

网络出版时间:2022-1-20 14:40 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220119.1132.007.html

阿维霉素干预 MTIF2 调控核糖体翻译进程抑制乙型肝炎病毒复制的机制研究

常 凯¹,那琬琳¹,刘晨霞¹,江忠勇¹,王艳艳¹,许宏宣²,沈金兰¹,刘 媛¹

摘要 目的 探讨核糖体翻译因子抑制剂阿维霉素对乙型肝炎病毒复制的抑制作用及分子机制。方法 使用不同浓度的阿维霉素处理肝癌细胞 Hep3B,应用 CCK-8 检测细胞活性,流式细胞法检测细胞凋亡,qPCR 方法检测病毒 HBV-DNA、pgRNA、宿主 MTIF2 和 RPL10 基因表达量,ELISA 免疫法检测 HBsAg 和 HBeAg,化学发光检测法对 AFP 进行定量检测,生物化学方法检测细胞外泌谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)和碱性磷酸酶(ALP)蛋白。结果 阿维霉素对 Hep3B 细胞增殖没有抑制作用,对细胞的凋亡也没有影响。但能促进细胞 AST 分泌,降低 AFP 外泌水平,对 ALP 分泌影响较小。在 Hep3B 细胞中,阿维霉素能通过干预 MTIF2 促使 pgRNA 表达量积累,反馈上调宿主 RPL10 和 MTIF2 基因 mRNA 表达。并能有效降低 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 水平。结论 阿维霉素能够抑制 MTIF2 翻译起始,通过影响翻译起始调控病毒组装蛋白的翻译进程,进而抑制乙肝病毒复制。

关键词 阿维霉素;乙型肝炎病毒;mRNA 翻译;翻译起始因子;调控机制

中图分类号 R

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)02-0203-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.008

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是人类主要的传染病之一,目前经食药监局批准用于治疗乙型肝炎的药物主要包括干扰素类及核苷酸类似物两大类^[1]。然而干扰素的副作用以及核苷酸类似物的耐药性使得抗 HBV 的治疗方法受到极大限制^[2]。

阿维霉素又称为卑霉素、阿维拉霉素,属于正霉

素族的寡聚糖类抗生素。主要是由绿色产色链霉菌 Tu57 发酵产生的一种次级代谢产物,呈无色针状结晶,微溶于水,易溶于丙酮、丙醇、乙酸乙酯、苯和乙醚等有机溶剂^[3]。已发现其具有抑制多种革兰阳性菌的功效,如耐万古霉素的肠球菌、耐甲氧苯青霉素的葡萄球菌等。然而其对革兰阴性菌的抑制效果欠佳。临床与基础医学研究^[4]发现,包含阿维霉素在内的正霉素类抗生素是一种能够有效作用于 trGTPases 的抑制剂。而 trGTPases 直接作用核糖体翻译合成起始蛋白质,参与病毒在宿主体内的复制^[5-6]。因此该研究旨在探讨宿主细胞中阿维霉素对 HBV 复制的抑制作用及分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人肝癌细胞系 Hep3B,含 HBV 基因组,购于成都诺和生物科技有限公司。阿维霉素(CAS11051-71-1)(加拿大多伦多研究化学品公司),胎牛血清(新西兰 Gibco 公司)。DMEM 培养基、PBS、青霉素链霉素双抗购于美国 Gbico 公司;Cell Counting Kit(CCK-8)购于日本同仁公司;细胞凋亡 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 购于上海碧云天公司;总 RNA 提取试剂盒、乙型肝炎病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)购于中山大学达安基因股份有限公司。TransScript Green Two-Step qRT-PCR SuperMix 试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒(酶联免疫法)和乙型肝炎病毒 e 抗原诊断试剂盒(酶联免疫法)购于北京万泰生物药业股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞 Hep3B 培养基:DMEM 高糖培养基、1% 青链霉素双抗、10% 胎牛血清。培养条件:5% CO₂,37℃,湿度为 36%。

1.2.2 CCK-8 检测细胞活性 Hep3B 细胞按每孔 1×10⁴ 个细胞的浓度接种于 96 孔板,制备细胞悬液。经 18 h 待细胞贴壁后,加入与配置好的含不同浓度阿维霉素的培养基 200 μl(阿维霉素浓度分别

2021-11-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81301445);四川省中医药管理局专项课题(编号:2020JC0124);西部战区总医院星火青年创新人才工程;全军医学科技青年培育计划项目(编号:16QNP051)

作者单位:¹ 中国人民解放军西部战区总医院检验科,成都 610083

² 成都市实验外国语学校生物教学与研究组,成都 610083

作者介绍:常 凯,男,主管技师;

刘 媛,女,博士,副主任医师,责任作者, E-mail: liuyuan198231@163.com

为 0、10、25、50 $\mu\text{g/ml}$)。加药培养 18、24、48 h 后吸出上清液,每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,再加入 90 μl 培养基,放入 CO_2 培养箱内孵育 3 h,使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(optical density, OD)。各浓度阿维霉素对 Hep3B 细胞的抑制率 = (对照组 OD 值 - 用药组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 调零孔 OD 值)^[7]。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 将人肝癌细胞 Hep3B 分别接种于 6 孔板中,接种浓度为 1×10^4 个细胞/孔,待 18 h 细胞贴壁后,加入含不同浓度阿维霉素的培养基(0、10、25、50 $\mu\text{g/ml}$)。18 h 后处理消化和洗涤细胞,再加入 5 μl AnnexinV-FITC,室温,避光,轻轻混匀避光 10 min;加入 5 μl PI 室温避光孵育 5 min,加入 PBS 适量,轻轻混匀后应用流式细胞仪检测细胞凋亡;用 70% 的冰乙醇固定 24 h,PI 染色后流式细胞仪检测。

1.2.5 ELISA 法检测 阿维霉素对培养细胞上清液中的 HBsAg、HBeAg, qPCR 检测阿维霉素对细胞培养上清液 HBV DNA 的影响 将 Hep3B 置于 T25 培养瓶,细胞浓度为 1×10^5 个/ml,分别添加阿维霉素浓度为 0、10、25、50 $\mu\text{g/ml}$ 的培养基孵育细胞 18 h,收集上清液离心 5 min (1 500 r/min),收集上清液用于检测 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg。

1.2.6 提取 mRNA 应用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,收集经阿维霉素(浓度 0、10、25、50 $\mu\text{g/ml}$)处理后的 18 h 的细胞及上清液,使用离心柱提取法提取 RNA,应用荧光定量 PCR 检测 MTIF2 基因和 pgRNA 表达量。

1.3 统计学处理 应用 SPSS v24.0 软件对数据结果进行统计分析,实验结果采用表示。符合正态分布规律数据组间比较使用独立样本 t 检验;数据间比较使用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义

2 结果

2.1 阿维霉素对细胞生长的影响 阿维霉素对 Hep3B 细胞的生长未发现抑制作用,48 h 内也未表现出浓度和时间依赖性。表 1 显示阿维霉素对

表 1 阿维霉素对 Hep3B 细胞生长活性的影响 (%)

阿维霉素浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	18 h 细胞活性	24 h 细胞活性	48 h 细胞活性
0	100.00	100.00	100.00
10	101.87	96.51	99.78
25	99.09	98.85	98.83
50	102.37	98.80	101.54

Hep3B 没有生长和活性抑制作用。

2.2 阿维霉素对细胞死亡和凋亡影响 阿维霉素对 Hep3B 细胞没有促进凋亡作用。在不同阿维霉素浓度 0、10、25、50 $\mu\text{g/ml}$ 处理后,结果见表 2。处理组与对照组之间不存在差异,表明阿维霉素对肝癌细胞 Hep3B 的凋亡和死亡没有影响。

表 2 阿维霉素对 Hep3B 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

阿维霉素浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	死亡率	凋亡率	死亡 + 凋亡率
0	3.14 $\pm$ 0.18	0.65 $\pm$ 0.03	3.79 $\pm$ 0.15
10	3.42 $\pm$ 0.40	0.70 $\pm$ 0.04	4.12 $\pm$ 0.36
25	3.41 $\pm$ 0.51	0.68 $\pm$ 0.13	4.09 $\pm$ 0.38
50	3.52 $\pm$ 0.36	0.58 $\pm$ 0.33	4.10 $\pm$ 0.30

2.3 阿维霉素对 HBV 毒力的影响 阿维霉素处理 Hep3B 细胞 18 h 后,应用 Taqman 引物 qPCR 检测 HBV DNA 浓度显示,不同浓度阿维霉素处理后均能降低 HBV-DNA 浓度,25 $\mu\text{g/ml}$ 降低幅度最大 ($F = 4.03, P = 0.005$)。但 HBV 的 pgRNA 浓度均有不同程度增加,10 $\mu\text{g/ml}$ 阿维霉素处理后增加幅度最大 ($F = 12.14, P = 0.003$) (图 1A、B)。

2.4 阿维霉素对宿主翻译调控蛋白的影响 不同浓度阿维霉素处理 Hep3B 细胞 18 h,检测宿主细胞翻译调控蛋白 RPL10 和 MTIF2 的 mRNA 相对表达水平。显示阿维霉素能够使 RPL10 和 MTIF2 的 mRNA 表达水平增加,使 RPL10 在 50 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度 ($F = 8.87, P = 0.003$) 处理后增加最多,MTIF2 增加最多的浓度也在 50 $\mu\text{g/ml}$ 浓度 ($F = 7.94, P = 0.007$) (图 1C、D)。

2.5 阿维霉素对病毒合成蛋白的影响 检测不同浓度阿维霉素处理后外泌 HBV 蛋白 HBsAg 和 HBeAg 的相对浓度,结果表明:不同浓度药物处理后 HBsAg 和 HBeAg 均表现出降低(图 1E、F)。

2.6 阿维霉素对细胞外泌成分的影响 经不同浓度阿维霉素处理后显示,Hep3B 细胞外泌成分甲胎蛋白浓度降低。阿维霉素处理 Hep3B 细胞能够提高谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)浓度,且具有浓度依赖性。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)浓度在阿维霉素处理后没有规律。ALT 在 10 $\mu\text{g/ml}$ 阿维霉素处理后浓度增加 ($F = 2.97, P = 0.001$),但在 25、50 $\mu\text{g/ml}$ 阿维霉素处理后其浓度降低(图 2)。

2.7 阿维霉素抑制 HBV 复制的分子机制 应用蛋白质互作分析软件 STRING v11.0 对宿主内的

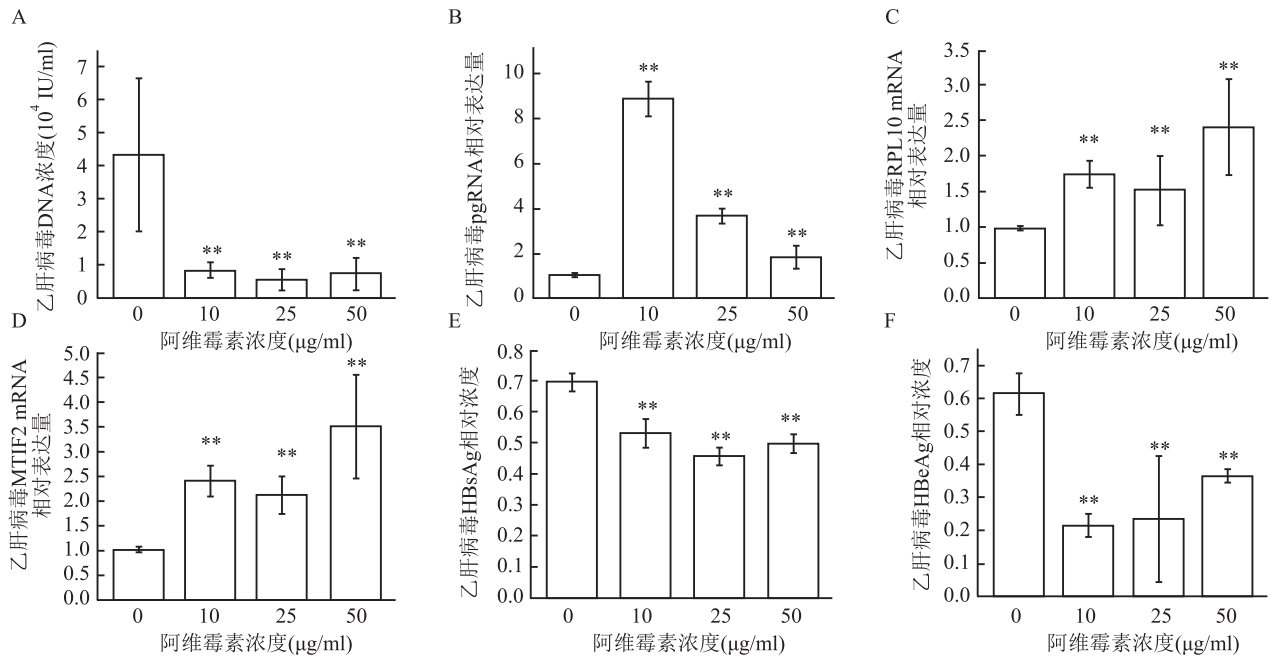


图1 阿维霉素对 HBV 毒力、宿主核糖体调控基因和外泌蛋白的影响

A:阿维霉素对 HBV DNA 浓度的影响;B:阿维霉素对 HBV pgRNA 表达的影响;C:阿维霉素对宿主 RPL10 mRNA 表达的影响;D:阿维霉素对宿主 MTIF2 mRNA 表达的影响;E:阿维霉素对外泌蛋白 HBsAg 的影响;F:阿维霉素对外泌蛋白 HBeAg 的影响;与对照组比较: ** $P < 0.01$

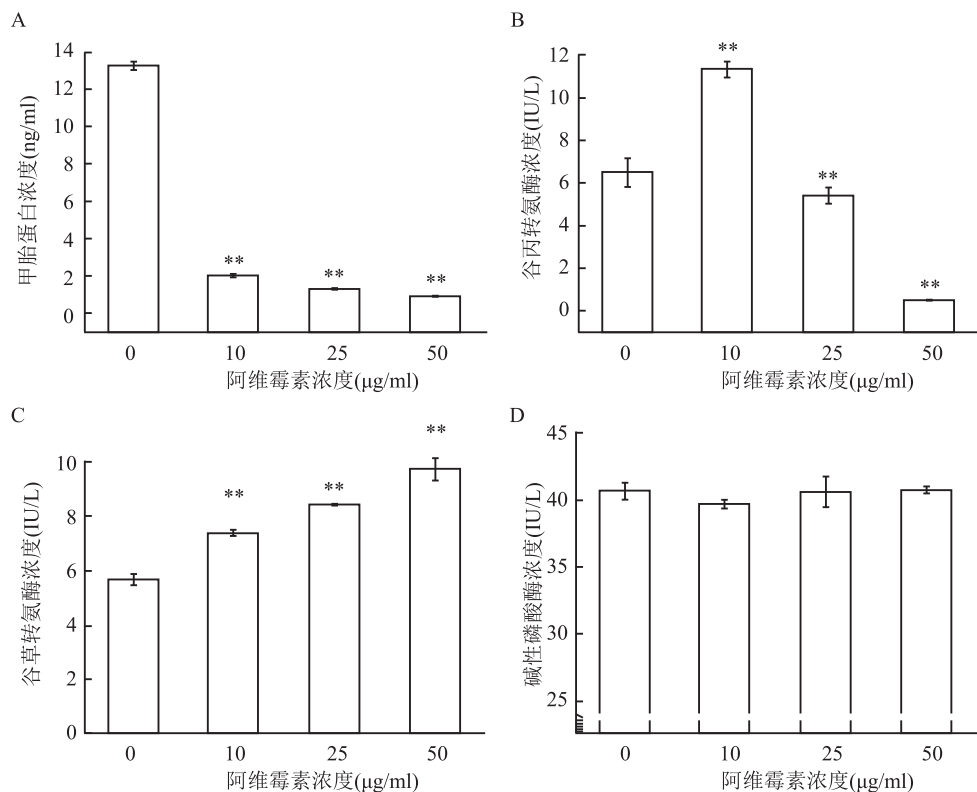


图2 阿维霉素对 Hep3B 外泌蛋白的影响

A:阿维霉素对甲胎蛋白浓度的影响;B:阿维霉素对谷丙转氨酶浓度的影响;C:阿维霉素对谷草转氨酶浓度的影响;D:阿维霉素对碱性磷酸酶浓度的影响;与对照组比较: ** $P < 0.01$

RPL10 和 MTIF2 蛋白进行分析发现,共有 7 个蛋白质形成互作集团,分别为 RPL10、MTIF2、RPL19、

RPL35、RPL18A、RPS12 和 RPS16(图 3A)。富集分析表明:7 个蛋白质主要具有参与核糖体结构组成

并影响翻译起始的功能,7个蛋白的亚细胞定位集中在细胞质线粒体和细胞质中,主要参与病毒 mRNA 翻译和肽链的延伸信号通路。

基于该研究,课题组模拟了一个 HBV 在宿主细胞内可能存在的复制机制,即 HBV 利用宿主细胞的核酸复制转录系统形成一个共价闭合环状 DNA (cccDNA)。cccDNA 以微型染色体形式存在于细胞核内,提供 pgRNA 在内的所有病毒 mRNA 的转录模板。pgRNA 和 mRNA 同时翻译出多种用于病毒包装的蛋白,在胞质中组装形成核衣壳复合体用于形成新的病毒中间体。在该过程中,RPL10 和 MTIF2 分别参与核糖体大亚基的组成和翻译起始。随后一部分中间体装配成成熟的病毒 Dane 颗粒释放入血;另一部分重新补充核内的 cccDNA^[8]。以此循环,大量增殖。该研究显示经阿维霉素处理,在翻译步骤前的基因 pgRNA、RPL10 和 MTIF2 等出现累积,翻译下游蛋白 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 浓度却降低。表明阿维霉素的作用位点位于核糖体翻译步骤(图 3B)。

3 讨论

常见的正霉素类抗生素有阿维霉素和晚霉素等,其能够结合 rRNA 的 H89 的小沟到 H91 的环区,通过 rRNA 的扰动间接地赋予核糖体翻译起始抗性^[9-10]。晚霉素一般不抑制肽键的形成,也不与其他几种抗生素竞争结合核糖体。阿维霉素则是通

过干扰 AA-tRNA 与核糖体的结合影响翻译进程^[11]。阿维霉素和晚霉素均被认为是很好的翻译起始抑制剂,它们以 IF2 依赖的方式抑制 fMet 的形成。然而抑制的确切步骤仍然不清楚。

MTIF2 为翻译起始因子 IF-2,多存在与线粒体和细胞质,是经典翻译因子 GTPase 家族中 IF-2 亚家族成员^[12]。MTIF2 是蛋白质合成起始的基本成分之一,能够保护甲硫酰-tRNA 不被自发水解,并促进其结合到 30S 核糖体亚基^[13]。同时也参与 GTP 在 70S 核糖体复合物的水解。在本研究中使用翻译起始抑制剂阿维霉素去抑制 MTIF2 功能,结果表明阿维霉素表现出对 HBV 组装必需蛋白的翻译抑制功能。

核糖体蛋白 L10(RPL10)为核糖体大亚基的组成单元,然而在核糖体构成中并非所有的核糖体蛋白成员均需参加^[14-15]。在已有研究中,包括 HIV 在内的多种病毒复制的翻译调控均有 RPL10 有关,结合本次研究结果,课题组推断宿主 RPL10 可能是特异性参与病毒翻译的核糖体蛋白。

本研究应用阿维霉素处理 HBV 细胞模型 Hep3B,表明阿维霉素能够有效调控 MTIF2 功能,通过抑制翻译起始减少病毒组装所需蛋白的翻译,进而影响 HBV 复制,反馈导致 MTIF2、RPL10 和 pgRNA 等上游基因表达量增加。该研究与正霉素类抗生素预测结合位点相对于起始因子在核糖体上的结合位点相一致。

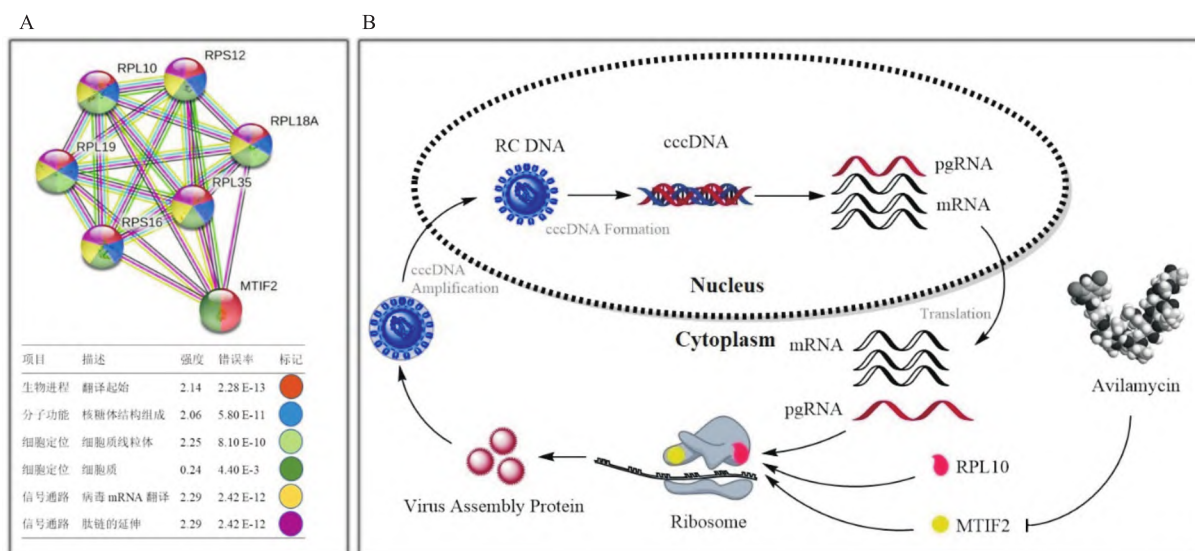


图3 RPL10和MTIF2蛋白PPI分析和阿维霉素参与HBV复制的机制分析

A: RPL10和MTIF2蛋白PPI分析图; B: 阿维霉素参与HBV复制的机制示意图

参考文献

- [1] Zhang B Y, Chai D P, Wu Y H, et al. Potential drug targets against hepatitis B virus based on both virus and host factors [J]. Curr Drug Targets, 2019, 20(16): 1636–51.
- [2] Guo Y, Lu H, Xu L, et al. The response of hepatitis B virus genotype to interferon is associated with a mutation in the interferon-stimulated response element [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(51): e18442.
- [3] Lv X A, Jin Y Y, Li Y D, et al. Genome shuffling of Streptomyces viridochromogenes for improved production of avilamycin [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(2): 641–8.
- [4] Mikolajka A, Liu H, Chen Y, et al. Differential effects of thiopeptide and orthosomycin antibiotics on translational GTPases [J]. Chem Biol, 2011, 18(5): 589–600.
- [5] Kim J, Lee S, Jung K, et al. Intensiometric biosensors visualize the activity of multiple small GTPases in vivo [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 211.
- [6] Bajpai A K, Davuluri S, Tiwary K, et al. Systematic comparison of the protein-protein interaction databases from a user's perspective [J]. J Biomed Inform, 2020, 103: 103380.
- [7] 叶雨笙, 常凯, 朱紫衣, 等. 吉西他滨促进 HepG2.2.15 细胞系中乙肝病毒 pgRNA 转录和病毒复制及相关分子机制研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2019, 44(12): 1564–70.
- [8] Stefan I, Rucheton M, D'Angeac A D, et al. Hepatitis B virus Dane particles bind to human plasma apolipoprotein H [J]. Hepatology, 2001, 33(1): 207–17.
- [9] Kroismayr A, Sehm J, Pfaffl M W, et al. Effects of avilamycin and essential oils on mRNA expression of apoptotic and inflammatory markers and gut morphology of piglets [J]. Czech J Animal Sci, 2008, 53(9): 377–87.
- [10] Zhao Q, Guo J T. Have the starting lineup of five for hepatitis B virus covalently closed circular DNA synthesis been identified? [J]. Hepatology, 2020, 72(3): 1142–4.
- [11] Krupkin M, Wekselman I, Matzov D, et al. Avilamycin and evernimicin induce structural changes in rProteins uL16 and CTC that enhance the inhibition of A-site tRNA binding [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(44): E6796–805.
- [12] Xu D, Wang Y, Wu J, et al. MTIF2 impairs 5 fluorouracil-mediated immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma *in vivo*: Molecular mechanisms and therapeutic significance [J]. Pharmacol Res, 2021, 163: 105265.
- [13] Overman RG Jr, Enderle P J, Farrow J M 3rd, et al. The human mitochondrial translation initiation factor 2 gene (MTIF2): transcriptional analysis and identification of a pseudogene [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1628(3): 195–205.
- [14] Lubyova B, Hodek J, Zabransky A, et al. PRMT5: A novel regulator of Hepatitis B virus replication and an arginine methylase of HBV core [J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0186982.
- [15] Liu Y, Zhao M, Gong M, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication via HBV DNA cleavage by Cas9 from Staphylococcus aureus [J]. Antiviral Res, 2018, 152: 58–67.

A study on the mechanism of Avilamycin intervention MTIF2 regulating ribosomal translation process to inhibit hepatitis B virus replication

Chang Kai¹, Na Wanlin¹, Liu Chenxia¹, Jiang Zhongyong¹, Wang Yanyan¹,

Xu Hongxuan², Shen Jinlan¹, Liu Yuan¹

(¹Dept of Clinical Laboratory, The General Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610083;

²Biology Teaching and Research Group, Chengdu Experimental Foreign Language School, Chengdu 610083)

Abstract Objective To investigate the inhibitory effect and molecular mechanism of ribosomal translation factor inhibitor Avilamycin on hepatitis B virus replication. **Methods** Liver cancer Hep3B cells were treated with different concentrations of Avilamycin. Cell activity was detected by CCK-8; the apoptosis was detected by flow cytometry, and HBV-DNA, pgRNA, MTIF2, RPL10 gene expression level was detected by qPCR method. The HBsAg and HBeAg was detected by ELISA. The AFP was detected by chemiluminescence. Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and alkaline phosphatase (ALP) proteins was detected by Biochemistry method. **Results** Avilamycin had no inhibitory effect on Hep3B cell proliferation and apoptosis. However, it could promote cellular AST secretion, reduce AFP levels, and have less effect on ALP secretion. In Hep3B cells, Avilamycin promotes accumulation of pgRNA expression by intervening with MTIF2 and feedback upregulates mRNA expression of host RPL10 and MTIF2 genes. It can effectively reduce the HBsAg, HBeAg, and HBV-DNA levels. **Conclusion** Avilamycin can inhibit MTIF2 translation initiation, regulate the translation process of viral assembly protein by affecting translation initiation, and then inhibit hepatitis B virus replication.

Key words avilamycin; hepatitis B virus; mRNA translation; translation initiation factor; regulatory mechanism