肝炎病毒学研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001352

14-3-3家族在HBV复制的肝癌细胞中的表达研究

张 祥[1],魏 杰[1],靳 鑫[1],王石磊[1],阳 媛[1],师悦媛[1],牛司强[2],汪德强[3]
(1. 重庆医科大学检验医学院,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第一医院检验科,重庆 400016;
3. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 14-3-3 家族在乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)复制的肝癌细胞中的表达。**方法**:运用 qRT-PCR 和 Western blot 分析 14-3-3 家族在 HBV 复制细胞系中的表达水平;qRT-PCR、Western blot 检测 HBV 复制在 HepG2 细胞中对 14-3-3ζ 表达的影响;Western blot 检测 HBV 复制在小鼠肝组织中对 14-3-3ζ 表达的影响。**结果**:在 HepG2.2.15 中,14-3-3 η、γ、ζ mRNA 和蛋白的表达水平较 HepG2 对照组明显增加(mRNA:t=16.5、27.86、17.23,P=0.000、0.000、0.000;蛋白:t=35.7、16.97、22.51,P=0.000、0.000、0.000);在 HepAD38(Tet-)中只有 14-3-3ζmRNA 和蛋白的表达水平较 HepAD38(Tet+)对照组明显增加(mRNA:t=14.27,P=0.000;蛋白:t=12.11,P=0.000);HBV 复制能使 HepG2 中 14-3-3ζmRNA 和蛋白的表达显著升高(mRNA:F=98.8,P=0.000; 蛋白:F=118.3,P=0.000);HBV 复制能使小鼠肝组织中 14-3-3ζ 蛋白的表达显著升高 (F=109.4,P=0.000)。**结论**:HBV 可以促进肝癌细胞内 14-3-3 η、γ、ζ 的表达,这一发现为控制 HBV 感染的治疗策略提供新的靶点。

【关键词】乙型肝炎病毒;14-3-3ζ;14-3-3 家族
【中图分类号】R512.6 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2017-03-05

Expression of 14-3-3 family members in HBV-replicated hepatoma carcinoma cells

Zhang Xiang[1], Wei Jie[1], Jin Xin[1], Wang Shilei[1], Yang Yuan[1], Shi Yueyuan[1], Niu Siqiang[2], Wang Deqiang[3]
(1. College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University; 2. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 3. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of 14-3-3 family members in HBV-infected hepatocellular carcinoma (HCC). ***Methods***: The expression levels of 14-3-3 family members in HBV-replicated cell lines were analyzed by qRT-PCR and Western blot. Both qRT-PCR and Western blot were used to detect the effect of HBV replication on the expression of 14-3-3ζ in HepG2 cells. Western blot was used to investigate the effect of HBV replication on the expression of 14-3-3ζ in mouse liver. ***Results***: The expression levels of 14-3-3η,γ,ζ mRNA and protein in HepG2.2.15 were significantly higher than those in HepG2 control group respectively (mRNA: t=16.5, 27.86, 17.23, P=0.000, 0.000, 0.000; protein: t=35.7, 16.97, 22.51, P=0.000, 0.000, 0.000). The levels of 14-3-3ζ mRNA and protein in HepAD38(Tet-) were apparently higher than those in HepAD38(Tet+) (mRNA: t=14.27, P=0.000; protein: t=12.11, P=0.000). HBV replication could obviously increase the expression of 14-3-3ζ mRNA and protein in HepG2 (mRNA: F=98.8, P=0.000; protein: F=118.3, P=0.000). HBV replication could significantly increase the expression of 14-3-3ζ protein in mouse liver tissue. ***Conclusion***: HBV can promote the expression of 14-3-3η,γ and ζ in hepatocarcinoma cells. This finding provides a new target for the treatment strategy for controlling infection of HBV.

【Key words】hepatitis B virus (HBV); 14-3-3ζ; 14-3-3 family members

作者介绍:张 祥,Email:1135808473@qq.com,
研究方向:HBV 相关性肝癌的发病机制。
通信作者:汪德强,Email:wangdq@cqmu.edu.cn。

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(编号:cstc2015jcyjA10003);重庆市卫计委 2016 年医学科研面上资助项目(编号:2016MSXM001);重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:KJ1702022)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170626.1150.026.html (2017-06-26)

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)是导致人类疾病的重要病原体,HBV 的慢性感染可引慢性乙型肝炎、肝硬化和原发性肝癌等相关疾病[1]。HBV 感染是一个严重的公共问题,全球约 20 亿人曾感染过 HBV,其中 3.5 亿人为慢性 HBV 感染者,每年约有 100 万人死于乙肝相关的各种终末期疾病[2]。控制 HBV 感染和治疗 HBV 患者已越来越引起人们的重视,尽管目前有 HBV 疫苗和多种抗病毒治疗方式,但也存在接种疫苗失败或者无应答的问题,治疗 HBV 患者的两大类药物(核苷酸类似物和干扰素)也均不能完全清除人体内的 HBV,并且可导致药物抵抗或产生严重的副作用[3-4]。因此,寻找新的靶点分子成为抗病毒研究的热点和重点。

14-3-3 是一个在真核生物中广泛表达的酸性蛋白家族,共有 7 种亚型(β、ε、η、γ、σ、θ 和 ζ)。该家族蛋白高度保守,参与细胞许多重要的生理过程,并在其中起至关重要的作用,如细胞周期调控、细胞信号传导、细胞凋亡、恶性肿瘤的形成等[5]。最近研究发现,14-3-3 蛋白家族与多种病毒如丁型肝炎病毒(hepatitis D virus,HDV)[6]、人乳头状瘤病毒(human papillomavirus,HPV)[7]、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV)[8]、登革热病毒(dengue virus,DV)[9]等的感染及其疾病的发生发展有关。这些发现揭示了 14-3-3 蛋白与病毒存在某种关联,但目前很少有研究关注于 HBV 与 14-3-3 蛋白之间的关系。本课题将研究 HBV 对 14-3-3 家族蛋白表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

肝细胞系 HepG2、HepG2.2.15、HepAD38 均购于 ATCC(American Type Culture Collection)公司。培养细胞用的DMEM 培养基、胰酶、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;转染试剂 Lipofectamine™ 2000、TRIZOL® Reagent 购自美国 Thermofisher 公司;逆转录试剂盒(GoScript ™ Reverse Transcription System)、实时荧光定量 PCR 试剂盒(GoTaq® qPCR Master Mix 2×)购自美国 Promega 公司;14-3-3 蛋白 qRT-PCR 引物合成由北京华大基因完成;抗 14-3-3β、θ、ζ 抗体购于上海生工,抗14-3-3ε、η、γ、σ 抗体购于美国 Bioworld 公司;抗 HBcAg 抗体购于丹麦 DAKO 公司;GAPDH 抗体、BCA 试剂盒、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的羊抗兔 IgG 抗体购自碧云天公司,HBV 复制质粒 pcDNA3.1-HBV1.1、pcDNA3.1-HBV1.3 由实验室保存。实验动物:普通雌性 C57BL/6J 小鼠购自重庆医科大学实验动物中心并由其代养,HBV 转基因小鼠 C57BL/6J 购自厦门大学,由重庆医科大学动物实验中心 SPF 级代养室培育。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染方法 HepAD38 包含 1.1 拷贝的整合 HBV 基因组,其表达由诱导型 CMV-Tet 启动子调控,用四环素处理细胞能降低 HepAD38 细胞中 HBV 的复制[11]。HepAD38 细胞系中没有用四环素(tetracycline)处理的细胞记为HepAD38(Tet-),用四环素处理的细胞记为 HepAD38(Tet+)。HepG2、HepAD38(Tet-)细胞系培养于含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,HepG2.2.15 细胞系培养于含有10%胎牛血清、400 μg/mL G418 的 DMEM 培养基中,HepAD38(Tet+)细胞系培养于含有 10%胎牛血清、0.3 μg/mL 四环素的 DMEM 培养基中,在含 5%CO_2、37 ℃孵箱中常规培养。质粒按照Lipofectamin 2000™(Invitrogen)的说明书进行转染。

1.2.2 RNA 提取及 qRT-PCR 检测 收集处理好的细胞,用 Trizol 裂解,氯仿抽提,经提取得到细胞总 RNA,通过 Nanodrop2000 测定其浓度和纯度,1%的琼脂糖凝胶电泳判断总 RNA 的完整性。按照逆转录试剂盒(GoScript™ Reverse Transcription System)说明书的方法,将 1 μg 的总 RNA 逆转录为 cDNA,-80 ℃保存备用。以 GAPDH 为内参进行 qRT-PCR 检测,按照实时荧光定量 PCR 试剂盒(GoTaq® qPCR Master Mix 2×)说明书配制反应体系和设置反应条件。每孔均设 3 个复孔,每组实验重复 3 次,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达水平。qRT-PCR 相关引物信息见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences of q RT-PCR

目的基因	引物序列
GAPDH	正义链:5'-GTATGACAACGAATTTGGCTACAG-3'
	反义链:5'-TGAGGGTCTCTCTCTTCCTCTTGT-3'
14-3-3β	正义链:5'-TTCTGAAGTGGCATCTGGAG-3'
	反义链:5'-TTGGGTGTGTAGGCTGCATTTC-3'
14-3-3ε	正义链:5'-TCAGCATTACTGTGTCGTCTCC-3'
	反义链:5'-ACCTCTCTCTTAGATGCTTGC-3'
14-3-3η	正义链:5'-TAGCTGAGCTGGACACACTAAACG-3'
	反义链:5'-TGCCTTCTCCTGCTTCTTCATCCTG-3'
14-3-3γ	正义链:5'-TTGAGATGGTCCGTGCGTAC-3'
	反义链:5'-ACTGGGTCTCGCTGCAATTC-3'
14-3-3σ	正义链:5'-TTCCACTACGAGATCGCCAAC-3'
	反义链:5'-TGCTGTCTTTGTAGGAGTCC-3'
14-3-3θ	正义链:5'-TGCAACTAATCCAGAGAGTAAGG-3'
	反义链:5'-AGCTCCTTGGGAATTATCTATCG-3'
14-3-3ζ	正义链:5'-ACAAGCAGAGAGCAAAGTCTTC-3'
	反义链:5'-TGACTGATCGACAATCCCTTTC-3'

1.2.3 Western blot 检测 14-3-3 家族各亚型的表达 收集细胞,根据细胞数加入相应体积的细胞裂解液 RIPA(含 1 mg/mL PMSF)在冰上裂解 15 min,再离心,去除细胞碎片留取上清;用 BCA 法测定蛋白质浓度,经 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白质后,恒压 100 V 转膜 1 h,将含有蛋白质的 PVDF 膜在

5%脱脂奶粉中室温封闭 2 h，一抗 4 ℃摇床过夜（GAPDH 抗体 1:2 000 稀释，HBcAg 抗体 1:700 稀释，14-3-3 蛋白抗体 1:1 000 稀释），然后 TBST 洗膜 4 次，每次 10 min；二抗室温摇床 1 h（二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG，1:5 000 稀释），TBST 洗膜 4 次后，ECL 显影。以 GAPDH 为内参。

1.2.4 C57BL/6J 小鼠肝组织蛋白的提取 选取 5 只 HBV DNA 表达量 10^5copies/mL 以上稳定表达 HBV 的转基因小鼠 C57BL/6J 和 5 只普通的 C57BL/6J 小鼠作为对照组，颈椎脱臼法处死后解剖游离肝脏，取组织指甲盖大小，秤取重量，按 50 mg/mL 加入相应体积的细胞裂解液 RIPA（含 1 mg/mL PMSF），先用无菌的剪刀剪碎组织，再用匀浆机置于冰上匀浆，冰上裂解 15 min，12 000 g 离心 30 min 去除组织碎片留取上清；用 BCA 法测定蛋白质浓度，分装后，-80 ℃保存备用。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism5.0 软件进行绘图，SPSS 19.0 软件进行统计学分析。所有数据均为计量数据，采用 Kolmogorov-Smirnov 检验确定数据是否为正态分布，且表示为均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）。两组均数间比较采用独立样本 t 检验分析，组间差异采用单因素方差分析。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 14-3-3 蛋白家族在 HBV 复制细胞中的 mRNA 表达水平

首先检测了 14-3-3 各家族成员在 HBV 复制细胞与对照细胞中的表达差异，选择 2 组细胞进行分析，即 HBV 复制细胞 HepG2.2.15 与对照细胞 HepG2 中的表达差异和 HBV 复制细胞 HepAD38(Tet-)与 0.3 μg/mL 四环素(tetracycline)处理的 HepAD38(Tet+)中的表达差异。HepAD38 中的 HBV 复制受四环素调控，用四环素处理细胞能降低 HepAD38 细胞中 HBV 的复制。qRT-PCR 分析发现 14-3-3η、γ、ζ 3 个基因的 mRNA 水平在 HepG2.2.15 细胞（分别为4.186 ± 0.298、2.029 ± 0.070、2.156 ± 0.102）中明显高于 HepG2 细胞（分别为 1.005 ± 0.134、1.000 ± 0.038、1.001 ± 0.064），差异具有统计学意义（t=16.5、27.86、17.23，P=0.000、0.000、0.000），见表 2 和图 1A。然而只有 14-3-3ζ 的 mRNA 水平在 HepAD38(Tet-)细胞（2.657±0.195）中明显高于 HepAD38(Tet+)细胞（1.004 ± 0.109），差异具有统计学意义（t=14.270，P=0.000），见表 3 和图 1B。

表 2 14-3-3 蛋白家族在 HepG2 和 HepG2.2.15 中的 mRNA 表达水平（n=3）

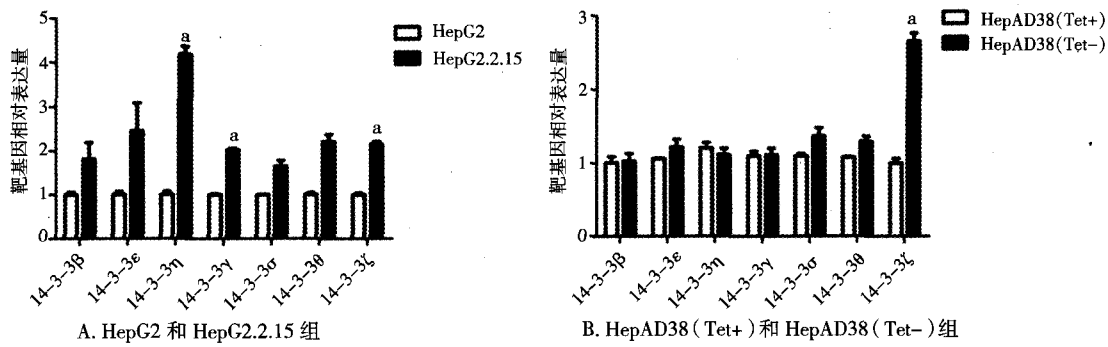
Tab.2 mRNA expression levels of 14-3-3 family members in HepG2 and HepG2.2.15（n=3）

组别	14-3-3 β	14-3-3 ε	14-3-3 η	14-3-3 γ	14-3-3 σ	14-3-3 θ	14-3-3 ζ
HepG2	1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.13	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.06
HepG2.2.15	1.82 ± 0.64	2.46 ± 1.09	4.19 ± 0.30	2.03 ± 0.05	1.78 ± 0.56	2.88 ± 0.93	2.16 ± 0.10
t 值	2.200	2.290	16.850	27.860	2.410	3.490	17.230
P 值	0.093	0.083	0.000	0.000	0.075	0.025	0.000

表 3 14-3-3 蛋白家族在 HepAD38(Tet+)和 HepAD38(Tet-)中 mRNA 表达水平（n=3）

Tab.3 mRNA expression levels of 14-3-3 family members in HepAD38(Tet+) and HepAD38(Tet-)（n=3）

组别	14-3-3 β	14-3-3 ε	14-3-3 η	14-3-3 γ	14-3-3 σ	14-3-3 θ	14-3-3 ζ
HepAD38(Tet+)	1.01 ± 0.14	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.11
HepAD38(Tet-)	1.03 ± 0.18	1.15 ± 0.17	0.93 ± 0.12	1.02 ± 0.14	1.25 ± 0.18	1.20 ± 0.11	2.65 ± 0.20
t 值	0.150	1.530	0.740	0.200	2.320	3.140	14.270
P 值	0.862	0.207	0.479	0.909	0.081	0.036	0.000



A. HepG2 和 HepG2.2.15 组　　B. HepAD38（Tet+）和 HepAD38（Tet-）组

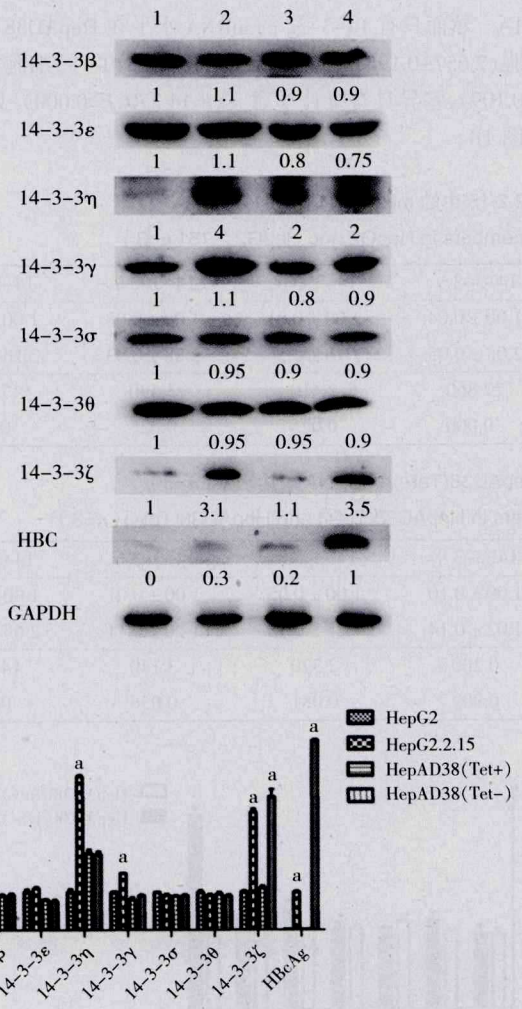
a：与 HepG2 或 HepAD38（Tet+）对照组比较，P<0.01

图 1 14-3-3 蛋白家族在 HBV 复制细胞中的 mRNA 表达水平（n=3）

Fig.1 Expression mRNA levels of 14-3-3 family members in HBV replication cells（n=3）

2.2　14-3-3 蛋白家族在 HBV 复制细胞中的蛋白表达水平

为了进一步验证了 14-3-3 家族各成员在 HBV 复制细胞与对照细胞中的表达差异，本课题组进行蛋白水平分析。首先检测了 HBV 复制细胞 HepG2.2.15 和 HepAD38(Tet-)中HBV核心抗原(HBcAg)，Western blot 分析发现 HBV 复制细胞HepG2.2.15 和 HepAD38(Tet-)中能够检测出HBV核心抗原的表达，且 HepAD38(Tet-)中 HbcAg 的表达高于HepG2.2.15；而 HepG2 和 HepAD38(Tet+)细胞中未检测出HBV 核心抗原(图 2)。其次检测 14-3-3 家族各成员在 HBV复制细胞与对照细胞中的蛋白水平表达差异，Western blot分析发现 14-3-3η、γ、ζ 3 个基因的蛋白水平在 HepG2.2.15细胞中高于 HepG2 细胞(图 2)。且只有 14-3-3ζ 的蛋白水平在 HepAD38(Tet-)细胞中明显高于 HepAD38(Tet+)细胞(图2)。



1：HepG2；2：HepG2.2.15；3：HepAD38(Tet+)；4：HepAD38(Tet-)

a：与 HepG2 或 HepAD38(Tet+)对照组比较，$P<0.01$

图 2　14-3-3 蛋白家族在 HBV 复制细胞中的蛋白表达水平

Fig.2　Expression protein levels of 14-3-3 family members in HBV replication cells

2.3　HBV 对 HepG2 中 14-3-3ζ 表达的影响

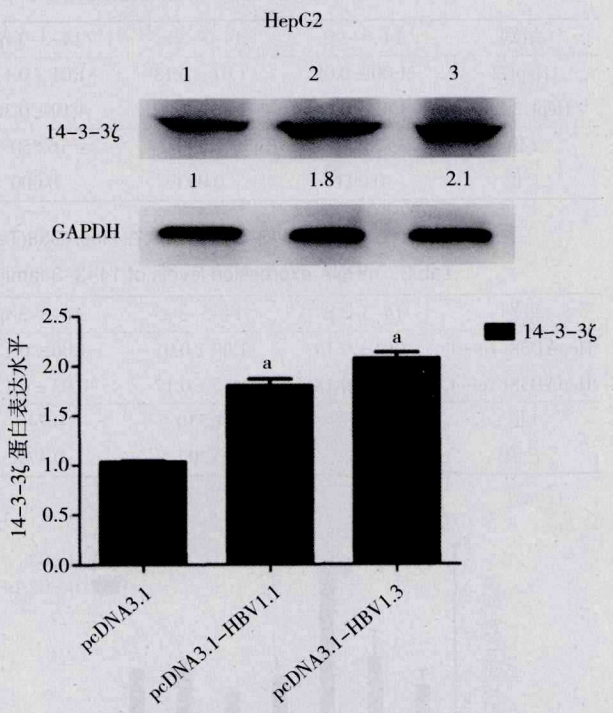
在 HepG2 细胞中瞬时转染对照质粒 pcDNA3.1、HBV 表达质粒 pcDNA3.1-HBV1.1 和 pcDNA3.1-HBV1.3 后，qRT-PCR 检测发现 HBV 表达质粒 pcDNA3.1-HBV1.1 和 pcDNA3.1-HBV1.3 处理组中 14-3-3ζ mRNA 水平表达相对值(分别为 4.411 ± 0.529、3.664 ± 0.104)高于 pcDNA3.1 对照组(1.000 ± 0.039)，差异具有统计学意义(F=98.800，P=0.000)，见表 4。Western blot 检测也发现 pcDNA3.1-HBV1.1 和pcDNA3.1-HBV1.3 能明显增加 14-3-3ζ 的蛋白表达水平(图3)。

表 4　HBV 对 HepG2 中 14-3-3ζ mRNA 表达的影响（n=3）

Tab.4　Effect of HBV on the mRNA expression of 14-3-3ζ in HepG2（n=3）

组别	qRT-PCR检测 14-3-3ζ 的表达
pcDNA3.1	1.00 ± 0.04
pcDNA3.1-HBV1.1	4.41 ± 0.53[a]
pcDNA3.1-HBV1.3	3.66 ± 0.10[a]
F 值	98.800
P 值	0.000

注：a，与 pcDNA3.1 比较，$P<0.01$



1：pcDNA3.1；2：pcDNA3.1-HBV1.1；3：pcDNA3.1-HBV1.3

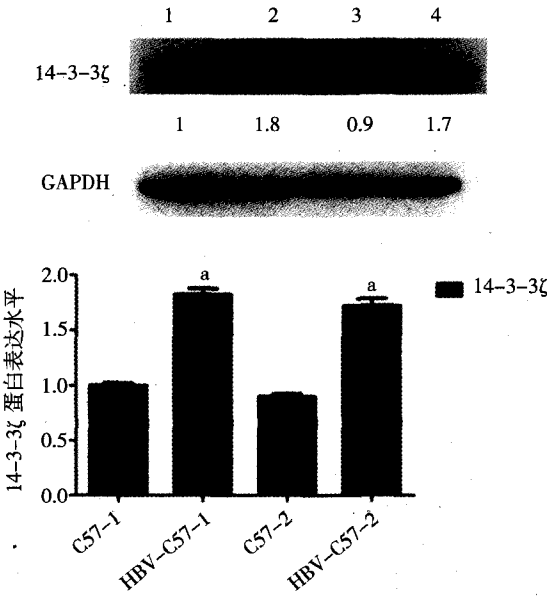
a：与 pcDNA3.1 对照组比较，$P<0.01$

图 3　HBV 对 HepG2 中 14-3-3ζ 蛋白表达的影响（n=3）

Fig.3　Effect of HBV on the protein expression of 14-3-3ζ in HepG2（n=3）

2.4 HBV 对小鼠肝组织中 14-3-3ζ 表达的影响

选取 HBV 转基因小鼠 C57 和普通的 C57BL/6J 做对照，来检测 HBV 在动物水平对 14-3-3ζ 表达的影响。Western blot 分析发现 14-3-3ζ 的蛋白水平在 HBV 转基因小鼠 C57 中明显高于普通 C57 小鼠（图 4）。



1:C57-1;2:HBV-C57-1;3:C57-2;4:HBV-C57-2

a:与 C57-1 或 C57-2 比较，$P<0.01$

图 4 HBV 复制对小鼠肝组织中 14-3-3ζ 表达的影响

Fig.4 Effect of HBV on the expression of 14-3-3ζ in mouse liver

3 讨 论

病毒对宿主的感染和致病能力，宿主对病毒的抵抗能力取决于病毒与宿主的相互作用[3]。病毒可通过上调或下调某些宿主因素，从而影响病毒自身复制和疾病的发生。14-3-3 家族广泛分布在各种组织细胞中，已经证实，有 200 多种蛋白与 14-3-3 蛋白有关联，14-3-3 蛋白与靶蛋白结合后改变靶蛋白的催化活性、细胞定位以及对蛋白酶和磷酸酶的敏感性，而这些靶蛋白的功能涉及细胞周期调控，细胞内信号传导、应激反应、凋亡、转录调节等诸多方面[10]。14-3-3 蛋白作为功能调节蛋白，在调节一些与病毒感染有关的细胞增殖中发挥了关键性的作用。近年来，有研究报道 14-3-3σ 在 HDV 感染病人中的肝细胞中表达减少，促进了 HDV 相关性肝癌的发生发展[6]；14-3-3ε 能直接或间接与 HIV 辅助蛋白相互作用，导致细胞死亡，引起 HIV 患者神经认知障碍[8]；14-3-3ε 能与登革热病毒（dengue virus，DV）的 NS3 蛋白结合防止视黄酸诱导基因蛋白（retinoic acid-inducible gene I，IRIG-1）向其适配器MAVS 转位，从而阻断治疗相关的抗病毒信号通路[9]。这些发现说明 14-3-3 蛋白是病毒感染重要的宿主因素之一。

本课题组主要研究 HBV 复制对肝癌细胞中 14-3-3 家族蛋白表达的影响。实验结果显示，在 14-3-3 蛋白家族中，HBV 复制对 14-3-3η、γ、ζ 的表达有统计学差异，对 14-3-3β、ε、θ、σ 的表达没有统计学差异。在有统计学差异的 3 种 14-3-3 蛋白中，只有14-3-3ζ 的表达在 2 组［HepG2.2.15 和 HepG2，HepAD38（Tet-）和 HepAD38（Tet+）］中，HBV 复制组都明显高于对照组；其余 14-3-3η、γ 的表达在 HepG2.2.15 组明显高于 HepG2 组，但在 HepAD38（Tet-）和 HepAD38（Tet+）组没有统计学差异。HepG2.2.15 是由西奈山医学院的研究人员构建，通过转染将两对“头尾相接”的 HBV 基因组 dimer 整合入 HepG2 细胞基因组[12]。HepAD38 包含 1.1 拷贝的整合 HBV 基因组，其表达由诱导型CMV-tet 启动子调控，病毒产量高于 HepG2.2.15，分化培养所需时间也较短[11]。虽然 HepG2.2.15 和 HepAD38 同为 HBV 复制细胞系，但两细胞的来源及表现特征是有差异的，所以有可能是细胞本身的差异导致两组细胞中 14-3-3η、γ 的表达差异不一致。另外在肝癌细胞 HepG2 中瞬时转染 HBV 复制质粒和 HBV 转基因 C57 小鼠的肝细胞中 14-3-3ζ 的表达有明显提高，说明HBV 能提高 14-3-3ζ 的表达。

14-3-3 蛋白是一种高度保守的酸性蛋白，在多种肿瘤中发现 14-3-3 过表达，已证明在食管癌、乳腺癌 14-3-3ζ 表达明显升高[13-14]。研究表明，14-3-3ζ 能结合 PI3K 的 p85 调节亚基，使 Akt 激活促进癌细胞存活，降低 14-3-3ζ 的表达可诱导细胞凋亡[15]。Axl 与 14-3-3ζ 结合是 Axl 发挥作用的关键，Axl 与 HCC 上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）产生，以及耐药性密切相关[16]。Huang等[17]也证明 14-3-3ζ 在 HCC 组织中高表达，参与 EMT 过程，高表达 14-3-3ζ 的 HCC 患者的预后差，且易对索拉菲尼产生抗性。因此 14-3-3ζ 在 HCC 的发生发展中发挥重要的作用。研究发现，14-3-3 家族蛋白能直接与激活诱导的胞苷脱氨酶（ac-

tivation-induced cytidinedeaminase，AID）、蛋白激酶 A（protein kinase A，PKA）、尿嘧啶 DNA 糖基化酶（uracil DNA glycosylase，Ung）和 HIV-1 相关的病毒蛋白 R（viral protein R，Vpr）相互作用。并利用这种天然存在的病毒蛋白破坏 14-3-3 和 AID 结合 S 区 DNA，从而抑制免疫球蛋白重链（immunoglobulin heavy chain，IgH）基因座的类别转换 DNA 重组（class switch DNA recombination，CSR）[18]。Ohman 等也发现，在角质细胞中 14-3-3ζ 蛋白参与抗病毒感染的天然免疫反应[19]。14-3-3ζ 在 HCC 的发生发展中发挥重要的作用，而乙型肝炎病毒的感染是 HCC 发生的主要诱因，因此 14-3-3ζ 可能参与了该阶段的免疫反应，但是其具体的作用机制鲜见报道。

综上所述，HBV 复制能诱导肝癌细胞中 14-3-3ζ 的过表达，提示 14-3-3ζ 与 HBV 存在某种关联，并可能在 HBV 相关性肝癌的发生发展中发挥重要作用。本实验主要研究 HBV 复制能诱导肝癌细胞中 14-3-3η、γ、ζ 的过表达，并且验证了 HBV 复制能诱导 14-3-3ζ 在肝癌细胞和小鼠肝组织中过表达。这种影响提示 14-3-3 家族特别是 14-3-3ζ 与 HBV 存在某种关联，并可能在 HBV 相关性肝癌的发生发展中发挥重要作用，从而为发展控制 HBV 感染的治疗策略提供新的靶点。

参 考 文 献

[1] Wei Y，Neuveut C，Tiollais P，et al. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene[J]. Pathol Biol，2010，58(4)：267-272.

[2] Dienstag JL. Hepatitis B virus infection[J]. N Engl J Med，2008，359(14)：1486-1500.

[3] Liaw YF，Chu CM. Hepatitis B virus infection[J]. Lancet，2009，373(9633)：582-592.

[4] European Association For The Study of The Liver. EASL clinical practice guidelines：management of chronic hepatitis B virus infection [J]. J Hepatol，2012，57(1)：167-185.

[5] Yaffe MB. How do 14-3-3 proteins work—Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis[J]. FEBS Lett，2005，513(1)：53-57.

[6] Mendes M，Pérez-Hernandez D，VázquezJ，et al. Proteomic changes in HEK-293 cells induced by hepatitis delta virus replication[J].J Proteomics，2013，89：24-38.

[7] Ganti K，Broniarczyk J，Manoubi W，et al. Thehuman papillomavirus E6 PDZ binding motif：fromlife cycle to malignancy[J].Viruses，2015，7(7)：3530-3551.

[8] Morales D，Hechavarria R，Wojna V，et al. YWHAE/14-3-3ε：a potential novel genetic risk factor and CSF biomarker for HIV neurocognitive impairment[J]. J Neurovirol，2013，19(5)：471-478.

[9] Chan YK，Gack MU. A phosphomimetic-based mechanism of dengue virus to antagonize innate immunity[J]. Nat Immunol，2016，17(5)：523-530.

[10] vanHeusden GP. 14-3-3 proteins：regulators of numerous eukaryotic proteins[J]. IUBMB Life，2005，57(9)：623-629.

[11] Ladner SK，Otto MJ，Barker CS，et al. Inducible expression of human hepatitis B virus(HBV) in stably transfected hepatoblastomacells：a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication[J]. Antimicrob Agents Chemother，1997，41(8)：1715-1720.

[12] Acs G，Sells MA，Purcell RH，et al. Hepatitis B virus produced by transfected Hep G2 cells causes hepatitis in chimpanzees[J]. ProcNatlAcadSci USA，1987，84(13)：4641-4644.

[13] Bajpai U，Sharma R，Kausar T，et al. Clinical significance of 14-3-3 zeta in human esophageal cancer[J]. Int J Biol Markers，2008，23(4)：231-237.

[14] Bergamaschi A，Frasor J，Borgen K，et al. 14-3-3ζ as a predictor of early time to recurrence and distant metastasis in hormone receptor-positive and -negative breast cancers[J]. Breast Cancer Res Treat，2013，137(3)：689-696.

[15] Zhao J，Meyerkord CL，Du Y，et al. 14-3-3 proteins as potential therapeutic targets[J]. Semin Cell Dev Biol，2011，22(7)：705-712.

[16] Reichl P，Dengler M，vanZijlF，et al. Axl activates autocrine transforming growth factor-β signaling in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology，2015，61(3)：930-941.

[17] Huang XY，Ke AW，Shi GM，et al. αB-crystallin complexes with 14-3-3ζ to induce epithelial-mesenchymal transition and resistance to sorafenibin hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology，2013，57(6)：2235-2247.

[18] Lam T，Thomas LM，White CA，et al. Scaffold functions of 14-3-3 adaptors in B cell immunoglobulin class switch DNA recombination [J]. PLoS One，2013，8(11)：e80414.

[19] Ohman T，Lietzén N，Välimäki E，et al. Cytosolic RNA recognition pathway activates 14-3-3 protein mediated signaling and caspase-dependent disruption of cytokeratin network in human keratinocytes[J]. J Proteome Res，2010，9(3)：1549-1564.

（责任编辑：张辉洁）