

· 基础研究 ·

丙型肝炎病毒 F 蛋白诱导 LX2 肝星形细胞活化*

邵圣文,徐伯赢,卢添宝,徐菊玲,顾福萍,段 劲
(湖州师范学院医学院创新实验室,浙江湖州 313000)

摘要:目的 探讨丙型肝炎病毒(HCV)F 蛋白对肝星形细胞(HSC)功能的影响。方法 采用脂质体转染法将 pcDNA3.1-f(实验组)或 pcDNA3.1 空质粒(对照组)转染 HSC 株 LX2 细胞,24、48 h 后收集细胞,用 Western blot 法检测 α -肌动蛋白(α -SMA)含量,RT-PCR 法测定金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP-1)和基质金属蛋白酶 2(MMP-2)基因 mRNA 表达水平。结果 转染后 24、48 h,实验组 LX2 细胞 α -SMA 蛋白表达量以及 TIMP-1 基因 mRNA 水平均明显高于对照组,两组细胞 MMP-2 基因 mRNA 水平接近。结论 HCV F 蛋白能够活化 HSC,上调其 TIMP-1 基因转录水平,但不影响 MMP-2 基因转录水平,使 MMP-2 蛋白的有效酶活性下降,造成肝组织细胞外基质(ECM)降解速率减慢,进而发生纤维化。

关键词:肝炎病毒属;肝细胞;金属蛋白酶类组织抑制剂;金属蛋白酶类

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.09.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)09-0883-03

Activation of hepatic stellate LX2 cells by F protein of hepatitis C virus*

Shao Shengwen, Xu Boying, Lu Tianbao, Xu Juling, Gu Fuping, Duan Jin

(Medical School Innovation Laboratory, Huzhou Teachers College, Huzhou, Zhejiang 313000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of hepatitis C virus(HCV) F protein on function of hepatic stellate cells. **Methods** 24 h and 48 h after transfection pcDNA3.1-f(test group) or pcDNA3.1(control group) plasmid into hepatic stellate LX2 cells by liposome, the protein of smooth muscle α -actin(α -SMA) was detected by Western blot, and the mRNA level of tissue inhibitor factor 1 of metalloproteinases(TIMP-1) and matrix metalloproteinase 2(MMP-2) gene were examined by RT-PCR. **Results** 24 h and 48 h after LX2 cells transfected pcDNA3.1-f(test group) or pcDNA3.1(control group), the content of α -SMA protein and the mRNA level of TIMP-1 gene of cells in test group was high than that in control group, and the mRNA level of MMP-2 gene of cells showed no difference between test and control groups. **Conclusion** HCV F protein is able to activate hepatic stellate LX2 cells, enhance the mRNA level of TIMP-1 gene, but not affect MMP-2 gene transcription, which make the effective enzyme activity of MMP-2 protein be decreased, the degradation rate of ECM in hepatic tissue slowed down, and result in hepatic fibrosis.

Key words: hepatitis virus; hepatocytes; tissue inhibitor of metalloproteinases; metalloproteinases

我国丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染者约 3 800 万,其中 60%为慢性感染^[1]。研究表明,HCV 慢性感染者中肝纤维化发生率达 25%,其中约 5%患者发展为肝硬化,相关肝癌年发病率约为 0.2%~3%^[2]。HCV 慢性感染者肝纤维化机制尚不十分清楚。2001 年,Xu 等^[3]发现 HCV 的 C 基因编码一个新的蛋白质,被命名为 ARF(alternate reading frame, ARF)蛋白,也称 F 蛋白^[4]。在 HCV 相关肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者血液中,F 蛋白以及抗 F 蛋白抗体检出率均高于其他 HCC 患者,提示 F 蛋白与 HCC 有关^[5]。另有研究表明,在肝纤维化过程中,肝星形细胞(hepatic stellate cells, HSC)功能发生紊乱。本研究通过分析 F 蛋白对 HSC 功能的影响,探讨 HCV 感染相关的肝纤维化发生机制。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 HSC 株 LX2 细胞为上海天呈公司生产。pcDNA3.1-f 质粒由第二军医大学武文斌博士惠赠。小鼠 α -肌动蛋白(smooth muscle α -actin, α -SMA)抗体为美国 CST 公司生产。小鼠 GAPDH 抗体为上海康成生物公司生产。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)标记的羊抗兔 IgG 抗体、羊

抗鼠 IgG 抗体以及 BCIP/NBT 显色试剂为武汉博士德公司生产。Trizol 试剂和脂质体 Lipfectamine2000 为美国 Invitrogen 公司生产。DMEM 培养基和胎牛血清为 Gibco 公司生产。逆转录酶及 Taq 酶为大连宝生物公司生产。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养与转染 转染前 1 d 将 LX2 细胞接种在含 10%胎牛血清及双抗的 DMEM 培养液中,37℃、5%CO₂ 培养,待细胞长至 70%~80%融合度时,进行转染。转染复合物配制:取 pcDNA3.1-f 质粒(实验组)150 μ g 与 250 μ L DMEM 培养液混匀,室温静置 5 min,另取 6 μ L 脂质体与 250 μ L DMEM 培养液混匀,室温静置 5 min,将二者混匀后室温静置 20 min。取 500 μ L 转染复合物与 300 μ L 无血清 DMEM 培养液,加入待转染细胞孔内,37℃、5%CO₂ 培养。以相同方法将 pcDNA3.1 空质粒(对照组)转染 LX2 细胞。转染 8 h 后更换培养液,加入含 350 μ g/mL G418 及 10%胎牛血清 DMEM 完全培养液,同时设立未转染质粒的 LX2 细胞作为对照孔,继续培养。分别于转染后不同时间点收集细胞进行检测。

1.2.2 α -SMA 检测 收集转染 24、48 h 的 LX2 细胞,加入

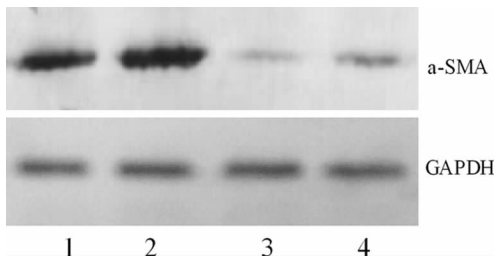
* 基金项目:湖州市自然科学基金资助项目(2008YZ05)。

120 μ L 细胞裂解液,12% SDS-PAGE 电泳后将蛋白转移到硝酸纤维素薄膜上,Western blot 分析 α -SMA 蛋白表达情况,一抗为小鼠 α -SMA 抗体(1:200 稀释),二抗为 AP 标记的羊抗鼠 IgG(1:1000 稀释),BCIP/NBT 显色后拍照,条带灰度值代表 α -SMA 蛋白表达水平。

1.2.3 金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP-1)和基质金属蛋白酶 2(MMP-2)基因 mRNA 表达量测定 收集转染 24、48 h 的 LX2 细胞,应用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA,按说明书进行操作。TIMP-1 上游引物:5'-CTC GTC ATC AGG GCC AAG TT-3',下游引物:5'-CAG CAA TGA GAA ACT CCT CGC-3',扩增片段长度为 210 bp。MMP-2 上游引物:5'-CTT TGC TCG TGC CTT CCA A-3',下游引物:5'-CCG TAC TTG CCA TCC TTC TCA-3',扩增片段长度为 386 bp。内参照 β -actin 上游引物:5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC-3',下游引物:5'-CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA-3',目标片段长度为 227 bp。逆转录反应体系组成:1 μ L oligo(dT)15(0.5 μ g/mL),1 μ g 纯化 RNA,5 μ L 5 \times 逆转录酶缓冲液,1 μ L dNTP,1 μ L 逆转录酶,无核酶双蒸水补至 25 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴 90 min,得到 cDNA 模板。PCR 反应体系组成:2 μ L cDNA 模板,2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液,0.5 μ L 上游引物,0.5 μ L 下游引物,1 μ L dNTP,0.25 μ L Taq 酶,双蒸水补足至 25 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 50 s,循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 10 min。取 10 μ L PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外照射拍照,条带灰度值代表 TIMP-1 或 MMP-2 的相对表达量。每个时间点进行独立 3 次试验。

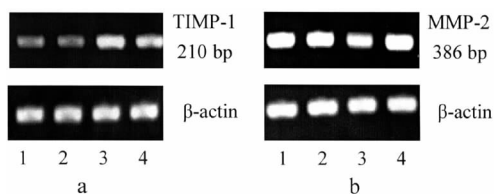
2 结果

2.1 pcDNA3.1-f 质粒转染后 LX2 细胞 α -SMA 蛋白表达情况 实验组转染 LX-2 细胞 24、48 h 后,细胞 α -SMA 蛋白表达量(1 和 2 泳道)均明显高于对照组(3 和 4 泳道),见图 1。提示 HCV F 蛋白使 LX-2 细胞发生了活化。



1、2:实验组转染 LX2 细胞 24、48 h; 3、4:对照组转染 LX2 细胞 24、48 h。

图 1 pcDNA3.1-f 对细胞 α -SMA 蛋白表达的影响



1、2:对照组转染 LX2 细胞 24、48 h 后 TIMP-1 mRNA 表达(a)与 MMP-2 mRNA 表达(b);3、4:实验组转染 LX2 细胞 24、48 h 后 TIMP-1 mRNA 表达(a)与 MMP-2 mRNA 表达(b)。

图 2 pcDNA3.1-f 对 TIMP-1 和 MMP-2 基因表达的影响

2.2 pcDNA3.1-f 对 LX2 细胞 TIMP-1 和 MMP-2 基因表达的影响 实验组转染 LX-2 细胞 24、48 h 后细胞 TIMP-1 基因 mRNA 含量(图 2a-3、4 泳道)均明显高于对照组转染细胞 TIMP-1 基因 mRNA 含量(图 2a-1、2 泳道)。实验组和对照组转染 LX-2 细胞 24、48 h 后细胞 MMP-2 基因 mRNA 含量基本相同(图 2b)。

3 讨论

肝纤维化是慢性肝病进展为肝硬化的重要环节^[6-7]。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积是肝纤维化的直接诱因^[8-9]。ECM 沉积取决于 ECM 生成与降解速度之间的平衡。基质金属蛋白酶家族(matrix metalloproteinases, MMPs)是重要的 ECM 降解酶^[10-11]。金属蛋白酶组织抑制因子家族(tissue inhibitor factors of metalloproteinases, TIMPs)是多种组织细胞分泌的蛋白质家族。在机体内, TIMPs 蛋白能够与 MMPs 蛋白结合形成复合物,从而抑制 MMPs 蛋白酶活性,复合物中两种蛋白比例决定 MMPs 实际酶活性^[12]。

已有研究表明,HSC 功能状态与肝纤维化密切相关^[13-14]。正常肝组织 HSC 处于静止态,长期慢性肝组织损伤可诱导 HSC 活化,使得细胞 α -SMA 以及 TIMPs 表达增加,细胞收缩能力增强^[15]。本文观察到,pcDNA3.1-f 转染 LX-2 细胞后,细胞 α -SMA 蛋白表达量明显增加, TIMP-1 基因转录水平明显增加,而 MMP-2 基因转录水平没有发生明显改变,提示 HCV F 蛋白能诱导静止态 LX-2 细胞活化。F 蛋白诱导活化的 LX-2 细胞,通过上调 TIMP-1 基因转录而增强 TIMP-1 蛋白的合成与分泌。由于 TIMP-1 蛋白能够抑制 MMP-2 酶活性,因此 TIMP-1 蛋白合成与分泌增加会导致 MMP-2 蛋白的实际酶活性下降,造成肝组织 ECM 降解速率减慢,从而引起肝组织 ECM 沉积。

总之,HCV F 蛋白通过活化 HSC,使之分泌大量 TIMP-1 蛋白,造成 MMP-2 实际酶活性下降,引起肝组织 ECM 降解速率减慢,最终导致 ECM 沉积后诱导肝组织发生纤维化。

参考文献:

- [1] 中华医学会肝病学会,中华医学会传染病与寄生虫病学分会,丙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志,2004,12(4):194-198.
- [2] Lonardo A, Loria P, Adinolfi LE, et al. Hepatitis C and steatosis: a reappraisal[J]. J Viral Hepat, 2006, 13(2): 73-80.
- [3] Xu Z, Choi J, Yen TS, et al. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift[J]. EMBO J, 2001, 20(14): 3840-3848.
- [4] Xu Z, Choi J, Lu W, et al. Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum[J]. J Virol, 2003, 77(2): 1578-1583.
- [5] Branch AD, Walewski JL, Gutierrez JA, et al. The hepatitis C virus alternate reading frame(ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others[J]. Semin Liver Dis, 2005, 25(1): 105-117.

- [6] 周伟,沈薇.肝细胞生长因子对肝纤维化的保护作用及其机制研究[J].重庆医学,2009,38(4):398-402.
- [7] Son G, Hines IN, Lindquist J, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in hepatic stellate cells blocks the progression of hepatic fibrosis[J]. Hepatology, 2009, 50(5): 1512-1523.
- [8] Perugorria MJ, Latasa MU, Nicou A, et al. The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin participates in the development of mouse liver fibrosis[J]. Hepatology, 2008, 48(4): 1251-1261.
- [9] Guo J, Friedman SL. Hepatic fibrogenesis[J]. Semin Liver Dis, 2007, 27(4): 413-426.
- [10] Han YP, Yan C, Zhou L, et al. A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix [J]. J Biol Chem, 2007, 282(17): 12928-12939.
- [11] Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, et al. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(6): 1362-1378.
- [12] Consolo M, Amoroso A, Spandidos DA, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease[J]. Int J Mol Med, 2009, 24(2): 143-152.
- [13] Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells—a key issue in liver fibrosis[J]. Front Biosci, 2002, 7(1): 808-826.
- [14] Muhanna N, Doron S, Wald O, et al. Activation of hepatic stellate cells after phagocytosis of lymphocytes: A novel pathway of fibrogenesis [J]. Hepatology, 2008, 48(3): 963-977.
- [15] Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury[J]. Semin Liver Dis, 2001, 21(3): 427-436.

(收稿日期:2010-08-10 修回日期:2010-09-10)

(上接第 882 页)

总之,对急性期 CPHD 患者无法用原发病解释的顽固性右心衰竭、低氧血症、血浆 D-二聚体升高,尤其是出现双下肢不对称水肿等临床表现,应高度警惕合并 PTE 的可能性,检查有无长期卧床及下肢深静脉血栓的症状、体征等,行静脉血栓栓塞危险性评估,对诊断可疑者尽早行 PE 相关检查,CTPA 可作为诊断 PE 的可靠手段^[12],CTPA 诊断 PE 的敏感性和特异性分别为 83%和 96%^[13]。对临床怀疑 CPHD 合并肺栓塞、无客观证据者,建议行预防性抗凝治疗。

参考文献:

- [1] 张欣,于文成.肺栓塞的诊治进展[J].山东医药,2010,50(3):106-107.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会.肺血栓栓塞症的诊断与治疗指南(草案)[J].中华结核和呼吸杂志,2001,24(3):259-264.
- [3] 唐中建.急性大块肺栓塞抢救 2 例报道[J].重庆医学,2009,38(20):2546-2549.
- [4] 王小平,曾祥毅,李丽荣,等.以咯血为表现的肺栓塞 1 例[J].实用医学杂志,2007,23(3):315.
- [5] 杜林林,卢中秋,李玉苹,等.急性肺栓塞早期诊断及误诊分析[J].实用医学杂志,2007,23(1):124-125.
- [6] 温燕杭,廖海星,肖霁仪,等.肺栓塞范围及部位与肺动脉压力变化关系的探讨[J].广东医学,2009,30(6):1109-1110.
- [7] Enden T, Klow NE. CT pulmonary angiography and suspected acute pulmonary embolism[J]. Acta Radiol, 2007, 44(2): 310-315.
- [8] Hadjiliadis D, Klempf K, Covert JA, et al. Elevated D-dimer levels in patients admitted to the medical intensive care unit (mCU): prevalence and association with outcomes[J]. AJRCCM, 2000, 161(4): A94.
- [9] Chan TC, Vilke GM, Brady WJ, et al. Electrocardiographic manifestations: pulmonary embolism[J]. J Emerg Med, 2006, 21(5): 263-270.
- [10] Eason C. Diagnosis of pulmonary embolism[J]. CMAJ, 2006, 168(1): 183-194.
- [11] 秦志强.电子计算机断层扫描在肺栓塞中的应用[J].中国呼吸与危重监护杂志,2010,9(1):104.
- [12] 莫党生,何德沛,轩若亮,等.肺栓塞的诊断与治疗[J].重庆医学,2007,36(7): 593-596.
- [13] Stein PD, Fowler SE, Goodman LR, et al. Multidetector computed tomography for acute pulmonary embolism[J]. N Engl J Med, 2006, 35(4): 2317-2327.

(收稿日期:2010-09-10 修回日期:2010-12-07)

启事:本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道,欢迎投稿。