

## 细胞自噬对乙肝病毒感染细胞干扰素表达的影响

倪扬笑<sup>1,2</sup>, 时迎娣<sup>1,2</sup>, 张迎秋<sup>3</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重点实验室, 北京 100101

<sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100039

<sup>3</sup>辽宁师范大学, 大连 116029

**摘要:** 【目的】细胞自噬 (Autophagy) 是真核细胞用于清除胞内聚集物、损伤细胞器而维持其稳态平衡的一种溶酶体降解途径。细胞自噬不仅在细胞生长发育、成熟、分化等过程中起重要作用, 且与病毒感染、细胞免疫密切相关。通过研究细胞自噬对乙肝病毒感染的 I 型干扰素的影响, 为进一步阐明乙肝病毒感染对机体天然免疫反应研究奠定基础。【方法】通过 siRNA 干扰 Beclin1 和 Atg7 表达, 检测自噬小体形成, Real-Time PCR 检测干扰素因子表达, 分析了细胞自噬对乙肝病毒感染细胞中干扰素形成的影响。【结果】干扰 Beclin1 和 Atg7 均可抑制细胞自噬发生, 抑制细胞自噬可降低干扰素因子的表达, 而对细胞活力和细胞凋亡无明显影响。【结论】抑制细胞自噬, 可降低 HBV 感染细胞中 IFN $\beta$  和 IFI27 的表达, 这在一定程度上意味着, HBV 诱导的自噬具有增强感染细胞天然免疫反应的作用。

**关键词:** 细胞自噬, 乙肝病毒, 干扰素, 细胞凋亡

**中图分类号:** R37      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2012) 11-1385-07

细胞自噬 (Autophagy), 不仅是一种细胞用于降解胞内多余蛋白质和受损细胞器, 维持其稳态平衡的代谢过程, 也是一种细胞用于防御外来物质侵入的防御机制<sup>[1]</sup>。自噬发生过程中, 首先形成的新月形双层膜, 会将待降解的蛋白或损伤细胞器包裹其中, 形成自噬小体 (Autophagosome); 随后自噬小体与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 在其中降解其包裹的待降解蛋白质或损伤细胞器<sup>[2]</sup>。自噬在防止机体感染、肿瘤发生、心血管病发生等方面发挥着十分重要的作用<sup>[3]</sup>。

近年来研究发现, 细胞自噬不仅可直接参与损伤细胞器、侵入细胞中外来物质的降解, 还具有调控

天然免疫的作用。自噬可通过维甲酸诱导基因 I 样受体 (RLR) 信号, 作为 PRR (pattern recognition receptor) 信号通路的效应子, 在天然免疫中起着重要作用<sup>[4]</sup>, TLR (Toll-like receptor) 作为 PRR 家族成员之一, 能够直接作用于自噬信号通路<sup>[5]</sup>, 自噬相关蛋白 Atg5 和 Beclin1 可参与 TLR7 诱导自噬形成的过程<sup>[6]</sup>, 自噬能促进病毒核苷酸向内吞小体中的运输并且激活 TLR7, 促进 I 型干扰素的释放<sup>[7]</sup>。而在丙肝病毒 (Hepatitis C Virus, HCV) 感染的肝细胞中, 敲降自噬相关蛋白 Beclin1、Atg7, 自噬抑制后可激活干扰素途径, 促进 INF $\alpha$ 、INF $\beta$ 、OAS1 和 IFI27 形成<sup>[8]</sup>。

基金项目: 国家自然科学基金 (31070149, 30770086)

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

作者简介: 倪扬笑 (1986-), 女, 浙江人, 硕士研究生, 主要研究方向为分子病毒学。E-mail: niyangxiao\_1986@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-05-08; 修回日期: 2012-06-01

乙肝病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染严重危害着我国乃至全球人口的健康。目前我国HBV感染者达1.2亿<sup>[9]</sup>;全球HBV感染者超过20亿人<sup>[10]</sup>,HBV长期携带者近4亿。全球范围,每年大约有100万患者死于HBV慢性感染引发的并发症<sup>[11-12]</sup>。在上世纪70年代中期,人们发现慢性乙肝患者自身产生干扰素的能力低下,应用外源性干扰素后,可增加机体的抗病毒作用,如今干扰素已被广泛应用于HBV感染的治疗中。

最近研究发现,HBV感染过程中产生的X蛋白能激活细胞自噬关键因子Beclin1的表达,使感染细胞对饥饿诱导的自噬更加敏感<sup>[13]</sup>,HBV表面抗原S蛋白也能促进HBV感染细胞自噬的发生<sup>[14]</sup>。我们研究发现HBV感染不仅能增强感染细胞的诱导性自噬,且可增强感染细胞的基本自噬<sup>[15]</sup>。HBV感染引起的细胞自噬,是否影响到干扰素信号途径,是否由于HBV慢性感染诱导细胞自噬的能力降低,致使其自身产生干扰素的能力低下呢?是否可通过提高HBV慢性感染细胞自噬的能力,提高自身产生干扰素的能力提高天然免疫反应呢?HBV能抑制巨噬细胞Toll样受体(TLR3)、黑色素瘤分化基因5(Mda-5)和维甲酸诱导基因I(RIG-I)表达,导致干扰素IFN $\beta$ 分泌下降<sup>[16]</sup>。STAT1甲基化被抑制后可以拮抗干扰素IFN $\alpha$ 对HBV的抗病毒效应<sup>[17]</sup>。我们检测I干扰素(IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ )及干扰素诱导基因(OAS1、IFI27)mRNA表达量,通过siRNA技术敲降自噬关键因子Beclin1和Atg7抑制自噬的发生,对HBV感染后自噬与干扰素信号途径的关系进行了研究。结果表明,抑制细胞自噬可明显降低HBV感染细胞中INF $\beta$ 和IFI27的表达。这为进一步阐明提高HBV感染细胞的天然免疫奠定了一定的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌株、细胞:**pHBV1.3质粒为实验室保存质粒,GFP-LC3质粒为中科院微生物研究所姜学军研究员惠赠;HepG2.2.15细胞、Huh7细胞为本实验室保存。

**1.1.2 抗体:**Beclin1抗体及Atg7抗体购自Sigma公司,PARP抗体为中科院微生物研究所姜学军研

究员惠赠,FITC标记二抗和TRITC标记二抗购自Santa Cruz公司, $\beta$ -actin抗体购自北京中山金桥公司。辣根过氧化物酶标记抗小鼠IgG及辣根过氧化物酶标记抗兔IgG购自GE health公司。

**1.1.3 试剂:**siBeclin1RNA、siAtg7RNA和对照siRNA购自Santa Cruz公司,Lipofectamine2000、TRIzol试剂购自Invitrogen公司。DMEM培养基、胎牛血清购自Gibco公司。

### 1.2 细胞培养

Huh7细胞于10%胎牛血清和100 mg/mL链霉素及100 U/mL的青霉素的DMEM细胞培养基中培养。HepG2.2.15细胞于10%胎牛血清和500  $\mu$ g/mL G418,100 mg/mL链霉素及100 U/mL的青霉素的DMEM细胞培养基中培养。其培养条件均在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下进行。

### 1.3 细胞转染

当细胞密度达到90%时,使用Lipofectamine2000,按照Lipofectamine:质粒(体积 $\mu$ L:质量 $\mu$ g)为2:1进行转染,6孔板每孔使用2  $\mu$ g质粒;当细胞密度达到50%时,使用Lipofectamine2000,按照Lipofectamine:siRNA(体积 $\mu$ L:质量pmol)为1:1进行转染,24孔板每孔使用25 pmol siRNA。

### 1.4 细胞活力检测

共转染HBV质粒和siRNA 72 h的Huh7细胞或者转了siRNA的HepG2.2.15细胞,分入96孔板中,每孔体积100  $\mu$ L。加入20  $\mu$ L MTS和100  $\mu$ L新鲜培养基,37 $^{\circ}$ C继续培养3 h后,吸取同样的上清,酶标仪测定在490 nm处的OD值,每个样品设置3次重复。

### 1.5 Western blot 检测

用细胞裂解液(150 mmol/L NaCl,50 mmol/L Tris-HCl,2 mmol/L EDTA,0.5% TritonX-100,0.5% sodium deoxycholate and 1x complete protease inhibitor)冰上裂解细胞30 min,12000 r/min离心10 min收集上清。用DC法(Bio-Rad Lab)测定蛋白质浓度。加入上样缓冲液于沸水中变性10 min。于12%分离胶进行SDS-PAGE电泳后,用半干转法将蛋白转移到PVDF膜。5%的脱脂牛奶(TBST配)封闭过夜。孵育特异性抗体,anti-Beclin1、anti-Atg7、anti-PARP稀释度为1:1000,anti- $\beta$ -actin为1:2000,二抗分别为辣根过氧化物酶标记的抗兔IgG浓度为1:4000

或抗小鼠 IgG 浓度为 1:2000, 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 自噬体形成定量分析

HepG2. 2. 15 细胞于转染前 1 天均匀铺于 24 孔板的盖玻片上, 转染等量的 GFP-LC3 质粒, 转染 72 h 后, 用冰冷的 PBS 洗 3 次, 在冰上用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 用含 DAPI 的封片剂封片并用荧光显微镜计数 50 个 GFP-LC3 明显表达的细胞中 GFP-LC3 聚集。

### 1.7 实时定量 PCR (Real-time PCR) 分析

收集细胞, 用 TRIzol 裂解细胞, 常规方法提取总 RNA, 并用 DNaseI 去除 DNA。通过变性琼脂糖电泳鉴定 RNA 完整性, 然后定量到 500 ng 利用 PrimeScript™ RT 试剂盒 (TaKaRa) 反转录成 cDNA。设计引物 interferon- $\alpha$ -inducible protein 27 (IFI27; Hs00271467\_m1), IFN  $\beta$  (Hs02621180\_s1), 2', 5'-oligoadenylate synthetase 1 (OAS1; Hs00973637\_m1), 及 IFN $\alpha$  (Hs00353738\_s1)。并利用 TaqMan gene expression assay (Applied Biosystems) 试剂盒进行 Real time PCR 反应, 其中 GAPDH (Hs99999905\_m1) 作为相对定量的参照。采用公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行相对定量的计算, 每个样品重复 3 次, 比较处理细胞系和对照细胞系之间 mRNA 表达水平的变化。

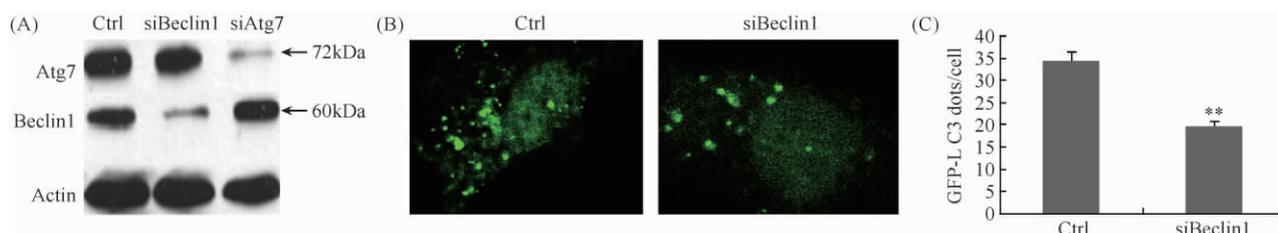


图 1 干扰 Atg7 和 Beclin1 可抑制 HepG2. 2. 15 细胞中自噬小体的形成

Fig. 1 The form of autophagosome was inhibited by knockdown of Atg7 and Beclin1 in HBV-infected HepG2. 2. 15 cells

A. HepG2. 2. 15 cells were transfected with control siRNA, siBeclin1 or siAtg7, and incubated for 2 days. The expression of Beclin1 and Atg7 was examined by western blot analysis. B. Control HepG2. 2. 15 cells and siBeclin1 HepG2. 2. 15 cells were transfected with GFP-LC3. Induction of autophagy was examined 48 hours after transfection. Confocal microscopy was used to examine the subcellular localization of GFP-LC3, which was visualized by fluorescence (green). C. Quantization 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 干扰 Atg7 和 Beclin1 可抑制 HepG2. 2. 15 细胞中 IFN $\beta$ 和 IFI27 的 mRNA 表达

为研究自噬对 HBV 感染细胞中干扰素信号途径的影响, 我们利用 Beclin1 和 Atg7 siRNA 抑制 HepG2. 2. 15 细胞自噬后, 通过 Real-Time PCR 检测

## 2 结果和分析

### 2.1 干扰 Atg7 和 Beclin1 可抑制 HepG2. 2. 15 细胞中细胞自噬的发生

Beclin1 和 Atg7 是细胞自噬发生过程中的 2 个关键因子, 其中 Beclin1 作为自噬相关蛋白的招募分子, 是自噬小体形成的重要起始因子, 而 Atg7 是结合泛素样蛋白 Atg8 及 Atg12 的 E1 样酶, 是自噬体形成的必需因子。为此, 为研究自噬对 HBV 感染细胞中干扰素信号途径的影响, 我们首先利用 siRNA 技术干扰了在 HBV 感染研究中普遍使用的整合有 HBV 基因组的 HepG2. 2. 15 细胞中的 Beclin1 和 Atg7。结果表明, 分别转染 Beclin1 siRNA 和 Atg7 siRNA 后, HepG2. 2. 15 细胞中, Beclin1 和 Atg7 的表达分别比对照降低了 75% 和 80%, 且都表现出了其作用的特异性 (图 1-A)。通过转染细胞自噬标志融合蛋白 GFP-LC3, 观察自噬小体形成发现, 在 Beclin1 siRNA 共转染的细胞中, 自噬小体的数量平均为  $19.6 \pm 1.4$ , 而对照平均为  $34.5 \pm 1.9$  (图 1-B、C), 这表明 Beclin1 siRNA 转染 HepG2. 2. 15 细胞, 降低 Beclin1 表达后, 抑制了细胞自噬的发生。同时, 转染 Atg7 siRNA 的 HepG2. 2. 15 细胞, 其自噬发生也明显降低 (Data not show)。

了其胞内 IFI27, IFN $\beta$ , IFN  $\alpha$ , OAS1 等干扰素的表达情况。结果发现, 利用 Beclin1 siRNA 和 Atg7 siRNA 抑制自噬后, 都能明显地抑制 HBV 稳定转染细胞系 HepG2. 2. 15 中 IFI27 和 IFN $\beta$  的 mRNA 的表达。转染 Beclin1 siRNA 后, IFI27 和 IFN $\beta$  的

mRNA 表达量分别比对照下降了 64.7% 和 59.2% (图 2 - A); 转染 Atg7 siRNA 后, IFI27 和 IFN $\beta$  的 mRNA 表达量分别比对照下降了 60.4% 和 72.4% (图 2 - B)。然而, 无论是转染 Beclin1 siRNA 还是转染 Atg7 siRNA 对 HepG2. 2. 15 中 IFN  $\alpha$  和 OAS1 的变化都无明显影响。

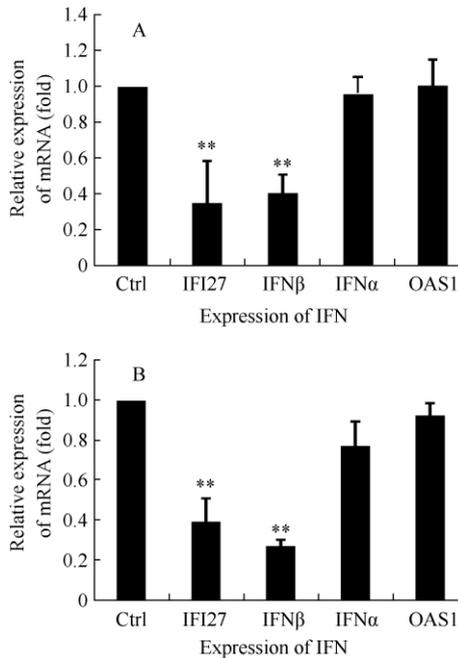


图 2 干扰细胞自噬可抑制 HepG2. 2. 15 细胞干扰素的表达

Fig. 2 The expression of IFN signaling molecules were inhibited in Beclin1 or Atg7-knockdown HepG2. 2. 15 cells.

Total cellular RNA was extracted from HBV-infected siBeclin1 HepG2. 2. 15 (A) or HBV-infected siAtg7 HepG2. 2. 15 (B) and control cells after 3 days of infection. Intracellular mRNA expression of IFN  $\beta$ , OAS1, IFN  $\alpha$ , and IFI27 was measured by real-time PCR. GAPDH was used as an internal control. The fold changes of mRNA are presented after normalization with a mock infected control. The results are presented as means of three independent experiments with standard errors (\*\*,  $P < 0.01$ ).

### 2.3 干扰 Atg7 和 Beclin1 可抑制 HBV 感染的 Huh7 细胞中 IFN $\beta$ 和 IFI27 的 mRNA 表达

为了进一步确证细胞自噬对 I 型干扰素表达的影响, 我们在研究了自噬对 HBV 稳定转染细胞系 HepG2. 2. 15 I 型干扰素表达影响的基础上, 研究了 HBV 瞬时转染细胞中细胞自噬与干扰素表达的影响。结果发现, 利用 HBV 表达质粒 pHBV1.3 转染 Huh7 细胞, 利用 Beclin1 siRNA 和 Atg7 siRNA 抑制细胞自噬后, 其结果与稳定转染细胞系相同。Beclin1

siRNA 和 Atg7 siRNA 抑制的细胞自噬可降低 IFI27 和 IFN $\beta$  的 mRNA 表达, 但对 IFN $\alpha$ , OAS1 表达无明显影响。Beclin1 siRNA 抑制的细胞自噬降低 IFI27 和 IFN $\beta$  mRNA 的表达量分别为 45.8% 和 60.4% (图 3-A), Atg7 siRNA 抑制的细胞自噬降低 IFI27 和 IFN $\beta$  mRNA 的表达量分别为 47.2% 和 95.8% (图 3-B)。

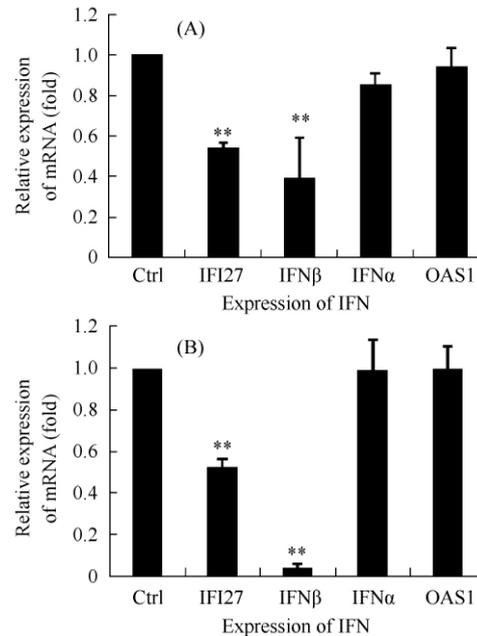


图 3 干扰细胞自噬可抑制 Huh7 细胞干扰素的表达

Fig. 3 The expression of IFN signaling molecules were inhibited in Beclin1 or Atg7-knockdown Huh7 cells.

Total cellular RNA was extracted from HBV-infected siBeclin1 Huh7 (A) or HBV-infected siAtg7 Huh7 (B) and control cells after 3 days of infection. Intracellular mRNA expression of IFN $\beta$ , OAS1, IFN $\alpha$ , and IFI27 was measured by real-time PCR. GAPDH was used as an internal control. The fold changes of mRNA are presented after normalization with a mock infected control. The results are presented as means of three independent experiments with standard errors (\*\*,  $P < 0.01$ ).

### 2.4 干扰 Atg7 和 Beclin1 抑制自噬和 IFN $\beta$ 和 IFI27 的表达与细胞凋亡无关

为阐明 HBV 感染细胞系细胞自噬对干扰素 IFI27 和 IFN  $\beta$  表达的影响是否与细胞凋亡有关, 我们对 Beclin1 siRNA 和 Atg7 siRNA 转染的 HepG2. 2. 15 的细胞活力和 caspase (半胱天冬蛋白酶) 的剪切活力进行了检测。结果发现, Beclin1 siRNA 和 Atg7 siRNA 转染 HepG2. 2. 15 细胞, 抑制其细胞自噬后, 对其细胞活力无明显影响, 且也不引起 caspase 底物 PARP (poly ADP-ribose polymerase)

切割的明显变化(图4)。PARP的切割是caspase依赖性细胞凋亡的一种特异性标志,当caspase依赖性细胞凋亡发生时,116 kDa的PARP会被caspase特异切割成89 kDa和24 kDa。经对Beclin1 siRNA和Atg7 siRNA转染细胞Western blot检测发现,PARP被切割成89 kDa的条带无明显变化(图4B)。

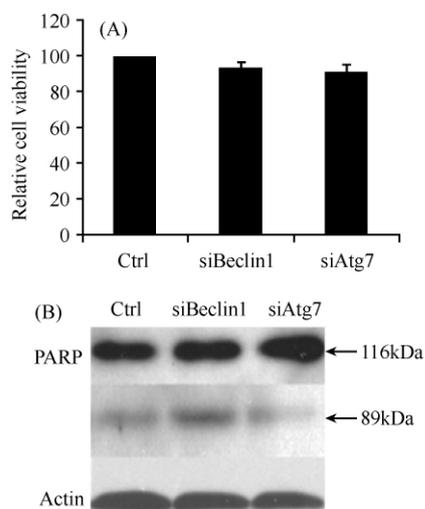


图4 干扰细胞自噬没有诱导细胞凋亡

Fig. 4 Cell apoptosis was not induced in Beclin1 or Atg7-knockdown HepG2.2.15 cells. A. Cell viability was examined in HBV-infected control HepG2.2.15 or siBeclin1 HepG2.2.15. The number of viable cells was counted at 1, 2, and 3 days. The results are presented as the means of three separate experiments with standard errors (\*\*,  $P < 0.01$ ); B. HBV-infected control HepG2.2.15, siBeclin1 or siAtg7 HepG2.2.15 were subjected to western blot analysis with a specific antibody for the detection of PARP. PARP was not cleaved to an 86 kDa signature peptide in Beclin1 or Atg7-knockdown HepG2.2.15 cells. The blot was reprobbed with an antibody to Actin for comparison with an equal protein load.

### 3 讨论

细胞自噬是真核细胞用于清除胞内聚集物、损伤细胞器而维持其稳态平衡的一种溶酶体降解途径。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作用,且与病毒感染、细胞免疫密切相关。一方面,自噬在防御病原微生物感染过程中,不仅能通过自噬小体包裹病原微生物,进而形成自噬溶酶体对其清除,且可通过调解细胞凋亡、调解细胞的天然免疫反应,提高机体免疫能力<sup>[18-19]</sup>。另一方面,一些病原微生物可抑制自噬调解的天然免疫反

应,甚至利用自噬,促进其在细胞中的增殖。如丙型肝炎病毒HCV感染的肝细胞诱导自噬的发生抑制了抗病毒天然免疫<sup>[20]</sup>,轮状病毒(Rotavirus)NSP4蛋白招募自噬小体双层膜结构来增强病毒RNA的复制<sup>[21]</sup>、A型流感病毒(Influenza virus A)可通过M2蛋白诱导自噬小体的积累等<sup>[22]</sup>。细胞自噬在不同的细胞及不同病原微生物感染过程中,发挥着不同的作用。

天然免疫(innate immunity)是宿主抵抗病原微生物感染的第一道防线。感染细胞产生I型干扰素分泌到胞外,与周围未感染细胞结合,通过导致翻译因子eIF2的磷酸化和失活,使其抵抗随后的感染,是天然免疫应答的一个重要方面。干扰素具有抗病毒及免疫调节的双重作用,使用外源性干扰素,可增加机体的抗病毒作用。在HBV感染治疗中,干扰素主要通过JAK-STAT(janus kinase-signal transducer and activator of transcription)信号通路发挥作用,转录激活干扰素刺激基因,促使机体产生抗病毒效应<sup>[23-24]</sup>。RIG-I信号通路在HBV感染过程中发挥作用<sup>[16]</sup>,细胞自噬可能通过某种方式激活RIG-I及其信号通路,使宿主细胞产生干扰素能力增强,从而启动机体抗病毒反应。我们研究发现,抑制细胞自噬,可抑制HBV感染细胞中IFN $\beta$ 和IFI27mRNA的表达,这在一定意义上说明IFN $\beta$ 和IFI27可能参与了RIG-I信号通路;OAS1和IFN $\alpha$ mRNA的表达没有明显变化,表明这两种因子可能不受RIG-I信号通路影响。细胞自噬不仅能促进天然免疫的发生,也能作为一个抑制剂阻止天然免疫的进一步扩大。如在HCV感染的肝细胞抑制自噬的发生时同时降低了IFN $\beta$ 和IFI27mRNA的表达,这可能是HCV感染引起的细胞自噬促进了Mda-5和RIG-I的表达,使干扰素表达增强。

自噬对细胞的存活与凋亡中具有双重作用,如在烟草花叶病毒(TMV)中,自噬能阻止病毒从感染部位向未感染部位扩增,进而引起未感染部位的细胞凋亡<sup>[25]</sup>;而在自噬蛋白缺乏时,流感病毒A能够诱导凋亡,这表明自噬促进了细胞存活<sup>[26]</sup>。细胞凋亡与天然免疫的相互作用中,IFN $\alpha$ 能通过调节JAK-STAT通路或PI3K通路诱导细胞凋亡<sup>[27]</sup>。文献报道通过干扰Beclin1和Atg7抑制细胞自噬,可诱导HCV感染细胞的凋亡发生<sup>[8]</sup>。而在我们的试验中发现,抑制自噬后,并不引起HBV感染细胞凋

亡的发生,对其细胞活力也无明显影响。这可能是细胞自噬被抑制后对 IFN $\alpha$  没有明显作用,从而未能实现凋亡。尽管我们的研究在一定程度上,揭示了 HBV 感染细胞中细胞自噬与干扰素表达、细胞凋亡间的关系,但其作用机理及在 HBV 感染治疗中的作用,还有待进一步研究。

**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的大量指导,并提供了 GFP-LC3 质粒和 PARP 抗体,特别致谢。

## 参考文献

- [1] Levine B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell*, 2005,120: 159-62.
- [2] Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2007,7:767-777.
- [3] Shoji-Kawata S, Levine B. Autophagy, antiviral immunity, and viral countermeasures. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009,1793 (9) :1478-1484.
- [4] Delgado M, Singh S, DeHaro S, Mater S, Ponpuak M, Dinkins C, Ornatowski W, Vergne I, Deretic V. Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunological Reviews*, 2009, 227 (1) : 189-202.
- [5] Takeuchi O, Akira S. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunological Review*. 2007, 220: 214-24.
- [6] Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. Toll-like receptors control autophagy. *The EMBO Journal*, 2008, 27: 1110-21.
- [7] Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science*, 2007, 315: 1398-401.
- [8] Shrivastava S, Raychoudhuri A, Steele R, Ray R, Ray RB. Knockdown of autophagy enhances the innate immune response in hepatitis C virus-infected hepatocytes. *Hepatology*, 2011, 53 (2) :406-414.
- [9] Nguyen VT, Law MG, Dore GJ. Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: epidemiological characteristics and disease burden. *Journal of Viral Hepatitis*, 2009, 16: 453-463.
- [10] Nguyen, VT, Law MG, Dore GJ. Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma : epidemiological characteristics and disease burden. *Journal of Viral Hepatitis*, 2009, 16 (7) : 453-463.
- [11] Beasley RP. Rocks along the road to the control of HBV and HCC. *Annals of Epidemiology*, 2009, 19 (4) : 231-244.
- [12] 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 Medicine Association of Thailand*, 2005, 88 (6) : 788-809.
- [13] 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 (1) : 60-71.
- [14] Li J, Liu Y, Wang Z, Liu K, Wang Y, Liu J, Ding H, Yuan Z. Subversion of Cellular autophagy machinery by Hepatitis B virus for viral envelopment. *Journal of Virology*, 2011, 85: 6319 - 33.
- [15] Sir D, Tian Y, Chen W, Ann DK, Yen TS, James Ou. The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 107:4383-4388.
- [16] 乙型肝炎病毒抑制巨噬细胞 TLR3、Mda-5 和 RIG-I 表达。肝脏 (*Chinese Hepatology*) , 2010, 15 (6) :425-428.
- [17] Li J, Chen F, Zheng M, Zhu H, Zhao D, Liu W, Liu W, Chen Z. Inhibition of STAT1 methylation is involved in the resistance of hepatitis B virus to Interferon alpha. *Antiviral Research*, 2010, 85 (3) :463-469.
- [18] Schmid D, Munz C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity*, 2007, 27: 11-21.
- [19] Li C, Capan E, Zhao Y, Zhao J, Stolaz D, Watkins SC, Jin S, Lu B. Autophagy is induced in CD4 + T cells and important for the growth factor-withdrawal cell death. *Journal of Immunology*, 2006, 177 (8) : 5163-5168.
- [20] Ke PY, Chen S. Activation of the unfolded protein response autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121 (1) :37-56.
- [21] Gannage M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe*, 2009, 6:367-380.

- [22] Zhou Z, Jiang X, Liu D, Fan Z, Hu X, Yan J, Wang M, Gao GF. Autophagy is involved in influenza A virus replication. *Autophagy*, 2009, 5:321-328.
- [23] Moucari R, Korevaar A, Lada O, Martinot-Peignoux M, Boyer N, Mackiewicz V, Dauvergne A, Cardoso AC, Asselah T, Nicolas-Chanoine MH, Vidaud M, Valla D, Bedossa P, Marcellin P. High rates of HbsAg seroconversion in HBeAg positive chronic hepatitis B patients responding to interferon: along-term follow-up study. *Hepatology*, 2009, 50 (6):1084-1092.
- [24] Rumi MG. Pegylated interferon a2b versus pegylated interferon a2a for chronic hepatitis C: The unreached goal of superiority. *Hepatology*, 2009, 51 (16):1097-1099.
- [25] Liu Y, Schiff M, Czymmek K, Tallozy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, 2005, 121:567-577.
- [26] Gannage M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Ramer PC. Matrix protein-2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe*, 2009, 6:367-380.
- [27] Herzer K, Hofmann TG, Teufel A, Schimanski CC, Moehler M, Kanzler S. IFN-alpha-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves promyelocytic leukemia protein and TRAIL independently of P53. *Cancer Research*, 2009, 69:855-862.

## Effect of autophagy on expression of interferon in hepatitis B virus-infected hepatocytes

Yangxiao Ni<sup>1,2</sup>, Yingdi Shi<sup>1,2</sup>, Yingqiu Zhang<sup>3</sup>, Huaiyi Yang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup>Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

<sup>3</sup>Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

**Abstract:** [Object] Autophagy is a lysosomal degradation pathway in which eukaryotic cells dispose intracellular aggregates or defective organelles to maintain cellular homeostasis. Autophagy not only plays a key role in the growth, development, mature and differentiation of cells, but also is associated with pathogenesis, virus infection and immunity. To clarify the mechanism of Hepatitis B virus (HBV) infection and cell immune response, we investigated the relationship between autophagy and IFN factors in the HBV infected cells. [Methods] We inhibited the autophagy by the RNA interference knockdown of Beclin1 and Atg7, the essential autophagic genes, examined the number of autophagosomes by fluorescence microscopy and examined the expression of interferon factors by Real-Time PCR. [Results] Autophagy was inhibited after transfected siBeclin1 or siAtg7. After inhibiting the autophagy, the expression of interferon factors were decreased, but cell apoptosis was not induced. [Conclusion] When the autophagy was inhibited, interferon signaling pathways were impaired in the HBV infected cells. The finding indicated that HBV induced-autophagy enhanced the interferon signaling pathways, and then increased the native immune response.

**Keywords:** autophagy, hepatitis B virus (HBV), interferon (IFN), apoptosis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070149, 30770086)

\* Corresponding author. Tel: +86-10-64807476; Fax: +86610-64807381; E-mail: yanghy@im.ac.cn

Received: 8 May 2012 / Revised: 1 June 2012