

## • 基础实验研究论著 •

## 乙型肝炎病毒对胰岛素样生长因子结合蛋白 3 表达的影响\*

祝成亮<sup>1</sup>, 李艳<sup>1△</sup>, 汪明<sup>1</sup>, 高国生<sup>2</sup>

(1. 武汉大学人民医院检验科, 湖北武汉 430060; 2. 宁波市第二医院, 浙江宁波 315010)

**摘要:** 目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)对胰岛素样生长因子结合蛋白 3(IGFBP3)表达的影响。方法 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 IGFBP3 mRNA 的表达, 免疫印迹法检测 IGFBP3 的蛋白表达, 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 IGFBP3 血清学含量。结果 IGFBP3 mRNA 和蛋白的表达在 HepG2 细胞中的表达水平较 HepG2. 2. 15 高; 乙肝患者 IGFBP3 血清学水平显著降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 HBV 能够在体内、外抑制 IGFBP3 的表达。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; 胰岛素样生长因子结合蛋白 3; 酶联免疫吸附试验; 表达

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.22.002

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2013)22-2947-02

## The effect of hepatitis B virus on the expression of circulating IGF-binding protein 3\*

Zhu Chengliang<sup>1</sup>, Li Yan<sup>1△</sup>, Wang Ming<sup>1</sup>, Gao Guosheng<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China;

2. The Second Hospital of Ningbo, Ningbo, Zhejiang 315010, China)

**Abstract; Objective** To explore the effect of hepatitis B virus(HBV) on the expression of IGF-binding protein 3(IGFBP3).

**Methods** mRNA and protein expression of IGFBP3 were measured by RT-PCR and Western blot. The serum levels of IGFBP3 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** Expression of IGFBP3 mRNA and protein were lower in HepG2. 2. 15 cells than in HepG2 cells. Serum IGFBP3 level reduced a lot in HBV patients( $P < 0.05$ ). **Conclusion** HBV can downregulate the expression of IGFBP3 both *in vivo* and *in vitro*.

**Key words:** hepatitis B virus; circulating IGF-binding protein 3; enzyme-linked immunosorbent assay; expression

原发性肝细胞癌(HCC)是常见的恶性肿瘤之一, 恶性程度高, 患者生存期短。中国是世界上 HCC 病死率最高的国家, 占世界上肝癌总死亡人数的 53%, 且发病率逐年上升<sup>[1]</sup>。目前 HBV 是公认的 HCC 主要诱因之一, 但 HBV 的致癌机制不明。胰岛素样生长因子(IGFs)是一类多功能细胞增殖调控因子, 能够促进细胞的分化、增殖以及个体的生长发育。IGF 结合蛋白 3(IGFBP3)是其结合蛋白之一, 在肿瘤的发生和发展过程中起到重要作用<sup>[2-3]</sup>。本研究拟探讨 HBV 对 IGFBP3 表达的影响, 为揭示 HBV 的致癌机制奠定理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 一般资料** 收集临床确诊乙肝患者 108 例, 男 63 例, 女 45 例; 年龄(43.5±17.8)岁; 所有患者均排除其他嗜肝病毒的感染和心、脑、肾等重要器官疾病。对照组为 102 例健康体检者。所有病例都符合 2005 年中华医学会肝病学分会、感染病学分会制订的《慢性乙型肝炎防治指南》。

**1.2 材料** 人肝癌细胞系 HepG2 和 HepG2. 2. 15 购自武汉大学典型培养物保藏中心; RNA 提取试剂 TRIzol R 购自 invitrogen 公司; M-MLV 逆转录酶购自美国 Promega 公司; IGFBP3 抗体购自上海瑞齐生物科技有限公司; IGFBP3 ELISA 检测试剂盒购自上海沪峰生物科技有限公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养** HepG2 和 HepG2. 2. 15 用含 10% 的胎牛血清 RPMI1640 培养基, 在 37 °C 恒温箱维持体积分数为 5%

的 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

**1.3.2 RT-PCR 检测** TRIzol R 试剂提取 HepG2 和 HepG2. 2. 15 细胞的总 RNA, 反转录出相应的 cDNA 后, 用 IGFBP3 基因的检测引物 5'-CCA AGC GGG AGA CAG AAT AT-3'(上游), 5'-GGT GGT GTA GCC TGG GAG A-3'(下游) 进行 PCR 扩增, 同时设立  $\beta$ -actin 作为内对照, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.3.3 免疫印迹检测** 分别收集 HepG2 和 HepG2. 2. 15 细胞, 细胞破碎后测定其浓度。各取一定量蛋白样品加入上样缓冲液后进行 SDS-PAGE 分离, 电泳结束后将蛋白转到硝酸纤维素(NC)膜上, 然后进行封闭、加入 IGFBP3 抗体, 洗膜、加入二抗, 洗膜后采用电化学发光(ECL) 显色系统进行显色。

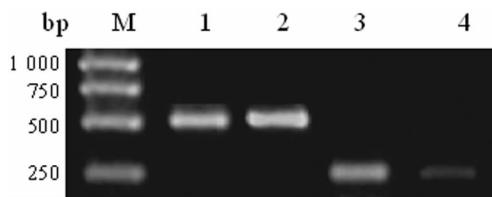
**1.3.4 IGFBP3 检测** IGFBP3 检测采用 ELISA 法。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 乙肝患者和健康对照 IGFBP3 血清学比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  表示有统计学差异。

## 2 结果

**2.1 HBV 抑制 IGFBP3 mRNA 和蛋白的表达** HepG2. 2. 15 是整合了 HBV 全基因组的 HepG2 细胞。为探讨 HBV 对 IGFBP3 表达的影响, 本研究采用 RT-PCR 和 Western blot 检测了 HepG2 和 HepG2. 2. 15 细胞中 IGFBP3 mRNA 和蛋白的表达差异。结果显示, 与 HepG2 细胞相比, HepG2. 2. 15 细胞中 IGFBP3 mRNA 和蛋白的表达均降低, 见图 1~2。

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81101485); 中国博士后特别资助基金资助项目(201104485); 中国博士后科学基金资助项目(20100471144); 国家临床重点专科专项经费, 浙江省医药卫生一般研究计划资助项目(2011KYB107)。 作者简介: 祝成亮, 男, 博士, 副主任技师, 主要从事肝炎致病及致癌机制研究。 △ 通讯作者, E-mail: yanlitf@yahoo.com.cn。



M: 标记物; 1: HepG2 中  $\beta$ -actin mRNA; 2: HepG2.2.15 中  $\beta$ -actin mRNA; 3: HepG2 中 IGFBP3 mRNA; 4: HepG2.2.15 中 IGFBP3 mRNA。

图 1 RT-PCR 检测 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞 IGFBP3 mRNA

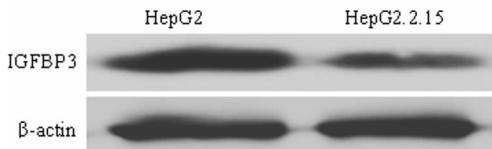


图 2 免疫印迹检测 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞 IGFBP3 蛋白表达

**2.2 乙肝患者 IGFBP3 血清学水平降低** 采用 ELISA 检测了乙肝患者和对照组的 IGFBP3 的血清学水平, 结果表明, IGFBP3 在乙肝患者 [(1 255.7  $\pm$  564.5) ng/mL] 显著低于健康对照组 [(2 987.5  $\pm$  953.2) ng/mL], 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨 论

HBV 感染引起急慢性肝炎, 最终导致肝癌的发生, 中国 80% 以上的肝癌患者伴有 HBV 感染<sup>[1]</sup>, 但目前为止, HBV 的致癌机制还不清楚。为探讨 HBV 的致病及致癌机制, 本研究前期工作采用基因芯片筛选整合了 HBV 全基因组的 HepG2.2.15 细胞及其对照细胞 HepG2 的差异表达基因<sup>[4]</sup>, 结果发现 IGFBP3 在 HepG2.2.15 细胞表达水平降低, 进一步采用 RT-PCR 和免疫印迹对芯片结果进行了验证, 发现 HepG2.2.15 细胞中 IGFBP3 mRNA 和蛋白的表达均降低, 表明 HBV 能够在体外抑制 IGFBP3 的表达。

IGFBP3 是一种分泌型蛋白, 能够分泌到人体血液中, 本

(上接第 2946 页)

aac(6')-Ib 四类 AME 基因, 并且绝大多数菌株为多种基因阳性 (35 株, 占 92.1%), 表明本院流行的 Ab 有极高的 AME 基因携带率, 是引起 Ab 对氨基糖苷类药物耐药的重要原因。

### 参考文献

- [1] Mak JK, Kim MJ, Pham J, et al. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 63(1): 47-54.
- [2] Barnaud G, Zihoune N, Ricard JD, et al. Two sequential outbreaks caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 or OXA-72 oxacillinase in an intensive care unit in France [J]. *Hosp Infect*, 2010, 76(4): 358-360.
- [3] 姜如金, 朱健铭, 吴康乐. 多药耐药鲍氏不动杆菌氨基糖苷类与喹诺酮类耐药相关基因研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(21): 4431-4434.
- [4] Morovat T, Bahram F, Mohammad E, et al. Distribution of different carbapenem resistant clones of *Acinetobacter baumannii* in Teh-

研究对比乙肝患者和健康对照者 IGFBP3 的血清学水平差异, 发现乙肝患者 IGFBP3 血清含量降低, 表明 HBV 能够体内抑制 IGFBP3 的分泌。

研究证实, IGFBP-3 能够抑制肺癌细胞、肝癌细胞、乳腺癌细胞和直肠癌细胞的增殖和分化, 通过 IGF 依赖性作用和 IGF 非依赖性作用的方式, 促进细胞凋亡, 并抑制血管的生成, 具有抗肿瘤的作用<sup>[5-6]</sup>。本研究发现 HBV 能够在体内外抑制 IGFBP3 的表达, 因此, HBV 可能通过抑制 IGFBP3 的表达进而促进肝癌的发生。但 HBV 具体如何调节 IGFBP3 的表达, IGFBP3 又如何参与肝癌的发生和发展过程, 这些都有待进一步研究与探讨。

总之, 本研究通过体内外实验探讨了 HBV 对 IGFBP3 的调节作用, 为 HBV 相关的肝癌的诊断和治疗提供重要的理论依据。

### 参考文献

- [1] El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(6): 1264-1273.
- [2] Fürstenberger G, Senn HJ. Insulin-like growth factors and cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2002, 3(5): 298-302.
- [3] Haydon AMM, MacInnis RJ, English DR, et al. Physical activity, insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding protein 3, and survival from colorectal cancer [J]. *Gut*, 2006, 55(5): 689-694.
- [4] 祝成亮, 李艳, 高国生, 等. 乙型肝炎病毒对载脂蛋白 A1 表达的影响及其机制探讨 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2012, 32(6): 504-507.
- [5] Ali O, Cohen P, Lee KW. Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3(IGFBP-3) as an anti-cancer molecule [J]. *Horm Metab Res*, 2003, 35(11/12): 726-733.
- [6] Chen B, Liu S, Xu W, et al. IGF-I and IGFBP-3 and the risk of lung cancer: a meta-analysis based on nested case-control studies [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28(1): 89.

(收稿日期: 2013-05-08)

ran hospitals [J]. *New Microbiol*, 2009, 32(3): 265-271.

- [5] Park YS, Lee H, Lee KS, et al. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors for acquisition and prevalent OXA-type carbapenemases-a multicentre study [J]. *Int Agents*, 2010, 36(5): 430-435.
- [6] 王春新, 谢国强, 严子禾, 等. 耐亚胺培南细菌的临床分离及耐药谱分析 [J]. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(9): 666-667.
- [7] Heritier C, Poirel L, Aubert D, et al. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicro Agents Chemother*, 2003, 47(1): 268-273.
- [8] 叶惠芬, 陈惠玲, 周小棉, 等. 广州地区鲍曼不动杆菌产  $\beta$ -内酰胺酶基因型调查 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2008, 8(4): 307-310.
- [9] 韩丽娟, 邵海枫, 王卫萍, 等. 鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类药物的耐药机制研究 [J]. 医学研究生学报, 2010, 23(10): 1038-1041.

(收稿日期: 2013-08-18)