

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.26.005

文章编号: 1005-8982(2017)26-0025-05

HCV NS4B 表达载体的构建及其对细胞凋亡的影响*

宋彬好¹, 赵嘉伟², 宋静³, 陈思思³, 胡志廷³, 韩昕³, 王敏敏¹, 任来峰³

(1.山西医科大学汾阳学院 科技中心,山西 汾阳 032200;2.厦门大学医学院 临床医学系,福建 厦门 361002;3.山西医科大学汾阳学院 医学检验系,山西 汾阳 032200)

摘要:目的 构建丙型肝炎病毒(HCV)2a型非结构蛋白 4B(NS4B)的真核表达载体,并观察其对骨肉瘤细胞 U2OS 凋亡的影响。**方法** 以质粒 PJFH1 为模板,通过 PCR 反应扩增 NS4B 目的基因片段,采用同源重组法与 PCMV-tag2b 载体相连,转化大肠杆菌感受态 DH5 α ,筛选正确的克隆。以脂质体为介导转染 U2OS 细胞,通过 Western blot 检测 NS4B 蛋白的表达,免疫荧光检测细胞的凋亡。**结果** 构建 pCMV-tag2b-NS4B 重组质粒,经测序其与 NCBI 公布的序列完全一致,并可在 U2OS 细胞中表达,DAPI 检测显示细胞凋亡率为(17.25 \pm 2.95)%,对照组凋亡率为(6.53 \pm 2.36)%。**结论** 成功构建 NS4B 的真核表达载体,并可在 U2OS 细胞中表达,诱导细胞凋亡。

关键词: 丙型肝炎病毒;非结构蛋白 4B;重组质粒;凋亡

中图分类号: R373.21

文献标识码: A

Construction of expression vector of HCV NS4B and its effect on cell apoptosis*

Bin-yu Song¹, Jia-wei Zhao², Jing Song³, Si-si Chen³, Zhi-ting Hu³,
Xin Han³, Min-min Wang¹, Lai-feng Ren³

(1. Science and Technology Center, Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang, Shanxi 032200, China; 2. Department of Clinical Medicine, School of Medicine, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361002, China; 3. Department of Laboratory Medicine, Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang,, Shanxi 032200, China)

Abstract: Objective To construct an eukaryotic expression vector of *Hepatitis C virus* (HCV) nonstructural protein NS4B, and investigate the effect of this protein on apoptosis of U2OS cells. **Methods** The fragment of target gene NS4B was obtained by PCR, and connected with the PCMV-tag2b vector using the homologous recombination method, and the PCMV-tag2b-NS4B was transformed into the *E.coli* DH5a. The right recombinant plasmid was selected. Lipofectamine 2000 was used to transfect PCMV-tag2b-NS4B into U2OS cells. Western blot was applied to detect the expression of HCV NS4B protein in U2OS cells, and immunofluorescence (IF) was used to assess the apoptosis of U2OS cells. **Results** The data showed that the recombinant plasmid PCMV-tag2b-NS4B was consistent with the one published on NCBI and could express HCV NS4B protein in U2OS cells. DAPI staining showed that the apoptosis rate of the PCMV-tag2b-NS4B group was (17.25 \pm 2.95)% and that of the control group was (6.53 \pm 2.36)%. **Conclusions** The eukaryotic expression vector of HCV NS4B has been successfully constructed, and HCV NS4B protein is expressed in U2OS cells and induces apoptosis.

Keywords: *Hepatitis C virus*; nonstructural protein 4B; recombinant plasmid; apoptosis

收稿日期:2016-12-26

* 基金项目:山西省自然科学基金(No:2014021037-9);山西省高等学校大学生创新创业训练项目(No:2014052);山西医科大学汾阳学院科技发展基金(No:2016B02)

[通信作者] 任来峰, E-mail: rlaifeng@163.com, Tel:15333434863

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染是造成慢性肝炎、肝纤维化及肝细胞肝癌的重要病因之一,严重威胁人类的生命健康^[1]。研究表明,HCV 非结构蛋白 4B (nonstructural protein 4B, NS4B)参与病毒复制、组装及释放等过程^[2-3]。最近研究表明,NS4B 可能参与宿主细胞的多种信号转导通路,干扰转录调控、内质网应激、恶性转化等过程,但各研究结果存在分歧^[4-6]。因此,本研究构建 HCV NS4B 表达载体,并观察其对骨肉瘤细胞 U2OS 凋亡的影响,为后续进一步研究其致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

U2OS 细胞株保存在液氮中,质粒 pCMV-Tag 2b 和 pJFH1(HCV 2a 型 cDNA)置入 -20℃冰箱冷冻保存,大肠埃希菌 DH5 α 购自北京康为世纪生物科技有限公司,In-Fusion HD Cloning Kit 购自美国 Clontech 公司,限制性内切酶 Hind III 购自美国 NEB 公司,质粒抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒均购自美国 Promega 公司。胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,DMEM(高糖)培养基、ECL 化学发光试剂购自武汉博士德生物工程有限公司,DNA 转染试剂 Lipofectamine 2000 及核染料 DAPI 购自美国 Invitrogen 公司,抗 Flag 抗体和二抗(HRP 标记)购自美国 Sigma 公司,引物合成和 DNA 测序由上海生工生物工程股份有限公司完成,DM 4000 型荧光显微镜购自德国 Leica 公司,Eon 型酶标仪购自美国 BioTek 公司。

1.2 方法

1.2.1 NS4B 引物的设计与合成 根据质粒 pJFH1 序列和质粒 pCMV-Tag 2b Hind III 酶切位点两端的序列,利用同源重组的原理设计 NS4B 引物,正向引物 P1:5'-ATTTCGATATCAAGCTTGCCTCTAGGGCGGCTCTC-3',正向引物 P2:5'-CGGTATCGATAAGCTTTCAGCATGGGATGGGGCAGT-3'。

1.2.2 NS4B 扩增及鉴定 以质粒 pJFH1 为模板,以 P1、P2 为引物,通过 PCR 反应扩增目的基因 NS4B,反应条件:95℃预变性 2 min,95℃变性 25 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 100 s,共 30 个循环,72℃继续延伸 6 min。PCR 产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳,根据分子量大小初步鉴定。

1.2.3 pCMV-tag2b-NS4B 重组质粒的构建及鉴定 Hind III 酶切 pCMV-tag2b 载体与目的基因 PCR 产

物由 In-Fusion 重组酶进行连接,重组反应体系:目的片段 3 μ l,pCMV-tag2b 1 μ l,In-fusion 重组酶混合物 2 μ l,ddH₂O 4 μ l, 总体系为 10 μ l,55℃反应 30 min。反应产物转化感受态 DH5 α 大肠杆菌,在 LB 固体培养基上挑取数个单克隆菌落,筛选重组质粒提取其质粒,进行双酶切鉴定,鉴定正确的质粒送至上海生工生物工程股份有限公司进一步测序鉴定。

1.2.4 细胞的复苏、培养及转染 将液氮中的 U2OS 细胞株取出,放入 37℃水浴箱中快速搅动融化,置于 3 倍体积 DMEM(高糖,含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素)培养基的无菌离心管中,1 500 r/min 离心 3 min,弃上清液,并加入含有 DMEM 培养基的细胞瓶中,于 5%二氧化碳 CO₂、37℃孵箱中连续培养。当细胞汇合度达 85%左右时,用 0.25%胰酶消化传代。转染前,将 U2OS 细胞培养于细胞培养板 / 孔中,待汇合度达 50%~60%时,按 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书进行脂质体转染。设置 pCMV-tag2b 空载体组和 pCMV-tag2b-NS4B 载体组,在转染后 48~72 h,进行后续实验。

1.2.5 细胞凋亡检测 U2OS 细胞接种到细胞爬片上,按上述方法转染相应质粒。转染 48 h 后收样,室温下用 PBS 漂洗 5~10 min/次,共 3 次,4%多聚甲醛固定 10 min,PBS 漂洗 3 次;再经 0.3% TritonX-100 通透处理 10 min,PBS 漂洗;DAPI 染核,封片,荧光显微镜下观察、拍照。凋亡细胞计数参照文献[7]的方法进行。

1.2.6 Western blot 检测 细胞转染 pCMV-tag2b-NS4B 48 h 后,用 RIPA 细胞裂解液裂解转染细胞(设未转染组为对照),抽提总蛋白,经 Bradford 法定量,加入 5 \times 上样缓冲液煮沸备用;经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,湿转法(200 mA,2 h)将蛋白转印至 PVDF 膜上,根据蛋白分子量条带剪下所需的膜,室温下 5%脱脂奶粉封闭 2 h;抗 Flag(1:500 比例稀释)或 α -tublin(1:5 000 比例稀释)单克隆抗体 4℃过夜,TBST 漂洗 5 min/次,共 3 次;再用 HRP 标记的抗鼠二抗(1:2 000 比例稀释)孵育 1.0~1.5 h,TBST 漂洗 5 min/次,共 3 次;混合 ECL 发光试剂显色,用 Fluor Chem FC2 成像仪采集图像。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 构建 pCMV-tag2b-NS4B 载体

本研究所用载体为 pCMV-tag2b。构建策略为选用 *Hind* III 为内切酶,设计目的基因 PCR 引物时,在正、反向引物的 5'-端分别添加 16 个与载体酶切位点上游同源的碱基序列,应用同源重组的原理将酶切的载体与 PCR 产物连接起来(见图 1)。首先扩增 HCV NS4B 基因,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳可见约 780 bp 的特异性条带(见图 2);然后进行重组质粒的克隆。挑取获得的细菌克隆扩增培养,提取质粒 DNA, *Hind* III 酶切,再经 1%琼脂糖凝胶电泳分析(见图 2)。酶切产物与 PCR 产物均在约 750 bp 处出现一条带,与 NS4B 的片段长度接近,初步提示重组质粒克隆成功。

2.2 pCMV-tag2b-NS4B 质粒测序

将上述构建的重组质粒送上海生工生物工程股份有限公司测序,测序引物为 CMV 正向引物:CGCA AATGGCGGTAGGCGTG(见图 3)。将结果序列与 pJFH1 NS4Bb 的标准序列进行比对,显示匹配度为 100%,表明成功构建 NS4B 真核表达质粒 pCMV-tag2b-NS4B。

2.3 NS4B 蛋白在 U2OS 细胞中的表达

将 U2OS 细胞复苏并在细胞瓶中培养(见图 4)。细胞转染 pCMV-tag2b-NS4B 或 pCMV-tag2b (同时设不转染组对照)48 h 后,收集细胞,经 Western blot 检测 U2OS 细胞中 NS4B 蛋白的表达,结果显示,只有在转染 pCMV-tag2b-NS4B 载体的细胞(实验组)中才表达 NS4B 蛋白(见图 5)。

2.4 NS4B 蛋白诱导 U2OS 细胞凋亡

细胞转染相应质粒 48 h 后,收集细胞,经 DAPI 染细胞核后在荧光显微镜下观察,分别计数其凋亡情况。转染 pCMV-tag2b-NS4B 组凋亡率为(17.25 ± 2.95)%,转染 pCMV-tag2b 组凋亡率为(6.53 ± 2.36)%,经 *t* 检验,差异有统计学意义($t=4.919, P=0.008$)。见图 6。

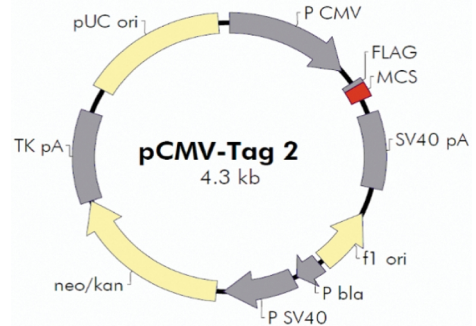
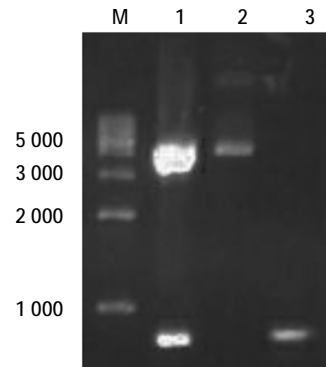


图 1 pCMV-Tag2b 载体结构



M:Marker; 1:pCMV-tag2b-NS4B 重组质粒 *Hind* III 酶切; 2:pCMV-tag2b-NS4B 重组质粒; 3:NS4B PCR 产物

图 2 pCMV-tag2b-NS4B 重组质粒鉴定

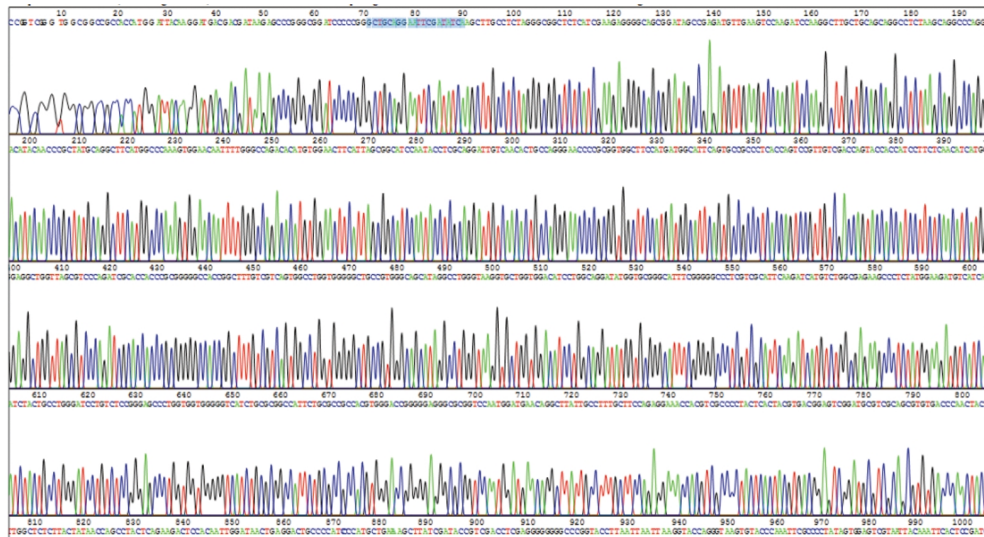


图 3 pCMV-tag2b-NS4B 重组质粒测序图谱

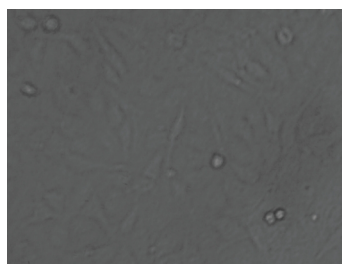
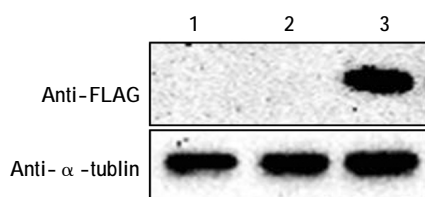
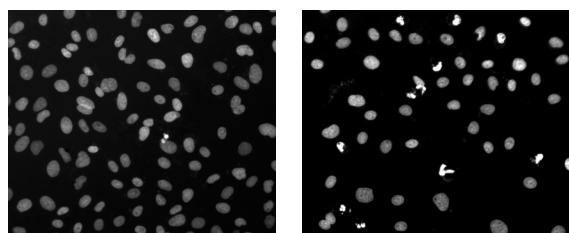


图 4 U2OS 细胞形态 (×20)



1: 未转染细胞对照组; 2: 空载体转染对照组; 3: NS4B-FLAG 转染细胞

图 5 NS4B 在 U2OS 细胞中的表达



PCMV-tag2b

PCMV-tag2b-NS4B

图 6 HCV NS4B 对细胞凋亡的影响 (×100)

3 讨论

分子克隆是现代生命科学研究中最基本的技术方法之一,传统的分子克隆通过双酶切法把目的基因连接到载体上。该方法首先应用 2 种限制性内切酶分别切割目的基因和载体,产生带有相同末端序列的目的基因片段和线性载体,然后用 T4 DNA 连接酶连接形成重组载体。最新发展起来的一种利用同源重组的原理进行分子克隆的方法,应用本方法设计引物时须在目的基因的 2 条引物 5'-端添加 15~20 个与载体酶切位点上游同源的核苷酸序列,最后加入重组酶,可将酶切后的载体和目的基因连接到一起,产生重组质粒⁹。同源重组法跟双酶切法相比,具有更加简单、快速、克隆效率高等优点⁹⁻¹⁰。本研究是利用同源重组的方法克隆 HCV NS4B 的重组载体 pCMV-tag2b-NS4B,经酶切和测序证明获得的重组质粒正确无误。Western blot 检测证明,本实验构建的重组载体可以在 U2OS 细胞中正确表达目的基因产物 NS4B 蛋白。

本研究将 PCMV-tag2b-NS4B 载体转染 U2OS 细胞,24 h 后通过 DAPI 染细胞核,在荧光显微镜下观察到明显的细胞凋亡。这与 ZHAO 等⁵在 293T 细胞和 Huh7 细胞中的研究结果一致。RUTKOWSKI¹¹和张艳妮等¹²发现,NS4B 可通过诱导细胞的非折叠蛋白质反应而启动细胞凋亡。李昌平等¹³在人正常 LO₂ 肝细胞中转染表达 NS4B 后,胰岛素样生长因子 IGF-II 表达上调,而抑癌基因 P16 表达下调,具有促进肝细胞增殖;此外,NS4B 可能抑制 Caspase-3 表达、促进 Survivin 的表达而抑制肝细胞凋亡¹³⁻¹⁴;最近研究表明,NS4B 可活化 EOR-Ca²⁺-ROS-NF-κB,抑制 HCV 感染诱导的肝细胞凋亡¹⁵。各实验室得出矛盾的结果其原因可能是所用的载体、细胞系等实验条件不同所致,具体细节尚待进一步研究。

综上所述,本实验利用同源重组法成功构建 HCV NS4B 的真核表达载体,初步研究发现 NS4B 可诱导 U2OS 细胞凋亡,为后续进一步深入研究 HCV NS4B 的生物学功能奠定基础。

参 考 文 献:

- [1] ARZUMANYAN A, REIS H M, FEITELSON M A. Pathogenic mechanisms in HBV-and HCV-associated hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(2): 123-135.
- [2] HUGLE T, FEHRMANN F, BIECK E, et al. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein[J]. Virology, 2001, 284: 70-81.
- [3] KONG L, FUJIMOTO A, NAKAMURA M, et al. Prolactin regulatory element binding protein is involved in hepatitis C virus replication by interaction with NS4B [J]. J Virol, 2016, 90(6): 3093-3111.
- [4] RAI R, DEVAL J. New opportunities in anti-hepatitis C virus drug discovery: targeting NS4B[J]. Antiviral Res, 2011, 90(2): 93-101.
- [5] ZHAO P, HAN T, GUO J J, et al. HCV NS4B induces apoptosis through the mitochondrial death pathway[J]. Virus Research, 2012, 169(1): 1-7.
- [6] KONG L, LI S, YU X, et al. Hepatitis C virus and its protein NS4B activate the cancer-related STAT3 pathway via the endoplasmic reticulum overload response[J]. Arch Virol, 2016, 161(8): 2149-2159.
- [7] 任来峰, 唐子执, 吴惠文, 等. HCV NS3/4A 基因外来表达对 Huh7 细胞凋亡及 DNA 损伤应答的影响[J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(8): 1110-1115.
- [8] 邝翡婷, 袁定阳, 李莉, 等. 一种载体构建的新方法: 重组融合 PCR 法[J]. 基因组学与应用生物学, 2012, 31(6): 634-639.
- [9] WANG S, ZENG X, LIU Y, et al. Construction and characterization of a PD5D5 recombinant lentivirus vector and its expres-

- sion in tumor cells[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(1): 91-98.
- [10] 马凯, 胡红霞, 于婧, 等. 双酶切和同源重组方法构建 pMIR-reporter 载体的比较[J]. *中国病原生物学杂志*, 2015, 10(6): 495-499.
- [11] RUTKOWSKI D T, KAUFMAN R J. A trip to the ER: coping with stress[J]. *Trends in Cell Biology*, 2004, 14(1): 20-28.
- [12] 张艳妮, 张庆华, 陈瑶, 等. 丙型肝炎病毒 NS4B 蛋白调控 Hep3B 细胞非折叠蛋白质反应研究[J]. *江西农业大学学报*, 2012, 34(1): 165-169.
- [13] 李昌平, 潘雯, 杨春, 等. 丙型肝炎病毒 NS4B 调控肝细胞增殖的相关机制研究[J]. *西南国防医药*, 2011, 21(4): 367-370.
- [14] 潘雯, 谭道玉, 李昌平, 等. 丙型肝炎病毒 NS4B 调控肝细胞凋亡的相关机制研究[J]. *泸州医学院学报*, 2009, 32(3): 339-343.
- [15] KONG L, LI S, HUANG M, et al. The roles of endoplasmic reticulum overload response induced by HCV and NS4B protein in human hepatocyte viability and virus replication[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): DOI: 10.1371/journal.pone.0123190.

(童颖丹 编辑)

欢迎订阅《中国现代医学杂志》

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年,是一本医学综合性学术期刊。由中华人民共和国教育部主管,中南大学、中南大学湘雅医院主办。创刊以来始终坚持以服务广大医药卫生科技人员、促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨,密切关注世界医学发展的新趋势,积极推广国内医药卫生领域的新技术、新成果,及时交流广大医药卫生人员的医学科学理论和业务技术水平,成为国内外医学学术交流的重要园地,已进入国内外多个重要检索系统和大型数据库。如:中文核心期刊(中文核心期刊要目总览 2008、2011 和 2014 版)、中国科技论文与引文数据库即中国科技论文统计源期刊(CSTPCD)、俄罗斯文摘(AJ)、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网全文数据库(CNKI)、中文科技期刊数据库、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、超星“域出版”及中国生物医学期刊光盘版等。

《中国现代医学杂志》辟有基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。主要刊登国内外临床医学、基础医学、预防医学以及医学相关学科的新理论、新技术、新成果,以及医院医疗、教学、科研、管理最新信息、动态等内容。主要读者为广大医药卫生科技人员。

《中国现代医学杂志》为旬刊,国际标准开本(A4 幅面),全刊为彩色印刷,无线胶装。内芯采用 90 g 芬欧汇川雅光纸(880 × 1230 mm),封面采用 200 g 紫鑫特规双面铜版纸(635 × 965 mm)印刷,每个月 10、20 和 30 日出版。定价 25 元/册,全年 900 元。公开发行,国内统一刊号:CN 43-1225/R;国际标准刊号:ISSN 1005-8982;国内邮发代号:42-143。欢迎新老用户向当地邮局(所)订阅,漏订或需增订者也可直接与本刊发行部联系订阅。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国现代医学杂志》发行部,邮编:410008。

电话:0731-84327938;传真:0731-89753837;E-mail:journal@zgxdyx.com

唯一官网网址:www.zgxdyx.com

《中国现代医学杂志》编辑部