

四环素调控表达系统调节 EGFP 和 HBV 前核心蛋白在哺乳动物细胞中表达*

朱晓东¹ 姚 丰² 田 波^{1**}

1. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080;

2. Laboratory of Tissue Repair and Gene Transfer, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

摘要 构建新型四环素调控的增强绿色荧光蛋白(EGFP)基因和乙肝病毒(HBV)前核心蛋白基因的表达载体, 利用脂质体转染哺乳动物细胞. 流式细胞术检测结果说明: 应用此系统四环素可使 EGFP 在 CHO 细胞中的表达提高 18 倍, 在 SSMC-7721 细胞与 HEK293 细胞中的表达分别提高 5 倍和接近 2 倍. 并且, 四环素可有效地诱导 HBV 的前核心蛋白基因在肝癌细胞系中的表达.

关键词 基因治疗 四环素诱导表达系统 增强绿色荧光蛋白 乙肝病毒 反式显性负调蛋白

基因治疗研究和应用过程中会遇到选择合适的基因导入系统、基因表达的可调控、缺少可治疗的基因等多方面的问题. 而对目的治疗基因在细胞中精确的调控表达一直是基因治疗研究中的关键性难题. 四环素诱导表达系统即 tet-off 和 tet-on 是目前应用最广, 也是惟一已用于转基因动物的一类可调控系统^[1-4]. 但它同时存在潜在的多性效应、融合病毒蛋白对细胞的毒性和构建的启动子产生较高的基础表达水平等缺陷. 对此, 新型四环素调控表达系统(商业名, T-RE_x system)的构建, 在很大程度上进行了改进, 使表达调控更加高效、严谨. 本文采用此系统及流式细胞术的方法, 定量分析了增强绿色荧光蛋白(EGFP)在不同类型的细胞中的调控表达水平; 并对四环素调节的人乙肝病毒(HBV)反式显性负调蛋白(*trans*-dominant negative)——核心蛋白在肝癌细胞系中进行了阻遏-诱导表达的研究.

1 材料与方 法

1.1 质粒、细胞和引物设计

pCMVtetOEGF 质粒、四环素阻遏蛋白(tetR)

表达载体 pCDNA3-tetR 和对照质粒 pCDNA3 为哈佛大学医学院赠送; 含有乙肝病毒全长基因组的质粒 TOPO-HBV¹⁾ 为本所高光侠教授构建并馈赠; pCMVEGFP 质粒购自 Clontech 公司. 用于扩增编码 HBV 前核心蛋白基因的 DNA 片段的引物顺序为: 5' TT GGATCCATGCAACTTTTTC ACCTCT-3' (其中划线部分为引入的 *Bam*HI 切点) 和 5'-TTT GCGGCCGCTAACATTGAGGTTCCCG-3' (其中划线部分为引入的 *Not*I 切点). 中国仓鼠卵巢巢细胞系 CHO-K1 和人胚胎肾细胞 HEK293 购自协和医科大学细胞库, 人肝癌细胞系 SSMC-7721 来自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库.

1.2 细胞培养

人肝癌细胞系 SSMC-7721 培养于含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基中; CHO-K1 细胞在含有 10% 胎牛血清的 F12 培养基中生长; HEK293 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中.

1.3 瞬间转染分析

使用 Qiagen 质粒纯化试剂盒(德国)大量制备高

2002-04-29 收稿, 2002-06-13 收修稿

* 国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号: G1999075602)

** 联系人, E-mail: tienpo@sun.im.ac.cn

1) 未发表

纯度质粒. 上面所述的几种细胞分别传代于6孔细胞板中, 每孔为 $(1\sim 2)\times 10^5$ 个. 将质粒 pCMVtetOEGFP 或 pCMVtetOprecore 与 pCDNA3-tetR 或对照质粒 pCDNA3 由阳离子脂质体 LipofectAMINE 介导共转染细胞(转染方法依照美国 Gibco BRL 公司产品说明书进行).

1.4 稳定细胞系 tetR-7721 的筛选

首先对质粒 pCDNA3-tetR 酶切线性化, 转染 SSMC-7721 细胞系. 48 h 后按 1:15 的比例传代, 用含 G418(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的选择培养基进行培养, 10~15 d 后挑取克隆扩大培养. 用质粒 pCMVtetOprecore 瞬间转染并用酶联免疫吸附分析(ELISA)的方法鉴定阳性细胞系.

1.5 流式细胞术测定(FACS)

细胞生长于6孔培养板, 脂质体法转染质粒 DNA. 48 h 后, 胰酶消化细胞, 用 PBS 洗细胞3次, 直接上 Becton-Dickinson 公司的流式细胞仪进行分析.

1.6 免疫印迹分析

基因转染 48 h 后收集细胞, 抽提细胞内总蛋白, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳(12%)后电转移至硝酸纤维素膜. 封闭后, 加抗 HBV 核心抗原的鼠抗体(由南京医科大学黄祖瑚教授赠送), 孵育后洗涤, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠的二抗孵育, 再洗涤. 加入显色底物, X 射线曝光.

2 结果

2.1 可诱导的表达载体的构建和在真核细胞中的表达

将 pCMVEGFP 质粒的 EGFP 基因克隆到 pCMVtetOEGF 质粒中, 由 lipofectAMINE 介导在真核细胞中瞬间表达, 荧光显微镜下观察. 与对照质粒相比, 转染 pCMVtetOEGFP 质粒的细胞呈现特征性绿色荧光(图版 I). 同样按照上述设计的引物采用 PCR 定向克隆的方法将 HBV 前核心蛋白基因克隆至此四环素调控的载体中, 免疫印迹检测其在肝癌细胞中的表达. 如图所示其分子量约为 22 ku (图 1), 与文献报道一致^[5].

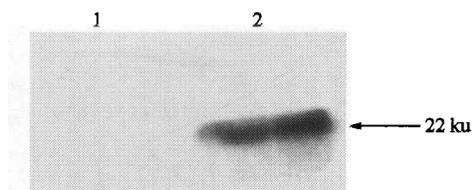


图1 HBV 前核心蛋白在 SSMC-7721 细胞中表达的 Western blot 分析

1. 细胞抽提液不加一抗的对照; 2. 加一抗的反应

2.2 EGFP 基因在诱导和阻遏条件下的表达

为了研究新型四环素调控表达载体在哺乳动物细胞中调节外源基因的表达情况, 选择了3种细胞系: CHO-K1, SSMC-7721 和 HEK293. 并采用3种条件共转染: (1) 0.5 μg 的 pCMVtetOEGFP 和 2 μg pCDNA3; (2) 0.5 μg 的 pCMVtetOEGFP 和 2 μg pCDNA3-tetR; (3) 0.5 μg 的 pCMVtetOEGFP 和 2 μg pCDNA3tetR, 且在培养基中加 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的四环素, 转染后培养四环素浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 培养 48 h 后经胰酶消化细胞进行流式细胞术分析. 以不转质粒的同种细胞作为空白(图 2(a)), 测定每组细胞的平均荧光强度(MFI)和转染效率(图 2(b)~(d)). 仅转染 pCMVtetOEGFP 和 pCDNA3, 转染效率为 73.73%, 平均荧光强度为 809.5; 当存在 2 μg pCDNA3-tetR 时, 平均荧光强度降为 42.2, EGFP 的表达抑制接近 20 倍(图 2(c)). 当在培养基中加入四环素(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 时, 由于四环素可使蛋白 tetR 失活, 从而抵消了 tetR 的抑制功能, 平均荧光强度又变为 771.6, 恢复了约 93% (图 2(d)), 即在转染效率相差不大的情况下, 加入四环素可使表达提高 18 倍多. 并且其他实验说明加入四环素或质粒 pCDNA3-tetR 对细胞群体荧光强度几乎未有影响.

采用同样的方法, 对转染质粒的 7721-SSMC 及 HEK293 细胞系也进行了 FACS 分析, 平均荧光强度变化的结果见表 1. 由表中可看出 EGFP 基因在两种细胞中在四环素调控表达系统的影响下表达强度是不同, 与在 CHO 细胞中亦不相同. 在 SSMC-7721 细胞与 HEK293 细胞中, tetR 可以分别产生 5.4 倍和 2 倍的阻遏, 当加入四环素后, 这种阻遏功能可被有效地抑制, 分别产生大于 5 倍和 1.75 倍的诱导, 平均荧光强度恢复率分别为 93.1% 和 83.8%.

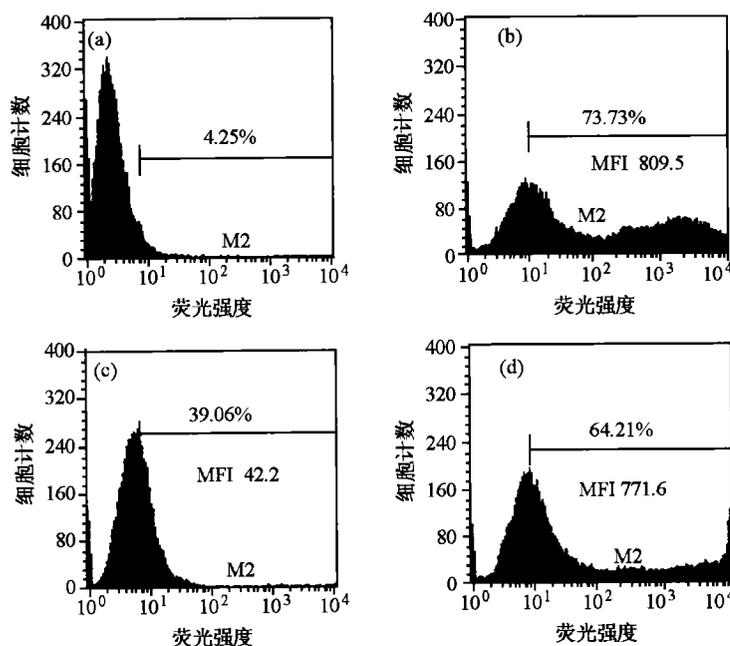


图2 EGFP基因在CHO-K1细胞诱导和阻遏条件下的表达

(a) 不转质粒的细胞空白对照; (b) 转染0.5 μg的pCMVtetOEGFP和2 μgpCDNA3;
(c) 转染0.5 μg pCMVtetOEGFP和2 μg pCDNA3-tetR; (d) 转染0.5 μg的pCMVtetOEGFP和2 μg pCMNA3tetR

表1 四环素调节EGFP基因在不同细胞中的表达

质粒	四环素	平均荧光强度	
		SSMC-7721	HEK293
PCMvtetOEGFP与pCDNA3	-	155.7	83.5
PCMvtetOEGFP与pCDNA3tetR	-	28.8	40.0
PCMvtetOEGFP与pCDNA3tetR	+	145.5	70.0

筛选稳定表达 tetR 蛋白的 SSMC-7721 细胞系, 用 ELISA 方法鉴定为阳性细胞系的记为 SSMC-7721-tetR. 此细胞系染色体整合了 tetR 基因, 其单独表达便可阻遏转染的外源前核心蛋白的表达, 而加入四环素, 则使得抑制功能释放, 结果如图 4.

2.3 HBV 反式显性负调蛋白的瞬间调节表达和在 tetR 稳定表达细胞系的调节表达

乙肝病毒的前核心蛋白属于反式显性负调蛋白, 它在细胞中的表达可以抑制乙肝病毒的复制. 我们将此蛋白的基因克隆至新型四环素高效调控表达载体中, 在建立的中国人肝癌细胞系 SSMC-7721 中进行瞬间共转染表达. 从总细胞抽提液中取等量的蛋白进行 Western blot 分析, 结果见图 3.

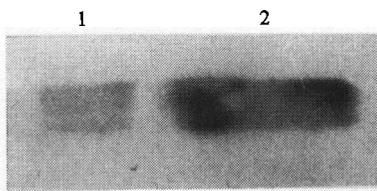


图4 四环素对HBV前核心蛋白的诱导

SSMC-7721-tetR 细胞系经质粒转染后做 Western blot 分析. 1. 转染 1 μg 的质粒 pCMVtetOprecore, 不加四环素; 2. 转染 1 μg 的质粒 pCMVtetOprecore, 后加 5 μg/mL 浓度的四环素培养基培养

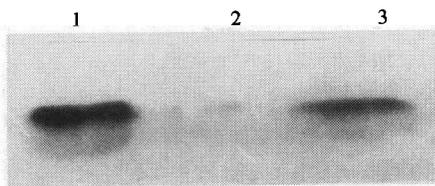


图3 Western blot 分析四环素调节 HBV 前核心蛋白表达

1. 1 μg 的 pCMVtetOprecore 和 3 μg pCDNA3 质粒共转染;
2. 1 μg 的 pCMVtetOprecore 和 3 μg pCDNA3-tetR 质粒共转染;
3. 1 μg 的 pCMVtetOprecore 和 3 μg pCDNA3-tetR 共转染,
后加浓度为 5 μg/mL 四环素培养基培养

3 讨论

新型四环素调控表达系统是在四环素诱导表达系统 tet-on 和 tet-off 的基础上, 研究证明其单独使用四环素阻遏蛋白 (tetR), 而不是四环素转录激活蛋白 (tTA), 便可作为有效的反式调控蛋白调节基因在哺乳动物细胞的表达, 而避免了 tTA 或反义四环素激活子 rtTA 中含有的单纯疱疹病毒 VP16 的转录活化区多肽对宿主细胞的毒性^[6,7].

本文采用流式细胞术方法,定量分析了报告基因 EGFP 使用新型四环素调控表达系统在不同哺乳动物细胞中的表达.相对于用其他报告基因如虫荧光素酶、表皮生长因子等方法的分析,此方法的最大优点是更能反映细胞群体的表达情况,通过比较 EGFP 的平均荧光强度值,可知道此表达系统在不同细胞的表达效率. FACS 分析 3 种细胞结果表明此系统在 CHO 中效率最高,SSMC-7721 为中度,而 HEK293 最低.当进行调控分析时,加入与不加入四环素,显示几种细胞 MFI 值的变化在 1.75 倍与 20 倍之间. CHO 细胞有很好的四环素调节的反应性,SSMC-7721 属于中度调节,而 HEK293 则较弱.后者也符合 Howe 等^[8]的结果,即 HEK293 细胞在表达外源基因时不受四环素的紧密调节.

持续性乙型肝炎病毒感染经常导致慢性化、肝硬化和肝细胞癌的发生.基于核酸水平的抗病毒肝炎基因治疗具有很强的应用前景.目前此方面的研究主要包括:反义 RNA 和反义 DNA,核酶, DNA 疫苗和反式显性负调蛋白等等^[9],基于设计和使用显性负调蛋白能作用和破坏“野生型”对应物蛋白的功能是抗病毒研究的一大策略,例如细胞过量表达 HIV 病毒 Rev 或 Tat 蛋白的突变体,可抑制野生型 HIV 的复制^[10~12].大量研究表明人乙肝病毒前核心蛋白或其突变体无论在细胞水平还是转基因动物实验上^[13,14]均可以抑制野生型病毒的复制,这种抗病毒效应主要是由于它们的表达可以干扰核心抗原积聚形成“野生型”的核衣壳,随之抑制了病毒前基因组 RNA 的入壳和病毒 DNA 的合成.在此研究成果上,我们通过定向 PCR 的方法将人乙肝病毒的前核心蛋白基因克隆于新型四环素调控表达质粒中,构建了 pCMVtetO-precure 载体,在中国人肝癌细胞系 SSMC-7721 中进行了瞬间表达分析,并构建稳定表达 tetR 的 SSMC-7721 细胞系,在此中完成调控表达分析.结果证明此调控系统对 HBV 前核心蛋白的表达有很好的控制性.

比较目前已知的哺乳动物细胞调控表达系统,新型四环素调控表达系统可产生较高的诱导表达水平和在阻遏条件下产生很低的基础表达水平.更重要的是它避开使用可对宿主细胞基因产生特异的激活作用的病毒反式激活蛋白,这对基因治疗的应用更有意义.我们用 EGFP 作为报告基因,在多种细胞中进行四环素的定量调控表达,结果说明此系统调节高效、精确;同时对构建的四环素可调节的乙肝治疗的 precure protein 基因在两种细胞系的表达

进行了研究,这为开展反式显性负调蛋白的乙型肝炎基因治疗打下了很好的基础.

致谢 感谢本所高光侠教授馈赠 TOPO-HBV 质粒;流式细胞术测定是在北京大学医学部基础医学院细胞分析室柳林与辛淑琴两位老师的帮助下完成的;对我所廖福莲女士承担部分技术工作,一并感谢.

参 考 文 献

- Gossen M, et al. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(12): 5547
- Gossen M, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 1995, 268(5218): 1766
- Bujard H. Controlling genes with tetracyclines. *J Gene Med*, 1999, 1(5): 372
- 魏旭东,等.促血小板生成素基因在 NIH3T3 细胞中表达的量调节. *中华医学杂志* 2000, 80(10): 773
- Guidotti L G, et al. The hepatitis B virus (HBV) precore protein inhibits HBV replication in transgenic mice. *J Virol*, 1996, 70(10): 7056
- Yao F, et al. Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(13): 1939
- Ogueta S B, et al. Design and *in vitro* characterization of a single regulatory module for efficient control of gene expression in both plasmid DNA and a self-inactivating lentiviral vector. *Mol Med*, 2001, 7(8): 569
- Howe J R, et al. The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(23): 14168
- Wands J R, et al. Nucleic acid-based antiviral and gene therapy of chronic hepatitis B infection. *J Gastroenterol Hepatol*, 1997, 12(9-10): S354
- Gjerdrum C, et al. Functional role of the HIV-1 Rev exon 1 encoded region in complex formation and *trans*-dominant inhibition. *FEBS Lett*, 2001, 495(1-2): 106
- Fraisier C, et al. Inhibition of Tat-mediated transactivation and HIV replication with Tat mutant and repressor domain fusion proteins. *Gene Ther*, 1998, 5(7): 946
- Bevec D, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells by retroviral-mediated gene transfer of a dominant-negative Rev *trans*-activator. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(20): 9870
- Lamberts C, et al. Precure-mediated inhibition of hepatitis B virus progeny DNA synthesis. *J Virol*, 1993; 67(7): 3756
- Wu C H, et al. Gene therapy applications in gastroenterology and hepatology. *Can J Gastroenterol*, 2000, 14(1): 57