

丙型肝炎病毒核心区蛋白和细胞凋亡对 HepG₂ 细胞周期的影响

全 俊,胡国龄,范学工,谭德明

全俊,胡国龄,范学工,谭德明,中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008
项目负责人:全俊,410008,湖南省长沙市,中南大学湘雅医院传染科.
quan73jun@hotmail.com
电话:0731-4327221
收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-10-21

摘要

目的:研究丙型肝炎病毒核心区(HCV-C)蛋白和细胞凋亡对肝癌细胞 HepG₂ 细胞周期的影响.

方法:首先运用基因重组技术构建包含HCV-C基因的真核表达质粒pcDNA3.1,然后利用脂质体介导将重组真核表达质粒转染肝癌细胞 HepG₂,经 G418 筛选获得稳定转染 HepG₂ 细胞(HCV-C 转染 HepG₂ 细胞),经 RT-PCR 和间接免疫荧光法证实其中有 HCV-C 蛋白表达. 然后进行如下实验: (1)MTT 法检测 HCV-C 转染 HepG₂ 细胞、空白质粒转染 HepG₂ 细胞和未转染 HepG₂ 细胞生长增生率; (2)流式细胞术(FACS)检测三组细胞凋亡率和细胞周期,以及 HCV-C 转染 HepG₂ 细胞经 Fas 抗体诱导凋亡后的细胞周期变化.

结果: (1)HCV-C 转染 HepG₂ 细胞增生率显著高于空白质粒转染 HepG₂ 和未转染 HepG₂ 细胞增生率; (2)细胞未经 Fas 抗体诱导凋亡时, HCV-C 转染 HepG₂ 细胞 S 期所占百分率高于未转染 HepG₂ 细胞 S 期所占百分率, HCV-C 转染 HepG₂ 细胞凋亡率低于无 HCV-C 转染 HepG₂ 细胞凋亡率; HCV-C 转染 HepG₂ 细胞经 Fas 抗体诱导凋亡时, 细胞 S 期所占百分率低于未经诱导凋亡细胞 S 期所占百分率.

结论: (1)HCV-C 蛋白具有抑制 HepG₂ 细胞凋亡的作用; (2)HCV-C 蛋白促进 HepG₂ 细胞从 G_{0/1} 期进入 S 期,从而可能促进细胞生长增生,抑制细胞凋亡; Fas 抗体诱导细胞凋亡时细胞被阻滞于 G_{0/1} 期.

全俊,胡国龄,范学工,谭德明. 丙型肝炎病毒核心区蛋白和细胞凋亡对 HepG₂ 细胞周期的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(3):350-352

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/350.htm>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)感染是引起输血后肝炎的主要病原体,且 HCV 感染后大部分会导致感染慢性化,可引起慢性丙型肝炎、肝炎后肝硬化及肝细胞癌(HCC)等严重后果. 目前对丙型肝炎的发病机制尚不清楚,免疫损

伤可能是其主要致病机制,但 HCV 对肝细胞的直接作用也起着一定作用,其中包括 HCV 对肝细胞增生和细胞周期的影响^[1-3]. Kalkeri et al^[4,5]发现转染了 HCV 全基因的细胞增生受到抑制; Werling et al^[6]报道慢性丙型肝炎患者肝细胞增生率低于非 HCV 所致慢性肝炎的肝细胞增生率,说明 HCV 具有抑制肝细胞增生的能力. 丙型肝炎病毒核心区(HCV-C)蛋白对细胞增生和细胞周期的影响还不清楚. 部分认为 HCV-C 蛋白抑制细胞凋亡促进细胞增生^[7-9],部分认为 HCV-C 蛋白抑制细胞增生^[10]. 细胞周期分为 G_{0/1} 期、S 期和 G₂/M 期,细胞周期在不同时相的多个调控点上受到调控,其中以 G₁/S 和 G₂/M 期转换调控点最为重要^[11,12]. 细胞周期阻断与细胞凋亡关系不明确,细胞周期阻断并不是越完全越促使细胞凋亡^[13]. 本实验旨在研究 HCV-C 和细胞凋亡对细胞周期的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 DNA 纯化试剂盒(QIAGEN),培养基 DMEM,脂质体 Lipofectamine2000、抗生素 G418(GIBCO),RT-PCR 逆转录试剂盒(Promega),FITC 标记山羊抗人 IgG (武汉博士德),兔抗人 Fas 多克隆抗体(Santa Cruz). 含有 HCV-C, E1, E2 区的质粒 puc118 由本所谭德明教授构建并赠送;质粒 pcDNA3.1(+),大肠杆菌 JM109 及肝癌细胞系 HepG₂ 由我科保存;流式细胞仪(FACS420).

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物 根据 HCV1a 序列(AF009606)设计能扩增全长 HCV-C 的引物(分别在两端引入酶切位点 Hind 及 EcoR,并在下游设计终止密码),上游引物: ACAAGCTTCCCATGAGCACGAATCCTAAAC,下游引物 AGAATTCCTAGGCTGAAGCGGGCACAGTC,预计扩增片段长度为 594 bp.

1.2.2 构建包括目的基因 HCV-C 的重组真核表达质粒^[14,15]

首先以包括 HCV-C、E1 和 E2 区的重组质粒 Puc118 为模板进行 PCR 扩增目的片段 HCV-C,将纯化的 PCR 产物与 T 载体(3 000 bp)经 T₄ DNA 连接酶 4 连接过夜,经氨苄青霉素筛选阳性克隆,并经 Hind、EcoR

双酶切和 PCR 鉴定证实. 然后利用基因重组技术构建包括目的片段 HCV-C 的重组真核表达质粒 pcDNA3.1 (约 5 400 bp),经抗生素筛选,PCR 扩增、HindIII 和 EcoRI 双酶切以及重组质粒 DNA 序列测定证实重组真

核表达质粒中包含目的片段 HCV-C, 说明含有目的基因 HCV-C 的重组真核表达质粒构建成功。

1.2.3 重组真核表达质粒转染肝癌细胞 HepG₂ 提取的重组真核表达质粒及空白质粒 pcDNA3.1 经脂质体介导转染肝癌细胞 HepG₂, 经 G418 筛选获得稳定转染重组真核表达质粒的 HepG₂ 细胞(分别称为 HCV-C 转染 HepG₂ 和空白质粒转染 HepG₂)。

1.2.4 RT-PCR 和间接免疫荧光法检测 HCV-C 转染 HepG₂ 中 HCV-C 表达 按 Trizol RNA 提取试剂盒说明提取细胞 RNA, 行 RT-PCR 检测 HCV-C 转染 HepG₂ 细胞中有无 HCV-C mRNA 表达。将细胞置于放有盖玻片的 6 孔细胞培养板中培养 48 h 后, 细胞经冷丙酮固定 30 min, 滴加山羊血清室温孵育 20 min 封闭; 以丙型肝炎抗体阳性患者血清(1:8)作为一抗孵育 2 h, FITC 标记的山羊抗人 IgG(1:32)为二抗 37℃ 孵育 1 h, 然后经 PBS 漂洗 3 次 × 5 min; 于荧光显微镜下观察 HCV-C 转染 HepG₂ 细胞中有无 HCV-C 表达。

1.2.5 MTT 法检测 HCV-C 蛋白对 HepG₂ 细胞增生率的影响^[15] 分别接种 2×10^4 个 HCV-C 转染 HepG₂、空白质粒转染 HepG₂ 和未转染 HepG₂ 细胞于 96 孔细胞培养板中培养 48 h 后, 使用 MTT(四甲基偶氮唑蓝)法检测细胞生长率。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡情况 分别传代 2×10^5 个 HCV-C 转染 HepG₂、空白质粒转染 HepG₂ 和未转染 HepG₂ 细胞至 6 孔细胞培养板中培养 72 h, 细胞经胰酶消化后用冷 70 ml/L 乙醇固定细胞于 4℃ 保存。细胞经流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期情况。Fas 抗体诱导 HepG₂ 细胞凋亡: HCV-C 转染 HepG₂ 首先培养 48 h 后加入 Fas 抗体(200 ng/ml)后再培养 24 h^[16-20]。

统计学处理 利用 SPSS10.0 软件进行统计分析: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组之间进行比较采用方差分析, 当 $P < 0.05$ 时, 采用 LSD 法分别进行两两比较; 两组之间进行比较采用成组设计 t 检验, 并以 $P < 0.05$ 确定差异是否具有显著性。

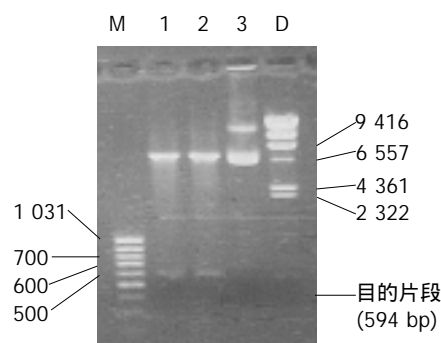
2 结果

2.1 重组真核表达质粒经 PCR 扩增可见 600 bp 左右的目的片段条带, HindIII 和 EcoRI 双酶切(图 1), DNA 序列测定说明包括 HCV-C 序列的重组真核表达质粒构建成功, 与 HCV1a 基因进行同源性比较符合率为 98.6%, 无移码突变。

2.2 经 RT-PCR 和间接免疫荧光法检测证实 HCV-C 转染 HepG₂ 细胞中有 HCV-C mRNA 和蛋白质表达, 而未转染 HepG₂ 细胞和空白质粒转染 HepG₂ 细胞中无 HCV-C 表达。

2.3 图 2 结果显示 HCV-C 转染 HepG₂ 细胞组生长增生率(0.32 ± 0.04)高于空白质粒转染 HepG₂ 组(0.26 ± 0.06)和未转染细胞组(0.26 ± 0.05)($P < 0.05$), 说明 HCV-C 蛋白促进 HepG₂ 细胞生长增生。

2.4 表 1 结果说明细胞未经 Fas 抗体诱导凋亡时, HCV-C 转染 HepG₂ 细胞凋亡率低于未转染 HepG₂ 细胞凋亡率, 同时 HCV-C 转染 HepG₂ 细胞 S 期所占百分率高于未转染细胞 HepG₂ 细胞 S 期所占百分率($P < 0.05$); 二组细胞之间 G_{0/1} 期所占百分率比较没有统计学差异($P > 0.05$), 但 HCV-C 转染 HepG₂ 细胞仍低于未转染 HepG₂ 细胞; 二组细胞之间 G₂/M 期所占百分率没有显著性差别($P > 0.05$)。以上结果说明 HCV-C 蛋白促进 HepG₂ 细胞从 G_{0/1} 期向 S 期转化, 而对 G₂/M 期没有影响。表 2 结果显示 HCV-C 转染 HepG₂ 细胞经 Fas 抗体(200 ng/ml)作用后凋亡率显著增加($P < 0.001$), 并且细胞凋亡增加时 S 期所占百分率少于未经 Fas 抗体诱导凋亡对照组 S 期所占百分率($P < 0.05$); G_{0/1} 期所占百分率与未经 Fas 抗体诱导凋亡对照组比较虽统计学上没有差异($P > 0.05$), 但经 Fas 抗体诱导凋亡组仍高于未经 Fas 抗体诱导凋亡组; 二组细胞之间 G₂/M 期所占百分率没有显著性差异($P > 0.05$)。说明 Fas 抗体诱导细胞凋亡时也是作用于 G₁/S 调控点, 使 HCV-C 转染 HepG₂ 细胞阻滞于 G_{0/1} 期, 而对 G₂/M 期没有影响。



泳道 M、D: DNA marker
泳道 1、2: 酶切后重组真核表达质粒
泳道 3: 未酶切重组真核表达质粒
图 1 重组真核表达质粒双酶切鉴定。

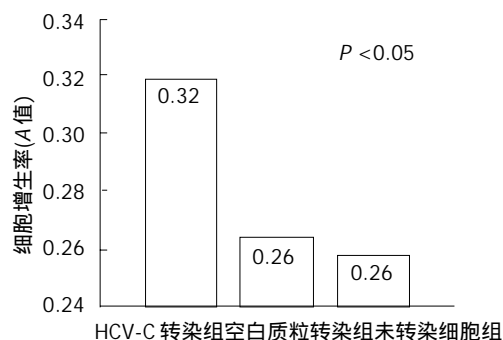


图 2 HCV-C 蛋白对细胞增生。

表 1 HCV-C 蛋白对 HepG₂ 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$, %)

细胞组别	n	G _{0/1} 期	S期	G ₂ /M期	细胞凋亡率
未转染细胞组	6	71.50±6.08	15.17±3.87	13.33±2.63	8.63±0.72
HCV-C 转染组	6	66.55±2.09 ^b	19.43±1.85 ^a	14.02±1.41 ^b	5.17±0.76 ^a

^a $P < 0.05$ vs 未转染细胞组; ^b $P > 0.05$ vs 未转染细胞组。

表2 细胞凋亡对 HCV-C 转染 HepG₂ 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

细胞组别	n	G _{0/1} 期	S 期	G ₂ /M 期	凋亡率
未诱导凋亡对照组	6	66.55±2.09 ^b	19.43±1.85 ^a	14.02±1.41 ^b	5.17±0.76 ^a
Fas 抗体诱导凋亡组	4	70.43±3.61	15.13±2.20	14.45±1.69	14.43±1.13

^aP < 0.05 vs Fas 抗体诱导凋亡组; ^bP > 0.05 vs 未转染细胞组。

3 讨论

目前公认 HCV-NS5 和 NS3 蛋白具有促进细胞增生、抑制细胞凋亡的功能^[21-24]；而 HCV-C 蛋白对细胞增生的影响还没有定论。细胞增生、死亡是受细胞周期调控的，细胞周期分为 G_{0/1} 期、S 期和 G₂/M 期，其中最关键的两期为 S 期和 M 期。不同生物细胞增生周期时间不同，主要是由 G₁ 期持续时间所决定的，而且 G₁ 启动是细胞周期启动的关键，因此 G₁/S 期的调控尤为重要。本实验结果表明 HCV-C 蛋白主要作用于 G₁/S 调控点，促进 HepG₂ 细胞由 G₁ 期进入 S 期，由此可能启动并加速细胞周期进程，促进细胞增生和抑制细胞凋亡。但 HCV-C 蛋白作用于 G₁/S 调控点的机制有待进一步研究。Cho et al^[8]发现 HCV-C 蛋白通过上调细胞中 cyclin E 促进细胞增生；Kwun et al^[22]发现 HCV-C 蛋白通过抑制 P21 促进细胞增生。当 HCV-C 转染 HepG₂ 细胞经 Fas 抗体诱导凋亡时 S 期百分率减少，细胞被阻滞于 G₁ 期。增生细胞对某些凋亡诱因的敏感性常依赖于细胞周期，本实验结果表明不管是 HCV-C 蛋白抑制细胞凋亡，还是由 Fas 抗体诱导细胞凋亡增加时都不是作用于 G₂/M 期。细胞周期阻断与细胞凋亡关系不明确，并不是细胞周期阻断越完全越促使细胞凋亡；细胞周期阻断并不直接诱导细胞凋亡，他可能是细胞凋亡的重要前提^[25]。细胞凋亡和增生分化是独立的两种方式，但细胞凋亡和增生分化可同时存在；细胞凋亡可发生在细胞周期不同时期。细胞凋亡与细胞增生并非一定成负相关，许多研究证明肿瘤组织含有激活的癌基因，但细胞却出现大量死亡；在慢性丙型肝炎患者肝细胞凋亡率和增生率可能同时升高，但存在增生/凋亡失衡^[26]。目前已知具有致凋亡作用的 C-myc 和腺病毒蛋白 E1A 都是细胞增生的诱导物。

4 参考文献

- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatopogy* 1997;26:62S-65S
- 陶小红,任红,沈鼎明,张小实,张大志,叶珈,古柏燕. 乙型肝炎病毒 X 蛋白对细胞周期的影响. *中华医学杂志* 1999;79:613-615
- 刘为纹. 肝细胞性肝癌病因学研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:93-95
- Kalkeri G, Khalap N, Akhter S, Garry RF, Fermin CD, Dash S.

- Hepatitis C viral proteins affect cell viability and membrane permeability. *Exp Mol Pathol* 2001;71:194-208
- Kalkeri G, Khalap N, Garry RF, Fermin CD, Dash S. Hepatitis C virus protein expression induces apoptosis in HepG2 cells. *Virology* 2001;282:26-37
- Werling K, Szentirmay Z, Szepesi A, Schaff Z, Szalay F, Szabo Z, Telegdy L, David K, Stotz G, Tulassay Z. Hepatocyte proliferation and cell cycle phase fractions in chronic viral hepatitis C by image analysis method. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:489-493
- Ray RB, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein promotes immortalization of primary human hepatocytes. *Virology* 2000;271:197-204
- Cho JW, Baek WK, Suh SI, Yang SH, Chang J, Sung YC. Hepatitis C virus core protein promotes cell proliferation through the upregulation of cyclin E expression levels. *Liver* 2001;21:137-142
- 刘重阳,刘为纹,陈东风,杨建民,房殿春. 丙型肝炎病毒核心蛋白对细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2001;9:1125-1128
- Kittleson DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000;106:1239-1249
- 郭德玉,陈意生. 细胞周期调控与细胞癌变. *国外医学. 生理病理科学与临床* 1997;17:1-4
- 卢斌,戴益民. 肝癌发生中细胞周期调控的异常. *世界华人消化杂志* 2001;9:205-208
- 周明华,陈思颖,李美芳,吴玺印. 细胞周期与细胞凋亡. *生理科学进展* 1996;27:319-322
- 刘重阳,刘为纹,杨建民,鲁荣,罗元辉. HCV 核心基因 cDNA 真核表达载体的构建及其表达. *世界华人消化杂志* 2000;8:1049-1050
- 全俊,胡国岭,范学工,刘双虎,谭德明. 丙型肝炎病毒核心区蛋白在 HepG2 细胞中的表达. *中国现代医学杂志* 2002;12:34-35
- 邹世洁,崔巍,张宇鹏,樊雅莉,李玉梅,王肃. 大黄酒对胃黏膜上皮细胞生长增生和凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2001;9:447-448
- Taya N, Torimoto Y, Shindo M, Hirai K, Hasebe C, Kohgo Y. Fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis C. *Br J Haematol* 2000;110:89-97
- Zhang XD, Nguyen T, Thomas WD, Sanders JE, Hersey P. Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types. *FEBS Lett* 2000;482:193-199
- 邵润轩,王江滨,王宵伟. 凋亡相关因子 Fas/FasL 在慢性肝炎原发性肝癌表达的规律. *世界华人消化杂志* 2000;8:937-939
- 梁云,陆斌,崔贞福,李晓冬,郭亚军,刘彦君. 肝细胞癌中 Fas/FasL 表达的意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:1364-1368
- Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80:1179-1183
- Kwun HJ, Jung EY, Ahn JY, Lee MN, Jang KL. p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol* 2001;82:2235-2241
- Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural Protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 1995;69:3893-3896
- Gale M Jr, Kwieciszewski B, Dossett M, Nakao H, Katze MG. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol* 1999;73:6506-6516
- 彭玮丹,张杰,曹云新,惠宏襄,金明,王成济. 紫杉醇诱导食管癌细胞的细胞周期阻断与细胞凋亡. *中国药理学通报* 1998;14:402-405
- Farinati F, Cardin R, Fiorentino M, D'errico A, Grigioni W, Cecchetto A, Naccarato R. Imbalance between cytoproliferation and apoptosis in hepatitis C virus related chronic liver disease. *J Viral Hepat* 2001; 8: 34-40