

- characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995, 3: 673 - 682.
- [5] Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*, 1999, 104: 155 - 162.
- [6] 公伟, 李占元, 曾庆东, 梁飞等. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体联合化疗药物杀伤胰腺癌细胞的研究. *中华肝胆外科杂志*, 2006, 2(12): 2.
- [7] 刘彤华, 李德春, 王永志. 反意义寡核苷酸对人胰腺癌细胞系细胞生长抑制作用. *中华病理学杂志*, 1993, 22, 25 - 29.
- [8] Knauert. MP, Glazer PM. Triplex forming oligonucleotides, sequence - specific tools for gene targeting. *Hnm Mol Gennet*, 2001, 10: 2243 - 2251.
- [9] Aoki K, Yoshida, Sugimura T, et al. Liposome - mediated in vivo gene transfer of antisense K - ras construct inhibits pancreatic tumor dissemination in the murine peritoneal cavity. *Cancer Res*, 1995, 55: 3810 - 3816.
- [10] Bouvet M, Bold RJ, Lee J. Adenovirus - mediated wild - type p53 tumor suppressor gene therapy induces apoptosis and suppresses growth of human pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol*, 1998, 5: 681 - 687.
- [11] Mukhoadhyay T, Roth JA. A codon 248 mutation retains tumor suppressor function as shown by enhancement of tumor growth by antisense p53. *Cancer Res*, 1993, 53: 4362 - 4366
- [12] Kijima H, Scanlon KJ. Ribozyme as an approach for growth suppression of human pancreatic cancer. *Mol Biotechnol*, 2001, 14: 59 - 72
- [13] Tsuchida T, Kijima H, Hor S, et al. Adenovirus - mediated anti - K - ras ribozyme induces apoptosis and growth suppression of human pancreatic carcinoma. *Cancer gene Therapy*, 2000, 7: 373 - 383
- [14] Kasuya H, Nomoro S, Kimata H, et al. Gene therapy for pancreatic cancer. *Hepato - gastroenterology*, 2001, 48: 957 - 961.
- [15] Kasuya H, Nishiyama Y, Nomoto S. Intraperitoneal delivery of hrR3 and ganciclovir prolongs survival in mice with disseminated pancreatic cancer. *J Surg Oncol*, 1999, 72: 136 - 141
- [16] McAuliffe PF, Jarnagin WR, Johnson P, et al. Effective treatment of pancreatic tumors with two multimitated herpes simplex oncolytic viruses. *J Gastrointest Surg*, 2000, 4: 580 - 588.
- [17] Yano T, Ishikura H, Kato H, et al. Vaccination effect of interleukin - 6 - producing pancreatic cancer cells in nude mice: a model of tumor prevention and treatment in immune - compromised patients. *Jpn J Cancer Res*, 2001, 92: 83 - 87
- [18] Sato T, Yamauchi N, Sasaki H, et al. An apoptosis - inducing gene therapy for pancreatic cancer with a combination of 55k Da tumor necrosis factor (TNF) receptor gene transfection and mutein TNF administration. *Cancer Res*, 1998, 58: 1677 - 1683.
- [19] Detjen K M, Farwig K, Welzel M, et al. Interferon gamma inhibits growth of human pancreatic carcinoma cells via caspase dependent induction of apoptosis. *Gut*, 2001, 49: 251 - 262.
- [20] Maehara N, Nagai F, Mizumoto K, et al. Gene transduction of NK4, HGF antagonist, inhibits in vitro invasion and in vivo growth of human pancreatic cancer [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2002, 19: 417 - 426.
- [21] Cascallo M, Calbo J, Gelpi Jt, et al. Modulation of drug cytotoxicity by reintroduction of wild - type p53 gene (Ad5CMV - p53) in human pancreatic cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7: 545 - 556.
- [22] Ghaneh P, Greenhalf W, Hump Hreys M, et al. Adenovirus - mediated transfer of p53 and p16ink4a result in pancreatic cancer regression in Vitro and in vivo [J]. *Gene Therapy*, 2001, 8(3): 199 - 208.
- [23] Ohshio G, Suwa H, Imanura M. Clinical implication of anti - p53 antibodies and p53 - protein in pancreatic disease [J]. *Int J Gastrointest Cancer*, 2002, 31: 129 - 135.
- [24] Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4(DPC4) in activation in human cancer. *Cancer Res*, 2001, 61: 4836 - 4872.
- [25] Fengxh Zhang, Y Wu. The tumor suppressor smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for Smad in TGH - induces transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for Smad3 in TGH - induced transcriptional activation. *Genes Dev*, 1998, 12: 2153 - 2163.
- [26] 吴文川, 靳大勇等. GM - CSF 增强胰腺癌 MUC1 - VN - TR 核酸疫苗免疫效果的研究. *中华肝胆外科杂志*, 2006, 7, 12, 7, 467 - 470.

作者单位: 545007 广西省柳州市第三人民医院肝胆外科¹
650101 云南省昆明市医学院第二附属医院外一科²

乙型肝炎病毒: 复制机制与基因封闭策略

胡康洪

【中图分类号】R512.6+2

【文献标识码】A

【文章编号】1672 - 5085(2008)07 - 0005 - 03

2008年5月19日是全球第一个世界肝炎日。按照世界卫生组织的最新统计,全世界患有慢性乙型肝炎(其病原 Hepatitis B virus,简称 HBV)的病人高达三亿五千万,其中,中国有一亿人呈乙肝病毒表面抗原阳性,是 HBV 感染人数最多的国家。HBV 在肝脏中持续存在易引起慢性感染(CHB),CHB 是导致肝硬化和肝癌的最主要诱因。目前,针对 CHB 的临床治疗主要通过注射干扰素或服用核苷(酸)类似物如拉米夫定(lamivudine) [1]等地

福韦(adefovir)等 [1,2]。然而,干扰素应答率低 [3]副作用大;使用核苷(酸)类似物易引起耐药性病毒突变株的出现。从分子水平上理解 HBV 的复制机制,确立新颖的药物干预靶标,并相应筛选有效的抑制剂,是临床实际的迫切需要。

1 HBV 感染及其后果

HBV 通过性接触、输血、使用血液制品而传播。在吸毒人群中利用不洁针头引起的交叉感染也是一种常见的传播方式。母

论 著

亲患有肝炎,新生儿被感染的可能性高达90%。感染HBV后,依临床表现分急性和慢性两种不同的炎症。急性炎症随后大部分自愈。大约5%~10%的感染病例转成慢性炎症。慢性感染情况下,免疫系统对潜伏的病毒进行持续地应答和攻击,但又无法成功清除之,常伴随以感染肝细胞的死亡。另外,损伤的肝组织不断被无功能意义的胞间基质蛋白质如I型和III型-胶原蛋白所取代,逐渐形成肝硬化,晚期极易诱发肝癌。肝癌是我国最常见的癌症之一。

2 疫苗虽然成功,但仍有局限性

利用基因技术在酵母细胞中大规模制造乙肝疫苗已经有了一些年的历史。不同于传统的用病毒灭活株作为疫苗,新型疫苗仅含有HBV囊膜蛋白。很多国家对新生儿接种,以避免感染。新型乙肝疫苗的应用减低了人群感染HBV的风险,取得的成就有目共睹。但是,在很多发展中国家,疫苗的费用仍非常昂贵;另外,疫苗仅仅是预防性的,对已经患有慢性感染的患者束手无策。

对业已形成的感染进行彻底治疗特别困难。首先,采用何种办法,仅仅特异性地攻击病毒和感染细胞,而又不损伤宿主器官?这与癌症治疗研究中遇到的难题相似。此外,病毒遗传物质核酸序列具有高的变异性,以致能够形成对抗治疗的变异体。针对慢性乙肝,临床上应用-干扰素取得了一定的疗效。这种人体的免疫分子已能用基因技术大规模生产。但是,它在临床上的疗效,长期仅达到30%左右,其原因不是十分清楚。

拉米呋啶(lamivudine)是另一种已经应用于临床的药物。它是一种核苷类似物,作为HBV P蛋白的底物,可以渗入正在合成的DNA链中。由于它缺乏应有的3',5'磷酸二酯键,使DNA合成反应无法继续进行。动物实验和临床实验证实它几乎没有毒副作用。临床数据显示使用该药后病人血清转阴率30%左右,与干扰素的效果相当。但是,在拉米呋啶治疗过程中,HBV能产生抗性突变,突变位点在P蛋白的催化区域:野生型中Tyr-Met-Asp-Asp(YMDD)中的甲硫氨酸(Met)被缬氨酸(Val)或异亮氨酸(Ile)代替,使病毒对其产生抗性。尽管如此,经验显示,长期持续地使用拉米呋啶可使病人维持较低的HBeAg。另外,将拉米呋啶和干扰素结合使用,得到比单一使用一种药物更好的效果。其它一些核苷类似物,比如Adefovir-dipivoxil, Coviciracil, Lobicavir等,也正在开始对HBV患者试用。

3 HBV复制的基本过程

不同于一个真正的生物体,病毒并不通过生长和分裂繁殖自身。病毒分子中包含有一些程序,指导病毒的遗传物质核酸和其它一些结构蛋白组分的增殖。另外,分子中还包含有一些信息,使得单一组分,在细胞因子的帮助下,自发组装(装配)成新的病毒颗粒。对这些分子和它们的相互作用进行研究,有助于我们了解HBV复制的分子生物学。这样获取的信息对开发新的治疗方案是有价值的。另外,HBV的核酸很小,其编码的蛋白质也很少,这为研究生命基本分子过程提供了一个相对简单的较为理想的模式系统^[3,4,5]。

HBV基因组最引人注目的一个特征就是非常小,并以不寻常的形式呈现。其基因组大约三千个核苷酸,比已知的最大的病毒基因组小几百倍,和人类拥有的基因组相比较,仅仅是百万分之一。为了补偿这一过分小的缺陷,病毒发展了一套精细的机制,特别有效地运用它的遗传信息。比方,总共四个基因,通过巢式转录,共编码七种蛋白质,这些蛋白质又能显示不同的结构。病毒在细胞之间以成熟的病毒颗粒形式存在,其内部基因组仅仅是部分双链形式,即只有两条链中的一条链是全长的。在颗粒内部,对复制病毒基因组至关重要的病毒“多聚酶(P)蛋白”,和一条DNA链共价偶连在一起。

在乙肝病人的血清中,除发现成熟病毒颗粒外,还发现许多不含核酸的空的病毒囊膜。人们把这种血清学证据称之为“乙

肝表面抗原(HBs-Antigen)”,这是一个重要的临床诊断指标。从激活免疫系统来看,乙肝表面抗原起到和成熟病毒粒子相同的作用。病毒基因组和P蛋白一起,被一个稳定的称之为衣壳蛋白的外壳所包裹,形成“核衣壳”。整个核衣壳又被一层囊膜所包被,囊膜是由病毒囊膜蛋白和宿主细胞双层酯膜组成,后者是病毒从细胞释放时,由细胞膜上获得的。

HBV感染过程是由多个步骤组成的,首先,HBV在挑选宿主细胞时特别苛刻严格。它只侵染人类和大猩猩的肝细胞。在实验室研究时,一般只能用原代肝细胞。病毒借助于其中囊膜蛋白,识别肝细胞表面特异性受体。利用与HBV有亲缘关系的鸭乙型肝炎病毒(duck hepatitis B virus, DHBV)作为模式系统,鉴定了与DHBV接合的受体分子。

病毒进入细胞后,其核酸从衣壳蛋白中释放出来,进入细胞核,形成一个完整的双链闭环环状DNA分子(cccDNA)。细胞中宿主本身的依赖于DNA的RNA聚合酶本来用于转录细胞mRNA,现在,被病毒接管用于以病毒cccDNA为模板,合成病毒mRNA。新合成的病毒mRNA输出到细胞质中,在核糖体中翻译病毒蛋白,用于包装新的病毒基因组。

类似于HIV等逆转录病毒,HBV采用一条独特的反转录途径:以病毒RNA为模板合成DNA,为此所需的反转录酶在HBV中称之为P蛋白。从时空顺序来看,首先,病毒mRNA负责翻译出衣壳蛋白和P蛋白,衣壳蛋白将病毒基因组RNA和P蛋白包裹起来,形成核衣壳,核衣壳内部进行反转录。最后,核衣壳在内质网中被病毒囊膜蛋白包裹成为成熟的病毒粒子,通过出芽方式从细胞中释放出去。

4 精密的包装机制

在细胞外部,病毒衣壳保护病毒基因组免受攻击;在细胞内部,衣壳负责运输病毒基因组到不同的地点,病毒组份得以不断加工成熟,直至从细胞中释放出去。通过氨基酸截短实验,发现仅核衣壳蛋白前四分之三的序列,足够使其形成蛋白质外壳。剩余的四分之一序列带有密集的正电荷,有助于和富含负电荷的病毒核酸接合。电子显微镜下观察到,从HBV感染的人肝中提取的衣壳,和从基因工程技术制造的衣壳,二者形状完全相同,都是由240个核衣壳蛋白亚单位组成,外观象一个由许多五角型组成的足球。二者唯一区别是,从人肝中分离的衣壳,内部电子密度较高,因为其内部包装有病毒基因组的缘故。

病毒RNA是如何包装进入衣壳的呢?而每一个衣壳中,必须同时也包装了反转录酶-P蛋白,没有它,RNA无法形成DNA基因组。由于病毒RNA仅占细胞总RNA的极少一部分,一定存在一种特异性机制专门识别病毒RNA。在实验室,借助转染技术,将“裸露”的病毒基因组导入培养的细胞系中,即避开成熟病毒粒子感染这一步骤(回避受体特异性问题)而直接增殖子代病毒。通过有目的地改变病毒基因组,将对包装必要的信号序列局限到前基因组RNA 5'末端附近区域。随后,发现了包装信号,它是一个约60nt组成的茎环结构,上下茎被一个侧向突出所隔开,外观就像一个火车信号牌。这一特殊结构,以及其中赋予的特别的核苷酸序列,使病毒前基因组RNA有别于细胞RNA。P蛋白能够特异性识别这一信号。

简言之,病毒前基因组RNA翻译衣壳蛋白亚单位和P蛋白酶,新合成的P蛋白酶特异性结合到前基因组RNA 5'端的包装信号上,衣壳蛋白亚单位围绕它们开始积聚,形成封闭的核衣壳。依靠这种简单的方式,保证病毒基因组和反转录必要的酶同时包装进入一个衣壳内^[6,7]。

核酸的合成是有方向的:即新合成的链总是从5'末端向3'末端进行。在合成开始时,酶定位在互补的模板3'末端。P蛋白和位于5'末端的包装信号结合,不能进行DNA合成。但前基因组RNA 3'末端也有一个和5'端结构和序列完全相同的, P蛋白从5'端转位到3'端,才能进行DNA合成。但是,合成的

引物从哪来呢? HBV 复制采用独特的“蛋白质引发”解决这一问题: P 蛋白和 5' 末端 结合时, 利用结构内部侧向突出上的序列作为模板, 合成由 3 到 4 个短的寡核苷酸组成的互补 DNA 片段引物, 由于它们共价结合在 P 蛋白上, 所以称之为蛋白质引发。引物合成后, P 蛋白转位到前基因组 RNA 3' 末端的另一个附近的 DR1 区, 以 RNA 为模板, 合成互补的 DNA。P 蛋白所具备的 RNase H 活力, 使得一边合成 DNA, 一边降解 RNA 模板; P 蛋白还具备聚合酶的活力, 它以新合成的 DNA 为模板, 再合成出另一条 DNA 链。

将以上事件在体外细胞培养系统中重演, 就有希望找到抑制以上反应的物质, 即病毒复制的分子抑制剂。目前还不能体外重建 HBV - P 蛋白反转录系统, 可能是因为体外缺乏胞内才具备的细胞因子, 而这些细胞因子对 HBV - P 发挥功能是必要的。但 DHBV - P 系统在兔网织红细胞溶解物 (Rabbit reticulocyte lysate) 中成功重建, 在这个体外系统中含有伴随蛋白 - 热休克蛋白 Hsp70、Hsp90 一类, 它们为 DHBV - P 发挥功能提供了必要的细胞因子^[8,9,10]。

五、对抗病毒治疗研究的启发

利用 DHBV - P 模式系统, 发现包装信号 和 P 蛋白结合后, 其结构发生急剧变化^[7,11]。我们最近从具有连续随机核苷酸序列的 RNA 文库中筛选出一些序列变异体, 它们只能和 P 蛋白结合, 有些变异体和野生型 比较, 结合能力甚至超出 20 倍到 40 倍^[12]。但是, 由于序列的改变引起的结构新变化 (比如“侧向突出”消失), 使其和 P 蛋白结合后不再能进行蛋白质引发和反转录合成 DNA。这些分子是病毒复制的潜在抑制剂, 又称诱饵 (decoy)。

目前针对慢性乙肝的基因封闭概述起来有四个方面: 核酶、反义 RNA、RNA 干扰、诱饵技术、胞内引入干扰肽或干扰蛋白。

我们在体外和细胞抽提物中, 运用锤头型核酶能有效切割 HBV 包装信号, 但这种效果在完整细胞中目前还无法观察到。反义 RNA 和 RNA 干扰技术, 在 DHBV, WHV (土拨鼠肝炎病毒), 裸鼠等实验模型中, 显示 HBV 靶 RNA 被特异性封闭或降解。近年发展的指数级富集的配体系统进化技术 (SELEX), 极大地便利了设计和筛选适体 (aptamer) 用于抗病毒治疗^[12,13]。

不同于前面几种技术作为转录、转录后水平的干预, 干扰肽或干扰蛋白质是翻译后水平的干预。即: 胞内合成干扰性多肽或 HBV 抗体, 例如 HBeAg 抗体并维持其非分泌形式。另外, 在 HBV 衣壳蛋白的 C 末端融合进核酸酶, 使其攻击衣壳内的 HBV 基因组。

无疑, 阐明 HBV 复制的分子细节, 不仅对基础研究, 而且对筛选有效的分子抑制物十分重要。病毒的各种组份间的相互作用, 以及它们和细胞因子间的相互作用, 构成了在时空上十分精确的分子间共同作用的网络, 最终导致产生新的病毒颗粒。原则上, 每个相互作用的环节都可以考虑成治疗性干预的攻击点。病毒的一些重要步骤被掀开了面纱, 一些与之相关的细胞因子的作用也被人们逐步认识。一些复制步骤甚至能够在体外重建并进行详细的生化分析, 尽管主要是针对鸭乙型肝炎病毒 (DHBV) 模式系统^[14]。对 HBV 而言, 目前还缺乏一个可进行感染而不仅仅是转染的细胞系, 以便更细节地研究受体特异性等 HBV 复制的早期步骤; 适当的动物模型也在寻找中, 并期望它能填补从灵长类大猩猩到土拨鼠和鸭如此巨大的宿主鸿沟, 以便验证抗病毒治疗的效果。在此方面, 在树鼩上正不断取得令人振奋的结果。随着对 HBV 认识的逐渐增多, 我们有信心利用基因封闭技术最终战胜这种严重的人类重大病毒性传染病。

参考文献

- [1] Jochum C. and Gerken G. (2000) Chronic hepatitis type B and C: recent progress in antiviral therapy. In Dienes, H. P., Brechot, C and Okuda, K (eds.) Chronic hepatitis - new concepts of pathogenesis, diagnosis and treatment, Falk Workshop, pp. 229 - 235.
- [2] Nassal M. (2000) Macromolecular interactions in hepatitis B virus replication and particle assembly. In Cann, A. J. (ed.), DNA virus replication. Oxford University Press, Oxford, U K, Vol. 26, pp. 1 - 40.
- [3] Nassal M. (2008) Hepatitis B virus: reverse transcription a different way Virus Res. 134, 235 - 249
- [4] Beck J. and Nassal M. (2007) Hepatitis B virus. World J Gastroenterol 13:48 - 64
- [5] Ganem D. and Schneider R. (2001) Hepadnaviridae: the viruses and their replication. In Fields, B. N. et al. (eds.) Fields Virology 4th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- [6] Wang GH. and Seeger C. (1992) The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. Cell, 71, 663 - 670.
- [7] Beck J. and Nassal M. (1998) Formation of a functional hepatitis B virus replication initiation complex involves a major structural alteration in the RNA template. Mol. Cell. Biol., 18, 6265 - 6272
- [8] Hu J. and Seeger C. (1996) Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1060 - 1064.
- [9] Stahl M., Beck J. and Nassal M (2007) Chaperones activate hepadnavirus reverse transcriptase by transiently exposing a C - proximal region in the terminal protein domain that contributes to epsilon RNA binding. J. Virol. 81 (24):13354 - 13364
- [10] Stahl M, Retzlaff M, Nassal M, Beck J. (2007) Chaperone activation of the hepadnaviral reverse transcriptase for template RNA binding is established by the Hsp70 and stimulated by the Hsp90 system. Nucleic Acids Res. 35 (18):6124 - 6136
- [11] Hu J. and Boyer M. (2006) Hepatitis reverse transcriptase and epsilon RNA sequence required for specific interaction in vitro. J Virol 80, 2141 - 2150
- [12] Hu K., Beck J. and Nassal M. (2004) SELEX - derived aptamers of the duck hepatitis B virus RNA encapsidation signal distinguish critical and non - critical residues for productive initiation of reverse transcription. Nucleic Acids Res. 32(14), 4377 - 4389.
- [13] Feng H., and Hu K. (2008) Application of antiviral aptamers against hepatitis. Chinese J Exp. Clin. Infect. Diseases. 2(3) (in press)
- [14] Schultz U, Grgacic E, Nassal M. (2004) Duck hepatitis B virus: an invaluable model system for HBV infection. Adv Virus Res. 63:1 - 70.

作者单位: 430071 湖北武汉 中国科学院武汉病毒研究所