

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.001899

NR6A1 在 HepG2 细胞中抑制 HBV 转录与复制的初步研究

魏 强, 魏霞飞, 甘春杨, 张文露, 黄爱龙, 胡接力

(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:筛选核受体家族中对乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)增强子或核心启动子转录活性有影响的基因, 初步研究生殖细胞核因子(germ cell nuclear factor, NR6A1)对 HBV 转录与复制的调控作用。**方法:**克隆带有核受体家族基因的表达质粒, 与海肾荧光素酶报告质粒 pcore-Rluc 共转染, 转染后检测荧光素酶活性, 筛选对增强子或核心启动子转录活性有影响的核受体基因。然后在 HepG2 细胞中共转染 HBV1.3 倍体质粒与 NR6A1 表达质粒; 通过 Southern blot 检测细胞内复制的 HBV DNA; Northern blot 检测 HBV RNA 的转录情况。**结果:**筛选出对 HBV 增强子/核心启动子有明显影响的基因 NR6A1, 其作用与对照组(空载和 pcore-Rluc 共转染)相比, Rluc 活性下降约 80%, 对照组为 1.000 ± 0.319 , NR6A1 组为 0.198 ± 0.009 ($P=0.000$)。NR6A1 过表达时, BCP(核心启动子, PCH9-1744-Rluc)实验组荧光素酶活性相对值(0.504 ± 0.023)较对照组(空载和 PCH9-1744-Rluc 共转染, 1.000 ± 0.099)下降约 50% ($t=6.534$, $P=0.0226$), BCP(核心启动子)+Enh II (PCH9-1636-Rluc)实验组荧光素酶活性相对值(0.089 ± 0.002)比对照组(空载和 PCH9-1636-Rluc 共转染, 1.000 ± 0.042)下降约 92% ($t=31.59$, $P=0.001$)。NR6A1N (NR6A1DBD+Hinge)荧光素酶活性相对值相对于阳性对照组(NR6A1 和 pcore-Rluc 共转染, 1.150 ± 0.141)无统计学差异, 其荧光素酶活性相对值为(1.000 ± 0.170) ($P>0.05$)。NR6A1C(NR6A1LBD+Hinge)荧光素酶活性相对值相对于阳性对照组(NR6A1 和 pcore-Rluc 共转染, 1.150 ± 0.141)无统计学差异, 其荧光素酶活性相对值为(1.160 ± 0.078) ($P>0.05$)。**结论:**过表达 NR6A1 通过抑制核心启动子和增强子 II 的活性能够显著抑制乙肝病毒的复制。

【关键词】乙肝病毒; 核受体; 生殖细胞核因子(NR6A1); 启动子; 增强子**【中图分类号】**Q786**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-01-10

Overexpression of NR6A1 inhibits HBV replication and transcription in HepG2 cells

Wei Qiang, Wei Xiafei, Gan Chunyang, Zhang Wenlu, Huang Ailong, Hu Jieli

(Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education)

【Abstract】Objective: To screen for the genes in the nuclear receptor family that affect the transcriptional activities of HBV enhancers or the core promoter, and to characterize the role of the initially screened gene germ cell nuclear factor(NR6A1) on the transcription and replication of HBV. **Methods:** cDNA was obtained by the reverse transcription of the mRNA from HepG2 cells. Different nuclear receptor genes were amplified from the cDNA and cloned into the plasmid PCH9. Then the plasmids were co-transfected with the plasmid with Renilla luciferase reporter gene driven by the core promoter of HBV(pcore-Rluc) into the HepG2 cells. The luciferase activity was assayed to screen for the nuclear receptor genes that had an effect on the transcriptional activities of the enhancers or the core promoter. Next, the plasmid of 1.3-fold HBV genome and NR6A1 were co-transfected into HepG2 cells. The intracellular HBV replication intermediates were analyzed by Southern blot, and HBV RNA was assayed by Northern blot. **Results:** Among those screened genes, NR6A1 showed a most significant influence on the HBV enhancer or the core promoter, as the Rluc activity was decreased by about 80% in the NR6A1 group compared to the control group (0.198 ± 0.009 vs. 1.000 ± 0.319 , $P=0.000$). Overexpression of NR6A1 decreased the relative luciferase activity of BCP(PCH9-1744-Rluc) group by 50% compared to that in the control group (0.504 ± 0.023 vs. 1.000 ± 0.099 , $t=6.534$, $P=0.0226$), as well as decreasing the relative luciferase activity in the BCP+Enh II (PCH9-1636-Rluc) group by 92% compared to that in the control group (0.089 ± 0.002 vs. 1.000 ± 0.042 , $t=31.59$, $P=0.001$). Both of the truncated mutants of NR6A1, NR6A1DBD or NR6A1LBD, did not significantly affect the relative luciferase activity of pcore-Rluc ($P>0.05$).

Conclusion: Overexpression of NR6A1 inhibits the replication of hepatitis B virus by reducing the transcription activities of the core promoter and enhancer II in HepG2 cells.

【Key words】 hepatitis B virus(HBV); nuclear receptor; germ cell nuclear factor(NR6A1); promoter; enhancer

作者介绍: 魏 强, Email: 870394253@qq.com,

研究方向: HBV 复制相关基因的研究。

通信作者: 胡接力, Email: hujieli1977@163.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181126.1723.004.html>

(2018-11-27)

乙型肝炎病毒属于嗜肝 DNA 病毒科,能引起肝硬化和肝癌等急慢性肝脏疾病,严重者如肝硬化和肝癌。其基因组为 3.2 kb 的环状、部分双链 DNA。HBV 基因组的转录与复制受 4 种不同的启动子(Sp I、Sp II、Cp、Xp)和 2 种增强子(En I、En II)调控,4 种不同的启动子能转录出 4 类不同的 mRNA,分别为 3.5 kb 的前核心 RNA (precore RNA) 和前基因组 RNA (pregenomic RNA, pgRNA)、2.4 kb 的 PreS1 RNA、2.1 kb 的 PreS2/S RNA、0.7 kb 的 X RNA^[1-3],核心启动子 Cp 对乙肝病毒的转录与复制起着至关重要的作用,其转录产物 pgRNA 既能作为逆转录的模板,形成松弛环状的双链 DNA (relaxed circular DNA, rcDNA),也能翻译出 C 蛋白和聚合酶。在 HBV 基因组的增强子/核心启动子区域存在大量的核受体结合位点,如特化蛋白 1 (specificity protein 1, sp1)^[4]、肝细胞核因子 3 (hepatocyte nuclear factors, HNF3 α)、肝细胞核因子 4 (hepatocyte nuclear factors, HNF4 α)^[5]、CCAAT 增强子结合蛋白 (CCAAT-enhancer-binding proteins, C/EBP)^[6],以及视黄醇类核内受体- α (retinoid X receptor alpha, RXR α)、过氧化物酶体增殖因子活化受体- α (peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR α)、鸡卵清蛋白上游启动子转录因子 1 (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 1, COUP-TF1)、肌动蛋白相关蛋白 (actin-related protein, ARP)^[7]等。不同的核受体与相应的核受体反应元件 (nuclear receptor response elements, NRRE) 结合可以调控 HBV 启动子活性,从而调控 HBV 复制与转录,表明核受体在乙肝病毒的转录与复制过程中起着重要的作用。目前为止在人体中总共发现 48 种核受体基因^[8],其中对乙肝病毒复制与转录有关的核受体基因数量非常有限,同时这些核受体以怎样的机制调控核心启动子现在仍然不清楚。

本研究利用 HBV 核心启动子驱动表达荧光素酶报告基因,筛选了可能影响 HBV 复制的核受体家族成员,发现 NR6A1 对 HBV 核心启动子和增强子 II 活性有显著抑制作用,进而对该因子在 HBV DNA 的复制与转录中的作用做初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

PrimerSTAR HS Mix 为 Takara 公司生产;胶回收和小抽试剂盒为 QIAGEN 公司产品;Taq 酶、T7 连接酶、DTT、ATP 购自 NEB 公司;肝癌细胞系 HepG2 细胞为本实验室保存;胎

牛血清购自 BI 公司,转染试剂 lipo3000 购自 Invitrogen 公司,胶原购自 BD 公司,抗 Flag 鼠单克隆抗体、 β -激动蛋白(β -actin)购自上海碧云天生物技术公司;海肾荧光素酶检测试剂盒 (Renilla Luciferase Assay System) 购自美国 Promega 公司。HBV1.3 倍体为本实验室构建并保存,pCH9/3091 质粒由德国弗莱堡大学 Nassal 实验室构建^[9]、陆军军医大学附属第一医院兰林博士惠赠。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 核受体基因表达质粒构建:从肝癌细胞系 HepG2 抽提 mRNA,以此为模板,反转录得到 cDNA,以得到的 cDNA 为模板,根据 Genbank 收录的核受体基因全序列设计引物,引物序列见表 1。利用这些引物扩增各基因后与载体片段做 golden-gate 反应即得到核受体基因表达质粒。HBV 增强子/核心启动子驱动表达的荧光素酶报告质粒 pCH9-pcore-Rluc (ACB) 构建:以 pCH9/3091 质粒为模板,用引物对 F 1070+R 1901,扩增 1070-1901 增强子/核心启动子片段;以 pCH9/3091 质粒为模板扩增载体,引物为 F SV40+R CMV;以 pRL-TK 为模板,用引物 F Rluc+R Rluc,扩增 Rluc 报告基因,引物序列见表 1。用 golden-gate 方法将增强子/核心启动子片段、Rluc 连接至 pCH9 载体,即得到 pCH9-pcore-Rluc。pCH9-NR6A1-Flag 构建:用 F 3flag 6A1-2+R amp 扩增 NR6A1,用 R 3flag GG+F amp 扩增质粒 3flag-Rluc-HBC,用 golden-gate 方法连接即得到 pCH9-NR6A1-Flag。以 pCH9-pcore-Rluc 质粒为模板分别扩增 1636-1901、1636-1744 缺失段和 1744-1901,扩增引物分别为 F 1636+R CMV、F 1744+R 1635、F 1744+R CMV,其序列见表 1,构建成功的突变体分别命名为 pCH9-1636-Rluc、pCH9-1635/1744-Rluc、pCH9-1744-Rluc。以 pCH9-NR6A1-Flag 质粒为模板分别扩增 NR6A1 DBD、NR6A1 LBD、NR6A1N (NR6A1DBD+Hinge)、NR6A1C (NR6A1LBD+Hinge),扩增引物分别为 F 6A1 843+Ramp、F amp+R 6A1 384、F amp+R NR6 268、F NR6 187+R amp 384,其序列见表 1,用 golden-gate 方法将上述片段连接至载体,构建成功的突变体分别命名为 NR6A1 DBD、NR6A1 LBD、NR6A1N (NR6A1DBD+Hinge)、NR6A1C (NR6A1LBD+Hinge)。

1.2.2 细胞培养、转染与海肾荧光素酶活性的检测 HepG2 细胞用含有 10%胎牛血清的 MEM 培养基培养,每隔 2~3 d 传代 1 次。转染条件:接种 HepG2 细胞到 24 孔板,待约 20 h 细胞贴壁生长融合度达到 90%时,用转染试剂 Lipofectamine3000 将核受体表达质粒和 pCH9-pcore-Rluc 按质量比 1:1 共转染细胞,48 h 后测定荧光素酶活性。荧光素酶活性测定按厂商说明书进行。

1.2.3 Western blot RIPA 裂解细胞,然后将样品与上样缓冲液充分混匀后沸水煮 3 min,配置 12% SDS-PAGE,蛋白样品经 12% SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h 后,分别加入抗 Flag (1:1 000) 抗体,抗 β -actin 抗体 (1:5 000) 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。山羊抗鼠二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h,最后加入底物发光剂 ECL 进行显色。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')
F NR1D2-1	CCGCCTCCGCGAGGGACCAT
R NR1D2-1	ACACATATAAATATGCATTTTAGC
F NR1D2-2	CGTCTCTTCACTGAGAGAACTGCCTGC
R NR1D2-2	TTAAGGGTGAACTTTAAAGGCCA
F NR1I3-1	ATGCTGCCTAAGAGAAGCAGGA
R NR1I3-1	AGCTGGGAAGGAAGTGAGCA
F NR1I3-2	ATGGCCAGTAGGGAAGATGAGCT
R NR1I3-2	TCAGCTGCAGATCTCCTGGAGCA
F NR6A1-1	GCCGGTCATGCGCGAGCAACA
R NR6A1-1	CACCCAAGACGCTGTGGTTGG
F NR6A1-2	ATGGAGCGGACGAACCGCC
R NR6A1-2	TCATTCTTGCACACTGGTC
F THRB-1	GTCACTGAAAAAAGGGATCCAG
R THRB-1	ATGACACCCACTAGTCTGTAG
F THRB-2	ATGACTCCCAACACTATGACAG
R THRB-2	CTAATCTCGAACACTTCCAAG
F RARG-1	AGACCCAGGGACTCTCACAC
R RARG-1	GAGATGGTCACTCTGCTGCCGTA
F RARG-2	ATGGCCACCAATAAGGAGCGACT
R RARG-2	TCAGGCTGGGACTTCAGGCC
F NR3C2-1	GCAACAGGTAGACGGCAGAGA
R NR3C2-1	GGAACTTAAGGCAAACTTCTTC
F NR3C2-2	ATGGAGACCAAAAGGTACACAA
R NR3C2-2	TCACTTCCGCTGGAAGTAGAG
F NR1H2-1	ACCTGGAGAGAGGCTGCTCCGT
R NR1H2-1	TCAGGCAAGGCTGTGGGGCT
F NR1H2-2	ATGTCTCTCTACCACGACT
R NR1H2-2	TCACTCGTGACGTCACAGATC
F RORA-1	GCCGTACCTTCCGATTAGAGCT
R RORA-1	CTTCAGACATTCTAGAAGTGCTT
F RORA-2	ATGCGGGTGACCGTAGCTCCCA
R RORA-2	CTTCAGACATTCTAGAAGTGCTT
F NR1D2 GG	TGCGTCCGTCTCCCATGGAGGTGAATGCAGGAGGTGT
R NR1D2 GG	TGCGTCCGTCTCTGTTAAGGCTGAACTTTAAAGGCCA
F NR1I3 GG	TGCGTCCGTCTCCCATGCCAGTAGGGAAGATGAGCT
R NR1I3 GG	TGCGTCCGTCTCTGTTATCAGCTGCAGATCTCCTGGAGCA
F NR6A1 GG	TGCGTCCGTCTCCCATGGAGCGGACGAACCGCC
R NR6A1 GG	TGCGTCCGTCTCTGTTATCATTCCTTGGCCACACTGGTC
F THRB GG	TGCGTCCGTCTCCCATGACTCCCAACAGTATGACAG
R THRB GG	TGCGTCCGTCTCTGTTACTAATCTCGAACACTTCCAAG
F RARG GG	TGCGTCCGTCTCCCATGGCCACCAATAAGGAGCGACT
R RARG GG	TGCGTCCGTCTCTGTTATCAGGCTGGGACTTCAGGCC
F NR3C2 GG	TGCGTCCGTCTCCCATGGAGACCAAGGCTACACAA
R NR3C2 GG	TGCGTCCGTCTCTGTTATCACTTCCGGTGGAAGTAGAG
F NR1H2 GG	TGCGTCCGTCTCCCATGTCTCTCTACACGACT
R NR1H2 GG	TGCGTCCGTCTCTGTTATCACTCGTGACGTCACAGATC
F RORA GG	TGCGTCCGTCTCCCATGCGGGTGACCGTAGCTCCCA

续表 1

引物名称	引物序列 (5'→3')
R RORA GG	TGCGTCCGTCTCTGTTACCCATCAATTTGCATTGCTG
F 3flag 6A1-2	ACGTCTCTCGACAAAGAGCGGGACGAACCGCCGCT
R 3flag GG	GCTGACCGTCTCCGTCTGATCGCTTTTGTAGTCCA
F 1070	GCTGACCGTCTCCCGTTGATGCCTTTGTATGCATGT
R 1901	GCTGACCGTCTCTAGACGACATGCCCCAAAGCCACCAAGCT
F SV40	ACTCACCGTCTCTTAACGCGCCGACTCTAGATCAT
R CMV	GCTGACCGTCTCTAACGGCTATGAACATATGACCCCGTA
F RLUC	GCTGACCGTCTCTCTACTTCCAAAGTTTATGATCCAGA
R RLUC	GCTGACCGTCTCAAGTTATTTTCATTTTGAAGACTCGCT
F NR6 187	AGCGTCTCGCATGTCACGAGCTCCACACTGTCT
R NR6 268	GACCTCTCTGTTAAATCAACATGCGCGTGCCCA
F 6A1 843	TCGTCTCGCATGCTGCTTTGCCGCTGGCCGA
R 6A1 384	ACGTCTCTGTTATTCTCTGATAGCCTTCCGGTTC
F 1697 GG	GCTGACCGTCTCTACCGTGAGGCACTTCAAAGACTG
R 1689 GG	TGCGTCCGTCTCTCGGTCTGACATTGCTGAGA
F 1703 GG	TGCGTCCGTCTCTTGCCTCAAGGTCGGTCTGTA
R 1686 GG	GCTGACCGTCTCTCGACCGACCTTGAGGCATAC
F amp	TGCGTCCGTCTCCTTGGTCCACTGAGCGTCAGA
R amp	GCTGACCGTCTCTCGAAAACCTACGTTAAGGGAT

1.2.4 HBV DNA 复制中间体的提取及 Southern blot 将 HepG2 细胞接种 12 孔板,细胞转染后第 5 天收集细胞,PBS 清洗后吸干,加 250 μ L 细胞裂解液,37 $^{\circ}$ C 反应 10 min,将各孔内液体转移至 EP 管,4 $^{\circ}$ C 离心后吸上清转移至新的 EP 管;然后依次加入 10 μ L 100 mol/L CaCl_2 ,2 μ L Micrococcal nuclease,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,再依次加入 4 μ L 0.5 mol/L EDTA、10 μ L 10 mg/mL Pronase、10 μ L 10% SDS,震荡混匀,继续孵育 1 h;然后用酚进行 DNA 萃取;离心转移上清至新的 EP 管后加 8 μ L 5 mol/L NaCl,2 倍体积无水乙醇,置于-20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜;过夜后离心弃去上清,70%乙醇离心洗涤沉淀,弃上清,沉淀风干后加入 dd H_2O 重溶。取溶解得到的 HBV DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后进行 Southern blot。碱变性 1 h 后以虹吸法过夜转膜至尼龙膜上;紫外交联固定 DNA,预杂交后将地高辛标记的 DNA 探针于 42 $^{\circ}$ C 杂交炉中过夜杂交,然后用 Roche DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒检测,具体操作按说明书进行。

1.2.5 细胞总 RNA 提取及 Northern blot 细胞总 RNA 抽提使用 TRIzol RNA 提取试剂,严格按照试剂盒说明书使用。取溶解得到的细胞总 RNA 经甲醛-琼脂糖凝胶电泳后行 Northern blot。将 Loading buffer 与样品混匀后于 65 $^{\circ}$ C 下变性 10 min,冰上 1 min;上样后电泳,电泳后将多余的胶切除,用 20 $\times$ SSC 洗 15 min 共 2 次;过夜转膜,然后用 RNA 探针于 68 $^{\circ}$ C 下杂交过夜,接着用 DIG Northern Stater Kit,具体操作按说明书进行。

1.3 数据处理统计学分析

采用 Graphpad Prism5.0 软件绘图,采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。2 组数据之间的比较采用两独立样本 t 检验,多组数据

之间采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 或多个实验组与对照组比较采用 Dunnett 多重比较方法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

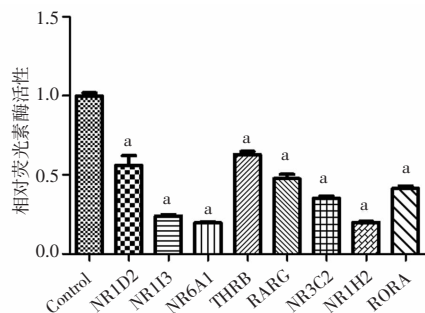
2 结果

2.1 核受体家族重组质粒的构建

以 HepG2 mRNA 逆转录得到的 cDNA 为模板,以巢式 PCR 扩增目的基因,成功扩增出 8 种核受体基因,分别为核受体亚家族 1D 组成员 2(nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2, NR1D2)、核受体亚家族 1I 组成员 3(nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3, NR1I3)、核受体亚家族 6A 组成员 1(nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1, NR6A1)、甲状腺激素受体- β (thyroid hormone receptor beta, THRB)、视黄酸受体- γ (retinoic acid receptor gamma, RARG)、核受体亚家族 3C 组成员 2(nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2, NR3C2)、核受体亚家族 1H 组成员 2(nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2, NR1H2)、视黄酸相关孤儿受体(RAR-related orphan receptor alpha, RORA),然后将其克隆至真核表达质粒。

2.2 影响 HBV 增强子/核心启动子活性的核受体基因初步筛选

由于 HBV 核心启动子活性相对较弱,而海肾荧光素酶(renilla luciferase, Rluc)具有灵敏度高的优点,所以本研究选用海肾荧光素酶为报告基因。利用构建成功的 HBV 增强子/核心启动子报告质粒 pcore-Rluc,在 HepG2 细胞上进行了荧光素酶筛选实验,以寻找对 HBV 增强子/核心启动子活性有抑制作用的核受体家族基因。从筛选结果可以看出(图 1),所有组进行比较有统计学差异($F=99.860, P=0.000$)。采用 Dunnett 多重比较法, NR1D2、NR1I3、NR6A1、THRB、RARG、NR3C2、NR1H2、RORA 与对照组(1.000 ± 0.319)相比,均对该报告基因的表达具有负性调节作用,其荧光素酶活性相对值分别为 NR1D2($0.559 \pm 0.109, P=0.000$), NR1I3($0.239 \pm 0.156, P=0.000$), NR6A1($0.198 \pm 0.009, P=0.000$), THRB($0.628 \pm 0.335, P=0.000$), RARG($0.476 \pm 0.480, P=0.000$), NR3C2($0.353 \pm 0.2209, P=0.000$), NR1H2($0.200 \pm 0.117, P=0.000$), RORA($0.414 \pm 0.25, P=0.000$),其中 NR6A1 在 HepG2 细胞中的作用与对照组相比,使 Rluc 活性下降约 80%。



a: 与对照组比较, $P < 0.05$

图 1 HepG2 细胞中不同核受体基因过表达对荧光素酶活性的影响

2.3 重组质粒 pCH9-NR6A1-Flag 蛋白在 HepG2 细胞中表达检测

HepG2 细胞转染 pCH9-NR6A1-Flag 表达质粒, 2 d 后裂解细胞蛋白进行 Western blot, 检测 NR6A1 的表达。结果显示 pCH9-NR6A1-Flag 转染 HepG2 细胞后在 56 kD 处出现特征性条带, 大小和 NR6A1-Flag 融合蛋白相同($54 \text{ kD} + 2 \text{ kD} \approx 56 \text{ kD}$)(图 2), 说明 NR6A1 重组蛋白表达正确。

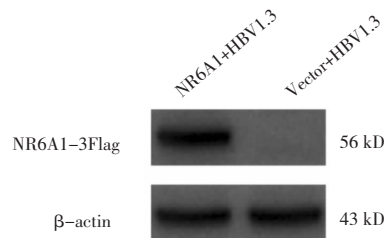
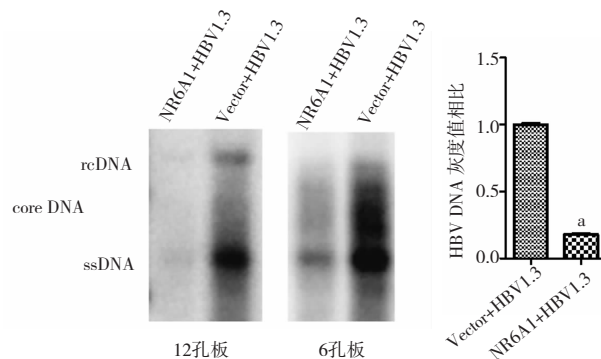


图 2 Western blot 检测 NR6A1 过表达

2.4 NR6A1 在 HepG2 细胞中过表达下调 HBV DNA 复制水平

为了观察 NR6A1 过表达对 HBV DNA 复制的影响, 分别将 NR6A1 表达质粒与 HBV1.3(实验组)或者空载体与 HBV1.3(对照组)共转染 HepG2 细胞, 用 Southern blot 检测细胞内复制的 HBV DNA。Southern blot 结果提示, 实验组 HBV DNA 表达量较于对照组明显下降(图 3), DNA 灰度值定量可得, 实验组与对照组灰度相对值分别为 0.180 ± 0.005 和 1.000 ± 0.015 ($t=71.740, P=0.000$), 说明在 HepG2 细胞中过表达 NR6A1 可以明显抑制 HBV DNA 的复制水平。



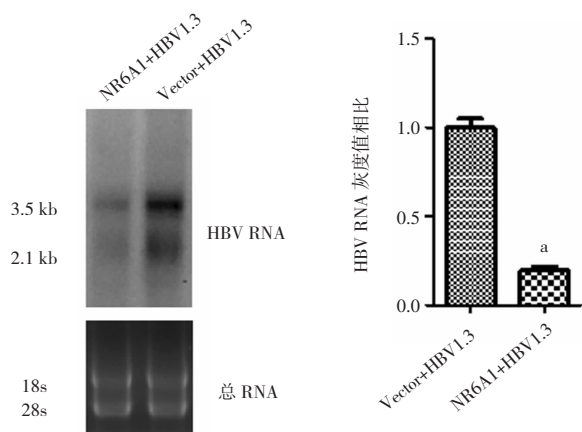
a: 与对照组比较, $P < 0.05$

图 3 NR6A1 过表达在 HepG2 细胞中可抑制 HBV DNA 复制

2.5 NR6A1 在 HepG2 细胞中过表达抑制 HBV RNA 转录

上述结果证明 NR6A1 能够抑制 HBV DNA 复制。为了进一步研究抑制作用是否是通过抑制 HBV RNA 转录水平所引起的, 分别将 NR6A1 表达质粒与 HBV1.3(实验组)或者空载体与 HBV1.3(对照组)共转染 HepG2 细胞, Northern blot 检测细胞总 RNA。Northern blot 结果提示实验组 RNA 表达量相对于对照组明显下降(图 4), RNA 表达灰度值相对定量

可得:实验组与对照组灰度相对值分别为 1.000 ± 0.072 和 0.194 ± 0.035 ($t=14.190$, $P=0.004$),说明在 HepG2 细胞中过 NR6A1 可以显著抑制 HBV 的转录。



a: 与对照组比较, $P < 0.05$

图4 NR6A1 过表达在 HepG2 细胞中可下调 HBV 转录水平

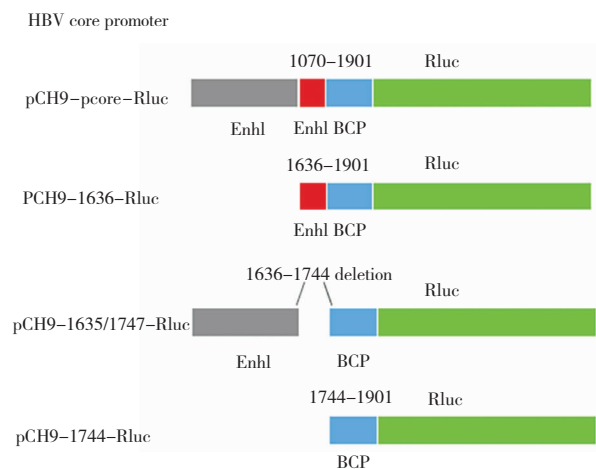
2.6 NR6A1 过表达抑制增强子 II 和核心启动子的活性

上述实验结果说明, NR6A1 能通过减弱 HBV 增强子/核心启动子活性,从而抑制 HBV RNA 转录而下调 HBV DNA 复制。为了进一步确定 NR6A1 在 HBV 增强子或核心启动子作用的序列区域,本研究构建了 3 种 pcore 截短突变体(图 5A),分别包含基本核心启动子(BCP)或者不同的增强子序列,即 BCP+Enh II (PCH9-1636-Rluc)、BCP+Enh I (PCH9-1635/1747-Rluc)和 BCP (PCH9-1744-Rluc)。本研究用 NR6A1 表达质粒或者空载体分别与上述 3 种 HBV 截短突变体以质量比为 1:1 共转染 HepG2 细胞,转染 48 h 后收集细胞进行海肾荧光素酶活性检测,结果显示(图 5B),BCP(核心启动子)+Enh I (PCH9-1635/1747-Rluc)实验组荧光素酶活性相对值 (0.900 ± 0.110) 相对于对照组(空载和 PCH9-1635/1747-Rluc 共转染, 1.000 ± 0.130) 无统计学差异 ($t=1.018$, $P=0.367$),而 BCP (PCH9-1744-Rluc) 实验组荧光素酶活性相对值 (0.504 ± 0.023) 相对于对照组(空载和 PCH9-1744-Rluc 共转染, 1.000 ± 0.099) 下降约 50% ($t=6.534$, $P=0.0226$), BCP+Enh II (PCH9-1636-Rluc) 实验组荧光素酶活性相对值 (0.089 ± 0.002) 相对于对照组(空载和 PCH9-1636-Rluc 共转染, 1.000 ± 0.042) 下降约 92% ($t=31.590$, $P=0.001$)。

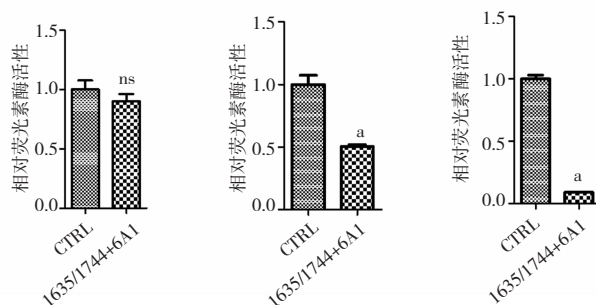
2.7 NR6A1 的铰链区对抑制荧光素酶的活性发挥着重要作用

为了确定 NR6A1 对荧光素酶活性的降低是通过 NR6A1 的那个部分起作用的,本研究对 NR6A1 进行截变体分析,将 NR6A1 分为 2 部分,即 1aa~128aa 的 DBD 和 282aa~449aa 的 LBD(图 6A),用 ACB 分别与 NR6A1DBD、NR6A1LBD 的 2 种截变体和 PACI(阴性对照)、NR6A1(阳性对照)以质量比为 1:1 共转染 HepG2 细胞,转染 48 h 后收集细胞进行海肾荧光

素酶活性检测,结果显示(图 6B),所有组进行比较有差异 ($F=21.494$, $P=0.006$),采用 LSD- t 检验法, NR6A1DBD 组荧光素酶活性 (1.011 ± 0.070) 和阴性对照组 (Vector 和 pcore-Rluc 共转染, 1.000 ± 0.228) 比较无统计学差异 ($t=0.577$, $P=0.928$), NR6A1 LBD 组荧光素酶活性 (0.900 ± 0.017) 和阴性对照组 (Vector 和 pcore-Rluc 共转染, 1.000 ± 0.228) 比较无统计学差异 ($t=0.539$, $P=0.449$)。以上结果提示单独的 NR6A1DBD、NR6A1LBD 并不能发挥作用。接下来构建了 1aa-268aa 的 NR6A1N 和 187aa-476aa 的 NR6A1C 截变体(图 6A),用 pcore-Rluc 分别与包含铰链区的 NR6A1N (NR6A1DBD+Hinge)、NR6A1C (NR6A1LBD+Hinge) 2 种截变体以质量比为 1:1 共转染 HepG2 细胞,结果显示(图 6C)所有组进行比较有差异 ($F=200.736$, $P=0.000$), NR6A1N 组荧光素酶活性 (1.000 ± 0.170) 与阳性对照组 (NR6A1 和 pcore-Rluc 共转染, 1.150 ± 0.141) 比较无统计学差异 ($t=1.488$, $P=0.190$), NR6A1C 组荧光素酶活性 (1.160 ± 0.078) 与阳性对照组 (NR6A1 和 pcore-Rluc 共转染, 1.150 ± 0.141) 比较无统计学差异 ($t=0.884$, $P=0.961$)。以上结果提示 NR6A1DBD、NR6A1LBD 需要铰链区存在时才能发挥对 pcore-Rluc 荧光素酶活性的抑制作用。



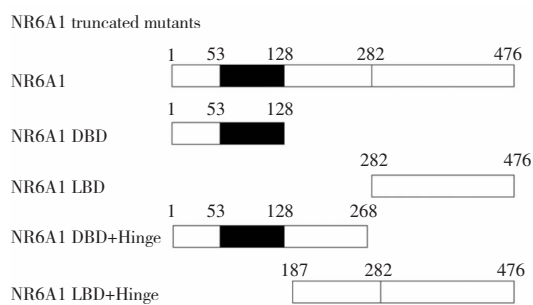
A. 3 种 pcore-Rluc 截短突变体结构图



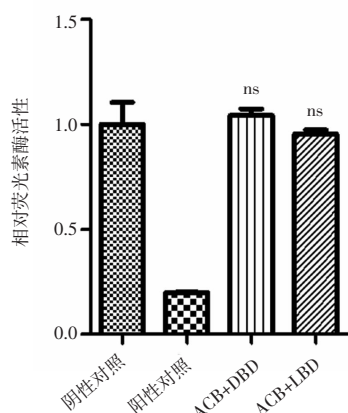
a: 与对照组比较, $P < 0.05$; ns: 与对照组比较, 统计学无差异

B. NR6A1 对 pcore-Rluc 截短突变体荧光素酶活性的影响

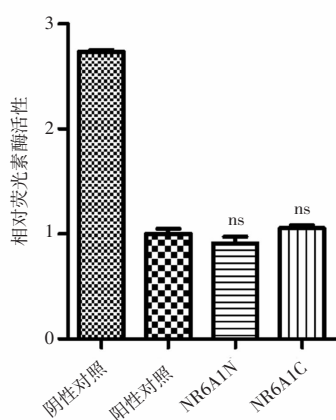
图5 NR6A1 对增强子/核心启动子的作用区域鉴定



A. NR6A1 截短突变体结构图



B. NR6A1 DBD、NR6A1 LBD 截短突变体对 pcCore-Rluc 海肾荧光素酶活性变化的影响

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; ns: 与对照组比较, 统计学无差异

C. NR6A1N、NR6A1C 截短突变体对 pcCore-Rluc 海肾荧光素酶活性变化的影响

图 6 NR6A1 截短突变体对增强子/核心启动子区域荧光素酶活性变化的影响

3 讨论

慢性 HBV 感染已经成为威胁全球的公共卫生问题。研究表明肝硬化和肝癌的发生跟 HBV 的复

制水平有关^[8],探索能够抑制 HBV 的转录和复制的新型抗病毒药物将成为重要的选择。目前已发现一系列核受体通过 4 种启动子和 2 种增强子对乙肝病毒复制和转录发挥着精细的调控,而大多数核受体具有转录激活功能,但对 HBV 转录与复制进行负调控的核受体则少有研究。本研究探讨了 NR6A1 对 HBV 转录与复制的影响。从实验结果可以看出, NR6A1 能够显著抑制荧光素酶的活性,通过与 1.3HBV 共转染,使其 HBV DNA 和 RNA 明显下降。以上研究结果提示 NR6A1 能够显著抑制 HBV 复制与转录,对发展新型抗乙肝病毒策略有一定的潜在价值。

NR6A1 属于核受体第六亚家族^[9]。到目前为止,由于 NR6A1 的配体还未被发现,故 NR6A1 还属于孤儿核受体的范畴,已经在很多物种上克隆得到 NR6A1,包括老鼠^[10]、人类^[11-14]、斑马鱼^[15]、有爪蟾^[16]。该基因定位于人类 9 号染色体的 q33~q34^[14],该核受体与其他核受体超家族成员具有类似的结构,主要由 DNA 结合域(DBD)、配体结合域(LBD)和铰链区组成。其 DBD 高度保守,包含 2 个能和靶基因上的激素应答元件或其他特异性 DNA 序列结合的锌指结构。锌指结构由 DR-,P-,D-box,还有 T-和 A-box 组成,其 p-box 与 RXR 等受体相同为 EGCKG,铰链区可与辅抑制子结合如 N-CoR^[17-18]。与其他核受体不同的是, NR6A1 对靶基因的作用主要表现为抑制效应,因此对生物的很多生命活动发挥着基本的调控作用。比如, NR6A1 通过下调 BMP-15 和 GDF-9 基因的表达调节卵泡发育^[19],也能通过抑制八聚体结合转录因子 4(octamer-binding transcription factor 4, Oct4)基因表达从而调节神经细胞的分化,通过抑制 miR-302a 调节细胞周期蛋白 D1(cyclin D1, CCND1)表达从而调节胚胎干细胞分化^[20-21]。通过对 NR6A1 截变体的分析说明单独的 NR6A1DBD、NR6A1LBD 并不能发挥作用,而需要通过铰链区来抑制 HBV 增强子 II 和核心启动子的活性,可能因为铰链区与辅抑制子结合起着关键作用,下一步本课题组将就此进行进一步的研究。通过对 HBV 增强子/核心启动子截变体的分析,实验结果显示删除增强子 I 的荧光素酶活性变化不明显,而删除增强子 II 和核心启动子的荧光素酶变化明显,提示 NR6A1 在 HBV 上的结合序列存在于增

强子 II 和核心启动子区域。同时实验结果显示当增强子 I 和核心启动子在一起的时候,荧光素酶的活性几乎无变化,当核心启动子单独存在的时候荧光素酶的活性出现变化,可能的原因是增强 I 上的促进乙肝病毒转录与复制的核受体位点与相应的核受体结合抵消了 NR6A1 对基本核心启动子的抑制作用。

参 考 文 献

- [1] Tang H, Delgermaa L, Huang F, et al. The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication[J]. *J Virol*, 2005, 79(9): 5548–5556.
- [2] Li J, Ou JH. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor[J]. *J Virol*, 2001, 75(18): 8400–8406.
- [3] Quasdorff M, Hösel M, Odenthal M, et al. A concerted action of HNF4alpha and HNF1alpha links hepatitis B virus replication to hepatocyte differentiation[J]. *Cell Microbiol*, 2008, 10(7): 1478–1490.
- [4] Lópezcabrera M, Letovsky J, Hu K Q, et al. Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter; trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(13): 5069–5073.
- [5] Bar-Yishay I, Shaul Y, Shlomai A. Hepatocyte metabolic signalling pathways and regulation of hepatitis B virus expression[J]. *Liver Int*, 2011, 31(3): 282–290.
- [6] Lazar MA. Maturing of the nuclear receptor family[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(4): 1123–1125.
- [7] Nassal M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly[J]. *J Virol*, 1992, 66(7): 4107–4116.
- [8] Martinot-Peignoux M, Asselah T, Marcellin P. HBsAg quantification to predict natural history and treatment outcome in chronic Hepatitis B patients[J]. *Clin Liver Dis*, 2013, 17(3): 399–412.
- [9] Owen GI, Zelent A. Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(5): 809–827.
- [10] Chen F, Cooney AJ, Wang Y, et al. Cloning of a novel orphan receptor (GCNF) expressed during germ cell development[J]. *Mol Endocrinol*, 1994, 8(10): 1434–1444.
- [11] Lei W, Hirose T, Zhang LX, et al. Cloning of the human orphan receptor germ cell nuclear factor/retinoid receptor-related testis-associated receptor and its differential regulation during embryonal carcinoma cell differentiation[J]. *J Mol Endocrinol*, 1997, 18(2): 167.
- [12] Kapelle M, KraTzschmar J, Husemann M, et al. cDNA cloning of two closely related forms of human germ cell nuclear factor (GCNF)[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1352(1): 13–17.
- [13] Süsens U, Borgmeyer U. Characterization of the human germ cell nuclear factor gene[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1309(3): 179–182.
- [14] AgoulNIK IY, Cho Y, Niederberger C, et al. Cloning, expression analysis and chromosomal localization of the human nuclear receptor gene GCNF[J]. *FEBS Lett*, 1998, 424(1–2): 73–18.
- [15] Braat AK, Zbergen MA, Vries ED, et al. Cloning and expression of the zebrafish germ cell nuclear factor[J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 53(4): 369–375.
- [16] Joos TO, David R, Dreyer C. xGCNF, a nuclear orphan receptor is expressed during neurulation in *Xenopus laevis*[J]. *Mech Dev*, 1996, 60(1): 45–57.
- [17] Hummelke GC, Cooney AJ. Germ cell nuclear factor is a transcriptional repressor essential for embryonic development[J]. *Front Biosci*, 2001, 6: D1186–1191.
- [18] Yan Z, Jetten AM. Characterization of the repressor function of the nuclear orphan receptor retinoid receptor-related testis-associated receptor/germ cell nuclear factor[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(45): 35077–35085.
- [19] Lan ZJ, Gu P, Xu X, et al. GCNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility[J]. *EMBO J*, 2003, 22(16): 4070–4081.
- [20] Fuhrmann G, Chung AC, Jackson KJ, et al. Mouse germline restriction of Oct4, expression by germ cell nuclear factor[J]. *Dev Cell*, 2001, 1(3): 377–387.
- [21] Wang H, Wang X, Archer TK, et al. GCNF-dependent activation of cyclin D1 expression via repression of Mir302a during ES cell differentiation[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(6): 1527–1537.

(责任编辑:冉明会)