

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.16.004
文章编号: 1005-8982 (2024) 16-0017-09

实验研究·论著

乙型肝炎病毒通过自分泌运动因子/溶血磷脂酸 信号损伤对糖稳态的作用及其机制研究*

朱政全¹, 梁斌¹, 石明连¹, 谷云艳², 周先丽¹, 梁成钦³, 刘永明¹, 苏何玲¹

(桂林医学院 1. 生物化学与分子生物学重点实验室, 2. 病理学教研室,
3. 药物化学教研室, 广西 桂林 541199)

摘要: **目的** 探讨乙型肝炎病毒(HBV)通过自分泌运动因子(ATX)/溶血磷脂酸(LPA)信号对糖稳态的损伤作用及相关机制。**方法** 利用基因芯片数据库分析HBV对ATX表达的影响。Western blotting检测HBV细胞株HepG2215、稳定表达HBV反式调节蛋白HBx和PreS2的HBx-HepG2和PreS2-HepG2细胞、对照组HepG2细胞的ATX蛋白表达水平。双荧光素酶报告基因检测HBx和PreS2对ATX启动子作用。构建稳定表达HBx和Pre-S2的小鼠分泌胰岛素细胞HBx-NIT、PreS2-NIT, 检测两者对胰岛素分泌的影响。利用rAAV8-1.3HBV经尾静脉注射C57BL/6小鼠复制HBV小鼠模型, NC为注射同体积生理盐水的C57BL/6小鼠。小鼠按2 g/kg腹腔注射葡萄糖进行糖耐量试验(GTT)。采用液相色谱-质谱联用法、酶联免疫吸附试验和血糖分析仪分别检测小鼠血清LPA、血清胰岛素和血糖浓度。**结果** HepG2215细胞ATX蛋白相对表达量高于HepG2($P < 0.05$)。PreS2与ATX启动子共转染组荧光素酶活性高于ATX启动子转染组($P < 0.05$), HBx与ATX启动子共转染组的荧光素酶活性高于ATX启动子转染组($P < 0.05$)。HBx-HepG2细胞ATX蛋白相对表达量高于HepG2细胞($P < 0.05$), PreS2-HepG2细胞高于HepG2细胞($P < 0.05$)。添加不同浓度LPA后NIT细胞胰岛素分泌表达量比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。1~3 $\mu\text{mol/L}$ LPA相对表达量与胰岛素分泌呈负相关($r = -0.990$, $P < 0.05$)。HBx-NIT细胞添加Ki16425前的胰岛素水平低于NIT细胞($P < 0.05$), PreS2-NIT细胞低于NIT细胞($P < 0.05$)。NIT、HBx-NIT和PreS2-NIT细胞添加Ki16425后的胰岛素水平较添加前高($P < 0.05$)。实验组血清LPA相对表达量、平均空腹血糖浓度、注射葡萄糖后的60、120 min平均血糖浓度和血糖浓度曲线下面积(AUC)平均值较对照组高($P < 0.05$)。实验组注射葡萄糖后15 min血清胰岛素浓度、血清胰岛素水平的AUC值较对照组低($P < 0.05$)。用HBV小鼠GTT血糖AUC绘制的ROC曲线显示, 曲线面积为0.770(95% CI: 0.556, 0.984), 特异性为60.00%(95% CI: 0.122, 0.738), 敏感性为90.00%(95% CI: 0.555, 0.998)。用HBV小鼠空腹血糖浓度绘制的ROC曲线显示, 曲线面积为0.865(95% CI: 0.703, 1.027), 特异性为80.00%(95% CI: 0.444, 0.975), 敏感性为60.00%(95% CI: 0.262, 0.878)。实验组胰岛 β 细胞功能指数、胰岛素敏感指数均小于对照组, 胰岛素抵抗指数大于对照组($P < 0.05$)。**结论** HBV反式调节蛋白HBx和Pre-S2上调ATX的表达, 增强ATX/LPA信号, 导致胰岛素分泌抑制, 糖耐量异常, 糖稳态受损。

关键词: 乙型肝炎病毒; 反式调节蛋白; 自分泌运动因子/溶血磷脂酸信号; 糖稳态
中图分类号: R373.2 **文献标识码:** A

Hepatitis B virus impairs glucose homeostasis via autotaxin/ lysophosphatidic acid signaling*

Zhu Zheng-quan¹, Liang Bin¹, Shi Ming-lian¹, Gu Yun-yan², Zhou Xian-li¹,
Liang Cheng-qin³, Liu Yong-ming¹, Su He-ling¹

(1. Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, 2. Department of Pathology, 3. Department of

收稿日期: 2023-11-21

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81460320, No: 82060787, No: 31560100)

[通信作者] 苏何玲, E-mail: helingsu@glmc.edu.cn; Tel: 13978348621

Medicinal Chemistry, Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541199, China)

Abstract: Objective To investigate the effects and underlying mechanisms of hepatitis B virus on impairing glucose homeostasis through the autotaxin (ATX)/ lysophosphatidic acid (LPA) signaling. **Methods** Gene expression databases were used to analyze the effect of HBV on the expression of ATX. Western blotting (WB) was performed to detect the protein expressions of ATX in HBV-expressing cell line HepG2215, HBx-HepG2 and PRES2-HepG2 cells stably expressing HBV trans-regulatory proteins HBx and PreS2, and normal control (NC) HepG2 cells. The dual luciferase reporter assay was applied to detect the effects of HBx and PreS2 on the promoter activity of ATX. HBx-NIT and PreS2-NIT, the mice insulin-secreting cells with stable expressions of HBx and pre-S2, were constructed to detect the effects of HBx and pre-S2 on insulin secretion. Mice models of HBV infection were established by injecting C57BL/6 mice with rAAV8-1.3 HBV via tail veins, while C57BL/6 mice injected with the same volume of normal saline were set as NCs. The glucose tolerance test (GTT) was performed by intraperitoneal injection of glucose at a dosage of 2 g/kg body weight of mice. Serum LPA, serum insulin and blood glucose were measured by liquid chromatography-mass spectrometry, ELISA kits and blood glucose analyzer, respectively. **Results** The protein expression of ATX in HepG2215 cells was higher than that in HepG2 cells ($P < 0.05$). The luciferase activity in those co-transfected with PreS2 and ATX promoter was higher than that in those transfected with ATX promoter alone ($P < 0.05$), and that in those co-transfected with HBx and ATX promoter was also higher compared with that in those transfected with ATX promoter alone ($P < 0.05$). The protein expression of ATX in HBx-HepG2 cells was higher than that in HepG2 cells ($P < 0.05$), and that in PreS2-HepG2 cells was higher than that in HepG2 cells ($P < 0.05$). There were differences in insulin secretion among NIT cells treated with different concentrations of LPA ($P < 0.05$), and the concentration of LPA was negatively correlated with insulin secretion when it was within the range of 1-3 $\mu\text{mol/L}$ ($r = -0.990$, $P < 0.05$). The level of insulin in HBx-NIT cells before treatment with Ki16425 was lower than that in NIT cells ($P < 0.05$), whereas that in PreS2-NIT cells was lower than that in NIT cells ($P < 0.05$). The levels of insulin in NIT, HBx-NIT and PreS2-NIT cells after treatment with Ki16425 were higher than those before the treatment ($P < 0.05$). The serum level of LPA, the mean concentration of fasting blood glucose, and mean concentrations of blood glucose and the areas under curves (AUCs) of blood glucose concentrations 60 and 120 min after glucose injection in the experimental group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). The serum concentration of insulin and the AUC thereof 15 min after glucose injection in the experimental group were lower than those in the control group ($P < 0.05$). The receiver operating characteristic (ROC) curve based on blood glucose concentrations in the GTT of HBV-infected mice showed an AUC of 0.770 (95% CI: 0.556, 0.984), a specificity of 60.00% (95% CI: 0.122, 0.738), and a sensitivity of 90.00% (95% CI: 0.555, 0.998). The ROC curve based on the concentrations of fasting blood glucose in HBV-infected mice showed an AUC of 0.865 (95% CI: 0.703, 1.027), a specificity of 80.00% (95% CI: 0.444, 0.975), and a sensitivity of 60.00% (95% CI: 0.262, 0.878). The homeostasis model assessment-beta cell and the insulin sensitivity index were lower and the insulin resistance index was higher in the experimental group than in the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** HBV trans-regulatory proteins HBx and PreS2 up-regulate the expression of ATX and enhance the ATX/LPA signaling, leading to inhibition of insulin secretion, abnormal glucose tolerance and impaired glucose homeostasis.

Keywords: hepatitis B virus; trans-regulatory protein; autotaxin/lysophosphatidic acid signaling; glucose homeostasis

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染所致的急、慢性肝炎及其并发症是全球性的公共卫生问题。据世界卫生组织报告, 全球慢性 HBV 感染人群估计有 2.96 亿^[1]。我国 HBV 感染人数约占全球的三分之一^[2]。有研究建议我国开展 HBV 感染的人群筛查, 以提高慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者的治疗率, 降低 CHB 相关病死率^[3]。表明 HBV

感染仍是我国当今的严重健康问题。CHB 导致诸多并发症, 糖尿病是其中之一。有研究指出, CHB 与 2 型糖尿病发病显著相关, 糖尿病是 CHB 的附加代谢并发症^[4-5]。实际上, CHB 患者糖尿病的发病率显著高于正常人群^[6]。然而, CHB 并发糖尿病发病机制尚未明确。

自分泌运动因子 (Autotaxin, ATX) 是一种具有

溶血磷脂酶D活性的分泌型糖蛋白,对溶血磷脂酰胆碱的水解是细胞外溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)的主要来源。LPA是具有广泛生物学效应的信号分子^[7-9],可与 ≥ 6 个细胞膜上的G蛋白偶联受体(LPA受体1-6)相互作用,然后通过不同的G蛋白激活多种信号通路^[10]。大量的研究表明,ATX/LPA信号在胚胎发育^[11]、血管生成^[12-13]和前脂肪细胞分化^[14]等生理过程中发挥重要作用,并与癌细胞的迁移和侵袭^[15-17]、纤维化^[18-20]、动脉粥样硬化^[21]和炎症^[22]等病理过程密切相关。近年来,越来越多的研究指出,ATX/LPA信号涉及糖尿病发病的多个环节。降低血浆中ATX和LPA水平可显著改善高脂饮食喂养小鼠的胰岛素敏感性和葡萄糖耐量^[23]。LPA抑制高脂饮食喂养小鼠的胰岛素分泌,并使葡萄糖稳态受损^[24]。ATX/LPA信号参与肥胖诱导的胰岛素抵抗^[25-27]。值得关注的是,HBV患者血清中检测到ATX表达升高^[28]。而本研究前期工作发现,HBV的X蛋白(HBx)可激活ATX基因启动子,上调ATX的表达,提示HBV感染可增强ATX/LPA信号^[29]。然而,ATX-LPA信号通路在CHB并发糖尿病发病机制中的作用尚待研究。

对美国国立生物技术信息中心(national center for biotechnology information, NCBI)基因芯片数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>)中来自122例HBV感染患者和6例正常人肝组织样品的基因芯片GSE83148数据进行生物信息学分析的结果显示,HBV感染可上调ATX的表达。因此,本研究应用HBV反式调节蛋白HBx和pre-S2表达载体和HBV小鼠模型,探讨体外和体内研究HBV感染对ATX/LPA信号的影响及其对葡萄糖稳态的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

20只6周龄的雄性C57BL/6实验小鼠购自桂林医学院实验动物中心[实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2016-0041,实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2016-0167],人肝癌细胞系HepG2细胞、HBV稳定表达HepG2215细胞由解放军302医院馈赠,NIT细胞购自美国模式培养物集存库,人胚肾细胞293T购自中国科学院细胞库,高糖DMEM培养基、F12K的完全培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素、

嘌呤霉素及胰酶均购自美国Gibco公司,萤光素酶报告基因质粒pGL3系列载体、双萤光素酶报告基因检测试剂盒均购自美国Promega公司,Lipofectamine™2000转染试剂、表达载体pcDNA3.1(+)购自美国Invitrogen公司,引物合成、测序均由上海生物工程有 限公司完成。rAAV8-1.3HBV试剂购自北京五加和分子医学研究所,LPA标准品购自美国Sigma-Aldrich公司,ATX抗体及 β -actin购自英国Abcam公司,Western blotting试剂耗材购自北京索莱宝科技有限公司,慢病毒载体及相应病毒包装蛋白购自上海吉玛公司,小鼠胰岛素检测试剂盒(ALPCO Catalog Number: 80-INSMSU-E01)购自美国EMD Millipore公司。

1.2 Western blotting检测ATX蛋白相对表达量

细胞经裂解、离心获得的上清液用二喹啉甲酰胺法进行蛋白含量测定。取30 μ g总蛋白加样,经SDS-PAGE凝胶电泳后转至聚偏二氟乙烯膜,5%牛血清白蛋白封闭转印膜30 min,TSBT洗膜,加入ATX抗体,4 $^{\circ}$ C保温过夜。TBST溶液洗膜,加入辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的二抗,室温放置2 h。TBST洗膜,ECL发光试剂显色。曝光胶片经显影、定影后,用Gel-Pro Analyzer测定蛋白区带灰度。以 β -actin作为内参,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算ATX蛋白相对表达量。

1.3 双萤光素酶报告基因检测ATX启动子相对活性

ATX启动子相对活性检测按JOSHITA等^[28]方法进行,基本步骤:①HBx和PreS2真核表达载体的构建,以HBV全基因组序列(GenBank accession no. AF384371)设计引物扩增HBx、PreS2基因,并在引物两端分别加上EcoR I和BamH I酶切位点序列。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)产物克隆入pGEM-T Easy载体,进而双酶切亚克隆入pcDNA3.1(+)载体,构建pcDNA3.1(+)-HBx和pcDNA3.1(+)-PreS2真核表达载体,获得的重组载体经DNA测序鉴定。②ATX启动子双萤光素酶报告基因载体的构建,以ATX基因序列(GenBank accession no. NM_001130863)在线预测其启动子,在扩增启动子引物两端分别加上KpnI和XhoI酶切位点。将扩增的ATX启动子序列克隆入pGEM-T Easy Vector,双酶切Teasy-ATX亚克隆入pGL3质粒中构建pGL3-

ATX 启动子双萤光素酶报告基因质粒。③HBx 和 PreS2 对 ATX 启动子作用的检测, pGL3-Basic Vector+pcDNA3.1 (+) 为空载体组, pGL3-Control Vector+pcDNA3.1 (+) 为阳性对照组, pGL3-ATX+pcDNA3.1 (+) 为 ATX 启动子组转染 HepG2 细胞, 检测 pGL3-ATX+pcDNA3.1 (+) 启动子活性。以 ATX 启动子组为对照, pGL3-ATX+pcDNA3.1 (+)-PreS2 为 PreS2 与 ATX 启动子共转染组, pGL3-ATX+pcDNA3.1 (+)-HBx 为 HBx 与 ATX 启动子共转染组转染 HepG2 细胞, 检测 HBx 和 PreS2 对 ATX 启动子的作用, 所有数据以 pRL-TK 载体作内参校正。同时将 ATX 启动子组作为对照组, PreS2 与 ATX 启动子共转染组、HBx 与 ATX 启动子共转染组为实验组。所有载体转染 24 h 后, 裂解细胞、按试剂盒说明书检测荧光。

1.4 HBx 和 PreS2 慢病毒重组载体的构建和病毒包装

HBx 和 PreS2 基因酶切片段以及线性化 LV5 载体于 4 °C 连接 16 h, 转染感受态细胞, 挑取阳性克隆送上海生工生物工程有限公司进行测序鉴定。获得 LV5-PreS2 和 LV5-HBx 重组质粒。将重组质粒和 LV5 分别按比例与包装质粒 (pGag/Pol、pRev、pVSV-G) 于 1.5 mL 无血清 DMEM 中混匀。另取 1.5 mL 无血清 DMEM 与 300 μ L RNAi-Mate 混匀, 将两管混合放置 20 ~ 25 min 后加入到 293T 细胞板中包装病毒。收集细胞上清液包装好的慢病毒并进行病毒的滴度检测。

1.5 稳定表达 HBx 和 PreS2 蛋白的 HepG2、NIT 细胞的建立

HepG2 细胞在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 完全培养基培养。细胞生长融合度 > 80% 时, 以 2×10^5 个/孔细胞密度接种于 24 孔板, 培养过夜后备用。NIT 细胞在含有 10%、青霉素 100 u/mL、链霉素 100 u/mL、90% F12K 的完全培养基培养。以 2×10^6 孔细胞密度接种于 6 孔板中, 培养过夜后备用。LV5、LV5-PreS2 和 LV5-HBx 慢病毒混匀于含总浓度为 5 μ g/mL 的聚凝胺完全培养基, 将混有慢病毒的完全培养基加入 HepG2 细胞板或 NIT 细胞板中, 加入嘌呤霉素在培养箱中培养至荧光检查细胞感染率达 90%。提取细胞总 DNA, PCR 检测 HBx 和 PreS2 基因, 阳性则获得稳定表达 HBx 和 PreS2 蛋白的 HepG2、NIT 细胞。

1.6 葡萄糖刺激胰岛素分泌实验

培养 HepG2、NIT 细胞至融合度达 80% 后, 按 2.5×10^6 个/孔细胞密度分别接种于 6 孔板中, 培养 4 d 后进行实验。用 $1 \times$ PBS 洗涤 6 孔板中细胞 2 次, 各孔中加入 1 mL Krebs-Ringer 缓冲液使细胞饥饿平衡 30 min, 按标记好的分组分别加入 2 mL 高糖 DMEM 培养基、Ki16425 (10 μ mol/L) 高糖 DMEM 培养基和 LPA (1、2、3、5 和 8 μ mol/L) 高糖 DMEM 培养基, 孵育 2 h 刺激 NIT 细胞分泌胰岛素, 胰岛素试剂盒检测细胞上清液胰岛素浓度。以胰酶消化细胞并进行细胞计数, 裂解细胞收集蛋白, 制备细胞总蛋白溶液, 酶标板微孔法考马斯亮蓝检测细胞总蛋白浓度, 用其校正胰岛素分泌量。

1.7 HBV 小鼠模型复制

小鼠以 1×10^{10} vg/只剂量经尾静脉注射 rAAV8-1.3HBV 进行模型复制。对照组为注射同体积生理盐水的 10 周龄 C57BL/6 雄鼠 10 只。所有小鼠自由饮食与饮水, 饲养 4 周后检测血清中 HBV 的拷贝数, $>10^4$ IU/mL 认定为模型复制成功。动物实验在桂林医学院实验动物中心完成, 饲养条件和实验标准均严格按美国健康研究所实验动物护理与利用指南进行^[30]。HBV 感染小鼠实验经桂林医学院医学伦理委员会审核批准。

1.8 糖耐量试验检测胰岛素、LPA 浓度

小鼠按 2 g/kg 腹腔注射葡萄糖进行糖耐量试验 (glucose tolerance test, GTT)。血糖测试仪检测小鼠空腹血糖, 以及葡萄糖加载后 15、30、60 和 120 min 的血糖浓度, 每个时间点重复测量 3 次。同时收集 GTT 过程中的血清样本用于胰岛素、LPA 浓度检测。

1.9 血清胰岛素和 LPA 的测定

小鼠按胰岛素检测试剂盒说明书测定血清胰岛素浓度。应用液相色谱-质谱联用法分析血清 LPA 浓度, 以对照组为对照, 计算实验组 LPA 浓度的相对表达量。

1.10 基因芯片数据分析

从 NCBI GEO DataSets 数据库中下载 GSE83148 基因芯片数据, 应用 GEO2R 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) 分析 HBV 感染对 ATX 基因表达的影响。HBV 感染组为 122 个 HBV 感染患者肝组织样本, 对照为 6 个正常人肝组织样本, 以 $P < 0.001$ 为标准执行分析, 制作火山图。

1.11 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 6 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验或方差分析, 进一步两两比较用 LSD- t 检验, 相关性分析用 Pearson 法, 绘制受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV 上调 ATX 的表达

基因芯片数据火山图分析结果提示, HBV 患者肝组织中 ATX 基因表达上调 ($P = 0.000$) (见图 1)。HepG2、HepG2215 细胞 ATX 蛋白相对表达量分别为 (1.04 ± 0.10)、(2.17 ± 0.06), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 20.209$, $P = 0.000$), HepG2215 细胞高于 HepG2。证实 HBV 上调 ATX 的表达。见图 2。

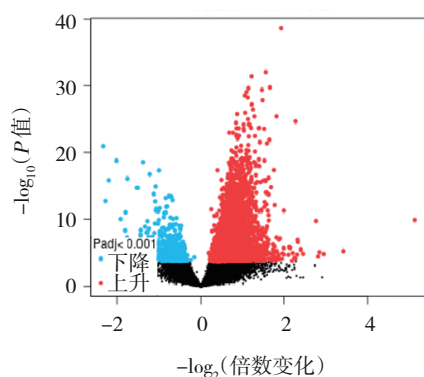


图 1 基因芯片数据分析火山图

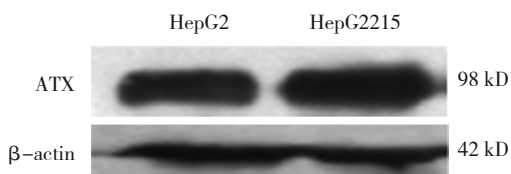


图 2 HepG2、HepG2215 细胞 ATX 蛋白条带图

2.2 各组 ATX 启动子萤光素酶活性比较

空载体组 ATX 启动子萤光素酶活性为 (0.09 ± 0.03), ATX 启动子转染组为 (1.00 ± 0.07), 阳性对照组为 (2.59 ± 0.03), PreS2 与 ATX 启动子共转染组为 (1.15 ± 0.04), HBx 与 ATX 启动子共转染组为 (1.47 ± 0.05), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 3202.000$, $P = 0.000$)。PreS2 与 ATX 启动子共转染组萤光素酶活性高于 ATX 启动子转染组 ($P < 0.05$),

HBx 与 ATX 启动子共转染组的萤光素酶活性高于 ATX 启动子转染组 ($P < 0.05$)。提示 HBV PreS2 蛋白及 X 蛋白可作用于 ATX 启动子, 上调 ATX 的表达。

2.3 HepG2、HBx-HepG2 和 PreS2-HepG2 细胞 ATX 蛋白相对表达量比较

HepG2、HBx-HepG2 和 PreS2-HepG2 细胞 ATX 蛋白相对表达量分别为 (1.04 ± 0.10)、(1.76 ± 0.04)、(1.47 ± 0.07), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 102.036$, $P = 0.000$)。HBx-HepG2 细胞高于 HepG2 细胞 ($P < 0.05$), PreS2-HepG2 细胞高于 HepG2 细胞 ($P < 0.05$)。提示 HBx 和 PreS2 可提高 HepG2 细胞中 ATX 蛋白表达水平, 这与双萤光素酶检测 HBx 和 PreS2 蛋白对 ATX 启动子作用结果相吻合。见图 3。

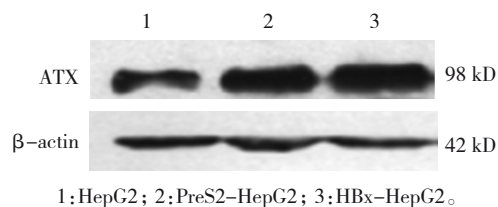


图 3 HepG2、PreS2-HepG2 和 HBx-HepG2 细胞 ATX 蛋白条带图

2.4 添加不同浓度 LPA 后 NIT 细胞胰岛素分泌表达量比较

添加 1、2、3、5 和 8 $\mu\text{mol/L}$ LPA 后 NIT 细胞胰岛素分泌表达量分别为 (409.82 ± 11.16)、(321.28 ± 78.14)、(230.34 ± 38.83)、(280.78 ± 45.13)、(270.83 ± 54.36) $\text{ng}/\mu\text{L}$, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 6.091$, $P = 0.004$)。1 ~ 3 $\mu\text{mol/L}$ LPA 浓度与胰岛素分泌呈负相关 ($r = -0.990$, $P = 0.000$)。

2.5 添加 LPA 受体抑制剂 Ki16425 前后的胰岛素水平比较

NIT、HBx-NIT 和 PreS2-NIT 细胞添加 Ki16425 前后的胰岛素水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), HBx-NIT 细胞低于 NIT 细胞 ($P < 0.05$), PreS2-NIT 细胞低于 NIT 细胞 ($P < 0.05$)。提示 HBV 抑制 NIT 细胞胰岛素水平。NIT、HBx-NIT 和 PreS2-NIT 细胞添加 LPA 受体抑制剂 Ki16425 后的胰岛素水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。NIT、HBx-NIT 和 PreS2-NIT 细胞添加 Ki16425 前后的胰岛素水平比较, 差异均有统计学意义 ($t = 6.414$ 、 8.809 和 7.115 , $P = 0.003$ 、 0.000 和 0.000), 添加后较添加前高。

提示 HBx 和 PreS2 通过 LPA 抑制 NIT 细胞的胰岛素浓度。见表 1。

表 1 NIT、HBx-NIT 和 PreS2-NIT 细胞添加 Ki16425 前后的胰岛素水平比较 (ng/ μ L, $\bar{x} \pm s$)

细胞	添加 Ki16425 前的胰岛素	添加 Ki16425 后的胰岛素
NIT	444.828 \pm 9.660	581.107 \pm 57.513
PreS2-NIT	392.876 \pm 20.816	552.820 \pm 46.248
HBx-NIT	259.275 \pm 37.369	540.893 \pm 67.867
F 值	46.842	0.424
P 值	0.000	0.669

2.6 实验组与对照组血清 LPA 浓度的相对表达量比较

实验组与对照组血清 LPA 浓度的相对表达量分别为 (1.42 \pm 0.50)、(1.00 \pm 0.14), 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 2.585, P = 0.019$), 实验组较对照组高。

2.7 实验组与对照组平均空腹血糖浓度、注射葡萄糖后不同时间平均血糖浓度、曲线下面积平均值比较

实验组平均空腹血糖浓度为 (6.59 \pm 1.96) mmol/L, 对照组为 (4.65 \pm 0.82) mmol/L, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 2.892, P = 0.009$), 实验组较对照组高。实验组注射葡萄糖后的 60、120 min 平均血糖浓度分别为 (18.16 \pm 3.16)、(17.13 \pm 1.17) mmol/L, 对照组分别为 (14.08 \pm 1.37)、(12.11 \pm 0.37) mmol/L, 经 *t* 检验, 差异均有统计学意义 ($t = 3.744, 3.900$, 均 $P = 0.001$), 实验组较对照组高。实验组血糖浓度 ROC 曲线的曲

线下面积 (area under curve, AUC) 平均值为 (67.89 \pm 2.91) mmolh/L, 对照组为 (60.12 \pm 1.12) mmolh/L, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 2.491, P = 0.023$), 实验组较对照组高。

2.8 两组血清空腹胰岛素浓度、注射葡萄糖后 15 min 血清胰岛素浓度、血清胰岛素水平的 AUC 值比较

实验组血清空腹胰岛素浓度为 (1.64 \pm 0.08) ng/mL, 对照组为 (1.61 \pm 0.09) ng/mL, 经 *t* 检验, 差异无统计学意义 ($t = 0.792, P = 0.439$)。实验组注射葡萄糖后 15 min 血清胰岛素浓度为 (1.80 \pm 0.17) ng/mL, 对照组为 (2.05 \pm 0.13) ng/mL, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 3.580, P = 0.002$), 实验组较对照组低。实验组血清胰岛素水平的 AUC 值为 (6.74 \pm 0.16) ngh/mL, 对照组为 (7.19 \pm 0.13) ngh/mL, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 2.236, P = 0.038$), 实验组较对照组低。

2.9 ROC 曲线分析

HBV 小鼠 GTT 血糖的 AUC 为 0.770 (95% CI: 0.556, 0.984), 特异性为 60.00% (95% CI: 0.122, 0.738), 敏感性为 90.00% (95% CI: 0.555, 0.998)。HBV 小鼠空腹血糖的 AUC 为 0.865 (95% CI: 0.703, 1.027), 特异性为 80.00% (95% CI: 0.444, 0.975), 敏感性为 60.00% (95% CI: 0.262, 0.878)。ROC 曲线分析显示, 4 只 (40%) HBV 小鼠空腹血糖浓度大于临界值, 存在糖耐量受损。以实验组空腹血清胰岛素浓度和 GTT 血清胰岛素浓度 AUC 作 ROC 曲线分析未能获得胰岛素分泌受损临界值 ($P > 0.05$)。见表 2 和图 4、5。

表 2 HBV 小鼠血糖、血清胰岛素和 GTT 血糖 AUC、血清胰岛素 AUC 的 ROC 曲线分析参数

指标	最佳截断值	P 值	AUC	95% CI		敏感 性 %	95% CI		特异 性 %	95% CI	
				下限	上限		下限	上限		下限	上限
HBV 小鼠空腹血糖	5.350 mmol/L	0.006	0.865	0.703	1.027	60.00	0.262	0.878	80.00	0.444	0.975
HBV 小鼠 GTT 血糖	66.130 mmolh/L	0.041	0.770	0.556	0.984	90.00	0.555	0.998	60.00	0.122	0.738
HBV 小鼠空腹胰岛素	-	0.131	0.700	0.460	0.940	-	-	-	-	-	-
HBV 小鼠 GTT 血清胰岛素	-	0.096	0.720	0.493	0.947	-	-	-	-	-	-

2.10 两组胰岛素指数比较

两组胰岛 β 细胞功能指数、胰岛素敏感指数、胰岛素抵抗指数比较, 经 *t* 检验, 差异均有统计学意义

($P < 0.05$), 实验组胰岛 β 细胞功能指数、胰岛素敏感指数均小于对照组, 胰岛素抵抗指数大于对照组。见表 3。

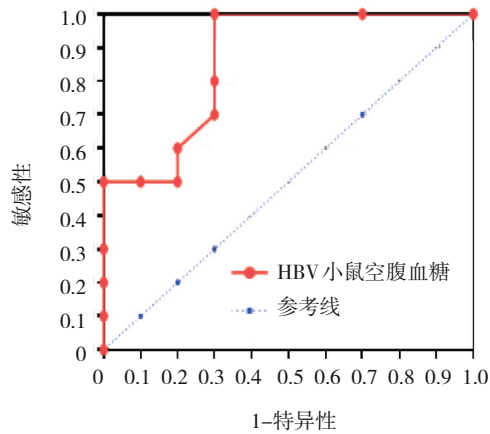


图 4 HBV 小鼠空腹血糖的 ROC 曲线

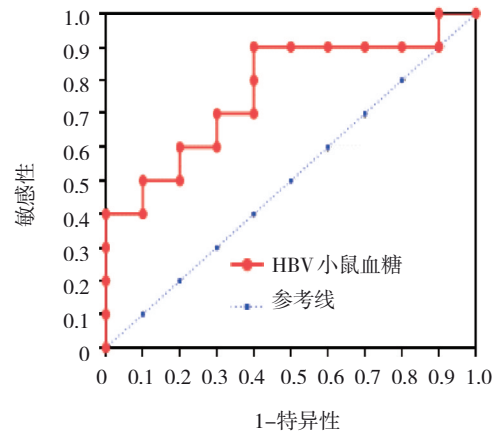


图 5 HBV 小鼠 GTT 血糖的 ROC 曲线

表 3 两组胰岛素指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	胰岛β细胞功能指数	胰岛素敏感指数	胰岛素抵抗指数
实验组	1.87 ± 1.30	0.09 ± 0.02	0.49 ± 0.15
对照组	3.60 ± 1.44	0.14 ± 0.02	0.33 ± 0.05
t 值	2.820	5.590	3.200
P 值	0.011	0.000	0.005

3 讨论

尽管越来越多的临床研究指出 CHB 与糖尿病发病相关, 但 CHB 并发糖尿病的发病机制仍缺乏实验证据。笔者团队报道了先天感染鸭 HBV 的鸭子糖代谢异常, 鸭子的肝内和肝外组织感染损伤葡萄糖耐量^[31]。在本研究结果中, HBV 可通过增强 ATX/LPA 信号损害糖稳态。

首先, 本研究结果发现, HBV 上调 ATX 表达。分析 NCBI 基因芯片数据库的 GSE83148 数据的结果显示, HBV 感染患者的肝组织中 ATX 表达上调。Western blotting 检测证实, HBV 细胞株 HepG2215 中的 ATX 蛋白含量高于对照 HepG2 细胞。鉴于 ATX 具有溶血磷脂酶 D 活性, ATX 表达上调将增强溶血磷脂酶 D 水解溶血磷脂酰胆碱生成 LPA, 加强 ATX/LPA 信号。有意义的是, 与上述 HBV 上调 ATX 表达的分析 and 实验结果相一致, 本研究中实验组血清 LPA 水平高于对照组。目前尚未有 HBV 影响 ATX 表达的研究报道。因此, 这种 HBV 上调 ATX 表达, 从而加强 ATX/LPA 信号的作用是首次被发现。此外, 笔者应用双荧光素酶检测 HBV 反式调节蛋白 HBx 和 PreS2 对 ATX 表达的影响, 结果提示这两种

HBV 反式调节蛋白均可增强 ATX 启动子活性。以 Western blotting 检测分析稳定表达 HBx 和 PreS2 蛋白的 HBx-HepG2 和 PreS2-HepG2 细胞, 结果显示这两种 HBV 反式调节蛋白稳定表达的细胞中, ATX 蛋白水平显著高于对照 HepG2 细胞。这些结果表明, HBV 反式调节蛋白 HBx 和 PreS2 激活 ATX 启动子是该病毒上调 ATX 表达的重要机制。

其次, 本研究结果表明, LPA、HBx 和 PreS2 抑制 NIT 细胞的胰岛素分泌, 并通过 LPA 受体介导对胰岛素分泌的抑制作用。在葡萄糖刺激胰岛素分泌实验中, LPA 抑制 NIT 细胞胰岛素分泌, 并且这种抑制作用在一定的 LPA 浓度范围内与 LPA 浓度呈负相关, 并具有受体介导的量效关系特征。实际上, 有研究报道 LPA 抑制高脂饮食喂养肥胖小鼠的胰岛素分泌^[26, 32], 并且这种抑制作用可被 LPA 受体拮抗剂 Ki16425 解除, 提示 LPA 通过其受体介导抑制胰岛素分泌。有意思的是, 稳定表达 HBV 反式调节蛋白 HBx 和 PreS2 的 HBx-NIT 和 PreS2-NIT 细胞的胰岛素分泌低于对照 NIT 细胞, 表明这两种 HBV 反式调节蛋白抑制 NIT 细胞的胰岛素分泌。不仅如此, 培养基中加入 LPA 受体拮抗剂 Ki16425 可显著促进 HBx-NIT 和 PreS2-NIT 细胞的胰岛素分泌, 提示 HBx 和 PreS2 对 NIT 细胞胰岛素分泌的抑制作用也是由 LPA 受体介导的。LPA 通过其受体抑制胰岛素分泌被认为是糖代谢异常相关疾病的潜在治疗靶点。

最后, 本研究的 HBV 小鼠胰岛素分泌减少, 糖耐量受损。尽管 HBV 小鼠空腹血糖和血清胰岛素水平与对照小鼠无显著差异, 但其胰岛β细胞功能指数和胰岛素敏感指数降低, 胰岛素抵抗指数升高, 表明 HBV 小鼠存在胰岛功能受损, 胰岛素敏感

性下降,以及胰岛素抵抗升高,但 HBV 导致 HOMA 指数异常的机制尚待进一步研究。在 GTT 中,实验组的胰岛素分泌对葡萄糖加载反应迟钝,在注射葡萄糖后的 15 min,其血清胰岛素水平显著低于对照组,并且其 GTT 中的血清胰岛素浓度 AUC 也小于对照组,提示 HBV 小鼠胰岛素分泌能力降低。与此同时,实验组血糖浓度下降迟缓,在注射葡萄糖后的 60、120 min,其血糖水平显著高于对照组,而且其血糖浓度 AUC 也大于对照组。用 HBV 小鼠 GTT 血糖 AUC 绘制 ROC 曲线的分析结果指出,40% 的 HBV 小鼠糖耐量受损。

综上所述,本研究通过基因芯片数据分析和实验检测首次发现 HBV 上调 ATX 的表达,并且在 HBV 小鼠检测到血清 LPA 浓度升高,这表明 HBV 可上调 ATX 表达并增强 ATX/LPA 信号。HBV 反式调节蛋白 HBx 和 PreS2 激活 ATX 启动子,提高 HepG2 细胞 ATX 蛋白含量,揭示了 HBV 上调 ATX 表达的重要机制。而 HBx 和 PreS2 抑制 NIT 细胞的胰岛素分泌,以及 LPA 受体拮抗剂 Ki16425 解除 HBx 和 PreS2 对 NIT 细胞胰岛素分泌的抑制作用的结果表明,HBx 和 PreS2 抑制 NIT 细胞胰岛素分泌是通过 LPA 受体介导的。HBV 小鼠在 GTT 中胰岛素分泌减少和糖耐量异常的结果提示,HBV 减少胰岛素分泌,从而导致葡萄糖利用障碍,糖耐量受损。这些研究结果表明,HBV 通过增强 ATX/LPA 信号,损伤葡萄糖稳态。

参 考 文 献 :

- [1] World Health Organization. Hepatitis B[EB/OL]. (2023-07-18) [2023-12-09]. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>.
- [2] CHEN S Q, LI J, WANG D, et al. The hepatitis B epidemic in China should receive more attention[J]. *Lancet*, 2018, 391(10130): 1572.
- [3] SU S, WONG W C, ZOU Z R, et al. Cost-effectiveness of universal screening for chronic hepatitis B virus infection in China: an economic evaluation[J]. *Lancet Glob Health*, 2022, 10(2): e278-e287.
- [4] LU J, HOU X H, TU H, et al. Chronic hepatitis B virus infection status is more prevalent in patients with type 2 diabetes[J]. *J Diabetes Investig*, 2017, 8(4): 619-625.
- [5] KIM K, CHOI S, PARK S M. Association of fasting serum glucose level and type 2 diabetes with hepatocellular carcinoma in men with chronic hepatitis B infection: a large cohort study[J]. *Eur J Cancer*, 2018, 102: 103-113.
- [6] XU C, CHEN J J, ZHANG P A. Relationship between diabetes mellitus and cirrhosis risk in chronic hepatitis B patients in Wuhan, China[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 8112-8119.
- [7] KAYA B, DOÑAS C, WUGGENIG P, et al. Lysophosphatidic acid-mediated GPR35 signaling in CX3CR1+ macrophages regulates intestinal homeostasis[J]. *Cell Rep*, 2020, 32(5): 107979.
- [8] PLASTIRA I, BERNHART E, JOSHI L, et al. MAPK signaling determines lysophosphatidic acid (LPA)-induced inflammation in microglia[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 127.
- [9] HARPER K, BROCHU-GAUDREAU K, SAUCIER C, et al. Hypoxia downregulates LPP3 and promotes the spatial segregation of ATX and LPP1 during cancer cell invasion[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(9): 1403.
- [10] ZHANG X T, LI M M, YIN N, et al. The expression regulation and biological function of autotaxin[J]. *Cells*, 2021, 10(4): 939.
- [11] DEL CASTILLO U, GNAZZO M M, SORENSEN TURPIN C G, et al. Conserved role for Ataxin-2 in mediating endoplasmic reticulum dynamics[J]. *Traffic*, 2019, 20(6): 436-447.
- [12] SMYTH S S, KRAEMER M, YANG L P, et al. Roles for lysophosphatidic acid signaling in vascular development and disease[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020, 1865(8): 158734.
- [13] ABDEL-LATIF A, HERON P M, MORRIS A J, et al. Lysophospholipids in coronary artery and chronic ischemic heart disease[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2015, 26(5): 432-437.
- [14] FEDERICO L, REN H M, MUELLER P A, et al. Autotaxin and its product lysophosphatidic acid suppress brown adipose differentiation and promote diet-induced obesity in mice[J]. *Mol Endocrinol*, 2012, 26(5): 786-797.
- [15] BRINDLEY D N, TANG X Y, MENG G M, et al. Role of adipose tissue-derived autotaxin, lysophosphatidate signaling, and inflammation in the progression and treatment of breast cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5938.
- [16] AMARAL R F, GERALDO L H M, EINICKER-LAMAS M, et al. Microglial lysophosphatidic acid promotes glioblastoma proliferation and migration via LPA1 receptor[J]. *J Neurochem*, 2021, 156(4): 499-512.
- [17] AIELLO S, CASIRAGHI F. Lysophosphatidic acid: promoter of cancer progression and of tumor microenvironment development. A promising target for anticancer therapies? [J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1390.
- [18] LEI H R, GUO M, LI X P, et al. Discovery of novel indole-based allosteric highly potent ATX inhibitors with great in vivo efficacy in a mouse lung fibrosis model[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(13): 7326-7346.
- [19] NINO I, KAFFE E, MÜLLER S, et al. Pharmacologic targeting of the ATX/LPA axis attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2018, 52: 32-40.
- [20] CORDOVA-CASANOVA A, CRUZ-SOCA M, CHUN J, et al. Activation of the ATX/LPA/LPARs axis induces a fibrotic response in skeletal muscle[J]. *Matrix Biol*, 2022, 109: 121-139.
- [21] de MONTGOLFIER O, POULIOT P, GILLIS M A, et al.

- Systolic hypertension-induced neurovascular unit disruption magnifies vascular cognitive impairment in middle-age atherosclerotic LDLr^{-/-}:hApoB^{+/+} mice[J]. *Geroscience*, 2019, 41(5): 511-532.
- [22] TRIPATHI H, AL-DARRAJI A, ABO-ALY M, et al. Autotaxin inhibition reduces cardiac inflammation and mitigates adverse cardiac remodeling after myocardial infarction[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 149: 95-114.
- [23] DUSAULCY R, RANCOULE C, GRÈS S, et al. Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid[J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(6): 1247-1255.
- [24] SUN S H, WANG R, SONG J W, et al. Blocking gp130 signaling suppresses autotaxin expression in adipocytes and improves insulin sensitivity in diet-induced obesity[J]. *J Lipid Res*, 2017, 58(11): 2102-2113.
- [25] D'SOUZA K, NZIRORERA C, COWIE A M, et al. Autotaxin-LPA signaling contributes to obesity-induced insulin resistance in muscle and impairs mitochondrial metabolism[J]. *J Lipid Res*, 2018, 59(10): 1805-1817.
- [26] RANCOULE C, DUSAULCY R, TRÉGUER K, et al. Involvement of autotaxin/lysophosphatidic acid signaling in obesity and impaired glucose homeostasis[J]. *Biochimie*, 2014, 96: 140-143.
- [27] BOUCHER J, QUILLIOT D, PRADÈRES J P, et al. Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression[J]. *Diabetologia*, 2005, 48(3): 569-577.
- [28] JOSHITA S, ICHIKAWA Y, UMEMURA T, et al. Serum autotaxin is a useful liver fibrosis marker in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Hepatol Res*, 2018, 48(4): 275-285.
- [29] 肖雅伦, 苏何玲, 谭燕莲, 等. 乙型肝炎病毒 X 蛋白对 autotaxin 表达的影响及其意义[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(13): 2088-2092.
- [30] NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals[M]. Washington (DC): National Academies Press (US); 1996. PMID: 25121211.
- [31] TAN Y L, LIU J X, QIN Y J, et al. Glucose homeostasis is dysregulated in ducks infected with duck hepatitis B virus[J]. *Intervirology*, 2021, 64(4): 185-193.
- [32] RANCOULE C, ATTANÉ C, GRÈS S, et al. Lysophosphatidic acid impairs glucose homeostasis and inhibits insulin secretion in high-fat diet obese mice[J]. *Diabetologia*, 2013, 56(6): 1394-1402.

(李科 编辑)

本文引用格式: 朱政全, 梁斌, 石明连, 等. 乙型肝炎病毒通过自分泌运动因子/溶血磷脂酸信号损伤对糖稳态的作用及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(16): 17-25.

Cite this article as: ZHU Z Q, LIANG B, SHI M L, et al. Hepatitis B virus impairs glucose homeostasis via autotaxin/lysophosphatidic acid signaling[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(16): 17-25.