

乙肝病毒 X 蛋白结合蛋白 (HBXIP) 增强肝癌细胞 NF- κ B 转录活性的实验研究*

王凤泽¹⁾ 沙 丽²⁾ 乔 玲¹⁾ 吴莲英¹⁾ 张晓东^{2)**} 叶丽虹^{1)**}

¹⁾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;

²⁾南开大学生命科学学院天津市微生物功能基因组重点实验室, 天津 300071)

摘要 前期研究结果表明, 乙型肝炎病毒 X 蛋白结合蛋白 (hepatitis B virus X-interacting protein, HBXIP) 具有促进细胞增殖的作用. 为了进一步阐明其分子机制, 观察了 HBXIP 对核因子 κ B (NF- κ B) 转录活性的影响. 实验中通过基因共转染将 NF- κ B 报告基因质粒 pNF- κ B-Luc 和 HBXIP 真核表达载体 pcDNA3-hbxip 导入人肝癌 H7402 细胞系中, 进行荧光素酶活性分析. 结果显示: H7402 细胞过表达 HBXIP 后 NF- κ B 的转录活性明显增强; 此外, 基因转染后经免疫印迹检测显示, 与 NF- κ B 二聚体结合的抑制亚基 I κ B α 的磷酸化水平明显增加; 同时, 提取 H7402 细胞的核蛋白, 然后应用免疫印迹检测细胞核中 p65/NF- κ B 的水平. 结果显示, H7402 细胞中 HBXIP 过表达后细胞核中 p65/NF- κ B 的水平明显增加. 当应用 RNA 干扰技术抑制了细胞内源性的 HBXIP 基因表达后, 则出现与上述结果相反的效果. 上述结果提示, HBXIP 可增加核内 p65/NF- κ B 蛋白水平, 进而发挥 NF- κ B 促转录调控的作用. 因此, HBXIP 可通过调控 NF- κ B 信号途径而促进细胞增殖.

关键词 乙型肝炎病毒 X 蛋白结合蛋白(HBXIP), 核因子 κ B (NF- κ B), I κ B α , 肝癌细胞

学科分类号 R363 Q25

乙型肝炎病毒 X 蛋白结合蛋白 (hepatitis B virus X-interacting protein, HBXIP) 是一个由 91 个氨基酸组成的分子质量为 9.6 ku 的细胞组成型蛋白质, 具有重要的生物活性. 据报道, HBXIP 可与乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) X 蛋白 (HBX) 的 C 端特异地结合, 从而降低 HBX 的活性, 并改变 HBV 的病毒复制周期^[1], HBXIP 还能够与 survivin 直接结合而参与细胞凋亡和有丝分裂过程^[2,3]. 我们前期研究发现, HBXIP 不但能够抑制 HBX 蛋白诱导的细胞凋亡^[4], 而且通过调节细胞周期而促进细胞增殖^[5,6]. 为了进一步阐明 HBXIP 促进细胞增殖的分子机制, 本文观察了 HBXIP 蛋白对核因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 转录活性的影响.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 表达载体与细胞株. 真核表达载体 pcDNA3 和 pEGFP-c2 由本室保存, NF- κ B 荧光素酶报告基

因质粒 pNF- κ B-Luc (5 $\times$ NF- κ B enhancer elements) 由纽约大学黄传书教授惠赠; 海肾荧光素酶报告基因质粒 pRL-TK 购自 Promega 公司; RNA 干扰载体 pSilencer-3.0-H1 由本室保存; 人肝癌细胞系 H7402 购自北京大学人民医院.

1.1.2 试剂及来源. RPMI1640 培养基和胎牛血清购于 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; Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 双荧光素酶测试试剂盒购自 Promega 公司; ECL Western blot 显色试剂盒购自 Amersham biosciences 公司; 兔抗人 HBXIP 抗体由本室制备^[7]; 鼠抗人 p65/NF- κ B 抗体和鼠抗人 p-I κ B 抗体购自 Santa cruz 公司; β -actin 为 Sigma 公司产品.

* 国家自然科学基金资助项目(30670959).

** 通讯联系人. Tel: 022-23506830, E-mail: zhangxd@nankai.edu.cn, yelihong@nankai.edu.cn

收稿日期: 2007-03-23, 接受日期: 2007-06-01

1.2 方法

1.2.1 细胞培养. 培养 H7402 细胞采用 RPMI 1640 培养基, 含有 10% 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 硫酸链霉素, 在 37℃ 孵箱 5% CO₂ 条件下培养.

1.2.2 基因转染. 克隆有野生型 HBXIP 全长的真核表达质粒 pcDNA3-hbxip 由本室构建^[4]. 参照 Marusawa 等^[2]报道的方法合成 HBXIP 基因 RNA 干扰片段, pSilencer-hbxip 和 pSilencer-control 质粒由本室构建^[5]. 转染前 24 h 将细胞传代, 待细胞长至 70%~80% 进行转染. 转染方法参照 Lipofetamine 2000 说明书, 转染 6 h 后更换含有 10% 胎牛血清的完全培养基. 应用 0.2 μg pEGFP-c2 与 2 μg pcDNA3-hbxip 或 2 μg pSilencer-hbxip 共转染, 以观察转染效率.

1.2.3 荧光素酶报告基因分析. 将报告基因质粒 (pNF-κB-Luc 和 pRL-TK) 和真核表达载体 pcDNA3-hbxip 或 pSilencer-hbxip 共转染至 H7402 细胞中, 其中海肾荧光素酶表达载体 pRL-TK 为内参. 转染 40 h 后按照荧光素酶试剂盒说明, 加入裂解缓冲液, 室温反应 15 min 后, 刮下细胞裂解产物并转移到 1.5 ml 离心管中, 14 000 r/min 离心 15 s, 把上清小心地转移到一个新的 1.5 ml 离心管中. 在每个含有 100 μl 荧光素酶测定缓冲液 (LAR II) 的离心管中加入等量细胞裂解液, 立即混匀放入荧光光度计, 测定 10 s 的光输出后加入 100 μl 荧光淬灭剂 (Stop & Glo reagent), 淬灭萤火虫荧光素酶同时启动海肾荧光素酶反应, 测定 10 s 后的光输出值. 每组实验重复 3 次. 分别以 pcDNA3 和 pSilencer-control 质粒为对照.

1.2.4 细胞核蛋白提取. 用 PBS 洗涤细胞 2 次后, 缓慢加入 400 μl 裂解液 A (300 mmol/L 蔗糖, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L HEPES pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 0.4 mmol/L PMSF, 蛋白酶抑制剂混合物); 冰浴 10 min 后加入 16 μl NP-40, 混合 10 s 继续冰浴 10 min. 4℃ 离心 2 min (12 000 r/min), 沉淀重新加入 500 μl 裂解液 A 洗涤 1 次, 再次 4℃ 离心 2 min, 弃上清. 沉淀加入预冷的裂解液 B (420 mmol/L NaCl, 20 mmol/L HEPES pH 7.9, 1% Triton X-100, 0.5% 脱氧胆酸盐, 1% SDS, 0.2 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L EGTA, 1.5 mmol/L MgCl₂, 蛋白酶抑制剂混合物), 冰浴 20 min 后, 4℃ 离心 12 min (14 000 r/min), 上清定量分析并用

于免疫印迹实验.

1.2.5 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, 蛋白酶抑制剂混合物) 冰上放置 20 min, 4℃ 12 000 g 离心 20 min, 收集上清定量分析. 取 30~40 μg 总蛋白进行 12% SDS-PAGE 实验, 电转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗, 分别为鼠抗人 p65/NF-κB 抗体 (1:1 000)、鼠抗人 p-IκB 抗体 (1:300) 和兔抗人 HBXIP 抗体 (1:1 000), 室温孵育 2~3 h, PBST 洗膜, 再分别加入抗鼠、抗兔的 IgG 室温孵育 1 h, PBST 洗膜, 增强型 ECL 试剂盒暗室曝光显影.

2 结 果

2.1 HBXIP 激活 NF-κB 的转录活性

为了研究 HBXIP 蛋白对 NF-κB 转录活性的影响, 将 pNF-κB-Luc 和 pRL-TK 质粒与 pcDNA3-hbxip (或 pSilencer-hbxip) 质粒在 H7402 肝癌细胞系中进行共转染, 通过双荧光检测仪检测荧光素酶活性. 结果显示, 与对照组相比, HBXIP 基因过表达能够显著增加 NF-κB 的转录活性, 而 RNA 干扰降低内源 HBXIP 基因表达后, 可抑制 NF-κB 的转录活性 (图 1).

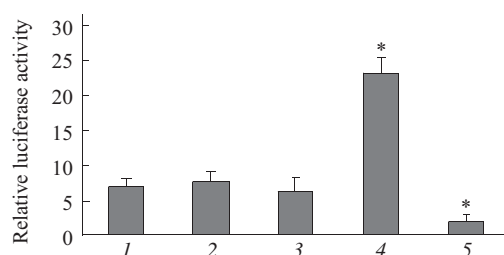


Fig. 1 Examination of NF-κB transcriptional activity in H7402 cells by luciferase activity assay

HBXIP increased transcriptional activity of NF-κB in H7402 cells. The luciferase activity assay was repeated 3 times. Each bar indicates the mean and standard deviation of 3 identically treated assay wells. * $P < 0.05$. 1: Mock; 2: pcDNA3; 3: pSilencer-control; 4: pcDNA3-hbxip; 5: pSilencer-hbxip.

2.2 HBXIP 增加 IκBα 的磷酸化水平

在瞬时转染 HBXIP 基因的同时共转染绿色荧光蛋白表达载体 pEGFP-c2, 以观察其转染效率. 结果显示, 转染效率约为 70%~80% (图 2). 免疫印迹检测结果显示, 瞬时转染 pcDNA-hbxip 表达载体后, H7402 细胞中 IκBα 的磷酸化形式 p-IκBα

水平有所增加, 相反, 应用 HBXIP 基因的 RNA 干扰后, 抑制了 H7402 细胞中内源性的 HBXIP 基因的表达, 导致 p-I κ B α 水平也相应减少 (图 3).

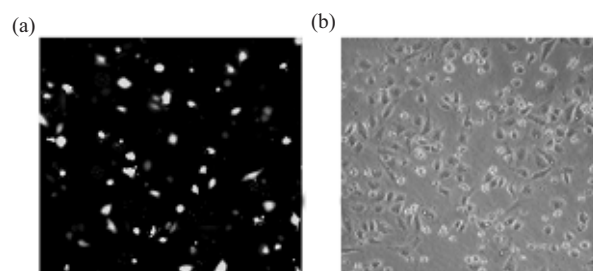


Fig. 2 Detection of transfection efficiency

Co-transfection transiently was performed in H7402 cells. (a) Co-transfected the plasmids of pcDNA3-hbxip and pEGFP-c2 in H7402 cells. (b) H7402 cells in light field.

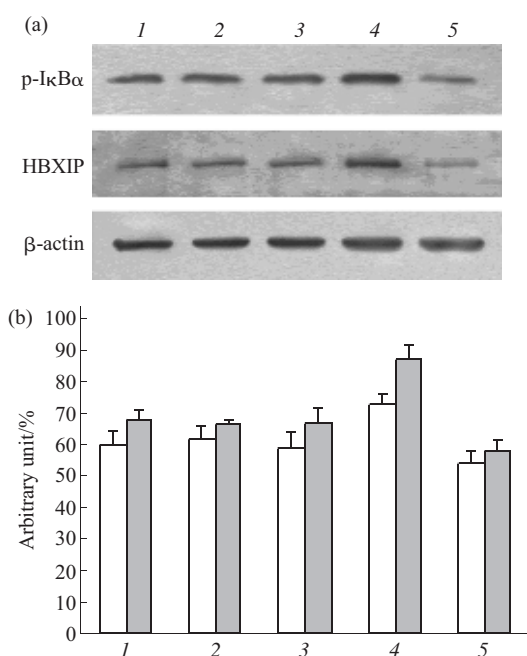


Fig. 3 Expression levels of phosphorylation of I κ B α were examined by Western blot analysis in H7402 cells

The levels of phosphorylation of I κ B α were increased significantly by the transiently transfected with pcDNA3-hbxip in H7402 cells, and the downregulation of HBXIP suppressed the phosphorylation of I κ B α . (a) HBXIP increased the level of I κ B α phosphorylation. (b) Results were analyzed by Glyco Band-Scan software. 1: Mock; 2: pcDNA3; 3: pSilencer-control; 4: pcDNA3-hbxip; 5: pSilencer-hbxip. □: HBXIP; ■: p-I κ B α .

2.3 HBXIP 增加细胞核内 NF- κ B 的水平

NF- κ B 通常以同源或异源二聚体的形式存在, 细胞在非刺激状态下, 与抑制物 I κ B 结合以一种未

被激活的形式存在于胞质, 当细胞受到损伤等刺激后, I κ B 降解, 活性 NF- κ B 释放并转移至胞核, 调节靶基因的转录活性. 因此, 我们提取核蛋白, 采用免疫印迹方法观察了 HBXIP 过表达后核内 p65/NF- κ B 表达水平的变化. 图 4 显示, 瞬时转染 HBXIP 基因后可明显增加 H7402 细胞核中 p65/NF- κ B 的含量, 而 HBXIP 基因的 RNA 干扰可明显降低核内 p65/NF- κ B 蛋白水平.

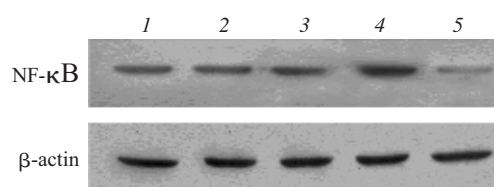


Fig. 4 Examination of p65/NF- κ B protein in nuclear extracts of H7402 cells by Western blot analysis

Over-expression of HBXIP in H7402 cells increased the levels of p65/NF- κ B in the nucleus, and downregulation of HBXIP mRNA in the cells by RNA interference (RNAi) resulted in the opposite results. β -actin was used as an internal control. 1: Mock; 2: pcDNA3; 3: pSilencer-control; 4: pcDNA3-hbxip; 5: pSilencer-hbxip.

3 讨 论

Melegari 等^[1]从 HepG2 细胞中克隆获得乙肝病毒 X 蛋白结合蛋白(hepatitis B X-interacting protein, HBXIP), 由于能够与乙型肝炎病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X, HBX)的 C 端特异结合而命名. 文献报道, HBXIP 可以作为 survivin 的协同因子而形成 survivin-HBXIP 复合物, 该复合物可以与 pro-caspase9 结合从而阻止其募集到 Apaf-1 上, 使 survivin 借助细胞色素 c 介导的凋亡途径选择性抑制 caspase 蛋白酶活性, 继而实现其在细胞凋亡机制和病毒病原体所致的肝癌作用中的桥梁纽带作用^[2]; HBXIP 还能够与人 ATP 依赖的 RNA/DNA 解旋酶 hSuv3p 结合, 并且 HBXIP 结合部位与该酶线粒体输入和结构稳定有关^[7]. 我们前期的研究结果显示, HBXIP 具有促进细胞增殖的作用^[9]. 为了进一步阐明 HBXIP 促进细胞增殖的分子机制, 本研究对 HBXIP 与 NF- κ B 的关系进行了探讨.

NF- κ B 是细胞内重要的核转录因子, 通过调控多种基因的表达而参与免疫反应、细胞凋亡、细胞增殖和肿瘤发生等过程^[8~11]. 在哺乳动物中, NF- κ B 家族包括 RelA(p65)、RelB、c-Rel、p50/105 (NF- κ B1) 和 p52/p100(NF- κ B2) 等 5 个成员, 可以

形成同源或异源的二聚体, 其中研究最多的是 p50/p65 异源二聚体, p50 内含核定位的氨基酸序列, 是 p105 水解去除 C 端序列的产物, 是核因子与 DNA 顺式作用元件 κ B 位点序列结合部分, 而 p65 则具有 1 个或多个转录激活结构域^[12]. 细胞在静息状态下, NF- κ B 以无活性的状态存在于细胞质中, 它与其特异性抑制因子 I κ B 结合组成一个三聚体 p50-p65-I κ B. NF- κ B 的激活机制如下: 首先是 I κ B 从 NF- κ B 复合体上解离降解, 暴露 NF- κ B 的核定位序列, 其次是 NF- κ B 发生核易位, 与特定的 κ B 序列结合并募集协同因子而调控转录. NF- κ B 的活化由其抑制亚单位 I κ B 的磷酸化所启动, 当 NF- κ B 受到激活剂刺激时, I κ B 即从三聚体中解离出来, 从而使 p50/p65 二聚体表现出 NF- κ B 活性, 并从细胞质中易位到细胞核中, 与 κ B 基序(κ B motif)相结合, 从而发挥转录调控作用^[13~15].

本研究通过检测 NF- κ B 的转录活性、I κ B α 蛋白磷酸化水平变化和细胞核内 NF- κ B 水平, 观察了在 H7402 肝癌细胞中 HBXIP 过表达和基因沉默时 HBXIP 对 NF- κ B 的影响. 荧光素酶报告基因系统检测结果显示, HBXIP 过表达具有促进 NF- κ B 转录活性的作用(图 1), 并且 H7402 细胞中磷酸化 I κ B α 蛋白水平增加(图 3), 表明 I κ B 从三聚体中解离出来, 有利于 NF- κ B 向核内易位. 为了进一步说明 NF- κ B 在细胞核中水平增加, 通过提取 H7402 细胞的核蛋白, 免疫印迹检测结果显示, 细胞核内 p65/NF- κ B 的含量明显增多(图 4), 更进一步证明 I κ B α 蛋白磷酸化水平提高可促进 NF- κ B 复合体的降解, 导致细胞核内 NF- κ B 的含量增加, 从而发挥其促转录调控作用. 当使 HBXIP 基因表达沉默时则出现相反的结果, 验证了上述结果的可靠性. 综上所述, 本研究发现 HBXIP 具有调节 NF- κ B 信号途径的作用, 有助于阐明 HBXIP 促进细胞增殖的分子机制.

参 考 文 献

- 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 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. *EMBO J*, 2003, **22** (11): 2729~2740
- 3 Fujii R, Zhu C, Wen Y, *et al.* HBXIP, cellular target of hepatitis B virus oncoprotein, is a regulator of centrosome dynamics and cytokinesis. *Cancer Res*, 2006, **66** (18): 9099~9107
- 4 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*, 2005, **21** (3): 403~407
Zhang X D, Ma H T, Ye L H, *et al.* *China J Biochem Mol Biol*, 2005, **21** (3): 403~407
- 5 Wang F, Sha L, Zhang W, *et al.* Involvement of hepatitis B X-interacting protein (HBXIP) in proliferation regulation of cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2007, **28** (3): 431~438
- 6 王凤泽, 吴蓬英, 乔玲, 等. 乙肝病毒 X 蛋白结合蛋白(HBXIP)调控细胞周期促进细胞增殖的实验研究. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, **23** (6): 487~491
Wang F Z, Wa L Y, Qiao L, *et al.* *China J Biochem Mol Biol*, 2007, **23** (6): 487~491
- 7 Minczuk M, Mroczek S, Pawlak S D, *et al.* Human ATP-dependent RNA/DNA helicase hSuv3p interacts with the cofactor of survivin HBXIP. *FEBS J*, 2005, **272** (19): 5008~5019
- 8 Tak P P, Firestein G S. NF-kappa B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*, 2001, **107** (1): 7~11
- 9 Wulczyn F G, Krappmann D, Scheidereit C. The NF- κ B/Rel and I κ B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med*, 1996, **74** (12): 749~769
- 10 Pahl H L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 1999, **18** (49): 6853~6866
- 11 Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature*, 2006, **441** (7092): 431~436
- 12 Lindstrom T M, Bennett P R. The role of nuclear factor kappa B in human labour. *Reproduction*, 2005, **130** (5): 569~581
- 13 Schaaf M J, Willetts L, Hayes B P, *et al.* The relationship between intranuclear mobility of the NF- κ B subunit p65 and its DNA binding affinity. *J Biol Chem*, 2006, **281** (31): 22409~22420
- 14 De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor κ B. *Oncogene*, 2006, **25**(51): 6868~6886
- 15 Claus S. I κ B kinase complexes: gateways to NF- κ B activation and transcription. *Oncogene*, 2006, **25** (51): 6685~6705

Promotion of Transcriptional Activity of NF- κ B Mediated by HBXIP in Hepatoma Cells*

WANG Feng-Ze¹⁾, SHA Li²⁾, QIAO Ling¹⁾, WU Lian-Ying¹⁾, ZHANG Xiao-Dong^{2)**}, YE Li-Hong^{1)**}

¹⁾Key Laboratory of Bioactive Material of Ministry of Education, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China;

²⁾Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Hepatitis B virus X-interacting protein (HBXIP), a cofactor of survivin, previously had been found to promote cell proliferation. In order to demonstrate the molecular mechanisms the effect of HBXIP on transcriptional activity of NF- κ B was investigated. The eukaryotic expression vector of HBXIP (pcDNA3-hbxip), or the RNA interference vector of HBXIP (pSilencer-hbxip) and NF- κ B luciferase reporter (pNF- κ B-Luc) were co-transfected into H7402 hepatoma cells. The pRL-TK vector was used as an internal control for normalization of luciferase activity, and the luciferase activity was determined by using the dual luciferase reporter assay system. The luciferase assay indicated that the over-expression of HBXIP could stimulated NF- κ B transcriptional activity in H7402 hepatoma cells. RNA interference (RNAi) targeting HBXIP mRNA resulted in the opposite effects. Statistically no significant difference was observed between the control cells and pcDNA3 empty vector-transfected cells or pSilencer-control transfected cells. The phosphorylation level of I κ B α , an inhibitor of NF- κ B, was increased by Western blot analysis when over-expression of HBXIP in H7402 cells. The p65/NF- κ B level in nucleus extraction from H7402 cells was examined by Western blot analysis after transfection. The data indicated that over-expression of HBXIP in H7402 cells was able to increase the levels of p65/NF- κ B in the nucleus. However, down-regulation of HBXIP mRNA in the cells by RNAi resulted in the opposite results. In conclusion, HBXIP is involved in cell proliferation by regulating NF- κ B signal pathway.

Key words HBXIP, NF- κ B, I κ B α , hepatoma cells

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30670959).

**Corresponding author. Tel: 86-22-23506830, E-mail: zhangxd@nankai.edu.cn, yelihong@nankai.edu.cn

Received: March 23, 2007 Accepted: June 1, 2007