明 (图 4), 在 pHCV 转染的 Vero-E6 细胞中不但有 HCV 结构蛋白 E2、Core 的表达 (其分子量分别为 72kDa 和 22kDa, 图

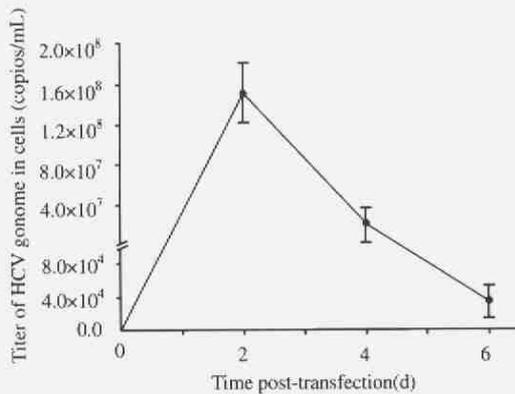


图3 转染 Vero-E6 细胞中 HCV 基因组复制的动力学曲线
Fig.3 Dynamic curve of HCV genome in Vero-E6 cells transfected with pHCV

4A, B), 也有 HCV 非结构蛋白 NS5 的表达 (图 4C), 由于 NS5 蛋白表达后被 NS3 蛋白酶裂解成 NS5A 和 NS5B 两部分^[2], 因此免疫印迹呈现两条带 (其分子量分别为 56kDa 和 66kDa, 图 4C)。结构蛋白和非结构蛋白的分子量与文献所报道的相近^[13]。

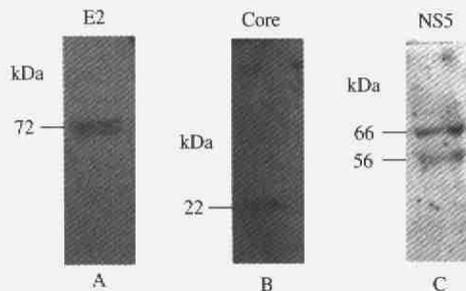


图4 Western-blotting 检测转染细胞中 HCV 的结构蛋白和非结构蛋白的表达

Fig.4 Western bolt analysis of Vero-E6 cells transfected with pHCV

A, E2 protein of HCV; B, Core protein of HCV; C, NS5 protein of HCV (NS5A: 56kDa, NS5B: 66kDa). Molecular weight in kilo Daltons are shown on the left.

2.5 转染 Vero-E6 细胞中 HCV 病毒体的电镜观察

pHCV 转染的 Vero-E6 细胞经低速离心、固定、常规包埋切片后电镜观察。成功地观察到直径约 40-50nm 的 HCV 病毒体 (图 5B), 其大小均一; 同时有 HCV 病毒体存在的视野中均可观察到典型的痘病毒粒子 (图 5B), 这从形态学角度直观地证实了重组痘病毒 (vTF7-3) 在该转染体系中的重要作用。

3 讨论

本研究的目的是要建立一种 HCV 全基因组克隆转染细胞培养体系, 为研究全病毒灭活或减毒疫苗提供技术平台。基于此目的, 我们利用了三个方

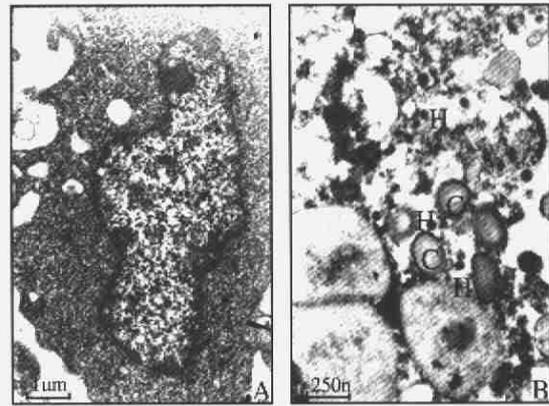


图5 pHCV 转染 Vero-E6 细胞中病毒的电镜形态
Fig.5 Electron microscopy observation of HCV and vTF7-3 particles in Vero-E6 cells transfected with pHCV

A, Vero-E6 cells; B, 60h after Vero-E6 cells transfected with pHCV. H: HCV particles. C: vTF7-3 particles.

面的研究策略: 首先构建了 HCV 全基因组克隆, 并插入噬菌体 T7 启动子和终止子序列, 同时在 HCV 基因组的 NS3 和 NS5A 基因上进行三个特异氨基酸编码序列的点突变, 获得 pHCV 重组质粒载体用于转染; 其次是利用重组痘病毒(vTF7-3)在宿主细胞中高效表达 T7 RNA 多聚酶的特性, 增强 pHCV cDNA 的转录效率, 提高 HCV 的复制水平, 从而获得高滴度的 HCV 病毒体; 第三是选用 vTF7-3 敏感的 Vero-E6 细胞作为转染宿主, 使得转染获得的 HCV 病毒体能安全地用于疫苗研究。研究结果显示 (图 3、4、5), 我们的目的基本达到, 初步建立了 pHCV 转染细胞培养体系。与本实验室先前建立的以 HeLa 为宿主的转染细胞培养体系相比, 以 Vero-E6 为宿主的培养体系具有以下几个特点: ①在相同的转染条件下, 其胞内 HCV 的基因拷贝数 $[(1.52 \pm 0.30) \times 10^8 \text{ 拷贝/mL}]$ 与 HeLa 细胞的 $[(1.09 \pm 0.20) \times 10^8 \text{ 拷贝/mL}]$ 相当; ②pHCV 转染的 Vero-E6 细胞能有效地表达 HCV 结构蛋白和非结构蛋白; ③同时能在胞内观察到 HCV 病毒粒子。且 Vero-E6 细胞在转染效率、HCV 基因拷贝数值、蛋白表达及病毒粒子装配等方面均达到预期的水平, 可替代 HeLa 细胞作为 pHCV 的转染宿主。因此, Vero-E6 细胞转染体系的建立, 为深入开展 HCV 的基础研究, 尤其是疫苗研制奠定了基础。

我们采用 RT-PCR 和荧光定量 PCR 技术检测 pHCV 质粒的转染效率和 HCV 基因组复制的动力学变化, 获得转染细胞培养时间与 HCV 基因组复制动力学曲线 (图 3)。通常 HCV 在细胞内的增殖是非溶细胞性的, 在一定时间内, 病毒滴度应与培养时间呈正相关。在我们的研究体系中, 转染 2d

后 HCV 基因组的复制效率就达到 10^8 基因拷贝/mL, 远远高于 HCV 阳性血清感染细胞的复制效率 ($10^3 \sim 10^4$ 基因拷贝/mL) 和 HCV 阳性病人血清中的病毒滴度^[12,14,15]。但随着培养时间的延长, 基因拷贝数呈下降趋势, 这与 vTF7-3 在细胞中增殖导致细胞溶解有关。可见, 在本研究体系中收集病毒体的时间应控制在 48~60h 较为合适。

对于研究 HCV 疫苗而言, 本研究工作仅仅是建立了一个技术平台, 仍有许多技术有待完善, 与之相关的机理有待深入研究。

参考文献

- [1] Poynard Y, Ratzu V, Benhamou Y, *et al.* Natural history of HCV infection[J]. *Best Practice Res. Clin Gastroenterol*, 2000, 14: 211-228.
- [2] Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1631-1648.
- [3] 闻玉梅. 现代医学微生物学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999.
- [4] Hsu H H. Prospects for a hepatitis C virus vaccine[J]. *Clin Liver Dis*, 1999, 3(4): 901-915.
- [5] Inchauspe G. DNA vaccine strategies for hepatitis C[J]. *J Hepa*, 1999, 30: 339-346.
- [6] Xavier F. Vaccination of chimpanzees with plasmid DNA encoding the HCV envelope E2 protein modified the infection after challenge with homologous monoclonal HCV[J]. *Hepatology*, 2000, 32(3): 618-625.
- [7] 李信端, 李 研. 一种高效增殖丙肝病毒体的方法及该方法所用的载体[R]. 中国专利 ZL 02 1 17666.3, 国际专利主分类号: C12N 7/01 2004.1.
- [8] Aizaki H, Aoki Y, Harada T, *et al.* Full-length complementary DNA of hepatitis C virus genome from an infectious blood sample[J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 1998, 27(2): 621-627.
- [9] Fuerst T R, Niles E G, Studier F W, *et al.* Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 8122-8126.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning-a Laboratory Manual*[M]. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1997.
- [12] Bartenschlager R, Lohmann V. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus[J]. *Antiviral Res*, 2001, 52: 1-17.
- [13] Myung J, Khalap N, Kalkeri G, *et al.* Inducible model to study negative strand RNA synthesis and assembly of hepatitis C virus from a full-length cDNA clone[J]. *J Virol Meth*, 2001, 94: 55-67.
- [14] Rum S, Berthillon P, Tanaka E, *et al.* Dynamic analysis of Hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80: 3007-3018.
- [15] Seipp S, Mueller H M, Pfaff E, *et al.* Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro[J]. *J Gen Virol*, 1997, 78: 2467-2476.