

· 基础研究 ·

白细胞介素 -21 与乙型肝炎病毒前 S2S 抗原融合蛋白
在 293T 细胞中的表达 *王 珏 张 野 苏雯静 李 颖 连建奇 白雪帆 黄长形[△]

(第四军医大学唐都医院全军感染病中心 陕西 西安 710038)

摘要 目的:构建白细胞介素-21(interleukin-21, IL-21)和乙型肝炎病毒前 S2S 抗原(S2S)的融合表达质粒,并研究其在 293T 细胞中的表达。方法:采用 PCR 方法扩增 IL-21 和 HBV 前 S2S 基因片段,分别克隆入 pcDNA3 真核表达质粒,用分子克隆方法构建融合表达质粒,并以脂质体 2000 转染 293T 细胞,分别应用 ELISA 法和 Western Blot 法检测细胞上清及细胞中 IL-21 和 HBsAg 的表达水平。结果:经酶切鉴定及 DNA 序列证实重组质粒内插入片段序列正确,三种重组质粒分别命名为 pcDNA-IL-21、pcDNA-S2S 和 pcDNA-IL-21-S2S,并且重组质粒能在 293T 细胞内表达并分泌相关蛋白。结论:成功构建 IL-21 和乙型肝炎病毒前 S2S 抗原的融合表达质粒,重组质粒能在真核细胞内表达。

关键词:白细胞介素-21;乙型肝炎病毒;前 S2S 抗原;融合质粒构建;转染

中图分类号:R512.62 **文献标识码**:A **文章编号**:1673-6273(2012)23-4401-04

Expression of Fusion Protein of Interleukin-21 and Hepatitis B Virus Pre-S2 and S Antigen in 293T Cells*

WANG Jue, ZHANG Ye, SU Wen-jing, LI Ying, LIAN Jian-qi, BAI Xue-fan, HUANG Chang-xing[△]

(Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Shaanxi, Xi'an, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To construct eukaryotic expression plasmids carried mouse interleukin-21 (IL-21) and hepatitis B virus pre-S2 and S (HBV S2S), and to investigate the expression of the plasmids in 293T cells. **Methods**: IL-21 and HBV S2S were amplified by polymerase chain reaction (PCR), and then they were cloned to pcDNA3 eukaryotic expression plasmid. Recombinant plasmid containing both IL-21 and HBV S2S were constructed by using molecular cloning. Plasmids were transfected into 293T cells by lipofectamine 2000. Expressions of IL-21 and HBsAg in supernatant and cells were tested by ELISA and Western Blot, respectively. **Results**: The sequences of insertion elements were confirmed by enzyme digestion and DNA sequencing. Three recombinant plasmids were named as pcDNA-IL-21, pcDNA-S2S, and pcDNA-IL-21-S2S, respectively. These plasmids could be expressed and secreted to related proteins in 293T cells. **Conclusions**: Recombinant eukaryotic expression plasmids containing IL-21 and HBV S2S were successfully constructed and could be expressed in eukaryotic cells.

Key words: Interleukin-21; Hepatitis B virus; Pre-S2 and S antigen; Confluent plasmid construction; Transfection

Chinese Library Classification(CLC): R512.62 **Document code**: A

Article ID: 1673-6273(2012)23-4401-04

前言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是世界医学领域一个长期为之奋战的难题,它的高感染率、高慢性化比例,及其可诱发的多种相关性疾病的高死亡率始终引起人们的关注^[1,2]。而 HBV 感染导致肝脏损伤的机制主要是由机体免疫系统介导的,并依赖于病毒的不断复制^[3]。其中,T 细胞在控制和清除病毒中的核心地位越来越成为研究者的共识,HBV 特异性 T 细胞数量的多少及功能的强弱均决定着 HBV 感染的预后^[4]。最新的研究证明,CD4⁺T 细胞分泌的白细胞介素-21(inter-

leukin-21, IL-21) 对维持 CD8⁺T 细胞的功能发挥重要作用。IL-21 可增强慢性病毒感染过程中 CD8⁺T 细胞应答,在 CD4⁺T 细胞辅助 CD8⁺T 细胞控制感染慢性化中发挥重要作用^[5-9]。但是,外源性 IL-21 能否增强 HBV 特异性 T 细胞分泌细胞因子和细胞杀伤功能目前尚无相关报道。因此,本研究拟构建 IL-21 与乙型肝炎病毒前 S2S(Pre-S2S)抗原的基因融合真核表达载体,为进一步研究该融合载体疫苗在体内试验中相关免疫细胞和免疫分子功能的影响及相应作用机制奠定基础。

1 材料与方法

* 基金项目:国家自然科学基金(81072434),国家"艾滋病和病毒性肝炎等重大

传染病防治"科技重大专项(2008ZX10002-006,2012ZX10002-007),唐都医院 2011 年苗子人才资助计划

作者简介:王珏(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向:乙型肝炎的发病机制,电话:15229379001,E-mail:wjmgmuluifeng@tom.com

[△]通讯作者:黄长形,E-mail:changxing_h@hotmail.com

(收稿日期:2012-02-11 接受日期:2012-03-06)

1.1 主要试剂

RNA 提取试剂盒(Qiagen 公司) ;高保真 Taq 酶(Takara 公司) ;限制性内切酶 *Hind* III、*Kpn* I、*Eco*R V (NEB 公司) ;T4 DNA 连接酶(Promega 公司) ;质粒提取试剂盒(Qiagen 公司) ;DMEM 高糖培养液(Hyclone 公司) ;胎牛血清(FBS, Invitrogen 公司) ;脂质体 2000(Invitrogen 公司) ;HBsAg ELISA 检测试剂盒(北京科华公司) ;鼠 IL-21 ELISA 检测试剂盒(eBioscience 公司) ;抗 PreS2 单克隆抗体(Santa Cruz 公司) ;抗 IL-21 单克隆抗体(Bio Legend 公司) ;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗鼠 IgG(Santa Cruz 公司) ;显色液 A 和 B(Cell Signaling 公司)。

1.2 菌种、质粒及细胞

DH5 感受态细菌购自天根公司 ;293T 细胞和 pcDNA3 真核表达质粒由本室保存 ;包含 HBV 全基因组的质粒由美国耶鲁大学病理学系 Michael D. Robek 教授惠赠。

1.3 IL-21 与 HBV S2S 目的基因的扩增与真核表达质粒的构建

取正常 BALB/c 小鼠脾脏, 研磨后分离脾细胞, 抽提总 RNA 后反转录制备 cDNA 模板, 用鼠 IL-21 上下游引物, 对鼠 IL-21 序列进行 PCR 扩增, 凝胶电泳分离后对 PCR 片段进行胶回收, 用 *Hind* III 和 *Kpn* I 酶切后连接入 pcDNA3 真核表达质粒中, 测序正确后命名为 pcDNA-IL-21(片段大小 :438bp) ;以 HBV 全基因组质粒为模板, 用 S2S 上下游引物, 对 HBVS2S 基因片段进行 PCR 扩增, 凝胶电泳分离后对 PCR 片段进行胶回收, 用 *Kpn* I 和 *Eco*R V 酶切连接入 pcDNA3 真核表达质粒中, 测序正确后命名为 pcDNA-S2S (片段大小 :846bp) ;用 *Hind* III 和 *Kpn* I 分别对 pcDNA-IL-21 和 pcDNA-S2S 进行双酶切, 回收 IL-21 片段和 pcDNA-S2S 片段后应用 T4 DNA 连接酶进行连接, 测序正确命名为 pcDNA-IL-21-S2S(片段大小 :1284bp) 此质粒含有 IL-21 和 S2S 融合基因片段。引物序列如下 :IL-21 上游引物 5'-CCA AGC TTA TGG AGA GAA CAC TGG TCT GC-3' (下划线为 *Hind* III 酶切位点) ;IL-21 下游引物 5'-GGG GTA CCG GAG AGG TGC TGG TGA ATC AT-3' (下划线为 *Kpn* I 酶切位点)。S2S 上游引物 5'-CGG GTA CCA TGC AGT GGA ATT CCA CAA CC-3' (下划线为 *Kpn* I 酶切位点) ;S2S 下游引物 5'-CCG A TA TCT TAA ATG TAT ACC CAA AGA CA-3' (下划线为 *Eco*R V 酶切位点)。

1.4 重组质粒转染细胞

将处于指数生长期的 293T 细胞(约 1×10^5 个细胞)接种于 24 孔细胞培养板中, 将 2 μ g pcDNA3、pcDNA-IL-21、pcDNA-S2S 和 pcDNA-IL-21-S2S 与分别 5 μ L 脂质体 2000 混合, 室温静置 20 min 后加入 293T 细胞, 置培养箱中培养 6 h 后换液, 细胞于含 10 %FBS 的 DMEM 中继续培养。

1.5 ELISA 法和 Western Blot 法分别检测 HBsAg 和 IL-21 的表达

转染 48 h 后分别收集细胞和上清, 裂解细胞后应用 Western Blot 法检测细胞中 HBsAg 和 IL-21 的表达, 应用 ELISA 法检测培养上清中 HBsAg 和 IL-21 的水平。

2 结果

2.1 重组质粒 pcDNA-IL-21、pcDNA-S2S、pcDNA-IL-21-S2S 的

双酶切鉴定

经 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 在约 450 bp、850 bp、1300 bp 处可见三条明显的 DNA 条带, 与目的基因大小相符, 测序结果正确。酶切产物电泳结果见图 1。

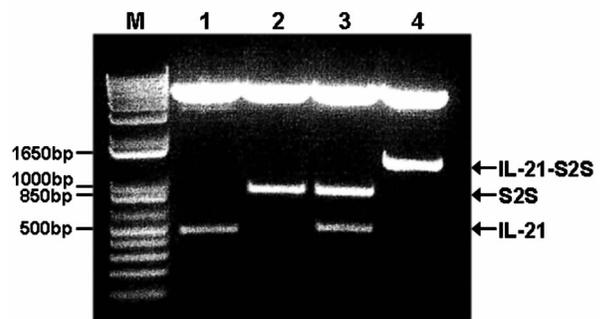


图 1 重组质粒的酶切鉴定 :M DNA Marker ;1. pcDNA-IL-21 应用 *Hind* III 和 *Kpn* I 酶切鉴定 2. pcDNA-S2S 应用 *Kpn* I 和 *Eco*R V 酶切鉴定 3. pcDNA-IL-21-S2S 应用 *Hind* III、*Kpn* I 和 *Eco*R V 酶切鉴定 4. pcDNA-IL-21-S2S 应用 *Hind* III 和 *Eco*R V 酶切鉴定

Fig.1 Enzyme digestion of recombinant plasmids M: DNA Marker; 1. pcDNA-IL-21 was digested by *Hind* III and *Kpn* I; 2. pcDNA-S2S was digested by *Kpn* I and *Eco*R V; 3. pcDNA-IL-21-S2S was digested by *Hind* III, *Kpn* I and *Eco*R V; 4. pcDNA-IL-21-S2S was digested by *Hind* III and *Eco*R V

2.2 转染细胞中 HBsAg 和 IL-21 的表达

293T 细胞转染 48 h 后收集细胞裂解后行 SDS-PAGE 电泳, 分别应用抗 PreS2 抗原和抗 IL-21 抗体进行 Western Blot 检测, 结果发现, 应用抗 PreS2 抗体检测, pcDNA3-S2S 转染的细胞在约 33 kD 处检测到蛋白表达, pcDNA3-IL-21-S2S 转染细胞在约 50 kD 处检测到蛋白表达; 应用抗 IL-21 抗体检测, pcDNA3-IL-21 转染细胞在约 17 kD 处检测到蛋白表达, pcDNA3-IL-21-S2S 转染细胞在约 50 kD 处检测到蛋白表达, 与预期大小一致。

2.3 转染细胞分泌 HBsAg 和 IL-21 的水平检测

293T 细胞转染 48 h 后收集培养上清, 应用 ELISA 法检测上清中 HBsAg 和 IL-21 的分泌水平, 结果发现, pcDNA3-IL-21 和 pcDNA3-S2S 转染的细胞上清中分别检测到高水平的 IL-21 和 HBsAg 表达, pcDNA3-IL-21-S2S 转染的细胞上清中可检测到两种蛋白的表达, 但是水平仅约为 pcDNA3-IL-21 和 pcDNA3-S2S 转染细胞表达水平的 1/3。

3 讨论

T 细胞免疫在控制和清除病毒中的重要作用已被多方证实。HBV 感染时存在着 T 细胞功能衰竭现象, 阻碍了机体免疫应答对 HBV 的清除, 但其中的机理至今尚不甚清楚^[10,11]。IL-21 是近年新发现的重要细胞因子, 最新研究表明, CD4⁺T 细胞分泌的 IL-21 可增强慢性病毒感染过程中 CD8⁺T 细胞应答, 维持 CD8⁺T 细胞的杀伤功能, 在清除病毒和控制感染慢性化中发挥重要作用。目前已知在慢性 LCMV 感染中, IL-21 是维持 CD8⁺T 细胞的功能的重要细胞因子^[5-9]。而在其与乙型肝炎病毒

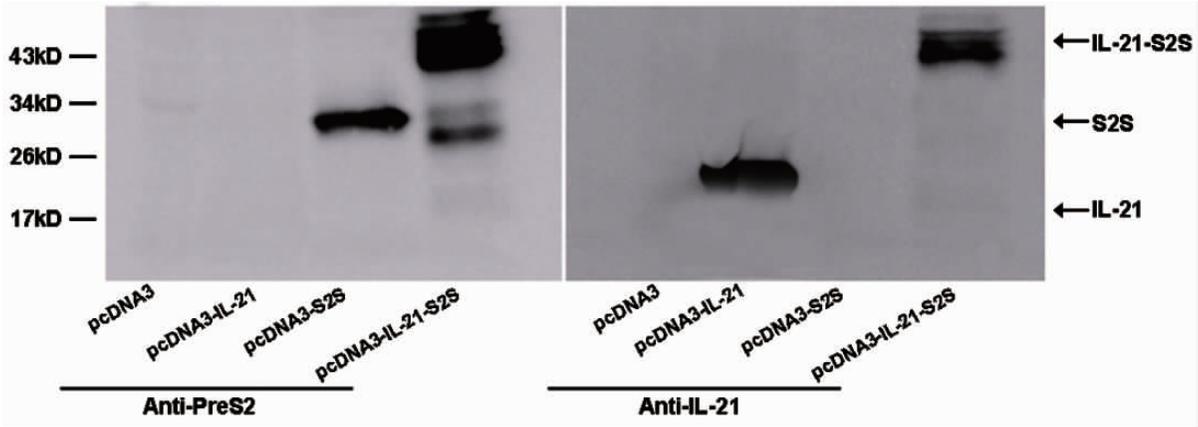


图 2 转染细胞中 HBsAg、IL-21 及融合蛋白的表达

Fig. 2 HBsAg, IL-21 and fusion protein expression in transfected 293T cells

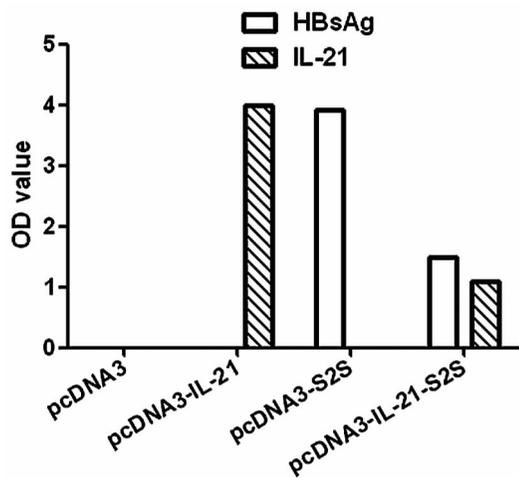


图 3 转染细胞培养上清中 HBsAg 和 IL-21 的表达

Fig. 3 HBsAg and IL-21 expression in the supernatants of transfected 293T cells

感染的关系中,近年来有研究表明,IL-21 在 HBV 感染不同临床表现患者外周血 CD4⁺T 细胞的表达有一定差异,IL-21 CD4⁺T 细胞比例在急性乙型肝炎组、乙肝病毒携带组中较正常对照组和慢重肝组有所升高,并且其与 Th17 细胞亚群有相关性,提示 IL-21 在 HBV 感染的发病机制可能发挥一定作用^[12-15]。在另一篇文献报道中显示,血清 IL-21 水平可能是 HBeAg 阳转的生物学标记,其研究结果提示血清 IL-21 的增加与抗病毒物质免疫应答的激活有关,而这种免疫应答可以控制 HBV 病毒复制及肝脏的炎症进展,并且可能为 HBeAg 检测呈阳性的慢性乙肝患者的个性化抗病毒治疗做出贡献^[16,17]。但是外源性 IL-21 能否增强 HBV 特异性 T 细胞分泌细胞因子和细胞杀伤功能尚无相关文献报道。

乙肝病毒表面抗原是乙肝病毒的包膜蛋白,由 3 种蛋白组成:主蛋白(S protein)、中蛋白(PreS2+S)和大蛋白(PreS1+PreS2+S)。试验中我们选取中蛋白构建模型,因为相比小分子蛋白,它包含 S2 基因编码即包含了更多潜在的 T 细胞表位,当应用于免疫时,可保留抗原刺激所必需的特有的抗原表位,而相比较于大分子蛋白,中型蛋白不含有 S1 片段,减少了因表达较大蛋白抗原而对其分泌性的影响^[18-20]。因此本研究选取乙型肝炎病毒表面抗原 S2S 与 IL-21 进行质粒融合构建,为今后在

体内研究融合 IL-21 的 S2S DNA 疫苗对小鼠肝脏和脾脏中相关免疫细胞和免疫分子功能的影响及相应作用机制的研究做铺垫,为证实 IL-21 可增强 T 细胞功能,及作为调节 HBV 感染者免疫功能的候选药物,达到清除 HBV 这个目的奠定基础。为进一步研究该融合载体疫苗在体内试验中相关免疫细胞和免疫分子功能的影响及相应作用机制奠定基础。

参考文献(References)

- [1] Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B [M]. Hepatology, 2001, 34(6):1225-1241
- [2] Liang X, Bi S, Yang W, et al. Evaluation of the impact of hepatitis B vaccination among children born during 1992-2005 in China [J]. J Infect Dis, 2009, 200(1):39-47
- [3] Bertoletti A, Maini MK. Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection [M]. Curr Opin Microbiol, 2000, 3(4):387-392
- [4] Hoofnagle JH, Doo E, Liang TJ, et al. Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop [C]. Hepatology, 2007, 45(4):1056-1075
- [5] Yi JS, Du M, Zajac AJ. A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection [J]. Science, 2009, 324(5934):1572-1576
- [6] Elsaesser H, Sauer K, Brooks DG. IL-21 is required to control chronic viral infection [J]. Science, 2009, 324(5934):1569-1572
- [7] Frohlich A, Kisielow J, Schmitz I, et al. IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection [J]. Science, 2009, 324(5934):1576-1580
- [8] Silver JS, Hunter CA. With a little help from their friends: interleukin-21, T cells, and B cells [J]. Immunity, 2008, 29(1):7-9
- [9] Coquet JM, Kyparissoudis K, Pellicci DG, et al. IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production [J]. Immunol, 2007, 178(5):2827-2834
- [10] Rehermann B, Fowler P, Sidney J, et al. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis [J]. J Exp Med, 1995, 181(3):1047-1058
- [11] Ge J, Wang K, Meng QH, et al. Implication of Th17 and Th1 cells in patients with chronic active hepatitis B. J Clin Immunol, 2010, 30(1):60-67
- [12] 丁艳荣, 张野, 黄长形, 等. IL-21 在不同乙型肝炎病毒感染者外周血 CD4⁺T 细胞中表达的初步研究 [J]. 细胞与分子免疫学杂志,

- 2011,27(3):304-306
- Ding Yan-rong, Zhang Ye, Huang Chang-xing, et al. The induced IL-21 levels in CD4⁺T cells of peripheral blood from the different clinical types of patients infected with hepatitis B virus [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2011,27(3):304-306
- [13] X.Hu, S.Ma, et al. Interleukin-21 is upregulated in hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure and associated with severity of liver disease[J]. Journal of Viral Hepatitis,2011,18:458-467
- [14] Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells[J]. Nature,2007,448(7152):484-487
- [15] Spolski, R. and W.J. Leonard. IL-21 is an immune activator that also mediates suppression via IL-10 [J]. Crit Rev Immunol,2010,30(6): 559-570
- [16] Ma, S-W, Huang, X. High serum IL-21 levels after 12 weeks of antiviral therapy predict HBeAg seroconversion in chronic Hepatitis B[J]. Journal of Hepatology,2011:753-755
- [17] Feldmann, M. Many cytokines are very useful therapeutic targets in disease. J Clin Invest,2008,118(11):3533-3536
- [18] Schdel F. EBVD: an new approach to molecular design of vaccing[J]. Immunologist,1998(suppl):1487-1491
- [19] 丁永和, 金立杰, 谷铁军,等.含 preS2 免疫表位的 HBsAg 基因质粒的构建及表达[J].生物技术杂志,2003,13(1) :1-2
- Ding Yong-he, Jin Li-jie, Gu Tie-jun, et al. Plasmid construction and expression of Hepatitis B surface antigen gene containing the preS2 immune epitope[J]. Biotechnology,2003,13(1):1-2
- [20] Sominskaya I, Paulij W, Jansons J, et al. Fine-mapping of the B-cell epitope domain at the N-terminus of the preS2 region of the hepatitis B surface antigen[J]. Immunol Methods,2002,260:251-261

·重要信息·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN :978-7-117-13344-9/R·13345)一书已于2010年9月14日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gamhbir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校7名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人13名作为国内编委,还包括国内外共40名专家参与编写。

全书共计130余万字,收录图片378幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分10章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分7章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价260元,全国各大书店有售。