

[文章编号] 1007-385X(2006)05-0358-04

## 作为基因转移载体的乙肝病毒衣壳的制备及其功能的初步鉴定

潘德键, 赵忠全, 王东林, 陈正堂(第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治中心, 重庆 400037)

**[摘要]** **目的:** 构建具有肝脏靶向性的乙型肝炎病毒衣壳基因转移载体。 **方法:** 采用 PEG 8 000 病毒浓缩法提取 HepG 2. 2. 15 细胞上清液中的乙型肝炎病毒, 用  $\beta$ -丙内酯法制备乙型肝炎病毒衣壳, 用它包裹 5. 3kb 的绿色荧光蛋白质粒以测试其装载能力, 并用 ELISA 法、PCR 法、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、透射电镜等对它进行定量、定性研究, 最后将其转染 HepG 2 细胞, 通过荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达情况, 通过流式细胞仪检测细胞发光率。 **结果:** 制备的乙型肝炎病毒衣壳载体保留病毒衣壳的表面蛋白 HBsAg + pre S<sub>1</sub> + pre S<sub>2</sub>, 无病毒 DNA; 该载体对绿色荧光蛋白质粒较高装载容量, 装载绿色荧光蛋白质粒后在肝癌细胞中有很高的转移效率, 并能实现高表达。 **结论:** 采用 PEG 8 000 病毒浓缩法、 $\beta$ -丙内酯法可从 HepG2. 2. 15 细胞上清液中制备乙型肝炎病毒衣壳基因转移载体, 该载体具有良好的生物学功能。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒; 衣壳; 肝脏; 靶向性; 基因转移

**[中图分类号]** R730.5 **[文献标识码]** A

## Construction of a liver targeting gene transfer vector using hepatitis B virus envelope particles and assessment of its function

PAN De-jian, ZHAO Zhong-quan, WANG Dong-lin, CHEN Zheng-tang (Cancer Center, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct a liver targeting gene transfer vector using hepatitis B virus envelope particles. **Methods:** Hepatitis B viruses were obtained from the supernatant of HepG 2. 2. 15 cells by a PEG8000 system and were inactivated by  $\beta$ -propiolactone to prepare hepatitis B virus envelope. The hepatitis B virus envelope was used to pack 5. 3 kb pIRES<sub>2</sub>-EGFP to assess their packing ability. Subsequently, the products were studied with ELISA, PCR, SDS-PAGE, and electron microscopy. Finally, the product was used to transfect HepG2 cells and the green fluorescent protein (GFP) expression was observed under a fluorescent microscope. The rate of GFP positive cells was determined by flow cytometer. **Results:** The acquired hepatitis B virus envelope retained the surface protein HBsAg + pre S<sub>1</sub> + pre S<sub>2</sub>, but with no virus DNA. The prepared envelope had high packing ability for GFP and the packed GFP had a high transfection rate in HepG2 cell. **Conclusion:** Hepatitis B virus envelope has been successfully obtained from the supernatant of HepG 2. 2. 15 cells with a PEG8000 system and  $\beta$ -propiolactone.

**[Key words]** Hepatitis B virus, envelope, liver, targeting, gene transfer

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(5): 358-361]

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是已知具有嗜人肝细胞特性的 DNA 病毒<sup>[1]</sup>, HBV 的嗜肝性主要是由于衣壳上镶嵌的外衣壳蛋白 Pre S<sub>1</sub>(21~47 区段)<sup>[2]</sup>与肝细胞膜表面的 HBV 受体结合而引起, 因此利用此生物学特性有可能将 HBV 改造成肝脏靶向性基因转移载体。国内外学者曾尝试利用基因重组技术把 HBV 改造为肝脏的重组病毒载体, 改造后的病毒载体在嗜肝性、安全性、转染效率、免疫原性、载容量等某些方面存在缺陷<sup>[3]</sup>。为此, 本实验考虑把 HBV 改造成具有嗜肝性的非病毒载体, 从而克服病毒载体的某些缺

陷。本研究制备了乙型肝炎病毒衣壳(hepatitis B virus envelope, HBVE), 以 HBVE 包裹绿色荧光蛋白质粒后转染肝癌细胞, 初步检测作为基因转移载体的 HBVE 的蛋白成分、病毒 DNA 的保留情况, 以及它们装载容量、转移效率和基因表达能力。

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 30100189)

**[作者简介]** 潘德键(1979-), 男, 重庆市人, 硕士研究生, 医师, 主要从事肿瘤基因治疗方面的研究。

**[通讯作者]** 王东林, Tel: 023-68774701

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

HepG 2.2.15 由第三军医大学西南医院传染病医院刘俊博士惠赠。人肝母细胞瘤细胞株 HepG2 细胞、绿色荧光蛋白质粒 pIRES<sub>2</sub>-EGFP 由本中心赵忠全硕士惠赠。质粒小量提取试剂盒购于 Promega 公司。标准胎牛血清购自天津, H&Y, Bio. Co。DMEM 购自 SIGMA 公司。PEG 8 000 购自华美生物工程公司。β-丙内酯购自 SIGMA 公司。乙肝病毒 ELISA 试剂盒购于上海阿尔法生物技术有限公司。乙型肝炎病毒核酸扩增(PCR)荧光定量检测试剂盒购于深圳市匹基生物工程股份有限公司。PIPA 购自上海申能博采生物科技有限公司。中分子量蛋白 Marker 购于重庆玛根医药有限公司。

### 1.2 质粒的提取

pIRES<sub>2</sub>-EGFP 转染 DH5α 感受态细胞后, 摇菌, 以质粒小量提取试剂盒进行多次提取<sup>[4]</sup>, 提取后于 -20 ℃ 保存备用。

### 1.3 细胞培养

Hep G 2.2.15 在含 10 % 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养<sup>[5]</sup>。

### 1.4 HBVE 的获得

经高速离心(10 000 × g, 20 min)后与 PEG 8 000 混合静置过夜, 再次高速离心(14 000 r/min, 30 min)后, 用 300 μl 的 VSB 液溶解病毒沉淀得到 HBV 浓缩液<sup>[6]</sup>。用(0.007 5% ~ 0.001 0%)的 β-丙内酯降解 HBV 浓缩液中的 HBV DNA 及残余的细胞 DNA, 并高速离心(18 500 × g, 15 min)得到 HBVE, 把 HBVE 悬浮在 40 μl 的 TE 溶液中备用<sup>[7]</sup>。

### 1.5 HBVE 包装 pIRES<sub>2</sub>-EGFP

HBVE 悬浮液与 8 μl 的 pIRES<sub>2</sub>-EGFP 及 5 μl 的 Triton-100 混合。混合物在 4℃ 条件下以 18 500 × g 离心 15 min, 得到乙型肝炎病毒衣壳与绿色荧光蛋白复合物 HBVE-GFP。然后用 1 ml 的平衡生理盐水 BSS 冲洗片状沉淀物 3 次, 以去除清洁剂及未整合的 DNA, 载体及目的基因复合物 DHBVE-GFP 在 300 μl 的 PBS 液中悬浮。储存在 4 ℃ 条件下备用<sup>[7]</sup>。

### 1.6 衣壳蛋白及 HBV DNA 的检测

取 HBV 浓缩液、HBVE 溶液、HBVE-GFP 悬浮液各 0.5 ml, 采用 ELISA 法检测乙型肝炎病毒 HBsAg、HBeAg、Pre S<sub>1</sub>。取 HBV 浓缩液、HBVE 溶液、HBVE-GFP 悬浮液各 0.1 ml, 采用 PCR 法检测 HBV DNA 的扩增情况(以大于 5 × 10<sup>2</sup> copy/ml 为阳性)<sup>[8]</sup>。

### 1.7 蛋白含量的检测

用分光光度计测定 HBV 浓缩液的蛋白浓度, 取 HBV 浓缩液、HBVE 溶液、HBVE-GFP 悬浮液、中分子量蛋白 Marker 各 10 μl 与上样缓冲液 10 μl 混合后, 进行 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[6]</sup>。

### 1.8 电镜形态学观察

取 HBV 浓缩液、HBVE 溶液、HBVE-GFP 悬浮液各 50 μl 负染, 用透射电镜(TECNAI 10 型)进行观察<sup>[8]</sup>。

### 1.9 HBVE-GFP 转染 HepG 2 细胞及其表达的检测

转染方法参照脂质体转染细胞的步骤, 48h 后把转染的细胞放于荧光显微镜下观察并拍照, 用流式细胞仪进行荧光细胞的计数。

## 2 结 果

### 2.1 HBVE 转移载体中 HBV 衣壳蛋白及 HBV DNA 保留情况

ELISA 法检测证实 HBVE、HBVE-GFP 能够较完整保留病毒表面蛋白成分; PCR 法检测显示 HBVE、HBVE-GFP 的 HBV DNA 的 PCR 扩增为阴性, 证实 HBV 已经被灭活(表 1)。

表 1 HBVE 转移载体中 HBV、HBVE、HBVE-GFP 的蛋白及 DNA 保留情况

Tab. 1 Examination of envelope protein and HBV DNA with ELISA and PCR

Groups	HBsAg	HBeAg	Pre S <sub>1</sub>	HBV DNA
HBV	+	+	+	+
HBVE	+	+	+	-
HBVE-GFP	+	+	+	-

### 2.2 HBVE 转染载体中 HBV 蛋白的含量

用分光光度计测定 HBV 浓缩液、HBVE 溶液、HBVE-GFP 悬浮液的蛋白质量浓度分别为 0.40 mg/ml、0.40 mg/ml、0.35 mg/ml。如图 1 中箭头所示, HBV、HBVE、HBVE-GFP 在 39 000 处可见条带, 提示中分子蛋白主要为 HBsAg + pre S<sub>1</sub> + pre S<sub>2</sub> 所构成的大颗粒蛋白<sup>[9]</sup>(图 1)。

### 2.3 HBV 衣壳蛋白的形态学特征

HBV 浓缩液、HBVE 溶液、HBVE-GFP 悬浮液负染后进行透射电镜观察, 照片(图 2)显示, HBV 直径 42 nm, 内含有 HBV DNA 的球形 Dane 颗粒, 其中可见电子致密物; HBVE 仍保留球形颗粒样结构, 但其中未见电子致密物; HBVE-GFP 中可再次观察到电子致密物, 提示 pIRES<sub>2</sub>-EGFP 已组合入 HBVE 中。

### 2.4 HBVE-GFP 对肝肿瘤细胞的转染效率

HBVE-GFP 转染 HepG2 细胞,48 h 后荧光显微镜下观察可见细胞发出亮度极强的绿色荧光(图 3),用流式细胞仪计数细胞发光率高达 67% ~ 73%。

衣壳蛋白 PreS<sub>1</sub>,将乙型肝炎病毒衣壳 HBVE 作为肝脏靶向性的基因转移载体在理论上具有可行性。

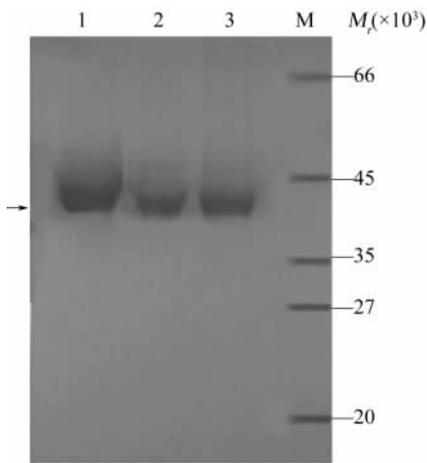


图 1 HBVE 转移载体中蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of proteins in HBVE gene transfer vectors

1: HBV; 2: HBVE; 3: HBVE-GFP; M: Middle molecular weight marker. Arrow indicated the protein positions of HBV, HBVE and HBVE-GFP (39 000)

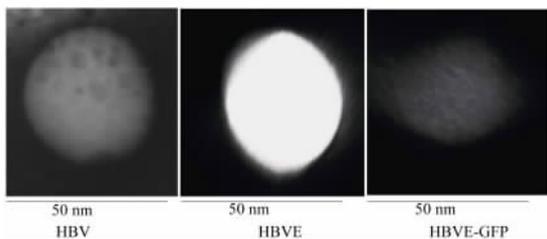


图 2 HBV, HBVE 和 HBVE-GFP 的电镜观察 (×105 000)

Fig. 2 Electron microscopic observation of HBV, HBVE, and HBVE-GFP (×105 000)

Electron microscopy of native HBV (HBV), inactivated HBV treated with β-propiolactone (HBVE), and in the presence (HBVE-GFP) of plasmid DNA

### 3 讨论

乙型肝炎病毒嗜肝性主要由 HBV 外衣壳上镶嵌的外衣壳蛋白 PreS<sub>1</sub>(21 ~ 47 区段)与肝细胞膜表面的 HBV 受体,包括 duck carboxypeptidase D (DCPD)、HBV-binding protein(HBV-BP)、唾液酸糖蛋白受体等通过直接或间接方式结合,经过胞饮作用<sup>[9]</sup>进入肝细胞。乙型肝炎病毒衣壳 HBVE 含有 HBV 嗜肝性的外

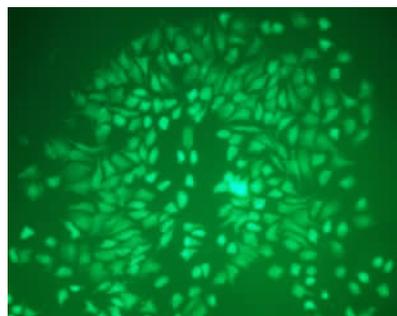


图 3 HBVE-GFP 转染肝肿瘤细胞荧光显微镜观察 (×200)

Fig. 3 HepG2 cells were transfected with HBVE-GFP GFP was observed by fluorescence microscopy (×200) 48 h after transfection

本实验采用 PEG 8 000 病毒离心浓缩法从 Hep G 2. 2. 15 细胞上清液中提取 HBV 颗粒,经 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳可显示较清晰的蛋白条带,此方法相对于从患者血液中提取 HBV 颗粒具有杂质相对较少且可重复性高的特点。β-丙内酯(BPL)是一种杂环化合物,对病毒具有很强的灭活作用,比甲醛作用强 25 倍,而且对病毒抗原影响或破坏作用较小,其作用机制通过与嘌呤碱基(主要是鸟嘌呤)反应改变病毒核酸结构,从而导致病毒核酸蛋白水解,达到灭活病毒的目的,同时可以最大限度降低生物制品中残留或污染细胞 DNA 的危险。因此,这是一种更为安全和可靠的灭活方法。目前,国内外已有多种疫苗采用 β-丙内酯进行灭活<sup>[10]</sup>;通过 β-丙内酯灭活并离心来制备的 HBVE,经 PCR 法检测 HBV DNA 为阴性,电镜观察可见无电子致密物的球形空心颗粒,ELISA 法检测证实 HBVE 能够较完整保留病毒表面蛋白的成份,显示 β-丙内酯对 HBV 具有很强的灭活作用,而且对 HBV 衣壳抗原破坏作用较小。根据转录起始位点的不同,HBV 的表面蛋白分为 3 类:24 000 的 HBsAg 小颗粒,32 000 的 HBsAg + pre S<sub>2</sub> 中颗粒,39 000 的 HBsAg + pre S<sub>1</sub> + pre S<sub>2</sub> 大颗粒<sup>[9]</sup>。本研究中,用 PEG 8 000 浓缩后的 HBV 主要含有 39 000 的表面蛋白大颗粒 HBsAg + pre S<sub>1</sub> + pre S<sub>2</sub>,而几乎不含有表面蛋白小颗粒 HBsAg,主要考虑浓缩过程中丢失太多所致,这与国外用 PEG 6 000 浓缩 HBV 所得的结果基本符合<sup>[11]</sup>。本实验采用 Hep G2 细胞,而不是直接选用肝实质细胞作为靶细胞,原因在于:(1) Hep G2 细胞易于培养、观察、持续传代培养;(2) HepG2 细胞与肝实质细胞在生物学方面的某些相似性,国际上目前研究 HBV 嗜肝性

多采用 Hep G2 细胞<sup>[12]</sup>; (3) 肝癌是一常见病种, 目前治疗效果相对不佳, 具有很高的研究价值。因此本实验采用 HepG2 作为靶细胞, 来研究 HBVE 作为肝脏靶向性基因转移载体的可能性。

本实验已成功构建乙型肝炎病毒衣壳 HBVE, 初步鉴定显示它具有如下特性: (1) 所构建的 HBVE 经 ELISA 法、蛋白电泳证实衣壳上的靶向蛋白 pre S<sub>1</sub> 能够完整保留, 与天然的乙型肝炎病毒外衣壳上的靶向蛋白基本相同, 保留了载体的嗜肝细胞特异性。(2) 经 PCR 法测定 HBVE 溶液的 HBV DNA 为阴性, 从结构组成来讲本质上属于非病毒载体(脂质双层 + 靶向蛋白), 将不存在 HBV 自主复制问题, 故其作为基因转移载体具有相对安全性。(3) 电镜观察发现, 5.3 kb 的 pIRES<sub>2</sub>-EGFP 能够组装入 HBVE 中, 证实 HBVE 具有较高载容量。(4) HBVE-GFP 能够有效地在 HepG2 细胞中表达。该复合物的生物学功能正在进一步研究中。HBVE 的构建将为探索将 HBVE 改造为肝脏靶向性基因转移载体提供初步的实验依据。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Park CW, Park YM, Lee GT, *et al.* Targeting of therapeutic gene expression to the liver by using liver-type pyruvate kinase proximal promoter and the SV40 viral enhancer active in multiple cell types [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314( 1 ): 131-137.
- [ 2 ] Park SG, Jeong YJ, Lee YY, *et al.* Hepatitis B virus neutralizing anti-pre-S1 human antibody fragments from large na ve antibody phage library. *Antiviral Res*, 2005, 68( 3 ): 109-115.
- [ 3 ] Wang L, Kaneko S, Honda M, *et al.* Approach to establishing a

liver targeting gene therapeutic vector using naturally occurring defective hepatitis B viruses devoid of immunogenic T cell epitope [ J ]. *Virus Res*, 2002, 85( 2 ): 187-197.

- [ 4 ] J 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[ M ]. 北京: 科学出版社, 1999. 19-20.
- [ 5 ] 薛庆善. 体外培养的原理及技术[ M ]. 北京: 科学出版社, 2001. 36-40.
- [ 6 ] 傅继华. 病毒学实用实验技术[ M ]. 青岛: 山东科学技术出版社, 2003. 102-103.
- [ 7 ] Kaneda Y, Nakajima T, Nishikawa T, *et al.* Hemagglutinating Virus of Japan ( HVJ ) Envelope Vector as a Versatile Gene Delivery System[ J ]. *Mol Ther*, 2002, 6( 2 ): 219-226.
- [ 8 ] 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学实验技术[ M ]. 北京: 人民军医出版社, 2003. 91-92.
- [ 9 ] Hilleman MR. Critical overview and outlook: pathogenesis, prevention, and treatment of hepatitis and hepatocarcinoma caused by hepatitis B virus[ J ]. *Vaccine*, 2003, 21( 32 ): 4626-4649.
- [ 10 ] Broo K, Wei J, Marshall D, *et al.* Viral capsid mobility: A dynamic conduit for inactivation[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98( 5 ): 2274-2277.
- [ 11 ] Yamada T, Iwabuki H, Kanno T, *et al.* Physicochemical and immunological characterization of hepatitis B virus envelope particles exclusively consisting of the entire L( pre-S1 + pre-S2 + S ) protein [ J ]. *Vaccine*, 2001, 19( 23-24 ): 3154 - 3163.
- [ 12 ] Payan C, Pivert A, Kampf G, *et al.* Assessment of new chemical disinfectants for HBV virucidal activity in a cell culture model[ J ]. *J Hosp Infect*, 2004, 56 ( Suppl 2 ): S58-S63.

[ 收稿日期 ] 2006 - 08 - 10

[ 修回日期 ] 2006 - 09 - 06

[ 本文编辑 ] 郁晓路

· 简 讯 ·

## 《临床肿瘤学杂志》征订启事

《临床肿瘤学杂志》是由国家新闻出版总署和解放军总政治部批准创办的肿瘤专业学术期刊, 是中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国生物医学核心期刊和 CSCO 团体会员期刊, 并被多家检索系统和数据库收录。本刊以“突出临床, 兼顾基础, 中西并蓄”为办刊特色, 主要刊登肿瘤临床研究领域的最新研究成果和经验, 国内外的研究动态与进展, 以及与临床密切相关的基础研究等。主要栏目有: 专家论坛、论著、经验交流、综述与讲座、专题笔谈、短篇报道、简讯等。读者对象为广大的肿瘤工作者和相关的医药卫生工作人员。

《临床肿瘤学杂志》为月刊, 大 16 开本, 80 页, 激光照排, 随文插印彩图, 印刷装帧精美, 国内外公开发行, 邮发代号 28 - 267。每期定价 10 元(包括邮寄费), 全年 120 元。本刊不仅是广大读者获取新信息的窗口, 也是广大作者施展才华的舞台, 欢迎大家订阅和投稿。全国各地邮局均可订阅, 漏订者直接汇款到南京市杨公井 34 标 34 号《临床肿瘤学杂志》编辑部补订。

邮编: 210002

电话: 025 - 84400143, 80864363

传真: 025 - 84400143

E - mail: LCZLX@cscoc.org.cn。