

NS5ATP9与HBx相互作用促进HBV cccDNA的形成与转录

袁晓雪^{1,2,3,4,5}, 耿雯倩^{1,2,3,4,5}, 王钧^{1,2,3,4}, 王阳^{1,2,3,4,5} (1. 传染病溯源预警与智能决策全国重点实验室, 首都医科大学附属北京地坛医院, 北京 100015; 2. 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所 新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015; 3. 北京市感染性疾病研究中心, 北京 100015; 4. 国家传染病医学中心, 首都医科大学附属北京地坛医院, 北京 100015; 5. 首都医科大学肿瘤学系, 北京 100069)

摘要: 目的 探讨丙型肝炎病毒 NS5A反式调节蛋白9 (hepatitis C virus NS5A-transactivated protein 9, NS5ATP9) 在乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 共价闭合环状DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) 形成与转录中的作用机制。方法 利用1.3拷贝HBV表达质粒转染Huh7和HepG2细胞、整合有4拷贝HBV基因组的HepG2.2.15细胞、在诱导型四环素启动子控制下表达HBV的HepAD38细胞构建NS5ATP9过表达或干扰的HBV细胞模型, 收集样品和细胞上清液, 提取RNA、HBV核心DNA (coreDNA)、cccDNA和蛋白, 利用酶联免疫吸附试验、实时荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)、Southern blot和Western blot技术检测HBV总RNA、前基因组RNA (pregenomic RNA, pgRNA)、乙型肝炎病毒s抗原 (hepatitis B virus s antigene, HBsAg)、乙型肝炎病毒e抗原 (hepatitis B virus e antigene, HBeAg)、松弛环状DNA (relax circular DNA, rcDNA) 以及cccDNA水平。在HepG2细胞中转染乙型肝炎病毒x蛋白 (hepatitis B virus x protein, HBx), 通过免疫荧光成像及免疫共沉淀方法检测NS5ATP9与HBx的结合情况。双荧光素酶报告基因实验检测NS5ATP9对HBx启动子活性的影响。利用Huh7细胞转染HBV1.3及HBV稳定表达细胞株HepG2.2.15和HepAD38转染NS5ATP9过表达/干扰质粒, 通过Western blot技术检测DDB1和SMC6的蛋白水平。结果 在HBV病毒活跃的细胞中, NS5ATP9 mRNA水平 [HepG2.2.15细胞: 1.891 ± 0.567 比 1.00 ± 0.034 , $t = 2.87$, $P = 0.0351$; HepAD38 tet+细胞: 1.978 ± 0.399 比 1.00 ± 0.034 , $t = 4.131$, $P = 0.0091$; HepAD38 tet-细胞: 2.642 ± 0.672 比 1.00 ± 0.034 , $t = 4.127$, $P = 0.0091$] 和蛋白水平均显著增加。过表达NS5ATP9后可显著增加HBeAg [(5.402 ± 0.327) S/COV比 (2.68 ± 0.552) S/COV, $t = 7.35$, $P = 0.0018$]、HBsAg [(2.846 ± 0.185) S/COV比 (1.512 ± 0.221) S/COV, $t = 8.02$, $P = 0.0013$]、HBV pgRNA及rcDNA的表达水平, 而干扰NS5ATP9后此增加作用消失 [HBeAg: (2.029 ± 0.09) S/COV比 (3.733 ± 0.445) S/COV, $t = 6.501$, $P = 0.0029$; HBsAg: (1.501 ± 0.105) S/COV比 (1.878 ± 0.174) S/COV, $t = 3.216$, $P = 0.0324$]。机制研究显示, NS5ATP9和HBx蛋白主要位于细胞核核仁内, 并具有共定位信号, 且NS5ATP9可显著提高HBx启动子 (1071.06 ± 79.44 比 488.47 ± 40.12 , $t = 13.09$, $P = 0.00012$) 的转录活性。另外, 过表达NS5ATP9可显著降低DDB1和SMC6的蛋白水平, 而沉默NS5ATP9则可显著提高DDB1和SMC6的蛋白水平。结论 HBV上调NS5ATP9的表达, 形成HBV-NS5ATP9-HBV cccDNA-HBV的正反馈环路, NS5ATP9通过与HBx相互作用上调肝细胞中HBV cccDNA的形成与转录, 进而促进慢性乙型肝炎的发生发展。

关键词: NS5ATP9; 肝炎病毒, 乙型; 乙型肝炎病毒共价闭合环状DNA; 乙型肝炎病毒x蛋白; 转录调控

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2024.01.006

基金项目: 国家自然科学基金项目青年基金 (81700508); 首都医科大学附属北京地坛医院内科研基金“启航计划”项目 (DTQH-202404); 北京市“科技新星” (Z201100006820051)

通信作者: 袁晓雪 Email: yuanxiaoxue1@ccmu.edu.cn

Role of NS5ATP9 on promoting HBV cccDNA formation and transcription

Yuan Xiaoxue^{1,2,3,4,5}, Geng Wenqian^{1,2,3,4,5}, Wang Jun^{1,2,3,4}, Wang Yang^{1,2,3,4,5} (1. National Key Laboratory of Intelligent Tracking and Forecasting for Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2. Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 3. Beijing Institute of Infectious Diseases, Beijing 100015, China; 4. National Center for Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 5. Department of Oncology, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective To investigate the role of hepatitis C virus NS5A-transactivated protein 9 (NS5ATP9) on the formation and transcription of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA). **Methods** HBV cell models overexpressing or interfering with NS5ATP9 were respectively constructed by using Huh7 and HepG2 cells with 1.3 copies of the HBV expression plasmid, HepG2.2.15 cells, and HepAD38 cells. Samples and cell supernatants were collected and RNA, coreDNA, cccDNA and protein were extracted. The levels of total HBV RNA, pregenomic RNA (pgRNA), hepatitis B virus s antigen (HBsAg), hepatitis B virus e antigen (HBeAg), relax circular DNA (rcDNA) and cccDNA were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), Southern blot and Western blot. HBx was transfected into HepG2 cells and the interaction of NS5ATP9 and HBx was detected by immunofluorescence imaging and Co-immunoprecipitation. The effect of NS5ATP9 on the activity of HBx promoter was detected by dual luciferase reporter gene assay. The protein levels of DDB1 and SMC6 were detected by Western blot after transfecting Huh7 cells with HBV 1.3, HepG2.2.15 and HepAD38 with NS5ATP9 over expression plasmid/siRNA. **Results** In cells with active HBV virus, both mRNA levels [HepG2.2.15 cells: 1.891 ± 0.567 vs. 1.00 ± 0.034 ; $t = 2.87$, $P = 0.0351$; HepAD38 tet+ cells: 1.978 ± 0.399 vs. 1.00 ± 0.034 ; $t = 4.131$, $P = 0.0091$; HepAD38 tet- cells: 2.642 ± 0.672 vs. 1.00 ± 0.034 ; $t = 4.127$, $P = 0.0091$] and protein levels of NS5ATP9 significantly increased. Over expression of NS5ATP9 significantly increased the levels of HBeAg [(5.402 ± 0.327) S/COV vs. (2.68 ± 0.552) S/COV; $t = 7.35$, $P = 0.0018$], HBsAg [(2.846 ± 0.185) S/COV vs. (1.512 ± 0.221) S/COV; $t = 8.02$, $P = 0.0013$], HBV pgRNA and rcDNA expression. However, the increasing was abolished after silencing NS5ATP9 [HBeAg: (2.029 ± 0.09) S/COV vs. (3.733 ± 0.445) S/COV; $t = 6.501$, $P = 0.0029$; HBsAg: (1.501 ± 0.105) S/COV vs. (1.878 ± 0.174) S/COV; $t = 3.216$, $P = 0.0324$]. Mechanistic studies revealed that NS5ATP9 and HBx protein are mainly located in the cell nucleolus and have co-localization signals, with NS5ATP9 significantly enhancing the transcriptional activity of the HBx promoter (1071.06 ± 79.44 vs. 488.47 ± 40.12 ; $t = 13.09$, $P = 0.00012$). Additionally, overexpression of NS5ATP9 significantly decreased the protein levels of DDB1 and SMC6, whereas silencing NS5ATP9 significantly increased the protein levels of DDB1 and SMC6. **Conclusion** HBV increases the expression of NS5ATP9, which forms a positive feedback loop of HBV-NS5ATP9-HBV cccDNA-HBV. NS5ATP9 promotes the formation and transcription of HBV cccDNA by interacting with HBx, thus promoting the occurrence and development of chronic hepatitis B.

Key words: NS5ATP9; Hepatitis B virus; Hepatitis B virus covalently closed circular DNA; Hepatitis B virus x protein; Transcriptional regulation

慢性乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是世界范围内的一个重大公共卫生问题。尤其在我国, HBV感染的流行程度更加严重。HBV引起的肝衰竭、肝硬化和原发性肝细胞癌等疾病每年造成大量死亡^[1-4]。抗HBV治疗是感染科学研究的热点及难点之一。HBV共价闭合环状DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) 作为HBV的转录模板, 产生病毒的亚基因组和各种mRNA^[5]。HBV cccDNA在肝细胞核内持续稳定存在是干扰素 (interferon, IFN) 和核苷(酸)类似物 [nucleos(t)ide analogues, NAs] 等药物无法彻底消除乙型肝炎病毒表面抗原 (hepatitis B virus surface antigen, HBsAg) 以及乙型肝炎难以治愈的重要原因^[6]。由于HBV复制是以cccDNA转录产物为基础, 此过程受到包括宿主细胞调控因子在内的多种因素调节^[7], 在宿主因子的作用下, cccDNA才得以长期存在于细胞中且难以被药物彻底消除。

已有研究表明, 多种靶向修复因子的小分子抑制剂, 如aphidicolin (衍生自细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂p21)、FEN-1核酸内切酶抑制剂PTPD、拓扑异构酶抑制剂、DNA连接酶抑制剂以及DNA检查点激酶ATR和CHK1抑制剂, 可有效减少cccDNA^[8-10]。通过深入研究参与cccDNA形成的宿主因子及其机制可发现抑制cccDNA生成的新靶点。然而, 以宿主DNA修复途径为靶点的方法在治疗慢性HBV感染方面是否可行和安全性还需进一步研究。cccDNA转录方面的研究显示, IFN- α 可能通过影响cccDNA相关组蛋白的翻译后修饰和转录抑制因子的招募降低cccDNA的转录活性^[11]。促炎细胞因子如白细胞介素 (interleukin, IL) -6和IL-1 β 可影响cccDNA的转录活性, 但并不会改变其含量^[12]。另有研究证明干扰组蛋白乙酰化或甲基化的药物可抑制cccDNA转录^[13]。尽管表观遗传修饰可抑制病毒表达, 但也存在干扰宿主基因调控的风险。乙型肝炎病毒X蛋白 (hepatitis B virus x protein, HBx) 在cccDNA转录及病毒感染建立中的重要作用也为寻找沉默cccDNA的病毒特异性靶标提供了新的研究方向^[14]。因此靶向与HBx结合的宿主蛋白可能是实现乙型肝炎治愈的潜在策略。

丙型肝炎病毒 NS5A反式调节蛋白9 (hepatitis C virus NS5A-transactivated protein 9, NS5ATP9) 是由本实验室通过酵母双杂交技术鉴别的新基因^[15], 是增殖细胞核抗原 (proliferation cell nuclear antigen, PCNA) 结合因子, 称为PCNA相关蛋白 (PCNA-associated factor, PAF/PCLAF), 已有研究表明

NS5ATP9在细胞增殖、分化、凋亡, DNA复制、损伤修复和信号转导以及肿瘤的发生、发展、预后等中发挥作用^[16-19], 其在HBV复制中的作用及机制目前尚未明确。本研究发现HBV上调NS5ATP9的表达, 形成HBV-NS5ATP9-HBV cccDNA-HBV的正反馈环路, NS5ATP9通过与HBx相互作用上调肝细胞中HBV cccDNA的形成与转录, 进而促进慢性乙型肝炎的发生发展, 具体如下。

1 资料与方法

1.1 细胞和质粒 HepG2细胞系购自美国ATCC数据库, Huh7细胞系购自上海中科院细胞库, HepG2.2.15细胞系和HepAD38细胞系为北京大学医学院鲁凤民教授惠赠。pGL4.10-basic、pGL4.10-HBCp、pGL4.10-HBXp、pGL4.10-HBSp、pcDNA3.1-NS5ATP9质粒为本实验室前期保存构建。HBV1.3、HBc、HBe、preS和HBx质粒为美国匹兹堡大学郭海涛教授惠赠。

1.2 细胞培养和质粒转染 HepG2、Huh7、HepG2.2.15和HepAD38细胞均采用含10%胎牛血清和100 U/ml青霉素、链霉素的DMEM培养基, 在37 °C和含5% CO₂的细胞培养箱中常规培养。细胞转染前1 d将生长状态良好的细胞按 1.5×10^5 个/孔接种至12孔板, 根据说明书操作, 使用jetPRIME (法国Polyplustransfection公司) 瞬时转染pcDNA3.1-NS5ATP9 (pNS5ATP9) 或NS5ATP9的siRNA (siNS5ATP9) (苏州吉玛基因公司)。

1.3 RNA提取和实时荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 按照Trizol试剂盒说明书从HepG2细胞中提取总RNA。使用PrimeScript™ RT Master Mix试剂盒 (日本TaKaRa公司) 将总RNA逆转录为cDNA。通过RT-PCR (Power SYBR® Green PCR Master Mix, 美国ABI公司) 扩增获得mRNA相对表达水平。反应条件为95 °C预变性15 min; 95 °C变性10 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 40个循环。以 β -actin为内参, 采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法分析计算mRNA的相对表达量。引物序列由上海生工公司设计合成。引物序列见表1。

1.4 HBV cccDNA的提取、纯化和定量 ①HBV cccDNA提取: 待检测细胞加入500 ml Hirt裂解液, 吹打混匀, 37 °C裂解15 min; 加入125 ml 2.5 mol/L KCl, 4 °C孵育过夜; 12 000 \times g于4 °C离心20 min, 取上清, 重复1次; 加入等体积酚氯仿抽提3次, 16 000 \times g于室温离心3 min; 加入70%体积的异丙醇, 颠倒混匀, 20 000 \times g于4 °C离心30 min; 去上清, 加入200 ml 70%乙醇, 颠倒混匀, 20 000 \times g于

4 °C离心5 min; 去上清, 室温充分干燥后加入20 ml ddH₂O充分溶解样品。②HBV cccDNA纯化: 先取1 ml加入49 ml无核酶水稀释, -20 °C保存, 后续检测HBV cccDNA用做内参模板; 剩余样本放至85 °C金属浴中加热5 min使DNA线性化; 加入PSAD酶置于37 °C保温箱中酶切处理16 h消化单链线性DNA。③HBV cccDNA定量: 梯度稀释标准品终浓度依次为3 × 10⁷拷贝/μl、3 × 10⁶拷贝/μl、3 × 10⁵拷贝/μl、3 × 10⁴拷贝/μl和3 × 10³拷贝/μl, 按照FastStart Essential DNA Probes Master (美国Roche公司)说明书配置PCR反应体系, 使用LightCycler480 II实时荧光定量PCR仪器(美国Roche公司)检测。反应条件为95 °C预变性10 min; 95 °C变性15 s, 61 °C退火1 min, 50个循环。所用探针及引物如表1所示, 引物由上海生工合成。

1.5 Southern blot HBV DNA经1.2%琼脂糖凝胶电泳后, 进行脱嘌呤、变性、中和后, 用虹吸法进行转膜24 h, 120 000 mj/cm²紫外交联1 min后进行预杂交2 h, 加入新鲜配制的带HBV DNA探针的杂交液, 置于65 °C杂交炉中杂交过夜; 在严谨杂交和洗膜步骤后, 将膜加入100 ml Blocking buffer中室温封闭30 min; 取出地高辛标记的二抗, 按1:10 000比例溶于新的Blocking buffer中, 室温孵育30 min; 置于20 ml Detection buffer中平衡2~5 min; 取出膜, 放入暗夹中, 均匀滴加CDP-Star, ready-to-use显影液(美国Roche公司), 室温孵育15 min, 用Bio-Rad显影仪曝光显影, 拍照分析。

1.6 Western blot检测蛋白表达 用含有蛋白酶抑制剂(5872 s, 美国CST公司)的哺乳动物细胞裂解缓冲液对细胞样品4 °C下裂解30 min, 使用Pierce BCA Assay Kit检测试剂盒(23225, 美国Thermo Scientific公司)测量蛋白质浓度。将60 mg总蛋白质进行SDS-PAGE电泳, 然后转印到PVDF膜

(ISEQ00010, 美国Millipore公司)上。用5%脱脂牛奶封闭1 h后, 将膜与指定的一抗在4 °C下孵育过夜。使用以下一抗: 抗NS5ATP9、抗PCNA(美国Santa Cruz公司)、抗HBc(厦门大学馈赠)、抗HBx(美国Bio Vendor公司)、抗GAPDH、抗Flag、抗DDB1、抗SMC6(美国Abcam公司)、抗β-actin(美国Sigma公司)。然后将膜与抗兔或抗小鼠二抗(中国中杉金桥公司)在室温下孵育1 h, 使用增强型化学发光系统(美国Millipore公司)检测蛋白质条带, 并使用Fusion Solo系统(VILBER, 法国)进行分析。

1.7 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 转染后48 h收集细胞培养上清液, 用ELISA试剂盒(郑州安图生物工程股份有限公司)检测细胞上清中HBsAg和乙型肝炎病毒e抗原(hepatitis B virus e antigen, HBeAg)水平。按照操作说明分别加入50 μl待测样品、阴性对照样品和阳性对照样品于反应孔, 加入50 μl酶标二抗, 混匀后37 °C孵育30 min, 用PBS清洗5次, 依次加入显色液A液、B液各50 μl, 混匀后37 °C孵育15 min, 加入终止液50 μl, 酶标仪450 nm波长条件下测量吸光度(A)值。

1.8 免疫荧光染色 24孔细胞培养板中接种于爬片上的细胞在转染48 h后进行免疫荧光染色, 每孔加入300 μl 0.5% Triton X-100, 室温静置10 min; 每孔加入500 μl 5%的牛血清, 将培养板放于37 °C培养箱中孵育30 min; 4 °C过夜孵育一抗; 荧光二抗(羊抗兔、羊抗鼠)按照1:1000稀释, 室温避光孵育1 h; DAPI按照1:2000稀释, 室温避光孵育5 min; PBS清洗后, 在载玻片上滴加1滴防淬灭剂, 将爬片倒扣在载玻片上, 静置30 min后, 荧光显微镜下观察并拍照保存图片。

1.9 免疫共沉淀 将pcDNA3.1-NC或pcDNA3.1-Flag-

表1 PCR引物序列

目的基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
NS5ATP9	CCCAGAAAGGTGCTTGGTT	GGGTCCCTCCTGCATATTT
HBx	ACTCTCTCGTCCCCTTCTCCGTCTG	TTGACATTGCTGGGAGTCCAAGAG
HBc	GGCTTTCGGAAAATTCCTATG	AGCCCTACGAACCACTGAAC
pgRNA	TCGGGAAGCCTTAGAGTC	TGCCTCGTCGCTAACAA
precoreRNA	TCTGCGCACCAGCACCATG	TGCCTCGTCGCTAACAA
总HBV RNA	CCGTCTGTCTTCTCATCT	GACCAATTTATGCCTACAGCCT
β-actin	CATCCGCAAAGACCTGTACGC	AGTACTGCGCTCAGGAGGAG
mitoDNA	CCCTCTCGGCCCTCTAATAACCT	GCCTTCTCGTATAACATCGCGTCA
cccDNA	TCATCTGCCGGACCGTGTGC	TCCCGATACAGAGCTGAGGCGG
cccDNA探针	5'-FAM-TTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGC-TAMRA-3'	

HBx质粒转染HepG2细胞。转染48 h后，用含有蛋白酶抑制剂（5872 s，美国CST公司）的哺乳动物细胞裂解缓冲液对细胞样品4 °C下裂解30 min，取上清液30 μ l作为上样量对照，剩余蛋白液加入ANTI-FLAG[®]M2 Magnetic Beads（美国Sigma公司）4 °C下孵育过夜。将洗脱下的蛋白质进行SDS-PAGE，然后转印到PVDF膜（ISEQ00010，美国Millipore公司）上。用5%脱脂牛奶封闭1 h后，将膜与指定一抗在4 °C下孵育过夜。使用以下一抗：抗NS5ATP9、抗Flag、抗 β -actin（美国Sigma公司）。然后将膜与抗兔或抗小鼠二抗（中国中杉金桥公司）在室温下孵育1 h，使用增强型化学发光系统（美国Millipore公司）检测蛋白质条带，并使用Fusion Solo系统（VILBER，法国）进行分析。

1.10 双荧光素酶活性检测 将带有pGL4.10-HBCp、pGL4.10-HBXp、pGL4.10-HBSp质粒分别与pcDNA3.1-NC或pcDNA3.1-NS5ATP9共转染HepAD38细胞。转染48 h后，使用双荧光素酶报告基因活性检测试剂盒（Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System Kit）中的1 \times Passive Lysis Buffer裂解细胞，吸取25 ml上清液检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性，以相对荧光素酶活性（萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性）表示报告基因的活性。

1.11 统计学处理 采用GraphPad Prism 9软件及SPSS

19.0软件进行数据分析。mRNA相对表达量为正态分布的计量资料，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组样本间比较采用独立样本t检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV上调NS5ATP9的表达 在HBV复制活跃的细胞中，NS5ATP9 mRNA水平 [HepG2.2.15细胞 (1.891 ± 0.567 ; $t = 2.87$, $P = 0.0351$)、HepAD38 tet+细胞 (1.978 ± 0.399 ; $t = 4.131$, $P = 0.0091$)、HepAD38 tet-细胞 (2.642 ± 0.672 ; $t = 4.127$, $P = 0.0091$) NS5ATP9 mRNA水平显著高于HepG2细胞 (1.00 ± 0.034)] 和蛋白水平均显著增加，见图1A~1C，在细胞水平提示NS5ATP9与HBV的活动性呈正相关。同时，利用HBV各病毒蛋白载体转染HepG2细胞发现，与对照组 (1.001 ± 0.094) 相比，HBV1.3 (3.201 ± 0.513 ; $t = 2.77$, $P = 0.0324$) 和HBx (4.312 ± 0.766 ; $t = 5.361$, $P = 0.0058$) 均可显著提高NS5ATP9的表达水平，见图1D；在HBV病毒活跃的细胞中，转录因子E2F1的表达量显著增加，即HepG2.2.15细胞显著高于HepG2细胞 (1.766 ± 0.544 比 1.000 ± 0.746 ; $t = 4.208$, $P = 0.0136$)；HepAD38tet-细胞显著高于HepAD38tet+细胞 (1.992 ± 0.306 比 1.228 ± 0.389 ; $t = 3.079$, $P = 0.0217$) 见图1E。

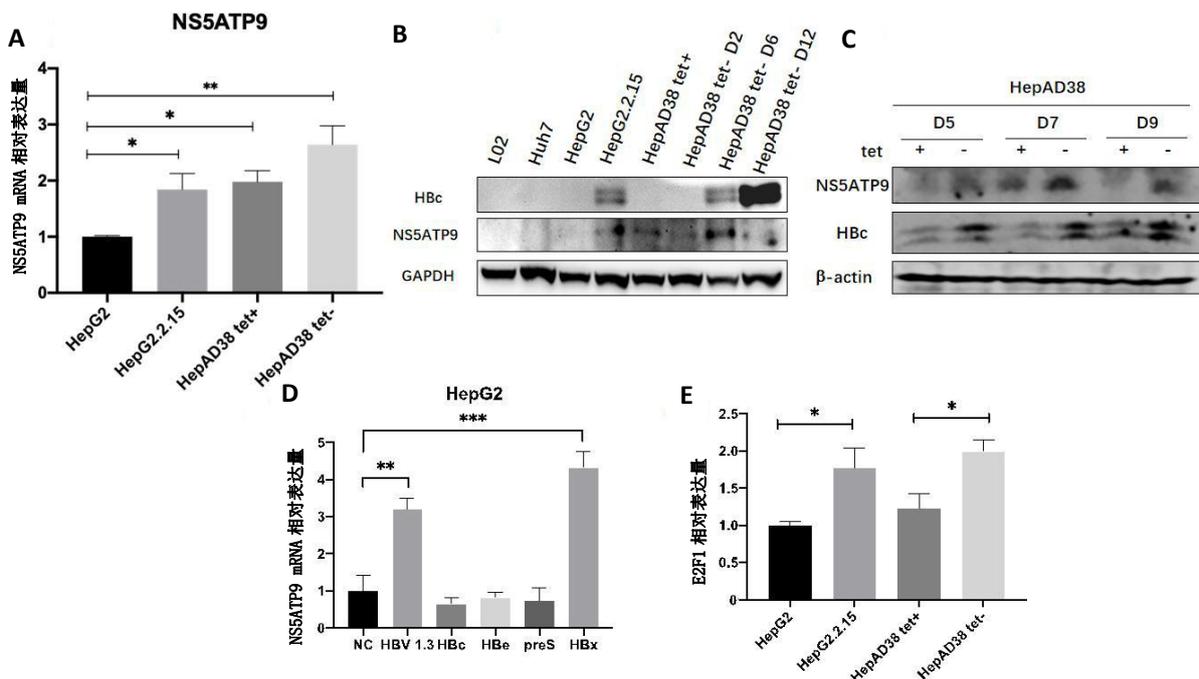


图1 HBV促进NS5ATP9的表达

注：A为采用实时荧光定量聚合酶链反应检测NS5ATP9 mRNA相对表达量；B、C为采用Western blot检测NS5ATP9蛋白水平；D为采用实时荧光定量聚合酶链反应检测NS5ATP9基因表达水平；E为采用实时荧光定量聚合酶链反应检测转录因子E2F1相对表达量；图中tet+指加四环素处理，tet-指撤去四环素，D2、D5、D6等代表处理第2天、第5天、第6天，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

2.2 NS5ATP9促进HBV复制 采用HepG2.2.15和HepAD38细胞转染NS5ATP9过表达/干扰质粒(HepG2.2.15细胞过表达: 72.377 ± 10.742 比 1.00 ± 0.173 , $t = 11.51$, $P = 0.000326$; HepG2.2.15细胞干扰: 0.252 ± 0.048 比 1.00 ± 0.086 , $t = 13.12$, $P = 0.000195$; HepAD38细胞过表达: 65.133 ± 18.004 比 1.00 ± 0.134 , $t = 6.169$, $P = 0.0035$; HepAD38细胞干扰: 0.231 ± 0.045 比 1.00 ± 0.164 , $t = 7.811$, $P = 0.001449$), 对HBV复制周期中重要指标进行检测, 结果表明, 过表达NS5ATP9后可显著增加HBeAg [(5.402 ± 0.327) S/COV比 (2.68 ± 0.552) S/COV, $t = 7.35$, $P = 0.0018$]、HBsAg [(2.846 ± 0.185) S/COV比 (1.512 ± 0.221) S/COV, $t = 8.02$, $P = 0.0013$]、HBV pgRNA及rcDNA的表达水平, 而干扰NS5ATP9后此增加作用消失 [HBeAg: (2.029 ± 0.09) S/COV比 (3.733 ± 0.445) S/COV, $t = 6.501$, $P = 0.0029$; HBsAg: (1.501 ± 0.105) S/COV比 (1.878 ± 0.174) S/COV, $t = 3.216$, $P = 0.0324$], 见图2A~2D, 说明NS5ATP9可提高HBV的复制活性; 同时, 构建NS5ATP9过表达的HepAD38细胞模型, 通过撤去四环素(tet-)诱导14 d后收集样品, 提取HBV cccDNA, 用Q-PCR探针法对HBV cccDNA水平进行检测, 结果表明过表达NS5ATP9后可显著提高HBV cccDNA水平(755.7 ± 157.08 比 100.0 ± 21.16 , $t = 10.13$, $P < 0.0001$), 见图2E。

2.3 NS5ATP9与HBx相互作用并促进HBx的表达 利用HepG2细胞转染HBx过表达载体, 通过免疫荧光

和免疫共沉淀技术检测NS5ATP9与HBx的细胞定位与表达量变化, 结果表明NS5ATP9和HBx蛋白主要位于HepG2细胞的细胞核核仁内, 并具有共定位信号(图3A); Co-IP实验结果显示NS5ATP9和HBx蛋白存在互作关系(图3B); 通过双荧光素酶报告基因实验检测NS5ATP9对HBV各相关蛋白的启动子活性的影响, 结果表明NS5ATP9可显著提高HBx启动子转录活性(1071.06 ± 79.44 比 488.47 ± 40.12 , $t = 13.09$, $P = 0.00012$), 而siNS5ATP9后可显著降低HBx启动子的转录活性(256.51 ± 191.6 比 630.03 ± 86.13 , $t = 3.556$, $P = 0.0242$) (图3C~3E), 提示NS5ATP9可通过调控HBx的功能促进HBV cccDNA的转录活性。

2.4 NS5ATP9调控Smc5/6复合物的稳定性 HBx蛋白被证实与DNA结合蛋白1(DNA-binding protein1, DDB1)的结合对于最大限度促进HBV复制是必要的。而宿主染色体结构维持(structural maintenance of chromosomes, Smc)蛋白复合物Smc5/6可识别HBV基因组, 其作为一种限制因子阻止新的HBV病毒产生。在HBV病毒活跃的细胞中, NS5ATP9表达量显著增加, 而DDB1和SMC6的蛋白水平却显著降低(图4A)。同时, 利用Huh7细胞转染HBV1.3及HBV稳定表达细胞株HepG2.2.15和HepAD38转染NS5ATP9过表达/干扰质粒, 结果显示过表达NS5ATP9可显著降低DDB1和SMC6的蛋白水平, 而沉默NS5ATP9则可显著提高DDB1和SMC6的蛋白水平(图4B~4G)。

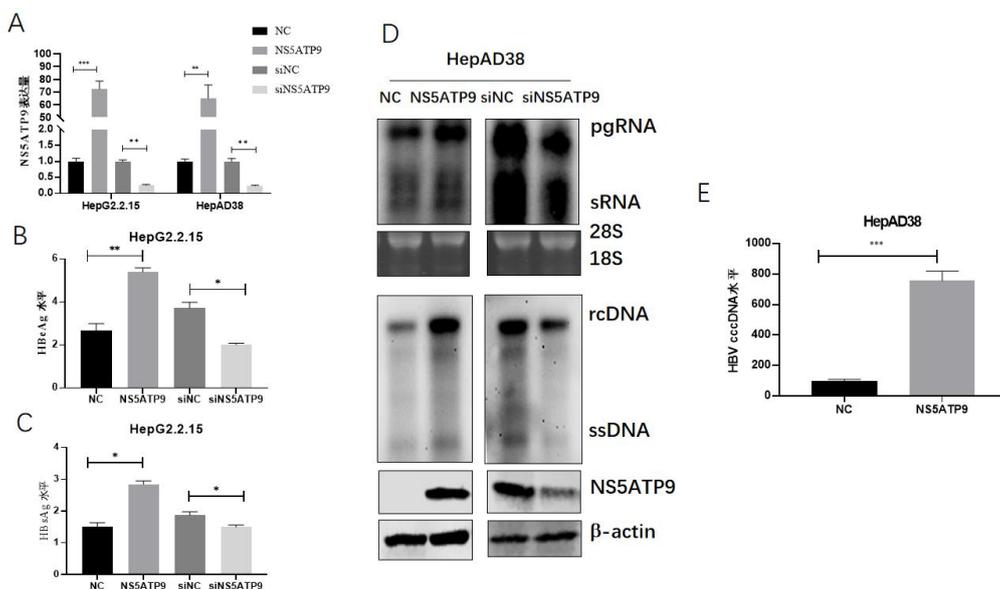


图2 NS5ATP9促进HBV复制

注: A为采用实时荧光定量聚合酶链反应检测NS5ATP9基因表达水平; B、C为酶联免疫吸附试验检测HBeAg和HBsAg; D为采用Northern blot和Southern blot检测HBV复制产物pgRNA、sRNA、rcDNA和ssDNA表达水平; E为采用实时荧光定量聚合酶链反应检测HBV cccDNA水平; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

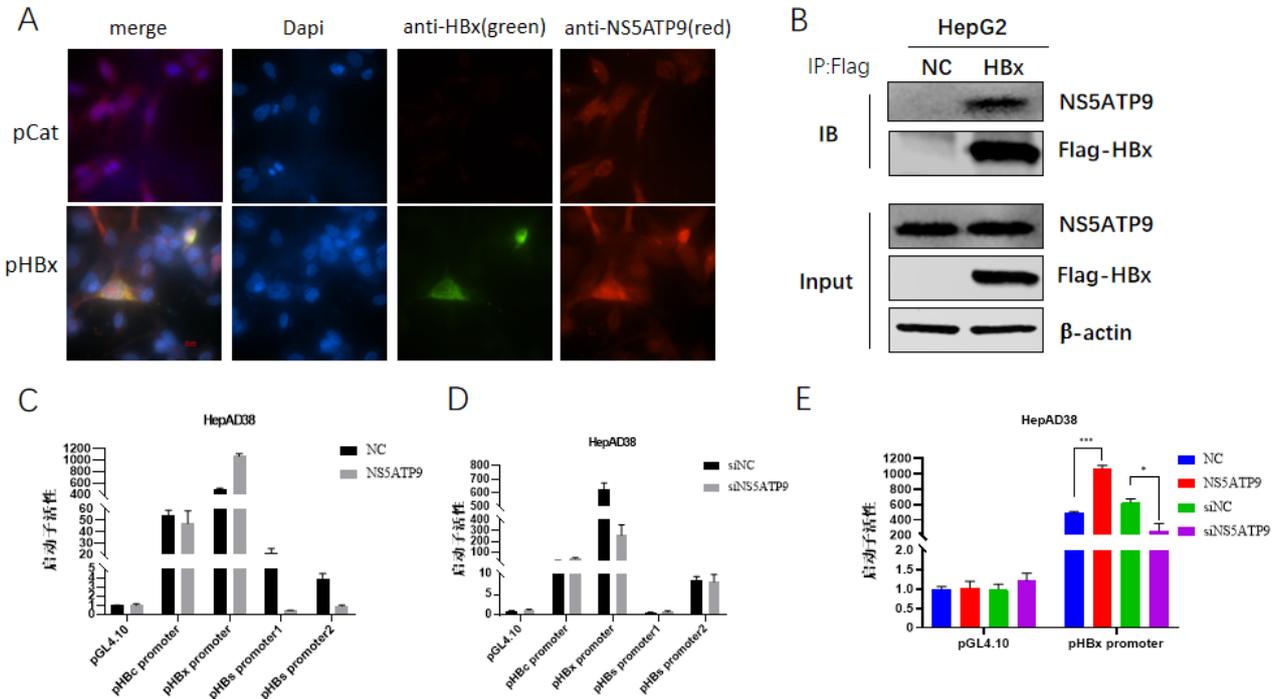


图3 NS5ATP9与HBx相互作用并促进HBx的表达

注：A为采用免疫荧光检测HepG2细胞内NS5ATP9和HBx蛋白的表达（merge：合并信号；Dapi：细胞核染色标记信号；anti-HBx green：绿色荧光显示HBx蛋白信号；anti-NS5ATP9 red：红色荧光显示NS5ATP9蛋白信号）；B为采用免疫共沉淀实验检测NS5ATP9和HBx蛋白的互作关系（IP-Flag：用Flag抗体下拉结合蛋白）；C~E为采用双荧光素酶活性检测NS5ATP9对HBx启动子活性的调控作用；* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ 。

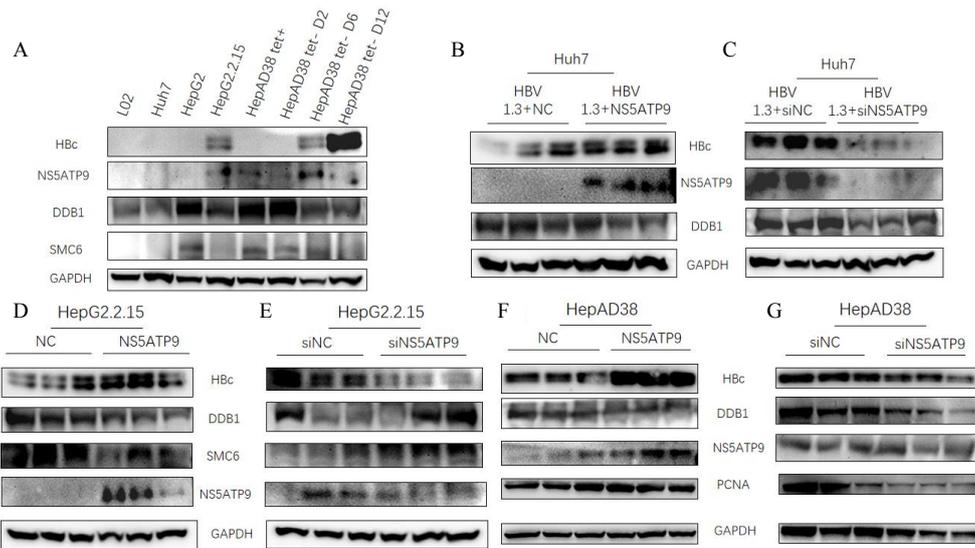


图4 NS5ATP9调控Smc5/6复合物的稳定性

注：A为采用Western blot法检测在HBV病毒活跃的细胞（HepG2.2.15细胞和HepAD38tet-细胞）中DDB1和SMC6的蛋白水平；B为将HBV1.3质粒和NS5ATP9过表达质粒共转染Huh7细胞，采用Western blot法检测过表达NS5ATP9后DDB1的蛋白水平；C为将HBV1.3质粒和siNS5ATP9共转染Huh7细胞，采用Western blot法检测DDB1的蛋白水平；D、E为将NS5ATP9过表达质粒或者siNS5ATP9分别转染HepG2.2.15细胞，采用Western blot法检测DDB1和SMC6的蛋白水平；F、G为将NS5ATP9过表达质粒或者siNS5ATP9分别转染HepAD38细胞，采用Western blot法检测DDB1和SMC6的蛋白水平。

3 讨论

以cccDNA作为靶标，寻找宿主肝细胞内能够调控HBV cccDNA形成和转录的调控因子并进一步探讨其作用机制是探索实现HBV感染彻底治愈的紧

迫任务，也是HBV研究领域亟需解决的热点问题，该领域的研究成果将对HBV治疗策略产生突破性影响。本研究以cccDNA的调控机制为切入点，围绕cccDNA的形成与转录开展上游调控因子的深入

研究,发现新的治疗靶点。本研究首次创新性地提出HBV上调NS5ATP9的表达,形成HBx-NS5ATP9-HBV cccDNA-HBV的正反馈环路,NS5ATP9通过与PCNA和HBx相互作用上调肝细胞中的HBV cccDNA,进而促进慢性乙型肝炎的发生发展。

在HBV cccDNA形成过程中,由于其本身不能自我复制,仅依靠自身稳定性和病毒基因组松弛环状DNA(relax circular DNA, rcDNA)的转化存在于细胞核中^[20]。rcDNA在去除病毒聚合酶和5'端RNA短序列后,进行单链区的修补和末端共价连接,从而形成cccDNA^[21]。最近研究发现,一种flap结构特异性核酸内切酶FEN1(flap structure-specific endonuclease, FEN)可移除HBV负链flap结构并促进rcDNA向cccDNA转化^[22]。Qi等^[23]发现,DNA聚合酶 κ (DNA polymerase κ , POLK)在cccDNA形成过程中发挥作用。另外,MSL2蛋白通过泛素化降解APOBEC3B增强HBV cccDNA的稳定性促进肝癌的发生发展^[24]。此外,宿主表达的多种微小RNA具有抑制病毒复制的功能^[25]。病毒也能通过与宿主的相互作用来限制宿主细胞的抗病毒机制以维持自身的复制活性。在HBV相关疾病的进展中,宿主与病毒间的相互制约平衡逐渐被打破,使细胞逐渐向恶性细胞转化。在这个动态连续过程中,宿主因子对cccDNA的形成和转录调控机制尚不清楚。因此,以cccDNA为靶标,寻找宿主肝细胞内能够抑制HBV cccDNA形成和转录的调控因子并进一步探讨其作用机制为乙型肝炎的治疗和药物研发提供了新思路。本研究证实NS5ATP9可促进HBV cccDNA的形成与转录,极大丰富了对HBV复制周期的理解,为慢性乙型肝炎的防治提供了一定的理论依据,并有助于探索新的HBV治疗策略。

HBx对多种同源或异源基因的转录调节区有直接反式激活作用,可增强HBV的转录,并激活包括癌基因(c-jun、c-fos、c-myc)、细胞因子和生长因子等多种不同细胞基因的转录过程^[26-28]。研究表明,HBx可通过与宿主蛋白相互作用影响HBV的复制状态,甚至影响cccDNA的稳定性和转录活性^[29]。Li等^[30]研究证明,HBx蛋白通过一个 α -螺旋与DDB1结合,激发CUL4-DDB1 E3泛素连接酶活性,两者间的结合结构对于病毒的装配非常重要。靶向HBx-DDB1相互作用的小分子硝唑尼特和Pevonedistat(MLN4924)可在体外HBV感染细胞模型中显著恢复Smc5/6蛋白水平,抑制cccDNA的转录和病毒蛋白合成^[31]。Decorsière等^[32]在*Nature*上发表的研究表明HBx可重定向DDB1-E3泛素连接酶CRL4的功能使其靶向到

Smc5/6进行泛素化,促使泛素化修饰后的Smc5/6被降解,继而提高HBV微染色体的稳定性,而在HBx蛋白缺失或HBx基因发生功能缺失突变时,Smc5/6作为宿主限制因子可限制cccDNA的转录,阻止子代病毒的产生。靶向HBx mRNA的siRNA可降低其表达水平,恢复Smc5/6复合物的水平^[33]。同时,siRNA和聚乙二醇化干扰素 α (pegylated interferon α , pegIFN- α)联合使用可显著降低所有病毒转录本的表达,包括HBx蛋白水平,导致体内Smc6水平出现反弹^[34]。本课题组对过表达NS5ATP9的HepAD38细胞系进行转录谱分析,发现NS5ATP9可显著降低DDB1、Smc5和Smc6的表达,同时利用蛋白印记技术证实在不同HBV病毒活跃细胞株中,NS5ATP9均能调控Smc5/6复合物水平,提示NS5ATP9可能通过与HBx的相互作用促使泛素化修饰后的Smc5/6被降解进而增强HBV cccDNA的稳定性。另外,HBV的复制过程依赖于cccDNA的转录活性,因而抑制cccDNA的转录活性也能有效阻断HBV的复制过程。研究表明,IFN- α 通过调控表观修饰以及对转录因子STAT1、STAT2与cccDNA的结合来抑制cccDNA转录^[35]。与此同时,HBx蛋白可通过调节cccDNA表观修饰状态来调控cccDNA的转录过程^[36]。因此,宿主转录因子可与HBx结合,共同调控HBV cccDNA的转录活性。在前期研究中利用蛋白质免疫共沉淀技术证实NS5ATP9与HBx蛋白相互作用,并可显著提高HBx启动子的转录活性,说明NS5ATP9可通过调控HBx的功能进而提高HBV cccDNA的转录活性,增强病毒在细胞内的存活能力,提示HBx对HBV cccDNA转录活性的促进作用可能与NS5ATP9调节表观修饰有关。

已有研究表明NS5ATP9的表达量受E2F1调控,结合位点是5'-TTTSSCGC-3'^[37]。本研究发现在HBV病毒活跃的细胞中,转录因子E2F1表达量显著增加,提示HBV相关蛋白可通过对转录因子E2F1的调控促进NS5ATP9表达。但HBV是如何“借助”NS5ATP9实现病毒复制,是否通过HBc/HBx-E2F1途径促进NS5ATP9的表达从而促进慢性乙型肝炎的发生发展,NS5ATP9是如何参与HBV cccDNA形成与转录及该过程中NS5ATP9是否能够通过HBV相关蛋白相互作用并促进慢性乙型肝炎疾病进程,相关调控作用和机制目前尚不清楚,这也是未来研究的重点。另外,本研究均利用体外细胞模型进行探讨,无法完全对应机体真实的生理情况,特别是NS5ATP9对机体免疫功能的调控作用尚未研究。后续研究一方面可增加临床样本进行验证和探讨,另一方面可利用NS5ATP9敲除小鼠及可有

效模拟NS5ATP9缺失转录特征的化学物质匹伐他汀和环孢素A构建HBV感染小鼠模型,进一步验证抑制NS5ATP9表达后降低HBV复制、延缓慢性乙型肝炎疾病进程的有效性,从而为乙型肝炎的治愈提供新的靶点药物。

综上,NS5ATP9可与HBx相互作用促进HBV cccDNA的形成与转录,进而促进慢性乙型肝炎的发生发展。

参考文献

- JENG W J, PAPATHEODORIDIS G V, LOK A S F. Hepatitis B[J]. *Lancet*,2023,401(10381):1039-1052.
- SARIN S K, KUMAR M, ESLAM M, et al. Liver diseases in the Asia-Pacific region: a Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*,2020,5(2):167-228.
- MCGLYNN K A, PETRICK J L, EL-SERAG H B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*,2021,73(Suppl1):4-13.
- CARUSO S, O'BRIEN D R, CLEARY S P, et al. Genetics of hepatocellular carcinoma: approaches to explore molecular diversity[J]. *Hepatology*,2021,73(Suppl 1):14-26.
- TSUKUDA S, WATASHI K. Hepatitis B virus biology and life cycle[J]. *Antiviral Res*,2020,10(182):104925.
- NASSAL M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B[J]. *Gut*,2015,64(12):1972-1984.
- MOHD-ISMAIL N K, LIM Z, GUNARATNE J, et al. Mapping the interactions of HBV cccDNA with host factors[J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(17):4276.
- WEI L, PLOSS A. Core components of DNA lagging strand synthesis machinery are essential for hepatitis B virus cccDNA formation[J]. *Nature Microbiol*,2020,5(5):715-726.
- MARTINEZ M G, BOYD A, COMBE E, et al. Covalently closed circular DNA: the ultimate therapeutic target for curing HBV infections[J]. *J Hepatol*,2021,75(3):706-717.
- WANG H, ZUO B, WANG H, et al. CGK733 enhances multinucleated cell formation and cytotoxicity induced by taxol in Chk1-deficient HBV-positive hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2012,422(1):103-108.
- ZHAO L N, YUAN H F, WANG Y F, et al. IFN- α inhibits HBV transcription and replication by promoting HDAC3-mediated de-2-hydroxyisobutyrylation of histone H4K8 on HBV cccDNA minichromosome in liver[J]. *Acta pharmacol Sin*,2022,43(6):1484-1494.
- PALUMBO G A, SCISCIANI C, PEDICONI N, et al. IL6 inhibits HBV transcription by targeting the epigenetic control of the nuclear cccDNA minichromosome[J]. *PloS One*,2015,10(11):e0142599.
- TSUKUDA S, WATASHI K. Hepatitis B virus biology and life cycle[J]. *Antiviral Res*,2020,182:104925.
- BELLONI L, POLLICINO T, DE NICOLA F, et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2009,106(47):19975-19979.
- 周利, 成军. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式调节蛋白9的研究进展[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*,2015,9(4):447-450.
- POVLSEN L K, BELI P, WAGNER S A, et al. Systems-wide analysis of ubiquitylation dynamics reveals a key role for PAF15 ubiquitylation in DNA-damage bypass[J]. *Nat Cell Biol*,2012,14(10):1089-1098.
- LIU L, CHEN X, XIE S, et al. Variant 1 of KIAA0101, overexpressed in hepatocellular carcinoma, prevents doxorubicin-induced apoptosis by inhibiting p53 activation[J]. *Hepatology*,2012,56(5):1760-1769.
- KIM M J, CERVANTES C, JUNG Y S, et al. PAF remodels the DREAM complex to bypass cell quiescence and promote lung tumorigenesis[J]. *Mol Cell*,2021,81(8):1698-1714.e6.
- TANTIWETRUEANGDET A, PANVICHIAN R, SORNMAIYURA P, et al. PCNA-associated factor (KIAA0101/PCLAF) overexpression and gene copy number alterations in hepatocellular carcinoma tissues[J]. *BMC Cancer*,2021,21(1):295.
- XIA Y, GUO H. Hepatitis B virus cccDNA: formation, regulation and therapeutic potential[J]. *Antiviral Res*,2020,180:104824.
- MARTINEZ M G, BOYD A, COMBE E, et al. Covalently closed circular DNA: The ultimate therapeutic target for curing HBV infections[J]. *J Hepatol*,2021,75(3):706-717.
- KITAMURA K, QUE L, SHIMADU M, et al. Flap endonuclease 1 is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus[J]. *PLoS Pathog*,2018,14(6): e1007124.
- QI Y H, GAO Z C, XU G W, et al. DNA Polymerase kappa is a key cellular factor for the formation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus[J]. *PLoS Pathog*,2016,12(10):e1005893.
- GAO Y, FENG J Y, YANG G, et al. Hepatitis B virus X protein-elevated MSL2 modulates hepatitis B virus covalently closed circular DNA by inducing degradation of APOBEC3B to enhance hepatocarcinogenesis[J]. *Hepatology*,2017,66(5):1413-1429.
- EZZIKOUURI S, OZAWA M, KOHARA M, et al. Recent insights into hepatitis B virus-host interactions[J]. *J Med Virol*,2014,86(6):925-932.
- JIANG Y, HAN Q, ZHAO H, et al. The mechanisms of HBV-Induced hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatocell Carcinoma*,2021,8:435-450.
- YANG L, ZOU T, CHEN Y, et al. Hepatitis B virus X protein mediated epigenetic alterations in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatol Int*,2022,16(4):741-754.
- AI L, LIU Q Q, LI Y, et al. The role of HBx protein in diseases beyond the liver[J]. *Infect Drug Resist*,2023,16:3225-3232.
- BELLONI L, POLLICINO T, DE NICOLA F, et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2009,106(47):19975-19979.
- LI T, ROBERT E I, VAN-BREUGEL P C, et al. A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery[J]. *Nat Struct Mol Biol*,2010,17(1):105-111.
- SEKIBA K, OTSUKA M, OHNO M, et al. Inhibition of HBV transcription from cccDNA with nitazoxanide by targeting the HBx-DDB1 interaction[J]. *Cell Mol Gastroenterol*,2019,7(2):297-312.
- DECORSIERE A, MUELLER H, VAN-BREUGEL P C, et al. Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor[J]. *Nature*,2016,531(7594):386-389.
- KORNYEYEV D, RAMAKRISHNAN D, VOITENLEITNER C, et al. Spatiotemporal analysis of hepatitis B virus X protein in primary human hepatocytes[J]. *J Virol*,2019,93(16):e00248-e00219.
- ALLWEISS L, GIERSCH K, PIROU S A, et al. Therapeutic shutdown of HBV transcripts promotes reappearance of the SMC5/6 complex and silencing of the viral genome in vivo[J]. *Gut*,2022,71(2):372-381.
- BELLONI L, ALLWEISS L, GUERRIERI F, et al. IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome[J]. *J Clin Invest*,2012,122(2):529-537.
- HONG X, KIM E S, GUO H. Epigenetic regulation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: Implications for epigenetic therapy against chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*,2017,66(6):2066-2077.
- 李华, 马文丽, 左长清, 等. KIAA0101基因在人非小细胞肺癌中的功能预测[J]. *南方医科大学学报*,2010,30(1):157-159.

收稿日期: 2023-08-10

袁晓雪, 耿雯倩, 王钧, 等. NS5ATP9与HBx相互作用促进HBV cccDNA的形成与转录[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2024,16(1): 29-37.