

乙型肝炎病毒核心启动子缺失变异对病毒抗原表达的影响

乙型肝炎病毒 (HBV) 核心启动子 (CP) 部分缺失变异已证实在几种HBV感染的临床现象中存在[1][2][3]。我们在一组14例血清抗-HBe阳性的无症状携带者中, 发现有9例在nt 1 748(或nt 1 747)至nt 1 767间有20(或21)个核苷酸的缺失, 此9例中有5例合并有nt 1 896 G→A点变异[4]。前期, 利用含1.2拷贝的HBV全基因真核表达载体P3.8 I, 已成功地构建了上述CP 20/21 bp缺失和20/21 bp缺失+A1896热点变异的HBV全基因重组载体, 分别命名为20d-P3.8 I、21d-P3.8 I、20d/A1896-P3.8 I、21d/A1896-P3.8 I [5]。本研究在此基础上转染HepG2细胞, 以研究此类变异株对病毒抗原表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

HepG2细胞为我室保存, 胎牛血清购于Hyclone公司, DMEM、脂质体Lipofectamine 2000 Reagent购于GIBCO公司, 分泌型碱性磷酸酶(secreted alkaline phosphatase, SEAP)质粒及SEAP检测试剂盒购于CLONTECH公司, 鼠抗HBs/HBe/HBc购于珠海中山公司, Western-blotting试剂盒购于KPL公司。

1.2 细胞转染

野生型(P3.8 I)和变异型(20d-P3.8 I、21d-P3.8 I、20d/A1896-P3.8 I、21d/A1896-P3.8 I)HBV全基因重组质粒采用脂质体介导方法转染。转染按产品说明书方法进行。以SEAP质粒共转染作为转染效率的内参照。

1.3 检测转染效率

用化学发光法检测SEAP表达量。按产品说明书方法进行。

1.4 HBsAg、HBeAg及HBcAg的ELISA检测

用ELISA法检测上清HBsAg、HBeAg的表达(双抗体夹心法)。而ELISA法检测HBcAg, 需裂解细胞, 即细胞团块用0.25 mol/L Tris-HCl pH 7.5悬浮, 使其浓度为 1×10^6 /ml, 加等体积的2×细胞裂解液[含150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA(pH 8.0), 1 mmol/L PMSF]混合涡旋15 s, 室温静置30 min, 4 °C 12 000 g离心10 min, 上清即可用于ELISA法HBcAg检测(双抗体夹心法)。

1.5 HBsAg、HBeAg及HBcAg的Western blotting分析

对于HBsAg、HBeAg的Western blotting分析, 收集细胞培养上清6 ml, 冷冻抽干溶于150 μ l 1×SDS凝胶加样缓冲液(0.05 mol/L Tris, 0.1 mol/L二硫苏糖醇, 2%SDS, 0.1%溴酚蓝, 10%甘油, pH 6.8), 取50 μ l进行SDS-12%PAGE电泳; 而对于HBcAg的Western blotting分析, 收集培养细胞 5×10^6 , 以预热至85 °C的1×SDS凝胶加样缓冲液200 μ l裂解细胞, 100 °C变性5 min, 离心后取上清50 μ l进行SDS-12% PAGE电泳。电泳毕后, 取出凝胶, 电转移法转印硝酸纤维素膜。Western blotting分析按产品说明书进行。

2 结果

2.1 转染效率检测

经液相闪烁仪检测，各突变株及野毒株的转染效率基本一致。20d-P3.8 I、21d-P3.8 I、20d/A1896-P3.8 I、21d/A1896-P3.8 I与P3.8 I的转染效率之比为0.994 : 1.006 : 0.998 : 1.003 : 1。

2.2 HBsAg、HBeAg及HBcAg的ELISA检测

ELISA分析表明，四种变异株转染HepG2细胞分泌到上清中的HBsAg、HBeAg及细胞内HBcAg均较野毒株显著减少(表1)。其中，四种突变株上清中HBsAg和细胞内HBcAg均近呈等量减少，仅为野毒株的1/6~1/8，但均较空载体转染者高；20d-P3.8 I、21d-P3.8 I转染者上清HBeAg仅为不足野毒株的1/10；而同时合并有A1896点变异的20d/A1896-P3.8 I、21d/A1896-P3.8 I转染者上清中HBeAg水平与转染空载体者相同，提示无HBeAg分泌。

表 1 重组载体转染 HepG2 细胞表达病毒抗原的 ELISA 检测结果 ($D_{490}, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 HBV antigen titer in cell extracts and culture medium of HepG2 cells transfected with either a wild-type or a mutant HBV genome ($D_{490}, Mean \pm SD$)

	HBsAg in medium	HBeAg in medium	HBcAg in medium
P3.8 I	0.039±0.003	0.344±0.002	0.367±0.002
20d-P3.8 I	0.064±0.004	0.032±0.002	0.046±0.004
21d-P3.8 I	0.062±0.003	0.033±0.003	0.042±0.002
20d/A1896-P3.8 I	0.067±0.006	0.004±0.001	0.045±0.003
21d/A1896-P3.8 I	0.065±0.003	0.003±0.001	0.046±0.002
Mock	0.003±0.001	0.002±0.001	0.004±0.001

Transfection was performed in 3 independent experiments.

2.3 Western blotting分析

进一步做Western blotting分析，经密度扫描发现，四种变异株各自的三种病毒抗原水平较野毒株者亦显著降低。变异株20d-P3.8 I、21d-P3.8 I、20d/A1896-P3.8 I、21d/A1896-P3.8 I与野毒株P3.8 I相比，上清HBsAg分别为0.19 : 0.26 : 0.20 : 0.23 : 1(图1)；上清HBeAg分别为0.15 : 0.17 : 0 : 0 : 1(图2)；细胞内HBcAg分别为0.16 : 0.17 : 0.16 : 0.15 : 1(图3)。

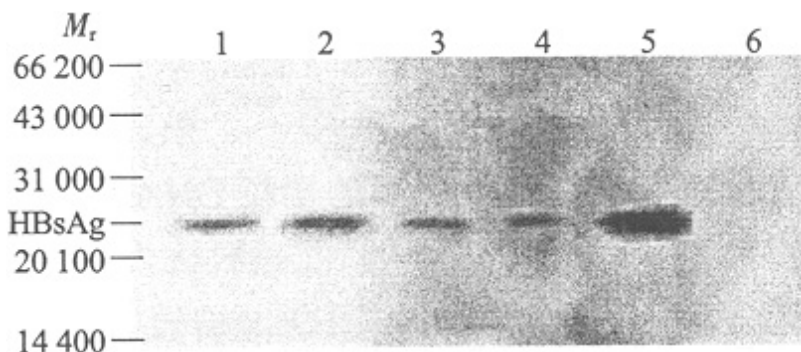


图1 细胞上清HBsAg的Western blotting分析

Fig.1 Western blotting analysis of HBsAg in the cell supernatants
Lane 1: 20d-P3.8 I; Lane 2: 21d-P3.8 I; Lane 3: 20d/A1896-P3.8 I; Lane 4: 21d/A1896-P3.8 I; Lane 5: P3.8 I; Lane 6: Mock. The position of the 27 000 HBsAg is marked.

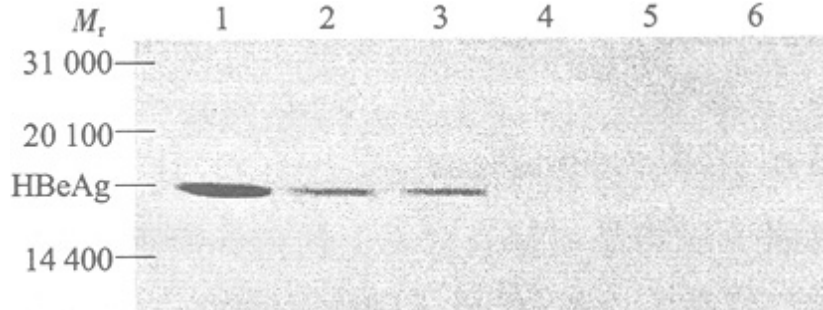


图2 细胞上清HBeAg的Western blotting分析

Fig.2 Western blotting analysis of HBeAg in the cell supernatants
Lane 1: P3.8 I ; Lane 2: 20d-P3.8 I ; Lane 3: 21d-P3.8 I ; Lane 4: 20d/A1896-P3.8 I ; Lane 5: 21d/A1896-P3.8 I ; Lane 6: Mock. The position of the 17 000 HBeAg is marked.

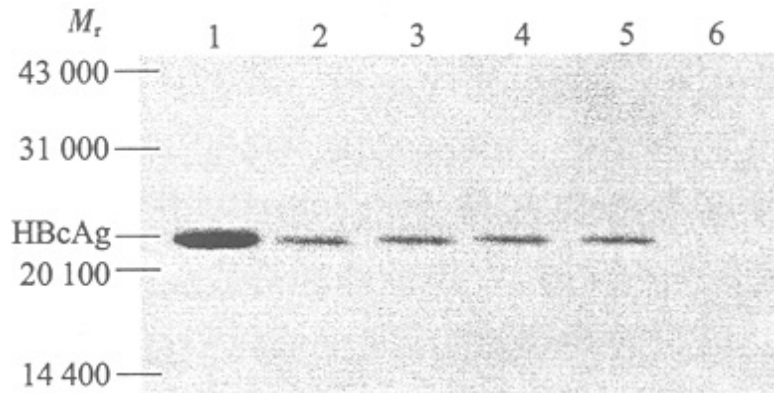


图3 细胞上清HBcAg的Western blotting分析

Fig.3 Western blotting analysis of HBcAg in the cell supernatants
Lane 1: P3.8 I ; Lane 2: 20d-P3.8 I ; Lane 3: 21d/A1896-P3.8 I ; Lane 4: 20d/A1896-P3.8 I ; Lane 5: 21d/A1896-P3.8 I ; Lane 6: Mock. The position of the 27 000 HBcAg is marked.

3 讨论

至今尚无理想的HBV体外感染的动物模型，目前多通过转染细胞模型来研究HBV变异的生物学意义。由于HBV基因组呈双链闭合环状，且其开放读框分布于全长DNA，因此需含大于单拷贝的HBV DNA全基因的载体才有可能在转染的细胞内建立HBV的复制状态。P3.8 I 质粒含有1.2拷贝HBV DNA全基因，野毒株在体外已证实其复制与表达能力[6]。本研究以此质粒为模型，构建的CP缺失变异株及合并存在的A1896点突变株，可为体外研究上述变异的生物学意义奠定基础。

为了证实转染效率，用含有SEAP基因的质粒共转染作为内参照。培养上清的SEAP经液相闪烁仪检测，SEAP量在所有实验中都很稳定，排除了因转染效率不同而对实验结果的影响。

重叠于X基因中的CP的缺失变异已在较多的病例中发现，包括HBsAg阴性的输血肝炎、血清标志物全阴性的HBV感染和血清抗-HBe阳性的无症状携带者等[1][2][3][4]。在HBV基因组中，CP有着极其重要的作用。它介导两种RNA即前核心mRNA和前基因组mRNA的转录。CP区无TATA盒(TATA box)，但含有4个TA富含区(TA1~TA4)，分别位于nt 1 752~1 755、nt 1 758~1 762、nt 1 771~1 775、nt 1 789~1 795。TA1~TA3决定前核心mRNA转录起始，而TA4决定前基因组mRNA的转录起始[7]。新近，国外学者通过体外细胞转染结果表明，CP区8 bp(nt 1 768~1 775)缺失株可使前核心mRNA及前基因组mRNA转录均下调，从而使病毒蛋白合成量明显减少[8]。此CP区8 bp的缺失，使整个TA3缺失，而本实验CP区20/21 bp缺失变异，使包括TA1~TA2的全部序列缺失。本文所述四种突变株较野毒株HBsAg、HBeAg及HBcAg表达量的减少可能是在转录水平上的差异所

致。A1 896点变异导致前C mRNA翻译中止，因此，合并有CP 20/21 bp缺失及A1 896点变异株者，对HBeAg表达的影响可由在转录和翻译水平双重下调产生，表现为与空载体转染的HBeAg水平相同。本研究中的四种突变株显示病毒抗原表达水平均显著下降，可以解释病毒抗原全阴性的不典型HBV感染、抗HBe(+)病变静息的无症状HBV感染等临床现象。

参考文献:

- [1] Feitelson MA, Duan LX, Guo J, et al. Precore and X region mutants in hepatitis B virus infections among renal dialysis patients[J]. *J Virol Hepatitis*, 1995, 2(1): 19-31.
- [2] Laskus T, Rakela J, Tong MJ, et al. Naturally occurring hepatitis B virus mutants with deletions in the core promoter region[J]. *J Hepatol*, 1994, 20(6): 837-41.
- [3] Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, et al. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen[J]. *J Virol*, 1994, 68(12): 8102-10.
- [4] 彭 劼, 骆抗先, 侯金林, 等. HBe抗体阳性的无症状携带与慢性活动性肝炎的HBV X及前C基因变异[J]. *中华内科杂志*, 2001, 40(5): 335-6.
- Peng J, Luo KX, Hou JL, et al. Analysis of X gene and precore region mutations of hepatitis B virus in asymptomatic carrier and patients with chronic active hepatitis positive for anti-Hbe[J]. *Chin J Intern Med*, 2001, 40(5): 335-6.
- [5] 彭 劼, 骆抗先, 林裕龙, 等. HBV核心启动子部分缺失重组体构建[J]. *第一军医大学学报*, 2001, 21(11): 804-7.
- Peng J, Luo KX, Lin YL, et al. Construction of recombinant eukaryotic expression plasmid containing hepatitis B virus genome with partial deletion of the core promoter[J]. *J First Mil Med Univ*, 2001, 21(11): 804-7.
- [6] 傅 磊, 吴 雪, 孔玉英, 等. 乙型肝炎病毒核心启动子及其上游顺序对基因表达的调控[J]. *病毒学报*, 1997, 13(3): 215-23.
- Fu L, Wu X, Kong YY, et al. Regulation of HBV gene expression by core promoter and its upstream sequence[J]. *Chin J Virol*, 1997, 13(3): 215-23.
- [7] Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64(1): 51-68.
- [8] Kohno K, Nishizono A, Terao H, et al. Reduced transcription and progeny virus production of hepatitis B virus containing an 8-bp deletion in basic core promoter[J]. *J Med Virol*, 2000, 61(1): 15-22.

参考文献:

- [1] Feitelson MA, Duan LX, Guo J, et al. Precore and X region mutants in hepatitis B virus infections among renal dialysis patients[J]. *J Virol Hepatitis*, 1995, 2(1): 19-31.
- [2] Laskus T, Rakela J, Tong MJ, et al. Naturally occurring hepatitis B virus mutants with deletions in the core promoter region[J]. *J Hepatol*, 1994, 20(6): 837-41.
- [3] Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, et al. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen[J]. *J Virol*, 1994, 68(12): 8102-10.
- [4] 彭 劼, 骆抗先, 侯金林, 等. HBe抗体阳性的无症状携带与慢性活动性肝炎的HBV X及前C基因变异[J]. *中华内科杂志*, 2001, 40(5): 335-6.
- Peng J, Luo KX, Hou JL, et al. Analysis of X gene and precore region mutations of hepatitis B virus in asymptomatic carrier and patients with chronic active hepatitis positive for anti-Hbe[J]. *Chin J Intern Med*, 2001, 40(5): 335-6.

[5] 彭 劫, 骆抗先, 林裕龙, 等. HBV核心启动子部分缺失重组体构建[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(11): 804-7.

Peng J, Luo KX, Lin YL, et al. Construction of recombinant eukaryotic expression plasmid containing hepatitis B virus genome with partial deletion of the core promoter[J]. J First Mil Med Univ, 2001, 21(11): 804-7.

[6] 傅 磊, 吴 雪, 孔玉英, 等. 乙型肝炎病毒核心启动子及其上游顺序对基因表达的调控[J]. 病毒学报, 1997, 13(3): 215-23.

Fu L, Wu X, Kong YY, et al. Regulation of HBV gene expression by core promoter and its upstream sequence[J]. Chin J Virol, 1997, 13(3): 215-23.

[7] Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(1): 51-68.

[8] Kohno K, Nishizono A, Terao H, et al. Reduced transcription and progeny virus production of hepatitis B virus containing an 8-bp deletion in basic core promoter[J]. J Med Virol, 2000, 61(1): 15-22.

[回结果列表](#)