

◇ 基础医学研究 ◇

乙肝病毒 HBx 基因稳转细胞系的建立及其诱导的内质网应激

陆 鹏^{1,2}, 姜同翠^{1,2}, 陈 露^{1,2}, 沈玉君^{1,2}, 沈玉先^{1,2}, 方圣云^{1,2}

摘要 目的 建立乙肝病毒(HBV) HBx 基因稳转细胞系,并观察该细胞系的增殖活性及内质网应激相关基因的表达情况。方法 采用 RT-PCR 法从 HepG2. 2. 15 细胞株中克隆 HBx 基因编码区片段,构建 pcDNA3. 1-HBx 真核表达质粒。利用脂质体将 pcDNA3. 1-HBx 转染至人 HepG2 细胞系,通过 G418 筛选后,经 Western blot 法对 HBx 的表达进行验证。并用 MTT 法检测细胞的增殖活性,同时观察过表达 HBx 蛋白对内质网应激相关基因表达的影响。结果 成功构建了 HBx 的真核表达质粒;建立了 HBV HBx 基因稳转细胞系;MTT 法检测显示该细胞系增殖活性明显上升;同时也发现 HBx 基因的过表达可上调内质网应激相关基因 BiP、PERK、ATF6、XBPI、MANF 的表达,而 CHOP 的表达降低。结论 HBx 基因过表达可诱导内质网应激,并促进 HepG2 细胞增殖。

关键词 HBx; 细胞增殖; 内质网应激

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)03-0283-05

乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染引起的慢性乙型肝炎被普遍认为是导致肝癌发生的重要因素。据统计,我国半数以上的肝癌患者有慢性乙肝病史。研究^[1-3]显示亚洲和北美地区乙肝抗原阳性携带者罹患肝癌的比例是非感染人群的 25~37 倍。HBV 是嗜肝 DNA 病毒家族的溶原性病毒,基因组呈双链环状结构,含有 4 个开放读码框架,分别为 S、P、C、X 区,其中 X 区所编码的产物 HBx 蛋白(hepatitis B virus X protein)是一种多功能的调节蛋白,具有广泛的反式激活功能。内质网(endoplasmic reticulum, ER)应激是真核细胞的一种保护性应激反应,是通过激活未折叠蛋白反应通路,以此来减少细胞内蛋白的异常聚集,起到细胞保护作用。近年来 ER 应激相关调节因子参与肿瘤的发生和发展受

到广泛关注,但关于 HBV 病毒 HBx 蛋白的过度表达在肝癌的发生发展中的作用,目前仍不清楚。该实验通过克隆 HBx 基因并建立稳定表达 HBx 蛋白的肝癌细胞系,观察 HBx 的过度表达是否可引起 ER 应激及对肝癌细胞增殖活性的影响,为后续相关机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、菌株及质粒 人肝癌细胞株 HepG2 购自中国科学院上海细胞库;表达 HBV 全基因组的肝癌细胞株 HepG2. 2. 15 为沈继龙教授惠赠;菌株 *E. coli* DH5 α 为本实验室保存;质粒 pcDNA3. 1 Vector 为美国马里兰大学方圣云教授惠赠;真核表达重组质粒 pcDNA3. 1-HBx 由本实验室构建。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基、opti-MEM 购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自美国 Axygen 公司;质粒大量提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;G418 购自上海生工生物工程有限公司;脂质体 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;DNA 连接酶、ExTaq 和各种限制性内切酶购自日本 TaKaRa 公司;其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.3 引物 引物均由上海生工生物工程有限公司合成,见表 1。

1.1.4 抗体 乙型肝炎病毒 X 蛋白(HBxAg)抗体购自美国 BBI 公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计 实验所需的引物使用 Primer premier 5.0 软件设计,由上海生工生物工程有限公司合成。根据 GenBank 上 HBx 基因序列设计一对引物,HBx-F 包含了 Hind III 酶切位点(表 1 中下划线标注),引物 HBx-R 包含了 EcoR I 酶切位点,见表 1。

1.2.2 质粒构建 以 HepG2. 2. 15 细胞 DNA 为模板,使用上游引物 HBxF 和下游引物 HBxR,PCR 扩增 HBx 序列。反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C

2013-11-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173074、91129729、81372576)

作者单位:安徽医科大学¹ 基础医学院、² 生物药物研究所,合肥 230032

作者简介:陆 鹏,男,硕士研究生;

沈玉先,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: shenyx@ustc.edu.cn;

方圣云,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: syf8811@gmail.com

45 s 60 °C 45 s 72 °C 1 min ,共 35 个循环 ,末次循环后 72 °C 10 min 反应结束。将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离 ,用胶回收试剂盒进行纯化。将回收的 PCR 产物和 pcDNA3.1 载体分别进行双酶切 ,限制性内切酶为 Hind III 和 EcoR I。酶切后将扩增片段连接入 pcDNA3.1 载体并转化 DH5 α 感受态细胞 ,提取质粒后再使用 Hind III 和 EcoR I 酶切鉴定。酶切片段正确的 pcDNA3.1-HBx 质粒由美国 Invitrogen 公司测序。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
HBx	F: GAAGCTTATGGCTGCTAGGCTGTGC
	R: CGAATTCCTTAGGCAGAGGGGAAAAAGT
Actin	F: TCAAGATCATTGCTCCTCTGAG
	R: ACATCTGCTGGAAGGTGGACA
PERK	F: TTGTCGCCAATGGGATAG
	R: CAGTCAGCAACCGAAACC
BIP	F: ACCTGGGTTAGGCTGTGTG
	R: TTGCCTGACTAAAGATGTGG
MANF	F: TCACATTCTCACCAGCCACT
	R: CAGGTCGATCTGCTGTGCATAC
ATF-6	F: CCATTGCTTTACATTCTCCAC
	R: CAGGTCCCACGCTCAGT
XBP-1	F: CAGAGGTCTACCCAGAAGGA
	R: CAGGCAGTCTAATAGTCAAGGA
CHOP	F: GGAGCTGGAAGCCTGGTATGA
	R: TCCCTGCTCAGCGCTCGATTT

1.2.3 稳转细胞株的建立及 HBx 蛋白表达的鉴定

将 HepG2 细胞接种到培养板上 ,待汇合度达 80% ~90% 进行转染。50 μ l Opti-MEM 稀释 1 μ g pcDNA3.1-HBx 质粒混匀 ,同样稀释 2 μ l 脂质体 lipofectamine 2000 于 Opti-MEM 中 ,具体操作按说明书进行。48 h 后用 G418 进行筛选 ,浓度选择 0.5 g/L。同理转染 pcDNA3.1 空载体作对照。该细胞系生长稳定后收集细胞进行 Western blot 实验 ,用 HBx 抗体进行检测。

1.2.4 HBx 对 HepG2 细胞增殖的影响

将处于对数生长期的 HepG2 细胞、稳转空载体的 HepG2 细胞、稳转 HBx 蛋白的 HepG2 细胞按 1×10^4 /孔的密度接种到 96 孔板里 ,设立不接种细胞的空白对照 ,每组设 6 个复孔 ,置于 37 °C CO₂ 培养箱中培养 72 h 后 ,每孔各加入 100 μ l MTT (5 g/L) 37 °C 继续培养 4 h 后终止培养。小心吸去培养液 ,每孔加入 150 μ l DMSO 测定前震荡 10 min ,使结晶充分溶解。以空白对照调零 ,于酶联免疫检测仪 570 nm 波长处测定各孔的光密度 (optical density , OD) 值。

1.2.5 HBx 诱导的 ER 应激 选取 ER 应激相关基因 ,包括 PERK、BIP、MANF、ATF-6、XBP-1 和 CHOP ,用 RT-PCR 方法检测其在 HepG2 细胞中和过表达 HBx 蛋白的 HepG2 细胞中的表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件分析 ,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,多组间比较采用方差分析 ,组间两两比较采用 Dunnett's T 法 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 HBx 基因的克隆及真核表达质粒的构建 收集培养的 HepG2.2.15 细胞 ,提取 DNA ,PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后 ,在约 500 bp 处可见明显的扩增产物条带 ,见图 1A ,该电泳结果和理论预测值相符。将 PCR 产物进行 EcoR I 和 Hind III 双酶切 ,然后连接到 pcDNA3.1 载体上以构建 pcDNA3.1-HBx 真核表达质粒 ,pcDNA3.1 载体上有氨苄青霉素抗性基因 (AmpR) ,见图 2。该质粒转化 DH5 α ,收集细菌抽提质粒 ,经过 EcoR I 和 Hind III 双酶切后 ,在 465 bp 处有一条带 ,见图 1B ,与基因 PCR 产物的大小一致 ,表明目的基因已成功插入 pcDNA3.1 质粒中 ,重组表达质粒 pcDNA3.1-HBx 构建成功。测得的序列在 Pubmed 里用 BLAST 检测与预期序列一致。

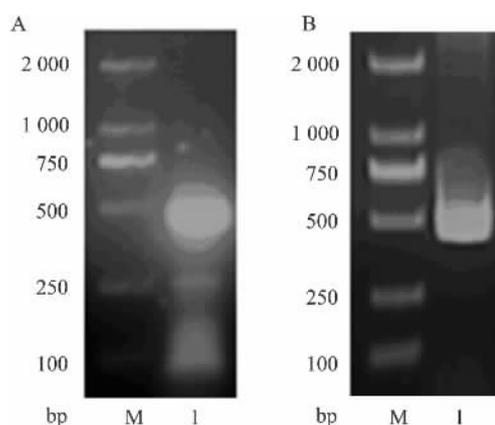


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳及重组质粒酶切鉴定 A: HBx 从 HBV 全基因组 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图; B: pcDNA3.1-HBx 重组质粒酶切后琼脂糖凝胶电泳图; M: DL 2000 Marker; I: PCR 产物

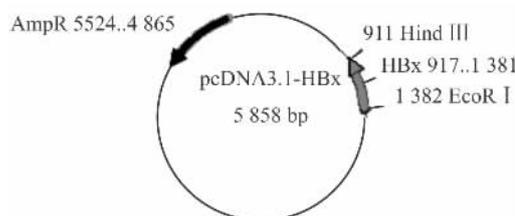


图 2 质粒 pcDNA3.1-HBx 的图谱

2.2 HBx 稳转细胞系的建立及 HBx 蛋白表达的鉴定 将构建的 pcDNA3.1-HBx 质粒转染 HepG2 细胞,用 G418(0.5 g/L) 筛选,然后将细胞充分稀释以便克隆挑选。挑取单个克隆,见图 3A,转至 6 孔板中培养,用 G418 维持筛选以建立稳转细胞系。收集细胞并提取蛋白质进行 PAGE 胶电泳,用抗 HBx 抗体检测,结果显示,转染 HBx 的 HepG2 细胞和 HepG2.2.15 细胞中有 HBx 蛋白表达,见图 3B。

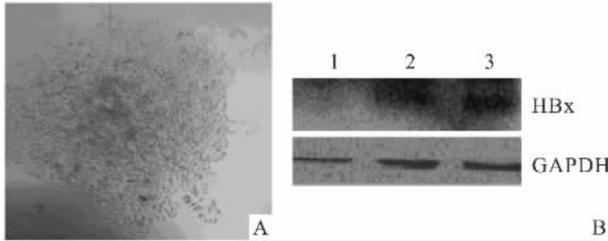


图3 HBx 稳转细胞株的建立及 HBx 蛋白表达的鉴定

A: 阳性克隆形成; B: HepG2 细胞表达 HBx 蛋白的鉴定; 1: HepG2; 2: HepG2-HBx; 3: HepG2.2.15

2.3 HBx 的表达对 HepG2 细胞增殖活性的影响

用 MTT 法对各组细胞的增殖活性进行检查,结果显示, HepG2.2.15 细胞和转染空白载体的 HepG2 细胞在培养 72 h 时,其增殖活性与 HepG2 细胞差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而稳转 HBx 的 HepG2 细胞在培养 72 h 时其增殖活性明显高于稳转空白载体的 HepG2 细胞,差异有统计学意义 ($F = 13.542, P < 0.01$),见图 4。

2.4 HBx 对 ER 应激相关基因表达的影响 用 RT-PCR 方法检测稳转细胞系中 ER 应激相关基因的表达情况,结果显示,稳定表达 HBx 蛋白的 HepG2 细胞中, BIP、PERK、ATF-6、XBP-1 和 MANF 表达上调,而 CHOP 则表达下调,见图 5。这些结果提示 HBx 蛋白的过表达可能引起 ER 应激。

3 讨论

HBx 蛋白在激活 HBV 转录调控过程中发挥重要的作用^[4],其能够参与肝细胞转化,在细胞周期调控、细胞信号传导通路和 DNA 修复中发挥多种功能^[5-7]。然而,关于 HBV 感染导致肝硬化和肝癌的分子机制仍存在争议,包括 HBx 蛋白如何促进肝硬化和肝癌的发生发展。HBV 基因组编码的 X 蛋白被认为是肝炎病毒侵入宿主后介导 HBV 基因组整合和促进 HBV 复制过程的主要调节因子^[8]。X 蛋白转基因动物可发生肝癌;患者体内 X 蛋白的表达

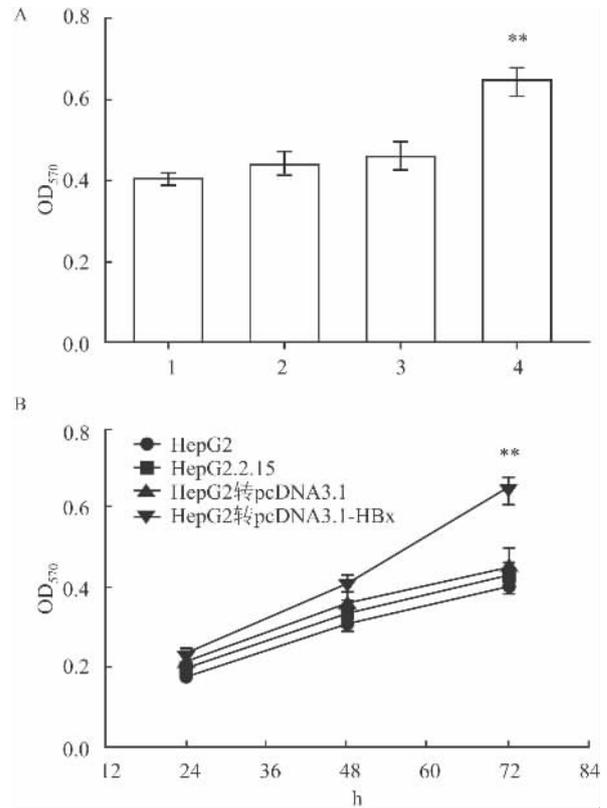


图4 HBx 的表达对 HepG2 细胞增殖活性的影响

1: 未转染的 HepG2 细胞; 2: HepG2.2.15 细胞; 3: 稳定转染空白载体的 HepG2 细胞; 4: 稳定转染 HBx 的 HepG2 细胞; 与稳转空白载体的 HepG2 细胞比较: ** $P < 0.01$

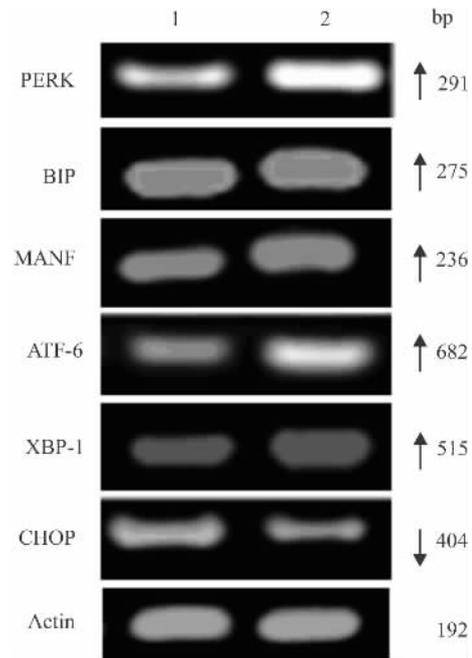


图5 HBx 的表达对 ER 应激相关基因表达的影响

1: pcDNA3.1; 2: pcDNA3.1-HBx

量与肝癌的发生呈明显的相关性; 这些研究^[18-9] 结

果提示 X 蛋白是促进肝癌发生的主要因素之一。研究^[8,10]表明 X 蛋白在某种状况下入核,影响体内多种转录因子的活性,如 AP-1、NF- κ B、STAT3 和 CREB/ATF 等,使得 TNF、TGF- β 等基因的表达发生变化,以此促进炎症向肿瘤的转化、增殖和转移。其中 TGF- β 被认为是促进肝脏纤维化乃至肝硬化的重要调节因子^[11]。但也有研究^[12]显示 HBx 蛋白可以通过影响细胞凋亡蛋白酶的活性和线粒体的功能促进细胞的凋亡。

HBV 表达可以诱发 ER 应激反应并激活 IRE1-XBP1 通路^[13-14]。进一步研究^[15]显示,HBV 表面抗原 pre-S2 突变体蛋白会引起 ER 应激。pre-S 是 HBV 的一种表面蛋白,其突变型可以逃避宿主免疫攻击,在 ER 腔内大量聚集,产生严重而持久的 ER 应激反应,其存在使患者发展为肝癌的概率大大增加,这也提示 ER 应激反应与肝癌发生之间的密切关系^[16]。炎症反应、氧化应激和 ER 应激间会相互促进,HBV 感染后引起宿主的先天免疫反应和炎症反应,其炎症细胞分泌大量的细胞因子、趋化因子、糖类或脂类代谢产物,并产生大量活性氧成分,可引起 ER 应激反应。而 ER 应激反应又可通过释放钙离子作用于线粒体促进活性氧的产生,加重炎症反应,氧化应激和炎症反应的加剧可促进正常肝细胞的恶性转化^[17]。

本研究显示,HBx 的过表达可促进肝癌细胞的增殖。同时也发现 UPR 相关基因对过表达 HBx 的反应性不同,HBx 蛋白可引起 PERK、BIP、MANF、ATF-6 和 XBP1 表达升高,而使 CHOP 表达降低,提示 HBx 通过作用于不同的 UPR 通路介导肝细胞的损伤和促使肝细胞的恶性转化。CHOP 是一个促凋亡基因,其低表达可能参与了肝癌细胞的过度增殖。至于 HBx 对 UPR 基因差异性调节的原因,可能与 ER 应激本身具有促增殖和促凋亡的两重性有关。由此推测 ER 应激及 UPR 通路的激活/抑制贯穿于肝炎到肝癌的全过程,各通路间可能存在平衡和补偿机制。

参考文献

- [1] Neuvet C, Wei Y, Buendia M A. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis [J]. *J Hepatol*, 2010, 52(4): 594-604.
- [2] Hassan M M, Hwang L Y, Hatten C J, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus [J]. *Hepatology*, 2002, 36(5): 1206-13.
- [3] Sun C A, Wu D M, Lin C C, et al. Incidence and cofactors of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study of 12 008 men in Taiwan [J]. *Am J Epidemiol*, 2003, 157(8): 674-82.
- [4] Andrisani O M, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review) [J]. *Int J Oncol*, 1999, 15(2): 373-9.
- [5] Tang H, Delgermaa L, Huang F, et al. The transcriptional trans-activation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication [J]. *J Virol*, 2005, 79(9): 5548-56.
- [6] Bouchard M J, Schneider R J. The enigmatic X gene of hepatitis B virus [J]. *J Virol*, 2004, 78(23): 12725-34.
- [7] Tang H, Oishi N, Kaneko S, et al. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(10): 977-83.
- [8] Kew M C. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26 Suppl 1: 144-52.
- [9] Kim C M, Koike K, Saito I, et al. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice [J]. *Nature*, 1991, 351(6324): 317-20.
- [10] Keasler V V, Hodgson A J, Madden C R, et al. Hepatitis B virus HBx protein localized to the nucleus restores HBx-deficient virus replication in HepG2 cells and *in vivo* in hydrodynamically-injected mice [J]. *Virology*, 2009, 390(1): 122-9.
- [11] Matsuzaki K. Modulation of TGF- β signaling during progression of chronic liver diseases [J]. *Front Biosci*, 2009, 14: 2923-34.
- [12] Terradillos O, Pollicino T, Lecoer H, et al. P53-independent apoptotic effects of the hepatitis B virus HBx protein *in vivo* and *in vitro* [J]. *Oncogene*, 1998, 17(16): 2115-23.
- [13] Christen V, Treves S, Duong F H, et al. Activation of endoplasmic reticulum stress response by hepatitis viruses up-regulates protein phosphatase 2A [J]. *Hepatology*, 2007, 46(2): 558-65.
- [14] Lazar C, Macovei A, Petrescu S, et al. Activation of ERAD pathway by human hepatitis B virus modulates viral and subviral particle production [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34169.
- [15] Hsieh Y H, Su I J, Wang H C, et al. Hepatitis B virus pre-S2 mutant surface antigen induces degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through c-Jun activation domain-binding protein 1 [J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(10): 1063-72.
- [16] Kim S Y, Lee P Y, Shin H J, et al. Proteomic analysis of liver tissue from HBx-transgenic mice at early stages of hepatocarcinogenesis [J]. *Proteomics*, 2009, 9(22): 5056-66.
- [17] Zhu H, Wang Y, Chen J, et al. Transgenic mice expressing hepatitis B virus X protein are more susceptible to carcinogen induced hepatocarcinogenesis [J]. *Exp Mol Pathol*, 2004, 76(1): 44-50.

天麻素改变大鼠窦房结细胞和心房肌细胞的电生理活动

王飞, 位凯, 沈兵, 王烈成, 孔德虎, 胡金兰

摘要 目的 记录大鼠心肌细胞生物电活动并观察天麻素对大鼠心肌细胞生物电活动的影响。方法 选用健康 SD 大鼠, 应用心肌细胞内生物电记录的方法, 了解正常窦房结及心房肌细胞的生物电活动情况, 观察并分析天麻素对大鼠窦房结和心房肌细胞生物电活动的影响。结果 在目前实验条件下, 能真实记录到窦房结和心房肌细胞电活动, 在此基础上观察到天麻素能加快大鼠窦房结细胞 V_{max} 4, 缩短心房肌细胞 APD_{90} , 其余的电生理参数变化不明显。结论 记录离体心肌细胞生物电活动的实验条件相对成熟; 天麻素能影响离体心肌细胞生物电活动, 可能与天麻素增强 $T-Ca^{2+}$ 通道通透性, 促进 K_{ATP} 的开放有关。

关键词 天麻素; 心房肌细胞; 窦房结细胞; 动作电位

中图分类号 R 33-33; R 932

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)03-0287-04

天麻作为我国常用的名贵中药有着巨大的药用价值, 天麻素是其有效成分之一, 化学结构为 4-羟

甲基苯甲醇- β -D 吡喃葡萄糖苷。研究^[1-2]表明, 天麻素具有镇静、催眠, 对脑细胞损伤有保护作用; 对于循环系统, 天麻素能降低外周血管阻力、降低血压和增加动脉血管顺应性^[3], 尤其可以增加外周及冠状动脉血流量, 对心脏具有一定的保护作用^[4]。实验室前期研究^[5]表明天麻素预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用, 能加快大鼠心率, 降低在体大鼠心肌缺血再灌注损伤时心律失常的发生。因此该研究拟从电生理学的角度, 探索天麻素对大鼠离体心肌细胞电活动的影响, 进而了解天麻素对心肌细胞的离子作用机制, 这也将成为研究天麻素降低心律失常发生的必要前提。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用健康成年 SPF 级 SD 大鼠(安徽省实验动物中心提供), 雌雄不拘, 体重(230 ± 10) g, 动物置于聚丙烯塑料大鼠笼内, 所有大鼠自由进食饮水, 自然采光, 室温维持在(24 ± 1) °C。在实验过程中, 其中有 5 只大鼠记录不到窦房结细胞动作电位而舍弃。部分细胞可以记录到动作电位, 但由于不稳定, 不能给药用作药物灌流前后数据的分析。

2013-08-26 接收

基金项目: 安徽省教育厅科研课题(编号: 2006KJ362b); 校级优秀青年教师后备人选基金资助(编号: 2009A028)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院生理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 王飞, 女, 硕士研究生;

胡金兰, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hj-

lan1872@163.com

Establishment of stable cell line expressing HBx and induction of endoplasmic reticulum stress by HBx

Lu Peng^{1,2}, Jiang Tongcui^{1,2}, Chen Lu^{1,2}, et al

(¹School of Basic Medical Sciences, ²Biopharmaceutical Research Institute, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To establish the cell line stably expressing hepatitis B virus X protein (HBx) by transfection of HBx to HepG2 cells and to investigate the effect of HBx on ER stress and proliferation. **Methods** HBx gene encoding fragment cloned from HepG2.2.15 cells by RT-PCR was inserted to pcDNA3.1 vector to construct the pcDNA3.1-HBx eukaryotic expression plasmid and established the stable cell line after G418 screening. Cell proliferation was determined by MTT method. The expressions of UPR genes were detected by PCR method. **Results** The HepG2s cell line stably expressing HBx was obtained. Overexpression of HBx up-regulated BiP, PERK, ATF6, XBP1, and MANF and down-regulated CHOP. The cell proliferation was enhanced in the HepG2s cells stably expressing HBx. **Conclusion** Stably expressing HBx induces ER stress by differentially regulating UPR genes and promotes the cell proliferation.

Key words HBx; cell proliferation; ER stress