

DOI:10.13350/j.cjpb.240902

• 论著 •

# BRACO-19 和 TMPyP4 在 HBV-1.3mer 质粒感染模型 对 HBV 转录和复制的抑制作用\*

马海洋<sup>1,2</sup>, 贺丽娜<sup>1,2</sup>, 吕树娟<sup>1,2\*\*</sup>, 余莉<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 安徽医科大学基础医学院微生物学教研室, 安徽合肥 230032; 2. 动物源性传染病安徽省重点实验室)

**【摘要】** 目的 探讨 G-四链体小分子配体 BRACO-19 和 TMPyP4 对乙型肝炎病毒转录和复制的影响。方法 利用含有 HBV 全基因组 1.3 倍复制子(HBV 1.3-mer)质粒转染 HepG2 细胞感染模型, BRACO-19 和 TMPyP4 分别作用 48 h, 酶联免疫吸附试验检测上清表面抗原(HBsAg)和 e 抗原(HBeAg)表达水平, 实时荧光定量 PCR 检测细胞内 HBV Total RNA、3.5 kb RNA 以及 DNA 表达水平, 将 HBV DNA 用 plasmid Safe™ ATP-Dependent DNase 37 °C 作用 3 h 后, 定量 PCR 检测病毒 cccDNA 的表达; QGRS Mapper 软件分析 HBV 推定的四链体形成序列 (putative quadruplex-forming sequences, PQS), 并在 HBV 1.3-mer 质粒 DNA 上设计 PQS 区域上下游引物及非 PQS 区域对照引物, 两种小分子配体分别作用 HBV 1.3-mer 质粒 DNA, qPCR stop 试验分别定量 PQS 和非 PQS 区域 DNA 扩增水平, 1% 琼脂糖凝胶电泳可视化验证。结果 20 μmol/L BRACO-19 和 TMPyP4 作用 HepG2 转染模型显著抑制 HBsAg 和 HBeAg 的表达水平, HBV 的 Total RNA、3.5 kb RNA、DNA 和 cccDNA 水平相较于对照组均显著下调。通过不同浓度 BRACO-19 和 TMPyP4 作用 HBV 质粒 DNA, qPCR stop 试验发现随着 BRACO-19 和 TMPyP4 药物浓度递增可以显著抑制 DNA 聚合酶在基因组中三个 HBV PQS 区域的扩增。结论 小分子配体 BRACO-19 和 TMPyP4 均能抑制 HBV 转染模型中的转录和复制, HBV 基因存在富含鸟嘌呤的四链体形成序列, BRACO-19 和 TMPyP4 特异性阻滞 DNA 聚合酶在 HBV 的 PQS 区域复制延伸。

**【关键词】** 乙型肝炎病毒; BRACO-19; TMPyP4; PCR stop assay

**【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2024)09-0999-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 Sep.; 19(9):999-1003, 1008.]

## BRACO-19 and TMPyP4 inhibit HBV transcription and replication in an HBV1.3-mer plasmid-infected model

MA Haiyang<sup>1,2</sup>, HE Lina<sup>1,2</sup>, LV Shujuan<sup>1,2</sup>, YU Li<sup>1,2</sup> (1. *Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China*; 2. *Anhui Province Key Laboratory of Zoonoses*)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effects of G-quadruplex small molecule ligands BRACO-19 and TMPyP4 on the transcription and replication of hepatitis B virus. **Methods** HepG2 cells were transfected with HBV 1.3-mer plasmid, and BRACO-19 and TMPyP4 were treated for 48 hours. The expression levels of HBsAg and HBeAg in the supernatant were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression levels of HBV Total RNA, 3.5 kb RNA and DNA in the cells were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. After HBV DNA was treated with plasmid Safe™ ATP-Dependent DNase at 37 °C for 3 hours, the expression of viral cccDNA was detected by qPCR. The putative quadruplex-forming sequences (PQS) of HBV were analyzed by QGRS Mapper software, and the upstream and downstream primers of PQS region and Non PQS region controls were designed on HBV 1.3-mer plasmid DNA. The two small molecule ligands were treated on HBV 1.3-mer plasmid DNA, and the qPCR stop test was used to quantify the DNA amplification levels of PQS and Non-PQS regions, and the results were verified by 1% agarose gel electrophoresis.

**Results** The expression levels of HBsAg and HBeAg were significantly inhibited by BRACO-19 and TMPyP4 in HepG2 transfection model, and the levels of HBV Total RNA, 3.5 kb RNA, DNA and cccDNA were significantly down-regulated compared with the control group. Sequence analysis of HBV by QGRS Mapper software identified three sequence regions rich in guanine-specific structures, which were named HBV PQS 1, HBV PQS 2, and HBV PQS 3, respectively. By treating HBV plasmid DNA with different concentrations of BRACO-19 and TMPyP4, the qPCR stop test showed that the amplification of DNA polymerase in three HBV PQS regions was significantly inhibited with the

\* **【基金项目】** 安徽省高校自然科学基金项目重点项目(No. KJ2020A0140)。

\*\* **【通讯作者】** 吕树娟, E-mail: lvshujuan@ahmu.edu.cn; 余莉, E-mail: lilyyu33@126.com

**【作者简介】** 马海洋(1999-), 男, 安徽滁州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: HBV 的感染与免疫。E-mail: 1796217339@qq.com

increasing drug concentration of BRACO-19 and TMPyP4. **Conclusion** Both BRACO-19 and TMPyP4 can inhibit HBV transcription and replication. HBV genome has guanine-rich G-quadruplex sequences. BRACO-19 and TMPyP4 specifically block the replication and extension of DNA polymerase in the PQS region of HBV.

**【Keywords】** Hepatitis B virus; BRACO-19; TMPyP4; PCR stop assay

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)是一种以其独特的不完整双链 DNA 为基因组的嗜肝性病毒,是慢性肝炎、肝硬化及原发性肝癌的重要病因<sup>[1]</sup>。目前,使用核苷类似物和干扰素等为代表的一线抗病毒药物,由于存在耐药,应答率低及副作用强等不良反应,临床治疗很少有患者能达到满意的治愈疗效,因此,HBV 的抗感染治疗仍然是全球亟待解决的问题<sup>[2,3]</sup>。

富含鸟嘌呤(guanine, G)的核酸形成的 G-四链体结构(G-quadruplex)是一种非经典的二级结构,它由鸟嘌呤碱基之间两两形成的 Hoogsteen 氢键连接而成四分体,再由两个或多个四分体通过  $\pi$ - $\pi$  堆叠形成平行,反平行和杂合的高阶空间结构,近来发现四链体的形成参与许多生理和病理的调节过程<sup>[4]</sup>。BRACO-19、TMPyP4 和 PhenDC3 分别是吡啶衍生物、吡啶衍生物和双喹啉衍生物,是常见的四链体的小分子配体,对四链体具有高亲和性,可稳定四链体结构,抑制端粒酶功能,因此在癌症的治疗中已作广泛的研究<sup>[5]</sup>。四链体不仅存在于哺乳动物细胞中,也存在于病毒等微生物的基因组中,如单纯疱疹病毒-1(Herpes Simplex Virus-1, HSV-1)、人巨细胞病毒(Human Cytomegalovirus, HCMV)、人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)、新型冠状病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV2)等病毒中均有报道启动子或非编码区等基因区域存在四链体结构,该结构参与调节转录、转译、复制等生物学过程<sup>[6-9]</sup>。四链体小分子配体如 BRACO-19、TMPyP4 和 PhenDC3 等可通过结合稳定该“扭结样”空间结构发挥抗病毒作用。有报道 PhenDC3 和 BRACO-19 等小分子配体对 HBV 四链体有较高的结合能力<sup>[10-11]</sup>,但对于 HBV 的复制转录调节过程仍不清晰,本研究拟通过 HBV 1.3 倍质粒转染 HepG2 细胞,探讨 BRACO-19 和 TMPyP4 分别作用后对 HBV 转录和复制水平的影响,并进一步用 qPCR stop 实验探究两种小分子配体对 Taq DNA 聚合酶在 PQS 区域阻滞影响的分子机制,从而为乙型肝炎病毒 PQS 位点对病毒表达调控的影响及小分子配体作为抗病毒开发研究提供新的思路。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

**1.1 质粒和细胞** HBV 全基因组 1.3 倍复制子质粒购于美国 Addgene 公司; HepG2 细胞系由本实验室保存。

**1.2 试剂与仪器** Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase 购于 Biosearch technologies; 质粒小提中量试剂盒购于天根生化科技有限公司; Lipofectamine 3000 购于美国 Invitrogen 公司; 青链霉素双抗购于上海碧云天生物技术有限公司; BRACO-19 购于 Sigma 公司; TMPyP4 购于 EMD Millipore Corporation 公司; Opti-MEM 无血清培养基和 TRIzol 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Evo M-MLV 反转录试剂预混液和 SYBR 荧光定量试剂盒购于湖南艾科瑞生物工程有限公司; HBsAg、HBeAg ELISA 检测试剂盒购于上海科华生物工程股份有限公司; 细胞培养基 DMEM 购买于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自于 NEWZERUM 公司; 0.25% 胰酶细胞消化液和基因组 DNA 小量抽提试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; 引物购于通用生物有限公司。荧光定量 PCR 仪购于瑞士 Roche 公司; 稳压稳流电泳仪购于上海天能生命科学有限公司; 琼脂糖凝胶成像仪购于上海勤翔科学仪器有限公司。

## 2 方法

**2.1 细胞培养及转染** HepG2 细胞于含有 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素的 DMEM 中培养至 90%, 传代接种于 24 孔板继续培养 18 h, 接种密度为 70% 时用于转染。转染前将培养基更换为 Opti-MEM 无血清培养基, 1  $\mu$ g HBV 1.3-mer 质粒与 1  $\mu$ L Lipofectamine 3000 混合后加入, 4 h 后更换含有 10% FBS 的完全 DMEM, 并添加终浓度为 20  $\mu$ mol/L 的 BRACO-19 或 TMPyP4 处理 48 h, 收集胞内总 RNA、总 DNA 及培养液上清供后续实验。

**2.2 ELISA 检测转染后上清中抗原变化水平** 将所收集的上清 2 000 g 离心除细胞碎片, 上清用于 HBsAg 和 HBeAg 检测, 检测方法参照 ELISA 试剂盒说明书, 并将检测结果以对照组进行均一化处理。

**2.3 cccDNA 的制备<sup>[12]</sup>** 胞内总 DNA 用基因组 DNA 小量抽提试剂盒抽提, 将提取的总 DNA 使用 Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase 处理, 用于去除基因组中的环状 DNA 和线性 DNA, 保留其中的 cccDNA, 反应体系: 1  $\mu$ g Total DNA, 2  $\mu$ L 25 mmol/

L ATP, 5  $\mu$ L 10  $\times$  Reaction Buffer 以及 1  $\mu$ L Plasmid-Safe DNase 混合均匀后,最终补充无酶水至 50  $\mu$ L,于 37  $^{\circ}$ C、70  $^{\circ}$ C 分别作用 30 min,待其冷却至 4  $^{\circ}$ C 后供后续检测。

**2.4 qPCR 检测基因相对变化水平** Trizol 提取细胞内总 RNA,通过逆转录得到 cDNA,上述方法制备总 DNA 和 cccDNA 分别作为模板,模板每孔加 2  $\mu$ L,再加入 2  $\times$  SYBR Green Pro Taq HS Premix 5  $\mu$ L,上、下游引物各 0.2  $\mu$ L 及适量无酶水进行基因扩增。Total RNA 上游引物:5'-TCACCAGCACCATGC AAC-3';下游引物:5'-AAGCCACCCAAGGCACAG-3'。3.5 kb RNA 上游引物:5'-GAGTGTGGATTCG CACTCC-3';下游引物:5'-GAGGCGAGGGAGT TCTTCT-3'。HBV DNA 上游引物:5'-CACATCAG GATTCCTAGGACC-3';下游引物:5'-GGTGA GTGATTGGAGGTTG-3'。cccDNA 上游引物:5'-CGTCTGTGCCTTCTCATCTGC-3';下游引物:5'-GCACAGCTTGGAGGCTTGAA-3'。GAPDH 上游引物:5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3';下游引物:5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'<sup>[12]</sup>。基因扩增程序:95  $^{\circ}$ C,30 s;95  $^{\circ}$ C,5 s,60  $^{\circ}$ C,30 s,40 个循环后,97  $^{\circ}$ C,1 s,将获取的 Ct 值使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析并统计作图。

**2.5 qPCR stop 实验<sup>[13]</sup>** 该实验以荧光定量 PCR 实验为基础,设计 HBV PQS 及 Non-PQS 序列上下游引物,引物设计及扩增序列见表 1。将 HBV 1.3-mer 质粒( $4 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L)取 2  $\mu$ L 作为模板使用,向其中加入 2  $\mu$ L 梯度浓度变化的 BRACO-19 或 TMPyP4,10  $\mu$ L 的 2  $\times$  SYBR Green Pro Taq HS Premix,上、下游引物各 0.4  $\mu$ L,以及 5.2  $\mu$ L 无酶水,终浓度为 25 mmol/L 钾离子进行扩增,基因扩增程序:95  $^{\circ}$ C,30 s(1 个循环);95  $^{\circ}$ C,5 s 和 60  $^{\circ}$ C,30 s(40 个循环)后,97  $^{\circ}$ C,1 s,37  $^{\circ}$ C,30 s。并将荧光定量 PCR 的产物收集,用于琼脂糖凝胶电泳。

表 1 扩增 HBV 1.3-mer 质粒 DNA qPCR stop 实验所用引物  
Table 1 Primers used in the qPCR stop assay for amplifications of HBV 1.3-mer plasmid DNA

引物 Primer	序列(5' to 3') Sequence	扩增区域 Amplification of the region	扩增长度 (bp) Product length
HBV PQS1 F	TGTGCCAAGTGTTTGCTGAC	HBV PQS1	86
HBV PQS1 R	AGGAGCCGAAAAGGTTCCAC		
HBV PQS2 F	CGACCGACCTTGAGGCATAC	HBV PQS2	103
HBV PQS2 R	TGCCTACAGCCTCCTAGTACA		
HBV PQS3 F	CACCAGCACCATGCAACTTTT	HBV PQS3	123
HBV PQS3 R	TAAGGGTCGATGTCATGCC		
Non-PQS F	AAATTCGAGTCCCAACCT	Non-PQS	81
Non-PQS R	CGCAGACATCCAGCGATA		

**2.6 琼脂糖凝胶电泳** 配制 1% 的琼脂糖凝胶,称取 0.3 g 琼脂粉至 30 mL 的 TAE 溶液后加热溶解,待其冷却至 60  $^{\circ}$ C 左右加入 3  $\mu$ L 溴化乙锭溶液混匀,倒入制胶槽并插好梳子待其凝固即可。将 20  $\mu$ L 荧光定量 PCR 产物和的 4  $\mu$ L 6  $\times$  DNA 上样缓冲液混匀,每孔上样 10  $\mu$ L,于 120 V 电压下电泳 15 min 左右,将电泳后的琼脂糖凝胶置于凝胶成像仪下观察。

**2.7 统计学分析** 目的基因的相对表达水平以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行处理。数据使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析,所有数据均表示为平均值  $\pm$  标准误差(SEM),数据使用 *t* 检验确定统计学显著性, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

### 1 BRACO-19 和 TMPyP4 抑制 HepG2 细胞中 HBV 的表达

将 HBV 1.3-mer 质粒转染至 HepG2 细胞后,20  $\mu$ mol/L BRACO-19 和 TMPyP4 继续作用 48 h 后,通过 ELISA 对细胞上清中 HBsAg 和 HBeAg 水平进行检测后发现,BRACO-19 和 TMPyP4 均可以下调 HBsAg 和 HBeAg 表达(图 1A,1B),且与对照组的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

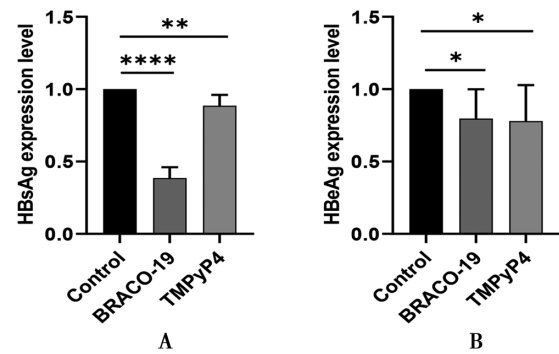


图 1 检测 BRACO-19 和 TMPyP4 对 HBsAg 和 HBeAg 表达影响  
A ELISA 检测 HBsAg 表达的相对水平 B ELISA 检测 HBeAg 表达的相对水平。数据以各组( $n \geq 3$ )的均值  $\pm$  SEM(三次独立实验)表示,采用 *t* 检验进行统计学分析。\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ 、\*\*\*  $P < 0.001$ 、\*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

图 1 检测 BRACO-19 和 TMPyP4 对 HBsAg 和 HBeAg 表达影响

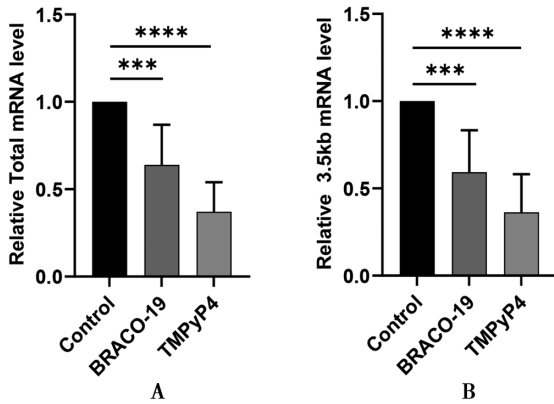
A The supernatant was collected for ELISA analysis to determine the relative levels of HBsAg expression. B Similarly, the supernatant was collected to assess the relative levels of HBeAg expression. Data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ) for each group (three independent experiments), and statistical analysis was performed using *t*-test, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

Fig. 1 Effect of BRACO-19 and TMPyP4 on the expression of HBsAg and HBeAg

### 2 BRACO-19 和 TMPyP4 抑制 HepG2 细胞中 HBV Total RNA 和 3.5 kb RNA 的表达

将上述小分子配体作用后的细胞进行 RNA 提取,通过荧光定量 PCR 实验检测 HBV Total RNA 和 3.5 kb RNA 的相对表达量,结果显示在 BRACO-19

和 TMPyP4 处理下, HBV 两种 RNA 水平均发生显著下调(图 2A, 2B), 与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



A 实时定量 PCR 检测 HBV 总 RNA B 实时定量 PCR 检测 HBV 3.5kb RNA。数据以各组 ( $n \geq 3$ ) 的均值  $\pm$  SEM (三次独立实验) 表示, 采用 *t* 检验进行统计学分析。\*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

图 2 检测 BRACO-19 和 TMPyP4 对 HBV 总 RNA 和 3.5 kb RNA 影响

A HBV Total RNA was quantified by qPCR. B HBV 3.5 kb RNA was quantified by qPCR. Data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ) for each group (three independent experiments), and statistical analysis was performed using *t*-test, \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

Fig. 2 Effect of BRACO-19 and TMPyP4 on the expression of Total and 3.5kb RNA

### 3 BRACO-19 和 TMPyP4 抑制 HepG2 细胞中 HBV DNA 和 cccDNA 的表达

上述小分子配体作用后的细胞提取 DNA, 再利用 Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase 处理去除环状 DNA 和线性 DNA, 获得 cccDNA, 使用荧光定量 PCR 实验检测 HBV DNA 和 cccDNA 的相对表达量, 发现在 BRACO-19 和 TMPyP4 的处理下, HBV DNA 和 cccDNA 水平均显著降低(图 3), 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

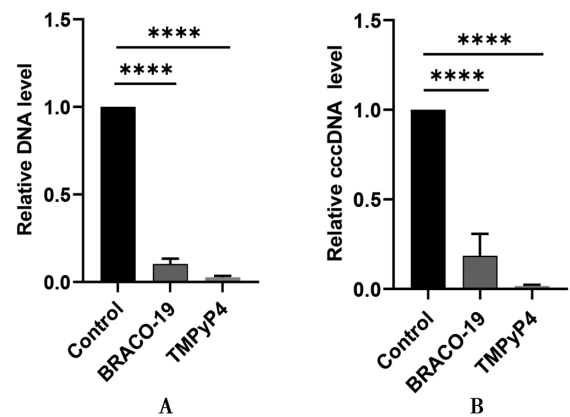
### 4 QGRS Mapper 分析特异性 PQS 序列

通过 QGRS Mapper 在线软件对 HBV 进行序列分析, 发现 3 个富含鸟嘌呤特异结构的序列区域, 将其分别命名为 HBV PQS 1, HBV PQS 2, HBV PQS 3。QGRS Mapper 对三段序列 G-score 评分: HBV PQS1 和 HBV PQS2 均为 19 分, HBV PQS3 为 18 分, 高分序列意味着均具有形成四链体的能力, 选取一段非 PQS 区域作为阴性对照, 命名为 Non-PQS。HBV PQS 及 Non-PQS 序列及其位置如图 4 所示。

### 5 BRACO-19 和 TMPyP4 抑制 HepG2 细胞中 HBV 的复制

通过荧光定量 PCR 终止实验验证, 在添加有 BRACO-19 和 TMPyP4 背景下, 对 DNA 进行扩增。钾离子是四链体的稳定剂, 为了排除钾离子对 DNA 扩增的影响, 设置了只加钾离子的对照, 由图 5 可见

25 mmol/L 钾离子不抑制 PQS 区域 DNA 扩增, 其他的实验组均添加了钾离子和不同浓度小分子配体, 作者检测了三个不同的 HBV PQS 区域以及 Non-PQS 的扩增情况, 只加水的 qPCR 组做阳性对照。结果显示, 在 BRACO-19 处理组随着药物浓度的提高, PQS 位点的 DNA 扩增比非 PQS 区域明显受到梯度抑制, 当 BRACO-19 用 3  $\mu$ mol/L 浓度处理时, PQS3 完全被抑制, PQS1 和 PQS2 在 3.5  $\mu$ mol/L 浓度下也完全无扩增条带, 而 Non-PQS 组仍然可以正常扩增; TMPyP4 组的抑制效果更明显, 1  $\mu$ mol/L 浓度下即可完全抑制 HBV PQS3, 0.5  $\mu$ mol/L 浓度下 PQS1 抑制效果明显, 1.25  $\mu$ mol/L 也基本完全抑制 PQS2。由此可见 DNA 聚合酶的延伸在 HBV PQS 区域由于 BRACO-19 和 TMPyP4 浓度的提高受到明显抑制。



A 实时定量 PCR 定量检测 HBV DNA B 实时定量 PCR 定量检测 HBV cccDNA。数据以各组 ( $n \geq 3$ ) 的均值  $\pm$  SEM (三次独立实验) 表示, 采用 *t* 检验进行统计学分析。\*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

图 3 实时定量 PCR 检测 BRACO-19 和 TMPyP4 对 HBV DNA 和 cccDNA 的影响

A HBV DNA was quantified by qPCR B For cccDNA analysis, DNA were treated for 3 h at 37  $^{\circ}$ C with plasmid Safe<sup>TM</sup> ATP-Dependent DNase and then quantified by qPCR. Data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ) for each group (three independent experiments), and statistical analysis was performed using *t*-test, \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

Fig. 3 Effect of BRACO-19 and TMPyP4 on the expression of DNA and cccDNA

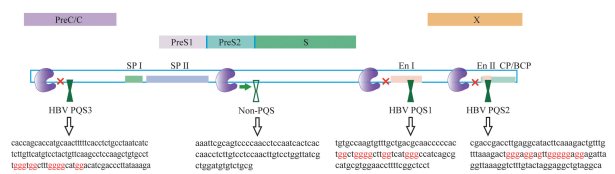
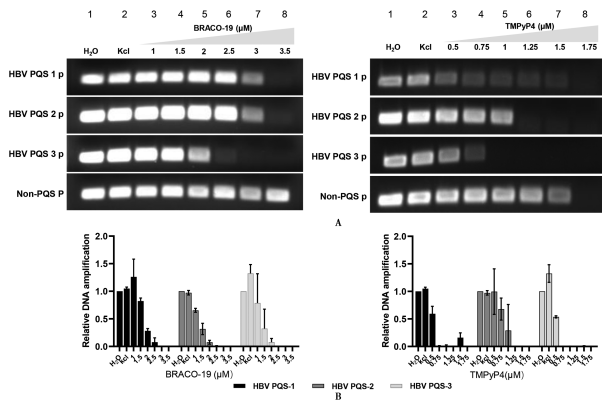


图 4 HBV 基因组中 PQS 序列及位置  
Fig. 4 Sequence and location of PQS in HBV genome

## 讨论

BRACO-19 和 TMPyP4 最早发现作为端粒酶的抑制剂, 具有显著的抗肿瘤疗效, 近年来陆续报道它们也具有抗病毒作用<sup>[14]</sup>: 如 BRACO-19 通过抑制 HSV-1 的 IE 基因启动子活性下调病毒表达<sup>[15]</sup>; BRACO-19

被证明对 HIV 具有抗病毒作用,四链体存在于 HIV 基因的 U3 区域,BRACO-19 通过结合 U3 区域,抑制病毒转录和复制,还可以抑制 HIV 的 NCp7 chaperone 活力<sup>[16,17]</sup>;TMPyP4 可通过靶向 HCMV 的基因组和 miRNA 的启动子活性发挥抗病毒作用<sup>[18]</sup>,TMPyP4 在体外和小鼠体内实验中均显示出显著的抗 SARS-CoV2 的能力<sup>[19]</sup>。前期的研究发现 HBV S 基因启动子及 pre-核心启动子存在四链体结构<sup>[10-11]</sup>,小分子配体对其具有亲和作用,但对于小分子配体对 HBV 基因调控作用尚不明确。



A 琼脂糖凝胶电泳检测荧光定量 PCR 产 1 阳性对照 2 25 mmol/L KCl 3-8 在 25 mmol/L KCl 存在下,不同浓度的 BRACO-19 (1, 1.5, 2, 2.5, 3 或 3.5 μmol/L) 的反应;不同浓度的 TMPyP4 (0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75 μmol/L) 的反应 B 根据荧光定量 PCR 的 C<sub>q</sub> 值进行统计学计算。

图 5 qPCR 终止试验检测 BRACO-19 和 TMPyP4 对 HBV DNA 复制影响

A Gel electrophoresis was conducted to detect the fluorescence quantitative PCR products 1 Positive control 2 25 mmol/L KCl 3-8 Reactions with different concentrations of BRACO-19 (1, 1.5, 2, 2.5, 3, or 3.5 μmol/L) in the presence of 25 mmol/L KCl, reactions with different concentrations of TMPyP4 (0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75 μmol/L) B Statistical analysis was conducted based on the C<sub>q</sub> values obtained from the fluorescence quantitative PCR.

Fig. 5 Investigate the impact of BRACO-19 and TMPyP4 on HBV DNA replication through qPCR stop assay

本研究发现 BRACO-19 和 TMPyP4 在 HepG2 细胞的 HBV 质粒转染模型中,它们均可抑制病毒的 Total RNA 和 3.5 kb RNA 转录,并抑制 DNA 的表达水平。HBV 隐匿的 cccDNA 难以清除,一直是乙肝难以治愈的重要原因,在本文中 BRACO-19 和 TMPyP4 也可显著下调 HBV cccDNA 的表达,因此证明了这两种小分子配体对于 HBV 的抗病毒治疗具有良好的前景。

为探索小配体药物抑制 HBV 表达的机理,本研究探究了 HBV 的 PQS 序列,它们是小分子配体识别的靶点,利用 QGRS Mapper 在线软件查找了 HBV 基因中 PQS 序列,通过高 G-score 评分定位了三个含有 PQS 的区域,分别设计这些序列上下游引物,qPCR stop 法帮助确定 HBV 基因组四链体基序的形成,该

方法快速可靠,已成功用于酵母和 HSV 等病原体四链体结构验证<sup>[13,15]</sup>,在本研究中 BRACO-19 和 TMPyP4 两种配体分子均对 HBV PQS 结构的选择性优于非 PQS 结构,增加小分子配体的浓度帮助 HBV PQS 区域形成更加稳定的空间扭结,这种障碍最终阻滞了 DNA 聚合酶的复制位点的延伸,从而导致复制产物的减少。在 HBV 实际复制过程中,在其自带的 DNA 聚合酶作用下,首先发挥 DNA 聚合酶活性将不完整的 DNA 复制成完整的双链 DNA,再超螺旋化形成 cccDNA 发挥转录功能转录为 RNA,因此根据研究结果推测两种小配体分子可在第一阶段影响 DNA 修复成完整的双链 DNA,进而影响其复制和转录。未来的研究中可进一步用 HBV 毒株在 HepG2-NTCP 等细胞感染模型上验证其功能。

综上所述,四链体配体可通过抑制 DNA 聚合酶活性在 HBV PQS 位点的延伸抑制病毒的复制和转录,发挥抗病毒作用,为乙肝抗病毒治疗提供新的方向。

#### 【参考文献】

- [1] JengWJ, Papatheodoridis GV, Lok ASF. Hepatitis B[J]. Lancet, 2023, 401(10381): 1039-1052.
- [2] TsengTC, Kao JH. Elimination of hepatitis B: Is it a mission possible? [J]. BMC Med, 2017, 15(1): 53.
- [3] WongGLH, Gane E, Lok ASF. How to achieve functional cure of HBV: Stopping NUCs, adding interferon or new drug development? [J]. J Hepatol, 2022, 76(6): 1249-1262.
- [4] HendersonE, Hardin CC, Walk SK, et al. Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs[J]. Cell, 1987, 51(6): 899-908.
- [5] RuggieroE, Richter SN. G-quadruplexes and G-quadruplex ligands: targets and tools in antiviral therapy[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(7): 3270-3283.
- [6] ArtusiS, Ruggiero E, Nadai M, et al. Antiviral Activity of the G-Quadruplex Ligand TMPyP4 against Herpes Simplex Virus-1[J]. Viruses, 2021, 13(2): 196.
- [7] SaranathanN, Biswas B, Patra A, et al. G-quadruplexes may determine the landscape of recombination in HSV-1[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 382.
- [8] TongQ, Liu G, SangX, et al. Targeting RNA G-quadruplex with repurposed drugs blocks SARS-CoV-2 entry[J]. PLoS Pathog, 2023, 19(1): e1011131.
- [9] RavichandranS, Kim YE, Bansal V, et al. Genome-wide analysis of regulatory G-quadruplexes affecting gene expression in human cytomegalovirus[J]. PLoS Pathog, 2018, 14(9): e1007334.
- [10] BiswasB, Kandpal M, Vivekanandan P. A G-quadruplex motif in an envelope gene promoter regulates transcription and virion secretion in HBV genotype B[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(19): 11268-11280.

(下转 1008 页)

发的首选区域,是腺病毒相关抗体制备的关键基因,但国内外关于 Hexon 的研究甚少。因此,本文围绕 HAdV-7 的 Hexon 基因展开研究。

本研究克隆了 HAdV-7 的 Hexon 基因,其大小为 2 805 bp,构建重组质粒 pET30a-Hexon 转入大肠埃希菌感受态细胞进行表达,结果显示以包涵体的形式表达出约 120 ku 的重组蛋白,并且在 IPTG 浓度为 1 mmol/L、34 °C 诱导 8 h 的条件下重组蛋白表达量最高。利用 Ni<sup>2+</sup>-NTA 组氨酸标签蛋白纯化柱对原核表达系统表达的 HAdV-7 Hexon 蛋白进行纯化,成功纯化出 HAdV-7 Hexon 蛋白。为后续研发 HAdV-7 单克隆及多克隆抗体的制备、新型疫苗研发及血清学检测方法等奠定基础。

【参考文献】

[1] 高文娟,金玉,段招军.人腺病毒的研究进展[J].病毒学报,2014,30(2):193-200.

[2] 任晓,曹玉贵,高丽华,等.97例成人7型腺病毒肺炎的临床分析[J].实用医药杂志,2019,36(9):808-810.

[3] 周静.7型腺病毒对人不同细胞系感染的敏感性及其病毒血症发生机制探究[D].广州医科大学,2022.

[4] HungKH,Lin LH. Adenovirus pneumonia complicated with acute respiratory distress syndrome: a case report [J]. Medicine (Baltimore),2015,94(20):e7776.

[5] Ann T,Carr MJ,Dunford L, et al. First report of sudden death due to myocarditis caused by adenovirus serotype 3 [J]. J Clin Microbiol,2010,48(2):642-645.

[6] HuangYC, Huang SL, Chen SP, et al. Adenovirus infection associated with central nervous system dysfunction in children [J]. J Clin Virol,2013,57(4):300-304.

[7] RyuJS, Cho JH, Han HS, et al. Acute respiratory distress syndrome induced by adenovirus in an otherwise healthy woman [J]. Yonsei Med J,2003,44(4):732-735.

[8] DuddingBA, Top FH-Jr, Scott RM, et al. An analysis of hospitalizations for acute respiratory disease in recruits immunized with adenovirus type 4 and type 7 vaccines [J]. Am J Epidemiol,1972,95(2):140-147.

[9] Yuki M, Hideaki S, Atsuko K, et al. Novel human adenovirus

strain, bangladesh [J]. EID,2012,18(5):846-848.

[10] Jones MS,Harrach B,Ganac RD, et al. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis [J]. Virol,2007,81(11):5978-5984.

[11] LiuEB,Ferreira L,Fischer SL, et al. Genetic analysis of a novel human adenovirus with a serologically unique hexon and a recombinant fiber gene [J]. PLoS One,2011,6(9):e24491.

[12] YangZ,Zhu Z,Tang LY, et al. Genomic analyses of recombinant adenovirus type 11a in China [J]. Clin Microbiol,2009,47(10):3082-3090.

[13] Robinson CM, Singh G, Henquell C, et al. Computational analysis and identification of an emergent human adenovirus pathogen implicated in a respiratory fatality [J]. Virology,2011,409(2):141-147.

[14] Walsh MP, Seto J, Liu EB, et al. Computational analysis of two species C human adenoviruses provides evidence of a novel virus [J]. Clin Microbiol,2011,49(10):3482-3490.

[15] Cai R, Mao NY, Dai JJ, et al. Genetic variability of human adenovirus type 7 circulating in mainland China [J]. PLoS ONE,2020,15(4):e0232092.

[16] 杨中英,魏建华,任洛,等. HAdV-7 感染诱导肺泡上皮细胞铁死亡 [J]. 陆军军医大学学报,2022,44(21):2146-2156.

[17] Zhao SH, Wan CS, Ke CW, et al. Re-emergent human Adenovirus genome type 7d caused an acute respiratory disease outbreak in Southern China after a twenty-one year absence [J]. Sci Rep,2014,4:7365

[18] 王亮,秦剑秋,尹刘江,等.人腺病毒7型流行病学及检测方法研究进展[J].中国卫生检验杂志,2022,32(19):2427-2430.

[19] 高文娟.人腺病毒南京、湖南、兰州地方株型别鉴定及 Hexon 全基因序列进化分析[D].兰州大学,2013.

[20] BoseS, Malur A, Banerjee AK. Polarity of human parainfluenza virus type 3 infection in polarized human lung epithelial A549 cells: role of microfilament and microtubule [J]. J Virol,2001,75(4):1984-1989.

[21] Top FH Jr, Dudding BA, Russell PK, et al. Control of respiratory disease in recruits with types 4 and 7 adenovirus vaccines [J]. Am J Epidemiol,1971,94(2):142-146.

[22] MahonG, BlairGE, WoodGM, et al. Is persistent adenovirus 12 infection involved in coeliac disease? A search for viral DNA using the polymerase chain reaction [J]. Gut,1991,32(10):1114-1116.

【收稿日期】 2024-03-22 【修回日期】 2024-06-05

(上接 1003 页)

[11] MolnarOR, Vegh A, Somkuti J, et al. Characterization of a G-quadruplex from hepatitis B virus and its stabilization by binding TMPyP4, BRACO19 and PhenDC3 [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 23243.

[12] ZhaoHJ, Han QJ, Wang G, et al. Poly I: C-based rHBV vaccine therapeutic vaccine eliminates HBV via generation of HBV-specific CD8(+) effector memory T cells [J]. Gut, 2019, 68(11):2032-2043.

[13] JamroskovicJ, Obi I, Movahedi A, et al. Identification of putative G-quadruplex DNA structures in S. pombe genome by quantitative PCR stop assay [J]. DNA Repair (Amst), 2019(82):102678.

[14] BurgerAM, Dai F, Schultes CM, et al. The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function [J]. Cancer Res, 2005, 65(4):1489-1496.

[15] ArtusiS, Nadai M, Perrone R, et al. The Herpes Simplex Virus-1 genome contains multiple clusters of repeated G-quadruplex:

Implications for the antiviral activity of a G-quadruplex ligand [J]. Antiviral Res, 2015, 118(6):123-131.

[16] ButovskayaE, Solda P, Scalabrin M, et al. HIV-1 Nucleocapsid Protein Unfolds Stable RNA G-Quadruplexes in the Viral Genome and Is Inhibited by G-Quadruplex Ligands [J]. ACS Infect Dis, 2019, 5(12):2127-2135.

[17] HarpsterC, Boyle E, Musier-Forsyth K, et al. HIV-1 genomic RNA U3 region forms a stable quadruplex-hairpin structure [J]. Biophys Chem, 2021(272):106567.

[18] KumarS, Choudhary D, Patra A, et al. Analysis of G-quadruplexes upstream of herpesvirus miRNAs: evidence of G-quadruplex mediated regulation of KSHV miR-K12-1-9, 11 cluster and HCMV miR-US33 [J]. BMC Mol Cell Biol, 2020, 21(1):67.

[19] QinG, Zhao C, Liu Y, et al. RNA G-quadruplex formed in SARS-CoV-2 used for COVID-19 treatment in animal models [J]. Cell Discov, 2022, 8(1):86.

【收稿日期】 2024-03-26 【修回日期】 2024-06-15