文章编号:1000-5404(2014)12-1233-04

论著

雷帕霉素诱导细胞自噬促进乙型肝炎病毒的复制

李 霞,黄文娟,朱素菲,陈维贤 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院检验科)

[摘要] **目的** 研究雷帕霉素诱导细胞产生自噬对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)复制的影响。**方法** 通过雷帕霉素诱导人肝癌细胞HepG2 2.15产生自噬,荧光显微镜和透射电镜下观察自噬小体形成,Western blot检测诱导后HepG2 2.15细胞自噬标志蛋白LC3-II/LC3-I的表达水平;荧光定量PCR检测HBV mRNA水平;加入自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA),Western blot检测自噬抑制后LC3-II/LC3-I的表达水平,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测乙肝病毒表面抗原(HBsAg)的表达,Southern blot检测HBV DNA水平,验证HBV复制情况。**结果** 雷帕霉素诱导后,HepG2 2.15细胞在荧光显微镜和透射电镜下观察到自噬小体的形成,LC3-II/LC3-I比值显著上升($P<0.05$);细胞诱导自噬后HBsAg和HBV mRNA显著增加($P<0.05$),而加入自噬抑制剂3-MA后,HBsAg和HBV DNA均显著减少($P<0.05$)。**结论** 雷帕霉素可能通过诱导细胞自噬促进HBV的复制。

[关键词] 雷帕霉素;自噬;乙型肝炎病毒;复制
[中图法分类号] R373.21;R392.32;R976 [文献标志码] A

Rapamycin-induced autophagy promotes HBV replication

Li Xia, Huang Wenjuan, Zhu Sufei, Chen Weixian (Department of Laboratory Medicine, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of autophagy induced by rapamycin on hepatitis B virus (HBV) replication. **Methods** Human liver cancer HepG2 2.15 cells were treated with rapamycin to induce autophagy. Fluorescence microscopy and transmission electron microscopy (TEM) were used to observe the autophagosomes. Western blotting was performed to analyze the expression level of autophagy marker protein LC3-II/LC3-I. Fluorescence quantitative RT-PCR was used to detect HBV mRNA level. After adding the autophagy inhibitor 3-methyl adenine (3-MA), Western blotting was employed to detect the expression level of LC3-II/LC3-I after autophagy inhibition. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression of HBV surface antigen (HBsAg). The level of HBV DNA was evaluated by Southern blotting. **Results** In the HepG2 2.15 cells treated by rapamycin, autophagosomes were observed with fluorescence microscopy and TEM, while the expression level of LC3-II/LC3-I was significantly increased ($P<0.05$). The expression of HBsAg and HBV mRNA was increased significantly ($P<0.05$) after induction of autophagy. The expression of HBsAg and HBV DNA was significantly reduced ($P<0.05$) after adding autophagy inhibitor 3-MA. **Conclusion** Rapamycin may promote HBV replication by inducing cell autophagy.

[**Key words**] rapamycin; autophagy; hepatitis B virus; replication

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81171628). Corresponding author: Chen Weixian, Tel: 86-23-63693198, E-mail: chenweixian75@163.com

自噬(autophagy)是细胞利用溶酶体途径对胞质蛋白和细胞器进行降解的一种再循环系统,它通过平衡细胞合成和分解代谢稳定细胞内环境。细胞在饥饿、生长因子缺乏和缺氧等条件及一些病理状态的刺激下,自噬能被诱导产生[1]。雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)作为氨基酸、生长因子、胰岛素等的感受器,对细胞生长具有重要调节作用,能抑制自噬的发生[2]。雷帕霉素(rapamycin,Rap)

[基金项目] 国家自然科学基金(81171628)
[通信作者] 陈维贤,电话:(023)63693198,E-mail:chenweixian75@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140126.0818.004.html(2014-01-26)

是一种典型的 mTOR 抑制剂,最先作为抗真菌药使用,后发展为免疫抑制剂和抗肿瘤药物。研究表明,雷帕霉素可以通过抑制 mTOR 信号通路诱导细胞产生自噬[3]。

本实验利用雷帕霉素诱导上调肝癌细胞系 HepG2 2.15 的自噬活性,检测诱导后自噬小体的形成、自噬标志蛋白 p62 和 LC3-II 的表达水平,以及 HBV 的表达与复制情况,探讨雷帕霉素诱导细胞自噬后对 HBV 的影响,为抗 HBV 治疗及雷帕霉素的应用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料试剂

质粒 pGFP-LC3 和人肝癌细胞株 HepG2 2.15 由本室保存。雷帕霉素、3-甲基腺嘌呤(3-MA)购自 SigmaAldrich 公司,羊抗 β-actin 抗体购自 Abcam 公司,LC3 抗体购自 Cell Signalling Technology 公司。兔抗羊 IgG 购自北京中山生物技术公司。细胞培养用胎牛血清购自 Gibco 公司。脂质体 2000、组织样本 DNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司。HBsAg ELISA 试剂盒购自珠海丽珠公司。彩色蛋白预染 Marker、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 配胶试剂盒购自碧云天公司。实时荧光定量 PCR 反应试剂盒、地高辛标志试剂盒购自 Roche 公司。逆转录试剂盒购自大连宝生物公司。环氧树脂购自 Ted Pell Inc 公司。多聚甲醛、戊二醛购自生工生物公司。其余常用试剂均为本室自行配制。

1.2 方法

1.2.1 自噬荧光小体 HepG2 2.15 细胞接种 24 孔板,细胞生长至 70% ~90% 时,转染 pGFP-LC3 (0.8 μg),具体转染方法按试剂说明书进行。转染 6 h 后换液,1 组加入自噬诱导剂雷帕霉素(50 nmol/L),1 组以 EBSS 平衡盐缓冲液替代培养基作饥饿处理,1 组为正常培养基(做对照),3 孔不同处理的细胞继续培养 24、36、48、72 h,于荧光显微镜下观察各组细胞中自噬荧光小体数量差异。同时以转染了 pGFP-LC3 后正常培养的 HepG2 细胞做为对照实验。

1.2.2 Western blot HepG2 2.15 细胞接种 6 孔板,1 组细胞加入雷帕霉素(50 nmol/L),1 组作饥饿处理,1 组作阴性对照,36 h 后向 1 组用雷帕霉素处理的细胞中加入自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(10 mmol/L),每组均设 3 个复孔。48 h 后分别收集上清液,并提取细胞总蛋白,按 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白提取物中加入 5 × 蛋白上样缓冲液,沸水浴 10 min,取 60 μg 蛋白上样,10% SDS-PAGE 电泳,电转至 PVDF 膜。脱脂奶粉封闭 2 h,分别加入 1∶500 的 p62 及 LC3 抗体 4 ℃过夜,PBS 洗膜 3 次,加入 1∶5 000 HRP 标志的羊抗兔抗体,37 ℃孵育 2 h。洗膜后,加入化学发光反应液,用化学发光检测仪检测。实验中以 β-actin 为内参照。

1.2.3 Real-time PCR HepG2 2.15 细胞接种 6 孔板,1 组细胞加入雷帕霉素(50 nmol/L),1 组细胞只进行换液,36 h 后用 Trizol 法分别提取每孔细胞 RNA,实验组和对照组均设 3 个复孔。紫外分光光度计测定 HBV RNA 浓度,RNA 用逆转录酶转录为 cDNA 后,用 Sybergreen 相对定量 PCR 法检测两组细胞 HBV RNA 含量表达差异,GAPDH 作为内参,仪器为 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪。GAPDH 上下游引物分别为 5′-GGCTCTCCAGAACTATCAT-3′ 和 5′-CACCTGGTGCTCAGTGTAA-3′。HBV 上下游引物分别为上游 5′- CCTAGTAGTCAGTTATGTCAAC-3′和下游 5′-TCTATAAGCTGGAGGAGTGCGA-3′。反应条件为:95 ℃ 3 min;94 ℃ 15 s ,55 ℃ 30 s,35 个循环后终止反应。

1.2.4 ELISA 将 1.2.2 收集的细胞上清液用珠海丽珠公司的双抗体夹心法 ELISA 试剂盒检测 HBsAg 浓度。如浓度超过检测上限,则进行 5 ~10 倍稀释后检测。实验操作按说明书进行,于 450 nm 处测定各孔光密度值[$D(450)$]。

1.2.5 透射电镜 将细胞用雷帕霉素处理后,估计细胞数达到 1×10^6/mL 时收集细胞,1 000 r/min 离心 10 min 弃培养基。缓慢注入 2% 多聚甲醛和 0.1% 戊二醛(0.1 mol/L PBS pH 7.4),室温固定 1 h,漂洗。再用 1% 锇酸冰上固定 2 h,漂洗后用 50%、70%、90%、100% 乙醇依次脱水 10 min,100% 丙酮 10 min ×3 次。丙酮与环氧树脂 3∶1包埋过夜,再放入纯包埋剂中 6 h,65 ℃烤箱过夜后切成 70 nm 厚度的超薄切片,醋酸铅铀染色,透射电子显微镜下观察细胞自噬体。

1.2.6 Southern blot HepG2 2.15 细胞接种 6 孔板,分雷帕霉素组、3-MA + 雷帕霉素组和对照组,按 1.2.2 一样的方法处理细胞,48 h 后用细胞裂解液 500μL 裂解各组细胞,37 ℃放置 15 min 后 15 000 r/min 离心 5 min,留上清液。加入 $MgCl_2$ 和 DNA 酶[4]37 ℃水浴 4 h,再加入 35% PEG 8000 冰浴 1 h,弃上清液。加入消化液和蛋白酶 K 45 ℃水浴 4 h 后用常规酚氯法提取 HBV DNA。将提取的 HBV DNA 与上样缓冲液混匀后在 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳,切胶后放于碱性缓冲液中变性 30 min,电转到尼龙膜上。预杂交和杂交按照地高辛标志试剂盒说明书进行,洗膜后曝光检测。

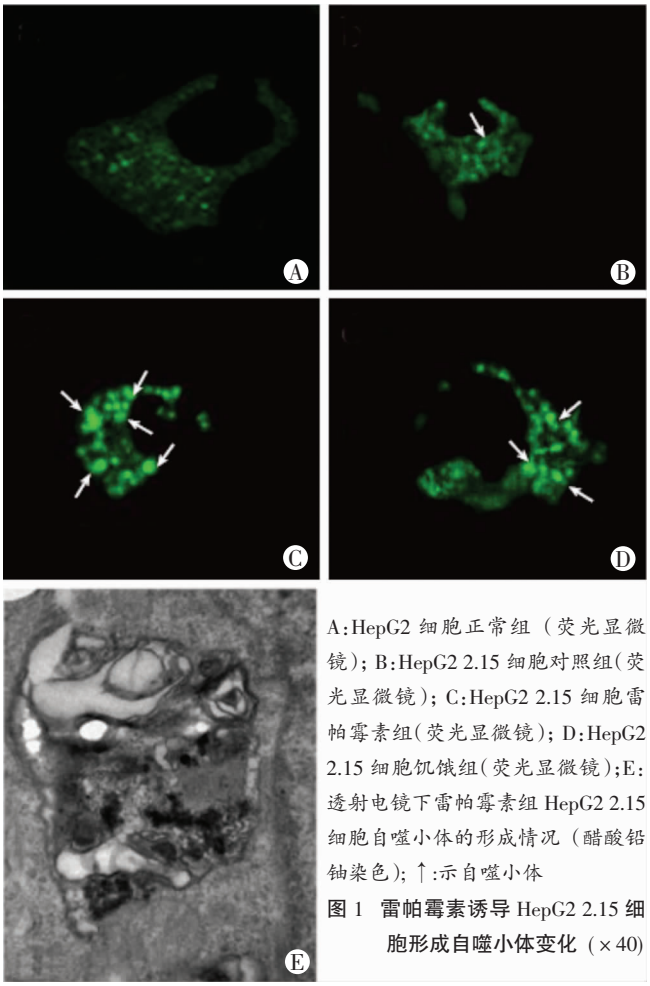
1.3 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 软件进行分析,两组实验数据间的比较采用 T 检验。Western blot 结果用 Quantity One 图像分析软件处理。

2 结果

2.1 雷帕霉素诱导 HepG2 2.15 细胞产生自噬荧光小体

将 pGFP-LC3 质粒转染进 HepG2 细胞,正常培养;同时将 pGFP-LC3 质粒转染进 HepG2 2.15 细胞后做不同处理,36 h 时于荧光倒置显微镜下观察各组细胞荧光的表达情况。HepG2 细胞未见明显自噬小体(图 1A)。在 HepG2 2.15 细胞里,雷帕霉素处理组(图 1C)和饥饿处理组细胞(图 1D)可见明显的自噬小体,而对照组自噬小体形成较少(图 1B)。将用雷帕霉素诱导的 HepG2 2.15 细胞通过透射电镜的观察也可见明显的自噬小体形成(图 1E),表明雷帕霉素可以诱导 HepG2 2.15 细胞产生自噬。

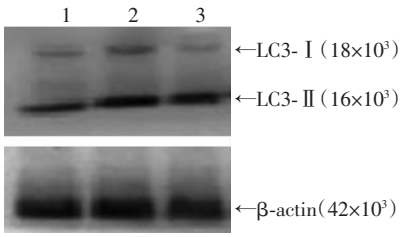


A:HepG2细胞正常组（荧光显微镜）；B:HepG2 2.15细胞对照组（荧光显微镜）；C:HepG2 2.15细胞雷帕霉素组（荧光显微镜）；D:HepG2 2.15细胞饥饿组（荧光显微镜）；E:透射电镜下雷帕霉素组HepG2 2.15细胞自噬小体的形成情况（醋酸铅铀染色）；↑:示自噬小体

图1 雷帕霉素诱导HepG2 2.15细胞形成自噬小体变化（×40）

2.2 Western blot检测雷帕霉素诱导HepG2 2.15细胞产生自噬

为了进一步证明雷帕霉素可以诱导HepG2 2.15细胞产生自噬，Western blot检测不同处理后HepG2 2.15细胞自噬标志蛋白微管相关蛋白1轻链3（LC3）的表达。结果显示（图2），雷帕霉素处理组LC3-II/LC3-I比值为（7.48±0.17），饥饿组为（6.21±0.15），与对照组（3.38±0.07）比较有统计学差异（$P<0.05$）。

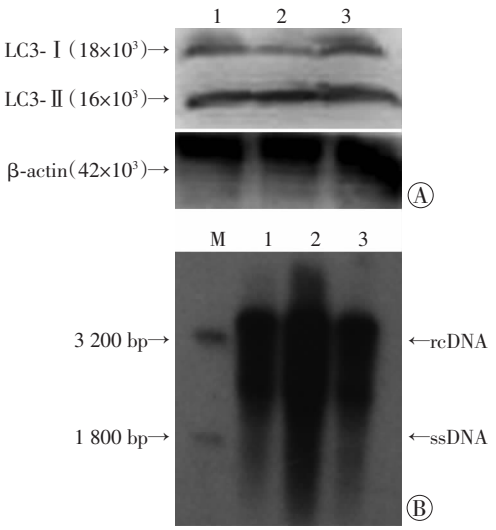


1:对照组；2:雷帕霉素组；3:饥饿组

图2 Western blot检测HepG2 2.15细胞自噬标志蛋白的表达

2.3 雷帕霉素通过自噬影响HBV的复制与表达

将细胞用雷帕霉素诱导36 h后加入3-MA，12 h后收集各组细胞上清液及提取总蛋白，Western blot检测自噬标志蛋白的表达（图3），雷帕霉素组LC3-II/LC3-I比值为（7.56±0.17），3MA组为（4.38±0.13），可见3-MA能够使雷帕霉素诱导的自噬受到抑制（$P<0.05$）。Southern blot检测HBV中间复制体DNA（图3B），从环状DNA（rcDNA）和单链DNA（ssDNA）的表达情况可见，雷帕霉素组HBV DNA表达明显增多，加入3-MA自噬抑制剂后HBV DNA表达减少。荧光定量PCR检测HBV mRNA相对表达量，结果表明，与空白对照组HBV mRNA相对表达量换算为（1.00±0.063）相比，雷帕霉素处理组HBV mRNA的相对表达量增加到（1.61±0.145）有统计学差异（$P<0.05$）。为了进一步证明雷帕霉素影响HBV的复制，用ELISA的方法[5]检测雷帕霉素诱导的细胞上清液中HBsAg的表达，雷帕霉素处理组D(450)值为（2.66±0.064），加入自噬抑制剂3-MA后减少到（1.16±0.065），与空白对照组（1.67±0.067）比较有统计学差异（$P<0.05$）。由此可见，雷帕霉素诱导细胞产生自噬后对HBV的复制与表达产生了很大影响。



1:3-MA+雷帕霉素组；2:雷帕霉素组；3:对照组；M:标准 A:Western blot检测结果；B: Southern blot检测结果

图3 雷帕霉素通过自噬影响HBV的复制与表达

3 讨论

研究表明，携带HBV的血液系统肿瘤、实体肿瘤或风湿性疾病患者接受免疫抑制剂如皮质类固醇、硫唑嘌呤等免疫抑制治疗后可能引起HBV再激活率增加[6-7]。雷帕霉素作为临床常用免疫抑制及抗肿瘤药物，临床常用于肾细胞癌及肝癌等疾病的治疗，可以提高此类患者的生存率[8]。在欧洲，研究者发现使用雷帕霉素患者的HBV再激活率增加[9]，其原因可能与雷帕霉素抑制了特异性T、B淋巴细胞反应，从而引起机体免疫抑制状态相关，但具体机制尚不清楚。由于雷帕霉素可以诱导细胞自噬的产生，我们推测雷帕霉素可能通过自噬影响HBV的表达。

细胞自噬是普遍存在于真核细胞中的细胞生物学行为，被称为Ⅱ型程序性细胞死亡。其主要作用是清

除或降解细胞内衰老的细胞器、受损伤的细胞结构以及多余的蛋白质等,同时也为细胞器的构建或细胞结构的再循环提供原料。细胞自噬作用在生物体生长发育、细胞分化及对环境应激的应答方面极为关键[10]。研究表明,EV71可以通过诱导RD细胞自噬促进子代病毒的产生与释放[11]。Ke等[12]发现,通过抑制细胞内自噬溶酶体的成熟可以减少HCV的复制。许多研究说明细胞自噬在多种病毒感染和增殖方面发挥着重要作用[13-14]。在HBV与细胞自噬的关系研究中发现,HBV可以上调细胞自噬水平,而细胞自噬亦可能影响HBV的复制水平[15]。雷帕霉素作为临床常用免疫抑制及抗肿瘤药物,其导致HBV复发时有发生,但其机制尚不完全明了。

为了研究雷帕霉素是否通过自噬途径影响HBV复制与表达,我们将雷帕霉素加入稳定表达HBV的HepG2 2.15细胞株,检测自噬荧光小体和自噬标志蛋白,同时检测自噬状态下HBV相关的实验指标。LC3是使用最广的自噬标志物,定位于自噬泡上。自噬形成时,LC3-Ⅰ(胞浆型LC3)会酶解掉一小段多肽,转变为LC3-Ⅱ(膜型结合型LC3),LC3-Ⅱ/Ⅰ比值的大小可估计自噬水平的高低[16]。同样,为了证明是自噬引起而非其他原因造成HBV表达增加,我们加入了自噬抑制剂3-MA做比较,发现自噬被抑制后HBV表达降低。再结合自噬产生后引起HBV mRNA、HBV DNA及HBsAg表达上升的结果,表明雷帕霉素通过细胞自噬影响HBV的复制和表达。研究发现,HBV启动子活性会影响其病毒的复制[17],而在HepG2 215细胞中HBV启动子活性很高。由此可见,HepG2 215细胞株能够稳定表达HBV,除了受病毒复制相关环节影响,还可能与其启动子活性有关,值得进一步研究。

在病毒感染宿主细胞的过程中,感染细胞可以通过自噬清除胞内寄生的病原体,而一些病原体反而通过细胞自噬促进其自身复制。由于许多抗肿瘤药物可能引起细胞自噬,从而影响感染的发生或再激活,提示我们在使用该类药物的时候,应对此问题予以高度重视。

参考文献:

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

[2] Kim J, Huang W P, Stromhaug P E, *et al*. Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation[J]. Biol Chem, 2002, 277(1): 763-773.

[3] Thoreen C C, Kang S A, Chang J W, *et al*. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1[J]. J Biol Chem, 2009, 284(12): 8023-8032.

[4] Qin J, Zhai J, Hong R, *et al*. Prospero-related homeobox protein (Prox1) inhibits hepatitis B virus replication through repressing multiple cis regulatory elements[J]. J Gen Viro, 2009, 90(Pt 5): 1246-1255.

[5] Li J, Lin S, Chen Q, *et al*. Inhibition of hepatitis B virus replication by MyD88 involves accelerated degradation of pregenomic RNA and nuclear retention of pre-S/S RNAs[J]. J Virol, 2010, 84(13): 6387-6399.

[6] Oketani M, Idol A, Uto H, *et al*. Prevention of hepatitis B virus reactivation in patients receiving immunosuppressive therapy or chemotherapy[J]. Hepatol Res, 2012, 42(7): 627-636.

[7] Manzano-Alonso M L, Castellano-Tortajada G. Reactivation of hepatitis B virus infection after cytotoxic chemotherapy or immuno-suppressive therapy[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(12): 1531-1537.

[8] Costa L J, Drabkin H A. Renal cell carcinoma: new developments in molecular biology and potential for targeted therapies[J]. Oncologist, 2007, 12(12): 1404-1415.

[9] Toso C, Merani S, Bigam D L, *et al*. Sirolimus-based immunosuppression is associated with increased survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2010, 51(4): 1237-1243.

[10] He C, Klionsky D J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy[J]. Annu Rev Genet, 2009, 43: 67-93.

[11] Huang S C, Chang C L, Wang P S, *et al*. Enterovirus 71-induced autophagy detected *in vitro* and *in vivo* promotes viral replication[J]. J Med Virol, 2009, 81(7): 1241-1252.

[12] Ke P Y, Chen S S. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro[J]. J Clin Invest, 2011, 121(1): 37-56.

[13] Dreux M, Chisari F V. Viruses and the autophagy machinery[J]. Cell Cycle, 2010, 9(7): 1295-1307.

[14] Brennan D C, Aguado J M, Potena L, *et al*. Effect of maintenance immunosuppressive drugs on virus pathobiology: evidence and potential mechanisms[J]. Rev Med Virol, 2013, 23(2): 97-125.

[15] 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(1): 60-71.

[16] Li J, Ni M, Lee B, *et al*. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(9): 1460-1471.

[17] 陈婧, 李毅, 谭畅, 等. TIA-1通过影响肝细胞转录因子的活性调节HBV的e抗原和s抗原表达[J]. 第三军医大学报, 2008, 30(9): 834-836.

(**收稿**:2013-11-12;**修回**:2014-01-02)

(编辑 王 红)