

HBx致肝细胞癌分子机制的研究进展

程斌, 林松挺, 杨玉珍

■背景资料

流行病学调查及一些体内外研究均为HBx致肝细胞肝癌(HCC)的发生提供了充分的证据,但其确切机制仍未完全阐明,因而成为目前该领域的研究热点.研究发现HBx具有间接调节转录、影响细胞生长周期、信号传导、DNA修复及介导细胞凋亡等多种功能,可能与HCC发生有关.近来还发现HBx可通过影响抑癌基因,如p53的新成员p73以及p16、p21等而参与肝细胞恶性转化与癌变,但其关系错综复杂.

程斌, 林松挺, 杨玉珍, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

国家自然科学基金资助项目, No. 30570821

通讯作者: 杨玉珍, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科.

yzyang@tjh.tjmu.edu.cn

电话: 027-83663612 传真: 027-83646605

收稿日期: 2007-03-22 接受日期: 2007-04-28

Advancement on molecular mechanism of hepatitis B virus X induced hepatocellular carcinoma

Bin Cheng, Song-Ting Lin, Yu-Zhen Yang

Bin Cheng, Song-Ting Lin, Yu-Zhen Yang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570821

Correspondence to: Yu-Zhen Yang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, No. 1095 Jiefang Street, Wuhan 430030, Hubei Province, China. yzyang@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2007-03-22 Accepted: 2007-04-28

Abstract

Chronic infection of Hepatitis B Virus (HBV) is one of the major causes of hepatocellular carcinoma (HCC) in our country. Some studies *in vivo* and *in vitro* found that hepatitis B virus X (HBx) can induce hepatocellular malignant transformation; also it has become the hot point in the research concerning the mechanism of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma at present. Recently, some research on the interaction between HBx and tumor suppressor gene p73 which was a new member of p53 family, p16 and p21, etc. and the influence of HBx on malignant transformation of hepatocellular has achieved preliminary results, but their relations are complicated. This ever in-depth study will help to reveal the molecular mechanism of HBx induced hepatocellular carcinoma, and it has great significance to explore the prevention and cure strategy of hepatitis B-related liver cancer.

Key Words: Hepatitis B virus; Hepatitis B virus X; Apoptosis; Cell proliferation; Hepatocellular carcinoma

Cheng B, Lin ST, Yang YZ. Advancement on molecular mechanism of hepatitis B virus X induced hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2242-2248

摘要

乙型肝炎病毒(HBV)慢性感染是我国肝细胞肝癌(HCC)发生的主要原因之一.一些体内外研究发现,乙型肝炎病毒x(HBx)可诱导肝细胞的恶性转化及癌变,成为目前研究乙肝相关性肝细胞癌发生机制的热点.近来在HBx与抑癌基因,如p53的新成员p73以及p16、p21等之间的相互作用及其对肝细胞恶性转化与癌变的影响等方面的研究也取得初步成果,但其关系错综复杂,这方面不断的深入研究将有助于进一步揭示HBx致肝细胞癌发生的分子机制,对探寻乙肝相关性肝癌新的防治策略具有重要意义.

关键词: 乙型肝炎病毒; 乙型肝炎病毒x; 凋亡; 细胞增殖; 肝细胞肝癌

程斌, 林松挺, 杨玉珍. HBx致肝细胞癌分子机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(20):2242-2248

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2242.asp>

0 引言

在我国,乙型肝炎病毒(HBV)感染被认为是肝细胞癌(HCC)发生最主要的原因,流行病学调查为此提供了充分的依据.进一步研究发现,HBV DNA整合入宿主细胞基因组多发生在乙型肝炎病毒x(HBx)基因区,因此,HBx基因及其产物在乙肝相关性肝癌的发生、发展中作用的研究吸引了众多感兴趣的学者.一些HBx转基因细胞与转基因动物研究均为HBx基因在HCC发生中作用的研究提供了直接的证据,但其确切机制仍未完全阐明.近年来研究发现,HBx具有间接调节转录、影响细胞生长周期、信号传导、DNA

修复及介导细胞凋亡等多种功能, 可能与HCC发生有关. 本文对HBx致肝细胞癌发生机制研究的最新进展进行综述.

1 HBx的结构与生物学效应

HBV全基因组大约32 kb, 具有4个开放读码框(ORF), HBx基因是HBV基因组中最小的开放读码框, 其编码基因位于第1374-1838位核苷酸之间, 所编码的HBx蛋白(含3种功能蛋白)由154个氨基酸组成, 分子量约为17 kDa, 具有多种转录调控活性. Ritter *et al*采用缺失突变方法分析不同HBxAg片段的活性, 发现C-端第149-154或N-端的第2-30氨基酸缺失不影响HBxAg的活性; 但当C-端第106-254或N-端1-9氨基酸缺失后HBxAg的活性完全丧失; N-端32-65氨基酸缺失, HBxAg的活性急剧下降, 说明32-65和106-148位氨基酸为HBx蛋白的功能区. 氨基酸突变分析表明, HBx蛋白分子上有3个活性区, 第46-52位, 特别是Pro-46, His-49和His-52; 第61-69位, 特别是Cys-61, Gly-67, Pro-68和Cys-69; 第132-139位, 特别是Phe-132, Cys-137和His-139都是功能所必需的. 大量研究发现, HBx蛋白具有广泛的生物学功能: (1)细胞转化功能^[1]; (2)抑制受损细胞DNA的剪切修复功能^[2]; (3)反式激活功能^[3]; (4)抑制细胞凋亡功能^[4]. 现已证实, HBx是一种多功能的病毒调节因子, 其影响HBV的复制和增殖是通过多种途径, 多方面因素的作用和相互影响而实现的. HBx可通过Ras-Raf-MAPK转导途径、DAG-PKC转导途径、JAK-STAT转导途径等, 分别激活AP-1, AP-2, NF- κ B等, 进而激活胰岛素样生长因子(IGF- I, II)及其受体IGF-IR基因启动子, 促进其转录, 进而调节细胞的生长分化. HBx的表达受增强子I(Enh I)调控, 又可通过与Enh I核心序列AP-J、C末端元件结合反式激活Enh I, Enh I是许多信号传导途径的信号分子, 胰岛素结合AP-1可上调Enh I的表达IL-6可与核因子(NF)结合上调Enh的表达^[5], HBx可上调血管内皮生长因子(VEGF)启动子活性, 在缺氧状态下诱导血管生成^[6].

既然HBx具有反式激活功能, 那么他可广泛激活病毒和细胞的启动子, 促进病毒的复制和细胞的转录、生长. Doria *et al*曾利用扫描共聚焦激光显微镜技术对转染HBx的细胞进行研究, 发现培养细胞中表达的HBx不仅存在于细胞质, 同时也存在于细胞核中. 进一步的研究资料表明, 存在于胞质与胞核中的HBx分别以独立

的作用方式发挥反式激活功能. HBx对多种同源或异源病毒或细胞的基因转录调节区具有反式激活作用, 如HBV增强子/核心启动子、S基因启动子、SV40的增强子及早期启动子、单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶(HSV-TK)启动子、人T淋巴细胞I型病毒(HTLV-1)的长末端重复序列(ITR)、人免疫缺陷病毒I型(HIV-1)的LTR、Rous肉瘤病毒(RSV)及 β -干扰素的启动子等^[7]. HBx也可反式激活RNA聚合酶(po1) I, II, III启动子, 并且对HLA-DR, MHC- I 及IL-8等都有反式激活作用^[8]. HBx通过NF- κ B, NF-AT, CRE/TRE等途径起反式激活转录作用, 可作用于TF II B, TF II H, TBP, RBP5, 紫外线损伤DNA结合蛋白(UVDDDB)以及I κ B等, 调节免疫与炎症反应相关基因的表达^[9].

HBx-ORF编码的蛋白不仅存在于HBV, 亦存在于土拨鼠肝炎病毒(WHV)和地松鼠肝炎病毒(GSHV), 但不存在于鸭肝炎病毒(DHBV), 而鸭肝炎的预后良好, 不形成肿瘤, 因此认为HBx可能与HBV致癌变密切相关. 进一步研究表明, HBx能直接或间接激活各种转录因子和癌基因, 是慢性HBV感染导致HCC的重要协同因子. Hoare *et al*^[10]研究发现, 受检慢性乙肝患者中69%可检测到HBx, 其中又有20%的HBx阳性患者肝细胞核中可检测到较高浓度的HBx, 提示核内物质可能参与HBx的生物学效应. Su *et al*^[11]报道在HCC患者的癌组织中, 利用HBx的多种mAb和多克隆抗体, 58.8%的患者可检测到HBx野生型片段和变异型片段, 在癌细胞的胞质和胞核中均可检测到HBx.

体外实验研究发现, 将HBx导入小鼠的肝细胞中, 可引起肝细胞的恶性转化^[12]. 将HBx基因转入小鼠体内, 可诱发转基因小鼠肝癌形成^[13]. 另外, 还有研究发现, HBx可反式激活*c-myc*, *c-fos*, *c-jun*等细胞原癌基因, 使感染HBV的非恶性胎鼠肝细胞系或胎鼠纤维瘤细胞系发生恶性转化, 并且用转化后的肝细胞接种到裸鼠后形成瘤灶^[1].

2 HBx致HCC的分子机制

乙型肝炎病毒(HBV)的慢性感染是导致肝细胞癌最主要的危险因素. HBx蛋白被认为在肝细胞癌的发生、发展中起着重要作用. 实验证实HBx作为一种反式活化因子, 能与细胞内多种与转录、基因调控有关的因子结合, 广泛激活病毒与细胞的启动子, 参与基因调控, 与肝细胞癌

■应用要点

本文特对目前国内外这方面研究的最新进展进行概括总结, 旨在促进HBx致肝细胞癌发生分子机制研究的深入开展.

■同行评价

本文对HBx与肝癌的关系进行了较为详细的介绍,内容较为丰富,涉及方面较广,对从事这一领域研究的学者们有较好的参考价值。

的发生、发展密切相关^[14]。HBx本身不能与双链DNA直接结合,而是通过蛋白与蛋白之间的相互作用来行使功能^[15]。有研究报道HBx对肝细胞并无直接致癌作用,只在致癌物存在时触发致癌作用^[16]。下面分别就其致肝细胞癌发生的各种可能机制作概述。

2.1 HBx与细胞增殖的关系及相关的细胞信号传导途径 迄今,国内外学者经过大量的研究证实,HBx可促进细胞增殖,这对肿瘤的发生、发展起着重要的作用。在HBV相关的HCC的发生机制中,HBx可能通过多种途径参与对细胞生长特性的调控。HBx可促进细胞有丝分裂,从而促进肝细胞增殖与恶性转化。目前研究认为,HBx促细胞增殖作用可能与以下调控机制有关。

2.1.1 HBx与蛋白酶体 蛋白酶体是一类与多数真核细胞非溶酶体降解有关的复合物,他既能降解变形、异常的蛋白质,也能降解如细胞周期素、细胞周期素依赖激酶抑制因子、P53等天然蛋白质,因此在细胞分化、细胞周期调控、信号转导、转录活化等方面具有重要的作用,其功能改变可以导致细胞高度增殖和恶性转化,在肝细胞癌变过程中具有重要作用。

26S蛋白酶体是由20S和19S组成的复合物,20S由 α 或 β 亚单位组成的4个七聚体叠加成的环构成,并且和 β 亚单位按 $\alpha, \beta, \beta, \alpha$ 的顺序排列,并通过 α 亚单位与19S相连,PSMA7是一个26S蛋白酶复合物的20S的 α 亚单位,其C末端自然暴露于20S亚单位的外环,影响着其他因子的功能;PSMC1是19S的亚单位,为ATP酶家族中的一员。两者结合对维持正常的细胞功能至关重要。HBx与PSMA7和PSMC1中任一分子的作用都可能改变26S蛋白复合物的空间构象而导致细胞内复杂的变化。Zhang *et al*^[17]通过实验发现,HBx可能在20S和19S之间的位点与PSMA7和PSMC1发生作用,HBx与PSMA7和PSMC1的相互作用可解除PSMC1抑制转录因子的作用,并促进转录因子的聚集进而促进转录。同时研究发现HBx在AP-1和VP-16的协同作用下刺激哺乳动物细胞,可扰乱PSMA7和PSMC1的功能,使细胞分裂失控。

2.1.2 HBx与MAPK和JAK1的作用 MAPK的激活对细胞的增殖、生长有着极为重要的意义。Nijhara *et al*^[18]通过缺失突变观察HBx对MAPK的作用发现,HBx第58-119个氨基酸对MAPK的激活起主要作用。Benn *et al*^[13]的研究表明,在转染细胞中HBx的表达可诱导Ras-GTP复合物的形

成以及MAPK的活化,从而通过Ras-Raf-MAPK途径激活多种转录因子。其机制是HBx刺激合成的复合物Ras-GTP可促使Raf磷酸化而活化,活化的Raf通过一系列反应激活MAPK, MAPK进一步使包括AP-1, NF- κ B, AP-2等在内的多种转录因子活化。有研究表明,HBx还可通过Ras/Raf-1信号途径的激活而刺激TBP启动子的转录。TBP是细胞基因转录所必须的转录因子,其激活可使RNA聚合酶II的活性增强。

Lee *et al*利用免疫沉淀和Western blot分析转染了HBx基因的Hepa细胞,发现HBx可通过促使一组新的酪氨酸蛋白激酶家族JAK的磷酸化进而激活一类新的转录因子,即信号转导子和转录激活子(STAT)。他们还通过缺失突变研究证实HBx诱导JAK-ATAT途径的活性是由HBx基因的中央区域所编码的HBx蛋白所决定的,STAT一旦被激活,便与JAK形成二聚物或多聚物转运到核内,结合到DNA上的STAT结合序列,导致不同基因激活。Kim *et al*^[19]也发现HBx可形成二聚体与JAK发生对接,激活JAK,激活的JAK可活化AP-1, NF- κ B和SRE增强子,发挥刺激转录活性的效应。

2.2 HBx与细胞凋亡的关系及相关的细胞信号传导途径 HBx对肝细胞凋亡的调节具有双重的调节作用,即具有促进肝细胞凋亡和抑制肝细胞凋亡的双重作用。那么到底其在什么情况下发挥促进凋亡的作用,什么情况下发挥抑制凋亡的作用呢?具体机制是什么?对此,各国学者都进行了大量研究,发现生长因子、细胞因子以及相关的信号传导途径在肝细胞的凋亡、增殖和再生中起着重要作用。这些信号传导途径包括STAT激酶途径、NF- κ B途径、JNK/SAPK途径、ER激酶1(ERK 1)途径和ERK2途径,各种信号传导途径通常具有交叉作用或重叠效应。HBx蛋白可通过调节肝细胞凋亡的传导途径调控肝细胞的凋亡。这在肝细胞癌变的起始阶段起着重要作用。以下分别概述HBx对肝细胞凋亡调控的各种信号传导途径。

2.2.1 HBx与Fas/FasL凋亡途径 FasL与靶细胞表面Fas结合后可诱导Fas分子三聚体化,导致Fas细胞质内的死亡结构域(DD)与接头蛋白FADD羧基端的DD结合,促使FADD N端的DED(death effector domain)与pro-Caspase-8/10的DED结合,继而激活下游的pro-Caspase,此外还可以激活Bcl-2家族的促凋亡成员Bid, Bid被Caspase催化断裂后, C端的活性部分转移至线粒体膜引起跨

膜势能破坏, 释放细胞色素C, pro-Caspase-2, 3, 9等, 继而激活下游的pro-Caspase3, 6, 7, 其效应为破坏DNA完整性、干扰细胞周期的正常运行、破坏细胞的结构, 最终导致细胞凋亡的形态学改变. 有学者将HBx基因转染肝癌细胞, 可上调肝癌细胞FasL的表达, 从而通过诱导表达Fas的T细胞凋亡而使肝癌细胞逃脱免疫监视^[20].

2.2.2 HBx与PI-3K/PKB途径 Shih *et al*研究发现, HBx可通过激活PI-3-K, 磷酸化PKB/Akt, 从而有效地抑制TGF- β 引起的细胞凋亡^[21]. 而PI-3-K和PKB/Akt的RNA表达水平并无明显变化. 分析认为HBx可能通过细胞因子, 诸如IL-6, 胰岛素生长因子I、表皮生长因子等来激活PI-3-K/PKB途径. HBx还可通过激活其他信号级联, 诸如Sre-Ras-GTP复合物和JAK-STAT等来间接激活PI-3-K/PKB途径. 也有实验表明HBx可直接作用于PI-3-K, PKB/Akt这两种激酶^[22].

2.2.3 HBx与PKC途径 哺乳动物的PKC家族至少包括10个家族成员, 这些磷酸依赖性激酶在细胞生长、分化、增殖与凋亡等方面有着重要意义. HBx能够增加内源性PKC的水平, 随后激活AP-1和NF- κ B转录因子. 有证据表明, HBx激活NF- κ B是一个PKC依赖过程. HBx也可能通过增加内源性激活因子Sn-1, 2-DAG短暂地激活PKC. 最近发现HBx蛋白能与XAP3(一种PKC结合蛋白)和PKC发生相互作用, 从而加速HBx的磷酸化, 增加PKC的自动磷酸化, 上调HBx介导的转录激活.

2.2.4 HBx与TNF/TNFR凋亡途径 TNF- α 可作为一种应激因子与细胞膜上的相应受体即TNFR相结合调控细胞凋亡, 一方面TNFR被激活后通过特定的结合蛋白TRADD, FADD, pro-Caspase-8启动凋亡, 另一方面激活后的TNF受体可通过上调NF- κ B以激活生存途径. TNFR可促使TRADD, TRAF2, IP, NIK和IKK组成一复合体, 允许NF- κ B转位子核内激活凋亡抑制基因TAP以抑制凋亡^[23], 这一信号传导途径有利于维持细胞生存与凋亡的一种动态平衡. 已有实验证实, HBx可刺激被转录因子NF- κ B激活的启动子, 细胞质中HBx的短暂表达可使两种NF- κ B的抑制因子I κ B α 和p105发生磷酸化而降解, 从而上调NF- κ B的表达.

2.3 HBx与肿瘤抑制因子 HBx与抑癌基因的关系目前研究也比较多, 并且不断有所发现. 在所有的抑癌基因中, p53家族以及p16和p21研究相对较多, p53家族有p53, p63, p73 3个成员, 其中p53

研究最多, 发现他与肿瘤的关系最为密切. 那么HBx与他们的关系如何呢? 下面就此进行概述.

2.3.1 HBx与p53家族 P53蛋白是由抑癌基因p53编码的, 有3个功能区: DNA结合区、寡聚化区、反式活化区, P53具有两个独立的HBxAg结合位点, 分别是位于p53特异DNA结合区、寡聚化区^[24]. p53具有维持细胞基因稳定性作用, 包括: 反式激活作用、抑制功能、调节DNA修复、引导细胞凋亡和细胞分裂周期调控功能. 在肝细胞中HBx与P53的关系, 学者进行了多方面的研究, 有人研究发现在肝细胞的胞质中发现了HBxAg与P53结合物, 并证实了他们的结合是可逆的^[4].

HBx对p53的影响是多方面的. P53与HBx蛋白相互作用, 破坏了P53的反式激活作用, 抑制P53引导的细胞凋亡^[4], 该机制在HBV相关的HCC的病理过程中起着重要作用. 在肝细胞核内, 低水平的P53支持细胞分裂期G₂, 阻止细胞凋亡, 而高水平的P53则可引导细胞凋亡^[25]. HBx-Ag与P53相互结合后, 可使P53定位于细胞核内的过程受阻, 导致核内P53浓度降低, 其所引导的细胞凋亡受到抑制. 另外, HBxAg可不依赖于P53, 而是通过HBx-PI3K-Akt-Bad途径抑制细胞凋亡, 还可以被PI3K特异性抑制剂所阻断. 还有研究发现, HBx可通过上调细胞周期蛋白激酶抑制剂(CDKI)p21waf1/cip1蛋白的表达, 延长G₁-S细胞周期转换, 增加了肝细胞基因突变的可能性^[26]. p53基因对HBx蛋白亦可有抑制作用, p53基因家族新成员p73 β , p73 α 基因, 均能通过抑制HBx的作用, 从而抑制HBV的复制, 其中p73 β 基因的抑制作用更主要、更有效^[15]. 至于P63目前报道甚少.

HBx蛋白与P53结合还可导致2种变化: (1)继发p53基因突变, 一方面是HBx增加对AFB1的敏感性, 同时AFB1摄入还可使感染HBV的人类肝细胞p53在249位点发生点突变, 另一方面HBx还可通过其他途径如HBx-PI3K-Akt-Bad途径和上调CDKI p21waf1/cip1蛋白表达, 延长G₁-S细胞周期转换, 增加了p53基因突变的可能性^[27]. 这一改变将导致失去wtp53的“分子警察”作用, 从而导致细胞增生而发生癌变. (2)继发AFP增加, AFP是常用的HCC的血清和组织标记物. 研究发现HBxAg与P53结合, 削弱了P53对AFP基因表达的抑制作用, 使得肝细胞内AFP合成增加, 而AFP可能是HBxAg促进乙型肝炎相关性HCC的发生、发展的一个重要因素.

既然HBx与p53的作用可以导致上述诸多的改变,那么HBx对p53修复DNA损伤的能力又有何影响呢?我们知道,p53通过调节转录及核酸切除修复过程而在保持基因组稳定性方面发挥作用。体内外一系列研究已证实,HBxAg能够与p53结合,影响p53的功能,干扰p53引导核酸修复功能。HBxAg还可通过结合p53抑制其引导的在转录起始或延伸阶段分别与转录因子IIH(TF IIH)的相互作用,使核苷酸损伤的切除修复中断。有学者发现,HBxAg可通过与p53的相互作用,进而影响肝细胞DNA的修复;也可与已损伤的DNA结合蛋白相结合,在核苷酸损伤的切除修复中起协同作用^[28]。

2.3.2 HBx与p16和p21 p16与p21是继p53之后研究得较多的肿瘤抑制基因,但其在HBx致肝细胞癌发生机制中的作用研究甚少。众所周知,肿瘤的发生是由于细胞增殖与分化异常所致,抑癌基因的抑癌机制之一就是使细胞分裂阻滞于细胞周期某一时相,而抑制细胞异常增殖。p16蛋白通过抑制细胞周期素依赖性蛋白激酶CDK4和CDK6的活性,使细胞周期停滞于G₁-S期。若其功能丧失,细胞就可能恶变。那么HBx是通过什么机制来影响p16而导致HCC发生的呢?王兆文 *et al*^[29]在HCCs及癌旁组织中研究HBx的整合与P16表达间的关系发现,HBx基因整合的HCC中,p16蛋白表达缺失率(19/25)远高于无HBx整合者(3/10),两者差异有显著性($P<0.05$),提示HBx基因整合影响P16表达可能是HBV致癌的重要机制之一。推测HBx基因整合可能在多个层面影响P16蛋白的表达:HBx基因整合可能引起p16基因的缺失或突变;HBx基因编码的蛋白与损伤后DNA结合蛋白(在核苷酸的切除修复中必不可少)相结合,可能使异常p16基因无法修复,出现复制障碍;HBx蛋白还可能与转录调节蛋白形成复合体,从而调节p16基因表达。HBx基因的整合也有可能影响p16 mRNA的表达与翻译过程。

P21作为一种细胞周期主要抑制调控因子,控制细胞周期G₁/S调控点,调控细胞周期的进展,因此,他在肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用。K.Fukushima *et al*研究HCCs及癌旁组织中P21^{waf1}和p16^{ink4a}表达时发现,P21^{waf1}表达水平的下降伴有P16^{ink4a}表达的减少或缺失,同时还发现P21^{waf1}的缺失表达常常伴p53基因的突变。因此,P53对P21^{waf1}表达的影响较大,推测P21^{waf1}的表达既受上游调节因子p53的调控,也受转录后调节因子p16^{ink4a}的调控。另外,还有实

验显示p16^{ink4a}甲基化在HCCs中出现的频率比在癌旁组织中更高,其甲基化与表达呈反比关系,而P21^{waf1}的表达减少程度也与P16^{ink4a}的甲基化程度及P16^{ink4a}低表达呈一定的正比关系。HBx蛋白是一种多功能蛋白质,可通过调控P21蛋白表达而影响细胞周期进程^[30],而HBx蛋白与P53蛋白相结合可使其失活,可以认为P21蛋白表达降低是由于HBx蛋白使P53蛋白失活所致。另外还有研究发现,HBx可通过非P53依赖的途径抑制P21^{waf1}的转录。

2.4 HBx对DNA修复的影响 在HBx与p53的关系中,谈到了HBx与p53的结合可干预受损DNA的修复,事实上HBx还可通过一些其他的途径影响受损DNA的修复。有研究证实,HBx可结合XAP-1而影响损伤DNA的修复。通过HBx缺失突变的研究发现,HBx第55-101氨基酸是X相关蛋白-1(XAP-1)的结合部位。由于损伤DNA与XAP-1的结合是DNA修复的第一步,HBx与XAP-1的结合影响了核苷酸切除修复的后续步骤,从而妨碍受损DNA的修复。Croisman与Jia *et al*的研究也证实,HBx抑制DNA修复并不依赖P53,后者还发现HBx可与TF IIH转录因子、核苷酸切除修复因子XPB, XPD在体外结合,阻碍XPB, XPD与P53的结合,进而影响受损DNA的修复。另外,HBx还可与UV2DDB结合从而影响DNA的修复。最近研究发现,表达HBx的Chang氏肝细胞对低剂量的紫外线照射的致死效应十分敏感,提示HBx可能通过结合受损DNA来干扰细胞的DNA修复功能,从而导致潜在的致死性或恶性突变的积累^[31]。Becker *et al*发现,HBx可与猴UV-DDB及人的XAP-1结合,且HBx的表达显著抑制细胞受损DNA的修复能力。这表明HBx在肝细胞癌变中可作为一个辅因子阻断细胞有效地修复受损DNA,导致DNA突变的累积而参与肝细胞恶性转化和癌变发生。

2.5 HBx与细胞周期 细胞周期又称细胞生活周期或细胞增殖周期,指细胞从上一次有丝分裂结束到下次有丝分裂完成所经历的整个过程。肿瘤生长的最基本特征是增殖失控,即表现为连续不断的细胞周期。分裂中的真核细胞必须经过细胞周期的两个“控制点”,即:G₁-S和G₂-M的转变,也就是DNA复制的起始与完成及细胞分裂的起始与完成。细胞周期的调控是在一系列的调控因子的严密监控下进行的,如果某一个或几个环节出现问题,将导致细胞周期调节失控从而导致细胞的分化增殖异常进而导

致肿瘤的发生. 一些癌基因和抑癌基因可直接参与细胞周期的调控, 如c-myc, c-fos, c-jun等原癌基因对细胞的增殖生长具有重要影响. HBx可通过反式激活作用激活这些基因, 使其处于活化状态, 持续刺激肿瘤细胞的增殖^[32]. 研究表明, HBx可缩短细胞从G期进入S期的时间, 使细胞快速通过细胞周期的两个控制点. 另外还有研究发现, HBx可通过提高细胞周期依赖激酶CDK2和CDC2的活性水平对细胞周期进行调控.

3 结束语

目前, HBx基因是研究乙肝相关性肝癌发生机制的热点, 经过各国学者的不懈努力, 取得了较大进展, 尤其在细胞信号传导途径方面的成绩更为突出. 在HBx与抑癌基因, 如与p53的新成员p73, 与p16, p21等之间相互作用对肝细胞恶性转化及癌变的影响等方面的研究也取得初步成果, 但HBx与p16甲基化关系方面的研究国内外尚未见报道, 而且HBx与p53, p21, p16之间的关系错综复杂, 这些仍需要不断地深入研究. 另外, 我们对HBx参与调控信号传导方面的研究应该说还处于比较肤浅的阶段, 在这些方面开展各种针对性的干预实验, 将有助于进一步揭示HBx致肝细胞癌发生的分子机制, 对探寻乙肝相关性肝癌新的防治策略具有重要意义.

4 参考文献

- Hohne M, Schaefer S, Seifer M, Feitelson MA, Paul D, Gerlich WH. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. *EMBO J* 1990; 9: 1137-1145
- Becker SA, Lee TH, Butel JS, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J Virol* 1998; 72: 266-272
- Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10350-10354
- Elmore LW, Hancock AR, Chang SF, Wang XW, Chang S, Callahan CP, Geller DA, Will H, Harris CC. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 14707-14712
- Choi BH, Park CJ, Rho HM. Insulin activates the hepatitis B virus X gene through the activating protein-1 binding site in HepG2 cells. *DNA Cell Biol* 1998; 17: 951-956
- Ohno H, Kaneko S, Kobayashi K, Murakami S. Human hepatitis B virus enhancer 1 is responsive to human interleukin-6. *J Med Virol* 1997; 52: 413-418
- Nakatake H, Chisaka O, Yamamoto S, Matsubara K, Koshy R. Effect of X protein on transactivation of hepatitis B virus promoters and on viral replication. *Virology* 1993; 195: 305-314
- Hu YP, Hu WJ, Zheng WC, Li JX, Dai DS, Wang XM, Zhang SZ, Yu HY, Sun W, Hao GR. Establishment of transgenic mouse harboring hepatitis B virus (adr subtype) genomes. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 111-114
- Weil R, Sirma H, Giannini C, Kremsdorf D, Bessia C, Dargemont C, Brechot C, Israel A. Direct association and nuclear import of the hepatitis B virus X protein with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6345-6354
- Hoare J, Henkler F, Dowling JJ, Errington W, Goldin RD, Fish D, McGarvey MJ. Subcellular localisation of the X protein in HBV infected hepatocytes. *J Med Virol* 2001; 64: 419-426
- Su Q, Schroder CH, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1998; 27: 1109-1120
- Qadri I, Ferrari ME, Siddiqui A. The hepatitis B virus transactivator protein, HBx, interacts with single-stranded DNA (ssDNA). Biochemical characterizations of the HBx-ssDNA interactions. *J Biol Chem* 1996; 271: 15443-15450
- Koike K, Moriya K, Iino S, Yotsuyanagi H, Endo Y, Miyamura T, Kurokawa K. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 1994; 19: 810-819
- Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 2003; 22: 2729-2740
- Xu ZH, Zhao MJ, Li TP. p73beta inhibits transcriptional activities of enhancer I and X promoter in hepatitis B virus more efficiently than p73alpha. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 1094-1097
- Su F, Theodosios CN, Schneider RJ. Role of NF-kappaB and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol* 2001; 75: 215-225
- Zhang Z, Torii N, Furusaka A, Malayaman N, Hu Z, Liang TJ. Structural and functional characterization of interaction between hepatitis B virus X protein and the proteasome complex. *J Biol Chem* 2000; 275: 15157-15165
- Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Kumar V, Sarkar DP. An internal segment (residues 58-119) of the hepatitis B virus X protein is sufficient to activate MAP kinase pathways in mouse liver. *FEBS Lett* 2001; 504: 59-64
- Kim H, Lee YH, Won J, Yun Y. Through induction of juxtaposition and tyrosine kinase activity of Jak1, X-gene product of hepatitis B virus stimulates Ras and the transcriptional activation through AP-1, NF-kappaB, and SRE enhancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 886-894
- Shin EC, Shin JS, Park JH, Kim H, Kim SJ. Expression of fas ligand in human hepatoma cell lines: role of hepatitis-B virus X (HBX) in induction of Fas ligand. *Int J Cancer* 1999; 82: 587-591
- Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase

- pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 25858-25864
- 22 Diao J, Garces R, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 189-205
- 23 DeLuca C, Kwon H, Lin R, Wainberg M, Hiscott J. NF-kappaB activation and HIV-1 induced apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; 10: 235-253
- 24 Lin Y, Nomura T, Yamashita T, Dorjsuren D, Tang H, Murakami S. The transactivation and p53-interacting functions of hepatitis B virus X protein are mutually interfering but distinct. *Cancer Res* 1997; 57: 5137-5142
- 25 Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 1996; 10: 2438-2451
- 26 Ahn JY, Jung EY, Kwun HJ, Lee CW, Sung YC, Jang KL. Dual effects of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle control depending on the status of cellular p53. *J Gen Virol* 2002; 83: 2765-2772
- 27 Park US, Park SK, Lee YI, Park JG, Lee YI. Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1->S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene* 2000; 19: 3384-3394
- 28 Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 357-368
- 29 王兆文, 彭志海, 李克, 蔡国强, 张益, 顾伟. p16影响乙肝病毒相关性肝细胞肝癌的发生. *中华肿瘤杂志* 2003; 25: 356-358
- 30 Fukushima K, Ueno Y, Yamagiwa Y, Yamakawa M, Iwasaki T, Ishii M, Toyota M, Shimosegawa T. Correlation between p21waf1 and p16ink4a expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research* 2001; 20: 52-67
- 31 Capovilla A, Carmona S, Arbuthnot P. Hepatitis B virus X-protein binds damaged DNA and sensitizes liver cells to ultraviolet irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232: 255-260
- 32 Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Price J, Raney AK, McLachlan A. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6599-6603

编辑 程剑侠 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

肝胆胰外科领域新技术研讨会通知

本刊讯 为了推动肝胆胰外科临床及科研工作的深入开展, 由哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰外科与世界华人消化杂志共同举办的国家继续教育项目“肝胆胰外科领域新技术研讨会”拟于2007-08-03/05在哈尔滨召开。届时将邀请日本及国内肝胆胰领域知名专家进行讲座和学术交流, 会议将对活体肝移植供受体手术、肝脏手术、血管技术在肝胆胰手术中的应用、如何提高胰十二指肠手术切除率以及生物人工肝脏等技术的新进展进行深入讨论, 学习该领域国内外先进技术和理念, 促进学术交流和学科发展。与会者将被授予国家I类继续教育学分12分。欢迎各位肝胆胰及相关领域同仁参加。

通讯地址: 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰腺外科。联系人: 吴祥松 电话: 0451-53643849-5721, 13633621389. E-mail: wxs417@yahoo.com.cn