

应用微阵列技术筛选 PS1 TP1 基因转染细胞差异表达基因

纪冬,成军**,郭江,刘妍,王琳,郭风劲

(解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心,北京 100039)

Screening of Genes Differentially Expressed in HepG2 Cells Transfected with

Gene 1 Transactivated by Hepatitis B Virus Pre-s1 with Microarray Assay

Ji Dong, CHENG Jun**, GUO Jiang, LIU Yan, WANG Lin, GUO Feng-jin

(Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

Abstract: To understand the differentially expressed target genes in Hep G2 cells transfected with PS1 TP1 protein expression vector, we compared the differentially expressed genes between the hepatoblastoma cell line Hep G2 transfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1(-)-PS1 TP1, respectively with cDNA microarray. The PS1 TP1 coding DNA fragment was amplified with polymerase chain reaction (PCR). The expressive vector of pcDNA3.1(-)-PS1 TP1 was constructed by routine molecular biological methods. The Hep G2 cells were transfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1(-)-PS1 TP1, respectively, using FuGENE6 Transfection Reagent. Total RNA was isolated and reverse transcribed. The cDNAs were subjected for microarray screening with 4096 cDNA probes. From the scanning results, it was found that 8 genes were up-regulated and 14 genes were down-regulated by PS1 TP1 protein expression. The expression of PS1 TP1 protein affected the expression spectrum of hepatocyte.

Key words: Hepatitis B virus; PS1 TP1 protein; Microarray assay

摘要: 阐明乙型肝炎病毒(HBV)前-S1蛋白反式激活蛋白1(PS1 TP1)的表达对于肝细胞的基因表达谱的影响。应用基因芯片技术对于pcDNA3.1(-)和pcDNA3.1(-)-PS1 TP1分别转染的Hep G2细胞的基因表达谱进行分析。以肝癌细胞系Hep G2基因作为模板,应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增PS1 TP1基因片段,以常规分子生物学技术构建表达载体pcDNA3.1(-)-PS1 TP1。以脂质体技术转染肝母细胞瘤细胞系Hep G2,提取总RNA,逆转录为cDNA,与转染空白表达载体pcDNA3.1(-)的Hep G2细胞进行DNA芯片分析并比较。在4096个基因表达谱的筛选中,发现有8个基因表达水平显著上调,14个基因表达水平显著下调。PS1 TP1基因的表达对于肝细胞基因表达谱有显著影响。DNA芯片技术是分析反式调节靶基因的有效技术途径。

关键词: 肝炎病毒;乙型;PS1 TP1蛋白;基因芯片

中图分类号:R 513.6 文献标识码:A 文章编号:1003-5125(2005)03-0239-04

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)的感染可导致肝脏急、慢性炎症,HBV诱导细胞恶性的发病机制还未完全弄清,但目前研究充分说明HBV蛋白对宿主细胞基因的反式激活作用在其致病过程中起着重要作用,最近的研究还发现,前-S1蛋白是一种反式激活因子^[1,2]。我们应用抑制性消减杂交(Suppression subtractive hybridization, S

SH)技术,对于前-S1蛋白反式激活作用的靶基因进行筛选,发现了前-S1蛋白可上调一些基因的表达,其中包括未知功能基因,命名为前-S1反式激活蛋白1(PS1 TP1),其编码区共有642个核苷酸(nt),产物由213个氨基酸(aa)残基组成(GenBank号:A Y426672)^[3~5]。但是PS1 TP1基因及其编码蛋白在HBV感染相关的慢性肝脏疾病的发生、发

收稿日期:2004-11-25,修回日期:2005-01-25

作者简介:纪冬(1975-),男,河北省怀来县籍,医师,硕士研究生,从事病毒性肝炎的临床治疗及实验研究。

E-mail:jd@genetherapy.com.cn

**通讯作者。Corresponding author. Tel:010-66933392, E-mail:cj@genetherapy.com.cn

展中的作用目前还不十分清楚。因此,为了深入了解 PS1TP1 的分子生物学功能,我们克隆了 PS1TP1 基因,并利用抑制性消减杂交技术(SSH)及微矩阵(microarray)技术进行了筛选,获得了大量有价值的结果。本实验中我们应用微矩阵技术,对于 PS1TP1 蛋白基因和空白表达载体转染肝母细胞瘤细胞系 Hep G2 进行筛选,试图从 PS1TP1 蛋白的表达对于肝细胞基因表达谱的影响这一角度,探索 HBV 感染的发病机制,包括 HBV 相关的肝细胞癌(HCC)发生发展的分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Hep G2 细胞及感受态大肠杆菌 DH5 (本室保存),pcDNA3.1(-)真核表达载体、细胞总 RNA 提取液 TRIzol (Invitrogen);FuGENE6 转染试剂(Roche),胎牛血清 FBS(Hyclone),Taq 聚合酶、T4 DNA 连接酶、EcoR I、BamH I(Takara),pGEM-T easy 载体(Promega),DNA 纯化试剂盒(博大泰克),其它生化试剂(Sigma)。

1.2 真核表达载体的构建及细胞转染

设计并合成 PS1TP1 基因序列特异性的寡聚核苷酸引物(有义链:5'-GAATTTCATGGACACTGAGAGAGTTGGG-3';反义链:5'-GGATCC TTA TTCTTCA GTTCTCTGCTC-3'),在引物的两端分别引入了 EcoR I 和 BamH I 酶切位点,引物由上海博亚公司合成。使用 25 μ L 反应体系,以 Hep G2 细胞 cDNA 为模板,放入 PE9600 PCR 仪中扩增。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 变性 60s,61 $^{\circ}$ C 退火 60s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60s,循环 35 次后,72 $^{\circ}$ C 保温 10min。扩增的 PS1TP1 蛋白编码基因首先克隆到 TA 载体中进行序列测定,然后亚克隆到真核表达载体 pcDNA 3.1(-)中,构建真核表达载体 pcDNA3.1(-)-PS1TP1,并进行内切酶分析鉴定连接正确。用 FuGENE6 转染试剂将 2 μ g pcDNA3.1(-)-PS1TP1 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35mm 平皿 Hep G2 细胞,48h 后收获细胞,使用 TRIzol 液体将细胞裂解后放入液氮中保存。

1.3 杂交及洗涤

使用氯仿-异丙醇提取转染了 PS1TP1 表达质粒及空载体的 Hep G2 细胞总 RNA,逆转录标记 cDNA 探针并纯化。Cy3-dUTP 标记对照组细胞总 RNA(50 μ g),Cy5-dUTP 标记实验组细胞总 RNA(50 μ g)。乙醇沉淀后溶解在 20 μ L 5 \times SSC + 2g/L SDS 杂交液中。包含的 4096 个 cDNA 由上海博星

基因芯片有限公司提供,包括原癌基因和抑癌基因、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。用 Cartesian 公司的 Cartesian 7500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样。将基因芯片和杂交探针在 95 $^{\circ}$ C 水浴变性 5min,将混合探针加在基因芯片上,置于 60 $^{\circ}$ C 杂交 15-17h。依次以 2 \times SSC + 2 g/L SDS、0.1 \times SSC + 2 g/L SDS、0.1 \times SSC 洗涤 10min,室温晾干。

1.4 检测与分析

在芯片上共有 4096 个 cDNA,为了监控芯片杂交技术体系的整个过程,用预先选定的内参照基因(24 条看家基因,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。由于实验组探针标记 Cy5 荧光素(呈红色),对照组探针 Cy3 荧光素(呈绿色),用 ImaGene 3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度,计算 Cy5/Cy3 比值,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的差异。若 Cy5/Cy3 > 2.0,该点呈现红色荧光,表示表达增强;Cy5/Cy3 < 0.5,为绿色荧光,显示表达减弱;黄色代表表达水平无差异。

2 结果

2.1 PS1TP1 蛋白的表达载体构建

利用自行设计的引物成功扩增出 PS1TP1 基因片段,PCR 产物经 0.9% 琼脂糖凝胶电泳分析显示扩增片段约 642 bp,与预期片段符合,且无非特异扩增现象。将扩增的 PS1TP1 基因与 pGEM Teasy 载体连接后测序,结果显示序列与报告的完全符合。用 EcoR I 及 BamH I 双酶切所得片段,连接到用相同酶切过的 pcDNA3.1(-)载体中,经酶切鉴定结果正确。由此表明 PS1TP1 基因已按正确方向克隆入真核表达载体中,pcDNA3.1(-)-PS1TP1 质粒构建成功。

2.2 PS1TP1 蛋白上、下调基因

在基因芯片的扫描分析中,对于某一点的两种叠加荧光信号,cy3 信号较强,该点多显绿色(下调趋势);如果 cy5 信号较强,该点多显红色(上调趋势);如果强度相似即显黄色。本实验以 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下为下调阈值,发现有 14 种基因的表达水平下调(表 1)。以 Cy5/Cy3 比值在 2.000 以上为上调阈值,发现有 8 种基因的表达水平上调(表 2)。

3 讨论

HBV 为带包膜的嗜肝 DNA 病毒,其基因组为

表 1 PS1 TP1 蛋白下调基因列表

Table 1 List of genes down-regulated by PS1 TP1

No.	GenBank number	Cy5/ Cy3	Genes
1	NM_199203	0.412	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2
2	A K123482	0.414	Homo sapiens cDNA FLJ41488 fis
3	NM_001951	0.448	Homo sapiens E2F transcription factor 5, p130-binding (E2F5)
4	NM_015270	0.463	Homo sapiens adenylate cyclase 6 (ADCY6)
5	NM_003419	0.467	Homo sapiens zinc finger protein 345 (ZNF345)
6	BC053904	0.480	Homo sapiens retinoblastoma binding protein 4
7	NM_173631	0.484	Homo sapiens zinc finger protein 547 (ZNF547)
8	A K001548	0.487	Homo sapiens cDNA FLJ10686 fis
9	A K095452	0.487	Homo sapiens cDNA FLJ38133 fis
10	A K027773	0.487	Homo sapiens cDNA FLJ14867 fis
11	A K054688	0.490	Homo sapiens cDNA FLJ30126 fis
12	NM_005100	0.493	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12 (AKAP12)
13	NM_016952	0.495	Homo sapiens cell adhesion molecule-related/ down-regulated by oncogenes (CDON)
14	A K097905	0.496	Homo sapiens cDNA FLJ40586 fis

表 2 PS1 TP1 蛋白上调基因列表

Table 2 List of genes up-regulated by PS1 TP1

No.	GenBank number	Cy5/ Cy3	Genes
1	NM_000845	2.014	Homo sapiens glutamate receptor, metabotropic 8 (GRM8)
2	NM_005296	2.087	Homo sapiens G protein-coupled receptor 23 (GPR23)
3	BC003636	2.099	Homo sapiens arrestin, beta 1
4	A K092463	2.200	Homo sapiens cDNA FLJ35144 fis, highly similar to Human hepatocellular carcinoma associated protein (JCL-1)
5	NM_181481	2.230	Homo sapiens chromosome 18 open reading frame 1 (C18orf1)
6	NM_000806	2.332	Homo sapiens gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1 (GABRA1)
7	A K093049	2.375	Homo sapiens cDNA FLJ35730 fis, highly similar to ALPHA-1-ANTICH YMO TR YPSIN PRE-CURSOR
8	NM_000779	2.466	Homo sapiens cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1 (CYP4B1)

部分双链环状 DNA,负链较长,正链较短,具有四个开放读码框(ORF),通过不同的起始密码子(ATG)

编码至少 7 个蛋白,包括三个表面抗原(包膜蛋白前-S1、前-S2、S);核心抗原(HBcAg);e 抗原(HBeAg);病毒多聚酶(P);X 蛋白(HBx)。其中前-S1 蛋白仅出现于大蛋白(LHBs)中,但其位于包膜的内、外两侧,在病毒的粘附、成熟等过程中具有多种功能,研究表明前-S1 蛋白还具有反式激活作用^[6-8],我们应用 SSH 技术筛选并克隆前-S1 蛋白反式激活的靶基因,其中包括未知功能基因,命名为 PS1 TP1,并构建其真核表达载体 pcDNA3.1(-)-PS1 TP1。为进一步研究 PS1 TP1 蛋白的反式激活作用,我们利用基因芯片技术对其上调、下调基因进行分析。结果表明,8 种基因的表达水平显著上调,14 种基因的表达水平显著下调。

在这些基因当中,有涉及到细胞增生、信号转导途径等过程的基因,说明 PS1 TP1 蛋白参与了这些过程。在下调的基因当中,E2F 家族在调控细胞周期和肿瘤抑制蛋白作用的过程中具有重要的角色,是细胞增生的主要调节因子,并且也是小 DNA 肿瘤病毒转化蛋白的靶位点。E2F 家族成员蛋白共有 5 个,均包括一个 DNA 结合域,一个与不同的转录因子蛋白结合的二聚体式结构域,一个富含酸性氨基酸的反式激活结构域,一个存在于反式激活结构域中的肿瘤抑制蛋白相关结构域。E2F DNA 结合位点可以在很多调节细胞周期的基因中都可以找到,特异性的抑制分子可以与 E2F 的反式激活域相结合,并且抑制其反式激活功能。对于 E2F-1, E2F-2, E2F-3,其抑制子是视网膜母细胞瘤基因表达产物 pRB。E2F-4 和 E2F5 可以与肿瘤抑制蛋白 p130 和 p107 结合,而不是 pRB。E2F-5 进入细胞核的过程涉及了核孔复合物的形成,它缺少核定位信号(NLS)的基本序列,研究表明 E2F-5 的入核过程仅仅需要其氨基酸端的 56 个氨基酸残基,并不依赖于 DP 或 pRB 家族蛋白的结合过程^[9]。E2F-5 cDNA 编码一个 346aa 的蛋白,分子量约 38kD, E2F-5 与 E2F-4 高度同源(78%的相似性),而与 E2F-1 只有 57%。E2F-4, E2F-5 在 G1 中期的表达量最大,而此时 E2F-1 还没有表达,这说明 E2F-4, E2F-5 作用是调节 G1 早期过程,包括 G0/ G1 期的转换。许多激素都是通过改变关键性调节蛋白的磷酸化状态触发信号转导途径来调节其细胞内的活性的。蛋白磷酸化是一个可逆性的过程,涉及到 2 种信号酶:蛋白激酶(可以将磷酸根从 ATP 转移到底物蛋白上)和磷蛋白磷酸酶(执行去磷酸化过程)。为了严密的控制激素启动的磷酸化过程,多功能的激酶和磷酸酶的活性可以精确的被调节,这需要第二信使的协

助,如 Ca^{2+} 、磷脂和 cAMP 等,从而可以激活下游一系列的信号转导途径。A 激酶锚蛋白(AKAPs)是一组结构不同的蛋白,具有与蛋白激酶 A(PKA)调节亚单位结合的功能,并且在细胞内限制全酶分解。AKAP12 正常表达于内皮细胞、培养的纤维母细胞和骨肉瘤细胞。与 PKA、PKC 和磷酸酶相关,在信号转导中起着重要的作用。这个蛋白是一个细胞生长调节蛋白,确保 PKA 与 cAMP 充分接触激活并纠正底物的分泌。一些 AKAP 可以协调信号转导级联的多种成分的作用,在同一个大分子复合物内有效的募集上游激活因子和下游效应分子。总之,AKAPs 可能是整合大量信号转导途径的关键蛋白^[10]。在上调基因当中,细胞色素 P450, 家族 4, 亚家族, 多肽 1(CYP4B1)有可能做为对于恶性肿瘤的基因治疗药物,细胞色素 p450 超家族为单加氧酶,涉及了多种反应,如药物的代谢、脂类的合成等方面,绝大多数 CYP 家族成员都存在于肝细胞,研究表明 HCC 组织的 CYP 基因表达都是上调的^[11]。Mohr *et al*^[12] 的研究表明 CYP4B1 可以有效、迅速的诱导 HCC 细胞的调亡而不依赖于 P53 蛋白,这个效应却是细胞系特异性的,这提示了 PS1 TP1 蛋白在 HBV 所致的肝癌中有可能发挥一定的作用。

总之,新基因编码蛋白 PS1 TP1 的表达对于肝细胞基因表达谱具有影响,上、下调一些基因,从而可能参与了细胞增生、信号转导、HCC 形成等过程,使得 PS1 TP1 蛋白在机体内的作用有了更进一步的了解,为 HBV 的病毒学研究,HBV 感染相关性疾病的诊断、治疗措施等方面提供了线索。当然,基因芯片结果也会有假阳性的可能,进一步的验证工作正在进行中。

参考文献

- [1] Ono M, Morisawa K, Nie J, *et al*. Transactivation of transforming growth factor alpha gene by hepatitis B virus preS1 [J]. *Cancer Res*, 1998, 58:1813-1816.
- [2] 纪冬,成军,董菁,等.应用微阵列技术筛选 HBV 前-S1 蛋白的反式调节基因谱[J]. *解放军医学杂志*, 2004, 29:871-874.
- [3] 成军,刘妍,洪源,等.乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较[J]. *世界华人消化杂志*, 2004, 12(2):327-331.
- [4] 纪冬,成军,王建军,等.应用抑制性消减杂交技术克隆乙型肝炎病毒前-S1 蛋白反式激活的相关基因[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2004, 13:3-8.
- [5] 纪冬,成军,郭江,等.乙型肝炎病毒前-S1 蛋白反式激活蛋白 1 基因的克隆化研究[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2004, 13:9-12.
- [6] Kim H S, Ryu C J, Hong H J. Hepatitis B virus preS1 functions as a transcriptional activation domain[J]. *J Gen Virol*, 1997, 78:1083-1086.
- [7] Ryu C J, Cho D Y, Gripon P, *et al*. An 80-kilodalton protein that binds to the pre-S1 domain of hepatitis B virus[J]. *J Virol*, 2000, 74:110-116.
- [8] Seeger C, Mason W S. Hepatitis B Virus Biology[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64:51-68.
- [9] Apostolova M D, Ivanova I A, Dagnino C, *et al*. Active nuclear import and export pathways regulate E2F-5 subcellular localization[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277:34471-34479.
- [10] Michel J J, Scott J D. AKAP mediated signal transduction [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002, 42:235-257.
- [11] Furukawa M, Nishimura M, Ogino D, *et al*. Cytochrome p450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver[J]. *Cancer Sci*, 2004, 95:520-529.
- [12] Mohr L, Rainov N G, Mohr U G, *et al*. Rabbit cytochrome P450 4B1: A novel prodrug activating gene for pharmacogene therapy of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7:1008-1014.