论著

文章编号:1000-5404(2014)10-0992-04

乙型肝炎病毒X蛋白诱导肝卵圆细胞恶性转化

廖 凯,王月飞,卢乐乐,张雷达 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所)

[摘要] **目的** 研究乙型肝炎病毒X蛋白(hepatitis B virus X, HBx)对肝卵圆细胞的转化作用。**方法** 构建表达HBx和嘌呤霉素抗性的慢病毒LV-HBx-PM及对照慢病毒LV-PM分别感染WB-F344肝卵圆细胞。以感染HBx慢病毒载体的WB-F344细胞作为实验组(WB-F344-HBx),以感染对照慢病毒载体的WB-F344细胞作为阴性对照组(WB-F344-PM),以未转染慢病毒载体的培养相同代数的WB-F344细胞作为空白对照组(WB-F344-Mock)。通过Real-time RT-PCR和Western blot验证各组细胞中HBx的表达;运用MTT法、流式细胞术、细胞迁移实验、裸鼠移植瘤实验观察各组细胞的增殖能力、细胞周期、迁移能力和成瘤能力。**结果** WB-F344-HBx细胞在基因水平和蛋白水平稳定高效表达HBx;WB-F344-PM和WB-F344-Mock不表达HBx。与阴性对照组WB-F344-PM相比,实验组WB-F344-HBx G_0/G_1期细胞比例降低[(55.98±0.39)% *vs* (61.65±1.37)%, $P<0.01$],G_2/M期细胞比例升高[(15.05±1.67)% *vs* (7.83±0.46)%, $P<0.01$],细胞周期进程加快,细胞增殖能力增强($P<0.01$),具有更强的细胞迁移能力和成瘤能力;而阴性对照组WB-F344-PM与空白对照组WB-F344-Mock相比,细胞周期、细胞增殖能力、细胞迁移能力和成瘤能力无显著变化。**结论** 乙型肝炎病毒X蛋白可诱导肝卵圆细胞恶性转化。

[关键词] 乙型肝炎病毒;HBx蛋白;卵圆细胞;恶性转化

[中图法分类号] R322.47;R373.21;R394.3 [文献标志码] A

Hepatitis B virus X protein induces malignant transformation of hepatic oval cells

Liao Kai, Wang Yuefei, Lu Lele, Zhang Leida (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** Detect the malignant transformation of hepatic oval cells induced by hepatitis B virus X (HBx) protein. **Methods** Hepatic oval cells, WB-F344 cells, transfected with lentivirus expressing HBx and puromycin (PM)-resistant gene were defined as an experimental group (WB-F344-HBx). The WB-F344 cells transfected with lentivirus only expressing PM-resistant gene were defined as a negative control group (WB-F344-PM). The WB-F344 cells without lentivirus transfection were defined as a blank control group (WB-F344-Mock). The expressions of HBx in the 3 groups were confirmed by real-time RT-PCR and Western blotting. The cell cycle, proliferation, ability of metastasis and tumorigenicity were detected with flow cytometry, MTT assay, metastasis experiment and nude mouse transplantation tumor experiment, respectively. **Results** Highly stably HBx protein expression was observed in the experimental group but not in the negative control and blank control groups. Compared with the negative control group, the experimental group showed decreased G_0/G_1 cell percentage [(55.98±0.39)% *vs* (61.65±1.37)%, $P<0.01$), increased G_2/M cell percentage [(15.05±1.67)% *vs* (7.83±0.46)%, $P<0.01$], significantly accelerated process of G_1/S cell cycle, promoted cell proliferation ($P<0.01$), and increased ability of metastasis and tumorigenicity. There was no significant difference in cell cycle, cell proliferation, ability of metastasis and tumorigenicity between the negative control group and the blank control group. **Conclusion** Hepatitis B virus X protein can induce malignant transformation of hepatic oval cells.

[**Key words**] hepatitis B virus; hepatitis B virus X protein; oval cells; malignant transformation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071979). Corresponding author: Zhang Leida, Tel:86-23-68765810, E-mail: zld666@aliyun.com

原发性肝癌是最常见的恶性肿瘤之一[1]。在我国,慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染是导致肝癌发生、发展的主要危险因素。目前HBV致癌的确切机制尚不明确,但乙型肝炎病毒X蛋白(hepati-

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071979)

[通信作者] 张雷达,电话:(023)68765810,E-mail:zld666@aliyun.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140328.0952.003.html(2014-03-28)

tis B virus X,HBx)被认为在 HBV 诱发肝癌的过程中发挥重要作用[2]。HBx 是一种由 HBV X 基因编码的多功能蛋白,可能通过与细胞内多种转录调控因子结合,促进病毒的复制和转录[3],激活多种原癌基因并抑制抑癌基因[4-6],调节细胞周期和增殖[7-8],抑制细胞凋亡等,最终导致肝细胞的癌变[9-10]。肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)学说的提出为肿瘤的发生、发展提供了新的解释,而越来越多的研究结果支持肝癌起源于肝癌干细胞的观点[11-13]。肿瘤干细胞可能来源于正常的干细胞。卵圆细胞被认为是一种具有干细胞特性的肝前体细胞。研究认为卵圆细胞作为肝干细胞在肝癌的发生和发展中发挥关键作用[14-15]。HBV 在肝癌干细胞起源中的作用和机制目前仍不清楚,因此,研究 HBx 蛋白与肝卵圆细胞向肝癌干细胞转化的关系具有重要的理论价值和现实意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

WB-F344 卵圆细胞株购于上海拜力生物科技有限公司。慢病毒载体 LV-HBx-PM 和 LV-PM 由上海生博生物医药科技有限公司设计构建;DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;胰酶购自碧云天公司;嘌呤霉素购自美国 Sigma 公司;HBx、β-actin 基因扩增引物均由生工生物工程(上海)有限公司设计并合成;PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 购自日本 TaKaRa 公司;Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG 购自美国 Invitrogen 公司;RIPA 裂解液(强)购自碧云天公司;小鼠抗 HBx 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自碧云天公司;超敏 ECL 化学发光试剂盒购自碧云天公司;Transwell chamber 购自美国 BD 公司。裸鼠购自第三军医大学西南医院动物房。

1.2 实验方法

1.2.1 WB-F344 卵圆细胞的培养 WB-F344 细胞培养于 DMEM(含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素)培养基,慢病毒感染后的 WB-F344 细胞培养于 DMEM(含 10% 胎牛血清、2 μg/mL 嘌呤霉素、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素)培养基,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,细胞呈单层贴壁生长。慢病毒感染 96 h 后,取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2.2 慢病毒感染 WB-F344 卵圆细胞 将 WB-F344 细胞按每孔 3×10^5 细胞接种于 6 孔板。12 h 后待贴壁细胞汇合率约为 50% 时,将表达 HBx 慢病毒和对照慢病毒按 10 的感染复数(MOI)分别感染 WB-F344 细胞。12 h 后弃去上清,更换为新鲜血清培养基,96 h 后更换为含 2 μg/mL 嘌呤霉素的血清培养基。将感染表达 HBx 慢病毒的 WB-F344 细胞记为 WB-F344-HBx(实验组),将感染对照慢病毒的 WB-F344 细胞记为 WB-F344-PM(阴性对照组),将未感染病毒的 WB-F344 细胞记为 WB-F344-Mock(空白对照组)。

1.2.3 real-time RT-PCR、Western blot 检测 HBx 在 WB-F344 细胞中的表达

1.2.3.1 Real-time RT-PCR 转染 96 h 后,分别收集 WB-F344-HBx、WB-F344-PM、WB-F344-Mock 细胞,提取总 RNA,反转录为 cDNA。HBx 上游引物和下游引物序列为:5′-TGCGC-GGGACGTCCTTTGTC-3′ 和 5′-GACCTGGTGGGCGTTCACGG-3′,扩增产物大小 232 bp;内参 β-actin 上游引物和下游引物序列为:5′-ACGGTCAGGTCATCACTATCG-3′ 和 5′-GGCATAGAG-GTCTTTACGGATG-3′,扩增产物大小为 155 bp。real-time RT-PCR 反应体系为:Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG 25 μL;上游引物(10 μmol/L)1 μL;下游引物(10 μmol/L)1 μL;cDNA 模板 3 μL;DEPC-treated water 20 μL,总体积 50 μL。反应条件:50 ℃ 持续 2 min,95 ℃ 持续 2 min,之后 95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s 交替共 40 个循环。

1.2.3.2 Western blot 使用 RIPA 裂解液分别提取 WB-F344-Mock、WB-F344-PM、WB-F344-HBx 细胞总蛋白。酶标仪 BCA 法测定蛋白浓度。热变性处理后按每个样本 40 μg 上样,12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干转至 NC 膜。室温下 5% 脱脂奶粉封闭30 min。用小鼠抗 HBx 一抗(1∶1 000) 4 ℃ 过夜,PBST 洗膜,用山羊抗小鼠二抗(HRP 标记)(1∶2 000)孵育 2 h,PBST 洗膜,ECL 发光显影检测 HBx 蛋白表达情况。

1.2.4 流式细胞术检测 HBx 蛋白对 WB-F344 细胞周期的影响 分别收集 WB-F344-HBx、WB-F344-PM、WB-F344-Mock 细胞,PBS 清洗后,预冷处理的 70% 乙醇在 4 ℃ 固定 2 h,PBS 清洗除去乙醇,加入浓度为 50 μg/mL PI(含 50 μg/mL RNase)染液在室温避光条件下孵育 30 min,用 300 目尼龙网过滤样品后流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.5 MTT 法检测 HBx 蛋白对 WB-F344 细胞增殖活性的影响 分别收集对数生长期 WB-F344-HBx、WB-F344-PM、WB-F344-Mock 细胞,调整细胞浓度为 1×10^4/mL,每孔 200 μL 接种于 96 孔板(2 000 个细胞/孔),每组设 4 个复孔,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。分别于 1、2、3、4、5 d 时加入 20 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中继续培养 4 h。小心吸取孔内的培养基,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO),置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。酶标仪测量各孔 490 nm 处的光密度值[D(490)]。

1.2.6 细胞迁移实验 各组待测细胞培养至对数生长期,换用无血清 DMEM 培养基继续培养 12 h。消化细胞,无血清 DMEM 培养基重悬制成 1×10^5/mL 的单细胞悬液,按每室 300 μL 接种于 Transwell chamber 的上室,下室加入 600 μL 含 10% 血清的 DMEM 培养基,每组细胞设置 3 个复孔。继续培养 36 h 后淋洗小室,4% 多聚甲醛室温固定 30 min。苏木精室温下染色 20 min,浸洗小室,用湿棉棒小心擦去上室底部膜表面上的细胞,揭膜,底面朝上晾干,载玻片中性树胶封片,显微镜下观察。每个样本取 10 个随机视野拍照并进行细胞计数。

1.2.7 裸鼠移植瘤实验 消化对数生长期的 WB-F344-HBx、WB-F344-PM、WB-F344-Mock 细胞并计数,用无血清 DMEM 培养基按 5×10^7/mL 重悬于 1.5 mL EP 管中,冰盒保存。按 0.2 mL/site(1×10^7 个细胞)接种于裸鼠腋下部皮下。每组细胞接种 6 只裸鼠,共计接种 18 只裸鼠。接种 6 周后处死裸鼠,解剖、观察成瘤情况并测量拍照。

1.2.8 肿瘤组织 HE 染色 组织块生理盐水冲洗干净,10% 中性甲醛固定,脱水,透明,石蜡包埋,4 μm 连续切片。常规 HE 染色(脱蜡,染色,脱水,透明,封固),观察组织病理变化。

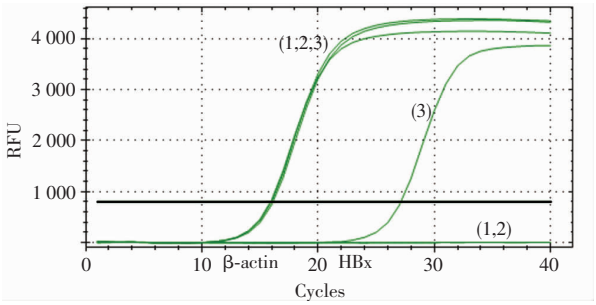
1.3 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析，MTT法测量吸光度比较采用重复测量方差分析，两两比较采用LSD检验。

2 结果

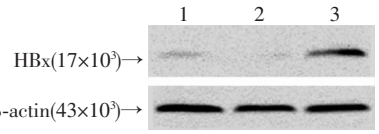
2.1 HBx在WB-F344细胞中的表达

Real-time RT-PCR和Western blot检测结果显示，HBx在WB-F344-Mock和WB-F344-PM组细胞中无表达，而在WB-F344-HBx组细胞中大量表达（图1、2）。



1：WB-F344-Mock组；2：WB-F344-PM组；3：WB-F344-HBx组

图1 Real-time RT-PCR检测HBx在各组细胞中的表达



1：WB-F344-Mock组；2：WB-F344-PM组；3：WB-F344-HBx组

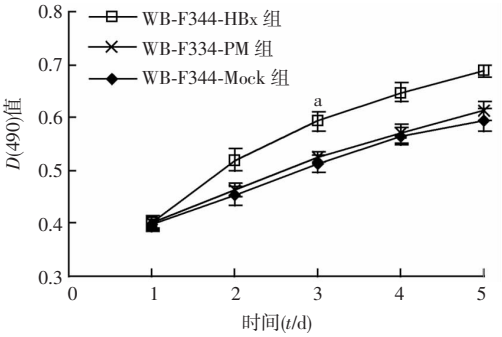
图2 Western blot检测HBx蛋白在各组细胞中的表达

2.2 流式细胞术检测HBX蛋白对WB-F344细胞周期的影响

结果显示，与WB-F344-PM组相比，WB-F344-HBx组细胞内 G_0/G_1 期细胞比例降低[(55.98 ± 0.39)% *vs* (61.65 ± 1.37)%，$P<0.01$]，G_2/M 期细胞比例升高[(15.05 ± 1.67)% *vs* (7.83 ± 0.46)%，$P<0.01$]，细胞周期进程加快。而WB-F344-PM组与WB-F344-Mock组相比，细胞周期无显著变化。

2.3 HBx促进WB-F344细胞增殖

MTT法检测细胞增殖结果（图3）显示，WB-F344-HBx组光密度值与WB-F344-PM组相比显著升高（$P<0.01$），增殖活性显著增强。而WB-F344-PM组与WB-F344-Mock组相比差异无统计学意义（$P>0.05$）。



a：$P<0.01$，与WB-F344-PM组比较

图3 MTT法检测慢病毒感染96 h后各组细胞的增殖活性

2.4 HBx促进WB-F344细胞迁移

在细胞迁移实验中，WB-F344-HBx组、WB-F344-PM组和WB-F344-Mock组透膜细胞数分别为(249.60 ± 17.28)、(42.50 ± 14.34)和(35.30 ± 10.00)。WB-F344-HBx组与WB-F344-PM组相比，细胞迁移数目显著增加（$P<0.01$），而WB-F344-PM组与WB-F344-Mock组相比差异无统计学意义（$P>0.05$，图4）。

2.5 HBx促进WB-F344细胞成瘤

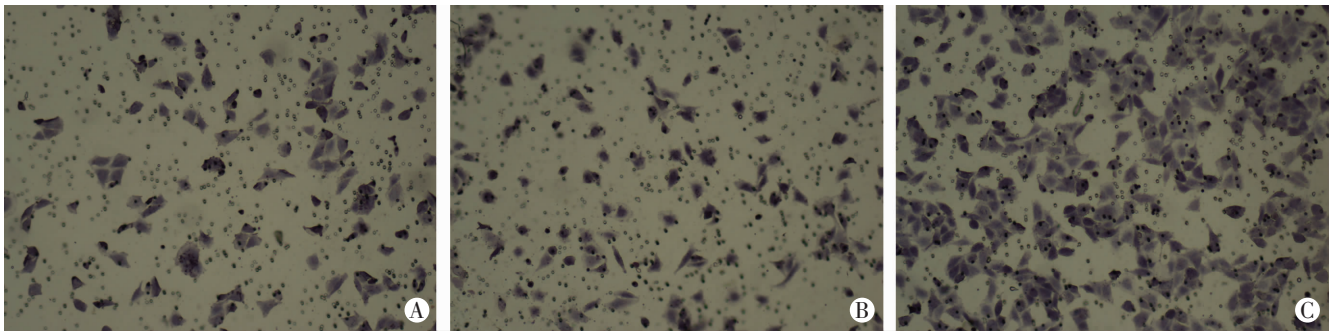
裸鼠移植瘤实验中，WB-F344-PM组有1只裸鼠死亡(16.7%)，其余2组未发生裸鼠死亡。WB-F344-HBx组共有5只裸鼠成瘤(83.3%)，瘤体长径为(7.0 ± 1.9) mm。其余2组均未发现成瘤（图5）。

2.6 组织学观察结果

HE染色显示瘤体组织细胞梭形，核轻至中度异型，核分裂少见，部分区域疏密不等排列凌乱。肿瘤组织呈浸润性生长，浸润周围肌肉组织及脂肪组织（图6）。

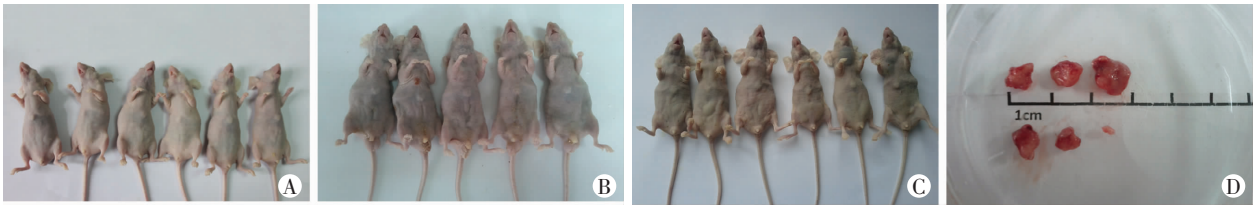
3 讨论

本研究构建了稳定、高效表达HBx的肝卵圆细胞WB-F344-HBx。通过流式细胞术检测发现WB-F344-HBx的细胞周期中 G_0/G_1 期细胞比例较对照组降低，而 G_2/M 期细胞比例则升高，细胞增殖能力增强。MTT法检测细胞增殖能力也证实WB-F344-HBx与对照组相比增殖活性显著提高，说明HBx能够促进卵圆细胞增殖。已有研究证实HBx能够促进肝细胞和肝癌细胞增殖[8,16]，而HBx促进作为肝前体细胞的卵圆



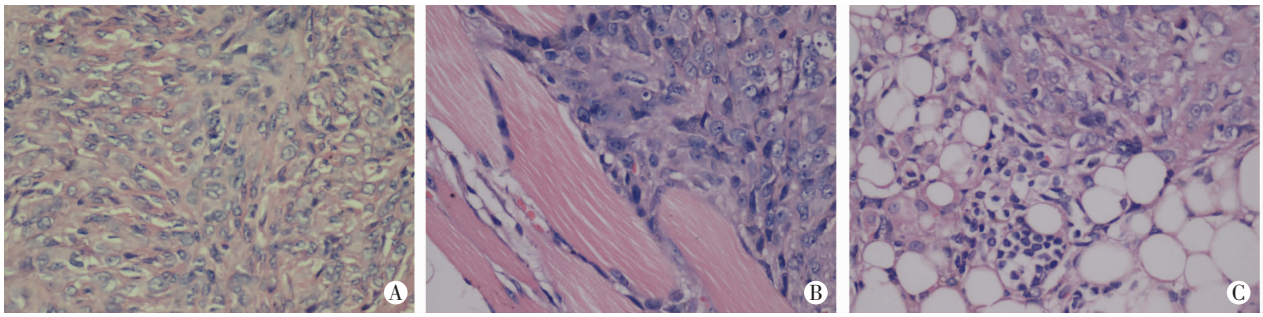
A：WB-F344-Mock组；B：WB-F344-PM组；C：WB-F344-HBx组

图4 各组WB-F344肝卵圆细胞细胞迁移实验结果 （LM ×100）



A:WB-F344-Mock 组;B:WB-F344-PM 组;C:WB-F344-HBx 组;D:WB-F344-HBx 组裸鼠腋下取出的瘤组织

图 5 各组裸鼠移植瘤成瘤实验大体观察



A:肿瘤组织;B:浸病理润的肌肉组织;C:浸润的脂肪组织

图 6 WB-F344-HBx 组裸鼠皮下肿瘤组织病理学变化 (HE ×400)

细胞增殖,提示我们 HBx 可能正是通过促进卵圆细胞恶性增殖,从而导致肝癌的发生。

迁移能力是恶性细胞的一个重要恶性生物学特征。HBx 对迁移能力的影响研究主要集中在肝癌细胞当中,如我们之前的研究发现 HBx 能够诱导肝癌细胞发生上皮-间叶样表型转化,促进侵袭、迁移[17]。而本研究结果显示稳定表达 HBx 的卵圆细胞 WB-F344-HBx 迁移能力较对照组显著增强。这说明 HBx 能够增强卵圆细胞的迁移能力,从而诱导卵圆细胞恶性转化。

卵圆细胞是一种具有多种分化潜能的肝前体细胞,能够分化为肝细胞、胆管细胞及胰岛细胞等[9],虽然此前有报道 WB-F344 卵圆细胞具有一定的自发成瘤能力[18],我们通过裸鼠移植瘤实验发现稳定表达 HBx 的卵圆细胞 WB-F344-HBx 与对照组相比成瘤能力显著增强,这直接证实了 HBx 能够促进卵圆细胞恶性转化。HBx 能够通过增强卵圆细胞增殖、促进迁移和成瘤来诱导卵原细胞恶性转化。

参考文献:

[1] 吴力群, 曹景玉, 王祖森, 等. 567 例不同病理类型的原发性肝癌肝切除术后预后分析[J]. 中华消化外科杂志, 2012, 11(6): 561 – 565.
[2] Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer[J]. J Lab Clin Med, 2006, 147(2): 58 – 66.
[3] Yang B, Bouchard M J. The hepatitis B virus X protein elevates cytosolic calcium signals by modulating mitochondrial calcium uptake [J]. J Virol, 2012, 86(1): 313 – 327.
[4] Klein N P, Schneider R J. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(11): 6427 – 6436.
[5] Kalra N, Kumar V. The X protein of hepatitis B virus binds to the F box protein Skp2 and inhibits the ubiquitination and proteasomal degradation of c-Myc[J]. FEBS Lett, 2006, 580(2): 431 – 436.
[6] Lee S G, Rho H M. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein[J]. Oncogene, 2000, 19(3): 468 – 471.
[7] Gearhart T L, Bouchard M J. The hepatitis B virus X protein modulates hepatocyte proliferation pathways to stimulate viral replication[J]. J Virol, 2010, 84(6): 2675 – 2686.
[8] Wang F, Zhou H, Xia X, *et al*. Activated Notch signaling is required for hepatitis B virus X protein to promote proliferation and survival of human hepatic cells[J]. Cancer Lett, 2010, 298(1): 64 – 73.
[9] Cheng A S, Yu J, Lai P B, *et al*. COX-2 mediates hepatitis B virus X protein abrogation of p53-induced apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(2): 175 – 180.
[10] Kuo T C, Chao C C. Hepatitis B virus X protein prevents apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by upregulating SATB1 and HURP expression[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(7): 1093 – 1102.
[11] Yao Z, Mishra L. Cancer stem cells and hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(18): 1691 – 1698.
[12] Mishra L, Banker T, Murray J, *et al*. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2009, 49(1): 318 – 329.
[13] 尤楠, 刘卫辉, 窦科峰. 胎肝干细胞治疗终末期肝病的研究进展[J]. 中华消化外科杂志, 2012, 11(2): 189 – 192.
[14] Marquardt J U, Thorgeirsson S S. Stem cells in hepatocarcinogenesis: evidence from genomic data[J]. Semin Liver Dis, 2010, 30(1): 26 – 34.
[15] Kubota K, Soeda J, Misawa R, *et al*. Bone marrow-derived cells fuse with hepatic oval cells but are not involved in hepatic tumorigenesis in the choline-deficient ethionine-supplemented diet rat model[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(2): 448 – 454.
[16] Wang F, Zhou H, Yang Y, *et al*. Hepatitis B virus X protein promotes the growth of hepatocellular carcinoma by modulation of the Notch signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2012, 27(4): 1170 – 1176.
[17] Yang S Z, Zhang L D, Zhang Y, *et al*. HBx protein induces EMT through c-Src activation in SMMC-7721 hepatoma cell line[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 382(3): 555 – 560.
[18] Hooth M J, Coleman W B, Presnell S C, *et al*. Spontaneous neoplastic transformation of WB-F344 rat liver epithelial cells[J]. Am J Pathol, 1998, 153(6): 1913 – 1921.

(收稿:2014-01-27;修回:2014-03-05)
(编辑 汪勤俭)