文章编号:1000-5404(2011)07-0715-04

论著

Caveolin-1的低表达与乙型肝炎病毒感染相关肝细胞癌的关系研究

杨雨晗[1],邓 缅[2] (610083 成都,成都医学院生物医学系:细胞生物学和遗传学教研室[1],生物化学与分子生物学教研室[2])

【摘要】 **目的** 研究小窝蛋白-1(Caveolin-1)的表达与乙型肝炎病毒(HBV)感染以及相关肝细胞癌(HCC)的关系。**方法** 免疫组化法检测HBV相关HCC中Caveolin-1表达量。构建Caveolin-1重组质粒,用Western blot检测转染了重组质粒的HepG2.2.15细胞中Caveolin-1表达量,并用ELISA法检测转染后培养上清中的HBsAg。**结果** 免疫组化结果显示Caveolin-1在95% HBV相关HCC组织中表达低于癌旁组织($P<0.05$)。Caveolin-1重组质粒构建成功并在HepG2.2.15中成功表达。ELISA检测发现用Caveolin-1重组质粒转染HBV感染稳定模型HepG2.2.15细胞48、72 h后,细胞培养上清中的HBsAg浓度相对未转染细胞分别下降了46.2%和48.8%($P<0.05$)。重组质粒转染HBV感染急性细胞模型48、72 h后,HBsAg浓度相对未转染细胞分别下降了41%和50%($P<0.05$)。**结论** Caveolin-1在HBV相关HCC中呈低表达,Caveolin-1的高表达抑制了HBV HBsAg的分泌。

【关键词】 小窝蛋白-1;乙型肝炎病毒;肝细胞癌
【中图法分类号】 R394.3;R512.62;R735.7 【文献标志码】 A

Correlation of low expression of Caveolin-1 and HBV related hepatocellular carcinoma

Yang Yuhan[1], Deng Mian[2] ([1]Department of Cell Biology and Genetics, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Biomedical Sciences, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

【**Abstract**】 **Objective** To detect the expression of Caveolin-1 in hepatitis B virus (HBV) related hepatocellular carcinoma (HCC) and determine the correlation between Caveolin-1 and HBV infection and HCC. **Methods** Immunohistochemical analyses were performed to detect the expression of Caveolin-1 in 40 tissue samples of HBV related HCC and 10 samples of non-related HCC, and their corresponding 50 paracarcinoma tissues. pcDNA3.1(+) Caveolin-1 eukaryotic expression vector was constructed and the recombinant plasmid was transiently transfected into HepG2.2.15 cells. The expression of pcDNA3.1(+) Caveolin-1 was detected by Western blotting. HBsAg expression of transfected cells were determined by ELISA. **Results** Immunohistochemical analyses results showed a lower expression of Caveolin-1 in 95% HBV-related HCC samples compared to their corresponding paracarcinoma samples ($P<0.05$). Western blotting indicated that the recombinant plasmids was successfully transfected into HepG2.2.15 cells and Caveolin-1 was expressed. Using ELISA analysis we observed that the levels of HBsAg in the supernatants of transfected HepG2.2.15 cells were reduced by 46.2% (48 h, $P<0.05$) and 48.8% (72 h, $P<0.05$) compared with the control one. And also a lower secretion of HBsAg was found in the transfected HepG2.2.15 cells (decreased by 41% for 48 h and 50% for 72 h, when compared with the non-transfected cells, $P<0.05$). **Conclusion** Caveolin-1 is expressed at a low level in HBV induced HCC, while the overexpression of Caveolin-1 might down-regulate HBV HBsAg secretion.

【**Key words**】 Caveolin-1; hepatitis B virus; hepatocellular carcinoma

Corresponding author: Deng Mian, Tel: 86-28-68289239, E-mail: 5996965@qq.com

Caveolin-1是相对分子质量为(21~24)×10³的多功能信号蛋白,是组成胞膜窖(caveolae)的主要功能蛋白,富集于细胞膜特异结构小凹、内质网和高尔基体等,并可在细胞质和细胞膜之间穿梭[1]。Caveolin-1参与了多种细胞活动,如膜泡运输、胆固醇运输、信号转导以及肿瘤抑制等[2]。Caveolin-1作为一种抑癌基因,对肿瘤生长转移有抑制作用。在肿瘤中Caveolin-1呈低表达,例如在典型的卵巢癌、肺癌、乳腺癌、间质肉瘤内Caveolin-1的表达均是下调的,但在膀胱癌、食道癌、前列腺癌和甲状腺癌(乳头型)中Caveolin-1表达

【通信作者】 邓 缅,电话:(028)68289239,E-mail:5996965@qq.com

均升高[3]。因此,Caveolin-1 的表达水平是降低、不变还是升高取决于肿瘤细胞的类型。在肝细胞癌(HCC)中,因分化状态、迁移性、侵袭能力甚至致病原因的不同,Caveolin-1 的表达水平也有差异[4]。我国是 HCC 高发地区,且大多数与 HBV 感染有关。研究显示 HBsAg 和甲胎蛋白(AFP)阳性的肝癌患者的 Caveolin-1 蛋白和 mRNA 表达强度明显低于阴性患者,提示 HBV 感染可能导致 Caveolin-1 的沉默[5],为 HBV 提供了一个潜在的治疗靶点。本研究利用免疫组化和分子克隆等方法检测 HBV 相关肝癌、癌旁肝组织中 Caveolin-1 蛋白的表达并分析其表达对 HBV 分泌的影响,为探索 HBV 治疗新途径和抗 HBV 药物的筛选等后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 DMEM 培养基、胎牛血清(FBS,美国 Gibco BRL 公司),载体 pcDNA3.1(+)(Ambion 公司),Trizol(Invitrogen 公司),First-strand cDNA 合成试剂盒(ExScript™ reagent kit,购自 TaKaRa 公司),*Taq* 酶、dNTP、限制性内切酶 *Hind*Ⅲ、*Bam*HⅠ、T_4连接酶(TaKaRa 公司),无内毒素质粒小提试剂盒(Promega 公司),凝胶回收试剂盒(Omega 公司),Lipofectamine 2000™(Invitrogen 公司),SABC 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),Anti-Caveolin-1 polyclonal IgG、Anti-β-actin polyclonal IgG、HRP 标记二抗(Santa Cruz 公司)。

1.1.2 细胞和 HCC 组织样本 人肝癌细胞株 HepG2 和 HepG2.2.15 购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

HCC 患者标本 50 例,其中 40 例患者均有 HBV 感染病史,来自于成都医学院第一附属医院病理科。从每例患者的标本中同时切取肝癌组织和对应的癌旁组织,大小约为 2 cm×2 cm×2 cm;切取的组织立即置于液氮中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 依据从 GenBank 中检索出的 Caveolin-1 基因 mRNA 序列,运用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计 Caveolin-1 基因的 ORF 扩增引物,为了将目的基因克隆至表达载体上,在上下游引物的 5′端分别添加酶切位点和保护碱基。上游引物 5′-CCCAAGCTTATGTCTGGGGGCAAATACG-3′(含 *Hind*Ⅲ酶切位点),下游引物 5′-CCGGGATCCTTATATTTCTTT-CTGCAAGTTGATG-3′(含 *Bam*HⅠ酶切位点),引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2.2 RT-PCR 参见文献[6]用 Trizol 提取细胞总 RNA,测 $D(260)/D(280)$ 值进行 RNA 定量与质量检测,取 1 μg 总 RNA,根据逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA,PCR 反应条件为 95 ℃ 5 min,95 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,72 ℃ 10 min,32 个循环。PCR 产物通过 1% 琼脂凝胶电泳、溴化乙锭染色后,用凝胶成像仪记录图像。引物序列同 1.2.1,得到包含了 Caveolin-1 CDS 序列的大小为 538 bp 的产物。

1.2.3 重组质粒 pcDNA3.1(+) Caveolin-1 的构建及鉴定 参见文献[7]以逆转录 cDNA 为模板进行 PCR 反应,反应体系为:10×BufferⅡ 5 μl,dNTP(2.5 mmol/L) 4 μl,上、下游引物各 1 μl,r*Taq* DNA 酶 1 μl(5 U/μl),模板 1 μl,用超纯净水补足至 50 μl。反应条件:95 ℃变性 5 min,94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min,共 30 个循环,然后 72 ℃延伸 5 min,获得约 538 bp大小的目的片段。用胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收,然后用限制酶 *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ进行酶切,同时用限制酶 *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ对表达载体 pcDNA3.1(+)进行酶切。将酶切后的 PCR 产物和酶切后的 pcDNA3.1(+)用 T_4 DNA 连接酶进行连接(16 ℃,过夜)。转化连接产物至大肠杆菌感受态后,挑取单菌落进行扩增,提取质粒并用 *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ双酶切连接产物,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切结果。将酶切正确的结果送 Invitrogen 公司测序。

1.2.4 重组质粒在真核细胞中的表达 参见文献[7]人肝癌细胞系 HepG2 和 HepG2.2.15 常规培养(DMEM 培养基,10% 胎牛血清,37 ℃,5% CO_2)。转染前 24 h,将细胞接种至 24 孔板上,每孔接种约 5×10^4 细胞,当细胞达 70% ~80% 时,将重组质粒 pcDNA3.1(+) Caveolin-1 以脂质体介导的方法转染 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞。具体步骤按照 Lipofectamine 2000 说明书操作。

1.2.5 免疫组化 参见文献[8]从液氮罐中取出临床组织,经 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,常规组织脱水、透明,石蜡包埋,制成目标蜡块。做 4 μm 连续切片,经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,高温高压抗原修复正常血清封闭后孵育一抗 2 h,二抗 40 min,SABC 复合物 40 min。DAB 显色并苏木精复染。

1.2.6 Western blot 参见文献[9]转染 72 h 后收集细胞,将细胞以 RIPA buffer 蛋白裂解液裂解,Braford 法测蛋白浓度,12% 的 SDS-PAGE 分离胶后转膜至 PVDF 膜。置膜于含 5% 脱脂牛奶的 PBST 中,4 ℃封闭过夜;一抗(Caveolin-1,1∶500;β-actin,1∶500)4 ℃孵育过夜,二抗 37 ℃孵育 2 h。ECL 显影,Quantity One 软件分析图像。

1.2.7 ELISA 参见文献[10]转染后 24、48、72 h 常规换液,更换等体积 DMEM 培养基继续培养,收集培养上清液 -70 ℃ 冻存。上清液中 HBV 浓度测定按照乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒进行。酶标仪 450 nm 处测光密度值[$D(450)$],根据标准品的光密度值求出标准曲线方程,计算出相应细胞上清液中 HBV 浓度。

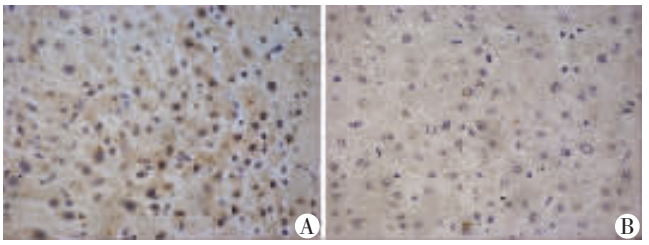
1.3 统计学分析

采用 SAS9.1 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,变化趋势的组间比较用重复观测资料的方差分析。

2 结果

2.1 Caveolin-1 蛋白在肝癌及癌旁组织中的表达

Caveolin-1 蛋白在无 HBV 感染病史的 HCC 中 9 例(90%,9/10)呈阳性表达,在有 HBV 感染病史的 HCC 中,有 38 例(95%,38/40)呈极弱阳性的表达,且显著低于无 HBV 感染病史的 HCC($P<0.05$,图 1)。

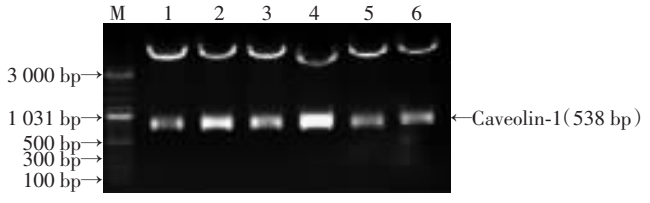


A：无 HBV 感染病史的 HCC；B：有 HBV 感染病史的 HCC

图 1　免疫组化检测 HBV 相关 HCC 组织中 Caveolin-1 的表达（SABC ×400）

2.2　重组表达质粒 pcDNA3.1(+)Caveolin-1 鉴定

选取的克隆经 PCR 扩增出 538 bp 的片段，与预期一致。构建的 pcDNA3.1(+) Caveolin-1 质粒限制酶 *Hind*Ⅲ和 *Bam*HⅠ进行酶切鉴定，如图 2 中电泳显示重组质粒被切成大分子的载体和 538 bp 大小的 Caveolin-1 序列片段。测序结果显示重组质粒 pcDNA3.1(+)Caveolin-1 序列与 GenBank 中检索出的 Caveolin-1 mRNA 序列一致，进一步证明目的基因片段成功插入载体。

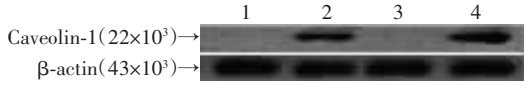


M：Marker；1～6：pcDNA3.1(+) Caveolin-1 重组质粒酶切产物

图 2　pcDNA3.1(+) Caveolin-1 重组质粒酶切结果

2.3　质粒转染细胞及其体外表达

如图 3 所示，转染了重组质粒的 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞表达 Caveolin-1，而未转染的 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞没有表达 Caveolin-1，说明重组质粒构建成功，且可以在细胞中正常表达。

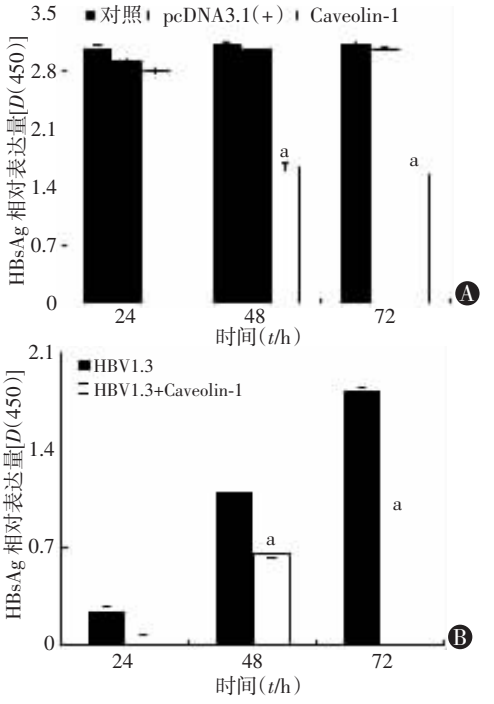


1：HepG2；2：HepG2 + Caveolin-1；3：HepG2.2.15；4：HepG2.2.15 + Caveolin-1

图 3　Western blot 检测重组质粒转染细胞后 Caveolin-1 的表达

2.4　ELISA 检测培养上清 HBV 的 HBsAg 结果

结果如图 4 所示，在转染后 24 h 的 HBsAg 浓度变化不大。转染后 48、72 h，转染重组质粒 pcDNA3.1(+) Caveolin-1 的 HepG2.2.15 细胞的 HBsAg 浓度相对未转染细胞分别下降了 46.2% 和 48.8%（$P<0.05$）。另外，用可表达 HBsAg 的 HBV 1.3 质粒转染 HepG2 细胞构建 HBV 感染急性模型。重组质粒 pcDNA3.1(+)Caveolin-1 转急性细胞模型后，ELISA 检测显示转染了 Caveolin-1 质粒细胞的 HBsAg 浓度相对未转染 Caveolin-1 质粒的分别下降了 41%（48 h）和 50%（72 h）（$P<0.05$）。可见，Caveolin-1 的高表达显著降低了 HBsAg 的分泌。



A：HepG2　a：$P<0.05$，与 pcDNA3.1(+) 比较

B：HepG2.2.15　a：$P<0.05$，与 HBV1.3 比较

图 4　ELISA 检测 Caveolin-1 表达引起的 HBV HBsAg 分泌变化

3　讨论

Caveolin-1 作为胞膜窖的主要功能蛋白，参与了多种细胞活动，如膜泡运输、胆固醇运输、信号转导以及肿瘤抑制等。研究还表明 Caveolin-1 参与多种病毒的感染、复制及出芽等[11-12]。本实验为了证明 Caveolin-1 的表达是否影响 HBV 的生理活动，收集了 40 例具有 HBV 感染史的 HCC 临床样本，并用免疫组化法检测了 Caveolin-1 在其中的表达，结果显示 Caveolin-1 在 95% 的 HBV 持续感染导致的 HCC 组织中的表达都低于癌旁组织，这一结果与 Yerian 等[13]和闫军等[14]的研究相符。Caveolin-1 在 HBV 相关 HCC 中的低表达提示 Caveolin-1 的表达量与 HBV 的感染存在某种联系。

为了进一步了解 HBV 感染与 Caveolin-1 表达的关系，我们构建了 Caveolin-1 重组质粒来调控 HBV 感染细胞模型中 Caveolin-1 的表达并观察其对 HBV 的影响。用重组 Caveolin-1 质粒转染 HBV 稳定转染细胞模型 HepG2.2.15 后发现 HBsAg 浓度相对未转染细胞明显下降。另外，用 HBV 1.3 质粒转染 HepG2 细胞构建的急性模型，我们也观测到 Caveolin-1 质粒转染细胞的 HBsAg 分泌浓度较对照组显著下降。ELISA 检测结果显示，Caveolin-1 的高表达抑制了 HBV 的 HBsAg 的分泌水平。

本研究表明，Caveolin-1 在 HBV 相关 HCC 组织中低表达，且 Caveolin-1 的高表达抑制了 HBV 的 HBsAg 的分泌。然而，Caveolin-1 对 HBV 的具体作用以及

Caveolin-1 表达在 HBV 感染中下调的具体机制还有待进一步研究。

参考文献：

[1] Liu P, Rudick M, Anderson R G. Multiple functions of caveolin-1 [J]. J Biol Chem, 2002, 277(44): 41295 - 41298.

[2] Williams T M, Lisanti M P. The caveolin proteins[J]. Genome Biol, 2004, 5(3): 214.

[3] 邸辉,焦保华. Caveolae、Caveolin-1 的功能及在肿瘤中的作用研究进展[J]. 中国医疗前沿, 2009, 4(22): 11 - 12,27.

[4] Cokakli M, Erdal E, Nart D, *et al*. Differential expression of Caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation state, motility and invasion[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 65.

[5] 赵伊遐, 付蕾, 席蕾, 等. 肝癌及癌旁肝组织中 caveolin-1 表达及其意义[J]. 中国普通外科杂志, 2007, 16(9): 867 - 871.

[6] 万涛, 张小花, 张磊, 等. HBV 对肝癌细胞中 AKR1C1 基因表达的影响[J]. 第三军医大学学报,2010, 32(3): 297 - 299.

[7] 杞少华, 彭芳芳, 张百芳, 等. PHLCX Nflag3/小窝蛋白-1 重组质粒的构建及融合基因在 293T 细胞中的表达[J]. 生命科学研究, 2005, 9(4): 331 - 335.

[8] 李菊, 苏宝山, 吴静. Caveolin-1 在宫颈癌组织中的表达及意义[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(4): 784 - 786.

[9] 徐阳炎, 杨慧龄, 涂剑, 等. pcDNA3.1/NT-GFP 小凹蛋白 1 及突变体表达载体的构建及功能分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(3): 297 - 300.

[10] 张胜权, 胡道军, 朱娟娟, 等. TLR7 激活对 HepG2.2.15 细胞株炎症因子 TNF-α 和 IL-6 表达的上调作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(9): 934 - 937.

[11] Ravid D, Leser G P, Lamb R A. A role for caveolin 1 in assembly and budding of the paramyxovirus parainfluenza virus 5[J]. J Virol, 2010, 84(19): 9749 - 9759.

[12] Brown G, Aitken J, Rixon H W, *et al*. Caveolin-1 is incorporated into mature respiratory syncytial virus particles during virus assembly on the surface of virus-infected cells[J]. J Gen Virol, 2002, 83(Pt 3): 611 - 621.

[13] Yerian L M, Anders R A, Tretiakova M, *et al*. Caveolin and thrombospondin expression during hepatocellular carcinogenesis[J]. Am J Surg Pathol, 2004, 28(3): 357 - 364.

[14] 闫军, 卢倩, 蔡磊, 等. 凹陷蛋白-1 基因在乙型肝炎相关性肝癌中的表达及其意义[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(46): 3272 - 3274.

(收稿:2010-10-29 修回:2010-11-30)

(编辑 张 维)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2011)07-0718-01

过量误服甲磺酸伊马替尼治疗慢性粒细胞白血病达到遗传学缓解 1 例

李 明,席亚明,张 豪,邓 伟,李 培 (730000 兰州,兰州大学第一医院血液科,血液病研究所)

【关键词】 伊马替尼;慢性粒细胞白血病

【中图法分类号】 R979.1 【文献标志码】 B

甲磺酸伊马替尼(商品名:格列卫)是慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia,CML)的分子靶向性药物,对慢性粒细胞白血病慢性期患者剂量为 400 mg/d,对急变期和加速期患者剂量为 600 mg/d。我院收治的 1 例 CML 慢性期患者过量误服甲磺酸伊马替尼 1200 mg/d,连续 10 d,并无明显的药物副反应发生,且快速达到部分细胞遗传学缓解,现报告如下。

1 病例资料

患者,男性,27 岁,藏族,因"腰困、乏力 2 个月"在当地县医院就诊。查血常规:白细胞 116×10^9/L,红细胞 3.82×10^{12}/L,血红蛋白 146 g/L,血小板 386×10^9/L,疑白血病,遂到我院诊治。入院查血常规:白细胞 75.20×10^9/L,中性中幼粒 23%,中性晚幼粒 3%,中性分叶核 62%,嗜碱中幼粒 1%,嗜碱分叶核 5%,成熟淋巴细胞 6%,血红蛋白 110 g/L,血小板 260×10^9/L。骨髓涂片检查:骨髓增生明显活跃,粒:红=31.33:1,粒系以中晚幼粒细胞为主,占 57%,原粒 4.5%,早幼粒 4%;红系明显受抑,中幼红 0.5%,晚幼红 2.5%,成熟红细胞大小不一,填充欠佳;淋巴细胞相对偏低,2.5%;单核细胞未见异常;巨核细胞 117 个,幼巨 19 个,产板巨 5 个,其余为成熟颗粒巨;NAP 积分 3 分。染色体分析:46,XY,t(9;22)。bcr/abl 融合基因阳性,为 b3a2 型。FISH 检测 bcr/abl(+)细胞占 84.51%。腹部 B 超示:脾脏增大,厚度约 67 cm,肋缘下未探及。诊断:慢性粒细胞白血病(慢性期)。给予羟基脲降白细胞、水化、碱化等对症支持治疗,患者白细胞逐渐下降。当白细胞为 39×10^9/L 时,开始给予甲磺酸伊马替尼 400 mg,1 次/d,口服。患者因语言沟通及翻译障碍,将甲磺酸伊马替尼误服为 400 mg,3 次/d,口服,即 1 200 mg/d,连续服用 10 d。患者误服甲磺酸伊马替尼期间,无恶心、皮疹、肌肉痉挛、骨痛、关节痛、腹泻、水肿等不良反应。误服后第 3 天查血常规:白细胞 2.75×10^9/L,中性粒细胞 53%,血红蛋白 110 g/L,血小板 290×10^9/L。误服后第 10 天查血常规:白细胞 1.85×10^9/L,中性粒细胞 54%,血红蛋白 110 g/L,血小板 105×10^9/L。骨髓无明显抑制,粒:红=1.72:1。FISH 检测 bcr/abl(+)细胞占 34%。血生化:丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、胆红素(直接、间接)、尿素氮、肌酐正常。尿常规:蛋白质 2+,亚硝酸盐阳性。误服后第 16 天白细胞上升至 3.15×10^9/L,继续给予甲磺酸伊马替尼 400 mg,1 次/d,口服。1 个月后复查血生化正常。心电图正常。心脏彩超:左心收缩功能正常,EF 65.64%。肺功能:通气功能正常。尿常规正常。骨髓:增生尚活跃,粒:红=2.27:1,中幼粒 7.5%,晚幼粒 3%;红系比例略偏高,中幼红 5.5%,晚幼红 15%,成熟红细胞大小轻度不一,部分略偏大,填充尚好;淋巴细胞相对偏高,29.5%;单核细胞未见异常;幼巨 1 个,成熟颗粒巨 2 个,血小板散在成簇分布。

【通信作者】 席亚明,E-mail:xiyaming02@163.com

(下转 722 页)