论著

文章编号:1000-5404(2005)14-1440-03

乙型肝炎病毒X基因-丙型肝炎病毒C基因融合表达蛋白对肝癌细胞端粒酶活性的影响

刘重阳,陈东风,王 军 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科,重庆 400042)

提 要:目的 建立HBV X-HCV C融合蛋白细胞表达模型,并探讨其对细胞端粒酶活性的影响。**方法** 双酶切质粒pXT1 -X,得到完整的HBV X基因片段后,将其插入到质粒PBK-CMV和PBK-HCV C的相应酶切位点,得到重组质粒PBK-X和PBK-X-C;再将质粒PBK-CMV、PBK-X、PBK-HCV C和PBK-X-C分别导入肝癌细胞株HepG2中,G418筛选,RT-PCR、蛋白印迹鉴定HBV X和HCV C蛋白表达。PCR-ELISA法检测端粒酶活性。**结果** 质粒PBK-CMV、PBK-X、PBK-HCV C和PBK-X-C在HepG2细胞中有稳定表达。表达融合蛋白的细胞的端粒酶活性较转染空载体的细胞及单独表达HBV X、HCV C蛋白的细胞明显升高。**结论** HBV X-HCV C融合蛋白能显著上调端粒酶活性,提示HBV、HCV可能具有协同致癌作用。

关键词:乙型肝炎病毒;丙性肝炎病毒;X基因;核心基因;端粒酶

中图法分类号: R394.2;R373.21;R735.7 **文献标识码:** A

Effect of hepatitis B virus X gene and hepatitis C virus C gene coexpression protein on telomerase activity of HepG2 cells

LIU Chong-yang, CHEN Dong-feng, WANG Jun (Department of Gastroenterology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish an experimental model of HCV C-HBV X coexpression protein and explore its effect on tolemerase activity. **Methods** The HBV X gene was recovered by enzyme digestion, cloned into PBK-CMV and PBK-HCV C, and the recombinant plasmids PBK-X and PBK-X-C were obstained. The plasmids PBK-CMV, PBK-X, PBK-HCV C and PBK-X-C were transfected into HepG2 cells with liposome. After selected with G418, positive colonies were obtained. The reverse transcription PCR and Western blotting were used to detect HBV X and HCV core protein expression and PCR-ELISA for tolemerase activity. **Results** The recombinant plasmid PBK-X-C could express HBV X and HCV core protein efficiently. The telomerase activity of the cells coexpressed HCV C-HBV X protein was higher than that of cells expessed HBV X, HCV C and vector only. **Conclusion** HBV X-HCV C coexpression protein can increase the telomerase activity of HepG2 cells, which suggests that HBV and HCV can cooperate with carcinogenesis.

Key words: hepatitis B virus; hepatitis C virus; X gene; core gene; telomerase

丙型肝炎病毒(HCV)与乙型肝炎病毒(HBV)双重感染的情况在临床上较常见,有许多报道发现双重感染时患肝细胞癌(HCC)的相对危险性明显增加[1],但其机制并不清楚,国内外鲜有相关报道,因此有必要对HCV、HBV的协同致癌作用进行研究。其中HBV X蛋白和HCV核心蛋白具有基因调节功能,被认为在HBV、HCV的致癌过程中起主要作用。端粒酶是一种能延长端粒末端的核酸蛋白酶,被认为与肝细胞癌的发生发展有着密切的关系。我们既往的研究发现HCV核心蛋可上调端粒酶活性[2],也有学者发现HBV X蛋白能激活细胞端粒酶[3,4],但两者对端粒酶是否有协同作用尚不清楚,本研究拟对此作一探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

PBK-CMV为真核表达载体(Stratagene产品)含有卡那霉

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900176)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39900176)

作者简介:刘重阳(1967-),男,辽宁省辽阳市人,博士,副教授,主要从事肝癌防治方面的研究。电话:(023)68757362

收稿日期:2004-06-24;修回日期:2005-03-11

素、新霉素抗性基因。PBK-HCV C 为我们既往构建完成的完整 HCV 核心基因 cDNA 插入到质粒 PBK-CMV 的 *Hind* Ⅲ,*Bam*HI 位点,得到的表达 HCV 核心蛋白的真核表达载体[5]。pXT1 -X 为含 HBV X 基因的真核表达载体,由重庆医科大学附属第二医院肝炎研究所任红教授惠赠。

1.2　方法

质粒构建:参照文献[6]进行,常规扩增、抽提质粒。*Xho* Ⅰ及 *Hind* Ⅲ双酶切质粒 pXT_1-X,得到完整的 HBV X 基因片段后,将其插入到质粒 PBK-CMV 和 PBK-HCV C 的 *Xho* Ⅰ及 *Hind* Ⅲ酶切位点,得到重组质粒 PBK-X 和 PBK-X-C,分别为 HBV X 基因和 HBV X 基因-HCV C 基因 cDNA 融合基因真核表达载体。

细胞培养及转染:人肝癌细胞株 HepG2 由我科实验室保存,培养于含 100 ml/L 新生小牛血清的 1640 培养液中,采用脂质体转染方法(德国宝灵曼公司试剂盒),分别转染 PBK-CMV、PBK-X、PBK-HCV C 和 PBK-X-C 质粒。在含 G418 4×10^5 U/L 培养液中筛选抗性细胞,挑取单细胞克隆扩增鉴定。将转染 PBK-CMV、PBK-X、PBK-HCV C 和 PBK-X-C 质粒的细胞分别命名为 HepG2-CMV、HepG2-B、HepG2-C 和HepG2-B-C。

转染细胞 HCV core 及 HBV X 基因表达的鉴定:用宝灵曼公司 Tripure 抽提试剂盒分别提取细胞 DNA 和 RNA。PCR 引物由上海生工生物工程公司合成,Page 纯化:HCV C 基因 5′ 引物 CACCATGAGCACGAATTCT,3′ 引物 TTAAGCGGAAGCTGGAT;PCR 反应条件为 94 ℃ 3 min,94 ℃ 1 min,55 ℃ 0.5 min,72 ℃ 1 min,35 个循环后,72 ℃延伸 10 min;RT-PCR 采用德国宝灵曼一步法试剂盒,反应条件为 60 ℃ 30 min,94 ℃ 1 min,55 ℃ 0.5 min,72 ℃ 1 min,35 个循环后,72 ℃延伸 10 min。HBV X 基因 5′ 引物 CTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTT,3′ 引物 GTTCACGGTGGTCTCCAT;PCR 反应条件为 93 ℃ 5 min,93 ℃ 1 min,55 ℃ 0.5 min,72 ℃ 1 min,35 个循环后,72 ℃延伸 10 min;RT-PCR 采用德国宝灵曼一步法试剂盒,反应条件为 60 ℃ 30 min,93 ℃ 1 min,55 ℃ 0.5 min,72 ℃ 1 min,35 个循环后,72 ℃延伸 10 min。转染细胞蛋白印迹鉴定:抽提细胞蛋白,采用 Western blot 检测转染细胞,化学发光法显色,一抗分别为鼠抗人 HCV core 单克隆抗体(由美国 Stanford 大学 H. B. Greenberg 教授惠赠)鼠抗人抗 HBV X 单克隆抗体(Santa creze 产品)。

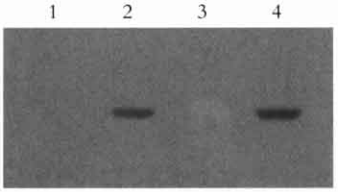
端粒酶活性的检测:采用宝灵曼公司(TRAP-ELISA)试剂盒。参照说明书将各株细胞分为平行 3 管,提取培养细胞端粒酶,紫外分光光度计进行蛋白定量,PCR- ELISA 法检测端粒酶活性。

c-myc 基因的变化:流式细胞仪检测各株细胞 c-myc 蛋白表达,抗体为 Santa cruz 产品。

2　结果

2.1　HBV X 基因表达鉴定

挑取 G418 抗性单细胞克隆扩增,提取细胞 DNA,经 PCR 扩增,琼脂糖电泳,可见 HepG2-B 和 HepG2-B-C 细胞阳性,而 HepG2-CMV 细胞及 HepG2-C 细胞阴性,证明 PBK-X 和 PBK-X-C 导入 HepG2 细胞中。提取细胞 RNA,RT-PCR 扩增,可见 HepG2-B 和 HepG2-B-C 细胞有 HBV X mRNA 表达,表明 HBV X 基因导入 HepG2 细胞后,有表达;而空载体细胞及 PBK-HCV C 细胞无表达。蛋白印迹鉴定:HepG2-B 和 HepG2-B-C 细胞中有 HBV X 蛋白表达,而 HepG2-CMV 细胞及 HepG2-C 细胞则为阴性,表明 PBK-X 和 PBK-X-C 细胞中能表达 HBV X 蛋白(图 1)。



1: HepG2-CMV; 2: HepG2-B; 3: HepG2-C; 4: HepG2-B-C

图 1　HBV X 蛋白的表达

Fig 1　HBV X protein expression

2.2　HCV C 基因表达鉴定

挑取 G418 抗性单细胞克隆扩增,提取细胞 DNA,经 PCR 扩增,琼脂糖电泳,可见 HepG2-C 和 HepG2-B-C 细胞阳性,而 HepG2-CMV 和 HepG2-B 细胞阴性,证明 PBK-HCV C 和 PBK-X-C 导入 HepG2 细胞中。提取细胞 RNA,RT-PCR 扩增,可见 HepG2-C 和 HepG2-B-C 细胞有 HCV C mRNA 表达,表明 HCV core 基因导入 HepG2 细胞后,有表达;而 HepG2-CMV 和 HepG2-B 细胞无表达。印迹鉴定:HepG2-C 和 HepG2-B-C 细胞中有 HCV 核心蛋白表达,而 HepG2-CMV 和 HepG2-B 细胞则为阴性,表明 PBK-HCV C 和 PBK-X-C 细胞中能表达 HCV 核心蛋白(图 2)。



1: HepG2-CMV; 2: HepG2-B; 3: HepG2-C; 4: HepG2-B-C

图 2　HCV C 蛋白的表达

Fig 2　HCV C protein expression

2.3　端粒酶活性的测定

各株细胞分为平行 3 管检测端粒酶活性,结果为 HepG2-CMV: 0.67 ± 0.13, HepG2-B: 0.99 ± 0.15, HepG2-C: 1.03 ± 0.14, HepG2-B-C: 1.42 ± 0.18;HepG2-B-C 细胞端粒酶活性明显高于 HepG2-CMV、HepG2-B 和 HepG2-C 细胞($P < 0.05$)。

2.4　c-myc 基因的检测

流式细胞仪检测各株细胞 c-myc 蛋白表达阳性细胞数(%)及平均荧光强度结果为 HepG2-CMV: 67.7、52;HepG2-B: 72.9、64;HepG2-C:73.7、63;HepG2-B-C:76.7、71.3。HepG2-B-C 细胞 c-myc 基因的表达(平均荧光强度)明显高于 HepG2-CMV、HepG2-B 和 HepG2-C 细胞。

3 讨论

HCV 核心蛋白也称 C 蛋白，是 HCV C 区基因编码产物，含 191 个氨基酸，分子量约为 22×10^3，被认为是 HCV 的核壳蛋白。近年来，认为 C 蛋白具有调节细胞生长和分化的作用[7]。HBV X 蛋白是 HBV 4 个开放读码框架(ORF)中的 X-ORF 编码的一种病毒蛋白，为含 154 个氨基酸的多肽，分子量为 17×10^3。HBV X 具有反式激活功能，可广泛激活病毒和细胞的启动子，对 HBV 在宿主肝细胞中的复制和诱导细胞的转录，增生以及于肝细胞的发生、发展关系非常密切[8]。

虽然这两个病毒看起来在分子水平上互相抑制，但是 HCV 与 HBV 协同致癌作用已有较多报道[9,10]。流行病学调查和肝组织免疫组化结果显示，在 HBV 感染高发区，HCC 与 HBV 一重叠感染在 HCC 患者中非常突出。在 HBV 高流行区，由于 HCV 和 HBV 感染机会多，因而这两种病毒重叠感染使慢性肝炎进展为肝硬化和 HCC 的机率增加。

端粒酶是由 RNA 和蛋白质构成的核糖核蛋白质复合物，能利用自身携带的 RNA 模板逆转录合成端粒 DNA(TTAGGG)，用以维持因细胞分裂而缩短的端粒结构，从而使细胞获得无限增殖能力，成为永生化细胞[11]。肝炎、肝硬化组织中的端粒酶活性较肝癌组织中活性低，肝癌组织中随着分化程度的降低，端粒酶活性亦增强，提示端粒酶的活性与细胞分化有关。Greenberg 等[12]将 c-myc 基因转染二倍体正常人体细胞中，发现转染后细胞端粒酶活性升高，提示 c-myc 基因有调控端粒酶活性的作用。有学者[13,14]克隆了人端粒酶催化亚单位(hTRT)基因的启动子序列，发现其核心区域内含有 c-myc 的结合位点，c-myc 的过量表达可以增加 hTRT 基因的转录，从而升高端粒酶活性。

我们研究发现 HepG2-B-C 细胞端粒酶活性较 HepG2-CMV、HepG2-B、HepG2-C 细胞均高($P<0.01$)，HepG2-B-C 细胞 c-myc 基因在转录水平和翻译水平亦较 HepG2-CMV、HepG2-B、HepG2-C 细胞升高，提示 HCV 与 HBV 重叠感染时，具有协同上调端粒酶活性的作用，这种作用可能是通过激活 c-myc 基因实现。而端粒酶的激活在肝癌的发生中起重要作用，因此推测 HCV 与 HBV 可能具有协同致癌的作用。近期有国外学者发现同时转染 HBV X 和 HCV C 基因的小鼠 NIH3T3 细胞，出现明显的肿瘤细胞生物学行为[15]，也提示 HCV 与 HBV 可能具有协同致癌的作用。

参考文献：

[1] Benvegnu L, Alberti A. Patterns of hepatocellular carcinoma development in hepatitis B virus and hepatitis C virus related cirrhosis[J]. Antiviral Res, 2001, 52(2): 199-207.

[2] 刘重阳，刘为纹，杨建民，等. 丙型肝炎病毒核心蛋白在 HepG2 细胞中的表达及其对端粒酶活性的影响[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2002，22(4)：419-421.

[3] 闵 军，陈亚进，王金林，等. 肝癌细胞端粒酶激活的可能机制：乙型肝炎病毒 x 基因-端粒酶反转录酶途径[J]. 中华实验外科杂志，2001，18(6)：529-530.

[4] 沈钦海，周卫平，张大志，等. 乙型肝炎病毒及其 x 基因对培养肝细胞端粒酶活性的影响[J]. 中华传染病杂志，2002，20(2)：112-113.

[5] 刘重阳，刘为纹，杨建民，等. HCV 核心基因 cDNA 真核表达载体的构建及其表达[J]. 世界华人消化杂志，2000，8(9)：1049-1050.

[6] 萨姆布鲁克 J 主编. 金东雁，黎孟枫，译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1996. 1-70.

[7] Moriya K, Fujie H, Shintani Y, *et al*. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice[J]. Nat Med, 1998, 4(9): 1065-1067.

[8] Livezey K W, Negorev D, Simon D. Increased chromosomal alterations and micronuclei formation in human hepatoma HepG2 cells transfected with the hepatitis B virus HBX gene[J]. Mutat Res, 2002, 505(1-2): 63-74.

[9] Geller S A. Hepatitis B and hepatitis C[J]. Clin Liver Dis, 2002, 6(2): 317-34.

[10] 王春艳，王 凯，冯冬梅. PCR 法与 ELISA 法检测丙型肝炎病毒及乙型肝炎病毒比较[J]. 郑州大学学报(医学版)，2002，37(4)：493-494.

[11] Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, *et al*. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. Science, 1994, 266(5193): 2011-5201.

[12] Greenberg R A, O'Hagan R C, Deng H, *et al*. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-myc but is not functionally equivalent in cellular transformation[J]. Oncogene, 1999, 18(5): 1219-1226.

[13] Takakura M, Kyo S, Kanaya T, *et al*. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells[J]. Cancer Res, 1999, 59(3): 551-557.

[14] Wu K J, Grandori C, Amacker M, *et al*. Direct activation of TERT transcription by c-myc[J]. Nat Genet, 1999, 21(2): 220-224.

[15] Jung E Y, Kang H K, Chang J, *et al*. Cooperative transformation of murine fibroblast NIH3T3 cells by hepatitis C virus core protein and hepatitis B virus X protein[J]. Virus Res, 2003, 94(2): 79-84.

(编辑 龙 亮)