

隐匿性 HBV 感染分子机制的研究新进展

朱丽 陶薇

摘要 乙型肝炎病毒(hepatitis B Virus, HBV)感染分为无症状携带、急性HBV感染、慢性HBV感染、暴发性HBV感染和隐匿性HBV感染5种形式。隐匿性HBV感染是指血清HBsAg阴性,血清和(或)肝组织中HBV DNA阳性。许多实验和临床研究证实隐匿性HBV具有传染性,可以通过再激活、输血或器官移植等发展成典型的乙型肝炎,加重HBV的传播,并最终发展为慢性肝病,包括肝硬化和肝癌,具有严重的危害性。隐匿性HBV感染的分子机制比较复杂,根据现有研究成果,本文对隐匿性HBV感染的分子机制的研究新进展进行综述。

关键词 隐匿性HBV(O-HBV) 隐匿性HBV感染(OBI) 变异 表观遗传 免疫

中图分类号 R392 文献标识码 A DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.11.050

HBsAg转阴及抗-HBs出现一直被认为是HBV被清除和疾病临床痊愈的标志。但是随着分子生物学技术的发展以及在HBV感染检测中的应用,研究者发现部分HBV感染者血清HBsAg阴性,但血清和(或)肝组织HBV DNA仍持续存在,因而提出了隐匿性HBV感染的概念^[1,2]。2008年在由欧洲肝脏研究联合会(EASL)组织的国际隐匿性HBV感染研讨会上,将隐匿性HBV感染定义为通过现有的检测方法检测出HBsAg阴性,但肝脏组织中存在HBV DNA(血清中可发现或未发现HBV DNA)的个体。这一定义暗示OBI在病毒复制的同时具有可传染性。许多实验和临床研究证实隐匿性HBV具有传染性,可以通过再激活、输血或器官移植等发展成典型的乙型肝炎^[1],加重HBV的传播,并最终发展为慢性肝病,包括肝硬化和肝癌,具有严重的危害性。

一、病毒因素

1. HBV S蛋白:(1)HBV S蛋白的变异:在HBV隐匿性感染阶段,HBV S蛋白的主要亲水区域有高频率的氨基酸置换。Mira等^[3]将20例OBI人群HBV S蛋白同HBsAg阳性患者进行比较,结果发现这20个HBV S蛋白主要亲水区有1~27个氨基酸发生改变而其他邻近区域氨基酸置换较少。利用酵母表达系统分别表达20个O-HBV基因D型S蛋白,这些重组S蛋白突变体不能与自身血清抗体反应,说明OBI作用机制可能是一个逃逸宿主免疫系统的突变机制。在S蛋白121、124和137位的半胱氨酸置换的S蛋白变异体对抗-HBs表现为无活性或低活性,

而利用基因定点突变的技术恢复124和137位半胱氨酸可以提高HBsAg免疫原性。此外G145R对诊断试剂盒中识别HBsAg的单克隆抗体表现出低亲和力^[4]。Kim等^[5]在其研究的25名OBI患者中发现7个患者HBV HBsAg MHR区有变异,包括T123S、M125I/N、C139R、D144E、V177A、L192F和W196L。通过体外转染试验发现C139R和D144E变异可以显著降低HBsAg的免疫原性。这些结果说明S蛋白的变异,也影响商业检测HBsAg试剂盒的检出率。(2)HBV S蛋白合成障碍:Martin等^[6]利用体外细胞实验发现基因型A的HBV sG145A变异可以降低HepG细胞外和细胞内HBsAg的表达量。当3种突变同时存在的时候(M103I、K122R和G145A),HBsAg的表达水平显著降低。这一研究结果说明S基因的变异可以导致HBsAg表达水平的降低。此外HBV S蛋白145位点还有其他的变异,如G145R是免疫逃逸突变体,并具有耐受拉米夫定的作用。G145R病毒突变体能够持续的减少HBsAg水平,提高耐受拉米夫定HBV复制,特别是当同时存在多聚酶变异时,如L180M和M204V。而sG458A变异能够改变该基因mRNA剪切,影响mRNA输出和DNA折叠,导致不表达HBsAg。(3)HBV S蛋白分泌障碍:HBsAg分泌障碍导致HBV隐匿性感染的患者也不占少数。Kim等^[5]在干扰素治疗后的患者的HBV中发现Y225del变异,这一变异可以减少HBsAg的分泌。综上所述,HBV S蛋白的变异、S蛋白合成障碍和S蛋白分泌量减少都会影响临床常规检测HBsAg的酶联免疫方法的检测结果,造成漏检。

2. 病毒复制能力降低:(1)缺陷型病毒的产生导致病毒复制能力降低:病毒基因转录控制区或多聚酶

作者单位:117000 本溪市第六人民医院(朱丽);310013 杭州,浙江省医学科学院(陶薇)

区的变异会减少肝细胞 HBsAg 的释放和降低 HBV 复制能力^[7]。在 HBV 感染过程中 S 基因发挥重要的作用,高水平的 S 基因能够促进非感染性 HBsAg 颗粒的组装和分泌,独立的释放病毒颗粒。当 S 基因由于剪切发生变异时,会干扰经由前基因组 RNA (pgRNA) 的病毒复制。很多研究报告发现 O-HBV pre-S1、Pre-S2/S 区域有基因变异和重组,这些变异可能影响了 pre-S2/S mRNA 剪切^[8,9]。此外,G145A HBV 病毒突变体还可以引起 HBV 多聚酶的反转录区域 W153C 变异,而该多聚酶反转录区域的变异会减少 HBV 复制^[6]。(2) 其他病毒感染抑制 HBV 复制:在很多 OBI 的病例中发现 HCV 或 HIV 同时感染的情况^[10]。HBV 与 HCV 和 HIV 具有相同的感染途径,因此不少研究者认为 HIV 和 HCV 感染者是隐匿性 HBV 感染发生率最高的人群^[11]。有关 HBV、HCV 共同感染的研究表明,重叠感染可使 HBsAg 的表达推迟、低水平及持续时间缩短,这可能与 HCV 的核心蛋白对 HBV 有抑制作用相关。

3. 表观遗传改变:HBV DNA 甲基化可以作为一个沉默病毒基因组的细胞防御机制。研究发现在基因组启动子区域的 CpG 二核苷酸的胞嘧啶甲基化可以导致基因沉默^[12]。HBV DNA 甲基化可以减少 HBV 蛋白表达、HBV 复制和 HBV 病毒颗粒的产量,形成 HBV 的隐匿性感染。HBV 基因组含有 3 个 CpG 岛,其中在 O-HBV 基因组的一个 CpG 岛发现较频繁的 DNA 甲基化。甲基化 HBV 序列已经被发现可以整合到 OBI 相关的 HCC 宿主基因组中。甲基化的共价闭环 DNA (cccDNA) 同血清 HBV DNA 低水平和肝纤维化患者肝组织低病毒产量关系密切。cccDNA 甲基化能减少 HBV 复制。此外,在甲基化的 HBV 中,HBeAg 和 HBcAg 的表达也显著减少,这些研究结果都说明 CpG 岛的甲基化可以调节 HBV 基因的表达。

此外,研究者还发现结合 DNA 的组蛋白乙酰化也具有调节 HBV 复制和调节 HBV 转录活性的作用。Samal 等^[13]研究发现结合 cccDNA 的组蛋白高度乙酰化后,能够增强病毒在细胞中的复制能力。当存在组蛋白脱乙酰化抑制剂的时候,结合 cccDNA 的乙酰化的组蛋白越多,则 HBV 转录水平和复制能力越强。今后还需要更多的研究聚焦于表观遗传改变在 OBI 中发挥什么样的作用和如何发挥作用。

4. HBV 病毒基因型的不同:目前关于病毒基因型是否与 OBI 的形成有关的研究很少,Kim 等^[5]在其研究的 25 例 OBI 患者中发现 75% 是基因 D 型(ayw

亚型),并且是韩国很稀少的 HBV 基因型;25% 是基因 C 型(adr 亚型),是该国占主要的 HBV 基因型。Makvandi 等^[14]研究伊朗 120 例 OBI 患者,HBV 基因 D(D1 亚型)是 OBI 的主要基因型。此外其他研究者也得出相同的结果^[15]。但是,Escobedo-Melendez 等^[16]研究墨西哥儿童 OBI 的流行情况发现 HBV 基因型 H 占研究样本的 71%。因此 HBV 基因型的不同是否同 OBI 的形成有关以及如何发挥作用都需要今后大量的研究证实。

二、宿主因素

很多研究显示宿主因素在诱导和维持 HBV 的隐匿状态起着重要的作用。从 20 世纪 70 年代开始,大量临床研究证实某些诱导机体免疫耐受的疾病如恶性血液病和化疗或免疫疗法等能够使 HBV 的隐匿状态转变为乙肝感染状态。这说明宿主因素在 OBI 的形成过程中发挥重要的作用。研究发现几种与宿主免疫反应相关的机制,如机体固有免疫、凋亡、特异性的 T 细胞反应和 VDR 受体多态性,都与调节 HBV 复制和 HBV 蛋白合成有关。

1. 机体固有免疫反应:研究发现机体固有免疫在控制 HBV 复制过程中也发挥着重要的作用,炎性因子如 I 型 IFN 和 TNF-α 能有效抑制病毒复制。Lucifora 等^[17]研究发现能够产生 I 型 IFN 刺激基因的肝细胞能提高 HBV 感染的固有免疫的效果,以控制病毒复制。

2. HBV 特异性的 T 细胞介导的免疫反应:研究者们发现在急性 HB 恢复几年后仍能够检测到抗 HBV 抗原的记忆 CD4 和 CD8 细胞,这一现象说明在隐匿性感染期间,尽管 HBV 合成抗原量少,现有检测方法无法检测,但是机体免疫系统仍然能够维持 HBV 特异性的 T 细胞反应。Bes 等^[18]通过检测 OBI 献血者 HBV 特异性的 T 细胞反应发现宿主免疫系统能够抑制 HBV 复制,因此解释了为什么 OBI 人群能检测到极低(甚至无)病毒载量和无法检测到 HBsAg。此外宿主清除病毒是通过激活和转运 T 细胞和 NK 细胞,因此在病毒急性感染期 T 细胞和 NK 细胞的数量会显著提高。OBI 患者不能表达高水平的 IL-12 和 SDF(stromal cell-derived factor)-1α,CD8⁺ T 细胞数量也较之健康人群降低^[19]。这些都影响了 T 细胞和 NK 细胞的增殖和抗病毒细胞因子的产生。因此 O-HBV 一方面在宿主免疫系统的作用下复制被抑制,一方面少量的病毒量又可以逃避宿主的免疫监控。

3. 细胞凋亡:研究者发现 OBI 患者血清细胞因

子(IL-8、IL10、sFas 和 sFasL)表达水平低于 CH 患者; OBI 患者的 sFas 水平显著低于 CH 患者。sFas 可以抑制 Fas 介导的感染 HBV 肝细胞的凋亡, 说明在两种不同的 HBV 感染阶段(O-HBV 和 C-HBV), 都存在抗肝细胞凋亡的现象, 但是抗凋亡的强度不同。此外 Hassanshahi 等研究发现 OBI 献血者血清趋化因子 CXCL12(SDF-1 α)表达水平减少, 由于 CXCL12 与其受体 CXCR4 能够调节细胞的存活、增殖和迁徙, 因此这一结果可能预示在 OBI 期间 HBV 与宿主免疫调节机制达成的某种平衡。

4. VDR 基因多态性: 最近的研究发现维生素 D₃受体(VDR)在宿主免疫反应中发挥重要的作用。维生素 D₃ 和其受体 VDR 能够调节多种细胞因子的表达, 在机体抗 HBV 反应中发挥重要的作用。Arababadi 等在 O-HBV 中发现 VDR 基因的多态性, 其中 VDR 内含子 8 和外显子 9 的 5'区的基因多态性能够影响 VDR 基因的表达。

5. 其他因素: 研究者发现主要组织相容性 A2 抗原(HLA-A2)阳性的急性自限性 HBV 患者的细胞毒性 T 细胞(CTL)能够识别位于 HBV 核心抗原 N 末端的结合 HLA-A2 的肽结合基序 HBcAg18-27 抗原决定簇。Askari 等^[20]研究发现 OBI 人群外周血单个核细胞(PBMCs) HLA-A2 抗原的表达水平显著低于正常健康对照组, 这可能说明 OBI 人群抗原提成细胞(APCs)不能完全将 HBcAg18-27 抗原决定簇提成给 CTL, 因此免疫细胞不能彻底清除感染肝细胞的 HBV。而且 HLA-A2 阴性的 OBI 人群也不能诱导细胞表达炎性因子。在 OBI 人群 HLA-A2 表达水平的降低造成的抗原提成的缺陷很可能会削弱机体抗 HBV 的免疫反应。另外研究者们发现趋化因子 CXCL12 等位基因 +801 区域基因多态性可能与 OBI 有关。

综上所述, OBI 的形成机制是病毒变异以及病毒和宿主相互作用的结果。这些研究成果对于正确认识隐匿性 HBV 感染以及预防随之而来的严重危害具有重要的意义。当然, 目前仍有许多无法解释的问题存在, 如 O-HBV 特殊存在的表观遗传改变发挥什么作用和如何发挥作用; O-HBV VDR 基因多态性的作用; 某些细胞因子的基因多态性是否与 OBI 形成有直接关系及如何发挥作用; 在 OBI 和其他 HBV 感染阶段宿主免疫系统在控制肝内细胞 cccDNA 复制的作用有何不同; 通过 O-HBV 全长基因组的功能研究鉴定出导致 OBI 形成的关键点等。

参考文献

- 1 Ferrari TC, Xavier MA, Vidigal PV, et al. Occult hepatitis B virus infection in liver transplant patients in a Brazilian referral center [J].

Braz J Med Biol Res, 2014, 47(11):990-994

- 2 Assar S, Arababadi MK, Ahmadabadi BN, et al. Occult hepatitis B virus (HBV) infection: a global challenge for medicine [J]. Chin Lab, 2012, 58(11-12):1225-1230
- 3 Mira EC, Daniel C, Crowther RA, et al. Impact of hepatitis B virus surface protein mutations on the diagnosis of occult hepatitis B virus infection [J]. Hepatology, 2010, 52(5):1600-1610
- 4 Yuan Q, Ou SH, Chen CR, et al. Molecular characteristics of occult hepatitis B virus from blood donors in southeast China [J]. Clin Microbiol, 2010, 48(2):357-362
- 5 Kim KH, Chang HY, Park JY, et al. Spontaneous HBsAg loss in Korean patients: relevance of viral genotypes, S gene mutations, and covalently closed circular DNA copy numbers [J]. Clin Mol Hepatol, 2014, 20(3):251-260
- 6 Martin CM, Welge JA, Rouster SD, et al. Mutations associated with occult hepatitis B virus infection result in decreased surface antigen expression in vitro. Journal of Viral [J]. Hepatitis, 2012, 19(10):716-723
- 7 Hollinger FB, Sood G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation [J]. J Viral Hepat, 2010, 17(1):1-15
- 8 Candotti D, Lin CK, Belkhiri D, et al. Occult hepatitis B infection in blood donors from South East Asia: molecular characterisation and potential mechanisms of occurrence [J]. Gut, 2012, 61(12):1744-1753
- 9 Biswas S, Candotti D, Allain JP. Specific amino acid substitutions in the S protein prevent its excretion in vitro and may contribute to occult hepatitis B virus infection [J]. J Virol, 2013, 87(14):7882-7892
- 10 Jang JY, Jeong SW, Cheon SR, et al. Clinical significance of occult hepatitis B virus infection in chronic hepatitis C patients [J]. Korean J Hepatol, 2011, 17(3):206-212
- 11 Musyoki AM, Msibi TL, Motswaledi MH, et al. Active co-infection with HBV and/or HCV in south African HIV positive patients due to cancer therapy [J]. J med virol, 2015, 87(2):213-221
- 12 Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease [J]. Nature Biotechnol, 2010, 28(10):1057-1068
- 13 Samal J, Kandpal M, Vivekanandan P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection [J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(1):142-163
- 14 Makvandi M, Neisi N, Khalafkhany D, et al. Occult hepatitis B virus among the patients with abnormal alanine transaminase [J]. Jundishapur J Microbiol, 2014, 7(8):e11648
- 15 Rizvi M, Azam M, Sultan A, et al. Prevalence of genotype D in chronic liver disease patients with occult HBV infection in northern region of India [J]. Indian J Pathol Microbiol, 2014, 57(4):537-541
- 16 Escobedo-Melendez G, Panduro A, Fierro NA, et al. High prevalence of occult hepatitis B virus genotype H infection among children with clinical hepatitis in west Mexico [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2014, 109(6):728-737
- 17 Lucifora J, Durante D, Testoni B, et al. Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells [J]. Hepatology, 2010, 51(1):63-72
- 18 Bes M, Vargas V, Piron M, et al. T cell responses and viral variability in blood donation candidates with occult hepatitis B infection [J]. J Hepatol, 2012, 56(4):765-774
- 19 Arababadi MK, Nasiri Ahmadabadi B, Kennedy D. Current information on the immunologic status of occult hepatitis B infection [J]. Transfusion, 2012, 52(8):1819-1826
- 20 Askari A, Hassanshahi GH, Ghalebi SR, et al. Intensity of HLA-A2 expression significantly decreased in occult hepatitis B infection [J]. Jundishapur J Microbiol, 2014, 7(6):e10298

(收稿日期: 2014-12-23)

(修回日期: 2015-01-12)