

X基因——抗乙型肝炎病毒治疗的新靶点

吴洲清, 唐健熹, 信芝, 姚蓝, 宋家武

吴洲清, 武汉大学附属中南医院 湖北省武汉市 430072
吴洲清, 唐健熹, 信芝, 姚蓝, 宋家武, 中山大学附属第五医院
消化内科 广东省珠海市 519000
广东省自然科学基金资助项目, No. 04300264
湖北省自然科学基金, No. 2004AA301C98
湖北省科技攻关项目, No. 2005AA304B05
通讯作者: 宋家武, 519000, 广东省珠海市, 中山大学附属第五
医院消化内科. songjw@mail.sysu.edu.cn
电话: 0756-2528843 传真: 0756-3318499
收稿日期: 2006-11-25 接受日期: 2006-12-27

X gene: a novel target for anti-hepatitis B virus infection

Zhou-Qing Wu, Jian-Xi Tang, Zhi Xin, Lan Yao,
Jia-Wu Song

Zhou-Qing Wu, Zhongnan Hospital of Wuhan University,
Wuhan 430072, Hubei Province, China
Zhou-Qing Wu, Jian-Xi Tang, Zhi Xin, Lan Yao, Jia-Wu
Song, Department of Digestive Diseases, the Fifth Affiliated
Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000,
Guangdong Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Guang-
dong Province, No. 04300264, the Natural Science Founda-
tion of Hubei Province, No. 2004AA301C98, and the Key
Science and Technology Project of Hubei Province, No.
2005AA304B05
Correspondence to: Dr. Jia-Wu Song, Department of
Digestive Diseases, The Fifth Affiliated Hospital of Sun
Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province,
China. songjw@mail.sysu.edu.cn
Received: 2006-11-25 Accepted: 2006-12-27

Abstract

X gene is one of the four genes of hepatitis B virus (HBV). HBV X (HBx) protein, which was coded by HBx gene, is a multifunctional regulator of cellular signal transduction and transcription pathways, and it is not only essential for the regulation of host immune reaction, participates all the HBV-related pathogenesis such as inflammation, carcinogenesis and other pathological process, but also play a critical role in HBV infection, replication, and gene expression. Down-regulation, knocking-out, or functional blockage of X gene can obviously inhibit the replication of HBV. In this review, we attempted to describe the current advance on the role of X gene in HBV replication and gene expression, and suggested that HBx had been a promising target for the treatment of HBV infection.

Key Words: X gene; Hepatitis B virus; Treatment; Target

Wu ZQ, Tang JX, Xin Z, Yao L, Song JW. X gene: a novel target for anti-hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(7):717-720

摘要

X基因是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的四个基因之一。最近的研究表明, 他不仅参与HBV感染宿主过程, 还影响HBV病毒基因的复制和表达, 直接或/和间接通过宿主的免疫反应或其他作用, 导致HBV致病的系列病理过程, 而且在HBV生命周期中具有非常重要的作用。降低或去除X基因转录, 或者封闭X蛋白某些功能以及使X基因表达沉默均能显著抑制病毒复制水平。本文通过对X基因在HBV复制和基因表达中的作用以及针对X基因的干预对HBV复制和基因表达的影响的最新研究成果进行综述, 提出X基因是乙肝抗病毒治疗的一个新靶点。

关键词: X基因; 乙型肝炎病毒; 治疗; 靶点

吴洲清, 唐健熹, 信芝, 姚蓝, 宋家武. X基因——抗乙型肝炎病毒治疗的新靶点. *世界华人消化杂志* 2007;15(7):717-720
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/717.asp>

0 引言

X基因是一种仅存于嗜肝性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的基因, 其基因结构具有极明显的特殊性, 至今尚未在其他逆转录病毒和生物细胞中发现他的存在。在被发现初期, 表达产物X蛋白的氨基酸序列与其他已知的生物蛋白序列有很大不同, 无法推测其功能, 而被命名为X蛋白。同时, X基因还具有高度的保守性^[2], 在嗜肝病毒的进化中, 基因序列一直保持着高度的基因同源性。因此, 生物学家推测, X蛋白在HBV的生物学上一定具有重要的生物学意义, 从而引起了广大生物学家的关注。越来越多的证据表明, 他在HBV的生命周期中, 直接影响病毒感染宿主、病毒复制, 调节和控制HBV其他

■背景资料

X基因是乙型肝炎病毒四个基因中的一个, 与宿主细胞生物学功能有广泛的联系和相互作用, 是乙型肝炎病毒致癌的主要基因和发病基础。但作为一个仅存于该类病毒, 而且相当保守的基因而言, X基因一定在乙型肝炎病毒的生命周期中具有重要生物学作用, 但国际上对此领域所知较少。最近的研究表明, 特别是随着对X基因研究的重大进展, 人们发现, X基因在乙型肝炎病毒的复制和基因表达方面, 都有重大影响, X基因除在HBV致癌作用外, 在其生活周期中, 无论是病毒本身的复制还是在调节其他基因表达上, 均具有重要的生物学功能。

■创新盘点

本综述在仔细研究国内外有关领域的最新研究成果后,提出了X基因是抗乙型肝炎病毒治疗的新靶点的假说。

基因功能的表达等生命过程,同时,他还是乙型肝炎病毒引起肝癌的直接病因^[1],并广泛参与影响宿主细胞的基因表达,反式激活和细胞信号转导过程。特别是最近获得的HBx在HBV生命周期中作用的重大进展^[3-5]。使越来越多的学者推测,X基因可能是抗乙型肝炎病毒感染的新靶点。

1 X基因产物在HBV生命周期中的重要作用

HBV的生命活动周期主要包括HBV感染宿主,病毒在细胞内的复制和基因表达,病毒的包装及脱颗粒等过程。现有的研究表明,X基因直接影响着HBV这些生命的活动。Chen *et al*^[6]和Zoulim *et al*^[7]在不同的实验室,应用基因突变技术,以土拨鼠为实验动物,研究HBV感染性质粒感染宿主土拨鼠的实验,证实了X基因在HBV感染中不可或缺的作用。Chen *et al*^[6]将HBV感染质粒的X基因进行突变,去除X基因蛋白表达,或对X基因表达的C其他突变,使X蛋白C其他分别截除52, 31, 16或3个氨基酸,与野生型感染质粒进行对照,研究其感染性与X基因间关系,结果发现,除在C末端截除3个氨基酸的突变质粒外,其他各种突变均不能有效感染土拨鼠。Zoulim *et al*^[7]应用不同的感染性质粒,独立进行了相似的实验,结果显示,所有注射野生型感染质粒的土拨鼠均被感染,而注射X基因突变后的感染性质粒的实验组却未能检出病毒感染的相应标志物,说明没有感染土拨鼠。提示X蛋白具有在HBV感染宿主细胞过程中不可或缺的重要性。

X蛋白的缺失,不仅影响到病毒感染宿主的过程,还直接影响到HBV在细胞内的复制和基因表达功能。Zoulim *et al*^[7]应用X基因突变技术,研究去除X基因表达的质粒在转染HepG₂和Huh7细胞后对病毒复制的影响,结果发现,所有转入的质粒,无论是野生型,还是X基因突变后的质粒,在转染初期即转染后24 h,均可发现病毒的复制,并从细胞上清中分离出病毒颗粒或与病毒相关的各种核酸,然而,随着观察时间的延长,转染X基因突变质粒的细胞中,肝炎病毒的分泌量显著减少:转入HepG₂的突变质粒组的肝炎病毒DNA量在实验第9天,只有野生型对照组的15%,转入Huh7细胞的X基因突变质粒,在第24天,其细胞分泌的HBV DNA量只有野生型的60%,进一步分析,细胞内病毒核内核酸量亦平行减少。提示X基因突变的质粒,病毒的复制能力显著减弱。Bouchard *et al*^[8]应用基因突变技

术,将X基因的突变质粒转入HepG₂中,亦发现病毒的复制能力显著降低的同样结果。Xu *et al*^[9]应用转基因方法研究X基因在活体动物体内对HBV复制的影响,他们应用基因工程方法,建立了能高效表达HBx蛋白野生型质粒,同时应用点突变技术建立去除HBx蛋白表达的突变质粒,并制备各自转基因鼠模型,结果发现,能表达野生型HBx蛋白的转基因鼠能高效复制HBV,而表达去除HBx蛋白的HBV转基因鼠,则不能形成HBV,从而在动物整体水平上,更进一步证实了HBx蛋白在HBV病毒复制中的重要作用。

2 X基因及其产物是HBV致病的主要原因之一

X基因不仅直接参与了HBV感染宿主、影响自身病毒基因的复制和表达,并直接或/和间接通过宿主的免疫反应或其他作用,导致了HBV致病的系列病理过程。X基因是HBV致癌的唯一基因。在HBV致癌中的作用,已获得一致的认同。没有X基因禽类HBV病毒,不能致癌。

Levrero *et al*^[10]和Tang *et al*^[11]用临床病理研究方法表明,细胞内X蛋白的表达与HBV病毒复制标志物HBeAg显著相关。而血清抗HBx则直接与乙型肝炎患者的疾病活动程度及病毒的复制有关。对乙肝患者的活检标本检测与血清学检查结果比较后发现,在6/38例免疫组化HBx染色阳性的标本中,6例血清中应用Western blot方法检出血清HBx抗体,组织病理学上,均证实为慢性活动性肝炎患者,且均为高病毒复制患者,而无HBV感染的正常和肝癌对照组则全为阴性。HBeAg阳性的乙型肝炎患者的HBx表达阳性的细胞数量显著高于HBeAg阴性的患者。Hoare *et al*^[12]通过对复制活跃的非肝硬化患者与复制不活跃的肝硬化患者的肝活检标本的比较发现,非肝硬化组HBxAg阳性率显著高于肝硬化组且染色的细胞数亦明显多于肝硬化组,患者血清HBeAg阳性患者的肝活检组织中HBxAg阳性细胞数量成倍增加。结合他们以前的研究,认为HBx表达与病毒高复制状态和保持高复制状态有关。Wang *et al*^[13]对218例乙肝相关肝炎和肝硬化患者进行了HBxAg表达与肝脏病理学研究,结果发现,HBxAg阳性细胞数量和染色程度与慢性活动性肝炎的肝病活动程度密切相关,HBxAg表达越多,肝炎活动程度越重。此外,他们还发现,HBxAg表达还与肝组织中异型增生(dysplasia)密切相关^[14],并提示HBxAg的细胞核内表达,与肝组织的异型增生关系尤其密切,提

示HBxAg表达与可能肝癌的发生存在密切的关系。

此外, X基因的突变还可影响到HBV基因的表达, 导致血清中不能检出HBsAg和HBeAg^[1,13,15-16]。Wang *et al*^[13]在研究HBxAg阳性的HBV相关的肝炎和肝硬化中发现, HBxAg阳性的108例肝硬化病例中, 只有17%病例核心抗原阳性; Feitelson *et al*^[15]在研究肾透析患者非甲非乙型HBsAg阴性的患者血标本时, 应用PCR扩增及基因测序技术, 结果发现, 34例患者中, 27例(82%)HBV DNA阳性, 其中23例(23/27)同时存在抗HBx或/和抗乙肝DNA聚合酶阳性, 24例发现丙肝阳性, 23例为乙、丙肝共同感染。其后, 他们对这些HBV DNA阳性的标本, 应用不同引物, 扩增不同片段时, 发现有不少含core和X基因的片段, 不能扩增或片段较预期为短, 进一步的基因测序分析发现, 这些病毒主要存在着X基因启动子/增强子区多位点的点突变和X基因的缺失突变, 并认为HBsAg阴性与这些X基因突变有关。

3 干预HBx表达可显著降低HBV复制程度

越来越多的证据证实, X基因可直接影响HBV或其他病毒的生命活动, 因此应用各种干预技术, 降低或去除X基因转录, 将会导致HBV复制能力显著下降; 或者, 在转录后水平上, 封闭X蛋白某些功能蛋白亦能显著抑制病毒的复制水平^[7,15]。Bouchard *et al*^[8]应用基因突变技术, 将X基因的突变质粒转入HepG₂中, 使之不能有效表达X基因, 发现乙型肝炎病毒的复制能力平均降低8-10倍。格列本脲(glibenclamide)是一种增加细胞质内钙离子浓度的化合物, 能恢复HBx缺失导致的病毒复制水平降低, 增加病毒复制时的mRNA水平; 在进一步实验中还证实, HBx去表达可显著降低HBV的DNA聚合酶的活性, 从而显著降低HBV复制水平。Melegari *et al*^[17]在用HepG₂细胞研究中, 应用酵母双杂交技术, 发现了一种只能与野生型X蛋白相结合、而非突变型的X蛋白无亲和力的X作用蛋白(HBx-interaction protein, XIP), 若截除X蛋白C末端的其他的突变型, 则X蛋白将不能有效地与XIP蛋白结合。他们将能表达XIP的质粒与含有野生型X基因的质粒共转入HepG₂细胞, 发现HBV复制能力显著降低, 与无X蛋白表达的HBV质粒复制能力相当, 显著低于对照的野生型X蛋白的质粒组。Sitterlin *et al*^[18]在研究中亦发现, HBV的有效复制, 有赖于X蛋白与一种UVDDDB蛋白(UV damaged DNA

binding protein)的正确结合。Klein *et al*^[19]在研究X蛋白的细胞信号转导途径时发现, X蛋白是通过激活Src激酶来影响HBV复制的。他们^[4,8,20]更进一步研究发现, Src激酶的特异抑制物格尔德霉素(Geldanamycin)或除莠霉素(herbimycin A)能够抑制Src激酶的功能, 从而能显著地抑制病毒的复制。此外, 他们还发现, 环孢霉素衍生物, 如环孢霉素A、H及阻断细胞质钙离子信号转导途径和线粒体转运孔通透性的特异性抑制剂SDZNL81, 均可显著影响HBV复制。

我们在前几年的研究中^[18,21-22], 采用显性负突变(dominant negative mutant, DN)技术, 构建X基因的DN突变体, 在转录后水平上, 干扰X蛋白的功能, 结果表明具有显著的抑制病毒复制^[21,23]和病毒基因表达^[22]的作用。最新的研究中, Carmona *et al*^[23]应用RNAi技术, 以HBx基因为靶点, 在显著抑制HBx基因表达(80%-100%)的同时, 在体外及小鼠体内均显示出抑制HBV病毒复制的显著效应^[11,24-25]。Shin *et al*^[24]及其所在的小组, 应用类似的方法, 在体外以及实验鼠的在体实验中, 亦获得了显著的抑制病毒复制及病毒蛋白表达的效果。Hou *et al*^[25]应用DNA酶(DNAzymes)技术, 以X基因为靶点, 干预病毒复制, 同样获得了显著的抑制HBV复制的效果。这一切都从不同的侧面提示: X基因是研究抗HBV感染、复制和基因表达的重要靶点。

4 X基因或是抗HBV治疗的新靶点和新希望

以HBV S基因为靶点的抗HBV的预防策略, 开创了HBsAb免疫预防的新时代, 使HBV预防成为现实^[26], 同时在保护器官移植后的供体肝免受HBV感染方面, 作出了突出的贡献。而以P基因为靶点, 以核苷类药物为代表的治疗策略, 开创了口服治疗HBV, 迅速而显著抑制HBV复制的新纪元^[27-29]。以C基因为靶点的基因治疗, 亦获得了显著的实验室抑制病毒复制的效果^[30-32]。但迄今为止, 尚少见以X基因为治疗靶点及其在HBV相关性肝癌中的作用的报道。我们在前期进行了这一方面的尝试, 并在抑制HBV复制和基因表达方面, 获得了初步的效果。

由于X蛋白在HBV的感染、复制及基因表达和导致肝癌的过程中均具有重要的作用, 因此, 针对X基因的抗HBV治疗, 将有望在抑制或清除病毒感染、复制和基因表达, 以及阻断HBV所致肝癌上, 发挥重要的作用, 成为HBV治疗中的新靶点。

■应用要点

乙型肝炎病毒的治疗, 是当前医学研究的重点和难点, X基因作为乙型肝炎病毒治疗新靶点观点的提出, 必将推动X基因在HBV生物学方面和与宿主相互影响的基础研究, 特别是对于指导治疗乙型肝炎病毒感染新的治疗药物和治疗策略的研究, 具有重要的理论意义和临床应用前景。

■同行评价

本文内容有一定新意, 文章的条理性不错, 有一定学术价值。

5 参考文献

- 1 王小众, 陶其敏. 乙肝病毒X基因与肝癌. 世界华人消化杂志 1999; 7: 1063-1064
- 2 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X基因酵母表达载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002; 10: 15-18
- 3 Ganem D. Virology. The X files-one step closer to closure. *Science* 2001; 294: 2299-2300
- 4 Bouchard MJ, Wang LH, Schneider RJ. Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science* 2001; 294: 2376-2378
- 5 Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 1995; 376: 737-745
- 6 Chen HS, Kaneko S, Girones R, Anderson RW, Hornbuckle WE, Tennant BC, Cote PJ, Gerin JL, Purcell RH, Miller RH. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J Virol* 1993; 67: 1218-1226
- 7 Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection *in vivo*. *J Virol* 1994; 68: 2026-2030
- 8 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
- 9 Xu Z, Yen TS, Wu L, Madden CR, Tan W, Slagle BL, Ou JH. Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *J Virol* 2002; 76: 2579-2584
- 10 Levrero M, Jean-Jean O, Balsano C, Will H, Perricaudet M. Hepatitis B virus (HBV) X gene expression in human cells and anti-HBx antibodies detection in chronic HBV infection. *Virology* 1990; 174: 299-304
- 11 Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci* 2006; 97: 977-983
- 12 Hoare J, Henkler F, Dowling JJ, Errington W, Goldin RD, Fish D, McGarvey MJ. Subcellular localisation of the X protein in HBV infected hepatocytes. *J Med Virol* 2001; 64: 419-426
- 13 Wang WL, London WT, Lega L, Feitelson MA. HBxAg in the liver from carrier patients with chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* 1991; 14: 29-37
- 14 陶小红, 沈鼎明. 乙肝病毒X蛋白与肝细胞癌变. 中华肝脏病杂志 1997; 5: 115-117
- 15 Feitelson MA, Duan LX, Guo J, Sun B, Woo J, Steensma K, Horiike N, Blumberg BS. X region deletion variants of hepatitis B virus in surface antigen-negative infections and non-A, non-B hepatitis. *J Infect Dis* 1995; 172: 713-722
- 16 Paterlini P, Poussin K, Kew M, Franco D, Brechot C. Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1995; 21: 313-321
- 17 Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Cloning and characterization of a novel hepatitis B virus x binding protein that inhibits viral replication. *J Virol* 1998; 72: 1737-1743
- 18 Sitterlin D, Bergametti F, Tiollais P, Tennant BC, Transy C. Correct binding of viral X protein to UVDDDB-p127 cellular protein is critical for efficient infection by hepatitis B viruses. *Oncogene* 2000; 19: 4427-4431
- 19 Klein NP, Bouchard MJ, Wang LH, Kobarg C, Schneider RJ. Src kinases involved in hepatitis B virus replication. *EMBO J* 1999; 18: 5019-5027
- 20 Bouchard MJ, Wang L, Schneider RJ. Activation of focal adhesion kinase by hepatitis B virus HBx protein: multiple functions in viral replication. *J Virol* 2006; 80: 4406-4414
- 21 宋家武, 林菊生, 梁扩寰. 乙型肝炎病毒X基因DN突变体稳定表达对乙型肝炎基因表达影响的实验研究. 中华传染病杂志 2003; 21: 251-254
- 22 宋家武. X基因DN突变体稳定表达抑制乙型肝炎病毒基因复制的实验研究. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 592-594
- 23 Carmona S, Ely A, Crowther C, Moolla N, Salazar FH, Marion PL, Ferry N, Weinberg MS, Arbutnot P. Effective inhibition of HBV replication *in vivo* by anti-HBx short hairpin RNAs. *Mol Ther* 2006; 13: 411-421
- 24 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
- 25 Hou W, Ni Q, Wo J, Li M, Liu K, Chen L, Hu Z, Liu R, Hu M. Inhibition of hepatitis B virus X gene expression by 10-23 DNazymes. *Antiviral Res* 2006; 72: 190-196
- 26 吴亚平. 全球性应用乙肝疫苗预防和控制乙型肝炎. 中国流行病学杂志 1989; 10: 57-60
- 27 Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, Crowther L, Condeary LD, Woessner M, Rubin M, Brown NA. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999; 341: 1256-1263
- 28 Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL, Gray DF. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 61-68
- 29 Schalm SW, de Man RA, Heijtkink RA, Niesters HG. New nucleoside analogues for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1995; 22: 52-56
- 30 Gonzalez-Aseguinolaza G, Crettaz J, Ochoa L, Otano I, Aldabe R, Paneda A. Gene therapy for viral hepatitis. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6: 1263-1278
- 31 von Weizsacker F, Wieland S, Kock J, Offensperger WB, Offensperger S, Moradpour D, Blum HE. Gene therapy for chronic viral hepatitis: ribozymes, antisense oligonucleotides, and dominant negative mutants. *Hepatology* 1997; 26: 251-255
- 32 Wands JR, Geissler M, Putlitz JZ, Blum H, von Weizsacker F, Mohr L, Yoon SK, Melegari M, Scaglioni PP. Nucleic acid-based antiviral and gene therapy of chronic hepatitis B infection. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: S354-369

电编 张敏 编辑 张焕兰