

乙型肝炎病毒 X 蛋白结合蛋白(HBXIP) 对细胞周期的影响

王凤泽, 吴莲英, 乔玲, 张晓东*, 叶丽虹*

(南开大学生命科学学院 教育部生物活性材料重点实验室,天津 300071)

摘要 乙型肝炎病毒 X 蛋白结合蛋白(hepatitis B virus X-interacting protein, HBXIP)可与乙肝病毒 X 蛋白(HBX)的 C 端结合,它具有抑制 HBX 活性的作用.为进一步阐明 HBXIP 对细胞增殖的作用及其分子机制,构建了 HBXIP 的真核表达载体,并将其稳定转染至正常人肝细胞系 L-O2 细胞中,建立了稳定表达 HBXIP 蛋白的肝细胞系,命名为 L-O2-*hbxi*p.然后,应用 MTT、BrdU 标记实验和流式细胞术等方法,发现 HBXIP 过表达后,L-O2 细胞的生长速度明显加快,可促进细胞由 G₁ 期进入到 S 期,表明 HBXIP 具有促进 L-O2-*hbxi*p 细胞增殖的作用.应用免疫印迹对有关细胞周期相关蛋白进行了检测.结果显示,HBXIP 过表达时可上调细胞周期蛋白 D₁、细胞周期蛋白 E 的表达,并下调 p21 和 p27 的表达,从而调节细胞周期,产生对细胞增殖的影响.

关键词 HBXIP;细胞增殖;细胞周期;肝细胞

中图分类号 R363; Q25

Effect of Hepatitis B Virus X-interacting Protein (HBXIP) on Cell Cycle

WANG Feng-Ze, WU Lian-Ying, QIAO Ling, ZHANG Xiao-Dong, YE Li-Hong

(Key Laboratory of Bioactive Material of Ministry of Education, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Hepatitis B virus X-interacting protein (HBXIP) was found by binding with C-terminal of hepatitis B virus X (HBX), and down-regulated the activity of HBX. To further investigate the effects of HBXIP on proliferation of the cell and its molecular mechanism, we constructed the eukaryotic vector of expressing HBXIP, termed pCMV-*hbxi*p, which was stably transfected into human normal hepatic L-O2 cells, named L-O2-*hbxi*p. Both MTT assay and BrdU incorporation assay demonstrated that the growth rate of L-O2-*hbxi*p cell was increased compared with control group, the results from FCM assay showed in L-O2-*hbxi*p cells, the number of G₁ phase was significantly reduced while S phase was enhanced, respectively, suggesting that HBXIP promote the cell proliferation. Furthermore, the proteins involving in cell cycle regulation were examined by Western blot analysis. Western blot results showed that HBXIP was able to promote cell cycle progression via up-regulating cyclin D₁ and cyclin E, and down-regulating p21 and p27.

Key words hepatitis B virus X-interacting protein; cell proliferation; cell cycle; hepatic cells

乙型肝炎病毒 X 蛋白结合蛋白(hepatitis B virus X-interacting protein, HBXIP)基因由 Melegari 等^[1]于 1998 年首次从 HepG2 细胞中克隆获得. HBXIP mRNA 在动物的心、肝、肾、胰腺和骨骼肌等组织中广泛表达,是细胞组成型蛋白. HBXIP 可分别与 HBX、survivin 和 hSuv3p 蛋白结合而发挥其作用^[1-3]. 最近, Fujii 等^[4]研究发现, HBXIP 还参与调节细胞中心体的复制. 我们前期研究发现, HBXIP 可以抑制 HBX 蛋白诱导的细胞凋亡^[5], 当瞬时转染 HBXIP 基

因时,能够上调 c-Myc、Bcl-2 和 PCNA 的表达,推测

收稿日期:2006-11-28,接受日期:2007-03-12

国家自然科学基金资助项目(No. 30670959)

*联系人 Tel:022-23501385,

E-mail: yelihong@nankai.edu.cn, zhangxd@nankai.edu.cn

Received: November 28, 2006; Accepted: March 12, 2007

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30670959)

*Corresponding authors: Tel: 022-23501385

E-mail: yelihong@nankai.edu.cn, zhangxd@nankai.edu.cn

HBXIP 对细胞增殖具有调控作用^[6]。为了进一步阐明 HBXIP 调节细胞增殖的分子机制,本研究将 HBXIP 基因稳定转染至正常肝细胞 L-O2 细胞中,观察了 HBXIP 对细胞周期调控蛋白的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 真核表达载体与细胞株 真核表达载体 pCMV-Tag2B、RNA 干扰载体 pSilencer3.0-H1 和大肠杆菌 TOP10 由本室保存。永生化的人正常肝细胞 L-O2 细胞系购自南京凯基生物科技有限公司。

1.1.2 引物设计 针对 GenBank 报道的 HBXIP 的基因片段 (NM. 006402) 设计引物,5 端添加限制性内切酶 *EcoR* 酶切位点,3 端添加 *Sal* 酶切位点。引物序列如下:正义链,5'-AGGAATTCATGGAGCCGACCTTGAGCAG-3';反义链,5'-GATGTCGACTCAAGAGCCATTTTGTGCA-3',引物由北京三博远志生物公司合成。

1.1.3 试剂 RPMI1640 培养基和胎牛血清购自 GIBCO 公司; *Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及限制性内切酶均为宝生物(大连)生物工程有限公司产品;G418 购自 Merck 公司;Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;ECL Western 印迹显色试剂盒购自 Amersham biosciences 公司;HBXIP 多克隆抗体由本室制备^[6];细胞周期蛋白 B、细胞周期蛋白 D₁、细胞周期蛋白 E、p21、p27 和 BrdU 单克隆抗体购自 NeowMarkes 公司;肌动蛋白单克隆抗体为 Sigma 公司产品;FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为 Dako 公司产品;MTT、BrdU、碘化丙啶 (PI) 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用 RPMI1640 培养基培养 L-O2 细胞,培养基中含有 10% 胎牛血清,100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 硫酸链霉素,在 37 °C 孵箱 5% CO₂ 条件下培养。

1.2.2 真核表达载体 pCMV-hbxip 的构建 以 pcDNA3-hbxip 为模板^[5],通过 PCR 方法扩增 HBXIP 基因,酶切后连入表达载体 pCMV-Tag2B。转化大肠杆菌 TOP10,通过卡那抗性筛选阳性克隆,然后进行载体酶切和序列测定。

1.2.3 HBXIP RNA 干扰载体 pSilencer-hbxip 的构建 参考 Marusawa 等^[2]的方法合成 HBXIP 干扰片段,载体的具体构建过程见参考文献[6]。

1.2.4 稳定转染 HBXIP 基因细胞系的建立 转染前 24 h 将细胞传代,待细胞长至 60%~70% 进行转

染。转染方法参照 Lipofetamine 2000 说明书,转染 24 h 后加入含有 G418 (500 mg/L) 的选择培养基培养细胞,隔天换液,2 周后挑取单克隆扩大培养,建成稳定传代的转染 HBXIP 基因细胞系,并采用免疫印迹方法检测 HBXIP 的表达水平。

1.2.5 瞬时转染 pSilencer-hbxip 将上述构建的 HBXIP 基因 RNA 干扰载体 pSilencer-hbxip 基因瞬时转染 L-O2 细胞,pSilencer-control 载体为阴性对照,基因转染方法同上。

1.2.6 MTT 分析 胰酶消化 L-O2-hbxip 及对照组细胞,计数并调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml,接种于 96 孔板中,各孔细胞数约为 4×10^4 个。37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,加 20 μl 5 g/L 的 MTT 于各个孔中,继续培养 4 h,然后吸去孔中的培养液,再加入 150 μl DMSO,室温振荡 10 min,用酶标仪(波长 570 nm)测定各孔的 A 值,以后每隔 24 h 以同样方法测 5 个平行孔,连续测定 7 次,绘制曲线图。

1.2.7 BrdU 标记实验 参考 Chen 等^[7]方法。加入 BrdU 前接种细胞于盖玻片上,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养并加入终浓度为 10 μmol/L BrdU,继续培养 4 h,加入固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)于 -20 °C 固定 20 min,PBS 冲洗后加入 2 mol/L HCl,37 °C 作用 40 min,用硼酸盐溶液中和,接着用含 1% TritonX-100 的 PBS 洗涤 3 次,3% BSA 封闭 1 h,加入 BrdU 单克隆抗体,4 °C 过夜反应,接着加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG,于 37 °C 条件下闭光反应 1 h,最后滴加浓度为 50 mg/ml 的 PI 溶液 37 °C 作用 30 min,倒置荧光显微镜下计数。随机选取 5 到 7 个视野分别计算 BrdU 标记的阳性细胞数和 PI 标记的细胞总数(不少于 800 个细胞),标记指数 = BrdU 标记的细胞数/PI 标记的细胞数。每组实验重复 3 次。

1.2.8 流式细胞术分析 用胰酶消化细胞制备细胞悬液,加入 75% 冷无水乙醇,4 °C 固定 18 h 以上,800 r/min 离心 5 min,细胞用 PBS 洗 2 次,并加入终浓度为 50 mg/L 的 RNase A,37 °C 30 min,冰浴 2 min,加入终浓度为 50 mg/L 的碘化丙啶染料,4 °C 闭光染色 30 min,然后上机检测,并用 Cell Quest 软件分析各组细胞的周期分布。每组实验重复 3 次。

1.2.9 免疫印迹分析 用预冷的 PBS 洗细胞 2 次,然后加细胞裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1 mmol/L PMSF, 1% SDS, protease inhibitor cocktails) 冰上放置 20 min,4 °C 12 000 g 离心 20 min,收集上清定量分析。取 30~40 μg 已定量的总蛋白进行 12% SDS-

PAGE,电转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭过夜,加入一抗,室温培育 3 h, PBST 洗膜,再分别加入抗鼠、抗兔的 IgG 室温培育 1 h, PBST 洗膜,应用增强型 ECL 显色试剂盒于暗室曝光显影,免疫印迹实验均重复 3 次。

2 结果

2.1 稳定表达 HBXIP 细胞系的建立

通过 G418 筛选,最后留取 3 株稳定转染 HBXIP 基因的 L-O2 细胞系,将其命名为 L-O2-*hbxip*。采用免疫印迹方法检测 HBXIP 的表达水平。结果显示,与转染空载体 pCMV-Tag2B 的 L-O2 细胞相比 (L-O2-pCMV),3 株 L-O2-*hbxip* 细胞中的 HBXIP 表达水平均有上调 (Fig. 1)。选取表达水平明显上调的 2 号细胞株作进一步实验。

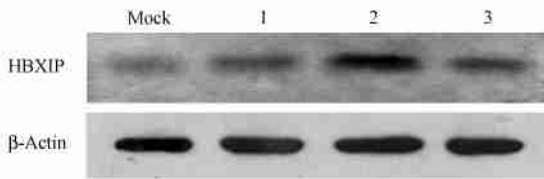


Fig. 1 Expression of HBXIP examined by Western blot analysis

HBXIP was over expressed in L-O2-*hbxip* cells.
Mock: Stable transfected with pCMV-Tag2B plasmid;
1—3: Stable transfected with pCMV-*hbxip* plasmid

2.2 HBXIP 对细胞增殖的影响

采用 MTT 法分别检测 L-O2-*hbxip* 细胞组和对照组的生存率,连续测定 7 d。结果表明,HBXIP 的过表达能够促进细胞生长 (Fig. 2)。同时,采用 BrdU 标记法进一步观察 HBXIP 对细胞增殖的影响。与对照组相比,L-O2-*hbxip* 细胞组处于 S 期的细胞数明显增多 (Fig. 3)。

2.3 HBXIP 对细胞周期的影响

应用 FCM 对 L-O2-*hbxip* 细胞和对照组细胞进行了细胞周期检测。结果显示 (Fig. 4),与对照组 (G₁ 期 78.5%, S 期 16.0%) 相比,L-O2-*hbxip* 细胞中 G₁ 期的细胞数目减少 (68.8%),而 S 期的细胞数目明显增加 (24.7%),提示 L-O2-*hbxip* 细胞具有增殖优势,表明 HBXIP 可能与 DNA 复制相关。

2.4 HBXIP 对细胞周期调节相关蛋白表达的影响

采用免疫印迹对 L-O2-pCMV 和 L-O2-*hbxip* 细胞中,细胞周期调节相关蛋白的表达水平进行了检

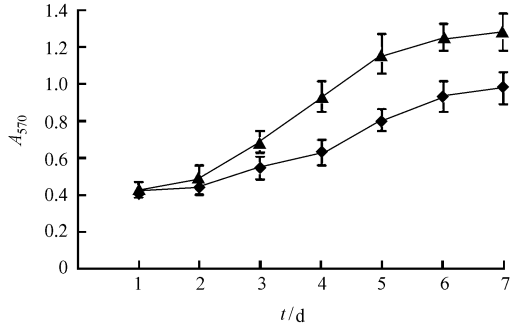


Fig. 2 Cell proliferation was measured by MTT assay in L-O2-*hbxip* cells

The y-axis represents the row A value. HBXIP-overexpressing cells promoted the cell proliferation
—pCMV-Tag2B; —pCMV-*hbxip*

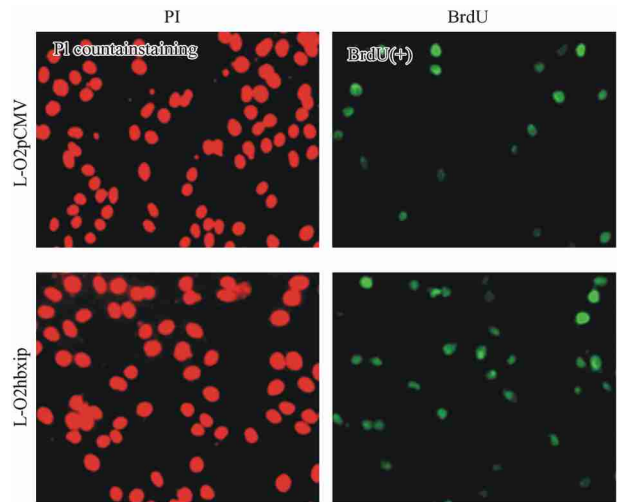


Fig. 3 Cell proliferation was measured by BrdU incorporation assay

Propidium iodide staining positive cells were red in the nucleus and green fluorescence showed the numbers of BrdU-positive cells

测。结果发现,L-O2-*hbxip* 细胞中,细胞周期蛋白 D₁ 和细胞周期蛋白 E 的表达水平较 L-O2-pCMV 细胞明显上调,而细胞周期蛋白 B 的表达在两组中无明显差异;而 L-O2-*hbxip* 细胞中,p21 和 p27 的表达较对照组均明显下调 (Fig. 5A)。将 HBXIP 基因的 RNA 干扰载体 pSilencer-*hbxip* 瞬时转染 L-O2 细胞后,免疫印迹结果显示,上述细胞周期蛋白的表达水平与过表达 HBXIP 时的结果完全相反 (Fig. 5B)。进一步说明,HBXIP 可以通过调控细胞周期蛋白 D₁、细胞周期蛋白 E、p21 和 p27 的表达来促进 L-O2 细胞的增殖。

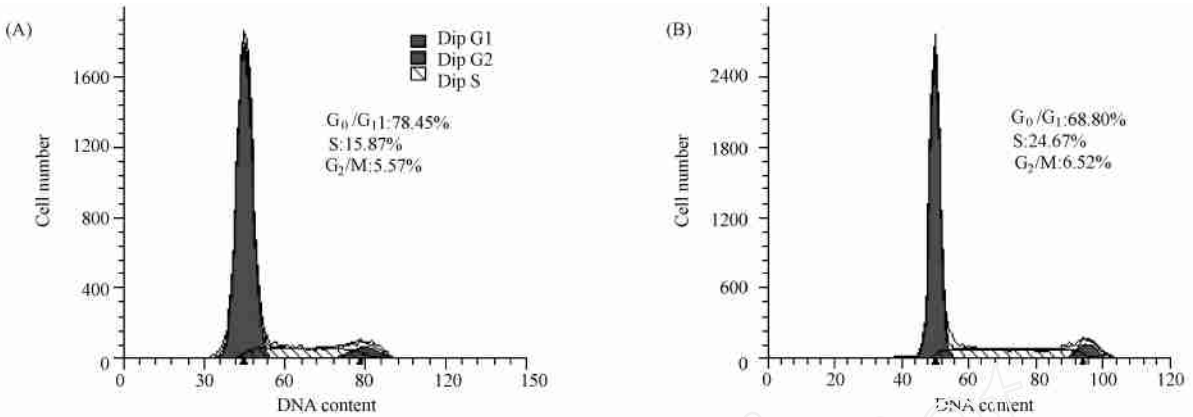


Fig. 4 Flow cytometry analysis for cell cycle

(A) L-O2 cells transfected with empty vector of pCMV-Tag2B; (B) L-O2 cells transfected with pCMV-*hbxi*p

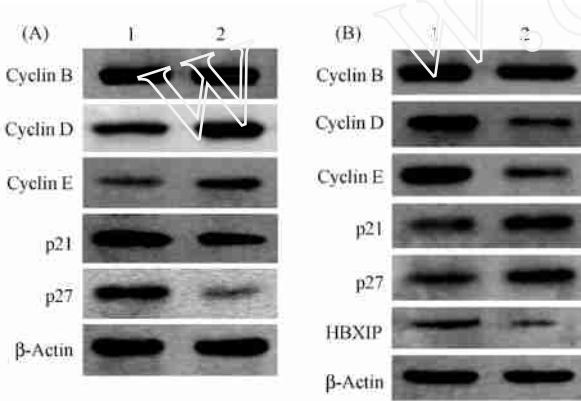


Fig. 5 Expression levels of proteins involved in regulation of cell cycle, such as cyclin B, cyclin D, cyclin E, p21 and p27 were examined by Western blot analysis

(A) Overexpression of HBXIP:
1. L-O2-pCMV cells, 2. L-O2-*hbxi*p cells.
(B) RNAi of targeting HBXIP mRNA:
1. pSilencer-control, 2. pSilencer-*hbxi*p

3 讨论

HBXIP 基因定位于人染色体 1p13.3,其开放阅读框基因编码 91 个氨基酸,分子量约为 9.6 kD. 目前,国内外对 HBXIP 功能研究很少,仅从作为其它蛋白的结合蛋白角度而研究其作用,而有关 HBXIP 对细胞增殖影响的研究尚未见报道. 作为 HBX 的结合蛋白,HBXIP 能特异地结合 HBX 的 C 末端,并降低 HBX 的活性,从而改变乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的复制周期^[1];作为 survivin 的协同因子,HBXIP 与 survivin 的复合物可以与 pro-caspase-9 结合,从而阻止其募集到 Apaf1 上,使 survivin 借助细胞色素 c 介导的凋亡途径选择性地抑制 caspase

蛋白酶活性,在细胞凋亡中发挥桥梁作用^[2]. 我们前期的研究结果显示,HBXIP 具有促进细胞增殖的作用^[6]. 为了进一步阐明 HBXIP 促进细胞增殖的分子机制,本研究以正常肝细胞系 L-O2 为实验材料,研究了 HBXIP 对细胞周期调控的影响. 在构建 HBXIP 基因真核表达载体的基础上,筛选得到稳定转染 HBXIP 基因的 L-O2 细胞系. 采用免疫印迹方法证实了 HBXIP 的过表达 (Fig. 1). MTT 和 BrdU 结合实验结果均显示,L-O2-*hbxi*p 细胞增殖水平明显高于对照组 L-O2-pCMV 细胞,显示 HBXIP 具有促进细胞增殖的作用 (Fig. 2, 3). 应用流式细胞术分析,发现与对照组相比,L-O2-*hbxi*p 细胞处于 G₁ 期的细胞数目明显减少,而处于 S 期的细胞数目增多,进一步说明 HBXIP 可促进 L-O2 细胞增殖 (Fig. 4),与瞬时转染 HBXIP 基因的实验结果相符^[6].

细胞的正常生长依赖于细胞周期中各种调节因子之间的平衡调控. 参与细胞周期调控的主要因子有:细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin dependent kinases, CDKs) 和 CDK 抑制蛋白 (cyclin dependent kinase inhibitors, CDKIs)^[8,9]等. 细胞周期蛋白是细胞周期的正调节因子,其表达的异常是导致肿瘤恶性转变并浸润生长转移的重要因素^[10]. 细胞周期蛋白 D₁ 和细胞周期蛋白 E 是引起细胞增殖的关键因子,细胞周期蛋白 D₁ 通常与 CDK4 结合,使后者激活,活化的 CDK4 可使 RB 磷酸化,进而使 E2F 启动 DNA 合成,促进细胞增殖^[11,12]. 细胞周期蛋白 E 可以与 CDK2 形成复合物,活化的 CDK2 不但可起始 DNA 合成,而且参与活化 NPTA 和组蛋白基因的表达^[13]. 我们的实验结果显示,HBXIP 能够上调细胞周期蛋白 D₁ 和 E 的表达,有助于解释 HBXIP 促

进 L-O2 细胞增殖的作用。p21 和 p27 属于细胞周期负调控因子 (CKIs) KIP1 家族的成员。p21 蛋白是最早发现并克隆的细胞周期蛋白依赖激酶 (CDK) 抑制因子^[14], 可以与 CDK2 和 CDK4 结合, 阻止细胞周期蛋白 E/CDK2、细胞周期蛋白 D1/CDK4 复合物形成, 导致 RB 不能被磷酸化, 从而阻止转录因子 E2F 从复合物 RB/E2F 中解离; p21 也可直接与 E2F 或增殖细胞核抗原 PCNA 结合, 从而抑制 DNA 的复制以及细胞周期继续运转所需基因的表达, 而将细胞周期阻滞在 G₁/S 期^[15,16]。p27 蛋白可以抑制细胞周期蛋白 E-CDK2、细胞周期蛋白 A-CDK2 和细胞周期蛋白 D1-CDK4 的复合物, 尤其以抑制细胞周期蛋白 E/CDK2 活性的作用为主, 对细胞周期进行负调节。p27 对 CDK 的抑制作用主要有两个方面: 其一, 可以通过 p27 的 C 端抑制 CDK2-Thr160 的磷酸化, 从而抑制细胞周期蛋白-CDK2 的前活性状态复合物的激活过程; 其二, p27 能够直接与细胞周期蛋白-CDK 结合, 抑制已激活的复合物的激酶活性^[17-19]。本研究发现, 在 HBXIP 蛋白过表达时 p21 和 p27 的表达发生下调; 与此相反, 转染 HBXIP 的 RNA 干扰载体 pSilencer-hbxip 可上调 p21 和 p27 的表达。因此, HBXIP 通过调节 p21 和 p27 的表达发挥促进细胞增殖的作用。

综上所述, HBXIP 具有促进细胞增殖的作用, 对细胞周期的调控作用可能是其促进细胞增殖作用的分子机制之一。HBXIP 具有上调细胞周期蛋白 D₁、细胞周期蛋白 E 表达和下调 p21、p27 表达的作用, 从而促进 L-O2 细胞由 G₁ 期进入 S 期。

参考文献 (References)

- [1] Melegari M, Scaglioni P P, Wands J R. Cloning and characterization of a novel hepatitis B virus x binding protein that inhibits viral replication [J]. *J Virol*, 1998, **72**(3) :1737-1743
- [2] Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, *et al.* HBXIP functions as a cofactor of surviving in apoptosis suppression [J]. *EMBO J*, 2003, **22**(11) :2729-2740
- [3] Minczuk M, Mroczek S, Pawlak S D, *et al.* Human ATP-dependent RNA/DNA helicase hSuv3p interacts with the cofactor of survivin HBXIP [J]. *FEBS J*, 2005, **272**(19) : 5008-5019
- [4] Fujii R, Zhu C, Wen Y, *et al.* HBXIP, cellular target of hepatitis B virus oncoprotein, is a regulator of centrosome dynamics and cytokinesis [J]. *Cancer Res*, 2006, **66**(18) : 9099-9107
- [5] 张晓东, 马宏涛, 叶丽虹, 等. HBXIP 基因对乙肝病毒 X 蛋白诱导细胞凋亡的影响. *中国生物化学与分子生物学报* (Zhang Xiao-Dong, Ma Hong-Tao, Ye Li-Hong, *et al.* Effect of hepatitis B X interacting protein on apoptosis induced by hepatitis B virus X protein [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2005, **21**(3) : 403-407
- [6] Wang F Z, Sha L, Zhang W Y, *et al.* Involvement of hepatitis B X-interacting protein (HBXIP) in proliferation regulation of cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, **28**(3) :431-438
- [7] Chen Z, Li D Q, Tong L, *et al.* Targeted inhibition of p57 and p15 blocks transforming growth factor beta-inhibited proliferation of primary cultured human limbal epithelial cells [J]. *Mol Vis*, 2006, **12**: 983-994
- [8] Wikman H, Kettunen E. Regulation of the G₁/S phase of the cell cycle and alterations in the RB pathway in human lung cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2006, **6**(4) :515-530
- [9] Gossel M J, Hinds P W. From cell cycle to differentiation: an expanding role for cdk6 [J]. *Cell Cycle*, 2006, **5**(3) :266-270
- [10] Pines J. Cyclins, CDKs and cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 1995, **6**(2) :63-72
- [11] Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression [J]. *Oncogene*, 2006, **25**(38) : 5220-5227
- [12] Genovese C, Trani D, Caputi M, *et al.* Cell cycle control and beyond: emerging roles for the retinoblastoma gene family [J]. *Oncogene*. 2006, **25**(38) :5201-5209
- [13] Sherr C J. Cancer cell cycles [J]. *Science*, 1996, **274**(5293) : 1672-1677
- [14] Harper J W, Adami G R, Wei M, *et al.* The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G₁ cyclin-dependent kinases [J]. *Cell*, 1993, **75**(4) :805-816
- [15] Gartel A L, Tyner A L. Transcriptional regulation of the p21WAF1/CIP1 gene [J]. *Exp Cell Res*, 1999, **246**(2) :280-289
- [16] Waldman T, Lengauer C, Kinzler K W, *et al.* Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21 [J]. *Nature*, 1996, **381**(6584) : 713-716
- [17] Koljonen V, Tukiainen E, Haglund C, *et al.* Cell cycle control by p21, p27 and p53 in Merkel cell carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2006, **26**(3B) :2209-2212
- [18] Martin A, Odajima J, Hunt S L, *et al.* Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27 (Kip1) and p21 (Cip1) [J]. *Cancer Cell*, 2005, **7**(6) :591-598
- [19] Polyak K, Lee M H, Erdjument-Bromage H, *et al.* Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals [J]. *Cell*, 1994, **78**(1) :59-66