

肿瘤内分泌

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002221

吉西他滨促进 HepG2.2.15 细胞系中乙肝病毒 pgRNA 转录和病毒复制及相关分子机制研究

叶雨笙, 常 凯, 朱紫衣, 刘晨霞, 江忠勇, 熊 杰

(西部战区总医院检验科, 成都 610083)

【摘要】目的:探讨吉西他滨对 HepG2.2.15 细胞中乙肝病毒前基因组 RNA (pregenomic RNA, pgRNA) 转录以及乙肝病毒复制的影响及其可能的作用机制。**方法:**使用不同浓度吉西他滨处理 HepG2.2.15 细胞, 分别使用 CCK-8 法、流式细胞术、实时定量聚合酶链式反应 (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)、酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测细胞活性、细胞凋亡、细胞周期、细胞内乙肝病毒 pgRNA、细胞培养上清液中乙型肝炎表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg)、乙型肝炎 e 抗原 (hepatitis B e antigen, HBeAg)、乙肝病毒 DNA (hepatitis B virus DNA, HBV DNA); 实时定量 PCR 法检测吉西他滨作用下 HepG2.2.15 细胞中与 pgRNA 转录有关的调控基因肝细胞核因子 4 α (hepatocyte nuclear factor 4, HNF4 α)、P38 蛋白激酶 (P38 mitogen-activated protein kinase, P38MAPK)、环磷酸腺苷效应元件结合蛋白 1 (cAMP responsive element binding protein 1, CREB1)、核转录因子 p65 (nuclear factor-kappa B p65, NF- κ B p65)、组蛋白去乙酰化酶 1 (histone deacetylase 1, HDAC1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, PGC-1 α)、叉头转录因子 O1 (forkhead box protein O1, FOXO1)、相关调控基因沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (sirtuin 1, SIRT1)、P53 mRNA 水平以及 pgRNA 的表达量, 分析这些基因随吉西他滨浓度变化与 pgRNA 随浓度变化的相关性, 找出与 pgRNA 变化相关性最高的基因, 并使用 Western blot 在蛋白质水平验证吉西他滨对此基因蛋白质表达量的影响。**结果:**吉西他滨对 HepG2.2.15 细胞的生长显示出浓度以及剂量依赖性的抑制作用; 吉西他滨使细胞凋亡率增高; 吉西他滨使细胞更多的细胞停滞在 G₀G₁ 期, 而处于 S 期细胞比例降低; 吉西他滨明显增加 HepG2.2.15 细胞内乙肝病毒 pgRNA, 72 h 之内呈现明显的时间与剂量依赖性; 吉西他滨作用细胞 24 h 会使细胞培养上清液中的 HBeAg 增加; 吉西他滨促进 HNF4 α mRNA、HNF4 α 蛋白质表达量增加, 且在所检测的与乙肝病毒转录调节有关的基因中, HNF4 α mRNA 变化趋势与 HBV pgRNA 变化趋势相关性最高。**结论:**吉西他滨可在细胞水平促进乙肝病毒 pgRNA 转录以及乙肝病毒的复制, 其机制为通过促进乙肝病毒转录因子 HNF4 α 的表达实现的。

【关键词】乙肝病毒; 乙肝病毒前基因组 RNA; HepG2.2.15 细胞; 吉西他滨**【中图分类号】**R373.2+1; R979.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-03-06

Gemcitabine promotes hepatitis B virus pgRNA transcription and viral replication in HepG2.2.15 cells and related molecular mechanisms

Ye Yusheng, Chang Kai, Zhu Ziyi, Liu Chenxia, Jiang Zhongyong, Xiong Jie

(Department of Clinical Laboratory, Chengdu Military General Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of gemcitabine on hepatitis B virus (HBV) pregenomic RNA (pgRNA) transcription and HBV replication in HepG2.2.15 cells and its possible mechanisms. **Methods:** HepG2.2.15 cells were treated with different concentrations of gemcitabine, and cell viability, apoptosis, cell cycle, intracellular HBV pgRNA, and HBsAg, HBeAg, HBV DNA in the cell culture supernatant were measured by CCK8 assay, flow cytometry, qRT-PCR, and ELISA respectively. The mRNA expression levels of pgRNA transcription-related regulatory genes, hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α), P38 mitogen-activated protein kinase (P38MAPK), cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1), nuclear factor-kappa B p65 (NF- κ B p65), histone deacetylase 1 (HDAC1), peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α), forkhead box protein O1 (FOXO1), sirtuin1 (SIRT1), and P53, and pgRNA in HepG2.2.15 cells treated with gemcitabine were determined by real-time quantitative PCR. The correlations between these genes and pgRNA with changes in gemcitabine

作者介绍: 叶雨笙, Email: 843492178@qq.com, 研究方向: 慢性乙型肝炎。
通信作者: 熊 杰, Email: byx410@163.com。
基金项目: 四川省科技厅资助项目 (编号: 2013JY0173)。
优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190610.1708.014.html> (2019-06-11)

concentration were analyzed to identify the gene with the highest correlation with pgRNA, and the effect of gemcitabine on the protein expression of the gene was verified at the protein level using Western blot. **Results:** Gemcitabine showed a concentration- and dose-dependent inhibitory effect on HepG2.2.15 cell growth; gemcitabine increased apoptosis; gemcitabine caused more cells to arrest in G₀G₁ phase, and the proportion of cells in S phase decreased. Gemcitabine significantly increased HBV pgRNA in hepG2.2.15 cells in a significant time- and dose-dependent manner within 72 h; treatment of cells with gemcitabine for 24 hours increased HBeAg in the cell culture supernatant; gemcitabine promoted the mRNA and protein expression of HNF4 α , and among all the genes involved in the regulation of HBV transcription we detected, the changing trend of HNF4 α mRNA expression was the most correlated with that of HBV pgRNA. **Conclusion:** Gemcitabine can increase HBV pgRNA transcription and HBV replication at the cellular level by promoting the expression of the HBV transcription factor HNF4 α .

【Key words】hepatitis B virus; hepatitis B virus pgRNA; HepG2.2.15 cell; gemcitabine

慢性乙型肝炎是由于感染乙肝病毒造成的, 是一种严重的公共健康问题。临床实践发现, 慢性乙型肝炎患者、无症状的乙肝病毒携带者在使用一些细胞毒抗肿瘤药物时, 会导致乙肝病毒再激活; 乙肝病毒复制成十倍以上的增加, 伴或不伴有肝功能受损, 严重者可能发展为肝衰竭^[1]。在我国, 恶性肿瘤是造成死亡的主要原因之一。据相关统计, 2015 年我国有约 300 万新发恶性肿瘤病例, 约 280 万人死于恶性肿瘤, 其中肺癌的发生率和死亡率最高^[2]。过去几年抗肿瘤药物的使用量明显增加, 其中细胞毒抗肿瘤药物所占比例最高, 达 60% 以上^[3]。考虑到慢性乙型肝炎和正使用抗肿瘤药物的癌症患者都是十分庞大的人群, 因此临床上面临乙肝病毒再激活问题的病人数量十分巨大。吉西他滨是治疗胰腺癌和非小细胞肺癌的一线用药, 也常应用于其他多种肿瘤, 已有临床病例报道发现吉西他滨可造成病人乙肝病毒的再活化^[4]。但是既往药理学研究发现, 吉西他滨作为一种核苷类似物, 可能干扰细胞 DNA、RNA 的形成, 也具有抑制多种病毒复制的能力^[5-6], 因此吉西他滨在细胞水平究竟表现为促进乙肝病毒的复制还是抑制乙肝病毒的复制值得商榷。本研究使用稳定转染了乙肝病毒基因的 HepG2.2.15 细胞系, 观察细胞内代表病毒复制水平的乙肝病毒 pgRNA、细胞培养上清中 HBeAg 和 HBV DNA, 研究了吉西他滨在体外对乙肝病毒复制的影响。乙肝病毒属于嗜肝 DNA 病毒科, 感染人的肝脏细胞, 通过从细胞核中共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) 转录为 pgRNA, 再由 pgRNA 反转录实现病毒的复制, 因此 pgRNA 的转录在乙肝病毒的复制中是关键的一环^[7]。本实验检测了影

响病毒转录为 pgRNA 的转录因子、可能影响转录效能的其他调控基因的 mRNA 的表达量, 并根据已有的研究将其分为 3 条途径: 一是 P38MAPK 以及其下游的转录因子 NF- κ B、CREB1、P53 途径; 二是转录因子 HNF4 α 、FOXO1 以及转录共激活因子 PGC-1 α 途径; 三是去乙酰化酶 HDAC1 和 SIRT1 途径, 试图找到吉西他滨影响 pgRNA 转录的关键信号通路及作用靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肝癌细胞系 HepG2.2.15, 转染了乙肝病毒的全基因组, 购于上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.1.2 药物及试剂 注射用盐酸吉西他滨 (泽菲, 江苏豪森公司); 胎牛血清 (澳大利亚 cellmax 公司); DMEM 培养基、PBS、青链霉素 (美国 Gibco 公司); G418 (德国 BioFroxx 公司, 纯度 $\geq 98\%$); TransDetect[®] Cell Counting Kit (CCK) (北京全式金生物技术有限公司); 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (上海碧云天公司); TransZol Up Plus RNA Kit RNA, TransScript Green One-Step qRT-PCR SuperMix 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司); 乙型肝炎病毒核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) (中山大学达安基因股份有限公司); 乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒 (酶联免疫法)、乙型肝炎病毒 e 抗原检测试剂盒 (酶联免疫法) (北京万泰生物药业股份有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2.2.15 完全培养基: DMEM 高糖培养基、1% 青链霉素、100 μ g/mL 链霉素, 细胞保种培养时加入 380 μ g/mL 的 G418, 进行药物实验时不加入 G418; 培养条件: 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C, 湿度为 36%。

1.2.2 胶原包被 6 孔板、96 孔板 将超纯水、乙酸、Collagen I RatTail Natural 鼠尾胶原按 500 : 0.5723 : 6.66 的比例混合均匀成胶原液,加入 6 孔板或者 96 孔板中,完全覆盖板底,放置 4 h 以上。吸出胶原液后,PBS 洗 2 遍后即可用于细胞培养。

1.2.3 CCK-8 检测细胞活性 HepG2.2.15 细胞按每孔 3 000、6 000、10 000 个细胞的浓度接种于 96 孔板,使用无 G418 的完全培养基培养。细胞接种 24 h 待完全贴壁后,更换为不同浓度含药培养基 200 μ L。吉西他滨的浓度为 0、0.5、1、2、5、10、20、30、40、50、70 和 100 μ mol/L,待药物作用 24、48 以及 72 h 后吸出上清液,每孔加入 110 μ L 的含 10 μ L CCK-8 的新鲜培养基,放入细胞培养箱中继续培养 2 h,用酶标仪测定 450 nm 处的光密度(optical density, OD)值。不同浓度吉西他滨对 HepG2.2.15 细胞的抑制率=[(对照组 OD 值-调零孔 OD 值)-(用组 OD 值-调零孔 OD 值)]/(对照组 OD 值-调零孔 OD 值)。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期与凋亡 将 HepG2.2.15 接种于胶原包被好的 6 孔板中,接种密度为 1×10^5 个/孔,24 h 后细胞完全贴壁,更换为含药培养基,药物浓度分别为 0、2、20、50、70 和 100 μ mol/L,48 h 后消化细胞,使用 AnnexinV-FITC 染色,流式细胞仪检测细胞凋亡;用 70%的冰乙醇固定 24 h,PI 染色后流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.5 ELISA 法检测吉西他滨对细胞培养上清 HBsAg、HBeAg,实时定量 PCR 检测吉西他滨对细胞培养上清 HBV DNA 的影响 将 HepG2.2.15 接种于 25 cm² 细胞培养瓶中,每瓶 5×10^5 个细胞,用 0、2、20、50、70 和 100 μ mol/L 的吉西他滨处理细胞 24 h,上清液 3 000 r/min 离心 5 min,重复 1 次,取上清液检测 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA。

1.2.6 提取 RNA,实时定量 PCR 检测 HBV pgRNA 以及调控 pgRNA 转录的转录因子的表达水平 将 HepG2.2.15 细胞接种于胶原包被好的 6 孔板中,接种密度为 1×10^5 个/孔,24 h 后细胞完全贴壁,更换为含药培养基,药物浓度分别为 0、2、20、50 μ mol/L,药物分别作用 24、48、72 和 96 h 后使用 TransZol Up Plus RNA Kit 提取 RNA,实时定量 PCR 检测乙肝病毒 pgRNA 以及各转录调控基因 mRNA 的表达量。

1.2.7 Western blot 法检测吉西他滨对 HNF4 α 蛋白表达量的影响 将 HepG2.2.15 细胞接种于胶原包被好的 6 孔板中,接种密度为 1×10^5 个/孔,24 h 后细胞完全贴壁,更换为含药培养基,药物浓度分别为 0、0.1、0.2、2、20、50、70 和 100 μ mol/L,药物作用 24 h 后提取蛋白,Western blot 法检测蛋白表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 进行统计分析,实验结果采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据进行正态分布检验,若数据符合正态分布,组间数据两两比较采用两独立样本 *t* 检验,多组均数比较采用单因素方差分析,相关性分析采用 Pearson 直线相关进行分析;若数据不符合正态分布,两两比较采用两样本秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 吉西他滨对细胞生长活性的影响

吉西他滨对 HepG2.2.15 细胞的生长具有抑制作用,在 72 h 内呈浓度和剂量依赖性。24 h 细胞活性 75%~100%;48 h 细胞活性 30%~65%;72 h 细胞活性 15%~50%;且各时间点细胞活性随浓度增加而降低(0~100 μ mol/L)。见表 1。

表 1 吉西他滨对细胞生长活性的影响(%)

吉西他滨浓度 (μ mol/L)	24 h 细胞活性	48 h 细胞活性	72 h 细胞活性
0	100.00	100.00	100.00
0.5	105.60	64.56	52.01
1	95.67	59.01	42.50
2	105.65	60.09	44.33
5	87.36	54.24	29.83
10	95.86	46.11	28.16
20	89.57	41.81	27.39
30	87.23	40.75	24.05
40	82.92	38.47	18.40
50	85.73	38.15	17.00
70	81.31	36.62	17.27
100	75.50	31.98	13.66

2.2 吉西他滨对细胞凋亡的影响

与对照组相比,吉西他滨明显增加 HepG2.2.15 细胞的凋亡率(2、20、50、70、100 μ mol/L 浓度吉西他滨组 *P* 分别为 0.014、0.001、0.003、0.043 和 0.000)。吉西他滨有增加 HepG2.2.15 细胞死亡率的趋势,但增加幅度不显著,其中仅有 50 μ mol/L 浓度吉西他滨组细胞死亡与对照组相比有明显增加(*P*=0.004),其余浓度组增加不明显(*P*>0.05),所有组细胞死亡率均在 15%以下。见表 2。

表 2 吉西他滨对细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

吉西他滨浓度 (μ mol/L)	细胞死亡率	细胞凋亡率	细胞死亡率 + 凋亡率
0	6.10 $\pm$ 2.34	0.70 $\pm$ 0.10	6.80 $\pm$ 2.43
2	6.50 $\pm$ 1.80	2.90 $\pm$ 0.92 ^a	9.40 $\pm$ 2.66
20	9.53 $\pm$ 1.65	6.20 $\pm$ 1.08 ^a	15.73 $\pm$ 2.71 ^a
50	14.67 $\pm$ 0.76 ^a	7.87 $\pm$ 0.72 ^a	22.5 $\pm$ 1.26 ^a
70	9.30 $\pm$ 0.42	6.10 $\pm$ 0.57 ^a	15.40 $\pm$ 0.99 ^a
100	10.00 $\pm$ 2.13	4.73 $\pm$ 0.51 ^a	14.73 $\pm$ 1.62 ^a

注:a,与对照组相比,*P*<0.05

2.3 吉西他滨对 HepG2.2.15 细胞周期的影响

与对照组相比,吉西他滨使 HepG2.2.15 细胞更多处于 G₀G₁ 期(2、20、50、70、100 μ mol/L 浓度吉西他滨组 *P* 值分别为 0.000、0.000、0.001、0.000、0.001),吉西他滨使处于 S 期的 HepG2.2.15 细胞的比例减少(*P* 值分别为 0.000、0.001、0.000、0.000、0.000)。见表 3。

表 3 吉西他滨对细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

吉西他滨浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	G ₀ G ₁ 期 (%)	S 期 (%)	G ₂ M 期 (%)
0	39.36 $\pm$ 2.86	49.37 $\pm$ 2.38	13.27 $\pm$ 0.72
2	72.31 $\pm$ 3.77 ^a	16.91 $\pm$ 2.74 ^a	10.77 $\pm$ 1.19 ^a
20	71.66 $\pm$ 3.19 ^a	16.49 $\pm$ 5.58 ^a	11.85 $\pm$ 3.77
50	73.63 $\pm$ 5.51 ^a	17.65 $\pm$ 3.33 ^a	10.05 $\pm$ 2.80
70	69.93 $\pm$ 3.62 ^a	18.53 $\pm$ 3.91 ^a	11.54 $\pm$ 1.04
100	73.23 $\pm$ 5.37 ^a	18.59 $\pm$ 1.91 ^a	8.19 $\pm$ 4.12

注:a,与对照组相比, $P<0.05$

2.4 吉西他滨对 HepG2.2.15 细胞上清液中 HBsAg、HBeAg、HBV DNA 的影响

检测指标 HBsAg 用药组以及对照组均为阴性,因此不采用此组数据作为结果分析。结果显示(表 4),吉西他滨增加 HepG2.2.15 细胞培养上清液中的 HBeAg(2、20、50、70、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度吉西他滨组 P 值分别为 0.011、0.005、0.008、0.000、0.005)。检测指标 HBV DNA 数据不符合正态分布,2、20、50、70、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组分别与对照组进行两样本秩和检验, P 值分别为 0.100、0.200、0.100、0.100、0.100、0.100,均大于 0.05,表明吉西他滨导致上清液中 HBV DNA 浓度增加,但不具有统计学差异。

表 4 吉西他滨对 HepG2.2.15 细胞上清液 HBeAg、HBV DNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

吉西他滨浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	HBeAg (S/CO)	HBV DNA (IU/mL)
0	7.26 $\pm$ 2.11	188.33 $\pm$ 32.31
2	14.90 $\pm$ 2.07 ^a	7 103.10 $\pm$ 3 012.05
20	23.70 $\pm$ 0.10 ^a	423.13 $\pm$ 82.38
50	17.30 $\pm$ 2.82 ^a	346.33 $\pm$ 37.76
70	23.23 $\pm$ 1.20 ^a	3 390.63 $\pm$ 2 469.44
100	16.07 $\pm$ 1.79 ^a	5 648.93 $\pm$ 2 391.98

2.5 吉西他滨对 HepG2.2.15 细胞中乙肝病毒 pgRNA 的影响

24、48、72 h 时吉西他滨明显增加 HepG2.2.15 细胞中的乙肝病毒 pgRNA(与各自的对照组相比,24 h 时 2、20、50 $\mu\text{mol/L}$ 吉西他滨组的 P 值分别为 0.005、0.001、0.006;48 h 时 P 值分别为 0.004、0.000、0.024;72 h 时 P 值分别为 0.003、0.003、0.001),吉西他滨导致的乙肝病毒 pgRNA 的增加呈明显的时间以及剂量依赖性。当药物作用于 HepG2.2.15

细胞 96 h,乙肝病毒 pgRNA 增加的幅度不再明显(P 值分别为 0.026、0.117、0.092),增加幅度在 96 h 时无时间依赖性(表 5、图 1)。

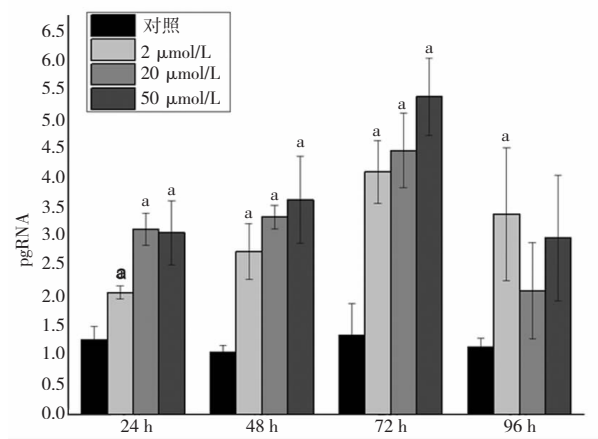
a:与对照组相比, $P<0.05$

图 1 吉西他滨乙肝病毒 pgRNA 表达量的影响

2.6 吉西他滨对乙肝病毒 pgRNA 相关的转录调控因子 mRNA 的影响以及各基因 mRNA 变化与 pgRNA 变化的相关性分析

2.6.1 吉西他滨对 pgRNA 及 pgRNA 转录调控基因 mRNA 表达的影响 结果显示(见表 6),吉西他滨作用 HepG2.2.15 细胞后,会导致 pgRNA、P38MAPK、NF- κ B p65、CREB1、HNF4 α 、FOXO1 mRNA 相对表达量明显增加;P53 mRNA 相对表达量有增加的趋势,但只有 50 $\mu\text{mol/L}$ 组有显著性;PGC-1 α 、HDAC1 mRNA 有增加的趋势,但不具显著性;SIRT1 mRNA 与对照组相比变化不明显。

2.6.2 乙肝病毒转录调控基因 mRNA 表达量随吉西他滨浓度变化趋势与 pgRNA 表达量变化趋势的相关性分析 不同浓度的吉西他滨作用于 HepG2.2.15 细胞 48 h,检测乙肝病毒 pgRNA 以及各 pgRNA 转录调控基因 mRNA 的表达量,使用相邻两浓度乙肝病毒 pgRNA 表达量的差值、各相关调控基因 mRNA 表达量的差值进行相关性分析。结果显示(图 2、图 3、图 4),在所有 3 个途径的 9 个与 pgRNA 的转录调控相关的基因中,随着吉西他滨浓度的变化,HNF4 α mRNA 的变化趋势与 pgRNA 的变化趋势相关性最高($r=0.934, P=0.020$),其余基因 mRNA 变化趋势与 pgRNA 变化趋势相关性不显著(均 $P>0.05$)。

表 5 吉西他滨对乙肝病毒 pgRNA 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

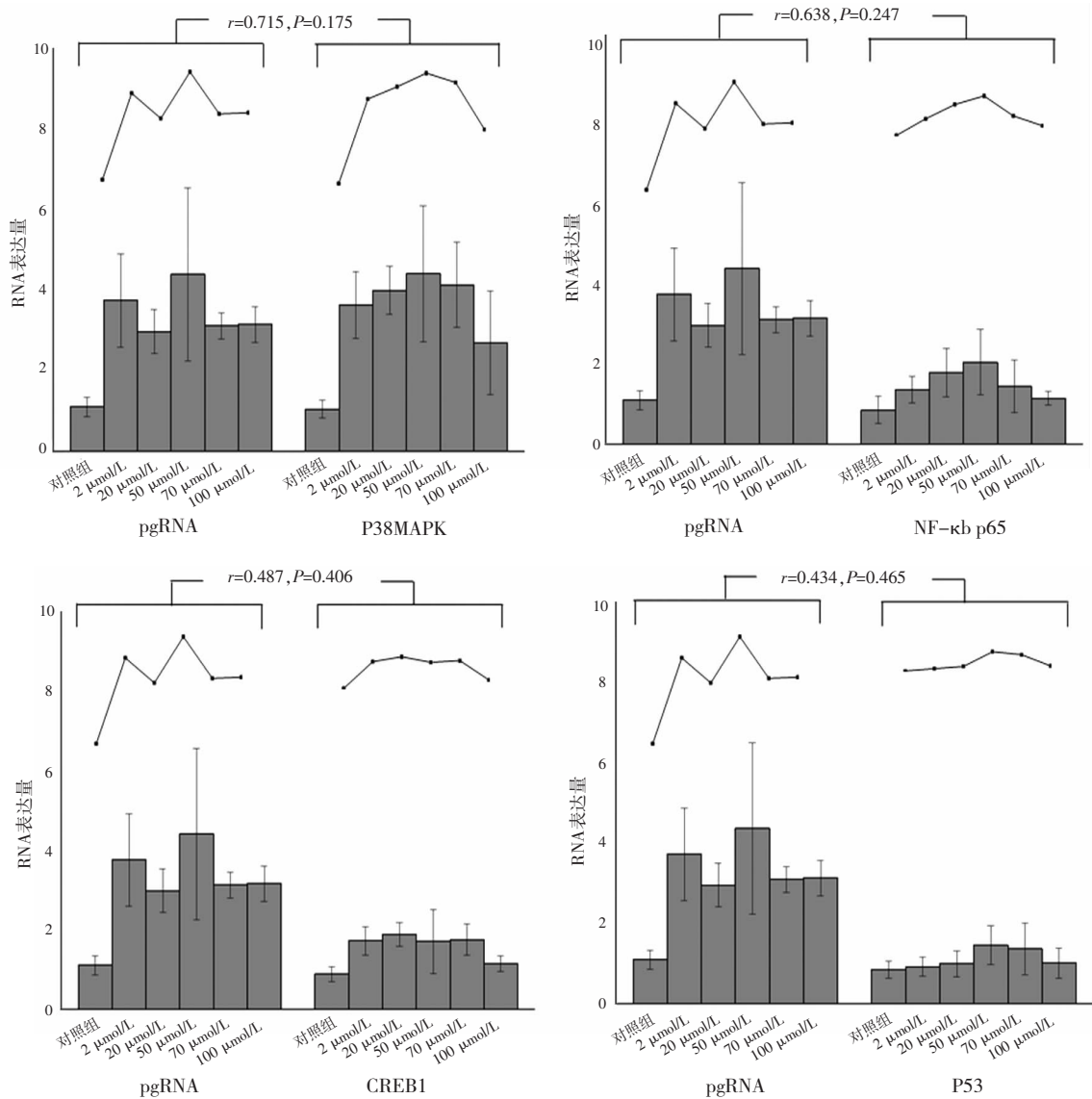
吉西他滨浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	24 h	48 h	72 h	96 h
0	1.26 $\pm$ 0.23	1.06 $\pm$ 0.11	1.34 $\pm$ 0.54	1.15 $\pm$ 0.15
2	2.07 $\pm$ 0.11 ^a	2.76 $\pm$ 0.47 ^a	4.11 $\pm$ 0.53 ^a	3.40 $\pm$ 1.13 ^a
20	3.13 $\pm$ 0.27 ^a	3.34 $\pm$ 0.20 ^a	4.47 $\pm$ 0.63 ^a	2.10 $\pm$ 0.81
50	3.08 $\pm$ 0.54 ^a	3.64 $\pm$ 0.74 ^a	5.38 $\pm$ 0.65 ^a	2.99 $\pm$ 1.06

注:a,与对照组相比, $P<0.05$

表 6 吉西他滨对 pgRNA 及 pgRNA 转录调控基因 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

RNA 表达量	对照组	2 $\mu\text{mol/L}$	20 $\mu\text{mol/L}$	50 $\mu\text{mol/L}$	70 $\mu\text{mol/L}$	100 $\mu\text{mol/L}$
pgRNA	1.11 $\pm$ 0.24	3.74 $\pm$ 1.16 ^a	2.97 $\pm$ 0.55 ^a	4.39 $\pm$ 2.14 ^a	3.11 $\pm$ 0.33 ^a	3.15 $\pm$ 0.44 ^a
P38MAPK	1.05 $\pm$ 0.21	3.63 $\pm$ 0.83 ^a	4.00 $\pm$ 0.59 ^a	4.41 $\pm$ 1.68 ^a	4.13 $\pm$ 1.05 ^a	2.69 $\pm$ 1.29 ^a
NF- κB p65	0.86 $\pm$ 0.34	1.36 $\pm$ 0.33 ^a	1.79 $\pm$ 0.61 ^a	2.05 $\pm$ 0.82 ^a	1.45 $\pm$ 0.66 ^a	1.15 $\pm$ 0.17
CREB1	0.88 $\pm$ 0.19	1.72 $\pm$ 0.36 ^a	1.87 $\pm$ 0.30 ^a	1.70 $\pm$ 0.81	1.75 $\pm$ 0.39 ^a	1.15 $\pm$ 0.20
P53	0.86 $\pm$ 0.21	0.93 $\pm$ 0.23	1.00 $\pm$ 0.33	1.47 $\pm$ 0.49 ^a	1.37 $\pm$ 0.64	1.02 $\pm$ 0.37
HNF4 α	0.96 $\pm$ 0.41	1.99 $\pm$ 0.28 ^a	1.86 $\pm$ 0.15 ^a	2.05 $\pm$ 0.63 ^a	1.67 $\pm$ 0.14 ^a	1.49 $\pm$ 0.35 ^a
FOXO1	1.87 $\pm$ 0.81	4.41 $\pm$ 0.73 ^a	3.74 $\pm$ 0.19 ^a	3.40 $\pm$ 1.34 ^a	4.30 $\pm$ 3.07	4.20 $\pm$ 1.23 ^a
PGC-1 α	0.99 $\pm$ 0.30	1.32 $\pm$ 0.51	1.20 $\pm$ 0.49	1.29 $\pm$ 0.44	1.40 $\pm$ 0.66	1.01 $\pm$ 0.27
HDAC1	1.65 $\pm$ 1.02	2.37 $\pm$ 1.00	2.25 $\pm$ 0.70	2.23 $\pm$ 1.02	1.93 $\pm$ 1.42	1.30 $\pm$ 0.21
SIRT1	0.50 $\pm$ 0.27	0.64 $\pm$ 0.15	0.66 $\pm$ 0.21	0.47 $\pm$ 0.22	0.62 $\pm$ 0.20	0.47 $\pm$ 0.17

注:a:与对照组相比, $P<0.05$;使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算用药后各 RNA 的表达量



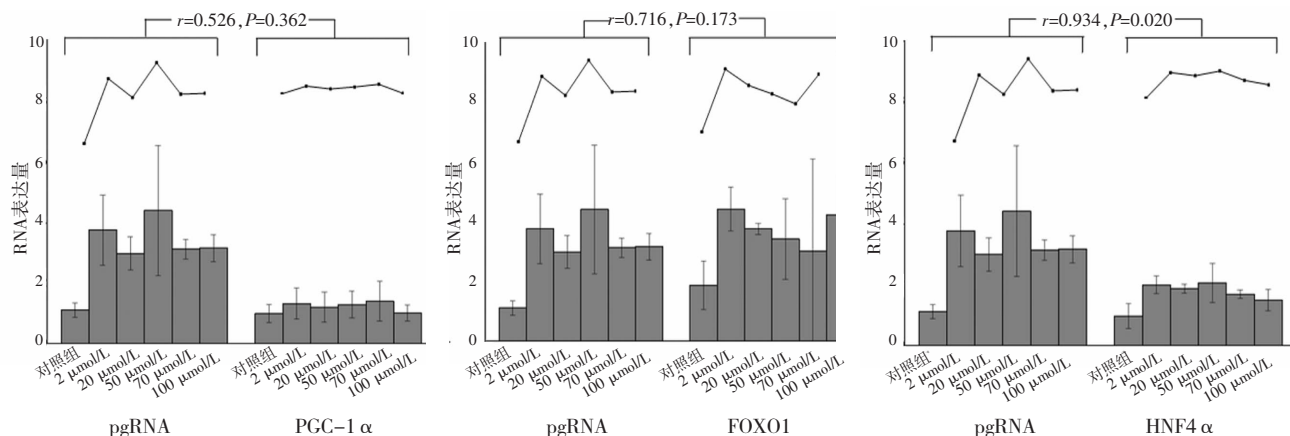
注:折线图为各基因 mRNA 随吉西他滨浓度变化的趋势

图 2 途径一 (P38 MAPK 以及其下游的转录因子 NF- κB 、CREB1、P53 途径) 各 mRNA 变化趋势与 pgRNA 变化趋势的相关性

2.7 吉西他滨对 HepG2.2.15 细胞中 HNF4 α 蛋白表达量的影响

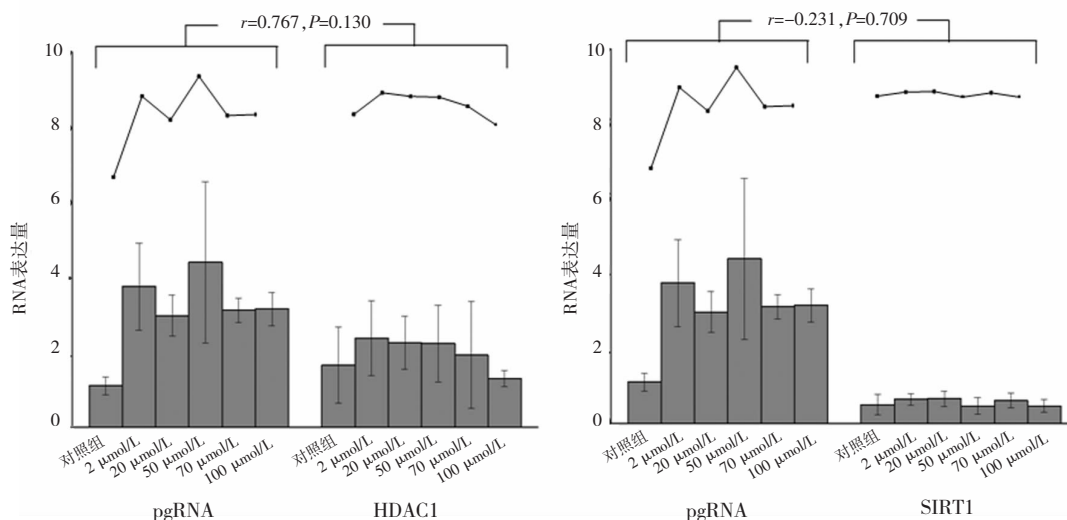
除最大浓度的 100 $\mu\text{mol/L}$ 外,与对照组相比,所有浓度

的吉西他滨均会导致 HepG2.2.15 细胞中 HNF4 α 蛋白的表达量增加(表 7、图 5)。



注:折线图为各基因 mRNA 随吉西他滨浓度变化的趋势

图 3 途径二(转录因子 HNF4 α 、FOXO1 以及转录共激活因子 PGC-1 α 途径)各 mRNA 变化趋势与 pgRNA 变化趋势的相关性

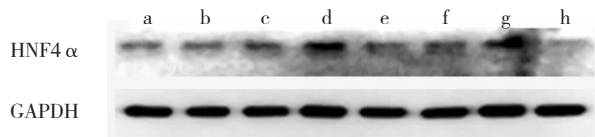


注:折线图为各基因 mRNA 随吉西他滨浓度变化的趋势

图 4 途径三(去乙酰化酶 HDAC1、SIRT1 途径)mRNA 变化趋势与 pgRNA 变化趋势的相关性

表 7 吉西他滨对蛋白 HNF4 α 表达的影响

吉西他滨浓度($\mu\text{mol/L}$)	HNF4 α 灰度值 / GAPDH 灰度值
0	1.000
0.1	1.214
0.2	1.393
2	1.556
20	1.071
50	1.198
70	1.669
100	0.760



注:蛋白灰度值检测,a~h 吉西他滨浓度分别为 0、0.1、0.2、2、20、50、70、100 $\mu\text{mol/L}$

图 5 吉西他滨作用 HepG2.2.15 细胞 24 h 对 HNF4 α 蛋白表达量的影响

3 讨论

本实验证明了不同浓度以及时间点吉西他滨均可刺激乙肝病毒 pgRNA 表达,且有明显时间以及剂量依赖性,细胞培养上清液 HBV DNA 有一定程度的增高趋势,HBsAg 则明显增加,即我们的实验充分证明吉西他滨在细胞水平刺激 pgRNA 转录以及乙肝病毒复制的效应。本结果提示在应用吉西他滨的病人中,需提前了解病人的乙肝病毒血清学指标,必要时预防性用药防止乙肝病毒再激活。

本研究从影响乙肝病毒 pgRNA 转录的转录因子或者其他转录调控基因着手,试图探究吉西他滨促进乙肝病毒 pgRNA 转录和乙肝病毒复制的分子机制。P38MAPK 是 MAPKs 的一个亚族,可以调节细胞的增殖、分化、凋亡以及炎症^[8-9]。对 P38MAPK 的相关研究发现:抑制 P38MAPK 可以使乙肝病毒

RNA 形成、乙肝病毒复制受到抑制, P38 MAPK 可能涉及病毒基因的转录调节^[10]。有意思的是, P38MAPK 的一些下游基因可以调控乙肝病毒的转录, 例如转录因子 NF- κ B、CREB1、P53, 其中 CREB1 的增加会导致乙肝病毒基因表达增加^[11], NF- κ B 的过度表达会抑制包括 pgRNA 在内的所有乙肝病毒 RNA 的表达以及病毒的复制^[12], P53 转录因子结合在乙肝病毒基因组上, 会抑制乙肝病毒基因的转录^[13]。转录因子 FOXO1 可以直接结合在乙肝病毒基因组上, 刺激其转录与病毒的复制^[14]; 转录因子 HNF4 α 在乙肝病毒基因组上有多个结合位点, 可促进病毒的转录, 过表达 HNF4 α 会导致 pgRNA 的转录呈倍数增加^[15]; PGC-1 α 在细胞内可以结合并刺激很多细胞核受体, 是一种转录共刺激因子, 已有研究发现 PGC-1 α 可协同 HNF4 α 和 FOXO1 发挥刺激乙肝病毒转录的作用, 细胞内 PGC-1 α 提高会导致呈剂量依赖性的乙肝病毒转录增加^[16]。乙肝病毒在细胞核中以 cccDNA 的形式存在, cccDNA 与核小体结合构成一个微染色体游离于细胞染色体之外。乙肝病毒的复制、pgRNA 的转录与微染色体上组蛋白 H3、H4 的乙酰化程度密切相关。实际上很多细胞乙酰转移酶、组蛋白去乙酰化酶均可结合在染色体上, 通过影响 H3、H4 的乙酰化程度来调节病毒的复制、pgRNA 的转录, 其中 HDAC1 是 I 类去乙酰化酶, 可以抑制 pgRNA 的转录以及病毒的复制^[17]。SIRT1 属于 III 类去乙酰化酶, 可广泛调节细胞功能, 包括细胞增殖、DNA 修复、凋亡、肿瘤发生等, 也可结合在 cccDNA 的微染色体上。SIRT1 在乙肝病毒的转录中扮演正向的作用, 过表达 SIRT1 可增强乙肝病毒的复制^[18], SIRT1 和 HDAC1 表现出对乙肝病毒转录起相反的调节作用, 其具体机制仍有待探究。

通过统计以上 3 个途径基因的 mRNA 表达水平、pgRNA 水平以及各自随着吉西他滨浓度变化而变化的趋势之间的相关性, 发现途径二中的 HNF4 α mRNA 变化与 pgRNA 变化相关系数最高 ($r=0.934$, $P=0.020$), 在蛋白水平进一步证明了吉西他滨可刺激 HNF4 α 表达增加。因 HNF4 α 是促进乙肝病毒 pgRNA 转录和乙肝病毒复制的重要转录因子, 推测吉西他滨是通过促进 HNF4 α 的表达而刺激 pgRNA 转录与乙肝病毒的复制。

参 考 文 献

[1] Manzano-Alonso ML, Castellano-Tortajada G. Reactivation of hepatitis B virus infection after cytotoxic chemotherapy or immunosuppres-

sive therapy[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(12): 1531-1537.

[2] Chen W, Zheng R, Baade PD. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[3] Lai YF, Lu JJ, Hu H. Analysis of the current situation of antitumor drug use in china: a hospital-based perspective[J]. Ther Innov Regul Sci, 2015, 49(1): 181-193.

[4] Cheong K, Li J, Karapetis CS. Gemcitabine and reactivation of hepatitis B[J]. Med Oncol, 2003, 20(4): 385-388.

[5] Ciccolini J, Serdjebi C, Peters GJ. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as a mainstay in adult and pediatric oncology: an EORTC-PAMM perspective[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2016, 78(1): 1-12.

[6] Shin HJ, Kim C, Cho S. Gemcitabine and Nucleos(t)ide Synthesis Inhibitors Are Broad-Spectrum Antiviral Drugs that Activate Innate Immunity[J]. Viruses, 2018, 10(4): E211.

[7] Schädler S, Hildt E. HBV life cycle: entry and morphogenesis[J]. Viruses, 2009, 1(2): 185-209.

[8] Ashwell JD. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(7): 532-540.

[9] Coulthard LR, White DE, Jones DL. p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics[J]. Trends Mol Med, 2009, 15(8): 369-379.

[10] Chang WW, Su IJ, Chang WT. Suppression of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits hepatitis B virus replication in human hepatoma cell: the antiviral role of nitric oxide[J]. J Viral Hepat, 2008, 15(7): 490-497.

[11] Kim BK, Lim SO, Park YG. Requirement of the cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein for hepatitis B virus replication[J]. Hepatology, 2008, 48(2): 361-373.

[12] Lin YC, Hsu EC, Ting LP. Repression of hepatitis B viral gene expression by transcription factor nuclear factor- κ B[J]. Cell Microbiol, 2009, 11(4): 645-660.

[13] Ori A, Zauberman A, Doitsh G, et al. p53 binds and represses the HBV enhancer; an adjacent enhancer element can reverse the transcription effect of p53[J]. EMBO J, 1998, 17(2): 544-553.

[14] Shlomai A, Shaul Y. The metabolic activator FOXO1 binds hepatitis B virus DNA and activates its transcription[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 381(4): 544-548.

[15] Yu X, Mertz JE. Distinct modes of regulation of transcription of hepatitis B virus by the nuclear receptors HNF4 α and COUP-TF1[J]. J Virol, 2003, 77(4): 2489-2499.

[16] Shlomai A, Paran N, Shaul Y. PGC-1 α controls hepatitis B virus through nutritional signals[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(43): 16003-16008.

[17] Pollicino T, Belloni L, Raffa G. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones[J]. Gastroenterology, 2006, 130(3): 823-837.

[18] Ren JH, Tao Y, Zhang ZZ. Sirtuin 1 regulates hepatitis B virus transcription and replication by targeting transcription factor AP-1[J]. J Virol, 2014, 88(5): 2442-2451.

(责任编辑: 唐秋姗)