

戊型肝炎病毒衣壳蛋白结合 CYP 2A6 并降低其底物催化能力

唐明, 郑子峰, 孙媛媛, 何水珍, 赵敏, 黄慧, 苗季*, 张军, 夏宁邵

(厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 肝炎病毒的感染常常导致人体肝脏代谢能力变化, 研究表明甲型肝炎病毒(Hepatitis A Virus, HAV)、乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)和丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus, HCV)的感染都会影响肝细胞对药物的代谢能力。在本研究中, 通过酵母双杂交系统在人肝 cDNA 文库中筛选与戊型肝炎病毒重组衣壳蛋白 E2 结合的蛋白, 发现了与细胞色素 P450 2A6(CYP2A6)部分片段高度同源的蛋白序列。通过 pull-down、免疫共沉淀以及特异性底物催化反应评价等方法进一步证实了 CYP2A6 与重组衣壳蛋白 E2、p239 间的相互作用, 并发现与 p239 结合可以降低 CYP2A6 对其特异性底物香豆素的催化能力。上述结果提示 CYP2A6 可能在戊肝病毒入侵细胞后的细胞病变过程中起作用。

关键词: 戊型肝炎病毒; 细胞色素 P450 2A6; 蛋白相互作用

中图分类号: R373.2 Q78 文献标识码: A 文章编号: 1009-8721(2009)01-0001-08

戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV) 主要经粪-口途径传播, 常引起戊型肝炎的暴发或者散发^[1], 但目前对戊型肝炎病毒感染和致病机理的研究报道还不多。重组衣壳蛋白 E2 是 HEV ORF2 的 aa394~606 片段表达后的蛋白, 该片段是其优势中和表位的集中区域^[2-4]。E2 能够形成二聚体, 但不能形成类病毒颗粒^[5-7]。另一重组衣壳蛋白 p239 是由 HEV ORF2 的 aa368~606 片段表达而成, 因此 p239 可视为 E2 的 N 端延伸改造的蛋白。相较于重组衣壳蛋白 E2, p239 包含了自组装区域, 能够形成类病毒颗粒并能很好地模拟真病毒, 已被证实可用于对 HEV 感染等相关机制的研究中^[8, 9]。酵母双杂交筛选系统常常需要表达的融合蛋白能够定向于核内来激活报告基因的转录。p239 蛋白组装成类病毒颗粒后无法透过细胞核核膜, 而 E2 蛋白能够透过核膜定位于细胞核。因此, 本实验室以 E2 作为诱饵蛋白利用酵母双杂交技术平台, 从人肝细胞文库中筛选与 HEV 衣壳蛋白相互结合的蛋白, 测序结果显示其中一个靶蛋白与细胞色素 P450 2A6(CYP2A6)的部分片段同源^[10]。

CYP2A6 蛋白主要表达于人肝脏组织中, 虽然

只约占肝总 P450 酶含量的 4% 且存在着很大的个体差异, 但该酶是烟碱代谢的重要参与成分, 对如亚硝胺(nitrosamines)、黄曲霉素 B1(aflatoxin B1) 以及一系列香豆素类生物碱等许多药物和癌前物的体内代谢清除起重要作用^[11]。已有研究表明, HAV、HBV 和 HCV 等肝炎病毒感染都会影响肝细胞的药物代谢能力^[12-15]。人肝 CYP2A6 酶能够高度特异地催化其底物香豆素的 7-羟基化反应, 故其产物 7-羟基香豆素可以用作体内或者体外检测 CYP2A6 活性的特异探针^[16]。本研究利用 pull-down、免疫共沉淀以及特异性底物催化反应评价等方法, 进一步研究了 HEV 重组衣壳蛋白 E2、类病毒蛋白颗粒 p239 与 CYP2A6 间的相互作用及活性影响, 为 HEV 的病理过程研究提供了线索。

材料与方法

1 实验材料及细胞培养 戊型肝炎病毒重组衣壳蛋白 E2 和 p239、Syphilis-his 梅毒蛋白、Gp78-his 蛋白由本实验室表达纯化, 能同时与 E2 和 p239 反应的 HEV 单克隆抗体 anti-E2/p239、抗 HA 的单克隆抗体 12CA5 由本实验室制备。抗 his 抗体 (Cat: se-803)、抗 α -Tubulin 抗体 (Cat: se-5546) 购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的羊抗鼠抗体 (Lot: 35580A) 购自 Molecular Probes 公司。香豆素 (coumarin, CAS 91-64-5) 和 7-羟基化香豆素 (7-hydroxycoumarin, Cat: H2, 400-3) 均购自 SIGMA-ALDRICH 公司。Huh7 细胞购自 ATCC, 37℃ 培养于含 10% 胎牛血清、100U/mL 青霉素、100U/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 隔天传代。pCW2A6his 质粒获赠于美国

收稿日期: 2008-08-15; 修回日期: 2008-11-04

基金项目: 福建省青年科技人才创新项目 (2006F3124); 重组戊型肝炎疫苗 Ⅲ期临床研究 (2006AA02A209)

作者简介: 唐明 (1984), 男, 在读硕士研究生, 分子病毒学专业。
(E-mail: tangming@xmu.edu.cn)

通讯作者: 苗季, 厦门大学国家传染病诊断试剂与工程疫苗技术研究中心 361005 厦门, (E-mail: jmiao@xmu.edu.cn)

范德比尔特 (Vanderbilt University) 大学 F. P. Guengerich 教授^[17]。

2 克隆构建及蛋白表达纯化 将 pCW2A6-his 质粒在大肠杆菌 ER2566 内进行原核蛋白表达, 收集菌液超声破碎, 离心后上清经硫酸铵沉淀, 并按 TALON 金属螯合亲和层析操作手册纯化蛋白。其他 his 融合蛋白纯化方法与此相同。在构建真核表达质粒时, 设计末端加保护碱基的正向引物 CYP2A6F (5'-TTTAAAGCTTCGGGATCCATGGCTGCT-TCAGGAATG-3') 和反向引物 CYP2A6R (5'-TTTGAAT-TCGTGATGGTGGTGGCG-3'), PCR 扩增后以 *HindIII*/*EcoRI* 位点接入 pcDNA3.1 表达载体中。同时在其 C 端以 *XhoI*/*XbaI* 位点接入 HA 融合标签序列。真核细胞转染表达均按梭华 (Sofast) 脂质体转染操作手册进行。

3 pul-down 实验 加入 20 μ g 带 his 标签的纯化融合蛋白与 3 μ g E2, p239 蛋白于 1ml PBS 体系中, 于 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇匀反应 60min, 再将 12 μ l Ni²⁺-NTA Agarose 介质于 4 $^{\circ}$ C 结合 90min; 再利用 0.5% TritonX100/PBS 洗涤 3 次, 每次洗 10min, 并 1 000g 离心 30s; 然后加入 40 μ l 150mmol/L 咪唑洗脱, 12 000 r/min 离心取上清制样, 经 SDS-PAGE 分离转膜后以一抗抗 his 兔抗 (1: 500) 和 16D7 (1: 2 000)、二抗 GAM (1: 4 000) 反应浓度进行免疫印迹分析。

4 细胞转染及免疫荧光检测 1 \times 10⁵ 细胞培养于预先放置盖玻片的 6 孔板中, 脂质体转染表达蛋白。免疫荧光检测简要过程: 细胞经 PBS 漂洗 3 次后, 用 4% 多聚甲醛固定 20min, 再加入 PBST (PBS+ 0.3% TritonX100) 通透 10min, 用羊血清封闭 30min, 一抗 12CA5 反应 1h, 再与 FITC 标记的二抗反应 30min, DAPI 反应 5min 染核并制片, 信号由

Leica 激光共聚焦显微镜扫描分析。

5 免疫共沉淀 在 100mm 细胞培养板上, 转染表达 CYP2A6-HA 蛋白后收集细胞加入裂解液, 低功率超声辅助细胞裂解。将对应 IP 抗体与 15 μ l Protein A/G Agarose 介质预先结合约 40min, 洗去未结合的抗体, 再加入 p239 及裂解液于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 然后用裂解缓冲液洗涤 3 次, 挂柱产物离心收集后煮沸制样, 经 SDS-PAGE 电泳分离、转膜后进行免疫印迹分析。同时平行做阴性对照, 在进行电泳时, 加入相应裂解液或者 p239 蛋白作为蛋白标记。

6 底物催化实验 在细胞中或者体外催化体系中, 先加入 p239 蛋白于 37 $^{\circ}$ C 进行孵育, 再加入 50mmol/L Coumarin 反应 60min。收集反应液, 离心取上清并加入等体积 0.1 mol/L Tris 9.0 以增加荧光信号的对比度, 在激发波长 370nm 和发射波长 450nm 条件下于 Fluoroskan Ascent FL 荧光化学发光分析仪上进行检测, 得到数据进行统计学 *t* 检验分析对比。同时设置相应对照, 实验多次重复。

结 果

1 酵母双杂交鉴定出 CYP2A6 蛋白与诱饵蛋白 E2 具相互作用

在之前的研究中, 我们利用酵母双杂交系统从人肝细胞 cDNA 文库中筛选与戊型肝炎病毒衣壳蛋白 E2 相互作用的蛋白 (表 1), 获得 8 个阳性克隆。

表 1 酵母双杂交阳性克隆筛选结果

Table 1 The screening result of Yeast Two Hybride positive clones

Prey No. of activation between ADX and BDE2	Autonomous activation	Activation between ADX and BD	Activation between BDX and ADE2	Related protein BLAST from Genbank
14	-	+	/	/
43	-	+	/	/
154	-	+	/	/
169	-	+	/	/
173	-	+	/	/
126	-	-	-	/
167	-	-	-	/
26	-	-	+	Unknown
122	-	-	+	Unknown
138	-	-	+	Unknown
188	-	-	+	Unknown
87	-	-	+	Cytochrome P450 2A6
162	-	-	+	TRP13, (Transformation-related protein)
175	-	-	+	P38IP (p38-interacting protein)
191	-	-	+	DDAH2, (Dimethylarginine dimethylaminohydrolyase 2)

X: candidate, E2: recombinant HEV capsid protein, AD: transcription Activating Domain, BD: DNA Binding Domain, ADX / ADE2: AD-fused X or E2, BDX / BDE2: BD-fused X or E2 - : Negative, + : Positive, /: No data, Unknown: Unknown protein

将测序结果进行 BLAST 分析后结论显示: 其中 4 个克隆没有与之匹配的同源蛋白; 另外 4 个克

隆分别与 CYP450 2A6、p38IP、DDAH2 以及 TRP13 的部分片段同源^[10]。利用酵母双杂交方法进行筛选, 结果显示 CYP2A6 蛋白部分片段(即序列 aa388~437)能与 E2 蛋白相互作用。

2 原核表达蛋白 CYP2A6 与 E2、p239 相互作用的 Pull-Down 验证

利用 pCW⁺2A6-his 质粒在大肠杆菌 ER2566 内进行表达, 纯化融合蛋白 CYP2A6-his。采用 pull-down 技术, 首先将 CYP2A6-his、阴性对照梅毒蛋白(Syphilis-his)及阳性对照蛋白 Grp78-his^[18]结合到金属螯合介质上, 再分别与 E2 或 p239 蛋白反应。咪唑洗脱产物经 SDS-PAGE 后, 分别与针对 E2 和 p239 的单抗 anti-E2/p239 及针对 his 的多抗 anti-his 反应。结果显示三种融合蛋白在镍柱上都具有很好的结合量, CYP2A6-his 与阳性对照组 Grp78-his 中都检测到 E2 或者 p239 蛋白, 而阴性对照组 Syphilis-his 中未检出(图 1), 这表明 CYP2A6 蛋白可以与 E2 及 p239 结合。

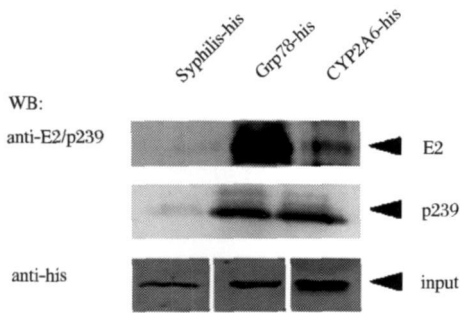


图 1 Pull-down 结果显示原核表达的 CYP2A6 与 E2、p239 蛋白具相互作用

Figure 1 Pull-down result demonstrated the interactions between prokaryotic expressed CYP2A6 and E2 or p239 protein

Syphilis-his and Grp78-his served as negative and positive controls respectively. The band in the right lane demonstrated that CYP2A6 could bind to the two recombinant HEV capsid proteins. Input proteins were showed below using anti-his antibody.

3 CYP2A6-HA 蛋白的真核表达及其检测

为了进一步在真核水平上验证 CYP2A6 与 p239 蛋白间的相互作用, 我们构建了 pcDNA3.1-CYP2A6-HA 质粒, 通过转染 Huh7 细胞表达 CYP2A6-HA 融合蛋白。首先进行底物香豆素的催化检测, 与 Blank 组空白细胞和 Control 组转染空

质粒 pcDNA3.1 的细胞相比, 可见 CYP2A6-HA 融合质粒在细胞内表达后具有明显的催化活性(图 2, A)。同时, 用针对 HA 的单抗 12CA5 进行免疫印迹分析, 能检测到约 50kD 的目的蛋白(图 2, B)。免疫荧光激光共聚焦检测显示, 融合蛋白 CYP2A6-HA 在细胞内呈现典型的内质网分布状态(图 2, B2), 对照为未转染的细胞(图 2, B4)。这与 CYP450 家族蛋白主要分布在内质网的胞质面是一致的^[19], 也表明 C 端融合 HA 标签对该蛋白的胞内分布和活性均无影响。

4 真核表达 CYP2A6-HA 与 p239 蛋白的免疫共沉淀验证

先将表达 CYP2A6-HA 的 Huh7 细胞裂解液与 HEV 类病毒颗粒 p239 混合, 然后将该混合液与介质单抗复合物共孵育。在以 HEV 特异性单抗作为共沉淀(IP)的捕获抗体时, 免疫印迹分析结果显示, 在免疫沉淀复合物中存在 CYP2A6-HA 蛋白(图 3, A), 其他对照均无特异蛋白带, 这表明 CYP2A6 能够与 p239 一起被 HEV 特异性单抗所捕获。同时, 利用抗 HA 的单抗 12CA5 作为 IP 捕获抗体时, 同样能检测到对应的 p239 蛋白(图 3, B)。在此实验的对照中可以检测到微弱的 p239 蛋白(图 3, B Lane 5), 可能是由于介质会非特异性地结合少量 p239 引起, 可作为本底, 并不影响结果。上述结果进一步说明了在真核细胞系统中表达的 CYP2A6 与 HEV 类病毒颗粒 p239 之间存在相互作用。

5 真核表达 CYP2A6 与 p239 作用影响其催化活性

为进一步研究这种相互作用的意义, 我们检测了 p239 对 CYP2A6 催化活性的影响。在转染表达 CYP2A6 的细胞中梯度加入 p239 蛋白共孵育约 2.0h, 检测 CYP2A6 对其特异性底物香豆素的催化活性(图 4, A)。同时对胞内 CYP2A6 和 p239 进行免疫印迹检测, 以 α -Tubulin 作为内参(图 4, B)。结果显示, 在加入 30 μ g p239 蛋白时能够较明显地检测到该蛋白, 对应 CYP2A6 的特异性底物催化活性分析发现, 当进入细胞的 p239 达到一定浓度后会使得 CYP2A6 对底物催化活性降低(标记★★表示 $P < 0.01$ 即差异显著)。

此外, 还利用表达 CYP2A6 的细胞裂解液进行体外催化实验分析。先将 CYP2A6 转染细胞表达后的裂解液与 50 μ g p239 蛋白共孵育, 并以未加入 p239 的裂解液作为对照, 在共孵育不同的时间段上收取混合液。利用特异性底物香豆素, 对混合液中

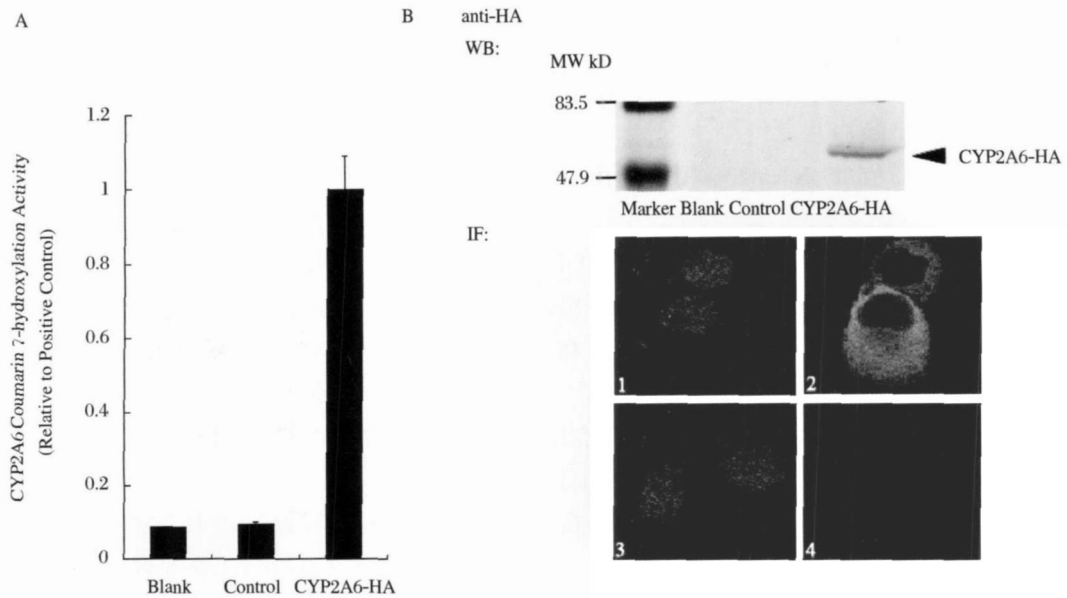


图2 融合蛋白 CYP2A6-HA 的真核表达和胞内分布检测

Figure 2 Eukaryotic expressed CYP2A6-HA and its cellular localization

A. Detection of CYP2A6 coumarin 7-hydroxylation activity in the transfected huh7 cells B. Western blot and immunofluorescent detection of CYP2A6 in transfected Huh7 cell. Marker: protein molecular weight marker, Blank: non-transfected Huh7 cell, Control: pcDNA3 1 control, CYP2A6-HA: CYP2A6-HA fusion protein. The immunofluorescent confocal microscope results indicated that CYP2A6 showed cytoplasmic distribution (B, 2), compared with negative control below (B, 4). B1, 3 were DAPI stained results of B2, 4 respectively.

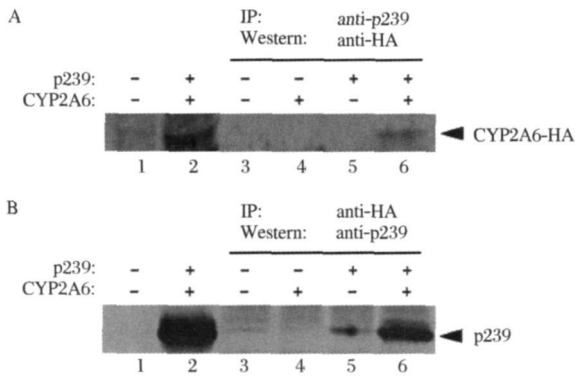


图3 免疫共沉淀结果证实真核表达 CYP2A6 与 p239 蛋白间的相互作用

Figure 3 Co-immunoprecipitation of p239 and CYP2A6 Cell lysates were immunoprecipitated using anti-p239 antibody and Western-blotted by anti-HA antibody in A, while immunoprecipitated using anti-HA antibody and Western-blotted by anti-p239 antibody in B. Lanes 1 and 2 served as markers. Cells in lane 1 were transfected with control vectors (pcDNA) whereas Lane 2 with expression plasmid (pcDNA-CYP2A6HA) and p239 added. Lanes 3~5 served as controls and Lane 6 demonstrated protein interaction.

CYP2A6 的酶催化活性进行检测。各试验组中均设置相应的转染 pcDNA3.1-GFP 质粒的细胞裂解液作酶催化活性的阴性对照。结果显示,在共孵育 1h 后, p239 开始对 CYP2A6 的特异性底物催化活性产生影响。这表明当裂解液中存在 p239 时, CYP2A6 的底物催化活性被降低了。在 p239 与细胞裂解液共孵育后 2h 到 3h 的几个实验组中, p239 对 CYP2A6 特异性底物催化活性的影响更为显著。到 3h 以后, 由于裂解液本身导致的蛋白降解使 CYP2A6 活性下降, 这种差异逐渐缩小, 到 6h 后 CYP2A6 的催化活性已经降低到与 GFP 转染细胞组相当, 已无法进一步检测更长时间下, p239 对 CYP2A6 的催化活性是否有进一步的影响。虽然在未加入 p239 的对照组中, 随着孵育时间的递增, CYP2A6 的活性受到胞内蛋白酶等的影响而呈现逐渐降低的趋势, 但 p 检验结果显示加入 p239 蛋白实验组和未加入 p239 蛋白实验组之间有显著性差异 (图 5, 标记 ★★表示 P 值 < 0.01, 即差异显著; ★表示 0.01 < P 值 < 0.05, 即有差异)。这一结果表明, p239 蛋白降低了 CYP2A6 的特异性底物催化能力。

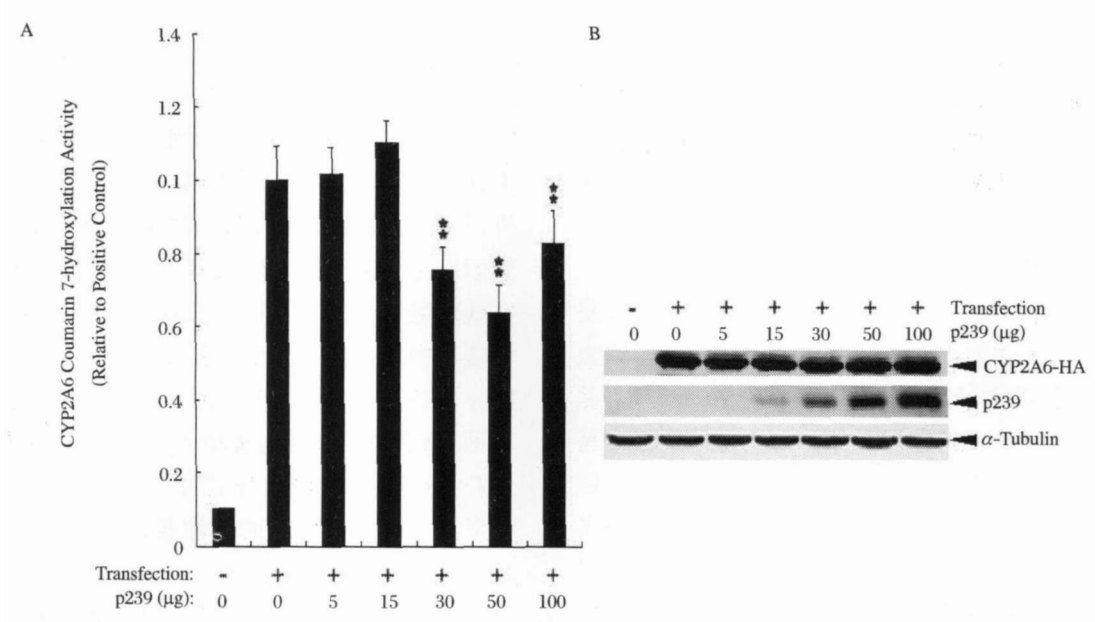


图4 外源加入的 p239 降低在 Huh7 细胞中转染表达的 CYP2A6 特异性底物酶活性

Figure 4 p239 decreased CYP2A6 coumarin 7-hydroxylation activity in transfected Huh7 cells p239 was incubated with CYP2A6-HA expressed Huh7 cells in different concentrations, then the catalysate 7-hydroxycoumarin was detected by fluorescence assay (A) and cell lysate was detected by Western blot (B).

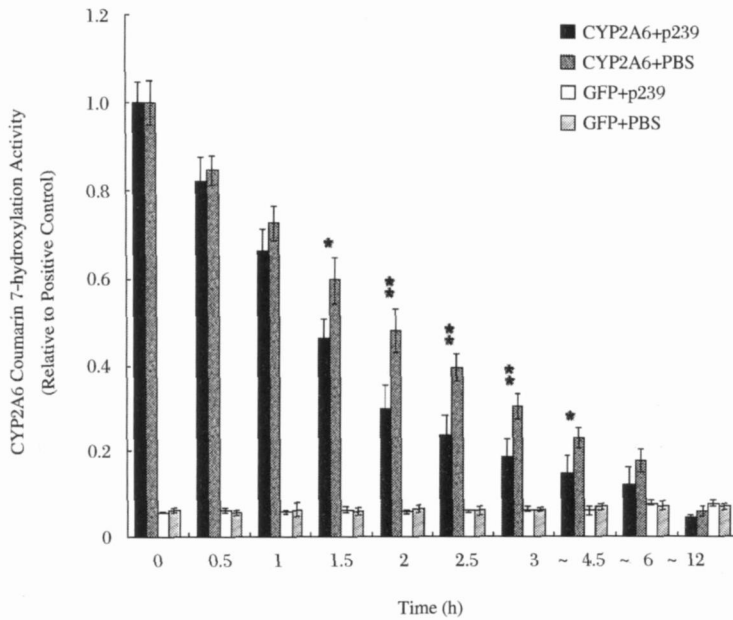


图5 P239 导致 CYP2A6 特异性底物酶活性降低表现出时间依赖关系

Figure 5 p239 decreased CYP2A6 coumarin 7-hydroxylation activity in time-dependent manner

50μg p239 was incubated with pcDNA-CYP2A6HA transfected cells lysates by gradient time and the catalysate 7-hydroxycoumarin was detected by fluorescence assay. No p239 added but PBS and pcDNA-GFP expressed cells served as controls

综合上述结果, 提示了蛋白 p239 与 CYP2A6 的结合会影响到 CYP2A6 的酶功能, 使其特异性底物催化能力下降。

讨 论

许多病毒如流感病毒(Influenza)、腺病毒(Ad-

enovirus)、单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus)、人免疫缺陷病毒(HIV)等的感染都可能导致机体对内、外源性化合物的体内代谢和清除能力的下降^[20]。本研究中的酵母双杂交筛选结果,初步验证了戊型肝炎病毒衣壳蛋白能够与肝内重要代谢酶细胞色素 P450 2A6(CYP2A6)具有相互作用,提示了戊肝病毒也可能影响机体的代谢能力。

细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP450)是一组由结构和功能相关的超家族基因编码的含铁血红素同工酶,参与众多内、外源性化合物的代谢,是人肝脏内极为重要的酶系。CYP2A6是CYP2A基因亚家族中重要成员,主要表达于肝脏,在未分化组织或者癌细胞中几乎检测不到其蛋白表达。该酶在尼古丁(nicotine)和可丁尼(cotinine)等烟碱代谢起着极其重要的作用,且在许多药物、化合物和癌前物的体内代谢清除中起重要作用^[11]。目前,对CYP450 2A6的研究主要集中于临床药理学、药物遗传学及癌症研究中,未见有报道其与戊型肝炎相关。

已有许多CYP450家族蛋白在大肠杆菌中表达,该表达系统成熟且操作简单,且所表达的蛋白与真核系统中表达的蛋白在二级结构和蛋白折叠方式上高度相似,具有与天然蛋白类似的构象^[11]。但是常常由于蛋白质加工不同、无内源血红素和缺乏其他氧化还原酶系等缺点,原核表达后的CYP450蛋白活性不完全^[21]。在HepG2、Huh7等哺乳动物肝癌细胞系中,虽然缺乏CYP2A6,但已天然存在NADPH-细胞色素P450还原酶(NADPH-cytochrome P450 reductase)和细胞色素b5(cytochrome b5)等CYP2A6催化所需要的酶系,故只需转染入CYP2A6的基因使其瞬时表达,该体系就具有催化能力^[22, 23],且其蛋白组装也最接近于天然蛋白形式。本研究中,利用大肠杆菌原核表达纯化CYP2A6蛋白,进行pull-down实验,证明了其与重组戊肝病毒衣壳蛋白E2、p239之间的相互作用。进一步利用肝实质细胞系Huh7瞬时表达CYP2A6蛋白,进行免疫共沉淀实验分析,这就确证了CYP2A6与p239的相互作用。

目前,只有少数报道表明肝炎病毒感染对机体药物代谢能力的影响。有研究表明HCV病人肝药物代谢能力受损^[12]。Sotaniemi, E. A.等的研究显示,患有较严重肝病的病人在口服香豆素后,其代谢产物7-羟基化香豆素的排除会延迟,表明了疾病降低了肝细胞对香豆素的代谢能力^[13]。此外有研究

表明,人肝CYP2A6与肝炎病毒造成的病理过程有关。对CYP450功能的研究显示,CYP2A6的活性会因为HAV^[14]感染受抑制,也会因为HBV和HCV感染而被加强^[15]。急性HAV感染会导致成人或者小孩人体肝内香豆素7-羟基化活性急剧下降,并认为活性显著减低的原因可能是HAV感染细胞后导致ER的破碎或者免疫调节,使代谢特性呈减弱趋势^[14]。在HBV整合到肝细胞DNA的小鼠模型中,可见CYP2As家族蛋白的上调表达^[24]。同时在感染了HBV和HCV的病人肝脏中^[15],也可见CYP2A6的表达量增加;研究者提出假设,认为肝CYP2A6蛋白含量的增加可能导致肝对黄曲霉素和亚硝胺类物质的代谢得以有效激活,并使更多的肝细胞加入进来。

虽然HEV与其他肝炎病毒在自身性质以及致病过程上有很大的差别,但仍存在不少相似之处。例如HEV和HAV、HCV一样都属于RNA病毒;HEV和HAV类似常常导致急性感染并且都不引起HCC^[11]。HEV被认为是在肝细胞细胞质中复制的^[25]。在患爆发性戊型肝炎病人中,可在肝细胞中检测到大量的HEV病毒^[26]。考虑到HEV目前仍缺乏有效的培养系统和纯化手段,本研究中采用重组衣壳蛋白p239作为病毒的模拟进行相关研究。CYP2A6酶处在具有多种代谢酶的内质网上,这也是DNA表达产物蛋白质生成的场所,而表达CYP450的基因易被内、外源性化合物诱导和抑制。这些酶类在受到化合物影响时,可能反过来影响细胞基因的表达调控。本研究结果表明p239与CYP2A6间具有蛋白相互作用且会降低其酶活性,这就进一步提示了CYP2A6可能在戊肝病毒入侵细胞后的细胞病变过程中起作用。上述推论需要相关临床研究数据加以确证,CYP2A6在该过程中的功能和作用机制还有待于更深入的研究来阐述清楚。

参考文献:

- [1] Mushahwar I K. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention[J]. J Med Virol, 2008, 80(4): 646-658.
- [2] Zhang J Z, Ng M H, Xia N S, et al. Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein[J]. J Med Virol, 2001, 64(2): 125-132.
- [3] Zhang J, Gu Y, Ge S X, et al. Analysis of hepatitis E

- virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein[J]. *Vaccine*, 2005, 23(22): 2881-2892.
- [4] Li S W, Zhang J, Li Y M, et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates[J]. *Vaccine*, 2005, 23(22): 2893-2901.
- [5] Li S W, Zhang J, He Z Q, et al. Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(5): 3400-3406.
- [6] 李少伟, 张军, 何志强, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 orf2 片段的聚合现象研究[J]. *生物工程学报*, 2002, 18(4): 463-467.
- [7] 李少伟, 何志强, 王颖彬, 等. 戊型肝炎病毒衣壳蛋白同源二聚体的相互作用结构域[J]. *生物工程学报*, 2004, 20(1): 90-98.
- [8] 何水珍, 郑子峥, 吴婷, 等. 戊型肝炎病毒细胞吸附模型的建立及病毒吸附区域初步研究[J]. *病毒学报*, 2006, 22(6): 426-430.
- [9] 苗季, 郑子峥, 何水珍, 等. 重组戊型肝炎病毒衣壳蛋白 p239 特异性吸附、侵入 HepG2 细胞并阻断野病毒对肝细胞的感染[J]. *病毒学报*, 2007, 23(4): 331-334.
- [10] 何水珍, 林亦伟, 郑子峥, 等. 人肝细胞内戊型肝炎病毒结合蛋白的酵母双杂交筛选[J]. *病毒学报*, 2006, 22(4): 262-266.
- [11] Xu C, Goodz S, Sellers E M, et al. CYP2A6 genetic variation and potential consequences[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(10): 1245-1256.
- [12] Jorquera F, Almar M, Diaz-Golpe V, et al. Impairment of metabolic function in chronic hepatitis C is related to factors associated with resistance to therapy[J]. *Am J Gastroenterol*, 2001, 96(8): 2456-2461.
- [13] Sotaniemi E A, Rautio A, Backstrom M, et al. CYP3A4 and CYP2A6 activities marked by the metabolism of lignocaine and coumarin in patients with liver and kidney diseases and epileptic patients[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1995, 39(1): 71-76.
- [14] Pasanen M, Rannala Z, Tooming A, et al. Hepatitis A impairs the function of human hepatic CYP2A6 *in vivo* [J]. *Toxicology*, 1997, 123(3): 177-184.
- [15] Kirby G M, Batist G, Alpert L, et al. Overexpression of cytochrome P-450 isoforms involved in aflatoxin B1 bioactivation in human liver with cirrhosis and hepatitis [J]. *Toxicol Pathol*, 1996, 24(4): 458-467.
- [16] Pelkonen O, Rautio A, Raunio H, et al. CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase[J]. *Toxicology*, 2000, 144(1-3): 139-147.
- [17] Kim D, Wu Z L, and Guengerich F P. Analysis of coumarin 7-hydroxylation activity of cytochrome P450 2A6 using random mutagenesis[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(48): 40319-40327.
- [18] 吴小成, 苗季, 郑子峥, 等. G_{rp}78/Bip 介导戊型肝炎病毒衣壳蛋白对宿主细胞的吸附[J]. *微生物与感染*, 2007, 2(2): 83-87.
- [19] Johnson E F and Stout C D. Structural diversity of human xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(1): 331-336.
- [20] Renton K W. Cytochrome P450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection[J]. *Curr Drug Metab*, 2004, 5(3): 235-243.
- [21] Fujita K and Kamataki T. Genetically engineered bacterial cells co-expressing human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase: prediction of metabolism and toxicity of drugs in humans [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2002, 17(1): 1-22.
- [22] Yoshitomi S, Ikemoto K, Takahashi J, et al. Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology [J]. *Toxicol In Vitro*, 2001, 15(3): 245-256.
- [23] Fujimoto Y, Itabe H, Sakai J, et al. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1644(1): 47-59.
- [24] Kirby G M, Chemin I, Montesano R, et al. Induction of specific cytochrome P450s involved in aflatoxin B1 metabolism in hepatitis B virus transgenic mice[J]. *Mol Carcinog*, 1994, 11(2): 74-80.
- [25] Krawczynski K. Hepatitis E [J]. *Hepatology*, 1993, 17(5): 932-941.
- [26] Lau J Y, Sallie R, Fang J W, et al. Detection of hepatitis E virus genome and gene products in two patients with fulminant hepatitis E [J]. *J Hepatol*, 1995, 22(6): 605-610.

HEV Capsid Protein Interacts with CYP 2A6 and Decreases Its Coumarin 7-Hydroxylation Activity

TANG Ming, ZHENG Zi-zheng, SUN Yuan-yuan, HE Shui-zhen,
ZHAO Min, HUANG Hui, MIAO Ji, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract: E2 is a recombinant hepatitis E virus capsid protein including its main antigenic determinants but lacking of the particle assembling domain. P239 was the G-terminal extending protein of E2 and could self-assemble to form virus like particles, which might serve as mimicry of virions both structurally and antigenically. We previously used yeast two-hybrid system to screen proteins interacting with E2 based on a human hepatocyte cDNA library. One candidate was identified as the segment (aa388-437) of cytochrome P450 2A6 protein, which is predominantly expressed in liver and important for metabolism. Some studies have demonstrated that hepatitis virus infection may altered cell metabolic clearance of coumarin which were rapidly metabolised by CYP2A6. In this research, we demonstrated that the protein interaction between HEV capsid proteins and CYP2A6 by pull-down and co-immunoprecipitation. It was also found that their interaction could decrease the CYP2A6 catalytic activity when p239 was incubated within the CYP2A6-transfected Huh7 cells. These results suggested that CYP2A6 might be related to the pathological process when HEV invaded host cells.

Key words: Hepatitis E virus (HEV); CYP2A6; Protein Interaction

Corresponding author: MIAO Ji, E-mail: jmiao@xmu.edu.cn