文章编号:1000-5404(2013)14-1451-04

论著

丙型肝炎病毒核心蛋白对 Dicer 切割功能的影响

黄文娟,李 霞,胡 琴,陈维贤 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院检验科)

[摘要] **目的** 探讨核心蛋白与 Dicer 的相互作用及其对 Dicer 功能的影响。**方法** 构建丙型肝炎病毒核心蛋白真核表达质粒,采用免疫荧光染色和 Western blot 检测核心蛋白的表达,Western blot 检测核心蛋白对细胞内 Dicer 表达的影响,免疫共沉淀技术检测真核细胞内核心蛋白与 Dicer 的相互作用。体外转录合成 dsRNA,检测核心蛋白对 Dicer 切割 dsRNA 作用的影响。**结果** 在细胞内,核心蛋白能够明显恢复被 shRNA 抑制的虫荧光素酶基因的表达($P<0.05$),而对 siRNA 引发的 RNAi 无拮抗作用。在真核细胞内,加入核心蛋白后,Dicer 的表达量无明显改变,并能检测到两者相互结合。在体外抑制实验中,重组表达的 Dicer 能切割 dsRNA 产生 siRNA;核心蛋白加入后,dsRNA 的切割受到抑制。**结论** 核心蛋白在真核细胞内可以结合 Dicer, 并通过抑制 Dicer 对 dsRNA 的切割作用,抑制 RNA 干扰作用。

[关键词] 丙型肝炎病毒;核心蛋白;Dicer 酶;免疫共沉淀
[中图法分类号] R373.21;R394-33;R394.3 [文献标志码] A

Hepatitis C virus core protein interacts with Dicer to inhibit processing of dsRNA

Huang Wenjuan, Li Xia, Hu Qin, Chen Weixian (Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the interaction between hepatitis C virus (HCV) core protein and Dicer enzyme and determine the effect of the core protein on Dicer. Methods An eukaryotic recombinant plasmid encoding HCV core protein was constructed, and the expression of the protein in the HepG2 cells after transfection was confirmed by immunofluorescence staining and Western blot analysis. The interaction between HCV core protein and Dicer enzyme in the HepG2 cells was detected by co-immunoprecipitation. After dsRNA was synthesized *in vitro*, inhibitory test was used to determine the effect of core protein on the dicing function of recombinant Dicer enzyme to dsRNA. Results HCV core protein significantly rescued the expression of extrinsic luciferase gene that was silenced by shRNA compared with control ($P<0.05$), but had no antagonistic effect on siRNA-induced RNAi *in vitro*. In HepG2 cells, core protein had no significant effect on the expression of Dicer, and a combination of them was also detected. *In vitro* inhibitory test demonstrated that recombinant Dicer sufficiently cut dsRNA into siRNAs. However, the addition of core protein inhibited the cutting of dsRNA and the production of siRNAs. Conclusion Core protein combines with Dicer, and inhibits the dicing function of Dicer for dsRNA to suppress RNA interference.

[**Key words**] hepatitis C virus; core protein; Dicer; immunoprecipitation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972582,30500428). Corresponding author: Chen Weixian,Tel: 86-23-63703244,E-mail: Chenweixian75@163.com

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种由双链 RNA 介导的、转录后 mRNA 水平关闭相应基因表达的序列特异性基因沉默机制,在人类抵抗 RNA 病毒的过程中有重要作用[1]。Dicer 是 RNAi 形成过程中所必需的一种核酸内切酶。它通过切割双链 RNA 或者发夹状 RNA(shRNA)来产生小干扰 RNA(small interfering RNAs, siRNA),后者形成并介导 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)对靶基因的降解。因此,Dicer 是 RNAi 过程中的一种关键酶,其功能状态将影响 RNAi 的效率。一些病毒通过产生某些蛋白质来抑制 Dicer 功能,进而对抗细胞通过 RNAi 途径对病毒的防御机制,提高其在宿主细胞内的生存能力。本研究旨在观察丙型肝炎核心蛋白对 RNAi 有无抑制作用,并探讨核心蛋白与 Dicer 的相

[基金项目] 国家自然科学基金(30972582,30500428)
[通信作者] 陈维贤,电话:(023)63703244,E-mail:Chenweixian75@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130321.1424.036.html(2013-03-21)

互作用及其对 Dicer 功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与细胞株 质粒 pCDNA3.1-3Flag、pLuc-FR(本室自建的双荧光素酶表达质粒)、pshRNA-GFP、pshRNA-Luc,pEGFP-Flag 由本室构建并保存。稳定表达绿色荧光蛋白(GFP)的细胞株(HepG2.GFP)由本室自行建立并提供。质粒 pSG5mP19 由英国 Charle 教授赠送(p19 为番茄丛矮病毒的一个能够抑制 RNAi 的蛋白质,本研究中用作阳性对照)。含 HCV1a 型全基因组的质粒 HFL 由美国洛克菲勒大学的 Rice 教授惠赠。细胞株 HepG2 细胞由本室保存[2]。

1.1.2 试剂 PCR 反应、限制性内切酶、PCR 产物纯化等常规分子生物学试剂购自大连宝生物公司。细胞培养用胎牛血清购自 Gibco 公司,培养基为 DMEM(HyClone)。脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。化学发光试剂 Supersignal Weste PicoChemiluminescent Substrate Kit 购买自 Pierce 公司[2],双荧光素酶检测试剂盒为 Promega 公司产品。兔抗 GFP 抗体购自 BD 公司;兔抗 Flag 抗体购自 Santa Cruz;羊抗 β-actin、FITC 标记的羊抗兔、HRP 标记的羊抗兔 IgG 和兔抗人 IgG 购自北京中山生物技术公司。免疫共沉淀所用试剂 homotype antibody with anti-Flag antibody M2 购自 Sigma 公司,Dicer 试剂盒购自 Genelantis 公司,体外转录试剂盒购自 Promega 公司。HCV 核心蛋白 1~122 aa 多肽片段,登革病毒 M 蛋白(denM)由本室自行提供。siRNA 序列为 5′-CACUUACGCUGAGUACUUCGA-3′,由大连宝生物公司合成,正负链退火得到双链 siRNA。

1.2 方法

1.2.1 克隆构建 HCV 核心蛋白表达克隆的构建选择带 3 倍 Flag 标签的真核表达质粒 pcDNA3.1-3 Flag 为载体,从 HFL 质粒上利用 PCR 方法获得 HCV 的核心蛋白编码的 DNA 片段,利用内切酶插入载体,得到核心蛋白表达克隆。克隆经过酶切分析及 DNA 序列分析,证明插入片段正确性[2]。

1.2.2 免疫荧光染色检测真核表达的核心蛋白 HepG2 细胞接种于预置玻片的 24 孔细胞培养板培养,分别转染 pCORE-3 Flag(表达核心蛋白质粒)和阴性对照 pcDNA3.1-3 Flag,48 h 后,吸尽每孔标本的液体,PBS 洗涤,多聚甲醛固定,封闭内源性过氧化物酶,孵育抗体后,荧光显微镜下(波长 568~574 nm)观察并照相[2]。

1.2.3 Western blot 检测真核表达的核心蛋白 HepG2 细胞种至 6 孔板,分别转染 pCORE-3 Flag(表达核心蛋白质粒)和阴性对照 pcDNA3.1-3 Flag,48 h 后提总蛋白,取 60 μg 蛋白进行 15% SDS-PAGE,转膜至 PVDF 膜,以 ELISA 和荧光定量RT-PCR 方法检测 HCV 阳性血清作一抗,二抗(抗人 IgG)浓度 1∶10 000,DAB 显色检测核心蛋白的表达。检测原核表达的全长核心蛋白及核心蛋白 1~122 aa 片段时,则直接将样品溶于上样 buffer,煮沸变性后按上述步骤进行。

1.2.4 核心蛋白对 RNAi 干扰体系中荧光素酶活性的影响 细胞分别转染 pLuc-FR、siRNA、pshRNA-GFP、pshRNA-Luc 和 pCORE-Flag 或 pSG5mP19 后 48 h,收集细胞裂解液,取上清液检测荧光素酶,具体操作按试剂说明书进行。阴性对照组为仅加入 pshRNA-LUC;空白对照组加入无关的 pshRNA-GFP。采用萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶(Luc/RL)的比值比较萤火虫荧光素酶相对活性,对照组比值标化为 1。进行 3 次独立实验,计算 Luc/RL 平均值,各组数据标准化后进行比较。

1.2.5 核心蛋白与 Dicer 在真核细胞内的相互作用 HepG2 细胞转染质粒 pCORE-Flag 及对照质粒 pEGFP-Flag,48 h后收集细胞,加入细胞裂解液(pH = 7.5 的 2.5 mmol/L Tris-HCl,250 mmol/L NaCl,5 mmol/L EDTA,1% NP-40),4 ℃ 30 min 裂解细胞,4 ℃高速离心 10 min,取上清液与 20 μL 标记 Flag 单抗的亲和磁珠 Ezview Red Anti-Flag M2 affinity gel beads (Sigma)混匀,4 ℃孵育过夜。高速离心回收蛋白结合磁珠,以 TBS 洗涤数次,离心回收磁珠,加入 40 μL 蛋白上样 buffer 煮沸 5 min 回收蛋白结合物,用 8% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至 NC 膜后进行 Western blot 检测 Dicer。实验中加入未进行免疫共沉淀处理的细胞裂解液作为阳性对照。一抗为兔抗 Dicer(BD),二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG,化学发光法显色。

1.2.6 核心蛋白抑制 Dicer 功能的体外实验 设计针对萤火虫荧光素酶的引物,在引物两端分别加入 λ 噬菌体 T7 启动子序列,PCR 扩增获得 DNA 片段,作为体外转录生成双链 RNA 的模板。T7luc 引物上游:5′-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGTTGCGCCCGCGAACGAC-3′,下游:5′-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAACCTCTTGGCAACCGC-3′。PCR 产物纯化后加入体外转录反应体系,37 ℃ 孵育2 h进行体外转录,转录产生的正负链 RNA 在孵育过程中退火生成双链 RNA,直接用于 Dicer 的功能实验,操作按试剂说明书进行。体外抑制实验反应体系(10 μL):dsRNA 1.5 μl,Dicer buffer 4 μL,10 mmol/L ATP 1 μL,50 mmol/L $MgCl_2$ 0.5 μL,Dicer 2 μL,分别加入全长核心蛋白(core)、1~122 aa 片段(T22)、denM 或无 RNase 水 1 μL 37 ℃孵育 18 h,用3%琼脂糖凝胶电泳观察处理结果。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

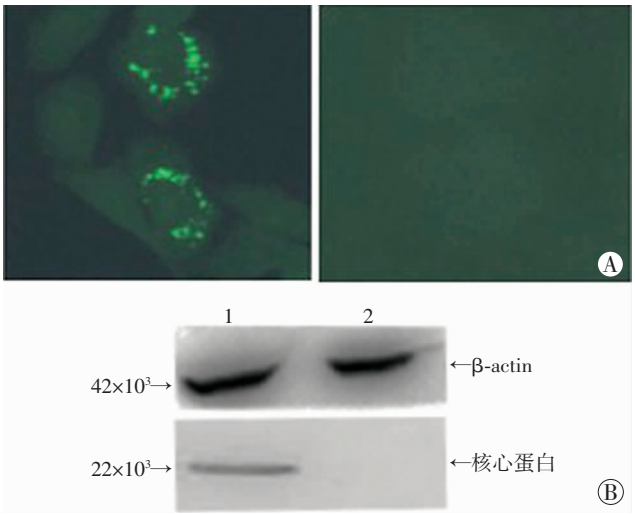
2.1 核心蛋白的表达及抗原性检测

免疫荧光染色及 Western blot 均检测到核心蛋白的表达。免疫荧光结果显示,核心蛋白有较强表达,主要位于细胞质中,呈颗粒状(图 1A)。利用 HCV 阳性血清做 Western blot 实验,检测到约 22×10^3 处有条带,阴性对照中相应位置无条带,表明表达的核心蛋白能够与阳性血清中的抗 HCV 核心抗体反应(图 1B)。

2.2 核心蛋白抑制 shRNA 介导的 RNAi 而不能抑制 siRNA 介导的 RNAi

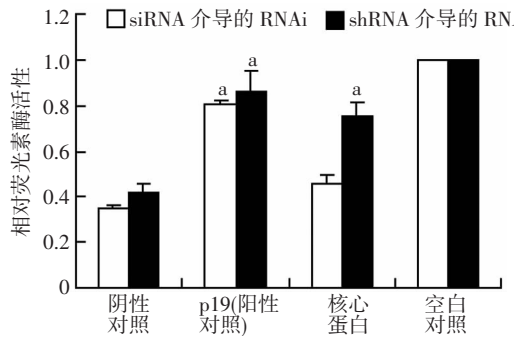
利用虫荧光素酶 RNAi 体系,核心蛋白能使被 shRNA 抑制的萤火虫荧光素酶基因的表达明显恢复,但其作用较番茄丛矮病毒 p19 蛋白弱。加入载体表达的 shRNA,荧光素酶相对活性降至 0.42,加入核心蛋白后,萤火虫荧光素酶的相对活性恢复至 0.75,与阴性对照组比较,两者具有显著统计学差异($P<0.05$)。当加入 p19 后,萤火虫荧光素酶的相对活性恢复至 0.86,与阴性对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$,图 2A)。当核心蛋白加入 siRNA 介导的 RNAi 体系中,发现核心

蛋白对 siRNA 引发的 RNAi 无拮抗作用,仅见 p19 与阴性对照有明显的统计学差异($P < 0.05$,图 2B)。表明核心蛋白对 siRNA的功能无影响,其抑制 RNAi 的作用发生于 siRNA 形成的上游,可能通过影响 siRNA 的形成产生。由于 shRNA 在细胞内形成 siRNA 需要 Dicer 的处理,因此核心蛋白极有可能通过影响 Dicer 的功能而发挥作用。



A:细胞免疫荧光结果(×40)　左:核心蛋白;右:阴性对照;B:Western blot 检测结果;1:HCV 阳性血清;2:阴性对照

图 1　HCV 核心蛋白真核表达的鉴定



a: $P < 0.05$,与阴性对照组比较

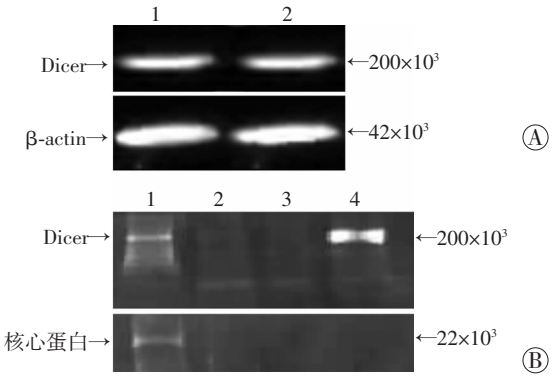
图 2　核心蛋白抑制针对虫荧光素酶的 RNAi 作用

2.3　核心蛋白与 Dicer 在真核细胞内的相互作用

Dicer 在 HepG2 细胞内有较高水平的表达。加入表达核心蛋白的质粒后,与对照组比较,两组差异无统计学意义($P > 0.05$),即核心蛋白不会引起细胞内 Dicer 的产量的明显变化(图 3A)。免疫共沉淀检测结果显示,当核心蛋白表达于细胞内时,可与 Dicer 结合,利用针对核心蛋白(Flag 标签)的抗体捕获核心蛋白,同时得到 Dicer 蛋白,即证明 Dicer 与核心蛋白可互相结合。而对照组 EGFP-3 Flag(mock)中,检测不到 Dicer 的条带,即 EGFP 并不能结合 Dicer,亦排除了 Flag 与 Dicer 的结合可能性。未转染任何质粒的细胞组用于排除细胞的非特异结合(图 3B)。

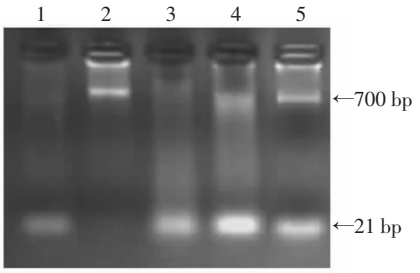
2.4　核心蛋白抑制 dicer 对 dsRNA 的切割

重组表达的 Dicer 在体外能充分地切割 dsRNA,产生 21 bp 的 siRNA(图 4 中阴性对照)。当核心蛋白加入后,仅见 700 bp 处有条带,21 bp 处未见条带,表明 dsRNA 没有被切割,而加入对照蛋白质 denM 时,仅见 21 bp 处有条带,即 dsRNA 的切割没有受到影响,加入 T22 后,在 700、21 bp 处均有条带,即 T22 影响部分切割功能。表明核心蛋白特异地抑制了 Dicer 对 dsRNA 的切割功能。



A:核心蛋白对真核细胞内 Dicer 表达量的影响　1:核心蛋白;2:阴性对照;B:核心蛋白与 Dicer 可在真核细胞内结合　1:核心蛋白;2:空白对照;3:阴性对照;4:阳性对照

图 3　免疫共沉淀实验检测核心蛋白与 Dicer 在真核细胞内的相互作用



1:阴性对照;2:核心蛋白;3:denM;4:T22;5:标准

图 4　核心蛋白抑制 Dicer 活性的体外实验

3　讨论

RNAi 在生物体的多种生理功能中发挥着重要作用,其包括参与 siRNA 的产生过程,RISC 的形成及效应阶段,Dicer 是真核细胞中决定 siRNA 产生的一种Ⅲ型核酸内切酶[3-5]。Dicer 相对分子质量约为 200 × 10^3,具有 4 个结构域,包括 N-端 RNA 解旋酶结构域(DexD/H)、DUF283 及 PAZ 结构域、2 个相邻的 RNA 酶Ⅲ结构域和 C 端 dsRNA 结合结构域(dsRBD)。Dicer 通过其 dsRBD 识别并结合长双链 RNA 或者 shRNA,然后由 RNA RNA 酶Ⅲ结构域将 dsRNA 切割成 21 ~23 nt siRNA 片段,每个片段的 3′端都有 2 个核苷酸突出。而 DUF283 及 PAZ 结构域则辅助 RNA RNA 酶Ⅲ的切割作用,并决定了切割产物的长度。PAZ 结构域是一种 RNA 结合元件,也存在于 Argouaute 等 RISC 相关蛋白中。

由于 RNAi 是生物体内限制病毒感染的重要机制,为了提高其生存机会,许多病毒也在进化过程中获得了对抗这一机制的能力,即能够编码产生 RNAi 抑制因子[6]。这些制因子可能在 RNA 干扰途径的多个

步骤发生作用,不同的抑制因子作用的方式和部位可能不同,而它们抑制 RNA 干扰的能力亦有强弱之别[7]。有的抑制因子可以结合长双链 RNA 或者影响 Dicer 活性从而影响 siRNA 的产生,如 HC-pro、呼肠孤病毒 δ3 因子、HIV-1 的 tat 因子[8-12];有的抑制因子可与 siRNA 结合,阻止其进入 RNA 干扰的效应物质——RISC 从而发挥抑制 RNA 干扰的作用,如 p19 等[13];另外一些抑制因子可能通过结合 RISC 中的某一成分来抑制 RISC 的形成及活性,甚至可能是通过影响 RNAi 的调节途径来影响 RNAi 的作用[14]。

本研究显示 HCV 的核心蛋白能够抑制 shRNA 介导的 RNAi 作用,但当核心蛋白引入 siRNA 介导的 RNAi 体系中时,RNAi 的效果却未受到明显影响。这一现象提示核心蛋白能影响 siRNA 的产生过程,而不能影响成熟的 siRNA 发挥作用。由于 Dicer 是产生 siRNA 的关键酶类,故推测核心蛋白影响了 Dicer 的活性。免疫共沉淀实验证实了核心蛋白与 Dicer 的结合作用。为了验证核心蛋白的存在影响了 siRNA 的产生,我们在体外进行了 Dicer 的活性实验,发现核心蛋白能够抑制 Dicer 对 dsRNA 的切割作用,与细胞内活性实验结果相符合。

RNA 干扰作用不仅是对抗病毒感染的重要手段,而且在染色质修饰、基因重组、发育时序、干细胞发育及物质代谢等多方面具有重要功能,具体表现为 microRNA的基因调节功能[15-18]。人类细胞中已发现有 200 多种 microRNA 存在,对细胞功能具有重要的调节作用[19]。由于核心蛋白能影响 Dicer 的功能,可能对细胞内 microRNA 的表达也会有影响,进而引起细胞代谢功能和分化凋亡等异常,导致疾病产生[20-21]。鉴于较多的研究证实核心蛋白在 HCV 感染导致肝癌中有较为重要的致病作用[22],其作用机制也有多种报道。我们推测核心蛋白通过抑制 Dicer 的功能从而影响 microRNA 的正常表达,可能是其致肿瘤的作用机制之一。

参考文献:

[1] Chang K, Marran K, Valentine A, *et al*. RNAi in cultured mammalian cells using synthetic siRNAs [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2012, 2012(9): 957-961.

[2] 易敏, 黄文娟, 宋彩虹, 等. 丙型肝炎病毒核心蛋白抑制 shRNA 介导的 RNA 干扰作用[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(12): 1162-1167.

[3] Li X, Tian X, Zhang B, *et al*. Variation in dicer gene is associated with increased survival in T-cell lymphoma [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51640.

[4] Lima W F, Murray H, Nichols J G, *et al*. Human Dicer binds short single-strand and double-strand RNA with high affinity and interacts with different regions of the nucleic acids [J]. J Biol Chem, 2009, 284(4): 2535-2548.

[5] Takeshita D, Zenno S, Lee W C, *et al*. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the C-terminal RNase Ⅲ domain of human Dicer [J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2006, 62(Pt 4): 402-404.

[6] Folimonova S Y. Superinfection exclusion is an active virus-controlled function that requires a specific viral protein [J]. J Virol, 2012, 86(10): 5554-5561.

[7] Mroczka A, Roberts P D, Fillatti J J, *et al*. An intron sense suppression construct targeting soybean FAD2-1 requires a double-stranded RNA-producing inverted repeat T-DNA insert [J]. Plant Physiol, 2010, 153(2): 882-891.

[8] Liu C, Axtell M J, Fedoroff N V. The helicase and RNaseIIIa domains of Arabidopsis Dicer-Like1 modulate catalytic parameters during microRNA biogenesis [J]. Plant Physiol, 2012, 159(2): 748-758.

[9] Houzet L, Jeang K T. MicroRNAs and human retroviruses[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1809(11/12): 686-693.

[10] Ding S W, Lu R. Virus-derived siRNAs and piRNAs in immunity and pathogenesis [J]. Curr Opin Virol, 2011, 1(6): 533-544.

[11] Sampey G C, Van-Duyne R, Currer R, *et al*. Complex role of microRNAs in HTLV-1 infections [J]. Front Genet, 2012, 3: 295.

[12] Ha T Y. MicroRNAs in Human Diseases: From Lung, Liver and Kidney Diseases to Infectious Disease, Sickle Cell Disease and Endometrium Disease [J]. Immune Netw, 2011, 11(6): 309-323.

[13] Valli A, Oliveros J C, Molnar A, *et al*. The specific binding to 21-nt double-stranded RNAs is crucial for the anti-silencing activity of Cucumber vein yellowing virus P1b and perturbs endogenous small RNA populations [J]. RNA, 2011, 17(6): 1148-1158.

[14] Ding S W, Voinnet O. Antiviral immunity directed by small RNAs [J]. Cell, 2007, 130(3): 413-426.

[15] Lavoie M, Ge D, Abou-Elela S. Regulation of conditional gene expression by coupled transcription repression and RNA degradation [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(2): 871-883.

[16] Nicholson A M, Finch N A, Rademakers R. Human genetics as a tool to identify progranulin regulators [J]. J Mol Neurosci, 2011, 45(3): 532-537.

[17] Kota S K, Balasubramanian S. Cancer therapy via modulation of micro RNA levels: a promising future. Drug Discov Today, 2010, 15(17-18): 733-740.

[18] Yin Y, Li J, Chen S, *et al*. MicroRNAs as Diagnostic Biomarkers in Gastric Cancer [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(10): 12544-12555.

[19] Maatouk D, Harfe B. MicroRNAs in development [J]. Scientific World Journal, 2006, 6: 1828-1840.

[20] Harris K S, Zhang Z, McManus M T, *et al*. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(7): 2208-2213.

[21] Scholthof H B, Alvarado V Y, Vega-Arreguin J C, *et al*. Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in Nicotiana benthamiana [J]. Plant Physiol, 2011, 156(3): 1548-1555.

[22] Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, *et al*. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region are associated with postoperative recurrence and survival of patients with HCV genotype 1b-associated hepatocellular carcinoma [J]. Ann Surg, 2011, 254(2): 326-332.

(收稿:2012-12-26;修回:2013-02-25)

(编辑 吴培红)