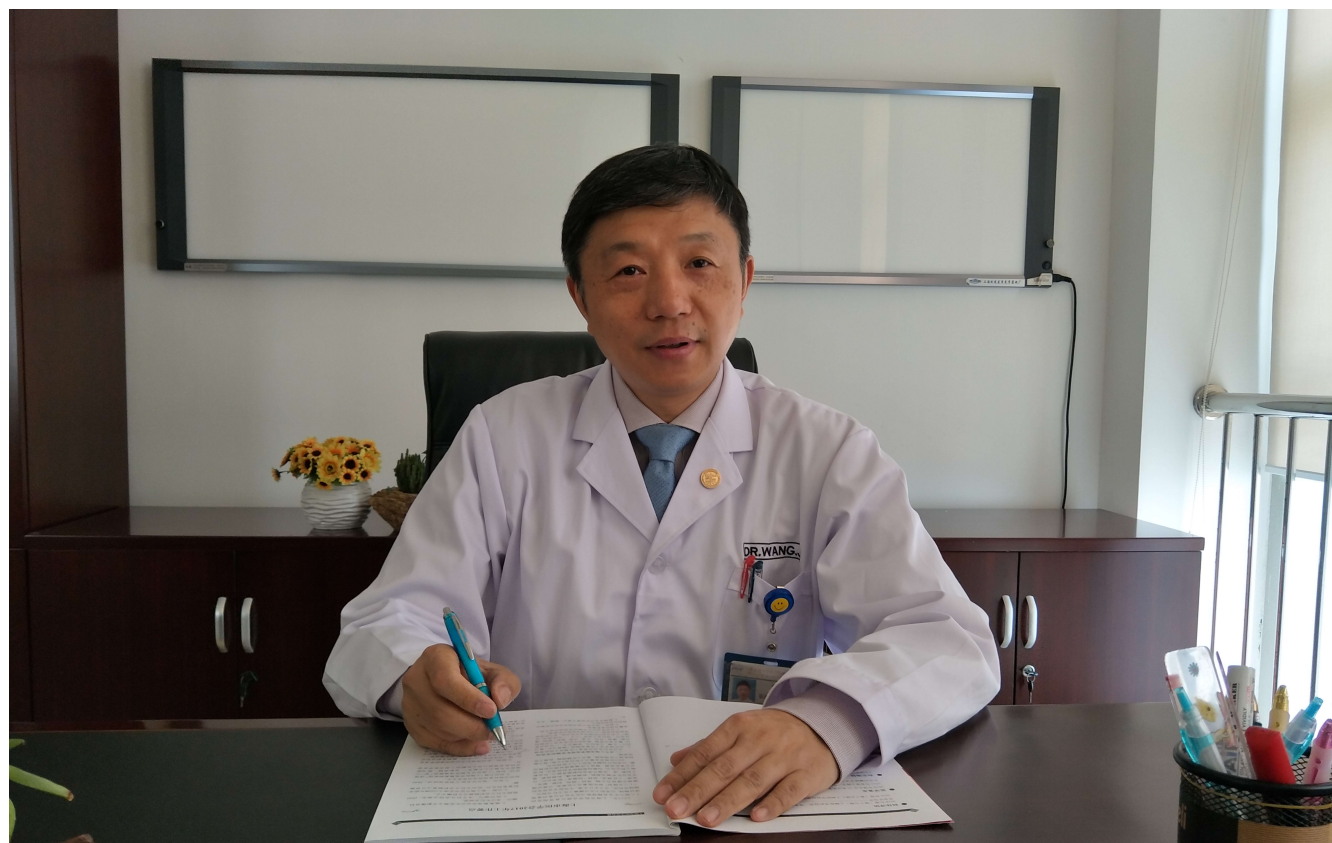


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2018年5月8日 第26卷 第13期 (Volume 26 Number 13)



13/2018

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物. 本刊被美国《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》数据库收录.

目 次

2018年5月8日 第26卷 第13期 (总第597期)

述评

- 755 自噬在肝脏缺血再灌注损伤中的作用及研究进展
李子一, 佟立权

基础研究

- 760 HBx蛋白及其羧基末端缺失35个氨基酸的突变体对正常肝细胞增殖的影响
朱冉旭, 羊东晔, 司徒伟基

临床研究

- 769 以PiCCO联合ScvO2目标导向液体治疗在重症胰腺炎早期治疗中的应用效果
张雪良, 徐子琴, 徐敏, 熊建华

临床实践

- 775 卡培他滨节拍化疗联合三维适形放疗对晚期老年食管癌患者血清肿瘤标志物、VEGF、CRP及基质金属蛋白酶水平的影响
刘瑜, 谢德耀, 陈艳丽, 何志锋, 池闯
- 782 新辅助化疗联合腹腔镜手术治疗进展期胃癌效果及患者生活质量情况观察
江良县, 周申康, 刘帅, 叶菲菲
- 790 规范化疼痛护理干预对胃癌晚期患者癌痛及生活质量的影响
李银英, 潘路佳
- 796 超声造影技术与核磁共振成像在肝外胆管癌诊断中的价值对比
朱伟年
- 803 早期含益生菌肠内营养支持方案对重型颅脑损伤患者血清白蛋白水平、炎性细胞因子及GCS评分的影响
刘伟贤, 龚杰, 赵东, 汤朱骁, 陈亮, 陈钟樑, 沈峥
- 810 优质护理联合高压氧综合治疗对幽门螺杆菌阳性消化性溃疡患者自我护理能力、生存状况的作用评估
梁晓英, 张蕊
- 816 腹部推拿合清宁丸治疗老年冠心病便秘患者的疗效作用
汪群芳

消 息

- 781 《世界华人消化杂志》外文字符标准
- 789 《世界华人消化杂志》消化护理学领域征稿启事
- 802 《世界《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标
- 809 《世界华人消化杂志》正文要求

封面故事

王坚, 上海交通大学医学院附属仁济医院胆胰外科科主任, 主任医师, 教授, 博士生导师. 曾获“上海市领军人才”、“上海市优秀学术带头人”、“上海市卫生局新百人计划”和“银蛇奖二等奖”, 担任中华医学会胆道外科学组委员等20余项国家级、省市级学术职务. 在国内率先提出围肝门外科技术体系治疗围肝门胆道肿瘤、高位胆管损伤性狭窄、中央型胆管囊肿和肝门胆管结石. 以项目负责人获国家级课题4项, 省部级课题6项等. 以第一或通讯作者发表论文100余篇, 其中SCI收录33篇. 副主编、参编16本专著.

本期责任人

编务 李香; 送审编辑 马亚娟; 组版编辑 张砚梁; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 崔丽君; 形式规范审核编辑部主任 马亚娟; 最终清样审核总编辑 马连生

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2018-05-08

原刊名 新消化病学杂志

期刊名称

世界华人消化杂志

国际标准连续出版物号

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

主编

程英升, 教授, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院放射科

党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科

吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科

王俊平, 教授, 030001, 山西省太原市, 山西省人民医院消化科

王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科

姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

编辑委员会

编辑委员会成员在线名单, 详见:

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/editorialboard.htm>

编辑部

马亚娟, 主任

《世界华人消化杂志》编辑部

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: wjgd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

制作

北京百世登生物医学科技有限公司

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室

电话: 010-85381892

传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物. 本刊被美国《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》、俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》数据库收录.

《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(<https://www.baishideng.com>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者和编者之间的信息反馈交流.

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

定价

每期90.67元 全年36期3264.00元

© 2018 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Contents

Volume 26 Number 13 May 8, 2018

EDITORIAL

- 755 Role of autophagy in hepatic ischemia-reperfusion injury

Li ZY, Tong LQ

BASIC RESEARCH

- 760 Impact of wild-type and carboxyl-terminal truncated hepatitis B virus X on hepatocyte proliferation

Zhu RX, Yang DY, Seto WK

CLINICAL RESEARCH

- 769 Effect of PICCO and ScvO₂ guided liquid therapy in early treatment of severe acute pancreatitis

Zhang XL, Xu ZQ, Xu M, Xiong JH

CLINICAL PRACTICE

- 775 Effect of capecitabine metronomic chemotherapy and three-dimensional conformal radiotherapy on serum tumor markers, VEGF, CRP, and matrix metalloproteinases in elderly patients with esophageal cancer

Liu Y, Xie DY, Chen YL, He ZF, Chi C

- 782 Neoadjuvant chemotherapy combined with laparoscopic surgery for treatment of advanced gastric cancer: Efficacy and impact on quality of life

Jiang LX, Zhou SK, Liu S, Ye FF

- 790 Effect of standardized pain nursing intervention on cancer pain and quality of life in advanced gastric cancer patients

Li YY, Pan LJ

- 796 Diagnostic value of contrast-enhanced ultrasound versus magnetic resonance imaging in extrahepatic cholangiocarcinoma

Zhu WN

- 803 Effect of different early nutritional support programs on serum protein, inflammatory cytokines, and Glasgow Coma Scale score in patients with severe craniocerebral injury

Liu WX, Gong J, Zhao D, Tang ZX, Chen L, Chen ZL, Shen Z

- 810 Effect of high quality nursing combined with hyperbaric oxygen therapy on self-care ability and survival in patients with *Helicobacter pylori* positive peptic ulcer

Liang XY, Zhang R

- 816 Effect of abdominal massage combined with Qingning pills in treatment of elderly coronary artery disease patients with constipation

Wang QF

COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Jian Wang, Professor, Chief Physician, Department of Biliary-Pancreatic Surgery, Ren Ji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, 1630 S, Dongfang Road, Shanghai 200127, China

Indexed/Abstracted by

Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica, Abstract Journals, and Scopus.

RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Xiang Li* Review Editor: *Ya-Juan Ma* Electronic Editor: *Yan-Liang Zhang* English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Editor-in-Charge: *Li-Jun Cui* Proof Editor: *Ya-Juan Ma* Layout Reviewer: *Lian-Sheng Ma*

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date May 8, 2018

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

ISSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

EDITOR-IN-CHIEF

Ying-Sheng Cheng, Professor, Department of Radiology, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Shuang-Suo Dang, Professor, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Xue-Liang Jiang, Professor, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

Lian-Xin Liu, Professor, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Zhan-Ju Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Bin Lv, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Jun-Ping Wang, Professor, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Shanxi, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Xiao-Zhong Wang, Professor, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Deng-Fu Yao, Professor, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Zong-Ming Zhang, Professor, Department of General Surgery, Beijing Electric Power Hospital, Capital Medical University, Beijing 100073, China

EDITORIAL BOARD MEMBERS

All editorial board members resources online at <http://www.wjgnet.com/1009-3079/editorialboard.htm>

EDITORIAL OFFICE

Ya-Juan Ma, Director
World Chinese Journal of Digestology
 Baishideng Publishing Group Inc
 7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA
 Fax: +1-925-223-8242
 Telephone: +1-925-223-8243
 E-mail: wjcd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Inc
 7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242
 Telephone: +1-925-223-8243
 E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

PRODUCTION CENTER

Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Limited Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China
 Telephone: +86-10-85381892
 Fax: +86-10-85381893

PRINT SUBSCRIPTION

RMB 90.67 Yuan for each issue
 RMB 3264 Yuan for one year

COPYRIGHT

© 2018 Baishideng Publishing Group Inc. Articles published by this open access journal are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in journals owned by the Baishideng Publishing Group (BPG) represent the views and opinions of their authors, but not the views, opinions or policies of the BPG, except where otherwise explicitly indicated.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at <http://www.wjgnet.com/1009-3079/Nav/36>. If you do not have web access, please contact the editorial office.

HBx蛋白及其羧基末端缺失35个氨基酸的突变体对正常肝细胞增殖的影响

朱冉旭, 羊东晔, 司徒伟基

朱冉旭, 羊东晔, 司徒伟基, 香港大学深圳医院消化及肝病科 广东省深圳市 518053

朱冉旭, 博士, 主治医师, 主要从事乙型肝炎病毒对肝癌作用机制的相关方面研究.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目, No. 81702777; 广东省自然科学基金资助项目, No. 2015A030310053.

作者贡献分布: 此课题的研究, 数据和写作分析由朱冉旭完成; 论文修改由朱冉旭、羊东晔及司徒伟基完成.

通讯作者: 朱冉旭, 主治医师, 518053, 广东省深圳市福田区海园一路(白石路与侨城东路交汇), 香港大学深圳医院消化和肝病科. zhurx@hku-szh.org

收稿日期: 2018-03-09

修回日期: 2018-04-17

接受日期: 2018-04-25

在线出版日期: 2018-05-08

Impact of wild-type and carboxyl-terminal truncated hepatitis B virus X on hepatocyte proliferation

Ran-Xu Zhu, Dong-Ye Yang, Wai-Kay Seto

Ran-Xu Zhu, Dong-Ye Yang, Wai-Kay Seto, Department of Gastroenterology and Hepatology, The University of Hong Kong-Shenzhen Hospital, Shenzhen 518053, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81702777; Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 2015A030310053.

Correspondence to: Dr. Ran-Xu Zhu, Department of Gastroenterology and Hepatology, The University of Hong Kong-Shenzhen Hospital, 1, Haiyuan 1st Road, Futian District, Shenzhen 518053, Guangdong Province, China. zhurx@hku-szh.org

Received: 2018-03-09

Revised: 2018-04-17

Accepted: 2018-04-25

Published online: 2018-05-08

Abstract

AIM

To construct lentiviral vectors expressing human wild-type HBx (wt-HBx) and truncated HBx (tHBx^{Δ35}) and study the effect of wt-HBx and tHBx^{Δ35} on the proliferation and apoptosis of normal liver cell lines.

METHODS

Lentiviral vectors TOPO3.1-wt-HBx and TOPO3.1-tHBx^{Δ35} were constructed and transfected into 293T cells with three packaging plasmids. The supernatants were collected to infect LO2 and MIHA cells, respectively. The expression of wt-HBx and tHBx^{Δ35} was detected by fluorescence microscopy and western blot analysis. The effect of HBx and tHBx^{Δ35} on the proliferation, cell cycle, and apoptosis was analyzed by cell counting, MTS, and flow cytometry, respectively.

RESULTS

The recombinant lentiviral vectors were successfully constructed. The proliferation of liver cells infected with tHBx^{Δ35} was significantly increased, compared with HBx or CTRL infected cells, while the proliferation of liver cells infected with HBx was decreased compared with tHBx^{Δ35} or CTRL infected cells ($P < 0.05$). tHBx^{Δ35} improved the number of cells in S phase, while HBx induced G0/G1-S cell cycle arrest. The effect of tHBx^{Δ35} or HBx on apoptosis was mild.

CONCLUSION

HBx can inhibit the proliferation of hepatocytes, while

tHBx^Δ35 can improve the proliferation of liver cells.

© The Author(s) 2018. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Lentiviral vector; Infection; tHBx^Δ35; wt-HBx; Proliferation; Hepatocyte; Apoptosis

Zhu RX, Yang DY, Seto WK. Impact of wild-type and carboxyl-terminal truncated hepatitis B virus X on hepatocyte proliferation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2018; 26(13): 760-768 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v26/i13/760.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v26.i13.760>

摘要

目的

构建野生型HBx(wild-type HBx, wt-HBx)和自然突变体HBx(truncated HBx, tHBx^Δ35)重组慢病毒表达载体, 建立稳定转染细胞株, 观察wt-HBx和tHBx^Δ35对肝细胞增殖和凋亡的影响。

方法

构建TOPO3.1-wt-HBx和TOPO3.1-tHBx^Δ35重组慢病毒载体; 与3个质粒包装系统用磷酸钙方法共同转染到人293T细胞, 包装成病毒颗粒, 分别感染肝细胞LO2和MIHA, 并进行荧光和Western blot法检测细胞中wt-HBx和tHBx^Δ35的表达情况。用细胞计数, 细胞活力测定, 集落形成实验, 流式细胞仪等方法检测对肝细胞增殖和凋亡效应的影响。

结果

重组慢病毒载体及稳定转染细胞株构建成功, 转染后wt-HBx和tHBx^Δ35在细胞中表达明显变化; tHBx^Δ35过表达细胞的增殖速度明显高于wt-HBx组和CTRL对照组, 而感染wt-HBx组的肝细胞增殖速度比CTRL对照组和tHBx^Δ35组增殖速度慢($P < 0.05$); tHBx^Δ35可能通过促进细胞S期的合成而刺激细胞增殖, 而wt-HBx可能通过捕获细胞的G0/G1期而抑制细胞增殖。但tHBx^Δ35, wt-HBx在肝细胞的凋亡率是很低的。

结论

HBx对肝细胞具有抑制增殖的作用, 而tHBx^Δ35对肝细胞具有促进增殖的作用。

© The Author(s) 2018. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 慢病毒载体; tHBx^Δ35; HBx基因; 细胞增殖; 肝细胞; 凋亡

核心提要: 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)编码HBx蛋白在原发性肝癌发展中发挥重要的作用。在肝癌

组织中, HBx 羧基末端频繁易丢失35个氨基酸, 形成自然突变体HBx(truncated HBx, tHBx^Δ35); 本研究主要探讨HBx和tHBx^Δ35对正常肝细胞增殖的影响。结果发现HBx对肝细胞具有抑制增殖的作用, 而tHBx^Δ35对肝细胞具有促进增殖的作用。

朱冉旭, 羊东晖, 司徒伟基. HBx蛋白及其羧基末端缺失35个氨基酸的突变体对正常肝细胞增殖的影响. *世界华人消化杂志* 2018; 26(13): 760-768 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v26/i13/760.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v26.i13.760>

0 引言

在正常组织的生长周期中, 细胞的凋亡和增殖是维持动态平衡的。当这个平衡发生破坏时, 就会引起诸多疾病。如当肝细胞凋亡过多时, 组织将出现坏死, 肝功能出现异常; 当肝细胞过度增殖时, 癌前病变及癌症将可能随之发生。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是我国诱发急慢性肝病和原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要病因^[1,2]。它属于嗜肝DNA病毒科, 直接感染肝细胞。HBV基因DNA组包含四个部分重叠的开放读码框(open reading frame, ORF), 分别命名为S, C, P和X。在这4个DNA基因组中, X-ORF编码154个氨基酸(amino acid, aa)多肽则称之为HBx蛋白^[3,4]。HBx作为反式调控蛋白, 通过协调和激活具有不同作用的功能性蛋白及其靶基因, 从而在病毒感染/复制以及诱发肝癌的发生发展中发挥重要的作用^[5,6]。

近年来, 人们在HBV相关肝癌的研究中, 发现HBx的突变体在诱发肝细胞癌变的过程中发挥了重要的作用。人们发现3'羧基末端被截短的HBx蛋白被频繁地检测在HBV相关的HCC肿瘤组织中^[7]。2003年Iavarone等^[8]和2004年Wang等^[9]的研究表明HBV在整合到肝细胞的时候, 易发生HBx突变, 即野生型HBx(wild-type HBx, wt-HBx)基因的3'末端被截断(丢失), 从而形成突变型的HBx (truncated HBx, tHBx)。2007年Xu等^[10]进一步发现: 在自然情况下, 在肝癌组织中HBx3'羧基末端易于丢失35aa, 即形成自然突变体tHBx^Δ35。但是自然突变体tHBx^Δ35如何诱导其癌变的作用机制目前仍不完全清楚。在本研究中旨在通过转染tHBx^Δ35, wt-HBx到正常肝细胞中探讨对肝细胞生长及增殖的影响及作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人永生化非肿瘤性肝细胞MIHA, LO2, 包装细胞293T细胞购自美国标准培养收集公司(ATCC, Manassas, VA, United States)。所有的细胞都用含10%

胎牛血清(HyClone公司, United States)的高糖DMEM培养液(Gbico公司)培养. 限制性内切酶EcoR I 购自美国Promega Biotech Co. Ltd公司; BamH I, Hpa I, Xho I, Sall内切酶, T4 DNA 连接酶购自美国New England BioLabs Inc.公司; RNA提取试剂盒, 无内毒素质粒提取试剂盒, DNA纯化试剂盒及PCR扩增试剂购自北京康为世纪生物科技有限公司. 引物序列均由Invitrogen公司合成. TOPO TA载体试剂盒购自Invitrogen公司. 流式细胞仪为BD FACS Aria™公司.

1.2 方法

1.2.1 重组慢病毒转移载体的构建: 野生型wt-HBx为全长HBx, 它是以HBV 血清型adw的HBx为模板; tHBx^{Δ35}为wt-HBx含3'末端被截断35氨基酸; 它的模板来自香港中文大学附属威尔斯亲王医院患HCC病人的血清; 引物设计: 分子克隆引物: HBx adw(wt-HBx)上游引物5'-GCCACCATGGATTACAAGGATGACGATGACAAGGCTGCTAGGGTGTGCTG-3', 下游引物: 5'-TAGGGCGTCTCGACTTAGGCAGAGGTGAAAA GTTG-3'(内含酶切位点); tHBx^{Δ35}:下游引物Reverse 5'-TAGGGCGTCTCGACTTAGTCTTTAAACACACAG TCTTTGA-3'; 在设计寡核苷酸序列中, Kozak一致序列(GCCACC)位于起始密码子(ATG)之前, 它可以增强转染进入真核细胞的效率. Flag-tag序列(GATTA CAAGGATGACGATGACAAG)连接在HBx序列的N端; 下游引物在HBx的CooH端截断35氨基酸处含有人工合成的终止密码子(TAA). 序列均由Invitrogen公司合成. wt-HBx, tHBx^{Δ35}的DNA片段通过PCR扩增和克隆到TOPO TA载体, 从而产生TOPO3.1-wt-HBx和TOPO3.1- tHBx^{Δ35}. 然后它们被亚克隆到含有EcoRI和Sall限制性内切酶切位点的慢病毒载体pRRL-cPPT-CMV-X-IRES- EGFP- PRE-SIN(由香港中文大学YC. Chen教授馈赠)中.

1.2.2 慢病毒的产生: 通过用磷酸钙方法将病毒转移载体和3个包装载体pMDL/pRRE, pRSV-REV和pCMV-VSVG瞬时转染到人293T细胞进行包装病毒. 在转染前1 d, 将生长状态良好的293T细胞接种至10 cm培养皿中, 待细胞密度达70%时, 更换无血清无抗生素DMEM培养基, 取质粒混悬液(10 μg病毒转移载体, 6.6 μg pMDL/pRRE, 3.5 μg pCMV-VSVG 和2.5 μg pRSV-REV通过用磷酸钙方法转移到293T细胞, 放入5% CO₂, 37 °C的温箱中孵育48 h, 收集含病毒的上清培养液, 并进行纯化和浓缩, 分装-80 °C冰箱保存.

1.2.3 慢病毒的感染: 感染前1 d, 取对数生长期状态良好的MIHA, LO2细胞, 按每孔 2×10⁴个细胞接种于24-孔培养板中. 待细胞密度达70%时, 弃去培养液, 加入

包装的慢病毒混悬液(4 μL 聚凝胺polybrene+15 μL慢病毒+381 μL新鲜DMEM培养基)放入5%CO₂, 37 °C的温箱中孵育. 经过48 h后, 换液, 放入荧光显微镜下观察细胞荧光发光(被感染上EGFP阳性的细胞则放射出绿色的荧光). 已感染的细胞所释放绿色荧光的密度和范围被测定为转染效率的标准.

1.2.4 Western-blot鉴定: 分别收集感染重组慢病毒和对照未感染的细胞, 裂解提取细胞总蛋白, 经BCA法蛋白定量, SDS-PAGE凝胶电泳样品, 蛋白上样量为50 μg, 半干转15 V稳压转膜17 min, 经凝胶蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜. 5%脱脂奶粉37 °C封闭1.5 h, 后加入鼠抗人HBx一抗(1:2000 稀释)或β-actin一抗(1:5000 稀释), 4 °C过夜, TBST洗膜后加入抗鼠二抗(1:5000稀释), 室温孵育1h, TBST洗膜后与化学发光底物孵育5 min, 暗室中用X线片曝光, 显影, 定影. 用β-actin作内参验证蛋白含量.

1.2.5 生长曲线绘制: 重组慢病毒tHBx^{Δ35}组, wt-HBx组和空载体(CTRL)阴性对照组按照1×10⁴个/孔接种在3块6孔板培养. 每24 h取3孔计数, 每孔计数2次, 取平均值作为日平均细胞数, 连续计数5 d, 绘制细胞生长曲线.

1.2.6 MTS法检测细胞增殖: 实验设重组慢病毒空载体阴性对照组CTRL, 重组慢病毒tHBx^{Δ35}组, wt-HBx组, 每组各设6个重复孔, 按照每孔5000个细胞密度接种于96孔板中, 在37 °C, 5% CO₂孵育0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h后分别每孔加20 μL MTS溶液, 继续培养2 h. 酶标仪上选490 nm波长测定各孔吸光度(A490)值. 计算6孔平均值.

1.2.7 集落形成实验: 将重组慢病毒空载体阴性对照组CTRL, 重组慢病毒wt-HBx组, tHBx^{Δ35}组细胞分别按每含50个细胞的密度接种于6孔板, 每组细胞接种3个孔. 将培养板移入CO₂培养箱培养2 wk. 弃去培养液, 用PBS液小心漂洗2次, 加入甲醇固定15 min, 弃去固定液, 加适量的0.25%结晶紫染料在室温下染10 min, 细胞集落在显微镜下计数, 重复3次以上实验取其平均值.

1.2.8 细胞周期的检测: 收集重组慢病毒空载体阴性对照组CTRL, 重组慢病毒wt-HBx组, tHBx^{Δ35}组细胞, 调整细胞密度至1×10⁸/L, 预冷的70%乙醇固定2 h后加入0.5 mL碘化丙啶染色液, 37°C避光温浴30 min, 随即进行流式细胞仪检测, 观察细胞周期分布情况.

1.2.9 细胞凋亡的检测: 收集重组慢病毒空载体阴性对照组CTRL, 重组慢病毒wt-HBx组, tHBx^{Δ35}组细胞, 调整细胞密度至1×10⁸/L, 加入5 μL膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(annexin V-FITC), 室温避光孵育10 min, 加入5 μL碘化丙啶(PI)染色, 随即进行流式细胞仪检测, 观察

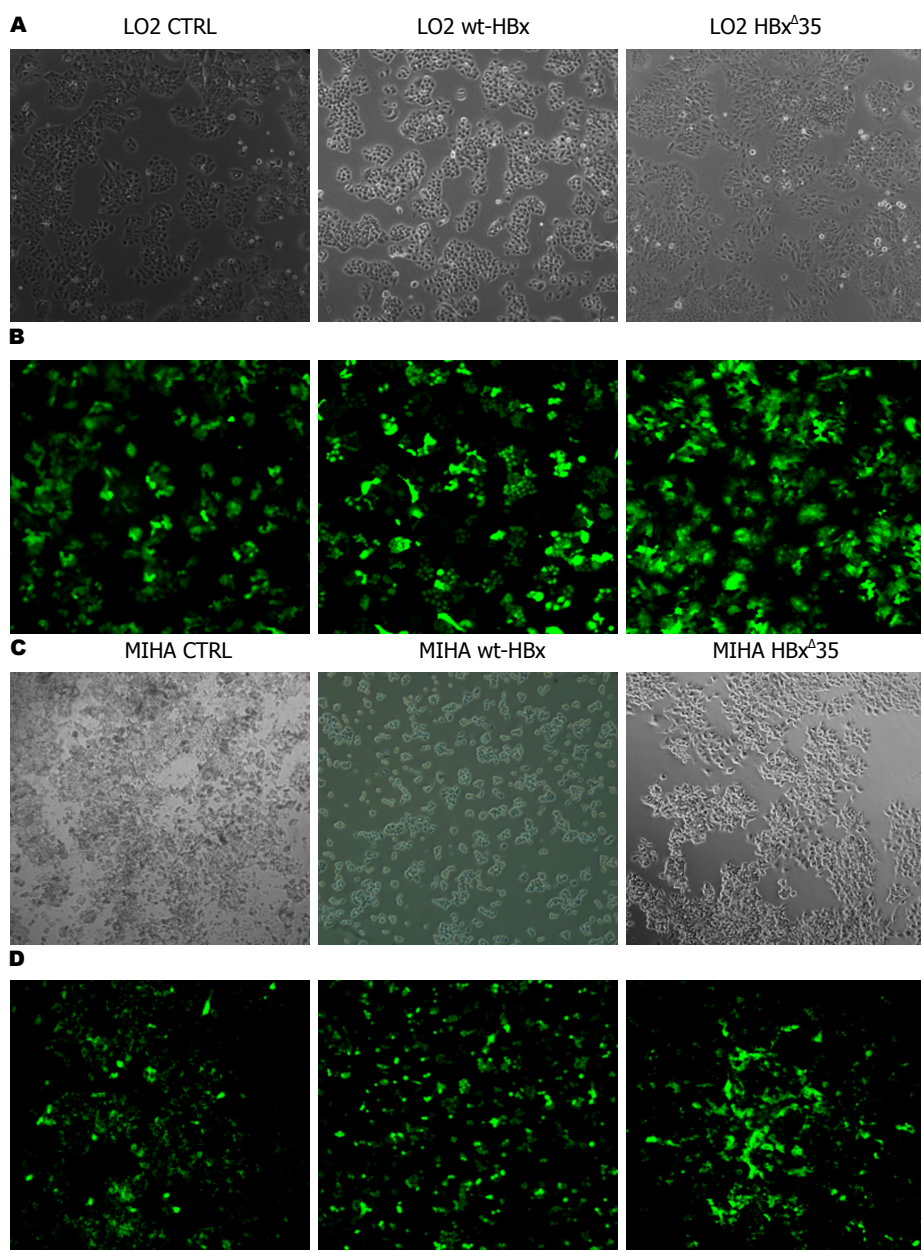


图 1 重组慢病毒感染肝细胞LO2/MIHA感染效率的鉴定. A: 重组慢病毒tHBx^Δ35组, wt-HBx组, 对照组CTRL分别感染LO2在白光显微镜下; B: 重组慢病毒tHBx^Δ35组, wt-HBx组, 对照组CTRL分别感染LO2在荧光显微镜下; C: 重组慢病毒tHBx^Δ35组, wt-HBx组, 对照组CTRL分别感染MIHA在白光显微镜下; D: 重组慢病毒tHBx^Δ35组, wt-HBx组, 对照组CTRL分别感染MIHA在荧光显微镜下.

凋亡细胞百分比.

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件分析, 组间比较采用*t*检验, $P < 0.05$ 为统计学差异意义. 数据以mean ± SD表示.

2 结果

2.1 感染效率鉴定 感染重组慢病毒48 h后在荧光显微镜下观察细胞, 其生长状态良好. 与对照组比较, 感染后的细胞可见广泛绿色荧光存在(感染效率 $\geq 80\%$), 说明慢病毒的感染效率较高(图1).

2.2 感染细胞后目的基因的鉴定 Western blot 结果显

示通过慢病毒的介导感染, 野生型wt-HBx和突变型tHBx^Δ35基因均在LO2和MIHA细胞中的蛋白水平上稳定地表达出来(图2).

2.3 tHBx^Δ35和wt-HBx 基因在肝细胞的生长效应 感染肝细胞5 d后, 感染tHBx^Δ35组的LO2肝细胞增殖速度比空载体(CTRL)对照组肝细胞增殖效应明显加快($P < 0.05$), 而感染wt-HBx组的MIHA肝细胞增殖速度比空载体(CTRL)对照组肝细胞增殖要慢($P < 0.05$). 类似的结果也显示在感染MIHA肝细胞中(见图3).

2.4 MTS法检测细胞增殖 经培养5 d后, 可见感染tHBx^Δ35组明显对肝细胞有促进增殖作用. 感染

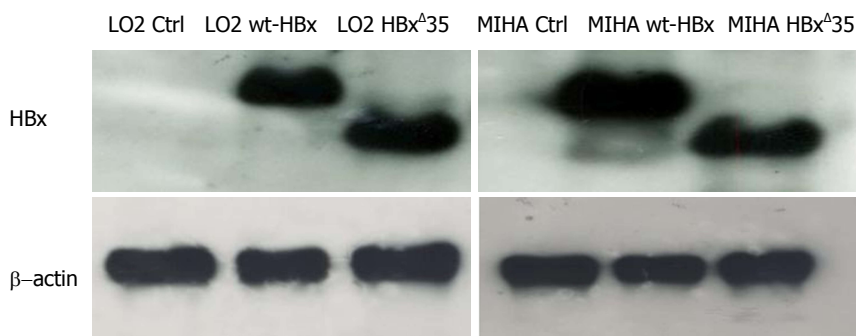


图 2 重组慢病毒感染肝细胞LO2/MIHA目的基因的蛋白鉴定. Western blot 分析不同组慢病毒分别感染肝细胞LO2和MIHA的HBx蛋白的表达, β -actin作为对照.

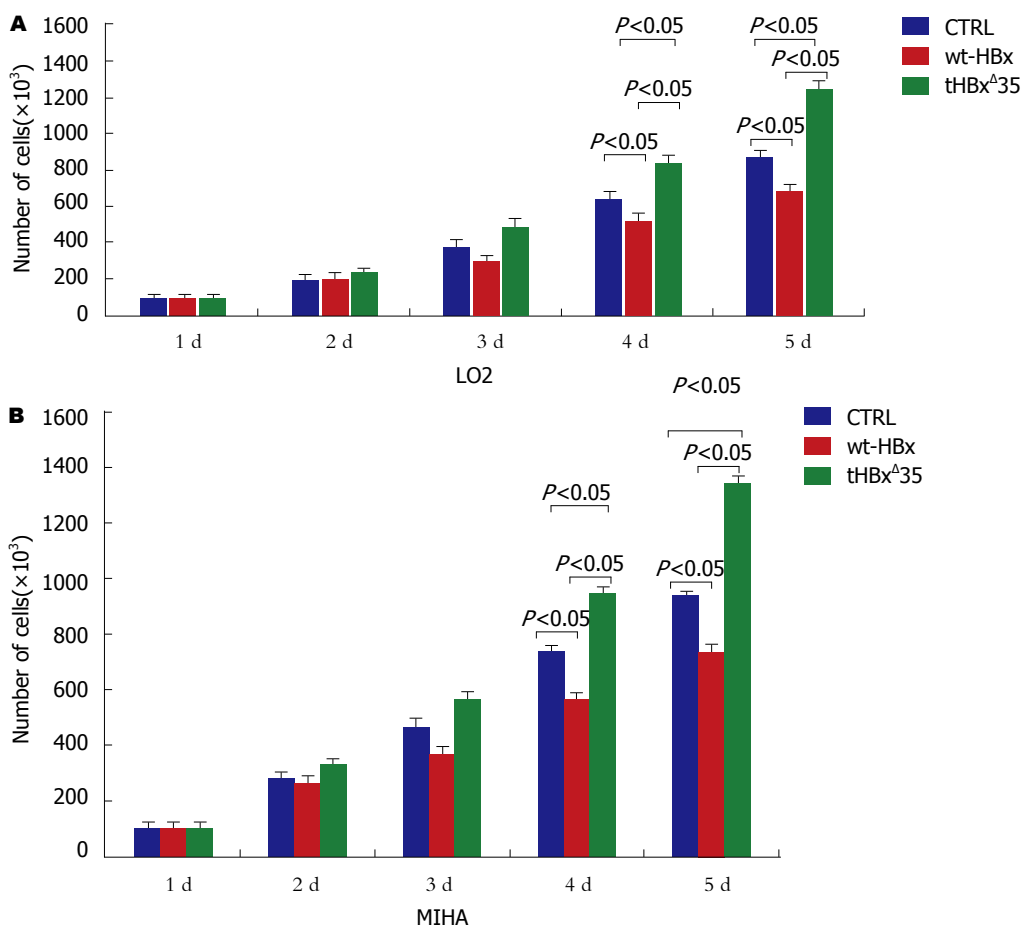


图 3 tHBx^Δ35和wt-HBx 基因在肝细胞的生长效应. A: 重组慢病毒tHBx^Δ35组, wt-HBx组, 对照组CTRL分别感染LO2时的生长情况; B重组慢病毒tHBx^Δ35组, wt-HBx组, 对照组CTRL分别感染 MIHA时的生长情况.

tHBx^Δ35组的LO2肝细胞增殖速度比wt-HBx组, 空载体(CTRL)对照组增殖效应要快($P < 0.05$). 而感染wt-HBx组的LO2肝细胞增殖速度却比空载体(CTRL)对照组, tHBx^Δ35组要慢($P < 0.05$), 其类似的结果也显示在感染MIHA肝细胞中(见图4). 显然, 我们的结果揭示感染tHBx^Δ35肝细胞比感染wt-HBx肝细胞更能促进肝细胞增殖.

2.5 集落形成实验 培养14 d后, 重组慢病毒tHBx^Δ35组形成细胞集落明显较空载体(CTRL)对照组, wt-HBx组

为多($P < 0.05$), 而wt-HBx组形成的细胞集落比tHBx^Δ35组, 空载体(CTRL)对照组要少($P < 0.05$), tHBx^Δ35组所形成细胞集落为三者中最多, wt-HBx组所形成的细胞集落则相较之为最少(如图5).

2.6 流式细胞仪分析细胞周期及凋亡 与细胞增殖试验结果一致, 重组慢病毒tHBx^Δ35组的细胞在S期(DNA合成期)的比例明显高于wt-HBx细胞和对照组(CTRL), $45.37\% \pm 3.15\%$ vs $28\% \pm 2.83\%$ vs $38.18\% \pm 2.69\%$, $P < 0.05$. 另一方面, wt-HBx组的细胞在G0/G1期(DNA

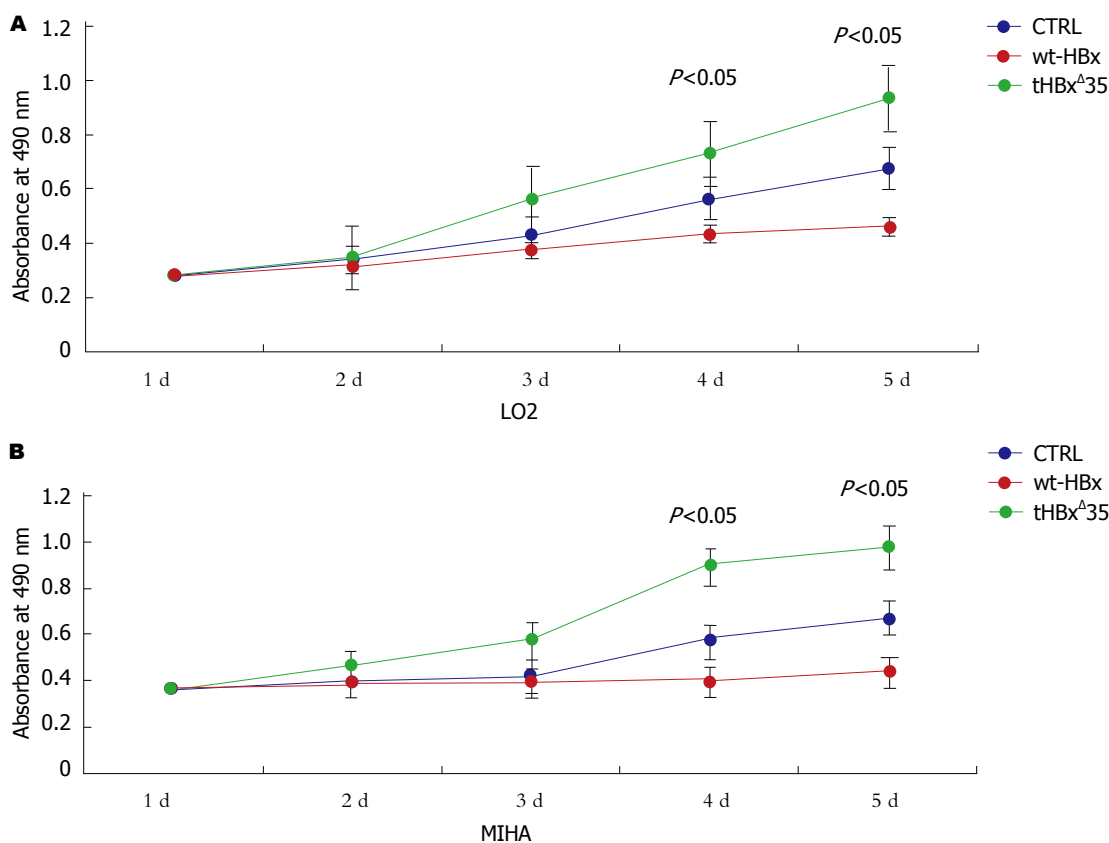


图 4 MTS法检测重组慢病毒感染细胞的增殖性. A: 示重组慢病毒tHBx^Δ35组, wt-HBx组, 对照组CTRL分别感染LO2细胞的生长情况; B示重组慢病毒tHBx^Δ35组, wt-HBx组, 对照组CTRL分别感染MIHA细胞的生长情况.

合成前期)的比例明显高于对照组(CTRL)和tHBx^Δ35组细胞(58.01%±3.14% vs 44.73%±5.69% vs 48.32%±4.35%, $P<0.05$), 而S期的比例明显低于tHBx^Δ35组和对照组(图6). 因而, 重组慢病毒tHBx^Δ35组的细胞可能通过促进细胞S期的合成而刺激细胞增殖, 而wt-HBx可能通过捕获(阻滞)细胞的G0/G1期而抑制细胞增殖. 然而, 在我们的研究中, 不同形式的HBx在MIHA细胞的凋亡率上却是很微弱的, 且显示不出明显的差异性(图7).

3 讨论

HBV与HCC的发生发展有着密切的关系. 近年来, 研究显示HBx在HBV相关的HCC疾病发展中发挥了重要作用. HBx是一个含154氨基酸的多功能蛋白. 但是HBx在HCC致癌过程中的作用机制还不是太清楚(存在广泛争议). 一些学者报道, 野生型HBx能诱导肝细胞的凋亡或是使细胞敏感于促凋亡刺激所诱发的凋亡^[11,12], 并且通过和原癌基因ras, myc的相互作用而抑制集落的形成^[13]. 他们认为HBx可以通过结合DNA修复基因以干扰宿主细胞DNA修复机制以及干预细胞周期的进展, 其中包括S期的进展和染色体的稳定性从而诱导肝细胞凋亡^[14]. 同时野生型HBx也可通过涉及肿瘤坏死因

子所诱导凋亡的体制, 包括激活一系列含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶级联反应从而促使细胞敏感于凋亡. 而另一方面, 一些学者则阐述了HBx促进肝细胞无限增殖, 进而导致HCC的产生. HBx和它的某些特定靶基因的相互作用则在启动肝癌形成的信号传导通路上发挥了主要的作用.

如何解释HBx在肝癌形成中截然相反的作用呢? 研究显示, 当HBx5'氨基端的前50个aa被明确为转化功能区时, 其3'羧基末端的后14个aa具有反式激活转化功能区的活性, 从而达到抑制细胞过度增殖的效应. 当羧基末端超过14aa的截断则会失去其对野生型wt-HBx的生长抑制效应^[15,16]. 2003年Iavarone等^[8]和2004年Wang等^[9]分别发现HBV在整合到肝细胞的时候, 易发生HBx 3'羧基末端的丢失, 即野生型wt-HBx转变为突变型的tHBx. 因而人们推测, 在肝癌组织细胞中HBx可能存在两种不同的形式: 野生型wt-HBx和突变型tHBx. 2007年Xu等^[10]在Hepatology进一步提出: 在自然情况下, 在肝癌组织中的HBx3'羧基末端, 359和360的碱基位置易于发生高频地G到A的突变, 即TGG变成TAA, 也就是在120个aa的位置形成了未成熟的终止密码子, 从而导致了羧基末端的35aa的自然丢失. 因而, tHBx^Δ35被认为

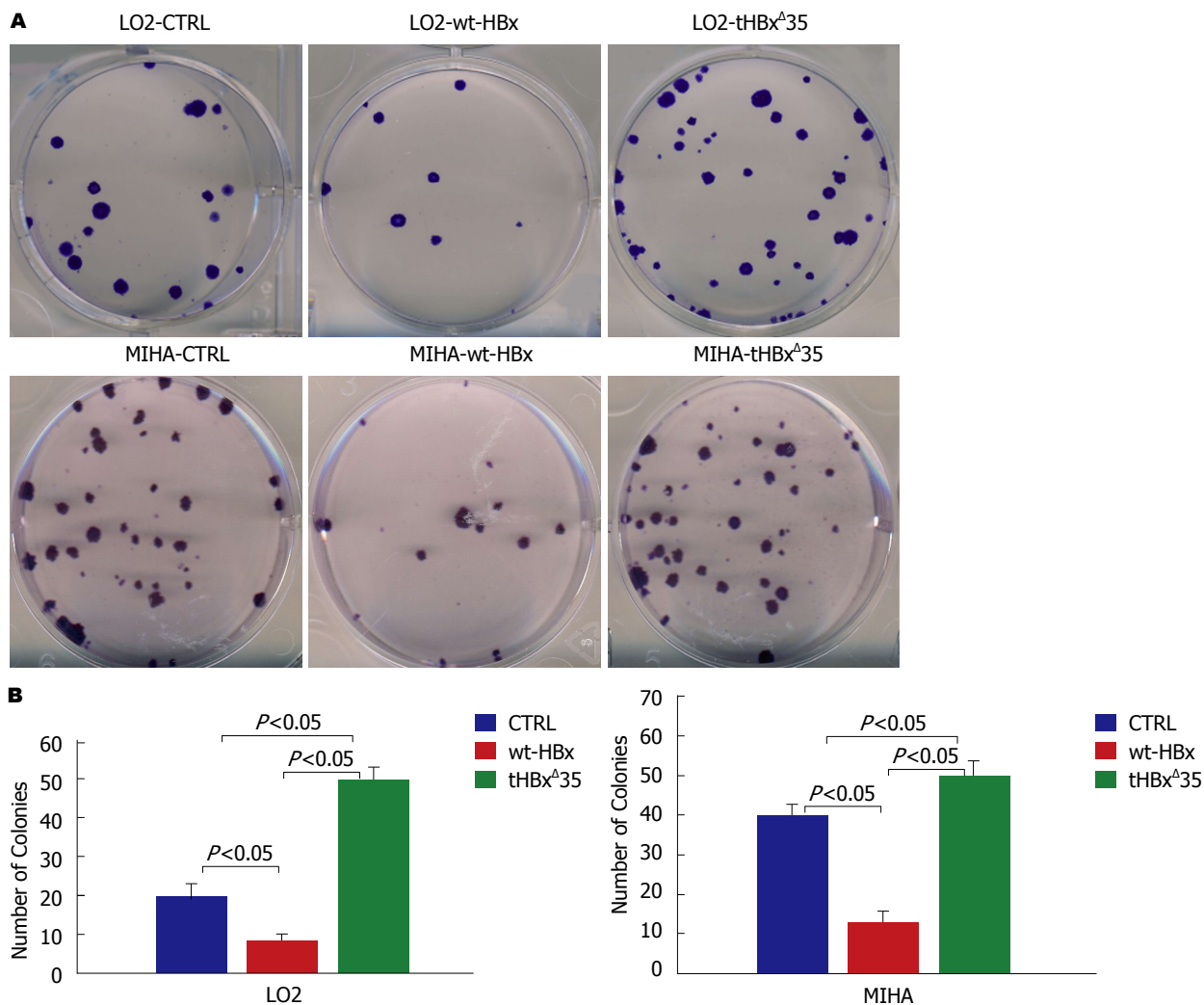


图 5 集落形成实验检测重组慢病毒感染肝细胞LO2, MIHA后形成的集落. A: 重组慢病毒tHBx^Δ35组, wt-HBx组, 对照组CTRL分别感染LO2和MIHA细胞而形成的集落; B: 重组慢病毒tHBx^Δ35组, wt-HBx组, 对照组CTRL分别感染LO2和MIHA细胞形成集落的计数.

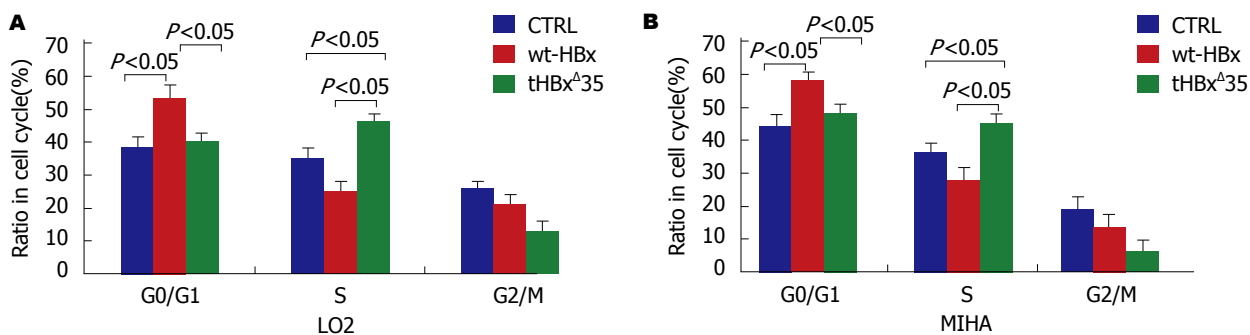


图 6 流式细胞仪分析重组慢病毒感染肝细胞LO2/MIHA的细胞周期. A: 重组慢病毒tHBx^Δ35组, wt-HBx组, 对照组CTRL分别感染LO2的细胞周期; B: 重组慢病毒tHBx^Δ35组, wt-HBx组, 对照组CTRL分别感染MIHA的细胞周期.

为是野生型HBx自然形成的突变体^[10]. 然而自然突变体tHBx^Δ35如何诱导其癌变的作用机制目前仍不完全清楚. 在本研究旨在通过转染tHBx^Δ35, wt-HBx到正常肝细胞中探讨对肝细胞生长及增殖的影响及作用机制.

本实验成功地扩增出wt-HBx和tHBx^Δ35, 并分别

将其成功地克隆入慢病毒载体质粒中Tpo3.1中, 经酶切鉴定及测序证实载体构建成功. 并与3个质粒系统将载体质粒包装成病毒颗粒, 感染肝细胞株. MIHA和LO2作为人永生非肿瘤性肝细胞, 因此, 成为我们所选择研究慢病毒稳定转染的肝细胞株. 当慢病毒感染

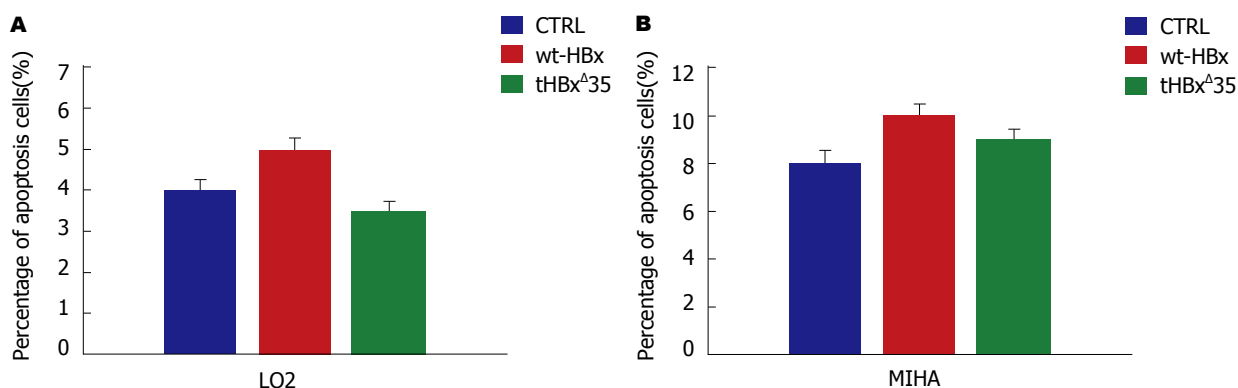


图 7 流式细胞仪分析重组慢病毒感染肝细胞LO2/MIHA后的细胞凋亡. A: 重组慢病毒tHBx^{Δ35}组, wt-HBx组, 对照组CTRL分别感染LO2的细胞凋亡率; B: 重组慢病毒tHBx^{Δ35}组, wt-HBx组, 对照组CTRL分别感染MIHA的细胞凋亡率. $P>0.05$, 无明显统计学差异.

肝细胞株MIHA和LO2 48 h后, 可见广泛绿色荧光存在, Western blot结果显示明显的过表达效果, 提示稳定转染细胞株构建成功. 慢病毒wt-HBx和tHBx^{Δ35}的稳定转染细胞株的构建成功为下一步的研究奠定了坚实的基础, 有利于tHBx^{Δ35}, wt-HBx基因在肝细胞中功能的研究以及进一步发病机制的探索.

为了明确tHBx^{Δ35}, wt-HBx是否对正常肝细胞的生长及增殖的影响, 我们首先用其生长曲线, MTS增殖试验, 集落形成实验鉴定, 发现感染tHBx^{Δ35}基因的MIHA和LO2肝细胞能生长地更快, 形成细胞克隆率更多; 而wt-HBx使得肝细胞生长变慢, 形成细胞克隆率较少. 这可能是因为tHBx^{Δ35}基因在羧基末端丢失了35aa, 失去了其对野生型wt-HBx的生长抑制效应. 接着, 我们用流式细胞仪进一步分析tHBx^{Δ35}, wt-HBx基因对肝细胞增殖影响的原因, 检测它们对细胞周期和凋亡的影响. 结果显示tHBx^{Δ35}基因可促使细胞S期的合成增加进而刺激细胞增殖, 而wt-HBx可通过捕获(阻滞)细胞的G0/G1期而抑制细胞增殖. 但tHBx^{Δ35}, wt-HBx对细胞的凋亡是很微弱的. 而本实验也存在一定的局限性, 并未对tHBx^{Δ35}基因如何促进细胞增殖的机制做更深入地具体分析.

总之, HBx在HBV相关的HCC疾病发生发展中发挥了重要的作用, 其羧基末端缺失35aa的突变体能促进肝细胞的异常增殖. tHBx^{Δ35}基因可能通过促使细胞S期的合成增加进而刺激细胞增殖, 而HBx可通过捕获(阻滞)细胞的G0/G1期而抑制细胞增殖. HBx蛋白是作为反式调控蛋白, 在细胞核内, 虽然不能直接结合靶基因DNA, 但可通过蛋白-蛋白相互作用即与转录因子结合, 如HBx和核转录因子, 炎症因子, 促癌因子等与其靶基因相互作用从而在病毒感染/复制以及诱发肝癌的发生发展中发挥重要的作用^[5,6], 这将是我们的下一步研究的方向, 为HBx蛋白羧基末端缺失35aa的突变体对HCC的发生发展的具体分子生物学机制以及为将来临床诊治提供

坚实的理论依据.

文章亮点

实验背景

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国最为常见的恶性肿瘤, 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染则是我国诱发HCC的主要病因. 研究发现HBV编码的X蛋白HBx在HCC发展中发挥重要的作用.

实验动机

近年来, 人们对HBx在HCC致癌过程中的作用机制还不是太清楚(存在广泛争议). 一些学者报道, HBx能诱导肝细胞的凋亡或坏死, 而另一些学者则发现HBx促进肝细胞无限增殖, 进而导致HCC的产生. 如何解释HBx在肝癌形成中截然相反的作用呢? 近来, 人们发现在肝癌组织中检测到HBx3'羧基末端易于丢失35个氨基酸, 即形成自然突变体(truncated HBx, tHBx^{Δ35}). 也许HBx感染肝脏组织后存在不同的形式, 即野生型HBx和突变体tHBx^{Δ35}, 从而产生出不同的作用. 然而人们对他们如何诱导正常肝细胞癌变的作用机制目前仍不完全清楚.

实验目标

本研究旨在通过转染tHBx^{Δ35}, wt-HBx到正常肝细胞中探讨对肝细胞生长及增殖的影响.

实验方法

构建wt-HBx和tHBx^{Δ35}重组慢病毒表达载体, 用磷酸钙方法包装成慢病毒颗粒稳定转染肝细胞株, 用细胞计数, 细胞活力测定, 集落形成实验, 流式细胞仪等方法检测对肝细胞增殖和凋亡效应的影响.

实验结果

重组慢病毒载体及稳定转染细胞株构建成功; 重组慢

病毒tHBx^Δ35相对于重组慢病毒wt-HBx组和CTRL对照组促进肝细胞增殖, 而重组慢病毒wt-HBx组则比较重组慢病毒tHBx^Δ35, CTRL对照组在肝细胞增殖速度中最慢($P < 0.05$); tHBx^Δ35可能通过促进细胞S期的合成而刺激细胞增殖, 而wt-HBx可能通过捕获细胞的G0/G1期而抑制细胞增殖。

实验结论

tHBx^Δ35对肝细胞具有促进增殖的作用, 而wt-HBx对肝细胞具有抑制增殖的作用。

展望前景

以tHBx^Δ35促进肝细胞增殖为理论基础, 接下来将进一步探寻tHBx^Δ35对其靶基因的作用机制, 进而对临床中乙型肝炎患者的诊断和治疗提供有价值的理论基础。

致谢

非常感谢香港中文大学陈力元教授, 郑诗乐教授在本实验中给予极大的帮助。

4 参考文献

- 1 Zhu RX, Seto WK, Lai CL, Yuen MF. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in the Asia-Pacific Region. *Gut Liver* 2016; 10: 332-339 [PMID: 27114433 DOI: 10.5009/gnl15257]
- 2 Lu T, Seto WK, Zhu RX, Lai CL, Yuen MF. Prevention of hepatocellular carcinoma in chronic viral hepatitis B and C infection. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 8887-8894 [PMID: 24379612 DOI: 10.3748/wjg.v19.i47.8887]
- 3 Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2016; 64: S84-S101 [PMID: 27084040 DOI: 10.1016/j.jhep.2016.02.021]
- 4 Ding SL, Yang ZW, Wang J, Zhang XL, Chen XM, Lu FM. Integrative analysis of aberrant Wnt signaling in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 6317-6328 [PMID: 26034368 DOI: 10.3748/wjg.v20.i30.10238]
- 5 Al-Qahtani AA, Al-Anazi MR, Nazir N, Ghai R, Abdo AA, Sanai FM, Al-Hamoudi WK, Alswat KA, Al-Ashgar HI, Khan MQ, Albenmoussa A, Cruz DD, Bohol MFF, Al-Ahdal MN. Hepatitis B virus (HBV) X gene mutations and their association with liver disease progression in HBV-infected patients. *Oncotarget* 2017; 8: 105115-105125 [PMID: 29285238 DOI: 10.18632/oncotarget.22428]

- 6 Shih C, Yang CC, Choijsuren G, Chang CH, Liou AT. Hepatitis B Virus. *Trends Microbiol* 2018; 26: 386-387 [PMID: 29500037 DOI: 10.1016/j.tim.2018.01.009]
- 7 Chen Z, Tang J, Cai X, Huang Y, Gao Q, Liang L, Tian L, Yang Y, Zheng Y, Hu Y, Tang N. HBx mutations promote hepatoma cell migration through the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cancer Sci* 2016; 107: 1380-1389 [PMID: 27420729 DOI: 10.1111/cas.13014]
- 8 Iavarone M, Trabut JB, Delpuech O, Carnot F, Colombo M, Kremsdorf D, Bréchet C, Thiers V. Characterisation of hepatitis B virus X protein mutants in tumour and non-tumour liver cells using laser capture microdissection. *J Hepatol* 2003; 39: 253-261 [PMID: 12873823]
- 9 Wang Y, Lau SH, Sham JS, Wu MC, Wang T, Guan XY. Characterization of HBV integrants in 14 hepatocellular carcinomas: association of truncated X gene and hepatocellular carcinogenesis. *Oncogene* 2004; 23: 142-148 [PMID: 14712219]
- 10 Xu R, Zhang X, Zhang W, Fang Y, Zheng S, Yu XF. Association of human APOBEC3 cytidine deaminases with the generation of hepatitis virus B x antigen mutants and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007; 46: 1810-1820 [PMID: 17847074]
- 11 Jiang Z, Liu H. Metformin inhibits tumorigenesis in HBV-induced hepatocellular carcinoma by suppressing HULC overexpression caused by HBX. *J Cell Biochem* 2017; Epub ahead of print [PMID: 29231260 DOI: 10.1002/jcb.26555]
- 12 Yang Y, Wang X, Zhang Y, Yuan W. Hepatitis B virus X protein and proinflammatory cytokines synergize to enhance TRAIL-induced apoptosis of renal tubular cells by upregulation of DR4. *Int J Biochem Cell Biol* 2018; 97: 62-72 [PMID: 29432906 DOI: 10.1016/j.biocel.2018.02.006]
- 13 Lee S, Kim W, Ko C, Ryu WS. Hepatitis B virus X protein enhances Myc stability by inhibiting SCF(Skp2) ubiquitin E3 ligase-mediated Myc ubiquitination and contributes to oncogenesis. *Oncogene* 2016; 35: 1857-1867 [PMID: 26165841 DOI: 10.1038/onc.2015.251]
- 14 Park SH, Lee SM, Kim YJ, Kim S. ChARM: Discovery of combinatorial chromatin modification patterns in hepatitis B virus X-transformed mouse liver cancer using association rule mining. *BMC Bioinformatics* 2016; 17: 452 [PMID: 28105934 DOI: 10.1186/s12859-016-1307-z]
- 15 Tu H, Bonura C, Giannini C, Mouly H, Soussan P, Kew M, Paterlini-Bréchet P, Bréchet C, Kremsdorf D. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res* 2001; 61: 7803-7810 [PMID: 11691796]
- 16 Zhang AY, Lai CL, Poon RT, Huang FY, Seto WK, Fung J, Wong DK, Yuen MF. Hepatitis B virus full-length genomic mutations and quasispecies in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2016; 31: 1638-1645 [PMID: 26905957 DOI: 10.1111/jgh.13316]

编辑: 崔丽君 电编: 张砚梁





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

