文章编号:1000-5404(2010)03-0297-03

短篇论著

HBV对肝癌细胞中AKR1C1基因表达的影响

万 涛[1,2],张小花[1],张 磊[1],田园园[1],丁世家[2],汤 华[1] (400016 重庆,重庆医科大学:感染性疾病分子生物学教育部重点实验室[1],检验系临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室[2])

[摘要] **目的** 研究HBV对肝癌细胞中AKR1C1基因表达的影响,并对其作用机制进行初步的探讨。**方法** RT-PCR和Real-time PCR检测HepG2.2.15和HepG2细胞中AKR1C1基因的差异表达情况;构建AKR1C1基因启动子虫荧光素酶报告质粒,并分别与HBV、HBx、HBs、HBp、HBc的表达质粒共转染HepG2细胞,双荧光素酶检测系统检测虫荧光素酶活性。**结果** AKR1C1基因在HepG2.2.15细胞中的表达高于HepG2细胞1.5倍;在HBV表达质粒与AKR1C1基因启动子虫荧光素酶报告质粒共转染的HepG2细胞中,虫荧光素酶的活性明显增强,为对照组3.37倍;相对HBs、HBp、HBc,HBx升高虫荧光素酶的活性的作用最强。**结论** HBV可以增强AKR1C1基因启动子的转录活性,促进AKR1C1在肝癌细胞中的表达,HBx在这一转录激活当中发挥重要作用。

[关键词] 肝炎病毒,乙型;肝肿瘤;AKR1C1基因;启动区(遗传学);基因表达
[中图法分类号] R373.21; R394.3; R735.7 **[文献标志码]** A

AKR1C1基因编码醛酮还原酶家族1中的一个成员C1,能将醛酮类化合物还原成相应的醇类[1]。AKR1C1蛋白在人的肝癌细胞,非小细胞型肺癌,皮肤鳞状上皮细胞癌等细胞中过度表达。并且其过度表达被认为与抗肿瘤药物的药物抵抗相关[2]。Lihong等用基因芯片方法检测了稳定表达HBx的肝癌细胞与未转染HBx的肝癌细胞之间存在差异表达的基因,其中AKR1C1基因在稳定表达HBx的肝癌细胞中表达量上调[3]。这说明HBx可能对肝癌细胞中AKR1C1的表达具有调节作用。

本研究首先对整合了HBV基因组的HepG2.2.15细胞与不表达HBV的HepG2细胞当中AKR1C1基因表达情况进行了比较,发现在HepG2.2.15细胞当中AKR1C1 mRNA的表达量高于HepG2细胞。提示HBV对该基因存在着调节作用。我们构建了AKR1C1基因启动子虫荧光素酶报告质粒并分别与HBV及HBV编码的4种蛋白的表达质粒瞬时共转染HepG2细胞,通过检测荧光素酶活性来观察HBV及其编码的蛋白是否影响AKR1C1基因启动子的活性来发挥转录调节作用。从而为HBV在肝癌的发生,发展过程中所起的作用提供新的认识。

1 材料与方法

1.1 实验材料及主要试剂

人肝癌细胞系HepG2及HepG2.2.15由本实验室保存,大肠杆菌DH5α由本实验室保存。质粒pCH-9/3091由德国Heidelberg大学Michael Nassal等构建,第三军医大学西南医院兰林博士转赠。pCMV-SPORT6-PTB购于ATCC(American Type Culture Collection)公司。质粒pGL3-Basic、pRL-TK及双荧光素酶检测试剂盒购自Promega公司。转染试剂Lipofectamine 2000™购自Invitrogen公司。

1.2 RT-PCR和Real-time PCR

Trizol法提取HepG2及HepG2.2.15细胞总RNA。通过反转录酶(M-MLV Reverse Transcriptase,Promega公司),逆转录形成cDNA。分别设计AKR1C1上游引物:5′-TGCTCTTATAGCCTGTGAGG-3′,下游引物:5′-AAGGATGACATTCCACCTGG-3′,反应产物为674 bp。以β-actin作为内参,上游引物:5′-GTGGATCAGCAAGCAGGAGT-3′和下游引物:5′-TGTGTGGACTTGGGAGAGGA-3′,反应产物为416 bp;反应条件为:94 ℃ 5 min,94 ℃ 45 s,58 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,25个循环,72 ℃ 10 min;Real-time PCR采用Syber green染料法(Power SYBR® Green PCR Master Mix,Biosysterms)。以β-actin为内参,AKR1C1基因上游引物:5′-GCCTTGGCAAAAAAGCACAA-3′;下游引物:5′-CTGGTAGCGCAGGGCAAT-3′。通过IQ5 multicolor Real-time PCR detection system(Bio-Rad)进行检测,以$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因相对表达量[4]。

1.3 AKR1C1基因启动子与虫荧光素酶报告质粒的重组与鉴定

AKR1C1基因启动子序列参照Selga等[1]的报道,上游引物:5′-AAGGTACCCTTCAGAGGAAATTAATGAGTG-3′下游引物:5′-AACTCGAGGTCACTAGCCTGGCTGGCAAATG-3′。以HepG2.2.15细胞基因组DNA为模板,PCR扩增AKR1C1基因启动子序列的DNA片段,回收纯化。将纯化后的AKR1C1基因启动子片段和虫荧光素酶报告质粒pGL3-Basic分别用*Kpn* Ⅰ和*Xho* Ⅰ双酶切后用T_4连接酶连接。提取质粒,并进行测序,命名为pGL3-Basic-AKR1C1-P。

1.4 细胞转染及荧光素酶活性检测

HepG2细胞经计数后接种于24孔板进行培养,按照Lipo-

[基金项目] 国家自然科学基金(30771924)
[通信作者] 汤 华,电话:(023)68486780,E-mail:tanghua86162003@yahoo.com.cn

fectamine 2000™转染试剂盒说明书进行转染。48 h后收集细胞,以海肾荧光素酶表达载体pRL-TK为内参,Turner TD20/20 luminometer检测仪检测荧光强度。以虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值(FL/RL)来表示相对荧光素酶活性。每组实验重复3次。

2 结果

2.1 AKR1C1基因在HepG2.2.15细胞中的表达高于HepG2细胞

我们首先用RT-PCR比较了HepG2.2.15和HepG2细胞当中AKR1C1信使RNA表达情况,结果如图1所示,在稳定表达HBV的HepG2.2.15细胞中,AKR1C1信使RNA的表达高于不表达HBV的HepG2细胞1.5倍。同时Real-time PCR的结果也显示HepG2.2.15细胞中,AKR1C1信使RNA表达量明显高于HepG2细胞。

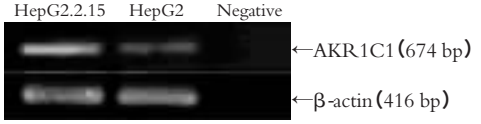
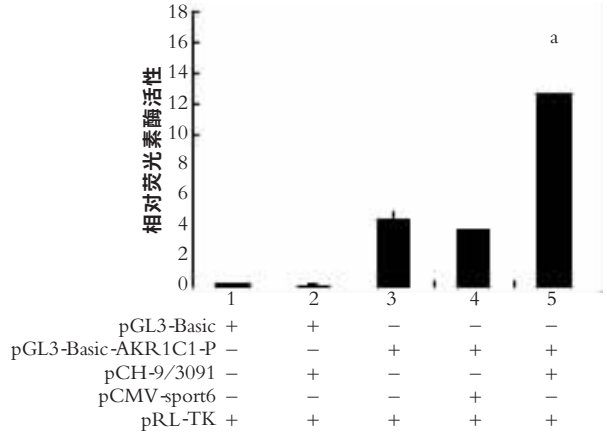


图1 AKR1C1在HepG2.2.15和HepG2细胞中的表达

2.2 HBV增强AKR1C1基因启动子活性

为了研究HBV对AKR1C1基因的表达在转录水平是否有影响,我们将构建好的pGL3-Basic-AKR1C1-P与表达HBV的质粒pCH-9/3091共同转染HepG2细胞,pGL3-Basic-AKR1C1-P与载体pCMV-SPORT6共转染作为对照,每组转染均同时转入pRL-TK质粒作内参。48 h后检测荧光素酶的活性。结果如图2所示,pGL3-Basic-AKR1C1-P与pCH-9/3091共转染组的相对荧光素酶活性是对照组的3.37倍,二者差异有显著性($P<0.05$)。

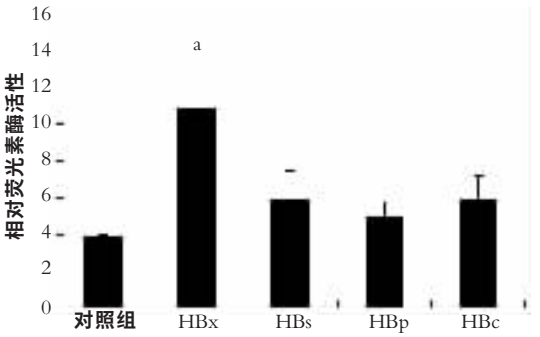


1:转入pGL3-basic;2:转入pGL3-basic和pCH-9/3091;3:转入pGL3-Basic-AKR1C1-P;4:转入pGL3-Basic-AKR1C1-P和pCMV-SPORT6;5:转入pGL3-Basic-AKR1C1-P和pCH-9/3091。另外,每组转染均同时转入pRL-TK质粒作内参;a:$P<0.05$,与对照组(4组)比较

图2 HBV增强AKR1C1启动子活性

2.3 HBx对AKR1C1基因启动子具有反式激活作用

HBx、HBs、HBc、HBp的表达质粒分别与pGL3-Basic-AKR1C1-P共转染HepG2细胞,pGL3-Basic-AKR1C1-P与载体pCMV-SPORT6共转染作为对照,每组转染均同时转入pRL-TK质粒作内参。48 h后检测荧光素酶的活性。结果发现,HBx转染组相对荧光素酶活性为对照组2.83倍,差异有统计学意义($P<0.05$)。HBs、HBc及HBp转染组与对照组差异无显著性(图3)。



a:$P<0.05$,与对照组比较

图3 HBx增强AKR1C1启动子活性

3 讨论

我们检测到在HepG2.2.15细胞中AKR1C1基因在mRNA水平是上调的。HepG2.2.15细胞为整合了HBV基因组,能稳定产生HBV病毒颗粒及表达相关蛋白而被广泛用于HBV致病机理研究的一株肝癌细胞系[3]。AKR1C1在HepG2.2.15细胞当中表达量增加,说明HBV可能对其产生了一定的调节作用。Ye等[5]用基因芯片结果显示在稳定表达HBx的肝癌细胞中AKR1C1表达上调也证明了这点。HBV感染是引起肝细胞癌的一个主要因素,但具体机制仍不清楚[6,7]。而HBx被很多的研究者认为在肝癌形成过程中发挥促进作用,因为在一些禽类肝脏DNA病毒中因缺少x的开放读码框而与肝癌的发生呈现一种非相关性。与之相对的是在HBx转基因小鼠中则能够诱导肝癌的发生[8,9]。

AKR1C1在肝组织中含量丰富。许多报道显示,AKR1C1在多种恶性肿瘤中均出现过度表达,并且与肿瘤的进程密切相关,在非小细胞性肺癌中可以作为判断预后的指征[10]。Selga等[1]的研究表明,AKR1C1在结肠癌细胞中表达量增加,是通过转录因子SP1、SP3与AKR1C1基因启动子结合而实现的。鉴于AKR1C1基因启动子上存在的一些转录因子的结合位点,我们推测HBx可能通过与转录因子结合或者间接作用于这些转录调节因子而影响AKR1C1启动子活性来调节其在肝癌细胞中的表达,具体机制仍有待研究。

参考文献:

[1] Selga E, Noe V, Ciudad C J. Transcriptional regulation of aldo-keto

reductase 1C1 in HT29 human colon cancer cells resistant to methotrexate: role in the cell cycle and apoptosis[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75(2):414 – 426.

[2] El-Kabbani O, Scammells P J, Gosling J, *et al*. Structure-guided design, synthesis, and evaluation of salicylic acid-based inhibitors targeting a selectivity pocket in the active site of human 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1)[J]. J Med Chem, 2009, 52(10): 3259 – 3264.

[3] Sells M A, Chen M L, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(4): 1005 – 1009.

[4] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402 – 408.

[5] Ye L, Dong N, Wang Q, *et al*. Progressive changes in hepatoma cells stably transfected with hepatitis B virus X gene[J]. Intervirology, 2008, 51(1): 50 – 58.

[6] Nguyen M H, Keeffe E B. Chronic hepatitis B: early viral suppression and long-term outcomes of therapy with oral nucleos(t)ides[J]. J Viral Hepat, 2009, 16(3): 149 – 155.

[7] Li J, Ou J H. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor[J]. J Virol, 2001, 75(18): 8400 – 8406.

[8] Arbuthnot P, Kew M. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma[J]. Int J Exp Pathol, 2001, 82(2): 77 – 100.

[9] Kim C M, Koike K, Saito I, *et al*. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice[J]. Nature, 1991, 351(6324): 317 – 320.

[10] Hsu N Y, Ho H C, Chow K C, *et al*. Overexpression of dihydrodiol dehydrogenase as a prognostic marker of non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(6):2727 – 2731.

(**收稿**:2009-07-07;**修回**:2009-10-19)

(编辑　邓强庭)

(上接 296 页)

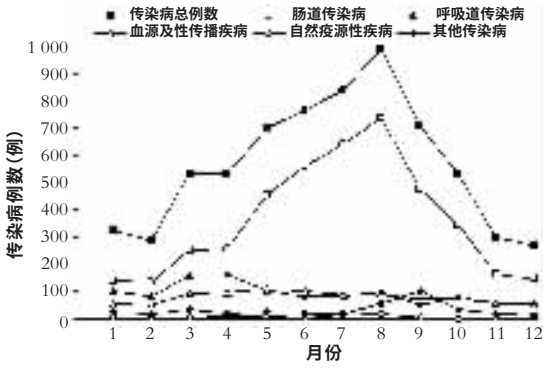


图 1　1992 – 2007 年各类传染病的季节性分布

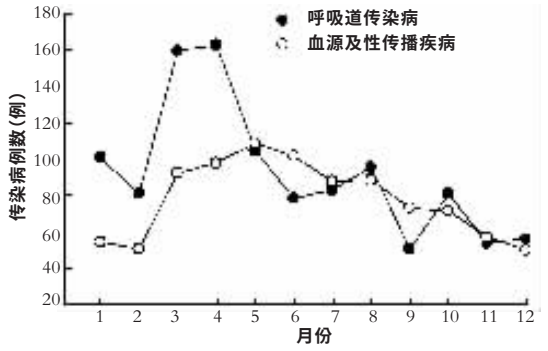


图 2　1992 – 2007 年呼吸道和血源及性传播疾病的季节性分布

3　讨论

从该部 1992 – 2007 年传染病发病的季节分布可以看出，传染病发病呈明显的季节性分布特征，这一特征主要与肠道传染病易发季节有关。肠道传染病发病高峰为夏秋季(5 ~ 10 月份)，11 月份至次年 4 月份维持一个较低的发病水平，这种发病的季节分布趋势明显反映了肠道传染病夏秋季高发的特点[3,4]。因此，在夏秋季节应加强饮食饮水卫生管理和环境整治等综合防控措施，培养官兵良好的生活卫生习惯，把住“病从口入”关，同时医疗卫生机构应开设肠道门诊，及时发现肠道传染病患者，做到患者的早发现、早诊断、早隔离、早治疗。

呼吸道传染病的发病有一定的季节性，3、4 月份发病比其他月份高 80% 左右，这一特点主要与肺结核、麻疹、水痘的春季高发有关[5]。肺结核发病率较高，且治疗周期长，费用高，直接影响到部队的战斗力，故应重点加以防控。此外，军队人群集体生活、集中居住、训练强度大，容易导致呼吸道传染病的发生和传播，故应加大对高发呼吸道传染病的防治力度，采取综合防控策略。

从图 2 看到，血源及性传播疾病 3 ~ 10 月份发病较多，其中 5 月份发病最多，而 11 月份至次年 2 月发病数较少，这种趋势可能与报告的乙肝发病趋势有关，但其季节特征不甚明显，其具体原因有待进一步调查及研究。

分析传染病发病的季节性变化规律对科学、合理地制定军队传染病防控策略提供了理论依据，对制定传染病防治措施具有指导意义。部队开展传染病预防控制工作不仅要在坚持制度性、经常性的疫情监测、督促和管理工作上下工夫，还应结合传染病发病的季节分布特征，开展有针对性、有重点地传染病预防工作，如 5 ~ 10 月份应重点防治肠道传染病，3、4 月份应密切监控呼吸道传染病。

参考文献：

[1] 孙海龙，马纯钢，汤浩，等. 1992 – 2005 年军队传染病流行趋势分析[J]. 解放军预防医学杂志，2007，24(5)：317 – 320.

[2] 郝永建，邓致荣，郭宝石，等. 第二炮兵部队 2001 – 2005 年传染病疫情分析[J]. 解放军预防医学杂志，2007，25(1)：67.

[3] 刘冬莹，吕翔. 潍坊市 2007 年法定传染病流行趋势分析[J]. 医学动物防治，2007，23(10)：744 – 745.

[4] 顾君. 苏州市平江区 2005 年法定传染病疫情分析[J]. 中华流行病学杂志，2007，28(5)：436.

[5] 郝永建，陶涛，郭宝石，等. 某部 1992 – 2007 年呼吸道传染病发病情况分析[J]. 解放军预防医学杂志，2008，26(3)：219.

(**收稿**:2009-07-28;**修回**:2009-08-13)

(编辑　邓强庭)