

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.12.1470

表达载脂蛋白 E-增强型绿色荧光蛋白的细胞系支持感染性丙型肝炎病毒的组装

杨再立^{1,2}, 赵凡凡², 王刚¹, 龙钢^{2*}

1. 上海大学生命科学学院, 上海 201900

2. 中国科学院上海巴斯德研究所, 上海 200031

[摘要] **目的** 探讨表达载脂蛋白 E-增强型绿色荧光蛋白(apolipoprotein E-enhanced green fluorescence protein, apoE-EGFP)的细胞系是否支持感染性丙型肝炎病毒(HCV)颗粒的组装。**方法** 利用 shRNA 基因沉默技术建立 apoE 稳定下调的 Huh7. 5. 1 细胞系, 然后通过基因工程技术在该细胞系中建立稳定表达 apoE-EGFP 融合蛋白的细胞系。将 HCV RNA 转染进入野生型细胞(Huh7. 5. 1 细胞)、对照组 sh-NT 细胞(转导非靶向野生型细胞基因的 shRNA 质粒的细胞)、apoE 下调的 Huh7. 5. 1 细胞(sh-apoE 细胞)以及表达 apoE-EGFP 融合蛋白的 sh-apoE 细胞(apoE-EGFP 细胞)中, 收集病毒液; 通过半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)方法检测释放到 Huh7. 5. 1、sh-NT、sh-apoE 和 apoE-EGFP 细胞培养上清液中的 HCV 的滴度。利用免疫荧光技术检测 apoE 与 HCV 的结构蛋白 E2 的相互作用, 利用蛋白质印迹法检测用具有特异亲和性 FLAG-gel 纯化的 HCV 颗粒表面的 apoE-EGFP 的表达。**结果** apoE-EGFP 融合蛋白在 apoE-EGFP 细胞系中高效表达; apoE-EGFP 细胞来源的 HCV 的感染性与 Huh7. 5. 1、sh-NT 细胞相比差异无统计意义; 在 apoE-EGFP 细胞系中, apoE-EGFP 融合蛋白与 HCV 结构蛋白 E2 存在共定位, 并且可以在 HCV 颗粒表面上检测到 apoE-EGFP 融合蛋白。**结论** apoE-EGFP 融合蛋白是 HCV 颗粒的组分, apoE-EGFP 细胞系支持感染性 HCV 颗粒的组装。

[关键词] 丙型肝炎病毒; 载脂蛋白 E; 绿色荧光蛋白质类; 细胞系

[中图分类号] R 373. 21

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2016)12-1470-05

Apolipoprotein E-EGFP-expressing cell lines supporting assembly of infectious hepatitis C virus particles

YANG Zai-li^{1,2}, ZHAO Fan-fan², WANG Gang¹, LONG Gang^{2*}

1. College of Life Science, Shanghai University, Shanghai 201900, China

2. Institute Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

[Abstract] **Objective** To investigate whether cell lines expressing apolipoprotein E-enhanced green fluorescence protein (apoE-EGFP) can support assembly of infectious hepatitis C virus particles. **Methods** apoE stably down-regulated Huh7. 5. 1 cell lines (sh-apoE cell lines) were established by shRNA gene silencing technique, and cell lines expressing apoE-EGFP fusion protein (apoE-EGFP cell lines) were established. The culture supernatants of wild-type Huh7. 5. 1 cells, control cells (sh-NT cells), sh-spoE cells and apoE-EGFP cells transfected with HCV RNA were collected and the HCV titer of supernatants was determined by TCID₅₀. The interaction of apoE with HCV structure protein E2 was examined by immunofluorescence and confocal microscopy, and the expression of apoE-EGFP on the surface of HCV particles purified by FLAG-specific affinity gel was analyzed by Western blotting analysis. **Results** The apoE-EGFP fusion protein was highly expressed in sh-apoE cell lines. The infectivity of HCV from apoE-EGFP cell culture supernatant was not significantly different with those of HCV from Huh7. 5. 1 and sh-NT cells. apoE-EGFP infused protein had fluorescent co-location with HCV structural protein E2, and was detected on the surface of HCV particles purified by FLAG-specific affinity gel. **Conclusion** The apoE-EGFP fusion protein is an important component of HCV particles and apoE-EGFP cell lines can support the assembly of HCV particles.

[Key words] hepatitis C virus; apolipoprotein E; green fluorescence proteins; cell lines

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(12): 1470-1474]

[收稿日期] 2016-04-24 **[接受日期]** 2016-06-07

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划项目(2015CB554301). Supported by State Key Development Program for Basic Research of China (2015CB554301).

[作者简介] 杨再立, 硕士生. E-mail: zlyang@ips. ac. cn

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-54923161, E-mail: glong@ips. ac. cn

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染是引发慢性肝炎、肝硬化和肝癌的原因之一^[1]。目前,全世界有大约 1.7 亿人感染了 HCV^[1]。尽管现在已经研究出了针对 HCV 的有效的抗病毒药物,但是由于其昂贵的费用以及病毒的耐药性突变,其他新的 HCV 抗病毒药物及 HCV 疫苗的研发仍然受到关注^[2]。HCV 是正链的单链 RNA 病毒,属于黄病毒科。其基因组长度大约为 9 600 nt,编码一条多肽链,经宿主本身蛋白酶和病毒编码的丝氨酸蛋白酶及信号肽酶裂解,产生结构蛋白 core、包膜蛋白 1(envelop protein 1, E1)、E2 和离子通道蛋白 p7,非结构蛋白 NS2、NS3、NS4A/4B 和 NS5A/5B^[3]。

感染性 HCV 颗粒的组装与宿主细胞因子紧密相关,主要是载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A1, apoA1)、C1、B 和 E。尽管有报道称 apoB 是 HCV 颗粒的组分^[4],但是更多的实验证据证实 apoE 和 apoC1 是感染性 HCV 颗粒的组分,尤其是 apoE^[2]。利用特异性小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 下调 Huh7. 5. 1 细胞中 apoE 的表达,可显著减少细胞内和分泌到细胞外的 HCV 水平^[5-6],并且 apoE 和 apoC1 的抗体也可以中和 HCV 的感染性^[6-7]。此外,通过电子显微镜也发现 apoE 为 HCV 颗粒的组分^[8-9]。

增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescence protein, EGFP) 是一种跟踪活体细胞中蛋白质行为的标记物^[10]。由于 apoE 是感染性 HCV 的组分,因此构建 apoE-EGFP HCV 用以研究 HCV 的生活史具有一定的可能性。然而,目前仍不清楚 apoE-EGFP 细胞系是否支持感染性 HCV 的组装。本研究通过比较 apoE-EGFP 和 Huh7. 5. 1 细胞来源的 HCV 的感染性,证实了 apoE-EGFP 细胞系支持感染性 HCV 的组装,而且 apoE-EGFP 也能成功组装到感染性 HCV 颗粒中。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和试剂 Huh7. 5. 1 细胞由中国科学院上海巴斯德研究所钟劲研究员馈赠, HEK293T 细胞由中国科学院上海巴斯德研究所钱志康研究员馈赠, Huh7. 5. 1 细胞来源的对照细胞 sh-NT 细胞(转导非靶向野生型细胞基因的 shRNA 质粒的细胞)、apoE 稳定敲低的 Huh7. 5. 1 细胞(sh-apoE 细胞)、表达 apoE-EGFP 的 sh-apoE 细胞(apoE-EGFP 细胞)均由本实验室构建。以上细胞均在含有 10%

胎牛血清 (FBS, Gibco)、1% 青霉素-链霉素 (penicillin-streptomycin, Gibco)、2 mmol/L 非必需氨基酸(non-essential amino acid, Gibco)的 DMEM (Gibco)培养液中培养。pFK_Jc1_FlagE2、pAPM_sh-apoE_Puro、psPAX2 和 pMD2. G 质粒为德国海德堡大学 Ralf Bartenschlager 教授馈赠。Goat anti-human apoE (ab947, Merck Millipore), rabbit anti-GFP (sc8334, Santa-cruz) 和 mouse anti-tubulin (66031, Proteintech), mouse anti-FLAG (M20008L, Abmart), mouse anti-NS5A(实验室自制); PCR 引物由上海铂尚生物技术有限公司合成、纯化。T7 polymerase 由本实验室纯化。

1.2 质粒及细胞系的构建 pWPI_apoE-eGFP 由本实验室构建; 将人源性 *apoE* 与 *EGFP* 基因分别通过 PCR 扩增, 使用 TIANgel Midi Purification Kit[天根生化科技(北京)有限公司]纯化得到 *apoE* 和 *EGFP* 基因的 PCR 扩增产物。然后, 将这两个基因片段通过重叠 PCR 连接, 得到融合的 *apoE-EGFP* 基因。然后此基因通过 *Bam*H I 和 *Spe* I 限制酶切位点插入 pWPI_BLR 载体中, 获得 pWPI_apoE-EGFP_BLR 质粒。经上海铂尚生物技术有限公司测序鉴定, 确认无误。扩增 *apoE-EGFP* 融合基因所用的引物: *apoE* 上游引物为 5'-AGA GGA TCC ATG AAG GTT CTG TGG-3'; *apoE* 和 *EGFP* 共下游引物为 5'-TCC TCC TCT TCC TCC TGA GTG ATT GTC GCT GGG-3'; *apoE* 和 *EGFP* 共上游引物为 5'-CAG GAG GAA GAG GAG GAG TGA GCA AGG GCG AG-3'; *EGFP* 下游引物为 5'-TCT ACT AGT TTA CTT GAC AGC TCG-3'。将 psPAX2、pMD2. G、pWPI_apoE-EGFP_BLR、pAPM_sh-apoE_Puro 和 pAPM_sh-NT_Puro(对照组)质粒转染进入 HEK293T 细胞中, 制备 apoE-EGFP、sh-apoE 和 sh-NT 慢病毒(sh-apoE RNA 靶向 *apoE* mRNA 的 3'非编码区)。然后将 sh-NT 和 sh-apoE 慢病毒分别转导进入目的细胞 Huh7. 5. 1 中, 48 h 后加入相应的抗生素进行筛选。获得 sh-apoE 细胞系后, 再将 apoE-EGFP 慢病毒转导进入 sh-apoE 细胞系中, 加抗生素筛选。最后, 采用蛋白质印迹法鉴定 apoE siRNA 对靶细胞内 apoE 蛋白表达的下调作用, 荧光显微镜观察 apoE-EGFP 的表达。

1.3 体外转录和 HCV 滴度的检测 将 pFK_HCV-Jc1_FLAGE2 DNA 使用 TIANquick Midi

Purification Kit[天根生化科技(北京)有限公司]纯化后,按照 Bartenschlager 实验室的体外转录方法^[3]将纯化后的 HCV DNA 转录、抽提 RNA。通过电穿孔法将 HCV Jc1-E2FLAG RNA 分别转染进入 Huh7. 5. 1、sh-NT、sh-apoE 和 apoE-EGFP 细胞中,转染 96 h 后收取病毒液,使用半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)方法检测 HCV 的滴度^[8]。

1.4 HCV 的纯化 研究所用的 HCV RNA 均为 Jc1-E2FLAG RNA,即在 HCV 结构蛋白 E2 的 N-末端加入了 FLAG 标签^[6]。将 HCV 病毒液浓缩 60 倍后,按照 FLAG-specific affinity gel(Sigma)操作指南纯化 HCV 颗粒,最后用 100 μg/mL FLAG 短肽溶液洗脱,得到纯化后的病毒液。

1.5 免疫荧光分析 将靶细胞 Huh7. 5. 1 铺入放有盖玻片的 24 孔板中,24 h 后弃细胞培养液,加入 HCV 病毒液,37℃ 孵育 4 h。弃病毒液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,加入新鲜培养液,37℃ 孵育 72 h。弃细胞培养液,用多聚甲醛固定 20 min。移除多聚甲醛,PBS 洗 3 次,用 0. 1% Triton X-100 处理 15 min;PBS 洗 3 次,加入 5% FCS 封闭 20 min。PBS 洗 3 次,加入一抗,室温孵育 1 h;PBS 洗 3 次,加入二抗,室温孵育 1 h;PBS 洗 3 次,ddH₂O 洗 1 次。将长有细胞的盖玻片倒扣在载玻片上,用指甲油固定盖玻片,共聚焦荧光显微镜拍摄图片。

1.6 蛋白质印迹法分析 收集的细胞或病毒用 loading buffer 处理,水浴 30 min。SDS-PAGE 分离蛋白后,将蛋白转移至 PVDF 膜上。用 5% 的脱脂牛奶溶液封闭 1 h,加入一抗(5% 脱脂牛奶溶液稀释),室温孵育 1 h;PBST 洗 3 次,加入二抗(1% 脱脂牛奶溶液稀释),室温孵育 1 h。PBST 洗 3 次后用 ECL 发光液显影。

1.7 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5. 0 进行数据处理与分析,组间比较采用 Student's *t* 检验。检验水准(α)为 0. 05。

2 结果

2.1 apoE-EGFP 细胞系的构建 利用 shRNA 基因沉默技术构建 sh-apoE 细胞系,并使外源基因 apoE-EGFP 在 sh-apoE 细胞系中稳定表达。蛋白质印迹法分析结果(图 1A)显示,sh-apoE 细胞中 apoE 的蛋白表达水平下调,说明 sh-apoE 细胞系构建成功;此外,apoE-EGFP 蛋白在 apoE-EGFP 细胞中大量表达。荧光倒置显微镜分析结果(图 1B)显示,在 apoE-EGFP 细胞的细胞质能观察到 EGFP 荧光,而在 sh-NT 细胞和 sh-apoE 细胞中观察不到绿色荧光,表明 apoE-EGFP 细胞系中 apoE-EGFP 可以高效表达。

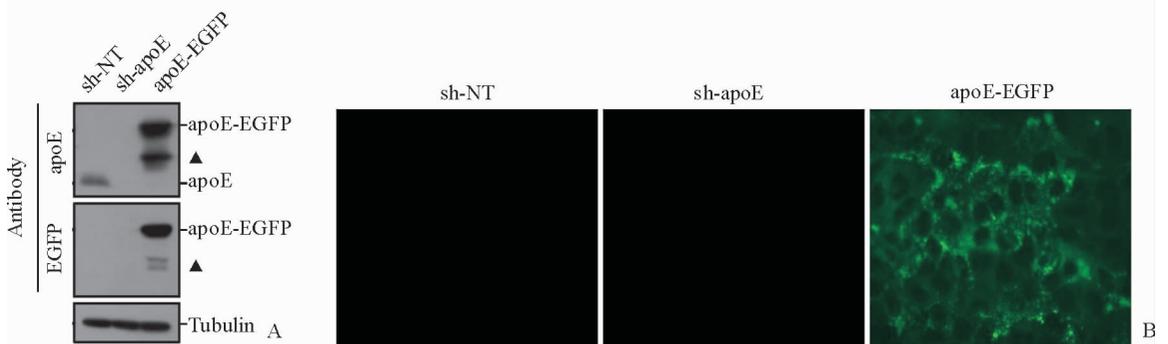


图 1 表达 apoE-EGFP 的细胞系的构建

Fig 1 Establishment of apoE-EGFP-expressing cell line

apoE-EGFP in apoE-EGFP cell lines was analyzed by Western blotting analysis (A) and fluorescence microscope (B). ▲: Non-specific band. apoE: Apolipoprotein E; EGFP: Enhanced green fluorescence protein. Original magnification: ×40 (B)

2.2 apoE-EGFP 融合蛋白表达对 HCV 感染性的影响 HCV 的滴度检测结果(图 2)显示,与野生型 Huh7. 5. 1 细胞相比,下调 apoE 的表达后,细胞产生的 HCV 的感染性下降约 10 倍;而在 sh-apoE 细胞中表达 apoE-EGFP 后,其产生的 HCV 的感染性达到了 sh-NT 细胞的水平。

2.3 apoE-EGFP 融合蛋白与感染性 HCV 的关

系 HCV 分别感染 Huh7. 5. 1 细胞和 apoE-EGFP 细胞后,采用蛋白质印迹法检测各病毒液,结果(图 3)显示,在所有细胞的病毒液中均检测到了病毒的结构蛋白 core,并且在 apoE-EGFP 细胞来源的病毒液中纯化的 HCV 颗粒上,可检测到 apoE-EGFP 融合蛋白,而对照组中没有检测到,表明 apoE-EGFP 融合蛋白是感染性 HCV 的组分。

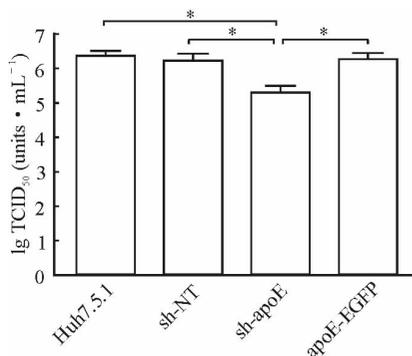


图 2 ApoE-EGFP 细胞系支持感染性 HCV 颗粒组装

Fig 2 ApoE-EGFP cell line supports assembly of infectious HCV particles

HCV Jc1-E2FLAG RNA was electroporated into Huh7.5.1, sh-NT, sh-apoE and apoE-EGFP cell lines. The titers of these viruses were determined by TCID₅₀ after culturing with free-serum media for 96 h. apoE: Apolipoprotein E; EGFP: Enhanced green fluorescence protein; HCV: Hepatitis C virus. * $P < 0.05$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.4 apoE-EGFP 蛋白与 HCV 结构蛋白 E2 的相互作用 免疫荧光分析结果(图 4)显示, apoE-EGFP 细胞内的 apoE-EGFP 与 HCV 结构蛋白 E2 共定位。

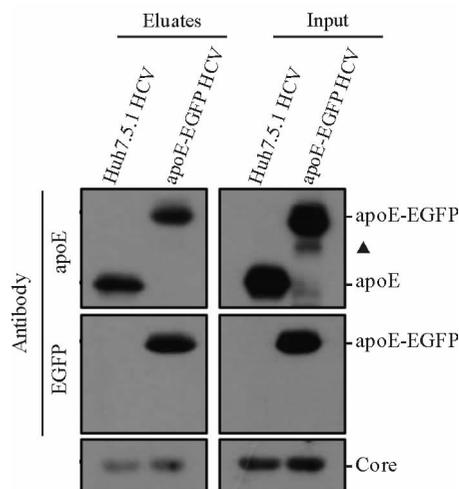


图 3 蛋白质印迹分析示 apoE-EGFP 是感染性 HCV 的组分

Fig 3 apoE-EGFP is a component of HCV particles by Western blotting analysis

HCV Jc1-E2FLAG RNA was electroporated into Huh7.5.1 and apoE-EGFP cell lines. apoE-EGFP and core proteins on the surface of HCV particles purified by FLAG-specific affinity gel were determined by Western blotting analysis. Eluates: Purified HCV; Input: Unpurified HCV. apoE: Apolipoprotein E; EGFP: Enhanced green fluorescence protein; HCV: Hepatitis C virus

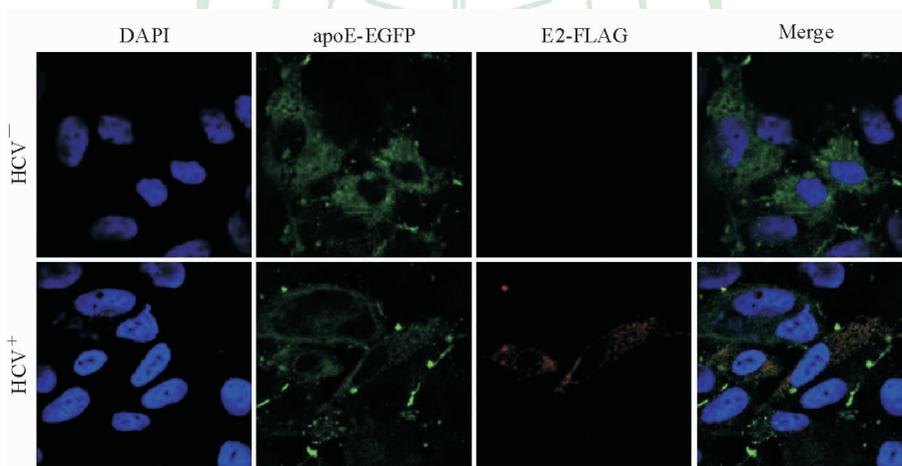


图 4 apoE-EGFP 与 HCV 结构蛋白 E2 相互作用

Fig 4 apoE-EGFP interacts with HCV structural protein E2

apoE-EGFP cells were infected with HCV Jc1-E2FLAG viruses. Co-localization of apoE-EGFP and E2 was analyzed by immunofluorescence assay and confocal microscope. E2-FLAG was tested by anti-FLAG antibody. apoE: Apolipoprotein E; EGFP: Enhanced green fluorescence protein; HCV: Hepatitis C virus. Original magnification: $\times 200$

3 讨论

人源 apoE 作为一类重要的载脂蛋白,对脂类的运输具有重要作用。研究发现 apoE 与心血管疾病、阿尔茨海默病密切相关^[11]。此外,科学家还发现它能影响 HCV 的感染性^[5]。首先,HCV 表面的 apoE 与宿主细胞表面的硫酸乙酰肝素的结合介导了 HCV 的吸附^[12]。其次,细胞内的 apoE 与 HCV 的

非结构蛋白 NS5A 相互作用,协助感染性 HCV 颗粒的组装^[13]。最后,感染性 HCV 的释放依赖于细胞内 apoE 的分泌^[14]。

本研究在 shRNA 介导 apoE 下调的 Huh7.5.1 细胞系中高效表达了 apoE-EGFP 融合蛋白,结果发现 apoE-EGFP 细胞系中产生的 HCV 颗粒的感染性与野生型细胞中产生的 HCV 颗粒的感染性相当。此外,将 HCV RNA 基因组转染进入 apoE-

EGFP 细胞系后,在收集的病毒液中纯化出来的 HCV 颗粒上能检测到大量的 apoE-EGFP 融合蛋白。Lee 等^[15]研究证实 apoE 与包膜糖蛋白 E2 在细胞中相互作用,帮助 HCV 组装出成熟的病毒颗粒。本研究用 HCV 感染 apoE-EGFP 细胞系,通过荧光共聚焦实验也观测到了 apoE-EGFP 和 E2 的相互作用。这些结果表明,apoE-EGFP 细胞系支持感染性 HCV 颗粒的组装。此外,基于 EGFP 具有跟踪活细胞中蛋白质行为的特性,apoE-EGFP 细胞系也可以用于示踪 HCV 颗粒组装的动态过程。

利用外源的荧光蛋白及标签标记活体细胞内的蛋白质是一种研究蛋白质功能的有效手段。Moradpour 等^[16]将 GFP 插入 HCV 非结构蛋白 NS5A 中,实现了对 HCV RNA 复制复合体的可视化。有研究报道,用四半胱氨酸标签标记 HCV 结构蛋白 core,可展示 core 在细胞中的转运及其与宿主细胞因子之间的相互关系^[17]。然而,迄今为止还没有对感染性 HCV 颗粒进行标记的研究报道。本研究构建的 apoE-EGFP HCV 颗粒的感染性与野生型 HCV 相当,有望用于更加深入地研究 HCV 的生活史,为 HCV 患者找到新的治疗策略。

【参考文献】

- [1] GOOSSENS N, HOSHIDA Y. Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Mol Hepatol*, 2015, 21: 105-114.
- [2] PERALES C, QUER J, GREGORI J, ESTEBAN J I, DOMINGO E. Resistance of hepatitis C virus to inhibitors: complexity and clinical implications [J]. *Viruses*, 2015, 7: 5746-5766.
- [3] BARTENSCHLAGER R, PENIN F, LOHMANN V, ANDRÉ P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles[J]. *Trends Microbiol*, 2011, 9: 95-103.
- [4] THOMSEN R, BONK S, PROPFE C, HEERMANN K H, KÖCHEL H G, UY A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein[J]. *Med Microbiol Immunol*, 1992, 181: 293-300.
- [5] CHANG K S, JIANG J, CAI Z, LUO G. Human apolipoprotein E is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture[J]. *J Virol*, 2007, 81: 13783-13793.
- [6] JIANG J, LUO G. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles[J]. *J Virol*, 2009, 83: 12680-12691.
- [7] MEUNIER J C, RUSSELL R S, ENGLE R E, FAULK K N, PURCELL R H, EMERSON S U.

- Apolipoprotein c1 association with hepatitis C virus [J]. *J Virol*, 2008, 82: 9647-9656.
- [8] MERZ A, LONG G, HIET M S, BRÜGGER B, CHLANDA P, ANDRE P, et al. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 3018-3032.
 - [9] CATANESE M T, URYU K, KOPP M, EDWARDS T J, ANDRUS L, RICE W J, et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 9505-9510.
 - [10] 艾伯茨. 细胞生物学精要[M]. 丁小燕, 陈跃磊, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2012.
 - [11] MAHLEY R W, RALL S C Jr. Apolipoprotein E; far more than a lipid transport protein[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2000, 1: 507-537.
 - [12] JIANG J, CUN W, WU X, SHI Q, TANG H, LUO G. Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein E binding to cell surface heparan sulfate [J]. *J Virol*, 2012, 86: 7256-7267.
 - [13] BENGAL W J, KRIEGER S E, DIMITROVA M, ZEISEL M B, PARNOT M, LUPBERGER J, et al. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles[J]. *Hepatology*, 2010, 51: 43-53.
 - [14] HISHIKI T, SHIMIZU Y, TOBITA R, SUGIYAMA K, OGAWA K, FUNAMI K, et al. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms [J]. *J Virol*, 2010, 84: 12048-12057.
 - [15] LEE J Y, ACOSTA E G, STOECK I K, LONG G, HIET M S, MUELLER B, et al. Apolipoprotein E likely contributes to a maturation step of infectious hepatitis C virus particles and interacts with viral envelope glycoproteins[J]. *J Virol*, 2014, 88: 12422-12437.
 - [16] MORADPOUR D, EVANS M J, GOSERT R, YUAN Z, BLUM H E, GOFF S P, et al. Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes[J]. *J Virol*, 2004, 78: 7400-7409.
 - [17] COLLIER K E, HEATON N S, BERGER K L, COOPER J D, SAUNDERS J L, RANDALL G. Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion [J/OL]. *PLoS Pathog*, 2012, 8: e1002466. doi: 10.1371/journal.ppat.1002466.

【本文编辑】 杨亚红