



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.010
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3953.shtml

· 基础研究 ·

乙肝病毒 X 蛋白对正常肝细胞生物钟基因表达的影响

金涛¹, 刘平², 黄早早³, 李常海⁴, 姚弘毅³, 柳湘洁³, 杨盛力⁵

(华中科技大学同济医学院附属梨园医院 1. 肿瘤科 2. 骨科 3. 康复科 5. 普通外科, 湖北 武汉 430077; 4. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 肝胆外科, 湖北 武汉 430030)

摘要

目的: 探讨乙肝病毒 X 蛋白 (HBx) 对人正常肝细胞中生物钟基因表达的影响。

方法: 分别将 HBx 表达质粒 (pcDNA3.1-HBx) 与空载体质粒 (pcDNA3.1) 转染入人正常肝细胞系 L02 后, 用 RT-PCR 与 Western blot 法检测细胞 HBx mRNA 与蛋白的表达; real-time PCR 检测细胞中生物钟基因 CLOCK、BMAL1、Per1、Per2、Per3、Cry1、Cry2、CKI ϵ 的表达。

结果: RT-PCR 与 Western blot 结果显示, L02 细胞转染 HBx 表达质粒后有明显的 HBx mRNA 与蛋白表达, 而转染空载体质粒的 L02 细胞无 HBx mRNA 与蛋白表达。与转染空载体质粒的 L02 细胞比较, 转染 HBx 表达质粒的 L02 细胞 CLOCK 与 Cry1 的 mRNA 表达明显升高, 而 BMAL1、Per1、Per2、Per3、Cry2、CKI ϵ 的 mRNA 表达明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

结论: HBx 能使正常肝细胞中的生物钟基因表达发生改变, 破坏肝细胞正常的生物节律, 这可能为其导致肝癌形成的机制之一。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(7):915-920]

关键词

癌, 肝细胞; 乙型肝炎病毒 X; 生物钟

中图分类号: R735.7

Effects of hepatitis B virus X protein on clock gene expression in normal hepatic cells

JIN Tao¹, LIU Ping², HUANG Zaozao³, LI Changhai⁴, YAO Hongyi³, LIU Xiangjie³, YANG Shengli⁵

(1. Department of Oncology 2. Department of Orthopedics 3. Department of Rehabilitation 5. Department of General Surgery, Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Corresponding author: YANG Shengli, Email: jixufendou2013@gmail.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the influence of hepatitis B virus X protein (HBx) on the clock gene expression in normal hepatic cells.

Methods: Human normal hepatic L02 cells were transfected with the HBx expression plasmid (pcDNA3.1-HBx) or empty vector plasmid (pcDNA3.1), respectively, then the HBx mRNA and protein expression in L02 cells was determined by RT-PCR method and Western blot analysis, respectively, and the mRNA expression of the clock genes that included CLOCK, BMAL1, Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2 and CKI ϵ in L02 cells were detected by real-time PCR.

Results: Results of RT-PCR and Western blot showed that both HBx mRNA and protein were obviously

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81272421)。

收稿日期: 2014-03-22; 修订日期: 2014-06-08。

作者简介: 金涛, 华中科技大学同济医学院附属梨园医院主治医师, 主要从事肿瘤方面的研究。

通信作者: 杨盛力, Email: jixufendou2013@gmail.com

expressed in the L02 cells transfected with HBx expression plasmid, which were not seen in the L02 cells transfected with empty vector plasmid. Compared with L02 cells transfected with empty vector plasmid, the CLOCK and Cry1 mRNA expressions were remarkably increased while the mRNA expressions of BMAL1, Per1, Per2, Per3, Cry2 and CKI ϵ were remarkably decreased in L02 cells transfected with empty vector plasmid, and all the differences had statistical significance (all $P < 0.05$).

Conclusion: HBx can change the expressions of clock genes in normal hepatic cells, which may disrupt circadian rhythm of liver cells, and this may be one of the mechanisms for the pathogenesis of liver cancer.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(7):915-920]

KEYWORDS Carcinoma, Hepatocellular; Hepatitis B Virus X Protein; Biological Clocks

CLC number: R735.7

尽管目前肝癌的发生机制尚不清楚,但诸多研究表明肝癌的发生发展和乙肝病毒 X 蛋白 (hepatitis B virus X protein, HBx) 有着密切关系。HBx 是乙肝病毒 X 基因编码的一种多功能蛋白,具有反式激活功能,广泛参与宿主细胞的基因调控和表达、蛋白质降解及细胞信号转导等过程,是导致肝癌发生发展的重要致病因子^[1]。

近年来研究^[2-4]发现肿瘤的发生发展和生物钟紊乱也有着密切关系,生物钟紊乱可以促进肿瘤的发生和发展。生物钟是人体在长期进化过程中形成的与自然界同步的内在节律,在分子水平上由 CLOCK、BMAL1、Per1、Per2、Per3、Cry1、Cry2、CKI ϵ 、NPAS2、Rev-Erb α 等多个生物钟基因 (clock gene) 精密调控。这种精密调控遭到破坏后可导致细胞的增殖、凋亡、侵袭转移、化疗耐药等生物学特征发生改变^[5]。

笔者^[6]的前期研究显示 CoCl₂ 诱导的缺氧环境可以导致肝癌细胞内生物钟基因的表达紊乱。作为肝癌常见的致病因子 HBx 对肝细胞的生物钟节律有无影响鲜有报道。故本研究在前期发现 HBx 上调 CLOCK 和下调 BMAL1 表达的基础上深入研究 HBx 对其他生物钟基因表达的影响^[7]。

1 材料与方 法

1.1 材 料

鼠抗人 HBx 单克隆抗体和鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;脂质体转染剂 lipofectamine 2000、TRIzol、SYBR[®] Green PCR Master Mix、G418 为 Life 公司产品;PCR 引物由 Life 公司合成;胎牛血清购于 Hyclone 司;人正常

肝细胞系 L02 细胞 (购自中国典型物种保藏中心)。pcDNA3.1-HBx 和 pcDNA3.1 质粒由华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科实验室保存。

1.2 稳定表达乙型肝炎病毒 X 蛋白的 L02 细胞系的建立与鉴定

将 L02 细胞接种于 24 孔板中,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,待细胞生长至 60%~80% 融合时按照 lipofectamine 2000 的说明书分别将 pcDNA3.1-HBx 和 pcDNA3.1 质粒转染至 L02 细胞中。转染 24 h 后,胰酶消化细胞,1 传 24 分布于 24 孔板中。用含 500 mg/L G418 的细胞培养液筛选 20 d,出现单克隆后改用含 250 mg/L G418 的培养液维持至传代,备份。得到的稳定细胞系分别命名为 L02/HBx 细胞系和 L02/pcDNA3.1 细胞系。并通过 RT-PCR 和 Western blot 对所建细胞系进行鉴定。这两株稳定的细胞系已经在之前的多项研究中被使用^[7-9]。

1.3 real-time PCR 技术检测 L02/HBx 和 L02/pcDNA3.1 细胞中各生物钟基因 mRNA 的表达

按照 TRIzol 说明书提取 L02/pcDNA3.1 细胞和 L02/HBx 细胞总 RNA,测得 RNA 的浓度和纯度后取 2 μ g 的 mRNA 逆转录为 cDNA。按照 SYBR[®] Green PCR Master Mix (2 \times) 说明书操作步骤进行定量 PCR 反应,每个样本设 3 个复孔。经预实验,将逆转录后的 cDNA 5 倍稀释做为模板。总反应体系为 25 μ L: sybrGreen Mix 12.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 10 μ mol/L 的上游和下游引物各 1 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 40 次循环内 94 $^{\circ}$ C 变性 60 s、58 $^{\circ}$ C 退火 60 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。重复 3 次^[10]。所用引物见表 1。

表 1 real-time PCR 引物
Table 1 Primers for real-time PCR

| 基因 | 引物 | 温度 (°C) | 产物大小 (bp) |
|---------|---------------------------------------|---------|-----------|
| Per1 | 5'-AGG CAA CGG CAA GGA CTC-3' | 60.2 | 101 |
| | 5'-GGC TGT AGG CAA TGG AAC TG-3' | | |
| Per2 | 5'-CTA CAG CAG CAC CAT CGT C-3' | 58.9 | 78 |
| | 5'-CCA CTC GCA GCA TCT TCC-3' | | |
| Per3 | 5'-TGG TGG TGG TGA ATG TAA GAC-3' | 57.2 | 104 |
| | 5'-GGC TGT GCT CAT CGT TCC-3' | | |
| Cry1 | 5'-CAA CCT CCA TTC ATC TTT CC-3' | 58.9 | 151 |
| | 5'-CTC ATA GCC GAC ACC TTC-3' | | |
| Cry2 | 5'-TGG GCT TCT GGG ACT GAG-3' | 57.2 | 136 |
| | 5'-GGT AGG TGT GCT GTC TTA GG-3' | | |
| CLOCK | 5'-GCA GCA GCA GCA GCA GAG-3' | 61.9 | 149 |
| | 5'-CAG CAG AGA GAA TGA GTT GAG TTG-3' | | |
| BMAL1 | 5'-TGC CAC CAA TCC ATA CAC AGA AG-3' | 60.9 | 123 |
| | 5'-TTC CCT CGG TCA CAT CCT ACG-3' | | |
| CKI ε | 5'-TCA GCG AGA AGA AGA TGT C-3' | 58.9 | 149 |
| | 5'-GAA GAG GTT GCG GAA GAG-3' | | |
| β-actin | 5'-AGT TGC GTT ACA CCC TTT CTT GAC-3' | 60.0 | 171 |
| | 5'-GCT CGC TCC AAC CGA CTG C-3' | | |
| β-actin | 5'-TAT CCC TGT ACG CCT CTG G-3' | 56.6 | 218 |
| | 5'-AAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3' | | |
| HBx | 5'-CGT CCT TTG TTT ACG TCC C-3' | 55.3 | 382 |
| | 5'-CAA TTT ATG CCT ACA GCC TCC-3' | | |

1.4 统计学处理

数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 通过 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 稳定表达 HBx 蛋白的 L02 细胞系的建立

通过 PCR 和 Western blot 可以检测到 L02/HBx

中有 HBx mRNA 和蛋白的表达, L02/pcDNA3.1 细胞中未见表达 (图 1)。

2.2 L02/HBx 和 L02/pcDNA3.1 细胞中各生物钟基因的表达

real-time PCR 结果显示: 转染 HBx 基因后 L02/HBx 细胞中 CLOCK、Cry1 的 mRNA 表达水平增加, BMAL1、Per1、Per2、Per3、Cry2、CKI ε 的 mRNA 表达水平降低, 与 L02/pcDNA3.1 细胞比较, 差异均有统计学意义 (均 *P* < 0.05) (图 2)。

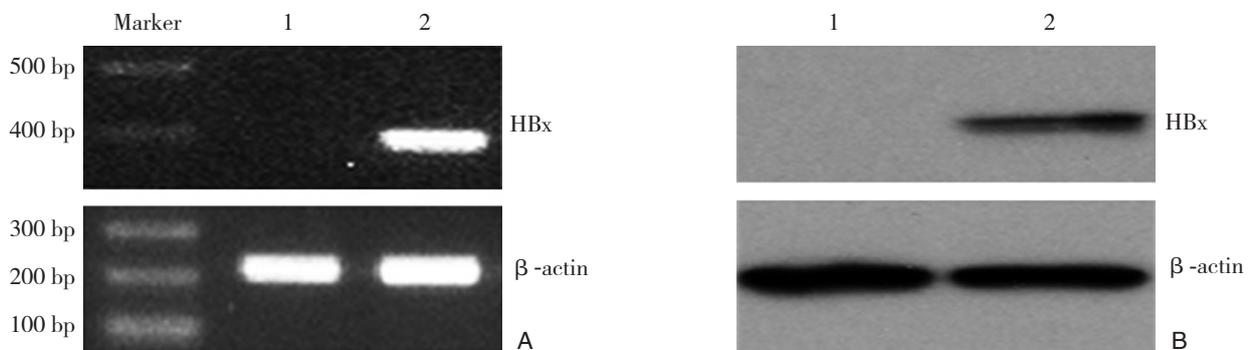


图 1 RT-PCR 和 Western blot 检测结果 A: HBx mRNA 表达; B: HBx 蛋白表达 Marker: 分子量标准; 1: L02/pcDNA3.1 细胞; 2: L02/HBx 细胞
Figure 1 Results of RT-PCR and Western blot A: HBx mRNA expression; B: HBx protein expression Marker: Molecular weight marker; 1: L02/pcDNA3.1 cells; 2: L02/HBx cells

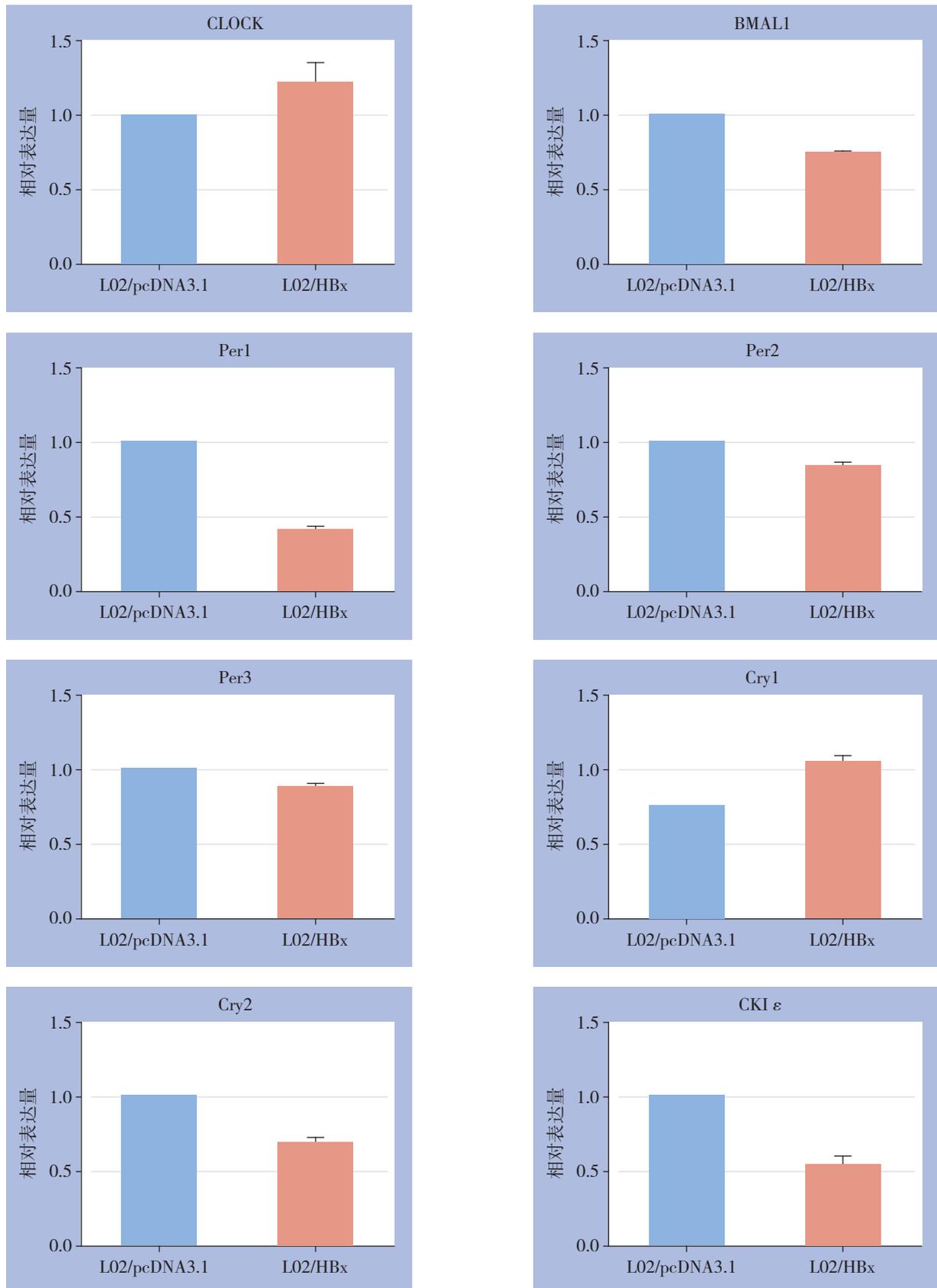


图 2 real-time PCR 检测 L02/pcDNA3.1 和 L02/HBx 细胞中各生物钟基因的表达

Figure 2 The expressions of the clock genes in L02/pcDNA3.1 cells and L02/HBx cells detected by real-time PCR

3 讨论

HBV 感染被公认为是肝细胞发生癌变的最主要的危险因素之一,在 HBV 的编码产物中 HBx 被证明在病毒复制和诱导癌变等方面起着重要作用。HBx 具有生长因子样作用可直接刺激细胞生长,并可通过影响正常的细胞周期、干扰 DNA 的修复、调节细胞增殖和凋亡、诱导细胞化疗耐药等,在肝癌的发生发展过程中发挥着重要作用^[1]。除此之外,笔者前期研究^[7]发现 HBx 还可导致生物钟基因核心成员 CLOCK 和 BMAL1 的表达发生改变。

生物钟基因是生命活动的时序控制器,它们的活动使得器官组织和细胞水平的生命活动高度有序、协同,并呈现明显的昼夜节律。目前已经发现 10 余种生物钟基因,包括 CLOCK、BMAL1、Per1、Per2、Per3、Cry1、Cry2、NPAS2、CKI ϵ 、Tim、Rev-Erb 和 DEC 等^[11]。这些基因构成两个重要反馈回路:(1) 转录调控因子 CLOCK 和 BMAL1 通过 bHLH-PAS 结构域形成异二聚体,同 Per1-3 和 Cry1-2 基因启动子的 E 盒结合并激活其转录,表达产物 Per 和 Cry 系列蛋白由细胞胞浆转移至核内,作为负性元件与 CLOCK/BMAL1 直接结合并抑制其活性,进而阻遏 Per1-3 和 Cry1-2 的转录^[12-13];(2) CLOCK 和 BMAL1 异二聚体在激活 Per 和 Cry 系列基因转录的同时,也激活了孤儿核受体 Rev-Erb 基因转录,其编码蛋白可与 BMAL1 的启动子相结合并阻遏其转录^[14-15]。由于基因转录、翻译及蛋白入核需一定时间,使生物节律分子振荡以近 24 h 为周期自激进行,生物钟基因这种负反馈循环构成人体内精确的内源性“分子钟”,调节机体各项生命活动有条不紊的进行^[16]。

细胞内生物钟紊乱可引起其下游的钟控基因(clock controlled genes, CCG)表达紊乱。人类基因组中约有 5%~15% 的 mRNA 的表达具有生物节律性,受生物钟基因的调控^[17-18]。这些受生物钟调控的基因包括细胞周期的关键调控因子(cyclin A, cyclin B1, cyclin D1),抑癌基因(P53, P21),癌基因(c-myc, Wee1)。这些受生物钟基因调控的靶基因参与了 DNA 的损失修复、细胞增殖和凋亡,因此生物钟紊乱有可能导致正常细胞生长失控和恶性转变^[17-19]。

本研究发现转染 HBx 后正常人肝细胞 L02 细胞中生物钟基因的表达都发生了变化,CLOCK、Cry1 mRNA 表达水平增加,BMAL1、Per1、

Per2、Per3、Cry2、CKI ϵ mRNA 的表达水平降低。上述基因均为昼夜节律的分子振荡中的重要成员,其表达水平发生了改变会引起 L02 细胞生物钟紊乱。恶性肿瘤的特征之一是细胞失控制性、失序性的增殖,这种失序性也必然体现在时间维度方面的紊乱。由于生物钟基因与细胞周期调控密切相关,尤其是影响着细胞增殖周期和凋亡,故与肿瘤密切相关,可能是肿瘤发生、发展的又一原因。大量流行病学研究发现昼夜节律的打乱(主要为光照的影响)与乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌的发生相关。上夜班及轮班工作者患乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌的风险大大增加^[20-21]。Filipski 等^[22]研究发现生物钟紊乱可以加快肝癌的发展。Lin 等^[23]研究发现肝癌组织中 Per1、Per2、Per3 和 Cry2 的表达下调,同 HBx 导致的变化趋势基本一致,因此本研究发现的这一现象有可能是 HBx 导致正常肝细胞出现失控制性、失序性的增殖继而癌变的又一原因。

本研究虽发现 HBx 可以引起正常肝细胞中生物钟基因的表达紊乱,但也存在着两点不足:(1) 只在 mRNA 水平上进行了检测,仍需在蛋白水平上进一步加以验证;(2) HBx 引起生物钟基因表达变化的机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 杨建青,潘光栋,刘振,等. HBx 蛋白诱发人肝细胞恶性表型的蛋白组学比较分析[J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19(8):881-884.
- [2] 王正荣. 时间生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2006:142-164.
- [3] 吴超,杨盛力,赵志辉. 生物钟基因 NPAS2 的研究进展[J]. 山东医药, 2013, 53(31):91-94.
- [4] 吴超,张金玲,杨盛力,等. 孤儿核受体 Rev-Erb α 功能与表达调控研究进展[J]. 山东医药, 2013, 53(30):98-101.
- [5] Zeng ZL, Luo HY, Yang J, et al. Overexpression of the circadian clock gene Bmal1 increases sensitivity to oxaliplatin in colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(4):1042-1052.
- [6] 程全胜,刘平,刘利平,等. CoCl₂ 模拟缺氧环境下肝癌细胞生物钟基因表达的变化[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(1):48-52.
- [7] 杨盛力,潘晓莉,熊枝繁,等. 乙肝病毒 X 蛋白对肝细胞生物钟基因的影响及其意义[J]. 中德临床肿瘤学杂志:英文版, 2011, 10(8):468-471.
- [8] 杨盛力,张小玲,刘利平,等. 乙肝病毒 X 蛋白通过激活 NF- κ B 信号通路上调耐药相关蛋白的表达[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2012, 41(1):54-58.
- [9] 杨盛力,陈孝平,张万广,等. 肝癌组织中 livin 基因表达及与乙型肝炎病毒 X 蛋白的关系研究[J]. 中华普通外科杂志, 2008,

- 23(12):921-923.
- [10] Fang X, Dong W, Thornton C, et al. Benzo(a)pyrene induced glycine N-methyltransferase messenger RNA expression in *Fundulus heteroclitus* embryos[J]. *Mar Environ Res*, 2010, 69 Suppl:S74-76.
- [11] Bersten DC, Sullivan AE, Peet DJ, et al. bHLH-PAS proteins in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(12):827-841.
- [12] Huang N, Chelliah Y, Shan Y, et al. Crystal structure of the heterodimeric CLOCK:BMAL1 transcriptional activator complex[J]. *Science*, 2012, 337(6091):189-194.
- [13] Duong HA, Robles MS, Knutti D, et al. A molecular mechanism for circadian clock negative feedback[J]. *Science*, 2011, 332(6036):1436-1439.
- [14] Solt LA, Wang Y, Banerjee S, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists[J]. *Nature*, 2012, 485(7396):62-68.
- [15] Cho H, Zhao X, Hatori M, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β [J]. *Nature*, 2012, 485(7396):123-127.
- [16] Takahashi K, Yamada T, Tsukita S, et al. Chronic mild stress alters circadian expressions of molecular clock genes in the liver[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 304(3):E301-309.
- [17] Schibler U. The daily timing of gene expression and physiology in mammals[J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2007, 9(3):257-272.
- [18] Canaple L, Kakizawa T, Laudet V. The days and nights of cancer cells[J]. *Cancer research*, 2003, 63(22):7545-7552.
- [19] Kelleher FC, Rao A, Maguire A. Circadian molecular clocks and cancer[J]. *Cancer Lett*, 2014, 342(1): 9-18.
- [20] Lahti T, Merikanto I, Partonen T. Circadian clock disruptions and the risk of cancer[J]. *Ann Med*, 2012, 44(8):847-853.
- [21] Parent M \acute{E} , El-Zein M, Rousseau MC, et al. Night work and the risk of cancer among men[J]. *Am J Epidemiol*, 2012, 176(9):751-759.
- [22] Filipski E, Subramanian P, Carri \grave{e} re J, et al. Circadian disruption accelerates liver carcinogenesis in mice[J]. *Mutat Res*, 2009, 680(1/2):95-105.
- [23] Lin YM, Chang JH, Yeh KT, et al. Disturbance of circadian gene expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2008, 47(12):925-933.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式：金涛, 刘平, 黄早早, 等. 乙肝病毒 X 蛋白对正常肝细胞生物钟基因表达的影响 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(7):915-920. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.010
Cite this article as: JIN T, LIU P, HUANG ZZ, et al. Effects of Hepatitis B virus X protein on of clock gene expression in normal hepatic cells[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(7):915-920. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.010

我刊姊妹刊《Gland Surgery》被 PubMed 收录

近日收到 PubMed Central (PMC) 通知, 我刊姊妹刊《Gland Surgery》杂志已正式被该数据库全文收录, 收录工作将在一个月内完成, 届时《Gland Surgery》全部文章 (包括往刊) 将可以在 PubMed 中获取。

《Gland Surgery》(Gland Surg; pISSN 2227-684X; eISSN 2227-8575) 于 2012 年 5 月由《中国普通外科杂志》与 AME 公司合作创刊, 是一本同行评审、开放获取的英文期刊, 主要刊登腺体疾病预防、诊断、治疗、预后等方面的文章。由我刊主编吕新生教授与北京 301 医院普通外科李席如教授共同担任主编; 湘雅医院普通外科的李新营, 泰国 Mahidol University 的 Visnu Lohsiriwat, 澳大利亚 University of Melbourne 的 Warren M Rozen, 以及美国 Virginia Commonwealth University 的 Kazuaki Takabe 等教授共同担任副主编。《Gland Surgery》拥有一支国际化的编委团队, 编委分别来自中国、美国、英国、日本、台湾、泰国、澳大利亚、意大利、加拿大、西班牙、希腊等世界各国。

欢迎业内人士登录《Gland Surgery》网站: <http://www.glandsurgery.org>。

中国普通外科杂志编辑部