

谷胱甘肽过氧化物酶与肝炎病毒蛋白关系的研究进展

白桂芹 成 军 张树林

【关键词】 肝炎病毒;谷胱甘肽过氧化物酶

Effect of Hepatitis virus proteins on Glutathione peroxidase

【Key words】 Hepatitis virus; Glutathione peroxidase

【First author's address】 Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

病毒性肝炎是病毒感染以后引起的免疫性和非免疫性肝细胞损害,自由基损伤及脂质过氧化对肝的损伤占有重要地位,它们作用于细胞膜和细胞大分子,引起脂质过氧化反应,形成脂肪肝,并损伤细胞内 DNA,破坏核苷酸辅酶。微量元素硒和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH Px, glutathione peroxidase)是体内主要的抗自由基和抗过氧化作用的因子,肝炎病毒蛋白可通过影响 GSH Px 基因及其表达的异常调节引起肝细胞的病理损害,导致肝硬化(LC)和肝细胞癌(HCC)的发生,但具体的机制还在研究之中。本文将目前关于 GSH Px 在病毒肝炎及其转归中的作用进行简要的回顾。

一、谷胱甘肽过氧化物酶的生物学作用及机制

GSH Px 是一种原型的真核硒蛋白,它主要存在于牛、羊及人等哺乳动物的红细胞及肝脏中,硒是 GSH Px 的重要组成部分,是 GSH Px 的活性中心。硒和 GSH Px 在肿细胞中的浓度比在红细胞中高 2~3 倍。GSH Px 催化还原型血谷胱甘肽氧化与过氧化氢(H₂O₂)还原反应,从而阻断超氧阴离子(O₂⁻)引起的细胞类脂过氧化而损害肝细胞;还能阻断由 LOOH 引发自由基的二级反应,从而减少 LOOH 对生物体的损害^[1]。肝细胞就是通过增加谷胱甘肽过氧化物酶的活性来清除自由基及防止过氧化作用而保护肝细胞,这与肝细胞的解毒功能密切相关。

自由基是机体生化反应中产生的性质活泼、具有极强氧化能力的物质。体内抗自由基体系主要包括酶类(超氧化物歧化酶、GSH Px、过氧化氢酶等)阻止自由基形成和通过非酶促抗氧化剂(还原型谷胱甘肽、维生素 E 等)捕获不成对的电子使自由基失活。过氧化脂质(LPO)是自由基对不饱和脂肪酸引发的脂质过氧化作用的最终产物,其含量的多少反映组织细胞的脂质过氧化速率或强度^[2]。机体存在阻止过氧化作用的防御体系,GSH Px 是细胞内抗脂质过氧化作用的酶性

保护系统的主要成分,可催化 LPO 分解生成相应的醇,防止 LPO 均裂和引发脂质过氧化作用的链式支链反应,减少 LPO 的生成以保护机体免受损害^[3]。

超氧化物歧化酶(SOD)广泛存在于各种生物体内,是清除超氧阴离子自由基的一种重要的酶。与 GSH Px 有协同作用,它能催化 O₂ 生成 O₂ 和 H₂O₂, H₂O₂ 则由 GSH Px 催化转变成 O₂ 和 H₂O,从而使 H₂O₂ 迅速清除,二者联合作用可有效防止组织细胞受过氧化损伤,能有效清除氧自由基,使肝细胞膜稳定性增加。

过量的氧、脂质过氧化物及代谢产物脂质自由基,可与 H₂O₂ 反应生成最强的氧化剂羟自由基·OH: (O⁻ - 2) + H₂O₂ → OH + OH· + ¹O₂。而且炎症过程中酶促反应也产生大量·OH,及巨噬细胞黏着面下层的(O⁻ - 2)因微环境 pH 值下降而易于质子化,生成氧化性能更强的氢过氧自由基(·HO₂)等活性物质,可直接破坏 SOD 和 GSH Px 分子结构中的-SH,损伤 DNA,引起酶合成不足或出错,导致 SOD 与 GSH Px 的生成减少,活性下降^[4,5]。机体抗氧化能力降低,这些有毒的物质浓度的病理性增高,首先:可攻击生物膜磷脂中的不饱和脂肪酸引起膜脂质过氧化反应,而膜脂质过度氧化会损害初级和次级溶酶体膜,溶酶体的酸性磷酸酶释放出来,对细胞和线粒体膜等重要的细胞器造成损害。其次:这些自由基对蛋白质的攻击是修饰氨基酸残基,引起结构和构象的改变,造成肽链、碱基断裂^[6]。这种自由基链式反应可持续进行,只有当产生损伤效应与新产生的酶(SOD, GSH Px, CAT)、自由基链阻断剂(如巯基化合物、维生素 E)等作用时,才能终止这种反应^[7]。

二、谷胱甘肽过氧化物酶与肝脏的临床疾病

GSH Px 是内源性抗氧化系统的重要组成部分,在人体各组织中,以肝脏 GSH Px 的活性最高。谈治雄等^[8]测定慢性活动性肝炎、肝硬化、肝癌等肝组织中的 GSH Px 活性,结果均显著低于肝功正常者,表明损伤过程中 GSH Px 活性受抑制。血浆谷胱甘肽依赖酶的活性在氧化剂增高时出现,并且从损伤的肝细胞中释放到血清,因此 GSH Px 是肝细胞损伤的超级标志^[9]。当肝脏有毒物质增高时,能影响肝脏的正常生理功能,从而使血液和体液中硒的浓度下降,谷胱甘肽过氧化物酶的活性降低,脂质过氧化物(LPO)浓度升高,导致

作者单位: 100039 北京,解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心



肝细胞受损程度增加。Wang 等^[10]研究发现谷胱甘肽和 GSH-Px 是通过抑制微粒体蛋白和肝细胞微粒体的细胞色素 P-450 的合成代谢从而损害肝细胞。

Chrobot 等检查 100 例有慢性病毒性肝炎的乙型肝炎病毒 (HBV) 和丙型肝炎病毒 (HCV) 感染的儿童,发现在慢性 HBV 和 HCV 感染的儿童的 CAT、SOD 活性降低和 GSH-Px 活性升高。认为慢性肝炎的儿童可能存在不充分抗氧化剂屏障^[11],这与成人病毒性肝炎 GSH-Px 活性降低的结果不同,其具体的机制不清。慢性活动性肝炎病人血过氧化歧化酶升高,在活动性病毒性肝炎和酒精性肝炎 GSH-Px 活性降低,红细胞 GSH-Px 在酒精性肝炎明显降低^[12]。Hadi 等研究发现肝硬化病人的 GSH-Px 和 SOD 的活性比对照组明显降低,提示肝硬化病人红细胞中抗氧化剂酶防御系统明显降低。但是在肝硬化病人血浆中过氧化作用明显增加,这将可能导致病人细胞外氧化剂应激状态而引起相应的病理损害^[13]。Wenger 等^[14]研究发现 GSH-Px 和 SOD 活性在胰腺癌组织和肝内转移组织比在肿瘤外胰腺组织无转移的肝组织明显降低,在胰腺癌病人 GSH-Px 活性降低而导致的脂质过氧化作用增强被认为刺激胰腺癌的肝转移。

流行病学调查显示在硒水平和地域性癌、HBV 感染及 HBV 相关的肝病和肝癌之间存在密切的联系。4 年动物鸭研究证实饮食硒补充减低 HBV 感染的 77.2% 和肝癌前损伤的 75.8%。8 年跟踪调查显示硒补充降低原发性肝癌发生率的 35.1%。从治疗组撤除硒原发性肝癌发生率开始升高。但是对 HBV 的抑制反应维持至治疗后 3 年后。提示持续性硒的补充对维持化学预防效果是必需的^[15]。因为 Liu 等^[16]应用原子吸收、逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 等技术研究发现硒的补充能增加 GSH-Px 基因的表达。另外 Guidotti 等观察发现硒治疗能明显抑制内毒素引起的一氧化氮 (NO) 的产生,硒给予后 24 小时能诱导细胞谷胱甘肽过氧化物酶活性的增高,提示在内毒素血症硒对 NO 的预防效果是因为诱导硒依赖的谷胱甘肽过氧化物酶^[17]。应用硒治疗后谷胱甘肽过氧化物酶活性升高, LPO 含量下降。

三、肝炎病毒蛋白对谷胱甘肽过氧化物酶基因的调节

Chang 等分离全长人类硒结合蛋白 56 kDa cDNA 克隆, cDNA 是 1 668 bp 利编码 472 个氨基酸残基的开放读码框架 (ORF), 分子量为 52.25 kDa 和等电点为 6.13。利用 Northern blot 杂交发现在鼠肝脏中硒结合蛋白 56 kDa 有高水平表达, 硒结合蛋白 56 定位于人类染 1q21-22^[18]。国内张等^[19]采用酵母双杂交技术对丙型肝炎病毒 E2 蛋白结合蛋白进行研究, 在人肝细胞文

库中筛选出人类硒结合蛋白, 表明 HCV E2 与硒结合蛋白有相互作用, 从而推测 HCV E2 可能存在编码硒蛋白的读码区, 那么硒结合蛋白在丙型肝炎致病过程中有什么作用, 是否会引起丙型肝炎患者体内硒含量的改变以及 GSH-Px 活性变化, 从而导致肝细胞病理损害, 值得我们进一步去研究。

细菌和真核细胞微生物的基因组用硒半胱氨酸的 UGA 密码子编码硒蛋白, 用一个复合物共同翻译机制使硒半胱氨酸结合成多肽链, 涉及 RNA 的茎环结构。依据人免疫缺陷病毒-1 (HIV-1) 基因组结构的分析, Taylor 等证明几个已知过度折叠的基因有编码硒蛋白的潜力 (如重叠 *envgp41*-编码区等是通过-1 的移框表达编码硒蛋白 GSH-Px)^[20]。外 RNA 的茎-环结构需要在 UGA 密码子位置插入硒半胱氨酸, 如果潜在的硒蛋白分子与另外基因重叠, 硒蛋白合成可能需要的基因组结构特点包括线立体的移框位点和 RNA 假结, 可以证实病毒中是一个规则而不是例外。一个同样的结构在 HBV 反转录编码区精确的同一位置被证实^[21]。

GSH-Px 在酶活跃位点有稀有的氨基酸硒半胱氨酸结合, 在 RNA 由 UGA 密码子于编码。DNA 病毒 (一种软体动物) 能编码功能性的硒依赖的 GSH-Px。改变传统数据库查询技术来定位潜在性病毒 GSH-Px 单元, 与比较性序列分析相结合, Zhang 等^[22]发现许多 RNA 病毒编码硒依赖的 GSH-Px 单元的证据, 包括几个人类病原菌如 HIV-1、HCV、柯萨奇病毒 B3、HIV-2 和麻疹病毒。对多个病毒分离后序列分析发现至少在病毒亚型或基因型范围内公认 GSH-Px 且有保守性, 因此支持这个保守区是功能性 GSH-Px 单元的理论。

HCV 谷胱甘肽基因与病毒序列数据库是同一的。利用结构生物信息方法, 用保守的谷胱甘肽活跃位点序列作为探针, 给硒半胱氨酸密码子特有的重量。产生多个序列联合和分析序列相似的有效性。结果发现 GSH-Px 同源区与 HCV NS4 基因区重叠, 并且在 HCV 非常保守的基因区。GSH-Px 保守的活跃位点区的序列相似性很高, HCV GSH-Px 的分子模式可计算的链能量比牛谷胱甘肽过氧化物酶结构的要好。认为 GSH-Px 基因的存在及表达有助于解释过氧化应激作用加速 HCV 疾病进展为肝细胞癌^[23]。本实验室利用抑制性消减杂交技术克隆 HCV NS3 蛋白反式激活基因的研究中, 筛选出硒蛋白 P, 从而证实 HCV NS3 对硒蛋白有上调作用。Li 等应用短链核甘酸微阵列技术 (基因芯片) 来决定与 HCV 核心蛋白表达对应的基因增生表达的变化, 通过 RT-PCR 证实金属硫蛋白家族的 mRNA 编码成员和细胞内 GSH-Px 样蛋白明显升高, 提示 HCV 核心蛋白表达导致细胞内过氧化应激, 也与核心

蛋白在其相关的肝硬化和肝细胞癌发病机制作用有关^[24]。

HBV、HCV 存在及表达硒蛋白 GSH-Px 基因的理论,进一步从基因及蛋白质水平证明 HCV、HBV 感染肝细胞后,改变硒蛋白 GSH-Px 表达,与硒结合蛋白相互作用从而干扰脂质过氧化作用,引起病毒性肝炎的肝损害,导致肝炎相关性肝细胞疾病的发生,其具体的机制还需系统的研究。

参考文献

- [1] 赵玉珍,栗坤,王光岩,等. 川芎素对老龄小鼠心、肝组织中谷胱甘肽过氧化物酶活化的影响. 黑龙江医药科学,1998,21(4):18-19.
- [2] 夏奕明,朱莲珍. 血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法. 卫生研究,1987,16(4):29-33.
- [3] 周玫. 谷胱甘肽过氧化物酶. 生物化学与生物物理进展,1985,12(3):27-30.
- [4] 陈瑗,周玫,主编. 自由基医学. 北京:人民军医出版社,1991. 106-296.
- [5] 方允中,李文杰,主编. 自由基与基础理论及其在生物学和医学中的应用. 北京:科学出版社,1989. 261-271.
- [6] 孙贵银,刘为纹,周志强,等. 自由基在实验性胃癌及癌前病变发生中的作用. 华人消化杂志,1998,6(3):219-221.
- [7] Sandy MS, Dimute D, Smith MT. Relationships between intracellular vitamin E, lipid peroxidation, and chemical toxicity in hepatocytes. Tokicool Appl Pharmacol, 1988, 93(2):288-297.
- [8] 谈治雄,李万亥,姚真真,等. 依布硒啉对西氯化碳及内毒素+D-氨基半乳糖致肝损害的保护作用. 药学报,1999,34(2):99-102.
- [9] Czuczejko J, Halota W, Zachara BA, et al. Plasma selenium concentration, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities in patients with chronic liver diseases. Pbl Merkurizus Lek, 2002, 13(76):312-315.
- [10] Wang X, Yang B. Protective effects of liu tea on CCl4 injured liver and its working mechanism. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 1995, 20(12):746-748, 764.
- [11] Chrobot AM, Szaflarska-Szczepanik A, Drewa G. Antioxidant defense in children with chronic viral hepatitis B and C. Med Sci Monit, 2000, 6(4):713-718.
- [12] Mezes M, Par A, Nemeth P, et al. Studies of the blood lipid peroxide status and vitamin E levels in patients with chronic active hepatitis and alcoholic liver disease. Int J Clin Pharmacol Res, 1986, 6(4):333-338.
- [13] Hadi YM, Kacmaz M, Serda-Ozturk H, et al. Antioxidant status of erythrocytes from patients with cirrhosis. Hepatogastroenterology, 1999, 46(28):2460-2463.
- [14] Wenger FA, Kilian M, Proske JM, et al. The impact of laparoscopic biopsy of pancreatic lymph nodes on lipid peroxidation using helium and carbon dioxide in BOP-induced pancreatic cancer in hamsters. Surg Endosc, 2001, 15(10):1150-1155.
- [15] Yu SY, Zhu Y, Li WG. Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong. Biol Trace Elem Res, 56(1):117-124.
- [16] Liu D, Liu S, Huang Y, et al. Effect of selenium on human myocardial glutathione peroxidase gene expression. Chin Med J (Engl), 2000, 113(9):771-775.
- [17] Guidotti LG, McClary H, Loudis JM, et al. Nitric oxide inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. J Exp Med, 2000, 191(7):1247-1252.
- [18] Chang PW, Tsui SK, Liew C, et al. Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein. J Cell Biochem, 1997, 64(2):217-224.
- [19] 张健,成这国,王琳,等. 丙型肝炎病毒 E2 蛋白结合蛋白的酵母双杂交筛选研究. 解放军医学杂志, 2003, 28(9):766-767.
- [20] Zhao L, Cox AG, Ruzicka JA, et al. Molecular modeling and in vitro activity of an HIV-1-encoded glutathione peroxidase. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(912):6356-6361.
- [21] Taylor EW, Nadimpalli RG, Ramanathan CS. Genomic structures of viral agents in relation to the biosynthesis of selenoproteins. Biol Trace Elem Res, 1997, 56(1):63-91.
- [22] Zhang W, Ramanathan CS, Nadimpalli RG, et al. Selenium-dependent glutathione peroxidase modules encoded by RNA viruses. Biol Trace Elem Resm, 1999, 70(2):97-116.
- [23] Zhang W, Cox AG, Taylor EW. Hepatitis C virus encodes a selenium-dependent glutathione peroxidase gene. Implications for oxidative stress as a risk factor in progression to hepatocellular carcinoma. Med Klin (Munich), 1999, 94(Suppl 3):2-6.
- [24] Li K, Prow T, Lemon SM, et al. Cellular response to conditional expression of hepatitis C virus core protein in Huh7 cultured human hepatoma cells. Hepatology, 2002, 35(5):1237-1246.

收稿日期:2003-12-10