DOI:10.16016/j.1000-5404.201910202

HBx 通过 HIPPO 信号通路导致小鼠肝癌的发生机制

张思遥,黄 欣,王 薛,杜 彬,毋 楠,周梦瑶,冯 涛 400016 重庆,重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心,基础医学院生物化学与分子生物研究中心

[**摘要**] **目的** 观察 HIPPO 信号通路在小鼠感染乙型肝炎病毒 X(hepatitis B virus X,HBx)不同时间的变化,初步探讨 HBx 导致肝癌发生的机制。**方法** 将转染 HBx 的肝前体细胞通过门静脉注射入小鼠体内,构建能稳定表达 HBx 的动物模型,分别于 30、90、180、360 d 取肝脏组织,HE 染色观察肝脏组织病理特征,RT-PCR、Western blot 以及免疫组化法检测肝脏组织中 HBx 的表达,RT-PCR 检测 HIPPO 信号通路相关因子 MST1、YAP1 mRNA 的表达,Western blot 检测 MST1、YAP1、p-MST1、p-YAP1 蛋白的表达。**结果** 成功构建能在小鼠肝脏中稳定表达 HBx 的动物模型并发展为肝癌,Western blot 结果显示,与对照组相比,HBx 组小鼠肝脏组织在术后 30 d 即出现 MST1 表达下调,p-MST1 表达上调($P<0.01$);YAP1 表达上调,p-YAP1 表达下调($P<0.05$),RT-PCR 与 Western blot 结果一致。这种改变一直持续至肿瘤发生。**结论** HBx 可以导致小鼠肝癌发生,其机制可能与长期影响 HIPPO 信号通路的表达有关。

[**关键词**] HBx;动物模型;肝癌;HIPPO 信号通路

[**中图法分类号**] R372.1; R730.23; R735.7 [**文献标志码**] A

Hepatitis B virus X promotes tumorigenesis of hepatocellular carcinoma through HIPPO signaling pathway in mice

ZHANG Siyao, HUANG Xin, WANG Xue, DU Bin, WU Nan, ZHOU Mengyao, FENG Tao Molecular Medicine and Cancer Research Center, Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the changes in HIPPO signaling pathway in mouse liver tissues expressing hepatitis B virus X protein (HBx) and explore the mechanism of HBx for causing hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Immortalized murine liver progenitor cells transfected with HBx gene were injected in mice *via* the hepatic portal vein. At 30, 90, 180, and 360 d after the cell injection, the liver tissues of the mice were sampled to examine HBx expression using real-time PCR, Western blotting and immunohistochemistry; the expression levels of the key factors in the HIPPO signaling pathway (MST1, YAP1, p-MST1, and p-YAP1) were detected using real-time PCR and Western blotting. **Results** We successfully established a mouse model with HBx expression in the liver tissues. The results of both real-time PCR and Western blotting showed that the expression levels of MST1 and p-YAP1 were down-regulated and YAP1 and p-MST1 were up-regulated in the liver tissues of the mouse model, and such changes persisted till the occurrence of HCC. **Conclusion** HBx causes HCC in mice possibly by persistently affecting HIPPO signaling pathway.

[**Key words**] hepatitis B virus X protein; animal models; hepatocellular carcinoma; HIPPO signaling pathway

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071770). Corresponding author: FENG Tao, E-mail: 100733@cqmu.edu.cn

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81071770)

[**通信作者**] 冯 涛,E-mail: 100733@cqmu.edu.cn

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是我国肝癌发生的主要危险因素之一,在原发性肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)的发生、发展中起重要作用。HCC 居全球癌症死亡率第 2 位,在中国也是排名前三的恶性肿瘤之一[1]。流行病学调查显示,HBV 携带者患 HCC 的危险性比非携带者高出 100 倍以上,但其致癌机制尚未完全阐明。已有证据表明,乙型肝炎病毒 X(hepatitis B virus X,HBx)基因及其编码的蛋白质是导致 HCC 发生、发展的重要因素[2]。所以,对 HBx 基因功能以及致癌机制的研究对 HCC 的治疗有着重要意义。

HIPPO 信号通路的核心因子 YAP 可通过激活或抑制下游靶基因的转录因子,参与细胞增殖、组织增长,由此控制器官大小和形状[3],在肝癌的发生、发展中起到重要作用。但 HBx 能否通过影响 HIPPO 信号通路从而诱导肝癌的发生尚不明确。本研究将课题组前期构建的动物模型常规饲养 360 d 后,有部分小鼠发生肝癌;在此基础上检测与增殖、凋亡相关的 HIPPO 信号通路相关因子在致癌过程不同阶段的表达,研究 HBx 诱导肝癌发生、发展中 HIPPO 信号通路的变化情况,探究 HBx 诱导肝癌发生的机制,为 HBx 致肝癌的早期预防、诊断和治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与动物 永生化小鼠肝前体细胞株 14-19 由美国芝加哥大学分子肿瘤研究中心馈赠,EGFP-14-19 和 HBx-EGFP-14-19 稳定转染慢病毒细胞株由本课题组前期构建并保存。无特殊病原体(specific pathogen free, SPF)级昆明小鼠由重庆医科大学实验动物中心提供并代为饲养。

1.1.2 主要试剂 FBS 胎牛血清购自 CELL BOX 公司,细胞培养基 DMEM(高糖)购自 HyClone 公司,TRIzol 总 RNA 提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司,逆转录试剂盒和 TB Green Premix *Ex Taq*™ 实时荧光定量试剂盒购自 TaKaRa 公司,HBx 抗体购自 Abcam 公司,GAPDH 抗体和 YAP1 抗体购自万类生物科技有限公司,p-YAP1 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司,MST1 抗体及 p-MST1 抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司,SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒购自碧云天生物技术公司,ECL 显影液购自 Advansta 公司,DAB 显色液及免疫组化 S-P 试剂盒购自北京中山金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏及培养 复苏小鼠肝前体细胞株 14-19、EGFP-14-19 和 HBx-EGFP-14-19,于含有 12%胎牛血清和 1%双抗的 DMEM(高糖)培养基中培养,培养箱温度 37 ℃,CO_2 浓度 5%,待细胞长至 80%以上,进行常规冻存、传代及后续试验。

1.2.2 动物模型的构建及分组 45 只 6~8 周龄、体质量(20±2)g 的雄性昆明小鼠随机分为生理盐水(normal saline group, NS)组、EGFP-14-19 组和 HBx-EGFP-14-19 组。建模参考文献[4]方法:小鼠术前禁食 1 d,麻醉后于腹部酒精消毒,剑突下行 2 cm 左右纵向切口使肝脏暴露,找到肝脏后方的肝门静脉,轻柔挑起,于门静脉远端用血管夹夹毕,近端缓慢注射生理盐水 200 μL、EGFP-14-19 或 HBx-EGFP-14-19 细胞悬液(200 μL 含 5×10^5 细胞的 PBS 溶液),注射完毕后以干棉球按压止血,待血止住后缝合腹腔。手术后分别于 30、90、180、360 d 处死小鼠,收取肝脏组织,一部分浸泡于 4%多聚甲醛,其余组织储存于液氮罐中用于后续实验。

1.2.3 免疫组化法 取小鼠新鲜肝脏浸泡于 4%多聚甲醛 48 h 后,常规石蜡包埋切片。后续按 S-P 法说明书进行操作,200 倍光学显微镜观察并拍照。

1.2.4 HE 染色 组织切片脱蜡后常规流程染色,中性树脂封片,于光学显微镜观察并拍照。

1.2.5 RT-PCR 检测 总 RNA 提取试剂盒分别提取各组小鼠 RNA,将 RNA 按照逆转录试剂盒的操作说明转录为 cDNA,无酶水将 cDNA 稀释 10 倍(测 HBx 不稀释),采用 10 μL 体系的 SYBRGreen 法进行检测(样本 cDNA 2 μL,上下引物稀释 100 倍后各 0.5 μL,SYBR 5 μL,加无酶水补齐至 10 μL),每组各 3 个复孔,实验重复 3 次,引物见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行目标基因相对表达量计算分析。

表 1 RT-PCR 引物序列与产物长度

基因	引物序列	产物长度/bp
GAPDH	上游:5′-CTCGTCCCGTAGACAAAATGGT-3′ 下游:5′-GAGGTCAATGAAGGGGTCGTT-3′	131
HBx	上游:5′-TGCGGACGACCCTTCTCGGG -3′ 下游:5′-GGGCAACATTCGGTGGGCGT-3′	195
MST1	上游:5′-CTTCCACTACAACATGAGCAGC-3′ 下游:5′-TGCAGGTCCGCACATAATCTT-3′	128
YAP1	上游:5′-ACCCTCGTTTTGCCATGAAC-3′ 下游:5′-TGTGCTGGGATTGATATTCCGTA-3′	221

1.2.6 Western blot 检测 取适量小鼠肝脏组织于液氮研磨,加入适量预配好的裂解液(RIPA:PMSF:蛋白磷酸酶抑制剂=100:1:2),超声 10 s 后冰上裂解 40 min,每隔 10 min 需振荡 1 次,使蛋白裂解更充分,裂解完毕后于 4 ℃,12 000 r/min 离心 10 min,小心吸取上清液,储存于做好标记的 EP 管中,用 BCA 法测上清液中蛋白浓度,剩余上清液加入蛋白上样缓冲液,100 ℃变性 5 min,放至室温后于-20 ℃保存。10%SDS-PAGE 胶电泳至溴酚蓝染料前沿到胶底部,250 mA 恒流电转蛋白至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,4℃摇床一抗敷育过夜,TBST 洗除膜上多余的一抗后二抗敷育 2 h,ECL 显色法显色。Image Lab 软件测量各目的条带的灰度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 14-19、EGFP-14-19 与 HBx-EGFP-14-19 细胞株 HBx 的鉴定

Western blot 与 RT-PCR 检测结果显示,14-19 及 EGFP-14-19 细胞组均无 HBx 表达,而 HBx-EGFP-14-19 细胞组中有 HBx 特异性表达($P<0.01$,图 1),表明 HBx 基因在 HBx-EGFP-14-19 细胞中转染成功。

2.2 小鼠肝脏组织 HBx 的表达鉴定

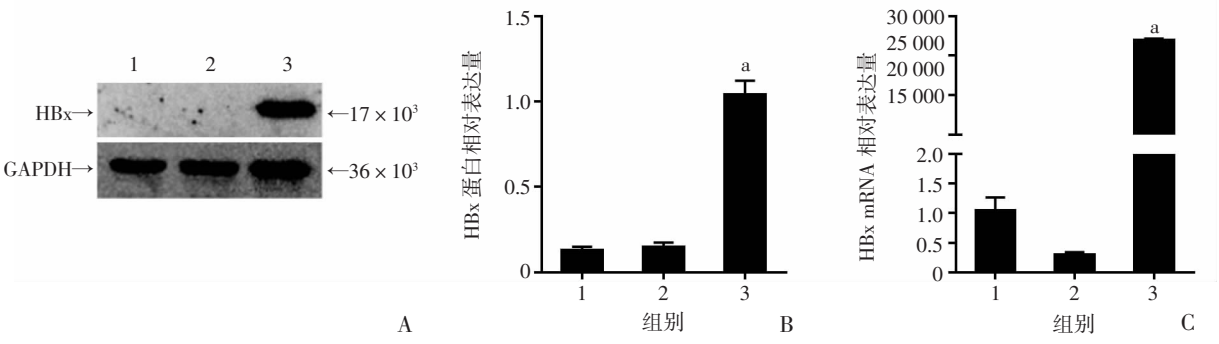
Western blot 与 RT-PCR 检测结果显示,与 NS 组和 EGFP-14-19 组比较,HBx-EGFP-14-19 组的小鼠在 30、90、180、360 d 时均能稳定表达 HBx($P<0.01$,图 2A~C)。免疫组化法结果显示 HBx-EGFP-14-19 组在 30、90、180、360 d 的肝脏组织中均有 HBx 阳性表达,而 NS 组和 EGFP-14-19 组没有 HBx 阳性表达(图 2D),表明 HBx 能在小鼠肝脏中长期稳定的表达。

2.3 小鼠肝脏组织肿瘤的鉴定

HBx 组小鼠在处理 360 d 时发现有部分小鼠发生肝癌,肉眼可见结节性病灶突出于肝脏表面,直径约 1 cm(图 3A)。HE 染色可见癌细胞分化程度高,大小不一,异型性明显,肝小叶结构基本消失(图 3B、C)。

2.4 小鼠肝脏组织感染 HBx 不同时期 HIPPO 信号通路相关因子表达变化

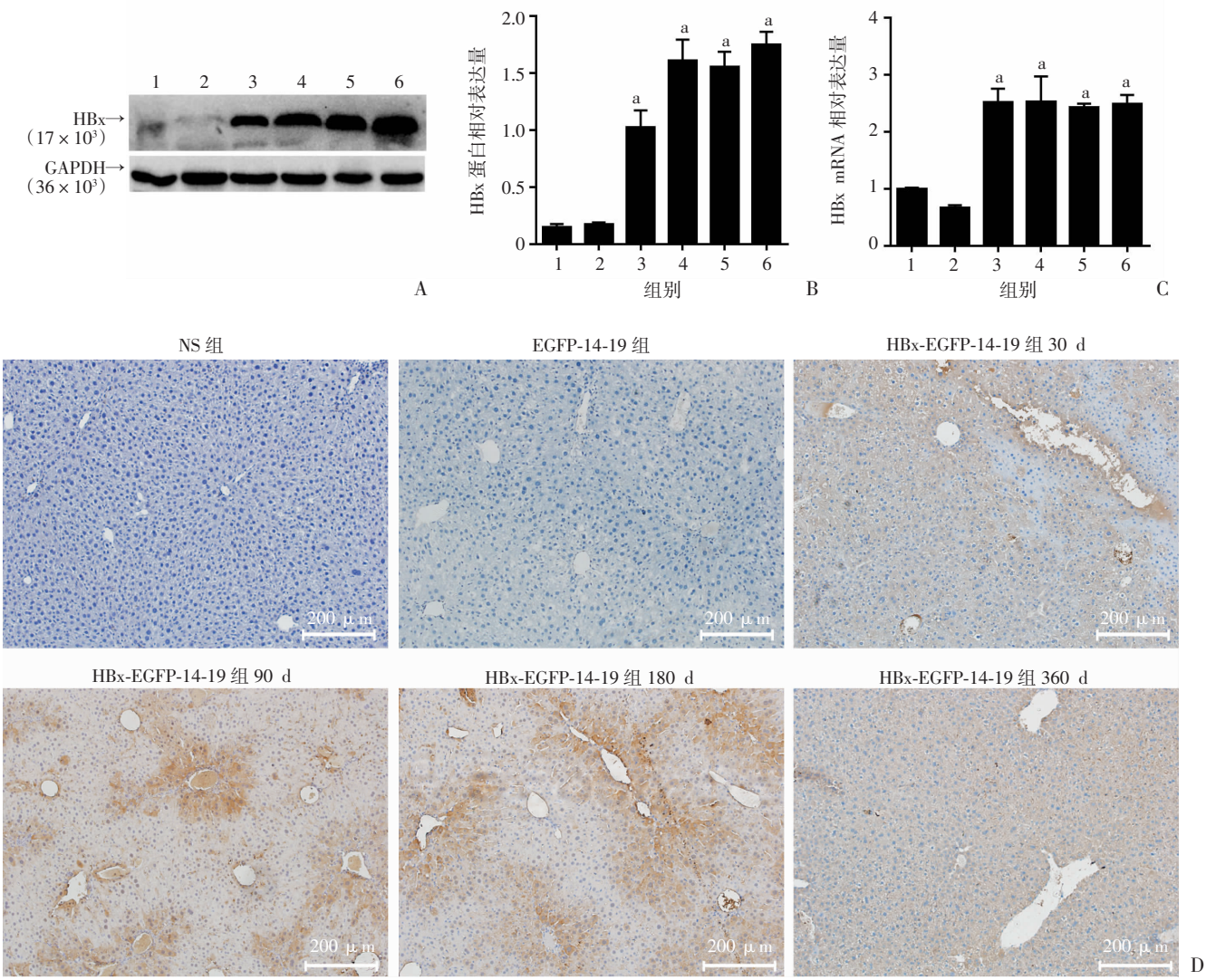
Western blot 与 RT-PCR 检测小鼠肝脏组织不同时期 HIPPO 信号通路相关因子 MST1、YAP1 的表达水平,结果显示,在小鼠感染了 HBx 后的不同时间点,MST1 的表达量持续下调($P<0.01$,图 4A、C、D),YAP1 的表达持续上调($P<0.01$,图 4B、F、G)。Western blot 检测磷酸化蛋白 p-MST1、p-YAP1 的表达水平,结果显示,p-MST1 表达量持续上调($P<0.05$,图 4C、E),p-YAP1 表达量持续下调($P<0.05$,图 4F、H),差异有统计学意义。表明 HBx 进入小鼠体内后长期抑制 HIPPO 信号通路上游 MST1 的表达,但是促进其下游效应分子 YAP1 的表达。



1:14-19 细胞组;2:EGFP-14-19 细胞组;3:HBx-EGFP-14-19 细胞组;a:$P<0.01$,与 14-19 细胞组、EGFP-14-19 细胞组比较

A、B:Western blot 检测细胞 HBx 蛋白表达及半定量分析;C:RT-PCR 检测 3 种细胞 HBx mRNA 的表达

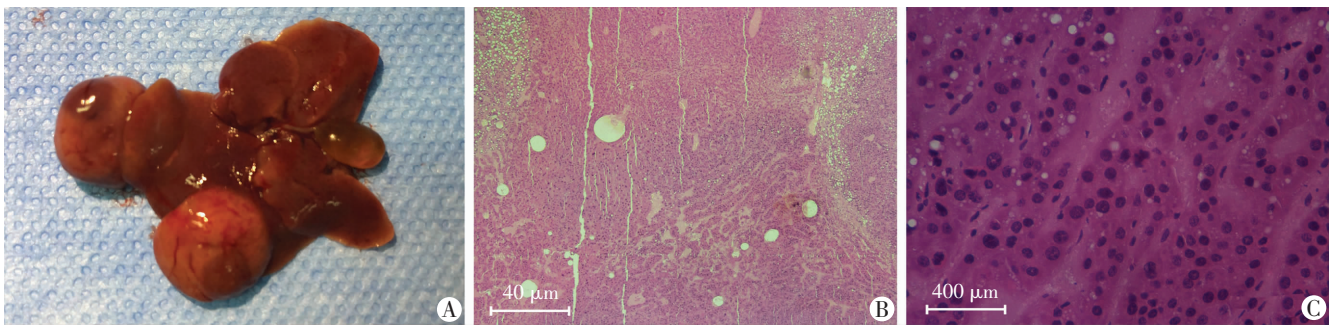
图 1 细胞株 HBx 的鉴定



1:NS 组;2:EGFP-14-19 组;3~6:分别为 30、90、180、360 d 的 HBx-EGFP-14-19 组;a:$P<0.01$,与 14-19 组、EGFP-14-19 组比较

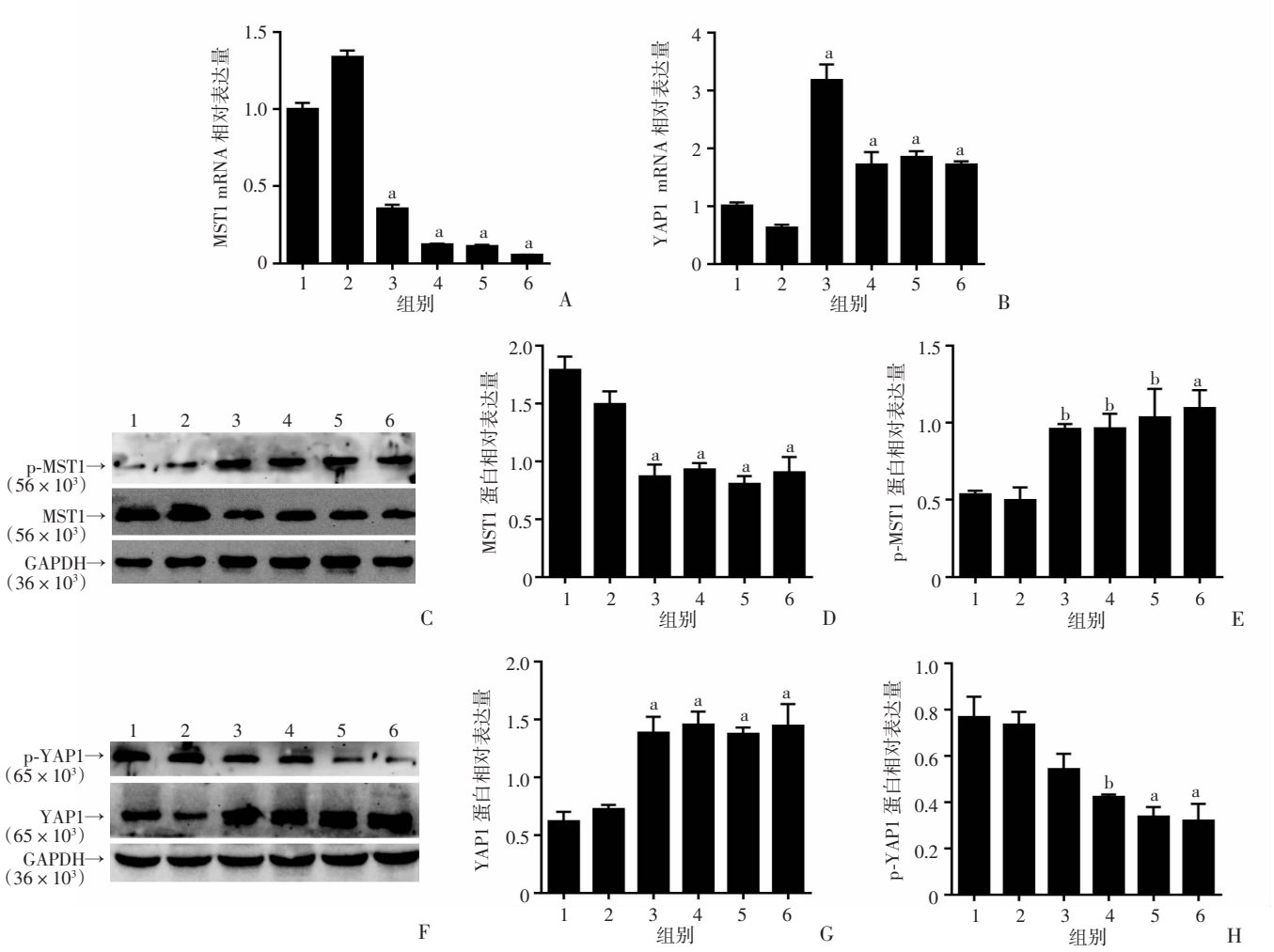
A:Western blot 检测各组小鼠肝脏组织 HBx 蛋白表达;B:小鼠肝脏 HBx 蛋白相对表达量;C:RT-PCR 检测各组小鼠肝脏组织 HBx mRNA 的表达;D:免疫组化法检测小鼠肝脏组织 HBx 蛋白的表达(S-P)

图 2 小鼠肝脏组织 HBx 的表达鉴定



A:360 d 小鼠肝脏肿瘤大体观;B:低倍显微镜观察小鼠肝脏肿瘤组织(HE);C:高倍显微镜观察小鼠肝脏肿瘤组织(HE)

图 3 小鼠肝脏肿瘤组织的鉴定



1:NS 组;2:EGFP-14-19 组;3~6:分别为 30、90、180、360 d 的 HBx-EGFP-14-19 组;a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 NS 组、EGFP-14-19 组比较

A、B:分别为小鼠肝脏组织中 MST1、YAP1 mRNA 的表达;C~E:Western blot 检测 MST1 和 p-MST1 蛋白的表达及半定量分析;F~H:Western blot 检测 YAP1 和 p-YAP1 蛋白表达及半定量分析

图 4 小鼠感染 HBx 后 MST1、YAP1 mRNA 的表达变化

3 讨论

HBx 是 HBV 中高度保守的一个多功能蛋白质,可以通过与多种导致 HCC 发生、发展的因子直接或间接作用,调节多种细胞过程,在病毒性肝癌的发病机制中起着至关重要的作用[2]。虽然 HBx 通常被认为具有致癌潜力,但其是直接致癌还是仅仅作为 HCC 发展的辅助因子还有待研究[5-7]。并且近年来,肿瘤相关机制的研究多是在癌细胞或癌症组织中进行,所得结果究竟是导致肿瘤发生的原因还是肿瘤发生后为了维持恶性增殖状态而产生的结果却无法确定。

HIPPO 信号通路最初在果蝇中发现,与细胞的增殖、凋亡和器官大小的调控相关,其核心因子 MST1/2、LATS1/2、Sav 和 MOB1 均为抑癌基因,主要效应因子 YAP 为癌基因。研究表明,YAP 在肝癌患者中呈现高表达[8]。细胞与动物实验也证实用 siRNA 降低 YAP 表达后,肝癌细胞迅速停止增殖,并获得了肝细胞分化特征;而敲除 WW45 后,YAP 表达量增多,肝脏体积增大,逐渐发展成为肝混合肿瘤[9-10],表明 YAP 表达量的增加,能导致肿瘤的发生。MST1 作为 YAP1 上游的调节因子,主要通过磷酸化 YAP1 使其不能进入细胞核从而失去活性,但本研究发现,p-MST1 呈现上调的趋势。其原因可能是 MST1 的磷酸化受到多种因子的调节,如表皮生长因子、肿瘤坏死因子、过氧化物等。在这些因子的刺激下,MST1 可通过多个磷酸化位点发生磷酸化作用,而这些因子大多在肿瘤中高表达[11-13],因而 p-MST1 呈现上调的趋势。研究表明,MST1 过表达可以促进肝癌细胞 HepG2 的凋亡,从而

抑制肝癌细胞的生长;而敲除 MST1 基因会导致小鼠肝癌的发生,表明 MST1 表达下调也可能与肿瘤的发生密切相关[14-15]。而在 ZHOU 等[16]的研究中,MST1 缺失后直到肝癌发生,p-YAP1 表达急剧下降而 YAP1 蛋白表达升高。这些结果显示 MST1 表达量的降低,也会导致 YAP1 表达量的增加。可见,HIPPO 信号通路被影响,在肝癌的发生中起了重要作用。ZHANG 等[17]在转染了 HBx 的肝癌细胞系以及 HBx 转基因小鼠的肝癌组织中发现 YAP 的表达量显著上升,陈琰琰等[18]将 HBx 及其突变体转入人正常肝细胞系 L02 中,发现 MST1 表达下调,p-MST1/2 表达上升,YAP 表达上升,p-YAP 表达下调。这些结果也证实了 HBx 可能对 HIPPO 信号通路产生影响,为 HBV 致肝癌的机制研究提供了新的依据。

本课题组的前期研究发现,小鼠成功感染 HBx 后肝细胞凋亡率降低,抗凋亡蛋白 Bcl-2、Mcl-1 表达量增高,促凋亡蛋白 Bax 的表达量降低[19-20]。说明 HBx 能抑制小鼠肝脏组织的凋亡,而抑制细胞凋亡又是肿瘤发生的重要原因之一[21]。HIPPO 信号通路中 YAP1 可在核内与多个转录因子如 TEAD 家族等结合,调控细胞的增殖与凋亡;MST1 的活化不仅可以促进 YAP1 的磷酸化,还能促进 Caspase-3 的活化[8]。本研究发现,HBX 在进入小鼠体内 30 d 时即抑制了抑癌基因 MST1 的表达,促进了癌基因 YAP1 的表达,并且使其长期处于异常状态,表明 HBx 可能通过持续影响 HIPPO 信号通路,使肝脏细胞处于长期凋亡抑制状态,进而导致 HCC 的发生。结果提示 HBx 导致的 HIPPO 信号通路的改变很可能是 HCC 发生的原因,可能为 HCC 的早期诊断提供新的依据。

本研究通过给免疫状态完好的小鼠注射转染 HBx 的肝前体细胞,构建了能长期稳定表达 HBx 的小鼠模型,并在无其他干扰因素的情况下生成肿瘤,是比较接近自然状态的动物感染模型;通过对该模型的研究,可了解 HBx 在进入小鼠体内至肝癌发生过程中不同时间的作用,而在肿瘤发生前期持续存在的一些改变则很可能是导致肿瘤发生的真正原因。这为阐明 HBx 诱导肝癌发生、发展的机制奠定了基础,也为研究肝癌的预防、早期诊断及治疗提供了条件。

参考文献:

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.

[2] ALI A, ABDEL-HAFIZ H, SUHAIL M, *et al*. Hepatitis B virus, HBx mutants and their role in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(30): 10238-10248. DOI: 10.3748/wjg.v20.i30.10238.

[3] ZYGULSKA A L, KRZEMIENIECKI K, PIERZCHALSKI P. Hippo pathway-brief overview of its relevance in cancer[J]. J Physiol Pharmacol, 2017, 68(3): 311-335.

[4] 刘梦楠, 张婷, 刘洁, 等. 感染 HBVx 的肝前体细胞的小鼠体内稳定表达模型构建[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(4): 1318-1324. DOI: 10.13417/j.gab.036.001318.
LIU M N, ZHANG T, LIU J, *et al*. Construction of stable expression model for hepatic progenitor cells infected with HBVx in mice[J]. Genom Appl Biol, 2017, 36(4): 1318-1324. DOI: 10.13417/j.gab.036.001318.

[5] KENG V W, TSCHIDA B R, BELL J B, *et al*. Modeling hepatitis B virus X-induced hepatocellular carcinoma in mice with the Sleeping Beauty transposon system[J]. Hepatology, 2011, 53(3): 781-790. DOI: 10.1002/hep.24091.

[6] MADDEN C R, FINEGOLD M J, SLAGLE B L. Hepatitis B virus X protein acts as a tumor promoter in development of diethylnitrosamine-induced preneoplastic lesions[J]. J Virol, 2001, 75(8): 3851-3858. DOI: 10.1128/JVI.75.8.3851-3858.2001.

[7] 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. DOI: 10.1038/351317a0.

[8] 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. DOI: 10.1002/cncr.24495.

[9] LEE K P, LEE J H, KIM T S, *et al*. The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(18): 8248-8253. DOI: 10.1073/pnas.0912203107.

[10] FITAMANT J, KOTTAKIS F, BENHAMOUCHE S, *et al*. YAP inhibition restores hepatocyte differentiation in advanced HCC, leading to tumor regression[J]. Cell Rep, 2015, 10(10): 1692-1707. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.02.027.

[11] CREASY C L, CHERNOFF J. Cloning and characterization of a member of the MST subfamily of Ste20-like kinases[J]. Gene, 1995, 167(1/2): 303-306. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00653-2.

[12] 李彩东, 陈锡莲, 杨勇卫, 等. 乙肝相关肝癌患者抗-

HBx 及 TNF-α、IL-4 和 IL-12 表达水平及临床意义研究[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(12): 1655-1657. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.12.026.
LI C D, CHEN X L, YANG Y W, *et al*. Study on the expression and clinical significance of anti-HBx, TNF-α, IL-4 and IL-12 in patients with hepatitis B related liver cancer[J]. Int J Lab Med, 2017, 38(12): 1655-1657. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.12.026.

[13] 韩少静, 郭永泽, 李帆, 等. EGFR 与慢性肝病、原发性肝癌的相关性[J]. 肝脏, 2018, 23(12): 1143-1144, 1152. DOI: 10.14000/j.cnki.issn.1008-1704.2018.12.032.
HAN S J, GUO Y Z, LI F, *et al*. Correlation of EGFR with chronic liver disease and primary liver cancer[J]. Chin Hepatol, 2018, 23(12): 1143-1144, 1152. DOI: 10.14000/j.cnki.issn.1008-1704.2018.12.032.

[14] XU C M, LIU C J, HUANG W, *et al*. Effect of Mst1 overexpression on the growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and the sensitivity to cisplatin *in vitro*[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2013, 45(4): 268-279. DOI: 10.1093/abbs/gmt006.

[15] SONG H, MAK K K, TOPOL L, *et al*. Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(4): 1431-1436. DOI: 10.1073/pnas.0911409107.

[16] ZHOU D W, 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. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.09.026.

[17] ZHANG T, ZHANG J P, YOU X N, *et al*. Hepatitis B virus X protein modulates oncogene Yes-associated protein by CREB to promote growth of hepatoma cells[J]. Hepatology, 2012, 56(6): 2051-2059. DOI: 10.1002/hep.25899.

[18] 陈琰琰, 朱慧芬, 杨道锋, 等. HBx 及其突变体 X17-3 对 Hippo 信号途径表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(16): 1704-1707. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2013.16.031.
CHEN Y Y, ZHU H F, YANG D F, *et al*. HBx and its mutant X17-3 regulates YAP through Hippo signaling pathway in human hepatic L02 cells[J]. J Third Mil Med Univ, 2013, 35(16): 1704-1707. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2013.16.031.

[19] 霍本念, 刘洁, 王薛, 等. HBx 基因抑制肝前体细胞凋亡与分化的小鼠体内研究[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(5): 406-414. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201710082.
HUO B N, LIU J, WANG X, *et al*. HBx gene inhibits apoptosis and differentiation of hepatic progenitor cells in mice[J]. J Third Mil Med Univ, 2018, 40(5): 406-414. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201710082.

[20] 王薛,霍本念,刘洁,等. HBx 基因激活 Akt/mTOR 信号通路抑制肝脏细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(10): 931-938. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201811185.
WANG X, HUO B N, LIU J, *et al*. Hepatitis B virus X gene inhibits hepatocyte apoptosis in mice *via* Akt/mTOR pathway[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(10): 931-938. DOI:10.16016/j.1000-5404.201811185.

[21] 齐伟, 徐扬, 邱实. 细胞凋亡与肿瘤微环境作用的研究进展[J]. 医学综述, 2017, 23(22): 4433-4437, 4442. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2017.22.012.
QI W, XU Y, QIU S. Research progress in apoptosis and tumormicroenvironment[J]. Med Recapitul, 2017, 23(22): 4433-4437, 4442. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2017.22.012.

(**收稿**:2019-10-30;**修回**:2019-11-30)
(编辑 汪勤俭)