

网络出版时间: 2017-5-22 17:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170522.1745.030.html>

◇技术与方法◇

HepG2. 2. 15 细胞的差异性表达及对 IFN- α 的反应性研究

汤波¹, 韦佳佳², 徐丙发², 范鲁雁^{1, 2}

摘要 采用有限稀释法从 HepG2. 2. 15 细胞株中分离出 10 株单克隆细胞株。ELISA 法检测其 HBsAg 与 HBeAg 表达量, 根据 HBsAg、HBeAg 表达量的不同, 筛选出最高、中等、最低 3 株克隆细胞株。MTT 法进行干扰素 (IFN)- α 的细胞毒作用研究, 表明 IFN- α 对不同克隆细胞株药物毒作用相似。ELISA 法检测各克隆细胞株给 IFN- α 前后 HBsAg、HBeAg 表达量, IFN- α 对 HepG2. 2. 15 细胞 HBeAg 的抑制作用较弱, 对 HBsAg、HBV DNA 的抑制作用较强, 且对表达量高的克隆细胞株抑制作用更强。不同 HepG2. 2. 15 细胞表达 HBsAg 与 HBeAg 存在差异性, 且表达量高的细胞株对治疗浓度的 IFN- α 更加敏感。

关键词 HepG2. 2. 15; 乙型肝炎病毒; IFN- α

中图分类号 R 978.7; R 512.62

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)07-1073-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.030

慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 是世界性的健康问题, 全球有超过 4 亿乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 携带者。HBV 感染可能导致肝癌和肝硬化的发生, 其严重危害人类的健康^[1-3]。干扰素 (interferon, IFN) 是一种细胞因子, 具有抑制细胞分裂、调节免疫、抗病毒、抗肿瘤等多种作用, 其广泛用于 HBV 的临床治疗^[4-6]。HepG2. 2. 15 细胞是抗 HBV 新药开发的一个良好的体外研究工具, 其能够在体外进行无限繁殖, 并能长期稳定分泌 HBsAg、HBeAg 和 Dane 颗粒, 是体外筛选抗 HBV 药物的良好模型^[7-9]。该研究通过挑选单细胞克隆细胞技术, 从 HepG2. 2. 15 细胞株中挑选出差异性表达 HBsAg 与 HBeAg 的不同细胞, 根据 HBsAg 表达量的不同, 取高、中、低 3 组细胞进

的反应性研究。探讨 IFN- α 对表达量不同的细胞的反应性和细胞毒作用, 为选择合适表达量的 HepG2. 2. 15 细胞株研究 HBV 做铺垫。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂 HepG2. 2. 15 细胞系 (上海博冬生物科技有限公司); IFN α -2b (合肥安科生物工程技术有限公司); 细胞增殖检测试剂 MTT (美国 Sigma-Aldrich 公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); DMEM 高糖培养基 (美国 Hyclone 公司); HBsAg 诊断试剂盒 (上海科华生物技术有限公司); HBeAg 诊断试剂盒、HBV 核酸定量检测试剂盒 (上海科华生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2. 2. 15 细胞 用含 10% 胎牛血清、380 mg/L G418、110 mg/L 丙酮酸钠的 DMEM 培养液, 并置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。培养 4 d, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代继续培养。

1.2.2 HepG2. 2. 15 细胞的挑单克隆实验 取对数期生长的 HepG2. 2. 15 细胞, 消化后计数, 用含 20% 胎牛血清、110 mg/L 丙酮酸钠的 DMEM 培养液配成 10 ml 的细胞悬浮液, 接种于 96 孔板中, 每孔 200 μ l, 共接种 10 块板。1 周后观察 96 孔板内细胞生长状况, 挑选出单一细胞生长的孔, 并作出标记。继续培养, 待标记孔内细胞增殖成团, 消化后原孔内培养。待细胞长满后, 消化转移至 24 孔板扩增, 再转 6 孔板继续扩增, 最后于 25 cm² 细胞培养瓶内培养, 并对各单克隆细胞进行编号。将原始 HepG2. 2. 15 细胞株标记为 A 细胞株, 设其为空白组细胞, 其它克隆细胞株标记为 B~K 细胞株。

1.2.3 HepG2. 2. 15 细胞单克隆的筛选 取对数生长期的各组单克隆细胞和原始细胞, 消化计数后配成 3 \times 10⁵/ml 的细胞悬液, 将各组细胞铺于 6 孔板中, 每组细胞设 3 孔, 每孔 3 ml, 9 \times 10⁵ 个细胞。于培养箱中培养 96 h 后收集各孔上清液, 将上清液置于 -20 °C 冷冻保存。按 HBsAg 诊断试剂盒说明书

2017-03-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81470165)

作者单位: ¹ 安徽医科大学药学院, 合肥 230032

² 安徽医科大学第三附属医院药学部, 合肥 230061

作者简介: 汤波, 男, 硕士研究生;

范鲁雁, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hfyyxb@163.com;

徐丙发, 男, 副主任药师, 责任作者, E-mail: zcandxbf@163.com

对各组上清液的 HBsAg 进行测定 450 nm 测其光密度 (optical density ,OD) 值 ,根据标准曲线计算出浓度 筛选出表达量高、中、低 3 组克隆。

1.2.3 MTT 法检测药物对细胞的毒性 取原始组细胞和 HBsAg 表达量高、中、低 3 组克隆组细胞 ,在其对数生长期进行处理 ,消化、计数后配成 1×10^4 / ml 的细胞悬液 ,接种于 96 孔板中 ,每孔 200 μ l ,2 000 个细胞。每组细胞接种 1 块 96 孔板。将细胞于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 4 h 后待细胞完全贴壁 ,吸去各孔培养基 ,每组细胞分别加入终浓度 500 000、100 000、50 000、10 000、5 000、1 000、500、100、50、0 IU/ml 的 IFN α -2b ,每个浓度 3 个副孔 ,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 d ,每孔加入 20 μ l MTT 溶液 (5 mg/ml) ,继续培养 4 h ,小心吸去孔内培养液 ,每孔加入 150 μ l 二甲基亚砷 ,置摇床上低速振荡 10 min ,使结晶物充分溶解。酶标仪 490nm 处测量各孔 OD 值 ,并计算出细胞生长抑制率。

1.2.4 IFN α -2b 抗 HBV 实验 取空白组细胞和 HBsAg 表达量低、中、高 3 组克隆组细胞 ,在其对数生长期进行处理 ,消化、计数后配成 3×10^5 / ml 的细胞悬液 ,将各组细胞铺于 6 孔板中 ,每组细胞设 6 孔 ,每孔 3 ml 9×10^5 个细胞。将细胞于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h 后待细胞完全贴壁 ,加入终浓度为 1 000 U/ml 的 IFN α -2b ,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 96 h 后吸出上清液 ,于 -20 $^{\circ}$ C 保存。按 HBsAg 断试剂盒、HBeAg 诊断试剂盒说明书对各组上清液的 HBsAg、HBeAg 进行测定 450 nm 测其 OD 值 ,并计算出 HBsAg、HBeAg 浓度。HBV 核酸定量检测试剂盒测定上清液 DNA 浓度

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析 ,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示 组间比较采用 *t* 检验 ,多组均数比较采用方差分析 ,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA 法检测 HepG2. 2. 15 克隆细胞株 HBsAg、HBeAg 的表达量

2.1.1 克隆细胞株 HBsAg 表达量 实验共挑选出 10 株克隆细胞 ,原始细胞株 A 为空白组细胞 ,B ~ K 为各克隆细胞株 ,HBsAg 表达量见图 1 ,克隆细胞株 HBsAg 表达量与空白组细胞存在差异有统计学意义 (B、C、D、G、H、K : *t* = 4. 014、2. 796、4. 160、3. 527、3. 752、6. 382 ,*P* < 0. 05 ; E、F : *t* = 6. 272、8. 083 ,*P* < 0. 01)。

2.1.2 克隆细胞株 HBeAg 表达量 10 株克隆细胞 HBeAg 表达量中有 8 组与空白组细胞差异无统计学意义 ,E、F 组细胞株与空白组细胞差异有统计学意义 (*t* = 4. 815、5. 078 ,*P* < 0. 01)。根据各克隆细胞 HBsAg、HBeAg 的差异性 ,按 HBsAg 表达量最低、最高、中等分别选出 E、F、J 3 株克隆细胞 ,与空白组细胞一起进行后续试验。

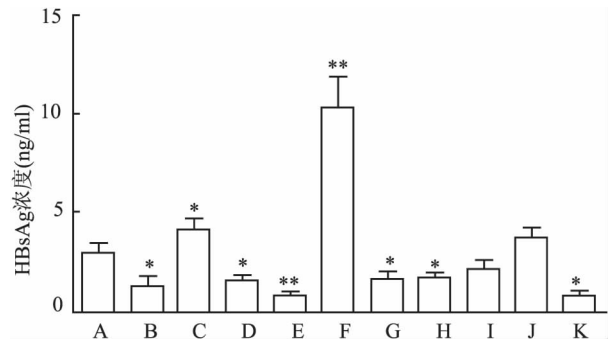


图 1 HepG2. 2. 15 克隆细胞株 HBsAg 表达量

A: 空白组细胞 ; B ~ K: 各克隆细胞 ; 与空白组比较 : * *P* < 0. 05 , ** *P* < 0. 01

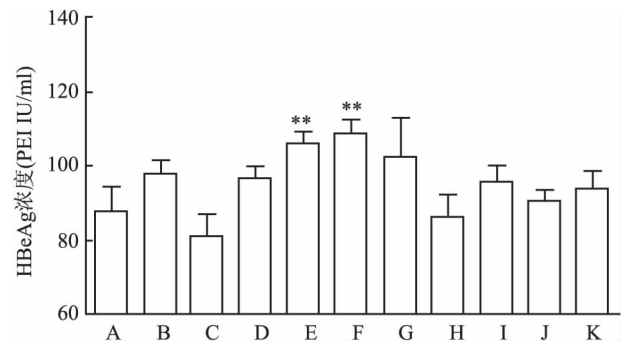


图 2 HepG2. 2. 15 克隆细胞株 HBeAg 表达量

A: 空白组细胞 ; B ~ K: 各克隆细胞 ; 与空白组比较 : * *P* < 0. 05 , ** *P* < 0. 01

2.2 MTT 法检测 IFN- α 对细胞的毒性 根据 HBsAg 表达量不同选出 E、F、J 3 组细胞株 ,与空白组细胞进行 IFN- α 的细胞毒作用研究。IFN- α 对空白组细胞、E、F、J 4 组细胞的细胞毒作用见表 1 ,浓度、OD 值变化曲线见图 3 ,结果显示 ,IFN- α 对 4 株细胞的药物毒作用随药物浓度表现出相同的变化趋势。

2.3 IFN- α 的抗 HBV 作用

2.3.1 IFN- α 对 HepG2. 2. 15 细胞 HBsAg 的影响 在 1 000 IU/ml IFN- α 作用 96 h 后 ,空白组、E、F、J 4 组细胞分泌 HBsAg 的量均有不同程度上的抑制 ,与相应的对照组比较 ,空白组、E、F、J 4 组细胞差异有统计学意义 (*t* = 4. 501、7. 965、25. 391、21. 403 ,*P* < 0. 01) ,见图 4。IFN- α 对各细胞株 HBsAg 抑制率大小见图 5。

表 1 IFN-α 对空白组、E、F、J 4 组细胞的细胞毒作用 ($\bar{x} \pm s$)

浓度 (IU/ml)	空白组		E 细胞株		F 细胞株		J 细胞株	
	A490 值	抑制率 (%)	A490 值	抑制率 (%)	A490 值	抑制率 (%)	A490 值	抑制率 (%)
0	1.068±0.039	-	1.138±0.046	-	1.038±0.030	-	1.015±0.050	-
50	1.152±0.027*	-7.921	1.199±0.027*	-5.383	1.044±0.009	-0.583	1.018±0.012	-0.281
100	1.083±0.073	-1.431	1.119±0.042	1.705	1.014±0.024	2.388	1.021±0.032	-0.571
500	1.086±0.023	-1.689	1.090±0.045	4.253	0.958±0.050*	7.717	1.012±0.031	0.260
1 000	1.028±0.047	3.753	1.052±0.038*	7.557	0.962±0.045*	7.343	0.995±0.035	1.954
5 000	0.892±0.037**	16.432	0.886±0.038**	22.188	0.804±0.037**	22.523	0.869±0.043**	14.419
10 000	0.889±0.043**	16.731	0.826±0.008**	27.446	0.780±0.030**	24.907	0.807±0.011**	20.476
50 000	0.779±0.010**	27.024	0.779±0.027**	31.532	0.746±0.030**	28.191	0.774±0.025**	23.781
100 000	0.732±0.019**	31.475	0.734±0.034**	35.533	0.682±0.027**	34.335	0.741±0.024**	26.983
500 000	0.728±0.010**	31.801	0.744±0.043**	34.607	0.640±0.022**	32.719	0.755±0.031**	25.589

与 0 IU/ml 浓度比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

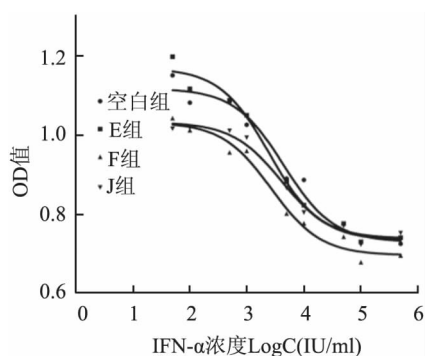


图 3 IFN-α 对空白组、E、F、J 4 组细胞的细胞毒作用 (浓度、OD 值变化曲线)

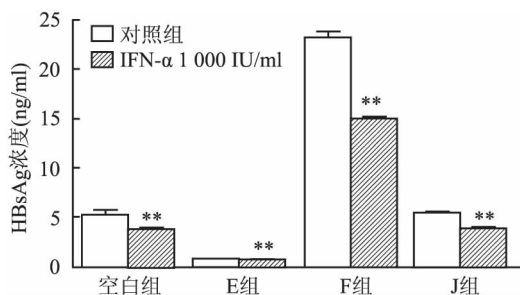


图 4 IFN-α 对 HepG2. 2. 15 细胞 HBsAg 的抑制作用 与对照组比较: ** $P < 0.01$

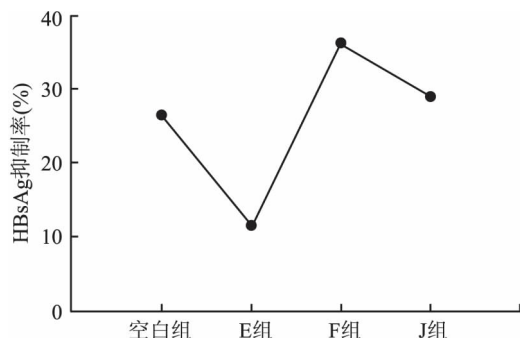


图 5 IFN-α 对 HepG2. 2. 15 细胞 HBsAg 的抑制率

2.3.2 IFN-α 对 HepG2. 2. 15 细胞 HBeAg 的影响 在 1 000 IU/ml IFN-α 作用 96 h 后, 空白组、E、F、J 4 组细胞分泌 HBeAg 的量均有不同程度上的抑制, 与相应的对照组比较, 空白、J 组均差异有统计学意义 ($t = 7.176, 7.965, P < 0.05$, 图 6)。图 7 为 IFN-α 对各细胞株 HBeAg 抑制率大小。

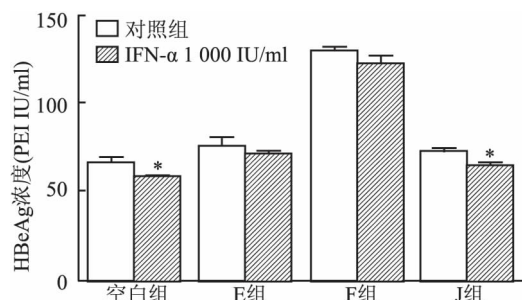


图 6 IFN-α 对 HepG2. 2. 15 细胞 HBeAg 表达的抑制作用 与对照组比较: * $P < 0.05$

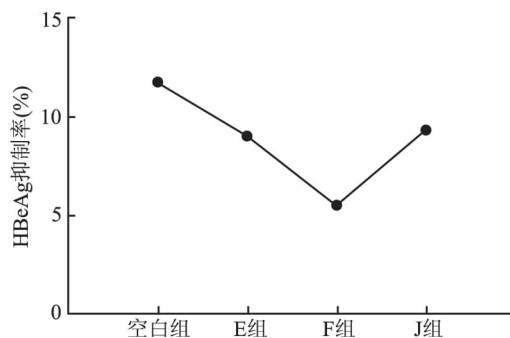


图 7 IFN-α 对 HepG2. 2. 15 细胞 HBeAg 的抑制率

2.3.3 IFN-α 对 HepG2. 2. 15 细胞分泌 HBV DNA 的影响 在 1 000 IU/ml IFN-α 作用 96 h 后, 空白、E、F、J 4 组细胞分泌 DNA 的量均有不同程度上的抑制, 与相应的对照组比较, 空白组、F、J 均差异有统计学意义 ($t = 5.131, 9.465, 9.981, P < 0.05$), 见图

8. 图9为IFN-α对各细胞株HBV DNA抑制率大小。

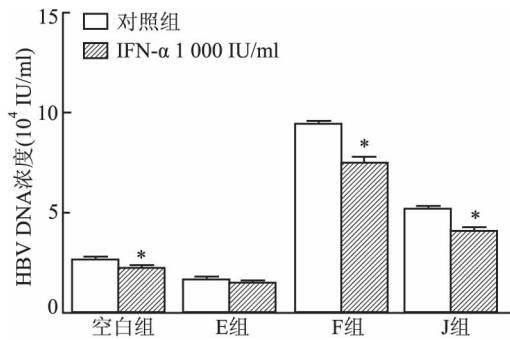


图8 IFN-α对HepG2. 2. 15细胞HBV DNA的影响与对照组比较: * P<0.05

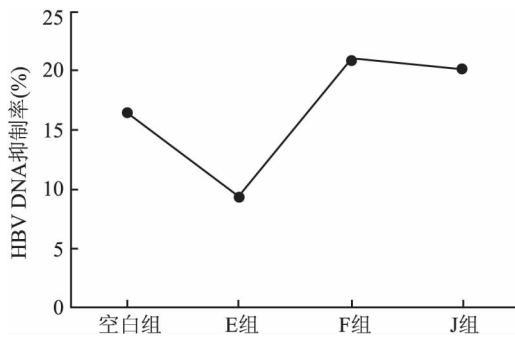


图9 IFN-α对HepG2. 2. 15细胞HBV DNA的抑制率

3 讨论

HBV是一种DNA病毒,属于嗜肝DNA病毒科,其病毒黏附、DNA的转录和翻译均对宿主细胞有严格的要求。HepG2. 2. 15是能够成功表达全部病毒标志的细胞系,对研究HBV生物学特性、发病机制、抗病毒药物筛选有重要意义。通过挑选单克隆细胞实验并检测其HBsAg与HBeAg表达量差异,显示不同克隆细胞株之间存在差异,其中HBsAg差异更加明显,说明HepG2. 2. 15细胞在表达病毒标志物能力上存在差异,这为研究其对IFN-α的反应性提供了生物学基础。故此试验选择了不同表达量的HepG2. 2. 15细胞进行IFN-α的反应性研究。

MTT结果显示,IFN-α对体外HepG2. 2. 15细胞的增殖产生影响。研究^[10-11]表明,在高浓度的IFN-α作用下,HepG2. 2. 15细胞增殖会受到不同程度的抑制作用。本实验在低浓度IFN-α刺激下,IFN-α对各单克隆细胞株有促进细胞增殖的作用,而在高浓度下,则表现出抑制细胞生长的作用,浓度越高,其细胞毒作用越强,且IFN-α对空白、E、F、J 4

株细胞细胞毒作用相差不大。

目前,主要认为IFN抗乙肝病毒作用主要通过JAK-STAT通路,IFN在细胞核内与IFN刺激应答反应元件相结合,开启IFN刺激基因的转录,并翻译一系列抗病毒蛋白来发挥抗病毒作用^[12-15]。在给予有效浓度1 000 IU/ml IFN-α作用96 h后检测各组HBsAg、HBeAg、及HBV DNA浓度,HBsAg表达量最高的F组克隆细胞株HBsAg抑制率最高,同时,表达量最低的E组HBsAg抑制率最低,且IFN-α对各细胞株均有不错的抑制效果。推测HBsAg表达量高的单克隆细胞株相较于低表达量细胞株在对IFN-α抑制HBsAg反应性上更加敏感。而HBeAg的检测结果显示并没有显示出很好的抑制作用,IFN-α对HBsAg有着更好的抑制效果。研究^[11]同样表明在体外实验中,IFN-α对HBeAg的抑制作用较弱。在HBV DNA实验中,F组HBV DNA浓度最高,其HBsAg、HBeAg同样最高,F组HBV DNA的抑制作用在4组细胞株中最强,其对IFN-α反应更加敏感。下一步本研究拟对不同细胞株进行基因测序和转录水平检测,探讨各细胞株在基因和转录水平是否存在差异。

综上所述,本实验通过挑选单细胞克隆技术分离出多株单克隆细胞,且HepG2. 2. 15细胞HBsAg、HBeAg的表达量存在差异,IFN-α作用于不同表达量的HepG2. 2. 15细胞,表现出相似的细胞毒作用,同时,在1 000 IU/ml IFN-α作用下,不同表达量的细胞株HBsAg、HBeAg、及HBV DNA抑制效果表现出差异性,表达量高的细胞株对治疗浓度IFN-α反应更加敏感,且IFN-α对HBsAg的抑制效果更好。这为选择合适表达量的HepG2. 2. 15细胞模型研究HBV提供了基础,而各克隆细胞株表达量及其对IFN-α药物反应性的差异性的具体原因,都尚需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Lee W M. Hepatitis B virus infection [J]. N Engl J Med, 1997, 337(24): 1733-45.
- [2] European association for the study of the liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection [J]. J Hepatol, 2012, 57(1): 167-85.
- [3] Yuen M F, Lai C L. Hepatitis B in 2014: HBV research moves forward—receptors and reactivation [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 12(2): 70-2.
- [4] Hadziyannis S J. Update on hepatitis B virus infection: focus on treatment [J]. World J Gastroenterol, 2014, 2(4): 285-91.
- [5] Liu S, Zheng H, Huang Y, et al. The effect of peginterferon al-

- pha-2a vs. interferon alpha-2a on intrahepatic covalently closed circular DNA in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2016, 40(3): 304-8.
- [6] Cho H, Kelsall B L. The role of type I interferons in intestinal infection, homeostasis, and inflammation [J]. *Immunol Rev*, 2014, 260(1): 145-67.
- [7] Guidotti L G, Chisari F V. Cytokine-mediated control of viral infections [J]. *Virology*, 2000, 273(2): 221-7.
- [8] Li L, Lei Q S, Zhang S J, et al. Suppression of USP18 potentiates the anti-HBV activity of interferon alpha in HepG2. 2. 15 cells via JAK/STAT signaling [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159019.
- [9] Wu L, Wang W, Zhang X, et al. Anti-HBV activity and mechanism of marine-derived polyguluronate sulfate (PGS) *in vitro* [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 143: 139-48.
- [10] 徐艳玲, 刘令九, 侯丽娟, 等. 干扰素 α -2a 与白细胞介素-2 联合作用对体外 HepG2. 2. 15 细胞增殖及乙型肝炎病毒复制的影响 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(7): 969-73.
- [11] 周尧远, 蒋孟军, 张荣军, 等. 干扰素 α -2b 对 HepG 2.2.15 细胞增殖、凋亡及 HBsAg 与 HBeAg 表达的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(5): 733-5.
- [12] 管世鹤, 杨凯, 陆蒙吉, 等. 乙型肝炎病毒及其抗原成分对干扰素信号传导途径分子和抗病毒蛋白表达的影响 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19(6): 440-4.
- [13] Liongue C, O'Sullivan L A, Trengrove M C, et al. Evolution of JAK-STAT pathway components: mechanisms and role in immune system development [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32777.
- [14] Schindler C, Plumlee C. Interferons pen the JAK-STAT pathway [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19(4): 311-8.
- [15] Bai L, Zhang W, Tan L, et al. Hepatitis B virus hijacks CTHRC1 to evade host immunity and maintain replication [J]. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7(6): 543-56.

Differential expressions of HBsAg and HBeAg by HepG2. 2. 15 cells and their reactivity to IFN- α

Tang Bo¹, Wei Jiajia², Xu Bingfa², et al

(¹*School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*Dept of Pharmacy, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230061)*

Abstract 10 single-cell clones of HepG2. 2. 15 cells were isolated by limited dilution and their expressions of HBsAg and HBeAg were determined by ELISA. According to expressions of HBsAg and HBeAg, the highest, medium and the lowest-expression clones were selected. Cytotoxicity of IFN- α were analyzed by MTT assay and the results suggested that IFN- α showed similar cytotoxicity to the different clonal cell lines. The clones were treated with IFN- α and HBsAg and HBeAg expressions were determined by ELISA. IFN- α weakly inhibited HBeAg expression and strongly inhibited HBsAg expression and HBV DNA replication, and the inhibition effect was stronger for those with higher expression levels. HBsAg and HBeAg were differentially expressed in HepG2. 2. 15 cells and the highly expressed clones were more sensitive to IFN- α .

Key words HepG2. 2. 15; HBV; IFN- α

(上接第 1072 页)

lung cancer (NSCLC) and its relationship with clinical features and prognosis. **Methods** The expression of ERCC1 was detected in 96 patients with advanced NSCLC by PCR assay. The clinicopathologic factors, treatment effect and survival time were observed. **Results** The expression of ERCC1 was related to smoking index ($P=0.029$), but it was not related to other clinicopathological factors. The patients with low expression of ERCC1 had better response rate and median survival time when compared to those with high expression patients. The difference was statistically significant ($P=0.001$, $P<0.01$). **Conclusion** ERCC1 expression is associated with smoking index and the patients with low expression of ERCC1 shows higher chemotherapy efficiency and longer median survival than patients with high expression, which indicates that detection of ERCC1 may be a useful parameter in evaluating the therapeutic effect and prognosis of smoking patients with advanced NSCLC.

Key words non-small cell lung cancer; smoking; ERCC1; prognosis