

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001892

顺铂通过 CREB1 诱导乙肝病毒再激活的实验研究

潘 娥,陈雪梅,高庆祝,魏 杰,胡 杰,梁 利,汪 凯,黄爱龙,唐 霓

(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:探索顺铂诱导乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)再激活的机制。**方法:**将稳定表达 HBV 的肝癌细胞系 HepAD38 分为 2 组,即磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)对照组及顺铂(Cisplatin)处理组,分别检测 cAMP 应答元件结合蛋白质-1(cAMP responsive element binding protein 1, CREB1)、乙肝病毒蛋白表达(HBsAg、HBcAg)及病毒复制水平(HBV DNA、HBV mRNA);同样在成功构建稳定敲低 CREB1(shCREB1)的 HepAD38 细胞中,同正常表达 HBV 的肝癌细胞系 HepAD38 进行对照,检测经顺铂处理后的 HBV 复制水平(HBV DNA、HBV mRNA)及蛋白表达水平(HBsAg、HBcAg)。**结果:**稳定表达 HBV 的肝癌细胞系 HepAD38 中,Western blot 检测显示,与 PBS 对照组相比,Cisplatin 处理组中 CREB1 相对表达量为 1.355 ± 0.049 ($P=0.010$);HBsAg 蛋白相对表达量为 1.679 ± 0.060 ($P=0.003$);HBcAg 蛋白相对表达量为 1.488 ± 0.047 ($P=0.005$)。qRT-PCR 结果显示经顺铂处理后,HBV DNA 绝对表达量为 249.600 ± 54.400 ($P=0.006$);HBV mRNA 相对表达量为 3.084 ± 0.256 ($P=0.000$);以上结果表明在 HepAD38 细胞中乙肝病毒蛋白表达水平以及病毒复制水平较 PBS 对照组明显上调,均具有统计学差异;与此同时,选择转入 shCREB1 质粒的 HepAD38 细胞,即 shCREB1 细胞,以及转入对照质粒且能正常表达 CREB1 的 HepAD38 细胞,即 shControl 细胞,2 种细胞组内均设置 PBS 对照组和 Cisplatin 处理组,分别检测乙肝病毒蛋白表达以及病毒复制水平。qRT-PCR 结果显示,HBV DNA 在 shControl 细胞的 Cisplatin 处理组相对表达量为 518.300 ± 3.458 ;而在 shCREB1 细胞的 Cisplatin 处理组相对表达量为 265.300 ± 3.125 ($P=0.000$);HBV mRNA 在 shControl 细胞的 Cisplatin 处理组相对表达量为 2.713 ± 0.318 ;而在 shCREB1 细胞的 Cisplatin 处理组相对表达量为 1.263 ± 0.056 ($P=0.000$)。Western blot 分析显示 shControl 细胞的 Cisplatin 处理组中的 HBsAg、HBcAg 相对表达量分别为 1.254 ± 0.001 、 2.238 ± 0.041 ;而在 shCREB1 细胞的 Cisplatin 处理组中的 HBsAg、HBcAg 相对表达量分别为 1.121 ± 0.036 ($P=0.021$)、 1.681 ± 0.015 ($P=0.000$)。**结论:**顺铂可以通过 CREB1 促进乙肝病毒复制水平以及蛋白表达水平上调。

【关键词】cAMP 应答元件结合蛋白质-1;乙肝病毒;HepAD38;顺铂**【中图分类号】**R512.62**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-10-19

Cisplatin induces hepatitis B virus reactivation via CREB1: An experimental study

Pan E, Chen Xuemei, Gao Qingzhu, Wei Jie, Hu Jie, Liang Li, Wang Kai, Huang Ailong, Tang Ni

(The Key Laboratory of Molecular Biology on Infection Diseases, Ministry of Education,
Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the mechanism of cisplatin-induced hepatitis B virus (HBV) reactivation. **Methods:** HepAD38 hepatoma cells with stable expression of HBV were divided into phosphate buffered saline (PBS) control group and cisplatin treatment group. The expression of cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1) and HBV proteins (HBsAg and HBcAg) and the level

of HBV replication (HBV DNA and HBV mRNA) were measured. HepAD38 cells with stable knock-down of CREB1 (shCREB1) were compared with those with stable expression of HBV, and the level of HBV replication (HBV DNA and HBV mRNA) and protein expression level after cisplatin treatment were measured. **Results:** As for HepAD38 hepatoma cells with stable expression of HBV, Western blot showed that compared with the PBS control group, the cisplatin treatment group had a relative expression level of CREB1 of 1.355 ± 0.049 ($P=0.010$), a relative expression level of HBsAg protein of 1.679 ± 0.060

作者介绍:潘 娥, Email: pane1216@sina.com,

研究方向:顺铂诱导乙肝病毒再激活的分子机制。

通信作者:唐 霓, Email: nitang809@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81471946、81572683);
重庆市科委基础与前沿重点资助项目(编号:cstc2015jcyjBX0011);重庆市高校创新团队建设计划资助项目(编号:CXTDX201601015);重庆市科技领军人才支持计划资助项目(CSTCCXLJRC201719)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181103.1406.002.html>
(2018-11-06)

($P=0.003$), and a relative expression level of HBcAg protein of 1.488 ± 0.047 ($P=0.005$). The results of qRT-PCR showed that compared with the PBS control group, the cisplatin treatment group had an absolute expression level of HBV DNA of 249.600 ± 54.400 ($P=0.006$) and a relative expression level of HBV mRNA of 3.084 ± 0.256 ($P=0.000$), suggesting that compared with the PBS control group, the cisplatin treatment group had significantly higher expression levels of HBV proteins and level of HBV replication. In addition, HepAD38 cells transfected with shCREB1 plasmid (shCREB1 cells) and HepAD38 cells transfected with control plasmid with normal CREB1 expression (shControl cells) were divided into PBS control group and cisplatin treatment group, and the expression of HBV proteins and the level of HBV replication were measured. The results of qRT-PCR showed that compared with the cisplatin treatment group of shCREB1 cells, the cisplatin treatment group of shControl cells had significantly higher relative expression levels of HBV DNA (518.300 ± 3.458 vs. 265.300 ± 3.125 , $P=0.000$) and HBV mRNA (2.713 ± 0.318 vs. 1.263 ± 0.056 , $P=0.000$). According to the results of Western blot, the cisplatin treatment group of shControl cells had a relative expression level of HBsAg of 1.254 ± 0.001 and a relative expression level of HBcAg of 2.238 ± 0.041 , while the cisplatin treatment group of shCREB1 cells had a relative expression level of HBsAg of 1.121 ± 0.036 and a relative expression level of HBcAg of 1.681 ± 0.015 ; there were significant differences in the relative expression levels of HBsAg and HBcAg between the two groups ($P=0.021$ and 0.000). **Conclusion:** Cisplatin can increase the level of HBV replication and the expression levels of HBV proteins via CREB1.

【Key words】cAMP response element binding protein 1; hepatitis B virus; HepAD38; Cisplatin

20 世纪 70 年代中期首次报道在接受肾移植以及使用细胞毒性药物的患者中出现乙肝病毒再激活现象^[1-2]。其定义为血清中 HBV DNA 陡然增加(高于基线值 10 倍)以及血清丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)水平明显升高(高于基线值 2~3 倍),或伴有不同程度的肝功能损伤临床表现,如黄疸、乏力、消化道症状等。其临床病程主要包括病毒复制增加期、肝损伤期以及疾病恢复期或恶化期^[3]。有文献报道慢性乙肝病毒患者使用不同的化疗药物后,乙肝病毒再激活发生率为 4%~68%^[4]。临床上,因乙肝病毒再激活的发生可能中断放化疗治疗,甚至诱导严重的肝功能衰竭发生。因此,深入研究细胞毒性药物诱导的 HBV 再激活机制,对于预防和阻断 HBV 再激活的发生具有重要的临床意义。

目前对乙肝病毒再激活发生的具体机制尚不清楚。初始机制认为是化疗药物抑制了宿主的免疫系统,进而导致病毒逃逸,使得病毒大量复制,病毒蛋白表达于肝细胞。化疗药物一旦撤除,机体免疫系统识别过量表达的外源病毒蛋白,激发过强的免疫反应,造成肝细胞损伤和肝功能损害。但是免疫功能紊乱还不足以解释所有的临床现象,因为大约一半的乙肝病毒再激活发生在化疗治疗的早期阶段,而不是化疗结束后的间隔期^[5]。因此,除了病毒宿主免疫平衡紊乱以外,化疗药物可能对 HBV 的复制还具有直接刺激作用。

最新的一些实验研究表明,细胞毒性化疗药物,包括阿霉素、依托泊苷或长春新碱,都可以通过剂量依赖性的方式直接刺激乙肝病毒复制和 HBsAg 分泌^[6-7]。顺铂(Cisplatin, DDP)作为广谱抗癌药物之一,临床应用已相当广泛。顺铂是否具有诱导 HBV 复制的能力? 如果有,其可能的机制是什么? 本研究在乙肝病毒稳定表达的 HepAD38 细胞中研究顺铂能否直接刺激 HBV 的复制,并进一步分析调控 HBV 复制的重要转录因子 cAMP 应答元件结合蛋白质-1(cAMP response element binding protein 1, CREB1)在顺铂诱导乙肝病毒再激活中发挥的作用,从而为临床预防和阻断细胞毒性药物诱导的 HBV 再激活提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 HepAD38 细胞、DH5 α 菌株、pLL3.7 载体质粒均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 HBV DNA、HBV mRNA、GAPDH 以及 CREB1 分别根据其相应的 CDS 基因序列设计引物,并购买擎科公司合成的各个基因的 cDNA 质粒;转染试剂 Lipofectamine™ 2000、Trizol reagent 购于 Invitrogen 公司;Micrococcal Nuclease 来自 New England Biolabs(货号 M0247S);iTaQ™ Universal SYBR Green Supermix 购于 Bio-Rad Laboratories 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于北京鼎国公司;PVDF

Membranes、ECL 工作液购于 Millipore 公司;尼龙膜、地高辛检测试剂盒、蛋白酶 K 购于 Roche 公司;胎牛血清(FBS)、DMEM/F12 培养基、青链霉素购于 Hyclone 公司;T4 DNA Ligase、限制性内切酶(*Xho* I 酶、*Hpa* I 酶、*Xba* I 酶、*Not* I 酶)购于 NEB 公司;T4 Polynucleotide Kinase 购于 Takara 公司;Reverse Transcription System、Alkaline Phosphatase Calf Intestinal(CIAP)和质粒小抽提取试剂盒购于 Promega 公司。

1.1.3 主要抗体 乙肝病毒核心抗原的抗体购于 Dako 公司(货号 B0586);乙肝病毒表面抗原的抗体购于 Novus 公司(货号 NB100-62652);CREB1 的抗体购于 Abcam 公司(货号 ab32515);二抗 Mouse anti-HBsAg 购于 Abcam 公司(货号 ab20402);二抗 Rabbit anti-HBcAg 购于 Dako 公司(货号 B0586)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepAD38 由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室保存,该细胞在有 10%胎牛血清、100 mg/mL 链霉素及 100 mg/mL 青霉素的 DMEM 培养基中,并放置在 5% CO₂、37 °C 孵箱中培养。

1.2.2 shCREB1 重组质粒的构建 根据 CREB1 基因的 CDS 序列设计 3 对不同的引物(表 1),购买擎科公司合成的 shCREB1 cDNA 质粒为模板,在高温退火等条件下扩增 DNA 片段大小为 50 bp,同时用限制性内切酶 *Xho* I 酶、*Hpa* I 酶处理载体质粒 PLL3.7,将目的质粒以及处理后的载体用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 电浴箱中连接 16 h,随后转入 DH5 α 化学感受态中,均匀涂于氨苄抗性的培养皿中过夜,随机挑选 5 个菌落,37 °C 恒温摇床过夜,用质粒小抽提取试剂盒提取,经凝胶电泳确定疑似正确质粒送擎科基因测序分析。

1.2.3 shCREB1 重组质粒效果的鉴定 选择测序成功的 3 对 shCREB1 质粒(即 1-1#、1-2#、1-3# shCREB1)以及对照 shControl PLL3.7 载体,分别取 3 μ g,同 7.5 μ L Lipofectamine™

2000 以及 250 μ L OPTI-MEM 混合物共转染到 6 孔板 Hep-AD38 细胞中,此时 6 孔板培养基已由完全培养基换成 1 mL 无血清无抗性 OPTI-MEM,放置孵箱培养 5~6 h 后,将 OPTI-MEM 弃掉换成完全培养基,48 h 后在荧光显微镜下观察转染效率,转染效率达 75%左右,收集细胞蛋白,用 Western blot 检测 shCREB1 重组质粒敲低效果。

1.2.4 shCREB1 重组慢病毒的包装 由上述实验可知 shCREB1 重组质粒敲低效果较好的是 shCREB1-2#、1-3#,故选择 shCREB1-2#、1-3# 质粒进行慢病毒包装。首先将 HepAD38 重铺至 3 个 6 cm 培养皿,密度为 30%~40%,待细胞贴壁后弃完全培养基,每个培养皿加入 3 mL OPTI-MEM;随后将 4 μ g 不同的目的质粒以及对照质粒 shControl 分别与 3 μ g 包装质粒以及 2 μ g 慢病毒包装系统载体 VSV-G 混匀后加入已在孵箱中孵育 20 min 的 22.5 μ L Lipofectamine™ 2000 和 250 μ L OPTI-MEM 混合物中,轻柔混匀后加入 6 cm 培养皿中,4~6 h 后换液,显微镜下观察病毒包装效率以及细胞状态,48~72 h 收集病毒上清,并用 0.45 mm 的滤过滤器进行过滤,随后冻存在 -80 °C 为后续实验做准备。

1.2.5 shCREB1 重组慢病毒效果鉴定 将 HepAD38 细胞以 45%的密度重铺于 6 cm 培养皿,待细胞贴壁后弃完全培养基,并将上述冻存在 -80 °C 的病毒上清即(shCREB1-2#、1-3# 及 shControl)约 2 mL,分别平铺于细胞中,在显微镜下观察绿色荧光的百分比,48 h 后病毒感染率约为 90%,收集细胞蛋白,用 Western blot 检测 shCREB1 重组慢病毒效果。

1.2.6 Western blot 检测乙肝病毒蛋白 HBsAg、HBcA 表达变化 将已感染的 shControl 或 shCREB1-2# 重组慢病毒的 HepAD38 细胞按照 40%的密度分别重铺于 6 cm 的培养皿中,待细胞贴壁后每组内加顺铂(4 μ mol/L)处理,设置组内对照 PBS(4 μ mol/L),待 72 h 后弃培养基,并用 PBS 清洗,加入细胞蛋白裂解液 200 μ L,提取细胞内总蛋白,用鼎国试剂

表 1 引物序列

基因	引物序列
shCREB1-1#	正向引物: 5' -TGCAGCTCATGCAACATCATTTCAAGAGAATGATGTTGCATGAGCTGCTTTTTTC-3' 反向引物: 5' -TCGAGAAAAAGCAGCTCATGCAACATCATTTCTTGAATGATGTTGCATGAGCTGCA-3'
shCREB1-2#	正向引物: 5' -TGCCTGCAAAACATTAACCATTTCAAGAGAATGGTTAATGTTGCAGGCTTTTTTC-3' 反向引物: 5' -TCGAGAAAAAGCCTGCAAAACATTAACCATTTCTTGAATGTTAATGTTTGCAGGCA-3'
shCREB1-3#	正向引物: 5' -TGCCAACCTCCAATTTACCAATTTCAAGAGATTGGTAAATTGGAGTTGGCTTTTTTC-3' 反向引物: 5' -TCGAGAAAAAGCCAACCTCCAATTTACCAATTTCTTGAATTTGGTAAATTGGAGTTGGCA-3'
HBV mRNA	正向引物: 5' -CCTAGTAGTCAGTTATGTCAAC-3' 反向引物: 5' -TCTATAAGCTGGAGGAGTGGCA-3'
HBV DNA	正向引物: 5' -CCTAGTAGTCAGTTATCAAC-3' 反向引物: 5' -TCTATAAGCTGGAGGAGTGGCA-3'
GAPDH	正向引物: 5' -CGACCACTTTGTCTAAG CTCA-3' 反向引物: 5' -CGACCACTTTGTCTAAGCTCA-3'
CREB1	正向引物: 5' -AGACTTCAGCACCTGCCATC-3' 反向引物: 5' -ATGGTAGTACCCGGCTGACT-3'

盒测蛋白浓度,每种蛋白取 30 μg 上样量,经 90 min 恒压电泳后,在恒电流转膜作用下转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,孵育适宜比例的抗体,其中 HBsAg 抗体(1:1 000)、HBcAg 抗体(1:1 000);4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。隔夜后用 $1 \times \text{TBST}$ 洗膜 4 次,每次 8~10 min,然后按 1:10 000 比例加入二抗室温孵育 1 h,继续用 $1 \times \text{TBST}$ 洗膜 4 次,每次 8~10 min,最后加入 ECL 发光试剂曝光,比较 CREB1 敲低前后乙肝病毒的 HBsAg、HBcAg 蛋白表达情况。

1.2.7 qRT-PCR 检测乙肝病毒病毒复制水平 DNA、mRNA 表达变化 HepAD38 细胞感染 shControl、shCREB1 慢病毒,72 h 后分别提取 HBV DNA、mRNA;其中提取乙肝病毒复制中间体步骤如下:根据不同细胞密度计算出相同细胞数(详见细胞计数),以相同的细胞数为基础,向其中加入 500 μL 细胞裂解液[1%NP-40、0.5 mmol/L 的乙二胺四乙酸(ethylene-diaminetetraacetic acid disodium salt,EDTA)、1 mol/L 的 Tris-HCl(pH8.0)、2%的蔗糖],在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱中裂解 15~20 min 后,室温,15 000 g,离心留取上清,加入 1 mol/L CaCl_2 5 μL 以及 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Micrococcal Nuclease 10 μL ,振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,加 0.5 mol/L 的 EDTA 10 μL 终止,室温,15 000 g,离心留取上清,加 PEG8000 200 μL ,混匀,冰预 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$,15 000 g,离心弃上清留沉淀,加 450 μL 蛋白酶 K 消化 Buffer,将沉淀吹散,然后再加 20 mg/mL 蛋白酶 K 20 μL ,45 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中过夜。第 2 天上清分别用 Tris 平衡酚、酚氯仿异戊醇、氯仿异戊醇抽提,然后加 3% 5 mol/L NaCl、1% 糖原以及 2.5 倍体积的无水乙醇,振荡混匀,放置 -80 $^{\circ}\text{C}$ (>1 h),最后 4 $^{\circ}\text{C}$,15 000 g 离心获得乙肝病毒核心颗粒 DNA。标准品 pCH9/3091-HBV1.1 作为量化参照物和定量标准,其浓度为 5.5×10^{10} copies/ μL ,连续倍比稀释 5~6 个样品。本实验体系有样品、iTaqTM Universal SYBR Green Supermix、引物参与;其扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,75 $^{\circ}\text{C}$ 1 s,连续 39 个循环,然后以 Ct 值为纵坐标,以标准品拷贝数量的 log 值为横坐标,绘制 PCR 反应的标准曲线。本实验选择 HBV 基因组的保守区域(通常为 C 区)设计引物,其引物序列见表 1。

提取 HBV mRNA 方法大致如下:弃掉完全培养基,加入细胞裂解液 Trizol reagent 置于冰上裂解,后用氯仿进行抽提,用糖原以及异丙醇沉淀。RNA 在逆转录体系下逆转录为 cDNA(具体详见 Promega 试剂盒),然后将 cDNA 作为实验样本,其反应体系体系有样品、iTaqTM Universal SYBR Green Supermix、引物(包括 HBV RNA、GAPDH)参与;其扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,连续 35 个循环,采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法分析 HBV mRNA 的相对表达量,即每一组样本的目的基因(HBV RNA)C_t 值减去内参基因(GAPDH)C_t 值,得到的数就是 ΔC_t ;换成公式就是: $\Delta\text{C}_t = \text{C}_t(\text{目的基因}) - \text{C}_t(\text{内参基因})$;再将每一组样本的目的基因 ΔC_t 减去对照组样本的 ΔC_t ,并对所有结果加一个负运算,其结果就是 $-\Delta\Delta\text{C}_t$,最后对 $-\Delta\Delta\text{C}_t$

进行 2 的幂运算计算出乙肝病毒 mRNA 的表达结果。

1.2.8 细胞计数 取 10 μL 台盼蓝染液转移至 0.5 mL 的 EP 管中,再加入 10 μL 消化后的细胞悬液,轻轻吹打混匀后,迅速吸取 10 μL 该混合悬液于计数板的小孔中,再将计数板放置于自动化细胞计数仪进行细胞计数,并做好相关记录。

1.3 统计学分析

本次研究数据采用 SPSS 17.0 统计学软件进行处理分析,所得数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,其中 2 组均数间比较采用两独立样本 t 检验,多组数据间采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。所有研究图片采用 CorelDRAW Graphics Suite X7、Image J 以及 Graphpad 软件作图。

2 结 果

2.1 qRT-PCR 检测不同浓度梯度的顺铂诱导乙肝病毒复制水平的表达情况

设置不同浓度的顺铂实验组(即 Control 组、2 $\mu\text{mol/L}$ 组、4 $\mu\text{mol/L}$ 组、6 $\mu\text{mol/L}$ 组、8 $\mu\text{mol/L}$ 组)处理 HepAD38 细胞,每天观察细胞状态,48 h 后,经浓度梯度为 8 $\mu\text{mol/L}$ 的顺铂处理后的细胞肉眼可见约 3/4 的存活细胞,其余浓度梯度的顺铂细胞状态佳,说明 8 $\mu\text{mol/L}$ 的顺铂具有少许细胞毒性作用,不适于实验研究。继续观察细胞状态,待 72 h 后提取其余浓度梯度处理后的细胞内乙肝病毒复制中间体,并用 qRT-PCR 分析顺铂诱导乙肝病毒复制水平的最适浓度。其结果显示:Control 组中 HBV DNA 绝对表达量为 (24.407 ± 2.284) 拷贝/细胞,2、4、6 $\mu\text{mol/L}$ 浓度顺铂诱导 HBV DNA 绝对定量分别为 (119.582 ± 1.054) 、 (255.719 ± 8.278) 、 (288.979 ± 5.078) 拷贝/细胞,可见当顺铂浓度为 6 $\mu\text{mol/L}$ 时可明显诱导乙肝病毒复制水平,与其他处理组比较,均具有统计学差异,故说明顺铂最适浓度为 6 $\mu\text{mol/L}$ (表 2)。

表 2 qRT-PCR 检测不同浓度梯度的顺铂诱导乙肝病毒复制水平的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	CREB1
Control 组	24.407 ± 2.284
2 $\mu\text{mol/L}$ 组	119.582 ± 1.054
4 $\mu\text{mol/L}$ 组	255.719 ± 8.278
6 $\mu\text{mol/L}$ 组	288.979 ± 5.078
F 值	473.659
P 值	0.000

注:2 $\mu\text{mol/L}$ 组与 Control 组比较, $P=0.000$;4 $\mu\text{mol/L}$ 组与 Control 组比较, $P=0.000$;6 $\mu\text{mol/L}$ 组与 Control 组比较, $P=0.000$;2 $\mu\text{mol/L}$ 组与 4 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P=0.002$;2 $\mu\text{mol/L}$ 组与 6 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P=0.002$;4 $\mu\text{mol/L}$ 组与 6 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P=0.018$

2.2 qRT-PCR 检测顺铂处理后乙肝病毒复制水平表达情况

选择适宜浓度的顺铂(6 $\mu\text{mol/L}$)处理 HepAD38 细胞,

并用 PBS 设置为药物对照组,待 72 h 后,用 qRT-PCR 筛选与乙肝病毒复制相关的转录因子,并检测乙肝病毒 DNA、mRNA 的表达情况。结果显示:HBV DNA 在 PBS 对照组与 Cisplatin 处理组中,其绝对表达量分别为 13.290 ± 1.690 、 249.6 ± 54.4 ;HBV mRNA 在 PBS 对照组与 Cisplatin 处理组中,其绝对表达量分别为 1.002 ± 0.055 、 3.084 ± 0.256 ,可见与对照组比较,顺铂处理组不管是 HBV DNA 还是 HBV mRNA 均明显上调,说明顺铂可明显诱导乙肝病毒的转录激活水平(表 3)。

表 3 qRT-PCR 检测顺铂处理后乙肝病毒复制水平表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HBV DNA	HBV mRNA
PBS对照组	13.290 ± 1.690	1.002 ± 0.055
Cisplatin处理组	249.600 ± 54.400	3.084 ± 0.256
<i>t</i> 值	5.318	9.740
<i>P</i> 值	0.006	0.000

注:Cisplatin 处理组与 PBS 对照组中的 HBV DNA 比较, $P=0.006$; Cisplatin 处理组与 PBS 对照组中的 HBV mRNA 比较, $P=0.000$

2.3 Western blot 检测顺铂处理后乙肝病毒蛋白以及 CREB1 蛋白表达

同样按照上述分组即 PBS 对照组和 Cisplatin 处理组,待 72 h 后提取细胞内的总蛋白,测其浓度,用 Western blot 方法检测 CREB1、HBsAg 以及 HBcAg。结果显示,Cisplatin 处理组与 PBS 对照组比较,其 CREB1、HBsAg 以及 HBcAg 都有明显的上调趋势。其中 CREB1 在 PBS 对照组中的蛋白相对表达量为 1.000 ± 0.105 ,在 Cisplatin 处理组中的蛋白相对表达量为 1.355 ± 0.086 ;HBsAg 在 PBS 对照组中的蛋白相对表达量为 1.000 ± 0.165 ,在 Cisplatin 处理组中的蛋白相对表达量为 1.679 ± 0.105 ;HBcAg 在 PBS 对照组中的蛋白相对表达量为 1.000 ± 0.134 ,在 Cisplatin 处理组中的蛋白相对表达量为 1.488 ± 0.082 ;由上述实验结果可知,与对照组比较,顺铂不仅上调 CREB1 蛋白表达量,还可促进乙肝病毒相关蛋白质的表达,具有统计学差异。因此,顺铂激活乙肝病毒的转录翻译的过程可能是通过转录因子 CREB1 上调的结果(表 4)。

表 4 Western blot 检测顺铂处理后乙肝病毒蛋白以及 CREB1 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HBsAg	HBcAg	CREB1
PBS对照组	1.000 ± 0.165	1.000 ± 0.134	1.000 ± 0.105
Cisplatin处理组	1.679 ± 0.105	1.488 ± 0.082	1.355 ± 0.086
<i>t</i> 值	6.011	5.383	4.526
<i>P</i> 值	0.003	0.005	0.010

注:Cisplatin 处理组与 PBS 对照组中的 HBsAg 比较, $P=0.003$;Cisplatin 处理组与 PBS 对照组中的 HBcAg 比较, $P=0.005$;Cisplatin 处理组与 PBS 对照组中的 CREB1 比较, $P=0.010$

2.4 Western blot 鉴定 shCREB1 重组慢病毒的敲低效果

用 shCREB1-2#、1-3# 重组慢病毒上清分别感染 HepAD38 细胞,设置对照细胞 shControl,待 72 h 后提取细胞总蛋白,用鼎国 BCA 试剂盒测浓度,Western blot 检测 shControl、shCREB1-2#、1-3# 的表达效率的差异。其结果显示,shCREB1-2# 重组慢病毒敲低效果较为明显,其中 shControl 细胞的 CREB1 蛋白相对表达量为 1.000 ± 0.072 ,shCREB1-2# 细胞的 CREB1 蛋白相对表达量为 0.499 ± 0.033 ,shCREB1-3# 细胞的 CREB1 蛋白相对表达量为 0.564 ± 0.050 ,根据方差分析结果可知,shCREB1-2# 细胞敲低效果更好,故选择 shCREB1-2# 慢病毒去构建稳定敲低细胞系(表 5)。

表 5 shCREB1 重组慢病毒中 CREB1 的灰度值比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	CREB1
shControl组	1.000 ± 0.072
shCREB1-2#组	0.499 ± 0.033
shCREB1-3#组	0.564 ± 0.050
<i>F</i> 值	1 027.599
<i>P</i> 值	0.000

注:shCREB1-2# 组与 shControl 组比较, $P=0.000$;shCREB1-3# 组与 shControl 组比较, $P=0.000$;shCREB1-2# 组与 shCREB1-3# 组比较, $P=0.002$

2.5 顺铂处理后稳定敲低 CREB1 的 HepAD38 细胞中乙肝病毒的病毒复制水平

分别用 shControl 或 shCREB1-2# 重组慢病毒上清感染 HepAD38 细胞,在显微镜下观察,待荧光密度感染约 85%时,将其重铺加顺铂处理,并设置 PBS 对照组,待 72 h 后提取细胞内乙肝病毒复制中间体以及乙肝病毒 mRNA,并用 qRT-PCR 进行检测,其中 HBV DNA 结果显示:shCREB1 细胞与 shControl 细胞相比较,不论是 PBS 对照组还是 Cisplatin 处理组其乙肝病毒的 DNA 水平都有较明显的下调趋势,其中 shControl 细胞的 PBS 对照组中,HBV DNA 相对表达量为 183.700 ± 7.630 ,shControl 细胞的 Cisplatin 处理组中,HBV DNA 相对表达量为 518.300 ± 3.458 ;shCREB1 细胞的 PBS 对照组中,HBV DNA 相对表达量为 162.700 ± 0.708 ,shCREB1 细胞的 Cisplatin 处理组中,HBV DNA 相对表达量为 265.300 ± 3.125 ,另外 HBV mRNA 结果显示:shControl 细胞的 PBS 对照组中,HBV mRNA 相对表达量为 1.000 ± 0.050 ,shControl 细胞的 Cisplatin 处理组中,HBV mRNA 相对表达量为 2.713 ± 0.318 ;shCREB1 细胞的 PBS 对照组中,HBV mRNA 相对表达量为 0.691 ± 0.044 ,shCREB1 细胞的 Cisplatin 处理组中,HBV mRNA 相对表达量为 1.263 ± 0.056 ,说明敲低 CREB1 后,顺铂促进乙肝病毒 DNA、mRNA 表达有明显下调趋势,具有统计学差异。其结果表明当敲低 CREB1 后,

可明显逆转顺铂诱导的乙肝病毒转录激活水平,进一步验证顺铂诱导乙肝病毒再激活需依赖转录因子 CREB1(表 6)。

表 6 顺铂处理后稳定敲低 CREB1 的 HepAD38 细胞中乙肝病毒的复制水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组间	组内	HBV DNA	HBV mRNA
shControl	PBS 对照组	183.700 ± 7.630	1.000 ± 0.050
	Cisplatin 处理组	518.300 ± 3.458	2.713 ± 0.318
shCREB1	PBS 对照组	162.700 ± 0.708	0.691 ± 0.044
	Cisplatin 处理组	265.300 ± 3.125	1.263 ± 0.056
F 值		2 969.002	73.354
P 值		0.000	0.000

注:在 shControl 细胞中,PBS 对照组与 Cisplatin 处理组的 HBV DNA 比较, $P=0.000$;在 shCREB1 细胞中,PBS 对照组与 Cisplatin 处理组的 HBV DNA 比较, $P=0.000$;shControl 细胞的 PBS 对照组与 shCREB1 细胞的 PBS 对照组中的 HBV DNA 比较, $P=0.003$;shControl 细胞的 PBS 对照组与 shCREB1 细胞的 Cisplatin 处理组的 HBV DNA 比较, $P=0.000$;shControl 细胞的 Cisplatin 处理组与 shCREB1 细胞的 PBS 对照组的 HBV DNA 比较, $P=0.000$;shControl 细胞的 Cisplatin 处理组与 shCREB1 细胞的 Cisplatin 处理组的 HBV DNA 比较, $P=0.000$;在 shControl 细胞中,PBS 对照组与 Cisplatin 处理组的 HBV mRNA 比较, $P=0.000$;在 shCREB1 细胞中,PBS 对照组与 Cisplatin 处理组的 HBV mRNA 比较, $P=0.029$;shControl 细胞的 PBS 对照组与 shCREB1 细胞的 PBS 对照组中的 HBV mRNA 比较, $P=0.521$;shControl 细胞的 PBS 对照组与 shCREB1 细胞的 Cisplatin 处理组的 HBV mRNA 比较, $P=0.556$;shControl 细胞的 Cisplatin 处理组与 shCREB1 细胞的 PBS 对照组的 HBV mRNA 比较, $P=0.000$;shControl 细胞的 Cisplatin 处理组与 shCREB1 细胞的 Cisplatin 处理组的 HBV mRNA 比较, $P=0.000$

2.6 顺铂处理后稳定敲低 CREB1 的 HepAD38 细胞中乙肝病毒蛋白表达

分别用 shControl 以及 shCREB1-2# 重组慢病毒的感染 HepAD38 细胞,同样加 Cisplatin 处理,并设置药物对照组 PBS,待 72 h 后提取细胞内乙肝病毒总蛋白,测其浓度,Western blot 检测 HBsAg、HBcAg 表达。其结果显示 shControl 细胞的 PBS 对照组 HBsAg、HBcAg 相对表达量分别为 1.000 ± 0.041 、 1.000 ± 0.081 ,shControl 细胞的 Cisplatin 处理组 HBsAg、HBcAg 相对表达量分别为 1.254 ± 0.001 、 2.238 ± 0.041 ;shCREB1 细胞的 PBS 对照组 HBsAg、HBcAg 相对表达量分别为 1.000 ± 0.017 、 1.000 ± 0.053 ,shCREB1 细胞的 Cisplatin 处理组 HBsAg、HBcAg 相对表达量分别为 1.121 ± 0.036 、 1.681 ± 0.015 。此结果在蛋白表达水平进一步验证了稳定敲低 CREB1 后,顺铂处理后乙肝病毒的 HBsAg、HBcAg 表达有所下降,具有统计学差异,该结果说明顺铂通过 CREB1 诱导乙肝病毒再激活,而敲低 CREB1 后,可部分逆转顺铂介导的乙肝病毒转录激活水平(表 7)。

表 7 顺铂处理后稳定敲低 CREB1 的 HepAD38 细胞中乙肝病毒蛋白灰度值的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组间	组内	HBsAg	HBcAg
shControl	PBS 对照组	1.000 ± 0.041	1.000 ± 0.081
	Cisplatin 处理组	1.254 ± 0.001	2.238 ± 0.041
shCREB1	PBS 对照组	1.000 ± 0.017	1.000 ± 0.053
	Cisplatin 处理组	1.121 ± 0.036	1.681 ± 0.015
F 值		8.191	243.010
P 值		0.008	0.000

注:在 shControl 细胞中,PBS 对照组与 Cisplatin 处理组的 HBsAg 比较, $P=0.017$;在 shCREB1 细胞中,PBS 对照组与 Cisplatin 处理组的 HBsAg 比较, $P=0.467$;shControl 细胞的 PBS 对照组与 shCREB1 细胞的 PBS 对照组中的 HBsAg 比较, $P=1.000$;shControl 细胞的 PBS 对照组与 shCREB1 细胞的 Cisplatin 处理组的 HBsAg 比较, $P=0.467$;shControl 细胞的 Cisplatin 处理组与 shCREB1 细胞的 PBS 对照组的 HBsAg 比较, $P=0.017$;shControl 细胞的 Cisplatin 处理组与 shCREB1 细胞的 Cisplatin 处理组的 HBsAg 比较, $P=0.021$;在 shControl 细胞中,PBS 对照组与 Cisplatin 处理组的 HBcAg 比较, $P=0.000$;在 shCREB1 细胞中,PBS 对照组与 Cisplatin 处理组的 HBcAg 比较, $P=0.000$;shControl 细胞的 PBS 对照组与 shCREB1 细胞的 PBS 对照组中的 HBcAg 比较, $P=1.000$;shControl 细胞的 PBS 对照组与 shCREB1 细胞的 Cisplatin 处理组的 HBcAg 比较, $P=0.000$;shControl 细胞的 Cisplatin 处理组与 shCREB1 细胞的 PBS 对照组的 HBcAg 比较, $P=0.000$;shControl 细胞的 Cisplatin 处理组与 shCREB1 细胞的 Cisplatin 处理组的 HBcAg 比较, $P=0.000$

3 讨论

乙肝病毒再激活通常发生于接受抗癌化疗、免疫抑制治疗、器官移植的患者中。近几年乙肝病毒再激活也被报道在慢性丙型肝炎合并乙肝病毒感染的患者接受抗病毒治疗过程中^[8-9]。有前瞻性研究表明化疗药物引起乙肝病毒再激活过程中其风险因子包括男性、年龄、HBcAg 阳性以及患淋巴瘤者,且在体外实验中也就是用阿霉素处理稳定表达乙肝病毒的肝癌细胞系 HepG2.2.15,发现阿霉素可明显促进乙肝病毒的表达,这一现象说明化疗药物可直接促进乙肝病毒的表达,并非免疫抑制间接所导致^[10-11],所以本研究在稳定表达乙肝病毒的肝癌细胞模型中验证了化疗药物顺铂可通过 CREB1 诱导乙肝病毒再激活,这有助于进一步研究其具体分子机制。

本研究重点讨论 CREB1 敲低后乙肝病毒的蛋白以及病毒复制水平的变化,根据相关文献可知化疗药物紫杉醇可诱导细胞周期阻滞过程中转录因

子 CREB 介导靶向细胞周期蛋白的表达^[12-13], 可见 CREB 转录因子在调节细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡以及肿瘤发生发展过程中具有不可替代的角色^[14-15], 比如 PKA、MAPK、PI3K/Akt 和 CaMK II 等信号通路^[16]。另外, I 型单纯性疱疹病毒感染机制中也需依赖 CREB^[17]。本研究在稳定表达乙肝病毒的肝癌细胞中证实 CREB1 可参与调控化疗药物顺铂介导乙肝病毒再激活这一现象, 其具体分子机制有待进一步探讨。

乙肝病毒持续性感染的主要原因是病毒 cc-cDNA 潜伏于感染肝细胞内, 常规抗病毒药物和干扰素都不能彻底清除 HBV cccDNA^[18-19]。根据这一现象, 提示顺铂介导乙肝病毒再激活过程是否有相关转录因子参与调节乙肝病毒的表现遗传修饰? 也就是说本研究中的转录因子 CREB1 是否可调控 HBV cccDNA? 这一问题本课题组将在后续的实验深入探讨 CREB1 参与顺铂介导 HBV 再激活的具体分子机制。

综上所述, 本实验利用成功构建稳定敲低 CREB1 的 HepAD38 细胞, 证明了顺铂通过 CREB1 诱导乙肝病毒再激活, 下一步研究将用免疫共沉淀以及染色质免疫沉淀等方法分析 CREB1 参与顺铂介导的乙肝病毒再激活信号通路的相关性, 还可深入研究 CREB1 是否参与乙肝病毒表现遗传修饰, 确定是否与乙肝病毒持续性表达存在相关性。

参 考 文 献

- [1] Albraith RM, Eddleston AL, Williams R, et al. Fulminant hepatic failure in leukaemia and choriocarcinoma related to withdrawal of cytotoxic drug therapy[J]. *Lancet*, 1975, 2(7934): 528-530.
- [2] Nagington J. Reactivation of hepatitis B after transplantation operations[J]. *Lancet*, 1977, 1(8011): 558-560.
- [3] Reddy KR, Beavers KL, Hammond SP, et al. American Gastroenterological Association Institute guideline on the prevention and treatment of hepatitis B virus reactivation during immunosuppressive drug therapy[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1): 215-219.
- [4] Paul S, Saxena A, Terrin N, et al. Hepatitis B virus reactivation and prophylaxis during solid tumor chemotherapy: a systematic review and meta-analysis[J]. *Ann Intern Med*, 2016, 164(1): 30-40.
- [5] Cheng AL, Hsiung CA, Su JJ, et al. Steroid-free chemotherapy decreases risk of hepatitis B virus (HBV) reactivation in HBV-carriers with lymphoma[J]. *Hepatology*, 2003, 37(6): 1320-1328.
- [6] Hayashi K, Ishigami M, Ishizu Y, et al. Clinical characteristics and molecular analysis of hepatitis B virus reactivation in hepatitis B surface antigen-negative patients during or after immunosuppressive or cytotoxic chemotherapy[J]. *J Gastroenterol*, 2016, 51(11): 1081-1089.
- [7] Hsu CH, Hsu HC, Chen HL, et al. Doxorubicin activates hepatitis B virus (HBV) replication in HBV-harboring hepatoblastoma cells. A possible novel mechanism of HBV reactivation in HBV carriers receiving systemic chemotherapy[J]. *Anticancer Res*, 2004, 24 (5A): 3035-3040.
- [8] Belperio PS, Shahoumian TA, Mole LA, et al. Evaluation of hepatitis B reactivation among 62920 veterans treated with oral hepatitis C antivirals[J]. *Hepatology*, 2017, 66(1): 27-36.
- [9] Chen G, Wang C, Chen J, et al. Hepatitis B reactivation in hepatitis B and C coinfecting patients treated with antiviral agents: a systematic review and meta-analysis[J]. *Hepatology*, 2017, 66(1): 13-26.
- [10] Ondracek CR, Reese VC, Rushing CN, et al. Distinct regulation of hepatitis B virus biosynthesis by peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha and small heterodimer partner in human hepatoma cell lines[J]. *J Virol*, 2009, 83(23): 12545-12551.
- [11] Chen YF, Chong CL, Wu YC, et al. Doxorubicin activates hepatitis B virus replication by elevation of p21 (Waf1/Cip1) and C/EBPα expression[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0131743.
- [12] Hoofnagle JH. Reactivation of hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2009, 49(5S): 156-165.
- [13] 孟爱民, 刘景生. cAMP 反应元件结合蛋白在药物依赖形成中的作用[M]. *中国药理学通报*, 2000, 16(4): 365-368.
- [14] Melnikova VO, Mourad-Zeidan AA, Lev DC, et al. Platelet-activating factor mediates MMP-2 expression and activation via phosphorylation of cAMP-response element-binding protein and contributes to melanoma metastasis[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(5): 2911-2922.
- [15] Zhang X, Odom DT, Koo SH, et al. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(12): 4459-4464.
- [16] Wei J, Yan W, Li X, et al. Activation of thromboxane receptor alpha induces expression of cyclooxygenase-2 through multiple signaling pathways in A549 human lung adenocarcinoma cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74(5): 787-800.
- [17] Wu H, Li T, Zeng M, et al. Herpes simplex virus type 1 infection activates the Epstein-Barr virus replicative cycle via a CREB-dependent mechanism[J]. *Cell Microbiol*, 2012, 14(4): 546-559.
- [18] Finch JT, Noll M, Kornberg RD. Electron microscopy of defined lengths of chromatin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72(9): 3320-3322.
- [19] Noll M, Kornberg RD. Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1[J]. *J Mol Biol*, 1977, 109(3): 393-404.

(责任编辑: 冉明会)