**分类号：R575**  **学校代码： 10392**

**学科专业代码：100201 学** **号：1121003022**



**博士学位论文**



**HBx 与 COXIII 共定位上调 HepG2 细胞线粒体功能促进细胞增殖**

**HBx Co-localizes with COXIII in HepG2 Cells to up-regulate Mitochondrial Fuction and Promote Cell Proliferation**

|  |  |
| --- | --- |
| **学** 位 类 型 **：** | **医学博士** |
| **所** 在 学 院 **：** | **协和临床医学院** |
| **申** 请 人 姓 名 ： | **郑碧云** |
| **学** 科 、 专 业 ： | **内** 科 学 （ 消 化 ） |
| **导** **师：** | **王小众** 教授 |
| **研 究 起 止 日 期 ：** | **2013 年 3 月至 2014 年 9 月** |
| **答 辩 委 员 会 主 席 ：** | **林建银** 教授 |
| **答** 辩 日 期 **：** | **2015 年 5 月 28 日** |

**二○一五年五月**



**目** 录

**缩略词表**

**Abbreviations**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全称** | **中文全称** |
| CCK-8 | Cell Counting Kit-8 | 细胞计数试剂盒-8 |
| cDNA | Complementary Deoxyribonucleic Acid | 互补 DNA |
| COX-2 | Cyclooxygenase-2 | 环氧化酶-2 |
| COXIII | Cytochrome c oxidase subunit III | 细胞色素 C 氧化酶亚单位 III |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | 二甲基亚砜 |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | 脱氧核糖核酸 |
| EDTA | Ethylendiaminotetraacetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| ECL | Enhanced chemiluminescence | 增强化学发光 |
| HBx | Hepatitis B virus x protein | 乙肝病毒 X 蛋白 |
| HBV | Hepatitis B virus | 乙型肝炎病毒 |
| HCC | Hepatocellular carcinoma | 肝细胞肝癌 |
| HRP | Horseradish peroxide | 辣根过氧化物酶 |
| NAC | N-acetylcysteine | [N 乙酰半胱氨酸](http://www.iherb.cn/NAC-N-Acetyl-Cysteine) |
| NC | Nitrocellulose | 硝酸纤维素 |
| NSAID | Non-steriod anti-inflammatory drug | 非甾体类抗炎药 |
| mRNA | Messenger ribonucleic acid | 信使核糖核酸 |
| OD | Optical density | 光密度 |
| ORF | Open reading frame | 开放读码框 |
| PBS | Phosphate buffered saline | 磷酸盐缓冲生理盐水 |
| PG | Prostaglandin | 前列腺素 |
| PMSF | Phenylmethylsulfonyl fluoride | 苯甲基磺酰氟 |
| RT-PCR  ROS TEM | Reverse transcription-polymerase chain reaction  Reactive oxygen species  Transmission electron microscopy | 逆转录-聚合酶链式反应  活性氧  透射电子显微镜 |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethylethylendiamine | N,N,N',N'-四甲基乙二胺 |

**HBx与COXIII共定位上调HepG2细胞线粒体功能促进细胞增殖**

摘 要

**背景和目的：**乙肝病毒x蛋白（HBx）被称为“病毒癌蛋白（viral oncoprotein）”，它促进了乙型肝炎病毒（HBV）相关的肝细胞癌的发展，但其确切机制未明。我们前期通过酵母双杂交、交配以及免疫共沉淀实验首次证实了线粒体内膜蛋白细胞色素C氧化酶亚单位III（COXIII）是HBx的体内结合蛋白。本研究将进一步探讨HBx与COXIII在线粒体中共定位及其对线粒体超微结构与功能的影响，探索HBx对HepG2细胞增殖能力的影响。

**方法：**首先构建稳定表达HBx的肝癌细胞株HepG2/HBx, 并以空载对照组

HepG2/mock、空白对照组HepG2作为实验对照，利用激光共聚焦显微镜观察HBx与COXIII在线粒体中的定位。接着通过RT-PCR与Western blot法检测COXIII的mRNA与蛋白表达水平，酶动力学方法检测线粒体细胞色素C氧化酶（COX）的活性，流式细胞仪测量细胞内ROS和线粒体跨膜电位的水平，扫描电镜下观察

HepG2/HBx细胞线粒体超微结构的改变。然后利用RT-PCR与Western blot法检测环氧合酶-2（COX-2）的mRNA与蛋白表达水平，加入ROS清除剂N-乙酰半胱氨酸

（NAC）后再检测COX-2的表达水平改变。采用CCK-8法和克隆形成试验检测细胞的增殖能力，接着加入COX-2的抑制剂NS-398后再次检测细胞的增殖能力改变情况。最后通过RT-PCR与Western blot法检测β–catenin的mRNA与蛋白表达水平，RT-PCR法检测β–catenin下游靶基因cyclin-D1以及c-myc的mRNA表达水平，并加入COX-2的抑制剂NS-398后观察HepG2/HBx细胞株β–catenin蛋白表达水平改变，再加入β–catenin的抑制剂XAV939后CCK-8法检测细胞增殖能力的改变。

**结果：**成功构建稳定表达HBx的肝癌细胞株HepG2/HBx，激光共聚焦显微镜观察到

HBx与COXIII在线粒体中共定位。HBx上调HepG2细胞COXIII转录后水平，增高

COX酶活性、ROS水平以及线粒体跨膜电位。扫描电镜下观察到HepG2/HBx细胞线粒体稍肿胀。另外，HBx上调HepG2细胞COX-2的mRNA与蛋白表达水平，当加入

ROS的清除剂NAC后，COX-2的蛋白表达水平下降。HepG2/HBx增殖能力增强，克隆形成率增高，当加入COX-2的抑制剂NS-398后，HepG2/HBx细胞的增殖能力下降。最后，我们检测到HBx能够上调HepG2细胞β–catenin的mRNA与蛋白表

达水平，以及β–catenin下游靶基因cyclin-D1和c-myc的mRNA表达水平，加入COX-2的抑制剂NS-398后HepG2/HBx细胞株β–catenin蛋白表达水平下调，而当加入β–catenin的抑制剂XAV939后，HepG2/HBx细胞的增殖能力下降。**结论：**稳定表达的HBx能够与COXIII在HepG2细胞线粒体中共定位，上调线粒体的功能，增加ROS的水平来提高COX-2的表达，进一步上调β–catenin的表达水平从而促进细胞的增殖。

**关键词：乙肝病毒； x 蛋白； 细胞色素； C 氧化酶亚单位； III； 活性氧； 环氧合酶-2； 细胞增殖**

**HBx Co-localizes with COXIII in HepG2 Cells to up-regulate Mitochondrial Fuction and Promote Cell Proliferation**

**Abstract**

**Background and Aim:** Hepatitis B virus X protein (HBx) which has been termed―viral oncoprotein‖leads to the development of HBV-associated HCC. However, the mechanism and details remain unclear. Our recent studies have revealed that HBx can interact with the inner mitochondrial membrane protein, cytochrome c oxidase subunit III (COXIII), by yeast two-hybrid system, mating experiment and coimmunoprecipitation. To futher explore the co-localizaiton of HBx and COXIII in HepG2 cells and to investigate the following changes of mitochondrial ultrastructure and function and the molecular mechanism of HBx in HepG2 cells growth promotion.

**Methods:** A HepG2 cell line stably expressing HBx gene by lentivirus vectors were constructed. HepG2/mock and HepG2 cells served as control groups. Confocal microscopy was utilized to assess the interaction between HBx protein and COXIII. Then the expression of COXIII mRNA and protein were investigated by RT-PCR and western blot respectively. Activities of cytochrome c oxidase, level of ROS and mitochondrial membrane potential were investigated in cell cultures. The morphologicalchanges of cell and mitochondria were observed by transmission electron microscopy (TEM). Next COX-2 mRNA was investigated by RT-PCR while the expression of protein (before and after the addition of ROS scavenger, NAC) was examined by western blot. Cell proliferation ability was analyzed by the cell-counting kit-8(CCK-8) and colony formation assay. Then cells were treated with the selective COX-2 inhibitor, NS-398, and measured the cell proliferation ability. Last but not the least, the expression ofβ–catenin mRNA and protein were investigated by RT-PCR and western blot, the expression ofβ-catenin target genes mRNA, cyclin-D1 and c-myc, was tested. Then cells were treated with the selective COX-2 inhibitor, NS-398, to investigate the changes ofβ-catenin protein expression. Finally, cells were treated with

β-catenin inhibitor, XAV939, to measure the changes of cell proliferation ability. **Results:** Our studies further demonstrated that HBx co-localized with the inner mitochondrial protein, COXIII, in HepG2 cells, causing the up-regulation of COXIII protein expression, COX activity, ROS level as well as mitochondrial membrane potential. Mitochondria were only slightly swelling in HepG2/HBx cells under TEM. In

Addition, HBx up-regulated the expression of COX-2 mRNA and protein in HepG2 cells, and the protein level was decreased when cells were treated with ROS scavenger, NAC. Moreover, HepG2/HBx cells increased the proliferation rate and formed more colonies, but the proliferation rate was declined when cells were treated with COX-2 inhibitor, NS-398. Finally, the expressions ofβ–catenin mRNA and protein as well as cyclin-D1 and c-myc mRNA were increased in HepG2/HBx cells. When cells were treated with the inhibitor of COX-2, NS-398, the protein expression ofβ–catenin was decreased, while treated with the inhibitor ofβ–catenin, XAV939, the proliferation rate of HepG2/HBx cells was declined.

**Conclusions:** The co-localization of HBx and COXIII leads to the up-regulation of mitochondrial function and the increased level of ROS. The following up-regulation of COX-2 increased the level ofβ-catenin to promote HepG2 cells growth.

**KEy words: Hepatitis B virus X; Irusxprotein; cytochromecoxidase subunit III; Reactive oxygen species; Cyclooxygenase-2; Cell proliferation**

前 **言**

乙型肝炎病毒（hepatitis B virus, HBV）是全球主要的人类病原体之一，它的慢性感染将导致一系列肝脏疾病的发生，包括肝炎、肝硬化和肝细胞癌（HCC）。目前全球肝细胞癌的年发病率为75万，是仅次于肺癌的第二位最常见的癌症致死原因，在它的病例中，慢性HBV感染者占大约二分之一[1, 2]。在HBV编码的蛋白质中，X蛋白（Hepatitis B virus X protein, HBx）被称为“病毒癌蛋白（viral

oncoprotein）“，它是一种多功能蛋白，含有154个氨基酸，分子量大小约为

17kD，能调节转录、信号转导通路、氧化应激、细胞凋亡、细胞增殖、细胞周期进程、DNA修复，并通与宿主因素之间相互作用促进了HBV相关的肝细胞癌的发生和发展[1, 3, 4]。因此，针对HBx引起肝细胞炎性损害和导致肝细胞癌的分子机制的研究逐渐引起了重视。

针对HBx引起肝细胞炎性损害和导致肝细胞癌的分子机制已经进行了众多的研究，现有的结果涵盖了细胞代谢、凋亡、原癌基因等多个方面，涉及到了已知的绝大多数重要信号分子，按其发挥的生物学效应可以归纳如下四点：一、信号传导和转录方面。HBx可以影响转录因子(transcription factor, TF) IIB、

TFIIH、RNA聚合酶RPB5亚基、TATA-结合蛋白（TATA-binding protein, TBP)、

cAMP反应元素结合蛋白cAMP response element-binding protein, CREB) 和

CCAAT增强结合蛋白（CCAAT-enhancer binding proteinα，c/EBPα）的功能[5]，可以间接激活转录因子如NF-κB、激活蛋白-1 (activator protein-1, AP-1)、激活T细胞核因子（nuclear factor of activated T cells, NFAT），以及Pyk2和Src激酶、Ras、Raf、MAP与信号传导蛋白和转录激活物3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 等信号分子。通过上述途径HBx可以有效的促进肝细胞增殖和HBV的复制[5-7]. 二、细胞周期方面。HBx除了可以间接激活上述Src激酶、Ras和MAPKs，促使静息细胞进入增殖期，还可以诱导cyclin D1、A和B1的产生，活化细胞周期蛋白依赖激酶1(cyclin-dependent kinase 1, CDK1)，从而产生HBx依赖性的G1、S和G2/M期进展[8, 9]。三、细胞凋亡方面。HBx对细胞凋亡的影响尚没有定论[5]，有研究发现HBx通过调节

JAK2/STAT3、Bax、Bcl-xL的途径促进细胞凋亡[10-12]，而另外研究则发现HBx可以调控Fas、p53、TGF-β、Raf-1途径抑制细胞凋亡[13-15]。这两种貌似相互矛盾

的作用提示HBx对凋亡不产生直接作用，而只是提供了一个作用背景，使得肝细胞对凋亡或者抑制凋亡的信号更加敏感，促使细胞在凋亡和“永生化”之间做出选择。四、与原癌基因的关系。目前虽然已经证明HBx可以导致肝癌的发生，但是没有找到HBx直接激活原癌基因致癌变的证据[16]。上述分子机制中有如此众多的信号分子均接受HBx调控，结合其对凋亡和原癌基因作用的不确定性提示HBx所发挥的致癌效应可能不是直接的。

为明确HBx作用的直接机制，众多研究者经过深入研究，发现HBx发挥不同的生物学功能取决于它在细胞中的不同定位，绝大部分的HBx存在于细胞浆中，只有少量存在于细胞核中，而胞浆中有一部分HBx定位于线粒体，影响线粒体的生理、代谢及其它相关功能[17, 18]。线粒体不仅能够通过氧化磷酸化为细胞提供能量，还能调控胞质Ca2+水平[19]、产生及释放活性氧（ROS）调节细胞氧化还原状态

[20]、调控细胞凋亡以及信号转导通路[21]、通过结构和动力学的重塑维持生命和死

亡之间的微妙平衡[22]。于是，随着众多研究者的努力，HBx在细胞内部的结合位点已经由胞浆细胞器精确到线粒体。在2000年至2005年期间，课题申请人和课题组成员在利用酵母双杂合体系筛选乙型肝炎病毒X结合蛋白的前期工作中发现编码线粒体内膜呼吸链复合物细胞色素C氧化酶Ⅲ（cytochrome c oxidase subunit III, COXIII）的克隆在肝细胞内同HBx相结合，并通过假阳性筛除实验，离体实验和免疫共沉淀印迹实验多次验证了COXⅢ与HBx的特异性结合作用，有充分实验数据支持筛选到的COXⅢ为一个新发现的HBx体内结合蛋白[23, 24]。这一个新发现指引课题组将研究深入到HBx作用的最基础起始点——体内结合蛋白COXIII。

COX是线粒体呼吸电子传递链的第四个中心酶复合物，因此又被称为复合物IV（Complex IV）。作为细胞色素系统的末端，它不再将电子继续往下传送，而是接受来自4个细胞色素c的4个电子，传递到一个氧分子上，将氧气转化为两个水分子。在这一进程中，它结合来自基质内的4个质子来制造水分子，同时跨膜转运4个质子，正是这种质子传递（proton pump）功能形成了跨膜的质子电化学势能差，而这一势能差可以被三磷酸腺苷合酶用于制造生物体中最基本的能量分子ATP。质子跨膜传递使得膜间隙积累了大量的质子，建立了质子梯度。由于膜间隙质子梯度的建立，使内膜两侧发生两个显著的变化∶首先线粒体膜间隙产

生大量的正电荷，而线粒体基质产生大量的负电荷，使内膜两侧形成电位差；第二是两侧氢离子浓度的不同因而产生pH梯度，这两种梯度合称为电化学势能差或者电化学梯度（electrochemical gradient）[25, 26]。质子传递在COX的作用中举足轻重，这个功能主要由COXIII完成，COXIII是COX的主要组成亚单位，分子量26021b, COXIII有7个跨膜螺旋，螺旋I和II形成一个螺旋束，螺旋III到VII形成另一个螺旋束，这两个螺旋束作为侧臂形成一个V型裂隙结构。COX的生物合成功能是线粒体生物合成功能的一个关键组成部分[27]，它功能的上调将为细胞提供更多的能量而促进细胞增殖，与癌症密切相关[28, 29]。COXIII是复合物IV（即COX）的主要组成亚单位，是调节COX的装配以及酶活性的重要亚基[30]，也是组成COX质子通路的最主要组成部分，缺乏COXIII的COX无法进行质子传递[31]。另外，COXIII表达的改变是氧化应激的分子标志[32]。

线粒体是ROS的主要来源[20]，HBx作用于线粒体增加了ROS的水平引起氧化应激，从而使肝癌细胞上调炎症介质环氧合酶2（COX-2）的水平产生炎症反应[33]、导致肝癌细胞处于对促凋亡信号的敏感状态[34]、令HBx转基因鼠因PTEN/Akt通路失调而激活致癌作用[35]。ROS是诱变剂和细胞有丝分裂原，它能上调促炎症基因的表达，增强纤维化的形成，在癌症发展中起着直接作用[36, 37]。HBx定位于线粒体，导致ROS产生增多、MPTP开放引起胞质Ca2+水平增多，从而上调了炎症介质环氧合酶-2（COX-2）的表达，促进细胞炎症反应的发生[33]。近年研究发现

Wnt/β–catenin信号通路细胞增殖、分化、癌变中担任着重要的角色。在HBV相关的肝细胞癌中，由HBx蛋白上调的β–catenin促进了HBx蛋白的促瘤活性。在Wnt/β–catenin信号通路中，β–catenin的下游靶基因，比如cyclin-D1，TCF以及c-myc的表达上调了[38, 39]。有研究表明在人胆管癌细胞，COX-2衍生的前列腺素E2激活β–catenin，二者信号通路可能有交集[40]。

综合上述资料以及我们的前期实验研究，为了进一步探索HBx致HBV相关性肝细胞癌的发生机制，本实验将利用慢病毒载体构建长期稳定表达HBx的HepG2/HBx细胞株，通过激光共聚焦显微镜进一步观察HBx与COXIII在线粒体中的共定位，然后检测COXIII表达水平的改变、COX酶活性的改变以及由此引发的线粒体超微结构与功能的改变，进一步研究HBx对线粒体ROS水平的影响，并探讨其对肝癌细胞增殖能力所造成影响的分子机制，由此进一步阐述乙肝病毒感染导致肝细胞

炎症和肝癌发生的机制。

# 第一部分 稳定表达**HBx**的肝癌细胞株的构建与鉴定

## 一 引言

慢病毒载体是由人类免疫缺陷1型病毒(HIV-1)为基础发展起来的基因治疗载体，可将目的基因整合至靶细胞基因组中，从而实现长期稳定地表达，具有转染非分裂细胞、装载外源性目的基因片段大、免疫反应小等特点，是近年来众多转基因方法中的新热点[41, 42]。

本实验室前期工作中应用In-Fusion技术原理设计克隆引物，采用PCR从真核表达载体PcDNA3.1-X中获取HBX基因（ayw型）全长序列片段，然后以In-Fusion交换酶使HBX基因和酶切线性化的慢病毒载体（该载体携带有eGFP——绿色荧光蛋白、3³Flag基因，并具有Puromycin——嘌呤霉素抗性筛选标记）质粒连接，使小分子多肽3³DYKDDDDK（Flag）在HBx的N端融合表达，获得重组慢病毒载体

PLOV. CMV. eGFP.2A.3³Flag＆HBX. EF1a. PuroR，并经过测序和表达检测鉴定。然后将慢病毒三质粒（重组质粒PLOV. CMV. eGFP.2A.3³Flag＆HBX. EF1a. PuroR或空载质粒与包膜质粒pMD2. G、包装质粒psPAX2）共转染293T细胞以包装慢病毒颗粒，将收获的重组病毒颗粒浓缩纯化并进行滴度测定。最终获得浓缩纯化后的重组病毒颗粒滴度为：8.61³107IU/ml，空载对照病毒滴度为：2.48³108IU/ml。本部分实验以包装好的慢病毒颗粒感染HepG2细胞，经过Puromycin（嘌呤

霉素）筛选后获得阳性细胞，荧光显微镜下观察嘌呤霉素筛选后阳性细胞eGFP（绿色荧光蛋白）表达情况，并利用PCR和Western-Blot鉴定。

## 二 实验材料与实验仪器

### **1** 主要实验材料

肝癌细胞株HepG2 上海中科院细胞库

嘌呤霉素 Sigma 公司

DMEM培养基 Hyclone公司

胰蛋白酶Invitrogen公司

胎牛血清Hyclone公司

TRizol试剂Invitrogen公司

RT-PCR试剂盒Thermo公司

小鼠抗人Flag单克隆抗体Abmart公司

小鼠抗人β-actin单克隆抗体北京中杉金桥生物技术有限公司兔抗小鼠二抗北京中杉金桥生物技术有限公司

BCA蛋白定量试剂盒碧云天生物科技有限公司哺乳动物细胞总蛋白抽提试剂 碧云天生物科技有限公司蛋白酶抑制剂购碧云天生物科技有限公司

蛋白印迹实验的ECL显色试剂 北京中杉金桥生物技术有限公司

### 2 主要实验仪器

无菌洁净工作台苏州净化设备有限公司

PCR仪AB2720型美国AB公司

稳压稳流电泳仪DYY-5型北京六一仪器厂

蛋白电泳及转印设备美国Bio-Rad公司

5430R小型高速多功能离心机Eppendorf公司

5810R台式高速大容量低温离心机Eppendorf公司倒置相差荧光显微镜NIKON TE2000-U尼康公司

凝胶成像仪Tanon-2500上海天能科技有限公司

C02培养箱(2300型) shelden公司

日立高性能超速离心机CP100WX Hitachi公司

电热恒温水槽DK-8D上海一恒科学仪器有限公司

## 三 实验步骤

### **1** 包装慢病毒颗粒，并测定滴度

将慢病毒三质粒（重组质粒PLOV. CMV. eGFP.2A.3³Flag＆HBX. EF1a. PuroR或空载质粒与包膜质粒pMD2. G、包装质粒psPAX2）共转染293T细胞以包装慢病毒颗粒，将收获的重组病毒颗粒浓缩纯化并进行滴度测定（此部分本实验室前期工作已经完成）。

### **2** 稳定表达**HBx**的**HepG2**细胞株的构建

#### **2.1** **HepG2**细胞的培养与传代

**2.1.1细胞复苏**

（1）从液氮罐中取出装有HepG2细胞的冻存管，迅速放入37°C水浴箱中并不断搅动，使冻存管中的细胞在1分钟之内融化；

（2）冻存管表面用75%乙醇擦洗消毒，吸出细胞悬液至离心管，再加入约

5ml含10%胎牛血清的DMEM培养液，轻轻混匀；

（3）离心（1000rpm, 5min），弃去上清；

（4）用含10%胎牛血清的DMEM培养液重悬后接种于培养瓶，置于37℃，5%CO2恒温培养箱子培养，第二日换液。

**2.1.2体外培养**

用含10%胎牛血清的DMEM培养液重新悬浮细胞，移入培养瓶中，在37C、5% CO2条件下常规培养3天。

**2.1.3细胞传代**

肝癌细胞为贴壁生长细胞，约3天消化传代一次，按以下步骤操作：

（1）用吸管吸取适量培养液轻轻吹打细胞表面，以去除老化细胞及死亡细胞，然后用吸管吸去培养液，并用无菌PBS液冲洗2次；

（2）加入1.5ml 0.25%的胰蛋白酶消化液，置常温约1min；显微镜下观察，待细胞变圆，细胞间隙增大时，用吸管吸去胰酶。

（3）加入含10%胎牛血清的DMEM培养液终止消化，反复吹打，使细胞吹打均匀；

（4）细胞计数：取10μl细胞悬液与20μl的0.4%台盼蓝染液混合，取其中

10μl加入细胞计数板中，数完4大格后，根据以下公式计算细胞数：每毫升（ml）细胞数＝(4 大格细胞数之和/4) ³104³3；

（5）细胞接种：用完全培养液将已经计数过的细胞悬液的细胞浓度调至1³105/ml，接种于细胞培养瓶中。

（6）将培养瓶置于恒温培养箱子(37℃, 5%CO2)中培养，次日换液。

**2.1.4细胞冻存**

（1）将细胞消化至单细胞悬液，1000 rpm 5min离心，弃上清；

（2）按照90%含FBS的DMEM培养基、10% DMSO比例加入细胞沉淀中，吹打混匀成细胞悬液；

（3）每支无菌冻存管中加入约1ml细胞悬液；

（4）然后将冻存管先放于-70℃24小时，最后放入液氮罐中保存，并做好标记备用。

#### **2.2** 慢病毒颗粒感染**HepG2**细胞

在病毒感染前一天，将HepG2细胞以2³104个每孔的密度接种于含新鲜培养液的24孔细胞培养板中，待HepG2细胞生长融合度达70%-80%时弃旧培养液，并将细胞用灭菌0.01M PBS缓冲液洗涤一次，然后按MOI=20的方式加入相应体积的慢病毒液，同时加入Polybrane至其终浓度为8ug/ml及完全培养基至总量为500μl，置37℃、5%CO2细胞培养箱中静置培养24h，培养24h后换为正常培养基继续培养，培养96小时后倒置相差荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达情况。同时以不含HBX基因的空载病毒颗率为对照。

#### **2.3** 嘌呤霉素筛选稳定表达**HBx**的**HepG2**细胞株

慢病毒颗粒感染HepG2细胞48 h后，用含0.2ug/ml嘌呤霉素的选择培养基筛选阳性克隆，并在荧光显微镜下观察带绿色荧光的抗性细胞克隆形成，筛选至空白对照组HepG2细胞全部死亡后实验组存活的细胞即为阳性克隆，挑取带绿色荧光的抗性阳性克隆扩大培养，并将嘌呤霉素浓度减至0.1ug/ml维持筛选，以获得长期稳定表达HBx的转基因细胞株（HepG2／HBx）。实验设空白对照组（HepG2细胞）与空载对照组（感染空载慢病毒颗粒的HepG2／mock细胞）。将挑取的阳性细胞克隆逐级扩大培养，经过大约10 d建立稳定表达HBx的HepG2 / HBx细胞株。

### **3** 稳定表达**HBx**的**HepG2**细胞株的鉴定

#### **3.1** **RT-PCR**法鉴定稳定表达**HBx**的**HepG2**细胞株

**3.1.1细胞总RNA抽提**

（1）首先取对数生长期的HepG2/HBx、HepG2/mock、HepG2三组细胞，弃去培养基，分别向25CM培养瓶中各加入1ML TRIzol室温放置5min，将裂解物到入新1.5ml EP管中。

（2）向EP管中加入200μl氯仿，盖紧盖子，用力摇15sec，室温下静置5min，然后在4℃，以12000g离心15min。

（3）取上一步离心后的上清转移到另一EP管中，向管中加入500μl异丙醇，上下颠倒混匀5-6次，室温下放置10min，然后4℃，以12000g离心10min。离心

后可见少量白色沉淀于管底。

（4）移弃上一步离心后的上清，向EP管中加入1ml用无核酶水配制的浓度为75％的乙醇，然后4℃，以7500g离心5min。

（5）移弃上一步离心后的上清，见沉淀在空气中干燥5min，向有白色沉淀的

EP管中加入30μl无核酶水溶解，并混匀。

（6）取2μl RNA溶解液于酶标仪上测取样本浓度和纯度。并将获得的RNA保存于-20℃冰箱备用。

**3.1.2 RT反应**

以下反应加样在冰上进行，反应条件为：42℃作用60min，70℃作用5min, RT终溶液即为cDNA溶液，冰浴，备用。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| RT 体系： |  | | |
| 试 剂 |  | 体 积（μl） |  |
| 5³RT 缓冲液 |  | 4.0 |  |
| RNA 酶抑制剂 |  | 1.0 |  |
| 逆转录酶 |  | 1.0 |  |
| dNTP 混合液(10 | mM) | 2.0 |  |
| 20uM 随机引物 |  | 1.0 |  |
| 模板 RNA |  | 2ug |  |

加无核酶水至总体积20

**3.1.3 PCR反应**

引物由上海博尚生物技术有限公司合成。HBX（产物大小465bp）

上游引物：5′ATG CAA GCT TAT GGC TGC TAG GCT GTA CTG3′下游引物：5′TGC GAA TTC TTA GGC AGA GTG AAA AAG TTG3′

β-actin（产物大小600bp）

上游引物：5′GGC ATC GTG ATG GAC TCC G3′下游引物：5′GCT GGA AGG TGG ACA GCG A3′

PCR体系：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 试 剂 |  | 体 积（μl） |
| 10³Buffer |  | 2.5 |
| Mgcl2 |  | 2.5 |
| DNTP MIX(10 | mM) | 1.0 |
| 上游引物 |  | 1.0 |
| 下游引物 |  | 1.0 |
| TaqDNA 酶 |  | 0.5 |
| cDNA |  | 2.0 |
| 无核酶水 |  | 14.5 |
|  | 总体积 |  | 25 |

PCR反应条件：94℃预变性5min，94℃变性45s，61℃退火30s，72℃延伸1min，共30个循环；72℃延伸7min。

**3.1.4 PCR产物电泳**

2％琼脂糖凝胶，取8μl PCR产物在其上进行电泳，电泳缓冲液1³TBE，恒压

100V电泳30min，在紫外灯下观察结果并照相。

#### **3.2** Western **blot**法鉴定稳定表达**HBx**的**HepG2**细胞株

**3.2.1蛋白抽提**

目 录

**[Abbreviations](#_Toc686707256)** 2

[摘 要](#_Toc686707257) 4

**[Abstract](#_Toc686707258)** 5

[前](#_Toc686707259)[言](#_Toc686707259) 5

[第一部分 稳定表达](#_Toc686707260)**[HBx](#_Toc686707260)**[的肝癌细胞株的构建与鉴定](#_Toc686707260) 5

[一 引言](#_Toc686707261) 5

[二 实验材料与实验仪器](#_Toc686707262) 6

[三 实验步骤](#_Toc686707263) 6

[四 实验结果](#_Toc686707264) 12

[五 讨论](#_Toc686707265) 12

**[第二部分 HBx](#_Toc686707266)**[与](#_Toc686707266)**[COXIII](#_Toc686707266)**[在](#_Toc686707266)**[HepG2](#_Toc686707266)**[细胞中共定位及其对线粒体结](#_Toc686707266) 12

[一 引言](#_Toc686707267) 12

[二 实验材料与实验仪器](#_Toc686707268) 12

[三 实验步骤](#_Toc686707269) 13

**[第三部分 HBx](#_Toc686707270)**[通过上调](#_Toc686707270)**[ROS](#_Toc686707270)**[水平增加](#_Toc686707270)**[COX-2](#_Toc686707270)**[的表达促进了](#_Toc686707270)**[HepG2](#_Toc686707270)** 19

[四 实验结果](#_Toc686707271) 22

[五 讨论](#_Toc686707272) 30

**[第四部分 HBx](#_Toc686707273)**[通过上调](#_Toc686707273)**[COX-2](#_Toc686707273)**[水平激活](#_Toc686707273)**[β-catenin](#_Toc686707273)**[信号转导通](#_Toc686707273) 30

[一 引言](#_Toc686707274) 30

[二 实验材料与实验仪器](#_Toc686707275) 30

[四 实验结果](#_Toc686707276) 35

[五 讨论](#_Toc686707277) 41

[结](#_Toc686707278)[论](#_Toc686707278) 41

[参考文献](#_Toc686707279) 41

[参考文献：](#_Toc686707280) 45

①取1.2ml蛋白标准配制液加入到一管蛋白标准(30mg BSA)中，充分溶解后配制成25mg/ml的蛋白标准溶液。配制后可立即使用，也可以-20℃长期保存。

②取适量25mg/ml蛋白标准，稀释至终浓度为0.5mg/ml。例如取20μl

25mg/ml蛋白标准，加入980μl稀释液即可配制成0.5mg/ml蛋白标准。蛋白样品在什么溶液中，标准品也宜用什么溶液稀释。但是为了简便起见，也可以用

0.9%NaCl或PBS稀释标准品。稀释后的0.5mg/ml蛋白标准也可以-20℃长期保存。

③根据样品数量，按50体积BCA试剂A加1体积BCA试剂B(50:1)配制适量BCA工作液，充分混匀。例如5ml BCA试剂A加100μlBCA试剂B，混匀，配制成5.1ml BCA工作液。BCA工作液室温24小时内稳定。

④将标准品按0，1，2，4，8，12，16，20μl加到96孔板的标准品孔中，加标准品稀释液补足到20μl。

⑤加适当体积样品到96孔板的样品孔中，加标准品稀释液到20μl。

⑥各孔加入200μl BCA工作液，37℃放置20-30分钟。

注：也可以室温放置2小时，或60℃放置30分钟。BCA法测定蛋白浓度时，颜色会随着时间的延长不断加深。并且显色反应会因温度升高而加快。如果浓度较低，适合在较高温度孵育，或适当延长孵育时间。

⑦将96孔板置于酶标仪，波长550nm，进行检测。读取根据标准曲线计算出样品的蛋白浓度。

**3.2.2配置蛋白电泳所需溶液**

（1）30%聚丙烯酰胺：14.55g丙烯酰胺，0.45g甲叉双丙烯酰胺，20ml双蒸水，混匀，搅拌后加水定容至50ml，装于棕色瓶中放置4℃冰箱保存备用。

（2）10%过硫酸铵（APS）：0.1g APS，1ml双蒸水，混匀，4℃冰箱保存。

（3）1.5M Tris²HCl(pH8.8)：45.43g Tris²HCl, 200ml双蒸水，使用浓盐酸将pH值调至8.8，最后定容至250ml，室温保存。

（4）1M Tris²HCl(pH6.8)：30.29g Tris²HCl, 200ml双蒸水，最后使用浓盐酸将pH调至6.8，最后定容至250ml，室温保存。

（5）10%SDS: 10g SDS, 200ml双蒸水，50℃水浴溶解，室温保存，使用前需再次水浴溶解混匀。

（6）1M Tris²HCl(pH7.5)：30.29g Tris²HCl, 200ml双蒸水，使用浓盐酸将pH调至7.5，定容至250ml，室温保存。

（7）TBS溶液：1M Tris²HCl(pH7.5) 10ml，8.8g氯化钠，加水至1000ml。

（8）20%Tween: Tween 20ml，加水定容至100ml，混匀，4℃冰箱保存。

（9）TBST溶液：100ml的TBS溶液，238μl的20%Tween，现配现用。

（10）5³电泳液：15g Tris²HCl; 72g甘氨酸；5g SDS；加双蒸水定容至

1000ml，4℃冰箱保存备用，在使用时稀释5倍。

（11）配制1³转移缓冲液：15.14g的Tris碱，72.07g的甘氨酸，甲醇1L，加水定容至5L。

（12）5%脱脂奶粉：0.5g的脱脂奶粉，10ml的1³TBST。

**3.2.3配置分离胶和积层胶**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 分离胶（两块胶 10ml） | 10％ | 12% |
| ddH2O | 5.385ml | 4.2ml |
| 40％Acr/Bic(37.5: 1) | 3.195ml | 3 ml |
| 1.5Mol/L Tris²HCl(pH8.8) | 2.94ml | 2.6ml |
| 10％SDS | 114 μl | 100μl |
| 10%APS | 114 μl | 100μl |
| TEMED | 5.1 μl | 4 μl |

（混合，灌胶前加入APS和TEMED）

用1ml枪头将其加入已卡好的两块玻板中用枪头将配制好的溶液缓慢加入到装配好的板中至凝胶高度为6cm左右，液面加到实线下方0.5cm处。观察一会分离胶液面没有下降，证明无漏后，在其上加入无水乙醇，盖至玻板交界处，清除气泡，室温下放置30min左右至聚合完全。分离胶凝固后（有明显的分界线），倒出无水乙醇，用双蒸水冲洗2次，滤纸吸干。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 5％浓缩胶（两块胶） | 4ml | 5ml |
| ddH2O | 2.884ml | 3.605ml |
| 40％Acr/Bic | 0.512ml | 0.64ml |
| 1.5Mol/L Tris²HCl(pH6.8) | 0.520ml | 0.65ml |
| 10％SDS | 40μl | 50μl |
| 10%APS | 40μl | 50μl |
| TEMED | 4 μl | 5 μl |

（混合，灌胶前加入APS和TEMED）

如上配制浓缩胶，用1ml枪头加入浓缩胶（不能有气泡），插入梳子（注意光面，毛面），垂直进入，不能有气泡，放置50min后，可看到分离胶，浓缩胶清晰分界线，晃动支架，平面无改变，说明已凝固。移液枪将浓缩胶加入板中至顶端，小

心插入梳子，注意不要产生气泡，凝胶聚合30min左右。

**3.2.4样品准备**

（1）配制5³上样缓冲液：1mmol/L Tris-HCl(pH6.8) 0.6mL, 10%SDS 2ml，

50%甘油5ml，2-巯基乙醇0.5ml，1%溴酚兰1ml, ddH2O 0.9ml，总体积10ml，保存于4℃备用。

（2）配制1X上样缓冲液的样品液：如21μl蛋白样品加入6μl 5³上样缓冲液，每孔配制含20ug总蛋白量的样品液，煮沸10min变性后上样。

**3.2.5电泳**

利用Bio-Rad电泳装置电泳，加入电泳缓冲液，拔去梳子，并将准备好的样品液和蛋白Marker分别加入上样孔中，样品首先在30V恒压下电泳10min，然后

80V恒压下电泳至染料接近两胶分界线处，最后120V恒压下电泳2h左右至溴酚蓝刚出胶底部，即可终止电泳，以上整个电泳过程在4℃进行。

**3.2.6蛋白质的转移**

（1）切胶、转膜：电泳完毕后，取出凝胶，对照Marker条带将有目的条带的凝胶切下，量取凝胶的长、宽，按照量取的长、宽大小剪取滤纸膜（滤纸上下各四层）。

（2）将Bio-Rad蛋白转移装置夹板准备好，凝胶使用1x转移缓冲液稍微清洗，用1x转移缓冲液吸水纸、滤纸（比凝胶稍微大一些）预湿，并按如下顺序排列装配于转移装置上：阴板→4层滤纸→凝胶→NC膜→4层滤纸→阳极，并赶走气泡。

（3）最后在4℃，300mA恒定电流下，转移90min。

**3.2.7洗膜**

（1）准备两个玻璃平皿，一个装TBST，一个装丽春红。

（2）分离出NC膜：首先将NC膜放入TBST中清洗下，再将NC膜拿起来甩几下后，放入盛有丽春红的玻璃平皿中染色，看看有无条带，条带是否清晰，剪并标记a、a’、b’、b’四条带。再使用TBST清洗，直至NC膜完全脱色。（用TBS-T洗去膜上的SDS，防止影响后面的抗体结合）。

**3.2.8膜的封闭与抗体孵育**

（1）将NC膜放入含5%脱脂奶粉的TBST液中封闭2.5h，之后用TBST洗3次，

每次洗5min。

（2）然后将NC膜置入鼠抗人Flag单克隆抗体（1:1000）中4℃过液，TBST洗NC膜3次，每次洗15min。

（3）将与一抗结合并清洗后的NC膜放入HRP二抗（1:2000）中杂交，并在室温孵育膜1h, TBST洗膜3次，每次洗10min。

**3.2.9 ECL显色**

（1）将ECL化学发光试剂盒中的A液和B液试剂按等比例混合为即为反应液。

（2）将NC膜放置于反应液中，在室温下孵育1-5min。

（3）孵育后去除反应液，将NC膜夹在两块塑料薄膜之间，在暗室，以X光胶片曝光。

（4）暗室中取出胶片，显影液中作用20sec，定影液中作用5sec。

（5）最后将图片扫描保存。

## 四 实验结果

### **1** 倒置荧光显微镜观察**HepG2 / HBx**细胞株**eGFP**的表达情况

重组慢病毒载体携带有eGFP的基因，能表达eGFP蛋白，在荧光显微镜下可以观察到绿色荧光。将重组慢病毒和对照空载病毒分别感染HepG2细胞，经过嘌呤霉素10天的筛选，并挑取带eGFP蛋白的阳性克隆扩大培养，分别命名为HepG2

／HBx和HepG2/mock，荧光显微镜下观察各组细胞eGFP表达情况，图1。



图1倒置荧光显微镜下观察三组细胞eGFP表达情况(³200)。左边为白光下观察，右边为荧光下观察。HBx: HepG2/HBx细胞；Mock: HepG2/mock细胞；Control：

HepG2细胞

### **2** **RT-PCR**法检测**HepG2/HBx**细胞株表达**HBX**基因情况

各组细胞中HBX基因mRNA表达情况如图2所示，仅有HepG2/HBx细胞有HBX基因mRNA表达，大小约465bp，而感染空载病毒的细胞与对照组细胞不表达。



图 2 RT-PCR检测各组细胞HBX mRNA表达情况。HBx：HepG2/HBx细胞; Mock：

HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

### **3** **Western blot**法检测**HepG2/HBx**细胞株表达**HBx**蛋白情况

各组细胞中HBx蛋白表达情况如图3所示，仅有HepG2/HBx细胞有HBx蛋白表达，条带约17 kDa，并且经过传代30代以上，HepG2/HBx细胞仍有目的基因的表达（结果为列出）。而感染空载病毒的细胞与对照组细胞不表达HBx蛋白。



图3 Western blot法检测各组细胞HBx蛋白表达情况。HBx: HepG2/HBx细胞;

Mock: HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

## 五 讨论

为进一步探索HBx蛋白与HCC发生和转归的关系，且能更好地模拟乙肝病毒慢性感染过程，有必要建立稳定表达HBx的HCC细胞模型。乙肝病毒感染是个慢性过程，随着分子生物学的发展，应用基因转导的技术在肝癌细胞稳定表达HBx是研究HBx生物学功能与病理机制的重要手段，更符合HBV感染的病理生理过程。而在把目的基因导入靶细胞过程中，载体起着关键作用。目前研究HBx功能的载体主要有非病毒载体哺乳乳动物载体pSI-NES-X、真核载体peDNA-3．1(+)／v5-hisB-HBx，以及病毒载体包括慢病毒载体和腺病毒载体AdGFP-HBx等[43-46]。而非病毒载体存在转染效率低、表达时间短、可能改变宿主细胞遗传性状及保存不稳定性等问题[47]，腺病毒载体腺病毒是双链DNA, 基因组游离于宿主基因组外，也较难获得稳定表达的细胞株，且因会出现一些免疫应答反应而具有缺陷性[48]。慢病毒载体可将目的基因整合至靶细胞基因组中，从而实现长期稳定地表达，具有转染非分裂细胞、装载外源性目的基因片段大、免疫反应小等特点[41, 42]。

本研究选用慢病毒系统成功构建了稳定表达HBx的HepG2细胞株，RT-PCR和Western-blot分析结果显示HepG2／HBx细胞能够持续稳定表达HBx基因。荧光显微镜下HepG2／HBx细胞绿色荧光蛋白表达率95%以上，经过反复传代，HBx始终保持着较高的表达水平。为后续研究HBx在HCC发生发展过程中的致病机制提供一个细胞模型。

# **第二部分 HBx**与**COXIII**在**HepG2**细胞中共定位及其对线粒体结

**构与功能的影响**

## 一 引言

HBx发挥不同的生物学功能取决于它在细胞中的不同定位，绝大部分的HBx存在于细胞浆中，只有少量存在于细胞核中，而胞浆中有一部分HBx定位于线粒体，影响线粒体的生理、代谢及其它相关功能[17, 18]。在2000年至2005年期间，课题申请人和课题组成员在利用酵母双杂合体系筛选乙型肝炎病毒X结合蛋白的前期工作中发现编码线粒体内膜呼吸链复合物细胞色素C氧化酶Ⅲ

（cytochrome c oxidase subunit III, COXIII）的克隆在肝细胞内同HBx相结合，并通过假阳性筛除实验，离体实验和免疫共沉淀印迹实验多次验证了COXⅢ与HBx的特异性结合作用，有充分实验数据支持筛选到的COXⅢ为一个新发现的

HBx体内结合蛋白[23, 24]。这一个新发现指引课题组将研究深入到HBx作用的最基础起始点——体内结合蛋白COXIII。

细胞色素C氧化酶(COX或复合物IV)是线粒体呼吸电子传递链的终端酶，由3个线粒体DNA编码的亚基（COXI、COXII、COXIII）和10个核DNA编码的亚基组成。它接受来自4个细胞色素c的4个电子，传递到一个氧分子上，将氧气转化为两个水分子。在这一进程中，它结合来自基质内的4质子来制造水分子，同时跨膜转运4个质子，正是这种质子传递（proton pump）功能形成了跨膜的质子电化学势能差（ΔΨm），而这一势能差可以被三磷酸腺苷合酶用于制造生物体中最基本的能量分子ATP[25, 26]. COXIII是复合物IV（即COX）的主要组成亚单位，是调节COX的装配以及酶活性的重要亚基[30]，COX的生物合成功能是线粒体生物合成功能的一个关键组成部分[27] 。

本部分试验中，我们应用激光共聚焦显微镜观察COXⅢ和HBx蛋白在HepG2细胞中共定位；用RT-PCR检测HepG2/HBx、HepG2/mock、HepG2三组细胞内COXⅢmRNA水平表达变化；以Western blot检测三组细胞线粒体内COXⅢ蛋白水平表达的改变；并通过比色法测定细胞色素C氧化酶（Cytochrome C oxidase, COX）活性改变、流式细胞仪检测线粒体膜电位（ΔΨm）改变、透射电镜观察HepG2/HBx细胞

内线粒体超微结构的变化、进一步探讨HBx与COXIII共定位后对线粒体结构和功能的影响。

## 二 实验材料与实验仪器

### **1** 主要实验材料

TRIzol试剂盒Invitrogen公司

RT-PCR试剂盒Thermo公司

线粒体抽提试剂盒Piecer公司

线粒体膜电位检测试剂盒TMRM Immunochemistry公司

细胞色素 C 氧化酶活性测定试剂盒 上海杰美基因医药科技有限公司 ft羊抗人 COXⅢ多克隆抗体 SantaCruz 公司

小鼠抗人FLAG单克隆抗体Abmart公司

驴抗小鼠CFTM488荧光二抗Sigma公司

驴抗ft羊CFTM350荧光二抗Sigma公司

线粒体染料MitoTrackerRed Molecular Probes公司

抗荧光淬灭碧云天生物科技有限公司

小鼠抗人β-actin 单克隆抗体 北京中杉金桥生物技术有限公司马抗ft羊二抗 北京中杉金桥生物技术有限公司

兔抗小鼠二抗北京中杉金桥生物技术有限公司

蛋白印迹ECL显色试剂购北京中杉金桥生物技术有限公司

### **2** 主要实验仪器

无菌洁净工作台苏州净化设备有限公司

PCR 仪 AB2720 型 美国 AB 公司

稳压稳流电泳仪DYY-5型北京六一仪器厂

CO2培养箱(2300型)美国shelden公司

荧光倒置显微镜TE-20000U日本尼康

低温高速台式离心机5810R德国Eppendorf公司

凝胶成像系统IS2000-200美国Alpha公司

蛋白电泳及转印设备美国Bio-Rad公司

激光共聚焦显微镜(Leica-SP5)德国Leica公司

流式细胞仪C6美国BD公司

EM208型透射电镜PHILIPS公司

酶标仪美国Bio-Rad公司

## 三 实验步骤

### **1** 激光共聚焦显微镜观察**COX**Ⅲ和**HBx**蛋白在**HepG2**细胞中共定位

#### **1.1** 线粒体染料的配置

将40ug MitoTracker Red粉剂从冰箱取出避光并放置到室温，然后离心，向瓶中加入470.35μl的DMSO配制成200umol/L的储存液并分装保存于-20℃冰箱备用，最终工作浓度为150nmol/L。

#### **1.2** 间接免疫荧光染色

（1）将细胞按1³104个每孔接种于放置了盖玻片的六孔板中，继续培养48h，待细胞接近60%-70%左右融合生长即可取出培养板，弃旧培养基，加入预温到37℃含有MitoTracker Red的培养基，在培养箱中避光孵育30min。

以下操作均避光下进行：

（2）线粒体染色后用0.01M PBS洗3次，每次5min。

（3）细胞固定：用-20℃预冷的100％甲醇固定细胞15min, 0.01M PBS洗3次，每次5min. (100%甲醇固定细胞后，能使细胞自带绿色荧光蛋白变性而使荧光猝灭[49]，故我们选用甲醇为固定剂以消除自带绿色荧光的影响。本实验中发现100%

甲醇固定细胞15分钟后细胞自带绿色荧光消失，与文献相符。）

（4）抗原封闭：用10％驴血清封闭玻片，37℃孵育45min，孵育后不要洗。

（5）加一抗：孵育后向玻片加入用封闭液稀释的一抗（1:100小鼠抗人Flag，1:25 ft羊抗人COXⅢ），4℃过夜。

（6）第二日取出，37℃复温45min, 0.01M PBS洗3次，每次5min。

（7）加二抗：加入用0.01M PBS稀释的荧光二抗（1:200驴抗小鼠CF488，

1:100驴抗ft羊CF350），37℃，孵育1h；然后室温0.01M PBS洗3次，每次5min。

（8）封片：用抗荧光淬灭剂封片。并在Leica SP5激光共聚焦显微镜下观察分析染色结果。

### **2** **RT-PCR**检测三组细胞内**COX**Ⅲ**mRNA**水平表达变化

#### **2.1** **RT**反应

分别抽提对数生长期的目的基因组HepG2/HBx、空载对照组HepG2/mock、空白对照组HepG2三组细胞总的RNA，逆转录为cDNA（实验方法同第一部分）。

#### **2.2** **PCR**反应

以2μl逆转录产物cDNA作为扩增模板，并以β-actin为内参扩增COXIII基因片段，引物由上海博尚生物技术有限公司合成，序列如下：

COXIII（产物大小463bp）

上游引物：5’AGC CCA TGA CCC CTA ACA 3'

下游引物：5’CCT CAT AGT TAG TGG ACT CG 3'

β-actin（产物大小600bp）

上游引物：5′GGC ATC GTG ATG GAC TCC G 3′下游引物：5′GCT GGA AGG TGG ACA GCG A 3′

PCR体系：

试 剂 体 积（μl）

10³Buffer 2.5

Mgcl2 2.5

DNTP MIX(10 mM) 1.0

上游引物 1.0

下游引物 1.0

TaqDNA 酶 0.5

cDNA 2.0

无核酶水 14.5

总体积 25

PCR反应条件：94℃预变性5min，94℃变性45s，58℃退火30s，72℃延伸1min，共30个循环；72℃延伸7min。

#### **2.3** 产物电泳

将扩增产物在1.8％的琼脂糖凝胶中电泳，观察结果并拍照。

#### **2.4** 结果分析

RT-PCR凝胶电泳图片采用Image J图像分析软件进行扫描分析，获得灰度值

数据，经过内参照β-actin条带灰度进行校正，校正灰度值以mean±SD表示。

### **3** **Western blot**检测三组细胞内**COX**Ⅲ蛋白水平表达变化

#### **3.1** 线粒体抽提

收集对数生长期目的基因组HepG2/HBx、空载对照组HepG2/mock、空白对照组HepG2三组细胞，严格按Piecer公司线粒体抽提试剂盒说明书步骤操作，具体步骤如下：

（1）开始实验之前加蛋白酶抑制剂分别至将使用的试剂A和C中。

（2）分别消化离心收集对数期细胞约2³107个，以4℃预冷的0.01M PBS洗涤2次。

（3）加入800μl的试剂A，并充分混匀，中速涡璇5sec，冰上冰浴2min。

（4）加入10μl的试剂B，并充分混匀，中速涡璇5sec，冰上冰浴5min，其中每间隔1min高速涡旋1次。

（5）加入800μl的试剂C，并颠倒混匀，4℃条件下，以700g离心10min。

（6）收集离心上清液，4℃条件下，以3000g离心15min。

（7）收集离心上清液，即为胞浆蛋白。

（8）沉淀中加入500μl的试剂C，4℃条件下，以12000g离心5min，弃去上清，沉淀即为细胞线粒体，置冰上保存备用。

#### **3.2** **Western blot**

（1）装配好板后，按照前述方法（第一部分）先后制备10％分离胶和5％积层胶；

（2）在获得的线粒体沉淀中加入l³酶稀释缓冲液30μl，制成样品溶液，

BCA法对蛋白质定量、配平，先煮沸变性然后进行10％SDS-PAGE电泳和蛋白印迹（方法同第一部分）。

（3）用含有50g/L脱脂奶粉的TBS-T溶液封闭NC膜1 h，然后将含有相应条带的NC膜分别与ft羊抗人COXIII多克隆抗体(1: 200)及鼠抗人β-actin单克隆抗体(1: 1000)在4℃条件下孵育过夜，孵育后用TBST洗涤3次每次15min，洗涤后分别再与马抗ft羊二抗(1: 2000)和兔抗小鼠二抗(1: 2500)作用1h。

（4）经ECL显影，western blot图片采用Image J图像分析软件进行扫描分析，获得灰度值数据，经过内参照β-actin条带灰度进行校正，校正灰度值以mean

±SD表示。

### **4** 比色法测定各组细胞**COX**酶的活性

#### **4.1** 实验原理

GENMED纯化线粒体COX活性测定试剂是一种旨在通过COX反应系统中还原性细胞色素C(Cytochrome C)氧化后吸光峰值的降低，即采用比色法测定样品中酶活性的权威而经典的技术方法。COX存在于真核生物的细胞线粒体上，主要通过氧化磷酸化为细胞提供能量。作为线粒体功能的生物标记，通过线粒体膜上的酶活性变化，来衡量线粒体外膜的完整性；基于还原型Cytochrome C转化为氧化型Cytochrome C的变化（550nm波长），来测定COX的活性。COX反应系统为：

4 cytochrome C2+ + 8H+ + O2- ---------- 4cytochrome C3+ + 2H2O + 4H+还原型（高吸收峰）COX氧化型（低吸收峰）

#### **4.2** 实验步骤

**4.2.1背景对照**

（1）移取160μl的ReagentA（缓冲液）到新的96孔板；

（2）加入20μl的ReagentC（稀释液）；

（3）枪头吹打数次，混匀；

（4）室温下孵育3min；

（5）放入酶标仪，置零；

（6）取出96孔板，加入20μl含有ReagentB（反应液）和ReagentD（稳定液）的反应工作液，混匀；

（7）即刻放入酶标仪检测550nm波长吸光值，此为背景空对照读数（0秒读数-60秒读数），正常读数差值为0.001至0.005；

**4.2.2样品检测**

（1）取对数生长期目的基因组HepG2/HBx、空载对照组HepG2/mock、空白对照组HepG2三组细胞，消化离心收集细胞约1³l07/L，分离线粒体并定量（方法同上述）。

（2）移取160μl的ReagentA（缓冲液）加入到96孔板中；

（3）加入20μl的待测样品（总量2微克线粒体蛋白）；

（4）用枪头轻柔吹打数次，混匀；

（5）室温下孵育3分钟；

（6）取出96孔板，加入20μl含有ReagentB（反应液）和ReagentD（稳定液）的反应工作液，混匀（限定在3秒之内）；

（7）即刻放酶标仪中检测550nm波长吸光值，此为样品读数（0秒读数-60秒读数），通常活性读数差值为正值；

（8）根据550nm波长吸光值变化计算细胞色素c氧化酶活性，具体公式如下：

{（样品读数—背景读数）³0.2（体系容量：毫升）³样品稀释倍数}

{0.02（样品容量：毫升）³21.84（毫摩尔吸光系数）³1（反应时间：（分钟）}

=微摩尔细胞色素C/分钟

unit定义：lunit为pH 7.0，25℃条件下，每分钟可氧化1 MmoL细胞色素C所需的酶的量。

### **5** 流式细胞仪检测三组细胞线粒体跨膜电位

#### **5.1** 实验原理

线粒体膜电位（ΔΨm）的存在，使亲脂性阳离子荧光染料四甲基罗丹明甲酯

（TMRM）可结合到线粒体基质，其荧光的增强或减弱说明线粒体内膜电负性的增高或降低。TMRM是一种源于Rhodamine家族用来检测线粒体膜电位的红色荧光探针。

#### **5.2** 实验步骤

分别消化离心收集对数生长期目的基因组HepG2/HBx、空载对照组

HepG2/mock、空白对照组HepG2三组细胞各1³106个，按照试剂说明书重悬细胞于0.5mL的无血清DMEM培养液中，并加入等体积的TMRM染色工作液使TMRM最终工作浓度为100 nmol/L，颠倒数次混匀，37℃、5%CO2培养箱内避光孵育20min，孵育后以600g、4℃离心3min，离心后以TMRM染色缓冲液洗涤2次，以去除残余的TMRM，洗涤后以0.01M PBS重悬细胞，用流式细胞仪以激发波长480nm，发射波长590nm检测细胞平均荧光强度，以反映ΔΨm的变化。

### **6** 透射电镜观察三组细胞线粒体超微结构

（1）取材：收集对数生长期目的基因组HepG2/HBx、空载对照组HepG2/mock、空白对照组HepG2三组细胞，消化离心收集细胞约1³l06/L。

（2）前固定：3%戊二醛-1.5%多聚甲醛-0.1M PBS (pH7.2) 4℃固定数天（2d

以上）；

（3）漂洗: 0.1M PBS漂洗3次；

（4）后固定：1%锇酸-1.5%亚铁氰化钾4℃1.5h；

（5）漂洗: 0.1M PBS漂洗3次。

（6）脱水：50%酒精10min→70%酒精饱和醋酸铀染液4℃过夜→90%酒精10min

→90%酒精-丙酮10min→90%丙酮10min→无水丙酮10min³3次。

（7）浸透：无水丙酮+环氧树脂618包埋剂（1:1）1.5 h；纯618包埋剂35℃3 h；

（8）包埋、聚合：35℃12 h，45℃12 h，60℃3d。

（9）修快，半薄切片，定位

（10）切片、染色：Leica UC-6型超薄切片机切100nm的超薄切片；经醋酸铀、柠檬酸铅分别染色5-15 min，并蒸馏水水洗。在PHILIPS EM208型透射电镜下观察并摄片。

### **7** 统计学分析结果

各实验结果以mean±SD表示。采用SPSS11.5软件，各组比较采用单因素ANOVA检验，以P <0.05作为具有显著性差异。

**四实验结果**

### **1** **COX**Ⅲ和**HBx**蛋白在**HepG2**细胞中共定位

我们观察到在激光共聚焦显微镜下HBx蛋白在HepG2/HBx细胞胞核和胞质中均有表达，呈绿色；COXIII蛋白在胞质中表达，呈蓝色；线粒体染色呈红色；三者重合在一起呈粉色（图1）。这说明HBx可定位于线粒体内膜呼吸链，与COXIII相互作用。由此阐明HBx与COXIII能够在线粒体中共定位。



图1 激光共聚焦显微镜观察HBx与COXIII共定位(³800) A: HepG2/HBx细胞; B：HepG2细胞

### **2** **HBx**对**HepG2**细胞内**COX**Ⅲ**mRNA**表达的影响

三组细胞COXⅢmRNA表达情况如图2所示，COXⅢmRNA/β-actin mRNA的相对灰度比值如表1所示，统计学分析提示三组细胞间COXⅢmRNA表达水平无明显差异(P> 0.05)，如图3所示。



图2 三组细胞COXIII mRNA的表达水平。1和2、3与4、5与6分别代表HepG2、

HepG2/mock、HepG2/HBx

表 1 三组细胞COXⅢ/β-actin mRNA相对灰度比值（n=3）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 别 | 第一次 | 第二次 | 第三次 | X  s |
| HepG2 | 1.3718 | 2.8508 | 1.3954 | 1.8726±0.8472 |
| HepG2/mock | 2.7093 | 2.2654 | 1.3571 | 2.1106±0.6892 |
| HepG2/HBx | 1.9218 | 2.6007 | 2.0174 | 2.1800±0.3675 |



图3 三组细胞COXIII mRNA的表达水平（P> 0.05），HBx：HepG2/HBx细胞; Mock：

HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

### **3** **HBx**上调**HepG2/HBx**细胞**COX**Ⅲ蛋白的表达

三组细胞COXⅢ蛋白表达情况如图4所示，COXⅢ/β-actin蛋白的相对灰度比值如表2所示，统计学分析提示HepG2/HBx细胞组中COXⅢ蛋白表达水平高于HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组，差异具有统计学意义(P<0.05)，如图5所示。结果表明HBx可以上调HepG2/HBx细胞的COXIII蛋白表达水平（转录后水平）。



图4 三组细胞COXIII蛋白的表达水平，HBx：HepG2/HBx细胞; Mock：

HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

表 2 三组细胞COXⅢ/β-actin蛋白相对灰度比值（n=3）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 别 | 第一次 | 第二次 | 第三次 | X  s |
| HepG2 | 0.4305 | 0.4195 | 0.4174 | 0.4225±0.0071 |
| HepG2/mock | 0.3491 | 0.4947 | 0.5292 | 0.4577±0.0956 |
| HepG2/HBx | 0.5740 | 0.7378 | 0.6396 | 0.6504±0.0824 |



图5 三组细胞COXIII蛋白的表达水平（\*，P<0.05），HBx：HepG2/HBx细胞;

Mock: HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

### **4** **HBx**上调**HepG2/HBx**细胞的**COX**酶活性

三组细胞COX酶活性检测结果如表3所示，经过统计学分析，结果表明

HepG2/HBx细胞组中COX酶活性较HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组升高（图6），差异具有统计学意义(P<0.05)。该部分实验表明HBx增加HepG2/HBx细胞的COX酶活性。

表 3 三组细胞COX酶活性(unit／ml）（n=3）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 别 | 第一次 | 第二次 | 第三次 | X  s |
| HepG2 | 10.30 | 11.45 | 16.00 | 12.5833±3.0143 |
| HepG2/mock | 11.45 | 20.49 | 13.74 | 15.2267±4.6998 |
| HepG2/HBx | 57.23 | 34.30 | 41.20 | 44.2433±11.7640 |



图6 三组细胞COX酶活性水平（\*，P<0.05），HBx：HepG2/HBx细胞; Mock：

HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

### **5** **HBx**上调**HepG2/HBx**细胞的跨膜电位

流式细胞仪检测三组细胞跨膜电位结果如图7所示，各组数值如表4所示，流式细胞仪采集的TMRM染色的荧光信号强弱代表线粒体跨膜电位的高低。经过统计学分析结果表明HepG2/HBx细胞组中线粒体跨膜电位较HepG2/mock细胞组与

HepG2细胞组升高（图8），差异具有统计学意义(P<0.05)。该部分实验表明HBx可以上调HepG2/HBx细胞的线粒体跨膜电位。



图7 流式细胞仪检测三组细胞线粒体跨膜电位水平，HBx：HepG2/HBx细胞;

Mock: HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

表 4 三组细胞TMRM染色平均荧光强度值（n=3）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 别 | 第一次 | 第二次 | 第三次 | X  s |
| HepG2 | 9753.57 | 9571.02 | 10497.10 | 9940.5633±490.5415 |
| HepG2/mock | 9551.51 | 9421.24 | 10264.61 | 9745.7867±454.0108 |
| HepG2/HBx | 39418.59 | 38707.96 | 36971.69 | 38366.08±1258.7658 |



图8 三组细胞线粒体跨膜电位水平（\*，P<0.05），HBx：HepG2/HBx细胞; Mock：

HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

### **6** 透射电镜观察三组细胞线粒体超微结构的改变

三组细胞在透射电镜下的观察结果如图9所示，与HepG2/mock细胞组与

HepG2细胞组相比，HepG2/HBx细胞组仅表现出线粒体稍肿胀，没有观察到线粒体核周聚集现象。



图9电镜下观察三组细胞线粒体超微结构，HBx: HepG2/HBx细胞；Mock：

HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

**五讨论**

肝细胞癌（HCC）是最常见的恶性肿瘤之一，死亡率位于世界第四，慢性乙型肝炎病毒（hepatitis B virus, HBV）感染是肝细胞癌的主要致病因素[50]。HBV编码的X蛋白（Hepatitis B virus X protein, HBx）与宿主因素之间相互作用促进了HBV相关的肝细胞癌的发生和发展[51]。HBx含有154个氨基酸，分子量大小约为17kD，它是一种多功能的调节器，能调节转录、信号转导通路、细胞周期进程、DNA修复、细胞凋亡、蛋白质的降解途径，并通过与宿主因素相互作用调节遗传稳定性[52]。

绝大部分的HBx存在于细胞浆中，只有少量存在于细胞核中，而胞浆中有一部分HBx定位于线粒体，影响线粒体的生理、代谢及其它相关功能[17, 18]。线粒体不仅能够通过氧化磷酸化为细胞提供能量，还能调控胞质Ca2+水平[19]、产生及释放活性氧（ROS）调节细胞氧化还原状态[20]、调控细胞凋亡以及信号转导通路[21]、通过结构和动力学的重塑维持生命和死亡之间的微妙平衡[22]。基于线粒体在生命过程中担任如此重要的角色，研究者们对HBx定位于线粒体后的致癌机制逐渐展开了研究，发现HBx能定位于线粒体外膜电压依赖性阴离子选择性孔道3（VDAC3）改变其跨膜电位[53]；HBx能促使线粒体在核周聚集[54]、能改变线粒体生理和功能状态[34]、能引起胞浆钙超载[55]而引发细胞凋亡；另外，HBx能调控线粒体的钙摄取水平促进细胞增殖与HBV的复制[56]，HBx还能破坏线粒体的动力学诱导线粒体裂变和自噬抑制细胞凋亡[57]。而本实验室前期工作中通过酵母双杂交、离体实验和免疫共沉淀印迹实验筛选到一个新发现的HBx体内结合蛋白——线粒体内膜呼吸链上COXⅢ蛋白[23, 24]。本部分实验通过间接荧光染色与激光共聚焦显微镜进一步证实了HBx蛋白与COXIII蛋白在线粒体中共定位（图1）。

线粒体呼吸链位于线粒体内膜上，由5个复合物组成，分别为：NADH（也称为复合物I）、琥珀酸氧化还原酶（也称为复合物II）、细胞色素C氧化还原酶（复合物III）、细胞色素C还原酶（也称为复合物IV）和ATP合成酶（也称为复合物V）。COXIII是复合物IV（即COX）的主要组成亚单位，是调节COX的装配以及酶活性的重要亚基[30]，也是组成COX质子通路的最主要组成部分，缺乏COXIII

的COX无法进行质子传递[31]。COX的生物合成功能是线粒体生物合成功能的一个关键组成部分[27]，它功能的上调将为细胞提供更多的能量而促进细胞增殖，与癌症密切相关[28, 29]。在本部分实验中，我们发现了HBx与COXIII在HepG2细胞共定位后，在转录后水平调节COXIII，即上调COXIII蛋白表达水平，而COXIII mRNA水平不改变。与此同时，HBx增加了HepG2细胞COX酶活性，意味着它将为细胞提供更多的能量用于细胞的生长、分化、转录、信号转导[28, 58]。随后我们发现在

HepG2/HBx细胞中，线粒体的膜电位升高了，电镜下观察其线粒体稍肿胀，这些结果说明了HBx与COXIII在HepG2细胞线粒体中共定位后，影响其结构与功能，进一步引起肝癌的发生、发展。

# **第三部分 HBx**通过上调**ROS**水平增加**COX-2**的表达促进了**HepG2**

**细胞的增殖**

**一引言**

结合临床循证医学证据，HBV感染后肝细胞发生炎症性改变最后导致肝癌发生需要数年至数十年的时间，这让研究者们想到HBx导致肝癌的机制可能不像其他的致癌基因那么强烈，更有可能是改变了肝细胞内部环境，导致慢性炎性损伤和死亡，给各种癌基因提供了激活的背景，而炎症反应与氧化应激起着至关重要的作用[1, 59]。

线粒体是调节凋亡、细胞能量代谢以及信号转导通路的关键细胞器，也是HBx诱导产生的ROS的关键部位[34]。HBx作用于线粒体增加了ROS的水平引起氧化应激，从而使肝癌细胞上调炎症介质环氧合酶2（COX-2）的水平产生炎症反应[33]、导致肝癌细胞处于对促凋亡信号的敏感状态[34]、令HBx转基因鼠因PTEN/Akt通路失调而激活致癌作用[35]。ROS是诱变剂和细胞有丝分裂原，它能上调促炎症基因的表达，增强纤维化的形成，在癌症发展中起着直接作用[36, 37]。COX-2是炎症反应的关键介质，它能通过刺激细胞增殖、血管形成、侵袭能力、抑制凋亡与免疫反应来促进肝癌细胞的增殖[60, 61]。

本部分实验将通过流式细胞仪测定HepG2/HBx细胞内活性氧簇(Reactive Oxygen Species, ROS)水平、RT-PCR与Western blot测定COX-2的mRNA与蛋白表达水平、CCK-8实验观察细胞的增殖水平、克隆形成实验观察细胞克隆形成能力。然后加入ROS抑制剂（NAC）观察COX-2蛋白表达水平的改变，从而探索ROS与COX-2的关系；接着加入COX-2抑制剂（NS-398）观察细胞增殖能力的改变，从而探讨COX-2与肝癌细胞增殖的关系。

**二实验材料与实验仪器**

### **1** 主要实验材料

ROS荧光探针-DHE北京威格拉斯生物技术有限公司

HepG2/HBx细胞第一部分构建好的

嘌呤霉素 Sigma 公司

DMEM培养基Hyclone公司

胰蛋白酶Invitrogen公司

胎牛血清Hyclone公司

TRizol试剂Invitrogen公司

RT-PCR试剂盒Thermo公司

100bp DNA Ladder加拿大Fermentas公司

CCK-8日本DOJINDO

N-acetylcysteine (NAC) Sigma 公司 NS-398 上海碧云天公司

兔抗COX-2单克隆抗体美国Abcam公司

小鼠抗兔二抗 北京中杉金桥生物技术有限公司小鼠抗人β-actin 单克隆抗体 北京中杉金桥生物技术有限公司兔抗小鼠二抗 北京中杉金桥生物技术有限公司

抗体稀释液上海碧云天公司

BCA 蛋白定量试剂盒 碧云天生物科技有限公司哺乳动物细胞总蛋白抽提试剂 碧云天生物科技有限公司蛋白酶抑制剂购 碧云天生物科技有限公司

蛋白印迹实验的 ECL 显色试剂 北京中杉金桥生物技术有限公司

### **2** 主要实验仪器

无菌洁净工作台苏州净化设备有限公司

PCR 仪 AB2720 型 美国 AB 公司

稳压稳流电泳仪DYY-5型北京六一仪器厂

蛋白电泳及转印设备美国Bio-Rad公司

5430R小型高速多功能离心机Eppendorf公司

5810R 台式高速大容量低温离心机 Eppendorf 公司倒置相差荧光显微镜 NIKON TE2000-U 尼康公司

倒置显微镜（CK2型）日本Olympus公司

凝胶成像仪Tanon-2500上海天能科技有限公司

C02培养箱(2300型) shelden公司

日立高性能超速离心机CP100WX Hitachi公司

电热恒温水槽DK-8D上海一恒科学仪器有限公司

超低温冰箱（MDF-283E型）日本三洋公司

微量移液枪Eppendorf公司

AL104型电子称英国Mettler toledo公司

干燥箱UH-686-101A上海实验仪器有限公司Lab Shaker恒温摇床/振荡器（THZ-031）上海博彩生物技术有限公司**三实验步骤**

### **1** 流式细胞仪检测三组细胞内**ROS**水平

#### **1.1** 实验原理

ROS是细胞线粒体氧化呼吸中产生的自由基活性的物质，参与细胞多种生理和病理形成机制。ROS荧光探针一二氢乙啶(Dihydroethidium, DHE)荧光探针可自由透过活细胞膜进入细胞内，并被细胞内的ROS氧化，形成氧化乙啶；氧化乙啶可掺入染色体DNA中，产生红色荧光，用流式细胞仪检测红色荧光的产生强度，进而判断细胞中ROS含量的多少和变化。

#### **1.2** 实验步骤

取对数生长期目的基因组HepG2/HBx、空载对照组HepG2/mock、空白对照组

HepG2三组细胞，分别消化离心收集细胞各l³106个，将离心后的细胞重悬于1.0

mL的无血清DMEM培养液中，加入5mmol/L的DHE工作液2μl，使其最终工作浓度为10umol/L，颠倒数次混匀，在37℃、5%CO2培养箱内避光孵育30min，孵育后以600g、4℃离心3分钟，0.01M PBS洗涤细胞3次，以充分去除未进入细胞的DHE，重悬细胞后用流式细胞仪以激发波长480nm，发射波长590nm检测细胞平均荧光强度，以反映ROS水平。

### **2** **RT-PCR**检测三组细胞内**COX-2 mRNA**水平表达变化

#### **2.1** **RT**反应

分别抽提对数生长期的目的基因组HepG2/HBx、空载对照组HepG2/mock、空白对照组HepG2三组细胞总的RNA，逆转录为cDNA（实验方法同第一部分）。

#### **2.2** **PCR**反应

以2μl逆转录产物cDNA作为扩增模板，并以β-actin为内参扩增COX-2基因片段，引物由上海博尚生物技术有限公司合成，序列如下：

COX-2（产物大小489bp）

上游引物：5′TCA AGT CCC TGA GCA TCT ACG 3′下游引物：5’CCT CAT AGT TAG TGG ACT CG 3'

β-actin（产物大小600bp）

上游引物：5′GGC ATC GTG ATG GAC TCC G 3′下游引物：5′GCT GGA AGG TGG ACA GCG A 3′

PCR体系：

试 剂 体 积（μl）

10³Buffer 2.5

Mgcl2 2.5

DNTP MIX(10 mM) 1.0

上游引物 1.0

下游引物 1.0

TaqDNA 酶 0.5

cDNA 2.0

无核酶水 14.5

总体积 25

PCR反应条件：94℃预变性3min，94℃变性45s，56℃退火30s，72℃延伸1min，共30个循环；72℃延伸7min。

#### **2.3** 产物电泳

取8μlRT-PCR产物与2μl的5³Loading Buffer混合均匀，加在12g/L琼脂糖凝胶（含0.5g/LGoodview）上进行电泳，电泳缓冲液为1³TBE，恒压电泳（100V）

20min。在紫外光下自显影，经计算机扫描成像。

#### **2.4** 结果分析

RT-PCR凝胶电泳图片采用Image J图像分析软件进行扫描分析，获得灰度值数据，经过内参照β-actin条带灰度进行校正，校正灰度值以mean±SD表示。

### **3** **Western blot**检测三组细胞内**COX-2**蛋白水平表达变化

#### **3.1** 蛋白抽提

（1）分别将HepG2/HBx、HepG2/mock、HepG2三组细胞接种培养于6孔培养板中，当细胞长融合至80%时，弃细胞培养上清液，使用预冷0.01M PBS洗涤细胞

2次。

（2）用含1mmol/L PMSF的细胞裂解液RIPR裂解细胞，于冰上静置30min。

（3）转移至1.5ml EP管中，4℃，12 000rpm离心15min。

（4）上清液转移至另一1.5ml EP管中，保存于-20℃备用。

#### **3.2** **Western blot**

（1）装配好板后，按照前述方法（第一部分）先后制备10％分离胶和5％积层胶；

（2）BCA法对蛋白质定量、配平，先煮沸变性然后进行10％SDS-PAGE电泳和蛋白印迹（方法同第一部分）。

（3）用含有50g/L脱脂奶粉的TBS-T溶液封闭NC膜1 h，然后将含有相应条带的NC膜分别与兔抗人COX-2单克隆抗体（用抗体稀释液稀释至1: 1000）及鼠抗人β-actin单克隆抗体(1: 1000)在4℃条件下孵育过夜，孵育后用TBST洗涤3次每次15min，洗涤后分别再与小鼠抗兔二抗(1: 2000)和兔抗小鼠二抗(1: 2500)作用

1h。

（4）经ECL显影，western blot图片采用Image J图像分析软件进行扫描分析，获得灰度值数据，经过内参照β-actin条带灰度进行校正，校正灰度值以mean

±SD表示。

### **4** 加入**ROS**的清除剂**N-acetylcysteine**（**NAC**）**后，Western blot**检测三组细胞内**COX-2**蛋白水平表达变化

#### **4.1** 细胞培养

将HepG2细胞以4³104个每孔的密度接种于含10%胎牛血清的DMEM新鲜培养液的6孔细胞培养板中，在37C、5% CO2条件下常规培养，待HepG2细胞生长融合度达70%-80%时弃旧培养液，并将细胞用灭菌0.01M PBS缓冲液洗涤一次，然后加入含10 mM NAC的DMEM新鲜培养液继续培养12h。

#### **4.2** 蛋白抽提

（1）弃去上述细胞培养上清液，使用预冷0.01M PBS洗涤细胞2次。

（2）用含1mmol/L PMSF的细胞裂解液RIPR裂解细胞，于冰上静置30min。

（3）转移至1.5ml EP管中，4℃，12 000rpm离心15min。

（4）上清液转移至另一1.5ml EP管中，保存于-20℃备用。

#### **4.3** **Western blot**

（1）装配好板后，按照前述方法（第一部分）先后制备10％分离胶和5％积层胶；

（2）BCA法对蛋白质定量、配平，先煮沸变性然后进行10％SDS-PAGE电泳和蛋白印迹（方法同第一部分）。

（3）用含有50g/L脱脂奶粉的TBS-T溶液封闭NC膜1 h，然后将含有相应条带的NC膜分别与兔抗人COX-2单克隆抗体（用抗体稀释液稀释至1: 1000）及鼠抗人β-actin单克隆抗体(1: 1000)在4℃条件下孵育过夜，孵育后用TBST洗涤3次每次15min，洗涤后分别再与小鼠抗兔二抗(1: 2000)和兔抗小鼠二抗(1: 2500)作用

1h。

（4）经ECL显影，western blot图片采用Image J图像分析软件进行扫描分析，获得灰度值数据，经过内参照β-actin条带灰度进行校正，校正灰度值以mean

±SD表示。

### **5** **Cell Counting Kit-8**（**CCK-8**）法检测细胞增殖活性

取对数期生长的HepG2/HBx、HepG2/mock、HepG2三组细胞，经0.25％的胰蛋白酶消化，用含10％胎牛血清的DMEM培养基配成单个细胞悬液，细胞计数后，把细胞浓度调至3³103/ml，按每孔100μl接种于96孔板，并设6复孔，37℃，5％

C02培养箱中培养。共接种3块板，分别于培养ld、2d、3d后，取出96孔板，吸弃原有培养液，用PBS洗涤后，加入CCK-8试剂与培养基的混合液，比例为CCK8: 培养基=10μl：100μl，经37℃，CO2培养箱培养3h后，于450nm波长下检测每孔的吸光值(OD). OD值即代表细胞的增殖能力，然后根据吸光值绘制生长曲线，比较各组细胞生长速度变化。实验重复三次。

### **6** 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力

取对数期生长的HepG2/HBx、HepG2/mock、HepG2三组细胞，经0.25％的胰蛋白酶消化，用含10％胎牛血清的DMEM培养基配成单个细胞悬液，并作梯度倍比稀释，按每孔500个细胞接种于6孔板，每组细胞各接种3孔。静止培养2周，当

培养板出现肉眼可见的克隆时终止培养。PBS清洗后用甲醇1ml固定15 min，结晶紫染色10min。将培养板置于显微镜低倍数下计数大于50个细胞的克隆数，按公式计算克隆形成率。克隆形成率（％）=克隆数／接种数³100％。实验重复三次。

### **7** 加入**COX-2**抑制剂**NS-398**后，**Western blot**检测三组细胞内**COX-2**蛋白水平表达变化

#### **7.1** 细胞培养

将HepG2细胞以4³104个每孔的密度接种于含10%胎牛血清的DMEM新鲜培养液的6孔细胞培养板中，在37C、5% CO2条件下常规培养，待HepG2细胞生长融合度达50%时弃旧培养液，并将细胞用灭菌0.01M PBS缓冲液洗涤一次，

然后加入含50 umol/L NS-398的DMEM新鲜培养液继续培养72h。

#### **7.2** 蛋白抽提

（1）弃去上述细胞培养上清液，使用预冷0.01M PBS洗涤细胞2次。

（2）用含1mmol/L PMSF的细胞裂解液RIPR裂解细胞，于冰上静置30min。

（3）转移至1.5ml EP管中，4℃，12 000rpm离心15min。

（4）上清液转移至另一1.5ml EP管中，保存于-20℃备用。

#### 7.3 **Western blot**方法同上述

### **8** 加入**COX-2**抑制剂**NS-398**后，**CCK-8**法检测细胞增殖活性

取对数期生长的HepG2/HBx、HepG2/mock、HepG2三组细胞，以及按照上述方法加入含50 umol/L NS-398的培养液培养72h的HepG2/HBx、HepG2/mock、HepG2三组细胞，经0.25％的胰蛋白酶消化，用含10％胎牛血清的DMEM培养基配成单个细胞悬液，细胞计数后，把细胞浓度调至3³103/ml，按每孔100μl接种于96孔板，并设6复孔，37℃，5％C02培养箱中培养。共接种3块板，分别于培养ld、

2d、3d后，取出96孔板，吸弃原有培养液，用PBS洗涤后，加入CCK-8试剂与培养基的混合液，比例为CCK8:培养基=10μl：100μl，经37℃，CO2培养箱培养

3h后，于450nm波长下检测每孔的吸光值(OD). OD值即代表细胞的增殖能力，然后根据吸光值绘制生长曲线，比较各组细胞生长速度变化。实验重复三次。

### **9** 统计学分析结果

各实验结果以mean±SD表示。采用SPSS11.5软件，各组比较采用单因素ANOVA检验，以P <0.05作为具有显著性差异。

## 四 实验结果

### **1** **HBx**上调**HepG2**细胞**ROS**水平

流式细胞仪检测三组细胞ROS水平如图1所示，数值结果如表1所示，流式细胞仪采集的DHE染色的荧光信号强弱代表ROS的高低。经过统计学分析结果表明HepG2/HBx细胞组中ROS较HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组升高（图2），差异具有统计学意义(P<0.05)。该部分实验表明HBx可以上调HepG2/HBx细胞的ROS水平。



图1 流式细胞仪检测三组细胞ROS水平，HBx：HepG2/HBx细胞; Mock：

HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

表 1 三组细胞DHE染色平均荧光强度值（n=3）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 别 | 第一次 | 第二次 | 第三次 | X  s |
| HepG2 | 185332.3 | 218566.9 | 187191.7 | 197030.3±18674.3769 |
| HepG2/mock | 249609.3 | 213313.7 | 188043.6 | 216988.9±30946.9926 |
| HepG2/HBx | 357063.4 | 352993.9 | 359063.8 | 356373.7±3093.1447 |



图2 三组细胞ROS表达水平（\*，P<0.05），HBx：HepG2/HBx细胞; Mock：

HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

### **2** **HBx**上调**HepG2**细胞**COX-2 mRNA**表达水平

三组细胞COX-2 mRNA表达情况如图3所示，COXⅢmRNA/β-actin mRNA的相对灰度比值如表2所示，统计学分析提示，HepG2/HBx细胞组中COXⅢmRNA 较

HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组升高（图4），差异具有统计学意义(P<0.05)。该部分实验表明HBx可以上调HepG2/HBx细胞的COXⅢmRNA水平。



图3 三组细胞COX-2 mRNA的表达水平。1和7、2与6、3与5分别代表HepG2、

HepG2/mock、HepG2/HBx，4代表marker。

表 2 三组细胞COX-2/β-actin mRNA相对灰度比值（n=3）

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 别 | 第一次 | 第二次 | 第三次 | X  s |
| HepG2 | 0.101 | 0.130 | 0.412 | 0.2144±0.1716 |  |
| HepG2/mock | 0.413 | 0.369 | 0.358 | 0.3798±0.2927 |  |
| HepG2/HBx |  | 0.950 | 1.125 | 0.558 | 0.9776 ± |

0.2904



图4 三组细胞COX-2 mRNA表达水平（\*，P<0.05），HBx：HepG2/HBx细胞;

Mock: HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

### **3** **HBx**上调**HepG2**细胞**COX-2**蛋白表达水平

三组细胞COX-2蛋白表达情况如图5所示，COXⅢ/β-actin蛋白的相对灰度比值如表3所示，统计学分析提示，HepG2/HBx细胞组中COXⅢ蛋白较HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组升高（图6），差异具有统计学意义(P<0.05)。该部分实验表明HBx可以上调HepG2/HBx细胞的COXⅢ蛋白表达水平。



图5 三组细胞COX-2蛋白表达水平，HBx：HepG2/HBx细胞; Mock：HepG2/mock细胞; Control：HepG2细胞

表3 三组细胞COX-2/β-actin蛋白相对灰度比值（n=3）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 别 | 第一次 | 第二次 | 第三次 | X  s |
| HepG2 | 0.5819 | 0.6233 | 0.4477 | 0.5509±0.0918 |
| HepG2/mock | 0.7397 | 0.8115 | 0.5624 | 0.7045±0.1282 |
| HepG2/HBx | 1.1365 | 1.2983 | 1.1527 | 1.1959±0.8910 |



图6三组细胞COX-2蛋白表达水平（\*, P<0.05），HBx: HepG2/HBx细胞; Mock：

HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

### **4** 加入**ROS**的清除剂**NAC**后，**HepG2/HBx**组**COX-2**蛋白水平下降

经10 mM NAC作用12h后，六组细胞COX-2蛋白表达情况如图7所示，COX-2/β-actin蛋白的相对灰度比值如表4所示，统计学分析提示，经10 mM NAC作用12h后的HepG2/HBx细胞组中COX-2蛋白表达水平较没有加药的HepG2/HBx组下降，差异具有统计学意义(P<0.05)；经10 mM NAC作用12h后的HepG2/HBx细胞组中COX-2蛋白表达水平仍高于经10 mM NAC作用12h后的HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组，差异具有统计学意义（P<0.05）（图8）。该部分实验表明HBx通过上调ROS的水平来增加HepG2/HBx细胞的COX-2蛋白表达水平，但升高的COX-2水平不全依赖于ROS.



图7六组细胞COX-2蛋白表达水平，左边三组为加入10 mM NAC作用12h，右边3组为无加药组，HBx: HepG2/HBx细胞; Mock: HepG2/mock细胞; Control：

HepG2细胞

表4 六组细胞COX-2/β-actin蛋白相对灰度比值（n=3）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 别 | 第一次 | 第二次 | 第三次 | X  s |
| HepG2 | 0.5819 | 0.6233 | 0.4477 | 0.5509±0.0918 |
| HepG2/mock | 0.7397 | 0.8115 | 0.5624 | 0.7045±0.1282 |
| HepG2/HBx | 1.1365 | 1.2983 | 1.1527 | 1.1959±0.8910 |
| HepG2 加 NAC | 0.5484 | 0.5777 | 0.5720 | 0.5660±0.0155 |
| HepG2/mock 加 NAC | 0.7435 | 0.5293 | 0.5650 | 0.6126±0.1148 |
| HepG2/HBx 加 NAC | 0.9171 | 0.8471 | 0.8324 | 0.8655±0.0452 |

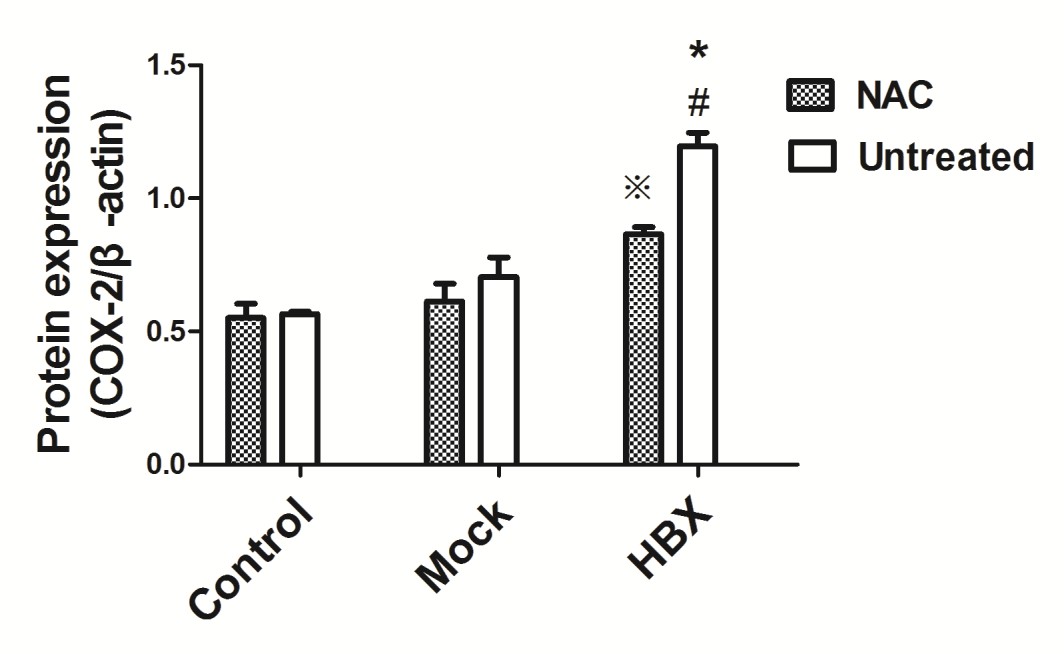


图8加入10 mM NAC作用12h后三组细胞COX-2蛋白表达水平（\*，P<0.05，

HepG2/HBx组与HepG2/mock、HepG2组对比；#，P<0.05, HepG2/HBx组与HepG2/HBx加入NAC组对比；※，P<0.05, HepG2/HBx加入NAC组与HepG2/mock加入NAC组、

HepG2加入NAC组对比），HBx: HepG2/HBx细胞; Mock: HepG2/mock细胞; Control：

HepG2细胞

### **5** **HBx**促进**HepG2**细胞的增殖能力

CCK-8实验检测三组细胞增殖能力情况如表5所示，统计学分析提示，

HepG2/HBx细胞组的增殖速度较HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组升高（图9），差异具有统计学意义(P<0.05)。该部分实验表明HBx促进HepG2/HBx细胞的增殖能力。

表5 CCK-8检测三组细胞的增殖能力(OD值)（ *X*

S, n=6)

| 组 别 | 1d | 2d | 3d |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| HepG2  HepG2/mock HepG2/HBx | 0.7253±0.0173  0.7263±0.0064  1.0371±0.0453 | 1.2546±0.0132  1.2446±0.0152  1.5870±0.0181 |  | 2.0913±0.0703  2.1489±0.0704  2.6328±0.0409 |



图9 CCK-8检测三组细胞增殖能力（\*, P<0.05），HBx: HepG2/HBx细胞; Mock：

HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

### **6** **HBx**促进**HepG2**细胞的克隆形成能力

三组细胞克隆形成能力如图10、表6所示，统计学分析提示，HepG2/HBx细胞组的克隆形成率较HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组升高（图11），差异具有统计学意义(P<0.05)，而HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组克隆形成率相近，差异无统计学意义。该部分实验表明HBx促进HepG2/HBx细胞的克隆形成能力。



图10 平板克隆形成实验检测三组细胞克隆形成能力，HBx：HepG2/HBx细胞;

Mock: HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

表6 三组细胞克隆形成率（ *X*

s)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 别 | n | 克隆形成率 |  | |
| HepG2 | 3 | 0.3238±0.0525 | |  |
| HepG2/mock | 3 | 0.3698±0.0057 | |  |
| HepG2/HBx | 3 | 0.6080±0.0640 | |  |



图11三组细胞克隆形成率（\*, P<0.05），HBx: HepG2/HBx细胞; Mock：

HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

### **7** 加入**COX-2**抑制剂后**HepG2/HBx**细胞**COX-2**蛋白表达水平下降

经50 umol/L NS-398作用72h后，六组细胞COX-2蛋白表达情况如图12所示，COX-2/β-actin蛋白的相对灰度比值如表7所示，统计学分析提示，HepG2/HBx细胞组中COXⅢ蛋白较HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组升高，差异具有统计学意义(P<0.05)；经50 umol/L NS-398作用72h后的HepG2/HBx细胞组中COX-2蛋白表达水平较没有加药的HepG2/HBx组下降，差异具有统计学意义（P<0.05）（图

13）。该部分实验表明50 umol/L NS-398能够抑制HepG2/HBx细胞的COX-2蛋白表达水平。



图12六组细胞COX-2蛋白表达水平，左边三组为加入50 umol/L NS-398作用72h，右边3组为加入等体积DMSO对照组，HBx: HepG2/HBx细胞; Mock：

HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

表7 六组细胞COX-2/β-actin蛋白相对灰度比值（n=3）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 别 | 第一次 | 第二次 | 第三次 | X  s |
| HepG2 | 0.4540 | 0.4654 | 0.5213 | 0.4802±0.0360 |
| HepG2/mock | 0.4639 | 0.4378 | 0.4801 | 0.4606±0.0213 |
| HepG2/HBx | 0.7933 | 0.6979 | 0.6142 | 0.7018±0.0896 |
| HepG2 加 NS-398 | 0.4058 | 0.2722 | 0.4110 | 0.3630±0.0787 |

HepG2/mock加NS-398 0.3982 0.2884 0.3234 0.3367±0.0561

HepG2/HBx加NS-398 0.3731 0.3628 0.4027 0.3796±0.0207

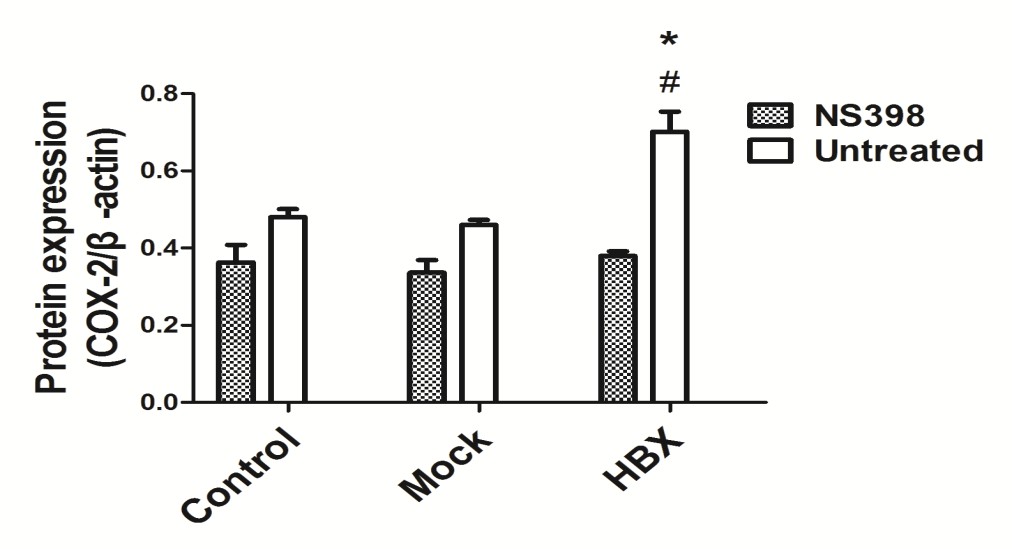


图13加入50 umol/L NS-398作用72h后三组细胞COX-2蛋白表达水平（\*，

P<0.05, HepG2/HBx组与HepG2/mock、HepG2组对比；#，P<0.05, HepG2/HBx组与HepG2/HBx加入NS-398组对比），HBx: HepG2/HBx细胞; Mock: HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

### **8** 加入**COX-2**抑制剂后**HepG2/HBx**细胞增殖能力下降

经50 umol/L NS-398作用72h后，CCK-8实验检测六组细胞增殖能力情况如表8所示，提示NS-398能够抑制各组细胞的增殖，这种抑制作用具有时间依赖性，随着时间的增加，NS-398对细胞生长抑制作用随之增加。统计学分析提示（图14），

HepG2/HBx细胞组在培养1d、2d、3d的时间中的增殖速度较HepG2/mock细胞组与

HepG2细胞组升高，差异具有统计学意义(P<0.05). HepG2/HBx细胞组在加入50 umol/L NS-398作用72h后继续培养1d、2d、3d的时间中的增殖速度较未加药的

HepG2/HBx细胞组下降，差异具有统计学意义(P<0.05)。该部分实验表明HBx促进

HepG2/HBx细胞的增殖能力依赖COX-2的增高。

表8 CCK-8检测三组细胞的增殖能力(OD值)（ *X*

S, n=6)

| 组 别 | 1d | 2d | 3d |
| --- | --- | --- | --- |
| HepG2 | 0.6451±0.0132 | 1.1400±0.0507 | 2.0267±0.0115 |
| HepG2/mock | 0.6266±0.0199 | 1.1507±0.0612 | 2.0183±0.0326 |
| HepG2/HBx | 0.8740±0.0136 | 1.4772±0.0146 | 2.4175±0.0512 |
| HepG2-NS398 | 0.5196±0.0060 | 0.8699±0.0448 | 1.4357±0.0369 |
| HepG2/mock-NS398 | 0.5069±0.0037 | 0.8852±0.0665 | 1.3958±0.0392 |
| HepG2/HBx-NS398 | 0.5214±0.0137 | 0.9552±0.0274 | 1.3720±0.0058 |



图14加入50 umol/L NS-398作用72h后六组细胞的增殖能力水平（\*，P<0.05，

HepG2/HBx组与HepG2/mock、HepG2组对比；#，P<0.05, HepG2/HBx组与HepG2/HBx

加入NS-398组对比），HBx: HepG2/HBx细胞; Mock: HepG2/mock细胞; Control：

HepG2细胞

## 五 讨论

越来越多的证据表明炎症反应在肝细胞癌的发展中起着重要的角色，它们能释放促炎因子和ROS，在DNA修复、DNA甲基化、DNA的氧化和脂质过氧化中其关键作用[62]。而线粒体是ROS的主要来源[34]，过量的ROS达到一定的阈值和电化学梯度改变共同作用会引起线粒体膜通透性转换孔( mitochondria permeability transition pore, MPTP)的开放释放大量的钙离子，导致胞浆钙超载，继而还可以激活线粒体上其他两种钙离子通路：线粒体钠-钙交换体（mitochondrial sodium-calcium exchanger, MNCX）和线粒体钙单向转运体（mitochondrial calcium uniporter, MCU），形成了以线粒体钙通道开放为原因，以胞浆钙超载为标志的多个信号分子、蛋白激酶的激活，并对细胞增殖、细胞周期、坏死和凋亡产生系列影响[63, 64]。最近，研究发现HBx定位于线粒体，导致ROS产生增多、MPTP开放引起胞质Ca2+水平增多，从而上调了炎症介质环氧合酶-2（COX-2）的表达，促进细胞炎症反应的发生[33]。最后炎症信号由细胞水平扩大到邻近细胞和组织水平，形成组织水平的炎症反应，最后在细胞和组织长期慢性炎症的基础上发生恶变。本部分实验表明HBx与COXIII共定位后将上调ROS的水平，从而提高炎症介质COX-2的表达水平。

近几年学者们在不同的模型与条件下对HBx蛋白促进细胞增殖的作用进行了大量的研究，得出了不同的结论。有人发现HBx蛋白及其结合蛋白(HBXIP)通过激活PI3-K通路促进肝癌细胞的增殖[65]。HBx蛋白与Akt之间相互作用，促进了细胞增殖以及出现致瘤性的转化[66]。Gearhart and Bouchard指出，在人类肝细胞以及原代小鼠肝细胞中，HBx蛋白依赖胞内钙信号调控细胞周期调节蛋白的表达，从而促进细胞增殖[67]。本部分实验也发现，在稳定表达HBx的HepG2细胞中，HBx促进了肝癌细胞的增殖，具有更高的克隆形成率。近年有研究发现COX-2介导的炎症反应能够刺激增殖、抑制凋亡从而促进了HBx转染的肝癌细胞的生长[68, 69]。因此我们推论稳定表达HBx促进了HepG2的增殖是否是因为COX-2水平的上调。于是我们加入了COX-2的抑制剂50 umol/L NS-398作用72h，发现随着COX-2表达水平的下调，HepG2/HBx组细胞的增殖能力也下降了。所以我们得出了结论：HBx

通过上调COX-2的表达水平来促进HepG2细胞的增殖。

该部分实验表明HBx与COXIII共定位后将上调ROS的水平，从而提高炎症介质COX-2的表达水平，进一步促进HepG2细胞的增殖。

# **第四部分 HBx**通过上调**COX-2**水平激活**β-catenin**信号转导通

**路促进了HepG2细胞的增殖**

## 一 引言

越来越多的研究关注到Wnt/β–catenin信号通路上，它在细胞增殖、分化、癌变中同样起着重要角色。在HBV相关的肝细胞癌中，由HBx蛋白上调的

β–catenin促进了HBx蛋白的促瘤活性。在Wnt/β–catenin信号通路中，

β–catenin的目标基因，比如cyclin-D1, TCF以及c-myc的表达上调了[38, 39]。有研究表明在人胆管癌细胞，COX-2衍生的前列腺素E2激活β–catenin[40]。因此我们猜想在HepG2/HBx细胞中，增高的COX-2能否激活β–catenin信号通路，它们二者是否在引起肝癌的发生、发展中有交集呢？

此部分实验我们将通过RT-PCR与Western blot测定β–catenin的mRNA与蛋白表达水平、RT-PCR法初步探讨β–catenin的目标基因cyclin-D1以及c-myc的mRNA表达水平、CCK-8试验观察细胞的增殖水平。然后加入COX-2抑制剂(NS-398)测定β–catenin的蛋白表达水平，从而探索COX-2与β–catenin的关系；接着加入β–catenin的抑制剂（XAV939），观察细胞增殖能力的改变，从而探讨

β–catenin信号通路在HBx致肝癌细胞增殖中的作用。

## 二 实验材料与实验仪器

### **1** 主要实验材料

HepG2/HBx细胞第一部分构建好的

嘌呤霉素 Sigma 公司

DMEM培养基Hyclone公司

胰蛋白酶Invitrogen公司

胎牛血清Hyclone公司

TRizol试剂Invitrogen公司

RT-PCR试剂盒Thermo公司

100bp DNA Ladder加拿大Fermentas公司

CCK-8日本DOJINDO

NS-398上海碧云天公司

XAV939 Selleck Chemicals公司

抗小鼠 β–catenin 一抗 北京中杉金桥生物技术有限公司小鼠抗人β-actin 单克隆抗体 北京中杉金桥生物技术有限公司兔抗小鼠二抗 北京中杉金桥生物技术有限公司

抗体稀释液上海碧云天公司

BCA 蛋白定量试剂盒 碧云天生物科技有限公司哺乳动物细胞总蛋白抽提试剂 碧云天生物科技有限公司蛋白酶抑制剂购 碧云天生物科技有限公司

蛋白印迹实验的ECL显色试剂北京中杉金桥生物技术有限公司

### **2** 主要实验仪器

无菌洁净工作台苏州净化设备有限公司

PCR 仪 AB2720 型 美国 AB 公司

稳压稳流电泳仪DYY-5型北京六一仪器厂

蛋白电泳及转印设备美国Bio-Rad公司

5430R小型高速多功能离心机Eppendorf公司

5810R 台式高速大容量低温离心机 Eppendorf 公司倒置相差荧光显微镜 NIKON TE2000-U 尼康公司

倒置显微镜（CK2型）日本Olympus公司

凝胶成像仪Tanon-2500上海天能科技有限公司

C02 培养箱(2300 型) shelden 公司 日立高性能超速离心机 CP100WX Hitachi 公司

电热恒温水槽DK-8D上海一恒科学仪器有限公司

超低温冰箱（MDF-283E型）日本三洋公司

微量移液枪Eppendorf公司

AL104型电子称英国Mettler toledo公司

干燥箱UH-686-101A上海实验仪器有限公司Lab Shaker恒温摇床/振荡器（THZ-031）上海博彩生物技术有限公司**三实验步骤**

### **1** **RT-PCR**检测三组细胞内**β–catenin mRNA**水平表达变化

#### **1.1** **RT**反应

分别抽提对数生长期的目的基因组HepG2/HBx、空载对照组HepG2/mock、空白对照组HepG2三组细胞总的RNA，逆转录为cDNA（实验方法同第一部分）。

#### **1.2** **PCR**反应

以2μl逆转录产物cDNA作为扩增模板，并以β-actin为内参扩增β–catenin

基因片段，引物由上海博尚生物技术有限公司合成，序列如下：

β–catenin（产物大小533bp）

上游引物：5′AAA TGG TTG CCT TGC TCA AC 3′下游引物：5’TCA GCA CTC TGC TTG TGG TC 3'

β-actin（产物大小600bp）

上游引物：5′GGC ATC GTG ATG GAC TCC G 3′下游引物：5′GCT GGA AGG TGG ACA GCG A 3′

PCR体系：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 试 剂 |  | 体 积（μl） |
| 10³Buffer |  | 2.5 |
| Mgcl2 |  | 2.5 |
| DNTP MIX(10 | mM) | 1.0 |
| 上游引物 |  | 1.0 |
| 下游引物 |  | 1.0 |
| TaqDNA 酶 |  | 0.5 |
| cDNA |  | 2.0 |
| 无核酶水 |  | 14.5 |
|  | 总体积 |  | 25 |

PCR反应条件：94℃预变性3min，94℃变性45s，58℃退火30s，72℃延伸1min，共30个循环；72℃延伸7min。

#### **1.3** 产物电泳

取8μlRT-PCR产物与2μl的5³Loading Buffer混合均匀，加在12g/L琼脂糖凝胶（含0.5g/LGoodview）上进行电泳，电泳缓冲液为1³TBE，恒压电泳（100V）

20min。在紫外光下自显影，经计算机扫描成像。

#### **1.4** 结果分析

RT-PCR凝胶电泳图片采用Image J图像分析软件进行扫描分析，获得灰度值数据，经过内参照β-actin条带灰度进行校正，校正灰度值以mean±SD表示。

### **2** **Western blot**检测三组细胞内**β–catenin**蛋白表达水平

（1）蛋白抽提、定量配平（方法同第一部分）。

（2）然后进行10％SDS-PAGE电泳和蛋白印迹（方法同第一部分）。

（3）用含有50g/L脱脂奶粉的TBS-T溶液封闭NC膜1 h，然后将含有相应条带的NC膜分别与β–catenin单克隆抗体（用抗体稀释液稀释至1: 1000）及鼠抗人β-actin单克隆抗体(1: 1000)在4℃条件下孵育过夜，孵育后用TBST洗涤3次每次15min，洗涤后分别再与兔抗小鼠二抗(1: 2500)作用1h。

（4）经ECL显影，western blot图片采用Image J图像分析软件进行扫描分析，获得灰度值数据，经过内参照β-actin条带灰度进行校正，校正灰度值以mean

±SD表示。

### **3** **RT-PCR**检测三组细胞内**cyclin-D1 mRNA**水平表达变化

#### **3.1** **RT**反应

分别抽提对数生长期的目的基因组HepG2/HBx、空载对照组HepG2/mock、空白对照组HepG2三组细胞总的RNA，逆转录为cDNA（实验方法同第一部分）。

#### **3.2** **PCR**反应

以2μl逆转录产物cDNA作为扩增模板，并以β-actin为内参扩增cyclin-D1基因片段，引物由上海博尚生物技术有限公司合成，序列如下：

cyclin-D1（产物大小416bp）

上游引物：5′CTG CCG TCC ATG CGG AAG ATC 3′下游引物：5’GTG GCA CAG AGG GCA ACG AAG 3'

β-actin（产物大小600bp）

上游引物：5′GGC ATC GTG ATG GAC TCC G 3′下游引物：5′GCT GGA AGG TGG ACA GCG A 3′

PCR体系：

试剂体积（μl）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 10³Buffer |  | 2.5 |
| Mgcl2 |  | 2.5 |
| DNTP MIX(10 | mM) | 1.0 |
| 上游引物 |  | 1.0 |
| 下游引物 |  | 1.0 |
| TaqDNA 酶 |  | 0.5 |
| cDNA |  | 2.0 |
| 无核酶水 |  | 14.5 |
|  | 总体积 |  | 25 |

PCR反应条件：94℃预变性3min，94℃变性45s，54℃退火30s，72℃延伸1min，共30个循环；72℃延伸7min。

#### 3.3 产物电泳与结果分析方法同前

### **4** **RT-PCR**检测三组细胞内**c-myc mRNA**水平表达变化

#### **4.1** **RT**反应

分别抽提对数生长期的目的基因组HepG2/HBx、空载对照组HepG2/mock、空白对照组HepG2三组细胞总的RNA，逆转录为cDNA（实验方法同第一部分）。

#### **4.2** **PCR**反应

以2μl逆转录产物cDNA作为扩增模板，并以β-actin为内参扩增cyclin-D1基因片段，引物由上海博尚生物技术有限公司合成，序列如下：

c-myc（产物大小203bp）

上游引物：5′TTC GGG TAG TGG AAA ACA G 3′下游引物：5’CAG CAG CTC GAA TTT CTT CC 3'

β-actin（产物大小600bp）

上游引物：5′GGC ATC GTG ATG GAC TCC G 3′下游引物：5′GCT GGA AGG TGG ACA GCG A 3′

PCR体系：

试剂体积（μl）

10³Buffer 2.5

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Mgcl2 |  | 2.5 |
| DNTP MIX(10 | mM) | 1.0 |
| 上游引物 |  | 1.0 |
| 下游引物 |  | 1.0 |
| TaqDNA 酶 |  | 0.5 |
| cDNA |  | 2.0 |
| 无核酶水 |  | 14.5 |
| 总体积 |  | 25 |

PCR反应条件：94℃预变性3min，94℃变性45s，58℃退火30s，72℃延伸1min，共30个循环；72℃延伸7min。

#### 4.3 产物电泳与结果分析方法同前

### **5** 加入**COX-2**抑制剂**NS-398**后，**Western blot**检测三组细胞内

**β–catenin蛋白表达水平变化**

#### **5.1** 细胞培养

将HepG2细胞以4³104个每孔的密度接种于含10%胎牛血清的DMEM新鲜培养液的6孔细胞培养板中，在37C、5% CO2条件下常规培养，待HepG2细胞生长融合度达50%时弃旧培养液，并将细胞用灭菌0.01M PBS缓冲液洗涤一次，

然后加入含50 umol/L NS-398的DMEM新鲜培养液继续培养72h。

#### 5.2 蛋白抽提、**Western blot**方法同上述

### **6** 加入**β–catenin**抑制剂**XAV939**后，**CCK-8**法检测细胞增殖活性

取对数期生长的HepG2/HBx、HepG2/mock、HepG2三组细胞，以及按照上述方法加入含20 umol/L XAV939的培养液培养24h的HepG2/HBx、HepG2/mock、HepG2三组细胞，经0.25％的胰蛋白酶消化，用含10％胎牛血清的DMEM培养基配成单个细胞悬液，细胞计数后，把细胞浓度调至3³103/ml，按每孔100μl接种于96孔板，并设6复孔，37℃，5％C02培养箱中培养。共接种3块板，分别于培养ld、

2d、3d后，取出96孔板，吸弃原有培养液，用PBS洗涤后，加入CCK-8试剂与培

养基的混合液，比例为CCK8:培养基=10μl：100μl，经37℃，CO2培养箱培养

3h后，于450nm波长下检测每孔的吸光值(OD). OD值即代表细胞的增殖能力，然后根据吸光值绘制生长曲线，比较各组细胞生长速度变化。实验重复三次。

### **7** 统计学分析结果

各实验结果以mean±SD表示。采用SPSS11.5软件，各组比较采用单因素ANOVA检验，以P <0.05作为具有显著性差异。

## 四 实验结果

**1 HBx上调HepG2细胞β–catenin mRNA水平**

三组细胞β–catenin mRNA表达情况如图1所示，β–catenin mRNA/β-actin mRNA的相对灰度比值如表1所示，统计学分析提示，HepG2/HBx细胞组中β–catenin mRNA较HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组升高（图2），差异具有统计学意义(P<0.05). 该部分实验表明HBx可以上调HepG2/HBx细胞的β–catenin mRNA水平。



图1三组细胞β–catenin mRNA的表达水平。1和7、2与6、3与5分别代表HepG2、HepG2/mock、HepG2/HBx，4代表marker。

表 1 三组细胞β–catenin/β-actin mRNA相对灰度比值（n=3）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 别 | 第一次 | 第二次 | 第三次 | X  s |
| HepG2 | 0.9420 | 0.4860 | 1.7828 | 1.0703±0.6578 |
| HepG2/mock | 1.7951 | 1.4944 | 2.0649 | 1.7848±0.2854 |
| HepG2/HBx | 2.6683 | 3.1744 | 2.6972 | 2.8466±0.2842 |



图2 三组细胞β–catenin mRNA表达水平（\*，P<0.05），HBx：HepG2/HBx细胞; Mock：HepG2/mock细胞; Control：HepG2细胞

**2 HBx上调HepG2细胞β–catenin蛋白表达水平**

三组细胞β–catenin蛋白表达情况如图3所示，β–catenin /β-actin蛋白的相对灰度比值如表2所示，统计学分析提示，HepG2/HBx细胞组中β–catenin蛋白水平较HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组升高（图4），差异具有统计学意义

（P<0.05）. 该部分实验表明HBx可以上调HepG2/HBx细胞的β–catenin蛋白表达水平。



图3 三组细胞β–catenin蛋白表达水平，HBx：HepG2/HBx细胞; Mock：

HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

表 2 三组细胞β–catenin/β-actin蛋白相对灰度比值（n=3）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 别 | 第一次 | 第二次 | 第三次 | X  s |
| HepG2 | 0.5110 | 0.5514 | 0.5959 | 0.5527±0.0425 |
| HepG2/mock | 0.5041 | 0.5333 | 0.5709 | 0.5361±0.0335 |
| HepG2/HBx | 0.7093 | 0.7512 | 0.7580 | 0.7395±0.0264 |



图4 三组细胞β–catenin蛋白表达水平（\*，P<0.05），HBx：HepG2/HBx细胞; Mock：HepG2/mock细胞; Control：HepG2细胞

**3 HBx上调HepG2细胞cyclin-D1 mRNA水平**

三组细胞cyclin-D1 mRNA表达情况如图5所示，cyclin-D1 mRNA/β-actin

mRNA的相对灰度比值如表3所示，统计学分析提示，HepG2/HBx细胞组中cyclin-D1 mRNA较HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组升高（图6），差异具有统计学意义(P<0.05). 该部分实验表明HBx可以上调HepG2/HBx细胞的cyclin-D1 mRNA水平。



图5 三组细胞cyclin-D1 mRNA表达水平，HBx：HepG2/HBx细胞; Mock：HepG2/mock细胞; Control：HepG2细胞

表 3 三组细胞cyclin-D1/β-actin mRNA相对灰度比值（n=3）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 别 | 第一次 | 第二次 | 第三次 | X  s |
| HepG2 | 0.3309 | 0.1801 | 0.2633 | 0.2581±0.0755 |
| HepG2/mock | 0.4620 | 0.4426 | 0.2357 | 0.3801±0.1255 |
| HepG2/HBx | 0.6094 | 0.5907 | 0.5326 | 0.5776±0.0400 |



图6 三组细胞cyclin-D1 mRNA表达水平（\*，P<0.05），HBx：HepG2/HBx细胞; Mock：HepG2/mock细胞; Control：HepG2细胞

**4 HBx上调HepG2细胞c-myc mRNA水平**

三组细胞c-myc mRNA表达情况如图7所示，c-myc mRNA/β-actin mRNA的相对灰度比值如表4所示，统计学分析提示，HepG2/HBx细胞组中c-myc mRNA 较

HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组升高（图8），差异具有统计学意义(P<0.05)。该部分实验表明HBx可以上调HepG2/HBx细胞的c-myc mRNA水平。



图7 三组细胞c-myc mRNA的表达水平。1和7、2与6、3与5分别代表HepG2、

HepG2/mock、HepG2/HBx，4代表marker。

表 4 三组细胞c-myc/β-actin mRNA相对灰度比值（n=3）

组别第一次第二次第三次

*X* s

HepG2 0.3794 0.1624 0.1752 0.2390±0.1218

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| HepG2/mock | 0.1481 | 0.3315 | 0.4884 | 0.3227±0.1703 |
| HepG2/HBx | 0.9432 | 1.1442 | 0.6369 | 0.9081±0.2555 |



图8三组细胞c-myc mRNA表达水平（\*, P<0.05），HBx: HepG2/HBx细胞; Mock：

HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

**5加入COX-2抑制剂NS-398后，HepG2/HBx细胞内β–catenin蛋白表达水平下降**

经20 umol/L XAV939的培养液培养24h后，六组细胞β–catenin蛋白表达情况如图9所示，β–catenin/β-actin蛋白的相对灰度比值如表5所示，统计学分析提示，经20 umol/L XAV939的培养液培养24h后的HepG2/HBx细胞组中

β–catenin蛋白表达水平较没有加药的HepG2/HBx组下降，差异具有统计学意义(P<0.05)；经20 umol/L XAV939的培养液培养24h后的HepG2/HBx细胞组中

β–catenin蛋白表达水平与经20 umol/L XAV939的培养液培养24h后的

HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组无差别，差异无统计学意义(P> 0.05)（图10）。该部分实验表明HBx通过上调COX-2的水平来增加HepG2/HBx细胞的β–catenin蛋白表达水平。



图9六组细胞β–catenin蛋白表达水平，左边三组为加入20 umol/L XAV939的培养液培养24h，右边3组为无加药对照组，HBx: HepG2/HBx细胞；Mock：

HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

表5 六组细胞β–catenin/β-actin蛋白相对灰度比值（n=3）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 别 第一次 | 第二次 | 第三次 | X  s |
| HepG2 0.5110 | 0.5514 | 0.5959 | 0.5527±0.0425 |  |
| HepG2/mock 0.5041 | 0.5333 | 0.5709 | 0.5361±0.0335 |  |
| HepG2/HBx 0.7093 | 0.7512 | 0.7580 | 0.7395±0.0264 |  |
| HepG2 加 XAV939 0.1386 | 0.4064 | 0.6423 | 0.3958±0.2520 |  |
| HepG2/mock 加 XAV939 0.2205 | 0.1656 | 0.3984 | 0.2615±0.11217 |  |
| HepG2/HBx 加 XAV939 0.1828 | 0.2271 | 0.3183 | 0.2427±0.0691 |  |



图10经20 umol/L XAV939的培养液培养24h后六组细胞β–catenin蛋白表达水平（\*, P<0.05, HepG2/HBx组与HepG2/mock、HepG2组对比；#, P<0.05, HepG2/HBx组与HepG2/HBx加入20 umol/L XAV939组对比），HBx: HepG2/HBx细胞; Mock: HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

**6加入β–catenin抑制剂XAV939后，HepG2/HBx细胞增殖活性下降**

经20 umol/L XAV939的培养液培养24h后，六组细胞增殖能力情况如表6所示，统计学分析提示，HepG2/HBx细胞组在培养1d、2d、3d的时间中的增殖速度较HepG2/mock细胞组与HepG2细胞组升高，差异具有统计学意义(P<0.05)。

HepG2/HBx细胞组在加入20 umol/L XAV939的培养液培养24h后继续培养1d、2d、

3d的时间中的增殖速度较未加药的HepG2/HBx细胞组下降，差异具有统计学意义

（P<0.05），如图11所示。该部分实验表明HBx促进HepG2/HBx细胞的增殖能力依赖β–catenin的上调。

表6 CCK-8检测三组细胞的增殖能力(OD值)（ *X*

S, n=6)

| 组 别 | 1d | 2d | 3d |
| --- | --- | --- | --- |
| HepG2 | 0.6619±0.0467 | 1.0525±0.0762 | 2.0125±0.0488 |
| HepG2/mock | 0.6684±0.0492 | 1.1112±0.1566 | 1.9901±0.0726 |
| HepG2/HBx | 0.8678±0.0584 | 1.4848±0.1561 | 2.4342±0.1068 |
| HepG2-XAV939 | 0.5369±0.0367 | 0.8404±0.0933 | 1.4162±0.0340 |

HepG2/mock- XAV939 0.5398±0.0399 0.8617±0.1094 1.4152±0.0772

HepG2/HBx- XAV939 0.5994±0.0299 0.9574±0.0726 1.4338±0.0601



图11 加入20 umol/L XAV939的培养液培养24h后六组细胞的增殖能力水平

\*, P<0.05, HepG2/HBx组与HepG2/mock、HepG2组对比；#, P<0.05, HepG2/HBx组与HepG2/HBx加入XAV939组对比），HBx: HepG2/HBx细胞; Mock: HepG2/mock细胞; Control: HepG2细胞

## 五 讨论

Wnt信号转导通路参与了多种生理过程、胚胎发育和癌症的发生，使其在过去的二十年中成为广为研究的课题。事实上，它在肝病理学中担任许多角色，尽管其在成年肝中主要是静止的。这条通路在高度动态的环境中调节肝细胞增殖、存活和分化，它的异常活化将导致一系列肝肿瘤诸如肝母细胞瘤与肝细胞癌的发生与发展。Wnt蛋白通过自分泌或旁分泌作用与位于细胞膜上的受体相结合，激活细胞内信号通路调节靶基因的表达，对细胞的增殖、分化、迁移、极性化和凋亡起到重要作用。经典Wnt通路描述当Wnt蛋白于细胞表面Frizzled受体家族结合后的一系列反应，包括Dishevelled受体家族蛋白质的激活及最终细胞核内β-catenin水平的变化。Dishevelled (DSH)是细胞膜相关Wnt受体复合物的关键成分，它与Wnt结合后被激活，并抑制下游蛋白质复合物，包括axin、GSK-3、与APC蛋白。[axin/GSK-3/APC复合体可促进细胞内](http://www.bio1000.com/zhuanti/product/201308/444257.html)信号分子β-catenin的降解。当“β-catenin降解复合物”被抑制后，胞浆内的β-catenin得以稳定存在，部分β-catenin进入细胞核与TCF/LEF转录因子家族作用并促进特定基因的表达[70, 71]。由此可见，β-catenin是Wnt信号通路的一个关键组成部分，其易位至细

胞核将发起下游靶基因的转录，比如c-myc基因和cyclinD1的转录[72, 73]。而异常激活的β-catenin是肝细胞癌发生的强大推动力。

近年有研究报道在在体内与体外试验中稳定转染HBx的HepG2细胞中高表达Oct-4、Nanog、Klf-4、b-catenin以及上皮细胞粘附分子（EpCAM）。此外，HBx能刺激细胞的迁移、生长在软琼脂以及球体形成。这意味着HBx能促进成熟肝细胞的分化以及癌细胞外观的形成而促进肝癌的发生[74]。与此同时，研究者们还发现HBx能通过激活WNT/b-catenin信号通路抑制肝祖细胞的凋亡[38]。另外，在人胆管癌细胞，COX-2衍生的前列腺素E2能激活β–catenin[40]。但是二者在肝癌细胞发生发展中是否有交集，尚无定论。

本部分研究发现了在稳定表达HBx的HepG2细胞中，β–catenin的mRNA以及蛋白水平表达上调了，另外β-catenin的下游靶基因c-myc基因和cyclinD1的转录水平增高。当加入COX-2的抑制剂NS-398后，β-catenin蛋白表达水平下降，意味着COX-2表达水平的增高可以上调β-catenin的表达。接着我们发现稳定表达HBx的HepG2细胞的增殖能力比HepG2/mock、HepG2组提高，而加入β-catenin的抑制剂XAV939后，HepG2/HBx的增殖能力下降了，这表明HBx通过上调β-catenin的表达提高HepG2/HBx细胞的增殖能力。总之，该部分实验阐述了稳定表达HBx的HepG2细胞通过上调COX-2的表达水平激活β-catenin的表达，从而提高细胞的增殖能力。

结 **论**

1利用慢病毒载体成功构建稳定表达HBx的肝癌细胞株HepG2/HBx，经过反复传代，HBx始终保持着较高的表达水平。

2 HBx与COXⅢ能够在HepG2细胞线粒体中共定位，通过转录后水平调节COXⅢ的表达，上调COX酶活性，增加线粒体膜电位，并导致线粒体脊轻微的肿胀。

3稳定表达的HBx上调HepG2细胞ROS的水平，从而提高炎症介质COX-2的表达，进一步促进HepG2细胞的增殖。

4稳定表达的HBxH通过上调epG2细胞COX-2的表达水平激活β-catenin的表达，从而提高细胞的增殖能力。

参考文献

[1] Buendia M, Neuveut C. Hepatocellular Carcinoma[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015, 5(2): 1-11.

[2] Ferlay J, Shin H R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin D M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.

[3] Tian Y, Yang W, Song J, Wu Y, Ni B. Hepatitis B virus X protein-induced aberrant epigenetic modifications contributing to human hepatocellular carcinoma pathogenesis[J]. Mol Cell Biol, 2013, 33(15): 2810-2816.

[4] Xu C, Zhou W, Wang Y, Qiao L. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Letters, 2014, 345(2): 216-222.

[5] Bouchard M J, Schneider R J. The enigmatic X gene of hepatitis B virus[J]. J Virol, 2004, 78(23): 12725-12734.

[6] Tarn C, Zou L, Hullinger R L, Andrisani O M. Hepatitis B virus X protein activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in dedifferentiated hepatocytes[J]. J Virol, 2002, 76(19): 9763-9772.

[7] Bouchard M J, Wang L H, Schneider R J. Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication[J]. Science, 2001, 294(5550): 2376-2378.

[8] Hodgson A J, Keasler V V, Slagle B L. Premature cell cycle entry induced by hepatitis B virus regulatory HBx protein during compensatory liver regeneration[J]. Cancer Res, 2008, 68(24): 10341-10348.

[9] Wu B K, Li C C, Chen H J, Chang J L, Jeng K S, Chou C K, Hsu M T, Tsai T F. Blocking of G1/S transition and cell death in the regenerating liver of Hepatitis B virus X protein transgenic mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(3): 916-928.

[10] He P, Zhang D, Li H, Yang X, Li D, Zhai Y, Ma L, Feng G. Hepatitis B virus X protein modulates apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells by activating the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(5): 1017-1029.

[11] Kim H J, Kim S Y, Kim J, Lee H, Choi M, Kim J K, Ahn J K. Hepatitis B virus X

Protein induces apoptosis by enhancing translocation of Bax to mitochondria[J]. IUBMB Life,2008,60(7):473-480.

[12] Miao J, Chen G G, Chun S Y, Lai P P. Hepatitis B virus X protein induces apoptosis in hepatoma cells through inhibiting Bcl-xL expression[J]. Cancer Lett, 2006, 236(1): 115-124.

[13] Kim S Y, Park S G, Jung H, Chi S W, Yu D Y, Lee S C, Bae K H. RKIP downregulation induces the HBx-mediated Raf-1 mitochondrial translocation[J]. J Microbiol Biotechnol, 2011, 21(5): 525-528.

[14] Pan J, Duan L X, Sun B S, Feitelson M A. Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B[J]. J Gen Virol, 2001, 82(Pt 1): 171-182.

[15] Shih W L, Kuo M L, Chuang S E, Cheng A L, Doong S L. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway[J]. J Biol Chem, 2000, 275(33): 25858-25864.

[16] Koike K. Hepatitis B virus X gene is implicated in liver carcinogenesis[J]. Cancer Lett, 2009, 286(1): 60-68.

[17] Ma J, Sun T, Park S, Shen G, Liu J. The role of hepatitis B virus X protein is related to its differential intracellular localization[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011, 43(8): 583-588.

[18] Rawat S, Clippinger A J, Bouchard M J. Modulation of apoptotic signaling by the hepatitis B virus X protein[J]. Viruses, 2012, 4(11): 2945-2972.

[19] Mcbride H, Scorrano L. Mitochondrial dynamics and physiology[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(1): 148-149.

[20] Nickel A, Kohlhaas M, Maack C. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 73: 26-33.

[21] Salvioli S, Bonafe M, Capri M, Monti D, Franceschi C. Mitochondria, aging and longevity--a new perspective[J]. FEBS Lett, 2001, 492(1-2): 9-13.

[22] Liesa M, Shirihai O S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrientutilization and energy expenditure[J]. Cell Metab, 2013, 17(4): 491-506.

[23] Wang X Z, Li D, Tao Q M, Lin N, Chen Z X. A novel hepatitis B virus X-interactive protein: cytochrome C oxidase III[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21(4): 711-715.

[24] Li D, Wang X Z, Yu J P, Chen Z X, Huang Y H, Tao Q M. Cytochrome C oxidase III interacts with hepatitis B virus X protein in vivo by yeast two-hybrid system[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(19): 2805-2808.

[25] Diaz F, Fukui H, Garcia S, Moraes C T. Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(13): 4872-4881.

[26] Mkaouar-Rebai E, Ellouze E, Chamkha I, Kammoun F, Triki C, Fakhfakh F. Molecular-clinical correlation in a family with a novel heteroplasmic Leigh syndrome missense mutation in the mitochondrial cytochrome c oxidase III gene[J]. J Child Neurol, 2011, 26(1): 12-20.

[27] Qi Z, He J, Su Y, He Q, Liu J, Yu L, Al-Attas O, Hussain T, Ding S, Ji L, Qian M. Physical exercise regulates p53 activity targeting SCO2 and increases mitochondrial COX biogenesis in cardiac muscle with age[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21140.

[28] Bafna S, Singh A P, Moniaux N, Eudy J D, Meza J L, Batra S K. MUC4, a multifunctional transmembrane glycoprotein, induces oncogenic transformation of NIH3T3 mouse fibroblast cells[J]. Cancer Res, 2008, 68(22): 9231-9238.

[29] Wu H, Rao G N, Dai B, Singh P. Autocrine gastrins in colon cancer cells Up-regulate cytochrome c oxidase Vb and down-regulate efflux of cytochrome c and activation of caspase-3[J]. J Biol Chem, 2000, 275(42): 32491-32498.

[30] Strogolova V, Furness A, Robb-Mcgrath M, Garlich J, Stuart R A. Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bc1-cytochrome c oxidase supercomplex[J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(8): 1363-1373.

[31] Wang S B, Murray C I, Chung H S, Van Eyk J E. Redox regulation of mitochondrial ATP synthase[J]. Trends Cardiovasc Med, 2013, 23(1): 14-18.

[32] You K R, Wen J, Lee S T, Kim D G. Cytochrome c oxidase subunit III: a

Molecular marker for N-(4-hydroxyphenyl) retinamise-induced oxidative stress in

Hepatoma cells[J]. J Biol Chem,2002,277(6):3870-3877.

[33] Lim W, Kwon S H, Cho H, Kim S, Lee S, Ryu W S, Cho H. HBx targeting to mitochondria and ROS generation are necessary but insufficient for HBV-induced cyclooxygenase-2 expression[J]. J Mol Med (Berl), 2010, 88(4): 359-369.

[34] Lee Y I, Hwang J M, Im J H, Lee Y I, Kim N S, Kim D G, Yu D Y, Moon H B, Park S K. Human hepatitis B virus-X protein alters mitochondrial function and physiology in human liver cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(15): 15460-15471.

[35] Ha H L, Yu D Y. HBx-induced reactive oxygen species activates hepatocellular carcinogenesis via dysregulation of PTEN/Akt pathway[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(39): 4932-4937.

[36] Bhogal R H, Curbishley S M, Weston C J, Adams D H, Afford S C. Reactive oxygen species mediate human hepatocyte injury during hypoxia/reoxygenation[J]. Liver Transpl, 2010, 16(11): 1303-1313.

[37] Jain M, Rivera S, Monclus E A, Synenki L, Zirk A, Eisenbart J, Feghali-Bostwick C, Mutlu G M, Budinger G R, Chandel N S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor-beta signaling[J]. J Biol Chem, 2013, 288(2): 770-777.

[38] Shen L, Zhang X, Hu D, Feng T, Li H, Lu Y, Huang J. Hepatitis B virus X (HBx) play an anti-apoptosis role in hepatic progenitor cells by activating Wnt/beta-catenin pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 383(1-2): 213-222.

[39] Srisuttee R, Koh S S, Kim S J, Malilas W, Boonying W, Cho I R, Jhun B H, Ito M, Horio Y, Seto E, Oh S, Chung Y H. Hepatitis B virus X (HBX) protein upregulates beta-catenin in a human hepatic cell line by sequestering SIRT1 deacetylase[J]. Oncol Rep, 2012, 28(1): 276-282.

[40] Lim K, Han C, Xu L, Isse K, Demetris A J, Wu T. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 activates beta-catenin in human cholangiocarcinoma cells: evidence for inhibition of these signaling pathways by omega 3 polyunsaturated fatty acids[J]. Cancer Res, 2008, 68(2): 553-560.

[41] Mcmahon J M, Conroy S, Lyons M, Greiser U, O'Shea C, Strappe P, Howard L,

Murphy M, Barry F, O'Brien T. Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a

Comparative study of viral and nonviral vectors[J]. Stem Cells Dev,2006,15(1):87-96.

[42] Rubinson D A, Dillon C P, Kwiatkowski A V, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney D L, Zhang M, Ihrig M M, Mcmanus M T, Gertler F B, Scott M L, Van ParijsL. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference[J]. Nat Genet, 2003, 33(3): 401-406.

[43] Kumar M, Jung S Y, Hodgson A J, Madden C R, Qin J, Slagle B L. Hepatitis B virus regulatory HBx protein binds to adaptor protein IPS-1 and inhibits the activation of beta interferon[J]. J Virol, 2011, 85(2): 987-995.

[44] Gearhart T L, Bouchard M J. The hepatitis B virus HBx protein modulates cell cycle regulatory proteins in cultured primary human hepatocytes[J]. Virus Res, 2011, 155(1): 363-367.

[45] Cheng B, Guo X, Zheng Y, Wang Y, Liu C, Li P. The effects of HBx gene on the expression of DNA repair enzymes hOGG1 and hMYHalpha mRNA in HepG2 cells[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009, 29(2): 187-192.

[46] Guifang Y, Yuehong Y, Ruixin W, Xianbo L, Wenting Z, Zhukelun. Establishment of a HepG2 cell line stably transduced with a lentivirus expressing the HBV X gene[J]. World Chinese Journal Of Digestology, 2012, 20(08): 638-643.

[47] Hu T, Fu Q, Chen P, Zhang K, Guo D. Generation of a stable mammalian cell line for simultaneous expression of multiple genes by using 2A peptide-based lentiviral vector[J]. Biotechnol Lett, 2009, 31(3): 353-359.

[48] Su J, Zhu Z, Wang Y, Xiong F, Zou J. The cytomegalovirus promoter-driven short hairpin RNA constructs mediate effective RNA interference in zebrafish in vivo[J]. Mar Biotechnol (NY), 2008, 10(3): 262-269.

[49] Nybo K. GFP imaging in fixed cells[J]. Biotechniques, 2012, 52(6): 359-360.

[50] Motavaf M, Safari S, Saffari J M, Alavian S M. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: the role of the virus x protein[J]. Acta Virol, 2013, 57(4): 389-396.

[51] Tian Y, Yang W, Song J, Wu Y, Ni B. Hepatitis B virus X protein-inducedaberrant epigenetic modifications contributing to human hepatocellular carcinoma pathogenesis[J]. Mol Cell Biol, 2013, 33(15): 2810-2816.

[52] Ng S A, Lee C. Hepatitis B virus X gene and hepatocarcinogenesis[J]. J Gastroenterol, 2011, 46(8): 974-990.

[53] Rahmani Z, Huh K W, Lasher R, Siddiqui A. Hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential[J]. J Virol, 2000, 74(6): 2840-2846.

[54] Takada S, Shirakata Y, Kaneniwa N, Koike K. Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death[J]. Oncogene, 1999, 18(50): 6965-6973.

[55] Geng X, Harry B L, Zhou Q, Skeen-Gaar R R, Ge X, Lee E S, Mitani S, Xue D. Hepatitis B virus X protein targets the Bcl-2 protein CED-9 to induce intracellular Ca2+ increase and cell death in Caenorhabditis elegans[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(45): 18465-18470.

[56] Yang B, Bouchard M J. The hepatitis B virus X protein elevates cytosolic calcium signals by modulating mitochondrial calcium uptake[J]. J Virol, 2012, 86(1): 313-327.

[57] Kim S J, Khan M, Quan J, Till A, Subramani S, Siddiqui A. Hepatitis B virus disrupts mitochondrial dynamics: induces fission and mitophagy to attenuate apoptosis[J]. PLoS Pathog, 2013, 9(12): e1003722.

[58] Liang L, Qu L, Ding Y. Protein and mRNA characterization in human colorectal carcinoma cell lines with different metastatic potentials[J]. Cancer Invest, 2007, 25(6): 427-434.

[59] Szabo G, Lippai D. Molecular hepatic carcinogenesis: impact of inflammation[J]. Dig Dis, 2012, 30(3): 243-248.

[60] Cheng A S, Chan H L, Leung W K, To K F, Go M Y, Chan J Y, Liew C T, Sung JJ. Expression of HBx and COX-2 in chronic hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: implication of HBx in upregulation of COX-2[J]. Mod Pathol, 2004, 17(10): 1169-1179.

[61] Bu X, Zhao C. The association between cyclooxygenase-2 1195 G/A polymorphism and hepatocellular carcinoma: evidence from a meta-analysis[J]. Tumour Biol, 2013, 34(3): 1479-1484.

[62] Hino K, Hara Y, Nishina S. Mitochondrial reactive oxygen species as a mystery

Voice in hepatitis C[J]. Hepatol Res,2014,44(2):123-132.

[63] Yang B, Bouchard M J. The hepatitis B virus X protein elevates cytosolic calcium signals by modulating mitochondrial calcium uptake[J]. J Virol, 2012, 86(1): 313-327.

[64] Gearhart T L, Bouchard M J. Replication of the hepatitis B virus requires a calcium-dependent HBx-induced G1phase arrest of hepatocytes[J]. Virology, 2010, 407(1): 14-25.

[65] Tang R, Kong F, Hu L, You H, Zhang P, Du W, Zheng K. Role of hepatitis B virus X protein in regulating LIM and SH3 protein 1 (LASP-1) expression to mediate proliferation and migration of hepatoma cells[J]. Virol J, 2012, 9: 163.

[66] Khattar E, Mukherji A, Kumar V. Akt augments the oncogenic potential of the HBx protein of hepatitis B virus by phosphorylation[J]. FEBS J, 2012, 279(7): 1220-1230.

[67] Gearhart T L, Bouchard M J. The hepatitis B virus HBx protein modulates cell cycle regulatory proteins in cultured primary human hepatocytes[J]. Virus Res, 2011, 155(1): 363-367.

[68] Cheng A S, Chan H L, Leung W K, To K F, Go M Y, Chan J Y, Liew C T, Sung JJ. Expression of HBx and COX-2 in chronic hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: implication of HBx in upregulation of COX-2[J]. Mod Pathol, 2004, 17(10): 1169-1179.

[69] Cheng A S, Yu J, Lai P B, Chan H L, Sung J J. COX-2 mediates hepatitis B virus X protein abrogation of p53-induced apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(2): 175-180.

[70] Nejak-Bowen K N, Monga S P. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad[J]. Semin Cancer Biol, 2011, 21(1): 44-58.

[71] Lachenmayer A, Alsinet C, Savic R, Cabellos L, Toffanin S, Hoshida Y, Villanueva A, Minguez B, Newell P, Tsai H W, Barretina J, Thung S, Ward S C, Bruix J, Mazzaferro V, Schwartz M, Friedman S L, Llovet J M. Wnt-pathway activation in two molecular classes of hepatocellular carcinoma and experimental modulation bysorafenib[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(18): 4997-5007.

[72] Tetsu O, Mccormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells[J]. Nature, 1999, 398(6726): 422-426.

[73] Gheorghiade M, Palazzuoli A, Ronco C. Acute heart failure treatment: traditional and new drugs[J]. Contrib Nephrol, 2010, 165: 112-128.

[74] Arzumanyan A, Friedman T, Ng I O, Clayton M M, Lian Z, Feitelson M A. Does the hepatitis B antigen HBx promote the appearance of liver cancer stem cells[J]. CancerRes, 2011, 71(10): 3701-3708.

**HBV X蛋白与线粒体相关的致病机制**

**【摘要】**HBV慢性感染与肝细胞癌（HCC）的发生、发展显著相关。由HBV X基因编码的x蛋白(HBx)是一种多功能蛋白，可以定位在线粒体，它通过蛋白质—蛋白质相互作用影响线粒体生理及其功能，导致线粒体膜通透性改变、膜电位的丢失、、

ATP合成降低、细胞色素C的释放、凋亡诱导因子以及钙释放到细胞质中、ROS增加、影响呼吸链酶复合体的表达和稳定性，并且调节细胞中铁代谢、诱导COX-2的表达增加，从而诱发肝细胞癌的发生、发展。本文针对以上问题，对HBx与线粒体相关的致病机制进行综述。

**【关键词】**HBV X 蛋白；线粒体；致病机制

**The Correlation of HBx Molecular Mechanisms with Mitochondria**

**【Abstract】**Chronic infection with HBV has been strongly associated with the

Development of hepatocellular carcinoma (HCC). HBx, encoded by the HBV genome, can be located on the mitochondrial membrane and acts as a multifunctional protein that interacts mitochondrial physiology and function though protein-protein interaction. HBx causes mitochondrial permeability transition, loss of mitochondrial membrane potential and ATP generation, releasing of cytochrome C as well as apoptogenic factors and Ca2+ to the cytoplasm, increasing of ROS, changing the expression and stability of Respiratory Chain Enzyme Complex, Also HBx regulates iron metabolism in cells, induces expression of COX-2, then induces the development of hepatocellular carcinoma (HCC). In this article, the correlation of HBx molecular mechanisms with mitochondria is discussed.

**【Key words】**HBV X protein; Mitochondria; Mechanism

目前全球约有3．5—4亿乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)慢性携带者[1][2]，每年约1百万死于HBV感染所致的肝衰竭、肝硬化、原发性肝癌[3]。HBV慢性感染与肝细胞癌（HCC）的发生、发展相关，但是二者的关系还没有完全阐明清楚，可能包括的机制有免疫介导的损伤、伴随的肝细胞再生以及HBX蛋白的活性作用[1]。因此，近年来对HBV X蛋白的研究越来越热。

HBV为含3．2 kb部分双链环状DNA的包膜病毒，其基因组含有4个重叠的开放读码框架，分别称为S、C、P和x区，此外还包括众多启动子和增强子等转录调节元件。HBx是HBV 4个开放读码框(ORF)中的 x 2ORF编码的病毒蛋白，为含有154个氨基酸的多肽，分子量17ku，由于其基因位于第1374—1836位核苷酸之间，是HBV基因组内功能重叠最明显的区域，因此决定了HBx功能的多样性。它并不直接与DNA结合，而是通过蛋白质—蛋白质相互作用来发挥功能的[4]。HBx具有广泛的基因转录调控作用，并能与宿主细胞的多种蛋白相互作用，从而调节基因表达及细胞蛋白功能，进而影响病毒自身的复制、宿主细胞的信号转导、细胞增殖与分化、细胞凋亡以及细胞癌变等。它可激活多种启动子和增强子，包含AP-1、AP-2、ATF／CREB、NF．kB、c／EBP、PI-3K及Egr—l或钙离子激活因子

NF—AT的DNA结合位点，还可激活RNA聚合酶I、Ⅱ、Ⅲ依赖性的启动子。研究表明HBx可与普通转录元件(TFIIB、TFIIH、RPB5 and TBP)，转录因子（CREB／ATF、

ATF2, C／EBPa、ATF3 1 NF—IL-6，Octl，SMAD4 and SREBPl）及转录辅因子相互作用[5]。然而，HBx的表达究竟是怎样影响病毒复制并导致HCC的发展还存在很大的争议。

HBx功能复杂多样，它在细胞中的不同定位发挥着不同的作用。HBx可以定位于细胞质和细胞核[6]。事实上，在感染HBV的病人以及大多数培养的肝细胞中发现

HBx主要定位在细胞质[7]，而且也利用荧光显微镜和激光共聚焦显微镜发现HBx大部分在细胞质和核周表达[8]。一些学者通过免疫荧光显微镜和亚细胞分级分离技术提出HBx可以定位在线粒体[9][10]。而线粒体是调节细胞凋亡、细胞能量代谢以及信号转导通路的关键细胞器[11]。HBx作用于肝瘤细胞系线粒体导致其生理及相关功能受影响：提高了活性氧（ROS）的水平，提高了脂质过氧化氢的产量，使线粒体膜电位增敏[12]。有证据表明局部过氧化物及自由基增多是致癌的关键因素[13]。这些充分提示了HBx引起的HCC可能通过HBx与线粒体的相互作用来实现的。因此，

在这里我们对HBx对线粒体的生理及其功能的影响进行综述，旨在进一步阐明HBx的作用机制，为HBV感染导致的肝脏损伤以及与其相关的肝细胞癌的进展的治疗提供新的靶点和依据。

**1 HBV X蛋白在线粒体的定位**

**1.1 HBx大部分定位于线粒体外膜**

在表达HBx的COS细胞[14]（一种猴肾细胞系细胞）、HepG2.215细胞[15]（一种稳定表达HBV cDNA复制复合物的HepG2细胞系细胞）、Huh7细胞[16]和HBx转基因小鼠肝细胞中[17]，都发现HBx定位于线粒体。Amy J. Clippinger and Michael J.

Bouchard[18]为了更好的模拟正常肝细胞的生理和功能，以原代小鼠肝细胞为模型系统，发现在原代小鼠肝细胞中HBx全部插入到线粒体外膜中，而在HepG2细胞中，HBx部分暴露在线粒体表面，部分插入到线粒体外膜中。虽然这些研究是在不同的细胞系细胞中展开的，但是他们都共同指出了线粒体大部分定位于线粒体外膜。

**1.2 HBx氨基酸序列中与线粒体定位有关的区域**

既然HBx定位于线粒体，那么HBx氨基酸序列中有关线粒体定位的必需区域的研究就显得格外重要。Kyung-Won Huh and Aleem Siddiqui[19]绘制了HBX中有关线粒体定位的区域，推断出一段跨膜区域（aa54-70）与线粒体定位相关，并指出HBx a-螺旋区域(aa 75–88 and aa 109–131)有助于HBx定位于线粒体。他们还进一步阐明HBX大多数定位于线粒体外膜，是它的本质特征，是基于它对胰岛素治疗的敏感和对碱治疗的抵抗。有研究发现，HBx定位在线粒体上的结合区域是aa68-117，这一区域是细胞凋亡必须的，但对于反式激活作用并非必须[20]。Sai Kam Li等[21]通过HBx中GFP绿色荧光蛋白的表达，以及人类肝细胞系带有GFP标签的HBx缩短突变的研究，显示HBx氨基酸序列的C末端对于它特异性定位于线粒体是不可缺少的。他们绘制出一段由7个氨基酸组成的C末端重要区域，指出该区域中第115位的半胱氨酸残基是HBx亚细胞定位最重要的残基，当它突变为丙氨酸时，HBx就不能特异性定位于线粒体。

HBx大多数定位于线粒体外膜，这将为进一步研究HBV相关的肝细胞癌提供线索和方向。同时HBx氨基酸序列中与线粒体定位有关的区域可以为RNi技术治疗慢性乙肝及其相关肝细胞癌提供新靶点。

**2 HBV X蛋白与线粒体相关的蛋白相互作用**

线粒体是调节细胞凋亡、细胞能量代谢以及信号转导通路的关键细胞器[11]。而HBx大多数定位于线粒体外膜，因此研究HBx对线粒体生理及其功能的影响将使HBV相关的肝细胞癌的致病机制进一步明朗。既然HBx并不直接与DNA结合，而是通过蛋白质—蛋白质相互作用来发挥功能的[4]，那么有必要对与HBx相互作用的与线粒体相关的蛋白进行研究。

**2.1线粒体膜完整性相关蛋白**

**2.1.1人类电压依赖型离子通道蛋白3(HVDAC3)**

VDAC是位于线粒体外膜的离子型孔道，对进出线粒体的代谢物的转运非常重要。有研究表明VDAC是线粒体膜上通透转位核孔复合体的成分之一，能调节线粒体的跨膜电位和细胞色素C的释放[22][23]。Rahman i[24]等通过酵母双杂交鉴定出能与HBx结合的新的靶蛋白，是电压依赖性离子通道蛋白家族的新成员，命名为

HVDAC3，他们认为HBx通过与HVDAC3相互作用，改变线粒体的功能。近来有学者利用激光共聚焦显微镜中双重免疫荧光证实了HVDAC3与HBx共同定位于线粒体，并导致线粒体膜电位的改变[25]。但也有人在HepG2细胞或者原代小鼠肝细胞中免疫共沉淀HBx与VDAC并不成功[26]。

**2.1.2线粒体膜通透性转换孔（MPTP）**

线粒体膜通透性转换孔（MPTP）是一种位于线粒体内膜的非选择性孔道，正常情况下，MPTP孔容许分子量小于1500的溶质通过，它的开放引起线粒体膜通透性改变，导致细胞色素C、凋亡诱导因子和Ca2+及膜间隙中的胱冬肽酶原等凋亡因子释放到细胞质中，致使细胞整体结构破坏、功能紊乱，发生凋亡。McClain等发现在HepG2细胞中，HBx作用于MPTP导致细胞质中钙水平的上升，应用环孢素

A—一种MPTP的抑制剂，可以阻断细胞质中钙水平的上升[27]。细胞之中钙信号以及MPTP的活性在HBx刺激HBV复制以及影响细胞周期调节蛋白方面是必须的[28]。环孢菌素的衍生物SD2 NIM811可以特异性阻断MPTP，从而影响HBV的复制[29]。这些研究都提出了一个推断：MPTP是一种与HBx相互作用的蛋白，其机制有待进一步研究。

**2.2细胞色素C氧化酶III ( COXIII )**

细胞色素c氧化酶复合体是最具特征的呼吸链酶复合体，由13个亚基组成，

COX III在复合酶的聚集和稳定性中起重要作用，并参与质子的传递和细胞色素c氧化酶介导的能量转换[30]。LI等通过酵母双杂交体系从成人正常肝细胞eDNA文库中筛选出一种新的x结合蛋白细胞色素C氧化酶Ⅲ(cyto—chrome c oxidaseIII, COXIII)，并指出HBV X基因下调COX蛋白表达，而对mRNA表达没有影响，说明HBV X基因主要影响COXIII的转录后表达水平[31]。HBV X基因抑制COXIII蛋白表达，还可能通过与COXIII结合改变其三维空间构象，导致复合物IV稳定性下降[32]。而抑制复合物IV活性可影响复合物I和复合物II、III的活性，进而影响呼吸链功能，导致跨膜电位下降[33]。COXIII的发现为研究HBV X基因在HCC发生、发展过程中的作用机制提供了良好的基础。

至于HBx与COXIII是如何作用，又是如何影响线粒体生理及其功能而作用于HBV相关的肝细胞癌，这些问题有待进一步研究探讨。

**2.3热休克蛋白60、70(HSP60、HSP70)**

研究发现，HSP70几乎全部定位在线粒体[34]；80-85%人类HSP60出现在线粒体，其他HSP60定位在线粒体外的区域，比如线粒体外膜附近、内质网以及细胞表面[35]。因HBx也大部分定位于线粒体外膜，我们可以大胆假设HBx与HSP60、HSP70之间可能存在相互作用。有人已经在试管和活体内利用亲和纯析和质谱法发现HBx的新的靶蛋白HSP60，利用标准免疫沉淀和免疫印迹法证实了HBX可以与线粒体

HSP60相互作用，从而促发HBx诱导的细胞凋亡，还指出HBx氨基酸序列中aa88-117是HSP60的结合区域[36]。S. M. Zhang[37]等利用双向凝胶电泳法以及质谱法发现HBx可以与人类肝细胞线粒体HSP60(GrpE)以及HSP70（DnaK）形成复合物，从而发挥它的功能，启动下游生物事件。还有学者报道HSP60与HSP70与鼠肝炎病毒基因组的3’端非翻译区结合[38]。HBx与线粒体热休克蛋白的相互作用将为研究HBV的致病机制提供一个新的研究方向。

**2.4转位到线粒体与HBx作用的蛋白**

**2.4.1原癌基因Raf-1的线粒体转位**

Raf-1是细胞质中一种分子量为300-500kDa的多蛋白复合体，由热休克蛋白

90以及二聚蛋白14-3-3组成的，它定位到线粒体将保护细胞免于压力介导的凋亡

[39]. 近期发现在HBx诱导的氧化应激可以导致Raf-1转位到线粒体，在HBx转基因小鼠中也发现这个现象，免疫共沉淀法证实了HBx与Raf-1形成一个蛋白-蛋白

复合物[40]。RKIP是Raf-1激酶的抑制剂，它可以与Raf-1结合，调节多条信号通路，特别是抑制Ras-Raf-1-MEK1/2-ERK1/2通路。在HBx介导的肝癌形成过程中，

RKIP的表达下调了，使得Raf-1的水平提高了，更多的Raf-1换位到线粒体，从而导致HBx介导的肝细胞癌的形成[41]。

**2.4.2细胞凋亡基因编码的蛋白Bax的线粒体转位**

Bax是Bcl-2家族蛋白的一员，它可以促进线粒体细胞色素C的释放，而Bcl-2可以抑制它的作用[42]。HBx可以直接结合于Bax，加强它转位到线粒体，进而导致线粒体膜电位的丢失和细胞色素C的释放，从而介导细胞凋亡，而Bax的抑制剂Bcl-2，可以抑制Bax的这些作用。HBx诱导细胞凋亡是通过与Bax相互作用并加强它转位到线粒体[43]。

**3 HBx对线粒体生理功能的影响及其与线粒体相关的致病机制**

既然HBx大部分定位于线粒体，那么它对线粒体生理功能的影响将进一步解释HBx诱导的肝细胞癌的发生机制。我们在前文中提到HBx与线粒体有关的蛋白质相互作用，会导致线粒体膜通透性改变、膜电位的丢失、细胞色素C的释放、凋亡诱导因子以及钙释放到细胞质中、影响呼吸链酶复合体的表达和稳定性。还有研究发现HBx会提高线粒体ROS的水平来影响线粒体的功能[44][45]。

**3.1 HBx致线粒体膜完整性改变**

在经典的细胞凋亡信号明显之前，线粒体经受的最主要的改变是膜的完整性受损，包括外膜和内膜。HBx作用于人类电压依赖型离子通道蛋白3(HVDAC3)导致外膜的通透性改变，从而引起多数的凋亡基因重分布，比如细胞色素C、AIF、以及线粒体膜间隙的Smac/DIA-BLO[46][47]。而这些细胞凋亡基因的重分布就是细胞凋亡的步骤之一。当HBx作用于MPTP时，导致线粒体内膜通透性改变，线粒体膜电位下降，从而ATP的产量下降[48]。

**3.2 HBx致ROS水平升高**

**3.2.1 ROS促进肝细胞癌的发生**

ROS是潜在的致癌物，因其在诱发突变、促进肿瘤生长和进展方面的作用[49]。如果没有适当调节好ROS的水平，那么过量的ROS将会损伤脂类、蛋白质或者DNA，抑制它们正常的功能[50]。ROS在所有介导肝脏纤维化的机制中起到了非常重要的作用[51]。它可以活化细胞信号通路，比如那些由分裂原活化蛋白激酶（MAPK）、核因

子（NF-κB）、磷脂酰肌醇3激酶（PI3K）、p53、β-catenin/Wnt通路来影响血管发生[52][53][54]。重要的是HBx活化MAPK、NF-κB、PI3K、p53、β-catenin被认为是导致HCC发展的重要因素。最近研究发现增加的ROS通过氧化灭活PTEN（一种通过去磷酸化Akt而发挥作用的肿瘤抑制物）激活促有丝分裂通路，从而激活

Akt、加快HepG2细胞的生长，与HBx转基因小鼠的肝癌形成密切相关。同时他们发现HBx诱导的ROS的增多可以进一步刺激HBx的表达，这提示了一个正反馈通路的存在，从而产生大量的H2O2，通过氧化应激诱导更多PTEN产生可逆的失活，促进肝癌的发生[55]。另外，在氧化应激作用下，HBV阳性的细胞通过Nrf2/ARE诱导细胞保护基因的表达[56]、下调p16INK4a的表达来逃避细胞凋亡[57]、激活H I F-1α的表达[58]，以及上文提及的促进原癌基因Raf-1的线粒体转位，这些都与

HBx相关的肝细胞癌的发生密切相关。

**3.2.2 ROS促进细胞凋亡**

相反，最近有学者研究发现表达HBx的肝细胞在暴露于氧化应激反应中，通过Caspase-3级联反应，加速Mcl-1蛋白的丢失，显著加强了肝细胞的死亡。Mcl-1是Bcl-2家族中的成员，发挥抗凋亡的作用，Mcl-1蛋白的丢失，增加了肝细胞对凋亡的敏感性[59]。

**3.2.3 ROS影响肝细胞铁代谢**

铁代谢在肝脏疾病中起着重要的作用，在HBV感染患者中正常的铁调节功能紊乱了，导致铁沉积。这些沉积的铁在肝细胞癌的形成过程中发挥着辅因子的作用[60]。铁是参与细胞复制和凋亡的重要因素，同时在ROS的产生所致的芬顿反应中也有铁的参加[61]。有研究发现，在Huh7-HBx细胞中，随着ROS水平的增加，转铁蛋白受体（FrR1）的表达下降了，铁调节蛋白1（IRP1）的铁蛋白重链下调了，总铁和游离铁水平都改变了，这些结果提示HBx通过ROS的水平调节铁代谢，从而导致肝脏的病理状态[62]。

**4. HBx致细胞质中钙水平提高**

钙离子是细胞中最普遍存在的信号转导原件，可以影响非常多细胞信号通路，从而调节细胞循环进程、细胞复制和细胞凋亡，因此，维持细胞内钙水平的稳定是进行生命活动的关键[63]。HBx作用于MPTP将使细胞质中钙水平上升，从而增加了HBx刺激的HBV复制；但是环孢菌素的衍生物，通过与线粒体相互作用，阻止

线粒体内的钙释放，从而抑制HBV的复制[64][65]。Tricia L等研究发现HBx依赖于线粒体的钙信号使肝细胞脱离G0期而停滞在G1期，从而改变细胞内环境，刺激

HBV的复制[28]。另外，HBx还依赖于钙信号诱导FAK（局部黏着斑）的活化，对HBx的复杂功能起到重要作用[66]。

**5其他**

COX-2是COX的一种可诱导的亚型，是炎症反应的关键介质。近年来有学者发现在转染HBV的肝细胞中，线粒体ROS以及细胞质钙信号将诱导COX-2 mRNA以及蛋白质的表达显著提高[67]。还有人指出HBx作用于线粒体，导致细胞内ATP水平下降，通过eIF2α/ATF4通路引起COX2的表达，从而参与到肝脏的炎症反应中[68]。

COX2的发现将为HBx相关的肝细胞癌的致病机制及治疗的研究提供新的思路。总之，HBV X蛋白（HBx）大多数定位于线粒体外膜，作用于与线粒体相关的蛋

白，包括人类电压依赖型离子通道蛋白3(HVDAC3)、线粒体膜通透性转换孔

（MPTP）、细胞色素C氧化酶III ( COXIII)热休克蛋白60、70（HSP60、HSP70）、以及转位到线粒体与HBx作用的蛋白——原癌基因Raf-1和细胞凋亡基因编码的

Bax蛋白，从而影响线粒体的生理及其功能，导致线粒体膜通透性改变、膜电位的丢失、细胞色素C的释放、ROS增加、ATP合成降低、凋亡诱导因子以及钙释放到细胞质中、影响呼吸链酶复合体的表达和稳定性，并且调节细胞中铁代谢、诱导COX-2的表达增加。线粒体生理及其功能受损后，引起线粒体相关的细胞凋亡、导致肝细胞病理状态的出现，并促进了肝细胞癌的发生。

参考文献：

[1] Seeger, C., F. Zoulim, and W. Mason. 2007. Hepadnaviruses, p. 2977–3029. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), Field's virology, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

[2] WHO. 2000, posting date. Hepatitis B fact sheet. http://www. who. int/mediacentre/factsheets/fs204/en/print. html.

[3] NeuveutC, WeiY, BuendiaMA． MechanismsofHBV-related hepatocarcinogenesis[J]． Hepatol, 2010, 52(4): 594-604．

[4] Maguire HF, Hoefﬂer JP, Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding speciﬁcity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. Science 1991; 252: 842–4

[5] Haviv I, Shamay M, Doitsh O, et a1． Hepatitis B virus pX targets TEIIB intranscription eoactivation[J]． Mol Cell Bid, 1998, 18, 1562—1569．

[6] Henkler, F., J. Hoare, N. Waseem, R. Goldin, M. McGarvey, R. Koshy, and I. King. 2001. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. J. Gen. Virol. 82: 871–882.

[7] Hoare, J., F. Henkler, J. J. Dowling, W. Errington, R. D. Goldin, D. Fish, and M. J. McGarvey. 2001. Subcellular localisation of the X protein in HBV infected hepatocytes. J. Med. Virol. 64: 419–426.

[8] Y. He, F. Yang, F. Wang, S. -X. Song, D. -A. Li, Y. -J. Guo & S. -H. Sun. 2007. TheUpregulation of Expressed Proteins in HepG2 Cells Transfected by the Recombinant Plasmid-containing HBx Gene[J]. Blackwell Publishing Ltd. Scandinavian Journal of Immunology 65, 249–256

[9] Henkler, F., J. Hoare, N. Waseem, R. D. Goldin, M. J. McGarvey, R. Koshy, and I. A. King. 2001. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. J. Gen. Virol. 82: 871–882.

[10] Shirakata, Y., and K. Koike. 2003. Hepatitis B virus X protein induces cell death bycausing loss of mitochondrial membrane potential. J. Biol. Chem. 278: 22071–22078.

[11] Salvioli, S., Bonafe, M., Capri, M., Monti, D., Franceschi, C., 2001. Mitochondria, aging and longevity. FEBS Lett. 492, 9–13.

[12] Young Ik Lee, Jung Me Hwang, Jee Hye Im, et al. Human Hepatitis B Virus-XProtein Alters Mitochondrial Function and Physiology in Human Liver Cells, 2004. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Vol. 279, No. 15, Issue of April 9, pp. 15460–15471

[13] Asare GA, Mossanda KS, Kew M C, et al. Hepatocellular carcinoma caused byiron overl ad: a possible mechanism of direct hepatocarcinogenicity [ J]. Toxicology, 2006, 219 ( 13) : 41-52.

[14] Rahmani, Z., K. -W. Huh, R. Lasher, and A. Siddiqui. 2000. Hepatitis B virus X

Protein colocalizes to mitochondria with human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential. J. Virol. 74:2840–2846.

[15] Takada, S., Y. Shirakata, N. Kaneniwa, and K. Koike. 1999. Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggre-gation at the nuclear periphery, leading to cell death. Oncogene 18: 6965–6973.

[16] Huh, K., and A. Siddiqui. 2002. Characterization of the mitochondrial association ofhepatitis B virus X protein, HBx. Mitochondrion 1: 349–359.

[17] Chen, J., and A. Siddiqui. 2007. Hepatitis B virus X protein stimulates the mitochondrial translocation of Raf-1 via oxidative stress. J. Virol. 81: 6757–6760.

[18] Amy J. Clippinger and Michael J. Bouchard. Hepatitis B Virus HBx ProteinLocalizes to Mitochondria in Primary Rat Hepatocytes and Modulates Mitochondrial Membrane Potential. J. JOURNAL OF VIROLOGY, July 2008, p. 6798–6811

[19] Kyung-Won Huh, Aleem Siddiqui. Characterization of the mitochondrial associationof hepatitis B virus X protein, HBx. J. Mitochondrion 1 (2002) 349–359

[20] Shirakata Y, Koike K． Hepatitis B virus X protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential[J]． J Biol Chem, 2003, 278(24): 22071—22078．

[21] Sai Kam Li, Sai Fan Ho, et al. Identiﬁcation of functionally important amino acid residues in the mitochondriatargeting sequence of Hepatitis B virus X protein. J. Virology. Virology 381 (2008) 81–88

[22] Green, D. R., and J. C. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. Science 281: 1309–1312.

[23] Marzo, I., C. Brenner, N. Zazami, S. A. Susin, G. Beutner, D. Brdiczka, R. Remy, Z. Xie, J. C. Reed, and G. Kroemer. 1998. The permeability transition complex: a target for apoptosis regulation by caspase and Bcl2-related proteins. J. Exp. Med. 187: 1261–1271.

[24] Rahmani Z, Maunoury C, SidiquiA. Isolation of a novel human voltagedependentanion channel gene [ J ]. Eur JH um Genet, 1998, 6( 4) : 337340.

[25] ZOHRA RAHMANI, KYUNG-WON HUH, ROBERT LASHER, AND ALEEM SIDDIQUI. Hepatitis B Virus X Protein Colocalizes to Mitochondria with a Human Voltage-Dependent Anion Channel, HVDAC3, and Alters Its Transmembrane Potential. J. JOURNAL OF VIROLOGY, Mar. 2000, p. 2840–2846

[26] Clippinger, A. J., Bouchard, M. J., 2008. Hepatitis B virus HBx protein localizes to mitochondria in primary rat hepatocytes and modulates mitochondrial membrane potential. J. Virol. 82, 6798–6811.

[27] McClain, S. L., Clippinger, A. J., et al., 2007. Hepatitis B virus replication isassociated with an HBx-dependent mitochondrion-regulated increase in cytosolic calcium levels. J. Virol. 81 (21), 12061–12065.

[28] Tricia L. Gearhart, Michael J. Bouchard, Replication of the hepatitis B virus requiresa calcium-dependent HBx-induced G1 phase arrest of hepatocytes. J. Virology 407 (2010) 14–25

[29] MichaelJ. Bouchard, RobynJ. Puro, LihuaWang, andRobertJ. Schneider. Activation and Inhibition of Cellular Calcium and Tyrosine Kinase Signaling Pathways Identify Targets of the HBx Protein Involved in Hepatitis B Virus Replication. J. JOURNAL OF VIROLOGY, July 2003, p. 7713–7719

[30] Hynes RO． Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines[J]． Cell,

2002, 110(6): 673—687．

[31] Lin N, Li D, ChenHY, et al. Effect of HBV X gene on mitochondria in HL7702 cells [ J]. Xi Bao Yu Fen ZiM i an Yi Xue Za Zhi, 2008, 24 ( 10): 972974 .

[32] Li Y, D Aurelio M, Deng J H, et al. An assembled complex maintains the stabilityand activity of complex I in mammalian mitochondria [ J]. J Biol Chem, 2007, 282( 24 ) : 17557-17562.

[33] Hargreaves I P, Dun can AJ, Wu L, et a l. I nhibition of mitochondrial complex IVleads to secondary loss complex II -III activit y : implications for the pathogenesis and treatment of mitochondrial encephalo myopathies [ J ]. Mitochondrion, 2007, 7 ( 4) : 284-287.

[34] Timothy B, Nathony NK, et al. (1995) Cloning and subcellular localization ofhuman mitochondrial hsp70. J. Biol Chem 270: 1705–1710

[35] Soltys BJ, Gupta RS (1996) Immunoelectronmicroscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells. Exp Cell Res 222: 16–27

[36] Yasuo T, Fumihiko K, Takayuki K (2004) Interaction of the hepatitis B virus X

Protein (HBx) with heat shock protein 60 enhances HBx-mediated apoptosis. Biochem Bioph Res Co 318: 461–469

[37] S. M. Zhang, D. C. Sun, S. Lou, X. C. Bo, Z. Lu, X. H. Qian, and S. Q. Wang. HBx protein of hepatitis B virus (HBV) can form complex with mitochondrial HSP60 and HSP70. J. Arch Virol (2005) 150: 1579–1590

[38] Nanda SK, Johnson RF, Liu Q (2004) Mitochondrial HSP70, HSP40, and HSP60bind to the 3'untranslated region of the Murine hepatitis virus genome. Arch Virol 149: 93–111

[39] Fabian, R., I. O. Daar, and D. K. Morrison. 1998. Critical tyrosine residues regulatethe enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. Mol. Cell. Biol. 13: 7170–7179.

[40] Jun Chen1, and Aleem Siddiqui. Hepatitis B Virus X Protein Stimulates the Mitochondrial Translocation of Raf-1 via Oxidative Stress. J. JOURNAL OF VIROLOGY, June 2007, p. 6757–6760

[41] Kim, Sun Young, Sung Goo Park, Hyeyun Jung, Seung-Wook Chi, Dae Yeul Yu, Sang Chul Lee, and Kwang-Hee Bae. RKIP Downregulation Induces the HBx-Mediated Raf-1 Mitochondrial Translocation. J. Microbiol. Biotechnol. (2011), 21(5), 525–528

[42] [RosséT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Ross%18%16%20T%22%5bAuthor%5d), [Olivier R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Olivier%20R%22%5bAuthor%5d), [Monney L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Monney%20L%22%5bAuthor%5d), [Rager M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Rager%20M%22%5bAuthor%5d), [Conus S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Conus%20S%22%5bAuthor%5d), [Fellay I](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Fellay%20I%22%5bAuthor%5d), [Jansen B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Jansen%20B%22%5bAuthor%5d), [Borner](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Borner%20C%22%5bAuthor%5d) [C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Borner%20C%22%5bAuthor%5d). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. [Nature. 1998](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9461208) [Jan 29; 391](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9461208), 496-499.

[43] [Kim HJ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Kim%20HJ%22%5bAuthor%5d) [Kim SY,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Kim%20SY%22%5bAuthor%5d) [Kim J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Kim%20J%22%5bAuthor%5d) [Lee H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Lee%20H%22%5bAuthor%5d), [Choi M,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Choi%20M%22%5bAuthor%5d) [Kim JK,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Kim%20JK%22%5bAuthor%5d) [Ahn JK](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Ahn%20JK%22%5bAuthor%5d). Hepatitis B virus Xprotein induces apoptosis by enhancing translocation of Bax to mitochondria. J. IUBMB Life. 2008 Jul; 60(7): 473-80.

[44] Lee YI, Hwang JM, Im JH, Lee YI, Kim NS, Kim DG, Yu DY, Moon HB, Park SK. Human hepatitis B virus-X protein alters mitochondrial function and physiology in human liver cells. J Biol Chem 2004; 279: 15460-15471

[45] Lim W, Kwon SH, Cho H, Kim S, Lee S, Ryu WS, Cho H. HBx targeting tomitochondria and ROS generation are necessary but insufficient for HBV-induced cyclooxygenase-2 expression. J Mol Med 2010; 88: 359-369

[46] Green, D. R., and Reed, J. C. (1998) Science 281, 1309–1312

[47] Kroemer, G., and Reed, J. C. (2000) Nat. Med. 6, 513–519

[48] Yumiko Shirakata and Katsuro Koike. Hepatitis B Virus X Protein Induces Cell Death by Causing Loss of Mitochondrial Membrane Potential. J. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 2003. pp. 22071–22078.

[49] Drög e W. Oxidative stress and aging. Adv Exp Med Biol 2003; 543: 191-200

[50] Perry G, Raina AK, Nunomura A, Wataya T, Sayre LM, Smith MA. How important is oxidative damageLessonsfromAlzheimer'sdisease. FreeRadicBiolMed2000; 28: 831-834

[51] Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. J Hepatol

2001; 35: 297-306

[52] Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. J Cell Physiol 2002; 192: 1-15

[53] Tien Kuo M, Savaraj N. Roles of reactive oxygen species in hepatocarcinogenesisand drug resistance gene expression in liver cancers. Mol Carcinog 2006; 45: 701-709

[54] Czaja MJ. Cell signaling in oxidative stress-induced liver injury. Semin Liver Dis 2007; 27: 378-389

[55] Hye-Lin Ha, Dae-Yeul Yu. HBx-induced reactive oxygen species activateshepatocellular carcinogenesis via dysregulation of PTEN/Akt pathway. J. World J Gastroenterol2010 October 21; 16(39): 4932-4937

[56] Stephanie Schaedler, Janis Krause, Kiyoshi Himmelsbach, Monica Carvajal-Yepes, Franziska Lieder, Karin Klingel, Michael Nassal, Thomas S. Weiss, SabineWerner, and Eberhard Hildt. Hepatitis B Virus Induces Expression of Antioxidant ResponseElement-regulated Genes by Activation of Nrf2. J. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 2010; 285(52): 41074–41086.

[57] Ye-Jin Kim, Jin Kyu Jung, Sun Young Lee, Kyung Lib Jang. Hepatitis B virus Xprotein overcomes stress-induced premature senescence by repressing p16INK4a expression via DNA methylation. J. Cancer Letters 288 (2010) 226–235

[58] L i u KG, X ieHH, L i u J. Expressions of hepatitis B virus X protein andhypoxiainducible factor-1 i n hepatocellular carcinoma and possible relationships [ J]. Ch i n JH epatol, 2007, 15( 2) : 122126 .

[59] Liang Hu1, Lei Chen, GuangZhen Yang, Liang Li, HanYong Sun, YanXin Chang, QianQian Tu, MengChao Wu and HongYang Wang. HBx Sensitizes Cells to Oxidative Stress-induced Apoptosis by Accelerating the Loss of Mcl-1 Protein via Caspase-3 Cascade. J. Hu et al. Molecular Cancer 2011, 10: 43

[60] Huang, X., 2003. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. Mutat. Res. 533 (1–2), 153–171.

[61] Toyokuni, S., 2002. Iron and carcinogenesis: from Fenton reaction to target genes. Redox Rep. 7 (4), 189–197.

[62] Jin-Mo Gu, Seung Oe Lim, Sae Jin Oh, So-Mi Yoon, Je Kyung Seong, Guhung Jung. HBx modulates iron regulatory protein 1-mediated iron metabolism via reactive oxygen species. J. Virus Research 133 (2008) 167–177

[63] Nicotera P, Zhivotovsky B, Orrenius S. Nuclear calcium transport and the role ofcalcium in apoptosis. Cell Calcium 1994; 16: 279-88

[64] JJane C. Oh, Deuk-Lim Jeong, In-Kyung Kim and Sang-Hwan Oh. Activation of calcium signaling by hepatitis B virus-X protein in liver cells. J. EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE. 2003. 35( 4) 301-309.

[65] Wei-Liang Xia, Yan Shen and Shu-Sen Zheng. Inhibitory effect of cyclosporine A onhepatitis B virus replication in vitro and its possible mechanisms. J. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2005; 4: 18-22.

[66] Michael J. Bouchard, Lihua Wang, and Robert J. Schneider. Activation of Focal Adhesion Kinase by Hepatitis B Virus HBx Protein: Multiple Functions in Viral Replication. J. JOURNAL OF VIROLOGY, May 2006, p. 4406–4414

[67] Wonchung Lim, Soon-Hwan Kwon, Hyeseon Cho, Sujeong Kim, Seungmin Lee, Wang-Shick Ryu, Hyeseong Cho. HBx targeting to mitochondria and ROS generation are necessary but insufficient for HBV-induced cyclooxygenase-2 expression. J. Mol Med (2010) 88: 359–369

[68] Hyun Kook CHO, Kyu Jin CHEONG, Hye Young KIM and JaeHun

CHEONG. Endoplasmic reticulum stress induced by hepatitis B virus X protein enhances cyclo-oxygenase 2 expression via activating transcription factor 4. J. Biochem(2011) 435, 431–439

致 谢

时光荏苒，博士生生涯即将结束。这三年时间里，在老师和同学的帮助下一路走来，经历过实验的迷茫与磨练，也有临床的兴奋与挑战，每一步都凝聚了自己的汗水，每一步都离不开老师的关怀。

在此，我首先要衷心感谢我尊敬的导师王小众教授，三年来不但在学习、科研、临床工作上对我严格要求，悉心教导和辛勤栽培，同时在生活上也给予我无微不至的关怀和照顾，我将铭记于心。导师精湛的医学技术、严谨求实的科学态度、朴实无华的人格魅力和宽厚待人的博大胸怀，深深地感染并激励着我，使我受益终身。

感谢福建医科大学附属协和医院消化研究所的黄月红老师和陈治新老师在科研过程中给予的帮助与指导！感谢消化研究所各位师兄师姐的帮助与支持！

感谢福建医科大学附属协和医院消化内科的各位前辈们，在临床学习过程中给予的悉心指导与帮助。

感谢三年来每一位曾经帮助、关心、支持我的老师、朋友和同学，特别感谢师姐邹来玉博士、方雪芬硕士、庄铭锴硕士、郭杞兰硕士等等，在生活、学习及实验过程中给予的无私帮助。

感谢我的家人在这三年来对我学习、工作、生活的支持与关怀，正是你们一直以来默默的付出和支持才让我顺利完成学业！