

PIG11 与热休克蛋白 60 的相互作用介导 肝癌 HepG2 细胞凋亡 *

刘小敏 胡 蓉 梁晓秋 ** 王晓娟 王 燕 张 杨

(南华大学病理教研室, 衡阳 421001)

摘要 为了探讨候选肝癌抑癌蛋白 PIG11(p53-induced gene 11, PIG11)诱导细胞凋亡的机制, 首次在 HepG2 细胞株中鉴定了 11 个 PIG11 结合蛋白, 热休克蛋白 60(heat shock protein 60, Hsp60)为其中之一. 采用免疫共沉淀联合 Western blot 技术对 Hsp60 进行了验证. 用 Western blot 检测其蛋白质表达, 结果显示: pLXSN-PIG11-HepG2 细胞中 Hsp60 蛋白表达较 pLXSN-HepG2、HepG2 细胞组下调($n=3$, $P<0.01$). 选取与 Hsp60 关系密切的 Bax 蛋白进行研究, Western blot 结果显示 PIG11 高表达可引起胞浆 Bax 向线粒体转位. 以上结果表明, PIG11 蛋白能与 HepG2 细胞中的 Hsp60 结合, 促进 Hsp60-Bax 的分离, 引起 Bax 从胞液到线粒体转位, 激活线粒体凋亡途径, 这可能是其诱导 HepG2 细胞凋亡的主要机制之一.

关键词 PIG11, Hsp60, HepG2, Bax

学科分类号 R735.7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00168

PIG11(p53-induced gene 11)是 p53 下游的一个靶基因, 可能是人肝癌的抑癌基因^[1]. 本课题组前期实验已证实, 肝癌抑制蛋白 PIG11 的高表达参与了 As₂O₃ 诱导细胞凋亡的过程, 并能通过升高细胞内 ROS 水平而增强细胞对介导 As₂O₃ 凋亡的敏感性^[2]. 肝癌组织及肝癌细胞株中 PIG11 蛋白表达显著低于正常肝细胞^[3], PIG11 基因转染肝癌细胞株 HepG2, 具有较强的抑制肝癌细胞生长和诱导凋亡的作用^[4]. 但 PIG11 蛋白在凋亡通路中的具体作用机制还不清楚.

研究表明, 细胞内蛋白质功能的正常发挥依赖于它与其他蛋白质的相互作用, 并可能以时间和空间依赖的方式形成大的复合物^[5]. PIG11 蛋白可能通过与其他生物分子如 DNA、RNA 及蛋白质的相互作用而在凋亡调控方面扮演重要角色^[6]. 为此, 建立 PIG11 蛋白稳定高表达 HepG2 肝癌细胞株模型^[4], 采用免疫共沉淀联合质谱分析技术, 首次在 HepG2 细胞株中鉴定了 11 个 PIG11 结合蛋白^[7]. 本实验试图从已鉴定的 PIG11 结合蛋白之一热休克蛋白 60(heat shock protein 60, Hsp60)着手, 将它与 PIG11 的生物学功能联系起来, 从而进一步

明确 PIG11 蛋白的作用方式, 阐明其诱导 HepG2 细胞凋亡的分子机制.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞. 人肝细胞癌细胞 HepG2 为中南大学湘雅医学院肿瘤研究所引进, 细胞模型 pLXSN-HepG2、pLXSN-PIG11-HepG2、miR-NC-HepG2 及 miR-PIG11-HepG2 均为本课题组前期构建^[4,8].

1.1.2 试剂. 免疫共沉淀试剂盒和 BCA 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司; PIG11 蛋白抗体由中国科学院生物物理研究所曹恩华教授惠赠; Hsp60 抗体购自博士德公司; 抗 Bax、 β -actin 及抗鼠、兔二抗购自 Santa Cruz 公司; COX-IV 抗体购自 Cell Signaling 公司; 预染 Marker 购自上海生物工程公

* 湖南省自然科学基金资助项目(06JJ2048)和湖南省衡阳市科技局资助项目(2008KJ008).

** 通讯联系人.

Tel: 0734-8281075, E-mail: liangxiaoliu505@hotmail.com

收稿日期: 2010-06-22, 接受日期: 2010-08-11

司; 胰酶细胞消化液、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒、线粒体蛋白提取试剂盒购自 Active Motif 公司.

1.1.3 仪器设备. 垂直电泳仪、电泳槽及转膜系统为美国 BIO-RAD 公司产品.

1.2 细胞培养

HepG2 及 pLXSN-HepG2 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 于 37℃, 5% CO₂ 且湿度为 95% 的培养箱内培养. 培养细胞呈单层生长, 融合贴壁达 90% 时常规传代. pLXSN-PIG11-HepG2 细胞则用含 12% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 换液和传代时则用 G418 按 1:15 的浓度维持培养, 其余方法同前. miR-PIG11-HepG2 及 miR-NC-HepG2 细胞则用含 12% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 换液和传代时则用 2 mg/L BSD 维持培养, 其余方法同前.

1.3 免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, IP) 和 Western blot 验证 PIG11 结合蛋白之一 Hsp60

1.3.1 细胞蛋白质样品的准备. 分别收集对数生长期的 HepG2、pLXSN-HepG2 和 pLXSN-PIG11-HepG2 细胞 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$, 冷 PBS 洗涤 2 次, 加适量细胞裂解液(免疫共沉淀试剂盒中提供的哺乳动物细胞裂解液)冰上裂解 30 min, 移入 1.5 ml EP 管, 12 000 r/min, 4℃ 离心 20 min, 收集上清液, 即为细胞总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度, 立即用于免疫共沉淀.

1.3.2 免疫共沉淀 PIG11 相关蛋白(按免疫共沉淀试剂盒说明书进行操作). 在含细胞总蛋白 2 g/L 的抽提缓冲液中, 加入 10 μl 的兔抗人 PIG11 抗体, 4℃ 孵育过夜. 取 40 μl 琼脂糖蛋白 G, 加入 0.4 ml PBS, 3 000 g 离心 5 min, 弃过柱液, PBS 洗 2 次, 收集琼脂糖蛋白 G, 将免疫复合物加入到装好琼脂糖蛋白 G 的 Handee™ Spin Cup (纯化柱)中, 4℃ 孵育至少 1 h 后离心, 加入 0.5 ml PBS 至柱子, 振荡混匀, 离心过柱, 重复 2~3 次, 以去除未结合或者非特异结合的蛋白, 加 10 μl 洗脱液至纯化柱中, 混匀离心, 将柱子放入一新微量离心管, 重复 3 次, 最后 5 000 g, 4℃ 离心 5 min 收集免疫复合物. 以正常兔 IgG 取代 PIG11 抗体作对照. 实验重复 3 次.

1.3.3 Western blot 分析. 收集的免疫复合物进行 10% SDS-PAGE 分离后转至 PVDF 膜(转膜条件 105 mA、120~180 min), 含 5% 脱脂牛奶的 TBST 液封闭 2 h, TBST 洗 3 次, 一抗(1:500)4℃ 孵育

过夜, TBST 洗 3 次, 每次 5 min, 相应的二抗(1:5 000)37℃ 孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 15 min, ECL 试剂发光、曝光、显影、定影. 薄层扫描仪(日本产, 型号 CS-930)扫描, Alphazmager2200 软件测定印迹区带的吸光度值. 实验重复 3 次.

1.4 Western blot 检测 Hsp60 及胞浆和线粒体中 Bax 的表达

1.4.1 蛋白质样品准备. 细胞总蛋白提取方法见 1.3.1. 胞浆线粒体成分蛋白用线粒体蛋白提取试剂盒提取(操作步骤按说明书进行). 收集细胞, 冷 PBS 洗涤 2 次. 加 500 μl 冷 Cytosotic 缓冲液重悬, 冰上孵育 20 min, 匀浆 30~50 次, 取上清离心(800 g, 4℃, 20 min), 重复 1 次, 再取上清至新冷 EP 管离心(10 000 g, 4℃, 20 min)后, 分别取上清离心(16 000 g, 4℃, 20 min)提取胞浆成分蛋白和取沉淀, 加 100 μl Cytosotic 缓冲液离心(10 000 g, 4℃, 10 min), 弃上清, 加 50 μl Complete Mitochondria Buffer, 冰上孵育 15 min 提取线粒体成分蛋白. 用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度. 分装, -80℃ 保存备用.

1.4.2 Western blot. 将各组蛋白质样本 100℃ 煮沸 5 min 后上样, 10%~15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜、封闭, 一抗(Hsp60 和 Bax, 1:500)4℃ 孵育过夜, 二抗(1:5 000)37℃ 孵育 1 h, ECL 试剂发光、曝光、显影、定影及结果分析. 以 β-actin 和 Cox-IV 为内参照. 实验重复 3 次.

1.5 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计分析软件包, 进行 One-way ANOVA 检验及 2 个独立样本的 *t* 检验分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义. 统计图采用 OriginPro8.0 绘制.

2 结 果

2.1 免疫共沉淀和 Western blot 验证 PIG11 结合蛋白 Hsp60

抗 PIG11 抗体沉淀各组细胞总蛋白, 免疫复合物电泳转膜后与抗 Hsp60 抗体进行 Western blot 分析. 结果显示: 三组 HepG2 细胞在相同位置均能检测到结合蛋白 Hsp60, 而对照组(正常兔 IgG 取代 PIG11 抗体)无条带(图 1), 表明 PIG11 与 Hsp60 能形成免疫复合物, 因而从免疫共沉淀中可以检测出来, 与质谱分析鉴定的结果一致^[7].

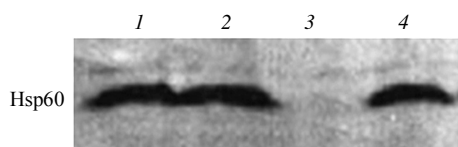


Fig.1 Co-immunoprecipitation and Western blot analysis of PIG11 interacting protein Hsp60

1, 2, 4: Protein complex of PIG11 antibody co-immunoprecipitation with HepG2, pLXSN-HepG2 and pLXSN-PIG11-HepG2 total proteins respectively. 3: Protein complex of IgG antibody of normal rabbit co-immunoprecipitation with HepG2 total proteins.

2.2 Western blot 检测 Hsp60 的表达

为进一步探讨各组 HepG2 细胞中 Hsp60 的表达情况以及 PIG11 与 Hsp60 的关系, 我们抽提细胞总蛋白进行 Western blot 分析. 结果显示: pLXSN-PIG11-HepG2 细胞中 Hsp60 蛋白表达较 HepG2、pLXSN-HepG2 组下调($P < 0.01$), pLXSN-HepG2 与 HepG2 对照组细胞中该蛋白质表达差异无显著性, miR-PIG11-HepG2 细胞中 Hsp60 蛋白表达较 HepG2、miR-NC-HepG2 组上调($P < 0.01$) (图 2). 表明 PIG11 高表达可引起细胞中 Hsp60 蛋白下调.

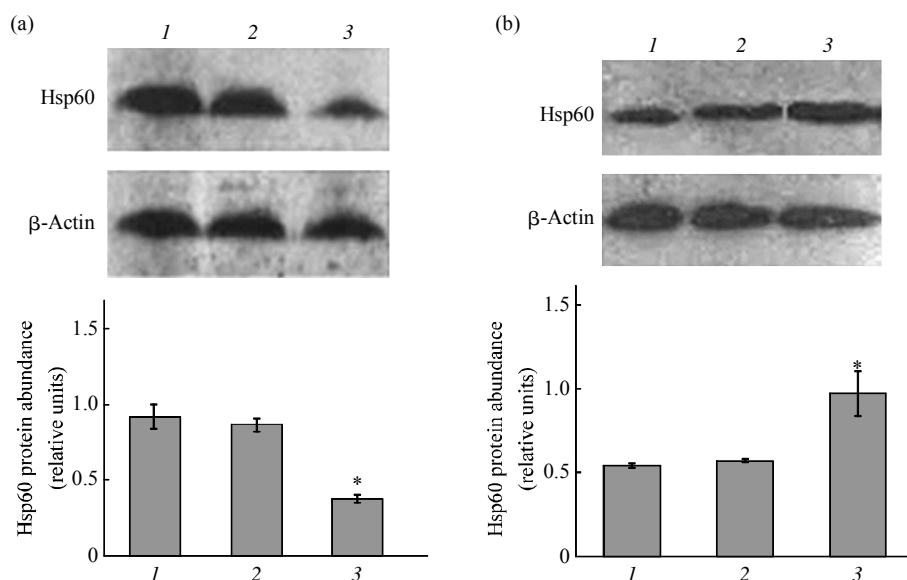


Fig. 2 Over-expression of PIG11 down-regulates protein expression of Hsp60 in HepG2 cells

(a) Expression of Hsp60 was monitored by Western blot in pLXSN-PIG11-HepG2 cells. 1: HepG2, 2: pLXSN-HepG2, 3: pLXSN-PIG11-HepG2; β -actin was used as an internal standard. Data represent the $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). * $P < 0.01$ vs other two groups. (b) Expression of Hsp60 was monitored by Western blot in miR-PIG11-HepG2 cells. 1: HepG2, 2: miR-NC-HepG2, 3: miR-PIG11-HepG2; β -actin was used as an internal standard. Data represent the $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). * $P < 0.01$ vs other two groups.

2.3 Western blot 检测胞浆和线粒体中 Bax 的表达

选用胞浆和线粒体成分蛋白提取试剂盒提取胞浆和线粒体成分蛋白, 进行 Bax 蛋白 Western blot 分析. 结果显示 (图 3): 与 pLXSN-HepG2 和 HepG2 细胞组相比, pLXSN-PIG11-HepG2 细胞组中胞浆 Bax 表达明显下调, 而线粒体 Bax 明显上

调($P < 0.01$), pLXSN-HepG2 和 HepG2 细胞组该蛋白质表达差异无显著性, 分别作为对照的 β -actin、Cox-IV 蛋白水平无明显变化; 而与 miR-NC-HepG2 和 HepG2 细胞组相比, miR-PIG11-HepG2 细胞组中胞浆 Bax 表达明显上调, 而线粒体 Bax 明显下调($P < 0.01$). 说明 PIG11 高表达可引起胞浆 Bax 向线粒体转位.

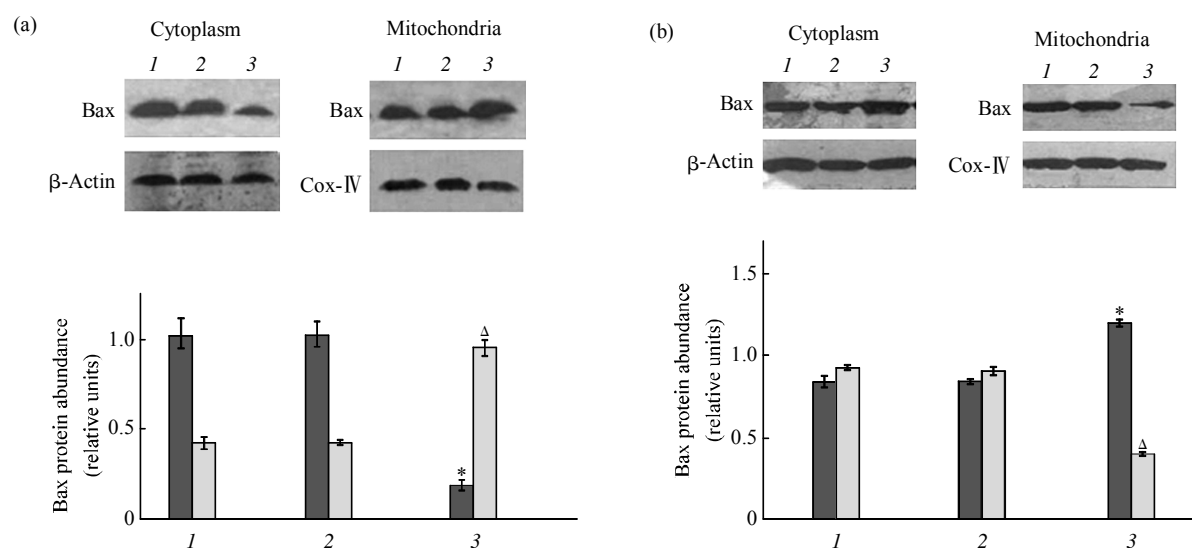


Fig. 3 Over-expression of PIG11 induces translocation of Bax protein from cytoplasm to mitochondria in HepG2 cells

(a) Expression of Bax was detected by Western blot in pLXSN-PIG11-HepG2 cells. 1: HepG2; 2: pLXSN-HepG2; 3: pLXSN-PIG11-HepG2; β -actin and Cox-IV were used as an internal standard. Data represent the $\bar{x} \pm s$ ($n=3$), * $P < 0.01$ vs other two groups, $^{\Delta}P < 0.01$ vs other two groups. (b) Expression of Bax was detected by Western blot in miR-PIG11-HepG2 cells. 1: HepG2; 2: miR-NC-HepG2; 3: miR-PIG11-HepG2; β -actin and Cox-IV were used as an internal standard. Data represent the $\bar{x} \pm s$ ($n=3$), * $P < 0.01$ vs other two groups, $^{\Delta}P < 0.01$ vs other two groups.

■: Cytoplasm; □: Mitochondria.

3 讨 论

热休克蛋白家族成员 Hsp60 作为一种分子伴侣, 在生理状态时能协助多肽或者蛋白质的正确转位、折叠和装配。近年研究表明, Hsp60 与肿瘤的发生发展、生物学行为及预后密切相关, 人类 Hsp60 在乳腺癌、胃癌、骨肉瘤、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、肝癌中呈高表达^[9-11]。Hsp60 的表达与否与卵巢上皮癌患者的生存期限有关, 即 Hsp60 低表达者较高表达者预后好^[8]。还有研究表明, Hsp60 参与细胞凋亡, Gupta 等^[12]研究显示, 在正常肌细胞中, Hsp60 存在于胞浆和线粒体中, 胞浆中 Hsp60 与 Bcl-2 家族中促凋亡成员 Bax 结合而形成 Hsp60-Bax 复合物, 而在给予诱导凋亡刺激下 (如低氧、ROS 增加等), Hsp60 则与 Bax 分离, Bax 释放至线粒体中而引起细胞色素 c 释放, 下游 Caspase 激活, 以致细胞凋亡。Ghosh 等^[13]运用高通量的蛋白质组学技术, 发现了一种新的能与分子伴侣 Hsp60 结合蛋白——生存素 Survivin,

Survivin 是迄今发现的最强的凋亡抑制因子, 也是一种细胞周期调节蛋白。Survivin 与 Hsp60 结合, 以最佳的折叠方式通过线粒体膜而发挥作用。研究中 Ghosh 等利用 RNA 干扰技术敲除 Hsp60 后, Hsp60-Survivin 破裂, 使得线粒体中的 Survivin 不稳定而降解, Survivin 减少, 丧失了其强大的抑制凋亡的作用。另一方面, 上述反应也累及到复合物 Hsp60-p53 的分离。曾有研究表明, 在许多肿瘤细胞中, Hsp60 与 p53 结合, 抑制 p53 自身的功能, p53 抑制肿瘤细胞生长和诱导凋亡的功能丧失, 导致肿瘤的发生发展。同样利用 RNA 干扰技术敲除 Hsp60 后, Hsp60-p53 复合物被分离, p53 功能抑制被解除, p53 表达增强, 诱导下游促进凋亡的靶基因如 Bax 等高表达, 以及诱导 Bax 相关的凋亡^[14-15]。

本实验证实 PIG11 蛋白能与胞浆中的 Hsp60 结合, PIG11 蛋白稳定高表达可引起细胞内 Hsp60 表达下调及与 Hsp60 关系密切的促凋亡蛋白 Bax 从胞浆向线粒体转位。结合上述 Hsp60 以及 Bax

的生物学功能, 我们推测, 在 PIG11 诱导细胞凋亡过程中, 胞浆中的 Hsp60 被 PIG11 诱导凋亡作用给刺激, 发生相互作用, 一方面干扰了 Hsp60-Bax 复合物的结合, 使其分离, Bax 释放到线粒体中, 产生诱导凋亡信号, 另一方面也可能伴随影响 Hsp60-p53 和 Hsp60-Survivin 复合物的形成, 使 p53 功能恢复, 诱导细胞凋亡. 同时 PIG11 高表达引起的细胞内 ROS 水平升高^[6], 可进一步加速 Hsp60-Bax 的分离, 引起 Bax 从胞浆到线粒体转位, 产生诱导凋亡的信号和线粒体的损伤, 通过线粒体激活细胞凋亡途经. 该研究为阐明 PIG11 诱导细胞凋亡机制提供了重要依据和新线索.

致谢 感谢中国科学院生物物理研究所曹恩华教授惠赠 PIG11 蛋白抗体.

参 考 文 献

- [1] Ricketts S L, Carter J C, Coleman W B. Identification of three 11p11.2 candidate liver tumor suppressors through analysis of known human genes. *Mol Carcinog*, 2003, **36**(2): 90–99
- [2] Liang X Q, Cao E H, Zhang Y, *et al.* A p53 target gene, PIG11, contributes to chemosensitivity of cells to arsenic trioxide. *FEBS Letters*, 2004, **569**(1–3): 94–98
- [3] Liu X M, Xiong X F, Song Y, *et al.* Possible roles of a tumor suppressor gene PIG11 in hepatocarcinogenesis and As₂O₃-induced apoptosis in liver cancer cells. *J Gastroenterol*, 2009, **44**(5): 460–469
- [4] Wu Y, Liu X M, Wang X J, *et al.* PIG11 is involved in hepatocellular carcinogenesis and its over-expression promotes HepG2 cell apoptosis. *Pathol Oncol Res*, 2009, **15**(3): 411–416
- [5] Naaby-Hansen S, Waterfield M D, Cramer R. Proteomics-post-genomic cartography to understand gene function. *Trends Pharmacol Sci*, 2001, **22**(7): 376–384
- [6] Xiong X F, Li H, Cao E H. PIG11 protein binds to DNA in sequence-independent manner *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **358**(1): 29–34
- [7] 胡 蓉, 王晓娟, 王 燕, 等. HepG2 细胞中 PIG11 相互作用蛋白质的初步分离与鉴定. *南华大学学报(医学版)*, 2009, **37**(2): 177–179
Hu R, Wang X J, Wang Y, *et al.* *J Nanhua University (Medical Edition)*, 2009, **37**(2): 177–179
- [8] 王 燕, 胡 蓉, 梁晓秋, 等. PIG11 基因沉默与 HepG2 细胞凋亡关系的研究. *中华肿瘤防治杂志*, 2010, **17**(8): 594–597
Wang Y, Hu R, Liang X Q, *et al.* *Chin J Cancer Prevention and Treatment*, 2010, **17**(8): 594–597
- [9] Schneider J, Jiménez E, Marenbach K, *et al.* Immunohistochemical detection of HSP60-expression in human ovarian cancer. Correlation with survival in a series of 247 patients. *Anticancer Research*, 1999, **19** (3A): 2141–2146
- [10] Trieb K, Gerth R, Windhager R, *et al.* Serum antibodies against the heat shock protein 60 are elevated in patients with osteosarcoma. *Immunobiology*, 2000, **201**(3–4): 368–376
- [11] Lim S O, Park S G, Yoo J H, *et al.* Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *World J Gastroenterol*, 2005, **11**(14): 2072–2079
- [12] Gupta S, Knowlton A A. HSP60, Bax, apoptosis and the heart. *J Cell Mol Med*, 2005, **9**(1): 51–58
- [13] Ghosh J C, Dohi T, Kang B H, *et al.* Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol Chem*, 2008, **283**(8): 5188–5194
- [14] Wadhwa R, Yaguchi T, Hasan M K, *et al.* Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/GRP75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein. *Exp Cell Res*, 2002, **274**(2): 246–253
- [15] Yaglom J A, Gabai V L, Sherman M Y, *et al.* High levels of heat shock protein Hsp72 in cancer cells suppress default senescence pathways. *Cancer Res*, 2007, **67**(5): 2373–2381
- [16] 刘小敏, 王晓娟, 张 杨, 等. 活性氧改变在 PIG11 高表达诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡中的作用. *肿瘤*, 2009, **29**(12): 116–119
Liu X M, Wang X J, Zhang Y, *et al.* *Tumor*, 2009, **29**(12): 116–119

Interaction of PIG11 and Hsp60 is Involved in Apoptosis in Human Hepatoma HepG2 Cells*

LIU Xiao-Min, HU Rong, LIANG Xiao-Qiu**, WANG Xiao-Juan, WU Yan, ZHANG Yang

(Department of Pathology, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract In order to explore the mechanisms of candidate liver tumor suppressor protein PIG11 induced apoptosis, eleven PIG11 binding proteins were first time identified in human hepatoma HepG2 cells, which heat shock protein 60 (Hsp60) is one of them. It has been confirmed by co-immunoprecipitation combined with Western blot analysis. Furthermore, using Western blot analysis, the protein expression of Hsp60 is down-regulated in pLXSN-PIG11-HepG2 cells group than that of pLXSN-HepG2 and HepG2 groups ($n=3$, $P < 0.01$), and over-expression of PIG11 induces translocation of Bax protein from cytoplasm to mitochondria in HepG2 cells. These results suggested that PIG11 protein can combine with Hsp60 in HepG2 cells, and the over-expression of PIG11 induce HepG2 cells apoptosis through mitochondrial pathway and the translocation of Bcl-2 family proteins Bax from cytoplasm to mitochondria maybe play an important role in the process.

Key words PIG11, Hsp60, HepG2, Bax

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00168

*This work was supported by grants from Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (06JJ2048) and Research Program from Hengyang Science and Technology Bureau of Hunan Province (2008KJ008).

**Corresponding author.

Tel: 86-734-8281075, E-mail: liangxiaoqiu505@hotmail.com

Received: June 22, 2010 Accepted: August 11, 2010