

• 综 述 •

X 蛋白的研究进展

潘 颖 综述,管世鹤 审核
(安徽医科大学,合肥 230032)

关键词:肝炎病毒; 乙型; 研究; X 蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.038

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)13-1485-03

乙型肝炎病毒(HBV)感染引起的乙型肝炎已成为全球范围的严重公共卫生问题之一,HBV 感染人群往往成为肝硬化和肝癌的高发人群。由于 X 蛋白可通过直接和间接的方式作用于病毒和宿主细胞,与乙型肝炎和肝癌的发生、发展有着密切的关系,从而成为近年来的研究热点。本文就近年来国内外对于 X 蛋白结构及生物学功能等的相关研究做一综述。

1 X 基因与 X 蛋白

HBV 是嗜肝 DNA 病毒科中正类嗜肝 DNA 病毒属的一员,HBV 基因组全长 3.2 kb,为部分单链的双股环状 DNA,其负链核苷酸包括四个重叠的开放阅读框架(ORF),分别是 S、C、P 和 X 区,其中 X 区位于增强子 1(Enh1)下游的第 1 374~1 838 位核苷酸,其 N 端与 P 区部分重叠,长 452~465 bp,由增强子 2(Enh2)、C 基因启动子(cp)和直接重复序列 DR1、DR2 构成,是病毒基因中最小的 ORF,并且是哺乳动物嗜肝病毒基因组中高度保守的读码框,其编码的 X 蛋白是由 145~154 个氨基酸残基组成,相对分子质量约 16.5×10^3 的多功能蛋白质。

X 蛋白功能的发挥与其在细胞内的表达水平及定位有关,研究表明^[1-2],低水平表达的 X 蛋白主要分布在细胞核,发挥反式激活作用,直接作用于细胞转录因子,参与相关的转录过程;而高表达水平时,X 蛋白多聚集在细胞质内,可促进多种蛋白激酶的活化,参与多种信号转导通路。

2 X 蛋白与 HBV 的复制

由于 X 开放阅读框架在哺乳动物嗜肝病毒基因组的高度保守性,因此其编码的 X 蛋白被认为在促进和增强病毒生命周期中发挥生物学作用。Bouchard 等^[3]通过将 X 蛋白表达缺失的 HBV(-HBx)与野生型 HBV 分别感染 HepG2 细胞,发现野生型 HBV 的复制水平是 X 蛋白表达缺失的 HBV 复制水平的 5~10 倍,而在小鼠模型和体外细胞模型中,X 蛋白可以使 X 基因缺陷型 HBV 的复制水平恢复到野生型 HBV 的水平^[4],证明了 HBV 在 HepG2 细胞内的复制明显依赖于 X 蛋白的表达。利用 siRNA 技术抑制 X 蛋白表达后,下调了 HBV 的转录与复制水平^[5],这一结果直接证明了 X 蛋白在 HBV 复制中发挥了重要作用。

X 蛋白加强 HBV 的复制可通过多种途径,如蛋白酶体依赖通路,有研究通过抑制细胞内蛋白酶体的活化而增强了 HBV 的复制,并且呈 X 蛋白依赖的形式^[6];损伤 DNA 结合蛋白(DDB)1 结合途径是 X 蛋白加强 HBV 复制的另一重要机制,研究表明 X 蛋白与 DDB1 的结合是 HBV 复制所必需的^[7],突变的 X 蛋白失去了与 DDB1 结合的能力,使得 HBV DNA 的复制处于低水平^[8],而抑制 DDB1 的表达可降低野生型 HBV 的转录和复制水平^[9];另外,还有研究利用格列本脲加强转染了 HBV(-HBx)的 HepG2 细胞内钙离子的浓度,发现 HBV(-HBx)DNA 复制水平得到大大的恢复,进一步研究

发现存在于线粒体膜上的 X 蛋白可通过增加细胞质内的钙离子浓度进而激活 Src 激酶途径,从而间接促进 HBV 的复制^[3],而阻断线粒体钙通路可以使 HBx 激活的 HBV DNA 复制明显抑制^[10]。

3 X 蛋白与肝细胞内信号转导途径的活化

存在于肝细胞质内的 X 蛋白可激活多种激酶及信号转导通路,从而引发一系列的生物学效应,如 Ras-MAPK 途径的激活直接影响了细胞的增殖和发育,并且可间接通过活化 Src 酪氨酸激酶从而刺激病毒聚合酶的活性^[11];蛋白激酶 C 水平的升高进一步实现信息的传递和转录因子的激活^[12];X 蛋白还可以促进 JAK 的磷酸化而激活 JAK/STAT 途径,上调转录活化 STAT3、STAT5 在细胞内的表达;另外,X 蛋白还参与 ERK1/2 途径、NF- κ B 途径、JNK/SAPK 途径、PI-3-K 途径等的激活,这些途径在调节肝细胞凋亡、增殖、再生中起关键作用^[13-14]。上述途径的激活并不是独立的,而是相互交叉相互影响的,如被 X 蛋白二聚体的形式激活的 JAK 可以活化 NF- κ B 途径,而 PI-3-K/PKB 途径的激活也有 JAK-STAT 和 Ras-GTP 复合物的参与^[15]。

X 蛋白对上述信号转导激酶的活化并不是通过与这些蛋白直接作用来完成的,而是通过活化其编码基因的上游序列,如 X 蛋白对 Ras、JNK、和 JAK-STAT 信号转导途径的活化就是通过激活 Src 家族受体的酪氨酸激酶来实现的,而此受体正是 Ras GTP 酶的上游活化序列,在体外细胞培养中,HBV 分泌的 X 蛋白持续刺激 Src 激酶的活化,而抑制 Src 激酶的表达可以阻止 X 蛋白对 AP-1、STAT3 等转录因子的作用,进一步影响相关的转录过程。

4 X 蛋白与肝细胞凋亡

关于 X 蛋白对肝细胞凋亡的影响有过不同的结论,有学者认为 X 蛋白通过增强细胞对促凋亡刺激物的敏感度而介导细胞凋亡;还可以通过上调 TNF- α 的表达,在促凋亡中起协同作用;还有实验表明,X 蛋白通过诱导线粒体聚集,扰乱线粒体功能来诱导凋亡^[16-17]。而肝细胞发生过度凋亡时,肝细胞因子会大量释放,从而诱导肝细胞再生和基因突变的积累,最终引起细胞的恶性转化。

也有研究表明 X 蛋白正是通过抑制凋亡而增大损伤 DNA 克隆复制的几率,从而给细胞突变提高机会,现已发现 X 蛋白可通过多种途径阻止细胞凋亡^[18-19],如上调 NF- κ B 的表达;下调 Bid 的表达,阻断其促凋亡作用;上调 HepG2 细胞端粒酶活性,使较多的细胞进入 S 期;还可以通过与 p53 结合形成复合物,抑制 p53 的核转位和其诱导的细胞凋亡等等。

实际上,X 蛋白对肝细胞凋亡的调控是双向的,既可以促进肝细胞的凋亡又可以抑制肝细胞的凋亡^[20],其涉及到的 Fas/FasL 凋亡途径、TNF/TNFR 途径、NF- κ B 途径、caspase-3 途径等通常具有有双重作用,如 X 蛋白可以激活并上调肝细

胞表面 FasL 的表达,而 FasL 的表达一方面可以诱导表达 Fas 的 T 细胞凋亡而使肝癌细胞逃脱免疫监视,另一方面又可以促进细胞凋亡。X 蛋白在什么情况下对肝细胞的凋亡发挥着的何种作用还需要进一步的研究,然而,X 蛋白对肝细胞凋亡的调节最终都导致细胞的恶性转化和肿瘤的形成。

5 X 蛋白与肝癌(HCC)的发生和发展

近年来,X 基因已被确证为癌基因,其编码的 X 蛋白被认为与肝癌的(HCC)发生和发展有着密切的联系,临床研究表明在 HBV 感染相关 HCC 中最常见 HBV X 基因在肝细胞基因组中的整合。体外实验通过将构建的高表达 X 基因的 pC-MVX/QSG770 细胞株接种于裸鼠皮下,发现在接种的第 2 周开始出现移植瘤生长,经 HE 染色证实为肝细胞癌组织^[21]。X 蛋白涉及 HCC 形成和发展的多个环节,除了通过体内复杂的信号网络系统调控细胞的生长外,还通过以下三种机制。

端粒酶能延长缩短的端粒使之不会因细胞分裂而有所损耗,在正常人体组织中端粒酶的活性受到严密的调控而维持细胞的正常增殖,而在肿瘤中端粒酶被重新激活,因此被认为与恶性肿瘤的形成密切相关,Leupin 等^[8]通过构建 X 基因真核表达载体并转染 HepG2 细胞,发现 X 基因上调了 HepG2 细胞端粒酶的活性,最新研究发现 X 蛋白上调端粒酶的表达是在转录水平上进行的,X 蛋白通过结合端粒酶启动子遏制物 MAZ,加强 MAZ 与其共有序列的结合,从而激活端粒酶^[22]。

抑癌基因 p53 的产物 p53 蛋白能与 DNA 特异结合,阻止损伤 DNA 的复制,以提供足够的时间修复损伤的 DNA;当修复失败时,p53 蛋白又可以引发细胞凋亡。p53 蛋白通过上述途径监视基因组的完整性,使之成为体内最重要的“基因组卫士”。X 蛋白对 p53 蛋白的影响是多方面的,首先,X 蛋白可与其结合形成复合体,从而阻止其进入细胞核,影响了 p53 蛋白在细胞内的分布:细胞质内 p53 蛋白的累积抑制了 p53 的抗增殖活性,细胞核内 p53 蛋白浓度的降低还抑制了其所引导的细胞凋亡;其次,X 蛋白能够干扰 p53 蛋白的 DNA 修复功能,p53 蛋白的 C 端结构域是其与损伤的 DNA 结合的区域,X 蛋白可以此区域结合从而阻止 p53 蛋白与损伤的 DNA 结合,影响其 DNA 修复功能^[23];最后,X 蛋白还可以导致 p53 基因的突变,Hou 等^[21]通过裸鼠成瘤实验发现 X 蛋白能上调移植瘤和 pC-MVX/QSG770 细胞细胞中突变型 p53 蛋白的表达,而突变的 p53 蛋白失去了正常的 p53 蛋白的一系列抗肿瘤功能从而导致肿瘤增殖。

促进肝癌细胞的侵袭转移是最近几年发现的 X 基因的新功能,周秀敏等^[24]构建针对 X 基因的 shRNA 表达载体 psiRNA,并转染 HepG2. 2. 15 细胞,再以 Transwell 小室测定 HepG2. 2. 15 细胞与纤维连接蛋白的体外黏附能力,发现阻断 X 蛋白的表达可明显抑制肝癌细胞 HepG2. 2. 15 的体外侵袭性生长。其相关机制涉及到 X 蛋白上调基质金属蛋白酶的表达、环氧合酶的表达和胰岛素受体底物-1 的表达增强等^[25-26]。

6 小 结

综上所述,X 蛋白参与了 HBV 感染和复制的多个阶段,在乙型肝炎的发病、发展和转化中发挥着重要的作用,而目前的针对 X 蛋白的研究还停留在比较肤浅的阶段,X 蛋白与体内复杂的信号转导途径以及与抑癌基因 p16、p21 之间的相互作用等等还有待于深入的研究,X 蛋白的具体功能及致病机制还需要进一步的揭示,这对防治由 X 蛋白引起的 HBV 感染、复制以及乙型肝炎发展和转归具有重要意义。

参考文献

[1] Henkler F, Hoare J, Wasseem N, et al. Intracellular localization of

the hepatitis B virus HBx protein[J]. J Gen virol, 2001, 82(4): 871-882.

- [2] Keasler VV, Hodgson AJ, Madden CR, et al. Hepatitis B virus HBx protein localized to the nucleus restores HBx-deficient virus replication in HepG2 cells and in vivo in hydrodynamically-injected mice[J]. Virology, 2009, 390(1): 122-129.
- [3] Bouchard MJ, Puro RJ, Wang L, et al. Activation and inhibition of cellular calcium and tyrosine kinase signaling pathways identify targets of the HBx protein involved in hepatitis B virus replication[J]. J Virol, 2003, 77(14): 7713-7719.
- [4] Keasler VV, Hodgson AJ, Madden CR, et al. Enhancement of hepatitis B virus replication by the regulatory X protein in vitro and in vivo[J]. J Virol, 2007, 81(6): 2656-2662.
- [5] Chan DW, Ng IO. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells[J]. J Pathol, 2006, 208(3): 372-380.
- [6] Zhang Z, Protzer U, Hu Z, et al. Inhibition of cellular proteasome activities enhances hepadnavirus replication in an HBx-dependent manner[J]. J Virol, 2004, 78(9): 4566-4572.
- [7] Tang KF, Xie J, Chen M, et al. Knockdown of damage-specific DNA binding protein1 (DDB1) enhances the HBx-siRNA-mediated inhibition of HBV replication[J]. Biologicals, 2008, 36(3): 177-183.
- [8] Leupin O, Bontron S, Schaeffer C, et al. Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death[J]. J Virol, 2005, 79(7): 4238-4245.
- [9] Melegari M, Wolf SK, Schneider RJ. Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression[J]. J Virol, 2005, 79(15): 9810-9820.
- [10] McClain SL, Clippinger AJ, Lizzano R, et al. Hepatitis B virus replication is associated with an HBx-dependent mitochondrion-regulated increase in cytosolic calcium levels[J]. J Virol, 2007, 81(21): 12061-12065.
- [11] Yun C, Cho H, Kim SJ, et al. Mitotic aberration coupled with centrosome amplification is induced by hepatitis B virus X oncoprotein via the Ras-mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein pathway [J]. Mol Cancer Res, 2004, 2(3): 159-169.
- [12] Zhang L, Wu SL, Rubin CS. A novel adapter protein employs a phosphotyrosine binding domain and exceptionally basic N-terminal domains to capture and localize an atypical protein kinase C: characterization of *Caenorhabditis elegans* C kinase adapter 1, a protein that avidly binds protein kinase C3[J]. J Biol Chem, 2001, 276(13): 10463-10475.
- [13] Kim JY, Song EH, Lee HJ, et al. HBx-induced hepatic steatosis and apoptosis are regulated by TNFR-1 and NF- κ B-dependent pathways[J]. J Mol Biol, 2010, 397(4): 917-931.
- [14] Mukherji A, Janbandhu VC, Kumar V. HBx protein modulates PI3K/Akt pathway to overcome genotoxic stress-induced destabilization of cyclin D1 and arrest of cell cycle[J]. Indian J Biochem Biophys, 2009, 46(1): 37-44.
- [15] Kim H, Lee YH, Won J, et al. Through induction of juxtaposition and tyrosine kinase activity of Jak1, X-gene product of hepatitis B virus stimulates Ras and the transcriptional activation through AP-1, NF- κ B, and SRE enhancers[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 286(5): 886-894.
- [16] Clippinger AJ, Bouchard MJ. Hepatitis B virus HBx protein localizes to mitochondria in primary rat hepatocytes and modulates mi-

- tochondrial membrane potential[J]. J Virol, 2008, 82(14): 6798-6811.
- [17] Clippinger AJ, Gearhart TL, Bouchard MJ. Hepatitis B virus X protein modulates apoptosis in primary rat hepatocytes by regulating both NF- κ B and the mitochondrial permeability transition pore[J]. J Virol, 2009, 83(10): 4718-4731.
- [18] 沈钦海, 周卫平, 张大志. 乙型肝炎病毒及其 x 基因对培养肝细胞端粒酶活性的影响[J]. 中华传染病杂志, 2002, 20(2): 112-113.
- [19] Zhu M, Dai Y, Zhan R. HBxAg enhanced p53 protein accumulation in hepatoma cells[J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 1999, 28(1): 31-34.
- [20] Assrir N, Soussan P, Kremsdorf D, et al. Role of the hepatitis B virus protein in pro- and anti-apoptotic processes[J]. Front Biosci, 2010, 15(1): 12-24.
- [21] Hou ZH, Liu GZ, Zheng F, et al. HBx gene inducing hepatocellular carcinoma in viro and its mechanism[J]. J Cent South Univ (Med Sci), 2009, 34(4): 282-288.
- [22] Su JM, Lai XM, Lan KH, et al. X Protein of Hepatitis B virus functions as a transcriptional corepressor on the human telomerase promoter[J]. Hepatology, 2007, 46(2): 402-413.
- [23] Lee AT, Ren J, Wong ET, et al. The Hepatitis B virus X protein sensitizes HepG2 cells to UV light-induced DNA damage[J]. J Biol Chem, 2005, 280(39): 33525-33535.
- [24] 周秀敏, 陶敏, 徐红, 等. 乙型肝炎病毒 X 基因阻断降低肝癌细胞 HepG2. 2. 15 与纤维连接蛋白的黏附[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2010, 30(3): 453-456.
- [25] Ou DP, Tao YM, Tang FQ, et al. The hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinoma metastasis by upregulation of matrix metalloproteinases[J]. Int J Cancer, 2007, 120(6): 1208-1214.
- [26] Longato L, Monte LZ, Kuzushita N, et al. Overexpression of insulin receptor substrate-1 and hepatitis Bx genes causes premalignant alterations in the liver[J]. Hepatology, 2009, 49(6): 1935-1943.

(收稿日期: 2010-10-09)

• 综 述 •

临床检验分析前质量控制中护理因素的作用

晏 萌 综述, 谢 萍 审校
(重庆市高新区人民医院护理部 400039)

关键词: 护理人员; 检验标本; 质量控制

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 13. 039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)13-1487-02

目前, 护理人员在临床检验采集标本中存在的采血时间与条件、血样不足、操作不规范等方面的问题, 影响了检测工作的准确性和可靠性。本文对此提出了加强与改进护理人员素质的相关措施, 以提高医疗工作质量。

1 采血前的准备

1.1 护理人员的准备 护理人员在采血前应做好“三查七对”, 认真核查患者姓名、性别、年龄、申请项目等情况。根据申请项目合理安排采血顺序。采血顺序为: 血培养、血凝管、血常规管、血沉管、生化管及其他管。

1.2 患者的准备 检验结果可受到生理、情绪、运动、药物、饮食、体位等因素的影响。因此, 护理人员要熟知各种影响因素, 在采血前主动跟患者沟通好, 并取得患者的配合。

1.2.1 生理因素 男性和女性在许多项目上都有差异, 如男性血红蛋白、血尿素、肌酐、血尿酸、肌酸激酶等均高于女性, 女性妊娠中后期血红蛋白下降; 不同年龄段检测结果也是不同, 如新生儿血红蛋白、胆红素明显高于成人, 健康儿童由于骨质生长与发育导致成骨细胞、破骨细胞活性增加, 碱性磷酸酶活性明显升高, 是健康成年男子的 3 倍。

1.2.2 情绪因素 采血一般需要在安静状态下进行, 如患者处于高度紧张的状态时, 可使血红蛋白、白细胞增高。

1.2.3 运动因素 运动可引起血液成分的变化, 如: 激烈运动后可使肌酸肌酶、乳酸脱氢酶、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、血糖等的测定值升高。有的恢复较慢, 如谷丙转氨酶在停止运动 1 h 后测定, 其值仍可偏高 30%~50%。还可引起电解质等成分的变化。

1.2.4 药物因素 药物对检验结果的影响逐渐被人们重视, 如: 青霉素类可干扰十几项试验; 大剂量静脉输液可使肌酐、尿

素、总蛋白和钾偏高; 注射胰岛素后可使血钾离子进入细胞内, 而引起假性血钾下降; 服维生素 C 后可使血糖、肌酐、尿酸、血脂等下降; 输入高渗葡萄糖后可使钾离子下降。

1.2.5 饮食因素 一般检测项目均要求禁食 12 h 后采血, 因为进食对于许多检测项目具有光学干扰作用。如进食后可引起血脂、血糖升高, 而血脂又可影响许多检测项目, 主要有 (1) 被分析物分布非均一性。(2) 血清或血浆中水分被取代, 有时可达 10% 左右。(3) 对吸光度的干扰。(4) 物理化学机制的干扰。如标本中的脂蛋白可整合亲脂成分, 降低与抗体的结合, 并影响电泳和层析。长期饮酒可使丙氨酸氨基转移酶、总胆汁酸、 γ -谷氨酰转肽酶等升高; 吸烟使血清高密度脂蛋白水平降低; 长期饮咖啡可使三酰甘油升高, 胆固醇下降。

1.2.6 体位因素 文献报导, 有 28 项生化指标坐位均值都大于卧位, 可见体位对生化结果影响很大。门诊为了便于操作, 通常采取坐位, 病房通常为卧位。需要指出的是, 对于同一患者, 每次采血最好采取相同的体位, 这样前后的检测结果才更有可比性。

2 采血时间

采血一般在早晨 7:00~10:00 进行。每一个实验都可能有不同的要求, 采血前一定要熟悉不同实验的要求, 采血时间的原则应该保证在采血后 1 h 内离心血样, 制成血浆或血清; 血涂片必须在采血后 2 h 内准备。各个医院的住院患者都是由护士采血, 而且是由夜班护士完成采血, 由于工作的特殊性, 任务重、时间紧, 大多数护士采集时间在早晨 5:00~6:00, 而检验时间在上午 9:00~10:00 开始, 这样无疑就耽搁了 4~5 h。另外, 不能让患者空腹时间太长 (16 h 以内), 否则会使血清清蛋白、补体细胞、运铁蛋白、血糖下降, 血清胆红素因清除