第 21 卷 6 期　　中 国 病 毒 学　　21（6）：546-550
2006 年 11 月　　VIROLOGICA SINICA　　November 2006

HSVⅠ感染人成纤维细胞诱导的 SR-15 蛋白生物学功能分析*

姜　莉#，李品忠#，董承红，李琦涵**

（中国医学科学院/中国协和医科大学 医学生物学研究所，昆明　650118）

Functional Analysis of SR-15 Protein of Human Fibroblast Induced by HSVⅠInfection

JIANG Li #, LI Pin-Zhong #, DONG Cheng-Hong, LI Qi-Han**

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science /Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Abstract: The binding of HSVⅠ to receptors of human fibroblast initiates viral infection and induces the cells to express specific proteins. SR-15, one of these proteins, was identified to interact with certain zinc finger proteins containing KRAB domain through binding zinc finger domain in yeast trap system. This interaction impacts the transcriptional repression of ZNF268, which is one of this type of zinc finger proteins in cells.

Key words: Herpes simplex virus Ⅰ(HSVⅠ)；SR-15；Interaction；Zinc finger protein

摘要：人单纯疱疹病毒Ⅰ型（Herpes simplex virusⅠ, HSVⅠ）结合人成纤维细胞相应受体以启动感染的过程，能够引起细胞产生特异性蛋白分子的表达，其中之一的 SR-15 蛋白经酵母双杂交系统分析证明可与细胞内多个具有 KRAB 结构的锌指蛋白产生特异性相互作用，其作用部位为锌指结构域，该作用能够影响该类蛋白之一 ZNF268 在细胞内的转录抑制作用。

关键词：HSVⅠ；　SR-15;　相互作用;　锌指蛋白

中图分类号：R373　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1003-5125(2006)06-0546-05

病毒感染细胞的过程是由病毒与受体的特异性结合所介导的[1]，这一结合过程能够引起细胞在信号传导中发生相关反应的事实已被研究所证实[2,3]。人单纯疱疹病毒（Herpes simplex virus, HSV）对上皮类细胞的感染，通常是由病毒表面的 gH 和 gC 蛋白与细胞膜上的硫酸乙酰肝素分子结合，随后通过一个属于 TNF/NGF 家族成员的受体分子介导进入细胞 [4]。实验已经证明，这样一个过程作为对细胞的感染刺激，能够引起被感染细胞的基因表达谱发生变化[5~7]，而针对这种变化所产生的蛋白分子进行功能分析，将有助于深入认识及理解 HSV 的感染机制。在本实验室的前期研究工作中，我们曾利用 HSVⅠ针对人成纤维细胞的感染体系，初步分析了 HSVⅠ感染人成纤维细胞后，该细胞基因反应的变化，并从中克隆到若干相关的 cDNA 基因[8]。其中被命名为 hsp-975 的基因编码一个具有 SR 蛋白特征结构，由 121 个氨基酸组成的蛋白分子(GenBank 登录号: AF281279)，这个蛋白仅在被感染细胞的 G1/S 期间表达[9]，我们称其为 SR-15 蛋白。为进一步了解 SR-15 蛋白的生物学功能，尤其是该蛋白在 HSVⅠ感染早期所具有的功能意义，我们利用蛋白分析的相关技术，对 SR-15 蛋白进行了系统的分析。结果表明，SR-15 蛋白能够与人胚肺细胞内多个具有 KRAB 结构的锌指蛋白产生特异性相互作用，并影响该类蛋白之一的 ZNF268 在细胞内的转录抑制作用。由于 SR-15 蛋白特异表达于 HSVⅠ感染细胞的 G1/S 期，因此，它能够影响 KRAB 结构锌指蛋白类的转录抑制作用，这表明其显然具有相应的细胞生物学意义。

1　材料和方法

收稿日期：2006-06-01,　修回日期：2006-09-1
*　基金项目：国家自然科学基金资助项目（30370065、30570081）
作者简介：姜　莉（1957-）女，满族，辽宁省籍，副研究员。
#　同为第一作者
**　通讯作者：李琦涵（1957-）男，江苏省籍，研究员，博导，主要从事分子病毒学研究。
Corresponding author: Tel: 0871-8335905, E-mail: qihanlister@gmail.com

1.1　实验材料

hsp-975 基因编码区片段（来自 pUC-975，本实验室保存）与 pcDNA3（Invitrogen）分别经 *Eco*R Ⅰ酶切处理后连接得到 pcDNA-975；hsp-975 编码区片段与 pGBKT7（Clonetech）分别经 *Eco*R Ⅰ酶切处理后连接得到 pGBKT-975。pGBKT-975-M 系列载体以同样的方法，按照图 1A 所示构建；pcDNA-ZF 由 ZNF286（NM_003 415）1～550 位氨基酸编码区基因，其包含 6 个锌指结构域和一个类 KRAB 结构域，与 pcDNA3 经 *Bam*H Ⅰ酶切并连接构建，pACT-ZF 与上述同样片段及方法连接构建。pACT-ZF-M 按图 1B 所示，根据相同方法构建。pCAT-En 系列载体由 SP1 作用序列，CAAT 序列与 pCAT-Basic 载体（Invitrogen）连接构建。大肠杆菌 DH5-α，生长于 LB 培养液（本实验室保存）。

中国仓鼠卵巢细胞 CHO-k1 生长于含 5%牛血清的 F12 营养液培养，100U/mL 青霉素；20μg/mL 链霉素，5%CO_2，37℃培养。抗 SR-15 鼠抗体由本实验室制备保存[8]，抗 ZF（KRAB-锌指蛋白）抗体由 ZNF268 蛋白第 1～550 氨基酸与 GST 融合形成的原核表达蛋白免疫小鼠所制备，本实验室保存。

1.2　质粒 DNA 转染细胞

培养于六孔板中的 CHO-k1 细胞生长至 80%密度后，利用 Lipofectamine™2000（Invitro- gene）转染相应质粒 DNA（3μg /孔）。37℃ 培养 12h 后，弃旧培养液，加入无抗生素的 DMEM（含 5%小牛血清），37℃培养细胞 36h 后，经 PBS 清洗 3 次。弃旧液，1×PBS 洗两次。用细胞刮收集细胞，1000r/min 离心 5 min，弃上清，用于相应检测。

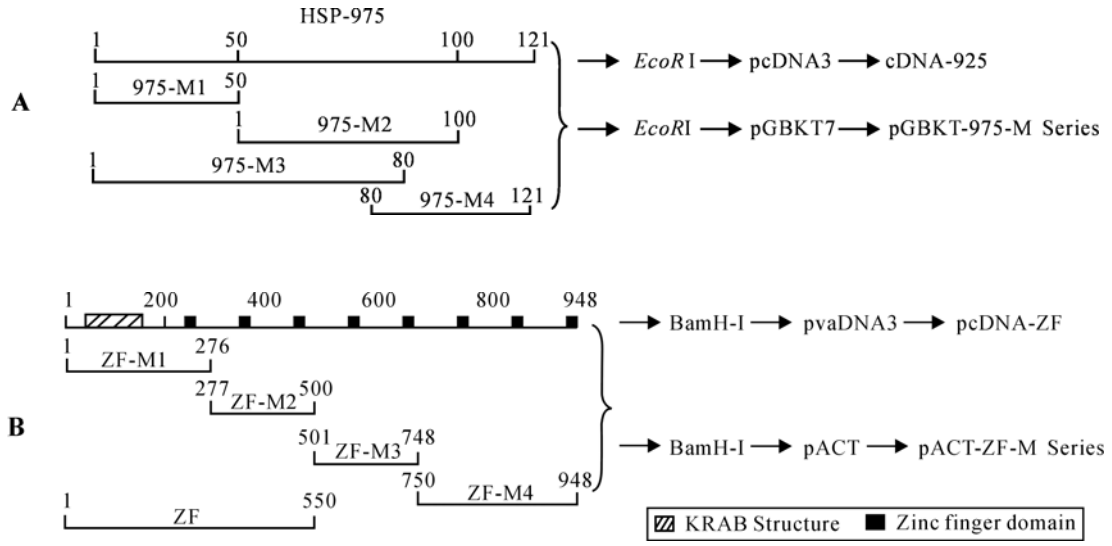

图 1　用于与 ZNF268 蛋白相互作用结构分析的 HSP-975 突变体设计

Fig.1　Design of mutation of HSP-975 and ZNF268 for analysis about the interaction of both proteins

A: The design of HSP-975 mutants. B: The design of ZNF268 mutants.

1.3　酵母双杂交系统检测蛋白质相互作用

1.3.1　SR-15 蛋白作用蛋白的筛选：重组质粒 pGBKT7-975 转化酵母细胞 AH109 后，与预制人胚肺细胞 cDNA 文库（Clontech）按标准方法融合。过程为：分别挑取转化 cDNA 文库的 Y187 菌落和转化 pGBKT7-975 的 AH109 菌落同时接种于 2 倍的 YPDA 培养基中，30℃培养 20-24 h，融合后培养液涂布于 SD/-Leu-Trp 平板，30℃培养 1 周；分别挑菌落划线于 SD/-His-Leu-Trp 和 SD/-Ade-His-Leu-Trp 平板，30℃培养 1 周，选取阳性克隆。其质粒转化大肠杆菌后，进行相应测序。

1.3.2　重组质粒的转化和酵母融合：以重组质粒 pGBKT7-975-M 与 pACT2－ZF-M 系列载体分别转化酵母细胞 AH109 和 Y187 后，分别涂布于 SD/-Trp 平板和 SD/-Leu 平板；同时设对照组质粒 pGBKT7-P53 和 pGBKT7-Lam 转化细胞。30℃培养 1 周后，按上述方法进行融合并挑取阳性克隆。

1.3.3　用 ONPG 液体法测定半乳糖苷酶活性：挑取 SD/-Ade-His-Leu-Trp 平板上的菌落接种到 5mL SD/-Ade-His-Leu-Trp 液体培养基中，摇床过夜培养（30℃，200r/min，20 h）；转种于含 YPD 培养基中 30℃摇床培养 3-5 h，OD_{600}＝0.5~0.8 时，收获酵母菌，并记录 *OD* 值。取样与 4mg/mL ONPG（Promega）30℃ 孵育直到黄色显现，记录反应时间；除去细胞碎片后分光光度计 420nm 光吸收值；以下述公式计算 β-半乳糖苷酶单位：β-半乳糖苷酶

单位数＝1000×OD_{420}/t×5×OD_{600}（OD_{600} =1mL 培养液在 A_{600} 处的吸收值；t：反应时间）。实验重复 3 次。

1.4 免疫沉淀

经 pcDNA-975 和/或 pcDNA-ZF 转染的 CHO 细胞按上述方法在 25cm^2 培养瓶中培养 24hr 后，按标准方法更换无甲硫氨酸 MEM 培养基 10mL，3h 后，再次更换无甲硫氨酸 MEM 培养基 10mL，随之加入[S^{35}]-甲硫氨酸至终浓度 50uCi/mL，继续 37°C 培养 10hr，最终弃去上清，以像皮刮子刮下细胞，加入 RIPA 缓冲液[Tris.HCl 50mmol/L(pH7.5)，NaCl 150mmol/L，NP-40 1%，SDS 0.1%，去氧胆酸 0.5%]200Ml，4°C 裂解细胞。取[S^{35}]-甲硫氨酸标记细胞裂解物 100μL，加入 50μL 抗血清，混匀后放置 37°C 2h；待抗原与特异性抗体之间形成可溶性免疫复合物后，与 Sepharose-A 蛋白混合置 4°C 1hr 形成免疫沉淀物，用 1×PBS 洗涤 2 次，离心后沉淀用 30μL SDS 样品 Buffer 悬浮，漩涡混合后 100°C 煮沸 5min，于室温离心，弃沉淀，上样于 12% SDS-PAGE 胶电泳；将凝胶用固定液固定，置凝胶于干燥仪上干燥后，进行放射自显影。

1.5 氯霉素乙酰转移酶(Chloramphenicol acetyltransferase, CAT)报告基因活性检测

将转染后所收集的细胞，重悬于 200μL Tris·HCl（25mmol/L，pH8.0）缓冲液中，冻融 3 次，16000g 离心 3min，除去细胞碎片，所得上清 40μL 放入 60℃水浴 10 min 后各加入 10μl 9.25×10^{5}Bq/mL [H^3]-氯霉素+5μL 正丁酰辅酶 A＋70μL Tris·HCl（25mmol/L，pH8.0），同时设空白对照。37℃水浴 1h 后，每只离心管加入 300μL 二甲苯，振荡离心，将上层有机液移至另一只新离心管，每管各加入 100 μL 新鲜的 250 mmol/L Tris.HCl（pH8.0），振荡离心。小心吸取 200 μL 上层液相移至液闪管，加入相应的液闪液。进行 ^{3}H 液闪计数，当数值位于 10 000～150 000 时，CAT 活性处在线性范围内。

1.6 统计学分析

使用 SPSS 软件包对相关数据进行处理，统计结果以 *P* 值表示。有关结果以均数±标准差表示。

2 结果

2.1 SR-15 蛋白能够特异结合结构域

以 SR-15 为诱饵蛋白在酵母双杂交系统中对人胚肺组织 cDNA 库的筛选结果表明，在经过二轮 SD/-Ade-His-Leu-Trp 的筛选后，仍形成 10 余个相互作用阳性克隆，根据对其与实验设置的阳性对照、阴性对照及相应的系统对照等所进行的综合分析，确定了这些阳性克隆均属于与 SR-15 相互作用的特定克隆，进一步对这些克隆进行的测序分析表明，这些克隆均属于锌与锌指蛋白类分子的特异作用，我们克隆了 ZNF268（NM_003404）基因中编码第 1～550 位氨基酸的片段 ZF (Fig.1B)，并构建了相应的真核表达载体 pcDNA-ZF，将其与 pcDNA-975 共转染入 CHO 细胞，再以免疫沉淀试验证实了二者在细胞内的相互作用（Fig.2）。在其中，抗 SR-15 特异抗血清及抗 ZF(KRAB-锌指蛋白)抗体，均能够将二者同时捕获。这些结果均肯定了 SR-15 和锌指结构蛋白具有相互作用的特性。

表 1 能与 SR-15 产生特异作用的蛋白的编码基因

Table 1 The genes that encoded proteins interactions with SR-15 specifically

GenBank No.	Name[a]
NM-003404	ZNF268
NP-694422	Zinc finger protein 268 isoform
AAL99923	CLL-ossociated antigen KW-4splicevarian
AAHH48350	ZNF84 protein
NP-001007089	Zinc finger protein 21 isoform 2
NP-940882	Zinc finger protein 615
BAA34518	KIAA0798 protein
AAH02858	Zinc finger protein 432
AAV97944	ZNF 569
AAH93625	Zinc finger protein 585B
NP-062537	Zinc finger protein 26 (KOX20)

[a]The proteins encoded by these genes list in table contain KBAB structure and zinc finger domain.

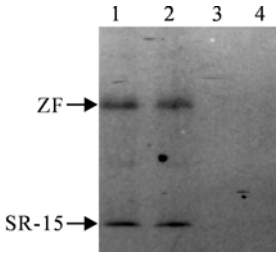

图 2 利用抗 SR-15 和抗 ZF 蛋白抗体对质粒共转染 CHO 细胞的免疫沉淀分析

Fig.2 Immunoprecipitation of CHO cells co-transfected by plasmids with antibodies of SR-15 or ZF

1, pcDNA-975 and pcDNA-ZF with SR-15 antibody; 2, pcDNA-975 and pcDNA-ZF with ZF antibody; 3, SR-15 antibody; 4, ZF antibody

2.2 SR-15 蛋白与锌指结构蛋白相互作用的机制

为了解 SR-15 与锌指蛋白的作用机制，我们设计了 4 个 SR-15 蛋白的缺失突变体（Fig.1A），将其分别克隆进入 pGBKT7 双杂交诱饵载体，利用 β-gal 结合活性实验，分别与克隆于 pACT 中的锌指结构蛋白 ZF 进行体内结合检测。结果表明，SR-15 蛋白是以其完整结构的分子与锌指结构发生相互

作用，任何缺失突变均直接影响与该 KRAB-锌指结构蛋白的结合(Fig.3A)。而以 ZF 蛋白的不同缺失突变体(Fig.1B)与完整 SR-15 分子的 β-gal 活性结合检测表明，ZNF268 分子中与 SR-15 分子发生结合作用的主要是具有锌指结构域的部分，而具有 KRAB 结构的部分无明显结合作用（Fig.3B）。

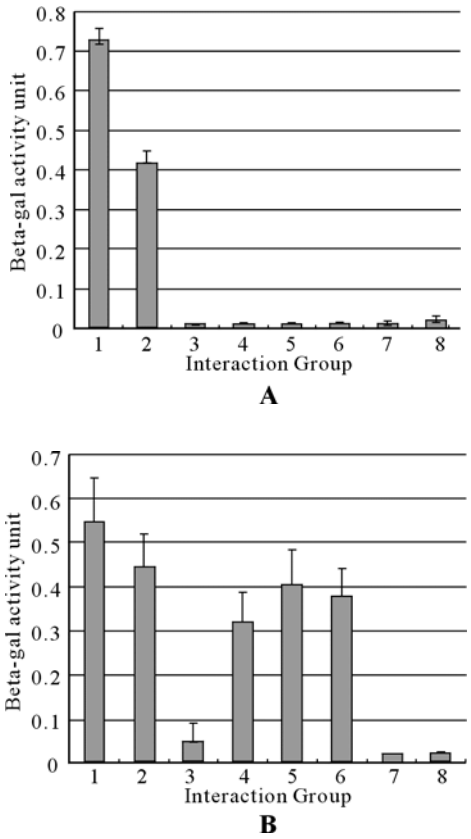

图 3　SR-15 与 ZF 相互作用的结构域分析

Fig.3　Analysis of structural domain that interacting between SR-15 and ZF proteins

A: Interaction of SR-15 mutants and ZF. 1, pGBKT-p53 + pACT-LT; 2, pGBKT-975+pACT-ZF; 3, pGBKT-975-m1 + pACT-ZF; 4, pGBKT-975-m2 + pACT-ZF; 5, pGBKT-975-m3 + pACT-ZF; 6, pGBKT-975-m4 + pACT-ZF; 7, pGBKT-975 + pACT2; 8, pGBKT7 + pACT-ZF. Detail protocol of experiment was described in material and method. Each sample was performed in three wells. B: Interaction of ZF mutants and SR-15. 1, pGBKT-p53 + pACT-LT; 2, pGBKT-975 + pACT-ZF; 3, pGBKT-975 + pACT-ZF-m1; 4, pGBKT-975 + pACT- ZF-m2; 5, pGBKT-975 + pACT-ZF-m3; 6, pGBKT-975 + pACT- ZF-m4; 7, pGBKT-975 + pACT2; 8, pGBKT7 + pACT-ZF. Detail protocol of experiment was described in material and method. Each sample was performed in three wells.

2.3　SR-15 蛋白影响 ZF 蛋白在细胞内的转录调控效率

以往的许多资料表明，KRAB-锌指蛋白依赖于其特殊的锌指结构域结合于 DNA 并对其调控元件 CAAT 而发挥转录调控功能[10]，很显然，任何结合 KRAB-锌指结构域不导致的阻断作用，都将直接影响锌指结构域对 DNA 的结合，并导致该蛋白对 CAAT 元件调控功能的改变。目前尚无明确的资料证实，在本实验中能够与 SR-15 蛋白产生特异相互作用的 ZNF268 分子所有的调控特性，但由于它的 KRAB 结构域组成，可以推断其具有对 CAAT 调控元件的转录抑制功能[11, 12]。在我们的 CAT 活性分析实验的结果中，也提示该蛋白的 N-端部分（1-550 氨基酸）结构 ZF 能够抑制具有 CAAT 增强子及 SV40 启动子的 pCAT 表达载体转录功能，从而降低 CAT 的表达量，而 SR-15 蛋白的存在，则直接影响该 KRAB-锌指结构蛋白 ZF 的这种抑制功能（Fig.4）。

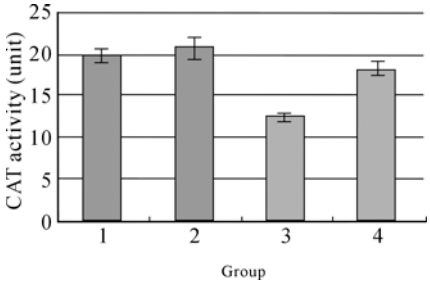

图 4　SR-15 对 ZF 转录抑制功能的影响作用

Fig.4　Inhibition of ZF's transcriptional repression on CAT expression by SR-15

1, Control pcDNA3 and pCAT containing CAAT enhancer element and SV40 promoter. 2, pcDNA-975, pcDNA3 and pCAT containing CAAT enhancer element and SV40 promoter. 3, pcDNA-ZF, pcDNA3 and pCAT containing CAAT enhancer element and SV40 promoter.　4, pcDNA-975, pcDNA-ZF and pCAT containing CAAT enhancer element and SV40 promoter. Static analysis of four groups shows: $P < 0.05$]

3　讨论

HSV Ⅰ对不同类型细胞的感染呈现出不同的病理学结局[13]，这在很大程度上取决于该病毒基因特殊的转录调控机理，以及病毒成分在感染复制过程中与细胞的相互作用特性[14]。同时，针对代谢活跃的人成纤维细胞而言，HSV Ⅰ结合其表面特异受体分子的过程，事实上也形成了对细胞的特定刺激，这种刺激信号引发的细胞反应，在一定程度上也能对随后的感染结局产生相应的影响[15]。因此，对 HSV Ⅰ特异诱导的 SR-15 蛋白分子的生物学功能分析，将有助于 HSV Ⅰ感染人成纤维细胞的机理分析。我们前期的研究结果表明，SR-15 蛋白所具有的特定结构，尤其是 RS 区域的存在，以及该蛋白特定表达于 G1/S 期间，都提示了该蛋白有可能参与细胞内与 DNA 或 RNA 的相互作用[9]。在本文所讨论的工作中，我们通过酵母双杂交分析及免疫沉淀实验，证明该蛋白能够与细胞内具有 KRAB 结构的锌指蛋白结合，其结合部位为锌指结构域的密集区域。而且，这种结合能够阻断这类 KRAB-锌指蛋白的功能所表现的转录抑制效应，这些结果表明，SR-15 作为一种在特定条件下产生的蛋白分子，在细胞内发挥了针对 KRAB 结构锌指蛋白转录因子

的调控作用。现有的资料表明，在不同类型的锌指蛋白中，具有 KRAB 结构的蛋白分子主要对基因中具有 CAAT 增强子序列的启动子转录过程表现抑制作用，它们在胚胎分化、组织形成及多种细胞生物学活动的过程中发挥了对某些基因表达的调控作用[16]。而 SR-15 蛋白对这类蛋白的去抑制作用，表明细胞能够执行另一种特定的调控方式，它可根据环境信号的刺激，阻断这类锌指蛋白的转录抑制功能，从而达到细胞的整体调节目的。但这样一种调控过程发生在 HSV Ⅰ对细胞感染的早期，其最终导致的细胞生物学功能的变化是否有利于病毒的感染过程，还是会对感染的进程产生不利的影响，仅只依据现有的资料尚无法定论。因此，进一步的分析必须从系统的角度来认识这类特定蛋白和其它细胞内功能分子的相互作用，以及它们在病毒感染过程中的意义。

References

[1] Li Q H, Jiang L（李琦涵，姜 莉）. The Molecular Biology of Viral Infection（病毒感染的分子生物学）[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004 .

[2] Benn J, Schneider R J. Hepatitis B virus HBx protein dere- gulates cell cycle checkpoint controls [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 92: 11215-11219.

[3] Boyle K A, Pietropaolo R L, Compton T. Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19: 3607-3613.

[4] Fields B N, Knipe D M, Howley P M. Herpes simplex virus and their replication [A]. In: Fields Virology [M]. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996, 1658-1575.

[5] Mogensen T H, Paludan S R. Molecular pathways in virus-induced cytokine production [J]. Microbiol Rev, 2001, 65: 131- 150.

[6] Tamanini A, Rolfini R, Nicolis E, *et al*. MAP kinases and NF-kaooa B collaborate to induce ICAM-I gene expression in the early phase of adenovirus infection [J]. Virology, 2003, 307: 228-242.

[7] Shen H, Cheng T, Preffer F I, *et al*. Intrinsic human immunode ficiency virus type 1 resistance of hematopoietic stem cells despite coreceptor expression [J]. J Virol, 1999, 73:728-737.

[8] Li Q-H, Dong C H, Wang L C, *et al*. Early expression of protooncogenes induced by the binding to cells of two viruses [J]. Acta Biochim Biophys, 2000, 32: 149-152.

[9] Li Q H, Zhao H L, Jiang L, *et al*. A SR protein induced by HSV1 binding to cells functioning as a splicing inhibitor of viral Mrna [J]. J Mol Biol, 2002, 316:887-894.

[10] Collins T, Stone J R, Williams A J. All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains [J]. Mol Cell Biol, 2001, 21: 3609-3615.

[11] Margolin J F, Friedman J R, Meyer W K,*et al*. Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 4509-4513.

[12] Melnick A, Ahmad K F, Arai S, *et al*. In-depth mutational analysis of the promyelocytic leukemia zinc finger BTB/POZ domain reveals motifs and residues required for biological and tran- scriptional functions [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20: 6550-6567.

[13] Paludan S R, Mogensen S C. Virus-Cell Interactions Regulating Induction of Tumor Necrosis Factor Alpha Production in Macrophages Infected with Herpes Simplex Virus [J]. J Virol, 2001, 75: 10170-10178.

[14] Paludan S R, Ellermann-Eriksen S, Mogensen S C. NF-κB activation is responsible for the synergistic effect of herpes simplex virus type 2 infection on interferon-γ-induced nitric oxide production [J]. J Gen Virol, 1998, 79: 2785-2793.

[15] Adler H, Beland J L, Del-Pan N C, *et al*. Suppression of herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced pneumonia in mice by inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS, NOS2) [J]. J Exp Med, 1997, 185:1533-1540.

[16] Beerli R R, Dreier B, Barbas C F III. Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factor [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97:1495-1500.