

• 综述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.06.043

lncRNA 在乙型肝炎病毒复制调控中的研究进展*

邓慧敏,张 琰,宋春丽 综述,周义文[△] 审校

南方医科大学深圳医院临床检验医学中心,广东深圳 518000

关键词:长链非编码 RNA; 乙型肝炎病毒; 复制; 基因调控

中图分类号:R512.6+2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)06-0853-04

全世界有超过 2.4 亿人感染乙型肝炎病毒 (HBV),15%~40% 的未接受治疗的慢性 HBV 感染者可进展为肝硬化,最终导致肝衰竭和肝癌^[1-2]。HBV 是大小约为 3.2 kb 的部分环状双链 DNA,其在 DNA 聚合酶作用下可转化形成共价闭合环状 DNA (cccDNA)。肝细胞中的两个高活性启动子 Enhancer I (En1)、Enhancer II (En2) 与肝细胞表面表达的特异性受体蛋白及细胞内富集的各类转录调控因子共同决定了 HBV 的嗜肝特性^[3]。想通过药物彻底消灭慢性 HBV 携带者体内的全部病毒十分困难,因此,寻找新的 HBV 检测标志物长链非编码 RNA (lncRNA) 在早期诊断 HBV 感染及调控 HBV 的复制过程有着重要的意义。

近十年的研究结果支持将大于 200 个核苷酸的非编码 RNA (ncRNA) 称为 lncRNA,其占 ncRNA 总量的 80% 以上,多由 RNA 聚合酶 II 转录形成。根据 lncRNAs 与临近蛋白编码基因的结构关系,分为以下 5 类:(1) 正义链或反义链;(2) 双向的 lncRNAs;(3) 基因间的 lncRNAs;(4) 增强子 lncRNAs;(5) 内含子 lncRNAs^[4-5]。根据 lncRNAs 保守性差,广泛参与细胞增殖、分化、凋亡等生物学过程的特点,推测对于感染 HBV 的细胞,靶向治疗的关键点就是对基因转录、蛋白质翻译以及细胞核内核外信使进行干扰^[6]。因此,本文就 lncRNAs 的功能及其参与 HBV 复制的具体分子机制综述如下:全面深入了解 HBV 复制相关的 lncRNA 肝癌高表达转录本 (HULC)、lncRNA HOX 转录反义 RNA (HOTAIR)、乙型肝炎病毒 X 蛋白 (HBX) 相关的 lncRNA DBH-AS1、lncRNA 生长阻滞特异性转录本 5 (GAS5)、lncRNA 母系印记基因 3 (MEG3) 等对 HBV 复制的调控机制,进一步认识 HBV 持续感染的过程,发现抗 HBV 复制的新靶点。

1 高表达 lncRNAs

1.1 lncRNA HULC HULC 定位于染色体 6p24.3。因为 HULC 没有开放阅读框,故不参与相

关蛋白质的翻译^[7]。HBX 的转录活性是病毒复制的必要条件,HBX 的转录本在肝细胞中逐渐累积,可诱导、改变许多参与基因表达需要的信号转导途径,控制细胞周期,参与转录调节、免疫应答和代谢等。cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB) 是 HULC 核心启动子区域 53nt-67nt 位的一个结合位点,HBX 可直接结合 CREB 上调 HULC 活性,抑制 p18 的表达水平,干扰 ATM/ATR 和 p53 信号传导途径,反式激活、增强 HBV 在细胞内的复制功能^[8-9]。

miR-372 是一种与细胞周期调控相关的微小 RNA,通过介导转录因子与启动子解离,促使 HULC 表达降低^[10]。HULC 近端启动子区域内的 CREB 磷酸化后能够“打开”并维持 HULC 启动子局部染色质结构,其具有抑制一系列 miRNA,包括 miR-372 活性的能力。HULC 抑制 miR-372 导致其靶基因 Prkacb 的翻译减少,诱导 CREB 磷酸化,磷酸化后的 CREB 再次激活 HULC 活性,增强 HULC 与 miR-372 结合,如此循环往复,构成正反馈调节^[11]。HBX 与 miR-372 共同增强 CREB 转录因子的活性,使 HULC 在 HBV 感染患者体内明显增高,提示 HULC 的高表达可作为诊断 HBV 复制的血清学检测指标,抑制肝细胞内 HBV 的复制。

1.2 lncRNA HOTAIR HOTAIR 长度约为 2 158 bp,定位于染色体 12q13.13,在 HOXC11 与 HOXC12 之间。其基因包含 5 个短外显子与 1 个长外显子 (235 bp 的 A 和 239 bp 的 B 两个结构域),HOTAIR 结构保守性相对较高,尤其是 B 结构域更加保守。HOTAIR 的功能部位主要集中在 5' 端的外显子 1' 和 3' 端的 B 结构域^[12]。在 HBV 复制的细胞中发现有丝分裂 polo 样激酶 1 (Plk1) 呈高表达,两种转录阻滞因子多梳蛋白 SUZ12 和 ZNF198 则低表达。此外, SUZ12 是转录抑制复合物 PRC2 的重要亚基之一, ZNF198 的稳定性由复合物 (赖氨酸特异性脱甲基酶 1) 调节,并观察到 Plk1 位点特异性介导 SUZ12 和

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目 (81702088)。

△ 通信作者, E-mail: yiwenzhou@126.com。

ZNF198的磷酸化,磷酸化抑制了SUZ12与PRC2的结合,破坏ZNF198与赖氨酸特异性脱甲基酶1复合物间的相互作用。HOTAIR通过交叉调节导致HOXD基因沉默和组蛋白H3第27位赖氨酸三甲基化(H3K27me3),3'端则与组蛋白脱甲基化酶复合物(LSD1/RE1沉默转录因子、REST/REST共抑制蛋白、CoREST)相互作用使组蛋白H3第4位赖氨酸二甲基化(H3K4me2)。HOTAIR就这样作为一个支架与两个复合物结合,靶向目的基因使染色体重排导致基因沉默^[13]。HOTAIR的表达增强了SUZ12和ZNF198的Plk1依赖性泛素化,也增加了Plk1介导的蛋白质降解,明显降低了SUZ12和ZNF198的稳定性^[14-15]。HBV的复制刺激了HOTAIR与Plk1的表达,支持了该机制与HBV复制的相关性学说。

1.3 lncRNA DBH-AS1 DBH-AS1是一个长度约为2 kb的lncRNA,是染色体9q34转录的多腺苷酸化尾巴。SUDAN等^[16]通过微阵列分析发现槲皮素能够下调HepG2细胞中DBH-AS1的表达,HSIEH等^[17]发现槲皮素能有效抑制HBX对几种关键癌基因的调控,推测HBX可能通过影响DBH-AS1的表达,参与HBV的复制。DBH-AS1可上调细胞周期正向调控蛋白CDK6、CCND1和CCNE1的mRNA水平,而下调细胞周期负向调控蛋白P16、P21、P27的mRNA水平,从分子水平验证了DBH-AS1具有促进细胞周期进程的作用。此外,通过过表达DBH-AS1可使p-ERK、p-p38、p-JNK蛋白磷酸化水平增高,证明DBH-AS1具有活化MAPK通路的功能。MAPK信号传导通路活化后促进cyclinD在G1期的表达,通过形成cyclinD-CDK4/CDK6复合物,加速G1/S期和G2/M过渡期,使细胞越过G1期限制点,从而促进细胞周期进程。研究还发现,DBH-AS1基因上游有一个类似p53的结合位点跨越了-447~-461 bp位置,抑制P53蛋白的生成,升高DBH-AS1的表达,但p53是否通过直接与DBH-AS1的启动子区域结合仍需进一步研究^[18]。P53蛋白负向调控细胞中DBH-AS1的含量,HBX与DBH-AS1的表达呈正相关。DBH-AS1上调MAPK信号通路中磷酸化的关键蛋白(p-ERK、p-p38、p-JNK)表达水平,加速细胞周期进程,抑制HBV DNA的核酸切除修复,促使负性生长调节因子失活,调控细胞凋亡等。

HBX是相对分子质量约为 17×10^3 的蛋白质,由HBV_x基因编码的154个氨基酸构成。HBX在细胞核内有转录调控启动子活性和在细胞核外调节信号通路的双重功能。HBX并不直接结合HBV基因组,而是与细胞内重要转录调控因子结合,增强HBV启动子活性,促进HBV DNA的复制。DBH-AS1与

HBX、p53之间的调节不仅影响细胞周期、转录和凋亡相关的信号通路,还促进病毒复制引起持续的免疫反应,促使HBV感染肝细胞引发慢性炎症反应。

2 低表达 lncRNAs

2.1 lncRNA GAS5 GAS5全长约为651 bp,定位于染色体1q25.1,于1988年在生长阻滞细胞中被发现。GAS5的编码基因是5'-末端寡嘧啶束(5'TOP)家族成员,包含12个外显子,内含子可编码10个box C/D snoRNA。KINO等^[19]发现成熟的lncRNA GAS5在一系列物种中的生长阻滞期积累,在缺乏血清或缺少生长因子诱导的生长抑制状态下呈明显上调趋势。

目前研究发现,在HBV阳性患者的血清中GAS5检出率明显高于健康人,GAS5可能通过以下几种途径参与HBV DNA的复制:mTOR是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于磷脂酰肌醇激酶-相关激酶家族。这些激酶介导细胞对压力的反应,如DNA损伤和营养缺乏,该蛋白质作为FKBP12-雷帕霉素复合物细胞周期停滞和免疫抑制作用的靶标。LAPLANTE等^[20]发现,5'TOP RNA GAS5通过影响雷帕霉素,减弱mTOR通路的特异性抑制细胞周期阻滞效应。HBV DNA大量复制时,由于p53与HBV增强子的特定区域结合,p53调控5'TOP RNA GAS5的表达受到抑制,GAS5通过影响雷帕霉素,减弱GAS5对生长停滞的保护效应,进一步促进HBV DNA的复制。

lncRNA GAS5具有细胞内天然“分子海绵”的作用,GAS5作为竞争性内源性RNA(ceRNA)吸附miR-21,使mRNA-21表达上调进而发挥相关生物学功能,影响HBV复制^[21]。miR-123作用于HBV core mRNA,减少HBV核心蛋白表达量,下调HBV的复制^[22]。GAS5启动子区存在CpG岛,启动子的高度甲基化使转录活性受到抑制,下调GAS5的表达,增强HBV DNA的复制,诱导HBV阳性者肝纤维化、肝细胞癌的发生,促使肿瘤的远处转移。

2.2 lncRNA MEG3 MEG3转录长度约为1.6 kb,定位于染色体14q32.3的DLK1-MEG3印迹区域。通过MEG3基因内10个外显子可剪接产生16种不同变体,现已证实有16种人MEG3 cDNA同种型。其中,变体1(NR_002766)即为MEG3,是主要的转录本^[23-24]。有研究报道,MEG3可以通过依赖p53的方式调节下游靶基因的表达^[25-26]。P53蛋白共有3个主要的结构域,N-末端反式激活结构域(TAD)、中间序列特异性DNA结合结构域(DBD)和含寡聚化结构域的C-末端调节区(OD)。MEG3可以与P53蛋白的DBD直接结合,以依赖p53的方式使P53蛋白在细胞

内积聚,延长 P53 蛋白半衰期,影响正常的细胞周期,还可通过抑制 p53 依赖的启动子转录和选择性地调节 p53 下游的靶基因 GDF15 的表达,使 HBV DNA 复制的负性调控作用减弱。MEG3 也可以通过不依赖 p53 的方式,如通过募集一些蛋白复合体对 p53 下游靶基因发挥功能调节作用,干扰 HBV DNA 的复制。P53 蛋白和 HBV 的结合方式有蛋白质-蛋白质结合(P53 蛋白与 HBX Ag 的结合),DNA-蛋白质结合(HBV DNA 与 P53 蛋白的结合),研究发现积聚的 P53 蛋白与 HBX Ag 可进一步反式激活、增强 HBV 的复制^[27]。

研究发现,许多白细胞介素(IL)家族成员,如 IL-6、IL-8、IL-24,和 IL1A 的表达量在 MEG3 稳定高表达细胞中均显著增加,炎症因子 IL-6 在 HBV 感染早期可以通过调控 HNF4a 的表达来抑制 HBV 的复制,这也是炎症因子调控 HBV 复制的重要手段^[28]。随着 HBV 复制,MEG 表达量逐渐降低,IL 家族抑制 HBV 复制的作用逐渐减弱,HBV 利用宿主的特异性代谢活动来促进自身病毒的增殖。此外,基因的甲基化在细胞增殖、DNA 修复、细胞周期调控和凋亡中起着重要作用^[28]。MEG3 的启动子区富含 CpG 岛,并且有两个差异性的甲基化区域(DMRs)IG-DMR 和 MEG3-DMR,均位于 MEG3 基因的上游。ZHANG 等^[29]认为 MEG3 启动子或基因间差异 DMRs 甲基化可能是导致细胞中 MEG3 低表达或表达缺失的主要原因,成为 HBV 复制失去抑制的又一重要原因。

3 其他

除了如上所述众多的 lncRNAs,还有许多其他因素也间接参与 HBV 的转录调控^[30]。例如:雌激素可以通过雌激素受体(ER- α)抑制由 HNF4a 介导的病毒转录活性,进一步调控病毒基因表达和复制,这也能部分解释在 HBV 感染人群中女性比男性的 HBV 载量要低的原因。干扰素是宿主细胞应对病毒入侵的天然保护手段,HBV 感染及复制时诱导的干扰素或者外源治疗使用的干扰素都可诱导大量的抗病毒基因的表达。炎症因子 IL-6 在 HBV 感染早期也可以通过调控 HNF4a 的表达来抑制 HBV 的复制。靶向干预 HBX 与肝细胞内 DDB1-E3 泛素连接酶结合,阻断 HBX 对 smc5/6 复合体等宿主限制因子的降解,增强对 cccDNA 的抑制作用,进一步影响 HBV 基因组的转录,干扰子代病毒的产生。此外,最新研究发现血清中存在抗体所包裹的乙型肝炎亚病毒颗粒,以衣壳-抗体复合物的形式存在,为 HBV RNA 的主要载体,因其对抗病毒药物的敏感性明显低于 HBV DNA,考虑将其作为肝内 cccDNA 的替代标志物,为抗 HBV 治疗后疗效评估提供新的检测指标^[31]。

4 总结与展望

随着对 lncRNAs 的关注,目前发现有多种 lncRNAs 广泛参与 HBV 复制的各个阶段,它们在慢性乙型肝炎患者体内频繁异常表达。本文以现有的文献为依据,总结了 lncRNAs 在 HBV 复制过程中周期调控、染色质重构、转录调节、翻译调控、增强子/启动子修饰、HBV 嗜肝特性等方面内容,明确了 HBV 与 P53 蛋白的关系,既存在 DNA-蛋白质(HBV DNA-P53 蛋白)结合形式,也存在蛋白质-蛋白质(HBXAg-P53 蛋白)结合形式,详细阐述了 lncRNAs 与 HBV 复制调控间的最新研究成果。进一步了解 HBV 复制调控网络及其与 lncRNAs 之间的相互作用,为发现更好的抗 HBV 治疗策略提供思路,为肝脏疾病的早期诊断和早期治疗提供新的生物标志物以及准确的药物作用靶点。

参考文献

- [1] LIU S, ZHOU B, VALDES J D, et al. Serum hepatitis B virus RNA: a new potential biomarker for chronic Hepatitis B virus infection[J]. *Hepatology*, 2019, 69(4): 1816-1827.
- [2] BAI L, ZHANG X, KOZLOWSKI M, et al. Extracellular hepatitis B virus RNAs are heterogeneous in length and circulate as capsid-antibody complexes in addition to virions in chronic hepatitis B patients[J]. *J VIROL*, 2018, 92(24): 1412-1427.
- [3] FEI Q J, YANG X D, NI W H, et al. Can hepatitis B virus DNA in semen be predicted by serum levels of hepatitis B virus DNA, HBeAg, and HBsAg in chronically infected men from infertile couples[J]. *Andrology*, 2015, 3(3): 506-511.
- [4] LIU Y, FERGUSON J F, XUE C, et al. Tissue-specific RNA-Seq in human evoked inflammation identifies blood and adipose lincRNA signatures of cardiometabolic diseases[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(4): 902-912.
- [5] FANG Y, FULLWOOD M J. Roles, functions, and mechanisms of long non-coding RNAs in Cancer[J]. *Genomics Rroteomics Bioinformatics*, 2016, 14(1): 42-54.
- [6] SCHMITZ S U, GROTE P, HERRMANN B G. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(13): 2491-2509.
- [7] LI D, LIU X, ZHOU J, et al. Long noncoding RNA HULC modulates the phosphorylation of YB-1 through serving as a scaffold of extracellular signal-regulated kinase and YB-1 to enhance hepatocarcinogenesis[J]. *Hepatology*, 2017, 65(5): 1612-1627.
- [8] DU Y, KONG G, YOU X, et al. Elevation of highly up-

- regulated in liver cancer (HULC) by Hepatitis B virus x protein promotes hepatoma cell proliferation via down-regulating p18[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(31):26302-26311.
- [9] QIU L, WANG T, XU X, et al. Long non-coding RNAs in Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: regulation, functions, and underlying mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12):2505.
- [10] WU G, WANG Y, LU X, et al. Low mir-372 expression correlates with poor prognosis and tumor metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15(1):182-187.
- [11] YU X, ZHENG H, CHAN M T V, et al. HULC: an oncogenic long non-coding RNA in human cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(2):410-417.
- [12] WU X, TUDORAN O M, CALIN G A, et al. The many faces of long noncoding RNAs in cancer[J]. *Antioxid Redox Sign*, 2018, 29(9):922-935.
- [13] PORTOSO M, RAGAZZINI R, BRENCIC Z, et al. PRC2 is dispensable for HOTAIR-mediated transcriptional repression[J]. *EMBO J*, 2017, 36(8):981-994.
- [14] ZHANG H, DIAB A, FAN H, et al. PLK1 and HOTAIR accelerate proteasomal degradation of suz12 and znf198 during hepatitis B virus-induced liver carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(11):2363-2374.
- [15] SU M, XIAO Y H, MA J L, et al. Long non-coding RNAs in esophageal cancer: molecular mechanisms, functions, and potential applications[J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1):118-124.
- [16] SUDAN S, RUPASINGHE H P. Quercetin-3-O-glucoside induces human DNA topoisomerase II inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(4):1691-1699.
- [17] HSIEH A, KIM H S, LIM S O, et al. Hepatitis B viral X protein interacts with tumor suppressor adenomatous polyposis coli to activate Wnt/beta-catenin signaling[J]. *Cancer Lett*, 2011, 300(2):162-172.
- [18] HUANG J L, REN T Y, CAO S W, et al. HBx-related long non-coding RNA DBH-AS1 promotes cell proliferation and survival by activating MAPK signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(32):33791-33804.
- [19] KINO T, HURT D E, ICHIJO T, et al. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor[J]. *Sci Signal*, 2010, 3(107):8-17.
- [20] LAPLANTE M, SABATINI D M. mTOR signaling in growth control and disease[J]. *Cell*, 2012, 149(2):274-293.
- [21] LIU X, SHE Y Q, WU H G, et al. Long non-coding RNA Gas5 regulates proliferation and apoptosis in HCS-2/8 cells and growth plate chondrocytes by controlling FGF1 expression via miR-21 regulation[J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1):18-23.
- [22] KOHNO T, TSUGE M, MURAKAMI E, et al. Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA[J]. *J Viral Hepatitis*, 2014, 21(9):e89-e97.
- [23] LANZAFAME M, BIANCO G, TERRACCIANO L, et al. The role of long non-coding RNAs in hepatocarcinogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3):682.
- [24] ZHU J, LIU S, YE F, et al. Long noncoding RNA MEG3 interacts with p53 protein and regulates partial p53 target genes in hepatoma cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10):e139790.
- [25] SUN L, LI Y, YANG B. Downregulated long non-coding RNA MEG3 in breast cancer regulates proliferation, migration and invasion by depending on p53's transcriptional activity[J]. *Biochem Bioph Res Commun*, 2016, 478(1):323-329.
- [26] HU D, SU C, JIANG M, et al. Fenofibrate inhibited pancreatic cancer cells proliferation via activation of p53 mediated by upregulation of LncRNA MEG3[J]. *Biochem Bioph Res Commun*, 2016, 471(2):290-295.
- [27] FLYNN R A, CHANG H Y. Long noncoding RNAs in cell-fate programming and reprogramming[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(6):752-761.
- [28] HE Y, LUO Y, LIANG B, et al. Potential applications of MEG3 in cancer diagnosis and prognosis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(42):73282.
- [29] ZHANG X, GEJMAN R, MAHTA A, et al. Maternally expressed gene 3, an imprinted noncoding RNA gene, is associated with meningioma pathogenesis and progression[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(6):2350-2358.
- [30] SUN M, KRAUS W L. From discovery to function: the expanding roles of long noncoding RNAs in physiology and disease[J]. *Endocr Rev*, 2015, 36(1):25-64.
- [31] WINER B Y, HUANG T, LOW B E, et al. Recapitulation of treatment response patterns in a novel humanized mouse model for chronic hepatitis B virus infection[J]. *Virology*, 2017, 502(1):63-72.