

# HBV调节胶原三股螺旋重复蛋白1表达的机制探讨

蔡春林, 陈伟红, 卓菲, 龙冬玲, 黎剑华

深圳市罗湖区疾病预防控制中心(深圳, 518020)

**摘要:目的** 探讨乙型肝炎病毒(HBV)对胶原三股螺旋重复蛋白1(CTHRC1)表达的影响及其调节的分子机制。**方法** 将HBV感染性克隆pHBV1.3及其单个基因的质粒分别与CTHRC1基因启动子共转染HepG2细胞,并测定荧光素酶的活性;采用反转录PCR和Western blot检测CTHRC1 mRNA和蛋白表达的情况。**结果** HBV X蛋白能够在HepG2细胞显著激活CTHRC1基因启动子的活性,并在mRNA和蛋白水平上调CTHRC1的表达。**结论** HBV通过X蛋白上调CTHRC1的表达。

**关键词:**乙型肝炎病毒;胶原三股螺旋重复蛋白1;X蛋白;机制

## Exploration of the regulatory mechanism of HBV on the expression of CTHRC1

CAI Chun-lin, CHEN Wei-hong, ZHUO Fei, Long DONG-ling, Li Jian-hua

(Luohu Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China)

**Abstract:Objective** To explore the effect of hepatitis B virus(HBV) on the expression of collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1) and its regulatory mechanism. **Methods** HepG2 cells were co-transfected with CTHRC1 gene promoter and HBV infectious clone pHBV1.3 and plasmids carrying individual genes of HBV, luciferase activity was measured, mRNA and protein expression of CTHRC1 were measured by RT-PCR and western blot. **Results** HBV X protein can activate CTHRC1 gene promoter activity as well as upregulate CTHRC1 mRNA and protein expression in HepG2 cells. **Conclusions** HBV upregulate the expression of CTHRC1 via HBV X protein.

**Key words:**Hepatitis B virus; Collagen triple helix repeat containing 1; X protein; Mechanism

HBV感染引起急慢性肝炎,最终导致肝癌的发生。据统计,全球近3.5亿HBV携带者,因此,HBV严重危害人类健康,但其致病机理不明。胶原三股螺旋重复蛋白1(CTHRC1)是2005年新发现的基因,参与调节骨组织形成<sup>[1]</sup>,同时CTHRC1是Wnt蛋白辅助因子,通过固定配合基的受体选择性激活Wnt/PCP途径,在肿瘤的形成过程中起到重要作用<sup>[2]</sup>。我们前期利用基因芯片技术发现HBV能够上调CTHRC1的表达,但其具体机制不清楚。本研究主要是探讨HBV调节CTHRC1表达的分子机制,为进一步揭示HBV的致病机理提供思路。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人肝癌细胞系HepG2由武汉大学典型培养物保藏中心提供;CTHRC1基因启动子pCTHRC1-Luc和HBV感染性克隆pBlue-ks-HBV1.3(pHBV1.3)质粒由本室构建;M-MLV逆转录酶、RNA提取试剂Trizol R和脂质体转染试剂Lipofectin2000购自美国Invitrogen公司;Luminometer荧光检测仪购自BioRad公司(美国);抗-CTHRC1单克隆抗体购自美国Promega公司;

**1.2 HepG2细胞培养** HepG2细胞培养在含10%小牛血清的RPMI1640培养基中,于37℃,5%的CO<sub>2</sub>条件下培养,生长至对数期状态备用。转染前将HepG2细胞接种24孔板或6孔板;基金:广东省医学科研基金(编号:A2013614和A2014663)

**作者简介:** 蔡春林,女,博士,副主任技师,研究方向:病毒学和免疫学

板上，待细胞生长至丰度至 80~90%时备用。

**1.3 HepG2 细胞的转染** 将质粒 DNA 和 Lipofectamine 2000 转染试剂分别稀释在无血清无双抗的 RPMI1640 培养基中后混匀，室温下作用 20min，将配制好的转染液加入细胞培养板中，细胞置 CO<sub>2</sub> 培养箱内继续培养。

**1.4 荧光素酶测定** 转染后的 HepG2 细胞培养 48h 后，加入裂解液裂解细胞，取 10  $\mu$ L 的细胞裂解液和 100  $\mu$ L 的荧光色素酶底物混匀，Luminometer 测定其光密度，实验重复 3 次。

**1.5 RT-PCR 检测** 提取 HepG2 细胞总 RNA，反转录酶合成相应的 cDNA，以 cDNA 为模板，用 CTHRC1 基因的检测引物进行 PCR 扩增，引物序列如下：CTHRC1 基因的检测引物 5' GGACACCCAACTACAAGC 3' (上游引物)，5' ACATCCACTAATCCAGCAC 3' (下游引物) 进行 PCR 扩增，设立  $\beta$ -actin 的检测引物作为内参。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.6 Western blot 检测** 取一定量蛋白样品进行 12% SDS-PAGE 进行分离，电泳结束后将蛋白转到硝酸纤维素 NC 膜上，分别加入抗-CTHRC1 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗温育，PBST 洗膜后采用 ECL 显色系统进行显色。

## 2 结果

**2.1 HBV 激活 CTHRC1 基因启动子活性** 为探讨 HBV 对 CTHRC1 表达的影响，我们将 HBV 感染性克隆 pHBV1.3 和含 CTHRC1 基因启动子的质粒 pCTHRC1-Luc 共转染 HepG2 细胞<sup>[3]</sup>，以共转染空载体 pBlue-ks 和 pCTHRC1-Luc 作为对照。结果显示，转染 pHBV1.3 荧光素酶活性为  $(876.8 \pm 25.9)$  RUL/ $\mu$ g 蛋白，转染 pBlue-ks 荧光素酶活性为  $(266.3 \pm 18.5)$  RUL/ $\mu$ g 蛋白，表明 HBV 能够在 HepG2 细胞上调 CTHRC1 启动子活性（见图 1）。

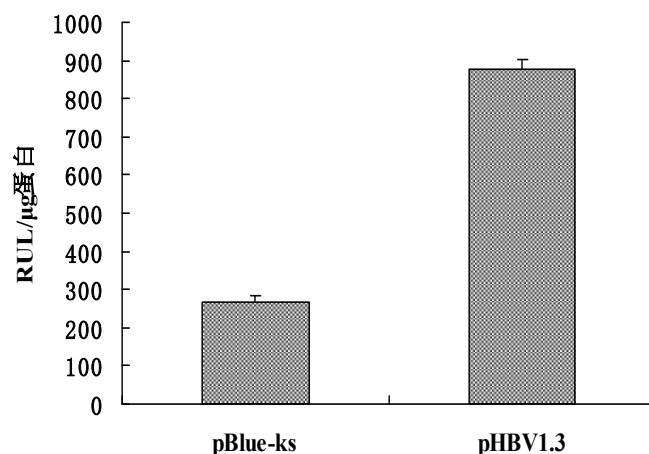


图 1 HBV 对 CTHRC1 基因启动子的激活作用

**2.2 HBV X 蛋白激活 CTHRC1 的启动子活性** 将含 HBV 基因组中所有单个质粒的真核表达载体 (pCMV-S、pCMV-X、pCMV-P、pCMV-E、pCMV-C) 分别与含 CTHRC1 基因启动子的质粒 pCTHRC1-Luc 共转染 HepG2 细胞，以共转染空载体 pCMV-tag2B 和 pCTHRC1-Luc 作为对照。

结果显示，转染 HBV 各个基因的后荧光素酶活性分别为(328.5±21.5)RUL/μg 蛋白，(921.6±26.6)RUL/μg 蛋白，(239.8±15.7) RUL/μg 蛋白，(205.1±13.7)RUL/μg 蛋白，(385.7±24.4) RUL/μg 蛋白，转染 pCMV-tag2B 荧光素酶活性为(252.9±16.4) RUL/μg 蛋白，表明 HBV X 蛋白能够显著上调 CTHRC1 基因启动子活性（见图 2）。

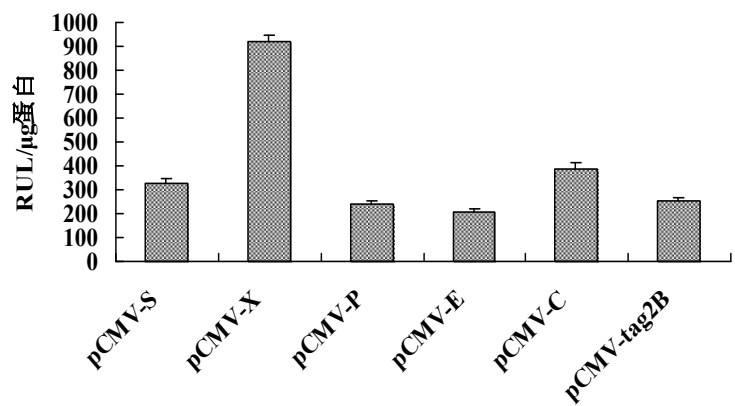


图 2 HBV 各个基因对 CTHRC1 基因启动子活性的调节作用

**2.3 HBV X 蛋白上调 CTHRC1 mRNA 和蛋白的表达** 为进一步探讨 HBV X 蛋白对 CTHRC1 表达的影响，我们将 X 蛋白基因真核表达质粒 pCMV-X 转染 HepG2 细胞，以转染空载体 pCMV-tag2B 作为对照。结果显示，转染 pCMV-X 后，CTHRC1 mRNA 和蛋白的表达明显上调，表明 HBV X 蛋白能够上调 CTHRC1 的表达情况（见图 3 和图 4）。

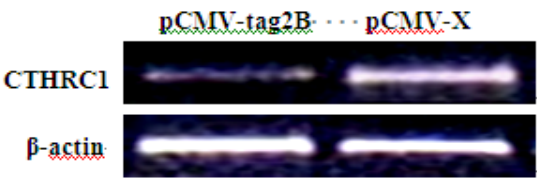


图 3 HBV X 蛋白对 CTHRC1 mRNA 表达的影响

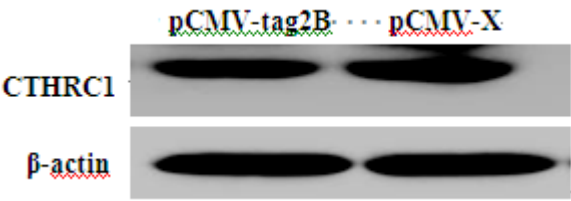


图 4 HBV X 蛋白对 CTHRC1 蛋白表达的影响

### 3 讨论

HBV 属于嗜肝病毒科，其基因组是一个长约 3200 对碱基的不完全双链环状 DNA，至少含有四个开放读码框，分别为 S、C、P 和 X 区，编码 HBV 外膜蛋白、核壳蛋白、聚合酶和 X

蛋白。

前期工作中,我们通过体内外实验证实了 HBV 感染能够上调 CTHRC1 的表达,但其具体机制不明。为探讨 HBV 调节 CTHRC1 表达的机制,我们采用荧光报告基因系统检测了 HBV 基因对 CTHRC1 启动子的调节作用。荧光报告基因系统以荧光素为底物,在荧光素酶的作用下,催化荧光素成为氧化荧光素,在荧光素酶氧化的过程中,会发出生物荧光,通过荧光的强度变化来判断基因启动子的变化。本研究中,我们将 HBV 各个基因的真核表达载体分别与 CTHRC1 基因启动子共转染 HepG2 细胞,检测结果发现 HBV 感染性克隆 pHBV1.3 能够上调 CTHRC1 启动子的活性,而 HBV X 基因其调节作用最强,我们进一步采用 RT-PCR 和 Western blot 证实 X 蛋白能够分别从 mRNA 水平和蛋白水平上调 CTHRC1 的表达。

HBV X 蛋白含有 154 个氨基酸,其分子量为 17Kda,在 HBV 致癌过程中起到重要作用,可通过影响细胞生存和前凋亡信号途径,以及通过 p53 依赖和非依赖方式抑制肝细胞 DNA 的修复等<sup>[4]</sup>。研究证实 CTHRC1 参与肿瘤的发生和转移,因此,HBV 可能通过 X 基因上调 CTHRC1 的表达,进而促进肿瘤的发生和发展。

HBV X 基因是一个弱的转录激活蛋白,但可以激活很多细胞和病毒的启动子,能够调节各种蛋白的表达,其转录激活作用通过了大量的 DNA 元件,如 NF- $\kappa$ B, AP-1, C/EBP, CREB/ATF, SP1 和 NF-AT 的结合位点等<sup>[5]</sup>。HBV X 基因通过哪种信号通路调节 CTHRC1 的表达尚待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Takeshita S, Fumoto T, Matsuoka K, et al. Osteoclast-secreted CTHRC1 in the coupling of bone resorption to formation[J]. J Clin Invest, 2013, 123(9):3914-24.
- [2] Ma MZ, Zhuang C, Yang XM, et al. CTHRC1 acts as a prognostic factor and promotes invasiveness of gastrointestinal stromal tumors by activating Wnt/PCP-Rho signaling[J]. Neoplasia. 2014, 16(3):265-78, 278.e1-13.
- [3] Wang FB, Zhu CL, Liu X, et al. HBV inhibits apoB production via the suppression of MTP expression[J]. Lipids Health Dis, 2011, 11;10:207.
- [4] Dai Y, Cros MP, Pontoizeau C, et al. Downregulation of transcription factor E4F1 in hepatocarcinoma cells: HBV-dependent effects on autophagy, proliferation and metabolism[J]. Carcinogenesis, 2014, 35(3):635-50.
- [5] Rawat S, Clippinger AJ, Bouchard MJ. Modulation of apoptotic signaling by the hepatitis B virus X protein[J]. Viruses, 2012, 8;4(11):2945-72.