

· 基础论著 ·

# O-糖基转移酶、Glt25D2与乙型肝炎包膜蛋白大蛋白的分泌有关

肖凡 董芳 乔雍 常路丝 张仁雯 成军 魏红山

**【摘要】目的** 在前期研究结果提示Glt25D2与HBV包膜蛋白大蛋白(LHBs)在体外相互作用基础上证明Glt25D2是否与HBV LHBs分泌相关。**方法** 采用激光共聚焦方法分析Glt25D2与LHBs在HepG2细胞内的定位。免疫共沉淀方法进一步证实Glt25D2与LHBs的相互作用。采用实时荧光定量PCR和Western blot方法分析mRNA和蛋白表达水平。应用ELISA方法检测细胞上清LHBs水平。实时荧光定量PCR方法检测上清HBV病毒载量。ELISA方法检测上清HBV LHBs水平。Western blot方法检测细胞中LHBs蛋白含量。Cobas Amplicor HBV Monitor Test方法检测细胞上清液HBV DNA载量。**结果** Glt25D2与LHBs在体外相互作用,上调的Glt25D2高表达促进HBV DNA复制和LHBs表达,Glt25D2低表达抑制HBV DNA复制和LHBs表达。**结论** Glt25D2与乙型肝炎包膜蛋白大蛋白的分泌有关。

**【关键词】** GLT25D2; 包膜大蛋白; 乙型肝炎病毒; 糖基化修饰

**Glt25D2, an O-glycosyltransferase is related with the secretion of hepatitis B virus surface large protein**

XIAO Fan\*, DONG Fang, QIAO Yong, CHANG Lu-si, ZHANG Ren-wen, CHENG Jun, WEI Hong-shan.

\*Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100015, China

Corresponding author: WEI Hong-shan, Email: drwei@ccmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** Our previous study demonstrated that Glt25D2 interacts with HBV LHBs in vitro. In this study, we aim to prove if Glt25D2, an O-glycosyltransferase, is related with the secretion of hepatitis B virus surface large protein (LHBs). **Methods** Confocal microscopy was used to determine the co-location between Glt25D2 and LHBs in HepG2 cells. The interaction between Glt25D2 and LHBs in vitro was examined by the method of co-immunoprecipitation. Quantitative real-time PCR and Western blot were undertaken to evaluate the levels of mRNA and protein. The levels of LHBs in the supernatant were measured with ELISA kits and HBV DNA was quantified with the Cobas Amplicor HBV Monitor Test. **Results** Our data demonstrated that Glt25D2 interacts with LHBs in vitro, up-regulated Glt25D2 expression could increase HBV DNA and LHBs levels in HepG2.2.15, down-regulated Glt25D2 expression decreased HBV DNA and LHBs levels. **Conclusions** Our results suggest that Glt25D2 is related with HBV LHBs secretion.

**【Key words】** Glt25D2; LHBs; HBV; Glycosyltransferase

慢性乙型肝炎是导致肝衰竭、肝硬化以及肝癌等重大肝病的主要原因<sup>[1]</sup>。我国属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<sup>[2]</sup>。目前关于HBV感染慢性化及导致肝硬化、肝癌的机制仍然不明。

乙型肝炎包膜蛋白分为3种(LHBs、MHBs、SHBs),这3种包膜蛋白必须以合适的比例存在才

能组装成含有HBV基因组的Dane颗粒,而LHBs与该颗粒关系最为密切<sup>[3]</sup>。本课题组实验结果已证实膜蛋白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<sup>[4,5]</sup>。

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<sup>[6]</sup>。不同于蛋白质的N-糖基化修饰,蛋白质O-糖基化修饰是一个高度动态的翻译后修饰,具有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等多种生物学功能<sup>[7]</sup>。

HBV pre-S2区的N-基化修饰是病毒颗粒分泌的

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.05.001

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(肖凡、乔雍、常路丝、张仁雯、成军、魏红山);山西省儿童医院消化科(董芳)

通讯作者: 魏红山, Email: drwei@ccmu.edu.cn



病毒载量 (Cobas Amplicor HBV Monitor test, Roche, Switzerland)。

### 八、HBV LHBs 检测

应用ELISA方法检测上清HBV LHBs水平 (北京热景生物有限公司)。

### 九、统计学处理

计数资料组间差异采用 $\chi^2$ 检验分析,  $P < 0.05$  时组间差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、Glt25D2 与 LHBs 共定位在内质网

噬菌体展示结果表明Glt25D2可能与HBV LHBs 相互作用。为进一步明确这个作用, 采用激光共聚焦技术分析Glt25D2与HBV LHBs的定位 (图1)。结果提示Glt25D2与HBV LHBs均定位在内质网, 并存在部分共定位。

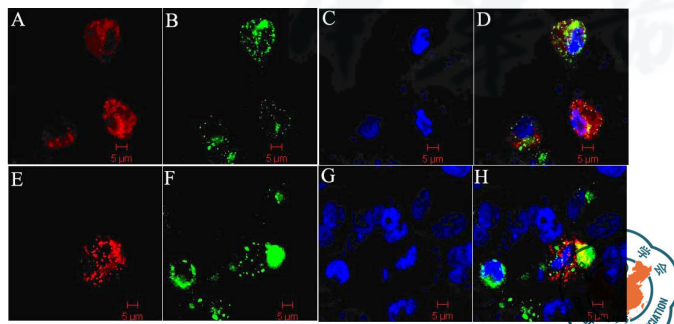
### 二、Glt25D2与LHBs在体外相互作用

为进一步证实以上结果, 采用免疫共沉淀方法分析Glt25D2与LHBs是否在体外相互作用。pcDNA3.1-LHBs 或 pcDNA3.1-Glt25D2质粒转染至HepG2细胞。结果提示Glt25D2与LHBs在体外存在相互作用 (图2)。

pcDNA3.1-LHBs 或 pcDNA3.1-Glt25D2 转染至HepG2细胞。提取蛋白, 与Protein A/G磁珠, Glt25D2或LHBs抗体孵育过夜。Western blot分析免疫共沉淀结果。结果显示Glt25D2与 LHBs在体外相互作用。

### 三、Glt25D2高表达促进LHBs分泌

4条Glt25D2干扰序列分别转染至HepG2.2.15



注: 采用激光共聚焦分析LHBs与Glt25D2的定位 (EGFP: 488 nm, DsRED: 546 nm, DAPI: 405 nm)。pEGFP-C1-LHBs和pDsRED-N1-Ergic-53共转染至HepG2细胞。图像显示LHBs定位在内质网 (A) pDsRED-N1-Ergic-53 (B) pEGFP-C1-LHBs (C) DAPI (D) A + B + C。pEGFP-C1-LHBs和pDsRED-N1-Glt25D2共转染至HepG2细胞。图像提示LHBs和d Glt25D2共定位在内质网 (E) pDsRED-N1-Glt25D2 (F) pEGFP-C1-LHBs (G) DAPI (H) E + F + G (X 20)

图1 LHBs 与 Glt25D2 共定位在内质网

细胞。培养48 h后, 收集细胞, 流式细胞仪检测其转染效率。提取蛋白, Western blot方法检测Glt25D2的干扰效率。结果显示转染效率平均为80%, 且3号干扰序列的干扰效率最高 (图3)。

pcDNA6.2-Glt25D2 shRNA和pcDNA6.2-negative转染至HepG2.2.15细胞。48 h后收集蛋白, Western blot 分析敲除效果。结果显示pcDNA6.2-Glt25D2 shRNA-3基因敲除效果最好。β-actin作内参。

pcDNA3.1、pcDNA3.1-Glt25D2、pcDNA6.2-Glt25D2 shRNA-3和 pcDNA6.2-negative分别转染至HepG2.2.15细胞。培养48 h后收集蛋白和上清检测。Glt25D2高表达能显著促进HBV DNA复制 ( $P = 0.000$ ) 和LHBs表达 ( $P = 0.021$ ) ; Glt25D2低表达则部分抑制了HBV DNA复制, 但无统计学意义 ( $P = 0.057$ ) , 但Glt25D2低表达能显著低抑制LHBs表达 ( $P = 0.021$ ) (图4A)。Western blot结

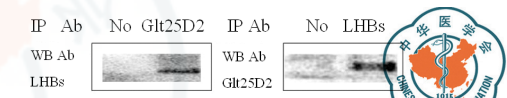


图2 Glt25D2与LHBs在体外相互作用

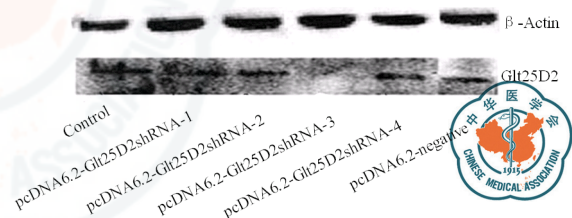
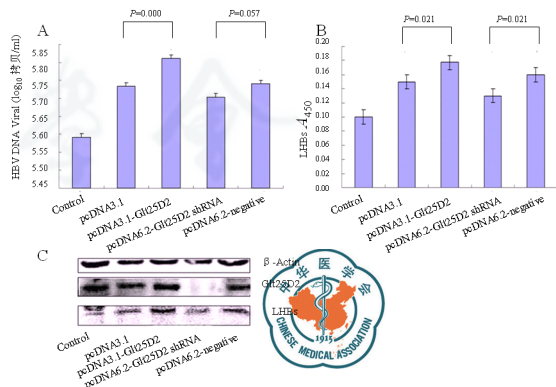


图3 体外Glt25D2基因敲除



注: pcDNA3.1、pcDNA3.1-Glt25D2、pcDNA6.2-Glt25D2 shRNA-3和pcDNA6.2-negative分别转染至HepG2.2.15 cells。48小时后, 提取细胞上清和蛋白。A: 细胞上清中, pcDNA3.1-Glt25D2转染组HBV DNA水平显著升高 ( $P = 0.000$ ) , pcDNA6.2-Glt25D2 shRNA-3转染组HBV DNA水平变化不明显 ( $P = 0.057$ ) ; B: 细胞上清中, pcDNA3.1-Glt25D2转染组HBV LHBs水平显著升高 ( $P = 0.021$ ) , pcDNA6.2-Glt25D2 shRNA-3转染组HBV LHBs水平显著下降 ( $P = 0.021$ ) ; C: 细胞蛋白中, pcDNA3.1-Glt25D2转染组HBV LHBs表达显著升高, pcDNA6.2-Glt25D2 shRNA-3转染组HBV LHBs表达显著下降

图4 Glt25D2参与调控LHBs表达

果也证实了Glt25D2高表达能促进HBV LHBs表达, Glt25D2低表达则抑制HBV LHBs表达(图4B)。

## 讨 论

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, 其中只有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。本课题组前期实验结果也证实: ①接受阿德福韦酯治疗的患者的血清LHBs与HBV DNA复制密切相关; ②血清LHBs水平可以作为的HBeAg阴性的乙型肝炎患者的预后指标。因此, 在3种膜蛋白中, 只有LHBs与Dane颗粒的关系最为密切。笔者发现新的O-糖基转移酶Glt25D2与HBV pre-S2蛋白可能存在相互作用。

已有研究报道证实乙型肝炎病毒包膜蛋白的N-糖基化修饰参与乙型肝炎病毒颗粒分泌<sup>[10-14]</sup>。O-糖基化修饰参与多种生物学功能。然后至今都不明确其在乙型肝炎病毒颗粒分泌过程中的作用。HBV包膜蛋白LHBs的Thr37位存在O-糖基化修饰。笔者的前期研究报道抑制细胞O-糖基化修饰能够有效抑制乙型肝炎病毒复制<sup>[15]</sup>, 推测而O-糖基转移酶, Glt25D2, 可能参与LHBs O-糖基化修饰, 且抑制HBV LHBs O-糖基化修饰可以抑制其组装成病毒颗粒。

激光共聚焦和免疫共沉淀技术提示Glt25D2与LHBs共定位在内质网, 并存在相互作用。通过转染和RAN干扰技术, 证实Glt25D2高表达能显著促进HBV DNA复制( $P = 0.000$ )和LHBs表达( $P = 0.021$ ); Glt25D2低表达则部分抑制了HBV DNA复制, 但无统计学意义( $P = 0.057$ ), 但Glt25D2低表达能显著低抑制LHBs表达( $P = 0.021$ ) (图4A)。Western blot结果也证实了Glt25D2高表达能促进HBV LHBs表达, Glt25D2低表达则抑制HBV LHBs表达(图4B)。

从以上结果, 可以得出结论Glt25D2可能与HBV LHBs分泌相关, 从而影响HBV 病毒颗粒的组装。

肖凡, 董芳, 乔雍, 等. O-糖基转移酶、Glt25D2与乙型肝炎包膜蛋白大蛋白的分泌有关展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(5): 633-636.

## 参 考 文 献

- 1 Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 2007, 132(4):1574-1585.
- 2 Bréchet C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology*, 2004, 127(5 Suppl 1):S56-61.
- 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. *中华肝病病杂志*, 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 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.
- 11 Liu X, Lin S, Wei HS, et al. Screening and characterization of hepatic b virus pre-s2 binding proteins by phage display system. *Chinese Journal of Pathogen Biology*, 2007, 2(1):8-10.
- 12 Zhang S, Shu H, Luo K, et al. N-linked glycan changes of serum haptoglobin  $\beta$  chain in liver disease patients. *Mol Biosyst*, 2011, 7(5):1621-1628.
- 13 Norton PA, Menne S, Sinnathamby G, et al. Glucosidase inhibition enhances presentation of de-N-glycosylated hepatitis B virus epitopes by major histocompatibility complex class I in vitro and in woodchucks. *Hepatology*, 2010, 52(4):1242-1250.
- 14 Lambert C, Prange R. Posttranslational N-glycosylation of the hepatitis B virus large envelope protein. *Virology*, 2007, 4:45.
- 15 肖凡, 乔雍, 张仁雯, 等. 抑制O-糖基化修饰促进乙型肝炎病毒释放. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2013, 7(1):11-13.

(收稿日期: 2012-12-04)

(本文编辑: 李卓)