

· 论 著 ·

# 持续表达的丙型肝炎病毒 NS4B 激活 HepG2 细胞内质网应激反应的研究\*

熊江红, 张庆华, 张艳妮, 朱向东, 孔令保<sup>△</sup>

(江西农业大学生物科学与工程学院, 南昌 330045)

**摘要:**目的 研究持续表达的丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白 4B(NS4B)对 HepG2 细胞内质网应激反应的影响。方法 NS4B 重组真核表达质粒 pcDNA3.1(-)NS4B 通过脂质体转染 HepG2 细胞, G418 筛选、基因组 PCR 和 Western blot 鉴定稳定转染细胞; RT-PCR 检测稳定转染细胞内 X 盒结合蛋白 1(XBP1) mRNA 剪接, 荧光素酶试验检测稳定转染细胞内 GRP78 启动子、XBP1 启动子和核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)活性。结果 基因组 PCR 和 Western blot 鉴定证实 NS4B 基因整合到转染 HepG2 细胞的染色体上, 并有效表达; 在 NS4B 稳定转染的 HepG2 细胞中, 检测到 XBP1 mRNA 剪接、XBP1 和 Grp78 启动子激活、Ca<sup>2+</sup> 稳态变化及 NF- $\kappa$ B 激活。结论 NS4B 在 HepG2 的稳定表达诱导了内质网应激反应, 揭示 NS4B 可能通过诱导肝细胞内质网应激反应在 HCV 感染及其致病性中发挥作用。

**关键词:** 肝炎病毒属; 内质网应激反应; HepG2 细胞; NS4B 蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.06.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)06-0524-03

## Continuous expression of NS4B in HepG2 cells induces endoplasmic reticulum stress response\*

Xiong Jianghong, Zhang Qinghua, Zhang Yanni, Zhu Xiangdong, Kong Lingbao<sup>△</sup>

(College of Bioscience and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China,)

**Abstract: Objective** To study the regulation of endoplasmic reticulum(ER) stress response by continuous expression of NS4B in HepG2 cells. **Methods** The recombinant vector pcDNA3.1(-) NS4B carrying hepatitis C virus NS4B gene was transfected to HepG2 cells using Lipofectamine 2000 reagent kit. Stable HepG2 cell lines with an integrated NS4B gene were selected by G418 and then confirmed by genome PCR and Western blot analysis; XBP1 mRNA splicing, GRP78 and XBP1 promoter activation, Ca<sup>2+</sup> homeostasis change and NF- $\kappa$ B activation were analyzed in stably-transfected HepG2 cells using RT-PCR and luciferase assays. **Results**

Genome PCR and Western blot demonstrated together that NS4B gene was integrated into the chromosome of transfected HepG2 cells and expressed successfully; XBP1 mRNA splicing, GRP78 and XBP1 promoter activation, Ca<sup>2+</sup> homeostasis change and NF- $\kappa$ B activation were observed in HepG2 cells stably-transfected with pcDNA3.1(-) NS4B. **Conclusion** Continuous expression of NS4B in HepG2 cells induces ER stress response, which implies the role of NS4B in HCV infection and HCV-associated liver disease via the induction on ER stress response.

**Key words:** hepatitis virus; ER stress response; HepG2 cell; NS4B protein

病原体感染、内质网 Ca<sup>2+</sup> 的消耗和膜蛋白过量表达等能引起从内质网到细胞质和细胞核的信号传导途径即内质网应激反应(ER stress response)。内质网应激可以激活 3 条信号通路: (1) 非折叠蛋白质反应(unfolded protein response, UPR); (2) 内质网超负荷反应(ER-overload response, EOR); (3) 固醇调节级联反应(sterol response pathway)<sup>[1-2]</sup>。

丙型肝炎病毒(HCV)感染容易引起慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌, 其致病机制目前并不很清楚。HCV 非结构蛋白 NS4B 是一个内质网膜结合蛋白。作者前期的研究发现非结构蛋白 4B(NS4B)在宫颈癌细胞 HeLa 的持续表达和肝癌细胞 Huh7 的过表达均能诱导内质网应激反应的 UPR 途径<sup>[3-4]</sup>。在人体内 HCV 感染的主要宿主细胞是肝细胞。而且, HCV 感染者大部分会发展成为持续性感染, 持续性感染又可进一步发展为肝癌<sup>[5]</sup>。为调查 NS4B 在肝细胞的持续表达是否也会诱导内质网应激反应以促进 HCV 感染和其致病性, 本研究通过稳定转染构建了持续表达 NS4B 的人肝癌细胞 HepG2,

NS4B 在 HepG2 细胞的持续表达诱导了人 X 盒结合蛋白 1(XBP1) mRNA 剪接、XBP1 和 Grp78 启动子激活、Ca<sup>2+</sup> 稳态变化及核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)激活, 表明 NS4B 可能通过诱导肝细胞内质网应激反应在 HCV 感染和其致病性中发挥作用。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 各种工具酶、生化试剂和细胞培养试剂主要购自 Promega、Invitrogen、晶美和大连宝生物等公司。NF- $\kappa$ B 报告质粒 pNF- $\kappa$ B-Luc 购自 Stratagene 公司。人肝癌细胞系 HepG2、大肠杆菌 BL21(DE3)、DH5 $\alpha$  和 NS4B 表达载体 pcDNA3.1(-)NS4B、XBP1 启动子报告质粒 pGL3 XBP1 pro 和 GRP78 启动子报告质粒 pGL3 GRP78 pro 等均由本实验室保存或以前构建<sup>[3-4, 6]</sup>。

### 1.2 方法

**1.2.1 HepG2 细胞的稳定转染和 G-418 筛选** NS4B 表达载体 pcDNA3.1(-) NS4B 和空载体 pcDNA3.1(-)稳定转染 HepG2 细胞。稳定转染和 G-418 筛选参照文献<sup>[6]</sup>进行。

\* 基金项目: 江西省科技支撑计划重点项目(2009BNA09400); 江西农业大学校基金资助项目(2950)。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: lingbaok@hotmail.com。

**1.2.2 基因组 PCR** 收获稳定转染细胞,参照文献[7]提取细胞基因组。以提取的基因组 DNA 为模板,利用 Ex-TaqDNA 聚合酶进行 PCR。使用的引物为 NS4B 引物对(正向:5'-GGA TCC TCT AGA ACC ATG GCT CAG CAC TTA CCG TAC-3';反向:5'-GAA TTC AAG CTT TTA GCA TGG AGT GGT ACA C-3')或内参 GAPDH 引物对(正向:5'-ATC ACT GCC ACC CAG AAG AC-3',反向:5'-ATG AGG TCC ACC ACC CTG TT-3')。0.7% Agarose 电泳鉴定 PCR 产物。

**1.2.3 Western blot 检测 NS4B 蛋白表达** 收获稳定转染细胞,加入裂解液(0.3% NP40,1 mmol/L EDTA,50 mmol/L Tris-Cl,1% TritonX-100,50 mmol/L NaCl,25 mmol/L NaF,1 mmol/L Na<sub>3</sub> VO<sub>3</sub>,10 μg/mL PMSF),冰浴 30 min,12 000 g 4℃离心 15 min,15%聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,然后使用 HCV 人阳性血清(1:100)作为为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:5 000 稀释)为二抗进行 Western blot 分析。蛋白带的检测用化学发光光学发光检测试剂盒。

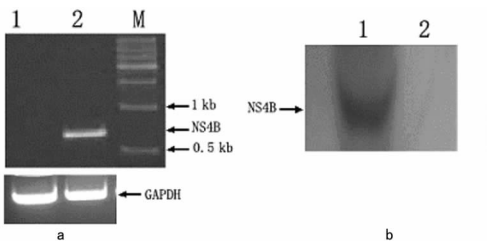
**1.2.4 RT-PCR 检测 XBP1 mRNA 的剪切** RT-PCR 参照文献[3]进行,2.0%琼脂糖电泳鉴定 RT-PCR 产物。

**1.2.5 荧光素酶试验检测 GRP78 和 XBP1 启动子活性** 使用 LipofectaminTM2000 将质粒 pRL-CMV(内参)和 pGL3 XBP1 pro,或者 pRL-CMV 和 pGL3 GRP78 pro 瞬时转染到 HepG2 稳定转染细胞中。2.5 μg/mL Tunicamycin (Tu)处理 6 h 的 HepG2 细胞作阳性对照。转染 24 h 后,按照双荧光素酶报告基因系统(Promega)的操作说明书检测荧光素酶活性。

**1.2.6 荧光素酶试验检测 NF-κB 激活** 使用 Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000 将 NF-κB 报告质粒 pNF-κB-Luc 和内参报告质粒 pRL-CMV(共转染 HepG2 稳定转染细胞中,然后 Ca<sup>2+</sup> 拮抗剂 TMB-8(100 μmol/L)处理 4 h 或不处理(阴性对照)。转染 48 h 后,按照双荧光素酶报告基因系统(Promega)的操作说明书检测荧光素酶活性。

**2 结果**

**2.1 NS4B 基因的整合与表达** pcDNA3.1(-) NS4B 和空载体 pcDNA3.1(-)稳定转染的 G418 抗性 HepG2 细胞分别命名为 HepG2-4B 和 HepG2-C 细胞。基因组 PCR 结果显示, HepG2-4B 细胞出现 780 bp 的特异性 NS4B 目的带,而阴性对照 HepG2-C 细胞未见特异性的 NS4B 目的带出现,同时所有细胞均检测到 446 bp 的 GAPDH 内参带(图 1a),说明在 HepG2-4B 细胞中 NS4B 基因已整合到细胞基因组。Western blot 结果显示,HepG2-4B 中可以检测出 27×10<sup>3</sup> 的 NS4B 目标带,而在阴性对照 HepG2-C 细胞中没有相应的带,见图 1b。



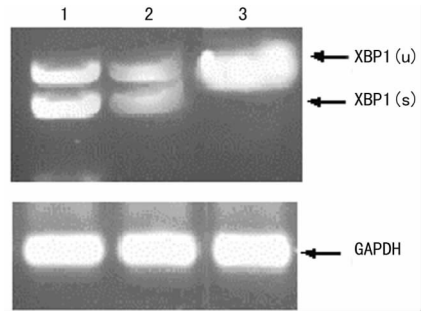
a 为 PCR 分析,1:HepG2-4B;2:HepG2-C;M:DNA marker。b 为 Western blot 实验,1:HepG2-4B;2:HepG2-C。

**图 1 稳定转染 HepG2 细胞的鉴定**

**2.2 RT-PCR 检测 XBP1 mRNA 的剪切** HepG2-4B 细胞和 Tu 处理的 HepG2 细胞,能够检测到剪切后的 PCR 产物 XBP1

(s)和未剪切的 PCR 产物 XBP1(u) s mRNA,而在阴性对照 HepG2-C 细胞,只检测到 XBP1-u(图 2)。同时所有细胞均检测到 GAPDH 内参带,说明 NS4B 在 HepG2 细胞的持续表达能够促进 XBP1 mRNA 的剪切。

**2.3 荧光素酶实验检测 GRP78 和 XBP1 启动子活性** 在 Tu 处理过的 HepG2 细胞中,GRP78 和 XBP1 启动子活性增高 9~12 倍。在持续表达 NS4B 的 HepG2-4B 细胞中,报告基因的荧光素酶活性要比对照 HepG2-C 细胞升高 6~8 倍,见表 1。



1: Tu 处理的 HepG2;2:HepG2-4B;3:HepG2-C。

**图 2 RT-PCR 检测 XBP1 mRNA 的剪切**

**表 1 GRP78 和 XBP1 启动子活性的报告基因检测 (n=3, x±s)**

组别	启动子活性	
	GRP78	XBP1
HepG2	1.00±0.03	1.00±0.02
Tu 处理的 HepG2	9.00±0.24	12.00±0.56
HepG2-C	1.89±0.07	0.98±0.04
HepG2-4B	6.00±0.22	8.00±0.19

**2.4 荧光素酶试验检测 NF-κB 激活** 在持续表达 NS4B 的 HepG2-4B 细胞中,报告基因的荧光素酶活性比对照 HepG2-C 细胞升高 4.8 倍,而 Ca<sup>2+</sup> 拮抗剂 TMB-8(100 μmol/L)的处理几乎完全抑制了 HepG2-4B 细胞中的荧光素酶活性升高,见表 2。

**表 2 荧光素酶试验检测 NF-κB 激活 (n=3, x±s)**

组别	NF-κB 活性
HepG2-C	1.0±0.04
HepG2-4B	4.8±0.15
TMB-8 处理的 HepG2-4B	1.3±0.11

**3 讨论**

位于内质网的 3 种跨膜蛋白 IRE1、PERK 和 ATF6 已被确认为 UPR 反应的信号转导蛋白质。当内质网内的非折叠或错误折叠蛋白积累时,GRP78/BIP 便与 IRE1、PERK、ATF6 解离引起这些信号转导蛋白质的激活。激活的 IRE1 催化 XBP1 mRNA 的剪接,剪接的 XBP1 mRNA 经翻译产生有活性的转录因子,调节其下游基因如 GRP78 等的表达,促进蛋白质的折叠和降解<sup>[1-2]</sup>。HCV 蛋白质的合成和加工,基因组的复制均在内质网进行<sup>[8]</sup>。HCV 复制子在体外培养的肝细胞内诱导 UPR,引起 ATF6 和 GRP78 激活,促进病毒的复制<sup>[9]</sup>。HCV 感染体外培养的肝细胞激活非折叠蛋白质反应,引起 GRP78、

磷酸化 eIF2 $\alpha$ 、CHOP 表达增加和细胞凋亡<sup>[10]</sup>。HCV 感染的 SCID/Alb-uPA 鼠肝内, GRP78 和 Bax 表达增加, 肝细胞出现凋亡症状<sup>[11]</sup>。GRP78 激活与肝细胞癌发生密切相关<sup>[12]</sup>。在持续性感染 HCV 患者肝内, ATF-6、IRE1 和 PERK 激活, 活性氧和 NF- $\kappa$ B 水平升高<sup>[13-14]</sup>, 显示在患者体内非折叠蛋白质反应和内质网超负荷反应被诱导。与 NS4B 在宫颈癌细胞 HeLa 的持续表达和肝细胞 Huh7 的过表达类似<sup>[3-4]</sup>。本研究发现 NS4B 在肝细胞 HepG2 的持续表达也能诱导 XBP1 mRNA 剪接、GRP78 和 XBP1 启动子激活。这些结果揭示 NS4B 在 HCV 诱导的 UPR、HCV 复制及致癌作用中可能发挥重要作用。

蛋白质如一些病毒蛋白在内质网的过度积累会导致 Ca<sup>2+</sup> 从内质网释放, 释放出来的 Ca<sup>2+</sup> 进一步引起 NF- $\kappa$ B 激活<sup>[1]</sup>。表 2 显示 NS4B 在肝细胞 HepG2 的持续表达引起 NF- $\kappa$ B 激活, 并且这种激活依赖 Ca<sup>2+</sup> 信号, 说明 NS4B 肝细胞 HepG2 的持续表达也能激活内质网应激反应的 EOR 信号通路。NF- $\kappa$ B 可启动众多基因转录, 直接参与多种人类疾病如炎症和癌症的形成发展<sup>[15]</sup>。本研究发现 NS4B 激活肝细胞 NF- $\kappa$ B 揭示 NS4B 可能在 HCV 感染引起的炎症与癌症中发挥一定作用。

#### 参考文献:

- [1] Pahl HL. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus [J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(3): 683-701.
- [2] Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease [J]. *J Hepatol*, 2011, 54(4): 795-809.
- [3] 郑义, 高博, 景维, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4B 诱导细胞非折叠蛋白反应 [J]. *中国病毒学*, 2005, 20(4): 374-378.
- [4] Zheng Y, Gao B, Ye L, et al. Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response [J]. *J Microbiol*, 2005, 43(6): 529-536.
- [5] Lemon SM, McKeating JA, Pietschmann T, et al. Development of novel therapies for hepatitis C [J]. *Antiviral Res*, 2010, 86(1): 79-92.
- [6] 熊舒珺, 吴晓玉, 孔令保. 丙型肝炎病毒 RNA 聚合酶在

HepG2 细胞的稳定表达及活性分析 [J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(3): 355-388.

- [7] 孔令保, 吴晓玉, 李昆太, 等. 持续表达 HCV NS5B 的 Bel-7402 细胞系的构建与鉴定 [J]. *江西农业大学学报*, 2009, 31(4): 717-723.
- [8] Egger D, Wolk B, Gosert R, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex [J]. *J Virol*, 2002, 76(12): 5974-5984.
- [9] Tardif KD, Mori K, Siddiqui A. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway [J]. *J Virol*, 2002, 76(15): 7453-7459.
- [10] Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Mishima K, et al. Development of plaque assays for hepatitis C virus-JFH1 strain and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity [J]. *Virology*, 2008, 371(1): 71-85.
- [11] Joyce MA, Walters KA, Lamb SE, et al. HCV induces oxidative and ER stress, and sensitizes infected cells to apoptosis in SCID/Alb-uPA mice [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(2): e1000291.
- [12] Maio M, Coral S, Fratta E, et al. Epigenetic targets for immune intervention in human malignancies [J]. *Oncogene*, 2003(22): 6484-6488.
- [13] Asselah T, Bièche I, Mansouri A, et al. In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C [J]. *J Pathol*, 2010, 221(3): 264-274.
- [14] Tai DI, Tsai SL, Chen YM, et al. Activation of nuclear factor kappaB in hepatitis C virus infection; implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis [J]. *Hepatology*, 2000, 31(3): 656-664.
- [15] Zhang Z, Rigas B. NF-kappaB, inflammation and pancreatic carcinogenesis; NF-kappaB as a chemoprevention target (review) [J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(1): 185-192.

(收稿日期: 2011-03-07 修回日期: 2011-10-13)

(上接第 523 页)

- [11] 何云锋, 吴小候, 罗春丽, 等.  $\Delta$ Np63 mRNA 在膀胱癌组织中的表达及意义 [J]. *重庆医学*, 2007, 36(14): 1350-1351.
- [12] Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(6): 457-467.
- [13] Yang D, Buchholz F, Huang Z, et al. Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(15): 9942-9947.

- [14] Tokar EJ, Diwan BA, Waalkes MP. Arsenic exposure transforms human epithelial stem/progenitor cells into a cancer stem-like phenotype [J]. *Environ Health Perspect*, 2010, 118(1): 108-115.
- [15] Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, et al. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis [J]. *Urol Oncol*, 2010, 28(4): 401-408.

(收稿日期: 2011-04-13 修回日期: 2011-08-10)