

细胞凋亡与病毒性肝炎研究进展

王玉洁 赵红 谢雯

病毒性肝炎是我国一种高发性传染病,以乙型和丙型肝炎最为常见。诸多因素参与了嗜肝病毒的致病过程,细胞凋亡为其中之一。肝脏被病毒感染后可以通过细胞凋亡清除病毒感染的细胞,但肝脏生理功能亦会因此受损,可见肝细胞凋亡在病毒性肝炎发病过程中是把双刃剑。肝细胞凋亡可以由嗜肝病毒的直接作用引起,包括特异性病毒蛋白产物和肝细胞膜上可触发细胞凋亡的各种受体的表达;也可以由病毒所引发的免疫反应引起^[1],主要通过穿孔素/颗粒酶途径以及Fas/FasL途径。

一、病毒性肝炎中细胞凋亡的存在

细胞凋亡的特征性形态学改变为凋亡小体的形成,随着细胞凋亡在各种疾病过程中作用的显现,肝病学家们对此领域在病毒性肝炎中是否亦存在及其作用进行了探索。Roberts等^[2]对63例丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染者的肝组织标本进行观察时发现,凋亡小体的存在是HCV患者肝组织学的特征性改变之一,推测在HCV感染的慢性化过程中肝细胞凋亡可能起了重要的作用。Faa等^[3]对4例HCV患者的肝组织标本进行电镜下观察发现,低倍电镜下肝窦状隙内可见凋亡小体以及一些炎性细胞;而部分肝细胞则有与凋亡相关的改变如细胞变圆、与邻近细胞解离、胞浆聚缩和细胞裂解等;而高倍电镜下,则除光面内质网扩张外,几乎所有的细胞内结构如细胞膜、线粒体等细胞器都似乎正常。Chlumska等^[4]对10例轻型活动性病毒性肝炎患者肝组织标本进行电镜观察及免疫组织化学分析发现,存在碎屑样坏死,未见溶解性坏死或弥漫性多核白细胞浸润,坏死的肝细胞是经凋亡过程实现,并迅速为肥大细胞所吞噬,继而淋巴细胞减少,浆细胞消失。最近有研究通过检测HCV感染者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中凋亡相关mRNA及蛋白的表达发现,HCV可从基因与蛋白水平促进细胞凋亡^[5]。

二、乙型肝炎病毒X蛋白与细胞凋亡

HBV基因组包含4个开放阅读框架,X基因是其中最小的一个开放阅读框架,编码分子量为16.5 kD的X蛋白,该蛋白由154个氨基酸组成。X蛋白对肝细胞凋亡具有促进与抑制的双向调节作用。

1. X蛋白对肝细胞凋亡的促进作用:Chen等^[6]研究表明X蛋白可以促进HL-770/HBx细胞的凋亡,而且存在剂量依赖性,转染72 h后达高峰。陈为贵等^[7]成功构建X基因的真核表达质粒转染HepG2细胞后,与空白对照组相比,X蛋白表达组细胞活力受到明显抑制($P \leq 0.01$),凋亡率显著增加($P \leq 0.01$),认为HBV感染过程中,

X蛋白的表达可以促进肝细胞凋亡进而引发肝脏炎症反应。Song等^[8]通过HepG2细胞转染X蛋白基因后发现细胞凋亡显著增多,G0~G1时间段显著延长,而未转染X蛋白基因的细胞则进入S期迅速增殖,提示X蛋白可以诱导细胞凋亡。最近有研究表明^[9],HBx还可以抑制弹性纤维形成,通过肌球蛋白轻链激酶信号途径触发细胞凋亡。

2. X蛋白对肝细胞凋亡的抑制作用:Diao等^[10]将X蛋白基因转染不同细胞,发现X蛋白能使这些细胞抵制Fas介导的凋亡,对TNF介导的凋亡也有一定抵抗。这可能与HBx抑制Caspase-8和Caspase-3活性,抑制细胞色素氧化酶C释放,上调SAPK/JNK的活性有关。在HepG2细胞中,X蛋白可上调端粒酶活性而抑制细胞凋亡。X蛋白还能激活核因子 κ B(NF- κ B),使其从胞质转入核内,启动核内靶基因的转录,调节细胞周期从G0/G1向S期过渡,从而抑制细胞凋亡。

翟露露等^[11]将表达HBx的质粒短暂转染Huh7和293T细胞,结果发现HBx对细胞凋亡的影响存在剂量依赖效应。转染低剂量HBx表达质粒会抑制细胞凋亡发生,而当转染量达到较高程度($> 1 \mu\text{g}$)时,反而会促进细胞凋亡,他们也初步探索了HBx剂量依赖调节细胞凋亡的作用机制,发现HBx随着表达量的不同会影响NF- κ B的细胞定位。

X蛋白对细胞凋亡双重调节作用的确切机制仍不清楚,可能与研究模型及其所处环境有关,在HBV感染过程中,当肝细胞处于再生、转录或对各种细胞因子产生应答等各种不同状态时,X蛋白对肝细胞凋亡的调控作用可能会发生变化。故使用更接近人体生理状态的肝脏模型进行研究在未来更有助于对HBx活性与肝细胞凋亡的相关性深入了解^[12]。

三、丙型肝炎病毒核心蛋白与细胞凋亡

HCV基因组含有一个开放的编码区,可编码一个由3011个氨基酸残基组成的多聚蛋白前体,然后由宿主和病毒的蛋白酶裂解为3个结构蛋白和6个非结构蛋白,核心蛋白即为3个结构蛋白之一。

与HBx类似,目前的研究表明,HCV核心蛋白既可以促进细胞凋亡,又可以抑制细胞凋亡。曾有实验显示该蛋白可以抑制各类非肝脏细胞的细胞系中TNF、顺铂以及原癌基因诱导的Caspase活化与凋亡,但在中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary, CHO)细胞中却表现出促进细胞凋亡的作用。而在肝脏细胞中也观察到了同样矛盾的结论。在瞬时转染的HepG2细胞中,核心蛋白不会影响TNF- α 或Fas诱导的凋亡,反之,另一个研究显示核心蛋白的单一瞬时表达或者与其他HCV蛋白的联合表达却可以抑制Fas介导的细胞凋亡^[13]。也有研究显示,组成性表达核心蛋白的HepG2细胞更容易发生Fas介导的细胞凋亡。同样,在瞬时以及稳定转染核心蛋白的Jurkat T淋巴细胞(人外周血白血病T细胞)中也观察到了其可

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.06.036

基金项目:北京市科委2012年度科技计划重大项目(No. D121100003912003)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院肝病中心

通讯作者:谢雯, Email: xiewen6218@163.com

增强Fas诱导的细胞凋亡^[14]。

有关于HCV蛋白干扰细胞凋亡分子学机制的研究不多,并且应当强调的是大部分研究应用的是不能模拟体内生理情况的人工过表达系统。有研究显示核心蛋白能与胞浆Fas以及TNF-R1结构域发生物理性作用从而增强这些受体的下游信号转导^[15]。而且发现,核心蛋白不仅能与死亡受体相互作用,还可以作用于Fas相关死亡结构域蛋白(Fas-associated with death domain protein, FADD)死亡结构域(death domain, DD),但不能作用于肿瘤坏死因子受体-1相关死亡结构域蛋白(TNF receptor-1-associated death domain protein, TRADD)。因此,在TNF治疗过程中,核心蛋白的表达增强了FADD介导的凋亡作用,而抑制了TRADD以及TRAF-2的募集与后来JNK的活化^[15]。也有报道称核心蛋白可以结合p53。但有报道其促进了p53及其下游靶目标p21的活化,有研究则表现出抑制作用^[16]。有研究显示,核心蛋白可以改变线粒体功能和促进氧化应激,观察在不同细胞系中的过表达发现,核心蛋白定位于线粒体内,与细胞色素C释放增加有关,但并未影响细胞凋亡^[17]。

转基因小鼠的应用可以避免细胞培养中非生理状态下过度表达而造成的人为误差。在C57/BL/6小鼠体内,核心蛋白结构性过表达显示出促进抗-Fas介导的细胞凋亡的作用^[18]。而在设定条件、表达核心蛋白的BALB/c小鼠体内,肝细胞凋亡数明显减少,生存率与HCV蛋白产物的表达相关^[19]。而且有趣的是,核心蛋白可以抑制肝组织中Caspase-9而非Caspase-8的活性。并且,线粒体中细胞色素C的释放在核心蛋白表达小鼠体内受到抑制,表明核心蛋白可以干扰线粒体凋亡途径。总之,转基因小鼠数据显示,核心蛋白等HCV蛋白产物可以直接或者间接抑制死亡受体结构的凋亡而非促进凋亡。

四、病毒性肝炎中的细胞凋亡相关受体及其配体

肝细胞膜上表达的凋亡相关性受体及其信号转导通路上的各种调节因子是病毒感染和慢性肝炎的中间桥梁。在慢性肝炎感染者的肝细胞中发现Fas、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)和TNF- α 系统都可呈高表达。

已证实Fas/FasL的表达与病毒感染程度相关:乙型肝炎和丙型肝炎病毒感染者肝细胞Fas的表达高于健康人;病毒复制活跃的活动期时Fas表达高于病毒复制减少的静止期;轻型活动性肝炎Fas表达较弱;中、重度肝炎时表达增强。这些高表达的Fas主要位于肝组织碎屑状坏死区和小叶内灶状坏死区。此外,HBV持续感染还可以诱导细胞毒性T细胞(cytotoxic T-lymphocyte, CTL)高表达FasL,为病毒感染时机体CTL杀伤病毒感染靶细胞的分子机制之一。HCV感染者肝细胞损伤过程中Fas/FasL途径起着关键性作用,可以通过直接的HCV感染和间接对病毒感染细胞的免疫攻击作用而使肝细胞发生过度凋亡。HCV感染过程中,HCV特异性T细胞迁移到肝脏并识别肝细胞上的病毒抗原,有研究认为这些免疫活化的细胞是由炎症反应而非病毒感染引起的,这样就可以合理解释Fas表达以及肝脏损伤程度与肝内病毒载量并无相关性的原因。最新研究亦表明,Fas/FasL基因多态性与HBV感染严重程度有关^[20]。

研究发现病毒性肝炎患者的肝细胞TRAIL表达也升高^[21-23],且自然杀伤细胞分泌的干扰素对TRAIL起到刺激作用,从而推测自然杀伤细胞可以通过TRAIL介导的肝细胞凋亡引发持久不愈的肝炎。TRAIL不会导致健康人的肝细胞损伤,却可引发病毒感染的肝细胞发生凋亡。在HBV感染导致的急性肝功能衰竭患者的肝组织内,TRAIL及其受体DR5的表达水平均增加,肝细胞感染肝炎病毒后即被TRAIL诱导发生凋亡,而对正常肝细胞无影响。研究表明,在急性HBV肝炎模型中,阻断TRAIL途径即可明显改善HBV引发的肝细胞凋亡。因此,TRAIL死亡受体途径介导的肝细胞凋亡在HBV感染肝细胞损伤中可能发挥重要作用。采用组织培养模型研究TRAIL介导的细胞凋亡发现,HCV非结构蛋白是活化TRAIL的重要因子,其激活TRAIL介导的细胞凋亡有赖于Caspase-9的存在,并且一部分依赖于线粒体的介导,表明HCV感染激活TRAIL进而引起细胞凋亡可能是机体的抗病毒机制之一。

TNF- α 不仅可通过线粒体途径诱导细胞凋亡,而且还可以增强Fas介导的细胞毒作用。在病毒性肝炎中,常常可以观察到血浆中TNF- α 及TNF-R水平有所升高。实验发现TNF- α 、Bax和Caspase-3随炎症程度上升而表达增高,而抑制凋亡因子Bcl-2则表达降低,这些现象提示表达这些细胞因子的细胞可能将面临凋亡的结局。

五、病毒性肝炎中免疫反应介导的细胞凋亡

病毒感染过程中,机体主要的免疫方式为CTL对病毒感染细胞的特异性杀伤,主要有两种分子机制:穿孔素/颗粒酶途径和Fas/FasL途径。在细胞外液中Ca²⁺催化下,穿孔素可以使细胞膜表面形成5~20 nm的孔径,随后颗粒酶可通过这些小孔进入靶细胞。在细胞内,颗粒酶可以分泌A和B,其中颗粒酶B能激活Caspase-3,进而活化DNA断裂因子,最终导致靶细胞凋亡。

Urban等^[24]用HBV表位肽刺激急性乙型肝炎患者的PBMC发现,表达大量穿孔素和干扰素的特异性CD8⁺T细胞出现增殖,表现出较高的细胞毒活性。慢性HBV患者的PBMC中穿孔素表达水平显著高于健康人^[25]。有研究表明,慢性HBV患者PBMC中CD8⁺T细胞计数较健康人显著增高,穿孔素和颗粒酶表达水平也显著增高,但增高幅度不及急性HBV患者^[26]。约50%HBV患者的肝组织可以表达颗粒酶,78.7%的患者可以表达穿孔素,并且两者的表达强度与血清ALT水平以及肝组织炎症程度显著相关^[27-28]。对于急性HCV患者,PBMC中特异性CD8⁺T细胞的穿孔素表达水平明显下降,细胞增殖能力、溶细胞活性和干扰素表达水平等都明显降低,但这种缺陷是一过性的,可逐渐恢复。急性HCV患者的这种反应与急性HBV患者不同,提示两种病毒感染后杀伤细胞的机制可能不同。慢性HCV患者PBMC中的自然杀伤细胞细胞计数、细胞毒活性和穿孔素阳性T细胞比例较正常对照和急性HCV患者低,肝内浸润的炎性细胞以CD8⁺T细胞为主^[29],均有穿孔素阳性细胞的分布,其中点状坏死区阳性率最高,其次为片状坏死区、门管区和小叶内非坏死区^[30]。

此外,病毒感染肝细胞后Fas受体表达增多,而免疫活化的CTL表面FasL表达增多,进而CTL可以通过两者的结合而发挥诱导细胞凋亡的作用。有研究表明,HBV感染后

发生的肝细胞凋亡主要通过CTL的Fas系统介导,即CTL Fas配体和肝细胞膜上的Fas受体特异结合后引发肝细胞凋亡。

六、细胞凋亡与病毒性肝炎的诊治

在动物实验中证实Caspase抑制物通过抑制蛋白激酶的作用,从而减弱肝细胞凋亡和坏死。Pockros等^[31]在丙型肝炎患者的临床试验中也得到了同样的结果:IDN6556是全Caspase抑制物,通过抑制下游的Caspase级联反应,起到抑制肝细胞凋亡的作用。在一项多中心双盲对照试验中已证实IDN6556能使慢性丙型肝炎患者肝细胞破坏减少从而达到转氨酶水平下降的效果,所以认为其可能成为治疗丙型肝炎的新型有效药物。

七、结语

数项研究已经表明抗凋亡药物治疗后疾病严重程度会减轻。提示细胞凋亡是病毒性肝炎发病过程中一个很重要的机制,认为细胞凋亡及其信号转导途径也许可为病毒性肝炎的治疗提供新靶点。但必须注意的是,病毒有不同的策略来逃避凋亡机制,在一些情况下病毒介导的肝损伤会因为不能中止免疫应答而发病,因此抑制凋亡也许可能会加速疾病的恶化。故需进一步研究来确定抑制凋亡究竟是会改善还是会加重病毒性肝炎,而对于抑制凋亡可以改善生存和减少组织损伤的病例来说,详细阐明其中的凋亡信号转导通路就很重要。

参 考 文 献

- 1 Kipiani NV, Topuridze ML, Kipiani VA, et al. The role of apoptosis in the development of virus hepatitis. *Georgian Med News*,2011(194):84-90.
- 2 Roberts JM, Searle JW, Cooksley WG. Histological patterns of prolonged hepatitis C infection. *Gastroenterol Jpn*,1993,28(Suppl 5):37-41.
- 3 Faa G, Ambu R, Congiu T, et al. Early ultrastructural changes during thioacetamide-induced apoptosis in rat liver. *J Submicrosc Cytol Pathol*,1992,24(3):417-424.
- 4 Chlumska A, Velenská Z, Vítková I, et al. Liver cholestasis in neonates and young children. *Cesk Patol*,1992,28(2):113-117.
- 5 Albertoni G, Arnoni CP, Latini FR, et al. Altered of apoptotic markers of both extrinsic and intrinsic pathways induced by hepatitis C virus infection in peripheral blood mononuclear cells. *Virology*,2012,9:314.
- 6 Chen HY, Tang NH, Zhang SJ, et al. Transfection and expression of hepatitis B virus x gene and its effect on apoptosis in HL-7702 cells. *World J Gastroenterol*,2004,10(7):959-964.
- 7 陈文贵,林琳,谢海涛,等.乙型肝炎病毒X蛋白表达及其对HepG2细胞凋亡的影响. *中国现代医学杂志*,2008,18(9):1190-1193.
- 8 Song CZ, Bai ZL, Song M, et al. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis. *World J Gastroenterol*,2003,9(7):1521-1524.
- 9 Kuo CY, Chou TY, Chen CM, et al. Hepatitis B virus X protein disrupts stress fiber formation and triggers apoptosis. *Virus Res*,2013,175(1):20-29.
- 10 Diao J, Khine AA, Sarangi F, et al. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with upregulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem*,2001,276(11):8328-8340.
- 11 翟露露,刘晶,谢幼华,等.乙型肝炎病毒X蛋白对细胞凋亡的影响存在剂量依赖性. *微生物与感染*,2011,6(2):72-77.

- 12 Rawat S, Clippinger AJ, Bouchard MJ. Modulation of apoptotic signaling by the hepatitis B virus X protein. *Viruses*,2012,4(11):2945-2972.
- 13 Marusawa H, Hijikata M, Chiba T, et al. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas-and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappa B activation. *J Virol*,1999,73(6):4713-4720.
- 14 Hahn CS, Cho YG, Khan BS, et al. The HCV core protein acts as a positive regulator of Fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology*,2000,276(1):127-137.
- 15 Zhu N, Ware CF, Lai MM. Hepatitis C virus core protein enhances FADD-mediated apoptosis and suppresses TRADD signaling of tumor necrosis factor receptor. *Virology*,2001,283(2):178-187.
- 16 Otsuka M, Kato N, Lan K, et al. Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem*,2000,275(44):34122-34130.
- 17 Okuda M, Li K, Beard MR, et al. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology*,2002,122(2):369-375.
- 18 Honda A, Hatano M, Kohara M, et al. HCV-core protein accelerates recovery from the insensitivity of liver cells to Fas-mediated apoptosis induced by an injection of anti-Fas antibody in mice. *J Hepatol*,2000,33(3):440-447.
- 19 Machida K, Tsukiyama-Kohara K, Seike E, et al. Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins. *J Biol Chem*,2001,276(15):12140-12146.
- 20 Zamani AG, O Barlas I, Durakbasi-Dursun G, et al. Evaluation of death pathway genes FAS and FASL polymorphisms in chronic HBV infection. *Int J Immunogenet*,2013. [Epub ahead of print].
- 21 Strater J, Walczak H, Pukrop T, et al. TRAIL and its receptors in the colonic epithelium: a putative role in the defense of viral infections. *Gastroenterology*,2002,122(3):659-666.
- 22 Zhang M, Li X, Pang X, et al. Identification of a potential HIV-induced source of bystander-mediated apoptosis in T cells: upregulation of TRAIL in primary human macrophages by HIV-1 TAT. *J Biomed Sci*,2001,8(3):291-296.
- 23 Sato K, Hida S, Takayanagi H, et al. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur J Immunol*,2001,31(11):3138-3146.
- 24 Urbani S, Boni C, Mossale G, et al. Virus-specific CD8⁺ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J Viral*,2002,76(24):12423-12434.
- 25 李明,朱传武,钱峰,等.慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞穿孔素表达与干扰素抗病毒疗效的关系. *中华肝脏病杂志*,2006,14(10):729-731.
- 26 郑纪山,王寿明,唐雨德,等.乙型肝炎病毒感染者外周血T细胞亚群和穿孔素-颗粒酶变化. *临床医学工程*,2009,16(12):4-6.
- 27 王海燕,贺永文,朱传武,等.慢性乙型肝炎患者肝组织穿孔素表达的临床意义. *世界华人消化杂志*,2006,14(22):2207-2210.
- 28 陈乃玲,白玲,邓涛,等.慢性肝病颗粒酶B及凋亡相关蛋白表达的研究. *军医进修学院学报*,2004,25(3):200-202.
- 29 Par G, Rukavina D, Podack ER, et al. Decrease in CD3-negative-CD8dim(+) and Vdelta2/Vgamma9 TcR peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol*,2002,37(4):514-522.
- 30 赵英仁,王一理,司履生,等.慢性丙型肝炎活化杀伤细胞perforin mRNA原位表达与肝损伤的关系. *第四军医大学学报*,2004,25(15):1349-1352.
- 31 Pockros PJ, Schiff ER, Shiffman ML, et al. Oral IDN-6556, an antiapoptotic caspase inhibitor, may lower aminotransferase activity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*,2007,46(2):324-329.

(收稿日期:2013-07-04)

(本文编辑:孙荣华)