

乙型肝炎病毒X蛋白与肝细胞内质网应激

邱杨, 王冬梅, 林忠宁

背景资料
为利用内质网(endoplasmic reticulum, ER)与乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的X蛋白(HBV X protein, HBx)之间的关系寻找新靶点药物为治疗HBV诱导的肝脏疾病提供理论依据。本文将从HBx与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)、ER应激与肝脏疾病、HBx与内质网应激三大部分解释HBx与内质网应激在肝脏疾病发病机制中的作用以及在肝病干预治疗上的意义等方面进行综述。

邱杨, 王冬梅, 林忠宁, 分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室 厦门大学公共卫生学院 福建省厦门市 361102

邱杨, 在读硕士, 主要从事肝毒性损伤和机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, Nos. 81172705, 81472997, 81573181
973计划前期研究专项基金资助项目, No. 2014CB560710
福建省自然科学基金资助项目, Nos. 2014J01372, 2015J01344

作者贡献分布: 本文综述由邱杨与王冬梅完成; 林忠宁审核。

通讯作者: 林忠宁, 教授, 博士生导师, 361102, 福建省厦门市翔安区翔安南路, 分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室, 厦门大学公共卫生学院. linzhn@xmu.edu.cn
电话: 0592-2880615

收稿日期: 2015-12-30
修回日期: 2016-01-16
接受日期: 2016-01-23
在线出版日期: 2016-03-08

Hepatitis B virus X protein and endoplasmic reticulum stress

Yang Qiu, Dong-Mei Wang, Zhong-Ning Lin

Yang Qiu, Dong-Mei Wang, Zhong-Ning Lin, State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics; School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 81172705, 81472997 and 81573181; Early-stage Project of National Key Basic Research Program of China, No. 2014CB560710; the Natural Science Foundation of Fujian Province of China, Nos. 2014J01372 and 2015J01344

Correspondence to: Zhong-Ning Lin, Professor, State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics; School of Public Health, Xiamen University, Xiang'an South Road, Xiang'an District, Xiamen 361102, Fujian Province, China. linzhn@xmu.edu.cn

Received: 2015-12-30
Revised: 2016-01-16
Accepted: 2016-01-23
Published online: 2016-03-08

Abstract

Persistent hepatitis B virus (HBV) infection is closely related to chronic hepatitis, cirrhosis and liver cancer. China is a country with a high prevalence of HBV infection, where the infection rate is up to 60%-70%, bringing great threat and harm to public health. What's worse is that HBV infection is the main etiology factor of primary hepatocellular carcinoma (HCC). However, the underlying mechanisms of virus-induced tumor formation remain controversial. Numerous studies indicate that HBV X protein (HBx) plays a prominent role in HBV-induced liver cell damage, hepatitis, liver fibrosis and malignant transformation, and is related to liver cancer induced by environmental exposure factors. As a multifunctional regulatory protein, HBx regulates a variety of cell signal transduction pathways, including the endoplasmic reticulum (ER) stress response. ER stress refers to the dysfunction of the ER, and misfolded or unfolded proteins gather in the ER. It is noteworthy that the expression of HBx can induce or effect ER stress, although the molecular mechanism remains unclear. This review summarizes the role of HBx in ER stress pathways, providing clues for the liver injury induced by HBV infection.

© 2016 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Hepatitis B virus; Hepatitis B virus X protein; Endoplasmic reticulum stress

同行评议者
裘云庆, 教授, 主任医师, 博士生导师, 浙江大学医学院附属一院感染科; 高月求, 教授, 主任医师, 博士生导师, 上海中医药大学附属曙光医院中医肝病科

Qiu Y, Wang DM, Lin ZN. Hepatitis B virus X protein and endoplasmic reticulum stress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2016; 24(7): 1040-1047 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/24/1040.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v24.i7.1040>

摘要

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染与持续性肝损伤和原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)关系密切。我国是HBV感染的高流行区, 给人群带来的健康威胁和损害是关注的热点问题。HBV感染是HCC的主要病原学因素之一, 但其诱导肿瘤形成潜在的分子机制依然存在争议。其中HBV的X蛋白(HBV X protein, HBx)在HBV致肝细胞损伤、诱导肝细胞恶性转化、与环境因素暴露协同诱导肝致癌作用等过程中所起的作用都是研究的焦点。HBx作为多功能调控蛋白调控大量细胞信号转导通路, 包括内质网(endoplasmic reticulum, ER)应激反应, 值得关注的是近几年已有文献报道HBx表达对肝细胞ER应激的诱导作用, 但对调控的分子机制的认识还不明确。因此, 本文综述了HBx影响肝细胞ER应激的研究进展, 为HBV感染诱导肝损伤和疾病的分子机制提供线索。

© 2016年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 乙型肝炎病毒; 乙型肝炎病毒X蛋白; 内质网应激

核心提示: 迄今为止, 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的X蛋白(HBV X protein, HBx)与内质网(endoplasmic reticulum, ER)应激关系的研究还很有限, 此综述阐述了HBx的表达对细胞内ER应激的影响, 探讨HBx调控ER应激在HBV感染诱发肝损伤中的潜在作用, 为探明HBx介导的HBV相关HCC发展的分子机制提供依据。

邱杨, 王冬梅, 林忠宁. 乙型肝炎病毒X蛋白与肝细胞内质网应激. *世界华人消化杂志* 2016; 24(7): 1040-1047 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/24/1040.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v24.i7.1040>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的形式是高度多样化的, 从隐性形式到急性肝炎和慢性重症肝病。病毒感染的病理结果不可预测, 肝损害的机制亦未完全明了。目前全

球尚有3.5亿HBV携带者, 每年约60万例死于HBV感染所致的肝衰竭、肝硬化、原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[1]。流行病学研究^[2]明确的显示, HBV感染引起全球超过50%的HCC病例以及HBV流行地区的70%-80%的HCC病例。现在有关慢性HBV感染并发展成为肝损伤的模型已充分建立, 其中的分子机制不断深入, 而且相互关联在一起的分子事件也得到进一步的研究。现认为在慢性HBV感染的个体中影响肝损伤的主要因素是慢性炎症导致的宿主免疫反应而不是HBV病毒的直接复制。但HBV编码的蛋白, 如HBV的X蛋白(HBV X protein, HBx), 能够通过调节细胞信号转导途径在HBV感染诱导肝损伤的过程中发挥重要作用^[3]。HBx蛋白被认为是一种癌蛋白, 能够干扰宿主细胞转录、信号转导、细胞周期、表观遗传学调控、DNA修复、细胞凋亡、线粒体自噬、内质网(endoplasmic reticulum, ER)应激以及染色体的稳定性等, 与乙型肝炎和肝癌的发生与发展密切相关, 日益受到关注^[4]。

ER是蛋白质、脂类和糖类的重要合成基地, 是细胞内钙离子的储存场所, 与物质运输、物质交换、解毒作用密切相关。影响到ER正常生理功能的因素有很多, 而ER功能紊乱很多情况下导致细胞将不能合成应有的蛋白, 亦不能发挥正常的生理功能, 甚至会出现细胞凋亡。ER应激反应使细胞进化形成强大的自我保护机制, 能够最大限度地对抗内外源性的刺激。目前, 已有的HBx与ER应激关系研究的描述还很有限。本文对此进行综述, 基于对HBx生物学作用的简单回顾, 阐述HBx的表达对细胞内ER应激反应的影响, 探讨HBx调控ER应激在HBV感染诱发肝损伤中的潜在作用, 为探明HBx介导的HBV相关HCC发展的分子机制以及靶向HBx介导ER应激的干预措施提供依据。

1 HBx与HCC

HBV感染是很长时间以来困扰我国的公共卫生问题。HBV属嗜肝DNA病毒科, 为含3.2 kb部分双链环状DNA的包膜病毒, 仅对人和猩猩有易感性。HBV基因组含有4个重叠的开放读码框(open reading frame, ORF), 分别称为S、C、P和X区, 各自编码HBV表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)、核心抗原(hepatitis

□ 研发前沿
研究热点包括ER应激在不同因素诱导肝损伤中的作用, 例如本文作者开展的ER应激在HBx与AFB1协同暴露诱导肝毒性转归中的作用; 研究的重点在于诱导ER应激的特点和差异性及其机制; 亟待研究的问题是ER应激能否作为肝损伤的早期标志物、潜在的干预靶点。

相关报道

有研究对质网应激的三条信号通路以及相关的凋亡与炎症进行详尽的叙述, 并对内质网应激在多种肝脏疾病中所扮演的作用进行了简要说明。

B core antigen, HBcAg)、核酸聚合酶(HBV-associated DNA polymerase, DNAP)和HBx蛋白^[5]。HBV可在很多通路中促进HCC的发生, 流行病学研究在慢性HBV感染与肝癌的发生之间提供了强烈的相关性, 是已知与人类肿瘤相关的少数病毒之一。已经有很庞大的数据描述了多重途径参与该致癌过程, 包括遗传损伤的积累导致的免疫性肝脏炎症、氧化应激的诱导, HBV DNA整合于宿主基因组导致的插入诱变, 通过表观遗传学的基因组甲基化修饰和miRNA表达的调控以及涉及病毒蛋白HBx与HBs参与的病毒特异性机制等。编码HBx蛋白的HBx基因是HBV基因组中最小的ORF, 是HBV复制必需的基因, 位于1374-1838位核苷酸, 全长438-465 bp, 蛋白相对分子质量约为17.5 kDa, 由145-154个氨基酸残基组成, HBx在急性和慢性肝炎中呈现出低水平表达^[6]。越来越多的研究发现HBx具有多重生物学功能, 可以调节细胞转录、DNA修复、细胞增殖和凋亡等。HBx基因是HBV复制和扩散所必需的基因, 在乙型肝炎慢性化和HCC的发生中具有重要作用。在HBV的作用下, 肝细胞不断受到损害, 当细胞DNA受到损伤后, 会自动启动修复机制, 通过核苷酸切除修复和转录偶联修复机制, 在多种修复酶和蛋白作用下修复受损的DNA, 但在此过程中, HBx能与上述修复酶或蛋白结合, 使其丧失活性, 从而使受损的细胞不能通过自身修复机制进行修复, 在持续HBV感染状态下使肝脏损伤程度加重^[7]。由此作为潜在的调控机制将HBx表达与HBV复制和HCC的发展联系在一起。然而, HBx在HCC发展过程中如何发挥其致癌功能, 是直接作用于HBV相关的HCC或者还是作为辅助因子, 成为讨论的焦点问题之一。一方面, 早期体外试验证实, 将HBx导入小鼠肝细胞, 可引起肝细胞的恶性转化^[8,9]。在一些HBx转基因小鼠模型中, HBx在缺乏HBV其他蛋白的情况下直接促进HCC的发展^[10]。将HBx基因转入小鼠体内, 可干扰正常肝细胞生长、诱发转基因小鼠肝癌形成, 使肝癌发生率至少增加10倍并缩短发生的潜伏期^[11,12]。人群调查发现, 早期肝癌形成过程中HBx发挥着重要作用^[13]。大量文献报道HBV相关的HCC发生中, HBV整合入宿主细胞的过程中HBx的整合是最重要的一步, 且患者定期检查发现HBx检出率及稳定性是最高

的, 提示HBx在肝致癌作用中的重要性^[14]。另一方面, HBx增加了促癌物质致肝癌的形成率。流行病学提供了强相关性证明, 慢性HBV感染和饮食中的黄曲霉毒素B1(aflatoxin B1, AFB1)暴露是HCC发生发展的两个主要病因风险因子。慢性HBV感染的个体, 若同时暴露于AFB1, 会增加至少3.5倍HCC患病风险^[15,16]。相关研究结果提供了HBx与AFB1相互影响的证据, 在AFB1单独暴露的野生型小鼠中HCC发生率为13.3%, 而在HBx转基因小鼠中暴露AFB1时HCC发生率高达44.8%^[17]。更有研究报道^[15], 采用具有干细胞特性的肝卵圆细胞(hepatic oval cell, HOC), 转染HBx基因后植入到小鼠肝脏建立模型, 给予AFB1处理后诱导肝脏成肿瘤率达到了16.7%。这些HBx转基因模型中, HBx表达不能直接诱导肿瘤形成, 但是会使致癌物质诱导的HCC更为敏感, 提示HBx在此过程的辅助因子功能更符合HBV感染相关HCC发展的生物学特征。

尽管在慢性HBV感染期间肝脏可以被完全感染, 但是恶性转化只发生在少数肝细胞中, 此过程通常需要慢性HBV感染几十年^[18]。HBx的多重生物活性, 包括HBx调控多种信号通路或细胞蛋白, 表现将HBx表达与促进HBV相关HCC发展进程联系起来的机制, 其中HBx对肝细胞ER应激的调控作用成为新的关注焦点。

2 ER应激与肝脏疾病

ER是细胞内的一个精细膜系统, 是真核细胞内蛋白质合成、脂质生成和钙离子贮存等生理活动的主要场所。在多种生理或病理条件下, 例如蛋白质糖基化的抑制、蛋白质不能形成正常的二硫键、突变蛋白表达、钙离子的流失等, 皆会引起未折叠蛋白或错误折叠蛋白在ER聚集, 扰乱ER的功能, 触发未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR), 这个过程被称为ER应激^[19]。

已知的ER应激调控中, 跨膜蛋白肌醇酶1(inositol requiring enzyme-1, IRE-1)、RNA依赖的蛋白激酶样内质网激酶(PKR-like ER kinase, PERK)以及活性转录因子6(activating transcription factor-6, ATF-6)是三条信号通路的重要分子^[19]。病理或损伤引发未折叠蛋白累积于ER时, PERK与GRP78分离而活化, 并引起其下游真核翻译起始因子2 α (eukaryotic initiation

factor 2 α , eIF2 α)磷酸化而失活, 终止细胞内绝大部分蛋白质的合成, 而激活活化转录因子4(activating transcription factor 4, ATF4)的表达, 同时引起增强子结合蛋白同源蛋白(C/EBP-homologous protein, CHOP)表达量上调^[20]. 激活的IRE1 α 能从X盒结合蛋白1(XBP-1)mRNA中特异性剪切26个碱基的内含子, 使翻译产物XBP-1促进GRP78表达, 以减轻或中止ER应激反应. 细胞通过PERK、ATF6和IRE1 α 激活, 增加帮助蛋白质折叠的ER分子伴侣的表达、阻止mRNA的转录而减少蛋白质合成和减轻ER错误折叠蛋白的累积, 并通过泛素依赖性降解途径降解ER中错误折叠的蛋白, 从而缓解ER压力和恢复细胞内环境稳态.

ER应激可以使细胞信号由促生存向促凋亡转换, 引起细胞凋亡, 由此既能为受损细胞提供修复机会, 又能最大限度清除过度损伤的细胞, 为维护机体的生理平衡和内环境的稳定起到重要作用^[21]. 但是, ER应激过强或持续时间过长, 超过细胞自身的调节能力, 可损伤细胞和引起细胞代谢紊乱以及凋亡等细胞死亡和结局^[22]. 细胞凋亡, 炎症, UPR激活和脂质改变都是常见的非酒精性脂肪肝(non alcoholic fatty liver disease, NAFLD)反应.

研究证明许多肝脏疾病的发病机制与ER应激相关, 包括肝脏疾病中的NAFLD、胆汁淤积、酒精性肝损伤, 尤其是HBV和/或HCV感染所致慢性肝炎与ER应激密切相关^[23,24].

基于对啮齿动物模型和人群样本的研究, ER应激对NAFLD的作用已成为近年来人们的相当感兴趣的课题. 有文献报道^[25], 在几个饮食或基因诱导的NAFLD模型中UPR已经被激活. 肥胖小鼠的肝、脂肪和肌肉组织中JNK(Jun N-terminal kinase)被激活, 并且*JNK1*基因缺失的小鼠免于发展为肥胖和胰岛素抵抗. 以上JNK的激活都与ER应激相关, 推测是IRE1 α 依赖的^[26]. 另一项研究^[27]表明, NAFLD患者的肝脏样本中, XBP-1显著增加, 但其他UPR标记基因并没有增加.

乙醇喂养小鼠的基因表达谱分析表明, 在持续长达6 wk的乙醇喂养的前2 wk, ER的分子伴侣如GRP78、GRP94、CHOP的转录水平就已经大幅度增高^[28]. 使用乙醇喂养CHOP基因缺失小鼠, 发现肝细胞凋亡与CHOP相互依存, 这说明在以上的肝损伤模型中, CHOP介导肝

细胞凋亡^[29]. 虽然许多不同的通路涉及到酒精引发的脂肪变性, 但是ER应激在酒精喂养的小鼠模型中的发生率说明了UPR的激活可能也参与了这个过程.

有文献报道有毒的疏水性胆汁酸被保留在胆汁淤积的肝脏, 胆汁酸脱氧胆酸钠能够诱导的UPR的*BiP*和*CHOP*基因在体外的高表达^[30]. 并且当用毒的胆汁酸鹅脱氧胆酸(glycodeoxycholic acid, GCDCA)处理CHOP缺陷小鼠肝细胞, 显示细胞死亡的降低. 利用胆汁淤积的胆管结扎小鼠模型已证实, CHOP保护肝细胞免受死亡, 并且在CHOP缺失小鼠模型中, 肝损伤和肝纤维化与对照相比不太严重^[31]. 这表明, 错误折叠蛋白在肝脏中积累能使其他有害刺激敏感, 有助于肝损伤的发生.

HBV或HCV在宿主细胞存活并复制时, 通常利用宿主细胞的ER作为糖蛋白合成及病毒组装的场所, 病毒复制增殖过程可影响ER的正常功能, 从而诱发ER应激. GRP78和GRP94在HBV引起的急/慢性肝功能衰竭的患者中呈高表达, 提示ER应激失调在HBV引起的急/慢性肝功能衰竭的发病机制中可能扮演重要作用, 而严重的ER应激反应或许能够预测HBV引发的急/慢性肝功能衰竭的发生^[32]. 毛玻璃样肝细胞的存在是慢性HBV感染的一个特征, 这些毛玻璃样肝细胞大多是由于HBsAg在ER腔中的积累而形成的, 但其病理作用却是未知的. 有一种解释是, 由于HBV蛋白能够利用ER蛋白折叠功能和细胞分泌途径, 所以在ER中探测出HBsAg的突变可能是由于滞留在ER的蛋白质无法进行正确的折叠而导致的^[33]. 有报道^[34]称HBsAg也能够激活过敏性炎症细胞因子. 在ML-1和HuH-7细胞中, 突变的HBsAg表达可诱导eIF2 α 磷酸化, 核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的核转运, 激活p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38-MAPK), 增加环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的表达^[35]. 在转基因小鼠的肝脏组织中, 探测到突变的HBsAg引起COX-2更高的表达^[36]. 在人肝癌样本中, 突变的HBsAg亦能激活COX-2. 这些证据提供了重要的见解即由于HBV感染和慢性携带者引发的细胞炎症及癌变潜在的与ER应激相关. 已有报道^[23]UPR在许多细胞模型以及疾病中与几种炎症反应通路相关, 其中包括NF- κ B、

创新盘点
本文主要总结近几年的文献, 较为客观地分析了HBx与内质网应激的关系, 提出了肝病治疗的新靶点, 并展望了前景和提出了作者的观点.

应用要点

本文提出了不同因素诱导肝损伤过程中的ER应激通路, 为筛查特定肝损伤的早期生物标志物和探讨肝损伤的靶向干预提供了理论基础和新的思路。

JNK、细胞白介素-6(interleukin-6, IL-6)以及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)的激活. 研究发现HBV和/或HCV能够上调GRP78和GRP94等分子伴侣的表达, 以对抗由于病毒复制引起的ER应激而造成的细胞损伤. 当ER应激过度, 肝细胞内B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)蛋白水平下降、半胱天冬酶12(Caspase12)诱导表达增加等促凋亡因子占优势, 可诱导肝细胞凋亡、甚至细胞坏死, 造成肝损伤^[37,38].

现已发现, ER应激与HCC的发生发展密切相关, ER应激的分子伴侣GRP78、GRP94在至少10种不同的癌症中表达增加, 尤以HCC、肺癌以及乳腺癌最为明显, 这些分子伴侣在抵御细胞凋亡中扮演重要作用. 此外, 化疗引起的肿瘤细胞UPR已被证明是维持恶性和抗治疗所需要的, UPR激活IRE1/XBP1通路对肿瘤生存很重要, 而且UPR也可增加肿瘤细胞对缺氧的适应能力^[39]. 研究^[40]表明, 在HCC样本中, 两个UPR依赖的转录因子(ATF6, XBP-1)在转录及蛋白水平均被上调. 涉及ER相关蛋白降解的含缬酪肽(valosin)蛋白p97, 已经被定义为HCC的预后基因^[41].

3 HBx介导的肝细胞ER应激

许多HBV携带者肝内病毒广泛而持续的复制, 但宿主可以无症状并且只有很少的肝损伤^[38]; 提示HBV DNA复制并不直接导致细胞毒性. Xu等^[42]曾报道HBV能阻碍蛋白折叠引起未折叠或错误折叠蛋白的累积引发细胞ER应激, 但机制迄今尚未阐明. 有研究明确证实, HBx能够作为UPR的诱导者, 或者作为ATF6和IRE1-XBP1通路的激活者; 提示HBx介导一些UPR通路的激活, 即可以促进HBV在肝细胞中复制, 也涉及HBV诱导的肝脏损伤的发病机制, 甚至可能影响HCC的发展.

3.1 HBx诱导ER应激的机制 HBV感染的肝细胞中, HBx蛋白能够促发UPR激活作为辅助HBV复制与表达的机制之一^[43]. 在HBx稳定表达的Hep3B细胞中, XBP-1 mRNA被剪切成XBP1(XBP1s), 同时ATF6解离, 并在HepG2细胞和HepG2.2.15细胞中发现相似现象, 说明HBx能单独激活ATF6和IRE1-XBP1通路, 且其激活ER应激是不依赖于细胞类型的一种普遍刺激现象. 研究表明, 一方面, HBx能

够直接刺激或与某些激酶相互作用, 如蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)、酪氨酸激酶(JAK/STAT)、NF- κ B激酶抑制因子(inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase, IKK)、磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, P3K)以及蛋白激酶B(PKB/AKT)^[44]. 由此给我们启发HBx可作为适配器或激酶活化剂而提高ER应激感应分子IRE1的磷酸化水平, 激活IRE1-XBP1通路. 另一方面, HBx蛋白能够与碱性亮氨酸拉链(bZIP)类转录因子, 如活化转录因子2(activated transcription factor 2, ATF2)和ATF3、cAMP应答元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)等交互作用, 提示HBx可能与属于bZIP家族的ATF6和XBP1结合从而诱导激活或共激活. 所以, HBx通过激活ER应激相关(ATF6与XBP1)通路, 参与帮助HBV表达与持续存在, 可能是HBV相关疾病包括HCC发生的新的发病机制.

HBV可导致Ca²⁺从ER释放和诱导ER应激反应. 研究发现, HBx诱导CREB激活的过程依赖于Ca²⁺蛋白激酶, CREB结合于丝/苏氨酸蛋白磷酸酶2A(protein phosphatase 2A, PP2A)催化C亚基(PP2Ac)基因启动子区域的CRE元件上从而诱导其转录上调, 参与PP2Ac涉及的多种重要细胞进程, 包括对细胞形态、信号转导及翻译、细胞周期和凋亡等的调控, 对HBx经由ER应激上调PP2A以揭示HBV相关病理机制给予重要启示^[45]. HBV或HBx诱导ER应激激活环磷酸腺苷应答元件结合蛋白H(cyclic-AMP-responsive-element-binding protein H, CREBH), 使CREBH过表达, 而且该作用能够被ER应激抑制剂4-苯基丁酸(4-phenyl butyric acid, 4-PBA)所减弱, 说明CREBH在HBx相关效应中的作用能够被ER应激调控^[46].

3.2 HBx介导ER应激与肝损伤效应 HBV在慢性肝损伤导致的炎症和再生的环境中诱导HCC的发展^[47]. 其中HBx与ER应激之间的交互作用, 虽不是调节UPR信号必需的, 但仍然在HBV相关HCC的发展中发挥重要作用. COX-2是炎症发展进程的关键因素之一, 其活性的增加刺激细胞增殖、血管生成、侵袭能力并且抑制细胞凋亡. COX-2异常表达与多种疾病诱发有关, 包括COX-2诱导合成前列腺素与许多肝脏疾病相关, 如肝纤维化、肝硬化和肝胆癌变. 之前的报道发现HBx与COX-2在HBV感

染、肝硬化以及分化良好的HCC组织样本中呈高度正相关^[48], 并且ER应激在COX-2调控上述疾病的发生过程中起到重要作用. 研究表明HBx通过引起未折叠蛋白在ER的堆积从而减少细胞内ATP水平, 并通过ATF4结合到COX-2基因(*PTGS2*)启动子区域促使转录激活和诱导COX-2的表达增高, 提示HBx诱导的ER应激发生可能是促使COX-2介导肝脏疾病发生发展的原因^[49]. 此外, 在肝再生过程中, HBV或ER应激激活CREBH可能起到重要作用, HBx和激活的CREBH可介导肝脏炎症反应和引发肝不受控制再生, 使肝细胞增殖迅速加快从而诱导HCC发生^[46].

在外源因素诱导ER应激的适应、警戒、凋亡三个阶段中, 适应信号以及警戒信号都致力于恢复ER的蛋白处理能力, 支持细胞度过应激期, 当ER损伤变为不可逆时凋亡信号即被启动. ER应激是除死亡受体活化和线粒体损伤外又一条新的介导细胞凋亡的信号传导通路, 与许多肝脏疾病相关, 是目前国内外研究的热点. ER应激诱导的凋亡表现为多种途径, 包括经典的线粒体凋亡通路途径, 如特异的Caspase途径, 而高表达Bcl-2等抗凋亡蛋白可以拮抗ER应激引起的凋亡. 研究发现, HBx转染的细胞(Chang/HBx)中ER应激会激活凋亡蛋白Caspase12和Caspase9, 采用Caspase3蛋白酶抑制剂(Ac-DEVD-CHO)处理细胞后凋亡蛋白的表达进一步提高和Caspase3被激活, 导致Chang/HBx细胞存活率显著减少, 提示蛋白酶抑制在促进HBx诱导ER应激反应、直接或间接介导细胞凋亡中的作用. 因此, 表明HBx激活UPR信号诱导ER应激反应, 趋向细胞存活或细胞凋亡, 以维持细胞内稳态^[50]. 而且, ER应激成为参与Caspase3活性调控的因素之一, 通过信号通路的激活改变从ER应激到凋亡的平衡, 在化疗诱导HBx表达的肝癌细胞凋亡中发挥核心作用, 有可能成为很有前景的抗癌治疗的靶标.

4 结论

ER是细胞内最大的膜网络结构, 担负着蛋白质合成、加工、转运和参与细胞内信号调控这些重任, 细胞内环境的稳态离不开ER及其正常生理功能, 所以在长期进化中细胞一直保留着ER应激作为高度保守的强效保护机制. 目前, 关于HBx与ER应激的相关研究还有限,

但仍然提供了令人信服的证据, 在不同的细胞模型中, HBx能够激活细胞UPR和ER应激, 因此成为研究的热点. 其中, 占主导地位的细胞信号通路在HBx调控UPR信号通路、诱导ER应激激活过程中可以发挥重要作用. 该方向的研究可能会提供关于HBx调控肝细胞ER应激在慢性HBV感染个体的肝损伤发展为HCC中不同阶段作用的线索, 而且很明显需要进一步研究阐明HBx调节ER应激的潜在机制. 这些将有助于为探讨HBV/HBx介导肝损伤、肝疾病的综合防治以及HBV相关HCC靶向干预策略提供依据.

同行评价
本文主要阐述HBx影响肝细胞ER应激的研究进展, 针对该方面内容已有相关实验性研究, 具有一定的创新性与意义, 有较好学术价值.

5 参考文献

- Block TM, Rawat S, Brosgart CL. Chronic hepatitis B: A wave of new therapies on the horizon. *Antiviral Res* 2015; 121: 69-81 [PMID: 26112647 DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.06.014]
- Yang Q, Shi Y, Yang Y, Lou G, Chen Z. The sterile inflammation in the exacerbation of HBV-associated liver injury. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 508681 [PMID: 25892853 DOI: 10.1155/2015/508681]
- Yang B, Bouchard MJ. The hepatitis B virus X protein elevates cytosolic calcium signals by modulating mitochondrial calcium uptake. *J Virol* 2012; 86: 313-327 [PMID: 22031934 DOI: 10.1128/JVI.06442-11]
- 吴德海, 邵升. HBx促进肝细胞癌发生发展的分子机制. *世界华人消化杂志* 2014; 22: 3773-3779
- Lin G, Zhang K, Li J. Application of CRISPR/Cas9 Technology to HBV. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 26077-26086 [PMID: 26540039 DOI: 10.3390/ijms161125950]
- Arzumanyan A, Reis HM, Feitelson MA. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 123-135 [PMID: 23344543 DOI: 10.1038/nrc3449]
- Yu Z, Gao YQ, Feng H, Lee YY, Li MS, Tian Y, Go MY, Yu DY, Cheung YS, Lai PB, Yu J, Wong VW, Sung JJ, Chan HL, Cheng AS. Cell cycle-related kinase mediates viral-host signalling to promote hepatitis B virus-associated hepatocarcinogenesis. *Gut* 2014; 63: 1793-1804 [PMID: 24440987 DOI: 10.1136/gutjnl-2013-305584]
- Kim SY, Lee PY, Shin HJ, Kim do H, Kang S, Moon HB, Kang SW, Kim JM, Park SG, Park BC, Yu DY, Bae KH, Lee SC. Proteomic analysis of liver tissue from HBx-transgenic mice at early stages of hepatocarcinogenesis. *Proteomics* 2009; 9: 5056-5066 [PMID: 19813210 DOI: 10.1002/pmic.200800779]
- Moudgil V, Redhu D, Dhanda S, Singh J. A review of molecular mechanisms in the development of hepatocellular carcinoma by aflatoxin and hepatitis B and C viruses. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2013; 32: 165-175 [PMID: 24099430]
- Kew MC. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 1: 144-152 [PMID: 21199526 DOI:

- 10.1111/j.1440-1746.2010.06546.x]
- 11 Slagle BL, Lee TH, Medina D, Finegold MJ, Butel JS. Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus X gene. *Mol Carcinog* 1996; 15: 261-269 [PMID: 8634084]
 - 12 Li CH, Wang YJ, Dong W, Xiang S, Liang HF, Wang HY, Dong HH, Chen L, Chen XP. Hepatic oval cell lines generate hepatocellular carcinoma following transfection with HBx gene and treatment with aflatoxin B1 in vivo. *Cancer Lett* 2011; 311: 1-10 [PMID: 21821357 DOI: 10.1016/j.canlet.2011.05.035]
 - 13 Ahuja R, Kapoor NR, Kumar V. The HBx oncoprotein of hepatitis B virus engages nucleophosmin to promote rDNA transcription and cellular proliferation. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1853: 1783-1795 [PMID: 25918010 DOI: 10.1016/j.bbamer.2015.04.012]
 - 14 Yuan W, Huang T, Yu J, Zeng L, Lian B, He Q, Li Y, Zhang X, Zhou F, Xie L. Comparative analysis of viral protein interaction networks in Hepatitis B virus and Hepatitis C virus infected HCC. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1844: 271-279 [PMID: 23774196 DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.06.002]
 - 15 Sun Z, Lu P, Gail MH, Pee D, Zhang Q, Ming L, Wang J, Wu Y, Liu G, Wu Y, Zhu Y. Increased risk of hepatocellular carcinoma in male hepatitis B surface antigen carriers with chronic hepatitis who have detectable urinary aflatoxin metabolite M1. *Hepatology* 1999; 30: 379-383 [PMID: 10421643]
 - 16 Lian M, Liu Y, Yu SZ, Qian GS, Wan SG, Dixon KR. Hepatitis B virus x gene and cyanobacterial toxins promote aflatoxin B1-induced hepatotumorigenesis in mice. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3065-3072 [PMID: 16718789]
 - 17 Matsuda Y, Ichida T. Impact of hepatitis B virus X protein on the DNA damage response during hepatocarcinogenesis. *Med Mol Morphol* 2009; 42: 138-142 [PMID: 19784739 DOI: 10.1007/s00795-009-0457-8]
 - 18 Chiu AP, Tschida BR, Lo LH, Moriarity BS, Rowlands DK, Largaespada DA, Keng VW. Transposon mouse models to elucidate the genetic mechanisms of hepatitis B viral induced hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 12157-12170 [PMID: 26576100 DOI: 10.3748/wjg.v21.i42.12157]
 - 19 Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 89-102 [PMID: 22251901 DOI: 10.1038/nrm3270]
 - 20 Gardner BM, Walter P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* 2011; 333: 1891-1894 [PMID: 21852455 DOI: 10.1126/science.1209126]
 - 21 Webster KA. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species. *Future Cardiol* 2012; 8: 863-884 [PMID: 23176689]
 - 22 Lu M, Lawrence DA, Marsters S, Acosta-Alvear D, Kimmig P, Mendez AS, Paton AW, Paton JC, Walter P, Ashkenazi A. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science* 2014; 345: 98-101 [PMID: 24994655 DOI: 10.1126/science.1254312]
 - 23 Wu S, Tan M, Hu Y, Wang JL, Scheuner D, Kaufman RJ. Ultraviolet light activates NFkappaB through translational inhibition of IkappaBalpha synthesis. *J Biol Chem* 2004; 279: 34898-34902 [PMID: 15184376]
 - 24 Gargalovic PS, Gharavi NM, Clark MJ, Pagnon J, Yang WP, He A, Truong A, Baruch-Oren T, Berliner JA, Kirchgessner TG, Lusis AJ. The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2490-2496 [PMID: 16931790]
 - 25 Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; 306: 457-461 [PMID: 15486293]
 - 26 Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420: 333-336 [PMID: 12447443]
 - 27 Lake AD, Novak P, Hardwick RN, Flores-Keown B, Zhao F, Klimecki WT, Cherrington NJ. The adaptive endoplasmic reticulum stress response to lipotoxicity in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol Sci* 2014; 137: 26-35 [PMID: 24097666 DOI: 10.1093/toxsci/kft230]
 - 28 Shinohara M, Ji C, Kaplowitz N. Differences in betaine-homocysteine methyltransferase expression, endoplasmic reticulum stress response, and liver injury between alcohol-fed mice and rats. *Hepatology* 2010; 51: 796-805 [PMID: 20069651 DOI: 10.1002/hep.23391]
 - 29 Ji C, Mehriani-Shai R, Chan C, Hsu YH, Kaplowitz N. Role of CHOP in hepatic apoptosis in the murine model of intragastric ethanol feeding. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 1496-1503 [PMID: 16131858]
 - 30 Bernstein H, Payne CM, Bernstein C, Schneider J, Beard SE, Crowley CL. Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein misfolding by the bile salt, deoxycholate. *Toxicol Lett* 1999; 108: 37-46 [PMID: 10472808]
 - 31 Tamaki N, Hatano E, Taura K, Tada M, Kodama Y, Nitta T, Iwaisako K, Seo S, Nakajima A, Ikai I, Uemoto S. CHOP deficiency attenuates cholestasis-induced liver fibrosis by reduction of hepatocyte injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G498-G505 [PMID: 18174271 DOI: 10.1152/ajpgi.00482.2007]
 - 32 Ren F, Shi H, Zhang L, Zhang X, Wen T, Xie B, Zheng S, Chen Y, Li L, Chen D, Duan Z. The dysregulation of endoplasmic reticulum stress response in acute-on-chronic liver failure patients caused by acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2016; 23: 23-31 [PMID: 26234401 DOI: 10.1111/jvh.12438]
 - 33 Su JJ, Wang HC, Wu HC, Huang WY. Ground glass hepatocytes contain pre-S mutants and represent preneoplastic lesions in chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1169-1174 [PMID: 18505413 DOI: 10.1111/j.1440-1746]
 - 34 Temel T, Cansu DÜ, Korkmaz C, Kaşifoğlu T, Özakıoğlu A. The long-term effects of anti-TNF- α agents on patients with chronic viral hepatitis C and B infections. *Int J Rheum Dis* 2015; 18: 40-45 [PMID: 24994655 DOI: 10.1126/science.1254312]

- 25195983 DOI: 10.1111/1756-185X]
- 35 Gilles PN, Guerrette DL, Ulevitch RJ, Schreiber RD, Chisari FV. HBsAg retention sensitizes the hepatocyte to injury by physiological concentrations of interferon-gamma. *Hepatology* 1992; 16: 655-663 [PMID: 1505908]
- 36 Jung J, Kim NK, Park S, Shin HJ, Hwang SG, Kim K. Inhibitory effect of *Phyllanthus urinaria* L. extract on the replication of lamivudine-resistant hepatitis B virus in vitro. *BMC Complement Altern Med* 2015; 15: 255 [PMID: 26220282 DOI: 10.1186/s12906-015-0792-3]
- 37 Chan SW. Unfolded protein response in hepatitis C virus infection. *Front Microbiol* 2014; 5: 233 [PMID: 24904547 DOI: 10.3389/fmicb.2014.00233]
- 38 Lazar C, Uta M, Branza-Nichita N. Modulation of the unfolded protein response by the human hepatitis B virus. *Front Microbiol* 2014; 5: 433 [PMID: 25191311 DOI: 10.3389/fmicb.2014.00433]
- 39 Zhou T, Lv X, Guo X, Ruan B, Liu D, Ding R, Gao Y, Ding J, Dou K, Chen Y. RACK1 modulates apoptosis induced by sorafenib in HCC cells by interfering with the IRE1/XBP1 axis. *Oncol Rep* 2015; 33: 3006-3014 [PMID: 25901709 DOI: 10.3892/or.2015.3920]
- 40 Shuda M, Kondoh N, Imazeki N, Tanaka K, Okada T, Mori K, Hada A, Arai M, Wakatsuki T, Matsubara O, Yamamoto N, Yamamoto M. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2003; 38: 605-614 [PMID: 12713871]
- 41 Yamamoto S, Tomita Y, Nakamori S, Hoshida Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M, Aozasa K. Elevated expression of valosin-containing protein (p97) in hepatocellular carcinoma is correlated with increased incidence of tumor recurrence. *J Clin Oncol* 2003; 21: 447-452 [PMID: 12560433]
- 42 Xu Z, Jensen G, Yen TS. Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 1997; 71: 7387-7392 [PMID: 9311817]
- 43 Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet* 2015; 386: 1546-1555 [PMID: 26231459 DOI: 10.1016/S0140-6736(15)61412-X]
- 44 Li B, Gao B, Ye L, Han X, Wang W, Kong L, Fang X, Zeng Y, Zheng H, Li S, Wu Z, Ye L. Hepatitis B virus X protein (HBx) activates ATF6 and IRE1-XBP1 pathways of unfolded protein response. *Virus Res* 2007; 124: 44-49 [PMID: 17092596]
- 45 Christen V, Treves S, Duong FH, Heim MH. Activation of endoplasmic reticulum stress response by hepatitis viruses up-regulates protein phosphatase 2A. *Hepatology* 2007; 46: 558-565 [PMID: 17526027]
- 46 Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 2006; 124: 587-599 [PMID: 16469704]
- 47 Diao J, Garces R, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 189-205 [PMID: 11325602]
- 48 Cheng AS, Chan HL, Leung WK, To KF, Go MY, Chan JY, Liew CT, Sung JJ. Expression of HBx and COX-2 in chronic hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: implication of HBx in upregulation of COX-2. *Mod Pathol* 2004; 17: 1169-1179 [PMID: 15218507]
- 49 Cho HK, Cheong KJ, Kim HY, Cheong J. Endoplasmic reticulum stress induced by hepatitis B virus X protein enhances cyclo-oxygenase 2 expression via activating transcription factor 4. *Biochem J* 2011; 435: 431-439 [PMID: 21244365 DOI: 10.1042/BJ20102071]
- 50 Hu L, Chen L, Yang G, Li L, Sun H, Chang Y, Tu Q, Wu M, Wang H. HBx sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis by accelerating the loss of Mcl-1 protein via caspase-3 cascade. *Mol Cancer* 2011; 10: 43 [PMID: 21504623 DOI: 10.1186/1476-4598-10-43]

编辑:郭鹏 电编:都珍珍

