论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201411228

细胞周期蛋白D2对HBV复制的影响

任吉华,冉龙宽,李宛蔚,陶娜娜,陈 祥,周洪钟,刘 波,陈 娟 (400016 重庆,重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室)

[摘要] **目的** 研究细胞周期蛋白D2(cyclin D2)对HBV复制的影响并探讨其作用的分子机制。**方法** 运用qRT-PCR分析细胞周期蛋白家族成员在HBV复制细胞系中的表达水平;qRT-PCR、Western blot检测HBV复制对cyclin D2表达的影响;Western blot验证cyclin D2沉默效果,Real-time PCR,Southern blot验证沉默cyclin D2对HBV复制中间体表达的影响及ELISA验证cyclin D2对HBsAg、HBeAg分泌的影响;并检测cyclin D2过表达对HBV复制的影响。**结果** 在细胞周期蛋白中,HBV复制对cyclin D2表达的影响最为显著,HBV感染明显促进cyclin D2 mRNA和蛋白水平的升高,下调cyclin D2显著抑制HBV的复制中间体的表达,HBsAg和HBeAg的分泌,过表达cyclin D2明显促进HBV的复制。**结论** HBV复制可以促进细胞内cyclin D2的表达,cyclin D2有利于HBV的复制。这一发现为降低HBV的感染率,探索治疗乙型肝炎新的靶点提供了新的策略。

[关键词] HBV;cyclin D2;细胞周期蛋白

[中图法分类号] R341; R373.21; R394.2 [文献标志码] A

Effect of cyclin D2 on HBV replication *in vitro*

Ren Jihua, Ran Longkuan, Li Wanyu, Tao Nana, Chen Xiang, Zhou Hongzhong, Liu Bo, Chen Juan (Key Laboratory of Molecular Biology on Infection Diseases of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the role of cyclin D2 in hepatitis B virus (HBV) replication and explore the cyclin D2 regulation mechanism in HBV replication. Methods The mRNA levels of cyclin family members were analyzed by RT-PCR. The effect of cyclin D2 on the expression of HBV replicative intermediates was measured by real-time PCR and Southern blotting, and the effect of cyclin D2 on the secretion of HBsAg and HBeAg was analyzed by ELISA. The effect of cyclin D2 over-expression on HBV replication was analyzed. Results Among the cyclin family members, HBV replication had the most significantly impact on cyclin D2 expression, and HBV replication induced cyclin D2 replication. Cyclin D2 knockdown inhibited the expression of HBV replicative intermediates and the secretion of HBsAg and HBeAg, and cyclin D2 over-expression promoted HBV replication. Conclusion HBV replication promotes cyclin D2 expression, and cyclin D2 is conducive to HBV replication. This discovery can provide a novel strategy for reducing HBV infection and exploring new hepatitis B therapeutic target.

[**Key words**] HBV; cyclin D2; cyclin

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81472271, 81201282). Corresponding author: Chen Juan, E-mail:yixin_xinyuan@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81472271,81201282)

[通信作者] 陈 娟,E-mail:yixin_xinyuan@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150617.0848.001.html(2015-06-17)

乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus,HBV)感染呈世界范围广泛流行,全球有超过3亿慢性感染者;并逐步发展为慢性乙型肝炎、肝硬化和肝癌,每年约有100万人死于乙肝相关的各种终末期疾病。尽管对HBV感染的控制已越来越引起了人们的重视,不同的方法已运用于控制HBV感染和治疗HBV患者,但治疗HBV患者的两大类药物(核苷酸类似物和干扰素)均不能完全清除人体内的HBV,并且可导致药物抵抗或产生严重的副作用。因此,寻找新的分子生物学治疗靶点,发展新的治疗策略显得尤为重要。

Cyclin D2是细胞周期蛋白家族D的成员之一。在细胞周期进程中,cyclin D2与细胞周期蛋白依赖性激酶4(Cyclin-dependent kinase4,CDK4)和CDK6形成复合物并作为其调节亚基在G1/S转换中发挥了重要作用[1]。有文献报道cyclin D2参与了肿瘤的进展[2],并且在HBV相关的HCC中,cyclin D2的启动子是高度甲基化的[3]。另外,一些细胞周期调节因子如p53、p21也是与HBV相关的HCC的发生发展有关的[4]。这些发现揭示着细胞周期的调节因子与HBV相关的HCC存在某种关联,但目前很少有研究关注于cyclin D2与HBV感染之间的关系。本课题将通过沉默cyclin D2表达和过表达cyclin D2两方面研究cyclin D2是否调控了HBV的复制。

1 材料与方法

1.1 材料

HepG2.2.15、HepG2细胞购于ATCC(American Type Culture Collection)公司。包装cyclin D2的shRNA的pLKO.1-puro质粒(产品目录编号SH2421),包装scramble shRNA的pLKO.1-puro质粒(产品目录编号SH2421)均购于Sigma-Aldrich。pcDNA3.1-cyclin D2购于addgene,人乙型肝炎病毒(HBV)复制质粒pGEM-HBV1.3由德国海德堡大学Protzer博士赠送。Cyclin D2抗体(3741)购于Cell Signaling Technology,β-actin抗体(sc-1616-R)购于Santa Cruz Biotechnology。ELISA试剂盒购于KHB。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染方法 HepG2细胞培养于含有10%胎牛血清的MEM培养基中,HepG2.2.15培养于含有10%胎牛血清,400 μg/mL G418的MEM培养基中,在含5% CO_2,37 ℃孵箱中常规培养。质粒按照Lipofectamin 2 000™(Invitrogen)的说明书进行转染。

1.2.2 细胞内HBV复制中间体提取和southern blot分析 细胞于六孔板中转染5 d后,去除培养基,PBS清洗,胰酶消化,加入0.5 mL细胞裂解液(10 mmol/L Tris-HCl pH=8.0、1 mmol/L EDTA、1% NP-40和2% sucrose),混匀后,37 ℃孵育15 min,转移裂解液到EP管中,15 000×g离心5 min。在上清中加入DNase Ⅰ(40 U/mL)和$MgCl_2$(10 mmol/L),37 ℃孵育≥4 h后加入200 μL 35% PEG 8 000(含1.5 mol/L NaCl),冰浴1 h后11 000×g、4 ℃离心5 min,留沉淀,加入0.5 mL蛋白酶K消化液(0.5% SDS, 150 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris-HCl pH=8.0和10 mmol/L EDTA)和0.5 mg/mL蛋白酶K(Takara),45 ℃过夜。酚氯仿抽提,异丙醇沉淀,70%乙醇洗涤,TE缓冲液或ddH_2O溶解HBV复制中间体。提取的HBV复制中间体经0.9%琼脂糖凝胶电泳,毛细管虹吸法转膜,120 ℃固定。预杂交后加人地高辛标记DNA探针杂交过夜。再化学发光、采集信号。

1.2.3 实时荧光定量PCR(qPCR) 提取HBV复制中间体,按照SYBR Green (Roche, Germany)说明书配制反应体系和设置反应条件,HBV DNA引物,上游:CCTAGTAGTCAGTTATGTCAAC,下游:TCTATAAGCTGGAGGAGTGCGA。每孔均设3个复孔,每组实验重复3次。

1.2.4 Western blot检测 转染3 d后,去除培养基,PBS清洗,RIPA裂解缓冲液裂解细胞,15 min后收集裂解液离心,去除细胞碎片,用BCA法测定蛋白浓度。取等量(30 μg)细胞总蛋白上样,于10%的SDS-PAGE中分离蛋白后,在Bio Rad湿式转移电泳槽转膜。5%脱脂牛奶封闭NC膜1 h,加一抗(1∶2 000稀释一抗),4 ℃摇床孵育过夜。然后以TBS-T洗涤3次,每次5 min。二抗(即HRP标记的兔抗人IgG抗体,以封闭液按1∶3 000稀释),室温下摇床孵育2 h,洗涤3次后,ECL显影。以β-actin为内参。

1.2.5 HBsAg和HBeAg的检测 按照酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒操作说明检测细胞培养上清中的HBsAg和HBeAg的分泌水平。

1.3 统计学处理

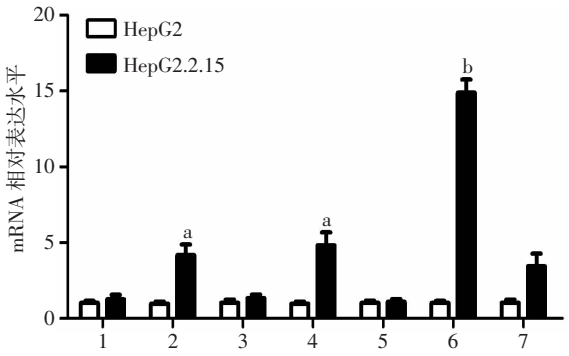
采用SPSS 17.0软件进行统计,多样本均数间的显著性检验用方差分析,两样本间均数比较采用配对t检验。

2 结果

2.1 细胞周期蛋白家族在HBV复制细胞中的表达水平

我们首先验证了细胞周期蛋白家族各成员在

HBV 复制细胞 HepG2.2.15 与对照细胞 HepG2 中的表达差异，qRT-PCR 分析发现 cyclin D2 的 mRNA 水平在 HepG2.2.15 细胞中显著高于 HepG2 细胞（$P<0.01$，图 1）。



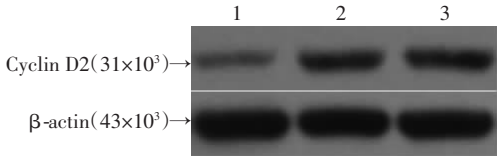
1：cyclin A2；2：cyclin B1；3：cyclin B2；4：cyclin C；5：cyclin D1；6：cyclin D2；7：cyclin E1

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 HepG2 细胞比较

图 1　qRT-PCR 分析在 HepG2.2.15 与 HepG2 细胞中细胞周期家族成员 mRNA 的表达差异　（$n=3, \bar{x}\pm s$）

2.2　HBV 复制对 cyclin D2 表达的影响

在 HepG2 细胞中瞬时转染对照质粒 pcDNA3.1、HBV 表达质粒 pCH9/3091 和 pGEM-HBV1.3 后，qRT-PCR 检测发现 pCH9/3091 和 pGEM-HBV1.3 组中 cyclin D2 的 mRNA 水平表达相对值[分别为（2.52±0.35）、（2.3±0.3）]显著高于 pcDNA3.1 组（1.01±1.01），差异具有统计学意义（$P<0.01$）。Western blot 检测也发现 pCH9/3091 和 pGEM-HBV1.3 能明显增加 cyclin D2 的蛋白表达水平（图 2）。

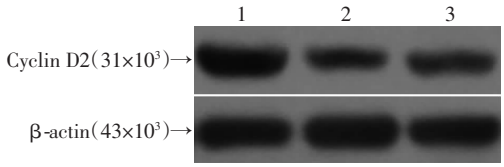


1：pcDNA3.1；2：pCH9/3091；3：pGEM/HBV1.3

图 2　Western blot 分析 pCH9/3091 和 pGEM-HBV1.3 对 cyclin D2 表达的影响

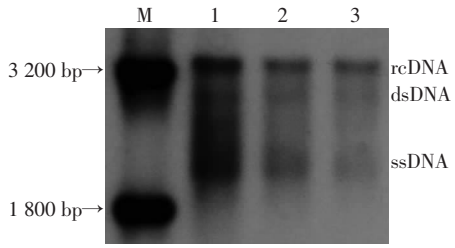
2.3　cyclin D2 沉默对 HBV 复制的影响

为了验证 cyclin D2 沉默对 HBV 复制的影响，我们用 shRNA 成功沉默了 HepG2.2.15 细胞中 cyclin D2 的表达（图 3）。Real-time PCR 检测证实 shcyclin D2-1 和 shcyclin D2-2 沉默 cyclin D2 的表达后，单个细胞 HBV 复制中间体的拷贝数[分别为（60.67±7.09）、（40.67±10.21）]显著低于对照 shCont 组（95.33±13.5），差异具有统计学意义（$P<0.05$）。southern blot 检测证实 cyclin D2 沉默后，HBV 复制中间体的表达水平显著降低（图 4）。ELISA 测定细胞培养上清也发现 cyclin D2 沉默后，HBsAg 和 HBeAg 分泌明显减少（$P<0.05$，图 5）。表明 cyclin D2 沉默显著抑制了 HBV 的复制和 HBV 抗原的分泌。



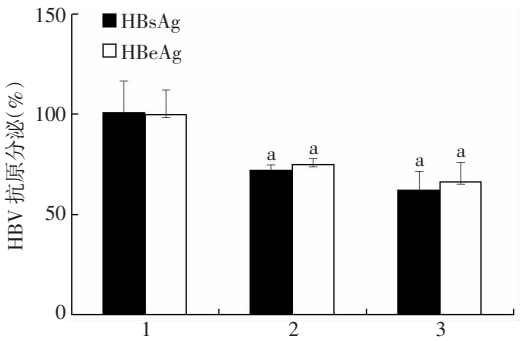
1：shCont；2：shcyclin D2-1；3：shcyclin D2-2

图 3　Western blot 验证 cyclin D2 沉默效果



M：标准；1：shCont；2：shcyclin D2-1；3：shcyclin D2-2

图 4　cyclin D2 沉默对 HBV 复制中间体表达的影响



1：shCont；2：shcyclin D2-1；3：shcyclin D2-2

HBsAg：HBV 表面抗原；HBeAg：HBV e 抗原

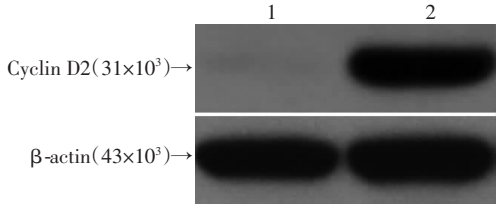
a：$P<0.05$ 与 shCont 比较

图 5　ELISA 检测 cyclin D2 沉默对 HBsAg 和 HBeAg 分泌的影响　（$n=3, \bar{x}\pm s$）

2.4　过表达 cyclin D2 对 HBV 复制的影响

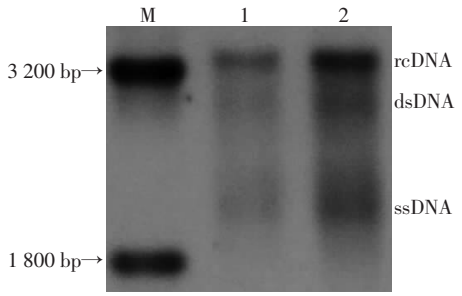
另一方面，为了确认 cyclin D2 对 HBV 复制的影响，我们在 HepG2.2.15 细胞中瞬时转染了 cyclin D2，Western bot 验证 cyclin D2 过表达是成功的（图 6）。Real-time PCR 检测分析发现过表达 cyclin D2 后，单个细胞 HBV 复制中间体的拷贝数（196.00±19.08）明

显高于对照 pcDNA3.1 组(93.33 ± 5.86)。southern blot 分析发现过表达 cyclin D2 后,HBV 复制中间体的表达水平也明显升高(图7)。ELISA 测定细胞培养上清也发现过表达 cyclin D2 组 HBsAg 表达相对值为(133.33 ± 6.66)明显高于 pcDNA3.1 组(101.33 ± 11.06),$P<0.05$;过表达 cyclin D2 组 HBeAg 表达相对值为(126.00 ± 6.56)明显高于 pcDNA3.1 组(98.33 ± 10.60),$P<0.05$。表明过表达 cyclin D2 能明显促进 HBV 的复制和 HBV 抗原的分泌。



1:pcDNA3.1;2: cyclin D2

图6 Western blot 验证 cyclin D2 过表达效果



M:标准;1:pcDNA3.1;2: cyclin D2

图7 cyclin D2 过表达对 HBV 复制中间体表达的影响

3 讨论

病毒对宿主的感染能力,宿主对病毒的抵抗能力和病毒导致疾病的预后取决于病毒与宿主的相互作用。病毒可通过上调或下调某些宿主因素,从而影响自身的复制。已有研究发现 HBV 感染可以促进 miR146a 的转录并下调了 STAT1 的表达,导致了 HBV 对干扰素的抵抗[5]。Cyclin D2 作为细胞周期蛋白,在调节一些与病毒感染有关的细胞增殖中发挥了关键性的作用。在多种刺激因子作用下,T 细胞和 B 细胞活化时,cyclin D2 是第一个被诱导表达的细胞周期蛋白[6-8],磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)和环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)能促进 cyclin D2 的启动子活性,从而调节了淋巴细胞增殖[9],并且 cyclin D2 也介导了肿瘤坏死因子家族的 B 细胞活化因子(B cell-activating factor belonging to the TNF family, BAFF)诱导的 $CD4^+$ T 淋巴细胞的增殖[10]。近年,有研究报道 cyclin D2 在 HIV 病人中的 $CD4^+$ T 细胞中表达减少[11],cyclin D2 mRNA 水平在人呼吸道合胞病毒感染的气道上皮细胞中的表达水平也降低[12]。这些发现说明 cyclin D2 是病毒感染重要的宿主因素之一。

Park 等[13]发现 cyclin D2 的多态性与 HBV 感染的清除有关,揭示着 cyclin D2 可能参与了 HBV 的生活周期。本课题组也研究发现 cyclin D2 与 HBV 复制密切相关,在细胞周期蛋白家族中,cyclin D2 在 HBV 复制细胞与对照细胞中的表达差异最为显著,瞬时感染 HBV 后,cyclin D2 的 mRNA 和蛋白水平都显著上升。进一步研究发现 cyclin D2 能明显促进 HBV 复制中间体的表达和病毒抗原的分泌。

Cyclin D2 除了具有调节细胞周期的作用外,还是多条信号通路中重要的信号分子。人类 T 细胞白血病病毒Ⅰ型(human T-lymphotropic virus 1, HTLV-1)的转录活化蛋白(Tax)可通过 NFκB 诱导 cyclin D2 活化[14],Cyclin D2 也是 BCR-ABL/FoxO3a 信号通路重要的下游靶点[15],Myc-cyclin D2-p27 信号通路也在休眠细胞的周期进展中发挥了重要作用[16]。HBV 的转录需要多种信号分子的参与,研究报道某些转录因子可结合于 HBV 核心启动子上参与了 HBV 复制的调控,如:Sp1[17]、PPAR-alpha[18]、AP1[19]、HNF4[20]、NFκB[21]等。本课题组下一步将通过研究 cyclin D2 对信号通路的影响,进一步阐明 cyclin D2 上调 HBV 复制的分子机制,从而为发展控制 HBV 感染的治疗策略提供新的靶点。

参考文献:

[1] Kato J Y, Sherr C J. Inhibition of granulocyte differentiation by G1 cyclins D2 and D3 but not D1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(24): 11513-11517.

[2] Song H, Hogdall E, Ramus S J, *et al*. Effects of common germ-line genetic variation in cell cycle genes on ovarian cancer survival[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(4): 1090-1095.

[3] Wang Y, Cheng J, Xu C, *et al*. Quantitative methylation analysis reveals gender and age differences in p16INK4a hypermethylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2012, 32(3): 420-428.

[4] Choi Y L, Park S H, Jang J J, *et al*. Expression of the G1-S modulators in hepatitis B virus-related hepatocellular carcino-

ma and dysplastic nodule: association of cyclin D1 and p53 proteins with the progression of hepatocellular carcinoma[J]. J Korean Med Sci, 2001, 16(4): 424 - 432.

[5] Hou Z H, Han Q J, Zhang C, *et al*. miR146a impairs the IFN-induced anti-HBV immune response by downregulating STAT1 in hepatocytes[J]. Liver Int, 2014, 34(1): 58 - 68.

[6] Appleman L J, Berezovskaya A, Grass I, *et al*. CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression[J]. J Immunol, 2000, 164(1): 144 - 151.

[7] Lam E W, Glassford J, Banerji L, *et al*. Cyclin D3 compensates for loss of cyclin D2 in mouse B-lymphocytes activated via the antigen receptor and CD40[J]. J Biol Chem, 2000, 275(5): 3479 - 3484.

[8] Martino A, Holmes J H 4th, Lord J D, *et al*. Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2 [J]. J Immunol, 2001, 166(3): 1723 - 1729.

[9] White P C, Shore A M, Clement M, *et al*. Regulation of cyclin D2 and the cyclin D2 promoter by protein kinase A and CREB in lymphocytes[J]. Oncogene, 2006, 25(15): 2170 - 2180.

[10] Ji F, Chen R, Liu B, *et al*. BAFF induces spleen CD4 + T cell proliferation by down-regulating phosphorylation of FOXO3A and activates cyclin D2 and D3 expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 425(4): 854 - 858.

[11] Sieg S F, Harding C V, Lederman M M. HIV-1 infection impairs cell cycle progression of CD4(+) T cells without affecting early activation responses[J]. J Clin Invest, 2001, 108(5): 757 - 764.

[12] Wu W, Munday D C, Howell G, *et al*. Characterization of the interaction between human respiratory syncytial virus and the cell cycle in continuous cell culture and primary human airway epithelial cells[J]. J Virol, 2011, 85(19): 10300 - 10309.

[13] Park T J, Chun J Y, Bae J S, *et al*. CCND2 polymorphisms associated with clearance of HBV Infection[J]. J Hum Genet, 2010, 55(7): 416 - 420.

[14] Iwanaga R, Ozono E, Fujisawa J, *et al*. Activation of the cyclin D2 and cdk6 genes through NF-kappaB is critical for cell-cycle progression induced by HTLV-I Tax[J]. Oncogene, 2008, 27(42): 5635 5642.

[15] Fernandez-de-Mattos S, Essafi A, Soeiro I, *et al*. Soeiro I, FoxO3a and BCR-ABL regulate cyclin D2 transcription through a STAT5/BCL6-dependent mechanism[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(22): 10058 10071.

[16] Bouchard C, Thieke K, Maier A, *et al*. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27[J]. EMBO J, 1999, 18(19): 5321 - 5333.

[17] Li J, Ou J H. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor[J]. J Virol, 2001, 75(18): 8400 - 8406.

[18] Tseng Y P, Kuo Y H, Hu C P, *et al*. The role of helioxanthin in inhibiting human hepatitis B viral replication and gene expression by interfering with the host transcriptional machinery of viral promoters[J]. Antiviral Res, 2008, 77 (3): 206 - 214.

[19] Ren J H, Tao Y, Zhang Z Z, *et al*. Sirtuin 1 regulates hepatitis B virus transcription and replication by targeting transcription factor AP-1[J]. J Virol, 2014, 88(5): 2442 - 2451.

[20] Zheng Y, Li J, Ou J H. Regulation of hepatitis B virus core promoter by transcription factors HNF1 and HNF4 and the viral X protein[J]. J Virol, 2004, 78(13): 6908 - 6914.

[21] Kwon J A, Rho H M. Hepatitis B viral core protein activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter through the nuclear factor kappaB binding site[J]. Biochem Cell Biol, 2002, 80(4): 445 - 455.

(收稿:2014-11-24;修回:2015-02-09)

(编辑 邓强庭)