论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201409217

HBX在肝癌细胞中通过下调miR-199a增强AKT的表达

谌 玲,谭 翠 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院分子肿瘤及表观遗传学重庆市重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨乙型肝炎病毒X蛋白(hepatitis B virus X protein, HBX)调节miR-199a的表达在HBV相关性肝癌发生中的分子机制。**方法** 重组HBX腺病毒(Ad-HBX)感染人肝癌HepG2细胞,HBX的siRNA转染稳定表达HBV基因的人肝癌HepG2.2.15细胞,荧光定量PCR方法检测HBV相关性肝癌组织标本和肝癌细胞中HBX、miR-199a、AKT的mRNA表达水平及运用Western blot检测肝癌组织标本和肝癌细胞中HBX、AKT的蛋白表达水平;分别用miR-199a mimics和miR-199a inhibitor的转染肝癌细胞后,荧光定量PCR方法检测肝癌细胞中AKT的mRNA表达水平及运用Western blot检测肝癌细胞中AKT的蛋白表达水平。**结果** miR-199a在HepG2.2.15细胞中表达水平显著低于HepG2细胞,并且证实其表达下调受到了HBX的调控($P<0.05$),HepG2.2.15细胞中AKT表达水平显著高于HepG2细胞($P<0.05$),在HepG2.2.15细胞中过表达miR-199a能明显下调AKT表达水平以及在HepG2细胞中抑制miR-199a能明显上调的AKT表达水平($P<0.05$),此外,miR-199a的表达量在HBV相关性肝癌组织比相应的癌旁组织表达降低。**结论** HBX可以通过miR-199a调节AKT导致HBV相关性肝癌发生。

[关键词] 乙型肝炎病毒X蛋白;微小RNA;肝癌;AKT信号通路
[中图法分类号] R394.2;R730.23;R735.7 [文献标志码] A

HBX enhances AKT expression through down-regulation of miR-199a in hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma

Chen Ling, Tan Cui (Chongqing Key Laboratory of Molecular Oncology and Epigenetics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the potential mechanism of hepatitis B virus X protein (HBX)-modulated miR-199a expression in hepatitis B virus (HBV) related hepatocarcinogenesis. **Methods** HepG2 cells were transfected with HBX-containing recombinant adenovirus (Ad-HBX), and HepG2.2.15 cells capable of stably expressing HBV gene were transfected with siRNA-HBX. Fluorescence quantitative PCR was used for detecting mRNA expression levels of HBX, miR-199a, and AKT in HBV-related hepatocellular carcinoma tissues and hepatocellular carcinoma cells, while Western blotting was adopted to detect the protein expression of HBX and AKT. After transfection with miR-199a mimics and miR-199a inhibitor, quantitative PCR and Western blotting were employed to detect the expression of AKT in hepatocellular carcinoma cells. **Results** Experimental results showed that miR-199a expression in HepG2.2.15 cells was significantly lower than that in HepG2 cells, and down-regulation of miR-199a expression was related with HBX ($P<0.05$). AKT expression in HepG2.2.15 cells was significantly higher than that in HepG2 cells ($P<0.05$), and over-expression of miR-199a in HepG2.2.15 cells could significantly reduce AKT expression ($P<0.05$), while inhibition of miR-199a in HepG2 cells could significantly increase AKT expression ($P<0.05$). In addition, the expression level of miR-199a in HBV-related hepatocellular carcinoma tissues was lower than that in the adjacent noncancer tissues. **Conclusion** HBX regulates the AKT expression through miR-199a, which may lead to HBV-related hepatocarcinogenesis.

[基金项目] 国家自然科学基金(81171562)
[通信作者] 谭 翠, E-mail: tancui0803@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150327.1350.006.html(2015-03-27)

[**Key words**] hepatitis B virus X; miR-199a; hepatocellular cancer; AKT signal pathway

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81171562). Corresponding author: Tan Cui, E-mail: tancui0803@163.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是一种恶性程度极高,预后极差的肿瘤,居我国恶性肿瘤死亡的前列[1]。流行病学调查发现数百万HCC患者合并有乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)的感染,HBV感染是HCC发生的重要原因之一[2-3]。研究表明miRNAs广泛参与生物体的增殖、凋亡等过程,miRNAs具有癌基因或抑癌基因的作用,其异常表达与肿瘤发生密切相关[4-5],可能成为肿瘤诊断和治疗的重要靶点,其中miR-199a与恶性肿瘤的发病关系近年来引起许多学者的重视[6]。miR-199a在肿瘤细胞增殖、转移、凋亡、血管生成等过程中具有重要作用[7]。虽然以往研究表明miR-199a与肝癌的发生、发展、预后密切相关[8],但其在HBV相关肝癌发生中的作用及分子机制尚不清楚。AKT信号通路的活化可以促进肿瘤的增殖、迁移和侵袭[5,9],对包括肝癌在内的多种恶性肿瘤的发生和发展作用显著[10-11];同时,有学者在肺癌中证实miR-199a可以活化AKT的表达[12],我们前期研究中发现乙型肝炎病毒X蛋白(hepatitis B virus X protein, HBX)可以调节miR-199a的表达,由于HBX可以激活PI3K-AKT信号通路,为了探索在HBV相关性肝癌发生过程中HBX是否是通过miR-199a调节AKT的表达,本研究检测了HBV相关性HCC组织标本中miR-199a的表达以及分析了其与AKT的相关性,并在体外实验中证实miR-199a可以调节AKT的表达,将可能为HBV相关性肝癌的发病机制提供了新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验采用的细胞株(HepG2细胞为人肝癌细胞,HepG2.2.15为稳定表达HBV基因的HepG2细胞,L02细胞为正常肝细胞)。HBV相关性肝癌患者的HCC组织和相应癌旁组织标本(各20例)由重庆医科大学附属第一医院生物样本库提供。本研究经重庆医科大学附属第一医院伦理学委员会批准。HBX腺病毒表达载体由重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心馈赠。

1.2 细胞培养和HBX腺病毒感染HepG2细胞

细胞株冻存于液氮中,于37 ℃恒温水浴箱快速解冻复苏后,1 000 × *g* 离心5 min,在加有10% FBS(Gibco BRL公司)的RPMI1640(Gibco-BRL)培养液中,培养于5% CO_2、37 ℃培养箱。每孔1.5×10^5细胞铺6孔板,5% CO_2、37 ℃培养24 h后按腺病毒操作说明进行细胞感染,48 h后观察感染GFP组细胞荧光蛋白表达情况,推测感染效率并进行后续实验。

1.3 细胞转染

将HepG2.2.15细胞分为2组,即NC对照组和siRNA-HBX干扰组;HepG2.2.15细胞和L02细胞分别分为2组,即NC1对照组和mimics组;HepG2细胞和L02细胞分别分为2组,即NC2对照组和inhibitor组;细胞转染按照Invitrogen公司Lipofectamine™ 2000试剂说明书的要求,分别混匀脂质体、无血清的培养基(Gibco BRL, USA)和miRNA mimics,或miRNA inhibitor,或HBX siRNA,或各自的阴性对照,加入无血清的培养基,培养4~6 h后换为含血清的培养基。miRNA及其对照序列转染的终浓度为50 nmol/L。HBX siRNA及其阴性对照NC,miR-199a mimics和阴性对照NC1,miR-199a inhibitor和阴性对照NC2均购自上海GenePharma公司。

1.4 实时荧光定量PCR

使用TRIzol试剂(Invitrogen公司)提取上述各组细胞的总RNA。使用M-MLV逆转录试剂盒(Promega,USA)的进行第1链cDNA的合成,以U6 RNA作为miRNA的内参基因,以β-actin作为其他内参基因。使用ABI 7500实时荧光定量PCR仪及SYBR Green试剂(Fermentas, USA)进行基因检测。采用两步法PCR扩增标准程序:95 ℃预变性20 s;95 ℃变性10 s,60 ℃退火20 s,扩增40个循环周期,每个标本设3个复孔。miR-199a成熟体和U6引物由广州RIBOBIO公司合成。对于HBX基因,5′-ACCAATTTATGCCTACAGCCTCC-3′(正向)和5′-CCGTCTGTGCCTTCTCATCTGC-3′(反向);AKT基因,5′-CTCATTCCAGACCCACGAC-3′(正向)和5′-ACAGCCCGAAGTCCGTTA-3′(反向);对于β-actin,5′-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3′(正向)和5′-GAAGCATTTGCGGTGGACGAT-3′(反向)。

1.5 Western blot检测蛋白表达

提取细胞的总蛋白,BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,Western blot检测蛋白表达按照我们前期研究的实验方法进行[13],分别用anti-β-actin (Ab156302.abcam, USA),anti-AKT (SC-1618,Santa Cruz Biotechnology,USA),HBx(ab156302.abcam,USA),经化学发光法检测各蛋白的表达情况。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。

1.6 统计学处理

所有的实验至少重复3次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 16.0统计软件分析及处理数据,行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 在表达 HBX 的人肝癌细胞中 miR-199a 的表达量显著下调

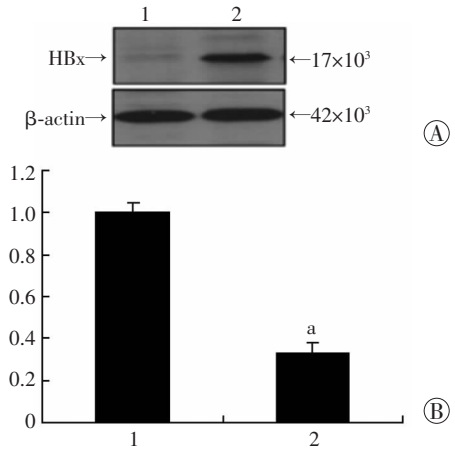
在人肝癌细胞株 HepG2.2.15 细胞和 HepG2 细胞中检测 miR-199a 的表达水平，结果显示，HepG2.2.15 细胞中表达 HBX，而 HepG2 细胞中不表达 HBX；miR-199a 在 HepG2.2.15 细胞中的表达量比 HepG2 细胞中显著下调（$P<0.05$，图 1）。为了检测下调的 miR-199a 是否与 HBX 表达相关，在 HepG2 细胞中分别转染 HBX 的表达载体 Ad-HBX 和对照载体 Ad-GFP，检测 HBX 和 miR-199a 的表达水平，结果显示转染 Ad-HBX 后 HepG2 细胞中的 miR-199a 表达水平比转染 Ad-GFP 的细胞有明显下调（$P<0.05$，图 1）。

2.2 HBX 可以调控 AKT 的表达

在人肝癌细胞株 HepG2.2.15 细胞和 HepG2 细胞中检测 AKT 的表达水平，结果显示 HepG2.2.15 细胞中 AKT 的表达量比 HepG2 细胞上调（$P<0.05$，图 3A）。为了检测 AKT 的高表达是否受 HBX 的调节，在 HepG2 细胞中分别转染 HBX 的表达载体 Ad-HBX 和对照载体 Ad-GFP，以及在 HepG2.2.15 细胞中分别转染 HBX 的 siRNA 和其阴性对照，分别检测 AKT mRNA 的表达水平，结果显示增强 HBX 表达的 HepG2 细胞中 AKT 的表达水平较 Ad-GFP 对照组有明显上调（$P<0.05$，图 3B）；而抑制 HBX 表达的 HepG2.2.15 细胞中 AKT 的表达较其对照组显著下降（$P<0.05$，图 3C、D）。

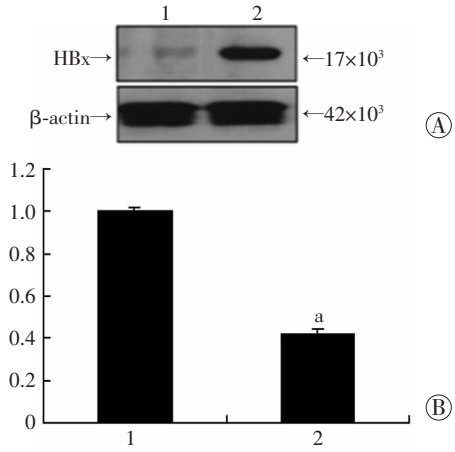
2.3 miR-199a 可以抑制 AKT 的表达

为了证实 miR-199a 可以调控 AKT 的表达，在 HepG2.2.15 细胞和 L02 细胞中分别转染 miR-199a mimics 和阴性对照 NC1，检测 AKT 的 mRNA 和蛋白表达水平，结果显示，增强 miR-199a 表达可以使 HepG2.2.15 细胞和 L02 细胞的 AKT 的 mRNA 和蛋白水平均发生下调（$P<0.05$，图 4A、C、D）；在 HepG2 细胞和 L02 细胞分别转染 miR-199a inhibitor 和其阴性对照 NC2 的结果显示，抑制 miR-199a 的表达可以使 HepG2 细胞和 L02 细胞中 AKT 的 mRNA 和蛋白水平均发生上调（$P<0.05$，图 4B、C、D）。



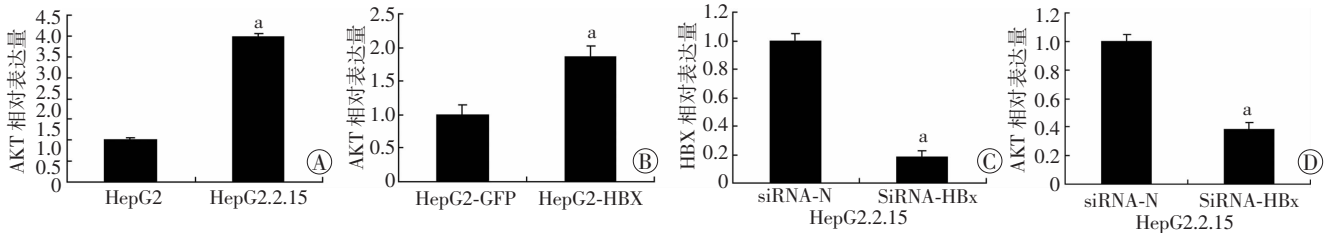
1：HepG2；2：HepG2.2.15　a：$P<0.05$，与 HepG2 比较
A：Western blot 检测结果；B：半定量分析结果

图 1　Western blot 检测 miR-199a 在 HepG2.2.15 的表达



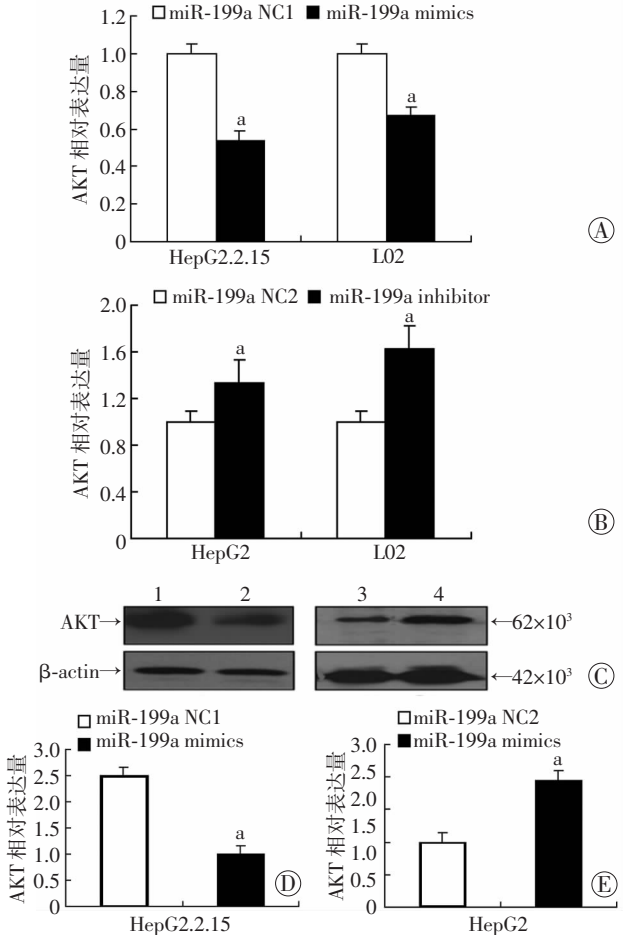
1：HepG2-GFP；2：HepG2.2.15-HBX　a：$P<0.05$，与 HepG2-GFP 比较　A：Western blot 检测结果；B：半定量分析结果

图 2　Western blot 检测转染 Ad-HBX 后 miR-199a 在 HepG2.2.15 的表达



A：AKT 在 HepG2.2.15 细胞和 HepG2 细胞中的 mRNA 表达　a：$P<0.05$，与 HepG2 比较；B：AKT 在转染 HBX 前后 HepG2 细胞中的 mRNA 表达　a：$P<0.05$，与 HepG2-GFP 比较；C：HBx 在 HepG2.2.15 敲除后 HBX 的表达；D：HepG2.2.15 敲除 HBX 后 AKT 的表达　a：$P<0.05$，与 siRNA-N 比较

图 3　AKT 在表达 HBX 的 HCC 细胞中表达上调



A:转染 miR-199a mimics 后细胞中 AKT mRNA 的表达 a:$P<0.05$,与 miR-199a NC1 比较; B:转染 miR-199a inhibitor 后细胞中 AKT mRNA 的表达 a:$P<0.05$,与 miR-199a NC2 比较; C:转染 miR-199a mimics 和 miR-199a inhibitor 后细胞中 AKT 的蛋白水平 1: miR-199a NC1; 2: miR-199a mimics; D、E:转染 miR-199a mimics 和 miR-199a inhibitor 后 AKT 蛋白相对表达量 a:$P<0.05$,与 miR-199a NC1 比较; a:$P<0.05$,与 miR-199a NC2 比较

图 4　miR-199a 抑制 AKT 的表达

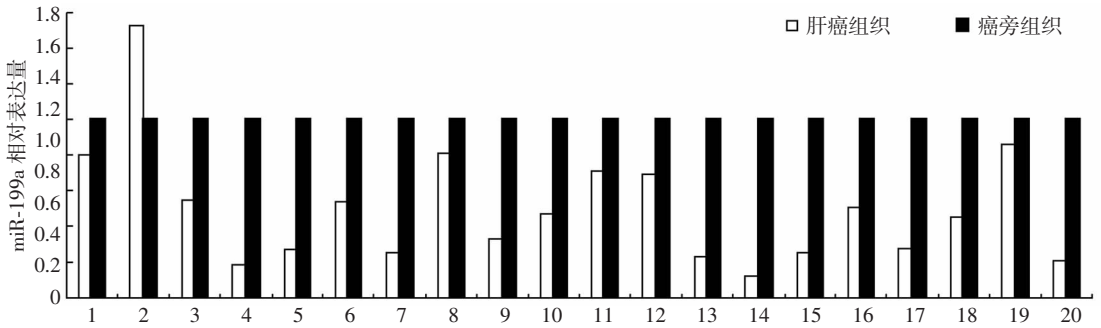
2.4　miR-199a 在 HBV 相关性肝癌组织中显著下调

miR-199a 在 HBV 相关性肝癌组织标本中的表达水平是否也像细胞水平一样发生改变呢？为了研究肝癌组织标本中 miR-199a 的表达量与肝癌的关联，我们用 Real-time PCR 检测了 20 例 HBV 相关性肝癌组织和相对应的癌旁组织标本中 miR-199a 的表达水平。结果显示，其中 18 例患者的癌组织 miR-199a 的表达水平比相应的癌旁肝组织有显著下调（$P<0.05$，图 4）。这说明 miR-199a 在 HBV 相关性肝癌的发生中可能充当抑癌基因的作用。

3　讨论

HBX 作为 HBV 基因组中最小的开放阅读框，同时也是结构和功能上重叠最明显的区域，编码产生的 HBX 蛋白被认为与 HCC 的发生、发展密切相关。HBX 能通过多种途径诱导肝癌的发生，在 HBV 相关性肝癌的发生、发展中具有重要的作用[2,13-14]。PI3K-AKT 信号通路广泛存在于细胞中，对调节细胞生长、增殖、分化发挥着重要的作用，研究表明 HBX 可以激活该信号通路的表达，进而影响下游多种效应分子的活化状态，与肝癌的发生、发展密切相关。但是 HBX 如何激活 PI3K-AKT 信号通路仍然不清楚。

miR-199a 在包括肝癌在内的多种肿瘤中被发现有异常表达，对肿瘤细胞增殖、血管生成、侵袭转移等病理过程都有着调控作用。Kim 等[15]采用 qPCR 检测肝癌发现 miR-199a 表达有显著下调，在肝癌中可以降低 MET 原癌基因的表达来发挥抑制肿瘤作用。miR-199a 还可以将肝癌细胞阻滞于 G_0/G_1 期，从而有效地抑制肿瘤细胞的增殖[16]。同时，有研究表明肝癌中 miR-199a 的表达降低与患者的生存期存在相关性，进一步通过动物模型研究发现，miR-199a 能够在体内减慢肿瘤细胞生长[6]。由此可见，miR-199a 确实在肝癌的发生过程中起着至关重要的作用。但其在 HBV 相关性肝癌的发生中的作用及其分子机制尚未完全阐明。



1－20：分别代表 20 例 HBV 相关性肝癌组织和相对应的癌旁组织

图 5　HBV 相关性肝癌组织和癌旁组织中 miR-199a 表达水平

HBX 还可以通过调节多种 miRNAs 的表达参与肝癌发生中的表观遗传学调控,那么在 HBV 相关性肝癌的发生中 HBX 是否对 miR-199a 也具有类似的调控机制呢? 本研究发现 miR-199a 在 HepG2.2.15 细胞中表达水平显著低于 HepG2 细胞,并且证实其表达下调确实受到了 HBX 的调控,有研究表明 miRNAs 可以通过调节 AKT 的表达发挥相应的生物学功能[17]。为了探讨在 HBV 相关性肝癌中是否存在着异常表达的能调控 AKT 表达的 miRNAs 参与了肝癌的发生过程,本实验结果证实 HepG2.2.15 细胞中 AKT 表达水平显著高于 HepG2 细胞,在 HepG2.2.15 细胞中过表达 miR-199a 能明显下调 AKT 表达水平,而在 HepG2 细胞中抑制 miR-199a 能明显上调的 AKT 表达水平,这说明 miR-199a 可能是通过调节 AKT 的表达参与了肝癌的发生过程。此外,我们还发现 miR-199a 的表达量在 HBV 相关性肝癌组织比相应的癌旁组织表达降低。但有关 miR-199a 下调 AKT 蛋白表达的具体机制仍有待进一步深入研究。

总之,本研究发现了 HBX 可以通过调节 miR-199a 参与 HBV 相关性肝癌的发生过程,初步探讨了 HBX-miR-199a-AKT 这一信号通路的发生机制,不仅为 HBV 相关性肝癌的发生提供了新的视角,也将可能为 HBV 相关性肝癌的分子靶向的治疗提供新的依据。

参考文献:

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al*. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69 – 90.

[2] 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.

[3] Tan A, Yeh S H, Liu C J, *et al*. Viral hepatocarcinogenesis: from infection to cancer[J]. Liver Int, 2008, 28(2): 175 – 188.

[4] Cao J X, Lu Y, Qi J J, *et al*. MiR-630 inhibits proliferation by targeting CDC7 kinase, but maintains the apoptotic balance by targeting multiple modulators in human lung cancer A549 cells[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1426.

[5] Jiang J, Zhang Y, Yu C, *et al*. MicroRNA-492 expression promotes the progression of hepatic cancer by targeting PTEN [J]. Cancer Cell Int, 2014, 14(1): 95.

[6] Cheung H H, Davis A J, Lee T L, *et al*. Methylation of an intronic region regulates miR-199a in testicular tumor malignancy[J]. Oncogene, 2011, 30(31): 3404 – 3415.

[7] Han Y, Kuang Y, Xue X, *et al*. NLK, a novel target of miR-199a-3p, functions as a tumor suppressor in colorectal cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2014, 68(5): 497 – 505.

[8] Zhang J, Wu G Q, Zhang Y, *et al*. Propofol induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by upregulation of microRNA-199a expression[J]. Cell Biol Int, 2013, 37(3): 227 – 232.

[9] Zhang Z, Hou X, Shao C, *et al*. Plk1 inhibition enhances the efficacy of androgen signaling blockade in castration-resistant prostate cancer[J]. Cancer Res, 2014, 74(22): 6635 – 6647.

[10] Zhang W, Liu S, Liu K, *et al*. Knockout of ADAM10 enhances sorafenib antitumor activity of hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*[J]. Oncol Rep, 2014, 32(5): 1913 – 1922.

[11] Liu C, Li J, Xiang X, *et al*. PDGF receptor-α promotes TGF-β signaling in hepatic stellate cells *via* transcriptional and post transcriptional regulation of TGF-β receptors[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014, 307(7): G749 – G759.

[12] Ding G, Huang G, Liu H D, *et al*. MiR-199a suppresses the hypoxia-induced proliferation of non-small cell lung cancer cells through targeting HIF1α[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 384(1/2): 173 – 180.

[13] Wei X, Tan C, Tang C, *et al*. Epigenetic repression of miR-132 expression by the hepatitis B virus x protein in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Cell Signal, 2013, 25(5): 1037 – 1043.

[14] Kim C M, Koike K, Saito I, *et al*. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice[J]. Nature, 1991, 351(6324): 317 – 320.

[15] Kim S, Lee U J, Kim M N, *et al*. MicroRNA miR-199a * regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2)[J]. J Biol Chem, 2008, 283(26): 18158 – 18166.

[16] Jia X Q, Cheng H Q, Qian X, *et al*. Lentivirus-mediated overexpression of microRNA-199a inhibits cell proliferation of human hepatocellular carcinoma[J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 62(1): 237 – 244.

[17] Zhang S, Hao J, Xie F, *et al*. Downregulation of miR-132 by promoter methylation contributes to pancreatic cancer development[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(8): 1183 – 1189.

(收稿:2014-09-30;修回:2014-11-21)

(编辑 汪勤俭)