

## 2 个由 HSV I 诱导的人成纤维细胞 EST 差异 表达基因的 SAGE 分析\*

周东霞, 王丽春, 董承红, 李卫东, 戴青, 李琦涵

(中国医学科学院中国协和医科大学 医学生物学研究所, 云南 昆明 650118)

**摘要:**对单纯疱疹病毒 I 型感染 KMB-17 细胞后的基因反应所克隆得到 2 个未知功能新基因片段 HSP-5 和 HSP-7 进行了初步探讨, 运用电子 SAGE 分析和组织表达分析, 表明 HSP-5 和 HSP-7 基因和肿瘤组织具有一定的相关性, 且在 KMB-17 细胞刺激 2 h 的细胞中的表达及癌组织中表达均大于对照细胞, 显示出 HSP-5 和 HSP-7 与 HSVI 病毒刺激, 以及肿瘤组织均有着一定的相互关系。

**关键词:** HSV I 感染; 基因反应; SAGE

**中图分类号:** Q 781      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0258-7971(2004)05-0445-05

在探索病毒与细胞相互作用的过程中, 分析由于病毒对细胞刺激后所诱导的差异基因在细胞内的功能具有潜在的价值。大量的工作表明, 在 mRNA 水平上反映病毒感染细胞过程中细胞内环境的改变具有相应的意义<sup>[1]</sup>。1995 年由 Velculescu 等创建基因表达系列分析(The serial analysis of gene expression, SAGE)的方法对于比较 2 组或多组 mRNA 间基因表达水平极为有效。其方法是从 mRNA 精确位置分离短标签序列(8~10 bp), 将它们连接成长的串联体, 克隆, 测序。克隆串联体中标签出现的频率直接反映标签代表转录本的丰度。因此, SAGE 方法可满足同时、定量分析成千上万个转录本<sup>[2~4]</sup>。但是, 传统的 SAGE 需要大量的人力和物力, 随着越来越多的生物信息学服务站点在不断地建立和完善, 利用生物信息学去发现基因表达和基因的功能显得更为方便有效。在我们的前期工作中, 我们已注意到 HSV I 结合人成纤维细胞 KMB-17 株的表面受体后, 诱导细胞出现了多种特异的基因反应<sup>[5]</sup>, 在这些基因反应的分析中, 我们克隆到了一些新基因<sup>[6,7]</sup>和若干差异片段。分析这些差异基因与病毒刺激的相关性和表达特性, 以

期进一步扩展对病毒与细胞相互作用的认识。在本文介绍的工作中, 我们将其中 2 个 EST 片段进行了电子 SAGE 分析和组织表达分析, 期待为进一步开辟抗病毒感染的研究工作提供一定的资料。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 细胞及病毒 Hep-2 细胞、KMB-17 细胞, 均生长于 DMEM-5% 小牛血清, 5  $\mu$ g/mL 双抗, 生长为单层且形态良好时备用。人单纯疱疹病毒 1 型(HSV I)由医学生物学研究所病毒免疫室保存, 繁殖并收获于 HeLa 细胞, 蔗糖密度梯度离心纯化, 病毒滴度为 7.0 CCID<sub>50</sub>/mL。

1.1.2 菌株和质粒 菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 医学生物学研究所病毒免疫室保存。克隆载体 pMD18-T, 购于大连宝生物公司。

1.1.3 主要试剂 限制性内切酶、聚合酶、连接酶、修饰酶及蛋白酶为大连宝生物公司, Quick mRNA 提取试剂盒、Time Save cDNA 合成试剂盒、cDNA 文库试剂盒为 Pharmacia 公司产品, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP 购自中国同位素公司。

\* 收稿日期: 2004-04-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270070)。

作者简介: 周东霞(1969-), 女, 云南人, 助理研究员, 硕士, 主要从事病毒免疫学方面的研究。

李琦涵(1957-), 男, 江苏人, 研究员, 博士, 主要从事分子病毒学方面的研究。

## 1.2 HSV I 病毒刺激 KMB- 17 细胞后的特异 cDNA 文库的建立

1.2.1 病毒结合细胞 采用常规细胞培养技术将 KMB- 17 培养至单层, 去除培养液, 无血清 DMEM 洗 2 次, 加入滴度为 7.0 CCID<sub>50</sub>/mL 的 HSV I, 室温吸附 30 min 后, 弃残余病毒液, 加入无血清 DMEM 培养液 2 mL, 37℃ 培养 2 h; 刮下细胞, 以预冷 PBS 洗 3 次备用; 提取 mRNA 并逆转为 cDNA, 使用 Pharmacia 试剂盒, 方法按说明书。

1.2.2 特异 cDNA 文库的建立 将上述逆转录的 cDNA 第 1 链, 制备成双链 cDNA, 并在 2 侧各加 1 个 *Eco* R I 位点的接头, 纯化制备, 方法按试剂盒说明书。

将上述带 *Eco* R I 位点的双链 cDNA 重组入 pUC- 18 质粒, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取白色菌落扩增培养, 编号并保存。

1.3 新基因的鉴定 病毒刺激前后的 mRNA 差异显示分析所获得的特异基因片段为模板, 按常规使用 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]- dATP 标记 PCR 扩增的特异性 DNA 片段为探针; 上述文库中的菌种扩增培养, 将小量提取的质粒 DNA 80℃ 变性后点样于硝酸纤维素膜上, 与探针 42℃ 杂交过夜, 2 $\times$  SSC 及 0.2 $\times$  SSC, 0.1 $\times$  SSC 梯度洗 5 遍, 放射自显影于 X 光片。将斑点杂交结果为阳性的质粒 DNA, 经 *Eco* R I 酶切初步确定基因大小后, 分别用正向(T7)、反向(SP6)引物 2 端进行测序分析, 确定测序结果, 并在 Genbank 中进行比对。

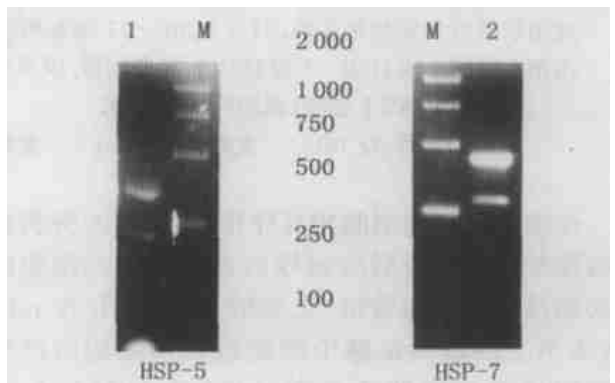
1.4 电子 SAGE 分析 通过 SAGE 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/>) 搜索 SAGE 标签, 并进行 EST 片段的表达谱分析。

1.5 利用 RNA 狭缝杂交分析基因在细胞及组织中的表达 为了进一步明确它在癌组织中的表达情况, 分别提取 Hep- 2 细胞、肝癌组织和膀胱癌组织的总 RNA, 以 KMB- 17 细胞、HSV I 刺激

KMB- 17 2 h 的细胞 mRNA 作为对照, 进行 RNA 斑点杂交。

## 2 结果与分析

2.1 差异显示片段的鉴定 我们选取差异条带, 将获得的差异显示片段切下后, 再次进行 PCR 扩增, 经狭缝印迹杂交, 利用差异片段制备的探针在上述特异 cDNA 文库中发现了数个长度不等的差异片段, 我们从中选取了 2 个长度为 373 bp 和 549 bp EST 片段基因(登录号分别为 AW307599, AW288475), 命名为 HSP- 5 和 HSP- 7(见图 1)。



M: DNA marker DL2000; 1, 2: PCR fragment

图 1 差异显示 PCR 扩增 HSP- 5 和 HSP- 7

Fig. 1 PCR of DD- PCR fragment HSP- 5 and HSP- 7

## 2.2 电子 SAGE 分析

2.2.1 从 Genbank 的 SAGE 分析发现 HSP- 5 有 2 个 SAGE Tag 与其相关, 分别见表 1。

针对上述 2 个表达标签, 在基因表达序列数据库中进行组织分布表达分析, 结果见表 2, 3。

2.2.2 从 Genbank 的 SAGE 分析发现 HSP- 7 有 2 个 SAGE Tag 与其相关, 分别见表 4。

针对上述 2 个表达标签, 在基因表达序列数据库中进行组织分布表达分析, 结果见表 5, 6。

表 1 HSP- 5 的 SAGE 标签分析

Tab. 1 SAGE tags of HSP- 5

序列方向	SAGE 标签	标签位置	PolyA 信号	PolyA 信号位置	PolyA 尾
5' - 3' (+)	ACCACCAAAA	261.. 270	AATAAA	482.. 487	—
3' - 5' (+)	TGCTCCAAGT	130.. 121	ATTAATA	35.. 30	—

表 2 ACCACCAAAA 标签在 SAGE 文库中的分析

Tab. 2 SAGE library data for ACCACCAAAA tag

SAGE 文库	标签数/ 百万序列	标签计数	总标签数	组织来源
SAGE pooled GBM	16	1	61 841	多型性胶质胚细胞瘤
SAGE 95- 259	25	1	39 473	侵袭性囊管瘤
SAGE 95- 260	22	1	45 179	转移性淋巴结癌
SAGE Ped GBM 1062	16	1	59 935	原发瘤

表 3 TGCTCCAAGT 标签在 SAGE 文库中的分析

Tab. 3 SAGE library data for TGCTCCAAGT tag

SAGE 文库	标签数/ 百万序列	标签计数	总标签数	组织来源
SAGE SciencePark MCF7 estradiol 3h	33	2	59 978	乳腺癌
SAGE LNCaP	44	1	22 637	前列腺细胞系

表 4 HSP- 7 的 SAGE 标签分析

Tab. 4 SAGE tags of HSP- 7

序列方向	SAGE 标签	标签位置	PolyA 信号	PolyA 信号位置	PolyA 尾
5' - 3' (+)	GTGAAACCCC	341.. 350	AATAAA	219.. 224	—
3' - 5' (-)	TTGCCAGGC	336.. 327	—	—	—

表 5 TTGGCCAGGC 标签在 SAGE 文库中的分析

Tab. 5 SAGE library data for TTGGCCAGGC tag

SAGE 文库	标签数/ 百万序列	标签计数	总标签数	组织来源
SAGE Duke 1273	2 034	79	38 836	成神经管细胞瘤
SAGE Duke H1020	2 482	130	52 371	星细胞瘤
SAGE HCT116	1 491	90	60 322	结肠癌细胞系
SAGE Caco 2	1 331	82	61 601	结肠癌细胞
SAGE SW837	803	49	60 986	癌细胞系
SAGE RKO	1 421	74	52 064	癌细胞系
SAGE Tu98	3 264	160	49 005	腺癌细胞
SAGE Duke mhh- 1	577	28	48 488	c- myc 阴性成神经管细胞瘤细胞系
SAGE 95- 259	1 545	61	39 473	侵袭性瘤
SAGE 95- 260	973	44	45 179	转移性淋巴结

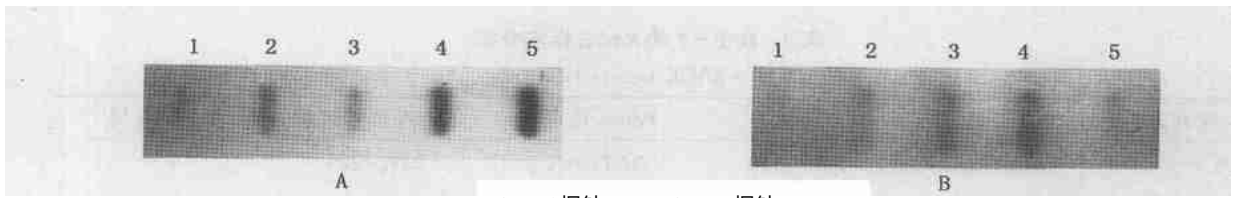
表 6 GTGAAACCCC 标签在 SAGE 文库中的分析

Tab. 6 SAGE library data for GT GAAACCCC tag

SAGE 文库	标签数/ 百万序列	标签计数	总标签数	组织来源
SAGE Duke 1273	7 029	273	38 836	成神经管细胞瘤
SAGE Duke H1020	11 342	594	52 371	星细胞瘤细胞系
SAGE HCT116	8 089	488	60 322	结肠癌细胞系
SAGE Caco 2	7 483	461	61 601	结肠癌细胞系
SAGE SW837	4 624	282	60 986	癌细胞系
SAGE Tu98	8 529	418	49 005	腺癌
SAGE OVT- 8	3 871	130	33 575	原发卵巢癌
SAGE Duke precrisis fibroblasts	2 841	25	8 797	皮肤成纤维细胞系( 恶变后期存活)

2.3 EST 基因在细胞及组织中的表达 结果发现在细胞受病毒感染刺激 2 h 中的表达高于无刺激细胞; HSP- 5 在肝癌组织和膀胱癌组织中的表达

较高, HSP- 7 在 Hep- 2 细胞和肝癌组织中的表达较高。



A: HSP- 5 探针; B: HSP- 7 探针

1: KMB- 17 对照; 2: 结合 HSV I 后的 KMB17; 3: Hep- 2 细胞; 4: 肝癌细胞; 5: 膀胱癌细胞

图 3 HSP- 5 和 HSP- 7 在 KMB- 17, Hep- 2 细胞及肝癌组织和膀胱癌组织中表达情况的 RNA 斑点杂交分析

Fig. 3 Northern analysis of KMB- 17, Hep- 2 cells and two cancer tissues

### 3 讨论

随着在基因水平对生命活动认识的深入,特别是基因组研究的进展,正在概念上和研究路线上为环境因素与机体在基因和蛋白质水平上的交互作用提供科学基础.特定环境下的基因表达分析是当前研究的一个重要方面<sup>[8,9]</sup>.因此在分子水平上从整体的角度分析病毒-细胞相互作用状态下细胞内动态变化的差异基因表达,了解基因表达调控的相互作用与联系,对于揭示病毒感染细胞这一特定时期的基因和蛋白质的功能,阐明相关疾病的分子机理及发现靶分子、辅助药物设计具有重要意义.

单纯疱疹病毒(HSV)是一种具有较强传染性的病原体,它是一种结构复杂的双链DNA病毒,具有多种表现抗原性的蛋白成分,在细胞内的复制

过程中与宿主细胞之间表现有多种相互作用<sup>[10,11]</sup>.HSV I 染细胞的过程具有极其复杂的内容,我们用 mRNA 差异显示技术发现了 HSV I 病毒刺激细胞后的特异性表达基因片段 HSP- 5 和 HSP- 7,而在对照细胞中则未找到相应转录本,从而提示在肺组织细胞中作为特定条件下表达的基因是与病毒刺激特定环境相关的,但其明确的功能如何,尚待进一步的研究.

我们将这 2 个 EST 片段在 NCBI 网站进行电子 SAGE 分析,发现在 HSP- 5 序列中含有 2 个 SAGE T ag,这 2 个表达标签在基因表达序列数据库中进行组织分布表达分析后发现 HSP- 5 表达的组织分布表现为存在于多种癌组织中及肿瘤细胞系中,例如多形成胶质细胞瘤、侵袭性腺癌、转移性淋巴瘤、胸腺癌和前列腺癌等等.同样, HSP- 7

序列中也含有2个SAGE Tag,表达标签在基因表达序列数据库中的组织分布表达分析结果更为明显,发现与HSP-7表达的组织分布相关的组织更为丰富,例如成神经管细胞瘤、星形胶质细胞瘤、结肠癌细胞系、肾腺癌、卵巢癌和多种癌细胞系等等,上述特征性的结果给我们提出了这样的问题, HSP-5和HSP-7基因和肿瘤组织具有一定的相关性,这种相关又和HSV I有什么联系呢? HSP-5和HSP-7的组织表达初步分析提示我们:差异基因HSP-5和HSP-7在KMB-17细胞刺激2h的细胞中的表达均大于对照细胞的表达,说明它们与病毒刺激直接相关;同时这一结果还进一步提示HSP-5在肝癌组织和膀胱癌组织中有高效表达, HSP-7在Hep-2细胞及肝癌组织中高效表达,当然此SAGE的发现还需要进一步的实验加以证实。

综上所述,EST片段HSP-5和HSP-7与HSV I病毒刺激,以及肿瘤组织均有着一定的相互关系,虽然HSV I的致肿瘤性未见明确报道,但它们之间的相互关系具有进一步研究的价值,同时本研究也为病毒-细胞相互作用的基因反应及其功能的研究提供了新的依据及线索,为今后更深一步的研究提供了基础。

#### 参考文献:

- [1] 李琦涵,姜莉.细胞因子与即刻早期基因反应[M].昆明:云南大学出版社,2001.
- [2] VELCUESCU V E, ZHANG L, VOGELSTEIN B, et al. Serial analysis of gene expression[J]. Science, 1995, 270: 484—487.

- [3] MADDEN S L, GALELLA E A, ZHU J, et al. SAGE transcript profiles for p53-dependent growth regulation[J]. Oncogene, 1997, 15: 1 079—1 085.
- [4] MADDEN S L, WANG C J, LANDES G. Serial analysis of gene expression: from gene discovery to target identification[J]. Drug Discov Today, 2000, 5: 415—425.
- [5] RUTH T at Singer, WAWRZYNIENEC P, TODD M L, et al. Use of differential display reverse transcriptase PCR to reveal cellular changes during stimuli that result in herpes simplex virus type 1 reactivation from latency: upregulation of immediate early cellular response genes TIS7, interferon, and interferon regulatory factor-1[J]. J Virol, 1998, 72: 1 252—1 261.
- [6] 李琦涵,董承红,王炯,等.2种病毒与细胞结合诱导的原癌基因早期表达[J].生物化学与生物物理学报,2000,32: 145—148.
- [7] 王炯,刘龙丁.在HSV I感染细胞中类PEBP蛋白基因的克隆及分析[J].中国病毒学杂志,2002,17(2): 97—101.
- [8] KARISER J. Environment institute lays plans for gene hunt[J]. Science, 1997, 278: 569—570.
- [9] WADMAN M. Genome study maps chemical sensitivity[J]. Nature, 1997, 389: 774.
- [10] TATAROWICZ W A, MARTIN C E, PEKOSZ A S, et al. Repression of the HSV I latency associated transcript (LAT) promoter by the early growth response (EGR) proteins: involvement of a binding site immediately downstream of the TATA box[J]. J Neurovirol, 1997, 3: 212—224.
- [11] Van Sant C, HAGGLUND R, LOPEZ P R, et al. The infected cell protein 0 of herpes simplex virus 1 dynamically interacts with proteasomes, binds and activates the cdc34 E2 ubiquitin conjugating enzyme, and possesses in vitro E3 ubiquitin ligase activity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98: 8 815—8 820.

## SAGE analysis on two EST gene of fibroblast induced by HSV I

ZHOU Dong-xia, WANG Li-chun, DONG Cheng-hong, LI Wei-dong, DAI Qing, LI Qi-han  
(Department of Viral and Immunology, Institute of Medical Biology, CAMS and PUMC, Kunming 650118, China)

**Abstract:** In this study, HSP-5 and HSP-7, two new unknown function EST gene of cellular response against the specific stimulation of HSV I was cloned from KMB-17 strain cDNA library established from mRNA of early gene response. SAGE analysis revealed that these two EST fragment were related with some tumor tissues, and the further Northern blot detection demonstrate that the transcripts of HSP-5 and HSP-7 was in more copies in cell line against the stimulation of HSV I binding as well as in some cancer tissues.

**Key words:** HSV I infection; gene response; SAGE