自噬在乙肝病毒引起的疾病中的功能

汪静雯¹, 孙桂鸿^{1,2*}

1. 武汉大学基础医学院, 武汉 430072;

2. 湖北省过敏及免疫相关疾病重点实验室, 武汉 430072

* 联系人, E-mail: ghsunlab@whu.edu.cn

2019-04-23 收稿, 2019-06-26 修回, 2019-07-01 接受, 2019-08-30 网络版发表

国家自然科学基金(81572447)资助

摘要 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)属于嗜肝DNA病毒科家族成员之一,全世界约有20亿人受到HBV感染,其中约3.5亿人是HBV携带者,HBV携带者中HBV长期低水平复制导致肝炎、肝硬化和肝细胞癌的发生.在这一过程中,越来越多的证据表明自噬扮演了重要角色.本文将从HBV在自噬不同阶段的作用,以及HBV引起的肝损伤和肝癌过程中自噬的功能这几个方面进行综述,以期深入探索HBV病毒致病机制和筛选抗病毒的靶点、研发抗病毒药物提供有效的帮助.

关键词 自噬, 乙型肝炎病毒, 肝纤维化, 肝癌, 肝炎

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界第五大最常见的癌症,也是导致癌症死亡的第三大原因. HBV感染是导致肝癌的重要因素之一^[1]. 虽然有效的疫苗接种、干扰素和多种核苷类似物等抗病毒治疗极大地减少新感染者的产生和缓解了HBV引发的肝病进展,但是却不能彻底治愈某些已被感染的乙肝患者. 在HBV感染个体内,因共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)不能被彻底清除而导致慢性感染,而HBV在慢性感染个体内长期低水平复制引起免疫和炎症反应,造成肝损伤,进而发展为肝炎、肝硬化和肝细胞癌. 越来越多的研究表明,自噬参与HBV引发的肝脏相关疾病的发生发展^[2]. 故了解自噬在HBV诱导的肝细胞癌形成过程中扮演的重要作用,对于开发新的治疗HBV感染引起的相关疾病的药物提供理论基础.

自噬是将细胞未折叠或错误折叠的聚集蛋白、受损的细胞器或入侵的病原体等包入囊泡,随后与溶酶体融合形成自噬溶酶体,进而被降解的过程. 细胞借助

自噬实现自身代谢的物质和能量的需要和某些细胞器的更新. 在生理情况下,自噬是维持在低水平状态,确保能连续清除多余、异位或受损的细胞器、生物大分子和部分受损基因组DNA等,保持细胞的内稳态,控制细胞各系统持续正常运作^[3,4]. 在病理条件下,如营养缺乏、代谢异常、氧化改变、基因毒性和蛋白毒性等,这些信号的改变会诱导自噬对它们形成的压力产生适应性反应,发挥对细胞保护功能^[5,6]. 肝脏是具有复杂代谢系统的器官,肝细胞活跃的代谢和维持正常功能所需的高能量,很大程度上依赖于自噬溶酶体对不同物质的降解. 肝脏利用自噬,降解大量细胞质成分或一些受损的细胞器等,如病原体、脂滴、核糖体和内质网(endoplasmic reticulum, ER)等^[7]. 同时文献^[8,9]显示,肝脏内的自噬能抑制肝肿瘤的发生,以保持肝细胞的适应性和基因组的完整性. 而肝脏任何一种自噬形式的紊乱或缺失都可导致细胞内损伤的线粒体,过氧化物酶等异常细胞器和异常膜结构的堆积,从而导致不同的肝脏病理状况,造成肝脏损伤,最终诱发肝肿

引用格式: 汪静雯, 孙桂鸿. 自噬在乙肝病毒引起的疾病中的功能. 科学通报, 2019, 64: 3109–3122

Wang J W, Sun G H. The function of autophagy in diseases caused by hepatitis B virus (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 3109–3122, doi: 10.1360/N972019-00354

瘤^[7,10]。因此,控制自噬活性可能在开发新的治疗肝癌发展药物或改善肝癌细胞耐药性方面具有潜力。本研究将讨论自噬对HBV相关肝癌形成的不同阶段的不同影响,以期帮助探索有效自噬调节剂,达到治疗HBV引起的癌症的目标。

1 HBV利用自噬建立慢性感染

自噬在HBV感染的每个阶段均扮演着重要的角色。1988年首次报道慢性HBV患者肝组织可能存在自噬性降解^[11]。研究发现慢性乙型肝炎患者经肾移植和免疫抑制治疗后,不仅肝细胞内过氧化物酶体增多,而且大量含乙肝病毒颗粒的肝细胞发生过氧化物酶体的溶解和/或自噬降解。从1988年至今的30年里,大量的文献揭示了HBV感染通过不同的途径激活自噬,而自噬则促进HBV的复制,下面将从HBV感染对自噬的影响来阐述它们的相互作用。

自噬过程分为四大大步,其分别由四类复合物共同调控:(1)自噬起始:由ULK1(uncoordinated 51-like kinase 1)/AMPK(5'-AMP-activated protein kinase)复合体调控;(2)自噬小泡成核:由PI3KC3(phosphatidylinositol 3-kinase class III,也称为Vps34)/Beclin-1复合体调节;(3)自噬体膜延伸、闭合和成熟:由ATG5-12/16L1和ATG8(autophagy associated gene)/LC3(light chain 3)的两大泛素连接复合体联合调控;(4)控制自噬溶酶体形成的内膜运输系统:通过GTPase Ras-相关蛋白,细胞骨架及囊泡转运相关蛋白等协同作用^[12]。当宿主细胞遭受一系列应激反应,如病原体入侵、营养物质的缺乏、组织损伤等,宿主细胞依据胞吞的位置,可分别通过内质网膜、线粒体与内质网膜衔接处的膜,高尔基体膜或是核内体膜脱落形成隔离膜^[13~18]。当隔离膜形成后,能量传感器磷酸腺苷活化的蛋白激酶(AMPK)感应氧化应激而被激活,PI3K(phosphatidylinositol-3-kinase)/AKT/mTOR(mammalian target of rapamycin)信号感应营养缺乏而失活,这两个事件共同增强了ULK1的激酶活性。ULK1复合物由ULK1, ATG13, FIP200(RB1-inducible coiled-coil protein 1, RB1CC1)和ATG101等蛋白组成。ULK1活性增强后通过磷酸化FIP200来加强复合物之间的相互作用,同时该复合物被募集到隔离膜上诱导自噬起始^[19,20],而激活的ULK1促进PI3KC3活化,并募集DFCP1(double FYVE-containing protein 1)和WIPI(WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1)家族成员,促进膜的延伸、成核而形成自噬

泡^[21];自噬泡在两大泛素连接系统的作用下扩张和伸展,形成成熟的自噬体^[22],最后依赖于一系列GTPase和膜泡运输相关蛋白的相互作用,促进自噬体和溶酶体的融合,形成自噬溶酶体而被酸性水解酶所降解^[23]。

在HBV感染过程中,HBV通过不同途径参与自噬的4个阶段,以利于HBV慢性感染的建立。下面将分别从自噬反应的各个阶段综述HBV的功能。

1.1 HBV与自噬起始

自噬起始反应离不开对AMPK和mTOR信号通路的调控,其中AMPK是维持细胞能量平衡和感应细胞能量变化的重要传感器之一,当胞内ATP水平较低时,AMPK被磷酸化激活,从而诱导自噬^[24];而mTOR在接受不同信号刺激时,如生长因子缺乏、能量状况异常、营养物质匮乏或压力失衡等,可抑制自噬起始以调节细胞的存活、生长和分化^[25]。多项研究发现,HBV感染细胞后能调控AMPK或/和mTOR通路,影响自噬进而调节HBV自身复制,而AMPK或/和mTOR信号的自噬调控,既相互独立又彼此影响^[26,27]。

一方面,研究显示HBV感染能够单独影响AMPK或mTOR通路,调节自噬起始,实现对HBV自身复制的影响。如2016年,Xie等人^[28]的研究报道,宿主因子PRKAA(AMPK的一种催化亚基)在HBV诱导的氧化应激反应中被激活,进而激活AMPK,从而诱导溶酶体蛋白酶的成熟,促进自噬溶酶体的降解而抑制HBV的产生。这提示着宿主细胞的抗氧化系统被精细地控制来介导AMPK等代谢传感器的激活,从而诱导HBV的自噬性降解,减轻由HBV复制引起的代谢应激,维持HBV的稳定感染。而该研究表明HBV诱导的自噬激活是不依赖于mTOR信号的抑制的。与之相反,也有文献显示,HBV感染可以不通过AMPK途径而单独抑制mTOR信号通路从而诱导自噬影响其HBV自身复制,如2017年Lin等人^[29]发现,miR-99家族成员的异常表达减弱了肝癌细胞的IGF-1R(insulin-like growth factor 1 receptor)/Akt/mTOR信号,激活ULK1,从而促进HBV复制,结果表明该过程的自噬激活与AMPK信号通路无关。综上,HBV感染可单独激活AMPK信号或单独抑制mTOR信号从而诱导自噬,促进HBV的复制。

另一方面,研究报道AMPK和mTOR这两个信号通路可以互相调控来诱导自噬。如2003年Inoki等人^[27]报道AMPK能激活结节性硬化复合体-2(tuberous sclerosis complex 2, TSC-2)以降低mTOR的活性,即AMPK通路

的激活能够抑制mTOR信号通路,而这种双重信号诱导的自噬激活,同样在维持HBV复制中发挥重要作用. 2016年Bagga等人^[30]使用原代大鼠肝细胞(与肝脏中的正常肝细胞非常相似)进行实验,发现HBx无论是单独转染而表达,还是通过HBV基因组实现HBx的表达,都能诱导ROS(reactive oxygen species)的累积而激活AMPK信号通路以抑制mTOR信号通路从而诱导自噬起始,进而促进HBV的复制. 让人感兴趣的是, Bagga等人^[30]还发现, HBx能直接激活mTOR信号通路而抑制自噬从而抑制HBV的复制. 这个结论与HBx抑制mTOR信号通路诱导自噬促进自身复制的观点是矛盾的. 更重要的是,对于HBx也能诱导mTOR信号通路并不是首次被报道. 早在2012年Yen等人^[31]的研究就发现, HBx可抑制PTEN(phosphate and tension homology deleted on chromosome ten)从而激活AKT/mTOR通路,随后Wang等人^[32]2013年报道HBx激活PI3K/AKT/mTOR而诱导自噬,以及在2015年Zhu等人^[33]则在HBx转基因小鼠中发现HBx可激活IKK β (I Kappa B Kinase β)进而激活mTOR/S6K1(S6 kinase 1)通路,这些研究结果虽然指出HBx能够激活mTOR通路从而调控自噬影响肝癌的发生发展,但是并未对此矛盾之处做以解释. 直到2016年Bagga等人^[30]首次提出HBV感染通过HBx能分别激活AMPK和mTOR信号通路而对病毒的复制产生相反的影响这一观点,即激活的AMPK信号通路抑制mTOR信号通路诱导自噬,进而促进HBV的复制,而激活的mTOR信号通路抑制自噬从而抑制HBV的复制,最终达到一个平衡,并且表明这种复杂的调控对于维持HBV稳定感染至关重要.

综上所述, HBV感染过程中,会通过不同的机制交错的调控AMPK和/或mTOR信号通路,从而抑制或者促进自噬,实现对HBV自身复制的调节. 而Bagga等人^[30]认为这些不一致的研究结果主要是由于研究中使用的细胞类型和感染方式不同,导致HBV感染产生的效应不同. 我们常用的癌细胞系(永生化或转化细胞系)中的信号转导途径和生理特性相对于正常肝细胞都发生了不同程度地改变;而HBV感染或直接转染HBx后,对细胞产生的主要调控的信号通路也不一样,正是由于研究者们使用了不同背景的细胞,不同的感染方式而导致产生不同的结果^[30]. 这些不同的研究也提示我们, HBV感染后对宿主细胞的影响是极为复杂的,根据HBV感染的程度和阶段不同, HBx或宿主因子能同时激活和抑制HBV复制的通路,起到调节器的作用,

控制HBV复制水平,从而促进HBV稳定感染的建立. 总之,现在大部分研究者都认为在HBV感染过程中, PI3K/mTOR/ULK1/AMPK信号通路受HBV自身或宿主因子的调控,诱导自噬起始反应,从而促进HBV自身复制的这一观点. 但我们不能忽略掉小部分持相反观点的研究,目前HBx是激活还是抑制mTOR信号,可能取决于细胞所处的外部培养条件和细胞本身性状(如具备的信号转导途径和生理特性等). HBV感染究竟是如何协调AMPK和mTOR信号来诱导调控自噬和自身复制的还不完全清楚. 这将是未来对于自噬和HBV复制研究的焦点.

1.2 HBV与自噬泡成核

PI3KC3-Beclin-1是自噬小泡成核复合体的核心成员. 大量的文献报道, HBV可通过其自身蛋白,如HBV的X和S蛋白,调控该复合物而影响自噬小泡成核. 我们知道, Beclin-1对自噬与凋亡具有双调控的功能,能介导自噬和凋亡处于一个动态平衡. 当机体在生理状况下,本底水平的Beclin-1不会诱导自噬激活,此时Beclin-1通过BH3结构域与抗凋亡蛋白家族成员B细胞淋巴瘤蛋白2(Bcl-2, B-cell lymphoma-2)或Bcl-2样蛋白(Bcl-XL)结合而处于静息状态^[34]. 而在HBV感染的情况下, HBV通过不同途径激活Beclin-1,诱导自噬. 在HBV引发肝疾病进程中,这种Beclin-1介导的自噬和凋亡的动态平衡会发挥重要生理功能. 如2009年文献^[35]报道, HBx通过促进Beclin-1的启动子转录活性上调Beclin-1的表达,激发自噬反应. 但对于HBx如何促进Beclin-1表达的具体分子机制当时并不清楚. 2010年的文献^[36]证明, HBx与 PI3KC3相互作用增强其活性,激发自噬并促进HBV DNA复制. 而2015年Zhang等人^[37]证明HBx能够去磷酸化DAPK(dephosphorylate/activate death-associated protein kinase),去磷酸化的DAPK活化后磷酸化Beclin-1和激活PI3KC3的PKD(protein kinase D)从而诱导自噬. 而在2017年, Zhong等人^[38]也发现, HBV感染后,通过HBx激活JNK(c-Jun NH2-terminal kinase),使Bcl-2和Bcl-XL磷酸化,导致其与Beclin-1分离,从而诱导自噬. 他们认为HBV可通过HBx-ROS-JNK途径调控Beclin-1的活化而促自噬. 而在2018年,我们确证了, HBV通过HBx与MYC相互作用,通过MYC抑制miR-192-3p的表达,导致X连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)的上调,进而激活核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路,促进

p65入核结合到Beclin-1的启动子上,实现上调Beclin-1的表达而促进自噬,并且进一步确定了HBV感染可通过自身蛋白X促进自噬成核帮助自身复制^[39],从而详细地阐明了HBx如何促进Beclin-1的表达诱导自噬的分子机制。

另外,除了X蛋白,S蛋白调节Beclin-1促进自噬的分子机制也将逐渐被揭示.2011年Li等人^[40]首次发现了HBs通过诱导内质网应激反应(endoplasmic reticulum stress, ERS)而诱导自噬这一现象.ERS指内质网腔内错误折叠与未折叠蛋白聚集以及钙离子平衡紊乱从而激活未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)、内质网超负荷反应和caspase-12(cysteiny l aspartate specific proteinase-12)介导的凋亡通路等真核细胞的一种保护性反应.文献^[41]报道,诱导的ERS激活UPR至少涉及3种不同的信号通路,即PERK(protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase)/eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α)通路、ATF6(activating transcription factor 6)/GRP78/94(glucose 2 regulated protein 78/94KD)通路和IRE1 α (inositol-requiring protein-1 α)/XBP1通路.基于这一研究背景,Li等人^[40]发现HBV感染确实能够促进PERK/eIF2 α 的磷酸化激活,诱导ATF6/GRP94通路及促进XBP1的剪切活化,而缺失HBs能够回复HBV对UPR反应的诱导.并且他们还发现干扰UPR信号通路能够抑制HBs诱导的自噬反应且抑制HBV自身复制.因此Li等人^[40]证实HBV感染通过HBs诱导UPR信号通路从而诱导自噬促进其自身复制.随后,2013年Margariti等人^[42]发现活化的XBP1能够增强Beclin-1的转录活性从而诱导自噬.这一发现为我们提供了一个可能的研究设想,即HBV是否通过HBs激活IRE1 α /XBP1通路调控Beclin-1而诱导自噬促进自身的复制.当时Li等人^[40]的实验结果仅表明干扰IRE1 α 后回复了对XBP1的切割作用,并且抑制HBs诱导的自噬反应从而抑制HBV的复制,并未检测干扰IRE1 α 后Beclin-1的表达情况.因此,简而言之,这些研究表明HBV的S蛋白能激活UPR信号通路诱导自噬并促进自身复制,而UPR信号通路中的IRE1 α /XBP1通路的激活能够促进Beclin-1的表达从而诱导自噬.我们相信未来对于HBs通过调控ER应激反应影响Beclin-1的表达而影响自噬将能得到进一步的研究探索。

1.3 HBV与自噬小体形成

自噬体膜的延伸涉及两大泛素化系统即ATG5/12/

16L1和ATG8/LC3复合体.其中ATG5/12/16L1复合物主要是介导自噬小泡的伸展扩张,使得由最初的小囊泡状或杯状结构发展为环状结构,并且随后募集ATG8/LC3复合物,进一步由环状形成完整的自噬小体,一旦自噬小体形成,ATG5/12/16L1脱离胞膜,重新延伸扩展其他隔离膜,而ATG8/LC3则定位在膜上直到最后自噬小体被降解。

到目前为止,科学家们对HBV感染后对自噬体膜延伸涉及的两大泛素复合体的调控还并不清楚.Li等人^[40]、Song等人^[41]和Kang等人^[43]发现HBV感染过程中S蛋白能够激活PERK,增加eIF2 α 的磷酸化,诱导ATG5/12/16L1活化,促进自噬小体形成.另一方面,S蛋白也能激活ATF6,上调GRP78/94-CHOP(C/EBP homologous protein)/ATG5信号通路从而激活自噬反应^[40,41,44,45]。

此外,2015年有课题组报道宿主因子Rab33B与ATG5/12/16L1复合体相互作用,并且偶联Alix(apoptosis-linked gene 2(ALG-2)-interacting protein X)对HBV衣壳蛋白的组装进行调节^[46].作者推测这是一种依赖于非经典的自噬反应的激活,即HBV裸衣壳在Rab33B,ATG5/12/16L1和Alix协同作用下可能依赖于细胞内的自噬体样囊泡中间体进行运输,以非传统(隔离膜形成、延伸、成核形成自噬小体的传统过程)的运输方式分泌到细胞外环境.随后,在2018年,该课题组发现,当ATG5/12/16L1的表达被干扰后,HBV核衣壳的形成及稳定性就被影响,病毒的产生也受到抑制^[47].在这一过程中,HBV core蛋白通过与ATG12内的无序区域相互作用而与ATG5/12/16L1复合体相结合,促进自噬,帮助HBV的核衣壳组装和HBV病毒的产生.然而,有趣的是,干扰LC3的表达或者突变ATG4B以抑制LC3II的产生均不能抑制HBV的复制,这说明调控ATG8/LC3复合物不影响HBV的复制.这些研究结果提示HBV core蛋白可以通过影响ATG5/12/16L1复合体引起经典和/或非经典自噬反应调节自身衣壳蛋白的组装以促进HBV复制,有助于早期慢性感染的建立,但分子机制以及参与的宿主调控因子都有待更详细的阐明。

1.4 HBV与自噬溶酶体形成与降解过程的调控

自噬溶酶体的形成与降解主要受HBV自身或者内膜运输系统相关蛋白如Rab, SNAP(synaptosomal-associated protein), MVB(multivesicular body), ESCRT-II(endosomal sorting complex required for transport-II)等

的调控。溶酶体利用超过50多种酸性水解酶来消化大分子组分,产生滋养细胞所需要的物质,而这些酶的功能则在U型ATP质子泵维持的高酸性pH环境中实现的,即溶酶体是通过利用ATP的代谢能量,将质子泵入腔中,以维持内环境稳态。2014年Liu课题组^[48]发现,HBV通过HBx与V-ATPase HD亚基结合,使质子不能被正常泵入溶酶体腔内,导致溶酶体酸性改变,自噬体的降解能力受到损害,从而抑制了HBV的降解,最后维持了细胞内的HBV水平,促进HBV形成慢性感染。

越来越多的报道称肝细胞内HBV病毒粒子的出芽和释放涉及控制自噬溶酶体形成的内膜运输系统相关蛋白。而这类蛋白报道最多的是以MVB形式存在的。MVB囊泡的形成和货物蛋白的分类依赖于至少17种类运输与膜融合相关蛋白的相互作用,其中大部分主要是ESCRT-I、ESCRT-II和ESCRT-III的组成部分。主要包括宿主因子 γ 2-Adaptin、Nedd4泛素连接酶、Vps4、Rab家族成员、VPS4B和SNAP等的相互作用。有证据表明,成熟的HBV病毒粒子、亚病毒颗粒(subviral particles, SVPs)和无包膜核衣壳都是通过不同的途径释放的且依赖不同的宿主因子^[49]。而已经有研究报道HBV是如何通过该系统诱导或抑制自噬溶酶体途径而被降解或分泌的。

早前Inoue等人^[50]发现,precore蛋白促进Rab相关蛋白7(Rab7)的活性,可促进内膜体和溶酶体的融合加速形成自噬溶酶体,从而促进HBV以自噬溶酶体途径被降解,作者推测这可能是病毒建立慢性感染一种保护机制。随着研究的深入,2018年Lin等人^[51]发现,Rab7可通过与PLEKHM1(pleckstrin homology domain containing protein family member 1)作用来调节自噬体和溶酶体融合从而介导HBV病毒和SVPs的降解。作者在Huh7细胞中发现HBsAg与Rab7部分共定位,沉默Rab7导致HBsAg与LC3共定位增加而HBsAg与溶酶体标记物LAMP1(lysosomal associated membrane protein 1)的共定位降低。作者认为沉默Rab7后抑制了HBsAg的自噬体途径降解,进一步研究发现PLEKHM1(自噬小体和溶酶体末端融合的特异性效应剂)的沉默显著增加了core蛋白、胞外分泌和胞内的S蛋白的表达水平和HBV DNA的产生。最后证实了PLEKHM1是连接Rab7和LC3的平台,并直接连接自噬膜和溶酶体膜,从而促进这些囊泡的融合与降解,而HBV病毒和SVPs正是依赖于Rab7- PLEKHM1介导的自噬体途径降解的^[51]。2019年该课题组最新的发现表明SNAP家族蛋白

中的SNAP29能诱导自噬体和溶酶体融合,作者认为SNAP29-VAMP8(vesicle-associated membrane protein 8)和Rab7-PLEKHM1协同促进自噬溶酶体形成,帮助HBV病毒和SVPs的降解^[52]。这些研究揭示了内膜运输系统相关蛋白协同调控自噬溶酶体的形成,影响HBV的复制。这些结果提示,自噬体形成与降解的调控,一方面,自噬体促HBV复制,另一方面自噬溶酶体防止HBV的过度复制,以免造成急性肝损伤,这种HBV的内稳态,有利于HBV的慢性感染的建立。而MVB复合体中除Rab, SNAP家族成员外,相信还有很多其他膜融合相关蛋白在HBV的分泌中起重要作用,这将在未来被一一揭示。HBV除了能被自噬溶酶体降解途径影响,也能直接与MVB小体作用而被分泌。虽然HBV是如何进入到MVB小体中暂时并不清楚,但是文献显示,干扰MVB小体功能,HBV的分泌量明显减少^[49]。另有研究认为,MVB停靠在肝细胞表面,以类似于外泌体释放的方法去释放MVB腔内病毒^[53]。随后的研究进一步揭示,HBV被MVB小体膜内陷包裹形成腔内囊泡,然后运输到细胞膜,类似于拓补学结构上的出芽的方式被释放到胞外^[54],但参与调节这个过程的宿主因子还未可知。因此对于探索新的参与MVB小体功能的宿主因子对于阐明自噬溶酶体形成阶段甚至膜泡运输过程至关重要。这些研究均表明,内膜运输系统在形态学和功能上调控自噬溶酶体的形成共同调节HBV的复制,以促使形成慢性HBV感染,尽管目前详细的研究机制还未可知,相信这将会是未来的研究热点。

综上所述,HBV感染肝细胞的生理过程中,不管是HBV本身编码的蛋白或是受HBV调控的宿主因子都被发现能够影响调控自噬的不同阶段,最终抑制或促进自噬或影响自噬流,以维持HBV病毒数量的相对稳定,有助于HBV慢性感染的建立。

2 自噬调节HBV诱导的肝损伤

在HBV慢性感染中,过度的炎症反应已被广泛认识为引起肝损伤-肝纤维化的中心力量。HBV的持续感染可激活肝脏驻留细胞(如库普弗细胞、肝星状细胞、窦状内皮细胞)和募集免疫细胞(如单核细胞、巨噬细胞、树突细胞和自然杀伤细胞等)共同发出促炎信号,分泌细胞因子、趋化因子、脂质信使和活性氧等分子,促进肝细胞的凋亡或坏死。而濒死的肝细胞释放细胞内容物与病毒释放的病原分子协同诱导炎症反应^[55-57]。

近年来,越来越多的关于自噬与炎症反应的研究被报道,自噬可通过Toll样受体(toll-like receptors, TLR)、Nod样受体(nod-like receptor, NLR)、TNF受体(tumor necrosis factor receptor)介导的信号通路来调节炎症反应,也能通过影响巨噬细胞、嗜中性粒细胞等炎症细胞的发育、功能和存活,影响许多炎性因子的转录和分泌来调节炎症反应.自噬调节炎症的机制十分复杂,且具有双向调节功能,即促炎和抗炎,这两种作用在疾病的进程中可发挥不同的作用.而炎症中的细胞因子、活性氧累积和相关转录因子也可调控自噬反应^[58-61].下面我们将对HBV长期感染引发的炎症、诱导的肝损伤过程中,自噬扮演的功能进行简要的综述.

2.1 自噬调节炎症在HBV引起的肝损伤中的功能

炎症反应是机体应对病毒/微生物感染或组织损伤等不利刺激的一种保护性反应.病毒或微生物感染机体后,释放的相关病原分子作为配体,与天然免疫相关受体如TLR,RLR(RIG-I-like receptor),NLR等结合后激活天然免疫信号通路,促进下游的相关炎症因子如NF- κ B, CXCL趋化因子, IL-6, IL8等的转录,帮助清除感染机体的病原体.轻微的炎症反应有助于组织修复和促进体内平衡的重建,而过度的炎症反应则导致不可逆的组织损伤^[55,62].2015年Takaoka课题组^[63]报道了HBV的先天反应识别机制,即HBV的pgRNA作为配体,其5'ε与RIG-I结合,激活III型而不是I型IFN信号通路,诱导下游的抗病毒适应性免疫和炎症反应,从而建立炎症反应和细胞死亡的反馈循环,最终导致肝损伤和肝纤维化^[62,63].

近年来的研究表明,自噬作为一种新的免疫调节机制,参与宿主对入侵病原体的免疫防御.其在由包括中性粒细胞, T淋巴细胞和巨噬细胞等在内的天然免疫细胞所介导的清除病原体的免疫和炎症反应中扮演着重要角色^[55].嗜中性粒细胞是天然免疫系统组成成分之一,主要采取3种策略抵抗病原微生物: (1) 微生物的吞噬; (2) 抗菌物质的分泌; (3) 嗜中性粒细胞胞外诱捕,其主要是通过释放一种网状结构NETs(extracellular traps)捕捉和清除微生物. NETs是由染色质、组蛋白和其他大量的蛋白酶等组成的胞外纤维结构^[64-66].这些大的细胞外纤维结构能够提供物理屏障防止微生物传播并且形成局部的抗菌环境从而清除微生物^[67].早前自噬被证实是NETs释放所必需的, Wortmannin介导的

对中性粒细胞自噬的抑制将导致染色质的异常解聚和阻止NETs的释放^[68],而使用雷帕霉素(Rapa)抑制mTOR促进自噬则加速NETs的释放^[69].近有报道称在慢性肝纤维化的病人中明显可见低水平的NET释放,并且肝硬化的患者若是缺乏NET释放将会增加并发症的发生率^[70].基于这个有趣的现象,2019年Hu等人^[71]报道了HBV引起的肝纤维化患者维持低水平的NET释放的详细分子机制,即HBV的core和e蛋白可以通过增强mTOR的活性抑制自噬水平和抑制ROS依赖的ERK(extracellular regulated protein kinases)和 p38 MAPK(mitogen-activated protein kinase)信号通路,从而抑制嗜中性粒细胞分泌NETs,以帮助HBV逃脱免疫和炎症反应,维持持续感染,最终引起肝损伤-肝纤维化.值得特别说明的是,该报道以及HBx诱导mTOR信号而抑制自噬反应的相关报道^[31,33]均与前人关于HBV的X和S蛋白诱导自噬的研究背道而驰,而提出了HBx还能抑制自噬以及HBV的core和e蛋白也是抑制自噬的,我们猜想这可能是HBV感染阶段和感染程度以及HBV对宿主细胞的致病程度不同所导致的.而具体的机制至今仍不清楚.

此外,越来越多的证据表明,自噬对于T细胞的激活和增殖是必需的.提高自噬活性可以维持在不同环境中的多个T细胞亚群的分化状态和功能,如调节性T细胞(Treg).2017年Cheng等人^[72]发现在慢性HBV感染的患者外周血中Treg细胞的自噬水平也被大大激活,并且提出自噬增加有利于抗HBV免疫反应和炎症反应的发生,利于维持HBV稳定感染.在研究中作者发现,用中和抗体阻断HMGB1(high-mobility group Box 1)可显著减弱自噬,并通过重组HMGB1蛋白对CHB-Treg细胞自噬作用进行时间和剂量依赖性分析而确证了这一结果.而HMGB1早前被报道是一种多功能蛋白,普遍存在的核蛋白,通常称为损伤相关分子模式分子(damage associated molecular patterns, DAMPs),在慢性HBV感染的患者中HMGB1异常高表达^[72,73],并且HMGB1已被报道可调节细胞外、胞浆和核水平的自噬活性^[73],也可通过Toll样受体(TLR2, TLR4)/MYD88(myeloid differential protein-88)/MAPK和晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)发挥促炎功能^[74,75].在这些研究的基础上,Cheng等人^[72]尝试研究HBV, Treg细胞的自噬活性和HMGB1之间的关系.他们证实在HBV慢性感染的情况下, HMGB1可以被坏死的实质肝细胞被动释放,也可以通过免疫细胞主动分泌.分泌的HMGB1与RAGE结

合,降低mTOR的磷酸化水平,增强Beclin-1/Vps34的活性,从而激活自噬,进一步诱导Treg细胞活化增殖,介导免疫与炎症反应,抵抗HBV感染,而长期的炎症反应最终引起肝损伤-肝纤维化^[72]。另一方面,Li等人^[76]发现HBV形成慢性感染过程中通过HMGB1引起的持续和长效的自噬反应也是肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)激活所必需的,虽然具体的分子机制尚不清楚,但这对形成肝纤维化也是必需的。这些研究为提出特异性抗HBV免疫的治疗策略开辟了新的思路。

此外,自噬除了调节炎症细胞介导的炎症反应,现在已有报道自噬还能调节肝脏常驻巨噬细胞-kuffer细胞(肝脏非实质细胞之一)依赖的炎症信号通路以诱导肝细胞癌。Sun等人^[77]发现,ATG5基因敲除促进Kupffer细胞产生炎症和纤维化因子的现象。在自噬缺陷的Kupffer细胞中,通过增强线粒体Ros-NF- κ B-IL-1 α / β 通路信号,促进肝炎、纤维化,最终导致肝癌的发生。迄今为止绝大部分的研究都是围绕在肝细胞和肝癌细胞中HBV与自噬关系的研究,对HBV感染的肝脏非实质细胞中自噬与炎症反应的研究相对较少。或许研究在HBV感染条件下,肝脏驻留细胞中的自噬调控作用将为治疗HBV引起的疾病提供理论靶点。

2.2 自噬缓解HBV引发的线粒体损伤

线粒体肝损伤一直被认为是慢性肝炎中HBV感染的后果之一。线粒体是一种动态的细胞器,它们经历分裂、融合和选择性的自噬清除(mitophagy),以维持线粒体的动态平衡,满足细胞的能量需求。清除受损的线粒体对于维持线粒体和细胞内环境的稳定至关重要^[78]。目前已经有众多的报道表明HBV慢性感染会导致线粒体损伤和分裂,如HBV通过诱导产生ROS导致线粒体结构紊乱,通透性改变,故而引起细胞色素c, AIF, Smac/DIABLO等多种致衰老因子在膜间隙的再分布而启动效应caspase激活,诱导肝细胞死亡^[79];另外HBx可靶向线粒体膜上的电压依赖性阴离子通道(VDAC),引起线粒体膜电位变化,线粒体膜电位的稳定是驱动ATP合成酶所必需的,它使腺苷二磷酸(ADP)磷酸化为三磷酸腺苷(ATP)。因此,线粒体膜电位的丧失意味着ATP生成的丧失,进而诱导线粒体依赖的凋亡途径导致肝细胞死亡^[80];HBV/HBx增加动力相关蛋白Drp1(dynammin-related protein 1)的Ser616位点磷酸化,使其反转排布到线粒体外膜上,诱导线粒体裂变^[81]。E3泛素连接酶Parkin,可以介导线粒体裂变与线

粒体自噬的动态平衡。作者发现HBV/HBx促进Parkin表达,使其反转到线粒体外膜,通过自身泛素化以增强对底物Mfn2(Mfn2是线粒体融合的介导子)的泛素化而促进其降解,从而诱导线粒体裂变,随后Parkin与分裂的线粒体一起结合p62等自噬货物运输蛋白,随后p62通过与自噬小体上的LC3结合使得分裂的线粒体与自噬小体形成复合物,最终整个复合物通过溶酶体被降解掉以清除受损的线粒体^[81,82]。通过线粒体自噬清除受损的线粒体,减弱了损伤的线粒体累积所引起的凋亡反应。而当HBV长期慢性感染反复诱导线粒体损伤-线粒体自噬反应最终将引发强烈的凋亡反应,引发炎症,造成肝损伤。

2.3 自噬降解HBV诱导的肝细胞死亡

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是一种典型的表达在自然杀伤细胞和细胞毒性T淋巴细胞上的死亡配体,通过结合死亡受体促进caspase依赖的细胞凋亡,参与对病毒感染或转化细胞的免疫监视,最终在感染得到控制时终止免疫反应,限制组织损伤,恢复内环境稳定^[83~85]。而目前发现许多病毒能够通过自噬调节TRAIL死亡配体信号而逃避抗病毒免疫,导致持续感染。例如: dengue virus^[86], Epstein-Barr virus^[87]和HBV^[88]

2016年文献^[88]报道,HBV的X蛋白通过自噬介导TNFRSF10B(tumor necrosis factor ligand superfamily member 10)/DR5降解来限制TNFSF10受体的信号转导,导致被病毒感染的细胞继续存活,从而维持HBV病毒的稳定复制。作者发现, TNFRSF10B蛋白在慢性乙型肝炎患者肝组织和HBV或HBx转染细胞系中的表达均显著降低。随后发现, HBx能够分别直接与TNFRSF10B和LC3B相互作用形成三者的复合物,但是当HBx不存在时, TNFRSF10B和LC3B不能相互作用,这提示HBx作为一种自噬受体样分子,并促进TNFRSF10B与被HBV感染的肝细胞中的自噬小体结合。最终导致TNFRSF10B通过溶酶体途径降解,而不是蛋白酶体途径降解,诱导自噬增加。作者推测HBV通过HBx诱导自噬逃避TNFSF10介导的抗病毒免疫的分子机制可能是导致慢性HBV感染的原因之一。因此, HBx通过自噬介导TNFSF10死亡受体下调,可能增强感染后的肝脏炎症和HBV持久性的复制,而当HBV病毒大量扩增至无法在机体中承载时,则引发强烈的无法完全被自噬反应所缓解的TNF杀伤性反应,造成肝

损伤。

3 HBV通过自噬调控肝癌

3.1 自噬抑制肝肿瘤发生

炎症被认为是癌症促进肿瘤生长的标志, 并与许多实体肿瘤的不良预后相关, 众所周知, HCC的进展与持续的炎症刺激密切相关。自噬被认为通过抑制炎症来调控癌症进展, 而抑制自噬可以导致炎症的持续升高, 这主要表现在自噬缺陷导致p62和泛素化蛋白, 损坏的细胞器, 尤其是线粒体等的累积从而诱导ROS的产生、基因组的损伤等, 进而诱发炎症和自发肿瘤^[89-91]。2008年在自噬被抑制的小鼠中, 首次观察到细胞的炎症水平大大升高。即作者发现在败血症休克时, 与野生型对照相比, ATG16L1基因敲除小鼠由于缺乏自噬性反应, 其炎症小体相关的IL-1 β 和IL-18细胞因子的水平升高^[92]。进一步的研究表明, 自噬蛋白LC3B和Beclin1的缺失增强了Caspase1的激活, 而Caspase1的激活是NALP3(NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3)炎症小体依赖的。敲除LC3B基因的小鼠对LPS诱导的死亡更敏感^[93]。这些研究均表明, 自噬确实能够抑制炎症反应, 而自噬的这一抑制炎症的功能在包括肝癌(HCC)在内的多种肿瘤发生中均起着重要的作用^[94]。多项研究表明, 自噬功能缺失的小鼠, 包括Beclin-1单等位基因敲除小鼠^[95]、ATG5敲除小鼠、ATG7肝脏特异性敲除小鼠^[10]最终均表现为自发的多发性肝脏肿瘤及强烈的炎症反应。同样的, 在肝癌病人的组织样品中经过检测发现, 与癌旁相比, 癌组织中的Beclin-1的表达显著下调, 甚至发现恶性程度更高的肝癌组织表现出更低的自噬活性^[96]。这些研究说明自噬水平的抑制促进了炎症及诱导了肝癌的形成。

已经有文献报道宿主细胞的非编码RNA如miRNA能抑制自噬而促进HBV诱导的肝癌发生。如2014年Lan等人^[97]报道在人的HBV相关的肝细胞癌组织样品中自噬水平下调, 并且自噬水平与miR-224是负相关的。这种负相关是由于自噬发生时, miR-224被募集到溶酶体上被降解而实现的。随后他们通过体外研究表明, miR-224高表达时可通过沉默其靶基因Smad4, 而在肝癌细胞迁移和肿瘤形成中发挥致癌作用。最后作者在HCC患者中, 发现低ATG5、高miR-224和低Smad4的表达与HBV感染致瘤和总生存率显著相关。即Lan等人^[97]提出在HBV相关的肝癌组织中, 自噬水平的降低抑制

了miR-224的溶酶体降解, 进而靶向Smad4, Smad4的缺失将TGF- β (transforming growth factor- β)的作用从肿瘤抑制因子转变为肿瘤促进因子从而促进肝肿瘤的发生。此外, 在Zhang等人^[98]揭示了DDX5(DEAD-box protein 5)与自噬、肝癌发生之间的关系。他们首先发现肝脏中的抑癌蛋白DDX5可以诱导自噬, 其是通过与p62相互作用, 减少了p62的半衰期促进p62降解, 而这种对p62的降解作用竞争性的抑制了p62/TRAF6(TNF receptor associated factor 6)介导的mTOR K63位的泛素化和随后mTOR的激活, 从而诱导自噬的发生。接着他们通过体内与体外实验均证实DDX5显著抑制HBV相关肿瘤/肝癌细胞生长, 减少肿瘤的重量; 而干扰DDX5结果相反。故作者证实了DDX5促进自噬从而抑制HBV相关肝肿瘤生成。有趣的是, 在2016年Zhang等人^[99]已经揭示了DDX5在HBx表达细胞, HBx/c-Myc小鼠肝肿瘤和HBV相关HCC患者组织中都是低表达的。那么我们想知道的是HBV/HBx是否可以通过抑制DDX5而抑制自噬反应促进肝癌发生呢? 另外, 作者还证实miR-17-5p下调DDX5而抑制自噬促进肝肿瘤的发生。然而在2013年, Jung等人^[100]发现HBV能促进miR-17-5p的表达, 这种促进作用可能是依赖于转录因子c-Myc的功能的。那么我们感兴趣的是HBV是否能诱导miR-17-5p的表达而靶向DDX5进而抑制自噬促进肝肿瘤的发生。这些有趣的问题相信很快会被解决。总之, 目前已经在逐渐揭示在自噬抑制的情况下miRNA如何参与调控HBV诱导肝癌发生的相关机制。

然而, 迄今为止, HBV从感染初期的促进自噬到感染后期的抑制自噬是如何转变的, 具体分子机制仍不清楚。

3.2 自噬促进肝癌发展

随着研究的继续, 令人惊讶的是, Sun等人^[101]报道在恶性转化的阶段和肿瘤进展阶段, 自噬介导的功能也是不一样的。作者通过大鼠肝癌模型证实在癌前病变的阶段, 自噬的抑制引起的ROS的上调促进了肝细胞的增殖、DNA损伤和炎性细胞因子的表达, 并最终加速了肝癌的发生过程。而一旦肿瘤形成后, 细胞内的微环境发生明显的变化, 肿瘤细胞的代谢水平大大加强。实体肿瘤中最突出的特征是缺氧诱导的氧化应激, 这是由于肿瘤在生长过程中所经历的血液供应不足。在缺氧条件下, 细胞会通过调节代谢以产生能量来克服, 多项研究表明细胞会诱导自噬降解生物大分子或

细胞器来产生氨基酸, 脂质等代谢产物为糖酵解, 三羧酸循环等提供充足的底物进而为细胞供能。故自噬在肝癌形成后期需要再度被激活以维持肿瘤细胞的高水平代谢。综上所述, 这项以大鼠肝癌模型进行的研究提示自噬通过保护正常细胞的稳定性抑制恶性转化阶段的肝癌发生, 并通过支持肿瘤细胞的生长促进肿瘤发展期的肝癌发展。总之, 自噬在肝癌的发生发展过程中始终起着保护者的作用^[101,102]。虽然这项研究仅仅只是在大鼠模型上的研究, 但是作者这个模型可以为我们理解自噬如何影响肝癌的发展提供一个新的视角, 为今后科学家们在更为有优势的HBV感染原代肝细胞、转HBV基因小鼠、HepRG、HepG2-NTCP(sodium taurocholate cotransporting polypeptide)等模型中进行研究提供了有力的数据支撑, 并将有助于加速自噬相关抗癌治疗的临床应用。

此外, 对于在肝癌形成后需要再度激活自噬以促肿瘤发展还有另外4个解释: (1) 自噬有助于使肿瘤细胞对放化疗诱导的细胞死亡不敏感; (2) 自噬反应通常通过降低肿瘤对细胞固有刺激和微环境刺激的敏感性来支持肿瘤的生长和发展, 而这些刺激通常会促进肿瘤的死亡, 特别是在所谓的上皮细胞间充质转换过程中; (3) 自噬可维持治疗后进入休眠或衰老状态的癌细胞的存活; (4) 自噬有助于维持肿瘤干细胞的活性^[5,103,104]。

目前还没有报道关于自噬对HBV感染相关的肝癌发展调控的研究。并且HBV感染机体的自噬反应的动态过程, 抑制与再激活机制仍在不断研究, 目前研究只能表明: 在HBV诱导的肝癌发生发展中自噬扮演的角色依赖于肿瘤发展的阶段和肝脏疾病的进程。

4 总结与展望

肝癌是继肺癌和胃癌之后死亡率第三大的疾病, 而HBV作为引发肝癌的首要因素之一, 故我们对于HBV致癌机制的研究刻不容缓。

自噬在20世纪70年代后得到广泛的关注, 众多的自噬相关蛋白(ATGs)已被证实, 而更多其他参与的宿

主因子有待未来进一步探索。自噬被越来越多的报道表明与HBV感染肝细胞后引发的一系列肝脏病变密切相关。HBV感染逐步引发肝脏病变的每一个阶段都受到自噬与宿主间分子相互作用的调控, 因此研究与HBV引发的肝脏疾病相关的自噬调控机制和其他胞内调控因子有助于将来为治疗HBV感染提供新的策略。通过了解HBV感染引起肝脏病变的各个阶段的自噬功能, 为未来考虑自噬相关治疗提供理论基础。

首先, 总结了HBV感染初期编码的蛋白和宿主因子如何在自噬反应的各个阶段来影响自噬, 并且利用自噬促进自身的复制, 以形成稳定感染。尽管HBV和宿主因子如何调节自噬小体的延伸和自噬溶酶体的形成阶段以利于自身复制的机制迄今为止不是很清楚, 相信未来这将成为研究者们研究热点。随之, 总结了HBV慢性感染阶段, 自噬与炎症反应如何相互调节以维持HBV稳定感染或形成慢性肝损伤。最后总结了HBV感染后期(恶性转变时期)即肿瘤形成前期, 自噬的抑制如何促进肿瘤形成。尽管对于在这个阶段HBV如何由之前的诱导自噬转变为抑制自噬的具体分子机制目前并不清楚, 相信未来将会很快被阐明。而在HBV感染末期即肿瘤发展期, 自噬又再度被激活以促进肿瘤发展, 目前还鲜有相关分子机制的研究报道。我们可以知道的是这可能是自噬反应为癌细胞供能, 增强癌细胞对放化疗的敏感性, 降低癌细胞对环境的敏感性及加强肿瘤干细胞的活性等而促进肿瘤发展的。

本文综述了自噬在HBV感染、慢性感染和肿瘤发生发展中的重要作用, 使我们了解到自噬在肿瘤的发生发展中既可以作为促进剂又作为抑制剂。HBV引发的肝癌是一个多步骤的过程, 而自噬在每一步骤中都具有作用, 但是具体功能, 特别是详细机制仍有许多未知。探索HBV与自噬之间的相互作用将是未来评估HBV病人的感染阶段及HCC病人的肿瘤形成阶段的关键指标之一, 阐明自噬应对于HBV感染的不同阶段做出不同的应答, 将为今后自噬相关治疗提供重要的理论依据。

参考文献

- Urban S, Schulze A, Dandri M, et al. The replication cycle of hepatitis B virus. *J Hepatol*, 2010, 52: 282–284
- Liu B, Wen X, Huang C, et al. Unraveling the complexity of hepatitis B virus: From molecular understanding to therapeutic strategy in 50 years. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45: 1987–1996
- Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451: 1069–1075
- Green D R, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*, 2011, 333:

1109–1112

- 5 Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 2010, 40: 280–293
- 6 Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell*, 2011, 147: 728–741
- 7 Malhi H, Gores G J. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology*, 2008, 134: 1641–1654
- 8 Sakai Y, Oku M, van der Klei I J, et al. Pexophagy: Autophagic degradation of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763: 1767–1775
- 9 Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev*, 2007, 21: 1367–1381
- 10 Takamura A, Komatsu M, Hara T, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev*, 2011, 25: 795–800
- 11 Reinke P, David H, Uerlings I, et al. Pathology of hepatic peroxisomes in chronic hepatitis B and immunosuppression. *Exp Pathol*, 1988, 34: 71–77
- 12 Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of ATG proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 27: 107–132
- 13 Ericsson J L E. Studies on induced cellular autophagy. *Exp Cell Res*, 1969, 56: 393–405
- 14 Dunn W A. Studies on the mechanisms of autophagy: Formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol*, 1990, 110: 1923–1933
- 15 Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, et al. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol*, 2010, 12: 747–757
- 16 Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, et al. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 1433–1437
- 17 Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 2013, 495: 389–393
- 18 Yen W L, Shintani T, Nair U, et al. The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. *J Cell Biol*, 2010, 188: 101–114
- 19 Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of ULK1. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 132–141
- 20 Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-ATG13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 2009, 20: 1981–1991
- 21 Liang C, Lee J, Inn K S, et al. Beclin-1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol*, 2008, 10: 776–787
- 22 Fujita N, Itoh T, Omori H, et al. The ATG16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell*, 2008, 19: 2092–2100
- 23 Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, 2012, 151: 1256–1269
- 24 Mihaylova M M, Shaw R J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 1016–1023
- 25 Laplante M, Sabatini D M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 2012, 149: 274–293
- 26 Roach P J. AMPK → ULK1 → autophagy. *Mol Cell Biol*, 2011, 31: 3082–3084
- 27 Inoki K, Zhu T, Guan K L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 2003, 115: 577–590
- 28 Xie N, Yuan K, Zhou L, et al. PRKAA/AMPK restricts HBV replication through promotion of autophagic degradation. *Autophagy*, 2016, 12: 1507–1520
- 29 Lin Y, Deng W, Pang J, et al. The microRNA-99 family modulates hepatitis B virus replication by promoting IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR/ULK1 signaling-induced autophagy. *Cell Microbiol*, 2017, 19: e12709
- 30 Bagga S, Rawat S, Ajenjo M, et al. Hepatitis B virus (HBV) X protein-mediated regulation of hepatocyte metabolic pathways affects viral replication. *Virology*, 2016, 498: 9–22
- 31 Yen C J, Lin Y J, Yen C S, et al. Hepatitis B virus x protein upregulates mTOR signaling through IKK beta to increase cell proliferation and VEGF production in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2012, 7: e41931
- 32 Wang P, Guo Q S, Wang Z W, et al. HBx induces HepG-2 cells autophagy through PI3K/Akt-mTOR pathway. *Mol Cell Biochem*, 2013, 372: 161–168
- 33 Zhu M, Guo J, Li W, et al. Hepatitis B virus X protein induces expression of alpha-fetoprotein and activates PI3K/mTOR signaling pathway in liver cells. *Oncotarget*, 2015, 6: 12196–12208
- 34 Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bel-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 2005, 122: 927–939
- 35 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. *Hepatology*, 2009, 49: 60–71
- 36 Sir D, Tian Y, Chen W L, et al. The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. *Proc Natl*

- Acad Sci USA*, 2010, 107: 4383–4388
- 37 Zhang H T, Chen G G, Hu B G, et al. Hepatitis B virus X protein induces autophagy *via* activating death-associated protein kinase. *J Viral Hepat*, 2014, 21: 642–649
 - 38 Zhong L, Shu W, Dai W, et al. Reactive oxygen species-mediated c-Jun NH2-terminal kinase activation contributes to hepatitis B virus X protein-induced autophagy via regulation of the Beclin-1/Bcl-2 interaction. *J Virol*, 2017, 91: e00001
 - 39 Wang J, Chen J, Liu Y, et al. Hepatitis B virus induces autophagy to promote its replication by the axis of miR-192-3p-XIAP through NF Kappa B signaling. *Hepatology*, 2019, 69: 974–992
 - 40 Li J, Liu Y, Wang Z, et al. Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. *J Virol*, 2011, 85: 6319–6333
 - 41 Song S, Tan J, Miao Y, et al. Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery. *J Cell Physiol*, 2018, 233: 3867–3874
 - 42 Margariti A, Li H, Chen T, et al. *XBPI* mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through *Beclin-1* transcriptional activation. *J Biol Chem*, 2013, 288: 859–872
 - 43 Kang X, Yang W, Feng D, et al. Cartilage-specific autophagy deficiency promotes ER stress and impairs chondrogenesis in PERK-ATF4-CHOP-dependent manner. *J Bone Miner Res*, 2017, 32: 2128–2141
 - 44 Hirsch I, Weiwad M, Prell E, et al. ERp29 deficiency affects sensitivity to apoptosis via impairment of the ATF6-CHOP pathway of stress response. *Apoptosis*, 2014, 19: 801–815
 - 45 Eletto D, Dersh D, Argon Y. GRP94 in ER quality control and stress responses. *Sem Cell Devel Biol*, 2010, 21: 479–485
 - 46 Döring T, Prange R. Rab33B and its autophagic ATG5/12/16L1 effector assist in hepatitis B virus naked capsid formation and release. *Cell Microbiol*, 2015, 17: 747–764
 - 47 Döring T, Zeyen L, Bartusch C, et al. Hepatitis B virus subverts the autophagy elongation complex ATG5-12/16L1 and does not require ATG8/LC3 lipidation for viral maturation. *J Virol*, 2018, 92: e01513–17
 - 48 Liu B, Fang M, Hu Y, et al. Hepatitis B virus x protein inhibits autophagic degradation by impairing lysosomal maturation. *Autophagy*, 2014, 10: 416–430
 - 49 Watanabe T, Sorensen E M, Naito A, et al. Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 10205–10210
 - 50 Inoue J, Krueger E W, Chen J, et al. HBV secretion is regulated through the activation of endocytic and autophagic compartments mediated by Rab7 stimulation. *J Cell Sci*, 2015, 128: 1696–1706
 - 51 Lin Y, Wu C, Wang X, et al. Hepatitis B virus is degraded by autophagosome-lysosome fusion mediated by Rab7 and related components. *Protein Cell*, 2019, 10: 60–66
 - 52 Lin Y, Wu C, Wang X, et al. Synaptosomal-associated protein 29 is required for the autophagic degradation of hepatitis B virus. *Faseb J*, 2019, 33: 6023–6034
 - 53 Hanson P I, Cashikar A. Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012, 28: 337–362
 - 54 Prange R. Host factors involved in hepatitisB virus maturation, assembly, and egress. *Med Microbiol Immunol*, 2012, 201: 449–461
 - 55 Nosratabadi R, Alavian S M, Zare-Bidaki M, et al. Innate immunity related pathogen recognition receptors and chronic hepatitis B infection. *Mol Immunol*, 2017, 90: 64–73
 - 56 Knolle P A, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev*, 2000, 174: 21–34
 - 57 Kimura K, Kakimi K, Wieland S, et al. Activated intrahepatic antigen-presenting cells inhibit hepatitis B virus replication in the liver of transgenic mice. *J Immunol*, 2002, 169: 5188–5195
 - 58 Qiu P, Liu Y, Zhang J. Review: The role and mechanisms of macrophage autophagy in sepsis. *Inflammation*, 2019, 42: 6–19
 - 59 Levine B, Mizushima N, Virgin H W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, 2011, 469: 323–335
 - 60 Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13: 722–737
 - 61 Deretic V, Kimura T, Timmins G, et al. Immunologic manifestations of autophagy. *J Clin Invest*, 2015, 125: 75–84
 - 62 Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, et al. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol*, 2013, 59: 583–594
 - 63 Sato S, Li K, Kameyama T, et al. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity*, 2015, 42: 123–132
 - 64 Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, 303: 1532–1535
 - 65 Yang H, Biermann M H, Brauner J M, et al. New insights into neutrophil extracellular traps: Mechanisms of formation and role in inflammation. *Front Immunol*, 2016, 7: 302
 - 66 Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make nets. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5: 577–582
 - 67 Branzk N, Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating netosis in infection and disease. *Semin Immunopathol*, 2013, 35: 513–530
 - 68 Pilsczek F H, Salina D, Poon K K, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to staphylococcus

- aureus. *J Immunol*, 2010, 185: 7413–7425
- 69 Itakura A, McCarty O J T. Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 305: C348–C354
- 70 Agraz-Cibrian J M, Segura-Ortega J E, Delgado-Rizo V, et al. Alterations in neutrophil extracellular traps is associated with the degree of decompensation of liver cirrhosis. *J Infect Dev Ctries*, 2016, 10: 512–517
- 71 Hu S, Liu X, Gao Y, et al. Hepatitis B virus inhibits neutrophil extracellular trap release by modulating reactive oxygen species production and autophagy. *J Immunol*, 2019, 202: 805–815
- 72 Cheng L S, Li J, Liu Y, et al. HMGB1-induced autophagy: A new pathway to maintain treg function during chronic hepatitis B virus infection. *Clin Sci*, 2017, 131: 381–394
- 73 Li J, Wang F P, She W M, et al. Enhanced high-mobility group box 1 (HMGB1) modulates regulatory T cells (Treg)/T helper 17 (Th17) balance via toll-like receptor (TLR)-4-interleukin (IL)-6 pathway in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat*, 2014, 21: 129–140
- 74 Sun X, Tang D. HMGB1-dependent and -independent autophagy. *Autophagy*, 2014, 10: 1873–1876
- 75 Huang W, Tang Y, Li L. HMGB1, a potent proinflammatory cytokine in sepsis. *Cytokine*, 2010, 51: 119–126
- 76 Li J, Zeng C, Zheng B, et al. HMGB1-induced autophagy facilitates hepatic stellate cells activation: A new pathway in liver fibrosis. *Clin Sci*, 2018, 132: 1645–1667
- 77 Sun K, Xu L, Jing Y, et al. Autophagy-deficient Kupffer cells promote tumorigenesis by enhancing mtROS-NF- κ B-IL1 α / β -dependent inflammation and fibrosis during the preneoplastic stage of hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*, 2017, 388: 198–207
- 78 Youle R J, Narendra D P. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Molecular Cell Biol*, 2011, 12: 9–14
- 79 Shirakata Y, Koike K. Hepatitis B virus X protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential. *J Biol Chem*, 2003, 278: 22071–22078
- 80 Rahmani Z, Huh K W, Lasher R, et al. Hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential. *J Virol*, 2000, 74: 2840–2846
- 81 Kim S J, Khan M, Quan J, et al. Hepatitis B virus disrupts mitochondrial dynamics: Induces fission and mitophagy to attenuate apoptosis. *PLoS Pathog*, 2013, 9: e1003722
- 82 Chi H C, Chen S L, Lin S L, et al. Thyroid hormone protects hepatocytes from HBx-induced carcinogenesis by enhancing mitochondrial turnover. *Oncogene*, 2017, 36: 5274–5284
- 83 Gruss H J. Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. *Int J Clin Lab Res*, 1996, 26: 143–159
- 84 Kim Y, Seol D W. Trail, a mighty apoptosis inducer. *Mol Cell*, 2003, 15: 283–293
- 85 Peteranderl C, Herold S. The impact of the interferon/TNF-related apoptosis-inducing ligand signaling axis on disease progression in respiratory viral infection and beyond. *Front Immunol*, 2017, 8: 313
- 86 Thepparit C, Khakpoor A, Khongwicht S, et al. Dengue 2 infection of HepG2 liver cells results in endoplasmic reticulum stress and induction of multiple pathways of cell death. *BMC Res Notes*, 2013, 6: 372
- 87 Hung C H, Chen L W, Wang W H, et al. Regulation of autophagic activation by Rta of Epstein-Barr virus via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Virol*, 2014, 88: 12133–12145
- 88 Shin G C, Kang H S, Lee A R, et al. Hepatitis B virus-triggered autophagy targets TNFRSF10B/death receptor 5 for degradation to limit TNFSF10/TRAIL response. *Autophagy*, 2016, 12: 2451–2466
- 89 Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 2006, 441: 885–889
- 90 Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 2006, 441: 880–884
- 91 Komatsu M, Waguri S, Koike M, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, 2007, 131: 1149–1163
- 92 Saitoh T, Fujita N, Jang M H, et al. Loss of the autophagy protein ATG16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature*, 2008, 456: 264–268
- 93 Nakahira K, Haspel J A, Rathinam V A K, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol*, 2011, 12: 222–230
- 94 Yazdani H O, Huang H, Tsung A. Autophagy: Dual response in the development of hepatocellular carcinoma. *Cells*, 2019, 8: 91
- 95 Qu X, Yu J, Bhagat G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the *beclin-1* autophagy gene. *J Clin Invest*, 2003, 112: 1809–1820
- 96 Ding Z B, Shi Y H, Zhou J, et al. Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma.

- [Cancer Res](#), 2008, 68: 9167–9175
- 97 Lan S H, Wu S Y, Zuchini R, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma through degradation of microRNA-224. [Hepatology](#), 2014, 59: 505–517
- 98 Zhang H, Zhang Y, Zhu X, et al. Dead box protein 5 inhibits liver tumorigenesis by stimulating autophagy via interaction with p62/SQSTM1. [Hepatology](#), 2019, 69: 1046–1063
- 99 Zhang H, Xing Z, Mani S K K, et al. RNA helicase dead box protein 5 regulates polycomb repressive complex 2/Hox transcript antisense intergenic RNA function in hepatitis B virus infection and hepatocarcinogenesis. [Hepatology](#), 2016, 64: 1033–1048
- 100 Sun K, Guo X L, Zhao Q, et al. Paradoxical role of autophagy in the dysplastic and tumor-forming stages of hepatocarcinoma development in rats. [Cell Death Dis](#), 2013, 4: e501
- 101 Jung Y J, Kim J W, Park S J, et al. c-Myc-mediated overexpression of miR-17-92 suppresses replication of hepatitis B virus in human hepatoma cells. [J Med Virol](#), 2013, 85: 969–978
- 102 Guo J Y, Chen H Y, Mathew R, et al. Activated ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. [Genes Dev](#), 2011, 25: 460–470
- 103 Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro J M, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. [EMBO J](#), 2015, 34: 856–880
- 104 Amaravadi R K, Yu D, Lum J J, et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. [J Clin Invest](#), 2007, 117: 326–336

Summary for “自噬在乙肝病毒引起的疾病中的功能”

The function of autophagy in diseases caused by hepatitis B virus

Jingwen Wang¹ & Guihong Sun^{1,2*}¹ School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China;² Hubei Province Key Laboratory of Allergy and Immunology, Wuhan 430072, China* Corresponding author, E-mail: ghsunlab@whu.edu.cn

Hepatitis B virus (HBV) belongs to the family of Hepadnaviridae and is a hepatotropic DNA virus. HBV can cause acute or chronic infection of the liver, and the chronic infection of hepatitis B virus (HBV) is a major risk factor for the development and progression of hepatocellular carcinoma (HCC). Although the wide use of popular HBV vaccines has significantly reduced the number of new HBV infections, and the treatment with antiviral drugs, such as nucleoside analogues and interferons, has also dramatically decreased the mortality of HBV-infected patients, HBV still posts great threat to the public health. According to the statistics by the World Health Organization (WHO) in 2017, there are still more than three hundred fifty million people worldwide who are infected with HBV, and approximately eight hundred eighty-seven thousand people die from HBV-related liver cirrhosis, liver cancer and other complications each year. This is mainly because the covalently closed circular HBV DNA (cccDNA) produced in the process of HBV infection, which is the bona fide transcription template for HBV RNAs, cannot be completely cleared by currently available drugs so chronic HBV infection develops in patients. Long-term low level replication of HBV from the chronic infected HBV *in vivo* causes immune and inflammatory responses, resulting in liver injury and gradual development of HCC over time. Thus, the mechanism of persistent replication and pathogenesis of HBV urgently needs to be further clarified to facilitate exploration of new therapeutic targets for developing new therapeutic drugs to prevent and treat hepatitis B infection and liver cancer.

Autophagy is a self-protective mechanism of eukaryotic cells to procedurally degrade the intracellular damaged components wrapped in biofilms, such as senescent organelles, misfolded proteins, or invasive pathogens, which not only provides energy for cell survival but also protects against the infection of pathogenic microorganisms in order to maintain the homeostasis of the intracellular environment. Thus, most bacteria and viruses develop strategies to suppress or bypass cellular autophagy to ensure their survival. However, some viruses, such as HBV, have been shown to induce autophagy and often use it for their replication. Decades of researches have shown that HBV infection can cause autophagy in the host liver cells, which is attributed to the phenomena that the proteins encoded by HBV, especially, HBs and HBx, can regulate the various stages of autophagy. Interestingly, autophagy is important for HBV amplification in host liver cells. In the early stage of infection, HBV induces autophagy to promote self-replication. Consistently, emerging evidences also indicated that autophagy was involved in the occurrence and development of liver diseases caused by HBV infection. The dysfunction of autophagy has been implicated in multiple cancers including HCC. Therefore, understanding the important roles of autophagy in the formation of HCC induced by HBV infection provides a theoretical basis for the development of new drugs for the treatment of diseases caused by HBV infection.

This article reviews the roles of HBV in different stages of autophagy development, as well as the function of autophagy in the process of liver injury and liver cancer caused by HBV, aiming to provide effective prospects for further exploration of the pathogenic mechanism of HBV infection and the screening of antiviral targets and the development of antiviral drugs against HBV infection.

autophagy, hepatitis B virus, hepatocellular carcinoma, liver fibrosis, hepatitisdoi: [10.1360/N972019-00354](https://doi.org/10.1360/N972019-00354)