

血清类粘蛋白2下调乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 转录活性的研究

洪源, 成军, 杨倩, 刘妍, 王建军

洪源, 成军, 杨倩, 刘妍, 王建军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治重点实验室 北京市 100039
洪源, 男, 1974-12, 福建省莆田市人, 汉族. 1998年毕业于第四军医大学军医系, 获医学学士学位, 2003年毕业于解放军军医进修学院, 获得内科传染病学硕士学位, 主要课题方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制. 国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Down-regulating effect of orosomucoid 2 on preS1 promoter of hepatitis B virus

Yuan Hong, Jun Cheng, Qian Yang, Yan Liu, Jian-Jun Wang

Yuan Hong, Jun Cheng, Qian Yang, Yan Liu, Jian-Jun Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, the 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070690; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To investigate activity of orosomucoid 2 (ORM2) on preS1 promoter (SP I) of hepatitis B virus (HBV).

METHODS: Yeast one-hybrid system was employed in screening of DNA-binding proteins specifically recognizing HBV-SP I sequence, in which ORM2 was identified in GenBank by bioinformatics. For further studying the interaction between ORM2 and HBV-SP I, the sequence of ORM2 was amplified from HepG2 genome by polymerase chain reaction (PCR) technique, which was then cloned into pcDNA3.1(-) expression vector. The HepG2 cell line was transfected by pCAT3-SP I, and co-transfected by pCAT3-SP I and pcDNA3.1(-)-ORM2, respectively. The chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity was detected by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.

RESULTS: pCAT3-SP I had higher activity of CAT than pCAT3-basic by ELISA kit. The expression of CAT from pCAT3-SP I was increased 81.9%, as compared with that in the co-transfection of pCAT3-SP I and pcDNA3.1(-)-ORM2.

CONCLUSION: Cell transfection and ELISA technology are successfully used to prove the results from yeast one-hybrid system, which brings some new clues for studying the specific binding proteins of HBV-SP I and its transcriptional regulation mechanism.

Hong Y, Cheng J, Yang Q, Liu Y, Wang JJ. Down-regulating effect of orosomucoid 2 on preS1 promoter of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(4):824-827

摘要

目的: 探讨血清类粘蛋白2(ORM2)对乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原基因启动子 I (HBV-SP I) 转录的激活作用。

方法: 以我实验室前期得到的HBV-SP I 的酵母单杂交系统筛选结果为基础, 利用生物信息学技术确定ORM2的基因编码区域, 聚合酶链反应(PCR)扩增ORM2编码基因, 克隆至真核表达载体 pcDNA3.1(-)中, 构建 pcDNA3.1(-)-ORM2载体; 将该质粒与SP I 的氯霉素乙酰转移酶(CAT)报告载体 pCAT3-SP I 共转染肝癌细胞系 HepG2 细胞系, 并以 pCAT3-SP I 单独转染 HepG2 细胞系作为对照, 酶联免疫吸附法(ELISA)检测CAT的表达活性。

结果: pCAT3-SP I 在 HepG2 细胞中能够启动CAT的表达; 共转染实验中 pCAT3-SP I + pcDNA3.1(-)-ORM2 组CAT的表达活性较 pCAT3-SP I 下降了81.9%。

结论: ORM2 蛋白具有对HBV-SP I 的反式抑制作用。本实验验证了我室利用酵母单杂交技术筛选HBV-SP I 特异结合蛋白的结果, 为进一步了解HBV-SP I 的转录调控机制及其与SP I 结合的反式作用因子提供了新的线索。

洪源, 成军, 杨倩, 刘妍, 王建军. 血清类粘蛋白2下调乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 转录活性的研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(4):824-827
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/20.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是一种严重危害人类健康的致病因子。他感染人体除引起急慢性乙型肝炎和肝硬化外, 还与肝癌的发生有密切关系^[1-4]。HBV 属嗜肝 DNA 病毒, 目前在其基因组中已发现并鉴定的顺式元件有4个启动子、2个增强子和糖皮质激素应答元件。其中表面抗原基因含有两个串联的启动子 SP I 和 SP II。SP I (2 219-2 780 nt)的主要作用是调节 2.4 kb mRNA 的转录,

编码表面抗原大蛋白^[5-8]. 有研究^[9]证实, SP I 含有典型 TATA 盒序列, 是 HBV 转录调节的重要组分, 也是 HBV 嗜肝性的重要原因之一. 为了寻找与 SP I 结合的肝特异性转录作用因子, 我室^[10]应用酵母单杂交体系^[11-23], 以 SP I 核心序列为“诱饵”, 对人肝细胞 cDNA 文库成功进行了筛选, 得到了 12 个结合蛋白基因. 本实验为了对 SP I 酵母单杂交的筛选结果进行验证, 选取了其中的一个反式作用因子基因-血清类粘蛋白 2(ORM2)为研究对象, 利用生物信息学手段对 ORM2 基因编码序列进行分析、克隆, 与真核表达载体 pcDNA3.1(-)连接, 构建了表达质粒; 与 SP I 的 CAT 报告载体 pCAT3-SP I 共转染, 旨在研究 ORM2 对 SP I 是否具有激活作用, 使下游 CAT 基因的表达发生变化, 这一结果也为研究 HBV 的转录调节机制提供新的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态 E.coli JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物 pGEM-Teasy 载体(Promega). 真核表达载体及 pCAT3-SP I 重组质粒为本室构建.

1.2 方法

1.2.1 基因编码序列分析 根据 GenBank 中 ORM2 的基因组序列, 确定 ORM2 的翻译起始子及终止密码子. 设计并合成引物, 在上下游引物的 5' - 端分别加上 EcoR I 和 Xho I 酶切位点序列. 上游引物: 5' -GAA TTC ATG GCG CTG TCC TGG GTT CT-3'; 下游引物: 5' -CTC GAG GAT CCA AGG CTG TGT CCT GC-3', 全长共 625 bp.

1.2.2 质粒构建 以 HepG2 细胞基因组为模板, 进行聚合酶链反应(PCR)反应, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 玻璃奶回收 DNA 片段, 纯化. 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 与 pGEM-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取在选择平皿(Amp, X-gal/IPTG)生长的白色菌落提取质粒, 经酶切(EcoR I/Xho I)及测序鉴定. EcoR I/Xho I 双酶切重组质粒 pGEM-T-ORM2, 玻璃奶纯化回收酶切产物, 定向克隆至 pcDNA3.1(-)载体, 构建成重组质粒 pcDNA3.1(-)-ORM2. 经双酶切及菌落 PCR 鉴定连接产物, 试剂盒法提取质粒.

1.2.3 细胞培养及 pCAT3-SP I 转染 HepG2 细胞系 HepG2 细胞系在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中生长. 细胞生长至 50-80% 时采用脂质体转染法, 具体转染方法参照 FuGENE6 说明书进行, 质粒 pCAT3-SP I 转染 48 h 后收获细胞.

1.2.4 共转染实验 细胞生长至 50-80% 融合度时, 质粒 pCAT3-SP I 与 pcDNA3.1(-)-ORM2 共转染 HepG2 细

胞系. 具体转染方法参照 FuGENE6 说明书进行, 转染 48 h 后收获细胞.

1.2.5 CAT 表达量的检测 将收获的细胞进行裂解, 提取上清液, 取 200 μ L 用于检测 CAT 的表达量. 具体方法严格按照 CAT ELISA 试剂盒说明书进行, 在 415 nm 光波下测吸光度 A 值.

2 结果

2.1 pcDNA3.1(-)-ORM2 重组质粒的构建 利用自行设计的引物成功扩增出 ORM2 的基因编码序列, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析显示扩增片段约 625 bp, 与预期片段符合(图 1). 将扩增产物与 pGEM-T 载体连接, 双酶切鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析显示两条带(3 000 bp 的 pGEM-T 载体和 625 bp 的 ORM2 DNA 片段), 与预期一致(图 2). 将双酶切产物与 pcDNA3.1(-)载体连接, 双酶切鉴定如图 3 所示(5 400 bp 的 pcDNA3.1(-)载体和 625 bp 的 ORM2 DNA 片段), DNA 测序结果和 GenBank 中 ORM2 的基因序列完全一致.

2.2 pCAT3-SP I 重组质粒的瞬时转染及报告基因 CAT 表达的检测 将重组质粒 pCAT3-SP I 转染 HepG2 细胞, CAT ELISA 结果如表 1 所示, 具有启动子活性.

2.3 pCAT3-SP I 与 pcDNA3.1(1)-ORM2 重组质粒共转染及 CAT 表达的检测 将 pCAT3-SP I 与 pcDNA3.1(-)-ORM2 共转染 HepG2 细胞时, CAT 的表达较 pCAT3-SP I 单独转染明显降低, 如表 2 所示, 说明 ORM2 对 HBV-SP I 具有反式抑制作用.

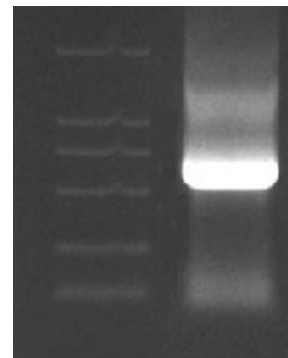


图 1 以 HepG2 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 ORM2 序列.

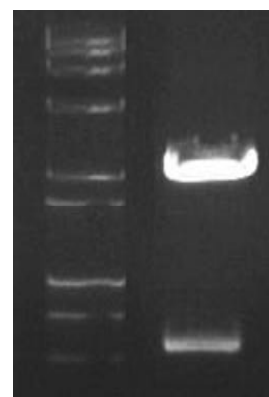


图 2 pGEM-T-ORM2 双酶切鉴定(EcoR I/Xho I).

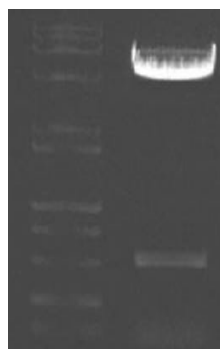


图3 pcDNA3.1(-)-ORM2 双酶切鉴定(EcoR I/Xho I).

表1 pCAT3-SP I 转染 HepG2 细胞后 CAT 的表达(A 值, mean±SD)

组别	质粒	吸光度
阴性对照组	pCAT3-basic	0.450±0.012
阳性对照组	pCAT3-promoter	0.875±0.022
实验组	pCAT3-SP I	2.136±0.051

表2 pCAT3-SP I 与 pcDNA3.1(-)-ORM2 共转染 HepG2 后 CAT 的表达(A 值, mean±SD)

组别	质粒	吸光度
阴性对照组	pCAT3-basic	0.338±0.002
阳性对照组	pCAT3-promoter	0.612±0.007
实验对照组	pCAT3-SP I	2.143±0.028
共转染组	pCAT3-SP I +pcDNA3.1(-)-ORM2	0.389±0.075

3 讨论

SP I 是 HBV 的一个重要转录元件, 调节 HBV 表面抗原大蛋白的表达. 对携带 HBV DNA 的转基因小鼠及感染 HBV 的黑猩猩模型的研究^[24-25]表明, 表面抗原主蛋白可在不同的组织中表达, 而表面抗原大蛋白只在肝内特异发现, 这一结果强烈提示: 表面抗原大蛋白的表达具有肝特异性, SP I 在肝特异性表达中起着关键作用. Raney et al^[6]通过应用瞬时转染分析、体外 RNase 保护分析等方法, 对这一现象的原因进行了研究, 结果显示, 肝细胞核因子 1(HNF1) 与 SP I 的结合可能是主要原因. 将该因子去除后, SP I 的转录活性下降了 20 倍. 同时可能还有其他肝特异因子参与调节. 为了寻找新的肝特异结合蛋白, 我室以 SP I 核心序列为“诱饵”, 整合入酵母基因组, 构建了酵母报告株; 经加入人肝 cDNA 文库进行筛选, 得到了 12 个双阳性克隆, 共表达 10 种蛋白, 其中有血清类粘蛋白 2、丝氨酸脱水酶、人肝细胞生长因子样蛋白等已知功能蛋白及 3 个未知功能蛋白. 为了对这一结果进行验证并深入研究 HBV 的转录调控机制, 我们选取了其中的一个已知功能基因 -ORM2 为研究对象, 以 CAT 为报告基因, 在真核细胞内对二者的相互作用进行了共转染验证.

人血清类粘蛋白又称为 $\alpha 1$ 酸糖蛋白($\alpha 1$ -acid glycoprotein, AGP), 是分子量为 41-43 kDa, 等电点(pI)

为 2.8-3.8 的糖蛋白^[26]. 在人、鼠和其他物种中, 他都是一种主要的血浆急性期反应蛋白. 当有组织损伤或感染时, 在糖皮质激素和细胞因子的联合作用下, 其表达水平明显升高, 可作为感染性肠炎的诊断标志之一^[27]. 他的氨基酸序列首先从人的血浆中分离得到, 从不同个体的血浆中分离得到的 ORM 序列具有很大的异质性^[28]. 其中 ORM2 编码基因位于 ORM1 下游约 3.3 kb 处, 由 2 个分离的基因座组成; Northern blot 杂交检测结果显示^[29], 人肝脏中的 ORM mRNA 主要来自 ORM1 编码基因的转录, ORM2 在肝脏中的表达水平很低. 尽管对 ORM 的结构研究早已开始, 但目前对他的生物学功能了解的仍不十分清楚. 一般认为, 他在血浆中可以结合和携带亲脂性药物, 使药物发挥效用; 依赖碳端氨基酸, 发挥免疫应答介导和结合活性; 对 ORM 转基因鼠的研究可以在小鼠体内了解与 ORM 结合药物的效果, 揭示免疫反应中应答元件和组织特异性元件的功能^[30].

本实验的主要目的是验证前期酵母单杂交的筛选结果, 在共转染实验中 pCAT3-SP I 和 pcDNA3.1(-)-ORM2 组的 CAT 的表达活性较 pCAT3-SP I 单独转染下降了 81.9%, 说明 ORM2 可与 HBV-SP I 结合, 且对 SP I 的转录活性有明显的抑制作用. 尽管这一结论与体内的情况不符, 因为在体内 ORM2 主要分布于血浆中, 与 HBV-SP I 的核内分布存在着一定的区室阻隔. 但这一结果有可能为今后 HBV 的治疗开辟一条新途径.

4 参考文献

- 1 Yan JC, Ma JY, Pan BR, Ma LS. Studies on virus hepatitis B in China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:611-616
- 2 Wang WL, Gu GY, Hu M. Expression and significance of HBV genes and their antigens in human primary intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:392-396
- 3 Qin LL, Su JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yian RQ. Expression of IGF- α , p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in tree shrews. *World J Gastroenterol* 2000; 6:138-139 PMID: 11819544
- 4 Hu YP, Hu WJ, Zheng WC, Li JX. Establishment of transgenic mouse harboring hepatitis B virus (adr subtype) genomes. *World J Gastroenterol* 2001;7:111-114
- 5 Wei Y, Etienne J, Renard CA, Tiollais P, Buendia MA. Unusual activation of the integrated preS1 promoter of woodchuck hepatitis virus in a liver tumour. *J Gen Virol* 1996;77: 177-182
- 6 Raney AK, Easton AJ, McLachlan A. Characterization of the minimal elements of the hepatitis B virus large surface antigen promoter. *J Gen Virol* 1994; 75:2671-2679
- 7 Gallina A, De Koning A, Rossi F, Calogero R, Manservigi R, Milanese G. Translational modulation in hepatitis B virus preS-S open reading frame expression. *J Gen Virol* 1992;73:139-148
- 8 Xu Z, Jensen G, Yen TS. Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 1997;71:7387-7392
- 9 Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J. Transcriptional control elements of hepatitis B surface antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:566-570
- 10 洪源, 成军. 应用酵母单杂交技术筛选乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 的结合蛋白. *中华流行病学杂志* 2003;24:000-000
- 11 Li JJ, Herskowitz I. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* 1993;262:1870-1873
- 12 Liu JD, Wilson TE, Milbrandt J, Johnston M. Identifying DNA-

- binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. *Methods* 1993;5:125-137
- 13 Alexander MK, Bourns BD, Zakian VA. One-hybrid systems for detecting protein-DNA interactions. *Methods Mol Biol* 2001; 177:241-259
- 14 Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9578-9582
- 15 Chevray P, Nathans D. Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5789-5793
- 16 Dalton S, Treisman R. Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell* 1992;68:597-612
- 17 Chew LJ, Huang F, Boutin JM. Identification of nuclear orphan receptors as regulators of expression of a neurotransmitter receptor gene. *J Biol Chem* 1999; 274:29366-29375
- 18 Wei Z, Angerer RC, Angerer LM. Identification of a new sea urchin ets protein, SpEts4, by yeast one-hybrid screening with the hatching enzyme promoter. *Mol Cell Biol* 1999;19:1271-1278
- 19 Sieweke M. Detection of transcription factor partners with a yeast one hybrid screen. *Methods Mol Biol* 2000;130:59-77
- 20 Huang J, Hou CH, Qian RL. Screening of genes related to the expression of human epsilon-globin Gene by using yeast one-hybrid system. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2001;33:246-250
- 21 Wilson TE, Padgett KA, Johnston M, Milbrandt J. A genetic method for defining DNA-binding domains: application to the nuclear receptor NGFI-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 9186-9190
- 22 Lisowsky T, Polosa PL, Sagliano A, Roberti M, Gadaleta MN, Cantatore P. Identification of human GC-box-binding zinc finger protein, a new Kruppel-like zinc finger protein, by the yeast one-hybrid screening with a GC-rich target sequence. *FEBS Lett* 1999;453:369-374
- 23 Mak KL, Longcor LC, Johnson SE, Lemercier C, To RQ, Konieczny SF. Examination of mammalian basic helix-loop-helix transcription factors using a yeast one-hybrid system. *DNA Cell Biol* 1996;15:1-8
- 24 Araki K, Miyazaki O, Hino N, Tomita N, Chisaka O, Matsubara K, Yamamura K. Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:207-211
- 25 Farza H, Hadchouel M, Scotto J, Tiollais P, Babinet C, Pourcel C. Replication and gene expression of HBV in a transgenic mouse that contains the complete viral gene. *J Virol* 1988;62:4144-4120
- 26 Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:157-171
- 27 Nielsen OH, Vainer B, Madsen SM, Seidelin JB, Heegaard NH. Established and emerging biological activity markers of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:359-367
- 28 Merritt CM, Board PG. Structure and characterisation of a duplicated human alpha 1 acid glycoprotein gene. *Gene* 1988; 66:97-106
- 29 Dente L, Pizza MG, Metspalu A, Cortese R. Structure and expression of the genes coding for human alpha 1-acid glycoprotein. *EMBO J* 1987;6:2289-2296
- 30 Israili ZH, Dayton PG. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab Rev* 2001;33:161-235

World Journal of Gastroenterology 栏目设置

《World Journal of Gastroenterology, WJG》主要开设以下栏目。(1)文献综述: 基于作者自己研究为主的综述性论文。(2)特色栏目 如食管癌、胃癌、肝癌、病毒性肝炎、中医中药、中西医结合等, 具有我国特色及国际领先水平的原创性研究论文。(3)基础研究 报道学术价值高、实验数据完整、具有原始性和创新性的研究成果。(4)临床研究 报道安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验的临床研究论文。(5)研究快报 报道具有原始性和创新性的阶段性成果。(6)病例报告: 报道对临床工作者有指导意义的个案。