

HBV 表面抗原大蛋白与 C53 蛋白在肝细胞内的相互作用研究

宋博 曲思麦

【摘要】 目的 采用酵母双杂交方法筛选出肝细胞内 HBV 表面抗原大蛋白(LHBs)的结合蛋白,并验证 LHBs 与 C53 蛋白在肝细胞内的相互作用。**方法** 构建 pGBKT7-LHBs 作为诱饵质粒,从人肝脏 cDNA 文库中筛选与其相互作用蛋白的编码基因,发现其中包括 C53 基因。分别构建 pCMV-5a-C53 和 pACT-C53 质粒,采用哺乳动物双杂交及免疫共沉淀的实验方法验证肝癌细胞系 HepG2 内这两种蛋白之间的相互作用。**结果** 成功从肝脏 cDNA 文库筛选出 C53 蛋白;成功构建了 pCMV-5a-C53 和 pACT-C53 质粒,并通过哺乳动物双杂交及免疫共沉淀方法明确了 LHBs 及 C53 在肝细胞内的相互作用。**结论** 肝癌细胞系 HepG2 中 LHBs 及 C53 存在明确的相互作用,为进一步研究二者的相互作用及对相关生物学功能的影响奠定了前期基础。

【关键词】 乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白;C53 蛋白;相互作用

Research on interaction between hepatitis B virus large surface protein and C53 in liver cell lines

SONG Bo, QU Si-mai. Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China

Corresponding author: SONG Bo, Email: songbo165@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To screen the proteins from human liver cDNA library which could interact with large surface protein (LHBs) and identify the interaction between LHBs and C53 in HepG2 cells.

Methods The interactive proteins were screened from human liver cDNA library by the reconstructed plasmid pGBKT7-LHBs. The plasmids pCMV-5a-C53 and pACT-C53 were reconstructed. The interaction between LHBs and C53 in liver cell line HepG2 was identified by mammalian two-hybrid and co-immunoprecipitation (CO-IP) methods. **Results** C53 was screened from human liver cDNA library by LHBs. The plasmids pCMV-5a-C53 and pACT-C53 were successfully reconstructed. LHBs and C53 had interaction in HepG2 cells determined by mammalian two-hybrid and CO-IP methods. **Conclusions** The interaction between LHBs and C53 was clear and further functional research would be done.

【Key words】 Hepatitis B virus large surface protein (LHB); C53 protein; Interaction

乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白(hepatitis B virus large surface protein, LHBs) (Pre-S1 + Pre-S2 + S 基因编码)是乙型肝炎病毒 3 种包膜蛋白之一,近年来对 LHBs 表达在乙型病毒性肝炎发病机制中的作用,与病毒复制、糖脂类代谢以及肿瘤发生的关系等方面的深入研究,已证明其具有重要的临床意义^[1]。有研究表明,LHBs 前-S 区的两种主要突变与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生密切相关^[2-3]。因此,本研究应用酵母双杂交技术筛选出人肝脏 cDNA 文库中的 LHBs 结合蛋白基因 C53,随后通过哺乳动物双杂交及免疫共沉淀实验进一步验证二者之间的相互作用,为研究 HBV 慢性感染在相关

肿瘤的发生及发展过程中所起的作用及其机制提供一定的实验依据。

材料与方法

一、材料

人肝脏 cDNA 文库、酵母双杂交系统试剂盒及酵母双杂交试验相关培养基均购自美国 Clontech 公司。实验中所用抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;引物合成及测序由北京金唯智生物技术公司完成。

二、方法

1. 人肝脏 cDNA 文库中 LHBs 相互作用蛋白的筛选:酵母表达载体 pGBKT7-LHBs 由本研究所构建^[4],以其作为诱饵质粒转化酵母菌株 AH109 后鉴定正确,与人肝脏 cDNA 文库质粒转化的酵母菌株 Y187 配合。配合产物在铺有 X-α-gal 的

SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基上生长 16 d 后,仍在此培养基上生长且变成蓝色的为阳性菌落。

阳性质粒的分析:挑取上述阳性菌落,扩大培养后用酸化玻璃珠法提取酵母质粒,再行电穿孔法转化大肠埃希菌,再次扩大培养后提取质粒酶切并测序,与人类基因组数据库进行比对分析。

2. 质粒构建:根据人类基因组数据库序列(GenBank accession:NM 176096.1),分别设计上、下游引物(5'-TCTAGAACATGGAGGACCATCAGCAGG T-3' 和 5'-GGTACCCAGAGAGGTTCCCATCAGGT-3'),在引物两端分别引入 *Kpn* I 和 *Xba* I 限制性内切酶的特异性酶切位点。反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 45 s,60℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 2 min,30 个循环;72℃ 保温 10 min,4℃ ∞。PCR 产物回收与 pGEM-T 载体连接,于 16℃ 连接过夜,转化 *E. coli* DH5α 感受态菌提取质粒,经酶切及测序比对分析鉴定正确后,双酶切产物连接 pCMV-5a 和 pACT 后以同样方法鉴定分析。

3. 细胞培养及质粒转染:HepG2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,2 d 传代 1 次。转染前 1 天,按 5×10^5 个/孔细胞密度计数,接种 6 孔培养板。转染时 DNA 量约 4 μg/孔并分为实验组和阴性对照组。

4. 哺乳动物双杂交:转染分为 6 组:(1)阳性对照组:质粒 pACT-myoD、pBIND-Id 和 pG5Luc 共转染;(2)实验组:质粒 pACT-C53、pBIND-LHBs 和 pG5Luc 共转染;(3)阴性对照组 1:质粒 pACT、pBIND 和 pG5Luc 共转染;(4)阴性对照组 2:质粒 pACT-C53、pBIND 和 pG5Luc 共转染;(5)阴性对照组 3:质粒 pACT、pBIND-LHBs 和 pG5Luc 共转染;(6)空细胞组。

质粒转染细胞 24 h 后裂解细胞,以 PBS 液洗涤细胞,每孔加入 Passive Lysis buffer,室温裂解 15 min,使细胞充分裂解,收集细胞裂解液置于冰上,离心后每孔取 20 μl 细胞裂解液加入微孔板,检测 Firefly Luciferase 和 Renilla Luciferase 双荧光值。

5. 免疫共沉淀:质粒 pCDNA3.1-myc-his(-)-LHBs 由本研究所构建及保存。质粒转染细胞 48 h 后,实验组和各阴性对照组均用非变性细胞裂解液裂解细胞,提取总蛋白,行免疫共沉淀实验:PBS 液洗涤细胞 2 次;细胞培养板每孔中加入 600 μl 预冰冷的非变性细胞裂解液使细胞完全裂解;抽提细胞内蛋白后,加入 Protein-G/A Beads,4℃ 振摇 3~4 h;离心收集上清后,加入 c-myc 单抗 4℃,振摇过夜;再次加入适量的 Protein-G/A Beads,振摇后离心弃上

清;非变性细胞裂解液洗涤沉淀后,离心弃上清;向沉淀中加入适量的 5× SDS 缓冲液,高温煮沸,离心收集上清,即可用于蛋白电泳及蛋白免疫印迹实验。

6. SDS-PAGE 及 Western blot 检测:设单转染 pCMV-5a-LHBs 组、实验组及阴性对照组,各级一抗均采用抗-LHBs(1:500 稀释),4℃ 封闭过夜。二抗均采用 HRP-山羊抗小鼠 IgG(1:2000 稀释)。

三、统计学处理

所有数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数之间的比较用方差分析,多个样本均数两两之间的比较用 SNK-*q* 检验,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、pGBKT7-LHBs 质粒成功转化酵母菌 AH109 用醋酸锂法转化酵母菌株 AH109 后在缺陷型 SD-Trp 培养基上培养。4 d 后,挑取酵母菌落进行 PCR 扩增,结果显示转化成功(图 1)。

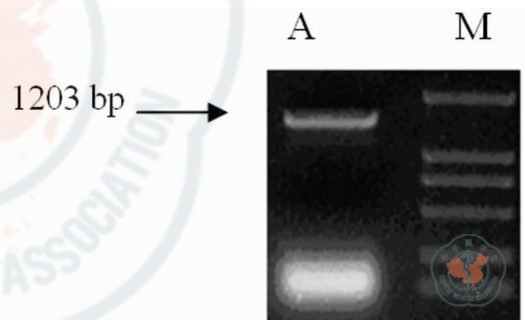


图 1 pGBKT7-LHBs 质粒转化 AH109 酵母菌株后菌落 PCR 鉴定图

注:M:DNA Marker;A:pGBKT7-LHBs 质粒转化 AH109 酵母菌株后单克隆菌株 PCR 扩增结果

二、自人肝脏 cDNA 文库中筛选出 C53 基因

通过酵母双杂交方法共筛选出 8 个阳性克隆,经测序后其中之一与人类基因组数据库进行同源序列比对分析,发现与 C53 基因(NM 176096.1)同源率为 100%(图 2)。

三、成功构建 pCMV-5a-C53 和 pACT-C53 质粒

构建的 pCMV-5a-C53 和 pACT-C53 质粒经双酶切及测序鉴定正确(图 3)。

四、哺乳动物双杂交实验结果

pACT-C53 和 pBIND-LHBs 共转染时,相对荧光素酶活性值较 pACT 和 pBIND 空载体转染组以及 pACT-C53 和 pBIND 空载体、pACT 空载体和 pBIND-LHBs 共转染组显著升高。分析结果表明,实验组和各阴性对照组相对荧光素酶活性值总体均数

比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)(表1)。结果提示,LHBs 与 C53 蛋白在 HepG2 细胞内存在相互作用。

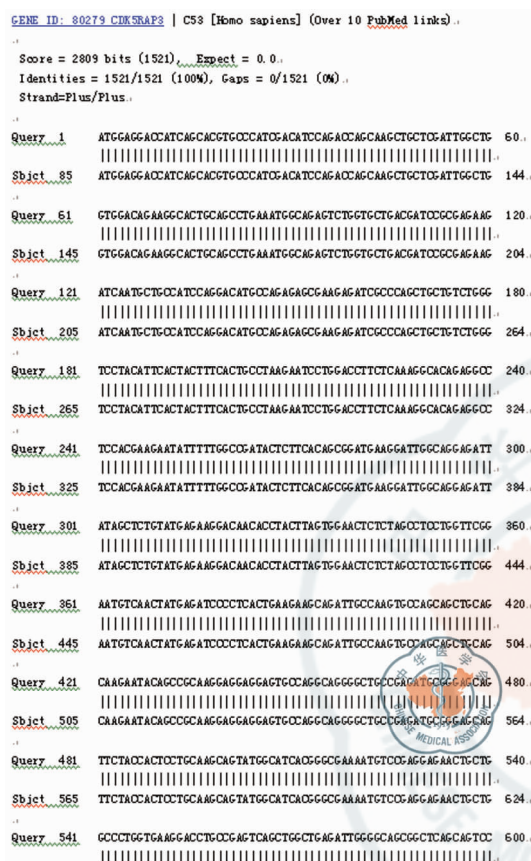


图2 酵母双杂交筛选阳性克隆

注:酵母双杂交筛选阳性克隆之一,其序列与人类基因组数据库进行同源序列比对分析发现,与 C53 基因 (NM 176096.1) 同源性为 100%

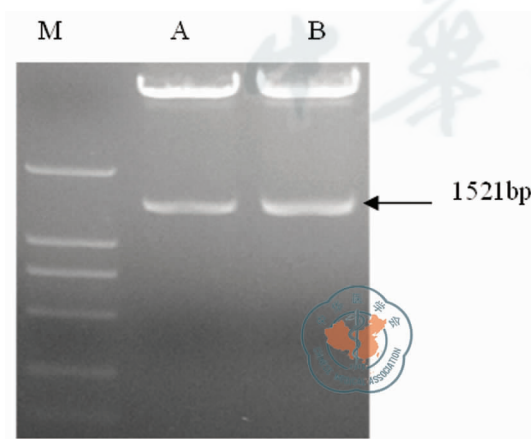


图3 pCMV-5a-C53 和 pACT-C53 质粒经双酶切及测序鉴定正确

注:M: DNA Marker; A: pCMV-5a-C53 质粒双酶切电泳图; pACT-C53 质粒双酶切电泳图

表1 哺乳动物双杂交实验结果

组别	例数	$\bar{x} \pm s$
实验组	3	0.0138 \pm 0.0023
阴性对照组		
1	3	0.0034 \pm 0.0008 ^a
2	3	0.0042 \pm 0.0006 ^a
3	3	0.0041 \pm 0.0010 ^a

注:^a对照组与实验组相比, $P < 0.01$

五、免疫共沉淀实验证实 LHBs 与 C53 蛋白在 HepG 2 细胞内存在相互作用

质粒 pCDNA3. 1-myc-his (-)-LHBs 和 C53 转染 HepG2 细胞后,分别用抗-FLAG 或抗-Myc 行 CO-IP实验及蛋白免疫印迹实验。结果提示 LHBs 与 C53 蛋白在 HepG2 细胞内存在明确的相互作用 (图4)。

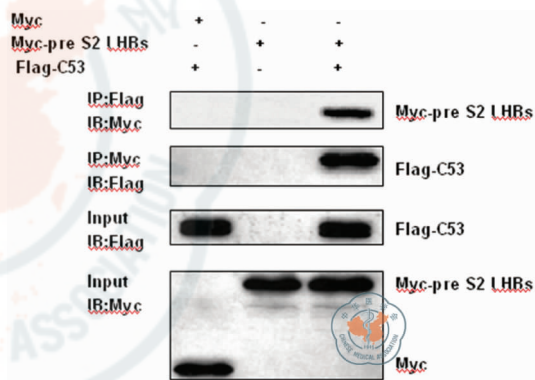


图4 LHBs 与 C53 蛋白在 HepG 2 细胞内的相互作用

讨 论

肝细胞癌是常见的恶性肿瘤,世界卫生组织统计数据显示,全球每年肝细胞癌新发病例约 63 万例,死亡人数近 60 万。我国每年新发肝细胞癌患者超过 30 万,病死率居各种肿瘤的第二位,且常见于中年男性。因其恶性度高、进展快,确诊时大多已属中晚期,治疗难度大、病死率高。肝细胞癌确诊后未得到有效治疗的患者,其中位生存期平均仅为 6 个月,5 年生存率 $< 5\%$ [5]。目前,已明确我国肝细胞癌主要致病因素是慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染,预后较差,其根本原因是 HBV 与肝细胞癌的发病机制至今未能完全明确、缺乏准确的早期诊断方法和有效的针对性治疗药物。因此,明确肝细胞癌尤其是 HBV 感染相关肝细胞癌的发病机制一直是肝细胞癌防治研究领域中的关键问题之一。

而 LHBs 与 HBV 慢性感染所致的慢性肝炎、肝

纤维化以及肝细胞癌密切相关^[6-9]。蛋白与蛋白之间相互作用构成了细胞生化反应网络的一个主要组成部分,蛋白-蛋白相互作用网络与转录调控网络对调控细胞及其信号转导有重要意义^[10-12]。由此,本实验研究了 LHBs 在肝细胞内的相互作用蛋白并进一步研究相关疾病的发病机制。

本研究通过体内及体外实验,发现 LHBs 与 C53 蛋白在肝细胞内存在明确的相互作用。本研究首先通过酵母双杂交实验初步发现了 LHBs 在人肝脏 cDNA 文库中存在相互作用蛋白——C53。随后通过哺乳动物双杂交及免疫共沉淀实验进一步证实了 LHBs 与 C53 蛋白在肝细胞内的相互作用。有研究表明 C53 基因可通过改变 Chk1 水平并影响其功能,进而加强 Cdk1 活性达到促进细胞有丝分裂的目的^[13-16]。LHBs 与 C53 蛋白的相互作用可能是肝细胞癌发病机制的一个环节,LHBs 通过与 C53 结合而进一步影响 Chk1 和 Cdk1 的功能及活性,进而促进细胞有丝分裂,尚需进一步的深入研究。

参 考 文 献

- 1 陈永健,周永列,夏骏,等. 血清乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白检测的临床意义与评价. 中华实验和临床病毒学杂志,2007,21(3):241-243.
- 2 Chan HL, Sung JJ. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. Semin Liver Dis,2006,26(2):153-161.
- 3 Fang ZL, Sabin CA, Dong BQ, et al. Hepatitis B virus pre-S deletion mutations are a risk factor for hepatocellular carcinoma: a matched nested case-control study. J Gen Virol,2008,89(Pt 11):2882-2890.
- 4 张维燕,张锦前,王琦,等. 酵母双杂交技术对人胰腺 cDNA 文库中 HBcAg 结合蛋白基因的筛选. 世界华人消化杂志,2008,16(16):1746-1750.
- 5 Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2009. CA Cancer J Clin,2009,59(4):225-249.
- 6 Eddleston A. Modern vaccines. Hepatitis. Lancet, 1990, 335(8698):1142-1145.
- 7 Fernholz D, Stemler M, Brunetto M, et al. Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce pre-S2 protein. J Hepatol 1991,13(Suppl 4):S102-S104.
- 8 Liu Q, Guntuku S, Cui XS, et al. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. Genes Dev,2000,14(12):1448-1459.
- 9 Takai H, Tominaga K, Motoyama N, et al. Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. Genes Dev,2000,14(12):1439-1447.
- 10 Brown EJ, Baltimore D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. Genes Dev,2000,14(4):397-402.
- 11 Syljuasen RG, Sorensen CS, Hansen LT, et al. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. Mol Cell Biol,2005,25(9):3553-3562.
- 12 Nojima H. G1 and S-phase checkpoints, chromosome instability, and cancer. Methods Mol Biol,2004,280:3-49.
- 13 Jiang H, Wu JC, He C, et al. A tumor suppressor C53 protein antagonizes checkpoint kinases to promote cyclin-dependent kinase 1 activation. Cell Res,2009,19:458-468.
- 14 Jiang H, Luo S, Li H. Cdk5 activator-binding protein C53 regulates apoptosis induced by genotoxic Sress via modulating the G2/M DNA damage checkpoint. J Biol Chem,2005,280(21):20651-20659.
- 15 Li H, Bergeron L, Cryns V, et al. Activation of caspase-2 in apoptosis. J Biol Chem,1997,272(34):21010-21017.
- 16 Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, et al. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. Cell,2003,114(5):585-598.

(收稿日期:2011-11-28)

(本文编辑:孙荣华)

宋博,曲思麦. 乙型肝炎表面抗原大蛋白与 C53 蛋白在肝细胞内的相互作用研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6(3):182-185.