

乙肝病毒感染导致 Mre11 下调及基因组断裂

刘煜^{1,2}, 杨小丽², 侯宁波¹, 赵帆¹, 张艳红¹, 袁静³, 何湘^{1,3*}, 钟辉^{1*}

(¹军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

(²武警总医院肝移植科, 北京 100039)(³军事医学科学院疾病预防控制研究所, 北京 100071)

摘要:【目的】乙肝病毒的持续感染与肝细胞癌的发生密切相关。本文探讨了乙肝病毒感染后导致宿主蛋白 Mre11 的变化, 并研究这种蛋白的变化可能导致肝癌发生的机制。【方法】本文通过 Western blot 检测了乙肝病毒感染 HL7702 细胞及肝癌组织标本的 Mre11 蛋白的变化, 并且通过 RNA 干涉的方法干扰了 Mre11 的表达, 用连接介导 PCR 检测基因组的变化。【结果】本研究发现乙肝病毒感染细胞导致 Mre11 表达下调, 肝癌组织也可以发现 Mre11 表达下调; 下调 Mre11 表达可以导致细胞基因组的断裂增多。【结论】HBV 感染导致 Mre11 表达下调导致基因组不稳定, 这可能与 HBV 感染导致细胞恶性转化相关。

关键词: 乙肝病毒; 肝细胞癌; Mre11; DNA 损伤修复

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 08-1031-04

原发性肝癌为临床常见的恶性肿瘤之一, 原发性肝癌的病因和发病机制尚未完全确定。流行病学调查发现肝癌高发区人群的 HBsAg 阳性率高于低发区, 而且肝癌患者血清 HBsAg 及其他乙型肝炎标志的阳性率可达 90%, 显著高于健康人群, 提示乙型肝炎病毒与肝癌高发有关。目前的研究发现, 乙肝病毒导致肝癌发生的因素包括以下几个方面: 乙肝病毒的基因组整合于宿主细胞的染色体^[1]; 此外, 乙肝病毒可以作用于机体内多种转录因子如 RNA 多聚酶 RPB5^[2]、TATA 结合蛋白^[3]、锌指蛋白 bZIP^[4]、抑癌蛋白 p53^[5] 等; 另外, 乙肝病毒还能作用于多种维持宿主细胞生命活动的重要蛋白如丝氨酸蛋白酶 TL2 和细胞 DNA 修复蛋白^[5]。这些相互作用激活了如 MAPK、蛋白激酶 C、Jak1-STAT 及核因子 NF- κ B 等细胞中多种重要的信号转导通路, 直接影响肝癌的发生^[7, 8]。尽管如此, 有关乙肝病毒参与肝细胞癌发生的确切分子机制尚未明了, 至今仍是该领域研究的热点之一。

肿瘤细胞具有核异质性的特征, 这种现象主要是

由于染色体的不稳定导致染色体的倍数改变造成的。正常的细胞中存在完整 DNA 损伤修复功能, 因而能够保证细胞基因组染色体的完整性和稳定性。本文报道了乙肝病毒感染后细胞内 DNA 损伤修复蛋白之一—Mre11 (减数分裂重组蛋白 11, Meiotic Recombination 11) 表达的变化, 并且检测了乙肝导致的原发性肝癌肿瘤细胞中的 Mre11 变化, 此外对 Mre11 缺失导致肿瘤的机制进行了初步探索。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、感染用 HBV 阳性血清及肝细胞癌标本: 人正常肝细胞株 HL-7702 购自上海细胞所。感染用 HBV 阳性血清来自武警总医院检验科, 经荧光定量 PCR 检测其 HBV 含量为 10^7 /mL。正常肝脏组织、肝细胞癌组织来自武警总医院肝移植科。

1.1.2 主要试剂和仪器: Mre11 抗体、HRP 标记的羊抗兔抗体分别购自 abnova、中杉公司。 γ -³²P 购自福

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30772605, 30700413); 武警总医院资助项目(WZ200515)

*通讯作者。Tel: +86-10-66931809; E-mail: hexiang_spring@yahoo.com

作者简介: 刘煜(1972-), 男, 吉林省长春市, 副主任医师, 研究方向为肝癌发生机制。E-mail: liuyu08@yahoo.com

收稿日期: 2008-01-30; 修回日期: 2008-04-22

瑞公司。小干扰 RNA 由 Invitrogen 公司合成。引物合成及测序由奥科公司完成。半干转膜仪购自 Bio-Red 公司。显色液购自 PerkinElmer Life Sciences 公司。

1.2 细胞培养与感染

HL-7702 细胞用含 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 1640 培养基在 CO₂ 含量为 5% 的 37 °C 孵箱中培养, 采用消化法进行细胞传代。传代后待细胞长至培养皿底面积约 70% 时, 换用添加 HBV 阳性血清的感染培养基培养。在感染后 0.5、3、6、9、12、24 h 分别取样。

1.3 Western blot 检测

将处理过或未处理过的细胞消化后离心收集, 根据细胞数量加入适量 SDS-上样缓冲液, 混合均匀后, 沸水中煮 5 min 制成蛋白样品。Western blot 检测按常规操作。一抗用 Mre11 抗体, 按 1 : 10000 稀释。二抗为羊抗兔, 稀释度为 1 : 5000。

1.4 RNA 干涉

RNA 干涉的靶序列选择按照文献中的设计原则^[9]。siRNA 靶序列选择根据 Mre11 序列 (GeneBank 编号 AF-073362) 进行设计, 设计后通过 NCBI-BLAST 比对, 与其它序列相同的碱基不超过 15 个。RNA 合成及退火由 Invitrogen 公司完成, 命名为 siMre11。siRNA 转染时采用 Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Inc.) 转染试剂, 严格按照转染试剂说明书进行操作。

1.5 连接介导 PCR (Ligation Mediated PCR, LM-PCR)

LM-PCR 操作方法参考文献^[10]。10 cm 细胞培养皿中的细胞转染 siRNA 6 h 后, pRep4-hairpin 质粒转染细胞。第 4 天收细胞, 用 Promega 质粒小提试剂盒提取 pRep4-hairpin 质粒, 定量后, 取相同量的质粒加入 100 pmol 的接头, 16°C 接头连接过夜。用接头上的 DR20 (5'-GCTATGTACTACCCGGGAATTCG-TG-3') 作为上游引物, 以质粒上的一段序列 (p506 : 5'-CGTGTGAGATGGACATCCAGTCTTT-3') 作为下游引物, 对连接产物进行 PCR, 条件如下: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 16 个循环。PCR 产物进行 Southern 鉴定。

2 结果

2.1 HBV 感染后 Mre11 表达量的变化

HBV 感染 HL7702 细胞后, 在不同的时间点取样, Western blot 检测 Mre11 表达水平的变化。Tubulin 作为等量上样的标准, 从图 1 中看到 Tubulin 表达水

平基本一致。另外也可以看到, HBV 感染细胞后, Mre11 表达水平从 0.5 h 开始降低, 6 h 基本上看不到 Mre11 的表达, 12 h 后开始恢复, 但表达水平仍然低于未感染细胞组。而用正常人血清感染的对照组, 在各个时间段 Mre11 均未发生变化 (结果未给出)。

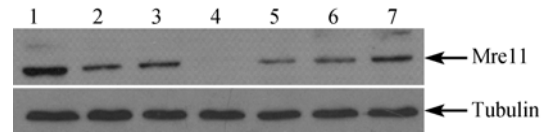


图 1 HBV 感染后 Mre11 表达水平降低

Fig. 1 Mre11 downregulation in HBV infected HL7702. 1. Infection with normal human serum; 2-7. Infection with HBV infected human serum, the cell was collected after 0.5 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h, respectively.

2.2 肝癌组织中 Mre11 表达量的变化

肝脏组织匀浆后, Western blot 检测 Mre11 的表达水平。图 2 上图是肝癌标本或正常肝组织 Mre11 表达水平, 下图以 Tubulin 为等量上样的标准, 从图中可以看到与正常组织相比, 部分病人的肝癌组织中的 Mre11 表达量降低。

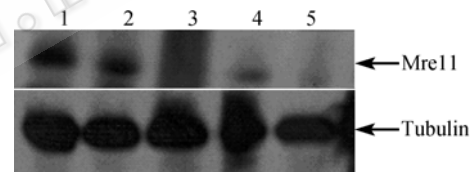


图 2 乙肝病人肝脏肿瘤组织 Mre11 表达水平降低

Fig. 2 Mre11 downregulation in hepatocellular carcinoma tissue. 1. Normal liver tissue; 2-5. Hepatocellular carcinoma tissue from different patients.

2.3 siRNA 干扰 Mre11 的表达

从上述结果中, 我们可以看到 HBV 感染可以导致宿主细胞 Mre11 下调。为了研究 Mre11 下调对细胞表型的影响, 本研究人为的下调了 Mre11 的表达。因为 Mre11 缺失是致死性突变, 所以本研究采用了

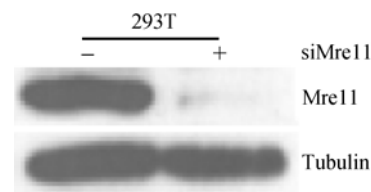


图 3 用 RNA 干涉方法下调 Mre11 的表达

Fig. 3 Mre11 downregulation by RNA interference. -: 293T cell transfected with control siRNA; +: 293T cell transfected with Mre11 specific siRNA.

RNA 干扰的方法降低 Mre11 在 293T 细胞中的表达, 结果显示(图 3), 转染 siMre11 后, 细胞中的 Mre11 的表达量显著减少, RNA 干扰的效率达到 90% 以上, 证明我们成功的干扰了 Mre11 的表达。

2.4 Mre11 对基因组稳定性的影响

在基因组序列中有大量的回文序列 (Palindrome), 回文序列易形成发卡结构, 这些发卡结构可以减慢复制的速度, 是复制过程中的突变热点。在复制的过程中, 细胞中的核酸内切酶将发卡结构切断, 本研究在 pRep4 质粒上构建了发卡结构, pRep4 质粒可以在真核细胞中复制, 它在细胞中的复制模拟了基因组的复制, 而且 pRep4 质粒相对于基因组而言背景简单, 便于研究。如果复制过程中有双链 DNA 断裂 (DNA Double Strand Breaks, DSBs) 的产生, 加入的接头便可以连接到 DNA 断端, 按照接头上的序列及质粒上的特定序列设计引物进行 PCR, 所以被称为连接介导 PCR (Ligation mediated PCR, LM-PCR), PCR 产物电泳后转膜进行 Southern blot 检测, 进一步放大信号, 将微观的 DNA 断裂用直观的方法体现出来。我们采用 Ligation mediated PCR 检测了缺失 Mre11 的细胞在复制的过程中是否产生了更多的、不可修复的断裂。从图 4 中可以看到与对照细胞相比, Mre11 表达下调的细胞在复制过程中产生了更多的断裂。

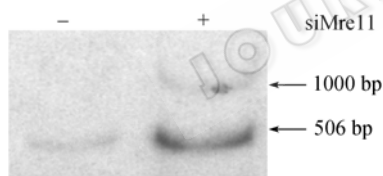


图 4 Mre11 下调后, 细胞内发生了更多的 DNA 断裂
Fig. 4 After Mre11 downregulation by RNA interference, more double strand break was detected by LM-PCR. -: 293T cell transfected with control siRNA; +: 293T cell transfected with Mre11 specific siRNA.

3 讨论

目前乙肝病毒参与肝细胞癌发生的分子机制尚不清楚, 本文探讨了乙肝病毒感染引起肝癌发生的可能机制。

首先, 用 HBV 病人血清感染 HL7702 细胞, 通过 Western blot 检测我们发现 HBV 可以降解细胞中 Mre11。MRN 复合物 (Mre11-Rad50-Nbs1 复合物) 在 DNA 损伤修复途径中扮演了重要的角色^[11, 12]。而

Mre11 是 MRN 复合物中组成成份之一。复合物中的 Mre11 突变, 会导致毛细血管扩张共济失调样疾病 (Ataxia-telangiectasia-like disease, ATLD), 疾病表现为发育迟缓, 小脑退行性变, 免疫缺陷, 癌症易感等, 从病人体内分离的细胞表现为对导致 DSBs 的药物及离子照射超敏感, 染色体不稳定等。

有报道指出 Mre11 多态性与微卫星不稳定的结肠癌患者、胃癌及子宫内膜癌相关^[13]。Mre11 与肝癌的发生有无关系尚未见报道。因此, 本研究观察了 HBV 感染导致的肝脏肿瘤中 Mre11 表达量的变化, 如结果部分所述, 肿瘤患者的肝癌组织中的 Mre11 表达下调。

Mre11 是致死型突变, 为了研究复合物的功能, 在我们的研究中采用了 RNA 干扰的方法下调 Mre11 的表达。根据 siRNA 设计原则设计了 Mre11 特异的小干扰 RNA (siMre11), 并在 293T 细胞中验证了 Mre11 的干扰效率。接着本文探讨了 Mre11 在维持基因组的稳定性方面所发挥的作用。用 LM-PCR 这种敏感而且特异的方法我们检测到 Mre11 及其核酸酶活性受损后, 细胞产生了更多的未修复的断裂。那么这些断裂可能会导致染色体易位, 染色体数目的异常, 最终导致细胞的恶性转化。

因此可以认为乙肝病毒感染会导致细胞内 Mre11 表达下降, 并且肝癌组织中也存在 Mre11 表达异常的现象。Mre11 表达下降是导致肿瘤发生的主要原因之一。

参 考 文 献

- [1] Cougot D, Neuveut C, Buendia MA. HBV induced carcinogenesis. *J Clin Virol*, 2005, 34(Suppl 11): S75-78.
- [2] Le TT, Zhang S, Hayashi N, et al. Mutational analysis of human RNA polymerase II subunit 5 (RPB5): the residues critical for interactions with TFIIF subunit RAP30 and hepatitis B virus X protein. *J Biochem*, 2005, 138(3): 215-224.
- [3] Qadri I, Maguire HF, Siddiqui A. Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(4): 1003-1007.
- [4] Perini G, Oetjen E, Green MR. The hepatitis B pX protein promotes dimerization and DNA binding of cellular basic region/leucine zipper proteins by targeting the conserved basic region. *J Biol Chem*, 1999, 274(20): 13970-13977.
- [5] Chung TW, Lee YC, Ko JH, et al. Hepatitis B Virus X protein modulates the expression of PTEN by inhibiting the function of p53, a transcriptional activator in liver cells. *Cancer Res*, 2003, 63(13): 3453-3458.

- [6] Lee AT, Ren J, Wong ET, *et al.* The hepatitis B virus X protein sensitizes HepG2 cells to UV light-induced DNA damage. *J Biol Chem*, 2005, 280(39): 33525–33535.
- [7] Bouchard MJ, Wang L, Schneider RJ. Activation of focal adhesion kinase by hepatitis B virus HBx protein: multiple functions in viral replication. *J Virol*, 2006, 80(9): 4406–4414.
- [8] Han JQ, Ding LH, Yuan B, *et al.* The estrogen receptor variant lacking exon 5 and Hepatitis B virus X protein inhibit estrogen receptor signaling in hepatoma cells. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(10): 3095–3106.
- [9] Elbashir SM, Harborth J, Weber K. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 2002, 26(2): 199–213.
- [10] Roth DB, Zhu C, Gellert M. Characterization of broken DNA molecules associated with V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(22): 10788–10792.
- [11] van den Bosch M, Bree RT, Lowndes NF. The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep*, 2003, 4(9): 844–849.
- [12] Abraham RT, Tibbetts RS. Guiding ATM to Broken DNA. *Science*, 2005, 308(5721): 510–511.
- [13] Ottini L, Falchetti M, Saieva C, *et al.* MRE11 expression is impaired in gastric cancer with microsatellite instability. *Carcinogenesis*, 2004, 25(12): 2337–2343.

HBV infection downregulated Mre11 expression and induced genome instability

Yu Liu^{1,2}, Ningbo Hou¹, Fan Zhao¹, Yanhong Zhang¹, Jing Yuan³, Xiang He^{1,3*}, Hui Zhong^{1*}

¹Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100850, China

²The General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Department of Liver Transplantation, Beijing 100039, China

³Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: [Objective] Prolonged infection with Hepatitis B virus (HBV) has been recognized as a major factor for hepatocellular carcinoma (HCC). In this study, we studied the host protein Mre11 fluctuations after HBV infection which might be eventually contributed to cell transformation. **[Methods]** Western Blot was monitored to detect the expression of Mre11, and RNA interference was used to downregulate protein expression. Then, Ligation mediated PCR was used to detect the level of DNA double strand breaks. **[Results]** Mre11 protein was downregulated when HBV infection occurred, and the downregulated expression was also seen in HCC tissue. By RNA interference, we found that Mre11 knockdown caused DNA instability. **[Conclusion]** Mre11 expression downregulation contributed at least partially to cell transformation caused by HBV infection.

Keywords: Hepatitis B virus; hepatocellular carcinoma; Mre11; DNA damage repair

Supported by the National Science Foundation of China (30772605, 30700413) and the General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces Foundation (WZ200515)

*Corresponding author. Tel: +86-10-66931809; E-mail: hexiang_spring@yahoo.com

Received: 30 January 2008/ Revised: 22 April 2008

2008年起《微生物学报》改为月刊

自2004年《微生物学报》改为大开本(8个印张128页)以来,已经连续两次扩版(2005~2006年为160页,2007年为176页),发表周期有了明显的缩短。但是,由于近年来稿量不断增长,发表周期不得不再度延长,目前的双月刊已无法满足广大作者和读者的需要。为了加快科技信息更新速度,与国际接轨,在编辑部提议下,经主办单位同意并报主管部门正式批准,本刊自2008年开始将1989年以来一直沿用了19年的双月刊改为月刊,发行日是每月的4日。

希望广大作者和读者一如既往地支持《微生物学报》!