

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.27.003

乙型肝炎病毒抑制肝细胞免疫检查点 PD-1 配体基因表达的研究*

郭莲娣¹, 王丹¹, 唐子执², 曾鸣², 王小军², 刘聪², 李友伟^{3△}

(1. 西南民族大学药学院, 成都 610041; 2. 四川大学华西第二医院, 成都 610041; 3. 四川省德阳市人民医院肝胆外科 618000)

[摘要] **目的** 在细胞水平上分析乙型肝炎病毒(HBV)复制及其编码的 X 基因(HBx)表达对细胞基因表达谱的影响,特别是免疫相关基因表达水平的变化。**方法** 通过慢病毒和 pcDNA 瞬时转染过表达 HBx 基因,利用 RNA-Seq 和 RT-qPCR 等方法检测免疫相关基因的表达水平,并在 HBV 复制细胞系中进行验证。**结果** HBV 复制和 HBx 表达可以剂量依赖性抑制免疫检查点程序性死亡分子 1(PD-1)配体基因(PD-L1/CD274)的表达,而 HBx 基因的 H-box 突变体的表达失去该抑制效应。**结论** HBV/HBx 具有抑制 PD-L1/CD274 基因表达的能力,在病毒感染的急性期解除抗原特异性 T 细胞激活的检查点,活化细胞毒性 T 细胞,这可能导致 T 细胞对高度复制的细胞进行攻击和清除,帮助病毒进入较低复制状态,达到病毒-宿主的平衡状态并奠定 HBV 慢性感染的基础。

[关键词] 肝炎病毒,乙型;HBx;免疫检查点;PD-L1/CD274

[中图法分类号] R512.62

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)27-3752-03

Hepatitis B virus inhibits expression of liver cell immune checkpoint PD-1 ligand gene*

Guo Liandi¹, Wang Dan¹, Tang Zizhi², Zeng Ming², Wang Xiaojun², Liu Cong², Li Youwei^{3△}

(1. College of Pharmacy, Southwest University for Nationalities, Chengdu, Sichuan 610041, China;

2. West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China;

3. Department of Hepatobiliary Surgery, Deyang Municipal People's Hospital, Deyang, Sichuan 638000, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the impact of hepatitis B virus (HBV) replication and its coded X gene (HBx) expression on cell gene expression profile, especially the immune related gene expression level changes. **Methods** Overexpressed HBx gene was transiently transfected through lenti-virus and pcDNA3, the RNA-Seq and RT-qPCR methods were used to detect the expression levels of immune related genes, which were verified in HBV replication cell line. **Results** This study found that the HBV replication and HBx expression suppressed the expression of immune checkpoint PD-1 ligand gene (PD-L1/CD274) in a dose-dependent manner, while the expression of H-box mutant in HBx gene lost this inhibition effect. **Conclusion** HBV/HBx possesses the ability for inhibiting PD-L1/CD274 ligand gene expression, may relieve the checkpoint of antigen-specific T cell activation in viral infection acute stage, activates cytotoxic T cells, which may cause that T cell attack and clear highly replicated cells, helps virus to enter the lower replication status, and reaches the balance status between virus-host and lays a basis of HBV chronic infection.

[Key words] hepatitis B virus; HBx; immune checkpoint; PD-L1/CD274

目前,免疫治疗通过刺激机体免疫系统提高内源性抗肿瘤免疫效应,已成为治疗肿瘤的新方向。其中免疫检查点程序性死亡分子 1(programmed death 1, PD-1)和 PD-1 配体(PD-1 ligand, PD-L1/CD274)信号通路的激活有助于肿瘤免疫逃逸,对肿瘤的治疗有非常重要的临床意义^[1-4]。在乙型肝炎病毒(HBV)感染过程中,PD-L1/CD274 的基因表达及其在 HBV 免疫中的作用机制,HBV 是否利用免疫检查点干扰宿主免疫系统,还未被深入研究。HBV 的 HBx 蛋白是具有多种调控功能的病毒蛋白质,广泛参与病毒的复制、蛋白质降解等过程,在 HBV 感染及原发性肝细胞癌诱发中起关键作用^[5-6]。本研究通过探讨 HBV HBx 的基因表达对免疫检查点信号 PD-L1/CD274 基因的调节,为进一步探讨免疫检查点 PD-L1/CD274 在 HBV 感染与宿主细胞、肝脏微环境和免疫应答网络的相互作用机制打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 细胞系 293T、L02 和 T43,大肠杆菌菌种 DH5 α ,载体质粒 cDNA 及慢病毒包装系统质粒均由华西第二医院基因组稳定性实验室提供;胎牛血清购自 Invitrogen;Infusion 克隆试剂盒、T4 DNA 连接酶购自 Clontech;限制性内切酶、聚偏氟烯(PVDF)膜及转染试剂购自 Fugene;ECL 发光底物购自 Millipore;质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒和总 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen;引物合成及测序由上海生工生物工程有限公司完成;RNA 反转录使用 Promega-A3500 反转录酶试剂盒;荧光定量聚合酶链反应(PCR)使用 Promega Go Taq[®] qPCR Master Mix 试剂盒完成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 293T、L02 和 T43 细胞为贴壁生长细胞,将其置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中,用含 10%胎牛血清和 1%

* 基金项目:四川省科技厅科技支撑项目(2017FZ0034);四川省卫生和计划生育委员会基金资助项目(16PJ144);国家级大学生创新创业训练计划项目(201610656073)。 作者简介:郭莲娣(1974—),博士,讲师,主要从事中药抗 DNA 损伤作用的研究。 △ 通信作者,E-mail:1031572133@qq.com。

青霉素/链霉素的 RPMI-1640 培养液培养, 定期更换培养液。待细胞贴壁生长至 90% 汇合度时, 弃上清液后加入 0.25% 胰蛋白酶/乙二胺四乙酸细胞消化液进行细胞传代。

1.2.2 分子克隆 通过 NCBI 查找 HBx 的 DNA 序列, 基因号为: DQ629997.1, 合成其 DNA 片段并作为模板, 设计带有酶切位点的上、下游引物: 5'-GTA CGA ATT CAT GGC TGC TCG GAT GTG CTG-3'; 5'-GAT CGG ATC CTT ACG CAG AGG TGA AAA AGT TG-3', PCR 扩增出对应的 DNA 片段后纯化回收, 对 DNA 片段和载体 pLVX-IRES-ZsGreen1 或 pcDNA3.1 进行双酶切(EcoR I; BamH I), 通过 T4 DNA 连接酶连接 DNA 片段和载体, 连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α , 在含有氨苄青霉素的平板上筛选阳性克隆并鉴定测序, 得到重组的 pLV-HBx 或 pcDNA3-HBx 载体。

1.2.3 慢病毒包装 将对数生长期的 293T 细胞用胰蛋白酶消化, 以 2.5 $\times 10^6$ 密度接种于 10 cm 培养皿, 直至细胞汇合度达 60%~70% 时开始转染。将慢病毒包装系统中的 3 种质粒 DNA 溶液(pLV-HBx 10 μ g, psPAX2 7.5 μ g, pMD2.G 6 μ g) 用适量无血清培养基 Opti-MEM 稀释, 随后加入 60 μ L Roche X-treme GENE HP 轻柔混匀, 室温孵育 20 min 以形成转染复合物, 然后将上述复合物加到细胞培养皿中, 轻轻混匀, 培养 6~10 h 后更换为完全培养基。转染 48 h 后于倒置荧光显微镜下观察 GFP 的表达, 转染效率应达到 90% 以上; 分别于 48 h 和 72 h 收集病毒上清液, 再以直径为 0.45 μ m 的滤器过滤后, 分装贮存待用。

1.2.4 基因表达谱(RNA-Seq)测定与分析 感染 pLV-HBx 或 pLV-EGFP 病毒的 L02 细胞经总 RNA 提取、mRNA 富集和建立 cDNA 文库等步骤, 进行 Illumina-HiSeq 测序。获得原始测序序列后, 利用 HTSeq、DEGSeq 和 KOBAS 等软件进行参考序列比对、基因表达水平、基因差异表达、转录因子和 GO/KEGG 等生物信息学分析。

1.2.5 mRNA 提取 将所孵育的 3.5 cm² 细胞板中加入 1 mL Trizol, 冰上放置 5 min 后用枪头吹打, 使核酸蛋白复合物完全分离。加入 0.2 mL 氯仿振荡 15 s, 静置并离心; 小心吸取离心后上层无色液体(RNA 层)移入 Qiagen RNA 提取试剂盒的吸附柱, 经过吸附和洗脱等过程, 用 50 μ L 的 DEPC 水溶解并离心得到 RNA。-70 $^{\circ}$ C 冰箱保存。紫外分光光度计测定细胞 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度值(A), 计算 RNA 的含量和纯度。

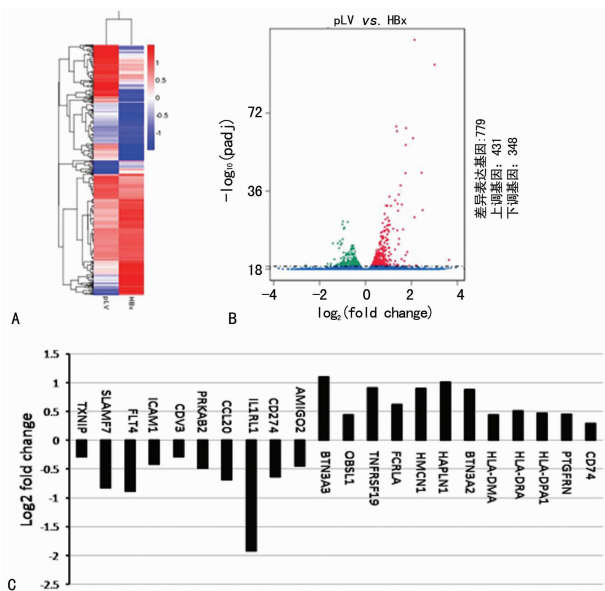
1.2.6 半定量及荧光定量 RT-PCR 2 μ g RNA 与反转录引物 oligdT 混匀, 70 $^{\circ}$ C 加热 5 min 后立即冰浴 5~10 min。根据 Qiagen 试剂盒说明书, 在反应体系中加入反转录酶及 RNA 酶抑制剂各 1 μ L, dNTP (10 mmol/L) 1.5 μ L, MgCl₂ 1.5 μ L, 5 \times 缓冲液 5 μ L, DEPC 水补足总体积至 25 μ L, 进行体外反转录反应得到 cDNA 产物。荧光定量 PCR 反应体系为 cDNA 模板 1 μ L, 扩增引物(10 mmol/L)各 1 μ L, 2 \times 缓冲液 10 μ L, DEPC 水补足体积至 20 μ L。每个样本平行重复 3 个定量 PCR 反应。cDNA 的半定量检测使用 TIANGEN 2 \times Taq PCR Master Mix 试剂盒进行 PCR 扩增, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测反应产物。所有半定量及定量 PCR 均选用 β -actin 基因片段为内参。反应中涉及引物 β -actin: 正向引物 5'-CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT-3', 反向引物 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'; HBx: 正向引物 5'-ATG GCT GCT CGG TTG TGC

TG-3', 反向引物 5'-TTA GGC AGA GGT GAA AAA GT-3'; PD-L1: 正向引物 5'-CTG TCT TTA TAT TCA TGA C-3', 反向引物 5'-AAA GCT TCT CCT CTC TCT TG-3'。

1.2.7 蛋白免疫印迹(Western blot) 细胞被 PBS 清洗 2 次后, 加入 RIPA 细胞裂解液在冰上裂解 30 min 后, 4 $^{\circ}$ C 14 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液并采用 BCA 法测定蛋白浓度, 然后将适量细胞总蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳进行分离, 并将蛋白转移至 PVDF 膜上, 电转后的膜在含 5% BSA 的封闭液中室温封闭 1 h。使用 PD-L1/CD274 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBST 清洗 3 次, 然后使用 HRP 标记的二抗稀释液室温孵育 1.5 h, PBST 洗 3 次。最后采用 ECL 发光试剂盒检测, 经凝胶分析系统曝光, 分析并存储图片。

2 结 果

2.1 HBx 基因干扰 L02 细胞中免疫相关基因的表达 HBx 克隆于 pLV 慢病毒载体, 经 293T 细胞包装的慢病毒感染正常肝细胞系(L02), 48 h 后收集细胞并提取 mRNA, 对全基因组表达谱进行定量检测, 并与表达 EGFP 的空病毒感染组进行, 分析比对基因表达的变化。HBx 表达总共造成 L02 基因表达谱中 779 个基因表达的改变, 其中包括上调基因 431 个, 下调 348 个(图 1A、1B)。笔者发现有 22 个免疫相关基因的表达水平受 HBx 表达的影响而呈现上调或下调(图 1C)。



A: RNAseq 检测出 HBx 诱导 L02 细胞基因表达谱变化的差异基因热图。红色表示高表达基因, 蓝色表示低表达基因。B: HBx 导致的差异基因火山图。C: HBx 导致的 22 个免疫相关基因表达的改变柱状图, 包括 PD-L1/CD274, HLA 家族和 TNF 信号通路等

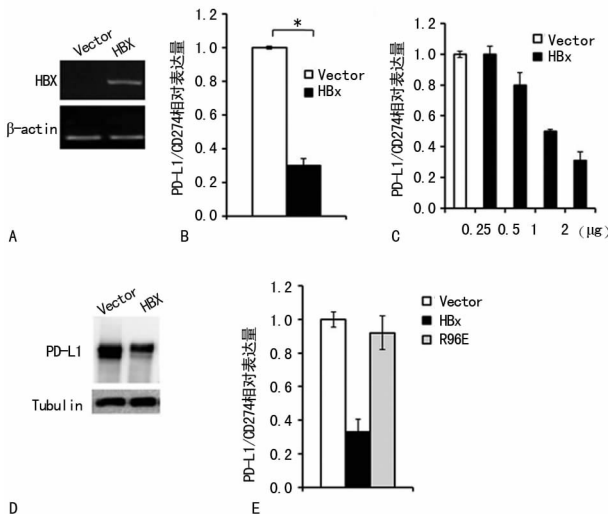
图 1 HBx 在肝细胞系中表达造成基因表达谱的改变

2.2 HBx 基因诱导 PD-1/CD274 的基因表达 由于免疫检查点基因 PD-1 及其配体在细胞毒免疫中的重要性, 本研究选择基因表达受 HBx 影响的 PD-L1/CD274 基因进一步研究。HBx 基因被克隆到 pcDNA3-HA 载体上, 经转染 48 h 后在 L02 细胞中表达(图 2A)。提取细胞 mRNA 后进行 RT-qPCR 定量检测 PD-L1/CD274 的基因表达水平, 发现 PD-L1/CD274 基因的表达量相对于 pcDNA 空载体的细胞显著降低, 且差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 2B); 当 pcDNA-HBx 转染剂量增加, PD-L1/CD274 表达则进一步受到抑制, 表现出剂量依赖效

应(图 2C)。Western blot 实验也说明 HBx 基因表达会让 PD-L1/CD274 基因的表达受到抑制(图 2D)。当 L02 细胞过表达 H-box 突变的 HBx 基因(R96E)时,PD-L1/CD274 的基因表达则不受 HBx 的影响,说明 HBx 对该基因表达的干扰依赖于 H-box 氨基酸基序的功能(图 2E)。

2.3 PD-L1/CD274 的基因表达在 HBV 复制细胞中被抑制

由于慢病毒和 pcDNA3 表达的 HBx 水平远远高于 HBV 感染或 HBV 阳性肝癌的 HBx 水平,本研究进一步采用整合了 HBV 基因组,并有 HBV 病毒活跃复制,同时 HBx 基因表达量又相对较低的 T43 细胞为研究体系^[7]。T43 细胞及其未整合 HBV 基因组的源细胞系 L02 的 mRNA 抽提后进行 RT-qPCR 定量。笔者发现,T43 细胞中的 PD-L1/CD274 基因表达水平显著低于 L02 细胞(图 3A),说明 HBV 复制过程中表达的低水平 HBx 也能够抑制 PD-L1/CD274 基因的表达,造成免疫耐受环境的抑制。该结果也在 HepG2. 2. 15 细胞中得以重复(图 3B)。当笔者用 3TC 降低 T43 细胞的 HBV 复制,却不影响 HBx 表达的情况下,发现 PD-L1/CD274 基因表达不受影响,说明该基因表达的抑制依赖于 HBx 的水平,却不依赖 HBV 的病毒复制水平(图 3C)。



A: RT-PCR 检测 L02 细胞转染 pcDNA3-HBx 质粒后,HBx 的表达情况;以 β -actin 的 PCR 产物为 PCR 反应内参。B: L02 细胞中表达 pcDNA3-HBx 后,荧光定量 RT-PCR 检测 PD-L1/CD274 的表达情况;Vector 表示空载体。C: L02 细胞转染不同剂量的 pcDNA3-HBx 后检测 PD-L1/CD274 的表达水平。D: L02 细胞表达 HBx 后用 Western blot 检测 PD-L1/CD274 的蛋白水平。E: 荧光定量 RT-PCR 检测野生型和带有 R96E 突变的 HBx 对 PD-L1/CD274 基因表达的影响

图 2 HBx 抑制 PD-L1/CD274 的基因表达

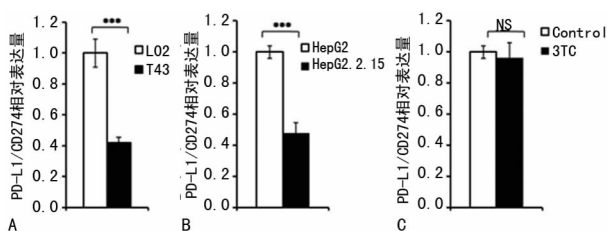


图 3 HBV 复制细胞中 PD-L1/CD274 的基因表达

3 讨论

HBV 编码的 X 基因具有表观遗传调控的能力,对病毒复制和基因表达(包括 HBx 自身的表达)提供正反馈信号,且在

病毒感染的转归和肝硬化、肝癌发生的过程中均发挥重要作用^[8]。HBx 调控病毒/宿主细胞基因表达的能力取决于其羧基端的 H-box 氨基酸基序,该基序可以通过劫持泛素化酶 CRL4,破坏染色质黏连蛋白 SMC5/6 调控染色质构象和基因表达。在 H-box 功能丧失的情况下,HBx 也会丧失调控病毒基因表达和干扰宿主表观遗传的能力^[9-10]。

本研究通过 RNA-Seq 技术发现 HBV 感染导致一系列宿主细胞基因表达的改变,其中包括免疫调节基因的增高或降低。其中,本课题组重点研究了在 HBx 表达和 HBV 复制的细胞中,PD-L1/CD274 基因的抑制机制。这些实验表明,HBx 是通过 H-box 基序和 CRL4 泛素化酶实现对 PD-L1/CD274 基因表达的抑制。进一步研究有助于解析 HBx-CRL4 的表观遗传调控网络如何抑制 PD-L1/CD274 的基因表达和解除肝细胞的免疫抑制微环境。本研究发现 HBx 对 PD-L1/CD274 基因表达的抑制表现出剂量依赖效应,由于 HBV 高度复制的细胞需要更多的 HBx 协调,该结果提示有病毒活跃复制的细胞较容易失去 PD-L1/CD274 的表达,亦容易遭受细胞毒性 T 细胞的攻击。同时,在 HBV 编码的 DNA 多聚酶受到药物抑制,HBx 水平不受影响的情况下,HBV 对 PD-L1/CD274 基因表达的抑制则不受影响。

肝脏的对外来抗原具有特殊的耐受机制,可以保护自身免于免疫系统的攻击,同时也不利于肝内病毒的清除,导致病毒长期感染。造成肝脏免疫耐受的机制之一是 B7 家族的协同刺激分子在肝脏的表达,特别是 PD-L1/CD274。不同于 B7 家族的其他成员,PD-L1/CD274 的表达不仅限于抗原递呈和淋巴细胞表面,在包括肝脏在内的多种外周及肿瘤组织中也有表达^[11]。此外,肝细胞表面不仅可以组成性地表达 PD-L1/CD274 蛋白,且受干扰素($\text{INF-}\gamma$)的诱导^[12];因此,肝脏的免疫耐受微环境有助于保护并容纳 HBV 的长期慢性感染。本实验结果则证明,病毒感染本身可以依赖 HBx 基因,对 PD-L1/CD274 的基因表达进行抑制,减低肝细胞表面呈现的免疫检查点信号,有利于 CD8^+ 细胞对病毒的识别,并在早期实现对病毒的清除。

然而,HBV 抑制 PD-L1/CD274 基因表达减低的程度依赖于 HBx 的剂量,即 HBx 表达量越高,PD-L1/CD274 表达受到抑制的程度越高。由于 HBx 本身的表达量与病毒复制密切相关,因此,这种剂量依赖效应提示 HBV 复制过度剧烈的肝细胞将较大程度地出现 PD-L1/CD274 表达降低,从而首先受到 CD8^+ 细胞的攻击;而病毒复制较为温和的细胞则继续依靠免疫耐受机制逃避 CD8^+ 细胞的攻击。从 HBV 急性感染到慢性化的发病过程来看,这种病毒复制/免疫耐受的负反馈机制可以帮助病毒实现与宿主免疫系统的平衡状态,有利于病毒进入慢性感染状态。此外,急性期或爆发性肝炎造成的大面积肝损伤亦可能与大量病毒复制解除免疫抑制/耐受的检查点有关。

总之,本研究发现 HBV 通过 HBx 的表观遗传调控功能抑制宿主细胞免疫检查点 PD-L1/CD274 的基因表达,可以部分和局部解除肝脏的免疫抑制微环境,有助于清除病毒复制过剩的肝细胞,以达到病毒复制和宿主免疫之间的平衡,帮助病毒进入慢性感染阶段。

参考文献

[1] Swaika A, Hammond WA, Joseph RW. (下转第 3758 页)

- changes in cardio-metabolic parameters in metabolically healthy obese subjects: a systematic review with Meta-Analysis[J]. *Nutrients*, 2016, 8(8):455.
- [5] Wu Y, Wu T, Wu J, et al. Chronic inflammation exacerbates glucose metabolism disorders in C57BL/6J mice fed with high-fat diet[J]. *J Endocrinol*, 2013, 219(3):195-204.
- [6] Beejmohun V, Mignon C, Mazollier A, et al. Cashew apple extract inhibition of fat storage and insulin resistance in the diet-induced obesity mouse model[J]. *J Nutr Sci*, 2015, 4(1):e38.
- [7] Zheng J, Chen T, Zhu Y, et al. Liraglutide prevents fast weight gain and β -cell dysfunction in male catch-up growth rats[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2015, 240(9):1165-1176.
- [8] Hirata T, Kawai T, Hirose H, et al. Palmitic acid-rich diet suppresses glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) and induces endoplasmic reticulum (ER) stress in pancreatic islets in mice[J]. *Endocr Res*, 2016, 41(1):8-15.
- [9] Cerf E. High fat programming of beta cell compensation, exhaustion, death and dysfunction[J]. *Pediatr Diabetes*, 2015, 16(2):71-78.
- [10] Brewer W. Regulatory crosstalk within the mammalian unfolded protein response[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(6):1067-1079.
- [11] Kim J, Lee J, Kang S, et al. Ionizing radiation activates PERK/eIF2 α /ATF4 signaling via ER stress-independent pathway in human vascular endothelial cells[J]. *Int J Radiat Biol*, 2014, 90(4):306-312.
- [12] Qin J, Fang N, Lou J, et al. TRB3 is involved in free fatty acid-induced INS-1-derived cell apoptosis via the protein kinase C δ pathway[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e96089.
- [13] Zhu Q, Zhong J, Jin F, et al. Tauroursodeoxycholate, a chemical chaperone, prevents palmitate-induced apoptosis in pancreatic β -cells by reducing ER stress[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2013, 121(1):43-47.
- [14] Moffett C, Patterson S, Irwin N, et al. Positive effects of GLP-1 receptor activation with liraglutide on pancreatic islet morphology and metabolic control in C57BL/KsJ db/db mice with degenerative diabetes [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2015, 31(3):248-255.
- [15] Prudente S, Trischitta V. The TRIB3 Q84R polymorphism, insulin resistance and related metabolic alterations [J]. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43(5):1108-1111.
- [16] Marso P, Daniels H, Brown-Frandsen K, et al. Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(4):311-322.
- [17] Zhang L, Zhang M, Zhang Y, et al. Efficacy and safety of dulaglutide in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis and systematic review[J]. *Sci Rep*, 2016(6):18904.
- [18] Díaz-Soto G, De Luis DA, Conde-Vicente R, et al. Beneficial effects of liraglutide on adipocytokines, insulin sensitivity parameters and cardiovascular risk biomarkers in patients with type 2 diabetes: a prospective study[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 104(1):92-96.

(收稿日期:2016-11-19 修回日期:2017-04-07)

(上接第 3754 页)

- Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy[J]. *Mol Immunol*, 2015, 67(2):4-17.
- [2] 赵飞龙, 麦海星, 李学超, 等. PD-1/PD-L1 信号通路在免疫细胞中的作用及其阻断抗体在肿瘤治疗中的应用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015(5):701-703.
- [3] Gibson A, Ogese M, Sullivan A, et al. Negative regulation by PD-L1 during drug-specific priming of IL-22-secreting T cells and the influence of PD-1 on effector T cell function[J]. *J Immunol*, 2014, 192(6):2611-2621.
- [4] Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(26):2455-2465.
- [5] Bouchard MJ, Schneider RJ. The enigmatic X gene of hepatitis B virus[J]. *J Virol*, 2004, 78(23):12725-12734.
- [6] Tang H, Oishi N, Kaneko S, et al. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein[J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(10):977-983.
- [7] Guo L, Wang X, Ren L, et al. HBx affects CUL4-DDB1 function in both positive and negative manners[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(4):1492-1497.
- [8] Feitelson MA, Duan LX. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 1997(150):1141-1157.
- [9] Li T, Robert EI, van Breugel PC, et al. A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery [J]. *Nat Struct Mol Biol* 2010, 17(2):105-111.
- [10] Angers S, Li T, Yi X, et al. Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery [J]. *Nature*, 2006, 443(7111):590-593.
- [11] Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition immune responses[J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20(1):29-53.
- [12] Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, et al. IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome[J]. *J Clin Invest*, 2012(122):529-537.

(收稿日期:2016-11-28 修回日期:2017-05-06)