

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.02.006

乙肝病毒 X 蛋白通过上调 NOX4 的表达活化肝星状细胞 *

李海燕 贺红艳 黄凤霞 黄君华 张道港 姚子淳

(西安医学院医学技术系 陕西 西安 710000)

摘要 目的:探讨乙肝病毒 X 蛋白(HBx)对肝星状细胞(HSC)活化的影响及其可能的分子机制。**方法:**构建稳定转染 HBx 基因的 L0₂ 肝细胞(L0₂-HBx), Western Blot 鉴定细胞株中 HBx 蛋白的稳定表达。以 L0₂-HBx、转染空质粒(L0₂-pcDNA3.1)和未转染肝细胞(L0₂)的条件培养基,分别孵育肝星状细胞株 LX-2,即 LX-2/L0₂-HBx、LX-2/L0₂-pcDNA3.1、LX-2/L0₂, Western Blot 检测上述各组细胞 α -SMA (肝星状细胞活化标志) 和 NOX4 的蛋白表达。以 L0₂-HBx 的条件培养基孵育 LX-2 细胞,分为转染 si-NOX4 (LX-2/L0₂-HBx+ si-NOX4)、无关干扰片段(LX-2/L0₂-HBx+snc-RNA)、未转染(LX-2/L0₂-HBx)3 组, Western Blot 检测各组 LX-2 细胞的 α -SMA 蛋白表达。**结果:**L0₂-HBx 中稳定表达 HBx 蛋白; LX-2/L0₂-HBx 细胞中 α -SMA 和 NOX4 的蛋白表达显著高于 LX-2/L0₂-pcDNA3.1、LX-2/L0₂ 细胞($P < 0.01$); LX-2/L0₂-HBx 细胞敲减 NOX4 后(LX-2/L0₂-HBx+si-NOX4), α -SMA 的蛋白表达显著低于 LX-2/L0₂-HBx+snc-RNA 和 LX-2/L0₂-HBx 细胞($P < 0.05$)。**结论:**肝细胞中表达的 HBx 蛋白可以通过 HSC 中 NOX4 上调 α -SMA 的表达,促进 HSC 的活化。

关键词: 乙肝病毒 X 蛋白; NOX4; 肝星状细胞; 活化

中图分类号: R-33; R575.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)02-227-04

HBx Protein Activated Hepatic Stellate Cells Through Up-regulation of NOX4 Expression*

Li Hai-yan, HE Hong-yan, HUANG Feng-xia, HUANG Jun-hua, ZHANG Xiao-gang, YAO Zi-chun

(Medical Technology Department, Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi, 710000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of HSC activation by HBx protein. **Methods:** HBx-transfected human non-tumour hepatic L0₂ cell line, named L0₂-HBx was established and showed HBx expression by western blot analysis. Western blot tested the effects of HBx on NOX4 and α -SMA expression in human HSC cell line (LX-2) after exposure to conditioned medium from L0₂-HBx, L0₂-pcDNA3.1, and L0₂ cells. After LX-2/L0₂-HBx cells treated with si-NOX4, the NOX4 and α -SMA expression were tested by western blot analysis. **Results:** The L0₂-HBx cell models were successfully constructed. The expression of HBx was significantly expressed. Compared with LX-2/L0₂-pcDNA3.1 and LX-2/L0₂ groups, NOX4 and α -SMA expression were increased significantly in LX-2/L0₂-HBx group ($P < 0.01$). α -SMA in LX-2/L0₂-HBx expressions were depressed, coupled with the fact that the NOX4 was silenced ($P < 0.05$). **Conclusion:** HBx protein activate hepatic stellate cells, and NOX4 play a vital role in the activation.

Key words: HBx; NOX4; Hepatic stellate cells; Activation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R575.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)02-227-04

前言

肝纤维化是肝脏组织在各种病因的损伤下发生的一种可逆的损伤修复反应,以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度沉积为特点,肝星状细胞是 ECM 的主要来源^[1]。若肝纤维化得不到有效控制,最终会进展为肝硬化。在我国,乙肝病毒感染是导致肝炎、肝硬化的主要病因^[2]。研究表明^[3-9]HBV 病毒编码的 HBx 蛋白在肝纤维化的启动和发展中发挥了重要作用。NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, NOX)的多种亚基如 NOX1、NOX2、NOX4,通过生成活性氧(ROS)介导了氧化应激反应,在肝星状细胞活化中发挥了重要作用^[10-15]。该研究通过探讨

HBx 对肝星状细胞的活化和 NOX 分子表达的影响及其分子机制,旨在为肝纤维化的发生发展的机制研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

人肝星状细胞株 LX-2、人肝细胞株 L0₂ 由中科院上海细胞库提供;细胞孵育于培养基(由 RPMI 1640、10%小牛血清、100 mg/L 链霉素、100 kU/L 青霉素配制而成),放置于 5% CO₂ 恒温培养箱(37℃),实验取用对数生长期细胞。pcDNA3.1-HBx 质粒(西安依科生物有限公司)、NOX4 siRNA(上海吉玛制药技术有限公司)、BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司)、潮霉素

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81700546);陕西省教育厅西安医学院专项科研项目(16JK1664);

西安医学院 2016 年博士科研启动基金项目(2016DOC15);西安医学院 2017 年配套基金项目(2017PT13)

作者简介:李海燕(1979-),博士,副教授,电话:(029)86177514, E-mail: lihaiyan319@126.com

(收稿日期:2018-05-27 接受日期:2018-07-09)

B (美国 Sigma 公司)、兔抗人 NOX4 抗体,鼠抗人 α -SMA、 α -tubulin 抗体(美国 Abcam 公司)。

1.2 HBx 转染 L0₂ 细胞株

(1) 按照 Lipofectamine™2000 脂质转染试剂盒说明书操作步骤,将 pcDNA3.1-HBx 质粒转染入对数生长期 L0₂ 细胞,阴性对照组转染空 pcDNA3.1 质粒。(2)转染 48 h,细胞以 1:10 比例稀释后,重新铺 24 孔板。经适当浓度潮霉素 B 选择培养 2 周,种至 96 孔板。(3)挑取较大单克隆,消化后扩大增殖至 24 孔板培养,最终扩大至 6 孔板培养,直至可进行 Western blot 实验检测 HBx 蛋白表达,建立 L0₂-HBx 细胞株。

1.3 制备稳定转染 HBx 的肝细胞条件培养基

分别将 L0₂-HBx、L0₂-pcDNA3.1、L0₂ 细胞株以 1×10^5 密度接种于 6 孔板,待细胞培养至 80%-90%融合度时更换为不含小牛血清的 RPMI1640 培养液,48 h 后吸取培养基,离心后取上清液即为条件培养基。

1.4 Western Blot 检测条件培养基孵育的肝星状细胞中 NOX4 和 α -SMA 蛋白的表达

将 LX-2 细胞以 1×10^5 密度接种于 6 孔板,待细胞培养至 80%-90%融合度时更换为不含小牛血清的 RPMI1640 培养液,饥饿 24 h。再以上述制备的 L0₂-HBx 条件培养基作用于饥饿后的 LX-2 细胞,阴性对照组为 L0₂-pcDNA3.1 条件培养基,空白对照组为 L0₂ 条件培养基。处理 24 h 后,以含有 1/100 PMSF 的 RIPA 细胞裂解液溶解细胞,提取蛋白,并以 BCA 法定量。蛋白变性、上样,行 SDS-PAGE 电泳,恒压 80 V,30 min 后转恒压 120 V 90 min,蛋白转 PVDF 膜,转膜 75 min,封闭 1 h,洗膜后分别与封闭液稀释的特异一抗于 4℃ 孵育过夜,PBST 洗膜 30 min,二抗孵育,室温 1 h,PBST 洗 20 min,化学发光法显影。实验平行重复 3 次。

1.5 Western Blot 检测条件培养基孵育的肝星状细胞在 NOX4 siRNA 干扰后 NOX4 和 α -SMA 蛋白的表达

以 NOX4 siRNA 转染 L0₂-HBx 条件培养基孵育的 LX-2 细胞,转染介质为 Lipofectamine™2000 脂质转染试剂盒,阴性对照组转染无关 siRNA 序列,空白对照组不加干扰序列。转染 24 h 后,提取上述 3 组细胞的总蛋白,进行 Western Blotting 检测,方法同上。实验平行重复 3 次。

1.6 统计学分析

统计分析采用 SPSS 13.0 统计学软件,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,保存在 Window Excel 数据库,两组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝细胞中 HBx 蛋白的表达

肝细胞 L0₂ 细胞株稳定转染 pcDNA3.1-HBx 质粒(L0₂-HBx),阴性对照(L0₂-pcDNA3.1)、空白对照(L0₂)分别为转染 pcDNA3.1 的 L0₂ 细胞与未转染 L0₂ 细胞。提取上述 3 组细胞的总蛋白质,以 Western Blot 实验检测 HBx 表达情况,结果显示 L0₂-HBx 细胞有相对分子质量约 17kDa 的条带出现,而其余两组细胞中无此条带出现(图 1),说明 L0₂-HBx 细胞可以稳定表达 HBx 蛋白。

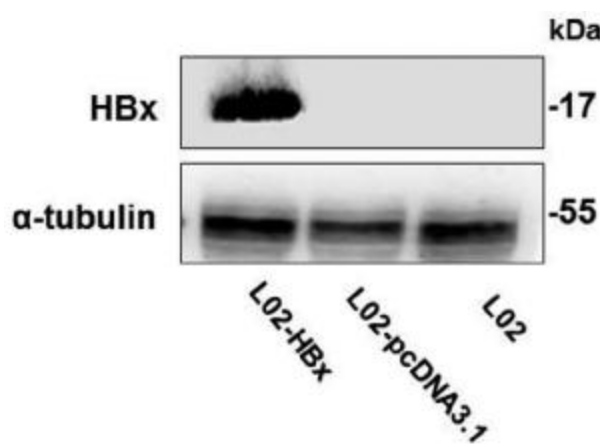


图 1 肝细胞中 HBx 蛋白的表达情况

Fig.1 HBx Expression in liver cells

2.2 L0₂-HBx 条件培养基对肝星状细胞 NOX4 和 α -SMA 蛋白表达的影响

分别以 L0₂-HBx、L0₂-pcDNA3.1、L0₂ 细胞的条件培养基孵育人肝星状细胞株 LX-2,24h 后提取上述 3 组 LX-2 细胞总蛋白,以 Western blot 实验检测 NOX4 和 α -SMA 的蛋白表达。结果显示:与 L0₂-HBx 共培养的 LX-2 细胞(LX-2/L0₂-HBx)中 NOX4 和 α -SMA 的蛋白表达均显著高于阴性对照组(LX-2/L0₂-pcDNA3.1)和空白对照组(LX-2/L0₂)($P < 0.01$),见图 2。

2.3 敲减 NOX4 对肝星状细胞 α -SMA 的蛋白表达的影响

以 L0₂-HBx 细胞的条件培养基孵育 LX-2 细胞,实验组以 si-NOX4 作用于 LX-2 (LX-2/L0₂-HBx+si-NOX4),阴性对照组(LX-2/L0₂-HBx+snc-RNA)和空白对照组(LX-2/L0₂-HBx)分别加入无关干扰片段细胞和不加干扰片段。Western Blot 结果显示:LX-2/L0₂-HBx+si-NOX4 组中随着 NOX4 表达的下调, α -SMA 的表达也显著低于阴性对照组和空白对照组(图 3)。

3 讨论

乙型肝炎病毒感染是慢性肝炎、肝硬化、肝细胞癌的重要致病因素之一,但其发病机制尚未完全阐明。HBx 蛋白由 HBV DNA 中一个最小的开放阅读框架编码而成,由 154 个氨基酸组成,是一个多功能的调节因子^[16-18]。国内外的研究普遍认为 HBx 蛋白在肝细胞癌的发生发展中发挥了重要的作用^[19-22],如其可以通过调节肝癌细胞转录、干扰正常肝细胞修复、影响多种细胞信号通路等方式,调控肝癌细胞的生长、增殖、侵袭与转移。

肝星状细胞是肝纤维化病理过程中细胞外基质的主要细胞来源,其活化在肝纤维化疾病进展中发挥了至关重要的作用^[23-25]。目前,研究表明^[5,7,26]乙肝病毒可以通过多种途径启动肝星状细胞的活化,而 HBx 蛋白可以促进 HSC 的增殖并使其致纤维化的病理过程中发挥作用,但 HBx 活化 HSC 的具体机制尚未完全阐明。

NOX4 是还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶(NOX)的一种亚基,通过其产生的活性氧簇(ROS)介导的氧化应激反应在肝纤维化的发生发展中发挥了重要作用。以往的研究结果显示^[27-29]NOX4 在肝纤维化的大鼠模型中表达增加,尤其是在 HSC 中的表达显著高于对照。Lan T 等^[30]揭示

NOX4 通过介导多条细胞信号通路,诱导 HSC 的持续激活。但 NOX4 在乙肝相关的肝纤维化中是否对 HSC 的活化发挥重要

作用尚未有文献报道。

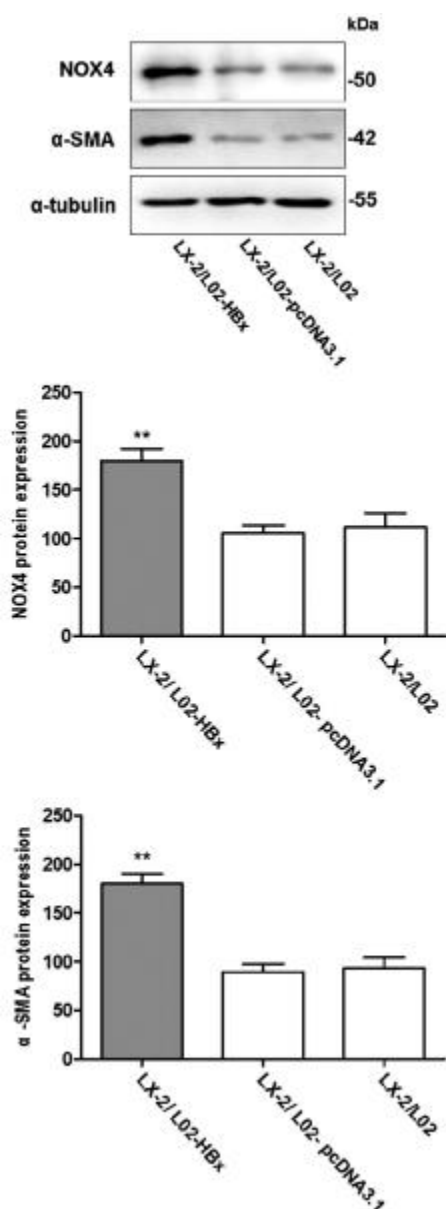


图2 不同条件培养基对肝星状细胞 NOX4 和α-SMA 蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of different conditioned medium from L0₂-HBx ,

L0₂-pcDNA3.1, and L0₂ cells on the NOX4 and α-SMA expression in LX-2

**P<0.01 vs. group 2.

为了解决上述问题,进一步证实 HBx 蛋白是否能够活化 HSC 以及通过何种分子活化 HSC,本研究将 HBx-pcDNA3.1 转染入 L0₂ 肝细胞株,构建了稳定转染 HBx 的 L0₂-HBx 细胞株,以 Western Blot 实验检测鉴定。为确定 HBx 蛋白对 HSC 是否有活化功能,本研究将 L0₂-HBx 细胞株的条件培养基孵育 LX-2 细胞,模拟体内感染了 HBV 的肝细胞对 HSC 的影响,检测 HSC 活化标志物α-SMA 和 NOX4 的蛋白表达。为了更好地模拟人感染 HBV 后,肝细胞与 HSC 所发生的病理生理过程,本课题的研究对象区别于以往国内外所使用的 HepG2、SMMC-7721 等肝癌细胞株,以具有正常肝细胞形态功能的 L0₂ 肝细胞株以及人正常肝星状细胞 LX-2 细胞株为研究对象。实

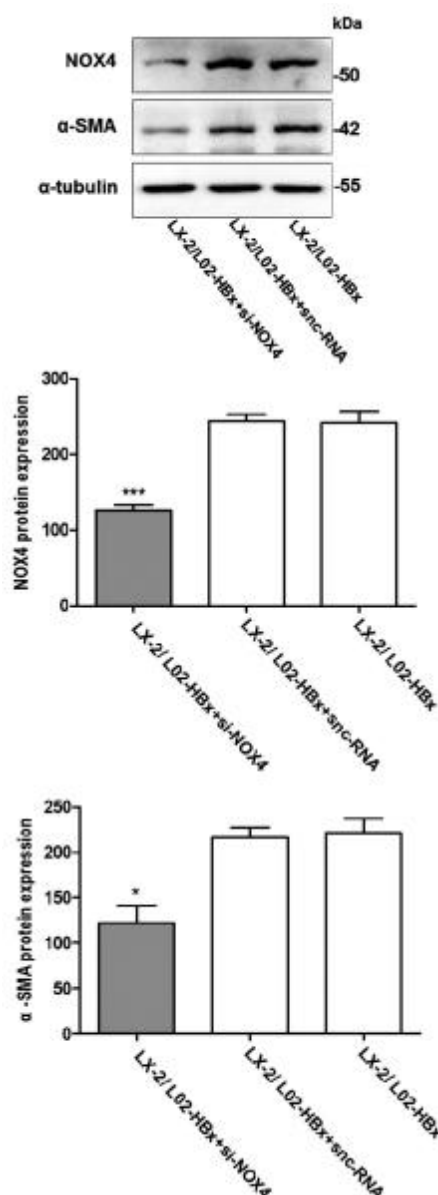


图3 敲减 NOX4 对肝星状细胞中α-SMA 蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of NOX4 expression knockdown on the α-SMA expression in

LX-2 cells

*P<0.05 vs. group 2.

验结果显示:L0₂-HBx 细胞条件培养基孵育的 LX-2 细胞中,α-SMA 和 NOX4 的蛋白表达明显高于对照组,说明表达 HBx 蛋白的肝细胞可以通过旁分泌的方式上调 NOX4 和活化 HSC,从而促进肝纤维化的发生。

为了进一步明确 NOX4 在乙肝相关的肝纤维化中所发挥的作用,本研究采用 si-NOX4 干扰了 L0₂-HBx 条件培养基孵育的 LX-2 细胞后,检测其表达及活化情况。Western Blot 结果表明,随着 NOX4 蛋白表达的下调,HSC 活化标志物α-SMA 的表达也部分地下调了,这表明 NOX4 在 HSC 的活化中发挥了一定作用。

本研究从新的视角探索了乙肝相关的肝纤维化发生发展

机制,为肝纤维化的临床治疗提供了一定的实验依据。为揭示 HBx 蛋白通过 NOX4 促进 HSC 的具体信号通路与分子机制,也尚需进行更深入的实验研究。此外,由于本研究实施于体外细胞培养体系,故其结论有待进一步的动物实验进一步加以验证。

参考文献(References)

- [1] Sun M, Kisseleva T. Reversibility of liver fibrosis[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015, 39(Suppl 1): S60-63
- [2] Li Y, Huang YS, Wang ZZ, et al. Systematic review with meta-analysis: the diagnostic accuracy of transient elastography for the staging of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016, 43(4): 458-469
- [3] Feng GX, Li J, Yang Z, et al. Hepatitis B virus X protein promotes the development of liver fibrosis and hepatoma through downregulation of miR-30e targeting P4HA2 mRNA [J]. *Oncogene*, 2017, 36(50): 6895-6905
- [4] Al-Qahtani AA, Al-Anazi MR, Nazir N, et al. Hepatitis B virus (HBV) X gene mutations and their association with liver disease progression in HBV-infected patients[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(62): 105115-105125
- [5] Gong J, Tu W, Han J, et al. Hepatic SATB1 induces paracrine activation of hepatic stellate cells and is upregulated by HBx [J]. *Sci Rep*, 2016, 24(6): 37717
- [6] Salarnia F, Besharat S, Zhand S, et al. Mutations in Hepatitis-B X-Region: Chronic Hepatitis-B versus Cirrhosis [J]. *J Clin Diagn Res*, 2017, 11(3): Oc31-oc34
- [7] Chen HY, Chen ZX, Huang RF, et al. Hepatitis B virus X protein activates human hepatic stellate cells through upregulating TGFbeta1[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(4): 8645-8656
- [8] Guo GH, Tan DM, Zhu PA, et al. Hepatitis B virus X protein promotes proliferation and upregulates TGF-beta1 and CTGF in human hepatic stellate cell line, LX-2 [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009, 8(1): 59-64
- [9] Kapoor NR, Chadha R, Kumar S, et al. The HBx gene of hepatitis B virus can influence hepatic microenvironment via exosomes by transferring its mRNA and protein[J]. *Virus Res*, 2017, 240: 166-174
- [10] Fayed MR, El-Naga RN, Akool ES, et al. The potential antifibrotic impact of apocynin and alpha-lipoic acid in concanavalin A-induced liver fibrosis in rats: Role of NADPH oxidases 1 and 4 [J]. *Drug Discov Ther*, 2018, 12(2): 58-67
- [11] Gan D, Zhang W, Huang C, et al. Ursolic acid ameliorates CCl4-induced liver fibrosis through the NOXs/ROS pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2018[Epub ahead of print]
- [12] Luangmonkong T, Suriguga S, Mutsaers HAM, et al. Targeting Oxidative Stress for the Treatment of Liver Fibrosis [J]. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2018[Epub ahead of print]
- [13] Kweon SM, Chi F, Higashiyama R, et al. Wnt Pathway Stabilizes MeCP2 Protein to Repress PPAR-gamma in Activation of Hepatic Stellate Cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0156111
- [14] Loffredo L, Del Ben M, Perri L, et al. Effects of dark chocolate on NOX-2-generated oxidative stress in patients with non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016, 44(3): 279-286
- [15] Shi H, Shi A, Dong L, et al. Chlorogenic acid protects against liver fibrosis in vivo and in vitro through inhibition of oxidative stress[J]. *Clin Nutr*, 2016, 35(6): 1366-1373
- [16] Slagle BL, Andrisani OM, Bouchard MJ, et al. Technical standards for hepatitis B virus X protein (HBx) research[J]. *Hepatology*, 2015, 61(4): 1416-1424
- [17] Slagle BL, Bouchard MJ. Role of HBx in hepatitis B virus persistence and its therapeutic implications[J]. *Curr Opin Virol*, 2018, 30: 32-38
- [18] Ali A, Abdel-Hafiz H, Suhail M, et al. Hepatitis B virus, HBx mutants and their role in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(30): 10238-10248
- [19] Huang XY, Li D, Chen ZX, et al. Hepatitis B Virus X protein elevates Parkin-mediated mitophagy through Lon Peptidase in starvation[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 368(1): 75-83
- [20] Xie X, Xu X, Sun C, et al. Hepatitis B virus X protein promotes proliferation of hepatocellular carcinoma cells by upregulating miR-181b by targeting ING5[J]. *Biol Chem*, 2018, 399(6): 611-619
- [21] Yeom S, Jeong H, Kim SS, et al. Hepatitis B virus X protein activates proteasomal activator 28 gamma expression via upregulation of p53 levels to stimulate virus replication [J]. *J Gen Virol*, 2018, 99(5): 655-666
- [22] Zheng BY, Gao WY, Huang XY, et al. HBx promotes the proliferative ability of HL7702 cells via the COX2/Wnt/betacatenin pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(6): 8432-8438
- [23] Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. *Compr Physiol*, 2013, 3(4): 1473-1492
- [24] Kordes C, Sawitzka I, Gotze S, et al. Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(12): 5503-5515
- [25] Cummins CB, Wang X, Nunez Lopez O. Luteolin-Mediated Inhibition of Hepatic Stellate Cell Activation via Suppression of the STAT3 Pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6)[Epub ahead of print]
- [26] Martin-Vilchez S, Sanz-Cameno P, Rodriguez-Munoz Y, et al. The hepatitis B virus X protein induces paracrine activation of human hepatic stellate cells[J]. *Hepatology*, 2008, 47(6): 1872-1883
- [27] Liang S, Kisseleva T, Brenner DA. The Role of NADPH Oxidases (NOXs) in Liver Fibrosis and the Activation of Myofibroblasts [J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 17
- [28] Paik YH, Kim J, Aoyama T, et al. Role of NADPH oxidases in liver fibrosis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(17): 2854-2872
- [29] Sancho P, Mainez J, Crosas-Molist E, et al. NADPH oxidase NOX4 mediates stellate cell activation and hepatocyte cell death during liver fibrosis development[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45285
- [30] Lan T, Kisseleva T, Brenner DA. Deficiency of NOX1 or NOX4 Prevents Liver Inflammation and Fibrosis in Mice through Inhibition of Hepatic Stellate Cell Activation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0129743