

尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶 4 上调 乙型肝炎病毒表面抗原基因 启动子 II 表达的研究

杨艳杰 成军 王琦 郭江

【摘要】 目的 研究乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原基因启动子 II(SP II)与肝细胞蛋白——尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶 4(NADHDH4)结合机制及其调节功能。**方法** 应用聚合酶链反应(PCR)技术,参照 HBV ayw 基因序列与 NADHDH4 cDNA 序列全编码区设计相应引物,以 pCP10 质粒及肝母细胞瘤细胞系 HepG2 基因组 DNA 为模板,扩增 SP II 和 NADHDH4 的 DNA 片段,将其分别克隆至 pCAT3 及 pcDNA3.1(-)中,构建 pCAT3-SP II 报告基因表达载体和 pcDNA3.1(-)-NADHDH4 真核表达载体,以其质粒共转染 HepG2 细胞。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 pCAT3-SP II 报告基因表达载体对 pcDNA3.1(-)-NADHDH4 真核表达载体的调节活性。**结果** 成功构建了 pCAT3-SP II 报告基因表达载体和 pcDNA3.1(-)-NADHDH4 真核表达载体,pCAT3-SP II 实验组酶表达为 pCAT3 的 2.8 倍,而 pcDNA3.1(-)-NADHDH4 + pCAT3-SP II 实验组酶表达约为 pCAT3-SP II 的 5 倍,结果显示 NADHDH4 对 HBV SP II 具有上调作用。**结论** 共转染实验证实了 NADHDH4 对 SP II 有明显的上调作用,为进一步阐明乙型肝炎病毒致病的分子生物学机制奠定了基础。

【关键词】 肝炎病毒,乙型;抗原,表面;转录启动子;尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶 4

Up-regulation of nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase 4 on surface antigen gene promoter II of hepatitis B virus YANG Yanjie, CHENG Jun, WANG Qi, GUO Jiang. *Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China*

【Abstract】 Objective To investigate the potential role of HBV SP II promoter DNA-binding protein on regulation of HBV replication. **Methods** HBV SP II and nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase 4 (NADHDH4) sequences were

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2011.03.001

基金项目:国家自然科学基金项目(C03011402、C30070689)

作者单位:06700 承德市,河北省承德市解放军第 266 医院感染科(杨艳杰);首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所(成军、王琦、郭江)

通讯作者:成军,Email:chengjdt@ccmu.edu.cn

amplified by polymerase chain reaction (PCR) with pCP10 plasmid DNA and HepG2 cell (hepatoblastoma cell line) genomic DNA as the templates, respectively. The amplified product was cloned into pCAT3 and pcDNA3.1(-) vector, with the resulted plasmids designated as pCAT3-SP II and pcDNA3.1(-)-NADHDH4. The HepG2 cell line was transfected by pCAT3-SP II and pcDNA3.1(-)-NADHDH4. The catalase (CAT) activity was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** pCAT3-SP II reporter gene expression vector and pcDNA3.1(-)-NADHDH4 eukaryotic expression vector were successfully constructed. The expression of pCAT3-SP II was 2.8 times as high as the negative control plasmid pCAT3-basic, while pCAT-SP II + pcDNA3.1(-)-NADHDH4 expression was nearly 5 times as high as the pCAT3-SP II plasmid. **Conclusions** It indicates that NADHDH4 can up-regulate HBV SP II promoter.

【Key words】 Hepatitis B virus; Antigen, surface; Transcription initiation site; Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase 4 (NADHDH4)

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染不仅能够引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生发展密切相关^[1-2]。但目前除了部分乙型肝炎患者对于干扰素 α (IFN- α) 以及部分患者对于核苷(酸)类似物治疗有应答之外, 尚缺乏确切有效的治疗方法^[3-4]。其主要原因为对 HBV DNA 复制的分子生物学机制尚不十分清楚, 因此需要寻找新的治疗靶点。

本实验利用噬菌体展示技术, 以 DNA 为固相支持分子, 筛选人肝细胞 cDNA 文库, 获得了与 HBV 表面抗原启动子 II (SP II) 结合的肝细胞蛋白——尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶 4 (nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase 4, NADHDH4), 为国内外率先进行的以噬菌体展示技术筛选启动子结合蛋白的研究。为深入研究其和 HBV 表面抗原启动子 II 结合的机制及功能, 本实验分别构建报告载体和表达载体共转染细胞, 进一步阐明了两者之间相互作用的分子生物学意义, 为深入研究 HBV 复制的分子生物学机制提供新的理论基础。

材料和方法

一、材料

质粒 pGEM-Teasy 和 pcDNA3.1(-)、pCAT3 Basic (Promega 公司), Taq 酶、琼脂糖、dNTPs、T4 DNA 连接酶、RNA 酶、玻璃奶 DNA 回收试剂盒 (北京博大科技公司), Kpn I、Xho I、Mlu I、Nhe I (北京晶能生物公司), 热循环仪、凝胶成像仪、酶联吸附读数仪 (美国 Thermo 公司), 大肠埃希菌 DH5 α 、pCP10 质粒为本实验室保存。

二、方法

1. HBV 表面抗原启动子 II 的扩增和克隆: 根据 HBV ayw 的基因序列, 用 Vector NT I 软件设计引物, 在编码区上下游分别设计合成一对寡核苷酸引物,

P1:5'-ACGCGTACCACCACTTGGATC-3', P2:5'-GCTAGCTGAGGATGACTGTTTC-3'。在引物 5'-端分别引入 *Mlu* I 和 *Nhe* I 位点(赛百盛公司合成)。

2. 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶 4 的扩增和克隆:根据 NADHDH4 cDNA 序列,包含从 ATG 至 TAA 为止的全编码区,用 Vector NT I 软件设计引(引物由上海申友公司合成)。P3:5'-CTCGAGATGCTAAACTAATCGTC-3',在 5'-端引入 *Kpn* I 酶切位点,P4:5'-GGTACCACTATATTTACAAGAGG-3',在 5'-端引入 *Xho* I 酶切位点。

3. 重组报告载体 pCAT3-SP II 的构建与鉴定:将 HBV 表面抗原启动子 II PCR 纯化产物与 pGEM-Teasy 载体混合,在 16℃ 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜,随后转化用氯化钙法制备的大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,在铺有 IPTG/X-gal 的氨苄西林平板上进行蓝白斑菌落筛选,挑取白色菌落用碱裂解法提取质粒,进行酶切鉴定。此质粒及 pCAT3 Basic 均用 *Mlu* I 和 *Nhe* I 双酶切,回收相应的酶切片段,在 16℃ 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜,随后转化用氯化钙法制备的大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,随机挑选在 LB/Amp 平板上生长的菌落,碱裂解法提取质粒,进行 *Mlu* I 和 *Nhe* I 双酶切鉴定。

4. 重组表达载体 pcDNA3.1(-)-NADHDH4 的构建与鉴定:将 NADHDH4 的 PCR 纯化产物与 pGEM-Teasy 载体混合,在 16℃ 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜,随后转化用氯化钙法制备的大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,在铺有 IPTG/X-gal 的氨苄西林平板上进行蓝白斑菌落筛选,挑取白色菌落用碱裂解法提取质粒,进行酶切(*Kpn* I/*Xho* I)及测序鉴定。然后将此质粒及载体 pcDNA3.1(-)均用 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切,回收相应的酶切片段,在 16℃ 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜,随后转化用氯化钙法制备的大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,随机挑选在 LB/Amp 平板上生长的菌落,碱裂解法提取质粒,进行 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。

5. 细胞培养及转染:分别用磁珠法提取质粒,将 pCAT3 basic、pCAT3 + pcDNA3.1(-)、pCAT3-SP II 和 pCAT3-SP II + pcDNA3.1(-)-NADHDH4 通过脂质体瞬时共转染 HepG2 细胞,HepG2 细胞系在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中生长。细胞生长至 50% ~ 80% 融合度时采用脂质体转染法,具体转染方法参照 Lipofectamine Reagent 说明书进行。上述质粒转染 48 h 后收获细胞。采用 ELISA 法检测氯霉素乙酰转移酶(catalase, CAT)的表达,研究 pcDNA3.1(-)-NADHDH4 对 pCAT3-SP II 功能的影响。

结 果

一、pCAT3-SP II 重组质粒的酶切鉴定

利用自行设计的引物 P1/P2 成功扩增出 HBV 表面抗原启动子 II 基因片段,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段约为 274 bp,与预期大小符合,且无非特异扩增现象。用双酶切所得目的片段,连接到以相同的 *Mlu* I 和 *Nhe* I 所切的 pCAT3 中经酶切鉴定结果正确。表明 pCAT3-SP II 质粒构建成功(图 1)。

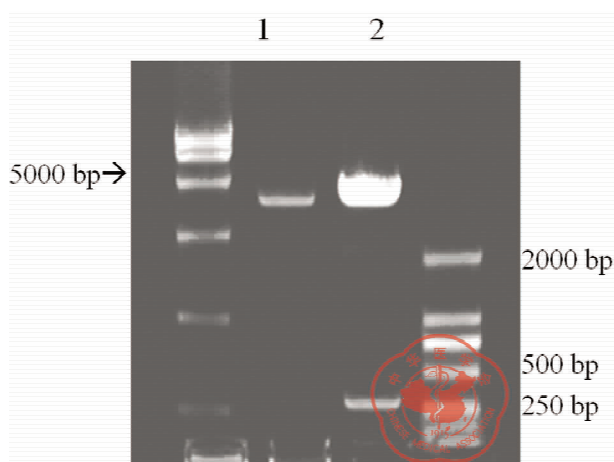


图 1 pCAT3-SP II 重组质粒的酶切鉴定
注:1:pCAT3-basic *Mlu*I/*Nhe*I 对照;2:pCAT3-SP II *Mlu*I 和 *Nhe*I 双酶切

二、pcDNA3.1(-)-NADHDH4 重组质粒的酶切鉴定

利用自行设计的引物 P3/P4 成功扩增出基因片段,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段约为 1389 bp,与预期大小符合,且无非特异扩增现象。用双酶切所得目的片段,连接到用相同的 *Kpn*I 和 *Xho*I 所切的 pcDNA3.1(-) 中经酶切鉴定结果正确。表明 pcDNA3.1(-)-NADHDH4 质粒构建成功(图 2)。

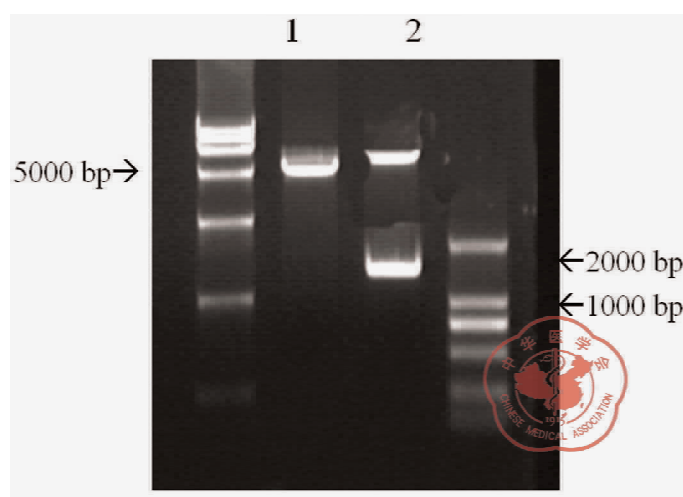


图 2 pcDNA3.1(-)-NADHDH4 重组质粒的酶切鉴定
注:1:pcDNA3.1(-) *Kpn*I/*Xho*I 酶切;2:pcDNA3.1(-)-NADHDH4 *Kpn*I/*Xho*I 酶切

三、pcDNA3.1(-)-NADHDH4 对 pCAT3-SP II 的激活作用

用脂质体法转染 HepG2 细胞,脂质体用量 6 μ l。培养 48 小时后,以 ELISA 法进行检测。氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达见表 1,pCAT3-SP II 实验组酶的表达为 pCAT3 的 2.8 倍,而 pcDNA3.1(-)-NADHDH4 + pCAT3-SP II 实验组酶的表达为 pCAT3-SP II 的近 5 倍,证明 NADHDH4 对 HBV SP II 有上调作用。

表 1 NADHDH4 对 HBV SP II 转录表达的上调作用

质粒	吸光度值(A)
pCAT3 Basic	0.137
pCAT3-SP II + pcDNA3.1(-)	1.634
pCAT3-SP II	0.388
pCAT3-SP II + pcDNA3.1(-)-NADHDH4	1.939

讨 论

乙型病毒性肝炎是一种世界性的传染病,我国为 HBV 感染的高发区,约 50%~70% 人群曾受 HBV 感染,约 8%~12% (约 1 亿) 人群为乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)携带者。因此,HBV 感染是我国严重的公共卫生问题之一。目前,虽已有乙肝疫苗用于预防 HBV 感染,但现有乙型肝炎患者及病毒携带者的治疗在今后至少 50 年内仍然是一个严重的问题。因此,研究 HBV 结构和功能,探讨 HBV 基因的特点和性质,探索 HBV 感染的防治措施十分必要^[5]。

乙型肝炎病毒为含有一段单股区的双链环状 DNA 病毒,属嗜肝 DNA 病毒科,其基因组结构紧密,仅约 3200 个碱基(bp),但可以最小容量发挥其高效功能。可分为结构基因序列和调节基因序列两部分,两者具有相互重叠的特点。HBV 负链核苷酸序列至少有 4 个开放读码框(ORF):C、P、S 和 X 基因,分别编码核壳、聚合酶、外膜蛋白和 X 蛋白^[6]。4 种 ORF 分别有各自的启动子。HBV 外膜蛋白能使病毒由感染的细胞分泌,并能附着和侵入新的细胞;同时其也是引起宿主保护性应答的抗原表位^[7-11]。SP II 启动子(2809~3152 nt)调节 2.1 kb mRNA 转录,编码中蛋白和主蛋白。SP II 启动子不含典型的 TATA 盒,但含有不典型的 TATA 样序列(-25~-32 bp),有启动子的特异活性,可与胞核提取物特异结合。SP II 中含 CCAAT 短序列,是一种调节外膜蛋白正常比率的重要因素,正调节 S 转录,促使主蛋白产量增加;负调节前-S1 基因的转录,使大蛋白产量减少,从而维持大/主蛋白 < 1/5 的正常比率。总之,SP II 启动子至少有 6 个负责正调节的转录因子结合位点(A~E、G)和 1 个负调节的转录因子结合位点(F)^[12-15]。因此,HBV 生活周期中,作为指导 S 基因组 RNA 转录的 SP II 启动子序列具有较为重要的作用。通过研究与 HBV 基因表达调控结合的肝细胞特异性蛋白质因子,对了解 HBV 致病机理、HBV 与肝癌的关系以及乙型肝炎和肝癌的预防和治疗均有着重要意义。

研究与肝炎病毒蛋白结合的肝细胞蛋白的技术有很多,除利用 λ 噬菌体、醇

母双杂交系统外,噬菌体展示技术也可达到同样目的^[16-18]。近年来随着 cDNA 噬菌体文库的构建和应用,逐渐认识到噬菌体表面展示技术在 DNA 结合蛋白的分离和鉴定方面也具有十分重要的应用前景。噬菌体展示技术是以改构的噬菌体为载体,将待选基因片段定向插入噬菌体外壳蛋白质基因区,使外源多肽或蛋白质表达并展示于噬菌体表面,进而通过亲和富集法筛选表达有特异肽或蛋白质的噬菌体,最终获得具有特异结合性质的多肽/蛋白质,并实现基因克隆化的重要分子生物学技术^[19-21]。此项研究首先设计肝炎病毒基因启动子序列 DNA 的特异性引物,并且将引物之一预先进行生物素化,以便此后的固相化。然后应用 PCR 扩增技术对目的基因片段进行扩增、纯化。以链亲和素包被免疫筛选板,当加入 PCR 扩增的启动子 DNA 时,通过生物素间的相互结合,将启动子 DNA 固相化。由于只有一端结合到链亲和素上,因此这些 DNA 片段有一定的自由取向空间,为以后的噬菌体结合留有空间。将肝细胞 cDNA 文库的表达型噬菌体加入到结合体系之中,能够与 HBV DNA 结合的噬菌体留下来,否则在淘洗过程中被洗掉。对结合的噬菌体载体中插入的基因序列进行分析,结合生物信息学技术的分析和比较,就可以确定与 HBV DNA 结合蛋白的编码基因。

为进一步研究肝细胞蛋白与 HBV 表面抗原基因启动子 II 相互作用的机制,本研究利用噬菌体表面展示技术,通过链亲和素-生物素作用,以 DNA 为固相支持分子,筛选人肝细胞 cDNA 文库,研究 HBV 启动子结合蛋白,并成功获得了 4 个阳性克隆,经序列测定和分析与 NADH4 基因高度同源^[22]。有文献报道在酒精性脂肪性肝病的发病机制中,酒精氧化使 NAD^+ 转变为 NADH ,从而使 NAD^+/NADH 比值下降;这使一些以 NAD^+ 为辅酶的反应受阻,乳酸/丙酮酸和 β -羟丁酸/乙酰乙酸比值升高^[23]。通过磷酸甘油穿梭机制、苹果酸-天冬氨酸穿梭机制进入线粒体的 NADH 增多,而 NADH 可抑制三羧酸循环(TCA)和脂肪酸的 β -氧化,从而使 ATP 生成减少,肝内脂肪酸蓄积;另外, NADH 还可促进 α -磷酸甘油的生成,且能使脂肪合成酶活性亢进,这均促进肝脏脂肪的合成^[24]。本研究结果认为 HBV SP II 启动子可以和 NADH4 蛋白的羧基末端结合,并推测该酶可能在乙型肝炎病毒持续感染导致慢性化及最终发展为肝细胞癌分子生物学机制中发挥一定作用,但其更深入的功能和意义有待进一步研究和验证。

参 考 文 献

- 1 Chan HL, Hui AY, Wong ML, et al. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2004, 3(11):1494-1503.
- 2 Liu S, Zhang H, Gu C, et al. Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101(6):1066-1072.
- 3 Fiorino S, Conti F, Gramenzi A, et al. Vitamins in the treatment of chronic viral hepatitis. *Br J Nutr*, 2011, 24(3):1-9.
- 4 Margeridon-Thermet S, Shafer RW. Comparison of the mechanisms of drug resistance among HIV, hepatitis B, and hepatitis C. *Viruses*, 2010, 2(15):2696-2704.
- 5 贾继东, 庄辉. 中国慢性乙型肝炎治疗进展研讨会会议纪要. *中华肝病杂志*, 2004, 12(3):698-702.
- 6 Lee JM, Ahn SH. Quantification of HBsAg: Basic virology for clinical practice. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(2):283-285.

- 7 Woltman AM, Op den Brouw ML, Biesta PJ, et al. Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function. *PLoS One*, 2011, 6(1): e15324.
- 8 Mallet V, Vallet-Pichard A, Pol S. The impact of human immunodeficiency virus on viral hepatitis. *Liver Int*, 2011, 31(Suppl 1): 135-142.
- 9 Hadziyannis SJ. Milestones and perspectives in viral hepatitis B. *Liver Int*, 2011, 31(Suppl 1): 129-134.
- 10 Leung KS, Lee KH, Wang JF, et al. Data mining on DNA sequences of hepatitis B virus. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform*, 2011, 8(5): 428-433.
- 11 Lin CL, Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: recent advances. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(Suppl 1): 123-142.
- 12 He XX, Lin JS, Chang Y, et al. Effects of two novel nucleoside analogues on different hepatitis B virus promoters. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(6): 1836-1844.
- 13 Jorge SA, Santos AS, Spina A, et al. Expression of the hepatitis B virus surface antigen in *Drosophila* S2 cells. *Cytotechnology*, 2008, 7(1): 51-58.
- 14 Rui E, Moura PR, Gonçalves KA, et al. Interaction of the hepatitis B virus protein HBx with the human transcription regulatory protein p120E4F in vitro. *Virus Res*, 2006, 115(1): 31-37.
- 15 Yoo YG, Lee MO. Hepatitis B virus X protein induces expression of Fas ligand gene through enhancing transcriptional activity of early growth response factor. *J Biol Chem*, 2004, 279(56): 36242-36248.
- 16 Jia L, Yu J, Song H, et al. Screening of human antibody Fab fragment against HBsAg and the construction of its dsFv form. *Int J Biol Sci*, 2008, 4(2): 103-108.
- 17 Yang GH, Yoon SO, Jang MH, et al. Affinity maturation of an anti-hepatitis B virus PreS1 humanized antibody by phage display. *J Microbiol*, 2007, 45(3): 528-534.
- 18 Wen WH, Qin WJ, Gao H, et al. An hepatitis B virus surface antigen specific single chain of variable fragment derived from a natural immune antigen binding fragment phage display library is specifically internalized by HepG2. 2. 15 cells. *J Viral Hepat*, 2007, 14(4): 512-518.
- 19 Kim SJ, Jang MH, Ahn HJ, et al. Selection of an affinity-matured antibody against a defined epitope by phage display of an immune antibody library. *J Immunol Methods*, 2008, 329(2): 176-179.
- 20 Zhang JL, Gou JJ, Zhang ZY, et al. Screening and evaluation of human single-chain fragment variable antibody against hepatitis B virus surface antigen. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2006, 5(3): 237-241.
- 21 Tan WS, Tan GH, Yusoff K, et al. A phage-displayed cyclic peptide that interacts tightly with the immunodominant region of hepatitis B surface antigen. *J Clin Virol*, 2005, 34(2): 35-42.
- 22 钟彦伟, 成军, 刘妍, 等. 可溶性 HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链抗体在大肠埃希菌中的表达. *肝脏*, 1999, 4(2): 73-75.
- 23 Hollingshead BD, Patel RD, Perdew GH. Endogenous hepatic expression of the hepatitis B virus X-associated protein 2 is adequate for maximal association with aryl hydrocarbon receptor-90-kDa heat shock protein complexes. *Mol Pharmacol*, 2006, 70(12): 2096-2102.
- 24 Lindros KO, Jarvelainen HA. A new oral low-carbohydrate alcohol liquid diet producing liver lesions: a preliminary account. *Alcohol*, 1998, 33(5): 347-351.

(收稿日期: 2010-12-31)

(本文编辑: 孙荣华)

杨艳杰, 成军, 王琦, 等. 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶 4 上调乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 II 表达的研究[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2011, 5(3): 258-264.