

preS2 荧光融合蛋白的表达及其对人端粒酶 逆转录酶启动子的激活作用

栾芳 张炳昌 王勇 范卫华 成士清 马春红

基金项目:山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2011SW035)

作者单位:250021 济南市,山东大学附属省立医院检验科(栾芳 张炳昌 王勇 范卫华 成士清)

250012 济南市,山东大学医学院免疫学研究所(马春红)

通讯作者:栾芳, E-mail:luanfang2004@126.com

【摘要】 目的 探讨乙型肝炎病毒编码的 preS2 蛋白对人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 启动子的激活作用。方法 PCR 扩增人 preS2 基因, 构建 preS2 与绿色荧光蛋白融合表达的载体 pEGFP-preS2, 共转染后通过荧光显微镜检测融合基因的表达。将 pEGFP-preS2 和 hTERT 全长启动子报告质粒 pGL3B-TRTP 共转染 HepG2 细胞, 48 h 后裂解细胞, 双荧光检测分析 preS2 对 hTERT 启动子的激活作用。结果 荧光显微镜检测证实 pEGFP-preS2 可在体外有效表达 preS2 融合蛋白, 双荧光试验表明 preS2 可显著激活 hTERT 启动子, 此激活作用具有剂量依赖性。结论 成功构建 preS2 绿色荧光融合表达载体, 并初步证实其对 hTERT 启动子的激活作用, 为进一步探讨肝癌发生中 hTERT 表达调控机制奠定基础。

【关键词】 preS2 蛋白; hTERT 启动子; 转录调控; 激活作用

Expression of HBV preS2 in vitro and its transcriptional activation function on hTERT promoter

LUAN Fang, ZHANG Bing-chang, WANG Yong, et al. Department of Clinical Laboratory, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the transcriptional activation function of preS2 on human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter in hepatocellular carcinoma cells HepG2. **Methods** HBV preS2 was amplified with PCR and cloned into pEGFP-N1 to construct expression vector pEGFP-preS2 which could express PEGFP-preS2 fusion protein. The expression of fusion protein in HepG2 cells was assayed under fluorescence microscope after cotransfection. pEGFP-preS2 and pGL3B-TRTP to cotransfect HepG2. Splitting cells after 48 h and dual-luciferase were used to detect activation of preS2 to hTERT promoter. **Results** The results of fluorescence microscope detecting showed that pEGFP-preS2 could express preS2 fusion protein in vitro. Dual-luciferase reporter assay system confirmed that preS2 had transcriptional activation function on hTERT promoter in HepG2 cells and the transactivation was dose dependant. **Conclusion** HBV preS2 green fluorescence fusion expression vector is successfully constructed and tentatively confirming its activation to hTERT promoter. It provide base for the regulation mechanism of hTERT to hepatocarcinogenesis.

【Key words】 preS2 protein; hTERT promoter; Transcriptional regulation; Activation

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是严重危害人类生命的恶性肿瘤, 全世界每年新发病例 100 万, 中国是 HCC 的高发地区, 病例数约占全球 HCC 病例的 55%^[1-3]。乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是 HCC 发生的主要危险因素, 临床研究发现 63.2% 的肝癌患者乙肝表面抗原阳性^[4]。因此, 揭示 HBV 相关 HCC 分子发病机制极为重要和迫切。

HBV 相关 HCC 的发生是多基因、多步骤、多阶

段的过程, HBV DNA 可以直接整合到宿主细胞基因组发挥其顺式激活作用, 也可以通过其编码蛋白发挥反式激活作用。HBV 及其蛋白对宿主多种基因尤其是肿瘤相关基因的调控, 在 HCC 发生中发挥重要作用。寻找受 HBV 调控的宿主关键基因并阐明其机制, 不仅有助于揭示 HBV 相关 HCC 发生机制, 还将为 HCC 的治疗提供新靶点。

本文研究在前期研究基础上, 结合当今研究进展, 选择 HCC 相关重要宿主基因——人端粒酶逆转

录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT), 深入研究 HBV 对 hTERT 的调控作用及其在 HCC 发生中的作用。

端粒酶的活化和端粒长度的维持与肝细胞永生化和密切相关。HBV 相关 HCC 中, 100% 的端粒酶呈激活状态, 且 hTERT 表达上调^[9]。本室前期研究^[6]发现, HCC 细胞系 HepG2 中过表达 HBV 反式激活蛋白 preS2 可以上调 hTERT 表达, 提示 preS2 介导的 hTERT 激活是 HBV 相关 HCC 发生的重要机制, 本文研究将在此基础上进一步阐明其机制。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株 质粒 pUC19/3.0HBV 由日本 Oita Medical University 的 Akira Nishizono 教授惠赠。真核表达载体 pEGFP-N1、pGL3-Basic、pRL-TK 购自 Promega 公司。

preS2 蛋白表达载体质粒 pcS2-HA, hTERT 全长启动子报告质粒 pGL3B-TRTP 为山东大学医学院免疫学研究所保存质粒。大肠杆菌 JM109 为本室保存菌种, 不具有氨苄青霉素抗性, 可作为宿主菌供载体扩增和原核表达。

1.2 细胞和细胞培养 非洲绿猴肾细胞系 COS-7 (ATCC) 由山东大学遗传研究所馈赠, 以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养。HCC 细胞系 HepG2 (ATCC HB-8065)、HepG2.2.15 (整合有 4 拷贝的 HBV DNA, 可稳定表达 HBV 抗原)、BEL7402、正常永生生化肝细胞系 LO2 购自上海中国科学院细胞所, 本室常规培养。HepG2 (ATCC), HepG2.2.15 以含 10% 胎牛血清的 Minimum Essential Medium 另加 1 mmol/L 的丙酮酸钠培养液培养, BEL7402、LO2 传代于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基中, 所有细胞均在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

1.3 仪器与试剂 工具酶: HindIII、PstI 及 T4 DNA 连接酶购自大连宝生物公司; 2×Pfu Taq PCR Master Mix 购自北京天为时代科技有限公司; DNA 分子量 Marker: DL15 000 以及 DL2000 购自大连宝生物公司; 质粒 DNA 小量提取及大量提取试剂盒和 PCR 产物回收试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司; 胎牛血清购自天津血液研究所; 引物、Olig(dt) 由上海博亚生物技术有限公司合成; 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 试剂盒购自美国 Sigma 公司; DAPI 购自美国 Sigma 公司; 双荧光素酶检测试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.4 pEGFP-preS2 融合蛋白表达载体的构建 根

据 GeneBank 公布的 adr 亚型 HBV 全基因序列 (gi: 59404), 设计特异性针对 preS2 基因片段的 PCR 引物: 上游引物 Forward (含 HindIII 酶切位点): 5'-AAGCTTCCACCATGCAGTGGAAGTCTC-3'; 下游引物 Reverse (含 PstI 酶切位点): 5'-TACTGCAGTGTGTTCTCCATGTTCCGGTG-3'。

PCR 反应条件如下: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 45 s, 共循环 30 次; 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经酶切回收后分别克隆至 pEGFP-N1 HindIII、PstI 位点, 构建含有 preS2 基因的重组质粒 pEGFP-preS2。以上重组子经单、双酶切, PCR 及 DNA 测序鉴定。

1.5 pEGFP-preS2 在 HepG2 细胞中的表达与核定位 将 HepG2 细胞在正常含血清的培养基中培养 24 h, 细胞长至培养基的 80% 时, 以 Lipofectamine™ 2000 介导 pEGFP-preS2 转染细胞, 转染 48 h 后的细胞经 4% 的多聚甲醛 PBS 在室温固定 15 min, PBS 漂洗三次, 含 0.5% Triton-X-100 的 PBS 在室温穿孔 15 min, DAPI 染色液室温作用 15 min 以上, 荧光显微镜下观察, 用 UV 波段激发, 照相保存实验结果。

1.6 preS2 蛋白对 hTERT 启动子反式激活作用的研究 preS2 表达载体 pcS2-HA 与 hTERT 启动子报告质粒 pGL3B-TRTP 各 0.5 μg 共转染肝永生细胞 LO2、肝癌细胞 HepG2、BEL7402 以及非洲绿猴肾细胞 COS-7, 48 h 后裂解细胞, 双荧光素酶报告基因检测 preS2 对 hTERT 启动子的作用; 同时在 HepG2 细胞中分别用 0 μg、0.25 μg 及 0.5 μg pcS2-HA 与 0.5 μg pGL3B-TRTP 质粒共转染双荧光检测, 验证 preS2 对 hTERT 作用的剂量依赖性。

2 结果

2.1 重组子的构建

2.1.1 质粒 pEGFP-N1 的鉴定 以 HindIII 和 PstI 分别单酶切质粒 pEGFP-N1, 以 DL15 000 为分子量 Marker, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示一条 4.7 kb 的 DNA 带, 与预期一致。见图 1A。

2.1.2 目的基因片段的获得 以 pUC19/3.0HBV 为模板, 利用 preS2 引物, PCR 扩增 preS2 基因片段, 2% 琼脂糖凝胶电泳显示 214 bp 的特异性扩增片段, 与预期分子量一致。见图 1B。

2.1.3 目的基因与载体的酶切回收 回收获得的 preS2 基因 PCR 产物, 经 HindIII、PstI 双酶切, 产物回收后, 紫外分光光度计测定 DNA 纯度 (OD260/OD280) 为 1.78, DNA 浓度为 280 μg/mL。pEGFP-N1

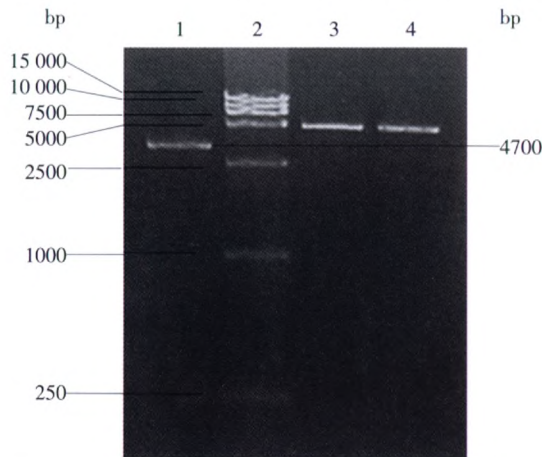


图 1A 质粒 pEGFP-N1 的 HindIII 和 PstI 的酶切电泳

注:1、质粒 pEGFP-N1;2、分子量参照 DL15 000;3、HindIII 单酶切质粒 pEGFP-N1;4、PstI 单酶切质粒 pEGFP-N1

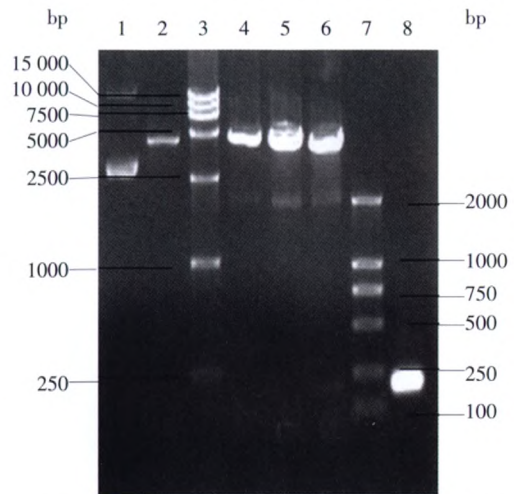


图 1C 重组质粒 pEGFP-preS2 的酶切及 PCR 鉴定

注:1、质粒 pEGFP-preS2;2、HindIII 单酶切质粒 pEGFP-N1;3、分子量参照 DL15 000;4、HindIII 单酶切质粒 pEGFP-preS2;5、PstI 单酶切质粒 pEGFP-preS2;6、HindIII 和 PstI 双酶切质粒 pEGFP-preS2;7、分子量参照 DL2000;8、preS2 基因(214 bp)

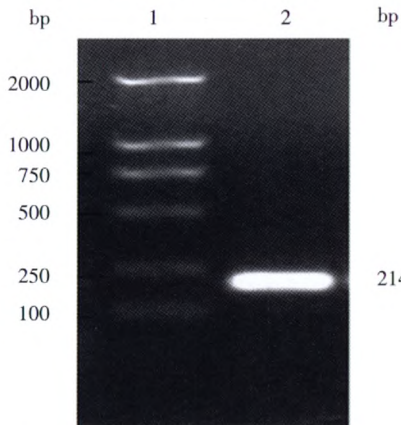


图 1B 目的基因 preS2 的 PCR 扩增

注:1、分子量参照 DL2000;2、preS2 基因(214 bp)

空载体双酶切后回收, DNA 纯度和浓度分别为 (OD260/OD280)1.78 和 110 μg/mL。

2.1.4 阳性重组子的酶切和 PCR 筛选 将酶切回收的目的基因 DNA 与相应酶切载体连接过夜, 并转化感受态菌 JM109, 涂布 LK 平板, 37 °C 倒置培养过夜。分别随机挑取 10 个单克隆, 提取质粒 DNA, 分别经 HindIII 单酶切鉴定重组子大小和经 HindIII+PstI 双酶切鉴定插入片段大小。酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示, 经 HindIII、PstI 单酶切可见约 4.9 kb 的条带, 而双酶切可见 4.7 kb 和 214 bp 左右的两条带, PCR 产物电泳后可见 214 bp 条带 (图 1C), 与预期一致。

2.2 阳性重组子的鉴定-DNA 自动测序与序列分析

利用测序引物 T7 对酶切筛选阳性的重组子进行 DNA 自动测序, 并对结果进行 BLAST 同源性分析, 测序结果见图 1D。同源性分析结果显示, 所测序列与 GeneBank 公布的 adr 亚型 HBV 全基因序列 [gi:

59404] 中的 preS2 基因片段 100% 同源, 表明成功构建包含 preS2 基因的真核表达载体 pEGFP-preS2。

2.3 DAPI 核染色后荧光显微镜观察 preS2 的核定位表达 pEGFP-preS2 转染 HepG2 细胞后 48 h, 经 DAPI 处理, 染色细胞核, 置于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达, 结果显示 pEGFP-preS2 转染后可介导 preS2-EGFP 融合蛋白表达, 且绿色荧光明显集中在细胞核内 (图 2), 提示 preS2 具有核定位能力, 具有转录因子的特点。

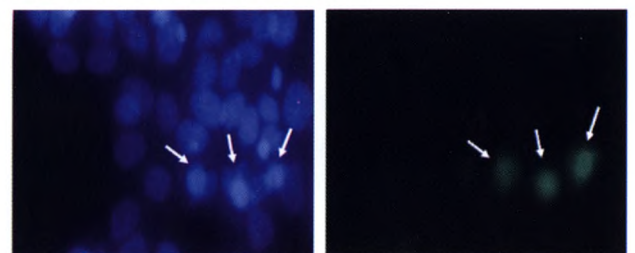


图 2 重组质粒 pEGFP-preS2 的核定位能力

注:箭头示重组质粒 pEGFP-preS2 在细胞核内的表达, 表明 preS2 蛋白具有核定位能力

2.4 preS2 上调全长 hTERT 启动子活性, 并且具有剂量依赖性

2.4.1 preS2 在不同细胞中对 hTERT 启动子的激活作用 preS2 表达载体与全长 hTERT 启动子控制的 luciferase 报告质粒共转染 LO2、BEL7402、HepG2 和 COS-7, 同时转染表达猴肾荧光素酶的 pRL-TK 为内参照, 双荧光素酶报告基因检测系统结果显示, 在不同细胞系中 preS2 对 hTERT 启动子均具有明显的反式激活作用, 与空载体转染组相比, preS2 对

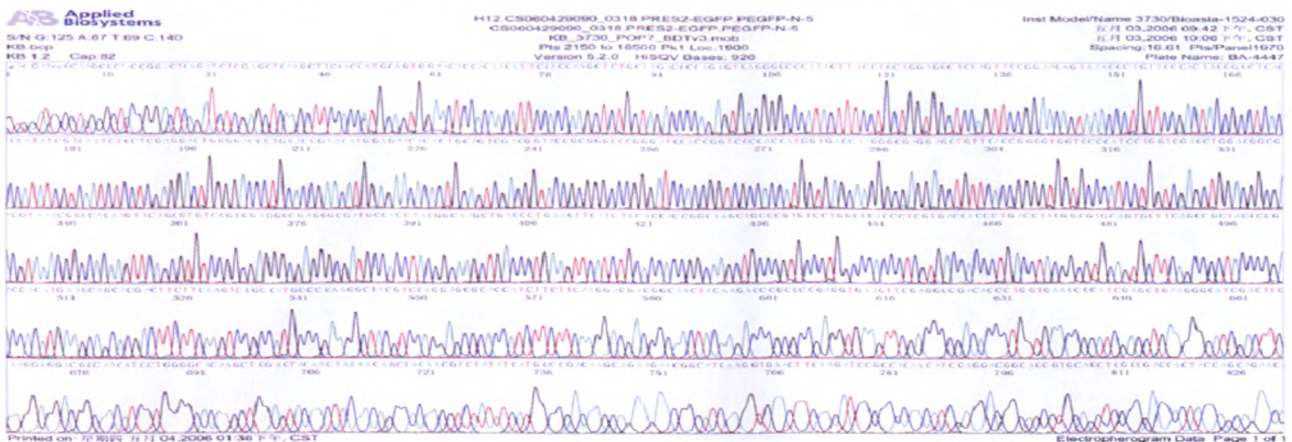


图 1D 测序鉴定重组质粒 pEGFP-preS2

hTERT 启动子的激活作用分别为 2.469 倍、2.933 倍、2.556 倍、2.426 倍(表 1),提示 preS2 对 hTERT 的激活作用没有细胞特异性。

表 1 pGL3B-TRTP 分别与 pcS-HA、pcDNA3 共转染后双荧光检测结果

细胞系	pcS2-HA/pGL3B-TRTP (平均值)	pcDNA3/pGL3B-TRTP (平均值)	比值
LO2	24.69	10.00	2.469
BEL7402	29.33	10.00	2.933
HepG2	25.56	10.00	2.556
COS-7	24.26	10.00	2.426

2.4.2 HepG2 细胞中 preS2 对 hTERT 反式激活作用的剂量依赖性 不同剂量(0/0.25/0.5 μg)preS2 表达载体与全长 hTERT 报告质粒(0.5 μg)共转染 HepG2 细胞,同时转染表达猴肾荧光素酶的 pRL-TK 为内参照,双荧光素酶报告基因检测系统检测显示,preS2 对 hTERT 启动子反式激活作用具有剂量依赖性。见图 3。

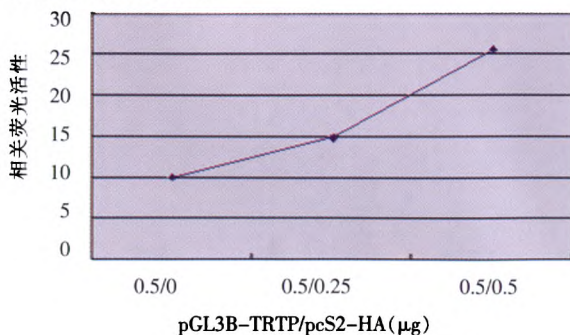


图 3 HepG2 细胞系中 preS2 对

hTERT 启动子剂量依赖性的反式激活作用

3 讨论

近期研究显示端粒酶的激活存在于大多数恶性肿瘤发生过程中,也包括 HCC^[7,8]。前期研究发现 HepG2 细胞转染 HBV DNA 编码的 preS2 蛋白后,

细胞端粒酶活性增强,hTERT 表达升高,细胞增殖能力提高,但 preS2 激活 hTERT 的机制仍不清楚。

整合的 HBV DNA 编码的 HBx 蛋白是一种重要的转录激活因子,能够反式激活同源/异源的病毒/细胞转录调节序列,与乙型肝炎的慢性化和促进肝细胞的转化有密切关系^[9,10]。

目前有关截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白(truncated middle surface protein of hepatitis B virus, MHBs')反式激活机制的研究尚不多。MHBs' 的反式激活效应是以 preS2 区域胞浆定位为基础的。1992 年 Natoli 等^[11]研究发现 preS2/S 编码的反式激活因子与蛋白激酶 C 依赖的信号途径有关。1994 年 Lauer 等^[12]深入研究发现 MHBs' 可能通过 AP-1 反式激活 c-myc 启动子。2000 年 Alka 等^[13]进一步证实 MHBs' 蛋白具有 DNA 结合功能,由此可对多种病毒基因和细胞周期调节基因具有激活作用,进而诱发肿瘤发生。Hildt 等^[14]在研究转基因鼠中发现 MHBs' 蛋白可激活 c-raf-1/Erk2 信号传导途径,促进肝细胞增殖。这些研究表明,MHBs' 能够影响多种细胞信号传导途径,激活多种病毒及细胞基因启动子,具有广泛的反式激活作用。然而,MHBs' 的有效反式激活片段 preS2 在 HBV 感染后 HCC 发生中到底影响了哪些关键基因,其通过什么分子途径影响肝细胞的恶性变,迄今尚未见相关报道。

本文研究成功构建了包含 preS2 基因的真核表达载体 pEGFP-preS2,并初步证实其对 hTERT 启动子有激活作用。几乎所有 HBV 相关 HCC 都有病毒 DNA 的肝细胞染色体整合,整合的病毒 DNA 并不存在固定的宿主染色体整合位点,而是发生高度重排,并且 HBV 也不存在经典的癌基因,所以病毒癌基因机制不能解释 HBV 导致 HCC 的发生。而病毒编码的蛋白对宿主细胞生长的调节作用可能是

HBV 致癌的主要因素。

端粒被形象地称为“有丝分裂时钟”,hTERT 是延长端粒过程中的限速酶。HBV 感染后可以直接整合到 hTERT 基因启动子区域,以顺式作用方式激活肝癌细胞中的 hTERT 基因^[15,16]。在前期研究中发现,仅具有 preS2 区的截短中蛋白(表达载体 pcS2-HA)的反式激活作用强于带有疏水区 I 的截短中蛋白(表达载体 pcTS-HA),稳定表达 preS2 蛋白的 HepG2 细胞系 HepG2/pcS2-HA,其细胞增殖能力、软琼脂集落形成能力、端粒酶活性均较亲本细胞 HepG2 明显增强,并且当反义封闭 hTERT 后,细胞系 HepG2/pcS2-HA 的细胞增殖能力明显降低^[16,17]。这些结果提示,preS2 蛋白可能通过反式激活 hTERT 的表达,持续活化端粒酶并进一步导致细胞的无限增殖,是 HBV 相关 HCC 发生的重要机制之一。hTERT 的调控主要发生在转录水平,本文研究也证实 preS2 蛋白通过反式激活 hTERT 启动子从而影响端粒酶的活性。

本文研究初步确定 HBV 编码的 preS2 蛋白通过反式激活 hTERT 启动子上调 hTERT 的表达,进而参与细胞恶性变,为阐明 HBV 相关 HCC 致病机制提供了新思路,也为 HCC 治疗提供了新靶点。

4 参考文献

- 1 Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 2003, 362:1907-1917.
- 2 Bosch FX, Ribes J, Díaz M, et al. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*, 2004, 127:S5-S16.
- 3 Liu CJ, Kao JH. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiology and pathogenic role of viral factors. *J Chin Med Assoc*, 2007, 70:141-145.
- 4 Ahn SH, Park YN, Park JY, et al. Long-term clinical and histological outcomes in patients with spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance. *J Hepatol*, 2005, 42:188-194.
- 5 Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M, et al. Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res*, 1995, 55:2734-2736.
- 6 Liu H, Luan F, Ju Y, et al. In vitro transfection of the hepatitis B virus

- PreS2 gene into the human hepatocarcinoma cell line HepG2 induces upregulation of human telomerase reverse transcriptase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 355:379-384.
- 7 Horikawa I, Barrett JC. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis*, 2003, 24:1167-1176.
- 8 Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene*, 2001, 269:1-12.
- 9 Spandau DF, Lee CH. Transactivation of viral enhancers by the Hepatitis B virus X protein. *Journal of virology*, 1998; 62:427-434.
- 10 Kim JH, Kang S, Kim J, et al. Hepatitis B virus Core Protein Stimulates the Proteasome-Mediated Degradation of Viral X Protein. *Journal of virology*, 2003, 77:7166-7173.
- 11 Natoli G, Adantaggiati ML, Balsano C, et al. Characterization of the Hepatitis B virus pre-S/S region encoded transcriptional transactivator. *Virology*, 1992, 187:663-670.
- 12 Lauer U, Ueiss L, Lipp M, et al. The Hepatitis B virus pre-S/St transactivator utilizes AP-1 and other transcriptional factors for transactivation. *Hepatology*, 1994, 19:23-31.
- 13 Alka S, Hemlata D, Vaishali C, et al. Hepatitis B virus surface (s) transactivator with DNA binding properties. *J Med Virol*, 2000, 61:1-10.
- 14 Hildt E, Munz B, Saher G, et al. The preS2 activator MHBst of Hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in the transgenic mice. *EMBO J*, 2002, 21:525-535.
- 15 Horikawa I, Barrett JC. cis-Activation of the human telomerase gene (hTERT) by the hepatitis B virus genome. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93:1171-1173.
- 16 Feitelson MA, Lee J. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*, 2007, 252:157-170.
- 17 Luan F, Liu H, Gao L, et al. Hepatitis B Virus preS2 protein favours HCC development via hTERT transcriptional activation in a novel preS2 responsive-region dependant manner. *GUT*, 2009, 58:1528-1537.

(收稿日期:2011-06-30)

(本文编辑:杨军)