

· 论 著 ·

HBV 转染肝癌细胞系基因表达谱改变的研究*

黄 健¹, 孙朝晖², 邹军荣¹, 朱晓艳¹, 熊英俊¹

(1. 江西省樟树市人民医院检验科 331200; 2. 广州军区广州总医院检验科, 广州 510010)

摘要:目的 利用寡核苷酸芯片筛选 HBV 感染应答基因, 探讨 HBV 感染分子致病机制。方法 选用 Agilent Human 1A Oligo 基因芯片进行乙型肝炎基因表达改变的研究, 用 Cy3 标记实验细胞(HepG2. 2. 15 细胞), Cy5 标记对照组细胞(HepG2 细胞), 比较 HepG2. 2. 15 细胞与 HepG2 细胞之间的基因表达谱差异; 用实时定量 PCR(RQ-PCR)对部分差异基因进行验证。结果 通过杂交、扫描、统计学分析, 根据 P Value LogRatio 值及 gProcessed signal/rProcessed signal 值从近 20 000 个基因中共筛选出差异表达基因 744 个, 其中 423 个基因表达上调, 321 个基因表达下调。用 RQ-PCR 技术对其中 4 个相关基因胰岛素样生长因子 2(IGF2)、甲胎蛋白(AFP)、干扰素同源序列结合蛋白(ICSBP)、核糖核苷酸还原酶缩多氨酸 M1(RRM1)的表达差异进行了验证, 与表达谱的结果基本保持一致。结论 通过验证, 表达谱芯片的杂交结果真实可靠, 为下一步继续进行差异表达基因的研究、了解 HBV 的致病机制打下了基础。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 寡核苷酸微阵列; 表达谱

doi:10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2011. 11. 005

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)11-1052-03

Study on gene expression profiles of hepatitis B by oligo microarray*

Huang Jian¹, Sun Zhaohui², Zou Junrong¹, Zhu Xiaoyan¹, Xiong Yingjun¹

(1. Clinical Laboratory, Zhangshu People's Hospital of Jiangxi Province, Zhangshu, Jiangxi 331200, China;

2. Clinical laboratory, General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China)

Abstract: **Objective** To disclose detailed gene expression with HBV infection and how HBV proteins regulate host cellular gene expression. **Methods** Gene expression profiles of cells with HBV infection was analyzed and compared by Agilent Human 1A oligo microarray method. We selected HepG2. 2. 15 cells as the cell line of research and the HepG2 as cell line of control. HepG2. 2. 15 cells were labeled with Cy3 and HepG2 cells were labeled with Cy5, respectively. **Results** After hybridization, microarray scanning and statistics analysis(P Value LogRatio and gProcessed signal/r Processed signal), 744 genes were differentially expressed in HepG2. 2. 15 cells contrast to HepG2 cells from almost 20 000 genes. Expression levels of 423 genes of these 744 genes were increased and 321 genes of these 744 genes were decreased. To validate the authenticity of the microarray, we adopted the technique of real time PCR to verify the genes of different expression. The results showed that the mRNA level of IGF2, AFP, ICSBP and RRM1 in HepG2. 2. 15 cells were up-regulated 9. 68, 4. 80 times and down-regulated 3. 03, 4. 02 times, respectively, comparing with HepG2 cells. The results of Oligo microarray were up-regulated 9. 89, 4. 56 times and down-regulated 2. 88, 3. 85 times, respectively. **Conclusion** From the results, it was concluded that the results of genes expression profile by oligo microarray method were true and reliable. The possible responsive genes to HBV infection derived from this microarray offers new information to the exploitation of pathogenesis of HBV and shows abundant potential targets for the treatment of HBV infection.

Key words: hepatitis B virus; oligo microarray; gene expression profiles

虽然许多研究都证实, HBV 感染肝细胞后, 诱导的肝损伤并非只是病毒的直接细胞毒作用, 病毒与肝细胞之间相互作用的分子机制还不十分清楚, HBV 蛋白调控宿主细胞基因表达情况整体还了解得很少, 基因之间的相互关系也不十分清楚。本实验选用 Agilent Human 1A 寡核苷酸(Oligo)基因芯片进行乙型肝炎基因表达谱改变的研究, 筛选 HBV 感染应答基因, 探讨 HBV 感染的分子致病机制, 寻找预防和治疗 HBV 感染的靶标。

1 材料与方

1.1 实验材料 肝癌细胞系 HepG2 细胞株和转染了 HBV DNA 的 HepG2. 2. 15 细胞株由广州军区广州总医院医学实验

中心惠赠。

1.2 主要试剂与仪器 Agilent 低 RNA 荧光线性扩增试剂盒、RNA 6 000 Nano Labchip 试剂盒、60 mer Human 1A Oligo Microarray Kit、Agilent 原位杂交试剂盒-plus(5184-3568)、Agilent Human 1A Oligo Microarray(G4110B)购自美国 Ailent Technologies 公司, RNeasy mini 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq™ 荧光定量检测试剂盒、EASY Dilution 购自大连宝生物公司, DU 530 紫外分光光度计购自美国 Beckman 公司, Agilent 2100 生物分析仪、Agilent 2565BA 基因芯片扫描仪购自美国 Agilent Technologies 公司, iCycler 实时定量 PCR(RQ-PCR)仪购自美国 BIO-RAD 公司。

* 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(7000065); 江西省宜春市科技局科技计划基金资助项目(JXYC2009KSB022)。

1.3 细胞总 RNA 抽提 按照鼎国 Trizol 试剂说明书,所有接触试剂均需去 RNase 处理,待细胞数目生长至 1×10^6 个/mL,按说明书提取总 RNA。

1.4 RNA 样品的荧光标记 按照 Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit 操作说明书进行。

1.5 Agilent Human 1A 基因芯片杂交 采用 Agilent 公司生产的原位合成试剂盒、60 mer Human 1A Oligo 基因芯片试剂盒进行样品的准备和杂交。

1.6 扫描结果分析 数据用 Feature extraction7.0 软件进行数据分析及标准化处理。

1.7 RQ-PCR 对芯片结果进行验证 利用 Primer Premier5.0 软件,设计 4 个目的基因胰岛素样生长因子 2(IGF2)、甲胎蛋白(AFP)、干扰素同源序列结合蛋白(ICSBP)、核糖核苷酸还原酶缩多氨酸 M1(RRM1)及管家基因 GAPDH 引物。

1.8 统计学处理 实验中采用 Agilent Feature extraction7.0 软件进行数据分析及标准化处理,根据 P Value LogRatio 值及 gProcessed signal/rProcessed signal 值判断表达差异基因。

2 结果

2.1 对实验细胞株 HepG2.2.15 细胞的初步鉴定 转染 2 拷贝的 HBV DNA 的 HepG2.2.15 细胞株,可持续稳定地分泌 Dane 颗粒及 HBsAg、HBeAg、HBV DNA 等。用酶联免疫法(一步 ELISA 夹心法)检测 HepG2.2.15 细胞培养液中的 HBsAg 和 HBeAg,得到 S/CO 值(Sample OD 值/Cutoff OD 值, >1.0 为阳性)分别为 9.246、15.129,认定该细胞稳定地分泌 HBsAg、HBeAg,可作为实验细胞株进行下一步研究。

2.2 HepG2 细胞与 HepG2.2.15 细胞光镜形态学观察 从光镜下观察, HepG2 细胞呈梭形,贴壁生长,形态正常。HepG2.2.15 细胞呈多角型,贴壁生长,成团聚集,形态正常,但贴壁能力稍有下降。

2.3 HepG2 细胞与 HepG2.2.15 细胞标记 Agilent Human 1A 芯片杂交 Cy5 标记对照组 HepG2 细胞, Cy3 标记实验组 HepG2.2.15 细胞。将 Cy3 和 Cy5 扫描图像完全重叠后,绿色表示在 HepG2.2.15 中高表达,红色表示低表达,黄色表示表达水平无改变。

2.4 芯片杂交信号散点图及差异基因列表 以 Y 轴表示 Cy3 (HepG2.2.15)的荧光信号强度, X 轴表示 Cy5(HepG2)的荧光信号强度,从中可以看出, HepG2.2.15 细胞株相对于 HepG2 细胞株出现许多差异表达基因。在检测的 20 000 余个基因中,共筛出差异表达基因 744 个,其中 423 个基因表达上调,321 个基因表达下调。

2.5 生物信息学分析 对上述差异表达基因进行 Panther 生物学过程(Biological process)分类,发现差异表达的基因主要包括以下几类:(1)与核苷酸代谢相关;(2)与蛋白代谢修饰相关;(3)与信号传导及转录调控相关;(4)与细胞及个体发育相关;(5)与 mRNA 的转录相关;(6)与细胞周期、细胞增殖和分化相关;(7)与物质运输相关;(8)与细胞结构及细胞运动性相关;(9)与免疫防御、应激相关;(10)与细胞表面受体介导的信号转录相关等。

2.6 RQ-PCR 对芯片结果进行验证 用目的基因的相对定量结果,计算出样品之间 RNA 量的相对值,然后从实验细胞和

对照细胞的 GAPDH(内标)定量结果,求出各对目的基因 RNA 量的误差 Ratio 值,用求得的误差 Ratio 值校正实验细胞和对照细胞目的基因的相对值。从数据结果得出 IGF2、AFP、ICSBP、RRM1 分别上调 10.55、5.23 倍和下调 2.78、3.69 倍,根据管家基因 GAPDH 相对量 Ratio 值进行误差校正,实际分别上调 9.68、4.80 倍和下调 3.03、4.02 倍。而寡核苷酸表达谱芯片筛选出的这几个差异基因分别为 IGF2、AFP 上调 9.89、4.56 倍和 ICSBP、RRM1 下调 2.88、3.85 倍,与 RQ-PCR 的结果基本保持一致。

3 讨论

60 mer 长链探针一定程度上可以克服短链 Oligo 探针的缺点,特异性又较传统 cDNA 探针提高,逐步为实验室所采用^[1]。与传统 cDNA 以及短链 Oligo 探针相比,长链 Oligo 探针具有诸多优势^[2]。本实验中应用代表近 20 000 余个人类基因和 EST 的 Agilent 芯片比较 HepG2.2.15 细胞与 HepG2 细胞基因表达谱的差异,发现 744 个差异表达基因,其中在 HepG2.2.15 细胞中上调者为 423 个,下调者为 321 个。通过对这些差异基因中的各种 Panther 分类做进一步分析,基因表达上调和下调情况与目前对 HBV 感染的分子致病机制的认识基本一致。本研究观察到原癌基因 C-JUN、JUND、C-FOSL1、DRIL1、DRIL2、C-MYC 等及 RAS 基因家族 RAB35、RAB5C、RRAD、RASD1 等相关基因在 HepG2.2.15 细胞中表达上调,而抑癌基因 TP53、TP53AP1、P16、P27 等表达下调。在 HepG2.2.15 细胞中表达上调的基因还包括 IGFBP1、IGFBP2、IGF2、IGF2R、AFP、FABP1、ALB、PCNA 等,而 RRM1、IGFBP7、GAS1、S100A4、HIPK2、CHEK2、人转化生长因子 1(TGFB1)、ICSBP 等基因在 HepG2.2.15 细胞中表达下调,其中 IGF2、AFP、FABP1、ALB、DRIL1、DRIL2、PCNA、MYC 的表达上调及 RRM1、TGFB1、ICSBP 的表达下调与杨静等^[3]的实验结果一致。HBV 感染后,AFP 的表达上调^[4]。AFP 是检测 HCC 的肿瘤标志物,它在 HepG2.2.15 细胞中表达上调也进一步说明 HBV 感染会导致 HCC;RRM1 为肿瘤抑制基因,是核苷酸还原酶 M1 亚单位,与另一亚单位 M2 共同构成活性复合体,使核苷酸还原为脱氧核苷酸^[5];TGFB1 可诱导抑制肿瘤坏死因子的细胞毒性作用的 TIAF1 的表达^[6],因此,HBV 可通过下调 RRM1、TGFB1 的基因表达而导致肿瘤的发生;ICSBP 是干扰素诱导蛋白的阴性调节子,Sgarbanti 等^[7]报道,在 HIV 感染后,ICSBP 表达抑制可通过促进 IRF1 表达上调而间接促进 HIV 病毒的复制和转录。Thornton 等^[8]证实,ICSBP 可通过抑制 CD4 蛋白的表达而抑制 HIV 病毒进入宿主细胞,也可通过与 ISRE 类似蛋白结合从而抑制 HIV 的转录。有关 ICSBP 与 HBV 的关系,目前为止还没有文献报道,根据 ICSBP 在 HBV 感染后下调以及 ICSBP 与 HIV 病毒的关系,推测 ICSBP 表达下调与 HBV 感染相关。

正常组织中不易检测出 IGF2 及其受体,而 HBV 的表达产物 HBxAg 可调节 IGF2 的生成,因此感染后肝细胞中往往 IGF2 高表达^[9],可引起毛细血管增生及恶性转化。本研究所用的 Agilent 芯片上有一组 IGF 及其相关基因探针,可检测 IGF1 及其受体、IGF2 及其受体、IGF 结合蛋白 1~7(IGFBP1~7)的表达水平。杂交结果表明,IGF2BP1、IGF2BP2、IGF2、

IGF2R、IGFBP1、IGFBP2 等在 HepG2. 2. 15 细胞中表达上调, 而 IGFBP7 表达下调。

本实验首次发现 HBV 感染后, 层连蛋白的 mRNA 水平发生上调, 如 LAMA3、LAMB2、LAMR1、LAMA2。Budkowska 等^[10]的实验结果显示, 人肝中的层连蛋白在体内可能以一种种属限制性的方式与 HBV 通过前 S2 区编码的抗原决定簇结合, 因此, 层连蛋白 mRNA 水平上调可能与 HBV 进入肝细胞有关。目前为止有关层连蛋白与 HBV 感染关系的报道还比较少, 尚需深入研究; 有学者通过实验认为, 载脂蛋白 H (APOH) 可能是 HBV 进入肝细胞的受体, HBV 可能通过与 CM 或 HDL 颗粒结合, “免费搭车”带进肝细胞^[11], 因此, 推测载脂蛋白类基因的表达上调, 意味着 HBV 通过增加肝细胞上与之结合的受体数量以达到不断感染肝细胞的目的; HBV 感染还使唾液酸糖蛋白受体 (ASGR) 明显上调。ASGR 是肝细胞表达的一种特异性糖蛋白, 在调节 HBV 病毒外壳的包装及肝细胞的胞吞方面有着重要作用, 可能是 HBV 进入肝细胞的受体之一^[12], 已经用于多种抗 HBV 的药物研究。ASGR 上调可致肝细胞对 HBV 的吞饮作用加强而增加其进入肝细胞的机会; ALB 即血清清蛋白, 本实验结果显示, HBV 感染后, 肝细胞中 ALB 表达上调, 这可能是由于 HBV 前 S 区具有聚合人 ALB 受体, 人 ALB 含有天然的血清白蛋白聚合体 (PHSA), 在肝细胞上也具有聚合人 ALB 受体, HBV 以 PHSA 为桥梁吸附至肝细胞表面。HBV 感染后, 通过增加人血清中 PHSA 的总量来增加与人 ALB 结合的机会, 由此增加进入肝细胞的机会, 因此其表达上调可能与促进 HBV 吸附并进入肝细胞有关^[13-15]。

在本实验中, 对照组 HepG2 细胞和实验细胞 HepG2. 2. 15 细胞使用浓度约 20 ng/ μ L 的总 RNA 溶液进行表达量恒定的 GAPDH (内标) 的 real time RT-PCR 反应, 将得到的 Ct 值在内标的标准曲线上进行不同样品内标的表达量, 并以 HepG2 细胞为基准, 求出相对误差值 (1.09)。使用相同浓度的 HepG2 细胞和 HepG2. 2. 15 细胞的总 RNA 溶液分别进行 4 个目的基因 (IGF2、AFP、ICSBP、RRM1) 的 RQ-PCR 反应, 将得到的 Ct 值在目的基因的标准曲线上进行比较, 通过芯片筛选出的这 4 个差异基因分别为 +9.89、+4.56 倍和 -2.88、-3.85 倍, 与 RQ-PCR 的结果基本保持一致。通过 RQ-PCR 的验证, 可见表达谱芯片的杂交结果真实可靠。

参考文献:

- [1] 吴清华, 马文丽, 石嵘, 等. 基因芯片中 60 mer 寡核苷酸 SARS 冠状病毒探针的制备[J]. 广东医学, 2003, 24(1): 7-10.
- [2] Shi R, Ma WL, Wu QH, et al. Design and application of 60mer oligonucleotide microarray in SARS coronavirus detection[J]. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(12): 1165-1169.
- [3] 杨静, 姚军, 杨宁敏. 病毒感染相关基因微阵列的制备及其在 HBV 感染应答基因筛选中的应用[J]. 病毒学报,

2004, 20(3): 218-224.

- [4] Ogden SK, Lee KC, Barton MC. Hepatitis B viral transactivator HBx alleviates p53-mediated repression of alpha fectoprotein in gene expression[J]. J Bio Chem, 2000, 275(36): 4806-4808.
- [5] Bravo R, Ware CF, Mogil RJ. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-1 [J]. Nature, 1987, 326(4): 515-521.
- [6] Chang NS, Aixaki H, Kato N, et al. Cloning and characterization of a novel transforming growth factor-beta-induced T1AF1 protein that inhibits tumor necrosis factor cytotoxicity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 253(3): 743-749.
- [7] Sgarbanti M, Borsetti A, Moscufo N, et al. Modulation of human immunodeficiency virus 1 replication by interferon regulatory factors[J]. J Exp Med, 2002, 195(10): 1359-1370.
- [8] Thornton AM, Buller FM, Devico AL, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 and vaccinia virus infection by a dominant negative factor of the interferon regulatory factors family expressed in monocytic cells[J]. Proc Natl Sci USA, 1996, 93(1): 383-387.
- [9] Young IL, Yoo JH. Activation of insulin-like growth factor II signaling by mutant type p53: physiological implications for potentiation of IGF-II signaling by p53 mutant 249[J]. Molecular Cellular Endocrinol, 2003, 203(1): 51-63.
- [10] Budkowska A, Bedossa P, Groh F. Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis B virus; identification by an anti-idiotypic anti body bearing the internal image of the pre-S2 domain[J]. J Virol, 1995, 69(7): 840-848.
- [11] Mehdi H, Michael J, Fehzm K, et al. Hepatitis virus surface antigen binds to apolipoprotein H [J]. J Virology, 1994, 68(4): 2415-2421.
- [12] Mcfarlane BM, Mcsorley CG, Vergani D, et al. Serum autoantibodies reacting with the hepatic asialoglycoprotein receptor protein in acute and chronic liver disorders[J]. J Hepatol, 1986, 3(2): 196-205.
- [13] 高普均, 曲立科, 杨翰仪. 乙型肝炎病毒嗜肝性机制研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2001, 17(1): 3-4.
- [14] 邓少丽, 黄恒柳, 陈伟, 等. 乙型肝炎病毒耐药变异与基因型检测在临床上的应用[J]. 重庆医学, 2008, 37(3): 249-251.
- [15] Willard MF, Stephen JW, Kent EV. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential [J]. Biotechniques, 1999, 26(1): 112-125.

(收稿日期: 2010-12-09 修回日期: 2011-01-22)