

丙型肝炎病毒不同基因型核心蛋白对肝母细胞瘤细胞凋亡影响的比较

冯胜虎^{1,2}, 鞠威^{1,2}, 全敏^{1,2}, 杨松³, 刘顺爱^{1,2}, 张锦前^{1,2}, 王琦^{1,2}, 梁金秋^{1,2}, 纪世博^{1,2}, 成军^{1,2} (1.首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015; 2.新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015; 3.首都医科大学附属北京地坛医院 内五科, 北京 100015)

摘要: 目的 比较HCV不同基因型核心蛋白(core)在肝母细胞瘤细胞凋亡中的作用。方法 构建6a基因型HCV core的表达载体pcDNA3.1/myc-His(-)-core(6a)[pCore(6a)]; 分别将1b、3a和6a基因型HCV core质粒以及空质粒pcDNA3.1/myc-His(-)(pNC)瞬时转染HepG2细胞, 48小时后利用流式细胞术检测细胞凋亡发生的情况; 利用Real-time PCR检测胱冬肽酶-3的mRNA水平变化; 利用化学发光法检测胱冬肽酶-3的活性变化, 比较HCV不同基因型core对细胞凋亡作用的差异。结果 成功构建了6a基因型HCV core的表达载体pcDNA3.1/myc-His(-)-core(6a)[pCore(6a)]; 与pNC组相比, 表达1b、3a和6a基因型HCV core的HepG2细胞中, Annexin V⁺细胞数均显著减少, 其中6a基因型core较1b和3a基因型core作用显著($P = 0.000, 0.001$); 同时实验组中凋亡效应分子胱冬肽酶-3的mRNA水平及其活性较对照组均降低; 其中与1b和3a基因型core相比较, 6a基因型core显著降低胱冬肽酶-3的mRNA水平, 而在抑制胱冬肽酶-3活性方面无显著差别。结论 HCV不同基因型core对细胞凋亡的作用不同; 基因6a型core对细胞凋亡的抑制作用更为显著; HCV基因6型核心蛋白可能更易导致肝癌的发生, 有待进一步研究。

关键词: 肝炎, 丙型; 基因型; 核心蛋白; 细胞凋亡

Effects of HCV core of different genotypes on cell apoptosis of HepG2 cell

FENG Sheng-hu^{1,2}, JU Wei^{1,2}, QUAN Min^{1,2}, YANG Song³, LIU Shun-ai^{1,2}, ZHANG Jin-qian^{1,2}, WANG Qi^{1,2}, LIANG Jin-qiu^{1,2}, JI Shi-bo^{1,2}, CHENG Jun^{1,2} (1. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2. Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China; 3. The Fifth Department of Internal Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

Abstract: Objective To compare the effects of HCV core of different genotypes on cell apoptosis of HepG2 cell. **Methods** The plasmid pcDNA3.1/myc-His(-)-core of genotype 6a [pCore(6a)] was constructed. And then pCore(1b), pCore(3a), pCore(6a) and negative control pcDNA3.1/myc-His(-)(pNC) were transiently transfected into HepG2 cells respectively. Flow cytometry was used to observe cell apoptosis post 48 hours while the mRNA levels and activities of caspase-3 were detected by Real-time PCR and caspase-glo 3/7 luminometer respectively. Then, compare the different effects of HCV core of different genotypes on cell apoptosis were compared. **Results** The plasmid pcDNA3.1/myc-His(-)-core of genotype 6a [pCore(6a)] was successfully constructed. Compared with control group, the number of Annexin V-positive cells were all decreased in core(1b), core(3a) or core(6a) expressed HepG2 cells, among which the effect of core(6a) was more remarkable. Meanwhile, the mRNA levels and activities of caspase-3 were all reduced in core(1b), core(3a) or core(6a) expressed HepG2 cells. Moreover, compared with core(1b) and core(3a), the effect of core(6a) is more significant in terms of caspase-3 mRNA level, but not caspase-3 activity. **Conclusions** Different

genotypes of HCV core have different effects on cell apoptosis. Inhibitory effect of genotype 6a core on apoptosis is more significant. HCV core protein of genotype 6a may be easier to cause liver cancer, which needs further study.

Key words: Hepatitis C; Genotype; Core protein; Apoptosis

目前,世界范围内大约有1.7亿人感染HCV, HCV有6个主要的基因型和100多种不同亚型, HCV感染可以导致CHC、肝纤维化、肝硬化及肝癌的发生,不同的基因型在临床上的致病情况不同^[1-3]。肝癌是HCV导致的终末期肝病,而细胞凋亡受阻是肝癌发生的重要机制。有研究发现随着感染率的增加,基因6型有可能成为中国西南地区乃至更大范围内重要的病毒亚型;并且发现基因6型HCV患者的平均病毒载量明显高于基因2型和基因3型^[4-6]。基于此,本研究通过构建真核表达载体,旨在比较1b、3a和6a基因型HCV core在细胞凋亡中作用的差异,为进一步了解基因6型HCV在肝癌中的作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞和HCV 1b及3a基因型core的表达载体均为本实验室保存。

1.1.2 试剂 DMEM细胞培养基和胎牛血清均购自美国Gibco公司; jet PRIME™ DNA&siRNA转染试剂购自法国Polyplus公司; 细胞凋亡检测试剂Annexin V-FITC和7-AAD购自美国Biolegend公司; 胱冬肽酶-3发光检测试剂盒购自美国Promega公司。血清中病毒RNA提取试剂盒购自德国QIAGEN公司; One Step RNA PCR 试剂盒和pGEM-Teasy载体等均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建 提取基因型为6a的HCV患者血清中的HCV RNA,以此为模板扩增HCV核心区片段;引物根据HCV Database中提交的6a亚型的HCV核心区基因序列设计引物,进行RT-PCR反应后琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果并进行切胶纯化回收。将回收产物首先连接TA载体进行序列测定,经Bam H I和Hind III双酶切后将目的基因连接到真核表达载体pcDNA3.1/myc-His(-)中,构建的表达载体进行酶切和测序鉴定。

1.2.2 细胞培养及重组质粒转染 用含10%胎牛血清的DMEM培养液,于5% CO₂孵箱中培养HepG2细胞;待细胞铺满培养瓶底后,将细胞传代种植于6孔板中,待细胞达60%~70%融合度时按转染试剂说明书进行重组质粒的转染,并设立阴性对照。

1.2.3 Annexin V检测细胞凋亡 质粒转染48小时后收集细胞,按照Annexin V/7-AAD检测试剂说明书处理细胞后利用流式细胞仪检测细胞凋亡的情况。Annexin V⁻7-AAD⁻为正常细胞; Annexin V⁺7-AAD⁻为早期凋亡细胞; Annexin V⁺7-AAD⁺为中晚期凋亡细胞。

1.2.4 胱冬肽酶-3的mRNA水平检测 处理细胞48小时后提取细胞RNA,并用逆转录试剂盒将其逆转录为cDNA, Real-time PCR检测胱冬肽酶-3 mRNA,以β-actin为内参。

1.2.5 胱冬肽酶-3的活性检测 将HepG2细胞以每孔1 × 10⁴个细胞的密度接种于96孔板中,转染重组质粒后48小时,按照胱冬肽酶-3化学发光试剂盒的操作流程处理细胞后检测细胞内胱冬肽酶-3的活性。

1.3 统计学处理 采用SPSS 16.0统计软件进行统计学分析,两组间比较采用配对t检验, P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建pcDNA3.1/myc-His(-)-core(6a)的表达载体 利用RT-PCR成功扩增出基因6a型的HCV core片段,用1%琼脂糖凝胶电泳分析,结果显示扩增片段约573 bp,与预期符合(图1A)。将经双酶切后的目的基因连接到pcDNA3.1/myc-His(-)载体中。酶切鉴定可见5500 bp大小的pcDNA3.1/myc-His(-)线性片段以及573 bp的基因6型的HCV core目的基因片段(图1B)。将酶切成功的质粒送北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序,序列比对完全一致,表明基因6a型的HCV core的表达载体构建成功。

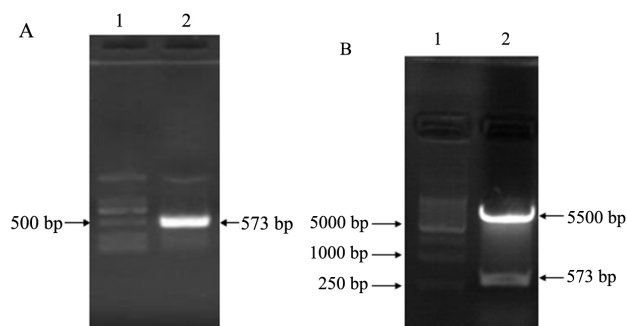


图1 pcDNA3.1/myc-His(-)-core(6a)表达载体的构建

注: A: 1%琼脂糖凝胶电泳验证HCV基因6型core的扩增情况; 1: Marker; 2: RT-PCR产物。B: pcDNA3.1/myc-His(-)-core(6a)酶切鉴定情况; 1: Marker; 2: 表达载体pCore(6a)经酶切后产物

2.2 HCV不同基因型core对Annexin V⁺细胞数的影响 利用Annexin V/7-AAD检测细胞凋亡情况, 结果显示与pNC组相比, pCore(1b)、pCore(3a)、pCore(6a)转染组Annexin V⁺细胞数均显著减少($P = 0.037$ 、 0.026 、 0.002 , 图2); 与pCore(1b)、pCore(3a)组相比, pCore(6a)组中Annexin V⁺细胞数减少更显著($P = 0.000$ 、 0.001 ; $n = 3$; 图2), 表明HCV 1b、3a和6a基因型core的表达均可以导致Annexin V⁺细胞数的减少, 其中6a基因型core的作用更显著。

2.3 HCV不同基因型core对胱冬肽酶-3 mRNA水平的影响 利用Real-time PCR检测胱冬肽酶-3 mRNA水平变化, 结果显示与pNC组相比, pCore(1b)、pCore(3a)、pCore(6a)转染组胱冬肽酶-3的mRNA水平均明显下降($P = 0.047$ 、 0.000 、 0.007 , $n = 3$); 同时, 与core(1b)和core(3a)相比, core(6a)显著降低胱冬肽酶-3的mRNA水平($P = 0.007$ 、 0.016 , $n = 3$), 见图3, 表明HCV 1b、3a和6a基因型core均可以降低胱冬肽酶-3的mRNA水平; 其中6a基因型core的作用更显著。

2.4 HCV不同基因型core对胱冬肽酶-3活性的影响 利用发光检测试剂盒检测胱冬肽酶-3活性的变化, 结果显示与pNC组相比, pCore(1b)、pCore(3a)、pCore(6a)转染组胱冬肽酶-3的活性均明显下降($P = 0.043$ 、 0.007 、 0.003 , $n = 4$); 而pCore(1b)、pCore(3a)、pCore(6a)三组间胱冬肽酶-3活性差异均无统计学意义($P = 0.243$ 、 0.748 , $n = 4$), 见图4, 表明HCV 1b、3a和6a基

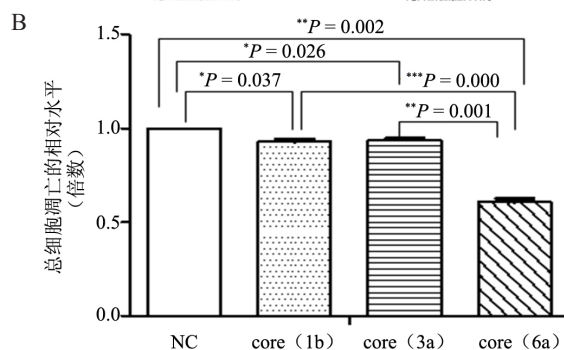
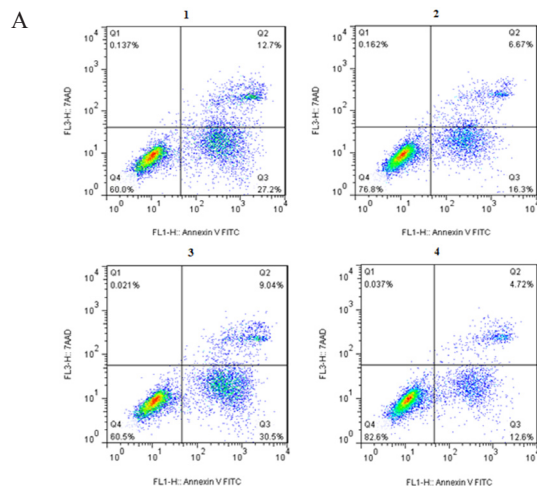


图2 HCV不同基因型core对Annexin V⁺细胞数量的影响

注: A: Annexin V检测流式细胞结果; 1: NC; 2: core(1b); 3: core(3a); 4: core(6a)。B: Annexin V检测结果统计图, core(6a)与core(1b)、core(3a)相比, 差异有显著统计学意义($P = 0.000$ 、 0.001 , $n = 3$)

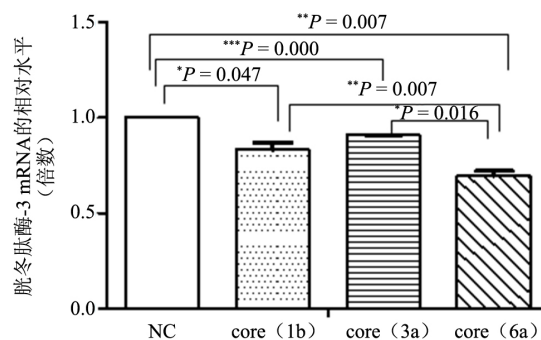


图3 不同基因型HCV core对胱冬肽酶-3 mRNA水平的影响

注: 胱冬肽酶-3 mRNA水平检测结果统计图 core(6a)与core(1b)和core(3a)相比, 差异有显著统计学意义($P = 0.007$ 、 0.016 , $n = 3$)

因型core均可以抑制胱冬肽酶-3的活性。

3 讨论

HCV是慢性肝炎和肝癌的主要原因之一, 但是基因型在CHC疾病进展中的作用依然存在着争议。作为HCV的主要结构蛋白, 核心蛋白引起的凋亡受阻是肝细胞癌变的主要机制之一。由于我国流行株HCV主要是基因1b型^[7], 因此目前大多数研究集中

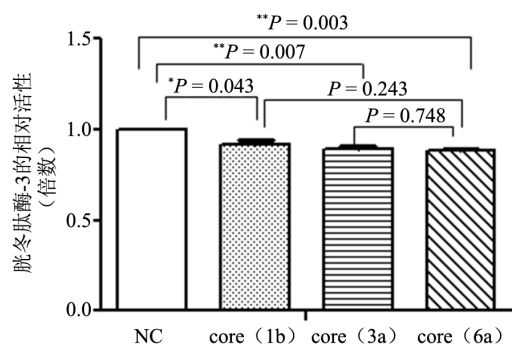


图4 不同基因型HCV core对胱冬肽酶-3活性的影响

注: 胱冬肽酶-3活性检测结果统计图 pCore (1b)、pCore (3a) 和 pCore (6a) 3组间胱冬肽酶-3的活性差异无统计学差异 ($P = 0.243$ 、 0.748 , $n = 4$)

于1b基因型HCV核心蛋白在细胞凋亡以及肝癌中作用的研究^[8,9]。另外,有文献^[10]报道基因3a型HCV核心蛋白也有抑制细胞凋亡的作用。

HCV基因6型约1500年前起源于东南亚中部,近年来感染率、传播途径和移民等相关因素的变化加快了这种基因型病毒的传播速度^[11]。文献^[4-6]报道基因6型有可能成为中国西南地区乃至更大范围内重要的病毒亚型,并发现基因6型HCV患者的平均病毒载量明显高于基因2型和基因3型。在前期的临床工作中,笔者发现本院就诊的HCV患者中,小部分为HCV基因6型感染。因此HCV基因6型核心蛋白在细胞凋亡中作用以及其与其他基因型核心蛋白对细胞凋亡作用的差异有待于进一步了解和探讨。

本研究通过成功构建6a基因型HCV core的表达载体并将其与1b和3a基因型core分别瞬时转染到HepG2细胞中,观察Annexin V⁺细胞数的情况以及凋亡效应分子胱冬肽酶-3的mRNA水平和活性的变化。研究发现,3种基因型HCV core均可明显减少Annexin V⁺的细胞数量,其中以6a型core作用更为显著;与之相应,3种基因型HCV core均可降低胱冬肽酶-3的mRNA水平,并显著抑制其活性,其中与1b和3a基因型core相比较,6a基因型core显著降低胱冬肽酶-3的mRNA水平,而在抑制胱冬肽酶-3活性方面也存在优势,需进一步优化实验得到证实。总之,结果表明不同基因型的core在抑制细胞凋亡中的作用程度不同,基因6a型core对细胞凋亡的抑制作用更为显著,提示基因6a型core可能更易导致肝癌的发生。

目前,关于HCV core抑制细胞凋亡机制的报道有很多。核心蛋白可以通过分别抑制p53和c-myc表达,上调microRNA-345进而抑制p21 (Waf1/Cip1) 表达以及增加p-AKT的表达等途径抑制细胞凋亡,促进细胞增殖^[10,12,13]。但是,目前关于6a基因型HCV core对细胞凋亡的机制以及其在肝癌发生中的作用的研究甚少,本课题组将在之后工作中展开具体的研究。

参考文献

- [1] Ray RB, Meyer K, Ray R. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein[J]. *Virology*,1996;226:176-182.
- [2] Mendivil-Perez M, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Glucose starvation induces apoptosis in a model of acute T leukemia dependent on caspase-3 and apoptosis-inducing factor: a therapeutic strategy[J]. *Nutr Cancer*,2013;65:99-109.
- [3] Nguyen MH, Keffe EB. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5, and 6[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*,2005;3:S97-S101.
- [4] 洪国祜, 谭朝霞, 郭艳, 等. 中国西南地区丙型肝炎病毒6a亚型病毒株的传播速率[J]. *中华肝脏病杂志*,2011;19:502-505.
- [5] Fu Y, Wang Y, Xia W, et al. New trends of HCV infection in China revealed by genetic analysis of viral sequences determined from first-time volunteer blood donors[J]. *J Viral Hepat*,2011;18:42-52.
- [6] Rong X, Lu L, Wang J, et al. Correlation of viral loads with HCV genotypes: higher levels of virus were revealed among blood donors infected with 6a strains[J]. *PLoS One*,2012;7:e52467.
- [7] Lu L, Nakano T, He Y, et al. Hepatitis C virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants[J]. *J Med Virol*,2005;75:538-549.
- [8] Jahan S, Ashfaq UA, Khaliq S, et al. Dual behavior of HCV core gene in regulation of apoptosis is important in progression of HCC[J]. *Infect Genet Evol*,2012;12:236-239.
- [9] 颜学兵, 梅蕾, 陈智, 等. 基因1b型HCV核心蛋白不同功能区域对HepG2细胞生长的影响[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*,2008;28:411-415.
- [10] Jahan S, Khaliq S, Siddiqui MH, et al. Anti-apoptotic effect of HCV core gene of genotype 3a in Huh-7 cell line[J]. *Virol J*,2011;8:522-528.
- [11] Pybus OG, Barnes E, Taggart R, et al. Genetic history of hepatitis C virus in East Asia[J]. *J Virol*,2009;83:1071-1082.
- [12] Basu A, Meyer K, Ray RB, et al. Hepatitis C virus core protein is necessary for the maintenance of immortalized human hepatocytes[J]. *Virology*,2002;298:53-62.
- [13] Shiu TY, Huang SM, Shih YL, et al. Hepatitis C virus core protein down-regulates p21(Waf1/Cip1) and inhibits curcumin-induced apoptosis through microRNA-345 targeting in human hepatoma cells[J]. *PLoS One*,2013;8:e61089.

收稿日期: 2013-10-31