

· 基础论著 ·

HCV NS3 对 IFN- λ I 表达的影响及其调控机制

高萍 董金玲 刘顺爱 王琦 张锦前 成军

【摘要】 目的 探讨丙型肝炎病毒(HCV)NS3 对干扰素- λ I(IFN- λ I/IL-29)表达的影响及其调控机制。**方法** 将HCV NS3 表达载体 pcDNA3.1/myc-His-NS3 转染至 HepG2 细胞,验证 HCV NS3 蛋白表达之后,采用实时荧光定量 PCR、Western blot 和 ELISA 法观察 HCV NS3 对 IFN- λ I mRNA 及其蛋白表达水平的影响。构建 IFN- λ I 全长启动子报告基因表达载体和 3'-非翻译区(3'-UTR)报告基因表达载体,借助双萤光素酶活性检测,探索 HCV NS3 对 IFN- λ I 转录水平的调控机制。**结果** pcDNA3.1/myc-His-NS3 在 HepG2 细胞中成功表达,与转染 pcDNA3.1/myc-His 空载体相比,pcDNA 3.1/myc-His-NS3 过表达时在 mRNA 和蛋白水平均能抑制 HepG2 细胞内 IFN- λ I 的表达,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。双萤光素酶活性检测结果显示,与对照组相比,转染 IFN- λ I 全长启动子和 3'-非翻译区报告基因表达质粒后,双萤光素酶活性变化无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** HCV NS3 在 mRNA 及蛋白水平能抑制 IFN- λ I 的表达,但其转录水平不受影响,具体调控机制尚有待进一步研究。

【关键词】 肝炎病毒,丙型;NS3 基因;干扰素- λ I ;调控

Effects and regulation mechanisms of HCV NS3 on expression of IFN- λ I in HepG2 cells GAO Ping, DONG Jin-ling, LIU Shun-ai, WANG Qi, ZHANG Jin-qian, CHENG Jun. Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University; Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China
Corresponding author: CHENG Jun, Email:chengjdt@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate on the effects and regulation mechanisms of HCV NS3 on IFN- λ I (IL-29) in HepG2 cells. **Methods** HCV NS3 protein expressive vector was cloned (pcDNA3.1/myc-His-NS3) and expressed in HepG2 cells, then the expression level of IFN- λ I was detected by qRT-PCR, Western blot and ELISA. IFN- λ I promoter reporter vector (pGL4.10-IFN- λ I P) as well as the IFN- λ I 3'-untranslated region (3'-UTR) reporter vector (pmirGLO-IFN- λ I 3'-UTR) were constructed and used for studying the regulation mechanism by luciferase assay. **Results** HCV NS3 protein expressed in HepG2 cells post-transfection successfully. Both the mRNA and protein expression levels were significantly decreased in the presence of HCV NS3 protein ($P < 0.05$). However, the results of luciferase assay showed that HCV NS3 protein had no influence on IFN- λ I promoter activity. In addition, miRNAs were involved in the regulation of IFN- λ I by HCV NS3 protein. **Conclusions** Overexpression of HCV NS3 could inhibit the expression of IFN- λ I, but the specific regulatory mechanism is still not clear.

【Key words】 Hepatitis C virus; NS3 gene; Interferon- λ I ; Regulation

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染在全世界范围内流行,全球约 1.8 亿人口感染^[1],我国一般人群抗-HCV 阳性率约为 3.2%,50% 以上感染者可能发展成为慢性感染,HCV 慢性感染可导致肝硬化和肝细胞癌等严重性肝病^[2]。采用 Peg IFN- α

联合利巴韦林的标准疗法,目前仅能够使 50%~60% 的患者实现持续性的病毒学应答(sustained virological response, SVR)^[3-4]。IFN- λ s 为近年来新发现的一种新型干扰素,已受到越来越多的重视,但其具体调控机制尚不清楚。本研究通过构建表达质粒,研究过表达 HCV NS3 对 HepG2 细胞内 IFN- λ I (IL-29)表达的影响。

材料与方法

一、主要材料及试剂

肝癌细胞系 HepG2 细胞、pcDNA3.1/myc-His 载体、pcDNA3.1/myc-His-NS3 和 pGL4.10[luc2]以

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.01.001

基金项目:国家“十二五”传染病重大专项(No. 2012ZX10002003);北京市科委重大项目(No. D09050703560908);北京市卫生系统高层次卫生技术人才“领军人才”项目(No. 2009-1-09)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所;新发突发传染病研究北京市重点实验室

通讯作者:成军,Email:chengjdt@ccmu.edu.cn

及 pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression 为本研究所保存。jet PRIME DNA&siRNA 转染试剂购自法国 Polyplus 公司,实时荧光定量 PCR 试剂 Power SYBR GREEN PCR Master Mix 购自 Life Technologies 公司,抗-IFN- λ I 购自美国 EPITOMICS 公司,羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司,抗- β -actin 购自美国 Santa Cruz 公司,IFN- λ I ELISA 试剂盒购自美国 Ray Biotech 公司。其他工具酶、生化试剂和细胞培养试剂主要购自 GIBCO、Promega、Invitrogen、Sigma、TaKaRa 及威格拉斯等生物公司。

二、方法

1. 质粒构建:IFN- λ I 全长启动子(P)和 3'-非翻译区(UTR)引物由上海生工生物技术有限公司合成,具体序列见表 1。目的片段以 HepG2 细胞全基因组 DNA 为模板扩增,严格按照质粒构建操作说明进行,构建完成后的 pGL4. 10-IFN- λ I -P 和 pmirGLO-IFN- λ I -3'-UTR 由北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序鉴定。

表 1 引物序列

基因	序列(5'→3')
IFN- λ I -P	上游:GAGCTCTTAAACCAATGGCAGAAG
	下游:AGATCTTGCAGCCATGGCTAAATC
IFN- λ I 3'-UTR	上游:AGACTCACCTGACACCCACACCTTAT
	下游:CTCGAGTCACAGAAGGTTCCAATTCCCT
β -actin	上游:CATCCGCAAAGACCTGTACGC
	下游:AGTACTTGGCTCAGGAGGAG
IFN- λ I (qRT-PCR)	上游:AACTGGGAAGGGCTGCCACATT
	下游:GGAAGACAGGAGAGCTGCAACT

2. 细胞培养与转染:HepG2 细胞采用含有体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期 HepG2 细胞进行质粒转染,严格按照 jet PRIME DNA&siRNA 转染试剂说明进行操作。

3. qRT-PCR: β -actin 和 IFN- λ I 引物由上海生工生物技术有限公司合成,具体序列见表 1。取对数生长期细胞进行转染,24 h 后用 Promega RNA 提取试剂盒提取 HepG2 细胞总 RNA,调整 RNA 浓度至 200 μ g/ μ l。采用 TaKaRa Prime Script RT reagent Kit (Perfect Real Time) 将所提取 RNA 逆转录为 cDNA。逆转录体系 20 μ l,逆转录条件为 37℃ 15 min,85℃ 5 s,4℃ + ∞ 。qRT-PCR 反应体系为 25 μ l,设置对照和内参,于 ABI 7500 荧光定量 PCR 扩增仪进行反应,扩增条件为 95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环。

4. ELISA:每孔加入转染 pcDNA3. 1/myc-His-NS3 或 pcDNA3. 1/myc-His-NC 后 HepG2 细胞上清 100 μ l,室温孵育 2.5 h。PBS 洗涤后每孔加入 100 μ l 抗体,室温孵育 1 h,PBS 洗涤后再加入 100 μ l 稀释好的 HRP,室温孵育 45 min。洗板后,底物显色、终止反应,于 450 nm 条件下上机检测。

5. Western blot:转染 HepG2 细胞 48 h 后,裂解细胞取上清,测定浓度后加入电泳上样缓冲液,取 80 μ g 进行电泳鉴定。分离胶 15%,浓缩胶 5%,胶厚 1.5 mm,电泳条件:在浓缩胶中以 90 V 电压电泳,分离胶中以 120 V 电压电泳。湿转,16 W、7 min。牛奶封闭后加入抗-IFN- λ I,4℃ 封闭过夜,洗膜,孵育二抗,显影。

6. 双萤虫素酶活性测定:转染 HepG2 细胞 48 h 后,采用 Dual-Luciferase Reporter Assay System 进行双萤虫素酶报告基因活性检测。每孔细胞先用 1 \times PBS 洗涤 2 次,加入 50 μ l 的 1 \times 细胞裂解液,室温轻摇,收集细胞裂解液,微孔板化学发光检测仪 (microplate luminometer) 检测双萤虫素酶活性。

三、统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,两组之间采用配对 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

一、pcDNA3. 1/myc-His-NS3 载体构建及其蛋白表达的鉴定

将测序正确的 pcDNA3. 1/myc-His-NS3 表达质粒转染至 HepG2 细胞,Western blot 结果显示转染 pcDNA3. 1/myc-His 空载体组无 HCV NS3 的表达,而转染 pcDNA3. 1/myc-His-NS3 表达质粒组可见 HCV NS3 大量表达,见图 1C。提示构建的载体能够成功表达。

二、HCV NS3 对 HepG2 细胞内 IFN- λ I 表达变化的影响

转染 pcDNA3. 1/myc-His-NS3 后,与转染 pcDNA3. 1/myc-His 空载体组 HepG2 细胞内 IFN- λ I 的表达量比较,qRT-PCR 结果显示 mRNA 水平下降 75% (*t* = 32.972, *P* < 0.05);ELISA 结果显示,细胞上清蛋白水平下降 45% (*t* = 3.644, *P* < 0.05);Western blot 结果显示细胞内蛋白水平下降 30% (*t* = 7.220, *P* < 0.05),见图 1A~D。提示过表达 HCV NS3 能够抑制 HepG2 细胞内 IFN- λ I 的正常表达。

三、HCV NS3 影响 IFN- λ I 表达的机制研究

1. IFN- λ I 基因启动子双萤虫素酶报告基因表达质粒的活性检测:将 pGL4. 10-IFN- λ I -P 报告基因表达质粒瞬时转染 HepG2 细胞,检测双萤虫素酶

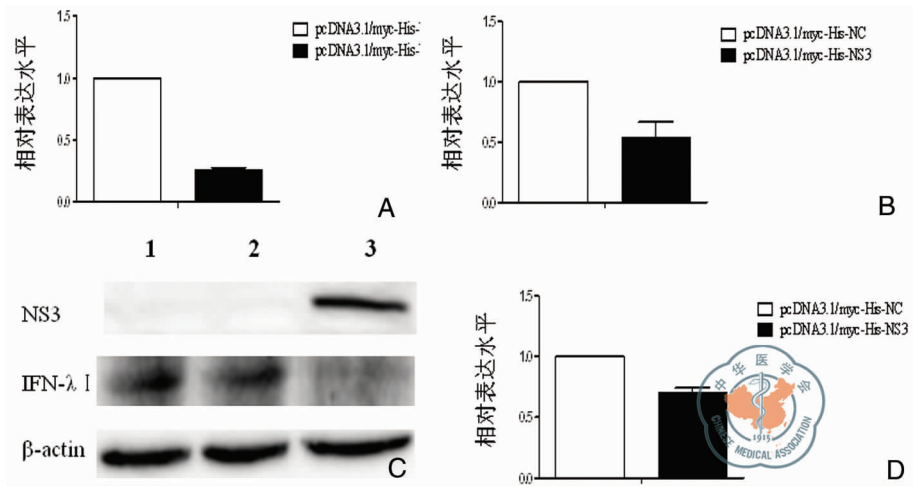
活性,发现 pGL4. 10-IFN-λ I -P 显示出强的启动子活性,与对照 pGL4. 10-Basic 相比差异具有统计学意义。将 pGL4. 10-IFN-λ I -P 和 pcDNA3. 1/myc-His-NS3 同时瞬时转染 HepG2 细胞,与对照组相比,双萤虫素酶活性无显著性变化,见表 2。

2. IFN-λ I 基因 3'-非翻译区双萤光素酶报告基因表达载体的活性检测:将 pmirGLO-IFN-λ I -3'-UTR 报告基因表达质粒瞬时转染 HepG2 细胞,检测双萤虫素酶活性,可见 pmirGLO-IFN-λ I -3'-UTR 显示出明显减弱的双萤虫素酶活性。将 pmirGLO-IFN-λ I -3'-UTR 和 pcDNA3. 1/myc-His-NS3 同时瞬时转

染 HepG2 细胞,与对照组相比,双萤虫素酶活性无显著性变化,见表 3。

讨 论

丙型肝炎病毒感染是导致肝硬化、肝细胞癌以及肝功能衰竭的重要病因之一,仅有 50%~60% 的患者经 Peg IFN-α 联合利巴韦林标准治疗后可获得持续病毒学应答。低应答率的原因除了病毒和宿主相关因素外,干扰素和利巴韦林的不良反应也对治疗剂量以及疗程产生一定的影响^[5-6,10]。因此,临床上迫切需要疗效更高且耐受性更佳的药物。



注:与转染 pcDNA3. 1/myc-His 空载体组对比,转染 pcDNA3. 1/myc-His-NS3 的 HepG2 细胞内 IFN-λ I 的表达量在不同水平变化如下:A;qRT-PCR 结果显示 mRNA 水平下降 75% (n = 4);B;ELISA 结果显示细胞上清蛋白水平下降 45% (n = 3);C~D;Western blot 结果显示细胞内蛋白水平下降 30% (n = 3),1 泳道为空白对照,2 泳道转染 pcDNA3. 1/myc-His 空载,3 泳道转染 pcDNA3. 1/myc-His-NS3

图 1 pcDNA3. 1/myc-His-NS3 转染 HepG2 细胞后 IFN-λ I 的表达

表 2 HCV NS3 对 IFNλ I -P 调控的双萤光素酶报告基因表达载体的活性检测

组别	次数	相对萤光素酶活性 ($\bar{x} \pm s$)
pGL4. 10-Basic + pcDNA3. 1/myc-His-NC	3	0. 2130 ± 0. 0163
pGL4. 10-IFN-λ I -P + pcDNA3. 1/myc-His-NC	3	2. 6377 ± 0. 0296
pGL4. 10-IFN-λ I -P + pcDNA3. 1/myc-His-NS3	3	2. 6190 ± 0. 3397

注: $t = 0. 828, P > 0. 05$

表 3 HCV NS3 对 IFN-λ I -3'-UTR 调控的双萤光素酶报告基因表达载体的活性检测

组别	次数	相对萤光素酶活性 ($\bar{x} \pm s$)
pmirGLO-Basic + pcDNA3. 1/myc-NC	3	0. 0843 ± 0. 0119
pmirGLO-IFN-λ I -3' UTR + pcDNA3. 1/myc-His-NC	3	0. 0240 ± 0. 0026
pmirGLO-IFN-λ I -3' UTR + pcDNA3. 1/myc-His-NS3	3	0. 0260 ± 0. 0053

注: $t = 5. 210, P > 0. 05$

IFN- λ s 为 III 型干扰素, 是 2003 年由美国科学家 Kotenko 和 Sheppard 等共同发现的一类新型干扰素, 包括 IFN- λ I、IFN- λ II 和 IFN- λ III, 也称为 IL-29、IL-28A 和 IL-28B^[7-8]。目前研究证实, IFN- λ s 在多种组织和器官中呈低水平表达, 包括血液、脑、肺、肝脏、卵巢、胰腺、垂体、胎盘、前列腺和睾丸等。有研究发现 IFN- λ I 血清学水平超过 IFN- λ II 和 IFN- λ III 至少两倍, rs12979860C 等位基因携带者的 IFN- λ I 血清水平较 rs12979860TT 携带者的血清学水平高^[9]。急性丙型肝炎患者的 IFN- λ I 血清学水平居于慢性丙型肝炎患者和健康者之间^[12]。另有研究表明, 高水平 IFN- λ s 对自发清除的 HCV 感染者有预处理作用^[11]。因此, IFN- λ s 在丙型肝炎的控制中起着重要作用。

本研究通过瞬时转染 pcDNA3.1/myc-His-NS3, 使得 HepG2 细胞内 HCV 非结构蛋白 NS3 的表达量增加, 运用 Western blot 分析验证后, 发现此时 HepG2 细胞内的 IFN- λ I 表达量在 mRNA、胞内蛋白和上清蛋白中均显著下调, 而对照组则无显著变化, 与 Langhans 等^[12]研究结果一致, 其在体外实验中证实 HCV NS3 能抑制 DCs 细胞中 IFN- λ I 的产生; 表明 HCV 感染后胞内 IFN- λ I 的表达受到明显抑制。而目前研究证实 IFN- λ I 具有抗病毒的作用, 可以在一定程度上解释感染 HCV 后患者易出现慢性化及疗效不佳等问题的。若可阻遏甚至反转此过程, 使得胞内 IFN- λ I 的表达量不下降反升高, 则可使其发挥更好的抗病毒活性, 更有助于患者的病情控制。本研究在探索 HCV NS3 下调 HepG2 细胞内 IFN- λ I 的机制实验中, 从启动子调控和 miRNA 调控方向入手, 目前尚未得到阳性结果。由于 IFN- λ I 主要通过 JAK-STAT 信号转导通路发挥其下游的抗病毒活性, 二者之间的调控可能涉及到具体分子间的相互作用, 尚有待于进一步证实。

综上, HCV NS3 可抑制 HepG2 细胞内 IFN- λ I 的表达。然而, HCV NS3 对 IFN- λ I 表达的抑制具体通过何机制来实现尚未明确, 根据目前的实验结

果推测此种抑制作用可能并非通过启动子或者 miRNA 的调控来实现, 可能涉及分子间的相互作用, 其确切机制仍有待于进一步的研究和证实。

参 考 文 献

- 1 Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*, 2009, 49(4):1335-1374.
- 2 Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*, 2010, 53(3):1020-1022.
- 3 Manns MP, McHutchison JG, Gordon S, et al. Peginterferon alpha-2b plus ribavirin compared to interferon alpha-2b plus ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C. A randomized trial. *Lancet*, 2001, 358(9286):958-965.
- 4 Fied MW, Schiffman MI, Reddy R, et al. Peginterferon alpha-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Eng J Med*, 2002, 347(13):975-982.
- 5 Wotnsland A, Hofmann WP, Sarrazin C. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(1):23-38.
- 6 Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 2009, 461(7262):399-401.
- 7 Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, 2003, 4(1):69-77.
- 8 Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*, 2003, 4(1):63-68.
- 9 Renaud JC. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nature Rev Immunol*, 2003, 3(8):666-676.
- 10 成军. 慢性丙型肝炎直接抗病毒药物耐药研究进展. 首都医科大学学报, 2012, 33(4):530-533.
- 11 刘明水. IFN- λ s 与乙型肝炎及丙型肝炎抗病毒治疗的相关性. 医学综述, 2012, 18(3):385-388.
- 12 Langhans B, Kupfer B, Braunschweiler I, et al. Interferon-lambda serum levels in hepatitis C. *J Hepatol*, 2011, 54(5):859-865.

(收稿日期:2012-09-22)

(本文编辑:孙荣华)

高萍, 董金玲, 刘顺爱, 等. HCV NS3 对 IFN- λ I 表达的影响及其调控机制[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2013, 7(1):14.