Original Article

Transfection of a Hepatoma Cell Line by Cloned HBV DNA and Evaluation of Transcription and Expression of Viral-specific Markers and Interferon Stimulated Genes

Hessam Mirshahabi[1], Mohsen Karimi [2], Farida Behzadian[3], Farzaneh Sabahi[4*]

1- Ph.D. Candidate, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Pasture Institute of Iran, Tehran, Iran
3- Associated Professor, Department of Molecular Genetics, Research Center for Science and Biotechnology, Malek Ashtar University, Tehran, Iran
4- Professor, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: sabahi_f@modares.ac.ir

Received: 23/Apr/2013, Accepted: 15/Jul/2013

Abstract

Objective: Despite availability of an effective vaccine against hepatitis B virus (HBV), the global prevalence of this virus infection has not diminished significantly. Contrary to numerous other human viruses, HBV does not have the ability to propagate in cell culture. However, infectious virus has been produced by transfection of human hepatoma cells with plasmids that contain full length HBV genome. Generation and optimization of appropriate cell culture systems can help us in demonstrating the quality of genome replication by PCR as well as expression of surface antigen secretion. Interferon stimulating genes (ISGs) are usually produced in response to interferon and can be determined as a measure of response to IFN-therapy. Therefore, in pharmacological studies, in addition to assessing the effects of a medicine on viral determinants of replication, its' effects on stimulation of various ISGs, as indicators of innate immune responses, can be achieved.

Methods: In this study, we transfected the Huh-7 hepatoma cell line with pCH-9/3091. HBsAg production and viral mRNA transcription were subsequently evaluated. In this system, by using ISGs-specific primers, the ISG mRNAs recognition method was optimized and utilized.

Results: Huh-7 cells supported HBV replication. The peak HBsAg secretion was observed at 72 h post-transfection. By using designed primers for the S and pg/pC regions, transcription and genome replication of the virus was shown. RT-PCR results for ISG production by transfected cells showed no role for HBV in enhancement of ISGs levels in Huh-7 cells.

Conclusion: The results indicated that this system can be used for functional studies of HBV-specific genes as well as assessment of the effects of new drugs or new vaccines. In addition, it may be used to study the mechanisms of drug resistance that have resulted in difficulties in response to HBV antivirals, including IFN-α.

Keywords: Hepatitis B virus, Transfection, Culture, PCR, Interferon stimulating gene

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 3, Autumn 2013, Pages: 65-79

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

مقاله اصیل

ترانسفکشن سلول‌های کبدی به‌وسیله DNA کلون شده ویروس هپاتیت B و ارزیابی میزان رونویسی و بیان نشانگرهای اختصاصی ویروسی و ژن‌های القا کننده اینترفرون

حسام میرشهابی[1]، محسن کریمی[2]، فریدا بهزادیان[3]، فرزانه صباحی[4*]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات علوم و بیوتکنولوژی، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران
۴- استاد، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی
Email: sabahi_f@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۲/۰۲/۰۳ پذیرش مقاله: ۹۲/۰۴/۲۴

چکیده

هدف: با وجود این‌که واکسن مؤثری علیه ویروس هپاتیت B وجود دارد، شیوع جهانی عفونت با این ویروس کاهش چشمگیری پیدا نکرده است. ویروس هپاتیت B برخلاف بسیاری از ویروس‌های بیماری‌زا در انسان قابلیت کشت در آزمایشگاه را ندارد؛ اما ترانسفکشن سلول‌های کبدی با منشأ انسانی به‌وسیله پلاسمید کد کننده ژنوم کامل ویروس هپاتیت B می‌تواند منجر به تولید ویروس عفونی شود. در صورت راه‌اندازی و بهینه‌سازی کشت سلولی، تکثیر ژنوم ویروس در این سلول‌ها را می‌توان با استفاده از PCR تشخیص داد، همچنین ترشح آنتی‌ژن سطحی ویروس به‌وسیله الایزا قابل اندازه‌گیری است. ژن‌های القا کننده اینترفرون در پاسخ به درمان ویروس هپاتیت B با داروی اینترفرون آلفا بیان می‌شود، در نتیجه اندازه‌گیری این ژن‌ها می‌تواند در موارد عدم پاسخ‌دهی به این دارو مؤثر باشد. در نتیجه در مطالعات دارویی علاوه بر تشخیص اثر ماده مورد نظر بر شاخص‌های ویروسی، با سنجش ژن‌های القا کننده اینترفرون می‌توان اثر دارو را نیز در فعال‌سازی ایمنی ذاتی علیه ویروس هپاتیت B بررسی کرد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ترانسفکشن سلول‌های کبدی Huh-7 به‌وسیله پلاسمید pCH-9/3091 انجام شد و سپس بیان آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B و همچنین تولید mRNAهای ویروسی بررسی شد. علاوه بر این، با استفاده از آغازگرهای ژن‌های القا کننده اینترفرون، روش شناسایی آن‌ها راه‌اندازی و بهینه‌سازی شد.

نتایج: سلول‌های Huh-7 از تکثیر ویروس هپاتیت B حمایت می‌کنند. انجام الایزا روی مایع رویی سلول‌ها بیشترین میزان آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B را در ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن تأیید می‌کند. با استفاده از آغازگرهایی که برای نواحی S و pg/pC طراحی شده، رونویسی و تکثیر ژنوم ویروس نشان داده شد. نتایج PCR با استفاده از آغازگرهای ژن القا کننده اینترفرون روی سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید ویروسی نشان داد که ممکن است ویروس هپاتیت B در بالا بردن میزان ژن‌های القا کننده اینترفرون در سلول‌های Huh-7 نقشی نداشته باشد.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد این سیستم می‌تواند راه حلی باشد برای مطالعه روی عملکرد ژنوم ویروس، آزمایش داروها و واکسن‌های جدید و همچنین بررسی مکانیسم‌های مقاومت‌های دارویی که در حال حاضر پاسخ به داروهای کنونی از جمله اینترفرون آلفا را با مشکل مواجه نموده است.

کلیدواژگان: ویروس هپاتیت B، ترانسفکشن، PCR، کشت سلولی، ژن‌های القا کننده اینترفرون

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، صفحات: ۶۵-۷۹

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

هپاتیت B (Hepatitis B) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های کبد در جهان است که عامل ایجاد کننده آن عفونت با ویروس هپاتیت B (Hepatitis B Virus: HBV) است [۱]. اگرچه واکسن مؤثری برای این بیماری در دسترس است اما تخمین زده می‌شود جمعیتی بین ۳۵۰ تا ٤۰۰ میلیون نفر به عفونت مزمن با ویروس HBV دچار باشند [۲، ۳]. مطالعات انجام شده در ایران نشان دهنده این است که ۱/۵ میلیون نفر با عفونت HBV زندگی می‌کنند که ۱۵ تا ٤۰ درصد آن‌ها در معرض خطر ایجاد سیروز (Cirrhosis) و هپاتوسلولار کارسینوما (Hepatocellular Carcinoma) هستند [٤]. سالیانه بیش از یک میلیون نفر در سراسر جهان به علت بیماری‌های وابسته به HBV جان خود را از دست می‌دهند [۵، ٦].

ویروس HBV جزء خانواده هپادناویریده (Hepadnaviridae) است که ژنوم آن یک DNA دو رشته‌ای حلقوی را ایجاد می‌کند. ژنوم فشرده ۳۲۰۰ نوکلیوتیدی از ٤ قالب خواندنی باز (Open Reading Frames: ORFs) هم‌پوشان (Overlap) تشکیل شده که پس از رونویسی تولید ٤ mRNA می‌نماید و پروتئین‌های HBeAg (Hepatitis B e Antigen)، Core، Pol، HBsAg (Hepatitis B Surface Antigen)، HBxAg (Hepatitis B x Antigen) نیز پس از ترجمه حاصل می‌شود [٦، ۷]. تکثیر ژنوم از طریق مکانیسم رونویسی معکوس و با تولید یک RNA حدواسط به نام pgRNA (Pregenomic RNA) صورت صورت می‌گیرد [۸، ۹]. علاوه بر این؛ pgRNA به عنوان الگو برای ترجمه پروتئین‌های core، pol، HBeAg نیز قرار می‌گیرد [۸، ۱۰]. حضور آنتی‌ژن‌های HBsAg، HBeAg در خون معمولاً نشانگر تولید ویروس با تیتر بالا و عفونت‌زایی بالای آن است [۱۰]. مطالعات متعدد نشان دهنده اهمیت مهار تکثیر ویروس در کاهش خطر عوارض عفونت مزمن HBV است [۱۱، ۱۲]. داروهای تأیید شده که در حال حاضر برای درمان عفونت HBV استفاده می‌شود شامل اینترفرون آلفا (Interferon alpha: IFN-α) که به عنوان یک ایمنومودولیتور (Immunomodulator) عمل می‌کند و آنالوگ‌های نوکلئوزیدی [مانند لامیوودین (Lamivudine)] و نوکلئوتیدی [مانند آدفوویر (Adefovir)] که نقش مهار پلیمراز ویروسی را دارند، است [۲، ۱۳، ١٤]. اگرچه این داروها به طور موفق بار ویروسی(Viral Load) را تا حد غیر قابل تشخیص کاهش می‌دهد اما پاسخ‌های پایدار ویروسی (Sustained Virologic Responses) رضایت بخش نیستند [٦].

مطالعات نشان داده است که گرچه کشت HBV از نمونه‌های بیماران موفقیت‌آمیز نبوده است اما ترانسفکش (Transfection) سلول‌های کبدی با ژنوم HBV که قادر به تکثیر باشد می‌تواند منجر به تولید و ترشح ویروس‌های عفونی شود [۱۵]. از کاربردهای ترانسفکشن رده‌های سلولی کبدی مانند HepG2 یا Huh-7 با استفاده از پلاسمیدهایی که حاوی ژنوم کامل HBV هستند می‌توان به این موارد اشاره کرد: مطالعه مقاومت‌های دارویی ناشی از عفونت با این ویروس، مطالعه روی عملکرد ژنوم ویروس [١٦-١٨]، بررسی تأثیر ضد ویروسی عصاره‌های مختلف گیاهی روی تکثیر ویروس HBV [۱۹]، بررسی تجویز اینترفرون بر ژنوتیپ‌های مختلف HBV [۲۰]. علاوه بر موارد فوق از سیستم کشت سلولی برای بررسی تأثیر داروها و واکسن‌های جدید نیز استفاده می‌شود [۲۱، ۲۲]. یکی از شیوه‌های درمانی جدید خاموشی ژن (Gene Silencing) بر پایه اسید نوکلئیک شامل استفاده از مولکول‌های RNA مداخله‌گر (RNA interference یا RNAi) از قبیل siRNA است [۱۳]. یکی از راه‌کارهای موجود برای بررسی میزان تأثیرگذاری چنین درمان‌هایی نیز استفاده از روش ترانسفکشن همزمان siRNA و پلاسمید کد کننده ژنوم ویروس است [۸، ۲۳]. سپس می‌توان با استفاده از روش‌های مولکولی همچون PCR میزان تأثیرگذاری دارو را بررسی نمود. از آن‌جایی که siRNA به صورت RNA دو رشته‌ای وارد سلول می‌شود و این نوع RNA می‌تواند باعث القای پاسخ اینترفرون شود [۸]، پس باید این اثر نامطلوب نیز بررسی شود؛ بنابراین با استفاده از PCR، ژن‌های القا کننده اینترفرون (Interferon Stimulating Genes: ISGs) را می‌توان مورد بررسی قرار داد [٢٤].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

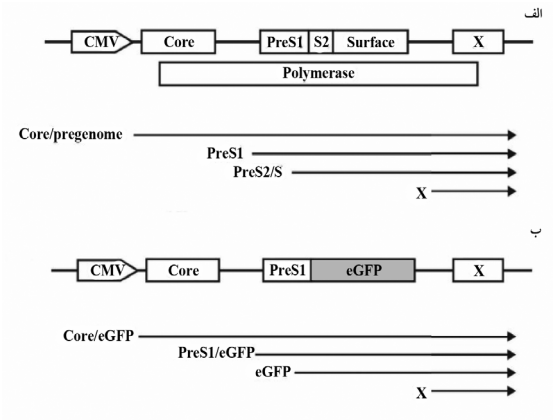
در این مطالعه نشان داده شد سلول‌های Huh-7 کـه منـشأ کبدی دارند، توسط پلاسمیدی که ژنـوم کامـل HBV را درون خود جای داده است ترانسفکت شده و از تولید ویروس کامـل حمایت مـی‌کننـد. بـا اسـتفاده از روش‌هـای مختلـف حـضور ویروس در این سلول‌ها و همچنین مایع رویی را می‌توان اثبات کرد. در ضمن القای ISGs به‌وسـیله HBV در ایـن سـلول‌هـا بررسی شد. این سیستم می‌تواند به عنوان روشی بـرای بررسـی عملکرد ژن‌های HBV و همچنین تکثیر ویروس مورد اسـتفاده قرار گیرد. همچنین با استفاده از بیـان گـذرای ژنـوم HBV در سلول‌های Huh-7 می‌توان میزان اثر گذاری تکثیر ویـروس بـر ایمنی ذاتی را بررسی نمود.

مواد و روش‌ها

پلاسمیدهای ویروسی

از آن‌جایی که هدف از این تحقیق راه‌اندازی سیـستم کـشت سلولی برای تکثیـر HBV اسـت، بنـابراین در اولـین قـدم بایـد پلاسمیدی که قادر به تولید ذرات ویروس هپاتیـت B در کـشت سلول است، تهیه شود. بدین منظور از بـین پلاسـمیدهای متعـدد که در مقالات مختلف از آن‌ها اسـتفاده شـده بـود [۲۳، ۲۵-۲۹]، ۲ پلاسمید با نـام‌هـای pCH-9/3091 [پروفـسور میـشل ناسـال (Michael Nassal)، آلمان] و pCH-eGFP [پروفسور پاتریـک اربوتنات (Patrick Arbuthnot)، آفریقـای جنـوبی) انتخـاب و اقدامات لازم برای دریافت آن‌ها از سازندگان انجام شد.

لازم به ذکر است که پلاسمید pCH-9/3091 حاوی ژنـوم کامل ویـروس هپاتیـت B اسـت کـه پـس از ترانسفکـشن بـه صورت درون بدنی (in vivo) و آزمایشگاهی (in vitro) قادر به تولید ذرات ویروسی است (شکل ۱، الـف) [۳۰]. پلاسـمید pCH-eGFP از لحـاظ سـاختار کـاملاً مـشابه pCH-9/3091 است با این تفـاوت کـه بـه جـای preS2/S ORF تـوالی ژن eGFP قرار داده شده است (شکل ۱، ب) [۳۱].



شـکل ۱ نمـایی شـماتیک از پلاسـمیدهای pCH-9/3091، pCH-eGFP و محل قرار گیری ORFها و RNAهای معادل آن‌هـا. (الـف) ایـن سـاختار بـا تولید pgRNA و سپس cccDNA از لحاظ عملکردی مـشابه ژنـوم حلقـوی HBV است. (ب) بـه علـت تخریـب ORF پلیمـراز، ایـن پـروتئین سـاخته نمی‌شود و در شکل نشان داده نـشده اسـت. ایـن پلاسـمیدها تحـت کنتـرل پروموتر CMV (Cytomegalovirus) قرار دارد [۲۷].

پلاسمیدها به میزان زیاد تکثیر و با استفاده از کیـت تخلـیص پلاسمید Maxi (Qiagen، آلمـان) اسـتخراج شـد. میـزان کمّـی پلاسمیدهای استخراج شده نیز بـا اسـتفاده از دسـتگاه نـانودراپ (Thermo Scientific، آمریکا) خوانده شد. در ادامه برای تأییـد درستی پلاسمیدهای ارسال شده با ۵ آنزیم محدودالاثر *Bam*HI، *Eco*RI، *Xho*I، *Xba*I و *Pst*I (Fermentase، آمریکا) براساس نقشه پلاسمیدها هضم آنزیمی صورت گرفت.

کشت سلول و بهینه‌سازی روش انتقال پلاسمید به‌درون سلول‌های یوکاریوت

سلول‌های Huh-7 سلول‌هایی بـا تکثیـر مـداوم هـستند و منشأ آن‌ها سلول‌های هپاتوسیت گرفته شـده از کارسـینوم کبـد انسانی است که در محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) غنی شـده بـا ۱۰ درصـد سـرم جنـین گـاو، پنی‌سیلین (Penicillin) (۱۰۰ واحد/ میلی‌لیتر) و استرپتومایـسین (Streptomycin) (۱۰۰ میکروگـرم/ میلـی‌لیتـر) کـشت داده شدند [۳۲]. رده سلولی مورد استفاده در ایـن پـژوهش اهـدایی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

دکتر فرزین روحوند (بخش ایدز و هپاتیت انستیتو پاستور ایران) می‌باشد. به منظور بررسی تولید پروتئین eGFP و بهینه‌سازی عوامل دخیل در ترانسفکشن، سلول‌های Huh-7 با پلاسمید pCH-eGFP ترانسفکت شدند. همچنین در این پژوهش برای ترانسفکشن از لیپوزومی به نام لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Lipofectamine 2000) (Invitrogen، آمریکا) استفاده شد.

در ترانسفکشن پلاسمید ۳ متغیر که نیاز به بهینه‌سازی آن‌ها وجود دارد عبارتند از تعداد سلول، میزان پلاسمید، میزان لیپوفکتامین. در ابتدا مقادیر متغیرهای فوق طبق دستورالعمل لیپوفکتامین ۲۰۰۰ در نظر گرفته شد و سپس با تغییر آن‌ها بهترین حالت ترانسفکشن به‌دست آمد. بدین منظور ٤٨ ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌ها برای بررسی میزان ترانسفکشن به‌وسیله میکروسکوپ فلوئورسنت ارزیابی شد.

در ادامه از مقادیر بهینه شده بالا برای ترانسفکشن پلاسمید pCH-9/3091 استفاده شد. به منظور بررسی کارآیی پلاسمید مورد نظر و همین‌طور بهینه‌سازی روش ارزیابی مولکولی، تولید HBV در کشت سلول با دو روش PCR و الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) آزموده شد.

ارزیابی میزان تولید HBsAg

با توجه به این‌که HBV پس از تکثیر از سلول خارج می‌شود، بنابراین می‌توان میزان پروتئین سطحی ویروس (HBsAg) را به‌وسیله ELISA آزمایش کرد. بدین منظور مایع رویی سلول‌های Huh-7 ترانسفکت شده با پلاسمید pCH-9/3091 در کنار سلول‌های ترانسفکت نشده (Mock) در ساعت‌های ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت پس از ترانسفکشن جمع‌آوری شدند. با استفاده از دستورالعمل کیت الایزای HBsAg (Biokit، اسپانیا) میزان آنتی‌ژن در مایع رویی سلول ارزیابی شد. نتایج اولیه حاصل از ELISA نشان داد که میزان مایع رویی مورد استفاده طبق دستورالعمل کیت زیاد است و جذب‌های نوری (Optical Density: OD) به‌دست آمده نشان دهنده اشباع بودن نمونه‌ها از HBsAg است؛ بنابراین برای رفع این مشکل مایع رویی مورد استفاده با نسبت‌های ۱/۲، ۱/۵، ۱/۱۰ با بافر فسفاته سالین (Phosphate Buffered Saline: PBS) رقیق شد تا بهترین رقت مشخص شود. پس از انجام ELISA روی نمونه‌ها مشخص شد رقت ۱/۲ می‌تواند در ادامه برای انجام الایزای HBsAg استفاده شود.

راه‌اندازی روش PCR روی ژن‌های ویروسی و بهینه‌سازی شرایط آن

برای بررسی تولید ذرات HBV و بیان ژن‌های آن از دو جفت آغازگر (Primer) استفاده شد. آغازگر pg/pC که pgRNAرا تکثیر می‌کند [۲۳] و آغازگر S که mRNA ژن S را زیاد می‌کند [۳۳]. توالی آغازگرهای ذکر شده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱ توالی آغازگرهای HBV

نام آغازگر	توالی (٣´ → ٥´)	محل قرارگیری بر روی ژنوم HBV*	طول قطعه (جفت‌باز)
pg/pC F	CAC CTC TGC CTA ATC ATC	١٨٢٨ –١٨٤٥	١٤٩
pg/pC R	GGA AAG AAG TCA GAA GGC AA	١٩٥٧ –١٩٧٦	
S F	CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT	٣٦٤ –٣٨٤	١١٦
S R	GGA CAA ACG GGC AAC ATA CCT T	٤٥٨ –٤٧٩	

* توالی HBV براساس جایگاه برش آنزیمی *Eco*RI به عنوان نوکلئوتید ۱ در ژنوتیپ HBV2 (شماره دست‌یابی J02203) است.
F: جلویی (Forward)، R: برگشتی (Reverse)

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

ابتدا PCR با استفاده از DNA استخراج شده از سرم بیمار مبتلا به فرم مزمن هپاتیت B ویروسی و آغازگرهای pg/pC و S انجام شد. در این مرحله با استفاده از نمونه کنترل مثبت آغازگرها بهینه‌سازی شد تا در ادامه روی mRNAهای به‌دست آمده از سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pCH-9/3091 نیز، PCR انجام شود. مقادیر مورد استفاده در واکنش ۱ میکرولیتر الگو، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار از هر dNTP، ۵ پیکومول از هر آغازگر، ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز (سیناژن، ایران) بود. تکثیر طی ٤۰ چرخه (۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه) پس از یک مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در دستگاه PCR (ABI، آمریکا) صورت گرفت. برای هر دو جفت آغازگر طیف دمایی انجام شد.

پس از گذشت ۷۲ ساعت از انجام ترانسفکشن، ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی سلول‌ها جمع‌آوری شد. برای ارزیابی HBV DNA ۱۷۵ میکرولیتر از مایع رویی با ۲ واحد آنزیم DNase I (Qiagen، آلمان) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا پلاسمیدهای اضافی که هنگام ترانسفکشن در محیط کشت باقی مانده‌است، از بین برود. لازم به ذکر است توانایی آنزیم DNase I در از بین بردن پلاسمید قبلاً آزمایش شد. برای غیر فعال کردن آنزیم DNase I واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس HBV DNA با استفاده از کیت QIAamp DNA Blood (Qiagen، آلمان) و طبق دستورالعمل کیت، استخراج شد. برای استخراج RNA، ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن با استفاده از کیت RNeasy Plus (Qiagen، آلمان)، سلول‌ها لیز و RNA تام آن‌ها استخراج شد. سپس به میزان ۵۰۰ نانوگرم از RNA استخراج شده برای ساخت cDNA با استفاده از دستورالعمل کیت Quantitect Reverse Transcription (Qiagen، آلمان) استفاده شد. در نهایت PCR روی cDNA ساخته شده با استفاده از آغازگرهای HBV و مطابق مقادیر و شرایط مورد استفاده در PCR روی DNA استخراج شده از سرم بیمار انجام شد به استثنای مقدار الگو که ۵ میکرولیتر از cDNA رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱/۵۰ استفاده شد.

PCR روی ISG ها به منظور ارزیابی پاسخ ایمنی ذاتی

برای بررسی اثر تکثیر HBV در سلول‌های ترانسفکت شده بر تولید اینترفرون ٤ ISG اصلی به نام‌های MX1، OAS1 (2′,5′-Oligoadenylate Synthetase)، STAT-1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1) و ISG-15 انتخاب شد [۳٤]. همچنین برای بررسی درستی مراحل استخراج RNA و ساخت cDNA از آغازگرهای Hprt-1 انسانی به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. مشخصات آغازگرهای ذکر شده در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲ توالی آغازگرهای ISG ها و کنترل داخلی

نام آغازگر	توالی (′۳ → ′۵)	محل قرارگیری روی ژن	طول قطعه (جفت‌باز)
MX1-F	GTT TCC GAA GTG GAC ATC GCA	۲۲۸ -۲٤۸	۲۸۰
MX1-R	GAA GGG CAA CTC CTG ACA GT	٤۸۸ -۵۰۷	
OAS1-F	GAT CTC AGA AAT ACC CCA GCC A	۱۱۳ -۱۳٤	۱٤۲
OAS1-R	AGC TAC CTC GGA AGC ACC TT	۲۳۵ -۲۵٤	
STAT1-F	ATG TCT CAG TGG TAC GAA CTT CA	۳۸۹ -٤۱۱	۱۰۷
STAT1-R	TGT GCC AGG TAC TGT CTG ATT	٤۷۵ -٤۹۵	
ISG15-F	CAG CGA ACT CAT CTT TGC CAG TA	٤٤ -٦٦	۹۵
ISG15-R	CCA GCA TCT TCA CCG TCA GG	۱۱۹ -۱۳۸	
h-Hprt-1-F	CCT GGC GTC GTG ATT AGT G	۱۸۳ -۲۰۱	۱۲۵
h-Hprt-1-R	TCA GTC CTG TCC ATA ATT AGT CC	۲۸۵ -۳۰۷	

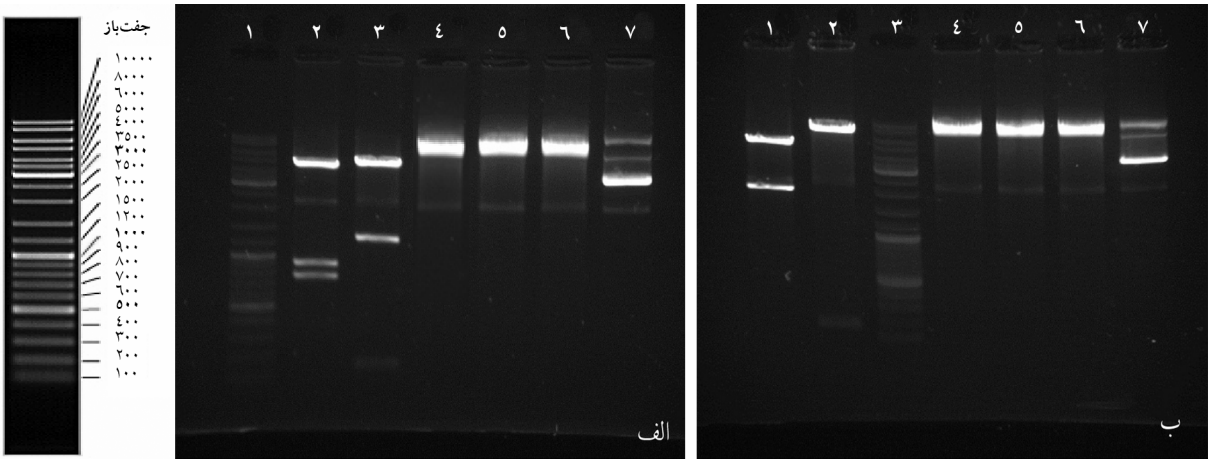
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

سلول‌های Huh-7 به تعداد $۰/۵\times۱۰^{۵}$ در پلیت ۲٤ خانه کشت داده شد. سپس به میزان ۱۰۰۰ واحد بین المللی از IFNα-2a (Peprotech، انگلستان) به آن‌ها اضافه شد و پس از گذشت ۲٤ ساعت RNA تام سلولی با استفاده از کیت RNeasy Plus (Qiagen، آلمان) استخراج شد تا به عنوان کنترل مثبت برای بهینه‌سازی آغازگرهای ISGs به‌کار گرفته شود. سپس با استفاده از کیتQuantitect Reverse Transcription (Qiagen، آلمان)، ۵۰۰ نانوگرم از RNA استخراج شده به cDNA تبدیل شد. پس از رقیق‌سازی cDNA به نسبت ۱/۵۰، مقدار ۵ میکرولیتر از آن در واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای ISGs استفاده شد.

نتایج

هضم آنزیمی

به دلیل دارار بودن یک جایگاه برش برای ۳ آنزیم محدودالاثر *Eco*RI، *Xho*I و *Pst*I، هضم پلاسمیدهای pCH-9/3091 و pCH-eGFP با این آنزیم‌ها باعث خطی شدن آن‌ها می‌شود. همان‌طور که در شکل ۲ نیز قابل مشاهده است، تفاوت جایگاه برش به‌وسیله آنزیم‌های محدودالاثر *Bam*HI و *Xba*I به علت تولید قطعات متفاوت منجر به تمایز این دو پلاسمید از هم می‌شود.

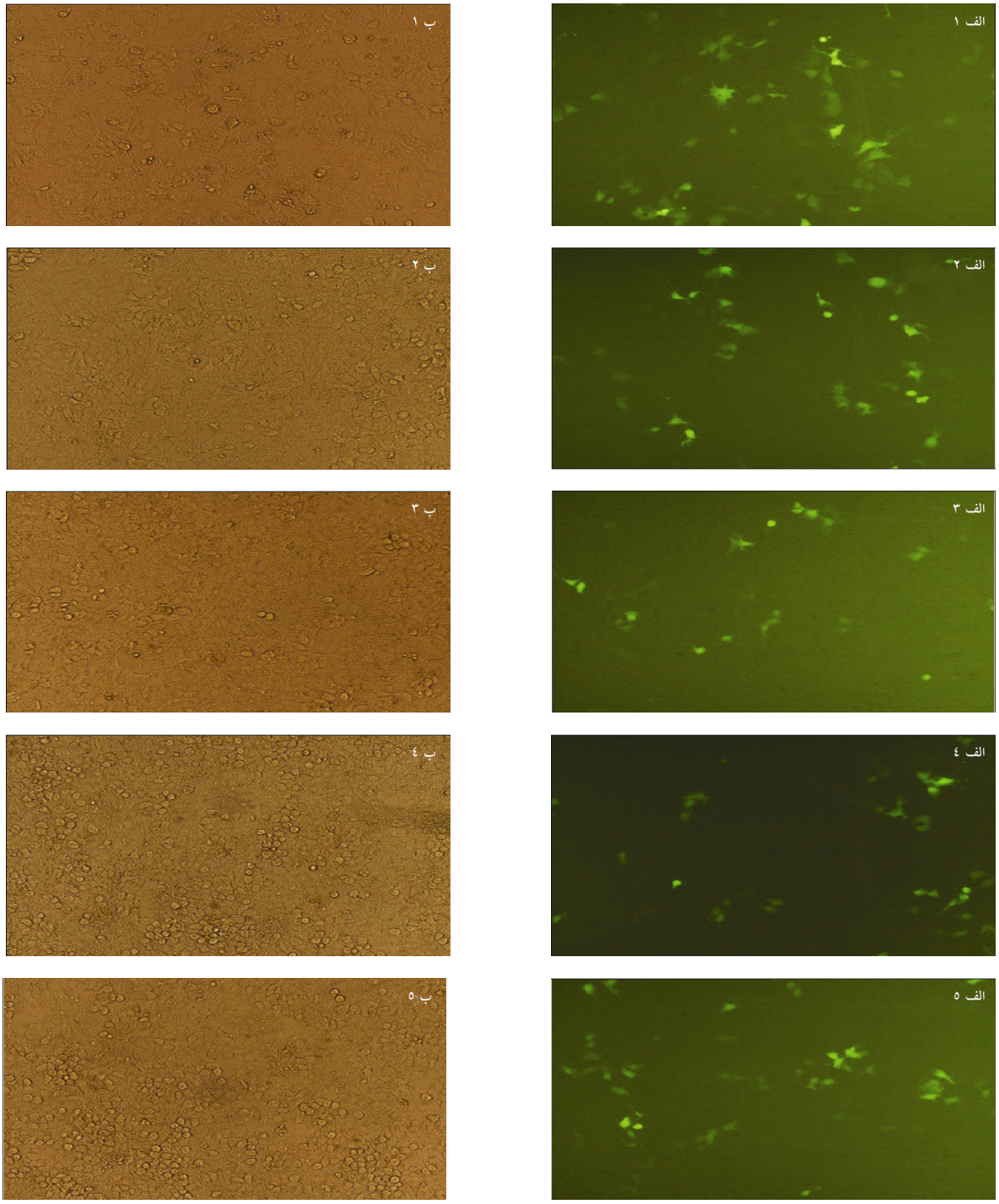


شکل ۲ هضم آنزیمی با استفاده از ۵ آنزیم محدودالاثر روی پلاسمیدهای pCH-9/3091 و pCH-eGFP؛ (الف) هضم آنزیمی روی پلاسمید pCH-9/3091؛ باند ۲) برش به‌وسیله آنزیم *Bam*HI باعث ایجاد قطعات ٤٦٦٠، ۹۱۲ و ۷٦٦ نوکلئوتیدی می‌شود، باند ۳) محصول هضم با آنزیم *Xba*I قطعات ٤۸۹۹، ۱۲۸۸ و ۱۵۱ نوکلئوتیدی ایجاد می‌کند، باندهای ٤، ۵ و ٦) به ترتیب هضم با آنزیم‌های *Eco*RI، *Xho*I و *Pst*I صورت گرفته که باعث خطی شدن پلاسمید می‌شود، باند ۷ پلاسمید هضم نشده است. باند ۱) نشانگر DNA است که اندازه باندهای آن در سمت چپ تصویر آورده شده است. (ب) هضم آنزیمی روی پلاسمید pCH-eGFP؛ باند ۱) هضم با آنزیم *Bam*HI باعث ایجاد قطعات ٤۸٦۸ و ۱٦۷۸ نوکلئوتیدی می‌شود؛ در حالی که در باند ۲ هضم با آنزیم *Xba*I قطعات ٦۳۹۵ و ۱۵۱ نوکلئوتیدی تولید می‌کند، هضم با آنزیم‌های *Eco*RI، *Xho*I و *Pst*I به‌ترتیب در باندهای ٤، ۵ و ٦ آورده شده است که پلاسمید را خطی می‌کند، باند ۷ پلاسمید هضم نشده است. باند ۳ نشانگر DNA است.

ترانسفکشن سلول‌های Huh-7 با پلاسمید pCH-eGFP

سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pCH-eGFP، ۲٤ ساعت پس از ترانسفکشن با محیط DMEM تعویض محیط شدند و برای ۲٤ ساعت دیگر در انکوباتور قرار داده شدند. پس از گذشت ٤۸ ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌ها از لحاظ بیان پروتئین فلوئورسنت سبز زیر میکروسکوپ فلوئورسنت مشاهده شدند. ابتدا تعداد سلول‌ها $۱/۰\times۱۰^{۵}$ در نظر گرفته شد و مقادیر پلاسمید و لیپوفکتامین متغیر بود. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود بهترین نتیجه با مقدار ۱/۲ میکروگرم پلاسمید و ۰/٦ میکرولیتر لیپوفکتامین به‌دست آمد.

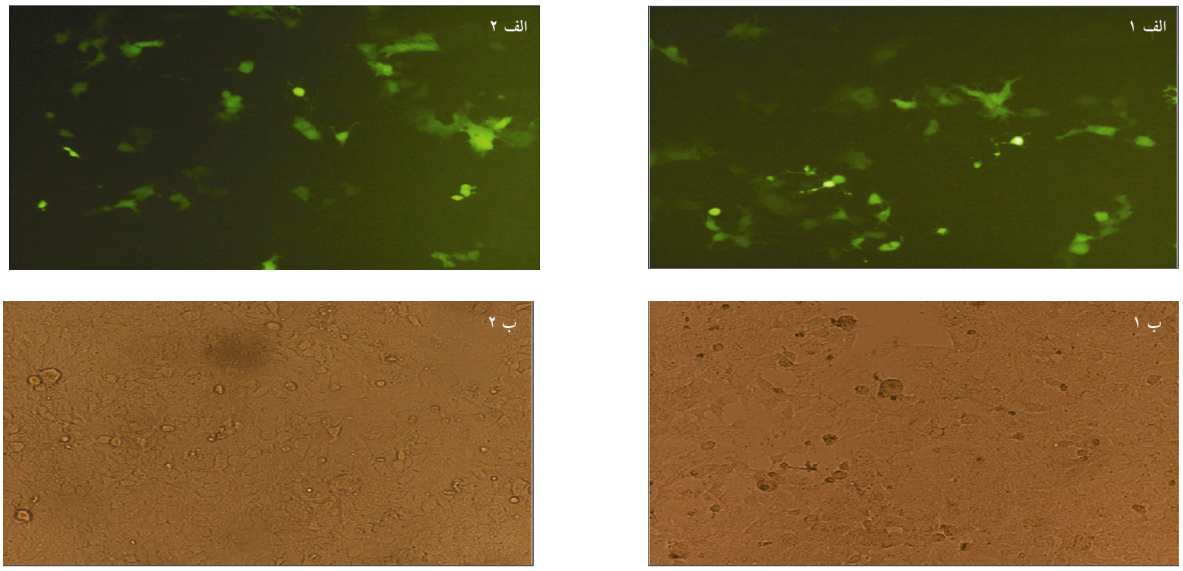
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]



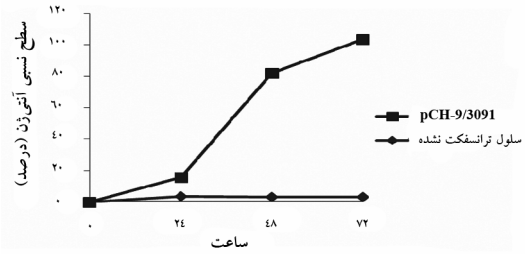
شکل ۳ مشاهده سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pCH-eGFP به‌وسیله میکروسکوپ فلوئورسنت؛ (۱- الف) سلول‌های ترانسفکت شده با ۰/۸ میکروگرم پلاسمید و ۰/٦ میکرولیتر لیپوفکتامین و (۱- ب) سلول‌های کنترل، (۲- الف) سلول‌های ترانسفکت شده با ۱/۲ میکروگرم پلاسمید و ۰/٦ میکرولیتر لیپوفکتامین و (۲- ب) سلول‌های کنترل، (۳- الف) سلول‌های ترانسفکت شده با ۰/۸ میکروگرم پلاسمید و ۱ میکرولیتر لیپوفکتامین و (۳- ب) سلول‌های کنترل، (٤- الف) سلول‌های ترانسفکت شده با ۱/۲ میکروگرم پلاسمید و ۱ میکرولیتر لیپوفکتامین و (٤- ب) سلول‌های کنترل، (٥- الف) سلول‌های ترانسفکت شده با ۰/۸ میکروگرم پلاسمید و ۲ میکرولیتر لیپوفکتامین و (٥- ب) سلول‌های کنترل. منظور از سلول‌های کنترل همان ناحیه از سلول‌های ترانسفکت بدون تاباندن نور ماورای بنفش است. (بزرگنمایی ۱۰×)

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

پس از مشاهده نتایج در ادامه تعداد سلول‌ها کاهش داده شد. $۰/۵\times۱۰^{۵}$ سلول با استفاده از ۰/٦ میکرولیتر لیپوفکتامین و ۰/۸ و ۱/۲ میکروگرم پلاسمید ترانسفکت شدند. درصد ترانسفکشن در چاهک ٢٤ خانه‌ای که با ۱/۲ میکروگرم پلاسمید ترانسفکت شده بود، بیشتر از سایر چاهک‌ها بود (شکل ٤).



شکل ٤ مشاهده سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pCH-eGFP به‌وسیله میکروسکوپ فلوئورسنت؛ (۱- الف) سلول‌های ترانسفکت شده با ۰/۸ میکروگرم پلاسمید و ۰/٦ میکرولیتر لیپوفکتامین و (۱- ب) سلول‌های کنترل، (۲- الف) سلول‌های ترانسفکت شده با ۱/۲ میکروگرم پلاسمید و ۰/٦ میکرولیتر لیپوفکتامین و (۲- ب) سلول‌های کنترل. منظور از سلول‌های کنترل همان ناحیه از سلول‌های ترانسفکت بدون تاباندن نور ماورای بنفش است. (بزرگنمایی ۱۰×)



شکل ۵ میزان تولید HBsAg در زمان‌های مختلف پس از ترانسفکشن

بیان HBsAg توسط سلول‌های Huh-7

نتایج ELISA روی مایع رویی که از سلول‌های ترانسفکت شده به‌دست آمده نشان دهنده بیان آنتی‌ژن سطحی ویروس، ٢٤ ساعت پس از ترانسفکشن اسن. همان‌طور که در شکل ۵ دیده می‌شود ویروس HBV در سلول‌های Huh-7 قادر به تکثیر است و بیشترین میزان آنتی‌ژن سطحی ویروس در زمان ۷۲ ساعت مشاهده می‌شود.

بهینه‌سازی آغازگرهای HBV

انجام PCR با استفاده از آغازگرهای pg/pC و S، طول قطعات محصولات PCR در جدول ۱ ذکر شده است (۵۵ درجه سانتی‌گراد =Tm). نمونه مورد استفاده DNA استخراج شده از سرم بیمار است. در ادامه برای هر دو آغازگر طیف دمایی انجام گرفت. محصولات PCR نیز روی ژل آگارز ۱ درصد ران شد (شکل ٦).

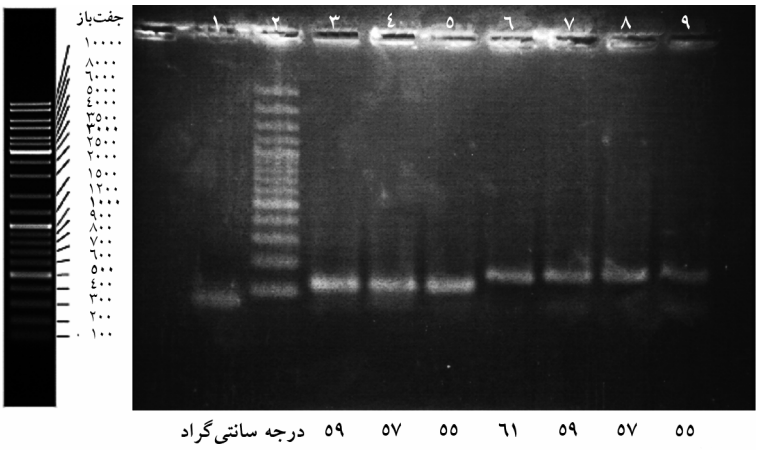
با استفاده از آغازگرهایی که در بند فوق بهینه شده بود PCR و RT-PCR روی RNA تام سلولی و DNA استخراج شده از مایع رویی سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pCH-9/3091 آزمایش شد. (شکل ۷)

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

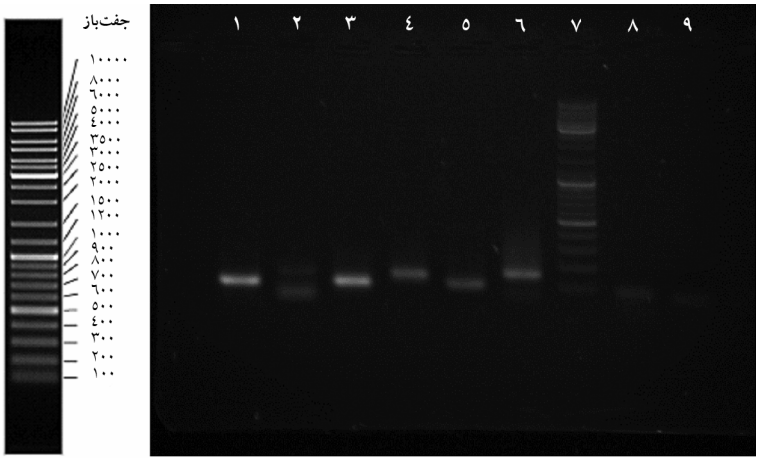
بهینه‌سازی آغازگرهای ISGs

پس از استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده با IFN-α، با استفاده از آغازگرهای ذکر شده در جدول ۲ RT-PCR انجام شد. با توجه به شکل ۸ IFN-α باعث افزایش بیان ISGها و در نتیجه باندهای مورد نظر روی ژل آگارز قابل مشاهده است.

سپس روی cDNA سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pCH-9/3091 (پلاسمید تولید کننده ذرات HBV)، PCR انجام شد اما برخلاف انتظار نتیجه منفی بود و به نظر می‌رسد تکثیر HBV باعث بالا رفتن میزان ISGها در سلول‌های Huh-7 ترانسفکت شده نمی‌شود (نتایج نشان داده نشده است).

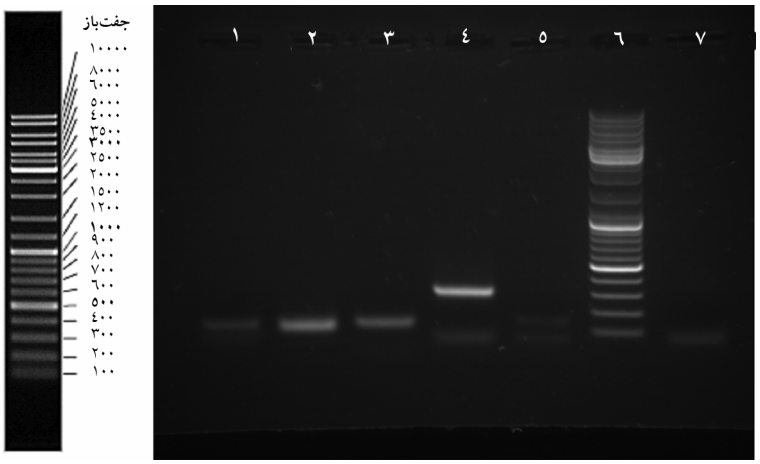


شکل ۶ طیف دمایی با استفاده از آغازگرهای ویروسی روی نمونه بیمار؛ باندهای ۳ الی ۵ PCR با آغازگر S و ۶ الی ۹ با استفاده از آغازگر pg/pC است. باند ۱ کنترل منفی PCR و ۲ نشانگر DNA است که اندازه باندهای آن در سمت چپ تصویر آورده شده است. طیف دمایی مورد استفاده در زیر تصویر آورده شده است.



شکل ۷ PCR روی RNA و DNA استخراج شده از سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pCH-9/3091؛ باندهای ۱، ۳ و ۵ PCR با استفاده از آغازگر S و باندهای ۲، ۴ و۶ با استفاده از آغازگر pg/pC است. باندهای ۱ و ۲ RT-PCR روی RNA سلول‌های ترانسفکت شده است. باندهای ۳ و ۴ DNA استخراج شده از سرم بیمار و ۵ و ۶ DNA ویروسی استخراج شده از مایع رویی کشت سلول است. باندهای ۸ و ۹ نیز به ترتیب کنترل منفی PCR با استفاده از آغازگرهای S و pg/pC است. اندازه باندهای نشانگر DNA (باند ۷) در سمت چپ تصویر آورده شده است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]



شکل ۸ PCR با استفاده از آغازگرهای ISG روی cDNA سلول تیمار شده با IFN-α؛ باند ۱ PCR با استفاده از آغازگر Hprt-1، باند ۲ ISG-15، باند ۳ STAT-1، باند ٤ MX-1 و باند ٥ OAS-1 است. باند ۷ کنترل منفی PCR با استفاده از آغازگر Hprt-1 است. اندازه باندهای نشانگر DNA (باند ٦) در سمت چپ تصویر آورده شده است.

بحث

با توجه به تخمین سازمان بهداشت جهانی، در حال حاضر بیش از ۳۰۰ میلیون نفر به صورت مزمن با HBV آلوده هستند که در معرض خطر ابتلا به سیروز و هپاتوسلولار کارسینوما قرار گرفته‌اند [۳۵]. شیوه‌های درمانی کنونی عفونت با HBV شامل استفاده از IFN-α و آنالوگ‌های نوکلئوتیدی مانند لامیوودین و آدفوویر است که البته فقط در بعضی از افراد پاسخ قطعی به درمان مشاهده می‌شود [۸]. یکی از دلایل کاهش پاسخ به درمان به‌وجود آمدن ویروس‌های جهش‌یافته (Mutant) مقاوم به درمان در خلال روند درمان است. تجزیه و تحلیل‌های فنوتیپی (Phenotypic) از بهترین روش‌های آزمایشگاهی است که با استفاده از ترانسفکشن DNAهای ویروسی کلون شده که دارای جهش‌های مشخص در ژنوم ویروس است، در کنار دارو برای مطالعات مقاومت دارویی HBV استفاده می‌شود [۱٦، ۳٦]. بنابراین ترانسفکشن رده‌های سلولی کبدی مانند Huh-7 با پلاسمیدهایی که حاوی ژنوم کامل ویروس است معمولاً برای مطالعه مقاومت‌های دارویی HBV استفاده می‌شود [۱٦]. گونه‌های متعددی از حیوانات همچون شامپانزه وحتی موش‌های نوترکیب، موش خرما و اردک به عنوان مدل برای عفونت HBV استفاده می‌شود اما با تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های ویروس عفونت به‌سرعت از بین می‌رود [۳۷، ۳۸]. از مشکلات استفاده از شامپانزه می‌توان به در دسترس نبودن، گران بودن و عدم ایجاد بیماری مزمن کبدی بعد از آلوده شدن با HBV اشاره کرد [۳۹]. مطالعات قبلی نشان داده‌است که دو رده سلولی HepG2 و Huh-7 برای بیان موقتی HBV مناسب هستند. این سلول‌ها قادر هستند ذرات عفونی را تولید کنند که از ذرات که در بدن انسان تولید می‌شوند، قابل تمایز نباشند [٤۰]. به علت این‌که در مراحل مختلف تولید ویروس همچون رونویسی، ترجمه و همانندسازی ژنوم، روش‌های تشخیصی وجود دارد، بنابراین این سیستم اجازه می‌دهد تا بتوان مطالعات عملکردی سریعی را روی جهش‌یافته‌های ویروسی که در هر مرحله از چرخه تکثیر دچار نقص هستند، انجام داد. البته سلول‌های دیگری نیز وجود دارند که به طور مستمر ویروس عفونی تولید می‌کنند اما یکی از معایب مهم آن‌ها نگهداری و پاساژ چنین سلول‌های در مواقعی است که آزمایشی روی آن‌ها انجام نمی‌شود. بنابراین باید همیشه موارد ایمنی را هنگام کار کردن با چنین سلول‌های به شدت رعایت نمود. این در حالی است که در روش ترانسفکشن گذرا فقط طی چند روز ویروس عفونی تولید خواهد شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

از آن‌جایی که پلاسمید pCH-eGFP با پلاسمید ویروسی فقط در ناحیه preS2/S تفاوت دارد و به جای آن از ژن eGFP استفاده شده است، بنابراین بهینه‌سازی شرایط ترانسفکشن با پلاسمید pCH-eGFP می‌تواند در ادامه پژوهش برای ترانسفکش پلاسمید pCH-9/3091 استفاده شود. با بهینه‌سازی مقدار لیپوفکتامین مصرفی تا ۷۰ درصد کاهش یافت و از ۲ میکرولیتر طبق توصیه شرکت سازنده لیپوفکتامین به ۰/٦ میکرولیتر رسید. میزان آنتی‌ژن سطحی ویروس یا HBsAg سرمی منعکس کننده DNA ژنومی داخل سلول‌های کبدی است و می‌تواند در کنار بررسی DNA ژنومی برای پیگیری بیماران مزمن کبدی ارزشمند باشد [٤١]. بنابراین تولید HBsAg در مایع رویی سلول‌های Huh-7 نشان دهنده تکثیر فعال ویروس است [٤٠]. حضور HBsAg در مایع رویی تا ۵ روز پس از ترانسفکشن سلول‌های Huh-7 (نتایج نشان داده نشده) بیانگر مفید بودن سیستم ترانسفکشن گذرا (Transient) در بسیاری از مطالعات دارویی است که نیازمند تیمار دارو و ویروس تا چندین روز است.

هدف از بهینه‌سازی و همچنین استفاده از آغازگرهای ویروسی با محصولات PCR کوتاه‌تر از ۲۰۰ جفت‌باز، مساعد کردن شرایط برای استفاده از این آغازگرها در آزمایش Real-Time PCR بود. با توجه به این مطلب طیف دمایی برای هر دو آغازگر ویروسی و همین‌طور ISGها انجام شد تا دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد که دمایی مطلوب در Real-time PCR است، استفاده شود.

در بیمارانی که دچار عفونت مزمن HBV هستند، درمان با IFN-α تا ٤٠ درصد توانایی پاک‌سازی شاخص‌های سرمی HBV و بهبود عملکرد کبدی را دارد. در مطالعه‌ای ارتباط بین پروتئین‌های Core و HBeAg در جلوگیری از پاسخ اینترفرون مشاهده شده است [٤٢]. مطالعات کِسکینن (Keskinen) و همکارانش نیز روی سلول‌های Huh-7 و HepG-2 نشان داد تلقیح ویروس‌های آنفلوانزا A (Influenza A) و سندایی (Sendai) روی سلول‌های ذکر شده تولید اینترفرون‌های تیپ I را القا نمی‌کند [٤٣]. البته درمان ضد ویروسی با داروی لامیوودین با کاهش بیان ژن‌های ویروسی و جلوگیری از تکثیر HBV می‌تواند به طور موقت بیان ISGها را به حالت اول بازگرداند. در مطالعه‌ای دیگر تأثیر پروتئین‌های HBV بر میزان بیان Mx در سلول‌های Huh-7 ترانسفکت شده بررسی شد و مشاهده شد القای بیان این ISG در این سلول‌ها به طور خاصی سرکوب می‌شود [٤٤]. با توجه به مطالب فوق و نتیجه PCR به‌دست آمده با آغازگرهای ISG بر سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید ویروسی، ممکن است تکثیر HBV در سلول‌های Huh-7 باعث بالا رفتن میزان ISGهایی که در این مطالعه بررسی شده‌است، نشود. این‌طور به نظر می‌رسد که HBV می‌تواند در میزان بیان ISGها تداخل ایجاد کند؛ به‌طوری که بیان ISG در رده‌های سلولی در حضور و عدم حضور HBV متفاوت خواهد بود [٤٤].

بنابراین این مطالعه نشان داد که بیان گذرای ژنوم HBV در سلول‌های Huh-7 روشی ساده و در عین حال دقیق برای مطالعات مولکولی روی ژنوم ویروس HBV، واسطه‌های تکثیری و تولید پروتئین‌های ویروسی است. همچنین برای بررسی اثر داروها، عصاره‌های گیاهی و مکانیسم‌های دخیل در ایجاد مقاومت‌های دارویی استفاده می‌شود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از رساله دانشجویی دکتری رشته ویروس‌شناسی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی آن دانشگاه انجام شده است.

منابع

[1] Peng J, Zhao Y, Mai J, Pang WK, Wei X, Zhang P, Xu Y. Inhibition of hepatitis B virus

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

replication by various RNAi constructs and their pharmacodynamic properties. J Gen Virol 2005; 86(Pt 12): 3227-34.

[2] Snyder LL, Esser JM, Pachuk CJ, Steel LF. Vector design for liver-specific expression of multiple interfering RNAs that target hepatitis B virus transcripts. Antiviral Res 2008; 80(1): 36-44.

[3] Grimm D, Kay MA. Therapeutic short hairpin RNA expression in the liver: viral targets and vectors. Gene Ther 2006; 13(6): 563-75.

[4] Alavian SM, Hajarizadeh B, Ahmadzad-Asl M, Kabir A, Bagheri-Lankarani K. Hepatitis B Virus Infection in Iran: A Systematic Review. Hep Mon 2008; 8(4): 281-94.

[5] Deng L, Li G, Xi L, Yin A, Gao Y, You W, Wang X, Sun B. Hepatitis B virus inhibition in mice by lentiviral vector mediated short hairpin RNA. BMC Gastroenterol 2009; 9: 73.

[6] Radhakrishnan SK, Layden TJ, Gartel AL. RNA interference as a new strategy against viral hepatitis. Virology 2004; 323(2): 173-81.

[7] Cuestas ML, Mathet VL, Oubiña JR, Sosnik A. Drug delivery systems and liver targeting for the improved pharmacotherapy of the hepatitis B virus (HBV) infection. Pharm Res 2010; 27(7): 1184-202.

[8] Chen Y, Cheng G, Mahato RI. RNAi for treating hepatitis B viral infection. Pharm Res 2008; 25(1): 72-86.

[9] Arbuthnot P, Longshaw V, Naidoo T, Weinberg MS. Opportunities for treating chronic hepatitis B and C virus infection using RNA interference. J Viral Hepat 2007; 14(7): 447-59.

[10] Seeger C, Zoulim F, Mason WS. Hepadnaviruses. In: Howley P, and Knipe D, (Eds). Fields Virology. Lippincott, 2007; p: 2977-3029.

[11] Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ; Risk Evaluation of Viral Load Elevation and Associated Liver Disease/ Cancer-In HBV (the REVEAL-HBV) Study Group. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. Gastroenterology 2006; 130(3): 678-86.

[12] Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH; REVEAL-HBV Study Group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. JAMA 2006; 295(1): 65-73.

[13] Arbuthnot P, Carmona S, Ely A. Exploiting the RNA interference pathway to counter hepatitis B virus replication. Liver Int 2005; 25(1): 9-15.

[14] Carmona S, Jorgensen MR, Kolli S, Crowther C, Salazar FH, Marion PL, Fujino M, Natori Y, Thanou M, Arbuthnot P, Miller AD. Controlling HBV replication in vivo by intravenous administration of triggered PEGylated siRNA-nanoparticles. Mol Pharm 2009; 6(3): 706-17.

[15] Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. World J Gastroenterol 2007; 13(1): 22-38.

[16] Lucifora J, Durantel D, Belloni L, Barraud L, Villet S, Vincent IE, Margeridon-Thermet S, Hantz O, Kay A, Levrero M, Zoulim F. Initiation of hepatitis B virus genome replication and production of infectious virus following delivery in HepG2 cells by novel recombinant baculovirus vector. J Gen Virol 2008; 89(Pt 8): 1819-28.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[17] Margeridon S, Carrouée-Durantel S, Chemin I, Barraud L, Zoulim F, Trépo C, Kay A. Rolling circle amplification, a powerful tool for genetic and functional studies of complete hepatitis B virus genomes from low-level infections and for directly probing covalently closed circular DNA. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(9): 3068-73.

[18] Durantel D, Brunelle MN, Gros E, Carrouée-Durantel S, Pichoud C, Villet S, Trepo C, Zoulim F. Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing. J Clin Virol 2005; 34 Suppl 1: S34-43.

[19] Waiyaput W, Payungporn S, Issara-Amphorn J, Panjaworayan NT. Inhibitory effects of crude extracts from some edible Thai plants against replication of hepatitis B virus and human liver cancer cells. BMC Complement Altern Med 2012; 12: 246.

[20] Zhang Y, Wu Y, Ye S, Wang T, Zhao R, Chen F, Abe K, Jin X. The response to interferon is influenced by hepatitis B virus genotype in vitro and in vivo. Virus Res 2013; 171(1): 65-70.

[21] Korba BE, Furman PA, Otto MJ. Clevudine: a potent inhibitor of hepatitis B virus in vitro and in vivo. Expert Rev Anti Infect Ther 2006; 4(4): 549-61.

[22] Shchelkunov SN, Shchelkunova GA. Plant-based vaccines against human hepatitis B virus. Expert Rev Vaccines 2010; 9(8): 947-55.

[23] Zhang YL, Cheng T, Cai YJ, Yuan Q, Liu C, Zhang T, Xia DZ, Li RY, Yang LW, Wang YB, Yeo AE, Shih JW, Zhang J, Xia NS. RNA Interference inhibits hepatitis B virus of different genotypes in vitro and in vivo. BMC Microbiol 2010; 10: 214.

[24] Sadler AJ, Williams BR. Interferon-inducible antiviral effectors. Nat Rev Immunol 2008; 8(7): 559-68.

[25] Blum HE, Galun E, Liang TJ, von Weizsäcker F, Wands JR. Naturally occurring missense mutation in the polymerase gene terminating hepatitis B virus replication. J Virol 1991; 65(4): 1836-42.

[26] Nassal M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. J Virol 1992; 66(7): 4107-16.

[27] Passman M, Weinberg M, Kew M, Arbuthnot P. In situ demonstration of inhibitory effects of hammerhead ribozymes that are targeted to the hepatitis Bx sequence in cultured cells. Biochem Biophys Res Commun 2000; 268(3): 728-33

[28] Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84(4): 1005-9.

[29] Christman JK, Gerber M, Price PM, Flordellis C, Edelman J, Acs G. Amplification of expression of hepatitis B surface antigen in 3T3 cells cotransfected with a dominant-acting gene and cloned viral DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1982; 79(6): 1815-9.

[30] Sun D, Rösler C, Kidd-Ljunggren K, Nassal M. Quantitative assessment of the antiviral potencies of 21 shRNA vectors targeting conserved, including structured, hepatitis B virus sites. J Hepatol 2010; 52(6): 817-26.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[31] Carmona S, Ely A, Crowther C, Moolla N, Salazar FH, Marion PL, Ferry N, Weinberg MS, Arbuthnot P. Effective inhibition of HBV replication in vivo by anti-HBx short hairpin RNAs. Mol Ther 2006; 13(2): 411-21.

[32] Clayton RF, Rinaldi A, Kandyba EE, Edward M, Willberg C, Klenerman P, Patel AH. Liver cell lines for the study of hepatocyte functions and immunological response. Liver Int 2005; 25(2): 389-402.

[33] Sitnik R, Paes A, Mangueira CP, Pinho JR. A real-time quantitative assay for hepatitis B DNA virus (HBV) developed to detect all HBV genotypes. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2010; 52(3): 119-24.

[34] Liang Y, Liu H, Liu B, Bai Y, Wu H, Zhou Q, Chen J. Detection of IFN Response of Non-Specific Effects on RNAi. Zhongguo Fei Ai Za Zhi 2009; 12(1): 16-22.

[35] Zoulim F. Hepatitis B virus resistance to antiviral drugs: where are we going? Liver Int 2011; 31 Suppl 1: 111-6.

[36] Chotiyaputta W, Lok AS. Hepatitis B virus variants. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2009; 6(8): 453-62.

[37] Lucifora J, Vincent IE, Berthillon P, Dupinay T, Michelet M, Protzer U, Zoulim F, Durantel D, Trepo C, Chemin I. Hepatitis B virus replication in primary macaque hepatocytes: crossing the species barrier toward a new small primate model. Hepatology 2010; 51(6): 1954-60.

[38] Favre D, Petit MA, Trépo C. Latent hepatitis B virus (HBV) infection and HBV DNA integration is associated with further transformation of hepatoma cells in vitro. ALTEX 2003; 20(3): 131-42.

[39] Guha C, Mohan S, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. Cell culture and animal models of viral hepatitis. Part I: hepatitis B. Lab Anim (NY) 2004; 33(7): 37-46.

[40] Chang CM, Jeng KS, Hu CP, Lo SJ, Su TS, Ting LP, Chou CK, Han SH, Pfaff E, Salfeld J. Production of hepatitis B virus in vitro by transient expression of cloned HBV DNA in a hepatoma cell line. EMBO J 1987; 6(3): 675-80.

[41] Sonneveld MJ, Zoutendijk R, Janssen HL. Hepatitis B surface antigen monitoring and management of chronic hepatitis B. J Viral Hepat 2011; 18(7): 449-57.

[42] Fernández M, Quiroga JA, Carreño V. Hepatitis B virus downregulates the human interferon-inducible MxA promoter through direct interaction of precore/core proteins. J Gen Virol 2003; 84(Pt 8): 2073-82.

[43] Keskinen P, Nyqvist M, Sareneva T, Pirhonen J, Melén K, Julkunen I. Impaired antiviral response in human hepatoma cells. Virology 1999; 263(2): 364-75.

[44] Guan SH, Lu M, Grünewald P, Roggendorf M, Gerken G, Schlaak JF. Interferon-alpha response in chronic hepatitis B-transfected HepG2.2.15 cells is partially restored by lamivudine treatment. World J Gastroenterol 2007; 13(2): 228-35.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]