

HCV 核心蛋白抑制干扰素 α 诱导的抗病毒基因表达及其机制研究

Study of the Effect of Hepatitis C Virus Core Protein on Interferon-induced Antiviral Genes Expression and Its Mechanisms

常燕子¹, 雷延昌², 郝友华², 陈珊珊¹, 吴 雯¹, 杨东亮², 陆蒙吉^{1*}

CHANG Yan-Zi¹, LEI Yan-Chang², HAO You-Hua², CHEN Shan-Shan¹, WU Wen¹, YANG Dong-Liang²
and LU Meng-Ji^{1*}

1 华中科技大学同济医学院病原生物系, 武汉 430030

2 华中科技大学附属同济医院临床免疫室, 武汉 430030

1 Department of Microbiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

2 Division of Clinical Immunology, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

摘 要 研究 HCV 核心蛋白对干扰素 α 诱导的抗病毒分子 PKR 和 2'-5' OAS 表达的影响及其机制。HCV 核心蛋白表达质粒转染 HepG2 细胞, RT-PCR 分析 PKR 和 2'-5' OAS 的 mRNA 水平变化, 荧光素酶活性分析核心蛋白对 ISRE 介导的基因表达的影响, Western-blot 分析 SOCS3、STAT1 及 STAT1 磷酸化水平的变化。在干扰素 α 刺激情况下, 表达 HCV 核心蛋白的细胞中, PKR 和 2'-5' OAS 的 mRNA 水平下降, ISRE 介导的荧光素酶活性降低, STAT1 磷酸化水平下降。此外, 核心蛋白表达的细胞中 SOCS3 的 mRNA 和蛋白水平明显升高。结果表明, HCV 核心蛋白可能通过激活 SOCS3、抑制 STAT1 的磷酸化, 从而下调干扰素 α 诱导的 PKR 和 2'-5' OAS 表达。

关键词 丙型肝炎病毒, 核心蛋白, 干扰素 α , STAT1, SOCS3

中图分类号 R392 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)06-1000-05

Abstract To study the effect of HCV core protein on the interferon-induced antiviral genes expression and its mechanisms. Methods HepG2 cells were transiently transfected with HCV core protein expression plasmid and the blank plasmid respectively. RT-PCR was used to analyze the effect of HCV core protein on PKR and 2'-5' OAS expression. The effect of HCV core protein on ISRE-mediated gene expression was detected by luciferase activity assay. Western-blot assay was performed to observe the change of mRNA and protein levels of SOCS3, STAT1 and p-STAT1 following HCV core expression. In the presence of HCV core protein, the transcription of PKR and 2'-5' OAS are down-regulated. ISRE-mediated reporter gene expression and STAT1 phosphorylation were inhibited. The transcription and expression of SOCS3 were induced compared with blank plasmid-transfected group. In HepG2 cells, HCV core protein can down-regulate the expression of some interferon-induced antiviral genes, which involves the induction of SOCS3 and the inhibition of STAT1 phosphorylation.

Key words hepatitis C virus, core protein, interferon- α , STAT1, SOCS3

慢性丙型肝炎病毒(HCV)感染是肝硬化和肝癌发生的重要原因之一^[1]。目前, 干扰素 α (IFN- α) 是

治疗 HCV 感染的主要药物,它主要通过激活细胞内 Jak-STAT 信号转导通路,诱导 PKR 和 2'-5'OAS 等干扰素刺激基因(interferon-stimulated genes,ISGs)的表达,从而发挥抗病毒效应。IFN- α 与细胞表面 I 型干扰素受体(IFNAR)结合后,可以激活与受体胞内段偶联的 Tyk2 和 Jak1 激酶,继而磷酸化下游底物——信号转导与转录激活因子(signal transducers and activators of transcription,STAT)1 和 2。磷酸化活化的 STAT1、STAT2 和另外一种转录因子 IRF-9/p48 组成异源三聚体复合物——ISGF3(IFN-stimulated gene factor 3)。ISGF3 转位到核内后,与 ISG 启动子区的 IFN 刺激应答元件(interferon-stimulated response element,ISRE)结合,从而激活 ISG 分子的转录^[2]。近来的研究表明,HCV 核心蛋白作为病毒重要的结构蛋白,可能会干扰 IFN- α 的产生和抗病毒效应。如抑制介导内源性 IFN 产生的转录因子 IRF-1 和 IL-12、IL-15 等 ISG 分子的转录^[3],还可以下调 Jak-STAT 通路下游 ISGF3 复合体的水平^[4]。然而,关于核心蛋白是否可以抑制 IFN- α 诱导的主要抗病毒分子如 PKR 和 2'-5'OAS 的表达,目前尚无一致结论。因此,在本课题中,我们以人肝癌细胞系 HepG2 为对象,研究了 HCV 核心蛋白对 IFN- α 诱导的 PKR 和 2'-5'OAS 表达的影响,并探讨这种影响是否由 Jak-STAT 通路介导,以及负调控因子 SOCS3^[5-6]是否参与了这种调控过程。

1 材料和方法

1.1 质粒

真核表达质粒 pCI-neo(Promega,美国),HCV 核心蛋白真核表达质粒 pCI-core 和启动子区含有 ISRE 元件的荧光素酶报告质粒 pISRE-luc 均由本室保存。

1.2 细胞培养与转染

人肝癌细胞系 HepG2 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(Hyclone,美国),在 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。用 Lipofectine 2000(Invitrogen,美国)进行细胞转染。转染前 18h,将生长状态良好的 HepG2 细胞以 90% ~ 95% 密度接种于 12 孔培养板,按照 Lipofectamine 2000 说明书中的转染程序,转入相应剂量的质粒,6h 后更换培养液。

1.3 RNA 提取和 RT-PCR

细胞总 RNA 的提取采用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司,美国),操作按照试剂说明书进行。然后以 Oligo dT(18)为引物,将 RNA 逆转录为 cDNA,再以 cDNA 为模板,PCR 分别扩增目的基因 PKR、2'-5'

OAS 和 SOCS3,以 GAPDH 为内参(引物序列见表 1)。反应条件均为 94℃ 变性 5min,以 94℃ 45s、55℃ 30s、72℃ 45s 循环 30 次后,72℃ 延伸 10min。

表 1 引物序列
Table 1 The sequence of primers

Target gene	Primer sequence	Predicted length
GAPDH	Left 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGG-3'	244bp
	Right 5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGT-3'	
SOCS3	Left 5'-CTCAAGACCTTCAGTCCAA-3'	554bp
	Right 5'-TTCTCATAGGAGTCACAGGTG-3'	
PKR	Left :5'-CCAGTGATGATTCTCTTGAGAGC-3'	419bp
	Right :5'-CCCCAAAGCGTAGAGGTCCA-3'	
2'-5'OAS	Left :5'-GGTGGTAAAGGGTGCTCCTC-3'	374bp
	Right :5'-TCTGCAGGTAGGTGCACTCC-3'	

1.4 细胞处理、SDS-PAGE 和 Western-blot 检测

12 孔板中的细胞用预冷 PBS 洗 2 次,每孔加 80 μ L 含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液[30mmol/L Tris pH7.4,150mmol/L NaCl,1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF),1mmol/L 正矾酸钠,1% NP40,10% 甘油] 4℃反应 15min,混悬,12000r/min 4℃离心 10min,收集上清液与 20 μ L 1 \times SDS 上样缓冲液混合后煮沸 5min。取 20 μ L 进行 12%SDS-PAGE 电泳分离蛋白,84mA 恒流 2h 湿法电转移至硝酸纤维素膜上,10% 小牛血清封闭过夜,加一抗(抗-HCV 阳性患者血清;SOCS3 鼠单抗,Biolegend,美国;或抗-STAT1 兔多抗和抗-磷酸化 STAT1(Tyr701)羊多抗,Santa Cruz,美国)37℃孵育 1h,PBS 漂洗 3 次,加二抗(辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗人 IgG、羊抗兔 IgG、兔抗鼠 IgG 或兔抗羊 IgG,北京中杉金桥)37℃孵育 1h,PBS 漂洗 3 次,ECL 试剂盒(Roche,德国)检测结果。

1.5 荧光素酶活性检测

将报告质粒 pISRE-luc 与 pCI-core 或 pCI 空载体共转染至 HepG2 细胞,转染后 12h 给予 IFN- α 刺激,刺激 12 h 后裂解细胞,用荧光素酶检测试剂盒(Promega,美国)检测细胞裂解物中荧光素酶活性,3 次独立实验取平均值。

2 结果

2.1 HepG2 细胞中 HCV 核心蛋白的表达

HCV 核心蛋白表达质粒 pCI-core 及空载体 pCI 各 1 μ g 瞬时转染 HepG2 细胞,抗-HCV 阳性患者血清为一抗,HRP 标记羊抗人 IgG 为二抗,进行 Western-blot 检测显示,转染 pCI-core 组有特异性条带,相对分子量约为 21kD(图 1)。

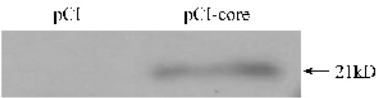


图1 Western-blot 检测 HCV 核心蛋白的表达

Fig.1 Western-blot analysis of HCV core protein expressed in HepG2 cells

2.2 核心蛋白抑制 PKR 和 2'-5'OAS 转录
为明确 HCV 核心蛋白对 IFN- α 诱导的 ISG 基因

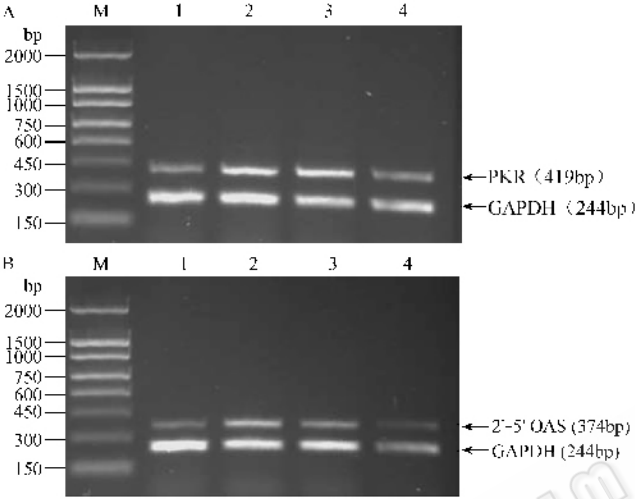


图2 核心蛋白抑制 PKR、2'-5'OAS 的转录

Fig.2 Inhibition of HCV core protein on PKR and 2'-5'OAS gene transcription

Levels of PKR (A) and 2'-5'OAS (B) mRNA in HepG2 cells were determined after transfected with pCI or pCI-core and treated for 24h with 1000IU/mL IFN- α , and the RNA levels were normalized with GAPDH. M: 150 bp DNA ladder; 1: untreated HepG2 cells transfected with 2 μ g of pCI; 2: IFN-treated HepG2 cells transfected with 2 μ g of pCI; 3: IFN-treated HepG2 cells transfected with 1 μ g of pCI-core and 1 μ g of pCI; 4: IFN-treated HepG2 cells transfected with 2 μ g of pCI-core.

2.3 核心蛋白抑制 ISRE 元件介导的荧光素酶活性
为研究 HCV 核心蛋白是否可能通过 ISRE 元件抑制了抗病毒基因的表达, pCI-core 或 pCI(各 1 μ g) 分别与启动子区含有 ISRE 元件的荧光素酶报告质

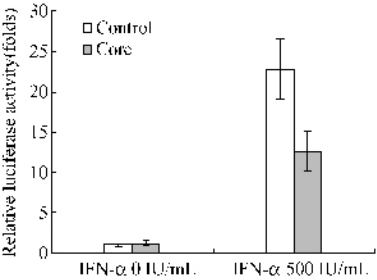
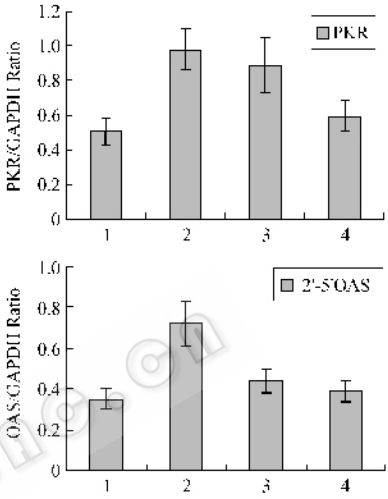


图3 核心蛋白对含 ISRE 元件的荧光素酶活性的影响

Fig.3 HCV core inhibit ISRE-mediated signaling in luciferase assay

Plasmid pCI-core or pCI with pISRE-luc containing ISRE element luciferase reporter were cotransfected to cells with IFN- α (500 IU/mL) treatment for 24h. Total protein was extracted for luciferase assay. Core: pCI-core + pISRE-luc; Control: pCI + pISRE-luc.

表达的影响, pCI-core 或 pCI 转染 HepG2 细胞 24h, 再以 IFN- α 1000IU/mL 刺激 24h 后, 提取总 RNA, 逆转录后以特异性引物扩增 PKR 和 2'-5'OAS。结果显示: IFN- α 处理后, 转染空载体的 HepG2 细胞 PKR 和 2'-5'OAS mRNA 水平均增加; 而转染 pCI-core 的细胞在 IFN- α 处理后 PKR 和 2'-5'OAS 的 mRNA 水平较空载体组明显下降(图2)。



粒 pISRE-luc(0.5 μ g) 共转染 HepG2 细胞, 转染后 12h 给予 IFN- α 500IU/mL 刺激, 刺激 12h 后裂解细胞, 进行荧光素酶活性检测。结果显示: 在 IFN- α 刺激情况下, 核心蛋白的表达可以使 ISRE 介导的荧光素酶活性下降(图3)。

2.4 核心蛋白抑制 IFN- α 诱导的 STAT1 磷酸化

STAT1 是 IFN- α 诱导的 Jak-STAT 信号转导通路中的关键分子, 其 701 位酪氨酸磷酸化(P-STAT1)是 STAT1 活化的标志。为了解 HCV 核心蛋白是否影响了 STAT1 的表达和磷酸化活化, 将 pCI 空载体和不同剂量的 pCI-core 分别转染 HepG2 细胞, 48h 后加入 1000 IU/mL 的 IFN- α 刺激, 30min 后进行 Western-blot 检测, 结果显示: 表达核心蛋白的细胞中 STAT1 的水平较对照组无明显变化, 但磷酸化 STAT1 的水平显著下降(图4)。

2.5 核心蛋白激活 SOCS3 的表达

SOCS3 是 IFN- α 诱导的 Jak-STAT 通路重要的负

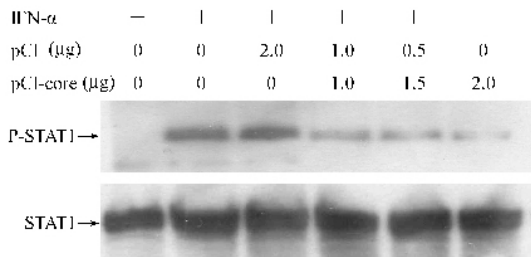


图4 核心蛋白对 STAT1 磷酸化的影响

Fig.4 Influence of HCV core on phosphorylation of STAT1

Cells were transfected with different amounts of plasmid pCI-core or pCI. Total protein extracted from the cells was analyzed by Western-blotting using anti-STAT1 or anti-P-STAT1.

调控因子。为了解 SOCS3 是否参与核心蛋白对 Jak-STAT 通路的抑制作用,以 pCI-core 或 pCI 空载体转染 HepG2 细胞 48h 后提取细胞总 RNA 和蛋白,进行 RT-PCR 及 Western-blot 分析。结果显示,与转染空载体组相比,在表达 HCV 核心蛋白的细胞中,SOCS3 的 mRNA 与蛋白表达水平均明显升高(图 5)。

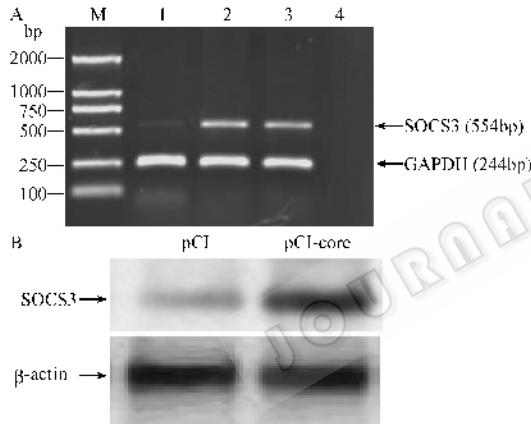


图5 HCV 核心蛋白激活 HepG2 细胞中 SOCS3 的表达

Fig.5 HCV core inducing SOCS3 expression

HepG2 cells were transfected with pCI-core or pCI for 48h. A the mRNA level of SOCS3 was analyzed by RT-PCR. M :DNA marker ; 1 :the empty vector pCI ; 2 3 :pCI-core ; 4 :no RNA control. B :expression of SOCS3 was detected by Western-blot.

3 讨论

IFN 的产生和应答是宿主抵御病毒感染的重要途径。目前,IFN- α 是治疗慢性 HCV 感染的主要药物,但其临床应答率较低^[7]。研究表明,HCV 病毒蛋白可以通过多种途径影响 IFN 的产生和抗病毒效应。如 NS3/4A 通过抑制 IRF-3 的活化而影响 I 型 IFN 的产生^[8]。结构蛋白 E2 和非结构蛋白 NS5A 能够抑制 IFN- α 诱导的重要抗病毒分子——PKR 的活性^[9,10]；HCV 核心蛋白组成病毒的核衣壳,是病毒重要的结构蛋白,研究表明它可以抑制 IRF-1 的表

达而影响 IFN- α 的产生,也可以下调 Jak-STAT 通路下游 ISGF-3 的水平^[3,4],但关于核心蛋白对 ISG 分子表达的影响,目前的研究结果尚不一致。Ciccaglione^[3]等报道:在 Huh7 细胞中,核心蛋白可以使 PKR,IL-12,IL-15 等 ISG 分子转录水平降低。Lucas^[11]的报道也显示,核心蛋白使 HepG2 细胞中 MxA 和 2'-5'OAS 的表达下降。而 Naganuma 等^[12]的研究则显示 HCV 核心蛋白转基因小鼠中,2'-5'OAS 的转录被激活。笔者推测这些研究结果中的差异可能与实验中选用的研究体系不同有关。本研究以人肝癌细胞系 HepG2 为对象,将核心蛋白表达质粒瞬时转染后,用半定量 RT-PCR 方法检测其对 PKR 和 2'-5'OAS mRNA 表达的影响。结果显示:用 IFN- α (1000IU/mL)处理后,表达核心蛋白的 HepG2 细胞中 PKR 和 2'-5'OAS mRNA 水平较空载体组明显下降,且这种抑制作用呈剂量依赖效应。该结果提示,核心蛋白的表达能够抑制一些 ISG 分子(如 PKR 和 2'-5'OAS)的表达,阻碍其发挥抗病毒作用。

许多 ISG 分子(包括 PKR 和 2'-5'OAS)基因的启动子区都含有 ISRE 结合元件,ISGF3 复合体与之结合后启动基因转录。为研究核心蛋白是否影响了 ISRE 参与的基因表达,我们用含有 ISRE 元件的荧光素酶报告质粒与核心蛋白表达质粒或空载体共转染 HepG2 细胞,在 IFN- α 刺激情况下,核心蛋白表达组荧光素酶活性较对照组明显下降。这说明核心蛋白有可能通过抑制 ISGF3 与 ISRE 的结合而下调 ISG 分子的转录。

已知 Jak-STAT 信号通路是 IFN- α 诱导 ISG 分子表达的主要途径。STAT1 是 Jak-STAT 通路中的关键分子。为进一步探讨 HCV 核心蛋白下调 IFN- α 诱导的抗病毒基因表达的机制,我们研究了核心蛋白对 STAT1 表达及活化的影响。结果发现:转染 HepG2 细胞 48h,用 IFN- α 刺激 30min 后,核心蛋白表达组与空载体组及空白对照组相比,细胞 STAT1 酪氨酸磷酸化水平显著降低,而非磷酸化 STAT1 水平则无明显变化。这说明核心蛋白不影响 STAT1 的表达,但可以抑制 STAT1 的磷酸化从而影响 Jak-STAT 通路的活化。对 Jak-STAT 通路活化的抑制,可能是 HCV 核心蛋白下调 IFN- α 诱导的抗病毒基因表达的机制之一。

研究发现,SOCS3 可以抑制 STAT1 的磷酸化活化而对 Jak/STAT 通路发挥负调控作用^[5,6]。近来,在慢性 HCV 感染者中发现,对 IFN- α 无应答患者的肝组织中 SOCS3 的表达水平较有应答者明显升高^[13]。而在对 IFN- α 产生抗性的 HCV 复制子细胞

中,SOCS3 的水平较 IFN- α 敏感细胞明显升高^[14]。这说明 SOCS3 在 HCV 对抗 IFN- α 抗病毒效应过程中可能发挥重要作用。为了明确核心蛋白是否通过调控 SOCS3 而影响 Jak-STAT 信号通路的活化和其下游抗病毒分子的表达,我们用 RT-PCR 和 Western-blot 分析了核心蛋白对 SOCS3 转录和表达的影响。结果显示,与空载体组相比,转染核心蛋白的 HepG2 细胞中 SOCS3 的 mRNA 和蛋白水平明显升高,即 HCV 核心蛋白对 HepG2 细胞 SOCS3 的表达有激活作用。由此看来,SOCS3 可能参与了核心蛋白抑制 STAT1 的磷酸化从而阻碍 Jak-STAT 通路活化,下调 ISG 分子表达的过程(图 6)。

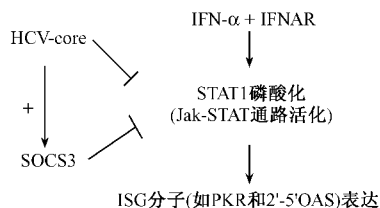


图6 HCV 核心蛋白对 IFN- α 诱导的 Jak-STAT 通路的影响(示意图)

Fig.6 Effect of HCV core protein on IFN- α induced Jak-STAT pathway

在临床上,只有不到 50% 的慢性 HCV 感染者对单一 IFN- α 或 IFN- α 联合病毒唑治疗有效。因此,阐明 HCV 对抗 IFN- α 的机制将有助于找到有效的治疗措施。我们的研究结果提示, HCV 核心蛋白有可能通过激活负调控因子 SOCS3、抑制 IFN- α 介导的 Jak-STAT 通路活化,从而下调如 PKR、2'-5' OAS 等抗病毒分子的表达。这可能是 HCV 对抗 IFN 效应,从而在宿主体内持续存在的机制之一。

REFERENCES(参考文献)

[1] Bisceglie DA. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* ,1997 **26** : 34S – 38S.
[2] Kisseleva T ,Bhattacharya S ,Braunstein J , *et al.* Signaling through the JAK/STAT pathway , recent advances and future challenges. *Gene* 2002 **285** : 1 – 24.

[3] Ciccaglione AR ,Stellacci E ,Marcantonio C , *et al.* Repression of interferon regulatory factor 1 by hepatitis C virus core protein results in inhibition of antiviral and immunomodulatory genes. *J Virol* , 2007 **81** : 202 – 214.
[4] Basu A ,Meyer K ,Ray RB , *et al.* Hepatitis C virus core protein modulates the interferon-induced transacting factors of Jak/stat signaling pathway but does not affect the activation of downstream IRF-1 or 561 gene. *Virology* 2001 **288** : 379 – 390.
[5] Song MM ,Shuai K. The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem* ,1999 **273** : 35056 – 35062.
[6] Shen X ,Hong F ,Nguyen VA , *et al.* IL-10 attenuates IFN α activated STAT1 in the liver : involvement of SOCS2 and SOCS3. *FEBS Lett* , 2000 **480** : 132 – 136.
[7] Fried MW ,Shiffman ML ,Reddy KR , *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* , 2002 **347** : 975 – 982.
[8] Ferreón JC ,Ferreón AC ,Li K , *et al.* Molecular determinants of TRIF proteolysis mediated by the hepatitis C virus NS3/4A protease. *J Biol Chem* 2005 **280** : 20483 – 20492.
[9] Song J ,Fuji M ,Wang F , *et al.* The NS5A protein of hepatitis C virus partially inhibits the antiviral activity of interferon. *J Gen Virol* ,1999 **80** : 879 – 886.
[10] Taylor D ,Shi S ,Romano P , *et al.* Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* ,1999 **285** : 107 – 110.
[11] Lucas SD ,Bartolome J , Carreno V. Hepatitis C virus core protein down-regulates transcription of interferon-induced antiviral genes. *J Infect Dis* 2005 **191** : 93 – 99.
[12] Naganuma A , Nozaki A , Tanaka T , *et al.* Activation of the interferon-inducible 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene by hepatitis C virus core protein. *J Virol* 2000 **74** : 8744 – 8750.
[13] Zhu HZ , Nelson DR , Crawford JM , *et al.* Defective Jak-stat activation in hepatoma cells is associated with hepatitis C viral IFN- α resistance. *J Interferon Cytokine Res* 2005 **25** : 528 – 539.
[14] Walsh MJ , Jonson JR , Rechardson MM , *et al.* Non-response to antiviral therapy is associated with obesity and increased hepatic expression of suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3) in patients with chronic hepatitis C , viral genotype 1. *Gut* ,2006 **55** : 529 – 535.