

汉坦病毒感染细胞整合素受体信号转导相关差异表达基因筛选*

徐芳玲, 杨占秋**, 程 丽, 杨继江, 刘汉燕, 肖 红, 文 利,

丁晓华, 陈文凯

(武汉大学医学院病毒学研究所 教育部病毒学重点实验室, 湖北武汉 430071)

Selection of Differentially Expressed Signal Transduction-Associated Genes
of Integrin in Hantavirus Infected CellsXU Fang-ling, YANG Zhan-qiu**, CHENG Li, YANG Chi-Chiang, LIU Han-yan, XIAO Hong,
WEN Li, DING Xiao-hua, CHEN Wen-kai

(Laboratory of Virology of Ministry of Education, Institute of Virology, Medical School, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: To develop the pathogenesis of *Hantavirus* infection, the differentially expressed signal transduction-associated genes of integrin in *Hantavirus* infected cells were investigated by using cDNA microarray. The primary human embryo pulmonary fibroblasts (HEPFs) were infected with Hantaan 76-118 virus. Total RNAs were extracted from infected and normal control group 6h, 24h and 96h post infection, respectively. During reverse transcription, the cDNAs were labeled by Cy5-dUTP and Cy3-dUTP. The labeled cDNAs hybridized with the Biostar-II H gene chip. After hybridization, the fluorescence signal was analyzed by scanning. It showed that the expression level of most (113/150) *Hantavirus* receptor and signal transduction-associated genes was normal, however, 37 genes presented obvious change. Among them, expressions of 31 genes changed at 6h post infection. 13 genes were down-regulated, and 18 up-regulated. However, 5 and 4 genes expressed diversely at 24h and 96h post infection respectively. Furthermore, some integrin signal transduction pathway-associated genes such as the gene of some related protein kinases were up-regulated at 6h post infection. The gene of enhancer of filamentation 1 was down-regulated at 6h and 96h post infection. The gene of microtubule-associated protein 1A was up-regulated at 6h post infection, but down-regulated at 24h and 96h post infection. These indicate that *Hantavirus* infection is related to integrins.

Key words: cDNA microarray; *Hantavirus*; Integrin; Signal Transduction; Human embryo Pulmonary fibroblast

摘要: 通过基因芯片技术观察汉坦病毒感染细胞后整合素受体信号转导相关基因的差异表达, 以探讨汉坦病毒进入细胞的分子机制。用汉滩病毒 76-118 株感染原代人胚肺成纤维细胞, 同时设立正常对照细胞, 于感染后第 6h、24h 和 96h 同时抽提感染组与正常对照组细胞总 RNA, 利用荧光标记 dUTP 逆转录制备 cDNA 探针, 与人类受体及信号转导类表达谱芯片杂交, 并对 Cy3、Cy5 荧光信号做扫描分析。结果显示有 37 项基因出现差异表达, 其中 31 项基因在感染后 6h 出现差异表达, 13 项下调、18 项上调; 但在感染后 24h 和 96h 分别只有 5 项和 4 项基因出现表达差异; 而且整合素信号转导通路中的重要基因如一些蛋白激酶相关基因在感染 6h 表达增强, 丝化增强子 1 在感染 6h 和 96h 表达下调, 微管相关蛋白 1A 在感染 6h 表达上调、感染 24h 和 96h 表达下调。这些进一步说明汉坦病毒感染细胞与整合素有关。

主题词: 基因芯片; 汉坦病毒; 受体; 信号转导; 原代人胚肺细胞

中图分类号: Q939.4

文章标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)04-0315-05

收稿日期: 2004-01-12, 修回日期: 2004-03-23

* 基金项目: 国家自然科学基金(39870659)和湖北省教育厅(301140166)共同资助

作者简介: 徐芳玲(1974-), 女, 讲师, 博士生, 研究方向为医学病毒学

** 通讯作者: 杨占秋(1952-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为医学病毒学。Corresponding author.Tel: 027-87331136;

E-mail: yangzhanqiu@163.com

自从 70 年代末期韩国学者^[1]发现汉坦病毒以来,国内外许多学者对汉坦病毒进行了深入研究。我们也对汉坦病毒的形态发生学及其变异情况进行了系列研究^[2]。但是汉坦病毒的致病机理目前尚无定论,病毒如何进入细胞亦不明了。虽然有研究表明^[3-6]整合素可能是汉坦病毒的细胞膜受体,但缺乏充分的证据。为此,我们应用基因芯片技术,首先对汉坦病毒感染细胞整合素受体信号转导相关差异表达基因进行了初步观察与分析,以探讨汉坦病毒感染细胞的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验所用人胚肺细胞为本室保存。取正常孕妇 3 个月水囊引产胚肺组织,按常规方法^[7]分散细胞并培养传代。经体外传代,该细胞呈现典型的二倍体成纤维细胞特征^[7,8],该实验所用细胞为第 20-23 代。

汉滩病毒 76-118 株由美国陆军传染病研究所 Huggin 教授赠送,经乳鼠脑内传代增殖,并在人胚肺细胞中传代适应,待阳性细胞数接近 100%后收集细胞悬液,用前保存于-80℃。用时将细胞悬液在-80℃反复冻融 3 次,3000r/min 离心 15min 后取上清接种细胞。

实验所用人类表达谱芯片(Biostar H II)为上海博星基因芯片有限责任公司制备,该芯片主要含有细胞受体、细胞信号与传递蛋白类基因,以及离子通道和运输蛋白、细胞周期、细胞代谢、细胞骨架和运动蛋白类和蛋白翻译合成类常用及正常对照、阴性对照、空白对照等质控基因共 2304 项,其中与整合素及其信号转导通路相关的基因约 150 项。

1.2 病毒接种

当培养细胞密度达到 2×10^8 个/mL 时,将细胞随机分为两组,即实验组和对照组。实验组接种病毒悬液,37℃ 吸附 1.5h 后补加维持液继续培养,对照组细胞不接种病毒,与实验组同时换上维持液。

1.3 总 RNA 提取

分别在病毒感染第 6h、24h 和 96h 弃去培养液,用 DEPC 处理 PBS 分别洗涤实验组和对照组细胞,然后分别加入上海联合基因公司 Easyextract 总 RNA 提取试剂,并分别用 DEPC 处理过的刮匙刮下细胞,再用一次性注射器反复吹打混匀后一步法^[9]提取细胞总 RNA。紫外和电泳分析总 RNA 质量。

1.4 探针制备

参照 Schena 等^[10]方法逆转录合成及纯化 cDNA 探针,分别用 Cy3、Cy5 荧光标记对照组和实验组探针。乙醇沉淀后将 Cy3 和 Cy5 标记探针混合溶解在 $20\mu\text{L } 5 \times \text{SSC} + 0.2\% \text{SDS}$ 杂交液中。

1.5 杂交和洗涤

将表达谱芯片和杂交探针分别做 95℃ 变性后置于杂交舱内,加入混合探针,用杂交密封舱加以密闭,不留有气泡。于恒温杂交箱内 60℃ 杂交 16h。按顺序用 $2 \times \text{SSC} + 0.2\% \text{SDS}$ 、 $0.1\% \text{SSC} + 0.2\% \text{SDS}$ 、 $0.1\% \times \text{SSC}$ 洗涤 10min,室温晾干。

1.6 扫描分析

用 Scanarray 4000 扫描芯片,对照组表达谱 (Cy3) 扫描结果和实验组表达谱 (Cy5) 扫描结果经计算机数据叠加后,用 Gene Pix Pro 3.0 软件分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度和比值,从而反映每个基因在两种样本中表达丰度的比值及有无差异。根据软件提供的校正系数对整张芯片的荧光信号值进行校正处理(均一化系数分别为 1.021, 0.975 和 0.969),以 Cy5/Cy3 值 > 2 或 < 0.5 , Cy3、Cy5 值两者皆大于 200 或其一大于 800, Cy5/Cy3 在 0.1-10 之间作为判断基因差异表达的条件筛选差异表达基因。

2 结果

2.1 细胞总 RNA 质量

实验组和对照组在实验前细胞数量一致。实验组 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.983,对照组 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.972,与电泳分析结果共同表明得到了高纯度的 RNA,完全符合实验要求。

2.2 整合素及其信号转导相关基因表达分析

在近 150 项整合素、整合素相关基因及整合素信号转导相关基因中,筛选出 37 项 Cy5/Cy3 大于 2 或小于 0.5 的基因(见表 1),其中 31 项基因在感染后 6h 出现差异表达,13 项下调、18 项上调(表 1,图 1 中远离 45° 角线的点);5 项基因在感染后 24h 出现差异表达,4 项下调,1 项上调(表 1,图 2 中远离 45° 角线的点);4 项基因在感染后 96h 出现差异表达,2 项下调,2 项上调(表 1,图 3 中远离 45° 角线的点);而且大多数差异表达基因(31/37)在汉坦病毒感染后 6h 出现。其中分布于芯片不同位置的同一类基因有相同的表达趋势(图 1, 2, 3 中 45° 角线附近的点),具有较大的可信度,可供后续研究及验证参考。

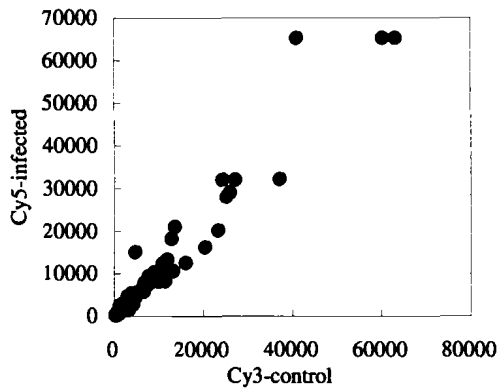


图1 汉坦病毒感染 HEPFs 细胞 6h 整合素及其信号转导相关基因杂交信号强度散点图

Fig. 1 The scatter plots of hybridizing signals of integrin and signal transduction-associated genes at 6h post infection

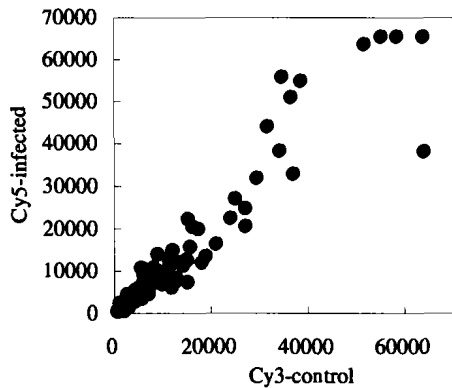


图2 汉坦病毒感染 HEPFs 细胞 24h 整合素及其信号转导相关基因杂交信号强度散点图

Fig. 2 The scatter plots of hybridizing signals of integrin and signal transduction-associated genes at 24h post infection

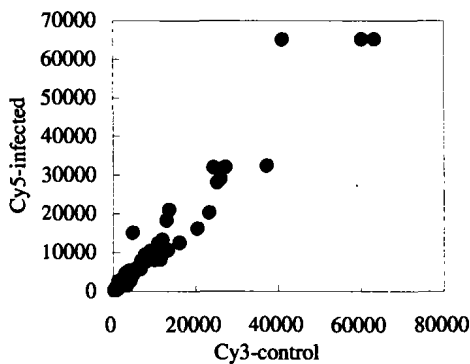


图3 汉坦病毒感染 HEPFs 细胞 96h 整合素及其信号转导相关基因杂交信号强度散点图

Fig. 3 The scatter plots of hybridizing signals of integrin and signal transduction-associated genes at 96h post infection

表 1 汉坦病毒感染后不同时间点人胚肺细胞中整合素受体信号转导相关差异表达基因

Table 1 Differentially expressed signaling transduction associated-genes of integrin at different time points in HEPFs after hantavirus infection

No	Gene name	Genbank-ID	Ratio(Cy5/Cy3)		
			6h	24h	96h
1	Enhancer of filamentation 1	NM_006403	0.157	-	0.465
2	Transmembrane 4 superfamily member	NM_012338	0.244	-	-
3	Mitogen-activated protein kinase kinase 6	NM_002758	0.315	-	-
4	Activin A receptor type II-like 1	NM_000020	0.335	-	-
5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	NM_003618	0.373	-	-
6	frizzled homolog 7	NM_003507	0.409	-	-
7	Serine/threonine 2	NM_003157	0.470	-	-
8	adenosine A3 receptor	NM_000677	0.471	-	-
9	protein phosphatase 4, regulatory subunit 1	NM_005134	0.472	-	-
10	regulator of G-protein signalling 5	NM_003617	0.484	-	-
11	Phosphoinositide-3-kinase catalytic, alpha polypeptide	NM_006218	0.487	-	-
12	Putative transmembrane protein	NM_007011	0.488	-	-
13	G protein-coupled receptor 75	NM_006794	0.492	-	-
14	dual specificity phosphatase 1	NM_004417	2.001	-	-
15	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	NM_004834	2.023	-	-
16	growth factor receptor-bound protein 2	NM_002086	2.062	-	-
17	regulator of G-protein signalling 7	NM_002924	2.150	-	-
18	Phosphoinositide-3-kinase catalytic, beta polypeptide	NM_006219	2.152	-	-
19	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	NM_004721	2.218	-	-
20	interleukin 7 receptor	NM_002185	2.244	-	-
21	Cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	NM_001407	2.264	-	-
22	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	NM_006609	2.366	-	-
23	Microtubule-associated protein 1A	NM_002373	2.523	0.488	0.494
24	Protein kinase, AMP-activated, gamma 1	NM_002733	2.725	-	-
25	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein	NM_007341	2.846	-	-
26	clathrin, heavy polypeptide (Hc)	NM_004859	2.911	-	-
27	adaptor-related protein complex 1, mu 2 subunit	NM_005498	3.033	-	-
28	regulator of G-protein signalling 16	NM_002928	3.247	-	-
29	Collagen, type XI, alpha 1	NM_080629	3.645	-	-
30	IkappaB kinase complex-associated protein	AF153419	3.649	-	-
31	interferon gamma receptor 2	NM_005534	5.492	-	-
32	Protein phosphatase 3, regulatory subunit B	NM_000945	-	0.294	-
33	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 10	NM_002714	-	0.493	-
34	adaptor-related protein complex 2, sigma 1 subunit	NM_004069	-	0.498	-
35	Dual specificity phosphatase 5	NM_004419	-	2.474	-
36	Matrix metalloproteinase 1	X05231	-	-	2.069
37	SH3-domain Grb2-like 2	NM_003026	-	-	3.192

Note: -, Normal range (0.5<Ratio<2.0)

2.3 差异表达基因初步分析

差异表达基因主要在汉坦病毒感染 6h 出现, 表达下调的 13 项基因中有受体类或 G 蛋白信号转导相关基因 7 项, 蛋白酶类基因 4 项, 脂类激酶基因 1 项, 胞外基质蛋白类基因 1 项; 表达上调的 18 项基因中有受体类或 G 蛋白信号转导相关基因 9 项, 蛋白酶类基因 6 项, 脂类激酶基因 1 项, 胞外基质蛋白类基因 2 项(见表 1); 感染 24h 和 96h 时大多数在感染 6h 时出现差异表达的基因恢复到正常范围, 有 1 项 G 蛋白信号通路基因及 2 项蛋白酶基因在感染 24h 表达下调、1 项蛋白激酶基因表达上调; 1 项蛋白酶和 1 项 G 蛋白信号转导相关基因在汉坦病毒感染 96h 表达上调。而且整合素信号转导通路中的重要基因丝化增强子 1、即与 Crk 关联基质(Crk-associated substrate, Cas)相关的基因或 Cas 样锚蛋白基因在感染 6h 和 96h 表达下调, 微管关联蛋白 1A 在感染 6h 表达上调、感染 24h 和 96h 表达下调。

3 讨论

不同的病毒通过不同的细胞受体感染细胞, 而且同一种病毒也需要不同的细胞受体来介导其感染不同的宿主细胞。Gavrilovskaya 等^[4,5]研究表明 $\beta 3$ 整合素介导了 HPS 和 HFRS 相关性汉坦病毒的感染, 而 $\beta 1$ 整合素介导了非致病性的 PH 和 Tula 汉坦病毒进入宿主细胞; 韩国学者 Sun^[6]研究表明 $\alpha 5 \beta 1$ 可能是汉坦病毒感染成纤维细胞的病毒受体。这些说明具有不同型别或致病性的汉坦病毒具有不同的宿主范围和细胞趋向性, 从而具有不同的整合素受体。在董京芳等^[11]的实验研究中, 未检测到 $\beta 3$ 整合素基因在正常汉坦病毒敏感细胞、如 VeroE6、2BS 等中的表达; 本研究中所用芯片基因来源于人, 以能较好模拟人体生理状况的人胚肺 2BS 细胞作为感染对象, 并检测到汉坦病毒感染后 $\beta 3$ 整合素相关基因的表达, 间接说明汉坦病毒感染细胞后引起了细胞表面受体基因表达的变化。根据其他学者^[12,13]的研究, 我们采用 6h、24h 和 96h 三个时间点动态观察汉坦病毒感染细胞基因表达变化, 并发现大多数整合素信号转导相关基因(表 1 中 1-3、5-7、9、11、14-15、18-19、21-24、29-30) 在感染 6h 出现差异表达, 病毒感染早期出现差异表达说明这些基因与汉坦病毒感染密切相关, 也进一步间接证实了整合素介导病毒感染(病毒吸附和入胞过程)的理论^[14], 因为病毒感染细胞的第一步即病毒与细胞表面的受体结合, 而且病毒-整合素相互作用比较复

杂, 病毒能与独特的整合素区域结合而不需要识别序列。本研究只观察到整合素相关基因出现差异表达, 没有直接观察到整合素基因表达的差异, 主要原因可能是汉坦病毒感染引起的细胞表面受体基因瞬时表达变化在 6h 以内, 病毒感染 6h、24h 和 96h 时细胞表面受体已恢复初始状态、胞内的相应信号转导通路则被激活, 为后续第 5d 感染细胞活力开始下降并逐渐凋亡^[15]做准备; 另一个原因则可能是汉坦病毒尚存在其他的细胞受体。

虽然针对整合素信号转导通路的研究已比较明确, 但整合素如何介导汉坦病毒感染细胞研究甚少。有鉴于此, 本研究从病毒感染 6h 开始检测汉坦病毒感染细胞基因表达差异, 相信会给整合素介导汉坦病毒感染细胞的信号通路研究有所启示。细胞外基质(ECM)和整合素以及胞膜内细胞骨架蛋白, 脚手架蛋白, 和大量信号分子组成粘着斑, 为整合素介导的信号传递提供了上游平台, 协助整合素激活多种酪氨酸激酶、小 G 蛋白和下游分子^[16]。粘着斑激酶(FAK)在整合素介导的信号传导途径中起着关键作用, 以 FAK 为中心的整合素信号传导途径, 除了比较清楚的 Ras/MAPK 途径, 还有磷脂酰肌醇-3 激酶(PI-3K)途径。Cas 样锚蛋白或丝化增强子和微管关联蛋白分别与 FAK 的聚集、激活有关, 而基质金属蛋白 1/间质胶原酶与细胞外基质胶原蛋白的分解有关, SH3 区域 Grb2 样蛋白则可能抑制酪氨酸磷酸化; 本研究中(见表 1)丝化增强子基因在感染 6h 和 96h 表达下调, 微管蛋白相关蛋白在感染 6h 表达上调、感染 24h 和 96h 表达下调; 细胞外基质胶原蛋白、SH3 结合蛋白等基因在感染 6h 表达上调、基质金属蛋白 1 和 SH3 区域 Grb2 样蛋白基因在感染 96h 时表达上调, 而 MAPK、PI-3K 相关激酶和 G 蛋白等信号分子基因表达在汉坦病毒感染 6h 出现不同程度变化, 而且大多数呈上调趋势; 说明在感染 6h 时 MAPK 通路可能被 FAK 激活, MAPK 激活后通过调节基因表达等改变细胞行为。而感染 24h FAK 的活性开始下降, 到感染 96h 时, FAK 的锚着、聚集、激活通路可能阻断, 进而说明汉坦病毒感染与整合素相关, 可能通过 Ras/MAPK 途径来调节汉坦病毒感染细胞的活动。而且整合素和生长因子受体(GFRs)在多层次上存在信号通路的交叉联系并参与细胞凋亡通路, 本研究中生长因子受体结合蛋白在感染 6h 表达增强, 可能与汉坦病毒诱导感染细胞凋亡相关(另文报道)。

基因芯片已成为研究细胞功能基因表达变化

的重要工具, 表明它既能成百上千倍地提高实验效率, 又能显著地降低系统误差。此次实验中不同的基因表达以及其他相关研究^[17-18]共同说明所采用的基因芯片技术是可靠的。病毒与细胞的相互作用非常复杂, 本研究侧重于观察病毒感染后对细胞的影响, 相信对汉坦病毒感染后不同时间点基因表达差异进行生物信息学的分析和发掘, 将为汉坦病毒致病机理和有效预防措施的阐明提供新的研究线索。

参考文献

- [1] Lee H W, *et al.* Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever[J]. *J Infect Dis*, 1978, 137(3): 298-308.
- [2] 丁晓华, 杨占秋, 肖红, 等. RT-PCR 扩增汉滩病毒及其核苷酸序列的发生树分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, 23: 38-41.
- [3] Mackow E R, Gavrilovskaya I N. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 256: 91-115.
- [4] Gavrilovskaya I N, Brown E J, Ginsberg M H, *et al.* Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediate by β 3 integrins[J]. *J Virology*, 1999, 73(5):3951-3959.
- [5] Gavrilovskaya I N, Shepley M, Shaw R, *et al.* β 3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(12): 7074-7079.
- [6] Sun Park-Ho. The role of alpha-5-beta-1 integrin on infection of hantaan virus in fibroblast[J]. *J Korean Soc Microbiology*, 1997, 32(2):255-263.
- [7] 郭淑芳, 鲁德银, 陈晓, 等. 原代人胚肺、肾细胞成功培养方法的改进[J]. *湖北医科大学学报*, 1999, 20(1):10-12.
- [8] 陈治文, 赵学海, 夏俊. 人胚肺细胞的体外培养及生物学特性[J]. *蚌埠医学院学报*, 1994, 19(3): 163-165.
- [9] Chevillard S. A method for sequential extraction of RNA and DNA from the sample, specially designed for a limited supply of biological material[J]. *Biotechniques*, 1993, 1:22-24.
- [10] Schena M, Shalon D, Heller R, *et al.* Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93(20): 10614-10619.
- [11] 董京芳, 姜郁青, 王健伟, 等. 检测整合素基因在汉坦病毒敏感细胞中的表达[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2002, 16(1): 40-43.
- [12] Sundstrom J B, McMullan L K, Spiropoulou C F, *et al.* Hantavirus infection induces the expression of RANTES and IP-10 without causing increased permeability in human lung microvascular endothelial cells[J]. *J Virol*, 2001, 75: 6070-6085.
- [13] 叶苓, 廖文俊, 刘彦仿, 等. 汉坦病毒感染体外诱导 VeroE6 细胞热休克蛋白的表达[J]. *第四军医大学学报*, 2000, 21(4): 399-401.
- [14] Triantafilou K, Yoshikazu T, Triantafilou M. Mechanisms of integrin-mediated virus attachment and internalization process[J]. *Crit Rev Immunol*, 2001, 21: 311-322.
- [15] Kang Ju-Il, Park Se-Hoon, Lee Pyung-Woo, *et al.* Apoptosis is induced by Hantaviruses in cultured cells[J]. *Virology*, 1999, 264: 99-105.
- [16] Giancotti F G, Ruoslahti E. Integrin signaling[J]. *Science*, 1999, 285: 1028-1032.
- [17] Geimonen E, Neff S, Raymond T, *et al.* Pathogenic and nonpathogenic hantaviruses differentially regulate endothelial cell responses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 13837-13842.
- [18] Nam J H, Yu C H, Hwang K A, *et al.* Application of cDNA microarray technique to detection of gene expression in host cells infected with viruses[J]. *Acta Virologica*, 2002, 46: 141-146.