

利用肝癌细胞系研究 HBV 的最新进展

李卉 胡康洪

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 属嗜肝 DNA 病毒科。一般可采用原代肝细胞或肝癌细胞系对 HBV 复制进行体外研究。由于原代肝细胞来源困难、存活时间短,而肝癌细胞系具有来源方便、操作简便、条件可控和可重复性等优点,是研究 HBV 的理想工具。现阶段可用于研究 HBV 的细胞系包括肝来源细胞系 HepG2 细胞及其改造细胞系(如 HepG2. 2. 15、HepG2. 2. 16、HepaRG 等)、Huh-7 细胞系、PLC/PRF/5 细胞系等;非肝源细胞系包括 FL5-1、Hela 细胞、单核细胞系 U937 细胞、树突状细胞、肾 293 细胞等虽可转染 HBV 但胞内环境与典型的肝细胞相差较远。以下对使用最为广泛的 HepG2、HepG2. 2. 15、Huh-7 细胞系研究 HBV 近两年所取得的最新进展作综述。

一、HepG2 细胞系

HepG2 是研究 HBV 应用最广泛的肝癌细胞系。1986 年, Sureau 等^[1] 利用电穿孔基因转移技术,将 ayw 亚型 HBV DNA 导入体外培养的 HepG2,获得的转染细胞系成功表达全部病毒标志物,标志着 HBV 体外研究的真正突破。

目前利用 HepG2 研究 HBV 主要方向包括:研究 HBV 编码的各类蛋白如 HBx、P 蛋白的功能;以培养 HepG2 为工具找寻更好的培养平台;改造 HepG2 以得到更好的研究 HBV 的细胞系工具。

1. HBx 功能研究:HBx 是 HBV 编码最小的功能尚不明确的蛋白质,近两年对 HBx 功能研究成果较多,主要集中在其调控细胞凋亡方面。McClain 等^[2] 发现表达 HBx 蛋白或表达 HBV 的 HepG2 与普通 HepG2 细胞相比,细胞质中 Ca^{2+} 浓度较高,研究表明,这种细胞质 Ca^{2+} 浓度的升高是由于 HBx 与线粒体膜相互作用,使膜通透性增加导致向细胞质中运输 Ca^{2+} ,而 Ca^{2+} 正是介导下游各类信号通路的第一信号。Bax 蛋白是一种促细胞凋亡因子,它被 14-3-3 蛋白识别并定位。Kim 等^[3] 将 HBx 转入 HepG2 中,发现 HBx 能直接与 Bax 结合,干扰 Bax 与 14-3-3 ϵ 的相互作用,使 Bax 从细胞质向线粒体膜转移,从而诱导细胞凋亡。组蛋白-H3-4 甲基转移酶(SMYD3)能参与肿瘤细胞增殖与凋亡的调控。Yang 等^[4] 发现将 HBx 转入 HepG2 后,SMYD3 及癌基因 C-MYC 的表达上调,细胞凋亡下降,HepG2 的增殖加快;用 siRNA 沉默 SMYD3 后 C-MYC 的表达下降,细胞凋亡加速,说明 HepG2 表达 HBx 后能提高 SMYD3 表达,可能由此导致肝癌发生,而

基金项目:国家自然科学基金(No. 30870131);国家“十一五”传染病重大专项(No. 2008ZX10002-011)

作者单位:430071 武汉市,中国科学院武汉病毒研究所病毒学国家重点实验室(李卉,胡康洪);德国雷根斯堡大学分子和细胞解剖学研究所(胡康洪)

通讯作者:胡康洪,Email:hukgh@wh.iov.cn

C-MYC 在此过程中起负调控作用。Tan 等^[5]研究发现 HBx 通过 SH3 模体与 Rac I 核苷酸交换因子作用,以激活 Rac I 信号通路,从而使 HBV 复制增强,并导致 HepG2 细胞出现膜皱褶和板状维族结构生理变化。

以上研究说明 HBx 一个主要功能是通过影响细胞增生的上游信号,介导特定通路从而干扰细胞凋亡。

2. 培养平台及方法学研究:Sodunke 等^[6]用柔刻石印术制作出聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane,PDMS)微通道,作为 HepG2 的培养容器,在这种细胞培养小室中能转染 HBV 基因组 cDNA 和感染重组腺病毒,可用作 HBV 复制的研究模型。该系统的最大优点是,细胞能在可控制的条件下生长,转染率高达 40%。该结果为利用三维培养系统培植细胞系开展 HBV 感染研究提供了有价值的思路。

Sun 等^[7]将四环素(Tet)调节的 Tet OFF 系统引入到 HepG2 细胞中建立 Hep2.2.16 细胞系。具体操作为将 Tet 阳性启动子插入到已建立的能表达 Tet 阳性反式激活蛋白的 HBV 基因组上游。能够实现 HBV 转录可调控的目的:当体系中不含 Tet 时,细胞可持续复制 HBV;当加入 Tet 后,HBV 复制停止。Hep2.2.16 能成为新的细胞系工具进行 HBV 的各项学术和新药研制方面的研究。Lucifora 等^[8]构建出新的 HBV 重组杆状病毒 Bac-HBV-1.1,含哺乳动物强启动子,能合成 pg RNA,与其他杆状病毒载体相比,它转入 HepG2 后 HBV 复制效率更高,并能检测出 ccc DNA,分泌在上清的粒子能感染 HepaRG 细胞;同时他们也构建出能抗拉米夫定和阿德福韦酯的 Bac-HBV-1.1 杆状病毒。

HBV 合成许多拼接 RNA,都能反转录成病毒 DNA,Abraham 等^[9]发现 HBV 转染 HepG2 时,胞内衣壳蛋白 DNA 50% 是来自于 5 种拼接 RNA,其中仅前基因组 RNA(pg RNA)能合成 RC DNA,其他拼接 RNA 也能作为模板反转录出单链 DNA,说明在细胞转染实验条件下,大量 HBV DNA 组分是拼接 RNA 来源的。因此通过转染细胞研究 HBV 时,必须考虑拼接 RNA 的存在给 HBV DNA 复制带来的影响。

二、Hep2.2.15 细胞系

将重组质粒 pDoLT-HBV-1 转染细胞 HepG2,得到的克隆称 HepG2.2.15,它能稳定分泌 HBeAg 及 HBsAg 和病毒成熟颗粒,可检测到细胞内 DNA 和 RNA,但不能检测到 ccc DNA。HepG2.2.15 细胞系可持续长时间地维持病毒复制(1 年以上),但病毒复制水平较低。

目前利用 HepG2.2.15 主要筛选抗 HBV 药物和研究抗病毒机制,及 HepG2.2.15 与 HepG2 细胞差异表达的各种蛋白及其功能的研究。

1. 抗病毒药物筛选:近年研究人员对中药提取物、一些植物的抗病毒蛋白、抗体库等潜在药物进行了筛选。

He 等^[10]发现用美洲商陆抗病毒蛋白以 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度处理 HepG2.2.15 细胞能显著降低 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 复制,最高抑制率为 50%;而将含美

洲商陆(pokeweed)抗病毒蛋白基因的质粒转入 HepG2. 2. 15 中, HBsAg、HBeAg 的分泌下降超过 99%, HBV DNA、RNA 含量分别下降 74% 和 69%。

Xie 等^[11]用环孢素(CsA)处理 HepG2. 2. 15 细胞,发现其能抑制 HBsAg、HBeAg 表达和 HBV DNA 复制。双向电泳发现 17 种蛋白质在 CsA 处理前后有显著变化,利用飞行时间质谱(MALDI-TOF)确定了其中的 11 种,几乎都与转录因子和翻译因子有关。Matthes 等^[12]筛选出 N4-羟基-5 甲基- β -L-脱氧胞嘧啶(β -L-Hyd4C),这种胞嘧啶类似物能有效降低 HepG2. 2. 15 分泌 HBV 成熟颗粒,其抑制靶标为 HBV DNA 聚合酶。Wu 等^[13]发现异芳基二氢嘧啶类化合物(Bay41-4109)能有效抑制 HepG2. 2. 15 中 HBV DNA 的释放,使胞质中 HBcAg 浓度下降。抗病毒机制为 Bay41-4109 能解聚核衣壳蛋白,将它们变成二聚体或单体,之后降解为短肽,包装蛋白以错误的形式积累,不能行使其正常功能。

2. RNA 干扰(RNAi)的利用:RNAi 指由 RNA 介导的基因沉默现象,近年来广泛用于抗 HBV 研究。

Jia 等^[14]利用 U6-RNA III (Pol III) 启动子表达 HBV shRNAs 基因,并转染 HepG2. 2. 15。通过嘌呤霉素筛选,建立稳定反转录 RNAi 系统。在嘌呤霉素抗性的 HepG2. 2. 15 中,HBV 各类蛋白和 mRNA 显著下降 88%,HBV 复制被抑制,说明基于反转录病毒的 RNAi 技术十分有效。Li 等^[15]进一步用 siRNA 和拉米夫定联用处理 HepG2. 2. 15,发现其 HBeAg、HBsAg 在 4 天后下降超过 90%,HBV DNA 含量也显著下降,联用时 HBV mRNA 浓度与单独使用 siRNA 或拉米夫定相比显著下降。

HepG2. 2. 15 与 HepG2 相比,MHC Class I-相关分子 A(MICA I,一种 NKG2D 受体的配体)含量下降,Tang 等^[16]发现在 HepG2. 2. 15 中加入 HBV siRNA 后能抑制 HBV 的表达,但持续低量表达 HBV 的 HepG2. 2. 15 中 MICA 表达增加,而 MICA 的增加导致 HepG2. 2. 15 被 NK 细胞溶解,表明 HBV 感染会阻断肝炎患者先天免疫系统,推断 siRNA 能限制 HBV 的复制从而增加抗癌免疫应答。

Ding 等^[17]使用人类全基因组 Bioarray 来确定 HepG2 和 HepG2. 2. 15 中所有差异表达基因,之后用抗 HBV 药物拉米夫定处理 HepG2. 2. 15,分析哪些差异表达的基因发生变化。通过生物信息学分析发现 6 个基因区:ABHD2、EREG、ACVR2B (activin a receptor, type II B)、CDC 34 (cell division cycle 34)、KHDRBS3 (KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3) 及 RORA (RAR-related orphan receptor A) 可能是细胞抗 HBV 的靶标,并用反义脱氧寡核苷酸来检测这些靶标的抗病毒活性,最终在 HepG2. 2. 15 中发现抑制 2 个基因区 ABHD2 及 EREG 能显著阻断 HBV 增殖。

三、Huh-7 细胞系

Huh-7 与 HepG2 一样来源于人肝癌细胞系,HBV DNA 转入 Huh-7 细胞系中也可检测到 HBsAg、HBeAg、HBcAg。Huh-7 与 HepG2 的区别在于 Huh-7 细胞表面有 CD81 受体,因此,HCV 能感染 Huh-7 而 HepG2 不能被感染。目前利用 Huh-

7 细胞系主要研究方向为:确定 HBV 中各蛋白的功能区,感染 HBV 后细胞体内变化所依赖的信号通路,以及体外表达 HBV 中各蛋白并研究其功能。

1. HBV 编码蛋白质功能区研究:Blanchet 等^[18]将包膜蛋白在合成过程中与内质网相互作用的结构区-胞内环 I 和 II (CYL- I ,CYL- II)进行突变,将突变分别引入到S-HBsAg、M-HBsAg、L-HBsAg 中之后转染 Huh-7,检测其自我积聚和形成 HBV/HDV 颗粒的能力,将其产生的粒子感染HepaRG,检测其是否还具有感染力。结果证明 CYL- I 突变(S 结构域的第 23 和 78 位点)的包膜蛋白具有感染能力,而 P29A 突变则由于破坏了 L-HBsAg 的合成和积累能力而不能形成病毒粒子。

HBV G1862T 突变发生在 pg RNA ϵ 信号的侧向突出上,当 pg RNA 翻译时,导致前蛋白 3'-端信号肽识别位点的缬氨酸被苯丙氨酸代替,将 G1862T 突变的 HBV 转染 Huh-7,发现 D 型 HBV 的复制下降(A 型无变化),而 HBeAg 分泌下降 54%,共聚焦显微观察突变子中一部分未分泌的 HBeAg 在内质网膜及高尔基体及其中间地带积聚,这种聚集体能主动与泛素热休克蛋白和蛋白酶作用,和胞质中的中间丝、波形蛋白、角蛋白分开。由 G1862T 突变形成的聚集体,可能在有 HBV 诱导的各种肝病中起一定作用^[19]。

一种位于内质网膜的磷酸肌醇-5-磷酸酶(SKIP)在骨骼肌和肾大量富集,它能与 HBV 核心蛋白相互作用。Hung 等^[20]发现 SKIP 不仅位于内质网还存在于细胞核中,且能抑制 HBV 表达;SKIP 突变分析表明其抑制结构域在其 199 ~ 226 位氨基酸残基,证实了 SKIP 与核心蛋白作用时会从内质网转移到核中,通过一个新的结构域与 HBV 核心蛋白相互作用从而抑制 HBV 基因的表达。

2. 体外表达功能蛋白:Favre^[21]将 HBV 聚合酶通过构建质粒转染 Huh-7,成功地在 Huh-7 中表达,翻译出的多肽保留了 RNA 聚合酶反转录活性,能反转录含 ϵ 信号的病毒 RNA 模板。若 mRNA 上缺失 ϵ 信号,则翻译出的全长 HBV 聚合酶不能反转录该模板,而研究发现截短的 HBV 聚合酶(缺失 YMDD 催化活性位点)也不能反转录含 ϵ 信号的 mRNA 模板。此表达系统中 HBV 聚合酶的反转录活性也能部分地被核苷(酸)类似物(比如拉米夫定)抑制。此系统能提供体外找寻新的直接对抗 HBV 聚合酶的抗 HBV 组分的方法,而不再需要动物或动物提取液。

3. 影响 HBV 感染的细胞调控因子:Kim 等^[22]利用酵母双杂交系统找到与 HBx 能相互作用的一个新蛋白-丝氨酸/苏氨酸磷酸化酶(PP2C α),将表达的 PP2C α 基因转入Huh-7后,表达量异常的 PP2C α 能将 STAT3 去磷酸化,从而降低 IL-6 的表达;而转入 HBx 后,HBx 会将去磷酸化的 STAT3 再次磷酸化,从而使 PP2C α 介导的 IL-6 含量下降。说明细胞感染 HBV 后可能影响类似于 PP2C α 负调控因子,从而引发肝癌。

法尼酯 X 受体 α (FXR α)是在肝中富集的核受体,由胆汁酸识别上游激素应答元素从而被激活产生 FXR α 杂二聚体,通过分析发现此二聚体能结合 HBV 增

强子 II (HBV enhancer II) 和核心启动子 (core promoter) 区域的两个基序 (motif)。Ramière 等^[23] 将含 HBV enhancer II 和 core promoter 序列的荧光报告基因载体转染 Huh-7, 发现胆汁酸能通过激活 FXR α 来增强其报告基因的活性, 将 HBV 转入后发现, FXR α 的存在能增加病毒 pg RNA 和 DNA 的复制中间产物, 说明 FXR α 能调节 HBV 核心启动子活性而胆汁酸在 HBV 自然感染中起重要作用。

四、小结

研究 HBV 可以在细胞系、原代肝细胞、动物实验等平台进行, 由于可直接感染 HBV 的黑猩猩、棉猴等属于珍稀濒危动物, 难以用于实验。小鼠感染 HBV 后其肝细胞中没有 ccc DNA 的形成, 不能成为慢性感染模型。鸭等鸟禽类动物模型与人体亲缘关系相差较远, 研究得出的实验结果很难应用于人体。而原代肝细胞来源困难及存活时间短, 实验很难控制, 因此利用人肝癌细胞系在研究 HBV 病毒方面一直是最方便最重要的基础工具。

纵观近两年以细胞系为工具的 HBV 研究热点还主要集中于抗 HBV 病毒药物筛选; 研究 HBV 编码的各类蛋白及其功能区的验证; 改造现有细胞系或培养平台以获得更利于研究 HBV 的细胞系系统。目前的研究取得了一定成果, 如构建出可感染 HBV 的细胞系 HepaRG^[24], 但 HepaRG 不太稳定且受到专利保护, 难以广泛用于 HBV 研究。下一步的研究重点集中于更深入的进行 HBV 复制机制等基础研究; 利用最新的方法 (如 RNA 诱饵技术等) 筛选有应用前景的抗病毒适配子; 利用三维培养系统, 改造现有细胞系使其具备感染 HBV 的能力等。将细胞系工具和体内实验结合运用, 相信在 HBV 基础研究方面将取得进一步突破。

参 考 文 献

- 1 Sureau C, Romet-Lemonne JL, Mullins JI, et al. Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell*, 1986, 47:37-47.
- 2 McClain SL, Clippinger AJ, Lizzano R, et al. Hepatitis B virus replication is associated with an HBx-dependent mitochondrion-regulated increase in cytosolic calcium levels. *J Virol*, 2007, 81:12061-12065.
- 3 Kim HJ, Kim SY, Kim J, et al. Hepatitis B virus X protein induces apoptosis by enhancing translocation of Bax to mitochondria. *IUBMB Life*, 2008, 60:473-480.
- 4 Yang L, He J, Chen L, et al. Hepatitis B virus X protein upregulates expression of SMYD3 and C-MYC in HepG2 cells. *Med Oncol*, 2009, 26:445-451.
- 5 Tan TL, Fang N, Neo TL, et al. Rac1 GTPase is activated by hepatitis B virus replication-involvement of HBX. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783:360-374.
- 6 Sodunke TR, Bouchard MJ, Noh HM. Microfluidic platform for hepatitis B replication study. *Biomed Microdevices*, 2008, 10:393-402.
- 7 Sun D, Nassal M. Stable HepG2- and Huh7-based human hepatoma cell lines for efficient regulated expression of infectious hepatitis B virus. *J Hepatol*, 2006, 45:636-645.
- 8 Lucifora J, Durantel D, Belloni L, et al. Initiation of hepatitis B virus genome replication and production of infectious virus following delivery in HepG2 cells by novel recombinant baculovirus vector. *J Gen Virol*, 2008, 89:1819-1828.
- 9 Abraham TM, Lewellyn EB, Haines KM, et al. Characterization of the contribution of spliced RNAs of hepatitis B virus to DNA synthesis in transfected cultures of Huh7 and HepG2 cells. *Virology*, 2008, 379:30-37.
- 10 He YW, Guo CX, Pan YF, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by pokeweed antiviral protein in vitro. *World J Gastroenterol*, 2008, 14:1592-1597.

- 11 Xie HY, Xia WL, Zhang CC, et al. Evaluation of hepatitis B virus replication and proteomic analysis of HepG2. 2. 15 cell line after cyclosporine A treatment. *Acta Pharmacol Sin*,2007 ,28 :975-984.
- 12 Matthes E, Funk A, Krahn I, et al. Strong and selective inhibitors of hepatitis B Virus replication among novel N4-hydroxy-and 5-methyl-beta-deoxycytidine analogues. *Antimicrob Agents Chemother*,2007 ,51 :2523-2530.
- 13 Wu GY, Zheng XJ, Yin CC, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by bay 41-4109 and its association with nucleocapsid disassembly. *J Chemother*,2008 ,20 :458-467.
- 14 Jia F, Zhang YZ, Liu CM. Stable inhibition of hepatitis B virus expression and replication in HepG2. 2. 15 cells by RNA interference based on retrovirus delivery. *J Biotechnol*,2007 ,128 :32-40.
- 15 Li GQ, Xu WZ, Wang JX, et al. Combination of small interfering RNA and lamivudine on inhibition of human B virus replication in HepG2. 2. 15 cells. *World J Gastroenterol*,2007 ,13 :2324-2327.
- 16 Tang KF, Chen M, Xie J, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by small interference RNA induces expression of MICA in HepG2. 2. 15 cells. *Med Microbiol Immunol*,2009 ,198 :27-32.
- 17 Ding XR, Yang J, Sun DC, et al. Whole genome expression profiling of hepatitis B virus-transfected cell line reveals the potential targets of anti-HBV drugs. *Pharmacogenomics J*,2008 ,8 :61-70.
- 18 Blanchet M, Sureau C. Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J Virol*,2006 ,80 :11935-11945.
- 19 Chen CY, Crowther C, Kew MC, et al. A valine to phenylalanine mutation in the precore region of hepatitis B virus causes intracellular retention and impaired secretion of HBe-antigen. *Hepato Res*,2008 ,38 :580-592.
- 20 Hung CS, Lin YL, Wu CI, et al. Suppression of hepatitis B viral gene expression by phosphoinositide 5-phosphatase SKIP. *Cell Microbiol*,2009 ,11 :37-50.
- 21 Favre D. Reverse Transcriptase activity of hepatitis B virus polymerase in eukaryotic cell extracts in vitro. *ALTEX*,2008 ,25 :197-211.
- 22 Kim JS, Rho B, Lee TH, et al. The interaction of hepatitis B virus X protein and protein phosphatase type 2 Calpha and its effect on IL-6. *Biochem Biophys Res Commun*,2006 ,351 :253-258.
- 23 Ramière C, Scholtès C, Diaz O, et al. Transactivation of the hepatitis B virus core promoter by the nuclear receptor FXRalpha. *J Virol*,2008 ,82 :10832-10840.
- 24 Gripon P, Rumin S, Urban S, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA*,2002 ,99 :15655-15660.

(收稿日期:2009-01-09)

(本文编辑:李卓)

李卉,胡康洪.利用肝癌细胞系研究 HBV 的最新进展[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2010,4(1):65-70.