

HBsAg 基因启动子 I DNA 结合蛋白 1 下调 IL-18 基因启动子

杨 媛, 洪 源, 成 军, 赵英仁, 黄燕萍, 王建军

杨媛, 赵英仁, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
洪源, 成军, 黄燕萍, 王建军, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所
基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
杨媛, 女, 1979-01-01 生, 陕西省西安市人, 汉族, 西安交通大学 2002 级
硕士研究生, 主要从事病毒性肝炎的分子生物学发病机制的研究。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队九五科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队十五科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第
302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实
验室, cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

Down-regulatory effects of HBsAg promoter I DNA binding protein 1 on IL-18 gene expression

Yuan Yang, Yuan Hong, Jun Cheng, Ying-Ren Zhao, Yan-Ping Huang, Jian-Jun Wang

Yuan Yang, Ying-Ren Zhao, Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China
Yuan Hong, Jun Cheng, Yan-Ping Huang, Jian-Jun Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689
Correspondence to: Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of Chinese PLA, 100 Xisihuan Zhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2004-05-28 Accepted: 2004-09-30

Abstract

AIM: To investigate the relationship between HBsAg promoter I DNA binding protein 1 (SBP1) and IL-18 promoter gene expression.

METHODS: Recombinant plasmid, named pcDNA3.1(-)-SBP1, were constructed by inserting a gene fragment of hepatitis B virus surface antigen promoter I DNA binding protein1 (SBP1) into pcDNA3.1(-). Then it was transfected into HepG2 cells transfected with pCAT3-IL-18P by FuGENE 6 transfection reagents. The activity of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) in HepG2 cells was detected by enzyme-linked immunoassay (ELISA) after 48 h.

RESULTS: pcDNA3.1(-)-SBP1 was confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. The expression of CAT in HepG2 cells co-transfected with pCAT3-IL-18P and pcDNA3.1(-)-SBP1 was 0.37 times of that transfected with pCAT3-basic, and 0.17 times of that transfected with

pCAT3-IL-18P. The inhibitory rate was about 86.32%.

CONCLUSION: SBP1 can down-regulate the expression of IL-18P promoter, which provides new evidence to explain the molecular biological mechanisms of SBP1 in the interactions between IL-18P and hepatocytes.

Yang Y, Hong Y, Cheng J, Zhao YR, Huang YP, Wang JJ. Down-regulatory effects of HBsAg promoter I DNA binding protein 1 on IL-18 gene expression. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(12):2797-2800

摘要

目的: 研究 HBsAg 基因启动子 I DNA 结合蛋白 1(SBP1)与白介素-18(IL-18)基因表达的关系, 研究 SBP1 在 HBV 致病的分子生物学机制中的作用。

方法: 构建质粒 pcDNA3.1(-)-SBP1, pCAT3-IL-18, 转染 HepG2 细胞进行表达, 应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞中氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性。

结果: 构建的表达载体 pcDNA3.1(-)-SBP1 经过序列分析和酶切鉴定正确。真核表达载体 pcDNA3.1(-)-SBP1 和 pCAT3-IL-18P 共转染的 HepG2 细胞的 pCAT 表达活性是 pCAT3 空载体的 0.37 倍, 是转染 pCAT3-IL-18P 的 0.17 倍, 抑制率达到 86.32%。

结论: SBP1 可以下调 IL-18 启动子的活性, 抑制 IL-18 基因的表达。

杨媛, 洪源, 成军, 赵英仁, 黄燕萍, 王建军. HBsAg 基因启动子 I DNA 结合蛋白 1 下调 IL-18 基因启动子. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2797-2800
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2797.asp>

0 引言

应用酵母单杂交体系^[1-3], 以 SP I 核心序列为“诱饵”, 对人肝细胞 cDNA 文库进行了筛选, 得到了一个未知基因, 命名为 HBsAg 基因启动子 I 结合蛋白 1 (SBP1), 可下调 SP I 的转录活性, 表达谱基因芯片技术研究 SBP1 可上调白介素-18(IL-18). 目前认为 IL-18 的抗病毒机制重要通过分泌 INF- γ 从而调节免疫发挥抗病毒的作用^[4], 为了进一步研究 SBP1 与 IL-18 的作用的具体机制, 我们将 SBP1 和真核表达载体 pcDNA3.1(-)连接, 构建了表达质粒; 与 IL-18 启动子的 CAT 报告载体 -pCAT3-IL-18p 共转染, 旨在研究 SBP1 对

IL-18是否具有相互作用,使下游CAT基因的表达发生变化。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞系 HepG2 细胞及大肠杆菌 DH5 α 菌株为本室保存, pCAT3-IL-18P 为本室构建; Tag DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及限制性内切酶均购自 Takara 公司; 质粒 DNA 提取试剂盒, 中间载体 pGEM-T 及报告质粒 pCAT3-basic 均购自 Promega 公司; CAT-ELISA 检测试剂盒及质粒 DNA 转染试剂盒购自 Roche 公司。其他生化试剂购自 Sigma 公司。由 Blastn 程序进行同源比对, 发现有 3 段 cDNA 片段与之同源, 分别为: BC033214, BI117624, BG981402, 进行同源拼接后, 发现该新基因开放读框(ORF)全长为 279 bp, 编码蛋白全长 92 aa, 位于第 6 号染色体, 无内含子序列。根据确定的基因序列的翻译起始位点到下游的 470 nt, 设计上游引物 5' - CTC GAG ACC ATG CCA ACA GGC CTG GTC AG -3', 下游引物 5' -GAA TTC TCT CCC CTG CAT GGC AAG TC-3' 其上下游引物两端分别加入 *Xho* I 和 *Eco* R I 限制性内切酶识别序列, 以 HepG2 细胞 mRNA 逆转录后的 cDNA 为模板, 经聚合酶链反应(PCR)扩增得到了 SBP1 的 DNA 全序列, PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 回收纯化。

1.2 方法 以 T-A 克隆法, 用 T4 DNA 连接酶将 SBP1 基因片段连入载体 pGEM-T Easy。将获得的质粒 pGEM-T-SBP1 和表达载体 pcDNA3.1(-) 分别用 *Xho* I 和 *Eco* R I 双酶切后用 T4 DNA 连接酶进行定向连接, 产物转化 DH5 α 宿主菌, 筛选抗氨苄青霉素阳性菌落; 提取质粒, 再次双酶切及 PCR 鉴定正向插入用 *Xho* I 和 *Eco* R I 双酶切的 pcDNA3.1(-), 命名为 pcDNA3.1(-)-SBP1。DNA 测序由上海博亚公司完成。HepG2 细胞系在含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液中生长。细胞生长至 50-80% 时采用脂质体转染法, 具体转染方法参照 FuGENE6 说明书进行, 设置 pCAT3-basic 为阴性对照组(每组 2 孔), 质粒 pCAT3-IL-18p 转染 48 h 后收获细胞。HepG2 细胞生长至 50-80% 时将 pcDNA3.1(-)-SBP1+pCAT3-IL-18P 加入细胞培养液中, 同时以转染 pCAT3-Basic 的 HepG2 细胞作阴性对照。转染 48 h 后, 收集细胞裂解液, 用于 CAT 活性检测。所有实验严格平行操作。CAT 含量检测 按照试剂盒说明书进行。取 1.0 μ g/L 的 CAT 标准品(试剂盒提供)及细胞裂解液 200 μ L 加入已包被抗体的 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h, 再依次加入第 1 抗体(地高辛标记的抗 -CAT)、第 2 抗体(偶联有过氧化物酶的地高辛抗体抗 -DIG-POD) 200 μ L 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h 后, 加入过氧化物酶的底物室温显色 10-30 min。用酶标仪检测标本在 415 nm 波长的吸光度, 其数值反映细胞提取物中的 CAT 表达水平。以未作转染的细胞裂解液平行实验作空白对照。

2 结果

SBP1 的 PCR 扩增产物以 HepG2 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增出全长为 470 bp 的 SBP1 序列(图 1)。构建的中间载体 pGEM-T-SBP1 以 *Xho* I 和 *Eco* R I 双酶切电泳图谱为两条带 470 bp(SBP1 基因片段)和约 3 000 bp (pGEM-T 空载体)(图 2)。重组质粒 pcDNA3.1(-)-SBP1 分别以 *Xho* I 和 *Eco* R I 双酶切及 DNA 序列测定均显示结果正确, pcDNA3.1(-)-SBP1 鉴定电泳图(图 3)表明, 该真核表达载体已构建成功。重组质粒 pcDNA3.1(-)-SBP1 与 pCAT3-IL-18P 共转染实验 空载体对照组 pCAT3 basic 的 CAT 的 A 值为 0.653, pCAT3-IL-18P 的 CAT 的 A 值为 1.755, 共转染 pCAT3-IL-18P/pcDNA3.1(-)-SBP1 的 HepG2 细胞 CAT 的 A 值为 0.240, 共转染 pCAT3-IL-18P/pcDNA3.1(-)-SBP1 的 CAT 的表达明显减弱, 抑制率为 86.3%, 说明 SBP1 对 IL-18 基因启动子有反式调节作用, 使其下游 CAT 基因的表达下降(图 4)。

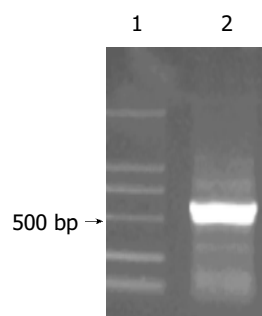


图 1 PCR 扩增 SBP1 启动子序列。1: Marker; 2: SBP1。

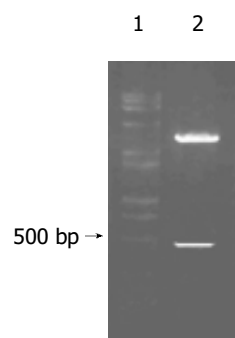


图 2 pGEM-T-SBP1 *Xho* I / *Eco* R I 双酶切鉴定图谱。1: Marker; 2: pGEM-T-SBP1。

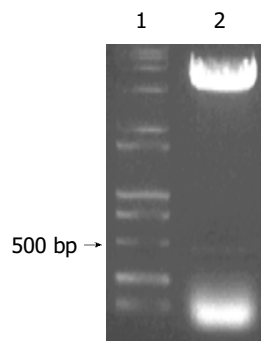


图 3 pcDNA3.1(-)-SBP1 *Xho* I / *Eco* R I 双酶切鉴定图谱。1: Marker; 2: pcDNA3.1(-)-SBP1。

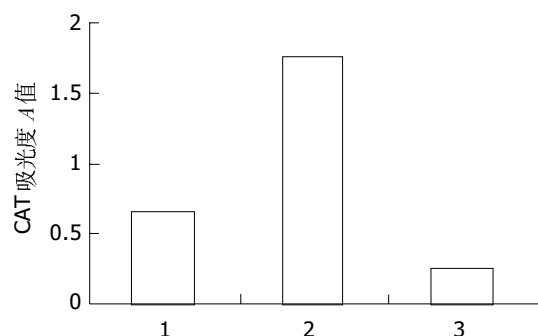


图4 CAT 酶表达结果. 1: pCAT3 basic; 2: pCAT3-IL-18P; 3: pcDNA3.1 (-)-SBP1+pCAT3-IL-18P.

3 讨论

HBV SP I 是 HBV 的一个重要转录元件, 调节 HBV 表面抗原大蛋白的表达. 现已证实 SP I 可与肝特异性核因子 1(HNF1)、HNF3、HNF4 特异结合, 这与 HBV 的嗜肝性有一定的关系^[5-8], 另外还有大量的非组织特异性的转录因子的存在, 如转录因子 Sp1, 八聚体转录因子(Oct-1)等也同样在 HBV 转录过程中发挥着重要的作用^[9-12]. Raney *et al* 提出在 HNF1 结合位点下游的 5-10 bp 可能还有其他肝特异性蛋白的结合位点. 为了寻找新的肝特异结合蛋白, 我们以 SP I 核心序列为“诱饵”, 整合入酵母基因组, 构建了酵母报告株; 经加入人肝 cDNA 文库进行筛选, 得到了 12 个双阳性克隆, 为了对这一结果进行验证并深入研究 HBV 的转录调控机制, 我们选取了其中的一个未知功能基因为研究对象, 经用计算机分析、拼接后, 得到了他的编码序列, 命名为 SBP1. 我们已应用 CAT-ELISA 和基因芯片技术对 SBP1 的功能进行了初步研究, 现已证实 SBP1 可下调 SP I, SBP1 基因芯片的研究结果显示可增强 IL-18 的表达. IL-18 作为一种干扰素 γ (IFN γ)的诱导因子, 可在白介素-12(IL-12)存在的情况下作用于 Th1 细胞, 去极化的 T 细胞, NK 细胞, B 细胞, 树突细胞产生 IFN γ ^[13-16], IL-2 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF), 从而发挥重要作用^[17-20]. IL-18 是一新的上调 Fas 配体(FasL)表达的细胞因子.

在慢性乙肝患者中 IL-18 的转录和表达水平与血清 ALT 水平呈明显相关性^[21]. IL-18 在体内通过激活 Fas 通路发挥促肝细胞凋亡的作用^[22]. 在患者感染了 HBV 后, 病毒本身与 IL-18 之间存在着复杂的相互作用, HBsAg 调节 IL-18 基因的转录, 通过诱导半胱天冬酶-1 来介导 IL-18 的分泌^[23]. HBxAg 是一种主要的病毒转录因子, 通过从转录水平调节 IL-18 从而参与肝脏的炎症调控^[24], 我们已证实 HBx 可上调 IL-18 启动子的活性. 在 HBV DNA 疫苗的研究中发现, IL-18 可增强免疫鼠中特异的细胞毒 T 细胞(CTL)活性和 TH1 应答, 提示 IL-18 和 HBV DNA 疫苗的共免疫在慢性 HBV 感染的治疗中起着关键的作用, 对于 HBV 预防性和治疗性疫苗提供了一种免疫策略, IL-18 是一种很有前景的免疫佐剂^[25].

HBV 转基因鼠的肝脏中 IL-18 通过依赖 IFN γ 和干扰素 α/β (IFN α/β)的模式来发挥抑制 HBV 的非细胞病变的复制, 并且这种抗病毒的效果是与 IL-12 协同作用的结果. IL-18 的抗病毒效果是通过诱导自然杀伤(NK)和自然杀伤 T(NKT)细胞产生 IFN γ , 另外, IL-18 在 IFN α/β 缺乏的鼠中不能抑制 HBV 的复制, 提示 IFN α/β 也有助于抗病毒效果的发挥. 这些结果提示 IL-18 通过在感染期间的自身限制达到控制 HBV 复制的效果, 并且对慢性肝炎患者有治疗的价值^[26].

基因芯片的研究发现 SBP1 可增强 IL-18, 为了验证 SBP1 和 IL-18 的结合以及 SBP1 对 IL-18 的调节作用, 以 pCAT3-IL-18p 为报告载体, 在人肝癌细胞系中对二者的相互作用进行了共转染验证. 结果证实, SBP1 的表达可下调 IL-18 的启动子活性, 表现为加入 SBP1 后使 IL-18p 下游的 CAT 表达活性降低. 这一结果证实了 SBP1 可与 IL-18p 结合, 且对 IL-18 的启动子活性有下调作用, 这点与基因芯片的结果不一致. 因此, 我们还需做大量的工作进一步研究 SBP1 的功能.

4 参考文献

- 1 洪源, 成军. 应用酵母单杂交技术筛选乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 的结合蛋白. 中西医结合肝病杂志 2003;13:337-339
- 2 Deplancke B, Dupuy D, Vidal M, Walhout AJ. A gateway-compatible yeast one-hybrid system. *Genome Res* 2004;14:2093-2101
- 3 成军. 病毒性肝炎发病机制相关基因克隆化的研究策略. 解放军医学杂志 2003;28:757-760
- 4 Sun Y, Chen HY, Sin SJ. Effect of IL-18 on peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B and hepatitis B virus DNA released by Hepag2.2.15 cell lines Hepatobiliary. *Pancreat Dis Int* 2004;3:230-234
- 5 Jung D, Kullak-Ublick GA. Hepatocyte nuclear factor 1 alpha: a key mediator of the effect of bile acids on gene expression. *Hepatology* 2003;37:622-631
- 6 Locker J, Ghosh D, Luc PV, Zheng J. Definition and prediction of the full range of transcription factor binding sites- the hepatocyte nuclear factor 1 dimeric site. *Nucleic Acids Res* 2002;30:3809-3817
- 7 Tang H, McLachlan A. Mechanisms of inhibition of nuclear hormone receptor-dependent hepatitis B virus replication by hepatocyte nuclear factor 3beta. *J Virol* 2002;76:8572-8581
- 8 Tang H, McLachlan A. Avian and Mammalian hepadnaviruses have distinct transcription factor requirements for viral replication. *J Virol* 2002;76:7468-7472
- 9 Kwun HJ, Jang KL. Natural variants of hepatitis B virus X protein have differential effects on the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene. *Nucleic Acids Res* 2004;32:2202-2213
- 10 Yan P, Mao X, Wang L, Zha X, Lu C. HBV C promoter Sp1 binding sequence functionally substitutes for the yeast ARS1 ABF1 binding site. *DNA Cell Biol* 2002;21:737-742
- 11 Han HJ, Jung EY, Lee WJ, Jang KL. Cooperative repression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene expression by hepatitis B virus X protein and hepatitis C virus core protein. *FEBS Lett* 2002;518:169-172
- 12 Sytina EV, Pankratova EV. Oct-1 transcription factor--plasticity and polyfunctionality. *Mol Biol (Mosk)* 2003;37:755-767
- 13 Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 2001;19:423-474
- 14 Papadakis KA, Prehn JL, Landers C, Han Q, Luo X, Cha SC, Wei P, Targan SR. TL1A synergizes with IL-12 and IL-18 to enhance IFN-gamma production in human T cells and NK cells. *J Immunol* 2004;172:7002-7007

- 15 Mavropoulos A, Sully G, Cope AP, Clark AR. Stabilization of IFN- γ mRNA by MAPK p38 in IL-12- and IL-18-stimulated human NK cells. *Blood* 2004;2:[Epub ahead of print]
- 16 Tsutsui H, Adachi K, Seki E, Nakanishi K. Cytokine-induced inflammatory liver injuries. *Curr Mol Med* 2003;3:545-559
- 17 Sun Y, Chen HY, Xin SJ. Effect of IL-18 on peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B and hepatitis B virus DNA released by HepG2.2.15 cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004;3:230-234
- 18 Malmgaard L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24:439-454
- 19 Biet F, Loch C, Kremer L. Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. *J Mol Med* 2002;80:147-162
- 20 Dinarello CA, Fantuzzi G. Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis* 2003;187(Suppl 2):S370-384
- 21 Stuyt RJ, Netea MG, Van Krieken JH, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. Recombinant interleukin-18 protects against disseminated candida albicans infection in mice. *J Infect Dis* 2004;189:1524-1527
- 22 Finotto S, Siebler J, Hausding M, Schipp M, Wirtz S, Klein S, Protschka M, Doganci A, Lehr HA, Trautwein C, Khosravi-Fahr R, Strand D, Lohse A, Galle PR, Blessing M, Neurath MF, Khosravi-Fahr R. Severe hepatic injury in interleukin 18 (IL-18) transgenic mice: a key role for IL-18 in regulating hepatocyte apoptosis in vivo. *Gut* 2004;53:392-400
- 23 Manigold T, Bocker U, Chen J, Gundt J, Traber P, Singer MV, Rossol S. Hepatitis B core antigen is a potent inducer of interleukin-18 in peripheral blood mononuclear cells of healthy controls and patients with hepatitis B infection. *J Med Virol* 2003;71:31-40
- 24 Lee MO, Choi YH, Shin EC, Kang HJ, Kim YM, Jeong SY, Seong JK, Yu DY, Cho H, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol* 2002;37:380-386
- 25 Chen JZ, Zhu HH, Liu KZ, Chen Z. Enhancing cellular immune response to HBV M DNA vaccine in mice by codelivery of interleukin-18 recombinant. *J Zhejiang Univ Sci* 2004;5:467-471
- 26 Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Virol* 2002;76:10702-10707

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 2005 年由半月刊改为周刊

本刊讯 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 以及日益增多的国际科技交流的需要, 从2005年开始, *World Journal of Gastroenterology*(WJG)由半月刊改为周刊出版. 每月7, 14, 21, 28 日出版, 50 元/期, 全年48期, 邮发代号82-261, 北京报刊发行局发行. 2002-10-11 获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金. 2003-01 获得第二届国家期刊奖百种重点期刊. 2003-01-15 由月刊改为半月刊. 2003-04-15 WJG(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp>)全文电子版免费开通, 截至2004-06-15 点击次数为1816277. 2003-04-15 世界胃肠病学杂志社稿件处理系统开发成功, 并开始使用. 作者通过用户名和密码在网上查找到稿件的全部处理记录. 2004-05-06 自然出版集团出版的《*Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*》收录WJG. 经过多项学术指标综合评定及同行多位专家评审推荐, WJG 被收录为国家科技部中国科技论文统计源期刊和中国科技核心期刊, 时间为2004-03/2006-03. 1998-01-15 / 2004-03-01 ISI SCI 收录期刊389种引用WJG 出版的论文687篇分布39个国家. 引用WJG 的SCI 高影响因子期刊包括自然医学28.740 (Nature Medicine), 细胞27.254 (Cell), 自然神经科学综述24.047 (Nature Reviews Neuroscience), 自然细胞生物学20.699 (Nature Cell Biology), 基因与发育 (Genes & Development) 18.772, 柳叶刀15.397 (Lancet), 自然神经科学14.857 (Nature Neuroscience), 神经元13.846 (Neuron), 自然癌症综述13.625 (Nature Reviews Cancer), 胃肠病学13.440 (Gastroenterology), 肝脏学9.825 (Hepatology), 等国际顶级期刊. 引用WJG 的作者分布于687个机构, 其中包括华盛顿大学医学院 (Washington Univ, Sch Med), 耶鲁大学 (Yale Univ), 康奈尔大学 (Cornell Univ), 明尼苏达大学 (Univ Minnesota), 斯坦福大学医学中心 (Stanford Univ, Ctr Med), 加州大学旧金山分院 (Univ Calif San Francisco), 美国国立卫生研究院 (National Institute of Health), 伦敦帝国大学等国际著名大学或研究机构. 2004-06-11 被CAB Abstracts, CAB Global Health 收录. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)