

乙肝病毒 MHBs⁺/HBx 蛋白对 Gal β 1 3GalNAc α 2 3-唾液酸转移酶的反式激活作用

丁卉平 王俊琦 金城*

(中国科学院微生物研究所微生物资源国家重点实验室 北京 100080)

摘要 PCR 方法扩增乙肝病毒 MHBs⁺、HBx 基因片段,构建真核表达载体 pcDNA3.1-MHBs⁺ 和 pcDNA3.1-HBx。PCR 方法从肝细胞基因组中扩增出 Gal β 1 3GalNAc α 2 3-唾液酸转移酶(ST3GalII)的启动子 Psial,用 Psial 取代 pEGFP-N1 的启动子 pCMV 构建 pEGFP-N1-Psial。利用磷酸钙-DNA 共沉淀的方法,将 pcDNA3.1-MHBs⁺、pcDNA3.1-HBx 分别与 pEGFP-N1-Psial 瞬时共转染至正常肝细胞 QGY-7701。流式细胞仪分析细胞平均荧光密度值发现,MHBs⁺、HBx 分别将 ST3GalII 启动子的活性上调了 35.2% 和 43.8%。研究了乙肝病毒 MHBs⁺、HBx 对 ST3GalII 的转录调控作用,对于揭示乙肝病毒感染与唾液酸转移酶之间的关系做了非常有益的探索。

关键词 乙肝病毒, HBx, MHBs⁺, α 2 3-唾液酸转移酶, 激活作用

中图分类号 Q939.4 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0551-05

乙肝病毒(Hepatitis B virus, HBV)属于嗜肝 DNA 病毒科,是已知的最小的 DNA 病毒之一。HBV 不仅可以导致急性和慢性肝炎,而且被认为是人肝细胞癌(Human hepatocellular carcinoma, HCC)的主要致病因子。目前,世界上的 HBV 慢性感染患者超过 2 亿,每年约 200 万人死于这种感染^[1]。流行病学和分子病毒学的研究显示 HBV 携带者患 HCC 的潜在危险是非携带者的 100 倍^[2],而且在几乎所有的 HBV 相关的肝癌组织中都发现有整合在细胞染色体上的 HBV 基因序列。但 HBV 在肝癌发生发展中所起的作用仍未研究清楚。

HBV 基因组大约 3.2kb,有 4 个部分重叠的开放阅读框:P、C、X、preS/S,分别编码病毒聚合酶、HBc 和 HBe 抗原、HBx 蛋白及 LHBs、MHBs、SHBs 3 种表面抗原^[3]。研究发现,整合在细胞染色体上的 HBV DNA 通常发生了重组和部分缺失,P、C 阅读框被破坏,而 60% 的情况下 X 区域保持完整,且 preS/S 的 3'末端被截短^[4]。20 世纪 80、90 年代发现 HBx 和 3'末端截短的 MHBs(MHBs⁺)蛋白对许多病毒、细胞启动子有反式激活作用,可以上调病毒及细胞基因的表达,从而参与肝癌的发展过程^[5,6]。

唾液酸是羧化的九碳糖,为相关的神经氨酸衍生物组成的一个家族,位于糖链末端,是糖链的关键决定簇,广泛存在于一些病毒、细菌、多种高等生物及所有哺乳动物的细胞膜和体液中,在许多生物过程中起重要的作用,如:病毒、细菌等微生物对宿主细胞的感染,癌细胞的恶性转化,选凝素(Selectin)介导的细胞粘附等^[7]。唾液酸化的糖蛋白和糖脂在正常细胞和癌细胞表面具有重要的、在药理学上适用的关系。唾液酸转移酶负责催化唾液酸从 CMP-唾液酸转移到糖蛋白和糖脂的糖链非还原端。该酶在大多数哺乳动物细胞中以相当低的水平组成性表达,保证细胞蛋白质和脂类的糖基化,其时空表达主要在转录水平上调控^[8]。

本实验室已经从人胎肝中克隆得到了一种 Gal β 1 3GalNAc α 2 3-唾液酸转移酶(ST3GalII),发现该酶在肝癌组织中的表达量高于正常肝组织,在癌旁组织中的表达又高于癌组织,而所检癌旁组织多为 HBV 感染的组织,因此推测 ST3GalII 与 HBV 慢性感染到肝硬化直至肝癌发生这一过程密切相关,其表达量升高可能是肝癌早期的一种标志^[9],但它在肝癌发展中的具体生物学作用还不清楚。本文探讨了

MHBs¹ 和 HBx 2 种蛋白对 ST3GalI 转录的调控作用, 希望为研究 HBV 感染所引起的肝细胞中的变化及其与肝癌发生发展的关系提供更多线索。

1 材料和方法

1.1 菌种与试剂

大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存, 限制酶、细胞培养用 DMEM 培养基均购自 GIBCO 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司; Taq DNA 聚合酶为 TaKaRa(大连)公司产品; HEPES 为 Roche 公司产品; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 载体构建

pcDNA3.1(+)为本实验室保存; pHBV 由军事医学科学院王海涛惠赠, pEGFP-N1 购自 Clontech 公司。以 pHBV 为模板, 分别设计引物扩增 HBx 和 MHBs¹ 基因片段, MHBs¹ 的上游引物为 5'-GGAAGCTTATGCAGTGGGAATTCC-3' (划线部分为 HindIII 位点), 下游引物为 5'-GCCTCGAGTTATCTTGTCAACAAG-3' (划线部分为 XhoI 位点)。HBx 的上游引物为 5'-ACAAGCTTATGGCTGCTAGGCTGTAC-3' (划线部分为 HindIII 位点), 下游引物为 5'-CTCTC-GAGTTAGGCAGAGGTGAAAAAGTTGCA-3' (划线部分为 XhoI 位点)。经 HindIII 和 XhoI 酶切后的 PCR 产物连接于用相同酶消化的 pcDNA3.1(+)构建真核表达载体 pcDNA3.1-HBx 和 pcDNA3.1-MHBs¹。

设计 PCR 引物, 上游为 5'-GGATTAATGGCGCT-GGAAGGATGCAA-3' (划线部分为 VspI 位点), 下游为 5'-ATAAGCTTACGGTGGGAGAGGGCTCG-3' (划线部分为 HindIII 位点), 以 QGY-7701 细胞基因组 DNA 为模板, 扩增 ST3GalI 启动子, 经 VspI 和 HindIII 酶切后连接到用相同酶消化的 pEGFP-N1, 并将此改造后的载体命名为 pEGFP-N1-Psial。

1.3 质粒纯化

用超螺旋质粒转染, 可以获得较高的转染效率。按照文献 [10] 中的方法纯化质粒。

1.4 细胞培养

QGY-7701 细胞购自上海生化细胞所细胞库, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在有一定湿度 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养。

1.5 细胞基因组 DNA 的提取

参照文献 [10] 中的方法提取 QGY-7701 细胞的基因组 DNA。

1.6 DNA 瞬时转染

瞬时转染参考文献 [11] 进行, 转染前 24h, 以 6 ×

10⁵ 细胞/6cm 平皿的密度接种细胞, 使转染时的细胞达到 40% ~ 80% 的汇片。5 μ g pEGFP-N1-Psial 分别与 pcDNA3.1-MHBs¹、pcDNA3.1-HBx 以 1:5 的摩尔量混合至终体积 220 μ L, 加入 250 μ L 2 × HEPES 缓冲液, 混匀。缓慢加入 31 μ L 2mol/L CaCl₂, 温和混匀 30s, 于室温静置 20 ~ 30min, 以形成均匀的磷酸钙-DNA 沉淀。将 500 μ L 沉淀加入培养皿中, 使细胞暴露于磷酸钙-DNA 沉淀中 16 ~ 20h。弃去培养液, PBS 洗 2 次, 换上预热的新的培养液。转染 48 \pm 5 h 后, 0.5mmol/L EDTA 消化细胞, PBS 重悬细胞沉淀, FACSCalibur (Becton Dickinson) 分析细胞平均荧光密度值。

2 结果

2.1 MHBs¹、HBx 基因表达载体的构建

根据文献报道^[12, 13], 在 HBV 第 194-76 个氨基酸之间截短的 MHBs¹ 和全长的 HBx 都有转录激活作用。据此结构特征, 设计引物扩增 MHBs¹、HBx 片段。PCR 结果(图 1, 2)显示, 扩增得到的 DNA 片段与预期基因片段大小一致, 分别为: MHBs¹ 237bp, HBx 465bp。酶切后的片段连接到表达载体 pcDNA3.1(+) (图 3), 分别得到 pcDNA3.1-MHBs¹ 和 pcDNA3.1-HBx。经测序表明, 扩增产物的序列与原序列一致。

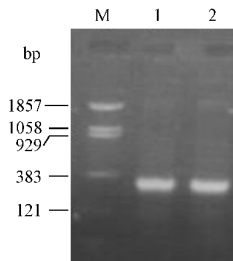


图 1 HBV MHBs¹ PCR 产物电泳分析(1.5% 琼脂糖)
Fig.1 1.5% agarose gel electrophoresis of MHBs¹ PCR product(237bp)
M. pBR322/BstNI DNA marker; 1, 2. MHBs¹

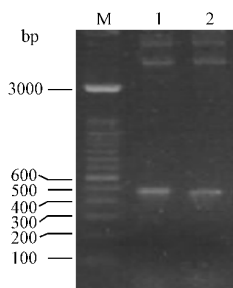


图 2 HBV HBxPCR 产物电泳分析(1.5% 琼脂糖)
Fig.2 1.5% agarose gel electrophoresis of HBx PCR product(465bp)

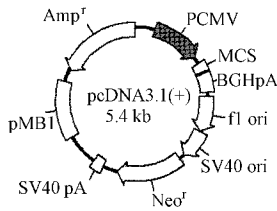


图3 真核表达载体 pcDNA3.1(+) 质粒图谱

Fig.3 Map of mammalian expression vector pcDNA3.1(+)

2.2 瞬时共转染

2.2.1 GFP 报告载体 pEGFP-N1-Psial 的构建: 根据文献报道的 ST3GalII 启动子序列^[14], 设计 PCR 引物, 以细胞基因组 DNA 为模板进行 PCR。对 ST3GalII 启动子序列进行分析, 发现该区域的 GC 含量达到 60%, 不利于 DNA 解链。而在反应体系中加入 5% 的 DMSO 后, 可以降低解链温度, 明显提高 PCR 的效率(图 4)。PCR 产物经 *VspI* 和 *HindIII* 酶切后, 连接到相同酶处理的 pEGFP-N1(图 5), 从而将 pEGFP-N1 上原有启动子 pCMV 替换成 ST3GalII 的启动子 Psial, 构建成 pEGFP-N1-Psial, 由 Psial 引导 GFP 的表达(图 6)。

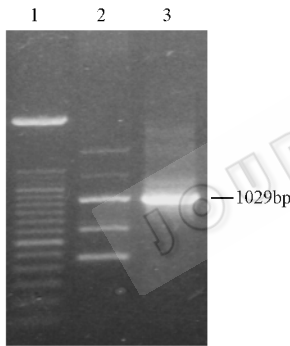


图4 Psial PCR 产物电泳图

Fig.4 Analysis of Psial PCR product on 1% agarose gel
1. 100bp DNA ladder; 2. Psial PCR product; 3. Detection of Psial in pEGFP-N1-Psial

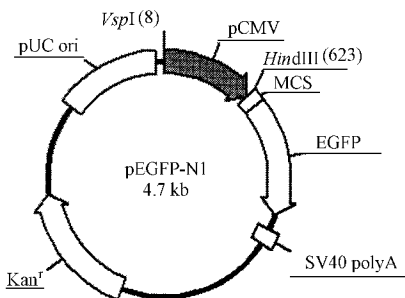


图5 GFP 报告载体 pEGFP-N1 质粒图谱

Fig.5 Map of GFP reporter vector pEGFP-N1

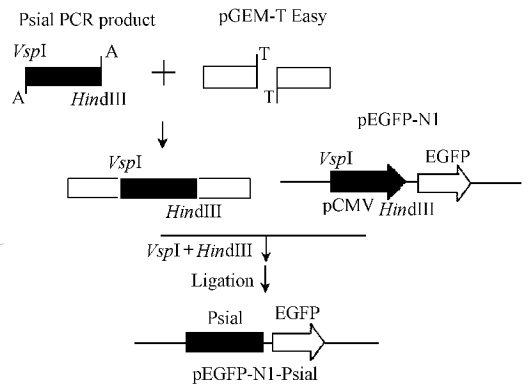


图6 pEGFP-N1-Psial 报告载体的构建

Fig.6 Construction of pEGFP-N1-Psial report plasmid

2.2.2 瞬时共转染细胞 GFP 的平均荧光密度分析: 为了探讨 MHBs¹ 和 HBx 是否能够上调 ST3GalII 启动子的活性, 将表达载体 pcDNA3.1-MHBst 和 pcDNA3.1-HBx 分别与含 Psial 启动子的载体 pEGFP-N1-Psial 共转染至 QGY-7701 细胞, 以空载体 pcDNA3.1(+) 与 pEGFP-N1-Psial 共转染的 QGY-7701 细胞作对照。图 7 显示的是收获转染细胞后, 经流式细胞仪分析得到的细胞平均荧光密度值。左上图为未转染的细胞的 GFP 峰形图, 右上图为共转染细胞的 GFP 峰形图, 将 GFP 荧光值超过 10^1 的细胞定为阳性细胞, 即 M1 区域的细胞。从图中可看出, 共转染细胞的 GFP 峰相对未转染细胞的 GFP 峰右移。这说明共转染细胞中的 GFP 得到表达, 转染实验是成功的。对实验组和对照组 M1 区域的细胞平均荧光密度值进行分析, 得到图 7 中下方的条形图。该数据表明, MHBs¹、HBx 的转入使 GFP 的表达分别上调了约 35.2% 和 43.8%。

3 讨论

乙肝病毒慢性感染与肝细胞癌症的发生发展有很强的相关性, 但其致病机理仍不清楚。有个别报道认为 HBV 基因启动子和增强子的插入可能导致细胞中癌相关基因被顺式激活, 但是 HBV 并没有典型的癌基因, 其整合位点也不特异, 而且病人在患上肝癌之前有相当长的 HBV 潜伏期, 这些都不能由顺式激活机理来解释。另一种观点认为整合的 HBV 基因通过反式效应激活或抑制与细胞生长分化相关的基因表达, 从而导致肝细胞癌症。实际上, 早在 1990 年就已发现 MHBs¹ 和 HBx 的转录激活作用并研究了各自的结构特征^[12, 13]。HBx 能够诱导或上调一氧化氮合成酶(NOS)^[15] 和转化生长因子(TGF-β)^[16] 的表达, 其激活作用与细胞信号级联反应有

关 Ras、Raf、MAP、PKC 等信号分子都可能参与了该过程^[17,18]。而 MHBst 的作用途径不甚清楚。

研究表明, ST3GalII 在肝癌、结肠癌、乳腺癌中的 mRNA 水平明显高于正常组织。本实验室检测了 14 例肝癌及其癌旁组织,发现癌旁组织中的 ST3GalII 表达水平相对癌组织分别高 1.3 ~ 31 倍,其中 9 例

癌旁组织为 HBV 感染组织,另有 5 例虽然为 HBV 阴性,但其家族成员亦有 HBV 感染或肝癌病史。这说明在 HBV 慢性感染到肝硬化直至肝癌发生的过程中,ST3GalII 的转录调节确实发生了变化,并且有一定的个体差异。

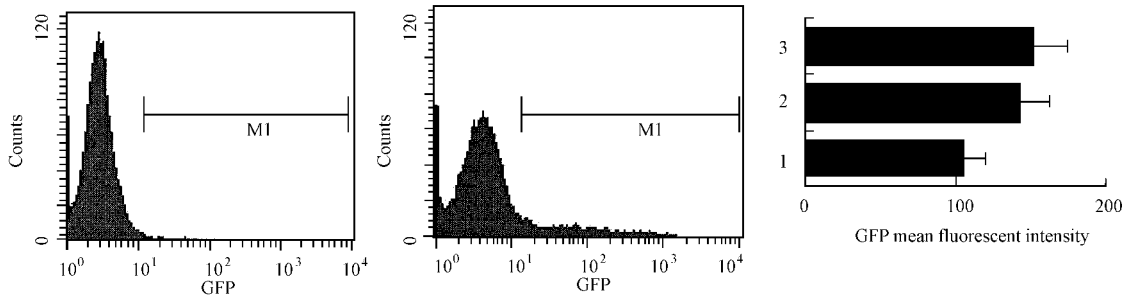


图 7 流式细胞仪分析 GFP 的平均荧光密度

Fig.7 FACSCalibur analysis of GFP mean fluorescent intensity

The histogram of untransfected cell (left) and transfected cell (middle) were shown. And GFP mean fluorescent intensity had been compared among 1, 2, 3: (right, 1. pcDNA3.1(+) + pEGFP-N1-Psial; 2. pcDNA3.1-MHBst + pEGFP-N1-Psial; 3. pcDNA3.1-HBx + pEGFP-N1-Psial). Each value represents the mean fluorescent intensity of GFP in three independent experiments. Bars indicate standard deviation of the mean fluorescent intensity

本文首次研究了乙肝病毒 MHBs¹、HBx 对 ST-3GalII 的调控作用,发现 MHBs¹、HBx 的瞬时转入使 ST3GalII 启动子的活性分别上调了 35.2%、43.8%。M 蛋白是一种糖蛋白,第 37 位氨基酸上有一个 L 和 S 蛋白都没有的 O-糖基化位点,其糖链结构于 1999 年得到测定,并发现该结构与 ST3GalII 催化形成的产物一致^[19]。可以推测,MHBs¹、HBx 上调 ST3GalII 的转录,有利于大量合成被正确糖基化的 M 蛋白,从而包装出有感染力的乙肝病毒粒子。另一方面,ST3GalII 转录水平的变化可能导致肝细胞表面糖链结构的变化,从而参与肝细胞恶性转化的过程。这些研究与分析对于揭示乙肝病毒感染与唾液酸转移酶之间的关系是非常有益的探索。

由于本研究采用体外培养的肝细胞为实验对象,因而 MHBs¹、HBx 的转染可能不能完全反映乙肝病毒体内感染肝细胞的状况。除了 MHBs¹、HBx 以外,也许还有许多其他因子参与肝癌发生发展过程中的 ST3GalII 转录调控。因此有必要结合体内实验进一步探讨 HBV 激活 ST3GalII 的途径,确定细胞表面肿瘤相关糖链结构的变化及其在肝细胞转化中的作用,为进一步揭示乙型肝炎与肝硬化、肝癌之间的联系提供重要线索。

REFERENCES (参考文献)

[1] Szmunn W. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: ev-

- idence for a causal association. *Progr Med Vir*, 1978, **24**: 40 ~ 69
- [2] Beasley R P, Hwang L Y, Lin C C *et al*. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet*, 1981, **2**: 1129 ~ 1133
- [3] Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature*, 1985, **317**: 489 ~ 495
- [4] Yamamoto S, Nakatake H, Kawamoto M *et al*. Transactivation of cellular promoters by an integrated hepatitis B virus DNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **192**: 111 ~ 118
- [5] Kekulé A S, Lauer U, Meyer M *et al*. The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature*, 1990, **343**: 457 ~ 461
- [6] Twu J S, Schloemer R H. Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J Virol*, 1987, **61**: 3448 ~ 3453
- [7] Schauer R, Kelm S, Reuter G *et al*. Biochemistry and role of sialic acid. *Biology of the sialic acids*. New York: Plenum Press, 1995, pp. 7 ~ 67
- [8] Paulson J C, Colley K J. Glycotransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem*, 1989, **264**(30): 17615 ~ 17618
- [9] Shang J, Qiu R, Jin C *et al*. Molecular cloning and expression of Gal β 1 β GalNAc α 2 β -sialyltransferase from human fetal liver. *Eur J Biochem*, 1999, **265**: 580 ~ 588
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [11] Graham F L, Van Der Eb A J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 1973, **52**: 465 ~ 467
- [12] Natoli G, Avantaggiati M L, Balsano C *et al*. Characterization of the hepatitis B virus preS2/S region as a transcriptional transactivator.

- Virology*, 1992, **187**: 663 ~ 670
- [13] Takada S, Koike K. Trans-activation function of a 3' truncated X gene-cell fusion product from integrated hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis tissues. *Proc Natl Acad Sci*, 1990, **87**: 5628 ~ 5632
- [14] Taniguchi A, Yoshikawa I, Matsumoto K. Genomic structure and transcriptional regulation of human Gal β 1 3GalNAc α 2 3-sialyltransferase (hST3GalI). *Glycobiology*, 2001, **11**(3): 241 ~ 247
- [15] Majano P L, Monzon C G, Cabrera M L *et al.* Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. Evidence for virus-induced gene upregulation. *J Clin Invest*, 1998, **101**(7): 1343 ~ 1352
- [16] Yoo Y D, Ueda H, Park K *et al.* Regulation of transforming growth factor- β 1 expression by the hepatitis B virus (HBV) X transactivator. *J Clin Invest*, 1996, **97**(2): 388 ~ 395
- [17] Benn J, Schneider R J. Hepatitis B virus pX protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, **91**: 10350 ~ 10354
- [18] Kekulé A S, Lauer U, Weiss L *et al.* Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumor promoter signaling pathway. *Nature*, 1993, **361**: 742 ~ 745
- [19] Schmitt S, Glebe D, Alving K *et al.* Analysis of the pre-S2 N- and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus. *J Biol Chem*, 1999, **274**(17): 11945 ~ 11957

Regulation of Gal β 1 3GalNAc α 2 3-sialyltransferase (ST3GalI) by Hepatitis B Virus MHBs^t/HBx Transactivator

DING Hui-Ping WANG Jun-Qi JIN Cheng*

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Hepatitis B virus MHBs^t and HBx fragments were amplified to construct eukaryotic expression vector pCDNA3.1-MHBs^t and pCDNA3.1-HBx. ST3GalI promoter region was obtained by the method of PCR and GFP report plasmid pEGFP-N1-Psial was constructed. pCDNA3.1-MHBs^t or pCDNA3.1-HBx with pEGFP-N1-Psial were transiently co-transfected into QGY-7701 cells using calcium phosphate-DNA co-precipitation, respectively. The expressions of Psial-directed GFP were analyzed by FAC-Scalibur. It was found that MHBs^t/HBx could upregulate ST3GalI promoter activity by 35.2% and 43.8%, respectively. We report the regulation of ST3GalI by MHBs^t and HBx transactivators. It would be helpful to further investigate the relation between hepatitis B virus infection and sialyltransferase expression.

Key words hepatitis B virus, MHBs^t, HBx, α 2 3-sialyltransferase, transactivation

Received: 05-14-2002

This work was supported by Grants from the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-3-02-01) and Ministry of Science and Technology of China (Special-aid for basic research).

* Corresponding author. Tel 86-10-62587206; Fax 86-10-62653468; E-mail jinc@sun.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>