

HGV RNA 基因组感染 HepG2 细胞的研究*

任 浩 朱分禄 戚中田**

(第二军医大学基础医学部微生物学教研室 上海 200433)

摘要: 为了观察 HGV RNA 基因组在 HepG2 细胞中的复制和表达并建立 HGV 感染的细胞模型, 体外转录制备 HGV RNA 基因组, Lipofectamin 介导转染 HepG2 细胞。取 HGV RNA 阳性培养上清液传代感染 HepG2 细胞, 采用 RT-PCR、免疫组化和 Western blot 等技术检测 HGV 在 HepG2 细胞中的复制和表达。HepG2 细胞在转染后 24h 便可在培养上清液中检测到 HGV 负链 RNA, 传代感染的细胞及培养上清液中可检测到 HGV 正、负链 RNA。在 90d 内传代 20 余次, 均能检测到 HGV 的复制。免疫组化和 Western blot 可检测到 HGV E2 蛋白在感染细胞中的表达。HGV 感染细胞经冻存后复苏, 仍能检测到 HGV RNA。故 HGV RNA 基因组能够在 HepG2 细胞中复制和表达, 此细胞模型有可能用于 HGV 的复制与感染防治的研究。

关键词: HGV, RNA 基因组, HepG2 细胞, 复制, 表达

中图分类号: R373.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0060-05

STUDIES OF HEPG2 CELLS INFECTED WITH HGV RNA GENOME

REN Hao ZHU Fen-Lu QI Zhong-Tian

(Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract: In order to observe the replication and expression of HGV RNA genome in HepG2 cells and establish a cell model of HGV infection, HGV RNA genome was prepared in vitro and transfected HepG2 cells with lipofectamin. HGV RNA-positive supernatants were used to infect fresh HepG2 cells. RT-PCR, immunohistochemistry and Western blot assays were carried out to detect the replication and expression of HGV in HepG2 cells. Both positive and negative strands of HGV RNA could be detectable in cell culture supernatants and cells at 24h post-transfection. During the culture periods of 90 days, the cells were maintained by changing the medium every 3 or 5 days, and cultured for more than 20 passages. Both strands of HGV could be detectable in culture supernatants and cells. Immunohistochemistry and Western blot results also confirmed that HGV E2 protein could be expressed in the infected HepG2 cells. HGV RNA could also be detectable in the frozen-thawed HepG2 cells infected with HGV RNA genome. Therefore, HGV RNA genome can replicate and express in HepG2 cells, this HGV RNA genome transfected cells model could be used as a cell model in the studies of replication and infection of HGV.

Key words: HGV, RNA genome, HepG2 cell, Replicate, Express

庚型肝炎病毒 (HGV) 为新近发现的单正链 RNA 病毒, 被认为与人类肝炎相关, 由于尚缺乏理想的细胞感染模型和动物模型, 其致病性及在宿主体内的复制和表达研究受到限制^[1,2]。已知 HGV RNA 复制周期中不形成 DNA 中间体, 故无法直接进行基因组操作。为了解决这一难题, 以 HGV cDNA 克隆为模板, 体外转录合成全长 HGV RNA 基因组, 转染 HepG2 细胞并进行传代感染实验, 采用 RT-PCR、免疫组化和 Western blot 等技术检测 HGV 在 HepG2 细胞中的复制和表达, 为研究 HGV 提供了一条新的可行途径。利用 HGV RNA 基因组进行细胞感染实验, 可在细胞内模拟病毒感染过程, 而避免

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39970394, 39830330, 39825116)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39970394, 39830330, 39825116)

** 联系作者 Tel: 021-25070265, E-mail: qizt@smmu.edu.cn

收稿日期: 2000-08-15, 修回日期: 2000-09-21

了 HGV RNA 阳性血清感染时血清中其它成分对细胞的影响^[3,4]。

1 材料与方法

1.1 细胞株及转染试剂等

HepG2 肝癌细胞株为本室保存, 3 株鼠抗 HGV E2 区单克隆抗体(命名为 M6, M13, M30)由 Dr. Engel (Roche Diagnostics, Germany) 惠赠, 含量约 $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ^[5]。转染试剂 Lipofectamin、DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶和 MMLV 购自 GIBCO/BRL, Taq DNA 聚合酶和羊抗鼠 IgG-AP 购自华美生物制品有限公司, NP40、DEPC、Trizol LS、Trizol 和 NBT/BCIP 等试剂购自华舜生物制品有限公司。

1.2 HGV RNA 基因组的制备

将 HGV 全基因组克隆至 pGEM3zf 的 *EcoR* I 和 *Xba* I 位点间, 获得含 HGV cDNA 基因组的克隆 pHGVqz^[6,7]。pHGVqz 以 *Xba* I 酶切线性化后作为体外转录的模板。体外制备按照试剂盒说明操作, HGV RNA 基因组溶于 DEPC 处理的水中, 按原 DNA 模板量加入 RQ1 DNase $1\text{U}/\mu\text{g}$, 37°C 15min 后酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 溶于 PBS, 0.7% 凝胶电泳定量并检查其完整性, 冻存于 -70°C 备用。

1.3 细胞转染

HepG2 细胞 ($10^6/3.5\text{mm}$ 培养皿) 于转染前 1d 传代, 待细胞融合至 60% ~ 70% 时转染。取一个 Eppendorf 管, 加 HGV RNA 基因组 $2\mu\text{g}$, 无血清 DMEM 培养基 $200\mu\text{L}$; 另取一个 Eppendorf 管, 加 Lipofectamin $8\mu\text{L}$, 无血清 DMEM 培养基 $200\mu\text{L}$, 二管混合均匀, 室温放置 45min。同时, 设立转染对照, 即以 PBS 替代基因组, 其余同上。HepG2 细胞用 PBS 洗 1 次, 加入转染混合物, 37°C 5% CO_2 孵育 5h 后, 加入等体积 20% FBS DMEM 培养基, 37°C 5% CO_2 孵育 24h 后换液, 保存上清液。收集转染后 24h 和 72h 的培养上清液和细胞, 备 RT-PCR 检测。

1.4 感染 HepG2 细胞

取转染后 24h 的培养上清液 $100\mu\text{L}$ 感染 HepG2 细胞 (25mL 玻璃培养瓶), 每 3 ~ 5d 换液 1 次, 留取上清液和半数细胞进行检测。(1) 培养上清液: 收集细胞培养上清液, $2,000\text{g}$ 离心 10min 以排除细胞的影响, -20°C 冻存。(2) 细胞收集: PBS 洗 2 次, 0.1% 胰蛋白酶消化, 留取 1/3 细胞继续培养, 其余细胞悬液 $2,000\text{g}$ 离心 10min, 弃上清液, PBS 洗 3 次, -20°C 冻存。取感染后检测出 HGV 负链 RNA 的培养上清液感染新鲜 HepG2 细胞, 在上清液检出 HGV 负链 RNA 之后, 再次感染新鲜 HepG2 细胞, 如此反复进行, 检测 HGV 在 HepG2 细胞复制的稳定性。

1.5 HGV RNA 正、负链的检测

取上清液 $200\mu\text{L}$ 或 10^7 细胞, 以 Trizol LS 和 Trizol 试剂提取 RNA, 溶于 $10\mu\text{L}$ DEPC 处理的水中, 取 $5\mu\text{L}$ 进行 RT-PCR 检测。引物位于 5'-NCR, 上游引物 Y3 (109-133 nt): 5'-GACACGGTTGCTAGGTCGTAAATCC-3', Y0 (33-53 nt): 5'-ACCGACGCCTATCTAA-GTAGA-3'。下游引物 Y2 (321-341 nt): 5'-AGAGAGACATTGAAGGCGGAC-3', Y20 (389-409 nt): 5'-CTTGGAGTCCCTCTCCAAGCC-3'。先用 Y0 (负链 RNA) 或 Y20 (正链 RNA) 37°C , 1h 逆转录, 再用 Y2 和 Y3 进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94°C , 30s, 56°C , 30s, 72°C , 45s, 共 35 个循环, 反应结束前 72°C 延伸 7min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

1.6 免疫组化

制备细胞爬片, PBS 漂洗 3 次, 每次 5min (下同); 3% H_2O_2 -甲醇溶液室温 15min, PBS 漂洗; 甲醇- -20°C 透化 20min, PBS 漂洗; 6% 的正常羊血清 37°C 温育 30min, 吸弃多

余封闭液;加 HGV E2 区单克隆抗体 (1:3,000, 1:6,000 稀释), 4℃反应 16h; PBS 漂洗, 加碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG (1:100), 37℃温育 1h; PBS 漂洗, TSM₁和 TSM₂各 5min×2 次梯度碱化, NBT/BCIP 避光显色 10min, PBS 终止显色, 中性树胶封片, 显微镜下观察。转染细胞和阴性对照细胞分别制备 3 张玻片, 分别为不加一抗、抗体 1:6,000 和 1:3000 稀释。

1.7 Western blot 鉴定

取 0.1% NP40/0.01mol/L PBS 60μL 重悬感染细胞和对照细胞 (约 10⁸), 室温裂解 20 min, -70℃速冻速融 3 次, 12,000g 离心 5min, 留取细胞裂解液。取中分子量标准 10μL、对照细胞、感染细胞裂解液各 20μL, 行 SDS-PAGE 电泳。凝胶经 300mA 稳流转膜 1h, 硝酸纤维素滤膜用丽春红染色观察转移情况。5%脱脂奶粉封闭 30min, 去离子水冲洗 5min, TBST 浸泡 5min×3 次, 加入 HGV E2 单克隆抗体 (1:20,000 稀释) 4℃过夜。去离子水冲洗 5min, TBST 浸泡 5min×3 次。加入碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG (1:500 稀释), 室温孵育 1 h, TBST、TSM₁ 和 TSM₂ 浸泡 5min×3 次。NBT/BCIP (NBT 6.6μL/mL TSM₂, BCIP 3.3μL/mL TSM₂) 避光显色 2.5h, 水洗终止显色。

2 结果

2.1 HGV RNA 的体外转录

取 HGV RNA 基因组 1μL 琼脂糖凝胶电泳分析, 所制备的 RNA 完整性较好, 分光光度计定量约 0.8μg/μL。为确保 RNA 基因组中的 DNA 模板被完全消化, 分别取 0.05μL



图 1 HepG2 培养上清液及细胞中 HGV 正负链 RNA 的扩增
1~4: HGV RNA, 1 Mock cell supernatants, 2 Transfected cell supernatants, 3 Mock cells, 4 Transfected cells
5~8: HGV cRNA, 5 Mock cell supernatants, 6 Transfected cell supernatants, 7 Mock cells, 8 Transfected cells, 9 DNA Marker DL2000

染后 24h 培养上清液感染 HepG2 细胞, 共传 20 余代, 在培养细胞和上清液中仍检测到了 HGV 正、负链 RNA, 而对照细胞均为阴性。

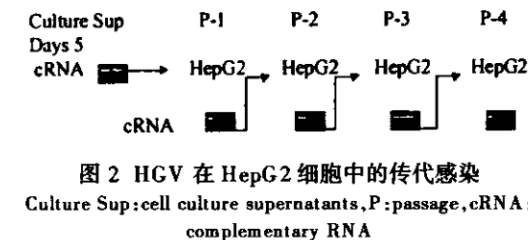


图 2 HGV 在 HepG2 细胞中的传代感染

Culture Sup: cell culture supernatants, P: passage, cRNA: complementary RNA

2.4 细胞复苏后 HGV 的检测

将 HGV 感染并传代至第 80d 的 HepG2 细胞冻存后复苏, 在复苏后第 5d 的细胞和培养

(1:20 稀释) 和 0.2μL (1:5 稀释) 基因组, 加或不加逆转录酶进行 RT-PCR 检测, 预期扩增片段为 233 bp, 反应中设立阴性和阳性血清对照。结果显示, 未加逆转录酶的反应未能扩增出预期片段, 表明 HGV RNA 基因组中的 DNA 模板已完全被消化掉。

2.2 HGV 正、负链 RNA

在转染后 24h 和 72h 的培养上清液和细胞中均检测到 HGV 正、负链 RNA, 结果如图 1 所示。以转

2.3 细胞传代感染

取感染后第 5d HGV 阳性培养上清液 100μL 感染新鲜培养的 HepG2 细胞, 在培养上清液中检测到 HGV 复制后, 取上清液 100μL 再次感染新鲜 HepG2 细胞, 如此反复感染 4 次, 均在培养上清液中检测到了 HGV 的复制 (图 2)。

上清液均检测到 HGV RNA, RT-PCR 扩增的片段与预期大小一致。

2.5 免疫组化

于感染后第 15d、25 d、35 d 和 45 d 制备细胞爬片, 在 HGV 感染细胞中均检测到 HGV E2 蛋白的表达, 1:3, 000 和 1:6, 000 两种稀释度的 HGV E2 抗体均能在感染细胞中检测到阳性信号。对照细胞及 PBS 对照均阴性 (图 3)。

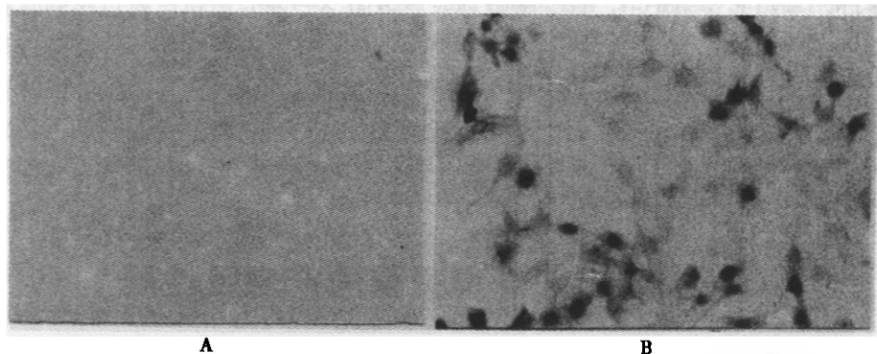


图 3 HGV RNA 基因组在 HepG2 细胞中的表达 (3.3×10^5)

A: Negative control, B: HGV RNA infected HepG2 cells

2.6 Western blot 鉴定

取 HGV 感染的 HepG2 细胞裂解液进行 SDS-PAGE, 以 HGV E2 单克隆抗体进行 Western blot 鉴定, 在 45kD 处有蛋白条带可与 HGV E2 单克隆抗体发生抗原抗体反应, 分子量大小与 HGV E2 (约 42kD) 蛋白相似, 表明感染的 HepG2 细胞中有 HGV E2 蛋白的表达 (图 4)。

3 讨论

HGV 的复制是通过负链 RNA 中间体介导的, 在被感染的宿主细胞胞浆内, HGV 基因组 RNA (正链 RNA) 直接作为模板翻译 HGV 多蛋白前体, 再被病毒和宿主的蛋白酶切割、加工为 HGV 的结构和功能蛋白如 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RDRP), 该酶以基因组 RNA 为模板复制出互补的负链 RNA 中间体, 负链 RNA 中间体又能作为模板供 RNA 依赖的 RNA 聚合酶合成正链 RNA, 即 HGV 基因组 RNA, 因此检测负链 RNA 有助于研究 HGV 的复制。

为了研究 HGV 的肝细胞亲嗜性并建立 HGV 感染的细胞模型, 本文以 HGV RNA 基因组转染 HepG2 细胞, 并对 RNA 基因组以 DNase 充分消化, 保证了转染物中不含 HGV cDNA, 排除了检测结果受质粒污染的可能性。在转染后 24h 和 72h 的培养上清液中均检测到 HGV 正、负链 RNA, 表明 HGV 能够在 HepG2 细胞中复制。免疫组化证实了 HGV E2 蛋白能在 HepG2 细胞中表达, Western-blot 结果显示了 HGV 不仅能在 HepG2 细胞中表达, 并有可能在细胞的参与下, 剪切成不同的蛋白。以上结果表明, HGV 能够在 HepG2 细胞中表达。此外, HGV 能够在 HepG2 细胞中稳定复制, 依据如下: (1) 感染的 HepG2 细胞持续培养达 90 余天 (20 余代), 在培养上清液和细胞中均检测到了 HGV 负链 RNA。 (2) 以 HGV 负链 RNA 阳性培养上清液感染新鲜 HepG2 细胞, 持续 4 代

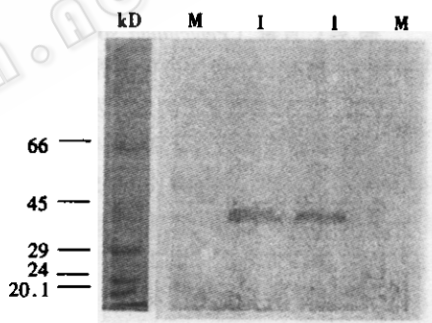


图 4 HGV 感染的 HepG2 细胞中 HGV E2 蛋白的表达

M: Mock cells, I: Infected cells

均检测到 HGV 的复制。(3) 冻存的 HepG2 感染细胞复苏后, 在细胞和培养上清液中仍能够检测到 HGV RNA。本研究表明 HepG2 细胞能在一定时间内 (至少 3 个月) 支持 HGV 的复制, 为 HGV 防治及复制机制的研究提供了体外细胞培养模型。

参 考 文 献

- [1] Simons J N, Leary T P, Dawson G T, *et al.* Nature Med, 1995, 1: 564 ~ 569.
- [2] Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Kezk Z-Y, *et al.* Science, 1996, 271 (5248): 505 ~ 508.
- [3] Kolykhalov A A, Agapov E V, Blight K J, *et al.* Science, 1997, 277: 570 ~ 574.
- [4] Cohen J L, Ticehurst J R, Feinstone S M, *et al.* J Virol, 1987, 61: 3035 ~ 3039.
- [5] Schmolke S, Tacke M, Schmitt U, *et al.* J Virol, 1998, 72 (5): 4541 ~ 4545.
- [6] 朱分禄, 戚中田, 任 浩, 等. 第二军医大学学报, 1998, 19 (4): 301 ~ 306.
- [7] Qi Z, Zhu F, He J, *et al.* J Med Coll PLA, 1998, 13 (2): 101.