

# 双香豆素在HBx介导的肝癌细胞生长增殖中的作用及其机制研究

王晴 程胜桃 陈娟\*

(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

**摘要** HCC是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 其中50%以上与乙型肝炎病毒(HBV)感染相关, 且乙肝相关性肝癌患者术后复发率明显高于未合并乙肝患者。而病毒蛋白HBx是促进乙肝相关性肝癌进展的主要因素。因此, 寻找能够有效抑制HBx促癌作用的小分子化合物, 减缓乙肝相关性肝癌的疾病进展, 对于延长患者生存期具有重要意义。该研究初步探讨了小分子化合物双香豆素在HBx介导的肝癌细胞生长增殖中的作用及机制。首先, 利用MTT实验确定了双香豆素的使用浓度。其次, 采用生长曲线、CCK-8和EdU实验检测了双香豆素对HBV稳定表达细胞(HepG2.2.15)、HBV感染细胞(HepG2-NTCP)、HBx过表达细胞(HepG2-HBx)、HBV瞬时表达细胞(HepG2 HBV-WT)及肝癌细胞(HepG2)生长增殖能力的影响; 同时利用平板集落形成实验检测了细胞集落形成能力。然后, 利用实时荧光定量PCR和Western blot分别检测了细胞生长增殖相关分子 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)及下游靶标c-Myc和细胞周期蛋白A2(Cyclin A2)的mRNA和蛋白水平。最后, 检测了双香豆素发挥抑癌作用时对HBx的依赖性。结果显示, 双香豆素呈浓度依赖地抑制HepG2.2.15细胞及HBV感染的HepG2-NTCP细胞的生长增殖及集落形成; 同时, 双香豆素显著抑制HBx过表达细胞(HepG2-HBx)及HBV瞬时表达细胞(HepG2 HBV-WT)的生长增殖。进一步机制解析发现, 双香豆素显著下调 $\beta$ -catenin、c-Myc和Cyclin A2的水平进而抑制细胞生长增殖。最后, 该研究证实了双香豆素对乙肝相关性肝癌生长增殖的抑制作用依赖于HBx。总之, 该文发现双香豆素可有效抑制乙肝相关性肝癌生长增殖且此作用依赖于HBx。

**关键词** 双香豆素; 乙肝相关性肝癌; 增殖; 乙型肝炎病毒蛋白X

## Effect and Mechanism of Dicoumarin on the Growth and Proliferation of HBx-Mediated Hepatocellular Carcinoma Cells

WANG Qing, CHENG Shengtao, CHEN Juan\*

(Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases, Chinese Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** HCC is one of the most common malignant tumors in the world, and more than 50% of which are associated with HBV (hepatitis B virus) infection. The postoperative recurrence rate of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma patients is significantly higher than that of uncombined patients. The viral protein HBx is the

收稿日期: 2020-11-02 接受日期: 2021-03-08

国家自然科学基金(批准号: 81871656)和重庆医科大学感染性疾病实验室主任基金(批准号: 202003)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68486780, E-mail: chenjuan2014@cqmu.edu.cn

Received: November 2, 2020 Accepted: March 8, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81871656) and the Key Laboratory of Infectious Diseases, CQMU (Grant No.202003)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68486780, E-mail: chenjuan2014@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5533>

main factor to promote the progression of hepatitis B-associated hepatocellular carcinoma. Therefore, it is of great significance to search for small molecule compounds that can effectively inhibit the carcinogenic effect of HBx and slow down the disease progression of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. In this study, the role and mechanism of the small molecule compound dicoumarin in the growth and proliferation of hepatoma cells mediated by HBx were preliminarily investigated. Firstly, the concentration range of dicoumarin was determined by MTT assay; then, the effects of dicoumarin on the growth and proliferation of HBV stable expression cells (HepG2.2.15), HBV infected cells (HepG2-NTCP), HBx overexpression cells (HepG2-HBx), HBV transient expression cells (HepG2 HBV-WT) and hepatoma cells (HepG2) were detected by growth curve, CCK-8 and EdU tests; meanwhile, the colony forming ability of cells was detected by plate colony forming assay. Afterwards, the mRNA and protein levels of  $\beta$ -catenin, c-Myc and Cyclin A2 separately were detected by real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot. Finally, the dependence of dicoumarin on HBx for its cancer inhibitory effect was detected. The results showed that dicoumarin inhibited the growth, proliferation and colony formation of HepG2.2.15 cells and HepG2-NTCP cells infected with HBV in a concentration-dependent manner; simultaneously, dicoumarin significantly inhibited the growth and proliferation of HBx overexpression cells (HepG2-HBx) and HBV transient expression cells (HepG2 HBV-WT). Further mechanism analysis showed that dicoumarin significantly decreased the levels of  $\beta$ -catenin, c-Myc and Cyclin A2, thereby inhibiting cell growth and proliferation. Finally, it was confirmed that the inhibitory effect of dicoumarin on the growth and proliferation of hepatitis B-related liver cancer depended on HBx. In conclusion, this study found that dicoumarin could effectively inhibit the growth and proliferation of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma, which was dependent on HBx.

**Keywords** dicoumarin; hepatitis B-related hepatocellular carcinoma; proliferation; hepatitis B virus X protein

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界范围内第六大最常见的癌症及第四大导致癌症病人死亡的原因, 严重威胁着人类健康。世界卫生组织的统计数据显示, 2018年全球肝细胞癌的新发病例为841 080例, 粗发病率为11.0/1.0万, 标化发病率为9.3/10.0万<sup>[1]</sup>。据此估算, 到2040年全球肝细胞癌的新发病例将高达1 361 836例<sup>[2]</sup>。尽管黄曲霉毒素污染、饮酒、非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 以及 II 型糖尿病等均与肝细胞癌的发生发展密切相关, 但肝细胞癌最主要的致病原因为乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染。50% 以上的肝细胞癌发生与 HBV 感染相关<sup>[3]</sup>, 且乙肝相关性肝癌患者术后复发率明显高于未合并乙肝患者。因此, 预防和治疗乙肝相关性肝癌对于延长患者生存期具有重要意义。

HBV 属于嗜肝 DNA 病毒科, 其基因组为长约 3.2 Kb 的部分双链松弛环状 DNA, 包含 4 个部分重叠的开放阅读框 (open reading frames, ORFs): preC/C、P、preS/S 和 X。其中病毒蛋白 X (hepatitis B virus X, HBx) 由最小的 ORF 编码, 包含 154 个氨基酸。尽管

乙肝相关性肝细胞癌的发生机制尚未完全阐明, 但有证据表明, 病毒蛋白 HBx 是促进乙肝相关性肝细胞癌进展的主要因素<sup>[4]</sup>。一方面, HBV 感染肝细胞时将 HBx 整合入宿主细胞核, 导致肝细胞基因组结构变异, 诱导肝细胞癌变; 另一方面, 作为重要的转录激活因子, HBx 通过转录激活多种癌基因, 干扰细胞内信号传导过程, 促进肝细胞癌的发生。此外, HBx 通过异常激活 P13K/Akt<sup>[5]</sup>、JAK-STAT<sup>[6]</sup>、Wnt/ $\beta$ -catenin<sup>[7]</sup> 等信号通路, 调控肝细胞增殖、凋亡等过程, 促进肝细胞癌的发生发展。因此, 寻找能够有效抑制 HBx 促癌作用的小分子化合物, 对治疗乙肝相关性肝细胞癌具有重要意义。

香豆素又称为香豆精, 为苯并吡喃酮类化合物, 广泛存在于花草植物中, 最初人们提取香豆素类化合物主要用于天然香料制备。随着分离提取技术的发展, 越来越多的香豆素及其衍生物被分离鉴定, 且其功能也不再限于香料制备, 还具有抗炎、抗肿瘤等效能。双香豆素 (dicoumarin, DIC) 属于香豆素类, 也是一种苯并吡喃酮类有机化合物。双香豆素最早作为一种抗凝血剂应用于临床, 随着

研究深入人们发现其具有抗肿瘤、抗菌和抗病毒等活性<sup>[8-9]</sup>。最近的研究证实,双香豆素可以抑制HBV的复制,具有明显的抗病毒效能<sup>[10]</sup>。体内实验发现,作为醌类氧化还原酶1[NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, NQO1]的特异性抑制剂,双香豆素可以通过抑制NQO1酶活性,从而抑制肝癌细胞生长并诱导其凋亡<sup>[11]</sup>。然而,双香豆素在乙肝相关性肝细胞癌中的作用尚未见报道。

因此,本研究初步探索了双香豆素对HBx介导的肝癌细胞生长增殖的作用,并进一步研究了其分子机制。研究发现,双香豆素通过下调细胞生长增殖相关因子进而拮抗HBx的促癌作用。本研究为双香豆素调节HBx介导的肝癌发生发展的分子机制提供实验依据,并提示双香豆素可能成为乙肝相关性肝癌的潜在治疗药物。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞及质粒 HepG2、HepG2.2.15购自ATCC(American Type Culture Collection); HepG2-NTCP细胞由本实验室保存; HBV表达质粒pCH9/3091(作为野生型HBV, HBV-WT)由陆军军医大学兰林教授馈赠; HBx缺失的HBV表达质粒(HBx-MUT HBV)是在pCH9/3091上将一个终止密码子插入HBx基因的起始处构建而成, HBx表达质粒(Flag-HBx)是将HBx全长插入到3xflag-CMV-7.1载体上构建而成,两者均由本实验室保存。

1.1.2 药物 双香豆素购自美国Sigma公司。采用0.13 nmol/L氢氧化钠溶液溶解双香豆素,终浓度为40 mmol/L,分装并储存于-80 °C备用。

1.1.3 试剂 胎牛血清、DMEM高糖型培养基购自美国Gibco公司;青霉素-链霉素购自美国Hyclone公司; Lipofectamine™ 3000转染试剂(Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent)购自美国Invitrogen公司; MTT试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司; EdU细胞增殖检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; Trizol、逆转录试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; SYBR GREEN试剂购自美国Bio-Rad公司; 化学发光试剂盒、蛋白定量分析试剂盒购自美国Sigma公司;  $\beta$ -catenin、c-Myc、Cyclin A2、 $\beta$ -actin、Flag-HBx抗体及荧光二抗购自美国Cell Signaling Technology公司; GAPDH抗体购

自美国Bioworld公司; HBc抗体购自丹麦DAKO公司; 引物自行设计并由北京擎科生物科技有限公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2和HepG2-NTCP细胞培养于含有10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的DMEM培养基中, HepG2.2.15细胞培养于含10%胎牛血清、400  $\mu$ g/mL G418的DMEM培养基中,以上细胞均在5% CO<sub>2</sub>、37 °C的孵箱中培养。

1.2.2 细胞转染 在HepG2细胞系中进行质粒转染。取对数生长期的HepG2细胞以 $3 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于12孔板中,待细胞融合度达到70%~90%时,进行细胞转染。提前30~60 min更换无血清培养基,并按照Lipofectamine™ 3000转染试剂盒说明书进行转染,转染8 h后更换新鲜培养基。

1.2.3 细胞感染 在HepG2-NTCP细胞系中进行HBV感染。取对数生长期的HepG2-NTCP细胞以 $2 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于12孔板中,待细胞融合度达到70%时,使用感染培养基预处理24 h,进行细胞感染。在4% PEG8000存在的情况下,用1 000个HBV病毒颗粒/细胞感染细胞。感染24 h后,用PBS清洗细胞3次,洗去残留病毒颗粒,并使用双香豆素处理细胞。

1.2.4 免疫荧光实验 免疫荧光实验检测HepG2-NTCP细胞中HBV的感染效率。细胞感染HBV 72 h后,用4%多聚甲醛固定细胞,0.5% Triton X-100透膜,2% BSA室温封闭40 min,之后加入一抗HBc(1:200),4 °C孵育过夜。第二天用PBS洗涤3次,每次5 min。滴加稀释好的荧光二抗(1:400),室温孵育2 h。最后用DAPI复染细胞核并在共聚焦显微镜下观察。每个孔内随机选取5个视野进行拍照并用Image J软件处理图片,计算HBc阳性细胞比例。

1.2.5 MTT法检测细胞活性 取对数生长期的细胞接种于96孔板中(HepG2.2.15和HepG2-NTCP细胞:  $2.0 \times 10^4$ 个/孔; HepG2细胞:  $1.5 \times 10^4$ 个/孔),于37 °C培养24 h后,分别加入0、3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400、800  $\mu$ mol/L的双香豆素继续培养72 h。每孔加入10  $\mu$ L的MTT溶液(5 mg/mL),37 °C避光培养4 h。弃去培养基,每孔加入100  $\mu$ L DMSO,置于摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解。用酶标仪测定490 nm波长处的吸光度(D)值,同时设置空白孔调零。细胞存活率=(处理组D值-空白组D值)/(对照组D值-空白组D值) $\times 100\%$ 。各组均设3个复孔,实验重复

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	序列(5'→3')
Gene name	Sequence (5'→3')
<i>β-catenin</i>	Forward: CAT CTA CAC AGT TTG ATG CTG CT
	Reverse: GCA GTT TTG TCA GTT CAG GGA
<i>c-Myc</i>	Forward: TAC AAC ACC CGA GCA AGG AC
	Reverse: TTC TCC TCC TCG TCG CAG T
<i>Cyclin A2</i>	Forward: TAA ACA GCC TGC GTT CAC CA
	Reverse: CAG GGC ATC TTC ACG CTC TA
<i>β-actin</i>	Forward: CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT
	Reverse: AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG

3次。

**1.2.6 生长曲线实验** 取对数生长期的细胞接种于12孔板中(HepG2.2.15和HepG2细胞:  $3 \times 10^5$ 个/孔; HepG2-NTCP细胞:  $2 \times 10^5$ 个/孔), 处理1~4天后, 胰酶消化细胞, 然后用新鲜培养基重悬细胞, 制备成单细胞悬液。使用牛鲍计数板在显微镜下进行计数, 并绘制生长曲线, 实验重复3次。

**1.2.7 CCK-8(cell counting kit-8)实验** 取转染后的HepG2细胞以 $3 \times 10^3$ 个/孔的密度接种于96孔板中, 于37 °C培养24 h后, 分别加入0、25和50 μmol/L的双香豆素培养1~4天。每孔加入10 μL CCK-8试剂, 37 °C继续培养2 h, 使用酶标仪检测450 nm波长处的 $D$ 值, 同时设置空白孔调零。细胞增殖率=(处理组 $D$ 值-空白组 $D$ 值)/(对照组 $D$ 值-空白组 $D$ 值) $\times 100\%$ 。各组均设置3个复孔, 实验重复3次。

**1.2.8 5-乙炔-2-脱氧尿苷(EdU)细胞增殖实验** 将终浓度为20 μmol/L的EdU染料加入细胞中培养(HepG2细胞: 12~16 h; HepG2-NTCP: 6~8 h), 使其参与细胞的DNA合成过程。用4%多聚甲醛固定细胞, 0.3% Triton X-100透膜, 再加入配置好的Click反应液避光孵育30 min, 最后用DAPI复染细胞核并在共聚焦显微镜下观察。每个孔内随机选取5个视野进行拍照并用Image J软件处理图片, 计算增殖细胞比例。

**1.2.9 平板集落实验** 将细胞以 $1 \times 10^3$ 个/孔的密度接种于6孔板中, 第二天细胞贴壁后, 采用不同浓度的双香豆素进行处理, 连续培养12天, 每两天更换1次培养基并重新加药。待肉眼明显观察到集落形成后, 用4%多聚甲醛和0.1%结晶紫固定并染色。将6孔板置于显微镜下观察, 对形成的集落进行计数(10个以上细胞所形成的细胞团作为一个集落)并拍照, 实验重复3次。

**1.2.10 RNA提取及qRT-PCR检测** Trizol法提取细胞的总RNA, 取1 μg逆转录为cDNA。采用qRT-PCR检测*β-catenin*、*c-Myc*和*Cyclin A2*的mRNA水平, *β-actin*为内参, 并以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算目的基因的相对表达水平。实验设置3个复孔并重复3次。引物序列如表1所示。

**1.2.11 Western blot** 提取细胞总蛋白质, BCA法检测蛋白质的浓度。取30 μg的蛋白质用10%的SDS-PAGE分离, 然后在90 V恒压下进行湿转, 将蛋白质转移至PVDF膜上。用5%脱脂牛奶室温封闭2 h后加入*β-catenin*(1:3 000)、*c-Myc*(1:3 000)、*Cyclin A2*(1:3 000)、GAPDH(1:10 000)、Flag-HBx(1:3 000)、*β-actin*(1:3 000)一抗, 4 °C孵育过夜。第二天用1× TBST洗去游离抗体, 加入HRP标记的山羊抗小鼠(1:10 000)或山羊抗兔IgG(1:3 000)二抗, 室温孵育2 h; 1× TBST洗膜3次, 每次10 min。ECL显影, 以GAPDH或*β-actin*为内参。

**1.2.12 统计学分析** 采用SPSS 22.0软件对实验数据进行统计分析。实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 每个独立实验均重复3次。两组间比较采用非配对 $t$ 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)及双因素方差分析(Two-Way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 双香豆素细胞毒性检测

为了明确双香豆素的细胞毒性大小, 我们利用MTT实验检测了双香豆素在多种细胞系中的半数致死药物浓度(50% cytotoxic concentration,  $CC_{50}$ )。首先将HepG2.2.15、HepG2及HepG2-NTCP细胞分别接种于96孔板中, 采用浓度梯度的双香豆素处理

细胞 72 h 后, 利用 MTT 检测细胞活性, 并计算  $CC_{50}$  值。结果显示, 双香豆素在以上三种细胞中的  $CC_{50}$  均  $>800 \mu\text{mol/L}$  (图 1A~图 1C)。同时, 我们进一步检测了双香豆素在肝癌细胞 Huh-7 以及 HBV 稳定复制细胞系 HepAD38 中的  $CC_{50}$ , 发现双香豆素在 Huh-7 细胞中的  $CC_{50} > 500 \mu\text{mol/L}$ , 在 HepAD38 细胞中的  $CC_{50} > 800 \mu\text{mol/L}$  (图 1D)。以上数据说明, 双香豆素在细胞中具有较高的  $CC_{50}$ , 以及较大的安全作用浓度。在后续研究中, 我们选用了显著小于  $CC_{50}$  值的药物浓度作为双香豆素的使用浓度进行实验。

## 2.2 双香豆素抑制 HBV 介导的肝癌细胞生长增殖

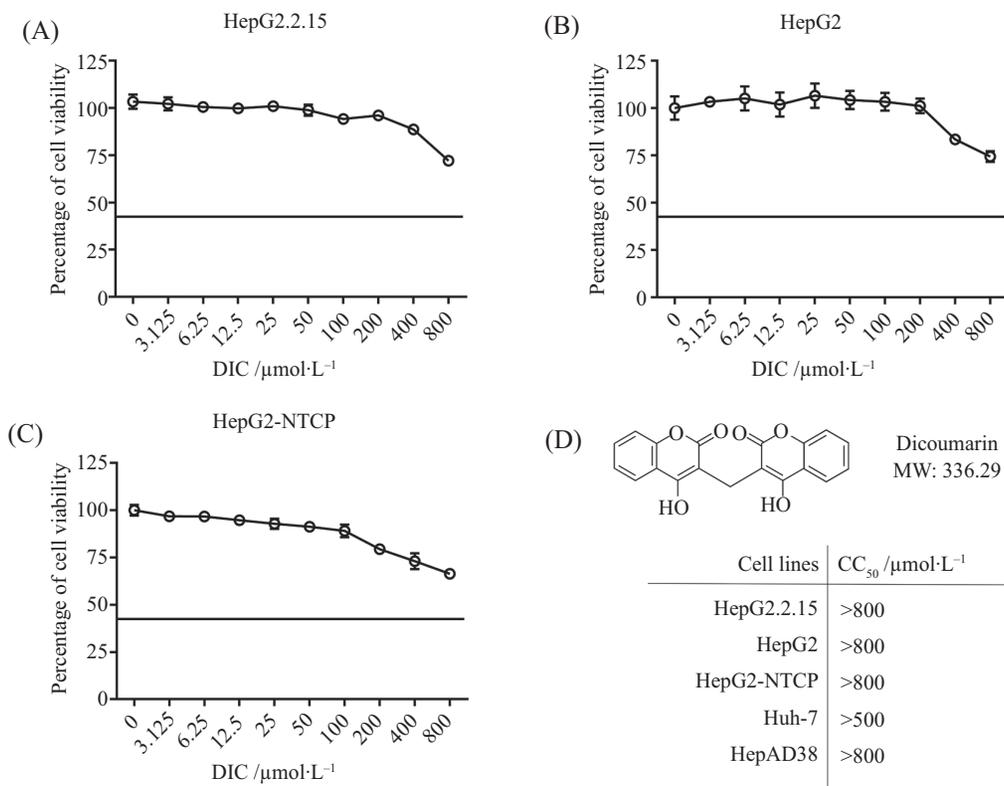
为了探究双香豆素在乙肝相关性肝癌发生发展中的重要作用, 我们首先检测了双香豆素对 HBV 稳定表达细胞 HepG2.2.15 生长增殖的影响。如图 2A 所示, 与肝癌细胞 HepG2 相比, 高浓度的双香豆素可显著抑制 HepG2.2.15 细胞的生长 ( $P < 0.01$ )。同时, 集落形成实验也证实用  $50 \mu\text{mol/L}$  和  $100 \mu\text{mol/L}$  双香豆素处理 HepG2.2.15 细胞后, HepG2.2.15 细胞集落形

成能力明显减弱 ( $P < 0.01$ ); 相比之下, HepG2 的集落形成能力受双香豆素抑制程度较低 ( $P < 0.05$ ) (图 2B)。

为了进一步证实双香豆素对乙肝相关性肝癌生长增殖的调控作用, 接下来我们在 HBV 感染细胞模型 HepG2-NTCP 中进行了研究。首先使用免疫荧光实验检测 HepG2-NTCP 细胞中 HBV 的感染效率。结果显示, HBV 感染细胞 72 h 后, 细胞内 HBc 的阳性率为 73.83% (图 2C)。随后, 在感染及未感染 HBV 病毒颗粒的 HepG2-NTCP 细胞中, 加入不同浓度的双香豆素进行处理。我们发现用  $50 \mu\text{mol/L}$  双香豆素处理时, 被 HBV 感染的 HepG2-NTCP 细胞生长明显减慢, 集落形成能力显著减弱 ( $P < 0.01$ ); 相比之下, 未感染 HBV 的 HepG2-NTCP 细胞受到双香豆素的抑制程度较低 ( $P < 0.05$ ) (图 2D 和图 2E)。以上结果提示, 双香豆素可抑制 HBV 介导的肝癌细胞生长增殖。

## 2.3 HBx 介导肝癌细胞生长增殖

研究表明, 病毒蛋白 HBx 在乙肝相关性肝细胞癌中扮演了重要角色, 是促进乙肝相关性肝癌

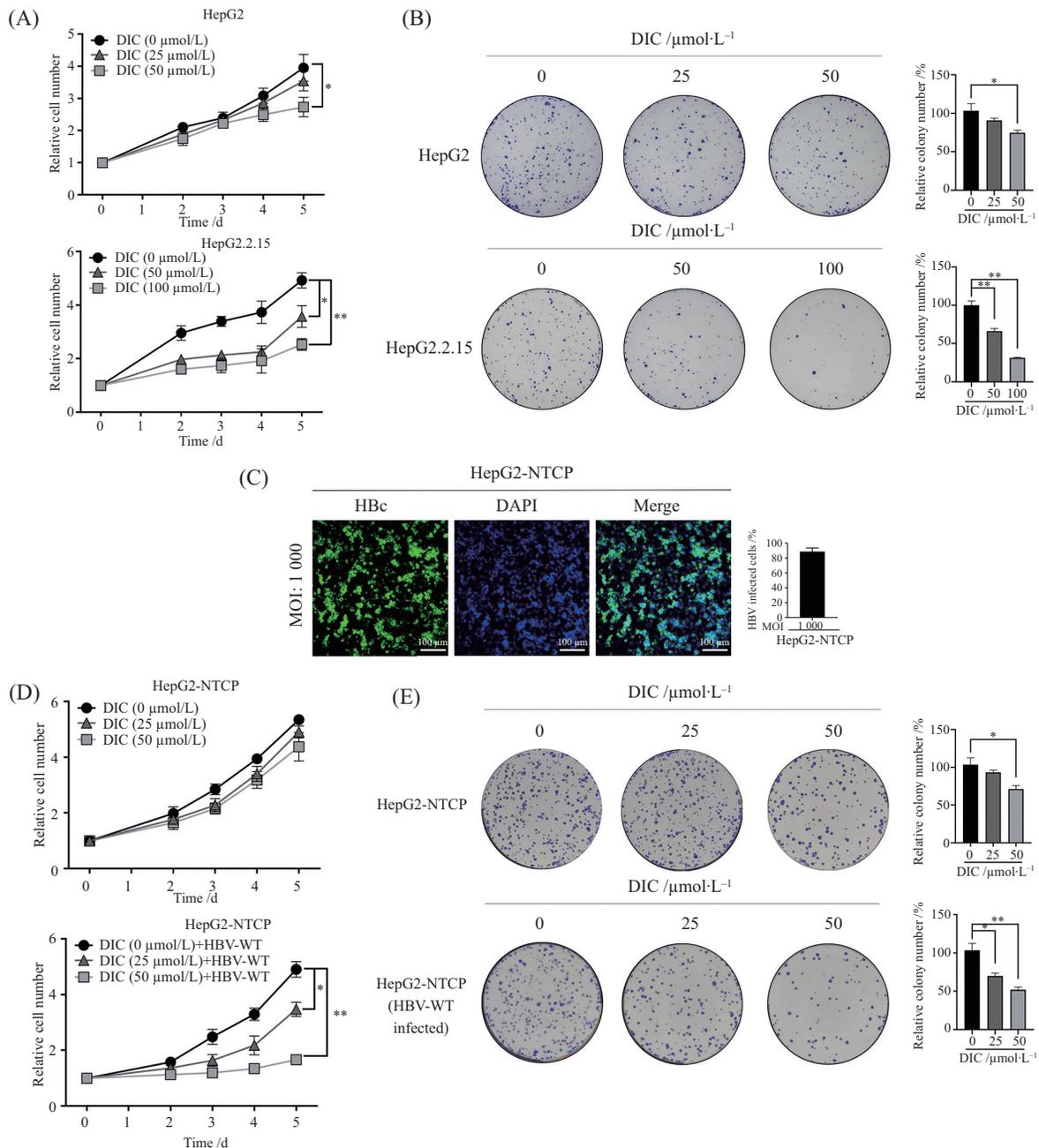


A: MTT 实验检测双香豆素在 HepG2.2.15 细胞中的细胞毒性; B: MTT 实验检测双香豆素在 HepG2 细胞中的细胞毒性; C: MTT 实验检测双香豆素在 HepG2-NTCP 细胞中的细胞毒性; D: 双香豆素的基本信息及其细胞毒性汇总。

A: MTT assay was used to detect the cytotoxicity of DIC in HepG2.2.15 cells; B: MTT assay was used to detect the cytotoxicity of DIC in HepG2 cells; C: MTT assay was used to detect the cytotoxicity of DIC in HepG2-NTCP cells; D: the basic information and cytotoxicity of DIC.

图1 双香豆素细胞毒性检测

Fig.1 Detection of the cytotoxicity of DIC



A: 生长曲线实验检测双香豆素对肝癌细胞HepG2及HBV稳定表达细胞HepG2.2.15生长增殖的影响。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ , 与DIC(0 μmol/L)组相比。B: 平板集落实验检测双香豆素对肝癌细胞HepG2及HBV稳定表达细胞HepG2.2.15集落形成能力的影响。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ , 与DIC(0 μmol/L)组相比。C: 免疫荧光实验检测HepG2-NTCP细胞中HBV的感染效率, MOI: 感染复数。D: 生长曲线实验检测双香豆素对HepG2-NTCP细胞及HBV感染的HepG2-NTCP细胞生长增殖的影响。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ , 与DIC(0 μmol/L)或DIC(0 μmol/L)+HBV-WT组相比。E: 平板集落实验检测双香豆素对HepG2-NTCP细胞及HBV感染的HepG2-NTCP细胞集落形成能力的影响。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ , 与DIC(0 μmol/L)或DIC(0 μmol/L)+HBV-WT组相比。

A: the effects of DIC on the growth and proliferation of hepatoma cells HepG2 and HBV stable expressing hepatoma cells HepG2.2.15 were detected by growth curve assay.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  vs DIC (0 μmol/L) group. B: the effect of DIC on the colony forming ability of hepatoma cells HepG2 and HBV stable expressing hepatoma cells HepG2.2.15 were detected by plate colony formation assays.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  vs DIC (0 μmol/L) group. C: the infection efficiency of HBV on HepG2-NTCP cells was detected by immunofluorescence assay. MOI: multiplicity of infection. D: the effect of DIC on the growth and proliferation of HepG2-NTCP cells and HBV-infected HepG2-NTCP cells were detected by growth curve assay.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  vs DIC (0 μmol/L) or DIC (0 μmol/L)+HBV-WT group. E: the effect of DIC on the colony forming ability of HepG2-NTCP cells and HBV-infected HepG2-NTCP cells were detected by plate colony formation assays.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  vs DIC (0 μmol/L) or DIC (0 μmol/L)+HBV-WT group.

图2 DIC抑制HBV介导的肝癌细胞生长增殖

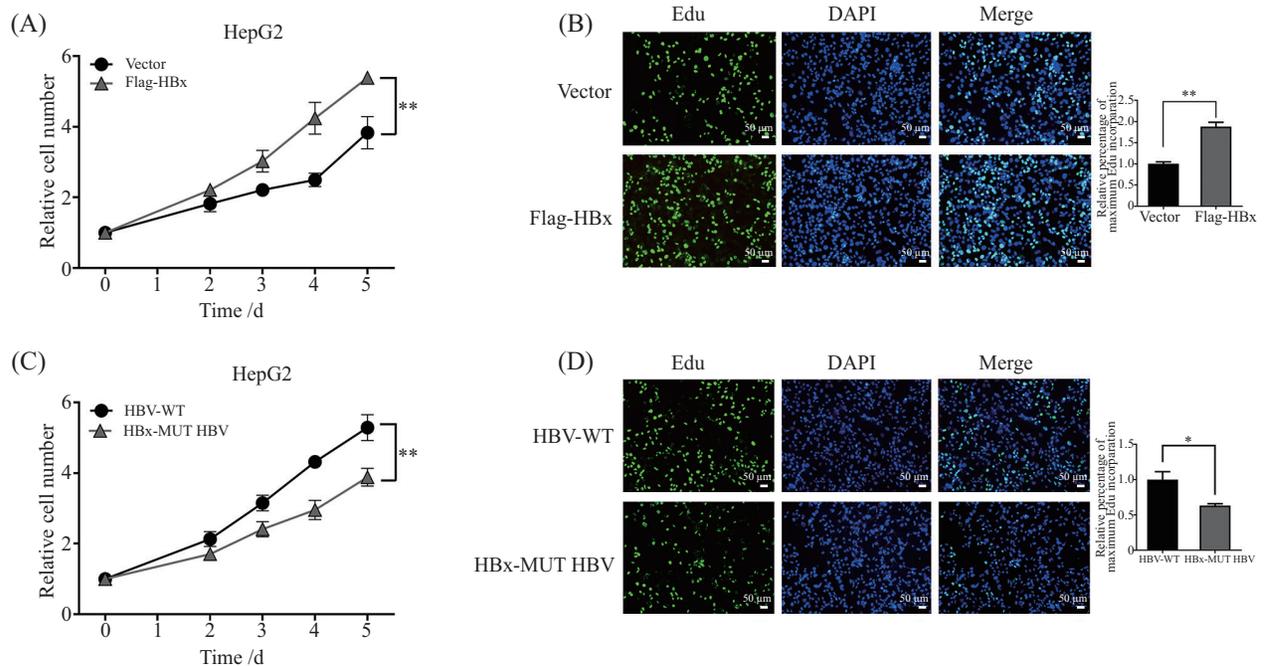
Fig.2 DIC inhibits the growth and proliferation of HBV-mediated HCC cells

进展的主要因素。针对此,我们在HepG2细胞中检测了HBx对肝癌细胞生长增殖的调控作用。首先,在HepG2细胞中过表达HBx,进行生长曲线实验。结果显示,与对照组相比,转染HBx表达质粒后,HepG2细胞的生长速度明显加快( $P<0.01$ )(图3A)。进一步的EdU染色结果提示,HBx过表达组的DNA合成速度明显加快( $P<0.01$ )(图3B)。以上结果说明,HBx可以促进肝癌细胞的生长增殖。随后,我们在HepG2细胞中分别转染野生型HBV质粒(HBV-WT)和HBx缺失型HBV质粒(HBx-MUT HBV),进行生长曲线实验及EdU增殖实验。生长曲线实验结果显示,HBx缺失可以削弱HBV诱导HepG2细胞生长增殖的能力( $P<0.01$ )(图3C);EdU增殖实验也证实了此结果( $P<0.05$ )(图3D),提示HBx在HBV介导的肝癌细胞生长增殖中发挥重要作用。

#### 2.4 双香豆素抑制HBx介导的肝癌细胞生长增殖

前面我们发现,双香豆素可有效抑制HBV表

达的肝癌细胞生长增殖,且HBx可促进肝癌细胞的生长增殖。那么,双香豆素是否能抑制HBx介导的肝癌细胞的生长增殖呢?为了探究这一问题,我们首先在HepG2及HepG2-HBx细胞中,采用不同浓度的双香豆素进行处理。生长曲线结果显示,25  $\mu\text{mol/L}$ 双香豆素可以抑制HepG2-HBx细胞生长增殖( $P<0.05$ ),50  $\mu\text{mol/L}$ 双香豆素表现出更明显的抑制效果( $P<0.01$ ),说明双香豆素可以呈浓度依赖地抑制HepG2-HBx而不是HepG2细胞的生长增殖(图4A)。CCK-8结果也印证了这一发现,25  $\mu\text{mol/L}$ 和50  $\mu\text{mol/L}$ 的双香豆素均可以显著抑制HepG2-HBx细胞的生长增殖( $P<0.01$ )(图4B)。随后,我们在HepG2细胞中分别转染野生型HBV质粒(HBV-WT)和HBx缺失型HBV质粒(HBx-MUT HBV),采用不同浓度的双香豆素处理,进一步探究HBx在其中发挥的重要作用。生长曲线和CCK-8实验结果显示,25  $\mu\text{mol/L}$ 和50  $\mu\text{mol/L}$ 的双香豆素均可以显著抑制HBV表达的HepG2细胞的生长增殖( $P<0.01$ );HBx缺失可有效减弱

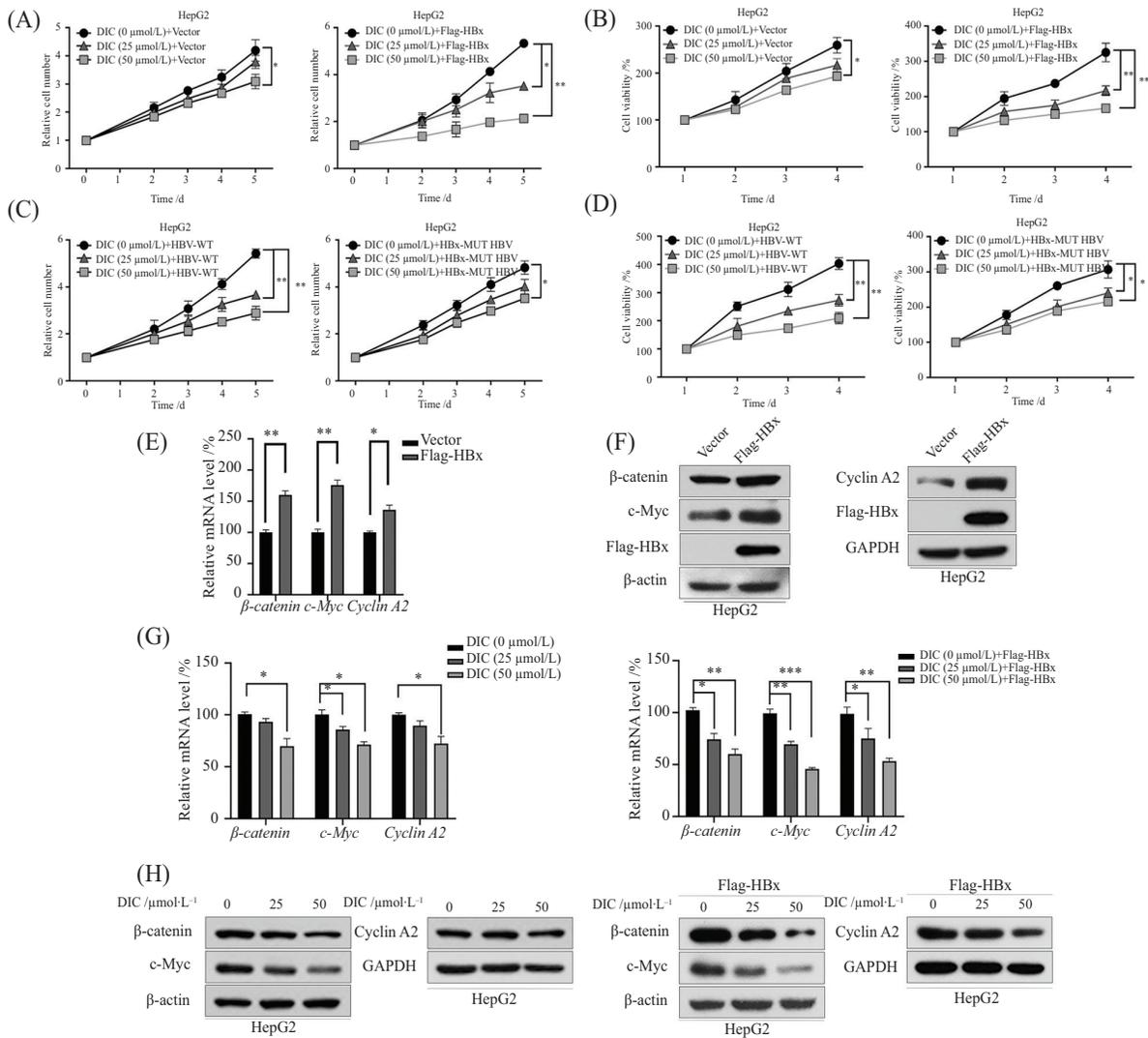


A: 生长曲线实验检测HBx过表达对HepG2细胞生长增殖的影响。 $**P<0.01$ ,与Vector组相比。B: EdU细胞增殖实验检测HBx过表达对HepG2细胞生长增殖的影响。 $**P<0.01$ ,与Vector组相比。C: 生长曲线实验检测HBx缺失对HBV瞬时表达细胞(HepG2 HBV-WT)生长增殖的影响。 $**P<0.01$ ,与HBV-WT组相比。D: EdU细胞增殖实验检测HBx缺失对HBV瞬时表达细胞(HepG2 HBV-WT)生长增殖的影响。 $*P<0.05$ ,与HBV-WT组相比。

A: the effect of HBx overexpression on the proliferation of HepG2 cells was detected by growth curve assay.  $**P<0.01$  vs Vector group. B: the effect of HBx overexpression on the proliferation of HepG2 cells was detected by the EdU cell proliferation experiment.  $**P<0.01$  vs Vector group. C: the effect of HBx deletion on the proliferation of HBV transient expression cells (HepG2 HBV-WT) was detected by growth curve assay.  $**P<0.01$  vs HBV-WT group. D: the effect of HBx deletion on the proliferation of HBV transient expression cells (HepG2 HBV-WT) was detected by the EdU cell proliferation experiment.  $*P<0.05$  vs HBV-WT group.

图3 HBx促进肝癌细胞生长增殖

Fig.3 HBx promotes the growth and proliferation of hepatoma cells



A: 生长曲线实验检测双香豆素对转染 Vector 和 Flag-HBx 的 HepG2 细胞生长增殖的影响。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与 DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+Vector 组或 DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+Flag-HBx 组相比。B: CCK-8 实验检测双香豆素对转染 Vector 和 Flag-HBx 的 HepG2 细胞生长增殖的影响。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与 DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+Vector 或 DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+Flag-HBx 组相比。C: 生长曲线实验检测双香豆素对转染 HBV-WT 及 HBx-MUT HBV 质粒的 HepG2 细胞生长增殖的影响。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与 DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+HBV-WT 或 DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+HBx-MUT HBV 组相比。D: CCK-8 实验检测双香豆素对转染 HBV-WT 及 HBx-MUT HBV 质粒的 HepG2 细胞生长增殖的影响。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与 DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+HBV-WT 或 DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+HBx-MUT HBV 组相比。E: qRT-PCR 检测 HBx 对 HepG2 细胞中  $\beta$ -catenin、c-Myc 和 Cyclin A2 mRNA 水平的影响,  $\beta$ -actin 为内参。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与 Vector 组相比。F: Western blot 检测 HBx 对 HepG2 细胞中  $\beta$ -catenin、c-Myc 和 Cyclin A2 蛋白水平的影响, GAPDH 或  $\beta$ -actin 为内参。G: qRT-PCR 检测双香豆素对 HepG2 和 HepG2-HBx 细胞中  $\beta$ -catenin、c-Myc 和 Cyclin A2 mRNA 水平的影响,  $\beta$ -actin 为内参。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与 DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ ) 或 DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+Flag-HBx 组相比。H: Western blot 检测双香豆素对 HepG2 和 HepG2-HBx 细胞中  $\beta$ -catenin、c-Myc 和 Cyclin A2 蛋白水平的影响, GAPDH 或  $\beta$ -actin 为内参。

A: the effect of DIC on the proliferation of HepG2 cells transfected with Vector and Flag-HBx was detected by growth curve assay. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+Vector or DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+Flag-HBx group. B: CCK-8 assay was used to detect the effects of DIC on the growth and proliferation of HepG2 cells transfected with Vector and Flag-HBx. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+Vector or DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+Flag-HBx group. C: the effect of DIC on the proliferation of HepG2 cells transfected with HBV-WT and HBx-MUT HBV was detected by growth curve assay. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+HBV-WT or DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+HBx-MUT HBV group. D: the effect of DIC on the proliferation of HepG2 cells transfected with HBV-WT and HBx-MUT HBV was detected by CCK-8 assay. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+HBV-WT or DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+HBx-MUT HBV group. E: qRT-PCR was used to detect the effect of HBx on the mRNA levels of  $\beta$ -catenin, c-Myc and Cyclin A2 in HepG2 cells.  $\beta$ -actin was used as loading control. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Vector group. F: Western blot was used to detect the effect of HBx on the protein levels of  $\beta$ -catenin, c-Myc and Cyclin A2 in HepG2 cells. GAPDH or  $\beta$ -actin was used as loading controls. G: qRT-PCR was used to detect the effect of DIC on the mRNA levels of  $\beta$ -catenin, c-Myc and Cyclin A2 in HepG2 and HepG2-HBx cells.  $\beta$ -actin was used as loading control. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ ) or DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+Flag-HBx group. H: Western blot was used to detect the effect of DIC on the protein levels of  $\beta$ -catenin, c-Myc and Cyclin A2 in HepG2 and HepG2-HBx cells. GAPDH or  $\beta$ -actin was used as loading controls.

图4 DIC抑制HBx介导的肝癌细胞生长增殖

Fig.4 DIC inhibits the growth and proliferation of HBx mediated hepatoma cells

双香豆素对表达HBV的HepG2细胞生长增殖的抑制作用( $P<0.05$ )(图4C和图4D)。以上结果说明,双香豆素抑制HBV介导的肝癌细胞生长增殖的作用依赖于HBx。

为了探究双香豆素抑制HBx介导的肝癌细胞生长增殖的可能机制,我们查阅文献发现Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路是一条进化上高度保守的信号通路,是肝癌发生的重要驱动因素<sup>[12]</sup>。为了明确HBx调控肿瘤细胞生长增殖的分子机制,我们首先检测了过表达HBx对Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路相关基因表达水平的影响。结果显示,与对照组相比,HBx可以显著促进HepG2细胞内 $\beta$ -catenin( $P<0.01$ )及其下游靶标c-Myc( $P<0.01$ )和Cyclin A2( $P<0.05$ )的mRNA及蛋白水平(图4E和图4F)。接下来,我们检测了双香豆素对HepG2及HepG2-HBx细胞内Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路相关基因的mRNA及蛋白表达水平的影响。结果显示,50  $\mu\text{mol/L}$ 的双香豆素对HepG2细胞中 $\beta$ -catenin、c-Myc和Cyclin A2的表达有一定的抑制作用( $P<0.05$ );但50  $\mu\text{mol/L}$ 的双香豆素对HepG2-HBx细胞中 $\beta$ -catenin( $P<0.01$ )、c-Myc( $P<0.001$ )和Cyclin A2( $P<0.01$ )的表达抑制作用更为显著(图4G和图4H)。以上结果提示,双香豆素可抑制HBx介导的肝癌细胞生长增殖,其机制可能与下调Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路有关。

### 2.5 双香豆素抑制HBV介导的肝癌细胞生长增殖的作用依赖于HBx

为了探究HBx在双香豆素抑制乙肝相关性肝癌进展中的作用,我们分别收集了野生型HBV病毒颗粒(HBV-WT)以及HBx缺失的HBV病毒颗粒(HBx-MUT HBV)。接下来,采用双香豆素处理分别感染了以上两种病毒颗粒的HepG2-NTCP细胞。检测结果发现,50  $\mu\text{mol/L}$ 双香豆素可显著抑制感染了野生型病毒颗粒的HepG2-NTCP细胞的生长,且使得细胞内DNA合成速度减慢( $P<0.01$ )(图5A和图5C)。然而,50  $\mu\text{mol/L}$ 双香豆素处理对感染了HBx缺失的HBV病毒颗粒的HepG2-NTCP细胞的生长以及DNA合成过程并没有显著的影响(图5B和图5D)。以上结果表明,双香豆素抑制HBV介导的肝癌细胞生长增殖的作用依赖于HBx。

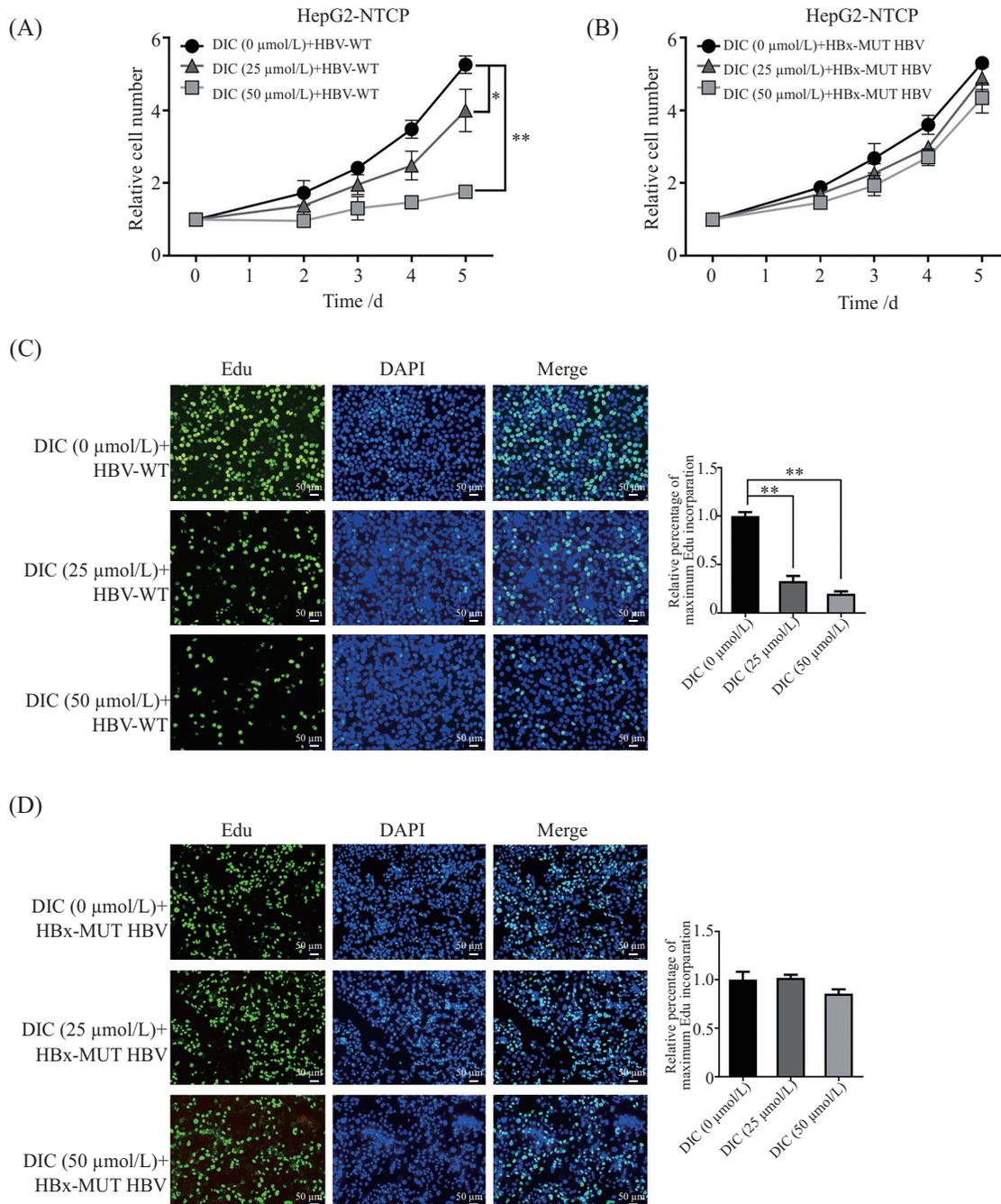
## 3 讨论

HCC是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,在我国,HBV长期感染是导致HCC产生、发展及治疗

后复发的重要危险因素<sup>[13]</sup>。WU等<sup>[14]</sup>报道,恩替卡韦或替比夫定等抗HBV药物治疗能够显著降低乙肝相关性肝癌的病死率并提高生存率。然而,即使经过五年的抗病毒治疗,肝癌发生及复发的风险仍然存在<sup>[15]</sup>。因此,进一步阐明乙肝相关性肝癌的发生机制,寻找新的治疗策略具有重要意义。

随着研究的深入,人们发现HBx不仅是调节HBV的关键蛋白,其在乙肝相关性肝癌的发生发展中也扮演着重要角色<sup>[16-17]</sup>。HBV感染肝细胞时将HBV整合入宿主细胞核,导致肝细胞基因组结构变异,是诱导肝细胞癌变的重要原因;而其中HBx整合入宿主细胞是HBV整合入宿主细胞过程中最重要的一步,提示HBx发挥着重要的促癌作用<sup>[18]</sup>。HBx介导的表观遗传学的改变与肝癌的发生密切相关。HBx可以通过减少WDR5蛋白的泛素化,增强其稳定性,进而促进全基因组H3K4me3的修饰,促进肝癌的发生发展<sup>[19]</sup>。此外,HBx作为一种反式激活因子,与多种信号通路相互作用,促进肝癌的发生。XU等<sup>[20]</sup>报道,HBx可以抑制p53介导的miR-148a活化,从而上调AKT/ERK/mTOR通路,促进肝癌的生长和转移。同时,促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 作为NF- $\kappa$ B的信号激活剂,可以通过此信号通路增强HBx蛋白的稳定性,促进HBx在细胞内的累积,参与肝癌的发生发展<sup>[21]</sup>。HBx还可以竞争性结合抑癌基因APC,导致细胞核中 $\beta$ -catenin的上调以及Wnt信号通路的激活,从而诱导细胞恶性转化<sup>[7]</sup>。而我们的研究也证实,双香豆素通过下调Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路相关分子,进而拮抗HBx对肝癌细胞生长增殖的促进作用。

香豆素类化合物是自然界中一类重要的天然有机化合物,因具有2H-1-苯并吡喃-2-酮结构而具备多种生物学特性。许多香豆素类化合物及其衍生物具有抗凝血、抗炎、抗氧化以及抗真菌作用<sup>[22]</sup>。研究表明,一些天然的香豆素类化合物能够抑制HIV-1整合酶活性,发挥抗病毒效能<sup>[23]</sup>。同时,补骨脂素、蛇床子素、瑞香素、东莨菪素等香豆素类化合物可以选择性作用于肿瘤细胞发挥抗癌作用<sup>[24]</sup>。双香豆素为天然香豆素的衍生物之一,被广泛用作抗凝血剂。最近的研究揭示,双香豆素可以用于治疗或预防流感病毒感染,并具有较强的抗HBV效应<sup>[10]</sup>。同时,双香豆素在多种癌症中通过不同机制发挥其抗癌作用。在肾细胞癌中,双香豆素可以抑制NF- $\kappa$ B和CREB的活性,在转录水平下调Bcl-2及下游基因



A、B: 生长曲线实验检测双香豆素对HBV-WT及HBx-MUT HBV感染的HepG2-NTCP细胞生长增殖的影响。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ , 与DIC (0  $\mu\text{mol/L}$ )+HBV-WT或DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+HBx-MUT HBV组相比。C、D: EdU细胞增殖实验检测双香豆素对HBV-WT及HBx-MUT HBV感染的HepG2-NTCP细胞生长增殖的影响。 $**P<0.01$ , 与DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+HBV-WT或DIC(0  $\mu\text{mol/L}$ )+HBx-MUT HBV组相比。

A,B: the effects of DIC on the proliferation of HepG2-NTCP cells infected with HBV-WT and HBx-MUT HBV were detected by growth curve assay.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  vs DIC (0  $\mu\text{mol/L}$ )+HBV-WT or DIC (0  $\mu\text{mol/L}$ )+HBx-MUT HBV group. C,D: the effects of DIC on the growth and proliferation of HepG2-NTCP cells infected with HBV-WT and HBx-MUT HBV were detected by EdU cell proliferation assay.  $**P<0.01$  vs DIC (0  $\mu\text{mol/L}$ ) or DIC (0  $\mu\text{mol/L}$ )+HBx-MUT HBV group.

图5 DIC抑制HBV介导的肝癌细胞生长增殖的作用依赖于HBx

Fig.5 The inhibitory effects of DIC on the growth and proliferation of HBV-mediated HCC cells depends on HBx

的表达, 促进细胞凋亡<sup>[25]</sup>。其次, 双香豆素通过靶向妊娠特异性 $\beta$ -1糖蛋白(pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1, *PSG1*)增强化疗药物的细胞毒性, 从而

抑制乳腺癌细胞的恶性表型<sup>[26]</sup>。双香豆素还可以通过抑制丙酮酸脱氢酶激酶1(pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1)的酶活性, 使细胞产生较高水平的活

性氧, 诱导细胞凋亡, 抑制卵巢癌<sup>[27]</sup>及肝癌<sup>[28]</sup>生长。此外, 作为还原酶抑制剂, 双香豆素可以通过抑制NQO1酶活性, 有效抑制如肝癌<sup>[11]</sup>、胰腺癌<sup>[29]</sup>、胆管癌<sup>[30]</sup>等多种恶性肿瘤的发生发展。但是双香豆素在乙肝相关性肝癌中的作用尚未见报道。本研究首次揭示了双香豆素在乙肝相关性肝癌进展中的抑制作用, 并初步探讨了其可能是通过下调Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路进而发挥功能的。

*c-Myc*是一种原癌基因(核蛋白基因), 与多种肿瘤发生发展密切相关。有文献报道, HBx可以通过抑制*c-Myc*的泛素化来提高*c-Myc*的稳定性, 从而极大地促进HBV的致癌作用<sup>[31]</sup>。我们发现, 双香豆素通过显著下调*c-Myc*水平, 抑制HepG2-HBx细胞生长增殖, 进而拮抗HBV的致癌作用。另外, *c-Myc*被认为可以加速细胞代谢, 激活细胞周期。其与复制前体相互作用, 形成位于DNA合成早期位点的复合物, 直接影响DNA的复制<sup>[32]</sup>。因此, 我们进一步检测了双香豆素对细胞周期蛋白Cyclin A2的调控作用。一致的是, 双香豆素同样下调了Cyclin A2的表达水平。提示双香豆素可能通过抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路, 使细胞发生细胞周期阻滞, 从而抑制乙肝相关性肝癌的发生发展。我们还发现双香豆素对Cyclin D1的影响较小(未展示), 猜测双香豆素主要通过Wnt信号通路发挥调控作用, 而Cyclin A2和Cyclin D1实际上受到多种信号通路的共同调控, Cyclin D1有可能不是双香豆素发挥功能的主要信号分子; 此外, 可能由于通路之间的相互影响以及周期蛋白的动态变化, 导致我们没有观察到双香豆素对Cyclin D1的调控作用, 具体机制还有待于进一步研究。重要的是在HBx缺失后, 双香豆素对细胞生长增殖的抑制作用消失, 这提示HBx可能是双香豆素发挥抑制乙肝相关性肝癌细胞生长增殖作用的关键因素。

综上, 本文发现小分子化合物双香豆素可有效抑制乙肝相关性肝癌细胞的生长增殖, 且此作用依赖于HBx。初步解析了双香豆素抑制乙肝相关性肝癌细胞生长增殖的可能机制, 为乙肝相关性肝癌的临床治疗提供新的理论依据。

### 参考文献 (References)

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortal-

ity worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.

[2] CHEN Q, AYER T, ADEE MG, et al. Assessment of incidence of and surveillance burden for hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C in the era of direct-acting antiviral agents [J]. *JAMA Netw Open*, 2020, 3(11): e2021173.

[3] EL-SERAG H B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(6): 1264-73.

[4] ZHANG X D, WANG Y, YE L H. Hepatitis B virus X protein accelerates the development of hepatoma [J]. *Cancer Biol Med*, 2014, 11(3): 182-90.

[5] MUKHERJI A, JANBANDHU V C, KUMAR V. HBx protein modulates PI3K/Akt pathway to overcome genotoxic stress-induced destabilization of cyclin D1 and arrest of cell cycle [J]. *Indian J Biochem Biophys*, 2009, 46(1): 37-44.

[6] BOCK C T, TOAN N L, KOEBERLEIN B, et al. Subcellular mislocalization of mutant hepatitis B X proteins contributes to modulation of STAT/SOCS signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Intervirology*, 2008, 51(6): 432-43.

[7] GRIGORYAN T, WEND P, KLAUS A, et al. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(17): 2308-41.

[8] TIMSON D J. Dicumarol: a drug which hits at least two very different targets in vitamin K metabolism [J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(5): 500-10.

[9] ZHANG W J, SU J, XU H D, et al. Dicumarol inhibits PDK1 and targets multiple malignant behaviors of ovarian cancer cells [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179672.

[10] TAKEUCHI F, IKESA S, TSUKAMOTO Y, et al. Screening for inhibitor of episomal DNA identified dicumarol as a hepatitis B virus inhibitor [J]. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0212233.

[11] LI W Y, ZHOU H Z, CHEN Y, et al. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 overexpression in hepatocellular carcinoma potentiates apoptosis evasion through regulating stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein [J]. *Cancer Lett*, 2019, 451: 156-67.

[12] WANG W, XU L, LIU P, et al. Blocking Wnt secretion reduces growth of hepatocellular carcinoma cell lines mostly independent of  $\beta$ -catenin signaling [J]. *Neoplasia*, 2016, 18(12): 711-23.

[13] SOHN W, PAIK Y H, KIM J M, et al. HBV DNA and HBsAg levels as risk predictors of early and late recurrence after curative resection of HBV-related hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(7): 2429-35.

[14] WU C Y, CHEN Y J, HO H J, et al. Association between nucleoside analogues and risk of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma recurrence following liver resection [J]. *JAMA*, 2012, 308(18): 1906-14.

[15] PAPTAEODORIDIS G V, IDILMAN R, DALEKOS G N, et al. The risk of hepatocellular carcinoma decreases after the first 5 years of entecavir or tenofovir in Caucasians with chronic hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2017, 66(5): 1444-53.

[16] MATSUDA Y, ICHIDA T. Impact of hepatitis B virus X protein on the DNA damage response during hepatocarcinogenesis [J]. *Med Mol Morphol*, 2009, 42: 138-42.

[17] NEUBEUT C, WEI Y, BUENDIA M A. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis [J]. *J Hepatol*, 2010, 52(4): 594-604.

- [18] YUAN W, HUANG T, YU J, et al. Comparative analysis of viral protein interaction networks in hepatitis B virus and hepatitis C virus infected HCC [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1844(1 Pt.B): 271-9.
- [19] GAO W W, JIA Z C, TIAN Y, et al. HBx protein contributes to liver carcinogenesis by H3K4me3 modification through stabilizing WD repeat domain 5 protein [J]. *Hepatology*, 2020, 71(5): 1678-95.
- [20] XU X, FAN Z, KANG L, et al. Hepatitis B virus X protein represses miRNA-148a to enhance tumorigenesis [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2): 630-45.
- [21] SHUKLA R, YUE J, SIOUDA M, et al. Proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  increases the stability of hepatitis B virus X protein through NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32: 978-85.
- [22] SAIDU N E, VALENTE S, BANA E, et al. Coumarin polysulfides inhibit cell growth and induce apoptosis in HCT116 colon cancer cells [J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20(4): 1584-93.
- [23] ONG E B, WATANABE N, SAITO A, et al. Vipirinin, a coumarin-based HIV-1 Vpr inhibitor, interacts with a hydrophobic region of VPR [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(16): 14049-56.
- [24] 黄月芬. 香豆素类化合物在肿瘤治疗上的应用 [J]. *海峡药学* (HUANG Y F. Application of anticancer drugs with coumarin structures [J]. *Strait Pharm J*), 2015, 27(8): 1-4.
- [25] PARK E J, MIN K J, CHOI K S, et al. Dicoumarol sensitizes renal cell carcinoma Caki cells to TRAIL induced apoptosis through down-regulation of Bcl-2, Mcl-1 and c-FLIP in a NQO1-independent manner [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 323(1): 144-54.
- [26] HE D X, GU F, WU J, et al. Targeting PSG1 to enhance chemotherapeutic efficacy: new application for anti-coagulant the dicoumarol [J]. *Clin Sci*, 2016, 130(24): 2267-76.
- [27] ZHANG W, SU J, XU H, et al. Dicoumarol inhibits PDK1 and targets multiple malignant behaviors of ovarian cancer cells [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179672.
- [28] XU H D, HE Y C, MA J Y, et al. Inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase-1 by dicoumarol enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to oxaliplatin via metabolic reprogramming [J]. *Int J Oncol*, 2020, 57: 733-42.
- [29] CULLEN J J, HINKHOUSE M M, GRADY M, et al. Dicoumarol inhibition of NADPH: quinone oxidoreductase induces growth inhibition of pancreatic cancer via a superoxide-mediated mechanism [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(17): 5513-20.
- [30] BURANRAT B, PRAWAN A, KUKONGVIRIYAPAN U, et al. Dicoumarol enhances gemcitabine-induced cytotoxicity in high NQO1-expressing cholangiocarcinoma cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(19): 2362-70.
- [31] LEE S, KIM W, KO C, et al. Hepatitis B virus X protein enhances Myc stability by inhibiting SCF(Skp2) ubiquitin E3 ligase-mediated Myc ubiquitination and contributes to oncogenesis [J]. *Oncogene*, 2016, 35(14): 1857-67.
- [32] DORASAMY M S, CHOUDHARY B, NELLORE K, et al. Dihydroorotate dehydrogenase inhibitors target c-Myc and arrest melanoma, myeloma and lymphoma cells at S-phase [J]. *J Cancer*, 2017, 8(15): 3086-98.