

· 基础研究 ·

应用抑制性消减杂交技术筛选乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白的下调基因

纪冬 成军 郭江 刘妍 陈国凤 王琳

【摘要】 目的 筛选与克隆乙型肝炎表面抗原大蛋白(LHBs)的下调基因,以阐明 HBV 感染相关性疾病的分子生物学机制。方法 应用常规分子生物学方法,克隆 LHBs 基因,构建真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-LHBs。将 pcDNA3.1(-)-LHBs 与 pCAT3-promoter 共转染肝癌细胞系 HepG2,用酶联免疫吸附法(ELISA)检测氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性。分别以 pcDNA3.1(-)-LHBs 以及 pcDNA3.1(-) 转染 HepG2 细胞,提取 mRNA 并逆转录为 cDNA,来源于 pcDNA3.1(-)-LHBs 转染细胞的 cDNA 为驱动(driver),来源于 pcDNA3.1(-) 的 cDNA 为测试(tester),进行抑制性消减杂交分析,构建 cDNA 消减文库,并转染大肠杆菌进行文库扩增,随机挑选克隆进行测序及同源性分析。结果

①成功构建 pcDNA3.1(-)-LHBs 真核表达载体;②pcDNA3.1(-)-LHBs 与 pCAT3-promoter 共转染 HepG2 细胞的 CAT 表达活性较对照组的活性明显下降($P < 0.01$),抑制率达 93.9%;③成功构建人 LHBs 下调基因的 cDNA 消减文库。通过生物信息学分析获得 14 种编码基因。结论 LHBs 是 HBV 基因组编码的一种反式调节因子,可以下调 SV40 早期启动子的活性。筛选到的 LHBs 下调的 cDNA 全长序列,包括与抗氧化防御、细胞生长调节、免疫及细胞凋亡密切相关的蛋白编码基因,以此可以推测 LHBs 存在的调控机制以及 HBV 的致病(癌)机制。

【关键词】 乙型肝炎病毒;表面抗原;反式调节

Screening of the target genes down-regulated by HBV large surface protein with suppression subtractive hybridization technique

Ji Dong, CHENG Jun, GUO Jiang, et al

The 7th Department of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

【Abstract】 Objectives To confirm the trans-regulation effect of HBV large surface protein(LHBs) and to screen human genes down-regulated by it. Methods Routine molecular methods were used to construct the expression plasmid of LHBs, named as pcDNA3.1(-)-LHBs. HepG2 cells were cotransfected with pcDNA3.1(-)-LHBs and pCAT3-promoter vector containing the SV40 early promoter. After 48h, cells were collected and the expression of chloramphenicol acetyltransferase(CAT) was detected by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-LHBs and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively. Suppression subtractive hybridization(SSH) method was employed to compare the down-regulated genes between the two groups. Amplification of the cDNA subtractive library was carried out with *E. coli* strain DH5 α . The cDNAs were sequenced and analyzed for autopoly in GenBank with Blast search after PCR. Results ①The expression plasmid pcDNA3.1(-)-LHBs was constructed. ②The expression of CAT was lower significantly in cells cotransfected with pcDNA3.1(-)-LHBs/pCAT3-promoter than in control group, the inhibition rate was 93.6%. ③Subtractive library of genes down-regulated by LHBs was constructed successfully. Altogether 14 coding sequences were gotten. Conclusions LHBs has trans-regulation effect and can down-regulate the activity of SV40 promoter. The obtained genes may be target genes down-regulated by LHBs, among which some genes coding proteins involved in cell cycle regulation, metabolism, immunity and cell apoptosis. This finding brings about some new clues for studying the biological functions of LHBs and further understanding of HBV hepatocarcinogenesis.

【Key words】 hepatitis B virus; surface antigen; trans-regulation

收稿日期:2005-06-06

作者单位:100039 北京市,解放军第 302 医院感染七科(纪冬、陈国凤),病毒性肝炎研究中心(刘妍、王琳);北京市地坛医院(成军、郭江)

作者简介:纪冬,男,1975 年 12 月生,河北省怀来县人,医学硕士,住院医师。Tel:010-66933392, E-mail: jidg302@126.com

乙型肝炎病毒(HBV)的持续感染至今仍然是一个全球性的健康问题,估计大约 6% 的世界人口为慢性 HBV 携带者,较健康人群更易发展为肝硬化、肝癌^[1],虽然对于 HBV 相关性疾病的诊断、治疗有了长足的发展,但目前对于具体的 HBV 致病(癌)机制尚不十分明确^[2]。研究 HBV 蛋白与肝细胞基因

之间相互调控的关系有助于明确 HBV 致病(癌)的分子生物学机制及促进抗病毒药物的发展。HBV 为带包膜的嗜肝 DNA 病毒属,其基因组由松弛环状、部分双链 DNA(rcDNA)所组成,具有四个开放读码框(ORF),分别为 S、X、C、P 区,其中 S-ORF 通过三个不同的起始密码子(ATG)编码前-S1、前-S2 和主 S 蛋白,组成表面抗原大蛋白(LHBs),中蛋白(MHBs)和小(主)蛋白(SHBs)。LHBs 编码区长度为 1203 nt,蛋白为 400 aa,介导 HBV 对于肝细胞的黏附,病毒颗粒的装配、释放,超螺旋 DNA 扩增的调节及转录的反式激活,参与了机体内广泛的信号途径^[3]。本实验应用抑制性消减杂交(SSH)技术筛选 LHBs 下调基因,从 LHBs 蛋白的表达对于肝细胞基因表达的影响这一角度,探索 HBV 感染的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态 *E. coli* DH5 α 为本室保存;pcDNA3.1(-)载体购自 Invitrogen 公司;T7/SP6 通用引物,pCAT3-promoter,pCAT3-Basic 载体,pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司;FuGENE6 转染试剂,CAT-ELISA 检测试剂盒购自 Roche 公司;mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司,PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒、50 $\times$ PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒购自 Clontech 公司,High Pure PCR Product Purification 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司;玻璃奶纯化试剂盒购自博大泰克公司;其它生化试剂购自 Sigma 公司。

1.2 方法 (1)真核表达载体的构建及蛋白检测:根据 adr 亚型 HBV 的基因序列,设计 LHBs 编码区特异性的上游(5'-GAA TTC AGC ATG GCA CCT TGC TCT TC-3')和下游引物(5'-GGA TCC TCA AAT GTA TAC CCA AAG AC-3'),同时在引物两端引入 EcoR I/BamH I 酶切位点,以 G376-7(GenBank 号:AF384371)质粒为模板,进行 PCR 扩增。PCR 产物将经玻璃奶回收后,定向克隆至 pcDNA3.1(-)载体中,构建重组质粒 pcDNA3.1(-)-LHBs,并酶切鉴定。将构建成功的重组载体 5 μ g 瞬时转染 HepG2 细胞,48 h 后收集细胞裂解液,ELISA 法检测 LHBs 的表达。(2)CAT 活性的测定:pcDNA3.1(-)-LHBs (2 μ g)/pCAT3-promoter(1 μ g)以脂质体法共转染 HepG2 细胞系,设置 pCAT3-Basic(1 μ g)为阴性对照组,pcDNA3.1(-)-empty(2 μ g)/pCAT3-promoter(1 μ g)为阳性对照组,每组 7 份。转染 48 h 后收集细胞裂解液,按照 CAT-

ELISA 检测试剂盒说明书进行 CAT 活性检测,最终标本用酶标仪(415 nm 检测波长,490 nm 参考波长)检测吸光度(OD)值,其数值反映细胞提取物中的 CAT 表达水平。

1.3 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Stata 7.0 统计软件进行统计分析,组间比较采用 *t* 检验。

1.4 消减杂交文库的建立及分析 以转染了重组表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA(dscDNA),以来源于 pcDNA3.1(-)-LHBs 的 cDNA 为驱动(driver),来源于 pcDNA3.1(-)空载体的 cDNA 为测试(tester),之后进行常规 SSH,方法按说明书进行,构建消减文库,之后将杂交产物做选择性 PCR 使差异性表达的片段得到特异性扩增。扩增产物连接至 pGEM-Teasy 载体中并转化 DH5 α 大肠杆菌,得到 93 个阳性克隆,以通用 T7/SP6 引物进行菌落扩增,证明含有插入片段后(200~2000 bp),随机挑选其中 35 个克隆测序(上海博亚公司),并且应用生物信息学将测得序列在 GenBank 数据库中进行同源性分析。

2 结果

2.1 pCAT3-TXNRD1p 重组质粒的构建 利用自行设计的引物成功扩增出 LHBs 基因片段,PCR 产物经 0.9% 琼脂糖凝胶电泳分析显示扩增片段约 1200 bp,与预期片段符合,且无非特异扩增现象。回收 PCR 产物并亚克隆至 pcDNA3.1(-)空载体中,酶切鉴定(图 1)。将构建好的质粒转染 HepG2 细胞,48 h 后收集细胞裂解液,使用 ELISA 方法(乙肝表面抗原检测试剂盒)检测 LHBs 的表达,结果见表 1。由此表明 LHBs 基因已按正确方向克隆入真核表达载体中,并可以在真核细胞中得到表达,pcDNA3.1(1)-LHBs 质粒构建成功。

表 1 LHBs 在 HepG2 细胞中的表达

组 别	P	P/N (N=0.05)	结果 (+/-)
pcDNA3.1(-)-LHBs 转染细胞裂解 液(实验组)	0.468	9.36	+
pcDNA3.1(-)空载 体转染细胞裂 解液(阴性对照 组)	0.026	0.52	-
HBV 表面抗原(阳 性对照组)	1.125	22.5	+

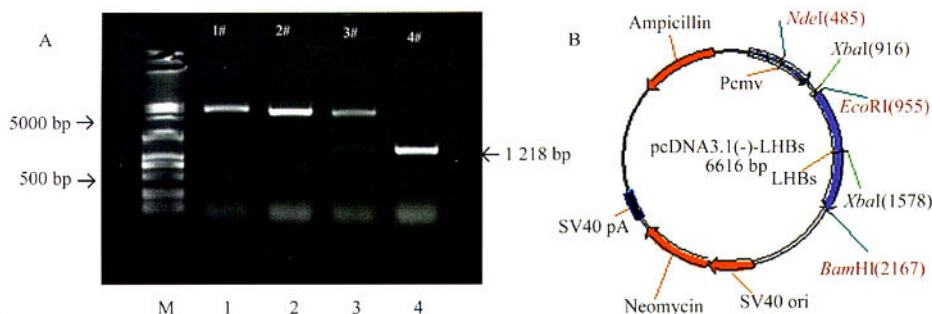


图 1 pcDNA3.1(-)-LHBs 重组质粒酶切图

A:pcDNA3.1(-)-LHBs 重组质粒酶切电泳图(0.9%琼脂糖凝胶)

M:Marker(15 000bp),1.Nde I 酶切,6616 bp(5404 bp + 1212 bp),2.Xba I 酶切,5954 bp/662 bp,3.EcoRI / BamHI 酶切,5404 bp/1212 bp,4.质粒 PCR 产物。B:pcDNA3.1(-)-LHBs 重组质粒图以及酶切位点

2.2 LHBs 对于 SV40 早期启动子的反式调节作用

在 pCAT3-promoter 质粒中,CAT 的表达是在 SV40 早期启动子的指导下进行的。共转染实验中通过 CAT 的表达情况可以表现出 LHBs 对于 SV40 启动子活性的调节作用。检测标本分为 3 组:pCAT3-Basic 为阴性对照组,pCAT3-promoter/pcDNA3.1(-)为阳性对照组,pCAT3-promoter/pcDNA3.1(-)-LHBs 为实验组,每组 7 份,CAT ELISA 结果见表 2。数据采用 Stata 7.0 软件进行分组 *t* 检验,实验组较阳性对照组的 CAT 表达明显下降且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),抑制率为 93.9%,说明 LHBs 确实具有反式调节作用。

表 2 LHBs 对 SV40 早期启动子的下调作用

组 别($n=7$)	CAT 值($\bar{x} \pm s$)
CAT-Basic	0.02 $\pm$ 0.15
CAT-promoter/pcDNA3.1(-)	1.79 $\pm$ 0.57
CAT-promoter/pcDNA3.1(-)-LHBs	0.11 $\pm$ 0.02

2.3 消减文库的构建及生物信息学分析 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提,紫外分光检测显示,转染了 pcDNA3.1(-)-LHBs 质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.96 μ g 和 4.13 μ g, $A_{260}/A_{280} = 1.90$,说明 mRNA 质优量足。dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的关键步骤,将连接有不同接头的两组 dscDNA 分别用特异性 G3PDH 引物进行扩增,结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度相当,说明 dscDNA 已与接头高效率连接。分别取消减及未消减 PCR 产物为模板,进行 PCR 扩增 G3PDH,电泳显示与未消减组相比,消减组中 G3PDH 基因产量大大减少,说明所构

建的消减文库具有很高的消减效率(图 2)。杂交产物经两轮 PCR 扩增后,T/A 克隆后获得 93 个阳性菌落,PCR 扩增,电泳显示含有 200~2000 bp 大小不等的插入片段(图 3),挑选其中 35 个克隆测序、比对,有 14 个与已知基因序列高度同源(96%~100%),见表 3。



图 2 消减效率分析结果

1~4.消减组,引物为 G3PDH3',5',PCR 循环次数分别为 18、23、28、33;5~8.未消减组,引物为 G3PDH3',5',PCR 循环次数分别为 18、23、28、33

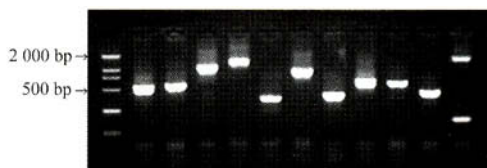


图 3 部分克隆菌落 PCR 鉴定电泳图

3 讨 论

HBV 的致癌性可能是通过两种途径产生的:(1)HBV DNA 的染色体整合所产生的顺式作用。通过整合,HBV 增强子、启动子等顺式元件可以改变细胞生长、分化基因的表达,从而在肝癌的发生、发展过程中起到重要的作用。(2)HBV 编码蛋白的反

表 3 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果

基 因	GeneBank 号	同源性(%)	相同克隆
核糖体蛋白 L17 (RPL17)	NM_000985	100	5
fau 1 蛋白	X65921	99	5
衔接器蛋白相关复合体 1 mu2 亚单位(AP1M2)	NM_005498	97	3
纤维连接蛋白(FN1)	NM_002026	100	3
F-盒蛋白 22(FBXO22)	NM_147188	98	3
DnaJ (Hsp40)蛋白	BC015809	96	2
PNAS-133 蛋白	AF277191	96	2
真核翻译延长因子 1α1	BC020477	99	2
过氧还原酶 PRDX1	NM_002574	96	2
核糖核酸酶 H1	BC002973	100	1
DC7 蛋白	AF201946	100	1
囊泡蛋白 29(VPS29)	NM_016226	99	1
肌管相关蛋白 4(MTMR4)	NM_004687	99	1
SMT3 抑制子	BC000036	98	1
无法分析序列			3

式调节作用。HBV DNA 插入的序列以及插入染色体的位点并不是固定的,顺式作用并不足以完全解释肝癌的形成机制。研究表明,HBV 编码蛋白具有反式调节病毒、宿主启动子的作用,从而参与肝癌的形成^[4]。LHBs 就是一种 HBV 编码的反式调节因子,LHBs 具有两种结构亚型,氨基端的前 S 结构域(前 S1 与前 S2)指向内质网膜胞浆侧的内向型(i-pre-S)和指向内质网腔的外向型(e-pre-S),这样的结构使得 LHBs 的功能具有多样性^[5-7]:(1)提供肝细胞受体结合位点;(2)对于 HBV 的生活周期是必需的;(3)诱导中和性抗体的产生;(4)细胞毒性;(5)致癌性。

SSH 方法是近年发展起来的一项新的基因克隆技术,能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因,可以在较短的时间内获得较理想的实验结果^[8]。本实验发现了 LHBs 下调的一些具有重要功能的基因,丰富了对 LHBs 反式调节作用的理解。(1)纤维连接蛋白 1(FN1)。FN 是一种具有多种功能的糖蛋白,研究表明在恶性肿瘤中,FN 与其受体 α5β1 的结合性降低,降低了恶性细胞与细胞外基质(ECM)的结合,促进了其向周边组织侵袭及向远处转移。本实验提示了 LHBs 可以下调 FN1,从另一方面降低了宿主细胞与 ECM 的结合,表现出与 HBx 同样的促进侵袭与转移的作用。(2)过氧还原酶 PRDX1。PRDX1 的功能:①抗氧化作用。PRDX1 又名硫氧还蛋白过氧化酶 2(TDPX2),可以利用硫氧还蛋白(Trx)作为电子供体,减少细胞生长过程中由于活性氧簇诱导的氧化应激,及过氧化氢诱导的凋亡。②

肿瘤抑制作用。研究表明缺失 PRDX1 的小鼠可以存活,能生育,但随着年龄增长会患严重的溶血性贫血和多种恶性肿瘤^[9]。③抗病毒作用。PRDX1 又名自然杀伤细胞增强因子 A(NKEFA),可以增强自然杀伤细胞的活性,并且涉及到了 CD8⁺T 细胞的抗病毒过程^[10]。④调节信号转导途径。PRDX1 可以抑制致癌的 c-Abl 酪氨酸激酶的活性,从而参与了蛋白磷酸化/去磷酸化这一重要的蛋白质功能调节^[11]。本实验说明 LHBs 可以下调 PRDX1 的表达,通过其多种功能参与了 HBV 致病(癌)的机制,有可能降低宿主抗 HBV 效应,促进肝细胞的凋亡、恶性化、肝癌的局部侵袭与远处转移等方面发挥重要的作用。

总之,本实验成功构建了 LHBs 的真核表达载体,验证了其反式调节的作用,并且通过对 LHBs 下调基因的分析,发现它参与了 HBV 感染的慢性化、肝细胞的癌变等过程,这有助于进一步明确 HBV 致病(癌)机制,从而探索更加有效的预防、治疗措施。

参考文献

- 1 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. N Engl J Med, 2004, 350: 1118-1129.
- 2 Liaw YF. Therapy of chronic hepatitis B: current challenges and opportunities. J Viral Hepat, 2002, 9: 393-399.
- 3 Wieland S, Thimme R, Purcell RH, et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 6669-6674.
- 4 Yotsuyanagi H, Hashidume K, Suzuki M, et al. Role of hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis in alcoholics. Alcohol

- Clin Exp Res, 2004, 28: S181-S185.
- 5 Brechot C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. Gastroenterology, 2004, 127: S56-S61.
- 6 Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. Virus Res, 2004, 106: 199-209.
- 7 Singh M, Kumar V. Transgenic mouse models of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. Rev Med Virol, 2003, 13: 243-253.
- 8 成军, 刘妍, 洪源, 等. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较. 世界华人消化杂志, 2004, 12: 327-331.
- 9 Neumann CA, Krause DS, Carman CV, et al. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. Nature, 2003, 424: 561-565.
- 10 Geiben-Lynn R, Kursar M, Brown NV, et al. HIV-1 antiviral activity of recombinant natural killer cell enhancing factors, NKEF-A and NKEF-B, members of the peroxiredoxin family. J Biol Chem, 2003, 278: 1569-1574.
- 11 Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, et al. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. Science, 2003, 300: 653-656.

• 病例报告 •

继发性血小板减少性紫癜并胼胝体梗塞(附 1 例报告)

王伯平

1 临床资料

继发性血小板减少性紫癜并胼胝体梗塞报道较少,现将解放军第 401 医院收治 1 例病历报告如下:患者,女性,67 岁。因鼻衄、皮肤青紫伴左侧肢体活动障碍 2 周入院。入院前 2 周因胃癌手术后实施化疗的过程中出现鼻衄及皮肤青紫,当时查 WBC: $2.1 \times 10^9/L$, RBC: $2.45 \times 10^{12}/L$, HGB 72g/L, PLT: $2 \times 10^9/L$ 。诊断为继发性血小板减少性紫癜而在血液肿瘤科住院治疗,经输注血小板 2U 后,血小板由入院时 $2.0 \times 10^9/L$ 升至 $50 \times 10^9/L$ 时,突然出现精神萎靡不振及左侧肢体活动不灵等症状,急做头颅 CT 检查未见颅内出血,诊断腔隙性脑梗死。病情渐加重,意识有时不清,并出现尿便失禁,左侧肢体不能活动,经综合治疗,病情稳定后由血液肿瘤科转来神经内科继续治疗。该患者 2 个月前曾在解放军第 401 医院普外科行胃癌切除术时检查血常规及凝血指标均正常,既往患高血压病 10 余年。查体:消瘦貌,四肢皮肤可见散在瘀斑,齿龈肿胀,心、肺(-),肝脾(-)。神经系统检查:意识清晰,左侧鼻唇沟变浅,口角右歪,伸舌左偏,左侧肢体肌张力减低,肌力 0~1 级,右侧肢体肌张力、肌力正常。左侧躯体感觉减退,左侧肱二、三头肌腱和膝、跟腱反射减退,左侧

Babinski、Chaddock 征均(+)。实验室检查:WBC: $18.5 \times 10^9/L$, RBC: $2.98 \times 10^{12}/L$, HGB 92g/L, PLT: $285 \times 10^9/L$, 中性: 94%, 淋巴: 6%。复查血常规: WBC: $13.9 \times 10^9/L$, RBC: $3.04 \times 10^{12}/L$, HGB 95g/L, PLT: $318 \times 10^9/L$, 中性: 77.9%, 淋巴: 11.5%。颅脑 MRI 诊断: (1) 右侧胼胝体膝部、双侧基底节区及双侧大脑半卵圆区腔隙性脑梗死; (2) 双侧侧脑室前后角脑白质脱髓鞘; (3) 脑萎缩; (4) 双侧额部硬膜下少量积液。

治疗经过: 给予人血白蛋白、输红细胞、神经营养剂等综合治疗后,病情稳定,住院 21d, 左上肢肌力 3 级, 左下肢肌力 0~1 级, 复查血小板及白细胞结果正常, 临床好转出院。

2 讨论

抗肿瘤化疗药可抑制血小板生成, 出现全血细胞减少表现。对长期高血压病患者, 在输注血小板后可出现脑梗死, 可能与短期内大量血小板输入人体内, 产生血小板聚集导致动脉硬化血管阻塞, 形成梗塞灶有关。胼胝体梗塞临床上十分少见, 长期高血压和糖尿病患者, 易发生血管壁粥样硬化溃疡斑块脱落, 是胼胝体梗塞的主要原因。该患者系老年女性, 胃癌术后应用化疗药, 出现鼻衄及皮肤青紫等症状, 入院时查血小板低, 符合继发性血小板减少性紫癜诊断, 入院后输注血小板 2U 治疗, 血小板急骤升高, 导致动脉硬化血管阻塞, 形成梗塞灶, 出现神经系统症状和定位体征, 颅脑磁共振诊断胼胝体梗塞。

收稿日期: 2005-09-21

作者单位: 266071 青岛市, 解放军第 401 医院神经内科

作者简介: 王伯平, 男, 1961 年 1 月生, 山东省青岛市人, 医学学士, 副主任医师。Tel: 0532-83970052, E-mail: wangboping@qdenc.com