

与 HBV preS1 黏附相关的细胞受体的研究*

王良宏¹, 杨丽², 潘卫¹, 李兴¹, 杨国珍^{1△}

(1. 贵阳医学院医学检验学院, 贵州贵阳 550009; 2. 四川大学华西第二医院生殖中心, 四川成都 610041)

摘要:目的 通过对人肝癌细胞(HepG2)细胞膜上乙型肝炎病毒(HBV)前S1区(preS1)的结合蛋白进行分离和质谱分析, 寻找与HBV黏附相关的特异受体。方法 以免疫磁珠法分离与preS1肽段结合的HepG2膜蛋白,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离结合蛋白,选取目的条带进行LC-MS/MS质谱分析及数据库检索。结果 HepG2细胞与preS1结合的蛋白,通过SDS-PAGE电泳分离出了16条带,选取HepG2与preS1结合蛋白分离出重复性较好的6条带,质谱分析出14种蛋白。结论 质谱分析的蛋白主要是与物质运输、细胞信号转导、抗原提呈、免疫调节以及能量代谢相关的蛋白。

关键词: 肝炎病毒,乙型;免疫磁珠;乙型肝炎病毒前S1区受体;葡萄糖调节蛋白前体78

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.10.024

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)10-1221-03

Research on cellular receptors associated with HBV preS1 adhesion*

Wang Lianghong¹, Yang Li², Pan Wei¹, Li Xing¹, Yang Guozhen^{1△}

(1. College of Medical Laboratory Science, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550009, China; 2. Department of Reproductive Medical Center, West China Second Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To seek the specific receptors associated with hepatitis B virus(HBV) adhesion by separating the binding protein of the HBV preS1 region in HepG2 and performing the mass spectrometry. **Methods** The immunomagnetic bead method was adopted to separate HepG2 membrane protein combined with preS1 peptide fragment and the binding protein was separated by the sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE), then the destination strips was analyzed by LC-MS/MS mass spectrometry and retrieved by the database. **Results** 16 bands were separated from HepG2 membrane proteins combined with preS1 by SDS-PAGE; 14 kinds of proteins were identified from 6 bands with better repeatability separated from HepG2 membrane proteins combined with preS1. **Conclusion** Protein analyzed by the mass spectrometry is mainly related with the material transport, cellular signal transduction, antigen presentation, immune regulation and energy metabolism.

Key words: hepatitis B virus; immunomagnetic beads; candidate receptor of preS1 of hepatitis B virus; glucose regulated protein precursor 78

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)严重危害人类健康,目前临床常用的抗病毒药物对慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的治疗效果并不十分理想,药物不能有效地阻止HBV在细胞内的复制和再感染。HBV感染早期,病毒与细胞相互作用的机制并不清楚,这可能会影响到药物的设计与治疗方案。HBV通过外膜蛋白与肝细胞膜上的特异受体相互识别,黏附于细胞膜上^[1],这种特异性的识别和黏附是HBV感染嗜性(组织和宿主特异性)的原因之一。大量研究显示,HBV的preS1肽段不仅直接参与了病毒与细胞的结合,而且其作用是十分关键和必需的^[2-3]。肝细胞受体识别位点在preS1的21~47表位^[4-7]。本课题以人肝癌细胞(HepG2)为实验对象,采用免疫磁珠法分离与preS1肽段结合的受体蛋白^[8],以期发现与HBV感染相关的受体蛋白,从而为HBV感染早期与细胞相互作用机制的研究打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 细胞株:HepG2细胞购自中国科学院细胞库。试剂:生物素标记preS1肽段购自赛百盛生物公司,链霉亲和素标记的磁珠购自柏汇申生物科技有限公司,细胞核-细胞质-细胞膜制备试剂盒购自普利莱基因技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含10%胎牛血清、双抗(青霉素100 U/mL,链霉素100 mg/mL)的DEME高糖培养基,于5% CO₂、37℃恒温培养HepG2细胞。

1.2.2 细胞膜蛋白的提取 收集大约2×10⁷个细胞,严格按照细胞核-细胞质-细胞膜制备试剂盒的说明书进行提取。

1.2.3 免疫磁珠法分离与preS1结合的蛋白 取2mg膜蛋白同300μL生物素标记的preS1,加PBS至1mL,4℃孵育过夜。次日取出后加入浓度为0.15g/L的链霉亲和素标记磁珠300μL,补足PBS至1200μL,37℃摇床孵育30min。将Epp管插入磁力架,吸出未结合的部分,然后用PBS将磁珠洗涤3次,弃PBS,加入裂解液30μL冰浴30min,将与preS1结合的蛋白裂解出来。

1.2.4 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白 将裂解的蛋白液用5%的浓缩胶,12%的分离胶进行SDS-PAGE分离,考马斯亮蓝R-250染色,UMAX扫描仪进行扫描。

1.2.5 质谱分析及数据库检索 选取在凝胶中颜色较深且重复性好的6条带进行质谱鉴定。LC-MS/MS质谱分析及检索由中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室完成。

* 基金项目:贵州省科学技术基金资助项目[黔科合J字(2008)2157];贵州省优秀人才省长专项基金资助项目[(2005)297]。 作者简介:

王良宏(1977-),副教授,硕士研究生,主要从事临床生化检验及分子诊断学研究。△ 通讯作者,Tel:(0851)6783108;E-mail:ygzandkj29@sina.com。

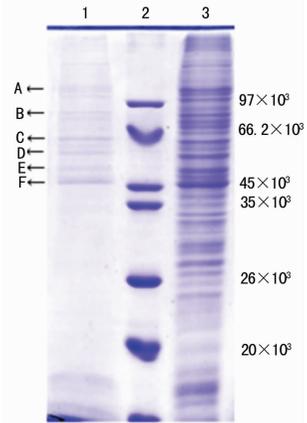
2 结 果

2.1 HepG2 细胞膜蛋白与 preS1 结合蛋白的分离结果

2 mg HepG2 膜蛋白与 300 μg 的 preS1 结合,经 300 μL 链霉菌亲和素标记磁珠获得的结合蛋白,通过 SDS-PAGE 分离出了 16 条带(图 1), $(45\sim 97)\times 10^3$ 的有 9 条带, $>97\times 10^3$ 的有 5 条带, $<20\times 10^3$ 的有 2 条带。

2.2 HepG2 细胞膜蛋白与 preS1 结合蛋白的质谱分析 选取其中颜色较深且重复性好的 6 条带(图 1)进行了质谱分析,成功分析出 14 个蛋白,除 Act1p 属酵母菌科外,其余均为人的种属。剩余的 13 个蛋白包含肌动蛋白 β (actin, beta)、微管蛋白 β (Tubulin, beta)、ATP 合酶(ATP synthase)、微管蛋白 α -1A 链(Tubulin alpha-1A chain)、热休克蛋白 60(60 kDa heat shock protein, HSP60)、角蛋白 1(keratin 1)、keratin 10、表皮细胞角蛋白 2(epidermal cytokeratin 2)、葡萄糖调节蛋白前体 78(78 kDa glucose-regulated protein precursor, GRP78)、热休克蛋白 70(Heat shock 70kDa protein 9, Mortalin)以及 3 个未命名的蛋白。质谱鉴定独立肽段数大于或等于 2,评分小于或

等于 $1\text{E}-5$ 为结果可靠,各蛋白质谱分析结果,见表 1。



1: 经磁珠分离后获取的蛋白; 2: 标记物; 3: 未能与磁珠结合的部分; A~F: 选取做质谱的 6 条带。

图 1 SDS-PAGE 分离 HepG2 膜蛋白与 preS1 结合蛋白

表 1 HepG2 与 preS1 结合蛋白的质谱结果

蛋白点	NCBI 登录号	蛋白质名称	相对分子质量	等电点	独立肽段数目	氨基酸覆盖率(%)	评分
1	14250401	actin, beta	40 978.45	4.59	5	17.39	4.82E-14
2	14318479	Act1p	41 662.86	4.61	3	8.00	1.97E-13
3	18088719	Tubulin, beta	49 639.95	4.62	4	12.16	7.08E-16
4	135435	Tubulin alpha-1A chain	50 036.49	4.32	2	7.76	9.28E-11
5	28940	unnamed protein product	57 919.39	4.94	8	22.82	1.74E-16
6	127798841	ATP synthase	59 670.58	5.48	2	5.24	7.37E-11
7	31542947	60 kDa heat shock protein	61 016.38	5.17	6	19.55	5.52E-18
8	119581085	keratin 10	63 307.94	4.31	5	13.14	8.13E-15
9	181402	epidermal cytokeratin 2	65 825.39	5.12	4	12.17	1.70E-19
10	11935049	keratin 1	66 027.01	4.70	5	11.18	1.70E-19
11	193788318	unnamed protein product	67 937.77	4.79	2	5.51	1.17E-11
12	16507237	78 kDa glucose-regulated protein precursor	72 288.43	4.75	6	14.53	4.09E-23
13	12653415	Heat shock 70kDa protein 9(mortalin)	73 618.86	5.23	2	5.30	3.14E-11
14	194378142	unnamed protein product	82 118.56	4.62	6	8.40	8.45E-15

3 讨 论

HBV 严重危害人类健康,目前临床常用的抗病毒药物对 CHB 的治疗效果并不十分理想,药物不能有效地阻止 HBV 在细胞内的复制和再感染。HBV 感染早期,病毒与细胞相互作用机制的研究显得尤为重要。

本课题采用了免疫磁珠分离法,该方法是一种省时、省力、方便快捷的方法,可有效分离受体蛋白^[8]。本研究成功分离鉴定出 14 种与 preS1 肽段结合的蛋白,主要包括以下几类。(1)微管蛋白:微管蛋白 β 、微管蛋白 α -1A 链。微管是构成细胞骨架的主要成分,它由微管蛋白 β 和微管蛋白 α 两个亚基结合在一起。维持细胞的形态,可影响膜内细胞器的空间定位和分布,参与物质运输及细胞内信号转导。(2)线粒体相关蛋白:ATP 合酶。线粒体上的 ATP 合酶是一个与 ATP 合成和水解相关的双向酶复合物。ATP 合酶主要存在于线粒体内膜,但已有研究表明在细胞表面也存在 ATP 合酶^[9],并且最近的研究表明 ATP 合酶可作为受体参与脂类代谢调控和肿瘤免疫标志识别等^[10]。(3)HSP: HSP60、Mortalin、GRP78。HSP 是一类所有细胞在应激状态下,由热休克基因编码合成的序列高度保守的蛋白,且能够对抗更为严重的应激损伤,这种现象称为热休克反应。HSP 60 作为线粒体蛋白主要表达在细胞质^[11],涉及线粒体蛋白和大分子的组装,有利于输入蛋白的正确折

叠,在线粒体基质中正确的产生多肽。王芳等^[12]在文中指出,HBV 感染的肝细胞会释放大量的可溶性 HSP60 分子,其表达水平与 HBV-DNA 水平呈正相关。Mortalin 和 GRP78 均属于 HSP70 家族。Mortalin 主要定位于线粒体,参与天然免疫和获得性免疫,有研究指出 Mortalin 是一种功能性膜蛋白,在细胞信号传导中扮演着重要角色。

GRP78 主要存在于内质网中,但在细胞膜上也有表达,细胞膜上的 GRP78 参与细胞信号转导、抗原提呈及病毒入侵等。有研究证实 GRP78 是 2 型登革热病毒(dengue virus serotype 2)受体复合物的主要成分之一^[13]。杨凤等^[14]通过激光共聚焦显微镜观察到 GRP78 在细胞膜上均匀分布,并指出 GRP78 可能通过与 preS1 结合参与 HBV 早期感染过程,葛以跃等^[15]联合利用 GST Pull-Down 与现代蛋白组学技术鉴定了 2 种与 preS1 特异结合蛋白:GRP78 和 GRP75。以上的研究提示,GRP78 在 HBV 感染初期黏附有着非常重要的作用,其在细胞信号转导、抗原提呈等过程中发挥重要作用。GRP78 能与 preS1 特异结合并且在肝细胞膜上表达,可能参与 HBV 早期侵入肝细胞的过程,本研究拟将 GRP78 作为 preS1 的候选受体,下一步将对其在 HBV 早期感染中的作用机制进行研究,为抗病毒药物的设计与治疗方案的更新打下基础。

参考文献:

- [1] De Meyer S, Gong ZJ, Suwandhi W, et al. Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes [J]. *J Viral Hepat*, 1997, 4(3):145-153.
- [2] Paran N, Geiger B, Shaul Y. HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment [J]. *EMBO J*, 2001, 20(16):4443-4453.
- [3] Lu X, Block T. Study of the early steps of the Hepatitis B Virus life cycle [J]. *Int J Med Sci*, 2004, 1(1):21-33.
- [4] Yokosuka Q, Arai M. Molecular biology of hepatitis B virus; effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B [J]. *Med Mol Morphol*, 2006, 39(3):113-120.
- [5] Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(1):65-73.
- [6] Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(1):14-21.
- [7] Abou-Jaoude G, Molina S, Maurel P, et al. Myristoylation signal transfer from the large to the middle or the small HBV envelope protein leads to a loss of HDV particles infectivity [J]. *Virology*, 2007, 365(1):204-209.
- [8] 杨丽, 王良宏, 潘卫, 等. 免疫磁珠法分离 preS1 结合蛋白 [J]. *贵阳医学院学报*, 2013, 38(1):24-26.
- [9] Burrell HE, Wolodarski B, Foster BJ, et al. Human keratinocytes release ATP and utilize three mechanisms for nucleotide interconversion at the cell surface [J]. *J Bio Chem*, 2005, 280(33):29667-29676.
- [10] 杜艳, 高峰. 细胞表面 ATP 合酶的研究进展 [J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2009, 29(6):741-743.
- [11] Martin JE, Swash M, Mather K, et al. Expression of the human groEL stress-protein homologue in the brain and spinalcord [J]. *J Neurol Sci*, 1993, 118(2):202-206.
- [12] 王芳, 史丽云. 热休克蛋白 60 介导的 TLRs 信号转导模式和“危险信号”学说 [J]. *医学综述*, 2012, 18(8):1134-1137.
- [13] Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP78(Bip) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2 [J]. *Arch Virol*, 2004, 149(5):915-927.
- [14] 杨凤, 丁岗强, 唐霓, 等. GRP78 在 HePG2 细胞的亚细胞定位及真核表达 [J]. *解放军医学杂志*, 2009, 34(11):1328-1330.
- [15] 葛以跃, 崔仑标, 史智扬, 等. 应用蛋白组学方法筛选和鉴定乙型肝炎病毒 PreS1 结合蛋白 [J]. *中国生物化学与分子生物学学报*, 2009, 25(5):459-464.
- (收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-12-16)
- (上接第 1220 页)
- 2004, 25(2):113-115.
- [2] Moghadaszadeh B, Beggs AH. Selenoproteins and Their Impact on Human Health Through Diverse Physiological Pathways [J]. *Physiology(Bethesda)*, 2006(21):307-315.
- [3] Zhang W, Joseph E, Hitchcock C, et al. Selenium glycinate supplementation increases blood glutathione peroxidase activities and decreases prostate-specific antigen readings in middle-aged US men [J]. *Nutr Res*, 2011, 31(2):165-168.
- [4] 黄峰, 黄峙, 郑文杰, 等. 富硒螺旋藻对肝叶切除大鼠肝细胞再生的促进作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(5):930-933.
- [5] Chen WX, Cao XZ, Zhu RZ. Effect of selenium dioxide on proliferation, apoptosis, and telomerase activity of human lung cancer cell line in vitro [J]. *Ai Zheng*, 2003, 22(9):927.
- [6] Wang XH, Wei YM, Bai H, et al. Apoptosis and regulation of expressions of apoptosis-related gene Bcl-2 and p53 induced by selenium dioxide in three leukemia cell lines [J]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2004, 24(10):1160-1163.
- [7] Haupt S, Berger M, Goldberg Z, et al. Apoptosis-the p53 network [J]. *Journal of cell science*, 2003, 116(20):4077-4085.
- [8] Luo H, Wang F, Bai Y, et al. Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012(94):304-308.
- [9] 林亚, 宋巧丽, 郑飞云. 野生型 p53 抑制宫颈癌 HeLa 细胞的研究 [J]. *现代妇产科进展*, 2008, 17(5):354-357.
- [10] 黄永红, 徐方云, 王红梅, 等. 野生型 p53 基因转染 U14 细胞增强肿瘤抗原的免疫原性 [J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(7):1413-1415.
- [11] Fu L, Liu Q, Shen L, et al. Proteomic study on sodium selenite-induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2011, 25(3):130-137.
- [12] Kil IS, Chung KH, Park JW. Silencing of mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase gene enhances selenite-induced apoptosis [J]. *Free Radic Res*, 2010, 44(3):332-339.
- [13] Sanmartín C, Plano D, Sharma AK, et al. Selenium compounds, apoptosis and other types of cell death: an overview for cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(8):9649-9672.
- [14] Weeks BS, Hanna MS, Cooperstein D. Dietary selenium and selenoprotein function [J]. *Med Sci Monit*, 2012, 18(8):RA127-132.
- [15] Algotar AM, Stratton MS, Ahmann FR, et al. Phase 3 clinical trial investigating the effect of selenium supplementation in men at high-risk for prostate cancer [J]. *The Prostate*, 2013, 73(3):328-335.
- (收稿日期:2013-09-22 修回日期:2013-11-26)