

网络出版时间:2024-02-01 15:58:27 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240201.1115.021

## 血红素加氧酶-1 通过诱导抗病毒蛋白的表达增强 IFN- $\alpha$ 抗 HBV 效应

笪蔚<sup>1</sup>,王琴<sup>1</sup>,魏安邦<sup>2</sup>,张浩<sup>1</sup>,汪任冰<sup>1</sup>,刘倩<sup>1</sup>,周强<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨血红素加氧酶-1 (HO-1) 对 HBV 复制的作用及 HO-1 联合  $\alpha$ -干扰素 (IFN- $\alpha$ ) 的抗病毒效应。方法 以 HepG2. 2. 15 细胞和 HBV 1. 3 质粒转染 HepG2 细胞即 HepG2-HBV1. 3 为 HBV 复制细胞模型;血红素 (Hemin) 分别处理 HepG2. 2. 15 和 HepG2-HBV1. 3 细胞,诱导 HO-1 表达;CCK-8 评估 Hemin 对 HepG2、HepG2. 2. 15 的毒性作用;化学发光法分析 Hemin 处理组及 si-HO-1 等实验组上清液中 HBsAg、HBeAg;RT-qPCR 分析 HO-1、IFN- $\beta$ 、HBV-DNA;Western blot 分析 IRF-3、JAK/STAT 信号通路中相关分子的表达;Hemin 联合 IFN- $\alpha$  处理 HepG2. 2. 15,监测 HO-1 是否具有协同 IFN- $\alpha$  抗病毒效应。结果 Hemin 剂量依赖性诱导 HO-1, HO-1 被诱导后发挥显著的抗 HBV 效应,同时 IFN- $\beta$ 、IRF-3 及 JAK/STAT 信号通路中 IRF-9、MxA 的表达均增加。沉默 HO-1 表达能逆转 Hemin 诱导组的抗病毒效应,同时 I 型干扰素 IFN- $\beta$  也呈现低表达,JAK/STAT 信号通路中的 IRF-9、MxA 的表达也被抑制。Hemin 联合 IFN- $\alpha$  发挥更强的抗病毒作用。结论 HO-1 能够发挥抗 HBV 效应,这种效应可能是增加 IRF-3 的磷酸化诱导 I 型干扰素表达来激活 JAK/

STAT 信号通路发挥抗病毒效应;HO-1 可以协同 IFN- $\alpha$  发挥抗病毒作用。

**关键词** 血红素;血红素加氧酶-1;JAK/STAT;IFN- $\beta$

**中图分类号** R 512. 6 + 2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0324-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.023

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是 DNA 病毒科中一种嗜肝的、带包膜的、部分双链的 DNA 病毒<sup>[1]</sup>。HBV 感染是一个重要的全球性健康问题,据世卫组织估计,全球有 2.57 亿人长期感染 HBV,每年约有 88.7 万人死于与 HBV 相关的并发症<sup>[2]</sup>。血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是血红素降解的关键酶,打开血红素的卟啉环,并释放等摩尔量的游离铁、绿胆素 (biliverdin, BV) 和一氧化碳 (carbon dioxide, CO)。HO-1 是一种重要的应激反应蛋白,它具有抗氧化、抗凋亡和抗炎的作用,在生理和病理条件下均对机体起保护作用,也被认为是一种细胞保护酶<sup>[3]</sup>;在过去的 10 年中,HO-1 已被成功探索出对多种病毒的抗病毒作用,并且对包膜病毒有选择性,能引起病毒包膜的破坏和解离;如 HIV、HCV、HBV、流感、登革热、埃博拉、呼吸道合胞病毒、人类单纯疱疹病毒等<sup>[4]</sup>;被认为是包膜病毒的通用杀病毒剂。在 HBV 感染中,Protzer et al<sup>[5]</sup> 证明了 HO-1 可以通过降低 HBV 核心蛋白的稳定性,直接抑制 HBV 在肝细胞中的复制,从而抑制 HBV

2023-09-20 接收

基金项目:安徽省转化医学研究院科研基金项目(编号:2021zhyc-C47);安徽省高校自然科学研究重点项目(编号:2023AH053169)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院<sup>1</sup> 检验科、<sup>2</sup> 儿科,合肥 230601

作者简介:笪蔚,女,硕士研究生;

周强,男,主任技师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

zhouqiang1973@163.com

tion, mTOR signal inhibition, autophagy regulation pathway activation and autophagy formation. Compared with shNC group, the expression of phosphorylated AMPK and LC3 protein decreased significantly in shNOD2 group ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of phosphorylated mTOR and p62 protein increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with Vec group, the expression levels of LC3 and AMPK protein in NOD2 group increased significantly ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of phosphorylated mTOR and p62 protein decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with shNC group, the point accumulation of GFP-mRFP-LC3 in shNOD2 group decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with Vec group, the point accumulation of GFP-mRFP-LC3 increased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** NOD2 may promote the proliferation, migration and invasion of CC through AMPK/mTOR signal, and its mechanism partly involves autophagy activation.

**Key words** nucleotide binding oligomerization domain receptor 2; AMP activated protein kinase; rapamycin target protein; cervical cancer cells; autophagy

核心共价闭合环状 DNA (HBV cccDNA) 的产生,可见 HO-1 的诱导可能是治疗乙型肝炎相关炎症的新选择,需要进一步研究其抗病毒机制,该研究旨在探究 HO-1 能否联合现有的抗 HBV 药物 IFN- $\alpha$  来发挥更强的抗病毒作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验试剂** HepG2、HepG2. 2. 15 购自上海富源生物公司;HBV 1. 3 由安徽医科大学第二附属医院检验科留存;si-HO-1 质粒、TRIzol、引物序列购自上海生工生物公司;DMEM、PBS 购自上海培源生物科技有限公司;胎牛血清购自南京维森特生物技术有限公司;0. 25% 胰酶消化液、CCK-8 试剂、双抗、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自上海碧云天生物有限公司;磷酸酶抑制剂购自上海陶术生物科技;HO-1 抗体、Mx $\alpha$  抗体购自英国 Abcam 公司;p-IRF-3、IRF-3 抗体、抗 IRF-9、抗 GAPDH、山羊抗兔 (H + L) HRP 和山羊抗鼠 (H + L) HRP 购自美国 Affinity 公司;Lipofectamine3000 转染试剂购自美国 ThermoFisher 公司;ECL 底物发光试剂盒购自中国武汉 Abbkine 公司;RNA 反转录试剂盒、荧光染料 SYBR 购自上海 ToloScript 公司。

**1.2 实验药物** Hemin (批次号: 52180; 纯度 > 96%) 购自美国 sigma 公司, Hemin 用氢氧化钠标准溶液充分溶解配成 10 mmol/L 的母液, -20℃ 保存; 在实验前用配制好的细胞培养基稀释母液至所需使用的浓度。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 细胞培养与转染** HepG2、HepG2. 2. 15 细胞培养: 向 DMEM 培养基中加入 10% FBS 和 1% 的双抗配制成新鲜培养基, 对于 HepG2. 2. 15 细胞每 100 ml 培养基中加入 320 ng 遗传霉素 G418, 然后在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 培养箱里培养, 待细胞生长至 90% 时, 用胰酶消化 2 min, 1: 2 传代培养。等细胞长到对数期进行均匀铺板, 等细胞融合至 60% ~ 70%, 用新鲜培养基换液后对细胞进行药物处理 48 h 后进行 qRT-PCR、Western blot 检测, 或进行 siRNA 转染 24 h, 用药物处理 48 h 后再进行 qRT-PCR、Western blot 检测。

**1.3.2 CCK-8 实验** 将细胞株进行传代, 离心后用配制的细胞培养基重悬, 进行细胞计数, 以  $5 \times 10^3$  个/孔的密度铺进 96 孔板中。待细胞贴壁后, 加入不同浓度的 Hemin (0、5、10、20、50、75、100  $\mu$ mol/L) 置于 37℃ 培养箱培养孵育 6 d, 每 3 d 换液 1 次。

到待测时间后, 以 1: 10 的比例将 CCK-8 试剂和提前配制的培养基混合, 吸尽培养基, 加入配好的溶液, 1 h 后酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值。

**1.3.3 HBV 相关指标定量检测** 收集 HepG2-HBV1. 3 经过药物处理 48 h 及转染小干扰 RNA (siRNA) 24 h 后再经过药物处理后的细胞上清液; 收集 HepG2. 2. 15 细胞经过不同药物处理 2、4、6 d 后的细胞上清液, 用美国雅培全自动化学发光分析仪 i4000SR 检测上清液中的乙肝表面抗原 (HBsAg)、乙肝 e 抗原 (HBeAg)。

**1.3.4 实时定量 PCR 分析** 通过使用两步逆转录聚合酶链式反应定量分析来测量基因表达。通过 TRIzol 提取总 RNA, 在 260 nm 处评估提取的 RNA 的浓度; 然后逆转录为 cDNA, GAPDH 被用作定量的内参, 引物设计序列见表 1。然后进行 RT-qPCR 测定, 反应条件: 95℃ 预变性 30 s, 40 个循环包括 95℃、10 s, 60℃、30 s, 测定 HO-1、IFN- $\beta$  的 mRNA 表达水平。

表 1 引物序列

| 引物名称         | 序列 (5'-3')                   |
|--------------|------------------------------|
| HO-1         | F: GGTGCTCGTACTGCTACTGTCATG  |
|              | R: AACCCCTTTCGATTGCGCCTTCTTC |
| IFN- $\beta$ | F: AGGACAGGATGAACCTTTGAC     |
|              | R: TGATAGACATTAGCCAGGAG      |
| GAPDH        | F: TGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG |
|              | R: GTGTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAG  |

**1.3.5 蛋白免疫印迹实验** 加入裂解缓冲液 (PI-PA: PMSF: 磷酸酶抑制剂 = 100: 1: 1) 以裂解细胞并获得全细胞蛋白质裂解物。4℃ 离心去沉淀后, 吸出细胞上清液。用 BCA 进行蛋白定量。随后以 1: 4 比例加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 在 100℃ 沸水的水浴锅中水浴 10 min 使蛋白质变性, 随后将蛋白质信息转至 PVDF 膜上, 转膜结束后, 进行切膜, 切分成所需的分子量条带, 再将条带都放入快速封闭液中封闭 1 h。封闭结束后多次洗膜。置条带于 HO-1 抗体 (兔源单抗 1: 2 000)、Mx $\alpha$  抗体 (兔源单抗 1: 1 000)、p-IRF-3 (兔源单抗 1: 1 000)、IRF-3 抗体 (兔源单抗 1: 1 000)、IRF-9 抗体 (兔源单抗 1: 1 000)、GAPDH (鼠源多抗 1: 5000) 一抗稀释液中, 摇床上 4℃ 慢摇过夜, 再用 TBST 缓冲液洗膜 5 次, 每次 5 min; 根据一抗来源不同, 分别放入山羊抗兔或鼠的二抗 (1: 5 000) 中室温下孵育 1 h, 然后再 TBST 缓冲液洗膜; 显影液 1: 1 配制, 滴于膜上, 置于化学发光成像仪内显影。

**1.4 统计学处理** 采用 Graphpad Prism 9.0 软件进行数据分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用单因素方差分析,Image J 软件对实验结果蛋白图进行量化分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Hemin 诱导 HO-1 的表达** 实验中选择了不同浓度 Hemin 作用于两种细胞系 2 d 诱导 HO-1,结果显示,HO-1 的表达水平以剂量依赖的方式增加(图 1)。为了测定 Hemin 药物的细胞毒作用,通过 CCK-8 法对 HepG2、HepG2.2.15 细胞进行细胞毒性检测。结果显示,浓度在 5 ~ 50  $\mu\text{mol/L}$  之间的 Hemin 持续作用细胞 6 d 后,对细胞不产生杀伤作用;而浓度在 75 ~ 100  $\mu\text{mol/L}$  之间的 Hemin 处理细胞会对细胞产生细胞毒作用(图 2)。

**2.2 HO-1 对 HBV 的体外抗病毒活性** 实验结果显示不同浓度 Hemin 处理 HepG2.2.15 细胞组的 HBV-DNA、HBeAg、HBsAg 与对照组相比表达降低

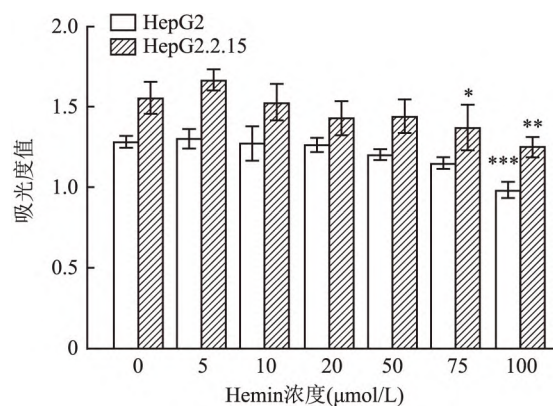


图2 不同浓度的 Hemin 对 HepG2、HepG2.2.15 的生长抑制程度与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

(图 3A),并与 Hemin 浓度成反比,当 50  $\mu\text{mol/L}$  Hemin 浓度作用细胞时,对 HBV-DNA、HBeAg 有明显的抑制作用,差异有统计学意义 ( $F = 24.19, P < 0.001$ ;  $F = 33.37, P < 0.001$ ),而对 HBsAg 的抑制没有 HBV-DNA、HBeAg 明显;对 HepG2-HBV1.3 细胞同样表现出 HBV-DNA、HBeAg 降低的抗病毒效应(图 3B),当 50  $\mu\text{mol/L}$  Hemin 浓度作用细胞时同样表现更明显的抗病毒效应 ( $F = 92.68, P < 0.001$ ;  $F = 53.61, P < 0.001$ )。

**2.3 HO-1 通过增强 I 型干扰素反应来发挥抗 HBV 作用** 不同浓度 Hemin 作用于 HepG2-HBV1.3、HepG2.2.15 细胞 2 d,图 4 显示 Hemin 以剂量依赖的方式增强了 IFN- $\beta$  的 mRNA 表达以及 HO-1、IRF-3、IRF-9 及下游抗病毒蛋白 MxA 的表达;在 50  $\mu\text{mol/L}$  Hemin 浓度作用下 IFN- $\beta$  的表达量明显增高,差异有统计学意义 (HepG2-HBV1.3:  $F = 122.68, P < 0.001$ ; HepG2.2.15:  $F = 289.3, P < 0.001$ ) (见图 4)。

**2.4 Si-HO-1 可以逆转 HO-1 发挥的抗病毒作用**

为了确定 HO-1 诱导的 I 型干扰素上调和抗病毒作用是否涉及 HO-1,设计 HO-1 siRNA (si-HO-1) 或 NC-siRNA (si-NC) 转染 HepG2-HBV1.3 细胞后,再用 Hemin 刺激诱导;不做处理的为空白对照组, Hemin 诱导的为阴性对照,结果表明,与 si-NC 和阴性对照组相比,si-HO-1 处理组的 HBsAg、HBeAg 的表达有所增高;HO-1、IFN- $\beta$  的 mRNA 表达降低,IRF-3、IRF-9 及下游的抗病毒蛋白 MxA 的分子表达均有所下降,说明 si-HO-1 处理组在一定程度上逆转了 Hemin 抗病毒作用(图 5)。

**2.5 HO-1 可以增强 IFN- $\alpha$  的抗病毒效应** IFN 是一种具有免疫调节和抗病毒作用的细胞因子,是临

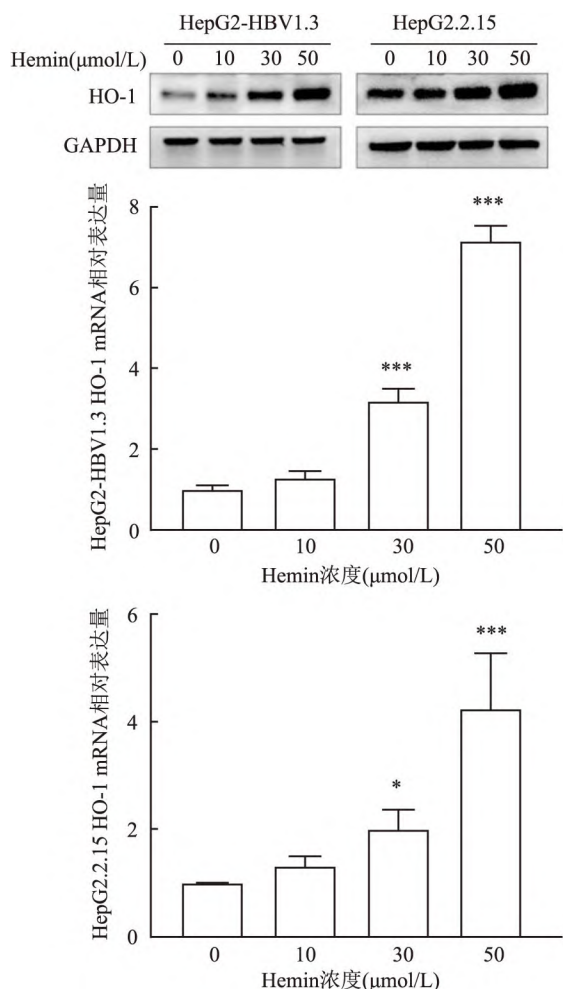
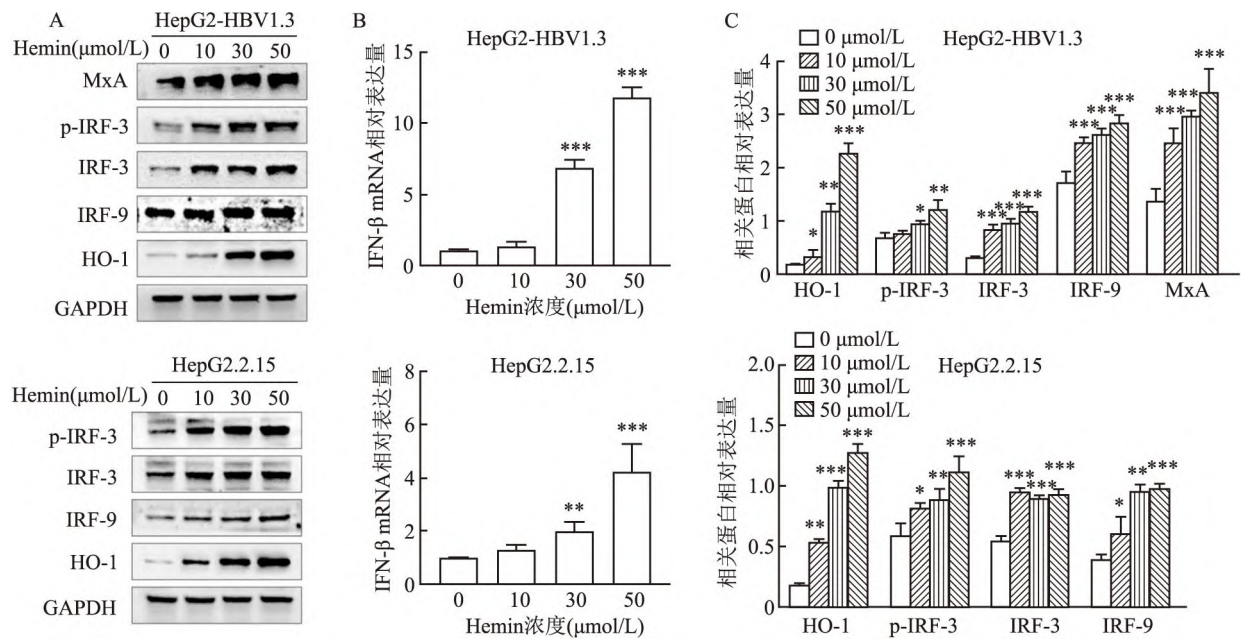
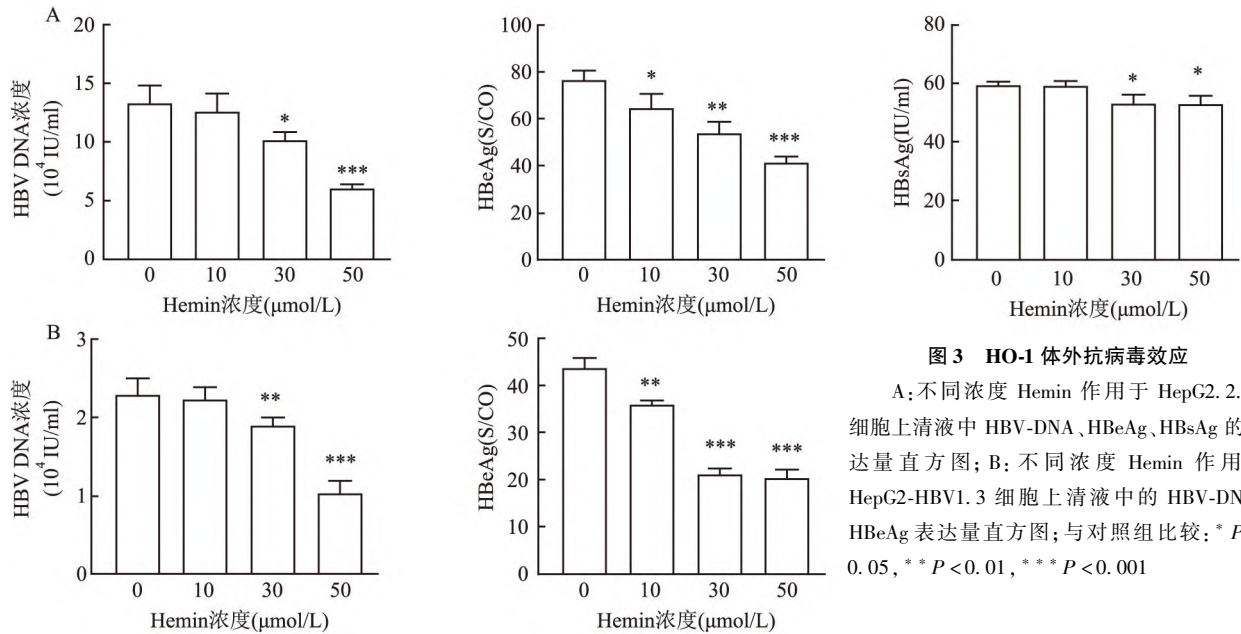


图1 不同浓度 Hemin 对 HO-1 的诱导与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$





床治疗慢性乙型肝炎的首选药物之一;可以通过诱导具有抗病毒特性的 ISG 来增强免疫功能。然而, IFN 治疗有一些局限性,如成本过高、停药后的反弹,大量患者在长期使用后出现耐药性等副作用。因此,为进一步证明了 HO-1 联合现有的 IFN- $\alpha$  发挥更强的抗病毒作用,设计 Control、Hemin、IFN- $\alpha$  和

Hemin + IFN- $\alpha$  组分别作用 2、4、6 d,实验结果显示联合用药组发挥更强的抗病毒作用,第 6 天时 HBsAg、HBeAg 较第 2、4 天更明显,HBV-DNA 也表现出相似的结果,可见联合作用抗病毒效应与时间有相关性(图 6)。

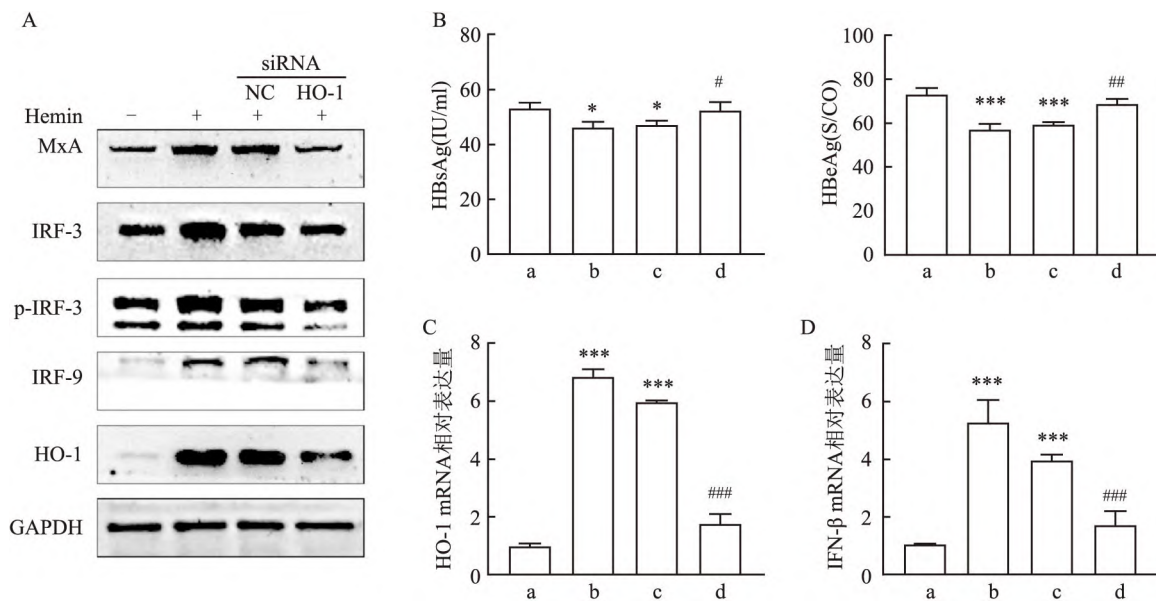
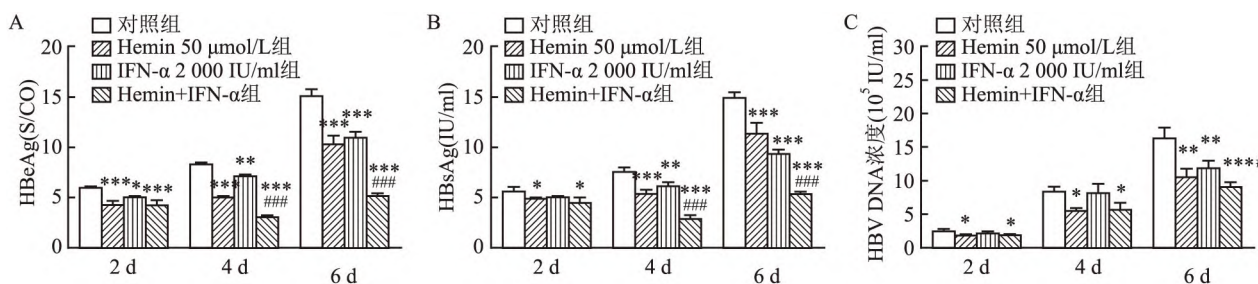


图5 HO-1 小干扰可以逆转 HO-1 抗病毒作用

A: 在 HepG2-HBV1.3 细胞中, 各处理组 HO-1 及相关分子蛋白图; B: 各处理组上清液 HBsAg、HBeAg 表达图; C: 各处理组的 HO-1 mRNA 的表达图; D: 各处理组 IFN- $\beta$  的 mRNA 表达图; a: 空白对照组; b: 阴性对照组; c: si-NC 组; d: si-HO-1 组; 与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与阴性对照组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$

图6 Hemin 与 IFN- $\alpha$  联合作用于 HepG2.2.15 细胞的抗病毒效应

A: 各处理组对 HepG2.2.15 细胞分别作用 2、4、6 d 的 HBsAg 表达; B: 各处理组对 HepG2.2.15 细胞分别作用 2、4、6 d 的 HBeAg 表达; C: 各处理组对 HepG2.2.15 细胞分别作用 2、4、6 d 的 HBV-DNA 表达; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 Hemin 组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$

### 3 讨论

乙型肝炎病毒是世界范围内最常见的慢性病毒病原体, 是已知最小的引起人类致病的 DNA 病毒之一, 约 3.2 kb, 可通过血液或人体分泌物进行传播。病毒通过独特的 HBV pgRNA 中间体进行复制, 最终在核内转化为共价闭合 DNA (cccDNA), 利用不同的启动子, 转录出 4 种 mRNA, 编码多种不同病毒蛋白 (HBsAg、HBeAg、HBcAg、RT 等) 并逆转录出 HBV DNA<sup>[6]</sup>。HBV 标志物是评估 HBV 感染、肝炎和其他疾病不可或缺的工具。HBV-DNA、HBsAg 和 HBeAg 是最常用的诊断 HBV 感染及预测治疗期间

病情复发和确定何时结束治疗的有效血清标志物<sup>[7]</sup>。

HBV 感染细胞后, 会激活机体先天免疫系统, 宿主细胞释放 IFNs, IFNs 介导的抗病毒作用及其重要。IFNs 是一种分泌型蛋白, 可以由细胞识别不同病原菌后产生。IFNs 与细胞表面的受体结合, 开始激活 JAK-STATs 通路; 磷酸化的信号转导转录激活因子 1/2 (signal transducer and activator of transcription1/2, STAT 1/2) 与干扰素调节因子-9 (interferon regulatory factor-9, IRF-9) 结合, 形成复合物干扰素刺激基因因子-3 (IFN-stimulated gene factor-3, ISGF-3); 进一步, ISGF-3 与核内干扰素刺激反应元件结

合,诱导一系列干扰素刺激基因的表达,如抗黏液病毒蛋白 A(MxA)、2',5'-寡腺苷酸合成酶(2',5'-Oligoadenylate synthetase,OAS)、双链 RNA 依赖的蛋白激酶(double-stranded RNA-dependent protein kinase,PKR);这些干扰素刺激基因通过多种机制在病毒复制的不同的阶段阻止病毒的复制<sup>[8]</sup>。IFN-JAK-STAT 轴是经典的抗 HBV 信号通路;在病毒感染之前或期间激活,增强先天免疫反应从而增强 IFN 的表达将有助于提高宿主对抗病毒的能力。因此诱导或恢复 I 型 IFN 产生和相应抗病毒反应的方法可能增强抑制宿主中的 HBV 复制。已知 HO-1 广谱抗病毒作用主要涉及 3 个方面:HO-1 及下游产物直接抑制病毒复制、增强宿主细胞 I 型 IFN 反应间接抑制病毒复制、抑制病毒感染引发的炎症损伤<sup>[9]</sup>;实验结果表明,HO-1 有效地抑制了 HBV DNA、HBeAg、HBsAg 的表达,HO-1 对 HBeAg 的抑制能力强于 HBsAg,这可能与 HO-1 及其产物可以直接抑制 HBV 的核心蛋白及 cccDNA 相关<sup>[5]</sup>。研究<sup>[10]</sup>显示通过激活 HO-1 介导的 I 型 IFN 反应在抑制病毒复制中发挥重要作用。实验结果也显示 Hemin 处理组的 IFN- $\beta$  也呈现高表达;不同浓度的 Hemin 不仅剂量依赖性诱导 HO-1 并且剂量依赖性诱导 JAK-STAT 通路中的 IRF-9、MxA;但对于 HepG2. 2. 15 细胞来说,MxA 在此细胞系中表达并不明显,这可能与外源性的病毒基因组的整合,导致细胞系的基因组重排和染色体变异有关,从而影响基因的表达相关<sup>[11]</sup>;而在瞬时转染 HBV-1. 3 的 HepG2 细胞中,MxA 可以被轻易诱导。除了已被证明的 HO-1 及其产物可以通过降低 HBV 核心蛋白稳定性从转录层面直接抑制病毒复制,猜测 HO-1 的另一部分抗病毒作用可能是通过激活 IFN-JAK-STAT 轴来诱导 ISG 来发挥的。Lazear et al<sup>[12]</sup> 研究认为 IRF-3 对响应病毒感染产生 I 型 IFN 和 IFN 刺激基因(ISG)至关重要。MA et al<sup>[13]</sup> 也证明了 IRF-3 上有 HO-1 的特异性受体,HO-1 可以与 IRF-3 特异性结合,并能促进其进入细胞核进行磷酸化诱导 I 型干扰素的产生来激活 JAK-STAT 通路。这表示 HO-1 可通过与 IRF3 的相互作用对 IFN- $\beta$  诱导来发挥抗病毒作用。

本实验中,si-HO-1 组能逆转 Hemin 处理组 HO-1 诱导的抗病毒效应及相关分子的表达;并且 si-HO-1 组 IFN- $\beta$  mRNA 表达也低于 Hemin 诱导组,推测 Hemin 发挥的抗 HBV 效应是通过 HO-1 来实现的;但是否也存在依赖 IRF-3 磷酸化及核转位诱导 I 型 IFN 有待进一步研究。

HO-1 不仅可以发挥一定的抗病毒作用,在细胞的抗炎、抗氧化、抗凋亡等细胞保护作用方面也被广泛研究。研究较多的是 Nrf2/HO-1 信号通路,揭示了 HO-1 在减轻氧化应激和组织保护中发挥作用<sup>[14]</sup>。HO-1 诱导的细胞损伤保护作用和多重抗病毒能力的结合,让 HO-1 成为一个潜在的临床抗 HBV 药物。再者 HO-1 相关的诱导剂(如血红素、环氧化酶抑制剂、他汀类药物或雷帕霉素等)已是被批准用于治疗人类疾病的药物<sup>[15]</sup>。实验结果表明联合 Hemin 与现有的抗 HBV 药物 IFN- $\alpha$  发挥出更好的抗 HBV 作用,值得注意的是,本身实验结果显示,在 HepG2. 2. 15 细胞系中,低浓度的 IFN- $\alpha$  在不同时间作用下并不能降低 HBsAg、HBeAg、HBV-DNA 的表达,后期实验使用高浓度的 IFN- $\alpha$  作用于 HepG2. 2. 15 细胞表现出了抗病毒性。低浓度的 IFN- $\alpha$  在体内能发挥抗病毒作用得益于人体强大的免疫调节功能,离开机体后,缺乏这种先天免疫,很难发挥抗病毒效应<sup>[16]</sup>,有研究<sup>[17]</sup>显示 HBV 的抗原或其核心蛋白等能够抑制重要的抗病毒蛋白 MxA 来拮抗 IFN- $\alpha$  的抗病毒作用。而 HO-1 与 IFN- $\alpha$  联合作用时,HO-1 能够降低核心蛋白的稳定性的表达,可能在一定程度上恢复了 IFN- $\alpha$  的抗病毒活性,联合作用时发挥了更强的抗病毒作用。

综上所述,本研究阐明了 Hemin 诱导的 HO-1 表达与 HBV 复制之间的相关性。HO-1 的上调以剂量依赖的方式抑制 HBV-DNA 复制及 HBsAg、HBeAg 的分泌,可能是通过促进 IRF-3 的磷酸化来增加 I 型干扰素的表达从而激活 JAK-STAT 通路来发挥抗病毒效应;并且联合现有的抗病毒药物 IFN- $\alpha$  能发挥更强的抗病毒作用,HO-1 具有显著的治疗潜力,可能有助于肝炎患者的治疗,但需要进一步研究。

## 参考文献

- [1] Woo H G, Kim S S, Cho H, et al. Profiling of exome mutations associated with progression of HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115152.
- [2] Xu B, Tang B, Wei J. Role of STAT1 in the resistance of HBV to IFN- $\alpha$ [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(6): 550.
- [3] Silva R, Vasconcelos L R, Travassos L H. The different facets of heme-oxygenase 1 in innate and adaptive immunity[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2022, 80(4): 609-31.
- [4] Singh D, Wasan H, Reeta K H. Hypothesis paper heme oxygenase-1 modulation: a potential therapeutic target for COVID-19 and associated complications[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 161: 263-71.



- [5] Protzer U, Seyfried S, Quasdorff M, et al. Antiviral activity and hepatoprotection by heme oxygenase-1 in hepatitis B virus infection [J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(4): 1156–65.
- [6] Jia J, Zhang Y, Zhang H, et al. Hepcidin expression levels involve efficacy of pegylated interferon- $\alpha$  treatment in hepatitis B-infected liver[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 107: 108641.
- [7] Howell J, Seaman C, Wallace J, et al. Pathway to global elimination of hepatitis B: HBV cure is just the first step[J]. *Hepatology*, 2023, 78(3): 976–90.
- [8] 樊星语, 胡冰琪, 黄俊峰, 等. HBV 通过下调 PTEN 的表达拮抗 IFN- $\alpha$  抗病毒活性[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(6): 953–7.
- [9] Sass G, Barikbin R, Tiegs G. The multiple functions of heme oxygenase-1 in the liver[J]. *Z Gastroenterol*, 2012, 50(1): 34–40.
- [10] Ma L L, Zhang P, Wang H Q, et al. heme oxygenase-1 agonist CoPP suppresses influenza virus replication through IRF3-mediated generation of IFN- $\alpha/\beta$ [J]. *Virology*, 2019, 528: 80–8.
- [11] Guan S H, Lu M, Grünewald P, et al. Interferon-alpha response in chronic hepatitis B-transfected HepG2. 2. 15 cells is partially restored by lamivudine treatment[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(2): 228–35.
- [12] Lazear H M, Lancaster A, Wilkins C, et al. IRF-3, IRF-5, and IRF-7 coordinately regulate the type I IFN response in myeloid dendritic cells downstream of MAVS signaling[J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(1): e1003118.
- [13] Ma L L, Wang H Q, Wu P, et al. Rupestonic acid derivative YZH-106 suppresses influenza virus replication by activation of heme oxygenase-1-mediated interferon response[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 96: 347–61.
- [14] Wang W, Wang S K, Wang Q, et al. Diclofenac and eugenol hybrid with enhanced anti-inflammatory activity through activating HO-1 and inhibiting NF- $\kappa$ B pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 259: 115669.
- [15] Schmidt W N, Mathahs M M, Zhu Z. Heme and HO-1 inhibition of HCV, HBV, and HIV[J]. *Front Pharmacol*, 2012, 3: 129.
- [16] Hu Q, Wang Q, Zhang Y, et al. Baseline serum exosome-derived miRNAs predict HBeAg seroconversion in chronic hepatitis B patients treated with peginterferon[J]. *J Med Virol*, 2021, 93(8): 4939–48.
- [17] 管世鹤, 杨 凯, 王 琴, 等. 低密度 cDNA Macroarray 对干扰素  $\alpha$  抗病毒蛋白的筛选[J]. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19(10): 774–8.

## Heme oxygenase-1 enhances the anti-HBV effect of IFN- $\alpha$ by inducing the expression of antiviral proteins

Da Wei<sup>1</sup>, Wang Qin<sup>1</sup>, Wei Anbang<sup>2</sup>, Zhang Hao<sup>1</sup>, Wang Renbing<sup>1</sup>, Liu Qian<sup>1</sup>, Zhou Qiang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Laboratory Medicine, <sup>2</sup>Dept of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To investigate the role of heme oxygenase-1 (HO-1) on HBV replication and the antiviral effect of HO-1 combined with  $\alpha$ -interferon (IFN- $\alpha$ ). **Methods** HepG2. 2. 15 cells and HBV1. 3-transfected HepG2 cells (HepG2-HBV1. 3) were used as HBV replicating cell models; Hemin treated HepG2. 2. 15 and HepG2-HBV1. 3 cells, to induce the expression of HO-1 molecules. CCK-8 method was used to assess the toxic effects of Hemin on HepG2 and HepG2. 2. 15; chemiluminescence method was used to analyze HBsAg and HBeAg in the supernatants of Hemin-treated group and si-HO-1 and other experimental groups; RT-qPCR was used to analyze HO-1, IFN- $\beta$  and HBV-DNA; Western blot was used to analyze the expression of IRF-3 and the expression of related molecules in the JAK/STAT signaling pathway; Hemin combined with IFN- $\alpha$  treated HepG2. 2. 15 to monitor whether HO-1 had synergistic IFN- $\alpha$  antiviral effect. **Results** Hemin dose-dependently induced HO-1, and HO-1 was induced to exert a significant anti-HBV effect, while the expression of IFN- $\beta$ , IRF-3, and IRF-9 and MxA, downstream molecules of the JAK/STAT signaling pathway, were all increased. Silencing HO-1 expression reversed the antiviral effect in the Hemin-induced group, and at the same time, type I interferon IFN- $\beta$  showed low expression, and the expression of IRF-9 and MxA in the JAK/STAT signaling pathway was inhibited as well. Hemin combined with IFN- $\alpha$  exerted stronger antiviral effects. **Conclusion** HO-1 can exert an anti-HBV effect, which may be due to increased phosphorylation of IRF-3 to induce type I interferon expression and thus activate the JAK/STAT signaling pathway to exert an antiviral effect; HO-1 can synergize with IFN- $\alpha$  to exert an antiviral effect.

**Key words** hemin; heme oxygenase-1; JAK/STAT; IFN- $\beta$