

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.10.002

乙肝病毒 X 蛋白对肝前体细胞分化的影响

白光文¹, 申利红², 卢永良², 李红丽², 冯涛², 黄佳祎²

(1. 重庆市丰都人民医院普外科, 重庆 408200; 2. 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的: 检测乙肝病毒 X (hepatitis B virus X, HBx) 蛋白对肝前体细胞分化的影响, 以探讨 HBx 蛋白能否促进肝干细胞的恶性转化。方法: 以腺病毒 Ad-HBx 和 Ad-GFP 感染肝前体细胞株 Hp14-19, RT-PCR 和 Western blot 证实 HBx 蛋白在肝前体细胞内的表达。RT-qPCR 和免疫荧光检测早期和晚期分化指标的变化, 并于诱导后 11 d 用 PAS 染色观察细胞的分化成熟程度。结果: Ad-HBx 能有效感染肝前体细胞株 Hp14-19 并表达。与对照组 (感染 Ad-GFP) 相比, 实验组 (感染 Ad-HBx) 细胞分化早期指标穿膜蛋白 (Delta like homolog, DLK)、肌酸激酶 19 (Creatine kinase 19, CK19) 和甲胎蛋白 (Alpha fetal protein, AFP) 表达降低减慢, 而晚期指标 CK18 和白蛋白 (Albumin, ALB) 表达升高不明显。PAS 染色阳性率降低。差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: HBx 可抑制肝前体细胞的分化, 这可能是最终导致肝前体细胞恶性转化的原因之一。

【关键词】乙肝病毒 X 蛋白; 肝前体细胞; 分化; 肿瘤干细胞

【中国图书分类法分类号】R575

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-06-12

Effect of hepatitis B virus X protein mediated by adenovirus on the differentiation of hepatic progenitor cells

BAI Guangwen¹, SHEN Lihong², LU Yongliang², LI Hongli², FENG Tao², HUANG Jiayi²

(1. Department of General Surgery, the People's Hospital of Fengdu; 2. Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To detect the effect of hepatitis B virus X (HBx) protein on the differentiation of hepatic progenitor cell and to explore whether HBx protein can promote the malignant transformation of hepatic stem cell. Methods: The hepatic progenitor cell Hp14-19 was infected with adenovirus Ad-HBx and Ad-GFP. The expressions of HBx protein in hepatic progenitor cell were confirmed by RT-PCR and Western blot. The changes of differentiation marker alpha fetal protein (AFP), delta like homolog (DLK), creatine kinase 19 (CK19), CK18 and albumin (ALB) in the hepatic progenitor cell treated with HBx were evaluated by RT-qPCR and immunofluorescence. The morphological change was observed by PAS staining at 11 d after the inducement. Results: HBx was expressed in the hepatic progenitor cell Hp14-19 infected with Ad-HBx. Compared with those in control group (infected with Ad-GFP), the expressions of early marker DLK, CK19 and AFP were decreased slowly while later marker CK18, ALB were increased slowly in experiment group (infected with Ad-HBx). PAS staining results showed that HBx inhibited glycogen synthesis in HP14.5 cells. Conclusions: HBx can inhibit the differentiation of hepatic progenitor cell, which maybe involved in the tumorigenesis of HBx-mediated liver cancer.

【Key words】hepatitis B virus X protein; hepatic progenitor cell; differentiation; tumor stem cell

原发性肝癌 (Primary hepatic carcinoma, PHC) 是我国高发的重大疾病, 其发生率约为 30.3/10 万, 且有逐年增加的趋势。乙肝病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 的感染为 PHC 的首要因素, 据估计 60%~80% 的 PHC 是由 HBV 引起的。HBV 含有 4 个开放型读码框, 分别编码包膜蛋白、核壳蛋白、病毒多聚蛋白

和 X 蛋白。其中最小的乙肝病毒 X (Hepatitis B virus X, HBx) 蛋白是一种多功能反式作用因子, 能与细胞内多种转录、调控因子结合, 促进病毒的复制和转录^[1]; 激活原癌基因的表达; 参与细胞周期调控^[2]; 破坏细胞 DNA 修复功能^[3]; 调节机体的免疫应答; 促进信号通路的异常激活^[4]等, 最终导致肿瘤的发生, 被认为在乙肝相关性肝癌的发生中具有重要的作用, 但其具体机制仍不完全清楚。近年的研究认为肿瘤干细胞是肿瘤发生的起始细胞, 而肝癌干细胞的来源可能是正常干细胞分化受阻所致。HBx 促

作者介绍: 白光文 (1970-), 男, 副主任医师,

研究方向: 肿瘤发生机制及基因治疗。

通信作者: 黄佳祎, 女, 副教授, Email: e738741@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81071770)。

进肝癌的发生是否通过抑制肝干细胞的分化,从而促进肝癌干细胞的出现尚未见报道。本实验利用前期分离鉴定的肝前体细胞株 Hp14-19,以腺病毒为载体导入 HBx 蛋白,观察其对肝前体细胞分化成熟的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

肝前体细胞株 Hp14-19 由本课题组前期分离鉴定^[1]; HEK293 细胞由本实验室保存;Ad-HBx/Ad-GFP 腺病毒由冯涛教授构建并保存;Trizol 试剂、逆转录试剂盒、DNA 聚合酶购自 TaKaRa;HIGH GLUCOSE DMEM 培养液、胎牛血清购自 Hyclone;胰酶购自 Gibco;引物由上海生物工程公司合成;HBx 抗体(兔抗人)购自卓诺生物技术公司;PAS 染色试剂盒购自 Sigma。

1.2 方法

1.2.1 肝前体细胞株 Hp14-19 的培养及腺病毒感染 肝前体细胞株 Hp14-19 在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养,保持饱和湿度,每 2~3 d 用 0.25%的胰酶消化传代。实验时加入地塞米松(0.1 μm)和二甲亚砜(2 μl/ml)诱导分化。病毒感染时,将 Hp14-19 细胞分为对照组和实验组,分别感染 Ad-GFP 和 Ad-HBx。感染 24 h 后荧光显微镜下观察 Hp14-19 细胞绿色荧光蛋白表达情况。

1.2.2 RT-PCR 检测 HBx 在肝前体细胞中的表达 将细胞分为对照组和实验组,2 组均予分化诱导剂处理,加入地塞米松(0.1 μm)和二甲亚砜(2 μl/ml),对照组感染腺病毒 Ad-GFP,实验组感染腺病毒 Ad-HBx。于感染病毒后第 2 天收集细胞,TRIzol 法提取总 RNA,RT-PCR 获得 cDNA。引物序列如下:HBx:上游 5'-CGGAATTCGATGGCTGCTAGGCTGTG-3'下游 5'-CCCTCGAGGGTTCATGCTGCTGCT-3'。PCR 反应采用 20 μl 体系:上下游引物(10 μmol/L)各 0.2 μl、模板 2 μl、dNTP mix(10 mmol/L)0.4 μl、Taq 酶(5 U/μl)0.2 μl、10×PCR buffer 2 μl、MgCl₂(25 mmol/L)1.2 μl、灭菌双蒸水 13.8 μl。循环条件为 94℃预变性 5 min,94℃30 s,55℃30 s,72℃40 s,共 28 个循环。

1.2.3 Western blot 检测 HBx 在肝前体细胞中的表达 细胞用预冷的 PBS 溶液洗涤 3 次,用 Western 裂解液:PMSF 为 100:1 的体积比例混合液裂解细胞 12 000 r/min 离心 4℃10 min,取上清液采用 BCA 法测定蛋白浓度,蛋白量调整一致后,加入 SDS 缓冲液,100℃变性 6 min。根据待测目的蛋白分子量配制相应浓度的 SDS-PAGE 胶,蛋白样品经电泳分离后,电转移至硝酸纤维素膜上。将膜置于含 5%脱脂奶粉的 TBST 中封闭 1 h,随后加入相应一抗反应过夜,TBST 8 min/次洗 5 次,与 IgG 标记的二抗在室温下反应 1 h,TBST 洗 5 次,每次 8 min,最后 ECL 法显影。

1.2.4 RT-qPCR 检测早期和晚期分化指标的改变 同上获得 cDNA。引物序列如下:甲胎蛋白(Alpha fetal protein, AFP),

F:5'-ACGAGGAAAGCCCCTCAG-3';R:5'-GCCATTCCCT-CACCACAG-3';肌酸激酶 19(Creatine kinase 19,CK19),F:5'-GCCCTAGAGCAGGCCAAT-3';R:5'-ATCTTGTGCGC-CAAGTCC-3';穿膜蛋白(Delta like homolog,DLK),F:5'-GCTGGGACGGGAAATTCT-3';R:5'-AACCCAGGTGTGCA-GGAG-3';白蛋白(Albumin,ALB),F:5'-CCAGACATT-CCCCAATGC-3';R:5'-CAAGTTCGCCCTGTTCAT-3';CK18,F:5'-CTGGGCTCTGTGCGAACT-3';R:5'-ACAGA-GCCACCCAGACA-3';GAPDH,F:5'-GGCTGCCAGAAC-ATCAT-3';R:5'-CGGACACATTGGGGGTAG-3'。PCR 反应采用 20 μl 体系:上下游引物(20 ng/μl)各 2.5 μl、模板 5 μl、2×Dynamo 10 μl。循环条件为 94℃预变性 5 min,94℃30 s,56℃30 s,72℃40 s,共 40 个循环。

1.2.5 免疫荧光检测早期和晚期分化指标的改变 同上将细胞分为对照组和实验组,于感染病毒后第 11 天做免疫荧光染色。吸弃培养基,PBS 洗涤 1×5 min,加 500 μl 甲醇/孔,-20℃固定 15 min。PBS 洗涤 3×5 min,5%羊血清或牛血清白蛋白 500 μl/孔,室温封闭 1 h。PBS 洗涤细胞 1×5 min,分别加入 1:100 稀释于 PBS 的羊抗鼠 ALB,DLK,IgG 一抗 500 μl/孔,室温摇动孵育 60 min。弃去一抗稀释液,PBS 洗涤 3×5 min,分别加入 1:500 稀释于 PBS 的 FITC 标记的抗羊 IgG 二抗 500 μl/孔,室温摇动孵育 30 min。弃去二抗稀释液,PBS 洗涤 3×5 min,立即置于倒置荧光显微镜下观察照相。

1.2.6 PAS 染色观察细胞功能的改变 将细胞分为对照组和实验组,培养 11 d 后做 PAS 染色。4%多聚甲醛固定 10 min,流水冲洗 2~3 min,0.5% Periodic Acid Solution 室温氧化 5 min,流水冲洗 2~3 min,Schiff's 试剂染色 15~20 min,流水冲洗 2~3 min,Hematoxylin 染色 1~2 min,流水冲洗 2~3 min。光镜下观察细胞内糖原沉积情况。

1.3 统计学分析

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.1[1]软件进行分析,组间用配对 *t* 检验进行统计,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 腺病毒 Ad-HBx 在肝前体细胞株 Hp14-19 中的表达鉴定

于病毒感染 24 h 后在荧光显微镜下观察,实验组中绿色荧光蛋白的表达和对照组一致,说明实验组和对照组的病毒感染量相当。RT-PCR 和 Western blot 检测可见实验组在相应大小有条带,而对照组没有。说明外源基因 HBx 在肝前体细胞中成功表达(图 1、2)。

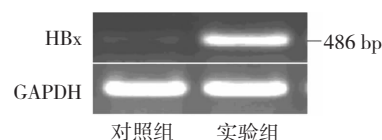


图 1 RT-PCR 鉴定腺病毒 Ad-HBx 在肝前体细胞株 Hp14-19 中的表达

Fig.1 Expressions of Ad-HBx in HP14-19 confirmed by RT-PCR

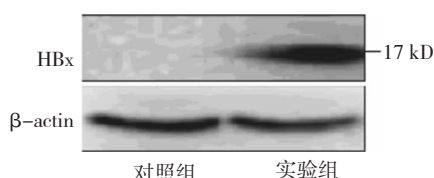


图2 Western blot 鉴定腺病毒 Ad-HBx 在肝前体细胞株 Hsp14-19 中的表达

Fig.2 Expressions of Ad-HBx in Hsp14-19 confirmed by Western blot

2.2 RT-qPCR 检测细胞分化指标的改变

结果显示,与对照组相比,感染了腺病毒 HBx 的肝前体细胞分化早期指标 DLK、CK19 和 AFP 的表达升高(图3),而晚期指标 CK18 和 ALB 的表达下降(图4)。在正常肝干细胞的诱导分化过程中,随着分化的进程,其早期指标的表达逐渐降低,而晚期指标的表达逐渐增高。结果发现在 HBx 的处理下,肝前体细胞分化过程中早期指标表达的降低减慢,而晚期指标表达的上升变缓,说明肝前体细胞的分化成熟受阻。

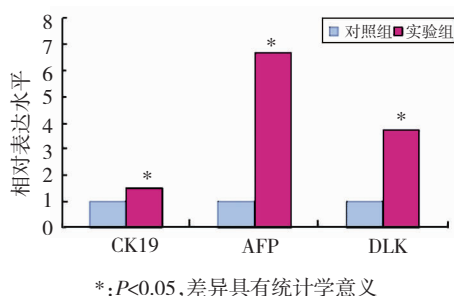


图3 RT-qPCR 检测实验组早期分化指标相对表达量的改变并与对照组比较

Fig.3 Change in relative expressions of early differentiation markers in Hsp14-19 treated with Ad-HBx by RT-qPCR and comparison between experimental group and control group

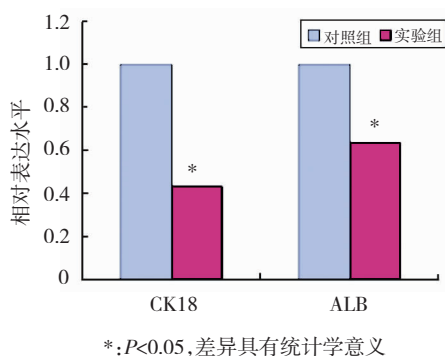


图4 RT-qPCR 检测实验组分化晚期指标相对表达量的改变并与对照组比较

Fig.4 Change in relative expressions of later differentiation markers in Hsp14-19 treated with Ad-HBx by RT-qPCR and comparison between experimental group and control group

2.3 免疫荧光检测细胞分化指标的改变

结果可见,实验组早期分化指标 DLK 阳性率明显高于对照组,而晚期分化指标 ALB 的阳性率低于对照组(图5)。该结果和定量 PCR 的结果一致,同样说明 HBx 导致了肝前体细胞的分化受阻。

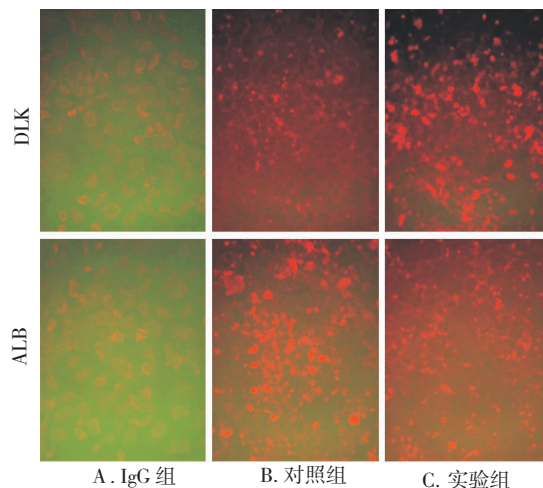


图5 免疫荧光化学法检测 HBx 对肝前体细胞株 Hsp14-19 诱导分化的影响

Fig.5 Effect of HBx on differentiation of Hsp14-19 by immunofluorescence

2.4 PAS 染色观察细胞功能的改变

同上将细胞分为对照组和实验组,培养后 11 d 后做 PAS 染色。与对照组相比,实验组糖原染色阳性细胞明显降低(图6)。糖原染色阳性提示有功能的成熟肝细胞的形成。HBx 的处理导致诱导分化时成熟肝细胞的生成降低,说明 HBx 抑制肝前体细胞的终末分化。

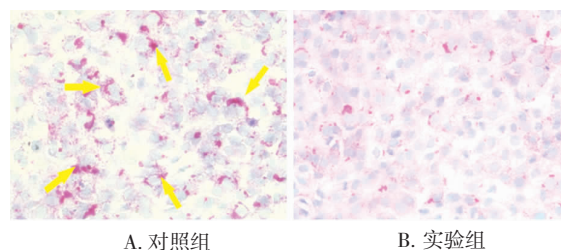


图6 PAS 染色 (200 ×)

Fig.6 PAS staining (200 ×)

3 讨论

随着肿瘤干细胞理论的提出,对 HBx 和肝癌干细胞关系的研究为进一步理解乙肝相关性肝癌的发病机制提供了新的思路。肿瘤干细胞最早于 1994 年在急性骨髓性白血病研究中发现,后来迅速在一系列实体瘤中得到证实,如:乳腺癌、脑癌、多发

性骨髓瘤、直肠癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌等等。肿瘤干细胞的发现和证实,引起了广泛的关注,为肿瘤发生机制的研究和治疗提供了新的突破。对肿瘤干细胞的来源目前主要有两个观点,一种观点认为,肿瘤干细胞和正常干细胞相比同样具有无限的增殖能力和分化潜能,具有相同的分子标志和共同的信号传导通路,肿瘤干细胞来源于正常干细胞^[6]。而和正常干细胞相比,肿瘤干细胞的分化能力受限,不能进行完整的谱系分化^[7],提示肿瘤干细胞可能来自于正常干细胞的分化受阻。另一种观点认为,肿瘤干细胞可来自于成熟细胞的去分化^[8]。在肝癌中同样存在具有无限增殖和自我更新能力的肝癌干细胞^[9],肝癌干细胞可来自于正常肝干细胞的分化受阻,也可来自于不同分化程度的成熟肝细胞的“去分化”。研究发现,在肝癌细胞 HepG2 中稳定表达 HBx 蛋白,可促进肝癌细胞 HepG2 具有干细胞的表型和分子特征,促进细胞的迁移和克隆形成^[10]。在 L02 细胞中稳定表达 HBx,同样可以促进在 L02 细胞的恶性转化^[11]。但 HBx 对肝干细胞的影响研究却较少。在 HBx 转基因小鼠的肝组织中,具有干细胞表型的 EpCAM⁺细胞增多,且经过 3,5-二乙氧羧基硫脲-1,4-二氢三甲吡啶喂食 7 个月后,均形成具有肝细胞癌和胆管癌组织学特征的混合性肿瘤。从 HBx 转基因小鼠中分离的 EpCAM⁺肝干细胞皮下注射,同样可形成混合型肿瘤^[12]。提示 HBx 与肝干细胞密切相关。HBx 可能是通过抑制肝干细胞的分化,使其分化受阻,最终导致其恶性转化,但相关实验报道较少,且 HBx 能否直接作用于肝干细胞,促进其恶性转化,尚未见报道。

本课题组在前期工作中分离鉴定了肝前体细胞,并在此基础上导入含 LoxP 位点特异修饰的 SV40 大 T 抗原,构建了可逆性永生化肝前体细胞株 Hp14-19。通过加入 Cre 重组酶敲除大 T 抗原,肝前体细胞 Hp14-19 可恢复自发分化的趋势,并在地塞米松和二甲亚砜的诱导下进一步分化。但当以腺病毒为载体导入外源基因 HBx 后,肝前体细胞的早期分化指标降低减慢,而晚期分化指标的上升不明显,提示外源基因 HBx 可导致肝前体细胞的分化受阻。而 PAS 染色结果可见 HBx 组的糖原沉积较少,说明 HBx 组成熟分化的肝细胞数量和对照组相

比明显降低,提示 HBx 可抑制肝干细胞的晚期成熟分化。HBx 对肝干细胞分化的抑制,可能是 HBx 导致肝干细胞恶性转化,促进肝癌起始细胞-肝癌干细胞出现的一个重要病理过程。在后期的实验中,将研究 HBx 导致肝干细胞恶性转化的机制,为乙肝相关性肝癌的发生提供新的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Yang B, Bouchard M J. The hepatitis B virus X protein elevates cytosolic calcium signals by modulating mitochondrial calcium uptake[J]. *J Virol*, 2012, 86(1): 313-327.
- [2] Gearhart T L, Bouchard M J. The hepatitis B virus X protein modulates hepatocyte proliferation pathways to stimulate viral replication[J]. *J Virol*, 2010, 84(6): 2675-2686.
- [3] Tian Y, Hu Y, Wang Z, et al. Hepatitis B virus regulates Raf1 expression in HepG2.2.15 cells by enhancing its promoter activity[J]. *Arch Virol*, 2011, 156(5): 869-874.
- [4] Bertoletti A, Gehring A J. The immune response during hepatitis B virus infection[J]. *J Gen Virol*, 2006, 87(Pt 6): 1439-1449.
- [5] Huang J, Bi Y, Zhu G H, et al. Retinoic acid signaling induces the differentiation of mouse fetal liver-derived hepatic progenitor cells[J]. *Liver International*, 2009, 29(10): 1569-1581.
- [6] Krivtsov A V, Twomey D, Feng Z, et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9[J]. *Nature*, 2006, 442(7104): 818-822.
- [7] Dalerba P, Cho R W, Clarke M F. Cancer stem cells: models and concepts[J]. *Annu Rev Med*, 2007, 58: 267-284.
- [8] Bjerkvig R, Tysnes B B, Aboody K S, et al. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(11): 899-904.
- [9] Ma S, Chan K W, Hu L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2542-2556.
- [10] Arzumanyan A, Friedman T, Ng I O, et al. Does the hepatitis B antigen HBx promote the appearance of liver cancer stem cells[J]? *Cancer Res*, 2011, 71(10): 3701-3708.
- [11] Zhang W Y, Cai N, Ye L H, et al. Transformation of human liver L-02 cells mediated by stable HBx transfection[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(8): 1153-1161.
- [12] Wang C, Yang W, Yan H X, et al. HBx induces tumorigenicity of hepatic progenitor cells in 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) treated HBx transgenic mice[J]. *Hepatology*, 2012, 55(1): 108-120.

(责任编辑:唐秋姗)