

发挥了抗炎、抗氧化的作用,并保护了心脏功能,减轻了失血性休克。笔者的研究与之前的很多研究相一致,进一步揭示了白藜芦醇的作用机制,为深入了解白藜芦醇的药理作用提供了基础资料并且为临床救治失血性休克提供有益的参考。

参考文献

- Gann DS, Drucker WR. Hemorrhagic shock [J]. J Trauma Acute Care Surg 2013, 75 (5):888-895
- Francioso A, Mastromarino P, Masci A, *et al.* Chemistry, stability and bioavailability of resveratrol [J]. Med Chem, 2014, 10(3):237-245
- 程丑夫, 刘虹. 白藜芦醇的心血管保护作用研究概况 [J]. 云南中医学院学报, 2013, 36 (1):98-100
- Park SK, Kim K, Page GP, *et al.* Gene expression profiling of aging in multiple mouse strains: identification of aging biomarkers and impact of dietary antioxidants [J]. Aging Cell, 2009, 8(4):484-495
- Li YG, Zhu W, Tao JP, *et al.* Resveratrol protects cardiomyocytes from oxidative stress through SIRT1 and mitochondrial biogenesis signaling pathways [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 438 (2):270-276

- Balaiya S, Murthy RK, Chalam KV. Resveratrol inhibits proliferation of hypoxic choroidal vascular endothelial cells [J]. Mol Vis, 2013, 19:2385-2392
- Szewczuk LM, Forti L, Stivala LA, *et al.* Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2: a mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (21):22727-22737
- Klinge CM, Blankenship KA, Risinger KE, *et al.* Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells [J]. J Biol Chem, 2005, 280 (9):7460-7468
- Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, *et al.* Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 299(1):H18-H24
- Li H, Xia N, Forstermann U. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol [J]. Nitric Oxide, 2012, 26(2):102-110
- Cherkas D. Traumatic hemorrhagic shock: advances in fluid management [J]. Emerg Med Pract, 2011, 13(11):1-19, 20

(收稿日期:2013-12-27)

(修回日期:2014-01-15)

丙型肝炎病毒 1b 基因型 C 区氨基酸 70 替代对细胞凋亡的影响

胡中杰 刘颖 仇丽霞 范作鹏 聂巍 梁珊 于红卫 金荣华

摘要 目的 探讨丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 1b 基因型 (genotype 1b, GT-1b) C 区氨基酸 (amino acid, AA) 70 替代对细胞凋亡的影响。**方法** 利用前期构建的 HCV GT-1b C 区 aa70 野生型和变异型核心蛋白表达质粒瞬时转染体外培养肝癌细胞系,采用 PCR 芯片检测细胞凋亡相关基因的表达,并以 Annexin-V FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡率。**结果** 与野生型核心蛋白相比,转染表达变异型核心蛋白可使 Huh7 细胞 84 个凋亡相关基因中 40 个表达相对增强,44 个表达相对减弱,但相差倍数均在 3 倍以内。HepG2 细胞转染野生型和变异型核心蛋白表达质粒后,细胞凋亡率分别为 $9.4\% \pm 1.9\%$ 、 $9.1\% \pm 2.2\%$, 低于空白载体对照组的 $14.3\% \pm 1.4\%$;以抗 Fas 抗体处理后,细胞凋亡率增高 ($52.4\% \pm 2.9\%$ 、 $56.1\% \pm 2.5\%$),但仍明显低于空白载体对照组的 $72.6\% \pm 2.1\%$ 。**结论** HCV 核心蛋白表达可抑制细胞凋亡,但核心蛋白单纯 R70Q/H 变异并不引起细胞凋亡相关基因表达及凋亡率的显著不同。

关键词 丙型肝炎病毒 核心蛋白 凋亡

[中图分类号] R5 [文献标识码] A

Effects of the Amino Acid 70 Substitution in the Core Region of Hepatitis C Virus Genotype 1b on Cell Apoptosis. Hu Zhongjie, Liu Ying, Qiu Lixia, *et al.* Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract Objective To investigate the effects of the amino acid (aa) 70 substitution in the core region (CR) of hepatitis C virus (HCV) genotype 1b (GT-1b) on cell apoptosis. **Methods** The expression plasmids of wild type and mutant aa70 core proteins were

基金项目:北京市优秀人才培养基金资助项目(2010D003034000009);中国初级保健基金会佑安肝病艾滋病基金资助项目(BJYAH-2011-073);首都医科大学基础-临床科研合作基金资助项目(1000172053-11JL61)

作者单位:100069 首都医科大学附属北京佑安医院丙肝与中毒性肝病科

通讯作者:胡中杰,电子邮箱: yfcyt@139.com

transfected into human hepatoma cell line. Apoptosis PCR array was performed to test the expression of 84 key genes involved in programmed cell death. And then, apoptosis rate was measured by flow cytometry (FCM). **Results** Compared with HCV aa70 wild type core protein, expression of mutant core protein in Huh7 cells could make 40 genes' expression increased and 44 genes' expression decreased among the 84 key genes related to apoptosis. However, the difference of multiples was within 3 times. Furthermore, when transfected with HCV aa70 wild type or mutant core protein expression plasmids, the apoptosis rates of HepG2 cells were $9.4\% \pm 1.9\%$ and $9.1\% \pm 2.2\%$ respectively, which were lower than those in control group transfected with empty vector ($14.3\% \pm 1.4\%$). Moreover, after treated with anti-Fas antibody, the apoptosis rates of HepG2 cells could rise to $52.4\% \pm 2.9\%$ and $56.1\% \pm 2.5\%$ respectively, which was still lower than that in control group ($72.6\% \pm 2.1\%$). **Conclusion** The expression of HCV core protein can inhibit fas-mediated apoptosis. But R70Q/H substitution alone is not sufficient for the significantly difference of the expression of apoptosis related genes and the cells' apoptosis rates.

Key words Hepatitis C virus; Core protein; Apoptosis

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 基因 1 型 (genotype-1, GT-1) C 区 (C region, CR) 氨基酸 (amino acid, AA) 70 和 91 替代 (R70Q/H, L91M) 是影响 IFN α 抗 HCV 疗效的独立预测因素, 尤其是 CR R70Q/H^[1]。无论是目前的标准治疗方案聚乙二醇干扰素 α (pegylated interferon, PEG-IFN α) 联合利巴韦林 (ribavirin, RBV), 还是在 PEG-IFN α /RBV 与直接作用抗病毒药物 (direct-acting antivirals, DAAs) 的三联治疗方案中, CR R70Q/H 都是无病毒学应答 (non virological respons, NVR) 的独立相关因素^[2]。但 CR R70Q/H 影响 IFN α 疗效的具体机制尚不明确。

笔者前期对 AA70 野生株 (70R) 和变异株 (70Q/H) 在 PEG-IFN α /RBV 治疗过程中的动态变化进行定量检测发现, 野生株和变异株在治疗过程中均呈同向变化, 变异株未显示出对 IFN α 的独立抵抗。体外细胞实验也发现, 野生型和变异型核心蛋白表达对于干扰素刺激应答元件 (interferon-stimulated response element, ISRE) 的激活无明显差异, 对主要干扰素刺激基因 (IFN stimulated genes, ISGs) mRNA 转录的影响也无显著差异。这些临床和基础研究结果提示单纯 R70Q/H 变异的核心蛋白似乎并不足以直接导致 IFN α 耐药, 而这和临床观察到的核心蛋白变异与 NVR 更易发生有关相矛盾, 其机制也有待于进一步的阐明。考虑到细胞凋亡是 HCV 清除的一个重要途径, 笔者拟在本研究中进一步利用体外细胞实验, 检测 HCV AA70 野生型和变异型核心蛋白对细胞凋亡的影响, 以了解 CR R70Q/H 是否能通过改变细胞凋亡情况而影响 HCV 的清除^[3]。

材料与方法

1. 细胞培养: 采用人肝癌细胞系 Huh7 和 HepG2 细胞进行 HCV 核心蛋白的表达。Huh7 和 HepG2 细胞的培养采用 DMEM 培养基 (Sigma-Aldrich) 和 10% 的胎牛血清 (Sigma-Aldrich), 并添加 100U/ml 青霉素 (Sigma-Aldrich) 和 0.1mg/ml 链霉素 (Sigma-Aldrich), 于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。

2. HCV GT-1b CR AA70 野生型和变异型核心蛋白表达质粒的构建和鉴定: 此部分工作在先前的研究中已完成, 实验过程简述如下: 首先从 1 例 HCV 1b 亚型感染者血清标本中分离 HCV RNA, PCR 扩增 C 区全序列, 经 TA 克隆后测序, 获得野生型密码子 70 (CGG) 的 C 区全序列, 然后采用定点突变技术构建携带变异型密码子 70 (CAG) 的 C 区全序列并经测序鉴定。其次, 以获得的 C 区全序列为模板, 利用包含 XhoI 酶切位点 (下划线) 的引物进行扩增, 所用正义引物为 5'-CCGCTCGAGACCATGAGCACAAATCCTAAACCTCAA-3', 反义引物为 5'-CCGCTCGAGTCAAGCGAAGCTGGGATGGT-3', PCR 产物纯化后以限制性内切酶 XhoI 酶切, 然后克隆进真核表达载体 pCXN2, 蓝白斑筛选后挑选克隆扩增, 通过测序鉴定表达质粒构建成功。然后利用 Huh7 细胞进行 HCV 核心蛋白的表达, 以脂类转染剂 Effectene Transfection Reagent 分别

将野生型和变异型核心蛋白表达质粒瞬时转染入 Huh7 细胞, 空白载体 pCXN2 作为对照。最后通过 Western blot 法进行鉴定, β -actin 作为内参照。

3. PCR 芯片检测细胞凋亡相关基因: Huh7 细胞培养 24h 后, 将野生型和变异型核心蛋白表达质粒瞬时转染入细胞, 空白载体 pCXN2 作为对照。37℃ 5% CO₂ 培养 48h, 收获细胞后采用 miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) 纯化细胞总 RNA, 然后分别使用 RT² First Strand Kit, RT² SYBR[®] Green qPCR Master Mixes 和 RT² Profiler PCR Array Systems (SABiosciences) 进行反转录、扩增和相对定量, 最后通过 PCR Array Data Analysis 分析数据, 可同时得到 84 个参与细胞凋亡的关键基因的上调或下调情况, 从而可了解野生型和变异型核心蛋白对这些基因表达的影响以及是否存在差异。

4. Annexin V FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡率: HepG2 细胞培养 24h 后, 将核心蛋白表达质粒 (野生型和变异型) 瞬时转染入细胞, 空白载体 pCXN2 作为对照, 继续培养 24h 后, 以 Anti-Fas (CD95) mAb (MBL) 处理, 终浓度为 100ng/ml, 每个样本设 3 个复孔。另外, 设置相同的样本但不用 Anti-Fas Ab 处理。培养 12h 后收集细胞, 细胞重悬后以 Annexin V

FITC/碘化丙啶(propidine iodide,PI)双染色,然后进行流式细胞术检测凋亡细胞数,计算细胞凋亡率。

结 果

1. HCV AA70 野生型和变异型核心蛋白对细胞凋亡相关基因表达的影响:在分别转染野生型和变异型核心蛋白表达质粒后,以细胞凋亡 PCR 芯片检测参与细胞凋亡的 84 个关键基因的表达。结果如图 1 所示。与对照组相比,野生型核心蛋白对 84 个凋亡相关基因的表达上调者有 45 个,下调者有 39 个,但上调或下调倍数均未超过 3 倍;而变异型核心蛋白导致表达上调者有 46 个,下调者有 38 个,其中有 2 个基因的上调或下调倍数超过 3 倍,分别为 caspase - 5

表达上调 4.41 倍(红色圆圈),CD40 配体表达下调 5.85 倍(绿色圆圈)。当变异型与野生型核心蛋白比较时,40 个基因的表达相对增高,44 个基因的表达相对降低,但相差倍数均未超过 3 倍。

2. HCV AA70 野生型和变异型核心蛋白对细胞凋亡率的影响:HepG2 细胞分别转染空白载体、野生型核心蛋白和变异型核心蛋白表达质粒后,流式细胞术显示细胞凋亡率分别为 14.3% ± 1.4%、9.4% ± 1.9%、9.1% ± 2.2%。以抗 Fas 抗体处理后,3 组的细胞凋亡率分别为 72.6% ± 2.1%、52.4% ± 2.9%、56.1% ± 2.5%(图 2)。转染了核心蛋白组的细胞凋亡率低于对照组,但转染野生型核心蛋白和变异型核心蛋白的细胞凋亡率无明显差异。

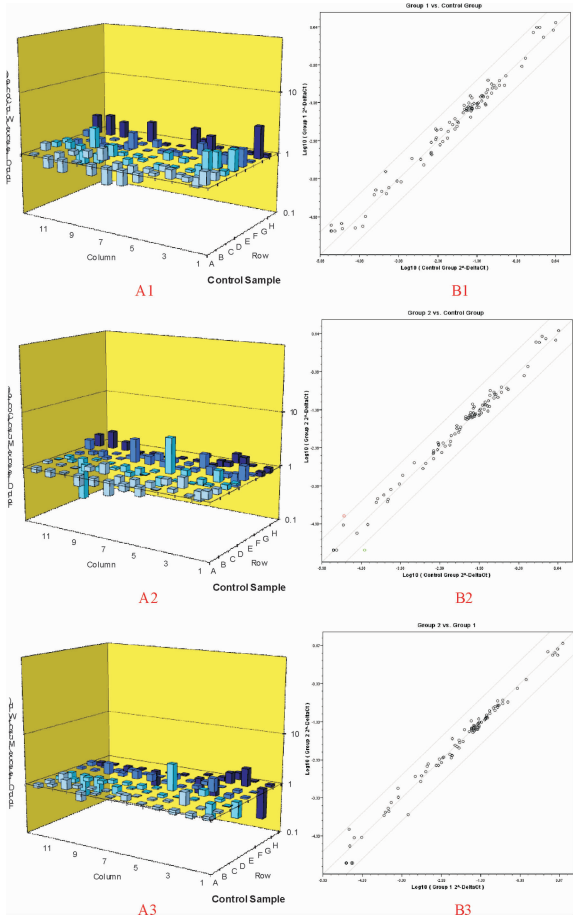


图 1 HCV AA70 野生型和变异型核心蛋白影响凋亡相关基因表达的三维形貌图和散点图

pCXN2 载体转染作为空白对照。A1. 野生型核心蛋白;B1. 空白对照;A2. 变异型核心蛋白;B2. 空白对照;A3. 变异型核心蛋白;B3. 野生型核心蛋白。A 均为三维形貌图(行、列显示检测基因在 96 孔板上的位置,纵坐标为基因表达水平的相差倍数);B 均为散点图(横、纵坐标为不同实验组各相关基因的 $\text{Log}_{10} 2^{(-\Delta C_t)}$,中间斜线为不同实验组各相关基因表达的相差倍数 $[2^{(-\Delta C_t)}]$ 为 1,中间斜线两侧的斜线为不同实验组各相关基因表达的相差倍数 $[2^{(-\Delta C_t)}]$ 的阈值,本研究设定为 3

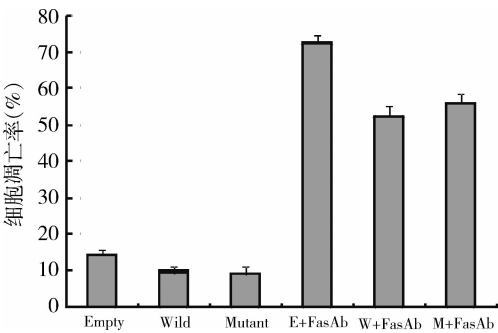


图 2 HCV AA70 野生型(Wild)和变异型(Mutant)核心蛋白对外培养细胞凋亡率的影响 pCXN2 载体转染作为对照(Empty),用或不用抗 Fas 抗体处理

讨 论

尽管 CR R70Q/H 是影响 IFN α 抗 HCV 疗效的独立预测因素,但笔者前期的临床和基础研究结果提示单纯 R70Q/H 变异的核心蛋白似乎并不足以直接导致 IFN α 耐药,这种矛盾的结果提示,可能有其他机制参与其中。考虑到细胞凋亡是机体抗病毒感染的重要手段,对细胞凋亡的抑制有利于病毒的持久感染,也是丙型肝炎慢性化的重要机制之一^[3]。而 HCV 核心蛋白可调控很多基因的转录,如细胞增殖、转化、凋亡等。其中对细胞凋亡的作用是抑制还是增强尚有争议,如有报道显示 HCV 核心蛋白能抑制 Fas 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF) α 介导的细胞凋亡,但也有报道显示 HCV 核心蛋白能增强 TNF α 介导的细胞凋亡^[4~6],这些相互矛盾的结果可能是由于实验方法的不同,也可能是由于核心蛋白不是直接影响细胞的凋亡,而是通过改变内部或外部的环境因素而间接影响^[7]。

本研究中首先利用凋亡 PCR 芯片检测 HCV

AA70 野生型和变异型核心蛋白对参与细胞凋亡关键基因表达的影响,以了解 R70Q/H 是否能通过影响细胞凋亡而影响 HCV 的清除。凋亡 PCR 芯片包含了参与细胞凋亡的 84 个关键基因,包括 TNF 配基及其受体、Bcl-2 家族成员、caspase、IAP、TRAF、CARD、死亡结构域、死亡效应结构域和 CIDE 家族,以及参与 p53 和 DNA 损伤通路的相关基因。通过实时定量 PCR 的方法,能利用该芯片简单可靠地同时检测这些与细胞凋亡相关的关键基因的表达情况。结果显示,与对照组相比,野生型和变异型核心蛋白对这些凋亡相关基因的表达既有上调者,也有下调者,但绝大多数上调或下调倍数未超过 3 倍,而当变异型与野生型核心蛋白比较时,两者对这些凋亡相关基因表达的影响均在 3 倍以内。这些结果提示,HCV 核心蛋白表达可影响细胞凋亡相关基因的表达,但这种影响既有上调者,也有下调者,且影响程度较小,而单纯 R70Q/H 的核心蛋白对细胞凋亡相关基因表达的影响差别不大。

当进一步以 Annexin V FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡率时,无论是否用抗 Fas 抗体处理,HCV 核心蛋白的表达均能减少细胞的凋亡,与 Marusawa 等^[5]的研究结果一致,但 AA70 野生型和变异型核心蛋白的表达对细胞凋亡率的影响无明显差异。这些研究结果提示,R70Q/H 变异的核心蛋白并不足以引起细胞凋亡情况的显著改变,不能以其对细胞凋亡的作用来解释其对 IFN α 治疗应答的影响。因此,

R70Q/H 变异影响 IFN α 抗 HCV 治疗的病毒学应答可能还有其他未知因素的参与,尚需更进一步的研究阐明。

参考文献

- 1 Shirakawa H, Matsumoto A, Joshita S, *et al.* Pretreatment prediction of virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients using viral and host factors [J]. *Hepatology*, 2008, 48(6):1753-1760
- 2 Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, *et al.* Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin [J]. *Hepatology*, 2010, 52(2):421-429
- 3 Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease [J]. *Science*, 1995, 267 (5203): 1456-1462
- 4 Ray RB, Meyer K, Steele R, *et al.* Inhibition of tumor necrosis factor (TNF- α) mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(4): 2256-2259
- 5 Marusawa H, Hijikata M, Chiba T, *et al.* Hepatitis C virus core protein inhibits fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF- κ B activation [J]. *J Virol*, 1999, 73(6): 4713-4720
- 6 Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, *et al.* Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis [J]. *J Virol*, 1998, 72(5): 3691-3697
- 7 Watashi K, Shimotohno K. The roles of hepatitis C virus proteins in modulation of cellular functions: a novel action mechanism of the HCV core protein on gene regulation by nuclear hormone receptors [J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(11):937-943

(收稿日期:2014-01-15)

(修回日期:2014-01-28)

IL-4 基因多态性与乙型肝炎疫苗反应相关性的荟萃分析

崔巍 刘胜 李承博 滕巍

摘要 目的 评价白细胞介素-4(IL-4)基因多态性与个体对乙型肝炎疫苗反应的相关性。方法 在 PubMed、Embase、Web of Science 和 China Bio Medicine(CBM)数据库中对 2012 年 12 月 1 日前发表的文献作关键词检索。应用 STATA12.0 软件对文献中的数据进行荟萃分析。结果 经全面检索,共纳入 5 篇文献,均为横断面研究。Meta 分析结果显示,IL-4 的 T 等位基因 rs2243250、rs2070874 和 C 等位基因 rs2227284 与乙型肝炎疫苗的高反应性相关。进一步依据种族进行的亚组分析显示,亚洲人群中 IL-4 基因多态性与乙型肝炎疫苗的反应性明确相关,但在高加索人群中则未发现这种相关性。结论 个体对乙型肝炎疫

基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(201202248)

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院传染科

通讯作者:崔巍,电子信箱:weicuisy@163.com