

· 药物研究 ·

重组 β-干扰素上调 HepG2 细胞表达基因 抑制性消减杂交技术筛选*

钟彦伟^{1,2}, 成军³, 曲建慧², 张黎颖³, 郭江³, 李晓东²

(1. 解放军军医进修学院, 北京 100853; 2. 解放军第 302 医院传染病研究所病毒性肝炎研究室, 北京 100039; 3. 北京地坛医院传染病研究所, 100011)

[摘要] 目的 利用抑制性消减杂交技术筛选重组 β-干扰素 (IFN-β) 上调 HepG₂ 细胞表达基因。方法 以重组 IFN-β 2 000 U · mL⁻¹ 刺激对数生长期 HepG2 细胞, 设经 0.9% 氯化钠注射液作用的 HepG2 细胞为阴性对照组; 制备 HepG2 细胞裂解液, 从中提取 mRNA 并逆转录合成 cDNA, 经 *Rsa* I 酶切后, 将实验组 cDNA 分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与阴性对照组 cDNA 进行两次消减杂交和两次抑制性聚合酶链反应 (PCR), 将产物与 T/A 载体连接, 构建 cDNA 消减文库, 并转染大肠埃希菌进行基因文库扩增, 随机挑选克隆 PCR 后进行测序及同源性分析。结果 成功构建了重组 IFN-β 作用 HepG₂ 后差异表达的 cDNA 消减文库。扩增后得到 50 个 200 ~ 1 000 bp 插入片段的克隆, 随机挑选其中 31 个插入片段测序, 通过生物信息学分析获得其全长基因序列, 共获得 20 种编码基因, 其中 1 种为未知功能的新基因。结论 通过该方法可筛选得到 IFN-β 作用于 HepG₂ 细胞后上调表达的部分基因, 包括与细胞生长调节、物质代谢和细胞凋亡密切相关的一些蛋白编码基因。

[关键词] 重组 β-干扰素; 抑制性消减杂交; 反式调节

[中图分类号] R979.5; R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2006)02-0096-03

Screening and Cloning of the Target Genes Transactivated by Recombinant β-interferon Protein using Suppression Subtractive Hybridization Technique

ZHONG Yan-wei^{1,2}, CHENG Jun³, QU Jian-hui², ZHANG Li-ying³, GUO Jiang³, LI Xiao-dong² (1. *Military Postgraduate Medical College of PLA, Beijing 100853, China*; 2. *Viral Hepatitis Research Center, Institute of Infectious Diseases, PLA 302 Hospital, Beijing 100039, China*; 3. *Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China*)

ABSTRACT Objective To clone and identify human genes transactivated by recombinant β-interferon protein.

Methods Suppression subtractive hybridization (SSH) and bioinformatics techniques were used for screening and cloning of the target genes transactivated by recombinant β-interferon protein. The mRNA was isolated from HepG2 cells induced by recombination β-interferon and 0.9 percent sodium chloride, respectively, and the SSH method was employed to analyze the differentially expressed DNA sequences between the two groups. After the restriction enzyme *Rsa* I digestion, small size cDNAs were obtained. Tester cDNA was then divided into two groups and linked up to the specific adaptor 1 and adaptor 2, respectively. After the tester cDNA had been hybridized twice with the driver cDNA and had undergone two times of nested PCR, the products were subcloned into T/A plasmid vectors to set up the subtractive library. Amplification of the library was carried out with transfection of *E. coli* strain DH5α. The cDNA was sequenced and analyzed in Genbank with Blast search after PCR. **Results**

The cDNAs differentially expressed by genes transactivated by recombinant β-interferon protein were successfully constructed. The amplified library contained 50 positive clones. Colony PCR showed that 31 clones contained 200-1 000 bp inserts. Sequence analysis was performed in 31 clones randomly, and the full-length sequences were obtained with the bioinformatics method. Altogether 20 coding sequences were obtained, including a new gene with unknown function. **Conclusion** The sequences obtained may be target genes transactivated by recombinant β-interferon protein, and some of these genes coding proteins may be involved in cell cycle regulation, metabolism, and apoptosis.

KEY WORDS Recombinant β-interferon; Suppression subtractive hybridization technique; Transactivation

慢性乙型病毒性肝炎 (乙肝) 严重危害我国人民健康, 到目前为止还没有有效而可靠的治疗方法。虽然 α-干扰素 (IFN-α) 有一定的抗病毒作用, 但研究表明, 该药仅对 30% ~ 40% 的病毒性肝炎患者有效。拉

米夫定虽然有一定的治疗效果, 但病毒的高抵抗率限制了其治疗作用。因此, 对 IFN-α 治疗无效的患者仍需探索新的治疗途径。近年来有研究证明, β-干扰素 (IFN-β) 可有效治疗 IFN-α 治疗无效的慢性乙肝患

者^[1,2]。也有研究者推荐对乙肝 e 抗原(HBeAg)阴性/乙肝病毒(HBV)DNA 阳性的慢性乙肝患者用 IFN- β 治疗^[3,4]。为探索 IFN- β 与肝细胞蛋白相互作用的分子生物学机制,笔者在本实验中采用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)将重组 IFN- β 作用于肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞,筛选差异表达的基因片段,并应用生物信息学进行分析,以期为加深了解 IFN- β 的功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 HepG2 细胞及感受态大肠埃希菌 DH5 α 为解放军第 302 医院传染病研究所病毒性肝炎研究室保存,mRNA 纯化试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司,PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒、50 \times PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒购自 Clontech 公司,高纯度 PCR 纯化试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司,T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的培养与刺激 重组 IFN- β 2 000 U \cdot mL⁻¹ 刺激生长于直径为 35 mm 的平皿的对数期 HepG2 细胞,16 h 后收获细胞。使用 mRNA 纯化试剂盒,直接提取重组 IFN- β 刺激后收获的 HepG2 细胞 mRNA,琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析。

1.2.2 消减杂交基因文库的建立 采用 PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒,常规 SSH 方法按说明书进行。以重组 IFN- β 刺激 16 h 后的 HepG2 细胞 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA(dscDNA),并分别标记为 Tester 和 Driver,dscDNA 经 *Rsa* I (一种识别 4 碱基序列的内切酶)消化,产生相对较短的平端片段,纯化酶切产物。将 Tester 的 dscDNA 分为两份,分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 adapter 1 和 adapter 2,然后与过量的 Driver dscDNA 进行杂交;合并两种杂交产物后再与 Driver dscDNA 作第 2 次杂交;

然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增,使 Tester dscDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接,转化 DH5 α 感受态细菌,在含氨苄西林的 LB/X-gal/IPTG 培养板上 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h。

1.3 基因序列的测定与分析 阳性菌落以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增,证明含有插入片段后(200 ~ 1 000 bp),随机挑选其中 31 个克隆增菌,测序(仪器由上海申友公司提供),并且应用生物信息学对测得的序列采用 GenBank 数据库进行同源性分析。

2 结果

2.1 mRNA 定性定量分析结果 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提。紫外分光检测显示,转染了真核表达质粒及空载体的 HepG2 细胞提取 mRNA 分别为 4.10 和 4.20 μ g, $A_{260}/A_{280} = 2.16$ 。20 g \cdot L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳可见 mRNA 为 >500 bp 清晰慧尾片状条带,证实 mRNA 质量完全满足进行消减杂交的要求。

2.2 dscDNA 两端连接效率的检测 dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤。将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 引物)进行 28 个循环扩增,产物用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度相当,说明 dscDNA 已经与接头发生高效率连接。

2.3 cDNA 消减文库消减效率的鉴定 以 1 μ L 消减及未消减 PCR 产物为模板,用 G3PDH 引物进行 PCR 扩增,分别在 18,23,28,33 次循环结束时从反应体系中吸取 5 μ L 进行电泳鉴定。结果显示,与未消减组 PCR 产物相比,消减组 PCR 产物中 G3PDH 基因产物大大减少,说明所构建的消减文库具有很高的消减效率。

2.4 差异表达 cDNA 片段的扩增与克隆 杂交产物经两轮 PCR 扩增后,菌落 PCR 扩增结果显示为 200 ~ 1 000 bp 大小不等的插入片段,从所获得的 50 个克隆中随机挑选 31 个克隆均含有插入片段,这些条带可能代表差异表达的基因片段。

2.5 cDNA 测序与同源性分析结果 随机挑选 31 个克隆测序,与 GenBank 数据库进行初步比较。其中 19 个克隆均与已知基因的部分序列高度同源(99% ~ 100%),1 个克隆基因片段未检索到任何相应的相似序列,可能代表了新的未知功能基因。结果见表 1。

[收稿日期] 2005-06-09 [修回日期] 2005-07-19

[基金项目] * 国家自然科学基金资助项目(基金编号:30371288)、军队“十五”科技攻关项目(基金编号:01MB135)、北京市自然科学基金资助项目(基金编号:5042024)、北京市第 35 批博士后科学基金资助项目(基金编号:2004035045)

[作者简介] 钟彦伟(1965-),女,吉林人,副研究员,在读博士,主要从事肝脏疾病治疗及发病机制的研究。电话:010-66933391,E-mail:zhongyanwei@126.com。

[通讯作者] 成军(1963-),北京人,教授,博士生导师,主要从事传染病研究。电话:010-64481639,E-mail:cj@genetherapy.com.cn。

表1 重组 IFN-β 刺激上调基因序列比较结果

同源蛋白名称	同源克隆数	同源性/%
干扰素介导的含有三十四肽重复单位的蛋白	1	100
琥珀酸脱氢酶复合物 B 亚基	1	100
核糖体蛋白	3	99 ~ 100
F1Fo-ATP 合酶复合体	2	100
ATP 合酶 H ⁺ 转运体线粒体 F0 复合体	2	100
慢性进行性外眼肌麻痹 (CPEO) 线粒体	1	100
孤立 TUVLI 线粒体	1	99
瘢痕蛋白	1	100
异种核糖体蛋白	2	100
CarG 结合因子	1	100
甘氨酸裂解系统蛋白 H (氨基载体)	1	99
骨形成素蛋白诱导激酶 (BMP2K)	2	93 ~ 99
合成构建神样蛋白	1	100
未知功能蛋白 HSPC268	1	100
克隆总计	20	

3 讨论

笔者在本实验中利用 SSH 筛选重组 IFN-β 作用 HepG₂ 细胞上调表达基因, 推测其在体内可能存在功能的线索。SSH 方法是近年发展起来的一项新的基因克隆技术, 与传统的方法比较, 具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点^[5~8], 能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因, 可以在较短的时间内获得较理想的实验结果^[9~12]。笔者以重组 IFN-β 刺激肝母细胞瘤细胞系 HepG₂, 并以 0.9% 氯化钠注射液作用的相同细胞系作为对照, 以两种作用的细胞系中提取的 mRNA 为起始材料, 应用 SSH 方法成功地构建了 IFN-β 刺激 HepG₂ 后上调表达的 cDNA 消减文库, 挑选 31 个克隆测序分析, 发现上调表达的有已知功能的基因序列和未知功能的基因序列。在本实验中获得 1 种未知功能蛋白, 如 HSPC268, 对其基因结构和功能正在研究之中。在已知功能的基因序列中, 主要包括: ① 细胞内结构与细胞生长相关蛋白, 如核糖体蛋白、IFN 介导的含有三十四肽重复单位的蛋白; ② 参与细胞内代谢的蛋白基因, 如琥珀酸脱氢酶复合物 B 亚基、ATP 合酶 H⁺ 转运体线粒体 F0 复合体、甘氨酸裂解系统蛋白 H (氨基载体); ③ 在胚胎形成发育中起重要作用的基因, 如骨形成素蛋白诱导激酶 (BMP2K)^[13]。这些基因的表达上调可能与 IFN-β 的作用有密切关系。未知功能蛋白, 如 HSPC268, 功能有待进一步研究。通过对重组 IFN-β 蛋白的上述反式

激活基因的分析, 笔者发现它与体内物质代谢、细胞生长关系密切。关于 IFN-β 蛋白在体内与各种活性因子的具体调节机制, 仍需进行更加深入的研究。

[参考文献]

[1] Raquel M, Gregorio C, Inmaculada F, et al. A pilot study of β-interferon for treatment of patients with chronic hepatitis B who failed to respond to α-interferon [J]. *J Hepatol*, 2002, 37(5): 655 - 659.

[2] Cooksley W G. Treatment with interferons (including pegylated interferons) in patients with hepatitis B [J]. *Semin Liver Dis*, 2004, 24 (Suppl 1): 45 - 53.

[3] Yasuji A, Kazuaki C, Akihito T, et al. A randomized, double-blind, controlled trial of natural interferon-β therapy for e-antigen-negative chronic hepatitis B patients with abnormal transaminase levels [J]. *J Gastroenterol*, 1996, 31: 559 - 564.

[4] Goodbourn S, Didcock L, Randall R E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures [J]. *J Gen virol*, 2000, 81 (10): 2341 - 2364.

[5] 成 军. 肝炎病毒蛋白反式激活作用的研究策略 [J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(5): 373 - 376.

[6] Galbraith E A, Antonopoulos D A, White B A. Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model [J]. *Environ Microbiol*, 2004, 6(9): 928 - 937.

[7] Hou L, Tang J W, Cui X N, et al. Construction and selection of subtracted cDNA library of mouse hepatocarcinoma cell lines with different lymphatic metastasis potential [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(16): 2318 - 2322.

[8] 郭 江, 成 军, 纪 冬, 等. 应用抑制性消减杂交技术克隆和筛选 HCVp7 蛋白的反式调节基因 [J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(11): 2990 - 2993.

[9] Sun W, Zhang K, Zhang X, et al. Identification of differentially expressed genes in human lung squamous cell carcinoma using suppression subtractive hybridization [J]. *Cancer Lett*, 2004, 212: 83 - 93.

[10] 杨 倩, 成 军, 刘 妍, 等. 抑制性消减杂交技术原理及应用 [J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(4): 456 - 458.

[11] Ji W, Wright M B, Cai L, et al. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes [J]. *BMC Genomics*, 2002, 3(1): 12 - 15.

[12] 王 方, 王宇明. 抑制性消减杂交技术及其在感染病学中的应用 [J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(4): 972 - 975.

[13] Ma L, Martin J F. Generation of a Bmp 2 conditional null allele [J]. *Genesis*, 2005, 42(3): 203 - 206.