

研究报告

丙型肝炎病毒核心蛋白基因表达
致人肝细胞恶性转化的研究*单 于¹⁾ 陈系古¹⁾** 黄 冰¹⁾ 胡安斌²⁾ 郭中敏¹⁾ 黄文革¹⁾

(1) 中山大学实验动物中心, 广州 510080; 2) 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科, 武汉 430022)

摘要 丙型肝炎病毒核心(HCV-C)蛋白是维持丙型肝炎病毒结构的重要蛋白质, 由于参与调节细胞的生长与凋亡, 被认为与HCV感染所致的肝硬化及肝细胞癌的发生有关. 为了进一步探索HCV-C蛋白与肝细胞癌发生的关系, 首先构建了表达HCV-C蛋白的真核表达载体, 脂质体介导转染Chang-liver人肝细胞株, 建立表达HCV-C蛋白的人肝细胞模型, RT-PCR方法检测HCV-C基因在人肝细胞内的表达, 蛋白质印迹和免疫细胞化学方法鉴定Chang-liver肝细胞内HCV-C蛋白及其在细胞内的分布情况. 表达HCV-C蛋白的Chang-liver人肝细胞培养20代以后, 与对照组细胞相比, 细胞的形态出现长梭形样改变, 生长速度显著加快, 细胞内DNA含量的均一性变差. 接种表达HCV-C蛋白的Chang-liver人肝细胞的6只裸鼠在第20天时全部有肿瘤长出, 且肿瘤组织结构符合肝细胞癌病理形态特点, 对照组裸鼠未见肿瘤生长. 上述结果表明HCV-C基因表达可导致Chang-liver人肝细胞发生恶性转化, 提示HCV-C蛋白与HCV感染所致肝细胞癌的发生有直接关系.

关键词 HCV-C蛋白, Chang-liver人肝细胞, 恶性转化

学科分类号 R373.21

丙型肝炎病毒(HCV)是主要经血传播的肝炎病原体, 世界范围内的感染率极高, 其显著特征是它的慢性化过程, 并进一步发展为肝硬化及肝细胞癌, 后者发生率每年高达4%^[1~3]. 核心蛋白(C蛋白)是HCV结构蛋白中功能最为复杂的蛋白质, 在HCV各种不同的亚型中具有高度的保守性^[4~6], 除了参与病毒RNA的包装以外, 还可通过激活或抑制宿主细胞如c-myc, p53等基因的转录, 调节细胞的生长、增殖及凋亡, 因此被认为与HCV感染所致的肝硬化及肝细胞癌的发生有关, 但目前国内外尚未获得其致人肝细胞恶性转化的直接形态学证据^[7~10]. 针对此问题, 本实验旨在探讨HCV-C基因的表达对人肝细胞生物学特性的影响, 力求阐明其在HCV感染所致肝细胞癌发生中的作用及机理, 进一步为肝细胞癌的治疗及新药研发奠定理论基础.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

pHCV-MA质粒由Nomoto馈赠, 表达质粒P^{cDNA3}由中山大学医学院寄生虫教研室赠送. 宿主菌*E. coli* JM-109由本室保存. Chang-liver人肝细胞株由本实验室细胞库提供. 限制性内切酶EcoRI、XbaI、质粒

DNA提取试剂盒、PCR纯化试剂盒和胶回收试剂盒、Taq酶、T4DNA连接酶(TaKaRa公司); RPMI-1640、FBS, G418、lipofectin(Gibco公司, USA); TRIZol、AMV一步法RT-PCR试剂盒(上海生物工程有限公司); HCV核心蛋白一抗(CLONTECH公司); ABC免疫组化试剂盒(BOSTER公司); 硝酸纤维素膜(Sigma公司); MTT(Sigma公司). BALB/c-nu/nu裸鼠由本实验动物中心提供.

1.2 PCR扩增HCV-C基因和载体构建

取1 μg质粒DNA(pHCV-MA)用于PCR, 根据2b型HCV基因序列设计HCV-C引物, 上游引物为5' GGCGAATTCCACAAATCCTAAACC 3', 下游引物为5' GCTCTAGATGAAGACACTGGCACTGT-AACG 3', 上游引物5'端包含基因的起始密码和EcoR I酶切位点, 下游引物5'端包含终止密码和Xba I酶切位点. 反应条件为96℃预变性8 min, 94℃ 45 s、56℃ 45 s、72℃ 1 min循环28次, 72℃延伸7 min. PCR产物纯化后, 用EcoR I,

* 国家自然科学基金资助项目(103055).

** 通讯联系人.

Tel: 020-87331393, E-mail: chenxigu@163.com

收稿日期: 2003-08-11, 接受日期: 2003-09-28

Xba I 酶切, 再克隆到 P^{cDNA3} 载体的 *Eco*R I, *Xba* I 位点上, 转化宿主菌 *E. coli* JM-109, 筛选获得重组质粒 $P^{cDNA3-C}$, 测序分析后保存备用。

1.3 细胞转染及筛选

取对数生长期 Chang-liver 肝细胞接种在 6 孔板内, 待细胞 70% ~ 80% 融合, 加入 lipofectin-质粒混合物, 饥饿培养 6 h 后更换成含 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基, 48 h 后用含 0.8% G418 全培养基筛选阳性细胞, 一周后更换为含 0.2% G418 全培养基维持筛选一月, 同时设未转染组和转染空载体质粒组细胞作为对照。

1.4 RT-PCR 检测 HCV-C 基因 mRNA 表达

TRIzol 裂解液裂解细胞, 提取细胞总 RNA, 一步法反转录后扩增 HCV-C 目的基因, 引物序列同 1.2, 扩增条件: 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 15 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min 扩增 30 个循环, 72℃ 延伸 7 min, 产物为 572 bp. β -actin 作为内对照, 上游引物为 5' TTCCTTCTTGGGTATGGAAT 3', 下游引物为 5' GAGCAATGATCT TGATCTTC 3', 扩增片段为 202 bp. 细胞总 RNA 提取和 RT-PCR 操作步骤按试剂盒说明进行。

1.5 蛋白质印迹检测细胞内 HCV-C 蛋白的表达

裂解提取细胞总蛋白, 各取 50 μ g 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 垂直电泳分离, 蛋白质印迹至硝酸纤维素膜上, PBS-5% 脱脂奶粉-0.02% Tween 20 阻断后, 进行核心蛋白-抗体结合反应, 一抗稀释浓度为 1: 20, 然后以核心蛋白二抗 IgG-HRP 与膜上的一抗结合, 混合两种试剂 (增强发光剂和氧化剂), 温育硝酸纤维素膜 1 min, 用保鲜膜包好, X 光片曝光 15 min 显示目的蛋白。

1.6 免疫细胞化学法分析 C 蛋白的细胞内分布

细胞转染并经 0.2% G418 充分筛选后, 进行 HCV-C 蛋白的免疫细胞化学法 (ICC) 检测 (ABC 法), 一抗稀释浓度为 1: 50, 同时设转染 P^{cDNA3} 质粒组及未转染组细胞作为对照, 操作程序按试剂盒说明。

1.7 细胞的光学形态观察

倒置相差显微镜下观察培养 20 代以上转染 $P^{cDNA3-C}$ 质粒组、转染 P^{cDNA3} 质粒组和未转染组 Chang-liver 肝细胞的生长情况。重点观察细胞形态结构及生长特性的改变。

1.8 细胞生长曲线测定

取转染后 20 代以上处于对数生长期的 3 组细

胞, 制成密度为 6×10^4 /ml 的细胞悬液, 接种于 96 孔平板, 每孔 100 μ l, 每个样品设 15 个平行孔, 于 37℃、5% CO_2 培养, 每 24 小时取 3 孔, 在 100 μ l 全培养基中加 2 g/L MTT 液 10 μ l, 培养 4 h 后用 100 μ l DMSO 充分裂解细胞, 自动酶标仪测 570 nm 波长处的吸光度值 (A_{570}), 以 3 孔的均值作为当天的测定结果, 每次均设空白对照, 以培养天数作为横坐标, 以吸光度值 (A_{570}) 作为纵坐标, 绘制 3 组细胞的生长曲线图。

1.9 流式细胞仪检测

培养 20 代以上的未转染组、转染 P^{cDNA3} 质粒组和转染 $P^{cDNA3-C}$ 质粒组 Chang-liver 肝细胞, 分别用胰酶消化后收集, PBS 洗涤 2 次, 70% 乙醇固定, 碘化丙啶 (PI) 染色, 上流式细胞仪 (FCM) 检测细胞 DNA 含量的均一性及细胞周期的特点。激发波长为 488 nm。

1.10 裸鼠成瘤实验

实验动物共设 3 组, 每组 6 只裸鼠。取转染后 20 代以上处于对数生长期的转染 $P^{cDNA3-C}$ 质粒组, 未转染组, 转染 P^{cDNA3} 空载体组 Chang-liver 人肝细胞, 消化, 制备单细胞悬液, 用无血清培养基离心洗涤 2 次, 计数细胞。用 PBS 重悬细胞并调整细胞密度为 2×10^{10} /L。用 1 ml 注射器抽取细胞悬液接种于裸鼠背部皮下, 每个接种部位注射 0.2 ml, 含活细胞数 4×10^6 。每组裸鼠接种一种细胞。从接种之日起, 每隔 4 天观察裸鼠的精神、饮食及成瘤情况。

1.11 统计学分析

3 组细胞不同生长时间点的 A 值比较用 t 检验, 统计软件采用 SPSS 10.0。

2 结 果

2.1 PCR 扩增 HCV-C 基因及载体构建

HCV-C 基因经 PCR 扩增后, *Eco*R I, *Xba* I 酶切, 电泳回收目的片段, 插入载体 P^{cDNA3} 的相应位点, 得到重组质粒 $P^{cDNA3-C}$ 。经酶切鉴定及序列分析表明, HCV-C 基因序列与参照序列完全相同。

2.2 HCV-C 基因 mRNA 在 Chang-liver 肝细胞的表达

RT-PCR 检测结果表明, HCV-C 基因在转染 $P^{cDNA3-C}$ 重组质粒组 Chang-liver 肝细胞有较强表达, 而转染 P^{cDNA3} 质粒组和未转染组 Chang-liver 肝细胞则无 HCV-C 基因的表达 (图 1)。

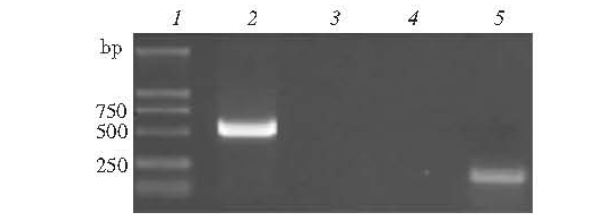


Fig. 1 HCV core-specific mRNA detection of the Chang-liver cells transfected with HCV core gene
1: DNA marker (DL2000); 2: P^{cDNA3}-C group; 3: P^{cDNA3} group;
4: Untransfected group; 5: β-actin.

2.3 蛋白质印迹检测 Chang-liver 肝细胞内 HCV-C 蛋白的表达

蛋白质印迹结果表明转染 P^{cDNA3}-C 重组质粒组细胞表达 HCV-C 蛋白，分子质量为 21 ku，而未转

染组细胞和转染 P^{cDNA3} 质粒组细胞则无 HCV-C 蛋白表达（图 2）.



Fig. 2 HCV core protein detection of the Chang-liver cells transfected with HCV core gene
1: Untransfected group; 2: P^{cDNA3} group; 3: P^{cDNA3}-C group.

2.4 HCV-C 蛋白在 Chang-liver 人肝细胞内的 ICC 分析

转染 P^{cDNA3}-C 重组质粒组细胞内有 HCV-C 蛋白表达，以胞核周围量最多，部分细胞表达较弱. 未转染组和转染 P^{cDNA3} 空质粒载体组细胞内则无 HCV-C 蛋白表达（图 3）.

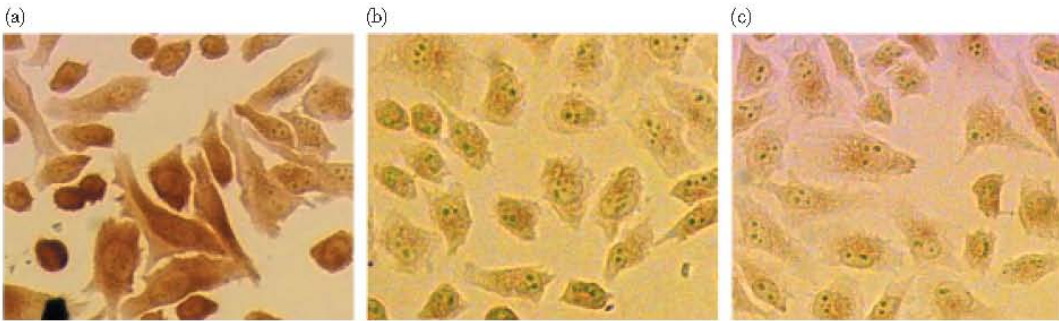


Fig. 3 Distribution of HCV core protein in the Chang-liver cells transfected with HCV core gene
(a) P^{cDNA3}-C group cells (×200); (b) P^{cDNA3} group cells (×200); (c) Untransfected group cells (×200).

2.5 转染 P^{cDNA3}-C 质粒组、转染 P^{cDNA3} 质粒组及未转染组 Chang-liver 肝细胞的形态学观察

转染 P^{cDNA3}-C 质粒组细胞体外培养初期，光镜下细胞生长形态无明显改变，20 代后细胞的形态

逐渐出现长梭型样改变，细胞大小差异不均，而相同培养条件下的转染 P^{cDNA3} 质粒组细胞及未转染组细胞的形态 20 代后没有改变，细胞仍然呈不规则的多角形.（图 4）.

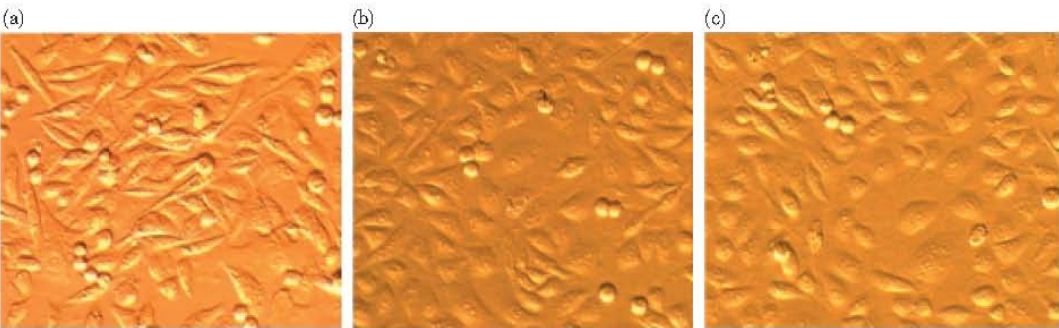


Fig. 4 Phenotypic changes of HCV core gene-transfected Chang-liver cells under light microscope
(a) P^{cDNA3}-C group cells (×200); (b) P^{cDNA3} group cells (×200); (c) Untransfected group cells (×200).

2.6 细胞生长曲线

转染 P^{cDNA3}-C 质粒组 Chang-liver 肝细胞 (liver-c cell) 培养自 24 h 以后 MTT 法测 A₅₇₀ 值比未转染组细胞 (liver cell) 显著增高 (P < 0.05), 而转染 P^{cDNA3} 质粒组细胞 (liver-Neo cell) A₅₇₀ 值与未转染组细胞相比无显著改变 (P > 0.05) (图 5)。

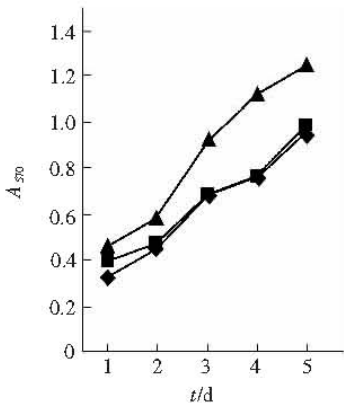


Fig. 5 Influence of HCV core gene expression on the growth of Chang-liver cells

▲—▲: liver-c cell; ◆—◆: liver cell; ■—■: liver-Neo cell.

2.7 流式细胞仪 (FCM) 分析细胞的生长特性

与未转染组 Chang-liver 肝细胞相比, 转染 P^{cDNA3}-C 质粒组细胞处于 S 期细胞的比例升高, 不同细胞内 DNA 含量的均一性变差, 而转染 P^{cDNA3} 质粒组 Chang-liver 肝细胞处于 S 期细胞的比例、细胞内 DNA 含量的均一性均无明显改变 (表 1)。

Table 1 Cell cycle analysis and DNA content was assessed by flow cytometry

Cell lines	S phase/%	CV/%
Chang-liver	23.0	5.0
P ^{cDNA3} -Chang-liver	23.2	5.2
P ^{cDNA3} -C-Chang-liver	32.9	6.2

2.8 裸鼠成瘤实验

接种表达 HCV-C 基因的 Chang-liver 肝细胞组裸鼠, 细胞接种后第 8 天部分裸鼠已可见肿瘤长出, 第 20 天该实验组裸鼠均可见肿瘤生长, 肿瘤平均直径约 0.4 cm × 0.5 cm, 肿瘤组织切片 HE 染色可见瘤组织结构紊乱, 大片组织坏死, 细胞排列呈腺样结构, 细胞异型性明显, 核大, 核仁明显, 并可见瘤巨细胞, 核分裂相多见, 可见较多病理性

核分裂相, 病理形态学分析符合肝细胞癌特征 (图 6)。而不表达 HCV-C 基因的 Chang-liver 肝细胞组裸鼠则未见肿瘤生长。

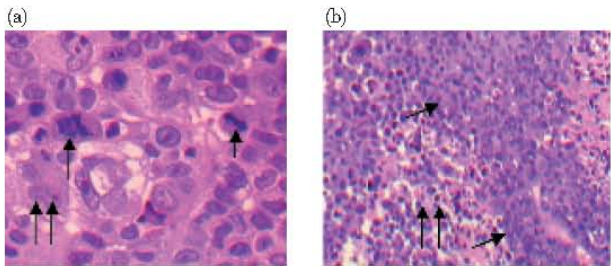


Fig. 6 Section of tumor tissues stained HE

(a) ×400, ↑ showed pathological karyokinesis phase of the cells in the tissue of the tumors, ↑↑ showed tumor giant cell in the tissue of the tumors. (b) ×200, ↑ showed adenotype structures in the tissue of the tumors, ↑↑ showed parts of the tissue necrosis.

3 讨 论

HCV-C 蛋白是 HCV 重要的结构蛋白, 分子质量为 21 ku, 除了与 HCV RNA 结合形成病毒的核心以外, 通过激活转录因子和别的细胞内信号转导途径, 正性或负性调控多种细胞基因的转录, 调节细胞生长、增殖及凋亡。主要有以下几方面: a. 野生型 p53 基因是一种抑癌基因, 可将 DNA 受损的细胞封闭于 G1 期直到 DNA 修复, 若无法修复, 则启动凋亡机制引起凋亡。Ray 等^[10,11]认为 HCV-C 蛋白特别是 80 ~ 122 位氨基酸可抑制 p53 启动子活性, 而使依赖 p53 的凋亡反应受抑制, P53 蛋白失去抗癌活性。b. HCV-C 蛋白既可通过结合到细胞周期素激酶 (cyclin-dependent kinase, Cdk) 抑制物 p21/Waf1 C 端的活性基团, 促进 p21/Waf1 的降解, 抑制 p21/Waf1 的活性, 影响细胞增殖周期^[12,13], 又可通过激活细胞周期素 E (cyclin E) 的途径促进细胞增殖^[14], 而细胞周期素 E 的过度表达与多种肿瘤的发生有关^[15-17]。c. NF-κB 是一种重要的核转录因子, 与多种基因的转录有关, 参与调节细胞的增殖与分化。NF-κB 通常与胞浆内 IκB 结合形成胞浆内复合物, 处于非激活状态, NF-κB 活化信号可促进 IκB 发生一系列磷酸化过程, IκB 随之降解, NF-κB 从复合物上解离, 进入核内启动一系列基因的转录^[18,19], HCV-C 蛋白可通过调节胞浆内核转录因子 NF-κB 信号转导通路中的某些环节, 激活核转录因子 NF-κB, 抑制细胞

凋亡, 促进细胞增殖^[20,21]. 基于上述理论, HCV-C 蛋白被认为与 HCV 感染所致的肝硬化及肝细胞癌的发生有关. 为了进一步探索 HCV-C 蛋白与肝细胞癌发生的关系, 我们选用 HCV 感染的天然宿主细胞, 即人肝细胞作为研究对象, 首先构建重组真核表达载体 p^{cDNA3-C}, 建立表达 HCV-C 基因的人肝细胞模型, 在此基础上观察 HCV-C 基因的表达对人肝细胞生物学行为的影响.

RT-PCR 方法检测结果表明, HCV-C 基因在感染后 20 代以上的肝细胞中仍然有较强表达, 说明 HCV-C 基因在我们建立的细胞模型中能长期表达. 蛋白质印迹和 ICC 结果显示, 我们建立的 Chang-liver 人肝细胞模型能表达 HCV-C 蛋白, 该蛋白质主要分布在细胞核周围, 少量进入核内, 与 Li 等^[22]在 HepG2 细胞上的研究结果相同. 肝细胞模型建立初期, 各组细胞的生长特征无明显差异, 随着培养时间的延长, 表达 HCV-C 基因组肝细胞中部分细胞出现梭型样改变. 培养 20 代以后, 我们进一步观察到肝细胞的生长特性发生了许多改变, 与不表达 HCV-C 基因组肝细胞相比: a. 细胞生长形态出现长梭型样改变; b. 细胞的增殖能力增强及细胞生长速度显著加快; c. 细胞间 DNA 含量的均一性变差, 即细胞间个体差异变大. 上述结果显示了表达 HCV-C 基因后肝细胞有恶性转化倾向. 为了进一步证实该细胞的恶性生物学行为, 又进行了裸鼠皮下接种细胞成瘤实验, 20 天后接种表达 HCV-C 基因的 Chang-liver 人肝细胞的 6 只裸鼠全部有肿瘤长出, 并且肿瘤组织结构符合肝细胞癌病理形态特点, 从而证实了 HCV-C 基因表达导致 Chang-liver 人肝细胞的恶性转化.

通过本研究, 证明了 HCV-C 蛋白可导致人肝细胞发生恶性转化, 并能在动物体内形成恶性肿瘤, 提示 HCV-C 蛋白与 HCV 感染所致肝细胞癌的发生有直接关系. 但是, HCV-C 蛋白致人肝细胞发生恶性转化的具体分子机理还有待于进一步研究和阐明, 这也将为 HCV 感染所致肝细胞癌发生机理的研究及其基因治疗和新药研发提供新的理论基础.

参 考 文 献

- Moradpour D, Cerny A, Heim M H, *et al.* Hepatitis C: an update. *Swiss Med Wkly*, 2001, **131** (21~22): 291~298
- Kawamura T, Furusaka A, Koziel M J, *et al.* Transgenic expression of hepatitis C virus structural proteins in the mouse. *Hepatology*, 1997, **25** (4): 1014~1021
- Moradpour D, Englert C, Wakita T, *et al.* Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology*, 1996, **222** (1): 51~63
- Pasquinelli C, Shoenberger J M, Chung J, *et al.* Hepatitis C virus core and E2 protein expression in transgenic mice. *Hepatology*, 1997, **25** (3): 719~727
- Yan B S, Tam M H, Syu W J, *et al.* Self-association of the C-terminal domain of the hepatitis-C virus core protein. *Eur J Biochem*, 1998, **258** (1): 100~106
- Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, *et al.* The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol*, 1998, **72** (7): 6048~6055
- Basu A, Meyer K, Ray R B, *et al.* Hepatitis C virus core protein is necessary for the maintenance of immortalized human hepatocytes. *Virology*, 2002, **298** (1): 53~62
- Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, *et al.* Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-x_L expression. *Virology*, 2002, **296** (1): 84~93
- Erhardt A, Hassan M, Heintges T, *et al.* Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology*, 2002, **292** (2): 272~284
- Ray R B, Meyer K, Ray R. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology*, 1996, **226** (2): 176~182
- Ray R B, Steele R, Meyer K, *et al.* Hepatitis C virus core protein represses p21/WAF1/Cip1/Sid1 promoter activity. *Gene*, 1998, **208** (2): 331~336
- Wang F, Yoshida I, Takamatsu M, *et al.* Complex formation between hepatitis C virus core protein and p21/Waf1/Cip1/Sd1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **273** (2): 479~484
- Yoshida I, Oka K, Hidajat R, *et al.* Inhibition of p21/Waf1/Cip1/Sd1 expression by hepatitis C virus core protein. *Microbio Immunol*, 2001, **45** (10): 689~697
- Cho J W, Baek W K, Suh S I, *et al.* Hepatitis C virus core protein promotes cell proliferation through the upregulation of cyclin E expression levels. *Liver*, 2001, **21** (2): 137~142
- Keyomarsi K, Conte D, Yoyofuku W, *et al.* Deregulation of cyclin E in breast cancer. *Oncogen*, 1995, **11** (5): 941~950
- Nielsen K H, Amerlov C, Cajander S, *et al.* Cyclin E expression and proliferation in breast cancer. *Anal Cell Pathol*, 1998, **17** (3): 177~188
- Spruck C H, Won K A, Reed S I. Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature*, 1999, **401** (6750): 297~300
- Karin M. How NF-KappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene*, 1999, **18** (49): 6867~6874
- Pahl H L. Activators and target genes of Rel/NF-KappaB transcription factors. *Oncogene*, 1999, **18** (49): 6853~6866
- Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, *et al.* Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology*, 2000, **32** (2): 405~412
- Tai D L, Tsai S L, Chen Y M, *et al.* Activation of nuclear factor kappaB in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 2000, **31** (3), 656~664
- Li K, Prow T, Lemon S M, *et al.* Cellular response to conditional expression of hepatitis C virus core protein in Huh7 cultured human hepatoma cells. *Hepatology*, 2002, **35** (5): 1237~1246

Research on Malignant Transformation of Cultured Human Hepatocytes by Hepatitis C Virus Core Gene Expression *

Shan Yu¹⁾, Chen Xi-Gu^{1) **}, Huang Bing¹⁾, Hu An-Bin²⁾, Guo Zhong-Min¹⁾, Huang Wen-Ge¹⁾

(¹⁾Department of Experiment Animal Center, ZhongShan University, Guangzhou 510080;

²⁾Department of General Surgery, Union Hospital, TongJi Medical College, HuaZhong University of Science and Technology, Wuhan 430030)

Abstract Hepatitis C virus (HCV) core protein is considered an important viral structural protein and has been known to regulate proliferation and apoptosis of the cells, thus, it is believed to be related to cirrhosis of liver and hepatocarcinogenesis resulting from HCV infection. To further study the relationship between HCV core protein and hepatocarcinogenesis. The eukaryote expressing recombinant plasmid vector were constructed, then transferred it into human hepatocyte-derived Chang-liver cell line by lipofectin and established the cell model expressing HCV core protein. HCV core mRNA in the Chang-liver cells was detected by RT-PCR. Expression and distribution of the HCV core protein in the Chang-liver cells were identified by Western blot and immunocytochemistry (ICC). Phenotype of the cells expressing HCV core protein altered and displayed long fusiform shape under light microscope cultured more than 20 passages after transfection. Compared with control group cells, the cells showed a markedly increased proliferation rate, and a higher variation index of DNA content. 6/6 of BALB/c-nu/nu nude mice generated tumors until 20 days after subcutaneous inoculation of the cells expressing HCV core protein. Furthermore, constitution structure of the tumors coincided with that of hepatocarcinoma. Control group nude mice did not generated tumors. Above results indicated that HCV core protein promoted the malignant transformation of the Chang-liver cells, which implied that HCV core protein was directly related to hepatocarcinogenesis result from HCV infection.

Key words HCV-C protein, Chang-liver human hepatocytes, malignant transformation

* This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (103055).

** Corresponding author. Tel: 86-20-87331393, E-mail: chenxigu@163.com

Received: August 11, 2003 Accepted: September 28, 2003