

人乳头瘤病毒 2 (HPV2) E2 蛋白不同功能区域的 突变点能够影响其转录抑制作用

高晨, 雷艳君, 姜慧英, 石琦, 田焱, 韩俊, 董小平

(中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室 北京 100052)

【摘要】人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV) 是引起皮肤和肛门、生殖器良性和恶性疣状增生性病变的主要原因。其中 HPV-2 与皮肤寻常疣的发生密切相关。我们前期的研究发现, 一株发现于巨大寻常疣患的 HPV2 变异株的 E2 蛋白存在多点突变, 而且这株变异的 E2 蛋白能够引起病毒启动子的活性的改变, 为了进一步研究 E2 蛋白这些突变点与病毒启动子之间的关系, 我们根据 HPV2 突变株的这些突变点设计了不同的引物, 分别采用延伸法对标准序列进行突变, 实验中构建的这些突变点主要分布在 E2 蛋白的 N 端、C 端以及两者之间的铰链区。PCR 进行扩增并纯化, 与 T 载体连接。经过测序证实后, 构建了 E2 不同的突变体的真核表达质粒, 并用脂质体法与带有 LCR 的 CAT 报道基因载体进行共转染。以同时转染 pCMV- β -gal 质粒作为内对照来消除由于不同孔、不同批次之间转染效率的不同对实验结果造成的影响。通过检测转染细胞上清中 CAT 的表达量, 从而获得不同 E2 区域点突变对病毒启动子活性抑制作用的影响研究。结果说明, 根据 HPV2 变异株上的点突变设计的这些突变点分别位于 E2 蛋白的 C 端 DNA 区、N 端的调控区以及两者之间的铰链区, 均能够影响 E2 蛋白对启动子活性的抑制作用。对于这些突变点与其启动子活性之间存在的关系的研究, 为进一步揭示与这例罕见巨大寻常疣临床表型之间存在着重要的联系提供了线索。

【关键词】 HPV2; 启动子; E2; 突变

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV) 是引起皮肤和肛门、生殖器良性和恶性疣状增生性病变的主要原因^[1]。传统上按照感染的部位及引起损伤的病理特征的不同将 HPV 分为皮肤型和粘膜型。皮肤型 HPV 主要感染皮肤上皮细胞, 其中 HPV-2 与皮肤寻常疣的发生密切相关。LCR 区是 HPV 基因组中基因调控重要的部分, 人乳头瘤病毒 E2 可以通过与 LCR 上的反式作用元件—转录因子结合位点 (Binding Sites, BS) 结合来调节早期启动子的活性^[2]。E2 结构上分 C 端的 DNA 结合区和 N 端的转录调控区, 中间由一个非保守的铰链区连接^[3]。

我们前期的一些研究发现^[4], 一株发现于巨大寻常疣患者的 HPV2 变异株的 E2 蛋白存在多点突变, 而且这株变异的 E2 蛋白能够引起病毒启动子的活性的改变。在此基础上, 我们设计了不同的引物, 根据发现的变异株突变特点和 E2 的结构特点构建了有不同的点突变, 构建表达 E2 蛋白的重组真核表达质粒, 并与带有 CAT 报道基因载体进行共转染, 对不同 E2 区域点突变的转录抑制作用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

E.coli DH5 α 、HindIII、BamHI 酶、pMD18-T vector 购自日本 TaKaRa 公司、LipofectamineTM 2000 Reagent 脂质体试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, CAT ELISA Kit 试剂盒购自 Roche 公司

1.2 E2 蛋白的突变及质粒构建

在我们前期的研究中发现一例巨大寻常疣患者组织中存在 HPV-2 基因, 且其早期蛋白 E2 能够引起病毒启动子活性的改变。经过对 E2 ORF 片段测序后, 发现存在多点点突变。突变如表 1:

核酸			氨基酸		
位置(nt)	标准株	变异株	位置(aa)	标准株	变异株
3037	T	C	118	L	S
3387	T	C	235	S	P
3543	T	C	287	Y	H
3561	A	C	293	S	R
3697	C	T	338	A	V

根据 HPV-2 原毒株基因序列(NC001352)设计 HPV-2 E2 基因 (nt2685~3860) 的引物, 上下游引物分别引入 HindIII、BamHI 酶切位点。Primer-E2 上游: 5' AAGCTTATGGAA ACACTGGCGAACCGT3' ,

Primer-E2 下游: 5' GGATCCTTATACAAA TGCAG ACATATA CCC3'。同时设计 E2 蛋白 N (3252nt) 端和 C 端扩增引物 (3389nt), Primer-E2N 下游: 5' GGATCCTTATGATTCTGCTGAGGC3', Primer-E2C 上游: 5' CTTAAGGTGGCTGGG ACTGTTATTCA C3'

根据分离到的突变株上的突变点设计引物, 以标准株为模板, 对 3037nt、3387nt、3697nt 以及 3037nt 和 3387nt 位置进行突变。突变引物如下: Primer-3037: 上游 5' GGACAATCAG TATCAGTGAAATTTGA TGGCAG CAG3'; 下游 5' CTGCTGCCATCAAA TTTCAGTGAT ACTGATTGTCC3'; Primer-3387: 上游 5' CCTCAGCAGAACC AACAGGAGCAGGAA GA3'; 下游 5' TCTTCCT GCTCCT GTTGG TTCTGCTGAGG3'; Primer-3697: 上游 5' AGA CGTACTGTATGTC AGGGTGTCTCCACGT3' 下游: 5' ACGTGG AGGAC ACCCTGACATACAGTACG TCT3'。

采用延伸法构建突变的 E2 基因序列。以构建带有 3697 点突变的 HPV-2 E2 基因为例, 用 E2 的 Primer-E2 上游引物和 Primer-3697 下游引物, 以及 Primer-3697 上游引物和 Primer-E2 下游引物分别扩增 HPV-2 原毒株 E2 基因的 N 端和 C 端, 扩增条件为 94℃ 1min; 56℃ 1min; 72℃ 1min, 30 个循环, 72℃ 延伸 5min。扩增出来的 DNA 片段分别进行回收纯化, 并进行重叠延伸反应, 反应条件为: 94℃ 1min; 56℃ 2min; 72℃ 2min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10min, 回收 PCR 产物, 与 pMD18-T vector (TaKaRa 公司) 连接构建重组质粒 pT-3697 E2。经测序后, 游离出 E2 片段并亚克隆至载体 pcDNA3.1, 构建质粒 pc-3037E2。以此类推, 构建质粒 pc-3387E2、pc-3037,3387E2、pc-E2N、pc-E2C 和 pc-3697E2。

1.3 脂质体介导的 HeLa 细胞瞬时转染

脂质体介导的 HeLa 细胞瞬时转染 人宫颈癌上皮细胞系 HeLa 细胞由本室保存。收集对数生长期细胞, 调整细胞浓度, 以 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ /孔接种至 6 孔板中, 按 Lipofectin 2000 说明进行质粒 DNA 转染。分别以 2 μ g HPV-2 原毒株真核表达质粒 pBLCAT-LCR (本室保存) 与 500 ng 的 pc-E2 各重组质粒共转染 HeLa 细胞。以上转染均以 1 μ g pCMV- β -gal 质粒作为内对照来消除由于不同孔、不同批次之间转染效率不同对实验结果造成的影响。

1.4 转染细胞中 CAT 表达量的检测

细胞转染后 48h 收获细胞, 裂解细胞获得细胞上清液。ONPG 检测上清中 β -gal 表达量; ELISA 方法

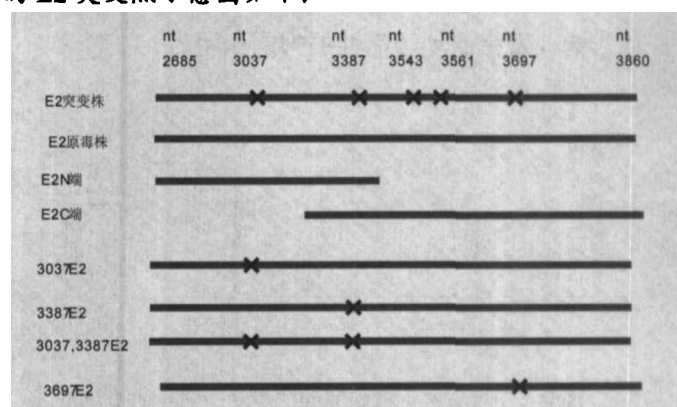
检测上清中 CAT 的表达量, 具体操作按 CAT ELISA Kit 试剂盒说明进行。

1.5 统计学分析

利用 T-test 或方差分析对 pBLCAT-LCR 质粒转染 HeLa 细胞后 CAT 的表达量及与 pc-E2 共转染 HeLa 细胞后 CAT 的表达量进行两两比较。

2 结果

2.1 根据发现的突变株 HPV2 上的点突变, 设计构建的 E2 突变点示意图如下:



2.2 E2 蛋白 N 端对转录抑制作用的影响

我们分别构建了包含有 3037nt 突变的以及缺失 N 端人 HPV-2 E2 蛋白的真核表达质粒, 以 2 μ g 的量与含有原毒株 LCR 序列的 CAT 报导质粒 pBLCAT-LCR 分别转染 HeLa 细胞, 测定其 CAT 表达量。结果显示在 HPV-2 原毒株 LCR 的控制下, CAT 的表达量与 HPV-2 E2 的原毒株比较, 3037nt 突变株与 N 端缺失株的细胞裂解上清中的 CAT 表达量均有所增加 (图 1), 而且 3037nt 突变株增加程度小于 N 端缺失株。这提示 HPV E2 蛋白的 N 端突变点以及 N 端的缺失都能够降低 E2 蛋白对于启动子活性的抑制作用。

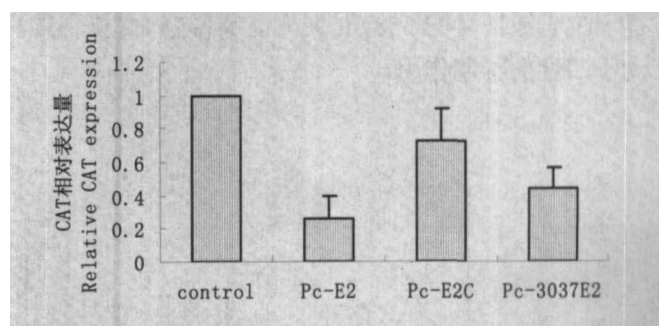


图 1 HPV-2 原毒株和变异株启动子活性的检测及 E2 蛋白对启动子活性的抑制作用

2.3 E2 蛋白 C 端对转录抑制作用的影响

3697nt 位点是位于 E2 蛋白 C 端的 DNA 结合功

能域中, 为了确定其突变对于 E2 蛋白启动子活性调节功能的影响, 我们构建了带有 3697nt 突变的 E2 蛋白以及整个 N 端缺失的 E2 蛋白真核表达质粒, 分别与含有原毒株 LCR 序列的 CAT 报导质粒 pBLCAT-LCR 共转染 HeLa 细胞, 并测定细胞裂解上清中 CAT 的表达量。结果缺失 C 端的 E2 蛋白 CAT 先对表达量为 0.72 ± 0.19 , 带有 3697nt 突变株的 E2 蛋白为 1.06 ± 1.45 , 都较原毒株 0.26 ± 0.14 高。显示 C 端缺失的 E2 和 3697nt 突变的 E2 都能够影响 E2 蛋白本身的启动子抑制活性, 而 C 端缺失的 E2 似乎更能影响其发挥启动子活性的抑制作用。

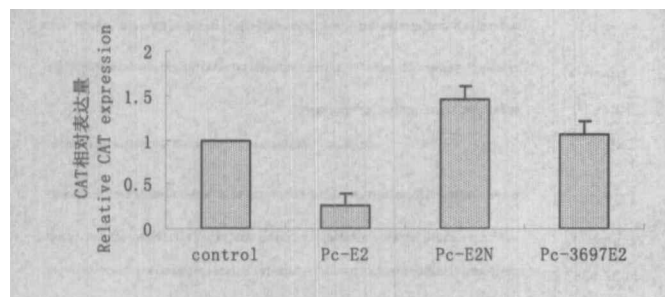


图2 HPV-2 原毒株和变异株启动子活性的检测及 E2 蛋白对启动子活性的抑制作用

2.4 铰链区中的突变点对 E2 蛋白转录活性的影响

3387nt 位于 E2 蛋白的 DNA 结合区以及 N 端转录调节区之间的铰链区。构建的带有此突变的质粒与 CAT 报导质粒 pBLCAT-LCR 共转染 HeLa 细胞, 结果显示 3387nt 位点的突变能够影响 E2 蛋白对于启动子活性的抑制作用, CAT 的相对表达量为 0.313 ± 0.14 , 比原毒株提高了 20%。位于 N 端的 3037nt 和 3387nt 同时突变的 pc-E2N-ProC 质粒, CAT 的表达量为 0.77 ± 0.05 均比单独的突变点对 E2 启动子的影响大。提示位于铰链区的 3387nt 突变能够影响 E2 蛋白的启动子活性的抑制作用。

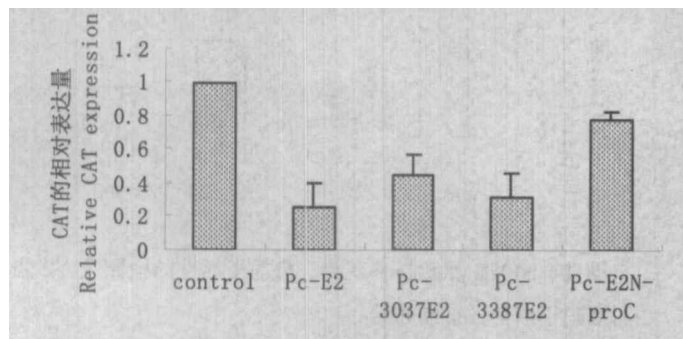


图3 HPV-2 原毒株和变异株启动子活性的检测及 E2 蛋白对启动子活性的抑制作用

3 讨论

HPV2 是引起皮肤寻常疣的常见 HPV 型别。在我们前期的研究中发现的一例罕见巨大寻常疣患者中证明病变组织中存在 HPV-2 基因, 获得的 HPV-2 全基因组序列的 E2 蛋白与原毒株比对结果显示, E2 蛋白有多个氨基酸发生改变。而且突变的 E2 蛋白转录抑制作用较野生型 E2 蛋白显著降低。突变株的 E2 蛋白能够降低了启动子活性的抑制作用。

在高危粘膜型 HPV-16、HPV-18 的研究上表面突变的 E2 蛋白及 LCR 上 E2 等转录因子结合位点的破坏可明显增强病毒早期启动子的活性, 诱导 E6/E7 基因过度转录、表达, 影响病毒复制并使宿主细胞发生恶性转化^[5,6], 对皮肤型 HPV 的报道却很少。

E2 蛋白是一种转录调节蛋白, E2 蛋白通过与其特异的结合位点相结合而发挥转录调节功能, 根据其结合位点的位置不同而发挥激活或者抑制作用^[7]。E2 蛋白结构上主要分为 C 端的 DNA 结合区、N 端的转录调节区以及非保守的两者中间的铰链区。E2 蛋白通过其 DNA 结合区结合特异性序列 ACCN₆GGT, 再通过 N 端的转录调节区来调节启动子的活性^[8]。文献显示 N 端的缺失会影响 E2 蛋白与特异序列的结合, 从而影响了 E2 蛋白本身的抑制作用, 使启动子的活性明显增加^[9]。这个结论在我们的实验中得以证实, 同时发现与变异株 E2 的点突变 3697 位点的突变也能够提高启动子活性, 虽然它的抑制作用不能完全类似于 N 端缺失的 E2, 但也能够说明此位点的氨基酸可能在 E2 的功能上有着重要的意义。

以往对于 E2 蛋白的 C 端及铰链区在 E2 功能中的作用研究较少, 大部分文献都认为 E2 蛋白主要通过 N 端与序列结合, 从空间结构上抑制了启动子的活性。我们的实验中显示无论是 C 端缺失的 E2 蛋白以及位于 N 端的突变点 3307 和铰链区的 3387 位点的突变同样能够影响其对启动子活性的抑制作用, 这说明在研究 E2 蛋白的启动子活性调节方面, C 端以及铰链区可能也起着重要的作用。

我们早期的研究结果提示了 HPV-2 变异株启动子活性增强及突变 E2 蛋白转录抑制作用的降低。对于这些突变位点与其启动子活性之间存在的关系的研究, 为进一步揭示与一罕见巨大寻常疣临床表型之间存在着重要的联系提供了线索。

参考文献

- [1] de Villier E M, Fauquet C, Broker T R, *et al.* Classification of papillomaviruses[J]. Virology, 2004, 324:17-27.
- [2] Turek LP. The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer[J]. Adv Virus Res, 1994, 44: 305-356.
- [3] Giri I, Yaniv M. Study of the E2 gene product of the cottontail rabbit papillomavirus reveals a common mechanism of transactivation among the papillomaviruses. J Virol 1988, 62(5): 1573-1581.
- [4] Yan-Jun Lei, Chen Wang, Chen Gao, Hui-Ying Jiang, Jian-Ming Chen, Jun Han, Yu-Kang Yuan, Xiao-Ping Dong HPV-2 Isolates from Patients with Huge Verrucae Vulgaris Possess Stronger Promoter Activities Intervirology 2007,50:353-360.
- [5] Romanczuk H, Howley P M. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89: 3159-3163.
- [6] Romanczuk H, Thierry F, Howley P M. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters[J]. J Virol, 1990, 64: 2849-2859.
- [7] McBride AA, Romanczuk H, Howley PM. The papillomavirus E2 regulatory proteins. J Biol Chem 1991,266:18411-18414.
- [8] Lambert PF, Hubbert NL, Howley PM, *et al.* Genetic assignment of the multiple E2 gene products in bovine papillomavirus transformed cells. J Virol 1989,63:3151-3154.

朊病毒病实验动物脑组织 PrP^{Sc} 样本库的建立

田焯, 张宝云, 韩俊, 高晨, 石琦, 姜慧英, 周伟, 董小平

(中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室 北京 100052)

【摘要】 朊病毒病是一类致死性神经退行性疾病, 可在人及多种动物中发病, 致死率达 100%。利用 Western blot 技术检测脑组织中 PrP^{Sc} 是目前 WHO 和 OIE 推荐使用的动物和人朊病毒病确诊诊断技术, 常规朊病毒病检测技术还有脑组织病理检测、免疫组化和免疫印记等, 此外许多新型的检测技术也在不断地研发。在诊断技术的研发中, 合格稳定的临床样本库对于诊断技术的考核十分重要。因此我们选用 30 只经颅内注射感染羊瘙痒因子 263K 的仓鼠, 这些仓鼠在经过相似的潜伏期后全部出现朊病毒病的典型临床表现, 并于终末期处死取脑组织, 并以 30 只正常仓鼠作为对照, 每只仓鼠脑组织分别制备 10%、1%和 0.5% 3 种浓度的匀浆, 分装冷冻保存。以 Western Blot 方法确定脑组织匀浆中 PrP^{Sc} 的存在情况, 并分别在建库半年和 3 年检测 PrP^{Sc} 的稳定性。经检测, 30 只感染仓鼠 10%脑组织匀浆全部可检出 PrP^{Sc}, 1%脑组织匀浆有 26 份为 PrP^{Sc} 阳性, 占总数的 86.7%, 另 4 份 (13.3%) 结果为阴性。30 份 0.5%的脑组织匀浆中 19 份显示 PrP^{Sc} 阳性, 占总数的 63.3%, 另 11 份 (36.7%) 未检出 PrP^{Sc}。半年及 3 年后复检, PrP^{Sc} 阳性检出率基本不变。所有正常仓鼠脑匀浆均为 PrP^{Sc} 阴性。由此我们建立了含有 90 份 PrP^{Sc} 阳性标本和 90 份 PrP^{Sc} 阴性样本的朊病毒病实验动物脑组织检测样本库, 具有可靠的检测重复性, 可满足动物和人朊病毒病诊断技术敏感新及特异性的评估和考核。

【主题词】 朊病毒; 羊瘙痒因子; 263K; 样本库

朊病毒病是一类致死性神经退行性疾病^[1], 包括人类的克雅氏病 (Creutzfeldt-Jakob disease, CJD) 牛海绵状脑病 (bovine spongiform encephalopathy, BSE) 和羊瘙痒病 (scrapie) 等, 病死率达 100%。目前认为是由于中枢神经系统中的细胞型 PrP^C 发生错误折叠转变成为致病构象 PrP^{Sc} 而引起。PrP^{Sc} 具有部分抵抗蛋白酶 K (proteinase K, PK) 消化这一特点在朊病毒病检测中常被用于区分 PrP^C 和 PrP^{Sc}。除了脑组织病理检测、免疫组化和免疫印记等常规朊病毒病

检测技术外, 许多新型的检测技术也在不断地研发。

目前 WHO 和欧盟认可的朊病毒病诊断技术均是基于脑组织 PrP^{Sc} 的检测^[2]。在诊断技术的研发中, 合格稳定的临床样本库对于诊断技术的考核十分重要。本文选择了 30 份羊瘙痒因子 263K 感染的仓鼠脑组织和 30 份正常仓鼠脑组织, 每份样本制备成三种不同浓度的脑组织匀浆, 建立了朊病毒病实验动物脑组织 PrP^{Sc} 样本库, 并对其稳定性进行了系统的检测, 为建立人和动物朊病毒病诊断技术的评估和考核系统奠定了基础。