DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.019
第25卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 2
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

文章编号:1000-5404(2003)02-0135-03

论著

丙型肝炎病毒核心蛋白抑制肝癌细胞P16、P27的表达

刘重阳[1],刘为纹[2],杨建民[2],陈东风[1],房殿春[2] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所消化内科,重庆 400042;[2]附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨HCV核心蛋白对肝瘤细胞P16、P27表达的影响。方法 将HCV核心基因cDNA插入真核表达载体PBK-CMV的*Hind*Ⅲ和*Bam*HⅠ位点间,构建重组质粒PBK-HCVc。再将重组质粒PBK-HCVc和空载体分别导入肝癌细胞株HepG2中,G418筛选,RT-PCR、蛋白印迹鉴定HCV核心蛋白表达。免疫组化,蛋白印迹检测P16、P27蛋白表达;RT-PCR检测P16、P27mRNA。结果 重组质粒PBK-HCVc在HepG2细胞中有稳定表达;表达HCV核心蛋白的细胞HepG2-C的P16、P27在蛋白水平和mRNA水平较转染空载体的细胞HepG2-CMV明显下降。结论 HCV核心蛋白能抑制P16、P27表达,可能与肝细胞的癌变有关。

关键词:丙型肝炎病毒;病毒核心蛋白;肝细胞癌;端粒酶
中图法分类号:R373.21;R394.3;R735.7 文献标识码:A

HCV core protein inhibits expression of P16 and P27 in HepG2 cells

LIU Chong-yang, LIU Wei-wen, YANG Jian-min, CHEN Dong-feng, FANG Dian-chun (Department of Gastroenterology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of HCV core protein on P16 and P27 expressions in HepG2 cells. **Methods** The HCV core gene cDNA was recoverd by PCR, and cloned into PBK-CMV. The recombinant plasmid (PBK-HCVc) and the empty vector were transfected into HepG2 cells with liposome. Screening was performed with G418. HCV core protein expression was detected by reverse transcription PCR and Western blotting. The protein expressions of P16 and P27 were analyzed by immunohistochemistry and Western blotting. P16 and P27mRNA expressions were analyzed by reverse transcription PCR. **Results** Stable expression of the recombinant plasmid was found in HCV core protein. The P16 and P27 of HepG2-C cells were lower than those of HepG2-CMV. **Conclusion** HCV core protein can inhibit the expressions of P16 and P27 in HepG2 cells, suggesting that HCV core protein contributes to viral carcinogenesis.

Key words: hepatitis C virus; viral core protein; hepatocellular carcinoma; P16; P27

丙型肝炎病毒(HCV)感染具有明显的慢性化倾向,与肝细胞癌(HCC)发生关系密切,近年发现HCV核心蛋白具有基因调节功能,推测其可能有致癌作用[1]。p16、p27是重要的抑癌基因,其表达水平与肝癌的发生呈负相关。本研究将p16、p27作为检测指标,探讨HCV核心蛋白可能的致癌作用。

1 材料与方法

1.1 质粒

PBK-CMV为真核表达载体(Stratagene产品),PCD-HCV为含有HCV结构区的质粒载体(由浙江医科大学陈智教授惠赠)。

1.2 质粒构建

参照文献[2]进行质粒构建。以PCD-HCV为模板,PCR法扩增全长HCV核心基因(5′-引物 CTCAAGCTTCACCATGAGCACG—AATTCT, 3′-引物 CTCGGATCCTTAAGCGGAAGCTGGAT)。PCR产物经*Hind*Ⅲ、*Bam*HⅠ酶切后,定向插入PBK-CMV的*Hind*Ⅲ、*Bam*HⅠ位点,得到表达HCV核心蛋白的真核表达载体PBK-HCVc。以*Hind*Ⅲ、*Bam*HⅠ酶切鉴定,并进行序列测定。

1.3 细胞培养及转染

肝癌细胞株HepG2由我科实验室保存,培养于含10%新生小牛血清的1640培养液中,采用脂质体转染方法(德国宝灵曼公司试剂盒),在含G418 400 U/ml培养液中筛选抗性细胞,挑取单细胞克隆扩增鉴定。同时以PBK-CMV空载体作以照。

1.4 转染细胞HCVcore基因的鉴定

RT-PCR检测C基因表达:宝灵曼公司Tripure抽提试剂盒提取细胞总RNA。宝灵曼公司一步法试剂盒进行RT-PCR,PCR引物由上海生工公司合成。蛋白印迹鉴定:抽提细胞蛋白,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900176)
作者简介:刘重阳(1967—),男,辽宁省辽阳市人,博士,讲师,主治医师,主要从事肝癌的防治方面的研究,发表论文18篇,电话:(023)68757362
收稿日期:2002-03-13;修回日期:2002-06-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PAGE 电泳，电转膜至 PVDF 膜，用武汉博士德公司 Western blot 试剂盒检测。抗 HCV core 单克隆抗体由 H. B. Greenberg 教授赠送(Stanford University，美国)。

1.5 P16、P27 蛋白水平的检测

1.5.1 免疫组化 采用武汉博士德免疫组化试剂盒，DAB 显色。

1.5.2 蛋白印迹 兔抗人 P16、P27 多抗为 Santa cruz 产品。

1.6 p16、p27 mRNA 水平的检测

RT-PCR 检测 P16、P27 mRNA：提取细胞总 RNA，紫外分光光度计定量后一步法试剂盒进行 RT-PCR，同时扩增看家基因 GAPDH 作为外参照，电泳后进行光密度扫描分析。

2 结果

2.1 PBK HCV c 基因重组鉴定

酶切结果与理论值相符，表明构建成功。序列测定结果表明重组体内的 HCV 核心基因与原序列相同。

2.2 PBK-HCV c 抗性克隆细胞及基因表达鉴定

2.2.1 PBK-HCV c 表达鉴定 提取细胞 RNA，RT-PCR 扩增，可见转染 PBK-HCVc 的细胞(HepG2-C)有 mRNA 表达，而转染空载体的细胞(HepG2-CMV)则为阴性，表明 HCVcore 基因导入 HepG2 细胞后，有稳定表达。

2.2.2 免疫组化结果 可发现 HepG2-C 细胞浆中有 HCV 核心蛋白表达，而转染空载体的 HepG2-CMV 细胞则为阴性，表明 HCVcore 基因转入细胞后有 HCV 核心蛋白表达。

2.2.3 蛋白印迹鉴定 HepG2-C 细胞中有 HCV 核心蛋白表达，而转染空载体的 HepG2 细胞则为阴性，表明 HCVcore 基因转入细胞后能表达 HCV 核心蛋白。

2.3 P16、P27 蛋白水平的变化

免疫组化：细胞计数以 100 个细胞/低倍视野，共 5 个视野的阳性细胞作统计处理，结果见表 1。蛋白印迹见图 1，2。P16、P27 表达显著降低($P<0.05$)。

表 1 丙型肝炎病毒核心蛋白对 P16、P27 的影响

Tab 1 Effect of HCV core protein on P16、P27 expressions (immunohistochemical)

	Positive rate(%, $\bar{x}\pm s$)	
	HepG2-CMV	HepG2-C
P16	81±7	67±5
P27	82±9	66±6



1: HepG2-C; 2: HepG2-CMV

图 1 Western Blot 检测 P16 表达

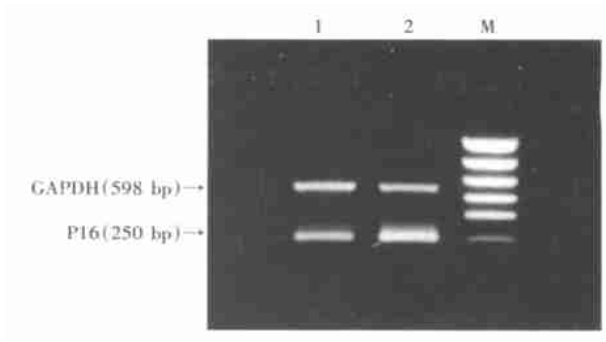
Fig 1 Detection of P16 expression with Western blotting

图 2 Western Blot 检测 P27 表达

Fig 2 Detection of P27 expression with Western blotting

2.4 P16、P27mRNA 水平的变化

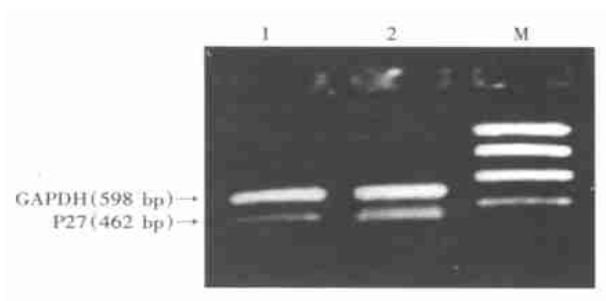
RT-PCR 检测 P16、P27mRNA，见图 3，4。30 个循环扩增后 HepG2-C 细胞扩增条带较 HepG2-CMV 细胞强。提示 HCV C 蛋白可能有抑制 P16、P27 转录的作用。



1: HepG2-C; 2: HepG2-CMV; M: Marker

图 3 半定量 RT-PCR 检测 P16 mRNA

Fig 3 Semi-quantitative detection of P16 mRNA with RT-PCR



1: HepG2-C; 2: HepG2-CMV; M: Marker

图 4 半定量 RT-PCR 检测 P27 mRNA

Fig 4 Semi-quantitative detection of P27 mRNA with RT-PCR

3 讨论

HCV 核心蛋白也称 C 蛋白，是 HCV C 区基因编码产物，含 191 个氨基酸，分子量约为 22×10^3，被认为是 HCV 的核壳蛋白。Ray 等[3]采用报道基因共转染的方法将编码 C 蛋白的 cDNA 与原癌基因 c-myc 共同转染猴 COS 细胞，发现 C 蛋白能够激活 c-myc 基因的启动子活性，且呈剂量依赖效应，而反义的 C 基因表达产物则无此作用。日本学者 Moriya 等[4]报道应用两种独立品系小鼠进行转基因实验，结果发现转入 HCV C 基因的两种独立品系小鼠早期出现肝脂肪变，进而出现腺瘤，16 个月时，两种独立品系小鼠均出现肝肿瘤，先为腺瘤，进而出现肝癌。这一研究提示 C 蛋白具有调节细胞生长和分化的作用，提供了其致癌的直接依据。

P16 是第一个被证实与肝癌发生的早期阶段相关的抑癌基因。Hui 等[5]发现在进展期肝癌中 P16 蛋白缺失率为 40%，在所有检测的肝癌细胞株及切除标本中，均未发现 P16 基因缺失与突变，即使在 P16 蛋白缺

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

失的标本中, 也可检测到 P16 mRNA, Hui 据此认为在肝癌中 P16 主要通过转录后调节机制失活。杨建民等[6] 的研究发现 P16 蛋白在 HCV 抗原阳性肝癌组织中的表达缺失率(16/20)明显高于 HCV 抗原阴性组(11/26), 作者认为 HCV 的致癌机理可能和 P16 的表达受抑有关。

P27 位于染色体 12P13 区带, 其功能主要是通过抑制 CDK 活性来控制细胞由 G_1 期进入 S 期, 抑制 PCNA 活性, 从而抑制 DNA 合成。Kanai 等[7] 利用 RT-PCR 技术研究了肝癌组织中 P27 mRNA 表达水平, 发现 52% 的肝癌组织 P27 mRNA 表达水平明显低于相应的非肝癌组织的表达水平, 肝癌组织 P27 mRNA 的平均表达水平也显著低于非肝癌组织的平均表达水平, 说明 P27 功能异常参与了肝癌的发生过程。

本实验比较了稳定表达 C 蛋白的 HepG2-C 细胞与转染空载体的细胞 P16、P27 表达与转录的差异, 结果提示 C 蛋白能抑制 P16、P27 的转录与表达。由于 C 蛋白抑制了 P16 和 P27 的表达, 推测 C 蛋白可能参与了致癌过程。

参考文献:

[1] 刘重阳, 刘为纹, 杨建民. 丙型肝炎病毒在肝细胞癌发生中的作用[J]. 国外医学病毒学分册, 1999, 6(4): 105－107.

[2] J. 萨姆布鲁克著, 金东雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996 311－312.

[3] Ray R B, Lagging L M, Meyer K, *et al*. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein[J]. Virus Res, 1995, 37(3): 209－220.

[4] Moriya K, Fujie H, Shintani Y, *et al*. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice[J]. Nat Med, 1998, 4(9): 1065－1067.

[5] Hui A M, Sakamoto M, Kanai Y, *et al*. Inactivation of p16Ink4 in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 1996, 24(2): 575－579.

[6] 杨建民, 汪荣泉, 卜保国, 等. HCV 感染对肝癌一些相关基因产物表达的影响[J]. 肿瘤, 2000, 20(1): 40－41.

[7] Kanai Y, Hui A M, Sun L, *et al*. DNA hypermethylation at the D1755 locusand reduced HIC-1 mRNA expression are associated with Hepatocarcinogenesis[J]. Hepatology, 1999, 29(3): 703－709.

(编辑　陈聪连)

(上接 134 页)

1.5　统计学处理

用 χ^2 检验。

2　结果

各组止恶心及止吐效果及不良反应发生情况见表 2。

表 2　止恶心疗效(止吐疗效)及不良反应发生率比较

组别	n	CR	PR	MR	F	有效率(%)	不良反应发生率(%)
A	52	38(45)	10(4)	4(3)	0(0)	92.3(94.2)	25
B	47	35(40)	6(2)	5(4)	1(1)	87.2(89.3)	36.2
C	50	8(12)	16(22)	20(11)	6(5)	48.0(68.0)	52

总体 $\chi^2=32.175$ $P<0.01$ 三组有效率有显著差异; A、B 两组 $\chi^2=0.699$, $P>0.05$ 有效率无显著差异; B、C 两组 $\chi^2=18.672$, $P<0.01$ 有效率有显著差异; A、C 两组 $\chi^2=24.103$, $P<0.01$ 有效率有显著差异。不良反应发生率统计结果: A、B 两组 $\chi^2=1.46$, $P>0.05$ 无显著差异; B、C 两组 $\chi^2=2.46$, $P>0.05$ 无显著差异; A、C 两组 $\chi^2=7.87$, $P<0.01$ 有显著差异。

3　讨论

格拉司琼是 5-HT3 受体拮抗剂, 它通过和 5-HT3 受体相结合而止吐。文献报道其有效率均在 90% 以上[5], 由表 2 统计结果可看出其止恶心及止吐有效率分别为 92.3%、94.2% 为 3 组中最高, 显著高于胃复安+地塞米松组($P<0.05$); 格拉司琼用药后的不良反应较低, 不良反应发生率为 25%, 显著优于胃复安+地塞米松组($P<0.05$)。格拉司琼用药量为 3 mg/d 98 元, 其药效价格比较为适中, 可作为非顺铂的联合化疗止吐的首选用药。

恩丹西酮是一种新型的抗呕吐药, 它能选择性阻断胃肠中迷走神经及中枢感受区内 5-HT3 释放, 通过拮抗外周和中枢神经元 5-HT3 受体而起到镇吐作用[6,7]。由表 2 统计结果可看出其止恶心及止吐有效率分别为 87.2%、89.3%, 与格拉司琼组有效率无显著差异, 但显著高于胃复安+地塞米松组($P<0.05$); 恩丹西酮用药后有一定的不良反应, 不良反应发生率为 36.2%, 处于中等水平与格拉司琼组及胃复安+地塞米松组不良反应发生率比较均无显著差异。恩丹西酮用药量为 8 mg/d 115 元, 其药效价格比较之格拉司琼偏低, 可作为非顺铂的联合化疗止吐的次选用药。

胃复安、地塞米松通过阻断中枢化学敏感区和胃肠迷走神经末梢的多巴胺受体而发挥止呕作用。在 3 组中其止恶心及止吐有效率最低为 48%、68%, 不良反应发生率最高为 52%。但这类药价格便宜, 用药量仅为 10 mg/d 0.23 元+5 mg/d 0.42 元, 其药效价格比为 3 组用药中最高, 可作为经济负担较为困难的化疗病人的止吐用药。

关键词: 格拉司琼; 恩丹西酮; 胃复安; 地塞米松; 化疗
中图法分类号: R975.4　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 曾万勇, 孙　燕. 联合应用止吐药控制高剂量顺铂引起胃肠反应的初步报告[J]. 实用肿瘤杂志, 1990, 5(3): 146.

[2] 杨旭才. 几组止吐药在肿瘤病人化疗中的疗效比较[J]. 癌症, 1993, 12(3): 253.

[3] 周际昌. 实用肿瘤内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998 33.

[4] 沈祖刚. 欧必亭联合治疗化疗所致的胃肠道反应[J]. 中国肿瘤临床, 2001, 28(3): 236.

[5] 张沂平, 孙　琳, 虞荣喜, 等. 国产格拉司琼预防化疗所致呕吐的临床疗效[J]. 中国肿瘤临床, 1999, 26(9): 702

[6] 苏维国, 赵庆训. 盐酸恩丹西酮[J]. 中国新药杂志, 1996, 5: (2)111.

[7] 胡晓飞, 方海飞. 恩丹西酮与胃复安合用缓解化疗后消化道反应的临床观察[J]. 南方护理学报, 2001, 8(1): 33－34.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net