doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.04.019

慢性乙型肝炎病毒感染病毒复制与肝细胞内质网应激反应相关性的初步研究 *

李 滢[1] 何毅怀[1] 杨方万[1] 穆茂媛[2] 林世德[1△]

（1 贵州省遵义医学院附属医院感染科 贵州 遵义 563000;2 贵州省遵义医学院附属医院介入科 贵州 遵义 563000）

摘要 目的:研究体内、体外乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)复制水平与肝细胞内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ER stress)反应基因表达的相关性。**方法:**选择 7 例慢性 HBV 感染者作体内研究,用液氮冷冻保存肝脏穿刺活检组织,检测肝功能并提取 mRNA;体外研究分三组,转染组(HepG2.2.15)为 HBV 基因转染人肝癌细胞株,对照组(HepG2)为人肝癌细胞株,干预组(3TC)为 50 μg/mL 拉米夫定作用于 HBV 基因转染人肝癌细胞。分别培养 2 天、4 天、6 天后收集细胞提取 mRNA。HBV DNA 载量的测定用实时定量聚合酶链反应（PCR）；活化转录因子 4（ATF4）、转录因子 C/EBP 同源蛋白（CHOP）、活化转录因子 6（ATF6）、X 盒结合蛋白 1(XBP1)及葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)的 mRNA 表达,用 SYBR Green 荧光定量逆转录聚合酶链反应(SYBR Green RT-PCR)检测,以β-actin 为内参照;GRP78 的表达用蛋白免疫印迹法(WB)检测。**结果:**体内研究结果表明:XBP1、GRP78、CHOP 及 ATF6 基因表达水平与病毒载量、炎症程度及肝组织纤维化程度无显著相关性(P>0.05);ATF6 与 GRP78 基因表达水平和 HBV DNA 水平呈显著正相关（P<0.05)。体外研究结果表明：干预组细胞培养 2 天至 6 天 HBV DNA 水平下降,CHOP、GRP78、ATF6 及 XBP1 基因表达水平在三组之间差异无统计学意义(P>0.05);WB 结果表明,转染组细胞 GRP78 的表达培养 4 天与 6 天相比差异无统计学意义(P>0.05),干预组培养 6 天后与转染组比较差异无统计学意义(P>0.05)。**结论:**研究结果提示体内 HBV 复制水平与肝细胞 ER stress 反应显著相关，而肝脏炎症程度及肝脏纤维化程度等与 ER stress 反应无明显相关性;体外三组细胞之间 ER stress 基因的表达无显著差异(P>0.05)。

关键词:乙型肝炎病毒;内质网应激;HepG2.2.15 细胞;拉米夫定

中图分类号:R512.62 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)04-690-06

A Preliminary Study on the Correlation between the Replication of Hepatitis B Virus and Endoplasmic Reticulum Stress of Hepatocytes*

LI Ying[1], HE Yi-huai[1], YANG Fang-wan[1], MU Mao-yuan[2], LIN Shi-de[1△]

(1 Infectious Department, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou, 563000, China;

2 Interventional department, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou, 563000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the possible correlation between hepatitis B virus (HBV) replication level and the related genes expression of hepatocyte endoplasmic reticulum stress (ER stress) in vivo and in vitro. **Methods:** 7 patients with chronic hepatitis B (CHB) were collected as vivo study. Liver biopsies were carried out and a fragment of liver tissue was immediately frozen in liquid, liver functions were tested and mRNA was extracted. Vitro study was divided as 3 groups, HBV genome transfected human hepatoma carcinoma cells were used as transfection group (HepG2.2.15), human hepatoma HepG2 cells were used as control group (HepG2), HBV genome transfected human hepatoma carcinoma cells were cultured with 50 μg/mL lamivudine were used as interference group (3TC). The cells were collected to extract the mRNA after cultured for 2 d, 4 d and 6 d HBVDNA levels were determined by the method of real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR), the expressions of activating transcription factor 4 (ATF4), C/EBP-homologous protein (CHOP), activating transcription factor 6 (ATF6), X box-binding protein 1 (XBP1) and glucose regulated protein 78 (GRP78) were investigated by the method of SYBR Green real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, β-actin was choosed as inner reference. The expression of GRP78 was determined by the method of western-blotting (WB). **Results:** The results in vivo study suggested that XBP1, GRP78, ATF6 and CHOP mRNA with HBV DAN load, intensity of liver inflammation and degree of liver fibrosis showed no significant correlations (P>0.05), while significantly positive correlations were found between GRP78 mRNA, ATF6 mRNA with HBV DNA levels (P<0.05). The result in vitro study suggested that HBV DNA levels in interference group decreased from 2 d to 6 d and no significant differences were found in the expressions of CHOP, GRP78, ATF6 and XBP1 mRNA among the there groups (P>0.05). The WB results suggested that GRP78 expression in transfection group increased from 4 d to 6 d but not significant and no significant

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81160067/H0318)

作者简介:李滢(1980-),硕士研究生,主治医师,研究方向:肝衰竭的发病机制及诊疗,电话:13708528616,E-mail:liyingzmc@163.com

△通讯作者:林世德,硕士研究生导师,教授,研究方向:肝衰竭的发病机制及诊疗,电话:13885254802,E-mail:linshide6@hotmail.com

(收稿日期:2018-06-06 接受日期:2018-06-30)

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

differences were found in interference group and transfection group at 6 d (P>0.05). **Conclusions:** The results suggested that hepatocyte ER stress is correlated with HBVDNA levels in vivo study, while intensity of liver inflammation and degree of liver fibrosis showed no significant correlations. The gene expressions of ER stress are not changed among the there groups in vitro.

Key words: Hepatitis B virus; Endoplasmic reticulum stress; HepG2.2.15 cells; Lamivudine

Chinese Library Classifcation(CLC): R512.62 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2019)04-690-06

前言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染导致肝细胞受损的机理尚不明确，且 HBV 感染者肝损伤与病毒复制的关联和机制也不清楚[1],但 HBV 自身的复制不会引起肝细胞损伤[2,3]。活跃的 HBV DNA 复制是慢性 HBV 感染者肝脏疾病进展的主要因素，阻断或减缓 HBV 感染者疾病进展的途径是长期抑制 HBV 复制[4]。内质网是细胞内糖类、脂类、蛋白质合成、肽链折叠、修饰的重要场所,除此之外还具有钙的贮存与释放,钙离子浓度调节等功能[5]。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ER stress）是指某些生理病变导致细胞内质网的稳态被破坏，使得钙代谢紊乱、腔内错误折叠或未折叠蛋白聚集[6,7]。钙离子浓度的改变会引起 ER stress,激活 ER stress 反应和未折叠蛋白反应(UPR),但当 ER stress 长时间持续时,内质网稳态无法及时恢复,UPR 会激活细胞凋亡信号[8-10]。已有的研究结果显示，病毒性肝炎[11,12]、酒精性肝病[13]、药物性肝炎[14]、酒精性脂肪肝等[15]的发病机制均与肝细胞 ER stress 有关[16,17]。

体外研究发现肝细胞 ER stress 反应由 HBV 及其抗原成分诱导[18-20],但体内研究较少。慢性 HBV 感染者诱导肝细胞 ER stress 的机制尚不清楚[21],且是否与 HBV 复制水平有关尚不清楚。为深入了解 HBV 的致病机制,本实验将从体内、体外两方面做初步研究，探讨肝细胞 ER stress 基因表达与慢性 HBV 感染病毒的复制水平的相关性。

1 实验方法

1.1 体内肝组织和体外细胞 RNA 提取

1.1.1 体内肝组织 RNA 的提取 选取在本院感染科入院的排除 EB 病毒和巨细胞病毒感染、丙、丁型肝炎、自身免疫及酒精性肝病,临床诊断为慢性 HBV 感染者,HBV DNA 持续阳性的 7 例患者为体内研究对象。进行肝脏穿刺病检,用液氮冷冻保存取出的新鲜肝组织,做好标记,统一提取肝 mRNA 具体操作如下：

（1）取液氮冷冻的 50 mg 的肝组织与研钵中研磨成粉,加入 1000 μL 的 RNAiso Plus 将组织覆盖,继续研磨至裂解液透明；

（2)将上述匀浆液转移至 1.5 mL 离心管,室温静置 5 min 后在 12000 rpm 4 ℃ 下离心 5 min 后，吸取上清液于新离心管中加入 200 μL 氯仿,剧烈震荡 15 s 后室温下 5 min 后在 12000 rpm 4 ℃ 下离心 15 min；

（3）取上层的无色上清液于离心管中加入等体积的异丙酮，混匀后在 15-30℃ 静置 10 min 后在 12000 rpm 4 ℃ 下离心 10 min 后弃去上清,加入 1 mL 75%的乙醇后在 12000 rpm 4 ℃ 下离心 5 min,弃去乙醇。室温下干燥 10 min 后,加入 50 μL 的 RNase-free 水溶解沉淀,待完全溶解后于 -80℃ 保存。

1.1.2 体外细胞 RNA 提取 体外研究分三组，转染组(HepG2.2.15）为 HBV 基因转染人肝癌细胞株，对照组(HepG2)为人肝癌细胞株,干预组(3TC)为 50 μg /mL 拉米夫定 (3TC)作用于 HepG2.2.15 细胞。当细胞生长铺展面积占瓶底面积 80-90%时传代,新分离的细胞按约 1× 10^7 个 /mL 的密度，每孔 3 mL 接种于 6 孔培养板中,24 小时后待细胞生长同步化后换用 2%FEB 的 DMEM 培养基培养，同化 2 天时各取出每组第一盘分别收集三孔上清，用 1× PBS 清洗一次加入 1000 μL 的 RNAiso Plus 轻微晃动,使得细胞充分裂解,用移液枪将细胞裂解液转移至去酶 EP 管,做好标记,液氮冷冻,同时每孔收集的上清做好标记,于 -40℃ 保存。培养 4 天与 6 天时提取每组上清及细胞样本,做好标记,所有细胞 mRNA 提取方法同 1.1.1 所述方法。

1.2 体内肝组织和体外细胞 HBA DNA 检测

HBVDNA 的定量分析采用美国 Bio-Rad 公司的 C1000 Thermal CyclerPCR 仪,试剂盒由大连 TaKaRa 公司提供。

1.3 体内肝组织和体外细胞 ER stress 相关基因表达检测

用 SYBR Green 荧光定量 PCR 技术检测 ATF4、CHOP、ATF6、XBP1 及 GRP78 的 mRNA 表达。反应条件为第一步：95℃ ,3 min,第二步:95℃ ,15 s,60℃ 退火 45 s,40 个循环,第三步:55-99℃ ,80 个循环,引物合成序列见表 1。

表 1 引物 GRP78、XBP1、ATF6、ATF4、CHOP、β-actin 引物序列

Table 1 Primer Sequence of GRP78, XBP1, ATF6, ATF4, CHOP, β-actin

Gene	Primer
GRP78	F:GAACACAGTGGTGCCTACCAAGAA
	R:TCCAGTCAGATCAAATGTACCCAGA
XBP1	F:TGAGTCCGCAGCACTCAGA
	R:CTGGGTCCAAGTTGTCCAGAA
ATF6	F:TGGCAAAGCAGCAACCAATTA
	R:GCAAGGACTGGCTGAGCAGA
ATF4	F:CCAACAACAGCAAGGAGGAT
	R:GTGTCATCCAACGTGGTCAG
CHOP	F:TGGCACCCAGCACAATGAA
	R:TGCTTTCAGGTGTGGTGATGTATG
β-actin	F:TGGCACCCAGCACAATGAA
	R:CATTGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA

1.4 体外 GRP78 表达检测

蛋白提取:将细胞碎片和裂解液转移至离心管中,在 4℃ ,12000 rpm 离心 5 min,收集上清液、定量备用。

电泳、显色:采用十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶系统,

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

取蛋白样品上样，加入缓冲液接通电源在室温下恒温电泳，先以 80 V 电压至蛋白质溶液通过浓缩胶后，改为 100 V 电压持续电泳至染料到达分离胶底部，关闭电源。电泳后转移至 PVDF 膜，用 TBS 液清洗 5 min，加入封闭液室温下孵育，加入一抗 GRP78 兔抗人抗体和鼠源 Acin 抗体(1:400)，室温下 1 h，洗膜，加二抗，以 TBST 液稀释 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:2000）孵育 GRP78，HRP 标记的山羊抗鼠 IgG（1:2000）孵育 β-actin 1 h，ECL 显色 1min，对获得的条带利用全自动凝胶成像分析系统扫描，用 Image pro plus 分析灰度。

1.5 肝脏炎症、纤维化分级

所有病例进行肝脏穿刺组织活检，对获得的标本用 10%甲醛溶液固定，常规石蜡切片，HE 染色，进行肝组织炎症分级和纤维化分期[22]。

1.6 统计学分析

用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，对 ER stress 相关基因的表达与 HBVDNA 水平、肝脏纤维化等做相关性分析，多重比较采用单因素方差分析，对于独立样本采用 t 检验分析差异，P<0.05 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 体内 HBVDNA 与 ER stress 相关基因表达

2.1.1 体内肝组织 ER stress 相关基因表达水平及与 HBV DNA、ALT、AST 的相关性 表 2 为慢性乙型肝炎患者肝组织 HBVDNA、ALT、AST 结果及 ER stress 相关基因表达水平。HBVDNA 值为 6.46×10^5 时 ALT 和 AST 值最大，但随着 HBVDNA 的复制，ALT 与 AST 值未出现递增趋势，HBVDNA 值为 1.63×10^7 时 CHOP 表达水平最高，HBVDNA 值为 7.58×10^7 时 GRP78、XBP1 表达水平最高，HBV DNA 值为 7.89×10^7 时 ATF6 表达水平最高。对体内肝组织 ER stress 相关基因表达水平与 HBV DNA、ALT、AST 做相关性分析，结果表明，ATF6、GRP78 基因表达与 HBVDNA 水平呈显著正相关(P<0.05)，XBP1、CHOP 基因表达与 HBVDNA 水平无明显相关性。见表2。

表 2 体内肝组织 ER stress 相关基因表达水平及 HBVDNA、ALT、AST 结果

Table 2 Results of related genes expression level of ER stress and HBVDNA, ALT, AST in vivo

Case	HBVDNA	ALT	AST	CHOP	GRP78	XBP1	ATF6
1	4.08×10^5	167	149	6.27	0.44	1.41	3.7
2	6.46×10^5	850	475	6.48	1.36	2.94	5.39
3	1.62×10^6	51	36	6.03	1.42	2.48	5.36
4	4.64×10^6	41	28	6.91	1.66	2.69	5.29
5	1.63×10^7	171	229	7.29	1.8	2.31	5.59
6	7.58×10^7	87	38	7.12	1.84	2.89	5.62
7	7.89×10^7	202	158	6.37	1.48	2.28	5.62

表 3 体内肝组织 ER stress 相关基因表达水平与 HBVDNA、ALT、AST 的相关性

Table 3 Correlation of related genes expression level of ER stress and HBVDNA, ALT, AST in vivo

		CHOP	GRP78	XBP1	ATF6
HBVDNA	r	0.53	0.70	0.32	0.67
	P	0.11	0.04	0.24	0.05
ALT	r	0.39	0.08	-0.19	-0.11
	P	0.19	0.44	0.35	0.41
AST	r	0.38	-0.01	-0.35	-0.16
	P	0.20	0.49	0.22	0.36

2.1.2 体内肝组织 ER stress 相关基因表达水平及与不同病毒载量的差异 根据 HBVDNA 病毒载量将患者分为两组，表 4 结果表明不同病毒载量与 CHOP、GRP78、XBP1、ATF6 的基因表达变化差异无统计学意义(P>0.05)。

表 4 体内肝组织不同病毒载量 ER stress 相关基因表达水平的差异

Table 4 Differences in related genes expression level of ER stress with different HBVDAN load in vivo

	Cases	CHOP	GRP78	XBP1	ATF6
HBV DNA≥ 10^7 copies/mL	3	6.93± 0.49	1.71± 0.20	2.49± 0.34	5.62± 0.03
HBV DNA<10^7 copies/mL	4	6.42± 0.38	1.22± 0.54	2.38± 0.67	4.94± 0.82
P		0.18	0.21	0.81	0.22

2.1.3 体内肝组织 ER stress 相关基因表达水平及与炎症程度的差异 表 5 为不同肝脏炎症两组患者的 ER stress 相关基因表达结果，CHOP、GRP78、XBP1 与 ATF6 的表达水平在 1 级及以上略高于 2 级及以上，但两组之间差异无统计学意义(P>0.05)。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 5 体内肝组织不同炎症分级 ER stress 相关基因表达水平的差异

Table 5 Differences in related genes expression level of ER stress with different intensity of liver inflammation in vivo

	Cases	CHOP	GRP78	XBP1	ATF6
Level 1and below	3	6.71± 0.51	1.55± 0.22	2.51± 0.38	5.54± 0.14
Level 2 and above	4	6.58± 0.52	1.34± 0.63	2.37± 0.66	4.99± 0.87
P		0.75	0.62	0.76	0.34

2.1.4 体内肝组织 ER stress 相关基因表达水平及与肝组织纤维化程度的差异 表 6 为不同肝纤维化分期的两组患者的 ER stress 相关基因表达结果，CHOP、GRP78、XBP1 与 ATF6 的表达水平在 2 期及以下略高于 3 期及以上，但两组之间差异无统计学意义（P>0.05）。

表6 体内肝组织不同纤维化分期 ER stress 相关基因表达水平的差异

Table 6 Differences in related genes expression level of ER stress in vivo with different degree of liver fibrosis

	Cases	CHOP	GRP78	XBP1	ATF6
Stage 3 and above	2	6.59	1.05	2.05	4.50
Stage 2 and below	5	6.66	1.58	2.58	5.52
P		0.88	0.21	0.26	0.06

2.2 体外 HBVDNA 与 ER stress 相关基因表达

2.2.1 3TC 干预 HepG2.2.15 细胞对 HBV DNA 复制的影响 图 1 为转染组与干预组细胞 HBV DNA 复制结果，随着培养时间增加，干预组细胞在 50 μg/mL 拉米夫定的作用下，HBV DNA 的复制受抑制，呈现递减趋势。

2.2.2 体外 HBVDNA 复制与 ER stress 相关基因表达 转染组、对照组、干预组细胞培养 2、4、6 天后 ER stress 相关基因的表达见图 2，ATF6、XBP1、GRP78、ATF4 及 CHOP 基因的表达在各组间差异均无统计学意义（P>0.05）。

2.2.3 3TC 干预对 GRP78 表达的影响 转染组细胞培养 4 天和 6 天，干预组细胞培养 6 天后的 GRP78 表达结果如下。结果表明转染组细胞 GRP78 的表达在培养 4 天与 6 天相比差异无统计学意义（P>0.05），干预组细胞培养 6 天后与转染组比较相差无统计学意义（P>0.05）。见图 3 和表 7。

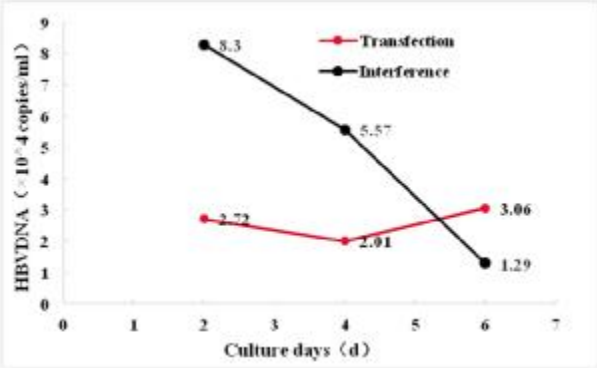

图 1 HepG2.2.15 转染组与 3TC 干预组细胞 HBVDNA

Fig. 1 HBVDNA of transfection group and interference group cells

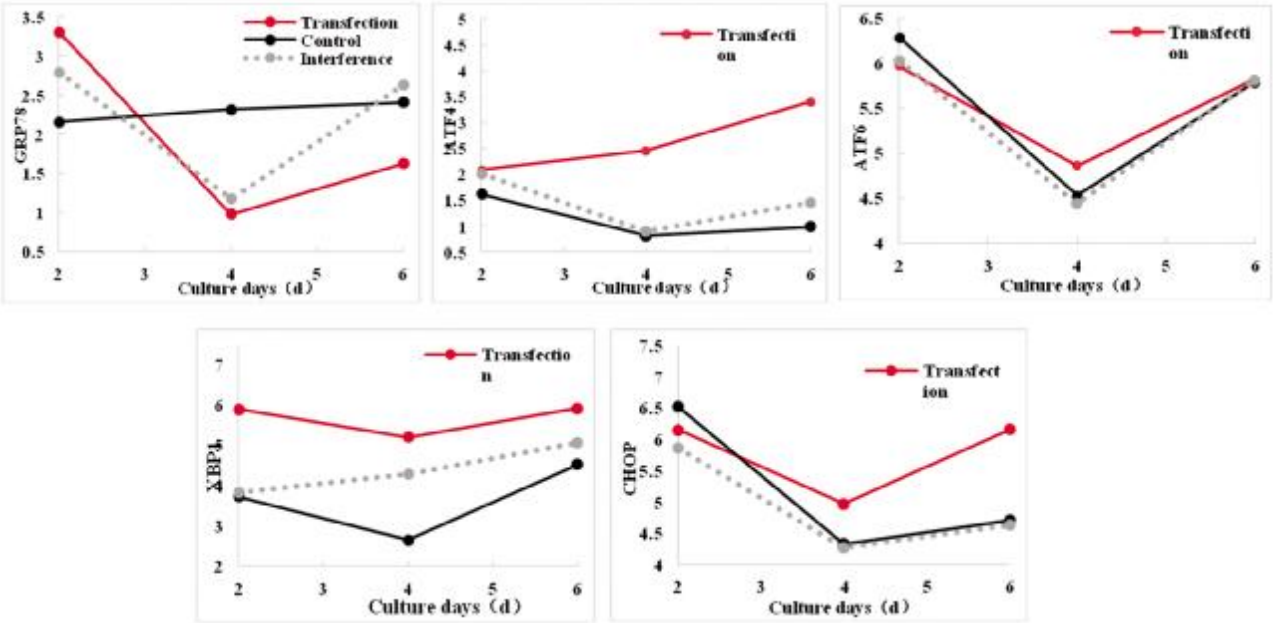

图 2 体外各细胞组 ER stress 相关基因表达水平的差异

Fig.2 Differences in related genes expression level of ER stress in vitro cells

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

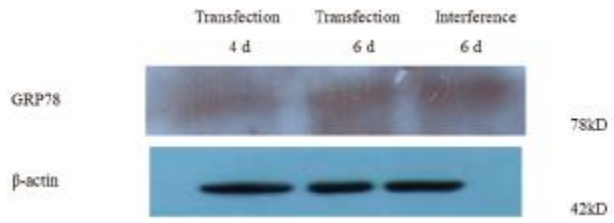

图 3 转染组细胞培养 4 天、6 天及干预组培养 6 天 GRP78 的表达结果

Fig.3 The results of GRP78 expression in interference group after the cells were cultured 6 days and in transfection group after 4 days and 6 days

表 7 转染组细胞培养 4 天、6 天及干预组培养 6 天 GRP78 条带相对光密度

Table 7 Relative optical density of GRP78 in interference group after the cells were cultured 6 days and in transfection group after 4 days and 6 days

Group	Relative optical density of GRP78
Transfection 4 d	0.94± 0.02
Transfection 6 d	1.27± 0.07
Interference 6 d	1.31± 0.10

3 讨论

体内研究结果表明,XBP1、GRP78、CHOP 及 ATF6 基因表达水平与病毒载量、炎症程度及肝组织纤维化程度无显著相关性,CHOP 及 XBP1 基因表达和 HBVDNA 水平无显著相关性(P>0.05)。仅 ATF6 与 GRP78 基因表达水平和 HBVDNA 相关,且具有统计学意义(P<0.05)。表明慢性 HBV 感染者肝细胞启动了 ER stress,与 HBV 的复制水平相关,且已有研究结果表明肝细胞 ER stress 对 HBV 复制有较大影响[23]。ER stress 对细胞代谢[16,24]、分化、增殖等细胞功能均有广泛影响[25]。Lai[9]和 Jäger 等[26]的研究结果表明 ATF6 激活后在高尔基体中被加工剪切,作为转录因子进入细胞核,能够提升细胞清除和降解折叠错误蛋白的能力,本研究发现在体内 ATF6 基因表达与 HBV 复制水平呈显著正相关,提示 ATF6 通路的激活可能与 HBV 复制有关。HBV 的表面抗原(HBSAg)主要是由大、中、小 3 种蛋白构成,前 S1、前 S2 及 S 基因编码、转录、合成了这三种蛋白。研究发现大、中、小 3 种蛋白的组成比例,与 HBV 颗粒的组装及释放和 HBsAg 的分泌等关系十分密切。当编码三种蛋白的基因变异时,使大、中、小 3 种蛋白比例改变,会导致 HBV 组装和分泌障碍,此时 HBsAg 大量在内质网腔内聚集激活 ER stress[27]。GRP78 在内质网内负责阻止新生肽聚集、调控钙稳态、启动未折叠蛋白、抗细胞凋亡等环节[10,28]。Hetz 等[27]研究发现大包膜蛋白(HBV-LP)与 ER stress 的关系最为密切,当前 S1、前 S2 基因变异时,中、小包膜蛋白急剧减少引起HBV-LP 在内质网聚集,使 HBV 颗粒组装障碍,诱导了 GRP78 表达增加。Nassal 等[23]研究结果表明 HBV-LP 激活肝细胞 ER stress 后可通过 IRE1-alpha-XBP1 通路激活 HBV 启动子,增加中、小包膜蛋白的合成以恢复细胞内大中小包膜蛋白的比例,维持 HBV 颗粒的组装。Wagner 等[29]研究发现 HBV 感染诱导 GRP78 表达,敲除 GRP78 基因后增加 HepG2 细胞内及细胞外病毒量,同时细胞培养液表面抗原及 e 抗原增加,相反增加 HepG2 细胞 GRP78 表达可抑制 HBV 复制,证明 GRP78 具有抑制 HBV 复制的作用。本研究结果中的两种 HBV 载量与 ER stress 相关基因表达差异不显著的原因存在以下几方面:体外研究选取的样本量少,HBVDNA 水平较高,样本之间相互的差异较小。后续研究应扩大样本量做深入研究。

体外研究结果表明,三组细胞培养 2、4、6 天后 ER stress 相关基因的表达在各组间差异均无统计学意义;转染组细胞培养 4 天、6 天,干预组培养 6 天后,发现 GRP78 在转染组细胞培养 6 天后的表达水平与 4 天相比有升高迹象,两组差异无统计学意义。干扰组培养 6 天后与转染组细胞比较相差无统计学意。对于拉米夫定抑制 HBV 复制后 ER stress 基因表达变化无差异原因分析如下:HBV 在正常细胞内与在肝癌细胞内诱导 ER stress 的机制存在差异;HBV 在体外和体内的复制过程可能也存在差异;本研究所选用的肝癌细胞病毒的复制水平比较低,3TC 抑制后病毒 HBVDNA 水平的变化不明显。由于本研究并未对所有的体外样本进行 HBVDNA 检测,因此还难以对体外 ER stress 相关基因表达与 HBV 复制水平的相关性做出判断。

综上所述,体内 HBV 复制水平与肝细胞 ER stress 反应显著相关,而肝脏炎症程度及肝脏纤维化程度等与 ER stress 反应无显著相关性;体外三组细胞之间 ER stress 基因的表达无显著差异。后续研究将扩大样本量深入研究二者的相关性。

参 考 文 献(References)

[1] Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009[J]. Hepatology, 2009, 50(3): 661-662

[2] Dandri M, Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection[J]. Gut, 2012, 61(Suppl_1): i6-i17

[3] Liang TJ. Hepatitis B: The virus and disease [J]. Hepatology, 2009. 49 (S5): S13-S21

[4] Fung J, Lai CL, Seto WK, et al. Nucleoside/nucleotide analogues in the treatment of chronic hepatitis B [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011, 66(12): 2715-2725

[5] Wang X, Qian X, Guo HC, et al. Heat shock protein 90-independent activation of truncated hepadnavirus reverse transcriptase [J]. Journal of virology, 2003, 77(8): 4471-4480

[6] Melegari M, Wolf SK, Schneider RJ. Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression[J]. Journal of virology, 2005, 79(15): 9810-9820

[7] Braakman I, Bulleid NJ. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum [J]. Annual review of biochemistry, 2011, 80: 71-99

[8] Kapoor A, Sanyal AJ. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response[J]. Clinics in liver disease, 2009, 13(4): 581-590

[9] Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response[J]. Physiology, 2007, 22(3): 193-201

[10] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation[J]. Science, 2011, 334(6059): 1081-1086

[11] Asselah T, Bièche I, Mansouri A, et al. In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C[J]. The Journal of pathology, 2010, 221(3): 264-274

[12] Birkenfeld AL, Lee HY, Majumdar S, et al. Influence of the hepatic eukaryotic initiation factor 2α (eIF2α) endoplasmic reticulum (ER)

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

stress response pathway on insulin-mediated ER stress and hepatic and peripheral glucose metabolism [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(42): 36163-36170

[13] Ke PY, Chen SSL. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro [J]. The Journal of clinical investigation, 2011, 121 (1): 37-56

[14] Merquiol E, Uzi D, Mueller T, et al. HCV causes chronic endoplasmic reticulum stress leading to adaptation and interference with the unfolded protein response[J]. PLoS one, 2011, 6(9): e24660

[15] Zha BS, Zhou H. ER stress and lipid metabolism in adipocytes[J]. Biochemistry research international, 2012, 2012

[16] Nagy G, Kardon T, Wunderlich L, et al. Acetaminophen induces ER dependent signaling in mouse liver [J]. Archives of biochemistry and biophysics, 2007, 459(2): 273-279

[17] Ji C. Dissection of endoplasmic reticulum stress signaling in alcoholic and non-alcoholic liver injury [J]. Journal of gastroenterology and hepatology, 2008, 23(s1)

[18] Adachi Y, Yamamoto K, Okada T, et al. ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum[J]. Cell structure and function, 2008, 33(1): 75-89

[19] Chua PK, Wang RYL, Lin MH, et al. Reduced secretion of virions and hepatitis B virus (HBV) surface antigen of a naturally occurring HBV variant correlates with the accumulation of the small S envelope protein in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus [J]. Journal of virology, 2005, 79(21): 13483-13496

[20] Wang HC, Wu HC, Chen CF, et al. Different types of ground glass hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection contain specific pre-S mutants that may induce endoplasmic reticulum stress [J]. The American journal of pathology, 2003, 163(6): 2441-2449

[21] Fan HL, Yang PS, Chen HW, et al. Predictors of the outcomes of acute-on-chronic hepatitis B liver failure [J]. World Journal of Gastroenterology: WJG, 2012, 18(36): 5078

[22] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会, 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8: 324-329

[23] Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way [J]. Virus research, 2008, 134(1-2): 235-249

[24] 钟卫卫, 林世德. 内质网应激与肝损伤研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18: 1021-1025

[25] Christen V, Treves S, Duong FHT, et al. Activation of endoplasmic reticulum stress response by hepatitis viruses up-regulates protein phosphatase 2A[J]. Hepatology, 2007, 46(2): 558-565

[26] Jäger R, Bertrand M J, Gorman A M, et al. The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress[J]. Biology of the Cell, 2012, 104(5): 259-270

[27] Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, et al. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1α[J]. Physiological reviews, 2011, 91(4): 1219-1243

[28] Tsang KY, Chan D, Bateman JF, et al. In vivo cellular adaptation to ER stress: survival strategies with double-edged consequences [J]. J Cell Sci, 2010, 123(13): 2145-2154

[29] Wagner M, Moore D D. Endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2011, 14 (4): 367-373

(上接第 660 页)

[27] Liu CM, Hungate BA, Tobian AA, et al. Male circumcision significantly reduces prevalence and load of genital anaerobic bacteria[J]. mBio, 2013, 4(2): e00076

[28] Dellabella M, Milanese G, Sigala S, et al. The role of the prostatic stroma in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome [J]. Inflamm Res, 2009, 58(12): 829-836

[29] Shen X, Ming A, Li X, et al. Nanobacteria: a possible etiology for type III prostatitis[J]. The Journal of urology, 2010, 184(1): 364-369

[30] Dennis LK, Lynch CF, Torner JC. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer[J]. Urology, 2002, 60(1): 78-83

[31] Zhao Z, Zhang J, He J, et al Clinical utility of the UPOINT phenotype system in Chinese males with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS): a prospective study [J]. PloS one, 2013, 8(1): e52044

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn