

## 乙肝病毒感染对细胞基本自噬的影响

王娟<sup>1,2</sup>, 时迎娣<sup>1,2</sup>, 杨怀义<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所, 病原微生物与免疫学院重点实验室, 北京 100101)

(<sup>2</sup> 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:**【目的】慢性乙肝病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染在肝硬化和肝癌的发生过程中起着重要的作用, 通过研究 HBV 感染对细胞基本自噬的影响, 为 HBV 感染诱发肝癌以及 HBV 的免疫逃逸机理研究提供新的思路。【方法】本研究利用乙肝病毒表达质粒瞬时或稳定转染不同肝细胞, 通过计数绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)聚集数目检测自噬小体形成, western blot 检测 LC3(microtubule-associated protein light chain 3, 微管相关蛋白质轻链 3)脂酰化和 p62 的降解, 通过构建 HBV B 型和 C 型 X 蛋白(HBx)的表达质粒并瞬时转染肝癌细胞和正常肝细胞, 对不同基因型 X 蛋白对细胞自噬的影响进行了分析。【结果】乙肝病毒感染后促进了 LC3 的脂酰化和 p62 的降解, 增加了自噬小体的形成, 增强了细胞的基本自噬。进一步研究发现, HBV 感染增强的细胞基本自噬水平由 HBx 所引发, 且 C 型 HBx 比 B 型对细胞基本自噬的增加更加显著。【结论】HBV 通过 HBx 增强细胞的基本自噬, 且不同基因型 HBx 对细胞基本自噬的增强程度不同, 为进一步阐明 HBV 感染机理奠定了基础。

**关键词:** 乙肝病毒; 细胞自噬; X 蛋白

**中图分类号:** S852    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2010) 12-1651-06

乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染引起的乙型肝炎严重影响着我国人口健康<sup>[1]</sup>。由于该病毒为“非溶细胞”性病毒, 且病毒感染后不能诱导干扰素的产生, 故 HBV 感染后常易造成对宿主细胞的免疫逃逸而建立起病毒的慢性感染。HBV 慢性感染不仅难以治愈, 造成患者病情的反复发作, 且与其肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)的发生密切相关<sup>[2-4]</sup>。HBV 属嗜肝 DNA 病毒科(Hepadnaviridae), 其基因组大小为 3.2 kb, 编码有 4 种病毒蛋白<sup>[5]</sup>。其中 X 基因编码的 X 蛋白(HBx)具有多种不同的功能, 其在病毒复制、细胞转化、HBV 诱发的 HCC 发生过程中都起着十分重要的作用<sup>[6-9]</sup>。

细胞自噬(Autophagy)是真核细胞用于清除胞内聚集体、损伤细胞器而维持其稳态平衡的一种蛋

白质降解途径<sup>[10]</sup>。近年来研究发现, 细胞自噬不仅在细胞生长发育、成熟分化等过程中起着重要的作用, 且与多种疾病发生、病毒感染与免疫等密切相关<sup>[11-15]</sup>。最近研究发现, HBx 能通过上调 Beclin1 的表达, 增强饥饿诱导下细胞自噬的发生<sup>[16]</sup>。那么, HBV 感染是否可以通过 HBx 的作用, 增强细胞基本自噬的发生, 从而促进病毒的复制循环呢? 为此, 我们利用 HBV 基因组和 HBx 基因分别转染 Huh7 细胞、HepG2 细胞、人张氏肝细胞(Chang liver cell), 研究了其对转染细胞的本底水平细胞自噬的影响。结果发现, HBV 感染可增强细胞基本自噬的发生。同时, 我们研究还发现, 不同基因型 HBx 对本底水平细胞自噬诱导的效应存在着一定的差异, 这为进一步阐明 HBx 对 HBV 复制循环,

基金项目: 国家自然科学基金(30770086, 31070149)

\* 通信作者。Tel: +86-10-64807476; Fax: +86-10-64807381; E-mail: yanghy@im.ac.cn

作者简介: 王娟(1984-), 女, 河南省郑州市人, 硕士研究生, 从事分子病毒学研究。E-mail: wintersweet1984@126.com

收稿日期: 2010-05-06; 修回日期: 2010-05-20

尤其是 HBV 引起的肝细胞癌的发生提供了一定的依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌株、细胞:** pHBV1.3 质粒, pET-21a-bx 质粒、pET-21a-cx 质粒、GFP-LC3 质粒为本实验室保存; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 为本实验室保存菌株; pMD18-T 购自 TaKaRa 公司; pFLAG-CMV<sup>TM</sup>-2 购自 Sigma 公司; HepG2 细胞、HepG2.2.15 细胞、Huh7 细胞为本实验室保存细胞; 人张氏肝细胞 (Chang liver cell) 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** *Hind* III、*Eco*R I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; DMEM 及 1640 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司; LC3 抗体、Flag 抗体购自 Sigma 公司, Beclin1、p62 抗体购自 Santa Cruz 公司,  $\beta$ -actin 抗体购自北京中山金桥公司; 质粒小提试剂盒 (Omega E. Z. N. A. Plasmid Minipreps Kit)、凝胶回收试剂盒 (Omega Gel Extraction) 购自 Omega 公司; Fugene 转染试剂购自 Roche 公司。PCR 仪器为 Bio Rad 公司生产, 低温高速离心机为 Eppendorf 公司生产, 凝胶成像仪为 Tanon 公司生产。

**1.1.3 引物:** 采用引物设计软件 Primer5.0, 根据 NCBI 上公布的 HBV B 型 (登录号: EU5700690) 和 C 型 (登录号: EU562217) X 蛋白的基因序列分别设计两对引物 (表 1)。

表 1 B 型和 C 型 HBx 引物序列

Table 1 Primer sequences of B type and C type HBx

Primer	Sequence (5'→3')
UBX	CGAAGCTTACTATGGCTGCTAGGCTGTG
LBX	GCGAATTCCTAGGCAGAGGTGAAAAAG
UCX	CGAAGCTTACTATGGCTGCTAGGATGTG
LCX	GCGAATTCCTAGGCAGAGGT GAAAAAG

### 1.2 pFLAG-CMV2-bx 和 pFLAG-CMV2-cx 载体的构建

PCR 扩增、连接、转化及酶切鉴定等常规实验参照分子克隆实验指南<sup>[22]</sup>进行。初步鉴定的质粒送上海 Invitrogen 公司测序。

### 1.3 细胞培养

HepG2 细胞、Huh7 细胞于 10% 胎牛血清和 100 g/L 链霉素及 100 U/mL 的青霉素的 DMEM 细胞培养基中培养。人张氏肝细胞于 10% 胎牛血清和 100 g/L 链霉素及 100 U/mL 的青霉素的 1640 细

胞培养基中培养。HepG2.2.15 细胞于 10% 胎牛血清和 500 mg/L G418, 100 g/L 链霉素及 100U/mL 的青霉素的 DMEM 细胞培养基中培养。其培养均在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下进行。

### 1.4 细胞转染

使用 Fugene 转染试剂, 按照质粒 ( $\mu$ g): Fugene ( $\mu$ L) = 1:3 比例, 每孔 2  $\mu$ g 质粒对过夜培养后的 6 孔板细胞进行转染。

### 1.5 Western blot 检测

细胞培养 24 h, 或者转染质粒 48 小时后, 细胞裂解液裂解细胞, 冰浴 30 min。离心 13000  $\times$  g, 30 min 后取上清。于 12% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳后, 用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜。5% 的脱脂牛奶封闭过夜。孵育特异的抗体, anti-LC3、anti-p62、anti-HBx 稀释度为 1:1000, anti-actin 为 1:2000, 二抗分别为辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG 浓度为 1:2000, 抗兔 IgG 浓度为 1:3000, 加 ECL 发光液, X-ray 自显影后采用图像系统软件 Quantity One 分析, 确定目的蛋白的表达差异。

### 1.6 噬体形成定量分析

HepG2 细胞和 HepG2.2.15 细胞于转染前一天均匀铺于 24 孔板的盖玻片上, 转染等量的 GFP-LC3 质粒, 转染 48 小时后, 用冰冷的 PBS 洗 2 次, 再用 4% 的多聚甲醛固定 30 min, 用含 DAPI 的封片剂封片。用荧光显微镜计数 50 个 GFP-LC3 明显表达的细胞中单个细胞 GFP-LC3 聚集的数目。

## 2 结果和分析

### 2.1 HBV 基因组转染增加自噬小体形成

利用 GFP-LC3 转染细胞, 通过检测 GFP-LC3 在细胞中的聚集可反映出细胞自噬发生过程中形成的自噬小体。当利用 GFP-LC3 转染细胞, 通过饥饿等手段诱导细胞自噬发生、自噬小体形成时, GFP-LC3 会由在胞质中的弥散分布转变到自噬小体上, 变成点状聚集。为了证实 HBV 感染对细胞自噬的影响, 我们利用 GFP-LC3 质粒对 HBV 稳定转染细胞系 HepG2.2.15 进行了瞬时转染, 利用荧光显微镜观察了 GFP-LC3 的点状聚集, 计数了 50 个细胞中 GFP-LC3 点状聚集的平均值。如图 1 所示, HepG2.2.15 细胞中 GFP-LC3 点状聚集的数目为 20.5  $\pm$  4.3 个, 对照细胞 HepG2 仅为 5.7  $\pm$  1.9 个, 由此可见, HBV 感染细胞中自噬小体的形成数目明显高于对照细胞 HepG2, 说明 HBV 基因组转染细胞后, 促进了细胞基本自噬的发生。

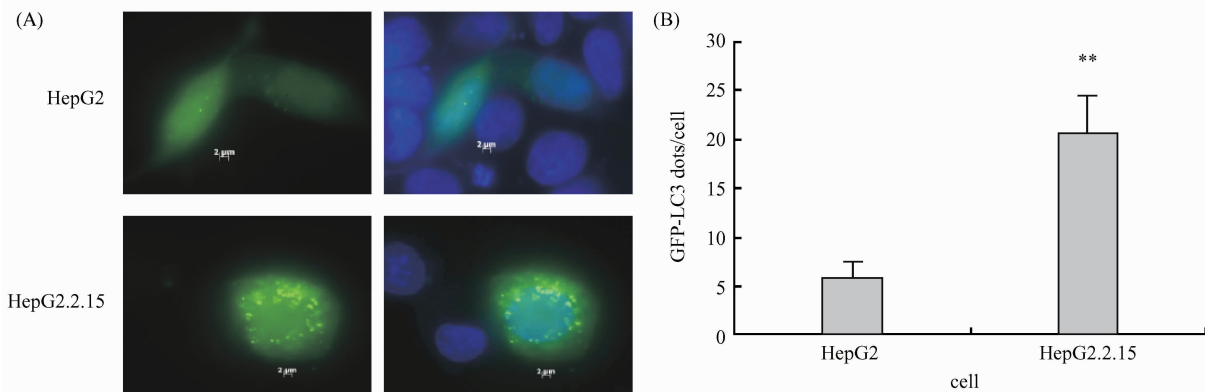


图 1 HBV 转染促进自噬小体形成

Fig. 1 Stable transfection of HBV in HepG2 cells results in autophagic vesicle formation. A: HepG2 or HepG2. 2. 15 cells were transfected with GFP-LC3. The images were captured by fluorescence microscope; B: Quantitation of fifty GFP-LC3 positive cells with GFP-LC3 dots. The data represent the mean  $\pm$  SD based on three independent experiments (\*\*,  $P < 0.01$ ).

## 2.2 HBV 基因组转染增加 LC3 脂酰化

微管相关蛋白轻链 3 (LC3) 的脂酰化是细胞自噬发生的一个重要标志。在细胞自噬发生过程的自噬小体膜形成阶段, 胞质型的 LC3 (LC3-I) 经磷脂酰乙醇胺化形成脂酰化的 LC3 (LC3-II), 进而插入到自噬小体膜上, 当自噬小体和溶酶体融合形成自噬溶酶体后, 内层膜上的 LC3-II 会被去脂酰化转变成 LC3-I 释放到胞质中。故在细胞自噬发生过程中, 常以 LC3-II 的变化, 进行细胞自噬水平的初步判断。当 LC3-II 增多时, 可在一定程度上说明细胞自噬的增加。我们利用 pHBV1.3 瞬时转染了 Huh7

和 HepG2 细胞后发现, 在正常培养条件下, 以转染 pcDNA3.0 的细胞中的比值作为 100%, Huh7 细胞的 LC3-II 的水平是转染 pcDNA3.0 的 204.8%, HepG2 细胞的 LC3-II 的水平是转染 pcDNA3.0 的 323.9%。同时, 我们还分析了 HBV 稳定转染细胞系 HepG2. 2. 15 细胞在相同条件下 LC3-II 的水平, 其是瞬时转染 pcDNA3.0 HepG2 细胞的 614.8%, 为瞬时转染 HBV 基因组的 HepG2 细胞的 189.7%。这从另一个方面说明, HBV 转染细胞后, LC3 脂酰化水平增强, 增强了细胞的基本自噬, 且稳定转染比瞬时转染增强作用更加明显 (图 2)。

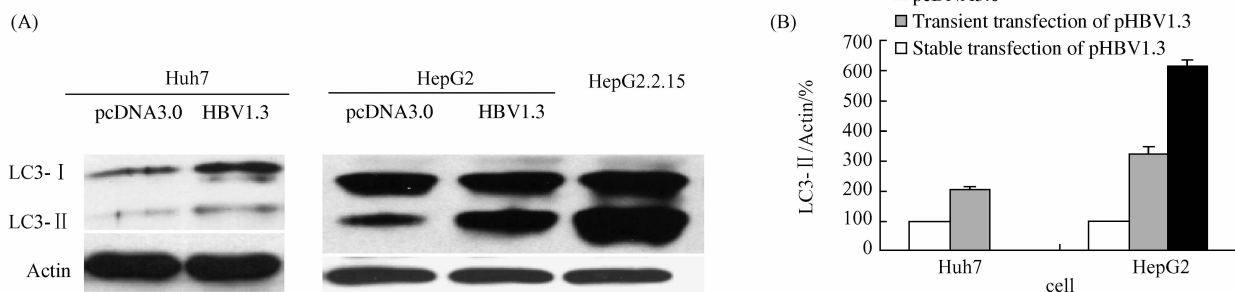


图 2 HBV 基因组转染细胞后增强了 LC3 的脂酰化

Fig. 2 Transfection of HBV in Huh7 or HepG2 cells increases the levels of LC3-II. A: After transfected with pHBV1.3, Huh7 cells or HepG2 cells were lysed and subjected to western blot with the antibodies indicated; B: Densitometry was performed for quantification. The data represent the mean  $\pm$  SD based on three independent experiments.

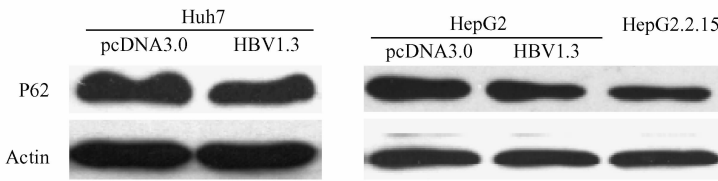
## 2.3 HBV 基因组转染增加 p62 的降解

p62/SQSTM1 蛋白是连接被泛素化的蛋白聚集体和 LC3 的接头蛋白, 其在自噬发生过程中会直接插入自噬小体中, 随后在自噬溶酶体中被降解。当细胞自噬被抑制后, p62 降解量减少<sup>[17]</sup>。如图 3 所示, HBV 基因组瞬时转染细胞后, 在正常培养条件下, 以转染 pcDNA3.0 的细胞中比值作为 100%,

Huh7 细胞中 p62 的水平比转染 pcDNA3.0 的下降了 36.4%, HepG2 细胞中 p62 的水平比转染 pcDNA3.0 的下降了 20.2%, 而稳定转染细胞系 HepG2. 2. 15 比转染 pcDNA3.0 的下降了 50.8%, 其为瞬时转染 HBV 基因组的 HepG2 细胞的 61.7%。这在一定程度上说明, HBV 转染细胞后, p62 的降解水平增强, 促进了本底水平细胞自噬的

发生,且稳定转染比瞬时转染促进作用更加明显。

(A)



(B)

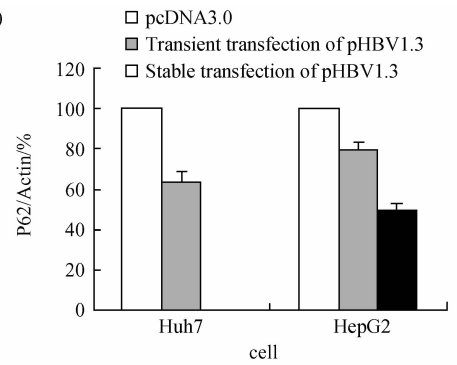


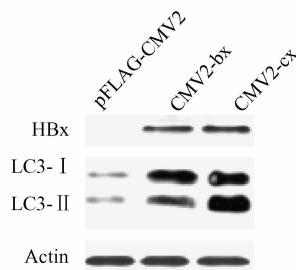
图3 HBV 转染后增加了 p62 的降解

Fig. 3 Transfection of HBV in Huh7 or HepG2 cells decreases the levels of p62. A; After transfected with pHBV1.3, Huh7 cells or HepG2 cells were lysed and subjected to western blot with the antibodies indicated; B; Densitometry was performed for quantification. The data represent the mean  $\pm$  SD based on three independent experiments.

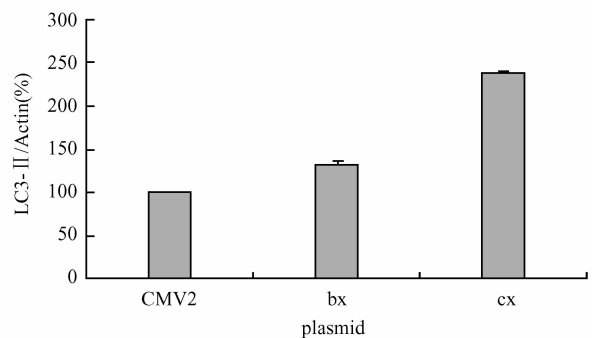
#### 2.4 HBx 转染增强 LC3 脂酰化和 p62 降解

HBx 能够增强 Beclin1 的表达促进饥饿诱导型细胞自噬的发生,但是对于 HBx 与本底水平细胞自噬的关系尚未阐明。为了阐明 HBx 在 HBV 感染增强本底水平细胞自噬过程中的作用,我们首先构建了 B 型和 C 型 HBx 表达质粒 pFLAG-CMV2-bx/cx, 然后分别转染肝癌细胞系 HepG2 或人张氏肝细胞 (Chang liver cell), 在正常培养条件下, 研究了其对

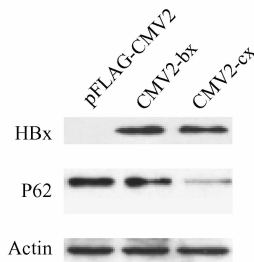
(A)



(B)



(C)



(D)

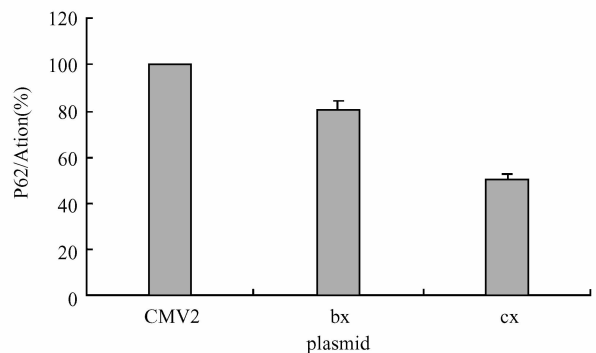


图4 HepG2 细胞或人张氏肝细胞转染 HBx 后,对 LC3-II 和 p62 的影响

Fig. 4 Transfection of HBx in HepG2 cells or Chang liver cells increases the levels of LC3-II and decreases the levels of p62. A; After transfected with pFLAG-CMV2-bx/cx, HepG2 cells were lysed and subjected to western blot with the antibodies indicated; B; Densitometry was performed for quantification; C; After transfected with pFLAG-CMV2-bx/cx, Chang liver cells were lysed and subjected to western blot with the antibodies indicated; D; Densitometry was performed for quantification. The data represent the mean  $\pm$  SD based on three independent experiments.

增强 LC3 脂酰化和 p62 降解的作用。如图 4 显示, 在 HepG2 细胞中, 以转染 p FLAG-CMV2 的细胞中的比值作为 100%, 转染 B 型或 C 型 HBx 的 LC3-II 水平分别是对照的 133% 和 237.8%。在人张氏肝细胞中, 以转染 pFLAG-CMV2 的细胞中的比值作为 100%, 转染 B 型或 C 型 HBx 的 p62 水平分别比对照下降了 19.7% 和 49.5%。这在一定程度上说明, HBx 转染细胞后, 增强了 LC3 脂酰化和 p62 降解,

促进了本底水平细胞自噬的发生,同时 C 型 HBx 比 B 型的促进作用更加显著。

### 3 讨论

细胞自噬与癌症的发生存在着密切的联系,同时 HBV 又在肝癌发生过程中起着重要的作用。在对 HBV 和细胞自噬的关系研究中,Tang H. 等研究发现 HBx 能通过上调 Beclin1 的表达,在饥饿诱导条件下提高细胞自噬的发生,但并为阐明其对细胞基本自噬的影响,而阐明这种影响对于 HBV 诱发肝癌的机理研究至关重要。我们研究发现,利用 HBV 表达质粒转染细胞后,在正常培养条件下,LC3 脂酰化水平增强,p62 蛋白降解水平增强,自噬小体形成增加,这都表明 HBV 转染能够增强细胞的基本自噬。为了进一步研究 HBV 增强本细胞基本自噬的机理,我们利用 HBx 表达质粒转染细胞,结果表明,LC3 脂酰化水平增强,p62 蛋白降解水平增强。这证实了不论是肝癌细胞系,还是正常肝细胞,HBx 都可以增强细胞的基本自噬。

我国 HBV 基因型以 B 型和 C 型为主,两型在血清学转换的时间、发展成肝细胞癌和对干扰素的治疗反应等方面存在明显差异。目前研究发现,C 型 HBV 感染与 B 型相比较患者体内的 HBeAg/HBeAb 的转换率较低,转换较晚,HBV DNA 的高复制持续时间长<sup>[18]</sup>;在干扰素的抗病毒治疗中发现,C 型 HBV 对干扰素的敏感性差于 B 型<sup>[19]</sup>;在临床症状方面,C 型 HBV 感染比 B 型患者肝功能异常更为常见,引起的临床表现及组织学损伤更严重,同时 C 型 HBV 感染更易发展成肝纤维化或肝细胞癌<sup>[20,21]</sup>。值得注意的是,我们研究发现,当用 B 型和 C 型 HBx 蛋白分别转染细胞时,不论是肝癌细胞系 HepG2 还是正常肝细胞系人张氏肝细胞,C 型 HBx 增强本底水平细胞自噬的效果都要比 B 型更加显著,这与 HBV 不同基因型感染造成的临床差异相一致。这可能是由于 C 型 HBx 诱发了较强的细胞自噬,其一方面在一定程度上利用自噬小体作为免疫逃逸场所造成宿主细胞的免疫反应难以激活,另一方面,其增强的细胞自噬可能促进了自噬性细胞死亡的发生,从而造成较重的肝损伤甚至诱发肝癌。这在一定程度上为解释不同基因型 HBV 对其自身复制循环的影响不同以及引起肝癌的时间、程度不同提供了理论依据。

**致谢** 中国科学院微生物研究所姜学军研究员在研究中给与了大量帮助,并提供了 GFP-LC3 质粒,特

此致谢!

### 参考文献

- [ 1 ] Nguyen VTT, Law MG, Dore GJ. Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: epidemiological characteristics and disease burden. *Journal of Viral Hepatitis*, 2009, 16:453-463.
- [ 2 ] Levi D, Tzakis A. HBV and HCC: comment on "Role of hepatitis B virus infection in the prognosis after hepatectomy for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a Western dual-center experience". *Archives Surgery*, 2009, 144:913.
- [ 3 ] Beasley RP. Rocks along the road to the control of HBV and HCC. *Annals Epidemiology*, 2009, 19:231-234.
- [ 4 ] Komindr A, Praditphol N, Suphanpayak S, Sae-Eaw R, Nussati A, Tujinda S, Kongteeraphap P, Intaraksa S, Rukchampong R, Deesawat T. Correlation of HBV and HCV with CH, LC, HCC in liver biopsied tissue at Rajavithi Hospital. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 2005, 88:788-809.
- [ 5 ] Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2006, 147:58-66.
- [ 6 ] Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*, 1991, 351:317-320.
- [ 7 ] Kim YC, Song KS, Yoon G, Nam MJ, Ryu WS. Activated ras oncogene collaborates with HBx gene of hepatitis B virus to transform cells by suppressing HBx-mediated apoptosis. *Oncogene*, 2001, 20:16-23.
- [ 8 ] Wei W, Huang W, Pan Y, Zhu F, Wu J. Functional switch of viral protein HBx on cell apoptosis, transformation, and tumorigenesis in association with oncoprotein Ras. *Cancer Letters*, 2006, 244:119-128.
- [ 9 ] Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus X protein. *Cancer Science*, 2006, 97:977-983.
- [ 10 ] Levine, B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell*, 2005, 120:159-162.
- [ 11 ] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451:1069-1075.
- [ 12 ] Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7:767-777.
- [ 13 ] Orvedahl A, Alexander D, Tallóczy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W, Burns D, Leib DA, Levine B. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host and Microbe*, 2007, 1:23-35.
- [ 14 ] Jackson WT, Giddings TH J, Taylor MP, Mulinyawe S, Rabinovitch M, Kopito RR, Kirkegaard K. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biology*, 2005, 3(5):861-871.

- [15] Prentice E, Jerome WG, Yoshimori T, Mizushima N, Denison MR. Corona virus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *Journal of biological chemistry*, 2004, 279:10136-10141.
- [16] Tang H, Da L, Mao Y, Li Y, Li D, Xu Z, Li F, Wang Y, Tiollais P, Li T, Zhao M. Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression. *Hepatology*, 2009, 49: 60-71.
- [17] Wang QJ, Ding Y, Kohtz DS, Mizushima N, Cristea IM, Rout MP, Chait BT, Zhong Y, Heintz N, Yue Z. Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *Journal of Neuroscience*, 2006, 26:8057-8068.
- [18] Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology*, 2002, 122:1756-1762.
- [19] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 2000, 118: 554-559.
- [20] Kim SR, Imoto S, Fuki S, Taniguchi M, Kim KI, Mita K, Ando K, Nakajima T, Hong HS, Fukuda K, Sasase N, Kudo M, Hayashi Y. Case of adult genotype C HBV carrier after acute hepatitis B, losing HBsAg and acquiring HBsAb after IFN and lamivudine treatment. *Hepatology Research*, 2006, 36:149-52.
- [21] Tan TL, Chen WN. A proteomics analysis of cellular proteins associated with HBV genotype-specific HBx: potential in identification of early diagnostic markers for HCC. *Journal of Clinical Virology*, 2005, 33:293-8.
- [22] Yin JH, Zhao J, Zhang HW, Xie JX, Li WP, Xu GZ, Shen J, Dong HJ, Zhang J, Wang L, Han JK, Wang HY, Cao GW. HBV genotype C is independently associated with cirrhosis in community-based population. *World Journal of Gastroenterology*, 2010, 16(3):379-83.
- [23] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 2<sup>nd</sup> eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

## Infection with Hepatitis B virus enhances basal autophagy

Juan Wang<sup>1,2</sup>, Yingdi Shi<sup>1,2</sup>, Huaiyi Yang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(<sup>2</sup> Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] Hepatitis B virus (HBV) is a major human pathogen that chronically infects 400 million people worldwide. Chronic infection of HBV plays a key role in the pathogenesis of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). To clarify the mechanism of HBV-related HCC and immune escape of HBV, we investigated the relationship between infection of HBV and basal autophagy. [ **Methods** ] To examine the number of autophagosomes upon transfection with HBV, HepG2. 2. 15 cells were transfected with green fluorescent protein-microtubule-associated protein 3 (GFP-LC3) and observed by fluorescence microscopy. Huh7 or HepG2 cells was transiently transfected with HBV expression vector pHBV1. 3, then the phosphatidylethanol-amine conjugation of microtubule-associated protein 3 (LC3) and the degradation of p62, both of which are specific indicators of autophagy, were evaluated by western blot. Moreover, HepG2 or Chang liver cells were transiently transfected with the constructed HBV X protein (HBx) expression vector in order to evaluate autophagic status of the cells. [ **Results** ] HBV and HBx were both able to increase the autophagosomes formation as well as the enhancement of autophagic flux. Notably, C type HBx had a more increment of autophagy than B type does. [ **Conclusion** ] HBV can enhance basal autophagy and the increment is dependent on HBx. Different genotypes of HBx had different effects on basal autophagy. Take together, these findings will help us to clarify the mechanism of HBV infection and the development of Hepatitis B to HCC in the future study.

**Keywords:** Hepatitis B virus (HBV); basal autophagy; HBV X protein (HBx)

(本文责编:王晋芳)