文章编号:1000-5404(2014)24-2451-04

论著

表达 HBx 的肝前体细胞的小鼠肝内移植模型的构建

钟 沁[1,2],张 超[1,2],何雪梅[1,2],胡代曦[1,2],张锡峰[1,2],黄佳祎[1,3],冯 涛[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学:分子医学与肿瘤研究中心[1],基础医学院生物化学与分子生物研究中心[2],基础医学院病理生理学教研室[3])

[摘要] **目的** 构建表达乙肝病毒 X 基因(HBx)的肝前体细胞,并经小鼠门静脉注射建立肝内移植模型,为进一步研究 HBx 对肝前体细胞的作用和影响及其在原发性肝癌发病机制中的作用奠定了基础。**方法** 分别将表达 HBx 基因的重组腺病毒 Ad-HBx-GFP 和空载体 Ad-GFP 转染小鼠肝前体细胞,再经小鼠门静脉注射后 3、7、14 d 取血清和肝组织,检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)变化情况,观察绿色荧光蛋白表达情况,免疫组织化学法观察 HBx 阳性染色,并取表达高峰在第 7 天的肝组织,进行 Western blot 法和实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)法分别检测 HBx 的蛋白及 mRNA 表达。**结果** 成功构建了表达 HBx 并靶向针对肝前体细胞的小鼠模型,绿色荧光蛋白表达量、免疫组化阳性细胞数量及血清 ALT 均在注射后第 7 天达到高峰,RT-PCR 及 Western blot 均检测到第 7 天 14-19/Ad-HBx-GFP 组小鼠肝组织目的基因及蛋白的特异性表达,与 14-19/Ad-GFP 组及生理盐水注射组相比结果具有统计学差异。**结论** 成功构建了表达 HBx 并靶向针对肝前体细胞的小鼠模型,操作可靠,重复性好,效果稳定,不仅对探讨原发性肝癌的发生机制奠定了基础,也为肿瘤动物模型的构建提供了新的思路。

[关键词] 乙型肝炎病毒 X 蛋白;肝前体细胞;绿色荧光蛋白;门静脉;小鼠模型
[中图法分类号] R-332;R322.47;R373.21 [文献标志码] A

Construction of intrahepatic transplantation model of hepatic progenitors cells expressing hepatitis B virus X in mice

Zhong Qin[1,2], Zhang Chao[1,2], He Xuemei[1,2], Hu Daixi[1,2], Zhang Xifeng[1,2], Huang Jiayi[1,3], Feng Tao[1,2] ([1]Research Center of Molecular Medicine and Cancer, [2]Center of Biochemistry and Molecular Biology, [3]Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] Objective To construct hepatic progenitor cells (HPCs) expressing hepatitis B virus X (HBx) and establish a mouse model by portal vein injection of the cells, in order to provide a platform to study the effect of HBx on HPCs and the mechanism of hepatocellular carcinoma (HCC). Methods The HPCs (cell line 14 – 19) were transfected by recombinant adenovirus vectors expressing HBx gene (Ad-HBx-GFP) as well as empty vector (Ad-GFP) separately, and the transfected HPCs were infused to the mouse from the portal vein. The control group was given equivalent normal saline. The change of serum alanine aminotransferase (ALT) was detected on the 3th, 7th and 14th days. The expression of HBx and green fluorescent protein (GFP) in liver tissue was detected by immunohistochemical technique and frozen section method. The expression of HBx at mRNA and protein levels was measured by RT-PCR and Western blotting. Results The mouse model expressing HBx was successfully established. The GFP expression, serum ALT level and HBx-positive cells reached the peaks on the 7th day. Compared with the control group and the 14-19/Ad-GFP group, the 14-19/Ad-HBx-GFP group showed specific expression of HBx mRNA and protein in the liver tissue. Conclusion The mouse model expressing HBx is successfully established with reliable operation and good repeatability, which lays a basis for exploring the mechanism of HCC and provides a new thought for establishing a tumor animal model.

[**Key words**] hepatitis B virus X; hepatic progenitor cells; green fluorescent protein; portal vein; mouse model

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071770, 81201679). Corresponding author: Feng Tao, E-mail: fengtao9_9@yahoo.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071770,81201679)
[通信作者] 冯 涛,E-mail:fengtao9_9@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1111.012.html(2014-11-06)

原发性肝癌(Hepatocellular carcinoma,HCC)是世界范围内重大恶性疾病之一,而乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus,HBV)是其发病的首要因素[1]。由HBV编码的乙型肝炎病毒X蛋白(Hepatitis B virus X,HBx),通过多种复杂的途径与HBV相关性肝癌的发生、发展有着密切的联系[2-3],但其具体机制还尚不清楚。肝前体细胞(hepatic progenitor cells,HPCs)是一类存在于肝组织内具有干细胞特性的细胞,在肝损伤过程中及特定环境因素下产生并增殖的一种具有多向分化潜能的肝原始细胞。近年来研究显示肝前体细胞可能是肝癌发生的起始细胞,其可能与肝前体细胞分化受阻有关[4-6]。本课题组前期相关研究成果显示,HBx能抑制小鼠胚胎干细胞的凋亡,影响肝前体细胞的增殖、分化,并能诱导肝前体细胞的上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transitions,EMT)、增强其迁移能力等[7-10],因此推测HBX可能通过对肝干细胞的调控在肝癌发生、发展中起着一定的作用,目前关于其作用机制的研究常限于细胞水平及转基因模型中,本实验通过体外构建表达乙肝病毒X基因的肝前体细胞,再经门静脉移植到小鼠体内,利用绿色蛋白作为示踪剂,既打破了体外细胞实验的局限性,也使模型的构建更具有操作性、重复性、针对性,为进一步探讨HBx对肝前体细胞的影响及其在肝癌机制中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠肝前体细胞株14-19由美国芝加哥分子肿瘤研究中心馈赠;人胚肾上皮细胞系293T细胞、Ad-GFP腺病毒及Ad-HBx-GFP由本教研室冯涛教授构建并保存;无特殊病原体(specific-pathogen free, SPF)级昆明小鼠,雄性,8~12周龄(20~30 g),由重庆医科大学动物中心提供。

1.2 主要试剂

总RNA提取试剂盒、RT-PCR试剂盒及实时荧光定量试剂盒SYBR® Premix Ex *Taq*™(Tli RNaseH Plus)购自大连宝生物公司;PCR引物由上海生工生物有限公司合成;DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶等购自Gbico;小鼠抗HBV病毒X抗体购自CHEMICON Interna-tional公司;兔抗小鼠β-actin、HRP标记的山羊抗小鼠IgG、免疫组化S-P及DAB染色试剂盒等均购自北京中杉金桥公司;HRP标记的山羊抗兔IgG购自Proteintech公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自北京鼎国昌盛技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及腺病毒扩增 复苏293T细胞及14-19细胞,用含10%胎牛血清的DMEM培养,并置于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度孵育箱内,待贴壁后正常换液,0.25%胰酶消化、传代。转染前先进行病毒扩增,将293T细胞以5×10^6密度均匀铺板于100 cm^2培养皿内,待细胞贴壁、变形后分别加入0.5 μL Ad-GFP及Ad-HBx-GFP的原病毒保存液,于24、48、72 h观察,待细胞感染率达90%以上收取细胞,离心(300×*g*, 5 min),PBS重悬后反复冻融3次(-200~37 ℃),台式离心机离心(最大速率)、收集上清即得病毒液,反复扩增多次后测病毒滴度为5×10^8 pfu/mL,分装置于-80 ℃保存备用。

1.3.2 重组腺病毒感染14-19细胞 分两组将扩增后的重组腺病毒Ad-GFP-HBx及空载体Ad-GFP分别转染14-19细胞(即14-19/Ad-GFP组、14-19/Ad-HBx-GFP组),病毒滴度为5×10^8 pfu/mL时加入病毒液10 μL,能使14-19细胞的感染率最高,取感染后48 h的细胞,提RNA及蛋白质,分别采用Real-time PCR及Western blot检测14-19细胞内HBx的蛋白及mRNA表达量按浓度分别感染14-19细胞,感染48 h后,计数细胞数量,PBS重悬并调整细胞数量为每200 μL PBS液中含5×10^5个细胞,备用于动物实验。

1.3.3 动物模型构建及分组 实验动物分3组,每组9只,分别门静脉注射转染Ad-GFP的14-19细胞(14-19/Ad-GFP组)、转染Ad-HBx-GFP的14-19细胞(14-19/Ad-HBx-GFP组),每只注射量均为5×10^5个细胞(溶于200 μL PBS中),生理盐水组注射200 μL生理盐水。小鼠术前禁食12 h,称质量、麻醉,待小鼠昏迷无肌张力后消毒、备皮,剑突下做长约2 cm的纵行切口,依次开腹显露肝脏后向右向头侧翻起小鼠肝脏并显露肝门区,小心分离门静脉的分支,充分暴露并确认门静脉后血管夹夹闭门静脉远端,于近端以细针头缓慢注射,完毕后棉签止血取下血管夹,待确定无出血后依次关闭腹腔、缝合,术后补液,第3、7、14天取小鼠新鲜肝组织,备用于后续实验。

1.3.4 小鼠血清ALT检测 于注射后3、7、14 d,分别经3组模型小鼠(每个时相点3只)的腹主动脉取血1.5 mL,4 000 r/min离心7 min后取血清,采用全自动生化分析仪进行小鼠的血清ALT检测。

1.3.5 观察绿色荧光蛋白表达情况 打开恒温冰冻切片机设置温度为-40 ℃,取3组模型小鼠的部分新鲜肝脏组织,大小为0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm,用OTC胶包埋后放于样品托盘上并置于恒温冰冻切片机内,速冻10 min后,将恒温冰冻切片机的温度上调为-11 ℃,约30 min后连续切片,厚度约8 μm,将肝组织切片直接贴附于载玻片上,晾干后立即荧光显微镜下观察,每只小鼠的肝组织均重复做3张冰冻切片,储存于-80 ℃冰箱内保存。

1.3.6 免疫组化法检测小鼠肝组织HBx阳性反应 取3组模型小鼠新鲜肝组织,大小为1.0 cm×1.0 cm×1.0 cm,用4%多聚甲醛固定,脱水、透明、浸蜡包埋后进行切片,切片厚度为6 μm,石蜡脱烤,枸橼酸抗原修复,山羊血清封闭、一抗4 ℃孵育过夜(HBx工作浓度为1∶400),二抗生物素孵育,SABC反应后DAB显色,苏木精复染,透明后封片后保存,按分组每组又以PBS代替一抗添加对照组,于显微镜下观察每张切片阳性染色情况。

1.3.7 检测小鼠肝组织内HBx蛋白和mRNA水平表达情况 采用实时荧光定量PCR检测各组HBx mRNA表达:取适量大小肝脏组织,液氮研磨后冰上匀浆,按RNA提取说明书提取RNA。测浓度后反转录制备cDNA进行荧光定量PCR,引物序列GAPDH:上引物5′-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3′;下引物5′-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3′;HBx:上引物5′-CCCA-

ACTCCTCGTTCACGGTGGTCTC-3′;下引物 5′-GAGACCACCGTGAACGAGGAGTTGGG-3′。采用 10 μL 反应体系如下:SYBR Premix Ex*Taq*™ Ⅱ 5 μL,上、下游引物各 0.4 μL(10 μmol/L),模板 1 μL,无菌双蒸水补齐 10 μL。反应条件依次为:95 ℃、94 ℃、65 ℃、72 ℃分别反应 5 min、15 s、30 s、30 s,40 个循环,95 ℃保温 1 min 后制作溶解曲线,检测引物的特异性,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析基因相对表达,每组设置 3 个复孔。蛋白质印迹分析各组肝组织 HBx 蛋白:取黄豆大小肝组织,液氮研磨后冰上匀浆,加入预先混合的蛋白裂解液和 PMSF(100∶1),1 380 × *g* 离心 5 min 收取上清,用 BCA 法测定蛋白浓度,加 SDS 上样缓冲液 ,100 ℃煮沸 5 min,根据待测目的蛋白分子量配制 SDS-PAGE 胶,每组各取 60 μg 蛋白上样量,电泳分离后,电转至硝酸纤维素膜上,经封闭液室温封闭 2 h,一抗4 ℃ 冰箱摇床孵育过夜,PBS 洗 8 min × 3 次,加入对应的二抗室温孵育 2 h,TBST 洗 15 min × 3 次,ECL 法显影检测。

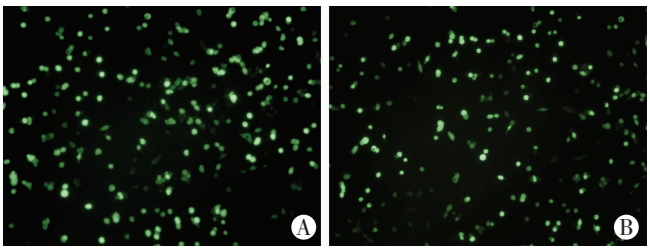
1.4 统计学方法

所得数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计处理,采用配对 *t* 检验进行组间的比较。

2 结果

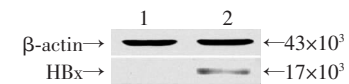
2.1 14-19 细胞的病毒感染效率检测

分别成功构建了表达 Ad-HBx-GFP 及 Ad-GFP 的 14-19 细胞当病毒滴度为 5×10^8 pfu/mL 时,细胞感染 48 h 后,14-19/Ad-HBx-GFP 组及 14-19/Ad-GFP 组荧光表达量为 90% 以上(图 1);Real-time PCR 结果显示 14-19/Ad-HBx-GFP 组的 mRNA 转录水平(1.75 ± 0.19)明显高于 14-19/Ad-GFP 组(0.37 ± 0.12)($P < 0.05$);Western blot 结果显示 14-19/Ad-HBx-GFP 组有特异性 HBx 蛋白表达,14-19/Ad-GFP 组则无($P < 0.05$)(图 2)。



A:14-19/Ad-HBx-GFP ;B:14-19/Ad-GFP

图 1 荧光显微镜观察重组腺病毒 Ad-HBX-GFP 及 Ad-GFP 对 14-19 细胞的感染效率(×200)



1:14-19/Ad-GFP 组;2:14-19/Ad-HBx-GFP 组

图 2 Western blot 检测重组腺病毒 Ad-HBx-GFP 感染 14-19 细胞后 HBx 蛋白表达

2.2 小鼠血清 ALT 检测情况

门静脉注射后,第 3 天检测 14-19/Ad-HBx-GFP 组及 14-19/Ad-GFP 组的小鼠血清 ALT 有所升高,第 7 天升高达到高峰后出现下降,至第 14 天趋于正常,生理盐水注射组血清 ALT 均保持在正常水平(表 1)。

表 1 各组小鼠血清转氨酶表达情况($n = 3$, $\bar{x} \pm s$, U/L)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天
14-19/Ad-HBx-GFP	58.22 ± 6.20[ac]	105.20 ± 11.20[b]	46.07 ± 4.30[a]
14-19/Ad-GFP	67.00 ± 5.90[ac]	97.4 ± 8.50[b]	50.45 ± 7.30[a]
生理盐水	38.33 ± 10.50	38.33 ± 10.50	40.52 ± 4.70

a:$P < 0.05$,与同组第 7 天比较;b:$P < 0.05$,与生理盐水组第 7 天比较;c:$P < 0.05$,与生理盐水组第 3 天比较

2.3 观察小鼠肝组织绿色荧光表达情况

荧光镜下观察新鲜肝脏组织冰冻切片如图 3 显示,门静脉注射后第 3 天 14-19/Ad-HBx-GFP 组及 14-19/Ad-GFP 组的小鼠肝组织均有微弱的绿色荧光表达,第 7 天显示了大量绿色荧光,以中央静脉周围较为强烈,且多位于细胞膜上,之后出现下降趋势,至第 14 天几乎无表达,而生理盐水注射则均无绿色荧光表达,结果表明细胞经小鼠门静脉注射后,最终能到达小鼠的肝脏内且具有较高的表达量(图 3)。

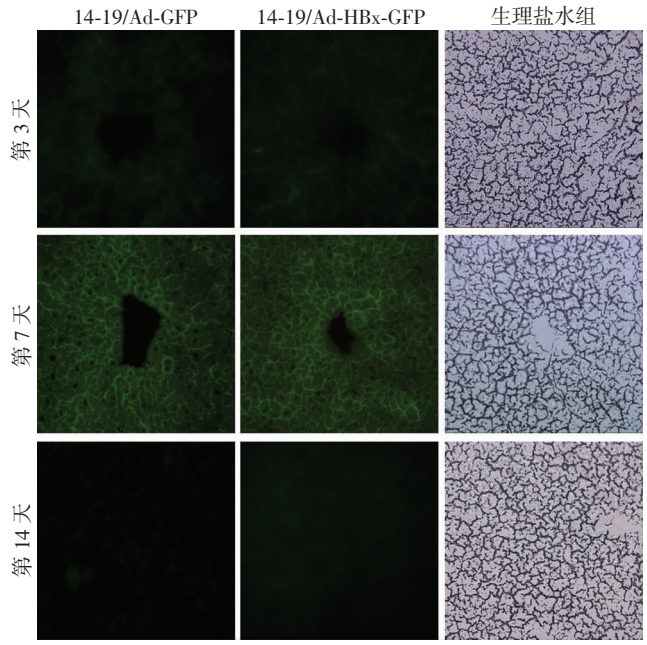


图 3 荧光显微镜观察 14-19/Ad-HBx-GFP 组、14-19/Ad-GFP 组及生理盐水组肝组织的绿色荧光的表达 (×200)

2.4 免疫组化法观察小鼠肝组织 HBx 阳性染色情况及其定位

石蜡切片免疫组化结果显示 14-19/Ad-HBx-GFP 组门静脉注射第 3 天见少量 HBx 阳性细胞,第 7 天 HBx 阳性细胞数量增多,到第 14 天阳性细胞难检测到,而 14-19/Ad-GFP 组及生理盐水注射组染色均未见阳性表达,如图中箭头所示,阳性细胞的表达位置多位于中央静脉周围,但细胞膜上及细胞质内均被染色,以细胞质内较多(图 4)。

2.5 小鼠肝组织中 HBx 蛋白及 mRNA 表达水平

门静脉注射 7 天后,以 GAPDH 为内参进行 Real-time PCR,结果显示 14-19/Ad-HBx-GFP 组的 mRNA 转录水平(1.28 ± 0.11)明显高于 14-19/Ad-GFP 组(0.34 ± 0.09)及生理盐水组(0.30 ± 0.04)($P < 0.05$);免疫印迹反应结果显示 14 – 19/Ad-HBx-GFP 组有特异性 HBx 蛋白表达(0.086 ± 0.008),14-19/Ad-GFP 组(0.038 ± 0.012)及生理盐水组(0.037 ± 0.006)则无表达($P < 0.05$)。以上表明 14-19 细胞经小鼠门静脉注射后,

最终到达鼠肝脏组织,并成功表达了 HBx(图5)。

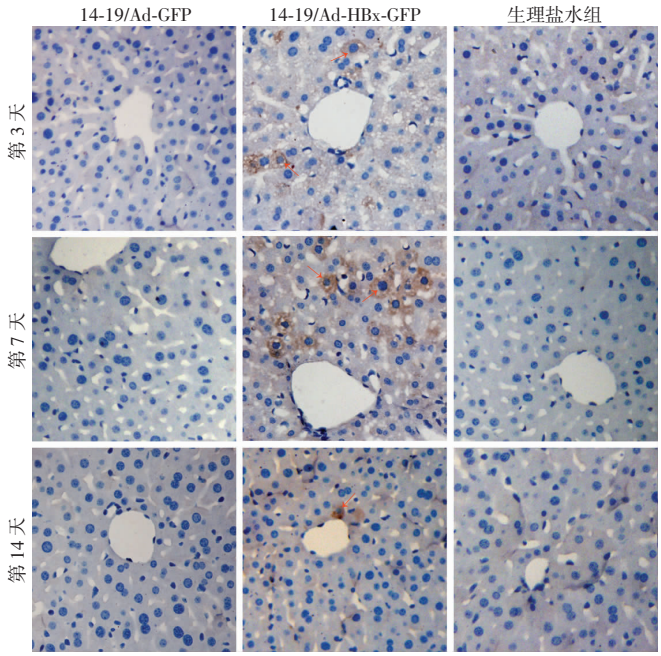
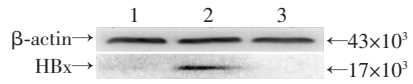


图4 免疫组化法分析肝组织 HBx 阳性表达情况 (S-P ×200)



1:14-19/Ad-GFP;2:14-19/Ad-HBx-GFP;3:生理盐水组

图5 Western blot 法检测 14-19/Ad-HBx-GFP、14-19/Ad-GFP 及生理盐水组小鼠肝组织 HBx 的表达

3 讨论

HBx 与 HBV 相关性原发性肝癌(HCC)的发生有着紧密的联系,其可通过多种途径促进肝癌的发生、发展[11-12]。越来越多的研究显示肝干细胞可能是肝癌发生的起始细胞[13]。本课题组的前期研究中已构建了重组腺病毒 Ad-HBX-GFP 及 Ad-GFP,且成功分离了小鼠的肝前体细胞,其相关成果显示 HBx 能对肝前体细胞起到调控作用[5-8]。但过去的相关研究大多局限于体外细胞实验,其由于培养条件及表达系统的不同对结果的分析有着不同程度的影响,而转基因动物虽可以运用组织特异性使基因在特定组织表达,但不能特异性靶向干细胞[14-15]。

本研究首先在体外构建了表达 HBx 的肝前体细胞,使 HBx 能靶向针对肝前体细胞,再经小鼠门静脉注射后移植到小鼠体内,其生长微环境更接近体内的发病模式,且小鼠体内本身不存在 HBx 基因,因此其自身就能作为一种外源性标志物来帮助鉴定细胞的肝内移植是否成功,这为相关方面的进一步深入研究提供了基础。在本实验中,显微镜下所见的绿色荧光表达量及免疫组织化学检测到的阳性细胞数量均在门静脉注射细胞后第7天达到高峰,下降至第14天就几乎检测不到,意味着 HBx 基因在肝内特异性表达的时间较短,这可能与腺病毒载体的瞬时转染有关,HBV 相关性原发性肝癌的发生往往需要很长的时间,那么要建立一个在肝组织内能有效、长期表达 HBx 基因的小鼠模型是目前我们需要考虑的问题及下一步实验的研究重点;当模型构建成功后,体内 HBx 对肝前体细胞的作用和影响是否能与体外研究所显示的结果保持一致,其又如何对肝前体细胞进行调控并影响正常的肝细胞,在肝癌的发生、发展中具体的机制又是什么,都需要进一步去探究。

参考文献:

[1] Liu W C, Liu Q Y. Molecular mechanisms of gender disparity in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(20): 6252-6261.
[2] Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, *et al*. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene[J]. Pathol Biol (Paris), 2010, 58(4): 267-272.
[3] Wang Y, Cui F, Lv Y, *et al*. HBsAg and HBx knocked into the p21 locus causes hepatocellular carcinoma in mice[J]. Hepatology, 2004, 39(2): 318-324.
[4] Huang J, Shen L, Lu Y, *et al*. Parallel induction of cell proliferation and inhibition of cell differentiation in hepatic progenitor cells by hepatitis B virus X gene[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(4): 842-848.
[5] Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, *et al*. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM + cells of normal and injured mouse liver[J]. Development, 2009, 136(11): 1951-1960.
[6] Wang C, Yang W, Yan H X, *et al*. Hepatitis B virus X (HBx) induces tumorigenicity of hepatic progenitor cells in 3, 5-diethoxycarbonyl-1, 4-dihydrocollidine-treated HBx transgenic mice[J]. Hepatology, 2012, 55(1): 108-120.
[7] Oertel M, Shafritz D A. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1782(2): 61-74.
[8] 申利红, 芦永良, 李红丽, 等. 乙型肝炎病毒 X 蛋白对小鼠胚胎肝干细胞凋亡及相关蛋白表达的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(6): 771-775, 779.
[9] 白光文, 申利红, 卢永良, 等. 乙肝病毒 X 蛋白对肝前体细胞分化的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(10): 846-849.
[10] 芦永良, 申利红, 李红丽, 等. HBx 诱导小鼠肝前体细胞上皮-间质转化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(2): 146-149.
[11] Neuveut C, Wei Y, Buendia M A. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis[J]. J Hepatol, 2010, 52(4): 594-604.
[12] 吴武佳, 陈李影慧, 宋晨源, 等. CCRK 在肝细胞癌组织中的表达及其与 HBx 的关系[J]. 军事医学, 2013, 37(2): 110-113.
[13] Arzumanyan A, Friedman T, Ng I O, *et al*. Does the hepatitis B antigen HBx promote the appearance of liver cancer stem cells? [J]. Cancer Res, 2011, 71(10): 3701-3708.
[14] Dion S, Bourgine M, Godon O, *et al*. Adeno-associated virus-mediated gene transfer leads to persistent hepatitis B virus replication in mice expressing HLA-A2 and HLA-DR1 molecules[J]. J Virol, 2013, 87(10): 5554-5563.
[15] von-Freyend M J, Untergasser A, Arzberger S, *et al*. Sequential control of hepatitis B virus in a mouse model of acute, self-resolving hepatitis B[J]. J Viral Hepat, 2011, 18(3): 216-226.

(**收稿**:2014-07-07;**修回**:2014-10-02)
(编辑 郭建秀)