

# HBV 核心蛋白突变体 L60V 重组质粒的构建 及其应用于 IFN- $\alpha$ 抗病毒机制

孙蓓蓓, 管世鹤, 王爱华, 杨凯, 潘颖, 吴园园

**摘要** 目的 构建乙型肝炎病毒核心蛋白(HBc)突变体 L60V 重组质粒,并探讨 L60V 拮抗  $\alpha$  干扰素(IFN- $\alpha$ ) 抗病毒活性的机制。方法 构建 HBc 突变体融合表达载体 pEGFP-L60V 转染人肝肿瘤细胞株 HepG2 细胞,荧光显微镜及 Western blot 法检测其在细胞中的表达;并以 RT-PCR 及 Western blot 法检测 JAK-STAT 信号转导途径分子及抗病毒蛋白表达。结果 经酶切和测序分析,成功构建 HBc 突变体 L60V 重组质粒;将 L60V 和 HBc 野生株表达质粒(pEGFP-WT)分别转染 HepG2 细胞后,以 1 000 IU/ml IFN- $\alpha$  处理,转染 L60V 和 HBc 野生株表达质粒的细胞内抗黏液病毒 A(MxA) 及 JAK-STAT 信号转导途径分子 STAT1、STAT2、IRF9 表达减少,其中在转染 pEGFP-L60V 细胞内的 MxA、STAT1、STAT2 和 IRF9 表达显著减少。结论 HBc 突变体 L60V 可能通过 JAK-STAT 信号转导途径抑制抗病毒蛋白 MxA 的表达来拮抗 IFN- $\alpha$  的抗病毒作用;其拮抗 IFN- $\alpha$  抗病毒作用比 HBc 更显著。

**关键词** 乙型肝炎病毒;核心蛋白;HepG2 细胞;IFN- $\alpha$

中图分类号 R 512.62

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)02-0181-05

慢性乙型肝炎是严重威胁生命的全球性疾病,影响着世界范围内 3 500 多万人<sup>[1]</sup>。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV) C 区基因合成 HBV 核心蛋

白(HBc),由于宿主免疫攻击,C 区易发生突变,来逃避宿主免疫清除病毒的作用<sup>[2]</sup>。我国 HBV 患者中最常见是 L60V (CTG-GTG) 点突变。目前, $\alpha$  干扰素(IFN- $\alpha$ ) 是治疗 HBV 最常用有效的药物,主要通过诱导合成多种抗病毒蛋白如抗黏液病毒 A(MxA) 蛋白、2' 5'寡腺苷酸合成酶(2' 5'-OAS)、蛋白激酶(PKR) 等来发挥抗病毒作用<sup>[3]</sup>。然而,临床上约有 1/3 的患者对 IFN- $\alpha$  发生持续性应答<sup>[4]</sup>。有研究<sup>[5]</sup> 表明 HBc 可以拮抗 IFN- $\alpha$  抗病毒作用,而 L60V 突变对 IFN- $\alpha$  作用的影响机制尚未明确。该实验构建重组质粒 pEGFP-L60V,以 HepG2 细胞为研究模型,通过 RT-PCR 及 Western blot 法检测 IFN- $\alpha$  抗病毒蛋白、JAK-STAT 信号转导途径分子的 mRNA 及蛋白水平,探讨 pEGFP-L60V 对 IFN- $\alpha$  抗病毒作用的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌株及细胞系** 质粒 HBV dimer 是含头尾相连的 HBV 全基因组的双拷贝基因,为本实验室保存;空载体 pEGFP-N1 和 *E. coli* 菌株 DH5a 为本室保存;pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司;人肝肿瘤细胞株 HepG2 为本实验室保存,细胞于含 10% 胎牛血清 DMEM(高糖)培养基中培养。

**1.1.2 工具酶、试剂** T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶 EcoR I、BamH I、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker(DL2000、DL10000) 均购自 TaKaRa 公司;质粒抽提试剂盒、PCR 产物纯化回收试剂盒均购自

2013-08-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171662);安徽省卫生厅中医药计划科研基金(编号:2012ZY110)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院检验科,合肥 230601

作者简介:孙蓓蓓,女,硕士研究生;

管世鹤,男,教授,主任技师,硕士生导师,责任作者,E-mail: shiheguan@126.com

NF- $\kappa$ B protein. **Results** Compared with NC group, MCF-7 cells viability and the expression of NF- $\kappa$ B protein were decreased by increasing concentrations and time of globular adiponectin, especially for the concentration of 40 and 80 ng/ml ( $P < 0.05$ ). Cells used by pretreatment of PDTC, the effect of globular adiponectin for cells growth and the NF- $\kappa$ B protein were blocked. The globular adiponectin (80 ng/ml) treated cells for 24 h, total apoptosis rate was (13.180 0  $\pm$  1.064 9)%. Compared with the control group, the difference was not statistically significant. **Conclusion** Globular adiponectin can inhibit the growth of MCF-7 cell, and the effect is shown dose dependent and a time dependent manner. Its mechanism may be related with NF- $\kappa$ B pathway.

**Key words** globular adiponectin; breast cancer; MCF-7; nuclear factor kappa B

AxyGen 公司; RNA 提取试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购自 Promega 公司; 引物合成及测序均由上海生物工程有限公司完成; HBc 一抗购自 Santa Cruz 公司; STAT1、STAT2 一抗购自美国 Bioworld Technology 公司; 二抗购自武汉博士德生物工程有限公司;  $\beta$ -actin 购自北京中杉金桥公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 HBc 基因扩增** 根据 ayw 亚型 HBV 全基因组序列(GI: 2182117) 设计引物, 引物序列为上游: 5'-CGGAATTCGCATGGACATCGACCCTATA-3'、下游: 5'-CGGGATCCAACATTGAGGTTCCCGAGATT-3', 下划线部分分别为 EcoR I 和 BamH I 的酶切位点, 全长 552 bp。以 HBV dimer 为模板扩增 HBc 基因, PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 以 95 °C 30 s、54 °C 1 min、72 °C 1 min 循环 35 次后, 72 °C 延伸 5 min。1% 琼脂糖电泳回收纯化, -20 °C 保存。

**1.2.2 pEGFP-WT 的构建** PCR 产物与 pMD18-T 载体按试剂盒说明进行连接, 挑取阳性克隆抽提质粒, 行双酶切、PCR 鉴定, 得到 pMD-HBc。空载体 pEGFP-N1 双酶切过夜, 纯化回收凝胶大片。pEGFP-N1 3  $\mu$ l、pMD-HBc 13  $\mu$ l、T4 DNA 连接酶 2  $\mu$ l、buffer 2  $\mu$ l 总体系 20  $\mu$ l 于 4 °C 连接过夜, 全量转入 DH5a 中, 涂于含卡那霉素的培养板中, 置于 37 °C 孵箱中过夜培养。挑取单克隆菌落少量扩菌, 用质粒小量抽提试剂盒提取质粒, 取质粒 8  $\mu$ l、EcoR I 0.5  $\mu$ l、BamH I 0.5  $\mu$ l、10  $\times$  H Buffer 1  $\mu$ l 37 °C 小量酶切 2 h, 琼脂糖凝胶电泳鉴定; 按之前 PCR 体系进行 PCR 鉴定; DNA 测序鉴定。

**1.2.3 pEGFP-L60V 的构建** L60V 的引物序列为上游: 5'-CAAGCAATTCTTTGGTGGGGGAACTAATG-3'、下游: 5'-CATTAGTTCACCCACCAAAGAATTGCTTG-3', 采用定点突变试剂盒(TaKaRa MutanBEST Kit) 对 pEGFP-WT 进行定点突变来获得 pEGFP-L60V 按照试剂盒说明书进行操作。双酶切鉴定; PCR 鉴定; 测序鉴定。

**1.2.4 细胞培养及处理** HepG2 细胞以 DMEM 培养基培养, 并补充 2 mmol/L 谷氨酰胺、50 IU/ml 青霉素、50  $\mu$ g/ml 链霉素、5% 胎牛血清在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 温箱孵育培养传代。状态良好并计数后接种于 6 孔板, 待细胞生长至 60% ~ 70% 融合时, 重组质粒 5  $\mu$ g 与 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen 公司) 8  $\mu$ l 分别加入 250  $\mu$ l 无血清 DMEM 静置 5 min, 混合静置 20 min 行转染 4 h 后换液。每组有 2 个复孔, 实验重复 3 次。

**1.2.5 Western blot 法检测细胞内 HBc 的表达** 转染后 24 h, 荧光显微镜观察是否有荧光, 以观察转染是否成功。提取蛋白做 Western blot 检测: 细胞 PBS 洗涤 2 次, 细胞刮刮下细胞至 1.5 ml 离心管中, 4 °C、1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 40  $\mu$ l 灭菌水轻轻吹散细胞, 再加入 10  $\mu$ l 的蛋白上样缓冲液混合煮沸 6 min。取 10  $\mu$ l 进行 SDS-PAGE 电泳, 10% 脱脂奶粉封闭 2 h, Tris-缓冲盐溶液(TBST) 漂洗 3 次, 加相应一抗过夜, TBST 漂洗 3 次, 二抗室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次, ECL 试剂盒检测。

**1.2.6 实验分组** 分别设立 pEGFP-N1 空白载体转染组、pEGFP-N1 + IFN- $\alpha$  处理组、pEGFP-WT + IFN- $\alpha$  处理组、pEGFP-L60V + IFN- $\alpha$  处理组。质粒转染后 24 h, 倒置荧光显微镜下观察绿色荧光情况; 再以 1 000 IU/ml IFN- $\alpha$  处理细胞 6 h。以上每组有 2 个复孔, 实验重复 3 次。

**1.2.7 RT-PCR 法检测 MxA、PKR、2', 5'-OAS、STAT1、STAT2 和 IRF9 mRNA 水平** 细胞总 RNA 提取采用 TRIzol 试剂, 通过逆转录合成 cDNA 用于 PCR 扩增目的基因, 以  $\beta$ -actin 为内参。PCR 扩增反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 1 min、54 °C 1 min、72 °C 1 min, 33 个循环; 72 °C 延伸 5 min。目的基因与内参  $\beta$ -actin 灰度值比值表示目的基因 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列及扩增长度大小

基因	引物序列	长度(bp)
MxA	上游: 5'-ACAATCAGCCTGGTGGTGGTC-3'	564
	下游: 5'-CCTCCCCTACAGTTTCTCTCC-3'	
PKR	上游: 5'-CCAGTGATGATTCTCTTGAGAG-3'	419
	下游: 5'-CCCCAAAGCGTAGAGGTCCA-3'	
2', 5'-OAS	上游: 5'-ATTGACAGTGCTGTTAAACATCA-3'	409
	下游: 5'-AGATCAATGAGCCCTGCATAAC-3'	
STAT1	上游: 5'-CCCTTCTGGCTTTGGATTGA-3'	518
	下游: 5'-GGGAGCAGGTTGCTCTGGT-3'	
STAT2	上游: 5'-CCCCATCAGACCAAAGAGCA-3'	635
	下游: 5'-CCAAAGTCCCAAATCAAACCCT-3'	
IRF9	上游: 5'-GGAGCAAGTGGAGACTGG-3'	636
	下游: 5'-CGCCCCGTTGTAGATGAAG-3'	
$\beta$ -actin	上游: 5'-TCACCAACTGGGACGACAT-3'	186
	下游: 5'-GCACAGCCTGGATAGCAAC-3'	

**1.2.8 Western blot 法检测细胞内 STAT1、STAT2 蛋白表达** HepG2 细胞转染质粒 24 h 后 IFN- $\alpha$  处理细胞 6 h, 提取蛋白做 Western blot 检测。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 11.0 和 Graphpad Prism 5 统计软件分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比

较采用方差分析(ANOVA),两组之间均数比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 HBc 突变体 pEGFP-L60V 重组质粒的鉴定

以 HBV dimer 为模板,经 HBV C 区设计引物进行 PCR 扩增 HBc,产物大小为 552 bp。pEGFP-WT、pEGFP-L60V 重组质粒经 EcoR I 和 BamH I 双酶切得到 552 bp 和 4 651 bp 大小的片段,见图 1、2;经测序结果显示 pEGFP-WT 的 nt2085(C/G) 获得 pEGFP-L60V,见图 3。



图 1 pEGFP-WT 双酶切鉴定

M<sub>1</sub>: Marker( DL10000); M<sub>2</sub>: Marker( DL2000); 1~6: PCR 阳性克隆菌液抽提质粒后双酶切

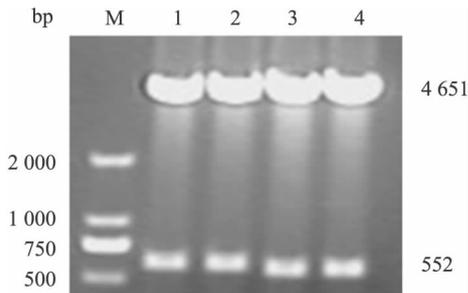


图 2 pEGFP-L60V 双酶切鉴定

M: Marker( DL2000); 1~4: PCR 阳性克隆菌液抽提质粒后双酶切

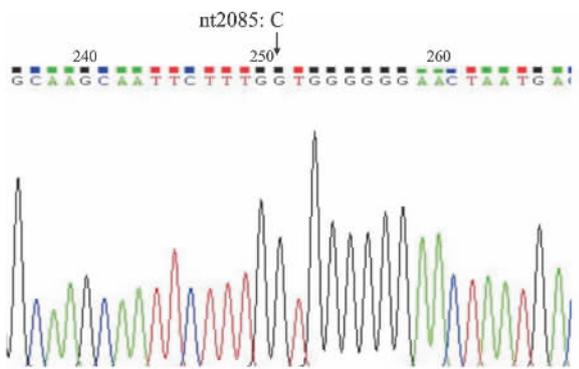


图 3 pEGFP-L60V 测序鉴定

2.2 荧光显微镜观察 转染后 24 h 各组均可以看到绿色荧光蛋白表达,表明 pEGFP-WT、pEGFP-L60V 成功转入 HepG2 细胞,见图 4。

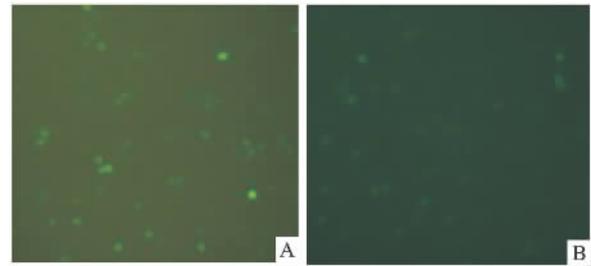


图 4 荧光显微镜观察重组质粒表达 ×100  
A: pEGFP-HBc; B: pEGFP-L60V

2.3 细胞内 HBc 蛋白的表达 转染 pEGFP-WT、pEGFP-L60V 重组质粒的 HepG2 细胞可以表达 HBc 蛋白,见图 5。

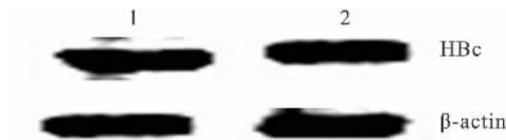


图 5 Western blot 检测 pEGFP-WT、pEGFP-L60V 蛋白的表达  
1: pEGFP-HBc; 2: pEGFP-L60V

2.4 pEGFP-WT、pEGFP-L60V 对 HepG2 细胞内 MxA、PKR、2' 5'-OAS mRNA 的影响 RT-PCR 结果分析显示,IFN- $\alpha$  处理转染细胞后 pEGFP-L60V + IFN- $\alpha$  组、pEGFP-WT + IFN- $\alpha$  组与 pEGFP-N1 + IFN- $\alpha$  组比较抗病毒蛋白 PKR、2' 5'-OAS mRNA 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );而 pEGFP-L60V + IFN- $\alpha$  组细胞 MxA mRNA 表达水平显著低于 pEGFP-N1 + IFN- $\alpha$  组和 pEGFP-WT + IFN- $\alpha$  组,差异有统计学意义 ( $F = 2\ 620.17, P < 0.05$ ),见图 6。

2.5 pEGFP-WT、pEGFP-L60V 对 HepG2 细胞内 STAT1、STAT2、IRF9 mRNA 的影响 IFN- $\alpha$  处理转染细胞后,转染 pEGFP-L60V + IFN- $\alpha$  组细胞 STAT1、STAT2、IRF9 mRNA 表达水平显著低于 pEGFP-N1 + IFN- $\alpha$  和 pEGFP-WT + IFN- $\alpha$  组,差异有统计学意义 ( $F = 8\ 669.59, 1\ 593.84, 1\ 873.25, P < 0.05$ ),见图 7。

2.6 细胞内 STAT1、STAT2 蛋白的表达 转染空载体质粒 pEGFP-N1 的细胞经 IFN- $\alpha$  处理后,STAT1、STAT2 蛋白表达增高,而转染 HBc 及突变体重组质粒后 IFN- $\alpha$  处理的细胞 STAT1、STAT2 蛋白

表达显著降低,见图8。

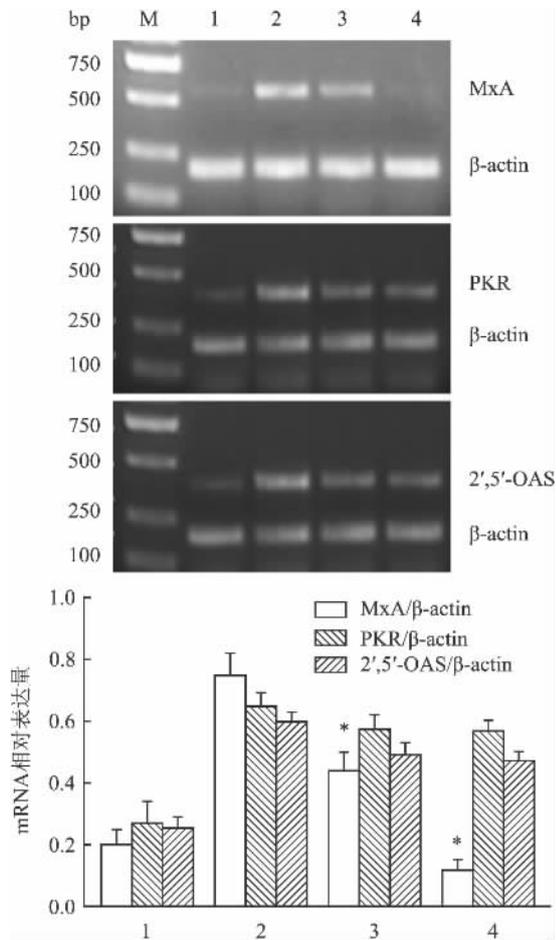


图6 RT-PCR 检测抗病毒蛋白 mRNA 的表达

M: Marker; 1: pEGFP-N1 组; 2: pEGFP-N1 + IFN-α 组; 3: pEGFP-WT + IFN-α 组; 4: pEGFP-L60V + IFN-α 组; 与 pEGFP-N1 + IFN-α 组比较: \* P < 0.05

### 3 讨论

HBV 可以造成肝硬化和肝细胞癌,IFN-α 是抗 HBV 感染的重要药物之一<sup>[6]</sup>,主要通过直接抗病毒作用及诱导机体的免疫反应来清除病毒。IFN-α 吸附于细胞表面的 IFN-α 受体 IFNAR-1 和 IFNAR-2,导致两个受体二聚化。两个与受体相关的酪氨酸激酶 Jak1 和 Tyk2 依次磷酸化 STAT1 和 STAT2,磷酸化的 STAT1 和 STAT2 与胞质中的 DNA 结合蛋白 IRF9 形成复杂的 IFN-α 激活基因因子(ISGF3)复合体,ISGF3 迅速异位于细胞核内,诱导宿主编码合成抗病毒蛋白 MxA、2',5'-OAS、PKR 来抑制 HBV 复制。

然而,临床上 IFN-α 治疗 HBV 的疗效并不理想。本课题组前期研究<sup>[5]</sup>表明 HBc 很可能特异性

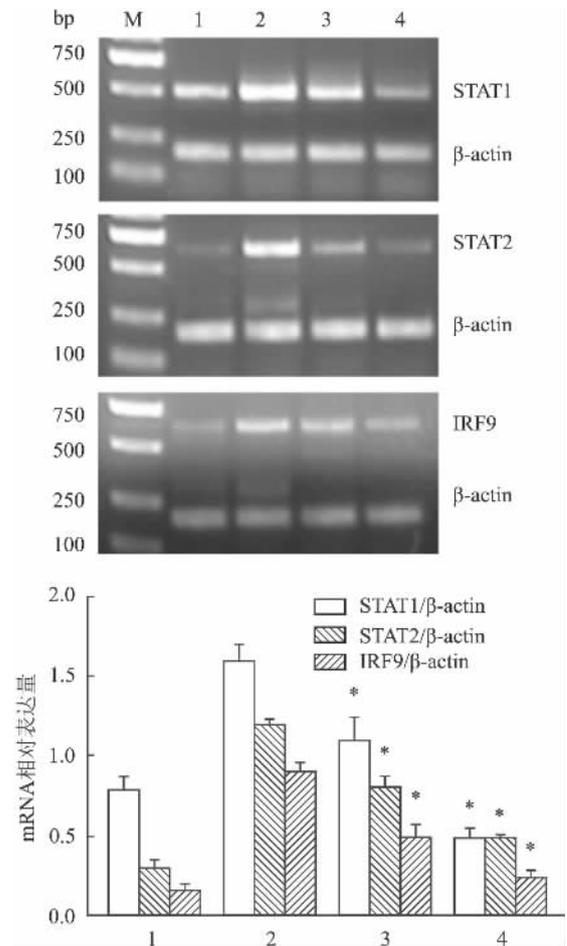


图7 RT-PCR 检测 JAK-STAT 信号转导途径分子 mRNA 的表达

M: Marker; 1: pEGFP-N1 组; 2: pEGFP-N1 + IFN-α 组; 3: pEGFP-WT + IFN-α 组; 4: pEGFP-L60V + IFN-α 组; 与 pEGFP-N1 + IFN-α 组比较: \* P < 0.05

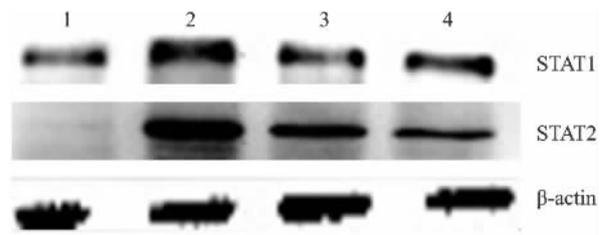


图8 Western blot 检测细胞内 STAT1、STAT2 蛋白表达

1: pEGFP-N1 组; 2: pEGFP-N1 + IFN-α 组; 3: pEGFP-WT + IFN-α 组; 4: pEGFP-L60V + IFN-α 组

地选择 MxA 作为抑制 IFN-α 抗病毒活性的靶蛋白来拮抗 IFN-α 的抗病毒活性。而目前已有文献<sup>[7]</sup>报道 HBc 突变体也可以抑制 MxA 的表达,但其对 IFN-α 抗病毒活性的具体影响机制以及是否与 HBc 存在差异都尚不了解。

因此,本课题组构建融合核心蛋白表达载体 pEGFP-WT,通过定点突变技术构建突变体 pEGFP-

L60V 经过双酶切及测序鉴定,并转染 HepG2 细胞检测到蛋白表达,说明该质粒可以用于后续实验。将两个重组质粒转染细胞,经过 IFN- $\alpha$  处理后细胞内抗病毒蛋白 MxA 及 JAK-STAT 信号转导途径分子 STAT1、STAT2、IRF9 mRNA 水平均明显下降,而 PKR、2' 5'-OAS mRNA 水平无明显改变,突变体与 HBc 相比较,细胞内的各指标下降水平更显著。本课题组推测 HBc 突变体 L60V 很可能通过抑制 JAK-STAT 信号转导途径分子来减少抗病毒蛋白 MxA 的表达,以拮抗 IFN- $\alpha$  的抗病毒作用;其拮抗作用比 HBc 更加显著。

IFN 治疗 HBV 的疗效由宿主与病毒间的相互作用决定。本研究通过构建 HBc 野生株及突变体 L60V 重组质粒并进一步实验结果表明,突变体 L60V 与 HBc 均可以抑制 IFN- $\alpha$  的抗病毒活性,这是影响乙肝患者临床结局的重要因素,可能是慢性肝炎活动的原因之一<sup>[8]</sup>,也可能增加慢性 HBV 感染者发生重型肝炎的机率。这一实验依据为临床找到更有效的治疗 HBV 的方案提供一定的指导,也对其他病毒感染的治疗提供一个新思路。

## Recombinant plasmid construction of L60V mutant core proteins of HBV and the study of its role in antiviral mechanism of interferon- $\alpha$

Sun Beibei, Guan Shihe, Wang Aihua, et al

(Dept of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To construct recombinant plasmid of L60V mutant core proteins of HBV, and explore its antagonistic action on the antiviral action of interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). **Methods** Built the fusion expression vector pEGFP-L60V of HBc mutant, the expression of the proteins was tested by the fluorescent microscope and Western blot after transfection to HepG2 cells. Detect moleculars of JAK-STAT signal transduction pathway and the antiviral protein expression by RT-PCR and Western blot. **Results** The recombinant plasmid of L60V mutant core proteins of HBV was established successfully according to the result of restriction endonuclease digestion and DNA sequencing; HepG2 cells were transfected with pEGFP-L60V and pEGFP-WT, the expression of the antiviral proteins MxA and JAK-STAT signal transduction pathway moleculars were decreased after treatment with 1 000 IU/ml IFN- $\alpha$ , and decreased even more in cells transfected with pEGFP-L60V. **Conclusion** L60V mutant core protein of HBV has the mechanism to antagonize the IFN- $\alpha$  antiviral activity by lowering antiviral protein MxA expression through JAK-STAT signal transduction pathway, and its functions are more efficiently than that of HBc.

**Key words** hepatitis B virus; core proteins; HepG2 cells; IFN- $\alpha$

## 参考文献

- [1] Liaw Y F. Antiviral therapy of chronic hepatitis B: opportunities and challenges in Asia [J]. J Hepatol, 2009, 51(2): 403-10.
- [2] Liu Z, Luo K, He H, et al. Hot-spot mutations in hepatitis B virus core gene: eliciting or evading immune clearance? [J]. J Viral Hepatol, 2005, 12(2): 146-53.
- [3] Samuel C E. Antiviral actions of interferons [J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(4): 778-809.
- [4] 顾婧茵, 卓超, 闫丽. 抗乙型肝炎病毒药物的研究进展 [J]. 国外医学药册, 2007, 34(2): 110-4.
- [5] 管世鹤, 杨凯, 陆应玉. HBV 核心蛋白拮抗  $\alpha$  干扰素抗病毒活性的初步研究 [J]. 临床检验杂志, 2010, 28(5): 356-7.
- [6] 潘颖, 管世鹤, 陆应玉, 等. MxA 蛋白对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV 复制的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(3): 213-5.
- [7] Zhijian Y, Zhen H, Fan Z, et al. Hepatitis B virus core protein with hot-spot mutations inhibit MxA gene transcription but has no effect on inhibition of virus replications by interferon  $\alpha$  [J]. Virol J, 2010, 7: 278.
- [8] 李发武, 卢放根. 乙型肝炎病毒 L60V、I97L 变异核壳蛋白对诱导 HepG2 细胞凋亡的影响 [J]. 四川医学, 2007, 28(1): 9-11.