

文章编号:1005-6947(2006)12-0923-04

· 基础研究 ·

乙肝病毒 X 基因对肝癌细胞表达 RhoC 的影响

郑岩松^{1,2}, 吕新生², 曾永毅¹, 林永堃¹, 林旭³

(1. 福建医科大学附属第一医院 普通外科, 福建 福州 350005; 2. 中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008; 3. 福建医科大学分子医学中心, 福建 福州 350004)

摘要:目的 探讨 X 基因对肝癌细胞表达 RhoC 基因的影响。方法 用定向克隆的方法构建 X 基因的真核表达载体 pcDNA3.1-X, 脂质体转染 HEPG2 细胞; 潮霉素选择培养稳定表达 X 基因的 HEPG2-X 细胞; 免疫组化鉴定 HEPG2-X 细胞 RhoC 蛋白表达。结果 构建的真核表达载体 pcDNA3.1-X 在 HEPG2 细胞中有稳定表达, HEPG2-X 细胞表达 RhoC 蛋白增强。结论 体外条件下, X 基因可促进肝癌 HEPG2 细胞 RhoC 表达增强。这可能与肝癌的侵袭、转移有关。

关键词: 基因, X; 基因, RhoC; 肝肿瘤, 实验性; 基因表达

中图分类号: R73-3; R735.7 **文献标识码:** A

The effect of HBV X gene vector on the expression of RhoC protein in HEPG2 cell line

ZHENG Yan-song^{1,2}, LU Xin-sheng², ZEN Yong-yi¹, LIN Yong-kun¹, LIN Xu³

(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China; 2. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 3. The Molecular Research Center, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of HBV X gene in the expression of RhoC gene in HEPG2 cell line. **Methods** The whole-length X gene was directly cloned to pcDNA3.1 vector. The recombinant vector (pcDNA3.1-X) was transfected into HEPG2 cells after selection with hygromycin, steady clones (HEPG2-X cells) were obtained. The expression of RhoC protein was analysed with immunohistochemical stain. **Results** The recombinant plasmid could steadily express X protein efficiently, and the expression of RhoC protein in HEPG2-X cell was enhanced. **Conclusions** HBV X gene can enhance the expression of RhoC protein in vitro. It may be related to invasiveness and metastasis of hepatocellular carcinoma.

Key words: Genes, X; Genes, RhoC; Liver Neoplasms, Experimental; Gene Expression

CLC number: R73-3; R735.7 **Document code:** A

HBV DNA 整合入宿主细胞基因组是肝癌遗传学研究的重大发现之一。近年来的研究表明 X 基因及其产物 pX 可促进肝癌的转移。Rho GTPases 是 Ras 超家族成员, 参与细胞信号传导、增殖和肌动蛋白骨架的调节; Rho GTPases 的一个成员 - RhoC 与肝

癌的转移有关。为了探讨 X 基因与 RhoC 在肝癌转移的相互作用, 本实验构建了表达乙肝 X 基因的真核表达载体, 并成功地将之转入 HEPG2 细胞, 观察其对 HEPG2 细胞表达 RhoC 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 克隆用 pcDNA3.1 载体、大肠杆菌 TOP10F⁺ 及 HEPG2 细胞由福建医科大学分子医学中心惠赠; Hight Fedelity 多聚酶链反应 (PCR) 试剂盒购自美国罗氏公司; 小量质粒抽提试剂盒、PCR 产物回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒购自上海华

基金项目:福建省自然科学基金 (c0310013) 及福建省卫生厅青年科研基金 (2002-01-04) 资助。

收稿日期: 2006-05-17; **修订日期:** 2006-07-25。

作者简介: 郑岩松, 男, 福建福清人, 福建医科大学附属第一医院副主任医师, 主要从事肝胆外科方面的研究。

通讯作者: 郑岩松

舜生物工程技术服务有限公司; dNTP 和 T4DNA 连接酶、NheI 及 KpnI 内切酶购自 BioLabs 公司; QIAGENMIDI 质粒抽提试剂盒购于美国 QIAGEN 公司; LIPFECTAMINETMReagent (18324-020) 购于 GIBCO-BRL 公司; 潮霉素购于 Bio-Lab 公司; 抗 RhoC 多克隆抗体 (sc12116) 购于 Santa Cruz 公司; DNAMarker 购于 TAKARA 公司; 其余生化试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.1.2 主要仪器 Beckman Microfuge 高速冷冻离心机(美国)、PCR 仪 Gene Amp PCR system2400(美国)、分子定量成像系统(美国) Gel Doc 1000 UV BIO-RAD 公司、紫外可见分光光度仪(瑞典) Pharmacia Biotech 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 X 基因扩增引物设计 上游引物为 GGG, GTA, CCT, TAG, GCA, GAG, GTG, AAA, AAG, TTG; 下游引物为 CTA, GCT, AGC, ATG, GCT, GCT, AGG, GTG, TGC, TG。

1.2.2 重组质粒的构建、转化、筛选及鉴定、提取 以 HBV 病毒 adr 标准株之 DNA 为模板进行扩增; 回收 X 片段; 限制性内切酶 NheI 与 KpnI 酶切过夜, 回收已酶切之 X 片段备用。载体 pcDNA3.1, 用限制性内切酶 NheI 与 KpnI 37℃ 酶切过夜后回收载体片段, 经 CIAP 处理, 回收备用。处理好的载体 X 片段在 T4 连接酶的作用下 4℃ 连接 16h。取 5 μL 连接产物加入到 0.1 mL TOP10F' 感受态菌中, 轻轻混匀后置冰上 30 min, 42℃ 热休克 2 min, 重新置冰上 2 min, 加入 0.9 mL 的 LB 液体培养基于 37℃ 缓慢摇动复苏 1 h, 收集菌体, 涂布于含 300 μg / μL 氨苄青霉素之 LB 琼脂培养皿中, 37℃ 培养过夜。次日挑取阳性单菌落, 加入 3.0 mL 的 LB 液体培养基于 37℃, 剧烈振荡培养约 4 h 后, 抽提质粒, 溶解于 20 μL 无核酸酶的水中。取 4 μL 提取的质粒于 20 μL 体积内用内切酶 NheI 与 KpnI 37℃ 酶切过夜, 1.0% 琼脂糖电泳鉴定含重组质粒的菌落后送上海博亚公司正向及反向测序。测序引物为 T4、T7 通用测序引物。挑取测序正确之阳性菌落于含 300 μg / μL 氨苄青霉素之 300 mL LB 液体培养基中, 37℃, 250 r/min 振荡培养过夜。次日用 QIAGENMIDI 质粒抽提试剂盒大量抽提质粒(按说明书操作)。纯化后溶于 300 μL 去离子水中。

1.2.3 常规脂质体转染法 将重组质粒转染入 HEPG2 细胞 约 3 周后, 获得稳定表达重组质粒的转染细胞。

1.2.4 转染细胞的鉴定及功能分析 用 TRIzol 抽提稳定转染的细胞的 RNA。用 X 基因扩增引物, 逆转录 PCR 检测转染细胞的 X 基因表达。

调节 HEPG2-X 细胞浓度为 2×10^5 / mL, 置细胞于 6 孔培养板(每孔内放入 1 片已作预处理的盖玻片), 在 37℃, 5% CO₂, 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中培养 48h。以转染空载体 pcDNA3.1 的 HEPG2(-) 和未转染之 HEPG2 细胞为对照组。取出盖玻片, 标本半干燥, 以 4℃ 丙酮固定 10 min。RhoC 多抗以磷酸盐缓冲液稀释成 1:100, 免疫组化染色过程按说明书进行。结果以 TMAGER 8000 彩色图像分析仪进行图像分析判断, 细胞内出现褐色颗粒为阳性细胞。每张片随机取 5 个高倍视野(10 × 40), 测定免疫组化染色后细胞的灰度值(像素单位)。以空载体 pcDNA3.1 为阴性对照。

1.2.5 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm sD$ 表示, 采用 Student's t 检验。P < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-X 载体构建及鉴定

阳性质粒经内切酶 NheI 与 KpnI 37℃ 酶切过夜后, 电泳出现 X 基因相应片段长度条带。序列测定结果如下:

```

CCCCCACCCCCCAAAAATAGAATTGACCCCTTACTC
AAGACAATGCGATGCAATTTCTCATTTTATTAGGAAAGG
ACAGTGGGAGTGGCACCTTCCAGGGTCAAGGAAGGCACG
GGGGAGGGGCAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAGGC
ACAGTCGAGGCTGATCAGCGTTTAAACTTAAGCTTGCTA
CCTTAGGCAGAGGTGAAAAAGTTGCATGGTGTGCTGTAAC
AGACCAATTTATGCTACAGCCTCCAGTACAAAGGCCCTT
TAACCTAATCTCTCCCCCAACTCTCCAGTCTTAAACA
AACAGTCTTTGAAGTATGCCTCAAGGTCGGTTCGTTGACATT
GCTGCGAGTCCAAGAGTCTCTTATGTAAGACCTTGGGCA
AGACCTGGTGGGCGTTCACGGTGGTCTCCATGCGACGTGC
AGAGGTGAAGCGAAGTGCACACGGTCCGGCAGATGAGAA
GGCACAGACGGGAGACCGCGTAAAGAGAGGTGCCCCCC
GTGGTCCGCCGGAACGGTAGATGAAGAAGGGGACGATAG
AGGCCCAAACGGCCCCGAGACGGGTCTCCGCGGGATTCA
GCGCCGACGGGACGTAGACAAAGGACGTCCCGCCGAGGA
TCCAGTTGGCAGCACACCCTAGCAGCCATGCTAGCCAGCT
TGGGTCTCCCTATAGTGAGTTCGTATTAATTTTC

```

划线部分为引入克隆用的酶切位点 NheI 与 KpnI 的序列。

2.2 HEPG2-X 细胞内外源 X 基因及 RhoC 蛋白的检测结果

从转染重组质粒 pcDNA3.1-X 的细胞克隆提取的 RNA 经 RT-PCR 扩增后,1.0% 的琼脂糖电泳可见特异性目的 DNA 片段,而转染空载体 pcDNA3.1 的克隆无特异性目的 DNA 片段。

通过图像分析仪得出 3 种 HEPG2 细胞免疫组化染色后细胞的灰度值:HEPG2-X 细胞 115.7 ± 8.5 (像素单位) (图 1);HEPG2(-) 细胞 $178.5 \pm$

5.7 及 HEPG2 细胞分别为 184.6 ± 9.6 。HEPG2(-) 和 HEPG2 细胞之间差异无显著性 ($P > 0.05$), 而 HEPG2(-) 细胞及 HEPG2 细胞与 HEPG2-X 细胞相比表达 RhoC 蛋白差异有显著性 ($P < 0.01$)。转染 X 基因的 HEPG2-X 细胞生长形态上与未转染 X 基因的 HEPG2 细胞及转染空载体的 HEPG2(-) 细胞有较大差别:HEPG2-X 细胞出现较多的丝状伪足和扁平足,且细胞的移动性明显增强(图 2)。

图 1 HEPG2-X 细胞表达 RhoC 蛋白

3 讨论

近年研究发现 X 基因及其产物 pX 与肝癌的发生关系密切,包括转 X 基因小鼠中肝癌的发生、pX 对多种癌基因的非特异反式激活作用、pX 与 p53 蛋白的结合在蛋白水平使靶细胞中抑癌基因及其产物功能发生改变,以及破坏了 p53 基因的负调节作用等多方面的证据^[1]。X 基因及其产物 pX 主要通过以下方式影响肝细胞癌的生物行为:(1)抑制 p53 介导的细胞凋亡;(2)抑制 Bax 的活性,促进 Bcl-2 的抗凋亡活性;(3)促进一些生长因子如 IGF-1、IGF-2 等的促生长作用;(4)促进肿瘤的转移。但 pX 的确切致癌机制尚未完全阐明^[2-3]。

2000 年,Clark 等人^[4]通过体内选择的方法选择高转移活性的黑色素瘤细胞,利用基因芯片分析证明,高转移活性的黑色素瘤细胞中与细胞外基质集合有关的基因及直接或间接的调节以肌动蛋白为基础的细胞骨架的基因表达增强:当 RhoC 过表达时促进转移,表明 RhoC 与肿瘤的侵袭、转移有密切关系。Kleer 等^[5]用免疫组化染色法检测人乳腺癌组织中 RhoC 蛋白的表达,发现其主要表达于浸润性癌组织中,而在良性病变中不表达,且其表达与肿瘤分期密切相关。笔者既往研究提供的证据包括:胃癌肝转移与 RhoCmRNA 及蛋白的表达有

1:HEPG2-X 细胞;2:HEPG2 细胞;3:HEPG2(-) 细胞;
M:DL-2000 marker

图 2 HEPG2-X 细胞内外源 X 基因的检测

关^[6];原发性肝癌组织中 RhoCmRNA 表达明显高于癌旁肝组织;有肝内转移灶者其癌组织中 RhoCmRNA 表达明显高于无肝内转移灶者。提示 RhoCmRNA 的表达与 HCC 的转移有关^[7]。近年国外有关 RhoC 基因的文献主要集中在乳腺癌基础研究,如 Pille 等^[8]利用 RhoC 及 RhoA 的反义寡核苷酸抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的侵袭转移取得明显的效果。

为了研究 X 基因与 RhoC 基因在促进肝癌转移中的相互作用,本实验成功地构建了 X 基因的真核表达载体,经测序表明其与 Genbank 上登录的 X 基因全长 cDNA 序列完全一致:即将之转染入肝癌 HEPG2 细胞可获得稳定表达 X 基因的 HEPG2-X 细胞。HEPG2 细胞本身不含 X 基因,经 RT-PCR 证实转染细胞中表达 X 基因,而且与未转染 X 基因的 HEPG2 细胞及转染空载体的 HEPG2(-) 细胞相比,HEPG2-X 细胞表达 RhoC 蛋白明显增强。实验还观察到,转染 X 基因的 HEPG2-X 细胞生长形态上与未转染 X 基因的 HEPG2 细胞及转染空载体的 HEPG2(-) 细胞有较大差别,其形态学改变近似于转染 RhoC 重组质粒的 HEPG2 细胞。关于 RhoC 的下游效应因子已有较多研究,而其上游基因则有待进一步的探讨。Han 等^[9]人构建稳定表达 X 基因的 HEPG2-X 细胞,利用基因芯片分析 588 个细胞

基因转录水平的变化,提示IGFR-2及RhoA基因上调,而转录延伸因子SII下调,表明X基因可选择性调节人肝癌细胞的转录。RhoC与RhoA序列上有高度的同源性,但RhoC在转移上的作用远强于RhoA,本实验证明X基因对RhoC亦有正相调控作用。但它是通过直接作用于RhoC基因,亦或通过其他的信号旁路起作用,仍尚不明确。

参考文献:

- [1] Cougot D, Neuveut C, Buendia MA. HBV induced carcinogenesis [J]. *J Clin Virol*, 2005, 34(1):S75-78.
- [2] Ou DP, Tao YM, Chang ZG, *et al.* Hepatocellular carcinoma cells containing hepatitis B virus X protein have enhanced invasive potential conditionally [J]. *Dig Liver Dis*, 2006, 38(4):262-267.
- [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(2):58-66.
- [4] Clark E, Golub T, Lander E, *et al.* Genomic analysis of metasta-

sis reveals an essential role for RhoC [J]. *Nature*, 2000, 406(6795):532-535.

- [5] Kleer CG, van Golen KL, Zhang Y, *et al.* Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease: A potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability [J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(2):579-584.
- [6] 石铮,郑岩松,曾金华,等. RhoC基因及蛋白在胃癌肝转移中的表达及意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2002, 19(4):310-311.
- [7] 郑岩松,吕新生,林永堃,等. RhoC基因在原发性肝癌中的表达及其意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(9):528-530.
- [8] Pille JY, Denoyelle C, Varet J, *et al.* Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Mol Ther*, 2005, 11(2):267-274.
- [9] Han J, Yoo HY, Choi BH, *et al.* Selective transcriptional regulations in the human liver cell by hepatitis B viral X protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 272(2):525-530.

文章编号:1005-6947(2006)12-0926-01

· 病例报告 ·

胸腺咽管囊肿并瘻管形成 1 例

陈凯, 陆俊地, 何鹏

(解放军第一八八医院 外一科, 广东 潮州 521000)

关键词:胸腺咽管囊肿/并发症; 瘻/病因学; 病例报告

中图分类号:R730.269; R635 **文献标识码:**D

患者 男, 23岁。因发现左侧颈部进行性增大的无痛性肿物 18年入院。8年前该肿物表面出现一指尖大小的皮肤破损, 挤压该肿物时可有白色浆液性分泌物流出, 可暂时愈合, 但不久又自行溃破。体查: 颈前区偏左侧甲状腺腺体下方可扪及约 4cm × 3cm 大小类球形肿物, 质地柔软, 表面光滑, 无触痛, 未触及扩张性搏动或震

颤, 易推动, 肿物表面及周围皮肤无红肿, 肿物表面未闻及血管杂音。胸部正侧位片检查未见异常。诊断: 颈部囊肿并瘻管形成。局部麻醉下, 以适量美蓝溶液经左侧颈部瘻管外口注入后, 以肿物为中心作一长约 7cm 的纵形手术切口。在左侧胸锁乳突肌前缘内侧显露肿物, 肿物呈暗红色, 囊性, 质地柔软, 透明度差, 包膜完整, 与周围组织稍粘连, 上下延伸成条索状(瘻管), 瘻管经颈内和颈外动脉之间, 在二腹肌深面上行, 追踪至近咽部, 未见瘻管内口。将肿物与周围组织小心分离, 将瘻管的下段分离后先行切除, 在近咽部将肿物及上段瘻管切除。病理诊断: 胸腺咽管囊肿。患者术后 1周

痊愈出院。

讨论 胸腺咽管囊肿临床上极少见。治疗本病的有效方法是将囊肿及瘻管全部切除。手术时注入美蓝溶液以指引切除瘻管的方向和范围, 术中关键是将瘻管的下段分离后先行切除, 再用探针通过瘻管的上段进入口腔中(瘻管内口), 并用丝线紧扎瘻管上段的下端于探针头上, 然后自口腔中拉出探针, 即将瘻管内翻自口腔中拉出, 便能达到全部切除的目的。本例患者术前未能明确诊断, 加之此前我院没有该病的手术治疗经验, 手术时没有完全切除瘻管内口, 遂有复发的可能。但患者现已随访 3年, 未见复发。

收稿日期:2006-09-30。

作者简介:陈凯,男,广西桂林人,解放军第一八八医院住院医师,主要从事普通外科临床方面的研究。

通讯作者:陈凯 E-mail: chen kai_0201