重组戊型肝炎病毒衣壳蛋白 p239 特异性吸附、侵入 Hep G2 细胞并阻断野病毒对肝细胞的感染

苗季[1],郑子峥[1],何水珍[1],刘平果[2],吴小成[1],孙媛媛[1],唐明[1],张军[1],夏宁邵[1]
(1. 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,厦门大学 生命科学院,福建 厦门 361005;
2. 厦门大学 附属中山医院肝胆外科,福建 厦门 361004)

关键词:戊型肝炎病毒(HEV);病毒吸附
中图分类号:R373.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-8721(2007)04-0331-04

戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)引起的戊型肝炎在临床症状上与甲肝相似,但病死率更高,妊娠晚期病死率可高达 15%～25%[1]。近年来,戊肝在世界各地暴发不断;而我国戊肝发病迅速增长,已经成为普遍流行、危害严重的疾病之一[2]。HEV 一般只在血清、粪便排泄物或胆囊中才能小量分离到,且本身极易降解,很难大量获得。此外,HEV 缺乏可靠的细胞培养模型,野生病毒虽可以低效感染 Hep G2、Huh7 等细胞,但仅维持数日[3,4]。这些都极大限制了对 HEV 感染机制的研究。因此目前对 HEV 细胞感染过程仍了解甚少。

HEV 衣壳由 ORF2 单一基因编码产物组装而成,因此可利用重组 ORF2 蛋白为工具进行病毒吸附与进入宿主细胞的探索。过去的研究已经证实重组表达的 HEV 衣壳蛋白 p239 可以形成颗粒并具有很好的抗原活性,可以在恒河猴体内有效诱导中和抗体的产生[5-7]。我们还以 p239 为诱饵蛋白,利用亲和层析、酵母双杂交、蛋白质谱等技术在肝细胞中调取了几个可能与 HEV 衣壳相互作用的蛋白,并初步建立了 HEV 与宿主细胞的吸附模型[8,9]。但是,作为原核表达的 ORF2 重组蛋白,p239 是否能很好地模拟真病毒与肝细胞的吸附过程还缺乏更直接的证据。本研究采用免疫荧光和 RT-PCR 技术探讨了 p239 对不同来源人肝细胞的吸附与阻断野生 HEV 感染的特性,为进一步利用 p239 进行 HEV 感染机制研究奠定了基础。

收稿日期:2007-02-13;**修回日期**:2007-03-19
基金项目:福建省科技重大专项(2004YZ01)福建省青年科技人才创新项目(2006F3124)
作者简介:苗季(1970-),男,博士,副教授,专业方向分子病毒学(Email: jmiao@xmu.edu.cn; Tel: 86-592-2184113)
通讯作者:夏宁邵,361005 厦门市,厦门大学国家传染病诊断试剂与工程疫苗技术研究中心(E-mail: nsxia@xmu.edu.cn)

1 p239 对 Hep G2 的特异性吸附

常规培养的 Hep G2 细胞经胰酶消化、离心后分别于 4 ℃和 37 ℃与 p239 或 p239 与 HEV 中和单抗 8C11 的混合物孵育 5min 及 30min[9]。细胞蛋白提取物 SDS-PAGE 电泳,然后进行免疫印迹分析,利用本室制备的 HEV 单克隆抗体 15B2 检测 p239。结果显示,无论在 4 ℃还是 37 ℃条件下,p239 均可以与 Hep G2 结合并且结合量基本一致,而孵育 30min 时 p239 对 Hep G2 的结合量明显比 5min 时的结合量多;同时,HEV 中和单抗 8C11 可以完全阻断这种结合(图 1A),而无关单抗则不能阻断(结果未示),表明 p239 与 Hep G2 的结合是特异性的。为更直观地观察 p239 对 Hep G2 的吸附,我们将 Hep G2 细胞培养于预先放置盖玻片的六孔板中。分别加入 p239 或 p239 和 8C11 的混合物,于 4 ℃或 37 ℃孵育 5min 及 30min。细胞经 PBS 漂洗、4%多聚甲醛固定,然后与 15B2(1:1 000)室温孵育 1h,再与 FITC 标记的羊抗鼠(Sigma,1:500)室温孵育 30min,最后封片在载玻片上。荧光信号由 Nikon 荧光显微镜分析。与免疫印迹实验结果不同,免疫荧光实验结果显示,在 37 ℃条件下,p239 经过 5min 孵育主要吸附在 Hep G2 的细胞膜上,经过 30min 的孵育则主要分布于细胞的胞质;在 4 ℃条件下,即使孵育 30min,p239 仍主要分布于细胞表面,不能进入到胞质中(图 1B)。免疫荧光结果同时显示 p239 对 Hep G2 的吸附可以被 8C11 特异性阻断。

2 p239 抑制野生 HEV 对 Hep G2 及原代培养人肝细胞的感染

利用野生 HEV 可以低效感染肝细胞的特性,观察了 p239 对野生 HEV 感染人原代肝细胞和

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Hep G2 的影响。原代肝细胞培养方法如下:取肝癌手术病人癌旁正常肝组织,剪切成 1mm^3 左右的小块,用消化液(1mg/ mL IV 型胶原酶,0. 1mg/ mL DNaseI, 0. 1mg/ mL 透明质酸酶, SIGMA-ADRICH) 37 ℃消化 45min,过 200 目细胞筛网收集滤液,80g 离心收集沉淀,用 DMEM 洗涤两次后铺板,37 ℃培养于含 20 %胎牛血清、100U/ mL 青霉素、100U/ mL 链霉素的 DMEM 培养基中。野生 I 型 HEV 取自发病期的由病毒攻击的恒河猴胆汁。病毒载量由 PCR 方法确定,所用引物及反应条件参见文献[10]。Hep G2 细胞中的总 RNA 用 Trizol 方法提取,PCR 引物及反应条件同上。野生 HEV 感染 Hep G2 细胞后第 6d,利用套式 RT-PCR 可以检测到细胞内病毒 RNA 的存在(图 2A,箭头)。HEV 如果预先和 8C11 抗体孵育则检测不到病毒 RNA,表明 8C11 可以阻断病毒对细胞的感染。此外,如预先将 HEV 与 p239 混合再感染 Hep G2,则在细胞内检测不到病毒 RNA(图 2A)。为进一步验证上述结果,我们将 HEV 感染原代培养的人肝细胞,结果也显示 p239 可以阻断 HEV 对原代肝细胞的感染(图 2B)。上述结果表明 p239 可以特异性竞争野生 HEV 对肝细胞的感染。

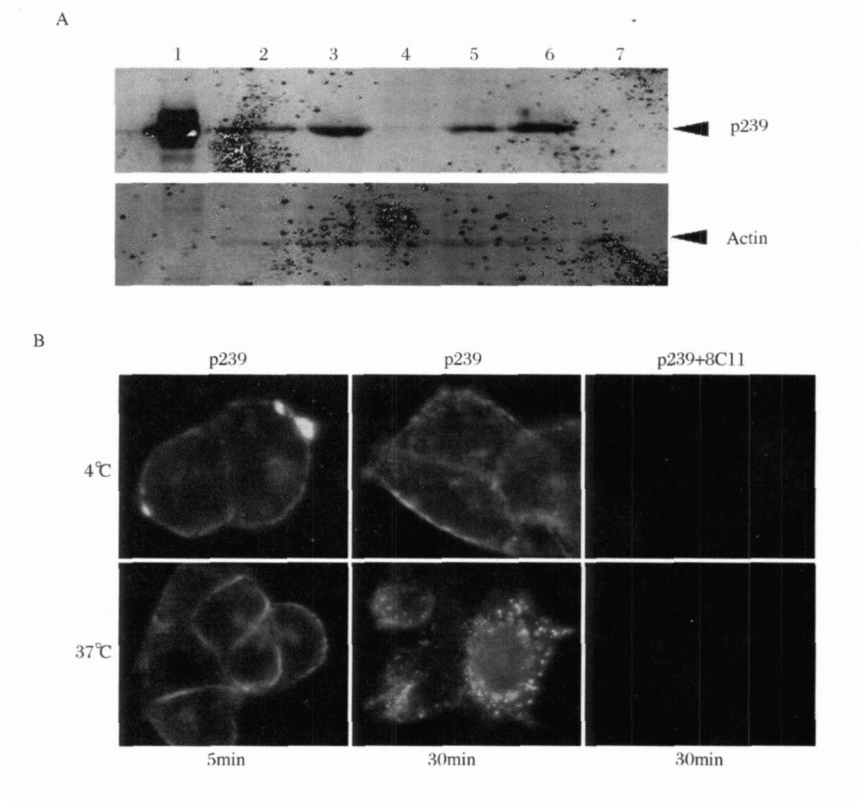

图 1 免疫印迹(A)及免疫荧光(B)实验结果显示 p239 对 Hep G2 的特异性吸附与侵入

Figure 1 Western blot (A) and immuno-fluorescence (B) results showed the specific adhesion and penetration of p239 on Hep G2 cells at indicated times and temperatures

Lane 1. *E coli* expressed p239; Lane 2. p239 incubated with Hep G2 at 37 ℃for 5 min; Lane 3. p239 incubated with Hep G2 at 37 ℃for 30 min; Lane 4. p239 pre-mixed with 8C11 and then incubated with Hep G2 at 37 ℃for 30 min; Lane 5. p239 incubated with Hep G2 at 4 ℃for 5 min; Lane 6. p239 incubated with Hep G2 at 4 ℃for 30 min; Lane 7. p239 pre-mixed with 8C11 and then incubated with Hep G2 at 4 ℃for 30 min.

过去的研究中,我们通过蛋白印迹法已经证实 p239 可以吸附于 Hep G2 细胞表面而且这种吸附可以被 HEV 中和单抗 8C11 所阻断[9]。本研究利用免疫荧光实验再次证实了上述结果,说明 p239 对 Hep G2 的吸附是特异性的。除此之外,观察到 p239 从吸附细胞膜到进入胞质的过程。更为重要的是,我们发现在 4 ℃条件下,p239 可以吸附到细胞膜上但不能进入到细胞内。细胞膜的流动性对膜的功能活动,包括病毒穿膜进入胞质具有重要意义[11, 12]。在低温条件下胞膜脂质双分子层处于固相晶态而失去流动性,当温度提高时,脂质双分子层可由晶态熔融为较为流动的液态。因此,可以认为

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

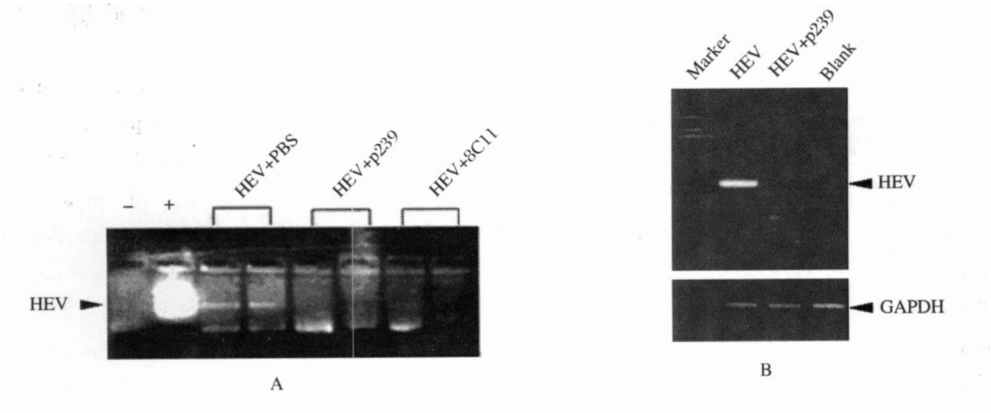

图 2　RT-PCR 结果显示 p239 可以特异性阻断野生 HEV 对 Hep G2(A)及原代培养人肝细胞(B)的感染

Figure 2　RT-PCR results showed pre-incubation of p239 particles with wild-type HEV specifically blocked the infection of the virus on Hep G2 cells (A) and on primary cultured human hepatocytes (B)

(-). Blank; (+). Positive control.

吸附在胞膜上的 p239 进入胞质的过程是生理性的而不是非特异性的胞吞作用。

以往的实验结果表明,8C11 抗体和野生 HEV 预先孵育后可以阻断 HEV 对恒河猴的攻击而使猴子免于感染和发病[7],但机制尚不清楚。本研究利用 HEV 对 Hep G2 的低效感染性在细胞水平上重复了上述实验。我们发现 8C11 可以阻断病毒感染 Hep G2,揭示 8C11 可以有效中和病毒对肝细胞的感染。另外,当 HEV 和摩尔比占绝对多数的 p239 混合后共同感染 Hep G2 或者原代培养的肝细胞,p239 也可以有效阻断 HEV 对细胞的感染。与 8C11 不同,p239 的阻断效应很可能是其可以较好地模拟 HEV 的表面结构,从而竞争性抑制了病毒和细胞膜的结合或穿膜。

结合以往研究和本研究的结果,我们总结出 p239 可以较好地模拟 HEV 表面结构,理由如下:①p239 上存在病毒的中和表位 8C11 和 8H3[7];②单克隆抗体 8C11 和 8H3 能直接捕获病毒,同时可以中和 HEV 对恒河猴的感染或致病性[7];③p239 除了可形成二聚体外,在体外还可以自发形成直径约为 15～30nm 的颗粒[5,13];④免疫印迹和免疫荧光实验证实 p239 可以吸附于宿主细胞表面,这种吸附可以被 8C11 特异性阻断,而且 p239 可以生理性地进入细胞胞质;⑤p239 可以竞争性抑制 HEV 对 Hep G2 或人原代肝细胞的感染。因此,我们认为完全可以利用 p239 进行 HEV 与宿主细胞相互作用的有关研究,从而绕过用天然 HEV 研究细胞受体、穿膜、转运等病毒感染机制的难题。在早期 HCV 受体研究时,由于缺乏有效的病毒感染模型,也曾大量采用重组蛋白技术,如利用 sE2 蛋白进行相关研究,并得到了很多重要的发现[14]。在没有建立起更好的 HEV 细胞感染模型时,采用已经广泛深入研究的 p239 做上述研究是有价值的。

参考文献:

[1]Jaiswal S P, Jain A K, Naik G, et al. Viral hepatitis during pregnancy[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2001,72(2):103-108.

[2]庄辉, 朱万孚, 李凡, 等. 我国戊型肝炎研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1999,19(5):448-450.

[3]Emerson S U, Clemente-Casares P, Moiduddin N, et al. Putative neutralization epitopes and broad cross-genotype neutralization of Hepatitis E virus confirmed by a quantitative cell-culture assay[J]. J Gen Virol, 2006,87(Pt 3):697-704.

[4]Emerson S U, Nguyen H, Graff J, et al. *In vitro* replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein[J]. J Virol, 2004,78(9):4838-4846.

[5]何志强, 张军, 李少伟, 等. 颗粒化重组戊型肝炎病毒衣壳蛋白及其抗原性与免疫原性[J]. 生物工程学报, 2004,20(2):262-268.

[6]张军, 李益民, 李少伟, 等. 大肠杆菌重组颗粒性戊型肝炎疫苗对恒河猴的免疫保护[J]. 病毒学报, 2004,20(1):1-6.

[7]Zhang J, Gu Y, Ge S X, et al. Analysis of hepatitis E

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein[J]. Vaccine, 2005, 23(22):2881-2892.

[8]吴小成, 何水珍, 郑子峥, 等. HepG2 细胞中与戊型肝炎病毒衣壳蛋白相互作用蛋白的初步研究[J]. 病毒学报, 2006, 22(5):329-333.

[9]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.

[10]葛胜祥, 郭清顺, 李少伟, 等. 基因 Ⅰ、Ⅳ型戊型肝炎病毒高灵敏度通用引物的设计和初步应用[J]. 病毒学报, 2005, 21(3):181-187.

[11]Dohner K, Sodeik B. The role of the cytoskeleton during viral infection[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2005, 285:67-108.

[12]Marsh M, Bron R. SFV infection in CHO cells: cell-type specific restrictions to productive virus entry at the cell surface[J]. J Cell Sci, 1997, 110 (Pt 1):95-103.

[13]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.

[14]Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions [J]. J Gen Virol, 2006, 87(Pt 5):1075-1084.

Recombinant HEV Caspid Protein p239 Specifically Attached on HepG2 Cells and Blocked the Infection of Wild-type HEV on Liver Cells

MIAO Ji[1], ZHENG Zi-zheng[1], HE Shui-zhen[1], LIU Ping-guo[2], WU Xiao-cheng[1], SUN Yuan-yuan[1], TANG Ming[1], ZHANG Jun[1], XIA Ning-shao[1]

(1. *National Institute of Diagnostics and Vaccine Development of Infectious Disease, Xiamen University, Xiamen* 361005, *China;*
2. *Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen* 361004, *China)*

Abstract: By using Western blot and immunofluorescence assays, the recombinant HEV capsid protein p239 was found specifically attached to the HepG2 cell surface and entered to the cytoplasm with the increase of incubation temperature. Pre-mixture of wild-type HEV with p239 blocked the infectivity of the virus on primary cultured human hepatocytes and HepG2 cells, indicating that p239 and HEV competed the same targeting site on these cells. These data provide evidence that p239 has a similar cell surface structure with wild-type HEV.

Key words: hepatitis E virus (HEV); virus attachment

Corresponding author: XIA Ning-shao, E-mail: nsxia@xmu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net