

HCV core/NS3/NS5A对内源性IFN- β 表达影响及其调控机制初步研究

董金玲¹, 高萍^{2,3}, 刘顺爱⁴, 王琦⁴, 张锦前⁴, 成军¹ (1. 北京大学北京地坛医院教学医院, 北京 100015; 2. 首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015; 3. 新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015; 4. 首都医科大学附属北京地坛医院, 北京 100015)

摘要: **目的** 探讨丙型肝炎病毒(HCV) core、NS3、NS5A对内源性IFN- β 表达的影响及其调控机制。**方法** 将HCV core、NS3、NS5A表达载体pcDNA3.1/myc-His-core/NS3/NS5A转染至HepG2细胞, 验证蛋白表达之后, 采用实时荧光定量PCR和Western blot及ELISA方法观察3种蛋白对IFN- β mRNA及蛋白水平表达的影响。构建IFN- β 全长启动子报告基因表达载体, 借助双萤虫素酶活性检测, 探讨HCV core、NS3、NS5A对IFN- β 转录水平的调控机制。**结果** pcDNA3.1/myc-His-core/NS3/NS5A在HepG2细胞中成功表达, 与转染pcDNA3.1/myc-His空载体相比, pcDNA3.1/myc-His-NS3/NS5A过表达时, 在mRNA及蛋白水平均能抑制HepG2细胞内IFN- β 的表达, 与转染空载体的对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。双萤虫素酶活性检测显示, 转染IFN- β 全长启动子报告基因表达质粒后, 与对照组相比, 双萤虫素酶活性降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。pcDNA3.1/myc-His-core过表达时对IFN- β 的表达无明显影响。**结论** HCV NS3/NS5A在mRNA及蛋白水平能抑制IFN- β 表达, 并通过其转录水平影响IFN- β 表达, core对IFN- β 的表达无明显影响。其具体调控机制有待进一步研究。

关键词: 肝炎, 丙型; 核心蛋白; 病毒非结构蛋白质类; 干扰素 β ; 基因表达调控

Effects and regulation mechanism of HCV core/NS3/NS5A on expression of IFN- β in HepG2 cells

DONG Jin-ling¹, GAO Ping^{2,3}, LIU Shun-ai⁴, WANG Qi⁴, ZHANG Jin-qian⁴, CHENG Jun¹
(1. Beijing Ditan Hospital, Peking University Teaching Hospital, Beijing 100015, China;
2. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China;
3. Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China;
4. Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

Abstract: Objective To investigate the effects and regulation mechanism of HCV core/NS3/NS5A on expression of IFN- β in HepG2 cells. **Methods** HCV core/NS3/NS5A proteins

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2013.01.001

基金项目: 国家“十二五”传染病重大专项(2012ZX10002003); 北京市卫生系统高层次卫生技术人才《领军人才》项目(2009-1-09); 北京市科委重大项目(D09050703560908)

通讯作者: 成军 Email: chengjdt@ccmu.edu.cn

were cloned (pcDNA3.1/myc-His-core/NS3/NS5A) and expressed in HepG2 cells, then the expression level of IFN- β was detected by qRT-PCR, Western blot hybridization and ELISA. IFN- β promoter reporter vector (PGL4.10-IFN- β -P) was constructed and used for regulation mechanism study by luciferase assay. **Results** HCV core/NS3/NS5A proteins were successfully expressed in HepG2 cells post-transfection. Both the mRNA level and protein expression of IFN- β were significantly decreased ($P < 0.05$) in the presence of NS3/NS5A protein. Luciferase assay revealed that NS3/NS5A proteins downregulated IFN- β promoter activity ($P < 0.05$). Meanwhile, HCV core protein had no significant effect on IFN- β expression. **Conclusions** Overexpression of NS3/NS5A could inhibit the expression of IFN- β by downregulating IFN- β promoter activity.

Key words: Hepatitis C; Core; Viral nonstructural proteins; Interferon-beta; Gene expression regulation

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 是重要的人类病原体, 其能够引起急性肝炎进而发展成慢性肝炎、肝纤维化和肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)。全世界有2亿多人感染HCV, 约占世界人口的3.3%^[1]。据统计, 每年约有400万人新感染HCV^[2]。HCV基因组大约有9.6 kb, 编码约3000个氨基酸。HCV蛋白受宿主和病毒蛋白酶的作用被切割形成至少10种蛋白, 包括4种结构蛋白 (核心蛋白core、两种包膜蛋白E1和E2, 还有p7离子通道) 和6种非结构蛋白 (NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B)。这一正性单链RNA病毒能够有效地逃避宿主免疫应答从而建立持续感染。在病毒感染引起的自然免疫阶段, 内源性IFN的产生是极其重要的部分, IFN- β 是天然免疫对抗病毒感染的第一个关键因子^[3]。Pubmed和Google Scholar搜索的资料显示, HCV的3种蛋白: Core、NS3/4A 和 NS5A对内源性IFN的产生有直接作用。本研究通过构建表达质粒, 研究过表达HCV core/NS3/NS5A对HepG2细胞内IFN- β 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂 肝癌细胞系HepG2细胞、pcDNA3.1/myc-His载体、pcDNA3.1/myc-His-core/NS3/NS5A和pGL4.10[luc2]为本研究所保存。jet PRIME DNA&siRNA转染试剂购自法国Polyplus公司, 实时荧光定量PCR试剂Power SYBR GREEN PCR Master Mix购自Life Technologies公司,

抗-IFN- β 、抗- β -actin购自美国Santa Cruz公司, 羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术公司, IFN- β 的ELISA试剂盒购自武汉Cusabio公司。各种工具酶、生化试剂和细胞培养试剂主要购自GIBCO、Promega、Invitrogen、Sigma、TaKaRa及威格拉斯等生物公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 IFN- β 全长启动子 (P) 引物由上海生工生物技术有限公司合成, 具体序列见表1。目的片段以HepG2细胞基因组DNA为模板扩增, 严格按照质粒构建操作说明进行, 构建完成后的pGL4.10-IFN- β -P由北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序鉴定。

1.2.2 细胞培养与转染 HepG2细胞用含有体积分数为10%胎牛血清的DMEM于37℃, 5% CO₂培养箱中培养。取对数生长期HepG2细胞进行质粒转染, 严格按照jet PRIME 转染试剂说明进行操作。

1.2.3 qRT-PCR β -actin和IFN- β 的引物由上海生工生物技术有限公司合成, 具体序列见表1。取对数生长期细胞进行转染, 24小时后用Promega RNA提取试剂盒提取HepG2细胞总RNA, 调整RNA浓度至200 μ g/ μ l。采用TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) 将所提取RNA逆转录为cDNA。逆转录体系为20 μ l, 逆转录条件为37℃ 15分钟, 85℃ 5秒, 4℃ + ∞ 。qRT-PCR反应体系25 μ l, 设置对照和内参, 于ABI 7500荧光定量PCR扩增仪

表 1 引物序列

名称	序列
IFN- β -P	上游引物5' -GATATCACAAGCTCCCTGCTGATGG-3' 下游引物5' -AAGCTTTCGCCTACTACCTGTTGTG-3'
β -actin	上游序列5' -CATCCGCAAAGACCTGTACGC-3' 下游序列5' -AGTACTTGCGCTCAGGAGGAG-3'
IFN- β (qRT-PCR)	上游序列5' -CTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCA-3' 下游序列5' -GCCAGGAGGTTCTCAACAAT-3'

进行反应,扩增条件为95℃ 10分钟,95℃ 15秒,60℃ 1分钟,40个循环。

1.2.4 ELISA法 在HepG2细胞中分别转染pcDNA3.1/myc-His-core/NS3/NS5A或pcDNA3.1/myc-His-NC 48小时后,取HepG2细胞上清100 μ l,按所需比例以100 μ l/孔加入包被有人抗-IFN- β 的ELISA板中,37℃ 孵育2小时。吸净液体,加入生物素标记抗体100 μ l/孔,37℃ 孵育1小时。吸净孔内液体并洗板3次。加入HRP亲和素100 μ l/孔,37℃ 孵育1小时。吸净孔内液体并洗板5次。加入TMB底物90 μ l/孔,37℃ 避光孵育30分钟后加入终止液50 μ l/孔,在450 nm波长下测量吸光值。每个样品重复测量3次。

1.2.5 Western blot法 转染HepG2细胞48小时后,裂解细胞取上清,测浓度后加入电泳上样缓冲液,取80 μ g进行电泳。分离胶12%,浓缩胶5%,胶厚1.5 mm。电泳条件:在浓缩胶中以90 V电压进行电泳,分离胶中以120 V电压进行电泳。湿转,功率32瓦,15分钟。牛奶封闭后加入抗-IFN- β ,4℃ 封闭过夜,洗膜,孵育二抗,显影。

1.2.6 双荧光素酶活性测定试验 转染HepG2细胞48小时后,采用Dual-Luciferase Reporter Assay System进行双萤虫素酶报告基因活性检测。每孔细胞先用1 \times PBS洗2次,加入50 μ l 1 \times 细胞裂解液,室温轻摇,收集细胞裂解液,之后用微孔板化学发光检测仪(Microplate Luminometer)检测双萤虫素酶活性。以加入25 ng/ml poly(I:C)的细胞为阳性对照组,每组做3个复孔,每孔加入质粒0.25 μ g,其中启动子与病毒蛋白的质量比为2:1。

1.3 统计学分析 采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验组与对照组之间采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pcDNA3.1/myc-His-core/NS3/NS5A载体构建及其蛋白表达鉴定 将测序正确的pcDNA3.1/myc-His-core/NS3/NS5A表达质粒分别转染HepG2细胞,Western blot结果显示转染pcDNA3.1/myc-His空载体组无蛋白的表达,而转染pcDNA3.1/myc-His-core/NS3/NS5A表达质粒组core/NS3/NS5A大量表达,表明构建的载体能够成功表达,见图1A。

2.2 HCV core/NS3/NS5A对HepG2细胞内IFN- β 表达变化的影响 转染pcDNA3.1/myc-His-NS3和pcDNA3.1/myc-His-NS5A后,与转染pcDNA3.1/myc-His空载体组对比,HepG2细胞内IFN- β 的表达量,采用qRT-PCR方法显示在mRNA水平分别下降63%和54% ($P < 0.05$);采用ELISA方法显示,在细胞上清蛋白水平分别下降20% ($P < 0.05$)和上调15% ($P < 0.05$);采用Western blot方法显示在细胞内蛋白水平分别下降30%和39% ($P < 0.05$)。而转染pcDNA3.1/myc-His-core后HepG2细胞内IFN- β 的表达量无明显变化,表明过表达NS3和NS5A能抑制HepG2细胞内IFN- β 的正常表达,见图1B、1C、1D。

2.3 HCV NS3/NS5A影响IFN- β 表达的机制研究

2.3.1 IFN- β 基因启动子双萤虫素酶报告基因表达质粒的活性检测 将pGL4.10-IFN- β -P报告基因表达质粒瞬时转染HepG2细胞,检测双萤虫素酶活性,发现pGL4.10-IFN- β -P显示出强的启动子活性,与对照pGL4.10-Basic相比,差异有显著统计学意义 ($P < 0.05$)。将pGL4.10-IFN- β -P和pcDNA3.1/myc-His-NS3及pcDNA3.1/myc-His-NS5A同时瞬时转染HepG2细胞,pGL4.10-IFN- β -P与对照组相比,其双萤虫素酶活性下降,见表2。

3 讨论

病毒感染后,IFN的产生是生物体防御机制极

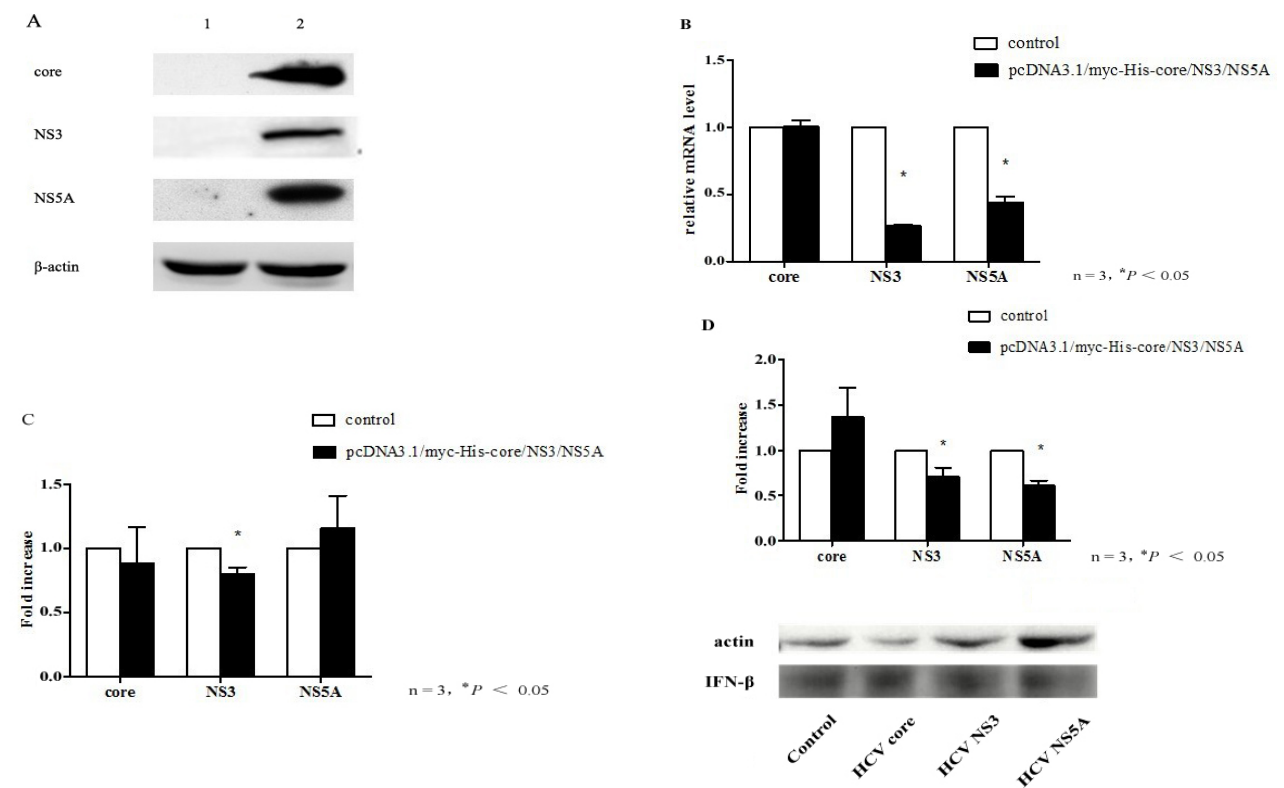


图 1 pcDNA3.1/myc-His-core/NS3/NS5A转染HepG2细胞后IFN-β表达变化

注：与转染pcDNA3.1/myc-His空载体组对比，转染pcDNA3.1/myc-His-core/NS3/NS5A的HepG2细胞内IFN-β的表达量在不同水平发生变化。
A：采用Western blot方法验证转染后细胞内蛋白表达，1泳道为转染pcDNA3.1/myc-His空载体，2泳道为转染pcDNA3.1/myc-His-core/NS3/NS5A；
B：采用qRT-PCR方法显示在mRNA水平IFN-β的表达量变化；C：采用ELISA方法显示在细胞上清蛋白水平IFN-β表达量变化；D：采用Western blot方法显示在细胞内蛋白水平IFN-β表达量变化

表 2 HCV NS3/NS5A 对IFN-β-P调控的双萤虫素酶报告基因表达载体的活性检测

组别	次数	相对萤虫素酶活性 ($\bar{x} \pm s$)
pGL4.10-Basic + pcDNA3.1/myc-His-NC	3	0.180 ± 0.063
pGL4.10-IFN-β-P + pcDNA3.1/myc-His-NC	3	1.534 ± 0.173
pGL4.10-IFN-β-P + pcDNA3.1/myc-His-NS3	3	2.619 ± 0.094
pGL4.10-IFN-β-P + pcDNA3.1/myc-His-NS5A	3	1.282 ± 0.117
pGL4.10-Basic + poly (I : C)	3	6.063 ± 0.288

其重要的部分，I型干扰素能够通过干扰病毒基因组的复制过程，限制机体内病毒的感染力^[4]。IFN-β是天然免疫对抗病毒感染的第一个关键因子。当发生病毒感染时，病毒RNA能够被病原相关分子模式（PAMPs）——如Toll样受体（TLRs）、维甲酸诱导基因I（RIG-I）及黑色素瘤分化相关的蛋白质5（MDA5）所识别^[5]。在这些受体中，TLRs募集受体分子髓样分化因子88（MyD88）及β-干扰素TIR结构域衔接蛋白（TRIF），而RIG-I和MDA-5募集病毒诱导信号调节子（VISA），继而通过TBK1和IKK-ε使IRF3磷酸化，最终诱发IFN-β转录^[6]。IFN-β继而激活IFN调节基因产生抗病毒效应^[7]。而从病毒方面考

虑，则将抑制IFN的产生作为对抗防御机制的不可或缺的功能^[8]。在与宿主细胞共存的过程中，很多病毒编码病毒蛋白抑制宿主产生IFN，使宿主细胞难以清除病毒^[6]。

大量研究表明，HCV core、NS3/4A及NS5A蛋白能够作用于宿主抗病毒天然免疫信号通路，为逃避机体天然免疫反应及HCV复制创造条件。有研究显示，在HCV 10种蛋白中，只有NS5B（一种RNA依赖性RNA聚合酶，RdRp）能够激活IFN-β启动子活性，NS4A、NS4B和NS5A能够有效抑制这一激活作用^[9]。感染淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒（LCMV）并且标记NS5A-Tg的小鼠体内IFN-β

表达降低,表明NS5A能够抑制内源性干扰素的表达及抗病毒反应^[10]。有研究^[11,12]通过NS3蛋白酶抑制剂的拟肽类作用位点表明TLR3和RIG1两种信号通路中的因子都是NS3/4A蛋白酶的作用位点。因而,NS3/4A通过特异性蛋白酶酶切TRIF调节因子而致TRIF不能募集TBK1,从而阻断了TLR3信号转导通路,不能激活IFN- β 启动子。Goughoulte等^[13]研究显示,HCV核心蛋白可减弱IL-6刺激的急性期反应,损伤固有免疫应答并能活化TNF- α ,增强炎症反应而使病毒持续感染。此外,HCV核心蛋白能够阻断DDX3发挥通过IPS-1诱导IFN- β 表达的作用^[14]。但是,Kobayashi等^[15]研究表明只有单体形式的HCV核心蛋白能够被TLR2识别,而重组形式或从血清中获得的HCV核心蛋白均不能有效激活TLR2信号转导通路,继而激活IFN信号转导通路。对感染的病毒来说,core-TLR2相互作用的破坏可能为其逃避天然免疫反应及持续HCV感染提供条件。

本研究通过瞬时转染pcDNA3.1/myc-His-core/NS3/NS5A,观察HCV蛋白core、NS3及NS5A对肝癌细胞系HepG2中IFN- β 表达的影响。本研究发现,NS3和NS5A表达增加后HepG2细胞内的IFN- β 表达量在mRNA和蛋白水平均有明显下调,而对照组则无明显变化,这表明感染HCV后NS3和NS5A能够有效抑制IFN- β 表达。如果可以阻断病毒蛋白对内源性免疫的抑制作用,使胞内IFN- β 量不下降,则可使机体更有效地发挥其抗病毒活性,从而抑制HCV的持续感染和慢性化。本研究在探索HCV NS3和NS5A下调HepG2细胞内IFN- β 的机制实验中,从启动子调控方向入手,通过双萤光素酶活性检测分析显示NS3和NS5A能够抑制IFN- β 启动子活性,这说明NS3和NS5A可能通过IFN- β 启动子发挥其抑制作用。而HCV core则对IFN- β 的表达无明显影响,可能与核心蛋白的状态有关,这与Kobayashi等^[15]研究结果相一致。

综上所述,HCV NS3和NS5A可以抑制HepG2细胞内IFN- β 的表达。这可能是HCV对抗机体内源性免疫反应的机制之一。NS3和NS5A通过抑制对IFN- β 启动子活性而实现对内源性IFN- β 表达的抑制

作用,其具体机制仍有待于进一步的研究和证实。

参考文献

- [1] Waheed Y, Shafi T, Safi SZ, Qadri I. Hepatitis C virus in Pakistan: A systematic review of prevalence, genotypes and risk factors[J]. *World J Gastroenterol*,2009,15:5647-5653.
- [2] Berenguer M, Lopez-Labrador FX, Wright TL. Hepatitis C and liver transplantation[J]. *J Hepatol*,2001,35:666-678.
- [3] Le Bon A, Schiavoni G, Dagostion G, et al. Type I interferons potentially enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo[J]. *Immunity*,2001,14:461-470.
- [4] De Los Santos I, Sanz J, Luque MM. Effect of the treatment of hepatitis C with interferon (IFN) and ribavirin (RBV) in body composition measurement by DEXA in HIV-HCV infected patients[J]. *J Int AIDS Soc*,2012,15:18303.
- [5] Meurs EF, Breiman A. The interferon inducing pathways and the hepatitis C virus[J]. *World J Gastroenterol*,2007,13:2446-2454.
- [6] Bowie AG, Unterholzner L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling[J]. *Nat Rev Immunol*,2008,8:911-922.
- [7] Sadler AJ, Williams BR. Interferon-inducible antiviral effectors[J]. *Nat Rev Immunol*,2008,8:559-568.
- [8] 戚中田. 丙型肝炎病毒感染与治疗药物[J]. *临床肝胆病杂志*,2011,27:15-18,27.
- [9] Masaru M, Naoya K, Motoyuki O, et al. Interferon-beta is activated by hepatitis C virus NS5B and inhibited by NS4A, NS4B, and NS5A[J]. *Hepatol Int*,2007,1:302-310.
- [10] Malte K, Tilmann B, Kyoshi H, et al. The hepatitis C virus non-structural NS5A protein impair both the innate and adaptive hepatic immune response in vivo[J]. *J Biol Chem*,2009,284:28343-28351.
- [11] Johannes GB, Erwin DB, Dieter H. Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus[J]. *Archives Biochem Biophys*,2007,462:254-265.
- [12] Yang D, Liu N, Zuo C, et al. Innate host response in primary human hepatocytes with hepatitis C virus infection[J]. *PLoS One*,2011,6:e27552.
- [13] Goughoulte M, Banerjee A, Meyer K, et al. Hepatitis C virus core protein interacts with fibrinogen-beta and attenuates cytokine stimulated acute-phase response[J]. *Hepatology*,2010,51:1505-1513.
- [14] Hiroyuki O, Masanori I, Misako M, et al. Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN-beta induction[J]. *PLoS ONE*,2010,5:e14258.
- [15] Kobayashi M, Yoshiki R, Sakabe J, et al. Expression of toll-like receptor 2, nod2 and dectin-1 and stimulatory effects of their ligands and histamine in normal human keratinocytes[J]. *Br J Dermatol*,2009,160:297-304.

收稿日期: 2012-12-25