文章编号:1000-5404(2009)23-2315-04

论著

乙型肝炎病毒 PreS1 蛋白与初期多肽相关复合体 α 亚单位特异性结合的研究

李 丹[1],丁 健[2],林 纳[1],王小众[1] (福建医科大学:[1]附属协和医院消化研究室,[2]附属第一医院消化内科,福州 350001)

摘 要:目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)PreS1 蛋白与人类初期多肽相关复合体 α 亚单位(nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide ,NACA)之间的结合作用。**方法** 采用交合实验验证 PreS1 蛋白和 NACA 在酵母细胞内的结合作用,利用离体结合实验证实二者在体外的结合作用,免疫共沉淀实验证实二者在哺乳动物细胞中的特异性结合。**结果** 携带 NACA 基因的酵母同携带 preS1 基因的酵母交合后发生反应,LacZ 活性检测菌落呈现蓝色,离体结合实验 Western 印迹中出现特异性结合活性反应条带,提示 PreS1 蛋白和 NACA 在体外存在直接相互作用,免疫共沉淀实验在 13×10^3 处出现蛋白条带,提示在哺乳动物细胞水平仍能检测到 PreS1 蛋白和 NACA 的特异结合。**结论** NACA 与 PreS1 蛋白在酵母细胞和哺乳动物细胞中均存在特异性结合,推测 NACA 可能通过与 PreS1 蛋白的结合影响病毒黏附及反式激活等过程。

关键词: 肝炎病毒,乙型;PreS1 蛋白;初期多肽相关复合体 α 亚单位;离体结合实验;免疫共沉淀实验
中图法分类号: R341; R373.21; R394.3 **文献标识码:** A

Interaction between hepatitis B virus PreS1 protein and nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide

LI Dan[1], DING Jian[2], LIN Na[1], WANG Xiao-zhong[1] ([1]Department of Gastroenterology, Union Hospital of Fujian Medical University, [2]Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

Abstract: Objective To explore the interaction between hepatitis B virus PreS1 protein and nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide (NACA). Methods Mating experiment and in vitro binding assays were carried out to verify the interaction between hepatitis B virus PreS1 protein and NACA *in vivo* and *in vitro* respectively in yeast cells. Coimmunoprecipitation was employed to demonstrate the binding reaction between the 2 proteins in mammalian cells. Results In mating experiment, the resulting diploids containing pAS2-preS1 and pACT2-NACA plasmids turned to blue in the X-gal assay. Western blot analysis displayed a positive reactive strap, which indicating PreS1 protein interacted directly with NACA *in vitro* binding assays. Moreover, interaction between the 2 proteins in mammalian cells was confirmed by coimmunoprecipitation, with a protein strap about 13×10^3 in Western blot. Conclusion Specific interaction exists between hepatitis B virus PreS1 protein and NACA in both prokaryotic and mammalian cells. NACA protein probably takes part in the adhesion and transactivation of HBV through the binding with PreS1.

Key words: hepatitis B virus; PreS1 protein; nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide; in vitro binding assay; coimmunoprecipitation

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)慢性感染是导致肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)的主要危险因子,HBVDNA 分子由 1 条约 3000~3300 碱基对的完整长链和 1 条约 1700~1800 碱基对的短链构成,长链分子上有 4 个开放的基因开放阅读框,分别称为 S、C、P、X。在编码 HBsAg 的 S 基因开放阅读框上游还有一段具有编码能力的核苷酸序列,称前 S 基因组,编码产物即为前 S1(PreS1)及前 S2(PreS2)蛋白。近年来,多项研究表明 PreS1 同 HBV 的黏附入胞、病毒复制、转录、分泌、机体免疫及疾病转归等均有关[1,2],寻找并鉴定肝细胞内的 PreS1 结合蛋白将有望进一步明确 PreS1 蛋白的生物学功能。本实验室此前已从成人肝细胞 cDNA 文库中筛选到多个可能的 PreS1 结合蛋白基因[3],其中一个基因同人类初期多肽相关复合体 α 亚单位(nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide ,NACA)高度同源[4]。本研

基金项目: 国家自然科学基金(30770979);福建省自然科学基金(C0310018)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30770979) and the Natural Science Foundation of Fujian(C0310018)
作者简介: 李 丹,女,福建省福清市人,博士,主治医师,主要从事乙型肝炎病毒相关疾病发病机制方面的研究。E-mail:doclidan@yahoo.com.cn
收稿日期: 2009-05-07;**修回日期:** 2009-07-30

究则在此基础上进一步通过系列实验验证 NACA 和 PreS1 蛋白在原核细胞和哺乳动物细胞中是否均存在特异性结合。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pAS2-1、pCLl、pLAM5′-1、pCMV-HA 和 pCMV-Myc 及成人肝细胞 cDNA 文库及酵母菌株 AH109、Y187 均购自美国 Clontech 公司，pGEX-5X-1 购自美国 Amersham Biosciences 公司，大肠杆菌 BL21 购自美国 Amersham Biosciences 公司，大肠埃希菌 JM105 由北京大学肝病研究所惠赠，SV40 转化的非洲绿猴肾细胞株（COS-7）购自中国科学院上海细胞所。

1.2 试剂

GAL4-BD 单克隆抗体、Myc 单克隆抗体和 HA-*Taq* 多克隆抗体、文库质粒 cDNA 片段的上下游引物及各种酵母培养基购自美国 Clontech 公司，PreS1 蛋白单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司，蛋白 G 免疫沉淀试剂盒购自美国 KPL 公司，GST 融合蛋白纯化试剂盒、GST 单克隆抗体、Whatman 滤纸购自美国 Amersham Biosciences 公司，脂质体快速转染试剂盒、质粒抽提试剂盒、各种内切酶、*Taq* DNA 聚合酶及 T_4DNA 连接酶购自美国 Promega 公司，凝胶回收试剂盒购自上海晶美公司，酸洗玻璃珠购自美国 Sigma 公司。

1.3 交合实验

将前期从成人肝细胞 cDNA 文库中筛选出 pACT2-NACA 质粒以常规乙酸锂转化法[5]转入酵母菌株 Y187，将新鲜 Y187-pACT2-NACA 酵母菌落划平行线于 SC/-leu 琼脂培养基上，30 ℃ 温育 3 d，同时分别将 AH109-pAS2-1、AH109-pLAM5′-1、AH109-pAS2- preS1 酵母菌落分别划于另一个 SC/-trp 琼脂培养基上，30 ℃ 温育 3 d；用灭菌 whatman 滤纸分别将以上两种菌落垂直交叉转印于同一个 YPD 琼脂培养基上，30 ℃ 温育 4 h；用灭菌 whatman 滤纸将以上菌落转印于一个 SC/-trp-leu 琼脂培养基上 30℃ 温育 2 ~ 3 d；最后以滤膜转印法测定 LacZ 活性：即将印迹有酵母菌落的 Whatman 滤纸置于液氮中浸泡 2 次，每次 10 ~ 15 s，将滤纸菌面向上，放置在浸有 Z 缓冲液/x-gal 的滤纸上面，防止气泡产生，30 ℃ 温育，在 25 min 至 8 h 变蓝的菌落为阳性克隆，超过 8 h 变蓝的为假阳性。

1.4 离体结合实验

玻璃珠法[5]抽提酵母 AH109-pAS2-1-preS1 及 AH109-pAS2-1 的蛋白抽提液。将筛选到的阳性克隆 cDNA 插入 pGEX-5X-1 质粒，构建表达融合蛋白 GST-NACA 的重组质粒 pGEX-5X-1-NACA，以双酶切法验证。将重组质粒转化大肠杆菌 BL21，增殖转化大肠杆菌至吸光度值约为 0.6 时，加入 IPTG，30℃震荡培养 4 h，离心回收菌液，PBS 洗 3 次，以谷胱甘肽凝胶珠试剂盒回收并纯化融合蛋白，操作严格按试剂盒说明书进行。纯化的融合蛋白与酵母蛋白抽提液混匀，4 ℃温育 2 h 后离心，沉淀经 PBS 洗 3 次，SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维膜，以 PreS1 单克隆抗体及以电化学发光法试剂盒（包含山羊抗小鼠二抗）进行检测。

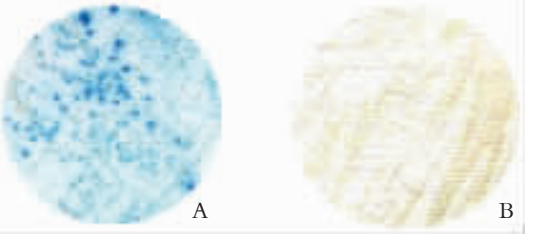
1.5 免疫共沉淀实验

将 preS1 基因全序列与 NACA 分别插入 pCMV-HA 和 pCMV-Myc 质粒，构建表达融合蛋白的质粒 pCMV-HA-preS1 和 pCMV-Myc-NACA，以双酶切法验证。重组质粒共转染 COS-7 细胞，培养收集转染细胞，PBS 洗细胞 3 次，加入添加蛋白酶抑制剂的细胞裂解液，离心取上清；加入 proteinG-agarose 悬液，4 ℃ 震荡 1 h，离心取上清，先后加入 Myc 单克隆抗体和 proteinG-agarose，4 ℃震荡过夜，离心沉淀加细胞裂解液，离心取上清进行 SDS-PAGE，以 HA-*Taq* 多克隆抗体进行 Western blot 检测，DAB 显色。

2 结果

2.1 交合实验

Y187-pACT2-NACA 同 AH109-pAS2- preS1 交合有反应，LacZ 活性检测菌落呈现蓝色，而 Y187-pACT2- NACA 与空载体 pAS2-1 及阴性对照质粒 pLAM5′-1 交合实验无反应，LacZ 活性检测菌落呈现白色（图 1）。

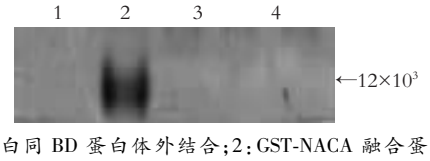


A：Y187-pACT2-NACA 与 AH109-pAS2-preS1 交合；B：Y187-pACT2-NACA 与 AH109-pAS2-1 交合

图 1 转化酵母 AH109-pAS2-preS1 与 Y187-pACT2-NACA 交合实验结果

2.2 离体结合实验

双酶切法证实成功构建重组质粒 pGEX-NACA。重组质粒 pGEX-NACA 转化的大肠杆菌在 IPTG 诱导下表达融合蛋白 GST-NACA，按 GST 融合蛋白纯化试剂盒说明沉淀并纯化 GST-NACA 蛋白，分别同 AH109-pAS2-1-preS1 及 AH109-pAS2-1 的蛋白抽提液温育，并以空载体表达蛋白 GST 作对照，Western blot 结果提示 AH109-pAS2-1-preS1 表达的融合蛋白 BD-PreS1 和 GST-NACA 可结合，而 GST-NACA 同 AH109-pAS2-1 表达的 BD 蛋白不结合，且 GST 同 BD-PreS1 和 BD 均不能结合，提示 PreS1 蛋白和 NACA 在体外存在直接及专一的相互作用（图 2）。

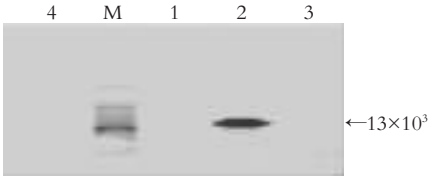


1：GST 蛋白同 BD 蛋白体外结合；2：GST-NACA 融合蛋白同 BD-PreS1 融合蛋白体外结合；3：GST-NACA 融合蛋白同 BD 蛋白体外结合；4：GST 蛋白同 BD-PreS1 融合蛋白体外结合

图 2 离体结合实验 Western blot 检测结果

2.3 免疫共沉淀实验

双酶切法证实成功构建重组质粒 pCMV-HA- preS1 及 pCMV-Myc- NACA。免疫共沉淀产物经 SDS-PAGE 及 Western blot 检测，共转染 pCMV-HA-preS1 和 pCMV-Myc-NACA 重组质粒的 COS-7 细胞抽提蛋白可见显色条带，位置约在 13×10^3 处，大小同 HA-preS1 蛋白相符，共转染 pCMV-HA 和 pCMV-Myc 质粒的 COS-7 细胞及未转染质粒的 COS-7 细胞抽提蛋白均未见显色条带（图 3）。



M:蛋白质标准;1:共转染 pCMV-HA-preS1 和 pCMV-Myc 的 COS7 细胞蛋白;2:共转染 pCMV-HA-preS1 和 pCMV-Myc-NACA 的 COS7 细胞蛋白;3:共转染 pCMV-HA 和 pCMV-Myc-NACA 的 COS7 细胞蛋白;4:共转染 pCMV-HA 和 pCMV-Myc 的 COS7 细胞蛋白

图 3　免疫共沉淀实验 Western blot 检测结果

3　讨论

近年来,随着对 HBV 的 PreS1 蛋白在 HBV 感染、复制、转录和机体免疫等方面研究的深入,发现它在 HBV 相关性疾病中起重要作用。首先,PreS1 蛋白在识别人肝细胞膜受体中起关键性的作用,但同 PreS1 蛋白相结合的受体蛋白的确定仍存在争议[2]。PreS1 同病毒复制关系密切,是乙型肝炎的早期诊断指标[6],PreS1 反映 HBV 复制情况较 HBeAg 更敏感,是识别慢性乙型肝炎患者 HBV 发生前 C 区变异后抗 HBe 阳性但仍存在病毒复制颇有价值的指标,对指导抗病毒治疗有重要临床意义[7]。同时,PreS1 抗原具有很强的免疫原性,尤其在 T 细胞反应水平上显著高于 HBsAg[8],包含了 3 种抗原 PreS1、PreS2 和 HBsAg 的重组乙型肝炎疫苗比单一 HBsAg 疫苗免疫后保护作用更好[9]。

筛选并验证 PreS1 结合蛋白是目前 HBV 研究的热点之一。1999 年,Harvey[10] 利用酵母双杂合系统观察 HBV PreS1 蛋白同肝细胞 cDNA 文库表达蛋白的相互作用,分离出包括编码载脂蛋白 H 在内的 10 个阳性克隆,但在其后的蛋白体外结合实验、Far-Western 及竞争实验显示,只有一个未命名蛋白同 PreS1 蛋白的作用有特异性,但此未命名蛋白最终生物学功能的阐明还有待其组织分布和细胞定位的确立。2001 年,Hartmanm-Stuhler 等[11] 也通过酵母双杂合系统筛选到一种网格蛋白衔接子相关蛋白:γ_2-adaptin,然而其后的大量实验证明它只能在 HBV 进入胞内后才能同病毒特异性结合,故猜测其主要功能是指导病毒的装配和分泌出胞,而在病毒入胞中的意义不大。

本研究前期从成人肝细胞 cDNA 文库中筛选到多个可能的 PreS1 结合蛋白基因,NACA 是其中之一。在酵母细胞中进行的交合实验得到显色为深蓝色的强阳性结果,提示 NACA 和 PreS1 蛋白在酵母细胞内有较强的结合作用。离体结合实验证明 NACA 和 PreS1 蛋白有直接结合作用,而其后的免疫共沉淀实验再次证明二者在哺乳动物细胞中也能够相互结合,另一个同期筛选出的候选蛋白 MAPK/ERK 激酶 1 虽然通过了体外结合实验中,但在免疫共沉淀实验中却未能显示出同 PreS1 蛋白的结合作用,这个结果从侧面更有力证实了 NACA 与 PreS1 蛋白之间存在较强的特异性结合作用。

初期多肽相关复合体(nascent-polypeptide-associated complex ,NAC)具有 α、β 两个亚单位,β 亚基又有 β_1、β_2 2 种形式,亚基组合方式多样,α、β 亚基可在体内外形成十分稳定的异二聚体,也可独立存在或同其他未知蛋白构成复合物。NACA 是 NAC 的重要亚基之一,在真核细胞中高度保守,一般定位于核糖体,但当其同核糖体的结合受抑时,转而定位于核内[12]。近来有学者通过共聚焦显微镜发现其还可定位于细胞膜周围[13]。迄今 NACA 的有关研究甚少,功能尚不完全明确。目前认为它可能是最先同核糖体分泌的初期多肽链相结合的胞内蛋白,能指导 HSP70 等分子伴娘(molecular bridesmaid)发挥蛋白正确定位、卷曲、折叠、构象等细胞蛋白自稳作用,阻止蛋白间错误的相互作用,并同神经胶质瘤、特异性皮炎、人类免疫缺陷综合征及 Alzheimer 病和唐氏综合症等疾病的发病相关[14]。有关 NACA 与 PreS1 蛋白的相互作用目前尚未见报道,二者间的相互作用有何潜在的功能意义呢?新近的研究报道证明 NACA 在基因复制及转录调控中起关键作用,它主要通过和 DNA 复制启动子 X-DNA 连接子及转录调控因子 AP-1、c-Jun 等结合,参于基因调控,尤其在多能间质前体细胞的分化中起重要作用[15,16],其活性可受丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白调控[17]。故结合 NACA 的细胞定位,目前推测 NACA 同 PreS1 蛋白结合可能同病毒入胞有关,并可通过影响宿主细胞蛋白的自稳作用,导致蛋白间错误的相互作用,反式激活某些关键基因,改变这些基因的表达水平,从而导致细胞功能改变及疾病的发生。

本实验结果为进一步明确 PreS1 蛋白的体内作用途径提供了新的实验依据,确定 PreS1 蛋白同 NACA 作用位点和进一步阐明其具体作用机制将是下一步研究的重点。

参考文献:

[1] Glebe D. Attachment sites and neutralising epitopes of hepatitis B virus [J]. Minerva Gastroenterol Dietol, 2006, 52(1):3 - 21.

[2] De-Meyer S, Gong Z J, Suwandhi W, *et al*. Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes[J]. J Viral Hepat,1997, 4(3): 145 - 153.

[3] 李　丹, 王小众, 林　纳, 等. 乙型肝炎病毒前 S1 结合蛋白的筛选和鉴定[J]. 中华传染病杂志,2007, 25(1): 20 - 24.

[4] Li D, Wang X Z, Ding J, *et al*. NACA as a potential cellular target of hepatitis B virus preS1 protein[J]. Dig Dis Sci, 2005, 50(6):1156 - 1160.

[5] Gietz R D, Triggs-Raine B, Robbins A, *et al*. Identification of proteins

that interact with a protein of interest: applications of the yeast two-hybrid system[J]. Mol Cell Biochem, 1997, 172(1-2): 67-69.
[6] 周 晖, 江楚文, 钱靖琳, 等. 前S1抗原和HBV-DNA与HBV血清标志物之间的相关性探讨[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(7): 1184-1186.
[7] Pontisso P, Vidalino L, Quarta S, *et al*. Biological and clinical implications of HBV infection in peripheral blood mononuclear cells[J]. Autoimmun Rev, 2008, 8(1): 13-17.
[8] Kim D H, Ni Y, Lee S H, *et al*. An anti-viral peptide derived from the preS1 surface protein of hepatitis B virus [J]. BMB Rep, 2008, 41(9): 640-644.
[9] Skrastina D, Bulavaite A, Sominskaya I, *et al*. High immunogenicity of a hydrophilic component of the hepatitis B virus preS1 sequence exposed on the surface of three virus-like particle carriers[J]. Vaccine, 2008, 26(16): 1972-1981.
[10] Harvey T J, Macnaughton T B, Park D S, *et al*. A cellular protein which binds hepatitis B virus but not hepatitis B surface antigen [J]. J Gen Virol, 1999, 80(Pt 3): 607-615.
[11] Hartmann-Stuhler C, Prange R. Hepatitis B virus large envelope protein interacts with gamma2-adaptin, a clathrin adaptor-related protein [J]. J Virol, 2001, 75(11): 5343-5351.
[12] Quelo I, Gauthier C, St-Arnaud R. Casein kinase Ⅱ phosphorylation regulates alphaNAC subcellular localization and transcriptional coactivating activity[J]. Gene Expr, 2005, 12(3): 151-163.
[13] Goatley L C, Twigg S R, Miskin J E, *et al*. The African swine fever virus protein j4R binds to the alpha chain of nascent polypeptide-associated complex[J]. J Virol, 2002, 76(19): 9991-9999.
[14] Beatrix B, Sakai H, Wiedmann M. The alpha and beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions[J]. J Biol Chem, 2000, 275(48): 37838-37845.
[15] Al-Shanti N, Aldahoodi Z. Inhibition of alpha nascent polypeptide associated complex protein may induce proliferation, differentiation and enhance the cytotoxic activity of human CD8$^+$ T cells[J]. J Clin Immunol, 2006, 26(5): 457-464.
[16] Akhouayri O, Quelo I, St-Arnaud R. Sequence-specific DNA binding by the alphaNAC coactivator is required for potentiation of c-Jun-dependent transcription of the osteocalcin gene [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(9): 3452-3460.
[17] 戴久增, 成 军, 曲建慧, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A调节新生多肽复合物启动子转录活性的研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(8): 579-581.

(编辑 张 维)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)23-2318-01

高血压病高尿酸血症与心脏舒张功能异常关系研究

王立文[1],黄体钢[2] ([1]解放军254医院心血管内科,天津 300142;[2]天津医科大学第二医院心血管内科,天津 300050)

高血压是伴有代谢紊乱的临床综合征,常伴随糖耐量异常、高血脂、高尿酸血症(HUA)及异常的体质量指数(BMI)。未经治疗的高血压患者有10.4%~27.3%伴有HUA,而HUA是心血管疾病的独立危险因素[1]。舒张功能的改变是高血压心功能改变的早期指标[2],对于高血压HUA等生化异常与舒张功能改变关系的研究国内外少见报道,本研究探讨原发性高血压合并高尿酸血症者与心脏舒张功能改变的关系。

1 资料与方法

1.1 对象

选择我院门诊及住院部轻中度高血压(95 mmHg≤舒张压≤110 mmHg,且收缩压≤180 mmHg)患者40例,其中男性20例,女性20例,年龄36~45岁,高血压病史3~10年,所有患者符合WHO诊断标准。剔除长期服用利尿降压药或其他影响尿酸药物者,排除糖尿病、继发性高血压且超声心动图检查射血分数≥55%的患者。依尿酸是否异常分为尿酸正常组及尿酸异常组,每组20例。尿酸异常组与尿酸正常组在血压水平、年龄、病程、肝肾功能等方面差异无统计学意义($P>0.05$)。

作者简介:王立文,女,天津市人,博士研究生,主治医师,主要从事高血压方面的研究。电话:(022)84683730,E-mail:wlw418@hotmail.com

收稿日期:2009-04-28;修回日期:2009-05-17

1.2 方法

患者空腹化验以下内容:尿酸(UA)、甘油三脂(TG)、胆固醇(TC)、肌酐(CR)、血糖(FPG),专人测量身高、体质量、腰臀围,计算体质量指数(BMI)、腰臀比值(WHR)。超声心动图测量二尖瓣口舒张早期峰值速度(E),舒张晚期峰值速度(A)及E峰减速时间,并计算E/A。

1.3 统计学分析

数据用SPSS 11.5统计软件进行分析,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,组间比较行t检验。

2 结果

如表1所示,尿酸异常组BMI、WHR显著高于尿酸正常组($P<0.05$)。2组均表现较高的TC、TG、LDL-C,HDL-C则呈低于正常趋势,在尿酸异常组TC、TG、LDL-C较尿酸正常组明显增高($P<0.05$)。临床左室舒张功能减退主要以E降低、A增高及E/A<1判定。本研究尿酸正常组E/A虽然为(1.04±0.27),>1,但是20例患者中发现4例E/A<1。在尿酸异常组E/A为(0.82±0.26),<1,舒张功能明显异常。提示尿酸异常组较尿酸正常组舒张功能异常更为显著。

(下转2322页)