

丙型肝炎病毒 NS4B 蛋白调控 Hep3B 细胞非折叠蛋白质反应研究

张艳妮, 张庆华, 陈瑶, 刘好桔, 刘志文, 孔令保*

(江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 研究表达的丙型肝炎病毒(HCV) NS4B 对 Hep3B 细胞非折叠蛋白质反应的影响。NS4B 重组真核表达质粒 pcDNA3.1(-) NS4B 通过脂质体转染 Hep3B 细胞, G418 筛选和 Western blot 鉴定稳定转染细胞; RT-PCR 检测稳定转染细胞内 XBP1 mRNA 剪接, Western blot 鉴定 ATF6 蛋白切割, 荧光素酶试验检测稳定转染细胞内 GRP78 和 XBP1 启动子活性。G418 筛选和 Western Blot 鉴定证实获得稳定表达 NS4B 的 Hep3B 细胞; 在该细胞内, XBP1 mRNA 剪接、ATF6 切割、XBP1 和 Grp78 启动子激活均被检测到。NS4B 在 Hep3B 的稳定表达诱导了非折叠蛋白质反应。

关键词: 丙型肝炎病毒; NS4B; Hep3B; 非折叠蛋白质反应

中图分类号: R373 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)01-0165-05

Regulation of Unfolded Protein Response in Hep3B Cells by HCV NS4B

ZHANG Yan-ni, ZHANG Qing-hua, CHENG Yao,
LIU Hao-ju, LIU Zhi-wen, KONG Ling-bao*

(College of Bioscience and Engineering, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: To study the effect of hepatitis C virus NS4B on unfolded protein response in Hep3B cells. The recombinant vector pcDNA3.1(-) NS4B with NS4B gene was transfected to Hep3B cells using Lipofectamine 2000. Stably transfected cells were selected by G418 and then confirmed by Western blot analysis; XBP1 mRNA splicing, ATF6 cleavage, GRP78 and XBP1 promoter activation were analyzed in stably transfected Hep3B cells using RT-PCR, Western blot or luciferase assays. G418 selection and Western blot demonstrated that Hep3B cells stably expressing NS4B were obtained successfully; XBP1 mRNA splicing, ATF6 cleavage, GRP78 and XBP1 promoter activation were observed in Hep3B cells stably expressing NS4B. Stable expression of NS4B in Hep3B cells induces unfolded protein response.

Key words: HCV; NS4B; Hep3B; unfolded protein response

内质网是真核细胞中一种重要的亚细胞器。多种生理或病理条件,如病原体感染,内质网钙的消耗,膜蛋白过量表达等均能引起从内质网到胞浆和胞核的信号传导途径即内质网应激反应(ER stress response)。内质网应激可以激活三条信号通路:(1)非折叠蛋白质反应(unfolded protein response,

收稿日期: 2011-09-08 修回日期: 2011-11-21

基金项目: 江西省科技支撑计划重点项目(2009BNA09400)、江西省自然科学基金项目(2010GZY0059)和江西农业大学基金项目(2950)

作者简介: 张艳妮(1983—),女,研究生,主要从事 HCV 研究, E-mail: 280960911@qq.com; * 通讯作者: 孔令保, 副教授, E-mail: lingbaok@hotmail.com。

UPR); (2) 内质网超负荷反应(ER-overload response); (3) 固醇调节级联反应(sterol response pathway)。位于内质网的三种跨膜蛋白IRE1 (inositol-requiring enzyme 1 α)、PERK (pancreatic ER kinase) 和 ATF6 (activating transcription factor 6) 已被确认为 UPR 反应的信号转导蛋白质^[1]。

HCV 是引起人类肝炎的一种主要病原因子,对人类健康和生命危害巨大^[2]。HCV 非结构蛋白 NS4B 由 261 个氨基酸组成,高度疏水,含有至少 4 个跨膜区,是一个内质网膜结合蛋白。该蛋白在病毒生活史及致病性中均发挥着重要作用。一方面,NS4B 参与病毒的基因组复制、病毒粒子的组装和释放^[3]。另一方面,NS4B 也通过调控细胞活动有助于丙肝病毒感染的致病性: NS4B 在肝细胞内通过激活 AKT 信号通路,增加 SREBP 的表达,引起肝细胞的脂肪积累^[4],说明 NS4B 在丙肝病毒感染引起的脂肪肝中发挥一定作用; NS4B 也可以诱导肝细胞 c-myc 和 ras 蛋白表达增加,NIH-3T3 细胞转化和老鼠体内肿瘤形成^[5-6],揭示 NS4B 可能在丙肝病毒感染引起的肝癌中发挥作用。笔者前期的研究发现 NS4B 在宫颈癌细胞 HeLa 的持续表达和肝癌细胞 Huh7 的过表达均能诱导 UPR,激活 UPR 的 ATF6 和 IRE1-XBP1 信号途径^[7-8]。许多疾病的发病机制都与内质网应激反应有关,如病毒感染性疾病、糖尿病和神经系统变性疾病以及一些化学毒物中毒引起的疾病^[1]。在人体内 HCV 感染的主要宿主细胞是肝细胞。而且, HCV 感染者大部分会发展成为持续性感染,持续性感染又可进一步发展为肝癌。是否 NS4B 在肝细胞的持续表达也会诱导 UPR 以促进肝癌形成? 国内外均未见报道。本研究中,笔者通过 NS4B 稳定转染人肝癌细胞 Hep3B,获得持续表达 NS4B 的 Hep3B 细胞。RT-PCR、Western blot 和报告基因实验发现 NS4B 在 Hep3B 细胞的持续表达诱导了 XBP1 mRNA 剪接、ATF6 切割、GRP78 和 XBP1 启动子激活,表明 NS4B 可能通过诱导肝细胞 UPR 在 HCV 感染引起的肝癌中发挥作用。

1 材料和方法

1.1 试验材料

各种工具酶、生化试剂和细胞培养试剂主要购自 GIBCO、Promega、Invitrogen、Sigma、晶美和大连宝生物等公司。人肝癌细胞系 Hep3B 和宫颈癌细胞系 HeLa、大肠杆菌 BL21 (DE3)、DH5 α 和 NS4B 表达载体 pcDNA3.1 (-) NS4B、XBP1 启动子报告质粒 pGL3 XBP1 pro、GRP78 启动子报告质粒 pGL3 GRP78 pro 等均由本实验室保存或以前构建^[7-9]。Hep3B 和 HeLa 用含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2 研究方法

1.2.1 ATF6 蛋白的原核表达与纯化 根据 ATF6 基因序列((GenBank accession no. AB015856) 设计 ATF6 引物(正向引物: 5'-GGTACCGAATTCAGGATGAACCCTAGTGTGGGACCT-3'; 负向引物: 5'-GCTACCAAGCTTCTCCCCTTCTGCGGATGGC-3')。TRIZOL 法提取 HeLa 细胞总 RNA,以提取的 RNA 为模板 RT-PCR 扩增 ATF6 基因,并将其克隆至载体 pET-His (Invitrogen),获得重组质粒 pET-His-ATF6。将重组质粒 pET-His-ATF6 转化到 BL21 (DE3) 菌株,37 °C 培养过夜,次日按 1:40 转种于 100 mL SOB 培养基中,待 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8 时,加入 1 mmol/L IPTG,37 °C 诱导表达。SDS-PAGE 分析 ATF6 蛋白的表达,Ni 柱纯化表达的 ATF6 蛋白。

1.2.2 兔 ATF6 抗体的制备及检测 纯化的 ATF6 蛋白,多点注射免疫昆明种纯系兔,第一次免疫 14 d 后加强免疫 1 次,第 21 天再加强免疫 1 次,共免疫 3 次,免疫剂量 0.2 mg/只。自初次免疫 14 d 起,定期对兔子耳静脉取血,离心收取血清。采用 ELISA 方法检测免疫家兔体内 ATF6 抗体水平,包被抗原为纯化后的 ATF6 稀释液(大约 50 ng/孔),二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体,1:5000 稀释使用。免疫前对家兔耳静脉取血,分离血清,作为阴性对照。

1.2.3 Hep3B 细胞的稳定转染和 G-418 筛选 NS4B 表达载体 pcDNA3.1 (-) NS4B 和空载体 pcDNA3.1 (-) 使用 LipofectaminTM 2000 转染培养的 Hep3B 细胞。转染后 24 h,使用含 300 μ g/mL G-418 的培养基进行稳定细胞系的筛选。当稳定转染的 G-418 抗性细胞被筛选出来后,将细胞培养基中的 G-418 质量浓度降为 200 μ g/mL。

1.2.4 Western blot 检测 NS4B 蛋白表达 收获稳定转染细胞,加入裂解液(体积分数 0.3% NP40, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-Cl, 体积分数 1% TritonX-100, 50 mmol/L NaCl, 25 mmol/L NaF, 1 mmol/L

Na_3VO_3 , 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMSF), 冰浴 30 min, 12 000 g 4 $^\circ\text{C}$ 离心 15 min, 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 然后使用 HCV 人阳性血清 (1:100) 作为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (1:5000 稀释) 为二抗进行 Western blot 分析。蛋白带的检测用 ECL Chemiluminescence Detection Kit。

1.2.5 RT-PCR 检测 XBP1 mRNA 的剪切 TRIZOL 试剂提取稳定转染细胞的总 RNA。RT-PCR 参照文献 [7] 进行, GAPDH 作为 RT-PCR 内参。Tunicamycin (Tu) 能够抑制蛋白质的糖基化修饰, 从而引起 UPR, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tu 处理 6 h 的细胞作为阳性对照。20 g/L 琼脂糖电泳鉴定 RT-PCR 产物。

1.2.6 Western blot 检测 ATF6 切割 使用前面制备的兔抗 ATF6 血清作为一抗, Western blot 检测 ATF6 蛋白切割, Western blot 方法同上。

1.2.7 荧光素酶试验检测 GRP78 和 XBP1 启动子活性 报告质粒 pGL3 XBP1 pro 和 pGL3 GRP78 pro 分别瞬时转染到 Hep3B 稳定细胞系中。2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tu 处理 6 h 的 Hep3B 细胞作阳性对照。转染 24 h 后, 按照双荧光素酶报告基因系统 (Promega) 的操作说明书检测荧光素酶活性。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 (relative luciferase activity, RLA) 表示。

2 结果

2.1 ATF6 蛋白在 BL21 (DE3) 中的表达与纯化

将重组质粒 pET-His-ATF6 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3), 1 mmol/L IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 检测发现一条与预期 ATF6 蛋白分子量吻合的 18 ku 蛋白带。Ni 柱纯化后的 ATF6 蛋白为一条单带, 可用于动物免疫实验 (图 1)。

2.2 兔 ATF6 抗体的 ELISA 测定

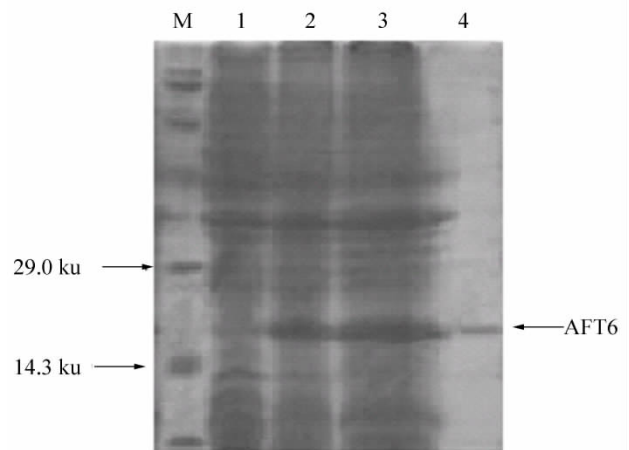
ELISA 检测表明: 自初次免疫后, 家兔于第 2 周开始产生特异性的兔 ATF6 抗体, 之后抗体水平一直持续上升, 到免疫第 9 周抗体水平升至最高, 抗体效价达到 1:3000。

2.3 Western blot 检测稳定转染 Hep3B 细胞的 NS4B 蛋白表达

如图 2 所示, pcDNA3.1(-)-NS4B 稳定转染的 Hep3B 细胞中可以检测出 27 ku 的 NS4B 目标带, 而在阴性对照 pcDNA3.1(-) 稳定转染的 Hep3B 细胞没有相应的带。表明稳定转染 pcDNA3.1(-)-NS4B 的 Hep3B 细胞成功地表达 NS4B 蛋白。

2.4 RT-PCR 检测 XBP1 mRNA 剪切

为了检测 NS4B 对 XBP1 mRNA 的调控, 通过 RT-PCR 检测 XBP1 mRNA 的剪切情况。所用的 XBP1 引物可以确定 XBP1 mRNA 的剪切: 剪切后的 PCR 产物 (XBP1-s) 为 416 bp, 未剪切的 PCR 产物 (XBP1-u) 为 442 bp。结果表明, pcDNA3.1(-)-NS4B 稳定转染的 Hep3B 细胞和 Tu 处理的 Hep3B 细胞, 能够检测到 XBP1-u 和 XBP1-s mRNA, 而在阴性对照 pcDNA3.1(-) 稳定转染的 Hep3B 细胞, 只检测到 XBP1-u (图 3)。同时所有细胞均检测到 446 bp 的 GAPDH 内

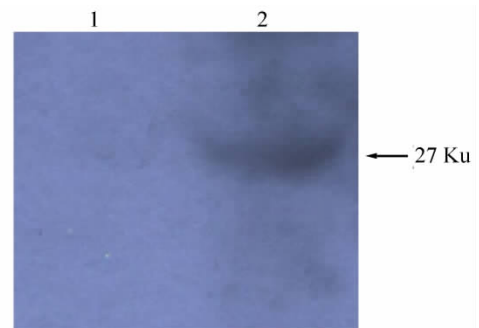


M: 蛋白质分子量标准品; 1: 没有诱导的 BL21 (DE3) 细胞裂解物; 2: 诱导的 BL21 (DE3) 细胞裂解物; 3: 诱导的 BL21 (DE3) 细胞裂解物沉淀部分; 4: 纯化的 ATF6 蛋白。

M: Protein Marker; 1: Cell lysate from non-induced BL21 (DE3); 2: Cell lysate from induced BL21 (DE3); 3: Pellet of cell lysate from induced BL21 (DE3); 4: Purified ATF6 protein.

图 1 ATF6 在 BL21 (DE3) 中的表达和纯化

Fig. 1 Expression and purification of ATF6 in BL21 (DE3)



1: pcDNA3.1(-) 稳定转染的 Hep3B 细胞; 2: pcDNA3.1(-) NS4B 稳定转染的 Hep3B 细胞。

1: Hep3B cells stably transfected with pcDNA3.1(-); 2: Hep3B cells stably transfected with pcDNA3.1(-) NS4B.

图 2 Western blot 检测稳定转染细胞 Hep3B 中 NS4B 蛋白的表达

Fig. 2 Western blot analysis of NS4B in stably transfected Hep3B cells

参带,说明 NS4B 在 Hep3B 细胞的持续表达能够调节 XBP1 mRNA 的剪切。

2.5 Western blot 检测 ATF6 剪切

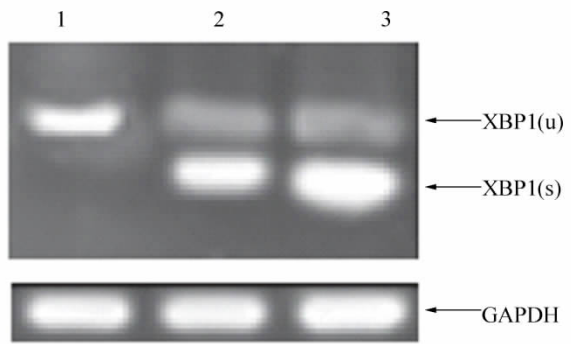
ATF6 是一种定位在内质网上的跨膜蛋白,在 UPR 发生的时候,ATF6 可被剪切为有转录激活活性的 p50ATF6。在 pcDNA3.1(-) - NS4B 稳定转染的 Hep3B 细胞中,能够检测到未剪切的 90 ku 的 p90ATF6 和剪切的 50 ku p50ATF6,而在而在阴性对照 pcDNA3.1(-) 稳定转染的 Hep3B 细胞,只检测到未剪切的 90 ku 的 p90ATF6(图 4)。表明 Hep3B 中持续表达的 NS4B 蛋白可以激活 ATF6 产生有转录激活活性的 p50ATF6。

2.6 荧光素酶实验检测 GRP78 和 XBP1 启动子活性

结果如图 5 所示:在 Tu 处理过的 Hep3B 细胞中,GRP78 和 XBP1 启动子活性增高 10 ~ 12 倍。在持续表达 NS4B 的细胞中,报告基因的荧光素酶活性要比对照细胞中升高 5 ~ 7 倍,说明 NS4B 在 Hep3B 的持续表达可以激活 XBP1 和 GRP78 启动子。

3 讨论

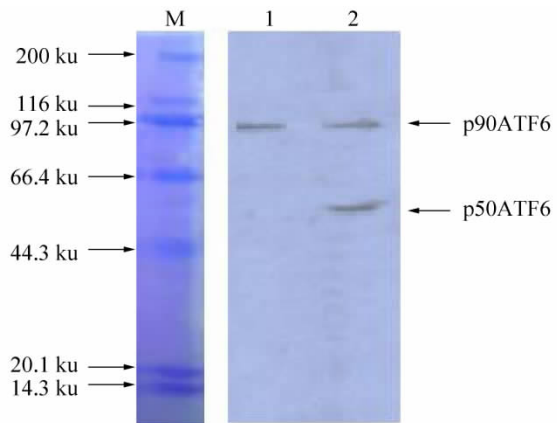
内质网内的非折叠或错误折叠蛋白的积累会引起 UPR,三个位于内质网的跨膜蛋白:ATF6(activating transcription factor - 6),IRE1(inositol requiring - 1)和 PERK(PER-like ER kinase)在哺乳动物的 UPR 发挥重要作用。当内质网内的非折叠或错误折叠蛋白积累时,分子伴侣 GRP78 与内质网的三种跨膜蛋白 ATF(activating transcription factor)6、IRE(inositol-requiring enzyme)1 和 PERK(PER-like ER kinase)解离,引起 ATF6、IRE1 和 PERK 的激活。活化的 ATF6 转移到核内,上调其下游基因如内质网分子伴侣的转录,促进蛋白质的折叠;激活的 IRE1 催化 XBP(X-box binding protein)1 mRNA 的剪接,剪接的 XBP1 mRNA 经翻译产生有活性的转录因子,调节其下游基因如内质网分子伴侣和 EDEM 的转录,促进蛋白质的折叠和降解,激活的 IRE1 也可以通过激活 JNK(c-Jun N-terminal kinase)诱导细胞自噬;PERK 的活化导致 eIF2 α 亚基的磷酸化,抑制 80S 核糖体组装,从而抑制蛋白质的合成。通过 ATF6、IRE1 和 PERK 蛋白的协同作用,引起累积在内质网内的非折叠或错误折叠蛋白减少,使细胞能够耐受及生存。当出现过强或者持久内质网应激时,内质网的功能紊乱得不到修正,IRE1、Bax/Bak 和 ATF4 蛋白启动凋亡信号通路,诱导细胞凋亡,导致细胞坏死和组织损伤^[1,10]。本研究中,笔者通过建立持续表达 HCV NS4B 的 Hep3B 细胞系,研究了持续表达的 NS4B 对 Hep3B 细胞 UPR 的影响。与 NS4B 在在宫颈癌细胞 HeLa 的持续表达和肝癌细胞 Huh7 的过表达类似^[7-8],持续表达的 NS4B 诱导了 XBP1 mRNA 剪接、GRP78 和 XBP1 启动子激活。另外,本研究构建了 ATF6 的原核表达载体 pET-his-ATF6 在大肠杆菌 BL21(DE3)中获得了高效表达,经 Ni 柱纯化后的 ATF6 蛋白,免疫家兔获得的 ATF6 抗血清,ELISA 检测表明其抗体滴度较高,应用此 ATF6 抗血清 Western blot



1: pcDNA3.1(-) 稳定转染的 Hep3B 细胞; 2: pcDNA3.1(-) NS4B 稳定转染的 Hep3B 细胞; 3: Tu 处理的 Hep3B 细胞。
1: Hep3B cells stably transfected with pcDNA3.1(-); 2: Hep3B cells stably transfected with pcDNA3.1(-) NS4B; 3: Hep3B cells treated with Tu.

图 3 RT-PCR 检测 XBP1 mRNA 的剪切

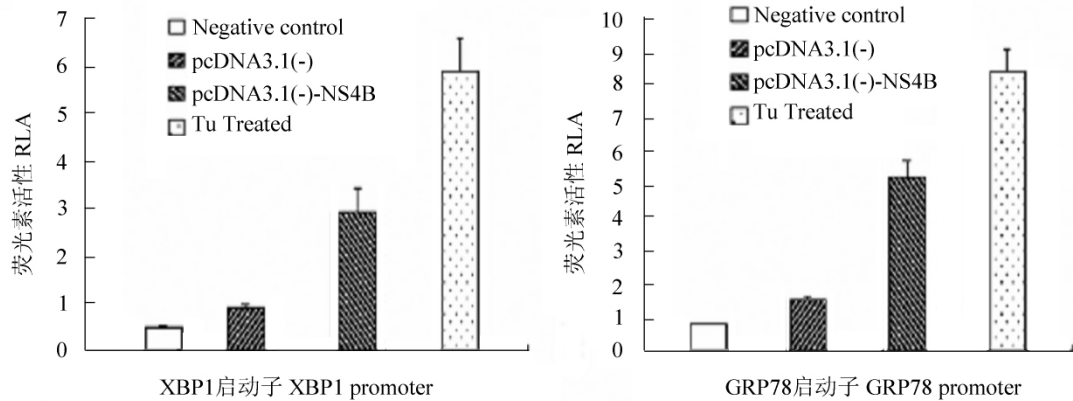
Fig. 3 Detection of XBP1 mRNA splicing by RT-PCR analysis



M: 蛋白质分子量标准品; 1: pcDNA3.1(-) 稳定转染的 Hep3B 细胞; 2: pcDNA3.1(-) NS4B 稳定转染的 Hep3B 细胞。
M: Protein Marker; 1: Hep3B cells stably transfected with pcDNA3.1(-); 2: Hep3B cells stably transfected with pcDNA3.1(-) NS4B.

图 4 Western blot 检测 ATF6 的激活

Fig. 4 Detection of the activation of ATF6 by Western blot



M: 蛋白质分子量标准品; 1: pcDNA3.1 (-) 稳定转染的 Hep3B 细胞; 2: pcDNA3.1 (-) NS4B 稳定转染的 Hep3B 细胞。

M: Protein Marker; 1: Hep3B cells stably transfected with pcDNA3.1 (-); 2: Hep3B cells stably transfected with pcDNA3.1 (-) NS4B.

图 5 pGL3 XBP1 pro 和 pGL3 GRP78 pro 的荧光素酶报告基因检测

Fig. 5 Luciferase Reporter assay of XBP1 and GRP78 promoter

检测发现: 持续表达的 NS4B 诱导了 ATF6 剪切。这些研究表明 NS4B 在肝细胞的持续表达可以诱导 UPR 的 ATF6 和 IRE1 - XBP1 两条信号途径。

病毒感染细胞后, 需要利用宿主细胞的内质网进行病毒蛋白的合成和加工, 一些病毒的复制和组装也依赖内质网, 这些活动通常会诱导 UPR。UPR 的诱导有助于病毒感染或者诱导病毒性疾病^[11]。丙肝病毒是一种高度依赖内质网的病毒, 其蛋白质的合成和加工, 病毒基因组的复制均在内质网进行^[12]。丙肝病毒复制子在体外培养的肝细胞内诱导 UPR, 引起 ATF6 和 GRP78 激活^[13]。丙肝病毒感染的 SCID/Alb - uPA 鼠肝内, GRP78 和 Bax 表达增加, 肝细胞出现凋亡症状^[14] GRP78 激活与肝细胞癌发生密切相关^[15]。本研究发现 NS4B 在肝细胞 Hep3B 的持续表达可以诱导 ATF6 切割和 GRP78 激活, 揭示 NS4B 可能通过诱导 UPR 在 HCV 感染引起的肝癌中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Pahl H L. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus [J]. *Physiol Rev* 1999, 79(3): 683-701.
- [2] Seeff L B. Natural history of hepatitis C [J]. *Hepatology* 1997, 26(Sup1): 21-28.
- [3] Jones D M, Patel A H, Targett - Adams P, et al. The hepatitis C virus NS4B protein can trans - complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus [J]. *J Virol* 2009, 83(5): 2163-2177.
- [4] Park C Y, Jun H J, Wakita T, et al. Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element - binding protein signaling via the AKT pathway [J]. *J Biol Chem* 2009, 284(14): 9237-9246.
- [5] 陈霞, 李昌平, 徐建玉, 等. 丙型肝炎病毒 NS4B 对肝细胞 c - myc 和 ras 蛋白表达的影响 [J]. *山东医药* 2007, 47(25): 736-738.
- [6] Einav S, Sklan E H, Moon H M et al. The nucleotide binding motif of hepatitis C virus NS4B can mediate cellular transformation and tumor formation without Ha - ras co - transfection [J]. *Hepatology* 2008, 47(3): 827-835.
- [7] 郑义, 高博, 景维, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4B 诱导细胞非折叠蛋白反应 [J]. *中国病毒学* 2005, 20(4): 374-378.
- [8] Zheng Y, Gao B, Ye L, et al. Hepatitis C virus non - structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response [J]. *J Microbiol* 2005, 43(6): 529-536.
- [9] 孔令保, 刘志文, 吴晓玉, 等. 丙型肝炎病毒 NS4B 在 Hep3B 细胞的表达及活性分析 [J]. *第三军医大学学报* 2010, 32(1): 54-57.
- [10] Kaplowitz N, Than T A, Shinohara M, et al. Endoplasmic reticulum stress and liver injury [J]. *Semin Liver Dis* 2007, 27(4): 367-377.
- [11] He B. Viruses, endoplasmic reticulum stress and interferon responses [J]. *Cell Death Differ* 2006, 13(3): 393-403.
- [12] Egger D, Wolk B, Gosert R, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex [J]. *J Virol* 2002, 76(12): 5974-5984.
- [13] Tardif KD, Mori K, Siddiqui A. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway [J]. *J Virol* 2002, 76(15): 7453-7459.
- [14] Joyce M A, Walters K A, Lamb S E, et al. HCV induces oxidative and ER stress, and sensitizes infected cells to apoptosis in SCID/Alb - uPA mice [J]. *PLoS Pathog* 2009, 5(2): 1-15.
- [15] Maio M, Coral S, Fratta E, et al. Epigenetic targets for immune intervention in human malignancies [J]. *Oncogene* 2003, 22(42): 6484-6488.