论著

文章编号:1000-5404(2008)09-0834-03

TIA-1通过影响肝细胞转录因子的活性调节HBV的e抗原和s抗原表达

陈 婧,李 毅,谭 畅,刘 湘,黄爱龙,汤 华 (重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所,教育部感染性疾病分子生物学重点实验室,重庆 400016)

摘 要:目的 证明TIA-1分子具有调节HBV基因表达的功能。方法 TIA-1真核表达质粒pcDNA3-TIA-1,用脂质体转染HepG 2.2.15细胞后,ELISA检测e和s抗原的表达;RT-PCR检测与HBV复制有关的转录因子HNF1、HNF2、HNF3、HNF4、RXRα、PPARα、C/EBP的表达。结果 与正常的HepG 2.2.15细胞相比,转染pcDNA3-TIA-1质粒的HepG 2.2.15细胞,其e抗原的表达量明显的增高,而s抗原表达量明显的降低。与正常的HepG 2.2.15细胞相比,转染pcDNA3-TIA-1质粒的HepG 2.2.15细胞中的HNF1、HNF2、RXRα mRNA含量有明显的下降。结论 TIA-1蛋白能通过影响与HBV复制有关的转录因子活性,调节HBV e抗原和s抗原的表达。

关键词:TIA-1;s抗原;e抗原;转录因子;HepG 2.2.15细胞
中图法分类号:R373.21;R392.11;R392.2 文献标识码:A

TIA-1 may interact with liver-enriched transcription factors and regulate HBV s and e antigen expressions

CHEN Jing, LI Yi, TAN Chang, LIU Xiang, HUANG Ai-long, TANG Hua (Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Insititute of Viral Hepatitis, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To identify TIA-1 function in regulating HBV replication. Methods pcDNA3-TIA-1 eukaryotic expression vector was transfected into HepG 2.2.15 hepatoma cell line with lipofectamine. HBV e antigen and s antigen was checked with ELISA method. RT-PCR was used to identify expression of some transcription factors that involved in HBV transcription such as HNF1, HNF2, HNF3, HNF4, RXRα, PPARα, and C/EBP. Results Compared with normal HepG 2.2.15 hepatoma cell, the expression of e antigen was obviously high and s antigen was depressed in the HepG 2.2.15 hepatoma cell transfected with pcDNA3-TIA-1 vector. Compared with normal HepG 2.2.15 hepatoma cell, the mRNA level of HNF1, HNF2, RXRα changed significantly. Conclusion These data show that TIA-1 may interact with liver-enriched transcription factors and regulate HBV e antigen and s antigen expression.

Key words: TIA-1; s antigen; e antigen; transcription factor; HepG 2.2.15 hepatoma cell line

蛋白TIA-1(cytotoxic granule-associated RNA-binding protein)为相对分子质量15×10^3大小,定位于细胞毒性T淋巴细胞(CTLs)细胞质中的低密度和高密度核心颗粒。虽然在静止的淋巴细胞只发现有相对分子质量15×10^3 TIA-1的表达,而在活化的淋巴细胞则发现另外3种剪接变异体TIA-1的表达(相对分子质量分别为28×10^3、40×10^3、53×10^3)。40×10^3的TIA-1是RNA结合蛋白家族的1个成员,这个RNA结合蛋白家族包括多聚腺嘌呤(A)结合蛋白、核糖核蛋白(如U1、A1、C1和核仁素)和一些假定的转录激活因子。

TIA-1主要表达在脑、睾丸和脾脏。TIA-1基因缺失型小鼠显示出高度的胚胎致死性,说明该基因在胚胎发育过程中有着重要的作用[1]。

HepG 2.2.15是HBV高表达细胞,它分泌s抗原和e抗原,并能在其中检测到HBV病毒颗粒。我们将pcDNA3-TIA-1的真核表达载体导入HepG 2.2.15细胞中,观察到TIA-1能刺激HBV e抗原的表达和下调HBV s抗原的表达,以期证明TIA-1能调控HBV的基因表达,为丰富HBV的基础研究和抗HBV的药物开发寻求新的抗病毒靶位。

1 材料与方法

1.1 材料

HepG 2.2.15肝细胞癌细胞株由本室提供;pcDNA3-TIA-1

基金项目:重庆医科大学科研启动基金(B9001-0228418046);重庆市教委科学技术研究项目(KJ060301)
Supported by the starting Funds of Science and Research of Chongiqng Medical University(B9001-0228418046) and the Sci & Tech Project of Chongqing Municipal Education Committee (KJ060301)
作者简介:陈 婧,女,四川省宜宾市人,硕士研究生,主要从事乙型肝炎病毒体内复制机制方面的研究。电话:(023)68486780,E-mail:happy2005_cj@126.com
通信作者:汤 华,电话:(023)68486780
收稿日期:2007-05-10;修回日期:2007-08-08

真核表达质粒由美国扬百翰女子医院风湿病免疫学部(Division of Rheumatology Immunology and Allergy Brigham and Woman's Hospital)的 Paul J. Anderson 博士惠赠(经本实验室测序验证,TIA-1 序列正确);乙型肝炎病毒 e 抗原、s 抗原和诊断试剂盒(酶联免疫法)购自上海实业科华生物技术有限公司;Tfx™-20 和 Tfx™-50 细胞转染试剂盒购自 Promaga 公司;Trizol 购自 Invitrogen。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　　HepG 2.2.15 细胞的培养条件为 10% 小牛血清、800 μg/ml G418 抗生素的 RPMI1640 培养基。37 ℃,5% CO_2 孵箱中培养。

1.2.2　细胞转染　　在 HepG 2.2.15 细胞生长到 80% ~90% 时,按 Promega 细胞转染技术指南及分子克隆实验指南[2] 进行细胞转染实验。分别将 pcDNA3-TIA-1、pcDNA3 质粒(对照)用转染试剂导入 HepG 2.2.15 细胞,并用转染试剂(不含 DNA)转染 HepG 2.2.15 细胞为阴性对照。

1.2.3　ELISA 法测定 HBV e 抗原、s 抗原蛋白　　收集 100 μl 培养细胞的上清液,用乙型肝炎病毒 e 抗原和 s 抗原诊断试剂盒(酶联免疫法)检测。按说明书要求,样品的吸光度值大于 2.1 倍阴性对照,样品就为阳性结果,低于 2.1 倍阴性对照为阴性结果。

1.2.4　RT-PCR　　从细胞中提取 RNA,纯化,经 DNA 酶处理,利用 Oligo(dT)$_{18}$ 引物进行反转录,合成 cDNA,RNA 酶处理。反应条件为 94 ℃ 预变性 4 min,再经 94 ℃ 变性 1 min,59 ℃ 解链 1 min,72 ℃ 延长 1 min,共 30 个循环。PCR 产物通过 1% 琼脂凝胶电泳、溴化乙锭染色后,用凝胶成像仪记录图像。引物序列为:HNF1 正义链 5′-TACGTTCACCAACACAGGTG-3′和反义链 5′-AGATGAAGGTCTCGATGACG-3′,反应产物为 595 bp;HNF2 正义链 5′-AATCTTGTACCAGGCCTACG-3′和反义链 5′-TGTGCAATTGCCATGACTCC-3′,反应产物为 605 bp;HNF3 正义链 5′-ACACGTACATGAGCATGTCG-3′和反义链 5′-TGATCCACTGGTAGATCTCG-3′,反应产物为 446 bp;HNF4 正义链 5′-CAGATGATCGAGCAGATCCA-3′和反义链 5′-AACTTCCTGCTTGGTGATGG-3′,反应产物为 371 bp;RXRα 正义链 5′-AGCACTATGGAGTGTACAGC-3′和反义链 5′-AAATGTTGGTGACAGGGTCG-3′,反应产物为 371 bp;PPARα 正义链5′-TGGAAGCTTTGGCTTTACGG-3′和反义链 5′-AAGGTGGATTGTTACTGGCC-3′,反应产物为 577 bp;C/EBP 正义链 5′-ATGGAGTCGGCCGACTTCTA-3′和反义链 5′-AGCTGCTTGGCTTCATCCTC-3′,反应产物为 498 bp;hGAPDH 正义链5′-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3′和反义链 5′-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3′,反应产物为 223 bp。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　TIA-1 对 HBV e 抗原、s 抗原表达的调节作用

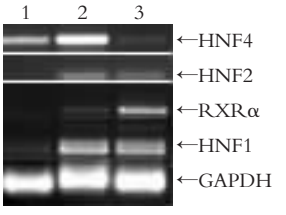
在转染 24 h 和 48 h 后,检测 HBV 的 s 抗原和 e 抗原。pcDNA3-TIA-1 转染 HepG 2.2.15 细胞后,细胞分泌的 e 抗原和 s 抗原与 pcDNA3 质粒(对照)和阴性对照相比较,差异有统计学意义。可以认为 TIA-1 能对 HBV 的 e 抗原和 s 抗原表达具有很强的调节作用。见表 1。

表 1　TIA-1 对 HBV e 抗原、s 抗原表达的调节作用

组别	e 抗原		s 抗原	
	24 h	48 h	24 h	48 h
pcDNA3-TIA-1	2.42 ± 0.22	2.12 ± 0.58	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.02
pcDNA3	1.72 ± 0.16	0.95 ± 0.07	0.36 ± 0.05	0.73 ± 0.05
阴性对照	1.49 ± 0.25	0.80 ± 0.03	0.35 ± 0.06	0.55 ± 0.04
F	20.50	13.33	14.03	180.10
P	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

2.2　TIA-1 对 HBV 复制有关的转录因子活性的影响

为了阐明 TIA-1 能调节 HBV 的 e 抗原和 s 抗原表达的机制,转染 24 h 后,提取 pcDNA3-TIA-1、pcDNA3、阴性对照这 3 组细胞的 RNA,进行 RT-PCR 实验。分别检测与 HBV 基因复制有关的转录因子 HNF1、HNF2、HNF3、HNF4、RXRα、PPARα、C/EBP 的表达。HepG 2.2.15 细胞在转染 pcDNA3-TIA-1 后,HNF1、HNF2、HNF4、RXRα mRNA 含量有明显的变化(图 1)。其中,HNF4 mRNA 表现为升高,HNF2、RXRα 和 HNF1 mRNA 表现为降低,而 HNF3、PPARα、C/EBP 则无明显变化。



1:pcDNA3-TIA-1 + 脂质体转染混合液;2:空质粒对照;3:阴性对照

图 1　与 HBV 基因复制有关的转录因子 RT-PCR 结果

3　讨论

肝炎病毒感染所引起的一系列肝脏疾病,发病机制非常复杂,涉及到肝炎病毒与肝细胞大分子之间的复杂的相互作用[3]。肝细胞癌细胞株 HepG 2.2.15 是应用最广泛的细胞模型。它是将含有 HBV 基因组(2 个 HBV 头对尾二聚体,以尾对尾方向串联)的重组载体质粒转染 HepG2 细胞,经 G418 筛选,得到的克隆能稳定分泌 HBsAg、HBeAg 及 Dane 颗粒,可检测到细胞内 DNA 和 RNA[4],证明 HepG 2.2.15 细胞株能稳定地支持 HBV 的复制。也就是说,HepG 2.2.15 细胞中含有 HBV 复制、表达所需的转录因子、转运蛋白等调节要素。

本实验为了证明 TIA-1 蛋白与 HBV 的基因复制、表达的相互关系,采用真核表达载体 pcDNA3-TIA-1,在 HBV 稳定表达细胞系 HepG 2.2.15 细胞株过度表达 TIA-1 蛋白,检测 HBV 基因的产物 s 抗原和 e 抗原。TIA-1 蛋白能抑制 s 抗原的表达,同时能上调 e 抗原的表达。TIA-1 蛋白对 s 抗原的表达抑制能维持一定时间,因为在 48 h 后,它的抑制作用依然强烈。TIA-1 蛋白对 s 抗原、e 抗原的表达具有不同的调节作用,说明

s 抗原和 e 抗原的调控因素是不同的。

为了阐明 TIA-1 蛋白对 s 抗原、e 抗原的表达调控的机制，有研究者将与 HBV 的基因复制有关的转录因子 HNF1、HNF2、HNF3、HNF4、RXRα、PPARα、C/EBP 等用 RT-PCR 方法进行了检测[5-7]。TIA-1 蛋白对各种转录因子的作用是不同的。TIA-1 蛋白能上调 HNF4 的表达，下调 HNF2、HNF1、RXRα 的表达，但不能影响 HNF3、PPARα、C/EBP 的表达。

本研究表明，TIA-1 蛋白能影响一些与 HBV 的基因复制有关的转录因子的活性，从而调节 e 抗原、s 抗原的表达，证明了 TIA-1 蛋白具有调节 HBV 基因表达的功能。

参考文献：

[1] Zhang T, Delestienne N, Hue G, *et al*. Identification of the sequence determinants mediating the nucleo-cytoplasmic shuttling of TIAR and TIA-1 RNA-binding proteins[J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 23): 5453-5463.

[2] 萨姆布鲁克 J，弗里奇 E F，曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁，黎孟枫，译. 第 2 版. 北京：科学出版社，1996：880-898.

[3] Bouchard M J, Schneider R J. The enigmatic X gene of hepatitis B virus [J]. J Virol, 2004, 78(23): 12725-12734.

[4] Sun D, Nassal M. Stable HepG2 and Huh7-based human hepatoma cell lines for efficient regulated expression of infectious hepatitis B virus [J]. J Hepatol, 2006, 45(4): 636-645.

[5] Zheng Y, Li J, Ou J H. Regulation of hepatitis B virus core promoter by transcription factors HNF1 and HNF4 and the viral X protein[J]. J Virol, 2004, 78(13): 6908-6914.

[6] Tang H, McLachlan A. Avian and Mammalian hepadnaviruses have distinct transcription factor requirements for viral replication[J]. J Virol, 2002, 76(15): 7468-7472.

[7] Uprichard S L, Wieland S F, Althage A, *et al*. Transcriptional and posttranscriptional control of hepatitis B virus gene expression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(3): 1310-1315.

（编辑 王 红）

（上接 833 页）

乳头，轻轻按住，让乳头全部进入仿生嘴内；②打开前气阀，另 1 只手以 40～60 次/min 的频率反复挤压橡皮球，挤压强度以乳头能够耐受为宜，逐渐加大力量；③双侧乳头交替进行；④每天使用次数和时间由医师指导；⑤用于矫正凹陷乳头时，封堵 A 接口，B 接口接负压球，即可将乳头吸入仿生嘴内，持续 5～10 min，每天 2～3 次，直至矫正。

2 临床应用与效果

2.1 临床资料

选取我院 2006 年 3 月至 2007 年 3 月分娩的 160 例初产妇进行研究（所有受试者均签署知情同意书），其年龄为 21～33 岁，孕周 39～41 周，单胎头位，无合并症和并发症，B 超示胎盘成熟度Ⅲ级，无负荷试验（NST）有反应，骨盆外测量无异常，头盆评分 >7 分，宫颈 Bishop 评分 >7 分[1]。受试者按照年龄、孕周、孕次进行配对，此后分入按摩器组（试验组）和缩宫素组（对照组），每组各 80 例。两组年龄、孕周及孕次无明显差异（$P>0.05$）。

2.2 方法

试验组按照 1.3 中介绍的方法以实用新型仿生乳头按摩器进行乳头刺激，交替按摩双侧乳头，每侧每次 15 min，每天 4 次，按摩乳头 48 h 未临产者为引产失败。对照组将缩宫素 2.5 U 加入 5% 葡萄糖溶液 500 ml 中静脉滴注，8～10 滴/min 开始，每 30 分钟无反应逐渐增加滴速，最多不超过 40 滴/min，48 h 未临产者为引产失败。两组均由专人观察胎心、宫缩及产程。

统计学方法：采用 SPSS 13.0 统计软件进行 Fisher's 确切概率法。

2.3 结果

试验组各受试者均能在医师鼓励下进行乳房按摩，按摩后 48 h 内均有不同强度宫缩产生，且无过强宫缩，发生临产 71 例（88.75%），其中 60 例经阴道分娩（84.5%），4 例因社会因素、7 例因产科指征行剖宫产（15.49%），产后出血 1 例（1.41%），发生新生儿窒息 2 例（2.82%）。对照组用药后 48 h 内临产者 73 例（91.25%），其中阴道分娩 62 例（84.93%，有 2 例为产前助产），3 例因社会因素、8 例因产科指征行剖宫产（15.07%），产后出血 2 例（2.73%），新生儿窒息 2 例（2.74%）。两组引产成功率、产后出血率及新生儿窒息发生率无明显差异（$P>0.05$）。

3 讨论

本实验纳入对象为 39～41 孕周，临近、达到或超过孕产期而无临产迹象的初产妇，引产前 NST 有反应，B 超提示胎盘成熟度Ⅲ级，此时胎儿已经成熟。为避免胎盘功能减退带来的不良妊娠结局可考虑引产[2]。本研究表明，通过按摩乳头，促进缩宫素的合成和释放，可诱发或促进有效子宫收缩，启动产程，促进分娩顺利进行，此时缩宫素的释放比较接近生理性脉冲释放，且简单易行，与缩宫素引产相比较，并未增加产后出血和新生儿窒息的风险。

我院采用的实用新型乳头按摩器能避免产妇害羞、天气寒冷等不利因素，模仿婴儿吮吸乳头的动作，通过产生规律的负压，有节奏的刺激乳头，实现类似吮吸感的有效物理刺激，安全诱发或加强宫缩，有效引产。

关键词：乳头；按摩器；仿生
中图法分类号：R715.3　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 凌萝达，顾美礼. 难产[M]. 修订版. 重庆：重庆出版社，1999：69-72.

[2] 杜保琳. 产前乳头刺激试验的临床价值[J]. 中华妇产科杂志，1987，22(3)：162-164.

（编辑 邓强庭）