



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.02.002

<http://xbyx.xysm.net/xbwk/fileup/PDF/201402117.pdf>

筛选丙型肝炎病毒1b型非结构蛋白4B慢病毒L02稳定株 差异表达基因和基因通路

蒋孝华^{1,2}, 谢玉桃¹, 蔡亚平³, 雷创², 江波², 彭花²

(1. 中南大学湘雅医院感染科, 长沙 410087; 2. 南华大学附属第一医院感染科, 湖南 衡阳 421001;

3. 南华大学流行病学教研室, 湖南 衡阳 421001)

[摘要]目的: 筛选表达丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)1b型非结构蛋白4B(nonstructural protein 4B, NS4B)的慢病毒稳定细胞株L02-NS4B差异表达基因和基因通路, 为深入研究HCV NS4B在慢性丙型肝炎和肝细胞癌发生中的作用及机制提供依据。**方法:** 将已构建好的2株慢病毒稳定细胞株LO2-NS4B和阴性对照慢病毒稳定细胞株LO2- mkate2复苏扩增; 应用Human Gene 1.0ST 芯片筛选出LO2-NS4B与LO2-mkate2差异表达基因。基于京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库, 利用Fisher精确检验和卡方检验, 对差异基因参与的信号转导通路进行显著性分析。应用实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, real-time QPCR)方法验证基因芯片中5个表达上调且与凋亡有关的基因, 即蛋白激酶C δ 结合蛋白(protein kinase C delta binding protein, PRKCDBP)基因、肿瘤蛋白p53(tumor protein p53, TP53)基因、v-akt 鼠科胸腺瘤病毒癌基因同源物1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, AKT1)基因、含3个杆状病毒凋亡蛋白抑制因子重复序列 (baculoviral IAP repeat containing 3, BIRC3)基因和B细胞淋巴瘤2样1基因(B-cell lymphoma 2-like1, BCL2L1)的mRNA水平。**结果:** 以LO2-NS4B与LO2-mkate2之间基因荧光强度的比值大于1.2或小于0.8为差异表达基因, 在已知的28 869个人类基因中LO2-NS4B中有2 682个差异表达基因, 包括1 446个基因表达上调和1 236个基因表达下调。上调基因参与的显著性信号转导通路41项, 主要有凋亡通路、细胞外基质受体相互作用通路、细胞周期通路、癌症通路和Toll样受体信号通路等; 下调基因参与的显著性信号转导通路20项, 主要有癌症通路、Wnt信号通路和细胞周期通路等。Real-time QPCR验证5个表达上调基因中有3个基因表达变化与基因芯片结果一致, 分别是AKT1, BIRC3和BCL2L1, 吻合率为60%。**结论:** HCV NS4B可以调节LO2细胞中与细胞凋亡、细胞周期和细胞增殖等有关的多种基因表达, 主要影响与细胞凋亡、细胞周期和癌症相关的信号转导通路。

[关键词] 丙型肝炎病毒; 非结构蛋白4B; 基因芯片; 慢病毒

Screening of differentially expressed genes and gene pathways in hepatitis C virus 1b type nonstructural protein 4B stably expressed L02 cell line

JIANG Xiaohua^{1,2}, XIE Yutao¹, CAI Yaping³, LEI Chuang², JIANG Bo², PENG Hua²

(1. Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410087; 2. Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang Hunan 421001;

3. Department of Epidemiology, University of South China, Hengyang Hunan 421001, China)

收稿日期(Date of reception): 2013-09-25

作者简介(Biography): 蒋孝华, 博士研究生, 主任医师, 主要从事病毒性肝炎的基础和临床研究。

通信作者(Corresponding author): 谢玉桃, Email: dream-03-08@126.com

ABSTRACT

Objective: To screen differentially expressed genes and gene pathways in L02 cell line stably expressing hepatitis C virus (HCV) 1b type nonstructural protein 4B (NS4B) mediated by lentiviral system, and to provide a basis for further research of molecular biological mechanism of NS4B gene in chronic hepatitis C and hepatocarcinogenesis.

Methods: NS4B stably overexpressed L02 cell line and negative control stable L02 cell line, designated as L02-NS4B and L02-mkate2 respectively, were resurrected and amplified in vitro. The differentially expressed genes between L02-NS4B and L02-mkate2 were determined by gene expression microarray from Human Gene 1.0ST. The significant pathways of the differential genes were selected by the Fisher's exact test and χ^2 test according to kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) database. The differential expression levels of 5 selected genes including protein kinase C delta binding protein (PRKCDBP), tumor protein p53 (TP53), v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT1), baculoviral IAP repeat containing 3 (BIRC3) and B-cell lymphoma 2-like1 (BCL2L1) from cDNA microarray data were further verified by real-time quantitative polymerase chain reaction (real-time QPCR).

Results: Between L02-NS4B and L02-mkate2, the genes with fluorescence intensity ratio >1.2 or <0.8 were considered as differentially expressed genes. A total of 2 682 differentially expressed genes in the known 28 869 human genes were detected in L02-NS4B, 1 446 genes were upregulated and 1 236 genes were downregulated. A total of 41 involved pathways of up-regulated differential genes were identified by KEGG database, mainly including apoptosis, extracellular matrix receptor interaction, cell cycle, pathways in cancer and Toll-like receptor signaling pathway; and 20 involved pathways of down-regulated differential genes were identified, mainly including pathways in cancer, Wnt signaling pathway and cell cycle pathway. Of the 5 upregulated genes selected from cDNA microarray data, 3 genes showed the same differential expression pattern by real-time QPCR as that shown in cDNA microarray data, namely AKT1, BIRC3 and BCL2L1. The confirmation rate of real-time QPCR was 60%.

Conclusion: HCVNS4B can up-regulate or down-regulate the expression of many genes in L02 cells, thus affecting multiple signaling pathways relevant to cell apoptosis, cell cycle and carcinogenesis.

KEY WORDS

hepatitis C virus; nonstructural protein 4B; microarray; lentivirus

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)非结构蛋白4B(non-structural protein 4B, NS4B)是一个27 kD含有261个氨基酸的疏水蛋白,能诱导一种称为膜网的特异膜改变,这种膜网包含HCV复制复合物^[1]。然而,NS4B诱导膜网形成的机制未明,在HCV结构蛋白和非结构蛋白的研究中,NS4B的研究相对滞后。为探讨HCV NS4B在HCV感染慢性化和肝细胞癌发生、发展过程中的作用及分子机制,本课题组前期研究构建了HCV1b型NS4B与红色荧光蛋白mkate2基因融合表达的慢病毒载体pLenti6.3-NS4B-mkate2和阴性对照慢病毒载体pLenti6.3-mkate2,包装慢病毒,感染人正常肝细胞系LO2细胞,建立了表达NS4B慢病毒的稳定细胞株L02-NS4B和阴性对照慢病毒稳定细胞株

LO2-mkate2。在此基础上,本研究应用Human Gene 1.0ST芯片筛选HCV1b型NS4B慢病毒稳定细胞株L02-NS4B差异表达基因,结合细胞信号通路分析,找到差异基因参与的显著性信号转导通路,为深入研究HCV NS4B致病的分子机制提供依据。

1 材料与方法**1.1 材料**

慢病毒稳定细胞株LO2-NS4B和LO2-mkate2由本课题组构建;TRIzol试剂、反转录试剂盒、RPMI 1640培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、杀稻瘟菌素购自美国Invitrogen公司;RNA提取试剂盒购自德国

QIAGEN公司; 全转录本表达谱试剂盒购自美国 Ambion公司; 基因芯片全转录本末端标记和对照试剂盒、基因芯片杂交、洗涤和染色试剂盒购自美国Affymetrix公司。引物由上海Invitrogen公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取和质检

按RNA提取试剂盒说明提取2个慢病毒稳定细胞株LO2-NS4B和LO2-mkate2总RNA, 用分光光度计测定RNA的浓度和纯度, 用1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA中28 S和18 S的完整性。

1.2.2 RNA反转录和体外转录

总RNA进行反转录合成第一轮cDNA, 然后体外转录合成cRNA并纯化, 以cRNA为模板, 利用随机引物进行反转录合成第二轮cDNA并纯化, 用分光光度计检测第二轮cDNA的浓度。

1.2.3 样品标记和杂交

配制片段化混合液, 将第二轮cDNA片段化, 用2%琼脂糖凝胶电泳检测片段化cDNA大小, 加入标记试剂对片段化cDNA标记。准备杂交混合液, 放在PCR仪上进行孵育后, 加入到芯片中, 然后把芯片放在杂交炉上杂交16 h。杂交结束后, 扫描芯片条形码, 注册样品信息, 生成样品对应芯片文件。把芯片插入洗脱槽中大约洗涤1 h, 然后进行芯片扫描生成数据。

1.2.4 信号转导通路分析

基于京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库, 利用Fisher精确检验和卡方检验, 对差异基因参与的信号转导通路进行显著性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.2.5 实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, real-time QPCR)验证基因芯片结果

用TRIzol试剂提取细胞总RNA, 反转录成cDNA, 以cDNA为模板行 real-time QPCR扩增基因芯片中5个表达上调且与凋亡有关基因: 蛋白激酶C δ 结合蛋白(protein kinase C delta binding protein, PRKCDBP)基因、肿瘤蛋白p53(tumor protein p53, TP53)基因、v-akt 鼠科胸腺瘤病毒癌基因同源物1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, AKT1)基因、含3个杆状病毒凋亡蛋白抑制因子重复序列 (baculoviral IAP repeat containing 3, BIRC3)基因和B细胞淋巴瘤2样1(B-cell lymphoma 2-like1, BCL2L1)基因。引物序列如下: PRKCDBP上游引物

5'-CGCTTTCCAGAAGGCACCA-3', 下游引物5'-ACTCCACCGGCTCCTCGTC-3'; TP53上游引物5'-TGCGTGTTTGTGCCTGTCCTG-3', 下游引物5'-CAGTGCTCGCTTAGTGCTCCCT-3'; AKT1上游引物5'-CCTCTGCTTGGGGTCTTCTT-3', 下游引物5'-CGGTCGCCTGCCCTTCTACA-3'; BIRC3上游引物5'-TGCCAAGTGTTTCCAAG GT-3', 下游引物5'-CGGCAGCATTAAATCACAGGG-3'; BCL2L1上游引物5'-AACTCGTCGCCTGCCTCCCT-3', 下游引物5'-GGCAACCCATCCTGGCACCT-3'; 内参 β -actin上游引物5'-CTCTGGCCGTACCACTGG C-3', 下游引物5'-GTGAAGCTGTAGCCGCGC-3'。PCR条件: 95 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 70 $^{\circ}\text{C}$, 45 s, 40个循环。根据real-time QPCR反应曲线得到每个样品待测基因和内参基因的Ct值, 计算基因的相对表达量 $=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, 其中 $\Delta\Delta\text{Ct}=\text{LO2-NS4B组}\Delta\text{Ct}-\text{LO2-mkate2组}\Delta\text{Ct}$, $\Delta\text{Ct}=\text{待测基因的Ct平均值}-\text{内参基因的Ct平均值}$ 。

2 结果

2.1 总RNA抽提结果

抽提LO2-NS4B和LO2-mkate2稳转株的总RNA, 其 A_{260}/A_{280} 在2.0~2.1之间, 电泳结果可见清晰的28 S和18 S核糖体RNA的两条带, 证实已提取高纯度的RNA(图1)。

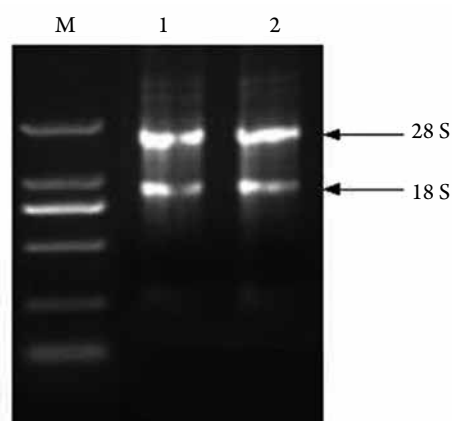


图1 总RNA电泳图

Figure 1 Electrophoresis image of total RNA

M: RNA marker; 1: LO2-NS4B; 2: LO2-mkate2

2.2 芯片质控检测

在GeneChip Human Gene 1.0 ST上包括28869个已知基因。核心质控标准B2 寡核苷酸(oligo)强阳性杂交质控合格(图2)。各项参考质控标准合

格, 本次芯片检测结果合格。

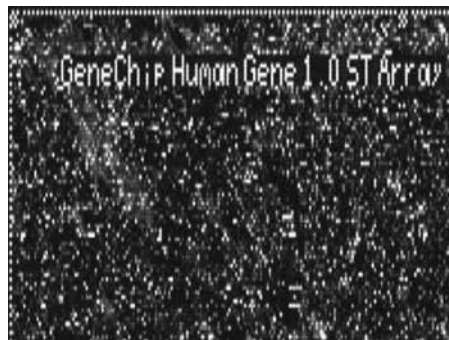


图2 芯片扫描图

Figure 2 Microarray scanning image

The microarray name in the upper left and the black and white checkerboard pattern in the corner is revealed, indicating that B2 oligo strong positive hybridization control is qualified

2.3 差异表达基因

与LO2-mkate2相比, LO2-NS4B与LO2-mkate2之间基因荧光强度的比值大于1.2或小于0.8为差异表达基因, 在已知的28 869个人类基因中LO2-NS4B稳转株筛选出差异表达基因2 682个, 其中上调基因1 446个, 下调基因1 236个; 以LO2-

NS4B与LO2-mkate2之间基因荧光强度的比值大于2或小于0.5为差异表达基因, 筛选出差异表达基因57个, 其中上调基因39个, 下调基因18个。部分上调或下调差异基因见表1。

2.4 信号转导通路分析

将LO2-NS4B与LO2-mkate2比较得到的差异基因进行显著性信号通路分析, 结果显示上调差异基因参与的显著性信号转导通路为41项, 下调差异基因参与的显著性信号转导通路为20项, 部分结果见表2和表3。

2.5 Real-time QPCR验证基因芯片中差异表达基因

Real-time QPCR验证基因芯片中5个表达上调且与细胞凋亡有关的基因: PRKCDBP, TP53, AKT1, BIRC3和BCL2L1, 以LO2-NS4B与LO2-mkate2之间mRNA表达量比值大于1.2和小于0.8分别为差异表达上调和下调, 结果显示其中有3个基因(AKT1, BIRC3和BCL2L1)的mRNA水平上调(比值分别为1.23, 1.95和1.84), 与基因芯片结果方向一致, 有2个基因(PRKCDBP和TP53)的mRNA水平下调(比值分别为0.21和0.55), 与基因芯片结果方向相反, real-time QPCR验证结果与基因芯片结果的吻合率为60%(图3)。

表1 LO2-NS4B 稳定株部分差异表达基因

Table 1 Differentially expressed genes in LO2 NS4B stably cell line

基因符号	基因描述	差异倍数
TOP2B	DNA 拓扑异构酶 II 型 β 180 kD	3.16
ATF6B	活化的转录因子 6β	2.91
SPINK5	丝氨酸蛋白酶抑制因子, Kazal 型 5	2.54
GPR1	G 蛋白偶联受体 1	2.53
TGM2	转谷氨酰胺酶 2	2.49
NR1H2	核受体亚家族 1, H 组, 成员 2	2.29
PRKCDBP	蛋白激酶 C, δ 结合蛋白	2.28
TP53	肿瘤蛋白 p53	2.27
MMP15	基质金属蛋白酶 15	2.06
TNFRSF21	肿瘤坏死因子受体超家族, 成员 21	2.03
AKT1	v-akt 鼠科胸腺瘤病毒癌基因同源物 1	1.42
BIRC3	含 3 个杆状病毒凋亡蛋白抑制因子重复序列	1.39
BCL2L1	B 细胞淋巴瘤 2 样 1	1.30
IFI44L	干扰素诱导蛋白 44 样	0.50
PPP1R3C	蛋白磷酸酶 1, 调节亚基 3C	0.50
HERC6	HECT 和 RLD 域含有 E3 泛素蛋白连接酶家族成员 6	0.42
ZNF14	锌指蛋白 14	0.40
BHLHE41	碱性螺旋-环-螺旋家族, 成员 e41	0.33

表 2 LO2-NS4B 稳定株上调差异基因参与的显著性信号转导通路

Table 2 Pathways of up-regulated differential genes in LO2-NS4B stably cell line

通路索引号	通路名称	通路差异 基因数量	通路基 因数量	P	误判率	富集度
480	谷胱甘肽代谢	10	50	8.10E-05	0.0017	4.7044
61	脂肪酸生物合成	4	6	9.11E-05	0.0018	15.6813
4510	黏着斑	21	200	2.66E-04	0.0035	2.4698
4210	细胞凋亡	12	85	4.95E-04	0.0046	3.3207
4512	细胞外基质受体相互作用	12	85	4.95E-04	0.0046	3.3207
4110	细胞周期	13	124	0.0048	0.0248	2.4660
3040	剪接体	13	127	0.0059	0.0294	2.4077
5200	癌症通路	25	326	0.0069	0.0329	1.8038
4620	Toll 样受体信号转导通路	11	102	0.0081	0.0373	2.5366
561	甘油脂代谢	7	50	0.0099	0.0434	3.2930
4910	胰岛素信号通路	13	138	0.0121	0.0499	2.2158
4115	p53 信号通路	8	68	0.0161	0.0601	2.7672
4621	Nod 样受体信号转导通路	7	58	0.0224	0.0730	2.8388
4012	ErbB 信号通路	9	87	0.0232	0.0745	2.4333

表 3 LO2-NS4B 稳定株下调差异基因参与的显著性信号转导通路

Table 3 Pathways of down-regulated differential genes in LO2-NS4B stably cell line

通路索引号	通路名称	通路差异 基因数量	通路基因数量	P	误判率	富集度
5200	癌症通路	26	326	2.96E-04	0.0199	2.2131
3040	剪接体	14	127	4.04E-04	0.0223	3.0590
3440	同源重组	6	28	8.23E-04	0.0341	5.9464
4144	内吞作用	17	202	0.0021	0.0569	2.3353
4141	内质网蛋白加工	14	166	0.0056	0.0891	2.3403
4310	Wnt 信号通路	13	150	0.0062	0.0940	2.4050
4110	细胞周期	11	124	0.0105	0.1392	2.4616

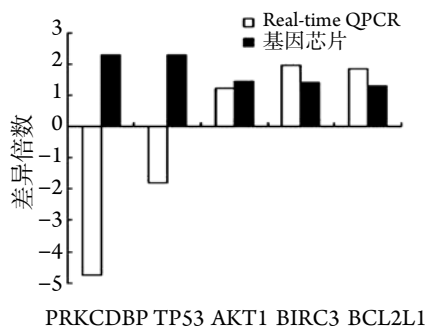


图 3 Real-time QPCR和基因芯片结果比较

Figure 3 Comparison of real-time QPCR and microarray results

Real-time QPCR validates 5 upregulated and apoptosis-related differential genes (PRKCDBP, TP53, AKT1, BIRC3 and BCL2L1) mRNA levels selected from cDNA microarray data, among which 3 genes (AKT1, BIRC3 and BCL2L1) mRNA levels are upregulated, which consistent with the direction of microarray results, however, 2 genes (PRKCDBP and TP53) mRNA levels are downregulated, which are contrary to the direction of microarray results.

3 讨论

HCV NS4B蛋白是一种膜内在蛋白,至少有4个转膜区域,主要定位在内质网膜上,其重要功能就是诱导含有HCV复制复合体的特殊膜改变即膜网的形成,这种膜网结构是HCV复制的场所。此外,NS4B还具有ATP/GTP酶^[2]和RNA结合活性^[3],可调节HCV基因组壳体化^[4]。鉴于其在HCV RNA复制和HCV生命周期中的重要作用,NS4B现已被作为抗HCV治疗的新靶位^[5-7]。运用基因芯片技术检测NS4B基因表达谱,结合细胞信号通路分析,能较好地筛选出异常表达基因及基因通路,从而较全面地研究NS4B致病的分子机制以及干预对策。

本研究以LO2-NS4B与LO2-mkate2之间基因荧光强度的比值大于1.2或小于0.8为差异表达基因,在已知的28 869个人类基因中LO2-NS4B稳转

株筛选出差异表达基因2 682个, 其中上调基因1 446个, 下调基因1 236个; 以LO2-NS4B与LO2-mkate2之间基因荧光强度的比值大于2或小于0.5为差异表达基因, 筛选出差异表达基因57个, 其中上调基因39个, 下调基因18个。这些基因涉及细胞凋亡、代谢、细胞外基质、细胞免疫以及细胞的侵袭转移等过程。为进一步探讨NS4B的致病机制, 对差异基因参与的信号转导通路进行了分析, 发现NS4B上调基因参与的显著性信号转导通路为41项, 主要有凋亡通路、细胞外基质受体相互作用通路、细胞周期通路、癌症通路和Toll样受体信号通路等; 下调基因参与的显著性信号转导通路20项, 主要有癌症通路、Wnt信号通路和细胞周期通路等。

基因芯片结果显示NS4B蛋白上调促凋亡基因TP53, 肿瘤坏死因子受体超家族成员21 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 21, TNFRSF21)和Fas相关死亡域基因 (Fas-associated via death domain, FADD)等mRNA水平, 又上调凋亡抑制基因BIRC3, BCL2L1和AKT1等mRNA水平, 说明NS4B蛋白与细胞凋亡可能相关。通过real-time QPCR方法进一步验证基因芯片中表达上调且与细胞凋亡有关的5个基因(PRKCDBP, TP53, AKT1, BIRC3和BCL2L1)的mRNA水平, 其中PRKCDBP是蛋白激酶C, δ 结合蛋白, 在许多癌细胞系其表达下调或缺乏, 在无胸腺的裸鼠其异位表达能抑制肿瘤发生^[8], 因而认为它是一种肿瘤抑制蛋白, 其过表达能诱导G₁期阻滞和促进细胞凋亡。TP53基因编码一种肿瘤抑制蛋白, 它的变异对肿瘤形成起重要作用。TP53既可阻滞细胞周期, 也可诱导细胞凋亡。AKT1基因编码丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, 通过磷脂酰肌醇3激酶活化而抑制凋亡。BIRC3基因编码凋亡抑制因子(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族中的一个成员, 通过与肿瘤坏死因子受体相关因子1 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 1, TRAF1)和TRAF2结合而抑制凋亡。BCL2L1基因编码的蛋白属于BCL-2蛋白家族。其编码的蛋白位于线粒体外膜, 调控线粒体外膜通道开放, 控制活性氧量和细胞色素C从线粒体释放出来, 从而抑制凋亡。Real-time QPCR方法验证结果显示3个凋亡抑制基因(AKT1, BIRC3和BCL2L1)mRNA水平上调, 而2个促凋亡基因(PRKCDBP和TP53)mRNA水平下调, 提示NS4B可能有抑制凋亡作用, 与Rai等^[9]报道一致。但Park等^[10]报道NS4B可通过抑制核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)活性而增强肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)诱导的细胞

凋亡。因此, NS4B与细胞凋亡的关系有待进一步研究。Real-time QPCR验证结果与基因芯片结果的吻合率为60%, 但由于验证基因数目较少, 此结果不能完全反映基因芯片的准确率。

NS4B蛋白上调整合素家族, 骨桥蛋白, 胶原蛋白和生腱蛋白等基因mRNA水平, 这些因子与细胞分化、黏附、迁移及肿瘤转移有关。NS4B蛋白上调白细胞介素1 β (interleukin 1 beta, IL1 β)、Toll样受体6 (toll-like receptor 6, TLR6)、分泌磷蛋白1(secreted phosphoprotein 1, SPP1)和趋化因子CC基序配体5 (chemokine C-C motif ligand 5, CCL5)等基因mRNA水平, 这些因子与炎症、免疫有关。由于基因芯片一次检测的基因数目较多, 不可避免地出现假阳性和假阴性结果, 因此上述结果尚需要通过real-time QPCR等方法进一步验证。

该芯片中细胞周期通路有124个基因, NS4B蛋白上调细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A)、细胞分裂周期20(cell division cycle 20, CDC20)和细胞分裂周期25C(cell division cycle 25 C, CDC25C)等13个基因mRNA水平, 下调细胞周期蛋白依赖性激酶6 (cyclin-dependent kinase 6, CDK6)、Mad2蛋白有丝分裂阻滞缺陷样1和Smad蛋白家族成员2等11个基因mRNA水平。癌症通路有326个基因, NS4B蛋白上调该通路中25个基因mRNA水平, 包括促肿瘤基因CDKN1A, BIRC3和BCL2L1等和抑肿瘤基因细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂2A(cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A)和FADD; 下调该通路中26个基因mRNA水平, 包括促肿瘤基因Jun原癌基因(jun proto-oncogene, JUN)和无翅型MMTV整合位点家族成员7B(wingless-type MMTV integration site family, member 7B, WNT7B)以及抑肿瘤基因MutS蛋白同源物2(mutS homolog 2, MSH2)、乳腺癌2早发(breast cancer 2, early onset, BRCA2)和NK3同源盒1(NK3 homeobox 1, NKX3-1)等。迄今NS4B是否具有致癌性尚不明确。Einav等^[11]发现NS4B在没有HA-ras基因共转染的情况下也可使NIH3T3细胞恶性转化, NS4B的ATP/GTP酶活性可能与这种细胞转化有关。但肝内表达NS4B的转基因小鼠没有发现有任何肿瘤发生的倾向^[12]。以上结果表明: NS4B能调节多个基因和多条信号转导通路, 这些基因及通路相互交错形成复杂的网络, 共同调节细胞的生命活动。

总之, 利用基因表达谱芯片技术结合信号通路分析, 发现NS4B蛋白能够上调或下调LO2细胞中许多不同基因的表达, 影响与细胞凋亡、代

谢、免疫、肿瘤发生等有关的多条信号途径, 这些结果为深入探索 NS4B 蛋白在 HCV 感染慢性化和肝细胞癌的发生、发展过程中的作用及其机制奠定了基础。

参考文献

1. Bartenschlager R. Hepatitis C virus: from molecular virology to antiviral therapy[M]. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH & Co. K, 2013: 167-198.
2. Thompson AA, Zou A, Yan J, et al. Biochemical characterization of recombinant hepatitis C virus nonstructural protein 4B: evidence for ATP/GTP hydrolysis and adenylate kinase activity[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(5): 906-916.
3. Einav S, Gerber D, Bryson PD, et al. Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(9): 1019-1027.
4. Han Q, Manna D, Belton K, et al. Modulation of hepatitis C virus genome encapsidation by nonstructural protein 4B[J]. *J Virol*, 2013, 87(13): 7409-7422.
5. Cho NJ, Dvory-Sobol H, Lee C, et al. Identification of a class of HCV inhibitors directed against the nonstructural protein NS4B[J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(15): 15-16.
6. Bryson PD, Cho NJ, Einav S, et al. A small molecule inhibits HCV replication and alters NS4B's subcellular distribution[J]. *Antiviral Res*, 2010, 87(1): 1-8.
7. Gu Z, Graci JD, Lahser FC, et al. Identification of PTC725, an orally bioavailable small molecule that selectively targets the hepatitis C Virus NS4B protein[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(7): 3250-3261.
8. Lee JH, Kang MJ, Han HY, et al. Epigenetic alteration of PRKDCBP in colorectal cancers and its implication in tumor cell resistance to TNF α -induced apoptosis[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(24): 7551-7562.
9. Rai R, Deval J. New opportunities in anti-hepatitis C virus drug discovery: targeting NS4B[J]. *Antiviral Res*, 2011, 90(2): 93-101.
10. Park J, Kang W, Ryu SW, et al. Hepatitis C virus infection enhances TNF α -induced cell death via suppression of NF- κ B[J]. *Hepatology*, 2012, 56(3): 831-840.
11. Einav S, Sklan EH, Moon HM, et al. The nucleotide binding motif of hepatitis C virus NS4B can mediate cellular transformation and tumor formation without Ha-ras co-transfection[J]. *Hepatology*, 2008, 47(3): 827-835.
12. Wang AG, Moon HB, Kim JM. Expression of hepatitis C virus nonstructural 4B in transgenic mice[J]. *Exp Mol Med*, 2006, 38(3): 241-246.

(本文编辑 傅希文)

本文引用: 蒋孝华, 谢玉桃, 蔡亚平, 雷创, 江波, 彭花. 筛选丙型肝炎病毒 1b 型非结构蛋白 4B 慢病毒 L02 稳定株差异表达基因和基因通路[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2014, 39(2): 117-123. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.02.002

Cite this article as: JIANG Xiaohua, XIE Yutao, CAI Yaping, LEI Chuang, JIANG Bo, PENG Hua. Screening of differentially expressed genes and gene pathways in Hepatitis C virus 1b type nonstructural protein 4B stably expressed L02 cell line[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2014, 39(2): 117-123. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.02.002