

· 基础论著 ·

丙型肝炎病毒 p7 蛋白上调去唾液酸糖蛋白受体 1 基因的表达

郭江 成军 洪源 王琦 邢卉春 毛羽

【摘要】 目的 探讨 HCV p7 对去唾液酸糖蛋白受体 1(ASGPR1)启动子转录的调节作用。**方法** 据生物信息学确定 ASGPR1 的启动子区域,聚合酶链反应(PCR)扩增 ASGPR1p,克隆至真核报告载体 pCAT3-Basic 中,构建 pCAT3-ASGPR1p 报告载体;以该质粒转染肝癌细胞系 HepG2,用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性;并与 pcDNA3.1(-)-HCV p7 共转染 HepG2 细胞系,用 ELISA 检测 CAT 的表达活性。**结果** 成功获得 ASGPR1p 启动子的正确克隆。pCAT3-ASGPR1p 和 pcDNA3.1(-)-HCV p7 共转染 HepG2 细胞的 CAT 表达活性是 pCAT3-Basic 空载体的 7.7 倍,是 pCAT3-ASGPR1p 的 2.4 倍。**结论** ASGPR1 启动子有顺式激活下游基因的活性,HCV p7 对 ASGPR1 基因的表达有上调作用。

【关键词】 丙型肝炎病毒 p7 蛋白;去唾液酸糖蛋白受体 1;基因启动子

Up-regulation of hepatitis C virus p7 on ASGPR1 gene promoter GUO Jiang, CHENG Jun, HONG Yuan, WANG Qi, XING Hui-chun, MAO Yu. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: CHENG Jun, Email: cj@genetherapy.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the transregulating effect of HCV p7 on ASGPR1 gene promoter. **Methods** Polymerase chain reaction(PCR) technique was employed to amplify the coding sequence of ASGPR1 promoter from HepG2 genomic DNA and the product was subcloned into pCAT3-Basic by *Kpn* I and *Bgl* II, named pCAT3-ASGPR1p. pCAT3-ASGPR1p was transfected into the hepatoblastoma cell line HepG2 and cotransfected with pcDNA3.1(-)-HCV p7 by FuGENE6 transfection reagents. The HepG2 cells transfected with pCAT3-Basic were used as negative control. The activity of CAT in transfected HepG2 cells was detected by an ELISA kit after 48 hours, which reflected the transregulating function of pcDNA3.1(-)-HCV p7 to

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2010.02.002

基金项目:国家自然科学基金(30371288)

作者单位:100015 北京市,首都医科大学北京地坛医院传染病研究所(郭江、成军、洪源、王琦、毛羽);首都医科大学北京地坛医院内五科(郭江、邢卉春)

通讯作者:成军,Email:cj@genetherapy.com.cn

ASGPR1 gene promoter. **Results** The report vector pCAT3-ASGPR1p was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. The expression of CAT in HepG2 cells cotransfected with pCAT3-ASGPR1p and pcDNA3.1(-)-HCV p7 were 7.7 times high as that of pCAT3-Basic and 2.4 times high as that of pCAT3-ASGPR1p. **Conclusions** HCV p7 can transregulate ASGPR1 promoter and can up-regulate the expression of ASGPR1 gene.

【Key words】 HCV p7; ASGPR1; Gene promoter

丙型肝炎病毒(HCV)是世界范围内慢性肝炎的主要病原之一^[1,2],常导致肝硬化、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)等各种严重肝病^[3-5]。HCV基因组含有一个长的开放阅读框架(ORF),编码多个蛋白。p7是由HCV基因组编码的一个小蛋白。关于其功能研究较少。本室应用抑制性消减杂交技术筛选了HCV p7蛋白的反式调节基因,发现其与体内物质代谢、信号转导、凋亡等关系密切,在病毒感染后肝细胞恶性变方面有一定的作用,而且对于HCV病毒颗粒结合和进入肝细胞有重要意义^[9]。

本研究选择去唾液酸糖蛋白受体1(ASGPR1)基因,采用基因重组技术构建pCAT3-ASGPR1报告基因载体,与pcDNA3.1(-)-HCV p7共转染人肿瘤细胞系HepG2细胞后,应用报告基因氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)共转染瞬时表达系统,测得下游CAT基因的表达增强。证明p7蛋白可上调ASGPR1启动子活性,进而上调ASGPR1基因的表达。为p7蛋白在体内的分子生物学机制提供了理论基础。

材料和方法

一、实验材料和试剂

重组表达载体pcDNA3.1(-)-HCV p7为本室构建,人肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞及大肠埃希菌DH5 α 菌株为本室保存。Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶及限制性内切酶均购自TaKaRa公司。质粒DNA提取试剂盒,中间载体pGEM-Teasy及报告质粒pCAT3-Basic均购自Promega公司;CAT-ELISA检测试剂盒及质粒DNA转染试剂盒购自Roche公司。玻璃奶纯化试剂盒购自博大公司。其他生化试剂购自Sigma公司。

二、ASGPR1启动子的聚合酶链反应扩增

根据ASGPR1基因启动子序列设计引物,并由上海生工公司合成引物,在上下游引物的5'-端分别加上Kpn I和Bgl II,上游引物:5'-GGTACCCGAGACT-TATCTTTAATATTGCCTG-3',下游引物:5'-AGATCTCACTCTCCTCATTTGTC-CAGATGCT-3'。以HepG2细胞基因组为模板,进行聚合酶链反应(PCR)(PE9600 PCR仪),扩增条件:95 $^{\circ}$ C变性60 s、58 $^{\circ}$ C 60 s、72 $^{\circ}$ C 90 s,共循环35次,其中94 $^{\circ}$ C预变性5 min,72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳、切胶、玻璃奶法回收、纯化。

三、pCAT3-ASGPR1p 的瞬时转染及报告基因 CAT 活性检测

回收产物在 T4 DNA 连接酶的作用下,与 pGEM-Teasy 载体连接,转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,挑取在选择平皿(Amp, X-gal/IPTG)生长的白色菌落提取质粒,经酶切(*Kpn* I/*Bgl* II)鉴定。*Kpn* I/*Bgl* II 双酶切重组质粒 pGEM-Teasy-ASGPR1p,玻璃奶纯化回收酶切产物,定向克隆至 pCAT3-Basic 载体,构建成重组质粒 pCAT3-ASGPR1p,经酶切及 DNA 测序鉴定(上海博亚公司)。磁珠法提取质粒以备转染。HepG2 细胞系在含 100 ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养。于 35 mm 平皿中生长至 50% ~ 80% 融合时采用脂质体转染法,具体转染方法参照 FuGENE6 Transfection Reagent 说明书。设置 pCAT3-Basic (1 μ g) 为阴性对照组, pCAT3-promoter (1 μ g) 为阳性对照组,以 pCAT3-ASGPR1p (1 μ g) 转染 HepG2 细胞,并以 pcDNA3.1(-)-HCV p7 (1 μ g) 与 pCAT3-ASGPR1p (1 μ g) 共转染细胞,48 h 后收获细胞,收集细胞裂解液,用于 CAT 活性检测。所有实验严格平行操作。取 1.0 μ g/L 的 CAT 标准品(试剂盒提供)及细胞裂解液 200 μ l,加入已包被抗体的 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C 温育 1 h,再依次加入一抗(地高辛标记的抗-CAT)、二抗(偶联有过氧化物酶的地高辛抗体抗-DIG-POD)各 200 μ l,37 $^{\circ}$ C 温育 1 h 后,加入过氧化物酶的底物室温显色 20 min。用酶标仪检测标本在 415 nm 检测波长、490 nm 参考波长下的吸光度(A)值,其数值反映细胞提取物中的 CAT 表达水平。

结 果

一、pCAT3-ASGPR1p 重组质粒的构建

利用自行设计的引物成功扩增出 pCAT3-ASGPR1p 的基因启动子序列,经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析显示扩增片段约 1772 bp,与预期片段符合(图 1)。将扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接,双酶切鉴定,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析显示两条带(3015 bp 的 pGEM-Teasy 载体和 1760 bp 的 ASGPR1p 启动子 DNA 片段),与预期一致(图 2)。将双酶切产物与 pCAT3-Basic 载体连接,双酶切鉴定如图 3 所示(3990 bp 的 pCAT3-Basic 载体和 1766 bp 的 pCAT3-ASGPR1p DNA 片段),DNA 测序结果和 GenBank 中推定的 ASGPR1p 启动子基因序列完全一致。pCAT3-ASGPR1p 质粒结构图见图 4。

二、pCAT3-ASGPR1p 重组质粒的瞬时转染及报告基因 CAT 的表达

将重组质粒 pCAT3-ASGPR1p 转染 HepG2 细胞,CAT ELISA 检测吸光度,空载体对照组 pCAT3-Basic 的吸光度为 0.041,阳性对照组 pCAT3-promoter 为 1.197, pCAT3-ASGPR1p 为 0.133,并以 pcDNA3.1(-)-p7 与 pCAT3-ASGPR1p 共转染细胞,其 CAT 吸光度值为 0.317(表 1、图 5),说明 p7 对 ASGPR1p 基因的表达有上调作用。

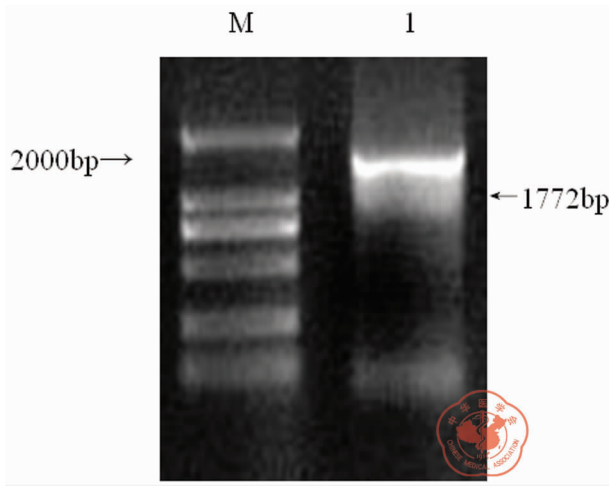


图1 以 HepG2 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 ASGPR1p 序列

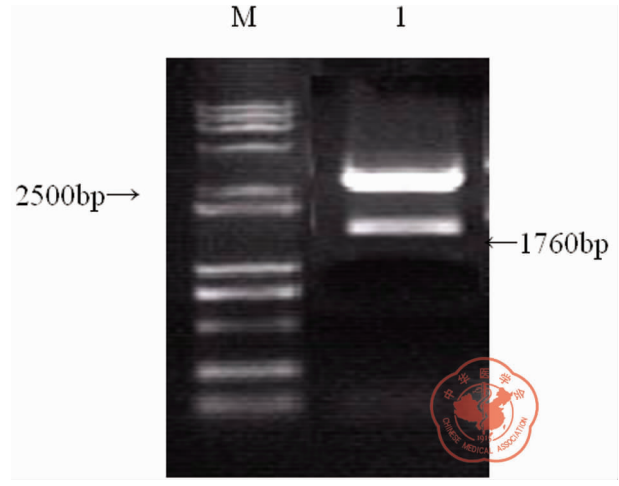


图2 pGEM-Teasy-ASGPR1p 双酶切鉴定 (Kpn I / Bgl II)

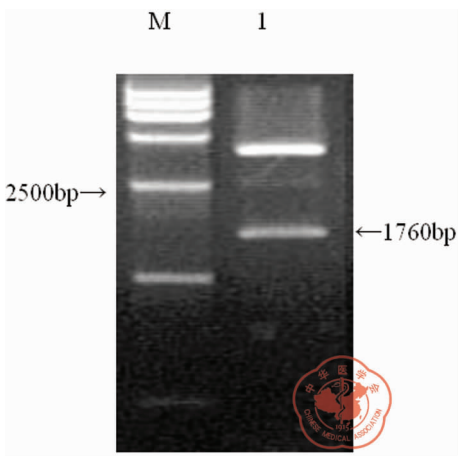


图3 pCAT3-ASGPR1p 双酶切鉴定 (Kpn I / Bgl II)



图4 pCAT3-ASGPR1p 质粒结构图

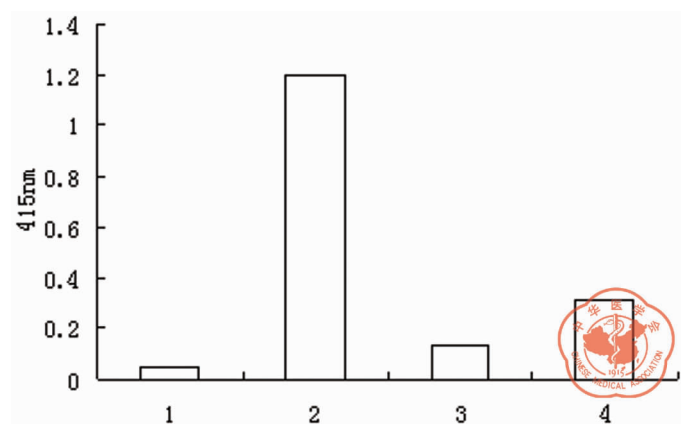


图5 pCAT3-ASGPR1p 和 pcDNA3.1(-)-p7 共转染 HepG2 细胞 CAT 表达
1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3: pCAT3-ASGPR1p; 4: pCAT3-ASGPR1p + pcDNA 3.1(-)-p7

表1 重组载体共转染 HepG2 细胞氯霉素乙酰转移酶检测结果

质粒	CAT(A)
pCAT-basic	0.041
pCAT-promoter	1.197
pCAT3-ASGPR1p	0.133
pCAT3-ASGPR1p + pcDNA3.1(-)-p7	0.317

讨 论

p7 蛋白是一种介于 HCV 结构蛋白与非结构蛋白之间的小蛋白,在脂质膜中形成六聚体阳离子通道,可使肝细胞内膜结构不稳定化,以利于成熟的病毒颗粒释放。金刚烷胺和长烷基链的亚氨基糖衍生物可抑制 p7 形成的阳离子通道,从而对 HCV 的治疗发挥重要作用^[10]。为进一步研究 p7 蛋白的功能,明确其在丙型肝炎发病机制中的作用,利用抑制性消减杂交技术筛选并克隆 HCV p7 反式激活的靶基因,笔者筛选到的结果中包括 ASGPR。

ASGPR 是数量丰富的一种异源低聚物的内吞受体,主要存在于肝脏实质细胞朝向窦状隙一侧的细胞膜表面。体内糖蛋白通过去唾液酸糖蛋白途径代谢,去唾液酸后通过去唾液酸糖蛋白受体在肝脏被吸收,所以 ASGPR 又称为肝糖凝集蛋白或肝凝集素^[11-13]。其主要功能是参与细胞凋亡、清除脂蛋白,同时又是嗜肝病毒的侵入位点^[14]。Soukharev 等^[15]通过对小鼠的研究发现 ASGPR1 具有两个转录起始位点,其次要的转录起始位点在主要起始位点上游 435 bp 处,ASGPR1 的 5'-近端 600 bp 是具有肝细胞特异性的启动子活性的最短区域。

Branza 等^[16]应用杆状病毒系统证实 HCV 结构蛋白(HCV-SP)结合到肝细胞或肝肿瘤细胞系,或 HCV-SP 的内在化部分是由 ASGPR 所致。而 HCV-SP 包括 p7 比不包括 p7 内在化更有效。p7 蛋白可调节 HCV 结构蛋白的内在化。p7 对于 HCV 病毒颗粒的细胞结合和进入是重要的^[17]。本实验结果提示 p7 蛋白可上调 ASGPR 基因的表达,这可能是 HCV 进入肝细胞的重要机制之一。本研究得到的结果是初步的,需进一步对 ASGPR 启动子进行缺失突变以确定其最小启动子区。

总之,p7 蛋白可上调去唾液酸糖蛋白受体基因的表达,进而促进 HCV 与肝细胞的结合,但其具体机制尚需要进一步详细研究。

参 考 文 献

- 1 成军,李克,陆荫英,等. 丙型肝炎病毒调节基因结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志,2002,10:223-225.
- 2 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志,2002,10:125-128.
- 3 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志,2002,10:999-1003.
- 4 刘妍,杨倩,成军,等. 基因表达谱芯片筛选 NS5ATP3 转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志,2004,12:306-310.
- 5 李克,王琳,成军,等. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志,2001,9:1379-

1383.

- 6 Wietzke-Braun P, Braun F, Sattler B, et al. Initial steroid-free immunosuppression after liver transplantation in recipients with hepatitis C virus related cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 2004, 10:2213-2217.
- 7 Gong GZ, Jiang YF, He Y, et al. HCV NS5A abrogates p53 protein function by interfering with p53-DNA binding. *World J Gastroenterol*, 2004, 10:2223-2227.
- 8 Anand BS, Velez M. Assessment of correlation between serum titers of hepatitis C virus and severity of liver disease. *World J Gastroenterol*, 2004, 10:2409-2411.
- 9 郭江, 成军, 纪冬, 等. 应用抑制性消减杂交技术克隆和筛选 HCVp7 蛋白的反式调节基因. *世界华人消化杂志*, 2004, 12:2590-2593.
- 10 Carrere-Kremer S, Montpellier C, Lorenzo L, et al. Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. *J Biol Chem*, 2004, 279:41384-41392.
- 11 田宝磊, 张永亮, 陈成功. 肝脏去唾液酸糖蛋白受体及其应用. *生命的化学*, 2001, 21:174-177.
- 12 刘海英, 仲人前, 孔宪涛. 去唾液酸糖蛋白受体与慢性肝病自身免疫. *中国免疫学杂志*, 2003, 19:585-587.
- 13 Sanford JP, Eddy RL, Doyle D, et al. Assignment of human asialoglycoprotein receptor gene (ASGR1) to chromosome 17p11-13. *Genomics*, 1991, 11:779-781.
- 14 Meier M, Bider MD, Malashkevich VN, et al. Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of the H1 subunit of the asialoglycoprotein receptor. *J Mol Biol*, 2000, 300:857-865.
- 15 Soukharev S, Hanover JA, Bethke B, et al. Organization of the mouse ASGR1 gene encoding the major subunit of the hepatic asialoglycoprotein receptor. *Gene*, 2000, 241:233-240.
- 16 Branza-Nichita N, Durantel D, Carrouee-Durantel S, et al. Antiviral effect of N-butyldeoxynojirimycin against bovine viral diarrhoea virus correlates with misfolding of E2 envelope proteins and impairment of their association into E1-E2 heterodimers. *J Virol*, 2001, 75:3527-3536.
- 17 Choukhi A, Ung S, Wychowski C, et al. Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins. *J Virol*, 1998, 72:3851-3858.

(收稿时间:2008-09-08)

(本文编辑:孙荣华)

郭江, 成军, 洪源, 等. 丙型肝炎病毒 p7 蛋白上调去唾液酸糖蛋白受体 1 基因的表达 [J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2010, 4(2):127-132.