

丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白反式调节基因 2 不同剪切体调节靶基因的比较

成军, 杨倩, 刘妍, 王建军, 纪冬

成军, 杨倩, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
刘妍, 王建军, 纪冬, 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 北京市 100039
成军, 男, 1963-08-17 生, 山东省淄博市人, 汉族. 1994 年北京医科大学传染病学博士, 1994-11-17/1997-12-01 在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究. 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制, 出版专著 5 部, 发表论文 600 篇. 现任中华医学会传染病与寄生虫病学分会副主任委员、《World J Gastroenterol》编委等.
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C30070689, No. C30371288
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、五科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100011, 北京东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京地坛医院传染病研究所. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

Comparison of target genes transactivated by different spliced transcripts of human NS5ATP2

Jun Cheng, Qian Yang, Yan Liu, Jian-Jun Wang, Dong Ji

Jun Cheng, Qian Yang, Institute of Infectious Diseases, Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Yan Liu, Jian-Jun Wang, Dong Ji, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of Chinese PLA, No. 98H038
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Institute of Infectious Diseases, Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Street, Beijing 100011, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2004-05-28 Accepted: 2004-09-30

Abstract

AIM: To identify and analyze target genes regulated by different spliced transcripts of human NS5ATP2 by microarray technique.

METHODS: The coding sequences for the two differently spliced transcripts of human NS5ATP2, NS5ATP2 (615) and NS5ATP2 (216), were cloned into eukaryotic expression vector pcDNA3.1 to yield pcDNA3.1-NS5ATP2 (615) and pcDNA3.1-NS5ATP2 (216) constructs, which were then transfected into HepG2 cells. The differentially expressed genes in the cells transfected with the two differently spliced variants were analyzed and compared by DNA microarray.

RESULTS: Forty-three genes were up-regulated by both NS5ATP2 (615) and NS5ATP2 (216), and 13 genes were down-regulated by both NS5ATP2 (615) and NS5ATP2 (216). Meanwhile, 3 genes were found to be up-regulated by NS5ATP2 (615), but down-regulated by NS5ATP2 (216). No genes were down-regulated by NS5ATP2 (615) while up-regulated by NS5ATP2 (216). Many genes were trans-regulated by NS5ATP2 (615) or NS5ATP2 (216) independently.

CONCLUSION: Different spliced transcripts of human NS5ATP2 may commonly or independently regulate target genes. They even exhibit opposite regulatory effects upon some target genes.

Key Words: Hepatitis B virus; DNA microarray; NS5ATP2

Cheng J, Yang Q, Liu Y, Wang JJ, Ji D. Comparison of target genes transactivated by different spliced transcripts of human NS5ATP2. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;13(2):198-201

摘要

目的: 利用基因表达谱芯片技术筛选、比较丙型肝炎病毒 NS5A 反式调节基因 2 不同剪切体对 HepG2 细胞基因表达的调控作用及差异性.

方法: 利用分子生物学技术和生物信息技术相结合, 克隆人 NS5ATP2 的不同剪切体蛋白的编码基因, 常规分子生物学技术构建相应的真核细胞表达载体 pcDNA3.1-NS5ATP2(615) 和 pcDNA3.1-NS5ATP2(216). 脂质体技术转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2. 利用基因表达谱芯片技术筛选转染细胞的差异表达 cDNA 的类型.

结果: 对于 2 个基因剪切体转染细胞系差异表达基因谱的分析, NS5ATP2(615) 和 NS5ATP2(216) 共同上调的基因 43 条; NS5ATP2(615) 和 NS5ATP2(216) 共同下调的基因 13 条; NS5ATP2(615) 上调, 而 NS5ATP2(216) 下调的基因类型 3 条; 未发现 NS5ATP2(615) 下调; NS5ATP2(216) 上调的基因类型; 还有一些靶基因, 或只受到 NS5ATP2(615) 的调节, 或只受到 NS5ATP2(216) 的调节.

结论: 不同剪切体的作用之间有共同的靶基因, 也有不同的靶基因, 甚至对于同一基因有相反的调节功能.

关键词: 丙型肝炎病毒; 基因芯片; NS5ATP2

成军, 杨倩, 刘妍, 王建军, 纪冬. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白反式调节基因 2 不同剪切体调节靶基因的比较. 世界华人消化杂志 2005;13(2):198-201
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/198.asp

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)感染后表达的病毒结构和非结构蛋白抗原, 对于肝细胞的基因表达谱产生重要影响, 这种异常的调节是慢性丙型肝炎、肝纤维化、肝细胞癌发生、发展的重要的分子生物学机制^[1]. HCV 结构和非结构蛋白通过直接或间接的机制, 对于肝细胞的基因表达调控产生影响, 造成肝细胞基因表达谱发生改变^[2]. 我们发现HCV结构和非结构蛋白具有广泛的反式调节作用^[3]. 其中包括一种未知功能基因, 命名为 NS5ATP2. 在 NS5ATP2 的 cDNA 克隆化的聚合酶链反应(PCR)扩增中, 发现了 NS5ATP2 基因长度为 615 nt 和 216 nt 的不同剪切型^[4]. 为了研究 NS5ATP2 基因及其不同的剪切型在肝细胞中的生物学功能及其差别, 我们利用基因表达谱芯片技术对于 NS5ATP2 基因不同剪切型 NS5ATP2(615)与 NS5ATP2(216)的反式调节的靶基因进行了比较分析.

1 材料和方法

1.1 材料 NS5ATP2(615)与 NS5ATP2(216)真核表达载体的构建. 将 NS5ATP2(615)与 NS5ATP2(216)的 cDNA 片段克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(-)中, 进行限制性片段长度多态性和序列测定. 肝母细胞瘤细胞系 HepaG2 细胞系的转染利用脂质体转染试剂进行转染^[4].

1.2 方法 NS5ATP2(615)与 NS5ATP2(216)基因表达产物反式激活靶基因的基因芯片技术筛选, 利用联合基因公司开发的基因表达谱芯片技术进行筛选, 此基因芯片含有 1 152 点, 包括免疫调节、细胞周期、细胞凋亡、信号转导等方面的功能基因类型. NS5ATP2(615)与 NS5ATP2(216)基因表达产物反式激活靶基因的比较. 将 NS5ATP2(615)与 NS5ATP2(216)基因表达产物共同上调、共同下调、作用相反、没有重叠的靶基因类型进行分析.

2 结果

2.1 NS5ATP2(615)与 NS5ATP2(216)共同上调的基因类型 NS5ATP2(615)与 NS5ATP2(216)共同上调的基因类型包括 42 条(表 1).

2.2 NS5ATP2(615)与 NS5ATP2(216)共同下调的基因类型 NS5ATP2(615)与 NS5ATP2(216)共同下调的基因类型 13 条(表 2).

表1 NS5ATP2(615)与 NS5ATP2(216)共同上调的基因类型

基因类型	NS5ATP2(615)	NS5ATP2(216)
1 结肠直肠癌突变基因	3.356	2.005
2 butyrophilin	3.415	2.009
3 MEMD 蛋白	3.057	2.035
4 甘氨酸转移酶	4.157	2.041
5 SIAH1 同源基因	4.481	2.059
6 TRAIL 受体 2	2.789	2.075
7 真核翻译起始因子 4A	2.164	2.086
8 焦磷酸酶	4.002	2.110
9 BCRA2 新基因	4.422	2.114
10 细胞凋亡相关 RNA 结合蛋白	2.393	2.122
11 SMAP-3	3.435	2.126
12 FLJ31098	2.242	2.128
13 LIV-1 蛋白	3.357	2.158
14 MTHFD2	2.409	2.160
15 人 cDNA	3.082	2.188
16 L 型电压依赖型钙通道 $\alpha 1$ 亚单位	2.960	2.197
17 DnaJ 样热休克蛋白 40	2.800	2.202
18 细胞分化相关 ATP 结合蛋白	2.881	2.234
19 烷化修复蛋白	2.603	2.255
20 CDC23	2.876	2.257
21 Paraoxonase 2	3.609	2.355
22 TGF β IIR α	3.580	2.359
23 RB 蛋白结合蛋白	2.728	2.398
24 KIAA0009 新基因	3.228	2.440
25 PRKAR1A	3.097	2.443
26 butyrophilin 3A2	3.851	2.472
27 锌指蛋白 217	3.824	2.480
28 肌管蛋白相关蛋白 6	4.839	2.504
29 固醇 C5 desaturase	4.463	2.517
30 DNA 依赖性蛋白激酶催化亚单位	4.209	2.564
31 滑膜肉瘤转位蛋白	4.468	2.599
32 cAMP 应答元件结合蛋白	3.175	2.604
33 G 蛋白调节信号调节因子 5	3.841	2.615
34 CD24 抗原	2.760	2.630
35 亨廷顿作用蛋白 2	2.741	2.642
36 泛素特异性蛋白酶 1	4.205	2.648
37 维生素 A 应答蛋白	2.943	2.856
38 Spualene epoxidase	4.297	3.081
39 FAP48	5.605	3.104
40 PROML1	3.221	3.343
41 PRKAR2B	5.635	3.859
42 胶质瘤放大序列 -41(GAS41)	2.820	4.074

表2 NS5ATP2(615)与NS5ATP2(216)共同下调的基因类型

基因类型	NS5ATP2(615)	NS5ATP2(216)
1 微染色体维持缺陷3(MCM3)	0.385	0.299
2 硫氧还蛋白还原酶1(TXNRD1)	0.341	0.326
3 谷胱甘肽过氧化物酶1(GPX1)	0.394	0.349
4 Prosaposin(PSAP)	0.320	0.350
5 肝细胞生长因子激活剂	0.382	0.381
6 线粒体内膜17同源基因B转移酶(TIM17B)	0.481	0.413
7 谷胱甘肽S-转移酶M3	0.250	0.419
8 精氨酸琥珀酸合成酶	0.309	0.452
9 KIAA0968新基因	0.251	0.459
10 MAP激酶激活死亡域(MADD)	0.456	0.464
11 蛋白磷酸酶1	0.421	0.472
12 胰岛素受体	0.339	0.481
13 TGFβ1	0.327	0.497

2.3 NS5ATP2(615)上调, 而NS5ATP2(216)下调的基因类型 NS5ATP2(615)上调, 而NS5ATP2(216)下调的基因类型 3条(表3)。

表3 NS5ATP2(615)上调, NS5ATP2(216)下调的基因类型

基因类型	NS5ATP2(615)	NS5ATP2(216)
1 MAX 作用蛋白 1(MX11)	2.129	0.346
2 Cofilin 异构体 1	3.935	0.477
3 RAD52	4.079	0.484

2.4 NS5ATP2(615)上调而NS5ATP2(216)下调的共同的靶基因类型 未发现NS5ATP2(615)下调, NS5ATP2(216)上调的共同的靶基因类型。

2.5 NS5ATP2(615)与NS5ATP2(216)非共同调节基因 包括乙酰辅酶A氧化酶1相似基因、热休克蛋白70蛋白9B、层黏连蛋白β2、金属蛋白酶组织抑制因子1、大肠杆菌mutS同源基因6、富含半胱氨酸血管形成诱导剂61、肿瘤转移抑制基因1(TSSC1)、烯醇化酶3、组织相容性13、抗氧化蛋白1、Ewing肉瘤断裂点区1、肌醇1, 3, 4三磷酸盐5/6激酶、丝裂原激活蛋白激酶12、1, 25-二羟基维生素D-3上调基因、核糖体蛋白L32、核糖体蛋白L26假基因1、妊娠特异性β-1糖蛋白6、FLJ32313新基因、hnRNA甲基转移酶、ATP合酶、膜金属内肽酶、MGC:10736新基因、NF-κB1A、C12ORF2新基因、核自身抗原精蛋白、PRKACB、泛素激活酶E1样基因、癌高表达基因、核受体亚家族3、减数分裂后分离增加基因1等多种类型的基因。

3 讨论

任何种类人的体细胞中的遗传物质都是23对、46条染色体。由30亿碱基对组成的序列, 包含了人的全部

的遗传信息。那么为什么会产生不同的细胞? 因为每一种活的细胞中所表达的基因类型、基因表达水平、表达的时空特点都是不一样的^[5]。之所以细胞种类不同, 主要细胞所表达的基因类型、表达水平、表达组织和细胞特异性、表达的先后顺序等都是不同的。真核细胞的基因表达调控机制十分复杂, 是在多个水平上进行调节的。其中最重要的是在转录水平的调节。转录水平的调节主要包括顺式(cis)和反式(trans)调节两种。所谓顺式调节就是指分子内部(intra-molecule)的调节, 所谓的反式调节就是指分子之间(inter-molecule)的调节^[6]。最为典型的顺式调节就是启动子启动编码基因的转录过程的调节。基因组DNA中增强子(enhancer)对于启动子转录活性的调节也属于这一大类。反式调节则更为广泛, 如转录因子蛋白对于启动子DNA序列的识别和转录活性的调节都属于此类。但是, 反式调节作用的因子, 不仅仅是蛋白质, 一些RNA分子也具有反式调节作用。由于反式作用属于分子之间的相互调节, 因而范围更宽。从广义上来讲, 所有肝炎病毒基因组所编码的病毒蛋白, 都会通过直接或间接途径, 对于肝细胞的基因表达谱产生影响, 因此属于广义上的反式调节因子^[7]。HCV的非结构蛋白NS5A是一种作用较强的反式激活作用蛋白。我们在证实NS5A蛋白具有肯定的反式激活作用的同时, 对于NS5A蛋白反式激活作用靶基因, 利用基因表达谱芯片技术和抑制性消减杂交技术, 对NS5A蛋白反式调节的靶基因进行了系统的研究, 发现NS5A蛋白反式调节的一系列的靶基因。其中也包含着一种未知功能基因, 命名为NS5ATP2。为了研究NS5ATP2的生物学功能以及NS5ATP2在慢性丙型肝炎发病机制中的作用和地位, 我们依据生物信息学分析的结果, 设计合成NS5ATP2基因序列特异性的引物, 利用聚合酶链反应技术对NS5ATP2的编码基因进行扩增。在基因扩增中意外地发现了NS5ATP2基因存在着不同的剪切型, 从而为研究NS5ATP2的结构和功能、表达与调控、生物学意义以及在慢性丙型肝炎发病中的作用和地位, 增添了新的内容^[8]。

来源于同一个基因的剪切型有时具有相反的生物学功能, 这在细胞凋亡相关基因的研究中十分常见, 这就是机体通过一定数量的基因表达调控, 实现不同的基因表达调节目的的重要途径和方式^[9]。为了研究NS5ATP2基因不同剪切型NS5ATP2(615)与NS5ATP2(216)的反式调节的靶基因的差别, 我们利用基因芯片技术分别对于NS5ATP2(615)与NS5ATP2(216)反式调节的肝细胞的靶基因类型进行分析, 然后对于不同剪切型NS5ATP2(615)与NS5ATP2(216)的反式调节的靶基因进行比较分析, 研究不同剪切型

NS5ATP2(615)与NS5ATP2(216)的生物学功能的差别^[10]. 从本文的研究结果来看, 既有共同上调的靶基因类型, 也有共同下调的靶基因类型. 说明 NS5ATP2(615)与NS5ATP2(216)不同剪切型的生物学功能具有相同或相似的一面. 但是, 在比较中也发现 NS5ATP2(615)与NS5ATP2(216)反式调节作用的一些差别. 例如, MAX作用蛋白 1(MXI1)、cofilin 异构体 1、RAD52 等 3 种基因受到 NS5ATP2(615)基因的上调, 但同时受到 NS5ATP2(216)基因的下调. 没有发现受 NS5ATP2(615)下调, 而受 NS5ATP2(216)上调的基因类型. 当然, NS5ATP2(615)与NS5ATP2(216)分别具有反式调节作用的靶基因类型就更多了, 这反映了 NS5ATP2(615)与NS5ATP2(216)基因的反式调节作用的差异和不同^[11]. 目前我们仅仅是利用分子生物学技术对于 NS5ATP2(615)与NS5ATP2(216)反式调节基因的类型进行了分析和比较, 但是, 关于其生物学功能特性的改变还需要进行更为细致的研究, 毕竟基因表达不同都会表现在细胞的生物学功能和特性的差别这一方面来. 关于 NS5ATP2(615)与NS5ATP2(216)不同剪切体对于肝细胞生物学作用的差别, 正在研究之中.

4 参考文献

- 1 刘妍, 成军, 王建军, 陆荫英, 杨倩. 应用基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒核心蛋白反式调节基因. 解放军医学杂志 2003; 28:55-57
- 2 成军. 功能基因组学与肝脏疾病研究. 世界华人消化杂志 2004; 12:1-5
- 3 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein-a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003; 9:300-303
- 4 Yang Q, Cheng J, Liu Y, Hong Y, Wang JJ, Zhang SL. Cloning and identification of NS5ATP2 gene and it's spliced variant transactivated by hepatitis C virus non-structural protein 5A. *World J Gastroenterol* 2004;10:1735-1739
- 5 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 王刚, 张玲霞. 牛丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 同源基因的克隆化研究. 中国人兽共患病杂志 2003;19:73-76
- 6 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 王刚, 张玲霞. 猪丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 同源基因的克隆化研究. 生物学杂志 2003; 20:10-33
- 7 成军, 李克, 王琳, 刘妍, 钟彦伟, 李莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 猴同源基因的克隆化与序列分析. 中西医结合肝病杂志 2003;14:349-351
- 8 王建军, 杨倩, 成军, 刘妍, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 NS5ATP6 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:251-253
- 9 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;24:81-83
- 10 杨倩, 刘妍, 成军, 李克, 王建军, 洪源, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 上调新生多肽相关复合物 α 多肽基因的表达. 世界华人消化杂志 2003;11:959-962
- 11 杨倩, 成军, 洪源, 刘妍, 王建军, 党晓燕, 张树林. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 2 的克隆化研究. 中西医结合肝病杂志 2003;14:352-356

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2005年全国胃病诊治研讨会征文通知

为了推动消化内镜及相关专业对各种胃病的诊断与治疗研究进展, 中华医学会消化内镜学分会定于 2005 年 6 月在大连召开全国胃病诊治研讨会. 会议将安排专题报告, 论文交流, 图像演示及自由讨论等内容. 现将征文内容及有关事项通知如下:

1 征文内容

(1)各种胃病的内镜, 病理诊断及分类; 分型; (2)各种胃病与幽门螺杆菌; (3)各种胃病与胃肠激素; (4)各种胃病与胃肠动力学; (5)放大内镜对胃良性病变, 癌前病变及早期胃癌的诊断应用; 超声内镜对胃良性, 恶性疾病的诊断应用; (6)各种胃病的药物治疗(胃黏膜保护剂, 药物根除幽门螺杆菌, 各种抗酸, 抑酸剂, 改善胃动力失常药剂及抗癌剂等); (7)内镜下对某些胃炎, 溃疡病, 早期胃癌的治疗; 对各种胃病的诊断与治疗以及其他临床研究与基础研究.

2 稿件要求

全文及摘要(摘要 800-1000 字), 均用中文打印(要求有光盘); 截稿日期为 2005-03-20.

3 投稿地址及联系方式

地址: 辽宁省沈阳市和平区砂阳路 252 号, 中华医学会辽宁分会学术会务部(邮编: 110015)

联系人: 刘敏杰 电话: 024-23391410, 传真: 024-23391410(稿件注明:“全国胃病学术会”)

主办: 中华医学会消化内镜学分会

承办: 中华医学会辽宁分会