细胞自噬在HBV慢性化感染中的研究现状

凌青霞，陈明泉，施光峰（复旦大学附属华山医院 感染科，上海 200040）

1 细胞自噬概述

细胞自噬是真核细胞特有的生命现象，是细胞利用溶酶体降解胞内衰老细胞器、长寿命蛋白和内吞物质的过程，其降解产物可被循环再利用[1,2]。生理状态下，大多数组织细胞有一个基础水平的自噬，以维持细胞内蛋白质代谢平衡及内环境稳态，当细胞遭遇压力如饥饿、生长因子缺乏、胞内蛋白质蓄积、病毒感染、氧化应激、内质网应激时可以诱导自噬增强，保护细胞免于死亡[3,4]。当细胞受压超过自噬调节能力时，自噬可诱导细胞凋亡。若细胞自噬的水平和调节出现紊乱，则会导致一系列疾病状态。

1.1 自噬形成过程及其分子机制　自噬在进化上具有高度保守性，目前已发现34个自噬相关基因（Atg），根据其功能分为4组，分别编码相关蛋白在自噬的诱导、产生、成熟、再循环中起重要作用[5]。

自噬体的诱导阶段由Ulkl（mAtg1）复合物介导，该复合物由Ulk1、mAtgl3和FIP200（mAtgl7）组成。在一定条件下，Ulk1被激活，并将mAtgl3和mAtgl7磷酸化，启动自噬过程[6-8]。自噬体膜形成阶段由Beclin-1（mAtg6）复合物介导，该复合物由hVps34即ClassⅢPI3K）、hVpsl5、Beclin-1和Atgl4组成，其主要功能是募集细胞质中含-FYVE-或-PX-序列的蛋白质，用于自噬体膜（IM）的形成[9]。IM延伸和封闭阶段和自噬体的形成与两个泛素样蛋白Atgl2-Atg5系统和mAtg8（LC3）密切相关，Atgl2与Atg5结合，并与Atgl6形成复合物，诱导LC3的结合反应。胞质内的LC3-Ⅰ，在Atg7和Atg3的相继作用下发生泛素化，与磷脂酰乙醇胺结合，最终形成LC3-Ⅱ，促进自噬体的形成，LC3-Ⅱ继而与泛素结合蛋白p62/SQSTM1相互作用，使溶酶体定位于自噬体，形成成熟的自噬溶酶体，因此，LC3-Ⅱ可作为细胞或动物实验中自噬体的特异标志物[9]。在自噬溶酶体内，自噬体内膜及其包裹物被降解，随后降解产物释放到细胞质中以供生物合成和代谢，Atg2-Atg9-Atgl8复合物参与了此循环再利用过程[10]。

1.2 自噬调控的分子通路　机体内存在精确的自噬调控机制，调控的第一水平为止于Atg体系上游的信号传导通路，第二水平的调控包括通过蛋白-蛋白之间的相互作用调控Atg体系或者通过信号传导分子直接调控Atg活性，第三水平的调控涉及晚期自噬（自噬体成熟及与溶酶体区融合）。

1.2.1 自噬调控的第一水平　调控细胞自噬的第一水平主要为依赖mTOR的信号传导通路。mTOR本身是一个调控细胞周期、生长和增殖的丝氨酸/苏氨酸激酶，对细胞自噬起负调控作用[11]。mTOR信号通路的上游刺激因子包括生长因子和胰岛素、营养、能量水平以及细胞胁迫因子（缺氧、活性氧、病毒感染）[12]。

mTOR的上游信号通路包括Ⅰ型PI3K/Akt/mTOR通路及LKB1/AMPK/TSC/mTOR通路[13]。生长因子、胰岛素作用于Ⅰ型PI3K使之活化，激活的PI3K磷酸化下游靶蛋白Akt，激活mTORC1从而抑制细胞自噬。当细胞缺乏营养、处于缺氧状态或能量很低时，胞内AMP/ATP比值升高可激活能量感应器AMPK，AMPK通过活化TSC2使mTORC1失活，诱导自噬。此外胞浆内的游离钙增加也可通过激活AMPK抑制mTORC1活性进而诱导自噬[14,15]。mTORC1下游的靶标是mAtg1、mAtgl3和mAtg17蛋白复合物，他通过调节Atg13的磷酸化状态调控自噬。

研究还发现除mTOR信号传导通路外，在营养能量缺乏时，AMPK亦可以通过直接磷酸化Ulk1激活其活性，从而进一步促进自噬[16]。

1.2.2 自噬调控的第二水平　目前研究的较多的是Ⅲ型PI3k途径：Ⅲ型PI3k可通过与其调控亚基UVRAG、Beclin-l及Bif-I结合形成有活性的复合物而促进自噬形成。其中Beclin-l在静息状态下与Bcl-2结合，当JNK途径被激活时，可抑制Bcl-2活性，从而释放Beclin-l，促进自噬产生。Bcl-2、UVRAG、死亡相关蛋白激酶DAPK和CDK分别发挥对该复合体的抑制与活化作用，从而达到对自噬的调节。近期发表于《Science》的一项研究[17]报道了组蛋白乙酰化酶Esa1以及去乙酰化酶Rpd3可通过调节自噬关键蛋白Atg3的乙酰化水平，从而实现对自噬过程的动态调控。

1.2.3 自噬调控的第三水平　研究发现，巴弗洛霉素、氯喹、组织蛋白酶抑制剂、p38MAPK等可通过调控自噬体与溶酶体结合或改变溶酶体功能实现对自噬第三水平的调控。

2 细胞自噬在HBV慢性感染中的研究现状

HBV为双链DNA嗜肝病毒，目前全球约有3.5亿HBV慢性感染者，其中我国约占1亿。HBV慢性感染可以导致肝脏炎症，肝纤维化、肝硬化甚至肝癌，严重危害公众健康，但迄今为止，HBV感染慢性化、持续感染机制尚未明确，这也是CHB防治困难的主要原因[18]。

细胞自噬作为机体的一种天然免疫防御机制，近年来

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2014.01.022
基金项目：上海市卫生局基金项目（20114270）
通讯作者：施光峰 Email: gfshi@shmu.edu.cn

日益受到关注，通常情况下，细胞可以利用自噬清除入侵胞内的多种外源性物质，包括细菌、病毒、寄生虫进而阻止感染进一步蔓延或向慢性化进展。HBV作为一种可慢性感染人肝细胞的病毒，不仅可以免于被细胞自噬清除，还可以通过特定的机制使细胞自噬有助于其慢性化感染。

2.1 HBV可诱导自噬增强且自噬的增强有利于HBV的复制 近年来，多项国内外的研究均发现，HBV可诱导多个肝细胞及肝癌细胞系的自噬增强，且HBV诱导的自噬是完全的，他既可以使自噬体的产生增加，同时促进自噬体与溶酶体结合，且自噬的增强有利于病毒本身的复制[19-27]。说明细胞自噬在HBV慢性化感染中起一定作用。

多项研究[19,21-23,25-27]发现HBV通过其HBx蛋白诱导细胞自噬增强。Sir等[19]发现HBV的HBx蛋白可结合并激活Ⅲ型PI3K，上调Beclin-1的表达，是其诱导自噬增加的重要机制。Li等[27]发现HBx还可激活未折叠蛋白反应途径（UPR）中的ATF6及IRE1-XBP1诱导自噬。另有两项研究[21,23]均发现，HBV还可通过HBx蛋白增强细胞对饥饿诱导的自噬的敏感性，并且有助于减少细胞在饥饿状态下发生凋亡。而Li等[20]通过将分别敲除了HBV DNA聚合酶、包膜蛋白及HBx基因的p1.3HBV转录入肝细胞系（Huh7），发现仅转录了敲除包膜蛋白的p1.3HBV的Huh7内LC3的表达明显下降，证明是HBV的包膜蛋白诱导了细胞自噬，该研究还进一步发现，HBV包膜蛋白中的SHBs可激活内质网应激是其诱导肝癌细胞系自噬增强的机制。

研究者用Ⅲ型PI3K特异性抑制剂3-MA或小干扰RNA沉默自噬关键基因Atg7或Atg5后均发现HBV-DNA的复制减少[19,20,24,26]，说明细胞自噬有助于HBV DNA的复制。研究[19,20,26]表明，自噬主要有助于HBV DNA的复制阶段，对RNA的转录阶段影响甚微。Li等[20]的研究发现细胞自噬可增加HBV包膜蛋白的装配以及促进病毒的释放，最近的一项研究[22]发现，HBx可激活内质网相关的蛋白质降解（ERAD）途径，具有缓解内质网应激作用的甘露糖苷酶样蛋白（EDEMs）可促进溶酶体对HBV包膜蛋白的降解，抑制内生性EDEM1的表达会显著提升包膜病毒和亚病毒颗粒的分泌，两项研究结果均显示细胞自噬增加病毒包膜蛋白的装配是其促进HBV复制的重要机制。

2.2 HBV感染后细胞自噬在机体抗病毒免疫中的作用 细胞自噬与机体的免疫系统间有着诸多联系。一方面，自噬是固有免疫的重要组成成分，其既可以直接清除病原体，又具有增强其他有固有免疫、减轻炎性反应的作用，固有免疫信号分子TLR、NOD等也可诱导或刺激自噬增强。其次，自噬在抗原提呈过程中的作用是至关重要的。细胞自噬不仅能促进MHC-Ⅱ类分子抗原提呈的经典途径，而且可将内源性抗原以MHC-Ⅱ类分子的形式递呈给$CD4^+$ T细胞，自噬也可促进MHC-Ⅰ类分子交叉提呈细胞外抗原[28]。

目前研究[29,30]显示，细胞自噬在机体抗病毒免疫过程中也起着重要作用。细胞可通过自噬识别病毒，并启动有效的防御机制瓦解病毒。细胞自噬还可将胞内的病毒抗原以MCH-Ⅱ类分子的形式递呈给$CD4^+$ T细胞，从而激活初始T细胞，启动有效地抗病毒适应性免疫应答。毫无疑问，在不同病毒感染时，细胞自噬在机体抗病毒免疫过程中的作用也不尽相同。如自噬的缺失可以增强机体对丙型肝炎病毒的天然免疫应答[31]，而在水疱性口炎病毒感染类浆细胞树突状细胞过程中，自噬相关基因可以正调控天然免疫的Ⅰ型干扰素的产生，从而增强抗病毒反应[32]。迄今为止，有两项研究就HBV感染后细胞自噬在机体抗病毒免疫中的作用作了相关报道。其中一项研究[33]通过小干扰RNA沉默自噬相关基因Beclin-1后，发现受感染的细胞的干扰素分泌减少，说明细胞自噬可增加HBV感染后干扰素信号通路表达。另一项研究[34]也发现，HBV可通过上调Beclin-1的表达促进单核因子的产生。两项研究的结果均显示细胞自噬可增强机体对HBV的天然免疫应答。

3 结语

细胞自噬有许多重要的功能，对维持细胞内生理平衡及清除胞内病原体感染的过程起重要作用，一般情况下，自噬是细胞的一种保护性机制。但有趣的是，HBV可利用肝细胞的自噬促进自身的复制。此外，机体的免疫失能是HBV持续感染的重要机制已达成共识，基于自噬与免疫系统间的诸多联系，为治疗CHB提供一种新的思路：可否通过调控自噬水平从而改善机体对HBV的免疫无能以及有效的抑制其在肝细胞内的复制，这就需要今后更多的研究来证实。

参考文献

[1] Beau I, Mehrpour M , Codogno P. Autophagosomes and human diseases[J]. Int Biochem Cell Biol, 2011,43:460-464.

[2] Mizushima N. Physiological functions of autophagy[M]. Curr Top Microbiol Immunol,2009,335:71-84.

[3] Sumpter R Jr, Levine B. Selective autophagy and viruses[J]. Autophagy,2011,7:260-265.

[4] Singh R,Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance[J]. Cell Metab,2011,13:495-504.

[5] Klionsky DJ. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes[J]. Dev Cell,2003,5:539-545.

[6] Ganley IG, Lam du H, Wang J, et a1. ULKI.ATGl3.F1P200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy[J]. J Binl Chem,2009,284:12297-12305.

[7] Marl M, Griffith J, Rieter E, et a1. An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis[J]. J Cell Biol,2010,190:1005-1022.

[8] Jung CH, Jun CB, Ro SH, et a1. ULK-Atgl3-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery[J]. Mol Biol Cell,2009,20:1992-2003.

[9] Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy[J]. Nat Cell Biol,2010,12:814-822.

[10] Tanaka Y, Kume S, Kitada M, et a1. Autophagy as a therapeutic target in diabetic nephropathy[J]. Exp Diabetes Res,2012,2012:628978.

[11] Jung CH, Ro SH, Cao J, et al. mTOR regulation of autophagy[J]. FEBS Lett,2010,584:1287-1295.

[12] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance[J]. J Cell Sci, 2009,122:3589-3594.

[13] Tong JF, Yan X, Zhu MJ, et al. AMP-activated protein kinase enhances the expression of muscle-specific ubiquitin ligases despite its activation of IGF-1/Akt signaling in C2C12 myotubes[J]. J Cell Biochem,2009,108:458-468.

[14] Cho SY, Lee HJ, Jung DB, et al. Activation of AMP-activated protein kinase alpha and extracelluar signal-regulated kinase mediates CB-PIC-induced apoptosis in hypoxic SW620 colorectal cancer cells[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2013,2013:974313.

[15] Shang L, Wang X. AMPK and mTOR coordinate the regulation of Ulk1 and mammalian autophagy initiation[J]. Autophagy,2011,7:924-926.

[16] Kim J, Kundu M,Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1[J]. Nat Cell Biol, 2011,13:132-141.

[17] Yi C, Ma M, Ran L, et al. Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation[J]. Science,2012,336:474-477.

[18] Ganem D, Prince M. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences[J]. N Engl J Med,2004,350:1118-1129.

[19] Sir D, Tian Y, Chen WL, et al. The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2010,107:4383-4388.

[20] Li J, Liu Y, Wang Z, et al. Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment[J]. J Virol,2011,85:6319-6333.

[21] Tang H, Da L, Mao Y, et al. Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression[J]. Hepatology,2009,49:60-71.

[22] Lazar C, Macovei A, Petrescu S, et al. Activation of ERAD pathway by human hepatitis B virus modulates viral and subviral particle production[J]. PLoS One,2012,7:e34169.

[23] Mao Y, Da L, Tang H, et al. Hepatitis B virus X protein reduces starvation-induced cell death through activation of autophagy and inhibition of mitochondrial apoptotic pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun,2011,415:68-74.

[24] Tian Y, Sir D, Kuo CF, et al. Autophagy required for hepatitis B virus replication in transgenic mice[J]. J Virol,2011,85:13453-13456.

[25] Wang J, Shi Y, Yang H. Infection with hepatitis B virus enhances basal autophagy[J]. Wei Sheng Wu Xue Bao,2010,50:1651-1656.

[26] Sir D, Ann DK, Ou JH. Autophagy by hepatitis B virus and for hepatitis B virus[J]. Autophagy,2010,6:548-549.

[27] Li B, Gao B, Ye L, et al. Hepatitis B virus X protein (HBx) activates ATF6 and IRE1-XBP1 pathways of unfolded protein response[J]. Virus Res,2007,124:44-49.

[28] Valdor R, Macian F. Autophagy and the regulation of the immune response[J]. Pharmacol Res,2012,66:475-483.

[29] Sir D, Ou JH. Autophagy in viral replication and pathogenesis[J]. Mol Cells,2010,29:1-7.

[30] Lee HK, Iwasaki A. Autophagy and antiviral immunity[J]. Curr Opin Immunol,2008,20:23-29.

[31] Shrivastava S, Raychoudihuri A, Steele R, et al. Knockdown of autophagy enhances the innate immune response in hepatitis C virus-infected hepatocytes[J]. Hepatology,2011,53:406-414.

[32] Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, et al. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells[J]. Science,2007,315:1398-1401.

[33] Ni Y, Shi Y, Zhang Y, et al. Effect of autophagy on expression of interferon in hepatitis B virus-infected hepatocytes[J]. Wei Sheng Wu Xue Bao,2012,52:1385-1391.

[34] Xia Y, Zeng D, Yu F, et al. Role of autophagy in monokine induced by interferon gamma (Mig) production during adenovirus-hepatitis B virus infection[J]. Hepatogastroenterology,2012,59:1245-1250.

收稿日期：2013-08-05

· 消息 ·

本刊关于论文著作权的说明

《中国肝脏病杂志（电子版）》为中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会主管、人民卫生出版社主办、人民卫生电子音像出版社有限公司出版的国家级医学科技期刊。为了保护作者和杂志的合法权益，避免引起著作权纠纷，根据《中华人民共和国著作权法》和相关法规，遵照人民卫生出版社相关规定，在本刊刊登文章的作者（著作权人）必须在文章刊登前签署《人民卫生出版社系列杂志论文著作权转让协议书》，否则不予采用。特此声明。

本刊《人民卫生出版社系列杂志论文著作权转让协议书》详见http://zggzbzz.j-ditan.com/ 下载专区栏目。

本刊编辑部