

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.021

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.021

# 慢性乙肝感染者外周血单个核细胞乙肝病毒 X 基因表达与氧化应激的相关性

代瑞琼, 魏俊

(武汉市医疗救治中心传染科, 武汉 430000)

**[摘要]** 目的: 探讨慢性乙肝感染者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)乙肝病毒X基因(hepatitis B virus X gene, HBVX)表达与机体氧化应激的相关性。方法: 采用RT-PCR检测正常对照组、轻度患者组、中度患者组、重度患者组外周血PBMC中HBVX mRNA的表达; 采用流式细胞仪检测以上各组细胞内ROS含量; 采用紫外分光光度仪检测各组血清MDA含量。结果: 各乙肝患者组PBMC中HBVX mRNA与正常对照组比较, 差异有统计学意义(正常对照组HBVX mRNA相对表达量为0, 轻度患者组为 $0.48 \pm 0.24$ , 中度患者组为 $0.71 \pm 0.15$ , 重度患者组为 $0.89 \pm 0.27$ ;  $P < 0.001$ ), 组间比较, 轻度患者组与中度患者组和重度患者组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ ); 中度患者组与重度患者组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。正常对照组ROS相对表达量为 $24.63 \pm 8.93$ , 轻度患者组为 $25.35 \pm 5.66$ , 中度患者组为 $38.24 \pm 11.64$ , 重度患者组为 $43.45 \pm 14.33$ 。PBMC中ROS含量, 随着乙肝程度加重, ROS含量增加, 轻度患者组与正常对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 中度患者组和重度患者组与正常对照组及轻度患者组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。正常对照组血清MDA含量为( $5.31 \pm 1.24$ ) nmol/L, 轻度患者组为( $6.03 \pm 1.45$ ) nmol/L, 中度患者组为( $12.27 \pm 3.53$ ) nmol/L, 重度患者组为( $19.72 \pm 4.66$ ) nmol/L, MDA含量随着患病程度加重而增加, 轻度患者组与正常对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 中度患者组和重度患者组与正常对照组及轻度患者组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。HBVX mRNA表达与ROS, MDA含量呈正相关(Spearman's  $r = 0.382$ ,  $r = 0.467$ ,  $P < 0.05$ )。结论: 慢性乙肝感染者外周血PBMC中HBVX mRNA表达随疾病程度加重而增加, 其与患者体内氧化应激反应呈正相关。

**[关键词]** 乙肝病毒; 单个核细胞; X基因; 氧化应激

## Expression of HBV X gene in peripheral blood mononuclear cell of HBsAg chronic infection patients and its relationship with oxidative stress

DAI Ruiqiong, WEI Jun

(Department of Infectious Disease, Wuhan Medical Treatment Center, Wuhan 430000, China)

**Abstract** **Objective:** To explore the expression of HBVX gene in PBMC in the patient of HBV chronic infection, and the

收稿日期 (Date of reception): 2017-07-21

通信作者 (Corresponding author): 魏俊, Email: junwei3331@126.com

correlation between it and oxidative stress. **Methods:** The expression of HBVX mRNA in PBMC was detected by RT-PCR. ROS in PBMC was detected by flow cytometer. MDA in blood serum was detected by ultraviolet spectrophotometer. **Results:** There were four groups through the degree of chronic hepatitis, including a normal group, a mild degree group, a midrange degree group and a severe degree group. There was significant difference of gene expression of HBVX mRNA in PBMC between the normal group and the chronic hepatitis group (HBVX mRNA expression of the normal group, the mild degree group, the midrange degree group and the severe degree group was  $0, 0.48 \pm 0.24, 0.71 \pm 0.15$  and  $0.89 \pm 0.27$ , respectively,  $P < 0.001$ ). There was significant difference of gene expression of HBVX mRNA of PBMC between the mild degree group and the midrange degree group or the severe degree group ( $P < 0.001$ ). The content of ROS in the the normal group, the mild degree group, the midrange degree group and the severe degree group was  $24.63 \pm 8.93, 25.35 \pm 5.66, 38.24 \pm 11.64$  and  $43.45 \pm 14.33$ , respectively. There was no significant difference of the content of ROS in PBMC between the normal group and the mild degree group ( $P > 0.05$ ). There was significant difference of the content of ROS in PBMC between the midrange degree group or the severe degree group and the normal group or the mild degree group ( $P < 0.001$ ). The content of MDA in the the normal group, the mild degree group, the midrange degree group and the severe degree group was  $(5.31 \pm 1.24), (6.03 \pm 1.45), (12.27 \pm 3.53)$  and  $(19.72 \pm 4.66)$  nmol/L. There was no significant difference of the content of MDA in blood serum between the normal group and the mild degree group ( $P > 0.05$ ). There was significant difference of the content of MDA in blood serum between the midrange degree group or the severe degree group and the normal group or the mild degree group ( $P < 0.001$ ). There was positive correlation between the expression of HBVX mRNA and the content of ROS and MDA (Spearman's  $r = 0.382, r = 0.467, P < 0.05$ ). **Conclusion:** The expression of HBVX mRNA in PBMC in the patient of HbsAg chronic infection is increased with degree of chronic hepatitis. There is positive correlation between the expression of HBVX mRNA and oxidative stress in the patient chronic hepatitis.

**Keywords** hepatitis B virus; mononuclear cell; X gene; oxidative stress

乙肝病毒X基因(hepatitis B virus X gene, HBVX)在HBV感染及肝细胞癌发生、发展中起关键作用。其广泛参与乙肝病毒复制、宿主细胞基因调控和表达、蛋白降解及细胞信号转导等过程。HBVX与宿主细胞整合后,使得正常细胞DNA片段缺失和整合后染色体重排,宿主细胞染色体DNA稳定性下降,最终导致细胞凋亡或者癌变<sup>[1-2]</sup>。HBVX定位于线粒体,能促使线粒体通透性发生改变,并影响线粒体氧化磷酸化等能量代谢,进而引起细胞氧化应激反应,导致氧自由基增加。而氧自由基增加是加重乙肝病毒感染,导致肿瘤发生、发展的重要因素<sup>[3-4]</sup>。故HBVX基因表达与细胞氧化应激可能存在一定关联性。本研究于2016年1月至2017年1月,以乙肝慢性感染者为研究对象,探讨外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)HBVX表达与体内氧化应激的相关性。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

收集2016年1月至2017年1月在本院门诊和住院的慢性乙肝患者共68例,均已确诊,按2000年《病毒性肝炎防治方案》<sup>[5]</sup>将慢性肝炎分成轻度、中度和重度3型,其中轻度患者组20例,中度患者组27例,重度患者组21例。男41例,女27例。纳入标准:入组标准参照2000年西安全国病毒性肝炎会议修订的诊断标准<sup>[5]</sup>(试行)。正常对照组选取健康体检者20例,其中男12例,女8例,年龄 $(33.2 \pm 5.2)$ 岁。本研究征得医院伦理委员会批准实施,患者均签署知情同意书。

### 1.2 材料

每组研究对象抽取晨起空腹静脉血6 mL,均分为3份,2份采用肝素抗凝管,1份采用促凝管,分别用于3项检测。HBVX-mRNA RT-PCR试剂盒购于

日本TOYOBO公司, 细胞内ROS检测试剂盒购于江苏碧云天农林科技有限公司, 血清MDA检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所, 引物合成购于上海英骏生物技术有限公司, PTC-100基因扩增仪购自美国伯乐公司, ELx800酶联免疫仪购于美国BioTek公司, 流式细胞仪购于美国BD公司, 752N紫外可见分光光度仪购于上海精密科学仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 PBMC 中 HBVX mRNA 检测

取患者晨起空腹静脉血2 mL, 肝素抗凝, 等量Hank's液稀释, 淋巴细胞分离液常规分离得到PBMC, 用Hank's液洗涤3次, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^8/L$ , 加入TRIzol裂解液充分震荡, 吹打, 放入4 °C冰箱存放24 h, 取出后震荡均匀, 4 °C离心分层, 取上层液体加入另一EP管, 加入等体积异丙醇震荡, 4 °C离心后取下层沉淀, 加入1 mL DEPC处理的75%乙醇洗涤, 离心后弃去上清, 放于37 °C金属浴中至透明, 用20  $\mu$ L DEPC溶解, 得到产物为总RNA。按照RT-PCR试剂盒操作说明书进行操作, 反转录条件为42 °C、60 min, 70 °C、15 min, 反应结束后将产物储存于-20 °C冰箱中备用。PCR条件为: 94 °C 4 min变性; 94 °C 30 s, 46 °C 45 s, 72 °C 45 s, 共38个循环, 72 °C 10 min延伸。上游引物5'-CGGAATTCCGATGGCTGCTAGGCTGTG-3', 下游引物5'-CCCTCGAGGGTG CATGGTGCTGGTGA-3', 扩增目的片段长度为445 bp。内参选用 $\beta$ -actin, 扩增目的片段为285 bp。产物经过琼脂糖凝胶电泳后使用DocJel 2000图像分析系统计算基因表达量。

#### 1.3.2 细胞内 ROS 测定

取肝素抗凝血2 mL, 同以上方法分离获得PBMC, 细胞内ROS测定按照试剂盒说明书操作, 上流式细胞仪检测, 激发波长为488 nm, 发射波

长525 nm, 检测各组细胞平均荧光强度。

#### 1.3.3 血清 MDA 含量测定

取促凝血2 mL, 留取上层血清, 血清MDA检测按照试剂盒说明书操作, 上紫外分光光度仪检测各管吸光度值, 波长采用532 nm, 1 cm光径, 对照采用蒸馏水。

### 1.4 统计学处理

使用SPSS 20.0统计学软件进行分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间数据采用One-way ANOVA分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 外周血 PBMC 中 HBVX mRNA 表达

正常对照组HBVX mRNA相对表达量为0, 轻度患者组HBVX mRNA相对表达量为 $0.48 \pm 0.24$ , 中度患者组HBVX mRNA相对表达量为 $0.71 \pm 0.15$ , 重度患者组HBVX mRNA相对表达量为 $0.89 \pm 0.27$  (图1, 表1); 各乙肝患者组PBMC中HBVX mRNA与正常对照组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ ); 轻度患者组与中度患者组和重度患者组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ ); 中度患者组与重度患者组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。

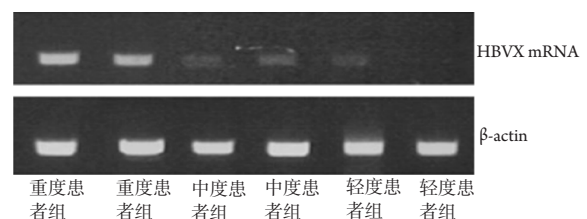


图1 三组HBVX mRNA RT-PCR结果

Figure 1 Results of HBVX mRNA in three groups by RT-PCR

表1 各组基本资料与检测结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of general information and detection results of different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	年龄/岁	HBVX mRNA	ROS	MDA/(nmol·L <sup>-1</sup> )
正常对照组	20	33.2 $\pm$ 5.2	0	24.63 $\pm$ 8.93	5.31 $\pm$ 1.24
轻度患者组	20	38.7 $\pm$ 6.2	0.48 $\pm$ 0.24	25.35 $\pm$ 5.66	6.03 $\pm$ 1.45
中度患者组	27	41.5 $\pm$ 5.9	0.71 $\pm$ 0.15	38.24 $\pm$ 11.64	12.27 $\pm$ 3.53
重度患者组	21	47.3 $\pm$ 7.2	0.89 $\pm$ 0.27	43.45 $\pm$ 14.33	19.72 $\pm$ 4.66
F			22.538	89.266	56.834
P			<0.001	<0.001	<0.001

## 2.2 各组 PMBC 中 ROS 含量比较

正常对照组ROS相对表达量为 $24.63 \pm 8.93$ , 轻度患者组ROS相对表达量为 $25.35 \pm 5.66$ , 中度患者组ROS相对表达量为 $38.24 \pm 11.64$ , 重度患者组ROS相对表达量为 $43.45 \pm 14.33$ ; PMBC中ROS含量随着病程加重而增加, 轻度患者组与正常对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 中度患者组和重度患者组与正常对照组及轻度患者组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ , 表1)。

## 2.3 各组血清中 MDA 含量比较

正常对照组MDA含量为( $5.31 \pm 1.24$ ) nmol/L, 轻度患者组MDA含量为( $6.03 \pm 1.45$ ) nmol/L, 中度患者组MDA含量为( $12.27 \pm 3.53$ ) nmol/L, 重度患者组MDA含量为( $19.72 \pm 4.66$ ) nmol/L; MDA含量随着乙肝患病程度加重而增加, 轻度患者组与正常对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 中度患者组和重度患者组与正常对照组及轻度患者组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ , 表1)。

## 2.4 HBVX mRNA 表达与细胞内 ROS 产量、血清 MDA 含量的相关性分析

HBVX mRNA表达与细胞内ROS含量呈正相关(Spearman  $r = 0.382$ ,  $P < 0.05$ )、与血清MDA含量呈正相关(Spearman  $r = 0.467$ ,  $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

慢性乙型肝炎是严重危害公众健康的问题, 即使自1980年代起人群普遍接种了有效的乙肝疫苗, 全球范围内仍有240 000 000人感染乙肝, 尤其以亚非地区感染率较高<sup>[6]</sup>, 且每年约有100万人死于乙型肝炎病毒感染相关性疾病。随着核苷类似物的发现, 乙肝母婴传播的控制取得了较大的进步<sup>[7]</sup>。此外, 控制乙肝病毒在体内复制能有效减轻持续感染患者临床症状, 同时也能延缓病毒感染相关性疾病的发生。

HBVX基因是HBV基因组中开放性的读码框, 与病毒复制密切相关, 含有154个氨基酸残基, 其不作用于DNA双链, 主要通过和宿主细胞内的多种蛋白质相互作用影响细胞的生物学功能, 最终导致细胞凋亡或癌变<sup>[8-9]</sup>。HBVX定位于细胞线粒体, 结合的区域主要位于68~77氨基酸, 这一区域是细胞凋亡必需的<sup>[10-11]</sup>。线粒体与细胞的氧化磷

酸化等能量代谢密切相关, HBVX蛋白结合后, 导致线粒体跨膜电压降低, 呼吸链电子传递过程中出现电子脱漏现象, 脱漏的电子则与分子氧进行单电子还原反应形成超氧阴离子, 超氧阴离子即是体内活性氧的主要来源<sup>[12-14]</sup>。细胞生物膜的不饱和脂肪酸是细胞内受氧化攻击的一大类分子靶标, 继而发生脂质过氧化, 产生MDA。所以, MDA是影响呼吸链复合物及线粒体内酶活性的重要物质, 也是细胞氧化应激的一个重要指标。

在本研究中, 检测HBVX mRNA表达水平结果显示: 各组乙肝患者组PMBC中HBVX mRNA高于正常对照组, 轻度患者组与中度患者组均低于重度患者组。而在肝癌的研究中则显示HBVX所调控的非编码RNA与乙肝相关肝癌的发生密切相关<sup>[15]</sup>。Livingston等<sup>[16]</sup>研究显示HBVX在乙肝病毒的复制周期中起关键作用, HBVX介导的对Smc5/6的降解是HBV基因组共价闭环环状DNA转录过程的必要步骤。在关于HBVX mRNA表达与氧化应激指标相关性的研究中, PMBC中ROS含量随着乙肝程度加重而增加。中度患者组和重度患者组高于正常对照组及轻度患者组。Ren等<sup>[17]</sup>的研究同样显示HBVX可促进氧化应激导致细胞受氧化伤害并加速HBV的复制, 而在这过程中线粒体蛋白SIRT3则可通过降低ROS的水平进而保护细胞免受氧化应激的伤害。此外, 本研究中, MDA含量随着患病程度加重而增加, 中度患者组和重度患者组高于正常对照组及轻度患者组。而在Zhao等<sup>[18]</sup>的研究中则提示MDA水平升高在肝功能下降及HBV相关的肝癌的形成过程中起一定作用, 同样提示MDA作为氧化应激指标的负性作用。

当然, 本研究尚存在一定的不足之处, 如本研究仅初步检测HBVX表达及其与相应氧化应激指标水平的关系, 而在此环节中具体调控的机制及后续临床可针对的主要靶点并未进行研究。此外, 在后续研究中, 可通过长期随访等方式, 探索在乙肝慢性感染基础之上, 患者发生肝癌的情况是否与HBVX及氧化应激相关, 以及相应HBVX及应激指标的高低是否与乙肝患者的预后存在一定的关联等。

综上, 在本研究关于慢性乙肝病毒感染患者的研究中, 随着病情的加重, 氧化应激逐渐加重, 而HBVX mRNA表达增加与氧化应激存在一定相关性。由此设想, 严格控制HBVX基因表达可能是抑制乙肝病毒复制、降低氧化应激反应、减少病毒感

染相关性并发症的发生、发展的重要途径。

## 参考文献

- Henkler F, Hoare J, Waseem N, et al. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(4): 871-882.
- Chami M, Ferrari D, Nicotera P, et al. Caspase-dependent alterations of Ca<sup>2+</sup> signaling in the induction of apoptosis by hepatitis B virus X protein[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(34): 31745-31755.
- McClain SL, Clippinger AJ, Lizzano R, et al. Hepatitis B virus replication is associated with an HBx-dependent mitochondrion-regulated increase in cytosolic calcium levels[J]. *J Virol*, 2007, 81(21): 12061-12065.
- Severi T, Vander Borcht S, Libbrecht L, et al. HBx or HCV core gene expression in HepG2 human liver cells results in a survival benefit against oxidative stress with possible implications for HCC development[J]. *Chem Biol Interact*, 2007, 168(2): 128-134.
- 肝病分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(6): 324-329.  
Hepatology section. Program for prevention and treatment of viral hepatitis[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2000, 8(6): 324-329.
- Yu R, Fan R, Hou J. Chronic hepatitis B virus infection: epidemiology, prevention, and treatment in China[J]. *Front Med*, 2014, 8(2): 135-144.
- Tseng TC, Kao JH. Elimination of hepatitis B: is it a mission possible?[J]. *BMC Med*, 2017, 15(1): 53.
- Jin YM, Yun C, Park C, et al. Expression of hepatitis B virus X protein is closely correlated with the high periportal inflammatory activity of liver diseases[J]. *J Viral Hepatitis*, 2001, 8(5): 322-330.
- Shirakata Y, Koike K. Hepatitis B virus X protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(24): 22071-22078.
- He P, Zhou G, Qu D, et al. HBx inhibits proliferation and induces apoptosis via Fas/FasL upregulation in rat renal tubular epithelial cells[J]. *J Nephrol*, 2013, 26(6): 1033-1041.
- Knoll S, Fürst K, Thomas S, et al. Dissection of cell context-dependent interactions between HBx and p53 family members in regulation of apoptosis: a role for HBV-induced HCC[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(20): 3554-3565.
- Hernández S, Venegas M, Brahm J, et al. The viral transactivator HBx protein exhibits a high potential for regulation via phosphorylation through an evolutionarily conserved mechanism[J]. *Infect Agents Cancer*, 2012, 7(1): 27.
- Lee YI, Hwang JM, Im JH, et al. Human hepatitis B virus-X protein alters mitochondrial function and physiology in human liver cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(15): 15460-15471.
- Lim W, Kwon SH, Cho H, et al. HBx targeting to mitochondria and ROS generation are necessary but insufficient for HBV-induced cyclooxygenase-2 expression[J]. *J Mol Med-Jmm*, 2010, 88(4): 359-369.
- Zhang B, Han S, Feng B, et al. Hepatitis B virus X protein-mediated non-coding RNA aberrations in the development of human hepatocellular carcinoma[J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(2): e293.
- Livingston CM, Ramakrishnan D, Strubin M, et al. Identifying and characterizing interplay between hepatitis B virus X protein and Smc5/6[J]. *Viruses*, 2017, 9(4): 69.
- Ren JH, Chen X, Zhou L, et al. Protective role of Sirtuin3 (SIRT3) in oxidative stress mediated by hepatitis B virus X protein expression[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150961.
- Zhao J, Zhao Y, Wang H, et al. Association between metabolic abnormalities and HBV related hepatocellular carcinoma in Chinese: a cross-sectional study[J]. *Nutr J*, 2011, 10(1): 49.

**本文引用:** 代瑞琼, 魏俊. 慢性乙肝感染者外周血单个核细胞乙肝病毒X基因表达与氧化应激的相关性[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(11): 2416-2420. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.021

**Cite this article as:** DAI Ruiqiong, WEI Jun. Expression of HBV X gene in peripheral blood mononuclear cell of HBsAg chronic infection patients and its relationship with oxidative stress[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(11): 2416-2420. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.021