

应用表达谱芯片技术研究 NS5ATP13 的反式调节基因

张黎颖, 邓红, 成军, 党晓燕, 刘妍, 蔺淑梅, 黄燕萍, 纪冬, 吴顺华, 纪泛扑, 邵清

张黎颖, 邓红, 党晓燕, 纪泛扑, 西安交通大学第二医院感染科
陕西省西安市 710004
成军, 刘妍, 蔺淑梅, 黄燕萍, 纪冬, 吴顺华, 邵清, 中国人民解放军第
302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重
点实验室 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 北京市中国人民解
放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心 cj@genetherapy.com.cn
电话 010-66933392 传真 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片研究 HCV 非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 NS5ATP13 的反式调节基因。

方法: 构建 NS5ATP13 基因的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5ATP13, 应用基因表达谱芯片技术对 pcDNA3.1(-)-NS5ATP13 转染的人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞和转染空载体的相同细胞的差异表达 mRNA 进行检测和分析。

结果: HepG2 细胞经转染 NS5ATP13 后, 有 86 条差异基因表达, 其中 46 条基因表达增强, 40 条基因表达降低。这些差异表达的基因与细胞的增生、分化及细胞的信号转导、代谢、凋亡密切相关。

结论: 应用基因表达谱芯片成功筛选了 NS5ATP13 的反式调节基因, 为进一步阐明 NS5ATP13 的反式激活作用及免疫调节机制提供了新的依据。

张黎颖, 邓红, 成军, 党晓燕, 刘妍, 蔺淑梅, 黄燕萍, 纪冬, 吴顺华, 纪泛扑, 邵清.
应用表达谱芯片技术研究 NS5ATP13 的反式调节基因. 世界华人消化杂志
2004, 12(11) 2757-2761
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2757.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)属于黄病毒属, 是含外膜蛋白的单股正链RNA病毒。在大多数感染人群中丙型肝炎病毒表现为持续性感染, 并可导致慢性肝炎、肝硬化, 或肝细胞癌, 而且与肝脏脂肪变、糖代谢紊乱有关^[1-10]。其基因组含有单一的开放读码框架, 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基(aa)的多肽前体, 两侧是 5' - 非翻译区及 3' - 非翻译区。因为 HCV 的基因复制形式没有经过 DNA 阶段, 不存在 HCV 基因组与肝细胞基因组 DNA 的整合, 所以, HCV 主要是通过基因组编码蛋白和肝细胞蛋白之间的相互作用及肝细胞蛋白与 HCV 调节基因的相互作用造成对肝细胞的损伤。其多肽前体至少被加工为十种结构蛋白和非结构蛋白, 其中非结构蛋白

NS5A 基因(位于 6 258-7 601 nt 之间)编码的 56 ku 的 NS5A 蛋白(448 aa)具有多种生物学功能, 在 HCV 多蛋白的成熟和 RNA 的复制过程中具有十分重要的作用^[11-14]。研究报道, NS5A 上存在干扰素 α 敏感决定区(ISDR), 与干扰素治疗的敏感性相关^[15-16]。此外, NS5A 还是一种作用很强的基因转录激活因子^[17-21], 调控着细胞内许多病毒及细胞基因的转录, 与感染 HCV 的细胞发生恶性转化过程有关, 我室已证明他可以反式激活 SV40 早期启动子 / 增强子^[21], 并应用抑制性消杂交技术 (SSH)对 NS5A 的反式调节基因进行了初步的研究^[22]。NS5ATP13 是我室利用 SSH 从分别转染真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A 和 pcDNA3.1(-)空载体的 HepG2 细胞中筛选出来的, 经过 PCR 扩增, TA 克隆, 测序鉴定证实, 已在 GenBank 上注册成功, 注册号为 AY820769。NS5ATP13 基因的编码序列全长为 2 103 个核苷酸(nt), 编码产物由 700 aa 组成。本研究为了进一步阐明 HCV 的致病机制, 应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)^[23-24]。对于 HCV 的 NS5A TP13 反式调节的靶基因成功地进行了筛选, 为今后更加广泛深入地研究 HCVNS5A 在 HCV 的致病机制中的作用及新基因 NS5ATP13 的生物学功能提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞由本室保存, 细胞培养相关试剂及总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Gibco 公司, FuGENE 购自 Roche 公司, NS5ATP13 真核表达质粒由本室构建。表达谱芯片由上海联合基因有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和取材 在 35 mm 培养皿中常规培养 HepG2 细胞, 细胞生长至对数期时, 以脂质体转染试剂 FuGENE 分别将 2 μ g pcDNA3.1(-)-NS5ATP13 和空载体 pcDNA3.1(-)转染 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞, 每 5 \times 10⁶ 个细胞加入 1 mL Trizol 试剂, 立即于液氮中保存。

1.2.2 总 RNA 提取 使用 Trizol 试剂一步法提取 NS5ATP13 表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5A TP13 和空载体 pcDNA3.1(-)转染的 HepG2 细胞总 RNA(分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度 A 值, 并行热稳定实验, 于 -20 $^{\circ}$ C 和 70 $^{\circ}$ C 保温 1 h 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 28 S、18 S 条带变化。

1.2.3 探针标记 参照 Chena *et al*^[25]方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化。Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5 μ g),

Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5 μ g). 乙醇沉淀后溶解在 20 μ L 5 × SSC+2 g/L SDS 杂交液中.

1.2.4 芯片制备 芯片包含的 1 152 个 cDNA, 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因、抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000–3 000 bp. 靶基因以 0.5 g/L 溶解于 3 × SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min), 紫外线交联, 再分别用 2 g/L SDS、双蒸水及 2 g/L 硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

1.2.5 预杂交 将预杂交液放入 95 °C 水浴锅内变性 2 min, 将待预杂交的芯片放入 95 °C 水浴锅内变性 30 s, 芯片取出后即放入无水乙醇中 30 s, 晾干. 将已变性的预杂交液加到芯片的点样区域内, 盖上盖玻片, 放入杂交箱内 42 °C 预杂交 5–6 h.

1.2.6 杂交及洗涤 将探针置于 95 °C 水浴中变性 2 min; 芯片置于 95 °C 水浴中变性 30 s, 芯片取出浸于无水乙醇 30 s, 探针取出后迅速置于冰上. 将探针置于芯片上, 用盖玻片覆盖, 置于杂交舱中, 用 Parafilm 密封, 放入 42 °C 杂交箱内杂交过夜(16–18 h). 依次以 2 × SSC+2 g/L SDS、1 : 1 000 SSC +2 g/L SDS、1 : 1 000 SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

1.2.7 扫描与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)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. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.5, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.4, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 总 RNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度 A_{260}/A_{280} >2.01, 热稳定实验 70 °C 保温 1 h 与 -20 °C 1 h 的电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA.

2.2 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA. 为了监控芯片杂交体系, 在芯片上设置了阴性对照(8 条水稻基因, 共 8 个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记 Cy5 荧光素(呈红色), 对照组探针标记 Cy3 荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从 1 000 个基因中筛选出差异表达基因共 86 条, 占 8.6%, 其中 46 条基因表达增强, 40 条基因表达降低.

2.3 差异表达基因分析 部分表达增强的基因(表 1). 部分表达降低的基因(表 2).

表 1 部分表达显著增加的基因

编号	Cy5/ Cy3	编码蛋白
1	2.512	酪蛋白激酶 1a1 (CSNK1A1)
2	2.516	RNA 结合基序蛋白 6 (RBM6)
3	2.526	磷脂酶 B1 (LYPLA1)
4	2.568	细胞骨架相关蛋白
5	2.579	神经紧张肽(NTS)
6	2.579	翻译抑制蛋白 p14.5 (UK114)
7	2.602	转化生长因子 β II 受体 α
8	2.612	氯离子通道 /p53 调节器官氯离子通道蛋白 4 (CLIC4)
9	2.618	RB 结合蛋白
10	2.618	低密度脂蛋白相关蛋白 2 (LRP2)
11	2.620	黑素瘤缺乏因子 2 (AIM2)
12	2.636	乳酸脱氢酶 B
13	2.656	泛素特异性蛋白酶 11 (USP1)
14	2.657	肿瘤高表达因子(HEC)富含亮氨酸重复序列
15	2.689	调节因子 X2, 影响人类组织相容性抗原 II 表达
16	2.708	cAMP 依赖性蛋白激酶催化亚单位 β (PRKACB)
17	2.770	选择素 2 (CUL2)
18	2.789	鲨烯环氧化酶(SQLE), mRNA
19	2.793	Ran 结合蛋白 2 (RanBP2alpha)
20	2.821	凋亡蛋白 1 抑制因子 (MIHC)
21	2.870	DnaJ 类热休克蛋白 40(HLJ1)
22	2.904	低电压依赖性钙离子通道 α 1 亚单位
23	2.918	alkB 分子类似物
24	2.954	转录因子 7 (TCF7)
25	2.965	甾醇 C5 脱氢酶(SC5DL), mRNA
26	2.979	亚铁螯合酶
27	3.021	嗜乳脂蛋白亚家族 2 成员 A2(BTN2A2)
28	3.087	钾离子电压门控通道 KQT 样亚家族成员 3
29	3.110	脆性 X 精神迟滞蛋白 1(FMR1)
30	3.119	FYN 结合蛋白(FYB-120/130)
31	3.323	包含 WD 重复序列的 SOCS 盒
32	3.457	细胞分裂周期蛋白 23 (CDC23)
33	3.755	造血细胞特异性 Lyn 底物 1 (HCLS1)
34	4.025	γ 氨基丁酸 α 受体 γ 2
35	4.053	FK506 结合相关蛋白(FAP48)转录子
36	5.609	cAMP- 依赖性蛋白激酶调节亚单位 II β (PRKAR2B)

表2 部分表达显著降低的基因

编号	Cy5/ Cy3	编码蛋白
1	0.243	核糖体蛋白 L32 (RPL32)
2	0.253	突触素样蛋白(SYPL), mRNA
3	0.274	基质金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP1)
5	0.280	层粘连蛋白 β 2 (LAMB2)
6	0.282	谷胱甘肽过氧化物酶 1 (GPX1)
7	0.282	BRCA2 和 CDKN1A 相互作用蛋白(BCCIP)转录本 C
8	0.316	转化生长因子 β 1 (TGFB1)
9	0.322	热休克蛋白 70(HSPA9B)
10	0.338	小 RNA 活化复合物, 多肽 1
11	0.352	微管相关蛋白, RP/EB 家族成员 2(MAPRE2)
12	0.354	CD79A 结合蛋白 1 (IGBP1),
13	0.355	乙酰辅酶 A 氧化酶 1 样蛋白
14	0.357	蛋白磷酸激酶 1 催化亚单位 α 型
15	0.359	核仁蛋白
16	0.364	蜡样脂质褐素
17	0.364	钙调素结合蛋白 1 (CALD1)
18	0.369	金属硫蛋白 3(MT3)
19	0.369	假想 IL-16 蛋白前体
20	0.370	肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合物亚单位 3 (ARPC3)
21	0.374	层粘连蛋白 B 受体
22	0.374	有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 2(MAP3K2)
23	0.377	环指蛋白和肿瘤坏死因子受体相关蛋白
24	0.383	肿瘤坏死因子受体相关蛋白 2 (TRAF2)
25	0.384	ADP 核糖基转移酶样 1 (ADPRTL1)
26	0.390	谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)
27	0.391	鸟苷酸环化酶 1 α 3 (GUCY1A3)
28	0.392	有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 3 (MAP4K3)
29	0.393	亮氨酸拉链
30	0.394	富含半胱氨酸血管生成诱导因子 (CYR61)
31	0.397	核糖体蛋白 S10
32	0.400	钙联接蛋白(CANX)

3 讨论

丙型肝炎病毒(HCV)感染与肝纤维化及肝细胞癌(HCC)的发生密切相关, 其中病毒基因编码的非结构蛋白 NS5A 起着重要的作用. HCV NS5A 位于 HCV 多蛋白的羧基末端, 是丝氨酸磷酸化蛋白质, 依磷酸化程度的不同而产生两种不同分子量大小的多肽 p56 和 p58. NS5A 是转录反式激活因子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核细胞转录因子特有的结构特征. 研究发现^[26]NS5A 蛋白通过双链 RNA- 活化蛋白激酶结合域与病毒复制、干扰素抵抗、细胞生长的限制有一定关系, 但是对结合域在疾病发展过程中的作用的认识是很有限的, 有待于进一步研究. 具有易变性特质的 NS5A 在感染 HCV 的自然病程中维持稳定, 表明其可能在病毒的生活周期中扮演中心角色. 一般来说, 转录的反式

激活因子是在细胞核中起作用的, 而 NS5A 定位于细胞内质网, 因此推测 NS5A 可能参与了细胞信号传导途径. NS5A 能够反式激活核转录因子 NF- κ B 及 STAT3, 在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用^[27]. Ghosh *et al*^[28]研究发现, NS5A 蛋白能够抑制细胞周期调节基因 p21WAF1, 激活人肝癌细胞中增生细胞核抗原(PCNA)基因, 从而调节细胞凋亡, 促进细胞增生. NS5A cDNA能够使转染的小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 具有转化特性, 且转化细胞移植入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶, 这一证据直接证明了 HCV NS5A 蛋白的恶性转化潜能.

NS5ATP13是我室利用 SSH 从分别转染真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A 和 pcDNA3.1(-)空载体的 HepG2 细胞中筛选出来的 NS5A 上调的未知功能蛋白基因, 我们应用基因表达谱芯片技术筛选 NS5ATP13 反式调节基因, 发现 NS5ATP13 可显著影响 HepG2 细胞基因表达谱, 得到 86 条显著差异表达基因, 包括已知和未知功能基因, 分别与细胞生长、分化、凋亡等相关.

结果表明 NS5ATP13 可上调 Ran 结合蛋白 2(RanBP2)、凋亡蛋白 1 抑制因子(IAP-1, MIHC, cIAP2)、细胞分裂周期蛋白 23(CDC23)等. RanBP2 作为核孔复合物的组成成分, 在细胞核内外的物质转运中发挥着重要的作用, Forler *et al*^[29]敲除果蝇细胞中的 RanBP2, 发现细胞增生和 mRNA 向核外转运均受到抑制. Gordon *et al*^[30]研究发现 IAP-1 在恶性胸膜间皮瘤细胞中高表达. Lee *et al*^[31]研究发现 CDC23 通过聚集 Dfp1-Hsk1 激酶及刺激小染色体维护蛋白的磷酸化参与复制前体复合物的活化过程. NS5ATP13 可能通过上调这些凋亡相关因子抑制细胞凋亡, 从而引起肿瘤的发生. cAMP 依赖性蛋白激酶(PKA)可作用于多种与糖脂代谢有关的酶类、一些离子通道和某些转导因子, 使他们发生磷酸化而改变其活性状态. 垂体腺苷酸环化酶激活肽被 PKA 激活后, 可引起细胞膜的持续去极化, 发挥抗凋亡的效应, 其中, 钾离子通道的活化在程序性细胞死亡中扮演了重要的角色^[32]. NS5ATP13 通过上调 PKA 和钾离子电压门控通道 KQT 样亚家族成员 3, 也可能是抑制凋亡发生的机制之一. 同时, 渗透压应激、炎症细胞因子、脂多糖(LPS)、紫外线、生长因子等细胞应激可以激活 p38 MAPK 信号转导途径, 而有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 2(MAP3K2)通过 p38 MAPK 信号转导途径可激活胱冬肽酶 -3, 诱导细胞凋亡^[33]. MAP3K 还可磷酸化 IKK (I κ B kinase). IKK 是一种丝/苏氨酸蛋白酶, 活化后可以磷酸化 I κ B, 进而释放出活化的 NF- κ B, 使其进入细胞核内发挥转录因子的功能^[34]. NS5ATP13 下调多种诱导细胞凋亡的信号分子, 可能在肝细胞癌的发生机制中起到一定的作用.

基质金属蛋白酶抑制剂 1(TIMPI)作为胶原酶抑制剂, 抑制 I 型, II 型, III 型胶原分解, 在肝纤维化的发生发展过程中起到重要作用^[35]. 转化生长因子 β 1

(TGF β 1)可诱导黏附分子CD44, CD49b, CD49, CD51, CD54和CD61以及细胞外基质成分纤维连接蛋白, 层粘连蛋白和IV型胶原的表达^[36]. NS5ATP13通过下调TIMP1、TGF β 1、层粘连蛋白 β 2 (LAM β 2)是否可以抑制肝纤维化的发生和发展, 其作为感染HCV的机体保护机制有待于进一步研究. NS5ATP13除了与已知蛋白基因相互作用外, 尚可作用于一些未知功能基因, 例如可下调假想蛋白AF038182, 其生物学功能以及该假想基因的结构和功能有待于进一步研究.

总之, 利用基因芯片高通量多角度系统地进行基因特征分析, 为我们从一个全新的视角认识靶基因NS5ATP13和HCV非结构蛋白NS5A的分子生物学功能、HCV的致病机制和肝纤维化及肝癌的发病机制打下了重要基础.

4 参考文献

- Zandman-Goddard G, Levy Y, Weiss P, Shoenfeld Y, Langevitz P. Transverse myelitis associated with chronic hepatitis C. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:111-113
- Moriguchi H, Kobayashi M, Chung RT, Sato C. Optimal IFN therapy for 40-year-old patients with severe HCV-1b infection. *Gastroenterology* 2003;124:1166-1167
- Chowdhury A, Santra A, Chaudhuri S, Dhali GK, Chaudhuri S, Maity SG, Naik TN, Bhattacharya SK, Mazumder DN. Hepatitis C virus infection in the general population: A community-based study in west bengal, India. *Hepatology* 2003;37:802-809
- Ioannou GN, Dominitz JA, Weiss NS, Heagerty PJ, Kowdley KV. Racial differences in the relationship between hepatitis C infection and iron stores. *Hepatology* 2003;37:795-801
- Ryu KJ, Kim JH, Lee SW. Ribozyme-mediated selective induction of new gene activity in hepatitis C virus internal ribosome entry site-expressing cells by targeted trans-splicing. *Mol Ther* 2003;7:386-395
- Kasuno K, Ono T, Matsumori A, Nogaki F, Kusano H, Watanabe H, Yodoi J, Muso E. Hepatitis C virus-associated tubulointerstitial injury. *Am J Kidney Dis* 2003;41:767-775
- Chen S, Wang Y. Genetic variation characteristics of the envelope region of hepatitis C virus in the patients with chronic hepatitis. *Zhonghua Shiyao He Linchuang Bingdixue Zazhi* 2002;16:219-222
- Hui CK, Belaye T, Montegrande K, Wright TL. A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepatol* 2003;38:511-517
- Fang CT, Tobler LH, Haesche C, Busch MP, Phelps B, Lepar G. Fluctuation of HCV viral load before seroconversion in a healthy volunteer blood donor. *Transfusion* 2003;43:541-544
- Sunagawa H, Takayama H, Yamashiro T, Sasaki H, Sashida Y, Matsuura K, Kayou M. Hepatocellular carcinoma in a patient with primary biliary cirrhosis and seronegativity for markers of hepatitis B virus and hepatitis C virus: report of a case. *Surg Today* 2003;33:219-223
- Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, Zeuzem S. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999;30:1004-1013
- Zech B, Kurtenbach A, Krieger N, Strand D, Blencke S, Morbitzer M, Salassidis K, Cotten M, Wissing J, Obert S, Bartenschlager R, Herget T, Daub H. Identification and characterization of amphiphysin II as a novel cellular interaction partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Gen Virol* 2003;84:555-560
- Georgopoulou U, Caravokiri K, Mavromara P. Suppression of the ERK1/2 signaling pathway from HCV NS5A protein expressed by herpes simplex recombinant viruses. *Arch Virol* 2003;148:237-251
- Qadri I, Iwahashi M, Simon F. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and 53 interactions with TBP and ERCC3. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:193-204
- Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J Virol* 2002;76:11079-11090
- Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
- Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chr via J, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000;275:7184-7188
- 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变的机制及其意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:999-1003
- Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997;71:8856-8859
- Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 刘妍, 段惠娟, 成军, 王建军, 陆荫英, 牟劲松, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活SV40病毒启动子的研究. *军医进修学院学报* 2003;28:40-42
- 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因的克隆化研究. *解放军医学杂志* 2003;28:40-43
- Jain KK. Current trends in molecular diagnostics. *Med Device Technol* 2002;13:14-18
- Ruano JM, Glidle A, Cleary A, Walmsley A, Aitchison JS, Cooper JM. Design and fabrication of a silica on silicon integrated optical biochip as a fluorescence microarray platform. *Biosens Bioelectron* 2003;18:175-184
- Chena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470
- Franco S, Gimenez-Barcons M, Puig-Basagoiti F, Furcic I, Sanchez-Tapias JM, Rodes J, Saiz JC. Characterization and evolution of NS5A quasispecies of hepatitis C virus genotype 1b in patients with different stages of liver disease. *J Med Virol* 2003;71:195-204
- Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- 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
- Forler D, Rabut G, Ciccarelli FD, Herold A, Kocher T, Niggeweg R, Bork P, Ellenberg J, Izaurralde E. RanBP2/Nup358 provides a major binding site for NXF1-p15 dimers at the nuclear pore complex and functions in nuclear mRNA export. *Mol Cell Biol* 2004;24:1155-1167
- Gordon GJ, Appasani K, Parcells JP, Mukhopadhyay NK, Jaklitsch MT, Richards WG, Sugarbaker DJ, Bueno R. Inhibitor of apoptosis protein-1 promotes tumor cell survival in mesothelioma. *Carcinogenesis* 2002;23:1017-1024
- Lee JK, Seo YS, Hurwitz J. The Cdc23 (Mcm10) protein is required for the phosphorylation of minichromosome maintenance complex by the Dfp1-Hsk1 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2334-2339
- Mei YA, Vaudry D, Basille M, Castel H, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. PACAP inhibits delayed rectifier potassium current via a cAMP/PKA transduction pathway: evidence for the involvement of I_k in the anti-apoptotic action of PACAP. *Eur J Neurosci* 2004;19:1446-1458

- 33 Pearl-Yafe M, Halperin D, Scheuerman O, Fabian I. The p38 pathway partially mediates caspase-3 activation induced by reactive oxygen species in Fanconi anemia C cells. *Biochem Pharmacol* 2004;67:539-546
- 34 Schmidt C, Peng B, Li Z, Sclabas GM, Fujioka S, Niu J, Schmidt-Supprian M, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ. Mechanisms of proinflammatory cytokine-induced biphasic NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2003;12:1287-1300
- 35 Hsu YC, Chiu YT, Lee CY, Lin YL, Huang YT. Increases in fibrosis-related gene transcripts in livers of dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci* 2004;11:408-417
- 36 Schierano G, Bellone G, Manzella C, Preti G, Emanuelli G. In vitro effect of transforming growth factor-beta on adhesion molecule expression by human gingival fibroblasts cultured in the presence of a titanium abutment. *J Periodontol* 2001;72:1658-1665

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

温郁金对胃癌细胞的抑制作用及其对 IGF- I、IGF- II 表达的影响

何必立, 吕 宾, 徐 毅, 苗 青, 范一宏

何必立, 浙江省台州医院消化科 浙江省临海市 317000
吕宾, 徐毅, 苗青, 范一宏, 浙江省中医院消化科 浙江省杭州市 310006
项目负责人: 吕宾, 310006, 浙江省杭州市, 浙江省中医院消化科
lvbin@medmail.com.cn
电话: 0571-87032028 传真: 0571-87077785
收稿日期 2004-08-30 接受日期: 2004-09-25

摘要

目的: 探讨温郁金对人胃癌细胞SGC-7901的抑制作用及其作用机制。

方法: 采用超临界二氧化碳萃取法提取温郁金挥发油成分。以氟尿嘧啶(5-Fu)为阳性对照药物, 采用MTT法, 测定温郁金提取物对体外培养胃癌细胞SGC-7901增生的影响; 应用放射免疫测定法分析温郁金提取物对细胞培养液中IGF- I、IGF- II 浓度水平的影响。

结果: 超临界二氧化碳萃取法提取温郁金获得温郁金提取物1和提取物2。温郁金提取物1、提取物2对胃癌细胞的生长有显著的抑制作用(均 $P < 0.01$), 且抑制率随药物浓度的升高而增高, 存在明显的量效关系。200 mg/L浓度的温郁金提取物1和提取物2对胃癌细胞生长的抑制率分别为64.44%、60.80%, 在这个浓度水平, 其抑制肿瘤细胞生长作用与阳性对照药物5-Fu效果相当。温郁金提取物1、提取物2能降低胃癌细胞培养液中IGF- I、IGF- II 的浓度水平(均 $P < 0.05$)。

结论: 温郁金提取物对人胃癌细胞SGC-7901生长有抑制作用, 其抑癌作用的机制可能与抑制胃癌细胞分泌IGF- I、IGF- II 有关。

何必立, 吕宾, 徐毅, 苗青, 范一宏. 温郁金对胃癌细胞的抑制作用及其对IGF- I、IGF- II 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2761-2763
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2761.asp>

0 引言

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)同肿瘤的关系近年来受到了广泛的关注^[1]。温郁金具有行气破血、消积止痛等作用, 是抗肿瘤复方中常见的药物, 前期在其抗肿瘤作用方面已有报道^[2], 但有关其对胰岛素样生长因子的影响研究鲜见。我们研究温郁金提取物对体外培养的胃癌细胞株SGC-7901的抑制作用, 并从其对胰岛素样生长因子 I (IGF- I)、胰岛素样生长因子 II (IGF- II)分泌的影响来分析其作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 胃腺癌细胞(SGC-7901)株(购自中科院上海细胞所), RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司, 噻唑蓝(MTT)、胰蛋白酶为上海生物工程公司产品, 氟尿嘧啶(5-Fu)为上海旭东海普药业有限公司产品, IGF- I 放免试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司, IGF- II 放免试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所, 二甲基亚砜为浙江杭州双林化工试剂厂产品, 温郁金购自浙江省中医院中药房, HA121-50-01型超临界萃取装置为江苏南通华安超临界实业公司产品, CO₂ 细胞培养箱为美国 Thermo Forma 公司产品, ELX800 酶标仪为美国 Bio-Tek 公司生产, SN-682 放射免疫γ计数器由中科院上海原子核研究所日环仪器厂生产。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SGC-7901 细胞常规培养于含 100 mL/L 灭活胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 置 37 °C、50 mL/L 的 CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养。