



HBx 抑制 IGFBP3 转录的机制

焦童^{1,2}, 刘宁宁¹, 叶昕^{1*}

¹中国科学院微生物研究所, 北京 100101

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要:【目的】在细胞水平上研究乙型肝炎病毒 X 蛋白(HBx)对胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (IGFBP3) 转录的影响并对具体机制进行初步探索。【方法】首先采用 RNA-Deep-Sequencing 技术分析 HepG2 和乙型肝炎病毒(HBV)转基因细胞 HepG2-4D14 中表达差异的基因, 然后通过实时定量 PCR 对相关基因进行验证; 利用启动子报告基因分析, 研究 HBx 对相关基因 IGFBP3 转录的调控; 通过染色质免疫共沉淀方法, 分析 HBx 抑制 IGFBP3 启动子活性的机制。【结果】RNA-Deep-Sequencing 的结果表明 IGFBP3 在 HBV 转基因细胞 HepG2-4D14 中水平显著下调, 实时定量 PCR 结果与 RNA-Deep-Sequencing 一致。进一步研究表明 HBx 能明显抑制 IGFBP3 的转录, 通过实时定量 PCR 发现 HBx 对 IGFBP3 转录的抑制作用依赖于 p53; 染色质免疫共沉淀实验结果表明 HBx 能够通过抑制 p53 与 IGFBP3 启动子的结合, 从而抑制 IGFBP3 的转录。IGFBP3 是一种细胞周期负调控蛋白, 我们推测 HBx 对 IGFBP3 水平的下调是其促进细胞增殖的途径之一。【结论】HBV 能显著下调 IGFBP3 的转录, 机制研究揭示 HBV HBx 通过干扰 p53 与 IGFBP3 启动子的结合进而抑制 IGFBP3 的转录。

关键词: HBx, IGFBP3, p53

原发性肝癌(HCC)是全球最普遍的恶性肿瘤之一, 世界范围内有超过 3.5 亿慢性感染患者存在发展为原发性肝癌的风险, 每年有 60 万人死于乙型肝炎病毒(HBV)的慢性感染^[1]。HBV 的慢性感染是导致 HCC 的最主要原因之一, 目前对其具体机制的研究仍不清楚。

HBV 属于嗜肝 DNA 病毒科, 通过逆转录进

行基因组复制。HBV 基因组是长为 3.2 kb 的环状部分双链 DNA, 具有 4 个重叠的开放阅读框(ORFs), 分别编码病毒被膜蛋白(pre-S1/pre-S2/S)、核心蛋白(pre-C/C)、聚合酶(Pol)以及 X 蛋白(HBx)^[2]。其中, HBx 由 154 个氨基酸组成, 分子量大小为 17 KD, 在所有哺乳动物嗜肝病毒中保守^[3]。已有报道证实 HBx 在基因转录^[3]、信号转

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2015CB910502); 国家自然科学基金青年基金(31600129)

*通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807508; E-mail: yex@im.ac.cn

收稿日期: 2016-12-02; 修回日期: 2017-02-09; 网络出版日期: 2017-03-02

导^[4]、增殖凋亡^[5]以及周期调控等方面具有重要的调节作用,并在 HCC 形成和发展的多个阶段发挥功能,比如,HBx 能够抑制肿瘤抑制因子 p53 的转录及其与靶基因启动子的结合,从而发挥抗凋亡的作用^[6-8]。

我们主要研究了 HBV 在原发性肝癌发生发展过程中所发挥的作用,以及 HBV 的慢性感染导致 HCC 的机制。为此我们采用 RNA-Deep-Sequencing 技术分析了 HepG2 和 HBV 转基因细胞 HepG2-4D14 中表达差异的基因,筛选其中能够影响细胞增殖、细胞凋亡以及肿瘤形成的基因,旨在阐明 HBV 通过调控基因表达导致 HCC 发生发展的机制。

胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBPs)家族由 IGFBP1、IGFBP2、IGFBP3、IGFBP4、IGFBP5 和 IGFBP6 组成。这些蛋白具有 36% 的同源性^[9-10],都能够结合胰岛素样生长因子(IGF)。IGFBP 由 3 个结构域组成,N 端及 C 端结构域与 IGF 的结合相关,在所有的 IGFBP 中保守。中间结构域存在差异,可能与不依赖 IGF 的功能有关^[11],这使得 IGFBP 能够通过 IGF 依赖性或非依赖性的机制发挥生物学功能。

IGFBP3 是 IGFBP 家族中含量最高的成员,主要由肝脏产生,基因定位于 7p12-14,由 264 个氨基酸组成。IGFBP3 可以与 IGF 结合形成复合物,延长 IGF 的半衰期,降低 IGF 与其受体的结合,从而竞争性地阻断 IGF I 型受体介导的信号传导,间接抑制肿瘤生长^[12]。

已有研究表明,p53 能够与 IGFBP3 的启动子区结合,促进 IGFBP3 的转录。由此我们推测,HBx 可能会通过 p53 抑制 IGFBP3 转录,进而解除 IGFBP3 的促凋亡作用。为了研究 p53 是否介导 HBx 对 IGFBP3 的抑制,本文在细胞水平进行实验。我们的实验结果表明,HBx 能够通过抑制

p53 与 IGFBP3 启动子的结合,从而抑制 IGFBP3 的转录,进而抑制 IGFBP3 的促凋亡作用。本文揭示了 HBx 抑制细胞凋亡、导致 HCC 的新机制,丰富了对该领域的认识。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞:人肾上皮细胞 293T 由本实验室保存,培养在含有 10%胎牛血清(购自 PAA 公司)的 DMEM 培养基中;人肝癌细胞 HepG2、HBx 转基因细胞 HepG2-HBx 由本实验室保存,HBV 转基因细胞 HepG2-C5、HepG2-4D14 由解放军 302 医院徐东平教授惠赠。人结肠癌细胞 HCT116-WT、HCT116-p53^{-/-}来自中国医学科学院,培养在含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中。

1.1.2 质粒:IGFBP3-luc 质粒为实验室所构建,IGFBP3-luc 选取了 IGFBP3 启动子区-210--+60 位(转录起始位点记为+1)的碱基片段^[13],载体为 pGL2-Basic,酶切位点为 *Nhe* I 和 *Hind* III。PCR 引物详见表 1。

1.1.3 抗体及试剂:Myc 抗体购自 Sigma 公司,tubulin、IGFBP3 抗体购自 CST 公司,p53 抗体购自 Santa Cruz 公司,荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司,MLV 逆转录试剂盒购自全式金公司,SYBR 购自 TOYOBO 公司,ChIP Assay 试剂盒购自碧云天公司,LipoPlus 转染试剂购自 Sage Creation 公司。

1.2 质粒转染和蛋白质免疫印迹实验

将 293T、HCT116-WT、HCT116-p53^{-/-}细胞于转染前铺入相应的培养皿中,24 h 后待细胞达到适宜的汇合度(293T 70%–80%、HCT116 30%–40%)时,进行转染。用无血清 DMEM 稀释转染试剂

LipoPlus, 使得转染试剂与 DNA 的比例为 3 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$, 混匀后静置 5 min, 再与无血清 DMEM 稀释的质粒混合, 静置 20 min 后加入细胞中。细胞置于 5% CO_2 的培养箱中 37 $^\circ\text{C}$ 培养, 转染 5 h 后换液。培养 48 h 后收取细胞, 弃培养基, 加入 1 mL PBS 悬起细胞, 1000 r/min、4 $^\circ\text{C}$ 离心 5 min。弃上清, 加入适量 Lysis Buffer, 冰上裂解 15 min, 12000 r/min、4 $^\circ\text{C}$ 离心 10 min。上清转移至新 EP 管, 加入 2 \times Loading Buffer, 煮样, 进行 SDS-PAGE, 将蛋白转至 PVDF 膜上进行 Western Blot 检测。

1.3 荧光素酶报告基因实验

293T、HCT116-WT 细胞铺入 24 孔板, 24 h 后转染, pRL-TK 质粒作为内参, 空载体作为空白对照。24 h 后收取细胞, 根据 Promega 荧光素酶检测试剂盒的说明书进行检测。

1.4 RNA 的提取及实时定量 PCR 实验

HepG2、HepG2-HBx、HCT116-WT、HCT116-p53^{-/-} 细胞转染 48 h 后, 收取细胞, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 定量后采用 MLV 逆转录试剂盒中的 Oligo dT 将其反转录为 cDNA。cDNA 作为模板, 根据需要采用相应引物(表 1), 进行实时定量 PCR。

1.5 染色质免疫共沉淀(ChIP)实验

293T 细胞共转 Myc-p53 及 FLAG-HBx 及空白对照 48 h 后, 收取细胞, 根据 ChIP Assay 试剂盒的说明书进行操作, 使用 Myc 抗体进行免疫沉淀, 分离与 p53 蛋白结合的 DNA。已知 p53 与 IGFBP3 启动子的结合区域为-210--159^[13-14](转录起始位点记为+1), 我们选用位于-250--110 的片段作为引物, 序列见表 1。最终产物用于实时定量 PCR, 检测 HBx 对 p53 与 IGFBP3 启动子区结合能力的影响。

表 1. 实时定量 PCR、ChIP Assay 所用引物

Primers	Primer sequences (5'→3')
RT-IGFBP3-F	CTCTGCGTCAACGCTAGTGC
RT-IGFBP3-R	CGGTCTTCTCCGACTCACT
RT-GAPDH-F	TGCACCACCAACTGCTTAG
RT-GAPDH-R	GATGCAGGGATGATGTTT
ChIP-F	GGTGGCCGGGCACACCTTGGT
ChIP-R	GGCTGCGGGGGCCCGTGCTTC

2 结果和分析

2.1 HBV 能够下调 IGFBP3 的 mRNA 及蛋白水平

首先, 我们采用 RNA-Deep-Sequencing 技术分析 HepG2 和 HBV 转基因细胞 HepG2-4D14 中表达差异的基因。我们的研究重点主要在于 HBV 在原发性肝癌发生发展过程中所发挥的作用, 因此在筛选 HepG2 和 HBV 转基因细胞 HepG2-4D14 中表达差异的基因时, 重点分析了在细胞增殖、细胞凋亡以及肿瘤形成中发挥作用的基因。我们采用实时定量 PCR 技术在细胞水平进行验证, 初步筛选基因。图 1-A 展示了部分数据。IGFBP3 的实时定量 PCR 验证结果与 RNA-Deep-Sequencing 结果一致, 并且已有相关报道证实 IGFBP3 具有促凋亡作用, 符合我们的研究目的, 因此, 我们优先选择了 IGFBP3 进行研究。

分析结果可知, 与 HepG2 细胞相比, HepG2-4D14 细胞中 IGFBP3 的 mRNA 水平下调了 5 倍。为了进一步证实该结果, 我们采用实时定量 PCR 检测 HBV 转基因细胞 HepG2-C5 及 HepG2-4D14 细胞中 IGFBP3 的 mRNA 水平, 如图 1-B 所示, HBV 转基因细胞 HepG2-C5 及 HepG2-4D14 细胞中 IGFBP3 的 mRNA 水平仅为 HepG2 细胞中的 20%。我们采用 IGFBP3 抗体进行 Western Blot, 如图 1-C 所示, 在 HBV 转基因

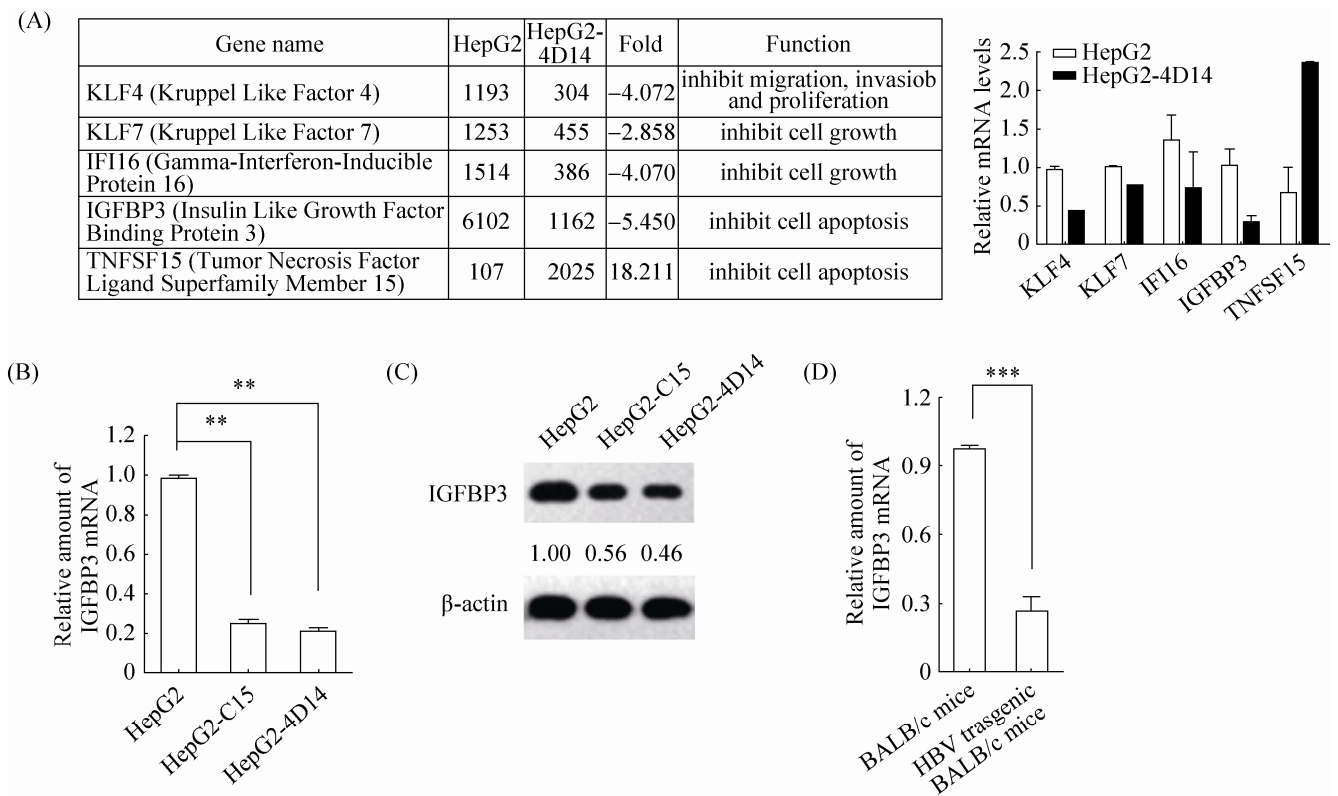


图 1. HBV 下调 IGFBP3 的 mRNA 及蛋白水平

Figure 1. HBx down-regulates the mRNA and protein level of IGFBP3. A: Real-time PCR was used to detect the mRNA level of KLF4, KLF7, IFI16, IGFBP3, TNFSF15 in HepG2 and HepG2-4D14 cells. The RNA level was normalized to GAPDH mRNA in cells. B: HepG2, HepG2-C5 and HepG2-4D14 cells were plated in 6-well plates and harvested after 48 h. The total RNAs were isolated with Trizol reagent, then mRNA of IGFBP3 was quantified by real-time PCR. The RNA level was normalized to GAPDH mRNA in cells. C: HepG2, HepG2-C5 and HepG2-4D14 cells were plated in 6-well plates and harvested after 48 h. The cell lysates were harvested for immunoblotting with IGFBP3 antibody. D: The total RNA of liver tissues of HBV transgenic and control mice was isolated with Trizol reagent, then mRNA of IGFBP3 was quantified by real-time PCR.

细胞 HepG2-C5 及 HepG2-4D14 细胞中 IGFBP3 的蛋白水平分别为 HepG2 细胞中的 56% 及 46%。为了进一步确认, 我们检测了 HBV 转基因小鼠肝组织中 IGFBP3 的 mRNA 水平, 如图 1-D 所示, HBV 转基因小鼠肝组织中 IGFBP3 的 mRNA 水平仅为对照组小鼠的 1/3。综上所述, HBV 能够下调 IGFBP3 的 mRNA 及蛋白水平。

2.2 HBx 抑制 IGFBP3 的转录

图 1 证实 HBV 能够抑制 IGFBP3 的 mRNA 及蛋白水平, IGFBP3 又是促凋亡因子, 我们推测

HBV 通过抑制 IGFBP3 的表达从而抑制凋亡。IGFBP3 的 mRNA 水平受到了抑制, 因此我们认为相对于翻译后修饰, HBV 更有可能是转录阶段发挥作用。

为了确定 HBV 所编码的蛋白中能够抑制 IGFBP3 转录的蛋白, 我们构建了 IGFBP3 启动子的报告基因系统, 用以探索 HBx 抑制 IGFBP3 转录的机制。如图 2-A 所示, HBx 能够显著抑制 IGFBP3 的启动子活性, 而 HBs 和 HBc 对 IGFBP3 的启动子活性没有明显的作用。因此, 我们得知

HBx 是抑制 IGFBP3 转录的蛋白。为了进一步确定, 我们选用 HepG2 和 HBx 转基因细胞 HepG2-HBx (图 2-B), 采取实时定量 PCR 技术检测 IGFBP3 的 mRNA 水平。如图 2-B 所示, HepG2-HBx 细胞中 IGFBP3 的 mRNA 水平仅为 HepG2 细胞的 25%, 结果表明, HBx 能够下调 IGFBP3 的表达。我们在 293T 及野生型 HCT116 细胞中转染 Myc-HBx 及 IGFBP3-luc (图 2-C、图 2-D), 转染 24 h 后检测荧光素酶活性, 如图 2-C、2-D 所示, 与对照组

相比, 过表达 HBx 的细胞中 IGFBP3 的荧光素酶活性显著减弱, 仅为对照组的 30%左右, 这说明 HBx 能够抑制 IGFBP3 的启动子活性, 从而抑制 IGFBP3 的转录。

2.3 p53 促进 IGFBP3 的转录

为了确定 p53 在 IGFBP3 转录过程中发挥的作用, 我们采用实时定量 PCR 检测 IGFBP3 在野生型 HCT116 细胞以及 p53 缺失的 HCT116-p53^{-/-} 细胞(图 3-A)中的 mRNA 水平。如图 3-A 所示,

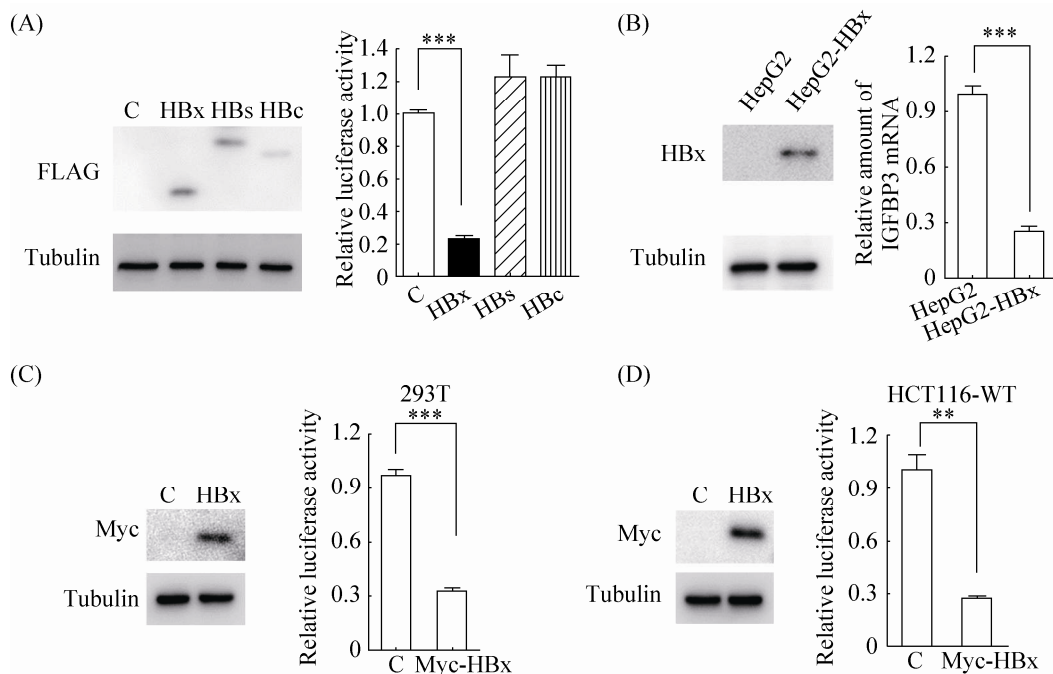


图 2. HBx 抑制 IGFBP3 的转录

Figure 2. HBx inhibits the transcription of IGFBP3. A: 293T cells were plated in 24-well plates and transfected with FLAG-HBx, FLAG-HBs, FLAG-HBc, IGFBP3-luc and pRL-TK plasmids. Cells were harvested for luciferase assay after 24 h. The protein level of HBx, HBs, HBc and tubulin was detected by immunoblotting. B: HepG2, HepG2-HBx cells were plated in 6-well plates and harvested after 48 h. The total RNAs were isolated with Trizol reagent, then mRNA of IGFBP3 was quantified by real-time PCR. The RNA level was normalized to GAPDH mRNA in cells. The protein level of recombinant HBx and tubulin were detected by immunoblotting. C: 293T cells were transfected with Myc-HBx, IGFBP3-luc and pRL-TK plasmids. Cells were harvested for luciferase assay after 24 h. Luciferase activity level was normalized to renilla activity. The protein level of HBx and tubulin was detected by immunoblotting. D: HCT116-WT cells were transfected with Myc-HBx, IGFBP3-luc and pRL-TK plasmids. Cells were harvested for luciferase assay after 24 h. Luciferase activity level was normalized to renilla activity. The protein level of HBx and tubulin was detected by immunoblotting.

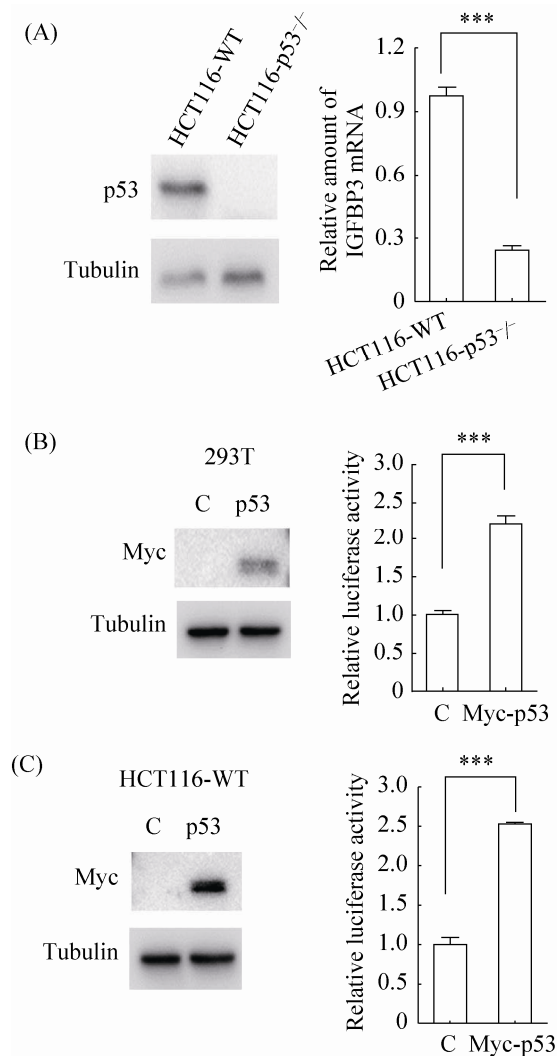


图 3. p53 促进 IGFBP3 的转录

Figure 3. p53 promotes the transcription of IGFBP3. A: HCT116-WT and HCT116-p53^{-/-} cells were plated in 6-well plates and harvested for real-time PCR after 48 h. The protein level of p53 was detected by immunoblotting. B: 293T cells were plated in 24-well plates and transfected with Myc-p53, IGFBP3-luc and pRL-TK plasmids. Cells were harvested for luciferase assay after 24 h. The protein level of p53 and tubulin was detected by immunoblotting. C: HCT116-WT cells were plated in 24-well plates and transfected with Myc-p53, IGFBP3-luc and pRL-TK plasmids. Cells were harvested for luciferase assay after 24 h. The protein level of p53 and tubulin was detected by immunoblotting.

在 HCT116-p53^{-/-} 细胞中, IGFBP3 的 mRNA 水平显著低于野生型 HCT116 细胞, 仅为野生型细胞的 24%。我们在 293T 及野生型 HCT116 细胞中转染 Myc-p53 (图 3-B、3-C), 以确定 p53 对 IGFBP3 启动子活性的影响。如图 3-B、3-C 所示, 过表达的 p53 能够显著促进 IGFBP3 的启动子活性, 与对照相比有 2 倍左右的上调。综上所述, p53 通过促进 IGFBP3 的启动子活性来促进 IGFBP3 的转录。

2.4 HBx 对 IGFBP3 转录的抑制依赖于 p53

根据上述实验结果, 我们提出假设, p53 可能会介导 HBx 对 IGFBP3 的抑制作用。为了探究 HBx 对 IGFBP3 转录的抑制是否依赖于 p53, 我们在野生型 HCT116 细胞及 HCT116-p53^{-/-} 细胞中转染 Myc-HBx, 转染 48 h 后采用实时定量 PCR 检测 IGFBP3 mRNA 水平的变化, Western Blot 检测 Myc-HBx 蛋白的表达情况(图 4-A)。如图 4-B 所示, 在野生型 HCT116 细胞中转染 HBx 后, IGFBP3 的 mRNA 水平与对照相比, 有 80% 的下调, 而在 HCT116-p53^{-/-} 的细胞中, IGFBP3 的 mRNA 水平与对照相比没有明显变化, 因此, HBx 对 IGFBP3 的抑制作用依赖于 p53。

2.5 HBx 通过影响 p53 与 IGFBP3 启动子的结合抑制 IGFBP3 的转录

已有文献报道, HBx 能够抑制 p53 与靶基因启动子的结合^[7]。我们推测 HBx 可能抑制 p53 与 IGFBP3 启动子的结合。我们在 293T 细胞中转染 FLAG-HBx 和 Myc-p53, 采用染色质免疫共沉淀技术以及实时定量 PCR, 检测 p53 结合 IGFBP3 启动子的能力。如图 5-B 所示, 我们使用 Myc 抗体进行免疫沉淀, 在沉淀获得等量 p53 蛋白(图 5-A) 的情况下, 转染 HBx 的细胞中 p53 与 IGFBP3 启动子的结合显著减弱, 与对照相比, 结合的启动

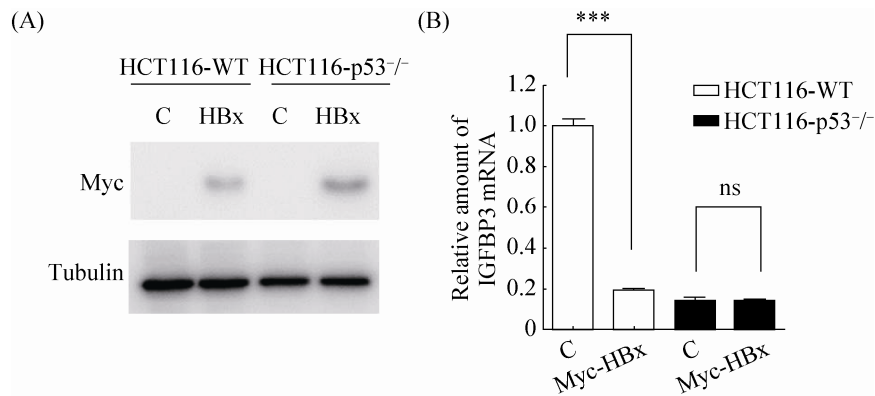


图 4. HBx 对 IGFBP3 转录的抑制依赖于 p53

Figure 4. The inhibition effect of HBx on IGFBP3 transcription depends on p53. HCT116-WT and HCT116-p53^{-/-} cells were transfected with Myc-HBx plasmids. A: cells were harvested after 48 h. The protein level of p53 and tubulin was detected by immunoblotting. B: the total RNAs were isolated with Trizol reagent, then mRNA of IGFBP3 was quantified by real-time PCR. The RNA level was normalized to GAPDH mRNA in cells.

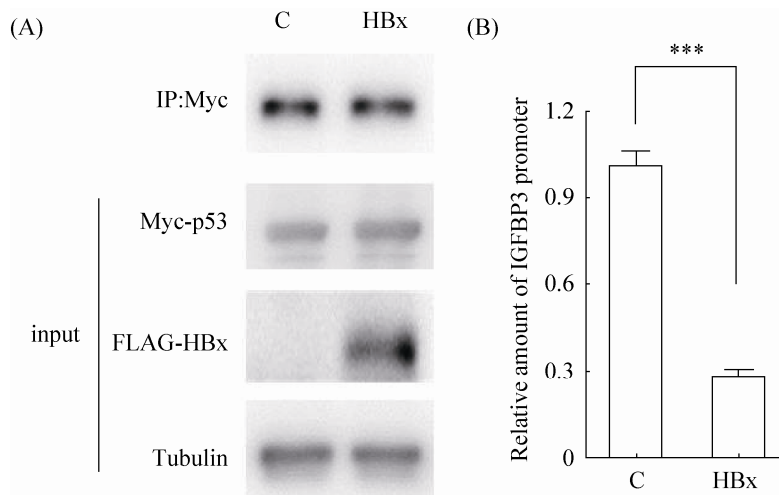


图 5. HBx 通过影响 p53 与 IGFBP3 启动子的结合抑制 IGFBP3 的转录

Figure 5. HBx inhibits the binding of p53 to the promoter of IGFBP3. 293T cells were transfected with Myc-p53 and FLAG-HBx. Cells were harvested after 48 h and subjected to ChIP Assay. A: the protein level of p53, HBx and tubulin was detected by immunoblotting. B: Real-time PCR was performed to quantify the amount of p53 binding DNA.

子含量降至 30%，说明 HBx 能够显著抑制 p53 与 IGFBP3 启动子的结合。这可能是 HBx 抑制 IGFBP3 转录的机制之一。

3 讨论

HBV 的慢性感染是诱发肝癌的主要原因。

HBx 对 HBV 的复制至关重要，同时也在 HCC 发展过程中发挥作用。HBx 是多功能蛋白，参与调控基因转录^[3]、细胞增殖、DNA 损伤修复，促进细胞周期^[15]、激活细胞内信号转导通路^[4]、调控细胞凋亡^[5]。例如，HBx 能够通过抑制线粒体膜上死亡配体 Bid 的表达，抑制线粒体释放细胞色

素 C, 降低 caspase-8 和 caspase-3 的活性, 进而抑制凋亡, 促进肝癌的发生^[16]。因此, 对 HBx 作用方式的研究能够帮助阐明 HCC 的发生发展机制。

已有报道指出 HBx 能够通过招募组蛋白去乙酰化酶(HDAC1), 促进其对 IGFBP3 启动子区转录因子 Sp1 的去乙酰化, 进而抑制 IGFBP3 的转录^[17]。该文发现 HBx 能够直接与 HDAC1 结合并且这种结合作用不依赖于 p53。本文发现 HBx 通过 p53 依赖性方式抑制 IGFBP3 的转录。关于 2 项研究所得结论的不同, 我们进行了如下分析。该文使用 Hep3B 细胞、选用 IGFBP3 启动子区-604+24 nt 的片段, 过表达 p53 进行免疫沉淀实验, 发现梯度过表达 p53 不影响 HBx 与 HDAC1 结合, 推知该结合过程不依赖于 p53。我们的实验使用野生型及 p53 缺失的 HCT116 细胞、选用 IGFBP3 启动子区-210+60 nt 的片段^[13], 转染 48 h 后进行实时定量 PCR, 检测 HBx 对 IGFBP3 转录的影响, 结果表明在缺失 p53 的情况下, HBx 不能抑制 IGFBP3 的转录。我们还通过染色质免疫沉淀技术发现 HBx 抑制 p53 与 IGFBP3 启动子的结合, 从而抑制 IGFBP3 的转录。综合两项研究, 我们认为, IGFBP3 的启动子区存在多个蛋白的结合位点, HBx 能够通过不同的机制抑制 IGFBP3 的转录, p53 在各个机制中发挥的作用也不尽相同。同时, 细胞及启动子片段的选择、细胞培养的时间、研究方法的不同也会导致结论的不同。另外, 该文没有检测 p53 对 IGFBP3 总体转录情况的作用, 与我们的结论并不矛盾。

本实验首次发现 p53 在 HBx 抑制 IGFBP3 转录过程中的作用, HBx 通过干扰 p53 与 IGFBP3 启动子的结合进而抑制 IGFBP3 的转录, 揭示了 HBx 促进肝癌发生的新机制。本实验对 HBV 调控 IGFBP3 机制的研究能够为肿瘤的治疗及药物的开发奠定基础。

参考文献

- [1] Lucifora J, Xia YC, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng XM, Sprinzl MF, Koppensteiner H, Makowska Z, Volz T, Remouchamps C, Chou WM, Thasler WE, Hüser N, Durantel D, Liang TJ, Munk C, Heim MH, Browning JL, Dejardin E, Dandri M, Schindler M, Heikenwalder M, Protzer U. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science*, 2014, 43(6176): 1221–1228.
- [2] Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*, 2015, 479–480: 672–686.
- [3] Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Science*, 2006, 97(10): 977–983.
- [4] Feng GX, Li J, Zheng MY, Yang Z, Liu YX, Zhang SQ, Ye LH, Zhang WY, Zhang XD. Hepatitis B virus X protein up-regulates C4b-binding protein α through activating transcription factor Sp1 in protection of hepatoma cells from complement attack. *Oncotarget*, 2016, 7(19): 28013–28026.
- [5] Kongkaviton P, Tangkijvanich P, Hirankarn N, Palaga T. Hepatitis B virus HBx activates Notch signaling via Delta-like 4/Notch1 in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146696.
- [6] Chao CCK. Inhibition of apoptosis by oncogenic hepatitis B virus X protein: implications for the treatment of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*, 2016, 8(25): 1061–1066.
- [7] Wang XW, Forrester K, Yeh H, Feitelson MA, Gu JR, Harris CC. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity and association with transcription factor ERCC3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(6): 2230–2234.
- [8] Chung TW, Lee YC, Ko JH, Kim CH. Hepatitis B Virus X protein modulates the expression of PTEN by inhibiting the function of p53, a transcriptional activator in liver cells. *Cancer Research*, 2003, 63(13): 3453–3458.
- [9] Lee SG, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. *Oncogene*, 2000, 19(3): 468–471.
- [10] Nguyen DV, Li Calzi S, Shaw LC, Kielczewski JL, Korah HE, Grant MB. An ocular view of the IGF-IGFBP system. *Growth Hormone & IGF Research*, 2013, 23(3): 45–52.
- [11] Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth

- factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrine Review*, 1999, 20(6): 761–787.
- [12] Mohan S, Baylink DJ. IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Endocrinology*, 2002, 175(1): 19–31.
- [13] Hanafusa T, Shinji T, Shiraha H, Nouse K, Iwasaki Y, Yumoto E, Ono T, Koide N. Functional promoter upstream p53 regulatory sequence of *IGFBP3* that is silenced by tumor specific methylation. *BMC Cancer*, 2005, 5(1): 9.
- [14] Bourdon JC, Degui-Chambon V, Lelong JC, Dessen P, May P, Debuire B, May E. Further characterisation of the p53 responsive element-identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene*, 1997, 14(1): 85–94.
- [15] Kim HS, Lee WJ, Lee SW, Chae HW, Kim DH, Oh Y. Insulin-like growth factor binding protein-3 induces G1 cell cycle arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase 2 and 4 in MCF-7 human breast cancer cells. *Hormone and Metabolic Research*, 2010, 42(3): 165–172.
- [16] Lee YI, Hwang JM, Im JH, Lee YI, Kim NS, Kim DG, Yu DY, Moon HB, Park SK. Human hepatitis B virus-X protein alters mitochondrial function and physiology in human liver cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(15): 15460–15471.
- [17] Shon JK, Shon BH, Park IY, Lee SU, Fa L, Chang KY, Shin JH, Lee YI. Hepatitis B virus-X protein recruits histone deacetylase 1 to repress insulin-like growth factor binding protein 3 transcription. *Virus Research*, 2009, 139(1): 14–21.

Mechanism of the inhibitory effect of HBx on IGFBP3 transcription

Tong Jiao^{1,2}, Ningning Liu¹, Xin Ye^{1*}

¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] To study the mechanism of HBx regulating the transcription of insulin growth factor binding protein 3 (IGFBP3). [Methods] RNA-sequencing method was used to screen differently expressing genes in HepG2 and HBV transgenic cell line HepG2-4D14. The mRNA of IGFBP3 was measured by reverse transcription and real-time PCR. To verify the activity of IGFBP3 promoter, cells were analyzed by luciferase assay. The binding of p53 and IGFBP3 promoter was measured by ChIP Assay. [Results] The level of IGFBP3 mRNA in HBV transgenic cell line HepG2-4D14 was significantly lower than that in HepG2 cells. The data of real-time PCR indicated that HBV HBx can down regulate the transcription of IGFBP3. By taking the approach of promoter luciferase assay on HCT116 and HCT116-p53^{-/-} cell lines, we found that HBx can inhibit the promoter activity of IGFBP3 in a p53-dependent manner. Our data also showed that HBx can significantly interfere with the binding of p53 to the promoter of IGFBP3. As IGFBP3 is a suppressor for cell growth, we postulate that HBx promotes the cell proliferation by reducing the level of IGFBP3. [Conclusion] HBx can inhibit the transcription of IGFBP3 in a p53-dependent manner.

Keywords: HBx, IGFBP3, p53

(本文责编: 李磊)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs of Fundamental Research and Development (2015CB910502) and by the National Natural Science Foundation of China (31600129)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64807508; E-mail: yex@im.ac.cn

Received: 2 December 2016; Revised: 9 February 2017; Published online: 2 March 2017