

乙型肝炎病毒相关线粒体致病机制研究进展

杨松¹, 邢卉春¹, 成军^{1,2} (1. 首都医科大学附属北京地坛医院 肝病中心, 北京 100015; 2. 首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015)

摘要: 线粒体是参与细胞内能量、细胞凋亡、免疫应答与细胞周期调控等的重要细胞器。在乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)致病机制中, HBV主要通过HBx与HBsAg作用于线粒体。HBV可以影响线粒体途径的细胞凋亡, 但HBV对线粒体凋亡的影响在不同环境下呈现不同的作用。HBV还可影响氧化应激损伤、细胞周期调控以及线粒体相关抗病毒免疫。HBV作用于线粒体, 一方面为完成HBV生命周期创造有利的细胞内环境, 另一方面会造成肝细胞损伤。阐明线粒体在HBV致病机制中的作用, 进一步深入阐释HBV导致细胞损伤尤其是肝细胞癌发生的可能机制, 可为相关药物研发提供新的靶位。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 线粒体; 凋亡;

Progress in HBV related mitochondrial pathogenesis

YANG Song¹, XING Hui-chun¹, CHENG Jun^{1,2} (1. Center of Hepatology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

Abstract: Mitochondria is an important cell organelle which is involved in energy metabolism, cell apoptosis, immune regulation and cell cycle regulation. In hepatitis B virus (HBV) pathogenesis, HBV interact with mitochondria through HBx and HBsAg. HBV may act on the mitochondria related intrinsic apoptosis, but the results are different in different situations. Besides, HBV is also related to oxygen stress injury, cell cycle regulation and antiviral immune response. Effect of HBV on mitochondria is to build the circumstance for HBV life cycle and cause liver injury. Further studies are needed to elucidate the role of mitochondria in HBV pathogenesis.

Key words: Hepatitis B virus; Mitochondria; Apoptosis

线粒体是细胞内能量生成的场所, 它还与细胞凋亡、免疫应答、细胞周期调控等多种生命活动密切相关^[1,2]。近年来乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)对于细胞线粒体的影响日益得到重视。HBV可作用于线粒体细胞凋亡、抗病毒免疫、细胞周期调控以及氧化应激损伤等多个方面^[3,4], 一方面为病毒生存和复制创造有利的细胞内环境, 另一方面会造成肝细胞损伤。本文拟将HBV相关线粒体致病机制综述如下。

1 HBV 与线粒体相互作用的蛋白

明确HBV线粒体致病机制首先要明确HBV依靠哪个蛋白与线粒体相互作用。HBV与线粒体相互作用的

蛋白主要为乙型肝炎病毒X蛋白(hepatitis B virus X protein, HBx)与乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)。Rahmani等^[5]于2000年首先报道HBx定位于线粒体并与电压依赖性阴离子通道3(voltage-dependent anion channel 3, VDAC3)结合而改变线粒体膜电位。此后Henkler等^[6]报道HBx以其表达量不同而定位于细胞核、线粒体与细胞质。McClain等^[7]进一步报道HBV感染细胞中约5%的HBx定位于线粒体。随后Li等^[8]将HBx与线粒体作用的具体序列定位在HBx的C-末端7个氨基酸残基, 尤其是第115位半胱氨酸是HBx与线粒体作用的关键氨基酸。

除HBx外, 有研究提示HBsAg也可直接或间接地作用于线粒体。Xiao等^[9]报道HBsAg可以结合烯酰辅酶A水合酶短链1(enoyl coenzyme A hydratase short

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2016.01.002

基金项目: “十二五”国家科技重大专项项目(No.2012ZX10004904);
北京市医院管理局临床医学发展专项经费资助项目(No.ZY201402)

通讯作者: 成军 Email: chengj0817@sina.cn

chain 1, ECHS1) 蛋白降低线粒体膜电位, 进而诱导细胞凋亡; 而Liu等^[10]研究表明, HBsAg可抑制JTB蛋白的线粒体转位, 可能与HCC的发生相关。

2 HBV 影响线粒体途径的细胞凋亡

在慢性乙型肝炎中, 凋亡是肝细胞的主要死亡形式^[11], 而线粒体相关的内源性凋亡途径又是细胞凋亡的主要途径之一^[12]。关于HBx引起内源性及外源性细胞凋亡有大量报道, 但研究结果却截然相反。部分研究提示HBx可以促进线粒体相关凋亡^[13-16], 而部分研究则提示HBx可抑制线粒体相关凋亡^[3,17]。就HBx诱导或促进线粒体相关凋亡而言, Takara等^[13]与Shirakata等^[14]分别报道, 细胞过表达HBx可导致线粒体聚集, 线粒体膜电位下降, 释放细胞色素酶C, 导致细胞凋亡; Kim等^[15]报道HBx可通过促进Bax向线粒体转位来诱导细胞凋亡。Terradillos等^[16]通过转基因小鼠研究表明, 线粒体HBx会弱化Bcl-2对于Fas凋亡的保护作用。

就HBx抑制线粒体凋亡而言, Mao等^[17]报道在L02、Chang、HepG2与BEL-7404细胞系中, 在饥饿的环境下, HBx可以抑制肝细胞线粒体释放细胞色素C以及凋亡诱导因子, 并可以抑制Caspase-9的活化来抑制线粒体相关凋亡。细胞内的线粒体存在线粒体分裂/融合的动态变化以适应细胞不同的应激状态。Kim等^[3]报道HBV感染肝细胞可促进线粒体分裂, 进而促进线粒体自噬, 通过这种方式清除受损伤的线粒体来维持细胞内稳态以避免肝细胞凋亡。

在不同的研究中由于试验细胞以及转基因小鼠模型不同, HBx表达水平不同, 外界影响因素不同以及是在完整HBV感染的背景下研究还是抛开HBV感染单纯研究HBx功能等均会影响研究结果; 而且在HBV感染的不同阶段HBx对线粒体凋亡的影响作用可能也不相同。HBx对于线粒体凋亡的影响尚不能一概而论。除HBx外, Xiao等^[9]报道, 在HepG2细胞系中, HBsAg结合于ECHS1蛋白可影响ECHS1蛋白线粒体定位, 并进一步降低线粒体膜电位, 进而诱导细胞凋亡。

3 HBV 相关线粒体氧应激损伤

Jung等^[18]研究表明, HBx可通过其C-末端作用于线粒体从而导致线粒体DNA损伤, 表现为线粒体8-氧鸟嘌呤水平升高; 同时导致氧自由基产生显著升高。Wang等^[19,20]通过酵母双杂交系统筛选HBx结合蛋白, 证实HBx可与细胞色素氧化酶III (cytochrome C oxidase III, COXIII) 结合, 进一步通过共聚焦显微镜证实HBx与COXIII共定位于线粒体内膜。Zou等^[21]报道在HL-7702细胞中, HBx可上调COXIII的表达以及氧自由基的生成。HBx促进线粒体氧应激损伤可进

一步影响线粒体凋亡、线粒体相关免疫等信号通路。

4 HBV 通过线粒体相关信号通路调节抗病毒免疫

近年来, 随着免疫代谢学 (immunometabolism) 的兴起, 线粒体在免疫调节中的作用逐渐成为研究的热点^[2]。线粒体为免疫细胞从非活化状态到活化状态提供能量, 并且参与先天性免疫与适应性免疫的多个信号通路。就病毒感染而言, 现有研究表明多种病毒可下调线粒体抗病毒信号蛋白 (mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS) 以干扰先天性免疫。MAVS是线粒体中发现的第一个与先天性免疫相关的蛋白^[22]。MAVS定位于线粒体相关膜 (mitochondrial associated membrane, MAM) 以及过氧化物酶体小体 (peroxisome); 定位于MAM的MAVS可通过NF- κ B信号通路以及IRF3信号通路诱导INF- λ 1与IFN- β 的生成; 而定位于过氧化物酶小体的MAVS可通过IRF1信号通路诱导IFN- λ 1的生成, 从而在病毒等感染时发挥抗病毒作用。在HBV感染中, Wei等^[23]研究表明HBx可作用于MAVS, 促进MAVS第136位赖氨酸的泛素化, 从而抑制MAVS信号通路的IFN- β 的生成。但HBx影响线粒体相关先天性免疫的机制尚需进一步阐明。

5 HBV 影响线粒体相关细胞周期调控

HBV感染肝细胞后会通过调节细胞代谢来营造利于其复制的内环境。早在1996年, Ozer等^[24]就报道HBV复制与肝细胞所处的细胞周期有关。Gearhart等^[25]阐明, 在原代肝细胞感染HBV模型中, HBx可以调节细胞内钙离子浓度而使肝细胞停滞在G₁期, G₁期肝细胞内环境有利于HBV复制。而Yang等^[26]报道, HBx可作用于线粒体钙离子通道, 进而增加细胞内钙离子浓度。在这些研究的基础上, Gearhart等^[27]进一步表明HBx可作用于线粒体通透转运孔道 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 来调节胞浆内钙离子浓度, 进而使细胞停滞于G₁期, 为HBV复制创造内环境。

6 小结

综上所述, HBV可通过作用于线粒体影响细胞凋亡、抗病毒免疫、氧应激损伤以及细胞周期等。HBV对于细胞凋亡的影响虽然研究众多, 但尚未有定论; 而HBV对于免疫以及细胞周期的影响尚处于起步阶段。尤其是HBx作为HBV与线粒体作用的主要蛋白, 相关研究得出的结论甚至互相矛盾。这一方面是由于HBx为多功能蛋白, 其功能非常复杂, 细胞模型不同、细胞内表达量不同以及细胞内定位不同均可能引起不同效应; 另一方面, 部分研究单纯表达HBx来研究细胞结构功能变化, 而未将HBx放在HBV感染细胞

的大背景下来进一步验证,不一定能客观体现HBx在HBV感染中的作用。为此Slagle等^[28]起草了关于HBx研究的技术标准以规范HBx的相关研究。虽然HBV相关线粒体损伤研究尚处于起步阶段,但HBV与线粒体相互作用的研究的确为HBV发病机制研究提供了新的思路,需进一步加强HBV相关线粒体损伤研究,以期深入阐释HBV导致细胞损伤尤其是肝细胞癌发生的可能机制,为相关药物研发提供新的靶位。

参考文献

- [1] McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse[J]. *Curr Biol*,2006,16:551-560.
- [2] Weinberg SE, Sena LA, Chandel NS. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity[J]. *Immunity*,2015,42:406-417.
- [3] Kim SJ, Khan M, Quan J, et al. Hepatitis B virus disrupts mitochondrial dynamics: induces fission and mitophagy to attenuate apoptosis[J]. *PLoS Pathog*,2013,9:e1003722.
- [4] Wei C, Ni C, Song T, et al. The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein[J]. *J Immunol*,2010,185:1158-1168.
- [5] Rahmani Z, Huh KW, Lasher R, et al. Hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential[J]. *J Virol*,2000,74:2840-2846.
- [6] Henkler F, Hoare J, Waseem N, et al. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein[J]. *J Gen Virol*,2001,82:871-882.
- [7] McClain SL, Clippinger AJ, Lizzano R, et al. Hepatitis B virus replication is associated with an HBx-dependent mitochondrion-regulated increase in cytosolic calcium levels[J]. *J Virol*,2007,81:12061-12065.
- [8] Li SK, Ho SF, Tsui KW, et al. Identification of functionally important amino acid residues in the mitochondria targeting sequence of hepatitis B virus X protein[J]. *Virology*,2008,381:81-88.
- [9] Xiao CX, Yang XN, Huang QW, et al. ECHS1 acts as a novel HBsAg-binding protein enhancing apoptosis through the mitochondrial pathway in HepG2 cells[J]. *Cancer Lett*,2013,330:67-73.
- [10] Liu YP, Yang XN, Jazag A, et al. HBsAg inhibits the translocation of JTB into mitochondria in HepG2 cells and potentially plays a role in HCC progression[J]. *PLoS One*,2012,7:e36914.
- [11] Wang K. Molecular mechanisms of liver injury: apoptosis or necrosis[J]. *Exp Toxicol Pathol*,2014,66:351-356.
- [12] Rawat S, Clippinger AJ, Bouchard MJ. Modulation of apoptotic signaling by the hepatitis B virus X protein[J]. *Viruses*,2012,4:2945-2972.
- [13] Takada S, Shirakata Y, Kaneniwa N, et al. Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death[J]. *Oncogene*,1999,18:6965-6973.
- [14] Shirakata Y, Koike K. Hepatitis B virus X protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential[J]. *J Biol Chem*,2003,278:22071-22078.
- [15] Kim HJ, Kim SY, Kim J, et al. Hepatitis B virus X protein induces apoptosis by enhancing translocation of Bax to mitochondria[J]. *IUBMB Life*,2008,60:473-480.
- [16] Terradillos O, de La Coste A, Pollicino T, et al. The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas apoptosis in the liver[J]. *Oncogene*,2002,21:377-386.
- [17] 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.
- [18] Jung SY, Kim YJ. C-terminal region of HBx is crucial for mitochondrial DNA damage[J]. *Cancer Lett*,2013,331:76-83.
- [19] Wang XZ, Li D, Tao QM, et al. A novel hepatitis B virus X-interactive protein: cytochrome C oxidase III[J]. *J Gastroenterol Hepatol*,2006,21:711-715.
- [20] Zheng BY, Fang XF, Zou LY, et al. The co-localization of HBx and COXIII upregulates COX-2 promoting HepG2 cell growth[J]. *Int J Oncol*,2014,45:1143-1150.
- [21] Zou LY, Zheng BY, Fang XF, et al. HBx co-localizes with COXIII in HL-7702 cells to upregulate mitochondrial function and ROS generation[J]. *Oncol Rep*,2015,33:2461-2467.
- [22] Seth RB, Sun L, Ea CK, et al. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3[J]. *Cell*,2005,122:669-682.
- [23] Wei C, Ni C, Song T, et al. The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein[J]. *J Immunol*,2010,185:1158-1168.
- [24] Ozer A, Khaoustov VI, Mearns M, et al. Effect of hepatocyte proliferation and cellular DNA synthesis on hepatitis B virus replication[J]. *Gastroenterology*,1996,110:1519-1528.
- [25] Gearhart TL, Bouchard MJ. The hepatitis B virus X protein modulates hepatocyte proliferation pathways to stimulate viral replication[J]. *J Virol*,2010,84:2675-2686.
- [26] Yang B, Bouchard MJ. The hepatitis B virus X protein elevates cytosolic calcium signals by modulating mitochondrial calcium uptake[J]. *J Virol*,2012,86:313-327.
- [27] Gearhart TL, Bouchard MJ. Replication of the hepatitis B virus requires a calcium-dependent HBx-induced G₁ phase arrest of hepatocytes[J]. *Virology*,2010,407:14-25.
- [28] Slagle BL, Andrisani OM, Bouchard MJ, et al. Technical standards for hepatitis B virus X protein (HBx) research[J]. *Hepatology*,2015,61:1416-1424.

收稿日期: 2015-07-28