

文章编号:1005-6947(2008)08-0768-05

· 基础研究 ·

乙肝病毒 X 蛋白激活 NF- κ B 信号通路对 AFP 表达的影响

任利, 陈孝平, 张万广, 刘利平, 杨盛力, 梁慧芳

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 肝脏外科中心, 湖北 武汉, 430030)

摘要:目的 研究乙肝病毒 X 蛋白(HBx)通过核因子- κ B(NF- κ B)信号通路对甲胎蛋白(AFP)的调节作用。方法 建立稳定转染 HBx 基因的 LO2 细胞系(LO2-HBx),用特异性的 NF- κ B 信号通路阻断剂 PDTC 阻断该信号通路,荧光双标激光扫描共聚焦显微镜观察转染前后及加入 PDTC 前后 NF- κ B 信号通路的激活、失活情况,同时用实时定量 PCR 和 Western Blot 技术检测转染前后及加入 PDTC 前后 AFP 在 mRNA 及蛋白水平上的表达变化。结果 以 LO2 细胞为参照,转染 HBx 基因后的 LO2-HBx 细胞 NF- κ B 信号通路被激活,AFP mRNA 和蛋白水平较转染前分别增加(2.78 ± 0.43)倍和(4.72 ± 0.53)倍,差异有统计学意义($P < 0.05$);PDTC 作用 24 h 后 LO2/HBx 细胞 NF- κ B 信号通路阻断,AFP mRNA 和蛋白表达分别为(1.40 ± 0.16)倍和(3.12 ± 0.44)倍,与未加入 PDTC 作用的 LO2-HBx 细胞相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 NF- κ B 信号通路是 HBx 上调 AFP 表达的途径之一。

[中国普通外科杂志,2008,17(8):768-772]

关键词:乙型肝炎病毒 X 蛋白;甲胎蛋白;核因子- κ B;信号通路;癌,肝细胞

中图分类号:R 34-33

文献标识码:A

Hepatitis B virus X protein induces AFP expression by activation of NF- κ B signaling pathway

REN Li, CHEN Xiaoping, ZHANG Wanguang, LIU Liping, YANG Shengli, Liang hui Fang
(Hepatic Surgery Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To study the effect of NF- κ B signaling pathway for HBx on up-regulation of alpha-fetoprotein (AFP). **Methods** On the basis of the establishment of LO2-HBx cell line with stable transfected HBx gene, NF- κ B signaling pathway blocker PDTC was introduced to cut off its signal transduction, double fluorescent staining and laser scanning confocal microscopy were applied to study the activation and deactivation of NF- κ B signaling pathway, and real-time PCR and Western Blot were facilitated to observe the expression of AFP gene before and after the HBx transfection as well as treating with PDTC.

Results The NF- κ B signaling pathway of Lo2-HBx cells was activated after transfection with HBx gene. When compared with control Lo2 cells without treatment, the mRNA and protein levels of AFP in Lo2-HBx cells increased (2.78 ± 0.43) and (4.72 ± 0.53) times respectively, this difference was of statistical significance ($P < 0.05$). But the mRNA levels of AFP decreased to (1.40 ± 0.16), and at the same time the expression of AFP also reduced to (3.12 ± 0.44) ($P < 0.05$) when the NF- κ B signaling pathway was blocked after treated by 50 μ mol/L PDTC for 24 h respectively. **Conclusions** NF- κ B signaling pathway

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30430670)。

收稿日期:2008-06-05; **修订日期:**2008-07-21。

作者简介:任利,男,华中科技大学同济医学院附属同济医院硕士研究生,主要从事肝癌肿瘤方面的研究。

通讯作者:陈孝平 E-mail:chenxp@medmail.com.cn

is one of the routes for HBx to up-regulate the expression of AFP.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(8): 768 - 772]

Key words: HBx; AFP; NF- κ B; Signaling Pathway; Carcinoma, Hepatocellular

CLC number: R 34 - 33

Document code: A

乙肝病毒 X 蛋白 (HBx) 是一种多功能蛋白,能广泛激活病毒与细胞的启动子,参与基因调控,与肝炎及肝癌的发生发展密切相关^[1-3]。甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP), 已长期应用于原发性肝癌的临床诊断和病情监测。AFP 具有很多重要的生物学活性,如作为结合、运输配体的工具,生长调节因子及抗癌药物结合物的载体等^[5-6]。原发性肝细胞性肝癌 (HCC) 患者 70% 以上的血清 AFP 水平明显提高,但也有部分血清 AFP 阴性者,可见 AFP 基因在 HCC 中有不同的表达调控机制。核因子 - κ B (NF- κ B) 是一类功能广泛的核转录调控元件,被激活后可以调控多种基因的转录和翻译^[7],本文探讨 HBx 是否可通过激活 NF- κ B 通路而影响 AFP 的表达,为寻找肝癌新的治疗途径提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

正常人肝 L02 细胞系和 pcDNA3.1-HBx 为本实验室保存。DMEM 培养基和胎牛血清购于 Hyclone 司;脂质体转染剂 lipofectamine 2000, G418 为美国 Invitrogen 公司产品;2 \times SYBR Green mix 购自 TOYOBO 公司,鼠抗人 HBx 单抗购于 CHEMICON 公司;兔抗多克隆抗体 β -actin,鼠抗人 NF- κ B 单抗和鼠抗人 AFP 单抗购于 Santa Cruze 公司;羊抗鼠 FITC-IgG 抗体和吡咯烷二硫氨基甲酸 (PDTC) 购于 Sigma 公司;多聚酶链反应 (PCR) 引物由上海生工合成;荧光双标激光扫描共聚焦显微镜为 NIKON 公司产品;荧光定量 PCR 仪 (7000 型) 为美国 ABI 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 稳定表达 HBx 的 L02 细胞系的建立与鉴定 将 L02 细胞接种于 24 孔板中,在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中生长至 60% ~ 80% 融合。采用脂质体转染法转染 pcDNA3.1-HBx,按照脂质体说明书操作。转染后 24 h,以 1:24 传代分布在 24 孔板中。用含 500 mg/L G418 的培养液筛选 20 d,收获单克隆。改用含 250 mg/L G418 的培养液维持,直至传代。所得细胞系命名为 L02-HBx 细胞系。通过细胞爬片,细胞免疫组

化对该细胞系进行鉴定:将 L02 细胞和 L02-HBx 细胞分别接种于载玻片上,于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养 48 h 后取出,磷酸盐缓冲液 PBS 清洗 3 次,丙酮 + 甲醇 (1:1) 固定 30 min;正常羊血清封闭 30 min 后,加入 1:100 倍稀释的 HBx 鼠抗人单抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后,PBS 洗 3 次,然后加入羊抗鼠二抗,室温孵育 30 min;PBS 洗 3 次后 DAB 显色,中性树脂封片,显微镜下观察并拍照。

1.2.2 共聚焦显微镜观察转染前后及加入 PDTC 前后 NF- κ B 信号通路激活失活情况 将爬片细胞分为 3 组:L02 细胞组,L02-HBx 细胞组及 50 μ mol/L PDTC 作用 24h 的 L02-HBx 细胞组。PDTC 待细胞贴壁后加入,作用 24 h 后取出,PBS 洗 3 次,丙酮 + 甲醇 (1:1) 固定 10 min,PBS 洗 3 次,0.25% triton - X100 处理 10 min,正常羊血清封闭 30 min 后加入 NF- κ B 单克隆抗体 (1:100),4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜;滴加羊抗鼠 FITC-IgG 抗体 (1:500),常温孵育 30 min,碘化吡啶 (PI) 染胞核 5 min。采用共聚焦显微镜进行荧光双标观察,以 488 nm 和 543 nm 双波长氮 - 氩激光激发样品,激发能量为 10%。

1.2.3 实时定量 PCR 技术检测转染前后及加入 PDTC 前后 L02 细胞 AFP mRNA 的表达 收获对数期生长的上述 3 组细胞,提取细胞总 RNA,测 RNA 的浓度和纯度。取相同量的 mRNA 逆转录为 cDNA。每组 cDNA 均以基因引物加荧光染料复合物 SYBR Green mix (2 \times) 进行定量 PCR 反应,每个反应设 3 个复孔。经预实验,将逆转录的 cDNA 稀释 5 倍为模板。AFP 引物序列:上游为 5'-GAGG-GAGCGGCTGACATTAT-3',下游为 5'-TGTTTCATC-CACCACCAAGC-3'。内参照 β -actin 引物序列:上游为 5'-AGAGGAAATCGTGCCTGAC-3',下游为 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'。总反应体系为 25 μ L;SYBR Green mix 12.5 μ L,cDNA 模板 2 μ L,10 μ mol/L 上游引物和 10 μ mol/L 下游引物各 1 μ L,ddH₂O 8.5 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,40 次循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 60 s,55 $^{\circ}$ C 退火 60 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。反应完成后在 ABI7000 软件系统中调整基线和阈值,读出各反应孔 Ct 值。基因表达水平差异的比较:

变化倍率 = $2 - \Delta \Delta Ct$, $\Delta \Delta Ct = (Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 内参基因}) / (Ct \text{ 阴性对照} - Ct \text{ 内参基因})$ 。

1.2.4 免疫印迹(Western Blot)检测转染前后及加入 PDTC 前后 L02 细胞 AFP 蛋白的表达 收获长满瓶的上述 3 组细胞,用三去污裂解液提取细胞总蛋白,应用考马斯亮蓝 R250 法测定蛋白浓度。制备 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺分离胶,4% 的积层胶。以每泳道加入 50 μg 蛋白量计算上样量,在其内加入 5 \times 上样缓冲液(loading buffer),沸水浸煮 8 min 变性后加样。垂直电泳条件:积层胶,60 V 40 min;分离胶,100 V 90 min,确定溴酚蓝到达凝胶的底部。然后将目的蛋白转至 PVDF 膜上。AFP 转膜条件:恒定电流 200 mA 70 min。内参 β -actin 转膜条件:恒定电流 200 mA,40 min。丽春红染膜,确认转膜效果后,5% 脱脂奶粉室温下封闭 7 h。加入鼠抗人 AFP 单抗,工作浓度 1:500,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗膜 3 次后,辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗鼠二抗,工作浓度 1:5000,室温孵育 2 h 后,洗脱二抗,ECL 显色。应用 Western blot 图象分析软件,结果以测定的 AFP 蛋白条带的积分光密度(IOD)与 β -actin 条带的 IOD 对比表

示组织 AFP 蛋白量的相对表达水平。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 11.5 版统计分析软件,两组间比较采用 t 检验,多样本间的两两比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 稳定表达 HBx 的 L02 细胞系的鉴定

HBx 在 L02 细胞中阴性表达(图 1A),在 L02-HBx 细胞中阳性表达(图 1B),且主要位于胞浆中。

2.2 荧光双标激光扫描共聚焦显微镜观察转染前后及加入 PDTC 前后 NF- κ B 信号通路激活失活情况

L02 细胞中 NF- κ B 主要位于胞浆内(图 2A)。L02-HBx 细胞中 NF- κ B 被激活,核内可见表达;核内 NF- κ B 呈绿色,PI 染核为红色,绿色和红色叠加后为黄色(图 2B)。加入 50 $\mu\text{mol/L}$ PDTC 作用 24 h 后,L02-HBx 细胞核中几乎无 NF- κ B 的表达(图 2C)。

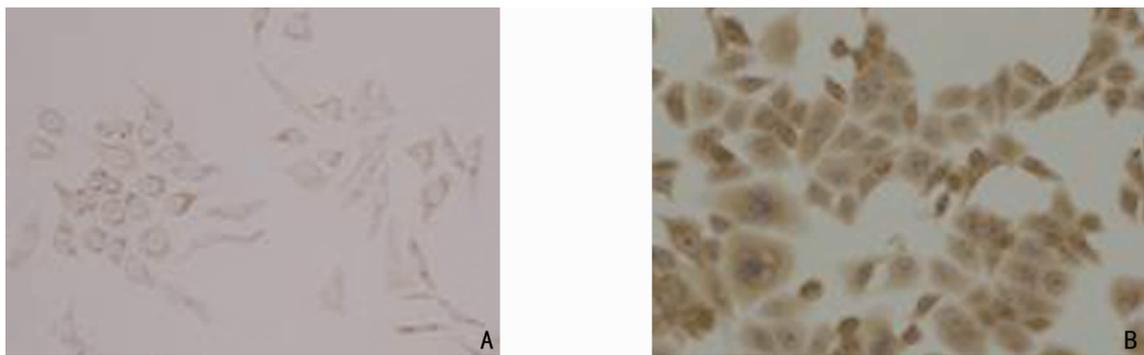


图 1 HBx 在 L02 和 L02-HBx 细胞中的表达($\times 200$) A:L02 细胞(HBx 阴性表达); B:L02-HBx 细胞(HBx 阳性表达的 HBx 主要位于细胞胞浆内)

2.3 转染前后及加入 PDTC 前后 L02 细胞 AFP mRNA 的表达

L02-HBx 细胞 AFP mRNA 表达为 L02 细胞的 (2.78 ± 0.43) 倍,50 $\mu\text{mol/L}$ PDTC 作用 24 h 的 L02-HBx 细胞 AFP mRNA 表达为 L02 细胞的 (1.40 ± 0.16) 倍,显示转染后 AFP mRNA 表达明显上调($t = 6.10, P < 0.05$),50 $\mu\text{mol/L}$ PDTC 阻断 NF- κ B 信号通道后 AFP mRNA 表达明显下调($t = 5.21, P < 0.05$)(图 3)。

2.4 转染前后及加入 PDTC 前后 L02 细胞 AFP 蛋白的表达

L02-HBx 细胞 AFP 蛋白表达为 L02 细胞的 (4.72 ± 0.53) 倍,50 $\mu\text{mol/L}$ PDTC 作用 24 h 的 L02-HBx 细胞 AFP 蛋白表达为 L02 细胞的 (3.12 ± 0.44) 倍。显示转染 HBx 后 AFP 蛋白表达明显上调($t = 7.82, P < 0.05$),50 $\mu\text{mol/L}$ PDTC 阻断 NF- κ B 信号通道后 AFP 蛋白表达明显下调($t = 4.13, P < 0.05$)(图 4)。

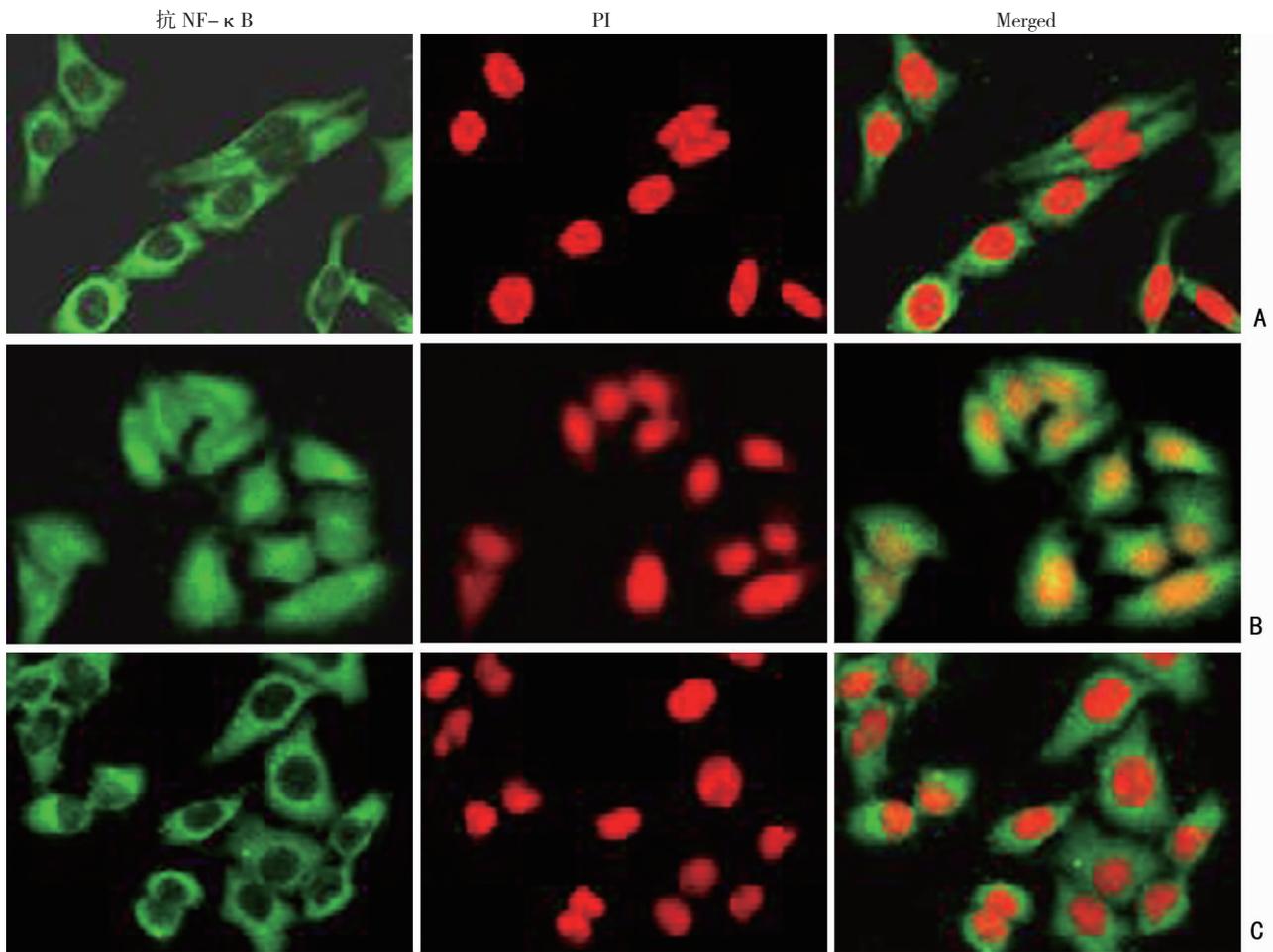


图2 转染前后及 PDTC 加入前后 NF-κB 信号通路激活失活情况 (×200) A: L02 细胞 (NF-κB 主要位于胞浆); B: L02-HBx 细胞 (NF-κB 表达增强, 且核内也有表达); C: 加入 PDTC 的 L02-HBx 细胞 (NF-κB 表达减弱, 核内表达消失)

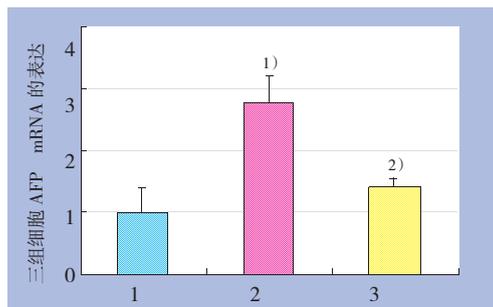


图3 转染前后及加入 PDTC 前后各组细胞 AFP mRNA 的表达 1: L02 细胞; 2: L02-HBx 细胞; 3: L02-HBx 细胞 + 50 μmol/L PDTC

注: 1) 与 L02 细胞比较 $P < 0.05$; 2) 与 L02-HBx 细胞比较, $P < 0.05$

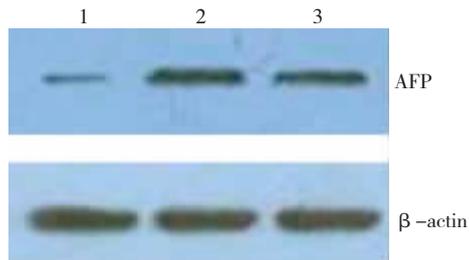


图4 转染前后及加入 PDTC 前后各组细胞中 AFP 蛋白的表达 1: L02 细胞; 2: L02-HBx 细胞; 3: L02-HBx 细胞 + 50 μmol/L PDTC

3 讨论

HBx 作为一种多功能蛋白,它可通过调控基因表达和蛋白间相互作用,激活多条细胞信号转导通路,并可激活 HIF-1 α , NF- κ B, AP-1, SP1 和 oct-1 等多种核转录因子,影响细胞的增殖、分化、凋亡,促进其恶性转化^[1-3],并促进肿瘤多药耐药的产生^[4]。在细胞静息状态时,HBx 与其抑制因子 I κ B 结合,以无活性形式存在于细胞质中^[7]。HBx 通过活化 IKK α 和 IKK β 使其抑制因子 I κ B 磷酸化,进一步导致 I κ B 泛素化和蛋白酶体介导的降解反应,使 NF- κ B 从胞浆复合体中释放出来,移位至胞核,恢复其转录激活活性,进而转录激活相应靶基因^[8-10]。PDTC 是 NF- κ B 特异性的抑制剂,它可通过稳定胞浆中的 I κ B 从而有效地抑制 NF- κ B 的活化和向细胞核内转移,阻断 NF- κ B 传导途径的信号传导^[11-12]。

AFP 系胚胎期由卵黄囊和肝脏实质细胞及部分消化道产生,出生后 AFP 基因转录迅速减少,6~8个月降至最低点,成人期几乎检查不到。AFP 含量升高多见于肝再生、肝细胞癌、卵黄囊肿瘤、慢性肝炎、肝硬化,偶见于其他恶性肿瘤。尽管 AFP 是 HCC 公认的肿瘤标记物,但仍有少部分患者 AFP 水平在正常范围,且体外研究中发现其在 HCC 各细胞系中的表达也存在很大差异^[5-6]。虽然 AFP 作为标记物已广泛应用于临床,但其变异及机制研究仍比较局限。AFP 基因表达的调控是一个复杂的过程,为什么在胎肝表达很高而出生后急剧下降,而在 HCC 时又明显上升?至今具体机制还不明了。有学者通过对 HBx 的研究发现,HBx 可通过减轻 p53 对 AFP 基因表达的抑制作用而上调 AFP 的表达^[13],为 AFP 的调节机制提出了一个新的思路。

本研究基于 HBx 与 AFP 的相关性,通过 HBx 质粒转染,发现转染 HBx 基因后 LO2 细胞中 AFP mRNA 和蛋白水平明显上调,应用 NF- κ B 抑制剂 PDTC 后 AFP mRNA 和蛋白生成明显减少。此结果表明 HBx 可以通过 NF- κ B 信号途径上调 AFP 的表达。本研究也发现,NF- κ B 信号通路经 PDTC 阻断后 LO2-HBx 细胞中 AFP 的 mRNA 和蛋白水平仍然高于 LO2 细胞。此现象一方面可能是因为 NF- κ B 信号通路阻断不彻底,另一方面 NF- κ B 信号通路只是 HBx 上调 AFP 表达的途径之一,可能还存在其他的信号通路,如 p53 通路。

综上所述,本实验证实了 NF- κ B 信号通路是

HBx 上调 AFP 的重要途径之一,探讨了 HBx 和 NF- κ B 在肝癌发病中的重要意义。丰富了 HCC AFP 升高调节机制。本结论为通过阻断该信号传导途径治疗肝癌提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Ohata K, Ichikawa T, Nakao K, *et al.* Interferon alpha inhibits the nuclear factor kappa B activation triggered by X gene product of hepatitis B virus in human hepatoma cells [J]. FEBS Lett, 2003, 553(3):304-308.
- [2] 杨建青,吕新生. HBx 在肝细胞癌发生发展中的作用机制[J]. 中国普通外科杂志, 2008, 17(3):345-349.
- [3] Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer [J]. J Lab Clin Med, 2006, 147(1):58-66.
- [4] 关剑,陈孝平,朱虹,等. 乙型肝炎病毒 X 蛋白上调肝癌多药耐药相关基因表达的研究[J]. 肝胆外科杂志, 2004, 12(3):214-216.
- [5] Farinati F, Marino D, De Giorgio M, *et al.* Diagnostic and prognostic role of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: both or neither? [J]. Am J Gastroenterol, 2006, 101(3):524-532.
- [6] Johnson PJ. The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma [J]. Clin Liver Dis, 2001, 5(1):145-159.
- [7] Tegethoff S, Behlke J, Scheiderei C. Tetrameric oligomerization of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(6):2029-2041.
- [8] Um HR, Lim WC, Chae SY, *et al.* Raf-1 and protein kinase B regulate cell survival through the activation of NF-kappaB in hepatitis B virus X-expressing cells [J]. Virus Res, 2007, 125(1):1-8.
- [9] Park SG, Chung C, Kang H, *et al.* Up-regulation of cyclin D1 by HBx is mediated by NF-kappaB2/BCL3 complex through kappaB site of cyclin D1 promoter [J]. J Biol Chem, 2006, 281(42):31770-31777.
- [10] Kanda T, Yokosuka O, Nagao K, *et al.* State of hepatitis C viral replication enhances activation of NF-kB and AP-1 signaling induced by hepatitis B virus X [J]. Cancer Lett, 2006, 234(2):143-148.
- [11] Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Mazzon E, *et al.* Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation [J]. Br J Pharmacol, 2002, 135(2):496-510.
- [12] Malaguarnera L, Pilastro MR, Vicari L, *et al.* Pyrrolidinedithiocarbamate induces apoptosis in human acute myelogenous leukemic cells affecting NF-kappaB activity [J]. Cancer Invest, 2005, 23(5):404-412.
- [13] Ogden SK, Lee KC, Barton MC. Hepatitis B viral transactivator HBx alleviates p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression [J]. J Biol Chem, 2000, 275(36):27806-27814.