

HBV 基因经生殖细胞垂直传播与 DNA 甲基化研究进展

谭小方(综述)/黄天华*(审校)

(汕头大学医学院生殖医学研究中心,广东 汕头 515041)

【摘要】 乙肝病毒 (HBV) 基因可能通过生殖细胞垂直传播并在早期胚胎中复制与表达。DNA 甲基化模式的改变是胚胎发育的关键, HBV 感染可导致宿主细胞表观基因组修饰异常, 诱发染色体不稳定, 影响胚胎的正常发育并增加肿瘤发生的风险。本文中对近年 HBV 基因的垂直传播及其与 DNA 甲基化的关系的研究进行综述。

【关键词】 HBV; DNA 甲基化; 垂直传播

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2008)03-0247-03

乙型肝炎是世界各国尤其是我国当前面临的重大公共卫生问题, 因此其传播途径, 发病机制及治疗手段的研究一直是医学研究的重点之一。业已通过实验证实, 乙肝病毒 (HBV) 基因可能经生殖细胞带入胚胎, 且在胚胎细胞中复制与表达。但迄今为止其复制与表达的调控机制及其对胚胎发育的影响在国内外文献中尚未见报道。DNA 甲基化是胚胎发育过程中的一个重要调控方式。本文中我们就乙肝病毒在胚胎中的复制、表达与 DNA 甲基化的关系作一综述。

1 乙肝病毒基因的垂直传播

真正意义上的垂直传播是指患者的生殖细胞受病毒的感染, 在受精时通过精子或卵子, 将病毒基因带到胚胎进而使子代患病的一种传播方式。目前, 人类 HBV 感染是否存在通过真正意义上的垂直传播发生感染尚缺乏足够证据, 但一些动物试验提示存在“乙肝病毒基因有可能通过生殖细胞垂直传播”的可能性。乙肝病毒基因的垂直传播分为父婴垂直传播和母婴垂直传播。

1.1 乙肝病毒基因的父婴垂直传播

1985 年 Hadchouel 等^[1]用分子杂交技术, 对 3 例乙型肝炎患者的精子进行研究, 发现其中两例的精子中存在 HBV DNA 整合。他们提出“乙肝病毒有可能通过生殖细胞垂直传播”的假设。后来 Davison 等^[2]从“血清中未发现病毒复制标志”的患者精液中也检测出 HBV DNA。1993 年, 郎振为等^[3]报道 HBV 存在于精原细胞, 初级精母细胞和精子细胞。黄建民等^[4-5]从 9 例乙肝患者取精样, 与去透明带金黄地鼠卵进行异种体外受精, 制备人精子染色体, 运用荧光原位杂交技术, 在 1 例慢性乙肝患者的精子染色体上检测到 HBV DNA 杂交信号, 首次证实了 HBV DNA 能够在人精子染色体上整合, 并发现乙肝病毒感染可诱发宿主细胞染色体畸变。继后一些学者^[6-7]分别将金黄地鼠和人精子经含有

HBV 基因的质粒转染后, 与去透明带金黄地鼠卵母细胞受精, 然后用 PCR、RT-PCR 技术在早期胚胎细胞中检测到 HBV 基因的存在和表达, 为 HBV 通过精子垂直传递提供了直接的实验证据。

1.2 乙肝病毒基因的母婴垂直传播

1989 年, 周恩亮等^[8]用原位杂交技术在 1 例肝炎患者卵泡细胞中检测到了 HBV DNA, 发现它们主要分布在卵泡细胞的细胞质及卵巢间质细胞内。此研究表明在自然状态下, HBV 可感染女性生殖腺的细胞, 为 HBV 可能经卵母细胞垂直传播提供了间接证据。张清健等^[9]将小鼠卵母细胞与 HBV 质粒共培养后, 用 FISH 技术证实卵的透明带不能成为阻挡 HBV DNA 进入的屏障, HBV DNA 能够整合到卵母细胞的染色体上。继后陈桂兰等^[10]的研究发现, 整合到卵母细胞基因组中的 HBV DNA 不会影响卵母细胞的受精功能, 该类卵母细胞能与正常精子受精, 由卵母细胞带入胚胎内的 HBV 基因也能在胚胎细胞中复制与表达。此研究为 HBV 经卵母细胞垂直传播提供了直接的实验证据。

2 DNA 甲基化与早期胚胎发育

表观遗传学是研究不涉及 DNA 序列改变的基因表达与调控的可遗传修饰, 即研究从基因演绎为表型的一门新兴学科。DNA 甲基化是常见的表观遗传学修饰方式, 指在 DNA 甲基转移酶的作用下, 将甲基加在 CpG 二联核苷酸胞嘧啶上。在结构基因的 5' 端调控区域, CpG 二联核苷酸常以成簇串联的形式排列, 这种富含 CpG 二联核苷酸的区域称为 CpG 岛。CpG 岛的特点^[11]为: ① CpG 岛主要位于基因的启动子区域; ② CpG 岛一般是非甲基化的; ③ 启动子区域的 CpG 甲基化可直接导致相关基因沉默, 即 DNA 甲基化一般与基因沉默有关, 而非甲基化一般与基因的活化有关。去甲基化则往往与一个沉默基因的重新激活相关联; ④ 启动子区 CpG 甲基化的密度与转录的抑制程度有关, 弱的启动子能被密度

收稿日期: 2008-01-18; 修订日期: 2008-02-28

基金项目: 国家自然科学基金资助(39970374)

作者简介: 谭小方(1982-), 男, 江西省丰城市人, 硕士研究生, 研究方向: 生殖遗传学。

* Correspondence to: HUANG Tian-hua, thuang@stu.edu.cn

较低的甲基化完全抑制,当启动子被增强子增强时,能恢复转录功能,但如果甲基化的密度进一步增加,转录又会被完全抑制。DNA 甲基化主要通过两个机制来阻止基因的表达,其一是启动子区域的 CpG 甲基化可阻碍转录因子复合体与 DNA 的结合。其二是甲基结合域蛋白(MBDs)和甲基化 DNA 结合。

2.1 早期胚胎的甲基化调节

在哺乳动物的早期胚胎发育过程中要经历 2 次表观基因组重编:一次在生殖细胞形成过程中;一次在早期胚胎的着床前发育过程中。在这两个阶段甲基化方式会发生全基因组范围内的重排,使细胞获得广泛的分化潜力。对于基因表达调控来说,不同器官和时间发生 DNA 甲基化谱的重排是细胞分化的重要方式。受精前生殖细胞的 DNA 是高度甲基化的。受精后,精子便发生快速,主动的去甲基化,这个过程起始于原核 DNA 复制开始前,表明它不是依赖 DNA 复制的去甲基化^[12]。精子的主动去甲基化与精子染色质的表观遗传重构有关。Reik 等^[13]用抗 5-MeC (5-methylcytosine) 抗体荧光免疫组化检测发现,小鼠精原核的主动去甲基化在受精后的 4 h 内便已完成,这种低甲基化状态一直维持到桑椹期。然而卵原核与精原核的快速,主动去甲基化不同,卵原核的去甲基化是逐步,被动的和具有 DNA 复制依赖性^[14]。这种区别是因为在卵原核中,去甲基化与维持 DNA 甲基化水平的酶——DNA 甲基转移酶 I (DNA methyl-transferase I, Dnmt1) 的丢失有关,它主要发生于受精卵第一次 DNA 复制和细胞分裂后。此后甲基化的程度越来越低,到桑椹胚达到最低水平。在从桑椹胚发育到囊胚时,会发生细胞特异的重新甲基化,在胚胎植入的阶段囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM)会选择性地再次甲基化,而在胚外组织 DNA 甲基化水平维持不变。囊胚内细胞团是哺乳动物发育的胚基,将发育成不同的组织和器官,所以其特定的甲基化模式,对于植入后的胚胎发育起着关键作用。这种在 ICM 发育的不同阶段,不同细胞,不同基因的选择性甲基化,对分化成各种特异基因表达类型的细胞有重要意义。这种基因表达的时空性调节是细胞分化的基础。

2.2 甲基化异常与胚胎发育

在配子发生和胚胎发育过程中,如果表观基因组重新编程发生误差将导致多种表观遗传缺陷性疾病,并且表观遗传修饰的重新编程对环境变化非常敏感。Oakes 等^[15]在动物精子发生过程中用 5-氮杂胞苷处理,结果显示不育率增加,并且使植入前胚胎的发育能力显著下降。5-氮杂胞苷使不育率增加是因为精子的活动度,受精能力,早期胚胎发育能力和 DNA 的甲基化程度等方面都发生了改变,因为 5-氮杂胞苷可以使精子 DNA 甲基化程度减低,可以选择性地抑制 DNA 从头甲基化能力。Eggan 等^[16]发现克隆成功的老鼠有正常的 X 染色体失活,表明能够存活的胚胎有正常的表观基因组重编;但克隆的胚胎和正常的胚胎在表观遗传修饰方面还是存在明显的差别。Kang 等^[17]对克隆牛的植入前胚胎用亚硫酸盐测序的甲基化分析方法,发现在桑椹胚中其甲基化程度比正常的高。Wendy 等^[18]发现在高度甲基化的体细胞核克隆的胚胎中存在迷乱的甲基化重排。他们发现克隆胎缺乏进一步被动去甲基化的能力,而且胚胎植入前再次甲基化发生在 4 细胞胚胎和 8 细胞胚胎阶段,比正常胚胎早,桑椹胚的甲基化程度比正常的高。此研究表明在大多数克隆胚胎中表观基因组重编比较混乱,

这说明核移植克隆成功率比较低的原因是由于表观基因组表观遗传状态重新编程的失败。因此正常的表观遗传学修饰对胚胎正常发育是必须的而且是非常重要的。

3 DNA 甲基化与 HBV 感染

将纯化的 HBV 全基因,通过原核显微注射方法,建立的 HBV 转基因小鼠模型为研究 HBV DNA 甲基化提供了理想的实验材料。1987 年 Yamamura 等^[19]在一些 HBV 转基因小鼠中,没有检测到乙肝表面抗原和 E 抗原的表达,但发现 HBV DNA 序列中所有的 CCGG 位点都被甲基化了。Araki 等^[20]也在 HBV 转基因小鼠中发现 HBV DNA 被甲基化,检测不到其抗原的表达。他们分析超甲基化与基因沉默的关系,将 5-氮杂胞苷注入 HBV 转基因小鼠中,使 HBV DNA 去甲基化,结果 3 周后观察到乙肝表面抗原的表达伴之 HBV DNA 甲基化程度明显减低。他们的研究表明,在转基因小鼠中 HBV DNA 的甲基化与乙肝抗原的表达呈负相关。继后他们又发现在转基因小鼠中,HBV DNA 甲基化存在组织特异性^[21],在肝细胞中 HBV 基因呈现高表达而在其他组织细胞中并非如此,表明甲基化的组织特异性可能是 HBV 具有嗜肝性的原因之一。1998 年 Schweizer 等^[22]发现在转基因小鼠中 HBV 基因的表达不仅与 HBV DNA 的去甲基化有关,还与激素和一些肝细胞转录因子参与有关。他们认为,DNA 的去甲基化是个复杂的过程,除了可以通过去甲基化酶和 DNA 修复途径而主动去甲基化,DNA 复制还可以对 DNA 上 5 甲基胞嘧啶的去除发挥重要作用。由此认为 HBV DNA 也参与了肝细胞中甲基化的调节过程。

癌基因的低甲基化和抑癌基因启动子高甲基化是肿瘤发生的重要机制。HBV 感染可导致抑癌基因启动子的高甲基化和全基因组低甲基化。现在已发现 HBV 感染与 p16^[23]、RAS 相关结构域家族基因 1(RASSF1)^[24]、谷胱甘肽 S 转移酶 1(GSTP1)^[25]、结肠多发性腺瘤样息肉病基因(APC)、和 E-cadherin^[26]等的甲基化有一定关系。由此可见,HBV 感染诱导的 DNA 甲基化的改变涉及细胞周期调控、信号转导、肿瘤转移浸润等方面。这提示 HBV 介导的 DNA 甲基化的改变参与了肿瘤发生的各个阶段。

病毒进入细胞也可诱发病毒 DNA 甲基化,使病毒基因沉默。其分子机制是 Dnmt 催化病毒基因启动子区甲基化,甲基化的启动子募集甲基化 CpG 结合蛋白(MeCP) 1 和 2、组蛋白去乙酰化酶(HDACs)、转录抑制因子等形成特异性蛋白复合体,进而在 HDACs (组蛋白去乙酰化酶)作用下染色体变得紧密压缩,从而使基因转录受到抑制,使基因组的稳定性得以维持^[27]。虽然这种病毒 DNA 的甲基化可以有效阻止外源 DNA 的致病作用,但是在病毒基因甲基化修饰的同时,正常 DNA 也可能被甲基化修饰。HBV 感染也可通过下调 DNA 甲基化转移酶 3B(DNMT3B)使宿主全基因组低甲基化,HBV 基因可促进这种调节^[28]。HBV 感染导致的全基因组低甲基化可导致染色体的不稳定性增高,出现高频率杂合性缺失,这也是 HBV 导致肿瘤的重要机制。

4 问题与展望

上述研究虽然使人们对 HBV 基因复制与表达的机制有更多的了解,但又提出了不少新的问题。譬如,HBV 基因能够整合到精子或卵母细胞的染色体上,由精子或卵子介导的 HBV 基因能

能够在早期胚胎细胞中复制与表达。那么 HBV 基因在早期胚胎细胞中复制和表达的调控机制是什么?与甲基化有什么关系?从雌雄配子经受精到早期胚胎发育,整合在配子基因组中的 HBV 基因的甲基化状态经历了何种变化过程?既然,HBV 具有嗜肝性,为何在早期胚胎细胞中能够复制和表达?早期胚胎细胞中哪些基因参与了 HBV 基因的复制和表达?其分子机制是什么?随着这些问题的解决,将为人们揭示更多 HBV 基因行为的奥秘。

HBV 基因通过生殖细胞传递给下一代,它可能造成的严重后果是:①成为 HBV 传播的新途径;②在宿主配子染色体上的整合可导致染色体不稳定从而诱发染色体畸变,增加流产、死产和出生缺陷率;③随着胚胎发育和个体生长,整合在配子基因组中的 HBV 基因有可能增加肿瘤发生的风险。

早期的胚胎发育是表观基因组重新编程的重要过程,越来越多的研究表明病毒基因在调节 DNA 甲基化方面起着重要作用,使一些基因表达上调或下调,从而影响正常的胚胎发育。因此研究从人类配子到胚胎发育各阶段中,HBV DNA 甲基化的变化过程及其对相关基因表达的影响,对维护人类健康有重要的理论和实践意义。

参考文献:

- [1] Hadchouel M, Scotto J, Huret JL, et al. Presence of HBV DNA in spermatozoa: a possible vertical transmission of HBV via the germ line [J]. J Med Virol, 1985, 16(1): 60-66.
- [2] Davison F, Alexander G, Trowbridge R, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leukocytes, of chronic HBsAg carriers. A lack of relationship with serum makers of replication [J]. Hepatol, 1987, 4(1): 37-44.
- [3] 郎振为, 孟忻, 肖桂兰, 等. 乙型肝炎患者睾丸组织中 HBV 分布的研究 [J]. 中华医学杂志, 1993, 73(6): 329-331.
- [4] Huang JM, Huang TH, Qiu HY, et al. Studies on the integration of hepatitis B virus DNA sequence in human sperm chromosomes [J]. Asian J Androl, 2002, 4(3): 209-212.
- [5] Huang JM, Huang TH, Wang YH, et al. Effects of hepatitis B virus infection on human sperm chromosomes [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(4): 736-740.
- [6] 黄天华, 谢庆东, 陈霓彤, 等. 精子携带的乙肝病毒基因在金黄地鼠胚胎中的复制与表达 [J]. 癌变·畸变·突变, 2005, 17(4): 193-197.
- [7] Ali Bahy, Huang TH, Salem HH, et al. Expression of hepatitis B virus genes in early embryonic cells originated from hamster ova and human spermatozoa transfect with the complete viral genome [J]. Asian J Androl, 2006, 8(3): 273-279.
- [8] 周恩亮, 赵连三, 黎飞, 等. 乙型肝炎病患者卵母细胞内检出乙肝病毒 DNA [J]. 遗传与疾病, 1989, 6(1): 46.
- [9] 张清健, 黄天华, 谢庆东, 等. HBV DNA 重组质粒转染小鼠卵母细胞的研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2004, 16(3): 185-189.
- [10] 陈桂兰, 黄天华, 谢庆东, 等. 卵母细胞携带的 HBV DNA 在小鼠早期胚胎中的复制与表达 [J]. 癌变·畸变·突变, 2005, 17(3): 179-182.
- [11] 薛京伦. 表观遗传学——原理、技术与实践 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 61.
- [12] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development [J]. Science, 2001, 293(5532): 1089-1093.
- [13] Santos F, Hendrich B, Reik W, et al. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo [J]. Dev Biol, 2002, 241(1): 172-182.
- [14] Wolffe AP, Jones PL, Wade PA. DNA demethylation [J]. Proc Natl Acad Sci, 1999, 9(11): 5894-5896.
- [15] Oakes CC, Kelly TLJ, Robaire B, et al. Adverse effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on spermatogenesis include reduced sperm function and selective inhibition of de novo DNA methylation [J]. Phar, 2007, 322(3): 1171-1180.
- [16] Eggan K, Akutsu H, Yanagimachi R, et al. X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos [J]. Science, 2000, 290(5496): 1578-1581.
- [17] Kang YK, Koo DB, Park JS, et al. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos [J]. Nat Genet, 2001, 28(2): 173-177.
- [18] Dean W, Santos F, Reik W, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos [J]. PNAS, 2001, 98(24): 734-738.
- [19] Yamamura K, Tsurimoto T, Ebihara T, et al. Methylation of hepatitis B virus DNA and liver-specific suppression of RNA production in transgenic mouse [J]. Cancer Res, 1987, 47(7): 681-688.
- [20] Araki K, Miyazaki J, Tsurimoto T, et al. Demethylation by 5-azacytidine results in the expression of hepatitis B virus surface antigen in transgenic mice [J]. Cancer Res, 1989, 49(4): 295-298.
- [21] Araki K, Akagi K, Miyazaki J, et al. Correlation of tissue-specific methylation with gene inactivity in hepatitis B virus transgenic mice [J]. Cancer Res, 1990, 50(12): 1265-1271.
- [22] Schweizer J, Valenza P, Goret F, et al. Control of expression and methylation of a hepatitis B virus transgene by strain-specific modifiers [J]. DNA Cell Biol, 1998, 17(5): 427-435.
- [23] Jicai Z, Zongtao Y, Jun L, et al. Persistent infection of hepatitis B virus is involved in high rate of p16 methylation in hepatocellular carcinoma [J]. Mol Carcinog, 2006, 18(7): 530-536.
- [24] Zhong S, Tang MW, Yeo W, et al. Intensive hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinomas [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(9): 3376-3382.
- [25] Zhong S, Tang MW, Yeo W, et al. Silencing of GSTP1 gene by CpG island DNA hypermethylation in HBV-associated hepatocellular carcinomas [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(4): 1087-1092.
- [26] Yang B, Guo M, Herman JG, et al. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma [J]. Am J Pathol, 2003, 163(3): 1101-1107.
- [27] Li HP, Leu YM, Chang YS. Epigenetic changes in virus-associated human cancers [J]. Cell Res, 2005, 15(4): 262-271.
- [28] Park IY, Sohn BH, Yu E, et al. Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein [J]. Gastroenterol, 2007, 132(4): 1476-1494.
- [29] Katoh H, Shibata T, Kokubu A, et al. Epigenetic instability and chromosomal instability in hepatocellular carcinoma [J]. Am J Pathol, 2006, 168(4): 1375-1384.