

· 综述 ·

# L<sub>a</sub> 蛋白与 HBV RNA 相互作用关系的研究进展

孙静慧<sup>1</sup>, 刘皋林<sup>1\*</sup>, 谭龙益<sup>2</sup>, 张 慧<sup>2</sup>

(1. 第二军医大学长征医院药学部, 上海 200003; 2. 长征医院实验诊断科)

**[摘要]** 新近研究发现, 人类L<sub>a</sub>蛋白(human L<sub>a</sub> protein, hL<sub>a</sub>)是一种与HBV RNA 转录调节相关的因子。L<sub>a</sub>蛋白可能结合在HBV RNA s的茎环结构上, 具有保护乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)RNA, 促进其翻译启动的作用, 可能是HBV RNA 的稳定因子。当L<sub>a</sub>蛋白发生突变后将无法与HBV RNA 结合, 丧失保护HBV RNA 的功能, 使其受到酶的降解, 无法转录翻译, 病毒的复制受阻, 从而抑制HBV 感染。本文综述了L<sub>a</sub>蛋白、HBV RNA 及核酶(nuclear RN ases)三者间相互作用关系的最新研究成果, 从分子水平上探讨了导致HBV RNA 降解的可能机制, 推测了野生型和突变型L<sub>a</sub>蛋白对乙型肝炎病毒RNA 的翻译启动和病毒复制的影响。

**[关键词]** L<sub>a</sub>蛋白; 肝炎病毒, 乙型; RNA; 核酶

**[中图分类号]** R 512.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X (2004)09-1020-03

## Study on interaction between human L<sub>a</sub> protein with hepatitis B virus RNA

SUN Jing-Hui<sup>1</sup>, LIU Gao-Lin<sup>1\*</sup>, TAN Long-Yi<sup>2</sup>, ZHANG Hui<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Laboratory Diagnosis, Changzheng Hospital)

**[ABSTRACT]** The human L<sub>a</sub> protein is recently identified as a host factor potentially involved in the post-transcriptional regulation of hepatitis B virus (HBV) RNA. The L<sub>a</sub> binding site is mapped to a predicted stem-loop structure within a region shared by all HBV RNA s, and it is known that human L<sub>a</sub> protein protected HBV RNA against RNase-mediated degradation. HL<sub>a</sub> mutants lost the ability of binding and protecting HBV RNA, which make it easy for HBV RNA to degrade and the virus replication to terminate. This review summarizes the latest investigation about the interaction of L<sub>a</sub> protein, HBV RNA and Nuclear RN ases, and discusses the possible mechanisms of HBV RNA degradation, the effect of L<sub>a</sub> protein and its mutants on the translation initiation of HBV RNA, and the replication of the virus.

**[KEY WORDS]** L<sub>a</sub> protein; hepatitis B virus; RNA; nuclear RN ases

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(9): 1020-1022]

\* 乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染严重威胁着人类健康, 虽然, HBV 感染的发病机制及其防治研究已经取得重大进展, 但如何阻断HBV 的复制一直是相关领域科学家面临的重大挑战。近年来的研究发现, 人类L<sub>a</sub>蛋白(human L<sub>a</sub> protein, hL<sub>a</sub>)具有稳定HBV RNA, 使其免受核酸酶破坏的作用, hL<sub>a</sub>突变可能使HBV 蛋白质翻译受阻。改变hL<sub>a</sub>的生物学性状, 干扰hL<sub>a</sub>与HBV RNA 之间的相互关系, 可能成为抗HBV 感染的突破口之一, 已经引起诸多关注。本文就hL<sub>a</sub>与HBV 两者之间的研究进展作一综述。

### 1 hL<sub>a</sub>的分子特性与功能

hL<sub>a</sub>最初是在系统性红斑狼疮患者的血清内发现的一种自体抗原, 是一类保守的RNA 结合磷蛋白, 含有RNA 识别模体(RNA recognition motifs, RRM s), 参与RNA 的代谢, 主要位于细胞核内, 相对分子质量为47 000, 人体每个细胞中约含有2 × 10<sup>7</sup>个拷贝<sup>[1]</sup>。hL<sub>a</sub>至少可分为3个区: (1)高度保守的N 末端区(包含60个氨基酸, 以前称为L<sub>a</sub>区); (2)中度保守的RRM, 亦称RNP 结构域(ribonucleoprotein domain); (3)非保守的C 末端区, 不同物种L<sub>a</sub>蛋白的C 末端区差异显著。

hL<sub>a</sub>蛋白含有3个与RNA s结合有关的RRM s, 分别为

RRM -1, RRM -2 和 RRM -3<sup>[2]</sup>。RRM 含70~80个氨基酸, 具有与RNA 结合所需的RNP-2和RNP-1序列, 折叠形成RRM s的次级结构<sup>[3]</sup>。RNP-2和RNP-1分别位于β和β'结构元件上。在三维结构中, RNP-2和RNP-1在铰链1和2之间汇集成一个RNA 结合表面。hL<sub>a</sub>的RRM -2和RRM -3是与HBV RNA 结合的核心部位, 如果RRM -2或RRM -3中的RNP-2和RNP-1缺失, hL<sub>a</sub>与HBV RNA 的结合即被阻断<sup>[4]</sup>。

L<sub>a</sub>蛋白可以结合大量新生小RNA。病毒转染细胞实验表明, L<sub>a</sub>蛋白也结合病毒编码的RNA s。L<sub>a</sub>蛋白与RNA 聚合酶III转录子如tRNA 前体的3'末端尿苷结合, 参与其加工处理<sup>[5]</sup>。与多种病毒和细胞RNA 相互作用, 参与脊髓灰质炎病毒(polio virus)和丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV)的帽子独立结构的翻译起始<sup>[6]</sup>, 还与HBV 和HCV 等病毒RNA 的稳定性有关<sup>[7]</sup>。最新研究发现, L<sub>a</sub>蛋白与体外HCV 的内部核糖体进入位点(the internal ribosome entry site, IRES)有关, 其N 末端和C 末端各自与HCV IRES 相互作用, 促进

\* [基金项目] 国家自然科学基金(30271180)。

[作者简介] 孙静慧(1974-), 女(汉族), 博士生

\* Corresponding author. E-mail: liugaolin@yahoo.com.cn



内部的翻译起始<sup>[8]</sup>。目前尚不清楚 La 蛋白如何完成这些不同的功能,但认为它是一种 RNA 伴侣分子,具有稳定 RNA 结构的作用。

## 2 hLa 蛋白与 HBV RNA 的相互关系

近期研究<sup>[9]</sup>已确定,La 蛋白是 HBV RNA 的结合蛋白,以磷酸化依赖模式结合在 HBV RNA 核苷酸 1 243 和 1 333 之间的一个茎环结构上,其磷酸化区域在 C 末端区内,目前已标注了 4 个磷酸化位点。hLa 在体内以二聚体形式存在<sup>[10]</sup>,但与 HBV RNA 结合时,多聚体分解为单体。hLa 常以单体或寡聚体的形式与 HBV RNA 结合形成复合物。野生型 La 蛋白单体的结合亲和力很高,约 0.8 nmol/L<sup>[4]</sup>,推测 hLa 结合 HBV RNA 的最佳结构是单体形式。La 蛋白参与多种小核 RNPs、核仁 RNPs 和 tRNA 前体的加工,它可能作为一种伴侣分子,在 RNA 的加工过程中依赖 hLa 寡聚体的形式起稳定 RNA 分子的作用<sup>[1]</sup>。但在 hLa-RNA 结合过程中,存在于 hLa 寡聚体和单体间的平衡调节尚需其他方法进行验证。

实验结果<sup>[4]</sup>表明,当 hLa 第 274~348 位氨基酸缺失后,hLa·HBV RNA 的复合物形式消失,可能由于 RRM-3 的 C 末端部分缺失或 Walker-A 模体(第 333~340 位氨基酸)的清除,由于 tRNA 前体的 5 端加工也依赖这些元件,因此这些元件很可能有助于结合。但也有报道 La 蛋白的 C 末端部分缺失仍然可结合人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)反式激活效应元件(transactivating responsive element, TAR)和 hY1 RNA 及不同的单链和双链 RNA 底物<sup>[10]</sup>。而且,基本区域(第 328~334 位氨基酸)被取代后,La 蛋白与 HCV 内部核糖体结合位点的结合受到抑制,说明不同的 La 区域与多种 RNA 子集的认识有关。今后的研究将区分在 hLa C 末端的特异性氨基酸对于直接结合及其与 HBV RNA 的结构稳定之间的相互关系。

在 RRM-1(第 11~99 位氨基酸)缺失的情况下,hLa 与 HBV RNA 的结合仍很强,说明 RRM-1 对结合并不必要,但 RRM-1 却明显影响与 tRNA 前体的相互作用,在 RNase P 剪切下,tRNA 成熟的调节也可能通过 hLa 的第 366 处丝氨酸的磷酸化作用而加以完成<sup>[11]</sup>。Maraia 等<sup>[12]</sup>建立了一种 La 蛋白与 tRNA 前体相互关系的模型,在这一模型中,RRM-1 可调节具有典型的 3'-UUU 结构的 RNA 聚合酶 III 转录物的结合,而 RRM-2 和 RRM-3 模体对一般 tRNA 前体的结合是必要的。另外,不成熟的 tRNA 的 5'-末端结合 hLa C 末端部分的 Walker-A 模体,但成熟的 tRNA 并不结合 hLa 蛋白,因此,RRM-1 和 Walker-A 模体对于 La 蛋白和 tRNA 前体之间的稳定作用关系都是必不可少的决定因素<sup>[13]</sup>。但对 HBV RNA 的认识结合在某种程度上有别于此,即 RRM-1 与结合是不相关的,而 RRM-2 和 RRM-3 模体对这种高亲和力结合具有协同作用。

可见,La 蛋白与多种 RNA 分子之间的相互作用关系具有广泛的结构和序列多样性。La 蛋白很可能与这些 RNA 子集通过建立由不同 La 区域完成的多种结合模式相互作

用。无论 C 末端区是直接和 HBV RNA 作用还是间接稳定某个部位,这种复杂的相互关系尚有待证实。hLa 寡聚体和多聚体之间的平衡受 RNA 结合的调节,引起了研究 hLa 蛋白多样化功能的广泛兴趣。RRM-2 和 RRM-3 模体被认为是 hLa·HBV RNA 相互作用关系的最重要区域。

## 3 La 蛋白与 HBV RNA 的关系受核酶影响

在某些情况下,核酶的剪切位点可被 RNA-结合蛋白保护,表明蛋白因子可以保护剪切位点,使 RNA 免受降解<sup>[14]</sup>。La 蛋白是一种稳定组蛋白 mRNA 的内参子,可延长组蛋白 mRNA 的半衰期<sup>[15]</sup>。实验证明,当 La 蛋白结合位点的结构发生改变时,HBV RNA 的半衰期缩短。3 和 5 的剪切产物均在 La 蛋白结合的茎环结构的上游位置产生。在 RNases 存在的情况下,5'-CP1 和 3'-CP2 均减少,表明生成 5'-CP1 和 3'-CP2 时酶的活性相同。由于从注射细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的鼠的肝提取物中制备而来的 RNase 活性较高,所以在 HBV RNA 的引物延伸分析中可见用注射 CTL 的鼠制备的核提取物处理的 HBV RNA 有显著降解,而未注射的无明显降解<sup>[14]</sup>。因此,HBV RNA 的降解 La 蛋白的断裂及 HBV RNA 底物的有效剪切的同时发生有力地说明,在 HBV RNA 的稳定性、全长 La 蛋白的存在及核酶活性三者之间有功能相关性。由于剪切位点位于 La 蛋白结合位点的 5 端,因此,La 蛋白可能通过阻止 RNases 进入剪切位点,从而达到保护剪切位点的作用。

研究发现,核酶的活性与 HBV RNA 的降解有关,在 HBV RNA 茎环结构的 5 端可以检测到内源性核酶的剪切活性。而且,鼠巨细胞病毒(MCMV)感染的细胞因子介导的 HBV RNA 下调与内源性核酶的剪切活性有暂时相关性<sup>[14]</sup>,说明稳态 HBV RNA 的含量受 2 种因素的控制,一是 La 对其产生的稳定影响,二是核糖核酸酶活性对其产生的不稳定影响。

已有报道,在疱疹单病毒感染、或用胰岛素(或雌激素)治疗幼鼠肝细胞之后,RNase 活性都有所增长<sup>[16,17]</sup>。不同的核内切酶的活性与类型影响剪切产物。现已知被完整的 HBV RNA 识别的剪切位点在 5'-CCA/UA/CU-3',但 HBV RNA 如何被核内切酶选择性剪切的机制尚不明确,也有可能是在 HBV RNA 的其他部位剪切,如雌激素调节的核内切酶与白蛋白 mRNA 和载脂蛋白 2 mRNA,可在几个位点分别剪切相应的 mRNA<sup>[18]</sup>。

核酶活性分析说明,剪切 HBV RNA 的位点近似位于预测的 La 蛋白结合位点。核酶活性的上调与全长 La 蛋白的消失,HBV RNA 的降解都有关联。由此可见,核酶的纯化与剪切位点的更详细的特征对于核酶调节 HBV RNA 稳定性机制的研究是非常必要的。

HBV 感染的治疗是目前世界上倍受关注的重大问题,La 蛋白干扰 HBV RNA 及其相关结构系统的研究将开创 HBV 感染治疗的一个新的时期,为临床治疗和药物研究提供新的方向。研究表明 La 蛋白与 HBV RNA 的翻译启动和病毒复制存在必然联系,但它们之间的确切关系尚有许多问

题值得进一步探讨,如La蛋白保护HBV RNA 免受降解的机制,hLa突变体中最佳突变位点的寻找及突变后干扰机制的确定,La蛋白多样化功能、核酶的作用特征及其与HBV RNA 作用的交互影响等。这些问题对于今后从分子水平和空间构象等方面研究乙肝病毒的发病机制具有重要理论意义和临床应用价值。

#### [参考文献]

- [1] Wolin SL, Cedervall T. The La protein[J]. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 375-403
- [2] Birney E, Kumar S, Krainer AR. A analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors[J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(25): 5803-5816
- [3] Wittekind M, Gorchach M, Friedrichs M, et al. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N NMR assignments and global folding pattern of the RNA-binding domain of the human hnRNP C proteins[J]. *Biochemistry*, 1992, 31(27): 6254-6265
- [4] Horke S, Reumann K, Rang A, et al. Molecular characterization of the human La protein-hepatitis B virus RNA. B interaction *in vitro*[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(38): 34949-34958
- [5] Maraia RJ. La protein and the trafficking of nascent RNA polymerase III transcripts[J]. *J Cell Biol*, 2001, 153(4): F13-F18
- [6] Crosio C, Boyl PP, Loreni F, et al. La protein has a positive effect on the translation of TOP mRNAs *in vivo*[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(15): 2927-2934
- [7] Maraia RJ, Intine RV. La protein and its associated small nuclear and nucleolar precursor RNAs[J]. *Gene Expr*, 2002, 10(1-2): 41-57
- [8] Pudi R, Abhinav S, Srinivasan N, et al. Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(14): 12231-12240
- [9] Heise T, Guidotti LG, Chisari FV. La autoantigen specifically recognizes a predicted stem-loop in hepatitis B virus RNA[J]. *J Virol*, 1999, 73(7): 5767-5776
- [10] Craig AW, Svitkin YV, Lee HS, et al. The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation[J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(1): 163-169
- [11] Intine RV, Sakulich AL, Koduru SB, et al. Control of transfer RNA maturation by phosphorylation of the human La antigen on serine 366[J]. *Mol Cell*, 2000, 6(2): 339-348
- [12] Maraia RJ, Intine RV. Recognition of nascent RNA by the human La antigen: conserved and divergent features of structure and function[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(2): 367-379
- [13] Fan H, Goodier JL, Chamberlain JR, et al. 5' processing of tRNA precursors can be modulated by the human La antigen phosphoprotein[J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(6): 3201-3211
- [14] Heise T, Guidotti LG, Chisari FV. Characterization of nuclear RNases that cleave hepatitis B virus RNA near the La protein binding site[J]. *J Virol*, 2001, 75(15): 6874-6883
- [15] Lee CH, Leeds P, Ross J. Purification and characterization of a polysome-associated endoribonuclease that degrades c-myc mRNA *in vitro*[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(39): 25261-25271
- [16] Oroskar AA, Read GS. Control of mRNA stability by the virion host shutoff function of herpes simplex virus[J]. *J Virol*, 1989, 63(5): 1897-1906
- [17] Pastori RL, Moskaitis JE, Schoenberg DR. Estrogen-induced ribonuclease activity in *Xenopus* liver[J]. *Biochemistry*, 1991, 30(43): 10490-10498
- [18] Chernokalskaya E, Dompenciel R, Schoenberg DR. Cleavage properties of an estrogen-regulated polysomal ribonuclease involved in the destabilization of albumin mRNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(4): 735-742

[收稿日期] 2004-01-09

[修回日期] 2004-05-11

[本文编辑] 尹茶

(上接第1019页)

降。查血钾 4.5 mmol/L, 血钠 140 mmol/L, 血氯 99 mmol/L, 尿素氮 18 mmol/L, 血肌酐 694 μmol/L。治疗上除停用盐酸阿罗洛尔外, 继续使用原先的降血压药物以及维持性血液透析。2 d 后患者病情渐平稳, 症状显著减轻, 自主心律恢复, 4月30日拔除临时起搏器, 患者无特殊不适, 观察1周后出院。

**2 讨论** 盐酸阿罗洛尔为降压药中α及β受体阻滞剂之一, 可同时阻断α及β受体, 其作用比大致为1:8。本药通过适宜的α受体阻断作用, 在不使末梢血管阻力升高的情况下, 呈现较强的β受体阻断作用所致的降压效应。该药用于严重肝肾功能衰竭患者要慎重, 长期用药时, 需定期检查心功能(心率、血压、心电图和X线)。出现心动过缓及低血压时须减量或停药。本例所用盐酸阿罗洛尔为常规剂量, 由小逐

渐增大, 最大量仅为20 mg/d。早期表现出良好的降压效果, 对心率无明显影响。发生窦性心动过缓及停搏时血电解质无异常, 因此与电解质改变无关; 而停用盐酸阿罗洛尔后患者心率逐渐恢复正常, 因此我们认为患者心率的变化与较长时间地使用该药物有关。临床上罕见如此严重的心动过缓, 究其原因我们推测除患者可能对该药物较常人敏感外, 还与其基础病变为慢性肾衰竭, 肾脏对药物的清除效率下降, 导致该药物体内蓄积, 再加上联合使用钙拮抗剂(氨氯地平), 两者可相互增强药理作用有关。因此临床上应高度重视盐酸阿罗洛尔用于肝肾功能损害患者的可能不良反应, 尽可能避免致死性心律失常等严重并发症的发生。

[收稿日期] 2004-06-16

[修回日期] 2004-08-12

[本文编辑] 邓晓群