

## 乙型肝炎病毒表面蛋白反式调节作用的研究进展

纪冬 徐东平 辛绍杰

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是严重危害人类健康的全球公共卫生问题,全世界有3.5亿~4亿感染者,其中20%~25%出现肝脏损伤,部分患者发展为肝硬化及肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC),每年因HBV感染死亡的人数为100万~200万<sup>[1-3]</sup>。我国有56.7%的人口感染过HBV,慢性携带者占9.75%<sup>[4]</sup>。虽然HBV相关性疾病的诊治有了长足的发展,但是对于HBV致病(癌)的具体机制尚不十分明确,这也影响到了抗HBV感染治疗的有效率。HBV病毒蛋白与肝细胞之间相互作用是病毒致病(癌)的关键,可以导致细胞损害、免疫功能失调和肿瘤发生,因此,明确并干扰HBV蛋白与肝细胞之间的相互作用,可以对HBV的防治提出新的思路<sup>[5]</sup>。本文就HBV表面蛋白反式调节作用的研究进展进行简要综述。

### 一、HBV表面蛋白的结构与功能

HBV是带包膜、嗜肝DNA病毒,其基因组有4个开放读码框架(ORF),分别命名为S、C、P、X区,其中S区通过三个框架内起始密码子(ATG)分为三个结构域:前-S1、前-S2和S结构域,从这三个ATG开始编码产生三种大小不等的表面蛋白:主蛋白(SHBs)、中蛋白(MHBs:前-S2 + S)和大蛋白(LHBs:前-S1 + 前-S2 + S)。三种表面蛋白均为Ⅱ型跨膜糖蛋白,并通过S结构域半胱氨酸形成的二硫键得以巩固。HBV表面蛋白具有多种功能,在HBV致病(癌)过程中发挥着重要的作用<sup>[6,7]</sup>。

前-S1蛋白由108或119个氨基酸组成,其氨基端(N-端)游离,羧基端(C-端)与前-S2蛋白的N-端相连接。前-S1蛋白仅出现于大蛋白中,位于包膜的内、外两侧,血清中主要存在于具有传染性的dane颗粒或管状颗粒表面上,是病毒感染复制的一个重要指标<sup>[8]</sup>。研究表明其具有多重功能:第一,参与了病毒与肝细胞受体的结合以及细胞摄入病毒颗粒过程,与肝细胞表面病毒受体相结合,使得HBV进入宿主细胞内,对于HBV的生活周期是必需的。第二,位于包膜内侧的结构域具有病毒核心颗粒的结合位点,调节病毒颗粒的装配并与病毒包膜建立物理性的相互作用,控制病毒超螺旋基因组的扩增。第三,位于包膜外表面的表位可以诱导出病毒中和抗体,改变宿主对于病毒重组的反应。除了以上功能外,最近的研究表明前-S1蛋白具有反式调节作用<sup>[9]</sup>。前-S2由55个氨基酸残基组成,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2010.02.013

基金项目:国家自然科学基金(30700713)

作者单位:100853 北京市,解放军军医进修学院(纪冬、辛绍杰);解放军第302医院(纪冬、徐东平、辛绍杰)

通讯作者:辛绍杰, Email:xsj302@yahoo.com.cn

不仅存在于病毒颗粒表面,亦可出现在非传染性球形颗粒表面,具有调节对表面蛋白的免疫应答及控制病毒颗粒装配等功能,促进病毒免疫清除。前-S2 蛋白已被证明具有很强的反式调节作用,可以与蛋白激酶 C(PKC) $\alpha/\beta$  结合,发生磷酸化反应触发了 PKC 依赖的 c-Raf-1/MPKKK(丝裂激活蛋白激酶激酶激酶)信号转导系统,从而激活转录子,如激活蛋白-1(AP-1)、细胞核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、激活蛋白-2(AP-2)、血清应答因子(SRF)、Sp1 和 c-myc、c-fos 启动子,参与病毒感染后的炎症和 HCC 发生<sup>[10]</sup>。主蛋白有 226 个氨基酸残基,可以诱导机体产生保护性抗体,也是 HBV 感染的主要标志之一<sup>[11]</sup>。另外对于病毒颗粒的装配及宿主细胞基因表达的改变也具有显著影响。

## 二、HBV 表面蛋白的反式调节作用

1. 反式调节作用的机制:HBV 进入肝细胞后,可以与肝细胞染色体整合并编码两种反式调节因子:HBV X 蛋白(HBxAg)和前-S2 反式调节因子家族:LHBs 和羧基端截短型中蛋白(MHBst)。LHBs 的反式激活作用与其独特的拓扑结构密切相关,其前-S1 和前-S2 区有一个与翻译不同步的转位过程,在横跨内质网膜时是指向内质网的胞质侧,这种在胞质滞留的前-S2 区,有机会与细胞中信号转导相关因子相互作用,发挥其反式激活作用,另有一部分 LHBs 的前-S1 和前-S2 区在翻译后转位跨过内质网膜,进入分泌途径,参与病毒颗粒的组装<sup>[12-14]</sup>。MHBst 是变异的病毒表面抗原中蛋白,缺失了位于 C-末端的膜定位信号,使 MHBst 具备内质网(ER)定位功能,不进入分泌途径而在 ER 滞留,其前-S2 区指向胞浆区,从而有机会与胞浆蛋白相互作用,发挥广泛的反式激活效应。进一步研究表明,MHBst 的最小反式激活单元定位于 4-53 氨基酸残基,MHBst53 是最小的转录激活因子,是一种非膜结合类型的 MHBst,提示仅前-S2 区就足以介导反式效应<sup>[15, 16]</sup>。

2. 反式调节作用与 HCC:HBV 感染与 HCC 发生密切相关,目前认为 HBV 的致癌性可能是通过两种途径产生的:第一,HBV DNA 的染色体整合所产生的顺式作用。通过整合,HBV 增强子、启动子等顺式元件可以改变细胞生长、分化基因的表达,研究表明 HBV 的整合发生于 90% 左右的 HBsAg 阳性的 HCC 患者上,说明整合确实在 HCC 的发生、发展过程中起到重要的作用。第二,HBV 编码蛋白的反式调节作用。HBV DNA 插入的序列以及插入染色体的位点并不是固定的,顺式作用并不足以完全解释 HCC 的形成机制。HBV 编码的两种反式调节因子 HBxAg 和前-S2 反式调节因子家族可以激活某些原癌基因如 N-ras 基因,抑制抑癌基因如 p53 基因,促进癌变的发生。根据致癌两步模型:起始/促进,前-S2 蛋白具有的肿瘤启动子样的功能:具有关键性突变(起始)的细胞可以被阳性选择出来(促进),这个过程也许可以用来解释 HCC 发展过程中潜伏期长的原因<sup>[17]</sup>。

3. 笔者研究结果:最近几年来使用抑制性消减杂交、基因芯片等技术研究 HBV 前-S2 蛋白的反式调节作用<sup>[18, 19]</sup>,结果发现在上调基因中,凋亡相关的 RNA 结合蛋白(NAPOR-3)、胱冬肽酶-9(caspase-9)、胱冬肽酶-6、凋亡蛋白 1 抑制子(MIHC)等均参与了细胞凋亡的控制机制,影响正常细胞的生长状态,从而为

HBV 在肝细胞中复制提供良好的环境;PKC、丝氨酸-苏氨酸激酶(KDS)、酪蛋白激酶 1 $\alpha$  1(CSNK1A1)、人蛋白激酶 2 型  $\beta$  调节亚单位(PRKR2B)等为体内蛋白磷酸/去磷酸化的重要调节剂,是 MAPK 传导通路中重要的组成部分,对大量细胞内、外刺激的转导起着中枢性调节作用,控制细胞的生长、增生、凋亡<sup>[20]</sup>。另外使用报告基因技术进一步验证了前-S2 蛋白对于硫氧还蛋白还原酶 1(TXNRD1)的上调作用,TXNRD1 和其底物硫氧还蛋白 1(Trx1)组成了一个氧化还原系统,TXNRD1 促进 Trx1 的还原,调节氧化应激,还影响细胞信号转导途径,如核因子 NF- $\kappa$ B、蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)和抗氧化物酶等。TXNRD1 是控制细胞氧化还原状态、抗氧化防御以及细胞氧化还原调节最重要的酶<sup>[21]</sup>。

在下调基因中,发现前-S2 蛋白可以下调诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)及胰岛素受体(insulin receptor,INSR)的表达。iNOS 在正常细胞中表达量极低,当病原体侵入肝细胞后就会诱导 iNOS 基因激活并产生大量的一氧化氮(NO),从而杀伤病毒、细菌、寄生虫和肿瘤细胞等。我们的研究表明前-S2 蛋白抑制 iNOS 基因的表达,从而降低体内 NO 的产生,抵抗宿主肝细胞的防御功能,实现 HBV 的慢性感染<sup>[22]</sup>。肝源性糖尿病的发生是胰岛素抵抗(insulin resistance,IR)及分泌进行性损害的共同结果,IR 的具体机制目前尚不明确,国外研究发现 IR 产生的原因可能为 INSR 表达的下调,降低组织对胰岛素生理作用的敏感性,并发现了一些可以下调其表达的蛋白,如 AMP 激活的蛋白激酶抑制剂(AICAR)等<sup>[23]</sup>。临床上也有报告肝硬化糖耐量减退者,肝细胞、脂肪细胞和肌肉细胞胰岛素受体数及亲和力降低,使胰岛素外周效应减弱。我们使用报告基因技术在转录水平验证了前-S2 蛋白可以抑制 INSR 启动子的活性<sup>[24]</sup>,使用 real-time PCR 技术明确了转染前-S2 蛋白表达质粒后,肝细胞(HepG2)INSR mRNA 明显降低,加入前-S2 抗体后,INSR mRNA 的表达水平部分恢复<sup>[25]</sup>。推测前-S2 蛋白与 INSR 基因的顺式作用元件结合,下调 INSR 基因的表达,导致外周组织的胰岛素抵抗,诱发肝源性糖尿病。

### 三、小结

综上所述,HBV 表面蛋白具有多种功能,参与了 HBV 完整的生活周期,引起肝细胞炎症损伤、恶性化的整个过程,其中反式调节发挥了至关重要的作用。通过寻找肝细胞中表面蛋白的反式调节作用蛋白,并进一步探明其机理,有助于更加深刻的理解 HBV 致病(癌)的分子生物学机制及促进抗病毒药物、抗肿瘤治疗方案的发展。

### 参 考 文 献

- 1 McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*,2009,49:S45-55.
- 2 Holness G, Carriero DC, Dieterich DT. Hepatitis B therapies and antiviral resistance detection and management. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*,2009,3:693-699.
- 3 Shi YH, Shi CH. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*,2009,15:3099-3105.

- 4 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第3版. 北京:人民卫生出版社. 2006;245-259.
- 5 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. 世界华人消化杂志,2003,11:888-896.
- 6 Patient R, Hourieux C, Roingear P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. Cell Microbiol,2009, 11:1561-1570.
- 7 Patient R, Hourieux C, Sizaret PY. Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. J Virol,2007,81:3842-3851.
- 8 高霞, 李卓成, 余吉佳, 等. 乙肝病毒 Pre-S1 检测在乙型肝炎诊断中的作用. 现代医学,2009,37:289-291.
- 9 Kim HS, Ryu CJ, Hong HJ. Hepatitis B virus preS1 functions as a transcriptional activation domain. J Gen Virol,1997,78:1083-1086.
- 10 成军, 刘妍, 洪源, 等. 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究. 世界华人消化杂志,2003, 11:1245-1247.
- 11 Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. Virus Res,2004,106:199-209.
- 12 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志,2002,10:125-128.
- 13 刘妍, 成军, 陆荫英, 等. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志,2002,10:217-219.
- 14 Hartmann-Stuhler C, Prange R. Hepatitis B virus large envelope protein interacts with g2-Adaptin, a clathrin adaptor-related protein. J Virol,2001,75:5343-5351.
- 15 Hu YP, Yao YC, Li JX, et al. The cloning of 3 truncated preS/S gene from HBV genomic DNA and its expression in transgenic mice. World J Gastroenterol,2000,6:734-737.
- 16 刘妍, 成军. HBV 截短的表面抗原蛋白 MHBst 的反式激活作用. 国外医学病毒学分册 2000,7:190-193.
- 17 Henkler FF, Koshy R. Hepatitis B virus transcriptional activators: mechanisms and possible role in oncogenesis. J Viral Hepat, 1996,3:109-121.
- 18 Ji D, Cheng J, Chen GF, et al. Study of transactivating effect of pre-S2 protein of hepatitis B virus and cloning of genes transactivated by pre-S2 protein with suppression subtractive hybridization. World J Gastroenterol,2005,11:5438-5443.
- 19 纪冬, 成军, 董菁, 等. 应用基因表达谱芯片技术筛选 HBV 前-S2 蛋白反式调节基因. 世界华人消化杂志,2004,12: 1559-1563.
- 20 Stockl L, Berting A, Malkowski B, et al. Integrity of c-Raf-1/MEK signal transduction cascade is essential for hepatitis B virus gene expression. Oncogene,2003,22:2604-2610.
- 21 纪冬, 成军, 郭江, 等. 乙型肝炎病毒前-S2 蛋白对硫氧还蛋白还原酶 1 基因表达的上调作用研究. 解放军医学杂志, 2004,29:677-679.
- 22 郭凤劲, 成军, 纪冬, 等. 乙型肝炎病毒前-S2 蛋白下调诱导型一氧化氮合酶基因启动子的转录活性. 中华肝脏病杂志, 2005,13:749-753.
- 23 Nakamaru K, Matsumoto K, Taguchi T, et al. AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase, down-regulates the insulin receptor expression in HepG2 cells. Biochem Biophys Res Commun,2005,328:449-454.
- 24 纪冬, 韩萍, 张健, 等. 乙型肝炎病毒前 S2 蛋白下调胰岛素受体启动子的研究. 中华医学杂志,2009,89:3069-3073.
- 25 苏何玲, 纪冬, 韩萍, 等. HBV 前 S2 蛋白对胰岛素受体基因下调作用的研究. 解放军医学杂志,2009,34:672-676.

(收稿日期:2010-03-08)

(本文编辑:孙荣华)

纪冬,徐东平,辛绍杰. 乙型肝炎病毒表面蛋白反式调节作用的研究进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2010,4(2):182-185.