文章编号:1000-5404(2008)18-1693-04

论著

腺病毒载体介导的 HBx 表达对 HepG2 细胞中 PPARγ 定位的影响

黄佳祎[1,2],毕 杨[1,2],左国伟[1],冯 涛[1,2] (重庆医科大学:[1]临床检验诊断学省部共建教育部实验室,重庆市市级重点实验室;[2]基础医学院生化与分子生物学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 检测外源基因 HBx 转入 HepG2 细胞后对 PPARγ 表达定量及定位的影响。**方法** 以 HBx 重组腺病毒感染 HepG2 细胞,分别用 RT-PCR 和总蛋白 Western blot 检测 PPARγ 表达量的改变,免疫细胞化学检测其定位改变,Western blot 分别检测细胞质和细胞核中 PPARγ 蛋白量的表达改变,MTT 法检测 HBx 对曲格列酮抑制 HepG2 增殖效率的影响。**结果** 外源基因 HBx 转入 HepG2 细胞后,RT-PCR、总蛋白 Western blot 显示 PPARγ 表达差异无统计学意义($P>0.05$),免疫细胞化学及细胞质和细胞核中 PPARγ 蛋白检测提示 PPARγ 在细胞核内表达降低而在细胞质中出现积聚,曲格列酮对 HepG2 细胞增殖的抑制效率降低($P<0.05$)。**结论** 外源基因 HBx 对 HepG2 细胞中 PPARγ 的表达量无明显影响,但影响其向核内转移。HBx 降低曲格列酮对 HepG2 细胞增殖的抑制效率。

关键词: HBx;HepG2 细胞;PPARγ;曲格列酮
中图法分类号: R394-33;R394.3;R735.7 **文献标识码:** A

Effects of HBx on localization of PPARγ in HepG2 cell line

HUANG Jia-yi[1,2], BI Yang[1,2], ZUO Guo-wei[1], FENG Tao[1,2] ([1]Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, [2]Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective Hepatitis B virus (HBV)-encoded X (HBx) contributes to the development of hepatocellular carcinoma (HCC). Peroxisome proliferator activated receptor (PPARγ) highly expressed in some hepatoma cell lines. We tend to investigate the possible relationship between HBx and PPARγ in the development of hepatic cancer. **Methods** PPARγ of HepG2 cells traysinfected with recombinant HBx adenovirus, with blank vector and without transfection was detected by RT-PCR for its mRNA level, Western blot for its protein level and immunocytochemistry for its localization. The effect of HBx on the inhibition of HepG2 cell growth by troglitazone, the ligand of PPARγ, was measured by MTT assay. **Results** The localization of PPARγ in HepG2 cells infected with HBx adenovirus was changed, increasing in cytoplasm and decreasing in cellular nucleus, while the expressions of PPARγ mRNA and protein were not significantly changed, compared with those in HepG2 cells or HepG2 cells transfected with blank vector. The inhibitory effects of troglitazone on HepG2 cell growth weakened when HepG2 cells were infected with HBx adenovirus. **Conclusion** HBx may affect the localization of PPARγ, but not the quantity of PPARγ expression. HBx decreases the inhibition ratio of troglitazone on HepG2 cell growth.

Key words: Hepatitis B virus-encoded X; HepG2 cell; Peroxisome proliferator activated receptor; troglitazone

---

基金项目: 国家自然科学基金(30771925)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771925)
作者简介: 黄佳祎,女,四川省眉山市人,博士,主要从事 HBX 与肝癌相互关系方面的研究。电话:(023)68092580,E-mail:e738741@126.com
通信作者: 冯 涛,电话:(023)68485229, E-mail:fengtao9_9@yahoo.com
收稿日期: 2007-11-06;**修回日期:** 2008-01-28

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种常见的、恶性程度极高的肿瘤,大约80%的原发性肝癌与乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染有关。已知HBV的基因组有4个开放阅读框,分别编码HBsAg、HBcAg、DNAP和HBx,其中HBx蛋白被认为在HBV相关性HCC的发生中占重要作用[1],但其具体机制仍不十分清楚。近年来研究表明PPARγ(peroxisome proliferator activated receptor)与肝癌的发生密切相关,多种肝癌细胞株中均有PPARγ表达的升高[2],并且PPARγ的配体曲格列酮能抑制肝癌细胞的生长[3]。本实验研究了HBx与PPARγ之间的关系,为进一步研究HBx在肝癌发生中机制奠定了基础,也为HBV相关性肝癌的治疗提供一个新的可能的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

HBx重组腺病毒(由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室馈赠);HepG2细胞为本实验室保存;RT-PCR试剂盒购自日本Toyoba公司;蛋白裂解液购自上海申能博彩生物技术有限公司;核蛋白和细胞质蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;PV-9000免疫组化试剂、浓缩型DAB试剂盒、购自北京中杉金桥生物技术有限公司;PPARγ单抗克隆抗体购自美国Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 腺病毒的转染 根据实验分为3组:HepG2组、HepG2+空腺病毒组、HepG2+HBx腺病毒组。细胞传代后待贴壁融合70%左右加入病毒液。

1.2.2 RT-PCR检测PPARγ在HepG2细胞中表达的改变 于细胞融合达70%~80%时收集细胞,柱式总RNA抽提试剂盒提取总RNA,RT-PCR试剂盒获得cDNA。设计PPARγ引物:上游:5′-CTTTATGGAGCCCAAGTTTGAGTT-3′;下游:5′-GAAATGTTGGCAGTGGCTCAG-3′,预计扩增片段为379 bp。内参β-actin引物:上游:5′-ACGAGACCACCTTCAACTCCATC-3′;下游:5′-TAGAAGCATTTGCGGTGGACGA-3′,预计扩增片段为304 bp。内参与目的基因PCR反应分管进行,PCR反应采用20 μl体系:上下游引物(10 μmol/L)各0.2 μl、模板1 μl、dNTP mix(10 mmol/L)0.4 μl、*Taq*酶(5 U/μl)0.2 μl、10×PCR buffer 2 μl、$MgCl_2$ 25 mmol/L) 1.2 μl、灭菌双蒸水14.8 μl。循环条件为94 ℃预变性5 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,35次循环。

1.2.3 Western blot检测PPARγ在HepG2细胞中表达的改变 转染腺病毒后48 h收集细胞。用PBS(pH 7.4)洗1次,加入蛋白裂解液1 ml(预先加入PMSF 10 μl),吹打,移入1.5 ml EP管。置于冰上30 min,再4 ℃,12 000×*g*离心30 min,吸取上清,紫外分光光度法测定浓度,加入10×加样缓冲液,煮沸5 min,分装,-80 ℃保存。从上述制备的样品中分别取出50 μl,用8%的SDS-PAGE凝胶电泳。电泳完成后,冰浴1 h将蛋白质从SDS-PAGE上转移至硝酸纤维素(NC)膜上。转移完成后TBS(pH 7.4)漂洗转好的NC膜5 min×3次,用TBST(含0.2 Tween20)配制的5%脱脂牛奶4 ℃封闭过夜。然后TBS漂洗5 min ×3次,室温下将NC膜与PPARγ抗体(1∶500)及内参抗体(1∶1 000)温浴1 h,用TBS漂洗5 min×3次,加辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶3 000)温浴1 h后,TBS漂洗5 min×3次,然后与ECL试剂反应约2 min后,成像,保存。

1.2.4 免疫细胞化学检测PPARγ的定位改变 将对数生长期的HepG2细胞按2×10^4/孔接于24孔板中的盖玻片上,24 h后观察其融合率达80%,加入重组腺病毒HBx,观察绿色荧光蛋白表达70%,吸尽各孔内的旧培养液,PBS漂洗5 min×3次。每张玻片加20 μl的3%过氧化氢,室温孵育10 min,以清除内源性过氧化物酶。甩掉过氧化氢,PBS漂洗2 min×3次,滴加一抗(鼠抗人PPARγ单克隆抗体,1∶200),4 ℃湿盒过夜,PBS漂洗,2 min×3次,加Polymer helper,37 ℃孵育30 min。PBS漂洗2 min×3次,加poly HRP-anti-Mo IgG,37 ℃孵育30 min,PBS漂洗2 min×3次,加DAB显色液,镜下控制显色,水冲洗终止。

1.2.5 Western blot检测细胞质和细胞核蛋白中PPARγ表达的改变 细胞质和细胞核蛋白的提取:细胞经预冷PBS洗涤后,刮下,4 ℃离心。细胞沉淀重悬于200 μl缓冲液A中(用前每毫升缓冲液A中加入1 μl DTT、5 μl PMSF、5 μl蛋白酶抑制剂)混匀后冰置15 min,加入11 μl冷缓冲液B,剧烈震荡5 s,13 000 r/min、离心5 min,取上清,即得胞质蛋白;在离心沉淀物中加入100 μl预冷缓冲液C(用前每毫升缓冲液C中加入1 μl DTT、5 μl PMSF、5 μl蛋白酶抑制剂),剧烈震荡15 s,冰置30 min。4 ℃、12 500 r/min离心10 min,取上清,即得核蛋白;紫外分光光度法测定浓度,加入10×退火缓冲液,煮沸5 min,分装,-80 ℃保存。其余步骤同上。

1.2.6 MTT法检测HBx对曲格列酮抑制HepG2增殖效率的影响 分别将3组细胞消化为单细胞悬液,以1×10^4/孔的密度均匀地接种于96孔板,待其完全贴壁后,先用无血清、无抗生素培养基同步化培养过夜,然后每孔分别加入含曲格列酮20、40、80 μmol/L的DMEM培养液,并设置相应的空白对照组。每组设3个复孔。继续培养24 h后,加入10 μl MTT(5 g/L),继续孵育4 h,弃上清,每孔加入100 μl DMSO,振荡10 min待结晶溶解,于酶标仪上测定570 nm波长的吸光度值[$D(570)$],计算不同浓度曲格列酮对HepG2细胞生长的抑制率:细胞抑制率(%)=[1-实验组$D(570)$/对照组$D(570)$]×100%。

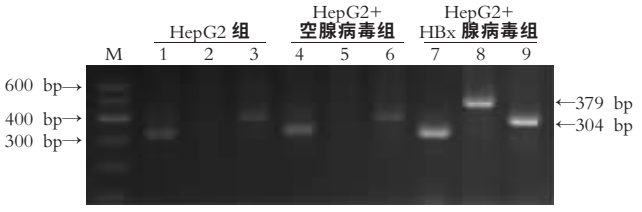
1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用统计软件SPSS 11.0处理,样本均数比较采用t检验。

2　结果

2.1　HBx 对 HepG2 细胞 PPARγ mRNA 表达的影响

按试剂盒获取 cDNA,以相同量 cDNA 为模板,分管进行内参、HBx 和 PPARγ 基因的扩增。结果显示在转染 HBx 的 HepG2 细胞中 HBx 基因特异性表达;PPARγ 基因在 400 bp 可见相应条带,且各组之间 PPARγ 与内参的比值差异无统计学意义($P>0.05$)。说明 HBx 基因有效转染入 HepG2 细胞,且转染 HBx 后对 HepG2 细胞中的 PPARγ 在转录水平上无影响。见图 1。

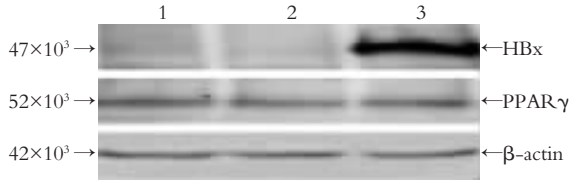


M:标准;1、4、7:β-actin ;2、5、8:HBx;3、6、9:PPARγ

图 1　RT-PCR 检测 HepG2 细胞 PPARγ mRNA 的表达

2.2　HBx 对 HepG2 细胞总 PPARγ 蛋白表达的影响

提取总蛋白后按蛋白浓度比例上样。结果显示在转染 HBx 的 HepG2 细胞中 HBx 特异性表达;PPARγ 蛋白在 52×10^3 处可见相应条带,且各组之间 PPARγ 与内参的比值差异无统计学意义($P>0.05$)。说明在转染 HBx 的 HepG2 细胞中有效表达 HBx 蛋白,且转染 HBx 后 HepG2 细胞中的 PPARγ 在翻译水平上无影响。见图 2。



1:HepG2 组;2:HepG2 + 空腺病毒组;3:HepG2 + HBx 腺病毒组

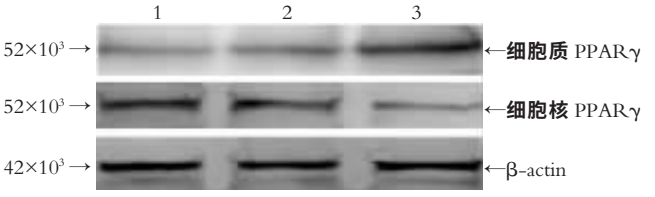
图 2　Western blot 检测 HepG2 细胞 PPARγ 总蛋白的表达

2.3　HBx 对 HepG2 细胞 PPARγ 定位改变的影响

结果显示细胞质和细胞核中均可见棕褐色颗粒。转染 HBx 后细胞核内棕褐色颗粒减少,而细胞质内棕褐色颗粒增多。说明转染 HBx 后,HepG2 细胞中 PPARγ 的定位发生改变。出现细胞质中的积聚而细胞核中减少。见图 3。

2.4　HBx 对 HepG2 细胞质和细胞核中 PPARγ 蛋白表达的影响

分别提取细胞质和细胞核蛋白后按蛋白浓度比例上样。结果显示在 52×10^3 处可见相应条带。在细胞质中,HepG2 组与转染空病毒组之间 PPARγ 与内参的比值差异无统计学意义($P>0.05$),而转染 HBx 组 PPARγ 与内参的比值升高,其差异具有统计学意义($P<0.05$);而在细胞核中,HepG2 组与转染空病毒组之间 PPARγ 与内参的比值差异无统计学意义($P>0.05$),转染 HBx 组 PPARγ 与内参的比值降低,其差异具有统计学意义($P<0.05$)。说明转染 HBx 后,HepG2 细胞质中的 PPARγ 表达升高,而细胞核中的 PPARγ 表达降低。见图 4。



1:HepG2 组;2:HepG2 + 空腺病毒组;3:HepG2 + HBx 腺病毒组

图 4　Western blot 检测 HepG2 细胞质和细胞核中 PPARγ 蛋白的表达

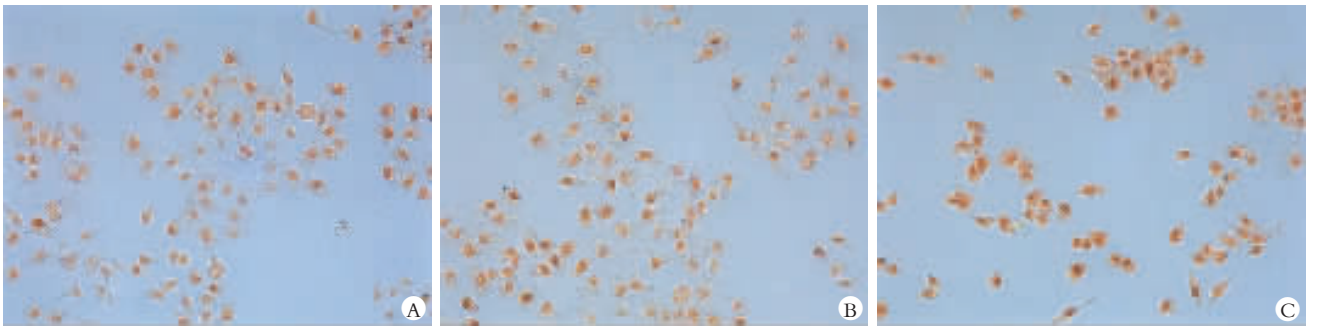
2.5　MTT 法检测 HBx 对曲格列酮抑制 HepG2 增殖效率的影响

结果显示曲格列酮能抑制 HepG2 细胞的增殖。HepG2 组与转染空病毒组之间抑制效率的差异无统计学意义($P>0.05$),而转染 HBx 组抑制效率降低,其差异具有统计学意义($P<0.05$)。说明转染 HBx 后,曲格列酮对 HepG2 细胞增殖的抑制效率降低。见表 1。

表 1　不同浓度曲格列酮对 HepG2 细胞生长的抑制效率及外源基因 HBx 的影响　(%,$\bar{x}\pm s$)

组别	20 μmol/L	40 μmol/L	80 μmol/L
HepG2 组	34.52 ± 4.85	50.12 ± 4.05	65.98 ± 5.07
HepG2 + 空腺病毒组	34.04 ± 4.68	51.01 ± 3.94	65.04 ± 4.42
HepG2 + HBx 腺病毒组	19.04 ± 4.38[a]	31.30 ± 4.56[a]	42.08 ± 4.36[a]

a:$P<0.05$,与 HepG2 组比较



A:HepG2;B:HepG2 + 空腺病毒组;C:HepG2 + HBx 腺病毒组

图 3　免疫细胞化学检测 HepG2 细胞 PPARγ 定位改变　(×400)

3 讨论

过氧化物酶体增殖物激活受体 PPAR 属于核激素受体(nuclear hormone receptor)超家族的成员。分为 PPARα、PPARβ 和 PPARγ 3 种亚型,其中 PPARγ 与肿瘤关系最为密切。与其他核激素受体一样,PPARγ 具有 4 个功能结构域:①氨基端结构域;②DNA 结合结构域(DNA-binding domain,DBD);③转录活性调节结构域;④配基结合结构域(ligand binding,LBD)。当其被配体激活后,常与视黄酸 X 受体(retinoic X receptor,RXR)或糖皮质激素受体结合形成异二聚体后,再进入核内与位于其上游的靶基因的特异性 DNA 序列,即过氧化物酶体增殖物反应元件(peroxisome proliferator response element,PPRE)结合,使靶基因活化,从而发挥其转录后调控作用。因其与脂肪代谢、脂肪细胞的终末分化等密切相关、被认为在肝脏疾病的发生中有重要作用。近年来在肝癌的研究中发现:人肝癌组织和 HLF、HuH-7、HAK-1A、HAK-1B、HAK-5、SMMC-7721、HepG2、Hep3B 等肝癌细胞株均存在 PPARγ 表达增高[4]。而用曲格列酮激活 PPARγ 后能通过调节细胞周期、诱导凋亡、调节醛脱氢酶 3(ALDH3)基因表达、抑制 COX-2 表达[5,6]等途径来抑制肝癌细胞的增殖,证实 PPARγ 与肝癌的发生密切相关。

HBx 蛋白是一种反式作用因子,其本身不能与双链 DNA 直接结合,而是通过蛋白与蛋白之间的相互作用来行使功能。因其具有多种调节功能,被认为在 HBV 相关性 HCC 的发生中占重要作用。以往的研究表明 HBx 可通过激活细胞癌基因,抑制 p53 的表达和功能,激活 PI3K-Akt、Jak1-STAT、SAPK/JNK、MAPK、Wnt/β-catenin 等信号级联通路,上调促基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)的表达等途径促进肿瘤的形成和转移。而对于 HBx 与 PPARγ 之间的关系研究甚少。我们的前期工作发现:HBx 能引起 β-catenin表达增加,功能增强,从而激活 Wnt/β-catenin 途径。而在 β-catenin 的表达过程中,PPARγ 作为一种重要的影响因子,在正常肝细胞中它通过非依赖性 GSK-3β 和 APC 的途径来降低 β-catenin 的表达[7]。因此我们试图研究 HBx 与 PPARγ 之间的关系,以进一步研究 HBx 导致肝癌发生的作用机制。在该实验中可见,在 HepG2 细胞中有 PPARγ 的表达。当转入 HBx 后,尽管总的表达量无明显改变,但在细胞内的分布发生了明显变化,细胞质内的含量升高而胞核内的含量降低。而 PPARγ 的激活和核内转移受两方面的影响:①与配体的结合;②磷酸化状态[8]。魏倩萍等[9]还发现 P38MAPK 被激活,磷酸化表达明显增加时,PPARγ 表达显著减少。由此可以推断:HBx 可能通过直接或间接与 PPARγ 结合,阻碍其与配体的结合,从而不能形成异二聚体进入细胞核,影响其转录后调控作用。或者 HBx 可能通过改变 PPARγ 的磷酸化状态来降低其功能,从而下调其下游基因的表达。这些都有待于我们进一步研究。当用曲格列酮激活 PPARγ 后能抑制肝癌细胞的增殖,但转入 HBx 后,其抑制效率降低。也证实 HBx 影响 PPARγ 的核内转移,从而降低 PPARγ 转录后调控作用,参与肝癌的发生。

参考文献:

[1] Feitelson M A, Reis H M, Liu J, *et al*. Hepatitis B virus X antigen (HBxAg) and cell cycle control in chronic infection and hepatocarcinogenesis[J]. Front Biosci, 2005, 10: 1558 - 1572.

[2] Koga H, Harada M, Ohtsubo M, *et al*. Troglitazone induces p27Kip1-associated cell-cycle arrest through down-regulating Skp2 in human hepatoma cells[J]. Hepatology, 2003, 37(5): 1086 - 1096.

[3] Yu J, Qiao L, Zimmermann L, *et al*. Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*[J]. Hepatology, 2006, 43(1): 134 - 143.

[4] 梁 磊, 乔 唐, 徐永健, 等. 过氧化物酶增殖物活化受体γ对肝肿瘤细胞生物学行为影响的实验研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2007, 13(6): 402 - 405.

[5] Okano H, Shiraki K, Inoue H, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma augments tumor necrosis factor family-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Anticancer Drugs, 2002, 13(1): 59 - 65.

[6] Canuto R A, Maggiora M, Trombetta A, *et al*. Aldehyde dehydrogenase 3 expression is decreased by clofibrate *via* PPAR gamma induction in JM2 rat hepatoma cell line[J]. Chem Biol Interact, 2003, 143 - 144: 29 - 35.

[7] Sharma C, Pradeep A, Wong L, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation can regulate beta-catenin levels *via* a proteasome-mediated and adenomatous polyposis coli-independent pathway [J]. J Biol Chem, 2004, 279(34): 35583 - 35594.

[8] Burns KA, Vanden-Heuvel J P. Modulation of PPAR activity *via* phosphorylation[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1771(8): 952 - 960.

[9] 魏倩萍, 邓华聪, 赵 颉. p38MAPK 对大鼠肾小球系膜细胞表达 PPARγ 的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(16): 1659 - 1662.

(编辑 王小寒)