

携 HBx 基因逆转录病毒载体的构建

闵 军¹, 刘彦文², 陈积圣¹, 罗树红², 余新炳²

(中山医科大学 1. 孙逸仙纪念医院肝胆外科, 广东 广州 510120; 2. 寄生虫学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】构建携 HBx 基因的逆转录病毒载体, 为研究 HBx 基因与肝癌生物学行为间的关系提供基础。【方法】采用 PCR 技术从 HBV 全基因组中扩增 HBx 基因; 将 HBx 基因亚克隆至质粒 pLNSX, 构建质粒 pLNSHBx, 磷酸钙-DNA 共沉淀法将重组体导入包装细胞系 PA317, 检测培养上清病毒滴度。【结果】应用 PCR 技术成功地从 HBV 基因组中克隆出全长 HBx 基因, 并经序列分析证实; 建立了产病毒细胞株 PA317/HBx, 检测其培养上清病毒滴度为 8.9×10^4 CFU, PCR 证实重组病毒中含有 HBx 基因。【结论】成功构建了携 HBx 基因的较高滴度逆转录病毒载体。

关键词: 基因, HBx; 逆转录病毒载体

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0043-03

Construction of a Retroviral Vector Containing HBx Gene

MIN Jun¹, LIU Yan-wen², CHEN Ji-shen¹, LUO Shu-hong², YU Xin-bing²

(1. Department of Hepato-biliary Surgery, Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120 China; 2. Department of Parasitology, Sun Yet-sen University of Medical Sciences Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】 Establish a retroviral vector carrying HBx gene for investigation of the effects of HBx gene on the biological behavior of hepatocellular carcinoma. 【Methods】 HBx gene was amplified from genomic DNA of HBV by PCR technique, and subcloned to plasmid pLNSX to construct recombinant plasmid pLNSHBx. Applying the calcium phosphate-DNA co-precipitation technique, the pLNSHBx was transferred into PA317 packaging cell line. Culture supernatant of these cells was collected for titration of the recombinant virus. 【Results】 HBx gene was cloned from HBV genome by PCR successfully, and proved by sequence determination. A vector producing cell line PA317/HBx was established. The titres of the recombinant virus in the culture supernatant were 8.9×10^4 CFU. An HBx gene integration was detected by PCR in the recombinant retroviral vectors. 【Conclusions】 A retrovirus vector containing HBx gene was successfully constructed.

Key words: gene, HBx; retroviral vector

乙型肝炎病毒 (HBV) X 基因 (HBx 基因) 是 HBV 4 个开放阅读框中最小的一个, 编码 154 个氨基酸、分子质量为 17 ku 的 X 蛋白, 即 HBxAg。X 蛋白是一种反式激活因子, 可激活多种细胞基因的启动子、诱导细胞转化、失活抑癌基因 P53、阻止 DNA 修复等, 在 HBV 诱发肝癌的机制中起重要作用, 因此, 被称为“病毒癌基因”^[1-3]。多年来, 有关 HBx 基因研究的焦点主要集中在其诱发肝癌的机制上, 鉴于 HBx 基因转录调节的特点, 以及肝癌组

织中 HBx 基因持续高表达的现象^[4,5], 我们提出 HBx 基因对肝癌的恶性行为具有潜在影响的新观点。为此, 我们构建了携 HBx 基因的重组逆转录病毒载体, 为深入研究 HBx 基因对肝癌生物学行为的影响打下基础。现将载体构建过程报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

收稿日期: 1999-04-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39700135, 39970718); 国家教委博士点基金资助项目 (9750); 广东省博士后基金资助项目

作者简介: 闵 军 (1965-), 男, 湖北黄石人, 博士, 讲师。 Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

携带 3.2 kb 全长人 HBV 基因组质粒 pT7T3HBV、逆转录病毒载体 pLNSX、PA317 包装细胞系和小鼠成纤维细胞系 NIH3T3 均为本室保存; G418 购自 Boehringer Mannheim 公司, Polybrene 为 Sigma 公司产品, 各种限制性内切酶和 PCR 试剂购自华美生物工程公司。

1.2 HBx 基因克隆

根据 HBx 基因全序列设计引物, 5' 端引物 (X1) 为: 5'-GG aagcttCATATGGCTGCTAGGCTG-3'; 3' 端引物 (X2) 为: 5'-TG aagcttAGATCTTGAACAGTAGGA-3', 引物两端均含 *Hind* II 酶切位点, 扩增片段长度为 518 bp。以质粒 pT7T3HBV 为模板, PCR 反应体积为 100 μ L, 其中含 2.5 mmol/L 4 \times dNTP 8 μ L, 5' 和 3' 游引物各 100 pmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 3 U, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 45 s, 50 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环。反应结束后, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, DEAE 膜回收片段。在全自动序列分析仪中进行序列分析。

1.3 HBx 基因重组逆转录病毒载体的构建

质粒 DNA 的提取、酶切、片段回收、去磷酸化、连接、转化参照文献[6]方法进行。

1.4 逆转录病毒的包装

重组质粒导入 PA317 包装细胞系采用磷酸钙-DNA 共沉淀法^[9]。

1.5 培养上清病毒鉴定

分别于转染后 3、7、14、21 d 收集细胞培养上清, 同时收集筛选后的阳性克隆细胞株培养上清, 5 000 r/min (Eppendorf 5417 型离心机, $r = 9.2$ cm) 离心 5 min, 取上清煮沸 15 min, 以此为模板, 分别以 HBx 基因引物 X1 和 X2, 新霉素抗性基因 (neomycin resistance gene, NeoR) 引物 N1 和 N2^[7] 进行 PCR 反应。

1.6 病毒滴度测定

收集 PA317/HBx 细胞培养上清, 5 000 r/min 离心 5 min, 上清用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 以 1 mL 每管分装, -70 $^{\circ}$ C 冻存备用。在 25 mL 的培养瓶中接种 10^5 个 NIH3T3 细胞, 置 37 $^{\circ}$ C、 $\varphi = 5\%$ CO₂ 培养 24 h, 吸去培养液, 将病毒上清分别按 10^{-3} 、 10^{-4} 倍稀释, 以每瓶 1 mL 加入到细胞表面, 同时加入 8 μ g Polybrene, 在 37 $^{\circ}$ C、 $\varphi = 5\%$ CO₂ 条件下吸附 2.5 h, 再加入 2 mL RPMI 1640 完全培养基培养 24 h, PBS 洗去病毒, 换含 G418 (终质量浓度 400 g/L) 的培养液进行选择培养, 3~4 d 换

液一次, 4~6 周细胞克隆形成后, 在倒置显微镜下计算克隆形成数目。按下列公式计算出上清的病毒滴度: 病毒滴度 (CFU) = 克隆数目 \times 稀释倍数 \times 10。

2 结果

2.1 HBx 基因克隆与序列测定

PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 可见一条特异条带位于 DNA 分子 Marker (M) 标准 515 bp 处, 与预计扩增长度 (518 bp) 相符 (图 1); 以 HBx 基因 3' 端引物对此特异片段在全自动测序仪中反向测序 (部分序列见图 2), 证明此片段即为 HBx 基因编码序列。

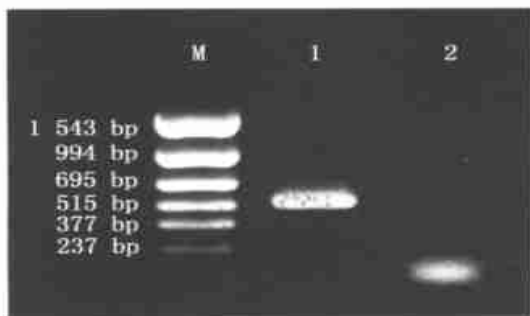


图 1 HBx 基因 PCR 扩增

Fig. 1 HBx gene amplification by PCR

M: PCR Marker; 1: pT7T3HBV plasmid DNA as template; 2: ddH₂O as template

1	ACTGACAAGA	GAGATAGGCA	GAGGTGAAAA	AGTTGCTGGT
41	GCTGGTGCGC	ANACCAATTT	ATGCCTACAG	CCTCCTAGTA
81	CAAGACCITT	AACCTAATCT	CCTCCCCCAA	CTCCTCCAG
121	TCTTTAAACA	AACAGTCTTT	GAAGTATGCC	TCANGGTCGG
161	TCGTTGACAT	TGCTGANAGT	CCAANAGTCC	TCTTATGTAA
201	GACCTTGGGC	AATATTGGT	GGCGTTTAC	GGTGGTCTCC
241	ATGCGACGTG	CAGAGGTGAA	GCGAAGTGCA	CACGGTCCGG
281	CAGATGAAGA	AGGCACATAC	GGGGANTCCG	CGTTAAAGAG
321	AGGTGCGCCC	CGTGTGTCGG	TCGGAACGGC	AGACGGAAAA
361	NGGGACTANA	NANTCCCAAN	CGACCCCGAN	AAGGGTCTGC
401	CGCAGGATTC	AGCGCCGACG	GGACGTANAC	NAAGGACGTC
421	CCGCGCAGGA	TCCANTTGGC	AGCA Δ NCCT	ANCAGCCATA
461	TGAACCT			

图 2 HBx 基因部分序列 (反义链)

Fig. 2 Partial nucleotide sequence of HBx gene (anti-sense)

2.2 重组逆转录病毒载体的构建与鉴定

PCR 产物 *Hind* II 酶切, pLNSX 质粒 *Hind* III 酶切, 用 *CIP* 酶对载体 5' 去磷酸化, 将目的片段与载体 DNA 连接, 产物转化大肠杆菌, 快速酚法初筛出重组质粒, 分别进行 HBx 基因 PCR 扩增及 *Hind* II 和 *Bam* HI 单酶切鉴定。重组体 1 和 2 经

Hind III酶切和HBx基因均切出约500 bp片段,以引物进行PCR扩增,也都扩增出约500 bp左右特异条带,这表明HBx基因已成功连入pLNSX载体中。pLNSX与HBx连接可能有两种方式,即正向连接和反向连接。pLNSX于2 786 bp处有一*Bam*HI单酶切点,HBx基因在距起始密码子30 bp处也有一*Bam*HI单切点。因此,重组克隆经*Bam*HI单酶切后,正向连接者产生6 265 bp与382 bp两个片段,而反向连接者则产生5 829 bp和818 bp两个片段。对1和2号重组质粒进行*Bam*HI单酶切,电泳结果如图3所示。1号重组子为正向连接,命名为pLNSHBx;2号重组子则为反向连接,命名为pLNSHBx^{AS}。

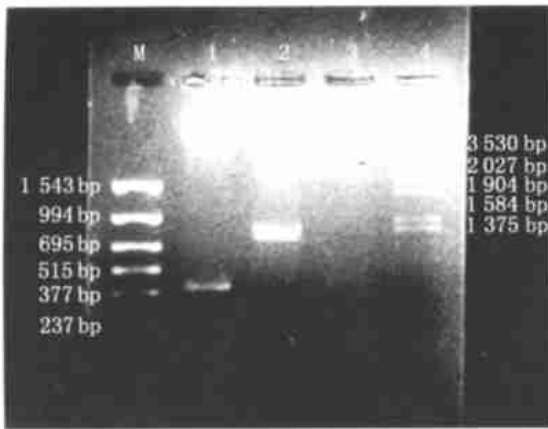


图3 pLNSHBx重组质粒*Bam*HI酶切鉴定

Fig. 3 Recombinant plasmid pLNSHBx was identified by restriction endonuclease enzyme *Bam*HI digested

M: PCR Marker; 1: Recombinant plasmid No. 1 was digested with *Bam*HI; 2: Recombinant plasmid No. 2 was digested with *Bam*HI; 3: Plasmid pLNSX was digested with *Bam*HI; 4: λ DNA/*Hind*III+*Eco*RI as DNA marker

2.3 携HBx基因重组逆转录病毒的包装与滴度测定

PA 317包装细胞是小鼠成纤维细胞NIH3T3经MoMLV转化而成,可为逆转录病毒载体提供结构蛋白。用磷酸钙-DNA共沉淀法将pLNSHBx导入PA317细胞,经400 mg/L G418筛选4周后形成细胞克隆;将细胞转至一新培养瓶中用800 mg/L G418加压筛选一次,此时仅少数细胞死亡,表明转染细胞能稳定表达NeoR基因。此细胞即为能分泌重组逆转录病毒的PA317产病毒细胞(vector producing cell, VPC),命名为PA317/HBx。

2.4 培养上清病毒鉴定

用HBx基因引物与NeoR基因引物分别对3、

7、14、21 d及PA317/HBx细胞培养上清进行PCR扩增,均扩增出特异性的HBx和NeoR基因条带,表明转染细胞能产生含HBx基因的重组逆转录病毒。

2.5 病毒滴度测定

用PA317/HBx细胞上清感染NIH3T3细胞,并让细胞在含G418的培养基中生长,第4周时可见克隆形成,此时在相差显微镜下统计克隆形成数目,稀释倍数为 10^{-3} 的培养瓶中有37个克隆生长, 10^{-4} 稀释的有12个克隆生长,取两者的均数,得出培养上清的病毒滴度为 8.9×10^4 CFU。

3 讨论

HBx基因编码的X蛋白是一个多功能的转录调节因子,可通过蛋白激酶信号途径活化AP-1、AP-2和NF- κ B等核因子,促进癌基因和细胞因子基因如*c-myc*、IGF-I等的表达,调节细胞的生长和分化^[1]。在肝癌组织中已发现HBx基因与X蛋白的阳性率很高^[4,5],但X蛋白对肝癌细胞的恶性行为有何影响,迄今未见报道。在本研究中,我们采用PCR技术从HBV全基因组中获得全长HBx基因,并成功构建了携HBx基因、具有感染能力与较高滴度的重组逆转录病毒。由于逆转录病毒载体可介导目的基因整合到细胞基因组中,因此,利用本实验构建的携HBx基因重组逆转录病毒来建立HBx⁺表型肝癌细胞株,可更接近于临床上HBx基因阳性肝癌的特征,从而为深入研究HBx基因对肝癌细胞生物学行为的影响打下基础。

参考文献:

- [1] Koike K. Hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis (review) [J]. *Intervirology*, 1995, 38(3~4): 134.
- [2] Koide K, Takada S. Biochemistry and functions of hepatitis B virus X protein (review) [J]. *Intervirology*, 1995, 38(3~4): 89.
- [3] Schaefer S, Gerlich W H. *In vitro* transformation by hepatitis B DNA (review) [J]. *Intervirology*, 1995, 38(3~4): 143.
- [4] 梁小浣, 汤钊猷, 张予, 等. 乙型肝炎病毒X基因在肝癌中的表达[J]. *中华微生物杂志*, 1990, 10(5): 341.

(下转第67页)

细胞。这些细胞有较大的胞体和较粗的细胞突起,提示它们是视网膜神经节细胞;而 GFAP 阳性的神经胶质细胞较少,这与视网膜的组织结构特点是相吻合的。

3.1.2 雪旺细胞培养 雪旺细胞是外周神经主要的胶质细胞,其典型的细胞形态呈梭形,双极,细胞核较清楚,胞体有发亮的边缘,据此可以进行细胞鉴定。S-100 是雪旺细胞中的一种钙结合蛋白,可作为鉴定雪旺细胞的依据之一。雪旺细胞于接种后 2 h 开始贴壁,其分裂增殖缓慢,体外培养时细胞增倍需要 1 周以上^[2],但一些生长因子对其增殖具有较强的刺激作用,如将雪旺细胞接种到已有视网膜神经细胞生长的培养瓶,此瓶中雪旺细胞的生长较单纯雪旺细胞的培养瓶中的细胞生长要快,表明视网膜神经细胞所分泌的神经营养因子对雪旺细胞的增殖具有增强作用;这与在体外单纯加入 NGF 能刺激雪旺细胞的增殖的结果是一致的。

3.2 共生培养的雪旺细胞对视网膜神经细胞的影响

3.2.1 外周神经外膜对视网膜神经细胞的影响

当把未去神经外膜雪旺细胞与视网膜神经细胞进行共生培养时,雪旺细胞对视网膜神经细胞的生长具有抑制破坏作用。这是因为神经外膜中含有磷脂相关的生长抑制因子(MAG)的缘故,MAG 对神经细胞的生长具有抑制作用^[3,4]。

3.2.2 雪旺细胞对视网膜神经细胞成活及突起生长的影响 共生培养时(同时接种或将视网膜神经细胞接种于已有雪旺细胞生长的培养瓶),雪旺细胞对视网膜神经细胞的突起生长具有促进作用,成活时间也较单纯视网膜神经细胞培养组长。这与雪旺细胞能合成、分泌多种神经营养因子(神经生长因子、脑源性神经生长因子、睫状神经营养因子等),产生细胞外基质(I、III、IV、V型胶原蛋白,层粘连蛋白,纤维连接蛋白等)及细胞粘附因子来维持神经元的成活,诱导、促进神经系统的再生有

关^[5,6]。

3.3 雪旺细胞与视网膜神经细胞融合生长的意义

扫描电镜观察的结果表明雪旺细胞与视网膜神经细胞可以以多种方式融合生长,表明雪旺细胞所分泌的物质不仅可在视网膜神经细胞的周围发挥作用,而且可以直接导入视网膜神经细胞而发挥作用。这对将来临床上用共生性雪旺细胞视网膜移植来促进中枢神经的再生具有重要的意义^[7]。

参考文献:

- [1] Kikuchi M, Kashii S, Honda Y, *et al*. Protective effects of methylcobalamin, a vitamin B12 analog, against glutamine-induced neurotoxicity in retinal cell culture [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38(5): 848.
- [2] 张自杰, 朱家恺. 乳鼠雪旺细胞的培养纯净和形态学研究 [J]. *中华显微外科杂志*, 1991, 14(1): 42.
- [3] Maffei L, Carmignoto G, Perry V H, *et al*. Schwann cells promote the survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve section [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(5): 1855.
- [4] Mari D, Kouichiro K. The role of Schwann cells during retinal ganglion cell regeneration induced by peripheral nerve transplantation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38(7): 1401.
- [5] Koenig H L, Schumacher M, Ferzaz B, *et al*. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells [J]. *Science*, 1995, 268(5216): 1500.
- [6] Bailey S B, Eichler M E, Valladiego A, *et al*. The influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicon chambers [J]. *J Neurocytol*, 1993, 22(3): 176.
- [7] Guest J D, Rao A, Olson L, *et al*. The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord [J]. *Exp Neurol*, 1997, 148(2): 502.

(编辑 刘清海)

(上接第 45 页)

- [5] 张帆, 朱源荣, 孙宗棠. 中国高发区肝细胞癌中 HBV x 基因的广泛存在及与 p53 基因 249 密码子高频率突变的密切关联 [J]. *中华肿瘤杂志*, 1998, 20(1): 18.

- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁, 黎孟枫译. *分子克隆实验操作指南* [M]. 第 2 版. 北京: 科学出

版社, 1992. 16~68, 787~791.

- [7] 张腾飞, 陈诗书. 细胞因子基因导入人肿瘤细胞的方法及鉴定 [J]. *生物化学杂志*, 1997, 13(1): 1.

(编辑 张敏瑞)