DOI:10.16016/j.1000-5404.202011188

HBx 介导 SAMHD1 降解并通过 Akt/p27 通路促进肝癌细胞增殖的机制研究

郑小川,皮思蝶,胡 源 400016 重庆,重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室

[摘要] **目的** 研究 HBx 蛋白调控 SAMHD1 降解,促进肝癌细胞增殖的机制。**方法** 收集肝癌患者的肿瘤组织及癌旁组织,通过 Western blot 检测肝癌组织与相应癌旁组织中 SAMHD1 的表达;通过 CRISP/Cas9 基因技术构建敲除 SAMHD1 的稳定细胞系,检测 SAMHD1 敲除后,HBV 稳定肝癌细胞系 HepAD38 细胞增殖和细胞周期的变化,通过 Western blot 检测相关周期蛋白表达的变化和 Akt/p27 通路的影响。检测 HBx 蛋白过表达对 SAMHD1 转录和蛋白水平的影响,通过放线菌酮和 MG132 处理,以及免疫共沉淀手段,进一步探索 HBx 调控 SAMHD1 蛋白降解的分子机制。**结果** ①研究发现 SAMHD1 在肝癌组织的表达量低于癌旁组织($P<0.01$)。②成功构建稳定敲除 SAMHD1 的肝癌细胞 HepAD38,MTT 实验表明稳定敲除 SAMHD1 的细胞组较对照组增殖加快($P<0.01$)。流式细胞术结果表明敲除 SAMHD1 的稳定细胞组与对照组相比细胞周期发生改变,敲除组 G_2/M 期细胞数(28.16±0.36)较对照组(22.52±0.56)升高($P<0.01$)。③Western blot 检测表明敲除 SAMHD1 的稳定细胞系与对照组细胞相比细胞周期蛋白表达量发生了改变,实验组细胞 p27 蛋白表达水平减弱,p-Akt 蛋白表达水平提高。④Huh7.0 细胞中过表达 HBx 后,SAMHD1 蛋白表达减弱。⑤免疫共沉淀结果表明 HBx 与 SAMHD1 相互结合;放线菌酮及泛素化 IP 实验表明 HBx 引起 SAMHD1 蛋白衰减时间提前,并使 SAMHD1 的泛素化程度加强。**结论** HBx 与 SAMHD1 相互作用,通过调控 SAMHD1 泛素化修饰降解 SAMHD1,从而影响 Akt/p27 通路调控细胞周期,促进肝癌细胞增殖。

[关键词] HBV;HCC;SAMHD1;p27;细胞周期
[中图法分类号] R373.21; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

Mechanism of hepatitis B virus X mediating SAMHD1 degradation to promote proliferation of hepatoma cells through AKT/p27 pathway

ZHENG Xiaochuan, PI Sidie, HU Yuan Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the molecular mechanism of hepatitis B virus X (HBx) regulating the degradation of SAMHD1 and promoting the proliferation of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods** The SAMHD1 expression in hepatoma and para-cancerous tissues collected from 15 HCC patients was detected by Western blotting. A stable hepatocellular carcinoma cell line of HepAD38 with SAMHD1 knockout was constructed using CRISP9/Cas9 technology, and the effects of SAMHD1 knockout on the change of proliferation and cell cycle were measured by MTT assay and flow cytometry, respectively, and its effects on related cyclin expression and Akt/p27 pathway were also detected by Western blotting. The impacts of HBx protein overexpression on the mRNA and protein expression of SAMHD1 were subsequently examined. In addition, the molecular mechanism of HBx regulating the degradation of SAMHD1 was further investigated through ubiquitin-proteasome pathway using cycloheximide (CHX) and MG132 treatment along with immunoprecipitation (IP) analysis. **Results** ①The expression of SAMHD1 was significantly lower in liver cancer tissues than the para-cancerous tissues ($P<0.01$). ②A stable SAMHD1 knockout cell line

[基金项目] 重庆市渝中区科技项目(20200122)
[通信作者] 胡 源, E-mail: biotottyhy@hotmail.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

HepAD38 (KO-SAMHD1) was successfully constructed, and MTT assay showed that the KO-SAMHD1 group had obviously faster cell proliferation ($P<0.01$), and flow cytometry indicated the group had larger amounts of cells arrested in G_2/M phase [(28.16±0.36)% *vs* (22.52±0.56)%, $P<0.01$] when compared with the control group. ③Western blot analysis indicated that the expression of related cyclins was changed in the KO-SAMHD1 group when compared with the control group, including the expression of p27 protein decreased and p-Akt protein increased. ④*In vitro* cell experiments showed that HBx overexpression induced decreased expression of SAMHD1 in Huh7.0 cells. ⑤The results of immunoprecipitation suggested that HBx were combined and interacted with SAMHD1. CHX and ubiquitination IP assay indicated an earlier decay time of SAMHD1 protein and enhanced ubiquitination of SAMHD1 induced by HBx. **Conclusion** HBx interacts with SAMHD1 and degrades it by regulating its ubiquitination, and thereby affects the Akt/p27 pathway to modulate the cell cycle and promote the proliferation of HCC cells.

[**Key words**] HBV; hepatocellular carcinoma; SAMHD1; p27; cell cycle

Supported by the Project of Science and Technology Plan of Yuzhong District, Chongqing (20200122). Corresponding author: HU Yuan, E-mail: biotottyhy@hotmail.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤之一[1]。HBV 感染能导致急性、慢性感染,同时也是肝细胞癌发生的一个重要危险因素[2-3]。HBV 是一种部分双链的环状 DNA 病毒,能编码 4 种重要的病毒蛋白:HBV 聚合酶、包膜蛋白、核心蛋白和 HBV X(HBx)蛋白。目前大量的研究表明:HBx 蛋白在病毒感染和 HCC 发生中发挥着重要的调控作用[4-5],但目前 HBx 诱导 HCC 发展的机制还尚不明确。

SAMHD1 是细胞内一种重要的 dNTP 三磷酸水解酶,能调控体内 dNTP 的水平[6]。目前报道 SAMHD1 能抑制多种病毒(如 HIV 和 HBV)的复制[7-8]。同时,SAMHD1 在肺癌中表达下调[9],在急性髓细胞白血病中能抑制细胞增殖[10-11],提示 SAMHD1 是一种潜在的抗癌因子。我们前期研究表明 SAMHD1 能够抑制肝癌细胞 Huh7.0 的增殖[12],但具体的分子机制尚不明确。

本研究中,我们初步揭示了 SAMHD1 在 HBV 诱导的 HCC 组织样本中表达明显下调,HBx 蛋白通过泛素化途径介导 SAMHD1 的降解,SAMHD1 下调后能通过影响 p27 的功能促进肝癌细胞增殖,为治疗 HCC 提供了潜在靶点。

1 材料和方法

1.1 HBV 感染的肿瘤组织样本

本研究严格遵循医学伦理原则并经重庆医科大学附属第二医院伦理委员会授权和监督(审批号:2012124)。以 HBV 表面抗原阳性、排除 HIV 和 HCV 等其他病毒感染的肝癌组织及其癌旁正常组织 15 例作为研究对象。其中男性 13 例,女性 2 例,年龄 23~71 岁,平均 46 岁。肿瘤组织离体之后置于低温液氮罐长期保存。

1.2 细胞培养,试剂和质粒

人胚胎肾 HEK293T 细胞、人肝癌 Huh7 细胞和 HepAD38 细胞培养方式如前所述[12]。HepAD38 是 HepG2.0 同源的稳定 HBV 复制细胞系。细胞转染按照 Lipofectamine 3000(Invitrogen, California, USA)的说明进行。

SAMHD1 表达质粒由 Sino Biological 公司(北京,中国)构建。pCMV-myc-ubiquitin 和 pCMV-Flag-HBx 由重庆医科大学唐霓教授馈赠,HBx 缺失突变体由基于 PCR 的突变技术构建(引物见表 1)。

表 1 HBx 突变引物设计

引物	序列(5′→3′)
HBxR96E FP	CCCAAGGTCTTACATAAGGAGACTCTTGGACTCTCAGC
HBxR96E RP	GCTGAGAGTCCAAGAGTCTCCTTATGTAAGACCTTGGG
HBx△2-51 FP	TCCGCGGAGATCTAAGCTTACCATGCACCTCTCTTTACGCGGACTCCCCG
HBx△2-51 RP	CGGGGAGTCCGCGTAAAGAGAGGTGCATGGTAAGCTTAGATCTCCGCGGA
HBx△52-80 FP	CGTTCCGACCGACCACGGGGCGACCACCGTGAACGCCCACCA
HBx△52-80 RP	TGGTGGGCGTTCACGGTGGTCGCCCCGTGGTCGGTCGGAACG
HBx△80-129 FP	GCTTCACCTCTGCACGTCGCATGGAGAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGG
HBx△80-129 RP	CCTACAGCCTCCTAGTACAAAGACCTTCTCCATGCGACGTGCAGAGGTGAAGC
HBx△130-154 FP	TGGGGGAGGAGATTAGGTTACCTGCAGGCGATTACAAGGA
HBx△130-154 RP	TCCTTGTAATCGCCTGCAGGTAACCTAATCTCCTCCCCCA

1.3 KO-SAMHD1 HepAD38 稳定细胞系构建

SAMHD1 基因的向导 RNA(gRNAs)序列由 E-CRISP 工具(http://www.e-crisp.org/E-CRISP/)设计。将克隆的 gRNA 和辅助载体(psPAX2 和 pMD2.G)与 lenti-CRISPRv2 质粒共转染 HEK293T 细胞。48 h 后,加入 PEG8000 对慢病毒上清进行浓缩。将包装的慢病毒感染 HepAD38 细胞,用嘌呤霉素筛选得到 KO-SAMHD1 单克隆 HepAD38 细胞。

1.4 免疫共沉淀和 Western blot

采取免疫共沉淀(co-IP)检测蛋白之间相互作用。具体步骤如下:细胞共转染 HA-SAMHD1 和 Flag-HBx 表达质粒,两天后使用 RIPA 裂解液裂解细胞获得总蛋白,细胞总蛋白封闭后与标签抗体 4 ℃结合过夜,第二天加入磁珠与混有抗体的蛋白 4 ℃结合 1 h,离心后用 2×loading 溶解磁珠上结合的蛋白,并采用 Western blot 检测蛋白表达。使用的抗体如下:anti-HA(Cat. No. 26183, Thermo, Massachusetts, USA), anti-Flag (Cat. No. MA1-91878, Thermo, Massachusetts, USA), anti-SAMHD1 (Cat. No. BS91202, Bioworld), anti-Actin (Cat. No. AA128, Beyotime, Beijing, China), anti-p21 (Cat. No. WL0362, Wanlei, China), anti-p27 (Cat. No. 3686T, CST, USA), anti-CDK2 (Cat. No. 2546S, CST, USA), anti-p-CDK2 (Cat. No. 2561S, CST, USA), anti-CDK6 (Cat. No. BS0568R, Bioss, China), anti-CyclinE1 (Cat. No. 4129S, CST, USA), anti-Akt (Cat. No. A0531, Bimike, China) and anti-p-Akt (Cat. No. A0530, Bimike, China)。

1.5 蛋白半衰期和泛素化程度检测

SAMHD1 半衰期检测:Huh7.0 细胞分别用 Flag-HBx 和空质粒转染,转染后按图中所示的不同时间放线菌酮处理,并进行 Western blot 检测 SAMHD1 表达。SAMHD1 泛素化检测:HEK293T 细胞共转染 Flag-HBx、HA-SAMHD1 和 Myc-ubiquitin 质粒,经蛋白酶体抑制剂 MG132 处理后,收集细胞进行 Co-IP 和 Western blot 分析。

1.6 细胞增殖实验

细胞转移至 96 孔板,MTS 法测定细胞增殖。在 4 天内按照 MTS 的说明书每 24 h 测量一次吸光度,每组重复 10 次。

1.7 反转录 PCR(RT-PCR)

使用 TRIzol 试剂提取总 RNA。按照试剂的说明书进行操作,用 Prime-Script RT 试剂盒(Cat No. 210808)进行反转录获取 cDNA,用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法检测并计算靶基因的相对水平。目的基因引物序列如前所述[12]。

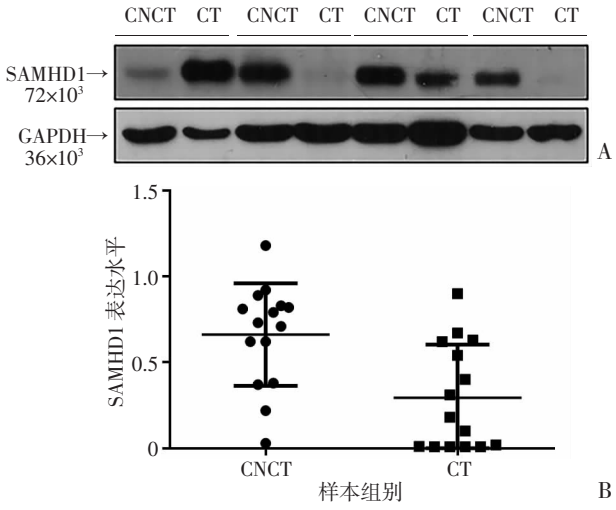
1.8 统计分析

用 GraphPad Prism 5 进行统计分析,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 t 检验比较两组的统计相关性或单因素方差分析,在比较 3 个以上组时采用方差分析。

2 结果

2.1 在 HBV 诱导的 HCC 肿瘤组织中检测 SAMHD1 的表达

通过 Western blot 比较 15 对配对的 HBV 诱导 HCC 样本中 SAMHD1 蛋白水平的表达情况。结果显示,与配对的癌旁组织相比,肿瘤组织中 SAMHD1 表达明显下调,样本下调比例为 86.7%(13/15),差异有统计学意义($P<0.01$,图 1)。

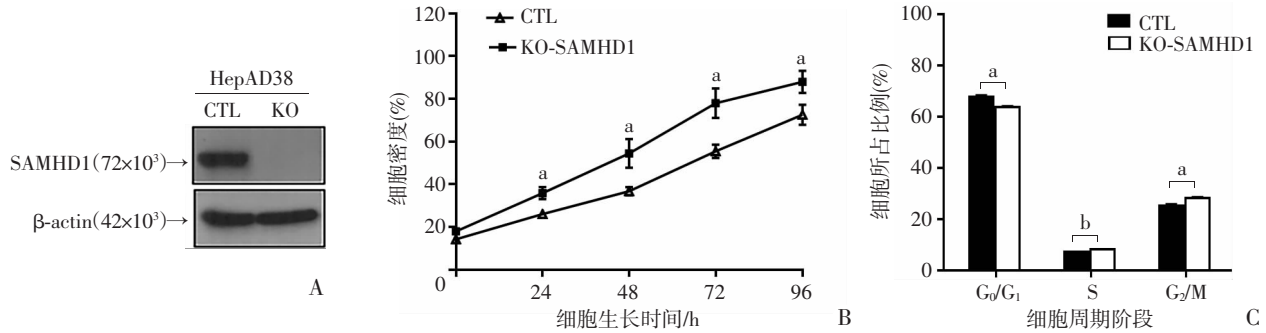


CT:肿瘤组织;CNCT:癌旁组织;a:$P<0.01$,与 CNCT 组比较

图 1 SAMHD1 在 HBV 感染的 HCC 样本中表达的变化

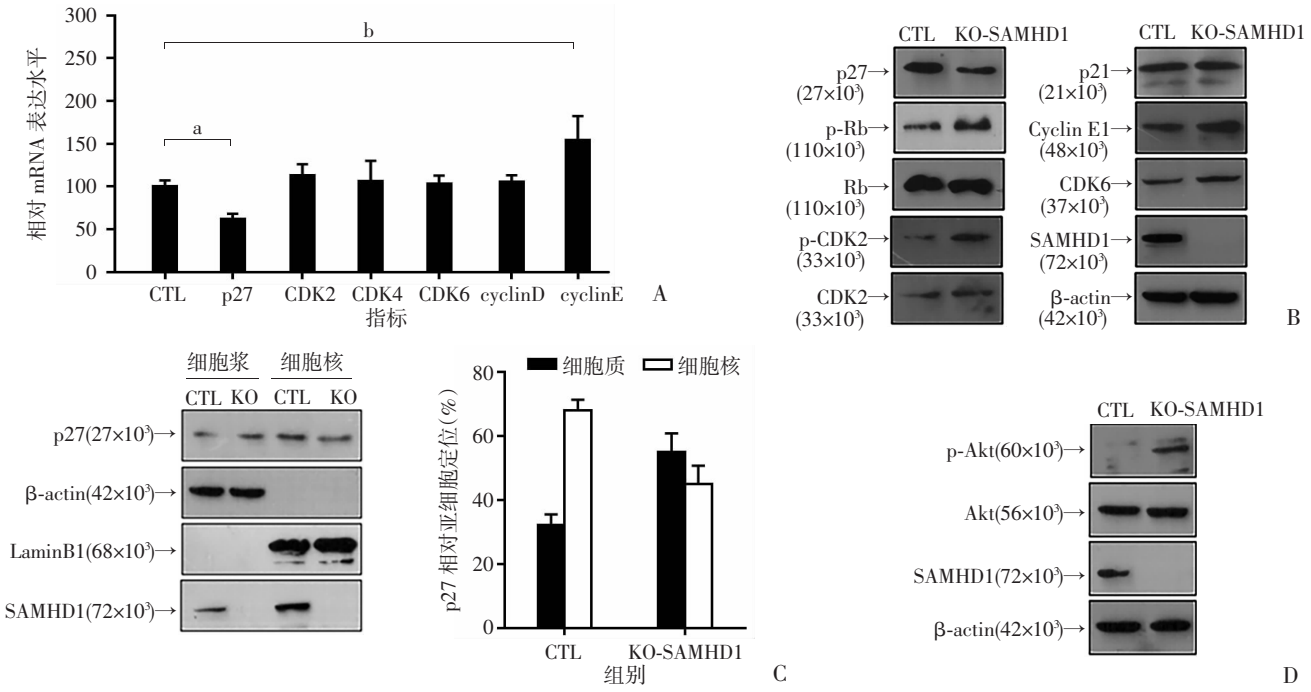
2.2 在 HepAD38 细胞中敲除 SAMHD1 促进细胞增殖

本研究利用 CRISP/Cas9 技术在 HepAD38 细胞中(HBV 稳定复制细胞)构建稳定敲除 SAMHD1 的细胞系。将靶向 SAMHD1 外显子 4 区的 gRNA(single guide RNAs, gRNA)克隆到慢病毒载体中,转导到 HepAD38 细胞中。经嘌呤霉素筛选后,对稳定敲除 SAMHD1 HepAD38 细胞进行 Western blot 检测,结果成功构建稳定敲除 SAMHD1 的 HepAD38 细胞系(图 2A)。细胞增殖 MTT 检测结果显示,敲除 SAMHD1 的 HepAD38 细胞增殖速度加快(图 2B,$P<0.01$)。接下来进一步探索了 SAMHD1 影响细胞增殖是否与调控细胞周期相关。结果如图 2C 所示,敲除 SAMHD1 显著降低 G_1/G_0 期细胞数($P<0.01$),同时 S 期细胞数目升高($P<0.05$)。这些结果表明 SAMHD1 通过控制细胞周期抑制肝癌细胞增殖。



A: Western blot 验证 HepAD38 细胞 KO-SAMHD1 的效率; B: MTT 法检测 KO-SAMHD1 对肝癌细胞 HepAD38 增殖的作用 a:$P<0.01$,与 CTL 组比较;C:流式细胞术检测 KO-SAMHD1 后细胞周期的分布变化 a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 CTL 组比较

图 2 SAMHD1 在细胞增殖和细胞周期中的作用 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



A、B: KO-SAMHD1 HepAD38 中 CDKs、cyclins 和 CKI 的转录和蛋白水平的变化($n=3$, $\bar{x}\pm s$);a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 CTL 组比较; C: 敲除 SAMHD1 对 p27 胞内分布的影响; D: KO-SAMHD1 的 HepAD38 细胞 Akt 和磷酸化 Akt 蛋白的表达情况

图 3 SAMHD1 对细胞周期调控蛋白及 p27 的分布的影响

2.3 在 HepAD38 细胞中敲除 SAMHD1 调控 p27 功能

本研究分析了 HepAD38 细胞周期相关蛋白的表达,包括细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)、细胞周期蛋白(cyclin)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(CKIs)。如图 3A 所示,RT-qPCR 结果显示敲除 SAMHD1 后,p27 的 mRNA 水平显著下调($P<0.01$),而 cyclin E1 的 mRNA 水平小幅上调($P<0.05$)。CDK2、CDK6 和 cyclin D 表达无影响变化。Western blot 证实在 SAMHD1-KO HepAD38 细胞中,p27 蛋白表达下调,cyclin E1 表达上调(图 3B)。同时在 SAMHD1-KO HepAD38 细胞中 Rb 的磷酸化增强。这些结果提示敲除 SAMHD1 主要是通过降低 p27 水平和增加 cyclin E 的表达,从而增强 Rb 蛋白的磷酸化来阻滞细胞周期停滞在 G_1 期间。由于 p27 功能抑制 CDK 活性受两种不同机制调控,包括转录水平和蛋白水平表达,以及亚细胞易位,因此本研究探索了 SAMHD1 是否调控 p27 蛋白的细胞转位。如图 3C 所示,敲除 SAMHD1 后,p27 细胞质定位略有增加(从 32% 到 55%)。此外,由于 Akt 的磷酸化与 p27 的功能相关,我们检测了 Akt 的磷酸化情况。结果表明,在 SAMHD1- KO HepAD38 细胞中 Akt 的磷酸化增强(图 3D)。

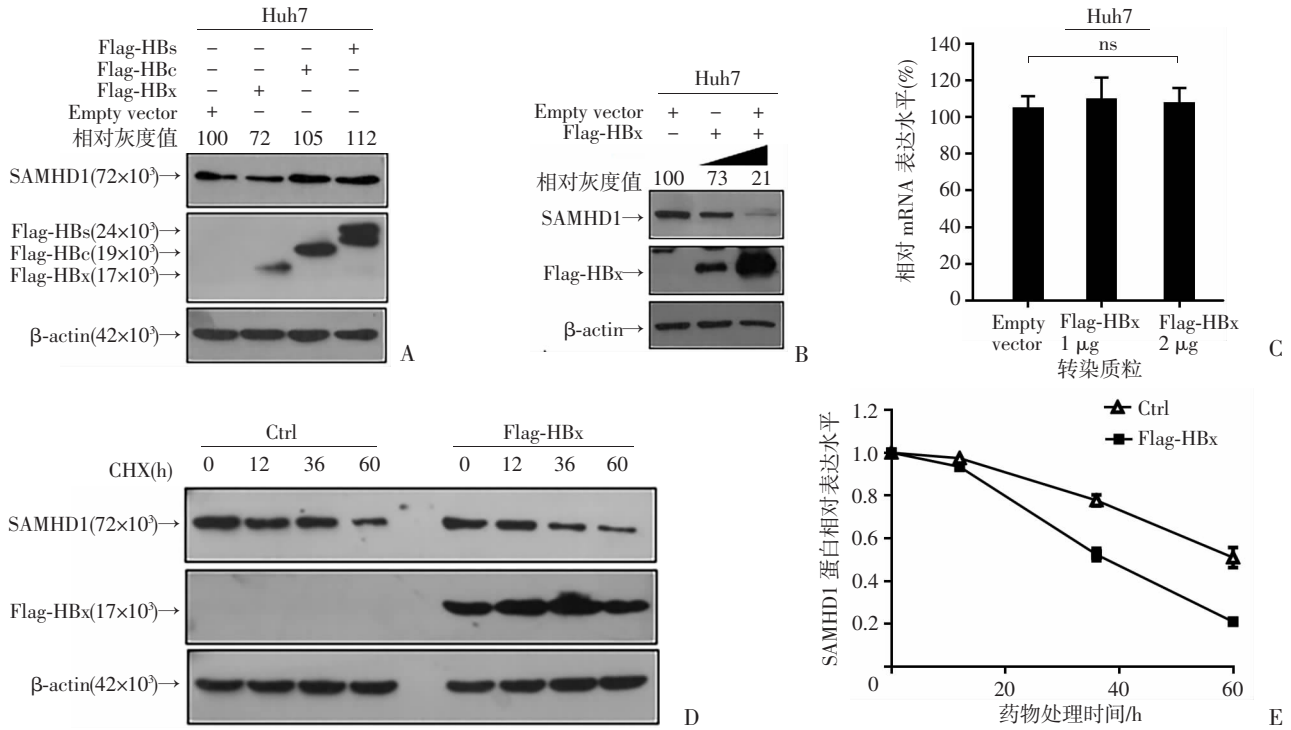
2.4 HBx 下调了 SAMHD1 蛋白水平及其稳定性

前期报道通过质谱筛选 SAMHD1 相互作用的宿主因子,HBx 可能是 SAMHD1 的底物靶标之一、可能对 SAMHD1 的表达有潜在的调控作用。如图 4A 所示,在 Huh7.0 上过表达 HBV 编码的三种病毒蛋白(HBx、HBc 和抗原蛋白),只有 HBx 过表达降低了 SAMHD1 的表达,且呈现剂量依赖趋势(图 4B)。qRT-PCR 检测提示过表达 HBx 并未影响 SAMHD1 的 mRNA 水平(图 4B)。为了检测 HBx 是否会影响 SAMHD1 蛋白的稳定性,本研究用放线菌酮(CHX)预处理 Huh7.0 细胞以阻断蛋白合成。结果表明在 HBx 存在的情况下,CHX 处理后的 SAMHD1 表达下降更快(图 4C)。这些结果表明 HBx 通过降低 SAMHD1 蛋白的稳定性,下调 SAMHD1 蛋白的表达。

2.5 HBx 与 SAMHD1 相互结合并通过泛素-蛋白酶体途径下调其表达

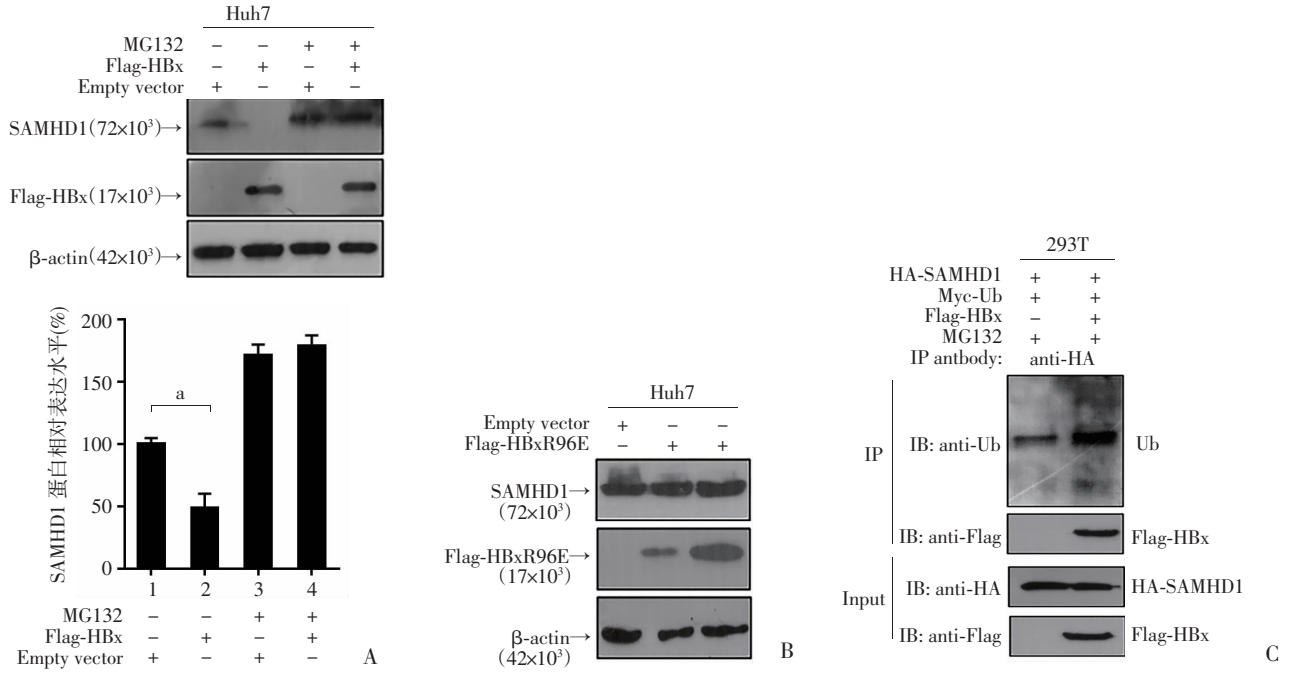
本研究进一步探索 HBx 是否通过泛素化蛋白酶体途径降低了 SAMHD1 蛋白水平。如图 5A 所示,蛋白酶体抑制剂 MG132 对 HBx 在 Huh7 细胞中降低的 SAMHD1 蛋白水平均有抑制作用。通过 293T 细胞中泛素化检测,HBx 过表达增加了 SAMHD1 的泛素化水平(图 5B)。由于 HBx 的 R96E 突变体是影响其泛素化途径的关键位点,本研究观察到 HBx 在 R96E 突变体中并未减少 SAMHD1 的表达(图 5C),上述结果提示 HBx 通过干预泛素蛋白酶体系统来抑制 SAMHD1 的降解。

为了检测 HBx 和 SAMHD1 之间是否存在相互作用,本研究将 Flag-HBx 和 HA-SAMHD1 共转染到 293T 细胞中进行 Co-IP。在抗 Flag 蛋白抗体免疫沉淀样品中出现 HA-SAMHD1 条带,而在对照组中没有(图 6A)。反向 Co-IP 实验也得到了相同的结果(图 6B)。为了确定 HBx 与 SAMHD1 相互作用的区段,构建了 HBx 片段缺失突变体,并进行 Co-IP 实验(图 6C)。如图 6D 所示,与其他缺失组相比,HBx 的 C 末端缺失突变体(130-154 区域)并未结合 Flag-SAMHD1,说明 HBx 的 C 末端对于 HBx-SAMHD1 的相互作用至关重要。



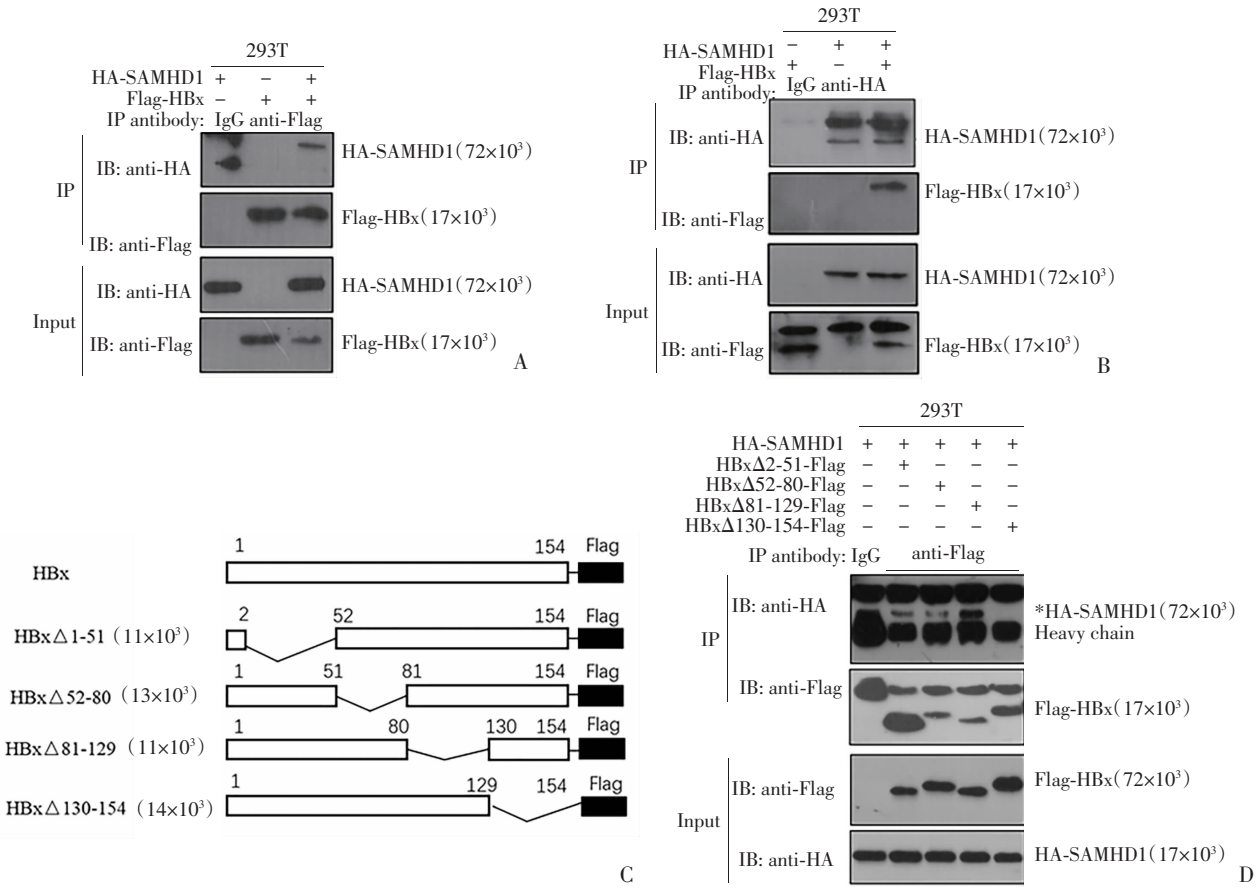
A: HBx 在蛋白水平下调 SAMHD1 的表达,HBV 编码的三种结构蛋白(Flag-HBx, Flag-HBs and Flag-HBc)转染至 Huh7 cells; B、C: qPCR 和 Western blot 检测 SAMHD1 在 mRNA 和蛋白水平上的变化情况; D、E: 过表达 HBx 通过影响蛋白的半衰期下调 SAMHD1 的表达及定量分析

图 4 HBx 对 SAMHD1 蛋白表达的影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



A:泛素化抑制剂 MG132 处理后对 SAMHD1 蛋白表达的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$),a:$P<0.05$,与 1 组空载未加药组比较; B: HBx 对 SAMHD1 的泛素化程度的影响,HEK293T cells 共转染 Flag-HBx, HA-SAMHD1 和 Ub-myc 表达质粒,后用 MG132 处理; C: HBx R96E 突变对 SAMHD1 表达的影响

图 5 HBx 对 SAMHD1 泛素化修饰的影响



A:正向 Co-IP 表明 SAMHD1 和 HBx 相互结合; B:反向 Co-IP 表明 HBx 和 SAMHD1 相互结合; C:Flag-HBx 片段缺失突变体的结构示意图; D: Co-IP 检测 HBx 与 SAMHD1 结合的区段

图 6 HBx 与 SAMHD1 相互结合的区域

3 讨论

SAMHD1 是一种降解细胞内 dNTP 水平的三磷酸水解酶,它是控制细胞内 dNTP 水平和维持 dNTP 稳态的关键调节因子。除了在先天性免疫传感和病毒抑制中发挥重要作用[13],SAMHD1 还被认为与某些癌症的发生有关。在前期研究中首次发现 SAMHD1 抑制肝癌细胞 Huh7.0 的增殖[12],但是 SAMHD1 能否调控 HBV 诱导的 HCC 发生及分子机制尚不清楚。在本研究中,首先发现 SAMHD1 在 HBV 诱导的 HCC 组织中下调(图 1),这促使更深入的研究 SAMHD1 在 HBV 诱导的 HCC 中的潜在作用。在 HBV 稳定复制的肝癌细胞系 HepAD38 细胞中敲除 SAMHD1,发现 SAMHD1 通过调控细胞周期促进细胞增殖(图 2)。此外,本研究进一步证明了 SAMHD1 通过调控 p27 的表达和细胞核/细胞质的定位来调控细胞增殖(图 3)。p27 是一个关键的细胞周期激酶抑制因子,通过多种途径影响 CDK 激酶和细胞周期蛋白 cyclin 的结合,从而调控细胞周期[14]。由于激活的 PI3K-Akt 通路有助于调控 p27 的表达和细胞质定位,并且发现在 KO-SAMHD1 的情况下,Akt 的磷酸化水平显著升高,说明在肝癌细胞中,SAMHD1 可能通过 PI3K-Akt 通路调控 p27 的功能。这与之前报道的在 THP-1 细胞中,SAMHD1 通过 PI3K-Akt 通路调控 p27 的移位一致[15]。

SAMHD1 作为宿主限制因子,可通过降低病毒复制所必需的 dNTP 水平来限制 HIV-1 和 HBV 等病毒的复制[15]。同时,病毒也进化出多种对抗策略来拮抗这些限制因子的抗病毒功能[16]。例如,HIV-2 编码 Vpx 蛋白可以针对 SAMHD1 进行蛋白酶体介导的降解,从而促进病毒的感染[17-19]。课题组前期也证实了 cyclin E2-CDK2 通过对 SAMHD1 磷酸化修饰来拮抗其对 HBV 复制的限制作用[20]。然而,关于 HBV 是否通过结构蛋白降解 SAMHD1 的报道较少。作为唯一的 HBV 调节蛋白,17×10^3 的 HBx 蛋白表现出多种功能:包括反激活细胞因子启动子,利用宿主泛素蛋白酶体途径药物降解细胞因子,从而促进病毒复制和肝癌发生[21-22]。现有的报道支持 HBx 与 DDB1 和 cullin 4-E3 泛素连接酶复合物(CRL4)结合,后者形成的 CRL4 复合物招募特异性底物进一步泛素化蛋白酶体降解[23]。在本研究中,发现了 HBx 可以与 SAMHD1 相互作用,并通过泛素蛋白酶体途径降解(图 4、5)。同时,HBV R96E 突变体没有诱导 SAMHD1 降解,提示 DDB1 可能参与了这个过程。

总的来说,本研究发现 SAMHD1 通过 Akt/p27 途径抑制肝癌细胞的增殖,而 HBx 可以通过泛素化蛋白酶体的方式介导 SAMHD1 的降解,从而加速癌细胞的增殖。因此,该研究成果强化了 HBx 诱导肝癌的功能,为靶向 HBV 诱导肝癌的治疗策略提供了理论依据。

参考文献:

[1] BOSCH F X, RIBES J, DÍAZ M, *et al*. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends[J]. Gastroenterology, 2004, 127(5Suppl 1): S5-S16. DOI: 10.1053/j.gastro.2004.09.011.

[2] LEVRERO M, ZUCMAN-ROSSI J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellularcarcinoma[J]. J Hepatol, 2016, 64(1 Suppl): S84-S101. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.02.021.

[3] REVILL P, TESTONI B, LOCARNINI S, *et al*. Global strategies are required to cure and eliminate HBV infection[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(4): 239-248. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.7.

[4] KONG F Y, YOU H J, KONG D L, *et al*. The interaction of hepatitis B virus with the ubiquitin proteasome system in viral replication and associated pathogenesis[J]. Virol J, 2019, 16(1): 1-10. DOI: 10.1186/s12985-019-1183-z.

[5] SLAGLE B L, BOUCHARD M J. Role of HBx in hepatitis B virus persistence and its therapeutic implications[J]. Curr Opin Virol, 2018, 30: 32-38. DOI: 10.1016/j.coviro.2018.01.007.

[6] GOLDSTONE D C, ENNIS-ADENIRAN V, HEDDEN J J, *et al*. HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase[J]. Nature, 2011, 480(7377): 379-382. DOI: 10.1038/nature10623.

[7] JEONG G U, PARK I H, AHN K, *et al*. Inhibition of hepatitis B virus replication by adNTPase-dependent function of the host restriction factor SAMHD1[J]. Virology, 2016, 495: 71-78. DOI: 10.1016/j.virol.2016.05.001.

[8] LAHOUASSA H, DADDACHA W, HOFMANN H, *et al*. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates[J]. Nat Immunol, 2012, 13(3): 223-228. DOI: 10.1038/ni.2236.

[9] KOHNKEN R, KODIGEPALLI K M, WU L. Regulation ofdeoxynucleotide metabolism in cancer: novel mechanisms and therapeutic implications[J]. Mol Cancer, 2015, 14: 176. DOI: 10.1186/s12943-015-0446-6.

[10] DE SILVA S, WANG FF, HAKE T S, *et al*. Downregulation of SAMHD1 expression correlates with promoter DNA methylation in Sézary syndrome patients[J]. J Invest Dermatol, 2014, 134(2): 562-565. DOI: 10.1038/jid.2013.311.

[11] WANG J L, LU F Z, SHEN X Y, *et al*. SAMHD1 is down regulated in lung cancer by methylation and inhibits tumor

cell proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 455(3/4): 229-233. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.10.153.

[12] 皮思蝶, 郑小川, 毛彬力, 等. SAMHD1 通过调控 p27 表达抑制肝细胞癌细胞增殖的研究[J]. 中国癌症杂志, 2020, 30(7): 489-496. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2020.07.002.
PI S D, ZHENG X C, MAO B L, *et al*. SAMHD1 inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma by regulating the expression of p27[J]. China Oncol, 2020, 30(7): 489-496. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2020.07.002.

[13] SZE A, OLAGNIER D, LIN R, *et al*. SAMHD1 host restriction factor: a link with innate immune sensing of retrovirus infection[J]. J Mol Biol, 2013, 425(24): 4981-4994. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.10.022.

[14] AKTAS H, CAI H, COOPER G M. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(7): 3850-3857. DOI: 10.1128/mcb.17.7.3850.

[15] KODIGEPALLI K M, BONIFATI S, TIRUMURU N, *et al*. SAMHD1 modulates *in vitro* proliferation of acute myeloid leukemia-derived THP-1 cells through the PI3K-Akt-p27 axis. Cell Cycle, 2018, 17(9), 1124-1137. DOI: 10.1080/15384101.2018.1480218.

[16] SOMMER A F, RIVIÈRE L, QU B Q, *et al*. Restrictive influence of SAMHD1 on Hepatitis B Virus life cycle[J]. Sci Rep, 2016, 6: 26616. DOI: 10.1038/srep26616.

[17] DUGGAL N K, EMERMAN M. Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(10): 687-695. DOI: 10.1038/nri3295.

[18] DELUCIA M, MEHRENS J, WU Y, *et al*. HIV-2 and SIVmac accessory virulence factor Vpx down-regulates SAMHD1 enzyme catalysis prior to proteasome-dependent degradation[J]. J Biol Chem, 2013, 288(26): 19116-19126. DOI: 10.1074/jbc.M113.469007.

[19] HOFMANN H, LOGUE E C, BLOCH N, *et al*. The Vpx lentiviral accessory protein targets SAMHD1 for degradation in the nucleus[J]. J Virol, 2012, 86(23): 12552-12560. DOI: 10.1128/jvi.01657-12.

[20] HU J, QIAO M, CHEN Y M, *et al*. Cyclin E2-CDK2 mediates SAMHD1 phosphorylation to abrogate its restriction of HBV replication in hepatoma cells[J]. FEBS Lett, 2018, 592(11): 1893-1904. DOI: 10.1002/1873-3468.13105.

[21] SPANDAU D F, LEE C H. Trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein[J]. J Virol, 1988, 62(2): 427-434. DOI: 10.1128/jvi.62.2.427-434.1988.

[22] LI Y, FU Y, HU X, *et al*. The HBx-CTTN interaction promotes cell proliferation and migration of hepatocellular carcinoma via CREB1[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 405. DOI: 10.1038/s41419-019-1650-x.

[23] ANGERS S, LI T, YI X H, *et al*. Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery[J]. Nature, 2006, 443(7111): 590-593. DOI: 10.1038/nature05175.

(**收稿**:2020-11-20;**修回**:2021-01-19)

(编辑 张艺霖)