

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.04.011

· 基础研究 ·

## 乙肝病毒 X 蛋白对不同肝细胞系凋亡的诱导作用

杨倩, 邓志华, 贺丹丹(山西医科大学第二附属医院 消化内科, 山西 太原 030001)

**[摘要]** **目的:** 研究乙型肝炎病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X protein, HBX)通过核转录因子 NF- $\kappa$ B 信号通路对不同肝细胞系凋亡的诱导作用。**方法:** 建立稳定转染 PEGFP-N1-HBX 质粒的人正常肝细胞系 L02(L02/HBX)和人肝癌细胞系 HepG2(HepG2/HBX),用特异性 NF- $\kappa$ B 阻断剂吡咯二硫代氨基甲酸酯(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)阻断 NF- $\kappa$ B 信号通路,流式细胞术检测 PEGFP-N1-HBX 转染前后及加入 PDTC 前后 L02 和 HepG2 细胞的细胞周期与凋亡,Western blotting 检测 NF- $\kappa$ B 的表达。**结果:** 成功构建了稳定转染 PEGFP-N1-HBX 的 L02/HBX 和 HepG2/HBX 细胞。与对照组 L02 细胞相比,L02/HBX 细胞凋亡率明显增加[(31.31 ± 0.51)% vs (14.05 ± 0.09)%,  $P < 0.05$ ];其 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例显著增加,S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例减少。与对照组 HepG2 细胞相比,HepG2/HBX 细胞凋亡率显著降低[(1.21 ± 0.04)% vs (10.26 ± 0.10)%,  $P < 0.05$ ];其 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例显著减少,S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例增加。PDTC 作用后,L02/HBX/PDTC 组凋亡率[(40.33 ± 0.07)%]及 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例较 L02/HBX 组显著增加,G<sub>2</sub>/M 期细胞比例明显减少,而 HepG2/HBX/PDTC 组凋亡率[(5.45 ± 0.07)%]及 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例较 HepG2/HBX 组显著增加,S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例明显减少,但其凋亡率仍低于对照 HepG2 细胞。Western blotting 结果显示,L02/HBX 细胞 NF- $\kappa$ B 表达显著下调,而 HepG2/HBX 细胞 NF- $\kappa$ B 表达显著增加,L02/HBX/PDTC 和 HepG2/HBX/PDTC 细胞 NF- $\kappa$ B 几乎不表达。**结论:** HBX 可下调正常肝细胞 L02 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达,阻滞细胞周期,促进细胞凋亡;而 HBX 可增加肝癌细胞系 HepG2 中 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达,加速细胞周期,抑制肝癌细胞凋亡。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒 X 蛋白;细胞周期;凋亡;NF- $\kappa$ B

**[中图分类号]** R735.7; R730.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)04-0402-06

## Apoptotic induction effect of hepatitis B virus X protein on different hepatocyte lines

YANG Qian, DENG Zhi-hua, HE Dan-dan (Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of NF- $\kappa$ B signaling pathway for hepatitis B virus X protein (HBX) on the apoptosis of different hepatocyte lines. **Methods:** To establish the normal hepatic cell L02 and hepatic cancer cell HepG2 stably transfected with PEGFP-N1-HBX plasmid (L02/HBX or HepG2/HBX cells). NF- $\kappa$ B signaling pathway inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) was used to cut off NF- $\kappa$ B signal transduction in L02 and HepG2 cells. Flow cytometry was applied to study the cell cycle and apoptosis of L02 and HepG2 cells before and after PEGFP-N1-HBX transfection as well as before and after PDTC treatment. Western blotting was used to examine the expression of NF- $\kappa$ B. **Results:** L02/HBX cells and HepG2/HBX cells stably transfected with PEGFP-N1-HBX were established successfully. The apoptosis of L02/HBX cells significantly increased compared with the control L02 cells [(31.31 ± 0.51)% vs (14.05 ± 0.09)%,  $P < 0.05$ ], and the proportion of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> stage increased with cells in S and G<sub>2</sub>/M stage decreased. The apoptosis of HepG2/HBX cells significantly decreased compared with the control HepG2 cells [(1.21 ± 0.04)% vs (10.26 ± 0.10)%,  $P < 0.05$ ], and the proportion of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> stage decreased with cells in S and G<sub>2</sub>/M stage increased. After PDTC treatment, the proportion of L02/HBX/PDTC cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase increased significantly [(40.33 ± 0.07)%], while that in S and G<sub>2</sub>/M phase decreased remarkably, and the apoptosis rate [(5.45 ± 0.07)%] was at a significantly higher level compared with L02/HBX cells. The apoptosis and the proportion of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of HepG2/HBX/PDTC were in-

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 30672405)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30672405)

**[作者简介]** 杨倩(1987-),女,河南省信阳市人,硕士生,主要从事肝癌基因治疗的研究。E-mail: yangqian20050105@163.com

**[通信作者]** 邓志华(DENG Zhi-hua, corresponding author), E-mail: ykdzh@yahoo.com.cn

creased significantly, and decreased remarkably in S and G<sub>2</sub>/M phase, while the apoptosis rate was still lower than the HepG2 cells. The expression of NF- $\kappa$ B protein was significantly decreased in L02/HBX cells but increased in HepG2/HBX cells compared with the control cells. There was almost no expression of NF- $\kappa$ B protein in L02/HBX/PDTC and HepG2/HBX/PDTC cells. **Conclusion:** HBX can retard the cell cycle of normal hepatic L02 cells and facilitate their apoptosis through down-regulating the expression of NF- $\kappa$ B protein. HBX can accelerate the cell cycle of hepatic cancer HepG2 cells and suppress the apoptosis through up-regulating the expression of NF- $\kappa$ B protein.

[ **Key words** ] hepatitis B virus X protein; cell cycle; apoptosis; NF- $\kappa$ B

[ Chin J Cancer Biother, 2012, 19(4): 402-407 ]

乙型肝炎病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X protein, HBX)是一种多功能蛋白,可通过反式激活机制参与调控细胞周期和信号转导,进而调节细胞增殖与凋亡,在乙肝病毒相关肝癌的发生、发展过程中起着重要作用。NF- $\kappa$ B 是一类功能广泛的转录因子,可通过对下游抗凋亡基因的调控,对癌细胞的正常程序化死亡产生抑制作用<sup>[1]</sup>。近年来研究<sup>[2]</sup>表明,HBX 能通过诱导 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活调节细胞凋亡。为此,本研究探讨 HBX 对不同肝细胞株凋亡的影响及其机制,为肝癌的治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和主要材料

重组 PEGFP-N1-HBX 质粒由山西医科大学微生物学与免疫学教研室保存,人正常肝细胞 L02 购自中科院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所,人肝癌细胞 HepG2 为本实验室保存。L02 细胞使用体积分数为 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, HepG2 细胞使用体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,两者均置于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub>,饱和湿度的培养箱中培养。脂质体转染剂 Lipofectamine™ 2000、G418 购自 Invitrogen 公司; Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购自 BD 公司;质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司。FACSort 型流式细胞仪购自 BD 公司。

### 1.2 G418 筛选浓度确定实验

将对数生长期的 L02 细胞接种于 24 孔板中, 24 h 后每孔依次加入 G418,将每孔中的 G418 质量浓度稀释至 0、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 000、1 100  $\mu$ g/ml,并调整培养基及血清用量。每 2~3 d 更换一次培养基,每日观察细胞的生长情况,确定细胞在 10~14 d 内全部死亡的最低 G418 质量浓度为最佳筛选浓度,G418 维持浓度为筛选浓度的一半。HepG2 细胞筛选实验同上。

### 1.3 L02 细胞和 HepG2 细胞的转染与筛选

将 L02 细胞接种于 6 孔板中,按照 Lipofectami-

ne™ 2000 脂质体操作说明将质粒和脂质体以 1:2.5 的比例转染 L02 细胞,转染 5 h 后更换含 15% 胎牛血清的培养基,转染 48 h 后将细胞消化,按 1 传 6 比例,培养于 6 孔板中,待细胞贴壁后用含 400 mg/L G418 的培养液筛选阳性克隆,筛选至对照组细胞全部死亡后,实验组存活的细胞团即为阳性克隆,挑取阳性克隆进一步扩大培养,加入含 200 mg/L G418 的培养基维持筛选至传代、备份。HepG2 细胞转染及筛选步骤同上,G418 筛选浓度为 700 mg/L,维持浓度为 350 mg/L,以获取稳定表达 HBX 的转基因细胞株 L02/HBX 和 HepG2/HBX,将空质粒对照组细胞命名为 L02/PEGFP-N1 和 HepG2/PEGFP-N1,正常对照组细胞命名为 L02 和 HepG2。

### 1.4 荧光倒置显微镜观察 L02/HBX 和 HepG2/HBX 细胞中 HBX 的表达

荧光倒置显微镜观察稳定转染 PEGFP-N1-HBX 质粒后 L02/HBX 和 HepG2/HBX 细胞中 EGFP 报告基因的表达,荧光显微镜下 490 nm 紫外波长激发观察稳定转染后细胞内 EGFP 报告基因的表达,分别以 L02/PEGFP-N1、L02 细胞和 HepG2/PEGFP-N1、HepG2 细胞作为对照。

### 1.5 Western blotting 检测稳定转染后细胞中 HBX 蛋白的表达

收集对数生长期细胞,裂解提取细胞总蛋白,测定浓度后,-80 °C 保存备用。取细胞蛋白提取物行 SDS-PAGE 电泳,然后半干转印于 NC 膜上,封闭液室温封闭 1 h,加入鼠抗人单克隆 HBX 第一抗体(1:1 000),4 °C 孵育过夜,以 TBST 振摇洗涤 3 次,每次 5 min,并与相应的二抗孵育 1 h,TBST 快速洗膜 3 次(每次 10 min),ECL 增强化学发光试剂盒检测蛋白的表达。分别以 L02/PEGFP-N1、L02 细胞和 HepG2/PEGFP-N1、HepG2 细胞作为对照。

### 1.6 Western blotting 法检测细胞核中 p65/NF- $\kappa$ B 蛋白的表达水平

将对数生长期的 L02/HBX 和 HepG2/HBX 细胞接种于 24 孔板,待细胞贴壁后加入 PDTC,调整培

培养基及血清用量,使 PDTC 终浓度分别为 5、10、20、30、50  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h 后观察细胞形态,并提取细胞核蛋白,蛋白定量。Western blotting 检测各 PDTC 浓度作用后细胞核内 NF- $\kappa$ B 的量。根据实验结果,20  $\mu\text{mol/L}$  PDTC 作用细胞后,核内 NF- $\kappa$ B 的量最少,故设为 PDTC 最佳作用浓度,并将 PDTC 作用后转染细胞命名为 L02/HBX/PDTC 和 HepG2/HBX/PDTC。

分别收集处于对数生长期的 L02 和 HepG2、L02/HBX 和 HepG2/HBX、L02/HBX/PDTC 和 HepG2/HBX/PDTC 细胞,提取细胞核蛋白(按试剂盒说明书操作),根据蛋白定量结果,行 SDS-PAGE。电转移至硝酸纤维素膜上,封闭液 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 1 h,将一抗(鼠抗人 NF- $\kappa$ B 单克隆抗体)用封闭液稀释 1 000 倍,4  $^{\circ}\text{C}$  反应过夜,应用鼠抗人肌动蛋白抗体( actin )作对照( 1 : 1 000 ),PBST 洗膜。将二抗用 1  $\times$  TBST 稀释 3 000 倍;将洗涤后的一抗反应膜放入二抗工作液中(室温、避光缓慢摇动)作用 1 h, PBST 洗膜。增强型 ECL 试剂盒暗室曝光显影,并采用美国 UVP 分析仪器,对胶片进行扫描和分析。

1.7 流式细胞术检测转染前后及 PDTC 加入前后细胞的细胞周期分布和凋亡

分别收集上述 6 组细胞制成单细胞悬液,加入

乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$  固定过夜,取出离心后 PBS 重悬,300 目尼龙网过滤,加入 10  $\mu\text{g/ml}$  RNase, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min,再加入碘化丙锭避光染色 30 min,流式细胞仪检测细胞周期分布情况。实验重复 3 次。

并分别收集上述 6 组细胞制成单细胞悬液,离心弃去培养液,200 目尼龙膜过滤后,将细胞重悬于 200  $\mu\text{l}$  结合缓冲液中,加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin-V-FITC 和 10  $\mu\text{l}$  PI,轻轻混匀,室温避光染色 15 min,期间规律摇晃几次,最后加入 150  $\mu\text{l}$  结合缓冲液,上机检测细胞凋亡率,重复实验 3 次。

### 1.8 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,多组定量资料比较用方差分析,组间比较用 LSD- $t$  检验,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 L02/HBX 和 HepG2/HBX 细胞中 EGFP 的表达

稳定转染 PEGFP-N1-HBX 质粒后,将 L02 和 HepG2 细胞在倒置荧光显微镜下观察,转染质粒 PEGFP-N1-HBX 和空质粒 PEGFP-N1 的细胞有荧光表达;未转染的细胞未见荧光表达(图 1)。

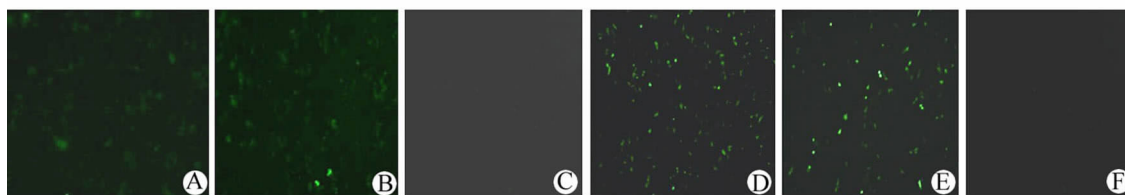


图 1 稳定转染 PEGFP-N1-HBX 质粒后 L02 和 HepG2 细胞中 EGFP 的表达

Fig. 1 Expression of EGFP in L02 and HepG2 cells after stable transfection with PEGFP-N1-HBX plasmid

A: L02/HBX cells (  $\times 200$  ); B: L02/PEGFP-N1 cells (  $\times 200$  ); C: L02 cells (  $\times 200$  ); D: HepG2/HBX cells (  $\times 100$  ); E: HepG2/PEGFP-N1 cells (  $\times 100$  ); F: HepG2 cells (  $\times 100$  )

### 2.2 L02/HBX 和 HepG2/HBX 细胞中 HBX 蛋白的表达

Western blotting 检测结果(图 2)可见,稳定转染 PEGFP-N1-HBX 质粒的 L02 和 HepG2 细胞中有 HBX 蛋白表达,而空质粒及空白对照组则检测不到 HBX 蛋白的条带。此结果证实了 PEGFP-N1-HBX 质粒成功转染 L02 和 HepG2 细胞,表明稳定表达 HBX 的转基因细胞株 L02/HBX 和 HepG2/HBX 构建成功。

### 2.2 L02/HBX 和 HepG2/HBX 细胞核内 NF- $\kappa$ B 的

### 表达水平

结果(图 3)可见,与对照组 L02 细胞相比,L02/HBX 细胞 NF- $\kappa$ B 表达水平明显下降[ ( 0.561  $\pm$  0.018 ) vs ( 1.152  $\pm$  0.009 ),  $P < 0.05$  ]。与对照组 HepG2 细胞相比,HepG2/HBX 细胞 NF- $\kappa$ B 表达水平显著增加[ ( 1.589  $\pm$  0.007 ) vs ( 1.102  $\pm$  0.01 ),  $P < 0.05$  ]。而加入 PDTC 后,L02/HBX/PDTC 和 HepG2/HBX/PDTC 组细胞 NF- $\kappa$ B 表达为( 0.215  $\pm$  0.017 )和( 0.187  $\pm$  0.003 ),几乎不表达。由此表明,HBX 稳定转染可下调正常肝 L02 细胞中 NF- $\kappa$ B

蛋白的表达,而增加肝癌 HepG2 中细胞 NF-κB 蛋白的表达,发挥调节细胞凋亡的作用。

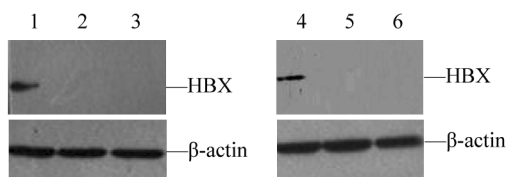


图 2 转染 PEGFP-N1-HBX 质粒后 L02 和 HepG2 细胞中 HBX 蛋白的表达

Fig. 2 Expression of HBX protein in L02 and HepG2 cells stably transfected with PEGFP-N1-HBX plasmid

- 1: L02/HBX cells; 2: L02/PEGFP-N1 cells;
- 3: L02 cells; 4: HepG2/HBX cells;
- 5: HepG2/PEGFP-N1 cells; 6: HepG2 cells

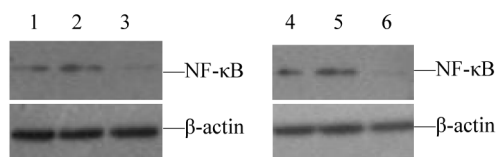


图 3 PEGFP-N1-HBX 转染前后及 PDTC 加入前后 L02 和 HepG2 细胞中 NF-κB 的表达

Fig. 3 Expression of NF-κB before and after PEGFP-N1-HBX transfection as well as before and after PDTC treatment

- 1: L02 cells; 2: L02/HBX cells; 3: L02 /HBX/PDTC cells;
- 4: HepG2 cells; 5: HepG2/HBX cells;
- 6: HepG2/HBX/PDTC cells

### 2.3 稳定转染 PEGFP-N1-HBX 质粒对 L02 和 HepG2 细胞周期分布的影响

法流式细胞术检测发现,与对照组 L02 细胞相比,L02/HBX 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例显著增加,S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例明显减少,L02/HBX/PDTC 较未加 PDTC 阻断剂组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例显著增加,G<sub>2</sub>/M 期细胞比例减少(P < 0.05,表 1)。

与对照组肝癌 HepG2 细胞相比,HepG2/HBX 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例显著减少,S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例明显增多,HepG2/HBX/PDTC 较未加 PDTC 阻断剂组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例显著增加,但仍低于 HepG2 细胞组;HepG2/HBX/PDTC 组 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例明显减少,但仍高于 HepG2 细胞组(P < 0.05,表 2)。上述研究结果显示,HBX 可阻滞正常肝 L02 细胞细胞周期进程,而加速肝癌 HepG2 细胞的细胞周期进程。

表 1 PEGFP-N1-HBX 转染前后及 PDTC 加入前后 L02 细胞的细胞周期(%, $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Cell cycle of L02 cells before and after PEGFP-N1-HBX transfection as well as before and after PDTC treatment(%, $\bar{x} \pm s$ )

| Cell         | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> | S                         | G <sub>2</sub> /M         |
|--------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| L02          | 49.09 ± 0.12                   | 30.16 ± 0.08              | 20.77 ± 0.09              |
| L02/HBX      | 68.47 ± 0.14 <sup>▲</sup>      | 15.99 ± 0.21 <sup>▲</sup> | 15.40 ± 0.15 <sup>▲</sup> |
| L02/HBX/PDTC | 75.72 ± 0.09 <sup>*</sup>      | 14.05 ± 0.17              | 4.41 ± 0.15 <sup>*</sup>  |

<sup>▲</sup> P < 0.05 vs L02 cells, <sup>\*</sup> P < 0.05 vs L02/HBX cells

表 2 PEGFP-N1-HBX 转染前后及 PDTC 加入前后的 HepG2 细胞的细胞周期(%, $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Cell cycle of HepG2 cells before and after PEGFP-N1-HBX transfection as well as after PDTC treatment(%, $\bar{x} \pm s$ )

| Cell           | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> | S                         | G <sub>2</sub> /M         |
|----------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| HepG2          | 63.40 ± 2.2                    | 23.96 ± 1.17              | 12.64 ± 1.31              |
| HepG2/HBX      | 37.85 ± 1.15 <sup>▲</sup>      | 42.46 ± 1.13 <sup>▲</sup> | 20.14 ± 1.13 <sup>▲</sup> |
| HepG2/HBX/PDTC | 50.14 ± 1.12 <sup>*</sup>      | 31.12 ± 2.11 <sup>*</sup> | 16.56 ± 1.22 <sup>*</sup> |

<sup>\*</sup> P < 0.05 vs HepG2/HBX cells; <sup>▲</sup> P < 0.05 vs HepG2 cells

### 2.4 稳定转染 PEGFP-N1-HBX 质粒对 L02 细胞和 HepG2 细胞凋亡的影响

经 Annexin V/PI 标记法流式细胞术检测发现,转染 PEGFP-N1-HBX 质粒后的 L02/HBX 细胞凋亡率为(31.31 ± 0.51)%,较对照组 L02 细胞的(14.05 ± 0.09)%显著增加(P < 0.05)。L02/HBX/PDTC 组细胞凋亡率为(40.33 ± 0.07)%,较未加阻断剂组 L02/HBX 细胞的凋亡率显著增加(P < 0.05)。

转染 PEGFP-N1-HBX 质粒后的 HepG2/HBX 细胞凋亡率为(1.21 ± 0.04)%,较对照组 HepG2 细胞的(10.26 ± 0.10)%显著降低(P < 0.05),且 HepG2/HBX/PDTC 组细胞凋亡率为(5.45 ± 0.07)%,较未加阻断剂组 L02/HB 细胞的凋亡率显著增加(P < 0.05),但其凋亡率仍低于对照组 HepG2 细胞(P < 0.05,图 4)。由此可见,HBX 可促进正常 L02 肝细胞凋亡,而抑制肝癌 HepG2 细胞凋亡。NF-κB 信号通路被 PDTC 阻断后,HBX 对正常肝细胞的促进凋亡作用增强,而对肝癌细胞的抑制凋亡作用减弱,但与对照组肝癌细胞相比,仍表现为抑制凋亡作用。

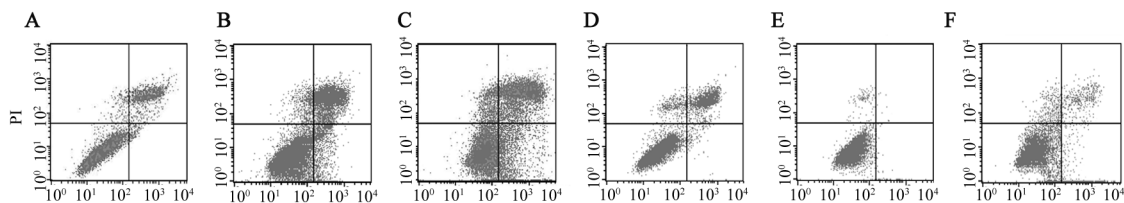


图 4 转染 PEGFP-N1-HBX 质粒对 L02 和 HepG2 细胞凋亡的影响

Fig. 4 Influence of PEGFP-N1-HBX transfection on apoptosis of L02 and HepG2 cells

A: L02 cells; B: L02/HBX cells; C: L02 /HBX/PDTC cells;

D: HepG2 cells; E: HepG2/HBX cells; F: HepG2/HBX/PDTC cells

### 3 讨论

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,占全球癌症死亡率的第3位,在许多促HCC发生、发展的因素中,慢性HBV感染起着关键作用。流行病学和临床资料<sup>[3]</sup>显示,东太平洋地区和撒哈拉以南非洲约80%的HCC与HBV慢性感染有关,世界约55%的肝癌由HBV感染引起。研究<sup>[4]</sup>证实,HBV基因组由4个重叠的开放阅读框(open reading frame, ORF)C、S、P和X组成,全长约为32 000 bp。HBX基因位于HBV基因组第1 374 ~ 1 838 位核苷酸之间,长约465 bp,是HBV DNA中最小的一个ORF,也是功能重叠最明显的区域,编码由154个氨基酸组成的分子量约为17 000的X蛋白。HBX可调节转录、影响细胞生长、信号转导、DNA修复及细胞凋亡等,这些功能可能与原发性HCC的发生具有密切的关系。一些体外及体内实验<sup>[5-6]</sup>表明,HBX可引起细胞周期阻滞和细胞凋亡;但也有研究<sup>[7-8]</sup>表明,HBX能抑制细胞凋亡。由此可见,HBX与细胞凋亡的关系极其复杂。现有研究<sup>[9-10]</sup>报道,HBX与凋亡呈双向调节机制,即HBX既可以促进肝细胞凋亡,也可以抑制肝细胞凋亡。Shih等<sup>[11]</sup>推测HBX对凋亡影响因不同细胞系及表达系统而异。因此,为进一步探讨HBX调控细胞凋亡在HCC发生中的作用机制,本课题特构建稳定表达HBX的细胞株L02/HBX和HepG2/HBX,流式细胞术观察HBX基因对L02和HepG2细胞周期和凋亡的影响。

研究结果显示,正常肝细胞系L02细胞转染HBX后,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例显著增加,S期和G<sub>2</sub>/M期细胞比例明显减少,提示HBX可抑制正常肝细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞向S期和G<sub>2</sub>/M转化,阻滞细胞周期进程。而肝癌细胞系HepG2转染HBX后,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细

胞比例显著减少,S期和G<sub>2</sub>/M期细胞比例明显增多,提示HBX可促进肝癌细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞向S期和G<sub>2</sub>/M转化,加速细胞周期进程。

同时本研究还通过Annexin V/PI标记法流式细胞术观察细胞凋亡,发现L02/HBX细胞凋亡率较对照组L02细胞明显增加,而HepG2/HBX细胞凋亡率较对照组HepG2细胞显著降低,这提示HBX对不同肝细胞系的凋亡调控作用不同,对正常肝细胞L02表现为促进凋亡,对于肝癌细胞HepG2表现为抑制凋亡。本研究认为,这一方面有利于癌细胞的存活和无限增殖,另一方面可通过释放细胞内的病毒颗粒,有效地促进感染的扩散,最终引起细胞的恶性转化。

NF-κB是细胞内重要的转录因子,通常以同源或异源二聚体的形式存在。细胞在静息状态下,NF-κB与抑制物IκB-α结合,以一种未被激活的形式存在于胞浆内,当它受到细胞因子、有丝分裂原、病毒、损伤等刺激后,IκB-α发生磷酸化并降解,NF-κB核定位信号暴露,并转入胞核与靶基因结合,调控其表达。通过调节多种细胞因子、生长因子的转录而参与免疫反应、细胞凋亡、细胞增殖和肿瘤发生等过程<sup>[12-15]</sup>。PDTC是NF-κB特异性的抑制剂,它可通过稳定胞浆中的IκB-α,从而有效地抑制NF-κB的活化和向细胞核内转移,从而阻断NF-κB的信号转导<sup>[16-17]</sup>。近年来研究<sup>[18]</sup>表明,HBX能激活NF-κB,并使其转移至细胞核,使抗凋亡基因表达增加,有利于癌细胞的存活和无限增殖,与肝癌细胞的凋亡抑制密切相关。

上述研究证实HBX对不同肝细胞系凋亡的作用不同,在此基础上,进一步用流式细胞仪检测PDTC作用24 h后的L02/HBX、HepG2/HBX细胞的细胞周期变化和凋亡,结果发现L02/HBX/PDTC细胞较未加阻断剂组凋亡率及G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例显

著增加, S 期和  $G_2/M$  期细胞比例明显减少; 而 HepG2/HBX/PDTC 细胞较未加阻断剂组凋亡率及  $G_0/G_1$  期细胞比例显著增加, S 期和  $G_2/M$  期细胞比例明显减少, 但其凋亡率仍低于对照组 HepG2 细胞。上述研究结果说明, HBX 对不同肝细胞系凋亡的调节作用有可能与诱导 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活有关。

本研究进一步通过 Western blotting 法检测了 L02 和 HepG2 细胞转染前后及加入 PDTC 前后细胞核中 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达, 结果发现转染 HBX 基因的 L02 细胞( L02/HBX )细胞核中 NF- $\kappa$ B 表达显著下降, 而转染 HBX 基因的 HepG2 细胞( HepG2/HBX )细胞核中 NF- $\kappa$ B 表达显著增加。PDTC 作用 24 h 后, L02/HBX 和 HepG2/HBX 细胞核中 NF- $\kappa$ B 表达均几乎为零。此结果表明, HBX 转染正常肝细胞 L02 后, 可通过下调 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达, 而阻滞细胞周期进程, 促进细胞凋亡; 而 HBX 转染肝癌细胞 HepG2 后, 可通过增加 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达, 加速细胞周期进程, 抑制细胞凋亡。本研究也发现, NF- $\kappa$ B 信号通路经 PDTC 阻断后, HBX 对正常肝细胞的促进凋亡作用增强, 而对肝癌细胞的抑制凋亡作用减弱, 但与对照组肝癌细胞相比, 仍表现为抑制凋亡作用。此现象一方面可能是 NF- $\kappa$ B 信号通路阻断不彻底, 另一方面可能是 NF- $\kappa$ B 信号通路只是 HBX 调节不同肝细胞系凋亡作用的途径之一, 还存在其他的信号通路, 其机制需进一步研究。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Dai LC, Wang X, Yao X, et al. Antisense oligonucleotide targeting midkine inhibit tumor growth in an *in situ* human hepatocellular carcinoma model [ J ]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28( 3 ): 453-458.
- [ 2 ] Kim HR, Lee SH, Jung G. The hepatitis B viral X protein activates NF- $\kappa$ B signaling pathway through the up-regulation of TBK1 [ J ]. *FEBS Lett*, 2010, 584( 3 ): 525-530.
- [ 3 ] Zheng S, Chang S, Lu J, et al. Characterization of 9-nitrocamptothecin liposomes: Anticancer properties and mechanisms on hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* [ J ]. *PLoS One*, 2011, 6( 6 ): e21064.
- [ 4 ] Jitendra S, Nanda A, Kaur S, et al. A comprehensive molecular interaction map for hepatitis B virus and drug designing of a novel inhibitor for Hepatitis BX protein [ J ]. *Bioinformatics*, 2011, 7( 1 ): 9-14.
- [ 5 ] 王海平, 陈孝平, 何松清, 等. 调节胞内 HBx 的表达对肝细胞凋亡的影响 [ J ]. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11( 7 ): 440.
- [ 6 ] Tanaka Y, Kanai F, Kawakami T, et al. Interaction of the hepatitis B virus X protein ( HBX ) with heat shock protein 60 enhances HBX-mediated apoptosis [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318( 2 ): 461-469.
- [ 7 ] 李东华, 陈孝平, 张万广. 乙肝病毒 X 蛋白通过上调 survivin 蛋白表达抑制肝癌细胞凋亡 [ J ]. *华中科技大学学报( 医学英德文版 )*, 2003, 23( 4 ): 383-386.
- [ 8 ] Shih WL, Kuo ML, Chuang SE. Hepatitis B virus X protein activates a survival signaling by linking SRC to phosphatidylinositol 3-kinase [ J ]. *J Biol Chem*, 2003, 278( 34 ): 31807-31813.
- [ 9 ] Fiedler N, Quant E, Fink L, et al. Differential effects on apoptosis induction in hepatocyte lines by stable expression of hepatitis B virus X protein [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12( 29 ): 4673-4682.
- [ 10 ] Kew MC. Hepatitis B virus X protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma [ J ]. *J Gastroenterology Hepatol*, 2011, 26( Suppl 1 ): 144-152.
- [ 11 ] Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, et al. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway [ J ]. *J Biol Chem*, 2000, 275( 33 ): 25858-25864.
- [ 12 ] Su F, Theodosios CN. Role of NF- $\kappa$ B and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein [ J ]. *J Virol*, 2001, 75( 1 ): 215-225.
- [ 13 ] Inoue J, Gohda J, Akiyama T, et al. NF- $\kappa$ B activation in development and progression of cancer [ J ]. *Cancer Sci*, 2007, 98( 3 ): 268-274.
- [ 14 ] Konecny FA. Review of cellular and molecular pathways linking thrombosis and innate immune system during sepsis [ J ]. *J Res Med Sci*, 2010, 15( 6 ): 348-358.
- [ 15 ] Suzuki J, Ogawa M, Muto S, et al. Novel I $\kappa$ B kinase inhibitors for treatment of nuclear factor- $\kappa$ B-related diseases [ J ]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2011, 20( 3 ): 395-405.
- [ 16 ] Malaguarnera L, Pilastro MR, Vicari L, et al. Pyrrolidinedithiocarbamate induces apoptosis in human acute myelogenous leukemic cells affecting NF- $\kappa$ B activity [ J ]. *Cancer Invest*, 2005, 23( 5 ): 404-412.
- [ 17 ] 康莹心, 胡国华, 吴蔚, 等. PDTC 对喉癌裸鼠模型中循环肿瘤细胞的影响 [ J ]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2011, 25( 9 ): 419-422.
- [ 18 ] Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer [ J ]. *Lab Clin Med*, 2006, 147( 2 ): 58-66.

[ 收稿日期 ] 2012 - 04 - 12

[ 修回日期 ] 2012 - 06 - 14

[ 本文编辑 ] 王莹