

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(10):1212–1220; 4 October 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.10.014

NF- κ B 激活 gp96 转录从而促进肝细胞生长、细胞周期进展和细胞转化

冯聪^{1,2}, 吴博^{1,2}, 范红霞², 李长菲², 孟颂东^{2*}

¹安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230601

²中国科学院微生物研究所, 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

摘要:【目的】探讨乙肝感染中 gp96 上调的机制及其可能发挥的病理学机制。【方法】首先通过生物信息学、Real-time PCR、荧光报告基因和 Western blot 研究 NF- κ B 激活 gp96 表达的机制。进一步通过在肝细胞中过表达或敲低 gp96 的水平, 运用 CCK-8 法和流式检测分析 gp96 对肝细胞增殖、凋亡, 和细胞周期的影响, 通过检测肝细胞 EMT 发生和细胞集落形成实验, 分析 gp96 对于 HCC 发生的作用。【结果】NF- κ B 与 gp96 启动子上 NF- κ B 结合位点结合, 激活 gp96 的表达。实验结果显示, gp96 能够促进肝细胞增殖、抑制凋亡, 促进细胞周期从静息期向分裂期的转化, 同时促进肝细胞 EMT 发生和细胞集落的形成。【结论】NF- κ B 通过活化 gp96 启动子上调其表达, 为 HBV 慢性感染上调 gp96 的机制提供了线索, 同时提示 gp96 在慢性炎症引发 HCC 过程中发挥重要作用。

关键词: NF- κ B, gp96, 细胞生长, 细胞周期, EMT

中图分类号: R37 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 10-1112-09

乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 感染是一种全球性疾病, 有超过 3.5 亿的慢性感染患者。临床数据显示, 慢性乙肝 (chronic hepatitis B, HCB) 中肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 发病率比未感染人群高 25–100 倍^[1–3], 这主要是由于 HBV 感染引发慢性炎症从而诱发肝癌^[4–8]。多种与慢性炎症相关的信号通路参与诱发 HCC^[9–10]。炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1、TGF- β 和 IFN- γ 等可直接或间接活化 NF- κ B 通路^[11], NF- κ B 通路的激活又可以促进多种炎症因子的转录, 形成正向反馈回路。在自发炎症诱发肝癌的 Mdr 基因敲除鼠模型中, 诱

导表达 I κ B α , 抑制 NF- κ B 通路可以促使转化的肝细胞凋亡, 降低 HCC 的形成, 这暗示 NF- κ B 通路是慢性炎症诱发 HCC 的重要通路之一^[8,12]。然而, 有研究表明不同炎症背景明显影响 NF- κ B 通路在肝癌等肿瘤的发生中的作用^[11], 显示该通路在 HCC 发生中作用的复杂性, 有关 NF- κ B 在 HCC 发生中的作用机制有待进一步阐明。

热休克蛋白 gp96 (又称 grp94) 属于热休克蛋白 90 (HSP90) 家族的一员, 正常条件下定位于细胞内质网膜上^[13], 我们前期研究发现 gp96 可结合乙肝病毒抗原, 并将抗原表位呈递给 MHC I 类分子, 活

基金项目: 国家自然科学基金 (31230026, 81321063, 81102018)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807350; E-mail: mengsd@im.ac.cn

作者简介: 冯聪 (1989–), 男, 安徽滁州人, 硕士研究生, 主要研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: fengcong0550@163.com

收稿日期: 2013-12-17; 修回日期: 2014-03-06

化病毒特异性 T 细胞^[14-16]。同时作为分子伴侣, gp96 帮助新合成或变性的蛋白分子折叠和装配。有研究发现, HBV 感染后 gp96 表达水平上调, 同时临床检测发现 gp96 在肝癌组织中表达明显升高, gp96 表达量与肿瘤分化程度和大小呈正相关^[17], 然而 gp96 上调的机制及生理功能并不清楚。

基于以上研究成果, 本研究进一步探讨在乙肝感染中 gp96 上调的机制及其可能发挥的病理学机制, 研究将为慢性乙肝感染向 HCC 转化的机制提供新的线索。

1 材料和方法

1.1 试剂与抗体

Opti-MEM、转染试剂 LipofectamineTM 2000、凋亡试剂盒购自 Invitrogen 公司, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司, 蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司, Trizol 购自天根生化科技(北京)有限公司, 反转录试剂盒、定量 PCR 检测试剂盒(SYBR Green Premix Reagent Kit)、RNase A、DNA mark 购自 TaKaRa 公司, CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所公司。大鼠抗人 gp96 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 兔抗人 E-cadherin、N-cadherin、vimentin 购自美国 Bioworld 公司, 小鼠抗人 β -actin 抗体及辣根过氧化物酶标记二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 细胞株、质粒和 siRNA

肝癌细胞 Huh7 购自 ATCC, 正常人肝细胞 L02 购自中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所。pRL-TK(海肾萤光素酶对照报告基因载体)、pcDNA3.1 为本实验室保存, pcDNA3.1-gp96、pGL3-gp96wt、pGL3-gp96mut 为本实验室构建, pcDNA3.1-p65 由中国科学院微生物研究所叶昕研究员惠赠。gp96 特异性 siRNA 由广州锐博生物科技有限公司设计和合成, 相应序列为 5'-CAGTTTGGATCTTGCTG TGG-3'。

1.3 生物信息学分析

根据已有文献报道^[18], gp96 基因上游 -799 至 +79 序列是其启动子区域, 运用转录因子结合位点在线预测 SignalScan (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/signal/>), MatInspector (<http://www.genomatix.de/products/index.html>), Neural Network

Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 和转录因子预测软件 TF-SEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 进行转录因子预测。

1.4 细胞转染

转染前一天消化细胞, 按照合适细胞数接种于六孔板中, 转染前换成 1.5 mL opti-MEM。在 250 μ L opti-MEM 中加入 4 μ L LipofectamineTM 2000, 混匀室温静置 5 min, 同时在 250 μ L opti-MEM 加入 2 μ g 质粒或者 80 pmol siRNA。将 LipofectamineTM 2000 与质粒/siRNA 混匀静置 20 min, 加入六孔板中, 4-6 h 后弃去 opti-MEM 换成正常培养基。

1.5 Real-time PCR 检测 gp96 mRNA 水平

用 Trizol 按照说明书提取细胞内总 RNA, 用 DEPC 水溶解, 测定 RNA 浓度。取 500 ng RNA 作为模板, 按照试剂盒说明书进行反转录。以 GAPDH 为内参, 将反转录产物进行 Real-time PCR 检测, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达量。

1.6 Western blot 检测 gp96、p65 蛋白以及上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)水平

转染后 72 h, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 然后在六孔板内用细胞裂解液(加入蛋白酶抑制剂)裂解细胞, 离心收上清, BCA 法测定蛋白浓度。每个样品取等量蛋白, 用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 转移蛋白到 PVDF 膜上, 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 二抗室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次, 按照说明书用 ECL 超敏发光液显影检测。

1.7 双荧光检测 gp96 启动子活性

在 L02 细胞中共转染 pRL-TK、pcDNA3.1-p65、pGL3-gp96wt/pGL3-gp96mut 质粒 48 h 后, 将细胞裂解后按照 Promega 双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书进行检测分析。通过荧光发光仪分别检测萤火虫荧光素酶的活性和海肾荧光素酶活性, 并以海肾荧光素酶活性作为内参分析荧光素酶的活性。

1.8 gp96 对细胞增殖的影响

按每孔 3000 个细胞将转染后的细胞铺到 96 孔板中, 每孔加入 100 μ L 培养基。在不同时间点(0、24、48、72、96 h), 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 吸出培养基, 测定 450 nm 的 OD 值。同时取 3 个不加细胞的培养基做空白对照。

1.9 gp96 对细胞周期的影响

转染 24 h 后,用含 0.5% 血清的培养基让细胞饥饿 24 h,使细胞同步化,再加入含 10% 血清的正常培养基继续培养 24 h。收集细胞并用预冷的 70% 乙醇固定细胞过夜,然后用 50 $\mu\text{g/mL}$ PI 和 50 $\mu\text{g/mL}$ RNase A 进行染色,通过流式细胞仪检测并分析结果。

1.10 gp96 对细胞凋亡的影响

细胞转染 72 h 后,用 50 nmol/mL TNF- α 刺激细胞 4 h。消化细胞,PBS 洗 2 遍,用 20 μL Annexin V 缓冲液将细胞轻轻悬起来,加入 1 μL 的 FITC annexin V 室温避光染色 15 min。向反应管中加入 Annexin V 缓冲液使终体积为 200 μL ,然后加入终浓度 1 $\mu\text{g/mL}$ PI 染色 3 min,最后通过流式细胞仪进行检测。

1.11 gp96 诱导细胞发生 EMT (epithelial-mesenchymal transition, 上皮细胞-间充质转化)

在 L02 细胞中转染 gp96 表达载体,转染 24 h 后消化细胞,重新铺板,使细胞密度为 50% - 60%,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,观察细胞形态。转染 72 h 后,PBS 洗 3 次,裂解细胞,Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白水平。

1.12 gp96 对细胞集落形成的影响

实验 Huh7 细胞转染 siRNA/control siRNA 24 h 后,消化细胞计数,稀释至合适浓度,在六孔板中分别接种 100、200 个细胞,每组 3 个重复。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,定期更换培养基,培养 2 - 3 周,用 PBS 洗 3 次,晾干,用甲醇固定 15 min,晾干,Giemsa 染色 10 min,流水洗净,显微镜观察,统计克隆数。

1.13 数据分析

每个实验都重复 2 - 3 次,每次设置 3 个重复。结果以平均值 \pm 标准差 (SD) 显示。Student *t* 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 认为是显著区别。

2 结果

2.1 NF- κ B 促进 gp96 的转录与表达

由于 NF- κ B 通路的活化在慢性乙肝向 HCC 转化中发挥重要作用,因此首先研究 gp96 表达上调是否受 NF- κ B 通路的调节。根据已有文献报道^[18],gp96 基因上游 -799 至 +79 序列是其启动子区域,通过生物信息学方法分析 gp96 启动子上是否有

NF- κ B 识别序列。使用 TF-SEARCH 预测发现 gp96 的启动子上有 CRE-BP1、NF- κ B、c-myc 等重要转录因子的结合位点(图 1-A)。同时使用 Signal Scan 软件预测,gp96 启动子上存在 NF- κ B、NF-Y 等转录因子结合位点,使用 Neural Network Promoter Prediction、MatInspector 软件预测也发现 gp96 基因上游启动子区域存在 NF- κ B 结合序列。

接下来通过细胞学试验验证 NF- κ B 对 gp96 转录的调节。在肝细胞系 L02 中转染 NF- κ B 的亚基 p65 表达质粒 pcDNA3.1-p65,gp96 的 mRNA 水平比对照组高近 3 倍(图 2-B),Western blot 检测显示过表达 p65 可显著提高 gp96 蛋白表达水平(图 2-C)。进一步对 gp96 启动子上 NF- κ B 结合位点进行定点突变,把含野生型 (pGL3-gp96wt) 或突变型 (pGL3-gp96mut) gp96 启动子的报告基因与 p65 表达载体共转 L02 细胞,结果如图 1-D 所示,p65 可以显著上调野生型 gp96 启动子活性,而对突变型启动子没有作用,说明 NF- κ B 通过与 gp96 启动子上 NF- κ B 转录因子结合位点结合从而激活 gp96 的转录与表达。

2.2 过表达 gp96 促进肝细胞增殖、抑制细胞凋亡,促进细胞从静息期向分裂期转化,诱导 EMT 发生

接着探讨 gp96 表达上调对肝细胞生长的影响。在正常肝细胞系 L02 中转染 gp96 表达载体 pcDNA3.1-gp96 或表达 GFP 的载体 pEGFP-C1 做对照。转染 pcDNA3.1-gp96 质粒显著提高 gp96 的蛋白水平(图 2-A),分别在转染后 24、48、72、96 h 利用 CCK-8 检测细胞增殖,如图 2-B 所示,过表达 gp96 显著提高细胞的增殖能力($P < 0.05$)。同时检测 gp96 表达对细胞凋亡的影响,如图 2-C 所示,过表达 gp96 显著抑制细胞凋亡,与对照相比,转染 gp96 表达载体 72 h 后细胞凋亡降低 50% ($P < 0.05$)。

进一步研究 gp96 对肝细胞周期和转化的作用。如图 2-D 所示,与对照相比,转染 gp96 表达载体后处于 G0-G1 期的细胞数量降低 20% ($P < 0.05$),而处于 S 期的细胞数量增加 24% ($P < 0.05$),说明过表达 gp96 促进细胞从静息期向分裂期的转化。同时过表达 gp96 后,肝细胞形态学发生变化,部分细胞从长梭形向短柱形转变(图 2-E)。通过 Western blot 检测 EMT 指标,发现过表达 gp96 使得 EMT 标志物 E-cadherin 明显下调,而 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白水平显著上调(图 2-F),说明过表达 gp96 诱导

细胞发生 EMT。

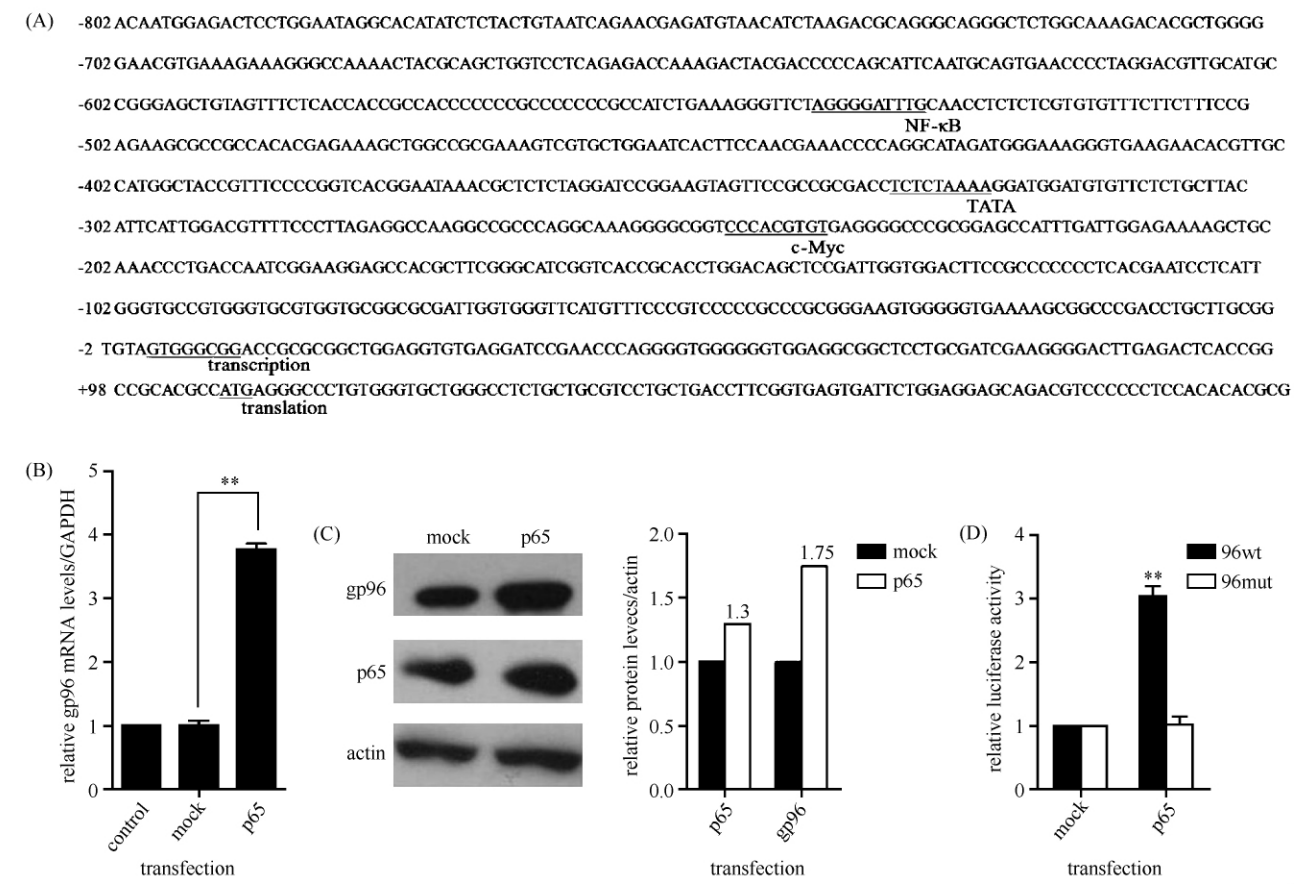


图 1. NF-κB 促进 gp96 表达

Figure 1. NF-κB promotes gp96 expression. A: the online TFSEARCH program was used to analyze the sequence of gp96 promoter. The putative binding sites for several cis-acting elements are indicated. B, C: L02 cells were transfected with p65 expression vector pcDNA3.1-p65 or GFP expression vector pEGFP-C1 as a mock. The mRNA (B) and protein (C) levels of gp96 were determined by real-time PCR and Western blot 48 and 72 h after transfection, respectively. D: L02 cells were co-transfected with the gp96 promoter luciferase reporter plasmid with a wild type or mutated NF-κB binding site and pcDNA3.1-p65 or pEGFP-C1 as a mock. The relative luciferase activity was determined 48 h after transfection. The luciferase activity of the mock-transfected group was set as 1.0. Data are presented as the means ± SD from three independent experiments. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$ compared with mock.

2.3 下调 gp96 抑制肝细胞增殖、促进细胞凋亡、抑制细胞从静息期向分裂期转化,并抑制细胞集落形成

反之,在 gp96 高表达的人肝癌细胞系 Huh7 中 转染 gp96 的 siRNA,可明显降低 gp96 的水平(图 3-A)。敲低 gp96 显著降低细胞的增殖能力($P < 0.05$ 或 0.01)(图 3-B),并促进细胞凋亡(图 3-C),与对照相比,转染 gp96RNAi 使细胞凋亡上升约 4 倍 ($P < 0.01$)。

进一步研究敲低 gp96 对肝细胞周期和集落形成的作用。gp96 下调明显影响 Huh7 细胞周期(图 3-D),与对照相比,转染 gp96RNAi 使处于 G0-G1 期的细胞数量升高 20% ($P < 0.05$),而处于 S 期的细胞数量降低 21% ($P < 0.05$),说明下调 gp96 抑制细胞从静息期向分裂期的转化。同时,与对照相比敲低 gp96 后细胞集落数明显减少(图 3-E),说明敲低 gp96 可以明显抑制细胞集落形成。

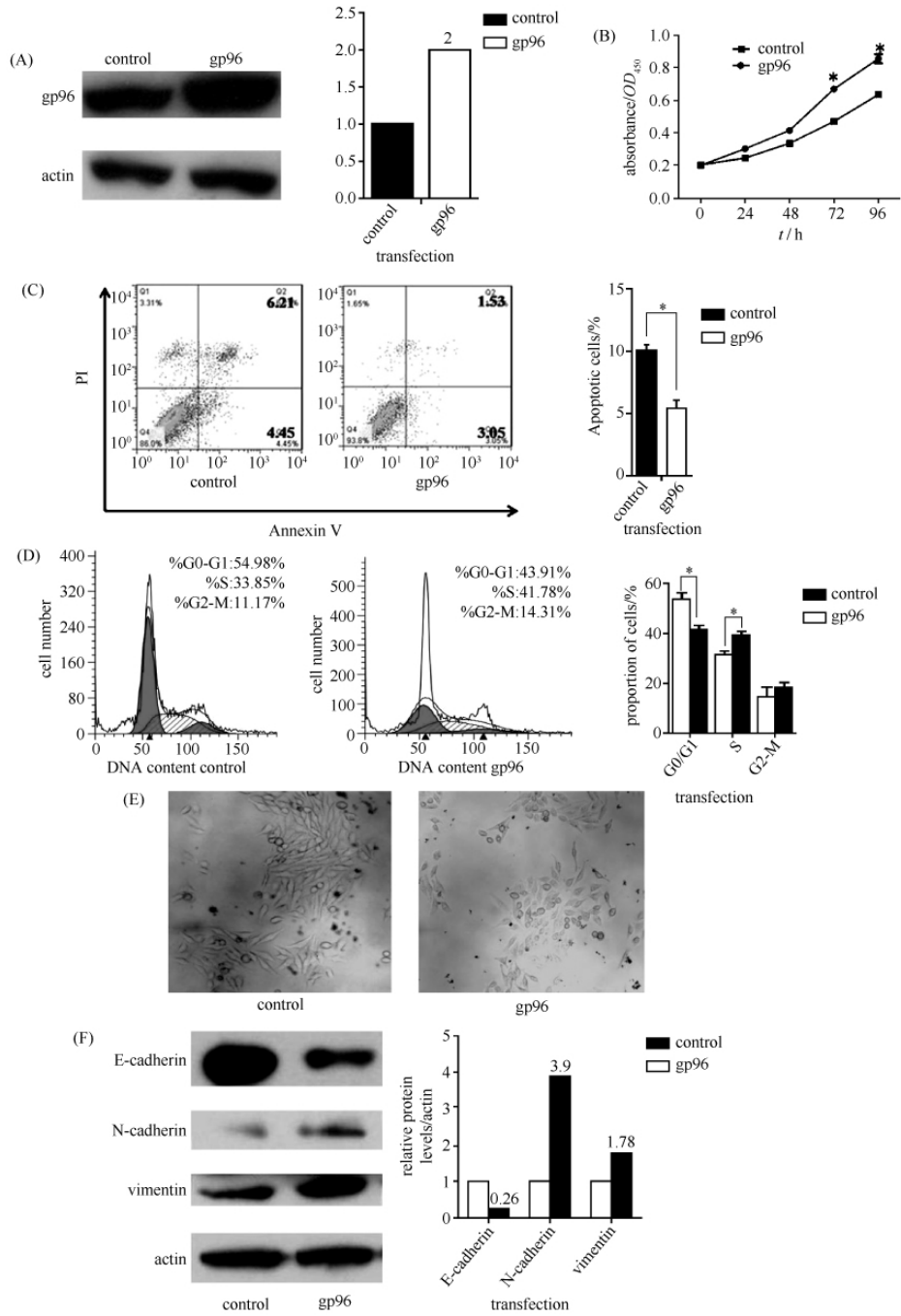


图 2. 过表达 gp96 对 L02 细胞增殖、凋亡、细胞周期以及 EMT 的影响

Figure 2. Effects of gp96 over-expression on proliferation, apoptosis, cell cycle and EMT of L02 cells. A: L02 cells were transfected with gp96 expression vector pcDNA3.1-gp96 or GFP expression vector pEGFP-C1 as a control. The whole-cell lysates were prepared 72 h after transfection. Western blot analysis was performed using antibodies against gp96 and actin. B: the proliferation of L02 cells was assessed by CCK-8 assay at 0, 24, 48, 72 and 96 h, respectively, after transfection with pcDNA3.1-gp96 or pEGFP-C1 as a control. C, D: L02 cells were transfected with pcDNA3.1-gp96 or pEGFP-C1 as a control. At 72 h after transfection, cells were stained with Annexin V/fluorescein isothiocyanate and PI. The apoptotic cells (Annexin V single positive and Annexin V/PI double positive) were analyzed by FACS. The percentage of apoptotic cells is shown (C). Transfected L02 cells were synchronized fixed and stained with PI for DNA content. The percentage of cells indifferent stages of cell cycle was analyzed by FACS (D). E, F: L02 cells were transfected with pcDNA3.1-gp96 or pEGFP-C1 as a control. Cell morphology was examined under the phase-contrast microscope 72 h after transfection (E). The protein levels of E-cadherin, N-cadherin, vimentin were determined by Western blot 72 h after transfection (F). Data are presented as the means \pm SD from three independent experiments. * $P < 0.05$ compared with control. Two independent experiments were performed with similar results.

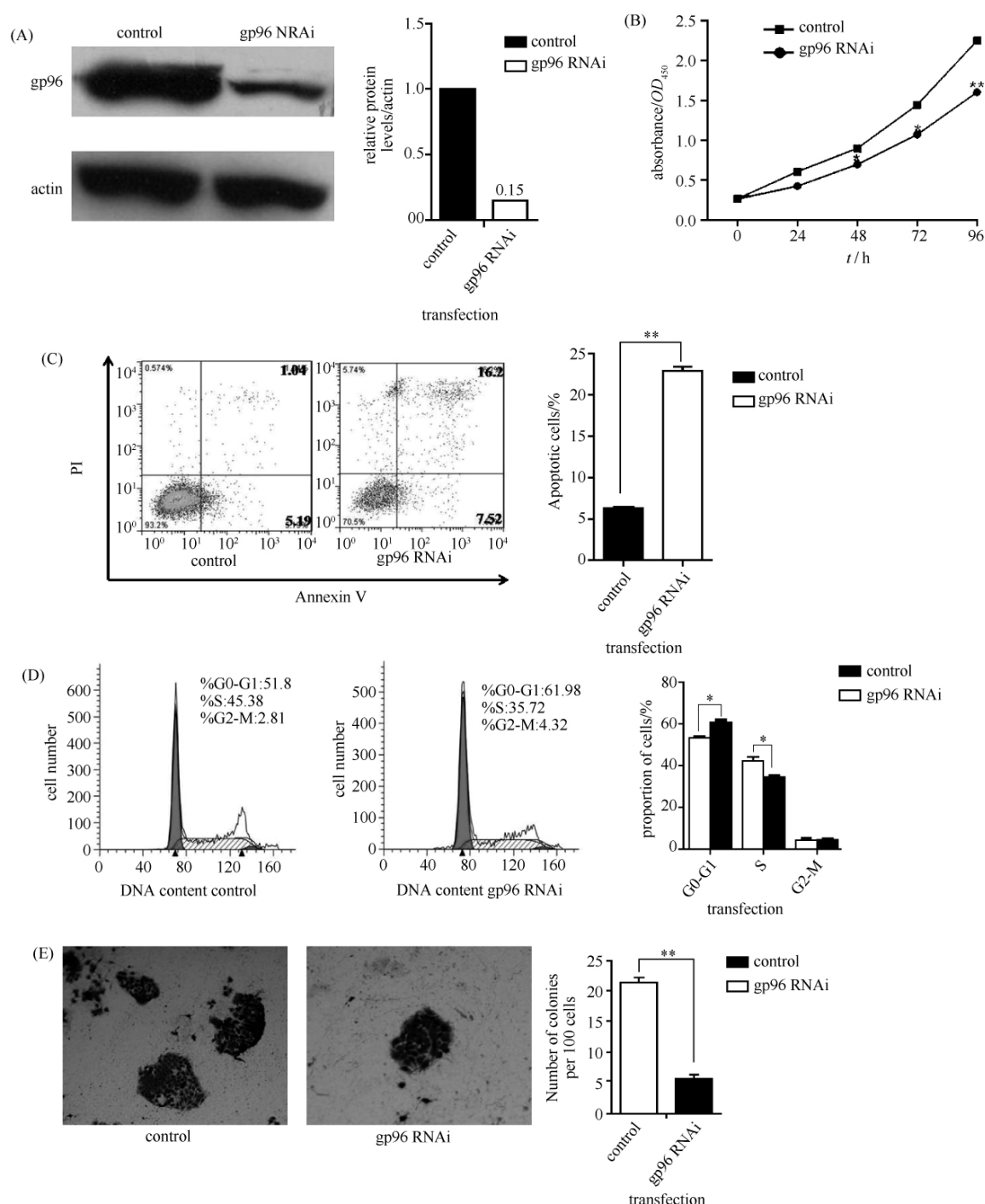


图 3. 敲低 gp96 对 Huh7 细胞影响增殖、凋亡、细胞周期和集落形成的影响

Fig. 3 Effects of gp96 depletion on proliferation, apoptosis, cell cycle, and colony-forming of Huh7 cells. A: Huh7 cells were transfected with gp96 siRNA or control siRNA as a control. At 72 h after transfection, cells were lysed and Western blot was performed using antibodies against gp96 and actin. B: Cell proliferation was assessed by CCK-8 assay at 0, 24, 48, 72 and 96 h, respectively, after transfection with gp96 siRNA or control siRNA. C, D: Huh7 cells were transfected with gp96 siRNA or control siRNA. At 72 h after transfection, the apoptotic cells (Annexin V single positive and Annexin V/PI double positive) were analyzed by FACS. The percentage of apoptotic cells is shown (C). Transfected Huh7 cells were synchronized, fixed and stained with PI for DNA content. The percentage of cells indifferent stages of cell cycle was analyzed by FACS. D, E: Huh7 cells transfected with gp96 siRNA or control siRNA were seeded in six-well plates at a density of 100 or 200 cells per well, and cultured for 2–3 wks. At the end, cells were stained with Giemsa, and colony formation was quantitated. Data are presented as the means \pm SD from three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared with control. Two independent experiments were performed with similar results.

3 讨论

在慢性肝炎诱发 HCC 中 NF- κ B 通路发挥重要作用,但具体作用机制有待进一步全面研究。本研究通过对 gp96 启动子上转录因子结合位点预测和报告基因分析,发现并验证存在 NF- κ B 结合序列,研究结果为探讨 HBV 感染上调 gp96 的机制提供了线索。进一步通过过表达和敲低 gp96 实验发现, gp96 对肝细胞的增殖、凋亡和细胞周期均有明显的调节作用,同时 gp96 诱导细胞 EMT 发生、促进细胞集落形成,提示 gp96 在慢性乙肝等感染和肝癌中表达升高可能在 HCC 发生和发展中发挥重要作用,为慢性乙肝感染引发肝癌的分子机制提供了新的思路。

我们实验室以及其他人的研究均发现乙肝慢性感染显著上调 gp96 的表达^[17,19-21], gp96 的表达水平与慢性乙肝疾病进展密切相关,同时临床数据也显示 gp96 在肝癌组织中表达量高于正常组织,且 gp96 表达量与肿瘤分化程度和大小正相关^[17]。有研究发现 HBV 的大表面蛋白在感染细胞的内质网中大量积累引起内质网应激反应,HBx 的表达可以激活未折叠蛋白反应中 ATF6 和 IRE1-XBP1 通路,均可能激活 gp96 的表达^[21-24]。鉴于在慢性乙肝感染中慢性炎症直接或间接活化 NF- κ B 通路^[11],本研究探讨 NF- κ B 是否参与 gp96 表达上调,研究发现 NF- κ B 直接作用于 gp96 启动子,促进 gp96 的转录与表达。综合其他人的研究成果,我们推测在慢性乙肝感染中,病毒因子和慢性炎症共同促进 gp96 的表达。

gp96 作为分子伴侣帮助新合成的蛋白分子或变性蛋白正确折叠和装配,对于膜蛋白在内质网中的质量控制和随后的分泌发挥重要作用^[26]。目前已发现的与 gp96 相互作用的客户蛋白包括整合素蛋白、胰岛素样生长因子、Toll 样受体等^[26],其中有多种蛋白和肿瘤的发生密切相关。整合素 α L 和 β 2 二聚化高度依赖于 gp96^[27],而整合素蛋白与肿瘤发生、生长、转移密切相关。gp96 缺失会导致胰岛素样生长因子 (IGF) 不能正常成熟和分泌^[28],此外,人类表皮生长因子受体 2 (HER2) 也与 gp96 存在相互作用^[29]。本研究发现 gp96 显著促进肝细胞增殖、抑制细胞凋亡,促进细胞从 G0-G1 期向分裂期 S

期的转化,过表达 gp96 会诱导细胞发生 EMT,提示 NF- κ B 上调 gp96 可能在慢性炎症向 HCC 的转化中发挥重要作用。下一步工作需要深入分析 gp96 促进肝细胞生长的机制以及与 gp96 相互作用的蛋白,为全面了解 HCC 发生的分子机制及治疗靶点提供依据。

综上所述,本研究发现慢性炎症活化的一个主要通路 NF- κ B 在转录水平上调 gp96 的表达,而 gp96 的上调显著促进肝细胞的生长,促进细胞进入分裂周期,诱导肝细胞 EMT 转化和集落形成,提示 gp96 在慢性炎症向 HCC 的转化中发挥重要作用。鉴于 gp96 在肝癌、胃肠癌、鼻咽癌、口腔癌均高表达,并与不良愈后相关^[30-32],本研究为 gp96 作为治疗肝癌等多种肿瘤的一个潜在新靶点提供了理论依据。

参考文献

- [1] Jules L. Dienstag, MD. Hepatitis B virus infection. *The New England Journal of Medicine*, 2008, 359: 1486-1500.
- [2] Kew MC. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Pathologie Biologie*, 2010, 58 (4):273-277.
- [3] Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, Beasley P, Patt YZ. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology*, 2002, 36 (5):1206-1213.
- [4] Nakagawa H, Maeda S. Inflammation-and stress-related signaling pathways in hepatocarcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 2012, 18 (31):4071-4081.
- [5] Wang J, Zhao W, Cheng L, Guo M, Li D, Li X, Tan Y, Ma S, Li S, Yang Y, Chen L, Wang S. CD137-mediated pathogenesis from chronic hepatitis to hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-transgenic mice. *The Journal of Immunology*, 2010, 185 (12):7654-7662.
- [6] Guerrieri F, Belloni L, Pediconi N, Levrero M. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *Seminars in Liver Disease*, 2010, 52:594-604.
- [7] Prieto J. Inflammation, HCC and sex: IL-6 in the centre of the triangle. *Journal of Hepatology*, 2008, 48 (2):380-381.
- [8] Potikha TI, Stoyanov E, Pappo O, Frolov A, Mizrahi L,

- Olam D, Shnitzer-Perlman T, Weiss I, Barashi N, Peled A, Sass G, Tiegs G, Poirier F, Rabinovich GA, Galun E, Goldenberg D. Interstrain differences in chronic hepatitis and tumor development in a murine model of inflammation-mediated hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 2013, 58 (1) :192-204.
- [9] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature Reviews Cancer*. 2009, 9 (11) :798-809.
- [10] He G1, Yu GY, Temkin V, Ogata H, Kuntzen C, Sakurai T, Sieghart W, Peck-Radosavljevic M, Leffert HL, Karin M. Hepatocyte IKKbeta/NF- κ B inhibits tumor promotion and progression by preventing oxidative stress-driven STAT3 activation. *Cancer Cell*, 2010, 17 (3) :286-297.
- [11] DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF- κ B and the link between inflammation and cancer. *Immunological Reviews*, 2012, 246 (1) :379-400.
- [12] Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gulkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF- κ B functions as a tumor promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, 2004, 431 (7007) :461-466.
- [13] Eletto D, Dersh D, Argon Y. GRP94 in ER quality control and stress responses. *Seminars in Cell Developmental Biology*, 2010, 21 (5) :479-485.
- [14] Meng SD, Gao T, Gao GF, Tien P. HBV-specific peptide associated with heat shock protein gp96. *Lancet*, 2001, 357 (17) : 528-529.
- [15] Wang S, Qiu L, Liu G, Li Y, Zhang X, Jin W, Gao GF, Kong X, Meng S. Heat shock protein gp96 enhance humoral and T cell responses, decreases Treg frequency and potentiates the anti-HBV activity in BALB/c and transgenic mice. *Vaccine*, 2011, 29 (37) :6342-6351.
- [16] Zhao B, Wang Y, Zhang Y, Li Y, Zhang X, Xu Y, Chen L, Li C, Ju Y, Meng S. TAT-mediated gp96 transduction to APCs enhances gp96-induced antiviral and antitumor T cell responses. *Vaccine*, 2013, 31 (3) :545-552.
- [17] Yao DF, Wu XH, Su XQ, Yao M, Wu W, Qiu LW, Zou L, Meng XY. Abnormal expression of HSP gp96 associated with HBV replication in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreatic Diseases International*, 2006, 5 (3) :381-386.
- [18] Maki RG, Old LJ, Srivastava PK. Human homologue of murine tumor rejection antigen gp96: 5'-regulatory and coding regions and relationship to stress-induced proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1990, 87 (15) :5658-62.
- [19] Liu Z, Li X, Qiu L, Zhang X, Chen L, Cao S, Wang F, Meng S. Treg suppress CTL responses upon immunization with HSP gp96. *European Journal of Immunology*, 2009, 39: 1-11.
- [20] Zhu XD, Li CL, Lang ZW, Gao GF, Tien P. Significant correlation between expression level of HSP gp96 and progression of hepatitis B virus induced diseases. *World Journal Gastroenterol*, 2004, 10: 1141-1145.
- [21] Lim SO, Park SG, Yoo JH, Park YM, Kim HJ, Jang KT, Cho JW, Yoo BC, Jung GH, Park CK. Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B. *World Journal Gastroenterol*, 2005, 11 (14) :2072-2079.
- [22] Xu ZC, Jensen G, Yen TS. Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. *Journal Virology*, 1997, 71 (10) :7387-7392.
- [23] Cho HK, Kim HY, Cheong J. Endoplasmic reticulum stress induced by hepatitis B virus X protein enhances cyclooxygenase-2 expression via activating transcription factor-4. *Biochemical Journal*, 2011, 435 (2) :431-439
- [24] Li B, Gao B, Ye L, Han X, Wang W, Kong L, Fang X, Zeng Y, Zheng H, Li S, Wu Z, Ye L. Hepatitis B virus X protein (HBx) activates ATF6 and IRE1- XBP1 pathways of unfolded protein response. *Virus Research*, 2007, 124 (1-2) :44-49
- [25] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8:519-529.
- [26] Marzec M, Eletto D, Argon Y. GRP94: an HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the Endoplasmic Reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 2012, 1823 (3) :774-787.
- [27] Hong F, Liu B, Chiosis G, Gewirth DT, Li Z. α 7 helix region of α I domain is crucial for integrin binding to endoplasmic reticulum chaperone gp96: a potential therapeutic target for cancer metastasis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288 (25) :18243-18248.
- [28] Wanderling S, Simen BB, Ostrovsky O, Ahmed NT, Vogen SM, Gidalevitz T, Argon Y. GRP94 is essential for mesoderm induction and muscle development because it regulates insulin-like growth factor secretion. *Molecular*

- Biology of the Cell*, 2007, 18 (10) :3764-3775.
- [29] Chavany C, Mimnaugh E, Miller P, Bitton P, Nguyen J, Trepel L, Whitesell R, Schnur J, Moyer, Neckers L. p185erbB2 binds to GRP94 in vivo. Dissociation of the p185erbB2/GRP94 heterocomplex by benzoquinone ansamycins precedes depletion of p185erbB2. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 (9) :4974-4977.
- [30] Wang X, Wang Q, Lin H, Li S, Sun L, Yang Y. HSP72 and gp96 in gastroenterological cancers. *Clinica Chimica Acta*, 2013, 417:73-79.
- [31] Zhou J, Xiao X, Yi H, Wang J, Wang X, Zhang Q. Upregulation of Gp96 correlates with the radiosensitivity and five-year survival rate of nasopharyngeal carcinoma. *Journal for Oto-Rhino-Laryngology and its Related Specialties*, 2012, 74 (3) :164-171.
- [32] Lin CY, Lin TY, Wang HM, Huang SF, Fan KH, Liao CT, Chen IH, Lee LY, Li YL, Chen YJ, Cheng AJ, Chang JT. GP96 is over-expressed in oral cavity cancer and is a poor prognostic indicator for patients receiving radiotherapy. *Radiation Oncology*, 2011, 6:136.

NF- κ B-induced gp96 up-regulation promotes hepatocyte growth, cell cycle progression and transition

Cong Feng^{1,2}, Bo Wu^{1,2}, Hongxia Fan², Changfei Li², Songdong Meng^{2*}

¹ School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, Anhui Province, China

² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] To investigate the mechanism of gp96 raised during hepatitis B virus (HBV) infection and the pathological mechanism. [Methods] The mechanism of NF- κ B activating gp96 expression was determined by bioinformatics analysis, luciferase reporter assay, real-time PCR and Western blot. The effect of over-expression and knockdown gp96 expression by transfection or RNA interference on hepatocyte proliferation, apoptosis and cell cycle was examined by CCK-8 and flow cytometry. The role of gp96 for HCC development was determined by epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colony formation assay. [Results] NF- κ B significantly increased the gp96 expression by binding to the NF- κ B binding site. Over-expression and knockdown studies both show that gp96 promoted hepatocyte proliferation, inhibited apoptosis, and induced G0/G1 to S phase cell cycle progression. Moreover, gp96 induced epithelial-mesenchymal transition and increased colony formation ability of hepatocytes. [Conclusion] Our results therefore provide insights in chronic HBV infection-induced gp96 expression, and indicate that elevated gp96 may contribute to HCC development during chronic inflammation.

Keywords: NF- κ B, gp96, cell growth, cell cycle progression, EMT

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31230026,81321063,81102018)

* Corresponding author. Tel: +86-40-64807350; E-mail: mengsd@im.ac.cn

Received: 17 December 2013/Revised: 6 March 2014