

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.23.021

HEV ORF3 cDNA 序列分析及在 HepG2 细胞的表达*

赵振宇¹,温雯静¹,刘新胜¹,赵江波²,刘晓东³

(1. 漯河医学高等专科学校病原生物学与免疫学教研室,河南漯河 462002;2. 江苏大学附属医院内内分泌科,江苏镇江 212001;3. 漯河医学高等专科学校人体解剖学教研室,河南漯河 462002)

摘要:目的 对构建的 HEV 新疆株 ORF3 真核表达载体 pcHEV3 进行 DNA 序列分析,并转染 HepG2 细胞进行表达,为进一步探索 ORF3 蛋白功能提供基础。方法 对 HEV ORF3 真核表达载体 pcHEV3 进行 DNA 测序,分析 ORF3 蛋白一级结构,脂质体介导法转染 HepG2 细胞,用免疫荧光法鉴定 ORF3 蛋白的表达及细胞内定位。结果 HEV 新疆株 ORF3 蛋白具有保守的 PPLP 基序,转染 HepG2 细胞后经免疫荧光鉴定能在细胞内表达。结论 构建出 HEV ORF3 蛋白真核表达重组载体,并能在 HepG2 细胞表达,为进一步研究 HEV ORF3 蛋白的功能提供了实验基础。

关键词:戊型肝炎病毒;开放读码框架;表达载体

中图分类号:R73.35

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)23-3034-03

DNA sequencing of HEV ORF3 cDNA and expression in HepG2 cell*

Zhao Zhenyu¹, Wen Wenjing¹, Liu Xinsheng¹, Zhao Jiangbo², Liu Xiaodong³(1. Department of Pathogenic Biology and Immunology, Luohe Medical College, Luohe, Henan 462002, China;
2. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China;
3. Department of Human Anatomy, Luohe Medical College, Luohe, Henan 462002, China)

Abstract: Objective To analysis the DNA sequence of HEV ORF3 cDNA and express in HepG2 cell. **Methods** Recombinant vector carrying HEV ORF3 cDNA was constructed and identified by DNA sequencing. Expression of recombinant vector in HepG2 cell was determined by immunofluorescence technique. **Results** The recombinant vector was constructed and expressed in HepG2 cell successfully. **Conclusion** The research laid experimental foundation for exploring the biological function of ORF3 protein in the pathogenesis of viral hepatitis E.

Key words: hepatitis E virus(HEV); open reading frame(ORF); expression vector

戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)在分类学上隶属于单独的戊型肝炎病毒属,是引起戊型肝炎的病原体^[1]。HEV 基因组包含 3 个开放读码框架(open reading frame, ORF),即 ORF1、ORF2、ORF3,其中 ORF1 编码病毒非结构蛋白,ORF2 编码病毒衣壳蛋白,ORF3 位于 ORF1 和 ORF2 之间,由 369 bp 组成,编码蛋白相对分子质量约 13.5 kD,由 123 个氨基酸组成,目前 ORF3 蛋白功能仍不清楚^[2-3]。初步研究提示其能与宿主靶细胞内信号蛋白相互作用,可能与 HEV 的致病有关^[4]。作者前期已克隆出 HEV 新疆株 ORF3 全长 cDNA 片段,并构建了真核表达载体 pcHEV3。为了研究 ORF3 蛋白功能,其在真核细胞内的表达是关键一环。为此,本研究对 ORF3 cDNA 进行测序,并转染 HepG2 细胞进行表达,为进一步探索 ORF3 蛋白功能提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 DMEM 细胞培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、Lipofect AMINE 购自 Invitrogen 公司,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的兔抗鼠抗体购自 Sigma 公司。鼠抗 ORF3 多克隆抗体由浙江省医学科学院生物工程研究所提供,人肝癌细胞系 HepG2 细胞,由浙江大学肿瘤研究所提供。超净工作台、CO₂ 培养箱购自美国 Forma Scientific 公司,荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。测序引物合成和 DNA 测序由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 HEV ORF3 cDNA 序列分析 将已构建的 HEV ORF3 真核表达载体 pcHEV3 转化大肠杆菌 TG-1 扩增,从氨

苄青霉素抗性筛选和酶切电泳鉴定的阳性克隆中选择 4 个克隆,经培养扩增后提取质粒 DNA,送上海生工生物工程有限公司测序。测序引物:5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG ACC-3',用 pcDNA3 多克隆酶切位点上游 CMV T7 启动子序列作为测序时引物的结合位点。做双向测序。选择序列完全正确的克隆进行扩增并用于下一步的研究。

1.2.2 pcHEV3 转染 HepG2 细胞 HepG2 细胞复苏后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养。转染前 24 h 将对数生长期细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,计数后取 1×10⁶ 个细胞接种在 60 mm 培养皿中,等细胞生长达 80% 融合时用于转染。将转染细胞分为 2 组:第 1 组,转染重组质粒 pcHEV3;第 2 组,转染质粒 pcDNA3。培养皿中细胞生长达 80% 融合时,取 6 μL 脂质体和 3 μg 质粒,按脂质体操作说明转染至 HepG2 细胞中。转染 48 h 后,测定细胞瞬时表达 ORF3 蛋白情况。

1.2.3 HepG2 细胞中 ORF3 蛋白瞬时表达检测 用免疫荧光法原位检测 HEV ORF3 蛋白表达及细胞内定位。取干净盖玻片,用 DMEM 培养基漂洗数次,放入细胞培养皿中,将转染后的 HepG2 细胞传入该皿。待盖玻片上长满细胞后,取出凉干。在 parofilm 膜上滴加鼠抗 ORF3 抗体,将盖玻片有细胞的一面向下盖在抗体上,密封于 37℃ 湿盒中孵育 0.5~1 h。加 FITC 标记的兔抗鼠抗体在 parofilm 膜上,将盖玻片有细胞的一面向下盖在抗体上,放入湿盒中,于 37℃ 孵育 0.5~1 h。用 60% 的甘油将盖玻片封在载玻片上,置于荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 HEV ORF3 cDNA 序列分析 从氨苄青霉素抗性筛选

和酶切电泳鉴定的阳性克隆中选择 4 个克隆,经培养扩增后提取质粒 DNA,送上海生工生物工程有限公司做序列分析。测序引物:5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG ACC-3',用 pcDNA3 多克隆酶切位点上游 CMV T7 启动子序列作为测序时引物的结合位点。做双向测序。测序结果证实插入序列与 HEV ORF3 cDNA 序列完全符合,无碱基突变。序列分析结果见图 1。

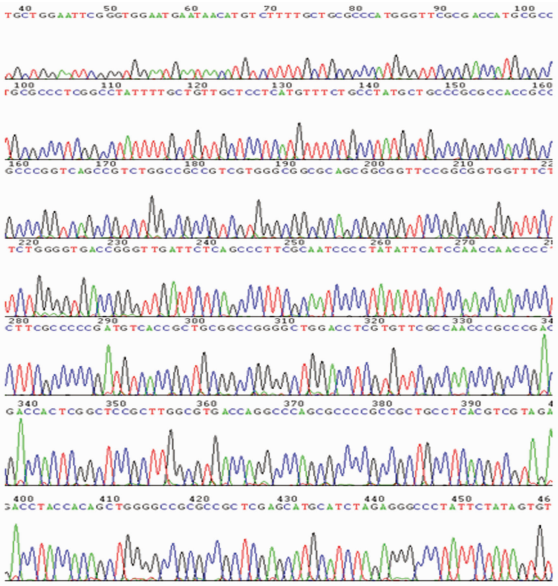


图 1 pcHEV3 DNA 测序图谱

2.2 HEV ORF3 蛋白氨基酸序列分析 根据遗传密码表,由 HEV 新疆株 ORF3 cDNA 碱基序列预测其编码蛋白质氨基酸序列组成如下,其中斜体代表第 104~113 位富含脯氨酸多肽区氨基酸序列。

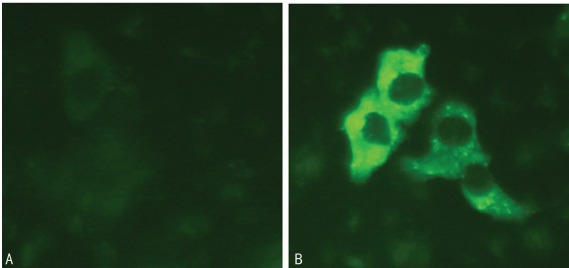
H₂N-MNNSFAAPMGSRPCALGLFCC
C S S C F C L C C P R H R P V S R L A A V V G G A A A
V P A V V S G V T G L I L S P S Q S P I F I Q P T P S P P
M S P L R P G L D L V F A N P P D H S A P L G V T R P
S A P P L P H V V D L P Q L G P R R-COOH

从世界各地分离到的不同戊型肝炎病毒株 ORF3 cDNA 第 208~369 位碱基序列较为保守,编码的氨基酸序列更为保守。不同 HEV 分离株 ORF3 蛋白第 70~123 位氨基酸序列比较如下,其中斜体代表第 104~113 位富含脯氨酸多肽区氨基酸序列。

新疆株 70 FIQPTSPPPMSPLRPGLDLVFANPP-
DHSAPLGVTRPSAPPLPHVVDLPQLGPRR 123
巴基斯坦株 70 FIQPTSPPPMSPLRPGLDLVFANPP-
DHSAPLGVTRPSAPPLPHVVDLPQLGPRR 123
缅甸株 70 FIQPTSPPPMSPLRPGLDLVFANQP-
DHSAPLGVTRPSAPPLPHVVDLPQLGPRR 123
中国株 70 FIQPTSPPPMSPLRPGLDLVFANPP-
DHSAPLGVTRPSAPPLPHVVDLPQLGPRR 123
印度株 70 FIQPTSPRMSPLRPGLDLVFANPP-
DHSAPLGATRPSAPPLPHVVDLPQLGPRR 123
墨西哥株 70 FIQPTPLPQLPLRPGLDLVFANQP-
DHSAPLGEIRPSAPPLPPVADLPQPGPRR 123

2.3 HEV ORF3 蛋白在 HepG2 细胞中表达 将重组质粒 pcHEV3 转染至 HepG2 细胞,48 h 后固定细胞,加入抗 ORF3 抗体及 FITC 标记的二抗,置荧光显微镜下观察。结果显示, HepG2 细胞内有 ORF3 蛋白表达,且 ORF3 蛋白表达主要在

细胞质中,呈点状分布,结果如图 2 所示。



A: 转染质粒 pcDNA3 HepG2 细胞; B: 转染重组质粒 pcHEV3 HepG2 细胞。

图 2 免疫荧光检测 HepG2 细胞中 ORF3 蛋白瞬时表达及细胞内定位

3 讨 论

戊型肝炎是由 HEV 感染引起的消化道传染病,主要通过粪-口途径传播,临床上发病急,容易发展成重型肝炎,病死率较高,是许多发展中国家的重要公共卫生问题^[5]。由于 HEV 体外难以培养,又没有成功的小动物实验感染模型,HEV 致病机制仍不清楚,为戊型肝炎防治带来很大困难^[6]。进一步探索 HEV 的致病机制,可为戊型肝炎的防治提供理论基础和实验资料,具有重要意义。

人体内正常细胞发挥功能是通过细胞内众多的信号分子之间进行特定有序的相互作用完成的。若这些过程发生紊乱,就会影响细胞的结构和功能,继而引起相关疾病。病毒感染人体后,可通过人体细胞表达多种病毒基因编码蛋白,其中有些可与细胞内信号分子以配体-受体相结合的方式发生相互作用,干扰细胞内正常信号的转导,引起细胞结构和功能异常,在病毒致病中发挥重要作用^[7-11]。Src 同源序列 3 结构域(Src homology 3 domain,SH3 结构域)由 50~100 个氨基酸残基组成,存在于多种激酶分子调节亚基之中,可通过与配体蛋白中富含脯氨酸氨基酸序列识别结合而调节激酶的活性^[12-13]。SH3 结构域识别的配体蛋白的核心区氨基酸序列为 X-P-(P)-X-P,其中 P 代表保守的脯氨酸,X 代表脂肪族氨基酸,(P)多为脯氨酸。实验研究表明,多种引起慢性感染的病毒,均可通过其编码蛋白上的 X-P-(P)-X-P 基序,与宿主细胞内含 SH3 结构域的蛋白激酶结合,激活相关的信号转导通路,从而有利于病毒在人体内的复制、免疫逃避以及病毒感染慢性化,与病毒致病有密切关系^[14]。

HEV ORF3 由 369 bp 组成,编码蛋白包含 123 个氨基酸,相对分子质量约 13.5×10³,目前 ORF3 蛋白功能仍不清楚。氨基酸序列分析表明,从世界各地分离到的不同戊型肝炎病毒株 ORF3 蛋白中 104~113 位氨基酸序列组成(RPSAPPLPHV)高度保守^[15],都含有富含脯氨酸的 PPLP 基序。由此推测,人体感染 HEV 后,在体内表达的 ORF3 蛋白可通过 PPLP 基序与含 SH3 结构域的蛋白激酶结合,激活相关信号转导通路,在戊型肝炎的发病过程中发挥重要作用。为了深入研究 ORF3 蛋白的功能,本研究在已构建的 HEV ORF3 cDNA 真核表达载体的基础上,对 ORF3 cDNA 进行序列分析,结果证实插入序列与已报道 HEV 新疆株 ORF3 cDNA 序列完全符合,无碱基突变。由碱基序列预测 ORF3 蛋白一级结构,表明其氨基酸序列与已报道的其他戊型肝炎病毒株一样,都含有保守的 RPSAPPLPHV 序列,可用来进一步研究 ORF3 蛋白与信号分子的相互作用。本研究所构建的 pcHEV3 为真核表达重组载体,具有 CMV T7 启动子,能在真核细胞高效表达外源基因。将 pcHEV3 转染 HepG2 细胞后,通过免疫荧光检测表明,ORF3 蛋白在细胞内能够高效表达。ORF3 蛋白在 HepG2

细胞表达后,经过翻译后修饰和加工,具有天然病毒蛋白的结构和生物学活性,可作为研究 ORF3 蛋白与宿主细胞相互作用的有效工具,为进一步探索 ORF3 蛋白在戊型肝炎发病中的作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Teshale EH, Hu DJ, Holmberg SD. The two faces of hepatitis E virus[J]. Clin Infect Dis, 2010, 51(3):328-334.
- [2] Holla RP, Ahmad I, Ahmad Z, et al. Molecular virology of hepatitis E virus[J]. Semin Liver Dis, 2013, 33(1):3-14.
- [3] Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus[J]. Virus Res, 2011, 161(1):47-58.
- [4] Chandra V, Kalia M, Hajela K, et al. The ORF3 protein of hepatitis E virus delays degradation of activated growth factor receptors by interacting with CIN85 and blocking formation of the Cbl-CIN85 complex[J]. J Virol, 2010, 84(8):3857-3867.
- [5] Meng XJ. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus[J]. Semin Liver Dis, 2013, 33(1):41-49.
- [6] Wedemeyer H, Rybczynska J, Pischke S, et al. Immunopathogenesis of hepatitis E virus infection[J]. Semin Liver Dis, 2013, 33(1):71-78.
- [7] Ersing I, Bernhardt K, Gewurz BE. NF- κ B and IRF7 pathway activation by Epstein-Barr virus Latent Membrane Protein 1[J]. Viruses, 2013, 5(6):1587-1606.
- [8] Guo P. Suppression of interferon-mediated antiviral immunity

by hepatitis B virus: an overview of research progress[J]. Scand J Immunol, 2013, 78(3):230-237.

- [9] Baresova P, Pitha PM, Lubyova B. Distinct roles of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded viral interferon regulatory factors in inflammatory response and cancer[J]. J Virol, 2013, 87(17):9398-9410.
- [10] Dai L, Bai L, Lu Y, et al. Emmprin and KSHV: new partners in viral cancer pathogenesis[J]. Cancer Lett, 2013, 337(2):161-166.
- [11] Ashkenazi A, Faingold O, Shai Y. HIV-1 fusion protein exerts complex immunosuppressive effects[J]. Trends Biochem Sci, 2013, 38(7):345-349.
- [12] Pawson T. Protein modules and signalling networks[J]. Naure, 1995, 373(6515):573-580.
- [13] Cohen GB, Ren R, Baltimore D. Modular binding domains in signal transduction proteins[J]. Cell, 1995, 80(2):237-248.
- [14] Chen BJ, Lamb RA. Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT[J]. Virology, 2008, 372(2):221-232.
- [15] Nagashima S, Takahashi M, Jirintai, et al. A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells[J]. J Gen Virol, 2011, 92(2):269-278.

(收稿日期:2014-01-26 修回日期:2014-04-08)

(上接第 3033 页)

- [3] Huang CS, Kawamura T, Toyoda Y, et al. Recent advances in hydrogen research as a therapeutic medical gas[J]. Free Radical Res, 2010, 44(9):971-982.
- [4] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. Nature Med, 2007, 13(6):688-694.
- [5] Ghosh S, Pulinilkunnil T, Yuen G, et al. Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion[J]. American J Physiol-Heart and Circulat Physiol, 2005, 289(2):H768-H776.
- [6] Kersten JR, Toller WG, Gross ER, et al. Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality[J]. American J Physiol-Heart and Circulat Physiol, 2000, 278(4):H1218-H1224.
- [7] Wu Y, Xia Z, Dou J, et al. Protective effect of ginsenoside Rb1 against myocardial ischemia/reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(7):4327-4335.
- [8] Wu Y, Xia ZY, Meng QT, et al. Shen-Fu injection preconditioning inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats: activation of eNOS via the PI3K/Akt pathway[J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011:384627. doi:10.1155/2011/384627. Epub 2010 Nov 29.
- [9] Eefting F, Rensing B, Wigman J, et al. Role of apoptosis in

reperfusion injury[J]. Cardiovascular Res, 2004, 61(3):414-426.

- [10] Sanfilippo CM, Blaho JA. The facts of death[J]. Intern Rev Immunol, 2003, 22(5-6):327-340.
- [11] 陈盼, 赵明, 蒋鹏, 等. 盐酸右美托咪啶预处理对缺血-再灌注损伤大鼠心肌 Bax 和 Bcl-2 表达的影响[J]. 重庆医学, 2012, 41(16):1604-1606.
- [12] Xie Z, Koyama T, Suzuki J, et al. Coronary reperfusion following ischemia[J]. Japan Heart J, 2001, 42(6):759-770.
- [13] McClintock DS, Santore MT, Lee VY, et al. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death[J]. Molecul Cell Biol, 2002, 22(1):94-104.
- [14] Cai L, Li W, Wang G, et al. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium mitochondrial cytochrome c-mediated Caspase-3 activation pathway[J]. Diabetes, 2002, 51(6):1938-1948.
- [15] Voutsadakis IA. Apoptosis and the pathogenesis of lymphoma[J]. Acta Oncologica, 2000, 39(2):151-156.
- [16] Schon EA, Manfredi G. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction[J]. J Clin Invest, 2003, 111(3):303-312.

(收稿日期:2014-02-15 修回日期:2014-05-20)