

B7-H1在HBV感染导致肝细胞癌中的调控作用

纪世博¹, 刘顺爱^{2,3}, 全敏¹, 冯胜虎^{2,3}, 张梦然^{2,3}, 张锦前^{2,3}, 梁金秋¹, 王琦^{2,3}, 邢卉春¹, 成军^{2,3} (1.北京大学北京地坛医院教学医院, 北京 100015; 2.首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015; 3.新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015)

摘要: 目的 探讨B7-H1 (B7-homolog 1) 在乙型肝炎病毒 (HBV) 感染导致的肝细胞癌 (HCC) 中的作用机制。方法 通过慢病毒lentivirus-B7-H1转染人正常肝细胞系L02、人肝癌细胞系HepG2、HepG2.2.15后, 应用MTT法观察细胞活性, 流式细胞仪检测细胞的凋亡情况, Western blot技术检测蛋白B7-H1、Survivin蛋白的变化情况。结果 抑制B7-H1表达水平后, 通过MTT检测表明细胞系HepG2.2.15细胞活性比HepG2细胞、L02细胞活性降低, 流式细胞仪检测凋亡增加, 同时Western blot显示Survivin蛋白的表达减少。结论 通过慢病毒转染抑制B7-H1的表达可以促进细胞系HepG2.2.15凋亡, B7-H1可能是通过调控Survivin的变化影响HBV感染的肿瘤细胞的增殖与凋亡。

关键词: B7-H1; 肝炎, 乙型; 癌, 肝细胞; Survivin

The role of B7-H1 in regulation of hepatocellular carcinoma caused by HBV infection

JI Shi-bo¹, LIU Shun-ai^{2,3}, QUAN Min¹, FENG Sheng-hu^{2,3}, ZHANG Meng-ran^{2,3}, ZHANG Jin-qian^{2,3}, LIANG Jin-qiu¹, WANG Qi^{2,3}, XING Hui-chun¹, CHENG Jun^{2,3} (1.Beijing Ditan Hospital, Peking University Teaching Hospital, Beijing 100015, China; 2.Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 3.Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China)

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of B7-H1 in the course that hepatitis B virus (HBV) caused hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** This study employed lentivirus mediated knockdown of B7-H1 to elucidate the oncogenic role of B7-H1 in human hepatocellular carcinoma HepG2 and HepG2.2.15 cell, MTT assay and flow cytometry that B7-H1 knockdown induced decreased cell proliferation and increased apoptosis, Western blot used to test the expression of B7-H1 and Survivin. **Results** The transfected lentivirus-B7-H1 HepG2 and HepG2.2.15 cells induced decreased cell proliferation and increased apoptosis, and at the same time the expression of Survivin protein also decreased. **Conclusions** Knockdown of B7-H1 induced decreased cell proliferation and increased apoptosis of HepG2.2.15 cell, B7-H1 effected on proliferation and apoptosis of that HBV causes HCC which may have role in Survivin ways.

Key words: B7-H1; Hepatitis B; Carcinoma, hepatocellular; Survivin

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是人类最常见的恶性肿瘤之一, 每年约有65万人死于HCC^[1]。乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是诱发HCC的重要致病因素^[2], 80%以上的HCC患者曾经感染过HBV^[3]。由此可见, HBV感染与

HCC发生密切相关, 而HBV在HCC发生、发展中的作用机制及环节目前还不十分清楚。

B7-H1是近年发现的B7家族的成员, 其配体为PD-1 (programmed cell death 1), 二者结合后, 可抑制T细胞活化或诱导凋亡^[4]。近来研究发现B7-H1

亦高表达于HCC的患者^[5],提示B7-H1可能是导致HCC发生和发展的一种重要机制。

本研究通过慢病毒转染抑制B7-H1在肝癌细胞系HepG2.2.15的表达情况,采用MTT法观察细胞活性变化,流式细胞仪检测细胞的凋亡情况,Western blot技术检测B7-H1、Survivin蛋白的变化情况,寻找B7-H1在HBV感染导致HCC过程中,对肿瘤细胞自身作用的可能途径。

1 材料与方法

1.1 主要材料 主要材料为人正常肝细胞系L02、人肝癌细胞系HepG2、HepG2.2.15,由首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所保存。细胞系从液氮中取出复苏后,常规培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基,在37℃、5% CO₂浓度和饱和湿度的培养箱中培养。人肝癌细胞系HepG2.2.15整合了HBV ayw亚型完全基因组、具有新霉素抗性、可稳定表达病毒蛋白及分泌病毒颗粒等,培养基为G418浓度为360 mg/L的DMEM高糖培养基。

1.2 主要试剂 B7-H1的shRNA重组慢病毒(B7-H1-RNAi-lentivirus)由上海吉凯基因公司提供,B7-H1的shRNA靶序列:5'-GGCGUUUACUGCUGCAUAA dtdt-3'。兔抗人B7-H1多克隆抗体,兔抗人Survivin单克隆抗体,兔抗人 β -actin抗体购自CST公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 细胞转染 将培养的人肝癌细胞系HepG2、HepG2.2.15细胞(5~8)×10⁴个细胞去血清培养6~8小时,将慢病毒液体以1 μ l:10 000细胞数加入培养皿中8小时后更换含血清培养基继续培养72小时,荧光显微镜下观察其转染效率。

1.4 MTT法检测HepG2、HepG2.2.15细胞的活力 将72小时转染成功的HepG2、HepG2.2.15应用南京凯基公司MTT细胞活力检测试剂盒进行细胞活力检测,操作步骤依据说明书。在酶联免疫检测仪上测定各孔的光吸收值并分析其结果。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 HepG2.2.15细胞用胰蛋白酶消化后1200 r/min 5分钟。用预冷Staining Buffer洗两次,Annexin V Binding Buffer以1×10⁶细胞/ml

的浓度重悬细胞。加入5 μ l FITC Annexin V,再加入10 μ l 7-AAD混匀,室温避光反应15分钟,1小时内用波长为488 nm的流式细胞仪检测分析。

1.6 Western blot检测蛋白变化 提取L02细胞、HepG2、HepG2.2.15细胞和转染细胞蛋白,加入5×样品缓冲液,99℃沸水浴变性5分钟,10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳。电泳1.5小时后,电转至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉室温封闭1小时,加兔抗人B7-H1多克隆抗体、兔抗人Survivin单克隆抗体(1:1000),4℃过夜,1×TBST洗膜3次,HRP标记的山羊抗鼠IgG孵育杂交,室温1小时,加显色液显色发光,扫描并分析条带的灰度值,结果以 β -actin的光密度值作为参照。

1.7 统计学处理 应用SPSS 16.0统计学软件,采用 t 检验对转染组和对照组的结果进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 B7-H1的表达 B7-H1在人肝癌细胞系HepG2.2.15细胞中的表达水平高于人肝癌细胞系HepG2细胞和人正常肝细胞系L02细胞,见图1。

2.2 细胞增殖活性及凋亡 转染慢病毒抑制B7-H1基因后细胞的活性受到抑制,细胞凋亡增加。转染细胞72小时抑制效率最大,HepG2.2.15转染组细胞比HepG2转染组细胞和HepG2.2.15组细胞增殖活力(MTT)降低了(12.0±3.0)%($P = 0.038$)、(52.0±2.0)%($P = 0.021$),见图2;进行流式细胞检测转染HepG2.2.15细胞凋亡增加(26.5±3.0)%($P = 0.029$)。

2.3 Western blot检测 B7-H1蛋白在L02细胞、HepG2细胞和HepG2.2.15细胞中的含量依次增多。慢病

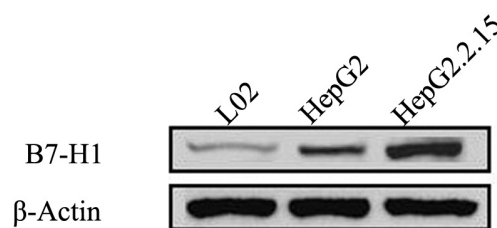


图1 B7-H1蛋白表达

注: Western blot显示L02细胞、HepG2细胞与HepG2.2.15细胞中B7-H1、 β -actin蛋白表达情况

毒转染细胞抑制了B7-H1蛋白的表达,抑制效率为72.3% ($P = 0.008$)。在B7-H1蛋白被抑制后Survivin蛋白也出现下降,蛋白水平下降了60.2% ($P = 0.010$),见图3。

3 讨论

HCC是严重影响人类健康的恶性肿瘤之一,每年全球的新发患者约60万人^[1]。目前,我国每年死于HCC的人数占全球HCC死亡数的半数之多^[6]。HBV感染与HCC的发生、发展密切相关,在HCC众多诱发因素中,HBV感染占到50%以上^[3]。但目前,HBV感染在HCC发生过程中的机制尚不十分清楚。

B7-H1是近年发现的B7家族的成员,广泛表达于抗原提呈细胞,活化的T、B细胞、巨噬细胞和胸腺皮质上皮细胞^[4],对T细胞的活化及存活起重要的调节作用^[7]。在结肠癌的研究中发现,B7-H1可能通过PI3K/Akt通路影响肿瘤的发生和发展^[8]。

近期发现在各种肿瘤组织和细胞中,B7-H1异常高表达,通过与T细胞上抑制性受体PD-1结合,抑制T细胞的免疫反应,负性调控机体免疫应答过程并能诱导T细胞凋亡,促进肿瘤细胞逃避免疫攻击^[9,10]。B7-H1本身的表达对肿瘤的影响目前鲜有报道,尤其是B7-H1自身在HBV感染导致HCC中的作用鲜有研究。

Survivin是一类仅在肿瘤细胞中表达的凋亡抑制因子(inhibitor of apoptosis, IAP),这一蛋白家族抑制细胞凋亡的作用远大于bcl-2的作用^[11,12]。目前认为Survivin是最强的凋亡抑制因子,可通过多种途径抑制凋亡,在肿瘤的发生和发展过程中发挥重要作用^[13-15]。

本研究通过慢病毒lentivirus-RNAi-B7-H1转染人肝癌细胞系HepG2.2.15,抑制了B7-H1的表达,发现细胞的生长增殖活性降低,进行流式细胞学检测发现细胞的凋亡率增加,提示B7-H1可能通过某些途径调控细胞的增殖和凋亡。笔者发现Survivin在人肝癌细胞系HepG2.2.15表达呈阳性,应用慢病毒抑制B7-H1后,其蛋白表达水平明显降低,推测B7-H1可能是通过调控Survivin基因影响HepG2.2.15细胞的增殖与凋亡,但其具体途径还需进一步深入研究。

在HBV感染发展为肝细胞癌的过程中,细胞信号通路发挥重要作用,进一步的研究希望可以明确B7-H1在影响HepG2.2.15细胞增殖和凋亡中的作用机制,寻找其调控的下游靶基因,明确其与B7-H1的相互作用,通过抑制B7-H1的表达抑制HepG2.2.15细胞的生长速度,有可能为HBV导致的肝细胞癌提供早期的分子预后指标及基因治疗的潜在靶点,为其诊断和治疗提供参考。

参考文献

- [1] Hu Z, Zhou J, Wang H, et al. Survival in liver transplant recipients with hepatitis B- or hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma: the Chinese experience from 1999 to 2010[J]. PLoS One, 2013, 8: e61620.
- [2] Wang Y, Jiang L, Ji X, et al. Hepatitis B viral RNA directly mediates down-regulation of the tumor suppressor microRNA miR-15a/miR-16-1 in hepatocytes[J]. J Biol Chem, 2013, 288: 18484-18493.
- [3] Lin YJ, Lee MH, Yang HI, et al. Predictability of liver-related seromarkers for the risk of hepatocellular carcinoma in chronic

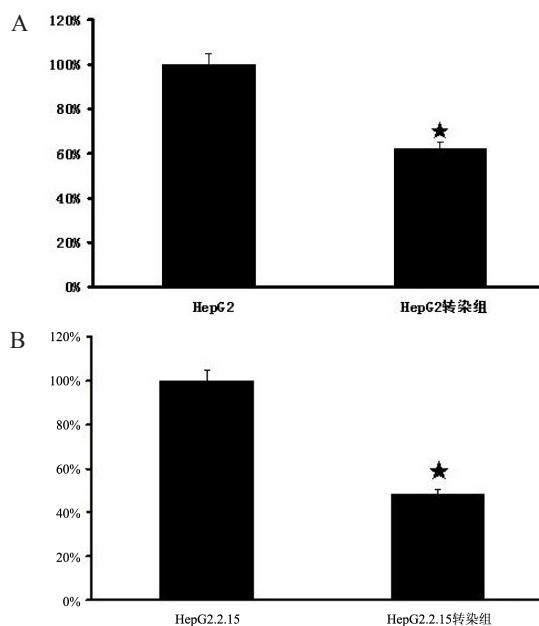


图2 MTT检测B7-H1抑制后细胞活力的变化情况

注: MTT显示HepG2.2.15转染组细胞比HepG2转染组细胞和HepG2.2.15组细胞增殖活力降低 (12.0 ± 3.0)% ($P = 0.038$)、(52.0 ± 2.0)% ($P = 0.021$)

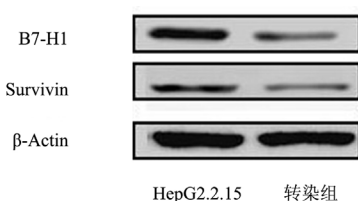


图3 Western blot显示B7-H1、Survivin和β-actin蛋白表达情况

- hepatitis B patients[J]. PLoS One,2013,8:e61448.
- [4] Shi J, Qin X, Zhao L, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Tat induces B7-H1 expression via ERK/MAPK signaling pathway[J]. Cell Immunol,2011,271:280-285.
- [5] Gao Q, Wang XY, Qiu SJ, et al. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res,2009,15:971-979.
- [6] Lu J, Gong W, Cheng H, et al. Detection of HBV genotypes of tumor tissues and serum by a fluorescence polarization assay in north-western China's hepatocellular carcinoma patients[J]. Virol J,2011,8:362.
- [7] Jiang W. Blockade of B7-H1 enhances dendritic cell-mediated T cell response and antiviral immunity in HBV transgenic mice[J]. Vaccine,2012,30:758-766.
- [8] 王佳玲, 曾雪, 王士勇, 等. B7-H1和PTEN在结肠癌中的表达及其临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2012,20:750-754.
- [9] Muhlbauer M, Fleck M, Schutz C, et al. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis[J]. J Hepatol,2006,45:520-528.
- [10] Shi F, Shi M, Zeng Z, et al. PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8 (+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients[J]. Int J Cancer,2011,128:887-896.
- [11] Altieri DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms[J]. Biochem J,2010,430:199-205.
- [12] Kelly RJ, Lopez-Chavez A, Citrin D, et al. Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin[J]. Mol Cancer,2011,10:35.
- [13] Zhang LQ, Wang J, Jiang F, et al. Prognostic value of survivin in patients with non-small cell lung carcinoma: a systematic review with meta-analysis[J]. PLoS One,2012,7:e34100.
- [14] Guha M, Altieri DC. Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks[J]. Cell Cycle,2009,8:2708-2710.
- [15] Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, et al. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics[J]. Clin Cancer Res,2008,14:5000-5005.

收稿日期: 2013-07-04

· 消息 ·

出版物上数字的用法

使用汉字的情形

1. 必须使用: (1)定型的词、词组、成语、惯用语、缩略语或具有修饰色彩的词语。例: 一方面、一律; (2)相邻的两个数字并列连用表示概数, 连用的两个数字间不能用顿号隔开。例: 二、三米、三、五天、十三、四岁、七、八十种; (3)带有“几”字的数字表示约数。例: 一百几十次、十几天; (4)星期几一律用汉字; (5)并列的几个阿拉伯数字与其复指数相连时, 复指数用汉字, 如几组数据中都含有6、7、8三个数字; (6)形容词前面的数字要用汉字。例: 试验方法有四大优点; (7)名词前面的数字“一”必须用汉字。例: 这一性质十分奇特; (8)“一”与量词组成数量词组作定语表示泛指时, 用汉字表示。如: 一种全新的试验方法; (9)叙述和不定数字一律用汉字。例: 无一例死亡, 任何一个患者。

2. 要求使用: (1)各民族的非公历纪年。例: 正月十五、日本庆应三年(1867年); (2)含有月日简称表示事件、节日和其他意义的词组。例: “一·二九”运动(12月9日)、五四运动。

3. 可以使用

(1)非物理量、整数一至十, 如果不是出现在具有统计学意义的一组数字中, 可用汉字, 但要照顾到上下文。例: 四种产品、六条意见、读了十遍、截至1984年9月、我国高等院校有新闻系6个; (2)用“多、余、左右、上下、约”等表示的约数, 一般使用汉字, 如果文中出现一组具有统计学和比较意义的数字, 为保持局部体例上的一致, 其约数也可以使用阿拉伯数字。