

免疫与感染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000028

乙肝病毒 X 蛋白通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控 Gankyrin 表达

刘 锐, 魏续福, 沈 艾, 吴忠均

(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究乙肝病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X protein, HBX)对 Gankyrin 表达水平的影响以及 Wnt/ β -catenin 信号通路在 HBX 基因调控 Gankyrin 表达中的作用。**方法:**HBX 腺病毒表达载体(Ad-HBX-GFP)感染转染 2 种人肝癌细胞系 HepG2、SMMC-7721 细胞, Si-HBX 分子(Si-HBX oligo)用 Lipofectamine™ 2000 转染入 HepG2.2.15 细胞, 用 RT-PCR 和 Western blot 法检测 HBX 与 Gankyrin 的表达情况; β -catenin 腺病毒载体转染 HepG2、SMMC-7721 细胞, 用 Western blot 法检测 β -catenin 与 Gankyrin 的表达情况; 在沉默 β -catenin 表达的 HepG2、SMMC-7721 细胞中过表达 HBX 基因, Western blot 法检测 β -catenin 与 Gankyrin 的表达情况。**结果:**①HepG2.2.15 细胞中 Gankyrin mRNA 与蛋白表达水平均高于 HepG2 细胞($P<0.05$)。②HepG2 与 SMMC-7721 细胞系中 Ad-HBX-GFP 组 Gankyrin mRNA 与蛋白表达水平均高于绿色荧光蛋白腺病毒表达载体(Ad-GFP)组($P<0.01$)。③HepG2.2.15 细胞中 Si-HBX 组 Gankyrin mRNA 与蛋白表达水平均低于 Si-阴性对照(Si-NC)组($P<0.01$)。④在 HepG2 与 SMMC-7721 细胞系中过表达 HBX 后, Ad-HBX-GFP 组 β -catenin 的蛋白表达水平均高于 Ad-GFP 组($P<0.01$)。⑤在 HepG2 与 SMMC-7721 细胞系中过表达 β -catenin 后, β -catenin 腺病毒表达载体(Ad- β -catenin-GFP)组 Gankyrin 的蛋白表达水平均高于 Ad-GFP 组($P<0.01$)。⑥在 HepG2 与 SMMC-7721 细胞系中沉默 β -catenin 后, 过表达 HBX 基因, Si- β -catenin 腺病毒表达载体(Ad-si- β -catenin-RFP)组与红色荧光蛋白腺病毒表达载体(Ad-RFP)组相比, Gankyrin 的蛋白表达水平未见升高($P<0.01$)。**结论:**HBX-Wnt/ β -catenin-Gankyrin 信号转导通路存在与肝癌细胞中, 抑制 β -catenin 的功能可阻遏 HBX 对 Gankyrin 的上调作用, 本结果将可能为肝癌的治疗提供新的思路。

【关键词】肝癌; 乙肝病毒 X 蛋白; Gankyrin; β -catenin**【中图分类号】**R735.7**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-04-09Regulation on expression of Gankyrin by hepatitis B virus X protein through Wnt/ β -catenin signaling

Liu Rui, Wei Xufu, Shen Ai, Wu Zhongjun

(Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of HBX on Gankyrin expression and role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in the regulation of HBX on Gankyrin. **Methods:** HBX adenovirus vector Ad-HBX-GFP was transfected into human hepatocellular carcinoma cell line HepG2, SMMC-7721 cells and Si-HBX molecules was transfected into HepG2.2.15 cells with Lipofectamine™ 2000. Expressions of HBX and Gankyrin were detected by RT-PCR and Western blot. β -catenin adenovirus vector was transfected into HepG2 and SMMC-7721 cells, and expressions of β -catenin and Gankyrin were detected by Western blot. HBX was overexpressed in β -catenin silenced HepG2 and SMMC-7721 cells, and expressions of β -catenin and Gankyrin were detected by Western blot. **Results:** ①Expressions of Gankyrin were higher in HepG2.2.15 cells than in HepG2 cells ($P<0.05$). ②mRNA and protein expressions of Gankyrin were increased significantly in Ad-HBX-GFP group than in Ad-GFP group in HepG2 and SMMC-7721 cell line ($P<0.01$). ③mRNA and protein expressions of Gankyrin were decreased significantly in Si-HBX group than in Si-NC group in HepG2.2.15 cells ($P<0.05$). ④Protein expressions of β -catenin were increased significantly in Ad-HBX-GFP group than in Ad-GFP group after overexpressing HBX protein in HepG2 and SMMC-7721 cell line ($P<0.01$). ⑤Protein expressions of Gankyrin were increased significantly in Ad-HBX-GFP group than in Ad-GFP group after overexpressing β -catenin in HepG2 and SMMC-7721 cell line ($P<0.01$). ⑥Protein expressions of Gankyrin were not increased in Ad-si- β -catenin-RFP group than in Ad-RFP group after silencing β -catenin in HepG2 and SMMC-7721 cell line and overexpressing HBX gene ($P<0.01$). **Conclusion:** HBX-Wnt/ β -catenin-Gankyrin signal transduction pathways are existed in hepatocarcinogenesis. Inhibiting the function of β -catenin can interrupt the up-regulation of Gankyrin by HBX, which may provide a new treatment method for hepatocellular carcinoma.

作者介绍:刘 锐, Email: lrcool@126.com,

研究方向: 乙型肝炎病毒和肝癌发病机制。

通信作者:吴忠均, Email: wzjey@126.com。**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(编号: 81171562)。**优先出版:** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000028.html>**【Key words】**hepatocellular carcinoma; hepatitis B virus X protein; Gankyrin; β -catenin

中国是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的高感染流行区,调查发现,HBV 携带者患肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的危险程度是非感染者 10 倍以上^[1]。近年来大量的研究证实 HBV 相关性 HCC 的发生主要与乙肝病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X protein, HBX)有关。HBX 蛋白是一种具有反式作用的多功能调节蛋白,参与细胞的各种调控机制,包括细胞周期调节、转录调控、信号通路以及调控癌基因与抑癌基因表达的作用,进一步导致 HCC 的发生^[2-3]。

近年来,研究发现癌基因 Gankyrin(26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10, psm10),它主要在 HCC 细胞中过度表达,可通过与泛素-蛋白酶体系统作用,降解肝脏细胞中的抑癌蛋白,导致细胞癌变在 HCC 的发生、发展和疗效评估中有重要价值^[4-5]。但目前在 HBV 相关性 HCC 研究中,Gankyrin 是否受到 HBX 蛋白的调控未见报道。本实验中拟通过调控 HBX 蛋白与 Wnt/ β -catenin 信号通路,来观察 Gankyrin 表达水平的变化,探讨 HBX 诱导 Gankyrin 的表达的分子机制,旨在了解 HBV 相关性 HCC 发生发展的生物学机理。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

HepG2.2.15 细胞由重庆医科大学细胞生物学与遗传学教研室周丹琳硕士馈赠;HepG2、SMMC-7721 细胞为本实验室常规保存;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM 培养基、改良型 RPMI1640 购自 Hyclon;脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen;RT-PCR 试剂盒购自 Takara,人 Gankyrin 蛋白抗体(兔)购自 Santa Cruz 公司;人 HBX 蛋白抗体(小鼠)购自 Abcam 公司;人 β -catenin 蛋白抗体(兔)购自 BD Biosciences 公司;人 GAPDH 抗体(鼠)、羊抗兔(二抗)、兔抗鼠(二抗)、

HBX 蛋白腺病毒表达载体(Ad-HBX-GFP)、 β -catenin 腺病毒表达载体(Ad- β -catenin-GFP)、Si- β -catenin 腺病毒表达载体(Ad-si- β -catenin-RFP)、绿色荧光蛋白腺病毒表达载体(Ad-GFP)、红色荧光蛋白腺病毒表达载体(Ad-RFP)、Si-HBX 分子(Si-HBX oligo)由上海吉玛制药技术有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 HepG2.2.15 细胞的培养与转染 操作步骤:采用含 100 ml/L FBS 的改良型 RPMI1640 培养基,37 °C、50 ml/L CO₂ 培养 HepG2.2.15 细胞。转染前 24 h,按 1.0×10^5 个/孔细胞浓度种于 24 孔板,待细胞生长致 70%~80%时进行转染。按脂质体 Lipofectamine™ 2000 说明书操作,将合成的 Si-HBX oligo 和 Si-阴性对照(Si-NC)oligo 分别转染入 HepG2.2.15 细胞,siRNA 的终浓度为 100 nmol/L,转染后 48 h,提取总 RNA 和蛋白。Si-HBX 靶序列见表 1。

表 1 本实验所用 PCR 引物及 siRNA 序列

Tab.1 Primers and siRNAs used in this experiment

Gankyrin (人)	正向引物(5'-3')	CCTCTTCATATTGCGGCTTC
	反向引物(5'-3')	TCAAGTTACCCTTGCTGCT
GAPDH(人)	正向引物(5'-3')	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
	反向引物(5'-3')	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
Si-HBX(人)	正义链(5'-3')	CCGACCUUGAGGCAUACUdtdt
	反义链(5'-3')	AAGUAUGCCUCAAGGUCGGdtdt
Si- β -catenin (人)	正义链(5'-3')	GGGUUCAGAUGAUUAAAUTT
	反义链(5'-3')	AUUUAUAUCAUCUGAACCCAG

1.2.2 HepG2 和 SMMC-7721 细胞的培养与腺病毒感染 操作步骤:Ad-HBX-GFP、Ad-GFP、Ad-Si- β -catenin-RFP、Ad-RFP、Ad- β -catenin-GFP 用含 100 ml/L FBS 的改良型 RPMI1640 培养基,37 °C、50 ml/L CO₂ 培养 HepG2 和 SMMC-7721 细胞,感染前 24 h,按 1.0×10^5 个/孔细胞浓度种于 24 孔板,待细胞生长致 70%~80%时进行感染。病毒感染浓度控制在 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ pfu/ml,感染后 48 h,荧光显微镜观察,提取总 RNA 和蛋白(Si- β -catenin 靶序列见表 1)。

1.2.3 实验分组 具体内容详见表 2。

1.2.4 RT-PCR 检测 Gankyrin、GAPDH mRNA 表达量 在

表 2 实验分组

Tab.2 Experiment grouping

组别	细胞系	实验组	对照组
组 1	SMMC-7721	Ad-HBX-GFP	Ad-GFP
组 2	HepG2	Ad-HBX-GFP	Ad-GFP
组 3	HepG2.2.15	Si-HBX	Si-NC
组 4	SMMC-7721	Ad-HBX-GFP	Ad-GFP
组 5	HepG2	Ad-HBX-GFP	Ad-GFP
组 6	SMMC-7721	Ad- β -catenin-GFP	Ad-GFP
组 7	HepG2	Ad- β -catenin-GFP	Ad-GFP
组 8	SMMC-7721	Ad-si- β -catenin-RFP, Ad-HBX-GFP	Ad-RFP, Ad-HBX-GFP
组 9	HepG2	Ad-si- β -catenin-RFP, Ad-HBX-GFP	Ad-RFP, Ad-HBX-GFP

转染后 48 h 用 TriZol (美国 Invitrogen 公司) 法提取细胞总 RNA, 用 cDNA 合成试剂盒 (日本 TAKATA 公司) 逆转录合成 cDNA。分别扩增 Gankyrin 和内参 GAPDH。产物大小分别为: Gankyrin 233 bp, GAPDH 346 bp (引物序列见表 1)。PCR 反应条件: 94 ℃ 预变性 10 min, 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环, GAPDH 共 23 个循环。PCR 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5 Western blot 法检测 Gankyrin、HBX、 β -catenin、GAPDH 蛋白表达量 将 6 孔板置冰面上用预冷 PBS 清洗细胞 3 次, 每孔加入预冷的 RIPA 裂解液 (碧云天公司) 200 μ l, RIPA 裂解液预先加入苯甲基磺酰氟 (PMSF) 2 μ l 使终浓度为 1 mmol/L。冰上裂解细胞, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清用 BCA 法测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度, 每蛋白样品加入 5 $\times$ 加样缓冲液, 按 5:1 混合, 99 ℃ 蛋白变性 5 min, 取 200 μ g 蛋白行 SDS-PAGE 电泳 (HBX: 12% SDS-PAGE 电泳, Gankyrin 12% SDS-PAGE 电泳, β -catenin 10% SDS-PAGE, GAPDH 12% SDS-PAGE 电泳) 电泳电转移印迹到 PVDF 膜, 加 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入 Gankyrin 兔抗人多克隆抗体, 按 1:500 稀释并孵育 2 h 后洗涤, 添加二抗 (美国 Santa-Cruz 公司) 按 1:5 000 稀释, ECL 法 (碧云天公司) 检测。人 HBX 蛋白小鼠抗人单克隆抗体 (Abcam 公司), 按 1:2 000 稀释并孵育 2 h 后洗涤, 添加二抗 (美国 Santa-Cruz 公司) 按 1:5 000 稀释, ECL 法 (碧云天公司) 检测; 人 β -catenin 蛋白抗体 (兔抗人) 购自 BD Biosciences 公司, 按 1:2 000 稀释, 并孵育 2 h 后洗涤, 添加二抗 (美国 Santa-Cruz 公司) 按 1:5 000 稀释, ECL 法 (碧云天公司) 检测。

1.3 结果判定

1.3.1 RT-PCR 技术图像分析 显影结果经 Quantity one 软件进行图片分析、计算净光密度值。并以 Bio-Image Analysis System 进行半定量分析, 结果以相对光密度值 (relative optical density, ROD) $\times$ 面积 (mm²) 表示。mRNA 的相对含量 = (目的条带 ROD $\times$ mm²) / (GAPDH 条带 ROD $\times$ mm²)。

1.3.2 Western blot 技术图像分析 显影结果经 Quantity one 软件进行图片分析、计算净光密度值。并以 Bio-Image Analysis System 进行半定量分析, 结果以 ROD $\times$ 面积 (mm²) 表示。蛋白的相对含量 = (目的蛋白条带 ROD $\times$ mm²) / (GAPDH 条带 ROD $\times$ mm²)。

1.4 统计学分析

PCR 与 Western blot 条带平均光密度值由 Quantity One 软件 (版本号: 4.6.2) 计算, 数据分析由 SPSS 19.0 统计软件处理, ROD 值以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较应用两独立样本 t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HepG2.2.15 细胞中 Gankyrin 表达水平高于 HepG2 细胞 将完整整合有 HBV 基因组的人肝癌细胞系 HepG2.2.15 细胞与人肝癌细胞系 HepG2 细胞提取总 RNA 与总蛋白后,

应用半定量 RT-PCR 以及 Western blot 检测 Gankyrin mRNA 及蛋白表达水平, 结果显示 HepG2.2.15 细胞 Gankyrin mRNA 表达水平比 HepG2 细胞 Gankyrin mRNA 表达水平高 (图 1), 差异有统计学意义 (表 3, $t=-3.796$, $P=0.019$); HepG2.2.15 细胞 Gankyrin 蛋白表达水平比 HepG2 细胞 Gankyrin 蛋白表达水平高 (图 2), 差异有统计学意义 (表 4, $t=-8.258$, $P=0.014$)。

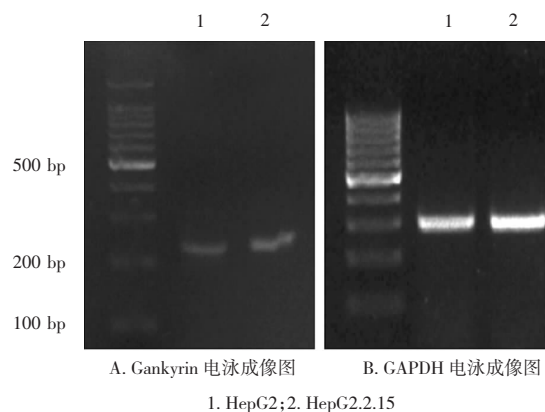


图 1 RT-PCR 检测 HepG2 与 HepG2.2.15 细胞中 Gankyrin mRNA 表达水平

Fig.1 Determination of transcription level of Gankyrin mRNA in HepG2 and HepG2.2.15 cells by RT-PCR

表 3 HepG2 与 HepG2.2.15 细胞中 Gankyrin 的 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	Gankyrin/GAPDH	t 值	P 值
HepG2	0.33 $\pm$ 0.05	-3.796	0.019
HepG2.2.15	0.45 $\pm$ 0.03		

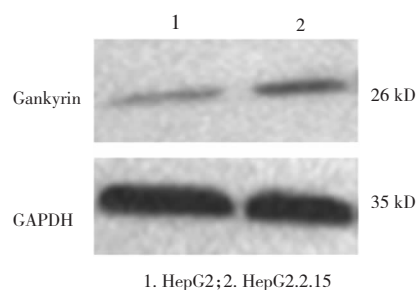


图 2 Western blot 检测 HepG2 与 HepG2.2.15 细胞中 Gankyrin 蛋白表达水平

Fig.2 Expression of Gankyrin protein in HepG2 and HepG2.2.15 cells detected by Western blot

表 4 HepG2 与 HepG2.2.15 细胞中 Gankyrin 的蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

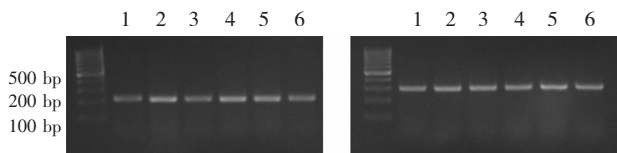
组别	Gankyrin/GAPDH	t 值	P 值
HepG2	0.65 $\pm$ 0.036	-8.258	0.014
HepG2.2.15	0.94 $\pm$ 0.026		

2.2 过表达 HBX 基因 Gankyrin 表达水平明显升高

本实验发现在 HepG2.2.15 细胞中 Gankyrin 水平较 HepG2 细胞明显升高,由此推测可能由于 HepG2.2.15 细胞整合有 HBV 基因组,HBV 基因组编码的 HBX 蛋白上调了癌基因 Gankyrin 的表达,为了验证这一假设,本实验将表达 HBX 蛋白的腺病毒载体感染 2 种人肝癌细胞株 HepG2、SMMC-7721 细胞,实验分组见表 2,48 h 后提取总 RNA 与总蛋白,应用 RT-PCR 检测 HepG2 与 SMMC-7721 细胞株中 Gankyrin mRNA 表达水平,发现 2 种细胞系中 Ad-HBX-GFP 组与 Ad-GFP 组 Gankyrin mRNA 水平均有明显升高(图 3),差异有统计学意义(表 5)。用 Western blot 检测 HepG2 与 SMMC-7721 细胞中 Gankyrin 蛋白表达水平,发现 2 种细胞系中 Ad-HBX-GFP 组与 Ad-GFP 组相比 Gankyrin 蛋白表达水平均有明显升高(图 4),差异有统计学意义(表 6)。

2.3 干扰 HBX 基因 Gankyrin 表达水平明显下降

为了进一步验证 HBX 蛋白可以调控 Gankyrin 的表达,本实验在 HepG2.2.15 细胞系中干扰 HBX 基因的表达,实验分组见表 2,48 h 后提取总 RNA 与总蛋白,应用 RT-PCR 检测 HepG2.2.15 细胞中 Gankyrin 的 mRNA 表达水平。发现在 HepG2.2.15 细胞中 Si-HBX 组与 Si-NC 组比较,Gankyrin 的 mRNA 表达水平明显下调(图 3),差异有统计学意义(表 5, $P < 0.05$)。应用 Western blot 检测蛋白表达水平(图 4)有明显下调,差异有统计学意义(表 6, $P < 0.05$)。



A. Gankyrin 电泳成像图

B. GAPDH 电泳成像图

1. SMMC-7721 Ad-GFP; 2. SMMC-7721 Ad-HBX-GFP;
3. HepG2 Ad-GFP; 4. HepG2 Ad-HBX-GFP;
5. HepG2.2.15 Si-NC; 6. HepG2.2.15 Si-HBX

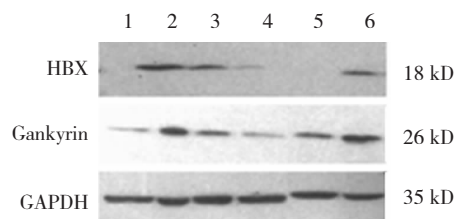
图 3 RT-PCR 检测调控 HBX 表达后 Gankyrin mRNA 的表达

Fig.3 Determination of transcription level of Gankyrin mRNA in HBX-regulated cells by RT-PCR

表 5 调控 HBX 基因的表达后 Gankyrin 的 mRNA 表达水平
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.5 Expression of Gankyrin mRNA in HBX-regulated cells
($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Gankyrin/ GAPDH	t 值	P 值
SMMC-7721 Ad-GFP	0.500 ± 0.027		
组 1 SMMC-7721 Ad-HBX-GFP	0.881 ± 0.041	-13.442	0.000
HepG2 Ad-GFP	0.480 ± 0.036		
组 2 HepG2 Ad-HBX-GFP	0.873 ± 0.045	-11.812	0.000
HepG2.2.15 Si-NC	0.820 ± 0.037		
组 3 HepG2.2.15 Si-HBX	0.454 ± 0.024	14.33	0.000



1. SMMC-7721 Ad-GFP; 2. SMMC-7721 Ad-HBX-GFP;

3. HepG2.2.15 Si-NC; 4. HepG2.2.15 Si-HBX; 5. HepG2 Ad-GFP;
6. HepG2 Ad-HBX-GFP

图 4 Western blot 检测调控 HBX 表达后 Gankyrin 蛋白的表达

Fig.4 Expression of Gankyrin protein in HBX-regulated cells detected by Western blot

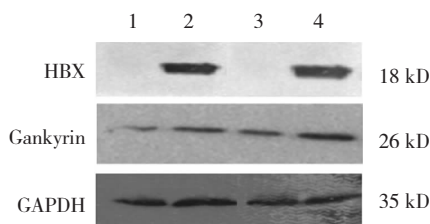
表 6 调控 HBX 基因后 Gankyrin 的蛋白表达水平
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.6 Expression of Gankyrin protein in HBX-regulated cells
($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Gankyrin/ GAPDH	t 值	P 值
SMMC-7721 Ad-GFP	0.516 ± 0.070		
组 1 SMMC-7721 Ad-HBX-GFP	1.603 ± 0.021	-25.692	0.000
HepG2 Ad-GFP	0.286 ± 0.050		
组 2 HepG2 Ad-HBX-GFP	1.396 ± 0.068	-22.710	0.000
HepG2.2.15 Si-NC	1.454 ± 0.039		
组 3 HepG2.2.15 Si-HBX	0.820 ± 0.060	15.305	0.000

2.4 过表达 HBX 基因 β -catenin 的表达水平明显升高

已有研究证实 HBX 可通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进下游癌基因的表达(如 c-myc、Cyclin-D1 等),Wnt/ β -catenin 信号通路在促进细胞增殖与周期调控等方面发挥极为重要的作用^[9]。所以,本实验推测 HBX 可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控 Gankyrin 的表达。为了证实这一猜测,本实验在 HepG2 与 SMMC-7721 细胞中过表达 HBX 基因,实验分组见表 2,48 h 后提取总蛋白,用 Western blot 检测 Wnt/ β -catenin 信号通路中的核心蛋白 β -catenin 的表达水平。发现 Ad-HBX-GFP 组与 Ad-GFP 组相比, β -catenin 蛋白表达量(β -catenin/GAPDH)明显上调(图 5),差异有统计学意义(表 7)。



1. SMMC-7721 Ad-GFP; 2. SMMC-7721 Ad-HBX-GFP;
3. HepG2 Ad-GFP; 4. HepG2 Ad-HBX-GFP

图 5 Western blot 检测过表达 HBX 基因后
 β -catenin 的蛋白表达水平

Fig.5 Expression of β -catenin in HBX-overexpressed cells
detected by Western blot

表 7 过表达 HBX 基因后 β -catenin 的蛋白表达水平
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.7 Expression of β -catenin protein in
HBX-upregulated cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Gankyrin/ GAPDH	t 值	P 值
SMMC-7721 Ad-GFP	0.441 $\pm$ 0.052		
组 4 SMMC-7721 Ad-HBX-GFP	1.180 $\pm$ 0.041	-19.469	$P < 0.01$
HepG2 Ad-GFP	0.523 $\pm$ 0.013		
组 5 HepG2 Ad-HBX-GFP	1.213 $\pm$ 0.065	-17.977	$P < 0.01$

2.5 HBX/Wnt/ β -catenin 信号通路调控 Gankyrin 的表达

由于过表达 HBX 蛋白,可上调 β -catenin 与 Gankyrin 的表达,Gankyrin 是否受到 β -catenin 的调控? 本实验在HepG2 与 SMMC-7721 细胞中过表达 β -catenin,实验分组见表 2,48 h 后提取细胞总蛋白,用 Western blot 分别检测 2 株细胞中 β -catenin 与 Gankyrin 蛋白表达水平,发现在 HepG2 与 SMMC-7721 细胞中过表达 β -catenin 后,Ad- β -catenin-GFP 组与 Ad-GFP 组比较,Gankyrin 水平(Gankyrin/GAPDH)明显上调(图 6A),差异有统计学意义(表 8)。为了进一步证实 HBX 蛋白通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控 Gankyrin 的表达这一猜测,本实验在已沉默 β -catenin 的 HepG2 与 SMMC-7721 细胞中过表达 HBX,用 Western blot 检测 Gankyrin 的表达水平。结果由图 6B 所示:在已沉默 β -catenin 的 HepG2 与SMMC-7721 细胞中,过表达 HBX 蛋白,发现 HBX 不能上调Gankyrin 的表达(图 6B),Gankyrin 差异有统计学意义(表 9)。

表 8 过表达 β -catenin 基因后 Gankyrin 的蛋白表达水平
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.8 Expression of Gankyrin protein in β -catenin-upregulated
cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Gankyrin/ GAPDH	t 值	P 值
SMMC-7721 Ad-GFP	0.211 $\pm$ 0.022		
组 6 SMMC-7721 Ad- β -catenin-GFP	0.613 $\pm$ 0.058	-11.096	0.000
HepG2 Ad-GFP	0.337 $\pm$ 0.015		
组 7 HepG2 Ad- β -catenin-GFP	0.750 $\pm$ 0.030	-21.266	0.000

表 9 在已沉默 β -catenin 的 HCC 细胞系中过表达 HBX 基因、Gankyrin 蛋白的表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.9 Expression of Gankyrin protein in overexpressed HBX and β -catenin-silenced cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Gankyrin/GAPDH	t 值	P 值
组 8 SMMC-7721 Ad-HBX-GFP, Ad-si- β -catenin-RFP	0.158 $\pm$ 0.045	-24.117	0.000
SMMC-7721 SMMC-7721 Ad-HBX-GFP , Ad-RFP	0.920 $\pm$ 0.030		
组 9 HepG2 Ad-HBX-GFP , Ad-si- β -catenin-RFP	1.178 $\pm$ 0.041	-21.473	0.000
HepG2 Ad-HBX-GFP, Ad-RFP	3.286 $\pm$ 0.165		

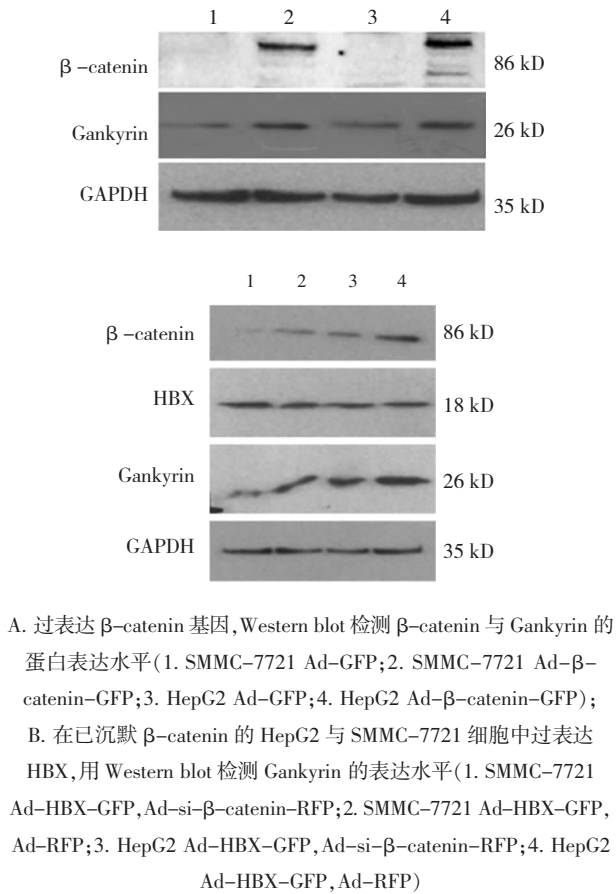


图 6 HBX 蛋白通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控 Gankyrin 的表达

Fig.6 Gankyrin regulated by HBX protein through Wnt/ β -catenin signaling pathway

3 讨论

HBV 基因组编码的 HBX 蛋白是一个具有反式作用的多功能调节蛋白,且已被证实与 HBV 相关性 HCC 的发生密切相关。癌蛋白 Gankyrin 常常在肝癌细胞中呈过表达状态,可作为评价 HCC 患者预后危险因素的可选基因^[5]。它在促进其它多种肿瘤发生发展中有着至关重要的作用,包括胰腺癌^[7]。目前,在乙肝相关性肝癌的研究中,HBX 与 Gankyrin 之间的相互关系,国内外未见报道。本研究发现,在整合有

HBV基因组的 HepG2.2.15 细胞系中 Gankyrin 的表达水平显著高于 HepG2 细胞,此结果提示HBV 基因组编码的某种蛋白可能参与调控 Gankyrin 的表达。随后的实验中,在 HepG2 及 SMMC-7721 细胞系中过表达 HBX 后,Gankyrin 的 mRNA 与蛋白表达水平均显著上调,另一方面,本实验在 HepG2.2.15 细胞中干扰 HBX 基因的表达,发现干扰 HBX 基因的 HepG2.2.15 细胞 Gankyrin 表达水平较对照组明显下调。证实了 HBV 基因组编码的 HBX 蛋白促进 Gankyrin 的表达,以上结果强有力的证实 HBX 与 Gankyrin 直接相关,HBX 可调控 Gankyrin 的表达,丰富了 HCC 的发生与 HBV 慢性感染密切相关这一理论,由于肝癌组织标本中 HBX 蛋白表达量极少,本实验未分析组织标本中 HBX 与 Gankyrin 表达的相关性,随着蛋白提取技术的不断进步,该问题将有可能解决。

β -catenin 蛋白是 Wnt 信号通路中的核心蛋白,当 Wnt 信号通路被激活后, β -catenin 的泛素化降解受到抑制,导致 β -catenin 在细胞质异常积聚,并通过核孔向胞核内转移。在细胞核中它可与 TCF/LEFs 结合形成转录因子复合体,激活下游多种靶基因的表达,如 c-myc、Cyclin-D1、Survivin 等,进而调控细胞的增殖与分化,促进多种肿瘤的生长、转移^[8-9]。因此,本实验推测 HBX 可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控 Gankyrin 的表达。为了证实这一结论,在两株肝癌细胞系中过表达 HBX,本实验发现 β -catenin 与 Gankyrin 表达水平均有上调,还发现在 HepG2 与 SMMC-7721 细胞系中,过表达 β -catenin 可激活 Gankyrin 的表达;为了更进一步证实 HBX 蛋白通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控 Gankyrin 的表达,本实验在已沉默 Wnt/ β -catenin 信号通路的肝癌细胞系中,过表达 HBX 蛋白,发现 HBX 促进 Gankyrin 表达的作用被阻遏。这说明 HBX-Wnt/ β -catenin-Gankyrin 信号转导通路存在与肝癌细胞中,抑制 β -catenin 的功能可阻遏 HBX 对 Gankyrin 的上调作用,但本实验仅仅检测了 Gankyrin 的表达水

平,证明 HBX 可通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调节 Gankyrin 的表达,但要证实直接调节 Gankyrin 表达的分子机制,将是本研究团队下一步拟解决的问题。

在大多数的肿瘤的发生发展过程中,多种致癌机制已被证实。探索肝癌各种致癌机制的潜在关联,不但有助于了解肝癌的分子机制的进展,而且可为肝癌的治疗提供新的治疗靶点。本文率先提出并验证了在肝癌发生过程中 HBX 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控 Gankyrin 表达。关于二者在临床组织中的关系以及对肝癌诊断和治疗中的意义有待于进一步探索。此结果将可能为乙肝相关性肝癌的治疗提供新的治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] Liaw YF,Chu CM.Hepatitis B virus infection[J].Lancet,2009,373(9663):582-592.
- [2] Kuo TC,Chao CC.Hepatitis B virus X protein prevents apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by up regulating SATB1 and HURP expression[J].Biochem Pharmacol,2010,80(7):1093-1102.
- [3] Arzumanyan A,Friedman T,Ng IO,et al.Does the hepatitis B antigen HBx promote the appearance of liver cancer stem cells?[J].Cancer Res,71(10):3701-3708.
- [4] Fu J,Chen Y,Cao J,et al.p28(GANK) overexpression accelerates hepatocellular carcinoma invasiveness and metastasis via phosphoinositol 3-kinase/AKT/hypoxia-inducible factor-1alpha pathways[J].Hepatology,2011,53(1):181-192.
- [5] Sun W,Ding J,Wu K,et al.Gankyrin-mediated dedifferentiation facilitates the tumorigenicity of hepatocytes and hepatoma cells[J].Hepatology,2011,54(4):1259-1272.
- [6] Reya T,Clevers H.Wnt signaling in stem cells and cancer[J].Nature,2005,434(7035):843-850.
- [7] Meng Y,He L,Guo X,et al.Gankyrin promotes the proliferation of human pancreatic cancer[J].Cancer Lett,2010,297(1):9-17.
- [8] Clevers H,Nusse R.Wnt/beta-catenin signaling in development and disease[J].Cell,2012,149(6):1192-1205.
- [9] Dong LW,Yang GZ,Pan YF,et al.The oncoprotein p28GANK establishes a positive feedback loop in β -catenin signaling[J].Cell Res,2011,21(8):1248-1261.

(责任编辑:唐秋姗)