

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

彭 劼, 骆抗先, 侯金林, 郭亚兵, 王战会 (第一军医大学南方医院感染内科, 广东 广州 510515)

摘要:目的 为研究乙型肝炎病毒(HBV)核心启动子(CP)20/21 bp 部分缺失(nt 1 748/1 747 至 nt 1 767)及同时存在的 A1 896点变异对病毒抗原表达的影响。方法 利用前期构建的 HBV 全基因的重载体转染 HepG2 细胞后,对病毒抗原进行 ELISA 检测及 Western-blotting 分析。结果 变异株分泌到细胞外的 HBsAg、HBeAg 及细胞内的 HBcAg 表达量较野毒株均明显减少。结论 HBV CP 20/21 bp 部分缺失株及同时存在的 A1 896 点变异株的病毒抗原表达较野毒株显著下降。

关键词: 病毒; 乙型肝炎; 缺失变异; 表达载体; 转染; 抗原

中图分类号:R512.6; Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2002)04-0306-03

Effects of partial deletion in the core promoter of hepatitis B virus genome on viral antigen expressions

PENG Jie, LUO Kang-xian, HOU Jin-lin, GUO Ya-bing, WANG Zhan-hui

Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the effects of 20/21 bp partial deletion mutation (from nt 1 748 or nt 1 747 to nt 1 767) in the core promoter (CP) region of hepatitis B virus (HBV) genome complicated by precore stop codon mutation at nt 1 896 on the expression of the viral antigens. **Methods** Eukaryotic expression vector containing full-length HBV genome with the above mutations was constructed. After transfection of the recombinant HBV plasmids into HepG2 cells, the expression of the viral antigens was examined with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blotting analysis. **Results** As shown by ELISA and Western blotting analysis, the amount of extracellular secretion of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and hepatitis B e antigen (HBeAg) along with intracellular hepatitis B core antigen (HBcAg) in the cells transfected with vectors containing HBV genomes with partial deletion in the CP region was markedly reduced compared with that produced by wild-type HBV. **Conclusion** The mutations in question causes marked reduction in viral antigen production by HBV in comparison that by wild-type HBV.

Key words: hepatitis B virus; gene mutation, deletion; expression vector; transfection; antigen

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^[1-3]。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 1×10⁶/ml,加等体积的 2×细胞裂解液[含 150 mmol/L NaCl,20 mmol/L EDTA (pH 8.0),

收稿日期:2001-12-08

基金项目:国家自然科学基金重点课题(39630280)

作者简介:彭 劼(1966-),男,湖北云梦人,第一军医大学博士生,主治医师,讲师,电话:020-85141945

1 mmol/L PMSF]混合涡旋 15 s,室温静置 30 min,4 ℃ 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 μl 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 μl 进行 SDS-12%PAGE 电泳;而对于 HBcAg 的 Western blotting 分析,收集培养细胞 5×10⁶,以预热至 85 ℃的 1×SDS 凝胶加样缓冲液 200 μl 裂解细胞,100 ℃变性 5 min,离心后取上清 50 μl 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

表 1 重组载体转染 HepG2 细胞表达病毒抗原的 ELISA 检测结果(D₄₉₀, $\bar{x} \pm s$)

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 (D₄₉₀, Mean±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.

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)。

3 讨论

至今尚无理想的 HBV 体外感染的动物模型,目

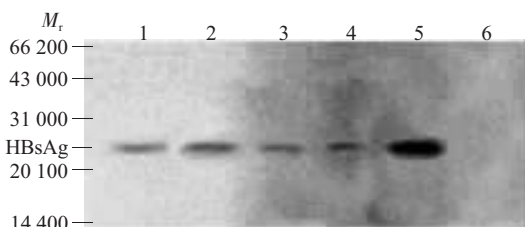


图 1 细胞上清 HBsAg 的 Western blotting 分析
Fig.1 Western blotting analysis of HBsAg in the cell supernatants

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.

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。

2.3 Western blotting 分析

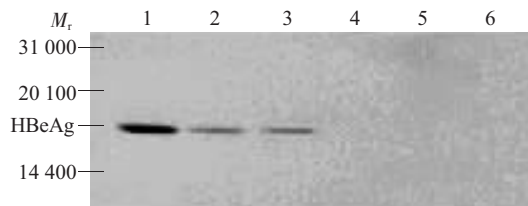


图 2 细胞上清 HBeAg 的 Western blotting 分析
Fig.2 Western blotting analysis of HBeAg in the cell supernatants

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.

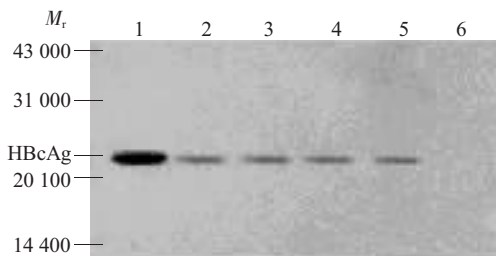


图 3 细胞上清 HBcAg 的 Western blotting 分析
Fig.3 Western blotting analysis of HBcAg in the cell supernatants

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.

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^[1-4]。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.

染色体的衰老

新的研究指出,细胞在其生命周期结束时停止分裂,这并不意味着套在染色体端部的端粒 DNA 的完全消失。细胞每分裂一次,在染色体端部的保护性的核蛋白盖(或端粒)就缩短一点点。科学家们一般认为细胞分裂最终停止是因为端粒 DNA 完全消耗了,但是,Jan Karlseder 发现虽然细胞的端粒 DNA 不断地缩短,但端粒的保护蛋白 TRF2 的过度表达,却可帮助培养的细胞不断地分裂。因此,研究者认为:端粒短到一定程度后,它不能再征集正常情况下保护它的蛋白,细胞也就停止分裂了。