

• 基础实验研究论著 •

驱动蛋白家族成员 4A 对乙肝病毒复制影响的研究*

祝成亮¹, 李艳^{1△}, 叶芳丽¹, 汤兆明²

(1. 武汉大学人民医院检验科, 湖北武汉 430060; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科, 湖北武汉 430027)

摘要:目的 探讨驱动蛋白家族成员 4A(KIF4A)对乙肝病毒(HBV)复制的影响及其调节机制。方法 将不同质量的 KIF4A 真核表达载体 Flag2B-KIF4A 转染 HepG2. 2. 15 细胞后, 采用 ELISA 法对细胞上清液中的 HBsAg 和 HBeAg 进行定量检测; 荧光定量 PCR 法检测细胞闭合环状 DNA(cccDNA)的水平; 将不同质量的 Flag2B-KIF4A 与 HBV 感染性克隆 pHBV1. 3、启动子 pHBV-Luc 共转染 HepG2 细胞后, 采用荧光检测仪检测 HBV 启动子活性。结果 KIF4A 能够上调细胞上清液中 HBsAg、HBeAg 和 cccDNA 的水平, 并上调 HBV 启动子活性, 且调节作用呈剂量依赖效应。结论 KIF4A 在 HepG2 细胞可以促进 HBV 的复制。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 驱动蛋白; 酶联免疫吸附测定; 转染

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 05. 001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)05-0513-02

Study of the effect of kinesin family member 4A protein on the replication of hepatitis B virus*

Zhu Chengliang¹, Li Yan^{1△}, Ye Fangli¹, Tang Zhaoming²

(1. Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Union Hospital Tongji Medical College Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430027, China)

Abstract: Objective To explore the effect of kinesin family member 4A protein(KIF4A) on the replication of Hepatitis B virus (HBV) and its regulatory mechanism. **Methods** HepG2. 2. 15 cells were transfected with different quality of plasmid carrying KIF4A gene, HBsAg and HBeAg in the supernatants were measured by ELISA, covalently closed circular DNA(ccc DNA) levels were measured by real-time PCR. HepG2 cells were co-transfected with different concentration of Flag2B-KIF4A, HBV infectious clone pHBV1. 3 and its promoter pHBV-Luc. HBV, and promoter activity were measured by luminometer fluorescence detector. **Results** Expression of HBsAg, HBeAg and cccDNA were upregulated by KIF4A as well as HBV promoter activity in a dose-dependent manner. **Conclusion** KIF4A enhances the replication of HBV in HepG2 cells.

Key words: hepatitis B virus; kinesin; enzyme-linked immunosorbent assay; transfection

乙肝病毒(HBV)感染属于 DNA 病毒, 主要感染人的肝细胞, 引起急、慢性肝炎, 导致肝癌的发生。调查显示, 中国肝癌患者中约 90% 有 HBV 感染史。KIF4A 是一个马达分子, 在肿瘤的发生和发展过程中起到重要作用^[1-3]。前期工作中, 笔者发现 KIF4A 在肿瘤组织高表达, 而且 HBV 感染肝细胞后能够诱导 KIF4A 的表达^[4], 本研究旨在探讨 KIF4A 对 HBV 复制的影响, 为揭示 HBV 的致癌机制奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料 肝癌细胞系 HepG2 和 HepG2. 2. 15 购自武汉大学典型培养物保藏中心; HBV 感染性克隆 pHBV1. 3、HBV 全基因启动子 pHBV-Luc 及 KIF4A 真核表达载体 Flag2B-KIF4A 由武汉大学生命科学院实验室构建。

1.2 仪器与试剂 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; HBV 细胞闭合环状 DNA(cccDNA)检测试剂盒购自北京索奥生物医药科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与转染 HepG2 和 HepG2. 2. 15 细胞培养于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中, 培养箱内环境为

5% CO₂, 37 °C。转染前, 将质粒 DNA 和 Lipofectamine 2000 转染试剂分别稀释在无血清和双抗的 RPMI1640 培养基中, 室温作用 20 min, 将配制好的转染液加入细胞培养板中, 细胞置于 CO₂ 培养箱培养。

1.3.2 HBsAg 和 HBeAg 的检测 将 Flag2B-KIF4A 转染 HepG2. 1. 5 细胞, 48 h 后, 采用 HBV ELISA 检测试剂盒测定细胞上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的水平, 操作严格按试剂盒说明书进行, 实验重复 3 次。

1.3.3 荧光定量 PCR 测定 HBV 闭合环状 DNA 提取 Flag2B-KIF4A 转染后的 HepG2. 1. 5 细胞 HBV cccDNA 作为模板, 采用 HBV cccDNA 试剂盒进行荧光定量 PCR, 操作严格按试剂盒操作说明进行, 实验重复 3 次。

1.3.4 荧光素酶的测定 将 Flag2B-KIF4A、HBV 感染性克隆 pHBV1. 3 及其启动子 pHBV-Luc 共转染 HepG2 细胞后, 培养 48 h, 去上清液, 加入裂解液裂解, 取 10 μL 的细胞裂解液和 100 μL 的荧光素酶底物混匀, 荧光检测仪测定其光密度, 实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 统计学分析采用 SPSS13. 0 软件进行处

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81101485); 中国博士后特别资助基金(201104485); 中国博士后科学基金(20100471144); 中央高校基本科研业务费专项资金(4101055); 病毒室国家重点实验室开放基金(2012007)。 作者简介: 祝成亮, 男, 讲师, 医学病毒学。 △ 通讯作者, E-mail: yanlitf@yahoo. com. cn。

理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 KIF4A 对 HBV HBsAg 和 HBeAg 合成和分泌的影响 将不同质量的 Flag2B-KIF4A (0.0、0.5、1.0、2.0 μg) 转染 HepG2.2.15 细胞, 48 h 后, 采用 ELISA 检测细胞上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的水平, 结果发现, 随着 Flag2B-KIF4A 浓度的不断增加, HBsAg 和 HBeAg 的表达也不断升高。4 个不同浓度梯度转染细胞的 HBsAg 在 450 nm 波长处的 OD 值分别为 0.381 ± 0.033 、 0.585 ± 0.037 、 0.763 ± 0.048 、 0.842 ± 0.058 , HBeAg 分别为 0.374 ± 0.028 、 0.498 ± 0.037 、 0.675 ± 0.047 、 0.788 ± 0.056 。表明 KIF4A 能够促进 HBsAg 和 HBeAg 的合成和分泌, 呈剂量依赖效应。见图 1。

2.2 KIF4A 对 HBV cccDNA 拷贝数的影响 将不同质量的 Flag2B-KIF4A (0 μg 、0.5 μg 、1 μg 、2 μg) 转染 HepG2.2.15 细胞, 48 h 后, 采用核酸扩增技术结合荧光标记探针杂交方法检测了细胞内 HBV cccDNA, 结果发现, 随着 KIF4A 质量的增加, HBV cccDNA 的水平也不断升高, KIF4A 质量分别为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 时, HBV DNA 拷贝数分别为 2.43×10^5 、 6.28×10^5 、 9.93×10^5 、 1.06×10^6 copy/mL。表明 HBV 能够上调 HBV cccDNA 的拷贝数, 呈剂量依赖效应。

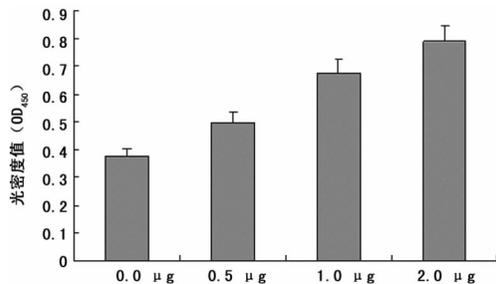


图 1 不同浓度 KIF4A 载体转染对 HBsAg 和 HBeAg 表达的影响

2.3 KIF4A 对 HBV 启动子活性的影响 将不同质量的 Flag2B-KIF4A (0.0、0.5、1.0、2.0 μg) 和 pHBV1.3 共转染 HepG2 细胞, 48 h 后, 采用荧光检测仪检测了 HBV 启动子活性, 结果发现随着 KIF4A 质量的增加, 荧光素酶的活性不断增强, 分别为 (268.3 ± 15.6) RUL/ μg 蛋白, (468.5 ± 19.7) RUL/ μg 蛋白, (785.4 ± 23.7) RUL/ μg 蛋白和 (976.5 ± 31.8) RUL/ μg 蛋白。结果表明 KIF4A 能够上调 HBV 启动子活性, 呈剂量依赖效应。见图 2。

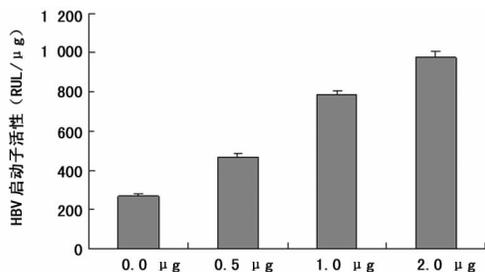


图 2 KIF4A 对 HBV 基因启动子的活性的影响

3 讨 论

肝癌是常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和病死率近年来一直呈上升趋势。中国是世界上肝癌病死率最高的国家, 其肝癌

病死人数占世界的 53%, HBV 是导致肝癌形成的最主要因素。KIF4 驱动蛋白亚家族包括 KIF4A、KIF4B、KIF21A 和 KIF21B 4 个成员^[5]。本课题组前期的工作发现 HBV 能够上调 KIF4A 蛋白的表达^[4], 并初步探讨了其调节机制, 但 KIF4A 对 HBV 复制的调节作用目前还没有相关报道。

本研究中, 笔者将 KIF4A 真核表达载体转染 HepG2.2.15 细胞系, 并检测了细胞上清中 HBsAg 和 HBeAg 合成和分泌的变化。HepG2.2.15 细胞是稳定转染了 HBV 全基因组的 HepG2 细胞, 可以稳定表达 HBV 病毒蛋白和分泌病毒颗粒。HBsAg 和 HBeAg 是 HBV 的复制的指标。检测结果发现 KIF4A 能够剂量依赖地上调 HepG2.2.15 中 HBsAg 和 HBeAg 的表达。cccDNA 是 HBV 各种 mRNA 合成的模板, 接下来笔者检测了 cccDNA 拷贝数的变化, 发现 KIF4A 同样能够剂量依赖地上调 HBV cccDNA 的合成, 因此, KIF4A 能够在 HepG2.2.15 细胞促进 HBV 的复制。为进一步探讨其调节机制, 笔者检测了 KIF4A 对 HBV 启动子活性的调节作用, 发现 KIF4A 能够在 HepG2 细胞剂量依赖地上调 HBV 基因启动子的活性。

HBV 病毒感染导致肝细胞癌 (HCC) 的发生是一个多因素、多阶段的复杂过程, 其具体机制目前还不清楚。近年来, 国内有学者提出了“正反馈调节机制”可能是 HBV 致癌的机制之一; HBV 感染引起一些肿瘤相关因子表达的增加, 而这些因子又促进 HBV 的复制, 进而引起 HCC 的发生^[6]。结合前期工作, 笔者发现 HBV 能够调节 KIF4A 的表达, 而本研究发现 KIF4A 还能促进 HBV 复制。有文献报道 KIF4A 在肺癌和乳腺癌中也呈现高表达, 并且与肺癌的预后有关^[7-8], 同时参与 DNA 损伤反应和有丝分裂, 是重要的肿瘤相关蛋白^[9-10]。因此, HBV 与 KIF4A 之间可能通过这种“正反馈调节作用机制”促进肝癌的发生。

本研究主要通过体外细胞实验完成, 而在动物体内实验 KIF4A 对 HBV 复制的调节作用是否具有同样的效果, KIF4A 又如何参与肝癌的发生, 这些问题尚待进一步的研究。

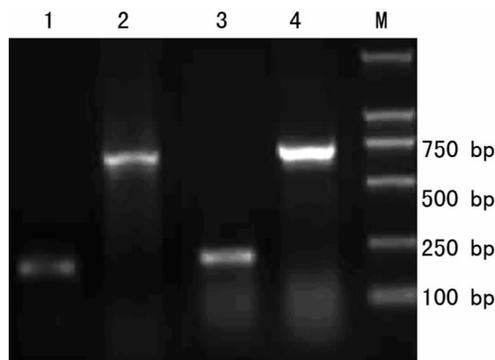
参考文献

- [1] Wu G, Zhou L, Khidr L, et al. A novel role of the chromokinesin Kif4A in DNA damage response [J]. Cell Cycle, 2008, 7 (13): 2013-2020.
- [2] Rouam S, Moreau T, Brot P. Identifying common prognostic factors in genomic cancer studies: a novel index for censored outcomes [J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11(1): 50.
- [3] Narayan G, Bourdon V, Chaganti S, et al. Gene dosage alterations revealed by cDNA microarray analysis in cervical cancer: identification of candidate amplified and overexpressed genes [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2007, 46(4): 373-384.
- [4] 刘兴辉, 祝成亮, 宋惠, 等. 乙型肝炎病毒对驱动蛋白家族成员 4A 表达的影响 [J]. 中华传染病杂志, 2012, 30(7): 407-410.
- [5] Gao J, Sai N, Wang C, et al. Overexpression of chromokinesin KIF4 inhibits proliferation of human gastric carcinoma cells both in vitro and in vivo [J]. Tumour Biol, 2011, 32(1): 53-61.
- [6] 高国生, 翁彭剑, 李永燕, 等. 痉挛性截瘫蛋白 21 对乙型肝炎病毒复制的影响及其机制 [J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(10): 747-750.
- [7] Taniwaki M, Takano A, Ishikawa N, et al. Activation of KIF4A as a prognostic biomarker and therapeutic target for (下转第 516 页)

为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测心肌 AT1R mRNA 的表达 以 β -actin 作为内参对 PCR 产物进行凝胶电泳检测,在 1、3 泳道约 225 bp 处可见一条带,与已知的 β -actin 片段大小一致;2、4 泳道约 720 bp 处出现特异性条带,符合已知的 AT1R mRNA 扩增片段大小,见图 1。采用凝胶分析软件测量条带的灰度值,得出手术组与非手术组心肌 AT1R mRNA 表达水平分别为 1.16 ± 0.12 和 2.19 ± 0.17 ,二者差异有统计学意义($P < 0.05$)。



1:非手术组内参;2:非手术组扩增产物;3:手术组内参;4:手术组扩增产物;M:DNA 标准带。

图 1 AT1R mRNA 的表达

2.2 兔血浆中 Ang II 值的浓度比较 见表 2。

表 2 两组新西兰兔手术前后不同时间血浆 Ang 水平比较 (pg/mL)

组别	手术前	手术后 2 周	手术后 3 周	手术后 4 周
手术组	97 ± 19	212 ± 51 *	201 ± 44 *	209 ± 45 *
非手术组	94 ± 18	101 ± 18	96 ± 19	97 ± 21

* : $P < 0.05$, 与非手术组比较。

3 讨 论

头端延髓腹外侧区 (RVLM) 是中枢神经系统对心血管活动调节的最后通路,存在有发放紧张性冲动的血管运动神经元^[5]。RVLM 的血管运动神经元活动能够使得压力敏感性神经元活动,从而导致机体基础血压下降^[6]。本实验原本拟采用的方法是根据“神经源性高血压”假说,在 RVLM 迷走神经根入脑干区植入球囊来建立动物模型,有国内的学者曾利用此方法建立了犬的高血压动物模型。但是由于兔脑部太小且实验方法过于复杂以致导致兔的死亡率极高,所以此方法不适合用于建立小动物的实验模型。因此笔者采用了经颈动脉制作神经源性高血压动物模型,此方法比较适合小型动物模型的建立,并用于对高血压的基础研究。以上两种方法都是有效的建立高血压动物模型的方法^[4]。

原发性高血压是一种遗传、环境、肥胖、高血糖、尿酸等

因素相互作用而形成的多基因疾病^[7],Bourassa 等^[8]认为高血压发病的原因之一可能就是由于 RVLM 的作用 Ang II 浓度升高。肾素-血管紧张素系统在该疾病的发病中起着重要的作用^[7,9]。血管紧张素原在肾素的作用下水解产生 Ang I,进而在血管紧张素转换酶作用下变成 Ang II^[10]。当体内的 Ang II 水平升高时,Ang II 可使血管内皮受损,使血管通透性增大,最终使得血压升高。AT1R 通过影响 Na^+/H^+ 交换、 Na^+/Ca^{2+} 交换等机制引起血管收缩,促进血管平滑肌细胞增殖和迁移,对维持血压及靶器官损害有着重要作用^[11]。

本实验通过颈动脉压迫兔迷走神经制作了原发性高血压动物模型。与对照组比较,手术组兔血浆 Ang II 水平及其 AT1R mRNA 的表达水平增高,本研究为高血压的产生机制和治疗提供了新的实验资料。

参考文献

[1] 刘洁琳,楼煜清,刘阔,等. WNK4 基因单核苷酸多态性与原发性高血压相关性研究进展[J]. 心肺血管病杂志,2011,30(6):54-57.

[2] 王尚才,刘阔,楼煜清,等. 醛固酮合酶基因多态性与血管紧张素转换酶抑制剂降压疗效的相关性研究[J]. 心肺血管病杂志,2011,30(4):293-296.

[3] 赵希军,赵爱玲,刘现亮,等. 兔急性心肌梗死再灌注后无复流与血管紧张素 II、缺血时间的关系[J]. 滨州医学院学报,2011,34(5):325-329.

[4] 刘佳,夏大胜. 经颅及颈动脉制作神经源性高血压模型的比较研究[J]. 天津医科大学学报,2011,17(2):207-209.

[5] 李宏宝,鲁彦,郑天珍. 头端延髓腹外侧区与原发性高血压[J]. 中华高血压杂志 2011,19(10):917-919.

[6] 钟明奎. 延髓腹外侧头端活性氧介导室旁核血管紧张素 II 的交感兴奋作用[J]. 中国老年学杂志,2011,6(31):2008-2011.

[7] 杨文娟. 尿酸水平与原发性高血压相关性的临床研究[J]. 实用心脑血管病杂志,2012,6(20):939-940.

[8] Bourassa EA, Sved AF, Speth RC. Angiotensin modulation of rostral ventrolateral medulla (RVLM) in cardiovascular regulation [J]. Mol cell Endocrinol, 2009,302(2):167-175.

[9] 倪挺,刘奇良,于浩. 一氧化氮和血管紧张素 II 在原发性高血压中的作用[J]. 心血管康复医学杂志,2012,21(2):147-149.

[10] Maan Z, Patel D, Moraitis K, et al. Comparison of stent-related symptoms between conventional Double-J stents and a new-generation thermoexpandable segmental metallic stent: a validated-questionnaire-based study [J]. J Endourol, 2010,24(4):589-593.

[11] 牛秋丽,刘洁琳,王佐广,等. 血管紧张素 II 1 型受体基因 rs388915 多态性与原发性高血压的相关性[J]. 心肺血管病杂志,2012,31(3):232-235.

(收稿日期:2012-11-09)

(上接第 514 页)

lung Cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007,13(22 Pt 1):6624-6631.

[8] 郝可可,展平,王琴. KIF4A 在非小细胞肺癌中的表达及其与预后的相关性[J]. 临床肿瘤学杂志,2010,15(12):1066-1069.

[9] Zhu C, Jiang W. Cell cycle-dependent translocation of PRC1 on the spindle by Kif4 is essential for midzone formation and cytokinesis

[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005,102(2):343-348.

[10] 王文晓,杨海彦,刘连新,等. 驱动蛋白 4A:驱动蛋白超家族的新成员[J]. 哈尔滨医科大学学报,2011,45(2):195-197.

(收稿日期:2012-11-09)