

慢性 HBV 感染者 IFN- γ 基因启动子甲基化状态的探讨

陈瑞琳 蔺淑梅 张树林 张曦

乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个严重的公共卫生问题。全球 60 亿人口中,约 20 亿人曾感染 HBV,其中 3.5 ~ 4 亿人为慢性感染,约占全球人口 6%。在 3.5 ~ 4 亿慢性 HBV 感染者中,约 15% ~ 25% 最终将死于 HBV 感染所致的肝衰竭、肝硬化和原发性肝癌^[1],严重危害人民健康。

HBV 感染后易慢性化,其机制可能与宿主免疫应答状态、病毒变异等多种因素相关。多年来研究认为,宿主免疫功能紊乱,尤其细胞免疫功能低下是乙型肝炎慢性化主要机制。大量研究资料表明,Th1/Th2 细胞亚群的失衡与 HBV 持续感染密切相关。在病毒复制部位,T 细胞分泌的细胞因子类型可能影响感染的最后结局。Th2 样细胞优势与维持慢性携带状态相关,倾向于发生持续性 HBV 感染,IL-4 可以促使 T 细胞向 Th2 发育;而 Th1 样细胞优势与病毒清除相关,在急性 HBV 感染中占优势,IL-12 促使 T 细胞向 Th1 发育,可能是有效的病毒清除机制。IL-12 抗病毒效应主要是诱导产生 IFN- γ 。IFN- γ 是由活化 T 细胞(Th1 细胞)和 NK 细胞产生,是一个重要的免疫反应调控因子。IFN- γ 不仅能直接抑制病毒复制,且可通过多种途径直接或间接促进 Th1 应答,提高 CTL(细胞毒性 T 细胞)及 NK 活性,增强细胞免疫,在清除 HBV 感染的免疫反应中发挥着重要作用,另外在肝细胞无损伤清除病毒中也起主要作用^[2]。所以 IFN- γ 作为 Th1 细胞标志与 HBV 感染后病毒复制、病情轻重、治疗反应及感染的最终结局密切相关。

一、慢性 HBV 感染者 IFN- γ mRNA 表达和分泌减少的原因

急性乙型肝炎患者的血清中,可检出高水平 IFN- γ ,显著高于正常及慢性对照;而慢性 HBV 感染中,外周血单个核细胞(PBMC)产生 IFN- γ 能力下降^[3],可能正是由于这种不充分的细胞免疫应答未能清除病毒而引起肝脏持续性损伤。资料显示,慢性乙型肝炎患者 PBMC 不论用特异性抗原(HBeAg、HBcAg、HBsAg)还是非特异性抗原如植物血凝素(PHA)刺激,其培养上清液 IFN- γ 水平及 PBMC 中 IFN- γ mRNA 表达量均低于正常对照组^[4,5];但也有资料显示,慢性乙型肝炎患者 PBMC 产生 IFN- γ 量高于健康对照,但低于急性肝炎患者^[6]。两组资料差异可能与检测的慢性乙型肝炎患者的病毒载量有关。Schlaak 等^[7]认为血清中存在的高病毒量能够抑制 IL-12 对 HBV 抗原诱导的特异性免疫反应的促进作用。大量

基金项目:陕西省自然科学基金(2003C244)

作者单位:710061 西安,西安交通大学医学院第一附属医院传染科

通讯作者:蔺淑梅 Email:linshumei123@126.com

资料显示,慢性乙型肝炎患者 PBMC 经抗原刺激后 IFN- γ 产量及表达 IFN- γ 的细胞百分数与血清 HBV DNA 水平呈负相关^[8];慢性 HBV 感染者较急性者 PBMC 受侵犯率高,且血清 HBV DNA 水平越高 PBMC 内 HBV DNA 检出率也越高^[9]。多项临床实验亦显示,慢性乙型肝炎 IFN- γ 治疗完全应答者,PBMC 中 IFN- γ mRNA 表达及培养上清液中 IFN- γ 水平较治疗前及无效者显著增加,而部分应答或无应答者治疗前后无显著差异^[10]。上述结果表明,HBV DNA 侵犯 PBMC 有可能抑制 IFN- γ mRNA 的表达,使 IFN- γ 的产量减少,且 HBV DNA 量与 IFN- γ 的产量呈负相关。

二、慢性 HBV 感染者 IFN- γ mRNA 表达和分泌减少的可能机制

1. 甲基化及其在基因转录调控中的作用:基因失活包括遗传学和表遗传学两个水平,分子遗传学水平基因失活有多种方式,如纯合子或杂合子丢失、点突变及基因移码等核苷酸序列改变,偶发突变是不可逆的。表遗传学是研究没有 DNA 序列变化的、可遗传的表达改变。人类基因组测序结果已表明高等生物的复杂性并不在于有更多的结构蛋白基因编码,而在于基因表达的调控机制更为复杂。其中 DNA 甲基化是表遗传学水平细胞开闭基因表达的一种重要方式。5-甲基胞嘧啶是脊椎动物中唯一的修饰碱基。在人类基因组中,甲基化 CpG 二核苷酸有两种分布形式,一种是分布于 CpG 岛区(富含 CpG 二核苷酸区域),常存在于基因 5'-端的基因调控区,其甲基化状态直接影响基因表达;另一种为散在分布的 CpG 二核苷酸。正常细胞内,启动子区的 CpG 岛呈非甲基化状态,而占大部分的散在分布的 CpG 二核苷酸多发生甲基化。基因组中绝大多数位点的甲基化状态是恒定的,但少数位点的甲基化状态可以发生改变,如某些组织特异基因的启动子甲基化状态具有组织特异性,即仅在表达的组织中呈非甲基化状态。当基因组 DNA 的甲基化状态发生改变时,会造成机体染色体不稳定或基因表达异常。

基因启动子区的 CpG 岛在正常状态下一般是非甲基化的,当其发生甲基化时,常导致基因转录沉寂,使重要基因如抑癌基因、DNA 修复基因等丧失功能。近年研究表明,基因启动子区甲基化程度越高,基因就越沉默,反之亦然,即基因转录水平与启动子区甲基化水平呈负相关^[11]。因此研究启动子区 CpG 岛甲基化状态是了解基因正常或异常表达的重要途径。现已证实基因的异常甲基化是人类肿瘤发生中最常见的事件。到目前为止在人类肿瘤及癌细胞株中发现大量肿瘤抑制基因、肿瘤转移抑制基因等 5'-启动子区正常非甲基化的 CpG 岛发生甲基化,并证明异常甲基化是其基因失活的主要机制^[12-15]。体外实验证实,用 5'-氮胞苷(azacytidine,一种去甲基化药)处理肝癌细胞株^[14]及裸鼠的移植瘤^[14],能诱导 p15 基因(一种抑癌基因)重新表达,抑制肿瘤生长^[15]。5-氮杂胞苷、5-氮杂-2'-脱氧胞苷目前已应用于临床实验作为常规化疗方案的补充,用于治疗儿童白血病等肿瘤^[12-15]。

2. IFN- γ 基因表达和甲基化的关系:Melvin 等^[16]为了明确甲基化对 IFN- γ 转录调控的作用,分析了 T 细胞系 IFN- γ 基因启动子区甲基化状态和其表达的关

系。结果表明,IFN- γ 基因表达水平和甲基化程度之间存在明显负相关。在成人 CD8⁺T 细胞、成人记忆/效应 CD4⁺/CD45 细胞的 IFN- γ 基因启动子区,CpG 岛存在明显低甲基化和 IFN- γ 基因高表达;而在胸腺、新生儿 T 细胞、成人幼稚 CD4⁺/CD45 细胞 IFN- γ 基因启动子区 CpG 岛存在显著高甲基化和低或不能检测到的 IFN- γ 水平。从而表明 T 细胞系 IFN- γ 基因甲基化程度高低可能是调控 IFN- γ 基因表达的重要决定因素。White 等^[17]研究脐血与成人 IFN- γ 水平差异时,亦认为 CD4⁺/CD45 RO⁻T 细胞 IFN- γ 基因启动子高甲基化是引起脐血低 IFN- γ 水平的主要机制。现大量研究已明确,IFN- γ 基因启动子甲基化是调控 IFN- γ 基因表达的主要机制^[18]。

3. 甲基化的特异性:最近有学者对人类 70 个肿瘤细胞系中 15 种基因的启动子甲基化状态进行系统研究,这 70 个细胞系包括 12 种肿瘤,结果证明每种肿瘤至少有一个基因的启动子区发生高甲基化,并且这些基因启动子甲基化具有肿瘤类型的特异性,如癌细胞的扩散能力与基因 E2-钙黏蛋白(cadherin)和金属蛋白酶组织抑制剂 23(TIMP23)有关,结直肠癌细胞系中经常出现 TIMP23 高甲基化^[19]。大量资料表明,IFN- γ 转录起始位点-55CpG 位点(即 293 位点)为关键性 CpG 位点,其甲基化状态与基因转录活性密切相关。Yano 等^[20]研究证实在 Th1 和 Th2 细胞,该位点甲基化状态是不同的,在产生 IFN- γ 的 Th1 细胞该位点是低甲基化的,而在不产生 IFN- γ 的 Th2 细胞该位点则是高甲基化的。用 5'-氮胞苷处理 Th2 细胞可抑制组蛋白去乙酰化酶招募到基因启动子区而抑制甲基化形成,导致该位点发生去甲基化,从而使 Th2 细胞分泌 IFN- γ ,表明甲基化的特异性。T 细胞系 IFN- γ 基因启动子区甲基化状态的不同,亦说明细胞可通过甲基化程度的高低来调控具组织专一性(tissue specificity)基因的表现。

4. 病毒感染可致基因组甲基化异常:人类 60% 的表达基因启动子位于 CpG 岛,在正常情况下这些 CpG 岛不发生甲基化。病毒感染是导致细胞基因组甲基化异常原因之一。资料显示在肝炎相关肝癌中高频出现的 p16 基因启动子区高甲基化与 HBV 感染有关。Kaneto 等^[21]检测了 HCC(原发性肝癌)、肝炎、癌前病变组织中 p16 基因启动子区 5'-CpG 岛的甲基化状态,认为 p16 基因启动子区 5'-CpG 岛的甲基化与乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒感染相关,且可能是肝炎病毒相关肝癌发生的早期改变。Narimatsu 等^[12]研究亦显示肝炎病毒可诱导 p16 基因启动子区甲基化与 Kaneto 的研究结果相同,并见所有 HBV 感染的细胞株 p16 基因均高甲基化。

Mikovits 等^[22]在研究 HIV-1 感染与基因组甲基化关系时发现,HIV-1 感染上调 DNA 甲基转移酶的表达,增加被感染 CD4 细胞 IFN- γ 基因启动子区甲基化。并随着 HIV-1 感染的 CD4 细胞 DNA 甲基转移酶表达的增加,IFN- γ 基因启动子区的甲基化显著增加,随之下调 mRNA 的表达及 IFN- γ 的产量。体外用 DNA 甲基转移酶反义寡核苷酸能抑制启动子区甲基化,IFN- γ 产量亦随之增加。这些结果显示病毒感染后 DNA 甲基转移酶活性增高,IFN- γ 基因启动子甲基化和 IFN-

γ mRNA 表达下调及 IFN- γ 产量下降之间存在显著相关性。从而提示 DNA 甲基化可能是 HIV 感染机体后 T 细胞功能障碍的机制之一。

综上所述,慢性 HBV 感染者 IFN- γ 基因表达下调及 IFN- γ 分泌不足可能与 HBV 侵犯 PBMC 影响 Th1 细胞功能有关。目前尚无从表遗传学角度研究 HBV 感染者 IFN- γ 基因启动子区甲基化状态及其在 HBV 发病机制中的作用。研究慢性 HBV 感染者 IFN- γ 基因启动子区甲基化状态,探讨 HBV DNA 复制与其甲基化状态的关系,有助于阐明 HBV 感染对 IFN- γ 基因表达及分泌的影响及其影响的分子机制,为机体细胞免疫功能下降致 HBV 感染慢性化机制提供进一步理论依据,也为慢性乙型肝炎治疗开辟新思路。

参 考 文 献

- 1 World Health organization. Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet 204 dex.
- 2 Falasca K, Ucciferri C, Dalessandro M, et al. Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C. *Ann Clin Lab Sci*, 2006,36:144-150.
- 3 Rico MA, Quiroga JA, Subira D, et al. Hepatitis B virus-specific T-cell proliferation and cytokine secretion in chronic hepatitis B e antibody-positive patients treated with ribavirin and interferon alpha. *Hepatology*, 2001,33:295-300.
- 4 Lee M, Lee M, Lee SK, et al. Expression of Th1 and Th2 type cytokines responding to HBsAg and HBxAg in chronic hepatitis B patients. *J Korean Med Sci*, 1999,14:175-181.
- 5 Paul S, Tabassum S, Islam MN. Interferon-gamma (IFN-gamma) response to different hepatitis B virus antigens in hepatitis B virus infection. *Bangladesh Med Res Counc Bull*, 2004,30:71-77.
- 6 张萍, 吴文漪, 魏来. 乙型病毒性肝炎患者外周血 T 助细胞 1、2 型细胞因子含量的测定及临床意义. *徐州医学院学报*, 2001, 21:304-306.
- 7 Schlaak JF, Tully G, Lohr HF, et al. The presence of high amounts of HBV-DNA in serum is associated with suppressed costimulatory effects of interleukin 12 on HBV-induced immune response. *J Hepatol*, 1999,30:353-358.
- 8 戴炜, 余卫业, 姜荣龙, 等. 慢性重型肝炎外周血单个粒细胞内干扰素和白细胞介素的表达及意义. *中华肝病杂志*, 2001, 9(增刊):64-65.
- 9 Xu D, Fu J, Jin L, et al. Circulating and liver resident CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol*, 2006,177:739-747.
- 10 刑同京, 章廉, 卢桥生, 等. 慢性乙型肝炎用干扰素治疗的 Th1/Th2 应答. *中华医学杂志*, 2000,80:268-270.
- 11 Tannapfel A. Methylation and other new concepts for the origin of hepatocellular carcinoma. *Pathologie*, 2006,27:284-288.
- 12 Narimatsu T, Tamori A, Koh N, et al. p16 promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma with or without hepatitis virus infection. *Intervirology*, 2004,47:26-31.
- 13 Arai M, Yokosuka O, Hirasawa Y, et al. Sequential gene expression changes in cancer cell lines after treatment with the demethylation agent 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Cancer*, 2006,106:2514-2525.
- 14 Jin B, Park DW, Nam KW, et al. CpG methylation of the mouse CYP1A2 promoter. *Toxicol Lett*, 2004,152:11-18.
- 15 Schmelz K, Wagner M, Dorken B, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces p21WAF expression by demethylation of p73 leading to p53-independent apoptosis in myeloid leukemia. *Int J Cancer*, 2005,114:683-695.
- 16 Melvin AJ, McGurn ME, Bort SJ, et al. Hypomethylation of the interferon-gamma gene correlates with its expression by primary T-lineage cells. *Eur J Immunol*, 1995,25:426-430.
- 17 White GP, Watt PM, Holt BJ, et al. Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45 RO⁺ T cells. *J Immunol*, 2002,168:2820-2827.
- 18 Kersh EN, Fitzpatrick DR, Murali-Krishna K, et al. Rapid demethylation of the IFN-gamma gene occurs in memory but not naive CD8 T cells. *J Immunol*, 2006,176:4083-4093.
- 19 Paz MF, Fraga MF, Avila S, et al. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res*, 2003,63:1114-1121.

- 20 Yano S, Ghosh P, Kusaba H, et al. Effect of promoter methylation on the regulation of IFN-gamma gene during in vitro differentiation of human peripheral blood T cells into a Th2 population. *J Immunol*, 2003,171:2510-2516.
- 21 Kaneto H, Sasaki S, Yamamoto H, et al. Detection of hypermethylation of the p16(INK4A) gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus. *Gut*, 2001,48:372-377.
- 22 Mikovits JA, Young HA, Vertino P, et al. Infection with human immunodeficiency virus type 1 upregulates DNA methyltransferase, resulting in de novo methylation of the gamma interferon (IFN-gamma) promoter and subsequent downregulation of IFN-gamma production. *Mol Cell Biol*,1998,18:5166-5177.

(收稿日期:2007-06-13)

(本文编辑:王琦)