

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.07.009

乙型肝炎病毒调节 Pasha 启动子活性的初步研究

任 敏, 曲嘉琳, 秦栋栋, 李 凯, 黄爱龙, 汤 华

(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘 要】目的:研究乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)对 microRNA 形成相关因子 Pasha 表达的调控,并对其作用机制进行初步探讨。方法:用 RT-PCR, Western blot 的方法检测 HepG2 细胞及稳定表达 HBV 的 HepG2-H7 细胞中 Pasha 的表达差异。构建 Pasha 启动子的萤火虫荧光素酶报告质粒,分别转染 HepG2 细胞及 HepG2-H7 细胞,检测 HBV 对 Pasha 启动子的影响。将 Pasha 启动子质粒与 HBV 4 种蛋白的真核表达质粒共转染 HepG2 细胞,寻找对启动子影响较大的 HBV 蛋白。结果:RT-PCR 和 Western blot 的结果显示 Pasha 在 HepG2-H7 细胞中的表达较 HepG2 细胞明显下降。萤火虫荧光素酶活性分析显示 HBV 能抑制 Pasha 启动子的活性,且 HBx 和 HBs 蛋白对其影响较大。结论:HBV 蛋白可以通过抑制 Pasha 启动子活性调节其在 HepG2-H7 细胞中的表达。

【关键词】乙型肝炎病毒;Pasha 基因;启动子;基因表达与调控

【中国图书分类法分类号】R373

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-01-08

Preliminary study on the regulatory effect of hepatitis B virus
on Pasha promoter activity

REN Min, QU Jialin, QIN Dongdong, LI Kai, HUANG Ailong, TANG Hua

(Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases, Ministry of Education,
Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the regulatory effect of hepatitis B virus (HBV) on the expression of Pasha and to discuss its mechanism. Methods: RT-PCR and Western blot were performed to check Pasha expression in HepG2 and HepG2-H7 cell lines. Pasha promoter luciferase reporter plasmid, pGL3-Pasha-P, was constructed and transiently transfected into HepG2 and HepG2-H7 cells to analyze the activity of Pasha promoter. Then HepG2 cells were transiently cotransfected with 0.5 μ g of pGL3-Pasha-P and HBx, HBs, HBp, HBc expression plasmids, respectively and the luciferase activity was detected. Results: The results of RT-PCR and Western blot showed that the expressions of Pasha in HepG2-H7 cells were lower than those in HepG2 cells. The luciferase activity assay of Pasha promoter demonstrated that HBV could suppress Pasha promoter activity and HBx and HBs proteins may play important roles in this process. Conclusion: HBV can down-regulate Pasha expression in HepG2-H7 cells through inhibiting its promoter activity.

【Key words】hepatitis B virus; Pasha gene; promoter; gene expression and regulation

MicroRNA(miRNA)是一类内源性的小分子非编码 RNA,大小约 21~23 nt。由于 miRNA 对基因具有广泛的转录后调节作用而成为近几年的研究热点。在细胞核内,miRNA 由基因组 DNA 在 RNA 聚合酶 II 的作用下产生原始转录体(Pri-miRNA),随后在 Drosha-Pasha 微处理器复合体的作用下形成具有短茎环结构的前体 miRNA(Pre-miRNA)。Pre-

miRNA 在 Ran-GTP 依赖的转运蛋白 Exportin 5 的作用下由胞核转运到胞质,最后在 Dicer 酶的剪切加工下形成成熟的 miRNA。微处理器复合体中的 Drosha 是 RNA 酶 III 家族的成员之一,它的主要作用是剪切 pri-miRNA 形成具有 3'端 2 nt 悬垂的 pre-miRNA^[1]。而 dsRNA 结合蛋白 Pasha 则主要参与 Drosha 对底物的识别^[2],是 miRNA 成熟过程中的一个重要的调节因子。

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染是威胁人类健康的一个重要的公共卫生问题^[3],HBV 慢性感染可以导致慢性乙型肝炎、肝硬化甚至肝

作者介绍:任 敏(1984-),女,硕士,

研究方向:重要基因在乙型肝炎病毒人体内复制、表达的
调控机理解析。

通信作者:汤 华,男,研究员,Email:tanghua86162003@yahoo.com.cn。

癌。最近有大量研究表明 HBV 感染可以导致体内 miRNA 表达谱的变化^[4,5]。但 HBV 导致 miRNA 表达变化的具体机制尚不明确。

通过本研究我们发现,在稳定表达 HBV 的 HepG2-H7 细胞中,HBV 能下调 Pasha 启动子的活性从而调节 Pasha 基因的表达,而 HBx 和 HBs 蛋白在这一过程中起到了主要作用。我们的研究初步揭示了 HBV 导致的 miRNA 表达变化的机制,为 HBV 致病机制研究提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 HepG2 由本实验室保存,稳定表达 HBV 的 HepG2-H7 细胞系为本实验室之前构建^[6]。pCMV-SPORT6 购于 ATCC(American Type Culture Collection)公司。质粒 pGL3-Basic、pRL-TK、逆转录试剂盒及双荧光素酶检测系统均购自 Promega 公司。Trizol 试剂及转染试剂 Lipofectamine 2000TM 均购自 Invitrogen 公司。SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、RIPA buffer 及 BCA 蛋白定量试剂盒购自中国碧云天公司。兔抗人 Pasha 多抗购自 Abcam 公司,鼠抗人 β -actin 单抗购自北京康为世纪生物有限公司,二抗羊抗兔 IgG 单抗和二抗羊抗鼠 IgG 单抗均购自北京中杉金桥生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 及 HepG2-H7 细胞系以及瞬时转染后的细胞培养于含有 10%胎牛血清,1%青/链霉素的 MEM 培养基中,培养条件:37 °C,5%CO₂ 的恒温孵箱。

1.2.2 RT-PCR Trizol 提取 HepG2 及 HepG2-H7 细胞总 RNA,并用 DNase 酶处理,通过逆转录试剂盒转录形成 cDNA,然后进行 PCR 扩增。引物序列为:Pasha-F:5'-AGACAG-AGTGGATGAAGAGG-3',Pasha-R:5'-ACTCTCTGTGTAGG-TACACC-3',扩增片段大小为 290 bp; β -actin-F:5'-GTGG-ATCAGCAAGCAGGAGT-3'和 β -actin-R:5'-TGTGTGGAC-TTGGGAGAGGA-3',扩增片段大小为 416 bp;PCR 反应条件为:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,28 个循环;72 °C 延伸 10 min。

1.2.3 Western blot 用含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液分别提取 HepG2 和 HepG2-H7 细胞的总蛋白,蛋白定量后各取 50 μ g 样品上样,8%的 SDS-PAGE 凝胶电泳,然后进行蛋白转膜,电转完后将 PVDF 膜用封闭液常温封闭 2 h,加入兔抗人 Pasha 多抗及鼠抗人 β -actin 单抗 4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜后,加入羊抗兔二抗和羊抗鼠二抗室温孵育 2 h,然后加入 ECL 显影剂,进行压片、洗片。

1.2.4 质粒构建 从 Ensembl Genome Browser database (<http://asia.ensembl.org/index.html>)中获得 Pasha 启动子的 DNA 序列,提取 LO2 细胞基因组 DNA 作为模板,PCR 扩增 Pasha 启动子片段。引物序列为:Pasha-P-F:5'-TATGAGCTCCG-

CGCTACTCCGCGCTCCCT-3',Pasha-P-R:5'-TATAAGCTTTC-CCACAGCTGGGAGTCTAG-3' (划线部分表示 Sac I 和 Hind III 酶切位点),反应产物为 1 150 bp。PCR 反应条件为:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 1 min,56 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min 15 s,30 个循环,72 °C 后延伸 10 min。PCR 产物和 pGL3-Basic 载体同时用 Sac I 和 Hind III 双酶切,胶回收约 1 kb 的 Pasha 启动子片段和约 4.8 kb 的 pGL3-Basic 载体片段,T4 连接酶 16 °C 过夜连接,产物转化 DH5 α 感受态菌。挑选阳性克隆,扩增后小量提取质粒进行酶切鉴定并测序。构建成功的重组质粒命名为 pGL3-Pasha-P。HBV 4 种蛋白的真核表达质粒 pCMV-SPORT6-HBx、pCMV-SPORT6-HBs、pCMV-SPORT6-HBp 及 pCMV-SPORT6-HBc 为本实验室之前构建^[7]。

1.2.5 细胞转染 HepG2 细胞及 HepG2-H7 细胞按每孔 2×10^5 个铺入 24 孔板,18~24 h 后用 Lipofectamine 2000TM 进行转染,具体操作按试剂盒说明书进行。质粒 pGL3-Pasha-P、pCMV-SPORT6、pCMV-SPORT6-HBx、pCMV-SPORT6-HBs、pCMV-SPORT6-HBp 及 pCMV-SPORT6-HBc 分别转染 0.5 μ g,pRL-TK 质粒转染 0.2 μ g。每个实验组同时转染 3 孔细胞,并进行 3 次独立实验。

1.2.6 双荧光素酶报告系统检测 转染后 48 h 收集细胞,并按照 Promega 试剂盒 Dual-Luciferase Reporter Assay System 技术手册操作进行荧光素酶活性检测。所用仪器为 Turner TD20/20 luminometer,pRL-TK 质粒作为内参用来标准化转染效率,每组的相对荧光素酶活性用萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值(FL/RL)来表示。

1.2.7 统计学分析 数据来自 3 次独立的重复实验。以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,采用方差分析方法进行统计学分析, $P < 0.05$ 则认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 HepG2 和 HepG2-H7 细胞中 Pasha 在转录水平的表达差异

首先用 RT-PCR 的方法明确了 HepG2 和 HepG2-H7 细胞中 Pasha 在转录水平的表达是否存在差异。结果如图 1 所示,在稳定表达 HBV 的 HepG2-H7 细胞中,Pasha 的 mRNA 表达量较其在 HepG2 中的表达量降低约 50%。

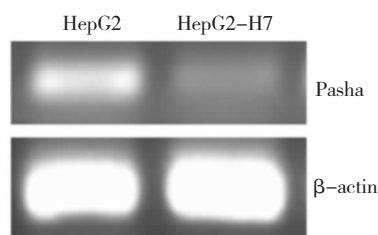


图 1 HepG2 和 HepG2-H7 细胞中 Pasha 在转录水平的表达比较
Fig.1 Comparison of Pasha mRNA expressions between HepG2 and HepG2-H7 cells

2.2 Western blot 检测 HepG2 和 HepG2-H7 细胞中 Pasha 在蛋白水平的表达差异

为了证实在 HepG2 和 HepG2-H7 细胞中, Pasha 在蛋白水平的表达也存在差异, 我们进行了 Western blot 实验, 分析了 Pasha 在 2 种细胞中的蛋白表达情况。Western blot 结果显示, Pasha 在 HepG2-H7 细胞中的蛋白表达水平较 HepG2 细胞降低(图 2)。Western blot 结果与 RT-PCR 的结果一致, 进一步说明了 HBV 对 Pasha 基因表达存在一定影响。

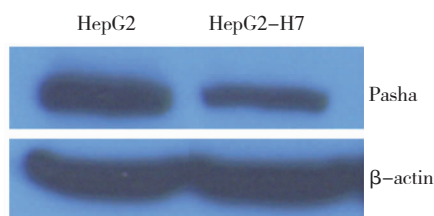
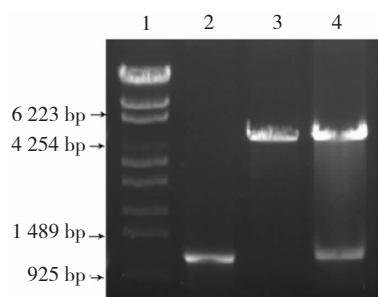


图 2 HepG2 和 HepG2-H7 细胞中 Pasha 在蛋白水平的表达比较

Fig.2 Comparison of Pasha protein expressions between HepG2 and HepG2-H7 cells

2.3 Pasha 启动子萤火虫荧光素酶报告质粒的构建及鉴定

为了进一步研究 HBV 影响 Pasha 基因表达的机制, 我们构建了 Pasha 启动子的萤火虫荧光素酶表达质粒 pGL3-Pasha-P。将构建好的启动子质粒用 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 得到大小约 1 kb 及 4.8 kb 的 2 个片段, 与预期结果一致(图 3)。测序结果也证实所构建的启动子序列正确。由此证明成功构建了 Pasha 启动子萤火虫荧光素酶报告质粒。



1. λ -EcoT14 I digest DNA Marker; 2. Pasha promoter PCR 片段; 3. pGL3-Basic 质粒; 4. pGL3-Pasha-P 质粒

图 3 pGL3-Pasha-P 质粒的 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定

Fig.3 Double enzyme digestion in indentifying pGL3-Pasha-P with *Sac* I and *Hind* III

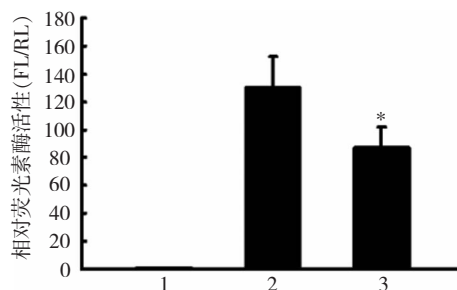
2.4 HBV 对 Pasha 启动子活性的调控

为了证实 HBV 对 Pasha 启动子是否有调控作用, 我们将 pGL3-Pasha-P 分别转染入 HepG2 和 HepG2-H7 细胞, 结果显示在 HBV 表达的情况下, Pasha 启动子的活性较 HBV 不表达组启动子的活性下降约 33%(图 4)。这一实验结果说明 HBV 可能抑制了 Pasha 启动子的活性。

2.5 HBx 和 HBs 蛋白抑制 Pasha 启动子的活性

HBV 有 4 个开放读码框架(X、P、S、C), 分别编码 4 类蛋白。为了进一步研究是 HBV 的何种蛋白对 Pasha 启动子起主

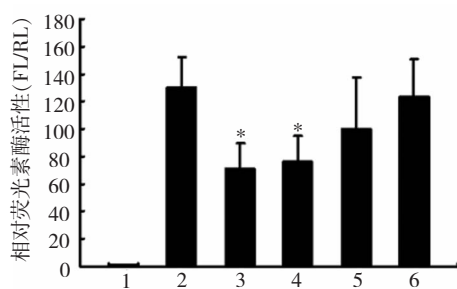
要的调节作用, 将表达 HBV 蛋白的 4 种真核表达质粒(pCMV-SPORT6-HBx、-HBs、-HBp 及-HBc)分别与 pGL3-Pasha-P 共转染 HepG2 细胞, 以 pRL-TK 质粒作为内参, 由此分析 4 种蛋白对 Pasha 启动子活性的影响。如图 5 所示, 我们发现转染 HBx 和 HBs 表达质粒组的相对荧光素酶活性分别较对照组下降了 46%和 41%, 结果具有统计学意义($P<0.05$), 而转染 HBp、HBc 表达质粒组的相对荧光素酶活性与对照组相比差异无统计学意义(图 5)。



1. 0.5 μ g pGL3-Basic 质粒转染 HepG2 细胞; 2. 0.5 μ g pGL3-Pasha-P 转染 HepG2 细胞; 3. 0.5 μ g pGL3-Pasha-P 转染 HepG2-H7 细胞, pRL-TK 质粒作为内参用来标化转染效率, 相对荧光素酶活性用萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值(FL/RL)来表示; *, 3 与 2 相比, $P<0.05$

图 4 HBV 抑制 Pasha 启动子活性

Fig.4 Inhibition of Pasha promoter activity by HBV



1. pGL3-Basic+pCMV-SPORT6 质粒共转染 HepG2 细胞作为空白对照组; 2. pGL3-Pasha-P+pCMV-SPORT6 共转染 HepG2 细胞作为阴性对照组; 3. pGL3-Pasha-P+pCMV-SPORT6-HBx 共转染 HepG2 细胞; 4. pGL3-Pasha-P+pCMV-SPORT6-HBs 共转染 HepG2 细胞; 5. pGL3-Pasha-P+pCMV-SPORT6-HBp 共转染 HepG2 细胞; 6. pGL3-Pasha-P+pCMV-SPORT6-HBc 共转染 HepG2 细胞, pRL-TK 质粒作为内参用来标化转染效率, 相对荧光素酶活性用萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值(FL/RL)来表示; *, 3、4 分别与 2 相比, $P<0.05$

图 5 HBx、HBs 过表达抑制 Pasha 启动子活性

Fig.5 Inhibition of Pasha promoter activity by over-expression of HBx and HBs

3 讨论

目前在各类细胞中发现的 miRNA 已有上千种。据研究报道, 高等真核细胞中, miRNA 基因占已

知基因的 1% 左右, 30% 的基因都要受到 miRNA 的调节^[8]。miRNA 主要通过靶基因的 mRNA 完全或不完全互补来调节靶基因的表达, 从而参与一系列的生理过程。

最近, miRNA 与 HBV 的关系成为研究热点。一方面有很多实验证实了 miRNA 可以影响 HBV 的复制和致病过程。比如说肝脏特异表达的 miRNA-122 可以抑制 HBV 的复制, 通过反义失活技术抑制 miRNA-122 的表达则会促进 HBV 复制, 进一步的研究证实 miRNA-122 对 HBV 复制的抑制作用是通过抑制血红蛋白氧化酶(HO-1)来实现的^[9]。另外有研究证实 miRNA-199a-3p 和 miRNA-210 可以直接以 HBV 的 S 抗原为靶标抑制 HBsAg 的表达, 从而调节 HBV 的复制及表达^[10]。另一方面, HBV 也可以通过影响体内 miRNA 的表达来利于自身的繁殖、复制与致病。2009 年, 刘妍等人利用 microRNA 芯片谱检测了 HepG2 和 HepG2.2.15 中差异表达的 miRNA, 结果发现了 27 个差异表达的 miRNA, 其中 7 个 miRNA 表达上调, 20 个表达下调^[5]。另外有实验进一步研究了 HBV 对 miRNA 的表达影响后, 发现 HBx 蛋白可以下调 Let-7 家族成员的表达, 而 Let-7 又可以通过其靶基因 STAT3 影响细胞的增殖, 由此对 HBV 的致病机理有了新的理解^[11]。

到目前为止, HBV 如何导致 miRNA 表达变化这一机制并不明确。本实验对 HBV 调节 miRNA 表达的机制进行了初步探讨。首先证实了在 HBV 表达的情况下, miRNA 成熟过程中的重要因子 Pasha 的表达是明显下降的。这说明 HBV 对 Pasha 基因可能有一定的调控作用。随后的启动子研究证实了 HBV 能够下调 Pasha 启动子的活性从而影响该基因的表达。通过进一步对 HBV 4 种蛋白的深入研究, 发现 HBx 和 HBs 能够下调 Pasha 启动子活性。由此推测可能是由于 HBx 和 HBs 蛋白影响 Pasha 基因的表达从而损害了 miRNA 的成熟过程, 由此导致了 miRNA 的异常表达。本研究的实验为 HBV 导致的 miRNA 表达异常提供了一个新的研究思路和可能机制。

但是 HBx 和 HBs 又是如何导致 Pasha 启动子活性下降? 都知道 HBx 通常不会直接与 DNA 结合来发挥其生物学功能, 它通常是与宿主的转录因子结合影响基因的表达, 比如说 AP-1, AP-2, NF-

κB 和 ATF2^[12]。因此本研究推测 HBV 可能是通过与转录因子相互作用来调控 Pasha 启动子活性的, 这有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing[J]. *Nature*, 2003, 425(6956): 415-419.
- [2] Markus L, Abdullah Y, Thomas T. The Human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D-melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis[J]. *Current Biology*, 2004, 14(23): 2162-2167.
- [3] Rehmann B, Nascimben M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection[J]. *Nat Rev Immuno*, 2005, 5(3): 215-229.
- [4] Ura S, Honda M, Yamashita T, et al. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2009, 49(4): 1098-1112.
- [5] 刘妍, 张亮, 戴久增, 等. 乙型肝炎病毒基因组转染 HepG2 细胞的 microRNA 表达研究[J]. *解放军医学杂志*, 2007, 32(2): 92-95.
- [6] Liu Y, Zhang L, Dai J Z, et al. The microRNA gene expression profiling in HepG2 cells transfected with full-length hepatitis B virus genome[J]. *Medical J Chinese People's Army*, 2007, 32(2): 92-95.
- [7] 罗强, 苏怀斌, 梁盼盼, 等. 1.1 倍全长 HBV 基因组克隆转染细胞系的建立[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(16): 1672-1675.
- [8] Luo Q, Su H B, Liang P P, et al. Establishment of cloned cell line transfected with 1.1-unit-length HBV genome[J]. *J Third Military Medical University*, 2011, 33(6): 1672-1675.
- [9] 张小花, 万涛, 张磊, 等. HBV 通过增强 DNAJB4 启动子活性调节其在 HepG2.2.15 细胞中的表达[J]. *医学分子生物学杂志*, 2009, 6(5): 391-393.
- [10] Zhang X H, Wan T, Zhang L, et al. HBV regulates DNAJB4 expression in HepG2.2.15 cells through enhancing its promoter activity[J]. *J Medical Molecular Biology*, 2009, 6(5): 391-393.
- [11] Griffiths-Jones S, Grocock R J, van Dongen S, et al. MiRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(Database issue): 140-144.
- [12] Qiu L P, Fan H X, Jin W S, et al. miR-122-induced down-regulation of HO-1 negatively affects miR-122-mediated suppression of HBV[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 398(4): 771-777.
- [13] Zhang G L, Li Y X, Zheng S Q, et al. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210[J]. *Antiviral Res*, 2010, 88(2): 169-175.
- [14] Wang Y, Lu Y, Toh S T, et al. Lethal-7 is down-regulated by the hepatitis B virus X protein and targets signal transducer and activator of transcription 3[J]. *J Hepatol*, 2011, 53(1): 57-66.
- [15] Feitelson M A, Lee J. Hepatitis B virus integration, fragile sites and hepatocarcinogenesis[J]. *Cancer Lett*, 2007, 252(2): 157-170.

(责任编辑: 关蕴良)