

学校编码: 10384

分类号

密级

学号: 24520101153285

UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

醛缩酶 B 与乙肝表面抗原 HBs 蛋白结合
抑制 HepG2 细胞凋亡

ALDOB acts as a novel HBsAg-binding protein and its
coexistence inhibit HepG2 cell apoptosis

吴 婧

指导教师姓名: 司 丽 娟

专 业 名 称: 内 科 学

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩日期: 2013 年 6 月

学位授予日期:

答辩委员会主席:

评阅人:

2013 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染是导致终末期肝病和肝细胞癌最重要的致病因素之一。果糖二磷酸醛缩酶 (ALD) 是一种普遍存在的四聚体结构糖酵解酶, 在糖酵解和糖异生过程中起着重要作用。它能可逆性催化裂解果糖-1,6-二磷酸 (FBP) 或果糖-1-磷酸 (F1P) 分别生成磷酸二羟丙酮和 3-磷酸甘油醛。在实验室的前期研究中, 我们利用酵母双杂交技术筛选出果糖二磷酸醛缩酶 B (ALDOB) 为乙肝表面抗原 (HBs) 的候选结合蛋白之一, 这种相互结合在肝癌发生发展中所起的作用正是我们研究的重点内容。

在本研究中, 我们旨在确认 ALDOB 为 HBs 的结合蛋白并研究在肝细胞癌 (HCC) 的发生发展过程中二者结合的功能及相互作用机制。我们观察到, 在体外实验中, 外源性和内源性免疫共沉淀提示 ALDOB 蛋白与 HBs 共结合且共定位于细胞浆中。ALDOB 与乙肝表面抗原 HBs 蛋白结合能抑制顺铂诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡。此外, western-blot 实验表明二者结合能增强 AKT 和下游 GSK-3 β 蛋白的磷酸化效应; 在 HepG2 细胞中下调促凋亡蛋白 Bax, Bid, Bim, Puma 的表达和上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 的表达。

通过上述研究我们发现, 醛缩酶 B 与乙肝表面抗原 HBs 蛋白结合能够抑制 HepG2 细胞凋亡, 增强 AKT 和下游 GSK-3 β 蛋白磷酸化水平, 改变 Bcl-2 家族蛋白的表达。醛缩酶 B (ALDOB) 与乙肝表面抗原 (HBs) 相互作用可能被应用 HBV 相关性肝炎或肝癌的治疗过程中作为一个潜在的治疗靶点。

关键词: 醛缩酶 B; 乙肝表面抗原结合蛋白; HepG2 细胞凋亡

Abstract

Chronic infection with hepatitis B virus (HBV) is a cause of end-stage liver disease and hepatocellular carcinoma. D-fructose-1,6-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) (aldolase) is a ubiquitous tetrameric structure enzyme of glycolysis that catalyze the reversible cleavage of fructose-1,6-bisphosphate (FBP) or fructose 1-phosphate (F1P) to dihydroxyacetone phosphate and either glyceraldehyde-3-phosphate or glyceraldehyde, respectively. Previously, we screened fructose-bisphosphate aldolase B (ALDOB) as a candidate binding protein of hepatitis B surface antigen (HBs) using the yeast two-hybrid assay. Our aim is to examine the effects of ALDOB interacted with HBsAg in HCC cell lines.

In this study, we aimed to confirm the ALDOB as a binding protein of HBs and to investigate the function and involved mechanism between its interactions during Hepatocellular carcinoma (HCC) development. Our results demonstrated that both of exogeneous and endogeneous ALDOB proteins bind to HBs and co-localized in the cytoplasm *in vitro*. The coexistence of HBs and ALDOB inhibit cisplatin-induced HepG2 cell apoptosis. Furthermore, western blot analysis showed the coexistence of HBs and ALDOB enhance the phosphorylation of AKT and downstream of GSK-3 β ; decreased expression of the pro-apoptotic proteins Bax, Bid, Bim, Puma and increased expression of the pro-survival proteins Bcl-2 and Mcl-1 in HepG2 cells.

Our results showed the coexistence of HBs and ALDOB inhibit HepG2 cell apoptosis. Furthermore, we defined the coexistence of HBs and ALDOB enhance the phosphorylation of AKT and downstream of GSK-3 β ; alter the expression of Bcl-2 family proteins in HepG2 cells. These findings suggest that its interaction might be applied as a potential therapeutic target during the treatment of HBV-related hepatitis or HCC.

Key words: ALDOB; HBs binding protein; HepG2 cell apoptosis

目 录

第一章 前 言	1
1.1 乙肝表面抗原 (HBsAg)	1
1.1.1 HBsAg 生物学特征	2
1.1.2 HBsAg 在肝细胞内复制、转录及表达模式	3
1.1.3 HBsAg 通过反式激活作用促进肝细胞癌的发生发展	4
1.2 醛缩酶 B (ALDOB)	5
1.2.1 醛缩酶的发现及生物学特征	6
1.2.2 醛缩酶与肝细胞癌的关系	7
1.3 细胞凋亡	8
1.3.1 AKT 信号通路与细胞凋亡	8
1.3.2 Bcl-2 家族蛋白与细胞凋亡	10
第二章 实验材料和相关试剂	13
2.1 主要实验试剂	13
2.2 主要实验耗材和仪器	13
2.3 相关实验试剂的制备	14
第三章 实验方法	18
3.1 构建稳定过表达 HBs 和稳定干扰 ALDOB 细胞系	18
3.1.1 构建目的基因 ALDOB 的干扰质粒	18
3.1.2 构建稳定过表达和干扰细胞株	21
3.1.3 Western-blot 验证稳定过表达 HBs 和稳定干扰 ALDOB 细胞株效果	22
3.2 蛋白质间相互作用的研究	24
3.2.1 材料	24
3.2.2 方法	25

3.3 细胞功能学研究	26
3.3.1 材料	26
3.3.2 方法	26
3.4 信号通路蛋白研究.....	28
第四章 结果与分析	29
4.1 稳定过表达 HBs 和稳定干扰 ALDOB 细胞株效果验证	29
4.1.1 结果	29
4.2 HBs 与 ALDOB 相互结合并共定位于细胞浆	29
4.2.1 结果	29
4.2.2 小结	31
4.3 ALDOB 与 HBs 蛋白结合抑制 HepG2 细胞凋亡	32
4.3.1 结果	32
4.3.2 小结	33
4.4 ALDOB 与 HBs 蛋白结合增强 AKT 磷酸化水平	33
4.4.1 结果	34
4.4.2 小结	35
4.5 ALDOB 与 HBs 蛋白结合改变 Bcl-2 家族蛋白表达	35
4.5.1 结果	35
4.5.2 小结	36
4.6 稳定干扰和过表达的 HepG2 细胞株迁移和侵袭功能	37
4.6.1 结果	37
4.6.2 小结	39
第五章 讨论与展望	40
参考文献	44
英文缩略词表	52
致 谢	54

Table of Contents

Chapter 1 Introduction	1
1.1 HBV Surface protein	1
1.1.1 Biological characteristics of HBsAg	2
1.1.2 HBsAg replication, transcription, and expression pattern in the liver cells	3
1.1.3 Trans-activation to promote the development of hepatocellular carcinoma	4
1.2 D-fructose-1,6-bisphosphate aldolase	5
1.2.1 Discovery and biological characteristics of ALD	6
1.2.2 The relationship of hepatocellular carcinoma and ALD	7
1.3 Apoptosis	8
1.3.1 Interaction of pathway of AKT and apoptosis	8
1.3.2 Interaction of Bcl-2 family proteins and apoptosis	10
Chapter 2 Materials and Reagents	13
2.1 The main Reagents	13
2.2 The main laboratory supplies and equipment	13
2.3 The preparation of Reagents	14
Chapter 3 Methods	18
3.1 Establish stable cells use HepG₂ Cells	18
3.1.1 The construction of interference ALDOB target gene plasmid	18
3.1.2 The construction of overexpression and interference cell lines.	21
3.1.3 The verification of overexpression and the interference effect in HepG ₂	22
3.2 Interaction of proteins	24
3.2.1 Materials	24
3.2.2 Methods	25
3.3 Function of stable cells	26
3.3.1 Materials	26

3.3.2 Methods	26
3.4 The research of signaling pathway.....	28
Chapter 4 Experimental results and Conclusion	29
4.1 The verification of overexpression HBs and interference ALDOB	29
4.1.1 Experimental results	29
4.2 ALDOB act as a binding protein of the HBs <i>in vitro</i>	29
4.2.1 Experimental results	29
4.2.2 Conclusion	31
4.3 The coexistence of HBs and ALDOB inhibit HepG2 cell apoptosis	32
4.3.1 Experimental results	32
4.3.2 Conclusion	33
4.4 The coexistence of HBs and ALDOB enhance the phosphorylation of AKT	34
4.4.1 Experimental results	34
4.4.2 Conclusion	35
4.5 The coexistence of HBs and ALDOB altered the Bcl-2 family proteins in HepG2	35
4.5.1 Experimental results	35
4.5.2 Conclusion	37
4.6 The function of migration and invasion in HepG2 cell lines	37
4.6.1 Experimental results	37
4.6.2 Conclusion	39
Chapter 5 Discussion and expetation	40
References	44
Abbreviation	52
Acknowledgement	54

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

1.1 乙肝表面抗原 (HBsAg)

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus) 是指引起人类急、慢性肝炎的 DNA 病毒, 简称 HBV。慢性乙型肝炎 (CHB) 是全球最严重的健康问题之一^[1, 2]。据世界卫生组织公布数据显示, 目前高达 3.5 亿人已成为慢性感染乙型肝炎病毒感染者。全球每年约 0.5 万至 1.2 万人死于由乙肝病毒感染引起的包括慢性活动性肝炎 (chronic active hepatitis)、肝硬化 (liver cirrhosis) 及原发性肝癌 (primary liver cancer) 等在内的各类肝脏疾病^[3, 4]。

肝细胞癌 (HCC) 是由病毒、化学致癌物等多病因作用, 癌基因或癌相关基因激活、抗癌基因失活或胚胎期某些癌基因重新复活等诸多因素引起肝细胞克隆性增殖而致癌变所致^[5, 6], HBV 感染与原发性肝癌关系密切, 大约半数以上的原发性肝癌是由于 HBV 持续感染所致, 故慢性乙型肝炎病毒感染已被确定为肝癌最危险的致病因素之一^[4, 7, 8]。

乙型肝炎病毒是嗜肝 DNA 病毒家族的嗜肝 DNA 病毒, 是迄今已知感染人类最小的双链 DNA 病毒。其基因组可以容纳大量的遗传信息并独立在宿主细胞内独立复制。事实上, HBV 完整精密的基因组结构, 客观上为其充分利用自身遗传物质提供了基础。HBV 基因组的长度约 3.2kb, 是不全环状 DNA 双链分子结构。包括 S 区, C 区, P 区和 X 区四个部分重叠开放阅读框 (ORF), 编码 7 种结构蛋白和非结构蛋白, 即前 S 抗原, HBsAg, 前 c 抗原, HBcAg, HBeAg, HBxAg 及 DNA 聚合酶。S 区由 S 基因和编码 163 个氨基酸、Pre S1 和 Pre S2 蛋白的前 S 基因组成。分别编码核心抗原 (hepatitis B core antigen, HbcAg) 的前 C 基因和编码 e 抗原 (hepatitis B e antigen, HbeAg) 的 C 基因共同组成 C 区。基因组中最长的 P 区, 编码病毒体 DNA 多聚酶 (polymerase)。由 154 个氨基酸组成的 X 蛋白 (hepatitis B X protein, HBx) 由 X 区基因编码。S 基因编码 226 个氨基酸大小的包膜蛋白。小蛋白、中蛋白和大蛋白这三种病毒包膜蛋白在共享共

同的 C-末端 226 个氨基酸，小蛋白（SHBs）仅含 S 蛋白区；前 S2 和 S 蛋白区共同组成中蛋白（MI-HBs）；所占区域最长，含有前 S1、前 S2 及 S 蛋白区）组成大蛋白（LHBs），包括 226 个氨基酸的小蛋白和 174 个氨基酸。SHBs 所含比例最高，约占 90% 左右，MHBs 其次，LHBs 最少，所以主要表面蛋白为 S 蛋白。乙肝表面抗原阳性提示存在 HBV 感染，e 抗体和核心抗体表明宿主细胞内 HBV 仍处于长期低水平复制状态，如果 e 抗体长期阳性，则说明 HBV DNA 已和宿主染色体 DNA 整合，并在肝细胞内复制增殖，导致乙型肝炎病毒慢性持续感染，进而诱发肝癌^[9-13]。由 25% 脂质和 75% 糖蛋白（其中糖蛋白的主要成分是乙肝表面抗原）共同组成的 HBV 外膜。在感染者血液中可找到大量的乙肝表面抗原，因此 HBsAg 阳性与否是诊断乙型肝炎病毒感染的主要指标。具有抗原性的 HBsAg，可诱导人体产生 HBs 特异性抗体，因而也是乙肝疫苗的最重要组成部分^[14]。

1.1.1 HBsAg 生物学特征

直径约 40-49nm 的球型嗜肝 DNA 病毒由囊膜和核衣壳组成，外部为无表面突起的囊膜结构；内部核衣壳结构对称，直径约 27~35nm，无核酸脂蛋白球型或纤维状颗粒可存在于感染动物血清中。由 25% 脂质和 75% 糖蛋白（其中糖蛋白的主要成分是乙肝表面抗原）共同组成的 HBV 外膜。

在电子显微镜下，HBV 主要表现为 3 种不同的形态结构。a、Dane 颗粒：即大球形颗粒结构，为直径 42nm 双层衣壳球形 HBV 颗粒，中央为 HBsAg，因此具备很强感染性和侵袭性。将外层衣壳去除后，电子密度大、直径为 27nm 多面体核心结构被暴露，在核心结构中存在 HBcAg、HBV DNA 及 DNA 多聚酶（DNA Poly-merase）等，Dane 颗粒比例因 HBV 复制状态不同而不同，例如在中重型慢性乙型肝炎患者中，Dane 颗粒被观察到呈明显增加趋势。b、小球形结构：是慢性乙型肝炎患者血清中最常见的小分子颗粒，为一种无核酸及多聚酶、直径为 22nm 球形或棒状结构，含量比 Dane 颗粒高约 1000 倍，相关研究表明可能是组装 Dane 颗粒时游离到血液中残存的 HBsAg。c、管形颗粒：管形颗粒：是直径大约在 50~70nm 间成串的小球形颗粒结构。HBV 颗粒是由在胞核及胞浆中合成并在胞浆中组装的 HBcAg、HBsAg 形成，最后释放入血，因而 HBV 具

有明显嗜肝性。其他细胞及皮肤、腹腔内其他脏器如胰腺、肾脏等组织中也能够检测到慢性乙肝病毒 HBV 的标志物。大部分肝细胞中 HBV 阳性病毒颗粒位于胞浆中，小部分在胞核中，少数在胞浆和胞核中均能检测到。以弥漫性、小叶灶性和局灶性形式分布在肝细胞内的 HBV-DNA，形态各异，其中以局灶性分布为主。HBsAg 可存在于 Dane 病毒颗粒、球形颗粒和管形颗粒病毒颗粒内，但是当 HBsAg 存在于后两者时不产生 HBV DNA；HBsAg 可以通过减少的幅度比体内 HBV DNA 下降的幅度大，继而从侧面反映肝细胞削减的程度^[15]。

1.1.2 HBsAg 在肝细胞内复制、转录及表达模式

通过宿主细胞膜进入细胞内时，乙型肝炎病毒的外膜蛋白被水解除去，剩余颗粒进而进入细胞核，形成松弛环状 DNA (rcDNA)，rcDNA 利用宿主螺旋异构酶及 DNA 修饰酶构建共价闭合的环状 DNA (cccDNA)，以细胞核内共价闭合环状 DNA 为模板以及 RNA 酶转录。短链 mRNA 及前基因组 mRNA 被释放到细胞质中。短链 mRNA 含有病毒的 DNA 序列的全部遗传信息，也称为病毒前基因组 RNA(pgRNA)，前基因组 mRNA 转录翻译后形成病毒蛋白再次进入细胞质。能够感染宿主细胞的核心颗粒即为 pgRNA 被 HbcAg 包裹所致。其中部分颗粒被保留在细胞质中，当核壳碎片时释放成熟的病毒基因组，随之进入细胞核形成 cccDNA，除此之外，通过表面的分子及包装内质网的外膜蛋白组装一个完整的病毒颗粒，并向细胞外分泌^[16]。

HBV DNA 聚合酶辅助单核苷酸进入 HBV DNA，形成一个完整的双链环状 DNA，进而合成 4 种 mRNA^[17, 18]，短链 mRNA (3.5kb) 含有乙肝病毒的遗传信息，即为乙肝病毒前基因组；Yang^[19] 研究发现，cccDNA 的第二种途径存在于 DHBV 和 WHV 慢性感染的肝细胞中。cccDNA 的 É 型和 Ê 型来源是线性 DNA 重组形式。重组的 cccDNA 重组部位的变化，是与母代不完全一样的 cccDNA 顺序。cccDNA 的转录线性 DNA 后形成的前基因组中，只形成的双链线性 DNA，而非双链环状 DNA。然而，双链线性 DNA 重组可以不断生成双链环状 DNA。

在光学显微镜下 HBsAg 表现为包涵体型，周边型，薄膜型，弥漫性和过渡性（弥漫型和周边型同时存在，前者向后者转化）这 5 种形式。免疫电子显微镜将 HBsAg 分为两类，一类分布于肝细胞粗面内质网和核膜，此类阳性物质主要

松散均匀地分布在细胞质中的膜系统上,另一类为管状结构,位于光面内质网上,大量聚集在一侧细胞质中,与肝细胞质的毛玻璃状物质类似,故此类细胞被称为毛玻璃肝细胞(ground glass hepatocyte, GGH)^[20, 21]。有研究表明,通过激光捕获显微图像分割方法可以得到两种毛玻璃肝细胞,利用遗传分析和分子生物学方法,发现存在不同的前 S 区突变, I 型 GGH 含有前 S1 缺失突变, HBsAg 表现为不同的包涵体,与细胞核轻度异型性变化的分布,往往出现在病毒复制的阶段,另一型 GGH 缺失突变体的前 S2 区, HBsAg 出现在晚期非复制阶段或肝硬化患者,表现为在肝细胞周围分布^[18, 22]。

近年来,不同类型的 GGH,它在慢性乙型肝炎的肝细胞内形状和分布形式是有区别的,故人们对分子和生物学特性不同类型的 GGH 都非常感兴趣。研究显示,通过诱导细胞周期蛋白 A 表达可导致大蛋白中前 S2 区缺失突变,通过其他应激机制可诱导肝细胞异常增生及结节性增殖,这一过程类似 HBV 引起的癌变。另外,在含有 B 细胞表位和 HLA 限制性细胞毒性 T 细胞表位的 II 型 GGH 内质网内,一旦前 S2 区缺失突变出现,该抗原表位随即移动,最终导致肝细胞不被免疫监视。所以,值得进一步研究的是 HBV 相关肿瘤与 II 型 GGH 之间的内在联系及不同类型的 HBsAg 阳性细胞是否包含特定 2S 或 S 突变,进而表现出不同的生物学行为^[23]。

1.1.3 HBsAg 通过反式激活作用促进肝细胞癌的发生发展

HBsAg 通过影响细胞生理功能,如糖类和脂类代谢,细胞生长和细胞凋亡过程,细胞骨架及基质构建及相关重要细胞内信号转导途径来发挥作用。持续表达的乙肝表面抗原,促使机体加强胆固醇合成,抑制糖酵解途径进而加强糖原作用。机体的微环境所造成的物质和能量代变化处于相对不稳定的状态,如外部环境因素改变,身体亦容易受干扰而随之变化^[24]。Hildt 等人指出,前 S2 调节蛋白家族中的大蛋白(LHBS)和中蛋白(MHBS)是介导肿瘤启动子活化的转录激活因子,负责肿瘤启动子介导活化。在截短 M-HBs 抗体转基因小鼠中,信号转导途径 c-raf-1/Erk2 被激活,蛋白激酶 C (PKC) 的依赖性信号转导通路可能与 M-HBs 的反式激活作用相关联,当前 S2 区和 PKCa/b 结合磷酸化反应发生时,导致 PKC 依赖 c-Raf-1/MAP2-的激酶信号转导链反应发生,进而激活活化蛋白-1

(AP-1)，核因子- κ B (NF- κ B) 激活蛋白-2 (AP-2)，血清反应因子 (SRF)，SP1 和 c-myc 等转录因子^[25, 26]。乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白 (LHBs) 具有相同的反式激活作用，并且还通过 PKC 信号转导途径导致 c-Raf-1/MAP2-激酶信号转导链反应发生，进而诱导转录因子 AP-1, NF- κ B 被激活，细胞异常增生被调控，导致肝癌发生。相关研究显示，部分 LHBs 进入分泌途径是通过前-S1、前-S2 区在翻译后易位跨内质网膜所致，与装配病毒颗粒有关。一部分 LHBs 通过前-S1、前-S2 区不同步的翻译和转位，被引导穿过内质网的细胞质侧，如留在细胞质中的前-S2 区发挥其反式激活作用就是通过和细胞信号转导相关的因素互相作用。故除了具有表面抗原功能外，我们还可以深入研究 S 蛋白 (HBs) 的其他功能，如反式激活等相关作用。

乙型肝炎病毒在宿主细胞内编码，生成病毒蛋白粘附宿主细胞，介导病毒颗粒在肝细胞内组装、释放、超螺旋结构 DNA 扩增和转录反式激活作用，进而影响宿主肝细胞代谢，诱发慢性肝病或肝癌的发生^[27]。HBV 可编码生成与肝细胞蛋白相互作用的病毒颗粒，进而与宿主肝细胞蛋白发生生物效应^[28, 29]。相关资料表明，乙肝表面抗原蛋白 (HBs) 可通过酵母双杂交和免疫共沉淀与宿主细胞蛋白发生相互作用^[30]。但是，与 HBsAg 相关联的确切结合蛋白进而导致肝癌发展分子机制仍是未知。综上所述，HBsAg 和促癌机制、相关生物学功能的进一步研究在 HBV 相关疾病的预防和治疗方面具有重要意义。我们认为，在不断分析和解决问题的道路上，人类最终将全面、深入剖析乙肝表面抗原的发病机制及其发挥的作用，并开发出新的对抗乙肝病毒的有效药物，以清除乙肝表面抗原，为人类造福。

1.2 醛缩酶 B (ALDOB)

在本实验室课题组前期研究中，我们通过酵母双杂交实验筛选出 HBs 候选结合蛋白醛缩酶 B^[31, 32]。D-果糖-1, 6-二磷酸醛缩酶 (EC4.1.2.13) (醛缩酶) 在机体能量代谢，如糖酵解和糖异生过程中发挥重要作用。醛缩酶在机体内分布广泛，含量丰富。

1.2.1 醛缩酶的发现及生物学特征

醛缩酶 (ALD) 是一种结构为四聚体的糖酵解酶, 普遍存在于自然界中^[33]。1936 年, 其由 Meyerhof 等人首先发现, 与葡萄糖和果糖的代谢及糖异生作用密切相关, 16 种氨基酸共同组成醛缩酶结构, 它的分子量为 160,000, 在代谢过程中可逆的催化果糖 1, 6-二磷酸 (FBP) 或果糖-1-磷酸 (F1P) 裂解生成磷酸二羟丙酮和甘油醛-3 磷酸^[34]。最初在动物肌肉组织中发现了醛缩酶同工酶活力, 并用色谱或电泳分离得到纯化结晶。目前人类已经鉴别了超过 30 种醛缩酶, 依据不同的催化机理可将其分为两类。其中, I 类醛缩酶从动物和高等植物中提取得来, II 类醛缩酶从细菌和真菌中提取得来。在本文中, 我们主要阐述 I 类醛缩酶。

醛缩酶以肌肉型 (A 型), 肝脏型 (B 型), 脑型 (C 型) 这三种不同同工酶形式存在于高等脊椎动物中。相关报道显示, 在个体发育和癌变过程中, 这些同工酶表达相互之间十分协调^[35, 36]。醛缩酶 B 作用于 1,6-二磷酸果糖 (FBP) 或果糖-1-磷酸 (F1P) 时活性相同, 它主要与糖酵解和糖异生这两个相反的代谢途径相关。当机体肝脏内醛缩酶同工酶 B 缺乏时会导致遗传性果糖不耐受症发生。此时假如持续摄入大量的碳水化合物饮食会导致肝功能损害, 最终导致肝硬化产生^[37-39]。在肝组织中表达的人果糖 1,6-二磷酸醛缩酶 B 由 ALDOB 基因编码。

在胚胎期肝脏可见到大量 ALD-A, 但是出生前 B 型醛缩酶开始取代 A 型, 随着肝脏分化及胚胎发育成熟, C 型醛缩酶活力逐渐消失, A 型醛缩酶迅速下降并维持低水平, 因而成年动物中 B 型醛缩酶成为肝脏专一同工酶。故通过检测血清醛缩酶活性来明确肝细胞的数量进而鉴别慢性活动性肝炎和肝硬化的实验是具可操作性的。在肝细胞癌组织中可检测到 ALDOB mRNA, 并与先天性疾病, 肿瘤复发及预后相关^[39-42]。故醛缩酶 B 在肝细胞癌发生发展中产生了相关作用。但是, 醛缩酶 B 如何在被慢性乙型肝炎病毒感染的宿主细胞中发挥作用, 迄今仍不明确。

在本实验研究中, 我们进一步证实醛缩酶 B (ALDOB) 与 HBs 相互结合并共定位于细胞质中。我们也探讨了 ALDOB 和乙肝表面抗原蛋白 (HBs) 在肝癌 HepG2 细胞株细胞凋亡过程中扮演重要的作用, 并进一步研究在这方面的信号通路途径相互作用。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库