文章编号:1000-5404(2006)13-1413-04

论著

乙型肝炎病毒核心抗原肝细胞结合新蛋白的功能研究

陆荫英,杨永平,王 琳,李 克,刘 妍,张玲霞,成 军 (解放军第302医院感染内科,北京 100039)

提 要:目的 为探讨乙型肝炎病毒(HBV)核心抗原(HBcAg)在乙型肝炎发病机制中的作用,筛选、克隆出人肝细胞中与HBcAg相互作用的未知蛋白基因C12并进一步对其功能作初步研究。**方法** 应用酵母双杂交系统-3筛选到与肝细胞蛋白结合的蛋白编码基因C12,克隆该基因并用再次用重回交实验证实作用可靠后,将基因与荧光蛋白基因融合表达,分析该基因表达产物在哺乳动物细胞中的定位;用MTT代谢实验了解C12表达对哺乳动物细胞生长代谢的影响作用;酵母双杂交实验寻找肝细胞中与之相互作用的蛋白;基因芯片技术了解C12基因表达对其他基因表达的影响。**结果** 成功地筛选并克隆出HBcAg的肝细胞结合蛋白C12基因,经回交实验再次证实C12基因的表达产物C12蛋白与HBcAg确切的结合作用。该基因与荧光蛋白基因融合表达转染293细胞、L02细胞后48 h细胞呈现均匀分布的强绿色荧光信号,提示C12蛋白可能主要定位在细胞质内;通过在Bel7402、L02细胞系中进行MTT检测,发现C12在上述细胞中表达没有对细胞的生长繁殖产生明显影响;用酵母双杂交系统-3筛选出肝细胞中与C12蛋白相互作用的蛋白基因16种;基因芯片技术在1 152个基因中筛选出17个差异表达的基因。**结论** C12蛋白主要定位在细胞质内,对哺乳动物细胞生长繁殖无明显影响,能与肝细胞中多种蛋白结合,在细胞内的过表达引起的生物过程涉及许多不同基因表达的变化。

关键词:乙型肝炎病毒;酵母双杂交技术;基因芯片技术;MTT代谢实验
中图法分类号:R341;R373.21;R394 **文献标识码**:A

Identification and characterization of a novel hepatitis B virus core antigen binding protein

LU Yin-ying, YANG Yong-ping, WANG Lin, LI Ke, LIU Yan, ZHANG Ling-Xia, CHENG Jun (Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

Abstract: **Objective** To elucidate the biological function of hepatitis B virus core antigen (HBcAg) on pathogenesis of hepatitis B and to identify and characterize the gene coding for a novel protein interacting with HBcAg in hepatocytes. **Methods** The yeast two-hybrid screening was performed to isolate cDNA clones encoding a novel proteins (C12) that directly interact with HBcAg. The interaction between HBcAg and C12 was verified by re-mating. The fluorescence protein fusion gene of pEGFP-N1-C12 was transfected into 293 cells and L02 cells and observed by fluorescent microscope. MTT assay was used to study the effect of C12 on metabolism of mammal cells. Yeast two-hybrid and cDNA microarray were performed to search binding protein and differential expression gene adjusted by C12. **Results** C12 gene was screened and identified by yeast two-hybrid system 3. The interaction between HBcAg and the novel protein coded by the new gene C12 was further confirmed by re-mating. After 48 h, fluorescence could be observed steadily in cell plasma. MTT assay showed that the C12 expression did not influence the growth of liver cells. Seventeen differential expression genes in HepG2 cells transfected with C12 protein expression plasmid by cDNA microarray were screened out, of which 16 genes were upregulated and 1 gene were downregulated. Twenty-one colonies containing 16 different genes coding for C12 binding proteins were isolated by yeast two-hybrid, 2 new genes with unknown function. **Conclusion** The novel protein C12 locates in cell plasma and interacts with many proteins in hepatocytes and may involve in many process of gene expression. C12 overexpression has no significant effect on the metabolism of liver cell.

Key words: hepatitis B virus; yeast-two hybrid technique; cDNA microarray; MTT assay

作者简介:陆荫英(1973-),女,贵州省安顺市人,博士,主治医师,主要从事传染病的基础及临床方面的研究,发表论文30余篇。电话:(010)66933429
收稿日期:2005-06-09;**修回日期**:2005-08-31

乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)同时存在于细胞核和细胞质内,具有保护病毒 mRNA,防止其被 RNA 酶降解的作用。HBcAg 与肝细胞蛋白的相互作用是病毒装配、释放、清除过程中关键的环节,找出其间的联系对于探明乙型肝炎病毒(HBV)致病机制,寻找有效的防治方法有着深远意义。在既往研究中,我们应用酵母双杂交技术筛选出部分 HBcAg 与肝细胞的相互作用蛋白基因,其中含未知基因,并能在真核表达载体中表达成相应的蛋白质。为进一步研究该未知蛋白的功能及其在 HBV 感染中的作用,在现有知识和经验的基础上,我们利用本实验室现有的技术手段,首先将基因与荧光蛋白基因融合表达,明确该基因表达产物在哺乳动物细胞中的定位,再进一步用 MTT 代谢实验、酵母双杂交实验、基因芯片等技术来对该基因的功能进行初步分析,以期能从中发现有价值的线索,为下一步更加具体的深入研究开辟道路。

1 材料与方法

1.1 材料

AH109 酵母菌株、预转化的 cDNA 肝文库酵母株 Y187、pGBKT7-BD 克隆载体及酵母 YPD 培养基、SD 培养基、X-α-gal 购于 Clontech 公司。大肠杆菌 DH5α 及 HBV ayw 亚型基因全序列质粒载体 pCP10、大肠杆菌 JM109 为本室保存,人肝癌细胞系 HepG2、Bel7402、人肝细胞系 L02、非洲绿猴肾细胞系 293 等(中科院上海细胞生物所),*Taq* DNA 聚合酶、T_4 DNA 连接酶、*Eco*R Ⅰ及 *Bam*H Ⅰ等限制性内切酶、RT-PCR 试剂盒(Takara)。IPTG 及 X-β-Gal 及 pGEM-T 克隆载体、pEGFP-N1 荧光蛋白载体(Promega)。其余化学试剂(Sigma)。pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen);Lipofectamine PLUS 转染试剂、胎牛血清、DMEM(Gibco),mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech),新基因 C12 扩增引物(P1:5′-GAATTCATGATAAGTGAAGGCGGATG-3′,P2:5′-GGATCCCTTGTTAACAGAGGACTTTT-3′),合成及 DNA 测序由上海博亚公司承担。General Scanning 公司的 ScanArray 3000,用 Cartesian 公司的 Cartesian 7500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片。

1.2 方法

1.2.1 C12 基因的筛选及鉴定 PCR 扩增 HBcAg 基因与 pGBKT7 载体连接,转化入酵母菌株 AH109,Western blot 免疫印迹法验证 HBcAg 在酵母中的表达,与肝文库的酵母配合,经过缺陷型培养基及 X-α-gal 的蓝白斑筛选,得到真阳性菌落;PCR 扩增出文库靶基因片段后测序并进行生物信息学分析,设计引物以 HepG2 细胞 cDNA 为模板,扩增出 C12 新基因的完整序列,酶切后并连接入另一酵母表达载体 pGADT7 中回交实验验证 HBcAg 与 C12 新基因表达产物的结合作用[1-3]。

1.2.2 C12 亚细胞定位 用引物 P1、P2 扩增 C12 基因全序,*Eco*R Ⅰ及 *Bam*H Ⅰ双酶切连入 pEGFP-N1 荧光蛋白载体,转化大肠杆菌经测序鉴定正确后纯化提取质粒脂质体法转染 293 细胞、L02 细胞,48 h 后荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.3 MTT 代谢实验 将 L02 及 Bel7402 两种细胞各以 1×10^4 细胞/孔接种于 24 孔板中培养过夜,每种细胞设 4 组,分别为空细胞组、单加脂质体组、加空载体组、C12 组,每组各 6 个平行孔,pcDNA3.1(-)-C12 真核表达载体转染细胞,培养 18 h,培养结束前 4 h 换成无血清的培养液,加入 MTT 储存液至终浓度 0.5 mg/ml,37 ℃孵育 4 h,吸弃上清,每孔加 DMSO 750 μl,震荡混匀 5~15 min,待结晶完全溶解后检测 *D* 值(检测波长 550 nm,参考波长 630 nm)。

1.2.4 C12 肝细胞结合蛋白筛选 构建 C12 的酵母表达载体,经过与人肝文库的配合、筛选后提取阳性酵母质粒进行 DNA 测序鉴定及生物信息学分析。

1.2.5 C12 的基因表达谱芯片分析 pcDNA3.1(-)-C12 和对照空载体 pcDNA3.1(-)转染 HepG2 细胞,48 h 后收获细胞,总 RNA 提取、纯化 mRNA,逆转录后 Cy3-dUTP 标记对照组细胞,Cy5-dUTP 标记实验组细胞并纯化。乙醇沉淀后溶解在 SDS 杂交液中与包含 1 152 个 cDNA 的芯片杂交,通用引物进行 PCR 扩增,点样,玻片经水合(2 h)、室温干燥(0.5 h),UV 交联,再分别用 SDS、水及硼氢化钠溶液处理 10 min,95 ℃水浴变性 5 min,加混合探针 60 ℃杂交 15~17 h、洗涤、室温晾干,扫描芯片进行检测与分析。

1.3 统计学方法

采用 SAS 统计软件进行 *t* 检验。

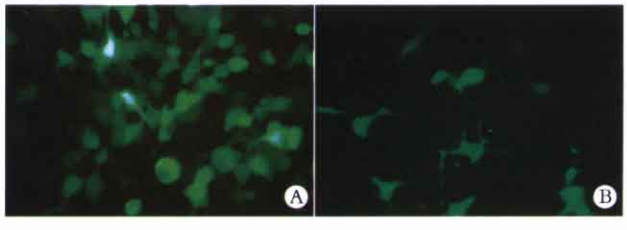
2 结果

2.1 HBcAg 为"诱饵"对肝细胞文库杂交筛选及鉴定结果

应用酵母双杂交技术以 HBcAg 为"诱饵"与肝细胞 cDNA 文库的杂交,筛选出 HBcAg 结合蛋白新基因 C12[4,5],生物信息学分析后重新克隆出 C12 基因全序并经回交实验再次证实其与 HBcAg 的结合作用。

2.2 C12 亚细胞定位

用引物 P1、P2 扩增出 C12 基因全序,酶切连入 pEGFP-N1 荧光蛋白载体后转染 293 细胞、L02 细胞,培养 48 h 后荧光显微镜下观察到细胞内呈现均匀分布的强绿色荧光信号,提示该蛋白可能主要定位在细胞质内(图 1)。



A:293 细胞;B:L02 细胞

图 1 C12 基因分别在 293 细胞与 L02 细胞中的表达

(荧光显微镜×400)

2.3　MTT 检测

经过在 Bel7402、L02 细胞系中进行 MTT 检测，结果显示 C12 基因的真核表达载体转染细胞后，与各组对照值相对比，P 值均大于 0.05，无显著的统计学意义，提示 C12 新基因在哺乳动物细胞中表达对细胞的生长繁殖无明显的影响作用（表 1）。

表 1　C12 新基因在 Bel7402 及 L02 细胞系中的 MTT 检测结果

细胞系	空白细胞	脂质体	pEGFP-N1	pEGFP-N1-C12
Bel7402	0.547 ± 0.076	0.575 ± 0.122	0.470 ± 0.124	0.503 ± 0.093
L02	0.216 ± 0.028	0.201 ± 0.01	0.197 ± 0.011	0.205 ± 0.024

2.4　C12 肝细胞结合蛋白筛选

pGBKT7-C12 酵母表达载体在酵母菌株 AH109 中稳定表达后，经过配合和双重筛选获得 21 个真阳性菌落，提取质粒克隆到大肠杆菌中测序，结果与 GenBank 数据库进行初步比较。发现共包含 16 种基因类型，其中有 2 个克隆为新基因，其余 19 个均与已知基因的部分序列高度同源（97% ~ 100%，表 2）。

表 2　C12 新基因肝细胞结合蛋白筛选结果

同源基因	同源性（%）	克隆数
组织蛋白酶 B	99	1
载脂蛋白 M	98	1
细胞色素 C 氧化酶Ⅱ	97 ~ 99	3
人类受体蛋白酪氨酸激酶 EPHB4 变异因子	99	1
KH 型剪接调控蛋白	98	1
磷脂酰肌醇脱酰酶聚糖 Q 转录变异因子	97	1
铁蛋白轻链	99	2
鸟氨酸脱羧酶 1	99	1
金属硫蛋白 2A	98 ~ 100	3
血液凝固因子Ⅳ	100	1
乙酰乳酸合成酶	99	1
钙激活蛋白酶	98	1
核外三磷酸盐双磷本科酰水解酶 5	99	1
血浆 α-球蛋白抑制因子	99	1
未知蛋白基因	100	2

2.5　C12 的基因表达谱芯片分析

在芯片上共有 1 152 个 cDNA，阴性对照点（8 条水稻基因，共 8 个点）的杂交信号均很低，证实了数据的可靠性。实验组探针标记 Cy5 荧光素（呈红色），对照组探针标记 Cy3 荧光素（呈绿色），红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异，黄色代表表达水平无差异[6]。按阳性标准，在 1 152 个基因中筛选出 17 个差异表达的基因，除 1 个未知基因表达上调外，其余 16 种基因的表达下调，提示 C12 的过表达对 HepG2 细胞中的这些蛋白表达有抑制作用（表 3）。

表 3　C12 影响表达减低的基因

基因 Bank 号	同源基因
000208	胰岛素受体
005500	SUMO-1 活化酶亚基 1
006292	肿瘤易感基因 101
012248	磷酸硒合成酶 2（SPS2）
006217	丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶抵制剂
016614	肿瘤坏死因子受体
006437	ADP-核酸转移酶类似物 1（ADPRTL1）
033306	Caspase 4 凋亡相关半胱氨酸蛋白酶 4
L04731	急性淋巴细胞性白血病易位子 T
002085	谷胱甘肽过氧化物酶（GPX4）
004728	DEAD box 蛋白多肽 21
002624	prefoldin 5 转录变异体 1
006415	丝氨酸棕榈酰转移酶
004127	G 蛋白通路抑制剂
014887	BCRA2 区域的假想蛋白
000660	转化生长因子 β_1（TGFβ_1）

3　讨论

人类基因组计划获得了大量的关于染色体 DNA 的基因序列信息，接下来确定编码基因序列、编码蛋白的结构及功能、生物学意义，是摆在我们面前的迫切任务。在既往研究过程中，我们筛选到 HBcAg 的肝细胞结合蛋白新基因 C12，为探寻其功能我们设计了将 HBcAg 肝细胞结合蛋白新基因 C12 连接入绿色荧光蛋白载体 pEGFP-N1，通过在几种细胞株中的融合表达，初步明确该新蛋白的亚细胞定位，从实验结果可以看出，转染后 48 h 细胞呈现均匀分布的强绿色荧光信号，提示该新蛋白可能主要定位在细胞质内。通过在 Bel7402、L02 细胞系中进行 MTT 检测，结果显示新基因 C12 在上述细胞中表达没有对细胞的生长繁殖产生明显影响，推测有以下可能：C12 新基因表达产物是细胞中正常存在的一种蛋白质，它可能对细胞的生长有显著的促进或抑制作用，但因受到细胞内其他蛋白质间的网络状调控而表现不出明显的影响；C12 新基因表达产物对细胞的生长繁殖没有明显的干预作用，而具备其他功能。

另外，通过寻找在肝细胞内的相互作用蛋白，发现蛋白相互作用网络中的相关蛋白，从中找出有价值的线索，对新基因表达产物的功能做初步预测，为下一步实验设计提供依据。利用酵母双杂交技术，在真核表达载体 pGBKT7 中构建 pGBKT7-C12 蛋白基因诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 C12 基因，与人肝 cDNA 文库的酵母菌株 Y187 进行配合，筛选出与之相

互作用的蛋白基因16种。其中,C12蛋白能与细胞色素C氧化酶、鸟氨酸脱羧酶1、乙酰乳酸合酶等多种蛋白酶结合,提示C12新蛋白可能与线粒体能量代谢、线粒体介导HBV的复制和装配有关;C12新蛋白还能与KH型剪接调控蛋白(KSRP)相结合,KSRP可能是调控增强子序列外显子剪切的因子,提示它可能参与了细胞周期调节和蛋白质的表达调控;钙激活蛋白酶、人类受体蛋白酪氨酸激酶EPHB4变异因子、磷脂酰肌醇脱酰酶聚糖Q转录变异因子1是细胞信号转导通路中重要的因子,C12新蛋白与之有相互作用提示它是否还影响信号转导通路。与血液凝固因子IX有相互作用,提示该新蛋白是否参与凝血过程。铁蛋白与乙肝病毒对肝细胞的损伤、肝细胞癌(HCC)的发生有关,通过酵母双杂交技术证实铁蛋白能跟C12新蛋白相结合,提示C12蛋白在铁蛋白与HBV肝细胞损害间可能起着桥梁作用。

应用基因表达谱芯片对C12表达质粒pcDNA3.1(-)-C12转染的HepG2细胞和空载体处理的相同细胞差异表达的mRNA进行检测,在1 152个基因中筛选出17个差异表达的基因,这些差异调节基因大多与细胞信号传导、细胞增殖分化、肿瘤发生等生物过程密切相关。如C12新基因在细胞中表达可降低胰岛素受体基因的表达,是否与HBV感染引起肝源性糖尿病有关;抑制细胞生长调节及信号转导相关基因如G蛋白通路抑制剂、肿瘤易感基因101、急性淋巴细胞性白血病易位子T等,丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶抑制剂、caspase-4、肿瘤坏死因子受体相关蛋白、转化生长因子、丝氨酸棕榈酰转移酶等及DNA复制及翻译相关基因如DEAD box蛋白多肽21等的表达可能与HBV感染引发肝细胞恶性变、肿瘤发生相关;抑制过氧化酶相关基因如ADP-核糖基转移酶、谷胱甘肽过氧化物酶4、磷酸硒合成酶2等,可以干扰细胞的能量代谢,引起细胞炎症坏死;抑制分子伴侣蛋白Prefoldin 5在细胞中的正常表达,可能干扰蛋白质的翻译后加工,致细胞功能紊乱。总之,利用基因表达谱芯片对C12蛋白差异调节基因的表达研究表明,细胞内C12蛋白的过表达引起的生物过程涉及许多不同基因表达的变化,

以上实验未能对C12基因的生物学功能作出肯定的结论,只是为新基因功能的初步探寻迈开了尝试性的一步,为以后的深入研究奠定基础,在今后的工作中我们还有许多工作要做,例如需要弄清新基因的表达调控机制,找出相关的启动子、转录因子及其作用方式;Northern-blot技术阐明基因的组织细胞分布特点及生理、病理情况下表达方式和水平的变化;建立转基因动物模型、基因敲除模型、基因敲除细胞系等了解该基因对活细胞及动物的影响;利用动物免疫、人源单链抗体的噬菌体文库制备特异性抗原,以便行进一步的免疫组化、Western blot等分析,了解基因编码蛋白表达水平、表达方式及其与临床疾病之间的关系等。

参考文献:

[1] SEREBRIISKII I G, TOBY G G, FINLEY R L Jr, *et al*. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system[J]. Methods Mol Biol, 2001, 175: 415-454.

[2] GIETZ R D, WOODS R A. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system[J]. Methods Mol Biol, 2002, 185: 471-486.

[3] 陆荫英,王 琳,刘 妍,等. 乙型肝炎病毒核心抗原与金属硫蛋白相互作用的研究[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(2): 161-163.

[4] 陆荫英,王 琳,成 军,等. 酵母双杂交技术筛选HBcAg肝细胞结合蛋白基因[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(4): 426-429.

[5] 陆荫英,陈天艳,成 军, 等. 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白新基因C12的研究[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(8): 1122-1125.

[6] 陆荫英,刘 妍,成 军,等. HBsAg结合蛋白C12基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(1): 62-65.

(编辑 龙 亮)

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中,引用英文文献的比例很高,但有不少作者将英、美人的姓名搞错,以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是:名-名-姓,"名"可以有1个、2个或3个,但"姓"只有1个。因此,从书籍或期刊中的姓名转录到文献时,要将次序调整为姓-名-名,姓是不可以简写的;"名"可以缩写,用第一个字母大写,不用缩写点。数据库在著录作者姓名时,已经调整为姓-名-名,可照录。

例如:John Quincy Public 写为 Public J Q。

本刊编辑部