

转 HBx 基因肝癌细胞增殖与抗凋亡特性研究

闵 军¹, 刘彦文², 陈积圣¹, 罗树红², 余新炳²

(中山医科大学 1. 孙逸仙纪念医院肝胆外科, 广东 广州 510120; 2. 寄生虫学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】研究转 HBx 基因肝癌细胞增殖与拮抗凋亡特性, 探讨肝癌恶性表型的分子基础。【方法】以携 HBx 基因重组逆转录病毒感染 QGY7701 肝癌细胞, G418 筛选, PCR 与 RT-PCR 鉴定; 流式细胞仪(FCM)检测细胞增殖周期; 用阿霉素诱导细胞凋亡, FCM 定量检测。【结果】QGY7701 肝癌细胞经 HBx 基因转染后, G418 筛选 4~6 周获阳性克隆株 QGY/HBx, PCR 与 RT-PCR 分别证实细胞有 HBx 基因整合与 HBx mRNA 表达; 细胞周期分析结果表明, QGY/HBx 细胞的细胞周期进程明显加快, 并可明显抵制阿霉素的凋亡诱导作用。【结论】HBx 基因可加速肝癌细胞周期的进程, 并增强肝癌细胞的抗凋亡能力。

关键词: 肝肿瘤; 基因, HBx; 细胞周期; 凋亡; 转基因

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0046-04

Studies on Characteristics of Proliferation and Apoptosis Resistance in Hepatocellular Carcinoma Cells with HBx Gene Transferred

MIN Jun¹, LIU Yan-wen², CHEN Ji-shen¹, LUO Shu-hong², YU Xin-bin²

(1. Department of Hepato-biliary Surgery, Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China; 2. Department of Parasitology, Sun Yet-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract:【Objective】To study the effects of transferred HBx gene on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma (HCC) cells for investigation of the molecular basis of malignancy behavior of HCC. 【Methods】QGY7701 HCC cells were infected with recombinant retrovirus carrying HBx gene and then selectively cultured with G418 and identified by PCR and RT-PCR techniques. The cell cycle and apoptosis induced by adriamycin (ADM) were determined by flow cytometer (FCM) respectively. 【Results】QGY7701 cells with HBx gene transferred were selectively cultured with G418 and the positive clones QGY/HBx obtained in 4 to 6 weeks. A HBx gene integration was detected by PCR in the genomic DNA of QGY/HBx cells and a steady expression of HBx mRNA by RT-PCR. The process of cell cycle of QGY/HBx cells were faster than QGY7701 cells. The QGY/HBx cells could resist the apoptosis induced by adriamycin. 【Conclusions】HBx gene could improve the proliferation ability of HCC cells. HCC cells modified by HBx gene could resist the apoptosis induced by adriamycin.

Key words: liver neoplasma; gene, HBx; cell cycle; apoptosis; transgenes

原发性肝癌的发生与 HBV 慢性感染密切相关。多年来, 在 HBV 及其编码分子的致癌特性和机制方面已进行了大量研究, 而对于 HBV 与肝癌生物学行为间关系的研究却鲜见报道。肝癌是一

种恶性程度极高的肿瘤, 具有生长快速、易转移和复发、广泛的耐药性等特征。鉴于 HBV 编码的一些致癌分子如 HBx、PreS/S 蛋白等在肝癌组织中的持续高水平表达^[1, 2], 我们推测, 肝癌的恶性行

收稿日期: 2000-04-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39700135, 39970718); 国家教委博士点基金资助项目(9750); 广东省博士后基金资助项目

作者简介: 闵 军(1965-)男, 湖北黄石人, 博士, 讲师

© 1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为一方面与其本身的病理特征有关,另一方面可能与HBV编码分子对肝癌生物学行为的潜在作用有关。本文研究转HBx基因肝癌细胞的增殖和拮抗凋亡特性,探讨肝癌恶性表型的分子基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

携HBx基因重组逆转录病毒为本室构建;人肝癌细胞系QGY7701购自上海中科院细胞库,G418购自Boehringer Mannheim公司, RNA酶(RNase A)与PCR试剂购自华美生物工程公司,DNA-Prep Reagent Kit为美国COULTER公司产品,阿霉素(Adriamycin, ADM)购自Farmitalia公司。

1.2 肝癌细胞HBx基因转染、筛选与鉴定

QGY7701肝癌细胞在含 $\varphi = 10\%$ 小牛血清的RPMI1640培养基中、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\varphi = 5\%$ CO_2 条件下培养至对数生长期时,加入 2×10^5 CFU携HBx基因重组逆转录病毒,吸附3 h后,加入完全培养基继续培养48 h后,用终质量浓度为300 mg/L G418的培养液选择培养,逐渐加大G418质量浓度至600 mg/L,并继续培养至抗性克隆形成。提取细胞基因组DNA与总RNA,再进行HBx基因PCR反应RT-PCR反应。以甘油醛3磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因RT-PCR产物作为内参照,引物序列参照文献[3]。

1.3 流式细胞仪(FCM)分析

静止期(G_0 期)细胞诱导:将转基因和未转基因的肝癌细胞在含 $\varphi = 10\%$ 小牛血清的RPMI1640培养基中、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\varphi = 5\%$ CO_2 条件下培养12 h,吸出细胞培养液,换含 $\varphi = 0.2\%$ 小牛血清的低血清RPMI1640培养基继续培养48 h后,胰酶消化收集细胞,此时细胞处于增殖相对的静止状态,即 G_0 期阻滞状态。

FCM分析:将上述细胞按 5×10^5 细胞/瓶接种在100 mL培养瓶中,以含 $\varphi = 15\%$ 小牛血清的RPMI1640培养基培养,刺激细胞增殖,分别于0、12、24、36和48 h收集细胞,PBS洗一次,加1 mL预冷PBS重悬细胞,加10 mL $\varphi = 70\%$ 乙醇4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。应用美国COULTER公司的DNA-Prep Reagent Kit试剂和ELITE

流式细胞仪检测细胞DNA含量,并用Phoenix公司的Multicycle软件处理,计算各细胞周期的DNA含量和百分数。

1.4 细胞凋亡诱导与定量检测

接种 1×10^5 个细胞到25 mL培养瓶中,于含 $\varphi = 10\%$ 小牛血清的RPMI1640培养基中、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\varphi = 5\%$ CO_2 条件下培养24 h,加入终浓度为1 g/L的阿霉素(adriamycin, ADM),分别诱导3 h和4 h后收集细胞, $\varphi = 70\%$ 乙醇固定,FCM检测各细胞周期DNA含量。

2 结 果

2.1 转HBx基因肝癌细胞株的建立与鉴定

将重组逆转录病毒上清感染QGY7701人肝癌细胞株,经G418筛选4~6周后克隆形成,收集细胞扩大培养,将该细胞株命名为QGY/HBx。对其基因组DNA与细胞总RNA进行HBx基因PCR与RT-PCR反应,分别扩增出特异的500 bp左右片段(图1、2),表明HBx基因已整合到细胞的基因组中、且有HBx mRNA的转录表达。



图1 转基因肝癌细胞基因组DNA HBx基因PCR扩增
Fig. 1 PCR amplification of HBx gene in the genomic DNA of the gene transferred HCC cells

M 1: PCR Marker; 1: Positive control of HBx gene; 2: QGY/HBx cells; 3: QGY7701 cells

2.2 转HBx基因对肝癌细胞细胞周期的影响

低血清培养可使细胞处于增殖相对静止状态,即 G_0 期阻滞状态。本实验先用低血清诱导QGY7701和QGY/HBx细胞至 G_0 期,然后用较高浓度血清刺激细胞生长,使其进入增殖期,用FCM检测生长0、12、24、36、48 h时各细胞周期的百分比,结果见表1,与静息期细胞(0 h)比,QGY/HBx细胞在12 h时的S期细胞的比例(61.5%)显著上升,在24 h时, G_2/M 期细胞比例达26.5%,比12h时(16.0%)明显上升,表明QGY/HBx细胞由

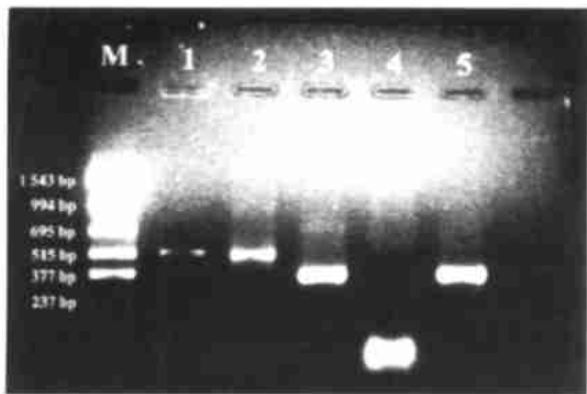


图2 转基因肝癌细胞 HBx 基因 RT-PCR 扩增

Fig. 2 HBx gene RT-PCR amplification in the gene transferred HCC cells

M1: PCR Marker, 1: Positive control of HBx gene, 2: HBx gene of QGY/HBx cells, 3: GAPDH of QGY/HBx cells, 4: HBx gene of QGY7701 cells, 5: GAPDH of QGY7701 cells

$G_0/G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2/M$ 的过程非常迅速。而 QGY7701 细胞在 12 h 时仅为 35.1%, 24 h 时 G_2/M 期细胞比例(11.6%)比 12 h(15.9%)时增高也不明显, 说明 QGY7701 细胞由 $G_0/G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2/M$ 的增殖过程缓慢且不明显。

2.3 细胞凋亡的诱导与定量检测

QGY7701 和 QGY/HBx 细胞经 ADM 培养 3 h 和 4 h 后, FCM 测定结果见表 1 与图 3、4。QGY7701 细胞在 G_0/G_1 峰之前出现一个明显的亚二倍体峰(sub G_1), 即凋亡峰, 其值分别为 27.8%和 36.5%, 说明 QGY7701 细胞在 ADM 诱导 3 h 和 4 h 后, 分别有 27.8%和 36.5%的细胞发生凋亡。与此同时, QGY7701 的 S 期细胞百分比升高, 而 G_2/M 期细胞百分比则降低。检测 QGY/HBx 细胞 3 h 和 4 h 的凋亡细胞百分比分别为 7.2%和 12.6%, 显著低于 QGY7701 细胞, 并且其 S 期和 G_2/M 期细胞百分比无明显变化。说明 QGY/HBx 细胞可拮抗 ADM 诱导的凋亡。

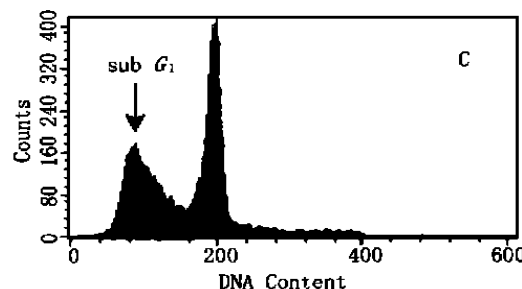
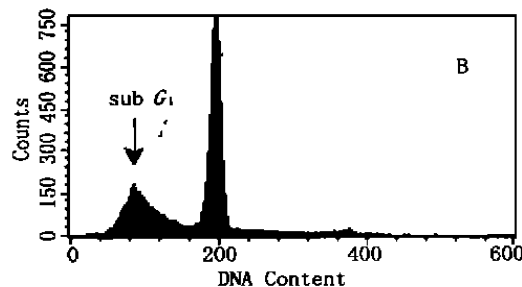
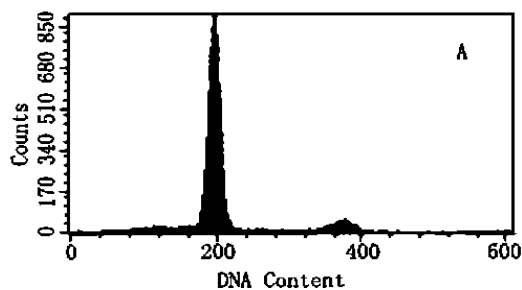


图3 ADM 作用后 QGY7701 细胞凋亡的 FCM 检测

Fig. 3 Apoptosis detected by FCM in QGY7701 cells with ADM treated

A, 0 h; B, 3 h; C, 4 h

3 讨论

HBx 基因是 HBV 4 个开放阅读框中最小的一个, 其蛋白产物是具有反式激活作用的多功能转录调节因子, 可通过激活癌基因与细胞因子基因启动子调节细胞的生长、分化。Koike 等^[4]于 1994 年首

表 1 ADM 对肝癌细胞的凋亡与细胞周期分布的影响

Table 1 Effects of ADM on the apoptosis and cell cycle distribution of HCC cells

Cell types	ADM (h)	Distribution of cell cycle			Proportion of apoptosis cells (%)
		G_0/G_1	S	G_2/M	
QGY7701	0	60.7	27.4	11.9	2.5
	3	60.1	33.8	6.1	27.8 ¹⁾
	4	58.0	38.4	4.6	36.5 ¹⁾
QGY/HBx	0	63.0	26.8	10.2	2.7
	3	58.9	28.4	14.7	7.2
	4	59.2	29.1	11.7	12.6

1) Compared with QGY/HBx cells, $P < 0.01$

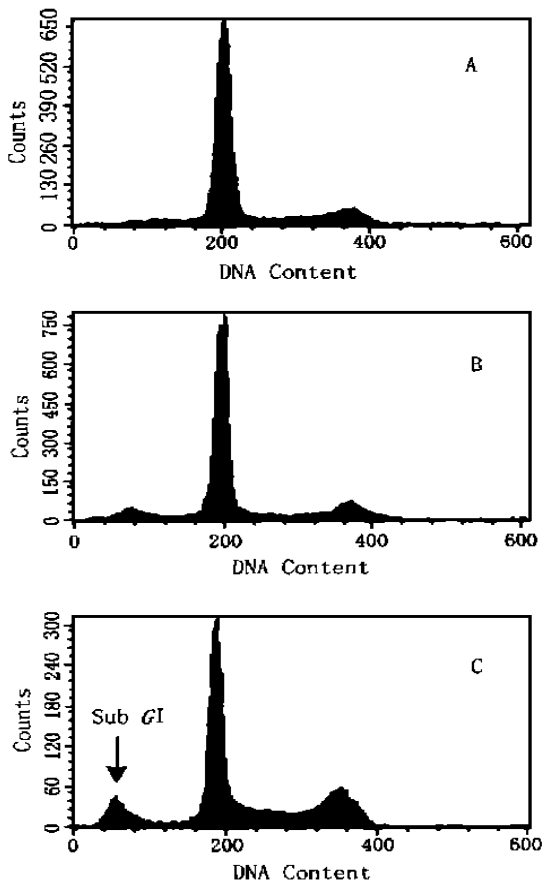


图4 ADM作用后QGY/HBx细胞凋亡的FCM检测
Fig. 4 Apoptosis detected by FCM in QGY/HBx cells with ADM treated
A, 0 h; B, 3 h; C, 4 h

先证明HBx基因具有丝裂原活性。他们将HBx基因导入小鼠成纤维细胞NIH3T3细胞中,然后用地塞米松诱导,结果发现细胞DNA合成增加、细胞周期进程加快。其后,Benn等^[5]又报道,HBx基因可下调Chang氏肝细胞的 G_0/G_1 和 G_2/M 检测点(check point)状态,促进细胞增殖,从而进一步证实HBx基因具有促进细胞有丝分裂的作用。在本实验中,我们研究了HBx基因对肝癌细胞增殖的影响。先采用低血清培养诱导QGY7701和QGY/HBx细胞进入增殖的相对静止状态,即让大部分细胞处于 G_0 期。通常,细胞由 G_0 期阻滞状态进入 S 期的过程较缓慢。本研究结果也表明:经血清诱导后,QGY7701细胞由 G_0/G_1 期进入 S 期的时间为24 h,处于 S 期的细胞数目也较少;而HBx基因阳性的QGY/HBx细胞由 G_0/G_1 期进入 S 期的时间为12 h,且大部分细胞均处于 S 期,在12~24 h,细胞由 S 期迅速进入 G_2/M 期;说明细胞增殖周期的进程明显加快, G_0/G_1 和 G_2/M 检测点状态下调。这与上述报道相符。细胞的增殖与拮抗

凋亡是两种相关的生物学行为,具有相似的分子机制。因此,我们还研究了转HBx基因对肝癌细胞抗凋亡特性的影响。

阿霉素(ADM)是临床上常用的化疗药物,其杀伤肿瘤细胞的机理与损伤细胞DNA,诱导细胞凋亡有关。在本实验中,我们应用终质量浓度为1.0 g/L的ADM在体外对QGY7701肝癌细胞分别作用3 h和4 h,经流式细胞仪定量分析,各有27.8%和36.5%发生凋亡,说明此质量浓度可成功诱导肝癌细胞凋亡。经用同样条件培养QGY/HBx细胞,凋亡细胞比例仅为7.2%和12.6%,表明QGY/HBx细胞对ADM具有耐受性。

本研究结果表明,HBx基因可下调肝癌细胞检测点状态,促进肝癌细胞增殖,并增强肝癌细胞的抗凋亡能力。这可能是肝癌细胞呈现较强恶性表型的机制之一。鉴于临床上约半数以上的肝癌对化疗药物均不敏感^[6]及本研究显示转HBx基因肝癌细胞对ADM的耐受现象,我们初步推测HBx基因可能与肝癌细胞耐药行为有关。

参考文献:

- [1] 张帆,朱源荣,孙宗棠.中国高发区肝细胞癌中HBVx基因的广泛存在及与P53基因249密码子高频突变的相关性[J].中华肿瘤杂志,1998,20(1):18.
- [2] Natoli G, Avantaggiati M L, Hofschneider P H, *et al*. Characterization of the hepatitis B virus preS/S region encoded transcriptional transactivator [J]. *Virology*, 1992, 187(2): 663.
- [3] Nardone G, Romano M, Calabro A, *et al*. Activation of fetal promoters of insulinlike growth factor II gene in hepatitis C virus-related chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 1996, 23(6): 1304.
- [4] Koike K, Morriya K, Yotsuyanagi H, *et al*. Induction of cell cycle progression by hepatitis B virus HBx gene expression in quiescent mouse fibroblasts [J]. *J Clin Invest*, 1994, 94(1): 84.
- [5] Benn J, Schneider R. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(24): 11215.
- [6] Shimada M, Takenaka K, Kawahara N, *et al*. Chemosensitivity in primary liver cancers: evaluation of the correlation between chemosensitivity and clinicopathological factors [J]. *Hepatogastroenterol*, 1996, 43(11): 1159.

(编辑 张敏瑞)