

丙型肝炎病毒核心蛋白通过 FOXO1/PGC-1 α 途径上调磷酸烯醇式丙酮酸羧基酶的转录

陈继征^{1,2}, 王倩^{1*}, 徐松²

¹南京医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 江苏省人类功能基因组实验室, 南京 210093

²中国科学院武汉病毒研究所, 病毒学国家重点实验室, 武汉 430071

摘要: 【目的】分析丙型肝炎病毒 (HCV) 核心蛋白 (CORE) 稳定表达对磷酸烯醇式丙酮酸羧基酶 (PCK1) 转录水平的影响, 并分析 HCV CORE 调控 PCK1 转录的分子机制, 为进一步阐明 HCV 感染致 2 型糖尿病机理的探讨提供新的思路。【方法】利用反转录病毒表达系统构建稳定表达 HCV CORE 的 Huh7-lunet-core 细胞系。采用 Real-time PCR 和萤光素酶报告基因技术检测 Huh7-lunet-core 细胞系中 PCK1、FOXO1 以及 PGC-1 α 转录水平变化, 并结合 Western blot 分析 FOXO1 的活性变化。【结果】HCV CORE 的稳定表达显著增强 PCK1 的转录水平, HCV CORE 不影响 FOXO1 的转录和表达水平, 但降低 FOXO1 的磷酸化水平, 激活了 FOXO1 的转录活性, 并增强 PGC-1 α 的 mRNA 表达水平。【结论】HCV CORE 在 Huh7-lunet 细胞中的稳定表达激活 FOXO1 的转录活性, 并与 PGC-1 α 协同作用, 上调 PCK1 的转录, 从而导致肝糖异生过度发生, 对 HCV CORE 调控 PCK1 转录的分子机制的揭示可能为 HCV 感染相关的糖尿病的治疗提供新的靶点。

关键词: HCV, CORE, 2 型糖尿病, 胰岛素抵抗, 磷酸烯醇式丙酮酸羧基酶, 糖异生, FOXO1, PGC-1 α

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 01-0052-08

丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus, HCV) 是输血后及散在性的非甲非乙型肝炎 (Non-A, Non-B Hepatitis, NANBH) 的主要病因。全世界目前约有 2 亿 HCV 感染者, HCV 感染临床特征在于它具有极易演变成慢性化的趋势^[1]。慢性 HCV 感染不仅是造成肝脏损伤最主要原因, 它还与许多肝外疾病相关, 研究表明 HCV 感染及其所致的慢性肝病与 2 型糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 也存在明显的相关性^[2-3]。

目前全球已有超过 1.5 亿人罹患 2 型糖尿病, 该病是一种以胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能障碍

导致的血糖持续升高为特征的慢性代谢性疾病^[4]。其中肝脏胰岛素抵抗是 2 型糖尿病发病机制的主要环节, 其病理生理特点是糖异生和糖原分解功能发生紊乱导致肝糖输出增多, 并尤以糖异生的作用为显著^[5]。磷酸烯醇式丙酮酸羧基酶 (PCK1) 是催化糖异生第一步的限速酶, 研究表明 PCK1 的转录水平与血糖控制、糖尿病的发生发展有密切关系。糖尿病 db/db 小鼠转染表达 PCK1 RNAi 腺病毒后, 动物体内 PCK1 的 mRNA 水平降低, 极大改善了高血糖和高胰岛素血症^[6]。叉头转录因子 (forkhead transcription factor O, FOXO) 是一类核转录因子家

基金项目: 国家自然科学基金 (30800044), 江苏省自然科学基金 (BK2008441), 病毒学国家重点实验室开放课题 (2010008)

* 通信作者。Tel: +86-25-86862729; E-mail: wqian@njmu.edu.cn

作者简介: 陈继征 (1987 -), 男, 河北邯郸人, 博士研究生, 研究方向为分子病毒学。E-mail: chenjizheng2005@sina.com.cn

收稿日期: 2011-10-08; **修回日期:** 2011-11-09

族,其中 FOXO1 是胰岛素活性的重要靶点。FOXO1 表达紊乱可以损伤胰岛素调节肝脏糖脂代谢的能力。研究表明与野生型小鼠相比,FOXO1 转基因小鼠的肝脏糖异生相关基因表达水平升高^[7]。

关于 HCV 感染和 2 型糖尿病相关性的最初解释是肝硬化引起胰岛素抵抗。然而,HCV 肝硬化患者中 2 型糖尿病发生率比 HBV 肝硬化患者的高得多。这说明 HCV 感染本身可能是导致胰岛素抵抗以及引发糖尿病的独立危险因素^[8]。关于 HCV 感染导致胰岛素抵抗的一个重要假说就是 HCV 通过干扰靶组织胰岛素信号通路引起胰岛素抵抗,而 HCV 的核心蛋白 (CORE) 在这个过程中发挥了重要作用^[9]。

HCV 是一有包膜的单股正链 RNA 病毒,编码一多聚蛋白前体,在宿主和病毒编码的蛋白酶的作用下,裂解为成熟的结构蛋白和非结构蛋白。CORE 是多聚蛋白的第一个蛋白,是构成病毒粒子的重要成分,在调控病毒本身以及病毒与宿主细胞相互作用中发挥关键作用^[10]。体外研究发现 HCV CORE 通过提高 TNF α 或其他炎症因子的水平影响胰岛素受体底物-1 (IRS-1) 酪氨酸磷酸化,从而抑制胰岛素信号通路并引起胰岛素抵抗^[11]。因此,HCV CORE 在 HCV 感染相关的胰岛素抵抗中发挥了关键作用。但是关于 HCV CORE 调控 PCK1,诱导肝脏过度糖异生,导致 2 型糖尿病发生的分子机制尚不清楚。

本实验通过构建稳定表达 HCV CORE 的细胞系,应用 Real-time PCR 和萤光素酶报告基因共转染瞬时表达系统,研究了 HCV CORE 在 Huh7- Δ unet 细胞中的稳定表达对 PCK1 转录水平的影响,并分析了 HCV CORE 调控 PCK1 转录的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、抗体:大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞由本实验室用 CaCl₂法自行制备。pGEMT easy 载体以及 pCDNA3 质粒购自 Invitrogen, pGL3-Basic Vector, pRL-TK 购自 Promega; FOXO1-3 \times IRS 萤光素酶报告质粒 (含有 3 个 FOXO1 结合位点) 以及 FOXO1-6 \times DBE 萤光素酶报告质粒 (含有 6 个 FOXO1 结合位点) 为本实验室保存;反转录病毒表

达系统包括质粒 pFB-Neo, pVPack-GP 和 pVPack-10A1 购自 Agilent 公司。含 HCV 全长基因组序列的质粒 p90/HCV FL-Long pU 为本实验室保存。CORE 抗体为本实验室保存, Thr²⁴-phosphorylated FOXO1, FOXO1, β -actin 抗体购自 Cell signaling。

1.1.2 病毒和细胞:腺病毒 Ade-eGFP 和 Ade-FOXO1-ADA [表达持续活化形式的 FOXO1 (CA-FOXO1:ADA)] 为本实验室构建。人肝癌细胞系 Huh7- Δ unet 细胞 (本实验室保存) 用含 10% 胎牛血清 (GIBCO/BRL 公司) 的 DMEM 培养基 (GIBCO/BRL 公司) 培养。

1.1.3 引物:参考 NCBI 的 GenBank 数据库中的相关序列,应用 Oligo 6.0 软件,设计检测用引物 (表 1)。所有引物均由上海英骏生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 RNA 提取和反转录

接种于 35 mm 细胞皿贴壁培养的 Huh7- Δ unet 细胞用 PBS (PH 7.4) 洗 2 遍后,加入 1 mL Trizol (Invitrogen) 试剂。按照一步法提取细胞总 RNA,具体操作见 Trizol 说明书。用紫外分光光度计进行 RNA 定量及纯度分析,取 1 μ g 总 RNA,用 AMV (Promega) 反转录试剂盒进行反转录,具体方法见说明书。

表 1 扩增 HCV core, pck1, foxo1, actin 基因片段以及 pck1, foxo1 启动子的引物

Table 1 Primers of PCR to amplify partial genes of core, pck1, foxo1, actin and promoters of pck1, foxo1

Gene/Promoter	Primers (5' - 3')
core	F: GGGAATTC (EcoRI) ATGAGCACGAATCCTAAAC R: GCCTCGAG (XhoI) TTAGGCTGAAGCGGGCACAG
pPCK1	F: GACTCGAG (XhoI) ACAGTGATTAGCCCCAGTTA R: GAAAGCTT (HindIII) AACGCAAGCGTCTCGAACAA
pFOXO1	F: GACTCGAG (XhoI) CGCCGGCGCCTCCACGTGGTT R: ACCCAAGCTT (HindIII) GACGCCGGGGCCGCTTGCTCT
actin	F: GAAATCGTGCCTGACATTA R: AAGGAAGGCTGGAAGAGTG
pck1	F: CATAAAGCAAATCATCATGCA R: TTGCCGAAGTTGTAGCCAAA
foxo1	F: TGGTCAAGAGCGTGCCTACT R: CCCGCTCTFGCCACCCTCTG
pgc-1	F: TTGCCCCAGATCTTCCTGAAC R: ATGAGGGCAATCCGTCTTC

1.3 稳定表达 HCV CORE 细胞系的构建

在 GenBank 中查找 core 基因序列,设计引物,

以 p90/HCV FL-Long pU 质粒为模板, 通过 PCR 扩增出 *core* (573 bp) 片段, 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 连接入 pGEMT easy 载体后, 用 *EcoRI* 酶切鉴定阳性克隆。将测序正确的克隆载体用 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切, 回收目的片段, 与经相同酶切处理的 pFB-Neo 连接, 构建成真核表达重组质粒 pFB-Neo-*core*。取对数生长期的 Huh7-*lunet* 细胞接种于 6 孔板内, 待细胞 60% - 70% 融合, 取 4 μg 质粒 (pFB-Neo-*core*, pVPack-GP, pVPack-10A1) 用脂质体 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 进行共转染, 具体操作按 Invitrogen 操作手册。转染 72 h 后, 收集细胞培养上清即重组病毒, 重新感染 Huh7-*lunet* 细胞, 48 h 后加入 G418 (终浓度 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 进行抗性筛选, 每 24 h 换液 1 次, 连续筛选 10 - 14 d。

1.4 重组萤光素酶报告基因质粒的构建

在 NCBI 的 GenBank 数据库中查找 PCK1, FOXO1 启动子序列, 并用 Oligo 6.0 软件设计引物 (表 1), 以 Huh7-*lunet* 细胞经逆转录获得的 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增出 PCK1 (780 bp), FOXO1 (428 bp) 启动子, 鉴定正确后, 与经相同 *Xho I* 和 *Hind III* 酶切处理的 pGL3-Basic 连接, 构建成真核萤光素酶报告基因质粒 pGL3-PCK1、pGL3-FOXO1。

1.5 Western blot 检测

待检测细胞用冰预冷的 PBS 洗 2 次, 加入冰预冷的蛋白裂解液 (碧云天)。用刮刀将细胞从培养皿或孔板中刮落, 收集于离心管中, 置于冰上裂解 20 min 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 $\times g$ 离心 10 min, 收集蛋白上清液用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定浓度。将煮沸变性的蛋白样品按 20 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 经 10% SDS-PAGE 分离后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、250 mA 转膜 2 h, 用 5% 脱脂牛奶封闭, 先后加入用含有 2% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液稀释的一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用 TBST 室温洗膜后, 用辣根过氧化物酶标记的二抗 (羊抗兔或羊抗鼠根据一抗的来源而定) 孵育 1 h; 用 TBST 室温洗膜 3 次, 以 ECL 法 (PIERCE) 按照说明书显示阳性条带, 曝光并显影。

1.6 Real-time PCR 检测

转染 24 h 后的细胞 (12 孔培养板培养) 提取 RNA 经逆转录后, 取 1 μL 反转录反应产物 cDNA 为模板, 用 2 \times SYBR GREEN PCR Master Mix (ABI) 对相应细胞的 PCK1, FOXO1 和 β -ACTIN 的 mRNA 水平进行相对定量检测。引物见表 1, 反应体系见说

明书, 反应在 ABI 7000 型定量 PCR 仪上进行, 反应条件如下: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 1 min 重复第 2-4 步, 总共 40 个循环。每次实验设 3 个平行孔, 重复 3 次。

1.7 瞬时转染和萤光素酶报告基因实验

接种 Huh7-*lunet-core* 细胞于 24 孔板中, 细胞贴壁后 (24 h 内), 取 1.6 μg 质粒 (pGL3-PCK1、pGL3-FOXO1、FOXO1-3 \times IRS、FOXO1-6 \times DBE 分别与内参照载体 pRL-TK 以 50 : 1 混合) 用脂质体 Lipofectamine 2000 进行转染。萤光素酶活性的检出按双萤光素酶报告基因检测系统 (Promega) 操作说明书进行: 细胞转染 24 h 后弃培养基, 用 PBS 漂洗细胞, 加 1 \times 被动裂解缓冲液 (Passive Lysis Buffer), 24 孔板约 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。室温轻轻摇动裂解 15 min, 转移入 1.5 mL 离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 $\times g$ 离心 2 min, 取 10 μL 上清, 加入 50 μL 萤火虫萤光素酶底物 LAR II, 涡旋震荡混匀后用 TD-20/20 luminometer (Turner BioSystems) 读值。随后向检测管中加入 50 μL 海肾萤光素酶底物 Stop&Glo Reagent, 再次读值获得样品萤光素酶活性。每次实验设 3 个平行孔, 重复 3 次。

2 结果

2.1 稳定表达 HCV CORE 的 Huh7-*lunet* 细胞系的构建

以 p90/HCV FL-Long pU 质粒为模板, 用表 1 中相应引物扩增出 HCV *core* 的序列片段, 5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定目的片段大小正确后连入 pGEMT easy 载体, 测序结果表明所扩增片段的序列没有突变。从 T 载体切下目的片段并连接到 pFB-Neo 载体上, 构建重组质粒 pFB-Neo-*core* (图 1-A)。将重组质粒 pFB-Neo-*core*、pVPack-GP, pVPack-10A1 共转染 Huh7-*lunet* 后获得的重组病毒感染细胞, 经 G418 持续筛选后, 获得 Huh7-*lunet-core* 细胞系。为证实 HCV CORE 稳定表达体系建立成功, 提取细胞总蛋白, 经 Western blot 鉴定, 如图 1-B 所示, Huh7-*lunet-core* 细胞中可以检测到 HCV CORE 的表达 (21 kDa)。

2.2 HCV CORE 对 PCK1 转录水平的影响

为了验证 PCK1 在稳定表达 HCV CORE 的细胞系中转录水平的变化, 我们首先采用 Real-time PCR

定量检测, 结果显示, Huh7-lunet-core 细胞中的 PCK1 转录水平与对照相比增加了约 4 倍 (图 2-A)。为进一步确定 HCV CORE 对 PCK1 转录水平的影响, 我们构建了含有 PCK1 启动子的萤光素酶报告基因载体 pGL3-pck1。与 pRL-TK 共转染 Huh7-

lunet-core 细胞后, 测定萤光素酶的活性。与 Huh7-lunet 细胞相比, HCV CORE 的稳定表达可显著增强 PCK1 启动子的活性 (图 2-B)。以上结果说明, 在 Huh7-lunet 细胞中稳定表达的 HCV CORE 可显著增加 PCK1 的转录水平。

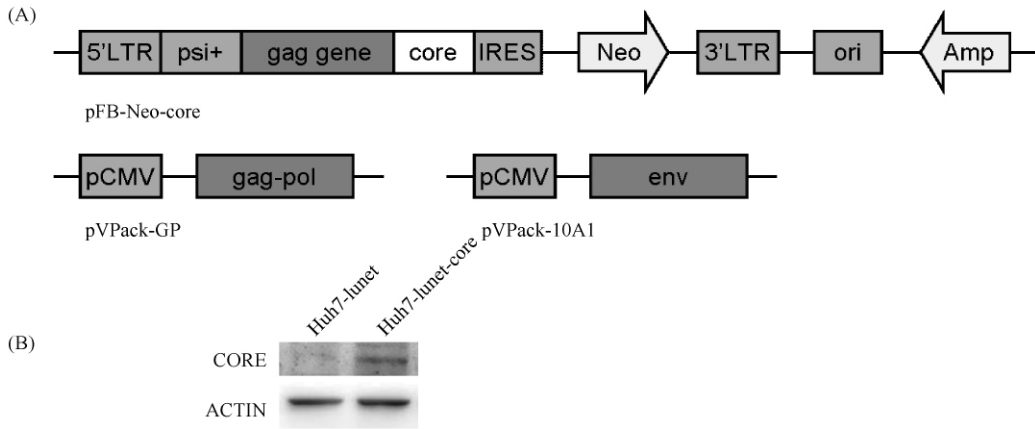


图 1 稳定表达 HCV CORE 的 Huh7-lunet 细胞系的构建

Fig. 1 Construction of cell line Huh7-lunet-core. A: pFB-Neo-core, pVPack-GP and pVPack-10A1 vector diagram; B. Identification of CORE expression by Western-blot.

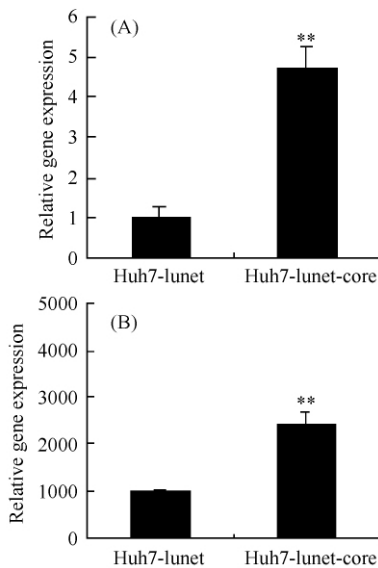


图 2 HCV CORE 对 PCK1 转录水平的影响

Fig. 2 HCV CORE increased the mRNA level of PCK1. A: Real-time PCR assay; B: Luciferase assay; **, significant ($P < 0.01$) differences between groups.

2.3 转录因子 FOXO1 对 PCK1 转录的影响

胰岛素抵抗时, 转录因子 FOXO1 的活化直接导致肝脏糖异生的增加, 为了进一步证明在 Huh7-lunet 细胞中, FOXO1 确实参与了对 PCK1 的调控, 我们用表达持续活化形式 FOXO1 的重组腺病毒

Ade-FOXO1-ADA 感染细胞, 如图 3-A 所示, ADA 在 Huh7-lunet 细胞中的转录显著增加。Real-time PCR 结果显示在 Ade-FOXO1-ADA 感染的细胞中 PCK1 转录水平与对照 Ade-eGFP 感染的细胞相比增加了约 2 倍 (图 3-B)。因此在 Huh7-lunet 细胞中 FOXO1

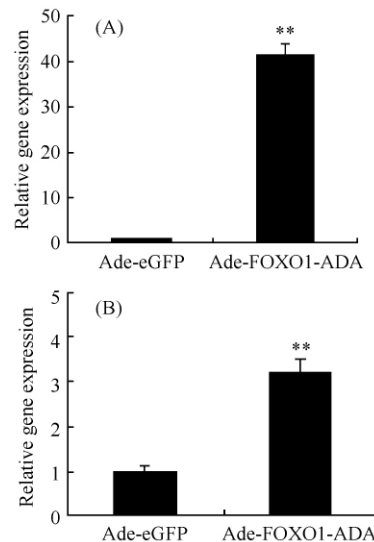


图 3 转录因子 FOXO1 对 PCK1 转录的影响

Fig. 3 Activated FOXO1 increased the mRNA level of PCK1 in Huh7-lunet cells. Real-time PCR assay of FOXO1 (A) and PCK1 (B) in Ade-FOXO1-ADA and Ade-eGFP infected Huh7-lunet cells; **, significant ($P < 0.01$) differences between groups.

参与调控 PCK1 转录,其活化可以显著增强 PCK1 的转录水平。

2.4 HCV CORE 对 FOXO1 转录表达的影响

为了探讨 FOXO1 在 HCV CORE 调控 PCK1 中的作用,我们检测了 HCV CORE 对 FOXO1 转录水平的影响。Real-time PCR 结果显示 HCV CORE 对 FOXO1 的转录水平无影响(图 4-A)。进一步构建

含有 FOXO1 启动子的萤光素酶报告基因载体 pGL3-foxo1。与 pRL-TK 共转染 Huh7-lunet-core 细胞后,采用萤光素酶报告基因法检测同样显示 HCV CORE 的稳定表达对 FOXO1 的转录没有影响(图 4-B)。接下来,我们检测了 HCV CORE 对 FOXO1 蛋白水平的影响,Western blot 分析显示 FOXO1 的总蛋白水平也没有明显变化(图 4-C)。

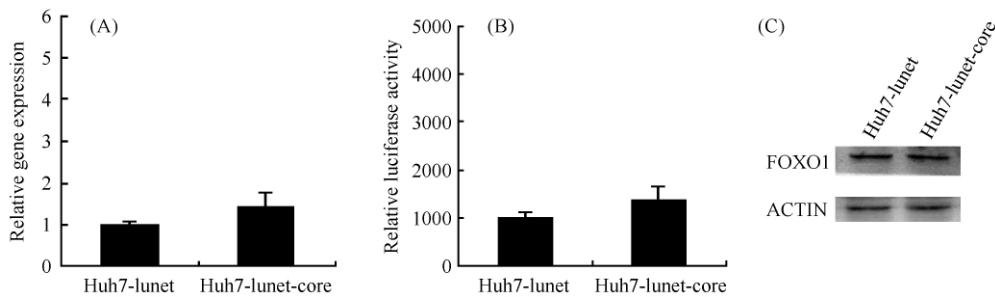


图 4 HCV CORE 对 FOXO1 转录表达的影响

Fig.4 HCV CORE had no effect on the expression of FOXO1 in Huh7-lunet cells. A: Real-time PCR assay; B: Luciferase assay; C: Western blot assay.

2.5 HCV CORE 对 FOXO1 活性的影响

FOXO1 的去磷酸化将引起其入核,进而调控其靶基因的转录。HCV CORE 的表达显著降低 Huh7-lunet 细胞 FOXO1 蛋白的 Thr24 磷酸化水平(图 5-A)。既然 HCV CORE 能够降低 FOXO1 的磷酸化水平,那么 HCV CORE 应该能够上调细胞中 FOXO1 的转录激活活性。接下来,我们用瞬时转染和萤光素酶报告基因的方法对此进行了检测。分别用

FOXO1-3 × IRS 以及 FOXO1-6 × DBE 萤光素酶报告基因质粒和 pRL-TK 质粒共转染 Huh7-lunet-core 细胞,24 h 后进行萤光素酶活性检测。如图 5-B、C 所示,HCV CORE 可以显著增加 FOXO1 的转录活性。以上结果说明,Huh7-lunet-core 细胞中,HCV CORE 的稳定表达可以通过激活 FOXO1 的转录活性上调 PCK1 的转录水平。

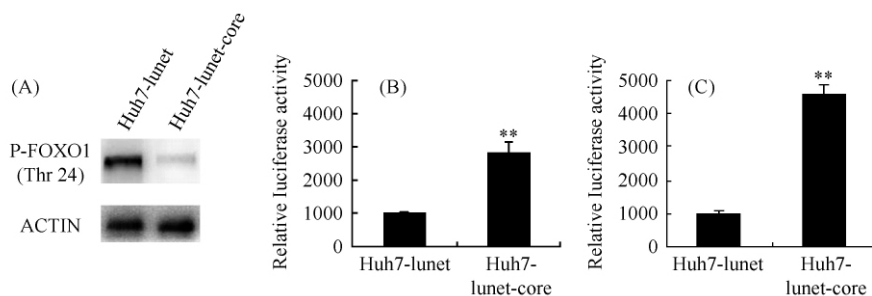


图 5 HCV CORE 对 FOXO1 活性的影响

Fig.5 HCV CORE activated the expression of FOXO1 in Huh7-lunet cells. A: Western blot assay; B: Luciferase assay of FOXO1-3 × IRS; C: Luciferase assay of FOXO1-6 × DBE; **, significant ($P < 0.01$) differences between groups.

2.6 HCV CORE 对 PGC-1 α 转录水平的影响

过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 辅助激活因子-1 α (PPAR γ -coactivator-1 α , PGC-1 α) 是一种多功能的转录调节辅激活因子,具有与多种核转录因子

包括 FOXO1 的结合位点,与糖异生有着密切关系。为了确定 PGC-1 α 在 HCV CORE 调控 FOXO1 介导的 PCK1 转录水平过程中的影响,我们采用 Real-time PCR 定量检测 PGC-1 α 的转录水平变化,结果

显示, Huh7-lunet-core 细胞中的 PGC-1 α 转录水平与对照相比增加了约 1 倍(图 6)。

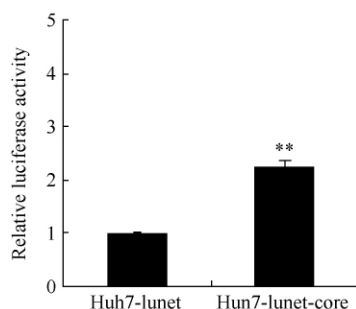


图 6 HCV CORE 对 PGC-1 α 转录水平的影响

Fig. 6 HCV CORE increased the mRNA level of PGC-1 α . Real-time PCR assay; **, significant ($P < 0.01$) differences between groups.

3 讨论

2 型糖尿病是由胰岛素抵抗和胰岛素分泌相对不足造成的全身性代谢紊乱综合症,其发病过程是糖耐量调节受损的渐进过程,大量的临床数据显示 HCV 的持续感染与 2 型糖尿病的发生发展相关^[3]。目前, HCV 感染通过引起靶组织的胰岛素抵抗导致 2 型糖尿病的发生发展已经得到初步证实,因此进一步分析病毒蛋白对胰岛素抵抗的影响,将有利于阐明病毒致糖尿病的机理。肝脏糖异生功能紊乱,肝糖输出增多是胰岛素抵抗发生的主要环节,肝脏糖异生作用主要通过胰岛素和胰高血糖素的相互拮抗调节维持正常的血糖水平。这些调节与编码糖异生途径限速酶的基因表达有关。其转录的多少,决定着糖异生的速度^[5]。因而对糖异生限速酶的转录调控分析是研究中关注的重点。本研究主要分析了 HCV CORE 蛋白的稳定表达对糖异生限速酶 PCK1 转录水平变化的影响及调控转录水平变化的分子机制。

CORE 作为 HCV 编码的结构蛋白,除具有组装病毒颗粒的功能外,还可与宿主细胞内多种蛋白质发生相互作用,参与宿主细胞的基因表达、生长、增殖与凋亡的调控,研究表明 CORE 对宿主细胞内基因表达的调节是致病的主要机理^[10]。Banerjee 等发现 HCV CORE 可以抑制 Huh-7 细胞胰岛素信号通路并引起胰岛素抵抗,增加肝糖输出^[12],我们的结果与此吻合,在 Huh7-lunet 细胞中稳定表达的 HCV CORE 可以显著上调细胞中 PCK1 的转录水

平,表明 HCV CORE 可能通过上调 PCK1 的转录水平,导致过度糖异生,从而导致了胰岛素抵抗的发生。

研究表明 PCK1 启动子上存在多个转录因子 FOXO1 的结合位点,并且转录因子 FOXO1 在 PCK1 转录中具有主要作用^[13]。与此一致,在 Huh7-lunet 细胞中,我们通过采用含持续活化 FOXO1 的腺病毒的感染实验也同样证实了 FOXO1 对 PCK1 的转录调控。

FOXO1 具有高度保守的磷酸化位点,是 PI3K/Akt 信号通路下游的关键分子,FOXO1 活性受翻译后修饰(包括磷酸化和乙酰化)调节。磷酸化的 FOXO1,通过与 14-3-3 蛋白的相互作用,从核内转移至胞质中,使 FOXO1 不能作用于其靶向基因,从而使其丧失了转录因子活性^[14]。研究发现 HCV CORE 可以与 14-3-3 蛋白结合并且在调控 FOXO1 中发挥作用^[15],Banerjee 等发现 HCV CORE 还可以调控 Akt 的磷酸化水平抑制其活性^[12],在我们的实验中磷酸化分析和转录活性分析均显示 HCV CORE 可以使 FOXO1 去磷酸化并增强其转录活性,我们推测在 Huh7-lunet 细胞中稳定表达的 HCV CORE 可能一方面通过与 14-3-3 蛋白结合,另一方面通过抑制 Akt 的活性,激活 FOXO1,进而参与到对 PCK1 的转录调节中。

PGC-1 α 是一种可以介导多种细胞能量代谢的核受体辅助激活因子,在脂肪和肌肉组织产热、葡萄糖代谢、脂肪酸氧化、线粒体生物合成等方面都起重要作用。PGC-1 α 虽然对糖异生基因如 PCK1、G6Pase 无直接的调节作用,但是研究证明它作为一种辅助激活因子,可与相关转录因子如糖皮质激素受体、FOXO1 结合,间接调节糖异生^[16]。生理条件下,PGC-1 α 促进肝糖异生,维持内环境稳定,发生糖尿病时 PGC-1 α 的大量激活导致不受反馈抑制的肝糖异生,诱发肝内胰岛素抵抗。结果显示 HCV CORE 可以上调 PGC-1 α 的转录水平,推测 PGC-1 α 与 FOXO1 协同作用调控 HCV CORE 诱导的 PCK1 转录增加。此外,我们在用 cDNA 芯片分析 HCV JFH1 株感染的 Huh 7.5.1 细胞与未感染细胞的差异表达基因时,也同样发现 PGC-1 α 的高表达(结果未显示)。

综合分析以上结果, HCV CORE 在 Huh7-lunet 细胞中的稳定表达激活 FOXO1 的转录活性,并与

PGC-1 α 协同作用,上调 PCK1 的转录,从而导致肝糖异生过度发生,最终诱导肝内胰岛素抵抗(图 7)。因此,HCV CORE 可能通过这条途径诱导或促进 2

型糖尿病发生发展,这为 HCV 感染致 2 型糖尿病机理的探讨提供新的思路,并且也有可能为 HCV 感染相关的糖尿病的治疗提供新的治疗靶点。

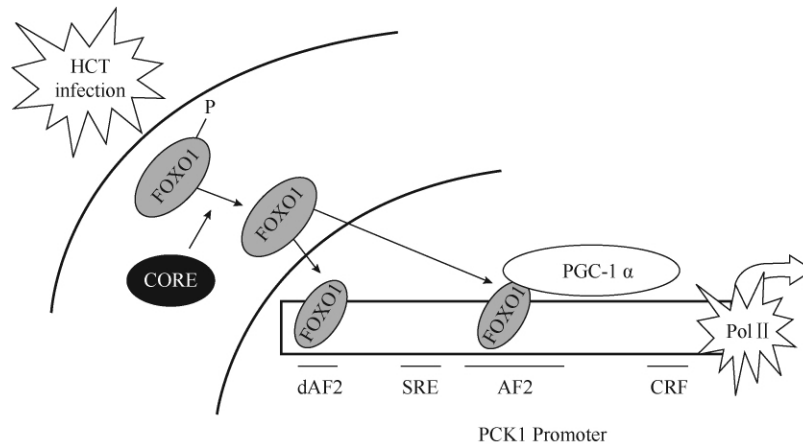


图 7 HCV CORE 调控 PCK1 转录的分子机制示意图

Fig.7 Schematic presentation of the signaling pathway induced by HCV CORE for over expressed PCK1.

参考文献

- [1] Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease*, 2004, 24 (Suppl 2) :3-8.
- [2] Galossi A, Guarisco R, Bellis L, Puoti C. Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 2007, 16 (1) :65-73.
- [3] Skowronski M, Zozulinska D, Juszczak J, Wierusz-Wysocka B. Hepatitis C virus infection: evidence for an association with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2006, 29(3) :750; author reply 751.
- [4] Groop L. Pathogenesis of type 2 diabetes: the relative contribution of insulin resistance and impaired insulin secretion. *International Journal of Clinical Practice*, 2000 (113) :3-13.
- [5] Kashiwagi A. Rationale and hurdles of inhibitors of hepatic gluconeogenesis in treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Research Clinical Practice*, 1995, 28 (Suppl) : S195-200.
- [6] Cadoudal T, Fouque F, Benelli C, Forest C. Glyceroneogenesis and PEPCK-C: pharmacological targets in type 2 diabetes. *Medicine Science (Paris)*, 2008, 24(4) :407-413.
- [7] Matsumoto M, Pocai A, Rossetti L, Depinho RA, Accili D. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo 1 in liver. *Cell Metablism*, 2007, 6(3) :208-216.
- [8] Balik I, Yilmaz N, Turkcapan N, Yasa H. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 1999, 30(2) :584.
- [9] Ratziu V, Heurtier A, Bonyhay L, Poynard T, Giral P. Review article: an unexpected virus-host interaction—the hepatitis C virus-diabetes link. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2005, 22 (Suppl 2) : 56-60.
- [10] Roingeard P, Hourieux C. Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *Journal of Viral Hepatitis*, 2008, 15(3) :157-164.
- [11] Aytug S, Reich D, Sapiro LE, Bernstein D, Begum N. Impaired IRS-1/PI3-kinase signaling in patients with HCV: a mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes. *Hepatology*, 2003, 38(6) :1384-1392.
- [12] Banerjee S, Saito K, Ait-Goughoulte M, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein upregulates serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs the downstream akt/protein kinase B signaling pathway for insulin resistance. *Journal of Virology*, 2008, 82(6) :2606-2612.
- [13] Sekine K, Chen YR, Kojima N, Ogata K, Fukamizu A, Miyajima A. Foxo1 links insulin signaling to C/EBPalpha and regulates gluconeogenesis during liver development. *Embo Journal*, 2007, 26(15) :3607-3615.

- [14] Zhao X, Gan L, Pan H, Kan D, Majeski M, Adam SA, Unterman TG. Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *Biochemistry Journal*, 2004, 378 (Pt 3): 839-849.
- [15] Lee SK, Park SO, Joe CO, Kim YS. Interaction of HCV core protein with 14-3-3epsilon protein releases Bax to activate apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 352 (3): 756-762.
- [16] Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*, 2003, 423 (6939): 550-555.

Hepatitis C virus core protein upregulates the transcription of PCK1 through FOXO1/PGC-1 α pathway

Jizheng Chen^{1,2}, Qian Wang^{1*}, Song Xu²

¹Key Laboratory of Human Functional Genomics of Jiangsu Province, School of Basic Medical Science, Nanjing Medical University, Nanjing 210093, China

²State Key Lab of Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China

Abstract: [Objective] We analyzed the effect of the stable expressed Hepatitis C virus core protein on PCK1 mRNA expression level and the molecular mechanisms involved in Huh7-lunet cells. [Methods] A retroviral vector mediated mammalian cell expression cell line of the HCV core protein was constructed. The mRNA and protein levels of PCK1, FOXO1 and PGC-1 α were analyzed by Real-time PCR and luciferase assay in Huh7-lunet-core cells. [Results] HCV CORE upregulated the mRNA levels of PCK1 significantly. Both the mRNA and protein levels of FOXO1 were not affected in Huh7-lunet-core cells, whereas a decreased phosphorylation status of FOXO1 was exhibited. Moreover, activation of FOXO1 by HCV CORE was detected. Further, the mRNA level of PGC-1 α was found to be significantly elevated in Huh7-lunet-core cells. [Conclusion] Our results revealed for the first time that HCV core protein expression-mediated FOXO1 activation and the increased PGC-1 α led to the elevation of PCK1 at the mRNA level, which suggesting the immoderate gluconeogenesis in HCV-infected hepatocytes. Our findings contributed to the understanding of the molecular mechanisms of HCV-related insulin resistance and provided potential new clues for the prevention and therapy of diabetes.

Keywords: HCV, CORE, Type 2 diabetes, Insulin resistance, PCK1, Gluconeogenesis, FOXO1, PGC-1 α

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30800044), by the Natural Science Foundations of Jiangsu Province (BK2008441) and by the Open Research Fund Program of the State Key Laboratory of Virology (2010008)

* Corresponding author. Tel: +86-25-86862729; E-mail: wqian@njmu.edu.cn

Received: 8 October 2011/Revised: 9 November 2011