

HBV 基因结构及体外表达的研究现状

汤 华 任中原

(天津医学院微生物学教研室, 天津30070)

The Studied Advances of Structure and in Vitro Expression of the Hepatitis B Virus Genome

Tang Hua Ren Zhong-yun

(Department of Microbiology, Tianjin Medical College, Tianjin 30070)

关键词: 乙型肝炎病毒 基因表达 病毒培养

Key words: Hepatitis B virus Expression of gene Propagation of virus in vitro

人乙型肝炎病毒 (HBV) 不仅能引起人类急慢性肝炎, 而且还可导致原发性肝癌的形成^[1]。然而, 遗憾的是至今尚无有效的办法来防治 HBV 的感染。近年来, 由于基因重组技术的发展, 加速了 HBV 的研究进程, HBV 的基因结构, 转录及增殖特性已基本弄清, 并且整合在原发性肝癌细胞染色体上的 HBV DNA 序列亦被证实。同时采用多种载体系统重组 HBV DNA 片段, 在体外已成功地表达了乙型肝炎表面抗原 (HBsAg), 乙型肝炎核心或 e 抗原 (HBcAg/HBeAg), 可望采用基因工程的方法来制备合适的 HBV 疫苗替代昂贵的 HBV 血源性疫苗。目前, 用来研究 HBV 基因表达的方法大体上可归纳为如下三种: (1) 体外转录克隆的 HBV DNA^[2]; (2) 将 HBV 基因整合到人, 小鼠及大鼠细胞的染色体上进行表达^[3]; (3) 将 HBV DNA 片段或序列重组在细菌质粒或病毒载体 (SV₄₀、痘苗、逆转病毒及单纯疱疹病毒) 上, 而后转染原核细胞 (E. coli, 酵母菌) 或哺乳类细胞进行表达。

完整的 HBV 颗粒由外壳蛋白 (HBsAg) 与核衣壳组成, 核衣壳由 HBcAg 构成, 其核心部分含有病毒 DNA, DNA 多聚酶/逆转录酶, 蛋白激酶及 DNA 结合蛋白^[4], 另一种存在于急慢性乙肝病人血清中呈可溶性状态的蛋白称之为 HBeAg, 它是由 HBV C 基因 (不含前 C 区) 编码的, 当用 2-巯基乙醇, 热或轻微的蛋白酶处理 HBV 核心颗粒时, 可使 HBcAg 转变成 HBeAg, 亦有人认为 HBeAg 能形成多聚体形式, 可能是病毒核心的一结构成分^[5]。

HBV 的基因结构与功能^[4,6,7,8]

HBV 基因组是一不寻常的特异性结构, 它是一环形的部分双股的 DNA 分子 (图

本文于1988年1月13日收到

已证明 HBV DNA 的 S(+) 链不管多长均不具有编码蛋白的功能即不含有开放读码框架 (open reading frame, ORF), 而 L(-) 链则含有所有 HBV 的蛋白密码, 其转录的 4 个 ORF, 分别称为 S, C, P 和 X, P 区最长与另外的三个区重叠, 这样, L(-) 链被阅读一次半。

S 区编码 HBV 包膜蛋白, 分为前 S₁ (Pre-S₁) 区, 前 S₂ (Pre-S₂) 区及 S 基因。HBV 各亚型的 S 基因与 Pre-S₂ 的长度是一致的, 而 Pre-S₁ 区变化较大, adw 亚型比 ayw 亚型的 Pre-S₁ 区约长 33 个核苷酸。Pre-S₁ 与 Pre-S₂ 的变异率相当于 S 基因的两倍, 这说明 S 基因编码病毒外壳的主要结构蛋白, 而 Pre-S 区的氨基酸顺序与病毒的包装关系较小, 但影响宿主的免疫应答。以前认为 S 蛋白抗体具有中和作用, 近来研究表明 Pre-S₂ 编码的 55 个氨基酸多肽的免疫原性明显高于 HBsAg 的 S 区, 该多肽的 N-末端的 26 个氨基酸含有代表主要抗体结合部位的决定簇。Pre-S₁ 区编码的 108 个 (adw 亚型) 或 119 个 (ayw 亚型) 氨基酸多肽, 连接在“中”蛋白 (后述) 的 N-末端, 并且位于病毒颗粒表面, 亦具有较高的免疫原性。Pre-S₁ 多肽在小鼠体内具有 T、B 细胞水平上的免疫活性, 在人急性 HBV 感染过程中, 可产生 Pre-S₁ 特异性体液免疫反应, 不过, Pre-S₁ 特异性抗体是否参与体内病毒的清除过程尚不清。

C 基因区编码核心抗原 (HBcAg) 和 e 抗原 (HBeAg)。该区有两个起始密码子, 一个位于核苷酸 1814, 另一个位于核苷酸 1901, 二者之间含有的 29 个密码子称为前 C 区 (Pre-C), 其它则称为 C 区。核苷酸第 1814~2450 序列编码 HBcAg, 而核苷酸第 1901~2450 序列编码 HBeAg。此外, 在前 C 第 1816 核苷酸处有一缺口, 推测该区为 HBV DNA 整合入宿主 DNA 的部位, 从而解释了为什么 HBV DNA 整合入宿主细胞 DNA 时, 通常只表达 HBsAg, 而不表达 HBcAg 或病毒颗粒。

P 区转译的产物是富含组氨酸的碱性蛋白, 分子量约为 90,000 道尔顿, 与 DNA 多聚酶相似。比较这种蛋白的氨基酸序列, 结果发现其覆盖 S 基因末端区所编码的氨基酸顺序与所有反转录病毒和花椰嵌病毒 (CaMV) 的反转录酶部分同源, 因而认为 P 区编码具有反转录酶活性的病毒 DNA 多聚酶。

X 区编码 145 到 154 个氨基酸的多肽, 其功能尚不清楚, 用合成多肽的抗体从 HBV 感染的肝组织中检测出相应的多肽为 P28, 而在原发性肝癌患者血清中测得与 HBxAg 起反应的抗体, 但抗-HBx 是否能作为 HCC 的血清学标记尚有待证实。

HBV 基因的转录与调控

在 HBV 感染的黑猩猩肝脏中检测到了两个 HBV 特异性 Poly (A) RNA 分子, 二者均是由 HBV DNA L(-) 链转录的, 分别命名为 2.1kb RNA 和 3.5kb RNA (图 1)。2.1kb RNA 分子的 5'-末端位于 Pre-S₂ 区上游 20 个核苷酸处, 而 3'-末端则位于 C 基因起始附近, 它覆盖了 Pre-S₂ 区、S 基因和 X 区。3.5kb RNA 分子的 5'-末端位于 Pre-C 区, 其 3'-末端与 2.1kb RNA 分子的 3'-末端位置相同, 因此, 它覆盖了整个 L(-) 链, 外加 100 个核苷酸序列。这提示 3.5kb RNA 分子产生于共价闭环形 HBV DNA, 并进行了极小部分的再次转录。通过克隆的 HBV DNA 片段转染细胞, 证实了 2.1kb RNA 是

HBV 主要包膜蛋白的翻译模板, 而 3.5kb RNA 则是其核心蛋白的翻译模板, 同时很可能指导具有反转录酶活性的 HBV DNA 多聚酶的合成, 至于指导其它 HBV 蛋白的 mRNA 尚不清楚^[1,4,9]。

HBV 只能在人和黑猩猩的肝脏中增殖^[4], 这提示 HBV 基因的表达存在严格的种系及组织特异性。已证实 HBV 基因组中至少含有 3 个启动子, HBcAg 基因启动子(CP), Pre-S 区启动子(SP_I)及 S 基因启动子(SP_{II}), 它们在 HBV DNA 基因图上的位置分别是核苷酸 1648、核苷酸 2780 及核苷酸 3152 处^[9,10,11]。Siddiqui 等描述的在 HBV DNA Pre-S 区内, EcoRI 切点上游部位, 控制其主要表面蛋白合成的“内部”(internal)启动子可能就是 SP_{II}^[12]。最近发现在哺乳类动物细胞及其病毒基因启动子上游区, 存在一顺式(in cis)刺激其启动子活性的核苷酸序列, 称之为增强子。HBV 增强子位于 HBcAg 基因启动子上游的 450 位核苷酸处即表面抗原的编码序列与“X”区之间, 它能明显地增强 HBsAg 基因启动子的活性及 HBcAg 基因的表达^[13,14,16]。不过增强子本身只有组织细胞特异性的反式作用因子(trans-act factor)作用下, 才能发挥作用^[16], Shaul 等从人肝癌细胞(Hep-G₂, PLC/PRF/5, Hep3B 等)中提取的特异性核蛋白能与 HBV 增强子及其上游区结合, 并明显增强了 HBV 基因的表达^[17]。因而, 推测肝细胞中这种特异性核蛋白的存在可能是 HBV 嗜肝性的原因所在。

HBV 基因的体外表达

前面已提到 HBV DNA L(-) 链的 4 个 ORF 编码的蛋白分别为 HBsAg、HBcAg/HBeAg、HBV DNA 多聚酶及 X 蛋白。如图 2 所示, S 基因编码的由 226 个氨基酸的多肽组成, 是 HBV 包膜的主要构成成分, 称为“主要”蛋白, Pre-S₂ 区与 S 基因共同编码的蛋白由 281 个氨基酸组成, 称为“中”蛋白, Pre-S₂ 多肽区含多聚人血清白蛋白受体(pHSA), Pre-S₁、Pre-S₂ 与 S 基因共同编码的蛋白最大, 含 398 氨基酸(adw 亚型), 称为“大”蛋白。最早采用克隆的 HBV DNA, 在酵母或哺乳类细胞中表达的蛋白通常是 S 基因编码的“主要”蛋白^[18,19], 而后来研究表明 HBsAg 的主要抗原决定簇位于 Pre-S₂ 多肽区, 并证明了 Pre-S₂ 多肽在小鼠体内能增加 S 蛋白的免疫原性, 人工合成的 Pre-S₂ 多肽的抗体能中和 HBV 的感染性并起到保护黑猩猩的作用, 因而认为体内 Pre-S₂ 多肽抗体在清除 HBV 过程中可能起到重要作用^[20-22]。所以, 近来人们致力于表达含 Pre-S₂ 多肽的“中”蛋白或含整个 Pre-S 多肽的“大”蛋白的研究。目前, 使用 HBV DNA 片段克隆已成功地在酵母细胞及哺乳类细胞中表达了具有多聚人血清白蛋白(pHSA)受体的“中”蛋白^[23,24], 同样已证明含 Pre-S₂ 基因与 S 基因克隆质粒的大肠杆菌(E. coli)提取物中的 HBsAg 颗粒亦含 pHSA 受体^[26]。Dehoux 等在酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)中成功地表达了含整个 Pre-S 多肽的“大”蛋白, 分子量为 3.9 KD, 具有 pHSA 受体, 并认为这种蛋白参与 HBV 颗粒包膜的构成^[26]。Scully 等将 S 基因插入柱状病毒(Baculovirus, 一种无脊椎动物病毒)基因中, 而后转染一种昆虫(Spodoptera frugiperda)细胞, 能分泌大量的 22nm HBsAg 颗粒, 认为可用来制备疫苗^[27]。

近来研究的另一方向是所谓的“嵌合”蛋白或“融合”蛋白的表达, 采用痘苗病毒

作 HBV 基因表达的载体, 其目的是在种痘的同时使机体获得对 HBV 的免疫力。此外, Delpyroux 等在 HBV S 基因部位插入合成的编码脊髓灰质炎病毒蛋白的 DNA 片段, 然后重组表达, 结果表明在产生的 22nm HBsAg 颗粒上携带有脊髓灰质炎病毒蛋白, 并能诱导产生特异性的中和抗体^[28]。因此, 很有可能通过基因工程的办法, 制备出高效的多价疫苗。

此外, HBsAg 颗粒在转染细胞中的形态发生也已开始研究。Patzner 等用 S 基因转染 CHO 细胞的研究结果表明, 合成的 HBsAg 蛋白在内质网中装配成柱状或球形颗粒, 并在其中聚集成一膨大区域; 形成的 HBsAg 多肽并不立即与胞浆膜发生融合; 胞内未能检测到 HBsAg 与寡聚唾液酸的复合物; 免疫荧光证实细胞膜上不含有 HBsAg, 因而认为 HBsAg 不是通过与细胞膜的融合而释放的^[29]。

X 基因编码的蛋白在体外表达也已成功。Siddiqui 等与 Pfaff 等分别报道了重组 X 基因在 Hep-G₂ 细胞和 SP₂ 系统表达的结果; 该蛋白由 154 个氨基酸组成, 分子量为 17/16.56 道尔顿, 并在兔体内制备出抗血清, 而后在 HBV 感染的肝脏中查到了相应 X 蛋白 p28, 但在患者血清中未能检出此种蛋白^[30,31]。

Serrano 等采用闭环状 HBV DNA 转染 Buffalo 大鼠肝细胞, 结果产生了 HBsAg 与 HBeAg, 并证实其 HBeAg 与蛋白磷酸激酶活性有关^[3]。Marquardt 等将在体外培养时仅产生 HBsAg 的 PLC/PRF/5 肝癌细胞接种于裸鼠体内, 结果检测到了 HBsAg 与 HBeAg 的产生, 而后从裸鼠体内再次取出该细胞培养时, 其 HBeAg 产生能力随之消失, 因而认为这种模式可用来研究 HBeAg 表达的调节^[32]。

最近, 几家实验室各自先后报道, 采用克隆环状的 HBV DNA 转染人肝癌细胞 (Hep-G₂) 成功地表达了 HBV 的全部标志, 包括 HBV DNA, HBV DNA 多聚酶, HBsAg 和 HBeAg/HBeAg, 并在培养上清液中检测到了少量的 Dane 氏颗粒, 从而宣告 HBV 体外培养成功^[33-36]。接着, Acs 等将培养出来的 HBV 接种到黑猩猩体内, 结果产生了典型的肝炎症状, 从而证实了培养出来的病毒是具有感染性的^[37]。因此, HBV 的这种体外增殖系统为研究 HBV 的增殖特性及抗 HBV 药物筛选提供了有效的模式。

参 考 文 献

- (1) David, H.R. & Hoofnagle, J.H., 1987, *Hepatology*, 7: 764
- (2) Chakraborty, P.R. et al., 1981, *Virology*, 111: 647
- (3) Serrano, M.A., & Hirschman, S.Z., 1984, *J. Gen. Virol.*, 65: 1373
- (4) Tiollais, P. et al., 1985, *Nature*, 317: 489
- (5) Aspinall, S. et al., 1986, *J. Gen. Virol.*, 67: 2315
- (6) Michel, M.L. & Tiollais, P., 1987, *Hepatology*, 7: 616
- (7) Will, H.W. et al., 1987, *J. Virol.*, 61: 904
- (8) Hoofnagle, J.H. et al., *Seminars in Liver Disease*, 6: 1
- (9) Cattaneo, R. et al., 1984, *EMBO J.* 3: 2191
- (10) Standing, D.N. et al., 1984, *J. Virol.*, 50: 563
- (11) Rall, L.B. et al., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3: 1766

- [12] Siddiqui, A. et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83** : 1027
- [13] Shaul, Y. et al., 1985, *EMBO J.* **6** : 1913
- [14] Tur-Kaspa, R. et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83** : 1027
- [15] Chang, H. K. et al., 1987, *Nucl. Acids. Res.* **15** : 2261
- [16] Jameel, S. & Siddiqui, A., 1986, *Mol. Cell. Biol.*, **6** : 710
- [17] Shaul, Y. & Ben-Levy, R., 1987, *EMBO J.* **6** : 1913
- [18] Murray, K. et al., 1984, *EMBO J.* **3** : 645
- [19] Choo, K. B. et al., 1985, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131** : 160
- [20] Milch, D. R. et al., 1985, *Science*, **228** : 1195
- [21] Neurath, A. R. et al., 1984, *Science*, **224** : 392
- [22] Neurath, A. R. et al., 1986, *Vaccine*, **4** : 35
- [23] Valenzuela, P. et al., 1985, *Biotechnology*, **3** : 317
- [24] Michel, M. L. et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81** : 7708
- [25] Fujisawa, Y. et al., 1985, *Gene*, **40** : 23
- [26] Deboux, P. et al., 1988, *Gene*, **48** : 155
- [27] Scully, L. J. et al., 1987, 第六届国际病毒性肝炎与肝病会议文摘汇编, P75 英国, 伦敦
- [28] Delpeyroux, F. et al., 1986, *Science*, **235** : 472
- [29] Patzer, E. J. et al., 1986, *J. Virol.* **58** : 884
- [30] Siddiqui, A. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84** : 2513
- [31] Plaff, E. et al., 1987, *Virology*, **158** : 456
- [32] Marquardt, O. et al., 1984, *J. Gen. Virol.* **65** : 1448
- [33] Sureau, . et al., 1986, *Cell*, **47** : 37
- [34] Yaginuma, K. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84** : 2678
- [35] Tsurimoto, T. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84** : 444
- [36] Sells, M. A. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84** : 1005
- [37] Aou, G. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84** : 4641