DOI:10.16016/j.1000-5404.201910164

HBx 基因通过 ERK1/2 信号通路促肝细胞增殖及炎性因子表达

黄 欣,张思遥,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** 利用稳定表达 HBx 基因的小鼠动物模型探讨 HBx 基因在体内对肝脏细胞周期和肝脏炎症活动的影响。**方法** 利用携带 HBx 基因的慢病毒感染肝前体细胞 14-19,小鼠肝门静脉注射经改造的肝前体细胞以构建表达 HBx 基因的小鼠模型。利用 qRT-PCR、Western blot 和免疫组化方法检测肝内 HBx 基因的 mRNA 和蛋白表达情况。建模后 180 d 检测小鼠肝组织的细胞周期调控因子 CDK4 和 CyclinD1,肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白介素-10(IL-10)的 mRNA 和蛋白表达水平以及 ERK1/2 信号转导通路成员 ERK1/2 和 MEK1/2 的蛋白表达水平。HE 染色观察 HBx 基因是否引起肝组织病理变化。**结果** 稳定表达 HBx 基因的小鼠模型构建成功。与生理盐水组和 EGFP-14-19 组相比,小鼠肝脏组织在转入 HBx 180d 后 HBx 显著上调 CDK4,CyclinD1,TNF-α 的 mRNA 表达水平($P<0.01$),同时显著上调 CDK4,CyclinD1,TNF-α 蛋白水平;HBx 显著下调 IL-10 的 mRNA 和蛋白表达水平($P<0.05$)。HBx 显著激活 ERK1/2 信号转导通路。给予 ERK1/2 信号通路抑制剂 U0126 后,与对照组相比,实验组 CDK4 和 CyclinD1,TNF-α 的 mRNA 表达水平显著下调($P<0.05$);同时,CDK4 和 CyclinD1,TNF-α 蛋白水平显著下调,IL-10 的 mRNA 和蛋白表达水平显著上调($P<0.01$)。HE 染色结果显示小鼠肝脏组织在转入 HBx 180d 后肝脏组织明显病变。**结论** HBx 通过激活 ERK1/2 信号通路促进肝细胞增殖,与肝脏炎症有关。

[**关键词**] HBx;ERK1/2 信号通路;细胞周期;炎症;动物模型
[**中图法分类号**] R373.21; R730.23; R735.7 [**文献标志码**] A

HBx gene accelerates cell proliferation and enhances inflammatory factors expression through ERK1/2 signaling pathway

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

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of HBx gene on hepatocyte cycle and immune system *in vivo* based on self-developed mouse model with stable expression of HBx gene. **Methods** Lentivirus carrying HBx gene were used to infect liver precursor cells 14-19. Then the modified liver precursor cells were injected into the portal vein of mice to construct the model. The model was identified with qRT-PCR, Western blot assay and immunohistochemistry. In 180 d after the model establishment, the mRNA and protein levels of cell cycle regulators CDK4 and Cyclin D1, TNF-α and IL-10 in the liver tissue were detected. While the protein levels of the proteins in the ERK1/2 and MEK1/2 signalling pathways were also measured. HE staining was used to observe the pathological changes in the liver tissue. **Results** The mouse model with stable expression of HBx gene was successfully constructed. Compared with the mice of normal saline group and the EGFP-14-19 group, in the mice in 180 d after the model establishment, HBx significantly

[**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

up-regulated the mRNA ($P<0.01$) and protein levels of CDK4, Cyclin D1 and TNF-α, but down-regulated the expression of IL-10 at both levels ($P<0.05$). HBx significantly activated ERK1/2 signalling pathway. After the administration of ERK1/2 signal pathway inhibitor U0126, the mRNA and protein expression of CDK4, Cyclin D1, and TNF-α was significantly down-regulated in the experimental group than the control group ($P<0.05$), but the mRNA and protein levels of IL-10 were in an opposite trend ($P<0.01$). HE staining showed that the liver tissue had obvious pathological changes in the mouse model. **Conclusion** HBx accelerates cell proliferation and induces liver inflammation by activating ERK1/2 signaling pathway.

[**Key words**] HBx; ERK1/2 signaling pathway; cell cycle; inflammation; animal model

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

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)占全世界癌症发生率的13%[1]。其中,慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染仍然是HCC发生、发展的主要因素[2]。乙型肝炎病毒X(hepatitis B virus X,HBx)位于HBV基因组中52~148氨基酸位点,产物是一种小的可溶性蛋白,参与了HBV相关肝癌的发生、发展。HBx调控细胞周期进展、细胞凋亡、蛋白质降解有关的细胞信号传导途径,并对基因稳定性产生影响[3]。HBV能够引起肝脏炎症,肝脏炎症环境是肝硬化和HCC的主要病因[4]。但是其中的机制尚未阐明清楚。肝祖细胞(hepatic progenitor cells,HPCs)是一种具有向肝细胞或胆管细胞分化的双潜能的肝干细胞[5]。有研究表明,在HBx和黄曲霉毒素B1协同作用下HPCs可以产生HCC细胞[6]。普遍认为癌症是一种干细胞疾病,因为只有这些细胞能在组织中存活足够长的时间,以获得肿瘤发展所需的基因变化数量[7]。这为我们将HBx构建在哪种细胞中提供了研究思路。本研究利用慢病毒作为载体构建表达HBx的肝前体细胞,并通过肝门静脉注射方式构建动物模型。同时在此模型上观察HBx在小鼠体内180 d后对细胞周期的影响,对炎性因子的改变以及是否引起小鼠肝脏的炎症反应,并探究其潜在的机制,为肝癌早期诊断、早期治疗提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系和小鼠 肝前体细胞14-19由美国芝加哥大学分子肿瘤研究中心馈赠,KM小鼠来自重庆医科大学实验动物中心,代养在动物中心无特殊病原体(specific pathogen free, SPF)级培养室。

1.1.2 主要试剂 DMEM高糖培养基购于HyClone公司;FBS胎牛血清购于CELL BOX公司;DAB显色液,免疫组化S-P试剂盒购自北京中杉金桥公司;BCA蛋白检测试剂盒购于碧云天公司;HBx抗体购于美国Abcam公司;内参抗体GAPDH购于北京博奥森公司;ERK1/2、Phosphy-ERK1/2(p-ERK1/2)、MEK1/2、Phosphy-MEK1/2(p-MEK1/2)购于Cell Signaling Technology公司;脱脂奶粉购于BD公司;CDK4,CyclinD1,TNF-α,IL-10抗体购于万类生物科技有限公司;抑制剂U0126购于MedChemExpress公司;二抗购于BioWorld公司;总RNA提取试剂盒购于北京康为试剂生物科技有限公司;Taq-PCR反应试剂盒和实时荧光定量试剂盒SYBR×Premix Ex *Taq*™购于TaKaRa公司;ECL显影液购于Advansta公司。

1.2 实验方法

1.2.1 14-19细胞培养与EGFP-14-19、HBx-EGFP-14-19细胞株的构建 将冻存的14-19细胞复苏,培养在含有10%~15%胎牛血清的DMEM高糖培养基并置于5%CO_2、37 ℃培养箱中。用限制性内切酶*Eco*RⅠ和*Bam*HⅠ对含有HBx的质粒和载体进行酶切,利用PCR扩增HBx基因,琼脂糖凝胶电泳验证,利用T_4连接酶将载体pLenti-CMV-HA-3FLAG-PGK-EGFP-F2A-Puro和基因片段以1∶3进行连接,构建质粒pLenti-CMV-HBVgp3-3FLAG-PGK-EGFP-F2A-Puro,再将状态良好的14-19细胞按5万/孔接种于24孔板,待细胞贴壁后分别加入病毒载体和构建的质粒。检测EGFP的表达量,待荧光表达率接近90%后,加入嘌呤霉素(1 μg/mL)筛选稳定表达的细胞株,连续筛选4周后进行目的基因检测。

1.2.2 模型构建方法和分组情况 将培养的EGFP-14-19细胞和HBx-EGFP-14-19细胞从培养皿上消化,悬浮于200 μL的PBS中待用。将60只KM小鼠分成3组:生理盐水组(15只)、EGFP-14-19组(15只)和HBx-EGFP-14-19组(30只)。小鼠饥饿处理24 h

后麻醉并固定,剑突下行 2 cm 纵向切口暴露小鼠肝门静脉,将 200 μL 的生理盐水,EGFP-14-19 和 HBx-EGFP-14-19 细胞悬浮液(5×10^5细胞悬浮于 200 μL PBS 中)分别注入各组小鼠肝门静脉中,完全止血后缝合伤口待小鼠苏醒后放入饲养箱中术后 3 d 密切观察。术后 180 d 将生理盐水组、EGFP-14-19 组全部小鼠和 HBx-EGFP-14-19 组中随机抽取的 15 只小鼠进行安乐死处理,取肝脏一部分保存于液氮中,一部分浸泡在 10% 福尔马林中。同时将剩下的 15 只 HBx-EGFP-14-19 小鼠随机均分成 3 组:HBx-EGFP-14-19 生理盐水组、HBx-EGFP-14-19-U0126 溶剂组和 HBx-EGFP-14-19-U0126 组。采用腹腔注射 U0126(10.5 mg/kg)溶解于溶剂(2% DMSO,40% 聚乙二醇 300,5%吐温-80,53%生理盐水),每天 1 次,连续处理 11 d,最后 1 次处理结束 24 h 后将小鼠安乐死,收取肝脏组织以便后续研究。

1.2.3 实时聚合酶链式反应(qRT-PCR) 提取各组小鼠的总 RNA 后,按照逆转录试剂盒说明将 1 μL/1 000 ng RNA 逆转录成 20 μL cDNA,稀释 10 倍使用 SYBR Premix *Ex Taq* 酶(TaKaRa)表达检测系统进行检测,在其他条件保持不变的情况下,选取 GAPDH 作为内参,在 CFX Manger 软件系统(Bio-Rad)下调整基线和阈值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对基因表达分析。每个样本设 3 个复孔,实验重复 3 次,引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因及片段长度	引物序列
GAPDH(85 bp)	上游 5′-TGACCTCAACTACATGGTCTACA-3′
	下游 5′-CTTCCCATTCTCGGCCTTG-3′
HBx(171 bp)	上游 5′- CTCTCTTTACGCGGACTCCC -3
	下游 5′- CTCAAGGTCGGTCGTTGACA -3′
CDK4(76 bp)	上游 5′- TCAGCACAGTTCGTGAGGTG-3′
	下游 5′-TCCATCAGCCGTACAACATTG-3′
CyclinD1(94 bp)	上游 5′-GCGTACCCTGACACCAATCTC-3′
	下游 5′- ACTTGAAGTAAGATACGGAGGGC-3′
IL-10(74 bp)	上游 5′- GCTCTTACTGACTGGCATGA -3′
	下游 5′- CTGGGAAGTGGGTGCAGTTAT-3′
TNF-α(193 bp)	上游 5′-ATGGGGGGCTTCCAGAACTCC-3′
	下游 5′-CTTGGTGGTTTGTGAGTGTGAGGGT-3′

1.2.4 Western blot 实验 采用 PMSF、RIPA 裂解缓冲液和蛋白磷酸酶抑制剂(PMSF:RIPA:磷酸酶抑制剂=1:100:2)提取冻存的肝脏总蛋白,用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离总蛋白,然后利用湿转法将蛋白转移到活化的 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶在室温下封闭膜 2 h。然后用 1×TBST 洗膜 3 次每次 15 min,一抗敷育 4 ℃过夜。然后用 1×TBST 洗涤膜,在常温下用二抗敷育 2 h。洗膜,显影。分析条带。

1.2.5 HE 染色 将组织切片放置于 55 ℃的烘箱中烘烤 2 h,放入二甲苯中脱蜡处理 30 min,将切片放入浓度为 100%、95%、80%、75%的酒精中进行梯度水化,苏木精水溶液中染色数分钟,氨水中分色数秒,自来水冲洗 1 h,伊红染色 2~3 min。梯度浓度酒精脱水各 5 min,二甲苯透明,中性树脂封片,镜检,分析图像信息。

1.2.6 免疫组织化学 将组织切片放置于 55 ℃的烘箱中烘烤 2 h,放入二甲苯中脱蜡处理 30 min,将切片放入浓度为 100%、95%、80%、75%的酒精中进行梯度水化,95 ℃的柠檬酸钠溶液中处理 15 min 待其冷却至室温。利用 3% H_2O_2 灭活内源性过氧化酶。牛血清室温封闭 15 min 后,PBS 洗涤切片,4 ℃一抗敷育过夜。次日切片置于 37 摄氏度敷箱中复温 30 min,室温下辣根过氧化酶标记的链霉素工作液处理 15 min,二抗室温敷育 15 min,PBS 洗涤切片,DAB 工作液染色处理切片 15~30 s 后将工作液洗净终止反应,苏木精核染 30 s 后清水洗净染液,梯度浓度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,镜检,分析图像信息。

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,两组间比较采用 LSD 检验。检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 HBx-EGFP-14-19 细胞中 HBx 的鉴定

为了确认转染效率,利用荧光显微镜对细胞进行成像。成功转染慢病毒载体的 14-19 细胞在显微镜下呈绿色荧光(图 1A)。此外,qRT-PCR 实验检测表明,与 14-19 细胞和 EGFP-14-19 细胞相比,HBx-EGFP-14-19 细胞中 HBx 的 mRNA 高表达(图 1B,$P<0.01$)。Western blot 结果也显示 HBx 蛋白在 HBx-EGFP-14-19 细胞中高表达(图 1C)。

2.2 小鼠肝组织中 HBx 的测定

为了评估 HBx 在小鼠肝脏是否长期稳定表达,利用 qRT-PCR、Western blot 和免疫组化检测小鼠肝脏中 HBx 的转录和蛋白水平。结果显示,与生理盐水组和 EGFP-14-19 组比较,HBx-EGFP-14-19 组 HBx 的 mRNA 高表达(图 2A,$P<0.01$),HBx 蛋白只在 HBx-EGFP-

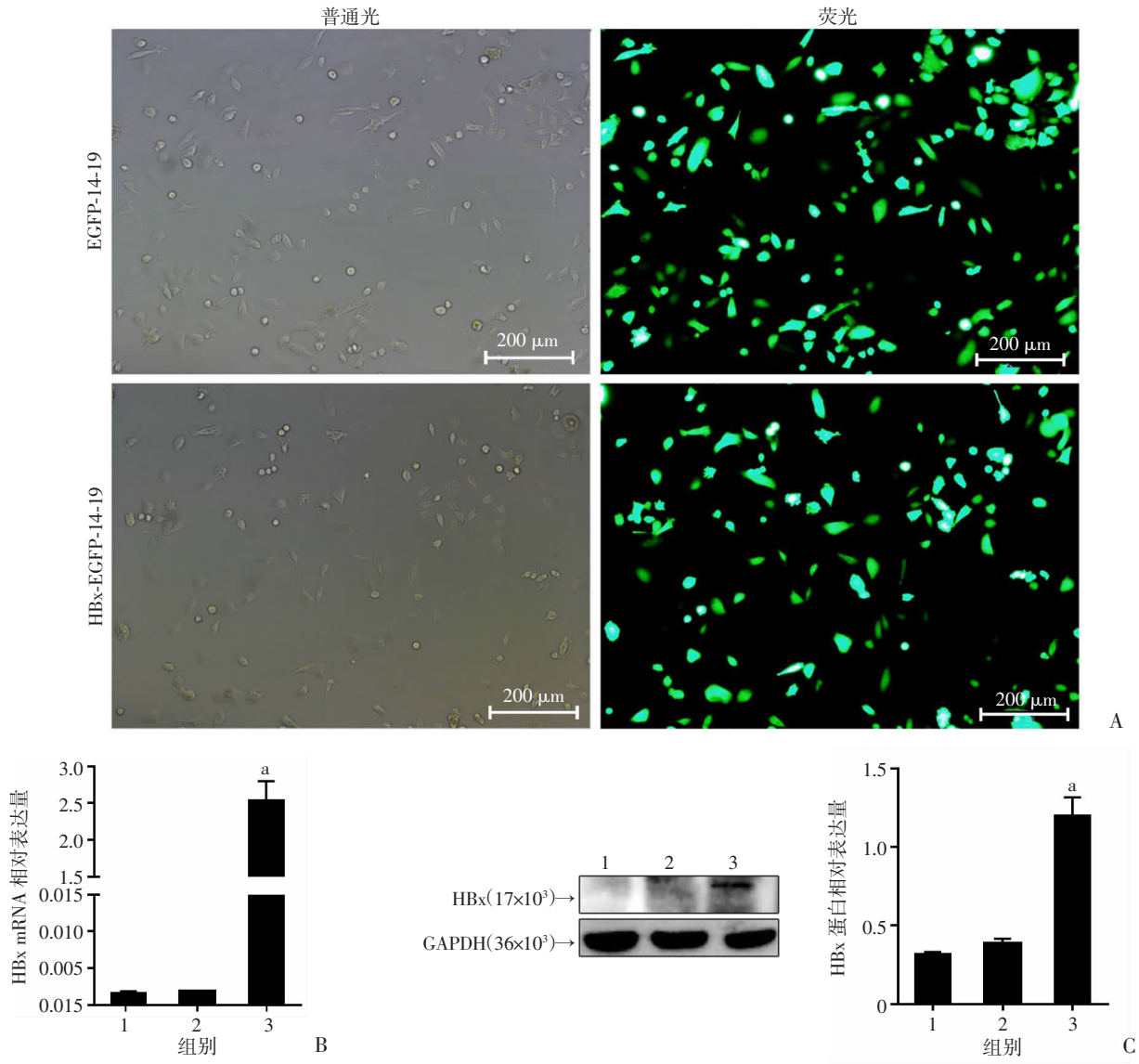
14-19 组表达(图 2B)。免疫组化检测显示生理盐水组和 EGFP-14-19 组无阳性染色,HBx-EGFP-14-19 组小鼠肝组织细胞膜和细胞质均呈棕黄色染色(图 2C),表明 HBx 蛋白在 HBx-EGFP-14-19 组小鼠肝组织中表达。

2.3 HBx 对小鼠细胞增殖的作用

qRT-PCR 检测方法显示,与生理盐水组和 EGFP-14-19 组相比,HBx-EGFP-14-19 组 CDK4 和 CyclinD1 表达水平显著升高(图 3A、B,$P<0.01$)。Western blot 与 qRT-PCR 结果一致(图 3E)。表明 HBx 促进肝细胞增殖。

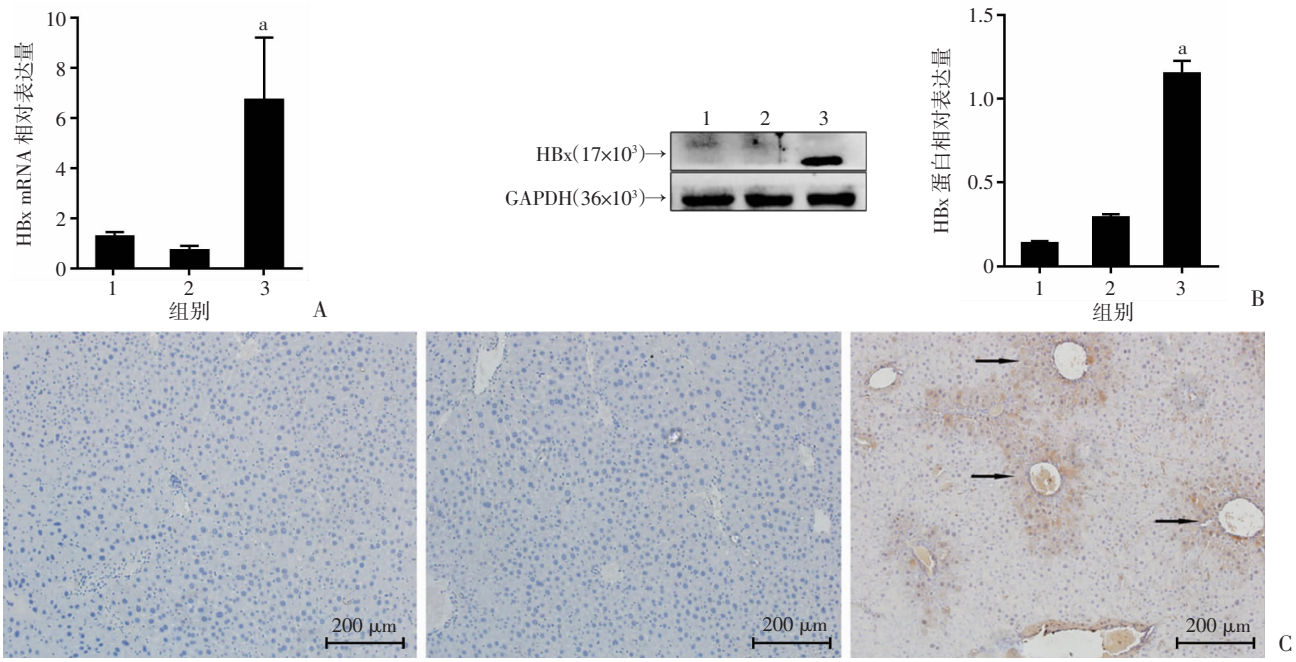
2.4 HBx 对小鼠肝脏炎症的促进作用

qRT-PCR 结果显示,与生理盐水组和 EGFP-14-19 组比较,HBx-EGFP-14-19 组 IL-10 表达水平明显下降(图 3C,$P<0.05$),TNF-α 表达水平明显上升(图 3D,$P<0.01$)。Western blot 检测结果与 qRT-PCR 结果一致(图 4A)。肝脏 HE 染色显示,与生理盐水组及 EGFP-14-19 组比,HBx-EGFP-14-19 组肝脏汇管区较多淋巴细胞浸润,黄色箭头表示较多肝细胞水肿,胞质疏松淡染,部分严重水肿至气球样变,有明显的炎症现象(图 4D)。



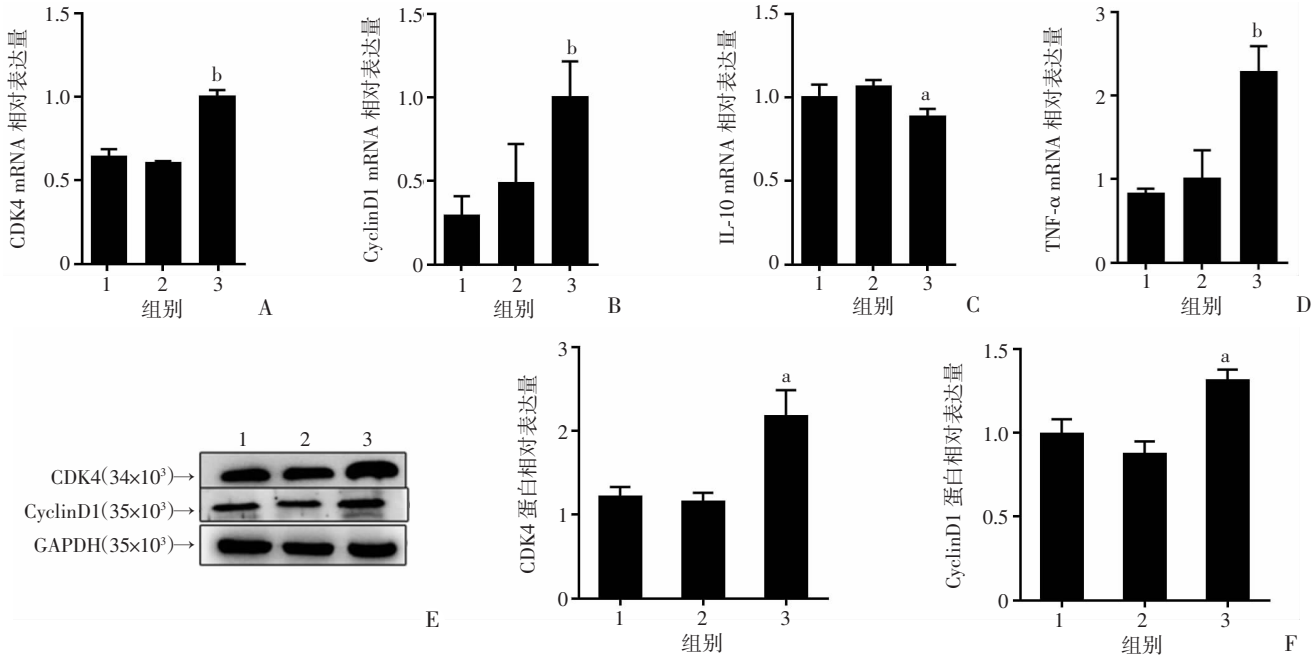
1:14-19 细胞组;2:EGFP-14-19 细胞组;3:HBx-EGFP-14-19 细胞组;a:$P<0.01$,与 14-19 细胞组、EGFP-14-19 细胞组比较; A:荧光显微镜检测绿色荧光蛋白 EGFP 的表达(×200);B:qRT-PCR 检测肝前体细胞中 HBx 的 mRNA 表达;C: Western blot 检测肝前体细胞中 HBx 蛋白表达及半定量分析

图 1 HBx-EGFP-14-19 细胞中 HBx 的表达



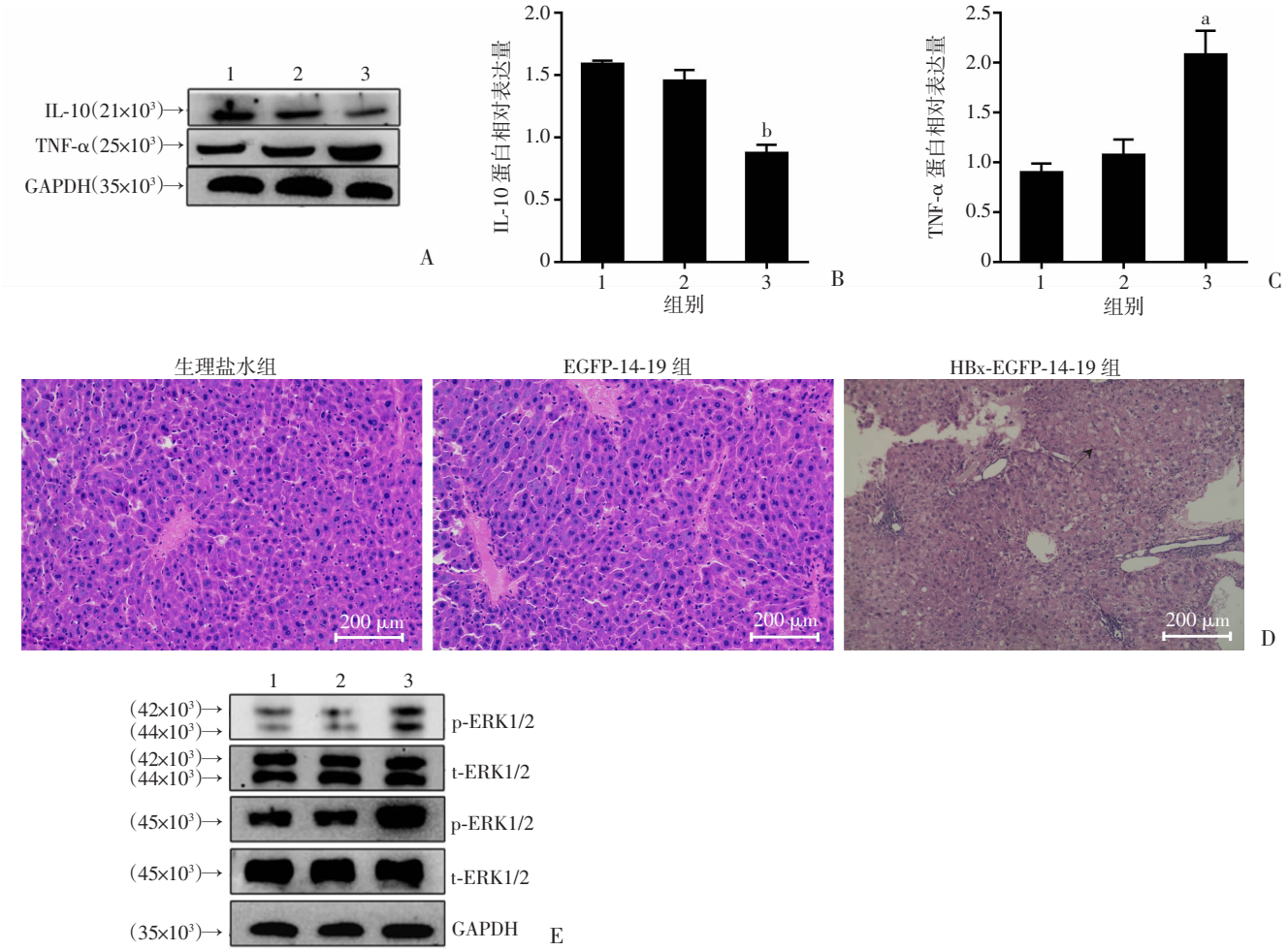
1:生理盐水组;2:EGFP-14-19 组;3:HBx-EGFP-14-19 组;a:$P<0.01$,与生理盐水组、EGFP-14-19 组比较;A:qRT-PCR 检测肝脏细胞中 HBx 的 mRNA 表达水平;B:Western blot 检测肝脏细胞中 HBx 的蛋白表达及半定量分析;C:免疫组化观测肝脏组织中 HBx 的蛋白表达(S-P×200) 黑色箭头示:HBx 的表达

图 2 感染 HBx 180 d 后小鼠肝脏组织中 HBx 的表达



1:生理盐水组; 2: EGFP-14-19 组; 3:HBx-EGFP-14-19 组; a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与生理盐水组、EGFP-14-19 组比较; A、B:qRT-PCR 法检测小鼠肝脏细胞中 CDK4 和 CyclinD1 的转录水平;C~D:qRT-PCR 法检测小鼠肝脏细胞中 IL-10 和 TNF-α 的转录水平;E~F:Western blot 检测小鼠肝脏细胞中 CDK4 和 CyclinD1 的蛋白表达水平及半定量分析

图 3 HBx 对小鼠肝脏细胞增殖的影响

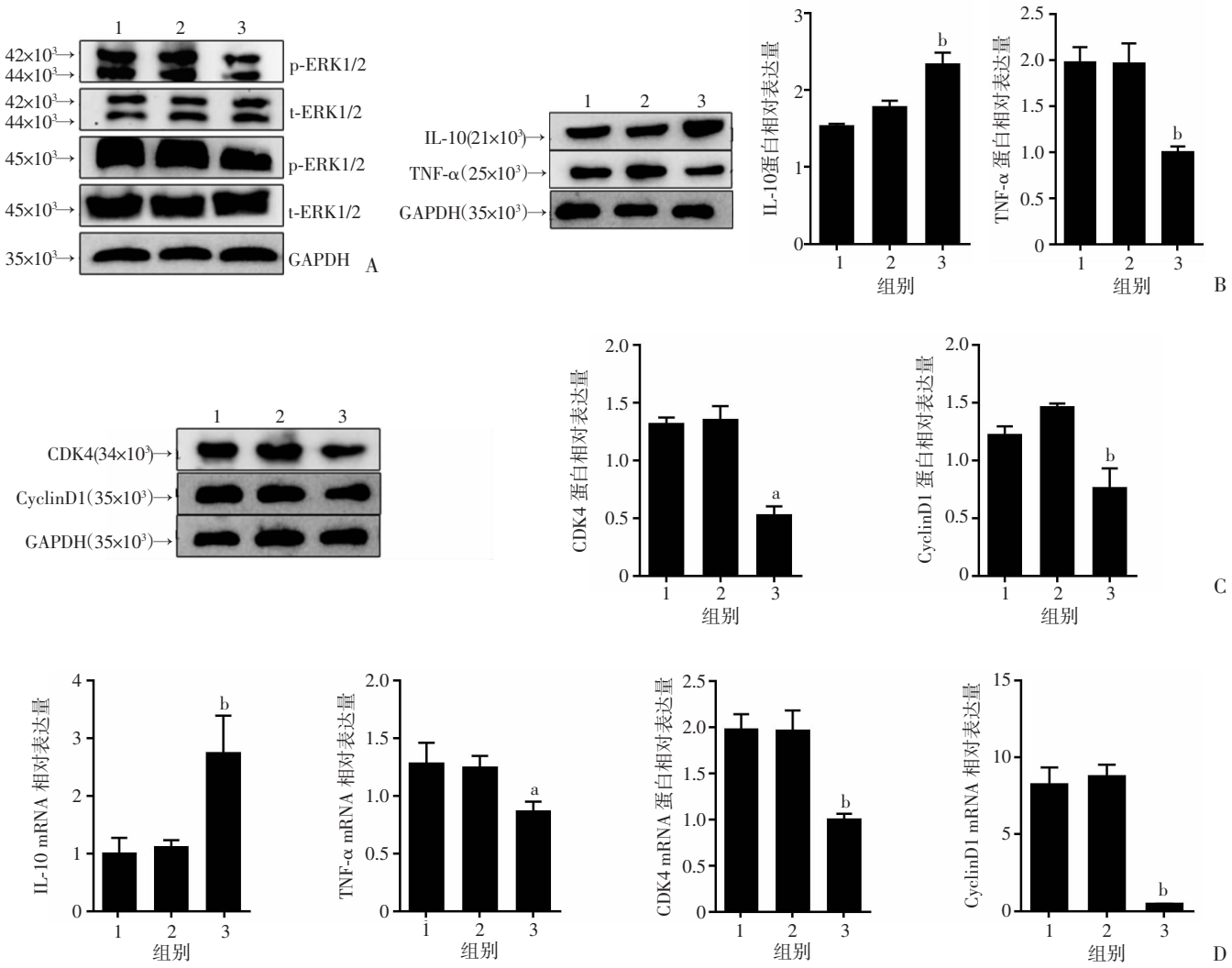


1:生理盐水组;2:EGFP-14-19 组;3:HBx-EGFP-14-19 组 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与生理盐水组、EGFP-14-19 组比较;A、B:qRT-PCR 法检测小鼠肝脏细胞中 CDK4 和 CyclinD1 的转录水平;A~C:Western blot 检测小鼠肝脏细胞中 IL-10 和 TNF-α 的蛋白表达及半定量分析;D:免疫组化观察 HBx 对小鼠肝组织病理学变化　黑色箭头示较多肝细胞水肿,胞质疏松淡染,部分严重水肿至气球样变;E:Western blot 检测肝脏细胞 MEK1/2、ERK1/2 总蛋白表达及磷酸化水平

图 4　HBx 对小鼠肝脏细胞炎性因子的影响

2.5　HBx 对小鼠肝细胞增殖和炎症的促进作用依赖于 ERK1/2 信号通路的激活

为了探究 HBx 促肝细胞增殖及炎性因子表达的分子机制,检测 ERK1/2 和 MEK1/2 的磷酸化水平。与生理盐水组和 EGFP-14-19 组比较,HBx-EGFP-14-19 组的磷酸化 ERK1/2(p-ERK1/2,Thr202/Tyr204)和磷酸化 MEK1/2(p-MEK1/2,Ser217/221)水平显著升高(图 4E)。正如预期的那样,各组的总 ERK1/2(t-ERK1/2)和总 MEK1/2(t-MEK1/2)蛋白水平差异无统计学意义(图 4E)。为了进一步研究 HBx 诱导的细胞周期加速和炎症细胞因子水平的变化是否依赖于体内 ERK1/2 信号通路的激活,采用高效非 ATP 竞争性 MEK1/2 抑制剂 U0126 处理 HBx-EGFP-14-19 组术后 180 d 小鼠。用 U0126 溶剂处理 HBx-EGFP-14-19 小鼠作为对照组。发现 U0126 处理组 p-ERK1/2 和 p-MEK1/2 的表达水平明显降低(图 5A)。qRT-PCR 结果显示,与 HBx-EGFP-14-19 生理盐水组和 HBx-EGFP-14-19-U0126 溶剂组比较,HBx-EGFP-14-19-U0126 组 IL-10 表达水平显著上升(图 5D,$P<0.01$),TNF-α 表达水平明显下降(图 5D,$P<0.05$),Western blot 检测结果与 qRT-PCR 结果一致(图 5B)。HBx-EGFP-14-19-U0126 组中 CyclinD1 和 CDK4 的 mRNA 和蛋白水平显著下降(图 5C、D,$P<0.01$,$P<0.05$)。说明 HBx 通过异常激活 ERK1/2 信号通路促肝细胞增殖及肝脏炎症。



1:HBx-EGFP-14-19 生理盐水组;2:HBx-EGFP-14-19-U0126 溶剂组;3:HBx-EGFP-14-19-U0126 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 HBx-EGFP-14-19 生理盐水组、HBx-EGFP-14-19-U0126 溶剂组比较;A:Western blot 检测给予小鼠 U0126 后肝组织中 MEK1/2、ERK1/2 总蛋白表达及磷酸化水平;B:Western blot 检测给予小鼠 U0126 后肝脏组织中 IL-10、TNF-α 蛋白表达及半定量分析;C:Western blot 和给予小鼠 U0126 后肝脏组织中 CDK4、CyclinD1 蛋白表达及半定量分析;D:qRT-PCR 检测给予小鼠 U0126 后肝脏组织中 IL-10、TNF-α、CDK4、CyclinD1 的转录水平

图 5 给予 HBx-EGFP-14-19 组小鼠给予 U0126 处理后对小鼠细胞增殖和肝脏炎症的影响

3 讨论

在 HBV 基因组中,HBx 是 HBV 复制、感染、致病的关键。为了探究 HBx 的作用,我们首先构建了表达 HBx 的细胞模型。由于正常干细胞与癌细胞具有分化、自我更新等共同特征,并且目前有越来越多的证据表明,干细胞能够引发癌症并加速癌症的发展[8]。干细胞在各种癌症中都有研究,包括肝细胞癌[9-10]、前列腺癌[11]、肺癌[12]。因此我们没有对癌细胞或者正常细胞进行改造,而是选择了肝内的干细胞肝前体细胞,与裸鼠或转基因小鼠模型相比,本研究构建的小鼠模型没有进行基因水平上的改造同时拥有完整的免疫系统,能更好地模拟自然条件下 HBV 持续感染人体肝脏后 HBx 所处的环境,因此,本研究构建的模型可以更好地用于探究 HBx 在体内的作用。

细胞周期调控细胞增殖和 DNA 损伤修复为对器官损伤和癌症等疾病的反应[13]。本课题组前期研究发现,HBx 可以通过 Akt/mTOR 信号破坏细胞凋亡和细胞周期的平衡[14]。本研究显示,在小鼠体内 HBx 可以上调细胞周期分子 CDK4、CyclinD1 的表达水平。表明 HBx 在小鼠体内可能通过异常调控肝脏细胞周期,造成正常细胞周期的紊乱。细胞周期的紊乱是肝

癌发生的原因之一。

肿瘤微环境在肿瘤的发生、发展过程中起着至关重要的作用,包括肿瘤细胞、炎性细胞、炎性细胞因子以及其他细胞和非细胞成分[15]。TNF-α 由炎症细胞产生并在免疫系统和肿瘤生长监测中发挥重要作用[16]。研究表明,抑制 TNF-α 的表达可改善苯并芘诱导的肺慢性炎症状况,延缓肺组织病理改变[17]。本研究结果显示,HBx 可以上调促炎因子 TNF-α 的表达,同时降低炎症抑制因子 IL-10 的表达,引起小鼠肝脏组织的病理改变。肝脏长期处于炎症环境中,会不断破坏受感染的肝细胞,从而触发坏死炎症性肝病,进而引发肝癌的发生[18]。本研究检测到在 HBx 180 d 小鼠肝组织出现炎症细胞浸润,水肿、胞质疏松淡染部分严重水肿至气球样变,说明 HBx 已经造成肝细胞不可逆的损伤。表明 HBx 可能通过促进肝脏炎症造成肝脏损伤来发挥促癌作用。

本研究揭示了在肝癌发生早期 HBx 通过异常激活 ERK1/2 信号通路参与细胞周期与肝脏炎症的事件。研究表明 ERK1/2 信号通路在肝癌的发生和发展中有重要作用[16]。近年来,RAS/RAF/MEK/ERK 信号转导途径在癌症治疗研究中成为重要目标。ERK1/2 通路抑制剂 U0126 通过降低肿瘤发生率,发挥有效的抗癌作用[19]。所以通过抑制 ERK1/2 信号通路的活性,可能为研究针对肝癌早期治疗的有效生物制剂奠定基础。本研究为进一步探究 HBx 发挥的生物学效应提供实验依据,同时为建立原发性肝癌早期的诊断方法和治疗的药物靶点提供了理论依据。

参考文献:

[1] ASIF A, KHALID M, MANZOOR S, *et al*. Role of purinergic receptors in hepatobiliary carcinoma in Pakistani population: an approach towards proinflammatory role of P2X4 and P2X7 receptors[J]. Purinergic Signal, 2019, 15(3): 367-374. DOI:10.1007/s11302-019-09675-0.

[2] CHIU A P, TSCHIDA B R, SHAM T T, *et al*. HBx-K130M/V131I promotes liver cancer in transgenic mice via AKT/FOXO1 signaling pathway and arachidonic acid metabolism [J]. Mol Cancer Res, 2019, 17(7): 1582-1593. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-18-1127.

[3] NG S A, LEE C. Hepatitis B virus X gene and hepatocarcinogenesis[J]. J Gastroenterol, 2011, 46(8): 974-990. DOI: 10.1007/s00535-011-0415-9.

[4] RINGELHAN M, PFISTER D, OCONNOR T, *et al*. The immunology of hepatocellular carcinoma[J]. Nat Immunol, 2018, 19(3): 222-232. DOI:10.1038/s41590-018-0044-z.

[5] DONG K S, CHEN Y, YANG G, *et al*. TGF-β1 accelerates the hepatitis B virus X-induced malignant transformation of hepatic progenitor cells by upregulating miR-199a-3p[J]. Oncogene, 2019. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1038/s41388-019-1107-9.

[6] LI C H, WANG Y J, DONG W, *et al*. Hepatic oval cell lines generate hepatocellular carcinoma following transfection with HBx gene and treatment with aflatoxin B1 in vivo[J]. Cancer Lett, 2011, 311(1): 1-10. DOI:10.1016/j.canlet.2011.05.035.

[7] ALISON M R, LOVELL M J. Liver cancer: the role of stem cells[J]. Cell Prolif, 2005, 38(6): 407-421. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2005.00354.x.

[8] SHEN L H, ZHANG X F, HU D X, *et al*. Hepatitis B virus X (HBx) play an anti-apoptosis role in hepatic progenitor cells by activating Wnt/β-catenin pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 383(1/2): 213-222. DOI: 10.1007/s11010-013-1769-5.

[9] JIN X L, HONG S K, KIM H, *et al*. Antiviral therapy may decrease HBx, affecting cccDNA and MSL2 in hepatocarcinogenesis[J]. Oncol Lett, 2019, 18(5): 4984-4991. DOI: 10.3892/ol.2019.10833.

[10] CHEN H J, ZHANG Y, YE S S, *et al*. Chromatin remodelling factor BAF155 protects hepatitis B virus X protein (HBx) from ubiquitin-independent proteasomal degradation [J]. Emerg Microbes Infect, 2019, 8(1): 1393-1405. DOI: 10.1080/22221751.2019.1666661.

[11] TSAO T, BERETOV J, NI J, *et al*. Cancer stem cells in prostate cancer radioresistance[J]. Cancer Lett, 2019, 465: 94-104. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.08.020.

[12] GREEN R, HOWELL M, KHALIL R, *et al*. Actinomycin D and telmisartan combination targets lung cancer stem cells through the wnt/beta catenin pathway[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 18177. DOI: 10.1038/s41598-019-54266-z.

[13] SCHAFER K A. The cell cycle: a review[J]. Vet Pathol, 1998, 35(6): 461-478. DOI: 10.1177/030098589803500601. [PubMed]

[14] 王薛, 霍本念, 刘洁, 等. HBx 基因激活 Akt/mTOR 信号通路抑制肝细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2019,41(10): 931-938. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201811185. https://doi.org/

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. https://doi.org/

[15] FU S, ZHOU R R, LI N, *et al*. Hepatitis B virus X protein in liver tumor microenvironment[J]. Tumor Biol, 2016, 37(12): 15371-15381. DOI:10.1007/s13277-016-5406-2.

[16] SHEN J, XIAO Z G, ZHAO Q J, *et al*. Anti-cancer therapy with TNF-α and IFNγ: a comprehensive review[J]. Cell Prolif, 2018, 51(4): e12441. DOI:10.1111/cpr.12441.

[17] 罗贤强, 陈如章, 高基民. 阻断 TNF-α 可改善苯并芘诱导的肺慢性炎症[J]. 浙江农业科学, 2019, 60(11): 2103-2105, 2108. DOI: 10.16178/j.issn.0528-9017.20191153.
LUO X Q, CHEN R Z, GAO J M. Blocking TNF-α can improve benzopyrene induced chronic inflammation of lung[J]. J Zhejiang Agric Sci, 2019, 60(11): 2103-2105, 2108. DOI: 10.16178/j.issn.0528-9017.20191153.

[18] CHISARI F V. Rous-Whipple Award Lecture. Viruses, immunity, and cancer: lessons from hepatitis B[J]. Am J Pathol, 2000, 156(4): 1117-1132. DOI:10.1016/s0002-9440(10)64980-2.

[19] LI L, ZHAO G D, SHI Z, *et al*. The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC[J]. Oncol Lett, 2016, 12(5): 3045-3050. DOI: 10.3892/ol.2016.5110.

(**收稿**:2019-10-24;**修回**:2020-01-08)

(编辑 汪勤俭)