

HCV NS5A 基因在 HeLa 细胞中的稳定表达及对细胞生长的抑制现象

杨小骏, 叶林柏, 郜金荣, 刘 静, 阳 帆, 叶 力, 余应龙,
廖庆娇, 吴正辉, 郑 义

(武汉大学生命科学院病毒研究所, 湖北武汉, 430072)

Stable Expression of NS5A Gene of HCV in HeLa Cells and Inhibition to the Growth of HeLa Cells

YANG Xiao-jun, YE Lin-bai**, GAO Jin-rong, LIU Jing, YANG Fan, YE Li, SHE Ying-long,
LIAO Qing-jiao, WU Zheng-hui, ZHENG Yi

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Full-length NS5A gene of *Hepatitis C virus* (HCV) was amplified by PCR, using the plasmid pBRTM/HCV 1-3011 containing HCV full-length open reading frame (ORF) as template, and cloned into the eukaryotic expressing plasmid pcDNA3.1 (-) by DNA recombination technique. The recombinant vector was identified by digestion with restriction enzymes and polymerase chain reaction and by directly sequencing. Then both the recombinant vector pcDNA3.1 (-)-NS5A and the control vector pcDNA3.1 (-) were transfected HeLa cells using LipoVecTM. The cells expressing NS5A stably were selected by G-418 and further proved by RT-PCR and Western blot analysis. We found the growth of HeLa cells expressing NS5A was slower than the cells transfected by pcDNA3.1 (-) in the same culture condition, and the population doubling time of HeLa cells expressing NS5A gene is increased about 50% (about 35-36 hours). There was no significant difference between the control cells and the cells transfected with pcDNA3.1(-) (about 23-24 hours). The results indicate that NS5A can inhibit the proliferation of HeLa cells.

Key words: HCV NS5A; HeLa cell; Gene expression; Cell growth inhibition

摘要: 应用 PCR 技术从含有 HCV (*Hepatitis C virus*) 全长开放阅读框的质粒 pBRTM/HCV 1-3011 中获得 NS5A 全长基因片断, 利用基因重组技术将其克隆至真核表达载体 pcDNA3.1(-) 中。通过酶切、PCR 及测序鉴定 NS5A 基因已正确插入到 pcDNA3.1(-) 中, 再利用脂质体介导转染 HeLa 细胞, 48h 后传代并利用 pcDNA3.1(-) 质粒上的 neo 抗性基因加入 G-418 进行筛选。大约两周后, 获得稳定表达的细胞株。经 RT-PCR 及 western blot 验证, 证实 HCV 的 NS5A 基因在 HeLa 细胞中已经获得了表达。在培养条件完全一致的情况下, 表达 NS5A 基因的 HeLa 细胞与 pcDNA3.1(-) 转染的细胞相比, 生长速度明显变慢, 其倍增时间约为 35-36h, 比对照组细胞增加了约 50%, 而转染 pcDNA3.1(-) 的细胞的倍增时间与正常 HeLa 细胞则无明显差别, 都为 23-24h。从而证明 HCV 的 NS5A 蛋白具有抑制 HeLa 细胞生长的作用。

关键词: HCV NS5A; HeLa 细胞; 基因表达; 抑制细胞生长

中图分类号: R512.6

文章标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0340-05

丙型肝炎病毒 (*Hepatitis C virus*, HCV) 属黄病毒科的正单链 RNA 包膜病毒, 是输血后肝炎的主要病因, 其中约 50% 的急性患者会转为慢性, 进而

发展为肝硬化和肝细胞性肝癌^[1]。迄今为止, 由于 HCV 在被感染组织和血清中滴度很低, 且尚无实用的动物模型和缺乏一合适的细胞培养系统, 所以目

收稿日期: 2002-02-17, 修回日期: 2004-03-31

* 基金项目: 国家博士点基金项目 (20010486015)

作者简介: 杨小骏 (1978-), 男, 湖北省籍, 博士研究生, 研究方向为医学病毒学

** 通讯作者: Corresponding author. Tel: 027-87682372, E-mail: linbaiye@whu.edu.cn

前对 HCV 感染机制仍然不甚明了。HCV 基因组为长约 9.5kb 的正链 RNA, 含有一个大的开放阅读框, 可以编码大约 3010 个氨基酸的聚蛋白, 在宿主及病毒编码的蛋白酶的作用下, 该蛋白可以被切割为结构蛋白 (Core, E1, E2, p7) 及非结构蛋白 (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) [2]。

丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 包含 447 个氨基酸, 有磷酸化和超磷酸化两种形式, 其中磷酸化位点位于 C 末端丝氨酸残基上, 分子量为 56/58kDa^[3,4]。近几年开展的 HCV 抗干扰素治疗机理研究发现, 在一定条件下单独的 NS5A 的表达能使 IFN 敏感病毒对 IFN 产生抗性, NS5A 可通过多种机制使细胞对 IFN 产生耐受^[5]。所以目前认为, NS5A 与病毒的抗干扰素的治疗有很密切的联系, 并且已经有实验证明, HCV 的 NS5A 蛋白在病毒的转录、复制及细胞信号转导中都有一定的作用^[6]。本研究利用重组真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A, 导入 HeLa 细胞中建立稳定表达 HCV NS5A 的细胞系。并研究 NS5A 蛋白对细胞生长的影响, 发现 NS5A 对细胞生长有明显的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

质粒与菌种: 含有 HCV-1b 型全长开放阅读框 cDNA 重组质粒 pBRTM/HCV 1-3011 由华盛顿大学 Rice 教授惠赠, 真核细胞表达载体 pcDNA3.1(-) 为本室保存, *E.coli* JM109 为本室保存。

工具酶与试剂: Taq 酶为 TaKaRa 公司产品, DNA 限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶为 MBI 公司产品, 总 RNA 提取试剂盒 TRIzol Reagent 及细胞转染试剂盒 LipoVecTM 为 InvivoGen 公司产品。RT-PCR 试剂盒由 Clontech 公司提供。DNA Extraction Kit 为 MBI 公司产品。

NS5A 多克隆兔抗血清由本室制备, 羊抗兔 IgG/HRP 为华美公司产品, 实验用细胞由中国典型培养物保藏中心提供, 所用培养基 DMEM 购自 Hyclone 公司, 胎牛血清购自四季青公司。G-418 购自 Promaga 公司。

1.2 全长 NS5A 基因的 PCR 扩增

根据 HCV-1b 序列设计特异性引物, 正向引物: 5'AGATCTGCTAGCATGGCTTCCGGCTCCTGG3' 反向引物: 5'TGG TAC CAA GCT TCA TGA GCA GCA 3'

以质粒 pBRTM/HCV 1-3011 为模板, PCR 解链温度 94℃, 退火温度 58℃, 延伸温度 72℃ 共重复 35 个循环。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 pcDNA3.1(-)-NS5A 克隆的构建

PCR 产物经 *Nhe* I, *Hind* III 双酶切, DNA 回收试剂盒回收 NS5A 片断, 真核表达载体 pcDNA3.1(-) 同样经过 *Nhe* I, *Hind* III 双酶切、回收后, 与回收后的 NS5A 片断以 1: 5 摩尔比混合, 16℃ 经 T4 连接酶连接过夜, 以常规 CaCl₂ 法转化 JM109 感受态细胞, 在含氨苄青霉素的 LB 平板上 37℃ 培养过夜, 筛选阳性菌落, 酶切及 PCR 鉴定重组质粒 pcDNA3.1(-)-NS5A, 然后进行克隆片断全长测序。

1.4 细胞转染及稳定表达 5A 蛋白的细胞系的建立

将 HeLa 细胞接种于 24 孔板中, 37℃, 5%CO₂ 条件下培养, 24h 后用 DNA 转染。按 LipoVecTM 使用说明书将脂质体分别与经 *Bgl* II 酶切、回收、纯化后的重组质粒 pcDNA3.1(-)-NS5A 及 pcDNA3.1(-) 混合, 室温下放置 30min 后, 加入到细胞培养基中, 6h 后更换培养基, 待细胞长满以后按 1: 8 传代, 传代 24h 后加入 500μg/mL 的 G-418 进行筛选, 每次传代时都加入 G-418, 大约两周后, 细胞在 G-418 的作用下死亡, 少量的细胞克隆产生以后, 将 G-418 的浓度降为 200μg/mL。扩增培养后, 一部分细胞用液氮保存, 其余细胞继续实验。

1.5 RT-PCR 检测 NS5A 在细胞中的表达

将持续传代的抗 G-418 的 HeLa 细胞及对照组细胞培养至 80% 汇片, 按照 InvivoGen 公司的总 RNA 提取试剂盒说明书操作, 提取细胞总 RNA。利用 Clontech 公司的 RT-PCR 试剂盒, 以提取的细胞总 RNA 作为 RT-PCR 模板, 加入随机引物, 进行 RT-PCR 反应。反应结束后, 以获得的 cDNA 为模板, 加入 NS5A 引物进行 PCR 反应, 反应产物用的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.6 western blot 检测 NS5A 蛋白在细胞中的表达

我们先将 NS5A 基因克隆到原核表达载体 PQE32 中, 在 JM109 工程菌株中表达 NS5A 蛋白, 并做了血清学检测^[7]。利用制备电泳分离 NS5A 蛋白, 将含有 NS5A 蛋白的胶挖出, 碾碎后注射兔子。一周后加强免疫一次, 数周后取血清, 血清在 -70℃ 保存。

将接近长满的细胞用胰酶消化以后, 离心除去胰酶收集细胞。经 SDS-PAGE 上样液处理以后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 并进行 western blot 分析, 首先把蛋白转移到硝酸纤维素滤膜上, 用 4% 脱脂牛奶封闭后, 再以 NS5A 多克隆兔抗血清直接作为一抗, 以羊抗兔 IgG/HRP 作为二抗分别反应, 最后用辣根过氧化物酶显色。

1.7 细胞生长曲线的绘制

将稳定表达 NS5A 蛋白的 HeLa 细胞、转染 pcDNA3.1(-) 的 HeLa 细胞、以及正常 HeLa 细胞培养至 80% 汇片, 胰酶消化后, 用培养液悬浮成细胞悬液, 血球计数板中进行计数。计数三次取平均值, 通过计算接种一定体积的细胞悬液至 12 孔板中, 三组细胞每组分别接种 4 孔, 使每孔细胞的数目约为 4×10^4 个, 接种时间计为 0h。从接种时间算起, 每隔 24h 计数 1 孔内的细胞数量, 吸出培养液, 加少量胰酶消化后, 加入无血清培养液, 用吸管吹打结合镜检确认细胞已基本悬浮, 吸出用血球计数板计数, 每个样品计数三次取平均值。以培养时间为横坐标, 细胞数目为纵坐标, 得到细胞生长曲线。

2 结果

2.1 pcDNA3.1(-)-NS5A 的构建与鉴定

PCR 获得的 HCV NS5A 片断在 5' 和 3' 端的引物上分别设计有针对 pcDNA3.1(-) 载体多克隆位点上的 *Nhe* I 和 *Hind* III 酶切位点, 将 PCR 产物与 pcDNA3.1(-) 载体分别以 *Nhe* I 和 *Hind* III 消化, 连接得到正确插入的 pcDNA3.1(-)-NS5A 重组质粒, 利用 *Hind* III 单酶切可以获得一条 6.8kb 的带, 由于 pcDNA3.1(-) 上有一个 *Bgl* II 酶切位点, 所以利用 *Bgl* II 单酶切可以获得一条 6.8kb 的带, 利用 NS5A 片断两端的 *Nhe* I 和 *Hind* III 酶切位点, 可以得到大小分别为 5.4kb 和 1.4kb 的两条带。以重组质粒为模板, 加入 NS5A 引物进行 PCR 反应, 得到单一的 1.4kb 的带 (图 1)。通过测序, 进一步证实了 NS5A 基因片断已经正确插入到真核表达载体 pcDNA3.1(-) 中。并且证实 DNA 序列正确 (测序结果未发表)。

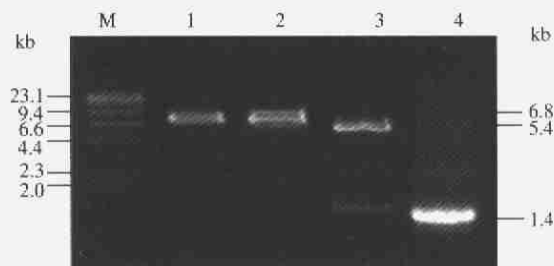


图1 pcDNA3.1(-)-NS5A 的酶切分析

Fig.1 Electrophoretic analysis of recombinant vector pcDNA3.1(-)-NS5A

M, λ -*Hind* III Marker; 1, pcDNA3.1(-)-NS5A/*Bgl* II 2, pcDNA3.1(-)-NS5A/*Hind* III 3, pcDNA3.1(-)-NS5A/*Nhe* I +*Hind* III. 4, pcDNA3.1(-)-NS5A/PCR.

2.2 重组载体 pcDNA3.1(-)-NS5A 在 HeLa 中的表达

2.2.1 RT-PCR 检测 NS5A 的 mRNA: 按照 Clontech

公司的 RT-PCR 使用说明书, 加入实验组及对照组细胞的总 RNA 及随机引物, RT-PCR 反应结束后, 以 RT-PCR 产物为模板, 加入 NS5A 引物进行 PCR 反应, 反应结束后用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 实验组出现 1.4kb 的特异性的带, 而对照组未见特异性的带出现 (图 2), 结果表明转化的 HeLa 细胞中 NS5A 基因已被转录产生 mRNA。

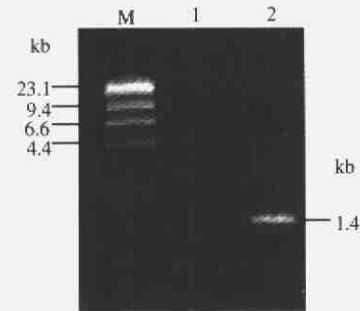


图2 RT-PCR 检测转化 HeLa 细胞中的 HCV NS5A mRNA

Fig.2 Detect HCV NS5A mRNA in HeLa cells by RT-PCR analysis

M, λ -*Hind* III Marker 1, HeLa/pcDNA3.1(-) 2, HeLa/pcDNA3.1(-)-NS5A

2.2.2 western bolt 检测: 将 NS5A 转化的 HeLa 细胞及对照组细胞用胰酶消化后收集, SDS-PAGE 电泳, 利用 NS5A 多克隆抗血清作为一抗进行 western blot 反应, 根据分子量大小的推测, 这条带的分子量与目的蛋白的分子量大小一致, 而对照组无任何特异性的带出现, 从而证明 NS5A 蛋白在 HeLa 细胞中已获得表达。(图 3)

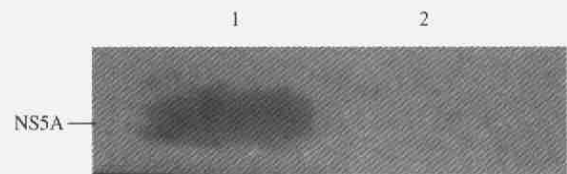


图3 Western blot 检测 NS5A 蛋白

Fig.3 Detect NS5A protein by Western blot analysis

1, HeLa/pcDNA3.1(-)-NS5A 2, HeLa/pcDNA3.1(-)

2.3 NS5A 的表达对于 HeLa 细胞生长的影响

分别转染 pcDNA3.1(-)、pcDNA3.1(-)-NS5A 以及正常 HeLa 细胞的生长曲线测定结果如图 4 所示, 表达 NS5A 蛋白的 HeLa 细胞的生长速率明显比只转染 pcDNA3.1(-) 的对照组细胞的生长速率要慢, 而对照组细胞与正常 HeLa 细胞的生长速度无明显差异。由于细胞接触抑制以及培养液的原因, 到细胞计数的第四天, 转染 pcDNA3.1(-) 的 HeLa 细胞及正常细胞由于已经基本长满, 生长速度有所减慢。因

此,我们在计算这三种细胞的倍增时间的时候,只取前三天的数据进行统计。(图 4)

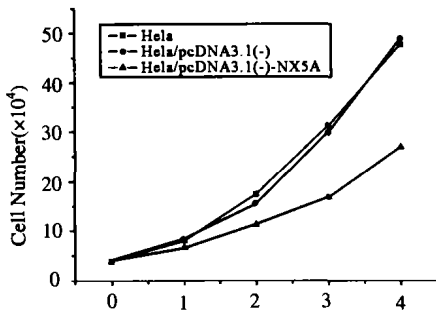


图 4 细胞的生长曲线

Fig.4 Cell growth analysis between HeLa/pcDNA3.1(-)-NS5A and HeLa/pcDNA3.1(-)

通过计算可以得出,稳定表达 NS5A 的 HeLa 细胞的倍增时间约为 36h,而对照组和正常细胞的倍增时间约为 23-24h,实验组细胞相对与转化 pcDNA3.1(-)的 HeLa 细胞及正常细胞的倍增时间增加了约 50%。与此同时,我们通过 MTT 法对细胞生长速率也进行了测定,并且得到了同样的实验结果(结果略)。由此可见,HCV NS5A 蛋白明显的抑制了 HeLa 细胞的生长。

3 讨论

丙型肝炎病毒是一种严重危害人类健康的传染病,由于目前尚未找到敏感的细胞培养系统和合适的动物模型,因此,目前对于 HCV 蛋白的功能研究多依赖于体外实验。

为了在真核细胞中稳定表达丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白,我们将全长的 NS5A 基因上 5'端加上一个翻译起始位点 ATG 和 Kozak 序列并克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(-)中的 AMV 启动子下游,测序结果充分证明 HCV NS5A 基因序列正确插入到 pcDNA3.1(-)中,保证了 HCV NS5A 基因能有效的进行表达。

由于线性化的 DNA 比闭合环状 DNA 更容易与真核细胞基因组发生重组,从而整合到细胞染色体上形成稳定的遗传状态,更加容易获得能够稳定持续表达目的基因的细胞株。因此我们利用真核表达载体 pcDNA3.1(-)CMV 启动子上游的 *Bgl*III 酶切位点,先将重组质粒线性化,经回收纯化后的 DNA 通过脂质体转染法对细胞进行转染,利用该载体上的 neo 抗性基因进行筛选,不能稳定表达 NS5A 蛋白的细胞在 G-418 的存在下都无法正常生长,最终获得了能持续稳定表达 NS5A 基因的细胞株。该细

胞株可以在 G-418 的存在下连续传代,并可以持续表达 NS5A 蛋白。

细胞生长的调节机制是多种基因表达产物相互作用的结果。目前已有实验表明,NS5A 蛋白具有一个核定位信号(NLS),可以进入细胞核中,并且可以与宿主蛋白相互作用,从而在转录水平上影响宿主细胞。文献表明,HCV NS5A 蛋白通常位于靠近细胞核的细胞质中,在某些情况下可以被 Caspase-like 蛋白酶切割,其切割产物可以进入细胞核中,与细胞核内的因子相互作用,参与了转录的调节^[8]。Gong 等通过 EMSA 的方法证实,NS5A 可调节细胞内 Ca^{2+} 浓度,从而影响转录因子 NF- κ B^[9]。Gsoh 等利用酵母双杂交的方法,通过用 NS5A 蛋白作为诱饵,研究细胞蛋白与 NS5A 蛋白的相互作用,结果发现 NS5A 可以与一种新的细胞转录因子 SRCAP 相互作用,从而影响宿主细胞的机能^[10]。HCV NS5A 除了能在转录水平上影响宿主细胞外,同时也影响宿主细胞的翻译。NS5A 蛋白还可以通过与 PKR 激酶结合,阻止细胞翻译起始因子 eIF2- α 的磷酸化,使某些基因的翻译水平升高或者降低,从而使病毒 mRNA 翻译得以顺利进行^[11]。同时,有文献报道,NS5A 与生长因子受体结合蛋白 2 (Grb2) 以及 p53 蛋白均有相互作用,可以抑制这两种细胞因子的活性^[12,13]。

NS5A 蛋白抑制细胞生长的作用,能够对 HCV 病毒在细胞内的转录、复制产生较为有利的影响。尽管 NS5A 在细胞中的转录及翻译过程中均产生一定的作用,但并没有直接的证据证明 NS5A 在这些过程中显著的抑制了细胞的生长。我们认为,这种结果有可能是因为 NS5A 参与了细胞生长调控的某些途径,并与某些细胞生长因子发生了直接或者间接的相互作用,从而对宿主细胞的生长产生了较为显著的影响。但由于细胞生长相关因素很多而且很复杂,目前尚不能断定 NS5A 显著降低细胞生长速率的直接原因,其具体作用机制仍需要做进一步的探讨。

参考文献

- [1] Kuo G, Choo Q L, Alter H J, *et al.* An assay for circulating antibodies to a major edologic virus of non-A, non-B hepatitis [J]. *Science*, 1989, 224: 362-364.
- [2] Hirowatari Y, Hi ji kata M, Tanji Y, *et al.* Expression and processing of putative nonstructural p-proteins of hepatitis C virus in insect cells using baculovirus vector[J]. *Virus Res*, 1995 35:43-61.
- [3] Kaneko T, Tanji Y, Satoh S, *et al.* Production of two physphoprotein

- from the NS5A region of the hepatitis C virus genome[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 205:320-326.
- [4] Chuo-ku. Phosphorylation of Hepatitis C Virus-Encoded Nonstructural Protein NS5A[J]. *J Virol*, 1995, 69:3980-3986.
- [5] Song J, Fujii M, Wang F, *et al*. The NS5A protein of hepatitis C virus partially inhibits the antiviral activity of interferon[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80(4): 879-866.
- [6] Yupeng H, Seng L T, Michael G K, *et al*. Regulation of mRNA Translation and Cellular Signaling by Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS5A[J]. *J Virol*, 2001, 75:5090-5098.
- [7] 阮 华, 郜金荣, 叶林柏, 等. HCV NS5A 基因表达及其在血清学检测中的应用评估[J]. *中国病毒学*, 2001, 16:190-193.
- Shinya S, Masami H, Kunitada S, *et al*. Cleavage of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A by a Caspase-like Protease(s) in Mammalian Cells[J]. *Virology*, 2000, 270: 476-487.
- [8] Gong G, Gulam W, Aleem S, *et al*. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kB[J]. *PNAS*, 2001, 98: 9599-9604
- [9] Asish K G, Mainak M, Ratna B R, *et al*. Hepatitis C Virus NS5A Protein Modulates Transcription through a Novel Cellular Transcription Factor SRCAP[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275:7184- 7188.
- [10] Michael G J R, Kwieciszwski B, Dossett M, *et al*. Antiapoptotic and Oncogenic Potentials of Hepatitis C Virus Are Linked to Interferon Resistance by Viral Repression of the PKR Protein Kinase[J]. *J Virol*, 1999, 73: 6506-6516.
- [11] Seng L T, Haruhisa N, Michael G K, *et al*. NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling [J]. *PNAS*, 1999, 96: 5533-5538.
- [13] Gong G Z, Jiang Y F, Zhu Y H, *et al*. Regulation mechanism of HCV NS5A on protein transactivity[J]. *中华免疫学杂志*, 2003, 11, 162- 165.