

慢性乙型肝炎患者外周血单核细胞中载脂蛋白B mRNA编辑酶催化多肽3G的表达及其临床意义

王建军 赵平 靳雪原 程勇前 闫涛 刘红虹 吴亮

【摘要】目的 探讨载脂蛋白B mRNA编辑酶催化多肽3G感染的不同阶段及应用不同抗病毒药物治疗期间水平的差异,推测固有免疫在抗病毒治疗中的作用。**方法** 选择应用聚乙二醇化干扰素 α -2a抗病毒治疗的慢性乙型肝炎(CHB)患者30例,口服恩替卡韦抗病毒治疗的CHB患者30例,未应用抗病毒治疗的CHB患者和乙型肝炎肝硬化代偿期患者各20例;健康成人20例为健康对照。检测CHB患者不同感染阶段及应用不同抗病毒药物期间的HBV DNA载量、ALT水平,应用荧光定量RT-PCR分析外周血单个核细胞(PBMC)中APOBEC3G mRNA的含量。**结果** 与健康成人比较,CHB、肝硬化患者应用恩替卡韦及干扰素抗病毒治疗期间,患者PBMC中APOBEC3G mRNA的含量分别升高1.4倍($t=-3.166$, $P=0.003$)、1.37倍($t=-2.206$, $P=0.0335$)、1.44倍($t=-3.381$, $P=0.0014$)和3.95倍($t=-4.790$, $P=0.0002$)。未应用抗病毒治疗的CHB患者血中的APOBEC3G mRNA的含量与应用恩替卡韦治疗患者差异无统计学意义($t=-0.242$, $P=0.8097$)。应用干扰素治疗的CHB患者PBMC中APOBEC3G mRNA的含量分别是未经治疗的CHB患者及应用恩替卡韦治疗患者的2.36倍($t=4.085$, $P=0.0002$)和2.40倍($t=4.9$, $P<0.0001$)。CHB炎患者ALT水平升高者PBMC中APOBEC3G mRNA的含量增高1.35倍,差异具有统计学意义($t=2.667$, $P=0.0112$)。HBV DNA载量高低与A3G mRNA含量无关($F=0.2124$, $P=0.8871$)。**结论** APOBEC3G在干扰素抗病毒治疗中起着重要作用。

【关键词】 载脂蛋白B mRNA编辑酶催化多肽3G; 肝炎, 乙型, 慢性; 抗病毒治疗

Expression and the clinical significance of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3G (APOBEC3G) in peripheral blood mononuclear cell of patients with chronic hepatitis B Wang Jianjun, Zhao Ping, Jin Xueyuan, Cheng Yongqian, Yan Tao, Liu Honghong, Wu Liang. International Treatment Centre of Liver Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Corresponding author: Zhao Ping, Email: zhaop9262@sina.com

【Abstract】Objective To investigate the differences between the levels of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3G (APOBEC3G) in different stages of HBV infection and during the different periods treated with different antiviral drugs, and to speculate on the role of innate immunity in antiviral therapy. **Methods** Total of 30 cases of chronic hepatitis B (CHB) who were treated with polyethylene glycol interferon alpha-2a and 30 patients treated with entecavir were selected, 20 patients with CHB and 20 patients with hepatitis B cirrhosis were selected; while 20 healthy adults collected as controls. The HBV DNA load and ALT levels were detected, and the level of APOBEC3G mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was analyzed by fluorescence quantitative PCR. **Results** Compared with healthy cases, during the period of using entecavir and interferon of patients with CHB and liver cirrhosis and antiviral. The levels of APOBEC3G mRNA in patients' PBMCs were increased by 1.4 times ($t=-3.166$, $P=0.003$), 1.37 times ($t=-2.206$, $P=0.0335$), 1.44 times ($t=-3.381$, $P=0.0014$) and 3.95 times ($t=-4.790$, $P=0.0002$). There was no significant difference in the levels of APOBEC3G

mRNA between the patients treated with entecavir and the patients without any treatment ($t = -0.242$, $P = 0.8097$). The levels of APOBEC3G mRNA in patients treated with interferon was 2.36 times ($t = 4.085$, $P = 0.0002$), 2.40 times ($t = 4.9$, $P < 0.0001$) as that in patients without any treatment and patients treated with entecavir, respectively. The levels of APOBEC3G mRNA in patients with high levels of ALT was 1.35 times higher than that of patients with normal level of ALT ($t = 2.667$, $P = 0.0112$). The levels of HBV DNA was not related to the content of APOBEC3G mRNA ($F = 0.2124$, $P = 0.8871$). **Conclusions** APOBEC3G plays an important role in the antiviral therapy of interferon.

【Key words】 Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3G (APOBEC3G); Chronic hepatitis B; Antiviral therapy

载脂蛋白B mRNA编辑酶催化多肽3G (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3G, APOBEC3G) 为APOBEC家族的成员之一, 是一种具有胞苷脱氨酶活性的RNA编辑酶, 可以参与载脂蛋白B mRNA的编辑, 诱导胞嘧啶诱导突变为尿嘧啶, 是介导天然免疫的重要因子。许多基础研究表明其具有直接的抗HBV的作用^[1-3]。本研究通过了解APOBEC3G在HBV感染的不同阶段及应用不同的抗病毒治疗期间水平是否有差异, 评价其在抗病毒治疗中的意义, 现报道如下。

资料与方法

一、主要试剂

淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂。总RNA TRIzol提取液、cDNA第1链合成试剂盒, 荧光定量PCR试剂盒均购自BIOMIGA公司, 采用荧光定量PCR仪ABI Prism 7500; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

二、病例来源

100例病例来自本科室2011年1月至2016年8月住院患者, 其中男性80例、女性20例, 平均年龄为37岁、平均年龄为22~75岁, 诊断符合2010年中华医学会肝病学分会与感染病学分会联合制定的《2010年慢性乙型肝炎防治指南》中慢性乙型肝炎、肝硬化标准。同时排除其他肝炎病毒合并感染及其他原因引起的肝功能异常。抗病毒药物的选择符合《2010年慢性乙型肝炎防治指南》的治疗方案。选择聚乙二醇化干扰素 α -2a (上海罗氏公司, 180 μ g/周) 抗病毒的慢性乙型肝炎患者30例, 应用口服恩替卡韦 (上海施贵宝公司, 0.5 mg/d) 抗病毒的慢性乙型肝炎患者30例, 所有抗病毒治疗的患者留取抗病毒治疗大于4周后的标本, HBeAg阳

性患者与HBeAg阴性患者比例为1:1; 未应用抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者, 乙型肝炎肝硬化代偿期各20例。健康对照组20例, 其中男性14例、女性6例, 平均年龄为24岁、平均年龄为19~42岁。

三、方法

1. 外周血PBMC分离及总RNA提取: 无菌操作采集实验组及健康对照组清晨空腹的EDTA抗凝静脉血5 ml, 用淋巴细胞分离液分离获取PBMC, 应用TRIzol试剂提取细胞总RNA, -80°C 储存提取的RNA。同时抽取各组人群静脉血5 ml, 分离血清检测血清HBV DNA含量及肝功能。

2. RT-PCR: (1) 应用cDNA第1链合成试剂盒将从各组血液中PMMCs中提取的总RNA合成CDNA第一链。

(2) 实时荧光相对定量PCR: 荧光定量PCR所需特异性引物有由上海生工生物技术有限公司合成。APOBEC3G上游引物: 5'-ACGTGAGCCTGTGCATCTTC-3', 下游引物: 5'-CAGGTCTTGGCTGTGCTCAT-3'。扩增片段202 bp。内对照基因 β -actin上游引物: 5'-GCCGTGGTGGTGAAGCTGT-3', 下游引物: 5'-ACCCACACTGTGCCCATCTA-3'。应用SYBR Green荧光染料技术行实时定量PCR反应。应用25 μ l反应体系, 包括SYBR Green PCR Master Mix 12.5 ml; 10 mmol/L引物各0.5 μ l; 模板1 μ l, 加双蒸水至25 μ l。反应条件: 95°C 、10 min, 95°C 、15 s, 60°C 、1 min、循环25次。扩增完毕后进行熔解曲线分析, 95°C 、15 s, 60°C 、1 min, 95°C 、15 s, 60°C 、15 s, 连续监测荧光, 由荧光定量PCR仪自动收集, 计算机分析CT值, 每个标本测3次。CT (Threshold Cycle) 值的含义: 每个反应管内荧光强度达到系统能够辨认的目的DNA合成时的循环数 (以阴性对照作参考), cDNA含量越低, 所对应的CT值越高。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 相对定量的方法表示

患者组相对于健康对照组APOBEC3G mRNA水平的倍数。 $\Delta CT = CT_{\text{Target}} - CT_{\beta\text{-actin}}$, $\Delta\Delta CT = (C_{T\text{Target}} - C_{T\beta\text{-actin}})_{\text{Test}} - (C_{T\text{Target}} - C_{T\beta\text{-actin}})_{\text{Control}}$, Control指健康对照组^[4]。

3. 血清中HBV DNA水平及肝功能水平由本院临床检验中心完成。HBV DNA应用实时PCR定量方法,检测下限为40 IU/ml, ALT水平应用常规生化检测方法。

四、统计学处理

统计采用SPSS 10.0软件进行分析, APOBEC3G mRNA水平以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、HBV感染者与健康对照的APOBEC3G mRNA水平

与健康对照相比, HBV感染者外周血PBMC中APOBEC3G mRNA表达水平升高, 见表1。

与健康成人比较, 慢性乙型肝炎、肝硬化及应用恩替卡韦及干扰素抗病毒期间, 患者PBMC中APOBEC3G mRNA的含量显著升高; 慢性乙型肝炎与乙型肝炎肝硬化患者血中APOBEC3G mRNA的含量差异无统计学意义 ($t = -1.146$, $P = 0.2652$); 未应用抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者血中的APOBEC3G mRNA的含量与应用恩替卡韦治疗患者差异无统计学意义 ($t = -0.100$, $P = 0.9209$); 应用干扰素治疗的慢性乙型肝炎患者PBMC中APOBEC3G mRNA的含量较未治疗的慢性乙型肝炎患者及恩替卡韦治疗的患者显著升高 ($t = 2.155$, $P = 0.0376$, $t = -2.979$, $P = 0.0056$)。

二、不同ALT水平患者PBMCs中APOBEC3G mRNA表达

在未行抗病毒治疗的慢性乙型肝炎及肝硬化

患者中, ALT高于正常 (> 40 U/L) 与ALT正常患者血中APOBEC3G mRNA的含量的比较结果提示, ALT水平升高的患者PBMC中APOBEC3G mRNA的含量较健康对照升高1.52倍 ($t = 4.276$, $P = 0.0002$), 较ALT水平正常患者升高1.35倍 ($t = 2.667$, $P = 0.0112$)。ALT水平正常的患者PBMC中APOBEC3G mRNA的含量与健康对照无差别 ($t = -1.610$, $P = 0.1143$)。

三、乙型肝炎患者A3G mRNA表达水平与HBV DNA含量的相关性

ALT正常但未应用干扰素治疗的慢性乙型肝炎肝硬化患者中, HBV DNA水平梯度选择 < 40 IU/ml、 $< 10^3$ IU/ml、 $< 10^6$ IU/ml、 $> 10^6$ IU/ml。结果提示, 各组间APOBEC3G mRNA表达水平差异无统计学意义 ($F = 0.2124$, $P = 0.8871$), 提示HBV DNA含量与血中APOBEC3G mRNA表达水平无相关性 (表2)。

讨 论

由乙型肝炎病毒持续感染所引起的病毒性肝炎、肝硬化和肝癌等已成为严重危害人民生命健康的重要疾病。目前经典的抗HBV治疗为应用干扰素或口服核苷类药物, 在抗病毒治疗方面已经取得了积极的进展, 但目前抗病毒疗效仍不能够令人满意。口服核苷类似物抗病毒治疗针对HBV DNA的复制效果较好, 但其疗程较长, 长期应用有可能出现耐药病毒变异株。干扰素因其在调节机体免疫方面较核苷类似物有优势, 但其不良反应较大, 患者

表2 HBV DNA不同水平患者 PBMC 中 APOBEC3G mRNA 表达

HBV DNA水平 (IU/ml)	例数	PBMC A3G mRNA表达
$> 10^6$	10	1.32 ± 0.48
$10^3 \sim 10^6$	22	1.45 ± 0.66
$< 10^3$	5	1.25 ± 0.47
< 40	3	1.38 ± 0.58

表1 各组患者与健康对照外周血 PBMCs 中 APOBEC3G mRNA 表达水平

组别	例数	PBMC A3G mRNA表达水平	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
健康对照	20	1		
慢性乙型肝炎未治疗	20	1.4 ± 0.56	-3.166	0.0030
乙型肝炎肝硬化未治疗	20	1.37 ± 0.75	-2.206	0.0335
慢性乙型肝炎行核苷类似物治疗	30	1.44 ± 0.58	-3.381	0.0014
慢性乙型肝炎行pegIFN治疗	30	3.95 ± 2.745	-4.790	0.0002

耐受性差,并且其对HBV DNA低于检测下限的比率相对较低,临床应用也越来越受到限制。另外,不同患者应用抗病毒疗效方面有一定的个体差异,个体免疫差异是否会影响抗病毒治疗的疗效对选择合适的抗病毒治疗方案可能有一定的意义。

APOBEC3G是一种机体天然抗病毒因子,参与宿主抵抗病毒入侵的防御机制^[5-6],近年来研究发现,APOBEC3G蛋白有广谱的抗病毒活性,对HBV DNA复制有强烈的抑制作用。关于APOBEC3G的抗HBV作用机制,目前研究提示主要通过以下方式:①通过影响HBV DNA逆转录抑制HBV DNA复制^[7-8];②通过诱导HBV DNA超突变抑制HBV DNA复制^[9-11];③包装到HBV病毒粒子中发挥抗病毒作用^[12];④IFN- α 通过JAK-STAT信号通路诱导APOBEC3G表达,参与干扰素的抗病毒作用^[13-14]。另外,还有研究发现,APOBEC3G基因变异不但可以影响HBV感染的慢性化,还可能调节HBV持续感染的进程^[15-16]。新近研究表明,APOBEC3G基因rs8177832的多态性降低慢性肝炎与原发性肝癌的发生,而rs2011861多态性增加肝癌发生的风险^[17]。

在PBMC中,APOBEC3G的高表达与HBV感染关系密切^[18-19]。一方面,HBV虽然是嗜肝病毒,但其定位并不专一,在HBV感染的靶细胞中,PBMCs仅次于肝细胞。已经在PBMCs中发现了HBV核酸及相关抗原;另一方面,PBMC作为T、B淋巴细胞、巨噬细胞以及NK细胞等各种免疫细胞的集合体,在清除HBV过程中发挥重要作用,也是感染HBV后出现免疫逃避、感染慢性化的重要原因,因此外周血PBMC中的APOBEC3G的水平可能反映机体对HBV的免疫情况。本研究选择了100例慢性乙型肝炎和乙型肝炎肝硬化的患者,以健康成人作为对照,检测各例患者中PBMC中APOBEC3G mRNA的相对含量,结果提示与健康成人比较,慢性乙型肝炎、肝硬化及应用恩替卡韦及干扰素抗病毒期间,患者PBMC中APOBEC3G mRNA的含量分别升高1.4倍、1.37倍、1.44倍和3.95倍,与既往有文献报道中慢性乙型肝炎病毒感染可以影响固有免疫因子APOBEC3G的表达一致^[20]。HBV DNA水平高低对与APOBEC3G mRNA的含量无关,提示在免疫耐受情况下,体内的自身抗乙型肝炎免疫并没有被激活。未应用抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者血中的APOBEC3G mRNA含量与应用恩替卡韦治

疗患者差异无统计学意义;应用干扰素治疗的慢性乙型肝炎患者PBMCs中APOBEC3G mRNA含量分别是未治疗的慢性乙型肝炎患者及恩替卡韦治疗患者的2.36倍和2.40倍。进一步分析发现,在慢性乙型肝炎患者和肝硬化患者中,ALT水平升高的患者PBMC中APOBEC3G mRNA的含量增高1.35倍。ALT水平正常的患者PBMC中APOBEC3G mRNA的含量与健康对照无差别。一般ALT水平正常的慢性HBV感染者多处于免疫耐受期,提示APOBEC3G在乙型肝炎免疫耐受期表达不活跃,而在乙型肝炎免疫活跃期积极参与抗HBV作用。尤其在应用干扰素抗病毒治疗期间,APOBEC3G表达显著升高,提示其可能积极参与干扰素的抗病毒反应。另外,在应用口服核苷类似物治疗的患者中,APOBEC3G的表达也有所提高,可能与所选择患者在治疗前均属于免疫活跃期有关。

综上,作为体内固有免疫的重要组成部分,APOBEC3G积极参与干扰素抗HBV的治疗过程中,可能起到重要作用,另外,APOBEC3G水平的高低可能反应体内对HBV的免疫状态,可能对于推测乙型肝炎的抗病毒治疗效果有作用,也有可能作为检测体内对乙型肝炎免疫状态的监测指标。由于试验中各组所选择的病例数较少,试验结果尚待增加样本量研究来进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Mohamadkhani A, Pourdada A, Tayebi S, et al. The potential role of APOBEC3G in limiting replication of hepatitis B virus[J]. Arab J Gastroenterol,2012,13(4):170-173.
- [2] Wang CX, Lu YQ, Qi P, et al. Efficient inhibition of hepatitis B virus replication by hepatitis delta virus ribozymes delivered by targeting retrovirus[J]. Virol J,2010,7:61.
- [3] Turelli P, Mangeat B, Jost S, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G[J]. Science,2004,303(5665):1829.
- [4] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method[J]. Methods,2001,25(4):402-408.
- [5] Olson ME, Harris RS, Harki DA. APOBEC enzymes as targets for virus and cancer therapy[J]. Cell Chem Biol,2017,S2451-9456(17):30388-30384.
- [6] Polevoda B, McDougall WM, Bennett RP, et al. Structural and functional assessment of APOBEC3G macromolecular complexes[J]. Methods,2016,107:10-22.
- [7] Nguyen DH, Gummuru S, Hu J. Deamination-independent inhibition of hepatitis B virus reverse transcription by APOBEC3G[J]. J Virol,2007,81(9):4465-4472.
- [8] Nguyen DH, Hu J. Reverse transcriptase-and RNA packaging signal-dependent incorporation of APOBEC3G into hepatitis B virus

- nucleocapsids[J]. *J Virol*,2008,82(14):6852-6861.
- [9] Beggel B, Münk C, Däumer M, et al. Full genome ultra-deep pyrosequencing associates G-to-A hypermutation of the hepatitis B virus genome with the natural progression of hepatitis B[J]. *J Viral Hepat*,2013,20(12):882-889.
- [10] Kitamura K, Wang Z, Chowdhury S, et al. Uracil DNA glycosylase counteracts APOBEC3G-induced hypermutation of hepatitis B viral genomes: excision repair of covalently closed circular DNA[J]. *PLoS Pathog*,2013,9(5):e1003361
- [11] 张伟, 张旭照, 方永明, 等. 胞嘧啶脱氨酶APOBEC3G可能通过 G-A突变抑制乙型肝炎病毒的复制[J]. *中华微生物和免疫学杂志*,2007,27(2):135-139.
- [12] Zhao D, Wang X, Lou G, et al. APOBEC3G directly binds Hepatitis B virus core protein in cell and cell free systems[J]. *Virus Res*,2010,151(2):213-219.
- [13] Xu F, Song H, Li N, HBsAg blocks TYPE I IFN induced up-regulation of A3G through inhibition of STAT3[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2016,473(1):219-223.
- [14] Chen H, Wang LW, Huang YQ, et al. Interferon-alpha induces high expression of APOBEC3G and STAT-1 in vitro and in vivo[J]. *Int J Mol Sci*,2010,11(9):3501-3512.
- [15] Ezzikouri S, Kitab B, Rebbani K, et al. Polymorphic APOBEC3 modulates chronic hepatitis B in Moroccan population[J]. *J Viral Hepat*,2013,20(10):678-686.
- [16] Meier MA, Suslov A, Ketterer S, et al. Hepatitis B virus covalently closed circular DNA homeostasis is independent of the lymphotoxin pathway during chronic HBV infection[J]. *J Viral Hepat*,2017,24(8):662-671.
- [17] He XT, Xu HQ, Wang XM, et al. Association between polymorphisms of the APOBEC3G gene and chronic hepatitis B viral infection and hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*,2017,23(2):232-241.
- [18] 彭程, 贺永文, 郭春霞, 等. 慢性乙肝患者外周血单个核细胞 APOBEC3GmRNA表达的水平及意义[J]. *寄生虫病与感染性疾病*,2007,5(1):15-18.
- [19] 陈辉, 王鲁文, 褚小刚, 等. 载脂蛋白BmRNA编辑酶催化多肽样3G在不同慢性乙型肝炎患者中的表达及其细胞内定位[J]. *中华肝脏病杂志*,2010,18(1):5-8
- [20] Song ZW, Ma YX, Fu BQ, et al. Altered mRNA levels of MOV10, A3G, and IFN- α in patients with chronic hepatitis B[J]. *J Microbiol*,2014,52(6):510-514.

(收稿日期: 2017-03-08)

(本文编辑: 孙荣华)

王建军, 赵平, 靳雪原, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血单核细胞中载脂蛋白 B mRNA编辑酶催化多肽3G的表达及其临床意义[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志 (电子版)*, 2018,12(1):56-60.