

· 基础论著 ·

HCV F 蛋白体外自组装以及在 HCV 感染者肝组织中的分布研究

邵圣文 于建国 武文斌 赵平 戚中田

【摘要】 目的 探讨 HCV F(frameshift)蛋白是否能自组装为病毒样颗粒以及 F 蛋白是否存在于 HCV 患者肝组织中。**方法** 将 0.5~1 g/L 大肠埃希菌重组表达的 F 蛋白与 0.006 g/L tRNA 混合,于 100 μ l 组装缓冲液中进行反应,取组装产物进行 1:10 稀释,2% 醋酸铀复染后电镜观察是否形成病毒样颗粒。HCV 感染者肝组织中 F 蛋白的检测采用免疫组织化学法。**结果** 1 g/L F 蛋白与 tRNA 混合(167:1)后,可形成直径 35 nm 的病毒样颗粒。在 20 例 HCV 感染者的肝穿刺组织标本中,有 2 例患者的肝细胞胞浆中可检测到 F 蛋白。**结论** F 蛋白在体外可以形成病毒样颗粒,在部分 HCV 感染者的肝组织中存在 F 蛋白,F 蛋白在 HCV 的生活周期中可能有重要功能。

【关键词】 丙型肝炎病毒;F 蛋白;病毒样颗粒;肝活检标本

Study on self-assembly of hepatitis C virus F protein in vitro and its distribution in liver of HCV-infected patients SHAO Sheng-wen*, YU Jian-guo, WU Wen-bin, ZHAO Ping, QI Zhong-tian. *Department of Microbiology, Medical School of Huzhou University, Huzhou, Zhejiang Province 313000, China

Corresponding author: QI Zhong-tian, Email: qizt@smmu.edu.cn

【Abstract】 Objectives To determine if hepatitis C virus (HCV) F protein self-assemble virion-like particle in vitro and exist in hepatic tissue of HCV-infected patients. **Methods** After assembly reaction completed by mixing F protein(0.5~1 g/L) purified from *E. coli* with tRNA (0.006 g/L) in 100 μ l assembly buffer, product dilution (1/10) was dyed by 2% uranyl acetate and virion-like particle structure was observed under electron microscopy. F protein of hepatic tissue of HCV-infected patients was detected by HRP-SP immunohistochemistry reaction. **Results** After F protein (1 g/L) mixed with tRNA (167:1), 35 nm size of virion-like particles formed. Within 20 samples of hepatic tissue section of HCV-infected patients, F protein were found in two samples, both locating in the cytoplasm of hepatic cells.

基金项目:国家 863 计划(2006AA02Z401);军队医药卫生“十一五”专项项目(06Z026)

作者单位:313000 浙江湖州,湖州大学医学院微生物学教研室(邵圣文);第二军医大学微生物学教研室(邵圣文、武文斌、赵平、戚中田);解放军第 88 医院肝病研究所(于建国)

通讯作者:戚中田 Email: qizt@smmu.edu.cn

Conclusions F protein can form virion-like particles in vitro, and exist in some hepatic tissue of HCV-infected patients, which indicate F protein may execute some functions in HCV life cycle.

【Key words】 Hepatitis C virus; F protein; Virus-like particle; Liver biopsy specimen

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染呈世界性分布,易引发慢性肝炎,进而发展为肝硬化、肝癌等终末期肝病^[1]。HCV 属黄病毒家族,基因组为单股正链 RNA,包含一个开放阅读框(open reading frame, ORF)。先前研究认为,HCV 的单个 ORF 包含 C、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B 共 10 个基因区,编码产生 10 种蛋白质。近年发现,HCV C 基因区存在一个新的重叠基因,编码一种新的蛋白质,被命名为 F 蛋白^[2,4]。人感染 HCV 后,体内可产生抗 F 蛋白的抗体和特异性 T 淋巴细胞^[5]。C 基因的主要翻译产物 C 蛋白可自组装为病毒样颗粒^[6]。F 蛋白是 C 基因区的次要翻译产物,其产量约为 C 蛋白的 2%^[4,7]。目前尚不清楚 F 蛋白是否具有自组装能力以及是否存在于 HCV 患者肝组织中。本研究旨在观察 F 蛋白是否能自组装为病毒样颗粒,并检测其是否存在于 HCV 患者肝组织中。

资料与方法

一、材料

20 例 HCV 患者以及 20 例 HBV 患者肝组织穿刺标本来自解放军第 88 医院。HCV 患者诊断依据我国丙型肝炎防治指南的标准^[8]。

HCV 1b 型 F 蛋白以及兔抗 F 蛋白抗体由本室制备^[9]。tRNA 为华美公司产品。HRP-SP 免疫组织化学检测试剂购自北京鼎国生物技术公司。

二、方法

1. F 蛋白自组装实验:参照文献^[6],将 50 ~ 100 μg 大肠埃希菌表达的 F 蛋白溶于 100 μl 组装缓冲液(1.7 mmol/L 醋酸镁,100 mmol/L 醋酸钾,25 mmol/L HEPES, pH 7.4)中,加入 0.6 μg tRNA 后轻轻混匀,37℃ 静置 10 min,冰水浴中静置 15 min;取组装产物进行 1:10 稀释,滴加在 400 目碳纤维载网上,静置 5 min,2% 醋酸铀复染,H-6000 型电子显微镜(日本 Hitachi 公司)扫描观察并拍照,电压 70 kV,放大倍数为 50 000。以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)为对照。

2. 肝组织中 F 蛋白检测:将肝组织石蜡块切片,二甲苯脱蜡至水,置于 0.01 mmol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中 95℃ 处理 10 min,自然冷却后经 0.01 mmol/L PBS 洗涤 5 次,再经含 3% 过氧化氢的 5% 甲醛处理 20 min;同上洗涤后加 5% BSA,37℃ 封闭 20 min;同上洗涤后加 5% BSA 稀释的兔抗 F 蛋白抗体(1:2000),37℃ 反应 1 h;余下反应按照 HRP-SP 试剂说明书进行;二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色液显色 5 min,苏木素复染,显微镜观察。结果判断:每张肝组织切片观察

5 ~10 个高倍镜视野,若 5 个或 5 个以上视野中,均有 ≥ 5 个肝细胞 DAB 显色阳性(棕褐色),则判断该组织切片 F 蛋白阳性。

结 果

一、F 蛋白自组装为病毒样颗粒

F 蛋白自组装实验结果见图 1。BSA 蛋白与 tRNA 混合(图 1A),形成 2 nm ~3 nm 大小的不规则颗粒。0.5 g/L F 蛋白与 tRNA 混合(图 1B),形成 20 nm ~30 nm 大小的颗粒,形态不规则,呈多形性。1 g/L F 蛋白与 tRNA 混合(图 1C),形成 35 nm 大小的颗粒,形态规则,呈球型,与 HCV 病毒颗粒外形相似。

二、肝组织中 F 蛋白检测结果

20 例 HCV 患者肝穿刺组织标本中,2 例 F 蛋白阳性,F 蛋白分布在肝细胞细胞质内(图 2A,B),18 例 F 蛋白阴性(图 2C)。20 例 HBV 患者肝组织穿刺组织标本,F 蛋白均为阴性(图 2D)。

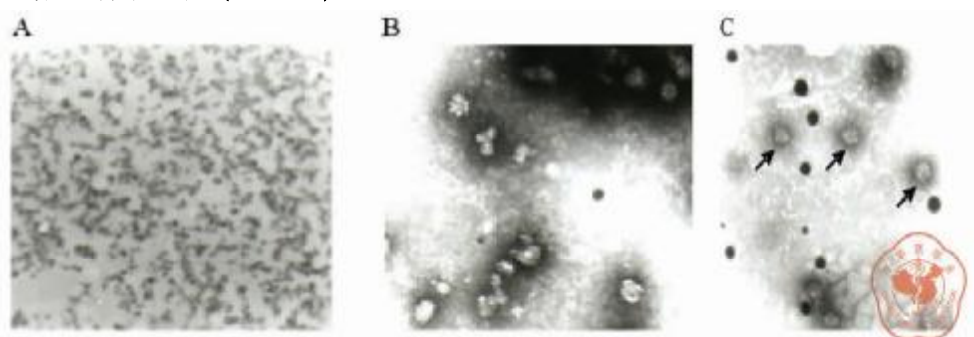


图 1 F 蛋白自组装后电镜观察结果(50 000 ×)
A: 1 g/L BSA;B: 0.5 g/L F 蛋白;C: 1 g/L F 蛋白

讨 论

近年发现,HCV C 基因在第 10 位密码子处可以发生 +1 位移码翻译,产生一种新的 HCV 蛋白质,即 F 蛋白。不同基因型 HCV 均能产生 F 蛋白,但一级结构高度变异;相同基因型 HCV 产生的 F 蛋白高度保守^[3-5]。这些研究提示,F 蛋白可能有某些重要功能。

F 蛋白的翻译产量仅为 C 蛋白的 2% 左右^[4,7],因此有研究者认为,F 蛋白不是 HCV 病毒颗粒的组成性蛋白,可能是一种调节性蛋白。先前研究表明,C 蛋白是构成 HCV 病毒颗粒核心的主要蛋白质^[10],并且 C 蛋白在体外具有自组装为病毒样颗粒的能力^[6]。由于我们在体外实验中观察到高浓度的 F 蛋白也能自组装为病毒样颗粒,因此我们推测 F 蛋白很可能参与 HCV 病毒颗粒的形成。

在 20 例 HCV 患者肝穿刺组织标本中,我们观察到 2 例患者肝组织的肝细胞细胞质内含有 F 蛋白,提示部分 HCV 患者肝组织中确实存在 F 蛋白。F 蛋白在肝组织中的低检出率可能与下面 2 个因素有关:(1)F 蛋白主要分布在 HCV 感染

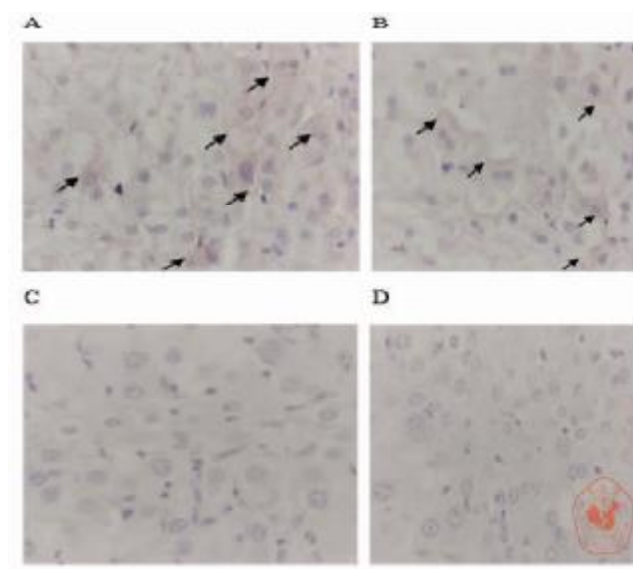


图 2 肝穿刺组织中 F 蛋白检测(200 ×)
A、B、C:HCV 患者 D:HBV 患者

细胞的内质网上,半衰期为 5 ~ 10 min^[11,12],加之其翻译产量较低,这使得肝组织中的 F 蛋白数量少,不易检出;(2)肝穿刺组织标本的质量以及保存时间影响 F 蛋白的检出。F 蛋白出现在少数 HCV 患者肝组织中,提示该蛋白在 HCV 的生活史乃至致病性等方面可能有重要功能,值得进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, et al. Viral hepatitis C. Lancet, 2003, 362:2095-2100.
- 2 Varaklioti A, Vassilaki N, Georgopoulou U, et al. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. J Biol Chem, 2002, 277:17713-17721.
- 3 Walewski JL, Keller TR, Stump DD, et al. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. RNA, 2001, 7:710-721.
- 4 Xu Z, Choi J, Yen TS, et al. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. EMBO J, 2001, 20:3840-3848.
- 5 Bain C, Parroche P, Lavergne JP, et al. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. J Virol, 2004, 78:10460-10469.
- 6 Kunkel M, Lorinczi M, Rijnbrand R, et al. Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. J Virol, 2001, 75:2119-2129.
- 7 Choi J, Xu Z, Ou JH. Triple decoding of hepatitis C virus RNA by programmed translational frameshifting. Mol Cell Biol, 2003, 23:1489-1497.
- 8 中华医学会肝病学会、中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志, 2004, 12:194-198.
- 9 邵圣文, 武文斌, 于建国, 等. 丙型肝炎病毒 F 蛋白抗原性及患者血清 F 抗体流行率的研究. 中华肝脏病杂志, 2006, 14:890-893.
- 10 Dubuisson J, Penin F, Moradpour D. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. Trends Cell Biol, 2002, 12:517-523.
- 11 Roussel J, Pillez A, Montpellier C, et al. Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein. J Gen Virol, 2003, 84:1751-1759.
- 12 Xu Z, Choi J, Lu W, et al. Hepatitis C virus F protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. J Virol, 2003, 77:1578-1583.

(收稿日期:2007-07-01)

(本文编辑:刘顺爱)