

DOI:10.13350/j.cjpb.220903

• 论著 •

乙型肝炎病毒 HBx 蛋白诱导肝细胞泛素连接酶 RNF5 抑制 STING/IFN- β 信号通路的研究^{*}

杨凯, 潘颖, 宇芙蓉, 张发苏, 陈谨, 李芳^{**}

(安徽医学高等专科学校医学技术学院, 安徽合肥 230601)

【摘要】 目的 研究乙型肝炎病毒编码 X 蛋白(HBx)对 HepG2 细胞 STING/IFN- β 信号通路的影响及其可能存在的机制。**方法** 将含 HBV 全基因组 1.5 倍复制子质粒 pHBV-48 和缺失 HBV X 基因的 HBV 复制子质粒 pHBV-48-X₀ 分别转染至 HepG2 细胞,采用细胞免疫荧光染色法观察细胞内 HBx 蛋白表达情况,同时采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测细胞内干扰素基因刺激因子(STING)基因表达水平及蛋白含量。分别转染空载体 pEGFP-N1 和 HBV 编码 X 基因表达质粒 pEGFP-HBx 至 HepG2 细胞,采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测细胞内 STING 及环指蛋白 5(RNF5)基因和蛋白含量。采用基因干扰技术减少转染质粒的 HepG2 细胞 RNF5 表达,Western blot 检测细胞 STING、干扰素 β (IFN- β)蛋白表达情况;以不同浓度蛋白酶抑制剂 MG132 处理转染 pEGFP-HBx 的 HepG2 细胞,Western blot 检测细胞内 STING、IFN- β 蛋白表达情况。**结果** 转染空载体、pHBV-48 及 pHBV-48-X₀ 的 HepG2 细胞 STING 基因相对含量差异无统计学意义($P>0.05$);转染空载体的 HepG2 细胞 STING 蛋白(1.14 ± 0.11)相对表达水平较转染 pHBV-48 的 HepG2 细胞(0.47 ± 0.09)显著升高($P<0.01$),但低于转染 pHBV-48-X₀ 的 HepG2 细胞(2.15 ± 0.18)($P<0.01$)。转染空载体及 pEGFP-HBx 的 HepG2 细胞 STING 基因相对含量差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),但转染 pEGFP-HBx 的 HepG2 细胞 STING 蛋白(0.48 ± 0.16)相对含量较转染空载体的细胞(0.87 ± 0.22)显著降低($P<0.01$);与转染空载体的 HepG2 细胞相比,转染 pEGFP-HBx 的 HepG2 细胞 RNF5 基因相对表达水平及蛋白相对含量均显著升高(均 $P<0.01$)。减少 HepG2 细胞 RNF5 表达后,细胞内 STING 和 IFN- β 相对蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。随着蛋白酶抑制剂 MG132 浓度逐渐升高,表达 HBx 的 HepG2 细胞内 STING 和 IFN- β 蛋白相对含量逐渐上升。**结论** 乙型肝炎病毒可能通过病毒编码蛋白 HBx 上调肝细胞泛素连接酶 RNF5 进而抑制 STING/IFN- β 信号通路。

【关键词】 乙型肝炎病毒;HBx;RNF5;STING/IFN- β 信号通路

【中图分类号】 R373.21

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)09-1005-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Sep.;17(9): 1005-1009, 1014.]

Hepatitis B virus X protein inhibits STING/IFN- β signaling pathway through up-regulation of ubiquitin ligase RNF5 in hepatocytes

YANG Kai, PAN Ying, YU Fu-rong, ZHANG Fa-Su, CHEN Jin, LI Fang (Department of Medical Technology, Anhui Medical College, Hefei 230601, China) ^{***}

【Abstract】 Objective To investigate the effect of hepatitis B virus-encoded X protein (HBx) on STING/IFN- β signaling pathway in HepG2 cells and its possible mechanisms. **Methods** The HBV replicon plasmid pHBV-48 containing the 1.5-fold HBV genome and the HBV replicon plasmid pHBV-48-X₀ lacking the HBV X gene were transfected into HepG2 cells, and the expression of Western blot. By transfecting the empty vector pEGFP-N1 or HBV encoding X gene expression, HBx protein in the cells was observed by immunofluorescence staining, and the mRNA and protein levels of interferon gene stimulator (STING) in cells were analyzed by real-time PCR and Western blot, respectively. The empty vector pEGFP-N1 and the HBV-encoding X gene expression plasmid pEGFP-HBx were transfected into HepG2 cells, respectively, and the mRNA and protein levels of STING and ring finger protein 5 (RNF5) cells were analyzed. Subsequently, RNF5 was silenced with siRNA technology, and the expression levels of STING and interferon β (IFN- β) proteins in cells were analyzed. The HepG2 cells transfected with pEGFP-HBx were then treated with different concentrations of protease inhibitor MG132, and the expression levels of STING and IFN- β protein in HepG2 cells were analyzed. **Results** There were no significant difference in the relative gene levels of STING in HepG2 cells transfected with empty vector,

^{*} **【基金项目】** 安徽省自然科学基金项目(No. 2108085MH301);安徽省高校自然科学研究重大项目(No. KJ2020ZD68)。

^{**} **【通讯作者】** 李芳, E-mail: lifangahyz@sina.com

【作者简介】 杨凯(1981-),男,安徽巢湖人,副教授,主要从事病毒性肝炎基础与临床研究。E-mail: yangkai@ahyz.edu.cn

pHBV-48 and pHBV-48-X0 respectively ($P>0.05$); however, the relative protein levels of STING in HepG2 cells transfected with empty vector (1.14 ± 0.11) were higher than that in transfected pHBV-48 HepG2 cells (0.47 ± 0.09) ($P<0.01$), but lower than those of HepG2 cells transfected with pHBV-48-X0 (2.15 ± 0.18) ($P<0.01$). In addition, the relative gene levels of STING gene in HepG2 cells transfected with empty vector and pEGFP-HBx had no statistical difference ($P>0.05$), but the relative protein levels of STING in HepG2 cells transfected with pEGFP-HBx (0.48 ± 0.16) were lower than that in HepG2 cells transfected with empty vector (0.87 ± 0.22). Compared with HepG2 cells transfected with empty vector, the relative gene and protein levels of RNF5 gene in HepG2 cells transfected with pEGFP-HBx were significantly increased ($P<0.01$). After reducing the expression of RNF5 in HepG2 cells, the relative protein levels of STING ($P<0.05$) and IFN- β ($P<0.01$) were significantly increased. As the concentration of protease inhibitor MG132 gradually increased, the relative protein levels of STING and IFN- β in HBx-expressing HepG2 cells gradually increased.

Conclusion Hepatitis B virus may upregulate hepatocyte ubiquitin ligase RNF5 through virus-encoded protein HBx, thereby inhibiting STING/IFN- β signaling pathway in HepG2 cells.

【Key words】 Hepatitis B virus; HBx; RNF5; STING/IFN- β signaling pathway

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染是一个世界性的公共卫生问题,全球约导有3.5亿人感染HBV,我国有近1亿HBV携带者^[1-3]。尽管以干扰素类和核苷类似物类为代表的一线抗病毒药已广泛应用于临床治疗HBV感染,然而伴随长期用药而来的耐药现象严重影响患者的抗病毒疗效^[4-5]。最新研究显示,干扰素基因刺激因子(Stimulator of interferon genes, STING)激动剂2,5-己酮可可碱能抑制体外肝细胞HBV复制及抗原分泌,提示STING可能具有治疗HBV感染作用^[6]。STING也被称为跨膜蛋白173(Transmembrane protein 173, TMEM173),作为免疫细胞信号转导的关键蛋白,可通过诱导干扰素 β (Interferon- β , IFN- β)进而在宿主感染免疫过程种发挥重要作用^[7]。Dansako等^[8]报道慢性乙型肝炎患者血清STING基因丰度较健康人群显著降低,且与患者血清HBV DNA载量呈负相关,与I型干扰素含量呈正相关,表明STING可能通过诱导I型干扰素继而抑制HBV复制。此外,通过HBV小鼠模型已证实,STING蛋白不仅能抑制HBV复制,还可通过下调巨噬细胞炎症小体的激活减缓HBV诱导的肝纤维化进程,揭示靶向STING蛋白可能是阻断HBV复制及其诱导的纤维化的重要治疗策略^[9]。然而,Zheng等^[10]的研究发现STING是介导自然杀伤细胞(Natural killer cell, NK)激活的重要衔接蛋白,HBV通过下调STING蛋白表达导致部分慢性乙型肝炎患者体内NK细胞免疫功能降低,提示抑制STING蛋白可能是HBV在宿主体内逃避免疫清除的重要策略之一。本研究拟通过体外试验探讨HBV对肝细胞STING/IFN- β 信号通路的影响及其可能存在的分子机制,从而为STING作为HBV感染的抗病毒治疗靶点奠定理论基础。

材料与方法

1 材料

1.1 质粒和细胞 HBV全基因组1.5倍复制子质粒pHBV-48和缺失HBV X基因的HBV复制子质粒pHBV-48-X₀由台湾大学医学院肝炎研究中心Ding-Shinn Chen教授提供;HBV编码基因表达质粒pEGFP-HBx由南京大学刘巧玉博士惠赠。肝细胞株HepG2细胞由本实验室常规培养保存。空载体pGEM-3Z和pEGFP-N1分别购自美国Promega公司和Clontech公司。

1.2 试剂与仪器 质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;Lipofectamine 3000TM转染试剂盒和ECL发光试剂均购自美国Thermo Fisher公司;细胞培养基DMEM和胎牛血清分别购自美国GIBCO公司和浙江天杭生物科技股份有限公司;胰酶细胞消化液和100 $\times$ 青霉素-链霉素溶液购自碧云天生物技术有限公司;蛋白酶抑制剂MG132购自美国MedChemExpress公司;siRNA干扰片段购自上海吉玛制药有限公司;TRIzol购自美国Invitrogen公司;RNA反转录试剂盒和基因扩增试剂盒均购自美国Roche公司;引物购自上海生工生物工程股份有限公司;HBx, STING, IFN- β , RNF5和GAPDH抗体均购自Santa Cruz公司。StrataGene Mx3000P型PCR仪购自美国安捷伦公司;电转仪和电泳仪购自美国BIO-RAD公司;荧光显微镜购自德国Leica公司。

2 方法

2.1 细胞培养及质粒转染 HepG2细胞以含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和0.1 mg/ml链霉素的DMEM培养,当细胞生长面积约占为培养皿底部面积80%时加入1 ml胰酶消化,以 2×10^6 细胞/ml密度接种于12孔板用于转染。转染前,改换无胎牛血清的DMEM培养细胞,以Lipofectamine 3000TM分别转染2 μ g质粒pGEM-3Z、pHBV-48、pHBV-48-X₀、pEGFP-N1和pEGFP-HBx至HepG2细胞48 h,收集细

胞,提取总 RNA 和总蛋白备用。采用同样方法转染 2 μ g pEGFP-HBx 至 HepG2 细胞 24 h,换液后以再转染 siRNA-RNF5 至细胞 24 h,收集细胞,提取总 RNA 和总蛋白备用。转染 2 μ g 浓度 pEGFP-HBx 至 HepG2 细胞 6 h,再以 0~20 μ mol/L 蛋白酶抑制剂 MG132 处理转染细胞 48 h,收集细胞,提取总 RNA 和总蛋白备用。

2.2 免疫荧光法检测 HepG2 细胞内 HBx 蛋白的表达 先后滴加 4%多聚甲醛和 0.5% Triton X-100 至细胞爬片,并以 3%牛血清白蛋白封闭 30 min,PBS 冲洗;以稀释的 HBx 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育爬片并过夜,冲洗;滴加荧光二抗 25 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,冲洗;滴加 DAPI 避光孵育 15 min,再以抗荧光淬灭剂封片并在荧光显微镜下观察细胞。

2.3 荧光定量 PCR 法检测细胞基因相对表达水平 将 12 孔板内 HepG2 细胞上清液弃净并置于冰上,每孔加入 0.5 ml TRIzol,收集细胞并剧烈振荡 15 s。随后,经氯仿、异丙醇和无水乙醇等试剂处理提取细胞内总 RNA。取 1 μ g RNA,采用 Roche 反转录试剂将其逆转录为 cDNA。取 5 μ l cDNA 为模板,与适量 Fast Start Universal SYBR Green Master,上、下游引物及无核酶水共同组成基因扩增体系。STING 基因上游引物:5'-ATGCCCCACTCCAGCCTGCA-3';下游引物:5'-TGCAGGCTGGAGTGGGGCAT-3'。IFN- β 基因上游引物:5'-ATGACCAACAAGTGTCTCCT-3';下游引物:5'-AGGAGACACTTGTGGTCAT-3'。GAPDH 上游引物:5'-ATGGTTTACATGTTTCAATA-3';下游引物:5'-TATTGGAACATGTAAACCAT-3'。基因扩增程序:95 $^{\circ}$ C 1 min,94 $^{\circ}$ C 20 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 20 s,40 个循环扩增后获得目的基因 Ct 值。

2.4 Western blot 检测细胞蛋白表达 将 12 孔板内 HepG2 细胞上清液弃净并置于冰上,每孔加入 120 μ l RIPA 后收集细胞,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,采用 BCA 方法检测蛋白浓度。按照待检样本蛋白:蛋白上样缓冲液为 1:4 的体积比混匀,置于沸水中煮浴 10 min,室温冷却,经 12%SDS-PAGE 蛋白电泳后经转膜,进行 Western blot 分析。一抗稀释度为 1:1000(过夜孵育),HRP 标记的二抗稀释度为 1:4000(孵育 2 h)。加入发光试剂 ECL 后用全自动自动曝光成像系统进行检测,分析目的蛋白表达情况。

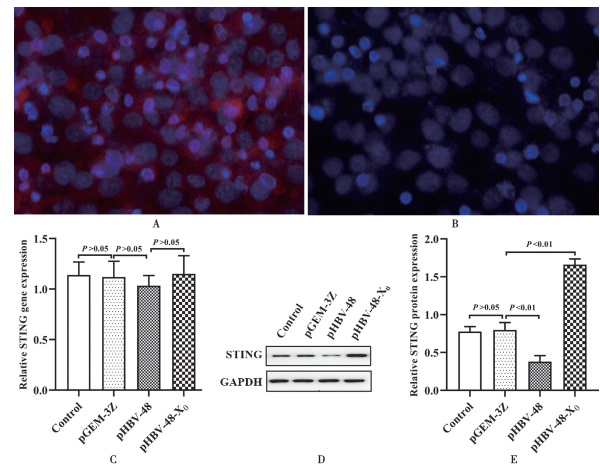
2.5 统计学分析 目的基因相对表达量的计算方法采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,目的蛋白吸光度值采用 Image J 软件分析。数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,运用 Graphpad Prism 8.0 软件进行数据统计分析并作图。多组数据间比较采用单因素方差分析,两组数据比较采用独立样本 t 检验,

$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1 不同 HBV 复制子对 HepG2 细胞 STING 蛋白表达的影响

将 2 μ g 浓度的空载体 pGEM-3Z、含有完整 HBV 复制子 pHBV-48、缺失 HBV X 基因的 HBV 复制子 pHBV-48-X₀ 等质粒分别转染 HepG2 细胞 48 h。细胞免疫荧光检测证实,转染完整 HBV 复制子的 HepG2 细胞表达 HBx 蛋白,转染缺失 HBV X 基因的 HBV 复制子细胞未见 HBx 蛋白表达(图 1A,1B)。荧光定量 PCR 显示,STING 基因在转染空载体的细胞、转染完整 HBV 复制子的细胞和转染缺失 X 基因 HBV 复制子的细胞中相对含量分别为 1.12 ± 0.16 、 1.03 ± 0.11 、 1.15 ± 0.18 ,差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 1C)。Western blot 显示转染空载体的 HepG2 细胞和转染完整 HBV 复制子的细胞 STING 蛋白相对表达水平分别为 1.14 ± 0.11 和 0.47 ± 0.09 ,差异有统计学意义($P < 0.01$);与转染缺失 HBV X 基因的 HBV 复制子细胞 STING 蛋白相对表达水平 2.15 ± 0.18 比较差异有统计学意义($P < 0.01$)(图 1D,1E)。



A、B 分别为转染质粒 pHBV-48 和 pHBV-48-X₀ 的 HepG2 细胞中 HBx 蛋白表达(红色代表 HBx) C 转染不同质粒的 HepG2 细胞中 STING 基因相对表达水平 D、E 转染不同质粒的 HepG2 细胞中 STING 蛋白相对含量

图 1 HBV 对 HepG2 细胞 STING 基因和蛋白表达的影响

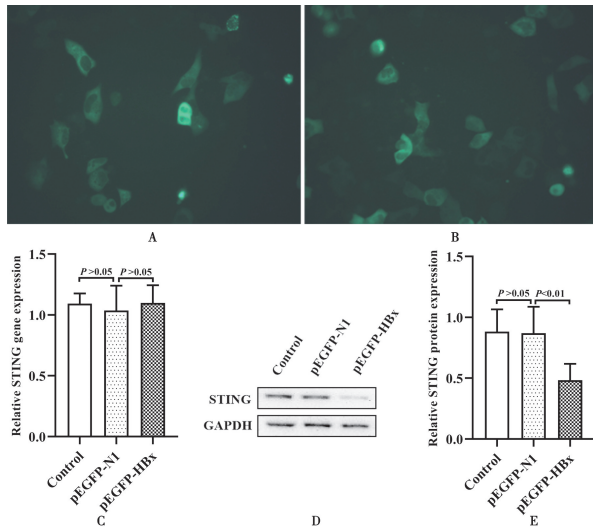
A、B HBx protein expression in HepG2 cells transfected with plasmids pHBV-48 and pHBV-48-X₀, respectively, and red represents HBx C Expression gene levels of STING in HepG2 cells transfected with different plasmids D、E Expression protein levels of STING in HepG2 cells transfected with different plasmids

Fig. 1 Effects of HBV on the expression of STING gene and protein in HepG2 cells

2 HBx 蛋白对 HepG2 细胞 STING 蛋白表达的影响

空载体 pEGFP-N1 和 HBV 编码 X 基因表达质粒 pEGFP-HBx 分别转染至 HepG2 细胞 48 h 后,荧

光显微镜下可观察到转染 pEGFP-HBx 的 HepG2 细胞 EGFP-HBx 融合蛋白发出绿色荧光,即 HBx 蛋白表达于 HepG2 细胞(图 2A,2B)。测定转染空载体的 HepG2 细胞 STING 基因相对含量为 1.05 ± 0.21 ,转染 HBx 基因表达质粒的 HepG2 细胞为 1.10 ± 0.14 ,差异无统计学差异($P > 0.05$)(图 2C);转染 HBx 基因的 HepG2 细胞 STING 蛋白相对含量为 0.48 ± 0.16 ,转染空载体的 HepG2 细胞为 0.87 ± 0.22 ,差异有统计学意义($P < 0.01$)(图 2D,2E)。



A、B 分别为荧光显微镜下的转染空载体 pEGFP-N1 和 pEGFP-HBx 的 HepG2 细胞 C 转染不同质粒的 HepG2 细胞中 STING 基因相对表达水平 D、E 转染不同质粒的 HepG2 细胞中 STING 蛋白含量

图 2 HBx 对 HepG2 细胞 STING 基因和蛋白表达的影响

A、B HepG2 cells transfected with empty vector pEGFP-N1 or pEGFP-HBx were observed under fluorescence microscope C Expression gene levels of STING in HepG2 cells transfected with different plasmids D、E Expression protein levels of STING in HepG2 cells transfected with different plasmids

Fig. 2 Effects of HBx on the expression of STING gene and protein in HepG2 cells

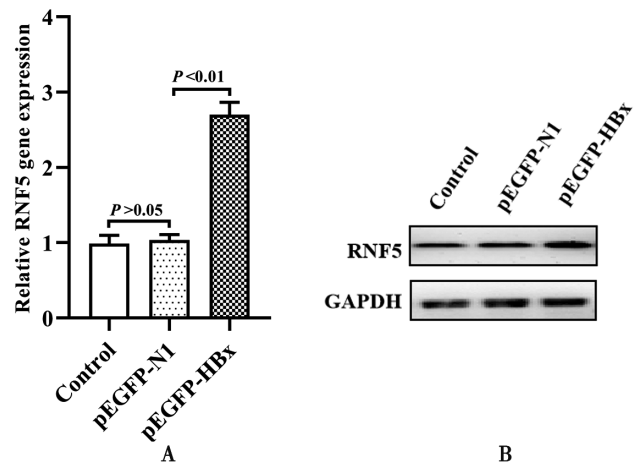
3 HBx 蛋白对 HepG2 细胞泛素连接酶 RNF5 蛋白表达的影响

RNF5 属于泛素连接酶,具有调节细胞蛋白的稳定性继而减少蛋白含量的功能。检测转染 HBx 基因表达质粒的 HepG2 细胞 RNF5 基因相对含量为 2.71 ± 0.16 ,转染空载体 pEGFP-N1 的 HepG2 细胞为 1.03 ± 0.16 ,差异有统计学意义($P < 0.01$)(图 3A);检测转染 HBx 基因的 HepG2 细胞 RNF5 蛋白相对含量为 0.78 ± 0.12 ,转染空载体的 HepG2 细胞为 2.71 ± 0.16 ,差异有统计学意义($P < 0.01$)(图 3B)。

4 下调 RNF5 蛋白表达对 HepG2 细胞 STING/IFN- β 信号通路的影响

将 $2 \mu\text{g}$ 浓度的 pEGFP-HBx 质粒转染至 HepG2 细胞 24 h 后,再转染 siRNA-control 或 siRNA-RNF5 至 HepG2 细胞 24 h。结果显示,siRNA-control 的

HepG2 细胞 RNF5 蛋白相对表达量为 1.89 ± 0.11 ,转染 siRNA-RNF5 的 HepG2 细胞为 0.41 ± 0.05 ,差异有统计学意义($P < 0.05$);转染 siRNA-RNF5 的 HepG2 细胞 STING 蛋白和 IFN- β 蛋白表达水平与 siRNA-control 的 HepG2 细胞比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(图 4)。



A 转染不同质粒的 HepG2 细胞中 RNF5 基因相对表达水平 B 转染不同质粒的 HepG2 细胞中 RNF5 蛋白相对含量

图 3 HBx 对 HepG2 细胞 RNF5 基因和蛋白表达的影响

A Expression gene levels of RNF5 in HepG2 cells transfected with different plasmids B Expression protein levels of RNF5 in HepG2 cells transfected with different plasmids

Fig. 3 Effects of HBx on the expression of RNF5 gene and protein in HepG2 cells

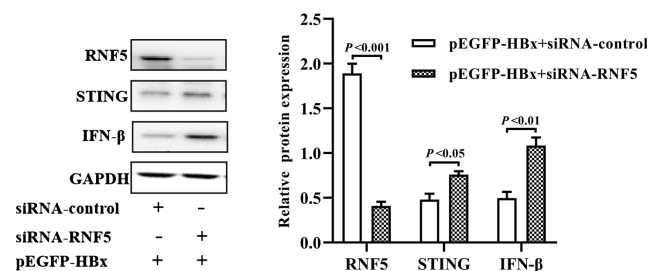


图 4 RNF5 对 HepG2 细胞 STING/IFN- β 信号通路的影响

Fig. 4 Effect of RNF5 on the STING/IFN- β signal transduction pathway in HepG2 cells

5 MG132 阻断 HBx 蛋白对 HepG2 细胞 STING/IFN- β 信号通路的抑制效应

MG132 是一种常用的蛋白酶抑制剂,为探讨 RNF5 是否通过泛素化进而降解 HepG2 细胞 STING 蛋白,用 MG132 处理转染 pEGFP-HBx 的 HepG2 细胞 48 h。结果显示,随着 MG132 浓度的逐渐升高,转染 pEGFP-HBx 的 HepG2 细胞 STING 和 IFN- β 蛋白表达水平也呈上升趋势,直至 MG132 浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ 时,转染 pEGFP-HBx 的 HepG2 细胞 STING 和 IFN- β 蛋白表达水平与未处理 HepG2 细胞比较差异均无统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 5)。

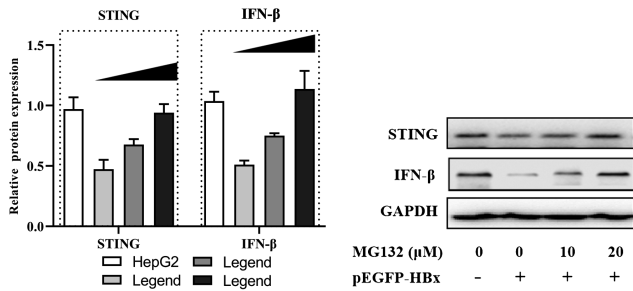


图5 蛋白酶抑制剂对HBx诱导HepG2细胞STING/IFN-β信号通路抑制效应的影响

Fig. 5 Effect of protease inhibitors on the STING/IFN-β signaling pathway inhibited by HBx in HepG2 cells

讨论

HBV属于嗜肝病毒,进入宿主体后,通过与肝细胞表面病毒受体结合启动感染肝细胞过程;同时不完全激活机体免疫系统,在逃避宿主免疫清除的基础上却能引起急性慢性肝脏炎症的发生^[11]。STING蛋白属于固有免疫系统信号转导的关键分子,能通过诱导I型干扰素进而参与宿主感染免疫、抗肿瘤免疫及自身免疫性疾病等过程,其中STING/IFN-β信号通路在机体防御病毒感染入侵中发挥重要作用^[12]。

HBV病毒颗粒除以完整的HBV颗粒存在形式外,还有多种缺陷性HBV颗粒也存在于患者体内^[13]。目前实验室多使用完整的HBV颗粒感染肝细胞,并发现HBV不能有效地激活肝细胞的固有免疫系统^[14-15]。然而,关于缺陷性HBV颗粒能否激活肝细胞固有免疫系统尚不清楚。本研究将含有完整HBV复制子pHBV-48质粒和缺失X基因的HBV复制子pHBV-48-X₀质粒分别转染至HepG2细胞,通过检测细胞STING基因和蛋白含量发现,无论是完整HBV复制子,还是缺失X基因的HBV复制子均不能影响细胞STING mRNA含量。在蛋白水平上,完整HBV复制子却能降低细胞STING表达,而缺失X基因的HBV复制子可显著促进细胞STING表达,提示HBV病毒的完整性可能是影响肝细胞固有免疫系统功能的重要因素,其中HBV基因编码的HBx蛋白具有潜在抑制肝细胞固有免疫系统STING相关信号通路的作用。

HBx蛋白属于HBV的非结构蛋白,相对分子质量仅为16.5 ku,远小于其它HBV基因编码蛋白,但其在病毒复制、细胞信号转导、基因转录激活、DNA修复和蛋白质降解等过程中却发挥着重要的作用^[16-17]。为验证HBx是否影响肝细胞STING蛋白表达,将HBx蛋白的真核表达质粒转染至HepG2细胞,结果发现HBx虽不能影响细胞STING mRNA含量,但可抑制细胞STING蛋白表达,表明HBx可能通过某种

策略导致STING蛋白低表达。值得注意的是,本研究还发现HBx在抑制HepG2细胞STING蛋白表达的同时上调环指蛋白5(Ring finger protein 5, RNF5)蛋白表达。RNF5是一种与内质网相关的泛素连接酶,定位于在内质网(Endoplasmic reticulum, ER)膜上,能通过调节细胞蛋白稳定性继而发挥清除胞内蛋白的功能,其在蛋白ER相关降解(ER-associated degradation, ERAD)途径中发挥重要作用^[18]。现已证明RNF5通过靶向调控STING蛋白泛素化和降解,从而阻碍病毒触发的免疫信号传导^[19]。鉴于HBx对HepG2细胞内STING和RNF5蛋白表达具有相反作用,据此推测HBx可能通过上调RNF5蛋白表达进而抑制STING蛋白。

细胞因子IFN-β属于I型IFN,依赖于激活细胞内信号通路级联放大继而诱导合成大量具有抗病毒效应的干扰素诱导蛋白,后者通过干扰病原微生物蛋白合成等方式抑制病原微生物的增殖^[20]。采用siRNA干扰HBx诱导HepG2细胞RNF5蛋白表达,实验结果证实RNF5具有对细胞STING蛋白及信号通路下游IFN-β蛋白表达的抑制效应,提示HBx通过上调RNF5表达抑制肝细胞STING/IFN-β信号通路,可能是HBV逃避宿主固有免疫清除作用的策略之一。为进一步探讨RNF5是否通过泛素化进而降解STING蛋白,通过使用肽醛类蛋白酶抑制剂MG132抑制HepG2细胞蛋白酶活性,发现转染pEGFP-HBx的HepG2细胞经MG132处理后,伴随着细胞STING蛋白表达上升,IFN-β蛋白表达也升高,表明RNF5可能通过对STING蛋白泛素化修饰进而降低肝细胞STING蛋白含量。

本研究通过体外细胞模型实验探讨了HBV感染逃避肝脏固有免疫可能存在的机制,揭示HBV基因编码的HBx蛋白能通过上调肝细胞泛素连接酶RNF5抑制STING/IFN-β信号通路,从而为进一步完善HBV感染免疫调控机制奠定了理论基础。

【参考文献】

- [1] Cryer AM, Imperial JC. Hepatitis B in pregnant women and their infants[J]. Clin Liver Dis, 2019, 23(3): 451-462.
- [2] Liu J, Liang W, Jing W, et al. Countdown to 2030: eliminating hepatitis B disease, China[J]. Bull World Health Organ, 2019, 97(3): 230-238.
- [3] Ou G, Liu X, Xu H, et al. Variation and expression of HLA-DPB1 gene in HBV infection[J]. Immunogenetics, 2021, 73(3): 253-261.
- [4] Chen J, Li Y, Lai F, et al. Functional comparison of interferon-α subtypes reveals potent hepatitis B virus suppression by a concerted action of interferon-α and interferon-γ signaling[J]. Hepatology, 2021, 73(2): 486-502.

(下转 1014 页)

- Acids Res. 2020, 7(19):11185-11198.
- [6] Toro N, Molina-sanchez MD. DNA cleavage and reverse splicing of ribonucleoprotein particles reconstituted in vitro with linear RmInt1 RNA[J]. RNA Biol, 2019, 16(7):930-939.
- [7] Wen Z, Lu M, Ledesma-amaro R, et al. TargeTron technology applicable in solventogenic clostridia: revisiting 12 years' advances[J]. Biotechnol J, 2020, 15(1):e1900284.
- [8] Kwon SW, Paari KA, Malaviya A, et al. Synthetic biology tools for genome and transcriptome engineering of solventogenic *Clostridium*[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020(8):282.
- [9] Dai Z, Dong H, Zhang Y, et al. Elucidating the contributions of multiple aldehyde/alcohol dehydrogenases to butanol and ethanol production in *Clostridium acetobutylicum*[J]. Sci Rep, 2016(6):28189.
- [10] 崔古贞, 陈相好, 洪伟, 等. 内含子编码蛋白 Mg²⁺ 结合位点功能分析及验证[J]. 生物技术通报, 2020, 36(10):165-172.
- [11] Morh G, Hong W, Zhang J, et al. A targetron system for gene targeting in thermophiles and its application in *Clostridium thermocellum*[J]. Plos One, 2013, 8(7):e69032.
- [12] Karberg M, Guo H, Zhong J, et al. Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria[J]. Nature Biotech, 2001, 19(12):1162-1167.
- [13] Liu Y, Miao J, Traore S, et al. SacB-SacR gene cassette as the negative selection marker to suppress agrobacterium overgrowth in agrobacterium-mediated plant transformation[J]. Front Mol Biosci, 2016(3):70.
- [14] Marx CJ. Development of a broad-host-range sacB-based vector for unmarked allelic exchange[J]. BMC Res Notes, 2008(1):1.
- [15] 崔古贞, 花登雄, 管玉祝, 等. 解纤维梭菌脱水四环素诱导的 ClosTron 基因打靶系统构建[J]. 微生物学通报, 2021, 48(9):2982-2990.
- [16] Shao L, Hu S, Yang Y, et al. Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum*[J]. Cell Res, 2007(17):963-965.
- [17] Mohr S, Ghanem E, Smith W, et al. Thermostable group II intron reverse transcriptase fusion proteins and their use in cDNA synthesis and next-generation RNA sequencing[J]. RNA, 2013, 19(7):958-970.
- [18] Hong W, Zhang J, Feng Y, et al. The contribution of cellulosomal scaffoldins to cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum* analyzed by using thermotargetrons[J]. Biotechnol Biofuels, 2014(7):80.
- [19] Stamos JL, Lentzsch AM, Lambowitz AM. Structure of a thermostable group II Intron reverse transcriptase with template-primer and its functional and evolutionary implications[J]. Mol Cell, 2017, 68(5):926-939.
- [20] Xu W, Peng J, Zhang W, et al. Enhancement of the *Brenneria sp.* levansucrase thermostability by site-directed mutagenesis at Glu⁴⁰⁴ located at the "-TEAP-" residue motif[J]. J Biotechnol, 2019(290):1-9.
- [21] Inthanavong L, Tian F, Khodadadi M, et al. Properties of *Geobacillus stearothermophilus* levansucrase as potential biocatalyst for the synthesis of levan and fructooligosaccharides[J]. Biotechnol Prog, 2013, 29(6):1405-1415.

【收稿日期】 2022-04-14 【修回日期】 2022-07-01

(上接 1009 页)

- [5] Huang Q, Zhou B, Cai D, et al. Rapid turnover of hepatitis B virus covalently closed circular DNA indicated by monitoring emergence and reversion of signature-mutation in treated chronic hepatitis B patients[J]. Hepatology, 2021, 73(1):41-52.
- [6] Guo F, Han Y, Zhao X, et al. STING agonists induce an innate antiviral immune response against hepatitis B virus[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(2):1273-1281.
- [7] 罗轩, 田烁冉, 李秋妹, 等. AMPK 通过抑制 STING 调节干扰素免疫应答通路的研究[J]. 中国医药生物技术, 2020, 15(1):32-39.
- [8] Dansako H, Imai H, Ueda Y, et al. High-level expression of STING restricts susceptibility to HBV by mediating type III IFN induction[J]. FASEB Bioadv, 2018, 1(2):67-80.
- [9] Li Y, He M, Wang Z, et al. STING signaling activation inhibits HBV replication and attenuates the severity of liver injury and HBV-induced fibrosis[J]. Cell Mol Immunol, 2022, 19(1):92-107.
- [10] Zheng B, Yu Y, Pan Z, et al. HBsAg Dampened STING associated activation of NK cells in HBeAg-negative CHB patients[J]. Int J Mol Sci, 2022, 22(14):7643.
- [11] Tsai TY, Huang MT, Sung PS, et al. SIGLEC-3 (CD33) serves as an immune checkpoint receptor for HBV infection[J]. J Clin Invest, 2021, 131(11):e141965.
- [12] 常佳佳, 侯石, 同心林, 等. 干扰素基因刺激因子(STING)及其激动剂的研究进展[J]. 药学报, 2021, 56(7):1880-1892.
- [13] Redelsperger F, Lekbaby B, Mandouri Y, et al. Production of hepatitis B defective particles is dependent on liver status[J]. Virology, 2012, 431(1-2):21-28.
- [14] Zhang Z, Trippier M, Real CI, et al. Hepatitis B virus particles activate toll-like receptor 2 signaling initially upon infection of primary human hepatocytes[J]. Hepatology, 2020, 72(3):829-844.
- [15] Lan P, Zhang C, Han Q, et al. Therapeutic recovery of hepatitis B virus (HBV)-induced hepatocyte-intrinsic immune defect reverses systemic adaptive immune tolerance[J]. Hepatology, 2013, 58(1):73-85.
- [16] Sekiba K, Otsuka M, Funato K, et al. HBx-induced degradation of Smc5/6 complex impairs homologous recombination-mediated repair of damaged DNA[J]. J Hepatol, 2022, 76(1):53-62.
- [17] Yuan H, Zhao L, Yuan Y, et al. HBx represses WDR77 to enhance HBV replication by DDB1-mediated WDR77 degradation in the liver[J]. Theranostics, 2021, 11(17):8362-8378.
- [18] Tcherpakov M, Delaunay A, Toth J, et al. Regulation of endoplasmic reticulum-associated degradation by RNF5-dependent ubiquitination of JNK-associated membrane protein (JAMP)[J]. J Biol Chem, 2009, 284(18):12099-12109.
- [19] Zhong B, Zhang L, Lei C, et al. The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MTA[J]. Immunity, 2009, 30(3):397-407.
- [20] Kaplan A, Lee MW, Wolf AJ, et al. Direct antimicrobial activity of IFN-beta[J]. J Immunol, 2017, 198(10):4036-4045.

【收稿日期】 2022-04-15 【修回日期】 2022-07-01