

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)03-0240-04

作为基因转移载体的乙型肝炎病毒衣壳对肝癌细胞的靶向性

潘德键¹, 王东林^{3*}, 王卫兵², 周锡建¹, 陈正堂⁴(1. 解放军第 101 医院 血液肿瘤科, 江苏 无锡 214044; 2. 解放军第 101 医院 传染病中心, 江苏 无锡 214044; 3. 同济大学 附属同济医院 肿瘤科, 上海 200065; 4. 第三军医大学 附属新桥医院 全军肿瘤研究所, 重庆 400037)

[摘 要] **目的:** 探讨乙型肝炎病毒衣壳作为基因转移载体对肝癌细胞的靶向性和有效性。**方法:** 采用 PEG 8 000 病毒浓缩法、 β -丙内脂法从能持续产生 HBV 的 HepG2. 2. 15 细胞上清液中制备乙型肝炎病毒衣壳(hepatitis B virus envelope, HBVE), 用它包裹绿色荧光蛋白质粒(pIRS₂-EGFP)后得到基因转移载体复合物 HBVE-GFP, 用脂质体包裹 pIRS₂-EGFP 后得到基因转移载体复合物 Liposome-GFP。用 HBVE-GFP 及作为对照的 Liposome-GFP 转染人成肝细胞瘤 HepG2 细胞来研究其转导效率; 用 HBVE-GFP 分别转染 HepG2 细胞及作为对照的人肺腺癌细胞 A549、人宫颈癌细胞 HeLa、人皮肤成纤维细胞 FB 来研究其靶向性; 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达情况, 流式细胞术检测细胞发光率。**结果:** (1) 有效性检测: Liposome-GFP 组及 HBVE-GFP 组均可见绿色荧光蛋白的表达, HBVE-GFP 组的荧光强度较 Liposome-GFP 组更强($P < 0.01$); Liposome-GFP 组的转染效率为(49.97 ± 2.37)%, 而 HBVE-GFP 组为(70.65 ± 3.15)%, 两者差异显著($P < 0.01$)。(2) 靶向性检测: 各种细胞均可见绿色荧光蛋白的表达, HepG2 细胞较其他细胞具有更强的荧光强度($P < 0.01$), HepG2 细胞的转染效率为(71.35 ± 0.03)%, 显著高于其他 3 组($P < 0.01$)。**结论:** 乙型肝炎病毒衣壳作为基因转移载体对肝癌细胞具有较好的转染有效性和靶向性。

[关键词] 乙型肝炎病毒衣壳; 基因转移载体; 转染效率; 靶向性; 肝癌

[中图分类号] R730.5 **[文献标志码]** A

Targeting efficiency of hepatitis B virus envelope as a gene transfer vector on liver cancer cells

PAN De-jian¹, WANG Dong-lin^{3*}, WANG Wei-bing², ZHOU Xi-jian¹, CHEN Zheng-tang⁴(1. Department of Hematological Oncology, No. 101 Hospital of PLA, Wuxi 214044, Jiangsu Province, China; 2. Infectious Disease Center, No. 101 Hospital of PLA, Wuxi 214044; 3. Department of Oncology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065; 4. PLA Research Institute of Cancer, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the transfection efficacy and targeting efficiency of hepatitis B virus envelope (HBVE) as a gene transfer vector for liver cancer cells. **Methods:** HBVE was obtained from the supernatant of HepG2.2.15 cells with a PEG8000 system and β -propiolactone. The pIRS2-EGFP was packed with HBVE to obtain HBVE-GFP and was packed with liposome to obtain Liposome-GFP. HBVE-GFP and Liposome-GFP were used to transfect human hepatoblastoma cell line HepG 2 to study the transfection efficiency. HepG 2, A 549, HeLa and FB cells were transfected with HBVE-GFP to appraise the targeting ability of HBVE-GFP. GFP protein expression was observed under a fluorescent microscope and the ratio of GFP positive cells was determined by flow cytometry. **Results:** (1) Transfection efficiency: The GFP protein was observed in both the liposome group and the HBVE group under the fluorescent microscope; the fluorescent intensity in the HBVE group was 3-4 times that of liposome group as determined by flow cytometry ($P < 0.01$). The transfection rate of liposome group was (49.97 ± 2.37)% and was (70.65 ± 3.15)% in HBVE group. (2) Targeting ability: The GFP was observed in all the 4 types of cells under the fluorescent microscope; the fluorescent intensity of the HBVE group was 2-3 times those of the other 3 groups ($P < 0.01$). The transfection rate of HepG2 group was (71.35 ± 0.03)% , significantly higher than those of the other 3 groups($P < 0.01$). **Conclusion:** HBVE as a gene transfer vector has a satisfactory transfection efficacy and targeting ability for liver cancer cells.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30100189). Supported by National Natural Science Foundation of China(No. 30100189)

[作者简介] 潘德键(1979 -), 男, 重庆市人, 硕士, 医师, 主要从事病毒致癌机制及肿瘤生物治疗的研究。E-mail: bk-333@163.com

* Corresponding author. Tel: 021-66111009, E-mail: xu_hong_wei@sina.com

[**Key words**] hepatitis B virus envelope; gene transfer vector; transfection efficacy; targeting ability; liver cancer

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(3): 240-243]

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是已知具有嗜肝细胞特性的DNA病毒^[1-2]。HBV的嗜肝性主要是由于衣壳上镶嵌的外壳蛋白PreS₁(21~47区段)^[3]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、载容量等某些方面均存在缺陷^[4-5]。为此,本研究考虑把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。在前期工作中,利用PEG 8 000病毒浓缩法、 β -丙内脂法从能产生HBV的HepG2.2.15细胞上清液中成功制备了乙型肝炎病毒衣壳基因转移载体(hepatitis B virus envelope, HBVE),初步研究显示该载体具有良好的生物学功能^[6]。在此基础上,进一步将HBVE包裹绿色荧光蛋白质粒后转染HepG2细胞及作为对照的人肺腺癌细胞株A549、人宫颈癌细胞株HeLa、人皮肤成纤维细胞株FB,探讨HBVE作为基因转移载体对肝癌细胞的转染效率及靶向性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

能持续产生HBV的HepG2.2.15细胞由第三军医大学西南医院传染病医院刘俊博士惠赠。人成肝细胞瘤细胞株HepG2细胞、人肺腺癌细胞株A549细胞、绿色荧光蛋白质粒pIRES₂-EGFP由全军肿瘤研究所赵忠全硕士惠赠。人宫颈癌细胞株HeLa细胞由第三军医大学新桥医院妇产科赵晓莉硕士惠赠,人皮肤成纤维细胞株FB细胞由第三军医大学大坪医院皮肤科毕建军硕士惠赠。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生物公司。 β -丙内脂和EM购自SIGMA公司。PEG 8 000购自华美生物工程公司。DOTAP Liposomal Transfection Reagent购自德国ROCHE公司。HepG2.2.15在含10%胎牛血清的DMEM培养液中,于37℃、5%CO₂、饱和湿度下培养。

1.2 HBVE的获得

HepG2.2.15细胞培养液上清经高速离心(10 000×g,20 min)后与PEG 8 000混合静置过夜,再次高速离心(21 000×g,30 min)后,用300 μ l的VSB液溶解病毒沉淀得到HBV浓缩液^[7]。用 β -

丙内酯(0.007 5%~0.001 0%)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 μ l的TE溶液中^[8]。采用ELISA法检测乙型肝炎病毒HBsAg、HBeAg、PreS₁,采用PCR法检测HBV DNA的扩增情况,用分光光度计测定HBV浓缩液的蛋白浓度,SDS-PAGE测定蛋白含量,用透射电镜进行形态学观察。

1.3 HBVE及脂质体包装pIRES₂-EGFP

1.3.1 HBVE包装pIRES₂-EGFP 20 μ l的HBVE悬浮液与8 μ l的pIRES₂-EGFP及5 μ l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HBVE-GFP在300 μ l的PBS液中悬浮,在4℃条件下存放备用^[6]。

1.3.2 脂质体包装pIRES₂-EGFP 在1 ml无血清DMEM培养液中稀释质粒DNA(8 μ l),以100 r/min旋转1 s;再加入脂质体20 μ l,以100 r/min旋转1 s。室温下放置5~10 min,使DNA结合在脂质体上获得Liposome-GFP。用分光光度法分别检测HBVE-GFP、Liposome-GFP的包封率。

1.4 HBVE转染效率及其靶向性的检测

用HBVE-GFP(HBVE-GFP组)以及作为对照的Liposome-GFP(Liposome-GFP组)转染HepG2来检测HBVE转染效率。用HBVE-GFP转染HepG2细胞(HepG2组)及作为对照的A549细胞(A549组)、HeLa细胞(HeLa组)、FB细胞(FB组)来检测HBVE靶向性。转染方法参照脂质体转染细胞的步骤,48 h后把转染细胞置于荧光显微镜下观察并拍照;用流式细胞仪进行荧光细胞计数,每种细胞的荧光值与相应对照细胞荧光值相除得到相对荧光强度。

1.5 统计学处理

应用SPSS11.0统计软件对相关数据进行独立样本t检验。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结 果

2.1 荧光显微镜观察HBVE-GFP及Liposome-GFP转染各种细胞后绿色荧光蛋白的表达

荧光显微镜下观察可见,在HepG2细胞中均可见绿色荧光蛋白的表达,HBVE-GFP组较Liposome-

GFP 组具有更强的荧光强度。在经 HBVE-GFP 转染后的 HepG2、A549、HeLa、FB 等 4 种细胞中,均可

见绿色荧光蛋白的表达,但 HepG2 组较其他 3 组具有更强的荧光强度(图 1)。

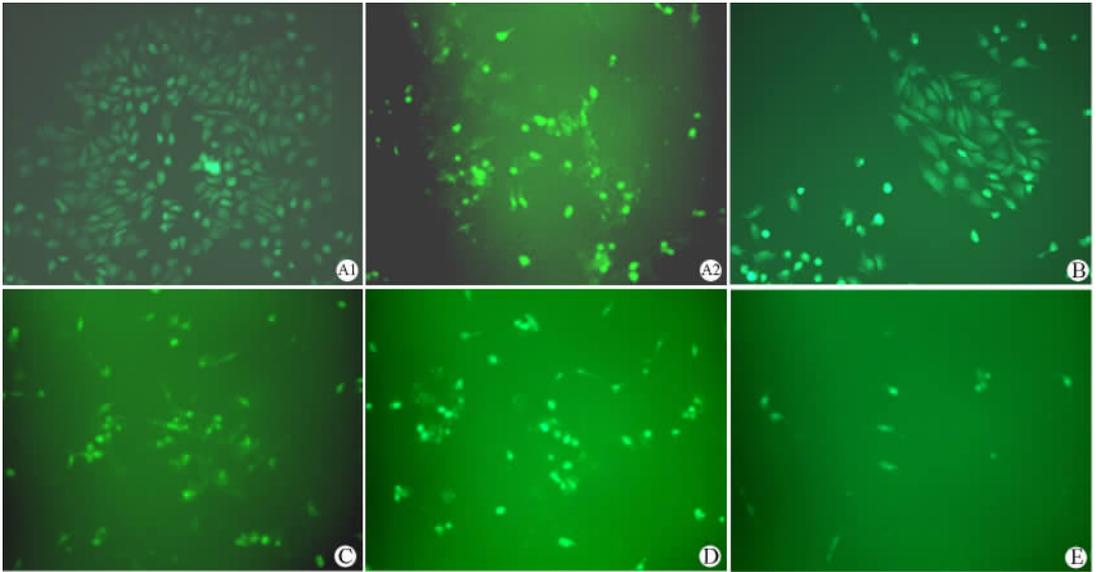


图 1 HBVE-GFP 及 Liposome-GFP 转染后各种细胞绿色荧光蛋白的表达(荧光显微镜, ×200)

Fig. 1 GFP expression in all cells transfected with HBVE-GFP or Liposome-GFP (fluorescence microscopy, ×200)

A1: HepG2, transfected with HBVE-GFP; A2: HepG2, transfected with Liposome-GFP; B: HepG2, transfected with HBVE-GFP; C: A549, transfected with HBVE-GFP; D: HeLa, transfected with HBVE-GFP; E: FB, transfected with HBVE-GFP

2.2 HBVE-GFP 转染细胞后绿色荧光蛋白的表达

流式细胞仪检测结果显示,在同种细胞 HepG2 中,HBVE-GFP 组表达绿色荧光蛋白的强度和效率均显著高于 Liposome-GFP 组(表 1, $P < 0.01$);在 HBVE-GFP 对多种细胞感染中,HepG2 组表达绿色荧光蛋白的强度和效率显著高于其他 3 组(表 2, $P < 0.01$)。

蛋白受体等]通过直接或间接方式结合,经过胞饮作用^[9]进入肝细胞。HBVE 含有 HBV 嗜肝性的外衣壳蛋白 PreS₁,将 HBVE 作为肝脏靶向性的基因转移载体在理论上具有可行性。

表 2 HBVE-GFP 转染多种细胞后的绿色荧光蛋白表达
Tab. 2 GFP expression in HepG2, A549, HeLa and FB cells transfected with HBVE-GFP

Groups	Transfective rate (%)	Fluorescent intensity
Hep G2	71.35 ± 0.03 **	88.06 ± 0.74 **
A549	35.91 ± 0.07	25.60 ± 0.26
HeLa	37.02 ± 0.22	27.51 ± 0.05
FB	32.28 ± 0.11	26.32 ± 0.53

** $P < 0.01$ vs A549, HeLa or FB group

表 1 HBVE-GFP、Liposome-GFP 转染 HepG2 细胞后绿色荧光蛋白的表达

Tab. 1 GFP expression in HepG2 cells transfected with HBVE-GFP or Liposome-GFP

Groups	Transfective rate (%)	Fluorescent intensity
HBVE-GFP	70.65 ± 3.15 **	97.65 ± 0.78 **
Liposome-GFP	49.97 ± 2.37	26.25 ± 0.51

** $P < 0.01$ vs Liposome-GFP group

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 PreS₁(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

前期研究^[6]采用 PEG 8 000 病毒离心浓缩法、β-丙内酯法从 HepG2. 2. 15 细胞中制备 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分。初步鉴定其有如下特性:(1)所构建的 HBVE 经 ELISA 法、蛋白电泳证实衣壳上的靶向蛋白 Pre S₁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,从结构组成来判断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)用电镜观察发现 5 300 bp 的 pIRES₂-EGFP 能够组装入 HBVE 中,证实 HBVE 具有较高载荷容量。(4)HBVE-GFP 能够有效地在 HepG2 细胞中表达。

脂质体是人工制备的由磷脂双分子定向排列而成的类脂小体。自 20 世纪 70 年代开始作为药物载体应用以来,由于其制备简单、对机体无毒、无免疫原性及易实现靶向性等特点而倍受重视^[10-11]。质粒 DNA 荷负电,容易与荷正电的类脂体(如正电荷脂质体)发生缩合,形成脂质体 DNA 复合物。Gershon^[12]于 1993 年利用电镜技术研究了复合物的形成后认为,最初质粒 DNA 与类脂体只是表面间进行结合。当结合到一定程度时,类脂体膜的融合与 DNA 的断裂同时发生,最终形成内部包封 DNA 的复合物。HBVE 结构本质是脂质体与靶向蛋白的复合物,其作用机制与脂质体类似。本实验应用脂质体法把 pIRES₂-EGFP 质粒转染到 Hep G2 细胞中,脂质体的转染效率为 49.97%,与文献报道的 50%~60% 基本一致^[8]。用 HBVE 包裹 pIRES₂-EGFP 后转染 Hep G2 细胞,转染效率为 70.65%,显著高于对照脂质体组($P < 0.01$)。荧光显微照片及流式细胞术检测结果可见,其荧光强度强于脂质体对照组($P < 0.01$),转染效果明显优于脂质体。

肿瘤治疗的发展方向是如何在提高疗效的同时减轻不良反应^[13-14],靶向基因治疗是解决这一问题的有效途径^[15-16]。本研究采用 HBVE-GFP 转染 Hep G2 细胞,同时以 A549、HeLa 两个肿瘤细胞株及人体正常组织 FB 细胞株作对照,来检测 HBVE 对肝癌的靶向性。检测结果表明,HBVE-GFP 转染 Hep G2 细胞后,绿色荧光蛋白的表达效率显著高于各对照细胞,表明 HBVE 作为载体对肝癌细胞具有较强的靶向性。图 1 中 A1、B 均为 HBVE-GFP 转染的 Hep G2 细胞,但绿色荧光蛋白的表达强度略有差异,主要是进行转染的细胞为不同培养批次所引起。

本实验在成功构建乙型肝炎病毒衣壳 HBVE 的基础上,证实其对肝癌细胞株 HepG 2 的转染效果显著优于普通脂质体,且具有较好的靶向性,提示 HBVE 作为基因转移载体值得更进一步地深入研究。

[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] Tharayil VS, Roberts LR. Molecular targets for therapy of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma [J]. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2006, 52(4):387-406.
- [3] Park SG, Jeong YJ, Lee YY, *et al.* Hepatitis B virus neutralizing anti-pre-S1 human antibody fragments from large native antibody phage library [J]. *Antiviral Res*, 2005, 68(3): 109-115.
- [4] 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.
- [5] Gao X, Kim KS, Liu D. Nonviral gene delivery: what we know and what is next [J]. *AAPS J*, 2007, 9(1): E92-104.
- [6] 潘德键, 赵忠全, 王东林, 等. 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[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13(5): 358-361.
- [7] 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.
- [8] Kaneda Y, Nakajima, 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.
- [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] Maruyama K, Suzuki R, Takizawa T, *et al.* Drug and gene delivery by "bubble liposomes" and ultrasound [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2007, 127(5): 781-787.
- [11] Zhong ZR, Liu J, Deng Y, *et al.* Preparation and characterization of a novel nonviral gene transfer system: procationic-liposome-protamine-DNA complexes [J]. *Drug Deliv*, 2007, 14(3): 177-183.
- [12] Gershon H, Ghirlando R, Guttman SB, *et al.* Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection [J]. *Biochemistry*, 1993, 32(28): 7143-7151.
- [13] Wells DJ. Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods [J]. *Gene Ther*, 2004, 11(18): 1363-1369.
- [14] Nguyen TH, Ferry N. Liver gene therapy: advances and hurdles [J]. *Gene Ther*, 2004, 11(Suppl 1): S76-S84.
- [15] Brandwijk RJ, Griffioen AW, Thijssen VL. Targeted gene-delivery strategies for angiostatic cancer treatment [J]. *Trends Mol Med*, 2007, 13(5): 200-209.
- [16] Mitrovic T, Radulovic S. Gene therapy of cancer [J]. *J BUON*, 2005, 10(2): 167-173.

[收稿日期] 2006-12-30

[修回日期] 2007-04-30

[本文编辑] 韩丹