

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.21.009

针对 HBV preS1、preS2 编码链的反基因锁核酸对 Hep2.2.15 细胞的抗病毒效果*

彭 彬¹, 许桂丹¹, 韦武均¹, 农顺强¹, 陈晓昊¹, 肖树荣¹, 邓益斌^{2△}

1. 右江民族医学院附属医院检验科, 广西百色 533000; 2. 广西肝胆疾病临床医学研究中心, 广西百色 533000

摘 要:目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV) preS1、preS2 DNA 同聚嘌呤区设计的锁核酸在体外对 HBV 复制和表达的抑制作用。方法 设计并合成锁核酸,以 Lipo3000 作为载体转染至锁核酸-脂质体组,设空白对照组,运用荧光定量 PCR、化学发光免疫分析等技术观察锁核酸对 HBsAg 表达、HBV DNA 复制的抑制作用,采用 CCK8 比色法观察锁核酸对 HepG2.2.15 细胞基本代谢的影响。结果 加入锁核酸后,HBsAg、HBV DNA 表达量相对于空白对照组逐渐降低,并随时间呈递增趋势,其中,preS1 的 3023-3037nt 位点在第 9 天对 HBsAg 表达的抑制率达(61.94±4.11)%,对 HBV DNA 复制的抑制率达(56.08±3.22)%;preS2 的 3305-3320nt 位点在第 9 天对 HBsAg 表达的抑制率达(72.93±4.14)%,对 HBV-DNA 复制的抑制率达(61.79±3.40)%。结论 HBV preS1 编码链的 3023-3037nt 位点和 preS2 编码链的 3305-3320nt 位点的反基因锁核酸片段对 HBsAg 表达和 HBV-DNA 复制的抑制效果最为明显,两者均可以作为抗 HBV 治疗的有效靶位。

关键词:乙型肝炎病毒; 锁核酸; preS1; preS2; HepG2.2.15 细胞
中图法分类号:R446.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2020)21-3106-04

Antiviral effect of antigene locked nucleic acid of HBV preS1, preS2 coding chain on Hep2.2.15 cells*

PENG Bin¹, XU Guidan¹, WEI Wujun¹, NONG Shunqiang¹,
CHEN Xiaohao¹, XIAO Shurong¹, DENG Yibin^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China; 2. Guangxi Hepatobiliary Disease Clinical Medical Research Center, Baise, Guangxi 533000, China

Abstract: Objective To investigate the inhibition of HBV replication and expression in vitro by the oligo-purine region of preS1 and preS2 DNA of hepatitis B virus (HBV). **Methods** Designed and synthesized locked nucleic acid, transferred to locked nucleic acid-liposome group with Lipo3000 as carrier, set up a blank control control, used fluorescent quantitative PCR, chemical luminescent immunoassay and other technologies to observe locked nucleic acid's inhibition of HBsAg expression, HBV DNA replication. Finally, the effect of locked nucleic acid on the basic metabolism of HepG2.2.15 cells was observed by CCK8 color method. **Results** After adding locked nucleic acid, the expression of HBsAg and HBV DNA gradually decreased compared with the control group, and showed an increasing trend with time. Among them, the 3023-3037nt site of preS1 inhibited HBsAg expression by (61.94±4.11)% on the 9th day, the inhibition rate of HBV DNA replication reached (56.08±3.22)%; the 3305-3320nt sites of preS2 inhibited HBsAg expression by (72.93±4.14)% on the 9th day, the inhibition rate of HBV-DNA replication reached (61.79±3.40)%. **Conclusion** Antigen-locked nucleic acid fragments targeting 3023-3037nt sites of HBV preS1 coding chain and 3305-3320nt sites of preS2 coding chain have the most obvious inhibitory effects on HBsAg expression and HBV-DNA replication, and both of which can be used as effective targets for anti-HBV therapy.

Key words: hepatitis B virus; locked nucleic acid; preS1; preS2; HepG2.2.15 cells

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(HBV)感染引起的一种传染性疾病,易发展为肝硬化和肝细胞癌^[1-2]。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81460123);广西科技计划项目基地与人才专项(桂科 AD17129025);广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA281187);广西肝胆疾病临床医学研究中心(桂科 AD17129025-25)。作者简介:彭彬,男,硕士研究生在读,主要从事基因诊断与治疗研究。△ 通信作者, E-mail: dengyb75@163.com。

目前,全球 HBV 携带者约有 3.5 亿,而我国约 1.3 亿,其中,广西壮族自治区为 HBV 感染的重灾区之一,在临床上对于乙型肝炎的治疗仍缺乏特效药^[3-4]。锁核酸亦称桥核酸,是近年来核酸研究领域的新热点^[5],是一种环状核苷酸衍生物,其核糖的 2'-O 与 4'-C 缩水形成氧亚甲基桥、硫亚甲基桥或胺亚甲基桥,形似锁状或桥状。研究表明,与其他寡核苷酸相比,锁核酸具有更强大的优势,如热稳定性强^[6-7]、抗酶解能力^[8-9]、与 DNA 或 RNA 相似^[10]、杰出的错配辨别力^[11]、水溶性好^[12]、降解半衰期长^[13]等。本研究针对 HBV preS1 的 3023-3037nt、3094-3109nt 2 个位点和 preS2 的 3201-3215nt、3305-3320nt 2 个位点分别设计合成锁核酸序列各 1 条,以 Lipo3000 介导转染 HepG2.2.15 细胞株,通过观察 HBV 的抑制作用,为研究新型抗 HBV 药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 材料为 HepG2.2.15 细胞,其能够在细胞上清液稳定表达 HBsAg、HBV DNA 等物质,是 HepG2 细胞在染色体上整合了 HBV 基因组的肝肿瘤细胞株,购自上海通派生物细胞库,Lipo3000 购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 仪器与试剂 荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 试剂盒购自深圳亚能生物技术有限公司;HBV HBsAg 定量检测试剂盒购自郑州安图生物工程股份有限公司;化学发光免疫测定仪购自郑州安图生物工程股份有限公司;实时定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。HepG2.2.15 细胞常规培养于含 G418、1% 胎牛血清的高糖型 DMEM 培养基中,并于 37℃、5% CO₂ 条件下培养,通过荧光定量 PCR 和免疫化学发光技术测量 HBsAg、HBV DNA 等指标,观察锁核酸对 HBV 的抑制作用。

1.3 方法

1.3.1 锁核酸的设计与合成^[4] 从 NCBI 基因库中搜索到 HBV ayw 亚型全基因组序列(3.2 kb DNA, NC:003977.1, GI:21326584),利用 RNA Structure 6.0 软件针对 preS1 编码链的 3023-3037nt、3094-3109nt 和 preS2 编码链的 3201-3215nt、3305-3320nt 4 个位点分别设计 1 条长度不等的反基因锁核酸序列。3023-3037nt 同聚嘌呤区:5'-CA * AA * TGCT * CCCGCT * C-3'(15 pb);3094-3109nt 同聚嘌呤区:5'-T * GT * TGTCA * ATAT * GCC-3'(15 pb);3201-3215nt 同聚嘌呤区:5'-A * GCA * GGAA * AATA * TAG-3'(15 pb);3305-3320nt 同聚嘌呤区:5'-A * AGA * TTGA * CGA * TATG-3'(15 pb)。以上各序列中,标注 * 号的前一个碱基进行锁核酸修饰。各序列经 BLAST 排除与人同源后由上海生物工程有限公司合成修饰并纯化。

1.3.2 实验分组与细胞转染 本实验设空白对照组与锁核酸-脂质体组。锁核酸-脂质体组包括 4 个亚组,分别为封闭 3023-3037nt 同聚嘌呤区(3023-3037nt 组)、封闭 3094-3109nt 同聚嘌呤区(3094-3109nt 组)、封闭 3201-3215nt 同聚嘌呤区(3201-3215nt 组)、封闭 3305-3320nt 同聚嘌呤区(3305-3320nt 组)。以 1×10^5 个/mL 细胞浓度接种于 6 孔板中,每组随机各设 6 个复孔,待细胞贴壁达 50%~60%后在各组每孔中加入锁核酸-脂质体药物,转染按照脂质体说明书操作,隔 3 d 收集培养上清液后再次给药,连续给药 3 次,并收集 3、6、9 d 的上清液。

1.3.3 细胞上清液 HBsAg 的检测 采用化学发光免疫技术对细胞上清液的 HBsAg 重复检测 3 次,取平均检测值。

1.3.4 HepG2.2.15 细胞上清液 HBV DNA 的检测

取细胞培养上清液 500 μ L 加入无酶 EP 管中,离心后留 200 μ L 加入 450 μ L DNA 提取液及 4 μ L 内标溶液,100℃恒温处理 15 min,按比例取相对应的 PCR 反应液及 Taq 酶,充分混匀之后按照每管 30 μ L 分装到 PCR 八连管中,备用。往上述 PCR 反应管中加入处理过的待测标本核酸、阴性、强阳性、临界阳性质控品及不同浓度的定量参考品的上清液各 20 μ L,瞬时离心数秒后放置于荧光定量 PCR 仪中。扩增条件:92℃预变性 2 min,93℃ 45 s,55℃ 60 s 共 10 个循环,93℃ 30 s,55℃ 45 s 共 30 个循环,72℃ 5 min 共 1 个循环。

1.3.5 细胞代谢活性的检测 采用 CCK8 比色法检测锁核酸对 Hep2.2.15 细胞代谢活性的影响,得到各组的吸光度(A)值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据分析,计数资料以率表示,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。并按以下公式计算抑制率(N 为测量值):

$$\text{抑制率} = \left(\frac{N_{\text{空白对照组}} - N_{\text{锁核酸-脂质体组}}}{N_{\text{空白对照组}}} \times 100\% \right)$$

2 结果

2.1 反基因锁核酸对 HBV DNA 复制的抑制效果 锁核酸-脂质体各亚组加入锁核酸药物后显示,不同亚组的 HBV DNA 复制在 3 d 后开始受到抑制,且抑制效果随时间显著升高,锁核酸-脂质体各亚组与空白对照组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);在 HBV preS1 的 3023-3037nt、3094-3109nt 2 个位点中,封闭 3023-3037nt 同聚嘌呤区的反基因锁核酸对 HBV DNA 复制的抑制效果最明显。在 HBV preS2 的 3201-3215nt、3305-3320nt 2 个位点中,封闭 3305-3320nt 同聚嘌呤区的反基因锁核酸对 HBV DNA 复

制的抑制效果最明显。见表 1。

2.2 反基因锁核酸对 HBV DNA 复制的抑制率 在 HBV preS1 的 3023-3037nt、3094-3109nt 2 个位点中,封闭 3023-3037nt 同聚嘌呤区的反基因锁核酸对 HBV DNA 复制的抑制效果最明显。在 preS2 的 3201-3215nt、3305-3320nt 2 个位点中,封闭 3305-3320nt 同聚嘌呤区的反基因锁核酸对 HBV DNA 复制的抑制效果最明显。见表 2。

表 1 反基因锁核酸对 HBV DNA 复制的抑制效果 ($\bar{x}\pm s, \times 10^5$ IU/mL, $n=6$)			
组别	3 d	6 d	9 d
空白对照组	2.26±0.13	3.61±0.16	4.87±0.08
3023-3037nt 组	1.56±0.14 ^a	2.22±0.09 ^a	2.66±0.07 ^a
3094-3109nt 组	1.62±0.09 ^a	2.33±0.09 ^a	2.91±0.05 ^a
3201-3215nt 组	1.52±0.07 ^a	2.14±0.03 ^a	2.60±0.06 ^a
3305-3320nt 组	1.49±0.08 ^a	2.01±0.11 ^a	2.42±0.09 ^a

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$ 。

表 2 反基因锁核酸对 HBV DNA 复制的抑制率 ($\bar{x}\pm s, \%, n=6$)			
组别	3 d	6 d	9 d
3023-3037nt 组	29.96±3.63	38.31±4.03	56.08±3.22
3094-3109nt 组	22.16±4.22	37.26±5.07	40.24±4.54
3201-3215nt 组	25.66±4.38	27.14±3.24	46.61±3.40
3305-3320nt 组	48.68±3.42	52.96±3.61	61.79±3.40

2.3 反基因锁核酸对 HBsAg 表达的抑制效果 锁核酸-脂质体各亚组加入锁核酸药物后显示,不同亚组的 HBsAg 抑制作用在 3 d 后开始受到抑制,且抑制效果随时间显著升高,锁核酸-脂质体各亚组与空白对照组比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。在 HBV preS1 的 3023-3037nt、3094-3109nt 2 个位点中,封闭 3023-3037nt 同聚嘌呤区的反基因锁核酸对 HBsAg 的抑制效果最明显。在 HBV preS2 的 3201-3215nt、3305-3320nt 2 个位点中,封闭 3305-3320nt 同聚嘌呤区的反基因锁核酸对 HBsAg 的抑制效果最明显。见表 3。

表 3 反基因锁核酸对 HBV HBsAg 表达的抑制效果($\bar{x}\pm s, \text{IU/mL}, n=6$)			
组别	3 d	6 d	9 d
空白对照组	0.19±0.03	0.40±0.04	1.10±0.04
3023-3037nt 组	0.14±0.04 ^a	0.27±0.04 ^a	0.68±0.04 ^a
3094-3109nt 组	0.14±0.06 ^a	0.29±0.04 ^a	0.79±0.04 ^a
3201-3215nt 组	0.13±0.09 ^a	0.27±0.04 ^a	0.65±0.04 ^a
3305-3320nt 组	0.13±0.03 ^a	0.26±0.06 ^a	0.64±0.05 ^a

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$ 。

2.4 反基因锁核酸对 HBsAg 表达的抑制率 在 HBV preS1 的 3023-3037nt、3094-3109nt 2 个位点中,封闭 3023-3037nt 同聚嘌呤区的反基因锁核酸对 HBsAg 的抑制效果最明显。在 HBV preS2 的 3201-3215nt、3305-3320nt 2 个位点中,封闭 3305-3320nt 同聚嘌呤区的反基因锁核酸对 HBsAg 的抑制效果最明显。见表 4。

表 4 反基因锁核酸对 HBsAg 表达的抑制率 ($\bar{x}\pm s, \%, n=6$)			
组别	3 d	6 d	9 d
3023-3037nt 组	36.17±3.26	49.62±4.36	61.94±4.11
3094-3109nt 组	28.75±4.22	37.07±4.31	40.22±4.21
3201-3215nt 组	43.28±4.36	48.50±3.75	68.14±5.34
3305-3320nt 组	50.38±6.17	57.42±4.19	72.93±4.14

2.5 CCK8 比色法检测锁核酸对 Hep2. 2. 15 细胞代谢的影响 用药 9 d 后,3023-3037nt 组、3094-3109nt 组、3201-3215nt 组、3305-3320nt 组的 A 值分别为 2.209±0.006、2.211±0.007、2.208±0.009、2.210±0.011,空白对照组的 A 值为 2.207±0.008,锁核酸-脂质体组各亚组与空白对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

HBV 是由约 3.2 kb 碱基对组成的相对松弛不完全双链 DNA 环状分子,共有 4 个开放读码区,即 S、C、P、X 区,其中,S、C 区序列是保守区,也是基因治疗的理想靶位^[14-16]。在编码 HBsAg 的 S 基因 5'末端有编码能力的核苷酸序列,称为 preS 区,可分为 preS1 区和 preS2 区,对应编码的是 preS1 蛋白和 preS2 蛋白。preS1 蛋白位于表面抗原大分子蛋白的 N 末端,由 109~119 个氨基酸组成,preS2 基因起始于第 3 172 位核苷酸,终止于第 833 位核苷酸。

本研究分别针对 HBV preS1 的 3023-3037nt、3094-3109nt 2 个位点和 preS2 的 3201-3215nt、3305-3320nt 2 个位点设计锁核酸序列,通过 Lipo3000 脂质体转染入 HepG2. 2. 15 细胞内,通过检测空白对照组和锁核酸-脂质体组的 HBV DNA 复制和 HBsAg 表达等来评价不同位点锁核酸的疗效,实验结果显示,preS1 的 3023-3037nt 位点每隔 3 d 连续 3 次对应给药之后,对 HBsAg 表达的 3 次抑制率分别为(36.17±3.26)%、(49.62±4.36)%、(61.94±4.11)%,对 HBV-DNA 复制的 3 次抑制率分别为(26.96±3.63)%、(38.31±4.03)%、(56.08±3.22)%;3094-3109nt 对 HBsAg 表达的 3 次抑制率分别为(28.75±4.22)%、(37.07±4.31)%、(40.22±4.21)%,对 HBV-DNA 复制的 3 次抑制率分别为(22.16±4.22)%、(37.26±5.07)%、(40.24±4.54)%;3201-3215nt 对 HBsAg 表

达的 3 次抑制率分别为 $(43.28 \pm 4.36)\%$ 、 $(48.50 \pm 3.75)\%$ 、 $(68.14 \pm 5.34)\%$ ，对 HBV-DNA 复制的 3 次抑制率分别为 $(25.66 \pm 4.38)\%$ 、 $(27.14 \pm 3.24)\%$ 、 $(46.61 \pm 3.40)\%$ ；3305-3320nt 对 HBsAg 表达的 3 次抑制率分别为 $(50.38 \pm 6.17)\%$ 、 $(57.42 \pm 4.19)\%$ 、 $(72.93 \pm 4.14)\%$ ；对 HBV-DNA 复制的 3 次抑制率分别为 $(48.68 \pm 3.42)\%$ 、 $(52.96 \pm 3.61)\%$ 、 $(61.79 \pm 3.40)\%$ 。由此可看出，preS1 编码链的 3023-3037nt 的抑制效果较好，preS2 编码链的 3305-3320nt 的抑制效果较好，而相对于 preS1 的 3023-3037nt，preS2 的 3305-3320nt 抑制效果较高，可更有效地通过 HepG2.2.15 细胞的核孔进入到细胞核内，与基因组 cccDNA 的编码链相结合并形成三链杂交分子，在细胞核的复制和转录水平发挥抗病毒效果，具体的机制还有待进一步的研究，此外，通过 CCK8 比色法证实锁核酸-脂质体各亚组对细胞的代谢活性无明显毒性作用。

综上所述，通过探究 preS1 的 3023-3037nt、3094-3109nt 2 个位点和 preS2 3201-3215nt、3305-3320nt 2 个位点，采用实时定量 PCR、化学发光免疫分析技术观察 HBV DNA、HBsAg 等抗病毒指标，这为 preS1、preS2 的靶位提供了理论和实验依据，也为 HBV 的药物治疗提供了有效的靶位。

参考文献

- [1] 邓益斌,王燕菲. 针对 HBV S 基因 mRNA 反义锁核酸设计及其在 2.2.15 细胞内的抗病毒作用[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(34): 3497-3501.
- [2] 邓益斌,农乐根,梁祚仁,等. HCV 锁核酸zyme对病毒 5' 非编码区基因调控的特异性抑制作用[J]. 基础医学与临床, 2014, 34(10): 1363-1366.
- [3] 邓益斌,张梁,王燕菲. HBV S 基因反义锁核酸抑制病毒体外复制[J]. 基础医学与临床, 2010, 30(4): 360-363.
- [4] 邓益斌,温旺荣. 反基因锁核酸体外抑制乙型肝炎病毒前 S₁ 基因表达[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(6): 722-725.
- [5] PABON-MARTINEZ Y V, XU Y, VILLA A, et al. LNA effects on DNA binding and conformation: from single strand to duplex and triplex structures[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 11043.
- [6] KUMAR P, TRUONG L, BAKER Y R, et al. Synthesis, affinity for complementary RNA and DNA, and enzymatic stability of triazole-linked locked nucleic acids (t-LNAs)

- [J]. ACS Omega, 2018, 3(6): 6976-6987.
- [7] KUMAR P, EL-SAGHEER A H, TRUONG L, et al. Locked nucleic acid (LNA) enhances binding affinity of triazole-linked DNA towards RNA[J]. Chem Commun (Camb), 2017, 53(63): 8910-8913.
- [8] XI D, SHANG J, FAN E, et al. Nanopore-based selective discrimination of microRNAs with single-nucleotide difference using locked nucleic acid-modified probes[J]. Anal Chem, 2016, 88(21): 10540-10546.
- [9] KAURA M, HRDLICKA P J. Efficient discrimination of single nucleotide polymorphisms (SNPs) using oligonucleotides modified with C5-pyrene-functionalized DNA and flanking locked nucleic acid (LNA) monomers[J]. Chem Asian J, 2016, 11(9): 1366-1369.
- [10] BIAGETTI M, CUCCIOLONI M, BONFILI L, et al. Chimeric DNA/LNA-based biosensor for the rapid detection of African swine fever virus[J]. Talanta, 2018, 184(1): 35-41.
- [11] LIMA J F, CARVALHO J, PINTO-RIBEIRO I, et al. Targeting miR-9 in gastric cancer cells using locked nucleic acid oligonucleotides[J]. BMC Mol Biol, 2018, 19(1): 6-10.
- [12] AHMADI S, SHARIFI M, SALEHI R. Locked nucleic acid inhibits miR-92a-3p in human colorectal cancer, induces apoptosis and inhibits cell proliferation[J]. Cancer Gene Ther, 2016, 23(7): 199-205.
- [13] MA L, CHEN H Y, ZHU H X, et al. Locked nucleic acid couples with Fok I nucleases to target and cleave hepatitis B virus's gene in vitro[J]. Yi Chuan, 2016, 38(4): 350-359.
- [14] MEHMANKHAH M, BHAT R, ANVAR M S, et al. Structure-guided approach to identify potential inhibitors of large envelope protein to prevent hepatitis B virus infection[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 1297484.
- [15] HEGER-STEVIĆ J, ZIMMERMANN P, LECOQ L, et al. Hepatitis B virus core protein phosphorylation: identification of the SRPK1 target sites and impact of their occupancy on RNA binding and capsid structure[J]. PLoS Pathog, 2018, 14(12): e1007488.
- [16] MORTAZAVI M, ZARENEZHAD M, GHOLAMZADEH S, et al. Bioinformatic identification of rare codon clusters (RCCs) in HBV genome and evaluation of RCCs in proteins structure of hepatitis B virus[J]. Hepat Mon, 2016, 16(10): e39909.