

截断型突变体 HBx – Mut120 稳定表达 真核细胞系的建立

鲍艳婷 陈公英 王 洁 李 鸽 葛 柯

摘 要 **目的** 成功构建 HBx 及其截断型突变体 HBx – Mut120 的真核载体,建立了两者稳定表达的 HepG2 细胞系,并研究了目的基因对细胞生长的影响。**方法** 采用 PCR 扩增 HBx 及其截断型突变体 HBx – Mut120 基因,然后分别克隆到 PCMV – Tag2B 载体中,并构建成重组质粒 HBx – PCMV – Tag2B 和 HBx – Mut120 – PCMV – Tag2B,经过 PCR、酶切、测序鉴定重组质粒后,将其转染人肝癌细胞 HepG2,经 Game 418 筛选后得到稳定表达目的基因的 HepG2 细胞,最后通过 RT – PCR 和 Western blot 鉴定 HBx、HBx – Mut120 的 mRNA 和蛋白在 HepG2 细胞中的表达情况,并用流式细胞仪检测了各组细胞的周期。**结果** (1)成功构建目的基因表达载体 PCMV – Tag2B – HBx、PCMV – Tag2B – HBx – Mut120。(2)成功建立稳定表达 HBx 及其缺失片段的 HBx 蛋白的 HepG2 细胞系。(3)通过流式细胞仪检测各组细胞周期及对比,发现 HepG2 – HBx 细胞和 HepG2 – HBx – Mut120 细胞的生长分数($G_2 + S$)明显高于 HepG2 细胞及空载体转染的 HepG2 细胞。**结论** 本实验成功构建携带 HBx 及其截断型突变体 HBx – Mut120 基因的重组表达质粒,转染人肝癌细胞 HepG2 细胞后分别能够稳定表达 HBx 蛋白和截断型 HBx 蛋白,HBx 及其突变体稳转细胞后更能促进 HepG2 细胞的增殖,且突变型目的基因稳转细胞系转移能力较前明显增强。为进一步研究截断型 HBx 突变体在肝癌的发生、发展中的作用奠定了实验基础。

关键词 HBx 基因 HBx 蛋白 C 端截短型 HBx 突变体 HepG2 细胞

中图分类号 R575 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.04.013

Establishment of Truncated Mutant HBx – Mut120 Stably Expressing Eukaryotic Cell Lines. Bao Yanting, Chen Gongying, Wang Jie, et al. Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Zhejiang 310000, China

Abstract **Objective** To construct the eukaryotic expression vector HBx truncated mutant HBx – Mut120 and establish HepG2 cell line with its stable expression, and research the effect of target gene on cell proliferation. **Methods** HBx and its truncated mutant HBx – Mut120 gene were amplified by PCR and then cloned into the PCMV – Tag2B vectors to construct recombinant plasmids HBx – PCMV – Tag2B and HBx – Mut120 – PCMV – Tag2B. the recombinant genes were confirmed by PCR, restriction enzyme digestion and DNA sequencing before they transfected human hepatoma cell line HepG2. We got HepG2 cells expressing stably target gene selected by Game 418. Finally, the mRNA and protein expressions of HBx、HBx – Mut120 were determined by the reverse transcription – PCR and Western blotting. Cell cycles were analyzed by FCM flow cytometry. **Results** (1) The objective gene expression vectors PCMV – Tag2B – HBx, PCMV – Tag2B – HBx – Mut120 was constructed successfully. (2) The HepG2 cell line stably expressing HBx and deleted protein – HBx – Mut120 was successfully established. (3) Compared these cell cycles tested by cytometry instrument, we found that growth points ($G_2 + S$) of HepG2 – HBx and HepG2 – HBx – Mut120 were significantly higher than of HepG2 and HepG2 with empty vector transfection. **Conclusion** The HBx and the truncated mutant HBx – Mut120 gene recombinant plasmid were successfully constructed in the experiment, which transfected human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and are capable of expressing HBx protein and the truncated protein stability. That provides the experimental basis for further studying the role of truncated HBx mutants in the occurrence and development of HCC.

Key words HBx; HBx protein; C terminal truncated HBx mutants; HepG2 cells

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y210435);2014 年第一批留学回国人员(团队)在杭创业基金资助项目(ZX13002017002005)

作者单位:310000 杭州师范大学附属医院肝病科(鲍艳婷、陈公英、王洁、李鸽);浙江医院(葛柯)

通讯作者:陈公英,电子信箱:chengongying@hotmail.com

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是危害人类健康的主要恶性肿瘤之一,具有很高的发生率和病死率。近来大量研究表明肝细胞肝癌的发生与乙型肝炎病毒(HBV)的感染有关,而 HBV 中的 X 蛋白被认为是肝细胞肝癌的发生、发展中最重要蛋白之一。X 蛋白(HBx)是一种只有 154 个氨基酸的

具有多功能的调节蛋白,与广泛分布于胞质、线粒体、核内以及核膜的多种蛋白都有相互作用,虽目前认为肝细胞肝癌的发生与之有关,但其致病作用却仍存在着许多矛盾的结果^[1]。研究证明 HBx 的 NH2 端能促进细胞增殖,而 C 端能抑制细胞增殖,因此提示,C 端如果缺失会导致 C 端相应作用消失,而使得 NH2 端的促进细胞增殖的功能得到发挥,最终促进细胞增殖。

研究者通过检测大量病例发现,在慢性 HBV 感染患者中确实存在 C 端截短型 HBx 突变体,而进一步通过检测慢性 HBV 感染者和 HBV 阳性肝细胞肝癌患者的肝组织均发现了第 120 位密码子终止的 C 端截短型 HBx 突变体 (HBx - Mut120),暗示这种突变体与肝癌的发生、发展有一定关系。因此,本研究应用 DNA 的重组技术成功构建了 HBx 截短型的 HBx - Mut120 突变体的稳定表达载体,为对照,同时构建了 HBx 的 HBx - Mut120 的稳定表达载体,并将其稳定转染了人肝癌细胞 HepG2,构建了稳定的细胞系,为更深一步研究 HBx 及其截短型突变体的功能奠定了基础和模型。

对象与方法

1. 材料:质粒,载体和细胞。(1)质粒:携带 HBx 全长的质粒 HBx - pGEM - T Easy 质粒为浙江大学医学院张旭照老师提供。(2)载体:PCMV - Tag2B 载

体由杭州师范大学实验室张航老师提供,图谱如图 1 所示;细胞:HepG2 细胞为人肝癌细胞,购自中科院上海细胞生物学研究所细胞库。(3)试剂和引物:2 × Taq masterMix (北京康为世纪公司);质粒小提试剂盒,质粒小提(去内毒素)试剂盒,PCR 纯化试剂盒,切胶回收试剂盒(美国 Omega 生物技术公司);DNA Marker(大连宝生物);限制性内切酶 EcoR I、Xho I、Buffer 10 × H(大连宝生物);TRIzol Reagent RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司),焦炭酸二乙酯(DEPC)(美国 Sigma 公司);RNA 反转录试剂盒(大连宝生物);氯仿,无水乙醇,75%乙醇,异丙醇(上海国药化学试剂有限公司);内参 GAPDH 引物(上海生工生物公司);DMEM 培养基(杭州吉诺生物医药有限公司),EDTA 胰蛋白酶,胎牛血清(FBS)(美国 Gibco 公司);DMSO(美国 Sigma 公司);X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent(瑞士 Roche 公司);G418(美国 Gibco 公司);蛋白裂解液(上海博彩科技有限公司)蛋白质 marker,兔抗人 HBx 抗体(美国 Cell Sciences 公司),抗兔二抗(中杉金桥公司),鼠源性 β-actin 单克隆抗体(美国 Sigma 公司),抗鼠二抗(美国 Jackson Immunoresearch 公司)。(4)ECL 显色液(美国 Bio-RAD 公司)。(5)溴化乙锭(PI)(美国 Bio-RAD 公司)。

CMV promoter 1~602

FLAG tag 682~705

multiple cloning site 707~780

SV40 polyA 857~1240

f1 origin 1378~1684

bla promoter 1709~1833

SV40 promoter 1853~2191

neomycin/kanamycin resistance ORF 2226~3017

HSV-TK polyA 3018~3476

pUC origin 3605~4272

pCMV-Tag 2B Multiple Cloning Site Region (sequence shown 620~844)

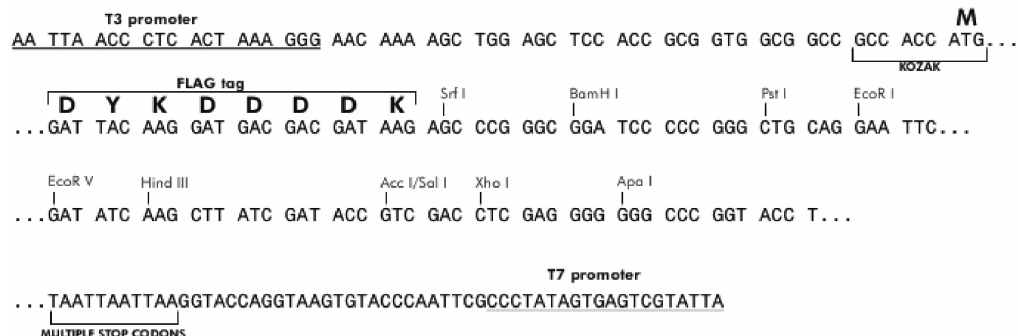


图 1 PCMV - Tag2B 图谱

2. 方法:(1)携带 HBx 及其截断型突变体 HBx - Mut120 基因的表达载体质粒的构建:引物 根据 HBx 基因序列设计引物:HBX 上游引物:5' - TACGAATTCATGGCTGCTAGGCTGTGCTG - 3',HBX - 120 下游引物:5' - CATCTCGAGCTACCACTCTTTAAACAAA-CAGTCTT - 3',HBX 下游引物:5' - ATCTCGAGT-TAGGC AGAGGTGAAAAAGT - 3'。利用 PCR 技术从 HBX - pGEM - T Easy 扩增出 HBX 截断型突变体 HBx - Mut120 基因,同时扩增 HBX 全长基因作为对照,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后作为目的片段,为提高目的基因与质粒的连接活性,将目的片段经 pMD18 - T 载体连接后经 EcoR I ,Xho I 双酶切后再次连接至 PCMV - Tag2B 载体上,经酶切、PCR 扩增及 DNA 测序分别鉴定后证明携带目的基因稳定表达的质粒构建成功。(2)稳定表达 HBx 及 HBx - Mut120 基因的细胞系的建立:取适量生长良好的 HepG2 细胞悬液分别加入到六孔板中的三孔中,置于 37℃ ,5% CO₂ 细胞培养箱中培养。待细胞生长状态良好,密度达到 70% ~ 90% 左右时即按照 X - tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 说明书将两种构建的目的质粒对细胞进行直接转染,无需弃生长培养基,作为对照,将 PCMV - Tag2B 空质粒做同样转染。细胞传代后培养基改为已配置好的含 600μg/ml G418 的完全培养基进行筛选,每 2 ~ 3 天进行换液,20 天后改为 200μg/ml G418 的 10% 血清的培养基培养,将稳定后的细胞系进行拍照,并分别命名为 HepG2 - PCMV 细胞, HepG2 - HBx 细胞和 HepG2 - HBx - Mut120 细胞。(3)RT - PCR 检测 HBx 及 HBx - Mut120 在 mRNA 水平的表达:将稳定表达后生长良好的 HepG2、HepG2 - PCMV、HepG2 - HBx 和 HepG2 - HBx - Mut120 4 种细胞系经 Trizol 处理后提取 RNA,然后按说明书将各个细胞的 RNA 进行反转录,然后以反转录获得的 cDNA 作为模板进行 PCR 反应,其产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。(4)Western blot 法检测 HBx - Mut120 在蛋白水平的表达:分别提取上述 4 种生长良好的密度约为 70% ~ 80% 的细胞系的蛋白,按说明书配置 10% 聚丙烯酰胺凝胶,根据蛋白浓度分别取一定体积的等量蛋白,加热 5min 变性,再加入上样液上样跑胶,然后用 NC 膜转膜,转膜后将膜用 5% 脱脂奶粉或 3% BSA 进行振摇封闭,室温下 1h,加一抗 4℃ 过夜,洗膜 3 次后加二抗,室温下孵育 1 ~ 2h,再次 3 次洗膜,最后进行 ECL 显色,曝光。

结 果

1. HBx 及 HBx - Mut120 基因的表达载体质粒的构建:(1)HBx 及其突变体 HBx - Mut120 基因的扩增:所得 HBx - Mut120、HBx 的 PCR 片段 400bp、500bp 左右,与预期的长度 (HBx - Mut120 360bp、HBx 465bp)一致,表明通过 PCR 扩增成功得到了这两种目的片段。如图 2 所示。(2)PCMV - Tag2B - HBx、PCMV - Tag2B - HBx - Mut120 重组质粒的鉴定:分别使用酶切及 PCR 的方法鉴定 PCMV - Tag2B - HBx 及 PCMV - Tag2B - HBx - Mut120 的重组质粒。如图 3、图 4 所示。(3)重组质粒的测序鉴定:将重组质粒送至上海生工生物公司进行测序,根据 BLAST 比对,PCMV - Tag2B - HBx 和 PCMV - Tag2B - HBx - Mut120 的重组质粒序列与已登记的目的序列的符合率为 99%,突变处均为第 196 位的 A→C,经遗传密码子表对比显示,AGG 和 CGG 均编码为精氨酸,因

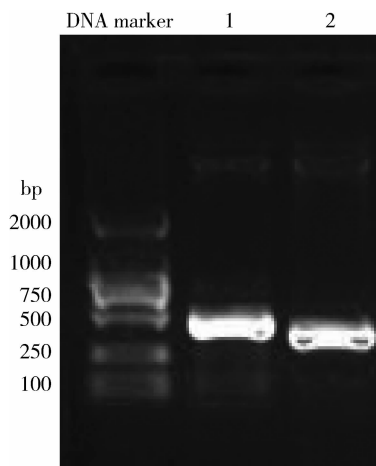


图 2 HBx、HBx - Mut120 基因的 PCR 扩增

1. PCR 的 HBx 目的片段产物;2. PCR 的 HBx - Mut120 目的片段产物

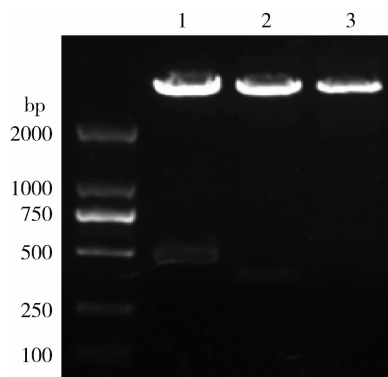


图 3 PCMV - Tag2B - HBx、PCMV - Tag2B - HBx - Mut120 酶切后琼脂凝胶电泳图

1. PCMV - Tag2B - HBx 酶切片段;2. PCMV - Tag2B - HBx - Mut120 酶切片段;3. PCMV - Tag2B 酶切片段

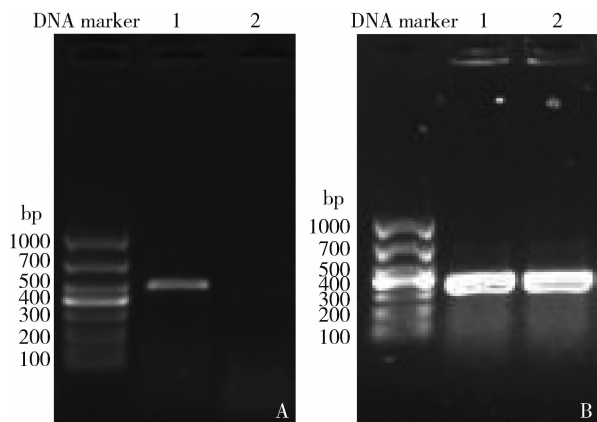


图4 两个重组质粒的PCR鉴定

A. 以扩增 HBx 的引物进行 PCR 反应; B. 用扩增 HBx - Mut120 的引物进行 PCR 反应。1. 以扩增 HBx 的引物对 PCMV - Tag2B - HBx 质粒为模板; 2. 以扩增 HBx 的引物对 PCMV - Tag2B - HBx - Mut120 质粒为模板

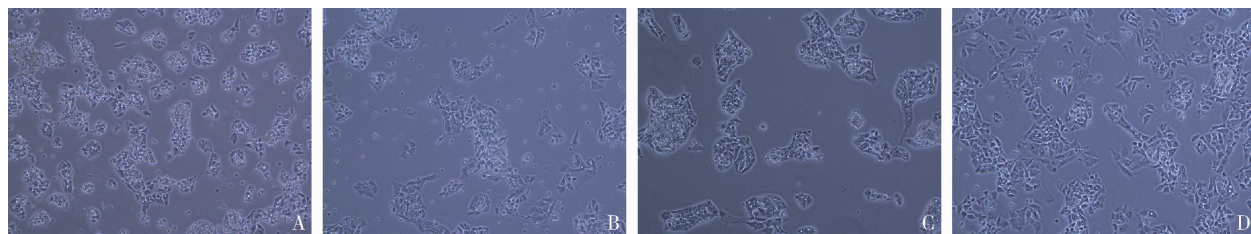


图5 4种细胞系的形态($\times 40$)

A. HepG2 细胞形态; B ~ D 分别为建立好的 HepG2 - PCMV、HepG2 - HBx 和 HepG2 - HBx - Mut120 细胞形态

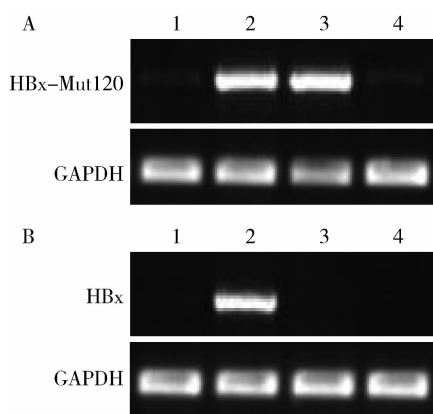


图6 RT-PCR 的细胞系鉴定

A. 以 HBx - Mut120 的引物扩增; B. 以 HBx 的引物扩增。
1. HepG2 细胞; 2. HepG2 - HBx 细胞; 3. HepG2 - HBx - Mut120 细胞; 4. HepG2 - PCMV 细胞

为以扩增 HBx - Mut120 片段的引物, 图 6B 以扩增 HBx 的引物分别作为 RT-PCR 反应的引物进行扩增细胞的 cDNA 以鉴定各个细胞的建立是否成功, 在细胞系中是否能检测出目的基因的转录表达, HepG2 和

此为无意编码, 再次证明 HBx 和 HBx - Mut120 表达载体构建成功。

2. 稳定表达细胞 HepG2 - HBx 及 HepG2 - HBx - Mut120 的建立: (1) HepG2 - HBx 及 HepG2 - HBx - Mut120 细胞形态: 根据质粒载体所携带 G418 抗性基因的特点, 筛选出转染有目的质粒的抗性细胞, 筛选大约 5 ~ 7 周后建立了稳定转染 HepG2 - PCMV、HepG2 - HBx 和 HepG2 - HBx - Mut120 的细胞系, 在倒置显微镜下进行了拍照, 并与 HepG2 细胞进行了形态对比, 如图 5 所示, HepG2 细胞形态偏圆形, 而转染后的细胞形态趋于细长梭型, 尤其转染 HBx - Mut120 的细胞系尤为明显, 提示细胞发生了上皮细胞间充质转化, 转移能力增强。(2) 检测 HBx 及其突变体 HBx - Mut120 在稳转细胞中 mRNA 水平的表达: 反转录后进行 PCR 鉴定结果如图 6 所示, 图 6 A

空载体 HepG2 - PCMV 细胞中不能扩增出两种目的片段, 说明其中不含 HBx 和 HBx - Mut120 基因片段的表达, 而 HepG2 - HBx 细胞能扩增出 HBx 和 HBx - Mut120 片段, 而 HepG2 - HBx - Mut120 细胞仅能扩增出 HBx - Mut120 基因, 而不能得到 HBx 基因片段, GAPDH 在两组各个细胞中表达稳定, 进一步证明了质粒成功转染进细胞并能够成功的转录表达。(3) 检测 HBx 及其突变体 HBx - Mut120 在稳转细胞中蛋白水平的表达: HepG2 - HBx 细胞和 HepG2 - HBx - Mut120 细胞经过 HBx 的特异性抗体均可检测到 HBx 蛋白的表达, 但 HepG2 - HBx - Mut120 细胞所表达的条带小于 17kDa, 而 HepG2 细胞和 HepG2 - PCMV 细胞不能检测到 HBx 蛋白的表达, 再次证明此实验已成功构建并稳定表达 HBx 蛋白的 HBx - 120 - HepG2 和 HBx - HepG2 这两种细胞系。如图 7 所示。

3. 流式细胞仪检测 HBx 及 HBx - Mut120 对细胞周期的影响: 用流式细胞仪检测了各组细胞的周期, 如表 1 所示。结果显示, HepG2 - HBx 和 HepG2 - HBx - Mut120 细胞组的生长分数 ($S + G_2$) 明显高于

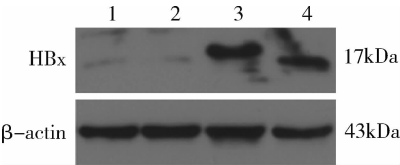


图 7 各细胞系中 HBx 蛋白的表达

1. HepG2 细胞;2. HepG2 - PCMV 细胞;3. HepG2 - HBx 细胞;
4. HepG2 - HBx - Mut120 细胞

HepG2 细胞和 HepG2 - PCMV 细胞,分别为 45.08% 和 46.71%,HepG2 - HBx - Mut120 细胞也较 HepG2 - HBx 细胞稍高。

表 1 各组细胞周期检测结果(%)

细胞系	G ₁ 期	G ₂ 期	S 期	S + G ₂
HepG2	69.76	8.00	22.24	30.24
HepG2 - PCMV	65.03	13.07	21.90	34.97
HepG2 - HBx	54.92	7.08	38.00	45.08
HepG2 - HBx - Mut120	53.29	2.32	44.39	46.71

讨 论

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界范围内第 5 大恶性肿瘤,给人类健康造成巨大的危害。近十年在恶性肿瘤病死率中居于第 3 位,并有上升的趋势^[2,3]。大量研究表明乙型肝炎患者及乙肝表面抗原 (HBsAg) 携带者的原发性肝癌发生率明显高于未感染人群^[4]。因此乙型肝炎病毒 (HBV) 是 HCC 发生的主要原因之一。HBx 蛋白近年来因与乙型肝炎及 HBV 相关肝癌的发生发展有密切关系而成为研究热点^[5-7]。HBx 影响细胞增殖、凋亡,最终导致慢性肝炎、肝硬化甚至肝癌的发生,因此被称为癌蛋白^[8]。有研究表明,HBx 蛋白功能的发挥水平与其在细胞内的定位有一定关系,如分布在细胞核内的 HBx 蛋白表达水平较低,具有反式激活的作用,能够直接参与相关转录^[9]。而在细胞质内的 HBx 蛋白多能高水平表达,参与多种信号转导^[10-13]。虽然关于 HBx 蛋白在肝细胞肝癌发病机制中的研究已经有很多年的历史,其参与肝细胞肝癌发病过程的事实也已经被广泛接受,然而目前对于其在肝癌发生中的作用机制还存在许多相互矛盾结果^[14]。

众所周知,HBx 本身对细胞增殖的作用比较明确,其可通过多个基因、micro RNA 细胞的异常增殖^[15,16]。HBx 基因所在之处正是 HBV DNA 整合位点所在的位置,在整合的基因组上,HBx 基因常常是

断裂和不完整的,这种突变的 HBx 基因直接连接到细胞的 DNA 上,重新转录得到融合的 HBx 蛋白。有研究表明从肝癌组织中克隆得到的这种 HBx 基因序列,更能表达具有功能的杂化蛋白质,甚至有一些的活性高于野生型的 HBx 蛋白^[17]。Tu 等^[18]在两例 HCC 肝组织中发现了 HBx 基因的缺失导致的截短了 20 个氨基酸的 HBx 蛋白的表达。由于在肝癌组织中发现了 C 端缺失的 HBx 突变体,表达了截短型的 HBx 蛋白,考虑其功能发生了变化,极有可能参与了细胞的恶变过程。之前有研究已将 HBx 基因转染 HepG2 细胞后,其生长速度明显比未转染的细胞快,并能存进细胞由 G₀/G₁ 期向 S 期过渡,这些都证明了 HBx 是一个促癌因子,本研究也证实了这点,另外加了一组突变组对照,更有力说明了截短型 HBx 更能促进肝癌的发生和发展^[19]。

研究发现在 HBx 蛋白中存在多种突变体,近年来 C 端截短型的突变体所表现出的抑制细胞凋亡,促进细胞增殖的作用备受关注。有研究从 7 例慢性肝炎的肝组织和 2 例 HBV 肝细胞肝癌组织中发现一种第 120 位密码子终止的 C 端截短型 HBx 蛋白突变体,均存在相似的 G→A 超突变,这种突变体不同于已报道的其他的 C 端截短型突变体,并且在不同的个体之间均存在,这种在慢性 HBV 感染者和 HBV 相关的肝细胞肝癌的肝组织标本内均存在相同位置终止的 C 端截短型 HBx 突变体具有很大的研究意义,那么笔者考虑这种 HBx 蛋白的突变体可能在慢性 HBV 感染发展为肝细胞肝癌的过程中发挥了重要的作用。也有最新研究认为,C 端缺失导致癌细胞增殖的机制可能是通过抑制抑癌基因 p16 表达而调控细胞周期进而促进肝癌细胞的增殖所致^[20]。笔者考虑这种突变体既然有促进细胞增殖的作用,那么在肝癌发生的情况下,这种突变体对肝癌细胞的增殖也起到了一定的作用,那么对这种突变体的研究将为 HBV 相关性肝癌的早期筛检和疾病治疗提供了一种新的切入点。

本研究是以肝癌细胞 HepG2 细胞为研究对象,将 HBx 截断型突变体 HBx - Mut120 基因克隆至 PCMV - Tag2B 质粒中,得到 PCMV - Tag2B - HBx - Mut120 重组质粒,然后将其转染 HepG2 细胞,经过 G418 的筛选最终得到能够稳定表达 HBx - Mut120 基因的细胞系。本研究发现,稳转目的片段的细胞形态发生了上皮细胞间充质转化,转移能力增强,突变型细胞系尤为明显。在转染了 HBx 及其突变体

HBx - Mut120 的 HepG2 细胞均能检测到 HBx 蛋白的表达,但突变体 HBx - Mut120 细胞所表达的蛋白条带较前者稍短,而未转染及转染空载体的 HepG2 细胞未检测出 HBx 蛋白,再次证明此实验已成功构建并稳定表达 HBx 蛋白的 HBx - 120 - HepG2 和 HBx - HepG2 这两种细胞系。经流式细胞术检测细胞周期后发现,稳转 HBx 及 HBx - Mut120 目的基因的细胞增殖能力明显强于其他两组对照组,且突变体较野生型的细胞系增殖能力也稍强,提示目的基因能促进 HepG2 细胞增殖。

综上所述,相信本研究建立的这种稳定 HepG2 细胞系的建立不仅为进一步研究缺失型的 HBx 基因所表达 HBx 蛋白的突变体在肝癌细胞的增殖、生物学作用及分子机制等方面提供了实验素材,亦将来临床上肝细胞肝癌治疗方案的研究奠定了基础。

参考文献

- Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator[J]. *Gastroenterol*, 2001, 36:651 - 660
- Sun H, Gao Y, Lu K, *et al.* Overexpression of Klotho suppresses liver cancer progression and induces cell apoptosis by negatively regulating wnt/b - catenin signaling pathway [J]. *World J Surg Oncol*, 2015, 13:307
- Liu J, Ni W, Xiao M, *et al.* Decreased expression and prognostic role of mitogen - activated protein kinase phosphatase 4 in hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastrointest Surg*, 2013, 17(4):756 - 765
- 王丽君,卜文哲,陈华.等.TACE联合替卡韦治疗乙型肝炎相关厚发性肝癌回顾性分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(20):1617 - 1622
- Rawat S, Clippinger AJ, Bouchard MJ. Modulation of apoptotic signaling by the hepatitis B virus[J]. *Viruses*, 2012, 4(11):2945 - 2972
- Liu H, Xu L, He H, *et al.* Hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell invasion and metastasis by stabilizing Snail protein[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(12):2072 - 2081
- Geng X, Huang C, Qin Y, *et al.* Hepatitis B virus X protein target Bcl - 2 protein to increase intracellular calcium, required for virus replication and cell death induction[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(45):18471 - 18476
- Assar S, Arababadi MK, Ahmadabadi BN, *et al.* Occult hepatitis B virus (HBV) infection: a global challenge for medicine [J]. *Clin Lab*, 2012, 58(11 - 12):1225 - 1230
- Arzumanyan A, Sambandam V, Clayton MM, *et al.* Hedgehog signaling blockade delays hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(22):5912 - 5920
- 王宏利,沙小莹,郭雅玲,等.乙肝相关性肝癌组织中 HBx 和 CEACAM1 的表达水平及意义 [J]. *中国实验诊断学*, 2016, 3(20):384 - 388
- 潘颖. X 蛋白的研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(13):1485 - 1487
- Huang J, Deng Q, Wang Q, *et al.* Exome sequencing of hepatitis B virus - associated hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Genet*, 2012, 44(10):1117 - 1121
- Wang F, Xia XM, Wang JL, *et al.* Notch1 signaling contributes to the oncogenic effect of HBx on human hepatic cells [J]. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(1):29 - 37
- 杨盛力,张小玲,刘利平,等.乙肝病毒 X 蛋白通过激活 NF - κ B 信号通路上调耐药相关蛋白表达的表达 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2012, 41(1):54 - 58
- Cho HK, Kim SY, Kyaw YY, *et al.* HBx induces the proliferation of hepatocellular carcinoma cells via API over - expressed as a result of ER stress[J]. *Biochem J*, 2015, 466(1):115 - 121
- Chen JJ, Tang YS, Huang SF, *et al.* HBx protein - induced upregulation of microRNA - 221 promotes aberrant proliferation in HBV related hepatocellular carcinoma by targeting estrogen receptor - α [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(2):792 - 798
- Hwang GY, Huang CJ, Lin CY, *et al.* Dominant mutations of hepatitis B virus variants in hepatoma accumulate in B - cell and T - cell epitopes of the HBx antigen [J]. *Virus Res*, 2003, 92:157 - 164
- Tu H, Bonura C, Giannini C, *et al.* Biological impact of natural COOH - terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues [J]. *Cancer Res*, 2001, 61:7803 - 7810
- 麦丽,杨林,邝建玉,等.乙型肝炎病毒 X 蛋白抑制 p16 蛋白表达及其促进 HepG2 肝癌细胞生长 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2013, 21(8):614 - 618
- 姚雪兵,杨林,朱建芸,等.野生型及羧基端缺失突变 HBx 对肝癌细胞增殖的影响 [J]. *广东医学*, 2015, 36(24):3742 - 3745
- (收稿日期:2017 - 07 - 30)
- (修回日期:2017 - 09 - 08)
- (接第 85 页)
- Ding L, Chen Q, Fan W, *et al.* Application of a time - resolved fluoroimmunoassay for detection of p16INK4a in cervix [J]. *Ann Diagnostic Pathol*, 2017, 29:7 - 10
- Lin G, Liu T, Hou J, *et al.* A Magnetic nanoparticle - based time - resolved fluoroimmunoassay for determination of the cytokeratin 19 fragment in human serum [J]. *J Fluorescence*, 2015, 25(2):361
- Xie M, Huang H, Hang J, *et al.* Evaluation of the analytical and clinical performances of time - resolved fluoroimmunoassay for detecting carcinoma antigen 50. [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2015, 36(3):265
- Liu F, Gao M, Zhang X, *et al.* Interferon - gamma release assay performance of pleural fluid and peripheral blood in pleural tuberculosis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12):e83857 - e83857
- 阮巧玲,张文宏.非人类免疫缺陷病毒感染潜伏性结核分枝杆菌感染的预防性治疗策略再思考 [J]. *中华传染病杂志*, 2016, 34(1):1 - 5
- (收稿日期:2017 - 07 - 13)
- (修回日期:2017 - 08 - 07)