

肝 疾 病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002213

顺铂通过 ROS 促进乙型肝炎病毒复制的实验研究

陈雪梅, 胡 杰, 潘 娥, 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(cisplatin)促进乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)复制的分子机制。**方法:**采用不同浓度的顺铂处理稳定表达 HBV 的 HepAD38 细胞, 台盼蓝染色检测细胞活力, 筛选出顺铂最适浓度, 分别采用 Real-time PCR 和 Southern blot 检测 HBV DNA 水平, Western blot 检测 HBsAg 和 HBeAg 蛋白表达。在顺铂诱导组加或者不加氧化应激抑制剂 *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸(*N*-acetyl-*L*-cysteine, NAC), 采用 CellROX Orange Reagent 染料在激光共聚焦显微镜下检测细胞内 ROS 水平, 并且检测 HBV DNA 水平、HBsAg 及 HBeAg 的蛋白水平。**结果:**台盼蓝染色筛选出顺铂的最适浓度为 6 $\mu\text{mol/L}$ 。Real-time PCR 实验结果显示, PBS 组, 0.5、2.0、6.0 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理后 HBV DNA 拷贝数/细胞分别为 515.152 ± 18.924 、 $1\,215.758 \pm 49.001$ ($P=0.000$)、 $1\,678.182 \pm 117.223$ ($P=0.000$)、 $2\,110.606 \pm 143.640$ ($P=0.000$); Southern blot 结果与 Real-time PCR 结果一致, 顺铂以剂量依赖方式增加 HBV DNA 水平。Western blot 结果表明, 与 PBS 组相比, 6.0 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂组 HBsAg、HBeAg 蛋白相对表达量分别为 3.102 ± 0.099 ($P=0.000$)、 4.001 ± 0.200 ($P=0.000$); 顺铂可以促进 HBV 复制和病毒蛋白的表达。进一步采用 NAC 与顺铂联合处理 HepAD38 细胞, Real-time PCR 实验结果表明, 顺铂组、顺铂+NAC 组 HBV DNA 拷贝数/细胞分别为 $2\,180.444 \pm 82.573$ ($P=0.000$)、 $1\,041.778 \pm 50.918$ ($P=0.000$), 2 组差异具有统计学意义。Western blot 实验结果表明, 顺铂组 HBsAg、HBeAg 蛋白相对表达量分别为 3.139 ± 0.061 ($P=0.000$)、 3.812 ± 0.109 ($P=0.000$), 顺铂+NAC 组 HBsAg、HBeAg 蛋白相对表达量分别为 2.101 ± 0.088 ($P=0.000$)、 1.613 ± 0.073 ($P=0.000$), 2 组之间 HBsAg、HBeAg 蛋白差异均具有统计学意义。**结论:**顺铂通过增强细胞内 ROS 水平, 促进 HBV 复制, 而 NAC 可以部分抑制顺铂刺激的 HBV 复制作用。

【关键词】顺铂; 乙型肝炎病毒; 病毒复制; 活性氧; *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸**【中图分类号】**R5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-12-25Cisplatin contributes to hepatitis B virus replication via ROS:
an experimental study

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

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

【Abstract】Objective: To investigate the molecular mechanism of cisplatin-induced hepatitis B virus (HBV) replication. **Methods:** HepAD38 cells with stable expression of HBV were treated with different concentrations of cisplatin, and the optimal concentration of cisplatin was chosen according to trypan blue staining for cell viability. The level of HBV DNA was measured by real-time PCR and Southern blot, and the expression of HBsAg and HBeAg was measured by Western blotting. The cisplatin-induced group of HepAD38 cells were treated with or without *N*-acetyl-*L*-cysteine (NAC). Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were deter-

作者介绍: 陈雪梅, Email: 6391623@qq.com,

研究方向: 顺铂诱导 HBV 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, 81872270, 81602417, 81572683); 重庆市“三百”科技领军人才支持计划资助项目 (编号: CSTCCXLJRC201719); 重庆高校创新团队建设计划资助项目 (编号: CXTDX201601015); 重庆市科委重点资助项目 (编号: cstc2018jcyjAX0254); 重庆市研究生科研创新资助项目 (编号: YB17138); 重庆医科大学研究生拔尖人才计划资助项目 (编号: BJRC201727)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190606.1650.002.html>
(2019-06-11)

mined with CellROX Orange Reagent under laser scanning confocal microscopy, and the level of HBV DNA and expression of HBsAg and HBeAg proteins were measured. **Results:** The optimal concentration of cisplatin was 6 $\mu\text{mol/L}$ according to trypan blue staining. The results of real-time PCR showed that compared with 515.152 ± 18.924 in the PBS group, the copies (per cells) of HBV DNA were $1\,215.758 \pm 49.001$ ($P=0.000$), $1\,678.182 \pm 117.223$ ($P=0.000$), and $2\,110.606 \pm 143.640$ ($P=0.000$) after being treated with 0.5, 2, and 6 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin, respectively. Moreover, cisplatin treatment increased HBV DNA levels in a dose-dependent manner as measured by Southern

blot, the same as results of real-time PCR. The results of Western blot showed that compared with the PBS group, the 6 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin treatment group had a relative HBsAg expression level of 3.102 ± 0.099 ($P=0.000$) and a relative HBcAg expression level of 4.001 ± 0.200 ($P=0.000$), suggesting that cisplatin contributed to HBV replication and protein expression. After HepAD38 cells were treated with cisplatin and NAC, the results of real-time PCR showed that the copies(per cells) of HBV DNA in the cisplatin group and cisplatin+NAC group were $2\ 180.444 \pm 82.573$ ($P=0.000$) and $1\ 041.778 \pm 50.918$ ($P=0.000$), respectively; there was a significant difference in the level of HBV DNA between the two groups. According to the results of Western blot, the cisplatin group had a relative HBsAg expression level of 3.139 ± 0.061 ($P=0.000$) and a relative HBcAg expression level of 3.812 ± 0.109 ($P=0.000$), and the cisplatin+NAC group had a relative HBsAg expression level of 2.101 ± 0.088 ($P=0.000$) and a relative HBcAg expression level of 1.613 ± 0.073 ($P=0.000$); there were significant differences in the relative expression levels of HBsAg and HBcAg between the two groups. **Conclusion:** Cisplatin enhances HBV replication by increasing intracellular ROS levels, and NAC can partially reverse cisplatin-induced HBV replication.

[Key words] cisplatin; hepatitis B virus; virus replication; reactive oxygen species; *N*-acetyl-*L*-cysteine

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个严重的全球性公共卫生问题。据世界卫生组织报道,全世界约有 20 亿人曾经感染 HBV, 约有 3.5 亿人患有慢性 HBV 感染, 慢性 HBV 感染是肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生的主要原因^[1-2]。HBV 是部分双链环状的、严格嗜肝 DNA 病毒, 其基因组全长 3.2 kb, 属于 Hepadnaviridae 家族。HBV 基因组主要转录为 4 种大小不同的 mRNA(即 0.7、2.1、2.4 和 3.5 kb 的 mRNA), 编码合成 7 种蛋白, 包括 HBV 小、中、大表面蛋白(hepatitis B surface antigen, HBsAg), HBV e 抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg)、HBV 核心抗原(hepatitis B core antigen, HBcAg), HB X 蛋白(hepatitis B x protein, HBx)和 DNA 聚合酶^[3-4]。1975 年 Galbraith 等^[5]首次报道了接受化疗药物治疗的肾移植患者发生 HBV 再激活。HBV 再激活是指相对于基线水平, HBV DNA 水平突然升高至少 100 倍或其绝对值达到 10^9 copies/mL 以上, 或同时伴有丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶水平升高。当慢性 HBV 感染者在接受化疗或者免疫抑制剂治疗时, 静息状态或者低复制状态的 HBV 瞬时活化, 发生 HBV 再激活现象, 大量瞬时活化的 HBV 激发机体急性免疫反应, 可能导致患者出现严重的肝功能损伤甚至肝衰竭, 从而导致原有治疗减缓或中断, 严重影响患者预后甚至危及生命^[6]。据报道, 在接受化疗的慢性乙型肝炎患者中, HBV 再激活的发生率为 4%~68%^[7]。HBV 再激活可发生在肝癌治疗期间或整个疗程完成之后。研究发现, HBsAg 阳性的肝癌患者 HBV 再激活率为 4%~67%, 病死率高达 18%^[8]; 直接作用抗病毒药物(direct act-

ing antivirals, DAA)成功治疗的丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)也发生隐匿性 HBV 再激活^[9]。因此, 需要研究 HBV 再激活的机制, 为临床提供潜在的治疗手段。

顺铂(cisplatin)是一种有效的化疗药物, 常用于治疗各种类型的癌症, 包括淋巴瘤、肉瘤、卵巢癌、宫颈癌、小细胞肺癌和膀胱癌等^[7, 10]。已有临床报道 HBV 再激活是接受顺铂治疗的癌症患者严重的并发症之一^[11-12]。目前认为 HBV 再激活的可能原因之一是化疗药物干扰了宿主对 HBV 复制的免疫调控, 当机体的免疫力受到抑制时病毒复制增强。但是近一半的 HBV 再激活发生在化疗早期, 表明除了扰乱免疫和病毒复制之间的平衡机制, 抗癌药物的直接刺激作用也是 HBV 再激活的原因之一^[6, 13]。因此, 化疗药物或免疫抑制剂相关的 HBV 再激活的潜在机制需要进一步研究。

本实验发现, 在 HBV 稳定表达细胞模型中, 顺铂通过增强活性氧(Reactive oxygen species, ROS)水平明显促进 HBV 复制。本研究旨在探讨慢性 HBV 感染和 HBV 再激活的潜在机制, 为临床预防和阻断 HBV 再激活提供指导。

1 材料和方法

1.1 细胞系

HepAD38 细胞系为本实验室保存。细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养于 DMEM/F12 培养基中(含 10%胎牛血清、100 mg/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素)。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 培养基、青链霉素购自 Hyclone 公司; 血清、

胰酶、台盼蓝购自 Gibco 公司;BCA 定量试剂盒购自鼎国公司;酚氯仿、IP 裂解液购自碧云天公司;定量 PCR 试剂盒和 Cell-ROX Orange Reagent 购自 Invitrogen 公司;微管酶购自 NEB 公司;蛋白酶 K、DIG 探针标记检测试剂盒、尼龙膜购自 Roche 公司;PVDF 膜、ECL 购自 Millipore 公司;HBsAg 抗体购自 Novus Biological 公司;HBcAg 抗体购自 Dako 公司; β -actin 抗体购自 Biosharp 公司;顺铂购自 Selleck 公司。

1.3 方法

1.3.1 台盼蓝染色检测细胞活力 将状态良好的 HepAD38 细胞以 40% 的密度接种于 48 孔培养皿中,细胞贴壁后换培养基并加入不同浓度的顺铂:0.1、0.5、2.0、4.5、6、8 $\mu\text{mol/L}$,各个浓度均设置 3 个重复孔,药物处理 120 h 后,胰酶消化制备单细胞悬液,将 18 μL 单细胞悬液与 2 μL 台盼蓝染料混匀,细胞计数板计数活细胞数和死细胞数,活细胞率(%)=活细胞总数/(活细胞总数+死细胞总数) $\times 100\%$ 。本实验重复 3 次。

1.3.2 Real-time PCR 检测 HBV 复制水平 使用不同浓度,即 0.5、2.0、6 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理 HepAD38 细胞,对照组用 PBS 处理,72 h 后,胰酶消化细胞后制备单细胞悬液,计数,离心去上清,CPLB 裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1% NP-40, 2% 蔗糖)裂解细胞,13 000 g 离心 5 min 后取上清,微管酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 1 h,13 000 g 离心 5 min 后取上清,35% PEG8000 冰上沉淀上清中的病毒颗粒 1 h,蛋白酶 K 消化过夜后酚/氯仿抽提,乙醇沉淀获得 HBV 复制中间体。选取 pCH9/3091 质粒作为标准品,Real-time PCR 方法对提取的 HBV 复制中间体进行定量检测。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,39 个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,75 $^{\circ}\text{C}$ 1 s),溶解曲线:50 $^{\circ}\text{C}$ 1 s,99 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。序列见表 1。本实验重复 3 次。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物
HBV DNA	正义链:5'-CCTCTTCATCCTGCT-3'
	反义链:5'-AACTGAAAGCCAAACAGTG-3'
β -actin	正义链:5'-AGGCCAACCAGGAGAAGATGACC-3'
	反义链:5'-GAAGTCCAGGCGACGTAGCAC-3'

1.3.3 Southern blot 检测 HBV 复制水平 HBV DNA 样品在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 110 V 60 min,碱变性后转膜至尼龙膜上,紫外交联固定 DNA 后,采用地高辛标记的 DNA 杂交进行杂交显影。

1.3.4 Western blot 检测 HBsAg 和 HBcAg 的表达 将状态良好的 HepAD38 细胞以 50% 的密度接种于 6 孔培养皿中,分别使用顺铂浓度 0.5、2.0、6 $\mu\text{mol/L}$ 处理 HepAD38 细胞,对照组用 PBS 处理,72 h 后提取总蛋白,BCA 定量检测蛋白浓度,取 30 μg 上样量,经 90 min 蛋白电泳后,蛋白转膜至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,1:1 000 和 1:500 的比例分别孵育 HBsAg 和 HBcAg 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。1 $\times$ TBST 洗膜后二抗孵育 1 h,1 $\times$ TBST 洗膜后加入 ECL 发光剂曝光。本实验重复 3 次。

1.3.5 ROS 染色 将状态良好的 HepAD38 细胞以 50% 的密度接种于铺有玻片的 6 孔板中,细胞贴壁后加入 *N*-乙酰半胱氨酸(*N*-acetyl-L-cysteine, NAC)(4 mmol/L)预处理 2 h 后加入 6 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理 36 h,对照组用 PBS 处理。弃培养基,无菌 PBS 洗涤细胞 3 次后,5 $\mu\text{mol/L}$ CellROX Orange 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,无菌 PBS 洗涤细胞 3 次,DAPI 染细胞核 3 min 后 PBS 洗涤 3 次,封片镜检。本实验重复 3 次。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计分析软件分析每次实验结果。数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较先采用单因素方差分析,再进行多重比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。每种实验均独立重复 3 次。

2 结果

2.1 顺铂对 HepAD38 细胞活力的影响

台盼蓝染色检测不同浓度顺铂对 HepAD38 细胞活力的影响(表 2),6 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理细胞活力大于 90%,8 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞活力为 82.792 ± 3.398 ,说明 8 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂时细胞活力明显降低,该浓度下对细胞有毒害作用,6 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂对细胞活力无明显影响,选择 6 $\mu\text{mol/L}$ 浓度作为顺铂最适浓度,并设置 0.5、2.0、6.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度进行后续实验。该实验重复 3 次。

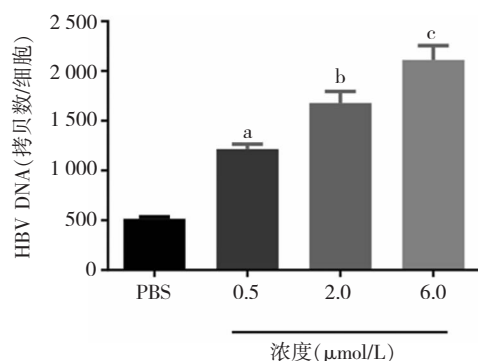
表 2 台盼蓝染色检测不同浓度顺铂处理组的细胞活力

组别	细胞活力
PBS 组	98.576 ± 0.392
0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组	96.627 ± 0.536
0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	95.640 ± 0.634
2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	93.876 ± 2.098
4.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	92.559 ± 0.998
6.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	91.494 ± 1.135
8.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	82.792 ± 3.398
<i>F</i> 值	29.104
<i>P</i> 值	0.000

注:PBS 组与 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.170$;PBS 组与 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.047$;PBS 组与 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.004$;PBS 组与 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.001$;PBS 组与 6.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$;PBS 组与 8.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$

2.2 Real-time -PCR 检测顺铂作用后 HBV DNA 表达水平变化

顺铂处理 HepAD38 细胞 72 h 后,提取细胞 HBV 复制中间体,Real-time PCR 检测细胞 HBV 复制水平。如表 3 和图 1 所示:与对照组相比,随着顺铂浓度梯度增加,每个细胞 HBV DNA 拷贝数分别为 $1\ 215.758 \pm 49.001$ 、 $1\ 678.182 \pm 117.223$ 、 $2\ 110.606 \pm 143.640$,说明顺铂促进 HBV 病毒复制。该实验重复 3 次。



注: a, PBS 组与 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$; b, PBS 组与 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$; c, PBS 组与 6.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$

图 1 Real-time PCR 检测不同浓度顺铂处理组的 HBV 复制水平

表 3 Real-time PCR 检测顺铂不同浓度组的 HBV 复制水平拷贝数/细胞

组别	复制水平
PBS 组	515.152 $\pm$ 18.924
0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	1 215.758 $\pm$ 49.001
2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	1 678.182 $\pm$ 117.223
6.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	2 110.606 $\pm$ 143.640
<i>F</i> 值	150.554
<i>P</i> 值	0.000

注: PBS 组与 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$; PBS 组与 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$; PBS 组与 6.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$

2.2 Southern blot 检测顺铂作用后 HBV DNA 表达水平变化

进一步采用 Southern blot 检测顺铂作用后 HBV DNA 表达水平。与 Real-time PCR 结果一致, 与对照组相比, 随着顺铂浓度梯度增加, 病毒核心颗粒中的 HBV DNA 水平明显增加 (图 2)。该实验重复 3 次。

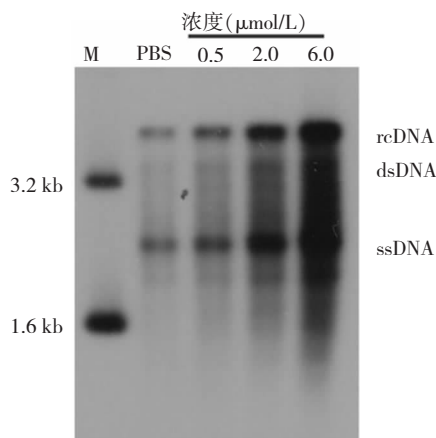
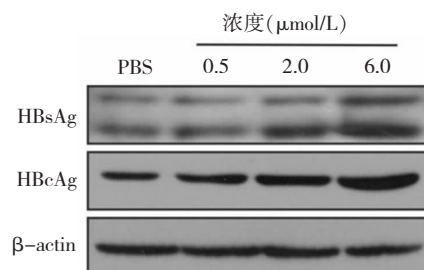


图 2 Southern blot 检测顺铂对 HBV DNA 水平变化的影响

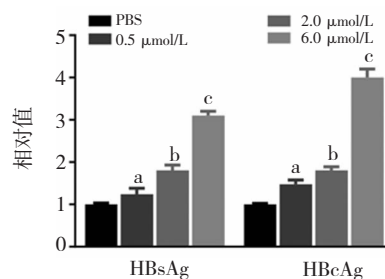
2.3 Western blot 验证顺铂作用后 HBV 病毒蛋白表达水平

Western blot 方法检测顺铂作用后 HBsAg 和 HBeAg 的表达水平 (图 3, 表 4)。随着顺铂浓度增加, 与 PBS 组相比,

6.0 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理组 HBsAg 和 HBeAg 蛋白相对表达量分别为 3.102 ± 0.099 ($P=0.000$)、 4.001 ± 0.200 ($P=0.000$)。该实验重复 3 次。



A. Western blot 检测 HBsAg、HBeAg



B. 各组蛋白相对定量

注: HBsAg, a, PBS 组与 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.026$; b, PBS 组与 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$; c, PBS 组与 6.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$; HBeAg: a, PBS 组与 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.001$; b, PBS 组与 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$; c, PBS 组与 6.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$

图 3 Western blot 检测 HBsAg、HBeAg 的蛋白表达水平

表 4 Western blot 检测各组蛋白相对表达量

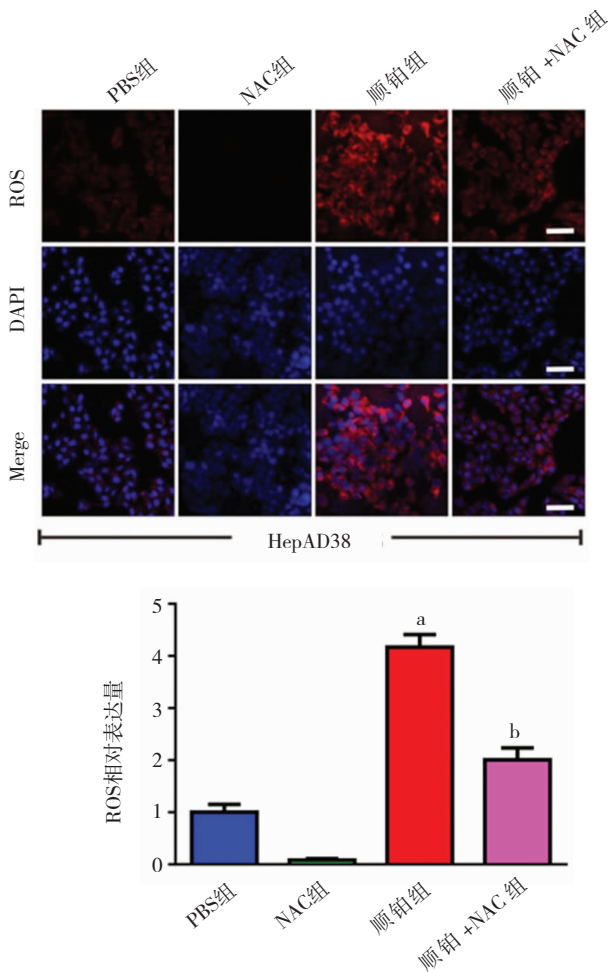
组别	HBsAg	HBeAg
PBS 组	1.000 $\pm$ 0.029	1.000 $\pm$ 0.024
0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.240 $\pm$ 0.142	1.478 $\pm$ 0.098
2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.808 $\pm$ 0.124	1.807 $\pm$ 0.081
6.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	3.102 $\pm$ 0.099	4.001 $\pm$ 0.200
<i>F</i> 值	228.981	373.748
<i>P</i> 值	0.000	0.000

注: HBsAg, PBS 组与 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.026$; PBS 组与 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$; PBS 组与 6.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$; HBeAg: PBS 组与 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.001$; PBS 组与 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$; PBS 组与 6.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P=0.000$

2.4 顺铂诱导 HepAD38 细胞内 ROS 水平增加

在 HepAD38 细胞模型中, NAC 处理 2 h 后加入顺铂继续处理 36 h, 激光共聚焦显微镜观察细胞内 ROS 水平 (图 4, 表 5)。与对照组 ROS 相对平均光密度为 (1.000 ± 0.154) 相比, 顺铂组 ROS 相对平均光密度为 (8.494 ± 0.243) ($P=0.000$); 说明顺铂明显增加细胞内 ROS 水平; 同时与顺铂组相比, ROS 抑制剂 NAC 联用顺铂组 ROS 相对平均光密度为 (2.005 ± 0.231) ($P=0.000$), 说明 NAC 与顺铂联用可以拮抗

顺铂诱导 ROS 水平上调。该实验重复 3 次。



注:a,PBS 组与顺铂组比, $P=0.000$;b:顺铂组与顺铂+NAC 组比, $P=0.000$

图 4 激光共聚焦检测 ROS 水平变化

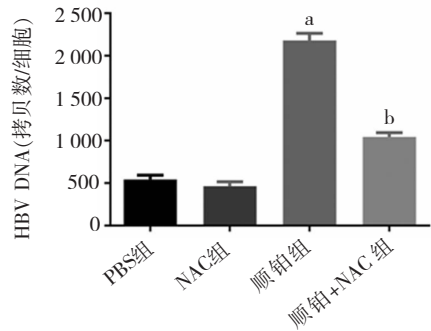
表 5 ROS 水平相对定量

组别	平均光密度
PBS组	1.000 ± 0.154
NAC组	0.082 ± 0.029
顺铂组	8.494 ± 0.243
顺铂 +NAC 组	2.005 ± 0.231
F 值	1 275.797
P 值	0.000

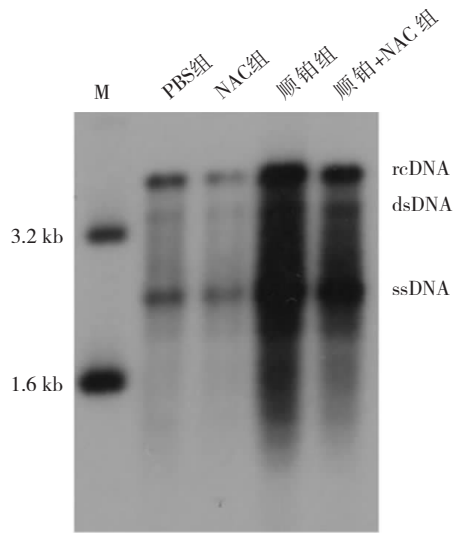
注:PBS 组与 NAC 组比, $P=0.000$;PBS 组与顺铂组比, $P=0.000$;PBS 组与顺铂+NAC 组比, $P=0.000$;顺铂组与顺铂+NAC 组比, $P=0.000$

2.5 顺铂通过 ROS 促进 HBV 复制

采用 ROS 抑制剂 NAC 预处理 HepAD38 细胞 2 h,顺铂处理 72 h 后提取 HBV 复制中间体,Southern blot(图 5)和 Real-time PCR(表 6)检测 HBV DNA 的表达水平变化。与顺铂组相比,顺铂+NAC 组 HBV DNA 水平明显降低,说明NAC 可以部分拮抗顺铂诱导的 HBV 再激活作用。该实验重复 3 次。



A. Real-time PCR 检测 HBV DNA



B. Southern blot 检测 HBV DNA

注:a,PBS 组与顺铂组比, $P=0.000$;b:顺铂组与顺铂+NAC 组比, $P=0.000$

图 5 抑制 ROS 后 Real-time PCR 和 Southern blot 检测的 HBV 复制水平

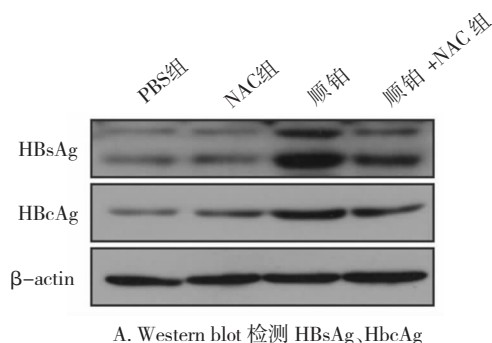
表 6 抑制 ROS 后 qRT-PCR 检测的 HBV 复制水平拷贝数/细胞

组别	复制水平
PBS组	542.556 ± 50.918
NAC组	464.000 ± 52.375
顺铂组	2 180.444 ± 82.573
顺铂 +NAC 组	1 041.778 ± 50.918
F 值	509.586
P 值	0.000

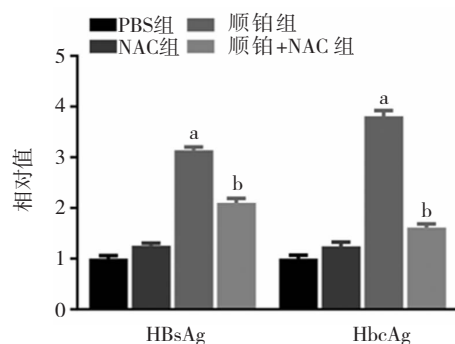
注:PBS 组与 NAC 组比, $P=0.152$;PBS 组与顺铂组比, $P=0.000$;PBS 组与顺铂+NAC 组比, $P=0.000$;顺铂组与顺铂+NAC 组比, $P=0.000$

2.6 抑制 ROS 后可以逆转顺铂促进的 HBV 复制

在稳定高表达 HBV 的 HepAD38 细胞模型中,NAC 预处理 2 h 后顺铂继续处理 72 h,Western blot 检测各组 HBsAg 和 HBcAg 蛋白表达水平(图 6,表 7)。与顺铂组相比,顺铂+NAC 组 HBsAg 和 HBcAg 蛋白表达水平明显降低,分别为 2.101 ± 0.088 ($P=0.000$)、 1.613 ± 0.073 ($P=0.000$),说明 NAC 可以拮抗顺铂诱导的 HBV 再激活作用。该实验重复 3 次。



A. Western blot 检测 HBsAg、HBcAg



B. 各组蛋白相对定量

注:HBsAg,a;PBS组与顺铂组比, $P=0.000$;b;顺铂组与顺铂+NAC组比, $P=0.000$;HBcAg;Pa;PBS组与顺铂组比, $P=0.000$;b;顺铂组与顺铂+NAC组比, $P=0.000$

图6 抑制 ROS 后 Western blot 检测 HBsAg、HBcAg 的蛋白表达变化

表 7 Western blot 检测各组蛋白相对表达量

组别	HBsAg	HBcAg
PBS组	1.000 ± 0.061	1.000 ± 0.068
NAC组	1.255 ± 0.053	1.245 ± 0.082
顺铂组	3.139 ± 0.061	3.812 ± 0.109
顺铂+NAC组	2.101 ± 0.088	1.613 ± 0.073
F 值	616.798	695.148
P 值	0.000	0.000

注:HBsAg,PBS组与NAC组比, $P=0.002$;PBS组与顺铂组比, $P=0.000$;PBS组与顺铂+NAC组比, $P=0.000$;HBcAg;PBS组与NAC组比, $P=0.008$;PBS组与顺铂组比, $P=0.000$;PBS组与顺铂+NAC组比, $P=0.000$

3 讨论

HBV再激活通常发生在接受DDAs化疗或免疫抑制剂治疗或器官和组织移植的患者中,已有报道慢性丙型肝炎合并感染HBV患者接受直接抗病毒药物治疗发生HBV再激活^[4]。化学治疗或免疫抑制

治疗时免疫系统的重建在HBV再激活引起的肝损伤中起重要作用。目前,在细胞毒性药物化疗期间HBV病毒复制增强的机制仍不清楚。本实验发现体外HBV复制细胞模型中顺铂可以刺激HBV复制,抑制ROS水平可以逆转顺铂诱导的HBV复制。

ROS是需氧细胞在代谢过程中产生的一系列活性氧簇,并作为许多细胞代谢过程产生的正常副产物。ROS包括超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$),羟基自由基($HO\cdot$),单线态氧(1O_2),过氧化氢(H_2O_2)和其他类型的化合物等^[15]。细胞许多生理过程中产生ROS,例如线粒体氧化磷酸化,内质网应激中的蛋白质折叠过程,各种内源性分子的分解代谢,比如脂质、生物多胺和氨基酸,外源引入的物质(如药物)等。越来越多的证据表明,ROS和氧化应激在病毒感染和复制过程中起关键作用。最近研究表明,诱导ROS可以激活Toll途径从而抑制登革热病毒^[16]。然而,许多病毒可以通过增加ROS产生促进病毒复制,包括HBV、HCV^[17]、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency, HIV)^[18]、流感病毒^[19]、呼吸道合胞体病毒^[20]和鼻病毒^[21]等。临床研究报道慢性乙型肝炎患者表现出明显的氧化应激水平升高,这些病人的肝脏标本中氧自由基水平较正常水平超出1.5~4个数量级^[17,22]。HBV蛋白(HBx、HBsAg和HBcAg)可以诱导细胞ROS的产生,HBx蛋白本身靶向线粒体,并直接与电压依赖性阴离子通道3相互作用改变了线粒体膜电位从而增加内源性ROS水平^[23-25]。HBsAg^[26]和HBcAg^[27]在内质网中积累并诱导内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)以及未折叠的蛋白质反应(unfolded protein response, UPR),UPR触发 Ca^{2+} 释放到细胞质中,随后增加ROS产生。此外, Schaedler等^[28]研究表明HBV激活Nrf2/ARE信号通路诱导ROS产生,抑制免疫蛋白酶体,从而可能产生HBV病毒部分免疫逃避反应。同时在HBV转基因小鼠中也报道了ROS水平增加可以促进HBV病毒的复制^[29]。本研究证明了顺铂可以促进HBV复制,而且联合NAC作用后可以逆转顺铂诱导的HBV复制水平上调。

HBV再激活不仅可发生于有慢性HBV感染、HBsAg携带及隐匿性感染的恶性肿瘤患者,也可发生于既往有HBV感染(仅抗-HBc阳性)的肿瘤患

者^[6]。目前国际上比较公认的 HBV 再激活机制包括免疫抑制影响机体对 HBV 复制的免疫控制;化疗药物对 HBV 复制具有直接促进作用^[30]。研究发现,共价环状闭合 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) 是乙肝病毒在肝细胞内进行转录和翻译的模板,可长期稳定存在于被感染细胞的肝细胞核内,当机体的免疫系统受损或免疫功能下降时,cccDNA 作为原始复制模板引起 HBV 再激活^[31-32]。因此,cccDNA 被认为是 HBV 再激活的主要病毒学基础。有学者提出 HBV 再激活的免疫抑制机制,即系统化疗、放疗、肝动脉栓塞化疗 (transcatheter hepatic arterial chemoembolization, TACE) 或肝切除术等治疗后免疫系统受到不同程度的抑制,机体控制 HBV 复制的免疫功能减弱,HBV 大量活跃复制^[33-34]。化疗药物直接诱导严重的 T 细胞和 B 细胞的大量消耗,同时通过过氧化物酶体增殖物受体 γ 共激活因子 1 α (proliferator-activated receptor γ coactivator-1, PGC-1 α) 介导的氧化应激途径引起 HBV 短期内大量复制,促进 HBV 的复制^[35-36]。除了抑制免疫功能,某些抗肿瘤药物也可通过非免疫抑制机制促进 HBV 复制,如类固醇药物和铂类化疗药物等。研究表明,多柔比星、阿霉素等细胞毒性药通过调节因子 X box 1 基因表达促进 HBV 复制增加^[37]。同时也发现顺铂等化疗药物激活 ER stress-PGC-1 α 信号轴促进 HBV 再激活^[38]。另有研究发现糖皮质激素类物质可以通过激活 HBV 基因组中的糖皮质激素应答元件直接刺激病毒复制,继而增加 HBV 再激活的风险^[39]。本研究发现顺铂可以促进 HBV 复制细胞模型中 HBV DNA 和 HBV 病毒蛋白表达,伴随细胞内 ROS 水平增加。进一步采用 ROS 抑制剂 NAC 处理,可以部分逆转顺铂刺激的病毒复制和转录,提示顺铂可能通过激活 ROS 水平,促进了 HBV 的复制。上述实验为预防和阻断 HBV 再激活提供了一定的实验基础,将为 HBV 再激活的预防和治疗提供新思路 and 理论依据。

参 考 文 献

[1] Tang LSY, Covert E, Wilson E, et al. Chronic hepatitis B infection: a review[J]. JAMA, 2018, 319(17): 1802-1813.
[2] Brechot C, Gozuacik D, Murakami Y, et al. Molecular bases for the

development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. Semin Cancer Biol, 2000, 10(3): 211-231.
[3] Schadler S, Hildt E. HBV life cycle: entry and morphogenesis[J]. Viruses, 2009, 1(2): 185-209.
[4] Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus[J]. Nature, 1985, 317(6037): 489-495.
[5] Galbraith 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.
[6] Loomba R, Liang TJ. Hepatitis B reactivation associated with immune suppressive and biological modifier therapies: current concepts, management strategies, and future directions[J]. Gastroenterology, 2017, 152(6): 1297-1309.
[7] Gonzalez SA, Perrillo RP. Hepatitis B virus reactivation in the setting of cancer chemotherapy and other immunosuppressive drug therapy[J]. Clin Infect Dis, 2016, 62(S4): 306-313.
[8] Jang JW. Hepatitis B virus reactivation in patients with hepatocellular carcinoma undergoing anti-cancer therapy[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(24): 7675-7685.
[9] Musolino C, Cacciola I, Tripodi G, et al. Behaviour of occult HBV infection in HCV-infected patients under treatment with direct-acting antivirals[J]. Antivir Ther, 2019, 24(3): 187-192.
[10] Xu Y, Wang C, Li Z. A new strategy of promoting Cisplatin chemotherapeutic efficiency by targeting endoplasmic reticulum stress[J]. Mol Clin Oncol, 2014, 2(1): 3-7.
[11] Yeo W, Lam KC, Zee B, et al. Hepatitis B reactivation in patients with hepatocellular carcinoma undergoing systemic chemotherapy[J]. Ann Oncol, 2004, 15(11): 1661-1666.
[12] Jang JW, Kwon JH, You CR, et al. Risk of HBV reactivation according to viral status and treatment intensity in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Antivir Ther, 2011, 16(7): 969-977.
[13] Hoofnagle JH. Reactivation of hepatitis B[J]. Hepatology, 2009, 49(5S): 156-165.
[14] Liu CJ, Chuang WL, Sheen IS, et al. Efficacy of ledipasvir and sofosbuvir treatment of HCV infection in patients coinfecting with HBV[J]. Gastroenterology, 2018, 154(4): 989-997.
[15] Gutowski M, Kowalczyk S. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance[J]. Acta Biochim Pol, 2013, 60(1): 1-16.
[16] Pan X, Zhou G, Wu J, et al. Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito Aedes aegypti[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(1): E23-31.
[17] Valgimigli M, Valgimigli L, Trerè D, et al. Oxidative stress EPR measurement in human liver by radical-probe technique. Correlation with etiology, histology and cell proliferation[J]. Free Radic Res, 2009, 36(9): 939-948.

- [18] Ivanov AV, Valuev-Elliston VT, Ivanova ON, et al. Oxidative stress during HIV infection: mechanisms and consequences[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016; 8910396.
- [19] Ng MP, Lee JC, Loke WM, et al. Does influenza A infection increase oxidative damage?[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(7): 1025–1031.
- [20] Jamaluddin M, Tian B, Boldogh I, et al. Respiratory syncytial virus infection induces a reactive oxygen species–MSK1–phospho–Ser–276 RelA pathway required for cytokine expression[J]. *J Virol*, 2009, 83(20): 10605–10615.
- [21] Biagioli MC, Kaul P, Singh I, et al. The role of oxidative stress in rhinovirus induced elaboration of IL–8 by respiratory epithelial cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(3–4): 454–462.
- [22] Valgimigli Li, Valgimigli M, Gaiani S, et al. Measurement of oxidative stress in human liver by EPR spin–probe technique[J]. *Free Radic Res*, 2000, 33(2): 167–178.
- [23] Zheng BY, Fang XF, Zou LY, et al. The co–localization of HBx and COXIII upregulates COX–2 promoting HepG2 cell growth[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(3): 1143–1150.
- [24] Lee YI, Hwang JM, Im JH, et al. Human hepatitis B virus–X protein alters mitochondrial function and physiology in human liver cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(15): 15460–15471.
- [25] Li SK, Ho SF, sui KW, et al. Identification of functionally important amino acid residues in the mitochondria targeting sequence of hepatitis B virus X protein[J]. *Virology*, 2008, 381(1): 81–88.
- [26] Hsieh YH, Su IJ, Wang HC, et al. Pre–S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(10): 2023–2032.
- [27] Lee H, Kim H, Lee SA, et al. Upregulation of endoplasmic reticulum stress and reactive oxygen species by naturally occurring mutations in hepatitis B virus core antigen[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(Pt 7): 1850–1854.
- [28] Schaedler S, Krause J, Himmelsbach K, et al. Hepatitis B virus induces expression of antioxidant response element–regulated genes by activation of Nrf2[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(52): 41074–41086.
- [29] Chen X, Hu Y, Zhang W, et al. Cisplatin induces autophagy to enhance hepatitis B virus replication via activation of ROS/JNK and inhibition of the Akt/mTOR pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 131: 225–236.
- [30] Guo L, Wang D, Ouyang X, et al. Recent advances in HBV reactivation research[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018; 2931402.
- [31] Seeger C. Control of viral transcripts as a concept for future HBV therapies[J]. *Curr Opin Virol*, 2018, 30: 18–23.
- [32] Zhou L, Ren JH, Cheng ST, et al. A functional variant in UBE2L3 contributes to HBV infection and maintains cccDNA stability by inducing degradation of APOBEC3A protein[J]. *Hepatology*, 2019, 69(5): 1885–1902.
- [33] Huang G, Lai EC, Lau WY, et al. Posthepatectomy HBV reactivation in hepatitis B–related hepatocellular carcinoma influences postoperative survival in patients with preoperative low HBV–DNA levels[J]. *Ann Surg*, 2013, 257(3): 490–505.
- [34] Jun BG, Kim YD, Kim SG, et al. Hepatitis B virus reactivation after radiotherapy for hepatocellular carcinoma and efficacy of antiviral treatment: a multicenter study[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0201316.
- [35] Tang X, Yan L, Li H, et al. Increased expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase cytoplasmic isoform by hepatitis B virus X protein affects hepatitis B virus replication[J]. *J Med Virol*, 2019, 91(2): 258–264.
- [36] Mouler Rechtman M, Burdelova EO, Bar–Yishay I, et al. The metabolic regulator PGC–1alpha links anti–cancer cytotoxic chemotherapy to reactivation of hepatitis B virus[J]. *J Viral Hepat*, 2013, 20(1): 34–41.
- [37] Wang J, Jia J, Chen R, et al. RFX1 participates in doxorubicin–induced hepatitis B virus reactivation[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(5): 2021–2033.
- [38] Li X, Pan E, Zhu J, et al. Cisplatin enhances hepatitis B virus replication and PGC–1alpha expression through endoplasmic reticulum stress[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3496.
- [39] Salpini R, Colagrossi L, Bellocchi MC, et al. Hepatitis B surface antigen genetic elements critical for immune escape correlate with hepatitis B virus reactivation upon immunosuppression[J]. *Hepatology*, 2015, 61(3): 823–833.

(责任编辑:唐秋姗)