

· 基础论著 ·

## HCV NS4A 与钙离子信号调节亲环素配体相互作用对细胞基因表达的影响

程勇前 刘妍 王琳 成军 徐东平 钟彦伟 戴久增 李晓东

**【摘要】 目的** 探讨 HCV NS4A 与钙离子信号调节亲环素配体(CAML)相互作用后对细胞基因表达的影响。**方法** 分别构建 HCV NS4A 及 CAML 真核表达载体 pCMV/Myc-NS4A 及 pcDNA 3.1/HisA-CAML, 分别转染 pCMV/Myc-NS4A (实验组)及 pCMV/Myc 空载体(对照组)至稳定表达 CAML 的 293 细胞,提取总 mRNA, 逆转录为 cDNA, 基因芯片技术检测转染 NS4A 对稳定表达 CAML 细胞株基因表达谱的影响。**结果** 与细胞凋亡有关的 Rho 蛋白信号转导相关基因有 7 种, 4 种呈现上调表达, 3 种呈现下调表达。**结论** 转染 HCV NS4A 后的 293-CAML 细胞的基因表达谱发生了一系列改变, 尤其是一些与细胞凋亡相关的 Rho 蛋白信号转导途径相关基因。HCV NS4A 可能通过与 CAML 相互作用对细胞凋亡过程产生影响, 并且主要以负调节为主, 从而赋予细胞对凋亡的抵抗, 并可能因此导致病毒感染的慢性化。

**【关键词】** 丙型肝炎病毒非结构蛋白 4A; 基因芯片; 细胞凋亡

**Detection of gene expression influence after the interaction between HCV NS4A and CAML with microarray assay** CHENG Yong-qian, LIU Yan, WANG Lin, CHENG Jun, XU Dong-ping, ZHONG Yan-wei, DAI Jiu-zeng, LI Xiao-dong. The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Corresponding author: CHENG Yong-qian, Email: cheng.yq@126.com; CHENG Jun, Email: cj@genetherapy.com.cn

**【Abstract】 Objective** To study gene expression influence after the interaction between HCV NS4A and CAML. **Methods** The vector of pCMV/Myc-NS4A and pcDNA3.1/HisA-CAML were constructed by routine molecular biological methods. The 293 cells were transfected with pCMV/Myc-NS4A and pcDNA 3.1/HisA-CAML by lipofectamine, respectively. And pCMV/Myc vector was transfected as negative control. Total RNA was isolated and reverse transcribed. The cDNAs were subjected for microarray screening. **Results** Seven genes were found related to cell apoptosis, among which, 4 showed up-regulated and 3 were down-regulated. **Conclusions** The

作者单位:100039 北京市,解放军第 302 医院(程勇前、刘妍、王琳、徐东平、钟彦伟、戴久增、李晓东);北京地坛医院(成军)

通讯作者:程勇前 Email: cheng.yq@126.com

成军 Email: cj@genetherapy.com.cn

expression of NS4A protein influenced the expression spectrum of 293-CAML cells, especially some genes related to cell apoptosis pathway. HCV NS4A may have some negative effect on the progress of cell apoptosis, which may lead to chronic HCV infection.

**【Key words】** HCV non-structure protein 4A; Microarray assay; Cell apoptosis

HCV 感染的慢性化比率很高,除约 20% 的急性感染者可自发清除 HCV 外,绝大多数都将发展为慢性丙型肝炎,甚至肝硬化和肝细胞癌<sup>[1]</sup>。但 HCV 感染之后的慢性化机制目前还不十分清楚。HCV 不仅可以感染肝细胞,而且可以在外周血单个核细胞存在并复制<sup>[2-4]</sup>。HCV 编码的蛋白与白细胞蛋白之间的相互作用可能在 HCV 持续感染并慢性化过程中具有重要作用。

本课题组通过酵母双杂交技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 4A (HCV NS4A) 与白细胞文库中的相互作用蛋白时发现 NS4A 在酵母细胞中与钙离子信号调节亲环素配体 (CAML) 具有相互结合作用<sup>[5]</sup>,并利用免疫共沉淀技术证实二者在哺乳动物细胞中同样可以相互结合<sup>[6]</sup>。

CAML 作为亲环素 B 的结合蛋白于 1994 年首次发现,尽管其具体作用机制目前还不十分清楚,但许多研究已证实其在 T 细胞受体及钙离子信号转导、细胞凋亡、免疫调节以及病毒感染等方面具有重要作用<sup>[7]</sup>。Feng 等<sup>[8]</sup>研究证实霍普金肉瘤相关疱疹病毒 K7 蛋白可以与细胞内 CAML 结合,可增加胞质钙离子反应,抑制凋亡诱导剂所致的细胞线粒体膜电位丧失,赋予细胞对凋亡的抵抗,从而保护细胞的线粒体使病毒完成在宿主细胞中的复制,并且保持持续感染。Kumar 等<sup>[9]</sup>证实与调节细胞凋亡和生长有关的人立早基因 IEX-1 可以与 CAML 相互作用,因此认为 CAML 与调节细胞凋亡有关。

细胞凋亡涉及细胞内复杂的分子调控机制,由一系列基因控制,并受复杂的信号调节。为探讨 HCV NS4A 与 CAML 相互作用后对细胞凋亡分子水平的可能影响,本课题组通过基因芯片技术检测转染 HCV NS4A 后可以稳定表达 CAML 的 293 细胞株的基因表达谱的改变。

## 材料和方法

### 一、材料

293 细胞及感受态大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  (本室保存), pcDNA3.1/His-A 真核表达载体 (Invitrogen 公司产品)、pCMV/Myc 真核表达载体 (Clontech 公司产品)、Fugene 6 转染试剂 (Roche 公司产品)、pGEM-Teasy 载体 (Promega 公司产品)、限制性内切酶 *Eco* R I、*Bgl* II、*Bam* H I 和 *Xho* I 均为 Invitrogen 公司产品。稳定表达 pcDNA 3.1/His-A-CAML 的 293 细胞株由本室构建。

### 二、HCV NS4A 蛋白真核表达载体的构建

以含有丙型肝炎病毒 (HCV) 全基因组 cDNA 的质粒 pBRTM3011 为模板,按照 HCV NS4A 全长序列设计引物 (上游: 5' -GAATTCGTAGCACCTGGGTGCTCGT-

TG-3';下游:5'-AGATCTTCAGCACTCTTCCATCTCATCG-3')进行PCR扩增出HCV NS4A的完整序列,连接入pGEM-T载体,DNA测序正确后,经EcoRI和BglII酶切后与pCMV/Myc载体连接,并酶切鉴定。

### 三、CAML蛋白真核表达载体的构建

从Jurkat细胞中提取的mRNA,反转录为cDNA作为模板,按照CAML全长cDNA序列设计的引物(上游:5'-GGATCCACATGGAGTCGATGGCCGTC-3';下游:5'-CCCTCGAGTCATGGTACTTCAGAGCC-3')进行PCR,扩增出CAML的完整序列,连接入pGEM-T-easy载体,DNA测序正确后,经BamHI和XhoI酶切后与pcDNA3.1/His-A载体连接,并酶切鉴定。

### 四、pCMV/Myc-NS4A转染至pcDNA3.1/HisA-CAML稳定转染细胞株

pCMV/Myc-NS4A(实验组)及pCMV/Myc空载体(对照组)分别转染稳定转染pcDNA3.1/HisA-CAML的293细胞。细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养液中。培养细胞计数并铺板在含血清但不含抗生素的正常培养基中,转染当天80%汇片。取6μl FuGENE 6,用无血清培养基稀释到100μl,混匀温育5min,按照转染试剂:DNA(μg)为2:1直接加入DNA,混匀并温育45min,逐滴加至直径为60mm的培养板中,培养48h后收集细胞。

### 五、细胞mRNA提取

Trizol法抽提RNA,定量后使用Agilent 2100质检,QIAGEN RNaseasy mini试剂盒纯化RNA。

### 六、探针标记及杂交

实验标记方法采用放大后间接标记法,其中实验组RNA采用Cy3荧光标记,对照组RNA采用荧光Cy5标记。RNA进行标记后利用等量的探针进行杂交,于50℃,16h杂交,并在50℃洗片(具体操作由上海生物芯片有限公司完成)。

### 七、检测与分析

芯片结果采用Agilent(Axon)扫描仪进行扫描,软件读取数据,分辨率为10μm,PMT 100%,采用Genespring进行Normalize处理分析,确定Cy3/Cy5,即实验组/对照组。差异基因筛选标准Ratio≥2或≤0.5, $P < 0.05$ 。阳性结果判断: Cy3/Cy5 > 2.0,红色荧光,表示表达增强; Cy3/Cy5 < 0.5,绿色荧光,表达减弱(具体操作由上海生物芯片有限公司完成)。

## 结 果

### 一、构建的HCV NS4A基因真核表达载体

经EcoRI和BglII酶切pCMV/Myc-NS4A质粒,得到约3.5kb的载体片段以及约162bp的NS4A片段,提示HCV NS4A基因真核表达载体构建成功(图1)。

### 二、构建的CAML基因真核表达载体

如图2,经BamHI和XhoI酶切pcDNA3.1/His-A-CAML质粒,得到约5.5kb的载体片段以及891bp的CAML片段,提示CAML基因真核表达载体构建

成功。

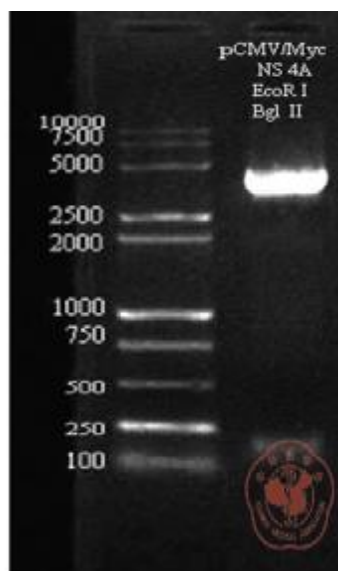


图1 *EcoR* I 和 *Bgl* II 酶切鉴定 pCMV/Myc-NS4A 载体

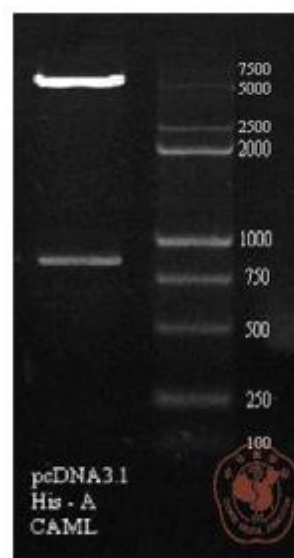


图2 *Bam* H I 和 *Xho* I 酶切鉴定 pcDNA3.1/His-A-CAML 载体

### 三、总 RNA 及 mRNA 的定性和定量分析

如图3所示,前面两个峰,第一个是 lab-on-chip 的加入液,后面是 5S 峰;后面两个峰,前面的是 18S 峰,后面的是 28S 峰,两个峰的面积比值是 2,质检结果合格。

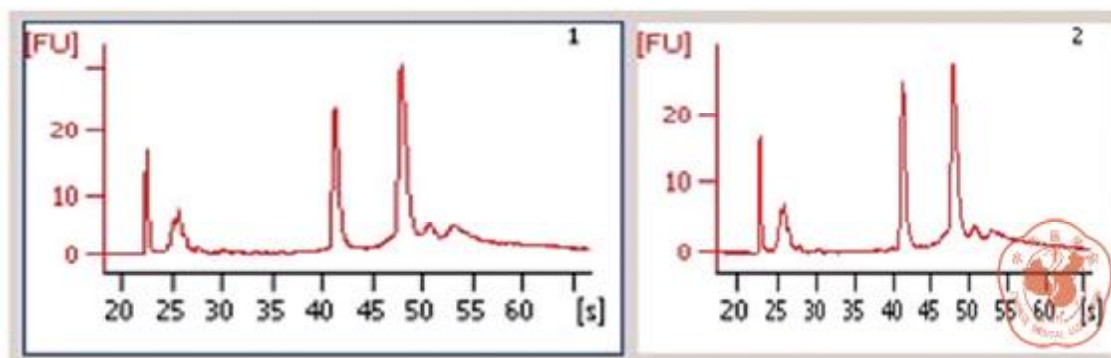


图3 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析

### 四、表达水平改变的基因

在基因芯片的扫描分析中,荧光染料的 Cy3/Cy5 比值在 2.000 以上,判断为上调表达基因;荧光染料的 Cy3/Cy5 比值在 0.500 以下,判断为下调表达基因。在本研究中共有 48 种基因的表达水平上调,其中未知功能基因 13 种;36 种基因的表达水平下调,其中未知功能基因 13 种。在以上结果中 Rho 鸟嘌呤核苷酸交换因子(GEF)10 基因表达明显上调,Cy3/Cy5 比值 12.760,与 Rho 蛋白信号转导相关基因中有 4 种呈现上调表达,3 种呈现下调表达(表1)。



表1 与 Rho 蛋白信号转导相关基因表达情况

与 Rho 蛋白信号转导相关基因编码蛋白	GenBank	表达水平	Cy3/Cy5 比值
Rho GTPase 激活蛋白 9	AF161339	上调	2.050
RAB26( Ras 原癌基因超家族)	NM_014353	上调	2.142
鸟嘌呤核苷酸交换因子 2 原癌基因	NM_003371	上调	2.151
Rho 鸟嘌呤核苷酸交换因子( GEF)10	NM_014629	上调	12.760
磷脂酶 A2	NM_003561	下调	0.421
肌球蛋白,轻链多肽 7	NM_021223	下调	0.467
G 蛋白连接受体 3	AI096774	下调	0.500

## 讨 论

细胞凋亡由细胞内复杂的网络调节完成,病毒感染后,感染细胞既可成为宿主免疫反应的靶子,也可通过细胞凋亡作为限制病毒复制的防御机制。为对抗宿主防御机制,病毒也存在精密的机制干扰细胞凋亡过程,从而赋予细胞对凋亡的抵抗,使病毒完成裂解细胞的复制,并且保持在宿主细胞中的持续感染。

以往对细胞凋亡的研究大量集中在凋亡信号途径对胞核的影响。目前大量研究表明,胞质内信号转导引起诸如细胞皱缩、膜发泡、凋亡小体形成及其被巨噬细胞吞噬等过程中的形态改变也相当重要。凋亡细胞及巨噬细胞吞噬凋亡小体时细胞形态的改变是由细胞骨架的变化所引起的,而 Rho GTPases 是细胞骨架肌动蛋白的重要调节因子<sup>[10,11]</sup>。

基因芯片是基因表达谱数据的重要来源,为阐明细胞基因表达谱的改变提供丰富而全面的数据。本研究应用基因芯片技术比较 pCMV/Myc-NS4A(实验组)及 pCMV/Myc 空载体(对照组)分别转染稳定表达 CAML 的 293 细胞的基因表达谱之后发现,转染 NS4A 后的 293-CAML 细胞有一系列与 Rho GTPases 信号通路相关的基因表达水平发生了改变,如 Rho 鸟嘌呤核苷酸交换因子( GEF)10、Rho GTPase 激活蛋白 9、RAB26( Ras 原癌基因超家族)、鸟嘌呤核苷酸交换因子 2 原癌基因( vav)等的基因表达明显上调,而肌球蛋白、G 蛋白连接受体等基因表达明显下调,提示 NS4A 可能通过与 CAML 相互作用对 Rho GTPases 信号通路活性产生影响。

Rho GTPases 是一类小 GTPases,分子量为 20 ~ 30 kD,属于 Ras 超家族中的一类,以结合 GDP(无活性)和结合 GTP(有活性)的方式发挥其分子开关作用,主要与细胞骨架肌动蛋白的结构改变有关,同时与细胞形态、极性、细胞黏附、转移、信号转导和细胞凋亡等多种生物学行为有密切关系<sup>[12,13]</sup>。

Rho GTPases 的作用受多种因子调控<sup>[14]</sup>:目前发现有 60 余种鸟嘌呤核苷酸交换因子( guanine nucleotide exchange factors, GEFs),如 Vav、Dbl 和 Tiam-1 等为 Rho 的激动剂;70 余种 GTP 酶活化蛋白( GTPase activating proteins, GAPs)为 Rho 的灭活剂,以及 4 种 GDP 分离抑制因子 GDIs( GDP dissociation inhibitors),Rho GTPase 信号调节途径参见图 4。

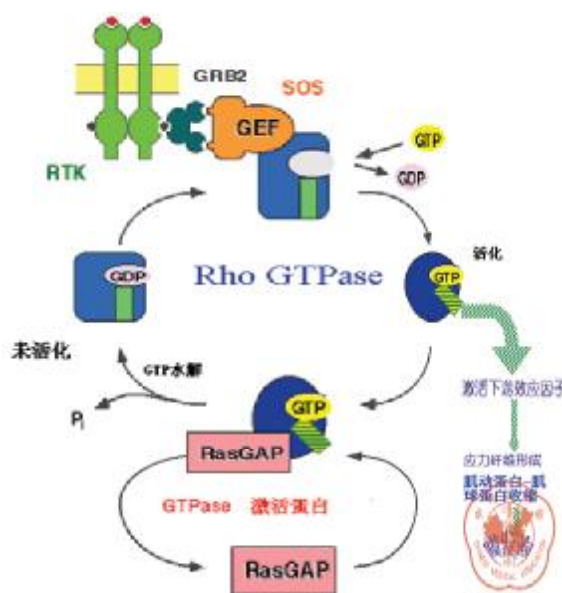


图4 Rho GTPase 信号调节途径示意图

Ikeda 等<sup>[15]</sup>在研究大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)凋亡时发现,在 HSCs 中,采用 C3 抑制 Rho 活性或 Y-27632 抑制 Rho 激酶活性,可增加胱冬肽酶 3 活性,从而促进 HSCs 凋亡。也就是说 Rho 活性增强可以抵抗细胞凋亡的发生。类似结果也得到其他实验的证实, Hippenstiell 等<sup>[16]</sup>在探讨 Rho GTPases 对人对内皮细胞凋亡影响时发现,抑制 Rho 蛋白活性可降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 并增加前凋亡蛋白 Bid 的表达,抑制 Rho 蛋白活性可诱导胱冬肽酶 9 和胱冬肽酶 3 依赖的细胞凋亡,认为阻止内皮细胞凋亡需要 RhoA 蛋白功能的激活。由此我们推论, NS4A 与 CAML 相互作用后可能会通过激活 Rho GTPases 信号通路从而赋予细胞对凋亡的抵抗,使病毒完成裂解细胞的复制,并且保持在宿主细胞中的持续感染。

目前也有许多研究认为 Rho/Rho 激酶具有促进细胞凋亡的作用<sup>[17-19]</sup>。在凋亡整个过程中,凋亡细胞和巨噬细胞的肌动蛋白细胞骨架重组来自 Rho GTPase 的信号途径。凋亡时,在 Rho 蛋白及其下游效应因子作用下,肌动蛋白-肌球蛋白收缩力的产生,不仅使细胞膜发泡,形成凋亡小体,有利于巨噬细胞的吞噬,同时也拉动邻近同类细胞,保持组织的完整性。但本研究结果提示与细胞膜发泡、凋亡小体形成相关的肌球蛋白的基因表达是下调的,也显示了细胞对凋亡的抵抗。不同的实验结果可能与实验所用的不同细胞株有关。

但同时研究也发现,与细胞内溶血卵磷脂(LPA)产生有关的磷脂酶 A2 的基因表达呈现下调。而 LPA 对许多细胞的凋亡具有保护作用<sup>[20-22]</sup>,其减少可能会削弱细胞对凋亡的抵抗能力。LPA 也参与 Rho GTPases 信号通路的调节:胞质溶胶中存在着不具有活性的与 GDI 结合的 Rho-GDP,在 LPA<sup>[23]</sup>等因素作用下,GDI 解离 Rho-GDP 到细胞膜上,在 GEF 的作用下转变为具有活性的 Rho-GTP, Rho-

GTP 作用于下游的效应分子,在 GAP 的作用下再转变为无活性的 Rho-GDP,完成一个循环。因此,LPA 的减少又成为 Rho GTPases 信号通路的一个负向调控因素。

由此可见,HCV NS4A 与 CAML 相互作用后可能通过 Rho 蛋白信号转导途径对细胞凋亡过程产生影响,并以负向调节为主,从而赋予细胞对凋亡的抵抗,因此导致病毒感染的慢性化。这一研究结果可能为揭示 HCV 感染的慢性化机制提供新的分子生物学解释。

此外,基因芯片研究结果还提示细胞内可抑制病毒复制的 IFN $\alpha$  刺激的基因因子 3( ISGF3 )表达明显下调( ratio 0.465 ),而 Wang 等<sup>[24]</sup>研究证实 p115-RhoGEF 的激活可以抑制 HIV-1 的复制。那么 Rho GTPases 信号通路的激活对 HCV 的复制是否会产生影响还有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*,2002,36:S35-S36.
- 2 Castillo I, Rodriguez-Inigo E, Bartolome J, et al. Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection. *Gut*,2005,54:682-685.
- 3 Goutagny NA, Fatmi V, De Ledinghen F, et al. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*,2003,187:1951-1958.
- 4 Pham TN, MacParland SA, Mulrooney PM, et al. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. *J Virol*,2004,78:5867-5874.
- 5 程勇前,王琳,成军,等. 酵母双杂交技术筛选人白细胞 cDNA 文库中 HCV NS4A 结合蛋白及 CAML 基因的克隆. *中华实验和临床病毒学杂志*,2007,21:47-49.
- 6 程勇前,成军,王琳,等. 体内免疫共沉淀对 HCV NS4A 与参与 Ca<sup>2+</sup> 信号调节的 CAML 蛋白相互作用的证实. *中华传染病杂志*,2007,25:76-79.
- 7 程勇前,成军. 钙离子信号调节亲环素配体研究进展. *世界华人消化杂志*,2007,15:56-60.
- 8 Feng PH, Park J, Lee BS, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus mitochondrial K7 protein targets a cellular calcium-modulating cyclophilin ligand to modulate intracellular calcium concentration and inhibit apoptosis. *J Virol*,2002,76:11491-11504.
- 9 Kumar R, Lutz W, Frank E, et al. Immediate early gene X-1 interacts with proteins that modulate apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*,2004,323:1293-1298.
- 10 Coleman ML, Olson MF. Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ*,2002,9:493-504.
- 11 Mills JC, Stone NL, Pittman RN. Extranuclear apoptosis. The role of the cytoplasm in the execution phase. *J Cell Biol*,1999,146:703-708.
- 12 Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*,2001,81:153-208.
- 13 Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*,1998,279:509-514.
- 14 Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*,2002,420:629-635.
- 15 Ikeda H, Nagashima K, Yanase M, et al. Involvement of Rho/Rho kinase pathway in regulation of apoptosis in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,2003,285:G880-G886.
- 16 Hippenstiel S, Schmeck B, Guessan PD, et al. Rho protein inactivation induced apoptosis of cultured human endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,2002,283:L830-838.
- 17 Petrache I, Crow MT, Neuss M, et al. Central involvement of Rho family GTPases in TNF-alpha-mediated bovine pulmonary endothelial cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*,2003,306:244-249.
- 18 Jin S, Shimizu M, Balasubramanyam A, et al. Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) induces actin cytoskeletal reorganization and apoptotic-like blebbing in lens cells. *Cell Motil Cytoskeleton*,2000,45:133-148.

- 19 Hagmann J, Burger MM, Dagan D. Regulation of plasma membrane blebbing by the cytoskeleton. *J Cell Biochem*, 1999, 73:488-499.
- 20 Deng W, Balazs L, Wang DA, et al. Lysophosphatidic acid protects and rescues intestinal epithelial cells from radiation- and chemotherapy induced apoptosis. *Gastroenterology*, 2002, 123:206-216.
- 21 Fang X, Yu S, LaPushin R, et al. Lysophosphatidic acid prevents apoptosis in fibroblasts via G(i)-protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem J*, 2000, 352:135-143.
- 22 Sautin YY, Crawford JM, Svetlov SI. Enhancement of survival by LPA via Erk1/Erk2 and PI 3-kinase/Akt pathways in a murine hepatocyte cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281: C2010-C2019.
- 23 Ye X, Ishii I, Kingsbury MA, et al. Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1585:108-113.
- 24 Wang L, Zhang H, Solski PA, et al. Modulation of HIV-1 replication by a novel RhoA effector activity. *J Immunol*, 2000, 164: 5369-5374.

(收稿日期:2008-04-03)

(本文编辑:王丹静)

程勇前,刘妍,王琳,等. HCV NS4A 与钙离子信号调节亲环素配体相互作用对细胞基因表达的影响 [J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2008, 2(3):138-145.