Copyright 2008
中华医学会肝病学会
保留一切版权

沪ICP备05007189号

上海翼多信息咨询有限公司
提供技术支持

丙型肝炎病毒核心蛋白对低氧诱导因子-1α和血管内皮生长因子表达的影响

刘兴晖　周新　祝成亮　宋惠　刘芳

【摘要】 目的 探讨HCV核心蛋白对低氧诱导因子1α(HIF-1α)和血管内皮生长因子（VEGF）表达的影响。 方法 将HCV核心蛋白基因的真核表达载体flag2B-core和HIF-1α siRNA转染Huh7.5.1细胞；采用RT-PCR和Western blot法分别检测HIF-1α、VEGF在mRNA和蛋白水平的表达变化，采用酶联免疫吸附试验检测细胞上清液中VEGF的含量。对各组间数据进行 t 检验。 结果 Huh7.5.1细胞转染flag2B-core后，HIF-1α和VEGF的mRNA和蛋白表达水平升高，细胞上清液中VEGF含量明显高于对照组[（654.5 ± 43.7）pg/ml与(365.9 ± 26.8） pg/ml，t = 653.1%, P < 0.01）]；Huh7.5.1细胞共转染flag2B-core和HIF-1αsiRNA后，HIF-1α和VEGF的mRNA和蛋白表达水平降低，细胞上清液VEGF含量明显低于对照组[（389.2 ± 29.6）pg/ml与（768.8 ± 47.3） pg/ml， t = 1330.22, P < 0.01）。 结论 HCV核心蛋白能够上调HIF-1α和VEGF的表达；HCV可能通过核心蛋白来调节HIF-1α和VEGF的表达。
【关键词】 肝炎病毒，丙型； 病毒核心蛋白质类； 血管生成因子； 低氧诱导因子1α

Effects of HCV core protein on the expression of hypoxia-inducible factor 1α and vascular endothelial growth factor

LIU Xing-hui*, ZHOU Xin, ZHU Cheng-liang, SONG Hui, LIU Fang. *Center for Gene Diagnosis, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071,China
Corresponding author: ZHOU Xin, Email: zhouxjyk@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of core protein of hepatitis C virus (HCV) on the expression of hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) and vascular endothelial growth factor (VEGF). Methods Huh7.5.1 cells were transfected with plasmid flag2B-core carrying HCV core gene, expression of HIF-1α and VEGF were measured by reverse transcription-polymorphism chain reaction (RT-PCR) and western blot. Enzyme link immunobsorbent assay (ELISA) were used to detect the level of VEGF in the supernatants. Results The expression of HIF-1α and VEGF mRNA and protein were upregulated after flag2B-core was transfected into Huh7.5.1 cells, and VEGF level in the supernatant was significant elevated as compared to controls [(654.5 ± 43.7) pg/ml vs (365.9 ± 26.8) pg/ml, t = 653.1%, P < 0.01]. The expression of HIF-1α and VEGF mRNA and protein were downregulated after flag2B-core and HIF-1α siRNA were co-transfected into Huh7.5.1 cells, and VEGF level in the supernatant was significanty reduced as compared to controls [(389.2 ± 29.6) pg/ml vs (768.8 ± 47.3)pg/ml, t = 1330.22, P < 0.01]. Conclusions HCV core protein enhances the expression of HIF-1α and VEGF. HCV may regulate the expression of HIF-1α and VEGF via the core protein.
【Key words】 Hepatitis C virus; Viral core proteins; Angiogenesis factor; Hypoxia-inducible factor-1α

HCV为有包膜的单股正链RNA病毒，其编码区只有一个开放阅读框，编码长约3010～3030个氨基酸的多聚蛋白前体，其中HCV核心蛋白是一种多功能蛋白，在HCV的致病及致癌过程中起到重要作用。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)能特异地促进细胞分裂、增殖及迁移，低氧诱导因子1α(hypoxia-inducible factor-α, HIF-1α)在VEGF合成过程中起着关键的调节作用[1]。研究结果表明，HCV感染引起丙型肝炎、肝硬化，最后可导致肝癌的发生，但HCV的致癌机制还不很清楚[2]。本研究主要探讨HCV核心蛋白对HIF-1α和VEGF表达的调节作用，为揭示HCV的致癌机制奠定基础。

材料与方法

1. 材料：肝癌细胞株Huh7.5.1细胞由武汉大学典型培养物保藏中心提供，HCV核心基因的真核表达载体Flag2B-core由武汉大学生命科学学院刘芳教授惠赠[3]。M-MLV逆转录酶购自美国普洛麦格公司，HCV核心蛋白、HIF-1α和VEGF单克隆抗体购自美国Sigma公司，脂质体转染试剂Lipofe ctamine 2000、RNA提取试剂Trizol和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔第二抗体购自美国英杰生命技术有限公司。HIF-1α siRNA和非特异性siRNA(NS -siRNA)序列参照文献[4]，由上海英俊生物技术有限公司合成。

2. 细胞培养及转染：Huh7.5.1细胞用含体积分数10%胎牛血清（购自杭州四季清公司）、100 U/ml青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM培养液常规培养。取指数生长期的细胞进行实验，转染前将细胞接种在6孔板，将4μg质粒DNA和5μl转染试剂分别稀释在100μl无血清无双抗的DMEM培养液中，室温下作用20 min，将配制好的转染液200μl添加到细胞培养液中，继续常规培养。

3. RT-PCR检测：收集Huh7.5.1细胞，Trizol试剂提取细胞总RNA，以总RNA为模板进行RT-PCR，逆转录出相应的cDNA。再以cDNA作为模板，分别用HIF-1α和VEGF基因的检测引物进行PCR扩增，引物序列如下：HIF-1α正义链：5′-TAGTGC
CACATCATCACC-3′，HIF-1α反义链：5′-ACATG
CTAAATCAGAGGG-3′；VEGF正义链： 5′-GGGCA
GAATCATCACGAAGT-3′，VEGF反义链： 5′GGC
TCCAGGGCATTAGACA- 3′；β-肌动蛋白（actin，
作为内参照）正义链：5′-ATGATATCGCCGCGCTC
G-3′，和β-actin反义链： 5′-CGCTCGGTGAGGA
TCTTCA-3′。PCR体系：10×PCR缓冲溶液(100 mmol/L Tris·HCl、pH8.5、500 mmol/L KCl、1.5 mmol MgCl2）2.5μl，200μmol/L dNTPs 2.5μl，1 U/μl Taq聚合酶1μl，cDNA 2μl，加灭菌蒸馏水至总体积25μl。PCR条件：94℃预变性5 min； 94℃ 45 s， 58 ℃ 45 s，72 ℃ 30 s，扩增25个循环； 72 ℃延伸10 min。PCR扩增产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测。
4. Western blot法检测：收集Huh7.5.1细胞，加入裂解液后超声破碎，考马斯亮蓝G250方法测定蛋白质浓度；取40 mg蛋白质样品，加等体积的上样缓冲液后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，将蛋白质转到硝酸纤维素膜上，5%的脱脂牛奶封闭膜2 h；分别加入1∶1000和1∶2000 HIF-1α和VEGF蛋白的单克隆抗体，温育2 h，磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffer solution tween -20，PBST)洗膜3次；加入1∶5000辣根过氧化物酶标记的羊抗兔第二抗体温育1 h，PBST洗膜4次；用电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)显色系统进行显色。
5. 酶联免疫吸附试验（ELISA）检测：取Huh7.5.1细胞培养上清液100μl加入到ELISA板小孔中，4℃包被过夜；磷酸盐缓冲液洗板5次，37 ℃封闭1 h，用PBST洗板5次；加入VEGF抗体（1∶200）100 μl/孔，37 ℃1 h，PBST洗板5次。辣根过氧化物酶偶联的驴抗羊IgG用PBST按1∶5000稀释，37 ℃ 30 min，PBST洗板5次。每孔分别加入显色液，37 ℃避光显色5 min；加入终止液，酶标仪读数。实验重复3次。
6. 统计学方法：实验数据用均数±标准差（x±s)表示，采用SPSS13.0统计软件包进行 t 检验，以$P < 0.05$表示差异有统计学意义。

结　果

1. HCV核心蛋白能够上调HIF-1αmRNA和蛋白的表达：将HCV核心基因的真核表达载体Flag2B-core转染Huh7.5.1细胞，并设立Flag2B空载体作为对照，转染48 h后，采用RT-PCR和Western blot法检测了细胞HCV核心蛋白的表达情况。结果显示，转染Flag2B-core后，HCV核心蛋白有明显表达；与对照组相比，转染Flag2B-core后HIF-1αmRNA和蛋白的表达水平显著升高，表明HCV核心蛋白能够上调HIF-1α的表达水平。见图1和图2 。
2. HCV核心蛋白能够上调VEGF mRNA和蛋白的表达：(1)将HCV核心基因的真核表达质粒Flag2B-core转染Huh7.5.1细胞，并设立Flag2B空载体作为对照，转染48 h后，采用RT-PCR和Western blot法分析了细胞VEGF mRNA和蛋白表达水平的变化。结果显示，与对照组相比，HCV核心蛋白能明显上调VEGF mRNA和蛋白的表达水平。见图3和图4。（2）细胞培养48 h后，进一步采用ELISA检测了Huh7.5.1细胞上清液中VEGF蛋白的含量，结果表明，VEGF在对照组细胞上清液中的浓度为(365.9 ± 26.8) pg/ml，转染真核表达质粒Flag2B - core后，Huh7.5.1细胞上清液中VEGF的浓度为(654.5 ± 43.7) pg/ml，两者差异有统计学意义($t = 653.19$，$P < 0.01$）。见图5。
3. HCV核心蛋白通过HIF -1α上调VEGF的表达：将HCV核心基因的真核表达质粒Flag2B - core和HIF-1αsiRNA共转染Huh7.5.1细胞，并设立NS - siRNA作为对照组。转染48 h后，采用RT- PCR和Western blot法分析细胞VEGF mRNA和蛋白表达水平的变化。结果显示，与对照相比，转染HIF -1α siRNA后，VEGF的表达量明显降低，见（图6，7）。采用ELISA检测了细胞上清液中VEGF蛋白的含量，结果为转染NS - siRNA后，Huh7.5.1细胞上清液中VEGF浓度为(768.8 ± 47.3） pg/ml，而转染HIF-1α siRNA后VEGF后浓度为（389.2 ± 29.6） pg/ml，两组差异有统计学意义（ $t = 1330.22$，$P < 0.01$），见图8。说明HCV核心蛋白可通过HIF-1α上调VEGF的表达。

讨　论

HCV感染能导致丙型肝炎、肝硬化和原发性肝细胞癌。据世界卫生组织报道显示，目前全球有1.7～2.0亿HCV感染者，占总人口的2 %～3 %；我国有4000万HCV感染者，约50 %～85 %的HCV感染者转变为慢性丙型肝炎，其中10 %～20%的慢性感染者会发展为肝硬化，最终导致HCC的发生[5]。HCV 核心蛋白含191个氨基酸，相对分子质量为2.1×10 4，序列十分保守。多个核心相互聚合并结合病毒核酸，组成病毒核心颗粒。核心蛋白能够保护病毒感染的肝细胞免受细胞介导的免疫攻击，参与细胞周期和凋亡过程等[6]。
有研究结果显示，除低氧可诱导HIF-1α和VEGF表达增加外，一些病毒蛋白如HBV X蛋白和人乳头瘤病毒16 E6蛋白等都能够调节HIF-1α和VEGF的表达，促进血管生成，参与肿瘤的形成过程[7]。在本研究中，我们将HCV核心基因的真核表达载体Flag2B-core转染Huh7.5.1细胞，采用RT-PCR和Western blot法检测到HCV核心蛋白能够在mRNA和蛋白水平上调HIF-1α和VEGF的表达；由于VEGF能够分泌到细胞外，我们进一步采用ELISA检测了细胞上清液中VEGF的含量，结果与RT-PCR和Western blot法检测结果一致。
HIF-1α和VEGF是最重要的促血管生成因子。HIF-1α在各种侵袭性肿瘤细胞和组织中表达升高，与肿瘤侵袭、迁移、转移密切相关[8]。VEGF为肿瘤血管生成的主要调控因子，能特异地结合血管内皮细胞，促进内皮细胞生长，增加血管通透性，从而诱导血管生成[4]。HCV感染能够上调VEGF的表达，促进血管的生成，但其具体机制不清楚[9]。本研究结果显示，HCV可能通过核心蛋白上调HIF-1α和VEGF在肝细胞中的表达，促进血管的生成，参与肿瘤的发生和发展。

为探讨HCV核心蛋白调节VEGF的机制，我们用HIF-1α的siRNA转染Huh7.5.1细胞，发现当HIF-1α表达被抑制后，VEGF的表达也随之降低，表明HCV 核心蛋白是通过HIF-1α来调节VEGF的表达。HIF-1α能够影响肿瘤细胞生长增殖、凋亡、迁移，其作用主要是通过调节其下游靶基因VEGF和趋化因子受体4等蛋白的表达来实现[4]；本研究结果提示可以通过筛选HIF-1α抑制剂来发展抗肿瘤血管生成的潜在药物。但HCV核心蛋白如何调节HIF-1α的表达，其具体的分子机制尚待进一步研究。

总之，在本研究中我们探讨了HCV核心蛋白对HIF-1α和VEGF的调节作用，并初步研究了其调节机制，为阐明HCV的致癌机制奠定了基础，同时也为肿瘤的治疗提供了线索。

参 考 文 献

[1] Sun X, Vale M, Jiang X, et al. Antisense HIF-1alpha prevents acquired tumor resistance to angiostatin gene therapy. Cancer Gene Ther, 2010, 17: 532-540.

[2] Takata A, Kuromatsu R, Ando E, et al. HCC develops even in the early stage of chronic liver disease in elderly patients with HCV infection. Int J Mol Med, 2010, 26: 249-256.

[3] Lu L, Wei L, Peng G, et al. NS3 protein of hepatitis C virus regulates cyclooxygenase-2 expression through multiple signaling pathways. Virology, 2008, 371: 61-70.

[4] Zhang Q, Tang X, Zhang ZF, et al. Nicotine induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human lung cancer cells via nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling pathways.Clin Cancer Res, 2007, 13: 4686 - 4694.

[5] Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: a global view. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 7: 448-458.

[6] Hu Z, Muroyama R, Kowatari N, et al. Characteristic mutations in hepatitis C virus core gene related to the occurrence of hepatocellular carcinoma. Cancer Sci, 2009, 100:2465-2468.

[7] Tang X, Zhang Q, Nishitani J, et al. Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 alpha protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells. Clin Cancer Res, 2007, 13: 2568-2576.

[8] Ding L, Chen XP, Wang HP. Expression and clinical significance of HIF-1α protein in hepatocellular carcinoma tissues. Zhonghua Ganzangbing Zazhi, 2004, 12: 656-659.(in Chinese)

丁磊，陈孝平，王海平.缺氧诱导因子-1α蛋白在肝癌组织中的表达及临床意义. 中华肝脏病杂志, 2004, 12: 656-659.

[9] Nasimuzzaman M, Waris G, Mikolon D, et al. Hepatitis C virus stabilizes hypoxia-inducible factor 1alpha and stimulates the synthesis of vascular endothelial growth factor. J Virol, 2007, 81: 10249 -10257.

（收稿日期：2010-11-25）

（本文编辑：朱红梅）

中华医学会肝脏病杂志版权