文章编号:1000-5404(2012)13-1259-06

论著

HBx基因缺失突变对HBV复制和转录的影响

罗 莉[1],何 松[1],郭进军[1],雷 宇[2],罗 娜[1],龚 倩[1] (400010 重庆,重庆医科大学:附属第二医院消化内科[1],病毒性肝炎研究所[2])

[摘要] **目的** 构建HBx基因缺失突变质粒pUC-HBV1.0.X7,研究HBx缺失对HBV复制和转录的影响。**方法** 以包含HBV全长基因组的野生型质粒pUC-HBV1.0为模板,用定点突变技术构建HBx基因缺失突变质粒pUC-HBV1.0.X7,并酶切和DNA测序鉴定。用*Sap* Ⅰ单酶切这两种质粒,获得线性的野生型和HBx缺失突变型HBV基因组,经转染试剂PolyJet™ Reagent介导分别瞬时转染到HepG2细胞中。在转染后各时间点Western blot检测HBx蛋白的表达,Southern blot和Real-time PCR同时检测细胞质DNA复制和细胞核cccDNA的合成,Real-time PCR分析定量HBV前基因组RNA(pgRNA)的转录。**结果** 在野生组中可检测到HBx蛋白的表达,而在HBx突变组中HBx蛋白的表达低于Western blot的检测范围。两组中各时间点合成的cccDNA水平无统计学差异($P>0.05$)。而在转染后96 hHBx突变组中细胞质DNA的复制和pgRNA的转录都分别比野生组减少50%~70%($P<0.05$)。**结论** HBx缺失虽然不影响细胞核HBV cccDNA的合成,但是它能下调细胞质HBV DNA的复制和pgRNA的转录。

[关键词] HBV X蛋白;cccDNA;前基因组RNA;定点突变技术
[中图法分类号] R394-33; R394.3; R373.21 [文献标志码] A

Effect of absence of HBx expression on HBV replication and transcription

Luo Li[1], He Song[1], Guo Jinjun[1], Lei Yu[2], Luo Na[1], Gong Qian[1] ([1]Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, [2]Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] Objective To construct the HBx-defective mutant plasmid pUC-HBV1.0.X7, and investigate the effect of the absence of HBx on HBV replication and transcription. Methods The wild-type plasmid pUC-HBV1.0 which containing full-length HBV genome was used as a template, and the plasmid pUC-HBV1.0.X7 with a stop codon at amino acid 7 of HBx was constructed by site-directed mutagenesis, which was then identified by *Hin*d Ⅲ and *Sac* Ⅰ restriction digestion and DNA sequencing. Then the plasmids pUC-HBV1.0 and pUC-HBV1.0.X7 were both digested by *Sap* Ⅰ enzyme to obtain linear HBV DNA, and the two kinds of linear HBV DNA were separately transfected into HepG2 cells with PolyJet™ Reagent. The expression of HBx was detected by Western blotting. Cytoplasmic HBV DNA and cccDNA were both detected by Southern blotting and real-time PCR. The transcription of HBV pgRNA was quantified by real-time PCR at different time points after transfection. Results The HBx-deficient plasmid pUC-HBV1.0.X7 was verified to be constructed successfully by double digestion and DNA sequence analysis. The expression of HBx was detected in the group of wild-type, while it was below the detection limit by Western blotting in the HBx mutant. The levels of cccDNA formation were not significantly different in the wide type HBx and HBx mutant ($P>0.05$). The levels of cytoplasmic HBV DNA and pgRNA in the HBx mutant were reduced by 50% to 70% respectively compared to those in the wild type HBx at 96 h ($P<0.05$). Conclusion Although the absence of HBx does not affect cccDNA formation, it can downregulate HBV replication and transcription.

[**Key words**] heptitis B virus X protein; covalently closed circular DNA; pregenomic RNA; site-directed mutagenesis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872249). Corresponding author: He Song, E-mail: hedoctor65@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30872249)
[通信作者] 何 松,E-mail: hedoctor65@sina.com

长期的研究表明HBV的X蛋白(HBx)与肝癌的发生、发展有密切关系,尽管它确切的致病作用还存在争议[1]。HBx蛋白是一个编码154个氨基酸,相对分子质量为17 $\times 10^3$的多功能调控蛋白。它主要存在于细胞质,少数存在于细胞核。它与宿主因子一起直接或间接地通过反式激活作用调节蛋白降解、转录复制、信号转导、细胞凋亡、细胞周期、DNA损伤修复等生物学活动[2]。HBV病毒的基因组DNA呈松弛环状DNA双链结构(relaxed circular, rcDNA),在细胞质内病毒脱衣壳,rcDNA转运至细胞核,在DNA聚合酶作用下合成HBV共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA,cccDNA);在RNA聚合酶Ⅱ的作用下,以HBV cccDNA为模板转录合成3.5 kb的HBV前基因组RNA(pregenomic RNA, pgRNA)。HBV pgRNA转运至细胞质,与HBV核心蛋白和聚合酶组成复合体,也可逆转录合成HBV rcDNA负链[3-4]。已有研究表明HBx对病毒复制起着重要的调控作用[5]。为此,本实验运用定点突变PCR技术,以包含HBV全长基因组的野生型质粒pUC-HBV1.0为模板构建HBx基因缺失突变型质粒pUC-HBV1.0.X7,用*Sap*Ⅰ酶切这两种质粒后获得线性的野生型和HBx缺失突变HBV基因组DNA,并瞬时转染至HepG2细胞,研究HBx缺失对HBV复制和转录的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 包含HBV全长基因组以及*Hind*Ⅲ/*Sap*Ⅰ、*Sac*Ⅰ/*Sap*Ⅰ性内切酶位点的野生型质粒pUC-HBV1.0已前期构建保存[6],感受态大肠杆菌*E. coli*. DH 5α购自天根公司。

1.1.2 细胞株 人肝细胞癌细胞株HepG2细胞为重庆医科大学附属第二医院消化内科实验室提供。

1.1.3 主要试剂 *Hind*Ⅲ和*Sac*Ⅰ酶、Premix PrimeStar® HS、λ-EcoT14 I DNA Marker、PrimeScript™RT reagent Kit、SYBR® Premix Ex *Taq*™Ⅱ kit试剂盒(大连宝生物公司);*Dpn*Ⅰ酶和预染的蛋白Marker,*Sap*Ⅰ限制性内切酶(Fermentas);去内毒素质粒小抽提试剂盒(北京百泰克生物公司);转染试剂PolyJet™ Reagent(Sina Gen Laboratories);蛋白酶抑制剂PMSF、RIPA细胞裂解液(中性)、SDS-PAG凝胶配制试剂盒(上海碧云天科技生物公司);兔抗HBx多克隆抗体(Abcam);兔抗β-actin多克隆抗体和辣根酶标记的羊抗兔IgG(北京康为生物公司);ECL检测试剂盒(南京凯基公司);Trizol Reagent试剂(Invitrogen);DNA纯化试剂盒、RQ1 RNase-Free DNase (Promega);DMEM高糖培养基(Hyclone);Plasmid Safe™ ATP-Dependent DNase (Epicentre),胎牛血清(杭州四季青生物公司),乙肝病毒DNA纯化试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司),Southern blot检测试剂盒和探针标记试剂盒(Roche),PCR引物由大连宝生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 HBx缺失突变型质粒pUC-HBV1.0.X7的构建和鉴定 根据pUC-HBV1.0中HBx序列和定点突变要求(将包含HBV全长基因组的质粒pUC-HBV1.0 HBx读码框中第7位氨基酸引入终止密码,即将第8位谷氨酰胺Gln的密码子CAA突变为终止密码TAA)[7-8],设计出一对包含突变位点的正反向引物序列P1和P2,P1:5′-CTAGGCTGTGCTGC(**T**)AACTGGATCCTGCG-3′;P2:5′-CGCAGGATCCAGTT(**A**)GCAGCACAGCCTAG-3′,括号内黑体字为突变碱基。PCR定点突变50 μl反应体系中包含Premix PrimeSTAR® HS 25 μl,突变引物P1、P2各1 μl(0.2 μmol/L),模板质粒pUC-HBV1.0约50 ng,加无菌去离子水补足至50 μl。反应条件为:98 ℃变性10 s,60 ℃退火5 s,72 ℃延伸6 min,共循环30次,最后4 ℃保存。PCR突变产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳检测。用*Dpn*Ⅰ酶消化模板质粒pUC-HBV1.0。然后将消化后的PCR突变产物直接转化到感受态大肠杆菌*E. coli* DH 5α,涂布在含氨苄青霉素的LB平板上。随机挑起3个白色菌落接种培养,用去内毒素质粒小抽提试剂盒提取相应质粒,用*Hind*Ⅲ和*Sac*Ⅰ酶对其酶切和DNA测序鉴定。

1.2.2 线性HBV DNA的获得 *Sap*Ⅰ酶单酶切质粒pUC-HBV1.0和pUC-HBV1.0.X7,其酶切产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下切下3 200 bp条带的胶,用DNA纯化试剂盒进行胶回收纯化,分别获得线性的野生型HBV全长基因组DNA和HBx缺失突变HBV基因组DNA。

1.2.3 细胞培养和HBV DNA转染 HepG2细胞置于37 ℃、5% CO_2孵箱中,用含10%的胎牛血清的DMEM高糖培养基常规培养传代。实验分空白对照组:未转染任何DNA;野生组:转染线性的野生型HBV全长基因组DNA;HBx突变组:转染线性的HBx缺失突变型HBV DNA。取对数生长期细胞,按每孔约1.0×10^6个细胞密度接种于6孔板中培养18~24 h,使细胞融合达70%~80%时,将1.5 μg质粒DNA与4 μl转染试剂PolyJet™ Reagent瞬时转染至每孔HepG2细胞中,转染组分别加入绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)质粒0.5 μg评估转染效率。转染后48 h在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白GFP的表达情况。

1.2.4 Western blot检测HBx蛋白的表达 转染后48、96 h,收集细胞提取细胞总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度。取80 μg细胞总蛋白进行12% SDS-PAGE凝胶电泳,湿转印于PVDF膜上,用含5%牛血清白蛋白(BSA)的封闭液室温封闭1 h,分别加入兔抗HBx多克隆抗体(1∶1 000)、兔抗β-actin多克隆抗体(1∶1 000)4 ℃孵育过夜。洗膜后将膜置于辣根酶标记的羊抗兔IgG(1∶2 000)室温孵育1 h,ECL显影,β-actin作为内参对照。用Quantity One图像分析软件对图像进行分析,将每个样本中HBx蛋白的光密度值与β-actin的光密度值相比,得出的比值代表HBx蛋白相对表达。

1.2.5 Southern blot检测 转染后48、96 h收集细胞,用乙肝病毒DNA纯化试剂盒提取细胞质HBV DNA,并提取细胞核HBV cccDNA方法如下[9]:用500 μl的细胞裂解液[50 mmol

Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol EDTA, 0.2% NP-40, 150 mmol NaCl]裂解细胞。在 4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min 后,其沉淀重悬在 500μl 细胞核裂解液(6% SDS,100 mmol NaOH)中,充分混匀后在 37℃孵育 30 min,再用 3 mol 的醋酸钾 (pH = 4.8) 进行中和,4℃ 12 000 r/ min 离心 10 min。然后用 DNA 纯化试剂盒回收纯化 HBV cccDNA。Southern blot 检测细胞质 DNA 病毒复制中间体和细胞核 cccDNA。取 10 μg 的细胞质 DNA 和 cccDNA 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳后,将 DNA 转印至尼龙膜上,用^{32}P 标记的全长 HBV 基因组 DNA 作为探针进行杂交,洗膜后在 -80℃曝光[10]。用 Quantity One 图像分析软件对图像进行分析,将转染后 48 h 野生组中细胞及 DNA 复制中间体[单链 DNA(single-stranded, SS)]和细胞核 cccDNA 的水平设置为 100%,HBx 突变组中细胞质 DNA 复制中间体和细胞核 cccDNA 的水平分别与野生组进行比较。

1.2.6 定量分析 HBV 细胞质 DNA 细胞转染后 24、48、72、96 h,用 *Taq*Man 探针法进行 Real-time PCR 对提取的细胞质 HBV DNA 进行绝对定量检测。上游引物为:5′-AGAAACAA-CACATAGCGCCTCAT-3′,下游引物为:5′-TG CCCCATGCTG-TAGATCTTG-3′;*Taq*Man 探针为:5′-FAM-TGTGGGTCACCAT-ATTCTTGGG-TAMER-3′[8]。Real-time PCR 20 μl 反应体系为:Premix Ex *Taq* 10 μl, DNA 20 ng, ROX Reference Dye 0.4 μl,上下游引物各 0.4 μl(0.2 μmol/L),探针 0.8 μl(0.4 μmol/L),用无菌去离子水补足体积至 20 μl。扩增反应条件为:95 ℃预变性 30 s, 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 31 s,共循环 40 次。将质粒 pUC-HBV1.0 作 10^9 ~ 10^3 梯度稀释后作为标准品。其结果表示为 DNA 的拷贝数(copies/cell)。

1.2.7 定量分析细胞核 cccDNA 细胞转染 24、48、72、96 h,提取的细胞核 cccDNA 用 Plasmid Safe™ ATP-Dependent DNase 在 37 ℃处理 1 h,去除开环和单链 DNA。用 *Taq*Man 探针法进行 Real-time PCR 绝对定量检测 HBV cccDNA。上游引物为:5′-CTCCCCGTCTGTGCCTTCT-3′,下游引物为 5′-GCCCCAAAGC-CACCCAAG-3′。探针为:5′-GTTCACGGTGGTCTCCATGCAACGT-FAM-3′ 和 5′-ROX-AGGTGAAGCGAAGTGCACACGGACC-PO4-3′[6,9]。Real-time PCR 20 μl 反应体系为:Premix Ex *Taq* 10 μl, DNA 10 ng,FAM-3′标记的探针 0.4 μl (0.2 μmol/L), 5′-ROX-标记探针 0.8 μl(0.4 μmol/L),上下游引物各 2 μl(0.5 μmol/L),用无菌去离子水补足总体积至 20 μl。扩增反应条件为:95 ℃预变性 10 min, 95 ℃ 10 s , 58 ℃ 5 s, 63 ℃ 10 s, 72 ℃ 20 s, 共 45 个循环。标准曲线制作方法同 Real-time PCR 定量分析细胞质 DNA 中所述。其结果表示为 DNA 的拷贝数 (copies/cell)。

1.2.8 定量分析 HBV 前基因组 RNA(pgRNA)转录 细胞转染后 24、48、72、96 h,用 Trizol Reagent 试剂提取细胞总 RNA,用 RQ1 RNase-Free DNase 37 ℃处理 30 min,以去除混入细胞的基因组 DNA,用紫外分光光度法测定 RNA 浓度和纯度。按照 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒说明将 DNase 处理后的 RNA 逆转录成 cDNA。然后用 SYBR® Premix Ex *Taq*™ Ⅱ试剂盒相对定量检测 HBV pgRNA 表达水平。检测 pgRNA 特异性引物序列:5′-GCCTTAGAGTCTCCTGAGCA-3 ′(上游), 5′-GAGGGAGTTCTTCTTCTAGG-3′(下游)[11];内参 GAPDH 序列:5′-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC -3′(上游), 5′-GAAGATGGT-GATGGGATTTC -3′(下游)。GAPDH 用作内参以标化各 RNA 样品。Real-time PCR 20 μl 的反应体系中包括 SYBR® Premix Ex *Taq*™ Ⅱ 10 μl, 上下游引物各 0.8 μl (0.4 μmol/L), Rox Reference Dye 0.4 μl, cDNA 2 μl,用无菌去离子水补足 20 μl。反应条件为 95 ℃预变性 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 31 s 40 个循环。用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法相对定量分析 HBV pgRNA 的转录。

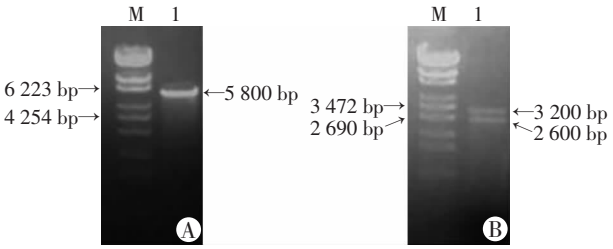
1.3 统计学分析

每次独立的实验重复操作 3 次以上,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间持续变化的比较用 SPSS 19.0 统计软件进行非参数的 Wilcoxon 秩和检验。用 Quantity One 图像分析软件对图像进行分析。

2 结果

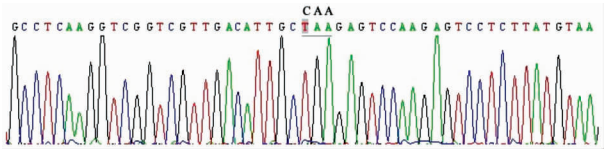
2.1 HBx 缺失突变型质粒 pUC-HBV1.0.X7 的鉴定

以 pUC-HBV1.0 为模板进行 PCR 定点突变,PCR 突变产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后见 5 800 bp 的条带(带缺刻的开环的 HBx 缺失突变质粒),与预期结果相符(图 1A)。突变产物经 DpnI 酶消化模板质粒后转化到感受态大肠杆菌 DH 5α,随机挑起 3 个白色菌落。用 *Hind*Ⅲ和 *Sac* Ⅰ酶双酶切抽提的质粒,其酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后见 3 200 bp HBx 缺失突变型 HBV DNA 片段和 2 600 bp pUC19 载体片段(图 1B)。酶切结果正确的质粒送检测序,测序结果显示 HBx 读码框中第 7 位氨基酸引入终止密码,即将第 8 位谷氨酰胺 Gln 的密码子 CAA 突变为终止密码 TAA,也与预期结果相符(图 2)。



A:HBx 缺失突变型质粒 pUC-HBV1.0.X7 的扩增 M:标准 ;1:PCR 突变产物;B:HBx 缺失突变型质粒 pUC-HBV1.0.X7 的酶切鉴定 M:标准;1:*Hind*Ⅲ和 *Sac* Ⅰ双酶切产物

图 1 HBx 缺失突变型质粒 pUC-HBV1.0.X7 的扩增和酶切鉴定结果

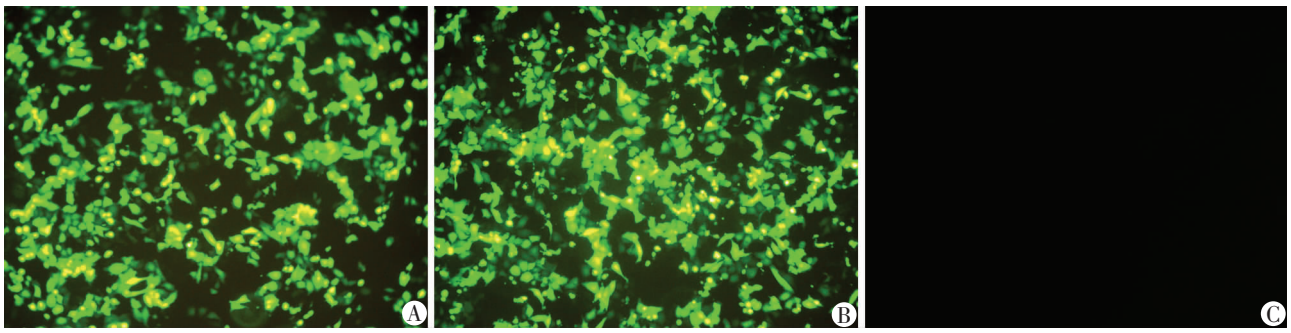


下划线为突变碱基

图 2 HBx 缺失突变型质粒 pUC-HBV1.0.X7 部分测序结果

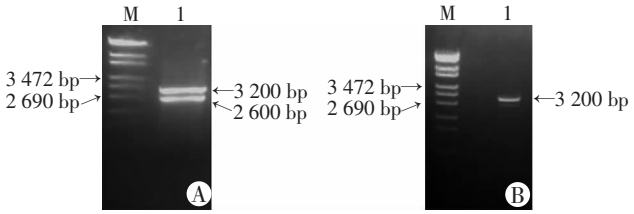
2.2 线性 HBV DNA 的获得

Sap Ⅰ酶单酶切野生型质粒 pUC-HBV1.0 和 HBx 缺失突变质粒 pUC-HBV1.0.X7,其酶切产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后见 3 200 bp HBV DNA 片段和 2 600 bp pUC19 载体片段(图 3A);紫外灯切下 3 200 bp 的胶条,经胶回收纯化得到的 DNA 后再进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳后只见 3200 bp HBV DNA 片段(图 3B)。



A:野生组;B:HBx 突变组;C:空白对照组

图4 HBV DNA 转染 48 h 后 HepG2 细胞中 GFP 的表达 (倒置荧光显微镜 ×200)



A:HBx 缺失突变型质粒 pUC-HBV1.0.X7 酶切鉴定 M:标准;1:*Sap* Ⅰ 酶切后产物; B:HBV DNA 胶回收纯化图 M:标准;1:回收纯化后的 HBx 缺失突变 HBV DNA

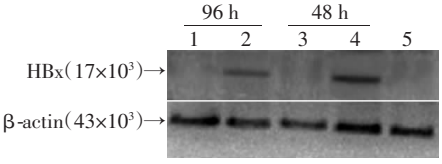
图3 *Sap* Ⅰ酶切 HBx 缺失突变型质粒 pUC-HBV1.0.X7 的产物和 HBV DNA 胶回收纯化结果

2.3 HBV DNA 转染 HepG2 细胞后 GFP 的表达

线性的野生型 HBV 全长基因组 DNA 和 HBx 缺失突变型 HBV DNA 经转染试剂 PolyJet™ Reagent 介导分别瞬时转染到 HepG2 细胞,转染组分别加入绿色荧光蛋白 GFP 质粒 0.5 μg 评估效率。转染后 48 h,在倒置荧光显微镜下观察到转染 2 种 HBV DNA 的 HepG2 细胞中都可见绿色荧光的表达,平均转染效率约 50% 左右,空白对照组中未见绿色荧光(图 4)。

2.4 HBx 蛋白的表达

细胞转染 48 和 96 h 后,提取细胞总蛋白,Western blot 检测 HBx 蛋白在 HepG2 细胞中的表达。在转染后 48 和 96 h,野生组中均可见 HBx 蛋白的表达,并且在 48 h 的表达(0.68 ± 0.04)比 96 h 的表达(0.32 ± 0.03)显著($P<0.05$)。而在 HBx 突变组和空白对照组中都未见 HBx 的表达。这表明野生型和 HBx 缺失突变型 HBV 细胞复制模型构建成功(图 5)。

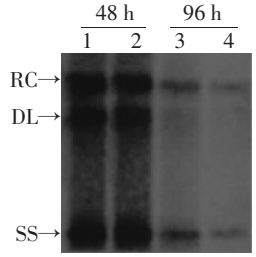


1、3:HBx 突变组;2、4:野生型组;5:空白对照组

图5 Western blot 检测 HBx 蛋白的表达

2.5 HBx 缺失会下调细胞质 HBV DNA 的复制

为了检测 HBx 缺失对病毒复制的影响,线性的全长 HBV 基因组(野生组)和 HBx 缺失突变的 HBV DNA(HBx 突变组)转染同等量的 HepG2 细胞。在转染 24、48、72 和 96 h 后,提取的细胞质病毒 DNA 用 *Taq*Man 探针法进行 Real-time PCR 绝对定量。野生组中在 48 h 细胞质 DNA 的水平为(39.1 ± 2.9) copies/cell,在 96 h 下降至(10.5 ± 1.4) copies/cell, HBx 突变组中在 48 h 细胞质 DNA 的水平为(36.6 ± 2.5) copies/cell,在 96 h 降低至(4.9 ± 1.1) copies/cell 。在转染后 24 和 48 h 当病毒复制达高峰时,野生组和 HBx 突变组中细胞质 HBV DNA 的水平无统计学差异($P>0.05$)。而在转染后 72 和 96 h,与野生组相比,HBx 突变组中细胞质 DNA 的水平显著下降,特别是在 96 h 减少了 50% ~70% ($P<0.05$)。Southern blot 检测细胞质 DNA 复制中间体的结果(图 6)与 Real-time PCR 结果一致。这表明 HBx 缺失会导致细胞质 HBV DNA 复制水平的下降。



1、3:野生组;2、4:HBx 突变组

RC:松弛环状 DNA;DL:双链线性 DNA;SS:单链 DNA

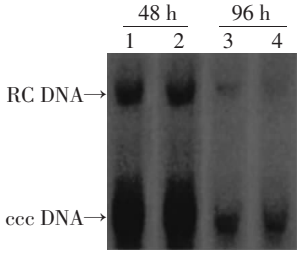
图6 HBx 缺失对细胞质 DNA 复制的影响

2.6 HBx 缺失不影响 HBV cccDNA 的合成,但能下调 pgRNA 的转录

细胞转染 24、48、72 和 96 h 后,提取的 HBV cccDNA 用 Plasmid Safe™ ATP-Dependent DNase 处理纯化后, Real-time PCR 对其绝对定量分析。野生组在 48 h 中 cccDNA 的水平为(38.4 ± 3.1) copies /cell,而在 96 h 下降至 (6.9 ± 1.5) copies/cell;HBx 突变组中在 48 h cccDNA 的水平为(36.5 ± 2.7) copies/cell,在 96 h 降低至(5.8 ± 1.2) copies/cell。无论是在细胞转染后 24 和 48 h 病毒复制达到高峰时,还是在转染后 72 和 96 h cccDNA 和病毒复制水平都显著下降时,野生组和 HBx 突变组 HBV cccDNA 的水平相似,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。Southern blot 检测到 cccDNA 的结果(图 7)也证实了 Real-time PCR 的结果。这表明 HBx 缺失不影响与 HBV cccDNA 的形成。

既然 HBx 缺失不影响 HBV cccDNA 的形成,我们又检测了 HBx 缺失对下游的 pgRNA 转录的影响。在转染后 4 个时间点,提取细胞总 RNA 经 RQ1 RNase-Free DNase 处理后逆转录成 cDNA, Real-time PCR 对其相对定量分析。与野生组相比,细胞转染后 24 和 48 h,HBx 突变组中 pgRNA 转录水平只是轻微减少,差异无统计学意义($P>0.05$)。随着转染时间的延长,差

异逐渐体现出来。特别是在 96 h,与野生组相比,HBx 突变组中 pgRNA 转录水平减少了 50% ~70% ($P<0.05$)。综合上述结果表明 HBx 缺失虽然不影响 cccDNA 的形成,但能下调 pgRNA 的转录。



1、3:野生组;2、4:HBx 突变组

图 7 HBx 缺失对细胞核 cccDNA 合成的影响

3 讨论

HBx 是 HBV 基因组编码的具有细胞和病毒调控作用的蛋白,尽管它的作用机制还不是很清楚,但是它在 HBV 的复制和转录中发挥重要作用。在先前的研究中我们发现在瞬时转染野生型 HBV 全长基因组的 HepG2 细胞中 HBV 复制和转录呈动态过程,在转染后 48 h HBV 细胞质 DNA、细胞核 cccDNA 的复制以及 HBV 转录水平达到峰值,72 h 病毒复制和转录开始显著下降[6]。而本研究通过 PCR 介导的定点突变技术[12-13]构建了 HBx 缺失突变质粒 pUC-HBV1.0.X7,采用不依赖载体的转染技术,将带有 *Sap* Ⅰ黏性末端的线性的野生型和 HBx 缺失突变的 HBV DNA 瞬时转入 HepG2 细胞中,线性 HBV DNA 自我环化后作为 cccDNA 模板启动细胞内病毒复制过程,研究 HBx 缺失对细胞质 HBV DNA 的复制、cccDNA 的合成和 pgRNA 转录的影响。

已有研究表明持续的 HBV 感染需要稳定的 cccDNA 池,从而保证 pgRNA 的稳定供给和产生转录模板[4]。在 RNA 聚合酶Ⅱ的作用下,以细胞核的 HBV cccDNA 为模板转录合成的 pgRNA 在病毒基因组扩增和病毒复制中起着关键的作用[3,5]。cccDNA 对现有的抗病毒药物相对不敏感,持续存在的 cccDNA 是停止抗病毒治疗后病毒复制反跳的主要原因[14-15]。已有体外研究发现 HBx 缺失导致 HBV 复制降低 65%,同样在体内试验中也证实了 HBx 缺失导致肝脏 HBV 复制中间体减少 72% ~83%,其 RNA 转录和 HBc 表达水平也显著降低[8]。在本研究中我们同样发现虽然 HBx 缺失不影响 HBV cccDNA 的合成,但是它能使 HBV 复制和 pgRNA 的转录分别减少 50% ~70%。

在本研究中我们将线性的野生型和 HBx 缺失突变的 HBV DNA 瞬时转入 HepG2 细胞,在野生组中转染后 48 h 病毒复制达高峰时,HBx 作为病毒复制时的产物表达也显著,在 96 h 病毒复制显著下降时,HBx 表达也明显下降。而 HBx 突变组中尚未检测到 HBx 的表达。无论是在转染后 24、48 h 病毒高峰复制时,还是在 72、96 h cccDNA 和病毒复制水平都显著下降时,野生组和 HBx 突变组中 HBV cccDNA 的水平相似,HBx 缺失不影响 HBV cccDNA 的合成。在转染后 24、48 h 病毒复制和转录达高峰时,HBx 突变组中 HBV 细胞质 DNA 的复制和 pgRNA 的转录水平与野生组相比无统计学差异。但是随着转染时间的延长,差异逐渐体现出来。特别是在 96 h 二者的水平都分别比野生组的水平减少 50% ~70%。这表明 HBx 缺失会下调细胞质 HBV DNA 复制以及细胞核 cccDNA 转录合成的 pgRNA,即 HBx 缺失会下调 HBV 复制和转录。

HBx 调控 HBV 病毒复制和转录的机制可能有以下几方面:首先,HBV 复制的激活主要是因为 HBx 提高转录水平。由于 HBV 复制需要的 HBx 序列与病毒转录协同作用所需的序列相同,pgRNA 的合成是病毒复制第一个可调控的环节[16]。HBx 可通过 Enh Ⅱ/core 启动子上的 C/EBPα 结合位点促进 pgRNA 的合成[17];第二,HBx 通过激活细胞质信号转导通路,如钙离子信号途径,Ras-Raf-有丝分裂激活激酶,Pyk2 和 Src 钙酪氨酸激酶途径从而促进病毒复制转录[18-20];另外 HBx 还可能直接和基本转录调控因子(如核糖体结合蛋白 5、TATA 结合蛋白以及 CREB/ATF 等)结合[16,21],启动其他的 HBV 复制转录调控途径,从而在多个步骤影响 HBV 复制和转录。

本研究中我们用 PCR 介导的定点突变技术成功构建 HBx 缺失突变型质粒 pUC-HBV1.0.X7,经 *Sap* Ⅰ酶切后获得线性 HBx 缺失突变的 HBV DNA,瞬时转染到 HepG2 细胞。HBx 缺失虽然不影响 HBV cccDNA 的合成,但是它能下调细胞质 DNA 的复制和 pgRNA 的转录,进一步阐明了 HBx 在 HBV 复制中重要作用。然而关于 HBx 对 HBV 复制和转录的调控机制还不是很清楚,有待于后续研究。基于现有抗病毒药物对 cccDNA 的不敏感,我们认为将 HBx 作为抗 HBV 的治疗靶点,在理论上是可行的。

参考文献:

[1] Seeger C, Mason W S. Hepatitis B virus biology[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(1): 51-68.

[2] Bouchard M J, Schneider R J. The enigmatic X gene of hepatitis B virus[J]. J Virol, 2004, 78(23): 12725-12734.

[3] Levrero M, Pollicino T, Petersen J, *et al*. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2009, 51(3): 581-592.

[4] Ryu D K, Ahn B Y, Ryu W S. Proximity between the cap and 5′epsilon stem-loop structure is critical for the suppression of pgRNA translation by the hepatitis B viral polymerase[J]. Virology, 2010, 406(1): 56-64.

[5] Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, *et al*. Hepatitis B virus X protein

is essential to initiate and maintain virus replication after infection[J]. J Hepatol, 2011, 55(5): 996 – 1003.
[6] Gong Q, Chen S, Guo J, *et al*. Chromosome remodeling related to hepatitis B virus replication in HepG2 cells[J]. DNA Cell Biol, 2011, 30(6): 347 – 354.
[7] Tang H, Delgermaa L, Huang F, *et al*. The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication[J]. J Virol, 2005, 79(9): 5548 – 5556.
[8] Keasler V V, Hodgson A J, Madden C R, *et al*. Enhancement of hepatitis B virus replication by the regulatory X protein *in vitro* and *in vivo*[J]. J Virol, 2007, 81(6): 2656 – 2662.
[9] Pollicino T, Belloni L, Raffa G, *et al*. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones[J]. Gastroenterology, 2006, 130(3): 823 – 837.
[10] Sambrook J, Russel D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 138 – 140, 151 – 153.
[11] Belloni L, Pollicino T, De-Nicola F, *et al*. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(47): 19975 – 19979.
[12] 朱江, 兰欢, 洪苏林, 等. 人NFBD1启动子区域顺式作用元件CHR的定点突变分析[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(10): 1020 – 1023.
[13] 周赞虎, 张永祥, 陈枝华, 等. 基因改造中快速PCR定点突变方法应用[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(1): 102 – 103.
[14] Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, *et al*. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy[J]. Gastroenterology, 2004, 126(7): 1750 – 1758.
[15] Ganem D, Prince A M. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences[J]. N Engl J Med, 2004, 350(11): 1118 – 1129.
[16] Tang H, Oishi N, Kaneko S, *et al*. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein[J]. Cancer Sci, 2006, 97(10): 977 – 983.
[17] Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator[J]. J Gastroenterol, 2001, 36(10): 651 – 660.
[18] Bouchard M J, Puro R J, Wang L, *et al*. Activation and inhibition of cellular calcium and tyrosine kinase signaling pathways identify targets of the HBx protein involved in hepatitis B virus replication[J]. J Virol, 2003, 77(14): 7713 – 7719.
[19] Bouchard M J, Wang L, Schneider R J. Activation of focal adhesion kinase by hepatitis B virus HBx protein: multiple functions in viral replication[J]. J Virol, 2006, 80(9): 4406 – 4414.
[20] Bouchard M J, Wang L H, Schneider R J. Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication[J]. Science, 2001, 294(5550): 2376 – 2378.
[21] Williams J S, Andrisani O M. The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(9): 3819 – 3823.

(**收稿**:2011-12-30;**修回**:2012-02-24)
(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2012)13-1264-01

左肾盂肉瘤样癌1例

黄盛权[1],廖钱金[2],陈尚雄[1],方针强[1],叶 刚[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院泌尿外科[1];400037 重庆,重庆市沙坪坝区新桥社区卫生服务中心儿童保健科[2])

[**关键词**] 肉瘤样癌;肾盂;手术治疗
[**中图法分类号**] R737.1 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者,男性,83岁,于2012年1月11日因"心累、气促2 d"到我院心内科就诊,肾功检查示肌酐升高,转肾内科就诊,肾内科以"慢性肾功能衰竭(氮质血症期)"收住院。患者入院前1个月,因感冒后出现心累、气促,活动后较明显,同时伴有肉眼血尿,遂到当地医院就诊,行超声提示"肾结石",门诊口服"云南白药、消炎药"等,在个体诊所输液治疗3 d,肉眼血尿好转。患者患病以来精神、食欲、睡眠差,大便较干燥,体质量较前减轻3 kg。入院后反复出现血尿,行泌尿系彩超检查提示:①右肾囊肿;②左肾结石,左肾囊肿,左肾中下及肾窦内及上段输尿管内不均质弱回声,考虑为血凝块;③膀胱壁粗糙,导尿球囊附近絮状弱回声,考虑为血凝块。经我科会诊后转我科,行双肾MRI检查(图1A):①左肾下极占位,结合腹部平片,考虑结石可能,建议CT检查;②左肾盂肾盏扩张积水;③双肾囊肿。CT检查(图1B):左肾及左输尿管上段多发结石伴左肾盂肾盏占位;双肾囊肿。6次脱落细胞学检查2次发现癌细胞。左肾盂输尿管逆行造影:左肾结石,左侧肾盂肾盏未见显影。肾小球滤过率(GFR):35.06 ml/min,左肾:10.32 ml/min,右肾:24.74 ml/min。入院肾功能:尿素(14.63 mmol/L),肌酐(181.70 mmol/L),完善相关检查后在腰硬联合麻醉下行左肾盂探查术,术中冰冻结果考虑左肾盂恶性肿瘤伴坏死出血,遂行左肾根治性切除术(因患者及家属拒绝而未切除残余输尿管及部分膀胱),切除的左肾大小正常,上级可见大小约4 cm×5 cm囊肿,肾脏剖面可见肾盂内一大小约1 cm×0.5 cm灰黄色结石,肾盂肾盏有一直径约2 cm新生物,质地脆。术后组织送检免疫组化结果提示左肾盂肉瘤样癌。患者术后恢复良好后出院,出院前2 d肾功能:尿素11.26 mmol/L;肌酐146.90 mmol/L。

(下转1292页)

[**通信作者**] 黄盛权,电话:(023)68774924,E-mail: huangshengquan2008@yahoo.com.cn