·基础论著·

丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因2表达产物的亚细胞定位

王建军 赵平 靳雪源 成军 卿松

【摘要】 **目的** 研究HCV核心蛋白反式激活基因2(TAHCCP2)在细胞内的表达及表达产物的亚细胞定位。**方法** 构建HBeAg TP基因的绿色荧光蛋白表达质粒pEGFP-C1-TAHCCP2,转染HepG2细胞,24 h后荧光显微镜下观察表达蛋白的亚细胞定位。**结果** 成功构建出TAHCCP2基因的绿色荧光蛋白表达质粒pEGFP-C1-TAHCCP2,其表达的蛋白定位于细胞核。**结论** TAHCCP2基因可表达TAHCCP2蛋白且定位于细胞核。

【关键词】 丙型肝炎病毒;TAHCCP2蛋白

Subcellular location of production of gene 2 transactivated by HCV core protein

WANG Jian-jun, ZHAO Ping, JIN Xue-yuan, CHENG Jun, QING Song, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Corresponding author: WANG Jian-jun, Email: awjja@126.com

【**Abstract**】 **Objective** To study the subcellular location of gene 2 transactivated by HCV core protein (TAHCCP2). **Methods** Green fluorescent protein (GFP) expression vector pEGFP-TAHCCP2 was established and transfected into HepG2 cells and the subcellular location of the proteins expressed by TAHCCP2 were analyzed through green fluorescent microscopy after 24 hours. **Results** The pEGFP-TAHCCP2 vector was successfully cloned, TAHCCP2 protein was expressed in cells and subcellularly located in nuclei. **Conclusions** TAHCCP2 gene can express TAHCCP2 protein which locates subcellularly in nuclei.

【**Key words**】 Hepatitis C virus; TAHCCP2 protein

丙型肝炎病毒(HCV)是一种单股正链RNA病毒,编码一种多蛋白分子,在病毒和宿主细胞蛋白酶的共同裂解下,至少裂解为3种结构蛋白(C、E1和E2)和6种非结构蛋白(NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B)。HCV核心蛋白是一种多功能蛋白,除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外,还具有调控细胞病毒基因表达、细胞生长以及免疫调节等多种功能。笔者通过抑制性消减杂交技术

作者单位:100039 北京市,解放军第302医院(王建军、赵平、靳雪原、卿松);首都医科大学北京地坛医院传染病研究所(成军)

通讯作者:王建军,Email:awjja@126.com

(suppression subtractive hybridization, SSH),对 HCV 核心蛋白表达载体转染的 HepG2 细胞进行研究,结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了核心蛋白反式激活的新靶基因,命名为 HCV 核心蛋白反式激活基因 2(TAHCCP2)。已在 GenBank 中注册,注册号为 AY039043。TAHCCP2 基因的编码序列全长为 429 个核苷酸(nt),编码产物由 142 个氨基酸残基(aa)组成[1]。为研究新基因的亚细胞定位,笔者从人肝癌细胞得到了 TAHCCP2 基因的全长编码序列,构建其与绿色荧光蛋白融合的表达载体 pEGFP-TAHCCP2 基因,通过基因与荧光蛋白基因融合表达,明确其表达产物的亚细胞定位。

材料与方法

一、材料

Wizard Pure-Fection 磁珠法质粒提取试剂盒、Lipofectamine 细胞转染试剂盒均购自美国 Promega 公司;pEGFP 荧光表达载体购自 Clontech 公司;人肝癌细胞系 HepG2、胰蛋白酶、EDTA 均购自美国 Sigma 公司。

二、方法

1. TAHCCP2 基因片段的获得:以人肝癌细胞系 HepG2 cDNA 为模板,PCR 扩增得到 TAHCCP2 的 DNA 序列(设计全长为 429 bp),与 pGEM-T 质粒连接后,对提取的连接产物进行 *Eco* RⅠ/ *Bam* HⅠ酶切鉴定,酶切片段与预期一致。回收该酶切片段,与 pEGFP 的 *Eco* RⅠ和 *Bam* HⅠ酶切产物连接后,再次进行了 *Eco* RⅠ和 *Bam* HⅠ酶切鉴定及 DNA 序列测定。

2. TAHCCP2 绿色荧光蛋白表达载体的构建:磁珠法纯化提取转染级质粒。将 TAHCCP2 基因的全序列双酶切后连接入绿色荧光载体 pEGFP,转化大肠埃希菌,鉴定正确后提取纯化的质粒准备转染细胞。

3. TAHCCP2 基因表达产物亚细胞定位:将提纯的转染级质粒转染 HepG2 细胞,以空载体作空白对照。转染 24 h 后,荧光显微镜下数码相机拍照,分析 TAHCCP2 的亚细胞定位。

结　　果

一、TAHCCP2 绿色荧光载体成功构建

TAHCCP2 基因成功连接入 pEGFP,经 *Eco* RⅠ和 *Bam* HⅠ酶切,琼脂糖凝胶电泳可见 4000 bp 的载体片段及 429 bp 的插入片段,表明质粒已构建成功。

二、TAHCCP2 基因表达产物亚细胞定位

pEGFP-TAHCCP2 表达质粒成功地在 HepG2 细胞中表达(图 1),在荧光显微镜下可观察到在转染细胞胞核内有弥散分布的绿色荧光,而细胞浆内无绿色荧光蛋白表达,进而推测 TAHCCP2 亚细胞定位于细胞核中。

讨　　论

早期研究认为,HCV 属于非整合性 RNA 病毒,与产生两种确定作用的反式激活子 HBV X 和截短型的前-S/S 基因的 HBV 不同,并不存在直接致癌的病毒蛋

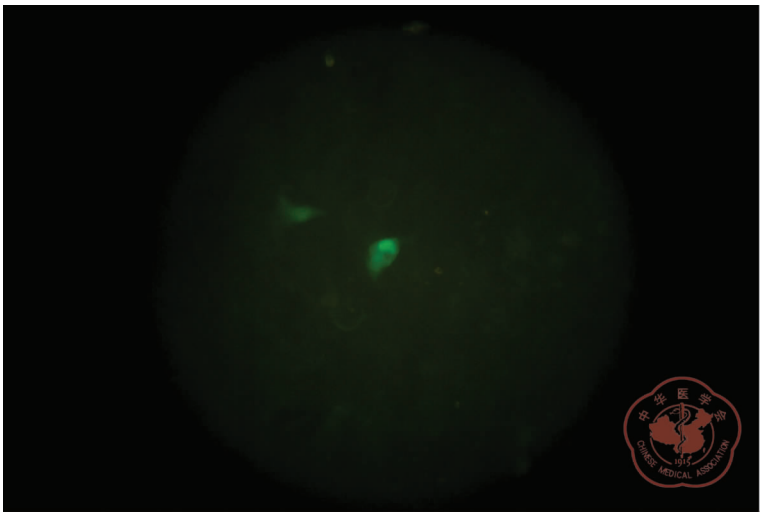

图1 TAHCCP2 在 HepG2 细胞中表达

白。后来研究证实核心蛋白也是一种反式激活蛋白,甚至其作用还要超过 X 蛋白。HCV 核心蛋白作为一种反式激活蛋白,对感染肝细胞中基因表达谱产生影响。核心蛋白对细胞信号转导途径具有明显的增强作用,尤其是对核因子-κB(NF-κB)、激活因子 1(AP-1)和血浆反应因子(SRE)信号转导途径具有明显的增强作用[2];在 HepG2 细胞中,核心蛋白激活人类 c-myc 基因、劳氏肉瘤病毒长末端重复序列(RSV LTR)和 SV40 早期启动子[3];核心蛋白还能抑制或增强 p53 基因启动子功能[4],这些证据表明核心蛋白具有潜在的致癌作用。核心蛋白转基因小鼠发生肝细胞癌的病理学特征直接证明了核心蛋白的这种作用。还有研究[5]发现 HCV 核心蛋白可与细胞内的一些细胞凋亡因子相互作用,从而促进细胞凋亡。

笔者应用抑制性消减杂交技术,发现 TAHCCP2 基因与体内物质代谢尤其是脂肪代谢关系较密切,并且与细胞分化生长与纤维化也有一定关系,在病毒感染后致肝纤维化方面有一定作用[6]。另外,TAHCCP2 也可负性调节体内的某些免疫反应,通过基因表达谱芯片研究发现其下调三种涉及体内氧化应激、细胞生长和能量代谢基因的表达,主要起到负性调节作用[7]。本实验进一步证实了 TAHCCP2 所表达的蛋白定位于细胞核内。TAHCCP2 是正常人体存在的基因,在 HCV 核心蛋白的存在下其功能可被进一步激活。关于 TAHCCP2 基因功能及其表达产物亚细胞定位的研究,不仅为 HCV 在体内的调节机制提供了部分线索,并且有助于人体新的未知功能基因的研究,也有助于发现新的疾病发生发展的线索。关于 TAHCCP2 在体内调节作用的更多证据,仍需要进一步的实验来证明。

参 考 文 献

1 王建军, 成军, 刘妍, 等. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因 TAHCCP2 的克隆. 世界华人消化杂志,2003,11:1893-1896.

2 Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, et al. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-virus core is the most potent signal inducer. Hepatology,2000,32:405-412.

3 Chang J, Yang SH, Cho YG, et al. Hepatitis C virus core from different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. J Virol,1998,72:3060-3065.

4 Ray RB, Steele R, Meyer K, et al. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. J Biol Chem, 1997,272:10983-10986.

5 Hahn CS, Cho YG, Kang BS, et al. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. Virology,2000,276:127-137.

6 王建军, 刘妍, 成军, 等. 应用抑制性消减杂交技术筛选 TAHCCP2 的反式调节基因. 世界华人消化杂志,2004,12:302-305.

7 王建军, 刘妍, 成军, 等. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎核心蛋白反式调节基因 TAHCCP2 的调节基因. 世界华人消化杂志,2004,12:840-842.

(收稿日期:2009-03-05)

(本文编辑:孙荣华)

王建军,赵平,靳雪源,等. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因 2 表达产物的亚细胞定位[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2010,4(1):11-14.