

与丙型肝炎病毒复制中间体 3' 末端结合的 宿主蛋白的研究*

邓庆丽** 黄开红 邵 静 黄志明

王 巍

(中山大学孙逸仙纪念医院医学研究中心, 广州 510120)

(中山大学肿瘤防治中心内科, 广州 510060)

摘要 宿主细胞蛋白在 HCV 复制过程中起着重要的作用. 应用蛋白质-核酸紫外交联法检测多个细胞株, 目的是明确是否存在可与 HCV 复制中间体 3' 末端特异性结合的细胞蛋白质. 结果显示, 在多个细胞株中存在一个分子质量约为 45 ku 的蛋白质 (命名为 p45), 可与 HCV 复制中间体 3' 末端 131~278 nt 结合, 这种结合可被过量的自身未标记 RNA 竞争抑制, 而非同源蛋白和非同源 RNA 均不能竞争抑制这种结合. 根据计算机 RNA 二级结构分析推测, p45 可能特异性结合于 HCV 复制中间体 3' 端的一茎环结构内. 这一结果提示, p45 在 HCV 子代 RNA 复制中可能起着重要作用.

关键词 丙型肝炎病毒, 复制体, 蛋白质-核酸紫外交联试验

学科分类号 Q78

丙型肝炎病毒 (HCV) 的感染常可导致慢性肝炎及肝硬化, 与肝癌的发生密切相关. 目前, HCV 的复制过程尚未清楚. 由于没有成熟的细胞模型, 而动物模型价格昂贵, 体外实验仍为研究其复制分子机理的主要手段. HCV 基因组全长约 9.3~9.4 kb, 两端各有一非编码区. 在复制的初期, 宿主细胞来源的聚嘧啶束结合蛋白 (PTB) 可与 HCV 数种非结构蛋白共同结合于正链 RNA 3' 末端非编码区 (3'-UTR) 茎环结构的保守序列, 通过此复制体促进负链 RNA 合成^[1,2]. 而在正链 RNA 合成的启动方面, 尽管还不完全清楚负链 3' 末端的二级结构, 但我们已证明 HCV 非结构蛋白 NS5B 作为 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RDRP), 可特异性结合于 HCV 复制中间体末端, 即负链 RNA 3' 末端^[3]. 为进一步研究 HCV 的复制机理, 本文用蛋白质-核酸紫外交联法 (UV cross-linking) 检测多个细胞株, 以明确是否存在细胞蛋白质与 HCV 负链 RNA 3' 末端特异性结合, 并且将 HCV 负链 3' 末端分为不同区域, 对细胞蛋白质结合的区域进行限制性分析, 以此推测子代 RNA 合成启动时的分子机制.

1 材料与方法

1.1 材料

将 HCV 日本株 5' UTR cDNA (核苷酸位点 1~586) 反向插入质粒 pGEM-7 (*Sma* I 酶切位

点), 因而在反向 5' UTR cDNA 序列上游含 T₇ 启动子, 下游含限制性内切酶 *Hind* III 的酶切位点, 构建所得的 HCV 负链 RNA 体外转录质粒命名为 pHCVN-3; 另外, 可体外转录负链 3' 端 585 nt 各片段的质粒 pT₇N466、pT₇N366、pT₇N278、pT₇N84、pT₇N585~467、pT₇N466~279、pT₇N278~131 和 pT₇N278~85, 以同样方法构建 (图 1).

大肠杆菌 JM109、肝癌细胞株 HepG₂、H7402、胰腺癌细胞株 Sw-1990、胃癌细胞株 7901、宫颈癌细胞株 HeLa、猴肾细胞株 COS-7 均来自本研究中心; 质粒提取试剂盒购自 QiaGen 公司, 蛋白质定量试剂盒购自 Bio-Rad 公司, RNA 合成试剂盒购自 Promega 公司, α -³²P 标记 UTP (1.11×10^{14} Bq/mmol) 购自北京市亚辉生物医学工程公司, 15 W 紫外透射仪购自 UVI 公司.

1.2 细胞蛋白质的提取

各细胞株采用 DMEM 等液体培养基 37℃ 于 CO₂ 培养箱内培养, 不同生长期收集细胞, 用预冷的磷酸盐缓冲液冲洗三次, 加入细胞裂解液裂解后, 硫酸铵沉淀上清蛋白, 溶解后于透析缓冲液内透析过夜, 分量保存于 -80℃ 冰箱, 留取少量测定蛋白质浓度.

* 广东省自然科学基金资助项目 (990098, 990101).

** 通讯联系人.

Tel: 020-81332415, E-mail: qldeng3@163.net

收稿日期: 2001-05-14, 接受日期: 2001-06-28

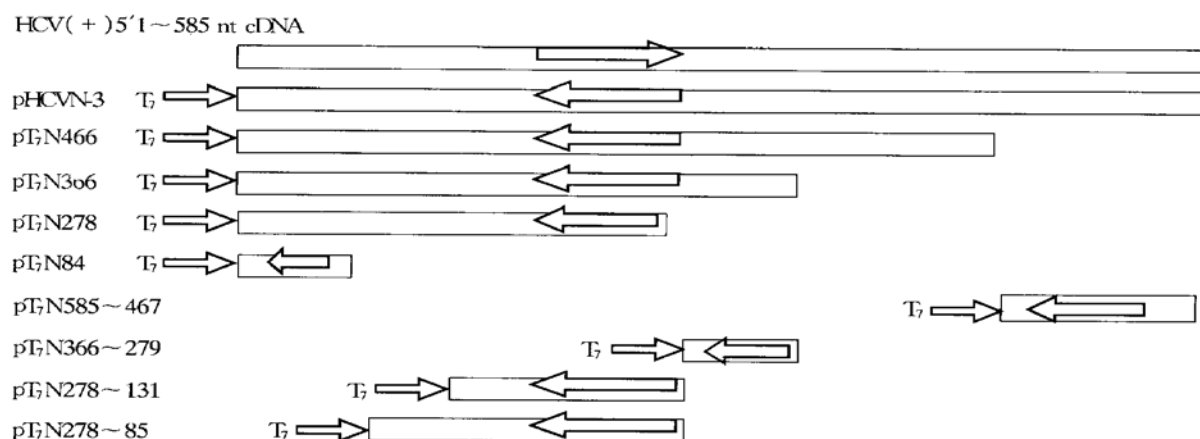


Fig. 1 Schematic diagrams of HCV 3'-terminal sequence transcripts used in this study

1.3 质粒的纯化与体外转录制备 RNA 探针

用大肠杆菌 JM109 扩增质粒后, 用质粒提取试剂盒提取纯化质粒; 将质粒切为线性, 在 T₇RNA 聚合酶作用下合成 RNA. 探针以 α -³²P UTP 标记. 探针经葡聚糖 Sephadex G50 柱纯化, 乙醇沉淀后溶于 MMK (20 mmol/L MOPS pH 7.6, 25 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂) 缓冲液. 使用前经 45 °C 水浴恢复 RNA 二级结构.

1.4 RNA 结合蛋白的鉴定及特异性分析

采用蛋白质-核酸紫外交联法 (UV cross-linking) 及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE).

UV cross-linking 参照 Furuya 的实验步骤进行^[4]. 将适量细胞浆蛋白质提取物在结合缓冲液 (终浓度 25 mmol/L HEPES pH 7.6, 125 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 10% 甘油, 0.1 mmol/L DTT, 7.5 mmol/L ATP, 10 mmol/L GTP) 中与 10 μ g 酵母 tRNA 混合, 30 °C 水浴 10 min, 然后加入适量³²P 标记的 RNA 探针, 在冰上用 254 nm 的紫外光照射使 RNA-蛋白质复合物共价结合; 经 RNA 酶 A 与 RNA 酶 T₁ 消化裸露在蛋白质-RNA 复合物外的 RNA 以及未与蛋白质结合的游离 RNA 后, 与蛋白质分子质量标记物一起进行 SDS-PAGE 电泳; 最后通过放射自显影识别结合在 RNA 探针上的蛋白质及其分子质量. 用非同源蛋白与非同源 RNA 的竞争试验明确这种 RNA 结合蛋白的结合特异性.

1.5 热力学模型推测负链 3' 端的二级结构

用热力学模型分析软件 RNA draw 1.1b2, 分析预测全长负链 3' 端和特定区域的二级结构, 分析最有可能的结合部位, 从而推断子代正链合成时

在负链 3' 末端的起点.

2 结 果

2.1 与 HCV 负链 RNA 3' 端结合的宿主蛋白的检测

虽然在细胞浆与细胞核内都有 HCV RNA 结合蛋白存在的证据, 但因为 HCV 作为单链 RNA 病毒, 主要在宿主细胞浆内复制, 我们采用胞浆提取物来检测是否有宿主蛋白参与 HCV 的复制过程.

用 [α -³²P] UTP 标记的 HCV 负链 3' 端 585 nt 作为探针来检测肝癌细胞株 HepG2 的胞浆提取物, 发现有一显影条带 (图 2, 箭头所示); 而且随着胞浆提取物量的增加, 这种 RNA 复合物结合作用也逐渐增强, 说明 HepG2 胞浆提取物中可能有蛋白质参与形成此 RNA 复合物 (图 2).

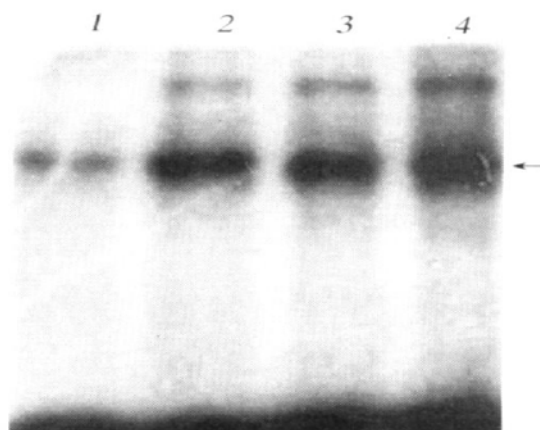


Fig. 2 Interaction of proteins from HepG2 cytoplasm with 3'-terminal sequences of HCV negative strand

1~4: 5 μ g, 10 μ g, 15 μ g, 20 μ g total proteins from HepG2 cytoplasm respectively.

为了确证此 RNA 复合物中与 RNA 结合的是

蛋白质, 我们作了对照试验: a. 不加细胞提取物; b. 不用紫外线照射; c. 在 UV cross-linking 后用蛋白酶 K 消化 30 min. 三种情况均显示这种 RNA 复合物消失, 说明确实有细胞来源的蛋白质与探针发生结合 (图 3). 与蛋白质分子质量标记物对比, 此核酸-蛋白质复合物位于约 45 ku 大小的位置. 为了方便叙述, 我们将此宿主蛋白命名为 p45 (下同).

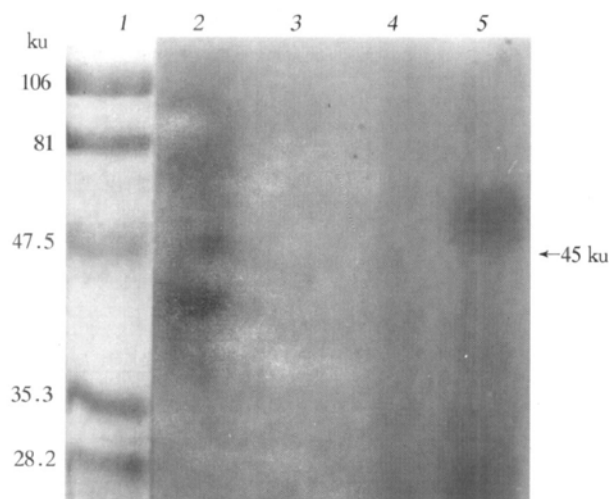


Fig. 3 Identification of proteins from HepG2 cytoplasm interacting with 3'-terminal sequences of HCV negative strand

1: protein marker (Bio-rad); 2: positive control; 3: without total proteins; 4: without UV irradiation; 5: with proteinase K treatment.

2.2 p45 与 HCV 负链 RNA 3' 端结合的特异性分析

如图 4 和图 5 所示, 用过量的 BSA (小牛血清白蛋白) 未能竞争抑制 p45 与 HCV 负链 RNA 3' 端的结合, 过量的 pGEM-7 的 polylinker 转录产物

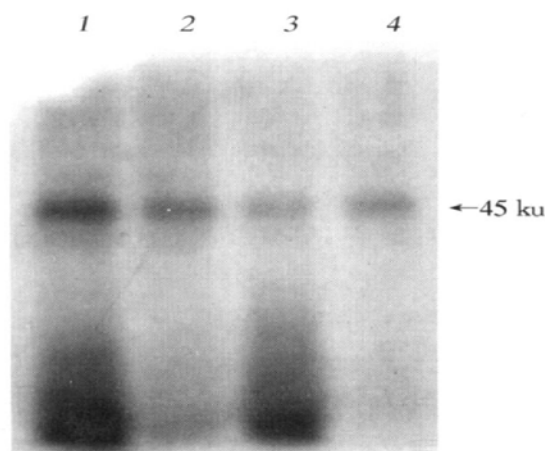


Fig. 4 Competitive interaction of heterogeneous BSA with 3'-terminal sequences of HCV negative strand

1 ~ 4: 10 μ g total proteins; 1: no BSA; 2 ~ 4: 15 μ g, 30 μ g, 60 μ g BSA respectively

与 HIV 的 RRE (Rev-protein response element)

RNA 也未能竞争抑制这一结合作用, 但用未标记的与探针相同的 RNA 作竞争物 (competitor) 时, 加入 20 倍的量即可使结合作用明显减弱, 加 40 倍的量可完全抑制结合作用. 这些结果说明了细胞蛋白质 p45 与 HCV 负链 RNA 3' 端之间的结合是特异性的.

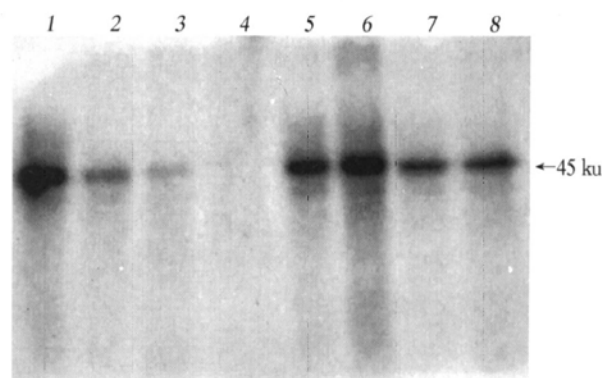


Fig. 5 Competitive interaction of p45 with heterogeneous RNA

1 ~ 8: 32 P labeled 3'-terminal probe of HCV negative-strand; 1: no competitor; 2 ~ 4: 10 $\times$, 20 $\times$, 40 $\times$ non-labeled 3'-terminal sequences of HCV negative-strand; 5, 6: 10 $\times$, 40 $\times$ non-labeled pGEM polylinker transcripts; 7, 8: 10 $\times$, 40 $\times$ non-labeled HIV RRE transcripts.

2.3 p45 是广泛存在于多种细胞株的细胞蛋白质

如图 6 所示, 来源不同的人细胞株 HepG2、H7402、HeLa、7901 均存在可与 HCV 负链 RNA 3' 端结合的细胞蛋白质 p45, 而来源于猴的细胞株 COS-7 则不存在这种蛋白质, 说明 p45 在人体内是一种广泛存在的细胞蛋白质, 并非肝脏细胞系所独有.

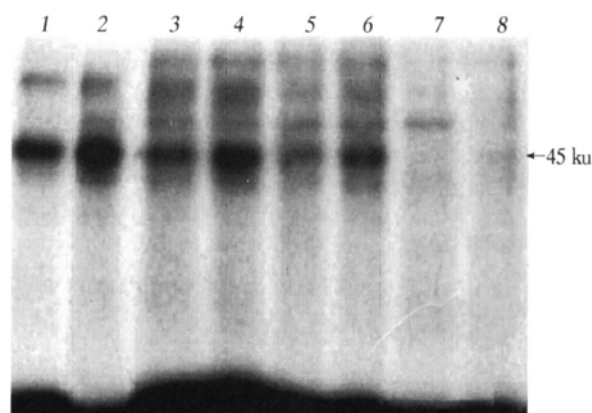


Fig. 6 Expression of p45 in other cell lines

1, 2: 10 μ g, 20 μ g total proteins of H7402; 3, 4: 10 μ g, 20 μ g total proteins of 7901; 5, 6: 10 μ g, 20 μ g total proteins of HeLa; 7, 8: 10 μ g, 20 μ g total proteins of COS-7.

2.4 p45 与 HCV 负链 3' 端的结合区域

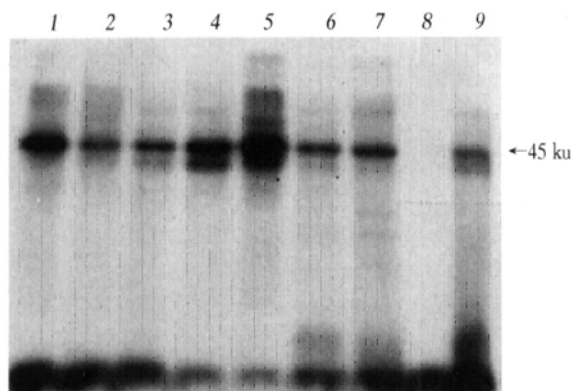


Fig. 7 Competitive interaction of p45 with eight 3'-terminal fragments of HCV negative strand

1 ~ 9: 32 P labeled full-length 3'-terminal probe of HCV negative strand; 1: no competitor; 2 ~ 9: 20 × non-labeled 3'-terminal transcripts of HCV negative strand from pT₇N466, pT₇N366, pT₇N278, pT₇N84, pT₇N585~467, pT₇N466~279, pT₇N278~131 and pT₇N278~85 respectively.

为了初步分析 HCV 负链 3' 末端与 p45 结合的具体区域, 我们构建了 HCV 负链 3' 末端 585 nt 不同区域的转录质粒, 包括 pT₇N466、pT₇N366、

pT₇N278、pT₇N84、pT₇N585~467、pT₇N466~279、pT₇N278~131 和 pT₇N278~85. 经体外转录制备各区域非标记 RNA, 分别作为竞争物用于 UV cross-linking, 加入量为标记探针的 20 倍.

结果显示, 只有 131~278 nt 片段可显著竞争抑制全长负链 3' 端探针与 p45 的结合, 其他区域只能使结合反应强度略为减弱或毫无影响, 初步判断负链 3' 端的 131~278 nt 为 p45 的结合区域 (图 7-8).

用计算机模拟程序通过计算热力学自由能建立负链 3' 端 1~341 nt 二级结构模型. 如图 8 所示, 与 HCV 的 5'-UTR 相似, 负链 3' 端 1~341 nt 可形成四个结构域 I、II、III 和 IV. 结构域 I 为起始部的发夹样结构, 认为与子代正链合成的起始有关, 在整个 3' 端与蛋白质结合过程中起调节作用; 131~278 nt 之间的结构域 III 所含核苷酸最多, 结构最复杂, 由一个长的不规则螺旋结构和多个分枝状茎-环结构组成, 194~201 nt 处的环状结构是最突出的部分, 可能为 p45 的结合位点; 结构域 II 和 IV 由多个小的茎环构成, 考虑在复制启动和与蛋白质结合时起辅助调节作用, 稳定结构域 III 的二级结构 (图 8).

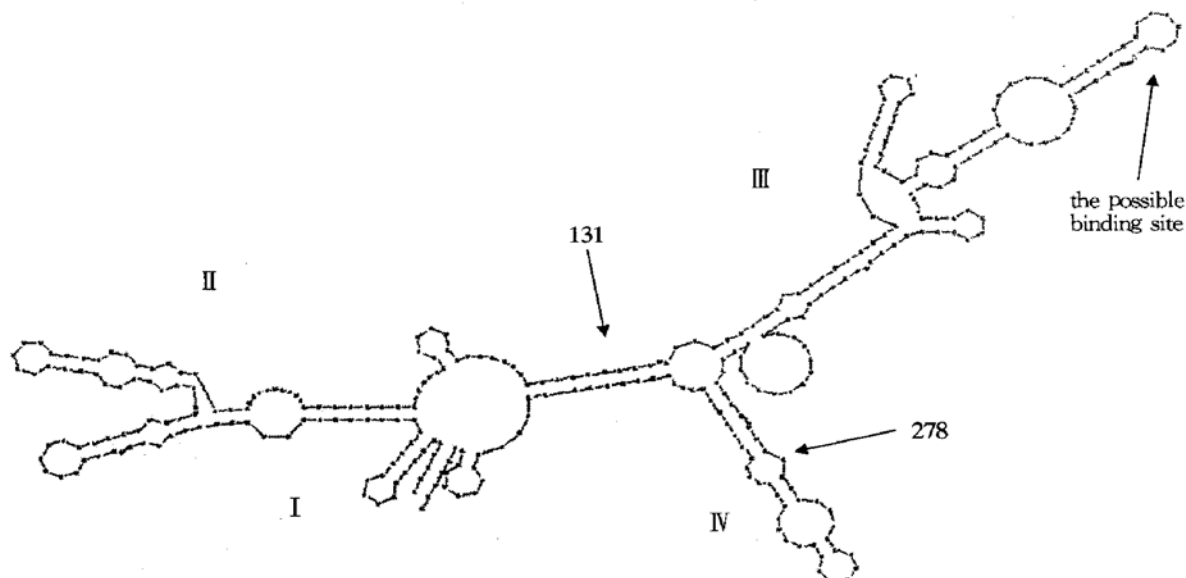


Fig. 8 The possible secondary structure of 3'-terminal 341 nt of HCV negative strand by computer

3 讨论

继乙型肝炎在全球肆虐多年后, 丙型肝炎在全球有增多趋势. 由于不清楚 HCV 复制的具体过程, 难以设计有针对性的治疗及预防措施. 从与 HCV 同属单一正链 RNA 病毒如脊髓灰质炎病毒、

日本脑炎病毒等复制的一般规律来看, 复制过程首先由含 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RDRP)、RNA 螺旋酶在内的数种病毒非结构蛋白与特定的宿主因子结合于正链 3'-UTR 形成复制体, 以 3' 端回文序列形成的发夹样结构作为引物, 合成复制中间体即负链 RNA; 之后, 复制体经分裂与重组重新形成

并结合于负链 3' 端, 促进子代正链 RNA 合成, 同时还控制子代正链 RNA 与复制中间体的数量比例在 10: 1~ 100: 1 之间^[5,6]. 由此可见在单一正链 RNA 病毒复制过程中, 最关键的步骤是正负链 RNA 3' 端复制体的形成过程, 而要研究这个过程, 最基本的是要清楚 3' 端的二级结构和复制体的成分.

HCV 复制这方面, 据多家实验室报道, HCV 正链 RNA 3'-UTR 可形成茎环结构 I、II、III, 宿主蛋白 p58、p87、p130 等作为 PTB 类蛋白, 可特异性结合茎环 II、III 的保守序列, 推测它们和病毒非结构蛋白 NS5B、NS3、NS4A、NS5A 一起与 HCV 正链 RNA 3'-UTR 结合形成复制体^[1,2,7,8], 其中 NS5B 为 RDRP, NS3 为丝氨酸蛋白水解酶、RNA 螺旋酶和三磷酸核苷酶, NS4A 与 NS5A 协助 NS3 起作用, 然后复制体通过正链 3' 端回折形成的发夹状引物来促进负链 RNA 合成^[9]. 作为 HCV 复制中间体的负链 RNA, 其 3'-UTR 的结构尚未有准确报道. 我们以前已证明 HCV NS5B 与复制中间体 3' 端结合的特异性比与正链 3'-UTR 更强. 本次结果证明宿主细胞蛋白 p45 与复制中间体 3' 端 131~ 278 nt 特异结合. 据此推测 HCV 复制中间体 3' 末端的二级茎环结构内存在与蛋白质特异结合的区域, 在负链合成结束后, 原来的复制体分裂, 病毒非结构蛋白如 NS5B、NS3、NS4A 等与宿主蛋白如 p45 结合形成新的复制体, 在引物合成后启动子代正链 RNA 合成.

参 考 文 献

- 1 Tsuchihara K, Tanaka T, Hijikata M, *et al.* Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with extreme 3' terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3' X. *J Virol*, 1997, **71** (9): 6720~ 6726
- 2 Takayoshi I T O, Lai M M C. Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome. *J Virol*, 1997, **71** (11): 8698~ 8706
- 3 黄志明, 黄开红, 邓庆丽, 等. NS5B 与 HCV 负链 RNA 3' 末端特异性结合的分析. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (3): 392~ 395
Huang Z M, Huang K H, Deng Q L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (3): 392~ 395
- 4 Furuya T, Lai M M. Three different cellular proteins bind to complementary sites on the 5'-end-positive and 3'-end-negative strands of mouse hepatitis virus RNA. *J Virol*, 1993, **67** (10): 7215~ 7222
- 5 Chen C J, Kuo M D, Chien L J, *et al.* RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *J Virol*, 1997, **71** (5): 3466~ 3473
- 6 Banerjee R, Echeverri A, Dasgupta A. Poliovirus-encoded 2C polypeptide specifically binds to the 3'-terminal sequences of viral negative-strand RNA. *J Virol*, 1997, **71** (12): 9570~ 9578
- 7 Inoue Y, Miyazaki M, Ohashi R, *et al.* Ubiquitous presence of cellular proteins that specifically bind to the 3' terminal region of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **245** (1): 198~ 203
- 8 Luo G. Cellular proteins bind to the poly (U) tract of the 3' untranslated region of hepatitis C virus RNA genome. *J Virol*, 1999, **256** (1): 105~ 118
- 9 Behrens S E, Tomei L, Francesco R D. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *The EMBO J*, 1996, **15** (1): 12~ 22

A Cellular Protein p45 Specifically Binds to The 3'-end of Hepatitis C Virus Intermediate Negative-strand RNA*

DENG Qing-Li**, HUANG Kai-Hong, SHAO Jing, HUANG Zhi-Ming

(Medical Research Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

WANG Wei

(Cancer Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China)

Abstract In order to study the possible mechanism of the cellular proteins involved in the process of replication of HCV RNA. UV cross-linking experiment was used to identify the cellular proteins which bind to the 3'-end of HCV intermediate negative-strand RNA. Results showed that a protein with approximate molecular mass of 45 ku (p45) cross-linked with the 3'-end 131~ 278 nt of HCV intermediate negative-strand RNA. The p45 presented in various cell lines of different origins. The amounts of RNA-protein complexes increased with increasing amounts of cellular extracts. Non-homologous proteins and RNA transcripts could not compete for the binding between p45 and the 3'-end of HCV intermediate negative-strand RNA. These results suggested that

the cellular protein p45 can specifically bind to the secondary structure of the 3'-end of HCV intermediate negative-strand RNA, thus p45 may play an important role in HCV RNA replication.

Key words hepatitis C virus, replica, UV cross-linking

* This work was supported by a grant from the Scientific Research Grant of Guangdong Province (990098, 990101).

** Corresponding author. Tel: 86-20-81332415, E-mail: qldeng3@163.net

Received: May 14, 2001 Accepted: June 28, 2001

光间受体视黄类物质结合蛋白 (IRBP) 的研究概况

于 黎^{1,2)} 李庆伟²⁾ 张亚平¹⁾

(¹⁾中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室, 昆明 650223;

²⁾辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029)

光间受体视黄类物质结合蛋白 (IRBP) 是一种仅在脊椎动物视网膜的光间受体基质 (IPM) 中发现, 并由光受体细胞合成并分泌的较大的单亚基糖酯类蛋白。由于它能够结合各种异构形式和化学形式的视黄类物质和脂酸, 因而在视循环中作为转移视黄类物质和脂酸的主要运输工具, 同时也具有保护视黄类物质免于降解和减少视黄类物质潜在的细胞毒性等作用。除了上述功能外, IRBP 在调控视黄类物质定位、新陈代谢以及各方面活性等方面也都有不同的特异性能, 因而是一种重要的蛋白质成分。

目前对此蛋白质基因结构的研究表明, *IRBP* 基因是不包括任何高度重复或中度重复序列的单拷贝基因。牛及人类等大多数哺乳动物及两栖类的 *IRBP* 基因都是由四个外显子和三个内含子组成, 进而编码形成含有四倍重复结构且大小约为 140 ku 的 IRBP。之所以存在此种结构特征的原因及意义还不清楚, 可能与 IRBP 结合视黄类物质和脂类有关。

大多数的报道中, 都认为 IRBP 具有两个结合视黄类物质的位点即每个 IRBP 分子可以结合两个分子的视黄类物质, 而 Shaw 和 Noy 等最近提出 IRBP 包括 3 个视黄类物质结合位点, 由于每个 IRBP 分子包括 4 个重复结构, 通过一定的研究, 也有人提出每个重复结构都有脂类结合位点, 至少有 4 个结合位点, 这就与以前提出的需要两个重

复结构来结合一分子脂类的观点相悖。因而在这方面仍然存在着大量争论。关于视黄类物质结合蛋白是如何在活性位点结合和释放脂类的分子机制方面, 理论上普遍认为廿十二碳六烯酸即 DHA 是促进 IRBP 的结合位点结合和释放脂类的一个开关, 但是 IRBP 的结构是如何具体行使其功能以及其结合位点的具体位置却仍然需要进一步的研究。由于此蛋白质在分子大小、重复结构、结合位点等方面都表现出其特殊性, 所以, IRBP 可以作为研究此类型蛋白质的一个进化模型。

根据 *IRBP* 基因表达发生在光受体分化早期, 且 IRBP 能够结合作为光受体外膜 (ROS) 完整结构必要成分的脂肪酸这两方面的证据。研究表明: IRBP 对于光受体的正常发育也是必需的。IRBP 的缺失, 可以破坏光受体细胞的完整性结构, 丧失光敏感度。而且此蛋白质与鼠及灵长类中的葡萄膜炎也有关。这些现象都表明 *IRBP* 可以被看作是某些形式的先天性视网膜退化的潜在候选基因。

由于 *IRBP* 是近年来才被广泛进行研究的一种蛋白质, 因而在许多方面都存在着悬而未决的问题需要进一步澄清, 如有关其结构是如何完成相应的功能, 结合位点的确切位置等一些重要的作用机制及其某些重要特征。同时, 在某些方面也存在着不同程度的争论, 如此蛋白质的结合位点数目等等, 这都需要我们用足够的时间和精力去解决。