

HBx-EGFP-TLM 融合蛋白表达载体的构建、蛋白表达纯化及活性检测

史晓燕^{1,2*}, 张莹莹^{2*}, 周晓巍², 陆健昇², 郭泽坤¹, 黄培堂²

1 西北农林科技大学 生命科学学院, 杨凌 712100

2 军事医学科学院 生物工程研究所, 北京 100071

摘要: 乙型肝炎病毒 X 蛋白 (HBx) 具有广泛的转录激活作用, 但是由于细胞类型和实验条件的差异, 外源启动子介导的 HBx 瞬时表达水平常表现出不均一性, 为其功能的研究带来困难。为了解决 HBx 研究过程中遇到的这些难题, 利用 PCR 扩增获得 HBx 及含转导肽 TLM 的 EGFP 编码序列, 经酶切后插入 pGEX-4T-1 原核表达载体, 成功构建重组质粒 pGEX-HBx-EGFP-TLM 和 pGEX-EGFP-TLM。重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 融合蛋白经 IPTG 诱导表达, 采用 ÄKTA™ Purifier 蛋白纯化系统纯化并进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析, 确定为目的蛋白。将纯化后的融合蛋白分别与 AML12 和 SMMC-7721 细胞共孵育, Western blotting 和激光共聚焦显微镜检测证实 TLM 转导肽能够介导 HBx-EGFP 和 EGFP 进入细胞, 同时进入细胞的 HBx-EGFP-TLM 能够发挥转录激活活性, 为 HBx 功能的深入研究奠定了基础。

关键词: 乙型肝炎病毒, 乙型肝炎病毒 X 蛋白, 原核表达, 转导肽 TLM

Expression, purification, and bio-activity analysis of fusion protein HBx-EGFP-TLM

Xiaoyan Shi^{1,2*}, Yingying Zhang^{2*}, Xiaowei Zhou², Jiansheng Lu², Zekun Guo¹, and Peitang Huang²

1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

2 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: Hepatitis B virus X protein (HBx) has various functions and plays a crucial role in the development of hepatocellular carcinoma (HCC). However, due to different transfection efficiency levels and experimental approaches, it is difficult to correlate the exact functions of HBx to HBV-associated HCC. In this study, we constructed two prokaryotic expression vectors, pGEX-HBx-EGFP-TLM and pGEX-EGFP-TLM, which expressed HBx-EGFP-TLM and EGFP-TLM fusion proteins respectively. Both vectors contained a coding sequence of TLM transduction motif derived from the

Received: January 26, 2011; **Accepted:** March 23, 2011

Supported by: Major National Science and Technology Special Projects for Prevention and Treatment of Major Infection Diseases (No. 2008ZX10002-021).

Corresponding author: Peitang Huang. Tel: +86-10-66948832; Fax: +86-10-66948833; E-mail: amms832@126.com

*These authors contributed equally to this study.

重大传染病防治国家重大专项 (No. 2008ZX10002-021) 资助。

PreS2-domain of Hepatitis B Virus surface antigens. In addition, EGFP was expressed as a reporter reflecting the transduction efficiency of TLM. The fusion protein HBx-EGFP-TLM or EGFP-TLM purified from *Escherichia coli* BL21(DE3) by ÄKTA™ Purifier system was incubated with AML12 and SMMC-7721 cells. Both Western blotting and laser confocal results indicated that the translocation motif TLM could lead HBx-EGFP and EGFP into the cytoplasm. Dual-Luciferase Reporter Assay revealed that the activity of *mEZH2* promoter could be up-regulated by the recombinant HBx. In conclusion, we expressed a cell-permeable HBx, which could provide a new method to study the functions of HBx.

Keywords: Hepatitis B virus, Hepatitis B virus X protein, prokaryotic expression, TLM translocation motif

乙型肝炎病毒 X 蛋白 (Hepatitis B virus X protein, HBx) 是 HBV 感染细胞后编码的一个多功能蛋白, 在 HBV 相关性肝癌的发生发展过程中发挥重要作用^[1]。HBx 具有广泛的转录激活活性, 可通过激活胞浆信号转导途径和直接与转录因子相互作用两种方式调控宿主基因表达, 进而导致宿主细胞生长异常和肿瘤的发生^[2]。研究表明, HBx 的这种双重转录调节作用与其在细胞的表达水平和细胞定位密切相关^[3]。当较低水平表达时, HBx 主要富集于细胞核, 通过与转录因子相互作用直接调节基因的转录表达^[4-5], 而当高水平表达时, HBx 则主要聚集于胞浆, 通过影响线粒体功能参与信号传导途径的激活和细胞凋亡的调控^[6-7]。目前认为, 除了所采用实验条件和细胞类型不同外, 外源启动子介导的 HBx 瞬时表达水平不同, 也是导致 HBx 生物学功能研究一直存在争议的原因之一^[8-11]。近年来, 也有一些报道采用 Tet-on/off 系统筛选 HBx 稳定表达细胞株以精确调控其在细胞的表达水平^[12-13], 但是这种方法实验周期较长, 且存在由于表达载体在细胞基因组的随机插入导致细胞遗传信息改变的风险。因此, 在体外建立一个快速、低毒的蛋白导入方法对 HBx 功能的研究显得尤为重要。

蛋白转导结构域 (Protein transduction domain, PTD) 是一类由带正电的精氨酸和赖氨酸组成的一段伸展性短链多肽, 能够以非受体依赖的方式介导多种生物大分子进入细胞, 因此又称为细胞穿透肽 (Cell-penetrating peptides, CPP), 被广泛应用于蛋白、核酸甚至病毒颗粒的细胞导入^[14-15]。转导肽 TLM (Translocation motif) 是新近在 HBV 前 S 抗原

中发现的一段具有 α 螺旋结构的短肽, 能够有效介导蛋白穿透细胞质膜, 且在细胞内不具有明显的亚细胞定位趋势^[16]。本实验通过将 TLM 与 HBx 融合表达, 使 HBx 在其介导下转入细胞, 并具有转录激活活性, 为进一步定量研究 HBx 的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞系和质粒

大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自全式金生物技术公司; 大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞购自天根生物技术公司; 小鼠肝细胞系 AML12 细胞和肝癌细胞 SMMC-7721 购自 ATCC, 分别培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基 (同时添加了 0.005 g/L 胰岛素, 0.005 g/L 转铁蛋白, 5 μ g/L 硒和 40 μ g/L 地塞米松) 和含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中; 原核表达载体 pGEX-4T-1 购自 GE Healthcare 公司; 双荧光素酶载体 pGL3-Basic 和 pBind 购自 Promega 公司; *mEZH2* 启动子萤光素酶报告载体 pGL3-pmEZH2 (-2 406/+22) 和 HBx 真核表达载体 pcDNA4.0/TO/ myc-His/EGFP-HBx 为本实验室构建保存。

1.1.2 工具酶、试剂和抗体

Prime STAR™ HS DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶及限制性内切酶 (*Sal* I -HF, *Eco* R I -HF, *Not* I -HF) 购自 NEB 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 NucleoSpin® Extract II 购自 MN 公司; 质粒小型抽提试剂盒 Plasmid Mini Kit I 购自

OMEGA BIO-TEK 公司; 细胞转染试剂 FuGENE® HD Transfection Reagent 购自 Roche 公司; Dual-Luciferase® Reporter Assay System 购自 Promega 公司; PVDF 膜和 ECL 显色试剂盒购自 GE Healthcare 公司; 抗 EGFP 兔单克隆抗体购自 MBL 公司, HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自中山金桥公司。其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 融合蛋白 HBx-EGFP-TLM 和 EGFP-TLM 原核表达载体的构建

以 HBx 真核表达载体 pcDNA4.0/TO/myc-His/EGFP-HBx 为模板, 使用表 1 中所列引物, 分别扩增 HBx 和 EGFP 基因序列并引入合适的限制性酶切位点。同时设计 EGFP 下游引物序列, 在 EGFP 蛋白羧基端引入长 8 个氨基酸的柔性 linker (GlyGlyGlySerGlyGlyGlyGly), 用以连接 EGFP 和 TLM (ProIleSerSerIleSerSerArgIleGlyAspPro) 转导肽序列。HBx、EGFP-TLM 序列及原核表达载体 pGEX-4T-1 酶切后进行三片段连接, EGFP-TLM 序列和 pGEX-4T-1 载体酶切后进行两片段连接, 分别构建重组原核表达载体 pGEX-HBx-EGFP-TLM 和 pGEX-EGFP-TLM。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆并测序。

1.2.2 HBx-EGFP-TLM 和 EGFP-TLM 融合蛋白的诱导表达

测序正确的重组质粒 pGEX-HBx-EGFP-TLM 和 pGEX-EGFP-TLM 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 挑取阳性克隆, 于 30 °C 摇床振荡培养细菌

至 OD₆₀₀ 值为 0.8 左右, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 于 16 °C 诱导表达 15 h。4 °C 离心收集菌体, 超声破碎后分别收取全菌、上清和沉淀进行 8% SDS-PAGE 电泳, 同时添加转化了 pGEX-4T-1 空载体的 BL21(DE3) 全菌作为对照, 以确定融合蛋白的表达及其形式表达。

1.2.3 HBx-EGFP-TLM 和 EGFP-TLM 融合蛋白的纯化和鉴定

收集菌体并用 80 mL 上样缓冲液 (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, pH 8.0) 重悬, 置于冰上超声破碎, 12 000 r/min 离心 15 min 收集上清。在 ÄKTA™ Purifier 蛋白纯化系统上, 将上清以 0.8 mL/min 的速率通过 GST 亲和纯化柱 GSTrap™ FF, 用 GST 洗脱缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽, pH 8.0) 洗脱 GST 融合蛋白。依据系统中 UV280 检测蛋白洗脱曲线收集纯化蛋白, SDS-PAGE 和 Western blotting 进行检测。

1.2.4 蛋白免疫印迹检测 TLM 的转导活性

培养 AML12 细胞至 70% 左右汇合度, 分别加入等量的 HBx-EGFP-TLM 和 EGFP-TLM 融合蛋白继续培养 4 h, 1×SDS 上样缓冲液直接裂解细胞提取总蛋白。样品进行 8% SDS-PAGE 分离并转膜, 加入抗 EGFP 单克隆抗体 (1:500 比例稀释) 室温孵育 4 h, TBST 洗膜 3 次后, 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:5 000 比例稀释) 室温孵育 2 h。用 ECL 显色试剂进行显色, 压胶片显影。

表 1 融合蛋白 HBx-EGFP-TLM 和 EGFP-TLM 原核表达载体构建所用引物及其序列

Table 1 Primer sequences for the construction of HBx-EGFP-TLM and EGFP-TLM expression vectors

Primer name	Primer sequence (5'-3')
HBx-EcoR I F	<u>GGAATTC</u> GCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTG
HBx-Sal I R	ACGCGT <u>C</u> GACCGGCAGAGGTGAAAAAGTTG
EGFP-Sal I F	ACGCGT <u>C</u> GACTCGTGAGCAAGGGCGAGGAG
EGFP-linker-TLM-Not I R	TTCTTTTTT <u>GCGGCCG</u> CTTAAGGGTCCCCAATCCTCGAGGAGATTGACGATATGGGTCTCTCTCTCCACTCCTCTCCCTTGACAGCTCGTCCAT

Restriction sites were underlined, the bold fonts were inserted to make sure the correctness of open reading frame.

1.2.5 激光共聚焦显微镜观察融合蛋白的细胞定位

分别铺种 AML12 和 SMMC-7721 细胞至激光共聚焦专用细胞培养皿, 培养细胞至 50% 左右汇合度, 加入大致等量的 HBx-EGFP-TLM 和 EGFP-TLM 融合蛋白孵育 4~10 h。预冷的甲醇-丙酮固定液 (1:1 比例混合) 固定细胞 15 min 后, 加入终浓度为 10 mg/L 的 PI 室温避光染核 30 min。激光共聚焦显微镜下观察荧光蛋白在细胞中的分布。

1.2.6 双萤光素酶报告基因检测系统检测 *mEZH2* 启动子活性

共转染 0.8 μ g *mEZH2* 启动子萤光素酶报告载体 pGL3-p*mEZH2* (-2 406/+22) 与 0.025 μ g pBind 内参载体至 AML12 细胞, 同时转染 pGL3-Basic 载体作为阴性对照。24 h 后, 分别加入等量的 HBx-EGFP-TLM 和 EGFP-TLM 融合蛋白, 继续培养 4 h 并收获细胞, 双萤光素酶报告基因检测系统检测 *mEZH2* 启动子活性。操作参照产品说明, 每个实验组重复 3 孔。

2 结果

2.1 HBx-EGFP-TLM 和 EGFP-TLM 蛋白原核表达载体的构建

以质粒 pcDNA4.0/TO/myc-His/EGFP-HBx 为

模板, 经常规 PCR 扩增, 分别获得大小为 462 bp 的 HBx 片段和 798 bp 的 EGFP-TLM 片段 (图 1A), 将其插入 pGEX-4T-1 载体, 成功构建融合蛋白 HBx-EGFP-TLM 和 EGFP-TLM (图 1B) 的原核表达载体 pGEX-HBx-EGFP-TLM 和 pGEX-EGFP-TLM。

2.2 融合蛋白 HBx-EGFP-TLM 和 EGFP-TLM 的表达、纯化及鉴定

将构建成功的 pGEX-HBx-EGFP-TLM 和 pGEX-EGFP-TLM 载体分别转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, IPTG 诱导表达, 裂解菌体提取总蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示, 与 pGEX-4T-1 空载体相比, 转化了重组质粒 pGEX-HBx-EGFP-TLM 和 pGEX-EGFP-TLM 的菌体分别在相对分子量为 72 kDa 和 55 kDa 处获得明显的表达蛋白条带, 与预期大小相符 (图 2A, 第 1、2 和 5 泳道)。为进一步确定融合蛋白以何种形式表达, 将诱导表达后的菌体进行超声破碎, 高速离心获得可溶性上清和包涵体沉淀, 分别对上清和沉淀进行 8% SDS-PAGE 检测。结果表明, 融合蛋白在 BL21(DE3) 中同时以包涵体和可溶性蛋白两种形式表达 (图 2A, 第 3、4、6 和 7 泳道)。

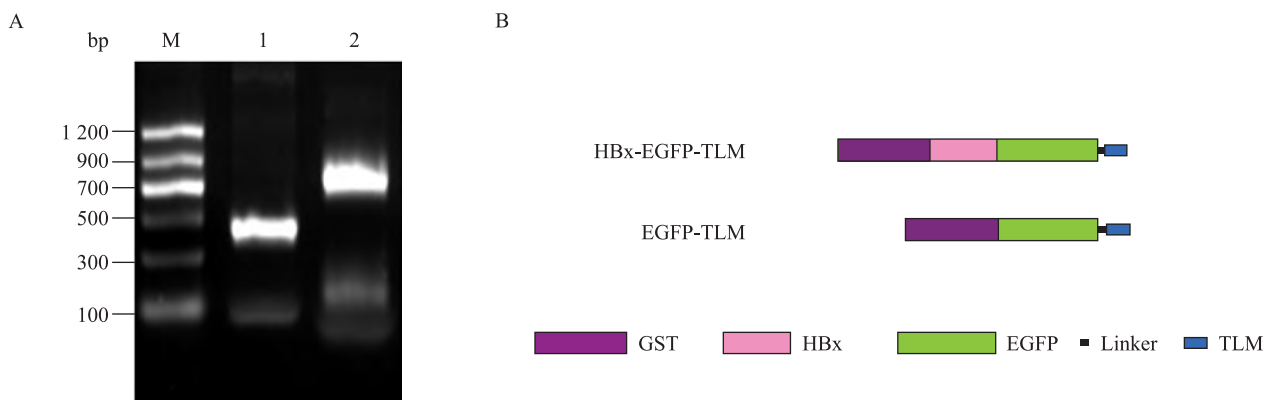


图 1 HBx-EGFP-TLM 和 EGFP-TLM 融合蛋白原核表达载体的构建

Fig. 1 Construction of vectors which express the recombinant protein HBx-EGFP-TLM and EGFP-TLM. (A) Amplification of HBx and EGFP-TLM fragments. M: DNA marker; 1: HBx, 462 bp; 2: EGFP-TLM, 798 bp. (B) Schematic representation of HBx-EGFP-TLM and EGFP-TLM recombinant proteins.

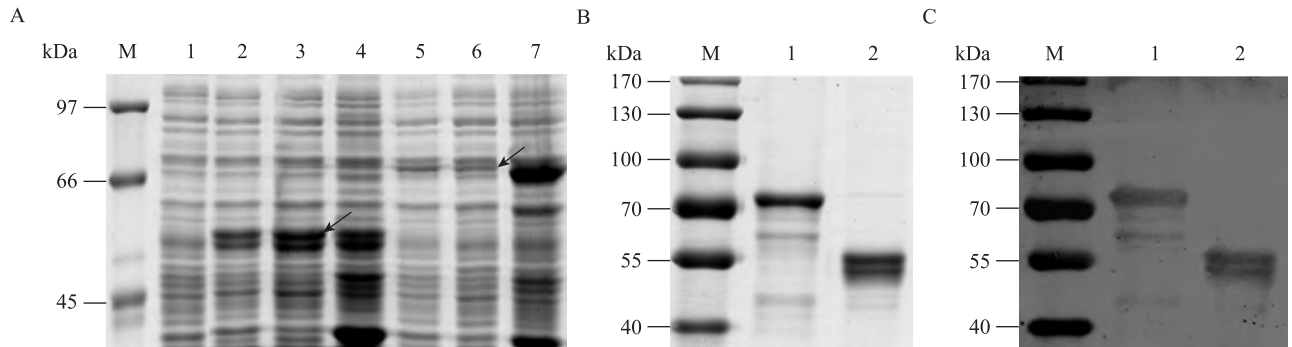


图2 融合蛋白 EGFP-TLM 和 HBx-EGFP-TLM 的表达纯化及鉴定

Fig. 2 Expression, purification and analysis of HBx-EGFP-TLM and EGFP-TLM fusion proteins. (A) Soluble expression of EGFP-TLM and HBx-EGFP-TLM proteins in *E. coli* BL21(DE3). M: protein marker; 1: lysate of *E. coli* BL21(DE3) transformed with pGEX-4T-1; 2, 3, 4: lysate, supernatant and precipitation of *E. coli* BL21(DE3) transformed with pGEX-EGFP-TLM respectively; 5, 6, 7: lysate, supernatant and precipitation of *E. coli* BL21(DE3) transformed with pGEX-HBx-EGFP-TLM respectively. (B, C) 8% SDS-PAGE (B) and Western blotting (C) analysis the HBx-EGFP-TLM and EGFP-TLM recombinant proteins which were purified by GST affinity chromatography GSTrapTM FF. M: protein marker; 1: purified HBx-EGFP-TLM; 2: purified EGFP-TLM.

按照优化后条件,将可溶性形式表达的融合蛋白利用 GST 亲和纯化柱 GSTrapTM FF 进行纯化,获得纯度较高的 GST 融合蛋白(图 2B)。在此基础上,利用 GFP 单克隆抗体 Western blotting 检测纯化蛋白,进一步确定所得产物为目的蛋白(图 2C)。

2.3 TLM 转导肽能够介导 HBx-EGFP 和 EGFP 进入细胞

为确定 TLM 转导肽能否介导融合蛋白进入细胞,将纯化的融合蛋白加入 AML12 细胞中孵育 4 h,利用抗 GFP 抗体 Western blotting 检测融合蛋白是否进入细胞。结果发现,与对照相比,在加入了 HBx-EGFP-TLM 和 EGFP-TLM 融合蛋白的 AML12 细胞中均检测到了相应的特异性条带(图 3A)。为进一步确定 TLM 转导肽融合蛋白的亚细胞定位及其转导功能,我们利用激光共聚焦显微镜分别检测了融合蛋白及 EGFP 蛋白在 AML12 和 SMMC-7721 细胞的分布。结果表明,与 AML12 细胞共孵育 4 h 后,两种融合蛋白在 TLM 转导肽的介导下均透过细胞膜逐渐进入胞浆,而作为对

照的 EGFP 蛋白则没有进入细胞(图 3B)。进一步在 SMMC-7721 细胞中将孵育时间延长至 10 h,结果显示更多量融合蛋白进入细胞,在胞浆中呈点片状分布(图 3C)。

2.4 转导肽 TLM 介导 HBx 进入细胞具有转录激活活性

已有报道显示 HBx 具有广泛的转录激活活性^[2],我们前期实验也证实 HBx 在 AML12 细胞中表达能够反式激活 *mEZH2* 启动子活性(待发表)。为进一步检测 TLM 转导肽介导 HBx 进入细胞是否具有正常的生物学活性,我们分别将融合蛋白 HBx-EGFP-TLM 和 EGFP-TLM 加入至转染了 *mEZH2* 启动子荧光素酶报告载体的 AML12 细胞中,孵育 4 h 后进行双荧光素酶活性检测。结果如图 4 所示,与对照相比,HBx-EGFP 进入细胞后可以明显上调 *mEZH2* 启动子活性,提示该融合蛋白在细胞内能够发挥其转录激活活性。该结果进一步说明,转导肽 TLM 融合的 HBx 蛋白不仅可以进入细胞,而且能够发挥其转录激活活性。

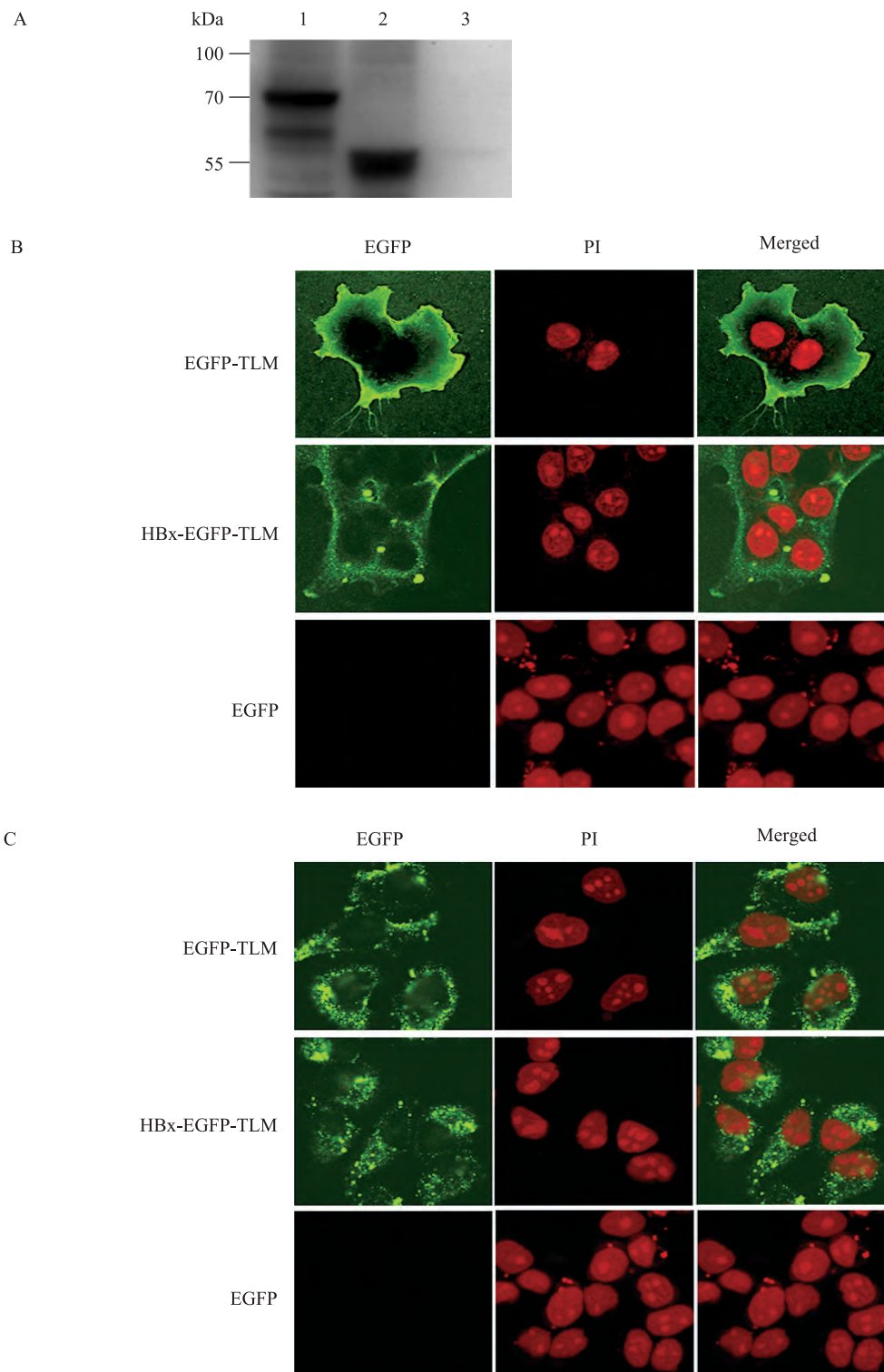


图 3 TLM 转导肽介导 HBx-EGFP 和 EGFP 融合蛋白进入细胞

Fig. 3 HBx-EGFP-TLM and EGFP-TLM proteins were translocated into AML12 and SMMC-7721 cells by TLM. (A) Western blotting analysis of fusion proteins transduced into AML12 cells. 1: HBx-EGFP-TLM; 2: EGFP-TLM; 3: negative control. (B, C) Determination of EGFP-TLM and HBx-EGFP-TLM fusion proteins which were translocated into the cytoplasm of AML12 (B) and SMMC-7721 (C) cells by the laser confocal fluorescence microscope.

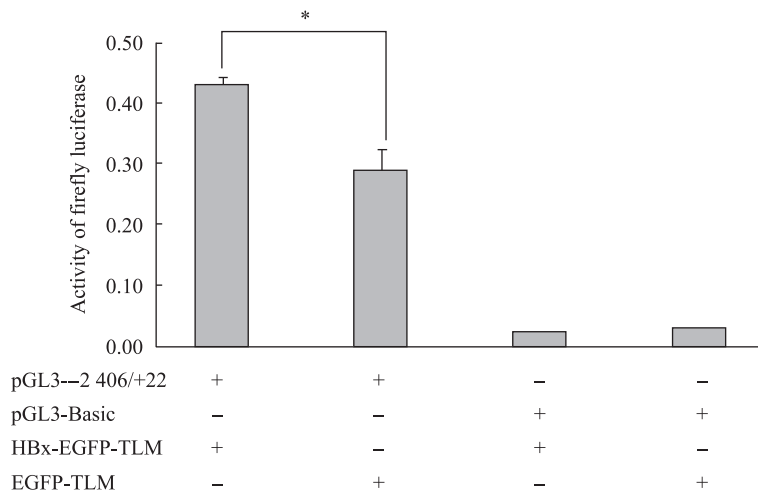


图4 HBx-EGFP-TLM 融合蛋白上调 *mEZH2* 启动子活性

Fig. 4 The activity of *mEZH2* promoter is up-regulated by HBx-EGFP-TLM in AML12 cells. pGL3-pmEZH2 (-2 406/+22) or pGL3-Basic was co-transfected with pBind. 24 hours after transfection, AML12 was incubated with the fusion protein HBx-EGFP-TLM or EGFP-TLM for four hours, and the luciferase activity was detected by Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System. The pGL3-Basic vector was used as a negative control. * $P < 0.05$, evaluated by Student's *t*-test.

3 讨论

在大多数的报道中,HBx 基因被认为是 HBV 导致肝癌发生发展的重要因素之一,目前已经成为研究 HBV 相关性肝癌发生机制的热点^[17]。通过构建 HBx 真核细胞表达载体,转染细胞瞬时或稳定表达 HBx 蛋白,是目前各实验室在 HBx 功能研究中普遍采用的实验方法。但是利用质粒介导 HBx 的瞬时表达,其表达水平常常不稳定,这可能是导致一些实验结果有差异的原因之一^[8-10]。有研究表明,不同表达水平的 HBx 细胞定位不同,进而对宿主细胞的影响不同^[3]。Tarn 等利用 Tet-off 系统构建不同 HBx 表达量的 3pX-1 和 4pX-1 细胞,发现 HBx 较低水平表达的 3pX-1 细胞和较高 HBx 表达水平的 4pX-1 细胞具有明显不同的生物学特性,且激活不同的信号转导途径^[18-19]。细胞穿透肽 (CPP) 可携带大分子蛋白穿过细胞膜进入细胞,其转导效率几乎能达到 100%,从而可有效避免因瞬时转染效率不同所导致的蛋白表达不稳定的问题^[20]。因此在本研究中,我们利用基因融合和原核表达技术,将 TLM 转导肽与 HBx 进行融合表达,以期在 TLM 的作用下实现 HBx

的细胞稳定导入。同时,我们在 HBx 蛋白的 N 末端融合了 GST 标签以便于融合蛋白的可溶性表达与纯化,在 HBx 蛋白的 C 末端融合了 EGFP 蛋白以便于观察融合蛋白的转导效率。结果表明,我们获得了可溶性的融合蛋白,并且在 TLM 转导肽的作用下,分子量约 72 kDa 的 HBx 融合蛋白可有效转入 AML12 和 SMMC-7721 细胞。

同时,我们还在实验中观察到,HBx 以及 EGFP 融合蛋白在 TLM 转导肽的作用下进入细胞均主要定位于胞浆 (图 3B),进一步延长孵育时间,更多融合蛋白进入细胞主要呈点片状分布 (图 3C)。这可能主要与 HBx 和 EGFP 蛋白融合了 GST 标签有关,由于 GST 蛋白为胞浆蛋白,从而导致融合蛋白在细胞中主要局限于胞浆^[21]。较长的孵育时间,将进一步导致胞浆中较多的融合蛋白发生变性聚集。这些结果提示我们,在后续的功能实验中需要切除 GST 标签和选择合适的孵育时间,以消除 GST 标签对融合蛋白功能的影响。为进一步确定 HBx 融合蛋白是否具有正常的生物学功能,我们利用荧光素酶报告系统检测了 HBx 融合蛋白对 *mEZH2* 启动子活性的影

响, 结果表明, 尽管有 GST 标签对蛋白定位的潜在干扰, 胞浆分布的 HBx 融合蛋白仍可激活 *mEZH2* 启动子活性, 发挥其正常的生物学功能。

总之, 本研究利用 TLM 转导肽与 HBx 蛋白融合, 可以显著介导 HBx 融合蛋白进入细胞, 并具有正常的生物学功能。这为保证快速实现 HBx 在细胞中均匀分布及其功能研究提供了新的工具。进一步可以通过改进设计, 去除多余融合蛋白的影响, 从而提高融合蛋白的生物学活性及稳定性。

REFERENCES

- [1] Koike K. Hepatitis B virus X gene is implicated in liver carcinogenesis. *Cancer Lett*, 2009, 286(1): 60–68.
- [2] Doria M, Klein N, Lucito R, et al. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors. *EMBO J*, 1995, 14(19): 4747–4757.
- [3] Henkler F, Hoare J, Waseem N, et al. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol*, 2001, 82(4): 871–882.
- [4] Kim H, Lee YH, Won J, et al. Through induction of juxtaposition and tyrosine kinase activity of Jak1, X-gene product of hepatitis B virus stimulates Ras and the transcriptional activation through AP-1, NF-kappaB, and SRE enhancers. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 286(5): 886–894.
- [5] Cougot D, Wu Y, Cairo S, et al. The hepatitis B virus X protein functionally interacts with CREB-binding protein/p300 in the regulation of CREB-mediated transcription. *J Biol Chem*, 2007, 282(7): 4277–4287.
- [6] Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(22): 10350–10354.
- [7] Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, et al. An internal segment (residues 58-119) of the hepatitis B virus X protein is sufficient to activate MAP kinase pathways in mouse liver. *FEBS Lett*, 2001, 504(1/2): 59–64.
- [8] Diao JY, Khine AA, Sarangi F, et al. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem*, 2001, 276(11): 8328–8340.
- [9] Lu YW, Chen WN. Human hepatitis B virus X protein induces apoptosis in HepG2 cells: role of BH3 domain. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(3): 1551–1556.
- [10] Gottlob K, Fulco M, Levrero M, et al. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem*, 1998, 273(50): 33347–33353.
- [11] Terradillos O, De La Coste A, Pollicino T, et al. The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas apoptosis in the liver. *Oncogene*, 2002, 21(3): 377–386.
- [12] Tang H, Liu L, Liu FJ, et al. Establishment of cell lines using a doxycycline-inducible gene expression system to regulate expression of hepatitis B virus X protein. *Arch Virol*, 2009, 154(7): 1021–1026.
- [13] Wang JC, Hsu SL, Hwang GY. Inhibition of tumorigenicity of the hepatitis B virus X gene in Chang liver cell line. *Virus Res*, 2004, 102(2): 133–139.
- [14] Zorko M, Langel Ü. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(4): 529–545.
- [15] Deshayes S, Morris MC, Divita G, et al. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(16): 1839–1849.
- [16] Oess S, Hildt E. Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene Ther*, 2000, 7(9): 750–758.
- [17] Kew MC. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(1): 144–152.
- [18] Tarn C, Bilodeau ML, Hullinger RL, et al. Differential immediate early gene expression in conditional hepatitis B virus pX-transforming versus nontransforming hepatocyte cell lines. *J Biol Chem*, 1999, 274(4): 2327–2336.
- [19] Tarn C, Lee S, Hu Y, et al. Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. *J Biol Chem*, 2001, 276(37): 34671–34680.
- [20] Chugh A, Eudes F, Shim YS. Cell-penetrating peptides: nanocarrier for macromolecule delivery in living cells. *IUBMB Life*, 2010, 62(3): 183–193.
- [21] Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1995, 30(6): 445–600.