

· 论 著 ·

# HBXIP 对 HepG2 细胞周期和凋亡的影响

胡凯<sup>1</sup>, 刘成永<sup>1</sup>, 魏素梅<sup>1</sup>, 陆明<sup>2</sup>

1. 徐州医科大学附属医院徐州传染病医院肝病科, 江苏 徐州 221004;

2. 江苏省人民医院肿瘤科, 江苏 南京 210029

**摘要:** **目的** 探讨乙肝病毒 X 蛋白结合蛋白(HBXIP)对 HepG2 细胞周期和凋亡的影响。**方法** 体外培养肝癌细胞 HepG2, 并以不转染细胞为对照组, 以转染 pCMV-HBX 质粒的细胞为 HBX 组, 以转染 HBXIPsiRNA + pCMV-HBX 质粒的细胞为 HBXIP-i 组(利用 HBXIP siRNA 干扰质粒沉默 HepG2 细胞中 HBXIP 基因表达)。Western blot 检测 HBX 和 HBXIP 表达水平; 克隆形成实验研究 HBXIP 对细胞增殖的影响; 流式细胞仪检测 HBXIP 对细胞周期和细胞凋亡的影响。**结果** HBX 组 HBX 蛋白表达上调, HBXIP-i 组 HBXIP 蛋白表达下调。HBX 组单细胞克隆数显著高于对照组和 HBXIP-i 组 ( $P < 0.01$ ), HBXIP-i 组单细胞克隆数显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。HBX 组 G0/G1 期细胞显著高于对照组和 HBXIP-i 组 ( $P < 0.01$ ), HBX 组 S 期、G2/M 期细胞显著低于对照组和 HBXIP-i 组 ( $P < 0.01$ )。HBX 组细胞凋亡率显著低于对照组和 HBXIP-i 组 ( $P < 0.01$ ), HBXIP-i 组细胞凋亡率显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )。**结论** HBXIP 可促进肝癌细胞的增殖和抑制癌细胞凋亡。

**关键词:** 乙肝病毒 X 蛋白; 乙肝病毒 X 蛋白结合蛋白; HepG2 细胞; 细胞周期; 凋亡

**中图分类号:** R 512.62 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2020)05-0589-04

## Effect of HBXIP on cell cycle and apoptosis of HepG2 cells

HU Kai\*, LIU Cheng-yong, WEI Su-mei, LU Ming

\* Department of Hepatology, Xuzhou Infectious Disease Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004, China

Corresponding author: LIU Cheng-yong, E-mail: hyhblue88@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the effect of hepatitis B virus X protein interacting protein(HBXIP) on cell cycle and apoptosis of HepG2 cells and its possible mechanism. **Methods** HepG2 cells were cultured in vitro, and non-transfected cells as the control group, while cells transfected with pCMV-HBX plasmid as HBX group, and transfected with HBXIPsiRNA pCMV-HBX plasmid as HBXIP-i group (using HBXIP siRNA interference plasmid to silence HBXIP gene expression in HepG2 cells). The expression of HBX and HBXIP protein were detected by Western blot. The effect of HBXIP on cell proliferation was studied by clonogenesis, cell cycle and apoptosis by flow cytometry. **Results** HBX protein expression was up-regulated in HBX group, and HBXIP protein expression was down-regulated in HBXIP-i group. The number of single cell clones in HBX group was significantly higher than that in control group and HBXIP-i group ( $P < 0.01$ ), and that in HBXIP-i group was significantly higher than that in control group ( $P < 0.01$ ). Cells in G0/G1 phase of HBX group were significantly higher than those of control group and HBXIP-i group ( $P < 0.01$ ), while cells in S phase and G2/M phase of HBX group were significantly lower than those of control group and HBXIP-i group ( $P < 0.01$ ). The apoptosis rate of HBX group was significantly lower than that of control group and HBXIP-i group ( $P < 0.01$ ), and that of HBXIP-i group was significantly lower than that of control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** HBXIP can promote the proliferation of hepatoma cells and inhibit the apoptosis of cancer cells.

**Key words:** Hepatitis B virus X protein; Hepatitis B virus X protein binding protein; HepG2 cell; Cell cycle; Apoptosis

**Fund program:** Scientific Research Project of Health and Family Planning Commission of Jiangsu Province (H201506)

原发性肝癌是我国常见肿瘤之一,肝细胞癌占原发性肝癌的 85%~90%。肝癌的形成涉及遗传、环境、肝炎等多种因素,肝炎病毒是我国肝癌主要的危险因素,慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染是肝癌发生的首要原因。HBV 致癌作用可能与 HBV 基因整合至肝细胞有关<sup>[1]</sup>。乙肝病毒 X 蛋白(HBX)被认为是 HBV 致癌的关键因子,宿主乙肝病毒 X 蛋白结合蛋白(HBXIP)可与 HBX 结合,参与 HBV 的复制、细胞增殖、细胞分裂等生命过程<sup>[2-3]</sup>。研究发现,肝癌、乳腺癌、卵巢癌、神经胶质瘤、膀胱癌中 HBXIP 蛋白均高表达,HBXIP 被认为是一种促癌蛋白,可能参与癌细胞的凋亡、增殖、促进血管生成、迁移、侵袭和细胞代谢<sup>[4-6]</sup>。目前在肝癌的研究中,多集中于 HBXIP 对肝癌细胞迁移的影响。本研究探讨 HBXIP 对肝癌细胞周期和凋亡的影响,并初步分析其作用机制。

## 1 材料与方法

1.1 主要材料 HepG2 细胞购买于中科院上海细胞库。细胞培养箱(美国 Thermo Scientific);超净工作台(苏州净化设备有限公司);光学显微镜(日本奥林巴斯);流式细胞仪(美国 BD 公司);低温高速离心机(美国 Beckman 公司);电泳仪(美国伯乐公司);胰蛋白酶(美国 Hyclon 公司);DMEM(美国 Hyclon 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);RIPA 裂解液(武汉博士德生物);Annexin V-APC/PI 凋亡试剂盒(美国 BD 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 细胞复苏后,培养于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。培养基采用 10% 胎牛血清的 DMEM。细胞培养至 80%~90% 融合后,胰酶消化传代培养。

1.2.2 分组和转染 依据 Genbank HBXIP 基因(NM\_006402)和 HBX 基因(NC\_003977.2)序列,构建 pCMV-HBX 质粒和 HBXIP 小干扰 RNA(siRNA),委托上海生工生物工程有限公司完成。HepG2 细胞胰酶消化重新接种,待 85%~90% 融合后,分别不转染、转染 pCMV-HBX 质粒和 HBXIP siRNA + pCMV-HBX,不转染作为对照组,转染 pCMV-HBX 质粒作为 HBX 组,转染 HBXIP siRNA + pCMV-HBX 作为 HBXIP-i 组<sup>[7]</sup>(利用 HBXIP siRNA 干扰质粒沉默 HepG2 细胞中 HBXIP 基因表达)。

1.2.3 Western blot 检测 HepG2 细胞转染后,继续培养 48 h,0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞。细胞裂解液裂解细胞。刮取细胞,12 000 rpm 冷冻离心。BCA

法测定蛋白质浓度。10% 丙烯酰胺 SDS-PAGE,80 mA 转膜 80 min,TBST 漂洗 3 次,5% 奶粉封闭 1 h,一抗孵育 4℃ 孵育过夜,TBST 漂洗 3 次,1:1 000 孵育二抗,室温孵育 1 h,化学发光显影,拍照。

1.2.4 克隆形成实验 HepG2 细胞培养至 90% 融合后,转染,继续培养 48 h,0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞。6 孔板每孔接种  $1 \times 10^3$  个细胞,继续培养 10~14 d,停止培养,去除培养液,甲醇固定,结晶紫染色 15 min,洗去染色液。显微镜下拍照计数。

1.2.5 细胞周期实验 HepG2 细胞培养至 90% 融合后,转染,继续培养 48 h,0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞,冷 70% 乙醇固定过夜,离心去乙醇,PBS 洗涤细胞,RNase A 37℃ 孵育 30 min,PBS 洗涤,碘化丙啶(PI)染色 30 min,混匀,上机检测,Flowjo 软件分析。

1.2.6 凋亡实验 HepG2 细胞转染后,继续培养 48 h,0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞。20 μM 顺铂孵育细胞 4 h,更换正常培养基,继续培养 14 h,收集细胞,加入 500 μl 结合缓冲液,加入 5 μl Annexin V-FITC、5 μl PI,避光反应 15 min,流式细胞仪上机检测凋亡率。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用方差分析及两两比较的 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 Western blot 检测转染效果 HepG2 转染 HBX 基因后,HBX 蛋白表达上调,HBXIP 蛋白无明显变化。HepG2 转染 HBX 基因和沉默 HBXIP 基因后,HBXIP 蛋白表达下调。见图 1。

2.2 HBXIP 对 HepG2 细胞增殖的影响 对照组形成单细胞克隆( $54 \pm 5$ )个,HBX 组形成单细胞克隆( $411 \pm 49$ )个,HBXIP-i 组形成单细胞克隆( $187 \pm 23$ )个。HBX 组单细胞克隆数显著高于对照组和 HBXIP-i 组( $P < 0.01$ ),HBXIP-i 组单细胞克隆显著高于对照组( $P < 0.01$ )。见图 2。

2.3 HBXIP 对 HepG2 细胞周期的影响 HBX 组 G0/G1 期细胞显著高于对照组和 HBXIP-i 组( $P < 0.01$ ),HBX 组 S 期、G2/M 细胞显著低于对照组和 HBXIP-i 组( $P < 0.01$ )。见表 1、图 3。

2.4 HBXIP 对 HepG2 细胞凋亡的影响 HBX 组细胞凋亡率显著低于对照组和 HBXIP-i 组( $P < 0.01$ ),HBXIP-i 组细胞凋亡率显著低于对照组( $P < 0.01$ )。见图 4。

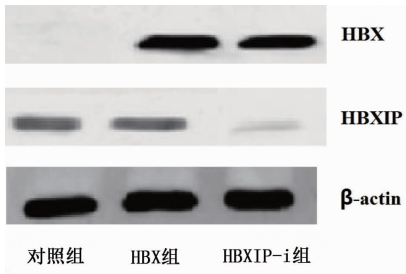


图 1 Western blot 检测转染效果

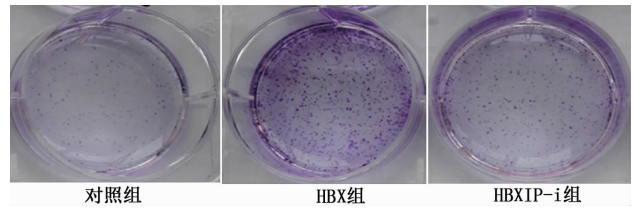


图 2 HBXIP 对 HepG2 细胞增殖的影响

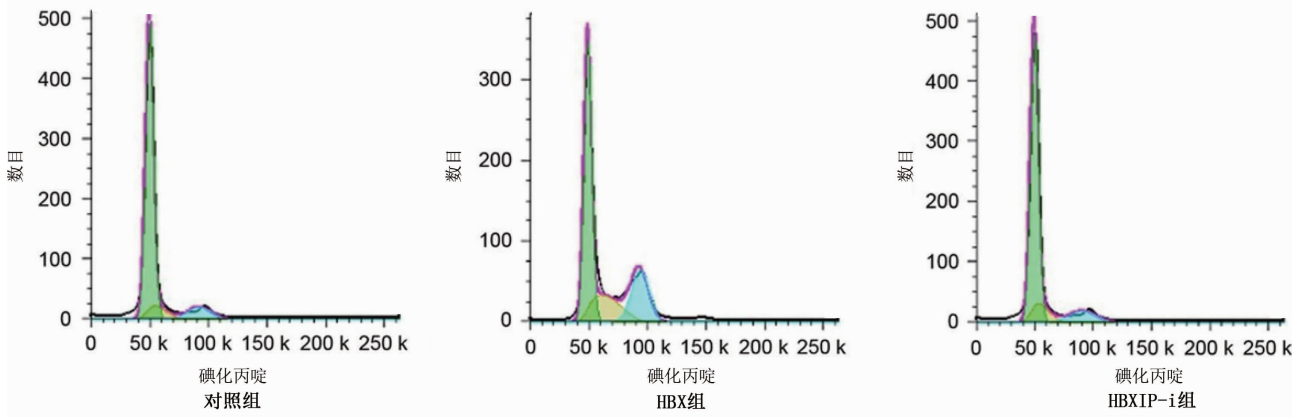
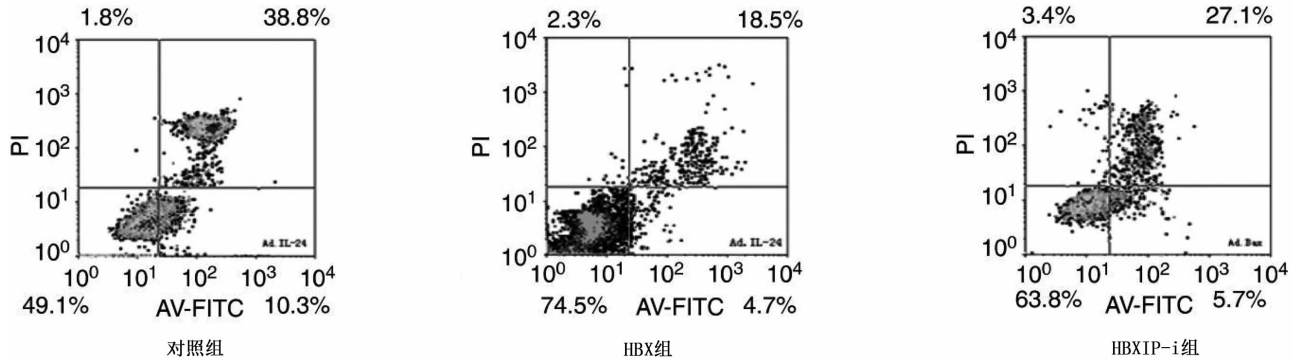


图 3 HBXIP 对 HepG2 细胞周期的影响



注:左上为坏死细胞,右上为晚期凋亡细胞,左下为正常细胞,右下为早期凋亡细胞。

图 4 HBXIP 对 HepG2 细胞凋亡的影响

表 1 HBXIP 对 HepG2 细胞周期的影响 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	G0/G1 期	S 期	G2/M 期
对照组	58.5 ± 8.3 <sup>a</sup>	21.5 ± 4.2 <sup>a</sup>	20.0 ± 3.9 <sup>a</sup>
HBX 组	77.5 ± 10.2	9.7 ± 1.2	12.8 ± 2.2
HBXIP-i 组	57.5 ± 7.7 <sup>a</sup>	24.3 ± 3.1 <sup>a</sup>	18.2 ± 2.5 <sup>a</sup>

注:与 HBX 组比较, <sup>a</sup>P < 0.01。

### 3 讨论

HBX 是肝癌中唯一表达 HBV 基因编码的病毒蛋白,被认为是 HBV 致癌的关键因子之一。HBXIP 蛋白可与 HBX 蛋白的羧基末端特异性结合<sup>[8]</sup>。HBXIP 蛋白由 173 个氨基酸构成,哺乳动物各组织均有表达,且较为保守<sup>[9]</sup>。

HBXIP 蛋白在乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃癌和膀胱癌等肿瘤中均表达上调<sup>[10-11]</sup>。在乳腺癌中,癌组织 HBXIP 蛋白阳性率显著高于癌旁组织,与肿瘤

的临床分期、淋巴结转移和 HER-2 表达相关,是影响乳腺癌患者预后的独立危险因素。非小细胞肺癌中 HBXIP 蛋白阳性率高于小细胞肺癌<sup>[12]</sup>。宫颈癌中,HBXIP 高表达与宫颈癌的临床分期、组织分化程度、淋巴结转移、HPV 感染和 p63 的表达显著相关。

HBXIP 蛋白与恶性肿瘤的发生、发展、转移和浸润等密切相关。HBXIP 蛋白可能参与肿瘤的糖代谢重排,如转染 HBXIP 后,乳酸和葡萄糖的生成显著增加,而细胞内的活性氧显著降低<sup>[13]</sup>。HBXIP 蛋白可促进癌细胞的侵袭和迁移,HBXIP 可激活 MEKK2/ERK1/2 信号通路,上调 Capn4 蛋白的表达,从而促进细胞形成丝状伪足,增强细胞的迁移能力<sup>[14]</sup>。HBXIP 还可促进肿瘤组织新生血管的形成,HBXIP 过表达能够调节 FGF-8 和 VEGF 促进肝癌血管的生成<sup>[15]</sup>。HBXIP 可促进癌细胞的增殖,上调 c-Myc、Bcl-2 和 PCNA,下调 p27,促进细胞增殖,HBXIP 还可

通过转录因子的辅激活因子,调节促进肿瘤细胞增殖<sup>[16]</sup>。HBXIP 抑制肿瘤细胞凋亡,乳腺癌研究中,HBXIP 可与 hSuv3p 蛋白结合,上调 survivin 的表达,发挥抗凋亡作用。

在目前的肝癌研究中,HBXIP 蛋白参与了肝癌的侵袭和迁移、促进血管生成和增殖。HBX 蛋白可通过 cAMP 效应元件结合因子上调 HBXIP,而 HBXIP 通过调控 GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 的表达发挥促迁移作用<sup>[17]</sup>。此外 HBXIP 可诱导 FGF8 蛋白表达,激活 PI3K/AKT/HIP1 $\alpha$  信号通路,促进肿瘤血管形成。而关于 HBXIP 对细胞凋亡和周期影响的研究尚不多见。本研究结果显示,过表达 HBX 后,HepG2 细胞增殖增强,G0/G1 期细胞增多,细胞凋亡率降低,而进一步 HBXIP 基因干扰后,取得了相反的结果,HepG2 细胞增殖下降,G0/G1 期细胞减少,细胞阻滞于 S 期,细胞凋亡率升高,表明 HBXIP 具有促进 HepG2 细胞增殖,抑制凋亡的作用。

综上所述,HBXIP 可促进肝癌细胞的增殖和抑制癌细胞凋亡。

#### 参考文献

- [1] Wang Y, Fang RP, Cui M, et al. The oncoprotein HBXIP up-regulates YAP through activation of transcription factor c-Myb to promote growth of liver cancer[J]. *Cancer Lett*, 2017, 385: 234 - 242.
- [2] 冯姝婷,姚远. 乙肝病毒 X 蛋白结合蛋白(HBXIP)在肝癌中的表达及定位[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(11): 1697 - 1699.
- [3] 司超,刘玮,刘俊,等. 肝癌组织中 HBXIP 和 Caspase 9 表达变化及临床意义[J]. *山东医药*, 2018, 58(16): 92 - 94.
- [4] Zhang WY, Lu ZP, Kong GY, et al. Hepatitis B virus X protein accelerates hepatocarcinogenesis with partner survivin through modulating miR-520b and HBXIP[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 128.
- [5] Shi H, Fang RP, Li YH, et al. The oncoprotein HBXIP suppresses gluconeogenesis through modulating PCK1 to enhance the growth of

hepatoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2016, 382(2): 147 - 156.

- [6] Wang Y, Cui M, Cai XL, et al. The oncoprotein HBXIP up-regulates SCG3 through modulating E2F1 and miR-509-3p in hepatoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2014, 352(2): 169 - 178.
- [7] Jin J, Tang SH, Xia L, et al. MicroRNA-501 promotes HBV replication by targeting HBXIP[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(4): 1228 - 1233.
- [8] Marusawa H. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression[J]. *EMBO J*, 2003, 22(11): 2729 - 2740.
- [9] 王凤泽,沙丽,乔玲,等. 乙肝病毒 X 蛋白结合蛋白(HBXIP)增强肝癌细胞 NF- $\kappa$ B 转录活性的实验研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(11): 1197 - 1201.
- [10] 姜勉,董佳丽,李航,等. HBXIP 蛋白表达对宫颈癌细胞的增殖能力及放射敏感性的影响[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2017, 41(5): 340 - 346.
- [11] 李巍巍,张丽丽. 肝炎 BX-相互作用蛋白在子宫内膜癌中的表达及临床意义[J]. *山西医药杂志*, 2016, 45(14): 1631 - 1633.
- [12] 司超. 乙肝病毒 x 蛋白结合蛋白(HBXIP)和 caspase 9 蛋白在肝细胞癌中的表达及意义[D]. 泸州:西南医科大学, 2018.
- [13] Li N, Wang YX, Che SL, et al. HBXIP over expression as an independent biomarker for cervical cancer[J]. *Exp Mol Pathol*, 2017, 102(1): 133 - 137.
- [14] Hu XM, Yan XH, Hu YW, et al. MiRNA-548p suppresses hepatitis B virus X protein associated hepatocellular carcinoma by downregulating oncoprotein hepatitis B x-interacting protein[J]. *Hepatol Res*, 2016, 46(8): 804 - 815.
- [15] Cheng CW, Chow AK, Pang R, et al. PIN1 inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma through modulation of the antiapoptotic function of survivin[J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(3): 765 - 775.
- [16] Fei HR, Li ZJ, Ying-Zhang, et al. HBXIP regulates etoposide-induced cell cycle checkpoints and apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells[J]. *Gene*, 2018, 647: 39 - 47.
- [17] Cai XL, Wang X, Cao C, et al. HBXIP-elevated methyltransferase METTL3 promotes the progression of breast cancer via inhibiting tumor suppressor let-7g[J]. *Cancer Lett*, 2018, 415: 11 - 19.

收稿日期:2019-08-30 修回日期:2019-09-25 编辑:王海琴