

痢疾杆菌侵袭 HeLa 细胞基因表达谱的研究

黄留玉^{2**} 史兆兴^{2**} 袁 静² 胡福泉^{1*}

(¹第三军医大学基础医学部微生物学教研室 重庆市微生物工程实验室 重庆 400038)

(²军事医学科学院疾病预防控制中心 北京 100071)

摘 要 采用 cDNA 微阵列技术检测了 HeLa 细胞被痢疾杆菌侵袭 1h 和 3h 后的基因表达变化,共发现 2 倍以上差异表达基因 752 个,上调基因有 509 个,下调基因有 306 个,并初步推测 HeLa 细胞通过激活某些信号通路,诱导表达多个基因,产生整体的细胞效应,以对抗痢疾杆菌的侵袭。对显著差异表达的两个基因 TNFR 1B 和 ERBB2,在痢疾杆菌侵袭 HeLa 细胞 1h 和 3h 后的表达量经荧光实时定量 PCR 验证,确定这两个基因的确在痢疾杆菌侵袭期间高表达,它们在细胞对痢疾杆菌 2457T 侵袭反应中起重要的作用。这些结果促进了对痢疾杆菌分子致病机理的认识,也为形成预防和治疗痢疾的策略提供了理论基础。

关键词: 痢疾杆菌福氏 2a; HeLa 细胞; cDNA 微阵列技术; 荧光实时定量 PCR; 信号通路

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)05-0810-07

宿主细胞在受到病原菌感染后,其基因的表达也会发生一系列的改变。研究认为痢疾杆菌对肠上皮细胞的作用,是通过侵入肠上皮屏障的位点--结肠的 M 细胞(由淋巴细胞和巨噬细胞组成),以内吞方式进入巨噬细胞后,会诱导巨噬细胞迅速凋亡,从而释放大量的痢疾杆菌,使得细菌集中于肠上皮细胞的基底面,然后利用 III 型分泌系统侵入肠上皮细胞,并在肠上皮细胞之间扩散、传播和增殖^[1]。在肠上皮细胞中的痢疾杆菌会刺激上皮细胞诱导表达某些细胞因子,一方面使肠上皮细胞处于炎性反应状态;另一方面具有趋化作用,吸引多形核白细胞向有痢疾杆菌的地方募集。这种多形核白细胞具有吞噬和杀死痢疾杆菌的作用,在杀死细菌的同时,也会破坏肠上皮细胞之间的紧密联结,使得更多的细菌穿过肠上皮屏障,从而更加重了已有的炎性反应,导致大量肠上皮细胞的死亡^[2]。在整个过程中肠上皮细胞的大量死亡是造成痢疾发生的关键环节,而导火线是痢疾杆菌侵入肠上皮细胞诱导炎性细胞因子的产生。因此,要了解痢疾杆菌的致病机理,必须研究上皮细胞在与痢疾杆菌相互作用过程中如何诱导细胞因子产生,诱导针对性的细胞效应。目前对痢疾杆菌侵袭上皮细胞后,宿主细胞基因发生的变化及

宿主的免疫保护机制还不十分清楚。

基因表达谱(转录组)是研究细胞表型和功能的一个重要决定因素。和基因组不同,表达谱是高度动态的,细胞所处环境改变或受到病原微生物入侵时,其形态和生理状况都会发生改变,甚至当细胞处于复制、分裂等正常的生理活动时,基因的转录情况也会变化很大,而这些都是由于基因表达的不同引起的^[3]。因此,本文利用 cDNA 微阵列技术探索了 HeLa 细胞被痢疾杆菌入侵诱导 3h 的人上皮细胞基因表达的差异,以期揭示痢疾发生发展的机理,为预防和治疗痢疾而进行的疫苗和药物靶标的筛选提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞株:大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和野生型痢疾杆菌福氏(*Shigella flexneri*) 2a 毒株 2457T 均为本室保存。实验前,痢疾杆菌福氏 2a 2457T 用豚鼠角膜实验鉴定其毒性并进一步增毒。人子宫上皮细胞株 HeLa 细胞为本室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:QIAquick Nucleotide Removal Kit(Qiagen, Hilden, Germany);Hybond N 尼龙

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-23-68752240; E-mail: hoofuquan@yahoo.com.cn

** 作者简介:对本文有同等贡献。黄留玉(1962-),男,河南郑州人,研究员,主要从事微生物功能基因组学研究。Tel/Fax: 86-10-52203301; E-mail: huangliuyuy@163.com; 史兆兴(1973-),男,山东人,副研究员,主要从事微生物功能基因组学研究。E-mail: shi-zhx@yahoo.com

收稿日期: 2007-03-26; 接受日期: 2007-05-22; 修回日期: 2007-05-28

膜上(Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK);芯片制作仪(BiorRobotics, Cambridge, UK);

1.2 HeLa 细胞侵袭实验^[4]

人子宫上皮细胞株 HeLa 细胞培养在含有 10% FBS 无支原体感染的 RPMI-1640 培养基中。HeLa 细胞侵袭实验方法按文献 [4] 进行, MOI 为 100 个细菌/细胞。37℃ 分别作用 1h 和 3h, PBS 冲洗 3 次感染后的细胞, 加入新鲜培养基(含 20μg/mL 的庆大霉素)以杀死细胞外的细菌, 再培养 3h。收集细胞并用 RNA 稳定剂 RNAlater(Qiagen, Hilden, Germany)保存样品。另外, 感染实验时进行染色检查, 用甲醇:冰醋酸(3:1)固定 15min, 美兰染色 10min, 检测 HeLa 细胞中细菌的数量。

1.3 cDNA 微阵列的构建

此芯片的 cDNA 克隆主要来自人的肝脏组织和肝癌细胞株, 约有 17000 个 cDNA 克隆, cDNA 片段的平均长度约为 1kb。利用通用引物 PCR 扩增所需片段, 并用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物的质量。将 PCR 产物异丙醇沉淀后溶于变性溶液(1.5mol/L NaCl, 0.5mol/L NaOH)利用芯片制作仪将 100μL 含 PCR 产物的溶液点到 8cm × 12cm 的 Hybond N 尼龙膜上, 每个点的直径约为 0.4mm, 每个 cDNA 片段在同一张膜的不同位置点两次。以 λDNA 和 pUC18 DNA 作为阴性对照。由中国科学院上海细胞和生化所用 BioRobotics 公司的 arrayer 制作。每张 8cm × 12cm 的尼龙膜上包含 8 个看家基因(分别编码核糖体蛋白 S9、β 肌球蛋白、3 磷酸甘油脱氢酶、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶、RPL13A 蛋白、泛素 C、磷脂酶 A2 和 UCHL1 蛋白)作为膜内对照基因, 每个基因均匀地点在每张膜的 12 个不同的位置。如果杂交结果中某个基因的 12 个点的最大差异倍数大于 1.5 倍, 则认为杂交结果是无效的。

1.4 RNA 的提取和检测

采用标准的 Trizol RNA 提取方法抽提对照组和实验组(包括感染后 3h 和 24h)的 HeLa 细胞总 RNA, 利用 poly(dT) resin(Qiagen, Hilden, Germany)分离纯化 mRNA, 并检测 mRNA 的质量和纯度, 使其纯度符合要求($OD_{260/280} > 1.9$)。总 RNA 质量检测(Lab on chip 检测)操作步骤参考人 oligo 基因表达谱芯片使用手册, Lab-on-chip 参照 Agilent 2100 分析仪操作手册, 制备凝胶, 按照软件提示进行 RNA 电泳操作, 评价 RNA 质量。

1.5 杂交

1.5.1 探针的制备: 荧光探针的制备(采取反转

cDNA 第一链标记), 具体操作参考人 oligo 基因表达谱芯片使用手册。70℃ 预变性 5 ~ 10min, 变性反应结束后在 PCR 管中配制 cDNA 第一链合成反应体系。采用 QIAquick Nucleotide Removal Kit 按操作手册进行荧光探针的纯化, 将纯化好的探针转入酶标板, 分别测定 A_{260} 、 A_{350} 、 A_{650} , 进行探针的定量。1μg 的 mRNA 反转录标记可以得到 30pmol 左右的荧光探针。

1.5.2 杂交和洗涤: 具体操作参考人 oligo 基因表达谱芯片使用手册。取出经定量的 Cy3 和 Cy5 标记的探针各 30pmol, 42℃ 杂交箱中避光杂交 16 ~ 18h。芯片用洗液(2 × SSC/0.1% SDS, 1 × SSC/0.1% SDS, 0.5 × SSC)分别在 50℃ 下严格洗涤 10min, 干片扫描。

1.6 检测和分析

将杂交好的芯片主要是通过使用 Agilent Scanner 来获取图像, 所得到的图像为两种荧光的复合图, 经 Split-tiff 软件分割成单色荧光图像。将图像导入图像分析软件 Imagen 经过自动和人工定位与排列, 确定杂交点的范围, 过滤背景噪音, 提取得到基因表达的荧光信号强度值。由于样本差异、荧光标记效率和检出率的不平衡, 对 cy3 和 cy5 的原始提取信号进行均衡和修正才能进一步分析实验数据。采用 Genespring 分析软件, 计算 ratio 值(两种荧光 cy3 与 cy5 的比值), 并进行分析。取 ratio 值在 0.5 ~ 2.0 范围内的基因不存在显著的表达差异, 而在该范围之外的基因则被认为表达出现显著改变。

1.7 实时定量 RT-PCR 验证

选取差异显著的两个基因 TNFR 1B 和 ERBB2 进行 RT-PCR 实验验证。以为内标, 表 1 为 PCR 所需引物 PCR 反应条件: 30℃ 10min, 42℃ 30 ~ 50min; 95℃ 5min, 74℃ 5min。反转录产物稀释 10 倍, 用以作为模版进行 PCR 反应。PCR 反应条件: 94℃ 2min, 94℃ 30s, 61℃ 30s, 72℃ 20s, 共 30 个循环; 72℃ 5min。

表 1 PCR 所需引物

Table 1 Primers for PCR

Genes	Primes (5'→3')
GAPDH : sense	GCAGGGGGAGCCAAAAG
GAPDH : anti-sense	AGGCAGGGATGATGTTCTGGA
Tnfr1B : sense	GACTGAAGCAAGCCAAAGTGA
Tnfr1B : anti-sense	AACACAGGGCAGGTCCTAAC
ERBB2 : sense	ACCCAACCGAAGTCATAGC
ERBB2 : anti-sense	GTGCCATCAGAGCAGTCTGT

2 结果

2.1 cDNA 微阵列体系的建立和质量控制

采用 Agilent2100 分析仪和较高灵敏度的 Lab-

on-chip 进一步对总 RNA 进行质量检测,通过对图谱的分析发现没有明显的 RNA 降解(图 1),因此判定 2 个样品的总 RNA 完整性良好,可以进行探针标记。

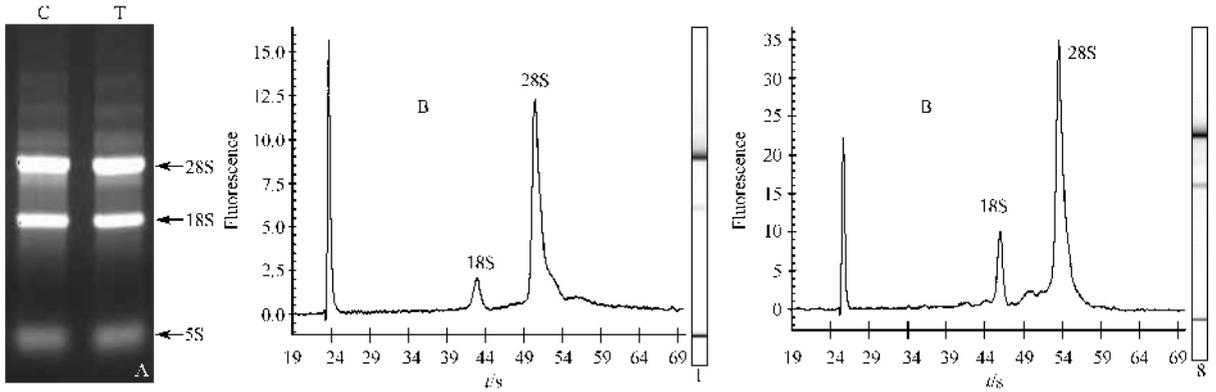


图 1 lab-on-chip 进行 RNA 质控的结果

Fig.1 Result of RNA detection by lab-on-chip. C was control (HeLa cells invaded for 1h), T was HeLa cells invaded for 3h, the middle peak stood for 18S and the right peak stood for 28S. The left lane was the agarose gelelectrophoresis detection of the total RNA.

2.2 HeLa 细胞被痢疾杆菌侵袭前后差异表达基因

本研究所用的 cDNA 芯片中包含约 17000 个基因,每个基因重复点制 6 次。通过人的 cDNA 芯片杂交分别检测了 HeLa 细胞受到痢疾杆菌侵袭后 1h 和 3h 基因表达变化(部分扫描图的结果见图 2)。

扫描获得信号后,每个基因的读数取 6 次杂交的平均值,标准化处理,计算得到 ratio 值。对 17000 个基因进行比较分析,检测 HeLa 细胞在被痢疾杆菌侵袭后 1h 和 3h 后的基因表达变化发现,共检出 2 倍以上表达差异基因 752 个。

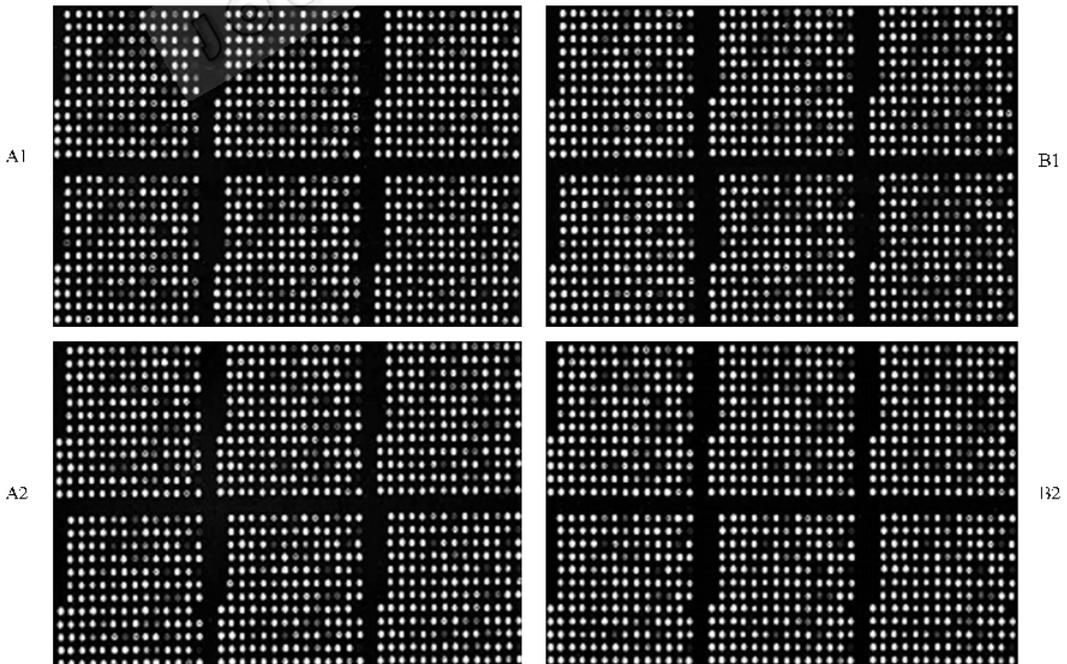


图 2 芯片杂交结果扫描图

Fig.2 The scanogram of hybridization result. A: HeLa cells invaded for 1h; B: HeLa cells invaded for 3h

在 752 个表达差异基因中,有 509 个基因上调,306 个基因下调;3 倍及 3 倍以上差异表达基因有 367 个,上调基因 262 个,下调基因 105 个。根据此芯片基因库的分类标准,将得到的差异表达变化基因分成 17 类,分别为原癌基因和抑癌基因、离子通道运输、细胞周期、细胞骨架运动、细胞凋亡、应激、DNA 合成修复重组、DNA 结合转录、细胞受体、免疫

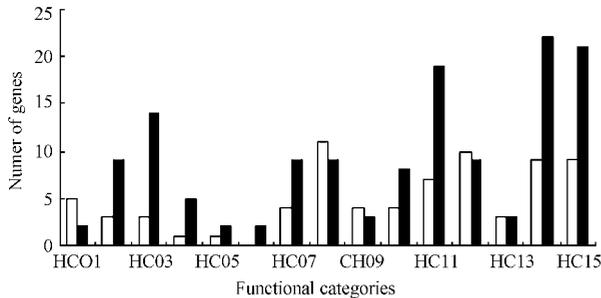


图 3 HeLa 细胞受痢疾杆菌侵袭 1h 和 3h 后差异表达基因的分类

Fig.3 Schematic presentation of cellular role categories of genes up-regulated (white bars) and genes down-regulated (black bars) of HeLa cells after invaded by *S. flexneri* 2a for 1h and 3h. HCO1: pro-onc and tumor suppressor genes; HCO2: ion channel transport; HCO3: cell cycle; HCO4: cytoskeleton; HCO5: apoptosis; HCO6: stress response; HCO7: DNA synthesis, repair and recombinant; HCO8: DNA-binding transcription; HCO9: cell receptor; HC10: immunorelate genes; HC11: signal transduction; HC12: metabolism-related genes; HC13: translation; HC14: development; HC15: cell differentiation.

相关、信号传导传递、代谢相关、蛋白翻译合成、发育相关、分化、未知类型。对差异表达基因的类型和基因数作柱形图(图 3),可明显地看到 DNA 合成修复重组、DNA 结合转录、信号传导传递、代谢相关、蛋白翻译合成、发育相关和分化类基因差异表达的较多,可能 HeLa 细胞在被痢疾杆菌侵袭时这几个方面产生了剧烈的反应。筛选到的可能涉及 PKC-P38MAPK 信号通路的基因总结于表 2。

2.3 荧光实时定量 RT-PCR 验证

为了验证芯片的可靠性和准确性,我们选取痢疾杆菌侵袭 HeLa 细胞 3h,在 PKC-P38MAPK 信号通路中差异显著的两个基因 TNFR 1B(T/C:2.13,感染 3h 比 1h 上调 2.13 倍)和 ERBB2(I/C:11.50,感染 3h 比 1h 显著上调 2.13 倍),它们被痢疾杆菌诱导表达。为了进一步确定它们在痢疾杆菌感染的 HeLa 细胞内是否发生转录上调,我们采用基于 SYBR Green I 染料的荧光实时定量 RT-PCR 进行验证,以管家基因 GAPDH 作为内标。

本研究通过熔点曲线分析识别扩增产物和引物二聚体,区分非特异扩增。结果表明 TNFR 1B、ERBB2 和 GAPDH 定量 PCR 产物实验中未出现污染、引物二聚体和非特异性扩增。以样品中所含 TNFR 1B 和 ERBB2 片段的相对浓度作为横坐标,以在 PCR 过程中 TNFR 1B 和 ERBB2 达到扩增进入指

表 2 筛选到的可能涉及 PKC-P38MAPK 信号通路的基因

Table 2 Probable genes related to PKC-P38MAPK signal pathway

Clone ID	GenBank ID	Ratid(infected/control)	Gene name
HTBBLF01	BE730622	0.499067379004505	G protein-coupled receptor family C, group 5, member B
ADBATC12	AK001354	3.27182874223037	putative G-protein coupled receptor
GLCFIF05	AV658073	2.04908954383039	homolog of mouse transient receptor potential-phospholipase C-interacting kinase CHaK; hypothetical protein FLJ20117
NPCBGF07	L33881	2.94419297214724	protein kinase C, iota
ADBAVB08	AB007884	0.134153032	Cdc42 guanine exchange factor(GEF)9
ADCAIF03	L36870	0.443354738057242	mitogen-activated protein kinase kinase 4
NPCAOG01	M64788	2.754820713041	RAP1, GTPase activating protein 1
CBFBRB07	U32519	0.222618448197047	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein
ADCACH11	AJ130894	2.76597939311368	transcription factor(p38 interacting protein)
ADCAVA07	M32315	2.126407911844	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
CDAADD03	Y16645	3.15521185632274	small inducible cytokine subfamily A(Cys-Cys), member 8(monocyte chemotactic protein 2)
ADBCFB12	AC005525	2.36959725861927	plasminogen activator urokinase receptor
ADBCLH04	X01057	4.32881676184831	interleukin 2 receptor alpha
HTCATE01	AC004382	0.441631145106405	small inducible cytokine subfamily A(Cys-Cys), member 17
GKCALC05	AF089744	2.11343670687534	xenotropic and polytropic retrovirus receptor
GKCEKF02	Z83845	7.635536E-02	transforming growth factor beta-activated kinase-binding protein 1
HTCADB05	AW514149	11.4958006333564	transducer of ERBB2, 1
GKCDKB09	Z00010	7.69686701115658	immunoglobulin kappa variable 1-13
HTBACD05	AA521510	2.01978797702161	lipopolysaccharide-specific response 5-like protein
CBLAIH06	AB014587	3.55371965709804	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4

数增长时的 CT 值所需的循环数为纵坐标,分别制作标准曲线。通过 TNFR 1B 和 ERBB2 的实时荧光扩增曲线(图 4),获得 TNFR 1B 和 ERBB2 在每个样品中的相对含量(表 3),分别计算 TNFR 1B 和 ERBB2 各时段的比值, > 2.0 判定为显著,结果发现 TNFR 1B 和 ERBB2 在 RT-PCR 实验中反映出了表达量的上调,与在 cDNA 微阵列分析中的表达差异相同,由此可知,cDNA 微阵列分析的数据是可信的。

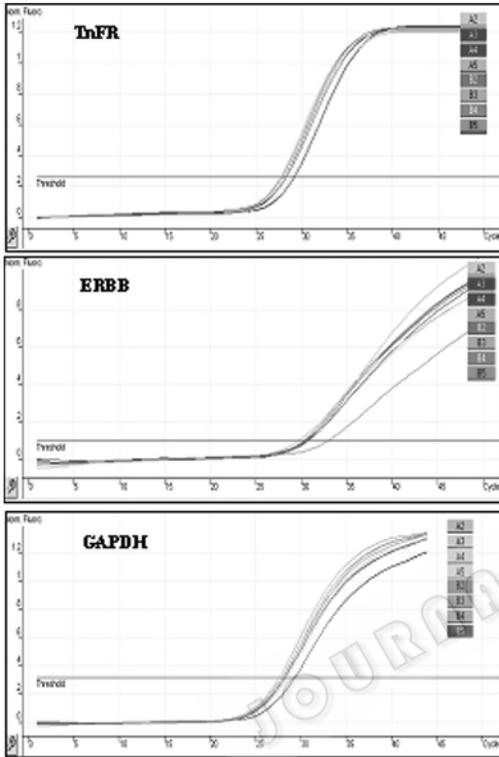


图 4 TNFR 1B、ERBB2 和 GAPDH 的实时荧光扩增曲线

Fig. 4 The real time RT-PCR curves of TNFR 1B, ERBB2 and GAPDH.

表 3 NPCCKH12、ADBCSB02 和 HTBAMG05 相对定量结果

Table 3 The result of relativity quality of NPCCKH12, ADBCSB02 and HTBAMG05

Genes	t/h	Relative concentration		Fold increase infected/control
		concentration HeLa cells invaded	non-infected HeLa cells (control)	
TNFR1B	1	0.575915	0.496265	1.160498
	3	0.690702	0.484447	1.425753
	5	0.680547	0.480772	1.415529
ERBB2	1	1.065788	0.647356	1.646371
	3	6.274122	0.651617	9.628543
	5	6.057620	0.6648418	9.111371

3 讨论

人们对肠上皮细胞与痢疾杆菌之间相互作用的认识主要集中在痢疾杆菌结合肠上皮细胞表面分

子、进入细胞、细胞内运动和细胞间扩散的分子机制,而对于肠上皮细胞的抵御和生存机制研究较少。目前,人们已经认识到痢疾杆菌可以激活肠上皮细胞的核因子 NF- κ B,诱导 IL-8 的表达^[5]。这种抵御和生存机制是针对痢疾杆菌侵入而产生的,在新的不利环境中肠上皮细胞也将诱导表达新的基因参与对痢疾杆菌的抵御。利用 cDNA 微阵列技术研究微生物和宿主之间的相互作用已经成为近期的研究热点之一^[6~8]。本研究采用含有 17000 多个基因的 cDNA 芯片分析了 HeLa 细胞对痢疾杆菌侵袭后基因转录水平的变化,共发现 2 倍以上差异表达基因主要集中在 DNA 合成修复重组、DNA 结合转录、信号传导传递、代谢相关、蛋白翻译合成、发育相关和分化。HeLa 细胞在痢疾杆菌侵袭后很多信号通路相关基因发生变化,具体讨论如下。

3.1 HeLa 细胞靶向运输痢疾杆菌和蛋白的能力提高

痢疾杆菌以内吞形式进入上皮细胞后,包被细菌内吞泡的运输和合成的许多蛋白进行细胞器之间的运输需要多种 Rab 蛋白(包括 Rab1A、Rab1B、Rab2、Rab3、Rab4 等)的参与^[6]。我们检测到了 Rab1 上调 2.18 倍、Rab2 上调 6.08 倍、Rab31 上调 3.00 倍,而 Rab22b 下调 2.00 倍。Rab1 和 Rab2 调控内质网向高尔基体的运输,主要参与早期的分泌过程,表明 HeLa 细胞在受到痢疾杆菌侵袭后,合成分泌型蛋白比较活跃。Rab22b 调控内吞液泡的运输,其下调以抵抗细菌的侵袭。

另外,我们还检测到高尔基体蛋白(GLG1)上调 7.20 倍、SEC22c 上调 5.24 倍,表明内吞过程中内质网和高尔基体之间的运输活跃^[7];VPS35 下调 4.63 倍,VPS35 具有使内吞液泡向溶酶体运送的靶向作用,其下调防止了痢疾杆菌向溶酶体的转运。由此可见,痢疾杆菌侵袭 HeLa 细胞后液泡运输和蛋白合成比较活跃,这些细胞功能都是在上皮细胞受到刺激后激活某些信号通路调控产生的。同时不同的信号通路可以产生不同的细胞功能,细胞因子的诱导表达也是信号通路激活的结果,并且诱导表达的细胞因子可能反过来调控上皮细胞的细胞功能,以应答痢疾杆菌的侵袭。

3.2 G 蛋白偶联受体参与的 MAPK 信号通路相关基因

在 G 蛋白偶联受体——PLC-PKC-MAPK 的信号通路^[8]中,本研究检测到两种 G 蛋白偶联受体的表达改变,GprC5 下调 2.00 倍,而 SH120(一种推测的 G 蛋白偶联受体)上调 3.27 倍,两种受体可能涉及

不同的 MAPK 信号通路。PLCIP 上调 2.05 倍,激活了 PLC;同时 PKC 上调 2.94 倍,表明极可能存在 SH120-PLCIP-PLC-PKC-MAPK 的信号通路此外,本研究还检测到 CDC42 鸟苷酸交换因子(ARHGEF)下调 7.45 倍、MKK4 下调 2.26 倍、Ras-GTPase 的激活蛋白 RAPI 上调 2.75 倍、P38IP 上调 2.77 倍,表明其下游信号通路 PKC-Src-CDC42-MEKK1-MKK4/7-JNK-JUN 是关闭的,RAPI-ERK/MAPK 被激活,并推测可能存在 PKC-P38IP-P38/MAPK 信号通路。

肿瘤坏死因子受体 TNFR1B 已知是通过 P38/MAPK 信号通路(TNFR1-P38IP-AP-1,调控细胞的功能)^[9],TNFR1B 上调 2.13 倍,表明此信号通路被激活,从而诱导产生了炎症趋化因子 MCP-2 和 MCP-3。MCP-3 可趋化激活大多数免疫细胞(包括单核细胞、树突状细胞、淋巴细胞、NK 细胞、嗜曙红细胞、嗜碱性细胞以及嗜中性粒细胞),有的免疫细胞具有识别和破坏肿瘤细胞的作用,MCP-3 具有抗肿瘤的效应。有 4 个 G 蛋白偶联的 C-C 趋化因子受体(C-CCKR-1、C-CCKR-2、C-CCKR-3 和 C-CCKR-5)可与 MCP-3 结合,导致 Ca^{2+} 浓度的升高,因此 MCP-3 的诱导表达可能参与 Ca^{2+} -CaM-CAMKK 信号通路的激活。而 MCP-2 可与 C-CCKR-1、C-CCKR-2 和 C-CCKR-3 共 3 个受体结合,不引起 Ca^{2+} 浓度的升高。因此,HeLa 细胞通过 P38/MAPK 信号通路诱导产生 MCP-2 和 MCP-3 等细胞因子,以募集免疫细胞杀死痢疾杆菌。

3.3 与 cAMP 相关的信号通路相关基因

本研究检测到腺苷酸环化酶 II 上调 2.48 倍,CREM 下调 3.55 倍和 CRH1 上调 3.11 倍,使第二信使 cAMP 量升高,从而激活了与 cAMP 相关的信号通路,即 cAMP-PKA-CREB/CREM 此信号通路^[10]。CREM 是 cAMP 反应性核调控因子,控制着 cAMP 信号通路是激活基因表达还是抑制基因表达,CREM 的转录体可拼接成抑制因子(ICER)和激活因子(ACT),ICER 反馈抑制 CREM 的表达,CREM 的下调是否激活基因表达,还需要进一步实验分析。CREB 是 cAMP 反应元件中的结合蛋白,它的激活可以启动基因的表达,CRH1 是 CREB 结合蛋白的抑制蛋白,而 CREB 的结合蛋白是 CREB 的转录共激活子^[11]因此 CRH1 的下调使 CREB 激活,诱导某些基因的表达。

3.4 其它信号通路相关基因

我们检测到的 CaMKK2(上调 6.21 倍)许多其它的转录因子(CNOT7(上调 3.39 倍)TADA31(上调 3.86 倍)GTFIIH1(下调 2.68 倍)GTFIIH2(上调 5.24

倍)GTFIIH1(上调 2.23 倍),表明 Ca^{2+} -钙调蛋白依赖的信号通路的激活^[12,13]。

磷脂酰肌醇 3 磷酸激酶(PI3K)信号通路^[14],即由 PI3K 形成第二信使分子 P(3)P、P(3,4)P2 和 P(3,4,5)P3。PI3K 是磷脂酰肌醇信号通路中关键的分子,它使磷脂酰肌醇的 3 号位磷酸化,得到几种不同的第二信使分子 P(3)P、P(3,4)P2 和 P(3,4,5)P3。这些信使具有不同的信号功能,P(3)P 参与液泡水解酶的分选,P(3,4)P2 和 P(3,4,5)P3 则会激活下游分子,参与基因表达的调控。在此通路中我们检测到下列基因的表达改变:PI3K3 的下调(7.76 倍)、红细胞生成素受体 EPOR(下调 4.52 倍)、CDS1(下调 14.4 倍)、PLA2(上调 2.99 倍)和 MTMR6(上调 5.93 倍),因此,这些基因的变化表明磷脂酰肌醇信号通路处于关闭状态。

以上讨论的这些信号通路相互之间都存在着相互联系,从而形成了一个信号通路网,最终形成细胞的整体效应。由此我们推测,在痢疾杆菌侵袭 HeLa 细胞过程中,HeLa 细胞为了在不利的环境中生存下去,对痢疾杆菌的侵袭产生了抵抗性适应反应,通过关闭某些信号通路(包括 PI3K 和 MKK4/MAPK 信号通路),激活某些信号通路(包括 cAMP、Cat+、CaM、PKC、Ras 和 P38/MAPK 信号通路),产生不同的信号分子,经过综合这些信号分子,使细胞产生具有针对性的细胞效应,包括诱导表达多种特异性蛋白(如酶、细胞骨架蛋白、细胞因子等),改变代谢途径、减弱某些代谢、加强另一些代谢以及提高胞内运输能力等,最终使自己可以适应痢疾杆菌的侵袭而生存下去。

参 考 文 献

- [1] Grassl GA, Finlay BB. Shigella rewrites host transcriptional responses. *Nature Immunology* 2007 **8**(1):15-16.
- [2] Bertrand CA, Danahay H, Poll CT, et al. Niflumic acid inhibits ATP-stimulated exocytosis in a mucin-secreting epithelial cell line. *American Journal of Physiology* 2004 **286**:C247-C255.
- [3] Philpott DJ, Yamaoka S, Isra'el A, et al. Invasive *Shigella flexneri* activates NF- κ B through an LPS-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *The Journal of Immunology* 2000 **165**:903-914.
- [4] Pedron T, Thibault C, Sansonetti PJ. The invasive phenotype of *Shigella flexneri* directs a distinct gene expression pattern in the human intestinal epithelial cell. *The Journal of Biological Chemistry* 2003 **278**(36):33878-33886.
- [5] Sansonetti PJ. Rupture invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote

- [6] Seabra MC ,Mules EH ,Hume AN. Rab GTPase ,intracellular traffic and disease. *Trends in Molecular Medicine* ,2002 **8** (1) : 23 – 30.
- [7] Tang BL ,Low DY ,Hong W. Hsec22c : a homologue of yeast Sec22p and mammalian rsec22a and msec22b/ERS-24. *Biochemical and Biophysical Research Communications* ,1998 **243** (3) 885 – 891.
- [8] Naor Z ,Benard O ,Segar R. Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors : the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* ,2000 , **11** (3) : 91 – 99.
- [9] Amrani Y ,Ammit AJ ,Panettieri RA Jr. Tumor necrosis factor receptor (TNFR) 1 but not TNFR2 ,mediates tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 and RANTES in human airway smooth muscle cells : role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *Molecular Pharmacology* 2001 **60** (4) 646 – 655.
- [10] Sassone-Corsi P. Coupling gene expression to cAMP signalling : role of CREB and CREM. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* ,1998 **30** (1) : 27 – 38.
- [11] Bamforth SD ,Braganca J ,Eloranta JJ , *et al.* Cardiac malformations , adrenal agenesis , neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2 , a new Tlap2 co-activator. *Nature Genetics* ,2001 **29** (4) : 469 – 474.
- [12] Chen J , Rappsilber J , Chiang YC , *et al.* Purification and characterization of the 1.0MDa CCR4-NOT complex identifies two novel components of the complex. *Journal of Molecular Biology* , 2001 **314** (4) : 683 – 694.
- [13] Wei W ,Dorjsuren D ,Lin Y , *et al.* Direct interaction between the subunit RAP30 of transcription factor IIF (TFIIIF) and RNA polymerase subunit 5 ,which contributes to the association between TFIIIF and RNA polymerase II . *The Journal of Biological Chemistry* 2001 **276** (15) : 12266 – 12273.
- [14] Weaver SA ,Ward SG. Phosphoinositide 3-kinases in the gut : a link between inflammation and cancer? *Trends in Molecular Medicine* , 2001 **7** (10) : 455 – 462.

Expression profile analysis of host HeLa cells invaded by *Shigella flexneri* 2a

HUANG Liu-yu^{2* *} ,SHI Zhao-xing^{2* *} ,YUAN Jing² ,HU Fu-quan^{1*}

(¹ Department of Microbiology ,Third Military Medical University ,Chongqing 400038 ,China)

(² Institute of Disease Control and Prevention ,Academy of Military Medical Sciences ,Beijing 100071 ,China)

Abstract :The changes of genes expression in HeLa cell during the invasion with *Shigella species* for 1h and 3h were analyzed by cDNA microarrays. The data showed that the expression levels of 752 genes were altered twice or greater as compared with the control 509 of them were up-regulated ,and 306 were down-regulated. It was supposed that some signal pathways in HeLa cell were activated ,then many genes were induced ,and at last comprehensive cell responses were produced ,so that HeLa cell could prevent against *Shigella species* infection. Two striking difference cDNA fragments TNFR 1B and ERBB2 ,which were up-regulated in the host epithelial cell during *Shigella* infection analyzed expression by real time RT-PCR as determined by cDNA arrays. We suggested they play important roles in response to the invasive *S. flexneri* 2457T. Based on the results of gene expression alterations ,the molecular pathogenic mechanism of *Shigella species* could be greatly and deeply understood ,and the strategy for prevention against and treatment for shigellosis would be formed.

Keywords : *Shigella flexneri* 2a ; HeLa cell ; cDNA microarray technology ; real-time quantitative reverse PCR ; signal pathways

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-23-68752240 ; E-mail : hoofuquan@yahoo.com.cn

** These authors contributed equally to this work. Tex/Fax 86-10-52203301 ;E-mail :huangliuyuly@163.com

Received : 26 March 2007/ Accepted : 22 May 2007/ Revised : 28 May 2007