

文章编号: 1004-0374(2010)11-1097-05

乙肝病毒表面抗原持续表达的新致病机制

赵超, 田晓晨, 闻玉梅*

(复旦大学上海医学院教育部/卫生部医学分子病毒学重点实验室, 复旦大学生物医学研究院, 上海200032)

摘要: 乙型肝炎表面抗原(HBsAg)持续阳性是控制乙肝中难以解决的重大问题。本研究通过揭示HBsAg致病机制的基础研究,寻找抑制或清除HBsAg的新途径。通过建立有可比性的HBsAg转基因鼠和稳定表达细胞系及相应对照,进行比较转录组学和蛋白质组学研究,发现了HBsAg在HBV慢性感染中的一些新致病机制。其中包括:HBsAg促进肝细胞内CypA分泌,后者可趋化炎症细胞在HBsAg阳性灶周围浸润;在细胞模型中,HBsAg分泌可引起胞内GRP78蛋白下降,导致肝细胞抗凋亡能力减弱;发现HBsAg在细胞中可上调截短的LEF1基因的表达,缺乏活化全长LEF1促成瘤和增殖活性;而肝癌组织中LEF1则倾向于核内分布,并活化Wnt下游基因Cyclin D1与c-myc,有促肿瘤活性。在转基因鼠和细胞模型中都发现了物质和能量代谢相关的基因发生变化,并与临床慢性乙肝患者表现相符。研究中有关CypA的发现提供了抑制HBsAg的新途径;有关代谢的变化提出了改变饮食内容与习惯可能有利于HBsAg阳性感染者的预后。

关键词: 乙肝病毒; 表面抗原; 致病机制; 慢性感染

中图分类号: R512.6; R373 **文献标识码:** A

New pathogenesis of persistent hepatitis B surface antigen expression

ZHAO Chao, TIAN Xiao-chen, WEN Yu-mei*

(Key Laboratory of Medical Molecular Virology, Ministry of Education/ Ministry of Health, Shanghai Medical College, Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Persistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) is an important but difficult problem for the control of viral hepatitis B. The aim of this study was to reveal the pathogenesis of HBsAg in hosts, and to provide clues for development of new strategies for inhibition or clearance of HBsAg. Transcriptomic and proteomic technologies were employed together with biological and molecular biological technologies to explore the pathogenesis of hepatitis B surface antigen (HBsAg). In a model of HBsAg positive transgenic mice and HBsAg expressing cell lines, compared to their control counterparts, several new pathogenic mechanisms were observed. The major findings are: (1) HBsAg induced extracellular secretion of cyclophilin A (CypA), which was associated with inflammatory responses in transgenic mice; (2) Proteomic results suggested that HBsAg played a pro-apoptotic role through down-regulation of GRP78; (3) HBsAg induced marked up-regulation of the truncated isoform of lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF-1) in cells, which was unable to enhance tumorigenesis and proliferative competence in nude mice; (4) LEF-1 was found with higher incidence to localize in the nucleus in HBV related HCC tissues and was speculated that HBsAg could stimulate proliferation and functional modification of hepatocytes via LEF-1 through the Wnt pathway at the pre-malignant stage; (5) Alterations in carbohydrate,

收稿日期: 2010-04-12

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30530040); 上海市自然科学基金(10ZR1402900, 10ZR1402300); 中国博士后科研基金(20080440075); 复旦大学上海医学院青年骨干教师基金(09J05); 复旦大学上海医学院研究学者基金

* 通讯作者: E-mail: ymwen@shmu.edu.cn

lipid and amino acid metabolism were induced by expression of HBsAg. The new finding of induced secretion of CypA by HBsAg provides new target for inhibition of HBsAg; while the metabolic changes caused by HBsAg expression suggest that by adjusting food habit and nutrition could benefit HBsAg positive hosts by progressing to more favorable prognosis.

Key words: hepatitis B virus; surface antigen; pathogenesis; chronic infection

目前全球乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)慢性感染者超过3.5亿,其中约1/4可发展为严重的肝脏疾病,包括慢性肝炎、肝纤维化、肝硬化和肝细胞肝癌^[1]。因此,乙肝病毒慢性感染严重威胁人群健康。乙肝表面抗原阳性不仅是乙肝慢性化机制中的问题之一,也是社会及广大人民群众关切的重要热点和难点。

1 乙肝病毒表面抗原及其研究动向

乙肝病毒表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)于1963年由研究人类学的Blumberg在澳大利亚土著人的血清中发现。通过数年的研究方才明确与一种经血源传播的肝炎(现称为乙型肝炎)相关。HBsAg的发现早于病毒颗粒(Dane颗粒)的发现整整7年,其原因是因为乙肝感染者血清中有大量的HBsAg。至今,尚不了解为何仅此一种病毒有大量的无病毒核酸蛋白颗粒。虽然HBsAg因具有强而有效的免疫保护性,已成功地作为预防性疫苗,但是对于已感染乙肝的患者持续存在的大量HBsAg仍无有效清除的治疗方法。因此,对于这一难题必须从基础研究入手。

乙肝病毒属嗜肝DNA病毒科,基因组由结构紧凑的3.2 kb的双链DNA组成,其复制过程需借助RNA复制中间体进行逆转录,这些特点决定了HBV特殊的生物学特性。感染者血清中含大量直径22 nm、长短各异的球形或棒状亚病毒颗粒和直径42 nm的球形Dane颗粒。两种病毒颗粒都具有7 nm的含磷脂的外膜蛋白层(包膜蛋白),称为乙肝表面抗原。包膜蛋白分为大、中、小三种类型(large、middle、small HBsAg,即LHBs、MHBs、SHBs),由HBV的S基因(分为preS1、preS2和S区)编码,但转录起始位点不同。HBsAg在血清中持续存在超过6个月是HBV慢性感染的标志。在大多数患者血清中,HBsAg组成的亚病毒颗粒含量远超过成熟病毒(Dane)颗粒,可多达后者的1 000倍以上,含量达每毫升数百纳克或更高。甚至在检测不到病毒复制的情况下,HBsAg仍能持续大量存在,并难以自体内清除。因此,HBsAg的研究是HBV慢性感染

研究的重点之一。

HBsAg在HBV感染、病毒颗粒形成、免疫识别、影响宿主细胞正常生理功能等方面发挥重要作用。目前HBsAg与宿主细胞关系的研究主要在于以下几个方面:(1)HBsAg preS1区和S区与肝细胞表面受体的识别与鉴定^[2];(2)HBsAg与宿主免疫应答的关系;(3)HBsAg在胞内信号通路中的作用;(4)HBsAg及其变异体在细胞损伤中的作用^[3],及与肝癌发生的相关性;(5)HBsAg干扰宿主的物质代谢和氧化还原反应等正常生理过程,是可能的致病机制之一。在以上研究中,一方面“对外”,细胞外HBsAg颗粒通过与细胞识别产生感染,诱导和干扰免疫应答;一方面“对内”,细胞内HBsAg在翻译、加工、分泌或降解过程中,通过多种机制干扰宿主正常信号通路和生理过程,产生细胞损伤,导致肝脏疾病。

2 乙肝表面抗原致病机制的研究进展

为系统研究HBsAg与宿主的关系,本课题组选用分离自我国的乙肝毒株建立了持续表达HBsAg转基因鼠和稳定表达HBsAg的细胞系。用转录组学及蛋白质组学方法,探索HBsAg对转基因小鼠肝脏、肾脏及人肝细胞系的转录体组和蛋白表达谱的影响,以揭示宿主细胞持续表达HBsAg的机制。在系统生物学研究基础上,结合传统病毒学和分子生物学方法,重点分析与细胞增殖、凋亡、分泌、信号传导、免疫应答相关的途径及环节,阐明HBsAg与宿主细胞相互作用的新机制。

2.1 HBsAg导致Cyclophilin A分泌至胞外,诱导小鼠肝脏炎性浸润

利用比较蛋白质组学研究HBsAg阳性转基因鼠肝与对照组鼠的差异蛋白谱,解析HBsAg持续存在的蛋白质谱,发现共有93种蛋白质发生改变。其中Cyclophilin A(CypA)(免疫抑制剂环孢菌素A,Cyclosporin A的主要药靶)含量下降。这一蛋白在稳定表达HBsAg的HepG2-S-G2细胞系中也下降,其下降的机制并非是基因转录水平下降,而是增加了CypA向细胞外转移^[5]。用免疫共沉淀、GST

pull-down 实验及共聚焦显微镜技术发现 HBsAg 可与 CypA 结合, HBsAg 与胞内 CypA 结合的强度显著高于与胞外。在 HBsAg 阳性转基因鼠血清中也发现 CypA 含量增多, 在 HBsAg 阳性乙肝患者血清中 CypA 量也高于正常人。同一肝移植患者由 HBsAg 阳性转为阴性后血清中 CypA 也相应降低。这些现象说明 HBsAg 与 CypA 共分泌有相关性, 而两者相互作用的分子基础解释了共分泌的机制; 也证实 HBsAg 促 CypA 分泌具有特异性, HBsAg 并不影响包括甲胎蛋白在内的其他蛋白分泌^[6]。

为研究胞外 CypA 的生物学意义, 把携带有 S 基因的质粒用高压尾静脉注入法在小鼠肝脏中表达 HBsAg, 发现 HBsAg 阳性鼠血清中 CypA 含量高于 HBsAg 阴性鼠, 病理学观察到鼠肝组织 HBsAg 阳性灶周围有单个核细胞为主的炎症细胞浸润, 并伴有血清转氨酶水平升高。为证实这一现象与 CypA 相关, 对小鼠先用 cyclosporin A 处理后则明显降低炎症细胞浸润程度。由于胞外 CypA 发挥多种生物学活性都通过细胞膜上的 CD147 分子介导^[7], 在表达 HBsAg 的尾静脉高压注射模型中注射 CD147 单抗以阻断 CypA 的作用, 结果发现鼠肝无炎症细胞浸润, 血清转氨酶水平正常^[6]。这些研究结果说明 HBsAg 特异性促进 CypA 分泌, 后者发挥趋化因子作用, 诱导炎症细胞浸润肝脏, 这是 HBV 导致炎症损伤的一种新机制。

2.2 HBsAg 引起胞内凋亡相关蛋白含量变化, 提示 GRP78 在 HBsAg 促肝细胞凋亡中起作用

肝脏组织由多种细胞组成, 为了简化模型, 避免非肝组织细胞的干扰, 分别在 HepG2 和 Huh7 细胞系上建立了多株 HBsAg 稳定表达细胞系, 用于细胞学研究。应用对比蛋白质组学, 发现系统表达 S 基因的细胞与对照细胞相比共鉴定出 81 个差异表达蛋白。用 MS/MS 对差异表达蛋白进行鉴定, 发现可归纳为代谢相关、免疫应答相关、蛋白质修饰和信号转导等几大类。通过差异蛋白质组学研究发现, HBsAg 稳定表达细胞系中凋亡相关的蛋白质含量发生变化, 包括 glucose-regulated protein 78 kD (GRP78)、heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (hnRNP H)、Rho GDP dissociation inhibitor (GDI)、cystatin、far upstream element-binding protein (FUSEbp) 和 TNF receptor-associated protein 1 (TRAP1) 等, 其中促凋亡蛋白丰度升高, 抗凋亡蛋白丰度降低。具有抗凋亡活性的葡萄糖调节蛋白 GRP78 在多个 HBsAg 分泌细胞模型中丰度下降。在 Huh7 细胞

中, 瞬时转染表达 HBsAg 或(和)干扰胞内 GRP78 表达都可促进凋亡下游产物 85 k 的 PARP 片段增加, 细胞存活率下降。在 HBsAg 稳定细胞系中回补 GRP78 后可回复细胞的抗凋亡能力^[8]。同时, RT-PCR 发现 HBsAg 表达不影响 GRP78 mRNA 水平。本研究通过差异蛋白质组学结合功能研究, 发现 HBsAg 分泌诱导胞内 GRP78 含量下降, 影响后者抗凋亡活性, 阐明 HBsAg 通过调控胞内 GRP78 促肝细胞凋亡的机制, 揭示 HBsAg 的一种新致病机制。

2.3 HBsAg 上调 lymphoid enhancer binding factor 1 的表达及其在肝癌发生发展中的作用

对 HBsAg 稳定表达细胞系进行的基因表达谱研究发现, HBsAg 表达可导致诸多基因有上下调的变化, 包括氨基酸、糖、脂类代谢、蛋白质修饰、细胞生长、信号转导、免疫等。其中发现 HBsAg 稳定表达细胞系 (HepG2-S-G2) 中上调截短及全长转录调控因子 LEF-1 (lymphoid enhancer binding factor 1) 的表达。通过 RT-PCR 和 real-time PCR 方法, 这一现象在多种表达 HBsAg 的不同细胞系中得到印证。由于 LEF-1 是 wnt 通路中的一个转录调控因子, 其下游效应因子为 Cyclin D1 和 c-myc, 可促进细胞增殖, 与肿瘤的生成和增殖有关, 但用 HepG2-S-G2 研究, 未发现 HepG2-S-G2 细胞可在裸鼠中增殖或诱生肿瘤。进一步研究发现上调的主要是相对分子质量为 39 k 的 LEF1 的截短体^[9]。通过对 30 对肝癌及癌旁组织以及 9 份正常肝组织分别用免疫组化及 RT-PCR 方法研究 LEF1 和 HBsAg 的表达及 LEF1 下游 c-myc 和 Cyclin D1 的表达水平。结果发现 LEF1 与 HBsAg 表达成正相关性, 在癌组织中, LEF1 主要存在核内或在胞浆内, 而在癌旁组织中 LEF1 则主要在胞浆中, 在正常肝组织中 LEF1 则仅在胞浆内。用 RT-PCR 研究发现截短的 LEF1 在肝癌组织中显著上调, 而且其下游基因 Cyclin D1 与 c-myc 也呈上调^[10]。结果提示在癌前及癌变期 HBsAg 可能起不同的作用, 在癌前期 HBsAg 上调 LEF1 及下游基因, 可以促进细胞增殖, 然而当细胞因其他因素出现恶变, 则 HBsAg 表达降低, 提示 HBsAg 可能在癌前期起促癌作用。

2.4 HBV 持续感染改变宿主物质代谢水平

先前已发现部分乙肝患者的物质代谢水平异常, 如约一半慢性乙肝患者血糖水平低于正常人。国外学者对 HBV 转基因鼠进行的基因芯片研究发现, HBV 可上调脂质合成相关基因表达, 抑制能量代谢基因, 如细胞色素 P450^[11]。通过对持续表达

HBsAg 转基因鼠肝脏和细胞系进行的系统生物学研究发现,更多与物质和能量代谢相关的候选基因或蛋白质发生变化,提示 HBsAg 可影响宿主的物质和能量代谢水平。对转基因鼠肝脏进行系统生物学研究,观察到胆固醇合成反应链中的催化酶,如甲羟戊酸脱羧酶(MVD)、固醇五碳脱氢酶(SC5D)和法呢基焦磷酸合成酶(FDPS)在 mRNA 或蛋白质水平上在转基因小鼠肝组织中与对照鼠相比存在差异,提示胆固醇合成的增强。同时,胆汁酸合成途径的限速酶——醛酮还原酶(AKR1D1)在蛋白质水平降低,提示胆固醇代谢的主要去路为胆汁酸合成的减少^[12,13]。而转基因鼠肝脏中糖代谢酶的变化,提示糖酵解降低、糖异生增强,可使糖原生成作用加强。参与尿素循环酶的变化,提示 HBsAg 可引起宿主氨生成增多,去路减少,而导致血氨升高。这些物质和能量代谢的改变引起的结果是:一方面,被改变的物质和能量代谢产物直接导致疾病发生;另一方面,这种改变造成微环境不稳定,使得宿主极易受外界因素干扰而发生失代偿。

2.5 HBsAg转基因鼠转录组学研究发现乙肝相关肾炎发病的又一机制

在对持续表达 HBsAg 转基因鼠和对照鼠肝、肾组织的转录体组学对比研究中发现,转基因鼠肝脏中 43 个基因上调和 104 个基因下调(大于 2 倍)。肾脏共有 520 个基因上调,76 个基因下调(大于 2 倍)。对肾脏差异表达谱基因分类分析,发现与补体激活、急性反应相关的途径及血液凝固相关基因的改变最为显著。选择部分差异表达谱有变化的基因用 RT-PCR 在不同批次的转基因鼠肾脏中证实,HBsAg 转基因鼠肾脏中 C3 补体和 C 反应蛋白转录水平明显升高。对鼠血清及肾脏的 C3 补体蛋白水平做了初步定量研究,结果表明转基因鼠的肾脏 C3 量增多,而血清 C3 量减少^[4]。由于转基因鼠中并不存在针对 HBsAg 的抗体,所以变化不是由 HBsAg-抗 HBs 复合物沉积所致,而是由转基因鼠中 HBsAg 上调补体介导的炎症通路所致,这是乙肝相关肾炎的另一个发病新机制。

3 蛋白质组学新技术有利于 HBV 与宿主关系的研究

通过学科交叉与合作,建立了用蛋白质组学研究病毒-宿主细胞关系的一系列技术和策略,配合转录组学研究和传统分子生物学方法,用于 HBV 与

宿主关系的研究。这些高通量蛋白质组学新方法包括:(1)低丰度蛋白质纳米材料富集和高效质谱鉴定的方法^[15];(2)蛋白质翻译后修饰技术的研究和应用^[16],增强磷酸化肽段 MALDI 离子化效率的基质体系研究和化学修饰法增强磷酸化肽段 SI/MALDI 离子化的研究,以及 N 糖蛋白的富集和质谱检测研究;(3)痕量蛋白质快速高效酶解和鉴定的新方法。利用这些新方法,通过进一步生物信息学分析,能有效鉴定出 HBV 引起变化的宿主蛋白,找出受其影响的相关通路。这种高通量的研究策略可为生物学研究提供有价值的候选蛋白或基因,有助于找出抑制或清除 HBsAg 的新靶点与新途径。

4 小结

利用分离自我国慢性肝炎携带者的 HBV 毒株,建立了 HBV 转基因鼠模型和 HBsAg 稳定细胞株,可持续表达 HBsAg,模拟 HBV 慢性感染状态。运用比较转录组学和蛋白质组学相结合的策略,筛选疾病相关的候选基因和蛋白质,并通过生物学方法进行验证和功能研究,揭示了 HBsAg 的一些新致病机制(图 1)。本项目研究发现 HBsAg 促进肝细胞内 CypA 分泌,后者可趋化炎症细胞,引起肝脏浸润,为抑制或清除 HBsAg 提出了新靶点与新途径。此外,在 HBsAg 阳性转基因鼠和细胞模型中都发现了物质和能量代谢相关的基因发生变化,并与临床慢性乙肝患者表现相符;可能通过改变 HBsAg 感染者的饮食习惯及生活方式会有利于感染者的预后。这些发现将通过与药物学者及传染病学者共同作进一步的转化型研究为社会服务。

[参 考 文 献]

- [1] Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, 2004, 350(11): 1118-29
- [2] Deng Q, Zhai JW, Michel ML, et al. Identification and characterization of peptides that interact with hepatitis B virus via the putative receptor binding site. *J Virol*, 2007, 81(8): 4244-54
- [3] Chua PK, Wang RY, Lin MH, et al. Reduced secretion of virions and hepatitis B virus (HBV) surface antigen of a naturally occurring HBV variant correlates with the accumulation of the small S envelope protein in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J Virol*, 2005, 79(21): 13483-96
- [4] Ren J, Wang L, Chen Z, et al. Gene expression profile of transgenic mouse kidney reveals pathogenesis of hepatitis B virus associated nephropathy. *J Med Virol*, 2006, 78(5):

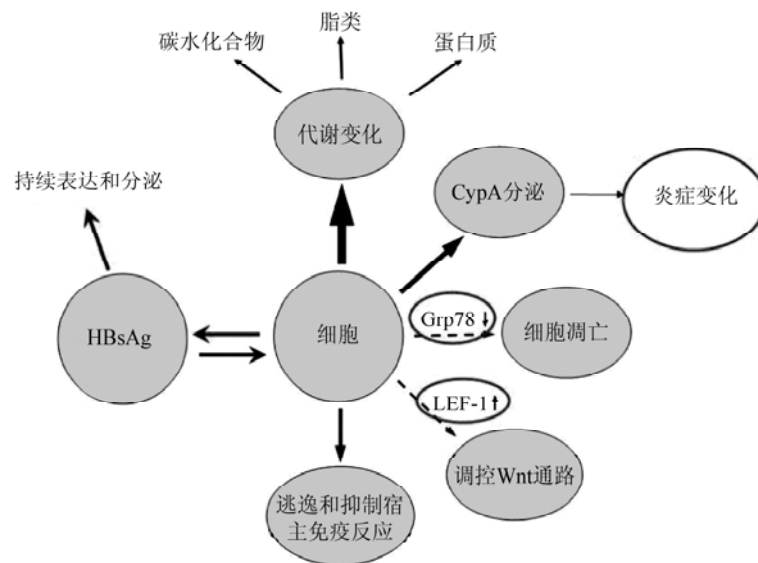


图 1 HBsAg 与细胞相互作用及其致病机制示意图

551-60

[5] Zhao C, Fang CY, Xiao CT, et al. Proteomic analysis of hepatitis B surface antigen positive transgenic mouse liver and decrease of cyclophilin A. *J Med Virol*, 2007, 79(10): 1478-84

[6] Tian X, Zhao C, Zhu H, et al. Hepatitis B surface antigen interacts and promotes cyclophilin A secretion: possible link to pathogenesis of HBV infection. *J Virol*, 2010, 84(7): 3373-81

[7] Yurchenko V, Zybarth G, O'Connor M, et al. Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J Biol Chem*, 2002, 277(25): 22959-65

[8] Zhao C, Zhang W, Tian XC, et al. Proteomic analysis of cell lines expressing small hepatitis B surface antigen revealed decreased glucose-regulated protein 78 kD expression in association with higher susceptibility to apoptosis. *J Med Virol*, 2010, 82(1): 14-22

[9] Tian X, Zhao C, Ren J, et al. Gene-expression profiles of a hepatitis B small surface antigen-secreting cell line reveal upregulation of lymphoid enhancer-binding factor 1. *J Gen Virol*, 2007, 88(Pt 11): 2966-76

[10] Tian X, Li J, Ma ZM, et al. Role of hepatitis B surface antigen in the development of hepatocellular carcinoma: regulation of lymphoid enhancer-binding factor 1. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28(1): 58

[11] Hajjou M, Norel R, Carver R, et al. cDNA microarray analysis of HBV transgenic mouse liver identifies genes in lipid biosynthetic and growth control pathways affected by HBV. *J Med Virol*, 2005, 77(1): 57-65

[12] Ren J, Zhao C, Fang CY, et al. Transcriptomic and proteomic studies on HBsAg-positive transgenic mouse livers suggest alterations in carbohydrate, lipid and amino acid metabolism [M]//Wen YM, et al. Recent works on microbes and infections in China. Singapore: World Scientific Publishing Co., 2009: 59-70

[13] 任军, 赵超, 方彩云, 等. 乙型肝炎表面抗原阳性转基因小鼠肝组织基因表达谱及蛋白组学的初步研究. *微生物与感染*, 2006, 1(1): 7-14

[14] Wen YM. Virus-host interactions in viral hepatitis B. *Hepat Int*, 2010, 4(suppl 1): S20-22

[15] Shen WW, Xiong HM, Xu Y, et al. ZnO-poly(methyl methacrylate) nanobeads for enriching and desalting low-abundant proteins followed by directly MALDI-TOF MS analysis. *Anal Chem*, 2008, 80(17): 6758-63

[16] Zhang B, Zhao C, Luo KX, et al. New lysine-acetylated proteins screened by immunoaffinity and liquid chromatography-mass spectrometry. *Sci Chn Chem*, 2010, 53(1): 238-44