DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.025
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

文章编号:1000-5404(2001)09-1055-03

论著

丙型肝炎病毒核心蛋白对 $HePG_2$ 细胞增殖和细胞周期的影响

刘重阳,刘为纹,杨建民,陈东风,房殿春 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察核心蛋白对细胞增殖和细胞周期调控的影响。方法 观察表达HCV核心蛋白的细胞株 $HePG_2$-C和作为对照的细胞株 $HePG_2$-CMV的细胞形态;绘制细胞生长曲线;检测细胞周期;用流式细胞仪、免疫组化染色检测PCNA,P16,P27,P53;半定量RT-PCR检测P16,P27,P53mRNA。结果 转染重组质粒PBK-HVCC的 $HePG_2$-C细胞与转染空载体PBK-CMV的 $HePG_2$-CMV细胞相比细胞形态未见明显变化。生长曲线显示 $HePG_2$ 细胞在转染PBK-HCVC和空载体PBK-CMV后,生长速度无明显变化。检测转染空载体的细胞 $HePG_2$-CMV 81.3%进入 G_0/G_1 期,7.7%进入S期;而转染PBK-HCV C的细胞 $HePG_2$-C 73%进入 G_0/G_1 期,13.7%进入S期。在进一步分子机制的探讨中发现 $HePG_2$-C细胞PCNA、P53表达显著增加,P16、P27表达显著降低。同样的变化也发生在转录水平。结论 HCV核心蛋白可能通过调节某些基因的转录与表达,增加细胞DNA合成,扰乱细胞周期,进而参与致癌过程。

关键词:丙型肝炎病毒核心蛋白;肝癌;细胞周期;基因
中图法分类号:R322.47;R329.28;R373.21 文献标识码:A

The effect of Hepatitis C virus core protein on morphology, proliferation and cell cycle of $HePG_2$ cells

LIU Chong-yang, LIU Wei-wen, YANG Jian-min, CHEN Dong-feng, FANG Dian-chun (Department of Gastroenterology, Southwestern Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of Hepatitis C virus core protein on morphology, proliferation and cell cycle of $HePG_2$ cells. Methods The morphology of $HePG_2$-C and $HePG_2$-CMV cells was observed by microscope. The growth curve was also made. Flow cytometry was used to determine cell cycle, the expression and transcription of PCNA, P53, P27, P16 were determined by immunohistochemical method. Results No obvious difference was found between $HePG_2$-C and $HePG_2$-CMV cells in morphology and growth rate. Flow cytometry analysis showed that 81.3% $HePG_2$-CMV cells was in G_0-G_1 phase, 7.7% was in S phase; and 73% $HePG_2$-C cells was in G_0—G_1 phase, 13.7% in S phase. HCV core protein was found to promote PCNA and P53 expression and transcription, and depress P16 and P27 expression and transcription. Conclusion HCV core protein could promote DNA synthesize, cell cycle, and involves in carcinogenesis.

Key words: hepatitis C virus core protein; hepatocellular carcinoma; cell cycle; gene

肿瘤细胞代谢的一个特点是增殖调节失控,细胞周期调控机制紊乱,为探讨丙型肝炎病毒核心蛋白(Hepatitis virsu C core protein,HCVC)可能的致癌作用,我们选用能稳定表达核心蛋白的细胞 $HePG_2$-C与仅转染空载体的对照细胞 $HePG_2$-CMV作为实验对象,观察核心蛋白对细胞增殖和细胞周期调控的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞制备

表达HCV核心蛋白的细胞株 $HePG_2$-C,作为对照的仅转染空载体的细胞株 $HePG_2$-CMV[1]。

1.2 细胞形态观察

常规HE染色。

1.3 细胞生长曲线

按《细胞培养》介绍的方法,常规消化细胞并计数,然后以每孔 3×10^3 个细胞分别接种 $HePG_2$-C和 $HePG_2$-CMV细胞接种于96培养板中,每个样本设3个复孔。将培养板移入 CO_2 孵箱中,在37 ℃,5% CO_2 及饱合湿度下培养。培养1 d后,每日取1块板,每孔加入MTT溶液20 μl,继续孵育4 h,吸弃孔内培养液,每孔加入150 μl DMSO,振荡10 min,使结晶充分溶解。选择490 nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸收值,记录结果。以时间为横轴,光吸收值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期

1.4.1 细胞同步化处理 细胞在培养瓶内生长至70%~80%,倾弃培养基,加入无血清培养基。37 ℃ 5% CO_2 培养箱培养16 h。

1.4.2 细胞制备与固定 消化贴壁细胞,离心、洗涤。0.01 mol/L PBS 2.5 ml重悬细胞,缓慢加入预冷的95%乙醇7.5 ml,使终浓度为70%。

1.4.3 流式细胞仪检测 清洗细胞后,与含1% RNA酶的Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)共同孵育(37 ℃ 30 min)。然后用溴化乙锭(EB)作细胞DNA染色。应用流式细胞仪测定各细胞周期所占百分比。

1.5 流式细胞仪检测 PCNA,P16,P27,P53

1.6 免疫组化染色检测 PCNA,P16,P27,P53

免疫组化染色按阳性和阴性计数,100个细胞/低倍视野,共5个视野。

1.7 半定量 RT-PCR 检测 P16,P27,P53

将看家基因GAPDH做为外参照,扩增30个循环。

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,主治医师,主要从事肝癌防治方面的研究,发表论文18篇,现在附属大坪医院野战外科研究所消化内科工作,重庆 400042。电话:(023)68757342
收稿日期:2001-06-15;修回日期:2001-08-31

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

1.8 统计学处理

采用 χ^2 检验和 t 检验。

2 结果

2.1 形态学观察

细胞呈梭形或多角形，大小不等，胞浆淡红染，核增大，核型不规则，深染，可见核分裂像及多个核仁。$HePG_2$-C 细胞与 $HePG_2$-CMV 细胞相比无明显变化。

2.2 生长曲线

$HePG_2$ 细胞在转染 PBK-HCVC 和空载体 PBK-CMV 后，生长速度无明显变化，提示 HCV 核心蛋白可能对 G418 抗性细胞生长无明显影响，见图 1。

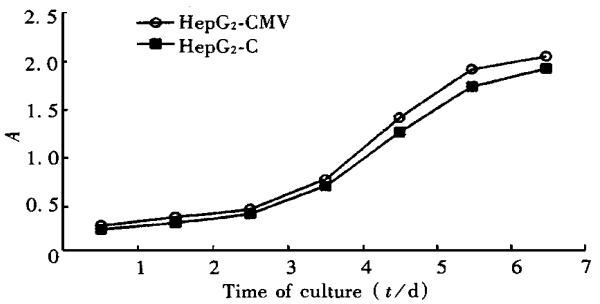


图 1 细胞生长曲线

Fig 1 Growth curve of cell

2.3 细胞周期

流式细胞仪检测转染 PBK-HCVC 细胞和空载体细胞的细胞周期结果，见表 1。

表 1 $HePG_2$-CMV 与 $HePG_2$-C 细胞的细胞周期

Tab 1 The cell cycle of $HePG_2$-CMV and $HePG_2$-C cells

Cell	G_0/G_1	S	G_2M	PI(%)
$HePG_2$-CMV	81.3	7.7	11.0	18.7
$HePG_2$-C	73.0	13.7	13.3	27.0

PI=(S+G_2M)/(G_0/G+S+G_2M)；*：$P<0.01$ vs $HePG_2$-CMV

结果发现，表达 C 蛋白组 G_0/G_1 细胞减少，S 期细胞明显增多，细胞增殖指数(PI)显著增加。提示 C 蛋白可能通过某种机制刺激细胞 DNA 合成，促进细胞增殖。

2.4 流式细胞仪检测 PCNA，P53，P16，P27

$HePG_2$-C 细胞 PCNA、P53 表达显著增加，P16、P27 表达显著降低，结果见表 2。

表 2 流式细胞仪检验 HCV 核心蛋白对 PCNA、P53、P16、P27 表达的影响

Tab 2 The effect of HCV core protein on PCNA, P53, P16 P27 expression(FCM)

	$HePG_2$-CMV		$HePG_2$-C		P
	Positive rate(%)	Hean flurescence intensity	Positive rate(%)	Hean flurescence intensity	
PCNA	42.2	65	73.6	60	<0.01
P53	75	43	100	64	<0.01
P16	78.4	63	54.6	49	<0.01
P27	57.7	62	35.7	59	<0.01

2.5 免疫组化染色检测 PCNA、P53、P16、P27

$HePG_2$-C 细胞 PCNA、P53 表达显著增加，P16、P27 表达显著降低，结果见表 3。

表 3 免疫组化检测 HCV 核心蛋白对 PCNA、P53、P16、P27 表达的影响

Tab 3 The effect of HCV core protein on PCNA, P53 P16, P27 expression(immunohistochemical)

	Positive rate(%)		P
	$HePG_2$-CMV	$HePG_2$-C	
PCNA	70±6	81±7	<0.05
P53	78±7	93±8	<0.05
P16	81±7	67±5	<0.05
P27	82±9	66±6	<0.05

2.6 半定量 RT-PCR 检测 P53，P16，P27mRNA

抽提细胞总 RNA，经 RT-PCR 扩增，并以 GAPDH 作为外参照，1.5%琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，紫外灯下观察。结果：与 $HePG_2$-CMV 细胞相比 $HePG_2$-C 细胞 P53 mRNA 转录上升 P16 mRNA 转录下降，P27 mRNA 转录下降。

3 讨论

截止 2001 年 4 月，尚未见有关 HCV 核心蛋白对肿瘤细胞形态影响的报道。本实验也未发现 HCV 核心蛋白对 $HePG_2$ 细胞形态有明显影响，推测 HCV 核心蛋白的作用可能不足以改变肿瘤细胞的形态。

Farinati 等[2]比较了 HCV 与 HBV 和酒精引起的慢性肝病标本的肝细胞增殖情况。发现丙型肝炎患者肝细胞增殖率明显高于乙型和酒精性肝炎患者的肝细胞增殖率，提示 HCV 感染可能具有促肝细胞增殖的作用，能增加发生癌变的危险性。我们用 HCVC 基因 cDNA转染 $HePG_2$ 细胞后，与转染空载体的 $HePG_2$ 细胞相比，细胞生长曲线无明显变化，提示 HCVC 蛋白可能无明显促进 $HePG_2$ 细胞增殖的效应。Wen 等[3]报告在无 P53 表达的肝癌细胞株 Hep3B 和表达野生型 P53 的肝癌细胞株 $HePG_2$ 中，HCV C 蛋白抑制 Hep3B 细胞的生长，对 $HePG_2$ 细胞的生长则无影响。这与我们的结论相似。

本研究采用稳定表达 HCVC 蛋白的 $HePG_2$-C 细胞，经无血清培养同步化处理后，与转染空载体的对照细胞相比，进入静止期的细胞少，而 S 期细胞明显增多，提示 HCVC 蛋白可能通过某种机制刺激细胞 DNA 合成，促进细胞进入 S 期。

PCNA 在细胞周期中实际上代表 DNA 合成，在细胞周期中起推进作用[4]。我们的结果发现 HCV C 蛋白可促进 PCNA 表达增高，这与 HCV C 蛋白对细胞周期的推进作用相吻合。

杨建民等[5]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)，认为 HCV 的致癌机制可能和 P16 的表达受抑有关。本实验比较了稳定表达 C 蛋白的 $HePG_2$-C 细胞与转染空载体的细胞 P16、P27 表达与转

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

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，因此间接提高了细胞周期素依赖性激酶(CDK)的功能，进而促进细胞进入 S 期。

Ray 等[6] 发现 C 蛋白在 COS7 细胞和 Hela 细胞中能够抑制 P53 基因启动子的转录，认为这很可能是 HCV 致癌的一个重要机制。相似的研究报告称 C 蛋白还能够抑制 P21 基因启动子的转录[7]。但近期 Wen 等[3] 报告在无 P53 表达的肝癌细胞株 Hep3B 和表达野生型 P53 的肝癌细胞株 $HePG_2$ 中，HCV C 蛋白对内源性和外源性 p53 均表现为激活作用，并通过 p53 依赖途径激活 p21。我们的结果与 Wen 等的研究结论相似，在表达野生型 P53 的肝癌细胞株 $HePG_2$ 中，HCVC 蛋白对 p53 表现为激活作用。如何解释 HCV C 蛋白对 P53 基因表达影响的差异，尚需进一步的研究讨论。

虽然 HCV 核心蛋白被认为有致癌作用，但其致癌机制仍存在较大争议。我们的研究提示 HCV 核心蛋白可能通过调节某些基因的转录与表达，增加细胞 DNA 合成，扰乱细胞周期，进而参与致癌过程。

参考文献：

[1] 刘重阳，刘为纹，杨建民，等. HCV 核心基因 cDNA 真核表达载体的构建及其表达[J]. 世界华人消化杂志，2000，8(9)：1 049－1 050.
[2] Farinat F, Cardin R, D' Errico A, *et al*. Hepatocyte proliferative activity in chronic liver damage as assessed by the monoclonal antibody MIB1 Ki67 in archival material: the role of etiology, disease activity, iron, and lipid peroxidation[J]. Hepatology, 1996, 23(6): 1 468－1 475.
[3] Wen L, Shih Y L, Min C, *et al*. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein[J]. Virology, 1999, 264: 134－141.
[4] 黄杰雄，黄致治. 增殖细胞核抗原的研究进展[J]. 国外医学：生理病理科学与临床分册，1994，14(1)：9.
[5] 杨建民，汪荣泉，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.
[6] Ray R B, Steele R, Meyer K, *et al*. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein[J]. J Bio Chem, 1997, 272(17): 10 983－10 986.
[7] Ray R B, Steele R, Meyer K, *et al*. Hepatitis C virus core protein represses p21WAF1/Cip1/Sid1 promoter activity[J]. Gene, 1998, 208(2): 331－336.

(编辑 薛国文)

文章编号：1000-5404(2001)09-1057-01

个案与短篇

C5a 对血管内皮细胞表达 P-选择素的影响

Effect of C5a on p-selectin expression in endothelial cells *in vitro*

黎 庶，汪正清 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室，重庆 400038)

中性粒细胞与血管内皮细胞间的粘附及跨内皮移行是炎症反应的关键环节，选择素等粘附分子在其中发挥着重要的作用。炎症局部产生的 TNF、凝血酶、激活的补体片段等多种因素都能上调粘附分子的表达，但 C5a 对 P-选择素表达的影响尚不十分清楚，本实验在体外用不同浓度 C5a 与培养的人脐静脉内皮细胞用，测定 P-选择素及中性粒细胞粘附率的动态变化，研究 C5a 对 P-选择素表达和对中性粒细胞粘附的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞株 ECV304：本室冻存；重组人 C5a[美国 sigma 公司]；小鼠抗人 P-选择素单克隆抗体[美国 Pharmingen 公司]；其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 按常规方法进行。

1.2.2 多形核中性粒细胞(Polymorphonuclear neutrophil：PMN)的分离与纯化 按常规 Percoll 密度梯度离心法分离中性粒细胞配制工作悬液(1.0×10^6 个/ml)。

1.2.3 P-选择素的检测 将培养至融合的细胞分两组，1 组用 10、25、50、100、250、500 nmol/L 的 C5a 分别刺激 10 min 以观察量效关系；另 1 组选用 250 nmol/L 的 C5a 分别作用 5、10、15、30 min 观察时效关系。ELISA 夹心法[1] 测定内皮细胞 P-选择素表达水平。490 nm 处检测吸光度。同时设阴性对照组(用 PBS 代替一抗)。

1.2.4 白细胞粘附率的测定 将内皮细胞培养至融合后，C5a 的作用剂量及时间与上述相同，弃培养基，每孔加 PMN 工作悬液 100μl，孵育 30 min，取上清液，并用 200μl 无血清，无抗生素的 DMEM 培养基轻洗 2 次，连同上清液一并进行白细胞计数(重复 3 次)。粘附率 = (1×10^5－收集的白细胞数)/1×10^5。

1.2.5 统计学处理 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用单因素方差分析。

2 结果

2.1 C5a 刺激内皮细胞 P-选择素的表达及中性粒细胞粘附率的量效关系

结果显示，P-选择素的表达水平随 C5a 浓度的增加而逐渐增高。尤当 C5a 浓度为 10 nmol/L 时最显著(P-选择素由正常时的 0.326±0.07 升至 0.506±0.01)，而当 C5a 浓度≥250 nmol/L 时，这种上升趋势明显减弱。但各浓度点的测值与正常对照比

(下转 1060 页)

作者简介：黎 庶(1972－)，女，重庆市人，硕士研究生，助教，主要从事微生物致病机制及防治方面的研究。电话：(023)68752239
收稿日期：2001-06-20；修回日期：2001-08-30

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