

学校编码： 10384

分类号_____密级_____

学号： 21620111152452

UDC_____

廈門大學

硕士学位论文

SRC-3 在 HBV 转录复制中作用的初步研究

**The Role of SRC-3 in HBV Transcription
and Replication**

王益

指导教师姓名：俞春东

专业名称：细胞生物学

论文提交日期：2014 年 4 月

论文答辩时间：2014 年 5 月

学位授予日期：2014 年 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2014 年

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(厦门大学生命科学学院俞春东)课题(组)的研究成果,获得(俞春东)课题(组)经费或实验室的资助,在(俞春东)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

摘要

乙型肝炎（Hepatitis B）是一种在世界范围内流行的传染性疾病，由乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus, HBV）感染引起。慢性 HBV 感染容易诱发肝硬化和肝癌等高致死率的疾病，因此受到广泛关注。

类固醇激素受体辅激活因子-3（Steroid Receptor Coactivator-3, SRC-3）是 p160 辅激活因子家族的一员。SRC-3 在细胞代谢和肝癌的发生发展中起到重要的作用，而这些过程也与 HBV 的复制密切相关，提示了 SRC-3 与 HBV 转录复制间可能存在相关性。

在本研究中，我们建立了流体动力学注射（Hydrodynamic Injection）感染 HBV 的小鼠模型，发现相对与野生型小鼠，感染 HBV 的 SRC-3^{-/-}小鼠的血清中含有更高水平的 HBV 抗原，其肝脏表达的 HBV 总 mRNA 水平也更高。在人肝癌细胞系 HepG2 中，降低 SRC-3 的表达水平可以提高培养液上清中 HBV 抗原水平和细胞内总 mRNA 水平。通过检测细胞抗病毒相关基因 mRNA 的表达水平，我们没有发现 SRC-3 对细胞清除病毒的机制产生明显影响，推测 SRC-3 可能影响 HBV 的转录。在 HepG2 细胞内，我们发现 SRC-3 的下调会导致 Akt 磷酸化水平降低，回补持续激活型 Akt 将重新抑制 SRC-3 敲低引起的 HBV 表达。在 SRC-3^{-/-}小鼠肝脏中的 Akt 磷酸化水平比 WT 小鼠较低。利用荧光素酶报告基因实验我们发现 SRC-3 可抑制 HNF-4 α 诱导的 HBV 核心启动子活性。这些结果说明 SRC-3 通过增强 Akt 信号抑制 HBV 转录，并可能与 HNF-4 α 的转录激活活性有关。

关键词： HBV; SRC-3

Abstract

Hepatitis B is a worldwide contagious disease caused by Hepatitis B virus (HBV) infection. Chronic HBV infection tends to induce cirrhosis and hepatocellular carcinoma with high mortality. Steroid receptor co-activator 3 (SRC-3) is a member of the family of p160 co-activators involved in cell metabolism and progression of HCC, and these processes are also highly related with replication of HBV, suggesting that SRC-3 may have a role in HBV replication.

In this study, we used hydrodynamic injection as animal model and found that after injection of HBV plasmid, the levels of HBV antigens in serum and HBV total mRNA in liver were significantly higher in SRC-3^{-/-} mice, compared with WT mice. Down-regulation of SRC-3 in HepG2 cells could increase the expression of HBV mRNA and antigens after transfection of HBV plasmid. However, no significant influence from SRC-3 was observed on the expression of anti-virus genes in HepG2 cells. Thus SRC-3 may regulate HBV replication on the transcription level. Phosphorylation of Akt was dampened in shSRC-3 HepG2 cells, and rescue of Akt phosphorylation could impair the enhancement of HBV expression. In addition, Phosphorylation level of Akt in liver tissues was lower in SRC-3^{-/-} mice, compared with WT mice. Furthermore, SRC-3 inhibited HNF-4 α -induced HBV core promoter activity. All these evidences indicated that SRC-3 negatively regulates HBV transcription, partially at least, through Akt signaling pathway which is related with the transcriptional activity of HNF-4 α .

Key words: HBV; SRC-3

目 录	
前 言	VII
1. 乙型病毒性肝炎概述	1
1.1 乙型肝炎的传播.....	2
1.2 乙型肝炎病毒相关疾病.....	2
2. 乙型肝炎病毒概述	3
2.1 乙型肝炎病毒的基因组.....	4
2.2 乙型肝炎病毒主要的功能蛋白.....	5
2.3 乙型肝炎病毒的复制与转录调控.....	8
3. 类固醇激素受体辅激活子-3 (SRC-3) 概述	11
3.1 SRC-3 的蛋白结构	12
3.2 SRC-3 的基因定位及表达.....	13
3.3 SRC-3 的功能和相关疾病.....	14
4. 立题背景	15
材料与amp;方法	17
1. 实验材料	17
1.1 主要试剂及药品.....	17
1.2 主要设备及器材.....	18
1.3 细胞系.....	18
1.4 菌株.....	18
1.5 实验动物	18
1.6 质粒.....	19
2. 实验方法	19
2.1 大肠杆菌感受态细胞制备.....	19
2.2 质粒转化感受态细胞.....	20
2.3 质粒的构建.....	20

2.4 质粒 DNA 的提取.....	22
2.5 动物组织基因组 DNA 提取.....	24
2.6 小鼠基因型鉴定 (PCR 法)	25
2.7 细胞培养	26
2.8 细胞冻存与复苏.....	26
2.9 细胞转染	27
2.10 稳定转染细胞株的建立.....	27
2.11 蛋白提取与蛋白浓度的测定.....	27
2.12 蛋白质印记法.....	28
2.13 RNA 的提取.....	29
2.14 逆转录 cDNA.....	30
2.15 实时荧光定量 PCR.....	30
2.16 荧光素酶报告基因实验.....	31
2.17 流体动力学注射 (Hydrodynamic Injection)	31
2.18 HBsAg 和 HBeAg 的 ELISA 检测.....	31
结果与分析	33
1. SRC-3 抑制 HBV 在小鼠体内表达	33
2. SRC-3 抑制 HBV 在 HepG2 细胞中表达	34
3. 未发现 SRC-3 与细胞抗病毒机制的相关性.....	36
4. SRC-3 通过增强 PI3K-Akt 信号通路抑制 HBV 表达	36
5. SRC-3 抑制 HBV 的 Akt 下游分子初探.....	38
讨 论.....	41
参考文献.....	43
致 谢.....	51

Table of contents

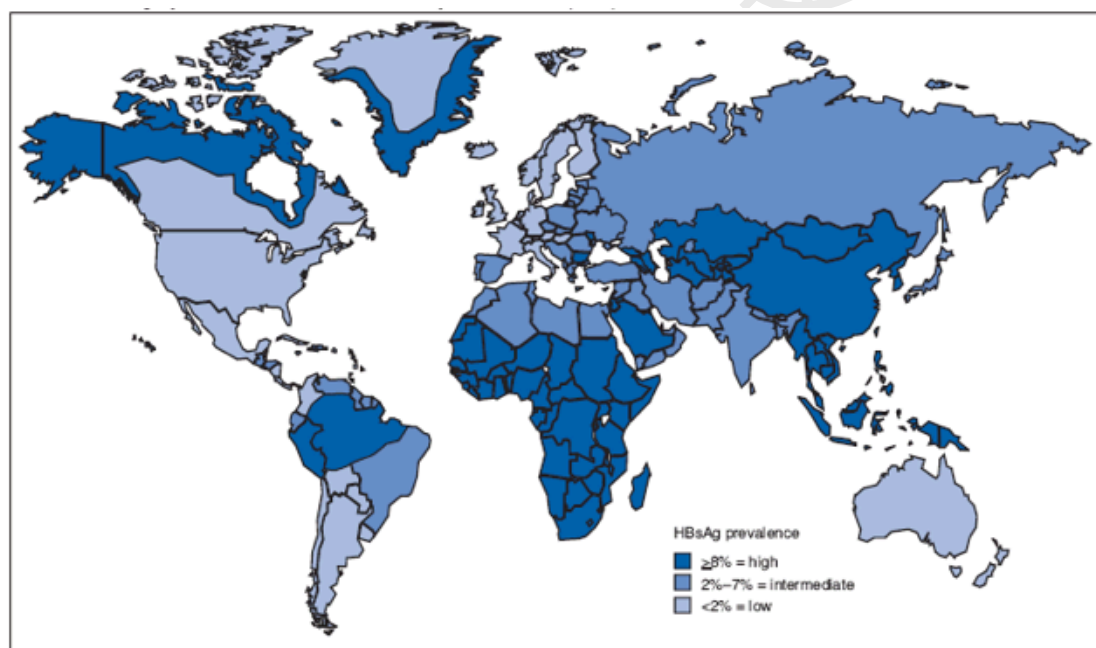
Introduction.....	VII
1. Hepatitis B	1
1.1 The transmission of hepatitis B.....	2
1.2 HBV-related diseases	2
2. Hepatitis B virus.....	3
2.1 HBV genome.....	4
2.2 HBV proteins	5
2.3 Replication and transcriptional regulation of HBV	8
3. Steroid hormone receptor coactivator-3 (SRC-3)	11
3.1 Structure of SRC-3 proteins.....	12
3.2 Positioning and expression of SRC-3	13
3.3 Functions of SRC-3 and diseases related.....	14
4. Research background	15
Materials and methods	17
1. Materials	17
1.1 Reagents.....	17
1.2 Equipments.....	18
1.3 Cell lines	18
1.4 Bacterial strains	18
1.5 Animals.....	18
1.6 Plasmids	19
2. Methods.....	19
2.1 Competent cells	19
2.2 Plasmid transformation	20
2.3 Plasmid construction	20
2.4 Plasmids extraction.....	22
2.5 Genomic DNA isolation from animals	24

2.6 Genotyping of SRC-3.....	25
2.7 Cell culture	26
2.8 Cell cryopreservation and recovery.....	26
2.9 Cell transfection.....	27
2.10 Construction of stably transfected cells.....	27
2.11 Protein extraction and concentration measuring.....	27
2.12 Western blot.....	28
2.13 RNA extraction.....	29
2.14 Reverse transcription reaction.....	30
2.15 Real-time quantatitive PCR	30
2.16 Luciferase reporter assay.....	31
2.17 Hydrodynamic injection.....	31
2.18 ELISA test for HBsAg and HBeAg	31
Results and analysis	33
1. SRC-3 suppressed HBV expression in vivo	33
2. SRC-3 suppressed HBV expression in HepG2 cells.....	34
3. No correlation between SRC-3 and anti-virus genes	36
4. SRC-3 suppressed HBV through Akt pathway	36
5. Down-stream molecules of Akt	38
Discussion.....	41
References	43
Acknowledgements	51

前言

1. 乙型病毒性肝炎概述

乙型病毒性肝炎 (Hepatitis B) 简称乙肝, 是一种由乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus, HBV) 引起的传染性疾病。根据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 2013 年 7 月发布的统计数据: “全球范围内慢性 HBV 感染者超过 2.4 亿人, 且每年大约有 60 万人死于急性 HBV 感染, 或慢性感染相关的疾病”, 占全球死亡原因排名第 7 位, 是一种极为常见而又危险的传染病。



引自 Mast EE 等人, 2006

图 1.1 世界慢性 HBV 感染分布地理图 (2005 年) ^[1]

Fig.1.1 Geographic distribution of chronic HBV infection (2005)

流行病学调查显示, HBV 感染主要发生在东亚、东南亚及撒哈拉以南非洲地区(图 1.1)^[1-2], 而中国是东亚地区 HBV 感染的“重灾区”。2013 年 7 月, 中国国家卫生和计划生育委员会对外公布, 我国累计拥有 HBV 携带者近 1 亿人, 为全球最多, 且每年新增感染者达 10 万人, 全球每年病毒性肝炎相关死亡人群中,

我国占近一半。有些学者因此将乙肝及其相关的疾病称为“中国病”^[3]。

1.1 乙型肝炎的传播

乙型肝炎在中国流行有着多方面的原因。从人种基因层面上说，黄种人比白种人更容易受到 HBV 的感染，除了中国、韩国、日本等东亚地区的黄种人，爱斯基摩人和印第安人也是乙型肝炎的高发人群。另一方面，HBV 传播的特点也是造成乙肝在中国流行的主要原因。HBV 的主要传播途径是血液或其他体液的接触传染。病毒可以通过皮肤表面的小伤口或者粘膜进入体内，举例来说，如注射器针头、手术器械的共用^[4]，不合格的血液制品^[5]及不安全的性行为^[6]等都有可能引起乙肝传播。近代中国社会资源有限，防疫意识普遍较低，一些医疗单位对医疗器械的消毒工作和对血液制品的检验检疫不够完善，对安全性行为的宣传不足，都是导致乙肝流行的诱因之一。母婴传播也属于血液传播，是中国 HBV 传播最主要的途径。新中国建国初 20 年处于人口快速增长期，由于当时对 HBV 了解甚少，也是导致乙肝大面积流行的主要原因。

1.2 乙型肝炎病毒相关疾病

1.2.1 急性乙型肝炎

根据感染时期和感染者的不同，乙型肝炎的病症程度十分不同。研究统计表明，有约三分之一的急性感染者会产生恶心、身体酸痛、精神萎靡、低热等症状，可发展为黄疸和黑尿，并在数周后病情趋于缓和，病毒载量降低，最终康复或转为慢性感染。极少数（约 1%）患者会发展为爆发性肝衰竭（Fulminant Hepatic Failure），典型的症状是突发高热、腹痛、呕吐，严重时可发生晕眩、昏迷甚至死亡^[7]。另外有研究报道急性肝炎感染患者还可能产生关节痛、关节炎及荨麻疹的初级症状^[8]。然而上述这些症状大多是不致命的，且大部分的急性 HBV 感染者并不表现或仅表现轻微的不适^[9]，使当时的人们忽略了慢性 HBV 感染对人体健康的严重危害。

1.2.2 慢性乙型肝炎

医学上认为：感染 HBV 六个月后如果病毒仍未被清除，则称为慢性 HBV 感染。由母婴传播途径感染的 HBV 尤其容易发展成慢性感染。慢性 HBV 感染者可能没有可见的症状或表现为持续性的肝脏炎症，但是发生肝硬化和肝癌的风险

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫