

· 基础实验研究论著 ·

乙型肝炎病毒调节胰岛素样生长因子结合蛋白 7 表达的机制研究*

祝成亮¹, 李艳^{1△}, 汪付兵², 刘芳³

(1. 武汉大学人民医院/湖北省人民医院检验科, 湖北武汉 430060; 2. 武汉大学中南医院检验科, 湖北武汉 430071; 3. 武汉大学生命科学院病毒学国家重点实验室, 湖北武汉 430072)

摘要:目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)调节胰岛素样生长因子结合蛋白 7(IGFBP7)表达的分子机制。方法 将 HBV 感染性克隆 pHBV1.3 与 *IGFBP7* 基因启动子 pIGFBP7-Luc 共转染 HepG2 细胞,并测定 *IGFBP7* 基因启动子 pIGFBP7-Luc 荧光素酶的活性;采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blot 分别检测 *IGFBP7* mRNA 和 *IGFBP7* 蛋白的表达。结果 转染 pBlue-ks 和 pHBV1.3 后, *IGFBP7* 基因启动子 pIGFBP7-Luc 荧光素酶活性分别为 (265.7±20.8) RUL/μg 和 (955.4±39.8) RUL/μg; *IGFBP7* mRNA 和 *IGFBP7* 蛋白的表达水平明显升高。结论 HBV 通过上调 *IGFBP7* 基因启动子活性来上调 *IGFBP7* 的表达。

关键词:乙型肝炎病毒; 胰岛素样生长因子结合蛋白; 荧光素酶活性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)21-2790-02

A mechanism research of insulin-like growth factor binding protein 7 expression regulated by hepatitis B virus*

Zhu Chengliang¹, Li Yan^{1△}, Wang Fubing², Liu Fang³

(1. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Wuhan University/Hubei Provincial People's Hospital, Wuhan, Hubei 430060, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China; 3. State Key Laboratory of Virology, College of Life Science of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

Abstract: Objective To discuss the molecular mechanism of insulin-like growth factor binding protein 7(IGFBP7) expression regulated by hepatitis B virus(HBV). **Methods** HBV infectious clone pHBV1.3 and *IGFBP7* gene promoter pIGFBP7-Luc were co-transfected into HepG2 cells. The luciferase activities of *IGFBP7* gene promoter pIGFBP7-Luc were detected. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western blot were adopted to measure the expression of *IGFBP7* mRNA and *IGFBP7* protein, respectively. **Results** After transfection of pBlue-ks and pHBV1.3, the luciferase activities of *IGFBP7* gene promoter pIGFBP7-Luc were (265.7±20.8) RUL/μg and (955.4±39.8) RUL/μg, respectively, and the expression levels of *IGFBP7* mRNA and *IGFBP7* protein were significantly increased. **Conclusion** HBV upregulate the *IGFBP7* expression via increasing the activity of *IGFBP7* gene promoter.

Key words: hepatitis B virus; insulin-like growth factor binding protein; luciferase activity

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染导致急、慢性病毒性肝炎,最终发展成为肝癌。迄今为止,全球 HBV 携带者有 3.5 亿,中国有 1.2 亿,每年死于乙型病毒性肝炎及其相关疾病约 100 万人,因此,HBV 感染严重危害人类健康^[1-4]。但 HBV 的致病机制还不清楚。笔者前期采用基因芯片筛选了人肝癌 HepG2 细胞和 HepG2.2.15 细胞的差异表达基因^[5],发现胰岛素样生长因子结合蛋白 7(insulin-like growth factor binding protein 7, IGFBP7)在 HepG2.2.15 细胞高表达。本研究旨在从细胞水平探讨 HBV 对 IGFBP7 表达调节的分子机制。

1 材料与方

1.1 材料 HepG2 细胞系购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。Trizol 试剂和脂质体 2000 转染试剂均购自美国 Invitrogen 公司;莫洛尼鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus, M-MLV)逆转录酶购自美国 Promega 公司;HBV 感染性克隆 pHBV1.3 和 *IGFBP7* 基因启动子 pIGFBP7-Luc 由本

室构建;抗-IGFBP7 多克隆抗体购自上海瑞齐实业科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 细胞培养于含 10% 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基(美国 GIBCO 公司)中,置 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养,48 h 后更换培养液。

1.2.2 细胞转染 将质粒 DNA 和脂质体 2000 转染试剂分别稀释在无血清、青霉素及链霉素的 RPMI 1640 培养基中。室温下作用 20 min,将配制好的转染液加入细胞培养板中,细胞置 CO₂ 培养箱内继续培养。将 HBV 感染性克隆 pHBV1.3 与 *IGFBP7* 基因启动子 pIGFBP7-Luc 共转染 HepG2 细胞,以空载体 pBlue-ks 作为对照。

1.2.3 荧光素酶的测定 转染后的 HepG2 细胞培养 48 h 后,加入裂解液裂解细胞,取 50 μL 的细胞裂解液和 50 μL 的

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81101485);国家临床重点专科专项经费资助项目(2010-305);中国博士后特别资助基金资助项目(201104485);病毒学国家重点实验室开放基金资助项目(2011009)。作者简介:祝成亮(1980~),男,博士,副主任技师,主要从事肝炎致病及致癌机制的研究。△ 通讯作者, E-mail: yanlitf@yahoo.com.cn。

荧光色素酶底物混匀,用分光光度计进行光密度测定,实验重复 3 次。

1.2.4 逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 采用 Trizol 试剂提取 HepG2 细胞总 RNA,用逆转录酶合成 cDNA 后,用 *IGFBP7* 基因的检测引物进行 PCR 扩增。*IGFBP7* 引物,上游:5'-GCA AGA GGC GGA AGG GTA AA-3',下游:5'-CTC AAG TAC ACC TGG GCA CC-3'。同时设立 β actin 作为内参照,扩增结束后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.5 Western blot 检测 取 30 μ g 蛋白样品,加入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(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。电泳结束后,将蛋白转到硝酸纤维素(nitrocellulose filter, NC)膜上,加入 *IGFBP7* 蛋白的多克隆抗体温育,加入第二抗体后采用增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)进行显色。

2 结 果

2.1 HBV 激活 *IGFBP7* 基因启动子 pIGFBP7-Luc 的活性 转染 pBlue-ks 和 pHBV1.3 后, *IGFBP7* 基因启动子 pIGFBP7-Luc 荧光素酶活性分别为 (265.7 \pm 20.8) RUL/ μ g 和 (955.4 \pm 39.8) RUL/ μ g, 见图 1。

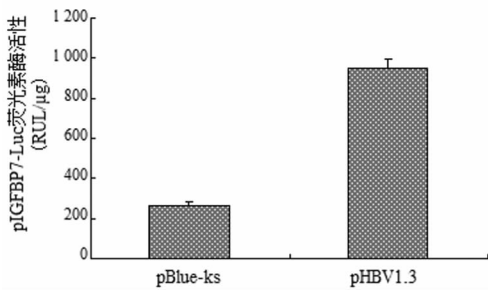


图 1 HBV 上调 *IGFBP7* 基因启动子 pIGFBP7-Luc 活性

2.2 HBV 上调 *IGFBP7* mRNA 和 *IGFBP7* 蛋白的表达 转染 pHBV1.3 后, *IGFBP7* mRNA 和 *IGFBP7* 蛋白的表达水平明显升高。

3 讨 论

人 *IGFBP7* 基因定位于染色体 4q12, 其 cDNA 长 1 124 bp, 编码 282 个氨基酸的前体蛋白质, 与小鼠有 70% 的同源性^[6-7]。*IGFBP7* 蛋白主要是在肝脏中合成并分泌, 其他组织和器官也能合成少量 *IGFBP7* 蛋白。研究表明, *IGFBP7* 蛋白在细胞的生长、发育、衰老、凋亡、癌变等病理生理过程中起重要作用^[8-11]。

HepG2.2.15 是整合了 HBV 全基因组的 HepG2 细胞, 能够合成和分泌完整的病毒颗粒, 笔者采用基因芯片筛选到 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞的差异表达基因 *IGFBP7*, 但 HBV 如何调节 *IGFBP7* 基因的表达目前尚无相关报道。

pHBV1.3 为 HBV 的感染性克隆, 转染 HepG2 细胞后能够包装成熟的病毒颗粒^[12], 本研究中, 笔者将 *IGFBP7* 基因启动子荧光素酶的报告基因 pIGFBP7-Luc 与 pHBV1.3 共转染 HepG2 细胞, 通过荧光报告基因系统检测了 *IGFBP7* 基因启动子 pIGFBP7-Luc 的活性变化。荧光素酶报告系统是以荧光素为底物, 通过催化荧光素氧化为氧化荧光素, 产生生物荧光, 然后通过荧光测定仪测定其强度, 根据荧光素酶活性的高低判断基因启动子的变化情况^[2]。本研究检测结果显示, pHBV1.3 能够激活 *IGFBP7* 基因启动子 pIGFBP7-Luc 活性。

采用 RT-PCR 和 Western blot 检测, 进一步证实了 HBV 能够在 mRNA 和蛋白水平上调 *IGFBP7* 的表达。

研究表明, 与正常组织相比, *IGFBP7* 蛋白在肿瘤组织中的表达明显降低, 体内实验证实 *IGFBP7* 蛋白能够抑制肿瘤的生长和血管的形成, 是潜在的肿瘤抑制因子^[13-15], 而 HBV 是导致原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)形成的最主要因素, 全球 60%~80% 的 HCC 由 HBV 引起。本研究发现 HBV 上调 *IGFBP7* 的表达, 这两者似乎矛盾, 但 HBV 致癌是一个复制的过程, 其中, 还包括宿主和病毒等方面的因素, HBV 并非通过调节某个基因的表达来致癌。

总之, 本研究从细胞水平初步探讨了 HBV 调节 *IGFBP7* 基因表达的分子机制, 但 HBV 是怎样激活 *IGFBP7* 基因启动子 pIGFBP7-Luc 转录活性, 其信号通路如何, 能否在血清学水平上调 *IGFBP7* 的合成和分泌, 还值得进一步深入探讨。

参考文献

- Kim BK, Han KH, Ahn SH. Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Oncology*, 2011, 81 Suppl 1: S41-49.
- El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(6): 1264-1273.
- Assar S, Arababadi MK, Ahmadabadi BN, et al. Occult hepatitis B virus (HBV) infection; a global challenge for medicine[J]. *Clin Lab*, 2012, 58(11/12): 1225-1230.
- Nelson PK, Mathers BM, Cowie B, et al. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs; results of systematic reviews[J]. *Lancet*, 2011, 378(9791): 571-583.
- 刘兴晖, 祝成亮, 宋惠, 等. 乙型肝炎病毒对驱动蛋白家族成员 4A 表达的影响[J]. *中华传染病杂志*, 2012, 30(7): 407-410.
- Sullivan L, Murphy TM, Barrett C, et al. *IGFBP7* promoter methylation and gene expression analysis in prostate cancer[J]. *J Urol*, 2012, 188(4): 1354-1360.
- Zapotocky M, Mejstrikova E, Smetana K, et al. Valproic acid triggers differentiation and apoptosis in AML1/ETO-positive leukemic cells specifically[J]. *Cancer Lett*, 2012, 319(2): 144-153.
- Heesch S, Bartram I, Neumann M, et al. Expression of *IGFBP7* in acute leukemia is regulated by DNA methylation[J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(1): 253-259.
- Shersher DD, Vercillo MS, Fhied C, et al. Biomarkers of the insulin-like growth factor pathway predict progression and outcome in lung cancer[J]. *Ann Thorac Surg*, 2011, 92(5): 1805-1811.
- Benatar T, Yang W, Amemiya Y, et al. *IGFBP7* reduces breast tumor growth by induction of senescence and apoptosis pathways[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 133(2): 563-573.
- Chen RY, Chen HX, Lin JX, et al. In-vivo transfection of pcDNA3.1-*IGFBP7* inhibits melanoma growth in mice through apoptosis induction and VEGF downexpression[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 29(1): 13-14.
- Zhu C, Zhang R, Liu L, et al. Hepatitis B virus enhances interleukin-27 expression both in vivo and in vitro[J]. *Clin Immunol*, 2009, 131(1): 92-97.
- Chen D, Yoo BK, Santhekadur PK, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-7 functions as a potential tumor suppressor in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(21): 6693-6701.
- Tomimaru Y, Eguchi H, Wada H, et al. *IGFBP7* downregulation is associated with tumor progression and clinical(下转第 2794 页)

难。RFP、INH、SM 和 EMB 是临床上最常见的一线抗结核药物,检测结核分枝杆菌对控制上述 4 种药物的耐药性,指导临床医师选择有效的抗结核药物,保证治疗效果及减少耐药菌株的扩散有极其重要的意义^[8]。目前临床上常规的结核分枝杆菌耐药性检测主要采用绝对浓度法和比例法进行培养,其最大的缺陷是培养时间长,至少需要 2~3 个月才能得到微生物敏感性结果,其操作烦琐,重复性差,缺乏快速诊断的优势,往往会延误患者的治疗。

国内、外大量研究证实^[9-11],结核分枝杆菌对 RFP 耐药主要是由于其编码 RNA 聚合酶 β 亚基的 *rpoB* 基因发生了突变引起,其中,90% 以上的突变发生在 507~533 位的 27 个氨基酸密码子(81 bp)组成的区域内。50%~70% 的 INH 耐药是因为 *katG* 基因的 315 位点突变,5%~10% 是因 *inhA* 基因突变引起;80% 的 SM 耐药是由核糖体蛋白 S12(*rpsL*) 基因突变引起,最常见的是 43 位密码子发生 AAG→AGG 突变。EMB 耐药与阿拉伯糖基转移酶的编码基因 *embB* 突变有关,主要发生在 306 位密码子处,最常见的突变为 ATG→GTG、ATG→ATA 和 ATG→CTG。本实验中,RFP 耐药菌在 *rpoB* 基因 531 位密码子处 TCG→TTG 突变的检出率为 66.7%,526 位密码子处 CAC→GAC 突变的检出率为 33.3%;INH 耐药菌在 *katG* 基因 315 位密码子处 AGC→ACC 突变的检出率为 65.0%,*katG* 基因缺失率为 10.0%,*inhA* 基因突变率为 25.0%;SM 耐药菌在 *rpsL* 基因 43 位密码子处 AAG→AGG 突变的检出率为 83.3%,88 位密码子处 AAG→AGG 突变的检出率为 16.7%;EMB 耐药菌在 *embB* 基因 306 位密码子处 ATG→GTG 突变的检出率为 70.0%,ATG→ATA 突变的检出率为 30.0%,上述突变检出率与国内、外其他研究报道结果接近^[12-15]。

本实验根据与结核分枝杆菌耐药高度相关的 5 种耐药基因(*rpoB*、*katG*、*inhA*、*rpsL*、*embB*)突变位点来设计膜芯片,扩增引物选在耐药突变区域两端的高保守区域,同时根据不同耐药基因的突变位点设计相应的特异性探针,利用反向斑点杂交进行检测,保证了方法的特异性和敏感性。以常规培养法为金标准,膜芯片法扩增结核分枝杆菌的敏感性、特异性、准确性分别达到 90.4%、98.8% 和 95.7%,对结核分枝杆菌 RFP、INH、SM 和 EMB 耐药性检测的敏感性分别为 92.3%、83.3%、68.8% 和 83.3%;准确性分别为 98.6%、97.3%、96.6% 和 98.5%;特异性均达到了 100.0%。以上结果证实膜芯片法已符合临床诊断性试验的要求,可用于临床结核分枝杆菌耐药性的快速筛查。

本实验共检测 393 例临床标本,其中有 17 例结果不相符合。以常规培养法为金标准,共检出 14 例阳性标本,其中耐药株 5 例,膜芯片法均未检出;在另外 3 例常规培养法检测的阴性标本中,膜芯片法检出耐药菌 1 例,敏感菌 2 例。膜芯片法对 INH、SM、EMB 耐药的检出率低于传统培养法,这可能与临床标本主要为痰液,因痰液标本消化不完全,使所提取的 DNA 样本中含有 DNA 聚合酶的抑制成份有关,也可能是由于突变类型并非芯片设计的突变类型或存在其他耐药机制,具体原因尚待进一步研究证实。膜芯片法对 RFP 耐药的检出率很高,

这与突变的相对集中、探针的合理设计有关。

本实验采用 PCR 技术结合膜芯片反向点杂交的方法,可从分子水平上同时检测与结核分枝杆菌耐药性相关的 *rpoB*、*katG*、*inhA*、*rpsL* 和 *embB* 五个基因突变类型,基本实现了快速、灵敏、准确地诊断结核分枝杆菌对一线抗结核药物 RFP、INH、SM 和 EMB 的耐药性的目的,在检测速度上只需 1 天时间,比传统方法快速,且具备敏感性、特异性、重复性好等优点,在实际应用中可作为常规微生物敏感性试验方法的补充,用于指导开展早期、有效的临床化疗。

参考文献

- [1] 刘宇红,姜广路,赵立平,等.第四次全国结核病流行病学抽样调查-结核分枝杆菌耐药性分析与评价[J].中华结核和呼吸杂志,2002,25(4):224-227.
- [2] 中国防痨协会.结核病诊断细菌学检验规程[J].中国防痨杂志,1996,18(2):28-31.
- [3] 方红辉,唐曙明,李芳芳,等.反向斑点杂交技术在结核分枝杆菌耐药性检测中的应用研究[J].实用预防医学,2008,15(5):1392-1394.
- [4] 李芳芳,方红辉,何林,等.结核分枝杆菌对利福平和异烟肼耐药基因突变快速检测方法的建立[J].中华检验医学杂志,2006,29(3):222-225.
- [5] 梁冰,黎意芬,黄瑞霞,等.耐药结核病人的耐药状况分析[J].临床肺科杂志,2011,16(6):891-892.
- [6] 许丽,杨应周,吴清芳,等.深圳市结核病一线抗结核药的耐药监测结果分析[J].中国防痨杂志,2010,32(4):204-207.
- [7] 赵玉玲,赵东阳,李辉,等.7年结核分枝杆菌临床分离株对一线和二线抗结核药物耐药趋势监测[J].中国卫生检验杂志,2010,20(2):338-340.
- [8] 王巍,李洪敏,吴雪琼,等.结核分支杆菌五种耐药基因检测的临床应用及评价[J].中华结核和呼吸杂志,2002,25(11):670-673.
- [9] Nachamkin I, Kang C, Weinstein MP. Detection of resistance to isoniazid, rifampin, and streptomycin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by molecular methods[J]. Clin Infect Dis, 1997, 24(5):894-900.
- [10] Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, et al. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol[J]. Nat Med, 1997, 3(5):567-570.
- [11] Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2009, 13(11):1320-1330.
- [12] 吴雪琼,张琼,张俊仙,等.应用基因芯片分析结核分枝杆菌常见耐药基因型的研究[J].中国防痨杂志,2006,28(1):4-10.
- [13] 徐威香,雷永良,王晓光,等.丽水市结核分枝杆菌 5 种耐药基因突变分析[J].中国卫生检验杂志,2012,22(2):353-356.
- [14] 甄伟,石大伟,赵玉玲,等.耐多药结核分枝杆菌异烟肼耐药相关基因 *katG* 突变分析[J].中国防痨杂志,2013,35(3):207-209.
- [15] Zhang M, Yue J, Yang YP, et al. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(11):5477-5482.

(收稿日期:2013-05-11)

(上接第 2791 页)

outcome in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2012, 130(2):319-327.

[15] Chen D, Siddiq A, Emdad L, et al. Insulin-like growth factor-bind-

ing protein-7 (IGFBP7): a promising gene therapeutic for hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. Mol Ther, 2013, 21(4):758-766.

(收稿日期:2013-05-01)