

乙型肝炎病毒X蛋白与肝细胞癌关系研究进展

李晓飞(浙江省义乌市中心医院, 义乌市 322000)

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的癌症之一,我国肝癌发病率和病死率居世界首位,占全球每年新发病例和死亡人数的55%^[1]。肝细胞癌的发病是多因素协同作用的结果,众多流行病学资料显示,乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染与HCC的发生密切相关,乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)携带者患HCC的危险性比HBsAg阴性者高200多倍。然而迄今为止,对HBV感染后确切的致癌机制还不甚清楚。X区是HBV基因组4个开放读码框中最小的一个,也是HBV结构和功能上重叠最多的区段,其变异可影响病毒的复制、表达甚至致癌。X蛋白与肝癌成为目前肝炎相关性肝癌领域一个研究热点。现就近几年国内外最新研究进展作一综述。

1 HBx的结构特点和生物学功能

1.1 HBx的结构 HBV基因组为双环嗜肝DNA分子,含4个开放读码框(ORF)即X区、S区、C区、P区。其中X区是ORF中最小的一个,位于nt1374~1838,含有145~154氨基酸,分子量约为16 500, X区包含增强子2、基本核心基因启动子及两个直接重复序列(DR)、核心基因上游调节序列(CURS)和上游负调节因子(NER),此区是易突变区域,也是HBV基因组内结构和功能重叠最明显的区域,具有广泛的基因转录调控作用。X蛋白在胞浆内粗面内质网的核糖体上合成,主要位于细胞质中,可通过核孔进入核内进而发

挥反式激活作用。

1.2 HBx的生物学功能 HBx是一种具有反式激活作用的多功能病毒调节因子,其不与DNA直接结合,在侵染宿主细胞后,主要通过和宿主细胞中的蛋白质发生相互作用,来发挥其功能。HBx具有广泛的生物学作用,在调节基因转录、信号转导通路、细胞增殖及凋亡、细胞周期控制等方面均有效应,另外其在影响端粒酶活性和促进肝癌细胞的侵袭和转移也起了重要作用。

2 HBx与HCC

2.1 HBx的反式激活作用 HBx的反式激活功能区主要位于其C端51~154氨基酸残基区域内,其反式激活作用可通过蛋白-蛋白间相互作用,作用于DNA结合蛋白转录因子,直接或间接作用于基因启动子或增强子进行反式激活。HBx能够广泛激活病毒和细胞的启动子,促进病毒的复制与细胞的转录增生,其中包括AP-1、AP-2、NF- κ B、SRF和CREB等。研究^[2]表明,肿瘤抑制蛋白VHL的结合因子VBP1能与HBx发生相互作用,使HBx更容易激活NF- κ B,促进细胞增殖。

2.2 HBx在细胞信号转导中的作用 HBx通过多种信号途径及多种作用方式影响肝细胞的生存和转化,产生多环节的刺激影响,使细胞免于凋亡,从而有助于细胞的永生化和肿瘤形成。

2.2.1 HBx与磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)信号通路 HBx可通过激活HBx-PI3K-Akt-Bad的信号转导通路,发挥抗凋亡的作用^[3]。HBx活化PI-3K,活化的PI-3K传递细胞存活信号,并进一步活化AKT而使Bad磷酸化,磷酸化

的Bad不能使Bcl-2家族中的2个凋亡蛋白质Bcl-2和Bcl-xL具有促凋亡活性,从而发挥抗凋亡的作用。

2.2.2 HBx与c-myc信号途径 c-myc基因的异常表达是癌变过程中较早出现的分子改变,与肿瘤的启动及癌变程度密切相关。免疫组织化学数据显示肝细胞癌中c-myc的过度表达与肝细胞肿瘤功能改变是一致的^[4]。

2.2.3 HBx与丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen activated protein kinase, MAPK)信号通路 HBx通过Src激酶家族活化Ras,激活Ras-Raf-MAPK信号级联途径,活化相应转录因子;经Ras-MEK-MAPK信号转导途径促进中心体扩增、多极纺锤体形成,使有丝分裂异常,染色体传代发生错误,进而影响细胞功能。研究发现Src酪氨酸激酶活化不仅改变Ras的表达,而且通过刺激病毒聚合酶活性影响HBV复制^[5]。

2.2.4 HBx与c-jun氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase, JNK)信号通路 JNK信号途径是细胞凋亡的主要信号转导途径,JNK高水平的表达预示着肝细胞的增生和再生。Sakurai等^[6]研究发现JNK途径对肝脏癌变有重要作用,实验中肝脏缺少NF- κ B激活剂IKK β 的小鼠对二乙基亚硝胺(DEN)诱导的肝癌形成敏感性提高,因为NF- κ B的活性下降提高了JNK暴露在TNF- α 的活性,而TNF- α 可以被DEN诱导,故JNK活性对正常肝细胞增生是必需的。

2.2.5 HBx与核因子 κ B(Nuclear factor κ B, NF- κ B)信号途径 HBx对转录因子NF- κ B有明显的激活作用,能结合并活化所有类型的NF- κ B,包括那些含有RelA(p65)、C-Rel、p52、p50和P105的类型。在HBx激活NF- κ B机制的研究中,有学者^[7]发现TANK结合激酶-1(TBK1)的表达和HCC有直接联系,HBx可在转录水平上调TBK1,而TBK1蛋白水平的上调可刺激NF- κ B p65在丝氨酸536位点的磷酸化,从而诱导NF- κ B的激活。

2.2.6 HBx与 β -链蛋白(β -catenin)与Wnt信号途径 有研究报道^[8]示HBx能增强 β -catenin的表达,并提示HBx可能是调控 β -catenin的关键因子,而 β -catenin的异常表达又能激活Wnt信号通路,最终

导致肝癌的发生。 β -catenin过表达可出现于58.4%与HBV相关的HCC中,并与肿瘤大小、组织分化程度等病理因素有关^[9]。

2.2.7 HBx与JNK-STAT信号通路 信号转导子和转录活化子3(STAT3)是EGFR、IL-6/JAK、Src等多个致癌性酪氨酸激酶信号通道汇聚的焦点,STAT3激活后诱导某些与细胞增殖、分化、生存、凋亡密切相关的关键基因异常高表达,通过各种途径促进细胞增殖、恶性转化、阻碍细胞凋亡,表现出致癌的作用。研究表明STAT3的激活与肝癌的形成与转移有关^[10]。

由此可见,HBx对细胞关键信号的通路均具有广泛的激活作用,这些信号通路相互作用,形成了一个巨大的激活网络,广泛参与了肿瘤细胞代谢、增殖、凋亡、侵袭转移等细胞生命活动的调节。通过对这些信号途径的调节,HBx实现了其对肝细胞发生发展过程中广泛而强有力的调控作用。

2.3 对细胞周期的影响 研究发现^[11]在小鼠肝细胞中HBx可以影响多种细胞周期调控蛋白(如CDK4、CDK2)的活性和水平,使细胞从G₀期进入G₁期,并造成G₁期到S期的停滞。此外,亦有实验证实羧基末端HBx 3'-40突变,缩短细胞从G₀/G₁期进入S期的时间,从而促进细胞增殖、致肿瘤性、侵袭性及生长和转移^[12]。

2.4 HBx在细胞凋亡中的作用 有学者^[13]认为HBx蛋白通过增强细胞对促凋亡刺激物的敏感度而介导细胞凋亡;还可通过上调TNF- α 表达,在促凋亡中起协同作用,而李卫华等^[14]的研究表明HBx具有丝裂原活性,可提高肝癌细胞的增殖活性,并增强肝癌细胞的抗凋亡能力,增加了肝癌细胞的恶性表型。现已发现HBx蛋白还可通过其他多条途径阻止细胞凋亡,如增加端粒酶活性^[15]、调节survivin基因表达、抑制Bcl-2基因表达等。实际上,HBx蛋白对肝细胞凋亡的调控是双向的,既可以促进肝细胞的凋亡又可以抑制肝细胞的凋亡^[16],其涉及的Fas/FasL凋亡途径、TNF/TNFR途径、NF- κ B途径、caspase-3途径等通常具有双重作用,

如HBx蛋白可以激活并上调肝细胞表面FasL的表达,而FasL的表达一方面可以诱导表达Fas的T细胞凋亡而使肝癌细胞逃脱免疫监视,另一方面促进细胞凋亡。

2.5 HBx的缺失突变 在肝癌发生过程中,HBx基因是肝细胞中最常见的HBV DNA整合部分,并且从肝癌患者中分离的HBV X基因绝大多数有缺失突变。定位于核内的HBx基因组转染HepG2细胞,HBV的复制能力明显下降,再将带有入核信号的HBx质粒和出核信号的HBx质粒分别转染到细胞中,结果表明只有前者可以恢复细胞的HBV复制能力^[17]。

2.6 HBx促进肝癌细胞的侵袭与转移 肝癌的侵袭转移是一个多步骤、多因素参与的复杂过程,多种相关因子在侵袭转移中亦发挥了重要作用。

HBx能通过多种机制促进肝癌细胞的侵袭转移:①上调细胞运动关键蛋白(RhoC)的表达,郑文建等^[18]利用RhoC-siRNA降低RhoC的表达水平后,肝癌细胞对细胞外基质的黏附能力及其对人工重建基底膜的侵袭、穿透能力均明显下降;②上调基质金属蛋白酶(MMP)的表达。Liu等^[19]研究发现,HBx可激活NF- κ B,使其上调MMP-9、MMP-2及MMP-14等酶的mRNA和蛋白的表达水平,促进HCC的侵袭和转移;③促进VEGF表达,HBx可以通过激活HIF-1通路上调VEGF的表达,VEGF及其受体Flt-1在肝癌组织中共同高表达^[20],促进新生血管形成,在肝癌的生长、侵袭和转移过程中发挥着重大作用。此外,有研究表明^[21]。HBx下调E-cadherin的表达,促进肝癌细胞发生上皮-间叶转变、黏附分子转换,进而上调T-cadherin的表达,从而促进肝癌的生长、侵袭和转移。

3 展望

综上所述,HBx对HCC的影响是多方面的,从肝癌的发生、发展到侵袭转移,都可以发挥调节作用,作用机制复杂,目前其确切作用机制尚不明确。深入研究HBx与HCC的关系将有助于特异性揭示肝细胞癌发生、发展与侵袭转移的分子

机制,从而为HBV相关性肝癌的预防及肝癌的靶向治疗提供理论基础,提高HBV慢性感染者及肝癌患者的生存质量。

参考文献

- [1] Parkin M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55: 74-108.
- [2] Kim SY, Kim JC, Kim JK, et al. Hepatitis B virus X protein enhances NF- κ B activity through cooperating with VBP1[J]. BMB Rep, 2008, 41: 158-163.
- [3] Mukherji A, Janbandhu VC. HBx protein modulates PI3K/Akt pathway to overcome genotoxic stress-induced destabilization of cyclin D1 and arrest of cell cycle[J]. Indian J Biochem Biophys, 2009, 46: 37-44.
- [4] EL-Basslouni A, Nosseir M, Zoheiry M, et al. Immunohistochemical expression of CD95 (Fas), c-myc and epidermal growth factor receptor in hepatitis C virus infection, cirrhotic liver disease and hepatocellular carcinoma[J]. APMIS, 2006, 114: 420-427.
- [5] Bouchard MJ, Wang L, Schneider RJ. Activation of focal adhesion kinase by hepatitis B virus HBx protein: multiple functions in viral replication[J]. J Virology, 2006, 80: 4406-4414.
- [6] Sakurai T, Maeda S, Chang L, et al. Loss of hepatic NF- κ B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation[J]. PNAS, 2006, 103: 10544-10551.
- [7] Kim HR, Lee SH, Jung G. The hepatitis B virus X protein activates NF-kappaB signaling pathway through the up-regulation of TBK1[J]. FEBS Lett, 2010, 584: 525-530.
- [8] 何柳兴, 丁浩, 冯涛, 等. HBx对肝细胞中 β -catenin表达的影响[J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35: 1122-1126.
- [9] Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma in relation to tumor cell proliferation and cyclin D1 expression[J]. J Korean Med Sci, 2003, 18: 211-217.
- [10] Ogata H, Chinen T, Yoshida T, et al. Loss of SOCS3 in the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3 mediated TGF-beta1 production[J]. Oncogene, 2006, 25: 2520-2530.
- [11] Gearhart TL, Bouchard MJ. The hepatitis B virus X protein modulates hepatocyte proliferation pathways to stimulate viral replication[J]. J Virol, 2010, 84: 2675-2686.
- [12] Liu X, Wang L, Zhang S, et al. Mutations in the C-terminus of the X protein of hepatitis B virus regulate Wnt-5a expression in hepatoma Huh7 cells: cDNA microarray and proteomic analyses[J]. Carcinogenesis, 2008, 29: 1207-1214.
- [13] Clippinger AJ, Gearhart TL, Bouchard MJ. Hepatitis B virus X protein modulates apoptosis in primary rat hepatocytes by regulating both and the mitochondrial permeability transition pore[J]. J Virol, 2009, 83: 4718-4731.
- [14] 李卫华, 缪晓辉, 戚中田, 等. 乙型肝炎病毒X蛋白对肝癌细胞生长的影响[J]. 生物医学工程临床, 2008, 12: 235-239.
- [15] Liu H, Shi W, Luan F, et al. Hepatitis B virus X protein upregulates transcriptional activation of human telomerase

- reverse transcriptase[J]. *Virus Genes*, 2010, 40: 172-182.
- [16] Assrir N, Soussan P, Kremsdorf D, et al. Role of the hepatitis B virus protein in pro- and anti-apoptotic processes[J]. *Front Biosci*, 2010, 15: 12-24.
- [17] Kealser VV, Amanda JH, Charles RM, et al. Hepatitis B virus HBx protein localized to the nucleus restores HBx-deficient virus replication in HepG2 cell and in vivo in hydrodynamically injected mice[J]. *Virology*, 2009, 390: 122-129.
- [18] 郑文建, 梁平, 赵弘智. RhoC-siRNA表达载体对肝癌细胞生长速度及侵袭力的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29: 1779-1782.
- [19] Liu LP, Liang HF, Chen XP, et al. The role of NF-kappaB in Hepatitis B virus X protein-mediated upregulation of VEGF and MMPs[J]. *Cancer Invest*, 2010, 28: 443-451.
- [20] 唐瑞峰, 苑建磊, 齐帅, 等. VEGF-B及其受体Flt-1在肝癌中的表达及意义[J]. 中国肿瘤临床, 2009, 36: 267-271.
- [21] 阳义, 刘利平, 陈孝平, 等. 乙肝病毒X蛋白对E-cadherin和T-cadherin表达的调节作用[J]. 临床外科杂志, 2009, 17: 464-466.

收稿日期: 2012-05-31

• 消息 •

《现代细胞外基质分子生物学》及《现代细胞凋亡分子生物学》已出版

由首都医科大学附属北京地坛医院副院长、传染病学研究所所长、内科传染病学专业博士生导师、生物化学与分子生物学专业博士生导师成军教授主编, 50余位国内感染病基础与临床领域、分子生物学领域中青年专家撰写的“肝炎病毒·分子生物学丛书”之《现代细胞外基质分子生物学》及《现代细胞凋亡分子生物学》已经于2012年7月正式出版发行, 科学出版社的编辑对两本专著的内容给予了很高的评价。

《现代细胞外基质分子生物学》全书共52章, 本书内容新颖、详实、全面地介绍了细胞外基质分子生物学、代谢调控及其与临床医学的关系: 一方面, 对胶原蛋白、纤维粘连蛋白、层粘连蛋白、聚合素、二聚糖、骨涎蛋白等细胞外基质成分进行了详细阐述; 另一方面, 对细胞外基质代谢调控相关的结构基础、基质金属蛋白酶、组织型金属蛋白酶抑制剂、细胞外基质代谢相关信号转导通路, 以及细胞外基质与胚胎发育、免疫系统发育、衰老、损伤修复、硬化性心脏病、肝纤维化、肾脏疾病、肺纤维化、中枢神经系统疾病、骨关节疾病、血液疾病、肿瘤转移、皮肤疾病等进行了详细论述。

《现代细胞凋亡分子生物学》全书共48章, 本书内容新颖、系统、详实的介绍了细胞凋亡的分子生物学、调控机制及其与临床疾病的关系: 一方面, 对细胞凋亡的形态发生学、酶学基础、发生途径、调控基因、相关细胞因子、钙离子、自由基、Fas系统、肿瘤坏死因子 α 、丝裂原激活激酶、热休克蛋白等及其与细胞外基质、细胞自噬、细胞周期的关系进行了详细阐述; 另一方面, 对细胞凋亡与发育生物学、免疫学、衰老、缺血/再灌注损伤、感染性疾病、血液系统疾病、内分泌系统疾病、心血管系统疾病、胃肠道疾病、肝脏疾病、肿瘤及基因治疗等进行了详细论述。

以上两本专著体现了国内外细胞外基质分子生物学及细胞凋亡分子生物学领域的最新进展, 特别是成军教授课题组近年来在本领域的最新研究成果和独到见解。该系列丛书的出版, 必将进一步推动该领域的研究及学术水平的进步。

首都医科大学附属北京地坛医院

地址: 北京市朝阳区京顺东街8号

医院网站: www.bjdh.com

电话: 010-84322058

邮编: 100015

Email: editor.ditan@gmail.com

传真: 010-84322059