

消化系统疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001928

乙型肝炎病毒复制对肝细胞 Id 家族表达的影响

王石磊¹, 汪德强², 魏杰², 靳鑫³, 阳媛³, 师悦媛³, 夏露露³, 牛司强⁴

(1. 重庆市中医院皮肤美容科, 重庆 400021; 2. 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;

3. 重庆医科大学检验医学院临床检验诊断重点实验室, 重庆 400016; 4. 重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究肝细胞中乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)复制对分化抑制因子(inhibitor of differentiation, Id)家族表达的影响。**方法:**利用 qRT-PCR、Western blot 检测分析 Id 家族在 HBV 瞬时或稳定复制的肝癌细胞中表达水平的变化,并在 HBV 复制质粒 PCH9-HBV1.1 转染的正常肝细胞和 HBV 转基因小鼠肝组织细胞模型中进一步验证。将乙型肝炎病毒 S 蛋白(hepatitis B virus S protein, HBs)、乙型肝炎病毒核心蛋白(hepatitis B virus core protein, HBc)、乙型肝炎病毒 DNA 聚合酶(hepatitis B virus DNA polymerase, HBp)、乙型肝炎病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X protein, HBx)的过表达质粒转染 HepG2 细胞,检测各组与载体对照组细胞中 Id 家族表达水平的变化,分析比较乙肝病毒编码的 4 种蛋白对 Id 家族的调控作用。利用荧光素酶报告基因检测病毒各组分蛋白对 Id 蛋白启动子活性的影响。**结果:**瞬时转染 HBV 表达质粒的 HepG2 细胞较对照组细胞, Id1、Id3 的 mRNA 和蛋白表达水平均降低(mRNA: $t=3.952, 3.189, P=0.017, 0.033$; 蛋白: $t=10.532, 4.155, P=0.000, 0.014$); HepG2.2.15 中 Id1、Id3 mRNA 和蛋白的表达水平较 HepG2 对照组均下降(mRNA: $t=5.553, 7.211, P=0.005, 0.002$; 蛋白: $t=4.193, 3.849, P=0.014, 0.018$); HepAD38(Tet-) 中 Id1、Id3 蛋白的表达量较 HepAD38(Tet+) 组均降低($t=3.052, 3.712, P=0.038, 0.021$)。同时, HBV 的复制可以抑制 LO2 细胞及小鼠肝组织中 Id1、Id3 的表达(mRNA: $t=14.564, 3.281, 3.489, 3.495, P=0.000, 0.030, 0.025, 0.025$; 蛋白: $t=5.651, 5.336, 4.948, 5.149, P=0.005, 0.006, 0.008, 0.007$)。转染 HBV 病毒各编码蛋白质粒的 HepG2 细胞中, HBc 组 Id1、Id3 较载体对照组的 mRNA 表达水平降低最明显(77.7%、76.2%, $F=9.945, 37.528, t=6.481, 10.915, P=0.000, 0.000$), Western blot 结果显示 HBx 组 Id1、Id3 蛋白表达量下降最明显(86.2%、68.4%, $F=38.225, 7.159, t=12.550, 5.295, P=0.000, 0.001$)。双荧光素酶报告基因检测结果表明, HBc 组 Id1、Id3 启动子活性较对照组降幅最大(62.2%、56.3%, $F=16.530, 5.210, t=5.442, 3.222, P=0.000, 0.019$)。**结论:**乙型肝炎病毒可以抑制肝组织、细胞中 Id1 及 Id3 的表达,其中 HBc 对 Id1、Id3 mRNA 的下调最明显, HBx 则对 Id1、Id3 蛋白水平上的抑制作用最明显。

【关键词】乙型肝炎病毒; Id 家族; 乙型肝炎病毒 C 蛋白; 乙型肝炎病毒 X 蛋白**【中图分类号】**R512.6**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-03-26

Effect of hepatitis B virus replication on the expression of inhibitor of differentiation family in hepatocytes

Wang Shilei¹, Wang Deqiang², Wei Jie², Jin Xin³, Yang Yuan³, Shi Yueyuan³, Xia Lulu³, Niu Siqiang⁴

(1. Department of Dermatology and Cosmetology, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine;

2. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases Established by Ministry of Education;

3. Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnosis, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University; 4. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of hepatitis B virus (HBV) replication on the expression of inhibitor of differentiation (Id) family in hepatocytes. **Methods:** The methods of qRT-PCR and Western blot were used to measure the expression of Id family in hepatoma cells with transient or stable HBV replication, and the results were further validated in normal liver cells transfected with PCH9-HBV1.1 HBV replicating plasmid and HBV transgenic mouse liver tissue cells. HepG2 cells were transfected with plasmids

with overexpression of hepatitis B virus S protein (HBs), hepatitis B virus core protein (HBc), hepatitis B virus DNA polymerase (HBp), or hepatitis B virus X protein (HBx), the change in the expression of Id family was measured in these groups and the vector control group, and the regulatory effect of four HBV-encoded proteins on Id family was analyzed and compared. Lu-

作者介绍: 王石磊, Email: 987877607@qq.com,

研究方向: 乙型病毒性肝炎的发病机制。

通信作者: 牛司强, Email: liuzhangcq@yahoo.com。

基金项目: 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.20181106.0916.004.html>
(2018-11-07)

ciferase reporter gene assay was used to analyze the effect of virus component proteins on the activity of Id promoter. **Results:** Compared with the control group, the group of HepG2 cells with transient transfection of HBV plasmids had significant reductions in the mRNA and protein expression of Id1 and Id3 (mRNA: $t=3.952$ and 3.189 , $P=0.017$ and 0.033 ; protein: $t=10.532$ and 4.155 , $P=0.000$ and 0.014); compared with the HepG2 control group, the HepG2.2.15 group had significantly lower mRNA and protein expression of Id1 and Id3 (mRNA: $t=5.553$ and 7.211 , $P=0.005$ and 0.002 ; protein: $t=4.193$ and 3.849 , $P=0.014$ and 0.018); compared with the HepAD38(Tet+) group, the HepAD38(Tet-) group had significantly lower protein expression of Id1 and Id3 ($t=3.052$ and 3.712 , $P=0.038$ and 0.021). In addition, HBV replication significantly inhibited the mRNA and protein expression of Id1 and Id3 in LO2 cells and mouse liver tissue (mRNA: $t=14.564$, 3.281 , 3.489 , and 3.495 , $P=0.000$, 0.030 , 0.025 , and 0.025 ; protein: $t=5.651$, 5.336 , 4.948 , and 5.149 , $P=0.005$, 0.006 , 0.008 , and 0.007). Among the HepG2 cells transfected with HBV-encoded protein plasmids, the HBc group had the greatest reductions in the mRNA expression of Id1 and Id3 compared with the vector control group (77.7% and 76.2% , $F=9.945$ and 37.528 , $t=6.481$ and 10.915 , $P=0.000$ and 0.000), and Western blot showed that the HBx group had the greatest reductions in the protein expression of Id1 and Id3 (86.2% and 68.4% , $F=38.225$ and 7.159 , $t=12.550$ and 5.295 , $P=0.000$ and 0.001). The dual-luciferase reporter gene assay showed that the HBc group had the greatest reduction in the promoter activity of Id1 and Id3 (62.2% and 56.3% , $F=16.530$ and 5.210 , $t=5.442$ and 3.222 , $P=0.000$ and 0.019). **Conclusion:** HBV can inhibit the expression of Id1 and Id3 in liver tissue and hepatocytes. HBc has the most significant effect in downregulating the mRNA expression of Id1 and Id3, while HBx has the most significant inhibitory effect on the protein expression of Id1 and Id3.

[Key words] hepatitis B virus; Id family; hepatitis B virus C protein; hepatitis B virus X protein

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 作为一种嗜肝性 DNA 病毒, 在全世界约有 20 亿人曾感染, 其中有 3.5 亿人为 HBV 慢性携带者。HBV 的慢性感染是肝硬化、肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的常见病因, 其患者终生发生终末期肝病 (肝硬化、肝功能衰竭和 HCC) 的风险占 $15\% \sim 40\%$, 每年有超过 60 万人死亡^[1-3]。

DNA 结合抑制因子 (Id) 蛋白是缺少 DNA 碱性结合域的螺旋-环-螺旋 (dnHLH) 转录因子家族蛋白, 其基因由 Benezra 等于 1990 年从小鼠肌源细胞中首次发现。人类共有 4 种 Id 基因 (Id1-4), 分别位于 20q1、2p25、1p36 和 6p22-21 号染色体。它们的分子量为 $13 \sim 20$ kD, 主要分布于胚胎及未分化成熟的组织细胞中, 并且随着细胞分化成熟而逐渐降低。Id 家族蛋白皆是短寿命蛋白质 (一般持续 $10 \sim 20$ min), 半衰期很短, 通过泛素-蛋白酶体途径降解^[4]。其结构由 2 个较保守的 α 螺旋区 (helix) 和一段长度不定、低保守的袢环 (loop) 区段构成。Id 蛋白可与 bHLH 转录因子通过 α 螺旋上疏水基团相互作用形成不能与 DNA 结合的异二聚体, 阻断 bHLH 对细胞增殖、凋亡及周期等的调控。研究表明, Id 蛋白在前列腺癌、乳腺癌、肝癌、食管癌等多种人肿瘤组织中高表达, 可以抑制细胞分化、促进增殖、调控周期、诱导凋亡、维持细胞存活、促进血管形成及肿

瘤浸润, 从而发挥癌蛋白功能^[5-8]。在肝癌细胞中, Id1、Id2、Id3 均高表达, 但 Id4 几乎不表达。

目前, 在乙型肝炎病毒相关肝细胞癌 (HBV-HCC) 中 Id 蛋白家族与 HBV 的关系罕有报道。本研究首先在 HBV 瞬时或稳定复制肝癌细胞、原代肝细胞及转基因小鼠模型中, 观察到 HBV 的感染和复制导致肝癌细胞中 Id1 和 Id3 的表达水平下调, 并且进一步发现 HBc 和 HBx 对 Id1、Id3 表达的抑制作用最强。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细胞和实验动物 HBV 复制质粒 PCH9-HBV1.1, 表达 4 种病毒编码蛋白的重组质粒 pCMV-sport6-HBs、pCMV-sport6-HBp、pCMV-sport6-HBc、pCMV-sport6-HBx、pcDNA3.1-HBc、pcDNA3.1-HBx 和报告基因质粒 pGL3-basic、pGL3-TK 均由本实验室保存。人肝癌细胞系 Huh7、HepG2, 稳定转染 HBV 的肝癌细胞系 HepG2.2.15、HepAD38 和正常肝细胞 LO2 均购自 ATCC (American Type Culture Collection) 公司。5 只 HBV 转基因雄性小鼠 C57BL/6J 购自厦门大学, 5 只普通的 C57BL/6J 雄鼠购自重庆医科大学实验动物中心。本研究所涉及的动物实验均符合重庆医科大学实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.1.2 主要实验试剂 限制性内切酶 (*Kpn* I 和 *Xho* I)、质

粒抽提试剂盒、重组酶购自 Promega 公司;MEM/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 R 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 R qPCR Master Mix 2×)购自美国 Promega 公司,Id 蛋白 qRT-PCR 引物合成于北京华大基因;BCA 试剂盒购自碧云天公司;HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗、BSA 均购自 Bio-world 公司;抗 Id1 抗体由课题组制备, β -actin 抗体及抗 Id2、Id3、Id4 抗体购于武汉三鹰公司,抗 HBcAg 抗体购于丹麦 DAKO 公司;双荧光素酶报告系统试剂盒(Dual-Luciferase Reporter Assay System)购自美国 Promega 公司。

1.2 实验分组

将 HepG2 细胞分别转染 PCH9-HBV1.1 和 PCH9 质粒作为实验组和载体对照组,在瞬时转染肝癌细胞模型中观察乙肝病毒对 Id 家族表达的影响。

将稳定转染 HBV 的 HepG2.2.15 作为实验组,HepG2 细胞作为对照组,在病毒稳定复制肝癌细胞模型中观察 HBV 对 Id 家族表达的影响。

将不加四环素培养的 HepAD38 细胞作实验组,同时将给予四环素培养的 HepAD38 细胞作为其自身对照,观察乙肝病毒对 HepAD38 肝癌细胞中 Id 家族表达的影响。

将 LO2 细胞分别转染 pcDNA3.1-HBV1.1 和 pcDNA3.1 质粒作为实验组和对照组,观察乙肝病毒对正常肝细胞中 Id1 及 Id3 表达的影响。

将能够稳定复制病毒的 HBV 转基因 C57 小鼠作为实验组,正常 C57 小鼠作对照,观察 HBV 复制对 Id1、Id3 在小鼠肝组织细胞中表达的影响。

将 HepG2 分为 6 组,分别转染 pCMV-sport6-HBV1.1、pCMV-sport6-HBs、pCMV-sport6-HBc、pCMV-sport6-HBp、pCMV-sport6-HBx 质粒作为实验组,转染 pCMV-sport6 空载质粒作对照,观察乙肝病毒的 4 种病毒编码蛋白对肝癌细胞 Id1、Id3 表达的影响。

1.3 细胞培养和转染

HepG2 细胞系使用含 10%胎牛血清的 MEM 培养基;HepG2.2.15 细胞系使用含 500 μ g/mL G418、10%胎牛血清的 DMEM 培养基;稳定转染乙肝病毒 HepAD38 细胞系中 HBV 的复制水平可以被四环素抑制,因此将其分成四环素(tetracycline)处理组和未处理组,分别记为 HepAD38(Tet+)及 HepAD38(Tet-)。其中,处理组使用含 10%胎牛血清、0.5 μ g/mL

四环素的 DMEM 培养基;其余细胞使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基。细胞均在 5%CO₂、37 °C 孵箱常规培养。质粒转染严格按照 Lipofectamin 2000™ Invitrogen 说明书操作。

1.4 RNA 提取及 qRT-PCR 检测

细胞处理 48 h 后,用 Trizol 裂解,氯仿抽提;将 5 只血清 HBV 的 DNA 含量皆在 10⁶ 拷贝/mL 以上 HBV 转基因小鼠 C57BL/6J 和 5 只普通的 C57BL/6J 小鼠(对照组)颈椎脱臼法处死后,迅速取出绿豆大小肝组织,液氮下研磨成屑,加入 1 mL Trizol 裂解后行常规 RNA 提取;提取的总 RNA 用分光光度计测定浓度和纯度,1%琼脂糖凝胶电泳判断降解情况。将 2.5 μ g 合格的 RNA 按照逆转录试剂盒(Roche™ Reverse Transcription System)说明书进行逆转录,cDNA 产物稀释后-80 °C 保存。以 GAPDH 为内参进行常规 qRT-PCR 检测。qRT-PCR 相关引物信息见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

引物	序列(5'→3')
GAPDH-正义链	GTATGACAACGAATTTGGCTACAG
GAPDH-反义链	TGAGGCTCTCTCTTCTCTCTTGT
HBV-正义链	CCTCTTCATCCTGCTGCT
HBV-反义链	AACTGAAAGCCAAACAGTG
Id1-正义链	GCTGTTACTCACGCCTCAAG
Id1-反义链	CAACTGAAGGTCCTGATGATG
Id2-正义链	ACTGCTACTCCAAGCTCAAGG
Id2-反义链	TGCAGGTCCAAGATGTAGTCG
Id3-正义链	AATCCTACAGCGCGTCATC
Id3-反义链	TGCTCTGGATGGGAAGGCTG

1.5 蛋白提取及 Western blot 检测

细胞处理 72 h 后,用细胞裂解液 RIPA(含 1 mg/mL PMSF)冰上裂解 15 min,低温高速离心 30 min 取上清。取黄豆大小上述小鼠的肝组织,剪刀剪碎后,置于冰上用匀浆机匀浆,加入适量的 RIPA(含 1 mg/mL PMSF)低温下裂解后离心取上清;BCA 法测定浓度,行常规 Western blot 操作。

1.6 启动子报告基因质粒构建

根据 GenBank 得到人 Id1、Id3 cDNA 起始密码子前 2 000 bp 的碱基序列,设计 Id1 和 Id3 的启动子重组引物。以 HepG2 细胞 cDNA 为模板进行 PCR,扩增片段与已被 *Kpn* I 和 *Xho* I 酶切 pGL3-Basic 载体同源重组。菌液 PCR 及酶切验证鉴定,最后将重组质粒的测序结果与目的序列比对。

表 2 启动子引物序列

引物	序列(5'→3')
Id1启动子-正义链	ATTTCCTATCGATAGGTA <u>CCATTACAGGTGCGCGCCA</u>
Id1启动子-反义链	ACTTAGATCGCAGATCTCGA <u>CGATTCTTGGCGACTGGCTG</u>
Id3启动子-正义链	ATTTCCTATCGATAGGTA <u>CCTGTATATGATGACCCGCTCTCCAT</u>
Id3启动子-反义链	ACTTAGATCGCAGATCTCGA <u>CAATAGTCTGGAACCTGGCAGGCACT</u>

注:下划线部分为与载体重叠序列,斜体部分为酶切位点

1.7 荧光素酶报告基因检测

将表达病毒及其 4 种编码蛋白的质粒分别和启动子质粒及相应比例的 PGL3-TK(1/50)用 LIP2000 共转染细胞,48 h 后收集细胞,用双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Dual-Luciferase Reporter Assay System Promega)处理,于 Promega 单管多动能检测仪中读取荧光数据。

1.8 统计学处理

采用 GraphPad Prism5.0 软件绘图,SPSS 19.0 软件行统计学分析。所有计量数据用 KolmogorovSmirnov 检验检测是否正态分布,并以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组均数间比较采用独立样本 *t* 检验分析。多组数据组间差异采用单因素方差分析,各实验组与载体对照组两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。检验水准均为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HBV 对肝癌细胞的 Id 家族 mRNA 表达水平的影响

先将 HepG2 细胞分别转染 pcDNA3.1 空载质粒和 pcD-

NA3.1-HBV1.1 HBV 复制质粒,48 h 后提取细胞 mRNA,qRT-PCR 分析结果,HepG2 载体对照组和实验组的 Id1、Id3 分别为 1.027 ± 0.242 、 1.060 ± 0.362 和 0.330 ± 0.062 、 0.231 ± 0.062 (图 1A、表 3)。再检测 Id 家族各成员在稳转 HBV 的 HepG2.2.15 细胞与对照 HepG2 细胞,及稳定复制 HBV 的 HepAD38(Tet-)细胞与用 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 四环素处理的 HepAD38(Tet+)中的 mRNA 表达差异,结果如图 1B、C 所示。Id1、Id3 的 mRNA 水平在 HepG2.2.15 细胞(分别为 0.309 ± 0.026 、 0.391 ± 0.067)中明显低于 HepG2 细胞(分别为 1.014 ± 0.178 、 1.005 ± 0.100),见表 4。而在 HepAD38 细胞系中,实验组和对照组 Id1、Id3 mRNA 的表达皆无统计学差异,见表 5。HBV 复制组与对照组 Id2 mRNA 水平的差异无统计学意义。

2.2 HBV 对肝癌细胞的 Id 家族蛋白表达水平的影响

提取 HBV 复制组及对照组细胞的蛋白,Western blot 分析 Id 家族蛋白水平的表达差异,结果如图 2 所示,HepG2 细胞 HBV 质粒转染组 Id1、Id3 的蛋白水平(0.409 ± 0.040 、 0.255 ± 0.058)明显低于载体对照组(1.000 ± 0.068 、 1.000 ± 0.247),差异具有统计学意义($t=10.532$ 、 4.155 , $P=0.000$ 、 0.014)。Id1、Id3 在

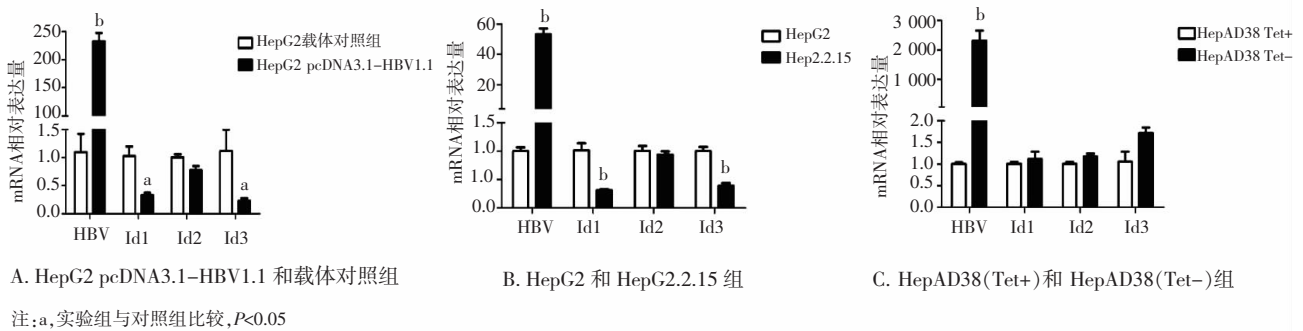


图 1 HBV 对肝癌细胞中 Id 家族的 mRNA 表达水平的影响

表 3 HBV 对 HepG2 中 Id 蛋白家族 mRNA 表达水平的影响

组别	HBV	Id1	Id2	Id3
HepG2 pcDNA3.1	1.098 ± 0.458	1.027 ± 0.242	1.003 ± 0.078	1.060 ± 0.362
HepG2 pcDNA3.1-HBV1.1	232.736 ± 20.664	0.330 ± 0.062	0.775 ± 0.103	0.231 ± 0.062
<i>t</i> 值	15.850	3.952	2.484	3.189
<i>P</i> 值	0.000	0.017	0.068	0.033

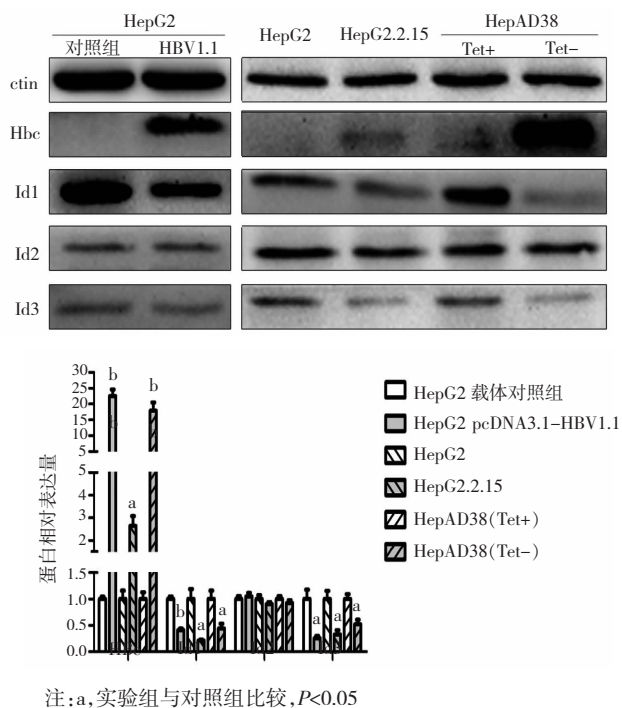
表 4 Id 蛋白家族在 HepG2 和 HepG2.2.15 中的 mRNA 表达水平

组别	HBV	Id1	Id2	Id3
HepG2	1.004 ± 0.092	1.014 ± 0.178	1.008 ± 0.121	1.005 ± 0.100
HepG2.2.15	53.218 ± 5.410	0.309 ± 0.026	0.937 ± 0.087	0.391 ± 0.067
<i>t</i> 值	13.646	5.553	0.671	7.211
<i>P</i> 值	0.000	0.005	0.539	0.002

表 5 Id 蛋白家族在 HepAD38(Tet+) 和 HepAD38(Tet-) 中 mRNA 表达水平

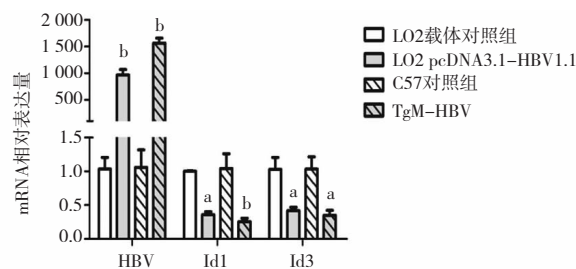
组别	HBV	Id1	Id2	Id3
HepAD38(Tet+)	1.002 ± 0.057	1.003 ± 0.074	1.002 ± 0.068	1.057 ± 0.327
HepAD38(Tet-)	2317.578 ± 479.233	1.119 ± 0.239	1.172 ± 0.099	1.716 ± 0.190
<i>t</i> 值	6.836	0.656	1.991	2.464
<i>P</i> 值	0.002	0.548	0.117	0.069

HepG2.2.15 细胞中的表达 (0.210 ± 0.026 、 0.327 ± 0.116) 较 HepG2 细胞 (1.000 ± 0.265 、 1.000 ± 0.218) 均降低 ($t=4.193$ 、 3.849 , $P=0.014$ 、 0.018); 未用四环素处理的 HepAD38 细胞相较于对照组, 其 Id1、Id3 蛋白相对表达量由 1.000 ± 0.226 、 1.000 ± 0.131 下降到 0.441 ± 0.126 、 0.517 ± 0.129 , 差异有统计学意义 ($t=3.052$ 、 3.712 , $P=0.038$ 、 0.021)。然而, 2 组细胞中 Id2 蛋白的表达皆无统计学差异。

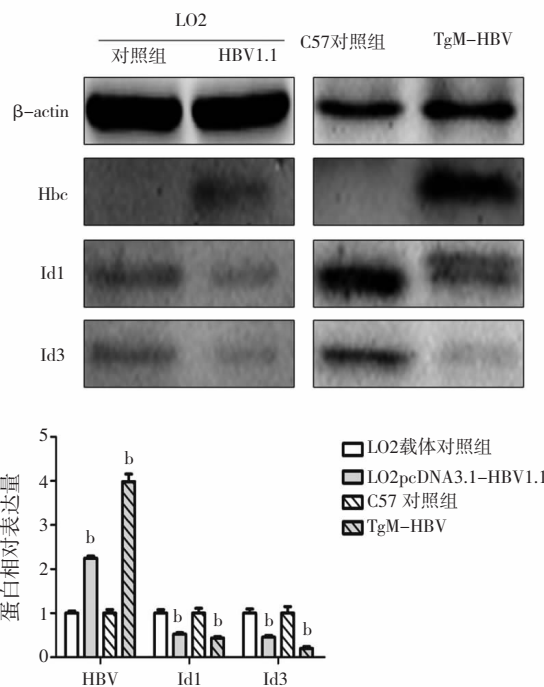


2.3 HBV 对正常肝细胞及小鼠肝组织中 Id1、Id3 表达的影响

为了进一步验证 Id1、Id3 在正常肝细胞和小鼠肝组织细胞中的表达是否受 HBV 影响, 本课题组首先在 LO2 细胞中瞬时转染 pcDNA3.1-HBV1.1 和 pcDNA3.1 对照质粒, qRT-PCR 检测发现 HBV 质粒转染组中 Id1、Id3 的 mRNA 相对表达量 (分别为 0.357 ± 0.061 、 0.417 ± 0.074) 低于空载对照组 (1.000 ± 0.011 、 1.029 ± 0.253), 差异具有统计学意义 ($t=14.564$ 、 3.281 , $P=0.000$ 、 0.030); Western blot 分析亦表明 pcDNA3.1-HBV1.1 组的 Id1、Id3 蛋白表达量 (0.523 ± 0.049 、 0.454 ± 0.053) 较对照组 (1.000 ± 0.109 、 1.000 ± 0.134) 明显减少 ($t=5.651$ 、 5.336 , $P=0.005$ 、 0.006)。其次, 选用 HBV 转基因 C57 小鼠 (TgM-HBV) 和普通 C57BL/6J (对照) 为实验对象, 检测 Id1、Id3 的表达水平。qRT-PCR 结果可得, TgM-HBV 组中 Id1、Id3 的 mRNA 表达水平 (0.255 ± 0.073 、 0.351 ± 0.101) 低于正常对照组 (1.042 ± 0.310 、 1.034 ± 0.257), 差异有统计学意义 ($t=3.489$ 、 3.495 , $P=0.025$ 、 0.025)。同样, Western blot 检测发现在 HBV 转基因小鼠中 Id1、Id3 的蛋白水平 (0.436 ± 0.047 、 0.196 ± 0.064) 较正常 C57 小鼠 (1.000 ± 0.154 、 1.000 ± 0.211) 明显降低 ($t=4.948$ 、 5.149 , $P=0.008$ 、 0.007) (图 3)。



A. qRT-PCR 检测 LO2 细胞 Id1、Id3 基因的 mRNA 表达量



B. Western blot 检测 Id1、Id3 基因的蛋白表达量

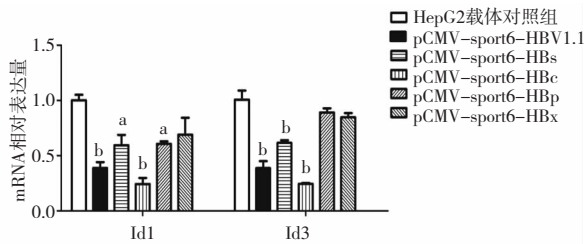
注: a, 实验组与对照组比较, $P<0.05$

图 3 HBV 对 LO2 细胞和小鼠肝组织中 Id1、Id3 表达的影响 ($n=3$)

2.4 HBV 4 种病毒蛋白对 HepG2 细胞中 Id1、Id3 表达的影响

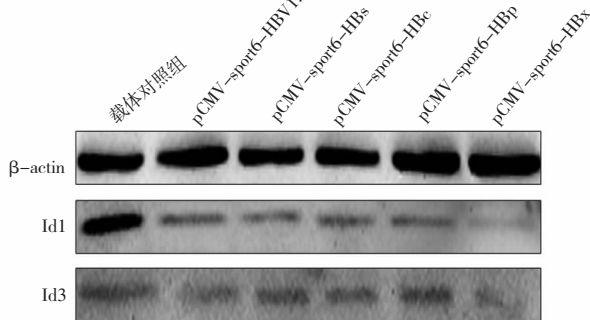
将 HepG2 细胞分成 6 组, 分别转染对照质粒 pCMV-sport6、HBV 复制质粒 pCMV-sport6-HBV1.1 和表达 HBV 病毒各组分蛋白的质粒 pCMV-sport6-HBs、pCMV-sport6-HBp、pCMV-sport6-HBc、pCMV-sport6-HBx, qRT-PCR 和 Western blot 检测分析各实验组和载体对照组 Id1、Id3 的表达, 结果如图 4、表 6 所示。HBV1.1 转染组 Id1、Id3 的 mRNA 和蛋白表达水平较对照组分别降低 (61.4%、62.1%和 76.1%、51.4%), 差异均有统计学意义 ($t=5.246$ 、 8.884 和 11.080 、 3.976 , $t=0.001$ 、 0.000 和 0.000 、 0.007), 再次验证了 HBV 可抑制肝癌细胞 Id1、Id3 的表达; 在 mRNA 水平上, HBs 组的 Id1、Id3 表达较对照组下降 40.7%、39.2%, HBc 组的 Id1、Id3 表达较对照组下降 77.7%、76.2%, HBp 组的 Id1 表达较对照组下降 39.5%, 差异均有统计学意义 ($F=9.945$ 、 37.528 ; $t_1=3.482$ 、 5.608 、 6.481 、 10.915 、 3.380 ; $P=0.018$ 、 0.000 、 0.000 、 0.000 、 0.021); 同样, 在蛋白水平

上,HBs 组的 Id1 表达较对照组下降 62.7%,HBc 组的 Id1 表达较对照组下降 52.9%,HBp 组的 Id1 表达较对照组下降 55.2%,HBx 组的 Id1、Id3 表达较对照组下降 86.2%、68.4%,差异均有统计学意义($F=38.225, 7.159; t_D=9.138, 7.708, 8.050, 12.550, 5.295; P=0.000, 0.000, 0.000, 0.000, 0.001$)。这表明乙肝病毒 4 种组分蛋白中,HBc 对肝细胞 Id1、Id3 mRNA 表达水平的抑制最明显,而 HBx 对 Id1、Id3 蛋白表达水平的下调最为明显。



A. qRT-PCR 检测细胞 Id1、Id3 基因的 mRNA 表达量

注:a,实验组与对照组比较, $P<0.05$



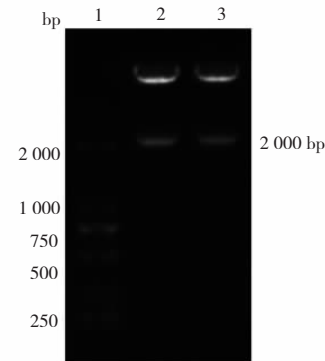
B. Western blot 检测细胞 Id1、Id3 基因的蛋白表达量

图 4 HBV 各组分蛋白对肝癌细胞中 Id1、Id3 表达的影响 ($n=3$)

2.5 启动子实验验证 HBc 对 Id1、Id3 mRNA 表达水平的影响

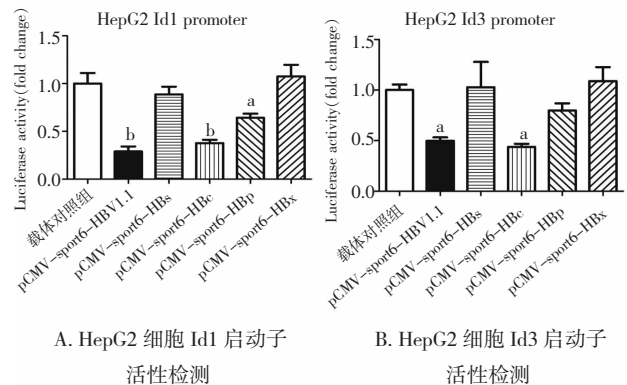
用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 将构建出的 pGL3-Id1 启动子及 pGL3-Id3 启动子重组质粒进行双酶切后,1%琼脂糖凝胶电泳,分别得到 2 条约 2 000 bp 大小的条带,与预期结果一致,如图 5 所示。用 DNAassist 软件将测定的基因序列与 GeneBank 查找的启动子序列进行比对分析,结果表明所插入的序列与目的序列完全吻合,重组质粒构建成功。将 HepG2 细胞分别转染质粒 pCMV-sport6、pCMV-sport6-HBV1.1、

pCMV-sport6-HBs、pCMV-sport6-HBp、pCMV-sport6-HBc、pCMV-sport6-HBx,并共转染 PGL3-TK 和 PGL3-Id1 启动子或 PGL3-Id3 启动子,48 h 后检测各组报告基因与海荧光素酶的荧光值,两者的比值反应目的启动子的相对活性,结果如图 6、表 7 所示。HBV1.1 组的 Id1、Id3 启动子活性较对照组分别下降了 71.0%、50.2%,HBc 组的 Id1、Id3 启动子活性较对照组下降 62.2%、56.3%,HBp 组的 Id1 启动子活性较对照组下降 35.5%,差异均有统计学意义($F=16.530, 5.210; t_D=6.205, 2.875, 5.442, 3.222, 3.106; P=0.000, 0.040, 0.000, 0.019, 0.025$)。进一步验证了乙肝病毒及其 C 蛋白对肝细胞 Id1、Id3 转录水平上的抑制作用。



1:DI2000 DNA Marker;2:pGL3-Id1 启动子双酶切产物;3:pGL3-Id3 启动子双酶切产物

图 5 pGL3-Id1 启动子和 pGL3-Id3 启动子重组质粒双酶切鉴定



A. HepG2 细胞 Id1 启动子活性检测

B. HepG2 细胞 Id3 启动子活性检测

注:a,实验组与对照组比较, $P<0.05$

图 6 HBV 各组分蛋白对肝癌细胞中 Id1、Id3 启动子活性的影响 ($n=4$)

表 6 HBV 组分蛋白对 HepG2 中 Id1、Id3 mRNA 和蛋白表达量的比较分析

组别	Id1 mRNA 表达量	Id3 mRNA 表达量	Id1蛋白表达量	Id3蛋白表达量
载体对照组	1.002 ± 0.069	1.007 ± 0.117	1.00 ± 0.119	1.000 ± 0.092
pCMV-sport6-HBV1.1 组	0.388 ± 0.076	0.386 ± 0.091	0.239 ± 0.040	0.486 ± 0.099
pCMV-sport6-HBs 组	0.595 ± 0.132	0.615 ± 0.035	0.373 ± 0.037	0.728 ± 0.112
pCMV-sport6-HBc 组	0.243 ± 0.077	0.245 ± 0.012	0.471 ± 0.069	0.662 ± 0.119
pCMV-sport6-HBp 组	0.607 ± 0.032	0.890 ± 0.053	0.448 ± 0.060	0.835 ± 0.230
pCMV-sport6-HBx 组	0.689 ± 0.218	0.847 ± 0.056	0.138 ± 0.052	0.316 ± 0.050
<i>F</i> 值	9.945	37.528	38.225	7.159
<i>P</i> 值	0.001	0.000	0.000	0.003

表 7 HBV 组分蛋白对 HepG2 细胞 Id1、Id3 启动子活性的比较分析

组别	Id1启动子 相对活性	Id3启动子 相对活性
载体对照组	1.000 ± 0.193	1.000 ± 0.094
pCMV-sport6-HBV1.1 组	0.290 ± 0.091	0.498 ± 0.059
pCMV-sport6-HBs 组	0.888 ± 0.139	1.028 ± 0.433
pCMV-sport6-HBc 组	0.378 ± 0.061	0.437 ± 0.055
pCMV-sport6-HBp 组	0.645 ± 0.071	0.798 ± 0.121
pCMV-sport6-HBx 组	1.076 ± 0.210	1.088 ± 0.240
F 值	16.530	5.210
P 值	0.000	0.004

3 讨 论

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)病毒感染与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生密切相关。HBV DNA 水平甚至被证明是 HCC 发生的独立预测因子^[9-10]。在慢性乙型肝炎中,持续的病毒感染和无效的 CD8⁺ T 细胞反应可以导致慢性炎症性肝损伤和肝细胞的反复补偿性增殖,继而发展为肝硬化和 HCC^[11]。此外,86.4%的 HBV 相关 HCC 中,HBV 整合入宿主基因组致使其发生缺失、易位、顺式/反式激活,并降低基因组的稳定性^[12]。其中包括 TERT、MLL4、CCNE1、SEN5P 和 ROCK1 等与细胞周期调控和祖细胞表型的基因上调和突变^[13]。

HBV 病毒编码的蛋白亦可直接参与宿主基因的调控表达,影响肝癌的发生发展。赵培庆等发现,DLC1(抑癌基因)在 HepG2 HBc 转染组与对照组的表达有明显差异,这表明 HBc 可以间接促进肝癌的发生发展。HBx 蛋白则是公认的直接致癌蛋白^[14]。作为一种多功能调节蛋白,它主要通过反式激活肝细胞癌基因及细胞因子^[15],促进细胞增殖,减少细胞凋亡,诱导细胞周期停滞,调控细胞氧化应激和 DNA 修复的信号通路^[16],进而诱导肝癌的发生。同时,HBx 可以直接上调 DNA 甲基转移酶 1(DN-MT1)的表达,诱导全基因组区域甲基化,沉默肿瘤抑制基因并降低染色体的稳定性^[17]。HBx 转基因小鼠模型研究表明其肝组织对其他已知致癌物的敏感性明显增加^[18]。

目前有研究报道,HCC 组织细胞中 HBV 的 cccDNA 拷贝数较其癌旁组织明显降低^[19]。在初级 Tupaia 肝细胞及复制 HBV 的细胞模型上的研究发

现,增强的有丝分裂与 HBV cccDNA 下降相关,即细胞增殖可以拮抗病毒复制^[20]。此外,HBV DNA 整合到宿主染色体形成的双链线性 DNA 可以通过其末端的非同源重组再次形成 cccDNA。然而,这种 cccDNA 的末端因含有随机改变冗余 r 序列而导致复制缺陷^[21]。Halgand 等^[22]发现肝癌组织细胞中存在 40 种与 pgRNA 水平有关的基因的表达水平发生了变化,而这些基因大多是参与细胞的周期调控和 DNA 损伤修复。总之,肝组织细胞发展成肿瘤后,HBV 的复制水平反而明显下降。

Id 蛋白在多种肿瘤中过表达,它的失调与肿瘤的发生、维持、进展和药物抗性有着直接关系。研究表明,Id1、Id2、Id3 在肝癌中均高表达,并参与其增殖、侵袭、转移及血管生成等多种生物过程^[23-26]。HBV 病毒及其编码蛋白是否影响肝癌细胞中 Id1、Id3 的表达,在目前却鲜有报道。本实验主要研究 HBV 复制对肝中 Id 家族蛋白表达的调控。结果表明,在 HBV 瞬时或稳定复制肝细胞中,HBV 可以抑制 Id1、Id3 的表达,而对 Id2 的表达没有明显影响。其中,Id1、Id3 在 HepAD38 四环素处理组和对照组的 mRNA 水平没有统计学差异。这可能是 HBV 复制水平受诱导型 CMVtet 启动子调控^[27]的 HepAD38 细胞病毒表达过高反而抑制了 Id1、Id3 的转录。同样,瞬时转染 HBV 复制质粒肝正常细胞 LO2 和 HBV 转基因小鼠肝组织中 Id1、Id3 的表达较对照组均明显下降,说明 HBV 复制能抑制肝组织、细胞中 Id1、Id3 蛋白的表达。为明确 HBV 自身蛋白对 Id1、Id3 表达的影响,将其组分蛋白的过表达质粒转染 HepG2 细胞,相关检测结果表明 HBc 对 Id1、Id3 转录的抑制最明显,而 HBx 则对 Id1、Id3 在蛋白水平上的下调最明显。后续实验将进一步筛查 HBc 与对照组 Id1、Id3 相关信号通路及转录因子变化,并检测分析 HBx 对 Id1、Id3 泛素化或蛋白酶体的影响。

综上所述,HBV 作为 HCC 早期发生发展的危险因子^[28],可以诱导肝癌的发生。在所形成的肿瘤中,HBV 的复制由于细胞增殖能力的增强、DNA 修复的上调以及病毒 DNA 的整合等原因而明显下调^[19-22],病毒编码蛋白 HBc 及 HBx 的表达也明显降低。此时,它们对 Id1、Id3 表达的抑制作用亦相应地下降甚至丧失,使其在肝癌细胞中的表达量大幅增高。而高表达的 Id1、Id3 将进一步促进 HBV-HCC 的发展。

参 考 文 献

- [1] Chen CJ, Yang HI. Natural history of chronic hepatitis B REVEALed [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(4): 628–638.
- [2] Kim BK, Han KH, Ahn SH. Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Oncology*, 2011, 81(S1): 41–49.
- [3] Rapti I, Hadziyannis S. Risk for hepatocellular carcinoma in the course of chronic hepatitis B virus infection and the protective effect of therapy with nucleos(t)ide analogues[J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(8): 1064–1073.
- [4] Trausch-Azar JS, Lingbeck J, Ciechanover A, et al. Ubiquitin-Proteasome-mediated degradation of Id1 is modulated by MyoD[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(31): 32614–32619.
- [5] Lin J, Guan Z, Wang C, et al. Inhibitor of differentiation 1 contributes to head and neck squamous cell carcinoma survival via the NF- κ B/survivin and phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(1): 77–87.
- [6] Niola F, Zhao X, Singh D, et al. Id proteins synchronize stemness and anchorage to the niche of neural stem cells[J]. *Nature Cell Biology*, 2012, 14(5): 477–487.
- [7] Coma S, Amin D A, Lasorella A, et al. Id2 promotes tumor cell migration and invasion through transcriptional repression of semaphorin 3F[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(9): 3823–3832.
- [8] Ruzinova MB, Schoer RA, Gerald W, et al. Effect of angiogenesis inhibition by loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors[J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(4): 277–289.
- [9] Chen CJ, Yang HI. Natural history of chronic hepatitis B revealed [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(4): 628–638.
- [10] Iloeje UH, Yang HI, Su J, et al. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(3): 678–686.
- [11] Bouchard MJ, Navas-Martin S. Hepatitis B and C virus hepatocarcinogenesis: lessons learned and future challenges[J]. *Cancer Lett*, 2011, 305(2): 123–143.
- [12] Sung WK, Zheng H, Li S, et al. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(7): 765–769.
- [13] Amaddeo G, Cao Q, Ladeiro Y, et al. Original article: integration of tumour and viral genomic characterisations in HBV-related hepatocellular carcinomas[J]. *Gut*, 2014, 64(5): 820–829.
- [14] Pollicino T, Saitta C. Occult hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 325(20): 5951–5961.
- [15] Misra KP, Mukherji A, Kumar V. The conserved amino-terminal region (amino acids 1–20) of the hepatitis B virus X protein shows a transrepression function[J]. *Virus Research*, 2004, 105(2): 157.
- [16] Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2016, 64(1S): 84–101.
- [17] Jung JK, Arora P, Pagano JS, et al. Expression of DNA methyltransferase 1 is activated by hepatitis B virus X protein via a regulatory circuit involving the p16INK4a-cyclin D1-CDK 4/6-pRb-E2F1 pathway[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(12): 5771–5778.
- [18] Yu DY, Moon HB, Son JK, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis B virus X-protein[J]. *J Hepatol*, 1999, 31(1): 123–132.
- [19] Wang Q, Lin L, Yoo S, et al. Impact of non-neoplastic vs intratumoural hepatitis B viral DNA and replication on hepatocellular carcinoma recurrence[J]. *British Journal of Cancer*, 2016, 115(7): 841–847.
- [20] Chong CL, Chen ML, Wu YC, et al. Dynamics of HBV cccDNA expression and transcription in different cell growth phase[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2011, 18: 96.
- [21] Wong DK, Yuen MF, Poon RT, et al. Quantification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Hepatology*, 2006, 45(4): 553–559.
- [22] Halgand B, Desterke C, Rivière L, et al. Hepatitis B virus pregenomic RNA in hepatocellular carcinoma: a nosological and prognostic determinant[J]. *Hepatology*, 2018, 67(1): 86–96.
- [23] Ding R, Han S, Lu Y, et al. Overexpressed Id-1 is associated with patient prognosis and HBx expression in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2010, 10(3): 299–307.
- [24] Matsuda Y, Yamagiwa S, Takamura M, et al. Overexpressed Id-1 is associated with a high risk of hepatocellular carcinoma development in patients with cirrhosis without transcriptional repression of p16[J]. *Cancer*, 2005, 104(5): 1037–1044.
- [25] Damdinsuren B, Nagano H, Kondo M, et al. Expression of Id proteins in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation[J]. *International Journal of Oncology*, 2005, 26(2): 319–327.
- [26] Jung JW, Yoon SM, Kim S, et al. Bone morphogenetic protein-9 is a potent growth inhibitor of hepatocellular carcinoma and reduces the liver cancer stem cells population[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(45): 73754–73768.
- [27] Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, et al. Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication[J]. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 1997, 41(8): 1715–1720.
- [28] Chan HL, Hui AY, Wong ML, et al. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma[J]. *Gut*, 2004, 53(10): 1494–1498.

(责任编辑: 冉明会)