

- IGF- II, p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in tree shrews. *World J Gastroenterol* 2000;6:138-139
- 5 Cheng ML, Wu YY, Huang KF, Luo TY, Ding YS, Lu YY, Liu RC, Wu J. Clinical study on the treatment of liver fibrosis due to hepatitis B by IFN- α (1) and traditional medicine preparation. *World J Gastroenterol* 1999;5:267-269
- 6 Tang RX, Gao FG, Zeng LY, Wang YW, Wang YL. Detection of HBV DNA and its existence status in liver tissues and peripheral blood lymphocytes from chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol* 1999;5:359-361
- 7 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:213-215
- 8 Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Posttranscriptional regulation of hepatitis B virus replication by the precore protein. *J Virol* 1997;71:345-353
- 9 Metzger K, Bringas R. Proline-138 is essential for the assembly of hepatitis B virus core protein. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 3):587-590
- 10 Conway JF, Cheng N, Zlotnick A, Stahl SJ, Wingfield PT, Steven AC. Localization of the N terminus of hepatitis B virus capsid protein by peptide-based difference mapping from cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14622-14627
- 11 Konig S, Beterams G, Nassal M. Mapping of homologous interaction sites in the hepatitis B virus core protein. *J Virol* 1998;72:4997-5005
- 12 Kratz PA, Bottcher B, Nassal M. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:1915-1920
- 13 Borisova G, Borschukova O, Skrastina D, Dislers A, Ose V, Pumpens P, Grens E. Behavior of a short pre S1 epitope on the surface of hepatitis B core particles. *Biol Chem* 1999;380:315-324
- 14 孙殿兴, 胡学玲, 胡大荣. 乙型肝炎病毒核心蛋白作为免疫载体的结构与功能基础. *国外医学病毒学分册* 2000;7:151-155
- 15 孙殿兴, 胡大荣, 邬光惠. HBV 核心蛋白结构与功能及其在基因治疗策略上的应用. *国外医学·流行病学传染病学分册* 2001;28:19-24
- 16 Huang CJ, Chen YH, Ting LP. Hepatitis B virus core protein interacts with the C-terminal region of actin-binding protein. *J Biomed Sci* 2000;7:160-168
- 17 Kau JH, Ting LP. Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J Virol* 1998;72:3796-3803
- 18 Daub H, Blencke S, Habenberger P, Kurtenbach A, Dennenmoser J, Wissing J, Ullrich A, Cotten M. Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol* 2002;76:8124-8137
- 19 Poisson F, Severac A, Hourieux C, Goudeau A, Roingeard P. Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle. *Virology* 1997;228:115-120

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

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039 国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 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(8):1245-1247
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1245.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的感染, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生、发展过程密切相关^[1-5]. 病毒进入到肝细胞之后, 肝炎病毒蛋白在肝细胞内不是孤立存在的, 病毒基因组在肝细胞内具有两种调控方式: 其一是顺式调节, 如启动子及增强子序列, 以直接方式影响另外一些基因组的功能, 是基因组内部调节方式; 其二是反式调节, 即基因组中一部分基因片段通过其转录或翻译产物产生对另一部分基因片段表达的调节方式, 如病毒基因组表达的反式激活蛋白, 以其表达产物的间接方式参与另外一些基因的功能调节, 可以对基因组内部的基因片段, 甚至可以对另外细胞或病毒的基因组有调控作用. 这种病毒蛋白对肝细胞基因组的反式调节作用, 影响了肝细胞的基因表达谱, 是病毒感染慢性化以及引起感染的肝细胞发生恶性转化的重要的分子生物学机制之一^[6-8].

1 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白(MHBst)的反式调节
近年研究发现, 从肝癌细胞系或肝癌组织甚至是外周血中克隆出的截短型前-S2/S基因表达产物羧基末端的截短型分子MHBst, 能够调控肝细胞某些基因表达从而影响细胞生长调节, 也具有反式激活功能. MHBst的反式激活效应可能与蛋白激酶C(PKC)依赖的信号传导途径有关, 前-S2区域与PKC α/β 结合发生磷酸化反应, 触发PKC依赖的c-Raf-1/MAP2-激酶信号传递链式反应, 结果激活了转录因子如激活蛋白-1(AP-1)、细胞核因子- κ B(NF- κ 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反应和肝细胞癌的发生^[9-15].

这种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, 未能进入分泌途径而在ER滞留, 其前-S2区指向胞质区, 从而有机会与胞质蛋白相互作用, 发挥其广泛的反式激活效应; 全长的乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白(MHBs)的前-S2区指向ER腔, 进入高尔基复合体而分泌. 所以说MHBst的反式激活功能依赖于其N-末端前-S2区的胞质定位功能. 具有反式激活功能的截短位点是在一定的范围之内, 缺失突变的范围是决定该截短型分子是否具有反式激活作用的重要因素, MHBst至少完全缺失蛋白C-末端S区的疏水区III, 才具有反式激活功能; S区的N-末端疏水区I是反式激活所必需的, 因为蛋白与膜的结合是转录激活功能所必需的, 这段核苷酸序列被称为“反式活性开启区”(trans-activity-on region, TAO). 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(aa), MHBst53是其中最小的转录激活因子, 是一种非膜结合类型的MHBst, 就是说, 仅前-S2区(1-55 aa)就足以介导反式效应, 说明作为反式激活因子的MHBst大小范围是很大的^[16-23].

羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白表现出一定的反式激活作用. MHBst 反式激活剂可以分成2种不同的类型:一种是内质网分布型,其代表是羧基末端截短76 aa的乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白(MHBst76),一种是细胞质分布型,代表是羧基末端截短63 aa的乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白(MHBst63). Hildt et al^[24]利用杆状病毒载体-昆虫细胞系表达系统表达了MHBst76和MHBst63蛋白,经过层析纯化以后可以获得高纯度的蛋白.从转染的HepG2细胞中也可以表达和纯化得到MHBst76蛋白.2种表达系统获得的重组MHBst蛋白都是未经糖基化修饰的蛋白类型.进一步的分析结果表明,以昆虫Sf9细胞系表达、纯化的MHBst76是N-端发生乙酰化、磷酸化、硫酸化修饰的蛋白.这些重组的蛋白导入细胞之后具有明显的反式激活作用.Sf9、HepG2不同细胞系表达的MHBst在反式激活作用上没有显著的差别.因此,重组MHBst蛋白的表达和纯化,为研究MHBst的反式激活作用提供了很好的物质基础.以昆虫细胞系Sf9表达的MHBst76是内质网膜相关的蛋白,在高尔基体中滞留并加工、分泌.因此表达MHBst76的Sf9的微粒体组分导入到的肝细胞Chang细胞中时,即表现出显著的反式激活作用.相反,全长的MHBs蛋白不具备这一功能.MHBst76是一种非糖基化的蛋白类型,这种蛋白的糖基化修饰并不是其反式激活作用所必须具备的结构特征.因为第4位上的天门冬氨酸残基的突变并不影响其反式激活功能.从大肠杆菌中分离纯化的重组MHBst76蛋白也具有相应的反式激活作用.因此认为非糖基化的MHBst76蛋白是其存在的一个基本型.

为了进一步研究MHBst的反式激活功能,筛选和克隆其反式激活的靶基因,我们选择编码167位氨基酸残基以后的羧基末端截短分子-MHBst167,构建其真核表达载体,并证明在真核细胞中瞬时表达的MHBst蛋白具有反式激活作用^[22].我们用抑制性消减杂交(SSH)方法成功地构建了MHBst反式激活相关基因差异表达的cDNA消减文库,对于得到的50个克隆进行生物信息学分析,其中4个克隆未检索到任何对应的相似序列,可能代表了MHBst反式激活新的靶基因,进一步的分析和功能鉴定正在进行中.另外还发现肿瘤发生密切相关的基因如c-myc,进一步用免疫印迹方法以抗c-myc的单克隆抗体验证MHBst对c-myc基因表达的上调作用,结果显示c-myc是MHBst反式激活作用的靶基因.c-myc基因是人的正常细胞基因组中一种高度保守的细胞癌基因,具有能够使正常细胞发生恶性转化的潜能.在大部分情况下,处于不表达状态或表达水平不足以引起细胞恶性转化.癌基因激活方式有多种,常见的如基因放大,基因突变,异源启动子表达,基因重排,基因过表达以及截短形式多肽的表达.我们的研究结果显示MHBst对c-myc基因的表达具有上调作用,对于阐明MHBst反式激活作用及其在HBV感染的慢性

化及肝细胞癌发生之间的作用具有重要理论意义^[23].

2 乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白(LHBs)的反式调节研究发现,乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白(LHBs)同MHBst相似,具有同样的反式激活效应,并且也是与依赖于PKC的信号传导途径有关,引发下游c-Raf-1/MAP2-激酶信号传递链式反应,从而激活了转录因子AP-1、NF- κ B等,调控细胞异常增生,引发HCC的发生^[24].LHBs的反式激活作用与其独特的拓扑结构密切相关,研究显示,LHBs的前-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.LHBs转基因鼠的肝细胞呈现毛玻璃样,与其持续过表达,转录反式激活病毒的启动子元件而促进病毒复制密切相关.可见LHBs是一种多功能的蛋白质,其反式激活作用对于阐明HBsAg携带者发生HCC的分子生物学机制具有重要意义^[25,26].

LHBs和MHBst构成了前-S2基因编码的HBV反式激活蛋白家族.这些反式激活蛋白的反式激活作用都是由前-S2蛋白位点在细胞质中的朝向所决定的.MHBst反式激活剂是PKC依赖性的,也是第28位上的丝氨酸位点依赖性的.磷酸化位点的完整性是其反式激活作用的机构基础.MHBst触发PKC依赖性的c-Raf-1/Erk2信号转导系统,进而激活转录因子AP-1和NF- κ B.

3 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活的原理

目前的研究结果表明,约三分之一的HCC组织中有HBV DNA的整合,并产生3'-末端截短型的反式激活蛋白.MHBst并不是分泌型的MHBs,在分泌过程中滞留在ER中,因此考虑到在细胞内的朝向是否决定其反式激活作用.通过融合蛋白表达的策略,将MHBs编码全长基因与ER定位信号肽序列KDEL融合,结果表明仅是将完整的MHBs滞留在ER中,并不能产生反式激活作用.应用蛋白酶对于微粒体中的蛋白成分进行降解,表明MHBst的氨基末端部分直接朝向胞质一侧,而MHBs蛋白分子中的氨基末端是朝向ER腔的.这一结构特点在一定程度上解释了MHBst蛋白的反式激活作用,而MHBs不具备反式激活作用的原因.通过缺失突变分析,证明MHBst的非膜相关部分也与其反式激活作用有关,表明非膜相关的MHBst蛋白代表了第二种类型的MHBst反式激活蛋白.这些具有反式激活作用的MHBst在细胞内均匀分布,在功能上与膜相关性MHBst蛋白并没有差别.MHBst53是目前为止已经发现的最小的反式激活作用蛋白.这2种类型的反式激活蛋白分子都能在生理条件下相互结合成同二聚体形

式, 形成二聚体相关的结构基础也是 MHBst 蛋白反式激活作用的先决条件. 提示 MHBst 的二聚体化与反式激活功能之间是密切相关的^[27-29]. MHBst 与报告基因质粒 pSV2CAT 的共转染实验研究结果表明, 前 -S2/S 基因的缺失范围达到第 III 疏水区时才具备反式激活功能. 缺失第 II 疏水区, 甚至是全部的 S 区之后, 也不影响其反式激活作用. 如果缺失突变涉及到疏水区 I, 则反式激活作用消失. 因此 HBV DNA 的 221-573 nt 之间的核苷酸区域与其反式激活作用密切相关.

MHBst 具有广泛的反式激活作用, 对于原癌基因 c-myc、c-fos 都具有显著的反式激活作用. 因此, MHBst 反式激活蛋白是以影响转录因子蛋白 AP-1 的活性来实现其转录调节的. 如果在 c-myc 基因启动子序列中将 AP-1 转录因子蛋白的结合位点序列缺失掉, 那么 MHBst 反式激活蛋白对于原癌基因 c-myc 的反式调节作用就受到显著影响. 对于 MHBst 反式激活作用的机制进行研究发现: 第一, 在一种 MHBst 反式激活没有应答的基因启动子序列中, 如果加入 AP-1 转录因子蛋白是别的核苷酸序列, 那么这种基因的表达就获得了被 MHBst 反式激活的能力; 第二, 利用 MHBst 表达质粒的共转染实验研究结果表明, AP-1 可以显著提高 c-jun 和 c-fos 的表达活性; 第三, 转录因子激活的 AP-1 抑制因子, 可以减弱 MHBst 的反式激活作用效果. 除了 AP-1 之外, MHBst 还能利用对 NF- κ B 和 AP-2 的调节实现其反式激活作用. 说明 MHBst 反式激活蛋白可以通过几种不同的机制对于基因表达的类型和水平进行调控. 因为 AP-1 调节的靶基因类型中有许多是与肿瘤有关的基因类型, 这就不难理解 MHBst 在 HCC 的形成过程中具有十分重要的意义^[30, 31].

4 参考文献

- 1 Yu SJ. A comparative study on proliferating activity between HBV related and HCV related small HCC. *China Natl J New Gastroenterol* 1997;3:236-237
- 2 Guo SP, Ma ZS, Wang WL. Construction of eukaryotic expression vector of HBV x gene. *World J Gastroenterol* 1999;5:351-352
- 3 Tang RX, Gao FG, Zeng LY, Wang YW, Wang YL. Detection of HBV DNA and its existence status in liver tissues and peripheral blood lymphocytes from chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol* 1999;5:359-361
- 4 Qin LL, Su JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yian RQ. Expression of IGF- II, p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in tree shrews. *World J Gastroenterol* 2000;6:138-139
- 5 Wang Y, Liu H, Zhou Q, Li X. Analysis of point mutation in site 1896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- 6 Wang JY, Wang XL, Liu P. Detection of serum TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-8 in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 1999;5:38-40
- 7 Liu YJ, Cong WM, Xie TP, Wang H, Shen F, Guo YJ, Chen H, Wu MC. Detecting the localization of hepatitis B and C virus in hepatocellular carcinoma by double in situ hybridization. *China Natl J New Gastroenterol* 1996;2:187-189
- 8 Zhu HZ, Cheng GX, Chen JQ, Kuang SY, Cheng Y, Zhang XL, Li HD, Xu SF, Shi JQ, Qian GS, Gu JR. Preliminary study on the production of transgenic mice harboring hepatitis B virus X gene. *World J Gastroenterol* 1998;4:536-539
- 9 Murakami S, Cheong J, Ohno S, Matsushima K, Kaneko S. Transactivation of human hepatitis B virus X protein, HBx, operates through a mechanism distinct from protein kinase C and okadaic acid activation pathways. *Virology* 1994;199:243-246
- 10 Yu DY, Moon HB, Son JK, Jeong S, Yu SL, Yoon H, Han YM, Lee CS, Park JS, Lee CH, Hyun BH, Murakami S, Lee KK. Incidence of hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis B virus X-protein. *J Hepatol* 1999;31:123-132
- 11 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 12 Arii M, Takada S, Koike K. Identification of three essential regions of hepatitis B virus X protein for trans-activation function. *Oncogene* 1992;7:397-403
- 13 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及其反式激活功能的影响. *解放军医学杂志* 2002;27:127-129
- 14 Hu YP, Hu WJ, Zheng WC, Li JX, Dai DS, Wang XM, Zhang SZ, Yu HY, Sun W, Hao GR. Establishment of transgenic mouse harboring hepatitis B virus (adr subtype) genomes. *World J Gastroenterol* 2001;7:111-114
- 15 Wang XZ, Tao QM. Hepatitis B X gene and hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1063-1064
- 16 Caselmann WH. Transactivation of cellular gene expression by hepatitis B viral proteins: a possible molecular mechanism of hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 1995;22(Suppl 1):34-37
- 17 Bangur CS, Switzer A, Fan L, Marton MJ, Meyer MR, Wang T. Identification of genes over-expressed in small cell lung carcinoma using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray expression analysis. *Oncogene* 2002;21:3814-3825
- 18 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. *解放军医学杂志* 2001;26:404-406
- 19 Hu YP, Yao YC, Li JX, Wang XM, Li H, Wang ZH, Lei ZH. 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
- 20 刘妍, 成军. HBV 截短的表面抗原蛋白 MHBs' 的反式激活作用. *国外医学病毒学分册* 2000;7:190-193
- 21 Caselmann WH, Renner M, Schluter V, Hofschneider PH, Koshy R, Meyer M. The hepatitis B virus MHBst167 protein is a pleiotropic transactivator mediating its effect via ubiquitous cellular transcription factors. *J Gen Virol* 1997;78:1478-1495
- 22 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙肝病毒表面抗原蛋白反式激活作用的初步研究. *肝脏* 2001;6:8-10
- 23 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c-myc 基因表达的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:141-144
- 24 Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* 1996;225:235-239
- 25 Wu GH, Huang YX, Fan GR, Zhang GX. Serum transformation growth factor β 1 in patients with hepatitis B. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:505-506
- 26 Hartmann-Stuhler C, Prange R. Hepatitis B virus large envelope protein interacts with γ 2-Adaptin, a clathrin adaptor-related protein. *J Virol* 2001;75:5343-5351
- 27 Kim HS, Ryu CJ, Hong HJ. Hepatitis B virus preS1 functions as a transcriptional activation domain. *J Gen Virol* 1997;78:(Pt 5)1083-1086
- 28 Huang YX, Wu GH. Relationship between hepatitis B and liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:682-685
- 29 Min F, Hao F. Hepatitis B virus envelope protein and protective immunity. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1065-1067
- 30 Yan JC, Chen WB, Ma Y, Tian RX, Ding TL, Xu CJ. Relationship between transforming growth factor beta-1 and vascular diseases in hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:751-754
- 31 Kojima N, Horiike N, Michitaka K, Onji M. In situ detection of mutated hepatitis B virus in microdissected, formalin-fixed liver tissues from patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1999;30:359-365