

# 乙型肝炎病毒 x 蛋白通过激活 p38 和 JNK 信号通路促进肝癌细胞增殖

娄晓丽 侯彦强

上海市松江区中心医院中心实验室, 上海 201600

通信作者: 侯彦强, Email: houyanqiang@aliyun.com, 电话: 021-67720472

**【摘要】 目的** 探讨乙型肝炎病毒 x (HBx) 蛋白对人肝癌细胞增殖的分子作用机制。**方法** 构建 HBx 蛋白的绿色荧光蛋白真核表达载体 HBx-pEGFP-C1, 利用脂质体转染技术将质粒 HBx-pEGFP-C1 转染人肝癌细胞系 HepG2 细胞株, 荧光显微镜检测报告基因表达产物 EGFP, RT-PCR 和 Western blot 方法检测 X 基因的表达情况。采用生长曲线和 TUNEL 染色检测 HBx 蛋白对 HepG2 细胞增殖和凋亡的作用。采用 Western blot 方法检测 caspase3、p-p38、p-JNK、p-Akt 的表达变化。**结果** 成功构建 HBx-pEGFP-C1 真核表达载体并转染 HepG2 细胞, 转染 HBx 蛋白的 HepG2 细胞与对照组相比增殖率明显升高 ( $t = -0.8999, P = 0.012$ ), 但细胞凋亡率和 caspase3 表达水平无明显变化。HBx 组 p-p38 (24 h) ( $t = -11.058, P = 0.0004$ )、p-JNK (48 h) ( $t = -15.022, P = 0.0001$ ) 与对照组相比表达升高明显。**结论** HBx 蛋白通过激活 p38 和 JNK 信号通路促进人肝癌细胞 HepG2 增殖。

**【关键词】** HBx 蛋白; HepG2 细胞; p38; JNK

**基金项目:** 国家自然科学基金青年项目 (81702729)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.04.013

## Hepatitis B virus x protein promote human hepatocellular carcinoma cells proliferation by activating p38 and JNK signalling pathway

Lou Xiaoli, Hou Yanqiang

Department of Central Laboratory, Shanghai Songjiang District Central Hospital, Shanghai 201600, China

Corresponding author: Hou Yanqiang, Email: houyanqiang@aliyun.com, Tel: 0086-21-67720472

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects and mechanism of hepatitis B virus x protein (HBx) on human hepatocellular carcinoma cells proliferation. **Methods** Eukaryotic expression vector HBx-pEGFP-C1 was constructed. HepG2 cells were transfected transiently using Lipofectamine 2000. HBx expression in transfected cells were measured by RT-PCR and Western blot. Cells proliferation and apoptosis were detected by using growth curves and TUNEL staining. The protein levels of caspase-3, p-p38, p-Akt and p-JNK were measured by Western blot. **Results** HBx was successfully expressed in HepG2 cells. Growth curve result showed that HBx promoted cell proliferation ( $t = -0.8999, P = 0.012$ ). Compared with control group, the levels of p-p38 (24 h) ( $t = -11.058, P = 0.0004$ ) and p-JNK (48 h) ( $t = -15.022, P = 0.0001$ ) in HBx-pEGFP-C1 group were increased significantly. There is no significant difference between the two groups' apoptosis. **Conclusions** Transient overexpression of HBx promoted human hepatic carcinoma cells proliferation and activated the p38 and JNK signalling pathway.

**【Key words】** Hepatitis B virus X protein; HepG2; p38; c-Jun N-terminal kinase

**Fund program:** National Natural Science Youth Program (81702729)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.04.013

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的发病率在我国及全世界逐年增加, 其中 HBV 感染是重要诱因<sup>[1]</sup>。HBV X 基因 (HBx) 是 HBV 病毒基因组中最小的开放性读码框架, 是最常见的整合入宿主基因组的开放阅读框, 长 462 bp, 编

码长度为 154 个氨基酸的蛋白<sup>[2-3]</sup>, HBx 蛋白影响肝细胞信号传导、新陈代谢、凋亡、细胞因子产生等过程<sup>[4-5]</sup>。

研究发现丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、Akt (蛋白激酶 B, 又

称 PKB) 等信号通路的活化在肝癌发生过程中有重要作用, p38MAPK 和 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 是 MAPK 家族主要成员, JNK 可以转移磷酸基团到羧基末端脯氨酸侧翼的丝氨酸或苏氨酸残基上, 在细胞周期、生长及凋亡等多种生理及病理过程中发挥重要作用。p38 MAPK 不易被生长因子活化, 但可被肿瘤坏死因子、紫外照射等应激信号显著活化<sup>[6]</sup>。AKT 是磷脂酰肌醇激酶 (phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase, PI3K) 下游信号分子, 与细胞存活及凋亡有关<sup>[7-8]</sup>。本实验利用人肝癌细胞系 HepG2 转染 HBx 的真核表达载体 HBx-pEGFP-C1 (增强型绿色荧光蛋白, enhanced green fluorescent protein, EGFP), 研究 p38、JNK 和 Akt 在 HBx 转染的人肝细胞增殖过程中活化水平, 从而阐述 HBx 在肝癌发生过程中相关的分子机制。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂** pEGFP-C1 质粒由本实验室保存, HepG2 购买自上海中科院生命科学院, HBV DNA 从临床大三阳乙肝患者血清中抽提。Taqmix 酶 (Tiangen 公司), Dnase、RT 反转录试剂盒、内切酶 *Hind*III 和 *Kpn*I (Fermentas 公司, 美国), DNA 连接试剂盒 (TaKaRa 公司, 大连), RPMI1640 细胞培养液和胎牛血清 (Gibco, 美国), 大肠感受态 DH5 $\alpha$ 、转染试剂盒 Lipofectmine 2000、蛋白裂解液 (Invitrogen, 美国), 质粒抽提试剂盒 (Sigma, 美国), 兔抗人 HBx 单克隆抗体、HRP 标记羊抗兔二抗 (abcam, 美国), 引物合成在上海生工生物工程股份有限公司完成。

**1.2 HBV DNA 的抽提** 收取临床乙肝大三阳患者促凝全血, 室温 3 000 $\times$ g 离心 10 min, 吸取新鲜血清 100  $\mu$ l 于无菌 EP 管内, 采用煮沸法严格按照科华试剂说明书抽提 HBV DNA, -20  $^{\circ}$ C 保存待用。

**1.3 HBx-pEGFP-C1 质粒的构建** PCR 扩增 HBx 片段: 取 1  $\mu$ l HBV DNA 作为模板, 2  $\mu$ l HBx 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) (HBx-F: AAGCTTATGGCTGCTAG GCTGTGCTGC; HBx-R: GGTACCTTAGGCAGAGG GGAAAAAGTT), 12.5  $\mu$ l Taq mix, 9.5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O; PCR 反应程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 65  $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 30 个循环, 72  $^{\circ}$ C 30 min, 4 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物水平电泳后, 回收片段长度为 477 bp 的产物与质粒 pEGFP-C1 进行 *Hind*III 和 *Kpn*I 双酶切, 胶回收 477 bp 的 HBx 片段

和 4.7 kb 的 pEGFP-C1 片段, 连接克隆后抽提质粒 HBx-pEGFP-C1。

**1.4 HBx-pEGFP-C1 质粒的转染及鉴定** HepG2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640, 转染前 1 d 接种 12 孔细胞培养板 2.5 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞/孔, 待细胞生长到对数期时, 用不含血清的 OPTI-MEM 液重悬和稀释, 按照 pEGFP-C1 或 HBx-pEGFP-C1 与 Lipofectmine 2000 质量体积比例为 1.5  $\mu$ g:3  $\mu$ l 转染 HepG2 细胞, 37  $^{\circ}$ C 培养 6 h 后加入等体积含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 培养 24 h 后, 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况, 采用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测 HBx 表达。

**1.5 细胞增殖率检测** 设 C0 (未转染组)、C (转染空白载体 pEGFP-C1 组) 和 X (转染 HBx 蛋白组) 3 组, 每组同时设 3 个重复, 转染前 1 d 接种 12 孔细胞培养板 2.5 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞/孔, 转染方法同上, 分别培养 24 h 和 48 h 后, 弃上清, 1 $\times$ PBS 洗 3 遍细胞, 10% 甲醛室温固定 30 min, 水洗 1 遍, 0.1% 结晶紫染液染色 30 min, 水洗数遍, 晾干, 加入 1 ml 10% 乙酸溶液溶解结晶紫, 分光光度计 590 nm 测吸光度值。

**1.6 TUNEL 染色** 设 C (转染空白载体 pEGFP-C1 组) 和 X (转染 HBx 蛋白组) 两组, 每组同时设 3 个重复, 无菌处理的玻片放入 6 孔细胞培养板内, 转染前 1 d 接种 3 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞/孔, 转染方法同上, 分别培养 24 h 和 48 h 后, 采用 TUNEL 法检测细胞的凋亡情况, 详细操作按照细胞凋亡检测试剂盒 (C1091, 碧云天) 说明书。主要步骤为细胞转染后 24 h, 弃上清, 1 $\times$ PBS 洗 1 遍, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 清洗 1 遍, 含 0.3% Triton-X 100 的 PBS 室温孵育 5 min, PBS 清洗 1 遍, 0.3% 过氧化氢溶液室温孵育 20 min, 加入 50  $\mu$ l TUNEL 检测液避光湿盒中孵育 60 min, PBS 清洗 3 次, 加入 50  $\mu$ l HRP 标记亲和素工作液, 室温避光孵育 30 min, PBS 清洗 3 次, 加入 200  $\mu$ l DAB 显色液, 显色 5~30 min, 显微镜下观察显色程度, PBS 清洗终止显色, 苏木素染色液 (C0107, 碧云天) 进行核染色, 显微镜下观察拍照。

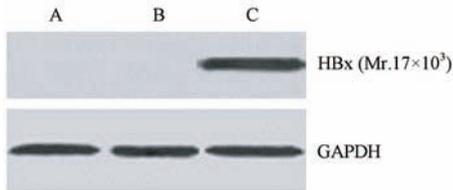
**1.7 蛋白表达检测** 设 C0 (未转染组)、C (转染空白载体 pEGFP-C1 组) 和 X (转染 HBx 蛋白组) 3 组, 转染 HepG2 细胞 24 h 和 48 h 后, 弃上清, 1 $\times$ PBS 洗 3 遍细胞, 加入 500  $\mu$ l 蛋白裂解液 RIPA (含蛋白酶抑制剂、PMSF), 采用 Bradford 方法检测蛋白浓度,

计算含 40 μg 蛋白总量的上样量,加入 5×蛋白上样缓冲液,100 °C 煮 5~15 min。SDS-PAGE 电泳,转膜,5%脱脂牛奶室温封闭 2 h,ACTB 抗体(SANTA, sc-1616R),caspase3 抗体(bioworld, bs1518), p-p38 抗体(CST, #4511), p-JNK 抗体(CST, #9255), p-Akt 抗体(CST, #4060)分别室温孵育 2 h,1×PBS 洗 3 遍,HRP 标记山羊抗兔或者兔抗鼠二抗(Jackson)室温孵育 1 h,1×PBS 洗 3 遍,加入 100 μl ECL 化学发光液,在 Chem-Doc 仪(Bio-Rad,美国)上曝光,调整曝光条件,利用 Image-lab 软件分析目的条带的光密度值。

**1.8 统计学方法** 采用 SPSS 20.0 软件进行数据统计学方法,两独立样本若符合正态分布则采用独立样本 *t* 检验,否则采用非参数检验;3 个以上样本采用单因素方差分析,方差齐采用 LSD 比较组间差异,方差不齐采用 Tamhane's T2 比较组间差异, $P < 0.05$  有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 HBx 转染及鉴定** 瞬时转染 HBx-pEGFP-C1 24 h 后,荧光显微镜下观察 HepG2 细胞内绿色荧光蛋白的表达,可见对照组细胞内绿色荧光呈匀质分布,HBx 转染组绿色荧光蛋白呈散点状、颗粒聚集状分布(图 1)。抽提转染 24 h 后细胞的 RNA,RT-PCR 在转染 HBx 的 HepG2 细胞内检测到 HBx RNA 的转录,Western blot 方法检测到转染 HBx 的 HepG2 细胞内有 HBx 的表达(图 2)。



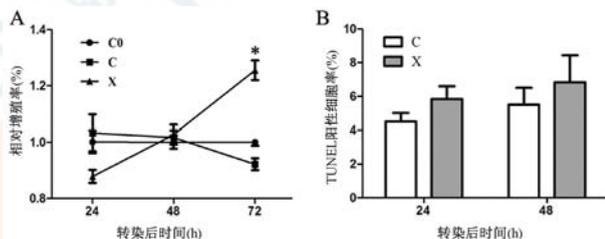
A, B, C: Western blot 检测 HepG2、转染 pEGFP-C1 的 HepG2、转染 HBx-pEGFP-C1 的 HepG2 的 HBx 表达

**图 2** HBx 在 HepG2 细胞内的表达检测

A, B, C: Detection of HBx expression in HepG2 cells, HepG2 cells transfected with pEGFP-C1, HepG2 cells transfected with HBx-pEGFP-C1 by Western blot

**Fig.2** Detection of HBx expression in HepG2 cells

0.012),提示 HBx 蛋白能够明显促进 HepG2 细胞的增殖(图 3 A)。



A: 生长曲线检测转染 HBx 后细胞增殖率变化; B: TUNEL 染色统计比较 HBx 蛋白对 HepG2 细胞凋亡的影响

**图 3** 细胞增殖率和凋亡比例

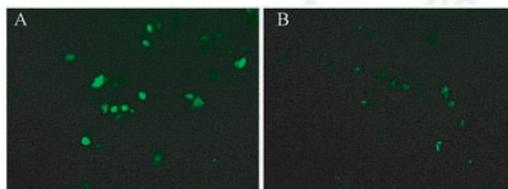
A: Detection of changes of cell proliferation rate after transfection with HBx by growth curve; B: Comparison of effects of HBx protein on HepG2 cells apoptosis by TUNEL staining statistics

**Fig.3** Cell proliferation rate and apoptosis ratio

**2.3 HBx 对 HepG2 细胞凋亡无明显影响** 通过 TUNEL 染色检测 C 组和 X 组 24 h ( $t = -2.530, P = 0.065$ ) 和 48 h ( $t = -1.220, P = 0.289$ ) 凋亡细胞的比例,发现两组之间无明显差异(图 3B,图 4);通过检测两组细胞 24 h ( $t = -0.472, P = 0.661$ ) 和 48 h ( $t = 0.409, P = 0.703$ ) 凋亡蛋白 caspase3 的表达变化,发现两组两个时间点的凋亡蛋白表达无明显差异(图 5),提示 HBx 蛋白不影响 HepG2 细胞的凋亡。

**2.4 HBx 激活 HepG2 细胞 p38 和 JNK 信号通路**

通过免疫印迹法检测 HBx 蛋白对 HepG2 细胞 p38、JNK 和 Akt 信号通路的影响,发现作用 24 h 后与对照组相比,HBx 能够明显激活 p38 信号通路 ( $t = -11.058, P = 0.0004$ ),作用 48 h 后与对照组相比,HBx 蛋白能够明显激活 JNK 信号通路 ( $t = -15.022, P = 0.0001$ ),同时研究也发现 HBx 蛋白对 Akt 信号通路无明显作用(图 6)。



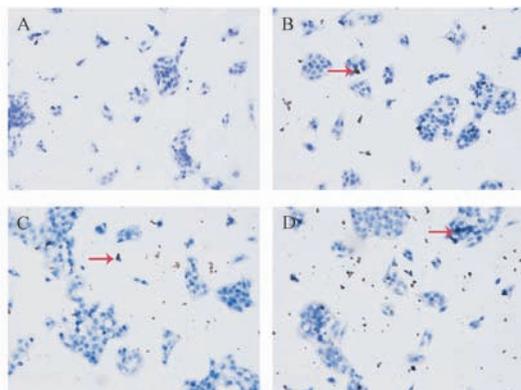
A: 转染 pEGFP-C1 的 HepG2 细胞; B: 转染 HBx-pEGFP-C1 的 HepG2 细胞

**图 1** 荧光显微镜下观察转染 HBx 蛋白的 HepG2 细胞(400×)

A: HepG2 cells transfected with pEGFP-C1; B: HepG2 cells transfected with HBx-pEGFP-C1

**Fig.1** Observation of HepG2 cells (400×) transfected with HBx protein under fluorescent microscope

**2.2 HBx 促进 HepG2 细胞增殖** 通过比较 C0、C 和 X 3 组细胞在 24 h、48 h 和 72 h 的增殖曲线,发现 HBx 组细胞增殖速度明显高于对照组(X vs C0  $t = -92.205, P = 0.0001$ , X vs C  $t = -0.8999, P =$



A, B: HepG2 转染 pEGFP-C1 24 h, 48 h; C, D: HepG2 转染 HBx-pEGFP-C1 24 h, 48 h

图 4 TUNEL 染色检测 HBx 转染后 HepG2 细胞的凋亡变化

A, B: HepG2 cells transfected with pEGFP-C1 24 h, 48 h; C, D: HepG2 cells transfected with HBx-pEGFP-C1 24 h, 48 h

Fig. 4 Changes in apoptosis of HepG2 cells after transfection with HBx detected by TUNEL staining

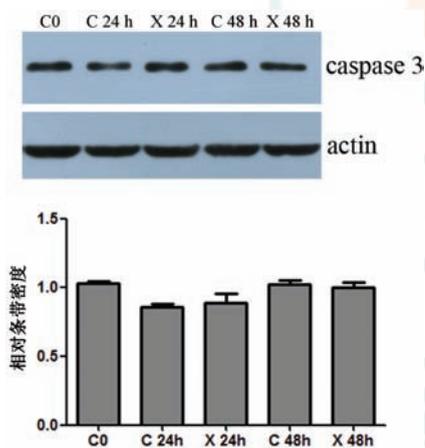


图 5 HepG2 转染 HBx 24 h 和 48 h 后 caspase3 表达水平变化  
Fig.5 Changes of caspase3 expression 24 and 48 h after the HepG2 cells were transfected with HBx

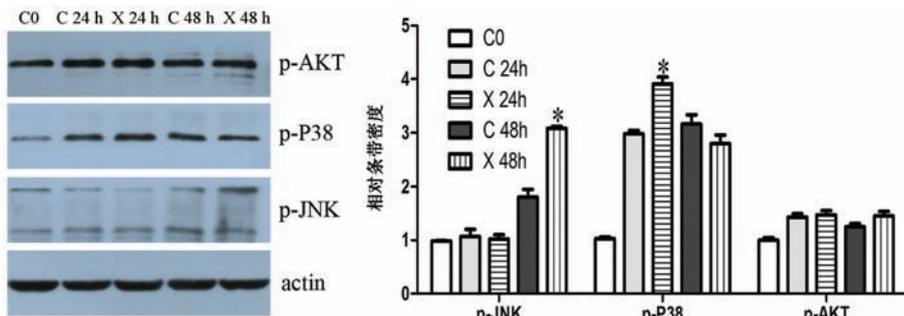


图 6 HepG2 转染 HBx 24 h 和 48 h 后 p-JNK、p-p38、p-Akt 表达水平变化

Fig.6 Changes in the levels of p-JNK, p-p38, and p-Akt expression 24 and 48 h after the HepG2 cells were transfected with HBx

### 3 讨论

原发性肝癌中 90% 是 HCC, HBV 感染是 HCC 发生的重要因素之一<sup>[9]</sup>, 据统计目前全球有 3.5 亿乙肝携带者<sup>[10]</sup>, 然而 HBV 相关 HCC 的发病机制仍不清楚。HBx 蛋白是多功能蛋白<sup>[11-12]</sup>, 主要分布在细胞核和线粒体, 很多研究发现 HBx 蛋白在 HCC 的发生和发展中发挥重要的作用, 其影响细胞的增殖、侵袭和转移、血管生成以及细胞凋亡等<sup>[13-14]</sup>。

异常活化的 MAPK 信号通路在肝癌的发生及转移中有重要作用<sup>[6]</sup>, 研究发现 HCV NS5A 蛋白通过抑制 p38 MAPK 信号通路的活性以及抑制宿主细胞凋亡, 导致 HCV 持续感染, 从而诱发肝癌的发生<sup>[15]</sup>; 研究发现肝癌 HepG2 细胞中, 多环芳香烃增加其 miR-181 家族的表达, 抑制 MAPK5 磷酸化和 p38 MAPK 活性, 从而促进肝癌的增殖<sup>[16]</sup>。有研究发现肝癌细胞中 p38 MAPK 信号通路被 mRNA 前体加工因子 19 激活后, 能够促进 Twist1 蛋白介导的上皮间质转移过程<sup>[17]</sup>。本研究发现 HBx 蛋白通过激活 p38/MAPK 信号通路, 促进肝癌细胞的增殖, 提示 p38 MAPK 信号通路在肝癌细胞增殖中有重要作用, 也可能参与肝癌侵袭及转移过程。

MAPK 信号通路的一个重要分支是 JNK 信号通路, C-Jun 氨基末端活性区 Ser63 和 Ser73 在 JNK 蛋白作用下发生磷酸化, 在肝癌中 JNK 信号通路激活, P53、P21 以及 C-Jun 等下游通路蛋白表达升高, 从而调控肝癌细胞的增殖周期及凋亡过程<sup>[18]</sup>, 研究发现肝癌组织中 JNK 的磷酸化水平明显高于邻近非癌组织, 其中约 70% 肝癌患者 JNK 异常活化, 研究发现 JNK 活性与肝癌复发相关<sup>[19]</sup>。HBx 通过上调 SAPK/JNK 抑制 Fas 介导的凋亡<sup>[20]</sup>, 同时还能上调 SATB1 和 HURP 的表达促进细胞凋亡, 研究也发

现 HBx 蛋白促进抗凋亡蛋白例如生存素、肝癌调节蛋白(HURP)<sup>[21]</sup>以及 p38/MAPK 信号通路抑制细胞的凋亡<sup>[22]</sup>。HCC 中转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 通过激活 (T $\beta$ RI)/pSMAD3C 引起细胞生长停滞,研究发现 HBx 激活 JNK/pSMAD3L 和抑制 (T $\beta$ RI)/pSMAD3C 信号通路促进细胞增殖,HBx 高表达的肝癌细胞株中抑制 JNK 信号通路能够恢复 TGF- $\beta$  生长停滞功能,因此研究认为联合采用 TGF- $\beta$  和 JNK 信号抑制剂是 HBx 相关肝癌重要的治疗靶点<sup>[23]</sup>。自噬有利于 HBV 的病毒复制,研究发现 HBx 在自噬体形成过程中也有重要作用,PI3K (VPS34)/beclin-1 和 ROS-JNK 信号通路参与了 HBx 诱导的自噬<sup>[24]</sup>。本研究发现 HBx 蛋白通过激活 JNK 信号通路,促进肝癌细胞的增殖,以上提示 HBx 蛋白激活重要的分子信号,在肝癌的发病机制中具有重要作用。

AKT(又称 PKB),是丝氨酸/苏氨酸激酶,也是最常见的激酶家族的成员,AKT 在肝癌中异常激活,与肝癌的增殖、凋亡和迁移密切相关<sup>[25-26]</sup>。有研究发现 HBx 通过激活 PI3K/Akt 信号通路促进肝癌细胞的增殖和转移<sup>[27]</sup>,HBx 蛋白激活 Notch1 信号通路,在肝癌细胞中共表达,Notch1 抑制剂能够抑制肝癌细胞的增殖及 ERK 和 Akt 信号激活<sup>[28]</sup>。本研究中 HBx 转染肝癌细胞后未发现 Akt 的活化,与之前的研究发现有一定的差异,可能的原因是 Akt 有 3 个同种异型,分别是 Akt1、Akt2 和 Akt3<sup>[29]</sup>,在不同的体外细胞模型中激活的亚型不同,需要更加深入的实验分析验证。

综上所述,HBx 蛋白激活 JNK、p38/MAPK、Akt 等重要的分子信号通路促进肝癌细胞的增殖,但对于细胞凋亡具有双向调控作用,而 HCC 的发生机理是一个复杂的病理生理过程,其中涉及的相关信号通路和机制研究需要更加深入的研究和诠释,本研究为 HBV 相关肝癌的分子靶点筛选及治疗提供潜在研究基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 娄晓丽:实验操作、论文撰写;侯彦强:研究指导、数据整理分析、论文审阅

## 参考文献

[1] 叶家才,崔书中,巴明臣.原发性肝癌的流行病学特征及其危险因素[J].实用医学杂志,2008,24(10):1839-1841. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2008.10.082.

[2] Benhenda S, Cougot D, Buendia MA, et al. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis[J]. Adv Cancer Res, 2009, 103: 75-109. DOI: 10.1016/S0065-230X(09)03004-8.

[3] Koike K. Hepatitis B virus X gene is implicated in liver carcinogenesis[J]. Cancer Lett, 2009, 286(1):60-68. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.04.010.

[4] Madden CR, Slagle BL. Stimulation of cellular proliferation by hepatitis B virus X protein[J]. Dis Markers, 2001, 17(3): 153-157.

[5] Song CZ, Bai ZL, Song CC, et al. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis[J]. World Gastroenterol, 2003, 9(7): 1521-1524.

[6] Delire B, Stärkel P. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications[J]. Eur J Clin Invest, 2015, 45(6): 609-623. DOI: 10.1111/eji.12441.

[7] Lin W, Zhong M, Yin H, et al. Emodin induces hepatocellular carcinoma cell apoptosis through MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in vitro and in vivo[J]. Oncol Rep, 2016, 36(2): 961-967. DOI: 10.3892/or.2016.4861. DOI: 10.3892/or.2016.4861.

[8] Kunter I, Erdal E, Nart D, et al. Active form of AKT controls cell proliferation and response to apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Rep, 2014, 31: 573-580. DOI: 10.3892/or.2013.2932.

[9] Gelband H, Chen CJ, Chen W, et al. Liver Cancer [M]. Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3). Washington (DC) 2015.

[10] Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(9): 674-687.

[11] Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, et al. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(16): 1134-1143. DOI: 10.1093/jnci/djn243.

[12] 侯彦强, 娄晓丽, 梁冬雨. HBx 蛋白对人 T 细胞抗炎性细胞因子分泌的影响[J]. 中华临床医师杂志, 2012, 6(18): 120-122. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.18.044.

[13] Martin-Vilchez S, Lara-Pezzi E, Trapero-Marugan M, et al. The molecular and pathophysiological implications of hepatitis B X antigen in chronic hepatitis B virus infection[J]. Rev Med Virol, 2011, 21(5): 315-329. DOI: 10.1002/rmv.699.

[14] Ng SA, Lee C. Hepatitis B virus X gene and hepatocarcinogenesis[J]. J Gastroenterol, 2011, 46(8): 974-979. DOI: 10.1007/s00535-011-0415-9.

[15] Amako Y, Igloi Z, Mankouri J, et al. Hepatitis C virus NS5A inhibits mixed lineage kinase3 to block apoptosis[J]. J Biol Chem, 2013, 288(34): 24753-24763. DOI: 10.1074/jbc.M113.491985.

[16] Song MK, Park YK, Ryu JC. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-mediated upregulation of hepatic microRNA-181 family promotes cancer cell migration by targeting MAPK phosphatase-5, regulating the activation of p38 MAPK [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 273(1): 130-139. DOI: 10.1016/j.taap.2013.08.016.

[17] Yin J, Wang L, Zhu JM, et al. Prp19 facilitates invasion of hepatocellular carcinoma via p38 mitogen-activated protein kinase/twist pathway[J]. Oncotarget, 2016, 7(16): 21939-21951. DOI: 10.18632/oncotarget.7877.

[18] Ni Z, Wang B, Dai X, et al. HCC cells with high levels of Bcl-2 are resistant to ABT-737 via activation of the ROS-JNK-autophagy

- pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 70:194-203. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.012.
- [19] Hagiwara S, Kudo M, Chung H, et al. Activation of c-Jun N-terminal kinase in non-cancerous liver tissue predicts a high risk of recurrence after hepatic resection for hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Res, 2012, 42(4):394-400. DOI: 10.1111/j.1872-034X.2011.00932.x.
- [20] Diao J, Khine AA, Sarangi F, et al. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway[J]. J Biol Chem, 2001, 276(11):8328-8340. DOI: 10.1074/jbc.M006026200.
- [21] Kuo TC, Chao CC. Hepatitis B virus X protein prevents apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by upregulating SATB1 and HURP expression[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(7):1093-1102. DOI: 10.1016/j.bcp.2010.06.003.
- [22] Xu Q, Gu S, Liang J, et al. The biological function of Hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Res, 2019, 27(4):509-514. DOI: 10.3727/096504018X15278771272963.
- [23] Wu YH, Ai X, Liu FY, et al. c-Jun N-terminal kinase inhibitor favors transforming growth factor- $\beta$  to antagonize hepatitis B virus X protein-induced cell growth promotion in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(2):1345-1352. DOI: 10.3892/mmr.2015.4644.
- [24] Zhong L, Shu W, Dai W, et al. Reactive Oxygen Species-Mediated c-Jun NH<sub>2</sub>-Terminal Kinase Activation Contributes to Hepatitis B Virus X Protein-Induced Autophagy via Regulation of the Beclin-1/Bcl-2 Interaction[J]. J Virol, 2017, 91(15):e00001-17. DOI: 10.1128/JVI.00001-17.
- [25] Xu N, Lao Y, Zhang Y, et al. Akt: a double-edged sword in cell proliferation and genome stability[J]. J Oncol, 2012, 2012:951724. DOI: 10.1155/2012/951724.
- [26] Chen J S, Wang Q, Fu X H, et al. Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9[J]. Hepatol Res, 2009, 39(2):177-186. DOI: 10.1111/j.1872-034X.2008.00449.x.
- [27] 胡丽娜, 孔凡运, 尤红娟, 等. 初步探讨乙型肝炎病毒 X 蛋白激活 PI3K/Akt 信号通路对肝癌细胞增殖和迁移的影响[J]. 徐州医学院学报, 2012, 32(4):211-215. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2065.2012.04.001.
- [28] Liao B, Zhou H, Liang H, et al. Regulation of ERK and AKT pathways by hepatitis B virus X protein via the Notch 1 pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Oncol, 2017, 51(5):1449-1459. DOI: 10.3892/ijo.2017.4126.
- [29] Yang Z Z, Tschopp O, Baudry A, et al. Physiological functions of protein kinase B/Akt[J]. Biochem Soc Trans, 2004, 32(Pt 2):350-354. DOI:10.1042/bst0320350.

(收稿日期:2018-09-03)

(本文编辑:吕新军)

## · 文献速览 ·

## 过去 10 年(2007—2017 年)新蚊虫相关病毒的发现和全球分布

Evans Atoni, Lu Zhao, Samuel Karungu, Vincent Obanda, Bernard Agwanda, Han Xia, Zhiming Yuan. The discovery and global distribution of novel mosquito-associated viruses in the last decade (2007-2017)[J]. Rev Med Virol, 2019; e2079. DOI: 10.1002/rmv.2079

在过去的 10 年里,病毒的搜寻和发现已经加快了步伐。这一成就由三个主要因素推动:(1)测序技术的进步;(2)扩大常规虫媒病毒监测策略;(3)对新出现病原体和新病毒的“搜寻”。从大量的宿主、媒介和环境样本中发现了许多新的病毒。为了有助于促进对全球蚊虫相关病毒多样性和分布的了解,并促进未来的研究,我们回顾了 2007 年至 2017 年在世界各地发现的蚊虫相关病毒。在分析期间,对属于 25 个家族的新发现蚊虫相关病毒和 1 组未分类病毒进行了分类。新发现蚊虫相关病毒排前 3 位的分别属于黄病毒科( $n=32$ )、弹状病毒科( $n=16$ )和布尼亚病毒科( $n=14$ )。此外,报告了 67 种未分类病毒。这些新发现病毒多数是从库蚊、按蚊、伊蚊和曼氏按蚊中鉴定的。值得注意的是,这些新发现病毒的数量并不能代表洲际病毒的多样性,而是受研究期间开展的研究数量的影响。这些新发现蚊虫相关病毒中有些具有直接或间接的医学意义。例如,在研究期间,报道了 14 种可在体外感染哺乳动物细胞的新型蚊媒病毒。这些病毒对新出现的病毒性疾病的全球卫生安全构成威胁。另一方面,本文所述的一些新发现的昆虫特异性病毒具有潜在的应用前景,可作为对抗已知致病性虫媒病毒的生物防治和疫苗制剂。总的来说,这篇综述概述了蚊子作为病毒媒介在全球病毒圈中所起的关键作用。

(吕新军 编译)