

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.035.html>

◇ 综 述 ◇

STAT1 修饰对干扰素抗乙肝病毒作用影响的研究进展

汤 波¹, 韦佳佳², 徐丙发² 综述, 范鲁雁^{1,2} 审校

摘要 干扰素是一种重要的细胞因子, 具有许多生物学功能, 主要包括抗病毒和免疫调节等。目前, 在我国临床上广泛使用干扰素来治疗慢性乙型肝炎和慢性丙型肝炎。JAK-STAT 信号通路是其发挥作用的主要通路, 而 STAT1 在其中充当重要角色。STAT1 在干扰素抗乙肝病毒过程中发挥重要作用, 其不同修饰也对抗病毒作用产生影响, 本文就近年来的研究进展进行综述。

关键词 STAT1; 干扰素; 乙型肝炎病毒; 研究进展

中图分类号 R 978.7; R 512.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)04-0615-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.035

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV) 是一种 DNA 病毒, 感染的血液或体内分泌物是其主要的传播途径^[1]。在全球有超过 4 亿人感染乙型肝炎病毒^[2-3]。中国拥有世界上最大的乙型肝炎病毒感染人群^[4]。HBV 感染可引起急慢性肝炎, 严重者可能发展为肝硬化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC), 严重威胁人类健康, 降低人们生活质量。目前临床上用于抗 HBV 的药物主要有干扰素类与核苷及其类似物类, 但二者长时间应用均会导致耐药性的产生从而降低疗效。干扰素(interferon, IFN) 具有抗病毒及免疫调节双重作用, 是临床上治疗慢性乙型肝炎的首选药物之一。其抗 HBV 主要通过 JAK-STAT 通路来完成, 而信号传导及转录激活因子 1(signal transducers and activators of transcription, STAT1) 是 JAK-STAT 通路中的重要信号物质, 在 IFN 发挥抗 HBV 疗效的过程中起重要作用。现对 STAT1 的作用作一综述。

1 IFN 发挥抗 HBV 作用的信号通路

1.1 JAK-STAT 通路 IFN 发挥抗病毒作用主要通过 JAK-STAT 通路: IFN 首先与细胞膜上的特异性识别受体相结合, IFNAR1 和 IFNAR2 形成受体二聚体, JAK1 与 Tyk2 结合而活化, 与 STAT1、STAT2 通过 SH2 结构域结合, STAT1、STAT2 被磷酸化激活后形成异源二聚体, 构象改变而被转移到核内。在细胞核内, 与干扰素刺激应答反应元件(IFN-stimulated response elements, ISRE) 相结合, 从而开启干扰素刺激基因(IFN-stimulated genes, ISGs) 的转录, 并翻译成具有直接或间接抗病毒作用的蛋白来发挥抗病毒作用^[5]。

1.1.1 JAK-STAT 通路的组成 JAK-STAT 通路由两部分组成: JAK 酶和 STAT 蛋白。JAK 酶分子量在 120~140 ku 之间。哺乳类一共有 4 种 JAK 酶: JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2。STAT 家族主要由 N 端寡聚化区、卷曲螺旋结构区、DNA 结合区、连接区、Sre 同源结构域 2 以及 C 端转录激活区组成。其中, SH2 在 STAT 活化过程中起关键作用^[6-7]。

1.1.2 JAK-STAT 通路下游抗病毒蛋白的表达 ISGs 被激活后经转录和翻译形成一系列抗病毒蛋白, 主要有双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA) 依赖的蛋白酶(protein kinase R, PKR)、2'-5'寡腺苷酸合成酶(2'-5'-oligoadenylate synthetase, OAS)、抗黏病毒蛋白(mixovirus resistance protein A, MxA) 等。IFN 在发挥抗病毒效应后, STAT1 在细胞核内发生去磷酸化, 从 DNA 上脱落而被转至胞质, 重新参与 STAT1 循环利用。

2 STAT1 的结构、变化及转运

目前, 已显示哺乳动物 STAT 家族共有 7 位成员: STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b、STAT6。在 IFN 介导的 JAK-STAT 通路中, STAT1 发挥着重要的作用。STAT1 在表达之后剪接形成 STAT1 α 和 STAT1 β 两种蛋白, 大小分别为 91、84 ku^[8]。IFN 是 STAT1 的重要激活物。当受到 IFN α

2016-12-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81470165)

作者单位: ¹ 安徽医科大学药学院, 合肥 230032

² 安徽医科大学第三附属医院药学部, 合肥 230061

作者简介: 汤 波, 男, 硕士研究生;

范鲁雁, 女, 教授, 主任药师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hfyyxb@163.com

或 IFN γ 刺激后, STAT1 的 Y701 位点磷酸化, 随后 STAT1 二聚体化或 STAT1/2 异二聚体化, 磷酸化在这个过程中是必须的^[9]。STAT1 的修饰还包括甲基化、乙酰化、泛素化等。其不同修饰对 JAK-STAT 通路产生重要的影响, 从而最终影响 IFN 抗 HBV 的作用。在 JAK-STAT 信号通路中, 位于胞质内 STAT1 经一系列变化入核, 调控相关基因转录并发挥其生物学功能。在转录后, STAT1 从靶 DNA 上脱落, 重新回到细胞质内。在细胞核内, Y701 位点发生去磷酸, 然后 STAT1 失活, 这对于 STAT1 转运出核是必须的。

3 STAT1 不同状态对 IFN 作用的影响

IFN 通过 JAK-STAT 信号通路发挥其抗病毒作用, 在这一过程中 STAT1 的不同状态影响着 IFN 的抗病毒活性。目前研究较多的是 STAT1 的磷酸化、乙酰化、甲基化和泛素化修饰。在实验中, 增加 STAT1 的磷酸化修饰可能会使抗病毒作用增强, 而高水平的乙酰化修饰则可能抑制 JAK-STAT 信号通路中 STAT1 的磷酸化, 降低 IFN 的抗病毒作用。STAT1 的甲基化修饰有利于 IFN 的抗病毒作用, 使得抗病毒作用变强, 而增加其泛素化修饰则会抑制 IFN 的抗病毒作用。

3.1 STAT1 的磷酸化修饰 蛋白质可以进行多种生物体共价键修饰, 其中磷酸化及去磷酸化是蛋白修饰的一种主要方式, 其动态变化可以调节蛋白质分子的活性及功能。

STAT1 蛋白的磷酸化可以对下游靶基因转录进行调节。Wen et al^[10] 于 1995 年报道了 STAT1 和 STAT3 的磷酸化修饰, 发现了 727 位丝氨酸的磷酸化。对于 STAT1, 还发现了其 708 位丝氨酸的磷酸化。在 IFN 刺激后, STAT1 可以发生酪氨酸磷酸化, 然后二聚体化, 在细胞核内与 DNA 相结合, 转录激活 IFN 刺激基因, 产生抗病毒效应。IFN 诱导的 STAT1 能否发挥最大转录活性, 其丝氨酸磷酸化发挥着重要作用^[11]。可以把酪氨酸磷酸化看做一个调控 STAT1 活性的分子开关, 其磷酸化与否及其程度大小明显影响 IFN 的抗病毒作用。同时, Wu et al^[12] 研究发现, 在 STAT1 的出核过程中, STAT1 的酪氨酸去磷酸化是必要的。因此, STAT1 在核内停留时间、STAT1 的出核转运受酪氨酸磷酸化调控。

研究^[13] 表明, IFN α 可通过增强肝脏细胞 STAT1 的磷酸化而发挥抗病毒作用。HCV 对 IFN α 产生耐药性可能与 STAT1 的磷酸化有关, 通过抑制

STAT1 磷酸化, 可以使其入核受阻, IFN 抗病毒作用减弱, HCV 对 IFN α 产生了耐药性^[14]。已有报道^[15] 指出, HBV 可通过抑制 STAT1 向细胞核内转移而削弱 IFN α 的抗 HBV 作用, 且慢性乙肝(chronic hepatitis B, CHB) 患者对 IFN α 敏感性与肝脏组织 STAT1 的表达量呈正相关性, 在同时使用干扰素治疗的情况下, 对 IFN 敏感的 CHB 患者肝细胞内 STAT1 表达量明显高于对 IFN 不敏感患者, 推测 IFN 抵抗可能和 STAT1 的下调有关^[16]。

3.2 STAT1 的乙酰化修饰 蛋白质的转录翻译后修饰在生命活动中扮演着重要的角色, 乙酰化可以调节组蛋白和非组蛋白的活性。蛋白乙酰化是调节其功能的重要途径。STATs 的乙酰化可以被组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)、组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs) 动态调节。

Antunes et al^[17] 发现 STAT1 乙酰化不影响其磷酸化, 但抑制其与 DNA 结合及核转位。磷酸化-乙酰化平衡是调节 STAT1 信号的重要开关: STAT1 酪氨酸、丝氨酸的磷酸化是 STAT1 发挥作用的必要条件, 而 STAT1 赖氨酸乙酰化可促进 STAT1 去磷酸化而失活^[18]。STAT1 是否发挥作用取决于细胞内磷酸化-乙酰化的平衡。这个平衡受多方面影响, 如 IFN、组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACI)、组蛋白乙酰转移酶环腺苷酸应答原件结合蛋白、T 细胞酪氨酸磷酸酶 45 等。研究^[19] 显示, IFN α 可诱导 STAT1 磷酸化, HDACI 则通过促进 STAT1 乙酰化而抑制 IFN α 诱导的 STAT1 磷酸化和 STAT1 相关基因表达。

3.3 STAT1 的甲基化修饰 STAT1 的甲基化程度影响 JAK-STAT 信号传导通路, 从而影响 IFN 抗乙型肝炎病毒效果。激活的 STAT 蛋白抑制因子 1 (protein inhibition of activated STAT1, PIAS1) 是 STAT1 的负性调节子, 可以和活化的 STAT 二聚体特异性结合, 使其与 DNA 序列结合受阻, 产生抵抗 IFN α 的作用^[20]。蛋白质精氨酸甲基转移酶 1 (protein arginine methyltransferase 1, PRMT1) 可以使蛋白质底物中的精氨酸发生甲基化。PRMT1 可以和 I 型 IFN 受体的细胞质区域相结合, 是这个家族中和信号转导关系密切的第一种酶。

STAT1 的 Arg31 可以被 PRMT1 催化, 发生非对称性二甲甲基化, 同时精氨酸甲基化后, STAT1 与 PIAS1 的连接受阻。低甲基化的 STAT1 与 PIAS1 结合而处于失活状态。当 STAT1 的 Arg31 被 PRMT1

催化发生甲基化后,使得 STAT1 与 PIAS1 解离从而活化,进而调节 ISGs 的转录。PRMT1 受蛋白磷酸酶 2Ac (protein phosphatase 2Ac, PP2Ac) 负性调节, HBV 可通过上调 PP2Ac 而降低 PRMT1 活性,使 STAT1 甲基化受阻,IFN 的抗 HBV 作用减弱。HBV 自身也可通过增强 STAT1-PIAS1 结合而降低 STAT1 的甲基化^[21],从而使抗病毒蛋白表达减少。

S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 是甲硫氨酸的活性形式,一个主要生物甲基供体,在动植物体内广泛存在,SAM 已被全世界广泛用于治疗慢性肝内胆汁淤积性肝病^[22]。SAM 能有效改善 STAT1 甲基化和减少 STAT1-PIAS1 结合,随后增加 PKR 和 2' 5'-OAS 基因表达,从而显著降低 HBsAg、HBeAg 的水平,增强 IFN α 的抗病毒效果^[21, 23]。

3.4 STAT1 的泛素化修饰 蛋白质泛素化是蛋白质的一种常见修饰形式,该过程能够调节不同细胞途径中各式各样的蛋白质底物。干扰素刺激基因 15 (interferon-stimulated gene 15, ISG15) 是一类小分子类泛素样蛋白,细胞受到 IFN 和病毒感染等刺激后生成,在抗病毒免疫中起重要的作用^[24]。泛素特异性蛋白酶 18 (ubiquitin-specific protease 18, USP18) 是泛素蛋白酶家族中的一员,可以将 ISG15 从 ISG 化学修饰的蛋白上移除。研究^[25]表明,通过抑制 USP18 可以增加 STAT1 的磷酸化,延长 STAT1 与 ISGs 的结合时间,IFN 诱导的目的基因表达增强,从而增强抗病毒作用。Dill et al^[26] 研究者用 IFN 治疗急性丙型肝炎患者和慢性丙型肝炎患者,发现对 IFN 反应较差的慢性丙型肝炎患者肝脏样本内 USP18 明显上调。

4 结语

IFN 抗肝炎病毒是一个复杂、严谨的调控过程,在这个过程中 STAT1 发挥着重要作用。从 IFN 与细胞膜上特异性受体结合开始,通过磷酸化、乙酰化、甲基化、泛素化等化学修饰,调控 STAT1 蛋白二聚体形成,入核后转录激活 IFN 刺激基因,诱导抗病毒物质表达发挥抗病毒作用。在这个过程中,不同类型的翻译后修饰相互影响,协同调控 STAT1 的分子活性。深入研究 STAT1 的变化过程和作用,将更清楚地揭示 IFN 抗肝炎病毒及肝炎病毒耐 IFN 的机制,为寻找合适的干预措施作下铺垫。

参考文献

[1] Wang G F, Shi L P, Ren Y D, et al. Anti-hepatitis B virus activi-

ty of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid *in vivo* and *in vitro* [J]. Antiviral Res, 2009, 83(2): 186-90.

- [2] Ayoub W S, Keeffe E B, Review article: current antiviral therapy of chronic hepatitis B [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2011, 34(10): 1145-58.
- [3] Yuen M F, Lai C L. Hepatitis B in 2014: HBV research moves forward—receptors and reactivation [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 12(2): 70-2.
- [4] Liao B, Zhang F, Lin S, et al. Epidemiological, clinical and histological characteristics of HBV/HDV co-infection: a retrospective cross-sectional study in Guangdong, China [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e115888.
- [5] Liongue C, O'Sullivan L A, Trengrove M C, et al. Evolution of JAK-STAT pathway component: mechanisms and role in immune system development [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32777.
- [6] Schindler C, Plumlee C. Interferons pen the JAK-STAT pathway [J]. Semin Cell Dev Biol, 2008, 19(4): 311-8.
- [7] George P M, Badiger R, Alazawi W, et al. Pharmacology and therapeutic potential of interferons [J]. Pharmacol Ther, 2012, 135(1): 44-53.
- [8] Schindler C, Fu X Y, Improta T, et al. Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene 210 encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(16): 7836-9.
- [9] Shuai K, Horvath C M, Huang L H, et al. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions [J]. Cell, 1994, 76(5): 821-8.
- [10] Wen Z, Zhong Z, Darnell J E Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation [J]. Cell, 1995, 82(2): 241-50.
- [11] Sadzak I, Schiff M, Gattermeier I, et al. Recruitment of Stat1 to chromatin is required for interferon-induced serine phosphorylation of Stat1 transactivation domain [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(26): 8944-9.
- [12] Wu T R, Hong Y K, Wang X D, et al. SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei [J]. J Biol Chem, 2002, 277(49): 47572-80.
- [13] Zhao L J, Hua X, He S F, et al. Interferon alpha regulates MAPK and STAT1 pathways in human hepatoma cells [J]. Virol J, 2011, 8: 157.
- [14] Hazari S, Chandra P K, Poat B, et al. Impaired antiviral activity of interferon alpha in Huh-7 cells with defective JAK-STAT pathway [J]. Virol J, 2010, 7: 36.
- [15] Lütgehetmann M, Bornscheuer T, Volz T, et al. Hepatitis B virus limits response of human hepatocytes to interferon- α in chimeric mice [J]. Gastroenterology, 2011, 140(7): 2074-83.
- [16] Chen H, Wang L W, Huang Y Q, et al. Interferon-alpha induces high expression of APOBEC3G and STAT-1 *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(9): 3501-12.
- [17] Antunes F, Marg A, Vinkemeier U. STAT1 signaling is not regu-

反义 RNA 与肝癌的研究进展

吕 贝^{1,2} 综述, 李华玲¹, 崔恒宓² 审校

摘要 反义 RNA 是一类能与特异性 mRNA 互补并从翻译、转录或转录后水平上高度特异地抑制靶基因表达的 RNA 分子。肝癌是全球最常见且致命的恶性肿瘤。肝癌组织的无限增殖、侵袭转移、放化疗耐受等能力成为其无法治愈并不断恶化的重要原因。反义 RNA 在肝癌肿瘤中异常表达, 肿瘤的恶性表型维持需要众多反义 RNA 的参与。近年来, 利用反义 RNA 技术治疗恶性肿瘤已经成为了一个新的研究方向, 本文对这一技术治疗肝癌进行了综述。

关键词 肝癌; 反义 RNA; 研究进展

中图分类号 Q 3-05

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)04-0618-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.036

反义 RNA (antisense RNA) 是一类小分子转录

2016-12-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81372237、81671056、91540117); 国家重点研发计划 (编号: 2016YFC1303604)

作者单位: ¹ 扬州大学医学院生物化学教研室, 扬州 225001

² 扬州大学表观遗传学及表观基因组学研究所, 扬州 225009

作者简介: 吕 贝, 女, 硕士研究生;

李华玲, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 2274292599@qq.com;

崔恒宓, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: hmcul@yzu.edu.cn

物, 其能通过抑制靶 RNA 来达到调节或封闭某个基因的表达^[1]。反义 RNA 最早显示于原核生物, 随着科技的不断提高, 反义 RNA 技术得到了很好的完善和发展, 并在肿瘤治疗中得到了充分的利用。

肝癌是五大常见癌症之一, 并且其死亡率在全球范围内排名第二^[2]。近 20 年来, 治疗肝癌和其他肿瘤多采用手术、化疗和中西医结合治疗。随着分子生物学各方面的不断完善, 反义 RNA 基因治疗已经成为一种可特异性阻断或调节致病基因表达的手段, 在各种疾病治疗中具有广阔的发展前景, 并成为肝癌治疗的新方法。

1 反义 RNA 作用机制

反义 RNA 通过碱基互补配对特定的 RNA 来发挥封闭、抑制靶基因表达的功能。反义 RNA 的作用位点主要有: ① mRNA 5'端非翻译区, 包含 SD 序列和核糖体联合位点; ② mRNA 5'端编码区, 主要是起始密码 AUG; ③ mRNA 5'端帽子构成位点; ④ 前 mRNA 外显子与内含子结合部; ⑤ mRNA ployA 构成位点。反义 RNA 通过作用以上位点发挥抑制基因表达的作用。其作用机制包括: ① 在复制水平上与引物前体 RNA 结合, 抑制 DNA 复制, 控制 DNA 复制效率; ② 在转录水平上与 mRNA 5'端结合以防止一个完整的 RNA 结合转录; ③ 在翻译水平上与

lated by a phosphorylation-acetylation switch [J]. Mol Cell Biol, 2011, 31(14): 3029-37.

[18] Krömer O H, Heinzl T. Phosphorylation-acetylation switch in the regulation of STAT1 signaling [J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 315(1-2): 40-8.

[19] Krömer O H, Knauer S K, Greiner G, et al. A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling [J]. Genes Dev, 2009, 23(2): 223-5.

[20] Tai D J, Hsu W L, Liu Y C, et al. Novel role and mechanism of protein inhibitor of activated STAT1 in spatial learning [J]. EMBO J, 2011, 30(1): 205-20.

[21] Li J, Chen F, Zheng M, et al. Inhibition of STAT1 methylation is involved in the resistance of hepatitis B virus to interferon alpha [J]. Antiviral Res, 2010, 85(3): 463-9.

[22] Anstee Q M, Day C P. S-adenosylmethionine (SAME) therapy in

liver disease: a review of current evidence and clinical utility [J]. J Hepatol, 2012, 57(5): 1097-109.

[23] Bing Y, Zhu S, Yu G, et al. Glucocorticoid-induced S-adenosylmethionine enhances the interferon signaling pathway by restoring STAT1 protein methylation in hepatitis B virus-infected cells [J]. J Biol Chem, 2014, 289(47): 32639-55.

[24] Skaug B, Chen Z J. Emerging role of ISG15 in antiviral immunity [J]. Cell, 2010, 143(2): 187-90.

[25] Li L, Lei Q S, Zhang S J, et al. Suppression of USP18 potentiates the anti-HBV activity of interferon alpha in HepG2.2.15 cells via JAK/STAT signaling [J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0156496.

[26] Dill M T, Makowska Z, Duong F H. Interferon-γ-stimulated genes, but not USP18, are expressed in livers of patients with acute hepatitis C [J]. Gastroenterology, 2012, 143(3): 777-86.