

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_密级\_\_\_\_

学号: 24520081153432

UDC\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

乙肝病毒表面抗原抑制肝癌细胞系中跳跃  
易位断裂点蛋白的线粒体转位而发挥潜在  
的促癌作用

HBsAg inhibit the translocation of JTB into Mitochondrion  
in HepG2 cell line , and play a potential role in HCC  
progression.

刘 贇 鹏

指导教师姓名: 任建林 教授

专 业 名 称: 内 科 学

论文提交日期: 2011 年 4 月

论文答辩时间: 2011 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 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

研究表明跳跃易位断裂点 (JTB) 基因在肝癌组织中呈现高水平表达, 而在其他多种恶性肿瘤中因基因发生的不平衡转位而使其表达量下调。目前关于 JTB 蛋白在肝癌发生发展中所发挥的作用的研究尚不充分。我们的研究表明 JTB 可以与乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 相互结合, 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。

我们通过构建稳转细胞的方法来研究 JTB 与 HBsAg 之间的相互作用及对细胞功能学的影响, 以 HepG2 肝癌细胞为基础建立了干扰 JTB 基因的 HepG2 细胞株及稳转 HBsAg 的 HepG2 细胞株等一系列工具细胞。主要任务在于检测各种细胞株之间抗凋亡能力的强弱及相关分子机制的研究。

我们观察到, 在高分化肝癌细胞株 HepG2 和 Huh-7 中, JTB 的表达量相对肝细胞株 LO-2 有明显增高, 而在高转移肝癌细胞株 MHCC-97H 细胞株中 JTB 表达量却发生下调现象。而且 JTB 可以与 HBsAg 相互结合, 这种相互结合作用使得 HBsAg 抑制了 JTB 的线粒体转位。同时还可以观察到干扰 JTB 之后, 肝癌细胞中 p65 磷酸化水平增高, 而稳转 HBsAg 之后 p65 磷酸化水平降低。有意义的是在稳转 HBsAg 细胞株中同时干扰 JTB 之后, p65 的磷酸化水平较单纯干扰 JTB 的细胞株有着更高的 p65 磷酸化水平。

通过上述研究我们发现 HBsAg 可以抑制 JTB 的线粒体转位, 促使 p65 磷酸化水平降低, 在稳转 HBsAg 细胞株中干扰 JTB 之后, 可以逆转 p65 磷酸化水平, 从而发挥更高的抗凋亡效应。

**关键词:** 乙肝病毒表面抗原 (HBsAg); 跳跃易位断裂点蛋白 (JTB); 凋亡

## Abstract

Jumping translocation breakpoint (JTB) is found a significant gene expression level in malignant liver tissues. However JTB suffers an unbalanced translocation in many other types of cancer that its expression was suppressed. No comprehensive analysis on its function in human hepatocellular carcinoma (HCC) has been performed to date. We previously found that JTB protein can bind to HBV surface antigen (HBsAg). Our aim is to examine the effects of JTB interacted with HBsAg in HCC cell lines.

We established HepG2 stable cell line expressing HBsAg and silenced JTB expression using short hairpin RNA stable produced in HepG2 cell. The effects of JTB and HBsAg was determined on cell apoptosis.

HCC cell lines HepG2 and Huh7 expressed high levels of JTB, compared with LO-2 liver cell. Silencing of JTB resulted in promoting cancer cell motility and invasion, reducing cell apoptosis. Expression of HBsAg could inhibit JTB's location in mitochondria. Furthermore, JTB silencing increased phosphorylation of p65 in HepG2 cell. HBsAg expression decreased phosphorylation of p65, while surprisingly found that knockdown of JTB in HepG2-HBs cell could obviously reverse the level of p65 phosphorylation up to three times more than HepG2-mock cell. While silencing JTB in HepG2-HBs cell express more advantages in cell antiapoptosis.

HBsAg inhibit the translocation of JTB into Mitochondrion in HepG2 cell line , and decreased phosphorylation of p65 with JTB expression . Silencing of JTB in HepG2-HBs cell reverse the level of p65 phosphorylation and result in promoting cancer cell apoptosis.

**Key words:** HBsAg ; JTB ; HepG2 ; Apoptosis

## 目 录

<b>第一章 前言</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 乙肝病毒表面抗原 (HBsAg)</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 HBsAg 的发现及生物学特征 .....	1
1.1.2 HBsAg 的亚细胞定位及在肝组织表达模式 .....	2
1.1.3 HBsAg 与肝细胞癌发生发展机制研究进展 .....	3
<b>1.2 跳跃易位断裂点蛋白 (JTB)</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 JTB 的生物学特征 .....	7
1.2.2 JTB 的组织分布及功能学研究 .....	7
<b>1.3 HBsAg 与 NF-KB 信号通路的研究</b> .....	<b>8</b>
1.3.1 NF-KB 信号通路 .....	8
1.3.2 HBsAg 与 NF-KB 相关性研究 .....	8
<b>1.4 实验设计</b> .....	<b>9</b>
1.4.1 实验基本思路示意图如下: .....	9
1.4.2 实验基本步骤如下: .....	9
<b>第二章 材料与方法</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1 相关稳转细胞系的建立</b> .....	<b>10</b>
2.1.1 材料 .....	10
2.1.2 方法 .....	14
<b>2.2 蛋白质间相互作用的研究</b> .....	<b>22</b>
2.2.1 材料 .....	22
2.2.2 方法 .....	22
<b>2.3 稳转细胞功能学研究</b> .....	<b>23</b>
2.3.1 材料 .....	23
2.3.2 方法 .....	23
<b>第三章 结果与分析</b> .....	<b>25</b>

<b>3.1 不同肝癌细胞系间 JTB 与 HBsAG 的表达情况</b> .....	<b>25</b>
3.1.1 结果.....	25
3.1.2 小结.....	26
<b>3.2 HBsAG 与 JTB 相互结合抑制 JTB 的线粒体定位</b> .....	<b>27</b>
3.2.1 结果.....	27
3.2.2 小结.....	28
<b>3.3 JTB 抑制 HBsAG 在肝癌细胞中的抗凋亡作用</b> .....	<b>29</b>
3.3.1 结果.....	29
3.3.2 小结.....	32
<b>3.4 HBsAG 通过抑制 JTB 的线粒体转位而抑制 p65 的活性。</b> .....	<b>33</b>
3.4.1 结果.....	33
3.4.2 小结.....	34
<b>第四章 讨论与展望</b> .....	<b>36</b>
4.1 肝细胞癌发生发展分子机制的研究.....	36
4.2 乙肝病毒感染与 JTB 的表达对肝癌发生发展的影响.....	38
4.3 展望.....	40
<b>参 考 文 献</b> .....	<b>41</b>
<b>英文缩略词表</b> .....	<b>49</b>
<b>致谢</b> .....	<b>51</b>

## Table of Contents

<b>Chapter 1 Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1.1 HBV Surface protein</b>	<b>1</b>
1.1.1 Discovery and biological characteristics of HBsAg	1
1.1.2 HBsAg subcellular localization and tissue distribution	2
1.1.3 Relationship between HBsAg and tumor	3
<b>1.2 Jumping translocation breakpoint</b>	<b>6</b>
1.2.1 Discovery and biological characteristics of JTB	7
1.2.2 HBsAg subcellular localization and function	7
<b>1.3 Pathway reaserch of HBsAg and NF-KB</b>	<b>8</b>
1.3.1 Pathway of NF-KB	8
1.3.2 Interaction of NF-KB and JTB	8
<b>1.4 Experiment design</b>	<b>9</b>
<b>Chapter 2 Materials and Methods</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Establish stable cells use HepG<sub>2</sub> Cells</b>	<b>10</b>
2.1.1 Materials	10
2.1.2 Methods	14
<b>2.2 Interaction of proteins</b>	<b>22</b>
2.2.1 Materials	22
2.2.2 Methods	22
<b>2.3 Function of stable cells</b>	<b>23</b>
2.3.1 Materials	23
2.3.2 Methods	23
<b>Chapter 3 Experimental results and Conclusion</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Expression of JTB gene HBsAg in HepG<sub>2</sub> stable Cells</b>	<b>25</b>
3.1.1 Experimental results	25
3.1.2 Conclusion	26

<b>3.2 HBsAg inhibit the translocation of JTB into Mitochondrion</b> .....	<b>27</b>
3.2.1 Experimental results .....	27
3.2.2 Conclusion.....	28
<b>3.3 JTB inhibit the role of antipoptosis of HBsAg</b> .....	<b>29</b>
3.3.1 Experimental results .....	29
3.3.2 Conclusion.....	32
<b>3.4 HBsAg inhibit the activity of of p65 by inhibition of JTB's translocation</b> ..	<b>33</b>
3.4.1 Experimental results .....	33
3.4.2 Conclusion.....	34
<b>Chapter 4 Discussion and expetation</b> .....	<b>36</b>
4.1 HCC .....	36
4.2The role of HBV infection and JTB in HCC .....	38
4.3 Expetation.....	40
<b>References</b> .....	<b>41</b>
<b>Abbreviation</b> .....	<b>49</b>
<b>Acknowledgement</b> .....	<b>51</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 第一章 前言

### 1.1 乙肝病毒表面抗原 (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。它是世界上分布最为广泛的病毒之一。据世界卫生组织统计, 全世界有 20 亿人口曾受到过 HBV 感染, 约有 3.5 亿人为慢性感染者<sup>[1]</sup>。有超过 100 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<sup>[2,3]</sup>。

HBV 基因组长约 3.2kb, 为部分双链环状 DNA。HBV-DNA 负链有四个开放读码框 (open reading frame, ORF), 分别称为 S、C、P 及 X, 能编码全部已知的 HBV 蛋白质。S 区包括 S 基因和前 S 基因, S 基因能编码主要表面蛋白, S 基因之前是一个能编码 163 个氨基酸的前 S 基因, 编码 Pre S1 和 Pre S2 蛋白。C 区基因包括前 C 基因和 C 基因, 分别编码核心抗原 (hepatitis B core antigen, HBcAg) 和 e 抗原 (hepatitis B e antigen, HBeAg)。P 区最长, 约占基因组 75% 以上, 编码病毒体 DNA 多聚酶 (polymerase)。X 区编码由 154 个氨基酸组成的 X 蛋白 (hepatitis B X protein, HBx)。S 区基因编码的三种蛋白是乙肝病毒包膜的主要组成成分, 它们是主蛋白 HBsAg (S), 中蛋白 MHBs (Pre S2+ S), 大蛋白 LHBs (Pre S1+ Pre S2+ S)。因 HBsAg 大量存在于感染者血液中, 是 HBV 感染的主要标志<sup>[4,5,6]</sup>。HBsAg 具有抗原性, 可引起机体产生特异保护性的抗 HBs, 也是制备疫苗的最主要成分。大球形颗粒是有感染性的 HBV 完整颗粒, 又称为 Dane 颗粒, 其外衣壳相当于一般病毒的包膜, 由脂质双层与蛋白质组成, 其中蛋白 70% 由 HBsAg 构成, 另外 30% 由大致相等量的 MHBs 和 LHBs 组成<sup>[7,8]</sup>。

#### 1.1.1 HBsAg 的发现及生物学特征

HBsAg 是 HBV 感染检测中最为重要的标志物, 它是于 1965 年美国科学家 Blumberg 博士首次在澳大利亚土著人血清中发现, 称为澳大利亚抗原, 并于 1974 年正式定名为乙型肝炎病毒表面抗原 (简称为 HBsAg)。它的分子量为

24KD, 系由混合的多肽组成, 含有脂类、糖类和蛋白质等。它可存在于患者的血液、唾液、乳汁、汗液、泪水、鼻咽分泌物、精液及阴道分泌物中。其对低温有较强的抵抗力, 甲醛可使其灭活, 将其加热到 60℃ 10 小时可降低其抗原性, 100℃ 5 分钟可完全灭活。乙肝病毒的表现型是其血清亚型 (subtype), 由外膜主蛋白 HBsAg 上的一些残基决定。主蛋白携带两对相互排斥的亚型决定簇 d/y 和 w/r, 由此组成乙肝表面抗原的 4 个主要亚型: adw、adr、ayw、ayr。我国以 adw、adr 为主。所有血清型的 HBsAg 都有共同的“a”决定簇, 此决定簇是 HBsAg 刺激 B 细胞产生中和抗体并与之结合的表位, 但较容易发生突变<sup>[9]</sup>。血清中检出 HBsAg 是乙型肝炎的早期诊断指标之一。研究发现 HBV 在进入人体肝细胞之后进行复制及转录过程, 除了产生成熟的病毒颗粒 (Dane particle) 以外, 还能合成并分泌大量的亚病毒颗粒。这些亚病毒颗粒不包含病毒基因组和衣壳蛋白, 主要由病毒的包膜蛋白以及宿主细胞来源的脂质成分组成。在 HBV 感染病人的血清中, HBsAg 亚病毒颗粒的含量远远超过 Dane 颗粒, 在病毒 DNA 检测不到的情况下, HBsAg 仍能持续大量存在。因此 HBsAg 不能反映病毒有无复制、复制程度、传染性强弱及预后。

### 1.1.2 HBsAg 的亚细胞定位及在肝组织表达模式

在感染乙肝病毒肝组织中 HBsAg 的光镜下的分布形态有五种, 即包涵体型、周边型、膜型、弥漫型及过渡型(弥漫型向周边型转变过程中的共存状态)。在免疫电镜下 HBsAg 的分布可分为两大类, 第一大类表现为: HBsAg 主要存在于肝细胞的粗面内质网和核膜上, 在免疫电镜下可见 HBsAg 阳性物质较松散而均匀地分布在胞浆内, 在光镜下表现为弥漫型和膜型; 第二大类表现为: HBsAg 存在于增生的滑面内质网腔中, 呈管状结构, 常大量聚集在胞浆的一侧, 相当于光镜下所见的肝细胞浆中的毛玻璃样物质, 特称该细胞为毛玻璃样肝细胞 (ground glass hepatocyte, GGH), 呈包涵体型和周边型分布。<sup>[10,11]</sup> 研究发现 GGH 在慢性乙肝的不同复制阶段可表现出不同类型, 其形态和在肝内的分布形式不同。Wang 等<sup>[12]</sup> 利用激光捕获显微分割法已得到两种类型毛玻璃样肝细胞, 并用分子生物学方法进行基因分析, 表明二者分别含有不同的前 S 区突变, 其中 I 型 GGH 含有前 S1 区缺失突变, HBsAg 在肝细胞中呈现包涵体型分布, 伴细胞核的轻度异型性改变, 常出现在病毒复制阶段; II 型 GGH 含有前 S2 区缺

失突变, HBsAg 在肝细胞中呈现周边型分布, 多出现在晚期非复制阶段或肝硬化患者。

### 1.1.3 HBsAg 与肝细胞癌发生发展机制研究进展

在控制和治疗乙型肝炎病毒 (HBV) 所导致的肝脏疾病中, 乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的持续阳性表达是难以解决的重大问题。有关 HBsAg 的致病机制, 目前的研究已有所揭示, 虽没有乙肝病毒 X 蛋白 (HBx) 研究的那样深入, 但 HBsAg 致病机制的研究为我们更有效地预防和控制乙肝相关疾病提供依据和方法。研究发现 HBsAg 在 HBV 感染、病毒颗粒的形成、免疫系统识别、影响宿主细胞正常功能及肿瘤发生发展等方面发挥着重要作用。

#### 1.1.3.1 HBsAg 肝细胞表面相应受体的识别及受体性质的鉴定

HBV 是嗜肝 DNA 病毒科的一种, 它仅可感染人和黑猩猩, 具有明显的组织嗜性和较严格的宿主特异性<sup>[13]</sup>, 目前认为 HBV 通过与肝细胞膜表面受体结合介导病毒入胞<sup>[14]</sup>, 与病毒吸附肝细胞膜相关的主要病毒外膜蛋白有 3 个, 即大蛋白(LHBs)、中蛋白(MHBs) 和主蛋白(SHBs), 这 3 个蛋白分别含有不同的由各自起始密码子开始转录的氨基端, 同时又具有共同的羧基末端。主蛋白由 S 基因编码, 含有 226 个氨基酸; 中蛋白由 S 及 PreS2 基因区编码, 含有 281 个氨基酸; 大蛋白是由 PreS1, PreS2 和 S 基因共同编码而来<sup>[15,16]</sup>。由于 PreS1 在不同亚型病毒中基因片段大小不同, 因此大蛋白的大小为 389 或 400 个氨基酸不等。HBV 前 S1 区在前 S2 区上游, 全序列都位于病毒颗粒外表。HBV 的 S 蛋白含有两段信号肽序列, 信号肽 II 插入内质网膜, 其后的亲水序列暴露在病毒颗粒表面, 是 HBsAg 的主要抗原表位; 信号肽 I 近氨基端插入内质网膜, 其后的亲水序列保留在胞浆内, 在病毒出芽后仍在毒粒内部<sup>[17]</sup>。PreS1 和主蛋白是构型性的, 而 PreS2 则是线性的。从病毒颗粒的构型可以看出, HBV 大蛋白和中蛋白在肝细胞表面受体和 HBV 作用时, 是与细胞接触的前哨, 较之主蛋白, 前 S 区更有可能作为病毒吸附肝细胞膜的吸附蛋白, 介导病毒附着和侵入细胞。前 S 区同时具有多种生物学功能和较强的免疫活性, 研究提示前 S 区与病毒的感染、复制和病毒颗粒的装配密切相关, 尤其在参与病毒与宿主细胞的相互作用中发挥至关重要的作用。因此对 PreS1 和 PreS2 抗原及相关受体的研究正成为 HBV 与靶细胞作用研究的热点领域<sup>[18,19,20]</sup>。

关于肝细胞膜上 HBV 受体的研究也已取得一定进展,目前已从人肝脏细胞及肝癌细胞系中分离出多个与各病毒表面蛋白区域结合的蛋白组分,如无涎糖蛋白受体( asialoglycoprotein receptor, ASGPR )<sup>[21]</sup>, 纤连蛋白( fibronectin)<sup>[22]</sup>, IgA 受体<sup>[23]</sup>,甘油醛-3-磷酸脱氢酶<sup>[24]</sup>, HBV-BP(HBV binding protein)<sup>[25]</sup>, 膜联蛋白( annexin V)<sup>[26]</sup>,载脂蛋白 H( apolipoprotein H)<sup>[27]</sup>, hIL-6( human interleukin6)<sup>[28]</sup>, HBV 结合因子(HBV-BF)<sup>[29,30]</sup>等, 其中 hIL-6 含有 preS1 的识别位点,可以介导 HBV 和细胞间的相互作用,有可能是病毒侵染的桥联分子;可溶性 HBV-BF 可与 HBV pre-S1 和 pre-S2 作用,它可能与病毒进入细胞有关。由于缺乏合适的感染系统,有关肝细胞受体的研究还没有统一的说法,至今尚无学术界公认的受体。对 HBV 感染相关受体的研究,不仅可以深入地了解 HBV 和人肝细胞的相互作用机制,而且对乙型肝炎的预防、治疗及抗病毒药物的研究都将发挥重要的指导作用。

#### 1.1.3.2 HBsAg 对机体免疫系统的影响

HBV 慢性持续性感染与肝硬化、肝细胞癌的发生密切相关<sup>[31,32]</sup>。终止 HBV 慢性携带是治疗 HBV 相关性疾病的根本方法。目前研究 HBV 在肝细胞内的复制和表达并不能直接导致细胞病变,病变主要是病毒基因编码的各类蛋白与宿主间的免疫反应造成。免疫系统介导的宿主与病毒的相互作用决定着 HBV 感染后病毒的清除和肝炎病变的进程。

免疫系统通过细胞裂解机制与细胞非裂解机制清除感染的 HBV<sup>[33]</sup>。HBV 长期携带者的存在提示某些患者可能难以彻底清除感染的 HBV。HBV 既可通过其抗原表位活化免疫系统,又可通过免疫耐受逃避免疫系统的清除作用,从而长期存在于宿主的体内。免疫耐受是一种激活的抗原特异性的免疫负应答,这是一个主动过程包括三个阶段:识别、活化、效应。而肝脏是一个容易发生免疫耐受的器官,同时 HBV 的感染可干扰免疫应答过程的任一阶段。HBV 在高复制状态有大量抗原表达,而抗原的过量表达通常可能与高带耐受或免疫漏逸(抗原量超过了免疫系统的清除能力)有关。外周血大量的 HBsAg 亚病毒颗粒(小球形颗粒与管形颗粒),干扰宿主对 HBV 的免疫应答并参与免疫耐受的诱导。HBV 也可通过抗原性变异使抗原的表达出现质的改变。S 基因序列的差异可将 HBV 基因组分为 A~G 7 个基因型<sup>[34]</sup>。根据 HBsAg 抗原决定簇的

差异可将 HBsAg 分为 10 个亚型。不同的基因型或亚型其抗原的免疫原性可能有所不同,对免疫应答的反应也可能有所不同<sup>[35,36]</sup>。在中国,主要的流行型为 B 型与 C 型,两者均对干扰素的应答性较差,这可能与我国 HBV 易于慢性化有一定的关系<sup>[36,37]</sup>。HBsAg 为 adr 亚型的 HBV 易形成无症状携带者,并易转为慢性肝病,甚至发展成肝细胞癌<sup>[38]</sup>。

过量的 HBsAg 可能起到了结合 HBV 中和抗体 anti-HBs 的作用,从而帮助感染性病毒颗粒逃避宿主免疫系统的监控并建立持续性感染<sup>[39]</sup>。此外,有报道认为 HBsAg 能模拟凋亡细胞的特征并与机体的凋亡细胞清除系统相互作用从而阻止获得性免疫反应的发生<sup>[40]</sup>。HBsAg 除了能够影响获得性免疫反应外,还可能通过上调 SOCS1 来干扰巨噬样细胞 TLR 通路的活化,从而影响固有免疫反应。HBsAg 的生物学功能及其在乙肝持续性感染中发挥的作用仍需要进一步的深入研究。

### 1.1.3.3 HBsAg 通过反式激活作用促进肝细胞癌的发生发展

近年研究发现,羧基末端截短型 HBsAg (MHBst),能够调控肝细胞某些基因表达从而影响细胞生长调节,也具有反式激活功能。这种变异的病毒表面抗原中蛋白,缺失了位于 C-末端的膜定位信号,使 MHBst 具备内质网(ER)定位功能,未能进入分泌途径而在 ER 滞留,其前-S2 区指向胞质区,从而有机会与胞质蛋白相互作用,发挥其广泛的反式激活效应。MHBst 的反式激活效应可能与蛋白激酶 C(PKC)依赖的信号传导途径有关,前-S2 区域与 PKCa/b 结合发生磷酸化反应,触发 PKC 依赖的 c-Raf-1/MAP2-激酶信号传递链式反应,结果激活了转录因子如激活蛋白-1(AP-1)、细胞核因子-kB(NF-kB)、激活蛋白-2(AP-2)、血清应答因子(SRF)、Sp1 和 c-myc、c-fos 启动子,参与病毒感染后的炎症反应和肝细胞癌的发生<sup>[41-47]</sup>;

乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白(LHBs)同 MHBst 相似,具有同样的反式激活效应,也通过 PKC 的信号传导途径有关,引发下游 c-Raf-1/MAP2-激酶信号传递链式反应,从而激活了转录因子 AP-1、NF-kB 等,调控细胞异常增生,引发 HCC 的发生<sup>[48]</sup>。研究显示,LHBs 的前-S1 和前-S2 区有一个与翻译不同步的转位过程,在横跨内质网膜时是指向内质网的胞质侧,这种在胞质滞留的前-S2 区,有机会与细胞中信号转导相关因子相互作用,发挥其反式激活作用。另有一部分

LHBs 的前-S1 和前-S2 区在翻译后转位跨过内质网膜, 进入分泌途径, 参与病毒颗粒的组装. 可见 LHBs 是一种多功能的蛋白质, 其反式激活作用对于阐明 HBsAg 携带者发生 HCC 的分子生物学机制具有重要意义<sup>[49,50]</sup>.

#### 1.1.3.4 HBsAg 结合蛋白及对细胞信号通路的影响

研究发现, HBsAg 的表达能促进一种名为亲环素 A( cyclophilin A, CypA) 的细胞蛋白的分泌. 而且 HBsAg 与 CypA 之间具有直接的蛋白- 蛋白相互作用, 借助这种相互作用两者结合在一起, 并通过共用的囊泡分泌途径转运至胞外. CypA 是一个多功能的细胞蛋白, 具有趋化因子的功能, 当 CypA 在表面抗原作用下分泌至肝脏细胞外后, 借助细胞表面受体 CD147 的作用下将巨噬细胞、T 细胞等免疫细胞吸引至感染的细胞周围并引起局部的炎性浸润<sup>[51,52]</sup>. HBsAg 的表达分泌对很多细胞正常生理功能包括糖代谢和脂类代谢、细胞的生长和凋亡、细胞骨架和细胞外基质的形成以及一些细胞内重要信号转导通路都有不同程度的影响. HBsAg 的持续性表达使得机体胆固醇合成增强、糖酵解途径受到抑制而糖原生成作用加强. 机体物质和能量代谢水平发生改变造成微环境相对不稳定, 使得机体极易受外界因素干扰而发生功能的改变<sup>[53]</sup>. HBsAg 引起细胞内包括 GRP78 在内的一系列胞内凋亡相关蛋白含量变化, 从而促进肝细胞的凋亡. HBsAg 还能通过调控转录因子 LEF-1 影响 Wnt 信号通路的激活, 从而在肝癌的发生发展过程中起到重要的作用<sup>[54,55]</sup>

综上所述, HBsAg 在病毒持续感染及肝细胞癌发生发展过程中起到重要作用, 进一步研究 HBsAg 的生物学功能及促癌机制无疑对预防和治疗 HBV 相关疾病有着重大意义. 我们相信在不断分析问题、解决问题的过程中, 最终将全面解析乙肝表面抗原在致病机制中的作用并将可研制出新的抗乙肝病毒与清除乙肝表面抗原的有效药物, 造福于人类.

## 1.2 跳跃易位断裂点蛋白 (JTB)

研究发现, 1q21 上的基因在许多类型的肿瘤中经常发生转位. 其中跳跃异位是一种不平衡的转位, 是指染色体片段扩增后从原先位置转位至端粒部位, 并重新组合. 人类跳跃异位断裂点基因 (Jumping Translocation Breakpoint, JTB) 既位于 1q21, 其内部具有跳跃异位所需的断裂点, 基因断裂后再与具有接收功

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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库