

TƯƠNG TÁC CỦA HBx-PROTEIN ĐỘT BIẾN VỚI NF-kB CÓ THỂ LIÊN QUAN TRONG BỆNH SINH UNG THƯ TẾ BÀO GAN

Nguyễn Linh Toàn^{*}; Lê Hữu Song^{**}
C. Thomas Bock^{***}

TÓM TẮT

NF-kB là một yếu tố phiên mã, điều hòa biểu hiện gen, đóng vai trò then chốt trong quá trình phát sinh ung thư. Xác định tương tác của HBx-protein với protein tín hiệu NF-kB bằng hoạt tính luciferase. Biểu hiện của HBx-gen (chủng đại và đột biến) trên tế bào nuôi cấy cho thấy gây tăng hoạt tính luciferase của NF-kB từ 2,5 - 6 lần so với chứng. Không những HBx hoang dại mà còn cả HBx đột biến đều gây tăng cường hoạt hóa NF-kB, đây có thể là một yếu tố gây mất điều hòa quá trình tăng sinh và chết tế bào theo chương trình. Kết quả quan sát này, nhấn mạnh một vai trò quan trọng của HBx đột biến trong bệnh sinh ung thư gan liên quan mất điều hòa dòng tín hiệu NF-kB.

* Từ khóa: Ung thư tế bào gan; HBV; HBx; NF-kB.

INTERACTION OF MUTATED HEPATITIS B x-PROTEIN WITH NF-kB MAY INVOLVE THE PATHOGENESIS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA

SUMMARY

NF-kB (nuclear factor kappa-B) acts as a transcription factor and regulates the expression of genes involved in many processes that play a key role in the pathogenesis of cancer. The interaction of the mutant HBx-proteins with NF-kB pathway was investigated using luciferase activity assay. HBx (wild-type and mutants) gen expression in cell culture were observed to lead to increase from 2.5 to 6-fold in luciferase activity of NF-kB in comparison to mock control. NF-kB was not only activated by wtHBx but also by HBx-mutants and that may cause dysregulated hepatocyte proliferation and apoptosis. This observation points to an active role of HBx-mutants in hepatocarcinogenesis that involves dysregulation of NF-kB pathway.

* Key words: Hepatocellular carcinoma; HBV; HBx; NF-kB.

ĐẶT VẤN ĐỀ

HBx-protein của virus viêm gan B (HBV) hoạt động như một yếu tố phiên mã, có vai trò trung tâm trong bệnh sinh ung thư tế

bào gan (hepatocellular carcinoma, HCC) [1, 4]. Tuy nhiên, đến nay cơ chế HBx của HBV gây HCC vẫn chưa hoàn toàn sáng tỏ. Nghiên cứu gần đây chứng minh HBx có biểu hiện như một tác nhân sinh ung thư.

* Học viện Quân y

** Bệnh viện TƯỚNG 108

*** Đại Tuebingen Đức

Phân biệt khoa học: TS. Trần Văn Khoa

Gần đây trên chuột chuyển gen người ta đã

gây được HCC bằng HBx [1]. Ngoài đột

biến gen tế bào, HBV có khả năng đột biến tự nhiên, đặc biệt đột biến mất đoạn gen trên vùng C-tận của HBx có liên quan rõ rệt với bệnh sinh HCC [2, 7, 8]. Những đột biến này tạo ra HBx có khả năng hoạt hóa gen sinh ung thư như Ras và Myc [2], hoặc hoạt hóa STAT3 [7].

NF- κ B (nuclear factor kappa-B) là phức hợp protein hoạt động như một yếu tố phiên mã, có vai trò quan trọng trong điều hòa miễn dịch, viêm và ung thư [6, 8]. NF- κ B điều hòa biểu hiện gen đóng vai trò then chốt trong phát sinh và phát triển ung thư như tăng sinh, di căn và chết tế bào theo chương trình [5]. Vì thế, rối loạn điều hòa NF- κ B được xem là một tác nhân gây ung thư. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá tương tác của HBx đột biến được phân lập từ BN HCC với yếu tố phiên mã NF- κ B trên tế bào ung thư gan, qua đó phân tích mối liên quan của chúng trong phát sinh HCC.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Các chủng HBx đột biến (HBV) phân lập từ BN HCC.

8/9 chủng HBx của HBV đột biến được phân lập từ huyết thanh 48 bệnh nhân (BN) HCC và 01 chủng HBx hoang dại (wt) phân lập từ plasmid HBV tái tổ hợp HBVpd4al mang kiểu gen C chứa 1.5mer [8, 9]. Những BN ung thư gan được chẩn đoán xác định HCC và điều trị tại Bệnh viện TWQĐ 108 [3, 7, 9]. Tất cả BN HCC có HBsAg huyết thanh (+), AND - HBV (+), anti-HCV (-) và HIV (-). Không có BN nào dùng thuốc kháng virus cũng như thuốc điều biến miễn dịch khác trước và trong quá

trình nghiên cứu [3]. Chẩn đoán HCC dựa trên hình ảnh giải phẫu bệnh lý và theo tiêu chuẩn chẩn đoán qui định trong nước và quốc tế [3, 9].

2. Kỹ thuật PCR.

Tách chiết axit nucleic của HBV từ huyết thanh của BN HCC, dùng bộ kit của hãng Quiagen (QiaAmp blood kit; Qiagen, Hilden, Đức) qui trình theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Khuếch đại gen HBx của HBV bằng phản ứng PCR.

3. Giải trình tự gen (sequencing) và tách dòng HBx-gen.

Toàn bộ sản phẩm HBx được tinh sạch bằng PCR-cycle kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Đức). Phân tích và so sánh trình tự gen, dùng chương trình BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) và so sánh với NCBI genBank. Tách dòng những chủng HBx đột biến từ sản phẩm PCR của chúng dùng vector pGEM-T Easy cloning (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Đức). Ít nhất 3 clon của mỗi trường hợp có gen HBx đột biến được giải trình tự gen, dùng cặp mồi pT7-forward và pM13-reverse [7].

4. Chế tạo các plasmid tái tổ hợp (Construction of recombinant plasmids).

Các chủng HBx đột biến và chủng hoang dại (wt) được tái tổ hợp trong vector pcDNA3.1 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Đức). Dùng cặp primer X-F1374 và X-R1856 tái tổ hợp gen. Các primer được thiết kế có đầu 5' mang trình tự enzyme giới hạn *XhoI* hoặc *ApaI* để thực hiện kỹ thuật tái tổ hợp và tách dòng (cloning). Tất cả các plasmid

đều được giải trình tự để xác định đúng gen, đúng đột biến, đúng chiều hoạt động của gen, khẳng định tái tổ hợp thành công vector mang gen HBx.

5. Biến nạp và nuôi cấy tế bào (Cell culture and transfections).

Tế bào ung thư gan dòng HepG2 được dùng cho tất cả các thí nghiệm nuôi cấy tế bào. Số lượng tế bào $2,5 \text{ ml} \times 10^5$ tế bào/ml cho 1 giếng (đĩa 6 giếng), phát triển trong môi trường Dulbecco's modified Eagle (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) chứa 10% FBS và 1% streptomycine/penicillin (Invitrogen). Tế bào HepG2 nuôi cấy ổn định sau 24 giờ được biến nạp (transfection) với HBx-plasmid đột biến hoặc wt phối hợp cùng với NF-kB-Luc vector (luciferase reporter gene) và β -GAL vector hoặc với chứng âm là HBx-plasmid với TAL vector (vector trống) và β -GAL vector hoặc với NF-kB-Luc vector với vector trống pcDNA3.1 (vector dùng tách dòng tạo HBx-plasmid) và β -GAL vector theo tỷ lệ 1:1:1 plasmid-ADN ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Phương pháp biến nạp dùng tủa calcium-phosphate ADN [7]. Thu hoạch các tế bào nuôi cấy phát triển sau 48 giờ, sau đó làm tan tế bào và thu protein toàn phần. Thực hiện tất cả thí nghiệm lặp lại ít nhất 03 lần, mỗi lần đều tiến hành cặp đôi song song.

6. Thu hoạch và làm tan tế bào.

Rửa tế bào HepG2 biến nạp HBx-plasmid sau nuôi cấy 48 giờ 2 lần bằng dung dịch PBS 1x và thu hoạch dùng 100 μl dung dịch "Cell Lysis Buffer 1x" (Promega) (25 mM Tris-phosphate (pH 7,8), 2 mM

DTT, 2 mM 1,2-diaminocyclohexane - N,N,N',N'-tetraacetic acid, 10% glycerol và 1% Triton® X-100). Ủ tế bào với dung dịch "cell lysis buffer" ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Thu dung dịch lỏng chứa tế bào đã tan trong ống 1,5 ml và ly tâm 14.000 vòng/phút/3 phút. Chuyển protein tế bào sang một ống 1,5 ml mới. Đo nồng độ protein toàn phần bằng kỹ thuật Bradford, dùng chất màu Coomassie blue G theo qui trình thường qui tại labo. Dung dịch protein của tế bào được dùng để thực hiện phản ứng luciferase ngay.

7. Phản ứng Luciferase xác định hoạt tính NF-kB.

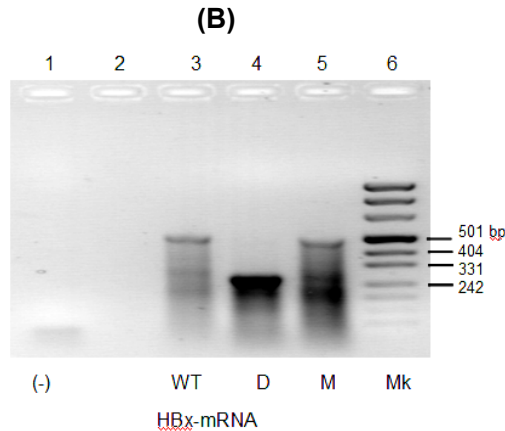
Dùng kit của Promega thực hiện phản ứng luciferase. Qui trình theo hướng dẫn của nhà sản xuất (www.stratagene.com). Trộn 10 μl dung dịch protein mẫu với 100 μl hỗn hợp đệm phản ứng - cơ chất luciferase (luciferase substrate-assay buffer mixture) trong ống luminometer, trộn nhẹ nhàng và đặt ngay ống vào máy luminometer. Đo cường độ ánh sáng từ phản ứng khoảng 8 giây sau khi trộn dung dịch protein mẫu với cơ chất trong khoảng 5 - 30 giây. Tất cả mẫu được thực hiện với một thời gian chờ giống nhau.

8. Phân tích thống kê.

Phân tích thống kê dùng chi bình phương test (website: www.stata.com); Phân tích các số liệu bằng thuật toán non-parametric Mann-Whitney *U*-test và so sánh đối xứng T-test dùng chương trình Statview, version 4.57 (website: www.statview.com).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đột biến gen HBx phân lập từ BN HCC.

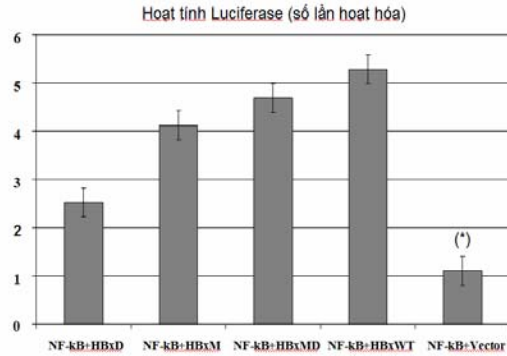


Hình 1: (A) Trình tự HBx-protein đột biến phân lập từ 4 BN HCC. Các mũi tên chỉ các đột biến điểm và vị trí mất đoạn đầu C-tận trên HBx-protein; (B) Biểu hiện HBx-mRNA của HBx-plasmid trên tế bào HepG2. Cột dọc từ trái qua phải (1, 2) chứng âm, (3) HBx-mARN-wt, (4) HBx-mARN đột biến mất đoạn, (5) HBx-mARN đột biến điểm và (6) thang chuẩn ADN.

Đột biến gen HBx của HBV được xác định bằng kỹ thuật giải trình tự gen. Kết quả cho thấy: 4/48 BN HCC có HBV mang đồng thời cả chủng đột biến điểm rải rác trên gen HBx kết hợp với chủng đột biến mất đoạn đầu cuối gen HBx (C-tận) (*hình 1A*). Biểu hiện HBx-mRNA và HBx-protein của HBx-plasmid tái tổ hợp trên tế bào HepG2 (*hình 1B*) (Toan NL và CS, 2008). Kết quả này chứng minh thành công trong kỹ thuật tách dòng tạo plasmid tái tổ hợp mang gen HBx và biểu hiện HBx-protein trên tế bào ung thư gan dòng HepG2. Đây là kết quả quan trọng, tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp.

2. HBx (chủng đột biến và chủng đại) hoạt hóa NF-kB.

Trong nghiên cứu gần đây chúng tôi đã chứng minh có sự phân bố bất thường trong tế bào của HBx-protein đột biến và tác động của chúng trên dòng tín hiệu JAK/STAT gây tăng cường hoạt hóa STAT3 và ức chế STAT1. Hậu quả của quá trình này có thể gây rối loạn tăng sinh, chết tế bào theo chương trình và phát sinh HCC [7]. Để làm tăng thêm nhận định trên, chúng tôi đánh giá tác động của các chủng HBx này trên dòng tín hiệu NF-kB bằng phản ứng luciferase. Kết quả cho thấy: đối với 4 chủng HBx mất đoạn đầu cuối gen HBx phân lập từ BN HCC theo thứ tự HBx-D1, -D2, -D3 đến -D4 hoạt hóa NF-kB 1,39, 4,53, 3,71 và 2,57 lần so với nhóm chứng là tế bào đáp ứng với vector chứa gen báo cáo NF-kB (Mock). Tuy nhiên, đáp ứng này của chủng HBx đột biến mất đoạn (D) đều thấp hơn so với chủng HBx-wt (*hình 2*). Các chủng HBx có đột biến điểm rải rác trên HBx (M) hoạt hóa NF-kB từ 4 - 5 lần so với nhóm chứng ($p < 0,05$) và tương đương nhóm tế bào đáp ứng với HBx-wt ($p > 0,05$). Trong khi đó, khi phối hợp cả hai chủng đột biến trên (tương tự như các chủng HBV được phát hiện từ BN HCC) chứng minh rõ rệt khả năng hoạt hóa mạnh mẽ dòng tín hiệu NF-kB từ 4,5 đến 6 lần so với chứng ($p < 0,01$) và tương đương nhóm tế bào đáp ứng với HBx-wt ($p > 0,05$) (*hình 2*).



Hình 2: Khả năng hoạt hóa NF-kB bởi các chủng HBx (đột biến và wt) qua số lần hoạt hóa luciferase so với nhóm chứng (tế bào đáp ứng chỉ với NF-kB đơn thuần, NF-kB+vector, mock).

Khả năng hoạt hóa (tính gộp) tăng từ 2,5 đến > 5 lần so với chứng (mock), theo thứ tự tăng dần từ nhóm tế bào HepG2 đáp ứng với chủng HBx đột biến mất đoạn đầu C-tận (D), đột biến điểm (M), phối hợp cả 2 loại đột biến (DM) và chủng đại (wt). (*), $p < 0,05$ so với các nhóm còn lại.

Kết quả cho thấy rằng, có thể do HBx-protein đột biến khác nhau nên mức hoạt hóa của chúng trên dòng tín hiệu NF-kB cũng khác nhau.

BÀN LUẬN

Những nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng đột biến điểm và đột biến mất đoạn đầu C-tận trên HBx-protein có liên quan đến phát triển HCC ở BN mang HBV mạn tính [2, 3, 7] HBx có khả năng hoạt hóa các gen tế bào như hoạt hóa AP1, AP2, CRE (Cyclic AMP Response Element), NF-kB [3, 4, 6], hoạt hóa một số protein truyền tín hiệu nội tế bào và kinases như Ras-Raf-MAP kinase, phosphoinositide 3 (PI-3) kinase, protein kinase C, Src kinase, Janus kinase-1 (JAK-1) và STAT (signal transducers and activators of transcription) [7]. Trên BN HCC liên quan nhiễm HBV xuất hiện nhiều kiểu đột biến trên gen HBx của HBV. Hậu quả những đột biến này gây ra sự phân bố bất thường nội bào và tăng cường hoạt hóa dòng tín hiệu Jak/STAT3 [7]. Hơn nữa, HBx đã được chứng minh có khả năng hoạt hóa nhiều gen khác nhau của tế bào [4, 5], cũng như sự tương tác của chúng với protein tín hiệu nội bào như ERK1/2, Ras-MAP kinase, AP1, P53, DDB protein (damaged-DNA binding protein), p21(WAF1/Cip1)... [4, 5, 6, 7, 8].

Trong khi đó, NF-kB có tác dụng điều hòa biểu hiện gen của tế bào. Rối loạn hoạt động của NF-kB có vai trò quan trọng trong sự phát sinh và phát triển ung thư, như gây rối loạn quá trình tăng sinh, chết tế bào theo chương trình. Nghiên cứu gần đây đã cho thấy, HBx có khả năng hoạt hóa NF-kB và tiếp theo ức chế quá trình tế bào chết theo chương trình [10]. Hậu quả của quá trình này có thể gây biến đổi chức năng tế bào và sống kéo dài bất thường. Ngược lại, khi ức chế biểu hiện NF-kB đã đưa được tế bào trở lại quá trình chết theo chương trình ở tế bào gan nhiễm HBx [10]. Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả chủng đột biến và hoang dại của HBx đều có khả năng gây hoạt hóa rõ rệt dòng tín hiệu NF-kB (p

< 0,05). Cũng như những công bố trước đây, HBx hoạt hóa dòng tín hiệu NF-kB có thể gây rối loạn quá trình tăng sinh, chết tế bào theo chương trình và cuối cùng có thể phát sinh ung thư tế bào gan ở những BN nhiễm HBV mạn tính.

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu tương tác của HBx đột biến phân lập từ BN HCC liên quan nhiễm HBV trên dòng tín hiệu NF-kB cho thấy:

1. Đột biến HBx của HBV là phổ biến trên BN ung thư tế bào gan và cùng tồn tại dạng đột biến mất đoạn đầu C-tận kết hợp với đột biến điểm rải rác trên toàn bộ HBx-protein ở BN HCC.

2. Các đột biến gen HBx của HBV biểu hiện trên tế bào ung thư gan dòng HepG2 gây tăng cường rõ rệt hoạt tính luciferase của NF-kB từ 2,5 - 6 lần so với nhóm chứng ($p < 0,05$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gen of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*. 1991, 351, pp.317-320.

2. Tu H, Bonura C, Giannini C, Mouly H, Soussan P, Kew M, et al. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res*. 2001, 61, pp.7803-7810.

3. Song LH, Duy DN, Binh VQ, Luty AJ, Kreamsner PG, Bock CT. Low frequency of mutations in the X gene, core promoter and precore region of hepatitis B virus infected Vietnamese. *J Viral Hepat*. 2005, 12, pp.160-167.

4. Noh EJ, Jung HJ, Jeong G, Choi KS, Park HJ, Lee CH, et al. Subcellular localization and transcriptional repressor activity of HBx on p21(WAF1/Cip1) promoter is regulated by ERK-mediated phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004, 319: 738-745.

5. Kim H, Lee H, Yun Y. X-gen product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells. *J Biol Chem*. 1998, 273, pp.381-385.

6. Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors*. 2007, 29 (1), pp.19-35.

7. Bock CT, Toan NL, Koeberlein B, Song le H, Chin R, Zentgraf H, Kandolf R, Torresi J. Subcellular mislocalization of mutant hepatitis B X proteins contributes to modulation of STAT/SOCS signaling in hepatocellular carcinoma. *Intervirology*. 2008; 51 (6), pp.432-443.

8. Zhou Y, Wang S, Ma JW, Lei Z, Zhu HF, Lei P, Yang ZS, et al. Hepatitis B virus protein X-induced expression of the CXC chemokine IP-10 is mediated through activation of NF-kappaB and increases migration of leukocytes. *J Biol Chem*. 2010, Apr 16, 285 (16), pp.12159-12168.

9. Toan NL, Song le H, Kreamsner PG, Duy DN, Binh VQ, Koeberlein B, Kaiser S, Kandolf R, Torresi J, Bock CT. Impact of the hepatitis B virus genotype and genotype mixtures on the course of liver disease in Vietnam. *Hepatology*. 2006, Jun, 43 (6), pp.1375-1384.

10. Lee YM, Kang M, Hwang JM, Lee S, Cho H, Kim YS. Sulfasalazine induces apoptosis of HBx-

expressing cells in an NF-kappaB-independent manner. *Virus Genes*. 2010, Feb, 40 (1), pp.37-43.