

肝细胞中HBV X基因的表达及其共培养的肝星状细胞的增殖和迁移

陈红英, 王小众, 陈治新

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

陈红英, 博士, 主要从事消化系统疾病的研究。

福建省科技人才基金资助项目, No. 2008F3043

福建省卫生厅青年基金立项医院基金资助项目, No. XH200801

作者贡献分布: 此课题由陈红英设计; 研究过程由陈红英操作完成; 研究所用新试剂及分析工具部分由王小众提供, 陈治新协助购买和筹备; 数据分析由陈红英完成; 本论文写作由陈红英完成。

通讯作者: 陈红英, 副主任医师, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科. zxl16@sina.com

电话: 0591-83357896-8482

收稿日期: 2011-12-23 修回日期: 2012-01-19

接受日期: 2012-02-27 在线出版日期: 2012-03-28

Expression of the hepatitis B virus X gene in liver cells promotes the proliferation and migration of co-cultured hepatic stellate cells

Hong-Ying Chen, Xiao-Zhong Wang, Zhi-Xin Chen

Hong-Ying Chen, Xiao-Zhong Wang, Zhi-Xin Chen, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Supported by: the Science and Technology Talent Foundation of Fujian, No. 2008F3043; and the Young Scholar Foundation of Health Department of Fujian, No. XH200801

Correspondence to: Hong-Ying Chen, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. zxl16@sina.com

Received: 2011-12-23 Revised: 2012-01-19

Accepted: 2012-02-27 Published online: 2012-03-28

Abstract

AIM: To determine whether the hepatitis B virus X (HBV X) gene is involved in the pathogenesis of hepatitis B-related cirrhosis.

METHODS: A eukaryotic expression vector containing the HBV X gene (pHBV-X-IRES2-EGFP) was constructed and transfected into HL-7702 cells. The transfected cells were divided into two groups. One group was selected with G418 and named L02/x, which could express the HBV X gene stably, and another group was transfected with pHBV-X-IRES2-EGFP for 48 h and named L02/48x. The expression of HBV X was detected

by real-time PCR and Western blot. L02/x and L02/48x cells were then co-cultured with hepatic stellate cells (HSCs) for 36 h, and the proliferation and migration of HSCs were detected.

RESULTS: Real-time PCR and Western blot analyses showed that L02/x and L02/48x cells could express HBV X. Compared to HSCs co-cultured with HL-7702 cells transfected with empty vector and non-transfected cells, the proliferation and migration of HSCs co-cultured with L02/x or L02/48x cells significantly increased.

CONCLUSION: The expression of the HBV X gene in HL-7702 cells could promote the proliferation and migration of HSCs and may play an important role in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced liver fibrosis.

Key Words: Hepatitis B virus X gene; Hepatic stellate cells; Co-culture; Proliferation; Migration

Chen HY, Wang XZ, Chen ZX. Expression of the hepatitis B virus X gene in liver cells promotes the proliferation and migration of co-cultured hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 721-728

摘要

目的: 研究乙型肝炎病毒X(hepatitis B virus X, HBV X)基因在乙型肝炎病毒致肝纤维化中的作用。

方法: 构建HBV X基因真核表达载体pHBV-X-IRES2-EGFP, 将其转染人肝细胞HL-7702后分成2组, 一组经G418筛选出稳定表达HBV X基因的肝细胞株(L02/x), 另一组予瞬时转染48 h(L02/48x)。Real-time PCR、Western blot鉴定2组细胞HBV X基因的表达。与转染空质粒和未转染的肝细胞组对照, 将L02/x和L02/48x细胞分别与肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)共培养36 h, 并检测各组HSCs增殖和迁移情况。

结果: Real-time PCR和Western blot实验显

■背景资料

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染可以导致慢性肝炎、肝纤维化和肝细胞癌的发生, 每年因乙型肝炎死亡者约为75万例。

■同行评议者

杨江华, 副教授, 皖南医学院弋矶山医院感染科

■ 研发前沿

目前认为HSCs活化是肝纤维化发生、发展的关键环节,各种致纤维化因子激活HSCs,使其活化、增殖,转化为肌成纤维细胞样细胞,合成多种细胞因子、大量合成细胞外基质,直接参与损伤修复,加速胶原沉积,促进纤维化进程。

示,转染pHBV-X-IRES2-EGFP载体的L02/x和L02/48x细胞均有HBV X基因的表达.与转染空质粒和未转染的肝细胞组对照,与L02/x和L02/48x细胞共培养的HSCs的增殖和迁移均显著增多。

结论: HBV X基因在肝细胞中的表达可以促进HSCs发生增殖和迁移,从而在乙型肝炎病毒致肝纤维化过程中起重要作用。

关键词: 乙型肝炎病毒X基因; 肝星状细胞; 共培养; 增殖; 迁移

陈红英, 王小众, 陈治新. 肝细胞中HBV X基因的表达及其共培养的肝星状细胞的增殖和迁移. 世界华人消化杂志 2012; 20(9): 721-728
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/721.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染可以导致慢性肝炎、肝纤维化和肝细胞癌的发生,每年因乙型肝炎死亡者约为75万例. HBV基因组是一个不全双链的环状DNA分子,其长链含有4个开放读码框架(open reading frame, ORF),分别为编码前S1蛋白,前S2蛋白及S蛋白的S基因,编码前C蛋白与C蛋白的C基因,编码DNA聚合酶蛋白的P基因,以及编码X蛋白的X基因. X基因是HBV DNA中最小的一个ORF,编码区位于1374-1818核苷酸之间,其编码的HBx蛋白由154个氨基酸组成,分子量为17 kDa. 已有大量的研究显示,HBx是一个多功能调节因子,他可以通过调节转录、影响细胞增殖^[1,2]与凋亡^[3-6]、干扰细胞周期^[7-9]及各种信号传导途径^[10-15]、影响细胞修复^[16-18]等从而在肝细胞癌发生发展中起重要的作用^[19-22]. HBV是肝纤维化形成的重要因素之一, Liu等^[23]研究发现HBV可以通过调节I型胶原纤维增殖和表达而影响肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的增殖. Martín-Vilchez等^[24]进一步研究证实HBx能激活HSCs而促进肝纤维化. 为进一步探讨HBV X基因在肝纤维化形成和发展中的作用,本文通过构建HBV X基因真核表达载体,使其在HL-7702人肝细胞中表达,观察与肝细胞共培养的肝星状细胞增殖和迁移的情况,揭示HBx与肝纤维化的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 用于获取目的基因HBV X的质粒

pUCmT-x为本研究所保存,真核荧光表达载体pIRES2-EGFP购自Clontech公司,两者双酶切后连接构建表达HBV X基因的重组质粒pHBV-X-IRES2-EGFP. HL-7702肝细胞为本研究室保存,质粒转染试剂盒lipo2000购自Invitrogen公司,转染后经G418(购自sigma公司)筛选构建稳定表达X基因的肝细胞株. β -actin蛋白抗体(Mouse mAb to Beta-actin)购自abmart公司,HBV X蛋白抗体[Hepatitis B Virus X antigen antibody(X36C)]购自Abcam公司(ab2741),经Realtime-PCR、Western blot进一步鉴定X基因的表达. 采用购自corning公司的Transwell非接触式共培养小室,将购自中国科学院上海细胞库HSCs细胞与肝细胞共培养,采用DMEM+10%FBS+1%P/S+1%Glutamax培养基(培养基成分购自Gibco公司),50 mL/LCO₂、950 mL/L湿润空气、37 °C培养. 采用碧云天公司的CCK-8检测试剂盒、杰美公司的结晶紫试剂盒、Thermo酶标仪(MuLTiSKAN MK3)检测HSCs的增殖与迁移. 实验过程中所用的各种酶,包括内切酶、连接酶、逆转录酶等购自上海生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 构建HBV X基因真核表达载体: 用PCR法从本研究所保存的pUCmT-x质粒^[25]中扩增出HBV X基因片段,在目的基因的5'端添加Xho I酶切位点,3'端添加EcoR I酶切位点. 引物序列如下: 上游为5'-TAATctcgagATGGCTGC-TAGGCTGTGCT-3'和下游5'-GTCAgaattcTTA-ATGGTG ATGGTGATGATGGGCAGAGGT-GAAAAAGTTGC-3'. PCR条件为94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 57 °C退火30 s, 68 °C延伸30 s, 共35个循环. 将目的基因PCR产物和目的载体pIRES2-EGFP用Xho I和EcoR I内切酶分别进行酶切, T4 DNA连接酶连接上述酶切产物,构建HBV X基因真核表达载体pHBV-X-IRES2-EGFP. 经酶切及直接序列测定以确认重组质粒的成功构建。

1.2.2 HBV X基因转染肝细胞: 将肝细胞株HL-7702培养于含DMEM+10%FBS中. 选择对数生长期的肝细胞HL-7702,采用脂质体转染的方法(按脂质体转染试剂盒lipo2000的说明书操作),将质粒pHBV-X-IRES2-EGFP和pIRES2-EGFP分别导入肝细胞HL-7702中(6孔板每孔中加入2 μ g DNA). 转染48 h后,荧光显微镜观察细胞的转染效率. 一部分肝细胞转染48 h后经G418

表 1 X基因qPCR检测引物序列

引物名称	引物序列	产物(bp)
HBV X-F1	5'-CCCGTCTGTGCCTTCTCATC-3'	105
HBV X-R1	5'-ATCTCCTCCCCCAACTCCTC-3'	
HBV X-F2	5'-CTAGGCTGTGCTGCCAACTG-3'	182
HBV X-R2	5'-AGAAGGCACAGACGGGGAGT-3'	
hACTB-F	5'-TCCTTCCTGGGCATGGAGT-3'	208
hACTB-R	5'-CAGGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'	

800 mg/L选择培养2 wk后, 挑取单克隆予进一步扩增以构建稳定表达HBV X基因的肝细胞株并命名为L02/x, 转染空质粒组命名为L02/ctr. 另一部分肝细胞于重组质粒瞬时转染48 h后作为瞬时转染组直接进入共培养实验, 此细胞分别命名为L02/48x, 其相应的转染空质粒对照组命名为L02/48ctr.

1.2.3 Real-time PCR鉴定X基因的表达: (1) 抽提5组细胞(L02/x、L02/48x、L02/ctr、L02/48ctr和HL-7702空白细胞)RNA并进行反转录, 检测RNA质量、浓度和纯度; (2) 依据目的基因及内参基因ACTB(Beta Actin)设计并合成荧光定量PCR引物, 引物序列见表1. SYBR Green法荧光定量PCR分析各基因的表达, PCR条件为: 95 °C 2 min; (95 °C 20 s, 57 °C 15 s, 72 °C 20 s)×40 cycles, qPCR反应体系如下: 2X qPCR buffer mix 10 μL, Primer 1 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 8 μL; PCR结束后, 进行熔解曲线实验, 升温温度从60 °C到95 °C; (3) 用 $\Delta\Delta C_t$ 法进行各基因表达的相对定量.

1.2.4 Western blot实验鉴定X基因的表达: 取稳定和瞬时转染X基因的肝细胞株L02/x和L02/48x, 其相应的转染空质粒细胞株L02/ctr和L02/48ctr, 以及相应的空白细胞对照组L02/NC和L02/48NC. Loading Buffer裂解此6组细胞并抽提蛋白, BSA法进行蛋白定量后行SDS-PAGE电泳, 恒压80 V, 30 min之后恒压120 V, 75-90 min, 恒压20 V条件下半干电转1 h, 将蛋白转移到PVDF膜上. 用封闭液(含5%脱脂奶粉的PBST溶液)室温封闭膜1 h; 用新配制的封闭液稀释一抗(HBV X蛋白抗体稀释比1:1 000; actin蛋白抗体稀释比1:4 000); 4 °C, 一抗孵育过夜; 用PBST洗膜30 min后室温下二抗孵育膜1 h, 再次洗膜后ECL显影.

1.2.5 肝细胞与肝星状细胞共培养: 将上述6组肝细胞及HSCs培养于DMEM+10%FBS+1%P/S+1%Glutamax培养液中. 采用Transwell共培养

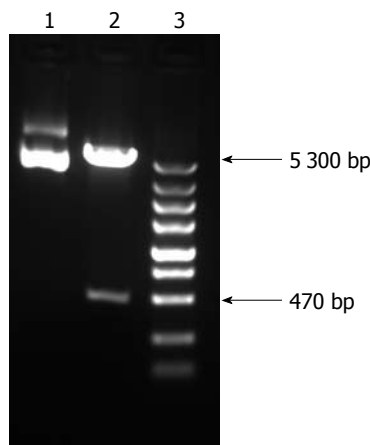


图 1 pHBV-X-IRES2-EGFP重组载体酶切鉴定. 1: HBV X重组质粒; 2: BamHI酶对重组载体质粒进行酶切; 3: 5 000 bp Marker.

体系, 取HSCs悬液(细胞数约为 6×10^5)接种到PBS浸润的上层小室中; 用镊子将小室仔细放于培养肝细胞的孔板中, 避免底部产生气泡, 放回培养箱中于50 mL/LCO₂、950 mL/L湿润空气、37 °C培养. 共培养36 h后进行下述实验.

1.2.6 CCK-8检测HSCs增殖: 在共培养36 h后, 每孔加入10 μL CCK-8, 混匀后培养箱中孵育3 h, 测定450 nm处的吸光度(A)值. 酶标仪读取待测样品和空白对照在450 nm处的A值, 将各待测样本的A值记为测量值, 空白对照的A值记为空白值, 则终值 = 测量值 - 空白值.

1.2.7 检测HSCs的迁移: 共培养36 h后取出小室, 去除小室中的培养基, 用湿润的棉签仔细擦掉小室上层的细胞; 在室温下, 用PBS润洗小室上表层, 将小室转移到新的6孔板中, 用4%的多聚甲醛室温固定细胞15 min, 用结晶紫染色试剂盒对细胞进行染色(按试剂盒说明书进行操作), 后用酶标仪检测570 nm处的A值, 然后计算细胞迁移.

统计学处理 重复上述实验3次, 将终值绘制柱状图, 结果用mean±SD表示, 用SPSS17软件进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学差异.

2 结果

2.1 重组克隆的成功构建 重组克隆的酶切鉴定如

■ 相关报道

研究显示, HBx是一个多功能调节因子, 他可以通过调节转录影响细胞增殖与凋亡, 干扰细胞周期及各种信号传导途径, 影响细胞修复等, 从而在肝细胞癌发生发展中起重要的作用.

同行评价

本文有一定的科学性、创新性和可读性,为HBV X基因与肝纤维化的临床研究提供了较为可靠的参考依据。

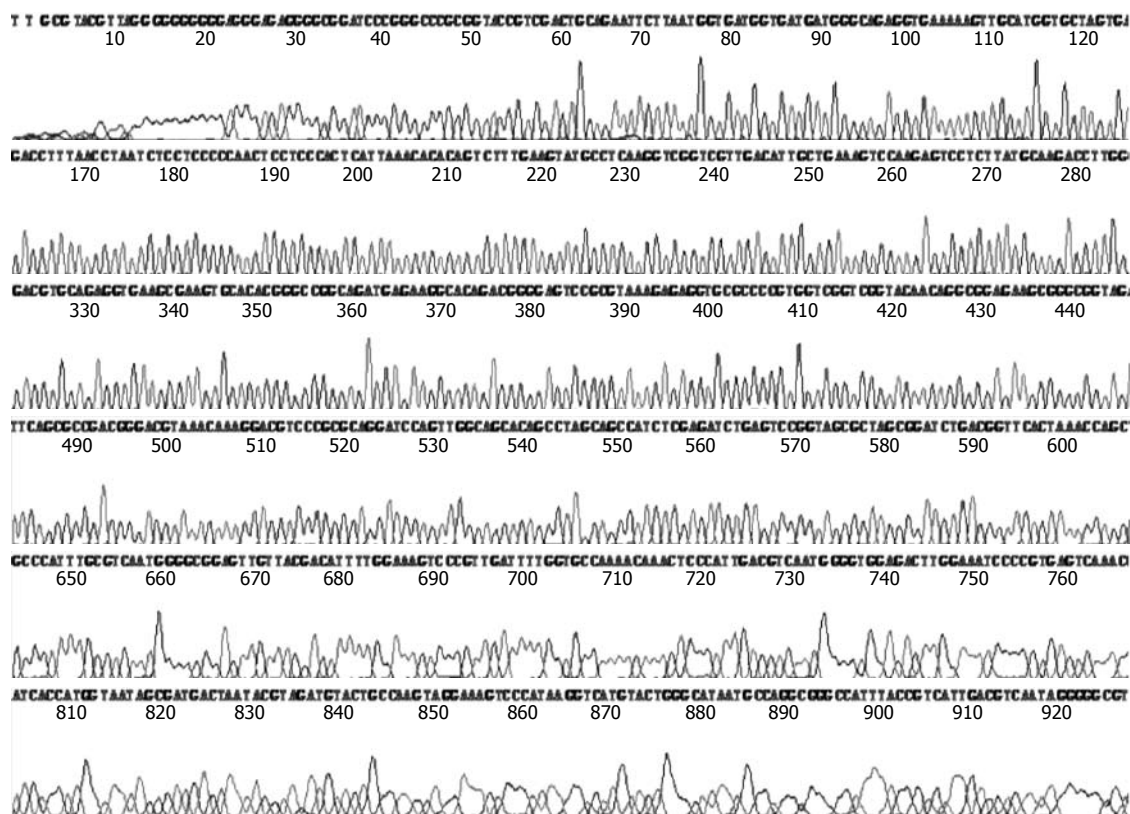


图2 重组克隆pHBV-X-IRES2-EGFP的测序。

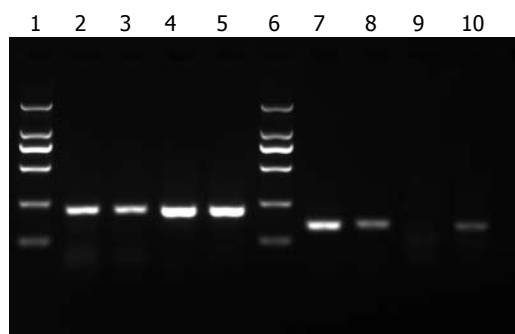


图3 RT-PCR检测各个细胞株中目的基因的表达. 1, 6: 2 000 bp Marker; 2-5: 内参引物hACTB在质粒、L02/48x、HL-7702和L02/x中的扩增; 7-10: X基因引物在质粒、L02/48x、HL-7702和L02/x中的扩增。

图1所示, pHBV-X-IRES2-EGFP重组载体经酶切电泳后可见HBV X基因目的条带(约470 bp)。NCBI网上比对测序序列,显示与HBV X基因99%相似度,结果证明已成功构建HBV X重组质粒(图2)。

2.2 PCR检测各个细胞株中目的基因的mRNA表达 重组质粒、L02/x、L02/48x和空白对照组HL-7702细胞均有内参基因的表达,前3组亦可见HBV X mRNA表达,而空白对照组HL-7702细胞则未见目的基因表达,即稳定和瞬时HBV X基因的肝细胞中有HBV X mRNA表达(图3)。

△△Ct法对各组目的基因表达相对定量,结果显示在稳定转染株中,L02/x的HBV X mRNA表达量为对照组L02/ctr的4倍,L02/48x的HBV X mRNA表达量为其对照L02/48ctr的54 855倍,进一步证实稳定和瞬时HBV X基因的肝细胞中有HBV X mRNA表达(表2,图4,5)。

2.3 Western blot检测各个细胞株中目的基因的表达 稳定和瞬时转染HBV X基因的肝细胞,即L02/x和L02/48x,均可见HBV X蛋白(17 kDa)的表达,而转染空质粒组L02/ctr和L02/48ctr,以及相应的空白细胞对照组L02/NC和L02/48NC均未有该蛋白的表达,即成功构建了稳定表达X基因的肝细胞株,同时验证了瞬时转染X基因的肝细胞确有目的基因的表达(图6)。

2.4 CCK-8检测HSCs细胞增殖 运用SPSS17软件进行统计分析,结果显示与稳定和瞬时HBV X基因的肝细胞共培养的HSCs增殖数值显著高于相应的转染空质粒组和空白组,差别有显著意义(表3,图7, $P < 0.05$)。

2.5 检测及计算HSCs的迁移 结晶紫染色后,运用SPSS17软件进行统计分析,结果显示与稳定和瞬时HBV X基因的肝细胞共培养的HSCs迁移数值显著高于相应的转染空质粒组和空白组,差别有显著意义(表4,图8, $P < 0.05$)。

表 2 各组细胞HBV X基因的Real-time PCR检测

样品	基因Actin				基因HBV X				ΔCt	$-\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
	Ct1	Ct2	Ct3	Ct-Ave	Ct1	Ct2	Ct3	Ct-Ave			
L02/48x	23.71	23.58	23.53	23.61	13.18	13.37	13.60	13.38	-10.22	-15.74	54854.92
L02/48ctr	21.79	21.81	21.73	21.78	27.02	27.62	27.25	27.30	5.52	0	1
L02/x	17.04	16.80	17.15	17.00	29.05	28.89	28.54	28.80	11.83	-2.01	4.03
L02/ctr	16.97	16.74	16.70	16.80	30.86	30.51	30.43	30.60	13.84	0.00	1.00

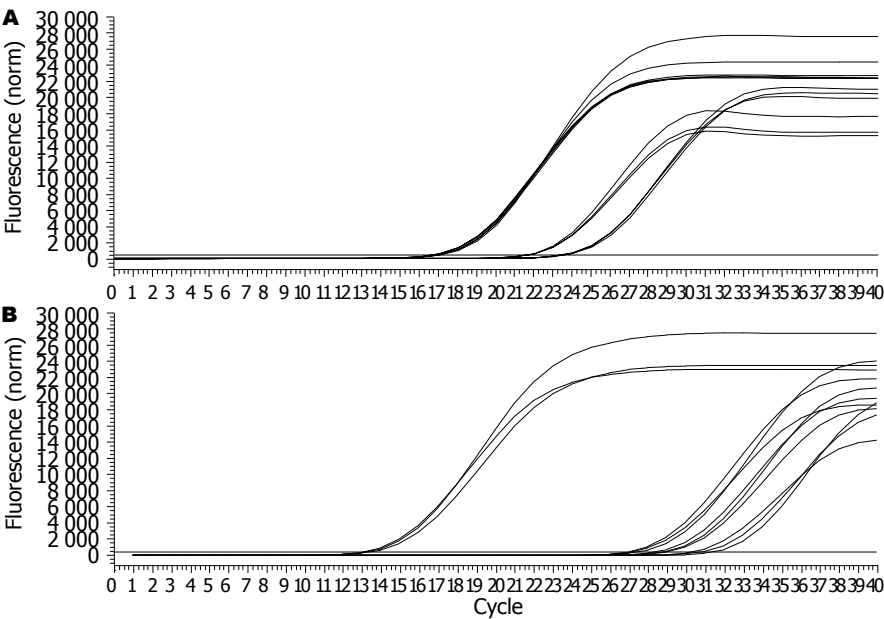


图 4 各组细胞目的基因及内参基因的qPCR扩增曲线. A: 目的基因扩增曲线; B: 内参基因扩增曲线.

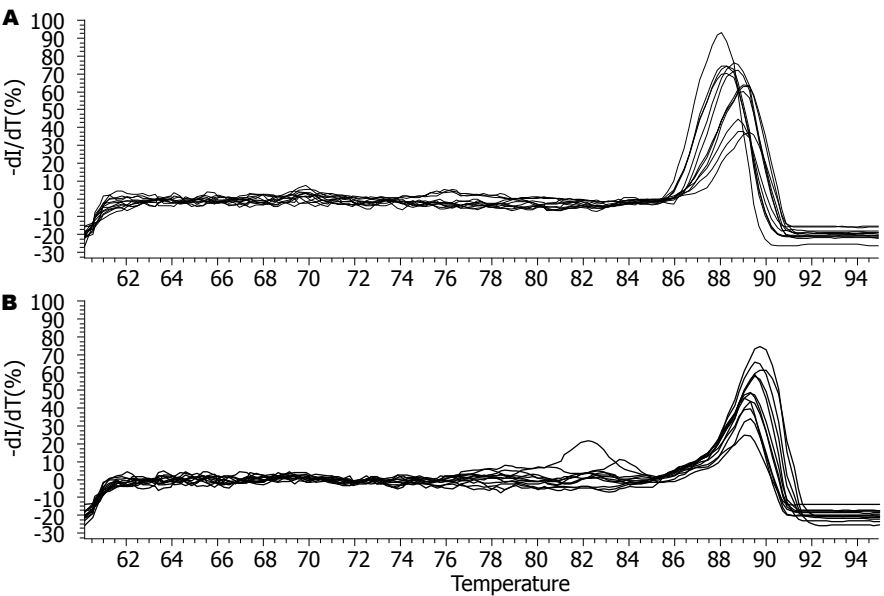


图 5 各组细胞目的基因及内参基因的qPCR溶解曲线. A: 目的基因在各组细胞cDNA中的溶解曲线; B: 内参基因hACTB在各组细胞cDNA中的溶解曲线.

3 讨论

我国属于HBV感染的高发病区, 每年有11-13万人死于HBV感染所致的肝硬化和肝细胞癌. 1989年Shirakata等^[26]将HBV X基因转染小鼠成纤维细胞, 并将其移植裸鼠发现该基因可诱发肿瘤形成, 从而揭示了HBV X基因的致癌作

用. 近30年来, 大量的分子生物学及动物实验已证实HBx蛋白可以通过影响PI-3激酶、p38和JNK等信号通路^[5,27]、干扰细胞修复^[17,18]等机制使细胞的增殖和凋亡失衡而致肝细胞癌的发生. 然而HBV X基因与肝纤维化的相关研究却少有报道, 二者关系未完全明确.

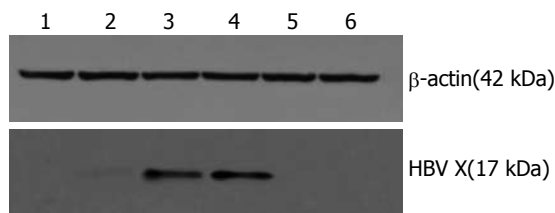


图 6 各组细胞中蛋白的Western blot检测. 1-3: 稳定转染组L02/NC、L02/ctr、L02/x; 4-6: 瞬时转染组L02/48x、L02/48ctr、L02/48NC.

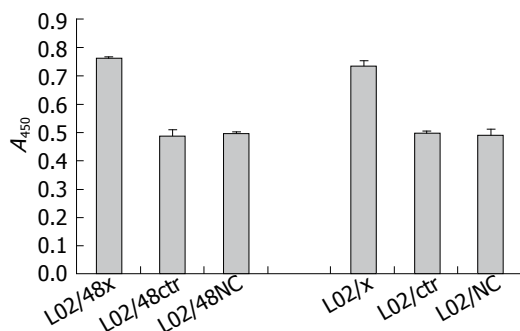


图 7 CCK8检测各组HSCs细胞增殖情况.

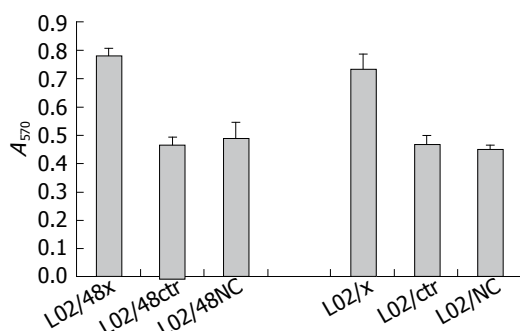


图 8 各组HSCs细胞迁移情况.

目前认为HSCs活化是肝纤维化发生、发展的关键环节, 各种致纤维化因子激活HSCs^[28], 使其活化、增殖, 转化为肌成纤维细胞样细胞, 合成多种细胞因子、大量合成细胞外基质, 尤其是I、III型胶原等, 并获得细胞运动和收缩功能, 向损伤部位迁移聚集, 直接参与损伤修复, 加速胶原沉积, 促进纤维化进程^[29]. 近年来仅有少数研究报道HBx有可能通过各种细胞因子旁分泌激活HSCs并促进其增殖, 从而参与肝纤维化进程^[30]. 为进一步明确HBV X基因与肝纤维化的关系, 本实验通过构建X基因真核表达载体, 以此为平台构建稳定和瞬时转染该基因的HL-7702肝细胞, 检测与其共培养的HSCs的增殖与迁移情况, 最后统计学分析HBV X基因对HSCs增殖和迁移的影响, 从而确立HBV X基因在肝纤维化中的作用.

表 3 CCK-8检测各组共培养HSCs细胞增殖情况

	第1次	第2次	第3次	mean ± SD
L02/48x	0.763	0.758	0.764	0.7617 ± 0.0032
L02/48ctr	0.487	0.470	0.508	0.4883 ± 0.0190
L02/48NC	0.497	0.503	0.492	0.4973 ± 0.0055
L02/x	0.753	0.735	0.725	0.7377 ± 0.0142
L02/ctr	0.496	0.506	0.489	0.4970 ± 0.0085
L02/NC	0.486	0.512	0.476	0.4913 ± 0.0186

表 4 各组共培养HSCs细胞迁移情况

	第1次	第2次	第3次	mean ± SD
L02/48x	0.424	0.427	0.448	0.4330 ± 0.0131
L02/48ctr	0.244	0.259	0.272	0.2583 ± 0.0140
L02/48NC	0.279	0.235	0.297	0.2703 ± 0.0319
L02/x	0.439	0.389	0.395	0.4077 ± 0.0273
L02/ctr	0.256	0.247	0.278	0.2603 ± 0.0159
L02/NC	0.246	0.247	0.257	0.2500 ± 0.0061

在实验中, 我们首先构建了HBV X基因的荧光真核表达载体pHBV-X-IRES2-EGFP, 经酶切及直接测序证实重组载体的成功构建. 其次是肝细胞的选择, 目前国内外大多数肝细胞研究选用HepG2为实验细胞, 但是此细胞具有部分肝癌细胞的特性, 不宜用于HBV致肝纤维化的研究. 为了更好模拟体内环境, 本实验选用具有正常肝细胞特性的HL-7702肝细胞, 通过脂质体转染技术, 获得稳定和瞬时转染HBV X基因的肝细胞, PCR和蛋白印迹实验均证实两组细胞中X基因的mRNA和蛋白的表达. 最后是肝细胞与HSCs的共培养实验. 既往研究已发现瞬时转染X基因24 h即有表达, 并逐渐上升, 于72 h达到最高峰, 之后回落^[9]. 以此为依据, 本实验选取瞬时转染48 h和稳定转染的肝细胞与HSCs于Transwell非接触培养体系中共培养36 h, 之后检测HSCs的增殖与迁移情况, 结果显示, 与转染空质粒和未转染肝细胞共培养的HSCs做对照, 与转染X基因组共培养的HSCs的增殖和迁移数值显著升高($P < 0.05$).

实验结果说明HBV X基因在肝细胞中的表达可促进与其共培养的HSCs发生增殖与迁移. 如上所述, HSCs的活化与增殖是肝纤维化进程的一重要环节, HBx对HSCs的这一作用揭示了其在肝纤维化发生与发展中的作用, 即HBV X基因的表达能促使HSCs增殖和迁移, 从而促进肝纤维化进程.

志谢 感谢唐南洪、李秀金及王晓茜同志在本试验中给予的大力帮助。

4 参考文献

- Gearhart TL, Bouchard MJ. The hepatitis B virus X protein modulates hepatocyte proliferation pathways to stimulate viral replication. *J Virol* 2010; 84: 2675-2686
- Mao Y, Da L, Tang H, Yang J, Lei Y, Tiollais P, Li T, Zhao M. Hepatitis B virus X protein reduces starvation-induced cell death through activation of autophagy and inhibition of mitochondrial apoptotic pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 415: 68-74
- Clippinger AJ, Gearhart TL, Bouchard MJ. Hepatitis B virus X protein modulates apoptosis in primary rat hepatocytes by regulating both NF-kappaB and the mitochondrial permeability transition pore. *J Virol* 2009; 83: 4718-4731
- Kuo TC, Chao CC. Hepatitis B virus X protein prevents apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by upregulating SATB1 and HURP expression. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 1093-1102
- Liu Q, Chen J, Liu L, Zhang J, Wang D, Ma L, He Y, Liu Y, Liu Z, Wu J. The X protein of hepatitis B virus inhibits apoptosis in hepatoma cells through enhancing the methionine adenosyltransferase 2A gene expression and reducing S-adenosyl-methionine production. *J Biol Chem* 2011; 286: 17168-17180
- Knoll S, Fürst K, Thomas S, Villanueva Baselga S, Stoll A, Schaefer S, Pützer BM. Dissection of cell context-dependent interactions between HBx and p53 family members in regulation of apoptosis: a role for HBV-induced HCC. *Cell Cycle* 2011; 10: 3554-3565
- Gearhart TL, Bouchard MJ. The hepatitis B virus HBx protein modulates cell cycle regulatory proteins in cultured primary human hepatocytes. *Virus Res* 2011; 155: 363-367
- Martin-Lluesma S, Schaeffer C, Robert EI, van Breugel PC, Leupin O, Hantz O, Strubin M. Hepatitis B virus X protein affects S phase progression leading to chromosome segregation defects by binding to damaged DNA binding protein 1. *Hepatology* 2008; 48: 1467-1476
- Chen HY, Tang NH, Li XJ, Zhang SJ, Chen ZX, Wang XZ. Transfection and expression of hepatitis B virus x gene and its effect on apoptosis in HL-7702 cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 959-964
- Yang WJ, Chang CJ, Yeh SH, Lin WH, Wang SH, Tsai TF, Chen DS, Chen PJ. Hepatitis B virus X protein enhances the transcriptional activity of the androgen receptor through c-Src and glycogen synthase kinase-3beta kinase pathways. *Hepatology* 2009; 49: 1515-1524
- Kim K, Kim KH, Cheong J. Hepatitis B virus X protein impairs hepatic insulin signaling through degradation of IRS1 and induction of SOCS3. *PLoS One* 2010; 5: e8649
- Wei C, Ni C, Song T, Liu Y, Yang X, Zheng Z, Jia Y, Yuan Y, Guan K, Xu Y, Cheng X, Zhang Y, Yang X, Wang Y, Wen C, Wu Q, Shi W, Zhong H. The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein. *J Immunol* 2010; 185: 1158-1168
- Hsieh A, Kim HS, Lim SO, Yu DY, Jung G. Hepatitis B viral X protein interacts with tumor suppressor adenomatous polyposis coli to activate Wnt/beta-catenin signaling. *Cancer Lett* 2011; 300: 162-172
- Chen L, Hu L, Li L, Liu Y, Tu QQ, Chang YX, Yan HX, Wu MC, Wang HY. Dysregulation of beta-catenin by hepatitis B virus X protein in HBV-infected human hepatocellular carcinomas. *Front Med China* 2010; 4: 399-411
- Ha HL, Yu DY. HBx-induced reactive oxygen species activates hepatocellular carcinogenesis via dysregulation of PTEN/Akt pathway. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4932-4937
- Matsuda Y, Ichida T. Impact of hepatitis B virus X protein on the DNA damage response during hepatocarcinogenesis. *Med Mol Morphol* 2009; 42: 138-142
- Qadri I, Fatima K, AbdeL-Hafiz H. Hepatitis B virus X protein impedes the DNA repair via its association with transcription factor, TFIIH. *BMC Microbiol* 2011; 11: 48
- Chen HY, Tang NH, Lin N, Chen ZX, Wang XZ. Hepatitis B virus X protein induces apoptosis and cell cycle deregulation through interfering with DNA repair and checkpoint responses. *Hepatol Res* 2008; 38: 174-182
- Koike K. Hepatitis B virus X gene is implicated in liver carcinogenesis. *Cancer Lett* 2009; 286: 60-68
- Xiang WQ, Liu W. [Role of HBx in hepatocellular carcinoma development]. *Zhejiang Daxue Xuebao (Yixueban)* 2010; 39: 333-338
- Pár A. [Hepatitis B virus (HBV) infection and hepatocarcinogenesis]. *Orv Hetil* 2010; 151: 1045-1053
- Kew MC. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 1: 144-152
- Liu X, Zhu ST, You H, Cong M, Liu TH, Wang BE, Jia JD. Hepatitis B virus infects hepatic stellate cells and affects their proliferation and expression of collagen type I. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122: 1455-1461
- Martín-Vílchez S, Sanz-Cameno P, Rodríguez-Muñoz Y, Majano PL, Molina-Jiménez F, López-Cabrera M, Moreno-Otero R, Lara-Pezzi E. The hepatitis B virus X protein induces paracrine activation of human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2008; 47: 1872-1883
- 陈红英, 唐南洪, 张生君, 陈治新, 王小众. 乙肝病毒X基因真核表达载体的构建及人肝细胞株HL-7702转染. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 614-617
- Shirakata Y, Kawada M, Fujiki Y, Sano H, Oda M, Yaginuma K, Kobayashi M, Koike K. The X gene of hepatitis B virus induced growth stimulation and tumorigenic transformation of mouse NIH3T3 cells. *Jpn J Cancer Res* 1989; 80: 617-621
- Shukla R, Yue J, Siouda M, Gheit T, Hantz O, Merle P, Zoulim F, Krutovskikh V, Tommasino M, Sylla BS. Proinflammatory cytokine TNF-alpha increases the stability of hepatitis B virus X protein through NF-kB signaling. *Carcinogenesis* 2011; 32: 978-985
- Shimada H, Staten NR, Rajagopalan LE. TGF-beta1 mediated activation of Rho kinase induces TGF-beta2 and endothelin-1 expression in human hepatic

- stellate cells. *J Hepatol* 2011; 54: 521-528
- 29 Wirkowska A, Paczek L. [Liver fibrosis and cirrhosis--causes. Part I]. *Przegl Lek* 2011; 68: 222-227
- 30 Guo GH, Tan DM, Zhu PA, Liu F. Hepatitis B

virus X protein promotes proliferation and up-regulates TGF-beta1 and CTGF in human hepatic stellate cell line, LX-2. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 59-64

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ...。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。(5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。