

丙型肝炎病毒 F 蛋白缺失对病毒复制及感染性的影响 *

王文博 许 刚 王 岩 陶清源 任 浩** 戚中田**

(第二军医大学微生物学教研室, 全军生物侦检与防护重点实验室, 上海市医学生物防护重点实验室, 上海 200433)

摘要 探索了 F 蛋白缺失及核心蛋白(Core)二级结构改变对丙型肝炎病毒(HCV)复制和感染性的影响。利用定点突变方法, 将 J6JFH1 的核心基因引进 5 个终止密码子以中断 F 蛋白的表达, 从而获得 F 蛋白缺失的病毒复制子 J6JFH1/ Δ F。体外制备 RNA 转录体, 并电穿孔转染 Huh7.5.1 细胞, 采用免疫荧光、实时荧光定量 PCR 方法以及病毒感染等方法, 观察 F 蛋白缺失对病毒复制、蛋白质表达及转染细胞上清感染性病毒颗粒产生的影响。在此基础上, 构建 5 个单一突变病毒体, 对 HCV 核心蛋白进行二级结构分析, 观察核心蛋白二级结构对 HCV 复制和翻译的影响。结果显示, 转染 48 h 后, J6JFH1/ Δ F 与野生型 J6JFH1 相比, J6JFH1/ Δ F 转染阳性细胞数明显降低, 细胞内 HCV RNA 水平降低约 95%, J6JFH1/ Δ F 转染后不同时间点细胞上清中 HCV RNA 拷贝数和病毒颗粒也明显降低。5 个单一突变体不影响核心基因二级结构, 病毒在细胞内复制和感染性与野生型水平一致。J6JFH1/ Δ F 所产生的改变可能是由于 5 处突变导致核心基因二级结构改变而造成的。结果说明, HCV F 蛋白缺失不影响病毒的复制翻译及病毒颗粒的包装释放, 核心蛋白二级结构的改变对病毒复制和翻译则产生较大影响。

关键词 丙型肝炎病毒, F 蛋白, 核心蛋白, 二级结构, 病毒复制

学科分类号 R373

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00272

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)属于黄病毒科, 是有包膜的单正链 RNA 病毒^[1]。HCV 感染是引起慢性肝脏疾病的主要病因之一, 可发展为脂肪肝、肝硬化以及肝细胞癌^[2-4]。HCV 一般通过血液或血制品传播^[5], 全球 HCV 感染者约有 1.7 亿, 而每年约有 10 万人发展为肝癌^[6]。目前 HCV 疫苗尚未研发成功^[7], 且唯一的治疗方案——干扰素联合利巴韦林治疗的应答率较低、存在严重的副作用、治疗费用昂贵等缺点, 严重限制了其应用。

HCV 基因组大约有 9 600 个碱基, 单一开放读码框(open reading frame, ORF)翻译出约 3 000 个氨基酸残基的多聚蛋白前体, 在宿主细胞及病毒蛋白酶的作用下, 剪切成至少 10 种结构蛋白(C、E1、E2 和 p7)和非结构蛋白(NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B)^[4, 8]。近年来, 一种新的病毒蛋白在一些实验室相继被发现, 被称为读码框移位蛋白(alternative reading frame protein, ARFP), 或称为 F 蛋白(frameshift protein), 也有学者称之为 core+1 蛋白^[9-12]。F 蛋白的产生机制及大小受基因

型影响, HCV 1a 型 8~11 位密码子处+1 移码翻译可产生一种约 17 ku 的蛋白质, 称为 Core+1/F^[9]。

在 HCV 1b 型中这种移码突变主要产生在 42 位密码子处, 并可能在 144 位产生-1 位的回复突变, 即 N 端和 C 端的氨基酸序列是 HCV 核心蛋白, 中间区域为 F 蛋白的嵌合体形式^[13-14]。另外, 最近研究发现在 F 蛋白也可以通过内源起始密码子产生, 起始位点主要在 26 位密码子处^[15]以及 85/87 密码子处^[16-17], 并以后者为主要形式, 称为 Core+1/S。

虽然 F 蛋白发现至今已有十余年, 但其生物学功能仍不明确^[18-21]。为进一步研究 HCV F 蛋白对病

* 国家自然科学基金(30872247), 国家传染病重大专项课题(2012ZX10002-003, 2012ZX10004801-002-005)和上海市重点学科(B901)资助项目。

** 通讯联系人。

任 浩. Tel: 021-81870996, E-mail: hmren@yahoo.com

戚中田. Tel: 021-81870988, E-mail: qizt@smmu.edu.cn

收稿日期: 2011-06-16, 接受日期: 2011-07-25

毒复制和感染的影响, 我们通过定点突变的方法使 F 蛋白表达缺失^[22], 观察了 F 蛋白缺失后的病毒体复制和翻译情况, 并进一步分析 F 蛋白缺失后对核心蛋白二级结构的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

QuikChange® LightningSite-Directed Mutagenesis Kit 为 Stratagene 公司(美国)产品; 异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside, X-gal)、NZ 胺(酪蛋白的酶促水解物)、酵母提取物等购自北京鼎国生物技术有限责任公司; 14 ml BD Falcon 聚丙烯管购自上海雅怡科学实验设备有限公司; HCV NS5A 单克隆抗体 9E10(Charles M. Rice 教授惠赠); M-MLV 反转录酶及 T7 体外转录试剂盒(RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7)购自 Promega 公司(美国); 胎牛血清、DMEM、opti-MEM、Alex488 羊抗鼠荧光二抗、FITC-羊抗人 IgG、Lipofectamine 2000 均购自美国 Invitrogen 公司; RNA 抽提试剂购自上海华舜生物工程公司; RotorGene 3000 荧光定量 PCR 仪购自 Corbett Research; 电穿孔仪 Gene Pulser Xcell 购自 Bio-RAD(USA); PMD18T 购自 Takara 公司; EGFP-N1 购自 Promega 公司。

1.2 质粒构建与细胞株

含有 HCV2a J6JFH1 株全长基因组的质粒 pFL-J6JFH1 及其复制缺陷性 pFL-J6JFH1(GND)由美国洛克菲勒大学 HCV 研究中心 Charles M. Rice 教授惠赠。J6JFH1/ Δ F 是以 pFL-J6JFH1 为模板, 按照试剂盒操作说明, 利用定点突变试剂盒引入了 5 处突变(nt406T-A, nt433T-A, nt472G-A, nt479 G-A/481G-A, nt613C-A)^[22]。这些突变能够终止目前报道的各种形式 F 蛋白的表达, 而不改变 HCV 氨基酸序列。J6JFH1m1 (nt406T-A), J6JFH1m2 (nt433T-A), J6JFH1m3 (nt472G-A), J6JFH1m4 (nt479G-A/481G-A), J6JFH1m5 (nt613C-A) 5 个单一突变病毒体同样采用定点突变的方法获得。Huh7.5.1 细胞由中国科学院上海巴斯德研究所钟劲教授提供。

EGFP-HCV 核心基因融合表达质粒: 为了验证 5 个突变是否影响核心基因的表达, 分别以质粒 pFL-J6JFH1 和 pFL-J6JFH1/ Δ F 为模板, 上游引物

J6C-F: 5' AAGCTTGCAGACACAAATCCTAAAC 3' 和下游引物 J6C-R: 5' GGATCCAGCGAGACCGGGTGGTG 3' 扩增获得 J6core 和 J6C Δ F, 斜体部分分别为 *Bam*H I (上游)和 *Hind* III (下游)酶切位点, PCR 产物克隆入 pMD-18T 获得 J6C-18T 和 J6C Δ F-18T 并送测序验证。测序证实后, 将 J6C-18T 和 J6C Δ F-18T 以及 EGFP-N1 同时以 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切连接, 获得 EGFP 融合表达的质粒。

1.3 病毒 RNA 转录体的制备

将质粒 pFL-J6JFH1、pFL-J6JFH1/ Δ F、pFL-J6JFH1m1、pFL-J6JFH1m2、pFL-J6JFH1m3、pFL-J6JFH1m4 和 pFL-J6JFH1m5 经过 *Xba* I 线性化后, 用 T7 体外转录试剂盒制备 RNA 体外转录体, 用 Tris 饱和的苯酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1)纯化 RNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性和纯度。

1.4 细胞培养及转染

细胞培养: 将 Huh7.5.1 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱培养, 细胞培养液中添加 2 mmol/L L-谷氨酰胺、0.1 mmol/L NEAA、100 g/ml 链霉素和 100 U/ml 青霉素。

RNA 转录体转染方法: 胰酶消化细胞, 1 000 g 离心 5 min, 弃上清, 10 ml DEPC-PBS 洗涤; 1 000 g 离心 5 min, 弃上清, 10 ml opti-MEM 洗涤; 离心弃上清, 2 ml opti-MEM 重悬, 细胞计数, 稀释至 1×10⁷ 个/ml; 取 400 μ l 转至 4 mm 电击杯中, 加入 10 μ g HCV RNA 转录体, 混匀。270 V、960 μ F、100 m Ω 电击一次, 迅速转至 10 cm 平皿中, 加 10 ml 全培养液于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。

质粒转染方法: 采用 Lipofectamine 2000, 具体方法依照说明书。

1.5 实时定量 PCR(FQ-PCR)

设计 HCV 5' 非编码区的特异性引物(上游引物为 HCVNTR-F: 5' CTTACGCAGAAAGCGTCTA 3'; 下游引物为 HCVNTR-R: 5' CAAGCACCTATCAGGCAGT 3'), 预期产物 245 bp^[23]。内参为人 GAPDH(GenBank 序列 BC013310)扩增引物(上游引物: 5' TGGGCTACACTGAGCACCAG 3', 下游引物: 5' AAGTGGTCGTTGAGGGCAAT 3', 预期产物 100 bp^[24])。

转染后 72 h, 抽提转染细胞总 RNA 或转染细胞上清 RNA, 随机引物逆转录成 cDNA 后, 以双标准曲线法对细胞中的 HCV RNA 进行定量. 检测标准品是引物 HCVNTR-F 和 HCVNTR-R 的 245 bp PCR 产物(稀释梯度为 $10^{-2} \sim 10^{-8}$), GAPDH 的标准品是纯化后的 PCR 产物(稀释梯度为 $10^{-1} \sim 10^{-7}$). 将两者进行梯度稀释, 分别绘制标准曲线. 各实验组样品的 C_t 值与标准曲线对比, 计算检测样品的浓度. 经内参基因 GAPDH 的均一化处理后, 即可计算出转染细胞内 HCV RNA 的水平^[25].

质粒 J6core 和 J6CΔF 的定量引物为, 上游引物 5' AAGCTTATGAGCACAAATCC TAAAC 3' 下游引物 5' GGATCCGGGTATCGATGACCTTAC 3'; 内参基因仍选用 GAPDH, 引物如前所述.

1.6 免疫荧光(immunofluorescence assay, IFA)

将转染后细胞接种 96 孔细胞培养板, 置于含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱培养; 48 h 后弃上清, 每孔加入 100 μl 甲醇, -20℃ 固定 20 min; PBS 洗涤 (5 min, 3 次), 每孔加入 100 μl 0.1% Triton X-100, 室温透化 30 min; PBS 洗涤 (5 min, 3 次), 每孔加入 100 μl 3% BSA, 室温封闭 1 h; 弃封闭液, 每孔加入 NS5A 单抗 9E10 (1:2 000) 或 HCV 患者血清 (1:100), 室温孵育 2 h; PBS 洗涤 (10 min, 3 次); 每孔加入 Alex-488 羊抗鼠 IgG 或 FITC-羊抗人 IgG (1:100), 避光孵育 1 h; PBS 洗涤 (3 min, 3

次), DAPI 染核 10 min, 荧光显微镜观察并照相.

1.7 转染细胞上清病毒滴度的检测

收集转染后不同时间点的细胞上清液, 3 000 g 离心 10 min 以去除可能存在的细胞碎片, 分装后保存在 -80℃. naïve Huh-7.5.1 按 1×10^4 个 / 孔接种到 96 孔细胞培养板, 置于含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱孵育. 细胞贴壁后弃培养液, 加入收集的细胞上清液, 继续培养 72 h, 以 NS5A 单克隆抗体为一抗, IFA 检测 HCV 蛋白阳性转染细胞.

2 结 果

2.1 核心基因引入的 5 个突变不影响核心蛋白的表达

HCV J6 株的核心区引入 5 个点突变 (nt406T-A、nt433T-A、nt472G-A、nt479 G-A/481G-A 和 nt613C-A), 获得 F 蛋白表达缺失的 J6CΔF 基因.

将 J6 的核心基因和 J6CΔF 基因分别克隆到 pEGFP-N1 载体上(图 1a), 并转染 293T 细胞. 转染后 72 h, 抽提细胞总 RNA, FQ-PCR 检测核心基因拷贝数, 结果表明 J6C-EGFPN1 和 J6CΔF 无显著性差异(图 1b). IFA 检测转染细胞内核心蛋白的表达, 二者在核心蛋白表达水平没有显著差别(图 1c).

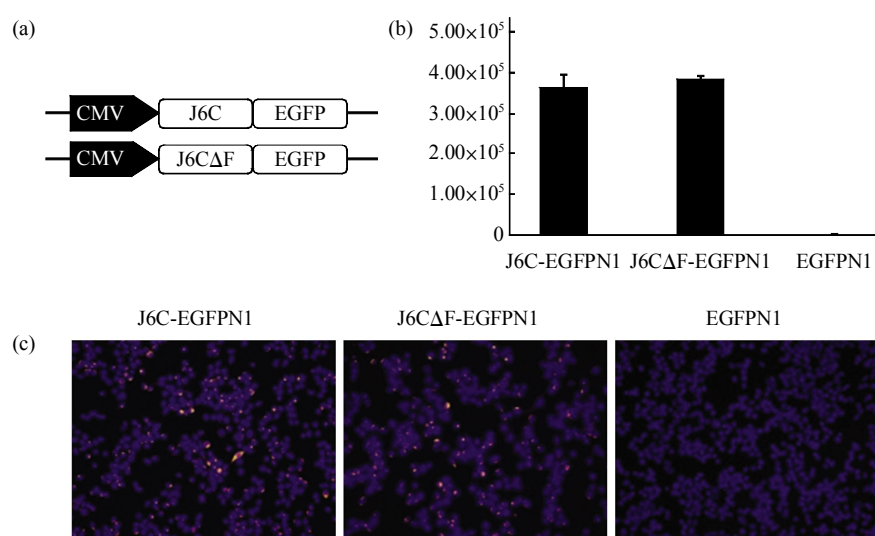


Fig. 1 J6C-EGFPN1 and J6CΔF-EGFPN1 were constructed (a) and RT-qPCR (b) and IFA (c) were carried out 100×

2.2 J6JFH1/ Δ F 转染的细胞病毒蛋白翻译明显减少, 上清病毒滴度显著降低

2.2.1 体外转录 HCV RNA 鉴定. 将体外转录的 J6JFH1、J6JFH1/ Δ F 和 J6JFH1/GND 的 RNA 转录体进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 结果如下, 转录体 RNA 条带单一, 降解很少, 可用于后续的转染实验(图 2).

2.2.2 转染细胞内 HCV 蛋白表达的检测. 体外转录 RNA 经电穿孔法转入 Huh7.5.1 细胞内, 转染后 48 h, IFA 检测细胞内病毒蛋白 NS5A 表达水平, 检测结果如图 3 所示. J6JFH1/ Δ F 转染细胞内病毒蛋白表达水平, 与野生型 J6JFH1 相比明显减少, 阴性对照株 J6JFH1/GND 没有检测到病毒蛋白表达.

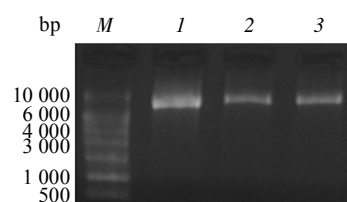


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of HCV RNA *in vitro* transcription

The genome RNA of three virus strains J6JFH1 (lane 1), J6JFH1/ Δ F (lane 2), J6JFH1/GND (lane 3) showed single and clear bands, which illustrated the virus genome RNA was structural integrity, and able to be used for subsequent cell transfection. *M*: Molecular mass marker.

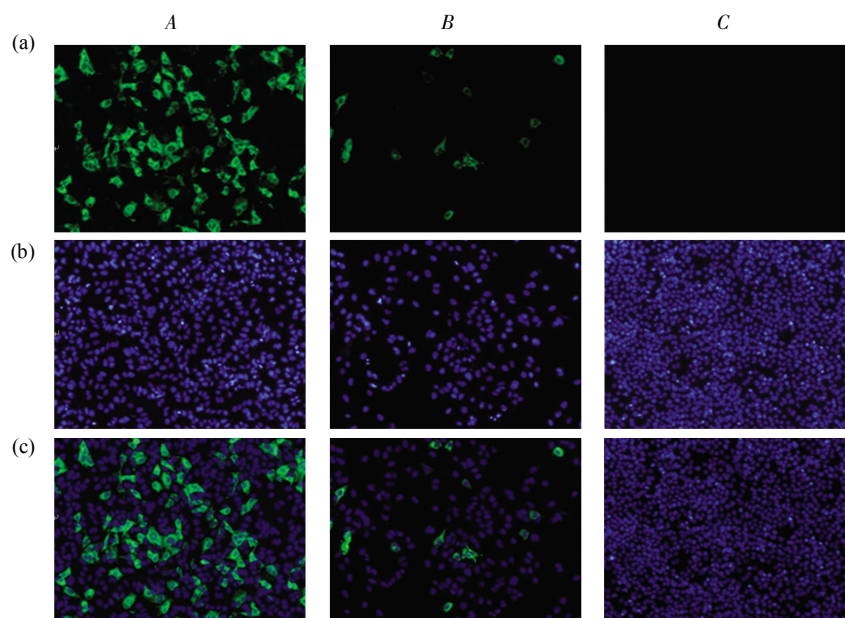


Fig. 3 The level of HCV proteins expressed in Huh7.5.1 cells were detected by Immunofluorescence assay

Wild-type J6JFH1 showed high level of viral proteins expressed in Huh7.5.1 cells (A); J6JFH1/ Δ F was significantly reduced in viral protein expression compared with wild-type (B); J6JFH1/GND (C), viral proteins were not detectable. (a) NS5A, (b) DAPI, (c) (a) & (b) merged. (200 $\times$)

2.2.3 转染细胞内 HCV RNA 水平的变化. 转染后 72 h, 抽提细胞总 RNA, 对 HCV RNA 进行定量分析. 结果如图 4 所示. F 缺失突变型 J6JFH1/ Δ F 细胞内病毒 RNA 含量约为 $(7.39 \times 10^6 \pm 2.54 \times 10^4)$ copies/ml, 与野生型 $(1.17 \times 10^8 \pm 1.46 \times 10^7)$ copies/ml 相比下降约 95% ($P < 0.001$), 结果与细胞内蛋白质表达水平一致.

2.2.4 转染细胞上清中 HCV RNA 及活性病毒颗粒感染性检测. 细胞转染后不同时间点收集细胞上清, 抽提上清 RNA 并对 HCV RNA 进行定量.

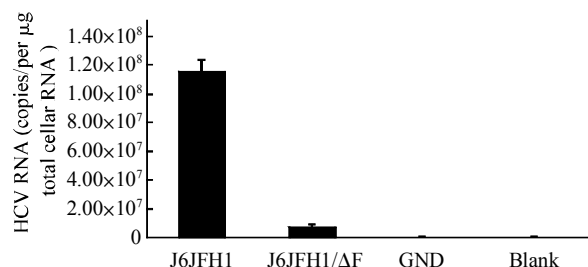


Fig. 4 The mean RNA level in transfected cells

J6JFH1/ Δ F was 7.39×10^6 copies per μ g total cellular RNA, while its corresponding was 1.17×10^8 copies per μ g total cellular RNA. It means that J6JFH1/ Δ F decreased greatly in replication ($(7.39 \times 10^6 \pm 2.54 \times 10^4)$ vs $(1.17 \times 10^8 \pm 1.46 \times 10^7)$, $P < 0.001$).

J6JFH1 RNA, 24 h 开始升高, 48 h 达到最高 (5.40×10^8 copies/ml), 之后开始下降; 而 J6JFH1/ Δ F 也有一个稍微上升的趋势, 但在我们检测的各时间点与野生型相比都显著下降(图 5a), 最高仅为 5.26×10^7 copies/ml. IFA 检测转染细胞上清中的感染性病毒颗粒, 结果如图 5 b 所示, 野生型 48 h 上清中病毒颗粒开始显著增多, 72 h 达到最高为 2.3×10^3 /ml, 与之相比, J6JFH1/ Δ F 转染的细胞上清中感染性病毒颗粒显著减少, 最高时仅为 53/ml, J6JFH1/GND 则不能产生感染性病毒颗粒.

2.3 RNA 二级结构分析

采用二级结构分析软件 RNADraw1.0 对 J6 株核心基因及各突变体的二级结构进行分析, 结果如图 6 所示. 5 个单一的突变(J6JFH1m1、J6JFH1m2、J6JFH1m3、J6JFH1m4、J6JFH1m5)核心蛋白二级结构基本不变, 与野生型 J6 核心蛋白基本一致. 而同时含有 5 个突变的 F 缺失型 J6JFH1/ Δ F 核心蛋白二级结构发生很大改变, 茎环结构与野生型 J6 核心蛋白有很大不同.

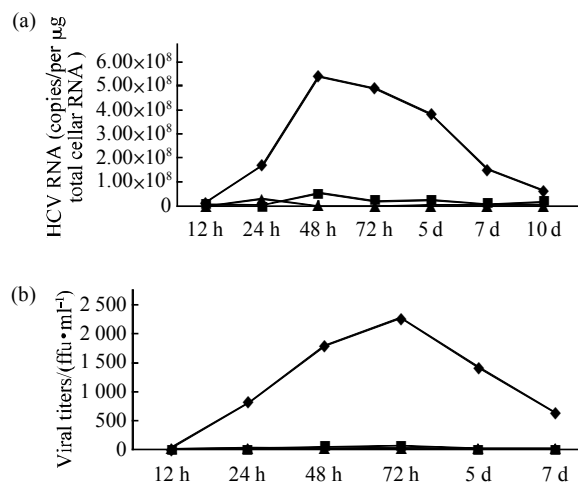


Fig. 5 HCV RNA level and viral titres in cell supernatant

J6JFH1 RNA began to increase from 24 h, and reached the maximum at 48 h post transfection. While J6JFH1/ Δ F also had a slight upward trend, but was significantly lower than wild type at each time point in our experiment (a). J6JFH1/ Δ F was also lower in viral titres than wild type (b). ◆◆: J6JFH1; ■■: J6JFH1/ Δ F; ▲▲: GND.

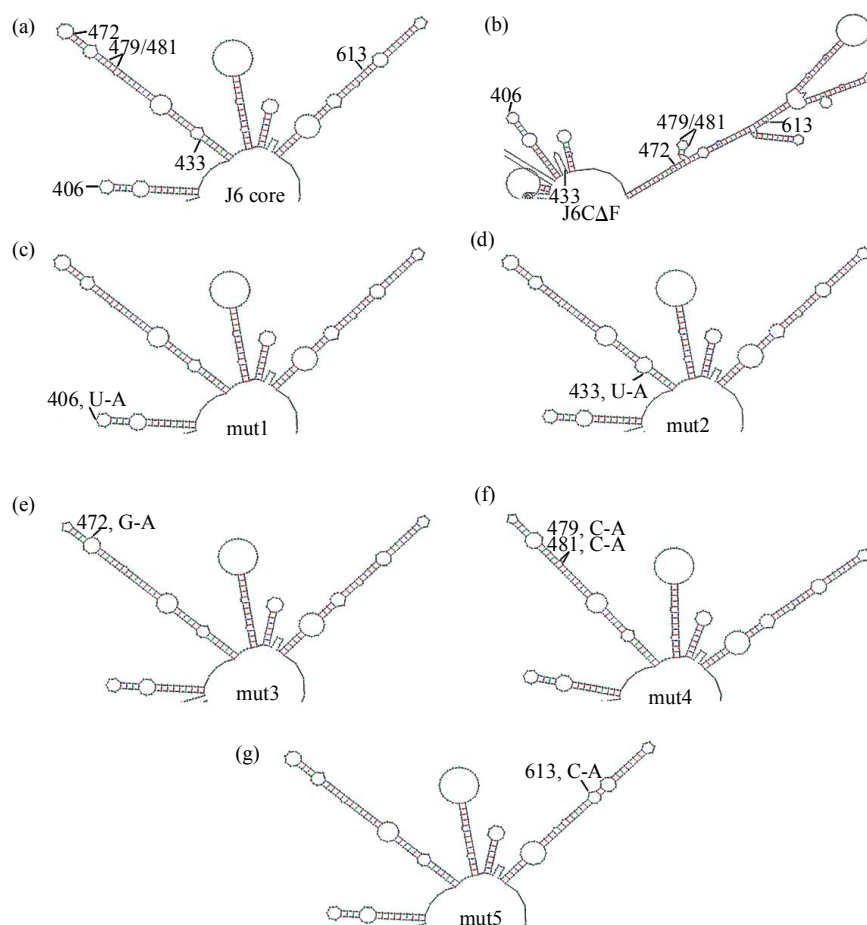


Fig. 6 HCV J6 core gene secondary structure, mutations have been out in the diagram

Five single mutant strains is consistent with the wild-type core gene secondary structure; F deletion J6C Δ F secondary structure has undergone great change. (a) J6 core. (b) J6C Δ F. (c) mut1(nt406U-A). (d) mut2(nt433U-A). (e) mut3(nt472G-A). (f) mut4(nt479C-A/nt481C-A). (g) mut5(nt613C-A).

2.4 单一突变病毒株的复制翻译及转染细胞上清病毒滴度水平无明显改变

2.4.1 突变体体外转录 RNA 鉴定. 构建单一突变体 J6JFH1m1 (nt406T-A)、J6JFH1m2 (nt433T-A)、J6JFH1m3 (nt472G-A)、J6JFH1m4 (nt479/481G-A, G-A) 和 J6JFH1m5 (nt613C-A), 体外转录, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析(图 7).

2.4.2 转染细胞内 HCV 蛋白表达. 将制备的单突变体 RNA 转录体电穿孔转染 Huh7.5.1 细胞, 转染后 48 h IFA 检测细胞内 HCV NS5A 蛋白的表达情况(图 8). 5 个单一突变体病毒在细胞内 HCV 蛋白表达水平与野生型基本一致, 而 J6JFH1/ Δ F 与野生型和单一突变型相比病毒蛋白表达则明显减少.

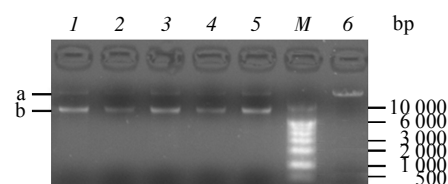


Fig. 7 HCV RNA *in vitro* transcription

1, 2, 3, 4, 5 were respectively J6JFH1m1, J6JFH1m2, J6JFH1m3, J6JFH1m4, J6JFH1m5, 6 was the linearized plasmid template. M was RNA maker 10 000 bp. The two electrophoretic bands were respectively linearized plasmids (a), *in vitro* transcript RNA (b).

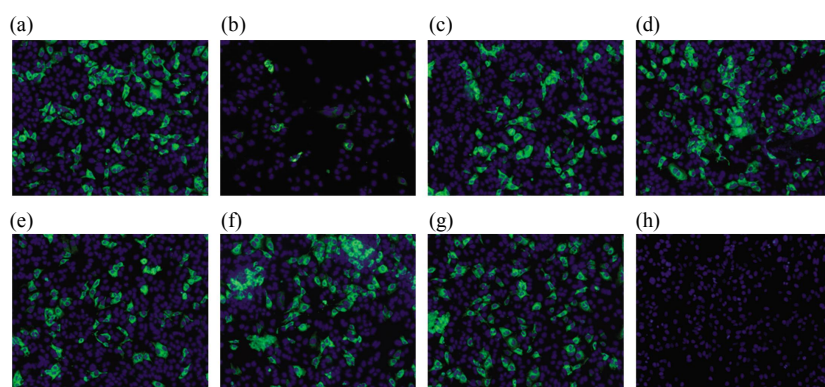


Fig. 8 The level of HCV proteins expressed in Huh7.5.1 cells were detected by Immunofluorescence assay

Single mutation viral strains J6JFH1m1 (c), J6JFH1m2 (d), J6JFH1m3 (e), J6JFH1m4 (f), and J6JFH1m5 (g) did not significantly decrease in NS5A expression compared with wild-type J6JFH1(a). J6JFH1/ Δ F (b) showed lower level NS5A than any other one. 200 $\times$

2.4.3 细胞内 HCV RNA 水平及上清病毒滴度检测. 与野生型 J6JFH1 相比, J6JFH1/ Δ F 细胞总 RNA 中 HCV RNA 水平显著降低(J6JFH1:($7.38 \times 10^5 \pm 1.79 \times 10^5$) copies/ml *vs.* J6JFH1/ Δ F:($2.16 \times 10^5 \pm 0.35 \times 10^5$) copies/ml

$P=0.033$). J6JFH1/ Δ F 与其他各组相比均有显著性差异, 组间差异 $P=0.02$. 而在 J6JFH1 和 J6JFH1m1、J6JFH1m2、J6JFH1m3、J6JFH1m4、J6JFH1m5 没有显著性差异, $P=0.119$ (图 9a). 上述检测表明

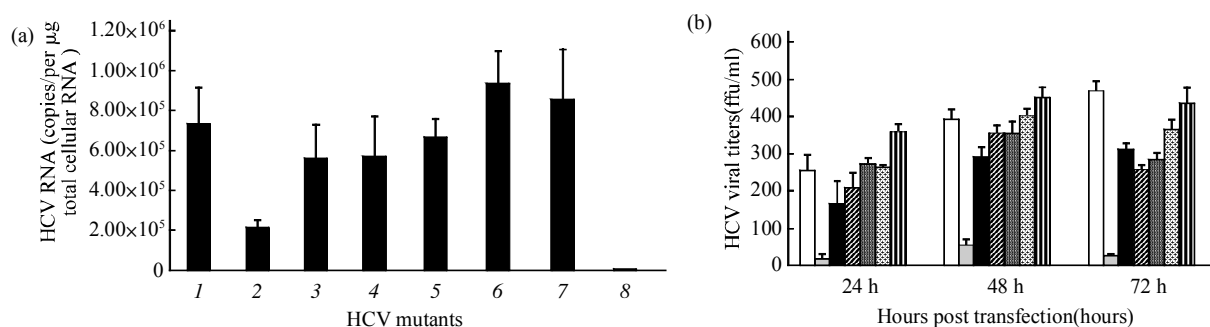


Fig. 9 HCV RNA level in transfected cells (a) and viral titers in cell supernatant (b)

HCV RNA levels in transfected were consistent with NS5A expression (a), and result in low infectious virus particles titration (b). 1: J6JFH1; 2: J6JFH1/ Δ F; 3: J6JFH1m1; 4: J6JFH1m2; 5: J6JFH1m3; 6: J6JFH1m4; 7: J6JFH1m5; 8: GND. □: J6JFH1; ▤: J6JFH1/ Δ F; ■: J6JFH1m1; ▨: J6JFH1m2; ▩: J6JFH1m3; ▪: J6JFH1m4; ▫: J6JFH1m5; ▬: GND.

HCV 蛋白表达和 RNA 复制趋势是一致的。

与野生型相比, J6JFH1/ Δ F 释放到上清病毒减少 90%以上(图 9b), J6JFH1/ Δ F 与其他各组相比 3 个时间点检测均有统计学差异, 组间差异 $P < 0.001$, 其他各组组间差异相对较小。

3 讨 论

F 蛋白是 HCV 核心区编码序列的移码编码产物, 编码 F 蛋白的开放阅读框与编码核心蛋白的序列重叠, 可由+1 移位编码或+1 读码框上的内源翻译起始位点产生。在 HCV-1a 型中, 在核心序列的密码子 8 至 11 位富含 A 的编码区发生移码, 产生一个与核心蛋白具有相同的 N 端序列的分子质量为 17 ku 的新蛋白(p17)^[9]; HCV-1b 中的移码发生在核心基因的 42 位密码子处, 并在密码子 144 处产生-1 移码, 从而产生一种 N 端和 C 端为核心蛋白序列、中间区域为 F 蛋白序列的杂合蛋白形式^[10]。密码子 26 被认为是内部翻译起始位点^[15]。

Core+1/S 是目前发现的最短的 F 蛋白, 这一蛋白质产生于核心蛋白编码区的 85~87 位, 是 F 蛋白内部起始翻译的主要位点^[26-27]。至目前为止, 核心编码区发现的移码蛋白主要有以上这些形式, 但对于 F 蛋白的功能至今还比较模糊^[28]。

为进一步研究 F 蛋白的功能, 明确其对丙型肝炎病毒复制和感染造成的影响, 我们首先构建了 F 蛋白缺失的突变体 J6JFH1/ Δ F, 与野生型 J6JFH1 相比, J6JFH1/ Δ F RNA 转录体转染细胞内蛋白质表达水平显著降低, 病毒 RNA 水平也下降了近 95%, 释放到上清中的活性病毒颗粒明显减少, 上清中病毒颗粒滴度为野生型的 0.5%。为了确认 5 个突变在上述改变中的作用, 分别将 5 个突变位点引入 J6JFH1 上, 形成 J6JFH1m1、J6JFH1m2、J6JFH1m3、J6JFH1m4 和 J6JFH1m5 单一突变体。这些突变没有改变核心蛋白的氨基酸序列, 只是在 Core+1 的读码框上引入终止密码子。22 位密码子突变(mut1/nt406)终止由核心密码子 8 至 11 位移码的 F 蛋白的翻译; 31 位密码子突变(mut2/nt433)终止 26 位内源密码子起始的 F 蛋白的翻译; 密码子 44(mut3/nt472)及 46(mut4/nt479+nt481)的突变分别终止 42 位密码子移码产生的 F 蛋白翻译, 以及所有上游位点的 F 蛋白的翻译。Mut4 的目的是作为一个补充, 以确保上游翻译出的 F 蛋白有效地终止。最后, 90 位密码子突变(mut5/nt613)终止由 85 或 87 内源起始的 F 蛋白翻译, 以及所有上游启动

的 F 蛋白的翻译。

将制备的 5 个突变体 RNA 转录体转染 Huh7.5.1 细胞, 检测细胞内病毒蛋白表达, 转染细胞上清病毒 RNA 以及对上清病毒滴度测定, 发现 5 个单独突变体和野生型之间没有显著性差异。考虑到引入的突变可能对 HCV 核心基因区 RNA 的二级结构引起变化, 核心基因区二级结构的改变可能影响 HCV RNA 复制和翻译, 我们用二级结构分析软件 RNADraw1.0 对 J6 株核心基因区二级结构进行分析, 5 个单一突变体核心蛋白二级结构基本不变, 而同时含有 5 个突变的 J6JFH1/ Δ F 核心蛋白二级结构发生很大改变, 茎环结构与野生型 J6 核心蛋白有很大不同。结合二级结构分析结果, J6JFH1/ Δ F 病毒株复制和翻译及感染性病毒颗粒的减少可能不是由于 F 蛋白缺失造成的, 而是核心基因区二级结构的改变影响了病毒 RNA 复制和翻译, 其具体机制有待进一步研究。

上述数据表明, F 蛋白对病毒的复制和感染性没有影响, 尽管如此, 尚不能肯定 F 蛋白是 HCV 的副产物, 对病毒没有任何作用。本实验基于 HCV 体外感染细胞模型 Huh7.5.1, 该模型不能用于研究 F 蛋白与宿主的相互作用, F 蛋白是否与 C 蛋白类似, 通过各种信号转导机制影响宿主调节因子或免疫系统^[29], 进而对 HCV 病毒致病性或慢性化产生影响, 目前还不得而知。有文章报道, F 蛋白与核心蛋白及 NS5A 相似, 亚细胞定位于内质网, 但保守型比核心蛋白略低。F 蛋白是否行使 C 蛋白的某些功能、干扰宿主信号转导途径、参与病毒致病和慢性化以及是否影响宿主免疫系统等问题都有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Di Bisceglie A M. Natural history of hepatitis C: Its impact on clinical management. *Hepatology*, 2000, **31**(4): 1014-1018
- [2] Hoofnagle J H. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*, 2002, **36**(5 Suppl 1): S21-S29
- [3] Poynard T, Yuen M F, Ratziu V, *et al.* Viral hepatitis C. *Lancet*, 2003, **362**(9401): 2095-2100
- [4] Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res*, 2004, **63**: 71-180
- [5] Alter M J. Epidemiology of hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1996, **8**(4): 319-323
- [6] Choo Q L, Kuo G, Weiner A J, *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989, **244**(4902): 359-362

- [7] Houghton M, Abrignani S. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature*, 2005, **436**(7053): 961–966
- [8] Moradpour D, Penin F, Rice C M. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*, 2007, **5**(6): 453–463
- [9] Xu Z, Choi J, Yen T S, *et al.* Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J*, 2001, **20**(14): 3840–3848
- [10] Varaklioti A, Vassilaki N, Georgopoulou U, *et al.* Alternate translation occurs within the Core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem*, 2002, **277**(20): 17713–17721
- [11] Walewski J L, Keller T R, Stump D D, *et al.* Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA*, 2001, **7**(5): 710–721
- [12] Branch A D, Stump D D, Gutierrez J A, *et al.* The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis*, 2005, **25**(1): 105–117
- [13] Boulant S, Becchi M, Penin F, *et al.* Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *J Biol Chem*, 2003, **278**(46): 45785–45792
- [14] Boumlic A, Vassilaki N, Dalagiorgou G, *et al.* Internal translation initiation stimulates expression of the ARF/core+1 open reading frame of HCV genotype 1b. *Virus Res*, 2011, **155**(1): 213–220
- [15] Baril M, Brakier-Gingras L. Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(5): 1474–1486
- [16] Vassilaki N, Boleti H, Mavromara P. Expression studies of the HCV-1a core+1 open reading frame in mammalian cells. *Virus Res*, 2008, **133**(2): 123–135
- [17] Vassilaki N, Mavromara P. Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J Biol Chem*, 2003, **278**(42): 40503–40513
- [18] Dalagiorgou G, Vassilaki N, Foka P, *et al.* High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma. *J Gen Virol*, 2011, **92**(Pt 6): 1343–1351
- [19] Qureshi H, Qazi R, Hamid S, *et al.* Identification of immunogenic regions within the alternative reading frame protein of hepatitis C virus (genotype 3). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011, **30**(9): 1075–1083
- [20] Yuksek K, Chen W L, Chien D, *et al.* Ubiquitin-independent degradation of hepatitis C virus F protein. *J Virol*, 2009, **83**(2): 612–621
- [21] Drouin C, Lamarche S, Bruneau J, *et al.* Cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus (HCV) alternate reading frame protein (ARFP) are undetectable during acute infection. *J Clin Virol*, 2010, **47**(1): 102–103
- [22] Vassilaki N, Friebe P, Meuleman P, *et al.* Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *J Virol*, 2008, **82**(23): 11503–11515
- [23] Inmaculada Castillo, Elena Rodriguez-Inigo, Juan Manuel Lopez-Alcorocho, *et al.* Comparative study on the clinical and virological characteristics among patients with single occult hepatitis B virus (HBV), single occult hepatitis C virus (HCV) and occult HBV and HCV dual infectio. *J Med Virol*, 2007, **79**(3): 236–241
- [24] Ding H, Liu Y, Bian Z Q, *et al.* Stably silencing of CD81 expression by small interfering RNAs targeting 3' -NNTR inhibits HCV infection. *Hepatitis Monthly*, 2008, **8**(4): 2267–2274
- [25] Winer J, Jung C K, Shackel I, *et al.* Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. *Anal Biochem*, 1999, **270**(1): 41–49
- [26] Vassilaki N, Boleti H, Mavromara P. Expression studies of the Core+1 protein of the hepatitis C virus 1a in mammalian cells. The influence of the Core protein and proteasomes on the intracellular levels of Core+1. *FEBS J*, 2007, **274**(16): 4057–4074
- [27] Wolf M, Dimitrova M, Baumert T F, *et al.* The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by Core protein expression. *Nucl Acids Res*, 2008, **36**(9): 3054–3064
- [28] Budkowska A, Kakkanas A, Nerrienet E, *et al.* Synonymous mutations in the core gene are linked to unusual serological profile in hepatitis C virus infection. *PLoS One*, 2011, **6**(1): e15871
- [29] Gao D Y, Jin G D, Yao B L, *et al.* Characterization of the specific CD4+ T cell response against the F protein during chronic hepatitis C virus infection. *PLoS One*, 2010, **5**(12): e14237

Effect of Hepatitis C F Protein and Core Secondary Structure on Viral Replication and Infection*

WANG Wen-Bo, XU Gang, WANG Yan, TAO Qing-Yuan, REN Hao**, QI Zhong-Tian**

(Department of Microbiology, The Second Military Medical University, Key Laboratory of Biodetection and Biodefense of PLA, Shanghai Key Laboratory of Medical Biodefense, Shanghai 200433, China)

Abstract Hepatitis C virus (HCV) F protein has been identified for more than ten years, but its functions remain unclear. In order to understand its roles in viral replication and infection, in this study 5 stop codons (nt406T-A, nt433T-A, nt472G-A, nt479/481G-A, G-A, nt613C-A) were introduced in plasmid J6JFH1 to construct J6JFH1/ Δ F which interrupt F protein expression, and then monitor the viral RNA replication and viral protein expression. Our data showed that the five mutations did not affect core gene replication and expression. The virus strain J6JFH1/ Δ F significantly reduced in the expression of viral proteins in transfected cells compared with wild-type J6JFH1, and viral RNA levels dropped by nearly 95% (J6JFH1/ Δ F ($7.39 \times 10^6 \pm 2.54 \times 10^4$) *vs* wild type ($1.17 \times 10^8 \pm 1.46 \times 10^7$), $P < 0.001$). The infectivity of virus released into the supernatant significantly reduced similarly. Further study found that these five mutations changed secondary structure of HCV core gene. In order to further explore the underlying reasons for the weakening of J6JFH1/ Δ F virus replication and infection, we constructed five separate mutant viruses based on J6JFH1, respectively, and form J6JFH1m1 nt406T-A, J6JFH1m2 nt433T-A, J6JFH1m3 nt472G-A, J6JFH1m4 nt479/481G-A, G-A, J6JFH1m5 nt613C-A. These 5 virus mutants do not influence the secondary structure of the core region, while J6JFH1m1, J6JFH1m2, J6JFH1m3, J6JFH1m4, J6JFH1m5 respectively stopped F protein expression shifting from nt374-383, nt417-419, nt436-445, nt474-477, nt597-605, in which J6JFH1m5 stopped all reported forms of F protein. By *in vitro* transcription and transfection into Huh7.5.1 cells, 48 hours post-transfection, the detection of intracellular viral protein NS5A expression levels, viral RNA in transfected cells, and virus titers in supernatant were carried out. The results showed that no significant differences were found among groups five separate mutants and wild type. These results indicated that the lack of F protein itself did not affect HCV viral replication and virion assembly and infectivity. All the results were seemed to result from the secondary structure of the core gene, but the mechanism was yet to be further studied. We concluded that HCV F protein deficiency did not affect translation of viral replication and packaging and release of virus particles, the core gene secondary structure changes had a great impact on viral replication and protein expression.

Key words hepatitis C virus, F protein, core protein, secondary structure, viral replication

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00272

*This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of China (30872247), Important National Science and Technology Special Projects for Prevention and Treatment of Major Infectious Diseases (2012ZX10002-003, 2012ZX10004801-002-005), Shanghai LAD Project (B901).

**Corresponding author.

REN Hao. Tel: 86-21-81870996, E-mail: hmren@yahoo.com

QI Zhong-Tian. Tel: 86-21-81870988, E-mail: qizt@smmu.edu.cn

Received: June 16, 2011 Accepted: July 25, 2011