

分子伴侣BiP结构域分析及对肝癌细胞增殖和凋亡的影响

李祥柱 刘艳娜 赵文君 周菁华 郭风劲*

(重庆医科大学细胞生物学及遗传学教研室, 重庆医科大学分子医学及肿瘤研究中心, 重庆 400016)

摘要 结合免疫球蛋白(binding immunoglobulin protein, BiP), 是Hsp70 (70 kilodalton heat shock proteins)蛋白家族的成员之一, 是内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)主要的调节器。为了研究BiP的分子结构与生物学功能的关系, 首先, 分析BiP的DNA序列和蛋白质空间构象, 接着利用重叠PCR方法分别克隆ATPase结构域缺失体和peptide-binding结构域缺失体(BiPa和BiPp), 成功构建带myc标签的真核表达载体, 转染LO2细胞和SMMC-7721细胞, 应用免疫印迹方法检测其在细胞内的表达; 运用MTT法、BrdU免疫组化法及流式细胞仪分别检测细胞的增殖和凋亡; 检测BiP及两个组成结构域对SMMC-7721细胞增殖和凋亡的影响。酶切、电泳和DNA测序结果显示, BiP全长和两个缺失体的真核表达载体构建成功; 免疫印迹检测到BiP三种真核载体在LO2细胞和SMMC-7721细胞中均能正确表达; MTT和BrdU免疫组化结果表明, BiP全长和缺失体BiPa、BiPp三种真核载体均能有效促进SMMC-7721的增殖, 各组间细胞增殖率结果分析提示ATPase功能域可能抑制细胞增殖, 而peptide-binding结构域可能促进细胞的增殖; 流式细胞仪结果显示, 转染BiP、BiPa、BiPp三种真核载体均可以促进SMMC-7721的凋亡, 缺失体BiPa与全长BiP组间凋亡率差异不显著; 而缺失体BiPp组细胞凋亡率明显低于全长BiP组, 两组差异具有显著性($P<0.05$); 提示ATPase功能域与细胞凋亡可能不相关, 而peptide-binding结构域可能促进细胞的凋亡。上述结果表明, BiP的两个组成结构域: ATPase功能域与peptide-binding结构域, 独立存在或者共同存在时, 调控细胞增殖与凋亡具有差异性; 当两个结构域共同存在时, 它们会协同调控细胞的增殖与凋亡, 具体的分子机制还需要进一步的实验研究和探讨。

关键词 BiP; 缺失体; 生物信息学; 细胞增殖

结合免疫球蛋白(binding immunoglobulin protein, BiP), 又称GRP78或HspA5, 是位于内质网(endoplasmic reticulum, ER)的重要分子伴侣, 属于热休克蛋白(Hsp70)家族成员之一。人类BiP基因定位于9q33.3, 具有高度保守的结构域, BiP由654个氨基酸组成: 包括N端ATPase功能域, C端peptide-binding功能域, C末端可变区。BiP与许多内质网蛋白都有短暂的相互作用, 因此是内质网维持内环境稳态的一个感应器。它参与前体蛋白质转运到内质网及随后的折叠、组装和运输, 包括错误折叠和错误组装蛋白质的输出及相关降解(ERAD), 调节相关内质网应激(ER stress, ERS)的三条主要信号通路: IRE1/XBP1S、PERK、ATF6, 调节内质网钙离子内稳态等诸多生物学过程^[1-2]。多年来的研究表明, BiP及其相互作用的蛋白质与多种疾病相关, 如传染性疾病、

遗传性疾病及多种癌症。关于分子伴侣BiP及各组成结构域与肿瘤细胞增殖与凋亡的关系, 目前报道甚少。本实验针对BiP各组成结构域, 成功构建相应结构域缺失体的真核表达载体, 初步研究BiP各组成结构域与肝癌细胞增殖与凋亡的关系, 为进一步深入揭示BiP各组成结构域的生物学功能奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Taq DNA高保真聚合酶为日本东洋纺(TOYO-

收稿日期: 2011-05-29 接受日期: 2011-08-22

国家自然科学基金(No.31040019)和教育部留学人员基金(No.2009-1590)

资助项目

*通讯作者。Tel: 023-68485898, E-mail: guo.fengjin@gmail.com

BO)公司的高保真聚合酶, 内切酶、胶纯化及DNA回收试剂盒为大连宝生物(TaKaRa)公司产品, 质粒小量提取试剂盒为Omega公司产品, 抗体均为Santa Cruz公司产品, 脂质体为Invitrogen公司产品。测序由华大基因提供, 含BiP全长基因质粒由日本熊本大学Takashi Sato博士后^[3]和美国佛罗里达大学Marina教授^[4]惠赠, pcDNA3.1(-)真核载体、LO2、SMMC-7721细胞由本实验中心保存。

1.2 人类BiP全长及缺失体真核表达载体的构建与测序

1.2.1 人类BiP全长基因的克隆与测序 根据人类BiP全长核苷酸序列(NM_005347), 用NTI软件设计一对PCR引物。上游引物BiP Sense: 5'-CGG GAT CCA TGA AGC TCT CCC TGG TG-3' (含BamH I酶切位点及其相应的保护碱基); 下游引物BiP Anti-sense: 5'-CCC AAG CTT GGG CAA CTC ATC TTT TTC TG -3' (含Hind III酶切位点及其相应的保护碱基)。用含BiP全长基因重组质粒作为模板进行PCR扩增, 扩增条件: 94 °C变性5 min, 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30个循环, 72 °C延伸10 min。将PCR产物回收纯化后用限制性内切酶BamH I和Hind III双酶切, 同时对pcDNA3.1(-)载体双酶切, 连接转化后, 挑取菌落提取质粒酶切鉴定并送测序, 得到BiP全长基因重组质粒pcDNA3.1(-)-BiP。

1.2.2 BiP缺失体真核表达载体的构建与测序

在获得BiP基因全长重组质粒和生物信息学分析的基础上, 进行BiP ATPase区和peptide-binding区核苷酸序列缺失的序列拼接, 并参照Karin等^[5]的重叠PCR技术的相关报道, 用NTI软件设计相应的PCR引物分别引入BamH I和Hind III 酶切位点及其相应的保护碱基(表1, 酶切位点用下划线表示)。

以全长BiP重组质粒pcDNA3.1(-)-BiP为模板, 分别以P1+P2、P3+P4、P1+P5、P6+P4, 进行第一次PCR (PCR1#), 反应条件参见表2, 得到的片段分别命名为AB1、CD1、AB2、CD2。

再分别以AB1和CD1、AB2和CD2为模板, 用构建全长BiP的引物(BiPS、BiPA)进行第二次PCR (PCR2#), 获得的片段分别命名为AD1、AD2。将第二次PCR产物AD1、AD2分别克隆入pcDNA3.1(-)载体, 得到缺失ATPase的真核表达载体pcDNA3.1(-)-BiPa (缺失第125~280 aa)和缺失peptide-binding区的真核表达载体pcDNA3.1(-)-BiPp (缺失第400~500 aa), 将构建好的两个缺失突变重组质粒进行双酶切鉴定并测序, 图1是构建BiP两个缺失突变体的结构示意图。

1.3 BiP各组成功能域生物信息学分析

结合已发表的研究报道, 登陆NCBI获得BiP核酸及蛋白序列, 提交BiP蛋白序列到PDB (Protein Date Bank)数据库查询其主要通过X-射线衍射和核

表1 克隆Bip缺失体引物序列
Table 1 Primers of cloning Bip deletions coden sequence

质粒 Plasmid	PCR1#引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	长度(bp) Length (bp)	PCR2#引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	长度(bp) Length (bp)
BiPa	P1	CGG GAT CCA TGA AGC TCT CCC	386	BiPS	CGG GAT CCA TGA AGC TCT CCC TGG TG	1 496
	P2	ATT GTC AGT TTT CTT TTC AAC CAC C				
	P3	TGA AAA GAA AAC TGA CAA TAG	1 147	BiPA	CCC AAG CTT GGG CAA CTC ATC TTT TTC TG	
	P4	AGC TGT GCA GCC CAA GCT TGG GCA ACT CAT CTT TTT C				
BiPp	P1	CGG GAT CCA TGA AGC TCT CCC	1 214	BiPS	CGG GAT CCA TGA AGC TCT CCC TGG TG	1 679
	P5	TAT CTC AAA AGC AGC ACC ATA CGC				
	P6	GGT GCT GCT TTT GAG ATA GAT GTG AAT GG	483	BiPA	CCC AAG CTT GGG CAA CTC ATC TTT TTC TG	
	P4	CCC AAG CTT GGG CAA CTC ATC TTT TTC				

表2 重叠PCR法克隆Bip缺失突变体第一次PCR条件

Table 2 Program of cloning Bip deletion mutants gene

质粒	PCR1#引物	变性	变性	退火	延伸	循环	延伸	保存
Plasmid	Primer	Denaturation	Denaturation	Anneal	Extend	Cycle	Extend	Hold
pcDNA3.1(-)-Bipa	P1/P2			52 °C, 30 s	72 °C, 35 s			
	P3/P4	94 °C	94 °C	58 °C, 30 s	72 °C, 95 s			
pcDNA3.1(-)-Bipp	P1/P5	5 min	2 min	52 °C, 30 s	72 °C, 35 s	30	72 °C 10 min	4 °C
	P6/P4			56 °C, 30 s	72 °C, 95 s			

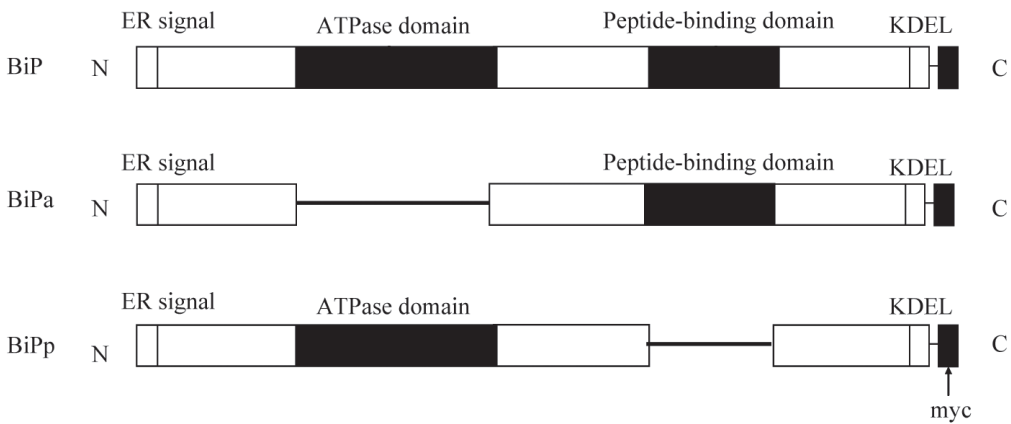


图1 Bip全长及其两个缺失体结构域图解

Fig.1 Schema of the Bip full-length and two mutant domains

磁共振(NMRI)试验测定的结构域;提交BiP蛋白序列到SWISS-MODEL服务器进行同源建模预测目前还没有经试验测定的结构域;并结合NTI软件对BiP蛋白结构进行综合分析。

1.4 BiP全长及缺失体的表达检测

将构建好的BiP基因全长重组质粒pcDNA3.1(-)-BiP和两个BiP基因缺失体的重组质粒pcDNA3.1(-)-BiPa、pcDNA3.1(-)-BiPp用脂质体转染入LO2细胞,提取蛋白,利用Western blot检测BiP全长及缺失体BiPa、BiPp在真核细胞中的表达。

1.5 MTT法检测BiP及缺失体对SMMC-7721细胞生长的影响

取对数生长期SMMC-7721细胞接种于96孔板;转染BiP全长及缺失体BiPa、BiPp真核表达载体,并设调零孔组、转染空载体对照组,每组设定5个复孔;分别在转染前和转染后培养1, 2, 3, 4 d相应时间终止,每孔加入MTT(噻唑蓝, 5 mg/mL) 20 μ L, 37 °C孵育4 h;吸去培养液,每孔加入150 μ L二甲基亚砷(DMSO)振荡10 min;以等体积的DMSO调零,用酶

联免疫检测仪在490 nm波长处检测各孔的吸光度(D)值,计算每组平均D值。按以下公式计算细胞增殖率(proliferation rate, PR): $PR = (\text{实验组平均}D\text{值} - \text{对照组平均}D\text{值}) / \text{对照组平均}D\text{值} \times 100\%$,以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,统计分析采用统计学t检验, $P < 0.05$ 差异显著,有统计学意义。

1.6 BrdU免疫组化法检测BiP及缺失体对SM-MC-7721细胞增殖的影响

6孔板中每孔分别接种 1×10^4 对数生长期SMMC-7721细胞,每组细胞平行做两复孔。分别转染BiP全长及缺失体BiPa、BiPp真核表达载体培养48 h后,加入15 μ mol/L BrdU, 37 °C孵育2 h, PBS洗1次,进行常规免疫组化, DAB染色后,显微镜下观察细胞核着色情况。每孔随机计数10个高倍视野中细胞总数及BrdU阳性细胞数,计算着色细胞比例。

1.7 FCM检测BiP及缺失体对SMMC-7721细胞凋亡的影响

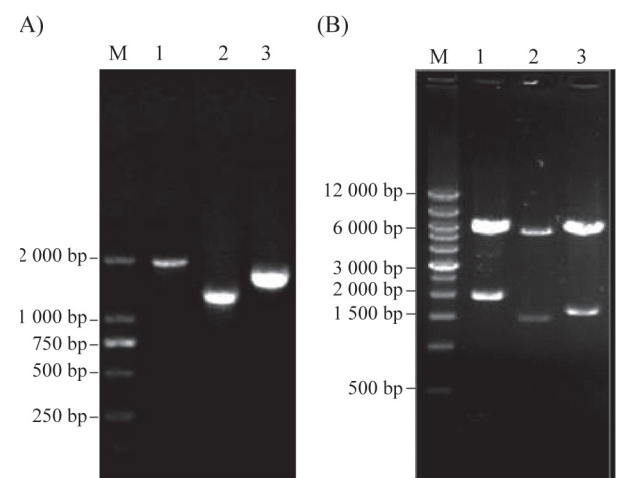
取处于对数生长期的SMMC-7721细胞,以 2×10^5 /mL细胞密度接种于6孔培养板中, 2 mL/孔,待

细胞融合率达95%时进行实验。实验分为: (1) 转染空质粒pcDNA3.1(-)对照组; (2) 转染BiP全长真核表达载体组; (3) 转染缺失体BiPa真核表达载体组; (4) 转染缺失体BiPp真核表达载体组, 细胞继续培养48 h。分别收集上述各组细胞, PBS洗涤2次, 加入100 μ L标记溶液(FITC-Annexin V和PI的终质量浓度均为1 μ g/mL)重悬细胞, 室温下避光培育10~15 min。离心沉淀细胞, 加培育缓冲液洗涤1次。加入荧光(SA-FLOUS)溶液于4 $^{\circ}$ C培育20 min, 避光振动, 上流式细胞仪分析各组细胞的细胞凋亡率, 上述各实验组分别设定5个平行组, 不同实验组细胞凋亡率取各平行组的平均值, 其中, 流式细胞仪检测由重庆医科大学生命科学院完成。

2 结果

2.1 BiP全长及缺失突变体重组质粒构建与鉴定

2.1.1 BiP全长及缺失突变体重组质粒构建与酶切鉴定 BiP全长基因PCR结果(图2A), 重组质粒经Hind III和BamH I双酶切鉴定均得到证实(图2B)。



A: BiP全长及重叠PCR产生的两个缺失突变体PCR琼脂糖电泳图; M: DL 2 000 DNA marker; 1: BiP PCR产物(1 982 bp); 2: BiPa PCR2#片段产物(1 498 bp); 3: BiPp PCR2#片段产物(1 679 bp); B: 重组质粒Hind III和BamH I双酶切琼脂糖电泳图; M: DL 12 000 DNA marker; 1: BiP酶切分析; 2: BiPa酶切分析; 3: BiPp酶切分析。

A: PCR amplification of target gene; M: DL 2 000 DNA marker; 1: BiP PCR product (1 982 bp); 2: BiPa PCR2# fragment product (1 498 bp); 3: BiPp PCR2# fragment product (1 679 bp); B: the recombinant plasmids digested with Hind III and BamH I; M: DL 12 000 DNA marker; 1: BiP restriction analysis; 2: BiPa restriction analysis; 3: BiPp restriction analysis.

图2 BiP全长及两个缺失突变体真核表达载体的构建

Fig.2 Construction of BiP and its two deletions eukaryotic expression vectors

2.1.2 BiP全长及缺失突变体重组质粒的序列测定与比对 BiP全长及2个缺失突变体重组质粒的测序和NTI软件比对结果均证实所构建BiP全长及2个缺失突变体重组质粒的序列与目的基因序列完全一致, 说明各重组质粒构建正确。

2.2 BiP蛋白功能域分析

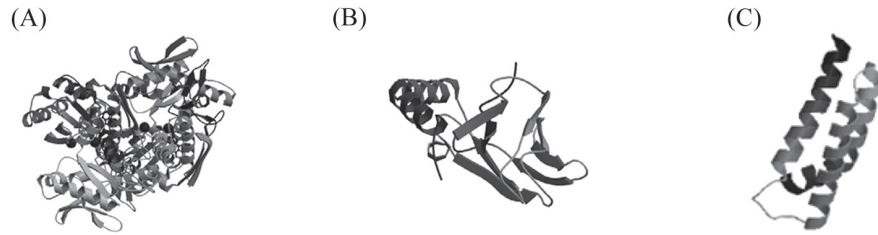
根据现有研究报道, BiP作为Hsp70家族的一员, 拥有Hsp70家族共有的三个结构区域^[6-7]: (1) N端: ATPase功能域含4个 α 螺旋形成一个裂缝, 裂缝底部带有ATP结合位点, 有ATP酶活性, 结合ATP并将其水解成ADP; (2) C端: peptide-binding结构域由4个反相平行的 β -折叠和1个 α 螺旋构成一个中性的疏水氨基酸残基凹槽, 能与长达7个残基的多肽相互作用; (3) C末端可变区富含 α 螺旋结构: 相当于给C端peptide-binding结构域加一个盖子, 当一个Hsp70蛋白与ATP结合时, 此盖子打开, 与之结合的多肽很快被释放; 而当Hsp70蛋白与ADP结合时, 此盖子关闭, 多肽就会紧密的结合在C端peptide-binding结构域。

登陆PDB只获得Wisniewska等^[8]经试验测定的BiP ATPase功能域三维结构图(3IUC, 图3A)。登陆NCBI数据库获得BiP的654个氨基酸序列, 以BiP同系物酵母Kar经试验测定的peptide-binding结构域三维结构为模板进行同源建模产生预测的peptide-binding结构域三维结构模型(图3B), 序列一致性: 72.483%; 以人类Hsp70经试验测定的C末端可变区三维结构为模板进行同源建模产生预测的C末端可变区结构模型^[9-11](图3C), 序列一致性: 41.975%, 结果都与目前的报道一致。

其中, 带有ATPase活性的ATPase功能域和peptide-binding结构域为Hsp70蛋白家族成员共同拥有两个主要的功能域。本实验参考Lee等^[12]论文提及的相关信息: BiP含654个氨基酸(aa), 包括氨基端的ER信号肽(1~18 aa)、一个ATPase功能域(125~280 aa)、一个peptide-binding结构域(400~500 aa)和一个羧基端定位ER的KDEL序列(651~654 aa), 来构建BiP分别缺失ATPase和peptide-binding区的缺失体(BiPa、BiPp)的真核表达载体, 并基于前面对BiP蛋白质结构的了解和分析, 预测成功构建的BiP全长和2个缺失体的真核表达载体在LO2细胞中均能正确表达。

2.3 BiP全长与缺失突变重组质粒在LO2细胞和SMMC-7721细胞中的表达

将构建好的BiP基因全长重组质粒和缺失体



A: BiP ATPase功能域(residues D26-D410): 含4个 α 螺旋形成一个裂缝; B: BiP peptide-binding结构域(residues D418-D566): 含4个反相平行的 β -折叠和1个 α 螺旋; C: C末端可变区(Residues D556-D636)-富含 α 螺旋结构。

A: the structure of the BiP ATPase domain (Residues D26-D410)-contains 4 α -helix domains forming 2 lobes with a deep cleft between; B: the structure of the BiP peptide-binding domain (Residues D418-D566)-contains two 4-stranded antiparallel β -sheets and single α -helix; C: the structure of the BiP C-terminal domain (Residues D556-D636)-rich in α -helix structure.

图3 人BiP结构域三维图

Fig.3 Three-dimensional structures of the human BiP

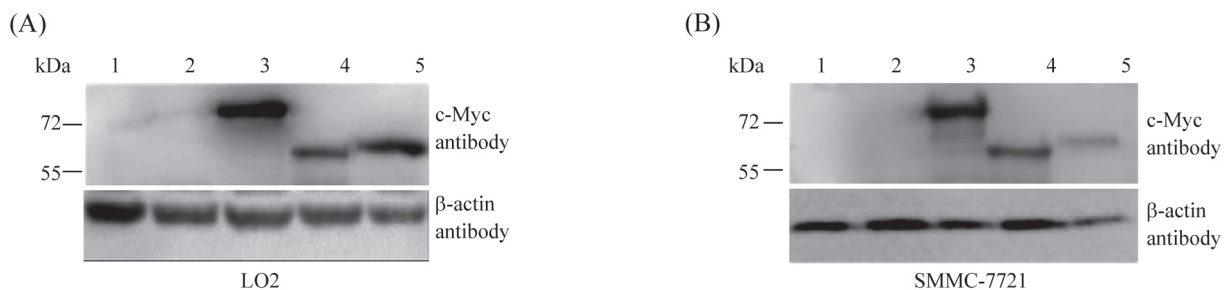
重组质粒用脂质体分别转染入LO2细胞和SMMC-7721细胞, 免疫印迹检测显示BiP全长及两个缺失突变体的重组质粒均可以在LO2细胞和SMMC-7721细胞内正确表达(图4)。

2.4 BiP促进SMMC-7721细胞的增殖

2.4.1 MTT法检测BiP全长及缺失体对SMMC-7721细胞增殖的影响 MTT结果表明, 无应激条件下, SMMC-7721细胞转染BiP全长和缺失体BiPa、BiPp重组质粒后, 分别在培养1, 2, 3, 4 d后检测细胞的增殖情况。结果显示SMMC-7721细胞分别在转染BiP全长和缺失体BiPa、BiPp重组质粒1, 2, 3, 4 d后, 细胞增殖率(PR)均逐渐增加, 其中, 转染BiP全长重组质粒1, 2, 3, 4 d后的细胞增殖率分别为19.79%、27.34%、46.85%、71.25%; 转染BiPa重组质粒1, 2, 3, 4 d后的细胞增殖率分别为28.09%、33.70%、54.73%、82.70%; 转染BiPp重组质粒1, 2, 3, 4 d后的

细胞增殖率分别为-0.94%、3.44%、20.95%、33.12%, 各组与相应的空白对照组比较差异均具有统计学意义(* P <0.05, ** P <0.01, 图5A), 说明上调BiP全长和缺失体BiPa、BiPp都可以明显促进细胞的增殖, 其中转染BiP全长和BiPa缺失体重组质粒组与空质粒对照组相比, 细胞增殖具有极显著差异; 缺失体BiPp组与对照组相比, 细胞增殖具有显著性差异, 各组结果均具有统计学意义。

2.4.2 BrdU免疫组化方法检测BiP及缺失体对SMMC-7721细胞增殖的影响 BrdU免疫组化结果显示, 转染BiP及缺失体BiPa、BiPp重组质粒48 h后, 细胞增殖能力均有不同程度上升, 与对照组相比, 转染BiP、BiPa、BiPp重组质粒后, SMMC-7721细胞的增殖率逐渐增加, 分别为10.62%、15.42%、23.11%、20.21%, 各转染组与对照组相比, 差异均具有统计学意义(* P <0.05, 图6A和图6B)。



1: 未转染组; 2: 转染pcDNA3.1(-)空载体组; 3: 转染pcDNA3.1(-)-BiP真核表达载体组; 4: 转染pcDNA3.1(-)-BiPa真核表达载体组; 5: 转染pcDNA3.1(-)-BiPp真核表达载体组。

1: cells without transfection; 2: cells transfected with pcDNA3.1(-); 3: cells transfected with pcDNA3.1(-)-BiP; 4: cells transfected with pcDNA3.1(-)-BiPa; 5: cells transfected with pcDNA3.1(-)-BiPp.

图4 8% SDS-PAGE检测BiP全长及两个缺失体融合蛋白在LO2细胞和SMMC-7721细胞的表达

Fig.4 8%SDS-PAGE analysis on the expression of BiP full-length and two mutant fusion proteins in LO2 cells and SMMC-7721 cells

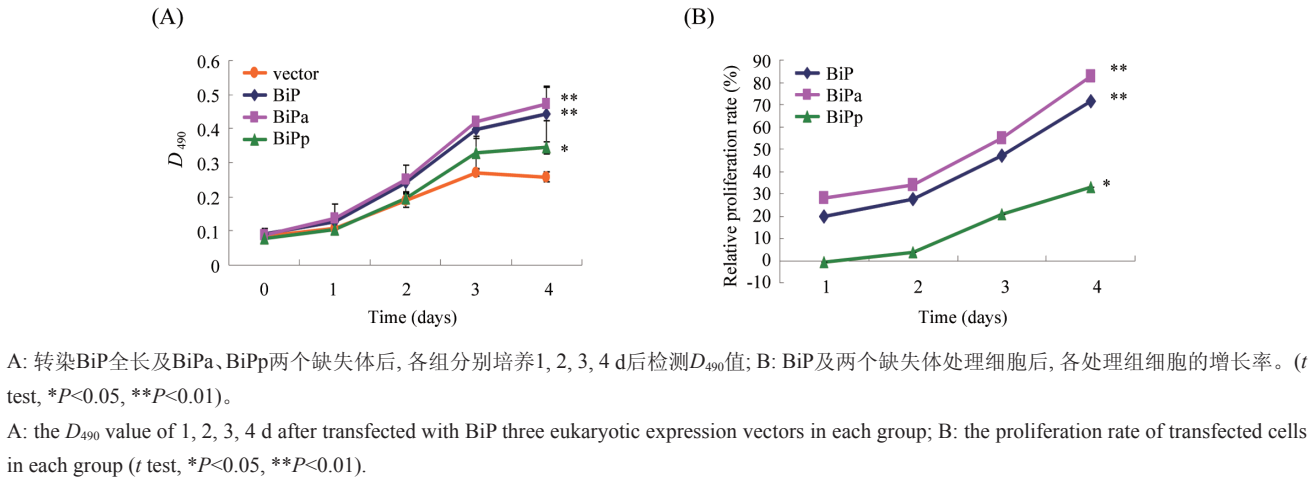


图5 MTT法检测转染BiP基因全长及缺失体对SMMC-7721细胞生长的影响($n=5$)

Fig.5 Effects on the cell growth of SMMC-7721 cells after transfected with BiP three expression plasmids by MTT assay ($n=5$)

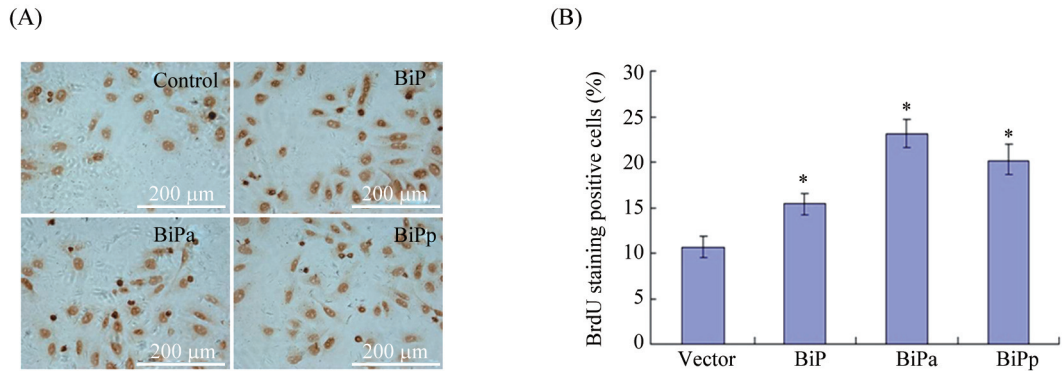


图6 BrdU染色检测转染BiP及其缺失体48 h后SMMC-7721细胞增殖情况(* $P<0.05$)

Fig.6 The proliferation of SMMC-7721 cells after transfected with BiP three eukaryotic expression vectors by BrdU staining analysis (* $P<0.05$)

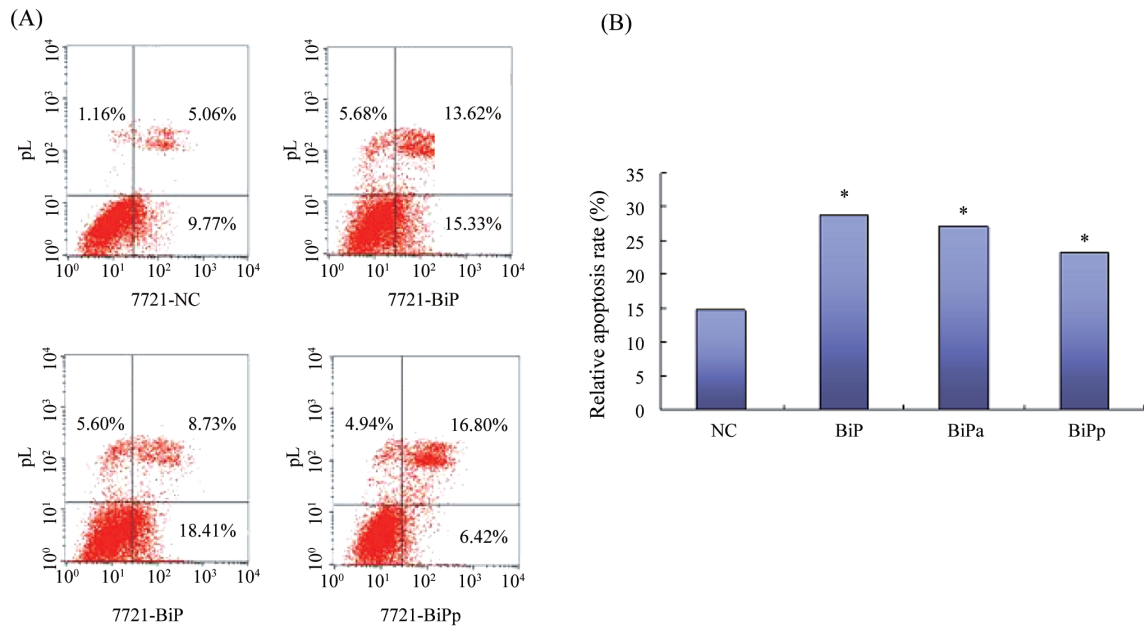


图7 FCM检测各组SMMC-7721细胞的凋亡率(* $P<0.05$)

Fig.7 Analysis on apoptosis rate in every SMMC-7721 cell groups by flow cytometry (* $P<0.05$)

2.5 BiP促进SMMC-7721细胞的凋亡

FCM检测结果表明, 转染BiP全长及两个缺失体BiPa、BiPp重组质粒后, SMMC-7721细胞的凋亡率分别为28.95%、27.14%、23.22%, 与未处理对照组(14.83%)比较, 转染BiP全长及两个缺失体BiPa、BiPp重组质粒后, 均可以明显促进肝癌细胞SMMC-7721的凋亡, 差异具有统计学意义(* $P < 0.05$, 图7A和图7B)。上述结果说明, 增加BiP或者BiPa、BiPp的表达能有效促进细胞凋亡, BiP的两个重要组成结构域BiPa和BiPp可能共同参与肝癌细胞的凋亡过程。

3 讨论

人类BiP由HSPA5基因编码, 是位于内质网腔的Hsp70分子伴侣。BiP是几乎在所有生长条件下都富含的蛋白质, 但它在内质网未折叠多肽积累的情况下合成更加显著。BiP与许多内质网蛋白都有短暂的相互作用, 因此是内质网维持内环境稳态的一个感应器。它参与前体蛋白质转运到内质网及随后的折叠和组装, 错误折叠和错误组装蛋白质的输出及相关降解(ERAD), 调节相关内质网应激(ER stress, ERS)的信号传导, 调节内质网钙离子内稳态等诸多生物学过程。通过对BiP各组成结构域的研究, 进一步分析BiP蛋白的活性中心, 对于探讨BiP蛋白的功能和BiP蛋白作用机理有着重要的指导意义。

目前的研究表明, BiP拥有Hsp70蛋白家族成员共同拥有的两个主要功能域: 带有ATPase活性的ATPase功能域和peptide-binding结构域。当ATP与ATPase功能域结合时, 它的peptide-binding结构域能与未折叠/错误折叠蛋白作用, 随后ATP水解作用加强BiP与这些未折叠/错误折叠蛋白的作用。在此情况下, 蛋白质二硫键异构酶(PDI)可促进二硫键还原、重排、再氧化直到蛋白质构象正确完成, 促使ADP交换成ATP结束了BiP与这些蛋白的作用而与其他未折叠/错误折叠蛋白结合^[13]。可见, BiP的ATPase功能域与ADP/ATP结合的变化可以调控peptide-binding结构域的运转, 同时, 多肽与peptide-binding结构域的结合/释放也可以刺激ATPase功能域上ATPase的活性。因此, BiP ATPase功能域与peptide-binding结构域两功能域间的相互作用是Hsp70蛋白家族成员实现其功能的重要原因。

Hendershot等^[14]的研究发现, 孤立表达BiP的peptide-binding结构域能与配体永久性地结合, 也能

干扰ER的正常功能; 相反, 孤立表达BiP的ATPase功能域不能与配体相互作用并且测不出对ER的损伤作用。BiP的ATPase功能域具有与ATP结合的作用和水解活性, 这被认为是ER折叠组装蛋白功能必不可少的; Snowden等^[15]在植物细胞中发现, 虽然缺少ATPase功能域的BiP缺失体对ER功能没有不利影响, 但孤立表达BiP的ATPase功能域会干扰分泌蛋白的合成。Hardy等^[16]则把细胞表面表达的BiP描述为内皮细胞上一个新生的血管生成因子受体, 其peptide-binding结构域可以诱导内皮细胞血管生成及毛细血管增加。

肿瘤细胞内质网中BiP升高增加了肿瘤细胞存活的机会, 使得肿瘤细胞对化疗药物产生抵抗从而造成肿瘤患者愈后不良和治疗失败。近年来发现, BiP在肿瘤细胞的细胞表面表达, 对肿瘤血管的生成也有促进作用^[16-17], 研究表明通过下调肿瘤细胞BiP的表达有望成为肿瘤治疗中一个新的辅助靶点。因此, 进一步阐明BiP及各组成结构域与肿瘤细胞增殖、凋亡的关系, 可为肿瘤治疗提供一定的理论基础。本实验在成功构建BiP及各组成结构域缺失体真核表达载体基础上, 运用MTT法、BrdU免疫组化法初步验证BiP及BiPa、BiPp的过表达均能有效促进肝癌细胞SMMC-7721的增殖, 其中各组细胞分别转染BiP全长、BiPa和BiPp真核载体后, 继续培养1, 2, 3, 4 d后, 采用MTT法检测各组细胞的增殖率(PR), 各组细胞增殖率大小顺序为: BiPa>BiP>BiPp; BrdU法测得BiP全长、BiPa和BiPp转染各组细胞后, 细胞增殖率大小为: BiPa>BiPp>BiP。结果表明, 缺失ATPase功能域的缺失体BiPa促进SMMC-7721肿瘤细胞的增殖作用比BiP全长和缺失体BiPp更加显著, 提示组成BiP的两个结构域: peptide-binding结构域与ATPase功能域调控细胞增殖的作用具有差异性, 独立的ATPase功能域可能抑制细胞增殖, 而独立的peptide-binding结构域可能促进细胞的增殖, 当组成BiP的这两个结构域共同存在时, 它们协同调控, 促进细胞的增殖, 具体的分子机制还需要进一步的实验研究和探讨。

细胞增殖与凋亡是两个既独立又互相联系的生物学过程, 为了进一步研究BiP及两个组成结构域与凋亡的关系, 我们通过流式细胞仪分别检测转染BiP、BiPa、BiPp重组质粒后, 肝癌细胞SMMC-7721的凋亡率, 结果显示, 与对照组凋亡率14.83%比较, 三个实验组细胞凋亡率均明显增加, 分别为

28.95%、27.14%、23.22%, 与对照组相比, 差异均具有统计学意义($P<0.05$); 其中, 缺失ATPase功能域的缺失体BiPa与全长BiP两组间凋亡率差异不显著; 而转染缺失体BiPp组细胞凋亡率明显低于全长BiP组, 两组差异具有显著性($P<0.05$), 提示ATPase功能域可能与细胞凋亡不相关, 而peptide-binding结构域可能促进细胞的凋亡; 当ATPase功能域与peptide-binding结构域同时存在时, 它们会协同调控促进细胞的凋亡。

综上所述, 我们的研究初步分析了内质网分子伴侣BiP的两个主要功能域: ATPase功能域与peptide-binding结构域单独存在或者共同存在时与细胞增殖及凋亡的关系, 我们认为两个结构域独立存在或者共同存在时, 调控细胞增殖与凋亡是有差异性的, 初步认为造成这种差异性的原因是组成BiP的这两个结构域在功能上具有相互作用。当它们共同存在时, 可以相互协同调控细胞的增殖与凋亡, 正是这种功能上的协同作用导致BiP这一复杂的生物学功能。我们的这些研究结果为进一步分析和探讨BiP及各组成结构域的生物学功能奠定基础, 为研究BiP与肿瘤增殖、凋亡及相关调节基因表达的信号转导机制奠定基础, 有利于阐明内质网分子伴侣在肿瘤生物学治疗中的实际意义。至于BiP作为内质网分子伴侣, 与真核细胞其他生物学特性的关系, 还有待进一步扩大细胞类型深入研究。

参考文献 (References)

- Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Müller L, *et al.* Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(9): 1556-69.
- Guo FJ, Lin EA, Liu P, Lin J, Liu C. XBP1U inhibits the XBP1S-mediated upregulation of the iNOS gene expression in mammalian ER stress response. *Cell Signal* 2010; 22(12): 1818-28.
- Susuki S, Sato T, Miyata M, Momohara M, Suico MA, Shuto T, *et al.* The endoplasmic reticulum-associated degradation of transthyretin variants is negatively regulated by BiP in mammalian cells. *J Biol Chem* 2009; 284(13): 8312-21.
- Gorbatyuk MS, Knox T, LaVail MM, Gorbatyuk OS, Noorwez SM, Hauswirth WW, *et al.* Restoration of visual function in P23H rhodopsin transgenic rats by gene delivery of BiP/Grp78. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(13): 5961-6.
- Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* 2007; 2(4): 924-32.
- Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 1998; 80(2): 183-201.
- Chevalier M, King L, Wang C, Gething MJ, Elguindi E, Blond SY. Substrate binding induces depolymerization of the C-terminal peptide binding domain of murine GRP78/BiP. *J Biol Chem* 1998; 273(41): 26827-35.
- Wisniewska M, Karlberg T, Lehtiö L, Johansson I, Kotenyova T, Moche M, *et al.* Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78. *PLoS One* 2010; 5(1): e8625.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinform-matics* 2006; 22(2): 195-201.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(13): 3381-5.
- Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 1997; 18(15): 2714-23.
- Zhang Y, Liu R, Ni M, Gill P, Lee AS. Cell surface relocation of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. *J Biol Chem* 2010; 285(20): 15065-75.
- Hendershot LM, Valentine VA, Lee AS, Morris SW, Shapiro DN. Localization of the gene encoding human BiP/GRP78, the endoplasmic reticulum cognate of the HSP70 family, to chromosome 9q34. *Genomics* 1994; 20(2): 281-4.
- Hendershot LM, Wei JY, Gaut JR, Lawson B, Freiden PJ, Murti KG. *In vivo* expression of mammalian BiP ATPase mutants causes disruption of the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 1995; 6(3): 283-96.
- Snowden CJ, Leborgne-Castel N, Wootton LJ, Hadlington JL, Denecke J. *In vivo* analysis of the luminal binding protein (BiP) reveals multiple functions of its ATPase domain. *Plant J* 2007; 52(6): 987-1000.
- Hardy B, Raiter A. Peptide-binding heat shock protein GRP78 protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis. *J Mol Med* 2010; 88(11): 1157-67.
- Gonzalez-Gronow M, Selim MA, Papalas J, Pizzo SV. GRP78: A multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(9): 2299-306.

Analysis on Molecular Chaperone BiP Domain and Influence on Proliferation and Apoptosis in Hepatoma Cells

Li Xiangzhu, Liu Yanna, Zhao Wenjun, Zhou Jinghua, Guo Fengjin*

(Department of Cell Biology and Genetics, Chongqing Medical University, Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Binding immunoglobulin protein (BiP) is a resident member of Hsp70 family and master regulator for Endoplasmic Reticulum Stress (ERS). To study the relationship of BiP domain with the physiological function, BiP DNA sequence and protein structure were analysed, two deletion mutants of BiP and BiP full-length eukaryotic expression vectors with myc tag were successfully constructed with the method of overlapping PCR mutagenesis respectively. BiPa deletion mutant is BiP mutant with ATPase domain deleted, BiPp deletion mutant is BiP mutant with peptide-binding domain deleted. After these eukaryotic expression vectors were transfected into LO2 and SMMC-7721 cells, they were identified the expression by Western blot. Then cell proliferation and apoptosis were analysed by MTT assay, BrdU immunohistochemistry and flow cytometry (FCM) respectively, next the relationship between cell proliferation/apoptosis and BiP/BiPa/BiPp were also analysed. Both the full-length BiP and the deletion mutants BiPa, BiPp can effectively improve SMMC-7721 cells proliferation by MTT assay and BrdU immuno-histochemistry. Besides, every group of cell proliferation rate results showed that ATPase domain might be inhibit cell growth, while peptide-binding domain might be increase cell growth. FCM results showed that both the full-length BiP and the deletion mutants BiPa, BiPp can enhance SMMC-7721 cells apoptosis. The difference of apoptosis rate between group BiPa and group BiP were no significance, however, the apoptosis rate of group BiPp was clearly lower than group BiP ($P<0.05$). It was showed that ATPase domain might be unconcerned with cell apoptosis, while peptide-binding domain might be increase cell apoptosis. These two domains, ATPase and peptide-binding, can coregulate cell proliferation and cell poptosis when they combined with each other. The molecular mechanism of them need to be studied deeply.

Key words BiP; deletion; bioinformatics; cell proliferation

Received: May 29, 211 Accepted: August 22, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31040019) and the Education Ministry Study Abroad Staff Foundation (No.2009-1590)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485898, E-mail: guo.fengjin@gmail.com