

肝富集转录因子对乙型肝炎病毒转录与复制的调控

王甦, 唐红

王甦, 四川大学华西医院感染性疾病中心, 生物治疗国家重点实验室感染性疾病分子生物学研究室(现在扬州大学医学院附院感染科) 四川省成都市 610041
唐红, 四川大学华西医院感染性疾病中心 四川省成都市 610041
国家杰出青年基金资助项目, No. 30325036
通讯作者: 唐红, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院感染性疾病中心. htang6198@hotmail.com
收稿日期: 2007-01-13 接受日期: 2007-02-12

Regulation of hepatitis B virus transcription and replication by liver-enriched transcriptional factors

Su Wang, Hong Tang

Su Wang, Center of Infectious Diseases, West China Hospital of Sichuan University; Molecular Biology Division of Infectious Diseases, National Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Hong Tang, Center of Infectious Diseases, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars, No. 30325036
Correspondence to: Hong Tang, Center of Infectious Diseases, West China Hospital of Sichuan University, 610041, Sichuan Province, China. htang6198@hotmail.com
Received: 2007-01-13 Accepted: 2007-02-12

Abstract

Hepatotropism is a prominent feature of hepatitis B virus (HBV). Cell lines of nonhepatic origin do not independently support HBV replication. In this review, we show that the nuclear hormone receptors, hepatocyte nuclear factor 4 and retinoid X receptor plus peroxisome proliferator-activated receptor, support HBV replication in nonhepatic cells by controlling pregenomic RNA synthesis, indicating that these liver-enriched transcription factors control a unique molecular switch restricting viral tropism. In contrast, hepatocyte nuclear factor 3 antagonizes nuclear hormone receptor-mediated viral replication, demonstrating distinct regulatory roles for these liver-enriched transcription factors.

Key Words: Hepatitis B virus; Transcription and replication; Liver-enriched transcription factors

Wang S, Tang H. Regulation of hepatitis B virus transcription and replication by liver-enriched transcriptional factors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(11):1237-1240

摘要

乙肝病毒具有明显的嗜肝性。在非肝源乙肝病毒复制体系中,发现肝富集转录因子在HBV肝特异性复制过程中起重要作用。其中,肝富集转录因子HNF4和RXR α -PPAR α 是调节前基因组RNA转录和病毒复制所必需,是病毒嗜肝性的重要决定因素之一,而肝富集转录因子HNF3对HNF4和RXR α -PPAR α 介导的HBV转录和复制具有抑制作用。从而揭示HBV的嗜肝机制涉及HBV感染进入细胞和HBV基因转录复制两个水平的调控。

关键词: 乙肝病毒; 转录与复制; 肝富集转录因子

王甦, 唐红. 肝富集转录因子对乙型肝炎病毒转录与复制的调控. 世界华人消化杂志 2007;15(11):1237-1240
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1237.asp>

0 引言

HBV属嗜肝DNA病毒,通过逆转录机制复制。其基因组全长3.2 kb,具有Cp, PSlp, Sp和Xp 4个启动子,分别调控3.5, 2.4, 2.1和0.7 kb HBV mRNA的转录,并进而编码合成HBcAg、HBeAg、DNA多聚酶、HBsAg及HBxAg,且3.5 kb前基因组RNA(pregenomic RNA)也是病毒逆转录复制的模板。因此,HBV基因组的转录是病毒复制过程中最关键的步骤。肝富集转录因子(liver-enriched transcription factor)是一类具基因转录调控作用的蛋白质分子,主要存在于肝脏。若干种肝富集转录因子,如肝细胞核因子(hepatocyte nuclear factor, HNF)1, HNF3, HNF4;视黄醇X受体 α (retinoid X receptor α , RXR α)、过氧化物酶增殖激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α)以及CCAAT增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP)等,能与HBV基因组的4个启动子结合,从而对HBV的

■背景资料

肝富集转录因子是一类具有基因转录调控作用的蛋白质分子,主要存在于肝脏。研究表明,若干种肝富集转录因子能与HBV基因组的启动子结合,对HBV的基因转录发挥正性和负性调控作用,由于这一领域对乙型肝炎发病机制研究和抗HBV药物作用靶点的筛选均十分重要,故成为当前的一个研究热点。

■创新盘点

本文提出肝富集转录因子在HBV的肝特异性复制表达过程中起重要作用。其中,核激素受体HNF4和RXR α /PPAR α 能支持HBV在非肝源细胞中的转录与复制,为HBV前基因组RNA合成和病毒复制所必需,是病毒嗜肝性的重要决定因素之一,而肝富集转录因子HNF3对核激素受体介导的HBV复制具抑制作用。提示HBV复制不仅取决于HNF4和RXR α /PPAR α 的水平,也与HNF3的相对水平和活性密切相关。

基因转录发挥调控作用。研究发现,核心启动子的激活有多种肝富集转录因子^[1-5]共同参与,从而控制病毒3.5 kb前基因组RNA的转录和病毒复制。现将几种主要肝富集转录因子的生物学特性及其在乙肝病毒基因转录与病毒复制中的作一综述。

1 核激素受体-HNF4以及RXR α /PPAR α

肝细胞核因子4(hepatocyte nuclear factor 4, HNF4)是核激素受体超家族配基激活型转录因子的高度保守成员之一,具有脂溶性激素受体的特性,能够直接进入细胞核调节基因转录,从而对机体的各种生理活动进行调控,是糖及脂类等能量物质代谢所必需的调控因子。HNF4通常在肝、肾、肠高度表达,而在胰腺则呈低水平表达。过氧化物酶体增殖激活受体(PPARs)是核激素受体的亚科,有PPAR α , PPAR γ 和PPAR δ 3种亚型;与另外一个亚科视黄醇X受体(RXR)形成二聚体复合物(RXR α /PPAR α)而起作用^[6]。PPARs的配基还不清楚,但许多化学合成的过氧化物酶体增生物如对氯苯氧异丁酸(clofibrilic acid), Wy-14643能起到配基的功能。已证实9-顺式维甲酸(9-*cis*-retinoic acid)是RXRs的配基。研究显示, HNF4和RXR α /PPAR α 等核激素受体能激活乙肝病毒核心启动子。

Tang *et al*^[1-2]建立了非肝源细胞HBV复制体系。用非肝源性细胞(鼠成纤维细胞NIH3T3)作为受体细胞,利用复制型HBV重组质粒研究病毒的转录和复制。结果发现,在未用共转染肝富集转录因子时,未见3.5 kb HBV RNA转录,也未检测到病毒复制,但仍有2.1 kb HBV RNA转录(研究表明其主要受泛嗜性转录因子调节);共转染HNF1 α , HNF1 β , HNF3 α , HNF3 β , C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ 和HNF6都不支持3.5kb HBV RNA转录和病毒复制;而在共转染HNF4或RXR α -PPAR α 时,能刺激3.5 kb HBV RNA合成和病毒复制。由于3.5 kb HBV RNA水平与病毒复制相关的,因此,核激素受体HNF4和RXR α -PPAR α 是调节前基因组RNA转录的主要决定因子,并进而调节病毒复制。提示HNF4和RXR α -PPAR α 在HBV肝特异性转录复制中具有重要作用。对HBV在不同类型细胞复制水平的比较发现,在分化成熟的肝癌细胞株(huh7和hepG2)中,并不需要外来的核激素受体,HBV就能较强的进行3.5 kb HBV RNA转录和病毒复制,主要是其已有各种肝富集转录因子。而未分化成熟的

肝癌细胞hepG2.1其转录因子水平较低,非肝源性3T3细胞在共转染RXR α -PPAR α 表达质粒,显示3.5 kb HBV RNA转录和病毒复制水平约为肝癌细胞的三分之一。在Hela, 293T, SW1353, CV-1和COS1等非肝源性细胞也证明了核激素受体调节3.5 kb HBV RNA转录和病毒复制。这表明,核激素受体主要在肝细胞内正性调节病毒复制。

为研究核激素受体调节HBV复制的作用位点和机制。Tang *et al*^[1]构建在核心启动子近端的HNF4结合位点(也是RXR α /PPAR α 的结合位点)的4个碱基突变的突变型HBV HNF4mut重组质粒。结果发现,该HNF4结合位点的突变,阻碍了HNF4与核心启动子近端的HNF4结合位点的结合,结果3.5 kb HBV RNA表达较野生株有轻微的下降,而病毒复制则明显下降。说明核激素受体对HBV的增强作用主要是通过该结合位点来实现的。由于该突变型重组质粒仍能在非肝源性细胞复制体系中复制(只是水平较野生株低),提示该HNF4结合位点并非唯一的作用位点。

有学者利用HBV转基因小鼠对PPAR α 在体内的作用进行了研究,发现PPAR α 能激活HBV病毒复制,从而证明在HBV复制周期中,PPAR α 在体内的作用。Raney *et al*^[4]用带有临床常见的前C区突变(A1764T和G1766A)的HBV病毒株构建转基因小鼠,该突变发生在核心启动子核素受体结合区(A1764T和G1766A),该区的突变阻断了RXR α -PPAR α 与核心启动子核素受体结合。结果显示,与野生株转基因小鼠相比,突变株转基因小鼠肝脏中2.1 kb HBV RNA和3.5 kb HBV RNA合成呈低水平,病毒复制明显下降。因此,核激素受体(HNF4和RXR α -PPAR α)为HBV前基因组RNA合成和病毒复制所必需,且是一个正性(增强作用)的调控因子,是病毒嗜肝性的重要决定因素之一。

2 肝细胞核因子3(HNF3)

HNF3家族包括HNF3 α , HNF3 β 和HNF3 γ 3个成员,具有一高度保守的DNA结合区即翼旋(wingedhelix)区并以单体形式结合。由于该DNA结合区与果蝇叉脑(forkhead)基因相应区域高度同源^[9,18],因此将HNF3 α , 3 β 和3 γ 的编码基因称为Foxa1, Foxa2和Foxa3。HNF3各成员的氨基末端和羧基末端有长大约100个氨基酸的高度保守,参与转录激活作用。HNF3 α , HNF3 β 和HNF3 γ 以不同的亲和性与相同DNA序列结合,不仅在肝细胞的成熟分化起重要的调控作用,

也参与胚胎的发育过程. 对其功能区在HBV转录复制中的研究显示, HNF3 β 氨基末端转录激活区对其抑制HBV复制的功能是非常重要的, 而酸基末端的转录激活区对乙肝DNA合成无明显影响. HNF3调节HBV转录复制的功能区位于氨基酸残基的1-102和103-152^[10,16-17].

利用报导基因的研究(reporter gene assay)显示^[10], HNF3 β 可以增强HBV核心启动子和PS1启动子的活性. 由于HBV前基因组RNA是HBV DNA复制的模板, 其活性由C启动子调控, 因此据此推测, HNF3应该能增强HBV前基因组RNA转录和DNA复制. 但对HBV 3.5 kb mRNA由外源的CMV启动子控制时发现, HNF3抑制HBV前基因组RNA和病毒DNA的合成. 同时, 利用非肝源性细胞鼠成纤维细胞NIH3T3病毒复制体系的研究发现^[10], HNF3对HNF4和RXR α /PPAR α 介导的乙肝病毒复制具有抑制作用. HNF3 α 和HNF3 β 能使3.5 kb HBV RNA转录水平下降2-3倍, HNF3 α 使HBV复制中间体下降8倍, HNF3 β 使HBV复制中间体下降25倍. 而当核激素受体共转染HNF1时, 未显示其对HBV转录或复制的调节作用. 提示HNF3能减少3.5 kb HBV RNA的转录, 明显降低HBV复制中间体.

Banks *et al*^[11]在表达HNF3 β 的HBV转基因小鼠同样证明, 过度表达HNF3 β 可明显减少病毒复制中间体水平, 较不表达HNF3 β 乙肝转基因鼠低6-23倍. 3.5, 2.4和2.1 kb HBV RNA转录产物与对照比较降低2-4倍. 因此, HNF3抑制HBV的转录和复制, 是一个负性调节因子. 同时研究表明^[10], HBV基因组上共有7个HNF3结合位点, 其中在增强子I/X启动子(EnhI/Xp)和C启动子(Cp)区各有2个, 多聚酶编码区(PORF)、PS1p和Sp区各有1个, 因而, HNF3对HBV的转录和复制的调节可能横贯整个过程. 同时在HBV复制体系中, 也有HBsAg, HBeAg, HBxAg等病毒产物的表达. 因而HNF3也可能通过病毒蛋白产物间接抑制HBV的复制.

3 其他肝富集转录因子

肝细胞核因子1(hepatocyte nuclear factor 1, HNF1)分为HNF1 α 和HNF1 β 两亚型. HNF1 α 能与肝特异表达基因如白蛋白、 β 纤维蛋白原、 α_1 -抗胰蛋白等基因的5'顺式调控元件结合, 受HNF1 α 调控的基因都具有GGTTAAT这一保守序列, 他们的编码产物参与糖代谢、解毒和血浆蛋白合成的生理过程. 研究表明, 在HBV基因

组表面抗原含有两个串联的启动子-Sp I 和Sp II^[7-8]. 其中, Sp I 含有典型TATA盒序列, 其上游50 bp处为HNF1结合位点^[12]. 该结合位点是HBV转录调节的重要组分. 对携带HBV DNA的转基因小鼠及感染HBV的黑猩猩模型的研究表明, 表面抗原主蛋白可在不同的组织中表达, 而表面抗原大蛋白只在肝内特异发现, 这一结果提示: 表面抗原大蛋白的表达具有肝特异性, Sp I 在肝特异性表达中起着重要作用. Chang *et al*^[13]通过应用短期转染、核酸酶保护分析技术等方法对这一现象的原因进行了研究, 结果显示, HNF1与Sp I 的结合可能是主要原因. Raney *et al*^[3]用转基因小鼠发现, 表达和不能表达HNF1的转基因小鼠, 对2.4 kb HBV RNA转录无明显的差别, 但不表达HNF1的转基因小鼠其HBV复制中间体较表达HNF1的转基因小鼠高2-4倍. 不表达HNF1的转基因小鼠, 其肝细胞中有cccDNA的表达, 而在表达HNF1的转基因老鼠的肝细胞中无表达. 提示, 由于HNF1的表达缺失, 表面抗原大蛋白表达下降, 病毒成熟障碍, 病毒使cccDNA重新返回肝细胞核. 因而, HNF1对表面抗原大蛋白的表达具有重要的调控作用. 进一步研究HNF1是对核心启动子的调控作用, Zheng *et al*^[14]研究发现, HNF1对野生株核壳启动子无作用. 但在HBeAg(-)/抗-HBc(+)自然突变型HBV(在核启动子附近核激素受体RXR α /PPAR α 结合位点有两个核苷酸替换A1764T, G1766A)时, 发现这种双突变株抑制前核心RNA转录, 但创造了HNF1结合区. Tang *et al*^[2]在3T3细胞共转染pHBV 4.1 kb双突变株和HNF1表达质粒发现, HNF1能轻微增加3.5 kb RNA和病毒复制. 经核酸酶保护技术分析HNF1能轻微调节前基因组RNA和前核心RNA的比率, 且优先调节前基因组RNA. 因而增加了病毒复制模板水平, 降低前核心RNA编码的HBeAg水平. Cai *et al*^[15]发现, 用Hela细胞复制乙肝病毒, 在加入hB1F和HNF1, 发现其病毒增加25倍. 同时发现hB1F和HNF1对增强子II有协同激活作用, 提示两种因子有协同作用.

总之, HBV感染在全球范围广泛流行, 仅HBV慢性携带者就达3.5亿人之多. HBV感染不仅可引起急性、慢性和重型肝炎, 而且与肝硬化、肝癌的发生密切相关, 是严重危害人类健康的感染性疾病^[19-21]. 肝富集转录因子对HBV的转录和复制具有重要调节作用. 因而通过改变各种肝富集转录因子的绝对和相对水平, 有可能起到干扰病毒复制的作用, 这为寻找抗HBV

■应用要点

深入研究肝富集转录因子不仅有利于进一步澄清HBV的嗜肝机制, 而且为寻找可能的抗病毒靶位点提供理论依据.

■同行评价

本文论述了肝富集转录因子对乙肝病毒转录与复制的调控,科学性较好,有一定的实际价值。

的治疗的新手段提供了新的思路和作用靶点。

4 参考文献

- 1 Tang H, McLachlan A. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1841-1846
- 2 Tang H, Raney AK, McLachlan A. Replication of the wild type and a natural hepatitis B virus nucleocapsid promoter variant is differentially regulated by nuclear hormone receptors in cell culture. *J Virol* 2001; 75: 8937-8948
- 3 Raney AK, Eggers CM, Kline EF, Guidotti LG, Pontoglio M, Yaniv M, McLachlan A. Nuclear covalently closed circular viral genomic DNA in the liver of hepatocyte nuclear factor 1 alpha-null hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 2001; 75: 2900-2911
- 4 Raney AK, Kline EF, Tang H, McLachlan A. Transcription and replication of a natural hepatitis B virus nucleocapsid promoter variant is regulated *in vivo* by peroxisome proliferators. *Virology* 2001; 289: 239-251
- 5 Tang H, Banks KE, Anderson AL, McLachlan A. Hepatitis B virus transcription and replication. *Drug News Perspectives* 2001; 14: 325-334
- 6 Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995; 83: 841-850
- 7 Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J. Transcriptional control elements of hepatitis B surface antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 566-570
- 8 Huan B, Kosovskiy MJ, Siddiqui A. Retinoid X receptor alpha transactivates the hepatitis B virus enhancer 1 element by forming a heterodimeric complex with the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Virol* 1995; 69: 547-551
- 9 Cirillo LA, McPherson CE, Bossard P, Stevens K, Cherian S, Shim EY, Clark KL, Burley SK, Zaret KS. Binding of the winged-helix transcription factor HNF3 to a linker histone site on the nucleosome. *EMBO J* 1998; 17: 244-254
- 10 Tang H, McLachlan A. Mechanisms of inhibition of nuclear hormone receptor-dependent hepatitis B virus replication by hepatocyte nuclear factor 3beta. *J Virol* 2002; 76: 8572-8581
- 11 Banks KE, Anderson AL, Tang H, Hughes DE, Costa RH, McLachlan A. Hepatocyte nuclear factor 3beta inhibits hepatitis B virus replication *in vivo*. *J Virol* 2002; 76: 12974-12980
- 12 Raney AK, Easton AJ, McLachlan A. Characterization of the minimal elements of the hepatitis B virus large surface antigen promoter. *J Gen Virol* 1994; 75 (Pt 10): 2671-2679
- 13 Chang HK, Ting LP. The surface gene promoter of the human hepatitis B virus displays a preference for differentiated hepatocytes. *Virology* 1989; 170: 176-183
- 14 Zheng Y, Li J, Ou JH. Regulation of hepatitis B virus core promoter by transcription factors HNF1 and HNF4 and the viral X protein. *J Virol* 2004; 78: 6908-6914
- 15 Cai YN, Zhou Q, Kong YY, Li M, Viollet B, Xie YH, Wang Y. LRH-1/hB1F and HNF1 synergistically up-regulate hepatitis B virus gene transcription and DNA replication. *Cell Res* 2003; 13: 451-458
- 16 Pani L, Overdier DG, Porcella A, Qian X, Lai E, Costa RH. Hepatocyte nuclear factor 3 beta contains two transcriptional activation domains, one of which is novel and conserved with the Drosophila fork head protein. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 3723-3732
- 17 Qian X, Costa RH. Analysis of hepatocyte nuclear factor-3 beta protein domains required for transcriptional activation and nuclear targeting. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 1184-1191
- 18 Hromas R, Costa R. The hepatocyte nuclear factor-3/forkhead transcription regulatory family in development, inflammation, and neoplasia. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 20: 129-140
- 19 Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317: 489-495
- 20 Moradpour D, Wands JR. Understanding hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1995; 332: 1092-1093
- 21 Ganem D. Persistent infection of humans with hepatitis B virus: mechanisms and consequences. *Rev Infect Dis* 1982; 4: 1026-1047

电编 张敏 编辑 王晓瑜