

# 分子伴侣及在病毒增殖中的作用

曾智勇<sup>1</sup>, 郭万柱<sup>1\*</sup>, 梁海英<sup>2</sup>

(1. 四川农业大学 动物生物技术中心, 四川 雅安 625014; 2. 华西希望集团 农业科学技术研究所, 四川 成都 622430)

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2005)11-0079-03

随着蛋白质研究技术的不断发展, 数以百种的蛋白质三维结构已研究的较为清楚, 但对于这些蛋白质折叠成天然构象的途径和机制尚知之甚少。通常认为蛋白质的 1 级结构决定了蛋白质的 3 级和 4 级结构, 但近年来研究表明, 在很多蛋白质的折叠与装配过程中, 有其他蛋白质或酶的参与, 其中分子伴侣就是目前研究得最多也是研究最热的一种。病毒是细胞内寄生物, 分子伴侣与病毒的增殖过程密切相关, 从病毒复制的起始、转录的进行、翻译的完成到病毒粒子的装配成熟, 甚至病毒在宿主体内的转运都有分子伴侣的参与。随着病毒与分子伴侣相互关系研究的深入, 产生了抗病毒的又一可能新途径。

## 1 分子伴侣概念与种类

分子伴侣 (molecular chaperones) 的概念是由 Laskey 于 1978 年首先提出并使用的<sup>[1]</sup>, 它是一类进化上非常保守的蛋白质家族, 能与结构、大小、定位和最终功能都不相同的多肽非特异性结合, 催化介导蛋白质特定构象的形成, 在生物体内起着稳定新生蛋白质、辅助其他蛋白质正确折叠、组装与转运或降解的作用, 对蛋白质功能的完整有着重要意义。

迄今为止发现的大多数的分子伴侣均属于热休克蛋白 (HSP) 的范畴, 其大致又可主要分为伴侣素家族、热休克蛋白 70 家族、热休克蛋白 90 家族 3 类非常保守的蛋白家族。

### 1.1 伴侣素家族 (Cpn)

Cpn 家族具有独特的双层 7~9 元环状结构的寡聚蛋白, 它们以 ATP 依赖方式促进体内正常和应激条件下蛋白质折叠。Cpns 又可分为 GroEL (Hsp 60) 家族和 TriC 家族。前者由双层相对分子质量为 60 ku 的 7 个亚基形成圆环组成, 在体内与一种辅助因子 (如 *E. coli* 中的 GroEs) 协同作用与非天然的多肽结合并辅助蛋白质重折叠, ATP 酶的循环使 GroEL 的底物结合面在亲水型和疏水型之间转化以完成不同的功能。除叶绿体中的类似物外, 这些蛋白质是由应激反应诱导的。TriC 型存在于古细菌和真核细胞质中, 由双层 8 或 9 元环组成, 亚基相对分子质量约为 55 ku。这种 Cpn 没有类似 GroES 的辅助因子, 可以直接与细胞骨架蛋白质如  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、微管蛋白、肌动蛋白及角蛋白连接, 只有古细菌中的成员有应激诱导性。

### 1.2 热休克蛋白 70 家族

该家族是一类相对分子质量约 70 ku 进化上最保守的蛋白质之一。其家族成员包括 Grp 78、Mtp 70、Hsc 70 及 Hsp 70,

广泛存在于原核和真核细胞中。其中前 3 种是正常条件下产生的, 而 Hsp 70 是由应激诱导产生。在细胞应激或非应激条件下, 该家族在蛋白质的从头折叠、跨膜运输、错误折叠多肽的降解及其调控过程中均发挥着重要的作用。

### 1.3 热休克蛋白 90 家族

热休克蛋白 90 家族, 其相对分子质量约为 90 ku 左右, 包括 *E. coli* 脑浆中的 HtpG, 酵母胞浆中的 Hsp 83, 果蝇胞浆中的 Hsp 83, 以及哺乳类胞浆中的 Hsp 90 与内质网中的葡萄糖调节蛋白 (GRP 94/ERP 90) 或内质网素等。Hsp 90 主要与细胞中不稳定的非活化蛋白结合, 促进其迅速活化或阻止其降解, 还可以与胞浆中的类固醇受体结合, 以封闭其 DNA 结合域, 阻碍其对基因转录调控区的激活作用, 使之保持在天然的非活性状态, 同时也使受体保持着对激素配体的高亲和力。此外, Hsp 90 还通过与 Ras 信号途径中许多信号分子的结合与解离, 介导这些分子的活性与非活性形式之间的转化。

## 2 分子伴侣在病毒增殖过程中的作用

### 2.1 分子伴侣在病毒感染发生中的作用

不同病毒, 其宿主特异性不尽相同。但对其宿主特异性为何不同, 以及病毒在感染宿主细胞的过程中, 宿主因子究竟发挥了什么样的作用等问题, 目前尚了解得很少。

HBV 感染发生的关键是其大包膜蛋白 (大蛋白) 介导的 HBV 与肝细胞受体结合, 以及核壳体的包被。大蛋白为一种特殊的双重膜型结构, 部分大蛋白的 N-末端前-S (Pre-S) 区域置于病毒体脂包膜的内部, 部分位于其外面, 这种混合形态是由于近一半的大蛋白分子在穿过内质网外膜由 1 个与翻译协同的转位作用所造成的。Leiffler Mary H 等<sup>[2]</sup>证实抑制前 S-区的转位需要前-S1 区一段特异性序列的辅作用, 缺失突变分析表明大蛋白的胞质锚定位点在第 70~94 位氨基酸之间, 而胞质中的 Hsp 70 则是大蛋白的特异结合靶物, 它与大蛋白结合位点在第 63~107 位氨基酸间, 胞质锚定位点的缺失可使大蛋白完全丧失与 Hsp 70 的结合作用。此外, Hsp 70 与大蛋白的相互作用能抑制前-S 区的协同翻译转位作用。Prange R 等<sup>[3]</sup>证实 Hsp-S1 区域有一段的特异性序列有抑制上述翻译协同转位作用。这一胞质锚定序列特异性地与 Hsp 70 家族成员结合, 提示分子伴侣参与了 HBV 感染侵入肝细胞的过程。

### 2.2 分子伴侣在病毒 DNA 复制中的作用

病毒 DNA 的复制是一复杂的过程, 除需要自身所编码蛋白质的参与外, 还要自身编码或依赖宿主细胞中如 Hsp 70 (Hsc 70、DnaK)、Hsp 40 (DnaJ)、Hsp 60 (GroEL)、Hsp 90 (HtpG、Grp)、Hsp 100 (C1P) 等分子伴侣的参与。DnaK、DnaJ 就是

收稿日期: 2005-03-11

作者简介: 曾智勇 (1978-), 男, 博士研究生。

通讯作者: 郭万柱 (1938-), 男, 教授, 本科, 博士研究生导师。

$\lambda$  噬菌体 DNA 复制所必需的。

Zylicz M 等<sup>[4]</sup>通过一定的体外研究系统得到一模型,在模型中,由  $\lambda$  噬菌体和大肠杆菌编码的蛋白组成了 1 个多组分的复制前起始复合体,该复合体在 DnaJ 的辅助下,排列在  $\lambda$  噬菌体 DNA 的复制起始区,接着 DnaK 与该复合体协作,水解 ATP,松弛多蛋白复合体,蜗牛酶 B 发挥作用使 DNA 解旋,从而使复制得以进行。

T 抗原分子伴侣是一类大的、多结构域、多功能的蛋白质,在病毒侵染的早期表达,可直接参与 DNA 的复制。多瘤病毒家族包括多瘤病毒 (polyomavirus) 和 SV 40 在内,均能编码 T 抗原分子伴侣。T 抗原含有一个 J 功能域,其主要功能是结合 Hsc 70 并激活 ATP 酶活性。T 抗原 J 功能域突变,将导致病毒 DNA 复制的缺陷。Liu J S 等<sup>[5]</sup>研究表明,乳头瘤病毒复制起始蛋白中的蜗牛酶 E1 结合到复制起始位点是由细胞内的 Hsc 70 伴侣分子和 Hsp 40 所激发的。将上述这些分子伴侣与无细胞体系的乳头瘤病毒复制系统孵育,可提高整个系统的复制效率。上述现象表明特定的原核或真核病毒要完成其病毒 DNA 复制前起始复合体的组装和解聚,需要依赖 Hsp 70、DnaJ-like 等分子伴侣的参与。

### 2.3 分子伴侣在病毒转录中的作用

SV 40 在猴肾的非分化细胞中呈向性分布,其完成这一过程需宿主细胞进入细胞周期,通过 SV 40 大 T 抗原的 pRB 结合域,介导松弛转录抑制复合体 pRB - E2F,使宿主细胞的转录顺利进行,产生病毒复制所需要的酶。自由的 E2F 能反式激活许多进入细胞周期 S 期所需的基因,从而启动转录。但当转录因子 E2F 与 pRB(或相关蛋白 p130 或 p107)结合后,其启动转录的功能受到阻遏,可使得转录无法进行。同时,大 T 抗原也是衰减 pRB 对 E2F 的阻遏作用而使细胞转型所必须的。因而,Sullivan C S 等<sup>[6]</sup>认为伴侣分子的 J 功能域与 Hsp 70 的功能域结合,通过改变复合体中 pRB 或其他一些成员的构象而释放 E2F 上的 pRB。细胞中表达的 J 功能域突变体,不能使 pRB - E2F 复合体解离,但野生型的 T 抗原却能轻易解离该复合体。

上述结果表明,E2F 从 T 抗原的 pRB 或相关蛋白的解离是受到 Hsp 70 介导的 ATP 水解作用促进的。SV 40 大 T 抗原的所有调节功能均受到 J 功能域突变体的抑制,Hsp 70(或同系蛋白)在大 T 抗原的所有调节活动中是必须的,但其机制目前尚不明了。

### 2.4 分子伴侣在病毒翻译中的调节作用

除了利用分子伴侣调节病毒基因转录外,一些病毒也利用分子伴侣来调节翻译。如流感病毒的侵染就可导致一种细胞 J 蛋白(P58IPK)与 Hsc 70 和 Hsp 40 在内的多蛋白复合体相互作用而负调控 PKR(RNA 激活的蛋白激酶)。PKR 是许多不同病毒的共同靶分子,因为 PKR 与双链 RNA(一种病毒侵染常见的副产品)反应而阻止翻译的进行。通过利用分子伴侣复合体,流感病毒可阻止 PKR 而使侵染必需的蛋白得以翻译。

### 2.5 分子伴侣在病毒粒子装配中的作用

乙型肝炎病毒(HBV)的组装需要先以其 RNA 为模板生成核蛋白复合体(RNP),包括病毒聚合酶多肽和一段前基因组

RNA 中的片段(sRNA)作为 DNA 合成起始的蛋白质引物,再由聚合酶上酪氨酸残基作为起点起始反转录。

Hu J 等<sup>[7]</sup>证实,HBV 的 RNP 合成需要宿主细胞的一些成分参与,包括 Hsp 90、p 23 及 ATP 水解功能,Hsp 90 能识别 2 个逆转录酶的必需区域,这 2 个区域对于 RNP 的形成和蛋白质引物作用是必不可少的。Hu J 等<sup>[8]</sup>的研究表明,HBV 聚合酶与宿主因子如 Hsp 90 复合物等相互作用,这对病毒基因组复制及病毒粒子装配是关键的一步。Hu J 等<sup>[8]</sup>用纯化的反转录酶宿主因子,在体外重建了 RNP 及蛋白质复合物,结果显示 Hsp 90 能识别逆转录酶上对 RNP 及蛋白质引物必需的 2 个区域,Hsp 90 的功能对于建立及保持逆转录酶的 RNA 结合功能是必需的,但 Hsp 90 对逆转录酶的合成及翻译后活化不是必要的。由此推测,Hsp 90 是作为一个内部桥梁,辅助逆转录酶的 2 个区域形成稳定而平衡的 RNP 结合形式,在 HBV 粒子装配中起着重要的作用。

### 3 结论与展望

综上所述,分子伴侣与病毒生命活动密切相关。其在不同病毒的感染、基因组复制、基因表达调节、病毒糖蛋白的折叠与成熟、病毒粒子的装配等过程中发挥着不尽相同的重要作用。对于分子伴侣与病毒之间相互关系的研究才刚起步不久,还有许多诸如病毒是如何利用细胞中分子伴侣、分子伴侣与病毒糖蛋白是如何结合等机制性问题尚需亟待解决。

就目前研究结果推测病毒广泛利用分子伴侣机制的原因:可能是某些病毒在进化选择压力下为保持其基因组足够小,而选择利用伴侣分子帮助其完成复杂的功能。如 SV 40 应用这一策略可让较小的基因组(小于 5 kb)通过编码小的多功能蛋白来完成病毒扩张所必需的所有功能,通过多功能蛋白利用它们的伴侣分子的功能域,解聚蛋白复合体,调节转录,使细胞转型,影响病毒 DNA 的复制、转录以及病毒粒子的装配等。

随着对分子伴侣与病毒相互关系的深入研究,在病毒性疾病的治疗上,分子伴侣将具有广阔的应用前景,且可能为病毒病的防治提供新的途径。特别是对于防治那些自身编码分子伴侣的病毒将最为有效,因为这些分子伴侣蛋白含有特异于病毒蛋白的基元,而在宿主编码的分子伴侣蛋白中不存在,故可作为小分子阻遏物的理想候选靶蛋白。

### 参考文献:

- [1] Hartl F U, Marin J. Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. Current Opinion in Structural Biology, 1995, 5: 92 - 102.
- [2] Leiffler Mary H, Werr M, Prange R. Sequence - specific repression of cotranslational translocation of the hepatitis B virus enveloped proteins coincides with binding of heat shock protein Hsp70[J]. Virology, 1998, 235(1): 144 - 152.
- [3] Prange R, Werr M, Heike L M. Chaperones involved in hepatitis B virus morphogenesis[J]. Bioinorganic Chemistry, 1999, 380(3): 305 - 314.
- [4] Zylicz M, Ang D, Liberek K, et al. Initiation of lambda DNA replication with purified host - and bacteriophage - encoded proteins: the role of the dnaK, dnaJ and grpE heat shock proteins[J]. The EMBO Journal, 1989, 8(5): 1601 - 1608.
- [5] Liu J S, Kuo S R, Makhov A M, et al. Human Hsp70 and Hsp40

# 大豆异黄酮在畜牧生产中的应用

生广旭<sup>1</sup>, 宋春玲<sup>2</sup>, 朱晶<sup>3</sup>

(1. 东北农业大学 动物营养研究所, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 中国农业大学 动物科学技术学院, 北京 100094; 3. 广东湛大集团 双城有限公司, 黑龙江 双城 150100)

中图分类号: S816.42

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2005)11-0081-03

从1931年Walz首次发现在大豆中存在异黄酮活性成分以来,大量研究证明,大豆异黄酮具有抗肿瘤、预防和治疗心血管疾病等作用,一直受到国内外学者的重视。同时,在畜牧生产中的应用也相继展开,1974年匈牙利科学家首次将异黄酮用于饲料添加剂;1988年前苏联学者报道了在日粮中添加异黄酮类化合物可提高畜禽生产力;1992年美国专利和1997年W.O.申请专利都把异黄酮类化合物列为具有明显促进动物生长作用的饲料添加剂;我国从20世纪90年代初也开始对异黄酮化合物进行研究。实验表明,大豆异黄酮在动物体内具有较高的生产活性,这对当前开发安全有效的抗生素替代品、畜牧业可持续发展具有重要意义。

## 1 大豆异黄酮的特性、含量分布及其分类

自Setchell K D R等<sup>[1]</sup>首次证实大豆异黄酮与哺乳动物雌激素结构相似,具有类雌激素作用。在早期研究中,被视为抗营养因子,是产生大豆食品的苦涩味和收敛性的原因之一。异黄酮化合物一般为固体,常温下为白色粉末,无毒无味,游离甙元无旋光性,而糖苷具有旋光性,且多为左旋。一般异黄酮甙元难溶或不溶于水,易溶于甲醇等有机溶剂,呈酸性,在不同处理下(如适当pH值或加热)能够改变大豆异黄酮类化合物的存在形式。

大豆异黄酮几乎全部来自大豆,其含量在大豆的不同部位差异较大,80%~90%存在于大豆子叶中,含量约为0.1%~0.3%,胚轴中所含异黄酮种类也较多且浓度较高,约为1%~2%,但占种子总重量的比例却很少(10%~20%),种皮含量最低,只有0.03%。异黄酮的含量分布除与大豆的不同部位有关外,同时还受大豆品种、类型、生长环境和分离提取方法等多种因素影响。

大豆异黄酮分游离型的甙元和结合型的糖苷2大类,在大

豆籽粒中,只有大约2%~3%的异黄酮以游离形式存在,而97%~98%是以 $\beta$ -葡萄糖苷的形式存在。从大豆中分离鉴定出12种异黄酮,其中3种为游离的大豆异黄酮甙元,分别为染料木黄酮(Cenistein)、黄豆苷原(Daidzein,又称大豆黄酮)、大豆黄素(Glycitein)。其他9种异黄酮糖苷,其中3种为葡萄糖苷结构,3种为乙酰基葡萄糖苷结构,3种为丙二酰葡萄糖苷结构。

## 2 大豆异黄酮的吸收与代谢特点

大豆异黄酮的吸收代谢特点,因动物种类不同而有所差别。一般情况下,单胃动物慢于复胃动物,鼠吸收最慢且不完全,大豆甙元的生物利用率显著高于染料木甙或黄豆甙元。在单胃动物体内,异黄酮类化合物主要在肠道微生物的作用下降解的。Lundh等<sup>[2]</sup>实验表明,大豆异黄酮主要在肠道中被吸收,吸收率为10%~40%。脂溶性的甙元可从小肠直接吸收,而大多数的结合型糖苷不能通过小肠壁,而是通过大肠细菌中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶的水解生成甙元,然后被肠黏膜吸收。被吸收的异黄酮及其分解产物在动物的解毒机制作用下在胃肠黏膜、肝和肾中被结合成葡萄糖醛酸酯的形式,少量结合成硫酸酯的形式,再经胆汁排入十二指肠,然后被小肠重新吸收。形成肝肠循环,去糖苷型的异黄酮经肝肠循环代谢,可与糖苷重新结合形成无生物活性的化合物。同时,也可进一步被细菌分解,转变成稳定的雌马酚(Equol)等代谢产物后被吸收。未被肠道菌群分解的结合型异黄酮不易被吸收,直接从胆汁分泌入肠道排出体外。

反刍动物体内异黄酮类化合物主要是在瘤胃微生物的作用下被降解,肝脏的代谢量很少。鸡豆黄素脱甲基生成染料木素,在瘤胃微生物作用下进一步代谢为对-乙基苯酚和有机酸,苜蓿花黄素脱甲基生成大豆黄酮,后者经脱甲基和脱糖苷后70%被微生物还原为双氢大豆黄酮,最后形成稳定的雌马酚被胃肠黏膜吸收。还有5%~20%受微生物作用开环成为O-脱甲基安哥拉紫檀素,极少量直接被胃肠黏膜吸收。所

收稿日期:2005-02-25

作者简介:生广旭(1974-),男,硕士研究生。

Chaperone Proteins Facilitate Human Papillomavirus - 11 E1 Protein Binding to the Origin and Stimulate Cell - free DNA Replication[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(46): 30704 - 30712.

[6] Sullivan C S, Cantalupo P, Pipas J M. The molecular chaperone activity of simian virus 40 large T antigen is required to disrupt Rb - E2F family complexes by an ATP - dependent mechanism[J]. Molecular and Cellular Biology, 2000, 20(17): 6233 - 6243.

[7] Hu J, Anselmo D. In vitro reconstitution of a functional duck hepatitis B virus reverse transcriptase: posttranslational activation by Hsp90[J]. Journal of Virology, 2000, 74(24): 11447 - 11455.

[8] Hu J, Toft D O, Seeger C. Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi - component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids[J]. The EMBO Journal, 1997, 16(1): 69 - 78.

(007)