

乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白结合蛋白研究进展

李志群, 成军, 马英骥

李志群, 马英骥, 黑龙江省哈尔滨医科大学第一临床附属医院传染科
黑龙江省哈尔滨市 150001
成军, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
通讯作者: 成军, 100011, 北京市, 北京地坛医院传染病研究所.
cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-11-18 接受日期: 2005-05-25

摘要

目前对乙型肝炎病毒(HBV)感染引起的急性、慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌的治疗, 还没有理想的疗效. 利用新型技术对HBV感染肝细胞的相关受体蛋白进行研究, 即对HBV表面抗原中蛋白结合蛋白进行筛选是一个重要的研究方向. HBV进入肝细胞之后, 其基因组在肝细胞内具有顺式和反式两种调控方式. HBV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, 从而对肝细胞的生长、代谢及恶性转化产生重要影响. 研究羧基末端截短的表面抗原中蛋白的结合蛋白可能是阐明HBV感染慢性化及引起肝细胞癌的重要分子生物学机制之一.

李志群, 成军, 马英骥. 乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白结合蛋白研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(15):2026-2028
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2026.asp>

0 引言

全世界有3.5亿乙型肝炎病毒(HBV)感染者. 通过对特定慢性HBV感染者血清中不同的HBV病毒基因克隆序列的比较提出了HBV准种特点, 野生型病毒之间、野生型病毒与突变型病毒之间、突变型病毒之间的反式调节机制是各种类型的缺陷型HBV存在的重要条件和机制, 也是HBV感染引起肝细胞癌(HCC)的重要分子生物学机制. 外周血中羧基末端截短的表面抗原中蛋白(MHBst)的编码基因的发现, 使我们对于HBV基因编码的反式激活蛋白的类型有了新的认识. 我们应用长距离精确聚合酶链反应(LA-PCR)技术克隆的HBV DNA全长序列, 是我国流行的adr亚型的HBV DNA全基因序列, 代表了真正存在的HBV的基因全长序列, 在HBV基因结构与功能的研究中, 以及在抗HBV治疗疗效应答的研究中具有重要的理论和实际应用价值^[1].

1 HBV基因组结构

HBV基因组具有独特而精密的结构, 为一不完整的小环状双链DNA, 约含3 200核苷酸, 双链的长度不对称. 其一为长链(负链), 长约3 200 bp, 为固定长度, 成链较完整, 仅有一固定的小缺口. 短链(正链)长度可变, 为长链的50-100%, 链上有长短不等的缺段. 内源性DNAP

可修补短链而形成长短不一的核苷酸链, 据称HBV DNA的特殊结构可能与其容易引起持续性感染以及与宿主细胞染色体整合有关. HBV核苷酸序列至少有4个开放读码区(open reading frame, ORF), 亦即S基因区、C基因区、P基因区和X基因区^[2].

HBV负链包含4个ORF, 即前-S/S ORF、前-C/C ORF、聚合酶ORF和X ORF. 前-S/S ORF编码的HBsAg包括小(SHBs), 中(MHBs)和大(LHBs)蛋白, 他们都有糖基化和非糖基化两种形式. SHBs由226个氨基酸残基组成, 是3种HBsAg相关蛋白中含量最丰富的一种, 含有较多半胱氨酸残基, 他们相互交叉连接, 形成构像性襻状结构, 称为HBsAg的主要抗原决定簇, 即“a”决定簇, 所有已知HBV分离株的HBsAg均含有此决定簇. “a”决定簇之外还包括相互排斥的亚决定簇d/y和w/r, 亚决定簇“d”或“y”. 不同的亚决定簇诱导的抗-HBs具有交叉保护性.

MHBs由前-S2和SHBs组成, 前-S2是SHBs的N-末端延伸, 长约55个氨基酸残基, 其中心部分携带着主要的抗原表位, 但与SHBs不同, 其免疫表位为非构像依赖性, 并且MHBs也不是病毒颗粒组装和释放所必需的. MHBs第3-16位氨基酸残基区域能够与多聚人血清白蛋白(pHSA)结合, 这种结合的意义目前还不清楚. 由于MHBs在B细胞水平的免疫原性比SHBs强, 有些国家已用动物细胞系生产含前-S2的HBsAg, 并已作为疫苗应用于临床^[3].

2 截短型HBV表面抗原中蛋白(MHBst)的反式调节

HBV基因组编码的蛋白作为反式激活因子对肝细胞某些基因表达调控的影响可能是HBV致癌的主要因素. 早期研究多集中在整合的病毒DNA编码的HBxAg蛋白的功能上, 证实HBxAg蛋白是一种具有广泛活性的反式激活因子, 与乙型肝炎的慢性化和促进肝细胞的恶性转化有密切关系; 近年研究发现, 从肝癌细胞系或肝癌组织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也具有反式激活功能. 编码的MHBst167是一种反式激活因子, 而全长的MHBs无此功能^[4].

目前研究表明, MHBs的反式激活效应可能与蛋白激酶C(PKC)依赖的信号转导途径有关, 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-激酶信号转导链式反应, 结果激活了转录因子如AP-1、NF- κ B、AP-2、SRE、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. MHB_s¹ 蛋白结构的改变, 缺失了位于 C-末端的膜定位信号, 使 MHB_s¹ 未能进入分泌途径而在内质网 (ER) 中滞留, 其前-S2 区指向胞质区与胞质蛋白相互作用, 产生转录激活功能; 而全长的 MHBs 蛋白的前-S2 区指向 ER 腔, 进入高尔基复合体而分泌. 所以说 MHB_s¹ 的反式激活功能依赖于其 N-末端前-S2 区的胞质定位功能. 而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, MHB_s¹ 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, 这段序列被称为“反式活性开启区”(trans-activity-on region, TA0)^[5-9]. 进一步研究表明, MHB_s¹ 的最小反式激活单元定位于 4-53 氨基酸残基, MHB_s⁴⁵³ 是其中最小的转录激活因子, 是一种非膜结合类型的 MHB_s¹, 就是说, 仅前-S2 区(aa 1-55) 就足以介导反式效应, 说明作为反式激活剂的 MHB_s¹ 大小范围是很大的. 我们目前正在构建不同截短范围的表达载体, 进一步研究 MHB_s¹ 的反式激活功能, 筛选和克隆其反式激活的靶基因^[10-16]. 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 种不同类型^[17]: 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).

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'-末端截短型反式激活蛋白. MHBst 并不是分泌型 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细胞质一侧, 而 MHBs 蛋白分子中的氨基末端朝向 ER 腔. 这一结构特点在一定程度上解释了 MHBst 蛋白具备反式激活作用, 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 2 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^[18-19]. 近年研究发现, 从肝癌细胞系或肝癌组织中亚克隆出的截短型前-S2/S 基因表达产物羧基末端的截短型分子 MHB_s¹ 也具有反式激活功能. 人们笃信只有整合在肝细

胞基因组中的 HBV 才编码截短型的 MHB_s¹, 在 HBV 相关性的 HCC 中具有重要作用. 我们第一次在外周血循环中检测到了 MHB_s¹ 的存在, 对于研究和了解 MHB_s¹ 在 HCC 形成过成中的作用具有重要的意义. 我们构建了一种含有约 500 bp MHBst167 基因的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-Mt, 该基因编码的 MHBs¹ 167 位氨基酸残基以后的羧基末端截短 pcDNA3.1(-)-Mt 瞬时转染 COS-7 细胞, 用前-S2 单克隆抗体检测到截短型蛋白 MHB_s¹⁶⁷ 的表达, 并且 1:32 倍稀释还可检测到 MHB_s¹⁶⁷ 蛋白阳性. 与报告质粒 pSV-lacZ 共转染 COS-7 细胞, 明显促进 β-gal 的表达, 证明 pcDNA3.1(-)-Mt 能增强 pSV-lacZ 的 SV40 启动子的功能, 编码的 MHB_s¹⁶⁷ 是一种反式激活因子, 而全长的 MHBs 无此功能^[20-26].

4 肝炎病毒蛋白反式激活肝细胞靶基因的克隆化

HBV 的基因突变几乎包括了基因突变的所有类型. HBV 在其复制的 DNA-RNA-DNA 的过程中, 由于存在着转录与逆转录的过程, HBV DNA 聚合酶缺乏严密的校读功能, 因而存在基因变异. HBV DNA 发生变异, 首先是 HBV DNA 复制过程中存在校读偏差, 这是 HBV DNA 序列异质性存在的内因, 其次 HBV 还要受到机体的免疫系统及抗病毒药物的选择压力等外因的影响. 变异是绝对的, 变异的程度和速度是相对的. 我们在 HBV 感染者的外周血中还发现了具有反式激活功能的 MHBst 缺失突变体, 这一点具有十分重要的生物学意义^[27]. 因为在此之前, 关于具有反式激活功能的 MHBst 都是在 HBV DNA 阳性的肝细胞癌组织中发现的, 而在外周血中发现 MHBst 是第一次, 为慢性 HBV 感染引起的肝细胞恶性转化的机制研究提供了新的方向^[28-29].

5 肝炎病毒蛋白结合的肝细胞蛋白基因的克隆化研究

为了阐明肝炎病毒蛋白与肝细胞蛋白之间的相互作用, 发现慢性病毒性肝炎发病机制研究的新线索, 我们利用酵母双杂交技术对于肝炎病毒蛋白结合的肝细胞蛋白的基因进行了克隆化研究. 首先将 MHBs, MHBst 蛋白的编码基因克隆到酵母表达载体 pGBKT7, 转化酵母细胞 AH109, 并以 Western blot 杂交技术证实目的蛋白的表达. 将转化的 AH109 酵母细胞培养至 10⁹ 数量级, 然后与含有肝细胞 cDNA 文库级的酵母细胞进行配合, 再在缺陷型培养基中进行选择培养. 从能够生长的 36 个克隆中提取质粒 DNA, 结合生物信息学技术手段进行序列分析.

乙型肝炎病毒表面抗原蛋白包括前-S1、前-S2 和 S 蛋白, 是 HBV 结合肝细胞膜上特异性受体的主要蛋白成分, 但 HBV 特异性肝细胞受体目前还没有确定^[30-33]. 研究表明, 前-S1 蛋白在 HBV 结合与感染肝细胞的过程中具有十分重要的作用. 在 HBV 感染的肝细胞中, HBV 的表面抗原包括前-S1 蛋白组分与肝细胞蛋白能够结合, 形成异种蛋白复合物, 对于 HBV 及肝细胞本身产生影响. 我们应

用噬菌体表面展示(phage display)技术,以固相化的前-S1蛋白,对于含有肝细胞基因的噬菌体文库进行筛选,获得了HBV前-S1蛋白的结合蛋白,使我们对于HBV表面抗原前-S1蛋白在慢性乙型肝炎的发病机制中的作用有了新的认识^[34]。因此研究MHBst的反式激活功能,有利于阐明HBV感染的慢性化和肝细胞癌形成的机制,同时也是探索治疗HBV感染新途径的一个重要突破口。

5 参考文献

- 1 成军, 董青. 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识. 世界华人消化杂志 2003;11:1073-1080
- 2 张官俊, 章谷生. 乙型肝炎生物治疗. 上海科学技术出版社, 2001: 1-3
- 3 张继明, 翁心华. 乙型肝炎病毒及其常见的基因突变. 肝脏 2003; 8:45-47
- 4 董青, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 刘妍, 夏小兵, 斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜蛋白基因的克隆化与序列分析. 中华肝脏病杂志 2001;9:163-165
- 5 董青, 施双双, 张国庆, 皇甫尧坤, 成军, 王勤环, 李莉. 乙型肝炎病毒表面抗原/抗体同时阳性患者体内S基因序列的分析研究. 中国公共卫生 2002;18:535-537
- 6 董青, 刘妍, 皇甫尧坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原一级结构多态性的初步研究. 胃肠病学和肝病杂志 2002;11:130-135
- 7 陆荫英, 成军, 张玲霞. 分子伴侣及其与乙型肝炎病毒的关系. 胃肠病学和肝病杂志 2002;11:177-180
- 8 成军. 抗肝炎病毒序贯治疗方案的研究进展. 国外医学·病毒学分册 2002;9:75-79
- 9 陆荫英, 王琳, 刘妍, 丁敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙型肝炎病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙型肝炎病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 10 Deng H, Dong J, Cheng J, Huangfu JK, Shi SS, Hong Y, Ren XM, Li L. Quasispecies groups in the core promoter region of hepatitis B virus. *Hepatobil Pancreatic Dis Int* 2002;1:392-396
- 11 钟彦伟, 成军, 施双双, 赵景民, 王刚, 夏小兵, 田小军, 李莉, 张玲霞. HBsAg人源噬菌体单链抗体的筛选及其在临床治疗和诊断中的应用. 中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:223-225
- 12 董青, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 郎振为, 皇甫尧坤, 李莉, 斯崇文. HBsAg中蛋白与IL-18联合核酸免疫HBsAg转基因小鼠的实验研究. 中华微生物学与免疫学杂志 2002;22:518-519
- 13 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV核心蛋白与截短型HBV表面抗原中蛋白协同反式激活功能. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-357
- 14 陆荫英, 李克, 刘妍, 成军, 王琳, 王业东, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前S2基因酵母表达载体的构建及表达. 胃肠病学和肝病杂志 2002;11:222-224
- 15 陆荫英, 王琳, 刘妍, 丁敏, 李克, 张玲霞, 王业东, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原单链抗体细胞内免疫抗乙型肝炎病毒基因治疗研究. 军队进修学院学报 2003;24:49-51
- 16 吴欣, 黄祖刚, 成军, 吴兴柳, 董青, 陆北川. 白细胞介素-12和白细胞介素-18质粒对HBsAg DNA疫苗诱导小鼠(H-2~d)体液免疫应答的影响. 南京医科大学学报(自然科学版) 2002;22:284-287
- 17 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: 1245-1247
- 18 Li H, Wang L, Wang SS, Gong J, Zeng XJ, Li RC, Nong Y, Huang YK, Chen XR, Huang ZN. Research on optimal immunization strategies for hepatitis B in different endemic areas in China. *World J Gastroenterol* 2000;6:392-394
- 19 焦成松, 周永兴, 朱德生, 贾战生, 冯志华. 乙型肝炎病毒S基因经显微注射导入SMMC-7721细胞核内的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:25-27
- 20 董青, 施双双, 张国庆, 皇甫尧坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒C基因启动了区异质性检测初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
- 21 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前S1基因酵母表达载体的构建及表达. 解放军医学杂志 2002;27:341-342
- 22 董青, 施双双, 皇甫尧坤, 成军, 王勤环, 王刚, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前C/C基因准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:122-124
- 23 董青, 成军, 王勤环, 刘妍, 王刚, 施双双, 李克, 邵得志, 斯崇文. 乙型肝炎病毒囊膜中蛋白与白细胞介素18联合基因免疫. 中华传染病杂志 2002;20:148-151
- 24 陆荫英, 刘妍. 乙型肝炎病毒X蛋白的功能研究进展. 国外医学·病毒学分册 2002;9:33-36
- 25 王琳, 陆荫英, 成军, 丁敏, 李克, 刘妍. 白细胞介素-18逆转录病毒载体的构建及抗乙型肝炎病毒的研究. 解放军医学杂志 2002; 27:699-701
- 26 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟琳松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型HBsAg中蛋白反式激活基因的克隆. 中华传染病杂志 2002;20:218-221
- 27 Wang XL, Guo H, Li ZZ, Jia SY, Zhang ZR, Liu H. Hemodynamic study of HBV carriers. *World J Gastroenterol* 1998;4 (Suppl 2):85
- 28 黄正明, 杨新波, 曹文斌, 周逸军, 卢立燕. 片灵冲剂治疗慢性乙型肝炎102例的临床研究. 华人消化杂志 1998;6:144-145
- 29 Li H, Wang L, Wang SS, Gong J, Zeng XJ, Li RC, Nong Y, Huang YK, Chen XR, Huang ZN. Research on optimal immunization strategies for hepatitis B in different endemic areas in China. *World J Gastroenterol* 2000;6:392-394
- 30 周俊英, 赵彩彦, 甄真, 冯志军. 病毒性肝炎纤维化与血清IL-1 β 及干扰素- γ 的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:100-101
- 31 You J, Zhuang L, Tang BZ, Yang WB, Ding SY, Li W, Wu RX, Zhang HL, Zhang YM, Yan SM, Zhang L. A randomized controlled clinical trial on the treatment of Thymosinal versus interferon-alpha in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:411-414
- 32 陈文笔, 严家春, 马勇, 沈月萍. 乙型肝炎患者循环血中血管内皮生长因子的含量及其与肝组织肝窦病变的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:1426-1427
- 33 严家春, 陈文笔, 马勇, 刘健虎, 孙新华, 徐长江. 乙型肝炎肝组织血管病变组织及免疫组织化学的研究. 世界华人消化杂志 2000; 8:1205-1210
- 34 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

编辑 张海宁