

# HCV核心基因转染HepG2细胞后基因表达差异筛选

唐志荣, 陈杰, 鲁鸿燕, 胡月英 (广西壮族自治区疾病预防控制中心, 南宁市 530028)

**摘要:** 目的 将真核表达载体pcDNA3.1(-) HCV core转染到HepG2细胞, 在HepG2细胞中表达HCV核心蛋白, 并筛选其中的差异表达基因。方法 将构建的真核表达载体pcDNA3.1(-) HCV core转染HepG2细胞后进行蛋白免疫印迹检测; 将pcDNA3.1(-) HCV core和pcDNA3.1(-)载体分别转染HepG2细胞后, 提取mRNA并逆转录为cDNA, 运用基因表达谱芯片技术分析差异表达基因。结果 构建的真核表达载体经双酶切鉴定; 转染HepG2细胞后HCV核心蛋白表达经蛋白免疫印迹证实; 经基因表达谱芯片分析发现, 其中基因表达水平显著上调和下调的分别是181个和48个。结论 筛选HCV核心基因转染HepG2细胞后的糖类和脂类物质代谢相关的差异表达基因, 从而为丙型肝炎病毒合并糖尿病、脂肪肝等代谢性疾病的分子生物学机制的研究提供了重要依据。

**关键词:** 丙型肝炎病毒核心抗原; HepG2细胞; 基因芯片; 差异表达基因

## Screening of genes differentially expressed in HepG2 cells transfected with HCV core gene

TANG Zhi-rong, CHEN Jie, LU Hong-yan, HU Yue-ying (Guangxi Center for Diseases Prevention and Control, Nanning 530028, China)

**Abstract: Objective** To detect HCV core expression and screen different gene expression in HepG2 cell transfected by HCV core by genechip technology. **Methods** The expression vector of pcDNA3.1(-) HCV core is transfected with HepG2 cell line. The expression of HCV core protein was observed by Western blot method. Comparison of differentially expressed genes between L02 transfected by pcDNA3.1(-) HCV core and pcDNA3.1(-) by cDNA microarray technique was carried out, respectively. **Results** The expression vector has been confirmed by restriction enzyme digestion. HCV core protein expression has been confirmed by Western blot. High quality mRNA and cDNA had been prepared and successful microarray screening had been conducted. From the scanning results, it was found 181 genes were up-regulated and 48 genes were down-regulated in HepG2 cell line transfected with HCV core. **Conclusions** cDNA microarray technology was successfully applied to screen the genes differentially expressed in HepG2 cell line transfected with HCV core, which brought some new clues for studying the molecular biology mechanism of hepatitis C virus with metabolic disease.

**Key words:** HCV core; HepG2 cell; Microarray; Differential expression gene

慢性肝炎病毒感染常合并其他代谢性疾病的发生。HCV感染与糖尿病(尤其是2型糖尿病)的发生、与移植后糖尿病、地中海贫血患者伴发的糖尿病或糖代谢异常均有相关性<sup>[1,2]</sup>。慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC)患者合并脂肪肝的发病率较高, 且与患者性别及感染的HCV基因型有关<sup>[3]</sup>。HCV核心蛋白基因编码的HCV核心蛋

白, 在HCV致病过程中可能起重要作用。基因芯片技术是指在固相支持物上原位合成寡核苷酸或者直接将大量基因探针以显微打印的方式有序地固定于支持物表面, 然后与标记的样品杂交, 通过对杂交的检测分析, 得出样品的遗传信息(基因序列及表达的信息)。由于在制备过程中运用了计算机芯片的制备技术如显微光蚀刻、显微打印等, 且常用硅芯片作为固相支持物, 所以称为

通讯作者: 唐志荣 Email: jingwanghou@yahoo.com.cn

基■芯片技术。■此本研究应用基■芯片技术,筛选HCV核心蛋白对HepG2细胞差异表达的基■,为进一步深入研究丙型肝炎病毒(HCV)特别是HCV核心蛋白在糖尿病、脂肪肝等代谢性疾病的发生发展过程中的多种生物学机制提供重要依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 真核表达质粒pcDNA3.1(一)HCV core、HepG2细胞系本实验室保存;细胞培养相关试剂及总RNA提取试剂Trizol均购自Gibco公司;HCV core 抗体,购自Santa Cruze公司。

### 1.2 方法

1.2.1 构建HCV核心蛋白基因真核表达载体 真核表达载体pcDNA3.1(一)HCV core为本实验室保存。

1.2.2 HepG2细胞的转染和筛选:细胞株用DMDM培养基(含有100 kU/L氨苄青霉素,100 ml/L小牛血清)常规培养,待生长到50%~70%融合时,采用Lipofectin 脂质体法(转染程序参照 Manitsans 方法)将pcDNA3.1(一)及pcDNA3.1(一)HCV core质粒转染细胞,含G418的培养基继续培养48小时,裂解细胞后留取上清,用于表达产物Western blot检测。

1.2.3 HCV核心蛋白Western blot检测 将上清于SDS-PAGE胶电泳,于5%的脱脂奶粉室温封闭2小时,加入TBST稀释过的抗体(小鼠抗人HCV核心蛋白的抗体,1:500稀释),4℃孵育1小时,用TBST液漂洗4~6次,每次5分钟,再用TBST稀释的酶标抗体(山羊抗鼠IgG-HRP,1:5000稀释)于30℃温育60分钟,TBST漂洗4~5次后滤纸吸干残余液体,加入ECL化学发光底物,在X光片曝光,显影、定影后可见结果。

1.2.4 总RNA提取 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞,细胞生长至对数期时分别将pcDNA3.1(一)及pcDNA3.1(一)HCV core转染HepG2细胞48小时后收获细胞。使用Trizol试剂一步法提取细胞总RNA(对照组和实验组),样品经分光光度计检测吸光度A值,并行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 mRNA纯化、探针标记和芯片制备 以Qiagen公司Oligotex mRNA Midi Kit纯化得mRNA,并行电泳检测常规方法逆转录标记cDNA探针并纯化Cy3-dUTP标记对照细胞mRNA(5μg),Cy5-dUTP标记实验细胞mRNA(5μg)。内醇沉淀后溶解于杂交液中。芯片包含的20 000个cDNA■生物芯片上海■家工程研究中心上海生物芯片有限公司提供,包括原癌基■和抑癌基■、免疫调节相关基■、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基■、信号转导相关基■等。以通用引物进行PCR扩增,靶基■溶解于3×SSC溶液,用Cartesian公司的Cartesian 7500 点样仪及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样。玻片经水合(2 小时)、室温干燥(0.5 小时),UV交联,再分别用0.2% SDS、水及0.2%硼氢化钠溶液处理10分钟,晾干备用。

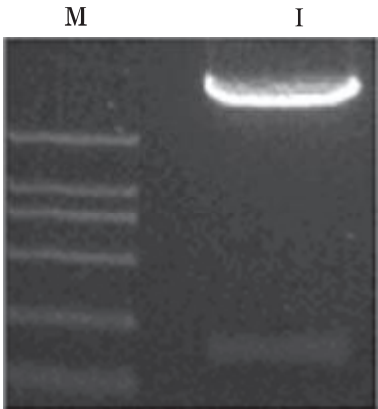
1.2.6 杂交及洗涤 将基■芯片和杂交探针在95℃水浴变性5分钟,将混合探针加在基■芯片上,置于60℃杂交15~17小时。以SSC洗涤10分钟,室温晾干。

1.2.7 检测与分析 用General Scanning公司的ScanArray 3000扫描芯片。用预先选定的内参照基■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。阴性结果判断: Cy5/Cy3>1.8,红色荧光,显示表达增强; Cy5/Cy3<0.6,为绿色荧光,显示表达减弱。

## 2 结果

2.1 真核表达载体pCDNA3.1(一)HCV core双酶切鉴定 真核表达质粒pCDNA3.1(一)HCV core为本实验室所保存,用前行Eco R I/Bam H I双酶切鉴定(见图1)。

2.2 真核表达载体pcDNA3.1(一)和pcDNA3.1(一)HCV core分别转染HepG2细胞后,经蛋白免疫印迹检测 HepG2细胞株用DMDM培养基培养,待生长到50%~70%融合时, Lipofectin 脂质体法将pcDNA3.1(一)及pcDNA3.1(一)HCV core质粒分别转染到HepG2细胞,培养48小时后裂解细胞后留取上清于SDS-PAGE胶电泳, Western



■ 1 pCDNA3.1 ( — ) HCV core经双酶切鉴定

M:标记物; 1: pCDNA3.1 ( — ) HCV core经Eco R I /Bam H I 双酶切鉴定

blot检测 (见图2)。

2.3 差异表达基因分析 基因表达水平显著上调和下调的分别是181个和48个, 摘取其中存在较为明显的表达差异且与糖类、脂类代谢密切相关的基因如下: (见表1、表2)。

3 讨论

前期研究已经表明: HCV感染人体后可导致患者出现胰岛素抵抗、糖耐量降低、糖尿病、脂肪肝等代谢性疾病, 这提示HCV与糖尿病、脂肪肝等代谢性疾病的发生、发展密切相关。大量的临床资料表明HCV与糖尿病的发生有更强的相关性, 但HCV导致糖尿病等代谢性疾病发生、发展的分子生物学机制尚不明确。■此, 为了进一步



■ 2 pCDNA3.1 ( — ) 质粒及pCDNA3.1 ( — ) HCV core质粒转染HepG2细胞后蛋白免疫印迹检测确定

1. pCDNA3.1 ( — ) 质粒转染细胞培养后裂解细胞上清Western blot结果;  
2. pCDNA3.1 ( — ) HCV core质粒转染细胞培养后裂解细胞上清Western blot结果

研究并明确HCV导致代谢性疾病的生物学机制, 笔者应用基因芯片技术研究HCV核心基因转染HepG2肝细胞后的差异表达基因。最终, 从20 000个基因中筛选出229个差异表达的基因, 其中基因表达水平显著上调和下调的分别是181个和48个, 这些基因涉及细胞信号转导、物质代谢、肿瘤发生、细胞凋亡等多个领域。

基因芯片技术具有强大的类比性、巨大的信息产出率、高度敏感性和专一性、高度重复性、微型化和自动化等优点。■前, 基因芯片技术已广泛应用于多个领域, 如基因组研究、临床疾病的基因诊断、后基因组计划、药物研究开发、法医学鉴定、生物信息学等。HCV感染可能与糖类、脂类代谢密切相关, 其机制■前仍很不明确, ■内外的相关研究并未深入阐明。本研究的

表 1 表达显著增强的蛋白基因

序号	GenBank No	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_030777.3	葡萄糖转运子 (GLUT10)	5.081
2	NM_182804.1	脂蛋白B48受体 (APOB48R)	8.181
3	NM_033252.1	β-1,3-N-乙酰葡萄糖胺转移酶 1	5.219

表 2 表达显著减弱的蛋白基因

序号	GenBank	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_002863.2	肝糖原磷酸化酶	0.499
2	XM_372040.2	谷氨酸依赖性天冬酰胺合成酶	0.275
3	NM_152742.1	磷脂酰肌醇 (蛋白) 聚糖2	0.444

工作旨在通过基因芯片的筛选,探寻这一机制中的关键环节。本研究发现了HCV核心蛋白导致HepG2细胞上调的基因GLUT10、APOB48R等,以及下调的基因肝糖原磷酸化酶等,这些都与糖类、脂类代谢密切相关<sup>[4-6]</sup>,可能是HCV致糖类、脂类代谢异常的关键环节及机制。

■此,从本研究中可以得出这样的结论:HCV感染人体后可以导致某些重要功能基因表达水平的改变(上调或下调),导致基因编码的蛋白功能的改变(增强或减弱),从而引起人体内分泌功能的改变而导致一系列代谢性疾病的发生,如胰岛素瘤、糖尿病、脂肪肝等。但HCV是如何导致基因表达水平的改变以及细胞信号传导等其他导致代谢性疾病发生的机制目前仍未明确,有待深入研究。

#### 参考文献

- [1] Saliba F, Lakehal M, Pageaux GP, et al. Risk factors for new-onset diabetes mellitus following liver transplantation and impact of hepatitis C infection: an observational multicenter study[J]. Liver Transpl, 2007, 13: 136-144.
- [2] Yoon EJ, Hu KQ. Hepatitis C virus (HCV) infection and hepatic steatosis[J]. Int J Med Sci, 2006, 3: 53-56.
- [3] Feinman SV, Berris B, Sinclair JC, et al. Inability to detect hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the duodenum of HBsAg-positive persons[J]. Dig Dis Sci, 1981, 26: 342-345.
- [4] Fujita Y, Ezura Y, Bujo H, et al. Association of nucleotide variations in the apolipoprotein B48 receptor gene (APOB48R) with hypercholesterolemia[J]. J Hum Genet, 2005, 50: 203-209.
- [5] Kawakami A, Tani M, Chiba T, et al. Pitavastatin inhibits remnant lipoprotein-induced macrophage foam cell formation through ApoB48 receptor-dependent mechanism[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25: 424-429.
- [6] Brown ML, Ramprasad MP, Umeda PK, et al. A macrophage receptor for apolipoprotein B48: cloning, expression, and atherosclerosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 7488-7493.

收稿日期: 2009-02-20

#### • 消息 •

### 《现代肝炎病毒分子生物学》第二版已经出版

■北京地坛医院副院长、内科传染病学专业博士生导师、生物化学与分子生物学专业博士生导师成军教授主编、全国63位专家参与编写的《现代肝炎病毒分子生物学》第二版已于2009年7月正式出版发行,科学出版社的编辑对本专著的内容有很高的评价。《现代肝炎病毒分子生物学》第二版全书约120万字,是在1997年第一版的基础上重新修订,增添了新的章节,体现了十余年来国内外在肝炎病毒分子生物学研究领域的最新进展,特别是成军教授课题组在过去十年间,在肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学研究领域的最新研究成果和独到见解。《现代肝炎病毒分子生物学》第二版的出版,必将进一步推动病毒性肝炎的研究和学术水平的进步。

地址:北京市朝阳区京顺东街8号

网址: [www.j-ditan.org.cn](http://www.j-ditan.org.cn)

Email: [editor.ditan@gmail.com](mailto:editor.ditan@gmail.com)

电话: 010-84322058

传真: 010-84322059