DOI:10.16016/j.1000-5404.202011152

HBx 通过 Notch 信号通路在正常免疫小鼠体内导致肝癌的作用机制

周梦瑶,杜 彬,毋 楠,黄 欣,张思遥,况 钦,吴 勇,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** 构建长期携带乙型肝炎病毒 X(hepatitis B virus X,HBx)的正常免疫小鼠模型,以探讨 HBx 在体内导致肝癌发生的机制。**方法** 将转染 HBx 的肝前体细胞经肝门静脉注射入昆明小鼠体内构建动物模型,分别于术后 30、90、180、360 d 收取肝脏组织,Western blot 和 RT-qPCR 检测 HBx 的表达,HE 染色观察组织病理切片,Western blot 和 RT-qPCR 检测 Notch1、Notch4、Hes1 的表达,然后于 180 d 腹腔注射抑制剂 DAPT,Western blot 和 RT-qPCR 检测肝脏细胞凋亡及细胞周期相关因子的表达变化。**结果** 动物模型构建成功且于 360 d 发生肝癌,与对照组相比,Notch1、Notch4、Hes1 的基因及蛋白水平均于 30 d 呈现显著上调且一直持续至 360 d($P<0.05$、$P<0.05$、$P<0.001$;$P<0.05$、$P<0.05$、$P<0.01$);Bcl-2、CDK4、CyclinE、CyclinD1 的蛋白水平在 HBx 组上调($P<0.001$;$P<0.01$;$P<0.001$;$P<0.01$),Bax 呈下调($P<0.001$),基因水平与其一致($P<0.05$;$P<0.001$;$P<0.001$;$P<0.01$;$P<0.001$),而抑制剂 DAPT 组显著扭转上述趋势。**结论** HBx 在体内通过持续激活 Notch 通路引起细胞凋亡及细胞周期异常变化,最终导致肝癌发生。

[关键词] 肝细胞癌;乙型肝炎病毒 X;小鼠模型;Notch 信号通路;DAPT
[中图法分类号] R373.21;R730.23;R735.7 [文献标志码] A

Mechanism of hepatitis B virus X inducing hepatocellular carcinoma through Notch signaling pathway in a normal immune mouse model

ZHOU Mengyao, DU Bin, WU Nan, HUANG Xin, ZHANG Siyao, KUANG Qin, WU Yong, FENG Tao Molecular Medicine and Cancer Research Centre, Center for Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To construct a normal immune mouse model carrying hepatitis B virus X (HBx) for long term so as to explore the possible mechanism of HBx causing hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Hepatic progenitor cells transfected with HBx were injected into Kunming mice *via* hepatic portal vein to construct the animal model. The liver tissues were harvested at 30, 90, 180 and 360 d after injection, respectively. The expression of HBx as well as that of Notch1, Notch4 and Hes1 at protein and mRNA levels was detected by Western blotting and RT-qPCR, respectively, and the histopathological changes were observed by HE staining. In addition, a novel γ-secretase inhibitor, DAPT, was intraperitoneally injected at 180 d, and then Western blotting and RT-qPCR were adopted to determine the changes in the expression of apoptosis and cell-cycle-related factors. **Results** The animal model was successfully constructed, and liver cancer occurred at 360 d. Compared with the control group, the mRNA and protein levels of Notch1, Notch4 and Hes1 were all significantly increased in the HBx group at 30 d ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.001$), and continued to 360 d ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$); the protein and mRNA levels of Bcl-2, CDK4, CyclinE and CyclinD1 were also up-regulated (protein: $P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.01$; mRNA: $P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.01$), while those of Bax down-regulated in the HBx

[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

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

group ($P<0.001$; $P<0.001$). However, the inhibitor DAPT significantly reversed the above trends. **Conclusion** HBx causes anti-apoptosis and abnormal cell cycle changes in mice through persistent activation of the Notch pathway, and then ultimately leads to HCC.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; hepatitis B virus X; mouse model; Notch signaling pathway; DAPT

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

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma,PLC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一,而肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)占90%以上,它是全球第五大最常见的癌症,也是导致癌症相关性死亡的第三大主要原因[1]。此外,乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)慢性感染在导致HCC发生的相关因素中占60%[2]。由于HBV-HCC的发病率和死亡率,它已成为发展中国家一个困难的公共卫生问题,并且由于其局限的早期诊断和治疗,情况正逐渐严峻[3]。此外,HBV感染还可以引起一系列其他临床疾病,包括无症状携带者、急性重症肝炎、慢性肝炎和肝硬化等[1]。研究表明乙型肝炎病毒X(hepatic B virus, HBx)是HBV的核心功能蛋白[4],并在HBV-HCC中起重要作用。但是,HBx导致HCC的具体机制尚不清楚,因此对HBx功能的研究显得极为迫切。Notch信号通路是一条进化中高度保守的通路。它参与许多发育过程,例如细胞命运确定、终末分化和增殖[5]。研究表明,Notch信号通路的异常激活可以诱导癌细胞增殖、转移和恶化[6-7],这是影响HCC发生发展中最为重要的因素之一。在对肿瘤相关通路深入研究的基础上,Notch信号通路已被认为是治疗HCC的潜在分子靶标[8]。研究表明,HBx可以通过影响Notch1和Notch4来激活Notch信号通路[9]。

因此,我们通过肝门静脉将HBx-EGFP-14-19细胞注射入昆明小鼠体内,以此建立正常免疫下感染HBx的慢性动物模型。我们的目的是监测从HBx感染到HCC发生过程中,Notch信号通路的长期动态变化,并探索HBx在小鼠体内的功能,为HCC的早期诊断和治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 永生化的小鼠肝前体细胞株14-19由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室捐赠,慢病毒稳转细胞系EGFP-14-19和HBx-EGFP-14-19由课题组前期构建并保存于实验室[10]。

1.1.2 动物 无特定病原体(specificpathogen free,SPF)级的雄性昆明小鼠由重庆医科大学实验动物中心提供并代养。

1.1.3 主要试剂 DMEM细胞高糖培养基购自HyClone公司,FBS胎牛血清购自Cell Box公司,抑制剂DAPT购自Selleck公司,总RNA提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司,反转录试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司,SYBR Green mix实时荧光定量试剂盒购自Bimake公司,SDS-PAGE凝胶配置试剂盒购自碧云天生物技术公司,GAPDH抗体和Notch1抗体购自Cell Signaling Technology公司,HBx抗体购自Abcam公司,Notch4抗体和Hes1抗体购自爱博泰克生物有限公司,Bcl-2抗体购自上海泊湾生物科技有限公司,Bax抗体购自南京巴傲得生物科技有限公司,CDK4和CyclinE抗体购自万类生物科技有限公司,CyclinD1抗体购自Bimake公司,ECL发光液购自Advansta公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将小鼠肝前体细胞14-19,EGFP-14-19和HBx-EGFP-14-19复苏后培养在添加10%胎牛血清和1%双抗的DMEM(高糖)培养基中,于5% CO_2、37 ℃的培养箱中培养。

1.2.2 动物模型构建及抑制剂 40只6~8周雄性昆明小鼠随机分为3组:正常(生理盐水)组($n=5$)、EGFP-14-19组($n=5$)和HBx-EGFP-14-19组(下设6个时相点,每个时相点5只)。手术前将小鼠禁食1 d,麻醉后固定四肢,用酒精消毒腹部,然后按腹中线切口暴露肝脏。找到肝脏后的肝门静脉,并缓慢注入生理盐水(每只小鼠200 μL)、EGFP-14-19或HBx-EGFP-14-19细胞悬液(5×10^5细胞数的200 μL PBS悬液),轻压棉球止血,缝合腹腔。分别在30、90、180和360 d对小鼠实施安乐死,取肝组织。

另取180 d HBx-EGFP-14-19小鼠15只,随机分为3组($n=5$):阴性对照组(HBx-EGFP-14-19)、阳性对照组(DMSO)和治疗组(DAPT)。DMSO对照组给予等量4% DMSO,治疗组给予DAPT(100 mg/kg),腹腔注射后72 h,对动物实施安乐死,并切除肝脏组织。

将所有肝脏样品切取部分新鲜组织浸泡于4%多

聚甲醛中,其余保存在液氮中,用于后续实验。

1.2.3　HE 染色　　脱蜡后对组织切片行 HE 染色,并用中性树脂固定载玻片,然后在光学显微镜下观察并拍照。

1.2.4　RT-qPCR 检测　　用总 RNA 提取试剂盒提取每组小鼠的总 RNA。按照反转录试剂盒的操作说明将 RNA 转录为 cDNA,然后用无酶水将 cDNA 稀释 10 倍。每个 RT-qPCR 反应系统均由 5 μL SYBR Green 混合物、2 μL cDNA 模板、0.5 μL 正向引物和反向引物(5 μmol/L)和无酶水组成,总体积为 10 μL,使用 GAPDH 作为内参,引物序列见表 1。每组有 3 个复孔,实验重复 3 次。用 CFX Manager 软件系统分析数据。

表 1　RT-qPCR 引物序列

基因		引物序列
HBx	上游	5′-TGCGGACGACCCTTCTCGGG-3′
	下游	5′-GGGCAACATTCGGTGGGCGT-3′
Notch1	上游	5′-GATGGCCTCAATGGGTACAAG-3′
	下游	5′-TCGTTGTTGTTGATGTCACAGT-3′
Notch4	上游	5′-GAACGCGACATCAACGAGTG-3′
	下游	5′-GGAACCCAAGGTGTTATGGCA-3′
Hes1	上游	5′-TCAACACGACACCGGACAAAC-3′
	下游	5′-ATGCCGGGAGCTATCTTTCTT-3′
Bcl-2	上游	5′-TCCATCTGACCCTCCGCC-3′
	下游	5′-CCCAGTTCACCCCATCCCT-3′
Bax	上游	5′-TGAAGACAGGGGCCTTTTTG-3′
	下游	5′-AATTCGCCGGAGACACTCG-3′
CDK4	上游	5′-TCAGCACAGTTCGTGAGGTG-3′
	下游	5′-TCCATCAGCCGTACAACATTG-3′
CyclinE	上游	5′-CTCCGACCTTTCAGTCCGC-3′
	下游	5′-CACAGTCTTGTCAATCTTGGCA-3′
CyclinD1	上游	5′-GCGTACCCTGACACCAATCTC-3′
	下游	5′-ACTTGAAGTAAGATACGGAGGGC-3′
GAPDH	上游	5′-CTCGTCCCGTAGACAAAATGGT-3′
	下游	5′-GAGGTCAATGAAGGGGTCGTT-3′

1.2.5　Western blot 检测　　剪取适量小鼠肝脏组织于液氮中研磨,加入预先配好的裂解液缓冲液(RIPA:PMSF=100:1),于冰上孵育 40 min 后在 4 ℃以 12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液作为总蛋白,使用 BCA 试剂盒测量总蛋白浓度。在上清液中加入蛋白上样缓冲液,于 100 ℃煮沸变性 15 min。通过 SDS-PAGE 电泳分离总蛋白(40 μg),并将其转印至 PVDF 膜上。室温下 5%脱脂牛奶中封闭 2 h 后,将膜孵育于一抗,4 ℃过夜。用 TBST 洗掉膜上多余的一抗后,于二抗中室温孵育 2 h,然后用 ECL 发光液于自动凝胶成像系统中显影,Image Lab 软件测量灰度值,GAPDH 作为内参。

1.3　统计学分析

所有实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间的差异采用单因素方差分析。使用 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析。

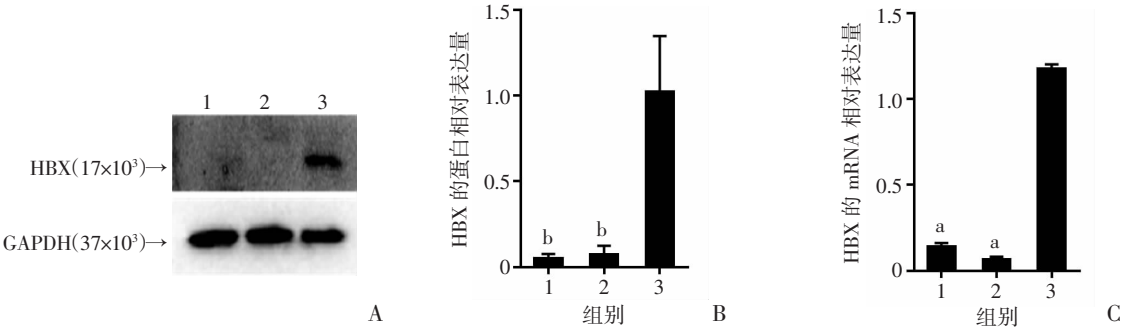
2　结果

2.1　HBx 在小鼠肝前体细胞中的表达鉴定

经复苏培养后,Western blot 和 RT-qPCR 显示与 14-19 和 EGFP-14-19 细胞相比,HBx-EGFP-14-19 细胞中 HBx 仍呈现显著高表达($P<0.01$, $P<0.001$, 图 1),说明 HBx 在肝前体细胞中转染成功。

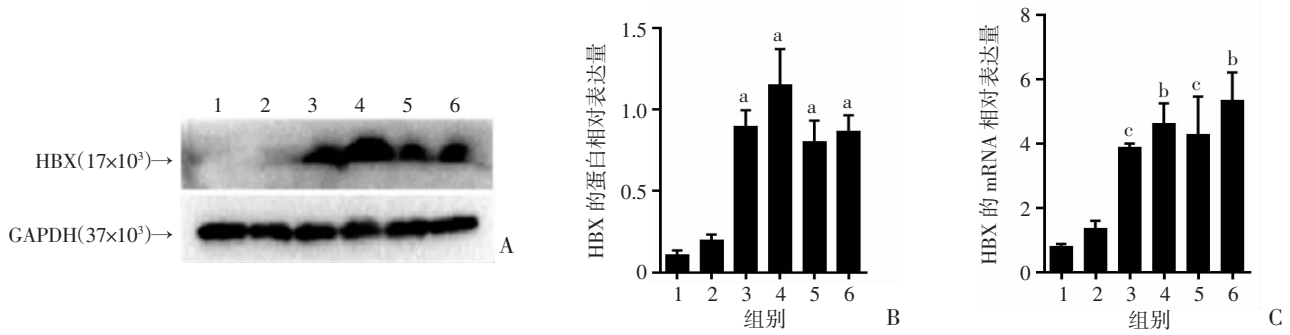
2.2　HBx 在小鼠肝脏组织中的表达鉴定

采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测正常、EGFP-14-19 组以及 HBx-EGFP-14-19 30、90、180、360 d 等 6 组中 HBx 的表达,以鉴定动物模型。Western blot 结果表明,与 EGFP-14-19 组和正常组相比,HBx 在 HBx-EGFP-14-19 组中显著过表达($P<0.001$,图 2A、B),RT-qPCR 结果一致($P<0.05$,图 2C)。表明 HBx 在小鼠模型中能持续性过表达,动物模型构建成功。



1:14-19 组;2:EGFP-14-19 组;3:HBx-EGFP-14-19 组; A:Western blot 检测细胞株中 HBx 的蛋白表达;B:蛋白表达半定量分析;C:RT-qPCR 检测细胞株中 HBx 的 mRNA 表达; a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,与 HBx-EGFP-14-19 组比较

图 1　肝前体细胞株中 HBx 的鉴定　($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



1:正常组;2:EGFP-14-19 组;3~6 分别为 HBx-EGFP-14-19 30、90、180、360 d 组;A:Western blot 检测小鼠肝脏组织中 HBx 的蛋白表达;B:蛋白表达半定量分析;C:RT-qPCR 检测小鼠肝脏组织中 HBx 的 mRNA 表达 a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与正常组、EGFP-14-19 组比较

图 2 小鼠肝脏组织中 HBx 的鉴定 ($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

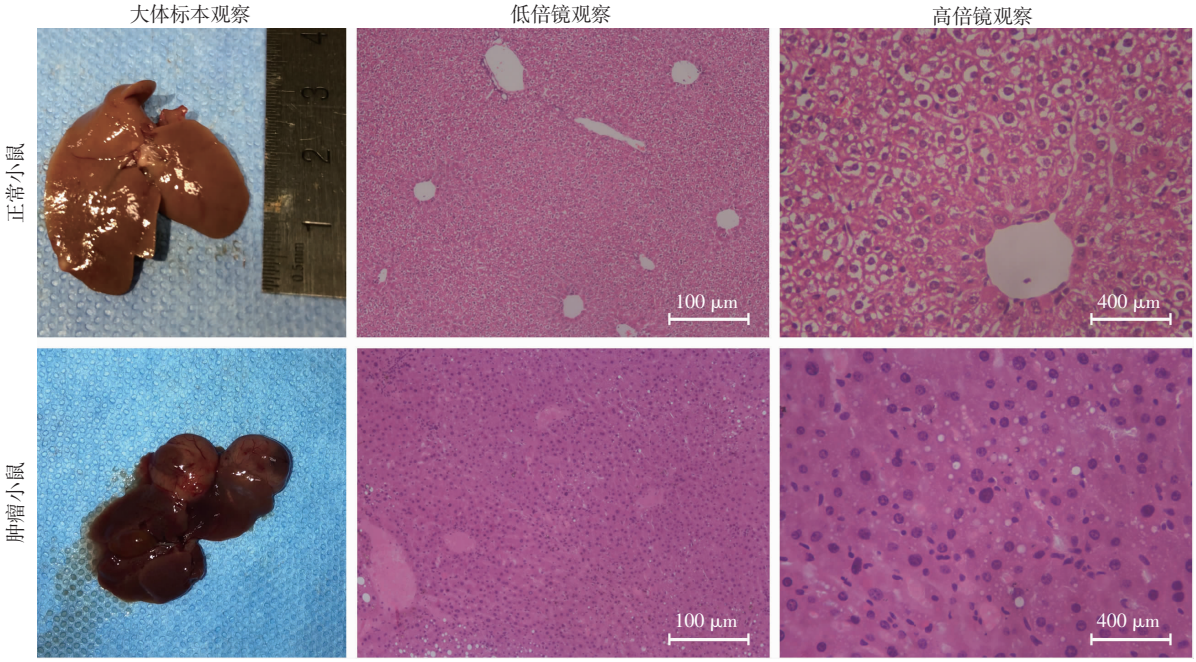


图 3 正常组与肿瘤组 360 d 小鼠肝脏大体标本及 HE 染色病理学观察

2.3 小鼠肝肿瘤鉴定

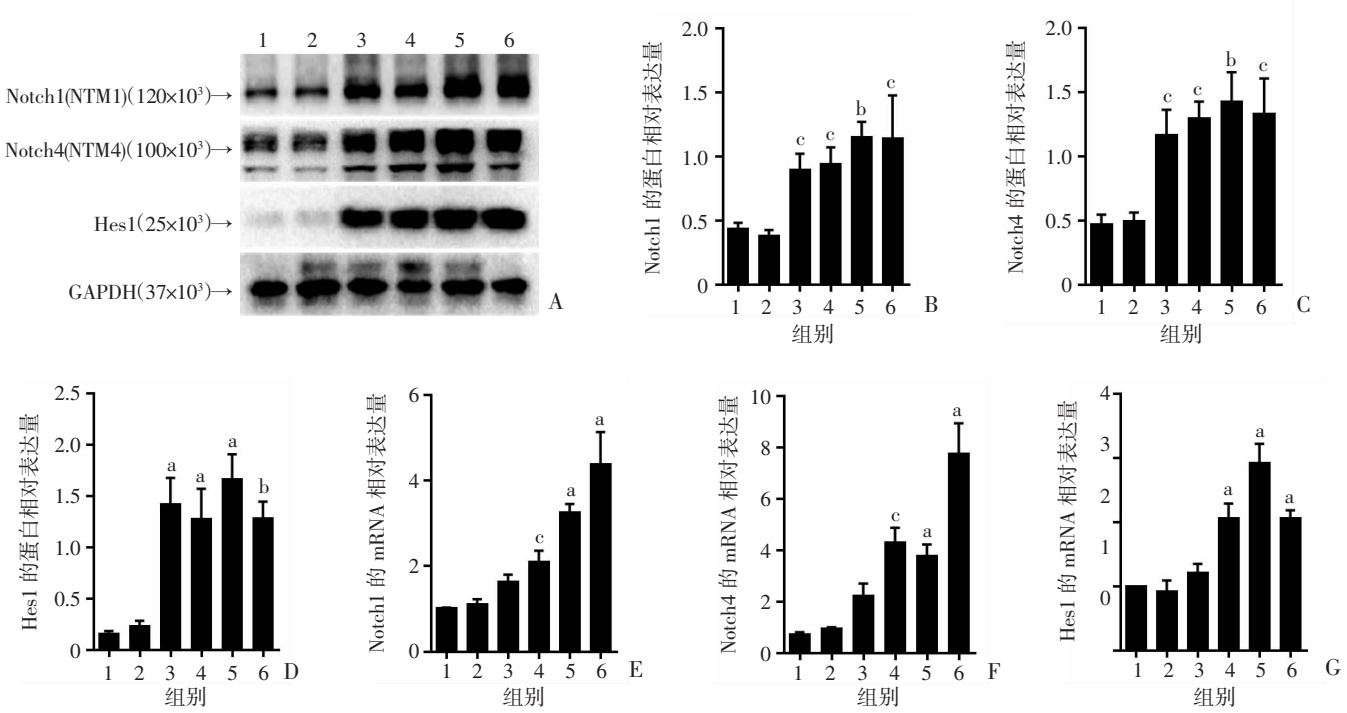
本研究在收集 HBx-EGFP-14-19 360 d 小鼠肝脏样本时发现部分小鼠肝脏出现肿瘤,且肝脏表面有结节性病灶突起,直径约为 1 cm。HE 染色镜下观显示,与正常肝组织相比,肿瘤组织中肝小叶结构基本消失且癌细胞大小不同,异型性明显(图 3)。上述结果为 HBx 可致癌性提供了直接证据。

2.4 Notch 信号通路在感染 HBx 后不同时间点的动态变化

为了探讨 HBx 对 Notch 信号通路的影响,本研究使用 RT-qPCR 和 Western blot 检测了 HBx-EGFP-14-19 组中不同天数的 Notch1、Notch4 和下游靶基因 Hes1 的表达。结果显示,Notch1、Notch4 和 Hes1 在不同天数 HBx-EGFP-14-19 组中的蛋白表达持续升高,且显著高于正常组和 EGFP-14-19 组($P<0.05$,$P<0.05$,$P<0.01$,图 4A~D),mRNA 水平与此一致(图 4E~G)。这表明 HBx 在体内通过促进 Notch1 和 Notch4 的表达持续性激活 Notch 信号通路,且 Notch 信号通路的持续激活可能是导致 HBx-HCC 发生的最重要的原因之一。

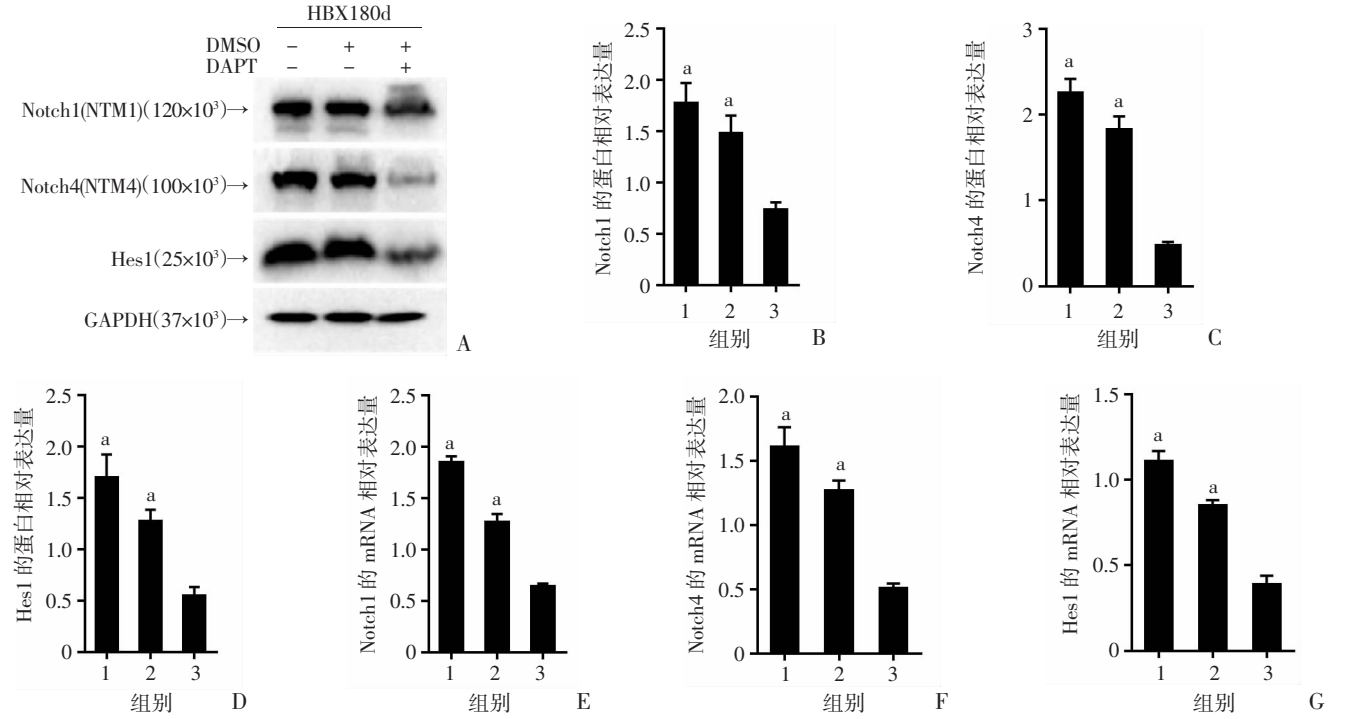
2.5 HBx 抗凋亡和促进细胞周期进程的作用是依赖于 Notch 信号通路

为了进一步证明 HBx 的抗凋亡和细胞周期加速作用与 Notch 信号通路之间的关系,我们对 HBx-EGFP-14-19 180 d 小鼠给予了 Notch 信号通路抑制剂 DAPT,同时以 DAPT 溶剂(4%的等量 DMSO)为阳性对照。Western blot 结果显示给予 DAPT 后,Notch1、Notch4 和 Hes1 的蛋白水平均显著降低($P<0.001$,图 5A~D),RT-qPCR 结果与此一致($P<0.001$,图 5E~F)。



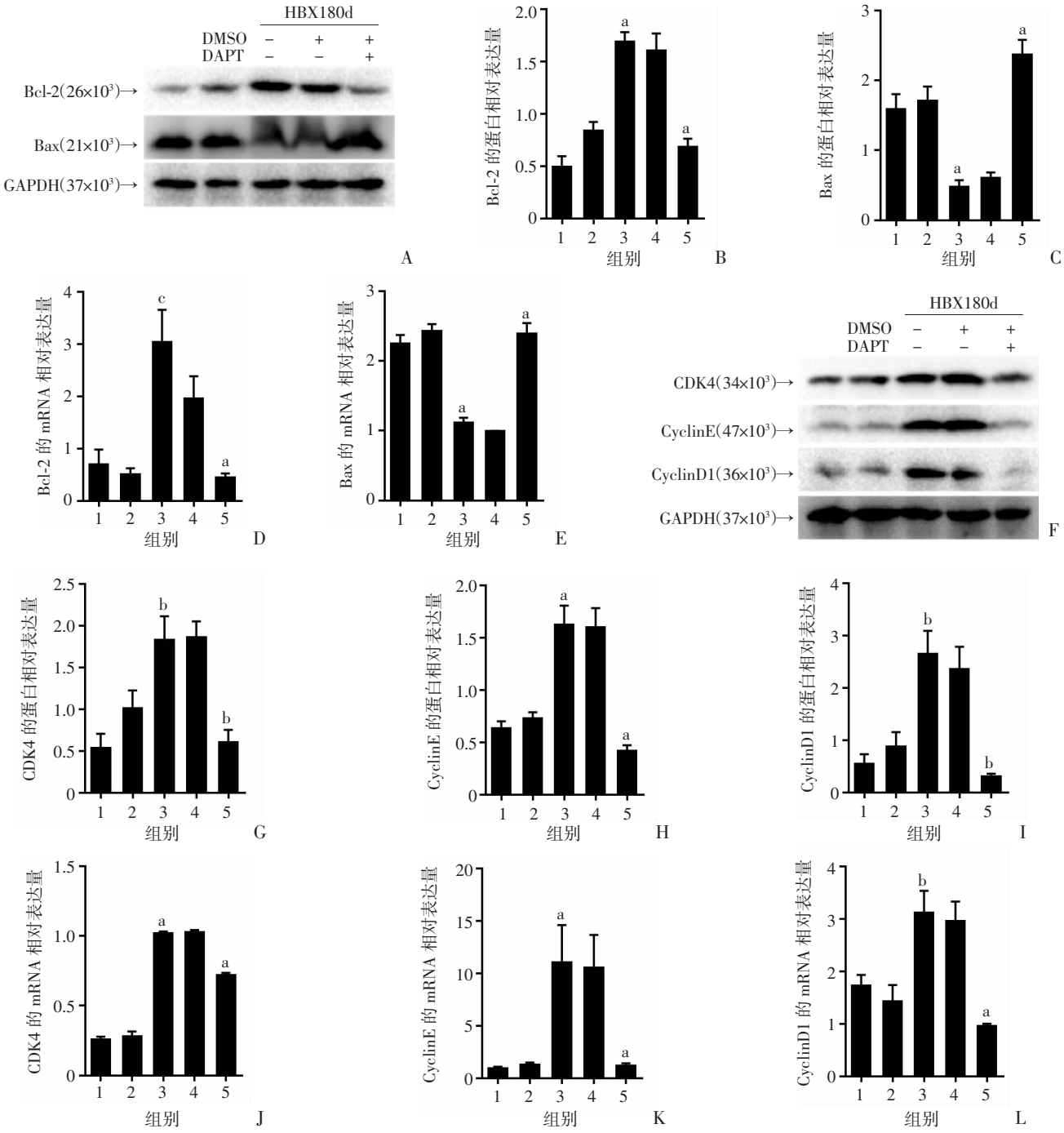
1:正常组;2:EGFP-14-19 组;3~6 分别为 HBx-EGFP-14-19 30、90、180、360 d 组;A~D:Western blot 检测不同时间点小鼠肝脏组织中 Notch1、Notch4、Hes1 的蛋白表达及半定量分析;E~G:RT-qPCR 检测不同时间点小鼠肝脏组织中 Notch1、Notch4、Hes1 的 mRNA 表达;a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与正常组、EGFP-14-19 组比较

图 4 不同时间点 Notch 信号通路的动态监测 ($n=5, \bar{x}\pm s$)



1:HBx-EGFP-14-19 180 d 组;2:HBx-EGFP-14-19 180 d-DMSO 组;3:HBx-EGFP-14-19 180 d-DAPT 组;A~D:Western blot 检测使用 DAPT 后的 Notch1、Notch4 和 Hes1 的蛋白表达及半定量分析;E~G:RT-qPCR 检测使用 DAPT 后的 Notch1、Notch4 和 Hes1 的 mRNA 水平;a:$P<0.001$,与 HBx-EGFP-14-19 180 d-DAPT 组比较

图 5 Notch 信号通路在小鼠体内被显著抑制 ($n=5, \bar{x}\pm s$)



1:正常组;2:EGFP-14-19 组; 3:HBx-EGFP-14-19 180 d 组;4:HBx-EGFP-14-19 180 d-DMSO 组;5:HBx-EGFP-14-19 180 d-DAPT 组;A~E:Western blot 和 RT-qPCR 检测抗凋亡指标 Bcl-2 和促凋亡指标 Bax 的蛋白表达及 mRNA 水平 a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与正常组、EGFP-14-19 组比较;F~L:Western blot 和 RT-qPCR 检测细胞周期相关指标 CDK4、CyclinE、CyclinD1 的蛋白表达及 mRNA 水平 a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,与 HBx-EGFP-14-19 180 d 组、HBx-EGFP-14-19 180 d-DMSO 组比较

图 6 HBx 在小鼠体内导致肝细胞凋亡和细胞周期相关指标的异常变化与 Notch 信号通路间的关系 ($n=5,\bar{x}\pm s$)

抗凋亡因子 Bcl-2 的蛋白水平在 HBx-EGFP-14-19 180 d 显著增加,而促凋亡因子 Bax 显著降低($P<0.001$,图 6A~C),mRNA 水平与蛋白表达一致($P<0.05$, $P<0.001$,图 6D、E)。Western blot 检测细胞周期相关因子的结果显示 CDK4、CyclinE 和 CyclinD1 在 HBx-EGFP-14-19 180 d 的蛋白表达均显著上调($P<0.01$,$P<0.001$,$P<0.01$,图 6F~I),RT-qPCR 显示其基因水平与蛋白表达一致($P<0.001$,$P<0.001$,$P<0.01$,图 6J~L)。

然而上述因子的异常表达均被 DAPT 显著扭转。基于以上数据,我们推测 HBx 在小鼠体内可以通过持续激活 Notch 信号通路,以此调节肝细胞凋亡并加速细胞周期进程,进而促进肝细胞癌的发生。

3 讨论

3.1 HBx 与 HCC

HCC 是世界上常见的恶性肿瘤之一,且病死率极高,严重威胁着人类生命和社会发展[11]。导致 HCC 发生的危险因素包括过量饮酒、HBV 感染、黄曲霉毒素和酒精性脂肪肝,但60%的 HCC 病例归因于 HBV[4]。HBV 病毒是一种共价封闭的环状 DNA(covalently closed circular DNA,cccDNA),包含一个 3.2×10^3 的基因组,该基因组作为转录模板存在于肝细胞核中[12]。此外,正是其核心蛋白 HBx 促进了 HBV 病毒基因组的转录[13]。先前的研究表明,上述过程的进行取决于 HBx 与宿主损伤特异性 DNA 结合蛋白 1(damage-specifific DNA-binding protein 1,DDB1)的结合[14]。此外,HBx 还通过上调去乙酰化酶 2(sirtuin 2, SIRT2)的表达来促进 HBV 复制和肝癌发生[15]。

尽管目前可接种 HBV 疫苗,但世界上仍有 2.4 亿人受到感染,且许多慢性 HBV 感染者会发展成肝癌[16]。而现有的肝癌治疗手段复发率高、预后差,只能提高生存率。因此,越来越多的研究者将注意力转向了肝癌的遗传背景和分子机制等方面[17-18],旨在发现异常变化并尽早进行干预。但是,先前关于 HBx-HCC 的大多数研究均使用传统的免疫缺陷肿瘤模型或转基因小鼠模型[19-20],由于肿瘤的形成与复杂的免疫功能障碍有关,因此在某种程度上具有一定的局限性。在本研究中,我们通过将 HBx-EGFP-14-19 细胞注射到正常免疫的昆明小鼠中,构建了长期稳定携带 HBx 的动物模型,以探索 HBx 引起 HCC 的机制。我们的动物模型是在自然状态下模拟 HBx 感染,因此可能更接近真实结果。

3.2 Notch 信号通路与 HCC

Notch 信号通路介导的旁分泌信号传导路径是通过跨膜配体和受体相互作用而实现的,通路激活使相邻细胞进行通讯传导,从而调节凋亡、增殖和决定细胞命运等[21]。Notch 信号通路主要由 Notch 受体、Notch 配体和细胞内效应分子组成[22],其激活需要相邻细胞的受体和配体结合,然后被 γ-分泌酶切割成 Notch 细胞内结构域(notch intracellular domain,NICD),NICD 进入细胞核并与 RBPJ 区域(recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region)结合,最终激活下游转录因子 *Hes* 和 *Hey* 家族等。当前,已经在哺乳动物中发现了 Notch 1/2/3/4 四个受体和 Delta-like 1(DLL1)、DLL3、DLL4、Jagged 1(JAG1)和 JAG2 五个配体。

近年来,越来越多的研究表明 Notch 信号通路在肝癌的发生发展中起着重要作用,并逐渐成为肝癌研究中的热点。研究表明[23],Notch 信号通路可以通过激活下游核受体基因 NR4A2 发挥致癌作用。雄激素受体(Androgen receptor,AR)可以通过下调 Notch4 的表达,从而抑制 HCC 血管生成[24]。基因工程模型研究表明[25],长期表达 NICD 的裸鼠模型在 6 个月时肿瘤生长率达到 33%,在 9 个月达到 50%,而在 12 个月达到 100%,同时在体外阻断 Notch 信号通路的表达时也显著抑制了肝癌细胞的恶性增殖。这些数据表明,Notch 信号通路不仅影响 HCC 的进展,而且可能是诱导 HCC 发生的重要因素,我们的研究结果与此一致。首次以长期动态方式监测 Notch 信号通路的变化,我们发现 Notch1 和 Notch4 在感染 HBx 30 d 后显示明显的高表达,并一直持续到 360 d HCC 发生。我们的研究提供了充分的证据,表明 Notch 信号通路的异常激活是导致 HCC 发生的重要因素。此外,Notch 还可以与 Hippo 信号通路形成正反馈回路,以促进 HCC 的进展[26]。但是,Notch 信号通路、HBx 和 HCC 之间的关系和分子机制尚不清楚。因此,我们的研究基于携带 HBx 的正常免疫小鼠模型,检测了 Notch 通路特异性抑制剂 DAPT 使用前后的细胞周期相关因子和凋亡相关因子的变化,初步探讨了三者间的关系和机制。

3.3 总结与展望

总之,我们构建了一个新的小鼠模型来探讨 HBx 的功能和分子机制。不仅首次以长期动态的方式监测了从 HBx 感染到 HCC 发生过程中的 Notch 信号通路的变化,而且在 360 d 模型小鼠中发现了肝癌产生,这首次为 HBx 的可致癌性提供了直接证据。我们的研究结果表明,HBx 在体内持续性激活 Notch 信号通路,从而促进细胞周期异常加速并抑制细胞凋亡,最终导致 HCC 的发生。重要的是,这些数据为肝癌的早期诊断和治疗奠定了基础。值得注意的是,我们的小鼠模型是使用肝前体细胞(hepatic progenitor cells,HPCs)来构建携带 HBx 的慢病毒,而不是肿瘤细胞或正常肝细胞。据报道,肝前体细胞可以分化为肝细胞和胆管上皮细胞,而人类肝细胞癌变可能是基于 HPCs 的转化[27]。此外,HCC 细胞的形态主要是细胞谱系中的早

期恶性转化,通常起源于 HPCs[28]。因此,使用不同的细胞系构建模型更有利于探索肝癌的起源机制。

此外,HBx 还可以通过其他信号通路和因子来调节 Notch 通路,从而促进 HCC 的进程。根据本课题组前期结果[10]和 SOKOLOWSKI 等[29]的研究,我们推测 HBx 可以通过调节 Akt 信号通路来激活 Notch 信号通路。另外,首次发现的 HBx-miR-3188-ZHX2-Notch1 信号通路在 HBV-HCC 的进展中同样起着重要作用[30]。此外,研究表明[31-32],有免疫抑制作用的代表性因子 IL-35 等在 HCC 患者血清中显著高表达,且在慢性 HBV 感染环境下,IL-35 可通过抑制抗病毒免疫反应来维持病毒持久性地发挥功能。因此,我们下一步将继续关注 HBx、Notch 信号通路和 HCC 之间的关系,并结合 HBx 抑制剂,充分发挥正常免疫小鼠模型的优势,着重探讨 HBx 导致的免疫环境改变,与 Notch 信号通路异常激活而促使 HCC 发生间的关系,以加深这三者之间的分子机制研究。然后在我们的小鼠模型基础上进行药物前期干预,旨在找到新的 HCC 诊断及药物治疗靶标。

参考文献:

[1] SONG P, TOBE R G, INAGAKI Y, *et al*. The management of hepatocellular carcinoma around the world: a comparison of guidelines from 2001 to 2011[J]. Liver Int, 2012, 32(7): 1053-1063. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2012.02792.x.

[2] SARTORIUS K, SWADLING L, AN P, *et al*. The multiple roles of hepatitis B virus X protein (HBx) dysregulated MicroRNA in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma (HBV-HCC) and immune pathways[J]. Viruses, 2020, 12(7): E746. DOI: 10.3390/v12070746.

[3] SARTORIUS K, MAKAROVA J, SARTORIUS B, *et al*. The regulatory role of MicroRNA in hepatitis-B virus-associated hepatocellular carcinoma (HBV-HCC) pathogenesis[J]. Cells, 2019, 8(12): E1504. DOI: 10.3390/cells8121504.

[4] LAMONTAGNE R J, BAGGA S, BOUCHARD M J. Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis[J]. Hepatoma Res, 2016, 2: 163-186. DOI: 10.20517/2394-5079.2016.05.

[5] LU J, XIA Y J, CHEN K, *et al*. Oncogenic role of the Notch pathway in primary liver cancer[J]. Oncol Lett, 2016, 12(1): 3-10. DOI: 10.3892/ol.2016.4609.

[6] HUANG Q F, LI J H, ZHENG J H, *et al*. The carcinogenic role of the notch signaling pathway in the development of hepatocellularcarcinoma[J]. J Cancer, 2019, 10(6): 1570-1579. DOI: 10.7150/jca.26847.

[7] WANG X Q, ZHANG W, LUI E L H, *et al*. Notch1-Snail1-E-cadherin pathway in metastatic hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2012, 131(3): E163-E172. DOI: 10.1002/ijc.27336.

[8] GIOVANNINI C, MINGUZZI M, GENOVESE F, *et al*. Molecular and proteomic insight into Notch1 characterization in hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(26): 39609-39626. DOI: 10.18632/oncotarget.9203.

[9] GAO J, XIONG Y M, WANG Y, *et al*. Hepatitis B virus X protein activates Notch signaling by its effects on Notch1 and Notch4 in human hepatocellularcarcinoma[J]. Int J Oncol, 2016, 48(1): 329-337. DOI: 10.3892/ijo.2015.3221.

[10] 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 hepatocyteapoptosis in mice via Akt/mTOR pathway[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(10): 931-938. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201811185.

[11] 周煜, 薛淑一, 李明春. Notch 信号通路及其与肝癌相关性的研究进展[J]. 实用医药杂志, 2018, 35(9): 842-846. DOI: 10.14172/j.issn1671-4008.2018.09.027.
ZHOU Y, XUE S Y, LI M C. Research progress on Notch signaling pathway and its relationship with liver carcinoma[J]. Pract J Med Pharm, 2018, 35(9): 842-846. DOI: 10.14172/j.issn1671-4008.2018.09.027.

[12] SEKIBA K, OTSUKA M, OHNO M, *et al*. Inhibition of HBV transcription from cccDNA with nitazoxanide by targeting the HBx-DDB1 interaction[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2019, 7(2): 297-312. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2018.10.010.

[13] LUCIFORA J, ARZBERGER S, DURANTEL D, *et al*. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection[J]. J Hepatol, 2011, 55(5): 996-1003. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.02.015.

[14] VAN BREUGEL P C, ROBERT E I, MUELLER H, *et al*. Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from extrachromosomal DNA templates[J]. Hepatology, 2012, 56(6): 2116-2124. DOI: 10.1002/hep.25928.

[15] CHENG S T, REN J H, CAI X F, *et al*. HBx-elevated SIRT2 promotes HBV replication and hepatocarcinogenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 496(3): 904-910. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.01.127.

[16] TANG L S Y, COVERT E, WILSON E, *et al*. Chronic hepatitis B infection: a review[J]. JAMA, 2018, 319(17): 1802-1813. DOI: 10.1001/jama.2018.3795.

[17] LI Y, FU Y, HU X, *et al*. TheHBx-CTTN interaction

promotes cell proliferation and migration of hepatocellular carcinoma via CREB1[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 405. DOI: 10.1038/s41419-019-1650-x.

[18] TAN S Y, VISVANATHAN S, ABU HASSAN R, *et al*. Autophagic degradation of misfolded nuclear receptor Co-repressor (NCoR) is linked to the growth of tumor cells in HBX positive hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. Front Oncol, 2019, 9: 1335. DOI: 10.3389/fonc.2019.01335.

[19] DUAN L, WU R, ZHANG X Y, *et al*. HBx-induced S100A9 in NF-κB dependent manner promotes growth and metastasis of hepatocellular carcinoma cells[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6): 629. DOI: 10.1038/s41419-018-0512-2.

[20] CHIU A P, TSCHIDA B R, SHAM TT, *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.

[21] BRAY S J. Notch signalling in context[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(11): 722-735. DOI: 10.1038/nrm.2016.94.

[22] ADAMS J M, JAFAR-NEJAD H. The roles of notch signaling in liver development and disease[J]. Biomolecules, 2019, 9(10): 608. DOI: 10.3390/biom9100608.

[23] ZHU B, SUN L, LUO W, *et al*. Activated Notch signaling augments cell growth in hepatocellular carcinoma via up-regulating the nuclear receptor NR4A2[J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 23289-23302. DOI: 10.18632/oncotarget.15576.

[24] BAO S X, JIN S, WANG C H, *et al*. Androgen receptor suppressesvasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma via circRNA7/miRNA7-5p/VE-cadherin/Notch4 signalling[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(23): 14110-14120. DOI: 10.1111/jcmm.16022.

[25] VILLANUEVA A, ALSINET C, YANGER K, *et al*. Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice[J]. Gastroenterology, 2012, 143(6): 1660-1669.e7. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.09.002.

[26] KIM W, KHAN S K, GVOZDENOVIC-JEREMIC J, *et al*. Hippo signaling interactions withWnt/β-catenin and Notch signaling repress liver tumorigenesis[J]. J Clin Invest, 2017, 127(1): 137-152. DOI: 10.1172/JCI88486.

[27] JIA S Q, REN JJ, DONG P D, *et al*. Probing the hepatic progenitor cell in human hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterol Res Pract, 2013, 2013: 145253. DOI: 10.1155/2013/145253.

[28] WARD S C, THUNG S N, LIM K H, *et al*. Hepatic progenitor cells in liver cancers from Asian children[J]. Liver Int, 2010, 30(1): 102-111. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2009.02126.x.

[29] SOKOLOWSKI K M, BALAMURUGAN M, KUNNIMALAIYAAN S, *et al*. Role ofAkt inhibition on Notch1 expression in hepatocellular carcinoma: potential role for dual targeted therapy[J]. Am J Surg, 2016, 211(4): 755-760. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2015.11.029.

[30] ZHOU S J, DENG Y L, LIANG H F, *et al*. Hepatitis B virus X protein promotes CREB-mediated activation of miR-3188 and Notch signaling in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Death Differ, 2017, 24(9): 1577-1587. DOI: 10.1038/cdd.2017.87.

[31] 尹洁, 王晓娜. IL-35 调控恶性肿瘤发生发展机制的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2018, 45(10): 529-534. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2018.10.050.
YIN J, WANG Y N. Advances in the mechanism of IL-35 regulating the development of malignant tumors[J]. Chin J Clin Oncol, 2018, 45(10): 529-534. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2018.10.050.

[32] SHAO X, MA J, JIA S, *et al*. Interleukin-35 suppresses antiviral immune response in chronic hepatitis B virus infection[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 472. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00472.

(**收稿**:2020-11-17;**修回**:2020-12-10)

(编辑 张艺霖)