

## APOBEC3G 体外抗 HIV 和 HBV 活性的分子机制\*

王爱华 综述, 管世鹤<sup>△</sup> 审校

(安徽医科大学第二附属医院检验科, 安徽合肥 230601)

**关键词:** 抗病毒药; 抗体, 病毒; 人免疫缺陷病毒蛋白质类; 综述**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.24.034**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)24-3016-03

载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽样蛋白 3G (APOBEC3G) 是天然抗病毒活性的胞嘧啶脱氨基酶家族成员, 近年来因其独特的抗病毒作用机制受到了广泛的关注。APOBEC3G 一方面能抑制病毒感染因子 (Vif) 基因缺陷 HIV-1 的复制, 能使 HIV-1 基因组发生突变, 致使病毒不能完成整个复制周期而起到抑制 HIV-1 复制的作用。另一方面, 在体外瞬时表达 HBV 的共转染细胞体系中, APOBEC3G 可通过干扰诱导 HBV DNA 发生突变、与病毒蛋白的间接作用等方式显著抑制 HBV 的复制。本文就 APOBEC3G 体外抗 HIV 和 HBV 活性的分子机制进行简要概述。

### 1 APOBEC3G 概述

APOBEC3G 蛋白, 也被称为 CEM15 蛋白, 属胞嘧啶脱氨基化酶家族成员<sup>[1]</sup>。是由人类细胞所编码的第一个真正的抗病毒蛋白。APOBEC3G 蛋白是固有免疫系统的组成部分, 是阻挡外来细菌和病毒入侵的第一道天然屏障, 固有免疫系统具有内在性和非特异性决定了其能对外来入侵的病原体做出迅速的反应。病毒和人体的免疫系统在体内一直在做长期的斗争, 而 APOBEC3G 蛋白可以称得上其中顽强的“英勇战士”。APOBEC3G 基因位于人 22 号染色体, 其转录的 mRNA 全长为 1 717 bp; 其编码的氨基酸在靠近 N 端和 C 端各有一个锌指结构域 (能结合锌离子并催化胞嘧啶脱氨)。其中 C 端的锌指结构域较 N 端的脱氨催化作用强, 在 APOBEC3G 的抗病毒活性中发挥主要作用<sup>[2]</sup>。2003 年研究发现, APOBEC3G 蛋白可以抑制人免疫缺陷病毒 (HIV) 的感染, 首次证实 APOBEC3G 具有抗病毒作用。后续研究显示, APOBEC3G 及其家族成员具有广谱的抗病毒作用, 对除 HIV 外的其他病毒也具有较强的抑制作用。如有学者证实 APOBEC3G 能够强烈抑制 HBV DNA 的复制。

### 2 APOBEC3G 抗 HIV 的分子机制

**2.1 APOBEC3G 的脱氨基作用** 研究表明, APOBEC3G 可以抑制 HIV 的复制, 在 HIV 疾病的进展中可能发挥一定的作用<sup>[3]</sup>。APOBEC3G 作用于 HIV-1 逆转录产生的第一条 cDNA 负链<sup>[4]</sup>, 诱发负链上的胞嘧啶 (C) 脱氨基突变为尿嘧啶 (U), 即 C-U 突变, 继而导致 cDNA 正链大量鸟嘌呤 (G) 突变为腺嘌呤 (A), 产生 G-A 超突变。这种 C-U 突变可能会导致以下结果: 含有尿嘧啶的负链 cDNA 在合成正链时受阻; 病毒基因组 DNA 被分割和降解; 即使逆转录过程有幸逃过上述机制, 合成了含有尿嘧啶的双链 cDNA, 但是 DNA 修复机制因此被启动, 将 U 变为 T, 那么在正链 cDNA 上就会形成 G-A 超突变, 这种频繁的突变可能通过引入致死性终止突变使病毒活性丧失, 即

使没有引入终止突变, 氨基酸组成的改变也会使病毒感染力下降<sup>[5]</sup>。APOBEC3G 除了脱氨的抗病毒机制外, 尚存在一些非脱氨抗病毒机制, Newman 等<sup>[6]</sup>通过替换 APOBEC3G 的 C 端锌指结构域中的某些特定氨基酸形成突变体, 使其失去 DNA 编辑活性, 结果发现其仍保留超过 80% 的抗病毒活性。说明 APOBEC3G 还可通过非脱氨机制降低病毒感染力。

**2.2 Vif 与 APOBEC3G 的相互作用** Vif 是 HIV 的辅助蛋白, 也是病毒在体内复制和致病的关键因素之一<sup>[7]</sup>。HIV-1 Vif 在产生感染性毒粒的过程中起着关键的作用, 可显著增强 HIV-1 病毒的感染力。HIV 感染的细胞分为两种: 允许性 T 细胞和非允许性 T 细胞。研究者发现 Vif 缺陷的 HIV-1 在非允许性 T 细胞中的增殖受到抑制, 而 Vif 缺陷和野生型 HIV-1 均可在允许性 T 细胞进行复制, 由此推测非允许性 T 细胞中可能存在一种内在的抗病毒因子, 后来的研究发现此类抗病毒因子为 APOBEC3G。为了进一步验证这一推测, 李岚和曾毅<sup>[8]</sup>将 HIV-1 野生株病毒和 Vif 株病毒分别感染 MT4 细胞 (允许性 T 细胞, 不表达 APOBEC3G) 和 H9 细胞 (非允许性 T 细胞, 天然表达 APOBEC3G), 通过检测其逆转录酶活性, 证实了 APOBEC3G 对 Vif 病毒株具有很强的抑制作用。APOBEC3G 是宿主抵抗病毒的内在因子, Vif 蛋白是病毒致病性的辅助蛋白, 功能上 Vif 具有拮抗 APOBEC3G 的作用<sup>[9]</sup>。Vif 可竞争 APOBEC3G 在病毒基因组 RNA 或病毒表面 Gag 蛋白的结合位点导致 APOBEC3G 不能顺利衣壳化, 阻止 APOBEC3G 包装进入病毒体内; Vif 还可通过泛素-蛋白酶体途径降解 APOBEC3G 导致其无法及时包装进入病毒体内来拮抗其作用<sup>[10]</sup>。最新研究表明, CBF- $\beta$  在介导 Vif 降解 APOBEC3G 的过程中发挥重要的作用<sup>[11-12]</sup>, Vif 通过募集 CBF- $\beta$  到泛素连接酶复合物由此降解 APOBEC3G, 在致病性上两者具有协同作用, 共同抵抗 APOBEC3G 的抗病毒作用。

### 3 APOBEC3G 抗 HBV 的分子机制

**3.1 APOBEC3G 与 HBV 复制的关系** HBV 与 HIV 相似的是在病毒复制过程中也存在逆转录, 研究显示 APOBEC3G 可抑制 HBV 复制<sup>[13-14]</sup>。通过研究慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞 (PBMC) APOBEC3G mRNA 水平, 发现其 APOBEC3G mRNA 水平显著高于健康对照人群<sup>[15-16]</sup>。这提示 APOBEC3G 有可能影响乙型肝炎患者体内 HBV 复制。进一步的研究发现, 在体外, 通过将 APOBEC3G 真核表达载体转染 HepG2. 2. 15 细胞 (能够分泌完整的 HBV 病毒子并表达 HBV 抗原), 用 ELISA 法检测细胞上清液中 HBsAg 和 HBeAg 的量, RT-PCR 分析 APOBEC3G 对 HBV mRNA 转录

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81171662); 安徽省卫生厅科学基金资助项目 (2010C057)。<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: shihéguan@

的影响,结果证实了 APOBEC3G 在体外可以显著抑制 HBV 的复制,可作为一种新型的抗病毒剂治疗 HBV 感染<sup>[17]</sup>。

**3.2 APOBEC3G 与 HBV X 蛋白(HBx)、HBV 核心蛋白(HBc)的相互作用** 研究资料表明 APOBEC3G 蛋白还可通过逆转录过程诱导 HBV DNA 的 X 基因发生 G-A 超突变,从而抑制 HBV 的复制<sup>[18-19]</sup>。除了在基因水平上,研究者还发现 APOBEC3G 可通过与 HBV 蛋白的相互作用间接抑制 HBV 的复制。通过将 HBx 的表达质粒和 APOBEC3G 蛋白的表达质粒共转染体外培养的肝癌细胞,提取蛋白进行免疫共沉淀和 Western Blot 分析,结果发现两种蛋白能在受体细胞内形成免疫复合物,表明 HBx 蛋白能与 APOBEC3G 蛋白发生相互作用。进一步研究发现,APOBEC3G 蛋白可抑制 HBx 蛋白的表达<sup>[20]</sup>,从而间接发挥抑制 HBV 复制的作用。APOBEC3G 是 1 个内在的抗逆转录病毒因子,能抑制乙型肝炎病毒复制,这种抗病毒活性主要依赖于 APOBEC3G 蛋白同某种蛋白结合形成融合蛋白进入病毒颗粒。HBc 蛋白是研究的焦点,为探讨其机制,研究者<sup>[21-22]</sup>将 APOBEC3G 与 HBc 表达质粒共转染 HepG2 细胞,利用荧光共振能量转移方法,检测 APOBEC3G 与 HBc 蛋白是否有相互作用。结果表明,APOBEC3G 通过直接结合 HBc 形成融合蛋白直接进入病毒颗粒,降解病毒核酸,从而发挥其抗病毒作用。

**3.3 APOBEC3G 的表达与 IFN- $\alpha$  的关系及作用机制** IFN- $\alpha$  是目前临床上治疗乙型肝炎病毒最常用的药物之一,体外研究表明,IFN- $\alpha$  主要通过主要通过 JAK-STAK 信号转导途径诱导宿主细胞产生抗病毒蛋白而发挥抗病毒作用。APOBEC3G 作为 1 种目前已被证实的抗病毒蛋白,很可能与 IFN- $\alpha$  有一定的关系。这一推测在 2006 年被 Tanaka 等<sup>[23]</sup>所证实。进一步研究表明,IFN- $\alpha$  能显著增强 CD4(+)T 细胞、巨噬细胞,原始肝细胞等细胞中 APOBEC3G 的表达<sup>[24]</sup>,增强了它们对病毒的抵抗力。IFN- $\alpha$  诱导抗病毒蛋白 APOBEC3G 的表达,可能是其发挥抗病毒作用的机制之一。为进一步研究 IFN- $\alpha$  诱导 APOBEC3G 表达的具体机制,Chen 等<sup>[25]</sup>以 HepG2. 2. 15 细胞作为 IFN- $\alpha$  应答的体外细胞模型,运用不同浓度的 IFN- $\alpha$  处理后,发现在一定浓度范围内,随着 IFN- $\alpha$  浓度的增加,APOBEC3G 的表达不断增加,同时 JAK-STAK 信号转导途径重要分子 STAT1 的表达随之增加。由此推测,IFN- $\alpha$  很可能通过 JAK-STAK 信号转导途径诱导 APOBEC3G 的表达。

#### 4 小 结

APOBEC3G 作为 APOBEC 超家族成员之一,是固有免疫系统的重要组成部分,是机体内天然的抗病毒因子。由于其在防止病原体入侵和免疫应答等方面的重要作用,近年来已受到越来越广泛的关注。APOBEC3G 具有广谱的抗病毒活性,目前研究最多的同时也是和人类关系最密切的是 HIV 和 HBV。通过体外研究其抗病毒的分子机制,未来以该蛋白为靶点,设计合成新型抗病毒药物,应用于临床试验,最终可为人类战胜艾滋病、乙型肝炎等病毒性疾病带来益处。此外,其他 APOBEC3 蛋白家族成员如 APOBEC3F 和 APOBEC3C 等对 HIV 和 HBV 的复制均有一定抑制作用。这些蛋白抗病毒作用的具体分子机制及其临床意义需要进一步的研究和探讨。

#### 参考文献

[1] 吴小霞,马义才. 固有免疫的新成员——APOBEC3G[J]. 免疫学杂志,2005,21(B06):93-95.  
 [2] Navarro F, Bollman B, Chen H, et al. Complementary function of

the two catalytic domains of APOBEC3G[J]. *Virology*,2005,333(2):374-386.  
 [3] 王福祥,毕蔓茹,颜丙柱,等. HIV/AIDS 患者 APOBEC3G mRNA 水平与 CD4 T 淋巴细胞计数相关研究[J]. 哈尔滨医科大学学报,2011,45(2):138-141.  
 [4] Wang X, Ao Z, Chen L, et al. The Cellular antiviral proteion APOBEC3G interacts with HIV-1 reverse transcriptase and inhibits its function during viral replication[J]. *J Virol*,2012,86(7):3777-3786.  
 [5] Harris RS, Liddament MT. Retroviral restriction by APOBEC proteins[J]. *Nat Rev Immunol*,2004,4(11):868-877.  
 [6] Newman EN, Holmes RK, Craig HM, et al. Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity[J]. *Curr Biol*,2005,15(2):166-170.  
 [7] Jäger S, Cimercmanic P, Gulbahce N, et al. Global landscape of HIV-human proteion complexes[J]. *Nature*,2011,481(7381):365-370.  
 [8] 李岚,曾毅. APOBEC3G 对 HIV-1 及其 Vif 缺失株的抑制作用[J]. 首都医科大学学报,2011,32(2):177-181.  
 [9] Wissing S, Galloway NL, Greene WC. HIV-1 Vif versus the APOBEC3G cytidine deaminases; an intracellular duel between pathogen and host restriction factors[J]. *Mol Aspects Med*,2010,31(5):383-397.  
 [10] Li L, Li JY, Sui HS, et al. HIV-1 Vif Proteion Mediates the Degradation of APOBEC3G in fission Yeast When Over-expressed Using Codon Optimization[J]. *Virological Sinica*,2008,23(4):255-264.  
 [11] Jäger S, Kim DY, Hultquist JF, et al. Vif hijacks CBF- $\beta$  to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection[J]. *Nature*,2011,481(7381):371-375.  
 [12] Zhang W, Du J, Evas SL, et al. T-Cell differentiation factor CBF-beta regulates HIV-1 Vif-mediated evasion of host restriction[J]. *Nature*,2011,481(7381):376-379.  
 [13] Noguchi C, Hiraga N, Mori N, et al. Dual effect of APOBEC3G on Hepatitis B virus[J]. *J Gen Virol*,2007,88(Pt 2):432-440.  
 [14] 王鲁文, 褚小刚, 刘艳红, 等. APOBEC3G 真核表达载体的构建及其对 HBV 复制表达的影响[J]. 武汉大学学报:医学版,2009,30(2):200-204.  
 [15] 李新宇,王鲁文,刘莉,等. 乙型肝炎患者外周血单个核细胞 APOBEC3G mRNA 表达[J]. 肝脏,2009,14(1):36-37.  
 [16] 彭程,贺永文,揭盛华,等. 慢性乙肝外周血单个核细胞 APOBEC3G mRNA 水平与 HBV 病毒及 IFN- $\gamma$  关系的研究[J]. 临床肝胆病杂志,2008,24(2):83-85.  
 [17] 韩思源,林菊生,林园园,等. APOBEC3G 体外抗乙型肝炎病毒的研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2007,16(2):152-155.  
 [18] 张伟,张旭照,方永明,等. 胞嘧啶脱氨酶 APOBEC3G 可能通过 G $\rightarrow$ A 突变抑制乙型肝炎病毒的复制[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2007,27(2):135-139.  
 [19] Köck J, Blum HE. Hypermutation of hepatitis B virus genomes by APOBEC3G, APOBEC3C and APOBEC3H[J]. *J Gen Virol*,2008,89(Pt5):1184-1191.  
 [20] 汤仁仙,甘宜敏,孔凡运,等. APOBEC3G 真核表达载体构建及抗 HBV 复制的初步研究[J]. 苏州大学学报:医学版,2010,30(6):1210-1213.  
 [21] Nguyen DH, Hu J. Reverse transcriptase- and RNA packaging signal-dependent incorporation of APOBEC3G into hepatitis B virus nucleocapsids[J]. *J Virol*,2008,82(14):6852-6861.  
 [22] Zhao D, Wang X, Lou G, et al. APOBEC3G directly binds Hepati-

tis B core protein in cell and cell free systems[J]. *Virus Research*, 2010, 151(2): 213-219.

[23] Tanaka Y, Marusawa H, Seno H, et al. Anti-viral proteion APOBEC3G is induced by interferon-alpha stimulation in human hepatocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(2): 314-319.

[24] Wang FX, Huang J, Zhang H, et al. APOBEC3G upregulation by alpha interferon restricts human immunodeficiency virus type 1

infection in human peripheral plasmacytoid dendritic cells[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt 3): 722-730.

[25] Chen H, Wang LW, Huang YQ, 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): 3501-3512.

(收稿日期: 2012-07-18)

• 综 述 •

## DNA 甲基化在精神分裂症中的研究进展\*

李秋平 综述, 冯磊光<sup>△</sup> 审校

(哈尔滨医科大学第一附属医院检验科, 黑龙江 哈尔滨 150001)

关键词: DNA 甲基化; 生物技术; 精神分裂症; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.24.035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)24-3018-03

精神分裂症是与遗传相关的疾病<sup>[1]</sup>。其病理机制与脑组织中 GABA 能神经元功能障碍有关, 由它们的启动子超甲基化的 GABA 基因的表达下调介导<sup>[2]</sup>。有学者发现精神分裂症患者死后脑组织中 reelin(络丝蛋白)的 mRNA 的表达下调约 50%。络丝蛋白和 GAD67 在精神分裂症患者皮层中表达减少与 DNMT1 在这些相同的皮质  $\gamma$  氨基丁酸能中间神经元内表达增加有关, 因此, 暗示在精神分裂症患者出生后甲基化下调<sup>[3]</sup>。DNA 甲基化作为表观遗传学机制之一, 与基因表达调控有关<sup>[4]</sup>。reelin 可能经受不同浓度的 DNA 甲基化表观遗传学修饰, 而且 reelin 的 DNA 甲基化畸变状态导致异常的表达可能增加精神病的易感性<sup>[5]</sup>。

### 1 reelin 与精神分裂症

reelin 是由 reelin 基因编码的一种大分子细胞外基质糖蛋白<sup>[6-7]</sup>由 Cajal-Retzius 细胞分泌, 在脑组织中含量丰富, 调节细胞在层状大脑区域中的定位, 并在皮质发育期间对神经细胞迁移的调控起到关键作用<sup>[8]</sup>。1998 年报道了在精神分裂症中 reelin 表达的一个严重的缺失, 说明了这种缺失在精神分裂症的发生学上成为一个重要的易感因素。有学者在最近的报道中提出低浓度的 reelin 和神经元的错误定位可能存在着关联<sup>[9]</sup>。

众所周知, 精神分裂症遗传是不遵循孟德尔规律的, reelin 被绘制到人染色体 7q22<sup>[10]</sup>被报道可能是与精神分裂症多源性遗传有关的许多基因座之一<sup>[11]</sup>。GAD67 是在  $\gamma$  氨基丁酸能神经元中从谷氨酸中合成 GABA 所必需的两种酶中的一种。络丝蛋白和 GAD67 在精神分裂症患者皮层中表达减少与 DNMT1 在这些相同的皮质  $\gamma$  氨基丁酸能中间神经元内表达增加有关, 因此, 暗示在精神分裂症出生后甲基化下调<sup>[12,3]</sup>。

### 2 甲基化与精神分裂症

**2.1 表观遗传学** 表观遗传是与遗传相对的, 在不改变基因组序列的前提下, 通过 DNA 甲基化和组蛋白的修饰等来调控基因表达<sup>[13]</sup>。表现遗传修饰的方式主要有 DNA 甲基化/去甲基化、组蛋白乙酰化和 RNA 干扰等。其中 DNA 甲基化最

常见<sup>[14]</sup>。表观遗传机制影响基因转录中短暂的调节, 在对认知方面必需的基因表达中, 支持功能依赖性改变。因此, 表观遗传促成精神分裂症的可能性, 是一种具有吸引力的分子领域的假设, 而且确实已经聚焦于很多研究中<sup>[15]</sup>。

**2.2 DNA 甲基化** DNA 甲基化是指在 DNA 甲基化转移酶的作用下, 在基因组 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5' 碳位共价键结合一个甲基基团。其是一个外遗传的事件, 主要发生在哺乳动物 CpG 二核苷酸胞嘧啶残基的第 15 个位置。在 CpG 甲基化结合蛋白和 DNA 甲基化转移酶(DNMTs)的作用下, 使 CpG 二核苷酸 5' 端的胞嘧啶转变成成为 5' 甲基胞嘧啶<sup>[16-17]</sup>。

正常人类的 DNA 中, 约有 3%~6% 的胞嘧啶被甲基化。在哺乳动物中, 70% 被甲基化, 而基因组中大量 CpG 富有的区域被称为 CpG 岛, 保持着非甲基化。CpG 岛广泛位于基因的启动子和第 1 个外显子中, 他们的甲基化经常与组织特异性的基因表达有关联。异常的 DNA 甲基化引起正常发育的中断和疾病的形成例如癌症<sup>[18]</sup>。

最近研究提出了 DNA 甲基化和去甲基化在确定的启动子中积极的控制调节基因表达。调节 DNA 甲基化至少有三种编码酶, 已知的 DNMTs 催化-CH3 组加入到嘧啶环 5 号位的胞嘧啶残基。DNMT1 被代表性地视为一种“维护”DNMT。DNMT3a 和 3b 被认为是“重生”DNMTs<sup>[15,19]</sup>。

### 2.3 DNA 甲基化与精神分裂症

**2.3.1 S-COMT 启动子特异部位胞嘧啶甲基化与精神分裂症** 位于 22q11 染色体上的儿茶酚-O-甲基转移酶基因已经被认为是精神分裂症易感因素的一个强烈的候选基因<sup>[20]</sup>。Brenda C. Murphy 等人假设精神分裂症相关的 COMT 基因仅仅涉及到 DNA 甲基化。他们检测了人类 COMT 启动子区胞嘧啶 DNA 甲基化分布。结果显示胞嘧啶在这些区域仅仅只受到 CpG 二核苷酸的抑制。一些结果显示单个精神病患者血液中的 DNA 异常, 存在着极度明显的阴性症状即完全甲基化的。对患有精神分裂症的异卵双胞胎血液中 DNA 甲基化没有区别。结果排除了 S-COMT 启动子甲基化是引起精神分裂