

· 论 著 ·

## HBV 对肝癌细胞中 MIA2 表达的影响\*

姚文瞰<sup>1,2</sup>, 杨少奇<sup>2△</sup>, 杨力<sup>2</sup>, 何芳<sup>2</sup>, 杨花<sup>1,2</sup>

(1. 宁夏医科大学, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学附属总医院消化内科, 银川 750004)

**摘要:**目的 探讨黑色素瘤抑制蛋白 2(MIA2)在肝癌细胞中的表达水平与乙型肝炎病毒(HBV)感染状态的关系。方法 培养人肝癌细胞株 HepG2 和持续表达乙肝病毒的人肝癌细胞株 HepG2.2.15, 采用细胞免疫组织化学和蛋白免疫印迹检测(Western blotting)2 种细胞株中 MIA2 蛋白表达水平差异。结果 MIA2 蛋白在 HepG2.2.15 细胞株中的表达水平较 HepG2 细胞株减低, 差异有统计学意义。结论 MIA2 蛋白在 HBV 阳性肝癌细胞中表达水平减低, 提示 HBV 感染可能通过抑制 MIA2 的表达导致肝癌发生。

**关键词:** MIA2; 肝炎, 乙型; 肝肿瘤; 免疫组织化学; 印迹法; 蛋白质

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.16.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)16-1804-02

## Effect of HBV on MIA2 expressions in HCC cells\*

Yao Wentun<sup>1,2</sup>, Yang Shaoqi<sup>2△</sup>, Yang Li<sup>2</sup>, He Fang<sup>2</sup>, Yang Hua<sup>1,2</sup>

(1. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Department of

Gastroenterology, the General Hospital of Ningxia University, Yinchuan 750004, China)

**Abstract: Objective** To investigate the relationship of the MIA2 expression in hepatoma cells with HBV infection status. **Methods** Cultured HBV-negative and HBV-positive hepatoma cell lines HepG2 and HepG2.2.15 cells, to investigate MIA2 protein expression differences in two cell lines by immunohistochemistry and Western blot analysis. **Results** The MIA2 protein expression level reduced in the HepG2.2.15 cell line compared with HepG2 cell line, the result was statistically difference. **Conclusion** MIA2 protein expression in HBV-positive liver cancer cells reduced. The results indicate a possibility that HBV infection may lead to liver cancer through inhibiting MIA2 expression.

**Key words:** MIA2; hepatitis B; liver neoplasms; immunocytochemistry; blotting, Western

黑色素瘤抑制蛋白 2(melanoma inhibitory activity 2, MIA2)是近年发现的 MIA 家族的新成员<sup>[1]</sup>, MIA 家族的其他成员包括 MIA、OTOR、TANGO<sup>[2-4]</sup>。Bossert 等<sup>[1]</sup>对人和小鼠的研究表明 MIA2 特异性地表达于肝脏组织中, 在睾丸组织中有极少量表达。Hellerbrand 等<sup>[5]</sup>研究显示 MIA2 是一个能够抑制肝癌生长和侵袭的抑癌基因。慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染是引发肝纤维化和肝细胞癌的首要原因<sup>[6]</sup>。中国是世界肝癌第一大国, 肝癌的发生与 HBV 感染关系密切<sup>[7]</sup>。HBV 是否通过影响 MIA2 的表达来调控肝癌发生与进展缺乏研究。本文通过检测不同 HBV 表达水平肝癌细胞株中 MIA2 的表达差异, 初步探讨 HBV 感染与 MIA2 表达在肝癌发生、发展中的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** HepG2 细胞株由本院中心实验室冻存, HepG2.2.15 细胞株由北大人民医院肝病研究所赠送。胎牛血清、DMEM 高糖培养基购自 Hyclone 公司, Anti-MIA2 购自美国 Abcam 公司, SP 系列免疫组织化学及 DAB 染色试剂盒购自北京中杉金桥公司, 全蛋白提取试剂盒及蛋白定量试剂盒购自南京凯基生物公司, 内参抗体及羊抗兔二抗购自北京博奥森生物技术公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基、在 50 mL/L CO<sub>2</sub>、37 °C 饱和湿度条件下培养细胞, 每 3~5

天用 0.25% 胰酶消化传代。

**1.2.2 免疫细胞化学** 将 24 孔细胞爬片置于 6 孔培养板内, 培养细胞于爬片上, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.5% Trion-X-100 破膜 20 min, 一抗(30 μg/mL)4 °C 过夜, 其余步骤参照中杉金桥公司 SP 系列免疫组织化学及 DAB 染色试剂盒说明书步骤完成, 显微镜下观察细胞并拍照。

**1.2.3 蛋白质印迹法检测(Western blotting)** 培养细胞于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶, 使用细胞刮刀刮取细胞, 参照凯基全蛋白提取及蛋白定量试剂盒说明书步骤完成细胞全蛋白提取和 BCA 法蛋白定量, SDS-PAGE 系统电泳、半干法转膜、5% 脱脂奶粉常温封闭 2 h, 一抗兔抗人 Anti-MIA2 多克隆抗体(0.2 μg/mL)、兔抗人 Anti-β-actin 多克隆抗体(1:700)4 °C 孵育过夜, 室温下复温 1 h, HRP 标记羊抗兔二抗(1:2000)室温孵育 2 h, 滴加化学发光底物, 暗室曝光洗片, 拍照扫描分析。

## 1.3 观察指标

**1.3.1 细胞免疫组织化学检测** 以细胞质中显示清晰棕黄或棕褐色细颗粒为阳性, 结果判定参照文献<sup>[8]</sup>采用半定量积分法: 高倍镜下连续观察 5 个高倍镜视野, 以阳性细胞数所占比例小于 5% 为 0 分, 5%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, 大于 75% 为 4 分。染色强度: 以无染色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 黄或深黄色为 2 分, 褐色或棕褐色为 3 分。2 项积分相乘大于 4 分为阳性。

**1.3.2 Western blotting 检测** 应用 BiospectrumAC 凝胶成

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81060194)。 作者简介: 姚文瞰(1978~), 硕士研究生在读, 主要从事消化道肿瘤的研究。

△ 通讯作者, Tel: 13995218678; E-mail: shaoqiyh@hotmail.com。

像分析系统扫描照相保存图片。

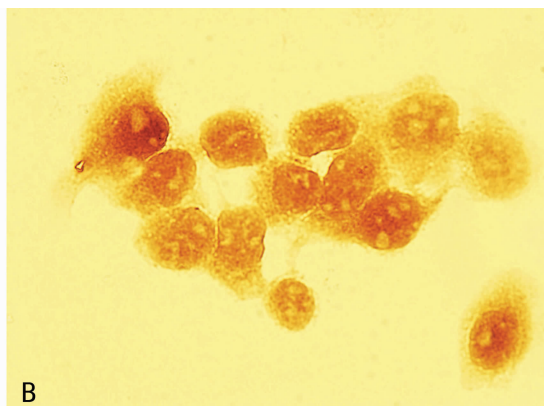
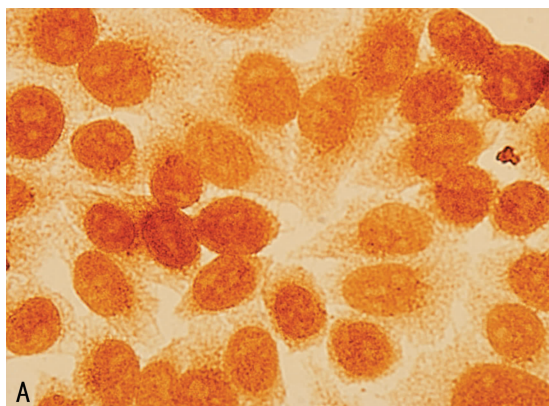
**1.4 统计学处理** 采用 SPSS11.5 软件进行统计学处理。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,进行方差齐性检验,方差齐者,用独立样本资料的 *t* 检验,若方差不齐,用非参数检验方法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 免疫细胞组织化学结果** MIA2 在 HepG2 及 HepG2.2.15 细胞中均为阳性表达,主要表达于细胞质和细胞核且以

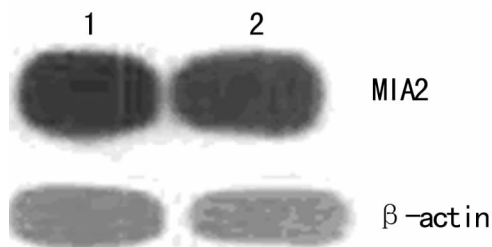
细胞核中显著,HepG2 和 HepG2.2.15 细胞中的积分分别为 9~12 分、6~9 分,见图 1。

**2.2 Western blotting 结果** 检测 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞中表达 MIA2 蛋白产物积分灰度值分别为  $(1.8 \pm 0.21)$  和  $(1.1 \pm 0.16)$ 。分析 2 条带的积分灰度值显示,HepG2.2.15 细胞中 MIA2 蛋白表达较 HepG2 细胞中减低(图 2),经统计学分析,方差齐,用独立样本的 *t* 检验,两组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



A: HepG2 细胞中出现棕黄和棕褐色颗粒; B: HepG2.2.15 细胞中出现黄色及棕黄色颗粒。

图 1 肝癌细胞株 HepG2 和 HepG2.2.15 中 MIA2 蛋白表达(IHC, ×100, DAB 染色)



1: HepG2 细胞; 2: HepG2.2.15 细胞。

图 2 Western blotting 检测 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞中 MIA2 和  $\beta$ -actin 蛋白表达

**3 讨论**

MIA2 是 Bosserhoff 等<sup>[1]</sup>发现的 MIA 家族中的一个新成员,在人类的 14q13.4 号染色体的基因位点上被标记出来。Hellerbrand 等<sup>[9]</sup>研究结果显示 MIA2 在肝癌组织中的表达信号较非肿瘤肝组织中明显减低,同时研究发现 MIA2 mRNA 在肝癌组织中表达较癌旁组织中减低( $P < 0.05$ )。杨帅等<sup>[10]</sup>对乙型肝炎后肝癌的研究显示 MIA2 在肝癌组织中表达明显低于癌旁组织( $P < 0.05$ ),且与肝癌的 TNM 分期、病理分级及肿瘤转移有关,提示 MIA2 的低表达可能导致肝癌细胞浸润转移。本研究采用细胞免疫组织化学和 Western blotting 方法检测 2 种肝癌细胞株中 MIA2 蛋白表达水平的差异,结果显示 MIA2 在 HepG2.2.15 细胞中的表达水平较 HepG2 细胞中减低,提示 HBV 促进肝癌细胞增殖和发生、发展与抑制 MIA2 的表达有关。细胞免疫组织化学结果亦显示,MIA2 在肝癌细胞的胞质和胞核中均有表达且以胞核中显著,说明 MIA2 的表达存在核转位现象,MIA2 的核转位现象尚未见报道。

HBV 在肝炎、肝硬化和由 HBV 感染引起的肝癌中起着重要的作用,可以促进细胞周期进程,使负性生长调节因子失活,结合并抑制 p53 及其他肿瘤抑制基因以及衰老相关因子,

其促进细胞周期进程、加速细胞周期转化的作用与激活 MAPK、JNK、Src 激酶等信号传导通路有关<sup>[11-13]</sup>。Hellerbrand 等<sup>[5]</sup>研究认为,MIA2 在肝癌组织中表达下调的原因与 MIA2 启动子区 HNF-1 结合位点的变异或 HNF-1 转录因子的缺失引起的 MIA2 转录下调以及肝癌组织中 TGF- $\beta$  信号通路发生障碍有关。Xu 等<sup>[14]</sup>的研究认为 HBV 促进肝癌细胞的增殖和肝癌的进展与 HBx 蛋白抑制 MIA2 的表达有关。最近有研究发现,抑癌基因可以通过泛素化进入核内,与 p53 形成核内复合体,后者抑制 p53 降解并增加 p53 的转录活性;也可以下调 Cyclin D1 水平并阻止 MAPK 的磷酸化<sup>[15]</sup>。HBV 抑制 MIA2 的表达与上述通路的关系,值得进一步研究探索,MIA2 对细胞功能的影响及其核转位和发挥抑癌作用的机理也是进一步研究的课题。

**参考文献:**

[1] Bosserhoff AK, Moser M, Scholmerich J, et al. Specific expression and regulation of the new melanoma inhibitory activity-related gene MIA2 in hepatocytes[J]. J Biol Chem, 2003, 278(17):15225-15231.  
 [2] Bogdahn U, Apfel R, Hahn M, et al. Autocrine tumor cell growth inhibiting activities from human malignant melanoma[J]. Cancer Res, 1989, 49(41):5358-5363.  
 [3] Robertson NG, Heller S, Lin JS. A novel conserved cochlear gene, OTOR: identification, expression analysis, and chromosomal mapping[J]. Genomics, 2000, 66(3):242-248.  
 [4] Bosserhoff AK, Moser M, Buettner R. Characterization and expression pattern of the novel MIA homolog TANGO[J]. Gene Expr Patterns, 2004, 4(4):473-479.  
 [5] Hellerbrand C, Amann T, Schlegelman J, et al. The novel gene MIA2 acts as a tumour suppressor(下转第 1808 页)

良,免疫力下降,也增加感染风险<sup>[11]</sup>。因此,SAP 的早期肠内营养显得尤为重要。肠内食物的刺激距幽门越远对胰腺分泌的影响越小,90 cm 以上时对胰腺的分泌几乎无影响<sup>[12]</sup>。本研究中的 EN+PN 组患者在肠功能稍有恢复后,均采用在床旁纤维胃镜引导下放置鼻空肠管实施早期肠内营养,早期肠内营养的患者临床表现情况较 TPN 组有所改善,如腹痛程度、肠功能的完全恢复、机械通气时间等,这与 McClave 等<sup>[13]</sup>报道一致。同时,通过膀胱测压法检测的腹压无明显变化,可能与两组 SAP 患者腹腔渗出积液、肠壁水肿无法在早期消除有关。本研究早期肠内营养的患者清蛋白和体质指数是升高的,但升高并不明显,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。分析其原因是早期的肠内营养并不是以改善全身营养状态为主要目的,更重要的是它可对肠道的直接刺激促进肠动力和吸收功能的恢复,并且促进胆汁排空,减少细菌毒素移位、减少肠源性感染机会<sup>[14]</sup>。另外,从实验室检测结果来看,对于早期肠内营养的患者淀粉酶恢复正常的天数及 CRP 均降低,说明早期肠内营养对 SAP 是安全的,能改善细胞因子与炎症介质的释放,减轻全身炎症反应<sup>[15]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 费修才. X 线辅助鼻空肠管早期肠内营养治疗急性重症胰腺炎的疗效[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(7): 1084-1086.
- [2] 曾超,唐勇. 重症胰腺炎营养支持治疗的临床研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(17): 2332-2333.
- [3] 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 重症急性胰腺炎诊治指南[J]. 中华外科杂志, 2007, 45(11): 727-729.
- [4] Stephen AM, Robert GM, Vincent WV, et al. Guidelines for the provision and assessment of nutrition support therapy in the adult critically ill patient; Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A. S. P. E. N) [J]. JPEN, 2009, 33(3): 277-316.
- [5] 童智慧,李维勤,虞文魁,等. 重症急性胰腺炎患者在 X 线及内镜辅助下放置鼻空肠管的比较[J]. 肠外与肠内营养杂志, 2007, 14(3): 153-156.

- [6] Will U, Wanzar C, Gerlach R, et al. Interventional ultrasound-guided procedures in pancreatic pseudocysts, abscesses and infected necroses-treatment algorithm in a large single-center study [J]. Ultraschall Med, 2011, 32(2): 176-183.
- [7] 刘大为. 实用重症医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 669-682.
- [8] 吴玉连,董鑫,黄昌拼. 重症急性胰腺炎死亡相关因素分析[J]. 中华普通外科杂志, 2005, 2(11): 686-688.
- [9] Olah A, Romics L. Early enteral nutrition in acute pancreatitis benefits and limitations [J]. Langenbeck Arch Surg, 2008, 393(3): 261-269.
- [10] 吴丹,戴洪银,汪小燕. 不同早期营养支持疗法治疗重症急性胰腺炎的疗效比较[J]. 重庆医学, 2011, 40(18): 1834-1836.
- [11] Kazunori T, Tadahiro T, Yoshifumi K, et al. JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis medical management of acute pancreatitis [J]. Hepatobiliary Pancreat Surg, 2006, 13(1): 42-47.
- [12] Winter TA, Marks T, Callanan M, et al. Impaired pancreatic secretion in severely malnourished patients is a consequence of primary pancreatic dysfunction [J]. Nutrition, 2001, 17(3): 230-235.
- [13] McClave SA, Chang WK, Dhaliwal R, et al. Nutrition support in acute pancreatitis: a systematic review of the literature [J]. JPEN, 2006, 30(2): 143-156.
- [14] Martindale RG, McCarthy MS, McClave SA, et al. Guidelines for nutrition therapy in critical illness: are not they all the same? [J]. Minerva Anestesiol, 2011, 77(4): 463-467.
- [15] 黄洁,秦帅,毛恩强,等. 重症急性胰腺炎早期肠内营养的影响因素分析[J]. 国际外科学杂志, 2010, 37(3): 158-161.

(收稿日期: 2012-12-08 修回日期: 2013-01-30)

(上接第 1805 页)

- in hepatocellular carcinoma [J]. Gut, 2008, 57(2): 243-251.
- [6] Ocamo P, Opio CK, Lee WM. Hepatitis B virus infection: current status [J]. Am J Med, 2005, 118(10): 1413-1415.
- [7] 陆培新,王金兵,张启南,等. HbsAg 携带者黄曲霉素暴露与肝癌发生相关性分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(5): 324-327.
- [8] Half E, Tang XM, Gwyn K, et al. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer and adjacent ductal carcinoma in situ [J]. Cancer Res, 2002, 62(6): 1676-1681.
- [9] Hellerbrand C, Bataille F, Schlegel J, et al. In situ expression patterns of melanoma inhibitory activity 2 in healthy and diseased livers [J]. Liver Int, 2005, 25(3): 357-366.
- [10] 杨帅,杨少奇,杨力,等. 黑色素瘤抑制蛋白 2 和 VEGF 在肝癌中的表达及其临床意义[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2011, 32(2): 211-214.
- [11] Koike K, Moriya K, Yotsuyanagi H, et al. Induction of

cell cycle progression by hepatitis B virus HBx gene expression in quiescent mouse fibroblasts [J]. J Clin Invest, 1994, 94(1): 44-49.

- [12] Tang H, Oishi N, Kaneko S, et al. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein [J]. Cancer Sci, 2006, 97(7): 977-983.
- [13] Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(9): 1215-1219.
- [14] Xu Y, Yang Y, Cai Y, et al. The X protein of hepatitis B virus activates hepatoma cell proliferation through repressing melanoma inhibitory activity 2 gene [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 416(3): 379-384.
- [15] 谢彬彬,钟雪云. PTEN 核转位的研究进展[J]. 国际内科学杂志, 2008, 35(7): 411-414.

(收稿日期: 2012-12-08 修回日期: 2013-01-22)