

稳定转染HBx基因的HepG2细胞株的建立及其对p53-p21途径的影响



曹鹏飞¹, 柳永和², 贺玉香³

Establishment of Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2 Stably Transfected by Hepatitis B Virus X Gene and Its Effects on p53-p21 Pathway

CAO Pengfei¹, LIU Yonghe², HE Yuxiang³

1. Department of Hematological Research, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Inspection Department, Xiangya School of Medicine, Central South University; 3. Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central South University

Abstract: Objective To establish the HepG cell line with stably transfected hepatitis B virus X gene and to study its effects on the p53-p21 pathway. **Methods** Lipofectamine was used to transfect the eukaryotic expression vector pcDNA3.1-HBx into human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. G418 was used to select the cell clones for stable expression of the HBx protein of HBV. Cell growth curve and clone plate experiment were used to analyse the malignant phenotype and the growth of hepatocellular carcinoma cells. Flow cytometry was used to assay the apoptosis rate and cell cycle. p53 protein expression levels were detected by Western blot and p21 mRNA levels were detected by RT-PCR. **Results** pcDNA3.1-HBx gene HepG2 cell line was successfully established. The cell growth and clone plate assay revealed that these cells had a relatively increased malignant phenotype. The results of flow cytometry also manifested that apoptosis rate of these transfected cells were higher than that of HepG2 cells. The cell number of G₁/G₀ cycle phase decreased and the cell number of G₂ cycle phase increased, while the expression of p53 protein increased and p21 mRNA decreased in those cells. **Conclusion** The HBx protein could promote the growth of hepatocellular carcinoma cells. The cell line stably transfected by HBx gene could enhance its malignancy through p53-p21 pathway.

Key words: Hepatitis B virus x gene; Eukaryotic expression vector; HepG2 cell; p53-p21 pathway

摘要: 目的 将构建的乙型肝炎病毒X基因的真核表达载体稳定转染HepG2细胞株, 并研究转染后对p53-p21途径的影响。方法 用基因转染的方法将已构建的载体pcDNA3.1-HBx 转染入肝癌细胞HepG2中, G418筛选出稳定转染X基因的细胞株。细胞生长曲线、平板克隆形成实验检测转染后肝癌细胞的恶性表型, 流式细胞仪检测细胞凋亡和周期, Western blot检测p53蛋白的表达, RT-PCR检测p21基因。结果 成功筛选出pcDNA3.1-HBx稳定转染的HepG2细胞株; 细胞生长实验、平板克隆形成实验显示稳定转染乙型肝炎病毒X基因的肝癌细胞恶性表型增高; 流式细胞仪结果显示, 转染后的细胞株凋亡率增高, G₁/G₀期细胞减少, G₂期细胞增多; Western blot 和RT-PCR分别显示, 转染株p53蛋白表达增高, 且下调p21基因水平。结论 乙型肝炎病毒X蛋白可刺激肝癌细胞生长, 稳定转染X基因的细胞株可能通过p53-p21途径增加肝癌细胞的恶性表型。

关键词: 乙型肝炎病毒X基因; 真核表达载体; HepG2细胞; p53-p21途径

中图分类号: R73-35 文献标识码: A

0 引言

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一。研究表明乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)X基因(HBx)编码的X蛋白与HCC的发生、发展密切相关^[1]。HBx具有多种生物学功能, 如参与病毒的复制、反式激活多

种病毒和细胞基因、通过影响正常细胞周期干扰DNA的修复及调节肝细胞增殖、分化和凋亡等, 但具体的致癌机制尚未明确^[2]。p53蛋白可通过其下游转录产物p21影响细胞的凋亡与周期, 认为与多种肿瘤的发病密切相关。本研究首先建立稳定转染X基因及空载体的HepG2细胞株, 分别记为HepG2X及HepG2X₀, 其次通过HBx与p53-p21途径的作用关系来验证其对肝癌细胞癌变机制的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

收稿日期: 2013-02-08; 修回日期: 2013-04-15

作者单位: 1. 410008 长沙, 中南大学湘雅医院血液研究室; 2. 中南大学湘雅医学院检验系; 3. 中南大学湘雅医院肿瘤科

作者简介: 曹鹏飞(1975-), 男, 博士在读, 主管技师, 主要从事临床血液学及肿瘤基础研究

细胞株及真核载体: 肝癌HepG2细胞株购自湘雅医学院细胞中心; 真核表达载体pCDNA3.1(+)-X由本实验室构建^[3]; 小牛血清RPMI1640培养液购自Gibco公司; Lipofectamine2000和G418均购自武汉晶美生物工程有限公司; HBx单克隆抗体购自Abcam公司; 辣根酶标记羊抗鼠IgG、鼠抗人P53单抗购自北京中杉金桥生物公司; Anti- β -actin购自北京BIOS公司; Trizol试剂购自上海生工; RT-PCR试剂盒购自Ferments公司; p21引物由上海生工合成; 流式细胞检测送北京鼎国生物公司检测。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞株HepG2细胞培养于含10%小牛血清的DMEM100 ml培养瓶中。内含青霉素100 u/ml、链霉素100 mg/L。待细胞生长呈单层铺满瓶底时, 用0.25%的胰蛋白酶(含0.02%EDTA)消化传代。

1.2.2 基因转染 将真核表达载体pCDNA3.1-X及空载体pCDNA3.1 2 μ g与脂质体10 μ l混合, 转染入对数生长早期的HepG2细胞。用含400 μ g/ml致死量的G418的培养液筛选2周, 极少数存活细胞继续在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度下培养3周, 并用含200 μ g/ml半致死量G418的培养液加以维持, 逐渐形成细胞克隆。小心用细胞刮刀刮取10个细胞克隆, 分别转移至10个25 ml的小培养瓶中, 用胰酶消化吹打成单细胞悬液, 继续用半致死量的G418培养液培养, 约一周后长满培养瓶。

1.2.3 Western blot检测X蛋白在HepG2X细胞株中的表达 用含10%胎牛血清(FCS)的DMEM培养液清洗, 再加入含10%FCS的DMEM, 离心收集各转染组及空质粒组细胞, 取100 μ l细胞裂解液(含PMSF10 μ l)充分裂解细胞。15%SDS/PAGE电泳后电转移至硝酸纤维膜上, 经过5%脱脂奶粉封闭。首先与一抗(鼠抗人Anti-HBx, 1:1 000稀释)温育2 h, 充分洗涤后, 再与二抗(羊抗鼠, 1:10 000稀释)室温孵育2 h, DAB显色。

1.2.4 转染细胞的细胞生物学检测

1.2.4.1 转染细胞生长曲线测定 HepG2、空质粒组及转染细胞制成单细胞悬液, 按每孔 3×10^3 个细胞的密度接种于24孔板, 细胞计数连续7 d。每组实验均重复3次, 取均数进行生长曲线的绘制。

1.2.4.2 平板克隆形成实验 消化对数期生长的细胞, 按每孔1 000个细胞的密度接种于6孔板, 移入CO₂孵箱培养2周。甲醇固定, 姬姆萨染液染色。计数大于50个细胞的克隆数, 按下面公式计算: 克隆形成率(%) = 克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。各组实验均重复3次。

1.2.5 细胞周期和细胞凋亡检测 消化对数期生长的细胞, PBS充分洗后, 收集 1×10^6 细胞经乙醇固定, 加碘化丙啶, 经流式细胞仪检测细胞周期; 细胞凋亡检测取 1×10^5 细胞按试剂盒说明进行, 依次加入碘化丙啶, 上流式细胞仪检测, 同时采用无血清

诱导24 h检测各转染组细胞凋亡状态。

1.2.6 Western blot检测p53蛋白 用Western blot分别检测HepG2、空质粒组及转染组p53蛋白的表达, p53蛋白检测方法同X蛋白检测。一抗1:400稀释, 二抗1:10 000稀释。

1.2.7 RT-PCR检测p21mRNA水平 Trizol试剂提取细胞总RNA, 操作按说明书进行。采用随机引物方法进行反转录, PCR进行cDNA扩增。PCR引物序列: 上游引物: 5'-AGGTGAGGGGACTCCAAGT-3'; 下游引物: 5'-TGCCTACAGCCTCCTAA TAC-3'。反应条件: 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C 2 min, 56 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共30个循环; 最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。扩增片断大小: 200 bp左右。 β -actin引物序列: 上游引物5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3'; 下游引物5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3', 扩增条件同上。扩增产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳, 紫外分析仪观察结果, 凝胶成像系统照相。

1.3 统计学方法

应用SPSS15.0软件进行统计学分析, 数据采用student *T*检验分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因转染

转染pcDNA3.1(+)-X株(即HepG2X细胞株)及转染空载体的HepG2细胞(即HepG2X₀细胞株)经G418筛选后, 两周后形成细胞克隆, 见图1, 而未转染的细胞株死亡。HepG2X₀及HepG2X细胞均形成细胞克隆, 但后者凋亡小体明显增多。

2.2 HBx基因在肝癌细胞HepG2的表达及Western blot检测

在转染了X基因的10个HepG2X细胞克隆中, X蛋白仅在1个克隆中有表达, 蛋白表达于约21 kD处, 见图2。说明X基因已成功转染入HepG2细胞株。

2.3 转染细胞的细胞生物学检测

2.3.1 转染细胞生长曲线测定 HepG2X细胞株较其他两株细胞生长快, 倍增时间缩短, 而其他两株细胞基本一致, 见图3。

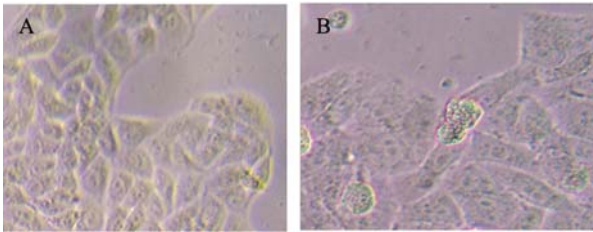
2.3.2 平板集落形成实验 取对数生长期未转染基因(HepG2)、转染空载体(HepG2X₀)及稳定表达X蛋白(HepG2X)的肝癌细胞亲本细胞各2 000个/皿, 接种于培养皿, 培养2周后可见细胞集落形成, 姬姆萨染色, 计算克隆形成率, 分别为69.6%、39.9%和42.0%, 见图4。*T*检验显示, HepG2X细胞株形成率较其他两株细胞高, 并且差异有统计学意义($P < 0.05$), HepG2X₀克隆形成率与HepG2细胞克隆形成率相近, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3.3 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡 HepG2、HepG2X₀及HepG2X细胞的凋亡率依次为1.23%、5.07%及13.0%, 表明HepG2X细胞比其他两株细胞的凋亡明显增加, 见图5。

2.4 HepG2、HepG2X₀及HepG2X细胞中的P53蛋

白检测

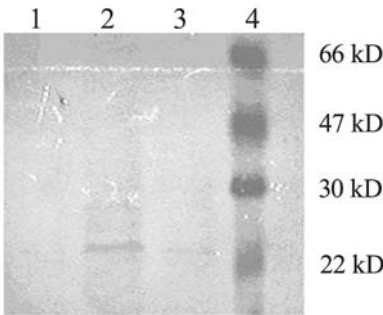
以上三株细胞在53 kD处均见蛋白表达，三次上样的HepG2X细胞中P53表达均强于HepG2及HepG2X₀细胞($P < 0.0001$)。而后两株细胞P53蛋白表达未见明显差异，见图6。



A: HepG2X₀ cell clone; B: HepG2X cell clone

图1 G418筛选细胞克隆图(×400)

Figure 1 Cell clone selected by G418(×400)



1:HepG2;2:HepG2X;3:HepG2X₀;4:prestained marker

图2 Western blot检测X蛋白表达

Figure2 X protein expression detected by Western blot

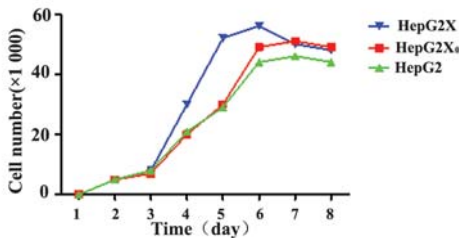
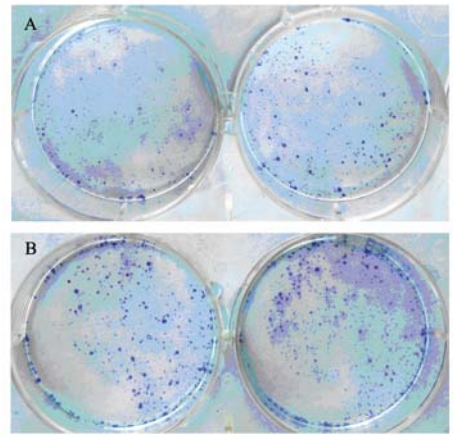


图3 HepG2、HepG2X₀、及HepG2X三株细胞生长曲线图
Figure3 Cells growth curves of HepG2, HepG2X₀ and HepG2X stains

2.5 HepG2、HepG2X及HepG2X₀细胞中p21mRNA的RT-PCR检测



A:HepG2 and HepG2X₀ plate clone formatting experiment; B:HepG2X plate clone formatting experiment

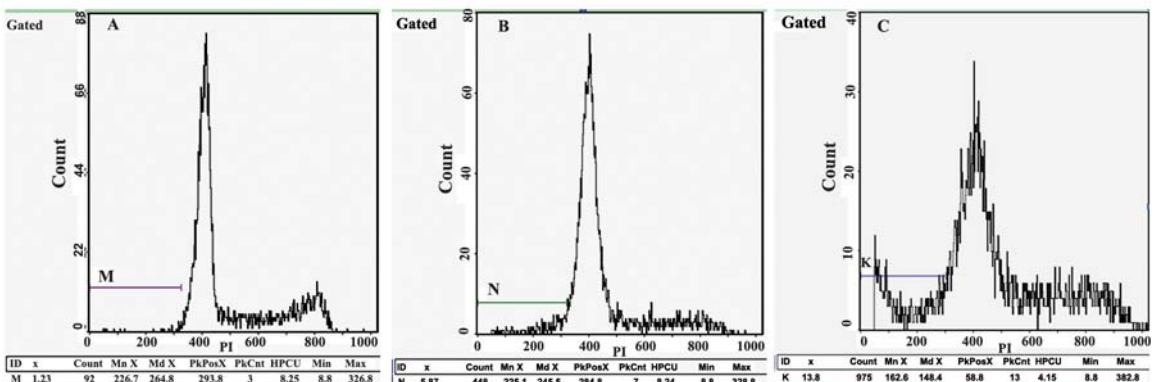
图4 平板克隆形成试验检验HepG2、HepG2X₀、HepG2X三株细胞系单克隆形成能力

Figure4 Plate clone formatting experiments inspect the monoclonal formation ability of HepG2、HepG2X₀ and HepG2X

约200 bp处可见p21mRNA的PCR产物片段，HepG2X较其他两组细胞p21mRNA水平明显减低，见图7。

3 讨论

原发性肝癌是最常见的恶性肿瘤之一，其发生与发展与HBV感染密切相关，特别是HBx基因编码的X蛋白具有反式激活作用，可激活病毒和细胞基因，调控其转录，与病毒复制和慢性感染状态的维持相关，在HCC的发生发展过程中具有重要作用^[4]。为研究X蛋白对肝癌细胞恶性表型的影响，本研究将HBx基因真核表达载体PCDNA3.1-X及空载体PCDNA3.1用脂质体介导法分别转入肝癌细胞HepG2，并经G418筛选获得稳定表达X蛋白的肝癌细胞克隆株HepG2X及HepG2X₀。Western blot证实X蛋白能在转染株HepG2X中表达，而在对照组细胞中不表达。有研究^[5]表明，HBx蛋白有促进与抑制凋亡的双重作用，这与本研究的结果一致。细胞生长实验表明HepG2X株生长的倍增时间明显短



A:untreated HepG2 cell apoptosis;B:HepG2X₀ cell apoptosis;C:HepG2X cell apoptosis

图5 流式细胞仪检测转染后HepG2、HepG2X₀和HepG2X细胞的凋亡水平

Figure5 HepG2、HepG2X₀ and HepG2X cell apoptosis after transfection detected by flow cytometry

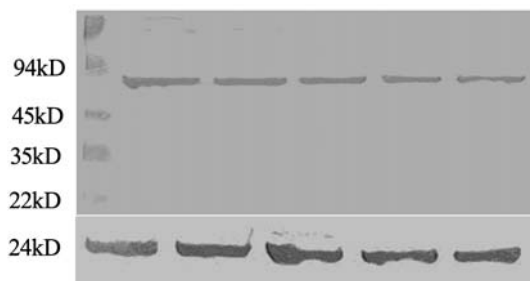


图6 HepG2X、HepG2X₀及HepG2细胞中P53蛋白Western blot检测
Figure6 p53 protein expression in HepG2X, HepG2X₀ and HepG2 detected by Western blot

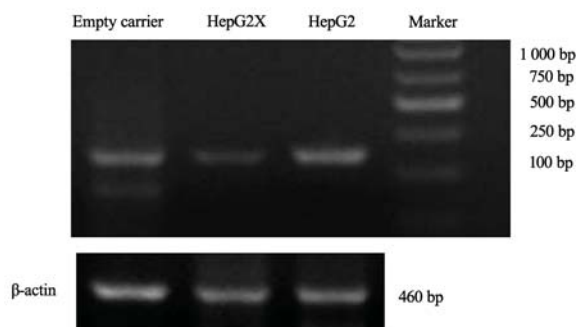


图7 RT-PCR检测HepG2、HepG2X及HepG2X₀细胞中p21mRNA的表达
Figure7 p21mRNA expression in HepG2, HepG2X and HepG2X₀ detected by RT-PCR

于HepG2及HepG2X₀细胞株，克隆形成率亦高于对照组亲本细胞，表明稳定表达X蛋白的肝癌细胞恶性表型增高，有抑制凋亡的作用。但流式细胞结果显示，转染株HepG2X比只转染空载体HepG2及HepG2细胞株凋亡率明显增加，细胞周期结果显示HepG2X细胞G₂/G₁比值增加，表明转染组的增殖期细胞增多，细胞DNA合成旺盛。形态学上转染株细胞生长力旺盛、分裂相极多见，凋亡小体明显增多，表明HBx蛋白同样具有促进凋亡作用，使肝癌细胞恶性表型增加。大量研究表明，HBx参与细胞凋亡的具体机制可能与p53-p21调节途径有关^[6-8]。

p53基因定位于17p13.1，编码具有蛋白质-蛋白质结合功能的p53蛋白。该基因及其表达产物分为野生型与突变型两种。含野生型p53的细胞在DNA受到损伤时可使细胞停止于G₁期以修复损伤的DNA，从而抑制凋亡的发生。HBxAg与p53可以结合形成复合物的形式使p53蛋白在细胞内积聚的现象也见于Kwun等^[7]及Mathonnet等^[8]的研究结果，而本研究表明稳定转染X基因的HepG2细胞株后p53蛋白表达明显高于未转染的HepG2细胞株，两者研究结果一致。HBx与p53结合后，可导致p53基因的突变而失活，从而使后者正常的抑制凋亡的活性下降。Western blot结果显示，HepG2X细胞p53含量比HepG2及转染空载体的HepG2细胞株增加。p53基因可与细胞内的转录因子p21结合，

起到活化与调节作用^[9]。p21作为p53基因的下游转录激活产物，具有抑制细胞周期素/细胞周期依赖性激酶的作用，导致G₁期阻滞，以修复损伤的DNA^[10]。由于p53的失活，其活化p21的功能减退。RT-PCR结果表明HepG2X细胞中p21 mRNA水平减低，从而使p53通过p21来修复损伤的DNA途径进一步受阻，最终导致细胞的恶性表型增加。但X基因与p53-p21途径具体的信号转导机制仍有待进一步研究。

参考文献：

- [1] Wei W, Huang W, Pan Y, *et al.* Functional switch of viral protein HBx on cell apoptosis, transformation, and tumorigenesis in association with oncoprotein Ras[J]. *Cancer Lett*, 2006, 244(1): 119-28.
- [2] Lee MO, Kang HJ, Cho H, *et al.* Hepatitis B virus X protein induced expression of the Nur77 Gene[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288(5): 1162-8.
- [3] Cao PF, Liu YH. Expression of raf-1 in HepG2 strain stably transfected by HBx gene[J]. *Zhong Liu Yan Jiu Yu Lin Chuang*, 2007, 19(11): 724-6. [曹鹏飞, 柳永和. 稳定转染HBx基因的HepG2细胞对raf-1表达的影响[J]. *肿瘤研究与临床*, 2007, 19(11): 724-6.]
- [4] Yu DH, Lin J, Qu JH, *et al.* Hepatitis B virus X protein inhibits hepatoma cell growth in vitro through p14(ARF)-dependent and p14(ARF)-independent pathways[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2009, 29(6): 1089-93. [余党会, 林静, 曲建慧, 等. 乙型肝炎病毒X蛋白和p14ARF依赖性、非依赖性途径对肝癌细胞生长的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(6): 1089-93.]
- [5] Wang F, Zhou H, Xia X, *et al.* Activated Notch signaling is required for hepatitis B virus X protein to promote proliferation and survival of human hepatic cells[J]. *Cancer Lett*, 2010, 298(1): 64-73.
- [6] Livezey KW, Negorev D, Simon D. Hepatitis B virus-transfected Hep G2 cells demonstrate genetic alterations and de novo viral integration in cells replicating HBV[J]. *Mutat Res*, 2000, 452(2): 163-78.
- [7] Kwun HJ, Jang KL. Natural variants of hepatitis B virus X protein have differential effects on the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(7): 2202-13.
- [8] Mathonnet G, Lachance S, Alaoui-Jamali M, *et al.* Expression of hepatitis B virus X oncoprotein inhibits transcription-coupled nucleotide excision repair in human cells [J]. *Mutat Res*, 2004, 554(1-2): 305-18.
- [9] Han HJ, Jung EY, Lee WJ, *et al.* Cooperative repression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene expression by hepatitis B virus X protein and hepatitis C virus core protein[J]. *FEBS Lett*, 2002, 518(1-3): 169-72.
- [10] Zhang SJ, Chen HY, Chen ZX, *et al.* Possible mechanism for hepatitis B virus X gene to induce apoptosis of hepatocytes[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(28): 4351-6.