

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.06.036

PI3K 与乙型肝炎病毒宫内感染的相关研究*

赵姝妤 吕楠 褚晓丹 王林 陈萱[△]

(哈尔滨医科大学附属第二医院妇产科 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 慢性乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染是全世界关注的公共卫生问题。我国是乙肝高流行区,每年约有 150 万乙肝病毒携带者分娩,近半数胎儿通过母婴垂直传播感染乙肝。由于婴幼儿期感染乙肝后形成的免疫耐受,往往成为慢性甚至终身携带者,逐渐发展为肝硬化、肝癌。近年来的研究发现,PI3-Akt 信号通路妊娠与妊娠生及或病理过程关系密切,在感染 HBV 的胎盘组织中发现 PI3K-Akt 信号通路中相关蛋白表达异常增高,且 HBxAg 干扰该通路调节凋亡功能。推断 HBxAg 通过调节 PI3K-Akt 信号通路活性影响胎盘功能,是 HBV 宫内感染的一种重要分子机制。为今后阻断 HBV 宫内感染提供新的研究方向。

关键词: 乙型肝炎病毒 HBxAg; 宫内感染; 信号通路

中图分类号: R714.7; R512.62 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)06-1145-03

PI3K Intrauterine Infection with Hepatitis B Virus*

ZHAO Shu-yu, LV Nan, ZHU Xiao-dan, WANG Lin, CHEN Xuan[△]

(Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Obstetrics and Gynecology, Harbin, Heilongjiang, 150086, China)

ABSTRACT: Chronic hepatitis B virus (Hepatitis B virus, HBV) infection is a public health problem of worldwide concern. Of high hepatitis B prevalence area, each year about 1.5 million hepatitis B virus carriers childbirth, about 80 million children may be infected through vertical transmission. Infant immune tolerance phase of infection, the infection often become chronic and even lifelong carriers, and the development of cirrhosis, liver cancer. Recent studies have found that the PI3-Akt signaling pathway pregnancy Health and pathological processes of close relationship, the study found abnormally high levels of PI3K-Akt signaling pathway protein found in the placental tissue infected with HBV, and interfere with the pathway HBxAg withered The perish function. To infer HBxAg affect placental function by regulating the activity of PI3K-Akt signaling pathway, an important molecular mechanism of HBV intrauterine infection. Provide a new direction for future blocking HBV intrauterine infection.

Key words: HBxAg; Intrauterine infection; Signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R714.7 **Document code :** A

Article ID: 1673-6273(2015)06-1145-03

全世界慢性乙型病毒性肝炎患者超过 3.5 亿人,其中通过母婴传播者占 30%^[1]。在围产期感染 HBV 者约有 90%发展成慢性乙肝病毒感染者,最终发展成肝硬化、肝癌。因此,避免围产期感染 HBV 显得尤为重要。近年来,通过剖宫产、新生儿主动及被动免疫及乙肝疫苗联合 HBIG 的应用,母婴传播的感染率已大为降低。但 HBV 宫内感染机制复杂,阻断 HBV 宫内传播,是降低宫内感染率的重要环节^[15]。

1 HBV 宫内感染的原因

胎盘是母体和胎儿物质交换的桥梁,其虽然是新生儿与母体的物理屏障,但也间接构成了胎儿宫内感染的通道。胎盘屏障是由绒毛毛细血管壁、绒毛间质和绒毛表面滋养层细胞构成。

宫内感染的原因包括:①胎盘细胞滋养层细胞感染。闫永平等研究发现^[4]在胎盘屏障中,HBV 感染率从母体面的绒毛滋养层细胞,至绒毛间质细胞,再到胎儿面的绒毛毛细血管内皮

细胞逐渐降低。因此,HBV 在胎盘屏障中的感染由母体靠近胎儿面蜕膜细胞、绒毛滋养层细胞、绒毛间质细胞、绒毛毛细血管内皮细胞的相对危险度随之增大。胎盘屏障的第一层细胞是滋养层细胞,母体血中的 HBV 首先感染与母体血液直接接触的滋养层细胞,通过逐层间的“细胞转移”,最终达到胎儿的血液循环,才有可能感染胎儿。胎盘细胞表面存在固有的 Fcγ R 受体,HBsAg-抗 HBs 抗体复合物通过此受体跨膜转移,将 HBsAg 带入细胞内,继而感染胎儿。实验结果^[9]表明 HBsAg 和 HBeAg 主要位于受感染胎盘细胞的胞浆内,而 HBcAg 和 HBV-DNA 主要位于细胞核内,进一步证明 HBV 可进入胎盘的细胞内,并在其中复制和表达,越是靠近胎儿面的胎盘组织感染 HBV,发生胎儿宫内感染的可能性越大。②血源性感染(胎盘渗漏学说),胎盘组织的轻微损坏比如子宫收缩,造成胎盘屏障的破坏,使具有高浓度 HBV-DNA 的母血进入胎儿循环,感染胎儿。③免疫细胞传播(外周血单个核细胞, PBMC),PBMC 是 HBV 转录和翻译的重要细胞之一。孕期应用高效价

* 基金项目:黑龙江省教育厅海外学人项目(1153h14)

作者简介:赵姝妤(1985-),女,硕士,主要研究方向:围生期宫内感染,E-mail:susie0527@163.com

△ 通讯作者:陈萱,妇产科主任,研究生导师,E-mail:chenxuan1021@126.com

(收稿日期:2014-06-06 接受日期:2014-06-30)

的 HBIG,能有效降低母血 HBV-DNA 载量,控制新生儿感染 HBV,但对 PMBC 感染者无效。有研究发现无其他因素的宫内感染时,仅表现为新生儿 PBMC 病毒感染。对人类免疫缺陷病毒宫内感染的研究发现^[7]病毒可感染 Hofbauer 细胞和滋养细胞从而引起胎儿感染。④免疫细胞因子失调,有学者发现人类白细胞抗原 HLA-DR3 和 HLA-DR51 可能是宫内感染的易感型。孕妇细胞免疫功能紊乱导致 Th1 型细胞因子 IFN-1、IL-12 水平下降,而 Th 型细胞因子 IL-6 水平上升,IFN-7、IL-12 抗病毒作用减弱,不利于孕妇体内 HBV 的清除,易导致胎儿宫内感染。⑤产道逆行感染,HBsAg 阳性孕妇的阴道分泌物中 HBV-DNA 呈阳性,且母体阴道分泌物中 HBV 高复制状态与宫内感染率高低密切相关,推测 HBV 感染可能通过直接蔓延感染胎盘细胞,或者羊水,进而感染胎儿。

实验证实^[2],HBV 感染的胎盘有合体滋养细胞结节增多,及绒毛膜羊膜炎改变,胎儿感染组具有绒毛纤维样坏死灶增多、绒毛血管充血扩张或增生、中性粒细胞和淋巴细胞浸润、绒毛水肿等病理改变。而正常对照组孕妇的胎盘组织很少出现以上病理改变。白茵^[3]等研究发现 HBV 可以感染体外培养的滋养层细胞,HBV 感染可以诱导滋养层细胞产生凋亡,从而推测胎盘的滋养细胞凋亡可能是胎盘的一种保护性机制。

2 PI3K 信号传导通路的概述

3-磷酸肌醇激酶(PI3K)是 1984 年由 Sugimoto 和 Macara 等发现的一种胞内磷脂酰肌醇激酶,家族成员属于原癌基因,与 v-src 和 v-ras 等癌基因的产物相关,是肌醇与磷脂酰肌醇的重要激酶。正常情况下 PI3K 活化可以特异地使肌醇环上的 3 位羟基磷酸化而产生的类脂产物,有 3,4-二磷酸磷脂酰肌醇(PI-3,4-P2)、3,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PI-3,5-P2)和 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PI-3,4,5-P3)。PI(3,4,5)P3 作为细胞内的第二信使,蛋白激酶 B(Akt)是 PI3K 下游直接的靶蛋白。激活的 Akt 通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白 Bad、Caspase9、NF- κ B、mTOR、Par-4、P21 等,介导胰岛素受体、PDGF、EGFR、凝血酶、IGF-1 等,调控参与细胞的增殖、凋亡的相关蛋白,是重要的抗细胞凋亡因子,在细胞凋亡过程中起到重要作用。实验证实多种肿瘤组织及细胞中,如乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌等妇科肿瘤、骨与软组织肿瘤、胃癌、结直肠癌等消化道肿瘤中 PI3K 及 AKT 的表达及活性明显增高^[18]。

3 PI3K 介导信号通路与妊娠的关系

妊娠早期的绒毛外滋养细胞侵入母体蜕膜间质和血管,从而使胎盘正常形成和维持妊娠过程,经典的研究认为其与恶性肿瘤细胞有很多的相似特征,如高度增殖,缺乏细胞间的接触抑制,能够迁移、侵蚀以及逃避免疫系统攻击^[9]。表皮生长因子 EGF 及受体 EGFR 表达于滋养层细胞。PI3K 是生长因子激活的受体酪氨酸激酶和/或 G 蛋白受体重要的下游信号分子^[5],多种生长因子可通过活化 PI3K 可进一步激活蛋白激酶 Akt,磷酸化大量靶蛋白,从而促进细胞的增殖、分化、迁移和侵蚀。妊娠早期的绒毛外滋养细胞的增殖、侵蚀和凋亡可能与 EGF 相关,但是其中作用机制并不明确^[9]。赵茵等^[9]研究发现 EGF 通过自分泌旁分泌环,激活 PI3K/Akt 通路,促进滋养细胞增

殖、抑制凋亡,如果该通路受到抑制,可能造成胎盘形成异常而发生病理性妊娠,如流产、子痫前期,如此通路被异常活化则可能引起滋养细胞疾病的发生。

妊娠期糖尿病的主要病理生理机制为妊娠期胰岛素抵抗(IR)增加。引起 IR 的主要原因为胰岛素信号转导受阻或减弱^[7]。胰岛素与细胞膜胰岛素受体结合后刺激细胞内 PI3K/Akt 信号通路,介导细胞外葡萄糖进入细胞内。研究表明,在 IR 状态,胰岛素对 PI3K/Akt 信号转导途径引起的作用下降,其可能是妊娠期 IR 的分子机制。肥胖的妊娠期糖尿病患者胎盘组织中 PI3K 的表达和活性降低。这与胰岛素信号无法通过 PI3K/Akt 信号通路调节葡萄糖的代谢,导致体内葡萄糖代谢障碍密切相关。IR 也可引起胎盘血管病变和结构变化,如并发妊娠期高血压疾病等将加重血管病变,进一步导致胎儿生长受限。

4 HBxAg-PI3K-Akt 信号通路与 HBV 宫内感染的关系

乙型肝炎病毒 X 基因所编码 X 蛋白是一个约 17kDa 的小分子蛋白,HBx 蛋白主要定位于细胞质,少量存在于细胞核中,在宿主细胞内功能复杂多样,其中,HBxAg 通过反式激活作用,可以促进 HBV 的复制及相关蛋白表达^[20]。现实验表明 HBxAg 可通过多种途径激活 PI3K-AKT 信号转导通路。在对肝细胞的体外研究中发现^[8],HBxAg 激活 PI3K-pAKT 信号通路可抑制肝细胞凋亡,促进肝细胞无序增殖,而引起细胞癌变。PI3K 家族作为信号转导通路的中间环节,通过磷酸化作用,激活其下游效应分子,参与调解细胞增殖、凋亡。Lee^[9]等的实验发现,在 HBV 感染的肝细胞中检测到 AKt 的含量比正常的肝细胞的含量增加数倍,通过使用 PI3K 化学抑制剂(渥曼青霉素),抑制其磷酸化作用后,不仅可以促进表达 HBx 蛋白的肝脏细胞凋亡,也可以加速正常的肝脏细胞死亡,证明 HBx 蛋白首先与 PI3K 相应转录区重叠,上调其磷酸化活性,从而调控 PI3K-Akt 信号通路,导致抑癌基因 P53 表达降低,抑制肝细胞凋亡发生癌变。

Sun 等^[10]通过体外实验对 HBV 感染的胎盘滋养层细胞与正常滋养层细胞进行了对照分析,结果显示 HBV 感染的滋养层细胞凋亡率明显高于正常对照,并且对凋亡率的影响与 HBV 滴度存在剂量依赖性,当 HBx 蛋白表达量明显增加时,细胞凋亡数增多,推断 HBV 在体内感染后,出现的胎盘滋养层细胞凋亡可能是胎盘屏障防治 HBV 宫内感染的保护性机制,但由于 HBxAg 对 PI3K-Akt 信号通路的影响,感染 HBV 的滋养层细胞凋亡减少,导致宫内感染。

白涵的研究小组^[3,11,12]针对 HBV 感宫内染与人滋养层细胞 HBV 感染和凋亡进行了一系列的研究,通过多种实验方法检测 HBV 感染后的人绒毛膜滋养层组织、体外培养的人滋养层细胞系的细胞形态变化、HBV 相关标志物,以及细胞凋亡情况。实验结果均表明:HBV 在体内外都可以感染滋养层细胞,并导致细胞凋亡增多,推断滋养层细胞凋亡为胎盘屏障阻断 HBV 宫内传播的保护性机制。

白桂芹等^[13]在对 HBV 感染胎盘的分子机制研究中,采用抑制性消减杂交技术,筛选出胎盘中特异性表达基因后构建 cDNA 消减文库,结果显示 HBV 感染胎盘组织中 PI3K 表达明

显高于对照。在前期实验基础上,白桂芹的小组进一步^[14]研究了高滴度 HBV 阳性血清(复制水平 $>10^7$ copy/ml)感染后的人绒毛滋养层细胞系 JEG-3, 通过 RT-PCR 及 Western blot 方法分别检测细胞内 HBx-mRNA 水平和 HBxAg 的表达;IMMS 方法检测细胞内 HBxAg 及 PI3K 的表达;及 FCM 方法检测 pAKT 表达情况。结果在细胞内检测到 HBx-mRNA 及 HBxAg 表达,并且细胞内 PI3K 及 pAKT 表达明显增高。与其他研究小组对 HBV 感染肝脏组织及胎盘组织的实验结果相吻合。

由此,我们有充足的理由推断:HBxAg 是通过调节 HBx-Ag-PI3K-AKT 信号通路,从而抑制感染 HBV 病毒的滋养层细胞凋亡,导致病毒感染细胞不被自身免疫及药物清除;同时 HBxAg 的表达使 HBV DNA 活性及 HBV 相关蛋白表达增加。随着机体 HBV-DNA 浓度及 HBV 相关蛋白表达增加,导致 PI3K 活性上调,进一步加强该信号通路对滋养层细胞凋亡的抑制作用。

参考文献(References)

- [1] Yue YF, Jiang H, Shi L, et al. Study on the mechanism of intrauterine infection of hepatitis B virus [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2004, 39(4): 224-226
- [2] Koumbi LJ, Papadopoulos NG, Anastasiadou V, et al. Dendritic cells in uninfected infants born to hepatitis B virus-positive mothers [J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(7): 1079-1085
- [3] Bai H, Zhang L, Ma L, et al. Relationship of hepatitis B virus infection of placental barrier and hepatitis B virus intra-uterine transmission mechanism[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(26): 3625-3630
- [4] Reddick KL, Jhaveri R, Gandhi M, et al. Pregnancy outcomes associated with viral hepatitis[J]. Viral Hepat, 2011, 18(7): e394-398
- [5] Xia S, Zhao Y, Yu S, et al. Activated PI3K/Akt/COX-2 pathway induces resistance to radiation in human cervical cancer He-La cells [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2010, 25(3): 317-323
- [6] Zhao Y, Xia S. PI3K/Akt pathway in the regulation mechanism of trophoblastic proliferation[J]. China Birth Health and Heredity, 2011, 19(10): 72-74
- [7] Del Rincon JP, Iida K, Gaylinn BD, et al. Growth hormone regulation of p85alpha expression and phosphoinositide 3-kinase activity in adipose tissue: mechanism for growth hormone-mediated insulin resistance[J]. Diabetes, 2007, 56: 1638-1646
- [8] Song G, Ouyang G L, Bao S D. The activation of Akt /PKB signaling pathway and cell survival[J]. Cell Mol Med, 2005, 9(1): 59-71
- [9] Lee YI, Kang-Park S, Do SI, et al. The hepatitis B virus X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade[J]. Biol Chem, 2001, 276: 16969-16977
- [10] Sun H, Tang X, Wang B, et al. A preliminary study on the molecular evolution of the two routes of intrauterine transmission of HBV [J]. Arch Virol, 2012, 157(1): 155-164
- [11] Bai G, Fu F, Tang Y, Wang Y. Effect of hepatitis B virus infection on apoptosis of a human choriocarcinoma cell line in vitro [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2013, 39(6): 1200-1211
- [12] BAI-Han, LI-Xia, Zhang-Lin, et al. Study on relationship between HBV intrauterine transmission and apoptosis and HBV infection of trophoblastic cells [J]. China Birth Health and Heredity, 2008, 18(1): 35-39
- [13] Bai GQ, Yue YF, Zhang SL, et al. Screening of differentially expressed genes in placentas with hepatitis B virus infection by suppression subtractive hybridization technique[J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2007, 42(2): 76-78
- [14] Bai G, Wang Y, Zhang L, et al. The study on the role of hepatitis B virus X protein and apoptosis in HBV intrauterine infection [J]. Arch Gynecol Obstet, 2012, 285(4): 943-949
- [15] Li F, Wang X, Men K, et al. Receptivity of human choriocarcinoma JEGIII cells and isolated trophoblast cells to hepatitis B virus infection and enhancement by tumor necrosis factor alpha [J]. Jpn J Infect Dis, 2007, 60(4): 167-172
- [16] Xu YY, Yu JY, Zhong YW, et al. Association between the frequency of class II HLA antigens and the susceptibility to intrauterine infection of hepatitis B virus[J]. Int J Biol Sci, 2008, 4(2): 111-115
- [17] Zhu YY, Mao YZ, Wu WL, et al. Does hepatitis B virus prenatal transmission result in postnatal immunoprophylaxis failure? [J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(12): 1836-1841
- [18] Guo Y, Liu J, Meng L, et al. Survey of HBsAg-positive pregnant women and their infants regarding measures to prevent maternal-infantile transmission[J]. BMC Infect Dis, 2010, 15(10): 26-30
- [19] Zhang L, Zhang W, Shao C, et al. Establishment and characterization of a spontaneously immortalized trophoblast cell line (HPT-8) and its hepatitis B virus-expressing clone[J]. Hum Reprod, 2011, 26(8): 2146-2156
- [20] Ding Y, Ma L, Wang XZ, et al. In vitro study on hepatitis B virus infecting human choriocarcinoma JEG-3 cells and its mechanism[J]. Intervirology, 2011, 54(5): 276-281
- [21] Guo Z, Wei J, Feng L, et al. Study on influence factors of HBV intrauterine infection in newborns of pregnant women with HBsAg [J] 2011, 40(2): 180-183
- [22] Sun H, Tang X, Wang B, et al. A preliminary study on the molecular evolution of the two routes of intrauterine transmission of HBV [J]. Journal of Hygiene Research, 2012, 157(1): 155-164
- [23] Deng M, Zhou X, Gao S, et al. The effects of telbivudine in late pregnancy to prevent intrauterine transmission of the hepatitis B virus: a systematic review and meta-analysis. [J] Virol J, 2012, 9: 185
- [24] Yu M, Jiang Q, Gu X, et al. Correlation between vertical transmission of hepatitis B virus and the expression of HBsAg in ovarian follicles and placenta[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54246
- [25] Guo Z, Shi XH, Feng YL, et al. Risk factors of HBV intrauterine transmission among HBsAg-positive pregnant women[J]. Viral Hepat, 2013, 20(5): 317-321