

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(8):867–874; 4 August 2013
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

IFN- α 对 gp96 的上调降低其抗 HBV 的效率

郜衍周^{1,3}, 范红霞^{1,3}, 邱立鹏^{2*}, 孟颂东^{1*}

¹中国科学院微生物研究所, 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

²江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013

³中国科学院大学, 北京 100049

摘要:【目的】探讨 IFN- α 上调热休克蛋白 gp96 对其抗 HBV 作用的影响。【方法】首先通过 RT-PCR、荧光报告基因和 Western blot 在转录和蛋白水平上研究 IFN- α 对 gp96 上调的时间、剂量依赖性。其次, 利用 RT-PCR、ELISA 分别研究转染表达 gp96、RNA 干扰 gp96 对 HBV 复制的影响。最后, 通过 ELISA、RT-PCR 研究 RNA 干扰 gp96 后 IFN- α 抗 HBV 的作用。【结果】发现 IFN- α 对 gp96 的上调具有时间、剂量依赖性。而 gp96 的上调促进了 HBV 的复制, 消除 IFN- α 对 gp96 的上调显著增强 IFN- α 抗 HBV 的效率。【结论】IFN- α 上调 gp96 对其抗乙肝病毒功能起负面影响, 抑制 gp96 上调可增强 IFN- α 的抗病毒效果。

关键词: IFN- α , gp96, HBV, 抗病毒效果, 复制

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2013)08-0867-08

全世界大约 20 亿人感染过乙肝病毒 (HBV), 至少 3.6 亿人为慢性乙肝感染^[1]。IFN- α 是第一种批准治疗慢性乙肝感染的药物, 相对于核苷类似物药物, 它拥有很多优势: 如疗效时间, 不易引发病毒耐药性, 少数患者 HBsAg 可能转阴等^[2]。临床上 IFN- α 仍是治疗 HBV 感染重要的一线药物。IFN- α 能激活 Jak/STAT 途径, 引发干扰素激活基因 (ISGs) 的表达, 同时干扰素可活化细胞毒性 T 细胞 (CTLs) 和自然杀伤细胞的功能^[3], 具有直接抗病毒功能。此外, IFN- α 能够阻止病毒颗粒的形成。然而, IFN- α 的作用机制并没有完全解释清楚^[4], 约有 70% 慢性乙肝患者对 IFN- α 治疗并不敏感^[5], 加上昂贵的治疗费用、明显的副作用, 因此需要对制约

IFN- α 抗病毒功能的因素进行深入研究, 发现能预测其疗效的生物标志物^[6]。

热休克蛋白 gp96 也称为 HSP90b1, GRP94, ERp99 或 TRA-1, 作为内质网中最主要的蛋白之一, 是细胞质热休克蛋白 HSP90 的同源蛋白^[7]。除了作为分子伴侣辅助蛋白折叠^[8], gp96 在先天免疫和适应性免疫中都发挥着重要作用。Gp96 可以结合来自肿瘤、病毒、胞内寄生菌的抗原多肽, 通过与细胞表面受体 CD91 或清道夫受体 A 结合进入抗原呈递细胞后将结合的抗原肽交叉呈递给 MHC I 和 MHC II 类分子, 从而激活多肽特异性 CTL^[9]。同时作为 Toll 样受体的重要分子伴侣, gp96 在天然免疫中也发挥着重要的作用^[10]。

基金项目: 国家科技项目重大专项 (2013ZX10002001-003-003); 深圳市科技创新委员会项目 (KQA201105260010A, CYC201012290024A)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807350; E-mail: mengsd@im.ac.cn

作者简介: 郜衍周 (1987–), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为分子病毒与分子免疫学。E-mail: gaoyanzhou10@mails.ucas.ac.cn

收稿日期: 2013-01-28; **修回日期:** 2013-04-28

我们和其他人的前期研究均发现 gp96 在乙肝感染的肝组织中表达明显上调, gp96 的表达水平与 HBV 感染的疾病进展紧密相关^[11-12]。基于以上结果, 本研究的目的是查明 gp96 是否影响 HBV 复制, 以及 gp96 在 IFN- α 治疗慢性乙肝感染中可能发挥的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、siRNA、细胞株: pcDNA3.1-Flag-gp96 质粒: 将人源 gp96 基因克隆到哺乳动物表达载体 pcDNA3.1-Flag (由中国科学院微生物研究所叶昕教授惠赠)。PGL3-Enhancer-TRA1: 将 gp96 启动子插入 PGL3-Enhancer 载体, 构建荧光报告载体。含有 1.3 HBV 基因拷贝的表达载体 pHBV1.3 由本实验室保存^[4]。化学合成的 gp96 干扰 RNA (gp96 siRNA) 购自广州市锐博生物科技有限公司, gp96 siRNA 正义链和反义链如下:

(正义链) 5'-GCAAGGACATCTCTACAAA dTdT-3'; (反义链) 3'-dTdT CGUCCUGUAGAGAUGUUU-5'。人肝癌细胞系 Huh-7 和人胚胎肾细胞株 293T 为本实验室保存细胞。

1.1.2 主要试剂和仪器: IFN- α (重组人源干扰素 α -2b) 购自北京凯因生物技术有限公司。小鼠抗人 gp96 抗体购自 Santa Cruz 公司; 小鼠抗人 GAPDH 抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠抗体购自北京中杉金桥公司。ECL 超敏发光液购自北京普利莱基因技术有限公司。胎牛血清及 DMEM 培养基购自 Gibco 公司。转染试剂 Lipofectamine 2000 和 opti-MEM、RNA 提取试剂 Trizol、DNase I 购自 Invitrogen 公司。SYBR Green Premix 试剂、反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。荧光定量 PCR 试剂盒购自 Promega 公司。HBsAg 和 HBeAg ELISA 检测试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司。血液组织细胞基因组提取试剂盒购自天根生化科技有限公司。引物由 Invitrogen 合成。酶标仪为 BIO-TEK 公司产品; Rotor-Gene Q 实时荧光定量 PCR 仪为 QIAGEN 公司产品。

1.2 细胞培养和转染

Huh-7 和 293T 用含 100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养

基在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。转染前一天将 Huh-7 或 293T 细胞铺到六孔板 (美国 Corning 公司)。待细胞汇合度至 50% 开始转染, 移去培养基并用 opti-MEM 洗 2 次, 然后用 Lipofectamine 2000 按说明转染 gp96 siRNA、pcDNA-Flag-gp96 或含有 1.3 拷贝 D 型 HBV 基因组的 pHBV 质粒^[13]。4-6 h 后将转染用培养基换成培养用的完全培养基。根据实验设置在换液时加相应量 IFN- α 。之后细胞在相同培养环境下继续培养 24-72 h。并于特定时间点从每孔收集 100 μ L 培养基检测 HBsAg、HBeAg 水平和病毒 DNA 拷贝数。收细胞后, 提取总 RNA 和蛋白, -80 $^{\circ}$ C 保存以便之后定量 RT-PCR 或 Western blot 检测。

1.3 RNA 提取和定量 RT-PCR

按照说明书用 Trizol 试剂提取处理细胞的总 RNA, 并反转录。GAPDH 作内参进行定量 RT-PCR。所用的 gp96 和 GAPDH 的引物如下: gp96 (forward) 5'-CAGTTTTGGATCTTGCTGTGG-3', gp96 (reverse) 5'-TACAGCAACTGTCCGCCACC-3',

GAPDH (forward) 5'-GGTGAA GGTGGGTGTG AACG-3', GAPDH (reverse) 5'-CTCGCTCCTGGAA GATGGTG-3'。HBV pgRNA 和全 mRNA 用的引物如前述^[14]。

实时定量荧光 PCR 使用 SYBR green premix 试剂按照说明书进行。

1.4 免疫印迹分析

用 PBS 清洗细胞 3 次, 然后直接在六孔板内用含蛋白酶抑制剂 (德国 Roche 公司) 的裂解液 (0.05 mol/L Tris, pH7.6, 含 0.15 mol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1% Nonidet P-40) 裂解。每个样品取等量蛋白用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移蛋白到 PVDF 膜 (美国 Millipore 公司), 一抗采用小鼠抗人 gp96 抗体或小鼠抗人 GAPDH 抗体, 二抗选用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠抗体, 按照说明书用 ECL 超敏发光液显影检测。

1.5 HBs 和 HBe 检测

用 Lipofectamine 2000 按照说明书在细胞中转染 pHBV 质粒, 在不同时间点收取细胞上清液, 通过夹心 ELISA 的方法检测 HBs 和 HBe。具体步骤如下: 将待测样品分别加入到抗-HBs 或抗-HBe 抗体包被的反应板中, 再加入辣根过氧化物酶标记的抗-HBs 或抗-HBe 抗体, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 洗板 5 次, 加入

显色底物后,37℃避光孵育 15 min,最后加入终止液终止反应,用酶标仪检测波长 450 nm 的 OD 值。

1.6 HBV DNA 拷贝数检测

48 h 收取处理细胞的培养基上清, DNase I 处理 2-3 h 后用提基因组试剂盒按照说明书提取细胞包装分泌的 HBV 基因组。用定量 RT-PCR 检测 HBV DNA 拷贝数。采用引物如下: HBx (forward) 5'-ACGTCCTTTGTTTACGTCCCGT-3' (nt 1414-1435), HBx (reverse) 5'-CCCAACTCCTCCCAGTCCTTAA-3' (nt 1744-1723)。

1.7 双荧光检测

用 Lipofectamine 2000 在 Huh7 细胞中共转染 pRL-TK(海肾质粒)和 PGL3-Enhancer-TRA1 质粒后,用 1000 U/mL IFN- α 或对照处理 24 h。将细胞裂解后用 Promega 双荧光素酶报告基因检测试剂盒按说明书进行检测分析。通过荧光发光仪分别检测萤火虫荧光素酶的活性和海肾荧光素酶活性,并以海肾荧光素酶活性作为内参分析荧光素酶的活性。

1.8 数据分析

每个实验都重复 2-3 次,每次设置 3 个重复。结果以平均值 \pm 标准差(SD)显示。Student *t* 检验进行组间比较。 $p < 0.05$ 认为是显著区别。

2 结果

2.1 IFN- α 上调 gp96 的表达

通过 RT-PCR 和 Western blot 在 mRNA 和蛋白水平检测不同浓度 IFN- α 处理和处理后不同时间的 Huh-7 细胞中 gp96 表达情况。IFN- α 浓度在 500 U/mL 到 1000 U/mL 时 gp96 转录水平稳定增加并且在 1000 U/mL 达到最高,随后降低。和未处理的细胞相比,IFN- α 处理 12 h 后 gp96 转录增加了 86% (图 1-A, $P < 0.01$)。双荧光结果显示 IFN- α 处理后 24 h 上调 gp96 启动子活性 19% (图 1-B, $P < 0.01$)。IFN- α 处理后 gp96 mRNA 水平在 12 h 内逐步提高并在 12 h 达到最高,然后直到 72 h 逐步降低 (图 1-C)。通过 Western blot 检测观察到相似的结果,对 Western blot 条带定量分析显示, IFN- α 处理显著上调 gp96 蛋白水平 (图 1-D, $P < 0.01$)。

2.2 gp96 促进 HBV 的复制

将 gp96 表达载体 pcDNA3.1-Flag-gp96 与 HBV 表达载体共转染 293T 细胞 48 h 后 gp96 蛋白水平

显著增加 (图 2-A),与转染空载体的对照相比,转染 gp96 表达载体使得 HBsAg 和 HBeAg 分别增加 87% 和 77% (图 2-B, $P < 0.01$),细胞上清中 HBV DNA 拷贝数提高了 265% (图 2-C, $P < 0.01$),同时 HBV pgRNA 增加了 109%,总 RNA 增加了 136% (图 2-D, $P < 0.01$)。以上结果表明过表达 gp96 明显促进 HBV 的复制, gp96 可能在转录水平促进 HBV 的复制。

2.3 下调 gp96 抑制 HBV 的复制

将 gp96 siRNA 或对照 siRNA (mock) 和 pHBV1.3 共转 Huh-7 细胞, gp96 蛋白水平在转染后 48 h 降低了大约 50% (图 3-A)。与 mock 相比, gp96 RNAi 处理显著降低 HBsAg 和 HBeAg 水平 (图 3-B) 与病毒 DNA (图 3-C) 水平,同时 HBV pgRNA 和总 RNA 分别降低了 79% 和 58% (图 3-D, $P < 0.01$)。

2.4 IFN- α 抑制 HBV 的复制

图 4-A 显示,与未处理的细胞相比,在 Huh-7 细胞中使用不同剂量 IFN- α 处理 24、48、72 h 后 HBsAg、HBeAg 均显著降低 ($P < 0.05$ 或 0.01), IFN- α 对 HBV 的抑制呈剂量依赖性。在 293T 细胞中也观察到类似的结果 (图 4-B, $P < 0.01$)。在 Huh-7 细胞中使用 1000 U/mL 的 IFN- α 处理 48 h 后 HBV DNA 水平降低了 54% (图 4-C), pgRNA 和总 RNA 分别降低了 43% 和 25% (图 4-D)。

综上所述,由于 IFN- α 在抑制 HBV 复制的同时上调 gp96 的转录与表达,而 gp96 的上调显著促进 HBV 复制,因此可以推断 gp96 的上调对 IFN- α 的抗病毒功能起负面影响。

2.5 下调 gp96 可增强 IFN- α 抗 HBV 的活性

为了进一步查明 IFN- α 引发的 gp96 上调在 IFN- α 抗病毒中的作用,在使用 IFN- α 处理的同时应用 RNAi 抑制 gp96 的表达上调。如图 5-A 和 5-B 所示,使用 1000 U/mL 的 IFN- α 和 50 nmol/L gp96 siRNA 联合处理转染 HBV 表达载体的 Huh-7 细胞,比单独使用 IFN- α 或 gp96 siRNA 更显著降低了 HBsAg、HBeAg 的分泌和 HBV DNA 拷贝数 ($P < 0.05$ 或 0.01)。如图 5-C, RNAi 显著抑制而 IFN- α 处理显著促进 gp96 的表达水平, gp96 RNAi 与 IFN- α 同时处理消除了 IFN- α 对 gp96 的上调作用,可以排除因 gp96 的抑制造成的抗病毒效应。

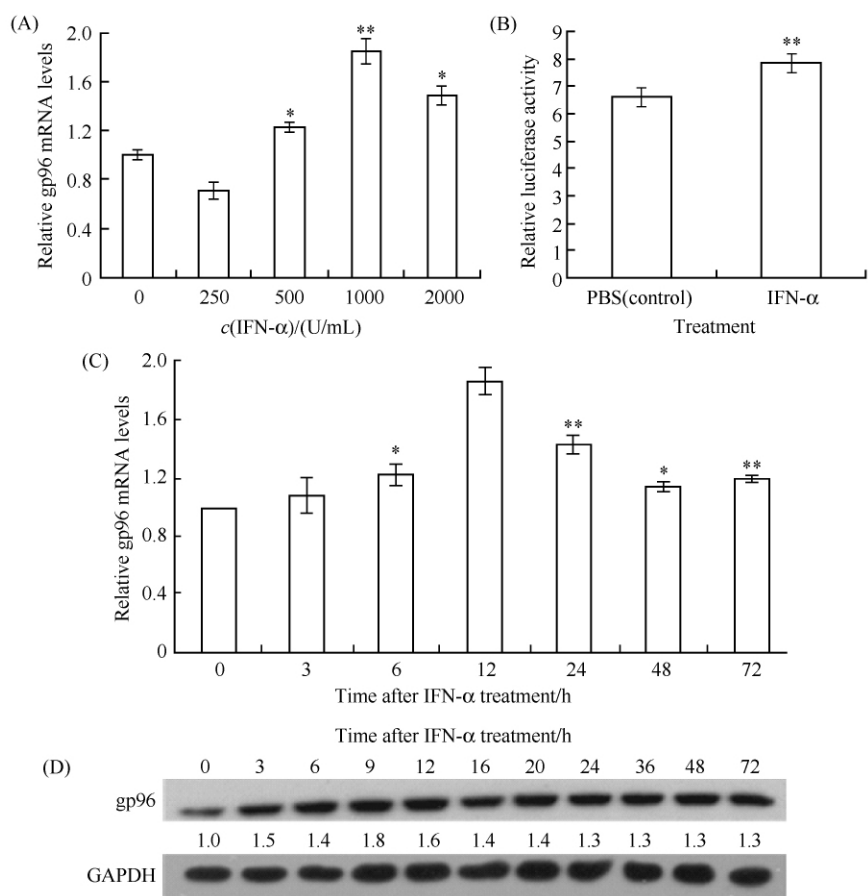


图 1. IFN-α 对 gp96 转录和表达的影响

Figure 1. The effect of IFN-α on transcription and expression of gp96. A: Huh-7 cells were treated with indicated concentrations of IFN-α (0-2000 U/mL). Gp96 mRNA levels were determined by real-time PCR after 12 h of treatment. B: relative gp96 promoter activity in Huh-7 cells transfected with PGL3-Ehancer-TRA1/PRL-TK under 1000 U/mL IFN-α treatment for 24 h. C, D: Huh-7 cells were treated with IFN-α (1000 U/mL) for indicated times. Gp96 mRNA (C) and protein (D) levels were analysed by real-time PCR and immunoblotting at indicated time points, respectively. GAPDH was used as internal control. The results are presented as means ± SD from three independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01 compared to control. The experiments were performed twice, and similar results were obtained.

3 讨论

干扰素作为治疗 HBV 感染的一线药物其疗效差异很大但机制并不清楚,最近的研究表明在 HBV 转基因鼠中当病毒滴度高时 IFN-α/β 抑制病毒复制,而当病毒滴度低时反而促进病毒复制^[15],因此需要对影响干扰素的抗病毒因素进行深入研究。gp96 在慢性乙肝患者中高表达,并且从慢性乙肝到肝硬化再到肝癌的过程中随着疾病进展表达逐步增

加^[12],但是 gp96 发挥的生理作用如对病毒复制的影响并不清楚。本实验研究显示 IFN-α 能够在转录水平上调 gp96,并且促进 gp96 表达呈时间和剂量依赖性,部分解释了 IFN-α 在不同慢性乙肝患者中抗 HBV 能力的巨大差异。本研究发现 IFN-α 在转录水平上调 gp96,这与文献报道一致^[10],在 gp96 启动子区发现有干扰素及其下游调控元件作用位点^[16]。鉴于其重要性,IFN-α 上调 gp96 的具体途径我们实验室正在研究。

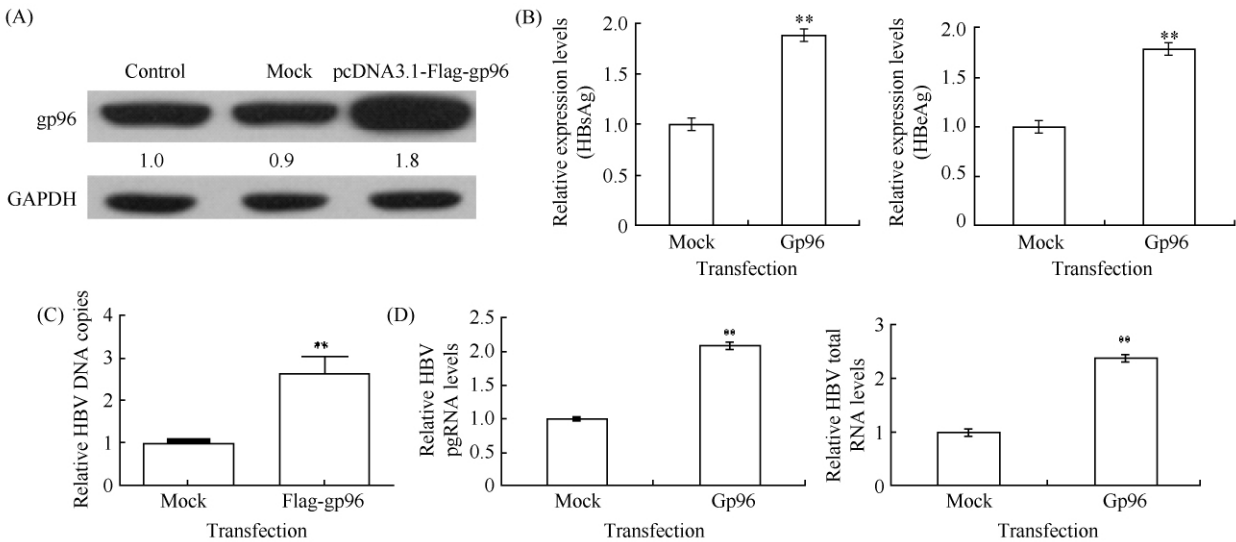


图 2. 过表达 gp96 增强 HBV 的复制

Figure 2. Over-expression of gp96 by transfection enhances HBV replication. 293T cells were co-transfected with the gp96 expression vector pcDNA3.1-Flag-96 or the empty vector pcDNA3.1 (mock) and HBV expression vector pHBV1.3. The cells were harvested 48 h after transfection. A: western blotting was performed to detect gp96 protein levels. GAPDH was used as internal control. B: the titers of HBsAg and HBeAg in culture medium were measured by ELISA. C: the HBV DNA levels in the supernatant were determined by RT-PCR. D: the HBV pgRNA and total RNA levels in transfected cells were determined by RT-PCR. Data are presented as means \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to mock.

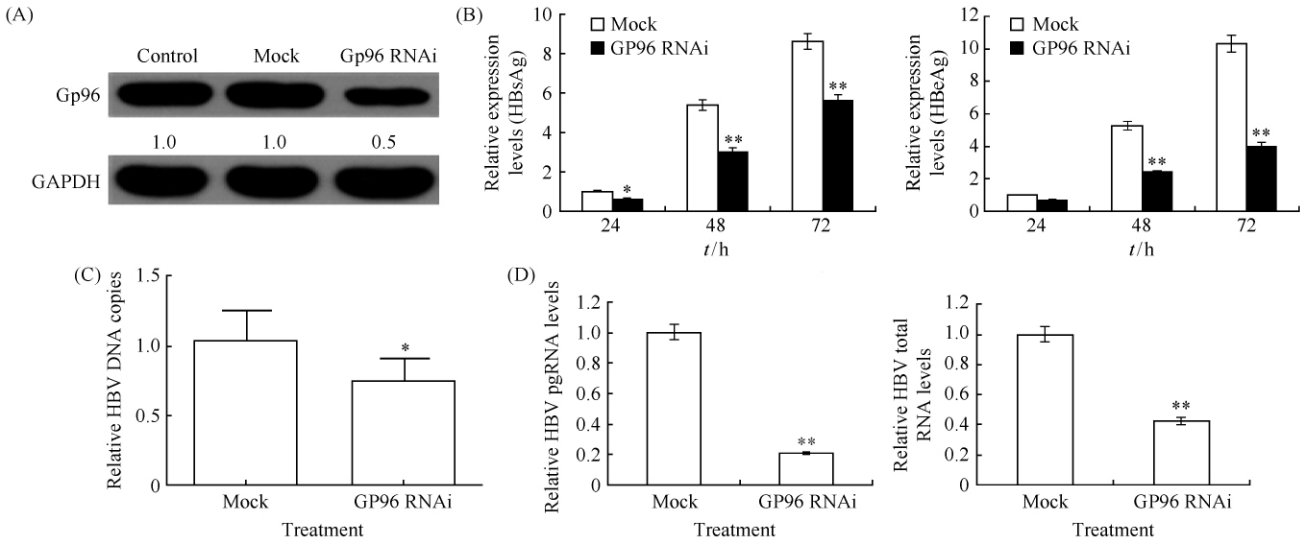


图 3. 通过 siRNA 下调 gp96 抑制 HBV 复制

Figure 3. gp96 knockdown by siRNA suppresses HBV replication. Huh-7 cells were co-transfected with 50 nmol/L gp96-targeting siRNA or scrambled siRNA as a mock. Cells were harvested at 72 h post-transfection. A: gp96 protein levels were determined by immunoblotting. GAPDH was used as internal control. B: the HBsAg and HBeAg levels in the supernatant were detected by ELISA at 24, 48, 72 h after treatment with gp96 siRNA in pHBV1.3 transfected cells. C: the HBV DNA copies were analyzed by real-time PCR 48 h after transfection. D: the HBV pgRNA and total RNA levels were analyzed by real-time PCR 48 h after transfection. Data are shown as means \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to mock.

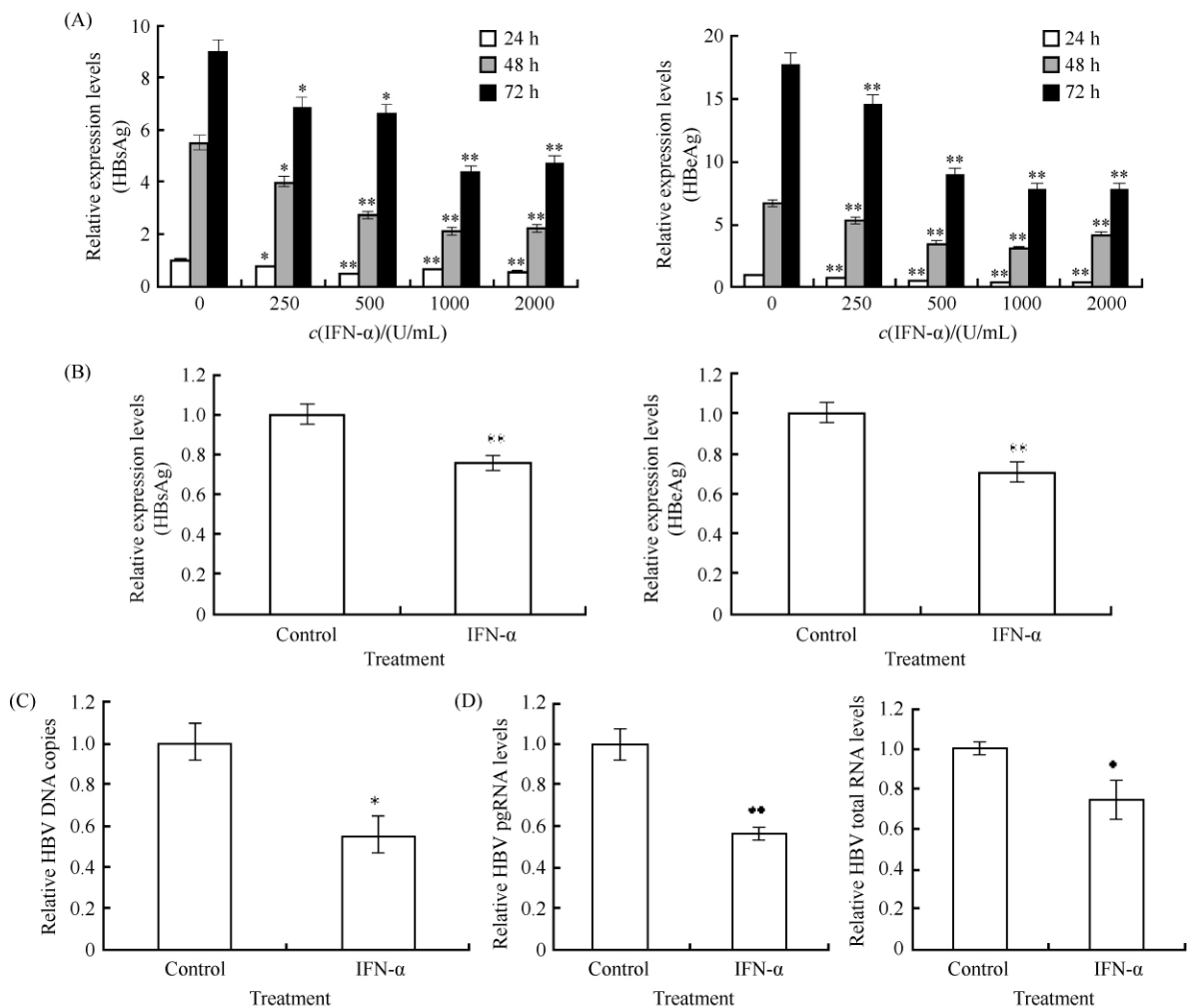


图 4. IFN-α 抑制 HBV 的复制

Figure 4. IFN-α suppresses HBV replication. A: Huh-7 cells transfected with pHBV1.3 were treated with IFN-α at indicated concentrations. The secreted HBsAg/HBeAg levels in the medium were measured by ELISA 24, 48, 72 h after treatment. B: 293T cells transfected with pHBV1.3 were treated with 1000 U/mL IFN-α or PBS as control. The levels of HBsAg/HBeAg in the supernatant were measured by ELISA 48 h after treatment. C, D: the HBV DNA copies in the supernatant (C) and pgRNA and total RNA levels in pHBV1.3-transfected Huh-7 cells (D) were determined by real-time PCR 48 h after treatment with 1000 U/mL IFN-α or PBS as control. Data are presented as means ± SD from three independent experiments. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 compared to control.

我们发现 gp96 可以促进 HBV 复制。有文献显示 HBV 病毒大表面蛋白可以通过激活 gp96 启动子间接激活 HBV S 区启动子^[17],而 gp96 可能参与调控 HBV 聚合酶的稳定性^[18]。关于 gp96 调节 HBV 复制的机制值得进一步研究。

通过 Jak/STAT 和 NF-κB 通路上调干扰素活化基因 (ISGs) 的表达是干扰素抑制 HBV 的主要途径之一^[4,19],多种 ISGs 参与抑制病毒复制,与这些研

究结果不同,本研究显示受干扰素上调的 gp96 促进病毒复制,说明干扰素调节 HBV 复制的双向性和复杂性,这也就部分解释了干扰素治疗慢性乙肝感染效果差异大的原因。本研究提示 gp96 高表达可能导致慢性乙肝患者对干扰素治疗不敏感,gp96 的表达水平可能作为预测 IFN-α 抗病毒疗效的一个重要生物学标志。

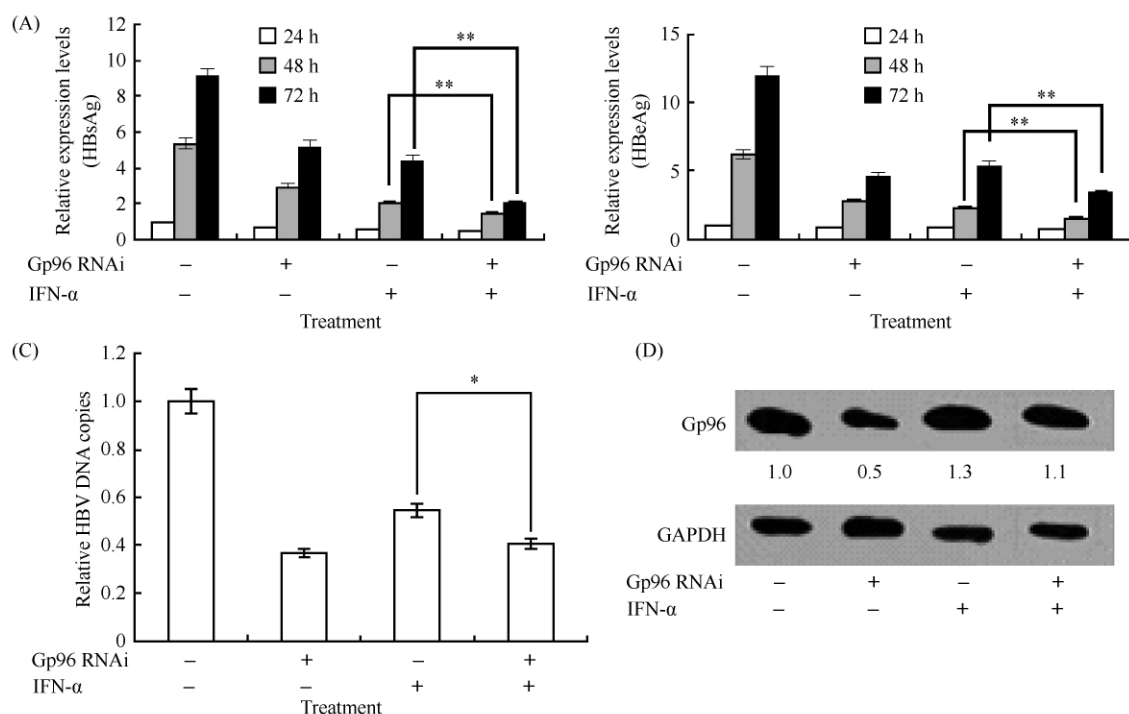


图 5. 下调 gp96 增强了 IFN- α 在 Huh-7 细胞中抗 HBV 的活性

Figure 5. Inhibition of IFN- α -induced gp96 upregulation increased the anti-HBV activity of IFN- α . Huh-7 cells were co-transfected with synthesized gp96-targeting siRNA or scrambled siRNA as a mock together with pHBV1.3, and then treated with 1000 U/mL IFN- α . A: The secretion of HBsAg/HBeAg in the supernatant was analysed by ELISA at 24, 48, 72 h after treatment of gp96 siRNA and IFN- α . B: HBV DNA copies were measured by real-time PCR 48 h after treatment with IFN- α . C: Gp96 protein levels were analysed by Western blotting at 48 h after treatment with gp96 siRNA and IFN- α . Data are presented as means \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to mock.

参考文献

- [1] Verma R, Khanna P, Prinja S, Rajput M, Chawla S, Bairwa M. Hepatitis B Vaccine in national immunization schedule: a preventive step in India. *Human Vaccines*, 2011, 7(12): 1387-1388.
- [2] Cooksley WG. Do we need to determine viral genotype in treating chronic hepatitis B? *Journal of Viral Hepatitis*, 2010, 17(9): 601-610.
- [3] Xu C, Guo H, Pan XB, Mao R, Yu W, Xu X, Wei L, Chang J, Block TM, Guo JT. Interferons accelerate decay of replication-competent nucleocapsids of hepatitis B virus. *Journal of Virology*, 2010, 84(18): 9332-9340.
- [4] Hao JL, Jin WS, Li XH, Wang SF, Zhang XJ, Fan HX, Li CF, Chen LZ, Gao B, Liu GZ, Meng SD. IFN- α -induced miR-122 inhibition negatively affects the anti-HBV efficiency of IFN- α . *Journal of Virology*, 2012, 87(1): 137-47.
- [5] Perrillo R. Benefits and risks of interferon therapy for hepatitis B. *Hepatology*, 2009, 49: S103-111.
- [6] Zhu YL, Qin B, Xiao CY, Lu X, Chen LM. Cell-type specific interferon stimulated gene staining in liver underlies response to interferon therapy in chronic HBV infected patients. *Digestive Diseases Sciences*, 2012, 57: 2355-2361.
- [7] Wu S, Hong F, Gewirth D, Guo BC, Liu B, Li ZH. The molecular chaperone gp96/GRP94 interacts with Toll-like receptors and integrins via its C-terminal hydrophobic domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(9): 6735-6742.
- [8] Weekes MP, Antrobus R, Talbot S, Hör S, Simecek N, Smith DL, Bloor S, Randow F, Lehner PJ. Proteomic plasma membrane profiling reveals an essential role for gp96 in the cell surface expression of LDLR family members, including the LDL receptor and LRP6. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11: 1475-1484.
- [9] Zhao B, Wang YZ, Zhang Y, Li Y, Zhang XJ, Xu YX, Chen LZ, Li CF, Ju Y, Meng SD. TAT-mediated gp96 transduction to APCs enhances gp96-induced antiviral and antitumor T cell responses. *Vaccine*, 2013, 31: 545-552.
- [10] Xu Y, Wang S, Zhang X, Meng S. Immune activity of heat shock protein gp96 and its application in active

immunotherapy for tumor and infectious diseases. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28(3): 261-266. (in Chinese)

徐亚星,王赛锋,张小俊,孟颂东. 热激蛋白 gp96 免疫学功能及在主动免疫治疗肿瘤和传染病中的应用. *生物工程学报*, 2012, 28(3): 261-266.

- [11] Liu Z, Li XH, Qiu LP, Zhang XJ, Chen LZ, Cao S, Wang FS, Meng SD. Treg suppress CTL responses upon immunization with HSP gp96. *European Journal of Immunology*, 2009, 39: 3110-3120.
- [12] ZhuXD, Li CL, Lang ZW, Gao F, Tien P. Significant correlation between expression level of HSP gp96 and progression of hepatitis B virus induced diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 2004, 10(8): 1141-1145.
- [13] Tang H, McLachlan A. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(4): 1841-1846.
- [14] Zheng Y, Li J, Ou JH. Regulation of hepatitis B virus

core promoter by transcription factors HNF1 and HNF4 and the viral X protein. *Journal of Virology*, 2004, 78(13): 6908-6914.

- [15] Tian Y, Chen WL, Ou JH. 2011. Effects of interferon- α/β on HBV replication determined by viral load. *PLoS Pathogens*, 7(7): e1002159.
- [16] Chen YG, Ashok BT, Liu X, Garikapaty VPS, Mittelman A, TiwariRK. Induction of heat shock protein gp96 by immune cytokines. *Cell Stress Chaperones*, 2003, 8(3): 242-248.
- [17] Xu ZC, Jensen G, Yen TSB. Activation of Hepatitis B Virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*, 1997, 71(10): 7387-7392.
- [18] Kim SS, Shin HJ, Cho YH, Rho HM. Expression of stable hepatitis B viral polymerase associated with GRP94 in *E. coli*. *Archives of Virology*, 2000, 145: 1305-1320.
- [19] Sadler AJ, Williams BR. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8:559-568.

IFN- α -induced gp96 upregulation negatively affects the anti-HBV efficiency of IFN- α

Yanzhou Gao^{1,3}, Hongxia Fan^{1,3}, Lipeng Qiu^{2*}, Songdong Meng^{1*}

¹Chinese Academy of Sciences Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

²Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [**Objective**] To investigate the effect of the Interferon- α -induced gp96 upregulation on the anti-HBV efficiency of Interferon- α (IFN- α). [**Methods**] The effect of IFN- α on the transcription and expression of heat shock protein gp96 was determined by real-time PCR, luciferase reporter assay and Western blot. The effect of over-expression or knock-down of gp96 by transfection or RNA interference, and treatment with IFN- α on HBV expression and replication was examined by ELISA and RT-PCR. [**Results**] IFN- α treatment led to increased gp96 expression in a time- and dose-dependent manner. The overexpression of gp96 enhanced HBV expression and replication, whereas downregulation of gp96 resulted in decreased HBV replication. Finally, we verified that blocking IFN- α -induced upregulation of gp96 significantly enhanced IFN- α -mediated HBV inhibitory effects. [**Conclusion**] IFN- α -induced upregulation of gp96 may negatively affect the anti-HBV function of IFN- α . These data provide valuable insight for enhancing the antiviral efficacy of IFN- α by simultaneous inhibition of gp96.

Keywords: IFN- α , gp96, HBV, antiviral efficiency, viral replication

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Science and Technology Major Project (2013ZX10002001-003-003) and by the Shenzhen Science and Technology Innovation Commission Project (KQA201105260010A, CYC201012290024A)

* Corresponding author. Tel: +86-10-64807350; E-mail: mengsd@im.ac.cn

Received: 28 January 2013/Revised: 28 April 2013