论著

文章编号:1000-5404(2013)16-1704-04

HBx及其突变体X17-3对Hippo信号途径表达的影响

陈琰琰[1],朱慧芬[2],杨道锋[3],刘晓聪[1],邓科兰[3],黄春梅[2],胡晓萌[3],姜素华[2,4],沈关心[2] (832002 新疆维吾尔自治区石河子,石河子大学医学院:生物化学教研室[1],病原生物学与免疫学教研室[4];430030 武汉,华中科技大学同济医学院:免疫系[2],附属同济医院感染科[3])

[摘要] **目的** 初步探寻HBx及其不同突变体表达与Hippo信号途径的关系,以及对细胞凋亡的影响。**方法** HBx及其突变体载体转染人正常肝细胞系L02,转染48 h后,提取总蛋白,Western blot检测细胞中Hippo信号途径MST1、YAP(yes-associated protein)的表达,磷酸化和去磷酸化的情况。采用Annexin V/PI标记流式细胞术检测细胞凋亡。**结果** HBx及其突变体载体转染L02细胞48 h后,Western blot结果显示细胞MST1表达下调,p-MST1/2表达上升($P<0.05$);YAP表达上升,p-YAP表达下调($P<0.05$)。Annexin V/PI标记法流式细胞术结果显示HBx及其突变体能促进L02细胞发生凋亡($P<0.05$),其介导的细胞早期凋亡尤为明显。**结论** HBx通过Hippo信号通路途径调控下游致癌基因YAP的表达。结合HBx介导的L02细胞凋亡这一结果说明HBx可能通过多种途径调节细胞周期。

[关键词] Hippo YAP;乙型肝炎病毒X蛋白;乙型肝炎病毒;肝癌;细胞凋亡

[中图法分类号] R322.47;R329.26;R394.2 [文献标志码] A

HBx and its mutant X17-3 regulates YAP through Hippo signaling pathway in human hepatic L02 cells

Chen Yanyan[1], Zhu Huifen[2], Yang Daofeng[3], Liu Xiaocong[1], Deng Kelan[3], Huang Chunmei[2], Hu Xiaomeng[3], Jiang Suhua[2,4], Shen Guanxin[2] ([1]Department of Biochemistry, [4]Department of Pathogenic Biology and Immunology, Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 832003; [2]Department of Immunology, [3]Department of infectious Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province, 430030, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the relationship of HBx and its mutant X17-3 with Hippo signaling pathway, and the effects of HBx on cell cycle and apoptosis. Methods L02 cells were transfected with HBx and its mutant, respectively. After 48 h of incubation, the expression levels as well as the phosphorylation status of MST1/2 and yes-associated protein (YAP) were detected by Western blotting. The apoptosis of L02 cells was examined with flow cytometry by Annexin V/PI staining. Results After 48 hours' transfection, Western blotting showed that the expression levels of p-MST1/2 and YAP were up-regulated, and those of MST1/2 and p-YAP were down-regulated ($P<0.05$). The results of flow cytometry indicated that the transfection of HBx and X17-3 resulted in more apoptotic cells ($P<0.05$), especially in early stage of apoptosis. Conclusion HBx regulates its downstream oncogene, YAP through Hippo signaling pathway. Its also regulates the cell cycle *via* several ways.

[**Key words**] Hippo YAP; hepatitis B virus X protein; hepatitis B virus; hepatocellular carcinoma; apoptosis

Supported by the National Major Project of Infectious Diseases (2012ZX10002006). Corresponding author: Jiang Suhua, E-mail: jshjane@yahoo.com.cn; Shen Guanxin, E-mail: guanxin_shen@yahoo.com.cn

肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是世界范围内常见的恶性程度较高的肿瘤之一,我国新发肝癌病例占全球的45%,成为肝癌的高发地区,乙肝病毒与肝癌发生的相关性高达80%,成为肝癌的主要诱因[1],其机制成为当今的研究热点。越来越多的研究表明,HBx(hepatitis B virus X protein)是一种多功能蛋白,可通过反式激活机制调控细胞周期和信号转导,影响细胞周期,在乙型肝炎病毒相关疾病发生起重要作用。X17-3是由印度学者Vijay Kumar通过PCR的方

[基金项目] 国家重大传染病专项课题(2012ZX10002006)

[通信作者] 姜素华,E-mail:jshjane@yahoo.com.cn

沈关心,E-mail: guanxin_shen@yahoo.com.cn

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130715.0926.002.html(2013-07-15)

法构建的高表达 HBx 蛋白 N 端 A 区域的质粒，该区域是被认为能抑制 HBx 蛋白的反式激活作用[2]，选用该质粒可能为明确 HBx 的反式激活作用与 Hippo-YAP 通路以及细胞周期的关系提供实验依据，Hippo-YAP 被认为是与肿瘤发生密切相关的一条信号通路。本研究初步探寻 HBx 及其不同突变体 X17-3 表达与 Hippo 信号途径的关系，以及对细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

人肝细胞系 L02(购自武汉大学)，细胞转染试剂（购自美国 Invitrogen 公司)，培养基 DMEM、胎牛血清(购自杭州四季青公司)，HBx 野生型质粒载体 X0 和 HBx 突变体 X17-3(由印度学者 Vijay Kumar 提供)[2]，超级感受态细菌制备试剂盒(购自碧云天生物)，质粒抽提试剂盒(购自康为世纪公司)，细胞总蛋白提取试剂盒(购自碧云天生物)，Western blot 适用一抗 MST1 及磷酸化 MST1/2(购自 abcam 公司)，YAP 及磷酸化 YAP(购自美国 Cell Signaling 公司)，HRP 标记二抗(购自武汉博士德)，超敏 ECL 化学发光即用型底物(购自武汉博士德)，Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒(购自北京庄盟国际生物公司)。

1.2 HBx 及其突变体质粒载体转染 L02 细胞

将 L02 细胞铺到 6 孔板内，并加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基，待到板内细胞汇合度达到 90%，即转染质粒到 L02 细胞内。细胞分 3 组：X0 组(转染 X0)、X17-3 组(转染 X17-3)和对照组(只加入转染试剂)，4 h 后 3 组全部换含 10% FBS 的 DMEM 继续培养。

1.3 Western blot 检测目的蛋白的表达

提取转染 48 h 后的细胞总蛋白，计算蛋白浓度后，每孔上样量 50 mg，10% 分离胶电泳条件 100 V 到 Marker 条带跑开，转膜 200 mA，湿转 1 h，5% BSA 封闭过夜，随后按抗体说明书建议浓度孵育一抗、二抗。最后滴加 ECL 显色剂曝光条带。采用 Image-Pro Plus 分析 Western blot 条带光密度，以目的蛋白与 β-actin光密度比值作为蛋白的相对表达量。

1.4 Annexin V/PI 标记流式细胞术检测细胞凋亡

转染后 48 h，用 0.25% 的不含 EDTA 的胰酶消化贴壁细胞，PBS 循环悬浮离心细胞 2 次，细胞计数后，以每管 5×10^8 左右的细胞量加到流式管中，按照 Annexin V/PI 细胞凋亡试剂盒说明书上的方法避光加入 Annexin V-FITC 和 PI，混匀，避光孵育 15 min，在 1 h 内采用流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。

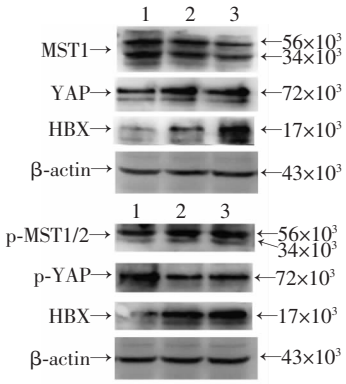
1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行双因素方差分析。

2 结果

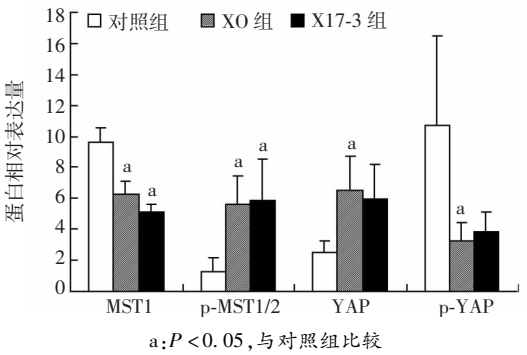
2.1 Hippo-YAP 通路各蛋白的表达

X0 组、X17-3 组较对照组 MST1 的表达下调，磷酸化 MST1/2(p-MST1/2)表达上调，差异有统计学意义($P<0.05$)。实验组较对照组 YAP 表达上调，磷酸化 YAP(p-YAP)表达下调，差异有统计学意义($P<0.05$)，见图 1、2。



1：对照组；2：X0 组；3：X17-3 组

图 1 Western blot 检测转染质粒 48 h 后各组 L02 细胞蛋白的表达

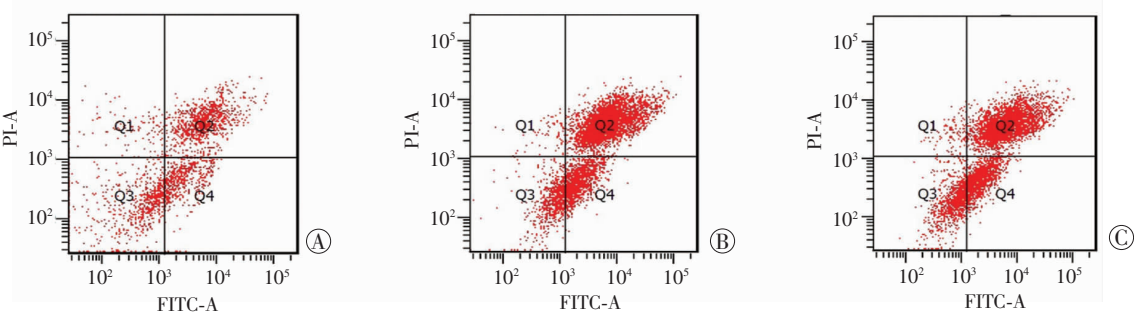


a：$P<0.05$，与对照组比较

图 2 转染质粒 48 h 后各组 L02 细胞中蛋白相对表达量

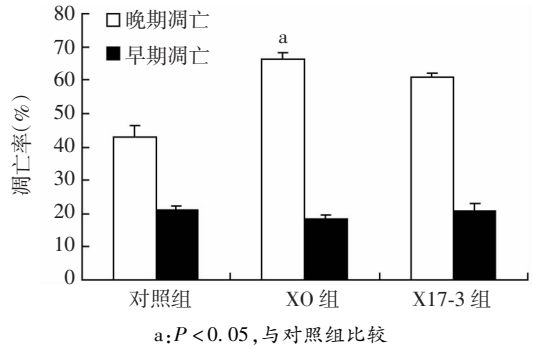
2.2 L02 细胞的早期凋亡和晚期凋亡

X0 组、X17-3 组和对照组在 Q2(晚期凋亡)、Q4(早期凋亡)象限均有反应，其原因可能与转染试剂 Lipofectamine 2000 对细胞的毒性相关。X0 组、X17-3 组晚期凋亡率较对照组有统计学差异($P<0.05$)，而早期凋亡率无统计学差异(图 3、4)。



A：对照组；B：X0 组；C：X17-3 组

图 3 各组 L02 细胞转染 HBx 及其突变体 X17-3 后对细胞凋亡的影响



a:$P<0.05$,与对照组比较

图4 转染质粒48 h后各组L02细胞凋亡率比较

3 讨论

HBV至少有4个开放重叠的读码框:S、C、P和X区,研究发现X基因表达的HBx蛋白在HBV相关性HCC的发生发展中起到重要的作用[3-6]。HBx是一种多功能蛋白,能通过多种途径诱导HCC的发生,比如可通过反式激活转录作用干扰肝细胞DNA的修复,从而影响细胞增殖凋亡周期等。近年来的研究表明HBx能通过激活Ras/Raf、Src、AP-1、NF-κB等途径来调节细胞的增殖与凋亡,代谢活跃度等[6-8]。但是对于HBx是否通过Hippo途径影响YAP磷酸化水平,调节细胞周期与凋亡还少见报道。

Hippo信号通路最早是在对果蝇研究中发现,通过抑制细胞增殖、促进细胞凋亡来影响器官的大小,Hippo信号途径亦可能与肿瘤发生发展的关系密切,引起关注,成为近年来的研究热点[9]。Hippo信号通路在果蝇中主要由Hippo、Sav、Wts和Mats组成,在哺乳动物中,与之对应的信号分子分别是MST1/2、WW45、LATS1/2和Mob1。Hippo通路中的4个核心成分构成2个蛋白激酶复合物形成一个级联反应,Hippo/MST与Sav/WW45相互作用,促进Wts/LATS和Mats/Mob1复合物发生磷酸化而活化[10-13]。近年研究认为在哺乳动物中YAP是一种癌基因,Hippo信号通路中磷酸化的LATS和Mob1复合物使转录因子YAP磷酸化,磷酸化后的YAP与14-3-3蛋白结合并在细胞质中滞留,使细胞产生接触抑制并控制器官大小。而未发生磷酸化的YAP即进入细胞核发生转录,使细胞增殖,不发生凋亡,形成肿瘤[14-16]。本研究中运用的质粒载体由印度学者Vijay Kumar构建,X17-3是高表达HBx基因中N端A区域的突变体,在Vijay Kumar的研究中发现该类突变体抑制HBx所有报告基因的反式激活作用和基本活性,并且认为该区域具有负调节作用[2]。本研究Western blot结果显示L02细胞内MST1/2在转染HBx野生型(X0)及HBx突变体(X17-3)后表达减弱,MST1和MST2是一种全长56 $\times10^3$或者(34~36)$\times10^3$的多肽,后者这种被截短的氨基末端是在细胞凋亡过程中由于细胞凋亡蛋白介导的应答反应产生的[17]。YAP表达加强,p-YAP表达下调。X17-3组和X0组相比无明显差别。提示HBx可能通过调控Hippo信号通路,进而YAP的表达加强。而HBx介导的Hippo-YAP通路的激活可能与HBx的反式激活作用无直接关联。近年来有研究表明,YAP的表达与HCC的发生、发展预后都有密切相关系[18-19]。本实验流式细胞术结果表明,L02细胞在转染了HBx及其突变体后,L02细胞晚期发生凋亡比对照组增多,X17-3组和X0组相比无明显差别。虽然各组均存在早期凋亡,但无统计学差异。本实验结果表明HBx介导的Hippo-YAP通路在HBV感染致病中可能起到关键的作用,而与肝癌发生发展的关系尚待进一步研究。HBx对于不同肝细胞系的影响不同,HBx可以通过下调L02细胞NF-κB蛋白的表达,而阻滞细胞周期进程,促进细胞凋亡[20]。HBx诱导的细胞凋亡,也可能与不同阶段HBV感染和HBx的表达量有关[21]。HBx还可通过线粒体途径和死亡受体途径诱导细胞凋亡[22]。有研究认为,HBx诱导的细胞凋亡可促进肝再生和基因突变的积累,进而导致肝细胞转化和HCC的发生[23]。由此表明,HBx无论是抑制细胞凋亡还是促进细胞凋亡,都可能导致肝细胞恶性转化,进而导致HBV相关性HCC的发生。

HBx是一种多功能蛋白,能通过多种途径诱导HCC的发生,并且HCC的发生发展是一种多因素诱导,多步骤的复杂过程,因此,更多的机制还需要进一步研究。

参考文献:

[1] Jain S, Singhal S, Lee P, *et al*. Molecular genetics of hepatocellular neoplasia[J]. Am J Transl Res, 2010, 2(1): 105-118.

[2] Misra K P, Mukherji A, Kumar V. The conserved amino-terminal region (amino acids 1-20) of the hepatitis B virus X protein shows a transrepression function[J]. Virus Res, 2004, 105(2): 157-165.

[3] Matsuda Y, Ichida T. Impact of hepatitis B virus X protein on the DNA damage response during hepatocarcinogenesis[J]. Med Mol Morphol, 2009, 42(3): 138-142.

[4] Neuveut C, Wei Y, Buendia M A. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis[J]. J Hepatol, 2010, 52(4): 594-604.

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

[6] Kim H R, Lee S H, Jung G. The hepatitis B viral X protein activates NF-kappaB signaling pathway through the up-regulation of TBK1[J]. FEBS Lett, 2010, 584(3): 525-530.

[7] Chan D W, Ng I O. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells[J]. J Pathol, 2006, 208(3): 372-380.

[8] Zhang J L, Zhao W G, Wu K L, *et al*. Human hepatitis B virus X protein promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis through interacting with a serine protease Hepsin[J]. Arch Virol, 2005, 150(4): 721-741.

[9] Apte U, Gkretsi V, Bowen W C, *et al*. Enhanced liver regeneration

following changes induced by hepatocyte-specific genetic ablation of integrin-linked kinase[J]. Hepatology, 2009, 50(3): 844 - 851.
[10] Edgar B A. From cell structure to transcription: Hippo forges a new path [J]. Cell, 2006, 124(2): 267 - 273.
[11] Zeng Q, Hong W. The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals[J]. Cancer Cell, 2008, 13(3): 187 - 192.
[12] Pan D. Hippo signaling in organ size control[J]. Genes Dev, 2007, 21(8): 886 - 897.
[13] Harvey K, Tapon N. The Salvador-Warts-Hippo pathway—an emerging tumour-suppressor network[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(3): 182 - 191.
[14] Zhao B, Lei QY, Guan K L. The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer[J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(6): 638 - 646.
[15] Zhao B, Wei X, Li W, *et al*. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control[J]. Genes Dev, 2007, 21(21): 2747 - 2761.
[16] Komuro A, Nagai M, Navin N E, *et al*. WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus[J]. J Biol Chem, 2003, 278(35): 33334 - 33341.
[17] Zhou D, Conrad C, Xia F, *et al*. Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene[J]. Cancer Cell, 2009, 16(5): 425 - 438.
[18] Xu M Z, Yao T J, Lee N P, *et al*. Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 2009, 115(19): 4576 - 4585.
[19] Kowalik M A, Saliba C, Pibiri M, *et al*. Yes-associated protein regulation of adaptive liver enlargement and hepatocellular carcinoma development in mice[J]. Hepatology, 2011, 53(6): 2086 - 2096.
[20] 杨倩, 邓志华, 贺丹丹. 乙肝病毒X蛋白对不同肝细胞系凋亡的诱导作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(4): 402 - 407.
[21] Fiedler N, Quant E, Fink L, *et al*. Differential effects on apoptosis induction in hepatocyte lines by stable expression of hepatitis B virus X protein[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(29): 4673 - 4682.
[22] Kuo C Y, Tsai J I, Chou T Y, *et al*. Apoptosis induced by hepatitis B virus X protein in a CCL13-HBx stable cell line[J]. Oncol Rep, 2012, 28(1): 127 - 132.
[23] Pollicino T, Terradillos O, Lecoeur H, *et al*. Pro-apoptotic effect of the hepatitis B virus X gene[J]. Biomed Pharmacother, 1998, 52(9): 363 - 368.

(**收稿**:2013-02-04;**修回**:2013-04-26)
(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2013)16-1707-01

经验交流

妇科腹腔镜术后肠外瘘的诊治研究

刘 毅,孙丽君 (563003 贵州 遵义,遵义医学院附属医院妇产科)

[**关键词**] 妇科腹腔镜;肠外瘘;腹腔双套管引流;乳胶管单腔引流
[**中图法分类号**] R713 [**文献标志码**] B

随着妇科腹腔镜技术的发展,越来越多的盆腔手术可以通过腹腔镜完成。同时,并发症也不可避免的出现,其中以肠管损伤致肠外瘘最为严重,易导致内外环境稳态失衡、感染及多器官功能衰竭,甚至死亡,保持有效的引流为治疗肠外瘘的重要措施[1]。我科自2010年2月至2012年12月治疗妇科腹腔镜致肠外瘘患者63例,我们对采用腹腔双套管引流+腹腔引流冲洗术和乳胶管单腔引流术两种治疗方法的临床资料进行分析,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

我科于2010年2月至2012年12月期间收治了539例患者行妇科腹腔镜手术,患者最小年龄17岁,最大年龄65岁,平均年龄为42岁,所有患者中409例行附件手术及子宫肌瘤切除术,80例行子宫全切术+双附件切除术,50例行广泛子宫切除术及盆腔淋巴结清扫术。所有患者中,230例患者在术前有盆腔手术史,包括卵巢囊肿剥除术、剖宫产术、子宫肌瘤切除术及阑尾切除手术。发生肠外瘘的患者共63例,发病率约为12%,采用双套管引流+腹腔引流冲洗术治疗患者32例,年龄20~55岁,平均年龄37.5岁,其中小肠瘘23例,结肠瘘9例。采用乳胶管单腔引流术治疗患者31例,年龄24~55岁,平均年龄39.5岁,其中小肠瘘26例,结肠瘘5例。

1.2 治疗方法

1.2.1 腹腔双套管引流+腹腔引流冲洗术 距肠外瘘口2 cm处由皮下潜行至腹腔,置入多孔腹腔双套引流管,外管用胶布固定于腹壁,内管接负压引流器后固定于腹壁,固定双套管的内外管应留有一定的活动度防止脱落。予以无菌生理盐水冲洗,冲洗速度为50滴/min为宜,同时根据引流液体的性质及量做适当调整,引流物稍粘稠时调大负压,同时滴入无菌生理盐水以稀释稠厚液体,再打开负压开关将负压调整至10~20 kPa进行吸引,持续冲洗+引流后接引流袋固定于腹壁。一般双套管24 h冲洗液总量平均为4 000 mL左右,同时经常检查管道,及时清除内管的堵塞物及溢出的肠液,保持管道通畅。观察引流液体的颜色、量与性质的变化,计算出漏出液体的量,以调整冲洗的液体量及速度。

1.2.2 乳胶管单腔引流术 上腹部引流管为吻合口上方引流管,下腹部原有腹腔镜穿刺Trocar处置入盆腔引流管。

1.3 统计学方法

应用SPSS 13.0统计学软件对治愈率采用χ^2检验,对通气、引流、拔管及住院时间采用t检验,以$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

(下转1712页)

[**通信作者**] 刘 毅,E-mail:2322526312@qq.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130428.0819.003.html(2013-04-28)