

乙型肝炎病毒复制对肝癌细胞 Arid2 基因表达的影响

李 治, 陈 震, 段玉洁, 聂丽珠, 田 玲, 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:初步研究乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染及其复制对肝癌细胞中抑癌基因 Arid2(AT-rich interactive domain 2)表达的影响。**方法:**采用携带 HBV 基因组 1.1 倍体的复制型重组腺病毒 Ad-HBV1.1 感染 Huh7 细胞, 或者四环素诱导的 HBV 复制细胞模型 HepAD38 细胞, 观察 HBV 瞬时或稳定复制细胞模型中 Arid2 的表达变化; 进一步采用 HBV 各元件乙型肝炎病毒 S 蛋白(hepatitis B virus S protein, HBs)、乙型肝炎病毒 DNA 聚合酶(HBV-pol)、乙型肝炎病毒核心蛋白(hepatitis B virus core protein, HBc)、乙型肝炎病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X protein, HBx)的过表达质粒转染 Huh7 细胞, 明确病毒自身编码蛋白对 Arid2 表达的调控作用。在上述细胞模型中, 运用 Southern-blot、ELISA、real-time PCR 的方法验证 HBV 的感染与复制情况, 通过 RT-PCR、Western blot 检测肝癌细胞抑癌基因 Arid2 表达水平的变化。**结果:**HBV 瞬时转染或稳定复制细胞模型中, Ad-HBV1.1 感染的 Huh7 细胞 mRNA 和蛋白表达水平明显降低, Western blot 结果显示 Arid2 蛋白表达水平降低了 46.10% ($P<0.05$); 在 HBV 稳定复制的 HepAD38 细胞中, Arid2 蛋白表达水平降低了 37.63% ($P<0.05$)。转染 HBV 4 种病毒编码蛋白过表达质粒的 Huh7 细胞中, 过表达 HBs、HBx 组较其他实验组 Arid2 表达水平明显降低, Western blot 结果显示 Arid2 蛋白表达水平在 HBs 组降低了 54.55% ($P<0.05$), 在 HBx 组降低了 46.38% ($P<0.05$)。**结论:**HBV 的感染和复制导致肝癌细胞中 Arid2 的表达水平下调, Arid2 基因的表达与 HBV 复制水平呈负相关, 其中 HBs、HBx 对 Arid2 的下调作用较明显。

【关键词】乙型肝炎病毒; Arid2; 乙型肝炎病毒 S 蛋白; 乙型肝炎病毒 X 蛋白

【中图分类号】R512.62

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-09-16

Replication of hepatitis B virus induces down-regulation of Arid2 expression in hepatoma cells

Li Zhi, Chen Zhen, Duan Yujie, Nie Lizhu, Tian Ling, Tang Ni

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

【Abstract】Objective: To investigate the effects of hepatitis B virus replication on the expression of Arid2 in hepatoma cells. **Methods:** The HBV-stable or transient expression cell models were used to evaluate the regulatory effects of HBV replication on Arid2 expression. For stable replication model, HepAD38 cells were used to express HBV under the control of inducible tetracycline promoter. For transient expression system, Huh7 cells were infected with the replicative recombinant adenovirus Ad-HBV1.1 carrying 1.1 copies of HBV genome. Southern-blot, ELISA and real-time quantitative PCR were employed to confirm HBV replication efficiency in hepatoma cells. The expression levels of Arid2 gene were determined by RT-PCR and Western blot. To further identify which of the viral-encoded proteins implicated in the regulation of Arid2 expression, Huh7 cells were transfected with hepatitis B virus S protein(HBs), HBp, hepatitis B virus core protein(HBc) or hepatitis B virus X protein(HBx)-expression plasmids, and Arid2 expression level were determined. **Results:** HBV virological marker and replicative intermediates were detected both in HBV-stably or transient expression system, indicating that HBV-stably or transiently expression cell model can robustly support HBV replication. The expression levels of Arid2 gene were significantly down-regulated both in the HBV stable replication and transient replication cell model. The protein expression level of Arid2 was decreased by 46.10% in Huh7 cells transfected with Ad-HBV 1.1 and by 37.63% in HepAD38 cells

($P<0.05$). Among the four viral-encoded expression plasmids, HBV surface antigen and HBx significantly repressed Arid2 mRNA and protein expression, with inhibitory effects of 54.55% and 46.38% ($P<0.05$) in protein level by HBs and HBx respectively. **Conclusion:** HBV replication represses Arid2 expression in hepatoma cells. Among viral-encoded proteins, HBs and HBx may play important roles in HBV-induced Arid2 repression.

【Key words】hepatitis B virus; Arid2; hepatitis B virus S protein; hepatitis B virus X protein

作者介绍:李 治, Email: 393884358@qq.com,

研究方向: 乙型肝炎病毒和新型抑癌基因 Arid2 功能关系的研究。

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:81371827, 31171307);

“十二·五”传染病国家科技重大专项资助(编号:

2012ZX10002005-003-002、2013ZX10002002-005-003);

重庆医科大学附属第二医院“优秀青年人才”资助项目。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150405.2036.002.html

(2015-04-03)

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是引起慢性肝炎的主要病因,每年全世界约有 100 万人死于 HBV 相关性疾病。HBV 慢性感染与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生密切相关,约 53% 的 HCC 与 HBV 感染有关^[1]。从 HBV 慢性感染到肝炎肝硬化最终发展为 HCC 是 HBV 与宿主细胞长期相互作用的过程,其中 HBV 高水平复制、病毒基因与宿主基因的整合导致基因遗传不稳定性是 HCC 发生的重要诱因^[2-3]。

哺乳动物酵母交换型转换/蔗糖不发酵复合物(Yeast mating-type switching/sucrose non-fermenting, SWI/SNF)复合物是一种进化保守的多亚基染色质重塑复合物,其核心亚单位 BRG1 或 BRM 具有 ATP 酶活性。SWI/SNF 复合物利用 ATP 水解所释放的能量动员核小体,改变染色质结构,从而调控靶基因转录。研究证实 SWI/SNF 复合物高频突变与人类多种肿瘤的发生相关,其亚基及其家族成员具有内在的抑癌基因活性^[4]。人类的 SWI/SNF 复合物分为两个亚型 BAF(BRG1/hBRM-associated factors)和 PBAF(Polybromo-associated BAF),两者仅有几个组成亚基不同。

Arid2 基因编码的 BAF200 是新近发现的 SWI/SNF 复合物核心亚单位 PBAF 中的一种特异性亚基,人类 Arid2 基因定位于第 12 号染色体,包含 21 个外显子,编码 1 个由 1835 个氨基酸残基构成、分子量约 197 kD 的蛋白质,Arid2 蛋白定位于细胞核,在全身多种组织如心脏,肝脏以及睾丸等中均有表达^[5]。

Arid2 含有 2 个典型的结构域,包括 N-端 ARID 结构域和 C-端 2 个富含 C2H2 锌指结构基序^[6]。ARID 结构域是一个基于螺旋-转角-螺旋基序的 DNA 结合结构域^[7-8]。最近研究表明,Arid2 基因具有肿瘤抑制作用,其失活突变参与了多种肿瘤的发生,尤其 Arid2 在肝癌组织中存在高频失活突变,是 HCC 发生的重要因素之一,其机制尚不明确^[9]。同时在 HBV、HCV 感染的 HCC 组织中,也发现 Arid2 基因失活突变,但是 HBV 病毒复制与 Arid2 表达的相关性未见研究报道^[10]。

本实验首先在 HBV 瞬时或稳定复制细胞模型中,观察到 HBV 的感染和复制导致肝癌细胞中 Arid2 的表达水平下调,并且 Arid2 基因的表达与 HBV 复制水平呈负相关,进一步研究发现乙型肝炎病毒 S 蛋白(hepatitis B virus S protein, HBs)、乙型肝炎病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X protein, HBx)对 Arid2 的下调作用较明显。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及细胞株 人肝癌细胞系 Huh7 细胞、HepG2 细胞和整合 HBV 病毒基因并可在四环素撤除后诱导 HBV 稳定复制的人肝癌细胞 HepAD38 均由本实验室保存。携带 HBV1.1 倍基因组的复制型重组腺病毒 Ad-HBV1.1 和表达 HBV 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 由本实验室汤华教授馈赠。

1.1.2 主要试剂 MEM 培养基、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;四环素购自 SIGMA 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司;G418 购自德国 Merck 公司;酚氯仿、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液(强)、PMSF、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液等购自碧云天生物技术公司;蛋白酶 K、PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real time 试剂盒购自 Takara 公司;地高辛标记试剂盒、FastStart Universal SYBR Green Master、Hybond-N+膜、NC 膜购自 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 (1)将 Huh7 细胞分别感染 Ad-HBV1.1 腺病毒,绿色荧光蛋白腺病毒(green fluorescent protein Adenovirus, Ad-GFP)作为实验组和载体对照组,同时设置空白处理组,在瞬时转染模型中观察 Ad-HBV1.1 腺病毒对 Huh7 肝癌细胞 Arid 基因表达量的影响。(2)将 HepAD38 细胞给予去四环素培养作为实验组,同时设置四环素培养的 HepAD38 细胞作为其自身对照,在 HBV 稳定复制模型中观察 HBV 复制对 HepAD38 肝癌细胞 Arid 基因表达量的影响。(3)将 Huh7 分为 5 组,分别转染 pCMV-sport6-HBs、pCMV-sport6-HBp、pCMV-sport6-HBc、pCMV-sport6-HBx 质粒作为实验组,转染载体 pCMV-sport6 质粒作为载体对照组,同时设置空白处理组,观察 HBV 4 种病毒编码蛋白过表达质粒对 Huh7 细胞 Arid 基因表达量的影响。

1.2.2 细胞的培养与转染 Huh7 细胞、HepG2 细胞培养在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中(含青霉素 100 U/ml,链霉素 100 g/ml),HepAD38 细胞培养在含 10%胎牛血清的 MEM 培养基中(含青霉素 100 U/ml,链霉素 100 g/ml,G418 200 g/ml,2 mmol/L 谷氨酰胺),37 ℃、体积分数为 5%CO₂ 的孵箱中培养。转染前 12 h 将细胞以每孔 40%~60%的密度接种在 6 孔板中培养,3 μg 质粒与脂质体 Lipofectamine2000 按说明书步骤共转染,4~6 h 更换培养液。

1.2.3 RT-PCR 与 real-time PCR 检测相关基因的表达 转染后 72 h,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,加入 RQ1 RNase-Free DNase(Promega)以去除 RNA 中残存的 DNA,采用 M-MLV 逆转录酶逆转为 cDNA 后,用 SYBE Green Master Mix 进行 real-time PCR 反应,特异性的引物序列见表 1。扩增条件为:95 ℃ 5 min,94 ℃ 20 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 30 s,40 个循环,72 ℃ 20 s,95 ℃ 1 min,60 ℃ 1 min。以 GAPDH 为内对照,将各基因平均 Ct 值与 GAPDH 基因 Ct 平均值相

比,即可得到各基因的相对表达量。半定量 RT-PCR 检测的 RNA 提取以及逆转录过程与上相同。按下列条件进行 PCR 扩增:95 ℃ 5 min,94 ℃ 20 s,63 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s,35 个循环后,72 ℃ 10 min,扩增后,用 5 μl 产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪下观察结果。

表 1 引物序列

Tab.1 Sequences for primers

Construct	Primer sequence
Arid2	正义链 5'-AGCAACAGCAGCAGCAACATTCA-3'
	反义链 5'-GAAGGACCACGTTTCGGAAG-3'
GAPDH	正义链 5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3'
HBV-DNA	反义链 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'
	正义链 5'-CCTAGTAGTCAGTTATGTCAAC-3'
	反义链 5'-TCTATAAGCTGGAGGAGTGGCA-3'

1.2.4 HepAD38 细胞中 HBV 复制中间体的检测 收细胞,用台盼蓝染色方法细胞计数,离心弃培养基,用 PBS 清洗 2 次,加入 500 μl 细胞裂解液(10 mmol/L Tris-HCl pH8.0,1 mmol/L EDTA,1%NP-40 和 2%蔗糖),混匀后于 37 ℃ 孵育 15 min,收集裂解液,室温条件下 15 000 g 离心 4 min。上清加入 40 U/ml Dnase I 和 10 mmol/L MgCl₂ 37 ℃ 金属浴孵育 4 h 后,每管加入 200 μl 预冷的 35 % PEG 8000(含 1.5 mmol/L NaCl),充分震荡后冰浴 1~2 h,于 4 ℃ 12 000 g 离心 15 min,小心弃去上清,沉淀中加入 500 μl 蛋白酶 K 消化液(25 mmol/L Tris-HCl(pH7.8),10 mmol/L EDTA,0.5 % SDS,150 mmol/L NaCl)和 12.5 μl 20 mg/ml 蛋白酶 K(Takara),45 ℃ 水箱中过夜。等体积酚氯仿抽提 1,2 次,异丙醇沉淀,75%乙醇洗涤,TE 缓冲液溶解。提取的 HBV DNA 取 2 μl 进行 SYBE Green Master Mix 实时定量 PCR 反应,每样本设 3 复孔,HBV DNA 特异性的引物序列见表 1。扩增条件为:95 ℃ 5 min,95 ℃ 20 s,63 ℃ 20 s,72 ℃ 30 s,40 个循环,72 ℃ 20 s,95 ℃ 1 min,60 ℃ 1 min。提取的 HBV DNA 经过 0.9%琼脂糖凝胶电泳,碱变性,毛细管虹吸法转膜,120 ℃ 固定,预杂交 1 h,家兔地高辛标记 DNA 探针杂交过夜,洗膜,胶片显影。

1.2.5 Western blot 检测 Arid2 基因蛋白表达水平 转染后 72 h 提取细胞蛋白,每孔加入 200 μl 裂解液,4 ℃ 离心后收上清液,用 BCA 法定量蛋白浓度,计算后每孔上样量 30 μg,10% SDS-PAGE 分离后,转移到 PVDF 膜上。5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,以 Arid2 抗体孵育 4 ℃ 过夜。TBST 洗膜 40 min,HRP 酶标羊抗兔二抗室温孵育 1.5 h。TBST 洗膜 40 min 后,加入底物发光剂 ECL,曝光。

1.2.6 HBsAg 和 HBeAg 的检测 转染后第 3 天收集各孔的上清液,1 200 r/min 离心,上清液按照 ELISA 试剂盒说明书进行测定,抗原相对百分比=(实验组抗原均数-对照组抗原均数)/对照组抗原均数×100%。

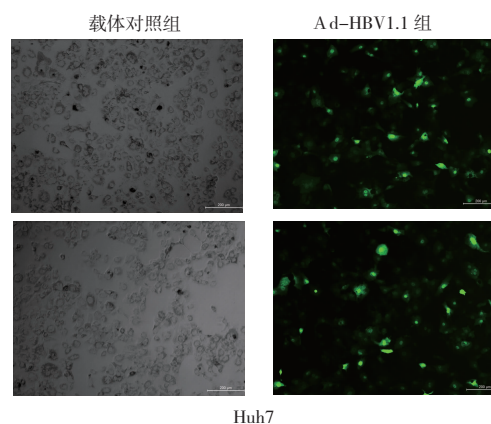
1.3 统计学方法

用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组数据之间的比较采用独立样本的 *t* 检验;多组数据的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Dunnett-*t* 检验;方差不齐时采用变量变换的非参数检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

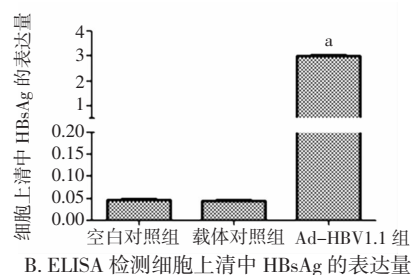
2.1 HBV 对 Huh7 细胞中 Arid2 表达水平的影响

将 Huh7 细胞分别感染 Ad-HBV1.1 腺病毒、Ad-GFP 作为实验组和载体对照组,同时设置空白处理组。见图 1。72 h 荧光显微镜观察 HBV 腺病毒与 GFP 腺病毒已感染细胞 70%~80%,并且通过 ELISA 检测细胞上清中 HBsAg 的表达量,空白处理组、载体对照组和实验组分别为:0.05±0.01、0.05±0.01、2.90±0.12,实验组高于对照组近 58 倍;同样检测 HBeAg 的表达量分别为:0.05±0.01、0.05±0.01、3.01±0.07,实验组高于对照组近 60 倍,证实 HBV 腺病毒成功感染肝癌细胞。同时提取细胞 mRNA 和细胞蛋白,检测 Arid2 基因的表达水平,如图 2 所示,空白处理组、载体对照组和实验组目的基因 Arid2 和内参 GAPDH 的 RT-PCR 和 Western blot 灰度比值反应目的基因相对表达量,结果表明实验组与载体对照组比较差异有统计学意义,Arid2 mRNA 和蛋白表达水平分别降低 51.87%和 46.10%,载体对照组与空白对照组差异无统计学意义。见表 2。

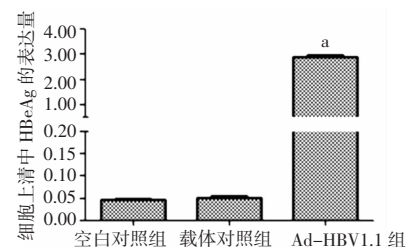


Huh7

A. Ad-GFP 和 Ad-HBV 感染 Huh7 细胞 72 h 荧光显微镜图像(200×)



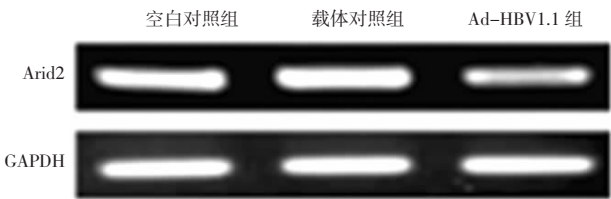
B. ELISA 检测细胞上清中 HBsAg 的表达量



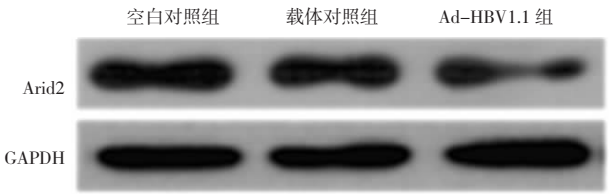
C. ELISA 检测细胞上清中 HBeAg 的表达量

图 1 Ad-HBV1.1 腺病毒感染肝癌细胞的鉴定

Fig.1 Validation of HBV infection in Huh7 cells transduced with Ad-HBV1.1



A. RT-PCR 检测细胞 Arid2 基因的 mRNA 表达量



B. Western blot 检测细胞 Arid2 基因的蛋白表达量

图 2 Ad-HBV1.1 感染对肝癌细胞 Arid2 基因表达的影响
Fig.2 Downregulation of Arid2 expression in Huh7 cells transduced with Ad-HBV1.1

表 2 Ad-HBV1.1 感染对肝癌细胞 Huh7 Arid2 基因 mRNA 和蛋白表达量的比较分析

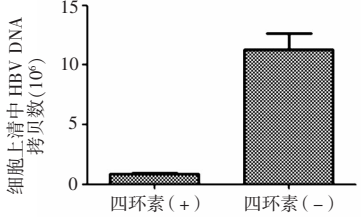
Tab.2 The expression and comparison of Arid2 in Huh7 cells transduced with Ad-HBV1.1

组别	mRNA表达量	蛋白表达量
载体对照组	0.85 ± 0.06	1.41 ± 0.15
空白对照组	0.83 ± 0.01	1.42 ± 0.05
Ad-HBV1.1 组	0.41 ± 0.02 ^a	0.76 ± 0.02 ^b
F 值	6.736	7.200
P 值	0.015	0.028

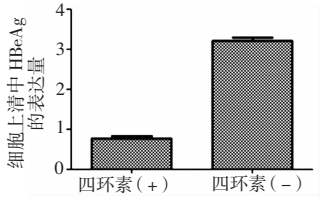
注:a、b 表示 Ad-HBV1.1 组和载体对照组相比较

2.2 HBV 对 HepAD38 肝癌细胞中 Arid2 表达水平的影响

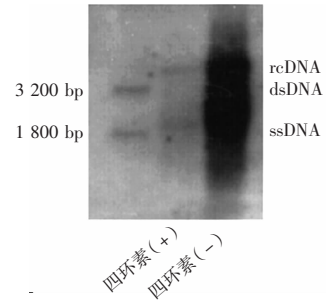
将 HepAD38 细胞给予去四环素培养作为实验组,同时设置四环素培养的 HepAD38 细胞作为其自身对照。如图 3 所示,培养 1 个月,ELISA 结果表明 HBeAg 在对照组和实验组细胞上清中表达量分别为:0.76 ± 0.18,3.21 ± 0.17,real-time PCR 和 Southern-blot 结果也同时证明实验组细胞中 HBV 复制水平明显高于对照组,四环素对 HBV 复制的开关作用得到验证。提取细胞 mRNA 和细胞蛋白,检测 Arid2 基因的表达水平,如图 4 所示,目的基因 Arid2 和内参 GAPDH 的 RT-PCR 和 Western blot 结果各自的灰度比值反应目的基因相对表达量,结果表明实验组与对照组比较差异有统计学意义,Arid2 mRNA 和蛋白表达水平分别降低 47.37%和37.63%。为了避免四环素本身对实验结果的影响,通过四环素培养和去四环素培养 HepG2 细胞,并重复上述实验,如图 5 所示,实验组与对照组比较差异无统计学意义,结果证实 Arid2 表达水平下降是由 HBV 复制引起。具体结果见表 3、4。



A. Real-time PCR 检测 HBV DNA 拷贝数



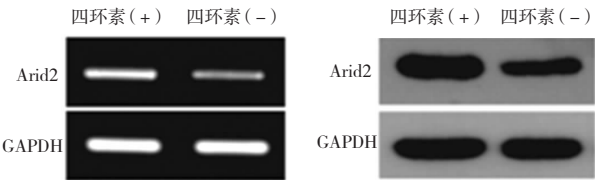
B. ELISA 检测细胞上清中 HBeAg 的表达量



C. Southern-blot 检测细胞中 HBV 复制水平

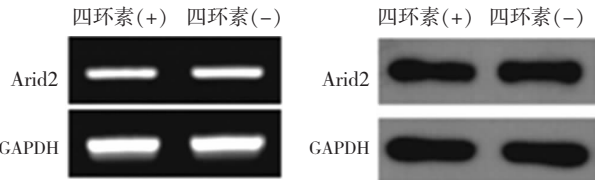
图 3 四环素对 HepAD38 细胞中 HBV 复制的影响

Fig.3 HBV replication levels in HepAD38 cells grown in the absence or presence of tetracycline



A. RT-PCR 检测 HepAD38 细胞 Arid2 基因的 mRNA 表达量
B. Western blot 检测 HepAD38 细胞 Arid2 基因的蛋白表达量

图 4 HBV 复制对 HepAD38 细胞 Arid2 基因表达的影响
Fig.4 Detection of Arid2 expression level in HBV stably transfected HepAD38



A. RT- PCR 检测 Hep2 细胞中 Arid2 基因的 mRNA 表达量
B. Western blot 检测 Hep2 细胞中 Arid2 基因的蛋白表达量

图 5 四环素对 HepG2 细胞 Arid2 基因表达的影响

Fig.5 Detection of the Arid2 gene expression level in HepG2 grown in the absence or presence of tetracycline

表 3 HBV 复制对 HepAD38 细胞 Arid2 基因 mRNA 和蛋白表达量的比较分析

Tab.3 The expression and comparison of Arid2 in HBV stably transfected HepAD38

组别	mRNA表达量	蛋白表达量
HepAD38(四环素+)	0.38 ± 0.02	1.01 ± 0.05
HepAD38(四环素-)	0.20 ± 0.01	0.63 ± 0.06
<i>t</i> 值	13.716	8.686
<i>P</i> 值	0.001	0.001

表 4 HBV 复制对 HepG2 细胞 Arid2 基因 mRNA 和蛋白表达量的比较分析

Tab.4 The expression and comparison of Arid2 in HepG2 grown in the absence or presence of tetracycline

组别	mRNA表达量	蛋白表达量
HepG2(四环素+)	0.36 ± 0.02	0.91 ± 0.06
HepG2(四环素-)	0.37 ± 0.02	0.92 ± 0.02
<i>t</i> 值	0.199	0.304
<i>P</i> 值	0.852	0.776

2.3 HBV 4 种病毒蛋白对 Huh7 细胞中 Arid2 表达水平的影响

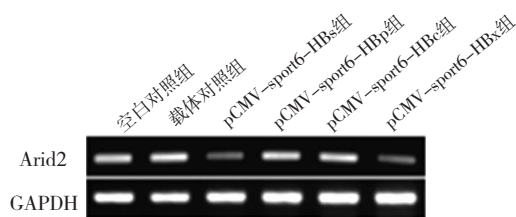
将 Huh7 分为 5 组,分别转染 pCMV-sport6-HBs、pCMV-sport6-HBp、pCMV-sport6-HBc、pCMV-sport6-HBx 作为实验组,转染载体 pCMV-sport6 作为载体对照组,同时设置空白处理组。如图 6 所示,空白对照组、载体对照组和各实验组目的基因 Arid2 和内参 GAPDH 的 RT-PCR 和 Western blot 结果各自的灰度比值反应目的基因相对表达量,结果表明 HBs 组 Arid2 mRNA 和蛋白表达水平分别降低 50.03%和54.55%,HBx 组下降 46.48%和 46.38%,其与载体对照组比较差异均有统计学意义,载体对照组与空白对照组差异无统计学意义,表明 HBV 4 种病毒蛋白中 S 蛋白和 X 蛋白对细胞 Arid2 的表达有明显的抑制作用。见表 5。

表 5 HBV 编码蛋白对肝癌细胞 Arid2 基因 mRNA 和蛋白表达量的比较分析

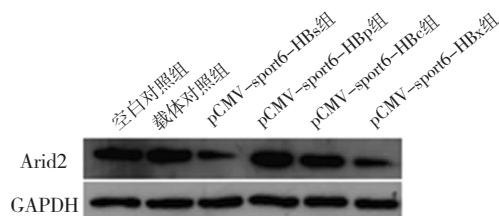
Tab.5 The expression and comparison of Arid2 in Huh7 cells transfected by four kinds of HBV virus encoded protein expression plasmids

组别	mRNA表达量	蛋白表达量
载体对照组	0.22 ± 0.01	0.71 ± 0.06
空白对照组	0.19 ± 0.01	0.71 ± 0.06
pCMV-sport6-HBs组	0.11 ± 0.01 ^a	0.38 ± 0.05 ^b
pCMV-sport6-HBp组	0.22 ± 0.05	0.67 ± 0.07
pCMV-sport6-HBc组	0.23 ± 0.01	0.70 ± 0.03
pCMV-sport6-HBx组	0.10 ± 0.01 ^c	0.38 ± 0.01 ^d
<i>F</i> 值	10.814	32.725
<i>P</i> 值	0.001 ^a ;0.001 ^c	0.002 ^b ;0.015 ^d

注 :a, $F=10.814$, $P=0.001$; b, $F=32.725$, $P=0.002$; c, $F=10.814$, $P=0.001$; d, $F=32.725$, $P=0.015$; a、b 表示 pCMV-sport6-HBs 组和载体对照组比较; c、d 表示 pCMV-sport6-HBx 组和载体对照组比较



A. RT-PCR 检测细胞 Arid2 基因的 mRNA 表达量



B. Western blot 检测细胞 Arid2 基因的蛋白表达量

图 6 HBV 编码蛋白对肝癌细胞 Arid2 基因表达的影响

Fig.6 Detection of Arid2 gene expression level in Huh7 cells transfected by four kinds of HBV virus encoded protein expression plasmids

3 讨论

HBV 慢性感染与 HCC 的发生密切相关,HBV 感染肝细胞后,病毒复制的同时产生大量的病毒蛋白,在与宿主细胞相互作用过程中引起免疫反应,并且 HBV 复制能活化各种信号级联反应导致宿主细胞的基因发生突变失活,进而肝细胞发生恶性转化,细胞恶性增殖,迁移和侵袭性增加,最终导致 HCC 的发生^[11-12]。HBV 编码的病毒蛋白可能直接影响细胞的功能,参与宿主基因突变失活的过程,有报道称 HBs 和 HBx 是肝癌组织中最常被检测到 HBV 相关蛋白。尽管已有部分研究证实 HBs 和 HBx 可通过影响细胞本身信号通路来激活基因转录促进肝癌发生,然而对于 HBs 和 HBx 在 HBV 相关肝癌(HBV-associated hepatocellular carcinoma,HBV-HCC)发生发展过程中的作用仍有许多不明之处^[13-14]。有研究发现 HBV 转基因小鼠过表达 HBs 可导致持续的肝细胞损伤从而诱导肝脏条件性反应,肝细胞可发生炎症、再生、异常转录,最终进展为肝肿瘤^[15]。有实验证实 HBs 表达可以活化 Src/PI3K/Akt 信号通路,调节 G1-S 细胞周期进展,使细胞发生凋亡抵抗并且恶性增殖^[16]。而另一种病毒编码蛋白 HBx 由 HBV 开放读码框架中最小的 X 基因编码。研究表明,HBx 本身不能直接与双链 DNA 结合,

但其可通过蛋白-蛋白相互作用与反式作用因子结合。HBx 是一种多功能蛋白,对基因转录、信号传递、细胞周期和细胞增生凋亡等均具有调节作用,HBx 可能通过这些作用直接或间接地导致肝细胞癌变^[17]。许多报道表明,HBx 可以导致细胞内抑癌基因的失活,有研究证实抑癌基因 P53 结合,使 P53 的正常调节功能障碍或失活,从而使癌基因激活而发生癌变^[18]。

Arid2 作为抑癌基因,已被证实在多种肿瘤组织中存在突变,其在肝癌组织中存在高频失活性突变,是 HCC 发生的重要因素之一,其机制尚不明确。HBV 病毒的复制及其病毒编码蛋白是否能够调控 Arid2 的表达,目前还没有相关研究报道。本实验中,在 HBV 瞬时或稳定复制细胞模型中观察到 HBV 可以直接导致抑癌基因 Arid2 表达下调,进一步采用 HBV 各元件 HBs、HBp、HBc、HBx 的过表达质粒转染 Huh7 细胞,明确病毒自身编码蛋白对 Arid2 表达的调控作用,结果表明 HBs、HBx 对 Arid2 的下调作用较明显,进一步阐明了 HBV 下调 Arid2 基因表达的机理。上述实验结果提示,HBV 复制以及编码产生的病毒蛋白可能通过下调抑癌基因 Arid2 的表达参与 HCC 的发生和发展。后续实验中将进一步检测 HBV 及其编码蛋白对 Arid2 启动子活性的影响,筛查 Arid2 相关信号通路及转录因子的变化,以进一步明确 HBV 导致 Arid2 表达水平下降的机制。

参 考 文 献

- [1] Bakhshinejad B, Sadeghizadeh M. Bacteriophages and their applications in the diagnosis and treatment of hepatitis B virus infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(33): 11671-11683.
- [2] Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(1): 74-81.
- [3] 慕生枝, 黄爱龙. 乙型肝炎病毒 PreS1 抗原的研究进展[J]. *重庆医科大学学报*, 2007, 32(2): 132-134.
- [4] Banine F, Bartlett C, Gunawardena R, et al. SWI/SNF chromatin-remodeling factors induce changes in DNA methylation to promote transcriptional activation[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(9): 3542-3547.
- [5] Wu JI. Diverse functions of ATP-dependent chromatin remodeling complexes in development and cancer[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2012(1): 54-69.
- [6] Zhang X, Azhar G, Zhong Y, et al. Zipzap/p200 is a novel zinc finger protein contributing to cardiac gene regulation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 346(3): 794-801.
- [7] Zhao H, Wang J, Huang Z, et al. Arid2: a new tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2011, 2(11): 886-891.
- [8] Shain AH, Pollack JR. The spectrum of SWI/SNF mutations, ubiquitous in human cancers[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55119.
- [9] Li M, Zhao H, Kinzler KW, et al. Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(9): 828-829.
- [10] Xu F, Flowers S, Moran E. Essential role of ARID2 protein-containing SWI/SNF complex in tissue-specific gene expression[J]. *Biol Chem*, 2012, 287(7): 5033-5041.
- [11] Zhang W, Xu W, Xiong S. Blockade of Notch1 signaling alleviates murine lupus via blunting macrophage activation and M2b polarization[J]. *Immunol*, 2010, 184(11): 6465-6478.
- [12] Zhang W, Xu W, Xiong S. Macrophage differentiation and polarization via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-ERK signaling pathway conferred by serum amyloid P component[J]. *Immunol*, 2011, 187(4): 1764-1777.
- [13] Neuveut C, Wei Y, Buendia MA. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis[J]. *Hepatology*, 2010, 52(4): 594-604.
- [14] Brechot C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(5s): 56-61.
- [15] Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, et al. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice[J]. *Cell*, 1989, 59(6): 1145-1156.
- [16] Liu H, Xu J, Zhou L, et al. Hepatitis B virus large surface antigen promotes liver carcinogenesis by activating the Src/PI3K/Akt pathway[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(24): 7547-7557.
- [17] Bouchard MJ, Schneider RJ. The enigmatic X gene of hepatitis B virus[J]. *Virology*, 2004, 78(23): 12725-12734.
- [18] Wang XW, Forrester K, Yeh H, et al. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(6): 2230-2234.

(责任编辑:冉明会)