

新基因丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6 (HCBP6) 的发现和研究的

——献礼非酒精性脂肪性肝病



成军教授, 博士, 主任医师, 北京大学医学部和首都医科大学博士生导师, 首都医科大学附属北京地坛医院副院长、北京高层次卫生人才领军人才、北京市有突出贡献人才、国务院特殊津贴获得者、全国模范军转干部(全国劳模)。曾任中华医学会热带病与寄生虫病学会第五届委员会主任委员、中华医学会感染病学分会第十届委员会副主任委员, 现任国际感染病学会 (INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES) 中国区执行主席、中国医师协会感染科医师分会第二届委员会副会长、国家卫健委疾病预防控制专家咨询委员会委员、北京亚太肝病诊疗技术联盟理事长、《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》总编辑、《中国肝脏病杂志(电子版)》总编辑、多个专业期刊副主编及编委。从事传染病临床医疗和基础研究工作近30余年, 2006年度入选北京市新世纪人才、2008年度入选北京市“十百千”卫生人才“十”层次人才, 2009年度入选北京高层次卫生人才培养计划领军人才。近年来主持或参与国家基础研究发展计划(973项目)、国家“十一五”和“十二五”传染病重大专项、国家自然科学基金、北京市自然科学基金、北京市科委重大专项、北京市医管局扬帆计划、登峰计划、首都医学发展基金项目等科研项目30余项, 发表学术论文1000余篇, 获发明专利3项, 获北京市科技成果二等奖1项, 主编或副主编专业著作20余部。

【摘要】丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6 (HCBP6) 是成军教授课题组利用酵母双杂交技术首先发现的与丙型肝炎病毒核心蛋白结合的蛋白。课题组进一步发现HCBP6可以感受肝细胞内总胆固醇与甘油三酯水平变化并调节总胆固醇与甘油三酯水平。动物模型发现, HCBP6基因敲除小鼠在高脂饮食喂养下会出现糖脂代谢紊乱。课题组进一步发现韩国红参组分可通过调节HCBP6改善糖脂代谢, 推动了含有该组分PTIB001治疗非酒精性脂肪性肝病的功能食品的问世。这些工作为基于PTIB001治疗NAFLD药物的研发提供了理论依据。

【关键词】丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6; 非酒精性脂肪性肝病; 脂代谢; 人参

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2019.05.001

基金项目: 北京市自然科学基金重点项目 (No.7161006); 北京市医院管理局“登峰”计划专项经费资助 (No.DFL20151701); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No.81700508)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院肝病中心

通信作者: 成军, Email: Chengj0817@sina.cn

卫生健康事业发展70年巡礼

Discovery and study of hepatitis C virus core protein binding protein 6 (HCBP6)

--Contribution to non-alcoholic fatty liver diseases

Center of Liver Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: Cheng Jun, Email: Chengj0817@sina.cn

【Abstract】 Hepatitis C virus (HCV) core protein binding protein 6 (HCBP6) is first identified by Professor Cheng Jun's team as a protein binding to HCV core protein with the yeast two hybrid system. Professor Cheng's team further found that HCBP6 can sensor the fluctuation of total cholesterol and triglyceride and help to maintain the homeostasis of lipid metabolism and glycometabolism. Homozygous HCBP6 knock-out mouse showed abnormal lipid metabolism and glycometabolism on high fat diet feeding. Professor Cheng's team found that PTIB001 from Korean red ginseng might help to maintain homeostasis of lipid metabolism and glycometabolism through HCBP6 pathway. Professor Cheng's team enhanced the development of functional food which contain PTIB001 for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). These work provide theoretical evidence for the development of PTIB001 related agents for NAFLD.

【Key words】 HCV core protein binding protein 6; Non-alcoholic fatty liver disease; Lipid Metabolism; Ginseng

一、丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6 (HCBP6) 基因的发现

1997年, 成军教授完成美国德克萨斯大学3年的博士后研究回国, 立志科研创新。针对当时慢性病毒性肝炎流行的实际情况, 对乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 和丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 与肝细胞相互作用的分子生物学机制进行了系统研究。其中一项技术就是利用蛋白-蛋白相互作用的酵母双杂交 (yeast-two hybrid) 技术筛选与肝炎病毒结构和非结构蛋白结合的人肝细胞蛋白。正是利用这一分子生物学技术, 成军教授团队以HCV核心 (core) 蛋白为“诱饵”, 从人肝细胞cDNA文库中筛选到可与HCV核心蛋白结合的蛋白。这是一项开放筛选的技术, 要从100万个克隆中进行筛选, 可以获得已知的基因, 也可以获得未知的基因。成军教授课题组非常幸运, 获得了一系列阳性克隆, 其中第6号克隆是先前从未报道的一个全新基因, 成军教授课题组将其命名为HCV核心蛋白结合蛋白6 (HCV core-binding protein 6, HCBP6), 并提交美国基因数据库 (GenBank), 经过与美国、瑞士和日本等三大基因序列数据库的基因序列比对, 证实HCBP6确实是以前从未研究报道的新基因, 从而承认成军教授课题组的命名, 并授予一个独有的检索号码 (Accession number), 即宣告了这一新基因的发现^[1-2]。

酵母双杂交技术实际上是筛选可以结合目标蛋

白结合蛋白的羧基末端序列, 并非全基因。关于这一新基因全基因序列的确定, 成军教授课题组利用当时有限的资料和生物信息学技术进行了电子拼接、多聚酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增和基因序列测定。在确认全基因序列以后, 对于起始密码子 (ATG) 上游的序列进行了启动子 (promoter) 序列的确定和转录活性的研究, 但是这一过程非常不顺利。当成军教授课题组从文献中得知翻译起始密码子及其下游的基因序列, 有时也是启动子序列重要组成部分的时候, 便改变了研究策略, 并取得成功^[3]。但HCBP6这个新基因究竟具有什么生物学功能, 却无从得知。

二、赋予HCBP6重要的生物学功能

HCBP6作为一个新基因, 世界上无人知道其具有什么生物学功能。当时, 成军教授课题组的另一项研究是关于慢性丙型肝炎 (chronic hepatitis C, CHC) 患者合并脂肪肝及其机制研究, 因当时认为CHC患者合并脂肪性肝病是一个非常显著的病理学特点。目前临床数据表明, 55%的CHC患者伴有不同类型和不同程度的脂肪肝, 但形成机制尚未明确^[4]。成军教授课题组为此建立了HCV结构基因转基因小鼠模型, 观察脂肪性肝病的病理学改变^[5]。同时, 利用分子生物学技术证实HCV core蛋白通过提高肝脏总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglycerides, TG) 的生物合成, 促进脂肪肝的形成^[6]。这些结果为CHC合并脂肪肝形成的分子生物学机制研究提供

卫生健康事业发展70年巡礼

了重要依据。

在这个时候, 成军教授课题组联想起多年前本课题组发现的HCBP6新基因生物学功能尚不明确, 但已知晓HCBP6蛋白可与HCV core蛋白相结合, HCV core蛋白可以调节TC和TG的生物学合成, 那么HCBP6蛋白会不会也在TC和TG的生物学合成调节中具有重要作用呢? 这一假设得到了研究结果的证实, 从而为HCBP6这个新基因的生物性功能研究打开了一个缺口, 使HCBP6研究进入到功能学研究阶段^[7], 更进一步印证了HCBP6是一个重要的基因。

三、为什么说HCBP6是一个作用广泛的基因、聪明的基因?

脂类代谢是人类生物医学研究中一个非常活跃的领域, 很多成就获得过诺贝尔生理或医学奖。成军教授课题组在这一重要领域中独特的贡献, 使临床研究对于肝脏脂类合成代谢的调节又深入了一步。HCBP6是一个新的、重要的基因, 同时也是对TC和TG均具有调节作用的“管得宽”基因。长期以来, 细胞内TC和TG合成的震荡调节机制, 谁是感受子(sensor), 谁是震荡调节子(oscillator), 一直未明确。成军教授课题组推测, 肝细胞中TC和TG水平不会过高, 也不会过低, 而是在一定范围内震荡(oscillation)调节, 那么是什么因素感受细胞内TC和TG水平并掌控TC和TG的合成速度呢? 如果可以阐明上述问题将具有十分重要的意义。成军教授推想, HCBP6可能有类似的作用。经过一系列的实验研究, 最后成军教授课题组利用精巧的科研设计, 证实了HCBP6蛋白可以感受肝细胞内TC和TG水平的变化, 并震荡调节细胞内TC和TG的生物合成速度。换句话说, HCBP6基因是肝细胞内TC和TG浓度的感受子, 同时也是TC和TG生物学合成的震荡调节子^[8]。此结论为细胞内TC和TG如何维持内环境稳定的机制研究做出了贡献。

所以说HCBP6是一个新基因、一个重要的基因、一个“管得宽”的基因、一个聪明的基因! 成军教授课题组之所以一步一步将HCBP6的功能研究推向前进, 是带着感情去思考、去推进的。成军教授说过:

这个HCBP6新基因是我们课题组发现的, HCBP6就像我们的一个孩子, 我们不仅发现了她、赋予她重要的生物学功能, 而且对她的地位和作用进行开创性研究, 我们始终是带着感情进行研究的。

四、为什么说HCBP6是一个具有临床应用价值的基因?

成军教授课题组在细胞和分子水平研究结果的基础上, 为阐释HCBP6在整体动物水平上的价值, 又构建了HCBP6(-/-)基因敲除小鼠模型。在喂养模型小鼠过程中, 非常意外地发现, HCBP6(-/-)基因敲除小鼠在高脂饮食(high-fat diet, HFD)喂养条件下, 长成了“硕鼠”! HFD喂养12周, HCBP6(-/-)基因敲除小鼠体重已经高达50 g, 而普通饮食组的小鼠体重仅约30 g, 差别巨大。病理组织学发现“硕鼠”具有显著的脂肪肝, 伴有血脂水平紊乱和丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)水平升高, 成军教授课题组确认HFD喂养的HCBP6(-/-)基因敲除小鼠脂肪肝属于脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)。这一发现具有十分重要的临床价值, 为NASH发病机制和治疗研究奠定了坚实的基础。

临床中脂肪性肝病或NASH患者, 绝大部分均为代谢综合征(metabolic syndrome, MS)的一种表现, 同时伴有糖代谢紊乱。那么在HFD喂养条件下形成的具有NASH病理学特点的“硕鼠”是不是同时也有MS特征? 同时伴有糖代谢紊乱呢? 成军教授课题组进一步研究表明, HFD喂养形成的具有NASH特点的“硕鼠”也有糖代谢紊乱, 符合MS特征。这一重要发现为HCBP6生物医学地位的奠定发挥了关键作用, 且从脂类代谢扩展到了糖脂代谢领域。

五、巧妙而缜密的科研思维推动了NASH新药的发现

HCBP6基因敲除小鼠长成了具有NASH或MS特征的硕鼠, 表明HCBP6这个新基因非常重要。成军教授有了一个大胆的想法: 寻找通过调节HCBP6而治疗NASH的新药。

带着这样的想法, 成军教授偶然发现韩国

卫生健康事业发展70年巡礼

学者一篇研究韩国红参抗衰老的论文^[9],作者利用韩国红参进行抗衰老研究获得了肯定的结果。抗衰老研究有效的一个明显标志就是实验动物的生殖能力增强。于是该文作者获取实验大鼠的睾丸组织进行基因表达谱芯片研究,想搞清楚抗衰老机制和作用靶点。结果韩国红参与调控的靶基因中就有HCBP6,且是表达水平变化最为明显的一个基因,但作者提出“这是一个功能未知的新基因”。成军教授激动得一夜没睡,连夜把几十种从红参分离的成分查清楚,并买来一一测试,终于找到了PTIB001化合物,证实其通过HCBP6调节肝脏的糖脂代谢,并在治疗NASH动物模型中得到了验证,而且在持续HFD喂养的小鼠模型中效果仍然十分显著,从而宣告了治疗NASH新化合物的发现。

屠呦呦先生的研究成果获得了诺贝尔奖,为世界和人类作出了巨大贡献,广为传颂。屠先生先从中医古籍文献得到提示,确定青蒿中具有抗疟药物,但是对于有效成分的分离鉴定却并不顺利。在那个关键时刻,屠先生果断改变了青蒿有效成分提取的溶剂和工艺,才有青蒿素的重大发现,才有化学合成和化学修饰药物的问世。因此,屠先生的贡献在所有的青蒿素研究中至为关键,获得诺贝尔奖当之无愧。成军教授PTIB001的发现也具有相似的科研思维决断过程,同样也是从植物药发现的有效成分。这一发现和系统地研究计划,得到了一系列国家自然科学基金和北京市自然科学基金重点项目的支持。基于调控HCBP6的化学成分PTIB001,治

疗NASH的功能性食品“利沃素”横空出世,为广大NASH患者提供了干预手段。同时为以PTIB001化学成分为基础的NASH新药的研究奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] 李克,王琳,成军,等. 筛选与克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2002,16(4):351-354.
- [2] Li K, Wang L, Cheng J, et al. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein-a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus[J]. World J Gastroenterol,2003,9(2):300-303.
- [3] 王琳,成军,李克,等. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6号结合蛋白基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定[J]. 中华肝脏病杂志,2006,14(2):81-85.
- [4] Cheng J, Li K, Wang L, et al. Study on the steatosis of patients with chronic hepatitis C virus infection[J]. Korean J Hepatol,2002,8(Suppl 3): S11-S14.
- [5] 成军,任进余,李莉,等. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变[J]. 世界华人消化杂志,2002,10(9):1022-1026.
- [6] Li M, Wang Q, Liu SA, et al. MicroRNA-185-5p mediates regulation of SREBP2 expression by hepatitis C virus core protein[J]. World J Gastroenterol,2015,21(15):4517-4525.
- [7] Gao LL, Li M, Wang Q, et al. HCBP6 modulates triglyceride homeostasis in hepatocytes via the SREBP1c/FASN pathway[J]. J Cell Biochem,2015,116(10):2375-2384.
- [8] Yang X, Han M, Liu S, et al. HCBP6 upregulates human SREBP1c expression by binding to C/EBP β -binding site in the SREBP1c promoter[J]. BMB Rep,2018,51(1):33-38.
- [9] In-Hye Kim, Si-Kwan Kim, Eun-Hye Kim, et al. Korean red ginseng up-regulates C21-steroid hormone metabolism via Cyp11a1 gene in senescent rat testes[J]. J Ginseng Res,2011,35(3):272-282.

(收稿日期: 2019-09-27)

(本文编辑: 孙荣华)

成军. 新基因丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6(HCBP6)的发现和研究——献礼非酒精性脂肪肝病[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2019,13(5):353-356.