

基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒核心蛋白反式调节基因 TAHCCP2 的调节基因

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京 100039
王建军, 男, 汉族, 1975-06 生, 吉林省通化市人, 1999 年毕业于第一军医大学, 现为军医进修学院 2001 级内科传染病学专业硕士研究生, 主要从事肝炎病毒蛋白的反式调节作用研究。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Screening and identification of the genes transactivated by human gene 2 transactivated by hepatitis C virus core protein using microarray assay

Jian-Jun Wang, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Dong Ji, Xiao-Yan Dang, Zhi-Qiang Xu, Chun-Hua Wang

Jian-Jun Wang, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Dong Ji, Xiao-Yan Dang, Zhi-Qiang Xu, Chun-Hua Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by Grants from National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To screen and identify the up- and down-regulated genes of TAHCCP2 in the hepatocyte, and to investigate its possible function of TAHCCP2 in vivo by cDNA microarray assay.

METHODS: Suppression subtractive hybridization (SSH) and bioinformatics techniques were used for screening and cloning of the target gene TAHCCP2 transactivated by HCV core protein. Total mRNA was isolated from HepG2 cells transfected pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, cDNA was prepared by reverse transcription. Microarray was conducted for screening of up-and down-regulated genes of both HepG2 cells.

RESULTS: The expressive vector of pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. After screening with DNA microarray, we found that 4 genes were down-regulated.

CONCLUSION: The obtained sequences may be target

genes transactivated by TAHCCP2, among which some genes coding proteins involve inoxidative stress, cell growth and energy metabolism. Advanced experiments need to be done to prove this finding.

Wang JJ, Liu Y, Cheng J, Yang Q, Ji D, Dang XY, Xu ZQ, Wang CH. Screening and identification of the genes transactivated by human gene 2 transactivated by hepatitis C virus core protein using microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(4):840-842

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片技术了解TAHCCP2在肝细胞中可能上调或下调的基因, 了解其可能的调节功能线索。

方法: 应用抑制性消减杂交(SSH)技术及生物信息学(bioinformatics)技术筛选并克隆HCV核心蛋白反式激活的新型靶基因TAHCCP2。以TAHCCP2表达质粒pcDNA3.1(-)-TAHCCP2转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA。应用基因表达谱芯片技术对差异表达mRNA进行检测和分析。

结果: TAHCCP2表达载体pcDNA3.1(-)-TAHCCP2经酶切鉴定和DNA测序鉴定正确。经基因表达谱芯片分析, 4种基因的表达水平下调。

结论: 筛选到的一些与体内氧化应激、细胞生长和能量代谢相关的基因, 推测了TAHCCP2可能存在的调控机制的线索, 尚需进一步的实验证明。

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒核心蛋白反式调节基因TAHCCP2的调节基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(4):840-842

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/840.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)基因组含有单一的开放读码框架, 编码3 010-3 033个氨基酸残基的多肽前体, 两侧是5' - 非翻译区及3' - 非翻译区。多肽前体至少被加工为十种结构蛋白和非结构蛋白, 其中核心区(1-573 nt)编码的21 kDa HCV核衣壳蛋白(191 aa)是一种多功能蛋白质, 在HCV致病过程中可能起着重要的作用^[1-5], 最近研究其与HCV感染后脂肪肝的形成也有一定关系^[6-9]。本室利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH), 对于表达HCV核心蛋白载体转染的HepG2细胞进行研究, 结合生物信息学技术

(bioinformatics)克隆了核心蛋白反式激活作用的新靶基因, 命名为 HCV 核心蛋白反式激活基因 2(TAHCCP2). 并应用基因表达谱芯片技术筛选与克隆 TAHCCP2 调节的基因, 推测其在体内可能存在功能的线索, 为研究 HCV 的致病机制及探索未知基因的功能提供了新的方向.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); FuGENE6 转染试剂(Roche), mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech, PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒购自 Clontech, High Pure PCR Product Purification 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, 丙型肝炎病毒核心蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-core 由本室构建. T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega). DNA 序列测定由上海申友公司完成.

1.2 方法

1.2.1 消减杂交文库的建立及克隆分析 分别将 pcDNA3.1(-)-core 及 pcDNA3.1(-)空载体转染 HepG2 细胞, 48 h 后提取 mRNA, 按 PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒扩增差异表达的 cDNA. 对于所获基因片段序列分析表明, 其中之一为新型基因片段, 与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源性, 利用表达序列标签(EST)序列的搜索和比对, 进行电子拼接, 根据基因起始密码子的 Kozak 规则和终止密码子下游保守的多聚腺苷酸信号序列, 确定新型基因序列. 从 HepG2 细胞提取总 RNA, 以逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术扩增获得该新基因的全长序列, 并测序证实, 命名为 HCV 核心蛋白反式激活基因 2(TAHCCP2), 在 GenBank 中注册, 注册号为 AY039043. TAHCCP2 基因的编码序列全长为 429 个核苷酸(nt), 编码产物由 142 个氨基酸残基(aa)组成.

1.2.2 真核表达载体及细胞转染 TAHCCP2 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 由本室构建. 用 FuGENE6 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.2.3 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析.

1.2.4 探针标记 参照 Schena et al 的方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5 μg), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5 μg). 乙醇沉淀后溶解在 20 μL 5 × SSC+0.2% SDS 杂交液中.

1.2.5 芯片制备 包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号

转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000 bp-3 000 bp. 靶基因以 0.5 μg/μL 溶解于 3 × SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min), 紫外线(UV)交联, 再分别用 0.2% SDS、水及 0.2% 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

1.2.6 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针在 95 °C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 °C 杂交 15-17 h. 依次以 2 × SSC+0.2% SDS、0.1% × SSC+0.2% SDS、0.1% × SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

1.2.7 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 的表达载体构建 TAHCCP2 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 经测序及酶切鉴定均正确.

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度 A260/A280>1.89, 热稳定实验 70 °C 保温 1 h 与 -20 °C 1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA. mRNA 主要集中于 0.9-4.0 kb 的连续条带.

2.3 TAHCCP2 基因下调基因 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下, 就判断为 TAHCCP2 的下调基因. 在本研究中发现有 4 种基因的表达水平下调(表 1), 未发现表达水平明显上调的基因.

表 1 TAHCCP2 基因下调基因类型

| 编号 | Cy5/Cy3 比值 | 基因名称 |
|----|------------|--------------------|
| 1 | 0.096 | 谷胱甘肽过氧化物酶 2 (GPX2) |
| 2 | 0.337 | 烯醇化酶 3 (ENO3) |
| 3 | 0.467 | HGF 激活因子(HGFAC) |
| 4 | 0.467 | 人类假想蛋白 |

3 讨论

HCV 核心蛋白是一种多功能蛋白质, 具有多种调控细胞、病毒基因表达、细胞生长以及免疫调节等功能. 核心蛋白对细胞信号转导途径, 尤其是核因子-κB (NF-κB)、激活因子 1(AP-1)和血浆反应因子(SRE)相关途径具有明显的增强作用; 在 HepG2 细胞中, 核心蛋白激活人类 c-myc 基因、劳氏肉瘤病毒长末端重复序列(RSV LTR)和 SV40 早期启动子^[10]; 核心蛋白还能抑制或增强 p53 基因启动子功能^[11-12], 这些证据表明核心蛋白具有

潜在的致癌作用. Aoki et al^[13]发现HCV核心蛋白通过和14-3-3蛋白相互作用表现出一种新型的Raf-1激酶激活蛋白特性,可能对肝细胞的生长起调节作用. HCV核心蛋白的反式激活功能在HCV致病中发挥重要的作用,研究其作用分子生物学机制有助于理解HCV感染的慢性化和致癌作用机制.

本室利用抑制性消杂交技术对于表达HCV核心蛋白载体转染的HepG2细胞进行研究,结合生物信息学技术克隆了HCV核心蛋白反式激活作用的新靶基因,命名为HCV核心蛋白反式激活基因2(TAHCCP2),并构建其真核表达载体TAHCCP2-3.1(-).应用基因表达谱芯片技术筛选与克隆TAHCCP2调节的基因,推测其在体内可能存在功能的线索.基因表达谱芯片技术可快速有效地检测到两组组织或细胞基因表达谱的差异.本实验我们用分子生物学技术构建了TAHCCP2的真核表达载体pcDNA3.1(-)-TAHCCP2,并用空载体作为阴性对照,利用脂质体转染HepG2细胞,之后从中提取总RNA,逆转录为cDNA,进行基因芯片技术分析.结果表明,4种基因的表达水平下调,无表达水平明显上调的基因.

在下调表达的基因中,谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)是参与体内氧化应激作用的重要的酶^[14-16].氧化应激可导致体内活性氧簇(ROS)和ROS清除分子数量的失衡.这一过程中,GPX1可以减少细胞内大部分的ROS,起到重要作用.GPX1的过表达可以延迟细胞生长,保护他们不受GSH和过氧化氢毒性作用的损害^[17].肝细胞生长因子激活剂(HGF-A)是一种常见的激活HGF的丝氨酸蛋白酶,可以使非活性状态的单链的肝细胞生长因子(HGF)转化为有活性的二聚体结构.HGF是一种多功能的多肽,参与肿瘤的生长,组织发生和损伤的修复.他的作用依赖与被HGFA激活和结合到特异的HGF受体(c-Met)上^[18].研究发现HGF对于肝损伤后的修复、毛发生长、上皮细胞的分裂和抗凋亡因子的产生也有重要意义^[19-22].烯醇化酶是参与体内糖酵解途径的酶类,其表达水平的降低可能会影响体内的能量代谢.

通过表达谱芯片技术对TAHCCP2的调节基因的分析,我们发现他所下调的3种基因涉及体内氧化应激、细胞生长和能量代谢,主要起到负性调节的作用.作为体内正常存在的基因,在HCV核心蛋白存在时表达增加,负性调节上述基因,可能与HCV感染后的发病机制有一定的关系.关于其在体内与各种活性因子的具体调节机制,仍需进一步实验来验证.

4 参考文献

- 1 成军.慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究.世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 2 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 3 李克,王琳,成军,陆荫英,洪源,刘妍,张玲霞.丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白.世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 4 成军,李克,陆荫英,董菁,李莉,王琳,钟彦伟.丙型肝炎病毒调节

- 5 基因区结合蛋白的研究进展.世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 6 李克,王琳,成军,张玲霞,段惠娟,陆荫英,杨继珍,刘妍,洪源,夏小兵,王刚,董菁,李莉,钟彦伟,陈菊梅.酵母双杂交技术筛选克隆HCV核心蛋白结合蛋白基因1.世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 7 王琳,李克,成军,陆荫英,张健,洪源,刘妍,王刚,钟彦伟,段惠娟,芮莉莉.丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白A1结合的研究.世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 8 成军,任进余,李莉,陆志檬,李克,洪源,陆荫英,王刚,刘妍,张玲霞,陈菊梅.丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变.世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 9 王琳,李克,成军,陆荫英,张健.丙型肝炎病毒蛋白与脂蛋白之间的相互作用.世界华人消化杂志 2002;10:1030-1032
- 10 Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses:C-virus core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 11 Chang J, Yang SH, Cho YG, Hwang SB, Hahn YS, Sung YC. Hepatitis C virus core from different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol* 1998;72:3060-3065
- 12 Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997;272:10983-10986
- 13 Lu W, Lo SY, Chen M, Wu K, Fung YK, Ou JH. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1999;264:134-141
- 14 Aoki H, Hayashi J, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1. *J Virol* 2000;74:1736-1741
- 15 De Haan JB, Crack PJ, Flentjar N, Iannello RC, Hertzog PJ, Kola I. An imbalance in antioxidant defense affects cellular function:the pathophysiological consequences of a reduction in antioxidant defense in the glutathione peroxidase-1 (Gpx1) knockout mouse. *Redox Rep* 2003;8:69-79
- 16 Buerkert E, Arnold C, Hammarberg T, Radmark O, Steinhilber D, Werz O. The C2-like {beta}-barrel domain mediates the Ca²⁺-dependent resistance of 5-lipoxygenase activity against inhibition by glutathione peroxidase-1. *J Biol Chem* 2003;8:69-79
- 17 Hassan AM. Glutathione peroxidase activity in blood cells from aspirin-induced asthma patients. *Ann Clin Biochem* 2003;40:369-373
- 18 Faucher K, Rabinovitch-Chable H, Barriere G, Cook-Moreau J, Rigaud M. Overexpression of cytosolic glutathione peroxidase (GPX1) delays endothelial cell growth and increases resistance to toxic challenges. *Biochimie* 2003;85:611-617
- 19 Nagashima M, Hasegawa J, Kato K, Yamazaki J, Nishigai K, Ishiwata T, Asano G, Yoshino S. Hepatocyte growth factor (HGF), HGF activator, and c-Met in synovial tissues in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol* 2001;28:1772-1778
- 20 Kaibori M, Inoue T, Oda M, Naka D, Kawaguchi T, Kitamura N, Miyazawa K, Kwon AH, Kamiyama Y, Okumura T. Exogenously administered HGF activator augments liver regeneration through the production of biologically active HGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:475-481
- 21 Yamazaki M, Tsuboi R, Lee YR, Ishidoh K, Mitsui S, Ogawa H. Hair cycle-dependent expression of hepatocyte growth factor (HGF) activator, other proteinases, and proteinase inhibitors correlates with the expression of HGF in rat hair follicles. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1999;4:312-325
- 22 Ohshima M, Sakai A, Sawamoto Y, Seki K, Ito K, Otsuka K. Hepatocyte growth factor (HGF) system in gingiva: HGF activator expression by gingival epithelial cells. *J Oral Sci* 2002;44:129-134
- 23 Somerset DA, Strain AJ, Afford S, Whittle MJ, Kilby MD. Hepatocyte growth factor activator (HGF-A) and its zymogen in human placenta. *Placenta* 2000;21:615-620