

(20):13934-13942.

- [15] Schnell O, Romagna A, Jaehnert I, et al. Krüppel-like factor 8 (KLF8) is expressed in gliomas of different WHO grades and is essential for tumor cell proliferation[J]. PLoS One, 2012, 7(1):e30429.
- [16] Wang X, Zheng M, Liu G, et al. Krüppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion[J]. Cancer Res, 2007, 67(15):7184-7193.
- [17] 何立丽, 张伟京, 苏航, 等. Ang-2 与 VEGF 的协同作用及其在抗肿瘤血管新生治疗中的应用[J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(2):445-448.
- [18] Monti E, Gariboldi MB. HIF-1 as a target for cancer chemotherapy, chemosensitization and chemoprevention [J]. Curr Mol Pharmacol, 2011, 4(1):62-77.

• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.13.045

- [19] Kienast Y, Klein C, Scheuer W, et al. Ang-2-VEGF-A CrossMab, a novel bispecific human IgG1 antibody blocking VEGF-A and Ang-2 functions simultaneously, mediates potent antitumor, antiangiogenic, and antimetastatic efficacy[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(24):6730-6740.
- [20] 段泽星, 谢立群. VEGF 在肿瘤生长和血管生成中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(27):2894-2900.
- [21] Li JC, Yang XR, Sun HX, et al. Up-regulation of Krüppel-like factor 8 promotes tumor invasion and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2010, 139(6):2146-2157.

(收稿日期:2014-12-18 修回日期:2015-02-19)

## USP18 及其在病毒性肝炎等疾病中的研究进展\*

李麟综述, 秦波<sup>△</sup>审校

(重庆医科大学附属第一医院感染科 400016)

[关键词] USP18; 干扰素; 病毒性肝炎; JAK-STAT

[中图分类号] R512.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)13-1851-03

泛素特异性蛋白酶 18(USP18)最初在 1999 年被克隆,其编码的蛋白相对分子质量为  $43 \times 10^3$ ,因此也被称作泛素特异性蛋白酶 43(UBP43)。USP18 最初是 Liu 等<sup>[1]</sup>在分析 AML1-ETO 融合基因敲入小鼠的基因差异表达时被发现并克隆的。近年研究发现 USP18 在干扰素(IFN)治疗多种疾病的应答不佳组中高表达,USP18 可能在其中扮演了重要角色。本文就近年来 USP18 的结构、信号转导及在病毒性肝炎等疾病中的生物学功能等研究进展综述如下。

### 1 USP18 概述

**1.1 USP18 的结构** 人类 USP18 基因定位于 22q11.2 染色体上,属于泛素特异性降解酶家族,在肝脏、胸腺和单核巨噬细胞中高表达。USP18 基因的转录启动子位于干扰素刺激应答反应元件(ISRE)内,故干扰素可以强烈诱发机体表达 USP18。生物信息学分析显示 USP18 编码 372 个氨基酸,蛋白质理论相对分子质量为 43 010.7,蛋白质理论等电点(pI)为 8.05。原子总数(total number of atoms)为 6 015,分子式为 C1900H3007N527O551S30。在哺乳动物网织红细胞中预测半衰期为 30 h;酵母体内预测半衰期大于 20 h;大肠杆菌体内预测半衰期大于 10 h。不稳定系数(instability index)为 57.20,是一个不稳定蛋白质。USP18 蛋白中相对含量比较多的氨基酸是 Leu(45 个,12.1%)、Ser(29 个,7.8%)、Gln(25 个,6.7%)、Lys(23 个,6.2%)、Glu(22 个,5.9%)、Arg(22 个,5.9%)、Val(21 个,5.6%)。酸性氨基酸残基总数(total number of negatively charged residues, Asp+Glu)为 42,碱性氨基酸残基总数(total number of positively charged residues, Arg+Lys)为 45,总平均疏水性(grand average of hydropathicity, GRAVY)为 -0.288,是可溶性蛋白质。USP18 基因编码的蛋

白质二级结构中有 43.01% 是  $\alpha$ -螺旋,12.63% 是  $\beta$ -折叠,41.94% 为无规则卷曲,为混合蛋白质。采用 WoLFPSORT、NetPhos 2.0 Server 等工具进行 USP18 亚细胞定位预测,分析结果显示它位于细胞外或内质网膜上,证明了其分泌蛋白的属性。磷酸化位点预测结果显示 USP18 有 15 个丝氨酸、2 个苏氨酸、2 个酪氨酸,表明其参与了细胞内信号转导。USP18 的活性中心含有高度保守短序列——半胱氨酸残基(半胱氨酸盒)和组氨酸残基(组氨酸盒),该结构是 USP 家族蛋白酶所特有的结构<sup>[2]</sup>。

目前对全长的 USP18 研究较多,普遍认为密码子 AUG 可翻译全长的 USP18 蛋白。Burkart 等<sup>[3]</sup>研究发现了 USP18 的截短亚型 USP18-sf,并证明它是由一种罕见的起始密码子(CUG)编码,这种非常规的起始部位具有较弱的转录起始效率,其可促进约 70% 的 USP18-sf 的表达。功能分析表明,USP18-sf 与全长蛋白都表现出酶活性和干扰 I 型干扰素信号转导的作用;与全长蛋白相比,USP18-sf 表现出不同的亚细胞分布,并在细胞核内表现出增强的去 ISGylation 活性,表明其可能具有更为特殊的功能,但其发挥作用的机制尚不清楚。Tokarz 等<sup>[4]</sup>发现在哺乳动物 F-box 蛋白 skp2 和异位 USP18 水平之间具有逆相关性,进一步研究发现 skp2 蛋白可结合 USP18 并启动它的多泛素化作用,使得 USP18 通过蛋白酶体降解,从而调节 USP18 蛋白的水平,因此 skp2 可能在调节 I 型干扰素的信号转导中发挥重要作用。

**1.2 USP18 与信号转导** USP18 有两个主要功能,即其酶活性和下调下游 I 型干扰素的信号转导。IFN- $\alpha/\beta$  的刺激可上调干扰素刺激基因 15(ISG15)的表达,USP18 能够特异性的从 ISGylation 的蛋白结合物中移出 ISG15,并进一步水解 ISG15 从

而阻碍其发挥生物效应。因此,通过抑制 USP18 的蛋白酶活性从而提高 ISG15 的修饰作用,可能成为增强干扰素干扰病毒复制的一种新手段。

干扰素通过激活 JAK-STAT 信号通路调节多种细胞功能。缺乏 USP18 可导致 USP18<sup>-/-</sup>小鼠对干扰素高度敏感,对淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、水泡性口炎病毒(VSV)、辛德毕斯病毒(SNV)等多种病毒引起的细胞病变效应应具有高度的抵抗力,并对多种肿瘤的发生发展具有较强的抑制作用<sup>[5]</sup>。应用 RNAi 沉默 USP18 后的细胞表现出高水平的 ISG15 修饰蛋白,并出现放大和延长的信号转导与转录激活子 1(STAT1)磷酸化、DNA 结合以及多种干扰素刺激基因(ISGs)诱导增加,表明 USP18 在下调干扰素反应性中具有重要作用,因此认为 USP18 最主要的作用是负性调节干扰素信号转导通路,但 USP18 阻断干扰素介导的 JAK-STAT 信号通路的分子机制尚不十分明确。目前认为 USP18 特异性地连接于干扰素受体 2(IFNAR2)亚单位的近膜区域,覆盖受体的 Box1-Box2 模体,而该区域是干扰素与酪氨酸蛋白激酶 1(JAK1)相互作用的关键部位,因此 USP18 可以与 JAK1 竞争受体,从而阻断 JAK1 的活化以及下游的细胞内信号转导。USP18 阻碍 JAK1-IFNAR2 受体复合物的形成呈剂量依赖性,并呈经典的负反馈方式。更为重要的是,不同于其他磷酸酶如细胞因子信号转导抑制因子(SOCS)、PIAS(protein inhibitor of activated STAT)等发挥效应时会影响许多细胞因子,USP18 介导的阻断效应特异性地作用于 I 型干扰素信号转导通路,表明 USP18 是由 I 型干扰素特异性触发的信号转导通路中新型的体内抑制剂。鉴于这种特异性,USP18 可能成为治疗慢性病毒感染和恶性肿瘤的潜在靶点<sup>[6]</sup>。此外,USP18 和 ISG15<sup>-/-</sup>以及 USP18 和 E1 泛素激活酶(Ube1L)<sup>-/-</sup>小鼠与亲代 USP18<sup>-/-</sup>小鼠有完整的干扰素作用系统,并对病毒的反应正常,ISG15 的 siRNA 并不能改变干扰素的抗丙型肝炎病毒(HCV)活性<sup>[7]</sup>,表明 USP18 阻断 JAK-STAT 信号通路可能并不依赖于它的酶活性。

## 2 USP18 在病毒性肝炎中的表达和意义

病毒性肝炎中 HBV 和 HCV 感染后多呈隐匿性感染状态,而持续性的 HBV、HCV 感染可能会导致肝硬化和原发性肝癌等后果。

IFN- $\alpha$  是目前治疗乙型、丙型肝炎的首选药物之一。荟萃分析表明,慢性乙型肝炎和慢性丙型肝炎患者的 IFN- $\alpha$  治疗持续应答率分别仅为 30% 和 50% 左右。因此,研究 IFN- $\alpha$  抑制肝炎病毒复制的机制,提高患者对 IFN- $\alpha$  的应答率显得尤为重要。IFN- $\alpha$  发挥作用的经典途径为 IFN 与其受体结合并使之二聚化从而改变其构象,进一步激活下游的 JAK,STAT 被 JAK 磷酸化后发生二聚化,然后穿过核膜进入核内调节相关抗病毒蛋白的基因如 MxA、2',5'寡腺苷酸合成酶、IRF7 等的表达,继而抑制病毒的复制。

HBV 可通过多种途径影响 IFN- $\alpha$  的抗病毒活性,从而影响其治疗效果。HBV 病毒可通过下调 STAT1 等的表达抑制 IFN- $\alpha$  JAK-STAT 信号转导途径相关分子和抗病毒蛋白的表达,但其影响 IFN- $\alpha$  抗病毒活性的机制目前尚无一致的结论。Xiao 等<sup>[8]</sup>利用基因芯片技术对 13 例慢性乙型肝炎患者 IFN- $\alpha$  治疗前的肝组织进行了基因谱的差异研究,发现应答组和无应答组肝细胞有 3 592 个基因有明显差异表达,且这些差异基因主要集中在 ISGs 和免疫调节相关基因;在无应答组中,位于同一信号传导途径的 USP18 和 CEB1 在治疗前高表达,提示 USP18 可通过抑制 JAK-STAT 信号通路明显影响 IFN- $\alpha$  的治

疗乙型肝炎的效果。Kim 等<sup>[9]</sup>发现在 USP18<sup>-/-</sup>小鼠中 HBV DNA 的稳态水平显著降低,肝组织中 CXC19、GBP1、IRF1、IRF7 等干扰素诱导基因显著上调,并通过研究只表达无抑肽酶活性 USP18 的小鼠发现,USP18 下调 JAK-STAT 信号通路并不依赖于它的抑肽酶活性。应用 RNAi 沉默 USP18 后 ISG15 蛋白的表达增加,HBV DNA 的复制减少甚至反转,推测沉默 USP18 的表达能增强 IFN- $\alpha$  抗病毒活性。因此 USP18 不仅可用于预测 IFN- $\alpha$  治疗效果,并且可能是一个提高 IFN- $\alpha$  治疗病毒性感染疗效的关键基因。

Chen 等<sup>[10]</sup>应用实时定量 PCR 技术检测了干扰素治疗 HCV 应答组和无应答组肝组织中基因水平的差异表达,发现 USP18 在无应答组中显著上调,这与其他研究者在 HBV 中的研究结果相似,而且在基因 1 型患者的肝组织中 USP18 的表达水平明显高于基因 3 型患者,因此 USP18 可作为预测 IFN- $\alpha$  治疗慢性丙型肝炎疗效的指标。Murray 等<sup>[11]</sup>应用 RNAi 技术沉默 USP18 后干扰素信号通路中的 ISRE 的活性和其下游的 2',5'寡腺苷酸合成酶(2',5' Oligoadenylate synthetase, 2-5OAS)的表达明显增强,细胞对干扰素的敏感性增强,STAT1 的酪氨酸磷酸化作用延长,ISGs 表达亦明显增强。Sarasin-Filipowicz 等<sup>[12]</sup>发现 USP18 是导致 IFN- $\alpha$  再次刺激时应答效率越来越低的关键调节因子。因此,抑制 USP18 的表达可能成为提高 IFN- $\alpha$  疗效的新手段。此外,Francois-Newton 等<sup>[13]</sup>发现使用 IFN- $\alpha$  时,USP18 通过阻碍 IFN- $\alpha$ 2 功能结合位点的形成来抑制干扰素信号转导,而使用 IFN- $\lambda$  后仍可检测到干扰素信号转导通路相关产物的表达,表明 IFN- $\lambda$  可能作为 IFN- $\alpha$  应答不佳的替代治疗。Dill 等<sup>[14]</sup>利用基因芯片技术研究 IFN- $\alpha$  治疗急性和慢性丙型肝炎不同反应性的机制,在慢性丙型肝炎无应答患者的肝脏标本中观察到 USP18 的表达上调,而在急性丙型肝炎患者中没有观察到这种现象,其具体机制有待进一步深入研究。

## 3 USP18 在其他相关疾病中的表达和意义

USP18 在立克次体感染的人微血管内皮细胞(HMECs)内的表达增加,USP18 敲除的 HMECs 内 STAT1 磷酸化的增加使 ISGs 如 OAS1、MX1 和 GBP1 转录激活,证明 USP18 可通过下调 STAT1 的活性发挥负性调节作用<sup>[15]</sup>。此外,敲除 USP18 的小鼠对伤寒沙门氏菌、LCMV 和 VSV 感染的细胞病变效应的抵抗能力比野生型小鼠更强。

USP18 在许多自身免疫性疾病的发病中也扮演了重要角色,在皮炎(DM)、多发性硬化(MS)患者中均检测到 USP18 的差异表达<sup>[16-17]</sup>。有研究发现,抑制 USP18 可通过增加 STAT 信号转导和线粒体途径的细胞凋亡而促进干扰素诱导的胰腺  $\beta$  细胞的炎症和凋亡。USP18 的去泛素化活性也可广泛影响自身免疫性疾病的信号转导机制,USP18 能通过对 TGF- $\beta$  激活激酶 1(TAK1)-TAK1 结合蛋白 1(TAB1)复合物的去泛素化调节来调控 T 细胞的活化和 T 辅助细胞 17(Th17)的分化<sup>[18]</sup>,故 USP18 可能成为治疗自身免疫性疾病的重要靶点。

不仅如此,USP18 还可能是一个具有广泛前景的治疗多种实体肿瘤的药物靶点,急性早幼粒细胞白血病(APL)、恶性肺部肿瘤、乳腺肿瘤中 USP18 的表达亦显著增加,干扰 USP18 表达可增加肿瘤细胞对治疗药物的反应性<sup>[19-21]</sup>。Shahidul 等<sup>[22]</sup>在肾母细胞瘤的研究中发现,USP18 可以通过上调 EGFR 的表达从而促进肾细胞的增殖,miR-7 可参与抑制 EGFR 的表达和肿瘤细胞的致瘤活性;Duex 等<sup>[23]</sup>研究发现 USP18 敲除可促进 miR-7 的上调,因此抑制 USP18 可治疗 EGFR 失

调的肿瘤。

#### 4 结 语

USP18 在很大程度上能影响干扰素治疗病毒性感染的效果,可作为预测其疗效的关键基因;同时,随着新的分子生物学技术的不断发展,USP18 的生物学功能及其介导的信号通路必将更加清楚,USP18 极有可能成为病毒性肝炎、自身免疫性疾病和肿瘤性疾病具有广泛应用前景的新的药物治疗靶点,值得进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] Liu LQ, Ilaria R Jr, Kingsley PD, et al. A novel ubiquitin-specific protease, UBP43, cloned from leukemia fusion protein AML1-ETO-expressing mice, functions in hematopoietic cell differentiation[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(4):3029-3038.
- [2] Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1695(1/3):189-207.
- [3] Burkart C, Fan JB, Zhang DE. Two independent mechanisms promote expression of an N-terminal truncated USP18 isoform with higher DeISGylation activity in the nucleus[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(7):4883-4893.
- [4] Tokarz S, Berset C, La Rue J, et al. The ISG15 isopeptidase UBP43 is regulated by proteolysis via the SCFSkp2 ubiquitin ligase[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(45):46424-46430.
- [5] Kim KI, Malakhova OA, Hoebe K, et al. Enhanced antibacterial potential in UBP43-deficient mice against *Salmonella typhimurium* infection by up-regulating type I IFN signaling[J]. *J Immunol*, 2005, 175(2):847-854.
- [6] Burkart C, Fan JB, Zhang DE. Two independent mechanisms promote expression of an N-terminal truncated USP18 isoform with higher DeISGylation activity in the nucleus[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(7):4883-4893.
- [7] Chen L, Li S, McGilvray I. The ISG15/USP18 ubiquitin-like pathway (ISGylation system) in hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(10):1427-1431.
- [8] Xiao C, Qin B, Chen L, et al. Preactivation of the interferon signaling in liver is correlated with non-response to interferon alpha therapy in patients chronically infected with hepatitis B virus[J]. *J Viral Hepatitis*, 2012, 19(2):e1-e10.
- [9] Kim JH, Luo JK, Zhang DE. The level of hepatitis B virus replication is not affected by protein ISG15 modification but is reduced by inhibition of UBP43 (USP18) expression[J]. *J Immunol*, 2008, 181(9):6467-6472.
- [10] Chen L, Borozan I, Feld J, et al. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(5):1437-1444.
- [11] Murray EJ, Burden F, Horscroft N, et al. Knockdown of USP18 increases  $\alpha$  2a interferon signaling and induction of interferon-stimulating genes but does not increase antiviral activity in Huh7 cells[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(9):4311-4319.
- [12] Sarasin-Filipowicz M, Wang X, Yan M, et al. Alpha interferon induces long-lasting refractoriness of JAK-STAT signaling in the mouse liver through induction of USP18/UBP43[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(17):4841-4851.
- [13] Francois-Newton V, Magno de Freitas, Almeida G, et al. USP18-based negative feedback control is induced by type I and type III interferons and specifically inactivates interferon  $\alpha$  response[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7):e22200.
- [14] Dill MT, Makowska Z, Duong FH, et al. Interferon- $\gamma$ -stimulated genes, but not USP18, are expressed in livers of patients with acute hepatitis C [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(3):777-786.
- [15] Colonne PM, Sahni A, Sahni SK. *Rickettsia conorii* infection stimulates the expression of ISG15 and ISG15 protease UBP43 in human microvascular endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 416(1/2):153-158.
- [16] Salajegheh M, Kong SW, Pinkus JL, et al. Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) conjugates proteins in dermatomyositis muscle with perifascicular atrophy[J]. *Ann Neurol*, 2010, 67(1):53-63.
- [17] Malhotra S, Morcillo-Suárez C, Nurtdinov R, et al. Roles of the ubiquitin peptidase USP18 in multiple sclerosis and the response to interferon- $\beta$  treatment[J]. *Eur J Neurol*, 2013, 20(10):1390-1397.
- [18] Liu X, Li H, Zhong B, et al. USP18 inhibits NF- $\kappa$ B and NFAT activation during Th17 differentiation by deubiquitinating the TAK1-TAB1 complex [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(8):1575-1590.
- [19] Guo Y, Dolinko AV, Chinyenetere F, et al. Blockade of the ubiquitin protease UBP43 destabilizes transcription factor PML/RAR $\alpha$  and inhibits the growth of acute promyelocytic leukemia[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23):9875-9885.
- [20] Guo Y, Chinyenetere F, Dolinko AV, et al. Evidence for the ubiquitin protease UBP43 as an antineoplastic target [J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(9):1968-1977.
- [21] Burkart C, Arimoto K, Tang T, et al. USP18 deficient mammary epithelial cells create an antitumour environment driven by hypersensitivity to IFN- $\gamma$  and elevated secretion of Cxcl10[J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(7):967-982.
- [22] Shahidul Makki M, Cristy Ruteshouser E, Huff V. Ubiquitin specific protease 18 (USP18) is a WT1 transcriptional target[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(5):612-622.
- [23] Duex JE, Comeau L, Sorkin A, et al. USP18 regulates epidermal growth factor (EGF) receptor expression and cancer cell survival via MicroRNA-7 [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(28):25377-25386.