

# 丙型肝炎病毒 NS4B 对肝细胞 c-myc 和 ras 蛋白表达的影响

陈霞<sup>1</sup>, 李昌平<sup>1</sup>, 徐建玉<sup>2</sup>, 陈枫<sup>3</sup>

The Effect of HCV NS4B on Expressions of c-myc Protein and ras Protein in Hepatic Cells

CHEN Xia<sup>1</sup>, LI Chang-ping<sup>1</sup>, XU Jian-yu<sup>2</sup>, CHEN Feng<sup>3</sup>

1. Department of Digestive disease, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 2. Department of Digestive Disease, The Suining People's Hospital; 3. Department of Infectious disease, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College

**Abstract :Objective** To investigate the effect of hepatitis C virus non-structural protein 4B (HCV NS4B) on c-myc and ras gene expressions in hepatic cells, and to study the possible role in the carcinogenesis of hepatoma. **Methods** The experiment was divided into negative control, empty vector PCXN2 and PCXN2-NS4B. The recombinant plasmid (PCXN2-NS4B) and the empty vector were transfected into Chang liver cells with liposome. Screening was performed with G418. HCV NS4B mRNA was detected by reverse-transcription PCR. The protein expressions of c-myc and ras were analyzed by immunohistochemistry. **Results** Stable expression of the recombinant plasmid was found in transfected Chang liver cells. No expression of c-myc gene was found in control group and group PCXN2. The expression of c-myc gene in group PCXN2-NS4B was 21.3% ± 1.2%. The expressions of ras gene in control group and group PCXN2 were lower than that in PCXN2-NS4B. **Conclusion** HCV NS4B promote the expression of c-myc and ras gene, suggesting that HCV NS4B may contribute to the viral carcinogenesis.

**Key words:** Hepatitis C virus; Non-structural protein 4B; c-myc; ras; G418

**摘要:**目的 研究丙型肝炎病毒非结构蛋白 4B(NS 4B)对肝细胞内癌基因 c-myc 和 ras 蛋白表达的影响,从而探讨其在肝癌发生机制中的可能作用。方法 通过脂质体介导法,将空白载体 PCXN2 及丙型肝炎病毒 NS4B 重组质粒 PCXN2-NS4B 引入 Chang 肝细胞内,并 G418 筛选作稳定传代,RT-PCR 法鉴定质粒成功转入肝细胞内,免疫细胞化学方法观察细胞内 c-myc 和 ras 表达情况。结果 获得具有 G418 抗性的 Chang 肝细胞;空白对照组及空白载体组无 c-myc 表达,转染 NS4B 组 c-myc 表达率为 (21.3 ± 1.2)%,与空白对照组及空白载体组比较差异有显著性;空白对照组及空白载体组 ras 弱阳性表达,转染 NS4B 组 ras 呈阳性表达,与空白对照组及空白载体组比较差异有显著性。结论 丙型肝炎病毒 NS4B 可促进癌基因 c-myc 和 ras 表达,并可能在丙型肝炎病毒的致癌机制中起重要作用。

**关键词:**丙型肝炎病毒;非结构蛋白 4B;c-myc;ras;G418

中图分类号:R735 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2006)10-0736-03

## 0 引言

丙型肝炎为全球流行性传染性疾病,据估计全球丙型肝炎病毒(HCV)感染者超过 1 亿人。原发性肝癌(HCC)是一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤,且发病率呈逐年上升趋势,HCV 与 HCC 关系密切,但 HCV 致肝癌的机制至今仍未明了,HCV 是一种 RNA 病毒,无逆转录酶活性,也不与宿主基因整合,并且其本身没有一个可知的癌基因。其致

癌作用可能与细胞凋亡受抑,癌基因及抑癌基因的突变及表达量的异常,细胞信号传导异常等有关。c-myc 和 ras 为重要的原癌基因,大量的研究发现,c-myc 和 ras 在 HCV 相关肝癌中起重要作用。迄今为止,HCV NS4B 的功能尚不明确,HCV NS4B 是否可影响相关癌基因与抑癌基因的表达,国内外未有相关文献报道。本研究利用脂质体介导技术将外源性基因 NS4B 导入正常肝细胞内,并 G418 筛选稳定传代,将 c-myc 和 ras 作为检测指标,探讨 HCV NS4B 可能的致癌作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞与质粒

收稿日期:2005-10-19;修回日期:2005-11-23

基金项目:四川省教育厅资助项目(20003531)

作者单位:1. 646000 四川泸州医学院附属医院消化内科;2. 遂宁市人民医院消化内科;3. 泸州医学院附属医院传染免疫实验室

作者简介:陈霞(1978-),女,硕士,医师,主要从事肝病研究

Chang 肝细胞株,由四川大学华西医学中心王修杰教授惠赠;空白载体 PCXN2 及 PCXN2-NS4B 质粒,李昌平教授构建并保存。

### 1.1.2 试剂

培养基 RPMI1640 (Gibco 公司),小牛血清(成都哈里生物公司), TritonX-100, G418 (上海 Sangon 公司),脂质体转染试剂 Dospers (德国 Roche 公司), Trizol RNA 提取试剂 (Gibco 美国), RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI), ras 多克隆抗体 (Neomarker 公司), c-myc 抗体 (Boster 公司), SP 超敏试剂盒 (福州迈新生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

用 RPMI1640 (含 10% 小牛血清) 将 Chang 肝细胞培养于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中,每 2~3d 换液一次。

#### 1.2.2 基因转染及筛选

取对数生长期细胞,转染前一天消化以  $3 \times 10^5$  / ml 接种于 6 孔板中,置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,待细胞生长达 70% 融合,将肝细胞分为 3 组,空白对照组(未转染的 Chang 肝细胞)、空白载体组(PCXN2 转染组), PCXN2-NS4B 转染组,每组设两个复孔,转染前以无血清培养基洗细胞 3 次,以 1.5 μg/6 μg 配制质粒/脂质体混合物,轻柔混合后室温下静置 15 min,将混合物逐滴加入相应各孔,空白对照组加入等体积无血清培养基,6h 后更换转染培养基,加入完全培养基继续培养,24h 后加入 G418 (1 000 mg/L) 筛选,待对照组细胞全部死亡后,G418 减量为 200 mg/L 维持筛选并传代培养。

#### 1.2.3 RT-PCR 转染细胞鉴定

细胞生长足量时,Trizol 试剂分别提取 PCXN2 组及 PCXN2-NS4B 组总 RNA,逆转录合成 cDNA,按试剂盒说明书建立反应体系,取 RT-PCR 产物 10 μl 行琼脂糖电泳(具体操作按说明书进行)。

#### 1.2.4 免疫细胞化学方法检测 c-myc 及 ras 蛋白的表达

将空白对照组、PCXN2 组及 PCXN2-NS4B 组细胞分别消化接种于经多聚赖氨酸处理的盖玻片上,置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 24h, PBS 洗细胞 3 次,10% 中性甲醛固定细胞 30min, 0.3% TritonX-100 通透细胞 30min,过氧化物酶阻断剂孵育 10min,非免疫性动物血清中孵育 10min,加一抗 4 °C 冰箱过夜后,生物素标记的二抗中孵育 10min,加 SP 复合物孵育 10min, DAB 显色,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,显微镜下观察,照相。以 PBS 代替一抗作阴性对照。每组

细胞各进行了 10 次独立性实验。

### 1.3 统计学处理

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  差异有显著性,利用 SPSS 10.0 软件进行统计分析。

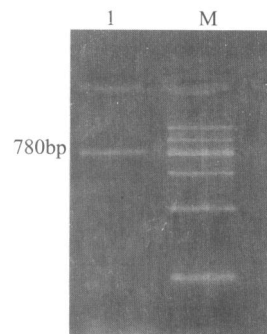
## 2 结果

### 2.1 细胞转染及筛选结果

用 G418 对各实验组的细胞进行筛选,结果显示:G418 1000 mg/L 筛选 48h 后,细胞开始脱壁漂浮,第 6d 转染组细胞出现新分裂增殖的细胞,第 10d 形成新生细胞克隆,呈集落状,第 15d 对照组细胞全部死亡,G418 减量为 200 mg/L 维持筛选,继续培养传代。

### 2.2 RT-PCR 抗性转染细胞的鉴定

提取细胞总 RNA,RT-PCR 扩增,可见 PCXN2 组及 PCXN2-NS4B 细胞有 mRNA 表达,表明外源基因导入 Chang 细胞后,有稳定表达,见图 1。



M:1200bp DNA Marker ;1: NS4B PCR product (780bp)

图 1 RT-PCR 产物琼脂糖电泳图谱

### 2.3 免疫细胞化学方法检测 c-myc 和 ras 蛋白水平的变化

以细胞质或核内棕黄色着色为阳性结果,不着色为阴性,细胞计数以低倍视野 100 个细胞,共 5 个视野的阳性细胞,取其均值为阳性细胞数作统计处理。c-myc 蛋白在胞浆和胞核均有表达。空白对照组及空白载体组无 c-myc 表达,转染 NS4B 组 c-myc 表达率为  $(21.3 \pm 1.2) \%$ ,  $P < 0.01$ ,与空白对照组及空白载体组比较差异有显著性;ras 蛋白主要在胞浆及核周表达。ras 空白对照组表达率为  $(1.2 \pm 0.5) \%$ ,空白载体组表达率为  $(1.3 \pm 0.2) \%$ ,转染 NS4B 组 ras 表达率为  $(52.6 \pm 2.4) \%$ ,与前两组比较差异均有显著性,  $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

丙型肝炎病毒 NS4B 是疏水的 27 KD 蛋白。目前相关研究认为 NS4B 是 HCV 复制复合体的一部

分,并且 NS4B 可能在 HCV 致病机制中发挥重要作用。NS4A/4B 的蛋白前体可显著影响宿主对 HCV 感染的免疫反应<sup>[1]</sup>。Kato 等<sup>[2]</sup>发现 NS4B 可激活 NF- $\kappa$ B 相关信号,而 NF- $\kappa$ B 可对抗 TNF- $\alpha$  诱导的细胞凋亡,提示 NS4B 可能可诱导细胞内的生存信号。Florese 等<sup>[3]</sup>报道了 NS4A 和 NS4B 在翻译水平至少可部分抑制细胞内蛋白合成如 RNase L、p53,其抑制宿主细胞翻译的机制可能有助于 HCV 在宿主细胞的生存与感染。本实验通过 G418 筛选,得到了 HCV NS4B 在正常肝细胞的稳定表达系统,观察了其细胞内蛋白 c-myc 和 ras 表达的影响。

c-myc 是 myc 癌基因家族中最重要的一员,编码一种细胞核内的 DNA 结合蛋白,myc 与不同因素,分别具有调节细胞增殖、分化及凋亡的不同效应。Ray 等<sup>[4]</sup>将编码 C 蛋白的 cDNA 与 c-myc 共转染猴 COS 细胞,发现 C 蛋白呈现剂量依赖性激活 c-myc 基因的启动子活性。也有其他一些研究发现 HCV 核心蛋白可诱导 c-myc 表达<sup>[4,5]</sup>。本实验发现在 HCV NS4B 转染的正常肝细胞中 c-myc 蛋白呈现高水平的表达,而空白对照组及空白载体组未检测到 c-myc 的表达,这提示 NS4B 可能诱导 c-myc 在蛋白水平的表达。myc 过度表达可改变细胞内周期调控,使细胞易于转变为恶性表型,与其他基因协同发挥作用可促使细胞的“永生化”,加速细胞增殖,引发肿瘤。

Park JS 等<sup>[6]</sup>报道协同表达 NS4B 和 H-ras 基因的 NIH3T3 细胞显示接触抑制的丧失、形态学上改变及锚着非依赖性生长,提示 HCV NS4B 和 H-ras 共同作用在 HCV 感染细胞的恶性转变中起重要作用。本实验同时观察了 HCV NS4B 对癌基因 ras 蛋白表达的影响。实验结果显示,转染了 NS4B 的肝细胞组 ras 蛋白表达率明显高于对照组,显示 NS4B 可促进 ras 蛋白的表达。ras 癌基因家族的蛋白产物能通过和 GTP 或 GDP 的结合来调节细胞的

生长和分化,其表达异常与肝癌细胞的增殖有关。

在实验性肝癌模型中,发现肝变异细胞、增生性病变以及肝细胞癌中,均可检测到 c-myc 及 ras 的表达增加,且有随病变进展而增加的趋势,c-myc 和 ras 可能具有协同作用,促进细胞增殖而形成肝癌<sup>[7]</sup>。本研究显示 HCV NS4B 可诱导或促进 c-myc 及 ras 蛋白的表达。因此,推测 HCV NS4B 有可能通过影响 c-myc 和 ras 蛋白的表达,在促进肝细胞增生和恶性转化中发挥重要作用。肝细胞的癌变是一个多因素参与的多阶段发展过程,HCV NS4B 究竟只是在某个阶段,或者是全过程参与肝细胞转化仍不清楚,另外,其影响癌基因表达后的进一步作用机制仍有待进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Konan KV, Giddings TH Jr, Ikeda M, et al. Nonstructural protein precursor NS4A/B from hepatitis C virus alters function and ultrastructure of host secretory apparatus [J]. *J Virol*, 2003, 77(14): 7843-7855.
- [2] Kato J, Kato N, Yoshida H, et al. Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo [J]. *Med Virol*, 2002, 66(2): 187-199.
- [3] Florese RH, Nagano-Fujii M, Iwanaga Y, et al. Inhibition of protein synthesis by the nonstructural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus [J]. *Virus Res*, 2002, 90(1-2): 119-131.
- [4] Ray RB, Lagging ML, Mayer K, et al. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein [J]. *Virus Res*, 1995, 37(3): 209-220.
- [5] Siavoshian S, Abraham J D, Kieny M P, et al. HCV core, NS3, NS5A and NS5B proteins modulate cell proliferation independently from p53 expression in hepatocarcinoma cell lines [J]. *Archives of Virology*, 2004, 149(2): 323-336.
- [6] Park JS, Yang JM, Min MK. Hepatitis C virus nonstructural protein NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 267(2): 581-587.
- [7] 罗丹, 刘启福, 苏建家, 等. 化学诱发大鼠肝癌变过程中癌基因原位表达的动态观察 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 1998, 14(2): 107-109.

[编辑:安 凤]