

# HBV X基因和X蛋白的功能

王小众, 林 纳

王小众, 林纳, 福建医科大学附属协和医院消化研究所 福建省福州市 350001

王小众, 北京大学医学博士毕业, 纽约大学医学院访问医师, 教授, 主任医师, 博士生导师.

福建医科大学科学研究发展基金项目, No. FJGXY 04017

通讯作者: 王小众, 350001, 福州市新权路29号, 福建医科大学附属协和医院消化内科. drwangxz@pub6.fz.fj.cn

电话: 0591-83357896-8482

收稿日期: 2006-06-01 接受日期: 2006-06-14

## 摘要

HBV X基因编码的X蛋白(PX)是一种多功能蛋白, 在HBV感染和肝细胞癌(HCC)发展的不同阶段, 执行不同的生物学功能. PX参与调节病毒复制, 显著影响肝细胞信号传导、新陈代谢、凋亡、细胞因子产生、细胞周期调控和癌基因、抑癌基因等方面基因表达, 干扰线粒体氧化磷酸化等能量代谢过程, 造成细胞氧化损伤, 促进细胞凋亡.

**关键词:** HBV X基因; X蛋白; 反式激活

王小众, 林纳. HBV X基因和X蛋白的功能. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2579-2585

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2579.asp>

## 0 引言

HBV X基因是HBV病毒基因组中最小的开放性读码框, 位于HBV基因组的1374-1838 bp处, 全长435-462 bp, 编码长度为154个氨基酸的蛋白. X基因序列在嗜肝病毒科中高度保守, 提示在HBV生物学功能上具有重要意义. 虽然对X基因和X蛋白(PX)的研究不断深入, 但是确切的功能尚无定论. 研究发现, PX不直接作用于双链DNA, 而是通过和细胞内的多种蛋白相互作用来调节细胞生物学功能. PX作为多功能蛋白, 广泛参与病毒的复制; 宿主细胞的基因调控和表达、蛋白质降解及细胞信号转导等过程; 并可通过影响正常的细胞周期, 干扰DNA的修复及调节肝细胞增殖、分化和凋亡, 在HBV病毒感染及原发性肝细胞癌(HCC)发生、发展中起关键作用.

## 1 X基因及其产物与HBV病毒复制

HBV X基因是病毒基因组的保守区域, 参与调

节病毒复制. PX天然反式激活作用的靶目标是病毒颗粒, 体内研究表明, 这对维持病毒基因的复制和表达十分重要. 将X基因缺陷型HBV转染入细胞后, 病毒复制水平仅为野生型HBV的10%<sup>[1]</sup>. 缺少X基因的Woodchuck HBV病毒无法在宿主细胞内复制或复制水平明显降低, 而在已转染X基因的HepG<sub>2</sub>细胞中, 病毒复制增加了5-10倍<sup>[2]</sup>. Tang *et al*<sup>[3]</sup>将X基因缺陷型HBV病毒转染HepG<sub>2</sub>细胞, 病毒复制、转录均受影响. 通过构建一系列PX突变株的研究发现, PX的C末端2/3氨基酸(51-154位点)是反式激活作用必须的, 也是调节病毒复制的功能区域, 其中52-65位点和88-154位点是关键区域.

Zhang *et al*<sup>[4]</sup>发现, X基因缺失使HBV病毒的复制下降, 加入蛋白酶抑制剂后, 病毒复制水平则大大提高, 甚至达到野生型复制水平, 提示PX可能通过蛋白酶依赖途径调控病毒复制. PX能与细胞内蛋白酶复合物组分结合, 可能通过抑制蛋白酶水解活性, 促进病毒复制. DDB1为细胞保守序列, 参与DNA修复和细胞周期循环的调控. Leupin *et al*<sup>[5]</sup>发现, PX与DDB1结合不仅能调节细胞增殖, 还能调节病毒复制. PX突变后, 失去与DDB1结合的能力, 导致病毒复制、转录处于低水平. 他们还发现, PX与DDB1结合对病毒复制的调控作用主要是在mRNA水平. 此外, PX能激活酪氨酸激酶(Scr)及钙离子信号途径, 通过线粒体PTF, 调节病毒的复制, 而Scr激酶抑制剂和钙离子信号抑制剂可抑制病毒在细胞内的复制. 提示, PX对HBV复制的调控可能涉及钙离子信号和胞质内Scr激酶<sup>[2]</sup>. HBV核心蛋白(HBcAg)对病毒复制至关重要, 其中155, 162和170位点丝氨酸的磷酸化尤其重要, PX通过刺激这些部位的丝氨酸磷酸化促进病毒的复制<sup>[6]</sup>. Zhang *et al*<sup>[7]</sup>通过酵母双杂交系统发现PX能与Hepsin在细胞内结合并相互作用, 在HepG2.2.1.5细胞系中刺激HBsAg的表达, 从而刺激病毒的复制.

## ■背景资料

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是通过逆转录复制基因组的嗜肝DNA病毒家族的一员, HBV感染可致急、慢性肝炎, 并同原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的进展密切相关. HBV具有一个编码16.5 kDa的X蛋白的开放阅读框, 此序列在所有哺乳动物嗜肝DNA病毒中高度保守. X蛋白是一个多功能的调节蛋白, 在HBV感染和HCC发展的不同阶段, 执行不同的生物学功能.

## ■研究前沿

HBV X基因是HBV病毒基因组中最小的开放性读码框,虽然对X基因和X蛋白(PX)的研究不断深入,但是确切的功能尚无定论.研究发现,不同表达量的X蛋白在细胞内的分布不同,提示其执行不同的生物学功能.最新的研究发现,PX可以定位在线粒体上,可能通过与线粒体外膜蛋白作用,增加外膜通透性,降低跨膜电压,干扰线粒体氧化磷酸化等能量代谢过程,造成细胞氧化损伤,促进细胞凋亡.

## 2 X基因及其产物在细胞核中的作用

在宿主细胞中表达的PX通过与一些转录调控蛋白质相互作用,在转录调控水平上激活或抑制靶基因的转录;或者直接通过与胞质蛋白质的相互作用,影响这些蛋白质的功能. HBV X基因转染肝细胞后以激光共聚焦显微镜观察可以发现,当X基因表达弱时,大部分位于胞核内,少量在胞质.当表达水平提高时,主要在胞质累积,包括存在线粒体内<sup>[8]</sup>. PX在细胞内不同的分布,提示其执行不同的生物学功能.真核细胞的基因表达调控主要是转录水平的调控,转录的调节则主要发生在影响转录初始复合体(PIC)的形成上. PIC是由6种普通转录因子即TFIA, TFIB, TFID, TFIE, TFIF和TFIH与RNA聚合酶(pol III)共同组成的聚合体. 众多研究表明, PX能和PIC中多个转录因子直接结合,调节宿主细胞转录.

RNA pol III在转录调控中起主导作用,他本身是由许多亚单位组成的复合体, RBP<sub>5</sub>是一个重要的亚单位,位于转录起始部分附近,能与许多转录调节因子结合. Le *et al*<sup>[9]</sup>用Far-Western方法,以<sup>32</sup>P标记的PX为探针从人肝癌细胞株HepG<sub>2</sub>的cDNA文库中筛选出了PX结合蛋白(XAP),并发现XAP与pol III的亚单位RBP<sub>5</sub>氨基酸序列完全一致. PX通过C末端与RBP<sub>5</sub>中央部分结合,促进细胞转录. 通过对RBP<sub>5</sub>中央部分一系列位点突变的研究发现, F76, I104, T111, S113, V74和N98是结合的关键区域,其中T111和S113与转录起始区域非常接近,因此, PX可能通过调节RBP<sub>5</sub>与DNA的结合来实现对基因的转录调控.

TF II B是重要的普通转录因子,在PIC形成过程中他主要作为桥梁介导pol III和TF II F复合体进入PIC. PX能直接与TF II B结合, PX的51-99位点和TF II B的125-295位点是相互作用的关键区域. 虽然PX与TF II B的作用机制没有明确,但普遍的观点认为, PX能稳定TF II B与DNA的结合,促进转录水平<sup>[10]</sup>. 此外, PX还能与转录因子SP1相互作用,影响其DNA结合能力,下调TF II H两个亚单位XPB(p89)和XPD(p80)的表达,使TF II H修复DNA的功能受损<sup>[11]</sup>. TATA盒结合蛋白(TBP)是唯一能直接结合TATA盒元件的普通转录因子, TBP和TBP协同因子(TAFs)共同组成TF II D. TF II D通过TBP和TF II A-DNA复合物结合,然后陆续接纳pol III和其他普通转录因子,组成PIC. TBP还是许多调节蛋白的结合对象,在转录调节中起十分重要的作用. PX可在ATP存

在的条件下与TBP结合,稳定TBP与TATA盒的结合,增加RNA聚合酶pol III和I的转录活性,提高转录水平<sup>[12]</sup>.

## 3 X基因及其产物在细胞质中的作用

3.1 PX与信号转导 在真核细胞中除了普通转录因子外,还存在许多细胞转录因子,他们主要结合启动子上游的特异DNA序列,起到调节转录的作用. 常见的这一类细胞转录因子如cAMP反应元件结合蛋白(CREB)/活化转录因子(ATF), AP-1, AP-2和NF- $\kappa$ B等,他们被激活后进入细胞核,发挥反式激活作用. 分布于胞质中的PX广泛参与细胞信号转导过程,激活下游的细胞转录因子、凋亡信号等,被认为是PX的重要生物学功能之一. (1)PX与ERK/MAPK途径: Najihara *et al*<sup>[13]</sup>将X基因通过肝细胞特异性病毒颗粒转入正常成年大鼠肝细胞中,发现细胞内的ERK活性增加. Guan *et al*<sup>[14]</sup>将X基因稳定转染HepG<sub>2</sub>细胞, ERK/MAPK信号传递途径的磷酸化程度增强,证明PX能激活ERK/MAPK信号转导途径. 研究发现, X蛋白C区(58-84位点)和D区(85-119位点)是激活ERK/MAPK途径的关键区域,而E区(120-140位点)则是非必要的. Bouchard *et al*<sup>[15]</sup>研究发现, PX能激活FAK, FAK是Src激酶家族的调节因子,能激活Src激酶及下游的MAPK,而FAK的抑制因子能阻止PX对MAPK信号途径的激活. Klein *et al*<sup>[16]</sup>报道, PX可激活Src激酶活性, Src激酶被激活后,促使Ras上游的shc, sos, Grb2及GTP结合到Ras,激活Ras, Ras激活Raf, Raf将上游信息传递给有丝分裂激活蛋白(MAP)激酶,分别通过刺激两种不同的MAP激酶家族调节成员: 细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERKs)和c-Jun末端激酶(JNKs)促进c-Fos和c-Jun的合成,使AP-1结合DNA能力增强,通过结合AP-1启动子上游反应元件的特异序列,使转录水平上调,完成信息传递. 此外, PX激活ERKs和JNKs导致AP-1-c-Fun复合物持久存在, AP-1-c-Fun复合物也将影响细胞的转录水平<sup>[17]</sup>. Su *et al*<sup>[18]</sup>实验证实, PX可通过激活Ras-Raf-MAPK激酶信号途径激活NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B是真核细胞中一类重要的转录调节因子,属于与癌基因v-Rel相关的蛋白家族. 在没有外来刺激因子的情况下, NF- $\kappa$ B与特异性抑制因子结合,以无活性形式存在于胞质中,当受外界信号刺激后, NF- $\kappa$ B与抑制因子分离,活化,向细胞核内转移,特异性结合NF- $\kappa$ B反应元件,促进

转录. PX激活NF- $\kappa$ B, 促使其发挥转录因子的作用, 调节一系列基因的表达. Lee *et al*<sup>[19]</sup>实验发现, 在Hela和Chang细胞中, PX通过激活NF- $\kappa$ B使淋巴毒素 $\alpha$ (LT $\alpha$ )转录水平增高, LT $\alpha$ 是一种细胞炎症因子, 能诱发肝脏炎症反应. NF- $\kappa$ B还上调MMP-9的表达, 在肝癌侵袭和转移过程中起重要作用<sup>[20]</sup>. NF- $\kappa$ B途径下游的uPA与肿瘤侵袭和转移有关. 在PX阳性的肿瘤组织中, NF- $\kappa$ B和uPA的活性明显增高, 肿瘤组织在血管侵袭, 肝内扩散及缺乏完整包膜等方面表现出更高的恶性程度<sup>[21]</sup>. 因此, PX激活NF- $\kappa$ B在HCC的发生和发展过程中起到重要的作用. PX通过Ras/ERK/MAPK途径刺激细胞产生多核、多中心纺锤体和有丝分裂失常, 使细胞DNA生成增多<sup>[22]</sup>. MDR-1, MRP-1和LRP是肿瘤细胞内的抗化疗药物相关基因, 转染X基因的肿瘤细胞这些基因表达明显增多, 用ERK/MAPK途径抑制因子干预细胞, 则抗化疗药基因表达减少, 细胞凋亡增多, 说明PX可能通过激活ERK/MAPK信号通路促使肿瘤细胞表达化疗药物抗性基因, 使细胞耐受化疗药物的攻击<sup>[14]</sup>. (2) PX与PI-3-K途径: PX能抑制TGF- $\beta$ 诱导的凋亡. PX不改变TGF- $\beta$ 受体的表达水平, 也不影响受TGF- $\beta$ 激活的PAI-1基因启动子的活性, 而是只作用于TGF- $\beta$ 本身. 在稳定表达X基因的Hep 3B细胞中, PI-3-K的活性及p85亚基丝氨酸残基磷酸化水平增高, TGF- $\beta$ 介导的细胞凋亡也明显减少. 当加入PI-3-K的抑制剂时, 细胞凋亡增加, 因此, PX可能通过激活PI-3激酶途径拮抗TGF- $\beta$ 的促凋亡作用<sup>[23]</sup>. (3) PX与JNK/STAT途径: STATs是一类细胞转录因子, 一般以无活性形式存在于胞质中, 当受到细胞外信号的刺激(如IL-6和EGF), Scr残基磷酸化, STATs就活化, 进入细胞核, 与相关的DNA序列结合, 调节基因转录. Waris *et al*<sup>[24]</sup>报道, 稳定转染X基因的HepG<sub>2</sub>细胞在没有任何细胞外刺激因素存在的情况下, 细胞内总STAT-3水平没有发生变化, 但是磷酸化水平增高, 提示STAT-3活性增高. Lee *et al*<sup>[25]</sup>发现, PX能激活Scr激酶家族成员Jak1, 使STATs Scr残基磷酸化而激活. 由于在肝细胞中Jak-STAT持续激活常与生长因子刺激有关, 因此, PX可能作为一种“内源性配体”激活生长因子信号转导途径. 此外, PX还能通过改变胞质内钙离子分布, 激活JNK/STAT信号传导途径<sup>[26]</sup>.

3.2 PX与细胞增殖和凋亡 在肝癌的发病过程中,

癌细胞和癌前细胞通常表现为凋亡增多伴随增殖增多<sup>[27]</sup>. 大量的研究发现, PX对细胞凋亡有双重调节作用. PX抑制肝细胞的凋亡一直被认为是HBV导致HCC发生的重要原因之一, 而PX对肝细胞凋亡的促进作用也被认为是有利于HCC的发生和发展. 转染X基因的HepG<sub>2</sub>细胞, 大部分细胞处于S期和G<sub>0</sub>/M期, 说明X基因能刺激肝癌细胞的增殖<sup>[28]</sup>. PX可通过多种途径抑制细胞凋亡. PX和Hepsin在细胞内结合并相互作用, 刺激细胞生长和抑制凋亡<sup>[7]</sup>; Yun *et al*<sup>[29]</sup>将X基因转染Chang细胞, DNA生成升高3倍, 没有明显凋亡表现. 当以NF- $\kappa$ B抑制因子IKKB干预细胞后, 细胞凋亡增多, 说明PX通过NF- $\kappa$ B促进细胞增殖, 抑制凋亡. 为防止DNA受损的细胞进入S期, P53可以直接诱发细胞凋亡, PX能抑制P53的促凋亡作用, 使DNA修复不完全的细胞得以存活<sup>[30]</sup>; 下调Bcl-2家族中促凋亡成员如Bax, Bid等表达, 阻断其促进凋亡作用<sup>[31-32]</sup>. PX可通过PI-3-K-Akt-Bad途径抑制caspase-3的活性而抑制凋亡, 这一作用是不依赖于P53途径<sup>[33]</sup>. 通过激活PI-3-K途径, 抑制TGF- $\beta$ 的促凋亡作用<sup>[23]</sup>. PX不仅能抑制肝细胞凋亡, 还具有促进肝细胞凋亡, 抑制细胞增殖的作用, 且这一作用依赖于PX在细胞中的表达水平, 当PX的表达处于高水平时可诱导细胞凋亡<sup>[34-36]</sup>. 在X基因转基因小鼠的实验中发现, 肝脏部分切除后, 肝细胞再生受到抑制<sup>[37]</sup>. PX可上调Fas/FasL的表达, 可能通过以下机制诱导Fas/FasL表达: (1)通过与Egr位点结合, 加强其与辅助因子CBP结合, 刺激启动子活性, 促进FasL的表达, 同时刺激蛋白质功能的发挥<sup>[38]</sup>; (2)IL-18是细胞炎症因子, 研究发现, IL-18有促进Fas/FasL表达的作用. PX能促进IL-18 mRNA的转录、蛋白质表达, 进而促进Fas/FasL的表达<sup>[39]</sup>; (3)c-FLIP是DISC的关键调节因子, 能抑制由Fas/FasL介导的细胞凋亡. PX通过与c-FLIP的DED1区域相互作用, 拮抗c-FLIP对Fas/FasL介导的凋亡抑制作用, 还使细胞对极低浓度的TNF- $\alpha$ 诱导的凋亡十分敏感<sup>[40-41]</sup>. 通过上调myc的表达, 使细胞对TNF- $\alpha$ 介导的凋亡信号敏感<sup>[42-43]</sup>, 与DDB1竞争性结合DDB2, 以DDB1非依赖形式介导细胞凋亡<sup>[44]</sup>. Survivin是新发现的PX结合蛋白. 单独的这两种蛋白均不能和caspase-9前体结合, 但是如果二者结合后即可引起caspase-9募集Alfa, 激活线粒体/Cyt c凋亡途径<sup>[45]</sup>. Bcl-2家族是重要的凋亡调控因子. 该

#### ■应用要点

鉴于HBV感染是一个多步骤、多环节的慢性过程, 且PX在HBV感染及HCC发生、发展中起关键作用. 因此, 进一步深入研究X基因及其产物的作用机制, 早期阻断PX的细胞毒性作用对于防止病毒感染播散, 减缓肝细胞的恶变和肿瘤的发生具有十分重要的意义.



### ■创新盘点

本文从X基因和X蛋白对HBV复制的调节,对宿主细胞转录、信号转导、细胞增殖、凋亡、周期调控、癌基因及抑癌基因的表达调控,以及对线粒体结构和功能的影响等方面较全面的阐述,尤其是对线粒体的影响是近年来研究的热点、要点。

家族包含两种功能截然相反的蛋白:抑凋亡蛋白和促凋亡蛋白,二者在细胞中的比例在一定程度上决定了细胞对死亡信号的反应及细胞的命运<sup>[31,46-49]</sup>。虽然酵母双杂交实验显示PX不能和Bcl-2家族的任何一种蛋白结合,但是PX能通过调节该家族成员的功能来调节细胞的增殖和凋亡。如拮抗Bcl-2的凋亡抑制作用,上调Bax和Bcl-XL等的表达,或抑制Bid介导的线粒体凋亡途径等<sup>[31,50]</sup>。

3.4 PX与细胞周期调控 Wu *et al*<sup>[51]</sup>构建了X基因的转基因小鼠,研究发现,PX能强烈刺激处于静止期的肝细胞由G<sub>0</sub>期进入G<sub>1</sub>期,抑制细胞G<sub>1</sub>/S期转化,打破细胞周期进程,使细胞发生非正常死亡。Li *et al*<sup>[28]</sup>研究却得出了相反的结论,转染X基因的HepG<sub>2</sub>细胞,大部分细胞处于S期和G<sub>0</sub>/M期,说明X基因能刺激肝癌细胞的增殖。Kwun *et al*<sup>[52]</sup>的研究报道,PX自然变异Ser-101替代Pro-101能稳定P53,可能是保护P53避免MDM2的降解。包含Met-130的PX变异通过抑制Sp1抑制P21活性。因此由于PX不同的变异,使其对P21有不同的调节功能,表现出对细胞周期不同的调节,可以为解释PX截然相反的功能提供一些线索。Peng *et al*<sup>[53]</sup>报道,PX整合后使肝癌和肝硬化患者基因组中cyclin A等基因表达发生显著改变<sup>[53]</sup>。Klein *et al*<sup>[54]</sup>研究发现,X基因能在转基因鼠的孕早期就诱导cyclin D1过表达。PX还能通过P53依赖和非依赖途径调控P21的表达,前者主要通过直接结合P53,抑制其功能,进而下调P21的表达,后者主要通过调节转录因子Sp1的活性来调节P21的表达<sup>[55]</sup>。

3.5 PX与癌基因和抑癌基因 恶性肿瘤发病机制之一就是癌基因和抑癌基因的平衡被打破,癌基因被激活,抑癌基因表达被抑制或功能受破坏。大量研究证实,位于胞质内PX可以激活c-myc, c-fos, ras, raf, src等多种原癌基因,并抑制P53, PRB等抑癌基因。Ou *et al*<sup>[56]</sup>对X基因转基因鼠进行研究,小鼠出生后,肝细胞即表现出增殖活跃,呈指数增长,伴随凋亡增多,这一现象一直持续到肝脏肿瘤发生,凋亡才减少。c-myc是一种细胞癌基因,目前较一致的观点认为,c-myc可与X基因协同作用,打乱细胞增殖和凋亡平衡,使细胞生长失控,引起细胞癌变<sup>[57-58]</sup>。实验证明,PX可促进c-myc基因的转录,高表达的c-myc使表达PX的细胞对许多凋亡信号敏感,尤其是TNF- $\alpha$ 介导的凋亡信号。在没有TNF- $\alpha$ 存在的情况下,HBV X基因与c-myc共转染细胞,

就足以引起细胞凋亡,而同时加入TNF- $\alpha$ 后,细胞的凋亡率升高了7-10倍。此外,HBV X基因与c-myc协同作用还可拮抗NF- $\kappa$ B的凋亡抑制作用<sup>[42,59-61]</sup>。目前对于PX和P53基因关系的研究比较多。P53是一种抑癌基因,他参与基因的转录、DNA的合成与修复以及细胞凋亡等过程。他与细胞的转化和肿瘤的发生关系密切,其功能的正常发挥对维持基因稳定性、阻断异常细胞的生长、诱导凋亡起重要作用。PX通过c-myc与P53上游启动子结合,抑制P53的转录;直接抑制P53基因介导的功能,例如抑制P53基因介导的凋亡等<sup>[30,60]</sup>。Choi *et al*<sup>[61]</sup>将X基因转入HepG<sub>2</sub>细胞中,发现pRB的肿瘤抑制作用削弱了,因此X基因可能干扰pRB的抑癌作用。

### 4 X基因及其产物与线粒体

线粒体是特殊的细胞器,氧化磷酸化等重要的细胞能量代谢都在线粒体内进行,是细胞能量产生的主要场所,此外,线粒体还参与细胞的凋亡信号转导,被认为是细胞凋亡的枢纽环节。最新的研究发现,PX可以定位在线粒体上,PX与线粒体的关系正逐渐成为目前研究的热点。有报道,PX的高表达导致PX线粒体的异常分布,如成块聚集等,但低水平表达时则此种现象缺如。另有学者观察到,PX在细胞质内的水平高于细胞核,且细胞质中的PX主要分布于线粒体外膜上<sup>[8]</sup>。PX与线粒体结合的区域已经被定位在68-177位点氨基酸,这一区域是细胞凋亡必须的,但是对反式激活作用并不是必须的。Huh *et al*<sup>[62]</sup>报道PX与线粒体结合的区域位于54-70位点氨基酸,而PX  $\alpha$ -螺旋区的75-88位点和109-131位点氨基酸对蛋白定位于线粒体则起辅助作用。这与Boya *et al*<sup>[63]</sup>的报道一致。PX和线粒体结合后,并不直接引起细胞色素C(cyt C)和AIF重分布,但线粒体跨膜电压却降低了,提示PX可能干扰了PTP的功能。Bcl-XL能通过稳定线粒体膜抑制PX的作用,进一步证实了PX能作用在PTP,降低线粒体跨膜电压。因此线粒体功能失调是X基因致癌的重要机制之一<sup>[64]</sup>。PX能下调线粒体中参与氧化磷酸化反应离子转运相关酶的活性,增加线粒体ROS水平和脂质过氧化氢产物,通过氧化损伤对细胞造成直接损伤,ROS清除剂能抑制PX的作用<sup>[65]</sup>。PX还可以和VDAC<sub>3</sub>结合,引起线粒体跨膜电压的下降,激活包括STAT-3和NF- $\kappa$ B在内的转录因子。这一过程对抗氧化物敏感,可能与PX能促进ROS的生成有关<sup>[24,65-66]</sup>。Wang *et al*<sup>[67]</sup>通过酵母双杂交系统

对成人正常肝细胞cDNA文库进行筛选, 发现了新的PX相关蛋白细胞色素c氧化酶III(COXIII), 并在离体结合试验及免疫共沉淀试验中验证了两者的特异性结合. COXIII复合体(复合体IV)是最具特征的呼吸链酶复合体, 由13个亚基组成, 其中较大的亚基COX I, COX II, COXIII由线粒体DNA(mtDNA)编码, 其余部分由细胞核DNA(nDNA)编码. COXIII在复合酶的聚集和稳定性中起重要作用, 并参与质子的传递和COX III介导的能量转换<sup>[68]</sup>. PX与COXIII的作用尚未阐明, 可能通过干扰线粒体能量代谢, 诱发细胞氧化损伤. Zhang *et al*<sup>[69]</sup>通过GST和免疫共沉淀系统发现, PX能与线粒体的HSP60和HSP70结合, 但X蛋白与二者间关系的研究尚未见报道.

总之, PX是一种多功能蛋白, 通过反式激活作用参与调节病毒复制; 与宿主细胞内的转录因子直接结合, 或通过信号转导途径激活细胞转录因子, 对宿主细胞基因转录进行调控, 激活细胞癌基因, 或抑制抑癌基因的表达和功能, 促使细胞表达各种与侵袭性有关的基因, 增加细胞侵袭能力, 或上调化疗药物的基因表达, 使细胞对化疗药物耐受; 打乱正常细胞周期, 干扰DNA受损细胞的修复, 造成遗传物质的不稳定性; 打破正常的细胞凋亡与增殖的平衡, 一方面促进细胞DNA合成, 增殖能力增强, 另一方面促进细胞凋亡, 刺激再生反应, 有利于病毒颗粒自凋亡细胞中释放并继续干扰其他细胞, 促进炎症发展, 凋亡效应还可增加突变机率, 使肝细胞生长失去抑制, 最终导致HCC的发生; 与线粒体外膜蛋白作用, 增加外膜通透性, 降低跨膜电压, 干扰线粒体氧化磷酸化等能量代谢过程, 造成细胞氧化损伤, 促进细胞凋亡. 在HBV感染和HCC发展的不同阶段, PX执行不同的生物学功能, 这主要取决于细胞的不同状态.

鉴于HBV感染是一个多步骤、多环节的慢性过程, 因此在早期阻断PX的细胞毒性作用对于防止病毒感染播散、减缓肝细胞的恶变和肿瘤的发生尤为重要. 基因治疗正逐渐成为抗HBV治疗的新方法. PX作为HBV基因治疗理想的靶蛋白, 可通过PX特异性干扰RNA来降低病毒的RNA和蛋白水平, 阻止或降低病毒复制, 或通过阻止、缓解PX对细胞的毒性作用, 达到治疗目的<sup>[70]</sup>.

## 5 参考文献

- 1 Zhang Z, Protzer U, Hu Z, Jacob J, Liang TJ. Inhibition of cellular proteasome activities enhances hepadnavirus replication in an HBX-dependent

- manner. *J Virol* 2004; 78: 4566-4572
- 2 Bouchard MJ, Puro RJ, Wang L, Schneider RJ. Activation and inhibition of cellular calcium and tyrosine kinase signaling pathways identify targets of the HBx protein involved in hepatitis B virus replication. *J Virol* 2003; 77: 7713-7719
- 3 Tang H, Delgermaa L, Huang F, Oishi N, Liu L, He F, Zhao L, Murakami S. The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication. *J Virol* 2005; 79: 5548-5556
- 4 Hu Z, Zhang Z, Kim JW, Huang Y, Liang TJ. Altered proteolysis and global gene expression in hepatitis B virus X transgenic mouse liver. *J Virol* 2006; 80: 1405-1413
- 5 Leupin O, Bontron S, Schaeffer C, Strubin M. Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death. *J Virol* 2005; 79: 4238-4245
- 6 Melegari M, Wolf SK, Schneider RJ. Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J Virol* 2005; 79: 9810-9820
- 7 Zhang JL, Zhao WG, Wu KL, Wang K, Zhang X, Gu CF, Li Y, Zhu Y, Wu JG. Human hepatitis B virus X protein promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis through interacting with a serine protease Hepsin. *Arch Virol* 2005; 150: 721-741
- 8 Henkler F, Hoare J, Waseem N, Goldin RD, McGarvey MJ, Koshy R, King IA. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 2001; 82: 871-882
- 9 Le TT, Zhang S, Hayashi N, Yasukawa M, Delgermaa L, Murakami S. Mutational analysis of human RNA polymerase II subunit 5 (RPB5): the residues critical for interactions with TFIIF subunit RAP30 and hepatitis B virus X protein. *J Biochem (Tokyo)* 2005; 138: 215-224
- 10 Yang Y, Ma Y, Zhen L, Chen Y, Ma W, Murakami S. HBV X protein (HBX) interacts with general transcription factor TFIIB both *in vitro* and *in vivo*. *Chin Med Sci J* 1999; 14: 152-157
- 11 Jaitovich-Groisman I, Benlimame N, Slagle BL, Perez MH, Alpert L, Song DJ, Fotouhi-Ardakani N, Galipeau J, Alaoui-Jamali MA. Transcriptional regulation of the TFIIF transcription repair components XPB and XPD by the hepatitis B virus x protein in liver cells and transgenic liver tissue. *J Biol Chem* 2001; 276: 14124-14132
- 12 Qadri I, Maguire HF, Siddiqui A. Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 93: 1003-1007
- 13 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes *in vivo*. *J Virol* 2001; 75: 10348-10358
- 14 Guan J, Chen XP, Zhu H, Luo SF, Cao B, Ding L. Involvement of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway in multidrug resistance induced by HBx in hepatoma cell line. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3522-3527
- 15 Bouchard MJ, Wang L, Schneider RJ. Activation of focal adhesion kinase by hepatitis B virus HBx protein: multiple functions in viral replication. *J*

## ■名词解释

1 X基因: HBV X基因是HBV病毒基因组中最小的开放性读码框, 位于HBV基因组的1374-1838 bp处, 全长435-462 bp, 编码长度为154个氨基酸的蛋白. PX不直接作用于双链DNA, 而是通过和细胞内的多种蛋白相互作用来调节细胞生物学功能. PX作为多功能蛋白, 广泛参与病毒的复制、宿主细胞的基因调控和表达、蛋白质降解及细胞信号转导等过程、并可通过影响正常的细胞周期, 干扰DNA的修复及调节肝细胞增殖、分化和凋亡, 在HBV感染及HCC发生、发展中起关键作用.

2 反式激活作用: 真核细胞中与结构基因表达调控相关, 能够被基因调控蛋白特异性识别和结合的DNA序列称为顺式作用元件. 包括启动子、上游启动子元件、增强子、加尾信号和一些反应元件等. 反式作用因子是指真核细胞内含有大量可以通过直接或间接结合顺式作用元件而调节基因转录活性的蛋白质因子. 反式作用因子通过顺式调控元件对基因所起的调控作用称为反式激活作用.

- Virol* 2006; 80: 4406-4414
- 16 Klein NP, Schneider RJ. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6427-6436
- 17 Benn J, Su F, Doria M, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol* 1996; 70: 4978-4985
- 18 Su F, Theodosios CN, Schneider RJ. Role of NF-kappaB and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol* 2001; 75: 215-225
- 19 Lee SH, Park SG, Lim SO, Jung G. The hepatitis B virus X protein up-regulates lymphotoxin alpha expression in hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1741: 75-84
- 20 Chung TW, Lee YC, Kim CH. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB J* 2004; 18: 1123-1125
- 21 Chan CF, Yau TO, Jin DY, Wong CM, Fan ST, Ng IO. Evaluation of nuclear factor-kappaB, urokinase-type plasminogen activator, and HBx and their clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4140-4149
- 22 Yun C, Cho H, Kim SJ, Lee JH, Park SY, Chan GK, Cho H. Mitotic aberration coupled with centrosome amplification is induced by hepatitis B virus X oncoprotein via the Ras-mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein pathway. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 159-169
- 23 Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 25858-25864
- 24 Waris G, Huh KW, Siddiqui A. Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF-kappa B via oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 7721-7730
- 25 Lee YH, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* 1998; 273: 25510-25515
- 26 Oh JC, Jeong DL, Kim IK, Oh SH. Activation of calcium signaling by hepatitis B virus-X protein in liver cells. *Exp Mol Med* 2003; 35: 301-309
- 27 Kim H, Lee H, Yun Y. X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 381-385
- 28 Li DH, Chen XP, Zhang WG, Qiu FZ. HBx gene facilitates the proliferation activity of hepatoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Zhonghua WaiKe ZaZhi* 2004; 42: 104-106
- 29 Yun C, Um HR, Jin YH, Wang JH, Lee MO, Park S, Lee JH, Cho H. NF-kappaB activation by hepatitis B virus X (HBx) protein shifts the cellular fate toward survival. *Cancer Lett* 2002; 184: 97-104
- 30 Huo TI, Wang XW, Forgues M, Wu CG, Spillare EA, Giannini C, Brechot C, Harris CC. Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis. *Oncogene* 2001; 20: 3620-3628
- 31 Chen GG, Lai PB, Chan PK, Chak EC, Yip JH, Ho RL, Leung BC, Lau WY. Decreased expression of Bid in human hepatocellular carcinoma is related to hepatitis B virus X protein. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1695-1702
- 32 Terradillos O, de La Coste A, Pollicino T, Neuveut C, Sitterlin D, Lecoeur H, Gougeon ML, Kahn A, Buendia MA. The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas apoptosis in the liver. *Oncogene* 2002; 21: 377-386
- 33 Gottlob K, Fulco M, Leverero M, Graessmann A. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem* 1998; 273: 33347-33353
- 34 Song CZ, Bai ZL, Song CC, Wang QW. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1521-1524
- 35 Chen HY, Tang NH, Zhang SJ, Chen ZX, Wang XZ. Construction of hepatitis B virus X gene expression vector in eucaryotic cells and its transfection in HL-7702 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12: 614-617
- 36 Wang H, Chen X, Bai X. Hepatic cell apoptosis was triggered by HBx accumulation and independent on verapamil. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2004; 24: 281-283
- 37 Tralhao JG, Roudier J, Morosan S, Giannini C, Tu H, Goulencok C, Carnot F, Zavala F, Joulin V, Kremsdorf D, Brechot C. Paracrine *in vivo* inhibitory effects of hepatitis B virus X protein (HBx) on liver cell proliferation: an alternative mechanism of HBx-related pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6991-6996
- 38 Yoo YG, Lee MO. Hepatitis B virus X protein induces expression of Fas ligand gene through enhancing transcriptional activity of early growth response factor. *J Biol Chem* 2004; 279: 36242-9
- 39 Lee MO, Choi YH, Shin EC, Kang HJ, Kim YM, Jeong SY, Seong JK, Yu DY, Cho H, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol* 2002; 37: 380-386
- 40 Korkolopoulou P, Goudopoulou A, Voutsinas G, Thomas-Tsagli E, Kapralos P, Patsouris E, Saetta AA. c-FLIP expression in bladder urothelial carcinomas: its role in resistance to Fas-mediated apoptosis and clinicopathologic correlations. *Urology* 2004; 63: 1198-1204
- 41 Kim KH, Seong BL. Pro-apoptotic function of HBV X protein is mediated by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing signal. *EMBO J* 2003; 22: 2104-2116
- 42 Su F, Theodosios CN, Schneider RJ. Role of NF-kappaB and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol* 2001; 75: 215-225
- 43 Kalra N, Kumar V. c-Fos is a mediator of the c-myc-induced apoptotic signaling in serum-deprived hepatoma cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 25313-25319
- 44 Bontron S, Lin-Marq N, Strubin M. Hepatitis B virus X protein associated with UV-DDB1 induces cell death in the nucleus and is functionally antagonized by UV-DDB2. *J Biol Chem* 2002; 277: 38847-38854
- 45 Zhang X, Dong N, Yin L, Cai N, Ma H, You J, Zhang H, Wang H, He R, Ye L. Hepatitis B virus X protein upregulates survivin expression in



- hepatoma tissues. *J Med Virol* 2005; 77: 374-381
- 46 Bouillet P, Strasser A. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 2002; 115: 1567-1574
- 47 Lakhtakia R, Kumar V, Reddi H, Mathur M, Dattagupta S, Panda SK. Hepatocellular carcinoma in a hepatitis B 'x' transgenic mouse model: A sequential pathological evaluation. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 80-91
- 48 Hung L, Kumar V. Specific inhibition of gene expression and transactivation functions of hepatitis B virus X protein and c-myc by small interfering RNAs. *FEBS Lett* 2004; 560: 210-214
- 49 Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; 17: 3225-3236
- 50 Lin N, Chen HY, Li D, Zhang SJ, Cheng ZX, Wang XZ. Apoptosis and its pathway in X gene-transfected HepG<sub>2</sub> cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4326-4331
- 51 Wu BK, Li CC, Chen HJ, Chang JL, Jeng KS, Chou CK, Hsu MT, Tsai TF. Blocking of G1/S transition and cell death in the regenerating liver of Hepatitis B virus X protein transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340: 916-928
- 52 Kwun HJ, Jang KL. Natural variants of hepatitis B virus X protein have differential effects on the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 2202-2213
- 53 Peng Z, Zhang Y, Gu W, Wang Z, Li D, Zhang F, Qiu G, Xie K. Integration of the hepatitis B virus X fragment in hepatocellular carcinoma and its effects on the expression of multiple molecules: a key to the cell cycle and apoptosis. *Int J Oncol* 2005; 26: 467-473
- 54 Klein A, Guhl E, Tzeng YJ, Fuhrhop J, Levrero M, Graessmann M, Graessmann A. HBX causes cyclin D1 overexpression and development of breast cancer in transgenic animals that are heterozygous for p53. *Oncogene* 2003; 22: 2910-2919
- 55 Lin J, Zhu MH, Zhu S, Qu JH, Li FM, Ni CR. The role of hepatitis B virus X gene and p53 on hepatocellular carcinoma cell growth. *Zhonghua BingLiXue ZaZhi* 2003; 32: 43-47
- 56 Ou DP, Tao YM, Chang ZG, Tang FQ, Yang LY. Hepatocellular carcinoma cells containing hepatitis B virus X protein have enhanced invasive potential conditionally. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 262-267
- 57 Terradillos O, Pollicino T, Lecoeur H, Tripodi M, Gougeon ML, Tiollais P, Buendia MA. p53-independent apoptotic effects of the hepatitis B virus HBx protein *in vivo* and *in vitro*. *Oncogene* 1998; 17: 2115-2123
- 58 Rabe C, Cheng B, Caselmann WH. Molecular mechanisms of hepatitis B virus-associated liver cancer. *Dig Dis* 2001; 19: 279-287
- 59 Schuster R, Gerlich WH, Schaefer S. Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene* 2000; 19: 1173-1180
- 60 Lee SG, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. *Oncogene* 2000; 19: 468-471
- 61 Choi BH, Choi M, Jeon HY, Rho HM. Hepatitis B viral X protein overcomes inhibition of E2F1 activity by pRb on the human Rb gene promoter. *DNA Cell Biol* 2001; 20: 75-80
- 62 Huh KW, Siddiqui A. Characterization of the mitochondrial association of hepatitis B virus X protein, HBx. *Mitochondrion* 2002; 1: 349-359
- 63 Boya P, Pauleau AL, Poncet D, Gonzalez-Polo RA, Zamzami N, Kroemer G. Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1659: 178-189
- 64 Shirakata Y, Koike K. Hepatitis B virus X protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential. *J Biol Chem* 2003; 278: 22071-22078
- 65 Lee YI, Hwang JM, Im JH, Lee YI, Kim NS, Kim DG, Yu DY, Moon HB, Park SK. Human hepatitis B virus-X protein alters mitochondrial function and physiology in human liver cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 15460-15471
- 66 Rahmani Z, Huh KW, Lasher R, Siddiqui A. Hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential. *J Virol* 2000; 74: 2840-2846
- 67 Wang XZ, Li D, Tao QM, Lin N, Chen ZX. A novel hepatitis B virus X-interactive protein: cytochrome C oxidase III. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 711-715
- 68 You KR, Wen J, Lee ST, Kim DG. Cytochrome c oxidase subunit III: a molecular marker for N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced oxidative stress in hepatoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 3870-3877
- 69 Zhang SM, Sun DC, Lou S, Bo XC, Lu Z, Qian XH, Wang SQ. HBx protein of hepatitis B virus (HBV) can form complex with mitochondrial HSP60 and HSP70. *Arch Virol* 2005; 150: 1579-1590
- 70 Shin D, Kim SI, Kim M, Park M. Efficient inhibition of hepatitis B virus replication by small interfering RNAs targeted to the viral X gene in mice. *Virus Res* 2006; 119: 146-153

电编 李琪 编辑 潘伯荣