论著

文章编号:1000-5404(2009)15-1440-03

多聚嘧啶序列结合蛋白抑制 HBV 转录后调节元件的功能

程丽英,万 涛,黄婷婷,蔡雪飞,张文露,黄爱龙,汤 华 (重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨多聚嘧啶序列结合蛋白(polypyrimidine tract binding protein,PTB)对乙型肝炎病毒转录后调节元件(HBV posttranscriptional regulatory element,HPRE)功能的影响。**方法** 采用 pDM138-HPRE CAT(chloramphenicol acetyl transferase)报告体系,通过质粒瞬时转染细胞的方式来探讨 PTB 对 HPRE 功能的影响。**结果** CAT 活性检测表明:PTB 的过表达使 HPRE 介导的 CAT 表达活性下降,并且呈剂量依赖性。当去除质粒上游剪接供体位点时,PTB 仍然可以降低 CAT 的活性。**结论** PTB 抑制 HPRE 的功能,并且这种抑制作用不依赖于上游剪接供体位点。

关键词: 乙型肝炎病毒;多聚嘧啶序列结合蛋白;HBV 转录后调节元件;CAT 检测;瞬时转染

中图法分类号: R373.21; R394-33; R394.3 **文献标识码:** A

Polypyrimidine tract binding protein inhibits the function of HBV posttranscriptional regulatory element

CHENG Li-ying, WAN Tao, HUANG Ting-ting, CAI Xue-fei, ZHANG Wen-lu, HUANG Ai-long, TANG Hua (Key Laboratory of Molecular Infectious Diseases of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of polypyrimidine tract binding protein (PTB) on HBV posttranscriptional regulatory element (HPRE). **Methods** The chloramphenicol acetyl transferase (CAT) expression plasmid pDM138-HPRE system was used. Transient co-transfection was adopted to identify the roles of PTB in HPRE-regulated gene expression. **Results** Functional analysis indicated that PTB could inhibit HPRE function in pDM138-HPRE CAT assay system in a dose-dependent manner. PTB could also depress CAT activity when upstream splice donor site was deleted. **Conclusion** PTB can inhibit the function of HPRE, and this inhibition is independent on upstream splice donor site.

Key words: Hepatitis B virus; HBV posttranscriptional regulatory element; polypyrimidine tract binding protein; CAT assay; transient transfection

为了在转录和转录后水平更有效的控制自身基因表达和复制,很多病毒都包含多个基因和顺式调节元件等复杂的调控机制[1]。最典型的就是逆转录病毒。例如人类免疫缺陷病毒(HIV-1)的 Rev 反应元件(Rev response element,RRE)、猿猴逆转录病毒的组成性出核元件(constitutive transport element,CTE)[2,3]。这些元件已经被证实为 RNA 出核元件。由于 HBV 与逆转录病毒结构和生活周期的相似性,人们由此关注 HBV 的顺式调节元件的存在。在 HBV 基因组顺式调节元件的研究中,一个具有与 RRE 相似功能的基因序列被鉴定,位于 HBV 基因组内(nt)1 200 ~ 1 650[1]。由于它在转录后水平增加 HBV 的表达,故被命名为转录后调节元件(HBV posttranscriptional regulatory element,HPRE)[4]。已有报道其能够很大程度上代替 Rev-RRE 的功能,提高 CAT 报告基因的表达活性[1,5]。虽然 HPRE 发挥功能的机制还不是很清楚,但是作为顺式调节元件,蛋白质与 HPRE 的结合对 HPRE 功能的发挥产生重要的作用。与 HPRE 特异性结合的两个细胞蛋白质分子已经被鉴定,其中一个就是多聚嘧啶管束序列蛋白 PTB[4]。

PTB 也被称为 p57,属于 hnRNP 家族,是一种广泛表达于大多数组织的 RNA 结合蛋白,结合于 C 或 U 富集的短 RNA 序列,从而参与一系列影响基因表达的细胞过程[6]。虽然调控机制还不清楚,但在所有的这些调控中,PTB 的功能是通过与 RNA 和其他蛋白质因

基金项目:国家自然科学基金(30771924)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771924)

作者简介:程丽英,女,山东省聊城市人,硕士研究生,主要从事乙肝病毒基因表达调控方面的研究。电话:(023)68486780,E-mail: chengliying_2005@126.com

通信作者:汤 华,电话:(023)68486820,E-mail:tanghua86162003@yahoo.com.cn

收稿日期:2008-10-23;修回日期:2009-03-17

子相互作用而发挥的[7]。Zang 等[8]报道 PTB 能与 HPRE 的片段Ⅲ特异性结合,并在此片断内鉴定出了两个结合位点。他们的点突变和稳定过表达实验结果显示:PTB 促进 HPRE 介导的 CAT 的表达活性。但在本研究中,我们证明 PTB 能抑制 HPRE 功能,还进一步发现:PTB 对 HPRE 的这种抑制作用的发挥与上游剪接供体位点的存在与否无关。

1　材料与方法

1.1　质粒

表达人类 PTB 的真核质粒 PCMV-SPORT6-PTB 购买于 ATCC (American Type Culture Collection)公司。CAT 表达质粒 pDM138-HPRE 和去除了上游剪接供体位点的 pDM138-HPRE-ΔSD 由 T. S. Benedict Yen, University of California 惠赠。

1.2　细胞培养和转染

Hela 细胞的培养液为含 10% 小牛血清的 RPM1640。生长条件为 5% CO_2 和 37℃。在转染的前 1 d 将细胞接种到 12 或者 6 孔板里,当细胞生长到 80% ~95% 时进行质粒共转染。用脂质体法共转染 PCMV-SPORT6-PTB 和 pDM138-HPRE 或者 pDM138-HPRE-ΔSD,对照组则转染 PCMV-SPORT6 和 pDM138-HPRE 或者 pDM138-HPRE-ΔSD。所用试剂是 Lipofectamine™ 2000(Invitrogen)。

1.3　RT-PCR 检测 PTB 的表达

细胞转染 48 h 后,弃去培养液。PBS 冲洗 2 次后裂解细胞提取细胞总 RNA,随机引物转录所有的 mRNA,最后设计针对 PTB 的特异性引物:正义链 5′-TGAACTACTACACCTCGGTG-3′;反义链 5′-TTGTAGATGTTCTGCCCGTC-3′。PCR 反应条件如下:94 ℃预变性 10 min; 94 ℃变性 1 min; 58 ℃退火 1 min; 72 ℃ 延伸 1 min。30 个循环。GAPDH 作为内参。PCR 产物为 413 bp。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4　CAT 表达活性检测

质粒 PCMV-SPORT6-PTB 和 pDM138-HPRE 共转染 Hela 细胞,48 h 后收集细胞检测 CAT 活性。细胞转染 48 h 后,弃去培养液。PBS 冲洗 2 次后,每孔加入 500 μl (6 孔板)或者 300 μl (12 孔板)的 1 × lysis buffer,摇床,冰上裂解 30 min,15 000 r/min 离心 30 min,收集上清。以下操作步骤见 CAT 检测试剂盒(Roche)。分别测定实验组和对照组的 CAT 表达水平。最后在 405 nm 波长处读数。相同的转染实验重复 3 次,取其平均值。

2　结果

2.1　在 pDM138 CAT 表达体系中 PTB 抑制 HPRE 的功能

质粒 PCMV-SPORT6-PTB 和 pDM138-HPRE 共转染 Hela 细胞,48 h 后收集细胞检测 CAT 活性。伴随 PTB 的过表达,CAT 的表达活性大大降低,且质粒 PCMV-SPORT6 对 CAT 的表达活性无影响。实验结果表明我们的共转染实验是成功的,达到了 PTB 过表达的预期效果,并且证明 PTB 的过表达能抑制 HPRE 的功能,见图 1 ~3。

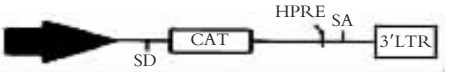
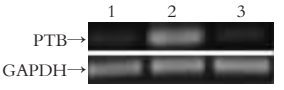
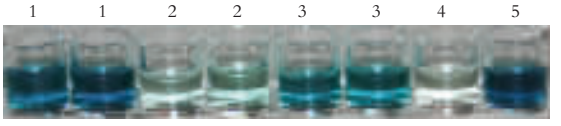


图 1　pDM138-HPRE CAT 质粒结构图



1:PCMV-SPORT6-PTB 0 μg;2:PCMV-SPORT6-PTB 1.5 μg;3:PCMV-SPORT6 1.5 μg

图 2　RT-PCR 检测 PTB 的表达

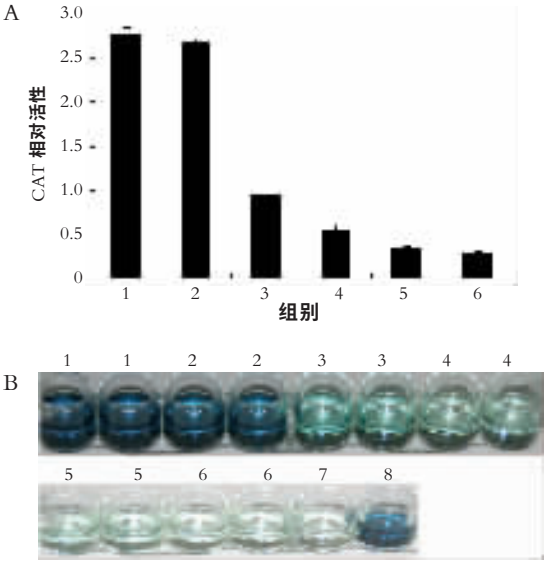


1:pDM138-HPRE;2:pDM138-HPRE + PCMV-SPORT6-PTB;3:pDM138-HPRE + PCMV-SPORT6(1 ~3 分别做两次检测);4:阴性对照;5:阳性对照

图 3　CAT 表达活性检测结果

2.2　在 pDM138 CAT 表达体系中 PTB 以剂量依赖性抑制 HPRE 的功能

随后,我们进行了质粒 PCMV-SPORT6-PTB 浓度梯度的转染实验。如图 4 所示:在 pDM138 CAT 表达体系中 PTB 呈浓度梯度依赖性抑制 HPRE 的功能,在一定范围内,CAT 表达活性的降低程度与质粒 PCMV-SPORT6-PTB 的转染量成正比。



A:CAT 活性统计图;B:CAT 活性结果　1:PCMV-HPRE 1μg;2:PCMV-HPRE 1μg + PCMV-SPORT6 1 μg;3:PCMV-HPRE 1 μg + PCMV-SPORT6-PTB 0.1 μg;4:PCMV-HPRE 1 μg + PCMV-SPORT6-PTB 0.5 μg;5:PCMV-HPRE 1 μg + PCMV-SPORT6-PTB 1 μg;6:PCMV-HPRE 1 μg + PCMV-SPORT6-PTB 1.5 μg(1 ~6 分别做两次检测);7:阴性对照;8:阳性对照

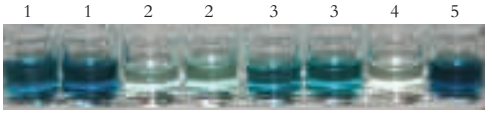
图 4　PTB 不同浓度下 CAT 表达活性

2.3 PTB 对 HPRE 功能的抑制作用不依赖于上游剪接位点的存在

我们通过去除 pDM138-HPRE 中的上游剪接供体位点来验证 PTB 抑制 HPRE 的作用是否与上游剪接供体位点有关。当用 pDM138-HPRE-ΔSD 代替 pDM138-HPRE 进行以上的转染实验时,PTB 仍然能够抑制 CAT 的表达。结果证明 PTB 对 HPRE 功能的抑制作用不依赖于上游剪接供体位点的存在。这显示 PTB 不通过影响剪接来抑制 HPRE 的功能,见图 5、6。



图 5 pDM138-HPRE-ΔSD 质粒的结构图



1:pDM138-HPRE-ΔSD 2 μg;2:pDM138-HPRE-ΔSD 2 μg + PCMV-SPORT6-PTB 1.5 μg;3:pDM138-HPRE-ΔSD 2 μg + PCMV-SPORT6 1.5 μg(1~3 分别做两次检测);4:阴性对照;5:阳性对照

图 6 去除上游剪接供体位点后 CAT 活性结果

3 讨论

RNA 与蛋白质之间的特异性结合是很多生物学过程的基础,例如核糖体和剪接体的组装与功能、基因表达的转录后调节[4,9]。通过在转录后水平促进 HBV 转录体在胞质内的聚集,HPRE 对 HBV 基因的高表达是非常重要的[1,4]。虽然 HPRE 发挥功能的机制尚不是很清楚,但是细胞因子与 HPRE 特异性的结合很可能在 HPRE 功能的发挥上具有举足轻重的地位[10]。因此,研究这些细胞蛋白的功能,对阐明 HPRE 在 HBV 生活周期中的地位是非常有意义的。

CAT 检测实验证明 PTB 抑制 HPRE 上调基因表达的功能并且呈 PTB 剂量依赖性。可能的机制:由于 PTB 与 HPRE 结合,有越多的 PTB 蛋白分子存在,就可以结合越多的 HPRE RNA,就使 HPRE 上调基因表达的功能降低,所以 PTB 抑制 CAT 的表达呈剂量依赖性。我们用 pDM138-HPRE-ΔSD 代替 pDM138-HPRE 共转染细胞,CAT 检测发现 PTB 抑制 HPRE 功能与剪接供体位点的存在与否无关。我们的实验结果显示 PTB 是不通过影响剪接来负性调控 HPRE 的功能的。已有文章报道 HPRE 通过促进表面抗原转录体在胞质内的积聚增加 HBsAg 的表达[4]。我们的实验结果揭示 PTB 抑制 HPRE 功能也与剪接位点的存在与否无关。所以我们推测 PTB 可能与 HPRE 相互作用影响 mRNA 的出核。

Zang 等[8]的实验结果显示:PTB 是 HPRE 的正调节因子。他们发现在 pDM138-HPRE 检测体系中,PTB 结合位点突变的 HPRE 突变体失去了促进 CAT 表达的活性;在稳定过表达 PTB 的细胞系中,HPRE 促进 CAT 基因表达的活性的功能明显高于在对照组细胞中的功能[8]。而我们的结果与之相反,可能有以下几个方面的原因。第一,还有其他因子结合到了 HPRE 突变体上或者 HPRE 突变位点改变了 HPRE 的二级结构,从而抑制了 HPRE 功能的发挥。第二,所用的细胞系不同,HPRE 发挥功能的环境不一样,从而使 HPRE 表现出了不同的功能活性。第三,稳定表达的细胞系是用表达载体随机整合在细胞染色体 DNA 中,经抗性筛选形成的,由于整合的随机性,可能造成某些基因的表达与正常细胞不一样。

总之,我们的数据表明 PTB 能够抑制 HPRE 的功能,这种抑制作用与剪接位点的存在与否无关。鉴于 HPRE 对 HBV 的高表达是非常重要的,PTB 很可能将下调 HBV 基因表达。

参考文献:

[1] Doitsh G, Shaul Y. A long HBV transcript encoding pX is inefficiently exported from the nucleus[J]. Virology, 2003, 309(2): 339-349.

[2] Cullen B R. Nuclear RNA export[J]. J Cell Sci, 2003,116(Pt 4): 587-597.

[3] Pandya S, Boris-Lawrie K, Leung N J, *et al*. Development of an Rev-independent, minimal simian immunodeficiency virus-derived vector system[J]. Hum Gene Ther, 2001, 12(7): 847-857.

[4] Tang H, Huang Y, Chen J, *et al*. Cellular protein TIA-1 regulates the expression of HBV surface antigen by binding the HBV posttranscriptional regulatory element[J]. Intervirology, 2008, 51(3): 203-209.

[5] 黄 英, 黄爱龙. HBV 转录后调节基序[J]. 国外医学:病毒学分册, 2005,12(2):48-51.

[6] Amir-Ahmady B, Boutz P L, Markovtsov V, *et al*. Exon repression by polypyrimidine tract binding protein[J]. RNA, 2005, 11(5): 699-716.

[7] Yuan X, Davydova N, Conte M R, *et al*. Chemical shift mapping of RNA interactions with the polypyrimidine tract binding protein[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 30(2): 456-462.

[8] Zang W Q, Li B, Huang P Y, *et al*. Role of polypyrimidine tract binding protein in the function of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element[J]. J Virol, 2001, 75(22): 10779-10786.

[9] Peritz T, Zeng F, Kannanayakal T J, *et al*. Immunoprecipitation of mRNA-protein complexes[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 577-580.

[10] 黄 英,张 君,何茂锐,等. 用 T7 噬菌体展示技术筛选乙型肝炎病毒 PreS1 相互作用蛋白[J]. 重庆医科大学学报, 2007,34(2): 340-343.

(编辑 汪勤俭)