

Huh7.5.1 细胞感染 HCV 观察干扰素治疗后 miRNA 表达谱变化

鲁 究^{1,2}, 邢小康¹, 宋广忠¹, 陈 智¹

(1. 浙江大学医学院附属第一医院传染病诊治国家重点实验室, 浙江 杭州 310003;

2. 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009)

[摘要] **目的:**探寻可能对丙型肝炎病毒(HCV)有作用的 mi-RNA。**方法:**用体外转录得到的 HCV 感染正常的 Huh-7.5.1 细胞,然后加入干扰素作用,采用 mi-RNA 表达谱芯片技术,分别测定 Huh-7.5.1 细胞正常组和 HCV 感染组及干扰素作用组的 mi-RNA 的表达,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析组间 microRNA 的表达情况。**结果:**以正常 Huh-7.5.1 细胞中表达的 mi-RNA 为基准,经过筛选发现 13 种 mi-RNA 在 HCV 感染后表达上调,而在干扰素治疗后则出现下调;另外还有 7 种 mi-RNA 则在 HCV 感染后出现表达下调,而在干扰素治疗后则发生上调。**结论:**mi-RNA10a、mi-RNA21、mi-RNA149 和 mi-RNA152 及 mi-RNA210 可能与 HCV 的复制转录有关。

[关键词] 干扰素 α /治疗应用;微 RNAs/遗传学;肝炎病毒属/遗传学;基因表达;丙肝病毒;mi-RNA

[中图分类号] R 512.63 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2011)06-0598-05

Alteration of mi-RNA expression profile after interferon treatment in HCV-infected Huh7.5.1 cells

LU Yan^{1,2}, XING Xiao-kang¹, SONG Guang-zhong¹, CHEN Zhi¹ (1. *State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infection Diseases, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China*; 2. *The Second Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China*)

[Abstract] **Objective:** To screen the mi-RNA expression profile after interferon treatment in cells infected with hepatitis C virus (HCV). **Methods:** Huh-7.5.1 cells was infected with HCV by *in vitro* transcription and cultured with interferon. The mi-RNA microarray was used to measure the mi-RNA expression in the control group, HCV transcription group and interference group. Intra-group differences were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Results:** With mi-RNA expressed in normal Huh-7.5.1 cells as a benchmark, expressions of 13 kinds of mi-RNAs were up-regulated after HCV infection and then down-regulated following interferon treatment; 7 were down-regulated after HCV infection and then up-regulated following interferon treatment. **Conclusion:** mi-RNA10a, mi-RNA21, mi-RNA149, mi-RNA152

收稿日期:2011-09-13 修回日期:2011-09-28

基金项目:国家“十二五”科技重大专项基金(2012ZX10002-003);浙江省科技计划基金项目(2009C03011-2)。

作者简介:鲁 究(1982-),男,药师,主要从事医院药学研究。

通讯作者:陈 智(1956-),男,教授,博士生导师,从事传染病基础和临床研究;E-mail:zju.zhichen@gmail.com

and mi-RNA210 may be related to hepatitis C virus replication and transcription.

[**Key words**] Interferon-alpha/ther use; MicroRNAs/genet; Hepacivirus/genet; Gene expression; HCV; mi-RNA

[J Zhejiang Univ (Medical Sci) , 2011 ,40(6) :598-602.]

丙型肝炎病毒(HCV)是引起肝脏病变和诱发肝癌的主要病原体之一,它极易变异,因此研制疫苗难度很大。而且其治疗方法有限,目前主要采用干扰素联合利巴韦林治疗的方法,但部分患者效果不甚理想。因此,探寻 HCV 在感染后是通过哪些方式复制的以及干扰素对 HCV 是如何作用的,就显得越来越重要了。

mi-RNA 是一类长约 22 个核苷酸的内源性非编码单链 RNA 分子,自 1993 年第一个 mi-RNA 编码基因 lin-4 由 Lee 等在线虫体内发现以来,迄今为止结合基因克隆和各种生物信息学方法已经发现了 5000 余种 mi-RNA,其中包括 500 余种人 mi-RNA,它们在人类的基因表达上扮演着重要的角色^[1]。一旦 mi-RNA 对基因表达的调控出了问题,就有可能导致疾病的发生。近来,许多研究表明 mi-RNA 参与多种病毒复制的调节,有些宿主和病毒都可以编码 mi-RNA,并且两者都在调控病毒生存周期及病毒与宿主相互作用的过程中起到非常关键的作用。

目前已有报道,mi-RNA122 可以与 HCV 基因组相互作用调节 HCV 的表达,当 mi-RNA122 被灭活,HCV 复制水平明显降低^[2]。那么,是不是有更多的 mi-RNA 可能与 HCV 的复制转录有关? 干扰素究竟能在什么层面对病毒发挥作用? 为此,我们做了以下实验并结合文献,希望能筛选出与 HCV 感染和干扰素治疗有关的 mi-RNA。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂 Huh7. 5. 1 细胞来自美国斯克利普斯研究所 Scott Forrest 教授,由上海巴斯德研究所钟劲教授提供。质粒 pFL-JC1 由美国 Apath 公司惠赠。DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、Opti-MEM 培养基购于 GIBCO 公司;脂质体 Lipofectamine 2000 和总 RNA 提取

试剂 Trizol Reagent 购于 Invitrogen 公司;T7 体外转录试剂盒购于 Promega 公司;逆转录试剂盒、SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒购于 Takara 公司;IFN α -2b 购于 PBL(Pestka Biomedical Laboratories)公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 把 Huh-7. 5. 1 细胞加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 37℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中培养。DMEM 培养基中添加 100 U/ml 的青霉素和 100 μ g/ml 的链霉素。

1.2.2 HCV 感染细胞模型的建立及验证 pFL-J6JFH-1 质粒用 T7 体外转录试剂盒按照说明书操作进行体外转录,得到 HCV RNA 转录体。在 6 孔细胞培养板上接种 Huh-7. 5. 1 细胞,每孔中加入 2 ml 含血清不含抗生素的 DMEM 培养基培养 24 h,当细胞培养达到 60% ~70% 汇合度时,把 HCV RNA 转染进去。转染时,以每孔 2 μ g HCV RNA 用 250 μ l Opti-MEM 培养基稀释,再以每孔 5 μ l 脂质体用 250 μ l Opti-MEM 培养基稀释,并室温放置 5 min,将稀释后的 HCV RNA 与脂质体轻轻混合,室温孵育 20 min 以形成复合物。然后每孔加入 500 μ l RNA-Lipofectamine 复合物,轻摇混匀后置于细胞培养箱孵育。6 h 后弃去培养液,每孔加入 2 ml DMEM 完全培养基继续培养。转染后第 3 天,收集细胞上清培养基。把 Huh-7. 5. 1 细胞重新接种在 6 孔细胞培养板上,待细胞达 50% ~60% 融合度时,每孔加入 2 ml 收集的细胞上清,培养箱中孵育 4 h 后用 PBS 清洗 3 次,加入完全培养基继续培养。

孵育后第 3 天,用 Trizol 提取感染细胞内总 RNA。按照逆转录试剂盒与荧光定量 PCR 试剂盒操作说明对细胞内 HCV RNA 进行扩增,同时利用正常 Huh-7. 5. 1 细胞作为对照。

1.2.3 IFN 处理 HCV 感染细胞 IFN α -2b 以

1 000 IU/ml 处理上述 HCV 感染细胞,48 h 后再次利用荧光定量 PCR 检测细胞内 HCV RNA 水平。同时用未经任何处理的感染细胞作为对照。

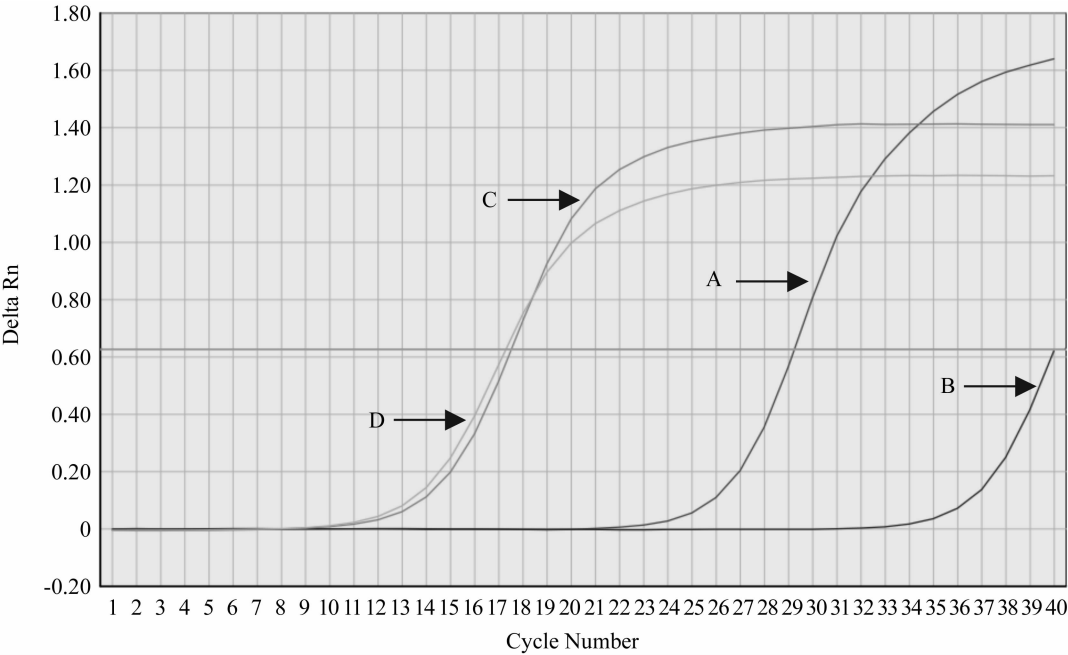
1.2.4 microRNA 表达谱分析 用 384 孔 TaqMan Low Density Array(A 板)分析 3 组样本的 microRNA 表达谱(参照试剂说明书)。方法为:配制 PCR 反应液 在 1.5 ml 离心管里依次加入 TaqMan Universal PCR Master Mix 450 μ l, RT 产物 6 μ l,无核酶水 444 μ l(共计 900 μ l);上样 将 100 μ l PCR 反应液加入到 TaqMan MicroRNA Array 的各自通道(共 8 道),离心后封口。启动 SDS v2.2 程序运行 384 孔 TaqMan

Low Density Array 默认的热循环条件,分析 microRNA 表达谱(A 板)。

1.3 数据分析 采用 $2(-\Delta\Delta CT)$ 法分析组间 microRNA 的表达情况,筛选出差异表达的 microRNAs。

2 结 果

2.1 HCV 感染细胞模型的建立 结果见图 1。在感染的 Huh-7.5.1 细胞中成功地检测到了 HCV RNA,而正常细胞组则无 HCV RNA 扩增。内标基因 GAPDH 的扩增曲线说明了样品均一性较好。



A:为感染的 Huh-7.5.1 细胞,B:为正常 Huh-7.5.1 细胞对照,C 和 D:分别为两种细胞内的 GAPDH 扩增曲线。

图 1 感染细胞中 HCV RNA 荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig.1 FQ-PCR amplification curve of HCV RNA in infected cell lines

2.2 microRNA 表达谱分析本研究结果 分为 Huh7.5.1 细胞对照组,HCV 感染组和感染后干扰素治疗组,经筛选的 microRNA 表达谱见表 1。

3 讨 论

本研究分为 Huh7.5.1 细胞对照组、HCV 感染组和感染后干扰素治疗组。通过 miRNA

芯片对已知的 380 个 mi-RNA 进行了检测,许多 mi-RNA 发生了变化。经过统计分析,我们发现其中有 13 种 mi-RNA 在 HCV 感染后表达上调,而在干扰素治疗后则出现下调,另外还有 7 种 mi-RNA 则在 HCV 感染后出现表达下调,而在干扰素治疗后则发生上调(见表 1)。因此,这些变化的 mi-RNA 很可能与 HCV 病毒的感染和清除过程有一定的相关性,即它们的表

表 1 经筛选的 microRNA 表达谱

Table 1 Expression profiling of screened microRNAs

mi-RNA	Huh7 正常 细胞中的 mi-RNA	HCV 感染后 细胞中的 mi-RNA	干扰素作用 后细胞中的 mi-RNA
hsa-miR-100	1	0.403	0.741
hsa-miR-10a	1	1.532	0.516
hsa-miR-140-5p	1	0.459	1.073
hsa-miR-148a	1	0.021	0.112
hsa-miR-149	1	3.171	0.065
hsa-miR-152	1	0.213	5.313
hsa-miR-181a	1	4.724	2.254
hsa-miR-193a-3p	1	2.426	0.994
hsa-miR-200b	1	1.442	0.333
hsa-miR-21	1	0.511	2.121
hsa-miR-210	1	1.444	0.634
hsa-miR-27a	1	0.659	2.251
hsa-miR-301b	1	4.269	0.124
hsa-miR-339-5p	1	0.024	1.185
hsa-miR-340	1	2.869	1.195
hsa-miR-365	1	3.072	1.189
hsa-miR-425	1	1.472	0.678
hsa-miR-616	1	15.778	0.549
hsa-miR-629	1	2.001	0.077
hsa-miR-99b	1	2.887	1.124

注:以正常 Huh-7. 5. 1 细胞中表达的 mi-RNA 为基准: 1.

达差异或许是因为病毒的感染和清除而被动发生改变,亦或者是它们的表达水平变化在 HCV 的病毒感染和干扰素清除病毒的过程中发挥着一定的调控作用。鉴于此,我们结合已报道的文献,在发生以上改变的 mi-RNA 中选取一些进行分析,推测它们与病毒的感染和清除可能存在着的联系。

Varnbolt 等研究发现,在 HCV 感染合并肝癌患者中 miR-10a 均出现异常表达,比正常水平上调 2 倍^[3]。在本实验中,我们也发现,正常 Huh7. 5. 1 细胞经 HCV 感染后,miR-10a 表达增加,上调至正常细胞的 1.5 倍,经干扰素作用后,miR-10a 表达下降至正常细胞的一半。

miR-10a 位于染色体 17q21,其直接作用位点是 HOXA1。它的异常表达很可能是 HCV 导致肝癌的因素之一,具体机理目前尚未研究清楚,有待进一步深入研究。

mi-RNA21 在细胞中有多个靶基因,在细胞的增殖、分化、凋亡中都起了重要的作用。它其中的一个作用位点在 NFIB(nuclear factor I/ B) 上, NFIB 是一个转录抑制因子, mi-RNA21 能够抑制它的表达。结果中 mi-RNA21 的低表达会使 NFIB 蛋白高表达,可能与 HCV 病毒侵入导致宿主需要抑制它的转录有关^[4-5]。同时在 Marquez 等的研究中发现,在慢性 HCV 感染的肝细胞中, SMAD7 是 TGF- β 信号传导通路的抑制信号蛋白,有抑制肝纤维化的作用^[6]。mi-RNA21 的上调可通过抑制 SMAD7 来促进肝纤维化,而在我们的结果中, HCV 感染后 mi-RNA21 是下调的,而干扰素作用后却出现 mi-RNA21 上调。这一相反的现象值得我们进一步去研究其原因,是否 mi-RNA21 还针对其它信号通路,而该通路与 HCV 的感染和清除相关^[7]。

mi-RNA149 作用于 HIV 病毒中的 vpr 基因,而 vpr 基因表达的 vpr 蛋白与反式激活病毒转录、转移病毒整合复合物的细胞核的一系列病毒生存的关键步骤有关。mi-RNA149 高表达能抑制 vpr 蛋白的表达,从而达到抑制病毒复制的目的。在 HIV 病毒中存在 hiv1-mir-H1,能够下调 mi-RNA149 的表达,从而促进 HIV 病毒的感染。在 HCV 中也许没有这种限制基因的存在,因此宿主细胞的 mi-RNA149 可能出于一种自我保护的机制呈现高表达,以对抗 HCV 病毒的入侵。干扰素作用后,但 mi-RNA149 却几乎消失。它与干扰素的作用关系需要进一步去发掘^[8]。

mi-RNA152,有报道表明其过度表达会使 HLA-G 蛋白表达显著降低,HLA—G 是非经典性人类白细胞抗原 I 类基因,主要分布在母体胎儿界面绒毛外细胞滋养层,可抑制 NK 细胞及 T 细胞杀伤活性,诱导 T 细胞凋亡,从而保护胎儿免受母体 NK 细胞及 T 细胞杀伤,在母胎免疫应答过程中发挥重要作用^[9]。本实验中 HCV 感染后 mi-RNA152 呈现低表达,会否引起

HLA-G 蛋白上调以逃避宿主对感染 HCV 细胞的免疫杀伤作用。而干扰素作用后,它大幅上升,预示着机体对 HCV 感染细胞的免疫耐受的打破,从而更有效地杀伤感染细胞和清除 HCV。

慢性 HCV 感染的机制尚不明确,但有间接证据表明,HCV 感染会对细胞内线粒体有一定的损伤,并会引起一定程度的氧化应激。这一过程可能会导致细胞内一定程度的缺氧,而缺氧能够触发 mi-RNA210 的表达^[10-11]。因此,mi-RNA210 可能在病毒感染过程中一定程度地缓解其造成的缺氧状况,这或许是机体自我保护的一种措施,但也可能是造成 HCV 感染慢性化的可能性原因之一。

目前,在病毒的感染、复制和转录及治疗等众多方面,mi-RNA 已经受到越来越多的关注,且被认为是细胞内重要的调控因素之一。以上仅仅是我们结合文献对实验结果做出的一些初步分析,表 1 中其余的 mi-RNA 未能找到与 HCV 及干扰素治疗相关的文献及报道,这些 mi-RNA 或许与 HCV 的感染与清除无关,也可能还有新的作用机制等待我们去发掘。因此下一步,我们将进一步结合文献选择其中与 HCV 可能相关性大的 mi-RNA,对其进行人为的调控,观察 HCV 感染与清除的变化,以期对靶点和机制进行更深入的探究,同时结合临床 HCV 难治型病例,发现与干扰素治疗无效相关的可能机理,使 mi-RNA 在 HCV 治疗领域中发挥更大的作用。

References:

[1] LIU Yan,WANG C M,LI Jin-yang,et al(刘 研,王春梅,李锦洋,等). Up-regulated expression of miS-181a in HepG2.2.15 cells transfected via full-length hepatitis B virus genome [J]. **Medical Journal of Chinese People's Liberation Army** (解放军医学杂志),2008,33(8):992-994. (in Chinese)

[2] LI Ping. miR-122 regulation in the role of liver

disease research [J]. **Practical Hepatology**,2010,13(5):397-399.

[3] FISH J E,SRIVASTAVA D. MicroRNAs: opening a new vein in angiogenesis research [J]. **Sci Signal**,2009,2(52):1-3.

[4] FANG Guo-qiang,WU Bing-li. LI En-min,et al(方国强,吴炳礼,李恩民,等). mir-21 and tumor [J]. **Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis**(癌变.畸变.突变),2010,22(1):65-74. (in Chinese)

[5] GAO W, SHEN H, LIU LX, et al. MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis [J]. **Cancer Res Clin Oncol**,2011,137(4):557-566.

[6] ZHANG Y, ZHENG S J, DUAN Z P. microRNA-21's role in the liver [J]. **World J Gastroentero**,2010,18(25):2621-2625.

[7] ZHI F,CHEN X,WANG S N,et al. The use of hsa-miR-21, hsa-miR-181b and hsa-miR-106a as prognostic indicators of astrocytoma [J]. **Eur J Cancer**,2010,(46):1640-1649.

[8] HARIHARAN M, SCARIA V, PILLAI B, et al. Targets for human encoded microRNAs in HIV genes [J]. **Biochem and Bioph Res Co**,2005,337(4):1214-1218.

[9] ZHU Xiao-ming,WANG Xiao-hong,JIANG Feng,et al(朱晓明,王晓红,姜 峰,等). miR-152 regulate JEG-3 cells of HLA-G expression [J]. **Journal of General Medicine**(中华全科医学),2011,9(2):171-172. (in Chinese)

[10] HUANG X, LE Q T, GIACCIA A J. MiR-210 micromanager of the hypoxia pathway [J]. **Trends Mol Med**,2010,16(5):230-237.

[11] GARZON R, PICHIORRI F, PALUMBO T, et al. MicroRNA fingerprints during human Megakaryocytopoiesis [J]. **PNAS**,2006,(103):5078-5083.

[责任编辑 张荣连]