

# 鼠肝炎病毒3型N蛋白I区激活 mfgl2凝血酶原酶基因

宁琴, 严伟明, 汪之沫, 习东, 刘铭锋, Gary Levy, 罗小平

宁琴, 严伟明, 汪之沫, 习东, 罗小平, 华中科技大学同济医学院同济医院传染科 湖北省武汉市 430030  
刘铭锋, Gary Levy, 多伦多大学医学院 加拿大 ON M5G 2C4  
宁琴, 女, 1966-01-03生, 江西省南城县人, 汉族. 1985年原同济医科大学学士, 1993年博士, 1994/2000年多伦多大学博士后. 免疫学和传染病学教授、主任医师、博士生导师. 现任华中科技大学同济医学院附属同济医院传染病教研室副主任, 研究室主任. 主要从事肝病的基础和临床工作和SARS研究工作. 国家自然科学基金资助项目, No. NSFC30170846  
杰出青年科学基金项目, No. NSFC30225040, NSFC30125019  
首批教育部防治非典科技攻关项目, No. [2003]64  
973计划“SARS防治基础研究”, No. 2003CB514100  
项目负责人: 宁琴, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 同济医院感染科, 临床免疫研究室. qning@tjh.tjmu.edu.cn  
电话: 027-83662391 传真: 027-83662391  
收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2003-11-13

## Domain I of nucleocapsid protein of murine hepatitis virus strain 3 upregulates transcription of mfgl2 prothrombinase/fibroleukin gene

Qin Ning, Wei-Ming Yan, Zhi-Mo Wang, Dong Xi, Ming-Feng Liu, Gary Levy, Xiao-Ping Luo

Qin Ning, Wei-Ming Yan, Zhi-Mo Wang, Dong Xi, Xiao-Ping Luo, Department of Infectious Disease, Tongji Hospital, Research Institute of Immunology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China  
Ming-Feng Liu, Gary Levy, Toronto General Hospital, The University of Toronto, Toronto, ON M5G 2C4, Canada  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30170846, the National Science Foundation of China for Distinguished Young Investigator, No. 30225040 and No. 30125019; Fund from Ministry of Education for SARS Study, No. [2003] 64  
Correspondence to: Dr. Qin Ning, Department of Infectious Disease, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefangdadao, Wuhan 430030, Hubei Province, China. qning@tjh.tjmu.edu.cn  
Received: 2003-10-09 Accepted: 2003-11-13

## Abstract

**AIM:** To investigate the responsible domain(s) of N protein and the I gene within the N gene of MHV-3 or MHV-A59 in the activation of mfgl2.

**METHODS:** To investigate the responsible domain(s) of N protein of MHV-3 or MHV-A59 in the activation of fgl2 gene, four ways comparison of the N protein was carried out and the site directed mutated N gene expression constructs within domain I and domain III were cotransfected respectively with mfgl2 promoter/luciferase reporter gene in CHO cells. Macrophages from Balb/cJ mice were infected with I gene mutated MHV virus Alb110 and its isogenic Alb111 for 8-10 hours, procoagulant activity (PCA) were measured. MHV-A59 I gene expression construct was cotransfected with mfgl2 promoter-report gene in Chinese hamster ovary (CHO) cells, and luciferase activity was detected for the assessment of promoter function.

**RESULTS:** Mutations of residues Gly-12, Pro-38, Asn-40, Gln-41 and Asn42 within domain I of the N protein of MHV-A59 to their corresponding residues were found in MHV-2 abrogated mfgl2 transcription, whereas mutation of other N protein domain III did not affect mfgl2 gene transcription. Alb 110 and Alb 111 infected macrophages showed a remarkable increasing in PCA activity compared with no virus or MHV-2 or MHV-JHM infected macrophages. There was no significant difference in PCA activity between Alb 110, Alb 111 infected group and MHV-A59 group. Cotransfection I gene expression construct with a reporter construct containing mfgl2 promoter in CHO cells displayed no significant difference in luciferase activity compared with nontransfected CHO cells.

**CONCLUSION:** Domain I of nucleocapsid protein of murine hepatitis virus strain 3 upregulates the transcription of mfgl2 prothrombinase/fibroleukin gene. The MHV-A59 I gene is not essential for activation of mfgl2 gene. Our study may shed lights on the investigation of current worldwide-distributed disease, severe acute respiratory syndrome (SARS).

Ning Q, Yan WM, Wang ZM, Xi D, Liu MF, Levy G, Luo XP. Domain I of nucleocapsid protein of murine hepatitis virus strain 3 upregulates transcription of mfgl2 prothrombinase/fibroleukin gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):594-599

## 摘要

**目的:** 研究鉴定激活 mfgl2凝血酶原酶基因之冠状病毒3型或A59型鼠肝炎病毒 (MHV-3, MHV-A59) 核心(N)蛋白的功能区域.

**方法:** 应用定点突变技术, 与 mfgl2 启动子共转染实验明确 mfgl2 凝血酶原酶基因之 MHV-3 或 MHV-A59 N 蛋白的功能区域. N 蛋白内含 I 基因突变病毒株 A1b 110 和其野生株 A1b 111 体外感染 Balb/cJ 小鼠巨噬细胞, I 基因表达载体与 mfgl2 启动子共转染实验阐明 I 蛋白在 mfgl2 基因激活中的作用.

**结果:** N 蛋白包含由两个可变间隔区(A, B)隔开的三个结构区(I, II, III), MHV-A59 N 蛋白 I 区可增强 mfgl2 转录活性, 当其基因序列突变为非嗜肝性 MHV-JHM 或 MHV-2 I 区序列时, 则丧失激活 mfgl2 启动子转录活性的功能. I 基因突变病毒株 A1b 110 和其野生株 A1b 111 体外感染 Balb/cJ 小鼠巨噬细胞后对 mfgl2 的激活无显著差异, 共转染实验阐明 I 蛋白并非 mfgl2 基因激活中的必备因素, 该组 mfgl2 启动子转录活性与对照组无显著差异, 而 N 蛋白可激活 mfgl2 启动子, 使其转录活性提高 62 倍.

结论: 鼠肝炎病毒N蛋白I区为激活 mfgl2凝血酶原酶基因的病毒蛋白功能区域.

宁琴, 严伟明, 汪之沫, 习东, 刘铭锋, Gary Levy, 罗小平. 鼠肝炎病毒3型N蛋白I区激活 mfgl2凝血酶原酶基因. 世界华人消化杂志 2004;12(3):594-599  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/594.asp>

## 0 引言

肝脏枯否细胞和血管内皮 mfgl2和hfgl2凝血酶原酶的高表达在冠状病毒-鼠肝炎病毒所诱导的小鼠暴发型病毒性肝炎和重症乙型肝炎的病情进展中起重要作用<sup>[1-2]</sup>. 我们的前期研究显示并非所有鼠肝炎病毒株都可诱导 mfgl2 基因表达, 仅嗜肝性鼠肝炎病毒3型(MHV-3)和A59型鼠肝炎病毒(MHV-A59)感染可在体内外诱导 Balb/cJ 小鼠 mfgl2 基因高表达, 而非嗜肝性2型和JHM型鼠肝炎病毒(MHV-2和MHV-JHM)在体内外不能激活 mfgl2 基因<sup>[3]</sup>. 已知 MHV-3 或 MHV-A59 核心(N)蛋白和宿主肝细胞核因子4(HNF4)为 mfgl2 基因激活的必要因素<sup>[4]</sup>. N蛋白由3个保守结构区I, II和III组成, II区为与基因组RNA结合的部位, 而I区和III区的生物学功能尚未明了<sup>[5-8]</sup>. 近来 Masters 研究组又在大多数 MHV N基因发现一内在开放阅读框架(internal ORF) I基因<sup>[9]</sup>. 我们阐明激活 mfgl2凝血酶原酶基因的病毒蛋白功能区域.

## 1 材料和方法

1.1 材料 Balb/cJ 小鼠6-8周龄购自 Jackson 实验室(Bar Harbor, ME), 在本院动物中心饲养. MHV-3, MHV-A59, MHV-JHM 和 MHV-2 购自美国典型生物保藏中心(ATCC). MHV-A59 I基因突变病毒株 Alb 110 和其野生型 Alb 111, 特异性I蛋白 mAb 由美国纽约州立研究院 Paul Marsters 教授提供<sup>[7]</sup>. Alb 110 病毒株 I 基因读码框起始密码和终止密码均被突变, 此株病毒不产生 I 蛋白. 所有的病毒株均采用鼠 17CL1 细胞系进行扩增培养, 鼠 L2 细胞系蚀斑纯化和滴度测定. 小鼠原代巨噬细胞: 将 30 g/L 硫羟乙酸盐 1.5 mL 注射到 Balb/cJ 小鼠腹腔内, 4 d 后从该小鼠腹腔抽取巨噬细胞悬浮于 RPMI 1640 培养液中(含 2 mmol/L 谷氨酰胺和 20 mL/L 胎牛血清). 形态学和非特异酯酶染色检测巨噬细胞纯度超过 95%. 锥虫蓝排实验检测巨噬细胞存活率超过 95%. 中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系来自 ATCC.

1.2 方法 N 基因、I 基因表达载体和 mfgl2 启动子虫荧光素酶(LUC)报告基因载体的构建<sup>[4]</sup>: 通过 RT-PCR 对 MHV 全长 N 基因、I 基因编码区和 3 非编码(UTRS)序列进行扩增, 并将其亚克隆到表达载体 pCR 3.1. 所用引物序列为: N 基因上游引物 5' ACG ATG TCT TTT GTT CCT GGG 3', N 基因下游引物 5' TTT TTT TTT GTG ATT CTT CCA 3', I 基因上游引物 5' CGC GCT GGT AAT GGA AT 3', I 基因下游引物 5' CTT CGG CCA TAT CAG GTT 3'. 此载体含 CMV 启动子和小牛

生长激素 3' 端信号控制系统. 所克隆之 MHV-2 N 基因序列已提交至 NIH 基因文库(序列号 AF061853)<sup>[3]</sup>. 从鼠基因组 P1 质粒的亚克隆 PM166 (pBluescript-m166)中酶解出 mfgl2 基因 5' 端 1.3 kb 的启动子 DNA 片段, 并将此 1.3 kb DNA 片段克隆至 pGL2 虫荧光素酶报告质粒(pGL2-basic, Promega) Sma I 和 Xho I 位点, 从而形成了 mfgl2 启动子/虫荧光素酶报告质粒 Pfgl2-LUC. 5' 端缺失 mfgl2 启动子/虫荧光素酶报告质粒的构建方法为以 PM166 为模板, 扩增 5' 端缺失 mfgl2 启动子 DNA 片段, 然后将其克隆到 pCR 2.1 载体, 再一次亚克隆到 pGL2 虫荧光素酶报告质粒 Xho I 和 HindIII 位点. 呼吸道合胞病毒(RSV) $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -Gal)表达质粒购自 Promega 公司. 突变体: 使用 Dnasis 软件对嗜肝性 MHV (MHV-3, 序列号 M35254 和 MHV-A59) 和非嗜肝性 MHV (MHV-2 和 MHV-JHM, 序列号 M25875) N 蛋白氨基酸序列进行了比较(表1). 根据 QuikChang<sup>TM</sup> (stratagene) 定点诱变试剂盒操作指导设计上下游引物, 以 MHV-A59 N 基因表达载体为模板进行扩增制备相应 N 基因突变体, 其氨基酸突变位点和引物序列见表 2. 以上质粒均经测序鉴定无误. 分别将 N 蛋白 1  $\mu$ L 或 I 蛋白表达质粒或 N 蛋白突变体表达质粒 pGL2-basic 或 pfgl2-LUC DNA 野生型启动子虫荧光酶报告质粒 0.5  $\mu$ g 以及  $\beta$ -gal 基因 DNA 0.25  $\mu$ g 溶于 OPTI-DMEM 培养液 100  $\mu$ L, 后与 OPTI-DMEM 培养液 100  $\mu$ L 混合(含 lipofectAMINE<sup>TM</sup> 3.5  $\mu$ L), 将混合物置于室温中孵育 30 min. 向混合物中加入 OPTI-DMEM 培养液 1.8 mL 使总量达 2 mL. 将上述混合物按每孔 1 mL 的体积加入六孔平板上汇合率达 50-80% 的 CHO 细胞内, 37  $^{\circ}$ C 50 mL/L CO<sub>2</sub> 条件培养 5 h, 换 20 g/L FBS DMEM 培养液, 44-48 h 后, 收集细胞并经液氮冻融 3 次, 取上清进行  $\beta$ -gal 和 LUC 活性测定.

1.2.1 前凝血质活性 感染 MHV 及突变株的巨噬细胞 (MOI=2.5) 在含有 100 mL/L 胎牛血清和 200 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI 1640 中培养 8 h, 未感染的巨噬细胞和 MHV-3 感染的巨噬细胞分别作为阴性和阳性对照. 采用单相凝集试验(one-stage clotting assay)<sup>[10]</sup>, 测定 mfgl2 凝血酶原酶的功能(PCA).

1.2.2 Western-blot 鉴定 I 蛋白的表达 转染 24 h 后, 向培养孔内加 Triton 裂解液 [pH 7.8 100 mmol/L 磷酸钾, 2 mL/L Triton X-100, 1 mmol/L DTT(临用前新鲜加入)], 收集裂解液上清, 用邻硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖苷(ONPG) 于 420 nm 处进行比色分析  $\beta$ -gal 活性, 以判断转染效率. 收集另设平衡实验孔转染细胞, 凝胶加样缓冲液裂解后进行 SDS-PAGE (150 g/L 聚丙烯酰胺凝胶)电泳. 半干法将蛋白质从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维素膜(NC膜)上, 丽春红 S 染色确认蛋白质已转移到 NC 膜上, 蒸馏水漂洗脱色以备免疫分析. 将 NC 膜置于封闭液中于平缓摇动的摇床平台上室温温育 2 h. 弃去封闭液, 加入兔抗 MHV I 蛋白 mAb (1:200), 平缓摇动的摇床平台上室温温育 1 h. PBS 洗涤 10 min  $\times$ 5 次. 加入

辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (1 : 1 500), 摇床平台上室温温育 1 h 观察结果.

统计学处理 采用 ANOVA 统计顾问软件(sigmastat advisory statistical software, jandel corporation) 对统计资料进行单向方差分析.

## 2 结果

### 2.1 mfgl2 基因的转录活性 我们比较了嗜肝性 MHV

(MHV-A59, MHV-3)与非嗜肝 MHV(MHV-2, MHV-JHM)的 N 蛋白氨基酸序列(表 1), 并对差异部分进行了系列定点突变. 瞬时转染试验显示, 嗜肝性 MHV N 蛋白 I 区有 4 个位点(Gly12, Pro38, Asn40, Gln41, Asn42)经突变后(表 2), 其激活 mfgl2 启动子的转录活性降为水平线(图 1), 而 N 蛋白 II 区突变体对 mfgl2 的转录活性没有明显下降, 表明嗜肝性 MHV N 蛋白 I 区为激活 mfgl2 凝血酶原酶基因的功能区域.

表 1 MHV-A59, MHV-3, MHV-2 和 MHV-JHM 的 N 蛋白氨基酸序列比较

		* G12S	* P38 del		P38L *	* NQN 40-42 del	
MHV-A59	1	MSFVPGQENA	GGRSSSVNRA	GNGILKKTWT	ADQTERGPNN	QNRGRRNQPK	50
MHV-3		G	G				
MHV-2		S	G		- - -	H	
MHV-JHM		S	G		L	K	
					*E85Q		
MHV-A59	51	QTATTQPNSG	SVVPHYSWFS	GITQFQKQKE	FQFAEGQGVP	IANGIPASEQ	100
MHV-3					E		
MHV-2		A			Q	S	
MHV-JHM					Q	Q	
MHV-A59	101	KGYWYRHNR	SFKTPDGGQK	QLLPRWYFY	LGTGPHAGAS	<u>YGDSIEGVFW</u>	150
MHV-3					S		
MHV-2					E		
MHV-JHM			H		E		
MHV-A59	151	<u>VANSQADTNT</u>	<u>RS</u> DIVERDPS	SHEAIPTRFA	PGTVLPQGFY	VEGSGRSAPA	200
MHV-3		NS	S				
MHV-2		SQ	K TA V	K		K	
MHV-JHM		SQ E R SA					
MHV-A59	201	SRSGRSQSR	GPNNRARSS	NQRQPASTVK	PDMAEEIAAL	VLAKLGKDAG	250
MHV-3				A			
MHV-2							
MHV-JHM		P					
MHV-A59	251	QPKQVTKQSA	KEVRQKILNK	PRQKRTPNKQ	CPVQQCFGKR	GPNQNFGGSE	300
MHV-3							
MHV-2			T				
MHV-JHM						P	
				*V321A			
MHV-A59	301	MLKLGTSDPQ	FPILAELAPT	VGAFFFGSKL	ELVKKNSSGA	DEPTKDVEYE	350
MHV-3							
MHV-2				PS			
MHV-JHM				A		G	
MHV-A59	351	QYSGAVRFDS	TLPGFETIMK	VLNENLNAYQ	<u>K-DGGADVVS</u>	<u>PKPQRKGRRQ</u>	400
MHV-3							
MHV-2		I		T	DQA SV L	P R	
MHV-JHM					NQ	RGTK	
MHV-A59	401	<u>AQEKKDEVDN</u>	VSVAKPKSSV	QRNVSRELTP	EDRSLLAQIL	DDGVVPDGLE	450
MHV-3							
MHV-2			L				
MHV-JHM		KKAQ					
MHV-A59	451	DDSNV* . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	500
500 MHV-3							
MHV-2							
MHV-JHM							

MHV-A59 N 蛋白完整氨基酸序列已列出, 其他三型 MHV 仅列出与 MHV-A59 不同的 N 蛋白氨基酸残基. 斜体和波浪纹、下划线部分表示可变间隔区 A 和 B 的序列. 破折号表示引入序列的空隙使比较的序列相应位置残基对齐. MHV-A59 N 蛋白中需要突变处理的氨基酸以黑体字和下划线表示. 星号后紧接着的部分表示突变.

表 2 MHV-A59 N 蛋白氨基酸突变位点和引物序列

Mutant Name	Mutation	Location of Mutation	Sense Primer (5' - 3')/Antisense Primer (5' - 3')
A59G12S	Gly12 to Ser12	Domain I	CCT GGG CAA GAA AAT GCC GGT AGC AGA AGC TCC TCT G/ C AGA GGA GCT TCT GCT ACC GGC ATT TTC TTG CCC AGG
A59P38L	Pro38 to Leu38	Domain I	GAC CAA ACC GAG CGT GGA CTA AAT AAT CAA AAT AGA GGC/ GCC TCT ATT TTG ATT ATT TAG TCC ACG CTC GGT TTG GTC
A59P38del	Pro38 deletion	Domain I	GCT GAC CAA CAA ACC GAG CGT GGA CCA AAT AAT CAA AAT AGA GGC AGA AGG/ CCT TCT GCC TCT ATT TTG ATT ATT TGG TCC ACG CTC GGT TTG TTG GTC AGC
A59NQN 40-42del	Asn40-Gln41- Asn42 deletion	Domain I	GG GCT GAC CAA ACC GAG CGT GGA CCA AAT (AAT CAA AAT) AGA GGC AGA AGG AAT CAG CCA AAG CAG ACT GC GC AGT CTG CTT TGG CTG ATT CCT TCT TCC TCT (ATT TTG ATT) ATT TGG TCC ACG CTC GGT TTG TTC AGC CC
A59E85Q	Glu85 to Gln85	Domain I	GGA AAG GAG TTT CAG TTT GCA CAG GGA CCA GGA GTG CCT ATT GCC GGC AAT AGG CAC TCC TGG TCC CTG AGC AAA CTG AAA CTC CTT TCC
A59V321A	Val321 to Ala321	Domain II	GCA GAG TTG GCT CCA ACA CCT GGT GCC GGT GCC TTC TTC GG CC GAA GAA GGC ACC GGC ACC AGG TGT TGG AGC CAA CTC TGC

黑体字母表示突变序列. 括号内黑体字母表示缺失序列. 所有突变的产物皆经测序核实方向和序列.

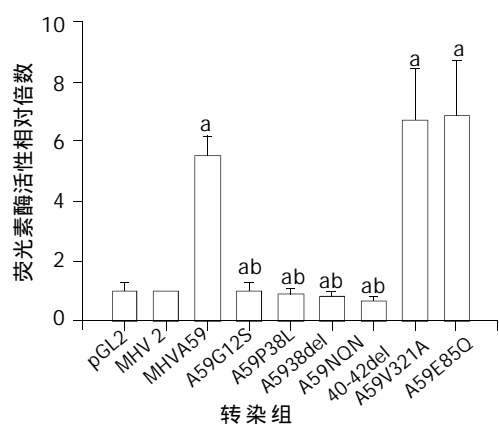


图 1 mfgl2 启动子与 MHV-A59 N 蛋白或其突变体 N 蛋白共转染后的转录活性检测. 共分 9 组, 每组设 3 个复管, 进行了相互独立而平衡的 5 次实验, 取 mean±SD 行统计学分析, 以 pGL2 组所显示的虫荧光酶活性为 1, 其余各组虫荧光酶活性表示方法为与其与 pGL2 组的相对比率. <sup>a</sup>P <0.01 vs 转染 MHV-2 N 基因表达载体的细胞进行比较; <sup>b</sup>P <0.01 vs 转染 MHV-A59 N 基因突变体表达载体的细胞进行比较.

2.2 巨噬细胞 PCA 的产生 我们将 MHV-A59 I 基因突变病毒株 A1b110 及其同基因型野生株 A1B111 感染 Ba1b/cJ 小鼠腹腔巨噬细胞并检测 PCA 活性. 结果显示, A1b 110 与 A1B 111 对小鼠巨噬细胞 PCA 活性的诱导程度无显著差异, 与 MHV-A59、MHV-3 组亦无显著差异(图 2)提示 I 基因可能对嗜肝性 MHV N 蛋白激活 mfgl2 启动子的作用无影响.

2.3 I 基因的真核表达 我们克隆了 MHV-A59 I 基因并构建了其表达载体. 并在 CHO 细胞进行了 I 基因的真核表达. 采用特异性 I 蛋白单克隆抗体进行 Western-blot 显

示一特异性的 23 KD 蛋白条带, 见图 3 箭头处.

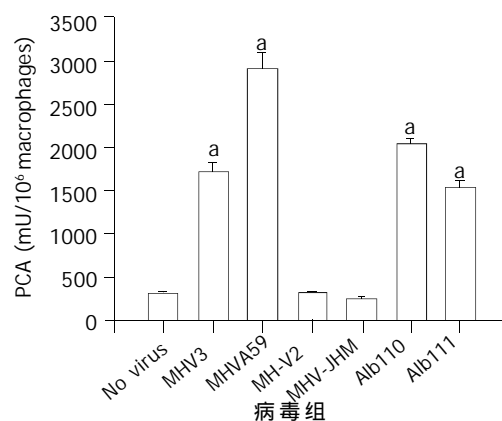


图 2 基因突变病毒株和其野生株感染 Balb/cJ 小鼠巨噬细胞后 PCA 检测. I 基因突变病毒株 Alb110 和他的同基因野生型 Alb111 感染 Balb/cJ 小鼠的巨噬细胞, 感染系数 2.5, 8-10 h 后收集巨噬细胞进行 PCA 测定. MHV-3、MHV-A59 感染组设为阳性对照, MHV-2、MHV-JHM 和无病毒感染组设为阴性对照. 进行了三次相互独立的实验, 每组设三管, 取 mean±SD 行统计分析. <sup>a</sup>P <0.01 vs 未受刺激的巨噬细胞进行比较.

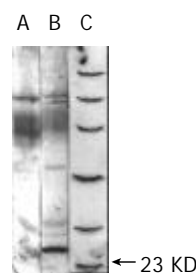


图 3 I 基因的真核表达. 泳道 A: 未转染 I-pCR3.1 质粒 DNA 的 CHO 细胞; 泳道 B: 转染 I-pCR3.1 质粒 DNA 的 CHO 细胞; 泳道 C: 蛋白质标准分子量.

2.4 I 基因不诱导 mfgl2 基因的表达 应用 SPSS 统计学分析软件对 3 组相对荧光素酶活性倍数进行单因素方差分析, 结果 I 蛋白组与 pCR3.1 空质粒组比较  $P > 0.05$  (0.234), 与 N 蛋白组比较  $P < 0.05$  (0.038), N 蛋白组与 pCR3.1 空质粒组比较  $P < 0.01$  (0.005). 说明 I 蛋白对 mfgl2 基因转录活性无显著作用(图 4)

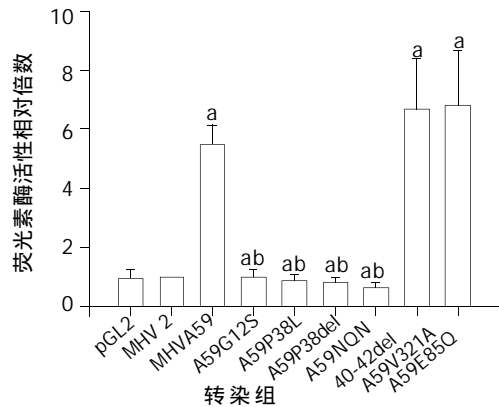


图 4 mfgl2 启动子与 I 蛋白共转染后的转录活性检测. N 蛋白表达质粒和 pCR3.1 空质粒分别设为阳性和阴性对照. 每组设了 3 个复管, 进行了相互独立而平衡的 4 次实验, 取 mean±SD 进行统计分析. 以 pCR3.1 空质粒但所得虫荧光酶活性为 1, 其余各组虫荧光酶的活性表示方法为与其与 pCR3.1 空质粒组的相对比率. \* $P < 0.01$  vs pCR3.1 空质粒组虫荧光酶活性比较差异有显著性.

### 3 讨论

我国重症乙型肝炎发病率高, 临床治疗手段有限, 其分子致病机制不甚明了<sup>[11-12]</sup>. MHV-3 或 MHV-A59 感染引起的小鼠病毒性肝炎模型已被认为是研究人类重症肝炎发病机制的良好工具<sup>[13-14]</sup>. mfgl2、hfgl2 凝血酶原酶的组织特异性表达已被证明在 MHV-3 引起的鼠暴发型肝功能衰竭和人类重症乙型肝炎的发病中起关键作用<sup>[1-2, 15]</sup>. MHV-3 N 蛋白通过肝脏特异性转录因子肝核因子 4 (HNF4) 诱导 mfgl2/fibroleukin 基因的表达<sup>[4, 16]</sup>. MHV-A59 N 蛋白与 MHV-3 N 蛋白仅有 1 个氨基酸的差异, 均可特异性地上调 mfgl2 基因表达<sup>[2-3]</sup>, 因此亦是进行嗜肝性 MHV 相关研究的代表病毒株. 嗜肝性和非嗜肝性 MHV N 蛋白均可进入被感染的细胞核内, 提示 MHV 介导的 mfgl2 转录激活与嗜肝性 MHV N 蛋白特异性性状有关<sup>[17-19]</sup>. N 蛋白 I 区和 II 区富含几种碱性氨基酸残基: lys, arg 和 his. 对 MHV-A59, MHV-3, MHV-JHM 和 MHV-2 的 N 蛋白氨基酸序列分析初步显示这些碱性氨基酸残基可形成簇状结构(至少有两个簇), 由可变长度间隔区隔开, 单独或协同作用均有可能为核定位信号. 已知 MHV N 蛋白 II 区主要作用是与病毒基因组结合, 而 I 区和 III 区的功能尚不明了<sup>[20-21]</sup>.

为确定嗜肝性 MHV N 蛋白对激活 mfgl2 表达发挥关键性作用之氨基酸功能域, 将 mfgl2 启动子/LUC 报告载体和 MHV-A59 N 基因野生型表达质粒或其氨基酸定点突变质粒共转染到 CHO 细胞, 结果显示位于 N 蛋白 I 区的氨基酸残基与 mfgl2 转录激活有关(图 1); 而 II 区

氨基酸残基突变则不影响. mfgl2 转录活性提示 N 蛋白 I 区的 Gly12, Pro38, Asn40, Gln41, Asn42 氨基酸残基很可能形成一个基元 (motif), 在 mfgl2 转录激活过程中发挥重要作用. 关于这些残基如何相互作用尚有待 MHV N 蛋白晶体结构的明确以深入研究.

I 蛋白是一个 23 ku 的疏水多肽, 由一个嵌入 MHV N 基因 5' 端的开放阅读框编码, 这个内在的基因被称为 I 基因, 其序列也已确证<sup>[22-24]</sup>. 目前已经发现在 MHV 感染的细胞上均有 I 蛋白的表达, 实验表明 I 蛋白并非 MHV 在组织培养或天然宿主体内复制所必须的结构蛋白, 但 I 基因沉寂病毒的噬斑直径要明显小于同基因的野生株病毒噬斑直径, 表明 I 基因的表达利于 MHV 病毒的生长<sup>[9]</sup>. 为阐明 N 基因内含 I 基因是否参与调节 mfgl2 的作用, 我们将 I 基因突变病毒株 Alb110 及其野生株 Alb111 体外感染 Balb/cJ 小鼠巨噬细胞, 检测其 PCA 活性, 将 I 基因表达载体与 mfgl2 荧光素酶报告质粒共转染以期明确 I 蛋白在 mfgl2 基因激活中的作用, 结果显示 I 蛋白非 mfgl2 基因激活的必备因素, 进一步论证了嗜肝性病毒株 MHV-3 和 MHV-A59 之 N 蛋白是促进前凝血酶原酶基因转录激活的病毒因素. 已知丙型肝炎核心蛋白对某些宿主基因的调节作用<sup>[25-27]</sup>, 我们的结果对人类乙型和丙型肝炎病毒核心蛋白调节宿主基因转录的研究具重要的指导意义.

目前累及全球 28 个国家和地区的 Urbani SARS 相关冠状病毒, 经测序核实其序列与 II 类冠状病毒其中包括 MHV 在基因序列同源性最大<sup>[28-30]</sup>, 目前尚未见到有关其发病机制、传播与防治动物模型的文献报道. 我们在 MHV-3 领域成功的科研经验对探讨 Urbani SARS 相关冠状病毒及其所致疾病的基础研究和防治有重要的借鉴意义.

致谢: 感谢胡锦涛女士协助本文文字和图表处理!

### 4 参考文献

- Ding JW, Ning Q, Liu MF, Lai A, Leibowitz J, Peltekia KM, Cole EH, Fung LS, Holloway C, Marsden PA, Yeger H, Phillips MJ, Levy A. Fulminant hepatic failure in murine hepatitis virus strain 3 infection: tissue-specific expression of a novel fgl2 prothrombinase. *J Virol* 1997;71:9223-9230
- 陈悦, 宁琴, 王宝菊, 张东坤, 严福明, 孙奕, 刁东, 严伟明, 郝连杰, Levy G, 罗小平. 重症乙型肝炎人纤维介素基因的表达及意义. *中华医学杂志* 2003;83:446-450
- Ning Q, Liu M, Kongkham P, Lai M, Marsden PA, Tseng J, Pereira B, Belyavsky M, Leibowitz J, Phillips MJ, Levy G. The nucleocapsid protein of murine hepatitis virus type 3 induces transcription of the novel fgl2 prothrombinase gene. *Biol Chem* 1999;274:9930-9936
- 宁琴, 罗小平, 汪之沫, 韩梅芳, 严伟明, 刘铭锋, Levy G. Mfgl2 凝血酶原酶/fibroleukin 基因转录调控元件 HNF4 的研究. *中华医学杂志* 2003;83:678-683
- Lai MM, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. *Advin Vir Res* 1997;48:1-100
- Cologna R, Spagnolo JF, Hogue BG. Identification of nucleocapsid binding sites within coronavirus-defective genomes. *Virology* 2000;277:235-249
- Narayanan K, Kim KH, Makino S. Characterization of N protein self-association in coronavirus ribonucleoprotein complexes. *Virus Res* 2003;98:131-140

- 8 Wu HY, Guy JS, Yoo D, Vlasak R, Urbach E, Brian DA. Common RNA replication signals exist among group 2 coronaviruses: evidence for in vivo recombination between animal and human coronavirus molecules. *Virology* 2003;315:174-83
- 9 Fischer F, Peng D, Hingley ST, Weiss SR, Masters PS. The internal open reading frame within the nucleocapsid gene of mouse hepatitis virus encodes a structural protein that is not essential for viral replication. *J Virol* 1997;71:996-1003
- 10 Ning Q, Brown D, Parodo J, Cattal M, Gorczynski R, Cole E, Fung L, Ding JW, Liu MF, Rotstein O, Phillips MJ, Levy G. Ribavirin inhibits viral induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol* 1998;160:3487-3493
- 11 冯志华, 聂青和, 白宪光, 白雪帆, 周永兴, 贾战生, 郝春秋. 膜式血浆置换治疗慢性重症肝炎肝功能衰竭疗效. *世界华人消化杂志* 2002;10:638-641
- 12 李冠群, 李今怡, 霍宏慎, 王兆荃, 姜卫国. 斑块状肝细胞坏死在亚急性重症肝炎病理诊断中的意义. *世界华人消化杂志* 2000;8(特刊 8):69
- 13 Jodie H, Stanley P. Mouse hepatitis virus. *Cur Opin Microbiol* 2001;4:462-466
- 14 Liu MF, Chan CWY, McGilvray ID, Ning Q, Levy GA. Fulminant viral hepatitis. Molecular and cellular basis, and clinical implications. *Exp Rev Mol Med* 2001;1-19
- 15 Marsden PA, Ning Q, Fung LS, Luo XP, Chen Y, Mendicino M, Ghanekar A, Scott GA, Miller T, Chan CWY, Chan MWC, He W, Gorczynski RM, Grant DR, Clark DA, Phillips MJ, Levy GA. The Fgl2/fibroleukin prothrombinase contributes to immunologically-mediated thrombosis in experimental and human viral hepatitis. *J Clin Invest* 2003;112:58-66
- 16 Ning Q, Lakatoo S, Liu M, Yan W, Wang Z, Phillips MJ, Levy G. Induction of prothrombinase fgl2 by the nucleocapsid protein of virulent mouse hepatitis virus is dependent on host hepatic nuclear factor-4 a. *J Biol Chem* 2003;278:15541-15549
- 17 Wurm T, Chen H, Hodgson T, Britton P, Brooks G, Hiscox JA. Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division. *J Virol* 2001;75:9345-9356
- 18 Hiscox JA, Wurm T, Wilson P, Britton P, Cavanagh D, Brooks G. Coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. *J Virol* 2001;75:505-512
- 19 Brockway SM, Clay CT, Lu XT, Denison MR. Characterization of the expression, intracellular localization, and replication complex association putative mouse hepatitis virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 2003;77:10515-10527
- 20 Masters PS, Parker MM, Ricard CS, Duchala C, Frana MF, Holmes KV, Sturman LS. Structure and function studies of the nucleocapsid protein of mouse hepatitis virus. In: Coronaviruses and their diseases. Cavanagh D, Brown T, eds. Plenum Press, New York 1990;239-246
- 21 Parker MM, Masters PS. Sequence comparison of the N genes of five strains of the coronavirus mouse hepatitis virus suggests a three-domain structure for the nucleocapsid protein. *Virology* 1990;179:463-468
- 22 Lapps W, Hogue BG, Brian DA. Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes. *Virology* 1987;157:47-57
- 23 Homberger FR. Sequence analysis of the nucleoprotein genes of three enterotropic strains of murine coronavirus. *Arch Virol* 1995;140:571-579
- 24 Kunita S, Mori M, Terada E. Sequence analysis of the nucleocapsid protein gene of rat coronavirus SDAV-681. *Virology* 1993;193:520-523
- 25 Lai M, Ware C. Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;242:117-134
- 26 McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 2000;7:2-14
- 27 Webster G, Brown D, Dusheiko G. HCV genotypes-role in pathogenesis of disease and response to therapy. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14:229-240
- 28 Poutanen SM, Low DE, Henry B, Finkelstein S, Rose D, Green K, Tellier R, Draker R, Adachi D, Ayers M, Chan AK, Skowronski DM, Salit I, Simor AE, Slutsky AS, Doyle PW, Krajden M, Petric M, Brunham RC, McGeer AJ. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med* 2003;348:1995-2005
- 29 Drosten C, Gunther S, Preiser W, Vander Werf S, Brodt HR, Becker S, Raberau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguere AM, Clinat J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manngueria JC, Muller S, Rickerts V, Sturmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1967-1976
- 30 Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarener J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ. A novel coronavirus associated with severe respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953-1966