

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.28.044

HBx 蛋白与 TGF- $\beta$  致 HBV 相关性肝病的研究进展王玉凤 综述,何 松<sup>△</sup> 审校

(重庆医科大学附属第二医院消化内科 400010)

[关键词] HBx; 转化生长因子  $\beta$ ; 肝炎病毒; 乙型; 肝纤维化; 癌; 肝细胞

[中图分类号] R512.62; R735.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)28-4011-02

肝细胞肝癌(HCC)是目前最常见的肿瘤之一,是癌症相关性死亡的第三大病因,每年约有 782 000 新发病例发生<sup>[1]</sup>。HCC 的危险因素包括:乙型肝炎病毒(HBV)或丙型肝炎病毒(HCV)的感染,黄曲霉毒素 B1、吸烟、酗酒、非酒精性脂肪肝病等。在我国,慢性 HBV 感染仍是导致 HCC 的最主要原因之一。HBV 是一个不完全环状双链 DNA,包含 4 个开放读码框(ORF),分别编码 4 种蛋白 S、X、E、C, X 基因作为最小的一个 ORF,其相对分子质量约  $17 \times 10^3$ ,编码由 154 个氨基酸组成的乙肝病毒 x 蛋白(HBx 蛋白)。HBx 蛋白参与众多重要的生物学过程,如细胞信号传递、周期进程、细胞增殖与凋亡、反式激活作用等,在 HCC 的形成过程中起着重要作用<sup>[2]</sup>。转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ )是一种多肽类细胞因子,广泛参与生物的各种病理生理学过程,在 HCC 的发生发展过程中起着重要作用。近年来,越来越多的研究发现,HBx 蛋白与 TGF- $\beta$  在肝纤维化、HCC 的进程中可通过多种途径相互影响,促进疾病进展,本文将根据目前研究水平对 HBx 蛋白与 TGF- $\beta$  在 HCC 发生发展程中的作用做一综述。

## 1 HBx 蛋白

HBx 蛋白是 3.2 kb HBV 基因组编码的蛋白,相对分子质量约  $17 \times 10^3$ ,是一种多功能调节蛋白及反式激活因子,它在病毒的复制、转录、凋亡、DNA 修复、蛋白降解等方面起着重要的作用,广泛参与细胞的多种信号通路,促进 HCC 的发生<sup>[2]</sup>。HBx 蛋白可与多种信号通路间相互作用,共同促进 HCC 的发生、发展。有研究者发现 HBx 蛋白可激活 PI-3K/Akt 和 MEK/ERK1/2 信号通路,有利于持续性 HBV 复制,同时促进肝癌细胞的上皮间质转化(EMT),有利于肝癌细胞的浸润和转移<sup>[3]</sup>。Wang 等<sup>[4]</sup>近期的研究发现 HBx 蛋白能活化 L02 细胞的 Notch1 和 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的活性,引起肝细胞恶性转化,促进肝癌的发生。HBx 蛋白能够激活细胞内的 JNK 信号通路,特别是 JNK2 与 RXR $\alpha$  相互作用,使 RXR $\alpha$  的 82 位苏氨酸发生磷酸化,进而下调 RXR $\alpha$  相关的转录激活功能,促进 HCC 的进程<sup>[5]</sup>。HBx 蛋白还可激活受体酪氨酸激酶 Ras-Raf MAPK 信号通路、蛋白激酶 C(PKC)、核因子 B(NF- $\kappa$ B)、Janus 激酶(JAK)/信号转导和转录激活子(STAT)等多种信号通路调控着细胞周期进程、肿瘤细胞侵袭与转移<sup>[6]</sup>。此外, HCC 的发生需要原癌基因的激活、抑癌基因失活、细胞增殖和分化异常、细胞凋亡的异常等。HBx 蛋白几乎参与了 HCC 发生发展的所有阶段。p53、p16 基因都是重要的抑癌基因,HBx 蛋白可上调 cyclin D、p21,下调 p16 的表达,同时 HBx 蛋白能够上调 p21 的表达拮抗内源性 p53 基因沉默导致的细胞周期向 S 期推进,从而促进 HBV 的复制和细胞增殖,HBx 蛋白还可特异性与 p53 结合,下调 c-myc,促进凋亡刺激蛋白 ASPP1、

ASPP2 基因甲基化,阻止细胞凋亡,促进 HBV 持续性复制,有利于 HCC 的形成<sup>[7]</sup>。

2 TGF- $\beta$ 

TGF- $\beta$  是一种与多种肿瘤生长相关的多肽性细胞生长调节因子,目前在哺乳动物发现的 TGF- $\beta$  共有 3 种:TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3,与肝脏疾病最密切相关的是 TGF- $\beta$ 1。慢性 HBV 感染、肝纤维化、HCC 是疾病进程的三部曲。肝纤维化是 HCC 发展过程中一个重要的中间过程,肝星形细胞(HSC)的活化、增殖、分化是肝纤维化形成的中心环节,普遍认为 TGF- $\beta$ 1 重要的促纤维化因子,参与 HSC 活化、增殖、分化过程,其主要通过 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路而发挥直接或间接作用。结缔组织生长因子(CTGF)是一种重要的致纤维化因子,有研究证实 TGF- $\beta$  可通过激活 Smad 和 MAPK 通路促使 CTGF 表达,导致肝星状细胞的活化、增殖及迁移,导致肝脏纤维沉积,促进肝纤维化进程<sup>[9]</sup>。TGF- $\beta$  还广泛参与调节细胞的生长、诱导凋亡和分化、免疫、调节细胞和基质间的相互作用,促进各种类型组织损伤的修复等。对于 HCC,就目前研究发现 TGF- $\beta$  对肝癌的发生起着双向调节作用。在肿瘤发生的早期, TGF- $\beta$  可作为一种肿瘤细胞抑制因子,诱导分化与凋亡。在肿瘤发生晚期, TGF- $\beta$  又能刺激血管生成、促进细胞外基质形成等,进而促进癌细胞的增殖和转移等。有研究发现, TGF- $\beta$  通路在人类肝癌中普遍下调,比较不同分期 HCC 标本, TGF- $\beta$  随着肝癌的进展分化,其活性也在变化, T $\beta$ RII 表达增加,其机制可能是 TGF- $\beta$  信号再次被激活,活化的 TGF- $\beta$  又可促进肝癌的进展<sup>[10]</sup>。一方面 TGF- $\beta$ 1 可能通过诱导肝癌细胞自噬相关基因(Beclin1)来抑制肝癌细胞增殖<sup>[11]</sup>。另一方面, TGF- $\beta$  可与 P13K、NF- $\kappa$ B 通路、Wnt/ $\beta$ -eatenin 等信号通路相互影响,协同参与促进 EMT,促进肿瘤发生、侵袭、转移<sup>[12]</sup>。

3 HBx 蛋白与 TGF- $\beta$  致 HBV 相关性肝纤维化

如前述, TGF- $\beta$  参与了肝纤维化的多步骤,通过对 HBV 相关性肝纤维化患者肝脏组织检测,发现 TGF- $\beta$  主要参与 HBV 感染相关的肝纤维化,在肝硬化患者血清和组织中 TGF- $\beta$ 1 表达水平升高,并且与肝脏损伤严重程度相关<sup>[13]</sup>。通过对 HBV 感染肝纤维化小鼠研究发现, TGF- $\beta$ 1 与 CD147 间相互作用,形成 TGF- $\beta$ 1-CD147 正反馈通路,激活 ERK1/2、Sp1,上调  $\alpha$ 平滑肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、I 型胶原纤维等刺激 HSCs 活化<sup>[14]</sup>。HBV 可通过多种途径促进肝星状细胞的活化增殖,随着对 HBV 相关性肝纤维化的深入研究,人们发现 HBV 中的 X 基因具有促进肝星状细胞的增殖、活化、迁移作用,导致肝纤维化的形成。Chen 等<sup>[15]</sup>研究者将重组质粒 pHBV-X-IRES2-EGFP 转染肝细胞 HL-7702,构建稳定表达 X 基因的细胞 L02/x 和瞬时表达 X 基因的细胞 L02/48x。利用 RT-PCR、

Western blot 法检测 HBx 蛋白表达水平及 HSCs 的增殖及迁移水平。结果显示,较对照组而言,L02/x、L02/48x 细胞中 HSC 的增殖及迁移水平更高,进一步研究结果显示在 HBx 蛋白表达条件下的肝星状细胞中, $\alpha$ -SMA、ColI、TGF- $\beta$ 1 的表达水平升高,表明 HBx 蛋白可以激活 HSC,促进肝星状细胞的增殖、迁移,HBx 蛋白与 TGF- $\beta$ 1 共同作用导致肝纤维化形成。但具体 HBx 蛋白与 TGF- $\beta$  间在 HBV 相关性肝纤维的发病机制缺乏大量研究明确,还需要进一步研究和探索。

#### 4 HBx 蛋白与 TGF- $\beta$ 致 HBV 相关性肝癌

随着研究深入发现,人们发现在慢性 HBV 感染患者血清中的 TGF- $\beta$ 1 水平较健康者升高,HBV 相关性 HCC 肝组织中 TGF- $\beta$ 1 过度表达,且与 HBV-DNA 复制和肿瘤的分化程度有关,经过抗病毒治疗后 TGF- $\beta$ 1 表达水平会下降<sup>[16]</sup>,提示 TGF- $\beta$  可能在 HBV 相关性 HCC 的发生发展过程中起着作用。近年研究证实,TGF- $\beta$  可以调节 p15、p21、p27 等细胞周期激酶抑制剂,影响细胞周期进程<sup>[12]</sup>。TGF- $\beta$  还可通过诱导 HBV cccDNA 凋亡、抑制 HBV RNA,从而抑制 HBV 复制<sup>[17-18]</sup>。而 HBx 蛋白具有抗凋亡、促进病毒持续性复制的作用。进一步研究发现在肝癌细胞中,HBx 蛋白可下调 p27 及 TGF- $\beta$  的表达,进而拮抗 TGF- $\beta$  诱导细胞滞留于 G<sub>1</sub> 期,促进细胞周期进程<sup>[19]</sup>。此外,HBx 蛋白虽然不直接影响 HBV cccDNA 水平,但却可上调 pgRNA 的转录,进而促进 HBV 的复制<sup>[20]</sup>。Almajhdi 等<sup>[21]</sup>发现,TGF- $\beta$  的低表达和 HBx 蛋白的高表达有利于肝细胞复制,二者的不同表达水平可刺激病毒复制中间产物(pgRNA)的合成以及核心和抗原的分泌水平,从而有利于肝细胞的增殖。通过在细胞水平对其信号通路的研究发现,TGF- $\beta$  可激活 TGF- $\beta$ RI 和 c-Jun N 端激酶(JNK)抑制细胞增殖,但 HBx 蛋白能将肿瘤抑制性通路可逆性转变为促进作用,促进 pSmad3C 向 pSmad3L 转变,有利于癌细胞生长<sup>[22]</sup>。Wu 等<sup>[23]</sup>进一步体外实验研究发现,HBx 蛋白可通过激活 JNK/PSMAD3L 信号通路,有利于肝癌细胞增殖,在表达 HBx 蛋白的肝癌细胞中,TGF- $\beta$  激活 TGF- $\beta$ RI 和 c-Jun N 端激酶(JNK)抑制细胞增殖的作用消失。进一步研究发现,在大鼠肝脏卵圆细胞中,HBx 蛋白可抑制 TGF- $\beta$  受体 2 在卵圆细胞中的转录活性和蛋白质合成,可调控肝脏卵圆细胞自身 TGF- $\beta$ 1 的分泌等多种途径,降低肝脏卵圆细胞对 TGF- $\beta$ 1 增殖抑制效应的敏感度,进而促进肝细胞生长<sup>[24]</sup>。此外,HBx 蛋白还具有拮抗 TGF- $\beta$  促进细胞凋亡的作用,HBx 蛋白既不影响 TGF- $\beta$  受体的表达,也不影响 TGF- $\beta$  促进纤溶酶原激活物抑制因子-1(PAI-1)生成的能力,HBx 蛋白主要是通过激活 PI3-kinase/Akt 信号通路活性,调节细胞的转录功能,在抗凋亡过程中起着重要的作用<sup>[22]</sup>。可见,在发病早期,TGF- $\beta$  与 HBx 蛋白在 HBV 相关性 HCC 发病机制中起着拮抗作用。

TGF- $\beta$  异常被激活是导致肝癌细胞恶性增殖、转移的主要原因,而 HBx 蛋白能够促进 TGF- $\beta$  通路的异常激活从而有利于 HCC 的形成。Liu 等<sup>[25]</sup>发现,PPM1a 表达水平在转染 HBx 蛋白的 HepG2 细胞和对照组之间无明显差异。当使用 TGF- $\beta$  处理后,转染 HBx 蛋白肝细胞中 PPM1a 表达水平明显下降,未转染 HBx 蛋白肝细胞中 PPM1a 表达水平上升,表明 HBx 蛋白可能通过下调 PPM1a 水平增强 TGF- $\beta$  信号通路活性促进肝细胞增殖。进一步研究发现,当使用 TGF- $\beta$  处理过量表达 HBx 蛋白的 HepG2 细胞后,HBx 蛋白促进 HCC 细胞的迁移作用增强,说明 TGF- $\beta$  可增加 HBx 蛋白促进细胞增殖、迁移的能力,二者在肝癌细胞的转移中起着协同作用。综上所

述,HBx 蛋白与 TGF- $\beta$  在 HBV 相关性 HCC 的不同进程中作用不同,但具体的机制仍不明确,还需进一步探索。

#### 5 展 望

HBV 相关性 HCC 流行性广、致命性高、作用机制复杂。HBx 蛋白是 HBV 中重要的分子蛋白,在 HCC 的发生发展中起着重要作用,但其具体机制仍不是很清楚。TGF- $\beta$  作用机制复杂,可见于多种人体肿瘤,目前大量研究证实 TGF- $\beta$  在肝细胞的生长、分化、凋亡、侵袭转移过程中起着重要作用。根据目前大量文献资料显示,TGF- $\beta$  和 HBx 蛋白有共同作用的信号通路、可调节相同细胞转录因子、影响细胞凋亡、促进肿瘤细胞侵袭转移等,共同影响肝脏疾病进展,导致 HBV 相关性 HCC 的形成。但二者间具体的作用机制还不清楚,还需进一步研究,从而为 HCC 患者提供新的治疗方案。

#### 参考文献

- [1] Flores A, Marrero JA. Emerging trends in hepatocellular carcinoma: focus on diagnosis and therapeutics[J]. Clin. Med, 2014, 8(8): 71-765.
- [2] Ming Geng, Xuan Xin, Liquan Bi, et al. Molecular mechanism of hepatitis B virus X protein function in hepatocarcinogenesis[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(38): 10732-10738.
- [3] Chen XM, Zhang L, Zheng SJ, et al. Hepatitis B virus X protein stabilizes cyclin D1 and increases cyclin D1 nuclear accumulation through ERK-Mediated inactivation of GSK-3 $\beta$ [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2015, 8(5): 455-463.
- [4] Sun Q, Wang RH, Luo J, et al. Notch1 promotes hepatitis B virus X protein-induced hepatocarcinogenesis via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. Int J Oncol, 2014, 45(4): 1638-1648.
- [5] 陆海生. JNK 信号通路介导 HBx 对 RXR $\alpha$  的磷酸化并促进 HCC 进程的分子机制[D]. 厦门: 厦门大学, 2014.
- [6] 吴德海, 邵升. HBx 促进肝细胞癌发生发展的分子机制[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(25): 3773-3779.
- [7] Xu JJ, Liu HO, Chen L, et al. Hepatitis B virus X protein confers resistance of hepatoma cells to anoikis by up-regulating and activating p21-activated kinase 1[J]. Gastroenterol, 2012, 143(1): 199-212.
- [8] 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(7): 473-480.
- [9] Nagaraja T, Chen L, Balasubramanian A, et al. Activation of the connective tissue growth factor (CTGF)-transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) axis in hepatitis C virus-expressing hepatocytes [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46526.
- [10] 毋小新. TGF- $\beta$  信号通路参与肝癌发生发展的机制研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2013.
- [11] 杨威, 杨红杰, 莫瑞祥, 等. TGF- $\beta$ 1 通过促进自噬相关基因 Beclin 1 表达抑制肝癌细胞增殖[J]. 华夏医学, 2014, 27(6): 19-23.
- [12] Fabregat I, Moreno-Caceres J, Sanchez A, et al. TGF-beta signalling and liver disease[J]. FEBS J, 2016, 283(12): 2219-2232.

族均可发病,但多见与黑色人种。HI 可见于出生时,也可见于新生儿期或幼童期。HI 为散发性,仅少数可能为家族性发病。

该患儿父母体健,无遗传性疾病史,无类似家族病史,符合该病的流行病学特征。HI 可累及多重系统,包括中枢神经系统、骨骼、肌肉和眼。癫痫是典型的中枢神经系统疾病,表明该患儿的癫痫症状很可能继发于伊藤色素减少症。此外,一同伴随该患儿的中枢神经损害得症状还有精神运动发育迟滞。患儿骨密度测量显示中度骨强度不足,提示 HI 可能在一定程度上影响着该患儿骨骼系统的生长。体格检查及眼底镜检查正常,表明该患儿的肌肉与眼暂未受明显影响。根据金如钧<sup>[5]</sup>报道,HI 的诊断标准为:(1)色素减退斑发生于生时或者出生之后;(2)在皮疹泛发的病例中,色素减退斑呈单侧分布;(3)在患者的一生中,色素减退斑的分布部位通常不会改变;(4)在受累区域内,白斑的皮疹形态和外观不会改变;(5)在色素减退斑的周围没有色素沉着带。该患儿的临床表现符合诊断标准(1)、(2)、(4)、(5),故考虑诊断为伊藤色素减少症。

患儿存在染色体异常,故可与无色素痣相鉴别<sup>[5]</sup>。无色素痣的皮损与伊藤色素减少症一致,均可呈线性或节段性。但无色素痣皮损位置固定,且通常分布更加局限。同时,无色素痣不伴有皮肤以外的表现,亦无染色体镶嵌现象。此外,可与伊藤色素减少症相鉴别的疾病还有线状涡轮状痣样色素增多病(LWNH)。LWNH 在许多方面与无色素痣和伊藤色素减少症相似<sup>[3]</sup>。名词“色素性镶嵌现象”恰当地描述了这 3 种疾病。LWNH 的皮疹通常固定不变,病变可仅累及皮肤,也可累及神经系统或有时累及其他器官(如心脏),LWNH 可能存在染色体镶嵌现象。LWNH 通常为散发性,这可能是由于莱昂化作用引起的遗传结构性异常的 X 染色体镶嵌体。

目前国内仅有为数不多的文章报道了伊藤色素减少症。向欣等<sup>[2]</sup>报道了 5 例伊藤色素减少症,其中 4 例在不同程度上有神经损害。王云鹏等<sup>[4]</sup>报道了 1 例 9 岁伊藤色素减少症儿童,其伴发难治性癫痫。先前的研究均未在染色体层次对该疾病进行探讨及鉴别。本病例为 1 名 10 个月 22 天的婴儿,伴染色体异常。其在伊藤色素减少症的基础上同时还存在有癫痫及精神运动迟缓。该病罕见,患儿症状典型,值得综合剖析该患儿病情,为今后的诊治工作提供参考。

#### 参考文献

- [1] Pavone P, Pratico AD, Ruggieri M, Falsaperla R: Hypomelanosis of Ito: a round on the frequency and type of epileptic complications[J]. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 2015, 36 (7): 1173-1180.
  - [2] 向欣,孙玉娟,王忱,等.伊藤色素减少症 5 例[J]. *实用皮肤病学杂志*, 2014, 7(1): 74-75.
  - [3] 常建民,鲍迎秋.线状和漩涡状痣样过度黑素沉着病[J]. *临床皮肤科杂志*, 2007, 36(9): 543-544.
  - [4] 王云鹏,蔡立新,李勇杰.伊藤色素减少症继发难治性癫痫 1 例手术治疗[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2013, 18(11): 692-693.
  - [5] 金如钧.无色素痣[J]. *医学综述*, 2007, 13(15): 1139-1141.
- (收稿日期:2017-04-07 修回日期:2017-06-23)
- 
- (上接第 4012 页)
- [13] 朱杰,杜文波,高润平,等.慢性乙型肝炎患者肝组织和血清 TGF- $\beta$ 1 的测定及临床意义[J]. *中国实验诊断学*, 2010, 14(7): 1073-1075.
  - [14] Li HY, Ju D, Zhang DW, et al. Activation of TGF- $\beta$ 1-Cd147 positive feedback loop in hepatic stellate cells promotes liver fibrosis[J]. *Sci Rep*, 2015, 12; 5: 16552.
  - [15] Chen HY, Chen ZX, Huang RF, et al. Hepatitis B virus X protein activates human hepatic stellate cells through up-regulating TGF- $\beta$  [J]. *Genetics Molecular Res Gmr*, 2014, 13(4): 8645-8656.
  - [16] 彭小华,堽堂英,杨求真,等.恩替卡韦与拉米夫定对乙型肝炎肝硬化患者血清 TGF- $\beta$ 1 的影响研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(4): 830-832.
  - [17] Qiao Y, Han X, Guan G, et al. TGF- $\beta$ 1 triggers HBV cccDNA degradation through AID-dependent deamination [J]. *FEBS Lett*, 2016, 590(3): 419-427.
  - [18] Liang GX, Liu GY, Kitamura K, et al. TGF- $\beta$ 1 Suppression of HBV RNA through AID-Dependent Recruitment of an RNA Exosome Complex [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11 (4): e1004780.
  - [19] Yang H, Cho M. Hepatitis B virus X gene differentially modulates cell cycle progression and apoptotic protein expression in hepatocyte versus hepatoma cell lines[J]. *J Viral Hepat*, 2013, 20(1): 50-58.
  - [20] Luo L, Chen S, He S, et al. Hepatitis B virus X protein modulates remodelling of minichromosomes related to hepatitis B virus replication in HepG2 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(1): 197-204.
  - [21] Almajhdi FN, Al-Qudari AY, Hussain Z. Differential expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 and HBx enhances hepatitis B virus replication and augments host immune cytokines and chemokines [J]. *Ann Hepatol*, 2013, 12(3): 408-415.
  - [22] Murata M, Matsuzaki K, Yoshida K, et al. Hepatitis B virus X protein shifts human hepatic transforming growth factor (TGF)- $\beta$  signaling from tumor suppression to oncogenesis in early chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2009, 49(4): 1203-1217.
  - [23] Yanhui Wu, Xi Ai, Fuyao Liu, et al. c-Jun N-terminal kinase inhibitor favors transforming growth factor- $\beta$  to antagonize hepatitis B virus X protein-induced cell growth promotion in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2): 1345-1352.
  - [24] 王恒毅,梁慧芳,陈孝平,等.乙型肝炎病毒编码 X 蛋白降低大鼠肝脏卵圆细胞对  $\beta$  型转化生长因子 1 增殖抑制效应敏感度的研究[J]. *中华外科杂志*, 2011, 49(5): 432-435.
  - [25] Liu Y, Xu Y, Ma HX, et al. Hepatitis B virus X protein amplifies TGF- $\beta$  promotion on HCC motility through down-regulating PPM1a [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (22), 33125-33135.
- (收稿日期:2017-04-26 修回日期:2017-06-22)