

· 基础论著 ·

抑制O-糖基化修饰促进乙型肝炎病毒的释放

肖凡 乔雍 张仁雯 常路丝 成军 魏红山

【摘要】目的 探讨抑制O-糖基化修饰对乙型肝炎病毒颗粒组装的影响。**方法** 采用O-糖基化修饰抑制剂Benzyl- α -GalNAc干预HepG2.2.15细胞。经7-AAD染色,应用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。采用实时荧光定量PCR方法检测上清HBV病毒载量。应用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测上清乙型肝炎病毒大蛋白(the hepatitis B virus large surface protein, HBV LHBs)水平。采用蛋白免疫印迹(Western blot)方法检测细胞中LHBs蛋白含量。**结果** Benzyl- α -GalNAc能显著促进细胞凋亡,上清中HBV DNA和LHBs水平呈剂量依赖性增加;Benzyl- α -GalNAc抑制细胞中LHBs蛋白表达。**结论** 抑制细胞O-糖基化修饰促进细胞凋亡,从而释放HBV LHBs和病毒颗粒;但在某种程度上抑制细胞O-糖基化修饰能够抑制细胞内LHBs合成。

【关键词】 O-糖基化修饰;乙型肝炎病毒;包膜大蛋白

O-glycosylation inhibition induce HBV release XIAO Fan, QIAO Yong, ZHANG Ren-wen, CHANG Lusi, CHENG Jun, WEI Hong-shan. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University; Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China
Corresponding author: WEI Hong-shan, Email: drwei@ccmu.edu.cn

【Abstract】Objective To investigate the effect of the inhibition of O-glycosylation on HBV assembly. **Methods** HepG2.2.15 cells treated with O-glycosylation inhibitor, Benzyl- α -GalNAc, were dyed with 7-AAD and examined by FACS for cell apoptosis. HBV DNA loading in cell supernatant was determined by real-time PCR. HBV LHBs levels in cell supernatant was tested by ELISA. LHBs levels in cells was analyzed by Western blot. **Results** Benzyl- α -GalNAc could significantly induce cell apoptosis. HBV DNA and LHBs levels in cell supernatant were increased in a dose dependent manner. However, Benzyl- α -GalNAc inhibited LHBs synthesis. **Conclusions** Inhibition of O-glycosylation could induce cell apoptosis and release HBV LHBs and virus. In some extent, inhibition of O-glycosylation may inhibit LHBs synthesis.

【Key words】 O-glycosylation; Hepatitis B virus; The hepatitis B virus large surface protein

据世界卫生组织统计,全球约有3.5亿HBV携带者。慢性乙型肝炎是导致肝功能衰竭、肝硬化以及肝癌等肝病的主要原因^[1]。我国为HBV高度感染区。乙型肝炎是严重危害我国人民生活健康的重大疾病^[2]。目前关于HBV感染慢性化及导致肝硬化、肝癌的机制尚不明确。

在慢性肝炎患者血清中有22 nm大小的小球形颗粒、管状颗粒和42 nm的Dane颗粒,其中仅42 nm的Dane颗粒含有HBV基因组。这3种病毒颗粒是由3种膜蛋白(LHBs、MHBs、SHBs)以不同比例组装。这3种膜蛋白必须以合适比例存在才能组装成

Dane颗粒,而LHBs与Dane颗粒关系最为密切^[3]。本课题组前期实验结果也证实膜蛋白LHBs与HBV DNA复制密切相关,而且血清LHBs水平可以作为接受阿德福韦酯治疗的HBeAg阴性的乙型肝炎患者的预后指标^[4-5]。

蛋白质的O-糖基化修饰是发生在细胞质与细胞核内的、动态的蛋白质翻译后修饰方式^[6]。蛋白质O-糖基化参与调节分泌蛋白质的功能,提高蛋白质的稳定性和溶解度,保护蛋白不被蛋白酶降解^[7]。HBV pre-S2区的N-基化修饰是病毒颗粒分泌的必要条件。相对于HBV pre-S2区保守的N-糖基化修饰,O-糖基化修饰则不保守^[8]。近年研究表明,C和D基因型的HBV包膜蛋白LHBs的Thr³⁷位存在O-糖基化修饰^[9]。LHBs的O-糖基化修饰的功能至今尚未明确。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.04.004

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30872243, 81071411, 30901273)

作者单位: 100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所; 新发突发传染病研究北京市重点实验室

通讯作者: 魏红山, Email: drwei@ccmu.edu.cn

基于以上研究结果,本研究利用O-糖基化修饰抑制剂Benzyl- α -GalNAc干预分泌HBV病毒的HepG2.2.15细胞,初步探讨O-糖基化修饰对HBV病毒颗粒组装的影响,报道如下。

材料和方法

一、HepG2.2.15细胞培养

HepG2.2.15细胞株由本室保存,在含10%小牛血清,380 μ g/ml G418的DMEM培养液中培养,培养环境为5% CO₂、37 $^{\circ}$ C细胞培养箱。

二、细胞凋亡检测

细胞培养24 h后,更换新鲜培养液,实验组中加入Benzyl- α -GalNAc (Merck, USA) [10],使样品终浓度分别为1、2、4、6、8、16 mmol/L。对照组加入同体积PBS。培养48 h后收集细胞。采用7-AAD染色,上流式细胞仪检测细胞凋亡情况,采用CellQuest软件分析数据。

三、HBV DNA载量检测

细胞培养24 h后,更换新鲜培养液,实验组中加入O-糖基化修饰抑制剂Benzyl- α -GalNAc,使样品终浓度分别为1、2、4、6、8、16 mmol/L。对照组加入同体积PBS。培养48 h后收集细胞上清。应用实时荧光定量PCR方法检测上清HBV病毒载量(Cobas Amplicor HBV Monitor test, Roche, Switzerland)。

四、HBV LHBs的检测

细胞培养24 h后,更换新鲜培养液,实验组中加入Benzyl- α -GalNAc,使样品终浓度分别为1、2、4、6、8、16 mmol/L。对照组加入同体积PBS。

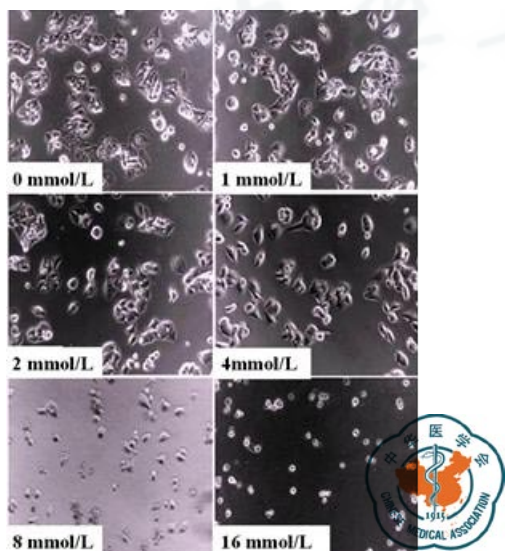


图1 Benzyl- α -GalNAc对细胞形态的影响(10 \times)

培养48 h后收集细胞上清。应用ELISA方法检测上清HBV LHBs水平(北京热景生物有限公司)。

五、Western blot分析

细胞培养24 h后,更换新鲜培养液,实验组中加入Benzyl- α -GalNAc,使样品终浓度分别为1、2、4、6、8、16 mmol/L。对照组加入同体积PBS。培养48 h后收集细胞,提取细胞总蛋白。等量蛋白经10% SDS-PAGE电泳分离,转膜,5%脱脂奶粉封闭,加入一抗鼠抗人抗体LHBs(1:1000)(北京热景生物有限公司)或鼠抗人抗体 β -actin(1:500)(Santa Cruz, USA)和二抗羊抗鼠IgG(1:2000)(Santa Cruz, USA)。经Typhoon 9400型激光扫描仪扫描成像。

六、统计学处理

采用SPSS 16.0 软件分析研究数据,计数资料组间差异采用 t 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

一、Benzyl- α -GalNAc对细胞形态的影响

Benzyl- α -GalNAc处理细胞48 h后,高浓度处理的细胞形态发生明显变化。图1可见4 mmol/L GalNAc处理的细胞变小,8 mmol/L GalNAc处理的细胞大部分已死亡,16 mmol/L GalNAc处理的细胞基本无存活,见图1。

二、Benzyl- α -GalNAc对细胞凋亡的影响

采用Annexin V染色方法探讨Benzyl- α -GalNAc诱导细胞凋亡的机制。图2可见16 mmol/L Benzyl- α -GalNAc能促进细胞进入晚期凋亡,诱导细胞死亡,与显微镜下观察的结果一致($t = 30$, $P < 0.05$),见图2。

三、Benzyl- α -GalNAc对HBV DNA水平的影响

实时荧光定量PCR结果显示,随着Benzyl- α -GalNAc浓度增加,HepG2.2.15 上清的HBV病毒载

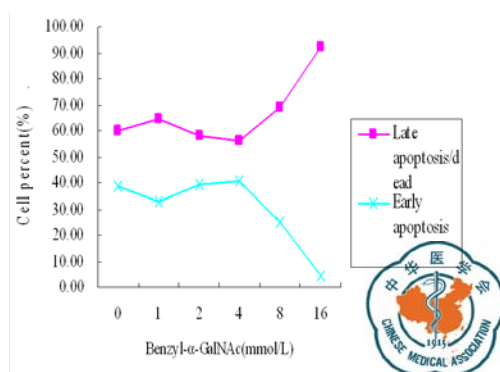


图2 Benzyl- α -GalNAc对细胞凋亡的影响

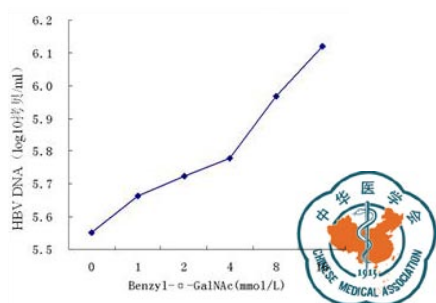


图3 Benzyl-α-GalNAc对HepG2.2.15细胞HBV DNA水平的影响

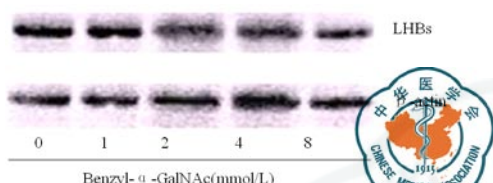


图5 Benzyl-α-GalNAc抑制HepG2.2.15细胞表达HBV LHBs

量呈剂量依赖性增长 ($t = 23$, $P < 0.05$), 见图3。

四、Benzyl-α-GalNAc对细胞上清HBV LHBs分泌的影响

ELISA方法检测上清HBV LHBs含量。结果显示, 随着Benzyl-α-GalNAc浓度增加, HepG2.2.15上清分泌的HBV LHBs呈剂量依赖性增加 ($t = 3.8$, $P < 0.05$), 见图4。

五、Benzyl-α-GalNAc对细胞HBV LHBs蛋白的影响

Western blot分析结果显示, 随着Benzyl-α-GalNAc浓度增加, 细胞中HBV LHBs蛋白量逐渐减少, 见图5。

讨论

Benzyl-α-GalNAc作为一种广谱蛋白质O-糖基化修饰抑制剂, 可以抑制包括O-GlcNAc、黏蛋白型O-糖基化修饰, 以及唾液酸修饰的O-糖基化修饰在内的绝大部分O-糖基化修饰^[11-13]。已有研究证明蛋白质O-糖基化修饰参与调控体内多种生理功能。Benzyl-α-GalNAc能够阻断Galnectin-9介导的Th17抑制作用, 表明蛋白质O-糖基化修饰与自身免疫性疾病相关^[14]。体外实验表明Benzyl-α-GalNAc显著地抑制子宫内膜细胞附着到腹膜间皮细胞, 这表明蛋白质的O-糖基化修饰与子宫内膜异位症的发生相关^[15]。蛋白质O-糖基化修饰与干眼症及多种肿瘤等疾病相关^[16-18]。总之蛋白质O-糖基化修饰与人类多种疾病相关。

本课题组前期实验结果也证实膜蛋白LHBs与HBV DNA复制密切相关, 而且血清LHBs水平可以

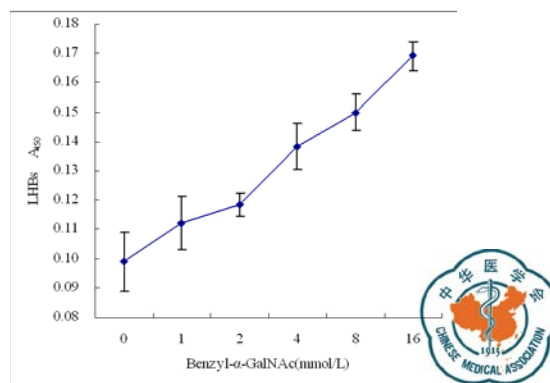


图4 Benzyl-α-GalNAc对HepG2.2.15细胞上清HBV LHBs水平的影响

作为接受阿德福韦酯治疗的HBeAg阴性的乙型肝炎患者的预后指标^[4-5]。HBV包膜蛋白中存在多种糖基化修饰。已有研究证明HBV包膜蛋白LHBs的Thr37位存在O-糖基化修饰。因此, 推测抑制HBV LHBs O-糖基化修饰可以抑制其组装成病毒颗粒。

本研究以HepG2.2.15细胞系为研究对象, 初步探讨O-糖基化修饰对HBV病毒颗粒组装的影响。O-糖基化修饰抑制剂Benzyl-α-GalNAc干预细胞后, 细胞发生明显的皱缩和死亡, 其机制可能是Benzyl-α-GalNAc诱导细胞凋亡。Benzyl-α-GalNAc作用HepG2.2.15细胞后, 上清的HBV LHBs和DNA水平呈剂量依赖性增长, 尤其在干预浓度为8、16 mmol/L的细胞上清中作用更为显著。其原因可能是大量肝细胞凋亡导致HBV病毒颗粒释放。Western blot结果显示, 随着Benzyl-α-GalNAc干预浓度增加, 细胞中LHBs蛋白量减少。故推测O-糖基化修饰抑制剂Benzyl-α-GalNAc在某种程度上能够抑制细胞合成LHBs, 而由于肝细胞凋亡, 导致细胞又大量释放了LHBs, 因此药物作用后, 细胞LHBs蛋白水平与上清中分泌水平相反。

由于O-糖基化修饰抑制剂Benzyl-α-GalNAc是个广谱O-糖基化修饰抑制剂, 因此其生物学作用广泛。其对HBV病毒颗粒组装的作用机制还需进一步研究。需要寻找针对HBV LHBs O-糖基化修饰的转糖基转移酶, 深入研究HBV LHBs O-糖基化修饰对病毒颗粒组装的影响。

参考文献

- Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 2007, 132 (4): 1574-1585.
- Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, et al. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*, 2004, 127 (Suppl 1): S35-S50.

- 3 Sureau C, Fournier-Wirth C, Maurel P. Role of N glycosylation of hepatitis B virus envelope proteins in morphogenesis and infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol*,2003,77(9):5519-5523.
- 4 Xiao F, Dong F, Du B, et al. Serum levels of LHBs: prognostic markers for HBeAg-negative patients with adefovir dipivoxil treatment. *Antiviral Therapy*,2009,14(8):1149-1456.
- 5 魏红山, 黄玉波, 宋淑静, 等. e抗原阴性慢性乙型肝炎患者血清表面抗原大蛋白水平与乙型肝炎病毒DNA之间的关系. *中华肝脏病杂志*,2006,14(7):543-544.
- 6 Hart GW. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem*,1997,66:315-335.
- 7 Goto M. Protein O-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions. *Biosci Biotechnol Biochem*,2007,71(6):1415-1427.
- 8 Werr M, Prange R. Role for calnexin and N-linked glycosylation in the assembly and secretion of hepatitis B virus middle envelope protein particles. *J Virol*,1998,72(1):778-782.
- 9 Schmitt S, Glebe D, Tolle TK, et al. Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. *J Gen Virol*,2004,85(Pt 7):2045-2053.
- 10 Tran DT, Lim JM, Liu M, et al. Glycosylation of α -dystroglycan: O-mannosylation influences the subsequent addition of GalNAc by the UDP-GalNAc polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *J Biol Chem*,2012,287(25):20967-20974.
- 11 Yang Z, Drew DP, Jørgensen B, et al. Engineering Mammalian Mucin-type O-Glycosylation in Plants. *J Biol Chem*,2012,287(15):11911-11923.
- 12 Gram Schjoldager KT, Vester-Christensen MB, Goth CK, et al. A systematic study of site-specific GalNAc-type O-glycosylation modulating proprotein convertase processing. *J Biol Chem*,2011,286(46):40122-40132.
- 13 Gill DJ, Clausen H, Bard F. Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation. *Trends Cell Biol*,2011,21(3):149-158.
- 14 Oomizu S, Arikawa T, Niki T, et al. Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner. *Clin Immunol*,2012,143(1):51-58.
- 15 Sumiyoshi M, Ricciuto J, Tisdale A, et al. Antiadhesive character of mucin O-glycans at the apical surface of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2008,49(1):197-203.
- 16 Kalra AV, Campbell RB. Mucin impedes cytotoxic effect of 5-FU against growth of human pancreatic cancer cells: overcoming cellular barriers for therapeutic gain. *Br J Cancer*,2007,97(7):910-918.
- 17 Chen L, Sundbäck J, Olofsson S, et al. Interference with O-glycosylation in RMA lymphoma cells leads to a reduced in vivo growth of the tumor. *Int J Cancer*,2006,119(6):1495-1500.
- 18 Porowska H, Paszkiewicz-Gadek A, Anchim T, et al. Inhibition of the O-glycan elongation limits MUC1 incorporation to cell membrane of human endometrial carcinoma cells. *Int J Mol Med*,2004,13(3):459-464.

(收稿日期: 2012-08-30)

(本文编辑: 孙荣华)

肖凡, 乔雍, 张仁雯, 等. 抑制O-糖基化修饰促进乙型肝炎病毒的释放[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2013, 7 (4): 495-498.

中华医学会