

乙肝病毒X基因真核表达载体的构建及人肝细胞株HL-7702 转染

陈红英, 唐南洪, 张生君, 陈治新, 王小众

陈红英, 张生君, 陈治新, 王小众, 福建医科大学附属协和医院消化内科 福建省福州市 350001
唐南洪, 福建医科大学附属协和医院肝胆外科 福建省福州市 350001
陈红英, 女, 1975-12-04 生, 福建省漳州市人, 汉族, 2001 年福建医科大学协和医院消化内科硕士生, 主要从事肝脏疾病研究。
项目负责人: 王小众, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科。drwangxz@pub6.fz.fj.cn
电话: 0591-3357896-8482
收稿日期: 2003-10-31 接受日期: 2003-12-08

Construction of hepatitis B virus X gene expression vector in eucaryotic cells and its transfection in HL-7702 cells

Hong-Ying Chen, Nan-Hong Tang, Sheng-Jun Zhang, Zhi-Xin Chen, Xiao-Zhong Wang

Hong-Ying Chen, Sheng-Jun Zhang, Zhi-Xin Chen, Xiao-Zhong Wang, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China
Nan-Hong Tang, Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China
Correspondence to: Dr. Xiao-Zhong Wang, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. drwangxz@pub6.fz.fj.cn
Received: 2003-10-31 Accepted: 2003-12-08

Abstract

AIM: To establish a human hepatocyte cell line which can express hepatitis B virus (HBV) X gene.

METHODS: HBV X gene was obtained through PCR technology. After A-tailing added, X gene was connected into vector PUCmT. Vector PUCmT-X and PcDNA3 were digested with *EcoRI* and *HindIII*. The fragments of X and PcDNA3 were connected to establish reconstituted plasmid PcDNA3-X. Then PcDNA3-X and PcDNA3 were transfected into HL-7702 cells by lipid-mediated transfection. After selected with G418, HL-7702/HBx cells were analysed by the reverse transcription-PCR to confirm the steady expression of X gene in HL-7702.

RESULTS: Reconstituted plasmid PcDNA3-X included the anticipated fragment of HBV X gene was proved by auto-sequencing assay. RT-PCR analysis showed that reconstituted plasmid PcDNA3-X could express the X protein efficiently in HL-7702 cells.

CONCLUSION: Hepatocyte can express HBV X gene which is an ideal model to study the effect of HBV X gene on the development of hepatitis and hepatocellular carcinoma.

Chen HY, Tang NH, Zhang SJ, Chen ZX, Wang XZ. Construction of hepatitis B virus X gene expression vector in eucaryotic cells and its transfection in HL-7702 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):614-617

摘要

目的: 构建表达乙肝病毒(HBV)X基因的人肝细胞株。

方法: 用 PCR 法扩增 HBV X 基因序列, 将其添 A 后连至 PUCmT 载体上, 用 *EcoI* 和 *HindIII* 双酶切 PUCmT-X 和 PcDNA3 载体, 连接酶切片段 PcDNA3 及 X 片段以构建重组质粒 PcDNA3-X。用脂质体转染法将 PcDNA3-X 及空质粒 PcDNA3 导入肝细胞 HL-7702 中, G418 选择培养, RT-PCR 鉴定其稳定表达。

结果: 已构建的 PcDNA3-X 经序列测定含有完整的 HBV X 基因片段, 转入 HL-7702 细胞后经 RT-PCR 证实该细胞有稳定表达 X 蛋白。

结论: 成功构建了表达 HBV X 基因的肝细胞株, 为进一步探讨 HBV X 基因在肝炎与肝癌发生中的作用提供了理想的实验模型。

陈红英, 唐南洪, 张生君, 陈治新, 王小众. 乙肝病毒 X 基因真核表达载体的构建及人肝细胞株 HL-7702 转染. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):614-617
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/614.asp>

0 引言

乙肝病毒(HBV)感染在我国较严重^[1-9], 已成为研究的热点。HBV X 基因是 HBV 基因组中最小的一个开放读码框架, 编码基因区位于 1 374-1 838 核苷酸之间, 其编码的 X 蛋白由 154 个氨基酸组成。目前认为 HBV X 基因及其产物在肝炎与肝癌的发生与发展中起重要的作用, 但具体机制尚未完全清楚^[10]。我们通过构建含 X 基因的真核表达载体并将其转染肝细胞 L02, 以建立稳定表达 HBV X 基因的人肝细胞株, 为进一步探讨 HBV X 基因在肝炎与肝癌(HCC)发生中的作用提供了理想的实验模型。

1 材料和方法

1.1 材料 Taq DNA 聚合酶、dNTP、胶回收试剂盒、添 A 试剂盒、PUCmT 载体与 DNA 抽提试剂盒购自上海生工生物工程服务有限公司; *EcoI* 和 *HindIII* 内切酶, T4DNA 连接酶, 质粒抽提试剂盒与脂质体转染试剂盒购自 Promega 公司; RNA 抽提试剂盒购自深圳生物晶美公司; PcDNA3 表达载体由本院风湿免疫研究所提供; 肝细胞株 HL-7702 和 E.coli DH5 α 由本院肝胆外科研究所

提供; 其余生化试剂均为国产或进口的分析纯试剂。

1.2 方法 表达载体的构建: X 基因扩增引物设计为上游: ATGCAAGCTTATGGCTGCTAGGCTGTACTG 和下游: TGC GAATTCTTAGGC AGAGGTGAAAAAGTTG, 由上海生工生物工程服务有限公司合成。用酚/氯仿抽提法从 HBV 感染患者血清中扩增出 X 基因片段。PCR 扩增采用 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 经 30 个循环。将 PCR 产物添 A 后与 PUCmT 载体连接, 将连接产物 PUCmT-X 转化入 E.coli DH5 α 中扩增, 抽提纯化 PUCmT-X 并测序。选择正向连接的克隆提取质粒, 经 Ecol I 和 Hind III 双酶切后连接于真核表达载体 PcDNA3, 构建 HBV X 基因真核表达载体 PcDNA3-X。经 PCR 和酶切方法确认为重组载体后由上海生工生物工程服务有限公司测定序列。酶切及连接方法参照分子克隆常规方法进行。将肝细胞株 HL-7702 培养于含 100 mL/L 胎牛血清的 DF 培养基 (DMEM : F12=3 : 1) 中。选择状态良好的对数生长早期肝细胞 HL-7702, 采用脂质体转染的方法(按脂质体转染试剂盒的说明书操作), 将重组质粒 PcDNA3-X 导入肝细胞 HL-7702 中, 同时将 PcDNA3 导入肝细胞 HL-7702 以作为空载体对照, 并以未进行基因转染的细胞为空白对照。转染细胞经 G418 600 mg/L 选择培养 2 wk 后, 挑取单克隆扩增鉴定。将转染有 PcDNA3-X, PcDNA3 的 HL-7702 分别命名为 HL-7702/HBx 和 HL-7702/PcDNA3。转染细胞 X 基因的鉴定: (1) 细胞基因组中目的基因的检测 DNA 抽提试剂盒提取 HL-7702/HBx 细胞的 DNA, 用 HBV X 基因的引物进行 PCR 扩增, 以 HL-7702/PcDNA3、HL-7702 细胞作对照。HBV X 基因扩增引物设计为上游: CCGTCTGTGCCTTCTCATCT 和下游: TAATCTCCTCCCCCAACTCC。PCR 条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 35 s, 65 °C 退火 35 s, 72 °C 延伸 1 min, 经 32 个循环。(1) RT-PCR 鉴定 X 基因的表达。用 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA, 按试剂盒说明书进行 RT 反应, 取逆转录反应产物 5 μ L 作为模板, 用 HBV

X 基因的引物进行 PCR 扩增, 仍以 HL-7702/PcDNA3、HL-7702 细胞作对照。HBV X 基因的引物及 PCR 条件同上。

2 结果

2.1 HBV X 的基因克隆 应用 PCR 技术从 HBV 感染患者的血清中扩增出 HBV X 基因片段。特异性的电泳条带出现在 500 bp 左右, 与预计的 470 bp 相符(图 1)。

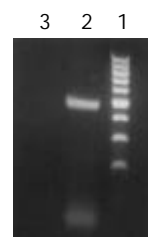


图 1 PCR 扩增出 HBV X 基因片段。1: 100 bp DNA ladder; 2: HBV X 基因阳性片段; 3: 阴性对照。

2.2 X 基因重组体的鉴定 PUCmT-X 测序结果示 X 基因正向插入 PUCmT 载体, 故选用 Ecol I 和 Hind III 双酶切 PUCmT-X 和 PcDNA3 载体。用 Ecol I 和 Hind III 对构建好的 PcDNA3-X 进行酶切分析, 以 PcDNA3 作对照, 电泳结果如预期, PcDNA3-X 酶切后出现 500 bp 左右的 X 酶切片段(图 2)。PcDNA3-X 的测序(图 1)与 X 基因序列比较表明 X 基因真核表达载体构建成功。

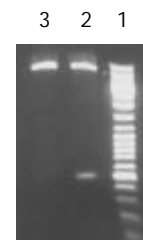


图 2 PcDNA3-x 双酶切鉴定结果。1: 1 Kb DNA ladder; 2: PcDNA3-x 双酶切产物; 3: PcDNA3 双酶切产物。

845 bases in 10174 scans

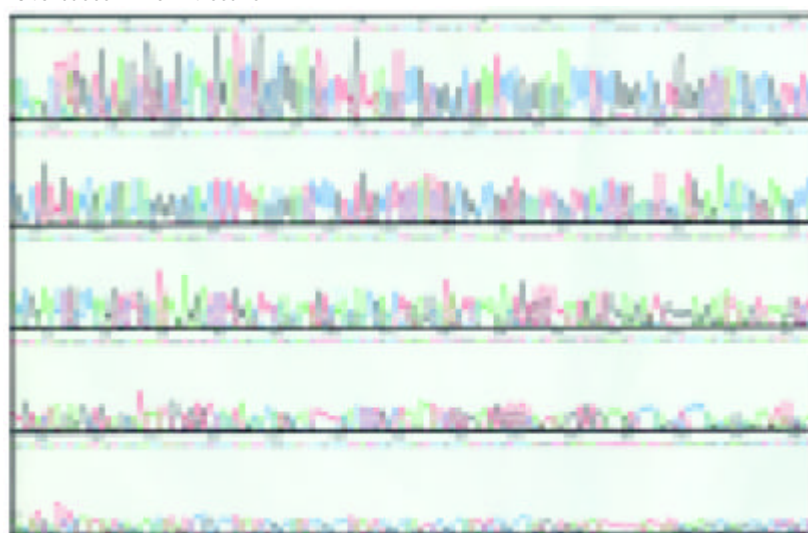


图 3 PcDNA3-X 的测序结果。

2.3 转染细胞 X 基因的鉴定 提取 HL-7702/HBx, HL-7702/PcDNA3, HL-7702 细胞的 DNA, 用 HBV X 基因的引物进行 PCR 扩增, HL-7702/HBx 细胞扩增出特异的 200 bp 左右的片段, 说明 HBV X 基因已整合到细胞的基因组中. 提取三组细胞 RNA, 经反转录合成 cDNA 后, PCR 扩增, 可见 HL-7702/HBx 细胞有 HBV X 基因 mRNA 表达(图 4). 表明 HBV X 基因已导入 HL-7702 细胞, 并有稳定表达.

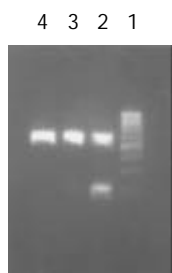


图 4 RT-PCR 检测 HL-7702 细胞 HBV X mRNA 转录. 1: 100 bp DNA ladder; 2: HL-7702/HBx; 3: HL-7702/PcDNA3; 4: HL-7702.

3 讨论

在我国, 乙型肝炎病毒(HBV)感染是引起 HCC 的主要病因之一^[11-17]. 流行病学调查表明, HBV 感染者 HCC 的发病率较对照人群高出 200 倍以上^[10-18]. 但 HBV 致 HCC 的具体机制一直未阐明. HBV X 基因的致癌作用已成了研究的热点. HBV X 基因的产物 X 蛋白大多存在于胞质中, 仅有一小部分在胞核内^[19]. 他是一种多功能蛋白^[20], 能作用于不同的目标(如: 转录因子, 细胞质激酶, 线粒体蛋白)^[21], 可能通过转录激活作用、抑制 DNA 的修复、调控肝细胞凋亡而诱发肝癌形成和促进肝癌发展的^[22]. 研究发现 HBV X 基因在少量表达时未显现出明显作用, 仅有当其表达产物积累到一定量, 聚集在一起时才起作用^[23]. 但 X 基因并非癌基因, 不含有特异致癌基因序列^[24]. 近几年来, 通过对转 HBV X 基因的肝细胞模型及小鼠动物模型的研究, 发现 HBV X 基因及产物 X 蛋白有以下生物学功能: (1)促进肝细胞凋亡, 诱导炎症的发生; (2)可与 P53 结合, 影响核苷的切补修复, 干扰细胞周期而促进肝癌细胞的增生^[25]; (3)作用于细胞因子和信号传导途径:上调 NF- κ B 的表达并转位于胞核内^[26-27]; 可激活^[28]并上调肝癌细胞表达 FasL; 能阻断 Bcl-2 介导的肝 Fas 途径的凋亡^[29]; 能使 Bid 的表达减少而阻断细胞凋亡^[30]; 可通过增加内源性激活因子 sn-1、2-DAG 短暂地激活 PKC^[31]; 可有效地抑制 TGF- β 引起的凋亡; 能激活 JNK 和 MAPK 信号传导途径^[32]; 能抑制 caspase3 的活性; 能通过下调 Sep 蛋白的表达而增加 TNF- α 的表达^[33]; (4)能引起线粒体膜电位的丢失而引发线粒体依赖性的细胞死亡^[34]; (5)能激活 IGF-IR 和 VEGF 基因的表达, 以促进肿瘤的生长与侵袭.

以上研究多以转 HBV X 基因的肝癌细胞株(如 HepG2、QG7701、HCC9204 等)和肝癌组织为对象, 探讨 HBV X 基因及其蛋白产物在肝癌细胞凋亡与增生

的信号传导通路、癌基因的激活等方面所起的作用, 以进一步揭示 HBV X 基因在 HBV 相关性 HCC 形成与发展中的意义. 而对于 X 基因及其产物在正常肝细胞中的作用报道甚少, 其影响尚未阐明. 因为这些研究的对象本身即为肝癌细胞, 故实验结果仅能说明 HBV X 基因在促进 HCC 发展中的作用, 而难以解释其诱发肝炎和 HCC 形成的作用. 理想的研究对象应为正常肝细胞, 将 X 基因导入正常的肝细胞, 观察转染后的肝细胞的形态与生物学功能的变化能较直观、较全面地了解 HBV X 基因的生物学功能. 我们以肝细胞 HL-7702 为研究对象, 利用 PcDNA3 载体将 HBV X 基因导入 HL-7702, 获得转 HBV X 基因的肝细胞株 HL-7702/HBx, 并用 PCR 和 RT-PCR 结果证明 HL-7702/HBx 基因组中有 HBV X 基因的整合, 且有 HBx mRNA 的转录表达. 说明 HL-7702/HBx 是可稳定表达 HBV X 基因的肝细胞株, 他为进一步探讨 HBV X 基因在肝炎和 HCC 发生、发展中的作用提供了一个理想的细胞模型.

4 参考文献

- Wang RX, Boland G, Guo Y, Lei SP, Yang CH, Chen J, Tian J, Wen JY, Du KH, van Hattum J, de Gast GC. Is a low dose of hepatitis B vaccine enough for a rapid vaccination scheme? *World J Gastroenterol* 2003;9:2353-2355
- Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-Cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- Cheng H, Zhang HZ, Shen WA, Liu YF, Ma FC. Expression of RNase H of human hepatitis B virus polymerase in *Escherichia coli*. *World J Gastroenterol* 2003;9:513-515
- Chen Y, Sze J, He ML. HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. *World J Gastroenterol* 2004;10:82-85
- Bai YJ, Zhao JR, Lv GT, Zhang WH, Wang Y, Yan XJ. Rapid and high throughput detection of HBV YMDD mutants with fluorescence polarization. *World J Gastroenterol* 2003;9:2344-2347
- Wei J, Wang YQ, Lu ZM, Li GD, Wang Y, Zhang ZC. Detection of anti-preS1 antibodies for recovery of hepatitis B patients by immunoassay. *World J Gastroenterol* 2002;8:276-281
- Han HL, Lang ZW. Changes in serum and histology of patients with chronic hepatitis B after interferon alpha-2b treatment. *World J Gastroenterol* 2003;9:117-121
- Du DW, Jia ZS, Li GY, Zhou YY. HBV DNA vaccine with adjuvant cytokines induced specific immune responses against HBV infection. *World J Gastroenterol* 2003;9:108-111
- 王小众, 陶其敏. 乙型肝炎 X 基因与肝癌. *世界华人消化杂志* 1999;7:1063-1064
- Garcia JM, Marugan RB, Garcia GM, Lindeman ML, Abete JF, Terron SD. TT virus infection in patients with chronic hepatitis B and response of TTV to lamivudine. *World J Gastroenterol* 2003;9:1261-1264
- Jaboli MF, Fabbri C, Liva S, Azzaroli F, Nigro G, Giovanelli S, Ferrara F, Miracolo A, Marchetto S, Montagnani M, Colecchia A, Festi D, Reggiani LB, Roda E, Mazzella G. Long-term alpha interferon and lamivudine combination therapy in non-responder patients with anti-HBe-positive chronic hepatitis B: Results of an open, controlled trial. *World J Gastroenterol* 2003;9:1491-1495
- Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X pro-

- tein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 14 Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. Anti-HBV hairpin ribozyme-mediated cleavage of target RNA in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94
 - 15 Xu ZH, Zhao MJ, Li TP. P73beta inhibits transcriptional activities of enhancer I and X promoter in hepatitis B virus more efficiently than p73alpha. *World J Gastroenterol* 2002;8:1094-1097
 - 16 Wang XZ, Chen XC, Chen YX, Zhang LJ, Li D, Chen FL, Chen ZX, Chen HY, Tao QM. Overexpression of HBxAg in hepatocellular carcinoma and its relationship with Fas/FasL system. *World J Gastroenterol* 2003;9:2671-2675
 - 17 Liu J, Li YH, Xue CF, Ding J, Gong WD, Zhao Y, Huang YX. Targeted ribonuclease can inhibit replication of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:295-299
 - 18 Shen LJ, Zhang HX, Zhang ZJ, Li JY, Chen MQ, Yang WB, Huang R. Detection of HBV, PCNA and GST-pi in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2003;9:459-462
 - 19 Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol* 2001;36:651-660
 - 20 Jin YM, Yun C, Park C, Wang HJ, Cho H. Expression of hepatitis B virus X protein is closely correlated with the high periportal inflammatory activity of liver diseases. *J Viral Hepat* 2001;8:322-330
 - 21 Birrer RB, Birrer D, Klavins JV. Hepatocellular carcinoma and hepatitis virus. *Ann Clin Lab Sci* 2003;33:39-54
 - 22 陈红英, 王小众. HBV X 基因与肝细胞凋亡. *福建医科大学学报* 2002;37:355-356
 - 23 Song CZ, Bai ZL, Song CC, Wang QW. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1521-1524
 - 24 王小众, 陈治新, 李丹, 林建银. 肝癌及肝硬化患者血清 HBV X 基因异质性分析. *福建医科大学学报* 2002;37:241-242
 - 25 Lin J, Zhu MH, Zhu S, Qu JH, Li FM, Ni CR. The role of hepatitis B virus X gene and p53 on hepatocellular carcinoma cell growth. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2003;32:43-47
 - 26 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
 - 27 Madden CR, Slagle BL. Stimulation of cellular proliferation by hepatitis B virus X protein. *Dis Markers* 2001;17:153-157
 - 28 王小众, 陈晓春, 杨映红, 陈治新, 黄月红, 陶其敏. 肝癌患者 HbxAg 与 Fas/FasL 表达的研究. *癌症* 2001;20:41-44
 - 29 Terradillos O, de La Coste A, Pollicino T, Neuveut C, Sitterlin D, Lecoœur H, Gougeon ML, Kahn A, Buendia MA. The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas apoptosis in the liver. *Oncogene* 2002;21:377-386
 - 30 Chen GG, Lai PB, Chan PK, Chak EC, Yip JH, Ho RL, Leung BC, Lau WY. Decreased expression of Bid in human hepatocellular carcinoma is related to hepatitis B virus X protein. *Eur J Cancer* 2001;37:1695-1702
 - 31 Diao J, Garces R, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12:189-205
 - 32 Oh JC, Jeong DL, Kim IK, Oh SH. Activation of calcium signaling by hepatitis B virus-X protein in liver cells. *Exp Mol Med* 2003;35:301-309
 - 33 Yi YS, Park SG, Byeon SM, Kwon YG, Jung G. Hepatitis B virus X protein induces TNF-alpha expression via down-regulation of selenoprotein P in human hepatoma cell line, HepG2. *Biochim Biophys Acta* 2003;1638:249-256
 - 34 Shirakata Y, Koike K. Hepatitis B virus X protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential. *J Biol Chem* 2003;278:22071-22078

World Journal of Gastroenterology 点击和下载次数

《World Journal of Gastroenterology, WJG》从 2003 年第 4-9 期电子版, 实现了动态网页制做, 记录每篇论文的点击和下载次数. 4-9 期共发表论文 322 篇, 其中 265 篇有点击和下载次数的记录, 占 82.29 %, 无点击和下载次数记录的为 57 篇(17.70 %). 2003-04-15/2003-10-13, 265 篇论文的点击次数为 35745, 平均每篇论文点击次数为 134.89, 最高点击次数为 1 918, 最低点击次数为 11. 其中每篇论文点击次数 100 次以上为 131 篇(49.43 %); 30-99 次为 123 篇(46.41 %); 11-29 次为 11 篇(4.15 %). 最高下载次数 1 087, 最低下载次数 10. 例如, 2003 年第 8 期刊出的第四军医大学唐都医院感染科王全楚等撰写的“RNA interference: Antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9(8):1657-1661”一文的点击次数为 1 918, 下载次数为 1 087.