

HBx 蛋白与 Hepsin 共表达可促进 HBV 复制

赵伟光¹, 张建林¹, 吴建国^{1**}, 朱 应¹, 李 雁¹, 朱忠超², 刘志苏²

(1. 武汉大学生命科学学院 病毒学教育部重点实验室, 湖北武汉 430072; 2. 武汉大学医学院中南医院, 湖北武汉 430071)

Co-expression of HBx and Hepsin Promotes Replication of HBV

ZHAO Wei-guang¹, ZHANG Jian-lin¹, WU Jian-guo^{1**}, ZHU Ying¹, LI Yan¹,ZHU Zhong-chao², LIU Zhi-su²

(1. College of Life Sciences, Wuhan University/Key Laboratory of the Ministry of Education for Virology, Wuhan 430072, China; 2. Zhongnan Hospital, School of Medicine, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: Entire ORF of Hepsin was isolated from adjacent live tissue of HCC with RT-PCR. Hepsin gene was inserted into expressing vector pCMV-tag-HS. The recombinant vector pCMV-tag-HS was co-transfected into liver tumor line Hep G2.2.1.5 with plasmid encoding HBx protein. The results indicated that co-expression of HBx and Hepsin increased the expressing level of viral proteins and the copy number of HBV, which implicated that the association of HBx and Hepsin promoted the replication of HBV.

Key words: HBx protein; Hepsin protein; Promotion; Replication

摘要: 运用 RT-PCR 技术从原发性肝癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 患者的癌旁组织中扩增了 Hepsin 基因编码区序列, 该序列已被克隆并构建了 pCMV-tag-HS 表达质粒。将 pCMV-tag-HS 表达质粒和表达 HBx 蛋白的载体共转染 HepG2.2.1.5 细胞, 观察 HBx 蛋白和 Hepsin 蛋白相互作用对 HBV 病毒复制和病毒蛋白表达的影响。研究结果表明共表达 HBx 蛋白、Hepsin 蛋白可以协同提高 HBV 病毒颗粒在培养液中的拷贝数, 并提高 HBV 病毒蛋白 HBs、HBe 的表达水平。这说明 HBx 蛋白和 Hepsin 蛋白相互作用可以增强 HBV 病毒的复制。

关键词: HBx 蛋白; Hepsin 蛋白; 增强; 复制

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0345-04

乙肝病毒(*Hepatitis B virus*, HBV)基因组中最小的阅读框编码一种只含 154 个氨基酸、分子量为 16.5 kDa 的蛋白, 称为乙肝病毒 X (HBx) 蛋白。HBx 蛋白分子量虽小, 但功能广泛, 它不仅是病毒复制所必须的, 而且与乙肝病毒的致病性和致癌性有密切的关系^[1,2]。HBx 作为一种多功能的调节因子主要是调控病毒基因组和宿主细胞基因的转录表达激活, 在 HBV 致癌机制中起着重要作用。HBx 蛋白既可以通过间接调控包括 NF- κ B、AP1、AP2 和 CRE 在内的顺式调控组件来调控多种细胞基因^[3-7], 也可以控制诸如 Ras/Raf 丝裂原启动的蛋白激酶、c-Jun 激酶、JAK/STAT 和蛋白激酶 C 等细胞

信号转导通路^[5,6,8]。然而, HBx 蛋白并不直接结合 DNA, 而是作为转录调节因子与转录因子以及包括 cAMP 反应组件结合蛋白/启动转录因子 (CREB/ATF) 和 NF- κ B 抑制蛋白 I κ B α 相互作用实现其功能^[3,6]。目前 HBx 蛋白影响 HBV 致病性和肝细胞转化的分子机制还不清楚。鉴定 HBx 蛋白相关的细胞靶蛋白分子, 并明确它们的特征仍然是阐明 HBV 感染和 HCC 发生发展的关键。我们曾利用酵母双杂交系统筛选到了一系列与 HBx 蛋白相关的细胞蛋白, 其中 Hepsin 与 HBx 蛋白的相互作用在体内体外试验中都得到很好的验证。Hepsin 属于跨膜丝氨酸蛋白酶家族成员之一^[9], 在包括卵巢癌和前列

收稿日期: 2004-06-28, 修回日期: 2004-07-18

作者简介: 赵伟光 (1950-), 男, 副教授, 从事医学分子病毒学研究

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 027-87163979, E-mail: wu9988@Vip. Sina. com

腺癌在内的许多癌细胞中超表达^[10, 11]。体内外试验研究表明 Hepsin 蛋白在肝细胞生长并维持肝细胞正常形态、细胞的发育, 起始血液凝集过程中是必不可少的^[12-14]。这些研究表明 Hepsin 可能具有重要的生理功能。本研究从原发性肝癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 患者的临床样品中分离并克隆 Hepsin 全基因, 构建真核表达载体转入肝癌细胞系 Hep G2.2.1.5, 观察这两种蛋白在细胞内共表达后对 HBV 病毒复制和病毒蛋白表达的影响。

1 材料与与方法

1.1 HBx 蛋白基因表达载体的构建

本研究涉及到的克隆、表达载体均由本实验室保存。以本实验室已经构建好的质粒 pGBKT7-HBx 为模板, 以 5'-GCG AAT TCT TAG GCA GAG GTG AAA AAG TTG-3' 和 5'-CAA GAA TTC ATG GCT GCT AGG CTG TGC TG-3' 为引物, 扩增 HBx 全基因, 经限制性内切酶 *Eco*R I 消化后, 用凝胶回收试剂盒回收纯化, 克隆到载体 pCMV-tag-2C, 得到重组质粒 pCMV-tag-HBx。

1.2 Hepsin 蛋白基因克隆及其鉴定

收集 HCC 患者的临床样品, 分别切取肝癌组织和癌旁组织 0.1g, 按照 Trizol 试剂分离细胞总 RNA 操作程序提取临床组织样品总 RNA。

利用 MMLV 逆转录系统制备 cDNA 第一条链。然后用引物: 5'-GCTTAAGCTTCGATGGCTGCAA GTGGCCGAGGTCTC-3' 和 5'-CGTTCGGTACCTC TTCCTGGGTCAGAGCTGGTTC-3' 扩增 Hepsin 全基因, 这一对引物分别含有限制性内切酶位点 *Hind* III 和 *Kpn* I 位点。PCR 产物经 *Hind* III 和 *Kpn* I 消化处理并用凝胶回收试剂盒纯化后克隆到表达载体 pCMV-tag-2C, 重组质粒命名 pCMV-tag-HS。最后测定 Hepsin 全基因的核苷酸序列并进行必要的分析。

1.3 细胞的培养及其转染

本研究中用到的细胞 HepG2.2.1.5 由第一军医大学南方医院提供, 该细胞系可以产生病毒颗粒, 并分泌 HBsAg 和 HBeAg^[15]。用完全 DMEM 培养基继代培养, 待长满细胞瓶以后按 1:1.5~1:2.5 转接到 24 孔培养皿等待转染。每一孔转染细胞按以下程序进行转染: 将 0.6μg 质粒 DNA 和 1.8μL Sofast 转染试剂分别稀释在 30μL 无血清无抗生素的 DMEM, 然后将后者逐滴添加到前者中, 边加边摇匀。室温下作用 20~30min, 将配制好的转染液逐滴添加到细胞培养基, 将细胞放回 CO₂ 培养箱内继

续培养。

1.4 病毒蛋白表达水平的测定

分别收集转染后 24h 和 48h 的细胞培养液。采用乙型肝炎病毒 e 抗原诊断试剂盒 (上海实业科华生物技术有限公司生产) 和乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒 (河南理利生物工程有限公司生产) 检测, 显色后测定样品中 OD_{450nm}, 判定 HBeAg 和 HBsAg 的含量。

1.5 实时定量 PCR 检测

在细胞转染 48h 后, 收集细胞培养液, 按照 HBV 核酸扩增 (PCR) 荧光定量检测试剂盒 (深圳市匹基生物工程股份有限公司生产) 操作流程制备 HBV DNA 样品。依要求设立 4 个标准阳性样品, 2 个阴性对照, 1 个临界阳性样品, 其它是实验样品, 体系为 40μL, 反应程序为 37℃ 5min、94℃ 1min, 进入循环 95℃ 5s, 60℃ 30s, 50 个循环。在荧光定量 PCR 仪 RG2000 (Corbett, USA) 上完成测定。测定完成后用该荧光定量 PCR 仪 RG2000 提供的分析软件进行分析。

2 结果

2.1 表达载体的构建

根据图 1 构建了 pCMV-tag-HS 表达载体。

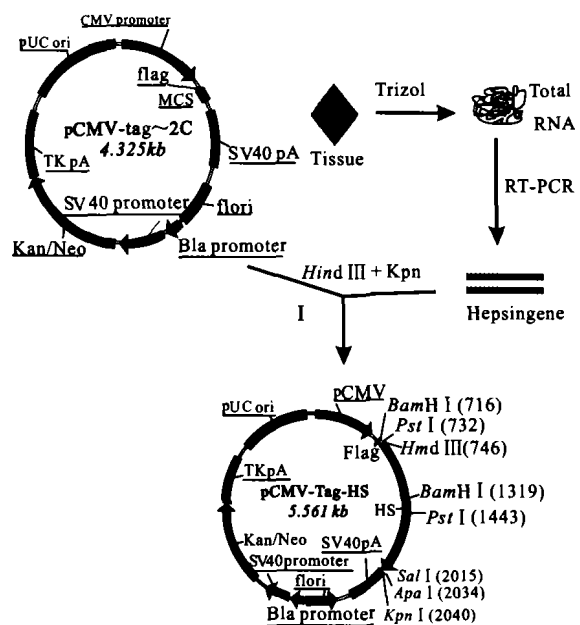


图 1 pCMV-tag-HS 表达载体的构建

Fig. 1 Construction of the expressing plasmid pCMV-tag-HS

2.1 Hepsin 全基因克隆及其核苷酸序列分析

从临床肝癌组织提取总 RNA, 利用 M-MLV 逆转录试剂盒制备第一链 cDNA, PCR 扩增 Hepsin

整个阅读框架, 扩增后凝胶电泳检测结果 (图 2)。从凝胶电泳图谱可以看到扩增出了预期的 1.3kb 条带。重组质粒 pCMV-tag-HS 用相应的限制性内切酶消化, 凝胶电泳检测结果 (图 3)。从凝胶图谱可以看出 pCMV-tag-2C 和 Hepsin 连接以后用限制性内切酶 *Hind* I 和 *Kpn* I 可以消化出预期的 4.3kb 和 1.3kb 条带。随后核苷酸序列分析结果表明从肝癌组织分离到的 Hepsin 基因的核苷酸序列与正常组织分离到的基因核苷酸序列仅仅相差一个核苷酸残基, 而且不会改变编码的氨基酸。

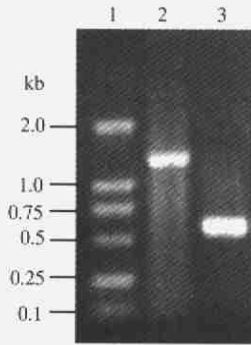


图 2 Hepsin 基因 PCR 产物

Fig. 2 Identification of Hepsin gene amplified by RT-PCR
1, Marker DL2000; 2, Hepsin gene; 3, β -actin.

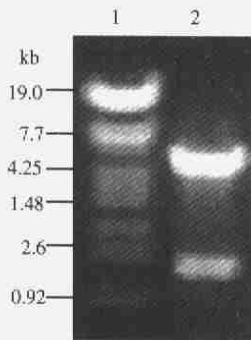


图 3 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pCMV-tag-HS
1, Marker λ -EcoT14 I; 2, pCMV-tag-HS / *Hind* III+*Kpn* I

2.2 Hepsin 蛋白与 HBx 蛋白共表达增强了病毒蛋白的表达

为了观察 Hepsin 蛋白和 HBx 蛋白相互作用对 HBV 病毒蛋白表达水平的影响, 将已构建好的表达 HBx 蛋白和 Hepsin 蛋白的质粒单独转染或者共转染肝癌细胞系 Hep G2.2.1.5, 用转染空载体作为对照。分别在转染 24h 和 48h 收集上清液, 用 ELISA 检测试剂盒测定 HBsAg 和 HBeAg 的量。3 次试验结果的平均值加标准差显示在图 4, 从图中可以看到 Hepsin 蛋白和 HBx 均可以增强 HBsAg 的表达, 两蛋白相互作用可以协同增强 HBsAg 的表达。

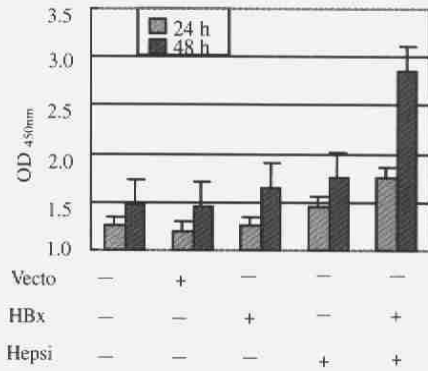


图 4 转染 Hep G2.2.1.5 细胞后 HBsAg 表达水平测定
Fig. 4 HBsAg expression level determined by ELISA

2.3 Hepsin 蛋白与 HBx 蛋白相互作用增强了 HBV 病毒复制

为了进一步确认 Hepsin 和 HBx 蛋白相互作用对 HBV 病毒复制的影响, 将已构建好的表达 HBx 蛋白和 Hepsin 蛋白的质粒单独转染或者共转染肝癌细胞系 Hep G2.2.1.5, 用空载体转染作为对照。转染 48h 后收集细胞培养液, 用 PG 公司提供的 HBV 病毒 DNA 检测试剂盒测定培养液中 HBV DNA 的拷贝数。3 次试验结果的平均值加标准差显示在图 5, 从图中可以看到超表达 Hepsin 或者超表达 HBx 蛋白均可以提高细胞培养液中 HBV DNA 的拷贝, 而共同表达 HBx 和 Hepsin 蛋白后在细胞培养液中 HBV DNA 的量进一步提高, 与空载体转染后 HBV DNA 拷贝数要多出一倍, 这说明两种蛋白相互作用有较强的协同作用。

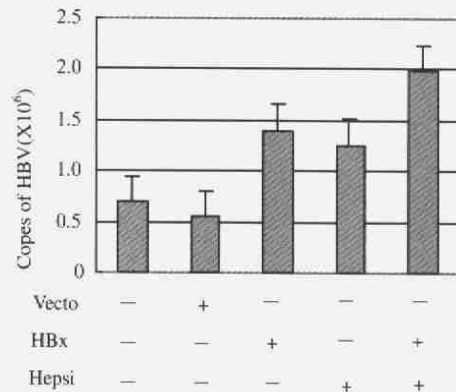


图 5 定量 PCR 的检测结果
Fig. 5 Results of the real-time quantitative PCR

3 讨论

蛋白酶消化细胞周围成分是肿瘤细胞生长和浸润的基础, 也是肿瘤细胞迁移到其它组织器官启动和释放众多生长因子和血管生成因子必需的^[12,14]。

许多资料表明 Hepsin 蛋白在卵巢癌和前列腺癌组织中都有超表达的现象, Hepsin 蛋白可能是卵巢癌和前列腺癌浸润过程中必需的蛋白酶^[10]。最近的研究说明 Hepsin 蛋白不仅在癌细胞中超表达, 参与了癌细胞的浸润, 而且 Hepsin 表达水平也可以作为前列腺癌的超前诊断的一个重要标记物^[11]。

肝细胞癌与 HBV 慢性感染有密切的关系。HBx 蛋白在 HBV 致病性和有利于肝肿瘤细胞浸润和迁移的分子机制仍然不清楚。在两次独立的酵母双杂交系统重复筛选到了 Hepsin 蛋白, 在用体外免疫共沉淀试验中 Hepsin 蛋白与 HBx 蛋白呈强阳性信号。这说明 Hepsin 蛋白和 HBx 蛋白直接相互作用。Hepsin 蛋白基因在大多数组织中可以检测到, 尤其在肝细胞中呈高水平表达^[12,14]。在细胞中表达的 Hepsin 是单一多肽链, 修饰成熟以后为 51KD 的 II 类跨膜糖蛋白, 在多种细胞中可以检测到, 包括肝癌细胞系 Hep G2^[10]。体外实验研究表明 Hepsin 蛋白在肝细胞生长和起始血液凝集的过程中起重要的作用^[12], 但是 Hepsin 在肝细胞中的作用还不清楚。用抗 Hepsin 抗体或者针对 Hepsin 的抗体处理细胞时可以强烈抑制细胞的生长同时改变细胞的生长形态, 这说明 Hepsin 蛋白在细胞生长和维持细胞的正常形态中起着重要的作用^[10,14]。本研究证明 HBx 蛋白和 Hepsin 蛋白相互作用可以增强 HBV 病毒的复制, 这可能是他们相互作用减少了 HBV 感染给细胞带来的损伤, 给 HBV 病毒复制及其病毒蛋白的表达提供了有利的场所, 也可能是 HBx 蛋白和 Hepsin 蛋白相互作用改变了肝细胞膜的结构, 有利于病毒粒子的释放, 这些都是本研究需要进一步试验验证的设想。

参考文献

- [1] Feitelson M A, Duan L X. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Path*, 1997, 150(4): 1141-1157.
- [2] Hwang G Y, Lin C Y, Huang L M, *et al.* Detection of the hepatitis B virus X protein (HBx) antigen and anti-HBx antibodies in cases of human hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(12): 5598-5603.
- [3] Ohata K, Ichikawa T, Nakao K, *et al.* Interferon alpha inhibits the nuclear factor kappa B activation triggered by X gene product of hepatitis B virus in human hepatoma cells[J]. *FEBS Lett*, 2003, 553(3):304-308.
- [4] Hafner A, Brandenburg B, Hildt E. Reconstitution of gene expression from a regulatory-protein-deficient hepatitis B virus genome by cell-permeable HBx protein[J]. *EMBO Rep*. 2003, 4(8): 767-773.
- [5] Andrisani O M, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis[J]. *Int J Oncol*, 1999; 15(2): 373-379.
- [6] Diao J, Garces R, Richardson C D. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001, 12(2-3): 189-205.
- [7] Weil R, Sirma H, Giannini C, *et al.* Dargemont CDirect association and nuclear import of the hepatitis B virus X protein with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(9): 6345-6354.
- [8] Tam C, Lee S, Hu Y, *et al.* Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(37): 34671-34680.
- [9] Hooper J D, Clements J A, Quigley J P, *et al.* Type II transmembrane serine proteases insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:857-860.
- [10] Tanimoto H Y, Yan Y, Clark J, *et al.* Hepsin, a cell surface serine protease identified in hepatoma cells, is overexpressed in ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 1997, 57:2884-2887.
- [11] Magee J A, Araki T, Patil S, *et al.* Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 5692-5696.
- [12] Torres-Rosado A, O'Shea S K, Tsuji A, *et al.* Hepsin, a putative cell-surface serine protease, is required for mammalian cell growth[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:7181-7185.
- [13] Vu T-K, Liu R W, Haakasma C J, *et al.* Identification and cloning of the membrane-associated serine protease, hepsin, from mouse preimplantation embryos[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272:31315-31320.
- [14] Kazuma Y, Hamamoto T, Foster D C, *et al.* Hepsin, a putative membrane-associated serine protease, activates human factor VII and initiates a pathway of blood coagulation on the cell surface leading to thrombin formation[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270:66-72.
- [15] Sells M A, Chen M L, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 1005-1009.